



(10) 授权公告号 CN 108884460 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 28

(21) 申请号 201780018352.1

(22) 申请日 2017.03.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108884460 A

(43) 申请公布日 2018.11.23

(30) 优先权数据
62/390,093 2016.03.19 US
62/360,041 2016.07.08 US
62/467,039 2017.03.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/023112 2017.03.19

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/165245 EN 2017.09.28

(73) 专利权人 埃克苏马生物技术公司
地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 格雷戈里·伊恩·弗罗斯特
詹姆斯·约瑟夫·奥努弗
吉亚贝·H·古比加
阿尼邦·昆都

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258
专利代理师 肖善强

(51) Int.Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C12N 5/0783 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2014186469 A2, 2014.11.20
Cecilia Frecha等.Stable transduction
of quiescent t cells without induction of
cycle progression by a novel lentiviral
vector pseudotyped with measles virus
glycoproteins.《Blood》.2008,第112卷(第13
期),文献号:4843. (续)

审查员 王娟

权利要求书3页 说明书106页
序列表114页 附图15页

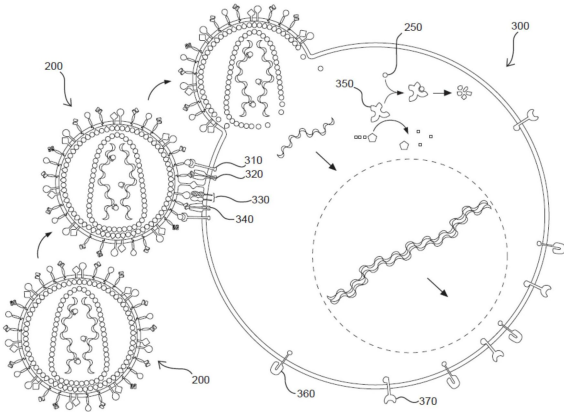
(54) 发明名称

淋巴细胞转导及其扩增调节的方法与组合
物

(57) 摘要

本发明提供了淋巴细胞的基因修饰方法和
执行过继细胞治疗的方法,所述过继细胞治疗包
括转导T细胞和/或NK细胞,而无需事先体外刺
激。该方法通常包括工程化信号多肽,所述工程
化信号多肽可包括淋巴增殖组件和/或嵌合抗原
受体(CAR),例如微环境限制的CAR。本发明提供
了所述工程化信号多肽的附加组件以及载体,如
逆转录病毒载体、包装细胞系及生成包装细胞系
的方法。此外,还提供了重组逆转录病毒和生成
重组逆转录病毒的方法。并提供了各种对照物,

包括在体内由核苷类似物控制的核糖开关等。



[接上页]

(56) 对比文件

Hans J. Kueng等.General Strategy for
Decoration of Enveloped Viruses with

Functionally Active Lipid-Modified
Cytokines.《Journal of Virology》.2007,第81
卷(第16期),第8666-8676页.

1. 一种用于对T细胞进行基因修饰的方法,所述方法包括:将包含T细胞的外周血单核细胞(PBMC)在离体的情况下与复制缺陷型重组逆转录病毒接触以形成转导反应混合物,

其中所述复制缺陷型重组逆转录病毒包含:

a) 位于其表面的假型化组件,所述假型化组件能够结合T细胞并促进所述复制缺陷型重组逆转录病毒与其的膜融合;

b) 多核苷酸,所述多核苷酸包括可操作地与T细胞中的活性启动子连接的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对第一工程化信号多肽进行编码,所述第一工程化信号多肽包括抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域;和

c) 位于所述复制缺陷型重组逆转录病毒的表面的活化组件,其中所述活化组件与异源膜连接序列融合,并且包含能够刺激TCR/CD3复合物的多肽,

其中在将T细胞从转导反应混合物中洗出之前将所述T细胞在离体的情况下与复制缺陷型重组逆转录病毒接触15分钟至12小时,以及

其中所述方法在不需要预先体外刺激的情况下进行,

其中所述接触促进所述T细胞与所述复制缺陷型重组逆转录病毒的膜融合,从而生成基因修饰的T细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中在将T细胞从转导反应混合物中洗出之前将所述T细胞在离体的情况下与复制缺陷型重组逆转录病毒接触15分钟至8小时。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述第一工程化信号多肽是嵌合抗原受体,并且其中所述胞内激活域是CD3 ζ 。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述能够刺激TCR/CD3复合物的多肽是抗CD3抗体。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述假型化组件包括水泡性口膜炎病毒包膜蛋白、麻疹病毒F多肽或麻疹病毒H多肽或其功能片段,以及所述复制缺陷型重组逆转录病毒还包括能够与CD28结合的膜结合多肽。

6. 根据权利要求2所述的方法,其中所述假型化组件包括水泡性口膜炎病毒包膜蛋白或其功能片段。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一个或多个转录单元编码第二工程化信号多肽,所述第二工程化信号多肽包含淋巴增殖组件,其中所述淋巴增殖组件包含细胞因子受体多肽,所述细胞因子受体多肽包含能够激活Jak途径的信号结构域,并且其中所述淋巴增殖组件不包含结合细胞因子的细胞因子受体。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一个或多个转录单元编码第二工程化信号多肽,所述第二工程化信号多肽包含淋巴增殖组件,其中所述淋巴增殖组件包括组成型活化的细胞因子受体多肽或其片段,以及其中所述组成型活化的细胞因子受体多肽或其片段的表达被调控。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一个或多个转录单元编码第二工程化信号多肽,所述第二工程化信号多肽包含淋巴增殖组件,其中所述淋巴增殖组件包括IL-7受体的胞内信号域、IL-12受体的胞内信号域、IL-15受体的胞内信号域、IL-21受体的胞内信号域,或转化生长因子 β 诱饵受体的胞内信号域。

10. 根据权利要求7所述的方法,其中所述第一工程化信号多肽和第二工程化信号多肽从自病毒LTR或其功能片段表达的病毒基因组的反向链上的单一转录物表达。

11. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述接触进行15分钟至8小时。
12. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述T细胞是休眠T细胞。
13. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述假型化组件包括能够刺激TCR/CD3复合物的多肽。
14. 一种复制缺陷型重组逆转录病毒, 所述复制缺陷型重组逆转录病毒包含:
 - a) 位于其表面的假型化组件, 所述假型化组件能够结合T细胞并促进所述复制缺陷型重组逆转录病毒与其的膜融合;
 - b) 多核苷酸, 所述多核苷酸包括可操作地与T细胞中的活性启动子连接的一个或多个转录单元, 其中所述一个或多个转录单元对第一工程化信号多肽和第二工程化信号多肽进行编码, 所述第一工程化信号多肽包括抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域; 所述第二工程化信号多肽包含促进T细胞在不存在IL-2的培养中增殖和/或存活至少7天的淋巴增殖组件; 和
 - c) 位于所述复制缺陷型重组逆转录病毒的表面的活化组件, 其中所述活化组件与异源膜连接序列融合, 并且包含能够刺激TCR/CD3复合物的多肽。
15. 根据权利要求14所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述淋巴增殖组件包含细胞因子受体多肽或其片段, 所述细胞因子受体多肽或其片段包含能够激活Jak途径的信号结构域。
16. 根据权利要求14所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述淋巴增殖组件包含细胞因子受体多肽或其片段, 所述细胞因子受体多肽或其片段包含能够激活Jak途径的信号结构域, 并且其中所述淋巴增殖组件不包含结合细胞因子的细胞因子受体。
17. 根据权利要求14所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述淋巴增殖组件包括组成型活化的细胞因子受体多肽或其片段, 以及其中所述组成型活化的细胞因子受体多肽或其片段的表达被调控。
18. 根据权利要求14所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述淋巴增殖组件包括IL-7受体的胞内信号域、IL-12受体的胞内信号域、IL-15受体的胞内信号域、IL-21受体的胞内信号域, 或转化生长因子 β 诱饵受体的胞内信号域。
19. 根据权利要求14所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述第一工程化信号多肽是嵌合抗原受体, 并且其中所述胞内激活域是CD3 ζ 。
20. 根据权利要求14所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述能够刺激TCR/CD3复合物的多肽是抗CD3抗体。
21. 根据权利要求20所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述抗CD3抗体是GPI锚定的抗CD3抗体。
22. 根据权利要求14所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述假型化组件包括猫内源性病毒包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒双嗜性包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒亲嗜性包膜蛋白、水泡性口膜炎病毒包膜蛋白、麻疹病毒F多肽或麻疹病毒H多肽或其功能片段。
23. 根据权利要求22所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述假型化组件包括水泡性口膜炎病毒包膜蛋白或其功能片段。
24. 根据权利要求20所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述复制缺陷型重组逆转录病毒还包括能够与CD28结合的膜结合多肽。

25. 根据权利要求14所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述第一工程化信号多肽和第二工程化信号多肽从自病毒LTR或其功能片段表达的病毒基因组的反向链上的单一转录物表达。

26. 根据权利要求14所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述复制缺陷型重组逆转录病毒还包括能够与CD28结合的膜结合多肽。

27. 根据权利要求14所述的复制缺陷型重组逆转录病毒, 其中所述淋巴增殖组件是组成性活性的, 并且其中所述组成性活性淋巴增殖组件为IL-7R α 突变体的功能性片段, 所述IL-7R α 突变体的功能性片段包括在243位具有插入氨基酸PPCL的SEQ ID NO:229的229至292位氨基酸。

淋巴细胞转导及其扩增调节的方法与组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年3月19日提交的第62/390,093号美国临时专利申请、2016年7月8日提交的第62/360,041号美国临时专利申请和2017年3月3日提交的第62/467,039号美国临时专利申请的权益。这些申请的全部内容均以引用方式并入本申请。

[0003] 序列表

[0004] 本申请通过引用并入了与本申请同时提交的电子序列表的资料。电子序列表中的资料以2017年3月16日创建的名为“F1_001_Sequence_listing.txt”的文本(.txt)文件的形式提交;文件大小为230KB,文件的全部内容以引用方式并入本申请。

技术领域

[0005] 本公开涉及免疫学领域,更具体地涉及T淋巴细胞或其他免疫细胞的基因修饰,以及生成逆转录病毒和控制基因表达的方法。

背景技术

[0006] 从个体(例如患者)分离出的淋巴细胞可以在试管内被激活,并通过基因修饰来表达合成蛋白,这种合成蛋白能够在结合遗传程序的基础上重新定向结合其他细胞和环境条件。这种合成蛋白的一个示例为嵌合抗原受体(CAR)。目前使用的一种CAR是胞外识别域(例如,抗原结合域)、跨膜域和由无复制能力的逆转录病毒进行编码的一种或多种胞内信号域的融合。

[0007] 虽然逆转录病毒具有感染非分裂细胞的效果,但是休眠CD4和CD8淋巴细胞很难控制这些载体的基因转导。为了克服这个困难,在用CAR基因载体进行基因修饰之前,通常用刺激性试剂在试管内激活这些细胞。在刺激和转导之后,基因修饰细胞在试管内扩增,随后重新导入清除淋巴细胞的患者体内。在体内抗原参与后,CAR的胞内信号部分可以启动免疫细胞中的相关激活反应,并释放细胞溶解分子,引起肿瘤细胞死亡。

[0008] 这种方法需要大量修改和生产体外增殖的T细胞,才能再次输注到患者体内,同时还需要通过淋巴清除化疗来释放细胞因子和耗尽竞争性受体,从而促进T细胞移植。一旦被引入体内,这种CAR疗法不但无法控制体内的增殖率,而且不能安全地导向肿瘤外表达的靶标。所以,目前的CAR疗法通常需要使用 1×10^5 至 1×10^8 细胞/kg的剂量,在12至28天内利用体外扩增的细胞进行输注;这种疗法作用于靶标,例如肿瘤靶;对于要去除的肿瘤,肿瘤靶的毒性通常是可接受的。由于体外扩增时间相对较长,除了可扩展性挑战外,还产生了细胞活力、不育性及样品身份等问题。因此,人们迫切需要更安全、更有效的可扩展T细胞或NK细胞治疗。

发明内容

[0009] 一方面,本申请提供了一种对个体的淋巴细胞进行基因修饰和扩增的方法,包括:

[0010] A.在无需事先体外刺激的情况下,使所述个体的休眠T细胞和/或NK细胞与重组逆

转录病毒进行体外接触,包括:

[0011] i. 位于其表面的假型化组件,能够结合T细胞和/或NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合;和

[0012] ii. 多核苷酸,包括可操作地与T细胞和/或NK细胞中的活性启动子连接的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对由体内控制组件调节的第一工程化信号多肽进行编码,其中所述第一工程化信号多肽包含淋巴增殖组件,

[0013] 其中所述接触促进所述重组逆转录病毒转导至少一部分休眠T细胞和/或NK细胞,从而生成基因修饰的T细胞和/或NK细胞;

[0014] B. 将基因修饰的T细胞和/或NK细胞引入所述个体;和

[0015] C. 使基因修饰的T细胞和/或NK细胞与一种化合物进行体内接触,所述化合物与体内控制组件结合,影响所述第一工程化信号多肽的表达并促进所述淋巴细胞在体内扩增,从而实现所述个体淋巴细胞的基因修饰和扩增。在各说明性实施例中,转导在没有体外刺激的情况下进行。

[0016] 在用于本申请中基因修饰和扩增淋巴细胞或进行细胞治疗的任何方面和方法中,如果未进行广义上的说明,在某些实施例中,多核苷酸进一步包括对第二工程化信号多肽进行编码的转录单元,所述第二工程化信号多肽包括第一嵌合抗原受体,所述第一嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区(ASTR)、跨膜域和胞内激活域。

[0017] 另一方面,本申请提供了一种对个体进行过继细胞治疗的方法,包括:

[0018] A. 对所述个体采血;

[0019] B. 使所述个体血液中的休眠T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒进行体外接触,其中所述重组逆转录病毒包括

[0020] i. 位于其表面的假型化组件,能够结合T细胞和/或NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合;和

[0021] ii. 多核苷酸,包括可操作地与T细胞和/或NK细胞中的活性启动子连接的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对第一工程化信号多肽和包括嵌合抗原受体的第二工程化信号多肽进行编码;所述第一工程化信号多肽包括由体内控制组件调节其表达的淋巴增殖组件,所述嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区(ASTR)、跨膜域和胞内激活域;

[0022] 其中所述接触导致至少部分休眠T细胞和/或NK细胞发生基因修饰;和

[0023] C. 将基因修饰的T细胞和/或NK细胞重新引入所述个体,其中所述基因修饰的T细胞和/或NK细胞在所述个体体内发生扩增、植入和/或具有持久性,并且其中所述方法在采血后、重新引入基因修饰的T细胞和/或NK细胞前的24小时内进行,从而对所述个体进行过继细胞治疗。

[0024] 另一方面,本申请提供了一种对个体进行过继细胞治疗的方法,包括:

[0025] A. 对所述个体采血;

[0026] B. 分离包括休眠T细胞和/或休眠NK细胞的外周血单核细胞(PBMC);

[0027] C. 使所述个体的休眠T细胞和/或休眠NK细胞与重组逆转录病毒进行体外接触,其中所述重组逆转录病毒包括位于其表面的假型化组件,能够结合休眠T细胞和/或休眠NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合;其中所述接触促进所述重组逆转录病毒转导所述

休眠T细胞和/或NK细胞,从而生成基因修饰的T细胞和/或NK细胞;以及

[0028] D. 在从个体采血起的24小时内,将所述基因修饰的细胞重新引入个体,从而对个体中进行过继细胞治疗。

[0029] 另一方面,本申请提供了一种转导个体休眠淋巴细胞的方法,包括使个体的休眠T细胞和/或休眠NK细胞与重组逆转录病毒进行体外接触,其中所述重组逆转录病毒包括位于其表面的假型化组件,能够结合休眠T细胞和/或休眠NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合,其中所述接触有助于所述重组逆转录病毒转导休眠T细胞和/或NK细胞,从而生成基因修饰的T细胞和/或NK细胞。在该方面的各说明性实施例中,至少10%、20%或25%的休眠T细胞和/或NK细胞,或10%至70%或20%至50%的T细胞和/或NK细胞由于该方法而被转导。

[0030] 另一方面,本申请提供了一种从分离血液中转导休眠T细胞和/或休眠NK细胞的方法,包括:

[0031] A. 对个体采血;

[0032] B. 分离包括休眠T细胞和/或休眠NK细胞的外周血单核细胞(PBMC);

[0033] C. 使个体的休眠T细胞和/或休眠NK细胞与重组逆转录病毒进行体外接触,其中所述重组逆转录病毒包括位于其表面的假型化组件,能够结合休眠T细胞和/或休眠NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合,其中所述接触有助于所述重组逆转录病毒转导至少5%的休眠T细胞和/或休眠NK细胞,从而生成基因修饰的T细胞和/或NK细胞,从而转导休眠T细胞和/或NK细胞。

[0034] 一方面,本申请提供了一种重组逆转录病毒,包括:

[0035] A. 一种或多种假型化组件,能够结合T细胞和/或NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合;

[0036] B. 多核苷酸,包括可操作地与T细胞和/或NK细胞中的活性启动子连接的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对包括淋巴增殖组件的第一工程化信号多肽进行编码,和对包括嵌合抗原受体的第二工程化信号多肽进行编码;所述嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域;其中所述第一工程化信号多肽和/或第二工程化信号多肽的表达通过体内控制组件调节;以及

[0037] C. 位于其表面的活化组件,其中所述活化组件能够结合T细胞和/或NK细胞,并且不被所述重组逆转录病毒中的多核苷酸进行编码。

[0038] 另一方面,本申请提供了一种重组逆转录病毒,包括:

[0039] A. 位于其表面的假型化组件,能够结合T细胞和/或NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合;其中所述假型化组件是麻疹病毒F多肽和/或麻疹病毒H多肽的胞质域缺失变体;

[0040] B. 多核苷酸,包括可操作地与T细胞和/或NK细胞中的活性启动子连接的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对包括嵌合抗原受体的第一工程化信号多肽和包括组成性活化IL-7受体突变体的第二工程化信号多肽进行编码,所述嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域;其中通过结合核苷类似物抗病毒药物的核糖开关调节所述IL-7受体突变体的表达;和

[0041] C. 一种能够结合CD3的多肽和一种能够结合CD28的多肽,其中所述多肽在重组逆

转录病毒的表面进行表达、能够结合T细胞和/或NK细胞,并且不由所述重组逆转录病毒中的多核苷酸进行编码;和在本申请的各说明性实施例中,核苷类似物抗病毒药物与核糖开关的结合增强了IL-7受体突变体的表达。

[0042] 在本申请提供的任何一种方法或组合中,如果未进行广义上的说明,重组逆转录病毒或逆转录病毒包括或进一步包括位于其表面的活化组件,能够激活休眠T细胞和/或休眠NK细胞。

[0043] 在提及T细胞和/或NK细胞、休眠T细胞或休眠NK细胞的本申请的任何一种方法或组合中,某些说明性实施例所说的细胞为T细胞。

[0044] 通常,本申请提供的任何一种方法和组合物中的重组逆转录病毒都存在复制缺陷。也就是说,病毒不能复制。在各说明性实施例中,逆转录病毒是慢病毒,例如复制缺陷型HIV慢病毒。

[0045] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行过继细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,10%-75%、或10%-70%、或10%-60%、或10%-50%、或10%-25%、或20%-75%、或20%-50%、或至少10%、20%或25%的休眠T细胞被转导,0%-75%的NK细胞被转导。在其他实施例中,5%-80%,或10%-80%,或10%-70%,或10%-60%,或10%-50%,或10%-25%,或10%-20%,或20%-50%的休眠NK细胞被转导。

[0046] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行过继细胞治疗的任何方法方面的各说明性实施例中,或在本申请提供的类似方法或任何组合物的说明性实施例中,如果未进行广义上的明确说明,所述第二工程化信号多肽的表达由体内控制组件调节。

[0047] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,接触时间可以是15、30或45分钟或1、2、3、4、5、6、7或8小时(按下限),或6、8、10、12、18、24、36、48和72小时(按上限)。例如,在各说明性实施例中,接触进行2至24小时,或4至12小时,或4至8小时。

[0048] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行过继细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,该方法可进一步包括使基因修饰的T细胞和/或NK细胞与化合物体内接触,所述化合物结合体内控制组件,以影响第一工程化信号多肽或第二工程化信号多肽的表达,并促进淋巴细胞在体内的扩增、移植和/或持续存在。

[0049] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行过继细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,基因修饰的T细胞和/或NK细胞在被引入或重新引入个体体内之前进行了8、7、6、5、4、3次或更少的体外细胞分裂。

[0050] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,基因修饰的T细胞和/或NK细胞在体内的扩增、移植和/或持续存在取决于结合体内控制组件的化合物的是否参与,并且在说明性实施例中,取决于结合体内控制组件的化合物的参与情况。

[0051] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行过继细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,个体在进行接触后的7、14或21天内、在接触期间和/或在修饰的T细胞和/或NK细胞被引入个体体内

的7、14或21天内均未接触淋巴细胞清除剂。在其他实施例中,个体在接触过程中也未接触淋巴细胞清除剂。

[0052] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,休眠T细胞和/或休眠NK细胞与重组逆转录病毒接触15分钟至12小时。

[0053] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行过继细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,该方法还包括在接触之后但在引入之前将重组逆转录病毒与T细胞和/或NK细胞分离的步骤。在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,所述接触步骤包括在接触之前或期间,和/或在基因修饰的T细胞和/或NK细胞已经被引入个体体内之后,对个体施用一定剂量的化合物。

[0054] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行过继细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,该方法包括,在使T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒进行体外接触前,对个体采血,血液中包括T细胞和/或NK细胞;其中所述引入是指重新引入。例如,从个体身上采集20-250ml血液。

[0055] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,在个体采血后、将修饰T细胞和/或NK细胞重新引入所述个体前,应最多间隔8、12、24或48小时。

[0056] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,在个体采血后、将修饰T细胞和/或NK细胞重新引入所述个体前,应最多间隔4或8小时(按下限)或12、24、36或48小时(按上限)。

[0057] 在本申请提供的进行基因修饰和扩增淋巴细胞或进行过继细胞治疗的任何方法方面或类似方法的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,在采血之后和重新引入血液之前的所有步骤在封闭系统中执行,在整个处理过程中需要人员监视所述封闭系统。在另一实施例中,在采血后和重新引入血液之前的所有步骤在封闭系统中执行,所述封闭系统与个体位于同一间房内。

[0058] 在本申请提供的包括一个或多个工程化信号多肽的任何方法和组合物的各说明性实施例中,如果未进行广义上的说明,工程化信号多肽中的一个包括或进一步包括抗原特异性靶向区(ASTR)和连接ASTR与到淋巴增殖组件的跨膜域。第一工程化信号多肽的ASTR能够结合第一肿瘤抗原(如有),第二个工程化信号多肽的ASTR能够结合第二肿瘤抗原。在各说明性实施例中,第一工程化信号多肽和/或第二工程化信号多肽进一步包括共刺激域此外,第一工程化信号多肽和/或第二工程化信号多肽进一步包括茎部。此外,第一工程化信号多肽进一步包括胞内激活域。第一工程化信号多肽和/或第二工程化信号多肽的胞内激活域源自CD3- ζ 。

[0059] 在本申请提供的包括淋巴增殖组件的任何方法和组合物的各说明性实施例中,淋巴增殖组件可包括T细胞存活基序。T细胞存活基序可包括CD28中IL-7受体、IL-15受体的全部功能片段或功能片段。在其他实施例中,淋巴增殖组件可包括细胞因子或细胞因子受体

多肽,或含有信号域的细胞因子受体多肽的片段。例如,淋巴增殖组件可包括通过接头共价连接到其同源白细胞介素受体多肽上的白细胞介素多肽。另外,淋巴增殖组件可以是IL-7受体的胞内信号域、IL-12受体的胞内信号域、IL-23受体的胞内信号域、IL-27受体的胞内信号域、IL-15受体的胞内信号域、IL-21受体的胞内信号域,或转化生长因子 β (TGF β) 诱饵受体的胞内信号域。在其他说明性实施例中,淋巴增殖组件为组成性活化。此外,淋巴增殖组件可包括突变IL-7受体或所述突变IL-7受体的片段,所述受体可进一步包括组成性活化的突变IL-7受体或所述突变IL-7受体的组成性活化片段。

[0060] 在本申请提供的包括重组逆转录病毒或逆转录病毒的任何方法和组合物的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,重组逆转录病毒可包括位于其表面的活化组件,所述活化组件包括:

[0061] A. 能够与CD3结合的膜结合多肽;和/或

[0062] B. 能够与CD28结合的膜结合多肽。

[0063] 此外,所述能够与CD3结合的膜结合多肽是一种能够与融合到异源GPI锚定连接序列的CD3结合的多肽,并且所述能够与CD28结合的膜结合多肽可以是一种能够与融合到异源GPI锚定连接序列结合的CD28的多肽。在一些实施例中,所述能够与CD28结合的膜结合多肽为CD80、CD86或能够诱导CD28介导的Akt活化的二者的功能片段,例如CD80的胞外域。

[0064] 在本申请提供的包括重组逆转录病毒的任何方法和组合物的各说明性实施例中,所述能够与CD3结合的膜结合多肽是与CD14GPI锚定连接序列结合的抗CD3scFv,并且所述能够与CD28结合的膜结合多肽是与CD16B GPI锚定连接序列结合的CD80或CD80的胞外域。在本申请提供的包括重组逆转录病毒的任何方法和组合物的各说明性实施例中,所述重组逆转录病毒包括位于其表面,与CD14GPI锚定连接序列结合的抗CD3scFv、与CD16B GPI锚定连接序列结合的CD80或CD80的胞外域,以及IL-7的融合多肽或所述IL-7的活性片段,以及包括GPI锚定连接序列的DAF。在本申请提供的包括重组逆转录病毒的任何方法和组合物的各说明性实施例中,IL-7或其活性片段以及DAF融合物、抗CD3scFv和CD80或其胞外域均包括DAF信号序列。

[0065] 在本申请提供的包括重组逆转录病毒或逆转录病毒的任何方法和组合物的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,重组逆转录病毒可包括位于其表面的膜结合细胞因子。膜结合细胞因子可以是IL-7、IL-15或其活性片段。在其他实施例中,膜结合细胞因子是IL-7的融合多肽或其活性片段以及DAF。例如,融合多肽可包括DAF信号序列 (SEQ ID NO:107的核苷酸1-31)、没有其信号序列的IL-7 (SEQ ID NO:107的核苷酸32-187) 和包括其GPI锚定连接序列 (SEQ ID NO:107的核苷酸188-527) 的DAF片段。

[0066] 在本申请提供的任何方法和组合物方面的说明性实施例中,假型化组件可包括一种或多种异源包膜蛋白。在其他示例中,假型化组件可包括由T细胞识别的一种或多种病毒多肽。一种或多种假型化组件可包括麻疹病毒F多肽、麻疹病毒H多肽和/或其片段。一种或多种假型化组件可以是麻疹病毒F多肽和/或麻疹病毒H多肽的胞质域缺失变体。

[0067] 在本申请提供的包括体内控制组件的任何方法和组合物的各说明性实施例中,体内控制组件是淋巴增殖组件,其中在没有化合物参与的情况下,淋巴增殖在促进T细胞和/或NK细胞增殖方面不活跃或活性较低,并且其中化合物是结合淋巴增殖组件并诱导淋巴增殖组件活性的分子伴侣。

[0068] 在本申请提供的包括体内控制组件的任何方法和组合物的各说明性实施例中,体内控制组件可以是包括核糖开关的多核苷酸。核糖开关能够结合核苷类似物,并且结合体内控制组件的化合物也是核苷类似物。核苷类似物可以是抗病毒药物。抗病毒药物可以是阿昔洛韦或喷昔洛韦。

[0069] 在本申请提供的包括工程化信号多肽的任何方法和组合物的各说明性实施例中,其中工程化信号多肽包括ASTR,第一和第二工程化信号多肽ASTR均可结合肿瘤相关抗原。在一些说明性实施例中,第二工程多肽的抗原特异性靶向区是微环境限制的抗原特异性靶向区。

[0070] 在本申请提供的包括重组逆转录病毒或逆转录病毒的任何方法和组合物的各说明性实施例中,如果未对该方法进行广义上的明确说明,重组逆转录病毒可对单株抗体检验生物的识别域进行编码。在一些实施例中,识别域在与嵌合抗原受体相同的转录物上表达,并且其中识别域通过核糖体跳跃和/或裂解信号与嵌合抗原受体分离。核糖体跳跃和/或裂解信号是2A-1。识别域包括由识别EGFR的抗体或其表位识别的多肽。作为本申请提供的另一种调节机制,识别域可以是被EGFR抗体识别并在转导T细胞和/或NK细胞表面表达的EGFR突变体。在相关实施例中,识别域包括由识别EGFR的抗体或其表位识别的多肽。

[0071] 在本申请提供的包括淋巴增殖组件的任何一种方法或组合物中,淋巴增殖组件可以是激活STAT5通路或抑制SOCS通路的miRNA或shRNA。例如,所述miRNA或shRNA是与核酸结合的miRNA,其中所述核酸对选自由以下内容组成的基团的蛋白质进行编码:ABCG1、SOCS、TGF β R2、SMAD2、cCBL和PD1在本申请提供的任何重组逆转录病毒或转导细胞或包括所述重组逆转录病毒或转导细胞的方法的各说明性实施例中,这些重组逆转录病毒或转导细胞可对miRNA或shRNA进行编码,例如在内含子中,在一些实施例中,1、2、3或4个实施例需要与对以下靶向内源性T细胞表达基因中一个或多个进行编码的核酸结合:PD-1、CTLA4、TCR- α 、TCR- β 、CD3- ζ 、SOCS、SMAD2、miR-155、IFN- γ 、cCBL、TRAIL2、PP2A或ABCG1。例如,在一个实施例中,重组逆转录病毒或转导细胞的基因组中可包括以下miRNA的组合:TCR- α 、CD3- ζ 、IFN- γ 和PD-1;在另一实施例中,为SOCS 1、IFN- γ 、TCR- α 和CD3- ζ 。

[0072] 在本申请提供的任何方法和组合物的各说明性实施例中,重组逆转录病毒、哺乳动物细胞和/或包装细胞可包括Vpx多肽。Vpx多肽可以是例如融合多肽,在一些示例中,特别是在包装细胞中,是膜结合的Vpx多肽。

[0073] 在本申请提供的任何一种方法或组合物中,所述一种或多种假型化组件可包括水泡性口膜炎病毒(VSV-G)包膜蛋白、猫内源性病毒(RD114)包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒双嗜性包膜蛋白、或肿瘤逆转录病毒亲嗜性包膜蛋白或其功能片段。

[0074] 另一方面,本申请提供了一种基因修饰的T细胞和/或NK细胞,包括:

[0075] a. 包括淋巴增殖组件的第一工程化信号多肽;和

[0076] b. 包括嵌合抗原受体的第二工程化信号多肽,所述嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区(ASTR)、跨膜域和胞内激活域。

[0077] 在本申请提供的包括包括哺乳动物包装细胞的任何一种方法中,包括重组逆转录病毒包装系统方面,或用于生成重组逆转录病毒的方法中,例如,可包装RNA基因组由可操作地连接到第三启动子的多核苷酸编码,其中所述第三启动子通过所述第一反式激活因子或所述第二反式激活因子被组成性活化或诱导。可包装RNA基因组由可操作地连接到启动

子的多核苷酸编码,其中所述启动子由第二反式激活因子诱导。本申请中用于促进第一和/或第二工程化信号多肽表达的启动子通常在靶细胞中是具有活性的,例如淋巴细胞、PBL、T细胞和/或NK细胞,但在各说明性实施例中,它们在包装细胞系中没有活性。第二反式激活因子可调节能够结合和激活靶细胞的活化组件的表达。在本申请提供的包括哺乳动物包装细胞的任何一种方法中,包括重组逆转录病毒包装系统方面,或用于生成重组逆转录病毒的方法中,例如在一些实施例中,可包装RNA基因组的表达可由第二反式激活因子调节。

[0078] 进一步地,可包装RNA基因组从5'至3'进一步包括:

[0079] 1.) 5'长末端重复序列或其活性片段;

[0080] 2.) 对逆转录病毒顺式作用的RNA包装组件进行编码的核酸序列;

[0081] 3.) 对第一靶向多肽进行编码的核酸序列;

[0082] 4.) 在靶细胞中具有活性的启动子;和

[0083] 5.) 3'长末端重复序列或其活性片段。

[0084] 在一些实施例中,对第一靶多肽进行编码的核酸序列与对逆转录病毒成分进行编码以用于包装和组装的RNA方向相反。

[0085] 在本申请提供的包括哺乳动物包装细胞的任何一种方法中,包括重组逆转录病毒包装系统方面,或者用于生成重组逆转录病毒的方法中,例如,第一靶多肽包括第一工程化信号多肽,并且其中所述第一工程化信号多肽包括淋巴增殖组件。可包装RNA基因组可进一步包括对第二靶多肽进行编码的核酸序列。第二靶多肽可包括第二工程化信号多肽,所述第二工程化信号多肽包括嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括:

[0086] 1.) 第一抗原特异性靶向区;

[0087] 2.) 第一跨膜域;和

[0088] 3.) 第一胞内激活域。

[0089] 在本申请提供的包括哺乳动物包装细胞的任何一种方法中,包括重组逆转录病毒包装系统方面,或者用于生成重组逆转录病毒的方法中,例如,哺乳动物细胞,例如包装细胞,可包括,例如在第二或第三转录单元上,或在可操作地连接到第一诱导型启动子的附加转录单元上对Vpx进行编码的核酸序列。哺乳动物细胞可以是包装细胞,也可以是293细胞。

[0090] 在本申请提供的包括哺乳动物包装细胞的任何一种方法中,包括重组逆转录病毒包装系统方面,或者用于生成重组逆转录病毒的方法中,第一配体可为雷帕霉素,第二配体可为四环素或阿霉素,或者第一配体可为四环素或阿霉素,第二配体可为雷帕霉素。

[0091] 在一些方面,本申请提供了一种可以是被本申请提供的任何重组逆转录病毒转导的细胞。该细胞可以是例如淋巴细胞,例如T细胞或NK细胞。在各说明性实施例中,该细胞是人类细胞。

[0092] 一方面,本申请提供了一种扩增个体中修饰T细胞和/NK细胞的方法,所述方法包括:

[0093] a.) 将从所述个体中获得的分离的休眠T细胞和/或NK细胞与本申请公开的任何实施例的重组逆转录病毒接触;

[0094] b.) 将基因修饰的T细胞和/或NK细胞引入所述个体;和

[0095] c.) 向所述个体施用有效量的阿昔洛韦、阿昔洛韦前药、喷昔洛韦或喷昔洛韦前药,其中所述经修饰的T细胞和/或NK细胞在施用阿昔洛韦、阿昔洛韦前药、喷昔洛韦或喷昔

洛韦前药后在所述个体中增殖从而扩增个体中的修饰的T细胞和/或NK细胞。

[0096] 在另一方面,本申请提供了一种停止修饰T细胞和/或NK细胞在个体体内扩增、移植和/或持续存在的方法,所述方法包括:

[0097] a.) 将从所述个体获得的分离的静止T细胞和/或NK细胞与本文公开内容的任何实施例的重组逆转录病毒接触;

[0098] b.) 将修饰的T细胞和/或NK细胞引入个体;

[0099] c.) 向所述个体施用有效量的阿昔洛韦、阿昔洛韦前药、喷昔洛韦或喷昔洛韦前药以扩增个体体内的修饰T细胞和/或NK细胞,其中所述修饰T细胞和/或NK细胞在施用阿昔洛韦、阿昔洛韦前药、喷昔洛韦或喷昔洛韦前药后在所述个体中增殖,从而扩增个体中的修饰PBL;和

[0100] d.) 停止施用阿昔洛韦、阿昔洛韦前药、喷昔洛韦或喷昔洛韦前药,其中一旦停止施用阿昔洛韦、阿昔洛韦前药、喷昔洛韦或喷昔洛韦前药,所述修饰T细胞和/或NK细胞便停止在所述个体中增殖,从而控制修饰T细胞和/或NK细胞在个体中的扩增、移植和/或持续存在。

[0101] 另一方面,本申请提供了一种治疗个体所患癌症的方法,所述方法包括:

[0102] a. 将从所述个体获得的分离静止T细胞和/或NK细胞与本申请公开的任何实施例的重组载体接触;

[0103] b. 将基因修饰的T细胞和/或NK细胞引入所述个体;和

[0104] c. 向所述个体施用有效量的阿昔洛韦、阿昔洛韦前药、喷昔洛韦或喷昔洛韦前药以扩增所述个体体内的修饰T细胞和/或NK细胞,其中所述修饰T细胞和/或NK细胞在施用阿昔洛韦、阿昔洛韦前药、喷昔洛韦或喷昔洛韦前药后在所述个体体内增殖,其中所述修饰T细胞和/或NK细胞中的嵌合抗原受体与所述个体体内的癌细胞结合,从而治疗个体所患癌症。

[0105] 在另一方面,本申请提供了一种包括重组多核苷酸的转导T细胞和/或NK细胞,所述重组多核苷酸包括可操作地连接到T细胞和/或NK细胞中活性启动子的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对由体内控制组件调节的第一工程化信号多肽进行编码,其中所述第一工程化信号多肽包括组成性活化IL-7受体突变体,并且其中所述体内控制组件能够与化合物体内结合和/或设计和/或配置成与化合物体内结合。

[0106] 另一方面,本申请提供了一种逆转录病毒包装系统,包括:

[0107] 一种哺乳动物细胞,包括:

[0108] A. 通过组成型启动子表达的第一反式激活因子,所述第一反式激活因子能够结合第一配体和第一诱导型启动子,用于在所述第一配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达;

[0109] B. 第二反式激活因子,能结合第二配体和第二诱导型启动子,同时在所述第二配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达;

[0110] C. 用于逆转录病毒粒子的可包装RNA基因组,

[0111] 其中所述第一反式激活因子调节所述第二反式激活因子和逆转录病毒REV蛋白的表达,其中所述第二反式激活因子调节gag多肽、pol多肽和能够结合靶细胞并促进其膜融合的一种或多种假型化组件的表达,并且其中所述逆转录病毒蛋白源自逆转录病毒。这方

面的实施例可包括本申请中提供的其他方面所述组件的任何实施例。

[0112] 另一方面,本申请提供了一种生成重组逆转录病毒的方法,包括:

[0113] A.培养包装细胞群体以使第一反式激活因子聚集,其中所述包装细胞包括通过第一组成型启动子表达的所述第一反式激活因子,其中所述第一反式激活因子能够结合第一配体和第一诱导型启动子,用于在所述第一配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达,并且其中所述第一反式激活因子调节第二反式激活因子和逆转录病毒REV蛋白的表达;

[0114] B.在所述第一配体参与下培养包括聚集的第一反式激活因子的包装细胞群体,从而使所述第二反式激活因子和逆转录病毒REV蛋白聚集,其中所述第二反式激活因子能够与第二配体和第二诱导型启动子结合,用于在所述第二配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达;和

[0115] C.在第二配体的参与下培育包括聚集的第二反式激活因子和逆转录病毒REV蛋白的包装细胞群体,从而诱导gag多肽、pol多肽和一种或多种假型化组件的表达,进而生成重组逆转录病毒,

[0116] 其中可包装RNA基因组由可操作地连接到第三启动子的多核苷酸进行编码,其中所述第三启动子可通过所述第一反式激活因子或所述第二反式激活因子被组成性活化或诱导,并且其中所述一种或多种假型化组件能够结合到靶细胞和/或促进所述重组逆转录病毒的膜融合。

[0117] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,哺乳动物细胞进一步包括能够结合和激活靶细胞的活化组件,第一反式激活因子调节活化组件的表达。活化组件位于逆转录病毒的表面,并且其中活化组件可包括:能够与CD3结合的膜结合多肽;和/或能够与CD28结合的膜结合多肽。能够与CD3结合的膜结合多肽是能够与异源GPI锚定连接序列融合的结合CD3的多肽,并且能够与CD28结合的膜结合多肽是能够与异源GPI锚附着序列融合的CD28结合的多肽。在一些实施例中,能够与CD28结合的膜结合多肽包括CD80、CD86或其能够诱导CD28介导的Akt活化的功能片段,例如CD80的细胞外域。在其他实施例中,能够与CD3结合的膜结合多肽是与CD14GPI锚定连接序列结合的抗CD3scFv,并且其中能够与CD28结合的膜结合多肽是与CD16B GPI锚定连接序列结合的CD80或其胞外片段。

[0118] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,哺乳动物细胞进一步包括膜结合细胞因子,由第一反式激活因子调节膜结合细胞因子的表达。膜结合细胞因子可以是例如IL-7、IL-15或其活性片段。实施例中的膜结合细胞因子可以是IL-7或其活性片段以及DAF的融合多肽。例如,融合多肽可包括DAF信号序列和没有其信号序列的IL-7,随后是DAF的残基36-525。

[0119] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,哺乳动物细胞包括与其膜相关联的活化组件,所述活化组件包括与CD14GPI锚定连接序列结合的抗CD3scFv、与CD16B GPI锚定连接序列结合的CD80的胞外域,CD80能够与CD28结合;和膜结合细胞因子,所述膜结合细胞因子包括IL-7的融合多肽或所述IL-7的活性片段以及包括GPI锚定连接序列的DAF,其中所述第一反式激活因子调节各活化组件和膜结合细胞因子的表达。在一些实施例中,IL-7或其活性片段和DAF融合物、抗CD3scFV和CD80

或其胞外片段均包括DAF信号序列。

[0120] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,哺乳动物细胞进一步包括Vpx多肽。在这些或其他实施例中,所述一种或多种假型化组件包括由T细胞识别的一种或多种病毒多肽。所述一种或多种假型化组件可以包括麻疹病毒F多肽、麻疹病毒H多肽和/或其片段。在某些说明性实施例中,所述一种或多种假型化组件是麻疹病毒F多肽和/或麻疹病毒H多肽的胞质域缺失变体。

[0121] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,可包装RNA基因组由可操作地连接到第三启动子的多核苷酸进行编码,其中所述第三启动子通过所述第一反式激活因子或所述第二反式激活因子被组成性活化或诱导。在各说明性实施例中,可包装RNA基因组由可操作地连接到第三启动子的多核苷酸进行编码,其中所述第三启动子可由第二反式激活因子诱导。

[0122] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,可包装RNA基因组从5'至3'进一步包括:

[0123] a) 5'长末端重复序列或其活性片段;

[0124] b) 对逆转录病毒顺式作用的RNA包装组件进行编码的核酸序列;

[0125] c) 对第一靶多肽或第二靶多肽进行编码的核酸序列;

[0126] d) 可操作地连接到所述第一靶多肽或所述第二多肽的第四启动子,其中所述第四启动子在靶细胞中有活性,但在包装细胞系中没有活性;和

[0127] e) 3'长末端重复序列或其活性片段。

[0128] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,包括上述的构建体,第三启动子启动的转录或表达促进了第四启动子向相反方向转录或表达。

[0129] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,可包装RNA基因组对本公开的任何实施例的重组逆转录病毒进行编码,其中第一靶多肽和第二靶多肽分别是第一工程化信号多肽和第二工程化信号多肽。例如,在一些实施例中,可包装RNA基因组进一步包括可操作地连接对第一工程化信号多肽或第二工程化信号多肽进行编码的核酸的体内控制组件。各说明性实施例中的体内控制组件是指核糖开关。各说明性实施例中的核糖开关能够与化合物结合,结合体内控制组件的化合物是指核苷类似物,这种核苷类似物可以是抗病毒药物,例如阿昔洛韦或喷昔洛韦。

[0130] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,可包装RNA基因组进一步包括内含子,所述内含子包括对miRNA或shRNA进行编码的多核苷酸。所述内含子邻近所述第四启动子并位于其下游。

[0131] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,靶细胞可以是T细胞和/或NK细胞。

[0132] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,所述一种或多种假型化组件包括水泡性口膜炎病毒(VSV-G)包膜蛋白、猫内源性病毒(RD114)包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒双嗜性包膜蛋白或肿瘤逆转录病毒亲嗜性包膜蛋白或其功能片段。

[0133] 在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些

实施例中,可包装RNA基因组为11,000KB或更小,或10,000KB或更小。在本申请提供的逆转录病毒包装系统和用于生成重组逆转录病毒的方法的一些实施例中,第一靶多肽包括第一工程化信号多肽,其中所述第一工程化信号多肽包括淋巴增殖组件,第二靶多肽包括具有CAR的第二工程化信号多肽。

[0134] 一方面,本申请提供了一种用于调节靶多核苷酸表达的分离多核苷酸,包括:

[0135] 多核苷酸,用于对与启动子和核糖开关操作性连接的靶多核苷酸进行编码,其中所述核糖开关包括:

[0136] a.) 适配体结构域,能够结合核苷类似物抗病毒药物,并且结合鸟嘌呤或2'-脱氧鸟苷的能力与所述核苷类似物抗病毒药物相比更低;和

[0137] b.) 能够调节所述靶多核苷酸表达的功能切换域,其中所述核苷类似物通过所述适配体结构域的结合诱导或抑制所述功能切换域的表达调节活性,从而调节所述靶多核苷酸的表达。

[0138] 在本申请提供的包括体内控制组件的任何方法和组合物的各说明性实施例中,体内控制组件可以是包括核糖开关的多核苷酸。核糖开关能够结合核苷类似物,并且结合所述体内控制组件的化合物也是核苷类似物。核苷类似物可以是抗病毒药物。抗病毒药物可以是阿昔洛韦或喷昔洛韦。核糖开关可以优选结合阿昔洛韦而非喷昔洛韦,或者优选结合喷昔洛韦而非阿昔洛韦。温度超过37℃、37.5℃、38℃、38.5℃或39℃时,例如超过39℃,核糖开关与所述核苷类似物抗病毒药物的结合能力降低。核糖开关的长度可为35、40、45和50个核苷酸(按下限),或为60、65、70、75、80、85、90、95和100个核苷酸(按上限),例如长度为45-80个核苷酸。在本申请提供的包括核糖开关的任何方法和组合物的各说明性实施例中,由核糖开关调节的靶多核苷酸可包括对miRNA、shRNA和/或多肽进行编码的区域。靶多核苷酸可以对淋巴增殖组件进行编码。靶多核苷酸能够可操作地连接到启动子。靶多核苷酸可包括编码多肽的区域,多肽可包括嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域。在本申请提供的包括核糖开关的任何方法和组合物的各说明性实施例中,功能切换域可以调节内部核糖体进入位点、病毒基因构建体中的前mRNA剪接供体可及性、翻译、转录终止、转录降解、miRNA表达或shRNA表达,从而调节所述靶多核苷酸的表达。核糖开关可包括核糖酶。在本申请提供的包括核糖开关的任何方法和组合物的各说明性实施例中,分离多核苷酸可以是分子克隆载体或表达载体。在本申请提供的包括核糖开关的任何方法和组合物的各说明性实施例中,分离多核苷酸可以整合到逆转录病毒基因组或哺乳动物染色体或其片段中。

[0139] 另一方面,本申请提供了一种用于基因修饰和扩增个体淋巴细胞的方法,包括:

[0140] A. 对所述个体采血;

[0141] B. 使个体血液中的休眠T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒进行体外接触,其中所述重组逆转录病毒包括:

[0142] i. 位于其表面的假型化组件,能够结合T细胞和/或NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合;其中所述假型化组件是麻疹病毒F多肽和/或麻疹病毒H多肽的胞质域缺失变体;

[0143] ii. 一种能够结合CD3的多肽和一种能够结合CD28的多肽,其中所述多肽在重组逆转录病毒的表面进行表达并且能够结合T细胞和/或NK细胞,并且其中所述多肽不由所述重

组逆转录病毒中的多核苷酸进行编码;和

[0144] iii. 多核苷酸, 包括可操作地与T细胞和/或NK细胞中的活性启动子连接的一个或多个转录单元,

[0145] 其中所述一个或多个转录单元对包括组成性活化IL-7受体突变体的第一工程化信号多肽和包括嵌合抗原受体的第二工程化信号多肽进行编码, 所述嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区 (ASTR)、跨膜域和胞内激活域,

[0146] 其中通过结合核苷类似物抗病毒药物的核糖开关调节所述IL-7受体突变体的表达, 其中所述核苷类似物抗病毒药物与所述核糖开关的结合增强了IL-7受体突变体的表达, 以及

[0147] 其中所述接触导致至少部分休眠T细胞和/或NK细胞发生基因修饰;

[0148] C. 将基因修饰的T细胞和/或NK细胞重新引入所述个体; 和

[0149] D. 使所述基因修饰的T细胞和/或NK细胞与核苷类似物抗病毒药物体内接触, 以促进所述T细胞和/或NK细胞的扩增, 其中所述方法在采血后、重新引入基因修饰的T细胞和/或NK细胞前进行, 间隔时间不得超过24小时和/或无需事先体外刺激, 从而实现所述个体淋巴细胞的基因修饰和扩增。

[0150] 在该方法的各说明性实施例中, 逆转录病毒是一种慢病毒。在另一个说明性实施例中, 重组逆转录病毒对T细胞进行基因修饰。在另一个说明性实施例中, 能够与CD3结合的多肽与能够与CD28结合的多肽分别融合到异源GPI锚定连接序列。在某些情况下, 能够与CD3结合的多肽可以是抗CD3scFvFc或抗CD3scFv, 并且能够与CD28结合的多肽可以是CD80。抗CD3scFvFc或抗CD3scFv和CD80均可进一步融合到DAF信号序列中。在另一个说明性实施例中, 重组逆转录病毒进一步包括位于其表面的融合多肽, 该融合多肽包含共价连接到DAF的细胞因子。在某些情况下, 细胞因子可以是IL-7或IL-15, 并且融合多肽可以包括DAF信号序列、没有信号序列的IL-7和包含GPI锚定连接序列的DAF片段。

[0151] 在紧接上文所述方法的另一个说明性实施例中, 核糖开关与核苷类似物抗病毒药物的结合可进一步调节嵌合抗原受体的表达; 在某些情况下, 核苷类似物抗病毒药物是阿昔洛韦和/或喷昔洛韦。在另一实施例中, 组成性活化的IL-7可以被miRNA或shRNA取代。在某些情况下, miRNA或shRNA可以由内含子中的核酸编码。

[0152] 另一方面, 本申请提供了一种重组逆转录病毒, 包括:

[0153] A. 位于其表面的假型化组件, 能够结合T细胞和/或NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合; 其中所述假型化组件是麻疹病毒F多肽和/或麻疹病毒H多肽的胞质域缺失变体;

[0154] B. 多核苷酸, 包括可操作地与T细胞和/或NK细胞中的活性启动子连接的一个或多个转录单元, 其中所述一个或多个转录单元对包括嵌合抗原受体的第一工程化信号多肽和包括组成性活化IL-7受体突变体的第二工程化信号多肽进行编码, 所述嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域; 其中通过结合核苷类似物抗病毒药物的核糖开关调节所述IL-7受体突变体的表达, 其中所述核苷类似物抗病毒药物与所述核糖开关的结合增强了IL-7受体突变体的表达; 和

[0155] C. 一种能够结合CD3的多肽和一种能够结合CD28的多肽, 其中所述多肽在重组逆转录病毒的表面进行表达、能够结合T细胞和/或NK细胞, 并且不由所述重组逆转录病毒中

的多核苷酸进行编码;和

[0156] 在上述重组逆转录病毒的各说明性实施例中,逆转录病毒是一种慢病毒。在该方法的其他说明性实施例中,能够与CD3结合的多肽和能够与CD28结合的多肽分别融合到异源GPI锚定连接序列中。在某些情况下,能够与CD3结合的多肽可以是抗CD3scFvFc或抗CD3scFv,并且能够与CD28结合的多肽可以是CD80。抗CD3scFvFc或抗CD3scFv和CD80均可进一步融合到DAF信号序列中。在另一个说明性实施例中,重组逆转录病毒进一步包括位于其表面的融合多肽,所述融合多肽包括共价连接到DAF上的细胞因子。在某些情况下,细胞因子可以是IL-7或IL-15,并且融合多肽可包括DAF信号序列、没有信号序列的IL-7和包含GPI锚定连接序列的DAF片段。

[0157] 在紧接上文重组逆转录病毒的另一个说明性实施例中,核糖开关与核苷类似物抗病毒药物的结合可进一步调节嵌合抗原受体的表达;在某些情况下,核苷类似物抗病毒药物是阿昔洛韦和/或喷昔洛韦。在另一实施例中,组成性活化IL-7可以被miRNA或shRNA取代。miRNA或shRNA可由内含子中的核酸编码。

[0158] 另一方面,本申请提供了一种生成重组逆转录病毒的方法,包括:

[0159] A.培养包装细胞群体以使第一反式激活因子聚集,其中所述包装细胞包括通过组成型启动子表达的所述第一反式激活因子,其中所述第一反式激活因子能够结合第一配体和第一诱导型启动子,用于在所述第一配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达,并且其中通过所述第一反式激活因子调节第二反式激活因子和逆转录病毒REV蛋白的表达;

[0160] B.在所述第一配体参与下,培养包括聚集的第一反式激活因子的包装细胞群体,从而使第二反式激活因子、逆转录病毒REV蛋白以及通常位于其表面的活化组件聚集,所述活化组件包括能够与CD3结合的多肽和能够与CD28结合的多肽,其中所述第二反式激活因子能够与第二配体和第二诱导型启动子结合,用于在所述第二配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达;和

[0161] C.在所述第二配体的参与下培养包括了聚集的第二反式激活因子和逆转录病毒REV蛋白的包装细胞群体,从而诱导gag多肽、pol多肽和假型化组件的表达,其中所述假型化组件能够与T细胞和/或NK细胞结合并促进重组逆转录病毒与组件的膜融合;其中所述假型化组件包括麻疹病毒F多肽和/或麻疹病毒H多肽的胞质域缺失变体,

[0162] 其中可包装RNA基因组由可操作地连接到第三启动子的多核苷酸编码,并且其中所述启动子通过第二反式激活因子诱导,

[0163] 其中可包装RNA基因组从5'至3'进一步包括:

[0164] i.5'长末端重复序列或其活性片段;

[0165] ii.对逆转录病毒顺式作用的RNA包装组件进行编码的核酸序列;

[0166] iii.分别对第一工程化信号多肽和第二工程化信号多肽进行编码的核酸序列;所述第一工程化信号多肽包括嵌合抗原受体,所述第二工程化信号多肽包括由裂解信号分离的组成性活化IL-7受体突变体;

[0167] iv.在T细胞和/或NK细胞中具有活性的第四启动子;和

[0168] v.3'长末端重复序列或其活性片段,和

[0169] 其中可包装RNA基因组进一步包括结合核苷类似物抗病毒药物的核糖开关,其中

核糖开关与核苷类似物抗病毒药物结合的结合增强了IL-7受体突变体的表达,从而生成重组逆转录病毒。

[0170] 在该方法的一个说明性实施例中,核糖开关与核苷类似物抗病毒药物结合可进一步调节嵌合抗原受体的表达。在另一个说明性实施例中,核苷类似物抗病毒药物是阿昔洛韦和/或喷昔洛韦。在另一个说明性实施例中,可包装RNA基因组还包括识别域,其中识别域包括由识别EGFR的抗体或其表位识别的多肽。在另一个说明性实施例中,第一配体是雷帕霉素,第二配体是四环素或阿霉素,或第一配体是四环素或阿霉素,第二配体是雷帕霉素。在另一个说明性实施例中,包装细胞进一步包括对第二或第三转录单元或可操作地连接到第一诱导型启动子的附加转录单元上的Vpx进行编码的核酸序列。在另一个说明性实施例中,能够与CD3结合的多肽和能够与CD28结合的多肽分别融合到异源GPI锚定连接序列中。在某些情况下,能够与CD3结合的多肽可以是抗CD3scFvFc或抗CD3scFv,并且能够与CD28结合的多肽可以是CD80。抗CD3scFvFc或抗CD3scFv和CD80均可进一步融合到DAF信号序列中。在另一个说明性实施例中,还可诱导包含共价连接到DAF的细胞因子的融合多肽的表达。在某些情况下,细胞因子可以是IL-7或IL-15,并且融合多肽可以包含DAF信号序列、没有信号序列的IL-7和包含GPI锚定连接序列的DAF片段。在另一个说明性实施例中,核糖开关与核苷类似物抗病毒药物的结合可进一步调节嵌合抗原受体的表达;在某些情况下,核苷类似物抗病毒药物是阿昔洛韦和/或喷昔洛韦。在另一实施例中,组成性活化IL-7可以被miRNA或shRNA取代。miRNA或shRNA可以由内含子中的核酸编码。在一个说明性实施例中,产生的逆转录病毒是一种慢病毒。

[0171] 另一方面,本申请提供了一种基因修饰的淋巴细胞,包括:

[0172] A. 包括组成性活化IL-7受体突变体的第一工程化信号多肽;和

[0173] B. 包括嵌合抗原受体的第二工程化信号多肽,所述嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区(ASTR)、跨膜域和胞内激活域。

[0174] 在上述基因修饰淋巴细胞方面的各说明性实施例中,基因修饰淋巴细胞是T细胞和/或NK细胞。在某些实施例中,淋巴细胞是T细胞。在另一个说明性实施例中,所述第一工程化信号多肽和/或所述第二工程化信号多肽的表达由结合核苷类似物抗病毒药物的核糖开关调节,其中核苷类似物抗病毒药物与核糖开关的结合增强了IL-7受体突变体的表达。在另一实施例中,组成性活化IL-7受体可被miRNA或shRNA取代。miRNA或shRNA还可以由内含子中的核酸编码。

[0175] 另一方面,本申请提供了一种基因修饰的T细胞和/或NK细胞,包括:

[0176] a. 包含淋巴增殖组件的第一工程化信号多肽;和

[0177] b. 包含嵌合抗原受体的第二种工程化信号多肽,所述嵌合抗原受体包含抗原特异性靶向区(ASTR)、跨膜域和胞内激活域。

[0178] 在基因修饰的T细胞和/或NK细胞方面的各说明性实施例中,淋巴增殖组件为组成性活化,在某些情况下,为组成性活化的突变IL-7受体或其片段。在另一个说明性实施例中,由体内控制组件调节第一工程化信号多肽和/或第二工程化信号多肽的表达。在某些情况下,体内控制组件是包括核糖开关的多核苷酸。在某些情况下,核糖开关能够结合核苷类似物,并且当核苷类似物存在时,表达第一工程化信号多肽和/或第二工程多肽。在其他说明性实施例中,基因修饰的T细胞和/或NK细胞包括位于其表面的活化组件、假型化组件和/

或膜结合细胞因子。在某些情况下,活化组件包括能够结合CD3的膜结合多肽;和/或能够结合CD28的膜结合多肽。在某些实施例中,活化组件包括融合到异源GPI锚定连接序列的抗CD3scFv和/或融合到异源GPI锚定连接序列的CD80。在一个说明性实施例中,假型化组件包括麻疹病毒F多肽、麻疹病毒H多肽和/或麻疹病毒F多肽和/或麻疹病毒H多肽的胞质域缺失变体。在其他实施例中,膜结合细胞因子是包括IL-7的融合多肽,或其融合到DAF的片段,或其包括GPI锚定连接序列的片段。

[0179] 一方面,本申请提供了一种用于基因修饰和扩增个体淋巴细胞的方法,包括:

[0180] A. 通常在无需事先体外刺激的情况下,使个体的休眠T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒进行体外接触,所述重组逆转录病毒包括:

[0181] i. 位于其表面的假型化组件,能够结合T细胞和/或NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合;和

[0182] ii. 多核苷酸,包括操作性连接T细胞和/或NK细胞中活性启动子的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对由体内控制组件调节的第一工程化信号多肽进行编码,其中所述第一工程化信号多肽包含淋巴增殖组件,并且可任意地对体内控制组件调节的第二工程化信号多肽进行编码,其中所述第二工程化信号多肽包括胞内激活域和任选的CAR的其他成分,

[0183] 其中所述接触促进所述重组逆转录病毒转导至少一部分休眠T细胞和/或NK细胞,从而生成基因修饰的T细胞和/或NK细胞;

[0184] B. 将基因修饰的T细胞和/或NK细胞引入所述个体;和

[0185] 使基因修饰的T细胞和/或NK细胞与化合物体内接触,所述化合物充当体内控制组件,以影响第一工程化信号多肽的表达并促进淋巴细胞在体内的扩增、移植和/或持续存在,从而基因修饰和扩增个体的淋巴细胞。

[0186] 在各说明性实施例中,在没有体外刺激的情况下进行转导。在各说明性实施例中,化合物是分子伴侣,例如小分子伴侣。在各说明性实施例中,分子伴侣与淋巴增殖组件的结合增强了淋巴增殖组件的增殖活性。分子伴侣可以在个体采集血之前、接触期间和/或T细胞和/或NK细胞被引入个体体内之后施用予个体。应了解的是,当化合物为体内控制组件时,这种化合物通常能够结合到淋巴增殖组件和/或CAR的成分上,并且在该方法的实施过程中结合到这种淋巴增殖组件或CAR组件上。本申请提供的涉及方法的其他实施例和教导涉,包括用重组逆转录病毒转染T细胞和/或NK细胞,也适用于这方面,包括分子伴侣实施例。

[0187] 另一方面,本申请提供了一种选择微环境限制的抗原特异性靶向区的方法,包括通过以下步骤淘选多肽展示文库:

[0188] a. 分别在正常和异常生理条件下对所述多肽展示文库的多肽进行结合测定;和

[0189] b. 选择与所述生理条件相比在异常条件下表现出结合活性增加的多肽,从而选择所述微环境限制的抗原特异性靶向区。

[0190] 另一方面,本申请提供了一种分离微环境限制的抗原特异性靶向区的方法,包括:

[0191] 通过以下步骤淘选多肽文库:

[0192] a) 使异常条件下的多肽文库与结合到载体上的靶抗原接触,其中用于表达与所述靶抗原的多肽结合的克隆体通过所述靶抗原保持与载体的结合;

[0193] b) 在生理条件下用结合多肽培育载体;和

[0194] c) 收集在生理条件下从载体洗脱的克隆体,从而分离所述微环境限制的抗原特异性靶向区。

[0195] 另一方面,本申请提供了一种用于结合靶抗原的嵌合抗原受体,包括:

[0196] a) 至少一个微环境限制的抗原特异性靶向区,其通过淘选多肽文库选择,并且与正常生理条件相比,在异常条件下结合测定的活性更强;

[0197] b) 跨膜域;和

[0198] c) 胞内激活域。

[0199] 另一方面,本申请提供了一种用于结合靶抗原的嵌合抗原受体,包括:

[0200] a) 微环境限制的抗原特异性靶向区,其在异常条件下与靶抗原结合的能力比正常生理条件下更强,其中所述抗原特异性靶向区与所述靶标结合;

[0201] b) 跨膜域;和

[0202] c) 胞内激活域。

[0203] 在本申请提供的包括微环境限制的抗原特异性靶向区 (ASTR) 的任何方法和组合物的各说明性实施例中,测定出异常条件下ASTR对靶抗原的结合亲和力比正常条件下增强了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。异常情况可能涉及低氧、酸性pH值、较高浓度的乳酸、较高浓度的透明质酸、较高浓度的白蛋白、较高浓度的腺苷、较高浓度的R-2-羟戊二酸、较高浓度的PAD酶、较高压力、较高氧化程度和较低的养分有效性。对于所述微环境限制的抗原特异性靶向区,pH值为6.7时抗原结合比pH值为7.4时更强。所述微环境限制的抗原特异性靶向区在肿瘤环境和/或试管内肿瘤替代测定条件下的抗原结合比相应生理条件下更强。所述靶标选自4-1BB、ST4、腺癌抗原、 α -胎甲球蛋白、AXL、BAFF、B-淋巴瘤细胞、C242抗原、CA-125、碳酸酐酶9 (CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受体)、CD28、CD30 (TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNT0888、CTLA-4、DRS、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、纤连蛋白额外结构域-B、叶酸受体1、GD2、GD3神经节苷脂、糖蛋白75、GPNMB、HER2/neu、HGF、人体扩散因子受体激酶、IGF-1受体、IGF-I、IgG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、胰岛素样生长因子I受体、整联蛋白 α 5 β 1、整联蛋白 α 5 β 3、MORAb-009、MS4A1、MUC1、粘蛋白CanAg、N-羟乙酰神经氨酸、NPC-1C、PDGF-R α 、PDL192、磷脂酰丝氨酸、前列腺癌细胞、RANKL、RON、ROR1、ROR2SCH 900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、肌腱蛋白C、TGF β 2、TGF-P、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2和波形蛋白。ASTR是抗体、抗原、配体、配体的受体结合域、受体、受体的配体结合域或亲和体。ASTR可以是全长抗体、单链抗体、Fab片段、Fab' 片段、(Fab')₂片段、Fv片段和二价单链抗体或双抗体。ASTR可包括抗体的重链和轻链。抗体可以是单链可变区片段。在一些实施例中,重链和轻链通过接头分开,其中所述接头的长度在6-100个氨基酸之间。在一些实施例中,重链位于嵌合抗原受体上轻链的N端;在一些实施例中,轻链位于嵌合抗原受体上重链的N端。

[0204] 在包括多肽展示文库的任何方法的各说明性实施例中,多肽展示文库为噬菌体展示文库或酵母展示文库。多肽展示文库可以是抗体展示文库。抗体展示库可以是人或人源化抗体展示文库。抗体展示文库可以是初始文库。该方法可包括用收集的噬菌体感染细菌细胞以产生精制噬菌体展示文库,然后使用从上一步骤产生的所述精制噬菌体展示文库重

复接触、培养和收集1至1000次。

[0205] 在本申请提供的包括分离或选择微环境限制的ASTR的任何方法的各说明性实施例中,该方法可包括下面的步骤:确定对微环境限制的抗原特异性靶向区进行编码的多核苷酸的核苷酸序列,从而确定微环境限制的ASTR的多肽序列。所述方法可包括下面的步骤:通过生成对多肽进行编码的多核苷酸来生成微环境限制的生物嵌合抗原受体,所述多肽包括微环境限制的ASTR、跨膜域和胞内激活域。该文库可以是单链抗体文库。

[0206] 分离微环境限制的ASTR的方法可包括重复淘选1到1000次。执行分离微环境限制的ASTR的方法时,可以不突变多核苷酸,所述多核苷酸在各轮淘选期间对分离微环境限制的抗原特异性靶向区编码。分离微环境限制的ASTR的方法通过在各轮淘选期间培养、高保真度扩增和/或稀释给抗原特异性靶向区进行编码的多核苷酸或包括该区域的宿主生物体来进行。该方法可包括,在重复前,诱变所选择和/或分离的微环境限制的抗原特异性靶向区。该方法可包括通过长阅读DNA测序确定一轮或多轮淘选之后,所选和/或分离的微环境限制的抗原特异性靶向区的序列和/或对该区域进行编码的多核苷酸。该方法可以包括确定分离微环境限制的抗原特异性靶向区扩增之前和之后的序列。分离微环境限制的ASTR的方法可在不重复淘选的情况下进行。分离微环境限制的ASTR的方法可在分离微环境限制的ASTR后进行,无需突变对分离微环境限制的ASTR进行编码的多核苷酸。

[0207] 在本申请提供的任何组合物的各说明性实施例中,包括具有微环境限制的ASTR的嵌合抗原受体,微环境限制的ASTR可通过淘选抗体文库确定。在一些实施例中,微环境限制的ASTR通过淘选噬菌体展示文库或酵母展示文库确定。在一些实施例中,嵌合抗原受体包含双特异性ASTR。

[0208] 另一方面,本申请提供了转导T细胞和/或NK细胞,包括重组多核苷酸,所述重组多核苷酸包括操作性连接T细胞和/或NK细胞中活性启动子的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对由体内控制组件调节的第一工程化信号多肽进行编码,其中所述第一工程化信号多肽包括组成性活化IL-7受体突变体,并且其中所述体内控制组件能够与化合物体内结合或或配置成与化合物体内结合。

[0209] 另一方面,本申请提供了一种重组逆转录病毒,包括重组多核苷酸,所述重组多核苷酸包括操作性连接T细胞和/或NK细胞中活性启动子的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对由体内控制组件调节的第一工程化信号多肽进行编码,其中所述第一工程化信号多肽包括组成性活化IL-7受体突变体,并且其中所述体内控制组件能够与化合物体内结合或或配置成与化合物体内结合。

[0210] 另一方面,本申请提供了一种转导T细胞和/或NK细胞的方法,包括使T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触,所述重组逆转录病毒包括重组多核苷酸,所述重组多核苷酸包括操作性连接T细胞和/或NK细胞中活性启动子的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对由体内控制组件调节的第一工程化信号多肽进行编码,其中所述第一工程化信号多肽包括组成性活化IL-7受体突变体,并且其中体内控制组件能够在转导条件下与化合物体内结合,从而转导T细胞和/或NK细胞。

[0211] 在转导T细胞和/或NK细胞、重组逆转录病毒和方法的各说明性实施例中,如上文所述,重组多核苷酸进一步包括对第二工程化信号多肽进行编码的转录单位,所述第二工程化信号多肽包括第一嵌合抗原受体,所述第一嵌合抗原受体包括抗原特异靶向区域

(ASTR)、跨膜域和胞内激活域。在其他说明性实施例中,淋巴增殖组件包括突变的IL-7受体或其片段。在其他说明性实施例中,体内控制组件是包括核糖开关的核苷酸。在某些情况下,核糖开关能够结合核苷类似物,并且结合所述体内控制组件的化合物也是核苷类似物。在某些情况下,核苷类似物是抗病毒药物,例如阿昔洛韦或喷昔洛韦。在某些实施例中,抗病毒药物是阿昔洛韦。在其他说明性实施例中,组成性活化IL-7受体突变体与EGFR或其表位融合。在其他说明性实施例中,组成性活化IL-7受体突变体包括eTag。在其他说明性实施例中,组成性活化IL-7受体突变体包括PPCL插入物。在其他说明性实施例中,组成性活化IL-7受体突变体包括PPCL在一个野生型人类IL-8受体位置上相当于位置243的插入物。在其他说明性实施例中,转导T细胞或NK细胞为转导T细胞。

附图说明

[0212] 图1是说明成分的示意图,包括包装细胞(100)和包装细胞(100)生成的重组逆转录病毒(200)。在图1中,能够对本发明的相关方面进行编码的各种载体(称为重组核苷酸(110))被包装成重组逆转录病毒(200),其中包括其基因组内的第一工程化信号多肽,所述第一工程化信号多肽包括淋巴增殖组件,在一些实施例中,还包括作为嵌合抗原受体(CAR)的第二工程化信号多肽。重组逆转录病毒的表达载体有:重组逆转录病毒的膜、允许逆转录病毒与靶细胞结合和融合的假型化组件(在非限制性实施例中,为麻疹病毒血凝素(H)多肽和麻疹病毒融合(F)多肽,或其胞质域缺失变体)(240)、能够结合和激活休眠T细胞的活化组件(在非限制性实施例中,具有能够与CD28激活的多肽和能够与CD3结合的多肽的活化组件)(分别为210和220)以及膜结合细胞因子(在非限制性实施例中,还包括IL-7的融合多肽)(230)。标记为(250)、(260)、(270)、(280)和(290)的部件分别为Src-FLAG-Vpx、HIV gag基质、HIV gag衣壳、RNA和HIV pol。

[0213] 图2是说明成分的示意图,包括包装细胞(200)生成的重组逆转录病毒(200)和重组逆转录病毒(200)转染的休眠T细胞(300)。逆转录病毒表面的组件与休眠T细胞表面的受体和/或配体结合。假型化组件可包括促进逆转录病毒与T细胞结合和融合的结合多肽和融合多肽(在非限制性实施例中,为麻疹病毒血凝素(H)多肽和麻疹病毒融合(F)多肽或胞质域缺失变体)。在非限制性实施例中,逆转录病毒包括位于其表面的活化组件,能够通过参与T细胞受体复合物和可选共受体(320)激活休眠T细胞(在非限制性实施例中,这种活化组件具有能够与CD28结合的多肽以及能够与CD3结合的多肽)。此外,位于逆转录病毒表面的膜结合细胞因子(在非限制性实施例中,为IL-7融合多肽)与休眠T细胞表面的IL-7R α (310)结合。逆转录病毒与T细胞融合,同时对第一工程化信号多肽,包括淋巴增殖组件进行编码的多核苷酸(在各说明性实施例中,为组成性活化的IL-7R α)(370),在迁移到细胞核之前反转录到细胞质中,以结合到激活T细胞的DNA中。在一些实施例中,与病毒一起包装的Src-FLAG-Vpx(250)进入休眠T细胞的细胞质,并促进SAMHD1(350)降解,从而导致了可用于反转录的细胞质dNTPs池的增加。在一些实施例中,多核苷酸还可以对包括CAR(360)在内的第二工程化信号多肽进行编码。在一些实施例中,化合物与调节其表达的体内控制组件结合时,淋巴增殖组件被表达(在非限制性示例中,体内控制组件是与核苷类似物结合的核糖开关)。在一些实施例中,体内控制组件也可以调节CAR的表达。区域(330)是SLAM和CD46。区域(340)是CD3。

[0214] 图3A-3E所示为载体系统的示意图。图3A所示为包括多核苷酸序列和ZFHD1DNA结合域的构建体,其中多核苷酸序列对融合至NF κ B p65激活域(p65AD)的FRB域进行编码,而ZFHD1DNA结合域融合至组成性表达的三个FKBP重复序列。图3A中的构建体还包括HIV1REV和在雷帕霉素诱导的ZFHD1/p65AD启动子调节下作为SrcFlagVpx融合体的Vpx。图3B所示为构建体,其中包括在ZFHD1/p65AD启动子调节下对rtTA序列进行编码的多核苷酸。图3C所示为构建体,其中包括对两侧为loxP位点的嘌呤霉素抗性基因和两侧为lox2272位点的胞外MYC tag进行编码的多核苷酸。两种可选标记都通过BiTRE启动子调节,BiTRE启动子的两侧为FRT位点。图3D所示为构建体,其中包括在TRE启动子以及TRE启动子与RFP的5'loxP位点之间的单个FRT位点的调节下,对两侧为loxP位点的RFP进行编码的多核苷酸。图3E所示为构建体,其中包括在TRE启动子以及TRE启动子与GFP的5'loxP位点之间的单个FRT位点的调节下,对两侧为loxP位点的GFP进行编码的多核苷酸。图3C-3E中的构建体用作其他多核苷酸序列插入包装细胞系基因组的着陆垫。

[0215] 图4A-4C示出构建体的示意图。图4A所示为包括三顺反子多核苷酸、CD80胞外域(ECD)和IL-7的构建体,其中三顺反子多核苷酸通过CD14GPI锚定附着位点对抗CD3(克隆UCHT1) scFvFc编码,CD80胞外域(ECD)能够通过CD16B GPI锚定附着位点与CD28结合,而且IL-7能够融合到衰变加速因子(DAF),其中转位子序列位于多核苷酸区域两侧,从而整合到HEK293S基因组中。图4B所示为包括多核苷酸的构建体,其中一个BiTRE启动子和一个多核苷酸区域在一个方向上对gag和pol多肽进行编码,一个多核苷酸区域在另一个方向上对麻疹病毒F Δ x和H Δ y蛋白进行编码。图4C所示为构建体,其包括了在CD3Z启动子调节下对CAR和淋巴增殖组件IL7R α -insPPCL进行编码的多肽,其中CD3Z启动子在HEK293S细胞中无活性,其中CAR和IL7R α -insPPCL通过对T2A核糖体跳跃序列进行编码的多核苷酸序列分离;并且IL7R α -insPPCL具有通过阿昔洛韦核糖开关调节的核糖酶。包含CAR的构建体进一步包括cPPT/CTS、RRE序列和对HIV-1Psi(Ψ)进行编码的核苷酸序列。整合到基因组、含CAR的构建体上的整个核苷酸序列,两侧为FRT位点。

[0216] 图5A-5C所示为用作选择性核糖开关调节的代表性核苷类似物的阿昔洛韦(图5A)、喷昔洛韦(图5B)和2'-脱氧鸟苷(图5C)的分子结构。

[0217] 图6表示花中间原体属的I-A型脱氧鸟苷核糖开关调节区和相关基因产物。该序列是M.florum L1基因组DNA(AE017263.1)nt624396至nt625670的反向互补序列,其与M.florum W37基因组DNA(CP006778.1)nt636277至nt 637550相同。用于初始筛选的脱氧鸟苷结合适配体序列用粗体和下划线表示。下游基因产物(核糖核苷酸还原酶的Ib类(有氧), β 亚基)用大写字母表示。

[0218] 图7表示针对定向进化策略的M.florum I-A型脱氧鸟苷核糖开关适配体区。空椭圆内的核苷酸可随机选择。条纹椭圆中的核苷酸可插入/删除和随机选择。

[0219] 图8A和8B表示M.florum I-A型脱氧鸟苷核糖开关适配体筛选文库。在图8A中,实线框内的核苷酸是靶向随机化的序列区,虚线框内的核苷酸是靶向插入/删除和随机化的序列区。图8B所示为通过突变(“随机核苷酸(“N”)”)和删除/插入产生的可能序列。

[0220] 图9所示为作为反向互补序列合成的M.florum I-A型脱氧鸟苷核糖开关适配体寡核苷酸文库,其中添加额外的碱基对以允许扩增PCR并添加用于在试管内转录的T7启动子,以进行文库筛选。也显示了相应的T7启动子扩增引物和反向扩增引物。

[0221] 图10所示为枯草芽孢杆菌鸟苷xpt核糖开关调节区和相关基因产物。该序列是枯草芽孢杆菌亚种6051-HGW基因组DNA (CP003329.1) nt2319439至nt2320353的反向互补序列。进行初始筛选的鸟苷结合适配体序列,用粗体和下划线表示。下游基因产物(黄嘌呤磷酸核糖转移酶xpt)用大写字母表示。

[0222] 图11表示针对定向进化策略的枯草芽孢杆菌鸟苷xpt核糖开关适配体区。空椭圆内的核苷酸可随机化。条纹椭圆中的核苷酸可插入/删除和随机化。

[0223] 图12A和12B表示枯草芽孢杆菌鸟苷xpt核糖开关适配体筛选文库。在图12A中,实线框内的核苷酸是靶向随机化的序列区,虚线框内的核苷酸是靶向插入/删除和随机化的序列区。图12B所示为通过突变(“随机核苷酸(“N”))和删除/插入产生的可能序列。

[0224] 图13表示作为反向互补序列合成的枯草芽孢杆菌鸟苷xpt核糖开关适配体寡核苷酸文库,其中添加额外的碱基对以允许扩增PCR并添加用于在试管内转录的T7启动子,以进行文库筛选也显示了相应的T7启动子扩增引物和反向扩增引物。

[0225] 图14所示为选择文库的构建。文库是根据结合已知鸟苷和脱氧鸟苷的RNA (Pikovskaya, 2013) 构建的。

[0226] 图15所示为氧化石墨烯(Gr0)适配体的选择。在步骤(1)中,进行RNA的转录和纯化。在步骤(2)中,洗脱纯化过的RNA。在步骤(3)中,用反向靶和缓冲液培养适配子。在步骤(4)中,用氧化石墨烯去除与反向靶或缓冲成分结合的序列。在步骤(5)中,对上清液中非特异响应的物种离心分区后将其丢弃。再洗涤两次,每次5分钟,从而去除大多数剩余的反向靶结合和缓冲液结合序列。在步骤(6)中,将含有阿昔洛韦溶液的1X选择缓冲液添加到Gr0结合文库中以进行阳性选择,从而使潜在的适配体序列通过与阳性目标的相互作用脱离Gr0。在步骤(7)中,通过最后离心步骤将上清液中的目标结合序列与仍吸附到Gr0上的非响应序列分离。在步骤(8)中,选择序列被反向转录,然后通过PCR扩增文库并转录生成下一轮选择文库。

[0227] 图16所示为氧化石墨烯并行评价实例。经过并行评价的富集文库被分成四等份。然后将文库样本添加到氧化石墨烯中,并进行培养以将文库负载到氧化石墨烯上。分别洗涤两次,每次5分钟,去除未结合的物质。对于阳性(阿昔洛韦)和特殊(喷昔洛韦)靶样,利用1X选择缓冲液分别制备1 μ M的靶样,其中反向靶用溶液中的10 μ M反向靶替代了阳性靶;阴性样品用等量的不含核酸酶的水替代了阳性靶。然后将样品与各自的氧化石墨烯制剂结合并培养。培养后,对样品进行离心分离,回收其上清液,并通过NanoDrop-1000分光光度计读数(赛默飞世尔科技公司;Wilmington, DE)确定文库恢复情况。分析变性PAGE上的剩余文库样本。凝胶染色/脱色后提取凝胶图像。为进行后续并行评价,恢复了与预期文库大小对应的各带区,其中阳性靶阿昔洛韦取代了阴性、配对物和特殊靶样预加载培养的反向靶。通过第二次并行评价回收材料,用于测序和分析。

[0228] 图17所示为阿昔洛韦的七个备选适配体。在37 $^{\circ}$ C下,通过1M Na⁺by Quikfold 3.0 (Zuker 2003) 计算每个适配体的自由能。使用专有算法识别序列。每个序列中带下划线的区域是PCR引物退火区域。

[0229] 图18所示为喷昔洛韦的七个备选适配体。在37 $^{\circ}$ C下,通过1M Na⁺by Quikfold 3.0 (Zuker 2003) 计算每个适配体的自由能。使用专有算法识别序列。每个序列中带下划线的区域是PCR引物退火区域。

[0230] 图19A所示为在PBMC中表达时,用于测试淋巴增殖/存活活性的IL7R α 变体的示意图。图19B所示为在IL-2参与或未参与时PBMC的活性百分比的条形图。

[0231] 图20所示为根据感染复数,利用慢病毒转导的假阴性选择T细胞和未刺激T细胞的转导效率图,其中慢病毒用VSV-G或截短MV (Ed) F和H多肽进行假型包装。为了更清晰,符号交错排列。

[0232] 图21所示为EF-1 α 启动子内含子中以CD3- ζ 为靶标的miRNAs能够敲减CD3复合物的表达。

[0233] 定义

[0234] 本申请中采用的术语“嵌合抗原受体”或“CAR”指将抗原特异性移植到T细胞、NK细胞、巨噬细胞和干细胞等细胞上的工程受体。本发明中的CAR包括至少一个抗原特异性靶向区 (ASTR) 和胞内激活域 (IAD), 可包括茎部、跨膜域 (TM) 和一个或多个共刺激域 (CSD)。在另一实施例中, CAR是一种双特异性CAR, 即对两个不同的抗原或表位具有特异性。在ASTR与靶抗原进行特异性结合后, IAD会激活胞内信号。例如, IAD可以不限MHC的方式, 利用抗体的抗原结合特性, 将T细胞特异性和反应性重新定向到所选择的靶标。非MHC限制性抗原识别使表达CAR的T细胞能够识别与抗原处理无关的抗原, 从而绕过主要肿瘤逃逸机制。此外, 在T细胞表达时, CAR不会与内源性T细胞受体 (TCR) α 和 β 链形成二聚体, 这是有利的。

[0235] 本申请中采用的术语“微环境”指组织或身体的任何部分或区域, 它们与身体或组织的其他部分或区域存在恒定的或时间上的物理或化学差异。例如, 本申请中采用的“肿瘤微环境”指存在肿瘤的环境, 它是肿瘤内的非细胞区, 直接位于瘤组织外但不属于癌细胞本身的胞内功能区隔。肿瘤微环境可以指肿瘤环境的任何和所有条件, 包括为恶性过程创造结构和或功能环境条件, 使其存活和/或扩大和/或扩散。例如, 肿瘤微环境可包括但不限于对以下条件的变更: 压力、温度、pH值、离子强度、渗透压、重量克分子渗透压浓度、氧化应激、一个或多个溶质的浓度、电解质浓度、葡萄糖浓度、透明质酸浓度、乳酸浓度、白蛋白浓度、腺苷水平、R-2-羟戊二酸水平、丙酮酸浓度、氧浓度和/或存在氧化剂、还原剂或辅助因子, 以及本领域技术人员应了解的其他条件。

[0236] 本申请中交替使用的术语“多核苷酸”和“核酸”指任何长度的核苷酸, 如核糖核苷酸或脱氧核苷酸的聚合形式。因此, 该术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交或包括嘌呤碱和嘧啶碱或其他天然的、化学上修饰或生化化学上修饰过的、非天然或衍生核苷酸碱基的聚合物。

[0237] 本申请中采用的术语“抗体”包括多株和单株抗体, 包括完整抗体和与抗原特异性结合的抗体片段。抗体片段可以是但不限于抗原结合片段 (Fab)、Fab' 片段、抗体片段、F(ab')₂ 片段、Fv片段、Fab'-SH片段、(Fab')₂:Fv片段、Fd片段、重组IgG (rIgG) 片段、单链抗体片段, 包括单链可变片段 (scFv)、二价scFv's、三价scFv's 和单域抗体片段 (如sdAb、sdFv、纳米抗体)。该术语包括基因工程和/或其他修改形式的免疫球蛋白, 如胞内抗体、多肽抗体、嵌合体抗体、单链抗体、完全人体抗体、人源化抗体、包括一种抗体的抗体特异性靶向区域和非抗体蛋白的融合蛋白、复共轭对配合物抗体、多特异性抗体, 如双特异性抗体、双抗体、三抗体、四抗体、串联di-scFv和串联tri-scFv。该术语还包括完整或全长抗体, 包括任何类或亚类抗体, 包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD。

[0238] 本申请中采用的术语“抗体片段”包括完整抗体的一部分, 例如完整抗体的抗原结

合或可变区。抗体片段的示例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、双抗体、线性抗体(Zapata等人,《蛋白质工程》8(10):1057-1062(1995))、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶对抗体的消化生成了两种相同的抗原结合片段,即“Fab”片段,每个片段都有一个抗原结合位点;还有一个残留“Fe”片段,这一名称反映出其很容易结晶。胃蛋白酶处理生成了具有两个抗原结合位点并且还能交联抗原的F(ab')₂片段。

[0239] 本申请中交替使用的术语“单链Fv”、“scFv”或“sFv”抗体片段包括抗体的V_H和V_L域,其中这些域可在单个多肽链中出现。在一些实施例中,Fv多肽进一步包括位于V_H和V_L之间的多肽接头或间隔物,使sFv能够形成抗原结合所需的结构。关于sFv的综述,参见Pluckthun《单株抗体药理学》第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,纽约,第269-315页(1994)。

[0240] 本申请中采用的“天然存在的”V_H和V_L域指在特定条件下,如美国专利8709755B2和申请W0/2016/033331A1中公开的条件,在没有发生进一步分子进化进而改变scFv格式产生的亲和力时,与宿主分离的V_H和V_L域。

[0241] 本申请中采用的术语“亲和力”指两种试剂可逆结合的平衡常数,并表示为解离常数(K_d)。同不相关的氨基酸序列的抗体相比,这种亲和力可以是其至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、至少1000倍或以上。抗体对靶蛋白的亲和力可以是,例如,约100纳摩尔(nM)至约01nM、约100nM至约1皮摩尔(pM),或约100nM至约1飞摩尔(fM)或以上。本申请中采用的术语“亲合力”指两种或多种试剂的复合物在稀释后的解离抗性。涉及抗体和/或抗原结合片段时,术语“免疫反应性”和“优先结合”在本申请中可以交替使用。

[0242] 本申请中采用的术语“结合”指由于共价、静电、疏水以及离子和/或氢键相互作用,包括盐桥和水桥等的相互作用,使两个分子直接结合。非特异性结合指亲和力小于约10⁻⁷M时的结合,例如,亲和性为10⁻⁶M、10⁻⁵M、10⁻⁴M等时的结合。

[0243] 本申请中采用的“细胞表面表达系统”或“细胞表面展示系统”指蛋白质或其部分在细胞表面的展示或表达。通常,产生的细胞可表达融合到细胞表面蛋白上的相关蛋白。例如,蛋白质被表达为具有跨膜域的融合蛋白。

[0244] 本申请中采用的术语“组件”包括多肽,涉及多肽融合体、多肽区域、及其功能突变体或片段,以及多核苷酸,涉及microRNA和shRNA,及其功能突变体或片段。

[0245] 本申请中采用的术语“区域”指多肽或多核苷酸的任何片段。

[0246] 本申请中采用的“域”指具有功能和/或结构特性的多肽或多核苷酸的区域。

[0247] 本申请中采用的术语“茎部”或“茎部域”指为侧翼多肽区提供结构柔性和间距的柔性多肽连接区,并且可由天然或合成多肽组成。茎部的来源可以是通常被定义为从人类IgG1(Burton(1985)《分子免疫学》22:161-206)的Glu216延伸至Pro230的免疫球蛋白(例如,IgG1)的铰链或铰链区。其他IgG同型的铰链区可通过将形成重链间二硫化物(S-S)键的第一和最后的半胱氨酸残基放置在同一位置来与IgG1序列对齐。如美国专利第5,677,425号中所公开的那样,茎部可以是自然发生的或非自然发生的,包括但不限于改变的铰链区。茎部可包括源自任何种类或亚类抗体的完整铰链区。茎部也可包括源自CD8的区域、CD28的区域或为侧翼区域提供柔性和间距时具有相似功能的其他受体区域。

[0248] 本申请中采用的术语“分离”指将物质从其原来的环境(例如,天然存在时,为自然环境中)中除去。例如,活体动物中自然形成的多核苷酸或多肽并不是孤立存在的,但从自然系统中的部分或所有共存材料分离出来的相同核苷酸或多肽则是孤立存在的。这种多核苷酸可能是载体的一部分和/或这种多核苷酸或多肽可能是组合物的一部分,并且仍然被分离,使得这种载体或组合物并不是其自然环境的一部分。

[0249] 本申请中采用的“多肽”指由肽键连接的单链氨基酸残基。多肽无法折叠成固定结构,也无法进行任何翻译后修饰。“蛋白质”是一种折叠成固定结构的多肽。“多肽”和“蛋白质”在本申请中可交替使用。

[0250] 如本申请中所使用,可“纯化”多肽以去除多肽自然环境中的污染物成分,例如,可能会干扰酶、激素和其他蛋白质或非蛋白溶质等多肽的诊断或治疗用途的物质。多肽可纯化(1)至由劳里法确定的抗体的90%、95%或98%以上(按重量计),例如99%以上(按重量计), (2)至足以通过采用转杯式测序仪得到N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基,或者(3)至均匀,使用考马斯蓝或银染色剂,在还原或非-还原条件下用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)达成。

[0251] 本申请中采用的术语“免疫细胞”通常包括从骨髓造血干细胞(HSC)中提取的白细胞(白细胞)。“免疫细胞”包括淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK(自然杀伤)细胞)和髓源性细胞(中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞)。

[0252] 本申请中采用的“T细胞”包括用于表达CD3的各类免疫细胞,包括T辅助细胞(CD4⁺细胞)、细胞毒性T细胞(CD8⁺细胞)、T调节细胞(Treg)和伽玛三角洲T细胞。

[0253] 本申请中采用的“细胞毒性细胞”包括CD8⁺T细胞、NK(自然杀伤)细胞、NK-T细胞、 γ δ T细胞、亚群CD4⁺细胞和能够调解细胞细胞毒性反应的中性粒细胞。

[0254] 本申请中采用的术语“干细胞”一般包括多能干细胞。“干细胞”包括胚胎干细胞(ES)、间充质干细胞(MSC)、诱导多能干细胞(iPS)和定型祖细胞(造血干细胞(HSC)、骨髓源性细胞等)。

[0255] 本申请中采用的“治疗”、“疗法”等术语指达到预期的药理和/或生理作用。这种效果可能是预防性的,即完全或部分预防疾病或疾病症状,也可能是治疗性的,即对于疾病和/或导致疾病的副作用,使其部分或完全治愈。本申请中采用的“治疗”涵盖哺乳动物(例如人类)的任何疾病治疗,包括:(a)对于易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的个体,预防患上这类疾病;(b)预防疾病,即阻止其发展;和(c)缓解疾病,即使疾病消退。

[0256] 本申请中采用的可交替使用的术语“个体”、“宿主”和“患者”等均指哺乳动物,包括但不限于人类、鼠类(例如,大鼠、小鼠)、兔形目动物(例如,兔子)、非人类灵长目动物、犬科动物、猫科动物、有蹄类动物(例如,马、牛、绵羊、猪、山羊)等。

[0257] 本申请中采用的术语“治疗有效剂量”或“有效剂量”指药物量或两种药物的总量,即为了治疗疾病对哺乳动物或其他个体给药时,足以影响疾病治疗的量。“治疗有效剂量”因药物、疾病、患病严重程度及治疗对象的年龄、体重而异。

[0258] 本申请中采用的术语“进化”指使用一种或多种诱变方法生成对不同多肽进行编码的不同多核苷酸,这种多肽本身即是改进生物分子和/或有助于生成另一种改进生物分子。“生理”或“正常”或“正常生理”条件包括但不限于以下条件:压力、温度、pH值、离子强度、渗透压、重量克分子渗透压浓度、氧化应激、一个或多个溶质的浓度、电解质浓度、葡萄

糖浓度、透明质酸浓度、乳酸浓度、白蛋白浓度、腺苷水平、R-2-羟戊二酸水平、丙酮酸浓度、氧浓度和/或存在氧化剂、还原剂或辅助因子,以及对于个体给药部位或作用部位的组织或器官而言,处于正常范围内的其他条件。

[0259] 本申请中采用的“基因修饰细胞”包括含有外源核酸的细胞,无论外源核酸是否整合到细胞的基因组中。

[0260] 本申请中采用的“多肽”可以包括部分或全部蛋白质分子以及任何翻译后修饰或其他修饰。

[0261] 本申请中采用的假型化组件可以包括“结合多肽”以及一种或多种“融合多肽”,其中结合多肽包括识别并结合靶宿主细胞的一种或多种多肽,通常是糖蛋白;融合多肽介导逆转录病毒和靶宿主细胞膜的融合,从而允许逆转录病毒基因组进入靶宿主细胞。本申请中采用的“结合多肽”也称为“T细胞和/或NK细胞结合多肽”或“靶向结合组件”,“融合多肽”也称为“融合组件”。

[0262] “休眠”淋巴细胞,例如休眠T细胞指处于细胞周期G0阶段、不表达活化标记例如Ki-67的淋巴细胞。休眠淋巴细胞可以包括从未遇到过特异性抗原的初始T细胞和以前遇到过的抗原更改的记忆T细胞。“休眠”淋巴细胞也称为“静止”淋巴细胞。

[0263] 本申请中采用的“淋巴细胞清除”包括减少个体淋巴细胞数量的方法,例如通过给予淋巴细胞清除剂。也可以通过部分或全身分割放射治疗来实现淋巴细胞清除。淋巴细胞清除剂可以是向哺乳动物给药时,能够减少哺乳动物中功能性淋巴细胞数量的化合物或组合物。这种药物的一个示例是一种或多种化疗剂。这种药物和剂量是已知的,可以由主治医生根据治疗对象来选择。淋巴细胞清除剂的示例包括但不限于氟达拉滨、环磷酰胺、克拉屈滨、地尼白介素或其组合物。

[0264] 应当理解,本公开及其提供的各方面和实施例不限于所公开的具体示例,当然可以是不同具体实例。还应当理解,本申请中采用的术语仅仅是为了公开具体示例和实施例,而不是为了限制这些具体实例和实施例,因为本公开的范围仅由所附权利要求限定。

[0265] 若给出了数值范围,应当理解,除非上下文另有明确说明,否则在数值范围上限和下限之间的干预值(至下限的十分之一)以及在规定范围内的任何其他规定值或干预值都包含在本公开内容中。根据所述范围内任何明确排除的限值,这些较小范围的上下限可以独立地包括在较小范围内,也包括在本发明中。若所述范围包括一个或两个限值,本发明还包括排除这些所包括限值中的一个或两个的范围。给定范围的多个低值和多个高值时,技术人员应了解,所选范围将包括比高值小的低值。本说明书中的所有标题都是为了方便读者理解,而不具有限制作用。

[0266] 除非另有定义,本发明中采用的所有科技术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员理解的含义相同。尽管在本发明的实践或测试中也可以使用与本发明所述相似或等同的任何方法和材料,但是当前描述的是优选方法和材料。本申请中提到的所有出版物通过引用并入本公开,并且描述了与引用的出版物相关的方法和/或材料。

[0267] 必须注意的是,如本申请和所附权利要求中所使用的,单数形式“一种”、“一个”和“该”包括复数形式,除非上下文另有明确规定。因此,例如,提及的“嵌合抗原受体”包括本领域技术人员已知的多种这样的嵌合抗原受体及其等同物,等等。还应注意的是,权利要求可起草为排除任何可选组件。同样,这一陈述可作为使用“单独”、“仅”等与权利要求要素的

陈述相关的依据,或作为使用“否定”限制的依据。

[0268] 应当理解,为了清楚起见,独立实施例的上下文中描述的本发明的某些特征也可以结合单个实施例予以提供。相反,为了简洁起见,在单个实施例的上下文中描述的本发明的各种特征也可以单独提供或以结合实施例提供。与本发明相关的实施例的所有组合都包含在本发明中,并且在本发明中被公开,就像每个组合都被单独和明确地公开一样。此外,各种实施例和其组件的所有子组合也包括在本发明中,并且在本发明中被公开,就像每个子组合在此被单独和明确公开一样。

具体实施方式

[0269] 本公开通过提供基因修饰淋巴细胞的方法和组合物以及进行过继细胞治疗的方法,克服了这些现有技术挑战,所述过继细胞治疗包括转导T细胞和/或NK细胞,其只需更少体外处理时间,例如24、12或8小时或更少,并且在一些实施例中没有进行事先体外刺激。这些方法非常适合采用封闭系统对个体血液进行体外处理,在实施这些方法时封闭系统与个体处于同一室内,个体的血液或其分离血细胞始终处于视线范围内。更具体地,本申请中公开的各方面和实施例通过提供转导休眠T细胞和/或休眠NK细胞的方法,克服了与当前采用的细胞疗法相关的问题;所述方法通常利用假型化组件促进重组逆转录病毒与休眠T细胞和/或休眠NK细胞的结合和融合,进而促进重组逆转录病毒对休眠T细胞和/或NK细胞的基因修饰。此外,本申请提供的方法通过在各说明性实施例中采用嵌合抗原受体和淋巴增殖组件,克服了本领域的现有问题,其中所述嵌合抗原受体和淋巴增殖组件的表达由体内控制组件调节,使个体与结合体内控制组件的化合物接触,或终止这种接触,从而促进基因修饰的T细胞和/或NK细胞在体内扩增。

[0270] 由于本申请详细公开的这些内容和其他改进内容,一方面,本申请提供了一种用于修饰个体(例如患有疾病或病症的患者)的休眠T细胞和/或休眠NK细胞的方法,其中包括采集个体的血液;休眠T细胞和/或NK细胞通过与重组逆转录病毒接触进行基因修饰;并且基因修饰的细胞通常在比现有方法更短的时间内,例如在24小时内和一些非限制性实施例中,在12小时内和/或不进一步扩大基因修饰的T细胞和/或NK细胞群体的情况下,以体外方式重新引入个体,例如使基因修饰的休眠T细胞和/或NK细胞在体外进行不超过4次的细胞分裂。因此,本申请提供的方法可以在比现有CAR疗法少得多的时间内进行,从而提供了在整个体外步骤期间个体可以留在诊所的方法。这有助于在封闭系统中执行体外步骤,因而降低了患者样本被污染和混合的几率,而且临床实验室执行起来也更容易。

[0271] 因此,图1和2所示为本申请提供的方法中的说明性组合物的示意图。图1提供了包装细胞(100)和这种包装细胞(200)产生的重组逆转录病毒的示意图。包装细胞(100)包括整合到基因组中的重组多核苷酸(110),所述重组多核苷酸包括重组转录组件,所述重组转录组件在诱导型启动子的调节下表达逆转录病毒蛋白和各种不同膜结合多肽,所述诱导型启动子由结合配体并被配体激活的反式激活因子调节。这些反式激活因子、诱导型启动子和配体用于诱导细胞膜结合多肽的顺序表达和积累,这些多肽将被整合到重组逆转录病毒的膜中,以及包装和组装逆转录病毒所必需的逆转录病毒成分中。

[0272] 如下文详细讨论的那样,由于各种多核苷酸的顺序诱导表达,产生了图1所示的说明性包装细胞(100),这种包装细胞可在说明性方法中用来产生重组逆转录病毒;用于转染

本申请提供的休眠T细胞和/或NK细胞(图2中(300))的方法中需要使用这种重组逆转录病毒。在非限制性的说明性实施例中,包装细胞(100)包括在其基因组中对可包装逆转录病毒RNA基因组进行编码的核酸,该基因组包括包装和组装逆转录病毒所需的逆转录病毒基因组的至少一些组件(作为非限制性说明性示例,逆转录病毒psi组件、逆转录病毒gag多肽和逆转录病毒pol多肽)。

[0273] 一些与包装细胞的细胞膜整合或结合的膜结合多肽将被整合或结合到逆转录病毒中,但不由逆转录病毒基因组进行编码。例如,包装细胞和由其形成的重组逆转录病毒可包括逆转录病毒Vpx多肽(250),在非限制性说明性示例中这种多肽可表达为膜相关融合蛋白,例如Src-Flag-Vpx多肽;假型化组件可包括结合多肽和融合多肽(240),在非限制性实施例中包括麻疹病毒血凝素(H)多肽和麻疹病毒融合(F)多肽,或其胞质域缺失变体;可选地,一种或多种活化组件(210,220)在非限制性实施例中包括能够与CD3结合的膜结合多肽和能够与CD28结合的膜结合多肽;和/或任选的膜结合细胞因子(230),其非限制性实施例是包含融合到DAF的IL-7或其片段的融合多肽。本申请提供了这些膜结合多肽的各种其他具体类型。

[0274] 由于转录组件通过包装细胞的连续表达,产生了重组逆转录病毒。RNA逆转录病毒基因组位于包装细胞的基因组内,通常在整合到包装细胞的基因组中后成为重组逆转录病毒的基因组;它包括逆转录病毒产生、感染和整合进宿主细胞,一般为休眠T细胞和/或NK细胞的基因组所必须的逆转录病毒成分(作为非限制性的说明性示例包括逆转录病毒Gag和Pol多核苷酸)。此外,逆转录病毒基因组还包括对本申请提供的一种或通常两种工程化信号多肽进行编码的多核苷酸。淋巴增殖组件通常由一种工程化信号多肽进行编码(在非限制性示例中为组成性白细胞介素7受体突变体),嵌合抗原受体通常由另一种工程化信号多肽进行编码。

[0275] 然后,在本申请提供的方法中,可通过重组逆转录病毒(200)转导休眠T细胞和/或休眠NK细胞(300)。如图2所示,在休眠T细胞和/或NK细胞(300)与重组逆转录病毒(200)接触后,上述逆转录病毒表面的膜多肽与休眠T细胞和/或NK细胞(300)表面的受体和/或配体结合。例如,假型化组件,如上所述,可包括与休眠T细胞和/或休眠NK细胞表面分子结合,并促进逆转录病毒(200)与T细胞和/或NK细胞膜结合和融合的结合多肽,此外还包括融合多肽。活化组件(210,220)通过与T细胞受体复合物结合来激活休眠T细胞和/或NK细胞(300),这一过程发生在接触期间中或接触后的培养期间。此外,膜结合细胞因子(230)可以出现在逆转录病毒的表面,并与休眠T细胞和/或NK细胞(300)表面的细胞因子受体(310)结合,从而进一步促进结合和激活。因此,不囿于理论限制,在本申请提供的各说明性实施例中,由于存在这些重组逆转录病毒(200)成分中的一种或多种,对于未在逆转录病毒(200)之中或之上的组件无需体外刺激或活化。反之,这又缩短了完成本申请提供的这些说明性方法所需要的体外处理时间。

[0276] 与T细胞和/或NK细胞(200)结合后,逆转录病毒与T细胞和/或NK细胞融合(300),使逆转录病毒中的多肽和核酸进入T细胞和/或NK细胞(300)。如上所述,逆转录病毒中的这些多肽中的一种是Vpx多肽(250)。Vpx多肽(250)与SAMHD1限制因子(350)结合并诱导其降解,该限制因子可降解细胞质中的游离dNTP。因此,在Vpx降解SAMHD1的过程中,细胞质中游离dNTP的浓度将递升,同时逆转录活性增强,从而促进逆转录病毒基因组的逆转录并整合

到T细胞和/或NK细胞基因组中。

[0277] 在逆转录病毒基因组整合到T细胞和/或NK细胞(200)中之后,T细胞和/或NK细胞基因组包括对信号多肽进行编码的核酸,其中核酸对淋巴增殖组件(370)编码;和任选的对CAR(360)进行编码的信号多肽。淋巴增殖组件和任选CAR的表达由体内控制组件进行调节。与结合体内控制组件的化合物接触,通过向转导T细胞和/或NK细胞(300)的个体给药时在体内进行,通过表达淋巴增殖组件和任选地由于CAR表达和CAR与其靶细胞结合,可促进T细胞和/或NK细胞(300)在体内增殖。因此,用本申请中的重组逆转录病毒转导的T细胞和/或NK细胞具有一种或多种驱动增殖和/或抑制细胞死亡的信号,这反过来在各说明性实施例中避免了现有方法中,在将转导T细胞和/或NK细胞返回个体体内之前,需要清除宿主淋巴细胞的做法。在各说明性实施例中,这又进一步降低了在转导T细胞和/或NK细胞被重新引入个体之前处理几天的要求。因此,在各说明性实施例中,从对所述个体采血到将血液重新引入个体体内,不得超过36小时、24小时、12小时,或者在某些情况下甚至不超过8小时,这从根本上改变了现有方法的CAR-T过程。此外,体内控制组件也提供了本文所述的安全机制之一。例如,停止施用化合物可以下调甚至终止淋巴增殖组件和任选CAR的表达,从而终止转导T细胞和/或NK细胞及其后代的增殖和/或存活信号。

[0278] 进行过继细胞治疗的方法

[0279] 在某些方面,本申请提供了对个体进行过继细胞治疗的方法,作为说明性示例,该方法可包括以下步骤:

[0280] A.对所述个体采血;

[0281] B.分离包括休眠T细胞和/或休眠NK细胞的外周血单核细胞(PBMC);

[0282] C.使所述个体的休眠T细胞和/或休眠NK细胞与重组逆转录病毒进行体外接触,其中所述重组逆转录病毒包括位于其表面的假型化组件,能够结合休眠T细胞和/或休眠NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合;其中所述接触促进所述重组逆转录病毒转导所述休眠T细胞和/或NK细胞,从而生成基因修饰的T细胞和/或NK细胞;以及

[0283] D.在个体采血后36、24、12甚至8小时内,将基因修饰的细胞重新引入个体,从而对个体中进行过继细胞治疗。

[0284] 就本申请提供的一些方面而言,具有类似步骤的方法均称为对个体的淋巴细胞进行基因修饰和扩增的方法。本领域技术人员应了解,本申请中进行的讨论适用于进行过继细胞治疗的方法和组合物,也适用于对个体的淋巴细胞进行基因修饰和扩增的方法。

[0285] 典型地,本公开的过继细胞治疗方法通过自体移植来进行,其中细胞从接受细胞治疗的个体或取自该个体的样本中分离和/或制备。因此,在一些方面,细胞来源于需要治疗的个体,例如患者,并且细胞在分离和处理后被施用予同一个体。在本申请公开的方法和组合物的一些实施例中,患有疾病或病症的个体进入医疗机构,在那里使用已知方法如静脉穿刺抽取个体的血液。在某些实施例中,从个体抽取的血液量为10、15、20、25、30、35、40、50、75或100ml(按下限)或200、250、300、350、400、500、750、1000、2000或2500ml之间(按上限)。在一些实施例中,从个体抽取10-400ml血液。在一些实施例中,从个体抽取20-250ml血液。在一些实施例中,处理的血液是新鲜的。在本申请公开的任何一个实施例中,新鲜血液可在处理前15、30、45、60、90、120、150或180分钟前从个体抽取。在一些实施例中,在本申请提供的方法中处理而不是储存血液。

[0286] T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒的接触通常有助于重组逆转录病毒转导T细胞和/或NK细胞。在本公开中,转导T细胞和/或NK细胞包括体外转导细胞的后代,其保留了在体外转导过程中整合到细胞的至少一些核酸或多核苷酸。在本申请所述的“重新引入”转导细胞的方法中,应当理解,当从个体的血液中收集这种细胞时,这种细胞通常不处于转导状态。本申请公开的任何一个方面的个体可以是,例如动物、哺乳动物,但在各说明性实施例中是人类。

[0287] 不囿于理论限制,在非限制性的说明性方法中,将对淋巴增殖组件(例如IL7组成性活化突变体)进行编码的多核苷酸由体外输送到可整合进T细胞或NK细胞基因组中的休眠T细胞和/或NK细胞时,为该细胞提供了体内扩增的驱动力,而且无需清除宿主的淋巴细胞。因此,在各说明性实施例中,个体在进行接触的1、2、3、4、5、6、7、10、14、21或28天内,或在进行接触的1个月、2个月、3个月或6个月内,在接触期间,和/或在修饰T细胞和/或NK细胞被重新引入个体的1、2、3、4、5、6、7、10、14、21或28天内,或1个月、2个月、3个月或6个月内,没有接触淋巴细胞清除剂。此外,在非限制性的说明性实施例中,进行本申请提供的方法时,在重组逆转录病毒与个体的休眠T细胞和/或休眠NK细胞接触和/或在整个体外方法中,个体无需接触淋巴细胞清除剂。

[0288] 因此,本公开的一些实施例的特征包括在个体体内扩增基因修饰T细胞和/或NK细胞的方法。在各说明性实施例中,这种方法中没有体外增殖或基本无增殖。

[0289] 在本申请的非限制性的说明性实施例中,从个体抽取血液到在T细胞和/或NK细胞体外转导后,将血液重新引入个体的整个方法/过程需要在48小时、36小时、24小时、12小时、11小时、10小时、9小时、8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时或2小时内完成。在其他实施例中,在本申请的非限制性的说明性实施例中,从个体抽血/采血到T细胞和/或NK细胞体外转导后,将血液重新引入个体的整个方法/过程在1至12小时内、2至8小时内、4至12小时内、4至24小时内、8至24小时内、8至36小时内、8至48小时内、12至24小时内、或12至36小时、或12至48小时内完成,或在15、30、60、90、120、180和240分钟内完成(按下限),或在120、180、240、300、360、420和480分钟内完成(按上限)。在其他实施例中,从个体的血液抽取/采集到T细胞和/或NK细胞体外转导后,将血液重新引入个体的整个方法/过程在1、2、3、4、6、8、10和12小时内进行(按下限),或在8、9、10、11、12、18、24、36或48小时内进行(按上限)。在一些实施例中,在接触发生的时间段之后,将基因修饰的T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒分离。

[0290] 因为本申请提供的用于过继细胞治疗的方法和用于在体内扩增前进行体外休眠T细胞和/或休眠NK细胞修饰的相关方法可以在比现有方法短得多的时间内进行,使得患者护理和安全性以及产品可制造性的根本改进成为可能。所以,在负责批准这些方法的监管机构看来,出于治疗目的在体内实施时,这些方法是有利的。例如,非限制性示例中的个体可以在将修饰T细胞和/或NK细胞重新引入患者体内之前,在样本被处理的整个过程中,与处理其血液或样本的仪器处于同一建筑(例如门诊输液室)或房间内。在非限制性的说明性实施例中,对于从个体抽血/采血到T细胞和/或NK细胞体外转导后将血液重新引入个体的整个方法/过程,个体需要保持在位点线内和/或与其正在处理的血液或细胞相距100、50、25或12英尺或一臂之距。在其他非限制性的说明性实施例中,从个体抽血/采血到T细胞和/或NK细胞体外转导后将血液重新引入个体的整个方法/过程和/或之后,个体处于清醒状态

和/或至少一个人可以持续监控正在处理的个体的血液或细胞。由于本申请所提供的改进,从个体抽血/采血到T细胞和/或NK细胞体外转导后将血液重新引入个体,用于过继细胞治疗和/或用于转导休眠T细胞和/或NK细胞的整个方法/过程可安排人员持续监测。在其他非限制性的说明性实施例中,从个体抽血/采血到T细胞和/或NK细胞体外转导后将血液重新引入个体的整个方法/过程中的任何时候都不是在没有人在场的房间内培养血细胞。在其他非限制性的说明性实施例中,从个体抽血/采血到T细胞和/或NK细胞体外转导后将血液重新引入个体的整个方法/过程在个体旁边和/或与个体在同一房间中和/或个体的床或椅子旁边进行。因此,可以避免样本身份混淆,也可以避免在几天或几周的时间里进行长时间和昂贵的培养工作。此外,本申请提供的方法很容易适用于封闭的自动化血液处理系统,其中将重新引入个体的血液样本及其成分仅与一次性成分接触。

[0291] 本申请提供的进行过继细胞治疗的方法通常包括转导休眠T细胞和/或NK细胞的方法,这些方法本身构成了本公开的不同方面。本领域技术人员应了解,本申请提供的用于转导T细胞和/或NK细胞的细节可以应用于包括这些步骤的任何方面。因此,在某些方面,本申请提供了一种转导T细胞和/或NK细胞、通常是休眠T细胞和/或休眠NK细胞的方法,该方法包括使休眠T细胞和/或休眠NK细胞与重组逆转录病毒接触,其中重组逆转录病毒通常包括位于其表面的假型化组件,所述假型化组件能够与休眠T细胞和/或NK细胞结合并促进重组逆转录病毒与这些细胞的膜融合,其中所述接触(和接触条件下的培养)有助于重组逆转录病毒转导休眠T细胞和/或NK细胞,从而产生基因修饰的T细胞和/或NK细胞。该方法的其他实施例可包括逆转录病毒、淋巴增殖组件、CAR、假型化组件、核糖开关、活化组件、膜结合细胞因子、miRNA和/或本申请公开的其他组件的任何实施例。这种转导T细胞和/或NK细胞的方法可以在试管内或体外进行。

[0292] 在用于过继细胞治疗的方法和本申请提供的包括体外转导休眠T细胞和/或休眠NK细胞的任何方法中,通常在细胞与重组逆转录病毒接触之前,将中性粒细胞/粒细胞与血细胞分离。在一些实施例中,包括外周血淋巴细胞(PBL)如T细胞和/或NK细胞的外周血单核细胞(PBMC)使用例如单采和/或密度梯度离心法与血样的其他成分分离。在一些实施例中,在处理PBMC和/或T细胞和/或NK细胞、使其与重组逆转录病毒接触、进行转导或转染之前,将去除中性粒细胞。治疗个体的细胞可以是同种异体细胞和/或自体细胞。

[0293] 作为非限制性示例,在一些实施例中,使用Sepax或Sepax 2细胞处理系统(BioSafe)分离用于执行PBMC的细胞。在一些实施例中,使用CliniMACS Prodigy细胞处理器(Miltenyi Biotec)分离PBMC。在一些实施例中,使用自动单采分离器给个体抽血,在血液通过分选特定细胞类型(例如PBMC)的设备后,将剩余部分返回个体体内。密度梯度离心可以在单采后进行。在一些实施例中,使用白细胞减少过滤装置分离PBMC。在一些实施例中,采用磁珠激活的细胞分选法根据细胞表型(即阳性选择)纯化PBMC中的特定细胞群体,例如PBL或其子集。也可以使用其他纯化方法,例如底物粘附或阴性选择,前者利用的底物可模拟浸润时T细胞遇到的环境,使其能粘附和迁移;后者可将不需要的细胞用抗体复合物靶向去除。在一些实施例中,红细胞玫瑰花环可用于纯化细胞。

[0294] 在本申请提供的任何相关方面的一些说明性实施例中,PBL包括T细胞和/或NK细胞。在本申请的某些实施例中,例如在修饰淋巴细胞的方法和进行过继细胞治疗的方法中,与本公开的重组逆转录病毒接触的T细胞和/或NK细胞主要是休眠T细胞。在一些实施例中,

T细胞和/或NK细胞由95%至100%的休眠细胞(Ki-67⁻)组成。在一些实施例中,与重组逆转录病毒接触的T细胞和/或NK细胞包括90%、91%、92%、93%、94%和95%的休眠细胞(按下限),或96%、97%、98%、99%或100%的休眠细胞(按上限)。在一些实施例中,T细胞和/或NK细胞包括初始细胞。

[0295] 在本申请公开的方法和组合物的一些实施例中,T细胞和/或NK细胞在体外与重组逆转录病毒接触,以基因修饰T细胞和/或NK细胞,使其在被再次引入个体体内时影响靶向免疫应答。在接触期间,重组逆转录病毒识别T细胞和/或NK细胞并与其结合,此时逆转录病毒和宿主细胞膜开始融合。然后,通过转导过程,重组逆转录病毒中的遗传物质进入T细胞和/或NK细胞,并整合进宿主细胞DNA中。慢病毒转导的方法是已知的。描述了示例性方法,例如王等人(2012)《免疫治疗期刊》35(9):689-701;Cooper等人(2003)《血液》101:1637-1644;Verhoeyen等人(2009)《分子生物学方法》506:97-114;和Cavalieri等人(2003)《血液》杂志102(2):497-505。

[0296] 本申请提供的许多方法包括转导T细胞和/或NK细胞。本领域已知的方法是用逆转录病毒如慢病毒体外转导T细胞和/或NK细胞。在各说明性实施例中,本申请提供的方法不需要体外刺激或激活。因此,尽管在转导过程中可能存在体外刺激分子,如抗CD3和/或抗CD28的磁珠,但在本方法中可以避免现有方法中的这一常见步骤。然而,利用本申请提供的说明性方法,不需要体外刺激。在某些示例性方法中,可以使用3-10个MOI(感染复数)单位的逆转录病毒;在一些实施例中,可以使用5-10个MOI单位的逆转录病毒,例如慢病毒。

[0297] 如本申请所述,转导反应可以在封闭系统如Sepax系统中进行,其中转导反应可以在系统的一次性袋中进行。从个体采集的血样中提取的血细胞,如PBMC,一旦从粒细胞,包括中性粒细胞中分离和/或纯化后,就可以在袋中与本申请公开的重组逆转录病毒接触,接触步骤(即转导反应)中一般不存在中性粒细胞。

[0298] 逆转录病毒可引入包含分离PBMC的袋中,从而接触PBMC。在一些示例中,从对所述个体采血到将血细胞如PBMC加入转导反应袋可间隔30分钟到4小时、30分钟到2小时,或大约1小时。可向转导反应混合物中添加将添加剂如培养基、人血清白蛋白、人AB+血清和/或源自个体的血清。一般需要采用介质,例如本领域已知的用于体外过程的介质(作为非限制性示例,X-VIVO 15(Lonza)或CTS介质(赛默飞世尔科技公司))。可向转导反应混合物中加入支持性细胞因子,例如IL2、IL7或IL15,或者HSA中发现的细胞因子。

[0299] 转导反应混合物可以在23℃和39℃之间培养,在一些说明性实施例中在37℃下培养。在某些实施例中,转导反应可以在37-39℃进行,以加快融合/转导。dGTP可以加入到转导反应中。转导反应混合物可培养1至12小时,在一些实施例中,培养6至12小时。转导后,在转导的T细胞和/或NK细胞被输注回个体体内之前,从转导反应混合物中洗出细胞。例如,该系统如Sepax仪器,可用于在转导细胞被输注回个体体内之前,用如10-50ml洗出液洗出细胞。在一些实施例中,在处理PBMC和/或T细胞和/或NK细胞、使其与重组逆转录病毒接触、进行转导或转染之前,将去除中性粒细胞。

[0300] 在进行过继细胞治疗的一个说明性实施例中,从个体采血并将血液置于血袋后,将血袋连接到细胞处理系统,例如Sepax细胞处理系统。使用细胞处理系统分离的PBMC被收集到袋中,在足以转导T细胞和/或NK细胞的条件下与重组逆转录病毒接触,并进行培养。在培养后,将含有PBMC和重组逆转录病毒混合物的袋连接到细胞处理系统上,并洗涤PBMC。将

洗涤后的PBMC收集到一个袋子中,然后再次注入个体体内。在一些实施例中,从采集血液到再输注转导的T细胞和/或NK细胞的整个方法在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18或24小时内进行。在各说明性实施例中,整个方法在12小时内执行。

[0301] 在一些实施例中,重组逆转录病毒的靶细胞是PBLs在一些实施例中,靶细胞是T细胞和/或NK细胞。在一些实施例中,T细胞是辅助T细胞和/或杀伤T细胞。

[0302] 在一些实施例中,本申请提供的重组逆转录病毒包括位于其表面的假型化组件,能够与T细胞和/或NK细胞结合并促进重组逆转录病毒的膜融合。在其他实施例中,重组逆转录病毒包括位于其表面的活化组件,能够与休眠T细胞和/或NK细胞结合。在其他实施例中,重组逆转录病毒包括位于其表面的膜结合细胞因子。在一些实施例中,重组逆转录病毒包括具有一个或多个转录单元的多核苷酸,所述转录单元对一种或多种工程化信号多肽进行编码,其中一种或多种工程化信号多肽包括淋巴增殖组件。在其他实施例中,使用两种信号多肽时,一种包括淋巴增殖组件,另一种通常是包括抗原特异性靶向区(ASTR)、跨膜域和胞内激活域的嵌合抗原受体(CAR)。如本申请所述,通常与本申请所提供的重组逆转录病毒表面相关的活化组件能够在适当的条件下与休眠T细胞和/或NK细胞接触足够长的时间,并且由于这种激活作用,活化组件还能激活休眠T细胞和/或NK细胞。应当理解,这种激活作用在本申请方法的接触步骤期间随着时间的推移而发生。此外,应当理解,在一些实施例中,在结合T细胞和/或NK细胞的重组逆转录病毒表面发现假型化组件时,在本申请的方法中,可通过假型化组件的结合来诱导激活。在那些实施例中,活化组件是可选的。

[0303] 关于假型化组件、活化组件、膜结合细胞因子、工程化信号多肽、淋巴增殖组件和CAR的更多细节,在本申请的其他部分进行了描述。

[0304] 在本申请公开的方法和组合物的一些实施例中,从血液中采集的总淋巴细胞的5%至90%被转导。在一些实施例中,被转导的淋巴细胞百分比为5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%和60%(按下限),或50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%和90%(按上限)。在一些实施例中,被转导的淋巴细胞为至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%或至少60%。

[0305] 在本申请公开的方法和组合物的一些实施例中,基因修饰的T细胞和/或NK细胞被引入、重新引入或注入个体体内,而无需其他体外操作,例如刺激和/或激活T细胞和/或NK细胞。在现有技术的方法中,在将基因修饰的T细胞和/或NK细胞引入个体之前,通过体外操作刺激/激活T细胞和/或NK细胞,并扩增基因修饰的T细胞和/或NK细胞。在现有技术的方法中,这通常需要几天或几周时间,并且个体还需要在初次抽血后几天或几周回到诊所输血。在本申请公开的方法和组合物的一些实施例中,在T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触之前,不需要通过接触抗CD3/抗CD28载体,如涂有抗CD3/抗CD28的磁珠,对T细胞和/或NK细胞进行体外刺激。本申请提供了一种无体外增殖的方法。在其他实施例中,基因修饰的T细胞和/或NK细胞不进行体外扩增,或扩增仅满足少量细胞分裂(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10轮细胞分裂),但在体内,即在个体体内会扩增,或主要扩增。在一些实施例中,不需要添加额外的培养基,使细胞进一步扩增。在一些实施例中,当PBL与重组逆转录病毒接触时,PBL不制造细胞。在各说明性实施例中,PBL在体外时,PBL不制造细胞。在以前的过继细胞治疗方法中,再次输注基因修饰的T细胞和/或NK细胞之前,个体清除了淋巴细胞。在一些实施

例中,在抽取血液之前,患者或个体未清除淋巴细胞。在一些实施例中,患者或个体在用基因修饰的T细胞和/或NK细胞回输之前没有清除淋巴细胞。

[0306] 在本申请公开的实施例的任一例中,重新输注到个体的T细胞和/或NK细胞的数量可为 1×10^3 、 2.5×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 2.5×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 2.5×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 2.5×10^6 、 5×10^6 和 1×10^7 细胞/kg(按下限)或 5×10^4 、 1×10^5 、 2.5×10^5 、 5×10^5 和 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 ,和 1×10^8 细胞/kg(按上限)。在说明性实施例中,重新输注到个体体内的T细胞和/或NK细胞的数量为 1×10^4 、 2.5×10^4 、 5×10^4 ,以及 1×10^5 细胞/kg(按上限)。在一些实施例中,重新输注到个体体内的PBL可以少于 5×10^5 、 1×10^6 、 2.5×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 ,和 1×10^8 个细胞(按下限),以及 2.5×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2.5×10^8 、 5×10^8 ,和 1×10^9 个细胞(按上限)。在一些实施例中,可重新输注到70kg个体或患者体内的T细胞和/或NK细胞的数量为 7×10^5 至 2.5×10^8 个细胞。在其他实施例中,可用于转导的T细胞和/或NK细胞的数量为约 $7 \times 10^6 \pm 10\%$ 。

[0307] 在本申请公开的方法中,从抽取血液到重新输注基因修饰T细胞和/或NK细胞,整个过继细胞治疗过程可以有利地在比先前方法更短的时间内进行。在一些实施例中,整个过继细胞治疗过程可以在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18或24小时内进行。在各说明性实施例中,整个过继细胞治疗过程可在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12小时内进行。在一些实施例中,整个过继细胞治疗过程可以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或15小时(按下限)内进行,或在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18或24小时(按上限)内进行。

[0308] 在本申请提供的一些实施例中,封闭系统中进行的步骤包括:抽取个体血样,使T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触和/或将基因修饰的T细胞和/或NK细胞引入个体体内。封闭系统是一种培养过程,通常在封闭或完全封闭的情况下进行以防止污染。本发明的优点在于,提供在封闭系统中进行CAR治疗的方法。细胞处理过程中最大的安全和监管控制的风险之一是经常暴露于环境中的污染风险,这在传统的开放式细胞培养系统中较常见。为了减轻这种风险,特别是在不使用抗生素的情况下,已经开发出一些商用方法,重点在于一次性设备的使用。然而,即使在无菌条件下,开瓶取样或增加额外的生长培养基也始终存在污染风险。为了克服这个问题,本申请提供了一种封闭系统过程,设计用于在不接触外部环境操作。因为由于外部环境通常不是无菌的,这样做便很重要。物质转移通过无菌连接或焊接管进行。换气时,空气通过气体渗透膜或类似的其他附加物,经 $0.2 \mu\text{m}$ 过滤器来防止环境暴露。

[0309] 在一些实施例中,封闭系统包括连接到个体体内循环系统的体外循环系统,使抽取血液循环到体外循环系统后再引入个体体内。在一些实施例中,体外循环系统包括用于分离PBL的系统或装置和/或用于分离T细胞和/或NK细胞的系统或装置,以及使细胞与重组逆转录病毒接触的系统或装置。在一些实施例中,封闭系统不允许T细胞和/或NK细胞暴露于空气中。

[0310] 这种封闭系统方法可通过市场上可买到的设备来进行。例如,该方法可以在适于封闭系统T细胞生产的设备中进行。这些设备包括G-RexTM、WAVE BioreactorTM、OriGen PermaLifeTM袋和VueLife[®]袋。

[0311] 在本申请公开的方法和组合物的一些实施例中,个体体内的基因修饰T细胞和/或NK细胞与存在于其中的体内控制组件结合的化合物接触,其中体内控制组件是由重组逆转

录病毒引入的遗传物质的一部分。在一些实施例中,体内控制组件可以是分子伴侣。在本申请公开的任何一个实施例中,化合物可以是核苷类似物。在一些实施例中,核苷类似物可以是核苷类似物抗病毒药物,其中抗病毒药物是经食品和药物管理局批准用于抗病毒治疗的化合物或美国抗病毒药物临床试验中使用的化合物。在各说明性实施例中,化合物可以是阿昔洛韦或喷昔洛韦。在一些实施例中,化合物可以是喷昔洛韦的口服前药泛昔洛韦或阿昔洛韦的口服前药伐昔洛韦。化合物与体内控制组件的结合影响了引入的遗传物质的表达,并因此影响基因修饰的T细胞和/或NK细胞的增殖。

[0312] 在一些实施例中,在从个体血液中分离PBL之前、同时和/或之后,以及在T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触之前,对个体施用核苷类似物抗病毒药物或前药,例如阿昔洛韦、伐昔洛韦、喷昔洛韦或泛昔洛韦。在一些实施例中,在从血液中分离PBL之前或在T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触之前5、10、15、30和60分钟(按下限),或1.5、2、3、4、5、6、8、12或24小时(按上限),对个体施用核苷类似物抗病毒药物或前药。在其他实施例中,根据本申请提供的方法,在从血液中分离PBL且T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触后1.5、2、3、4、5、6、8、12或24小时(按下限),或 $1/2$ 、1、2、3、4、5、6、7、10、14、21或28天,对个体施用核苷类抗病毒药物或前药。在一些实施例中,根据本申请提供的方法,在从血液中分离PBL且T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触后至少1.5、2、3、4、5、6、8、12或24小时,或至少2、3、4、5、6、7、10、14、21或28天,对个体施用核苷类似物抗病毒药物或前药。在一些实施例中,在将PBL重新输注到个体体内至少1、2、3、4、5、7、10、14、21、28、30、60、90或120天,或5、6、9、12、24、36、48、60、72、84、96、120月或无限期,对个体施用核苷类抗病毒药物或前药。在本申请公开的任何一个实施例中,可在重新输注PBL前和/或期间和/或重新输注PBL之后,对个体施用核苷类抗病毒药物或前药。

[0313] 在一些实施例中,按每日一次、两次、三次或四次的频率对个体施用与体内控制组件结合的化合物。在一些实施例中,按日剂量持续服用化合物1周、2周、4周、3个月、6个月、1年或无限期服用,直到个体不再患病,如无癌症。如本申请详细公开的那样,在各说明性实施例中这种药物是一种与核苷类似物如核糖开关结合的核苷类似物抗病毒药物。

[0314] 在本申请提供的方法中,利用本领域已知的方法传送药物,无论是小分子或生物制剂。在本发明的方法中,任何此类方法均可用于传送药物或候选化合物或抗体。例如,常见的给药途径包括非干预性口服(经口)、局部给药(经皮肤)、经粘膜给药(经鼻、颊/舌下、阴道、眼和直肠)和吸入给药途径。许多蛋白质和肽类药物,如单株抗体,必须通过注射或纳米针阵列提供。例如,许多免疫接种是基于蛋白质药物传递,通常通过注射完成。

[0315] 工程化信号多肽

[0316] 在一些实施例中,用于接触T细胞和/或NK细胞的重组逆转录包括多核苷酸,所述多核苷酸包括对一个或多个工程化信号多肽进行编码的一个或多个转录单元,其中一个或多个工程化信号多肽包括淋巴增殖组件。在一些实施例中,信号多肽包括以下的任意组合:胞外抗原结合域(或抗原特异性靶向区或ASTR)、茎部、跨膜域、胞内激活域、淋巴增殖组件、调节域(如共刺激域)和T细胞存活基序。在各说明性实施例中,至少一个、两个或所有工程化信号多肽是CAR。在一些实施例中,使用两个信号多肽时,一个信号多肽对淋巴增殖组件进行编码,另一个信号多肽对嵌合抗原受体(CAR)进行编码,其中嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区(ASTR)、跨膜域和胞内激活域。在其他实施例中,CAR可包括与抗原特异性靶向

区融合的淋巴增殖组件。在其他实施例中,淋巴增殖组件是组成性活化的白细胞介素受体(如IL-7R α 的已知变体)时,不需要抗原特异性靶向区,因为结合并不取决于配体存在与否。本领域的普通技术人员将能够重新配置系统,从而通过本申请公开的方法和化合物中使用的类似或不同控制组件将淋巴增殖组件和CAR放置在不同的多核苷酸上。技术人员应了解,这种工程多肽也可以称为重组多肽。

[0317] 抗原特异性靶向区

[0318] 在一些实施例中,工程化信号多肽包括特异性结合对的成员,通常为ASTR,有时称为抗原结合域。特异性结合对包括但不限于抗原抗体结合对、配体受体结合对等。因此,适用于本公开的工程化信号多肽的特异性结合对的成员有ASTR,包括抗体、抗原、配体、配体的受体结合域、受体、受体的配体结合域和亲和体。

[0319] 一种适用于本公开的工程化信号多肽的ASTR可以是任何抗原结合多肽。在某些实施例中,ASTR为抗体,如全长抗体、单链抗体、Fab片段、Fab'片段、(Fab')₂片段、Fv片段和二价单链抗体或双抗体。

[0320] 在一些实施例中,ASTR是单链Fv(scFv)。在一些实施例中,重链位于工程化信号多肽中轻链的N端。在其他实施例中,轻链位于工程化信号多肽中重链的N端。在任何一种公开的实施例中,可按本申请详细讨论的那样,通过接头将重链和轻链分隔开。在任何一种公开的实施例中,重链或轻链可以位于工程化信号多肽的N端,通常是另一域的C端,如信号序列或肽。

[0321] 其他基于抗体的识别域,如cAb VHH(骆驼抗体可变域)和人源化抗体,IgNAR VH(鲨鱼抗体可变域)和人源化抗体,sdAb VH(单域抗体可变域)和“骆驼化”抗体可变域适于与工程化信号多肽结合使用,也适于使用了本公开的工程化信号多肽的方法。在某些情况下,基于T细胞受体(TCR)的识别域,如单链TCR(scTv、含V α V β 的单链双域TCR)也适合使用。

[0322] 在一些实施例中,ASTR可以为多特异性抗体,如双特异性抗体。多特异性抗体能结合至少两个不同位点的特异性。在某些实施例中,一个结合特异性用于一个靶抗原,另一个结合特异性用于另一个靶抗原。在一些实施例中,双特异性抗体可与靶抗原的两个不同表位结合。双特异性抗体也可用于将细胞毒性药物定位到表达靶抗原的细胞中。双特异性抗体可制备为全长抗体或抗体片段。

[0323] 一种适用于本公开的工程化信号多肽的ASTR可以有多种抗原结合特异性。在某些情况下,抗原结合域对于靶细胞表达(合成)的抗原中的表位具有特异性。在一个示例中,靶细胞是肿瘤细胞相关抗原。癌细胞相关抗原可以是以下相关抗原,例如乳腺癌细胞、B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、间皮瘤、肺癌细胞(例如小细胞肺癌细胞)、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、间皮瘤细胞、肺癌细胞(例如小细胞肺癌细胞)、非霍奇金B细胞淋巴瘤(B-NHL)细胞、黑色素瘤细胞、慢性淋巴细胞白血病细胞、急性淋巴细胞白血病细胞、神经母细胞瘤细胞、神经胶质瘤细胞、胶质母细胞瘤细胞、成神经管细胞瘤细胞、大肠癌细胞等。癌细胞相关抗原也可以由非癌细胞表达。

[0324] 与工程化信号多肽的ASTR结合的抗原的非限制性示例包括CD19、CD20、CD38、CD30、ERBB2、CA125、MUC-1、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、CD44表面黏附分子、间皮素、癌胚抗原(CEA)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFRvIII、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)、高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、MAGE-A1、IL-13R-a2、GD2、Ax1、Ror2等。

[0325] 在某些情况下,适用于工程化信号多肽的特定结合对的成员为ASTR,它是受体的配体。配体包括但不限于细胞因子(例如IL-13等)、生长因子(例如调蛋白、血管内皮生长因子等)、整合素结合肽(例如,包含序列Arg-Gly-Asp的肽)等。

[0326] 当工程化信号多肽中特异性结合对的成员是配体时,工程化信号多肽可以在特异性结合对的第二成员的参与下激活,其中特异性结合对的第二成员是配体的受体。例如,当配体是VEGF时,特异性结合对的第二成员可以是VEGF受体,包括可溶性VEGF受体。

[0327] 如上所述,在某些情况下,工程化信号多肽中包含的特异性结合对的成员是ASTR,它是受体,例如配体受体、共受体等。受体可以是受体的配体结合片段。适合的受体包括但不限于生长因子受体(例如,VEGF受体)、杀伤细胞凝集素样受体亚家族K,成员1(NKG2D)多肽(MICA、MICB和ULB6的受体)、细胞因子受体(例如,IL-13受体、IL-2受体等)、CD27、天然细胞毒性受体(NCR)(例如,NKP30(NCR3/CD337)多肽(HLA-B相关转录物3(BAT3)和B7-H6的受体等)等。

[0328] 茎部

[0329] 在一些实施例中,工程化信号多肽包括位于细胞外,并介于ASTR和跨膜域之间的工程化信号多肽部分中的茎部。在某些情况下,茎部与野生型CD8茎部区具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性(FCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP(SEQ ID NO:80)),或与野生型免疫球蛋白重链茎部区具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的一致性。在工程化信号多肽中,所用茎部允许存在抗原特异性靶向区,通常,整个工程化信号多肽与靶抗原的结合能力增强。

[0330] 茎部区可为约4个氨基酸至约50个氨基酸的长度,例如约4aa至约10aa、约10aa至约15aa、约15aa至约20aa、约20aa至约25aa、约25aa至约30aa、约30aa至约40aa或约40aa至约50aa

[0331] 在某些情况下,工程化信号多肽的茎部包括至少一个半胱氨酸。例如,在某些情况下,茎部可以包括序列Cys-Pro-Pro-Cys(SEQ ID NO:62)。如有,第一工程化信号多肽的茎部中的半胱氨酸可与第二工程化信号多肽的茎部形成二硫键。

[0332] 茎部可包括本领域已知的免疫球蛋白铰链区氨基酸序列;例如,Tan等人.(1990年)《美国国家科学院院刊》87:162;和Huck等人.(1986)《核酸研究》14:1779。作为非限制性示例,免疫球蛋白铰链区可包括一个域,所述域与以下任一氨基酸序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:DKTHT(SEQ ID NO:63)、CPPC(SEQ ID NO:62)、CPEPKSCDTPPPCPR(SEQ ID NO:64)(见,例如Glaser等人(2005)《生物化学杂志》280:41494)、ELKTPLGDTTHT(SEQ ID NO:65)、KSCDKTHTCP(SEQ ID NO:66)、KCCVDCP(SEQ ID NO:67)、KYGPPCP(SEQ ID NO:68)、EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:69)(人IgG1铰链)、ERKCCVECP(CP)(SEQ ID NO:70)(人IgG2铰链)、ELKTPLGDTTHTCP(CP)(SEQ ID NO:71)(人IgG3铰链)、SPNMVPHAHHAQ(SEQ ID NO:72)(人IgG4铰链)等。茎部可包括具有人IgG 1、IgG 2、IgG 3或IgG 4铰链的氨基酸序列的铰链区。与野生型(天然存在的)铰链区相比,茎部可包括一个或多个氨基酸置换和/或插入和/或删除。例如,人类IgG 1铰链的His229可以被Tyr置换,使茎部包括序列EPKSCDKTYTCPPCP(参见,例如,Yan等人),(2012年)《生物化学杂志》287:5891)。茎部可包括来源于人CD8的氨基酸序列;例如,茎部可包括氨基酸序列TTTPAPR

PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:73) 或其变体。

[0333] 跨膜域

[0334] 本公开的工程化信号多肽可包括用于插入真核细胞膜的跨膜域。跨膜域可以介于 ASTR 和共刺激域之间。跨膜域可插入茎部和共刺激域之间,使嵌合抗原受体从氨基末端 (N 端) 到羧基末端 (C 端) 依次包括:ASTR、茎部、跨膜域和激活域。

[0335] 将多肽插入真核 (例如哺乳动物) 细胞的细胞膜的任何跨膜 (TM) 域适用于本申请公开的各方面和实施例。适用于本申请提供的任何方面或实施例的 TM 域的非限制性示例,包括一个域,所述域与以下任一 TM 域中的至少 10、15、20 个或所有氨基酸的片段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列一致性:a) CD* α (IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:46)); b) CD8 β (LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC (SEQ ID NO:47)); c) CD4 (ALIVLGGVAGLLLLFIGLIGFCVRC (SEQ ID NO:48)); d) CD3Z (LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV (SEQ ID NO:49)); e) CD28 (FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:50)); f) CD134 (OX40): (VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL (SEQ ID NO:51)); g) CD7 (ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA (SEQ ID NO:52)); h) CD8TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:75)); 及 i) CD28IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:76))。

[0336] 作为非限制性示例,本发明一个方面的跨膜领域可与 SEQ ID NO:46 的跨膜域、CD8 β 跨膜域、CD4 跨膜域、CD3- ζ 跨膜域、CD28 跨膜域、CD134 跨膜域或 CD7 跨膜域具有至少 80%、90% 或 95% 的序列一致性。

[0337] 胞内激活域

[0338] 激活后适用于本公开的工程化信号多肽的胞内激活域通常包括产生一个或多个细胞因子、增多细胞死亡和/或增殖增强的 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、自然杀伤 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和/或中性粒细胞。在本申请中,激活域也可以称为活化域。

[0339] 在一些实施例中,胞内激活域包括下文所述的至少一个 (如一、二、三、四、五、六等) ITAM 基序。在一些实施例中,胞内激活域包括 DAP10/CD28 型信号链。在一些实施例中,胞内激活域没有共价连接到膜结合的工程化信号多肽上,而是在细胞质中扩散。作为非限制性示例,本发明的一个方面的胞内激活域与下文所述的 CD3Z、CD3D、CD3E、CD3G、CD79A、DAP12、FCER1G、DAP10/CD28 或 ZAP70 域具有至少 80%、90% 或 95% 的序列一致性。

[0340] 适用于本公开中工程化信号多肽的胞内激活域包括免疫受体酪氨酸活化基序。一个 ITAM 基序是 YX_1X_2L/I , 其中 X_1 和 X_2 是独立的任何氨基酸。在某些情况下,工程化信号多肽的胞内激活域包括 1、2、3、4 或 5 个 ITAM 基序。在某些情况下,一个 ITAM 基序是在胞内激活域中重复两次,其中 ITAM 基序的第一和第二个实例由 6 到 8 个氨基酸 (例如, $(YX_1X_2L/I)(X_3)_n$ (YX_1X_2L/I)) 分开,其中 n 是从 6 到 8 的整数, $6-8X_3$ 可以是任何氨基酸。在某些情况下,工程化信号多肽的胞内激活域包括 3 个 ITAM 基序。

[0341] 适合的胞内激活域可以是源自含 ITAM 基序的多肽中含 ITAM 基序的部分。例如,适合的胞内激活域可以是源自含 ITAM 基序的蛋白质中含 ITAM 基序的域。因此,适合的胞内激活域不需要包含源自激活域的整个蛋白质序列。适合的含 ITAM 基序的多肽的示例包括但不限于:CD3Z (CD3- ζ)、CD3D (CD3 δ)、CD3E (CD3 ϵ)、CD3G (CD3 γ)、CD79A (抗原受体复合物相关蛋

白 α 链)、DAP12和FCER1G (Fc ϵ 受体I γ 链)。

[0342] 在某些情况下,胞内激活域来源于T细胞表面糖蛋白CD3- ζ (又称CD3Z、T细胞受体T3 ζ 链、CD247、CD3- ζ 、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ)等。例如,适合的胞内激活域可包括一个域,所述域与以下序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段,或整个以下氨基酸序列(2个亚型)中约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)的连续片段(约110 aa至约115 aa、约115 aa至约120 aa、约120 aa至约130 aa、约130至约140 aa、约140 aa至约150 aa或约150 aa至约160 aa),具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性:

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQL**YNEL**NLGRREE**YDVL**DKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEG**LYNEL**QKDKMAE**AYSEI**GMKGERRRGKGHDGL**YQGL**STATKDT**YDAL**HMQALPPR (SEQ ID NO:11)或
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQL**YNEL**NLGRREE**YDVL**DKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEG**LYNEL**QKDKMAE**AYSEI**GMKGERRRGKGHDGL**YQGL**STATKDT**YDAL**HMQALPPR (SEQ ID NO:12),其中
ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0343] 同样,适合的胞内激活域多肽可包括全长CD3- ζ 氨基酸序列中含ITAM基序的部分。因此,适合的胞内激活域可包括一个域,所述域与以下序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段,或以下氨基酸序列中约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)的连续片段(约110 aa至约115 aa、约115 aa至约120aa、约120 aa至约130 aa、约130至约140 aa、约140 aa至约150 aa或约150 aa至约160 aa),具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQL**YNEL**NLGRREE**YDVL**DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG**LYNEL**QKDKMAE**AYSEI**GMKGERRRGKGHDGL**YQGL**STATKDT**YDAL**HMQALPPR (SEQ ID NO:13)、
RVKFSRSADAPAYQQGQNQL**YNEL**NLGRREE**YDVL**DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG**LYNEL**QKDKMAE**AYSEI**GMKGERRRGKGHDGL**YQGL**STATKDT**YDAL**HMQALPPR (SEQ ID NO:81)、
NQL**YNEL**NLGRREE**YDVL**DKR (SEQ ID NO:14)、
EGL**YNEL**QKDKMAE**AYSEI**GMK (SEQ ID NO:15)或DGL**YQGL**STATKDT**YDAL**HMQ (SEQ ID NO:16),其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0344] 在某些情况下,胞内激活域来源于T细胞表面糖蛋白CD3 δ 链(也称为CD3D、CD3- δ 、T3D、CD3抗原、 δ 亚基、CD3 δ 、CD3d抗原、 δ 多肽(TiT3复合物)、 δ 链、t细胞受体T3 δ 链、t细胞表面糖蛋白CD3 δ 链等)。因此,适合的胞内激活域可包括一个域,所述域与以下序列中至少10、15、20个或所有氨基酸的片段或以下氨基酸序列中约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)的连续片段(约110 aa至约115 aa、约115 aa至约120 aa、约120 aa至约130 aa、约130至约140 aa、约140 aa至约150 aa或约150 aa至约160 aa)具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:

MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTGTLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDESTVQVHYR
MCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQV**YQPL**RDRDDAQ**YSHL**GGNWARNK (SEQ ID NO:17) 或
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTGTLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDESTVQVHYR
TADTQALLRNDQV**YQPL**RDRDDAQ**YSHL**GGNWARNK (SEQ ID NO:18),其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0345] 同样,适合的胞内激活域多肽可包括全长CD3 δ 氨基酸序列中含ITAM基序的部分。因此,适合的胞内激活域可包括一个域,所述域与以下序列中至少10、15、20或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或

100%的序列一致性: DQV**YQPL**RDRDDA**QYSHL**GGN (SEQ ID NO:19), 其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0346] 在某些情况下, 胞内激活域源自T细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链(也称为CD3 ϵ 、T细胞表面抗原T3/Leu-4 ϵ 链、T细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链、AI504783、CD3、CD3 ϵ 、T3 ϵ 等)。因此, 适合的胞内激活域可包括一个域, 所述域与以下序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段, 或以下氨基酸序列中约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)的连续片段(约110 aa至约115 aa、约115 aa至约120 aa、约120 aa至约130 aa、约130至约140 aa、约140 aa至约150 aa或约150 aa至约160 aa), 具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEMGGITQTPYKVISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIGSDEDHLSLKEFSELE
QSGYVVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDSVATIVVDICITGGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPPV

PNPD**YEPI**IRKGQRDL**YSGL**NQRRI (SEQ ID NO:20), 其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0347] 同样, 适合的胞内激活域多肽可包括全长CD3 ϵ 氨基酸序列中含ITAM基序的部分。因此, 适合的胞内激活域可包括一个域, 所述域与以下序列中至少10、15、20或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性: NP**DYEPI**IRKGQRDL**YSGL**NQR (SEQ ID NO:21), 其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0348] 在某些情况下, 胞内激活域源自T细胞表面糖蛋白CD3 γ 链(也称为CD3 γ 、T细胞受体T3 γ 链、CD3- γ 、T3 γ 、 γ 多肽(TiT3复合物)等)。因此, 适合的胞内激活域可包括一个域, 所述域与以下序列中至少10、15、20个或所有氨基酸的片段或以下氨基酸序列中约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)的连续片段(约110 aa至约115 aa、约115 aa至约120 aa、约120 aa至约130 aa、约130至约140 aa、约140aa至约150 aa或约150 aa至约160 aa)具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性: MEQKGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWN
LGSNAKDPRGMQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRQSRASD
KQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO:22), 其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0349] 同样, 适合的胞内激活域多肽可包括全长CD3 γ 氨基酸序列中含ITAM基序的部分。因此, 适合的胞内激活域可包括一个域, 所述域与以下序列中至少10、15、20或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性: DQL**YQPL**KDREDDQ**YSHL**QGN (SEQ ID NO:23), 其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0350] 在某些情况下, 胞内激活域源自CD79A(也称为B细胞抗原受体复合物相关蛋白 α 链、CD79a抗原(免疫球蛋白相关 α)、MB-1膜糖蛋白、Ig- α 、膜结合免疫球蛋白相关蛋白、表面IgM相关蛋白等)。因此, 适合的胞内激活域可包括一个域, 所述域与以下序列中至少10、15、20个或所有氨基酸的片段或以下氨基酸序列中约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)的连续片段(约110 aa至约115 aa、约115 aa至约120 aa、约120 aa至约130 aa、约130至约140 aa、约140 aa至约150 aa或约150 aa至约160 aa)具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:

MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWVRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTL
 IIQNVNKS HGGIYVCRVQEGNESYQQSCGTYL RVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIIILLFCAVVP GTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEY
 EDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGT YQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO:24) 或 MPGG
 PGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWVRVLHGNYTWPPEF
 LGPGEDPNEPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIIILLFCAVVP GTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLD
 DCSMYEDISRGLQGT YQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO:25), 其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0351] 同样,适合的胞内激活域多肽可包括全长CD79A氨基酸序列中含ITAM基序的部分。因此,适合的胞内激活域可包括一个域,所述域与以下序列中至少10、15、20或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:ENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGT YQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO:26),其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0352] 在某些情况下,胞内激活域来源于DAP12(也称为TYROBP、TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白、KARAP、PLOS、DNAX活化蛋白12、KAR相关蛋白、TYRO蛋白酪氨酸激酶-结合蛋白、杀伤激活受体相关蛋白、杀伤激活受体相关蛋白等)。因此,适合的胞内激活域可包括一个域,所述域与以下序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段,或以下氨基酸序列中约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)的连续片段(约110 aa至约115 aa、约115 aa至约120 aa、约120 aa至约130 aa、约130至约140 aa、约140 aa至约150 aa或约150 aa至约160 aa),具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPY
QELQGRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO:27) 、
 MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQ
ELQGRSDVYSDLNTQ (SEQ ID NO:28) 、
 MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPY**QELQGRSDVY**
SDLNTQRPYYK (SEQ ID NO:29) 或
 MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPY**QELQGRSDVY**
DLNTQRPYYK (SEQ ID NO:30),其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0353] 同样,适合的胞内激活域多肽可包括全长DAP12氨基酸序列中含ITAM基序的部分。因此,适合的胞内激活域可包括一个域,所述域与以下序列中至少10、15、20或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:ESP**YQELQGRSDVYSDL**NTQ (SEQ ID NO:31),其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0354] 在某些情况下,胞内激活域来源于FCER1G(也称为FCRG、Fcε受体I γ链、Fc受体 γ链、fc-εR1-γ、fcR γ、fcεRI γ、高亲和力免疫球蛋白ε受体亚基 γ、免疫球蛋白E受体、高亲和力、γ链等)。例如,适合的胞内激活域可包括一个域,所述域与以下序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段,或整个以下氨基酸序列中约50个氨基酸至约60个氨基酸(aa)的连续片段(约60 aa至约70 aa、约70 aa至约80 aa、约80 aa至约88 aa),具有至少50%、

60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性：MIPAVLLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIIVLTLLYCRLKIQRKAAITSYEKSDGV**YTGL**STRNQET**YETL**KHEKPPQ (SEQ ID NO:32)，其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0355] 同样，适合的胞内激活域多肽可包括全长FCER1G氨基酸序列中含ITAM基序的部分。因此，适合的胞内激活域可包括一个域，所述域与以下序列中至少10、15、20或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性：DGV**YTGL**STRNQET**YETL**KHE (SEQ ID NO:33)，其中ITAM基序以粗体显示并加下划线。

[0356] 适用于本公开中工程化信号多肽的胞内激活域包括DAP10/CD28型信号链。DAP10信号链的一个示例是氨基酸序列：RPRRSPAQDGKV**YINM**PGRG (SEQ ID NO:34)。在一些实施例中，适合的胞内激活域可包括一个域，所述域与以下序列中至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性：RPRRSPAQDGKV**YINM**PGRG (SEQ ID NO:34)。

[0357] CD28信号链的一个示例是氨基酸序列：

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSD**YMNMT**PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:35)。在一些实施例中，适合的胞内域可包括一个域，所述域与以下序列中至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性：FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSD**YMNMT**PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:35)。

[0358] 适用于本公开中工程化信号多肽的胞内激活域包括ZAP70多肽，例如，适合的胞内激活域可包括一个域，所述域与以下序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段，或以下氨基酸序列中约300个氨基酸至约400个氨基酸、约400个氨基酸至约500个氨基酸、或约500个氨基酸至约619个氨基酸的连续片段，具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性：MPDPAAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAIAAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGDKFLLRPRKEQGTYSLSLIYGKTVYHYLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAPTLPAHPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKFLKLRDNLIIADIELGCGNFGSVRQGVYMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKWPLKWYAPECINFRKFSSRSVWSYGVTMWEALSYGQKPYKKMGPEVMAFIEQGKRMECPPECPELYALMSDCWIYKWEDRPDLTVEQRMACYYSLSASKVEGPPGSTQKAEAAACA (SEQ ID NO:36)。

[0359] 淋巴增殖组件

[0360] 虽然胸腺迁出和遇到抗原后的增殖响应会使细胞继续增加，但抗原清除后，抗原特异性效应细胞的去除也会损失部分细胞，所以在整个成年期外周T淋巴细胞的数量会维持在非常稳定的水平 (Marrak, P. 等人. 2000. 《自然免疫学》1:107-111; Freitas, A.A. 等人. 2000. 《免疫学年评》18:83-111)。外周T细胞区的大小由影响增殖和存活的多种因素调节。然而，在淋巴细胞减少的环境中，由于“急性稳态增殖”机制维持了外周T细胞区的大小，T淋巴细胞可不依赖同源抗原进行分裂。通过在试管内增殖T细胞并将其引入淋巴细胞清除的

个体中,确定了过继细胞治疗期间个体或患者的淋巴球减少症状况,从而增强转染T细胞的移植和抗肿瘤作用。但不可对个体进行淋巴细胞清除,因为可能引起严重的副作用,包括免疫功能失调和死亡。

[0361] 研究表明,淋巴细胞清除可去除作为稳态细胞因子的细胞源的内源性淋巴细胞,从而释放细胞因子,诱导过继转移细胞的存活和增殖。已知一些细胞因子,例如IL-7和IL-15介导T细胞的抗原非依赖性增殖,因此能够在非淋巴细胞减少的环境中引发稳态增殖。然而,这些细胞因子及其受体具有内在调节机制,在稳态时预防淋巴组织增殖性疾病。

[0362] 本申请提供的许多方面包括淋巴增殖组件或对所述淋巴增殖组件进行编码的核酸,通常是工程化信号多肽的一部分。在本申请的各说明性实施例中,将淋巴增殖组件引入休眠T细胞和/或休眠NK细胞中,通常通过用逆转录病毒转导休眠T细胞和/或休眠NK细胞,所述逆转录病毒的基因组对作为工程化信号多肽的一部分的淋巴增殖组件进行编码。淋巴增殖组件可以是细胞因子或在其他说明性实施例中,可以是细胞因子受体或包含其信号域的片段,所述细胞因子受体激活STAT3通路、STAT4通路,或在其他说明性实施例中,激活Jak/STAT5通路。因此,淋巴增殖组件在非限制性示例中可以是细胞因子受体,或包括其信号域的活性片段,例如白细胞介素受体,或包括其信号域的活性片段,所述受体可激活STAT5。因此,淋巴增殖组件是诱导T细胞和/或NK细胞增殖的多肽。说明性淋巴增殖组件通过激活STAT5诱导增殖。因此,在各说明性实施例中,这种淋巴增殖组件的片段保留了通过激活STAT5诱导T细胞和/或NK细胞增殖的能力。

[0363] 在本申请提供的一些方法和组合物中,淋巴增殖组件用于促进基因修饰T细胞在体内的增殖或扩增,而不必清除个体的淋巴细胞。同样,进行本申请所提供方法的非限制性说明性实施例时,包括将淋巴增殖组件注入个体的休眠T细胞和/或NK细胞,通常通过转导所述T细胞和/或NK细胞,在方法实施之前、期间和/或之后,无需清除个体的淋巴细胞;或进行所述方法前,在个体采血之前、期间和/或之后,无需清除个体的淋巴细胞;或对个体进行体外修饰T细胞或NK细胞之前,期间和/或之后,和/或将基因修饰T细胞和/或NK细胞重新引入个体之前,期间和/或之后,无需清除个体的淋巴细胞。促进T细胞体内增殖的因素包括细胞因子及其受体,其中受体通常包括配体结合域和信号域。在一些实施例中,本申请公开的方法和组合物中使用的淋巴增殖组件是细胞因子和/或细胞因子受体。细胞因子可以是白细胞介素,细胞因子受体可以是白细胞介素受体。淋巴增殖组件可以是细胞因子的功能片段和/或细胞因子受体的功能片段,如细胞因子受体的信号域,其中片段能够例如激活STAT5,进而促进T细胞增殖。

[0364] 在一些实施例中,本申请的方法和组合物中细胞因子淋巴增殖组件包括以下一种或多种:白细胞介素-7 (IL-7) 或其受体 (IL-7R) 或其信号域;白细胞介素-12 (IL-12) 或其受体 (IL-12R) 或其信号域;白细胞介素-23 (IL-23) 或其由IL-12R β 1和IL-23R组成的受体,或其信号域;白细胞介素-27 (IL-27) 或其受体 (IL-27R) 或其信号域;白细胞介素-15 (IL-15) 或其受体 (IL-15R) 或其信号域;白细胞介素-21 (IL-21) 或其受体 (IL-21R) 或其信号域;或转化生长因子 β (TGF β) 或其受体 (TGF β R) 或其信号域;或TGF β 诱饵受体 (TGF- β -显性-阴性受体II (DNRII))。在一些实施例中,淋巴增殖组件是IL-12R或TGF β 诱饵受体 (TGF- β -显性-阴性受体II (DNRII))。

[0365] IL-7与IL-7受体结合,IL-7受体是由IL-7R α 和常见 γ 链受体组成的异二聚体。结

合产生对胸腺内T细胞发育和外周存活很重要的级联信号。已知IL-7与IL-7受体的结合激活了Jak/STAT5通路。

[0366] IL-12参与了天然T细胞向Th1细胞的分化(Hsieh CS等人,1993.《科学》260(5107):547-9),被称为T细胞刺激因子。IL-12与IL-12受体结合,IL-12受体是由IL-12R- β 1和IL-12R- β 2形成的异二聚体受体。IL12可通过激活STAT4起作用,但也可激活T细胞中的STAT5(Ahn,H.等人1998.《免疫学杂志》161:5893-5900)。IL-12家族由细胞因子IL-12、IL-23和IL-27组成。IL-23的受体由IL-12R β 1和IL-23R组成。IL-27是异二聚体细胞因子,由两个不同的基因组成,分别为Epstein-Barr病毒诱导的基因3(EBI3)和IL-27p28。IL-27与IL-27受体相互作用。

[0367] IL-15是T细胞和NK细胞刺激因子,其结构和功能与IL-2相似。两种细胞因子均诱导T细胞增殖,并且认为其共同功能是由使用IL-2/IL-15R β 和常见 γ 链的两种受体产生的。IL-15的信号通路始于与IL-15R α 受体的结合,随后递呈给在其细胞表面携带IL-15R β γ c复合物的周围细胞。结合IL-15 β 亚基后,激活Janus激酶1(Jak1)和 γ c亚基Janus激酶3(Jak3),导致STAT3和STAT5的磷酸化和活化。

[0368] IL-21在活化的人CD4⁺T细胞和NK T细胞中表达,在T辅助细胞的Th2和Th17亚基中可上调IL-21的表达。IL-21受体(IL-21R)在T、B和NK细胞的表面表达,并且在结构上类似于其他I型细胞因子如IL-2R或IL-15的受体。IL-21R需要与共同的 γ 链(γ c)二聚化,以结合IL-21。与IL-21结合时,IL-21受体通过Jak/STAT通路起作用,激活STAT1、STAT3和STAT5。

[0369] TGF β 诱饵受体(TGF- β -显性-阴性受体II(DNR II))通过与TGF β 结合的天然受体竞争阻断TGF β 信号传导。TGF β -DNR II是RII的一种激酶死亡截短形式,含有RII的胞外TGF β 结合域和跨膜域。TGF β -DNR II结合配体但不磷酸化和活化RI,从而减少或消除Smad磷酸化。

[0370] 已在患有B和T细胞急性淋巴细胞白血病的个体中发现IL-7R α 的功能获得性突变(B-ALL和T-ALL)(Zenatti PP等人,2011.《自然-遗传学》43:932-939;Snocat,C.等人2011.《实验医学杂志》208:901-908;McElroy,C.A.等人2012.《美国国家科学院院刊》109(7):2503-2508)。突变包括IL-7R α TMD的N-末端区域中的嵌入和删除(几乎所有含有额外Cys残基的序列)和S165-C165突变。半胱氨酸导致受体的组成性活化。一些突变导致T-a11基团激活JAK1。这些功能获得性IL-7R突变体可作为淋巴增殖组件用于本申请提供的任何一个方面。

[0371] 因此,在一些实施例中,淋巴增殖组件是突变的IL-7受体。在其他实施例中,突变的IL-7受体是组成性活性的,在不存在细胞因子配体的情况下激活JAK-STAT5通路。在其他实施例中,突变的IL-7受体包括插入237和254之间的1到10个氨基酸,其中包括能够组成性活化STAT5通路的半胱氨酸残基。在一些实施例中,突变的IL-7受体为IL-7Ra-insPPCL(SEQ ID NO:82作为代表)。

[0372] 在一些实施例中,淋巴增殖组件是嵌合细胞因子受体,如不限于与其受体结合的细胞因子,所述受体通常组成性活化与相应激活的野生型细胞因子受体(如STAT3、STAT4,在各说明性实施例中为STAT5)相同的STAT通路。在一些实施例中,嵌合细胞因子受体是一种白细胞介素或其片段,通过接头与同源受体或其片段连接或共价连接。在一些实施例中,嵌合细胞因子受体IL-7与IL-7Ra结合。在一些实施例中,嵌合细胞因子受体IL-7与IL-7Ra的域,如IL-7Ra的胞外域和/或IL-7Ra的跨膜域结合。在一些实施例中,淋巴增殖组件是没

有结合细胞因子的一种细胞因子受体,事实上,在各说明性实施例中,本申请提供的淋巴增殖组件是没有结合细胞因子的组成性活化的细胞因子受体。这些嵌合IL-7受体在表达时通常组成性活化STAT5。

[0373] 在一些实施例中,淋巴增殖组件不是细胞因子或细胞因子受体,而是可刺激STAT5通路的miRNA,它通过使SOCS通路中的负调节因子降级,进而增强STAT5的活化来进行。在一些实施例中,miRNA是影响扩散的蛋白质,例如不限于ABCG1、SOCS1、TGF β R2、SMAD2、cCBL和PD1。在各说明性实施例中,如本申请所示,此类miRNA可位于包装细胞和/或重组逆转录病毒基因组的内含子中,其表达通常由在T细胞和/或NK细胞中具有活性的启动子驱动。不囿于理论,转录单元中包含的内含子可能会导致更高的表达和/或转录稳定性。因此,将miRNA置于逆转录病毒基因组的内含子中的能力增加了本公开的教导,其克服了现有技术中试图使最大活性进入逆转录病毒(例如慢病毒基因组)的大小限制的挑战。在一些实施例中,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个miRNA,在各说明性实施例中为2至5个,例如4个miRNA,其中一个或多个miRNA与能够编码ABCG1、SOCS1、TGF β R2、SMAD2、cCBL和PD1中一个或多个结合的核酸,可包括在重组逆转录病毒基因组中,并使用本申请提供的方法递送到靶细胞,例如T细胞和/或NK细胞。事实上,如本申请所述,1、2、3或4个miRNA可以在单个内含子如EF1a内含子中递送。

[0374] ABCG1是ATP结合盒转运蛋白,负调节胸腺细胞和外周淋巴细胞增殖(Armstrong等人.2010.《免疫学杂志》184(1):173-183)。

[0375] SOCS1是细胞因子信号转导的负调节因子的SOCS(细胞因子信号传导抑制因子)家族的成员,其抑制Jak/Stat通路,如STAT5。SOCS1也称为JAB(Janus激酶结合蛋白)、SSI-1(Stat诱导的Stat抑制剂-1)和TIP3(Tec-相互作用蛋白)。

[0376] TGF β R2是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的成员,可与TGF- β 结合形成使蛋白磷酸化的组合物,然后进入细胞核并调节与增殖相关的基因转录。

[0377] SMAD2介导信号的转化生长因子(TGF)- β ,并调节多种细胞过程,如细胞增殖、凋亡和分化。

[0378] cCBL是一种E3泛素连接酶,它通过ZAP-70除磷和失活以及TCR内化来抑制TCR信号传导。

[0379] PD1(CD279)是表达在T细胞和ProB细胞上的细胞表面受体。PD-1与两个配体PD-L1和PD-L2结合。通过PD-1函数进行信号传导以防止细胞活化。

[0380] 在本申请公开的一些方法和组合物中,淋巴增殖组件的表达由体内控制组件的化合物诱导,甚至依赖于体内控制组件(如这里所讨论的)的结合;在非限制性实施例中,这种化合物为核糖开关。在一些实施例中,淋巴增殖组件由T细胞和/或NK细胞中激活的启动子表达。对于本申请提供的方法和组合物,熟练的技术人员应认识到,在T细胞和/或NK细胞中激活的启动子是已知的,并且可用来表达第工程化信号多肽或第二工程化信号多肽,或所述第一和第二工程化信号多肽的任何成分。在各说明性实施例中,此类启动子在包装细胞系,如本申请公开的包装系中不活跃。在一些实施例中,启动子是EF1a启动子或小鼠干细胞病毒(MSCV)启动子(Jones等人《人类基因治疗》(2009)20:630-40)。在各说明性实施例中,启动子是T细胞特异性CD3- ζ 启动子。

[0381] 在一些实施例中,淋巴增殖组件受微环境限制。例如,淋巴增殖组件可以是在异常

与生理条件下与各细胞因子进行差异结合的突变受体。例如,可采用在肿瘤环境中比在正常生理环境中与IL7结合更紧密的IL-7R。

[0382] 在一些实施例中,淋巴增殖组件融合到识别域或消除域中。本申请中更为详细地公开了所述识别域或消除域。这种融合具备优势,特别是使用截短或其他突变淋巴增殖组件时,逆转录病毒基因组中所需多核苷酸的数量更少。这在本申请提供的各说明性实施例中很重要,因为它有助于将对更多功能组件进行编码的核酸纳入逆转录病毒基因组中。在其他实施例中,淋巴增殖组件融合到共刺激域和/或胞内激活域中。本申请所公开的淋巴增殖组件不是嵌合抗原受体(CAR)或胞内激活域或共刺激域。然而,在一些实施例中,淋巴增殖组件可以与抗原特异性靶向区(ASTR)融合,并通过ASTR与抗原的结合来激活。在其他实施例中,工程化信号多肽可包括ASTR、胞内激活域(如CD3- ζ 信号域)、协同刺激域和淋巴增殖域。本申请中还公开了共刺激域、胞内激活域、ASTR和其他CAR域的进一步细节。

[0383] 在本申请各说明性实施例中,将T细胞和/或NK细胞存活组件引入休眠T细胞和/或休眠NK细胞,通常用逆转录病毒传导休眠T细胞和/或休眠NK细胞,其中基因组对作为工程化信号多肽的一部分的T细胞和/或NK细胞编码。在一些实施例中,淋巴增殖组件也是T细胞和/或NK细胞存活组件。如上所述,一些淋巴增殖组件不仅能促进增殖,还能促进细胞存活。在一些实施例中,T细胞和/或NK细胞存活基序不是淋巴增殖组件。例如,T细胞和/或NK细胞存活基序可以是CD28T细胞存活基序或CD137细胞存活基序。在包括ASTR,如scFv的工程化信号多肽上可发现这种T细胞存活基序。在一个说明性实施例中,T细胞存活基序是CD28T细胞存活基序或通过CD8a跨膜域或CD28跨膜域连接scFv的CD137基序。在某些实施例中,所述胞内信号域包括一个多肽序列,所述多肽序列包括免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)。在某一实施例中,多肽序列是CD3- ζ 信号域。

[0384] 调节域

[0385] 调节域可改变胞内激活域在工程化信号多肽中的作用,包括促进或抑制激活域的下游效应或改变响应的性质。适用于本公开的工程化信号多肽的调节域包括共刺激域。一种适用于工程化信号多肽的共刺激域的长度为约30个氨基酸到约70个氨基酸(aa),例如,一个共刺激域的长度可以为约30aa至约35aa、约35aa至40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa,或约65aa至约70aa。在其他情况下,可调节域的长度为约70aa至约100aa、约100aa至约200aa或大于200aa。

[0386] 共刺激域通常可增强和/或改变对激活域的响应的性质。适用于本公开中工程化信号多肽的共刺激域通常是来源于受体的多肽。在一些实施例中,协同刺激域发生同型二聚体化。一个个体共刺激域可以是跨膜蛋白的胞内部分(即,共刺激域可衍生自跨膜蛋白)。适合的共刺激多肽的非限制性示例包括但不限于4-1BB(CD137)、CD27、CD28、CD28缺失的Lck,其中Lck结合了(IC Δ)、ICOS、OX40、BTLA、CD27、CD30、GITR和HVEM。例如,本发明的一个方面的共刺激域与以下共刺激域具有至少80%、90%或95%的序列一致性:4-1BB(CD137)、CD27、CD28、CD28缺失的Lck,其中Lck结合了(IC Δ)、ICOS、OX40、BTLA、CD27、CD30、GITR和HVEM。例如,本发明的一个方面的共刺激域与适合的共刺激多肽的非限制性示例的共刺激域具有至少80%、90%或95%的序列一致性,包括但不限于4-1BB(CD137)、CD27、CD28、CD28缺失的Lck,其中Lck结合了(ICD)、ICOS、OX40、BTLA、CD27、CD30、GITR和HVEM。例如,本发明的一个方面的共刺激域与以下共刺激域具有至少80%、90%或95%的序列一致性:4-1BB

(CD137)、CD27、CD28、CD28缺失的Lck,其中Lck结合了(IC Δ)、ICOS、OX40、BTLA、CD27、CD30、GITR和HVEM。

[0387] 一种适于工程化信号多肽中共刺激域的长度约30个氨基酸到约70个氨基酸(aa),例如,一个共刺激域的长度可以为约30aa至约35aa、约35aa至40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa,或约65aa至约70aa。在其他情况下,共刺激域的长度为约70aa至约100aa、约100aa至约200aa或大于200aa。

[0388] 在某些情况下,共刺激域来源于跨膜蛋白CD137的胞内部分(也称为TNFRSF9; CD137; 4-1BB; CDw137; ILA等例如,适合的共刺激域可包括一个域,所述域与以下氨基酸序列中至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:1)。在这些实施例中的一些实施例中,共刺激域的长度为约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa或约65aa至约70aa。

[0389] 在某些情况下,共刺激域来源于跨膜蛋白CD28(也称为Tp44)的胞内部分。例如,适合的共刺激域可包括一个域,所述域与以下氨基酸序列中至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:RSKRSRLHSDYMNTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:2)。在这些实施例中的一些实施例中,共刺激域的长度为约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa或约65aa至约70aa。

[0390] 在某些情况下,共刺激域来源于跨膜蛋白的胞内部分,CD28缺失的Lck用于结合Lck(IC Δ)。例如,适合的共刺激域可包括一个域,所述域与以下氨基酸序列中至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:RSKRSRLHSDYMNTPRRPGPTRKHYPYAAAARDFAAYRS (SEQ ID NO:3)。在这些实施例中的一些实施例中,共刺激域的长度为约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa或约65aa至约70aa。

[0391] 在某些情况下,共刺激域来源于跨膜蛋白ICOS(也称为AILIM、CD278和CVID1)的胞内部分。例如,适合的共刺激域可包括一个域,所述域与以下氨基酸序列中至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:TKKKYSSSVHDPNGEYFMRAVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO:4)。在这些实施例中的一些实施例中,共刺激域的长度为约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa或约65aa至约70aa。

[0392] 在某些情况下,共刺激域来源于跨膜蛋白OX40(也称为TNFRSF4、RP5-902P83、ACT35、CD134、OX-40、TXGP1L)的胞内部分。例如,适合的共刺激域可包括一个域,与以下氨基酸序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:RRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:5)。在这些实施例中的一些实施例中,共刺激域的长度为约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约

55aa至约60aa、约60aa至约65aa或约65aa至约70aa。

[0393] 在某些情况下,共刺激域来源于跨膜蛋白CD27的胞内部分(也称为S152、T14、TNFRSF7和Tp55)。例如,适合的共刺激域可包括一个域,所述域与以下氨基酸序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:HQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO:6)。在这些实施例的一部分中,共刺激域的长度为约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、。

[0394] 在某些情况下,共刺激域来源于跨膜蛋白BTLA(也称为BTLA1和CD272)的胞内部分。例如,适合的共刺激域可包括一个域,所述域与以下氨基酸序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHNSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:7)。

[0395] 在某些情况下,共刺激域来源于跨膜蛋白CD30(也称为TNFRSF8、D1S166E和Ki-1)的胞内部分。例如,适合的共刺激域可包括一个域,所述域与以下氨基酸序列中约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130至约140aa、约140aa至约150aa、约150aa至约160aa或约160aa至约185aa的片段,具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:RRACRKIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK (SEQ ID NO:8)。

[0396] 在一些情况下,共刺激域衍生自跨膜蛋白GITR的胞内部分(也称为TNFRSF18、RP5-902P8.2、AITR、CD357和GITR-D)。例如,适合的共刺激域可包括一个域,所述域与以下氨基酸序列中的至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV (SEQ ID NO:9)。在这些实施例的一些实施例中,共刺激域的长度为约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、约65aa至约70aa或约65aa至约70aa。

[0397] 在某些情况下,共刺激域衍生自跨膜蛋白HVEM的胞内部分(也称为TNFRSF14、RP3-395M20.6、ATAR、CD270、HVEA、HVEM、LIGHTR和TR2)。在一些实施例中,适合的共刺激域可包括一个域,所述域与以下氨基酸序列中至少10、15、20个或所有氨基酸的片段具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH (SEQ ID NO:10)。在这些实施例的一些实施例中,第一和第二多肽的共刺激域的长度为约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、约65aa至约70aa或约65aa至约70aa。

[0398] 接头

[0399] 在某些情况下,工程化信号多肽包括任何两个相邻域之间的接头。例如,接头可以位于跨膜域和第一共刺激域之间。作为另一个示例,ASTR可以是抗体,接头可位于重链和轻

链之间。作为另一个示例,接头可以在ASTR和跨膜域和共刺激域之间。作为另一个示例,接头可以位于第二多肽的共刺激域和胞内激活域之间。作为另一个示例,接头可位于ASTR和胞内信号域之间。

[0400] 连接肽可以具有多种氨基酸序列中的任何一种。蛋白质可以通过间隔肽连接,通常是柔性连接,尽管不排除其他化学连接。接头可以是长度在约1至约100个氨基酸之间的肽,或者长度在约1至约25个氨基酸之间的肽。这些接头可以通过使用偶联蛋白质的合成的、对接头进行编码的寡核苷酸产生。可使用具有一定柔性的肽接头。连接肽实际上可以具有任何氨基酸序列,要记住合适的接头将具有产生一般柔性肽的序列。使用小的氨基酸,如甘氨酸和丙氨酸,用于产生柔性肽。这种序列的创建对于本领域技术人员来说是常规的。

[0401] 适合的接头可以容易地选择,并且可以是不同长度的任何合适接头,例如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸

[0402] 示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物($(G)_n$)、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如, $(GS)_n$ 、 $GSGGS_n$ 、 $GGGS_n$ 和 $GGGGS_n$,其中n是至少一个的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。特别关注甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物,因为这两种氨基酸都是相对非结构化的,因此可以用作成分之间的中性系链。特别关注甘氨酸聚合物,因为甘氨酸比丙氨酸进入更多的phi-psi空间,并且比具有较长侧链的残基受到的限制少得多(参见Scheraga,《计算化学综述》11173-142(1992))。示例性柔性接头包括但不限于GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:53)、GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:54)、GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGSG (SEQ ID NO:56)、GGSGG (SEQ ID NO:57)、GSGSG (SEQ ID NO:58)、GSGGG (SEQ ID NO:59)、GGGSG (SEQ ID NO:60)、GGGSG (SEQ ID NO:61)等。本领域普通技术人员应了解,与上述任何组件结合的肽的设计可包括全部或部分柔性接头,从而使得接头可包括柔性接头以及提供非柔性结构的一个或多个部分。

[0403] 嵌合抗原受体

[0404] 在本发明的一些方面,工程化信号多肽是嵌合抗原受体(CAR)或对CAR进行编码的多核苷酸,在本发明中简称为“CAR”。在一些实施例中,本公开的CAR包括:a)至少一个抗原特异性靶向区(ASTR);b)跨膜域;和c)胞内激活域。在各说明性实施例中,CAR的抗原特异性靶向区是靶抗原抗体的scFv部分。

[0405] 本公开的CAR可在真核细胞例如哺乳动物细胞的质膜中出现,其中适合的哺乳动物细胞包括但不限于细胞毒性细胞、T淋巴细胞、干细胞、干细胞后代、祖细胞、祖细胞后代、NK细胞、NK-T细胞和巨噬细胞。在真核细胞的质膜中出现时,本公开的CAR在一种或多种靶抗原存在时具有活性,所述靶抗原在某些条件下与ASTR结合。靶抗原是特异性结合对的第二个成员。特异性结合对的靶抗原可以是可溶性(例如,不与细胞结合)因子;在细胞如靶细胞表面出现的因子;在固体表面出现的因子;脂双层中出现的因子等。在ASTR为抗体,而特异性结合对的第二个成员为抗原时,抗原可以是可溶性(例如,不与细胞结合)抗原;在细胞如靶细胞表面出现的抗原;在固体表面出现的抗原;脂质双层中出现的抗原等。

[0406] 在某些情况下,本公开的CAR,当在真核细胞的质膜中出现,并且被一种或多种靶抗原激活时,增强了细胞中至少一种核酸的表达。例如,在某些情况下,当在真核细胞的质

膜中出现,并且被一种或多种靶抗原激活时,本公开的CAR与不存在一种或多种靶抗原时核酸的转录水平相比较,将至少一种核酸在细胞中的表达增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍。

[0407] 作为一个示例,本公开的CAR可包括含有免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM) 的胞内信号多肽。

[0408] 本公开的CAR,当在真核细胞的质膜中出现,并且被一种或多种靶抗原激活时,在某些情况下,可以导致细胞产生更多的一种或多种细胞因子。例如,当在真核细胞的质膜中出现,并且被一种或多种靶抗原激活时,本公开的CAR可以将细胞产生的细胞因子增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。其产生可增加的细胞因子包括但不限于干扰素 γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-2、IL-15、IL-12、IL-4、IL-5、IL-10、趋化因子、生长因子等。

[0409] 在某些情况下,本公开的CAR,当在真核细胞的质膜中出现,并且被一种或多种靶抗原激活时,可以导致细胞中核酸转录的增加和细胞产生细胞因子的增加。

[0410] 在某些情况下,本公开的CAR,当在真核细胞的质膜中出现,并且被一种或多种靶抗原激活时,导致细胞对靶细胞具有细胞毒性活性,所述靶细胞在CAR第一多肽的抗原结合域与抗原结合的细胞表面表达。例如,如果真核细胞是细胞毒性细胞(例如,NK细胞或细胞毒性T淋巴细胞),本公开的CAR,当在细胞的质膜出现,并且当被一种或多种靶抗原激活时,增强了细胞对在其细胞表面表达一种或多种靶抗原的靶细胞的细胞毒性活性。例如,如果真核细胞是NK细胞或T淋巴细胞,当在细胞的质膜中出现,并且被一种或多种靶抗原激活时,相比存在一种或多种靶抗原时细胞的细胞毒性活性,本公开的CAR将细胞的细胞毒性活性增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍。

[0411] 在某些情况下,本公开的CAR,当在真核细胞的质膜中出现,并且被一种或多种靶抗原激活时,可导致其他CAR激活相关事件,例如增殖和扩增(由于细胞分裂增加或抗凋亡反应)。

[0412] 在某些情况下,当本公开的CAR,当在真核细胞的质膜中出现,并且被一种或多种靶抗原激活时,可以导致其他CAR激活相关事件,例如胞内信号调制、细胞分化或细胞死亡。

[0413] 本公开的CAR可以在真核细胞膜中出现,其中CAR的第一和第二多肽彼此不共价连接。本公开的CAR可以作为单个异二聚体在真核细胞膜中出现,所述异二聚体不共价连接到膜中的任何其他多肽。或者,本公开的第一CAR可以作为共价或非共价连接到本公开的第二CAR的异二聚体在真核细胞膜中出现。在某些情况下,第一CAR的第一多肽和第二CAR的第一多肽中存在茎部,通过茎部中出现的半胱氨酸之间形成的二硫键可共价连接第一和第二CAR。

[0414] 在某些情况下,本公开的CAR可以在真核细胞膜中出现,其中CAR的第一多肽包括抗体片段,CAR的第二多肽包括衍生自细胞因子受体的信号转导域,使得在二聚化时,CAR可以代表异二聚体-信号体CAR,例如由至少两种独立多肽组成的信号体。本领域已知的“信号体”是由抗体片段和衍生自细胞因子受体的信号转导域组成的单个嵌合大分子。在某些情

况下,当在真核细胞的细胞膜中出现、被二聚体二聚并被抗原如寡聚抗原激活时,本公开的异二聚体-信号体CAR可诱导异二聚体-信号体CAR低聚。异二聚体-信号体CAR的这种配体诱导的低聚可以激活(例如增加)或维持(例如维持)信号转导,例如异二聚体-信号体CAR的配体诱导的低聚可以传递引发细胞应答的信号。在某些情况下,多种异二聚体-信号体CAR可以组合使用,以引发期望的细胞应答。

[0415] 在一些实施例中,本公开的CAR受到微环境的限制。这种特性通常是CAR的ASTR域的微环境限制特性所致。因此,本公开的CAR在微环境条件下比在正常生理环境条件下具有更低的结合亲和力,或在各说明性实施例中,可以具有对一种或多种靶抗原的更高结合亲和力。

[0416] 序列重组

[0417] 在某些情况下,可以使用位点特异性重组技术在细胞中重排或删除工程化信号多肽的序列,在本申请中可以称为重组多肽。在某些实施例中,对特定工程化信号多肽的细胞活化相关响应可以通过位点特异性重组来改变,例如,引发第一活化相关响应的工程化信号多肽的第一胞内激活域可以换成引发第二活化相关响应的第二胞内激活域。本领域技术人员应了解的是,细胞中可使用位点特异性重组,以将工程化信号多肽的任何域或序列与本申请公开的任何其他域或序列交换。本领域技术人员还应了解的是,细胞中可使用位点特异性重组,以删除工程化信号多肽的任何域或序列。序列和域的这种交换和切除在本领域中是已知的,例如,参见Tone等人(2013)《生物技术与生物工程》3219-3226中所述的信号体的域交换,其公开内容通过引用在此公开。在体内进行位点特异性重组的机制和要求也是本领域所知的,例如,参见Grindley等人(2006)《生物化学评论年报》567-605和Tropp(2012)《分子生物学》(Jones&Bartlett Publishers,Sudbury,MA),其公开内容通过引用并入本申请。

[0418] 在一些实施例中,通过将上述所有不同域融合在一起以形成融合蛋白来产生工程化信号多肽。工程化信号多肽通常由转录单元产生,所述转录单元包括对本申请所述工程化信号多肽不同域进行编码的多核苷酸序列。在一些实施例中,本发明的ASTR能识别靶细胞上的抗原并与之结合,但受到微环境的限制。

[0419] 通过产生蛋白文库并筛选文库中与靶抗原具有所需结合亲和力的蛋白质,可以发现全部或部分适用于至少靶抗原结合域的野生型或天然蛋白质,作为本发明中的ASTR。野生型蛋白可以通过筛选cDNA文库来发现。cDNA文库是插入宿主细胞集合中的克隆cDNA(互补DNA)片段的组合,它们一起构成了生物体转录组的一部分。cDNA文库中的信息是非常强大和有用的工具,通过筛选文库中与靶抗原具有期望结合亲和力的蛋白质,可发现具有所需特性的蛋白。

[0420] 组合

[0421] 在一些实施例中,由重组逆转录病毒提供的多核苷酸具有对一种或多种工程化信号多肽的某些组合进行编码的一个或多个转录单元。在本申请提供的一些方法和组合物中,基因修饰的T细胞包括重组逆转录病毒转导T细胞后一种或多种工程化信号多肽的组合。应了解的是,出于方便使用第一多肽、第二多肽、第三多肽等,“第一多肽”上的组件和“第二多肽”上的组件表明这些组件位于不同的多肽上,在特异性多肽的其他组件或步骤中,通常将其称为第一多肽或第二多肽,仅供参考和约定。

[0422] 在一些实施例中,第一工程化信号多肽包括能够结合抗原的胞外抗原结合域和胞内信号域。在其他实施例中,第一工程化信号多肽还包括T细胞存活基序和/或跨膜域。在一些实施例中,第一工程化信号多肽不包括共刺激域,而在其他实施例中,第一工程化信号多肽确实包括共刺激域。

[0423] 在一些实施例中,第二工程化信号多肽包括淋巴增殖基因产物或胞外抗原结合域。在一些实施例中,第二工程化信号多肽还包括一个或多个以下物质:T细胞存活基序、胞内信号域和一个或多个共刺激域。在其他实施例中,当使用两种工程化信号多肽时,至少一种是CAR。

[0424] 在一个实施例中,一种或多种工程化信号多肽在同一转录物下的T细胞特异性启动子或一般启动子下表达,其中在转录物中,对工程化信号多肽进行编码的核酸被对一种或多种内部核糖体进入位点(IRE)或一种或多种蛋白酶裂解肽进行编码的核酸分离。

[0425] 在某些实施例中,多核苷酸对两种工程化信号多肽进行编码,其中第一工程化信号多肽包括能够与第一抗原结合的第一胞外抗原结合域,以及第一胞内信号域但不包括共刺激域,第二多肽包括能够与VEGF结合的第二胞外抗原结合域,和第二胞内信号域,例如共刺激分子的信号域。在某些实施例中,第一抗原是PSCA、PSMA或BCMA。在某些实施例中,第一胞外抗原结合域包括抗体或其片段(例如scFv),例如对PSCA、PSMA或BCMA具有特异性针的抗体或其片段。在某些实施例中,与VEGF结合的第二胞外抗原结合域是VEGF的受体,即VEGFR。在某些实施例中,VEGFR是VEGFR1、VEGFR2或VEGFR3。在某些实施例中,VEGFR是VEGFR2。

[0426] 在某些实施例中,多核苷酸对两种工程化信号多肽进行编码,其中第一工程化信号多肽包括胞外肿瘤抗原结合域和CD3- ζ 信号域,第二工程化信号多肽包括抗原结合域,其中抗原是血管生成因子,以及一个或多个共刺激分子信号域。血管生成因子可以是例如VEGF。一个或多个共刺激分子信号基序可以包括例如来自CD27、CD28、OX40、ICOS和4-1BB中每一个的共刺激信号域。

[0427] 在某些实施例中,多核苷酸对两种工程化信号多肽进行编码,其中第一种工程化信号多肽包括胞外肿瘤抗原结合域和CD3- ζ 信号域,第二多肽包括能够与VEGF结合的抗原结合域,以及来自CD27、CD28、OX40、ICOS和4-1BB中每一个的共刺激信号域。在另一实施例中,第一信号多肽或第二信号多肽也具有T细胞存活基序。在一些实施例中,T细胞存活基序是或源自IL-7受体(IL-7R)的胞内信号域、IL-12受体的胞内信号域、IL-15受体的胞内信号域、IL-21受体的胞内信号域、或转化生长因子 β (TGF β)受体或TGF β 诱饵受体(TGF- β -显性阴性受体II(DNRII))的胞内信号域。

[0428] 在某些实施例中,多核苷酸对两种工程化信号多肽进行编码,其中第一工程化信号多肽包括胞外肿瘤抗原结合域和CD3- ζ 信号域,第二工程化信号多肽包括能够与VEGF结合的抗原结合域、IL-7受体胞内T细胞存活基序和来自CD27、CD28、OX40、ICOS和4-1BB中每一个的共刺激信号域。

[0429] 在一些实施例中,两种以上的信号多肽由多核苷酸编码。在某些实施例中,只有一种工程化信号多肽包括与肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原结合的抗原结合域;其余工程化信号多肽均包括与非肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原结合的抗原结合域。在其他实施例中,两种或多种工程化信号多肽包括与一种或多种肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原结合的

抗原结合域,其中至少一种工程化信号多肽包括不与肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原结合的抗原结合域。

[0430] 在一些实施例中,肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原是Her2、前列腺干细胞抗原(PSCA)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、B细胞成熟抗原(BCMA)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、癌抗原-125(CA-125)、CA19-9、钙结合蛋白、MUC-1、上皮膜蛋白(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、酪氨酸酶、黑色素瘤相关抗原(MAGE)、CD34、CD45、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、肌间线蛋白、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、囊肿病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、melan-A蛋白(T淋巴细胞识别的黑色瘤抗原;MART-1)、myo-D1、肌肉特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触素、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、M2型丙酮酸激酶同工酶(肿瘤M2-PK)的二聚体形式、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2(神经节苷脂G2)、EphA2、CSPG4、CD138、FAP(成纤维细胞活化蛋白)、CD171、 κ 、 λ 、5T4、 α v β 6整联蛋白、整联蛋白 α v β 3(CD61)、泌乳激素、K-Ras(V-Ki-ras2鼠Kirsten肉瘤病毒致癌基因)、Ral-B、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD20、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、EGFR、EGP2、EGP40、EpCAM、胎儿型AChR、FR α 、GD3、HLA-A1+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、Lewis-Y、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、ROR1、存活素、TAG72、TEMs、VEGFR2、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、精子蛋白17(Sp17)、间皮素、PAP(前列腺酸性磷酸酶)、prostein、TARP(T-细胞受体 γ 可变阅读框架蛋白)、Trp-p8、STEAP1(前列腺1的六跨膜上皮抗原)、异常ras蛋白或异常p53蛋白。

[0431] 在一些实施例中,第一工程化信号多肽包括与第一抗原结合的第一胞外抗原结合域,及第一胞内信号域;第二工程化信号多肽包括与第二抗原结合的第二胞外抗原结合域,或与第二抗原结合的受体,及第二胞内信号域,其中第二工程化信号多肽不包括共刺激域。在某些实施例中,第一抗原结合域和第二抗原结合域都是受体的抗原结合部分或抗体的抗原结合部分。在某些实施例中,第一抗原结合域或第二抗原结合域中的一个或两个是scFv抗体片段。在某些实施例中,第一工程化信号多肽和/或第二工程化信号多肽另外包括跨膜域。在某些实施例中,第一工程化信号多肽或第二工程化信号多肽包括T细胞存活基序,例如本申请所述的任何T细胞存活基序。

[0432] 在另一实施例中,第一工程化信号多肽包括与HER2结合的第一胞外抗原结合域,第二工程化信号多肽包括与MUC-1结合的第二胞外抗原结合域。

[0433] 在另一实施例中,第二工程化信号多肽的第二胞外抗原结合域与白细胞介素结合。

[0434] 在另一实施例中,第二工程化信号多肽的第二胞外抗原结合域与损伤相关分子模式(DAMP,也称为警报素)结合。在其他实施例中,DAMP是热休克蛋白、染色质蛋白高迁移率族蛋白B-1(HMGB1)、S100A8(也称为MRP 8或钙粒蛋白A)、S100A9(也称为MRP 14或钙粒蛋白B)、血清淀粉样蛋白A(SAA)、脱氧核糖核酸、三磷酸腺苷、尿酸或硫酸肝素。

[0435] 在某些实施例中,所述第二抗原是与肿瘤细胞呈递的抗原结合的抗体上的抗原。

[0436] 在一些实施例中,通过第二工程化信号多肽的信号转导激活是非抗原性的,但与缺氧相关。在某些实施例中,缺氧是由缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、HIF-1 β 、HIF-2 α 、HIF-2 β 、HIF-3 α 或HIF-3 β 的激活引起的。

[0437] 在一些实施例中,一种或多种工程化信号多肽的表达由体内控制组件调节,这在

本申请中更详细地公开。

[0438] 附加序列

[0439] 工程化信号多肽,例如CAR,可进一步包括一个或多个额外多肽域,其中所述域包括但不限于信号序列、表位标记、亲和域和产生可检测信号的多肽。本申请提供的任何方面或实施例的额外域的非限制性示例包括一个域,所述域与以下所述任何序列具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列一致性:信号序列、表位标记、亲和域或产生可检测信号的多肽。

[0440] 适用于个体CAR,例如个体CAR的第一多肽中的信号序列包括任何真核信号序列,所述真核信号序列包括自然形成的信号序列、合成(例如人造)信号序列等。例如,在一些实施例中,信号序列可以是CD8信号序列MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:74)。

[0441] 适合的表位标记包括但不限于血凝素(HA;例如YPYDVPDYA;SEQ ID NO:37)、FLAG(例如,DYKDDDDK;SEQ ID NO:38)、c-myc(例如,EQKLISEEDL;SEQ ID NO:39)等。

[0442] 亲和域包括可与结合配偶体相互作用的肽序列,例如载体上可用于鉴定或纯化的固定肽序列。对多个连续单个氨基酸(如组氨酸)进行编码的DNA序列,与表达的蛋白融合时,可借助与树脂柱(如镍琼脂糖凝胶)结合的高亲和力进一步纯化重组蛋白。示例性亲和域包括His5(HHHHH;SEQ ID NO:40)、HisX6(HHHHH;SEQ ID NO:41)、c-myc(EQKLISEEDL;SEQ ID NO:39)、Flag(DYKDDDDK;SEQ ID NO:38)、,Strep标记(WSHPQFEK;SEQ ID NO:42)、血凝素,例如HA标记(YPYDVPDYA;SEQ ID NO:37)、GST、硫氧还蛋白、纤维素结合域、RYIRS(SEQ ID NO:43)、Phe-His-His-Thr(SEQ ID NO:44)、几丁质结合域、S-肽、T7肽、SH2域、C-末端RNA标记、WEAAAREACCRECCARA(SEQ ID NO:45)、金属结合域,例如锌结合域或钙结合域,例如钙结合蛋白,例如钙调蛋白、肌钙蛋白C、钙调磷酸酶B、肌球蛋白轻链、恢复蛋白、S-调控蛋白、视锥蛋白、VILIP、神经钙蛋白、海马钙结合蛋白、聚集蛋白、钙牵蛋白、calpain大亚基、S100蛋白、小清蛋白、钙结合蛋白D9K、钙结合蛋白D28K、钙网膜蛋白、内含肽、生物素、链霉亲和素、MyoD、Id、亮氨酸拉链序列和麦芽糖结合蛋白。

[0443] 适合的可检测信号产生蛋白包括例如,荧光蛋白、进行催化反应以产生可作为产物的可检测信号的酶等。

[0444] 适合的荧光蛋白包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)或其变体、GFP(BFP)的蓝色荧光变体、GFP(CFP)的青色荧光变体、GFP(YFP)的黄色荧光变体、增强型GFP(EGFP)、增强型CFP(ECFP)、增强型YFP(EYFP)、GFPS65T、Emerald、Topaz(TYFP)、Venus、Citrine、mCitrine、GFPuv、去稳定化EGFP(dEGFP)、去稳定化ECFP(dECFP)、去稳定化EYFP(dEYFP)、mCFPm、Cerulean、T-Sapphire、CyPet、YPet、mK0、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、DsRed-单体、J-Red、dimer2、t-dimer2(12)、mRFP1、pocilloporin、Renilla GFP、Monster GFP、paGFP、Kaede蛋白和kindling蛋白、藻胆蛋白和藻胆蛋白耦合物(包括B-藻红蛋白、R-藻红蛋白和别藻蓝蛋白)。荧光蛋白的其他示例包括mHoneydew、mBanana、mOrange、dTomato、tdTomato、mTangerine、mStrawberry、mCherry、mGrapel、mRaspberry、mGrape2、mPlum(Shaner等人(2005)《自然方法》2:905-909)等。适用于如Matz等人(1999)《自然生物技术》17:969-973所述,珊瑚虫物种的各种荧光蛋白和有色蛋白。

[0445] 适合的酶包括但不限于辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、 β -半乳糖苷酶(GAL)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶、转化酶、黄嘌呤氧

化酶、萤火虫荧光素酶、葡萄糖氧化酶 (GO) 等。

[0446] 识别域和/或消除域

[0447] 本申请提供的任何重组逆转录病毒可包括对识别域或消除域进行编码的核酸, 所述识别域或消除域作为对本申请提供的任何工程化信号多肽进行编码的核酸的一部分或与其分离。因此, 本申请提供的任何工程化信号多肽可包括识别域或消除域。例如, 本申请公开的任何CAR可包括识别域或消除域。此外, 识别域或消除域可以与本申请公开的任何淋巴增殖组件一起表达, 甚至与其融合。识别域或消除域在T细胞和/或NK细胞上表达, 但在逆转录病毒上不表达。

[0448] 在一些实施例中, 识别域或消除域可以衍生自单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-tk) 或诱导型半胱天冬酶-9。在一些实施例中, 例如美国专利8,802,374中公开的, 识别域或消除域可以包括修饰的内源性细胞表面分子。修饰的内源性细胞表面分子可以是任何被修饰的细胞表面相关受体、配体、糖蛋白、细胞粘附分子、抗原、整联蛋白或分化簇 (CD)。在一些实施例中, 修饰的内源性细胞表面分子是截短的酪氨酸激酶受体。一方面, 截短的酪氨酸激酶受体是表皮生长因子受体 (EGFR) 家族的成员 (例如, ErbB1、ErbB2、ErbB3、ErbB4)。在一些实施例中, 识别域可以是被抗体识别的多肽, 所述抗体可识别EGFR成员的胞外域。在一些实施例中, 识别域可以是EGFR家族成员的至少20个连续氨基酸, 或者例如EGFR家族成员的20至50个连续氨基酸。例如, SEQ ID NO:78是一种示例性多肽, 所述多肽由识别EGFR成员的胞外域的抗体识别, 并在适当条件下与抗体结合。这种胞外EGFR表位有时在本申请中称为eTag。在各说明性实施例中, 这种表位由市售的抗EGFR单株抗体识别。

[0449] 表皮生长因子受体, 也称为EGFR、ErbB1和HER1, 是胞外配体表表皮生长因子家族成员的细胞表面受体。EGFR活性的改变与某些癌症有关。在一些实施例中, 对包括人类表皮生长因子受体 (EGFR) 的EGFR多肽进行编码的基因可通过去除对多肽进行编码的核酸序列来构建, 其中所述多肽包括膜远端EGF结合域和胞质信号尾部; 但所述基因保留了由抗EGFR抗体识别的胞外膜近端表位。优选地, 抗体是已知的、可商购的抗EGFR单株抗体, 例如西妥昔单抗、马妥珠单抗、耐昔妥珠单抗或帕尼单抗。

[0450] 其他实施例表明, 将生物素化-西妥昔单抗与抗生物素微珠结合应用于免疫磁珠分选法, 成功地将已经用含有EGFRt的构建体慢病毒转导的T细胞从低至2%细胞群富集到大于90%的纯度, 而未观测到对细胞制剂的毒性。此外, 其他实施例表明, 这种惰性EGFR分子的组成型表达不影响T细胞表型或效应子功能, 正如协同表达的嵌合抗原受体 (CAR) CD19R所指示的那样。此外, 其他实施例表明, 通过流式细胞分析, EGFR被成功地用作小鼠T细胞移植的体内跟踪标记。进一步地, 通过Erbbitux®介导的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 途径, 证明EGFR具有自杀基因的可能。本公开的发明人已经使用慢病毒载体在PBMC中成功表达了eTag, 并且已经发现将PBMC暴露于西妥昔单抗进行的eTag试管内表达为PBMC提供了有效消除机制。因此, EGFR可用作具有免疫治疗潜力的转导T细胞的非免疫原性选择工具、跟踪标记和自杀基因。EGFR核酸也可以通过本领域众所周知的方法检测。

[0451] 在本申请提供的一些实施例中, EGFR被表达为还包括CAR的单一多肽的一部分, 或者表达为包括淋巴增殖组件的单一多肽的一部分。在一些实施例中, 对EGFR识别域进行编码的氨基酸序列可以通过裂解信号和/或核糖体跳跃序列与对嵌合抗原受体进行编码的氨基酸序列分离。核糖体跳跃和/或裂解信号可以是本领域已知的任何核糖体跳跃和/或裂解

信号。不囿于理论限制,核糖体跳跃序列可以是,例如氨基酸序列为 GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO:77) 的 2A-1。不囿于理论限制,裂解信号和核糖体跳跃序列的其他示例包括 FMDV 2A (F2A)、马甲型鼻病毒 2A (缩写为 E2A)、猪捷申病毒-1 2A (P2A) 和荨麻毛虫 β 四体病毒 2A (T2A)。在一些实施例中,对识别域进行编码的多核苷酸序列可以位于与 CAR 或淋巴增殖组件相同的转录物上,但是通过内部核糖体进入位点与对 CAR 或淋巴增殖组件进行编码的多核苷酸序列分离。

[0452] 在本申请根据经验举例说明的其他实施例中,识别域可以表达为融合到淋巴增殖组件上的融合多肽的一部分。与分离的多肽相比,这种构建体的优势在于,特别是与本申请提供的其他“节省空间”组件相结合,在 RNA 基因组上占据的基因组空间较少。在一个说明性实施例中,eTag 表达为与 IL7R 突变体融合的融合多肽,如本申请实验论证的那样。

[0453] 假型化组件

[0454] 本申请提供的许多方法和组合物均包括假型化组件。通过异源包膜糖蛋白使逆转录病毒假型化后,通常会改变病毒的趋性,还可促进宿主细胞的转导。本申请所用的假型化组件可以包括“结合多肽”;所述结合多肽包括识别并结合靶宿主细胞的一种或多种多肽,通常是糖蛋白,以及一种或多种“融合多肽”,其介导逆转录病毒和靶宿主细胞膜的融合,从而允许逆转录病毒基因组进入靶宿主细胞。在本申请提供的一些实施例中,假型化组件作为多肽/蛋白,或对多肽/蛋白进行编码的核酸序列提供。

[0455] 在一些实施例中,假型化组件是猫内源性病毒 (RD114) 包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒双嗜性包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒亲嗜性包膜蛋白、水泡性口膜炎病毒 (VSV-G) 包膜蛋白和/或副粘病毒麻疹包膜蛋白 H 和 F。

[0456] 在一些实施例中,假型化组件包括衍生自不同蛋白的结合多肽和融合多肽。例如,本申请公开的方法和组合物的重组逆转录病毒可通过麻疹病毒 (MV) 的融合多肽 (F) 和血凝素多肽 (H) 假型化;在非限制性示例中,还可以通过 MV 的临床野生型菌株和包括 Edmonston 菌株 (MV-Edm) 或其片段的疫苗株假型化。不囿于理论限制,认为血凝素 (H) 多肽和融合 (F) 多肽在进入宿主细胞中发挥作用,其中 H 蛋白使 MV 与靶细胞上的受体 CD46、SLAM 和 Nectin-4 结合,F 介导逆转录病毒和宿主细胞膜的融合。在一个说明性实施例中,特别是当靶细胞是 T 细胞和/或 NK 细胞时,结合多肽是麻疹病毒 H 多肽,融合多肽是麻疹病毒 F 多肽。

[0457] 在一些研究中,用截短的 F 和 H 多肽假型化的慢病毒颗粒在滴度和转导效率上有显著增加 (Funke 等人 2008.《分子治疗》16 (8):1427-1436), (Frecha 等人 2008.《血液》112 (13):4843-4852)。当 F 胞质尾区被 30 个残基 (称为 MV (Ed) -F Δ 30 (SEQ ID NO:105)) 截断时,获得最高滴度。对于 H 变体,删除 18 或 19 个残基 (MV (Ed) -H Δ 18 (SEQ ID NO:106) 或 MV (Ed) -H Δ 19) 时出现最佳截短,虽然不管是否用丙氨酸 (MV (Ed) -H Δ 24 (SEQ ID NO:235) 和 MV (Ed) -H Δ 24+A) 替换删除的残基,截短的 24 个残基都会产生最佳滴度。

[0458] 在一些实施例中,包括那些针对转导 T 细胞和/或 NK 细胞的实施例,本申请公开的方法和组合物的重组逆转录病毒通过突变或变种的麻疹病毒融合 (F) 多肽和血凝素 (H) 多肽进行假型化,在说明性示例中,通过麻疹病毒 F 和 H 多肽的胞质域缺失变体进行假型化。在一些实施例中,突变的 F 和 H 多肽是“截短 H”或“截短 F”多肽,其胞质部分已经截短,即氨基酸残基 (或对蛋白进行编码的相应核酸分子的编码核酸) 已经删除。“H Δ Y”和“F Δ X”分别表示这种截短的 H 和 F 多肽,其中“Y”表示从氨基末端删除的 1-34 个残基,“X”表示从胞质域羧基

末端删除的1-35个残基。在另一实施例中，“截短的F多肽”是F Δ 24或F Δ 30和/或“截短的H蛋白”选自由H Δ 14、H Δ 15、H Δ 16、H Δ 17、H Δ 18、H Δ 19、H Δ 20、H Δ 21+A、H Δ 24和H Δ 24+4A，更优选由H Δ 18或H Δ 24组成的基团。在一个说明性实施例中，截短的F多肽是MV (Ed) -F Δ 30，截短的H多肽是MV (Ed) -H Δ 18。

[0459] 在一些实施例中，融合多肽包括表达为一种多肽的多个组件。在一些实施例中，结合多肽和融合多肽从相同的转录物翻译，但从单独的核糖体结合位点翻译；在其他实施例中，结合多肽和融合多肽被裂解肽位点或核糖体跳跃序列分离，裂解肽位点不受理论限制，并在翻译后被裂解，这在文献中是常见的。在一些实施例中，与结合多肽相比，从单独的核糖体结合位点翻译结合多肽和融合多肽会产生更多的融合多肽。在一些实施例中，融合多肽与结合多肽的比率为至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1、至少6:1、至少7:1或至少8:1。在一些实施例中，融合多肽与结合多肽的比率为1.5:1、2:1或3:1 (按下限)，或3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1 (按上限)。

[0460] 活化组件

[0461] 本公开的许多方法和组合物方面包括活化组件或对活化组件进行编码的核酸。与转导到休眠T细胞的慢病毒 (LV) 相关的限制归因于一系列进入前和进入后障壁以及细胞限制因素 (Strebel等人2009.《BMC医学》7:48)。限制之一在于包膜假型LV颗粒不能识别潜在受体并介导与细胞膜的融合。然而，在某些条件下，休眠T细胞与HIV-1慢病毒载体的转导可能很大程度上取决于T细胞受体 (TCR) CD3复合物和CD28共刺激 (Korin&Zack.1998.《病毒学杂志》72:3161-8, Maurice等人2002.《血液》99:2342-50)，以及是否暴露于细胞因子 (Cavalieri等人,2003年)。

[0462] 免疫系统细胞，例如T淋巴细胞，通过受体或受体复合物识别特异性抗原并与之相互作用，在识别这些抗原或与这些抗原相互作用时，所述受体或受体复合物会导致细胞活化并在体内扩增。所述受体的一个示例是抗原特异性T淋巴细胞受体复合物 (TCR/CD3)。T细胞受体 (TCR) 在T淋巴细胞表面表达。成分CD3负责在配体占据TCR后进行胞内信号传递。抗原-CD3复合物的T淋巴细胞受体 (TCR/CD3) 可识别由主要组织相容性复合体 (MHC) 的蛋白呈递给它的抗原肽。MHC和肽的复合物在抗原呈递细胞和其他T淋巴细胞靶标的表面表达。刺激TCR/CD3复合物会导致T淋巴细胞激活和随后的抗原特异性免疫反应。TCR/CD3复合物在免疫系统的效应子功能和调节中发挥主要作用。

[0463] T淋巴细胞还需要第二个共刺激信号才能完全激活。如果没有这样的信号，T淋巴细胞既不会响应与TCR结合的抗原，也会变得无能。例如，这种共刺激信号由T淋巴细胞蛋白CD28提供，所述淋巴细胞蛋白与抗原产生细胞上的CD80和CD86相互作用。另一种T淋巴细胞蛋白ICOS (可诱导共刺激因子) 与ICOS配体结合时，提供共刺激信号。

[0464] T细胞受体 (TCR) CD3复合物的活化和与CD28的共刺激可以通过体外暴露于携带有抗CD3和抗CD28的固体表面 (例如珠子) 而进行。在本申请公开的方法和组合物的一些实施例中，休眠T细胞通过暴露于携带有抗CD3和抗CD28的固体表面而体外激活。

[0465] 在本申请提供的方法和组合物的某些说明性实施例中，能够与CD3和/或CD28结合的多肽作为“活化组件”出现在本发明公开的方法和组合物的重组逆转录病毒表面，这也是本发明的方面。与CD3和/或CD28结合的多肽因能够激活休眠T细胞而称为“活化组件”。

[0466] 在一些实施例中，活化组件是能够与CD3结合的多肽。在一些实施例中，能够与CD3

结合的多肽是抗CD3抗体,或保留了结合CD3的能力的片段。在各说明性实施例中,抗CD3抗体或其片段是单链抗CD3抗体,例如,但不限于抗CD3scFv。在另一说明性实施例中,能够与CD3结合的多肽是抗CD3scfvfc。

[0467] 本发明中提供并可用的多个抗人CD3单株抗体及其抗体片段包括但不限于UCHT1、OKT-3、HIT3A、TRX4、X35-3、VIT3、BMA030 (BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT31、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW24B6、OKT3D、M-T301、SMC2和F101.01。

[0468] 在一些实施例中,活化组件是能够与CD28结合的多肽。在一些实施例中,能够与CD28结合的多肽是抗CD28抗体或保留有结合CD28的能力的片段。在其他实施例中,能够与CD28结合的多肽包括CD80、CD86或其能够与CD28结合并诱导CD28介导的Akt活化的功能片段,例如CD80的外部片段。在各说明性实施例中,抗CD28抗体或其片段是单链抗CD28抗体,例如,但不限于抗CD28scFv。在另一个说明性实施例中,能够与CD28结合的多肽是CD80,或CD80的片段,例如CD80的外部片段。

[0469] 抗CD28抗体在本领域中是已知的,作为非限制性示例,可包括单株抗体9.3、IgG2a抗体(华盛顿州西雅图百时美施贵宝公司Jeffery Ledbetter博士)、单株抗体KOLT-2、IgG1抗体、15E8、IgG1抗体、IgM抗体248.23.2和IgG2a抗体EX5.3D10。

[0470] 在一个说明性实施例中,活化组件包括两种多肽,一种能够与CD3结合的多肽和一种能够与CD28结合的多肽。

[0471] 在某些实施例中,能够与CD3或CD28结合的多肽是抗体、单链单株抗体或抗体片段,例如单链抗体片段。因此,抗体片段可以是,例如,单链片段可变区(scFv)、抗体的抗体结合(Fab)片段、单链抗原结合片段(scFab)、不含半胱氨酸的单链抗原结合片段(scFab Δ C)、片段可变区(Fv)、抗原(CRab)相邻表位特异性构建体或单域抗体(VH或VL)。

[0472] 在一些实施例中,活化组件与异源信号序列和/或异源膜连接序列融合,这两者都有助于将活化组件导向膜。异源信号序列将活化组件靶向内质网,其中异源膜连接序列与一种或多种脂肪酸(也称为翻译后脂修饰)共价连接,使得融合到异源膜连接序列的活化组件锚定在质膜的脂筏中。在一些实施例中,翻译后脂修饰可以通过豆蔻酰化、棕榈酰化或GPI锚定进行。豆蔻酰化是翻译后蛋白修饰,对应于14碳饱和脂肪酸、肉豆蔻酸与真核或病毒蛋白的N末端甘氨酸的共价键。棕榈酰化是一种翻译后蛋白修饰,对应于C16酰基链与蛋白质的半胱氨酸的共价键,而不太频繁地对应与蛋白质的丝氨酸和苏氨酸残基的共价键。GPI锚定指在翻译后修饰过程中,将糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着于蛋白质的C末端。

[0473] 在一些实施例中,异源膜连接序列为GPI锚定连接序列。异源GPI锚定连接序列可以衍生于任何已知的GPI锚定蛋白(在Ferguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW.《糖基化磷脂酰肌醇锚》中进行了评述.Varki A, Cummings RD, Esko JD等人编辑.《糖生物学基础》第2版.冷泉港(NY):美国冷泉港实验室期刊;2009.第11章)。在一些实施例中,异源GPI锚定连接序列是来自CD14、CD16、CD48、CD55 (DAF)、CD59、CD80和CD87的GPI锚定连接序列。在一些实施例中,异源GPI锚定连接序列源自CD16。在各说明性实施例中,异源GPI锚定连接序列衍生自Fc受体Fc γ RIIIb (CD16b) 或衰变加速因子(DAF),也称为补体衰变加速因子或CD55。

[0474] 在一些实施例中,一个或两个活化组件包括异源信号序列,以帮助将活化组件直接表达达到细胞膜上。可以使用在包装细胞系中活跃的任何信号序列。在一些实施例中,信号

序列是DAF信号序列。在各说明性实施例中,活化组件在其N末端融合到DAF信号序列,在其C末端融合到GPI锚定连接序列。

[0475] 在一个说明性实施例中,活化组件包括与源自CD14的GPI锚定连接序列融合的抗CD3scFvFc及与源自CD16b的GPI锚定连接序列融合的CD80;并且两者都在本申请提供的重组逆转录病毒的表面表达。在一些实施例中,抗CD3scFvFc在其N末端融合至DAF信号序列,在其C末端融合至源自CD14的GPI锚定连接序列,并且CD80在其N末端融合至DAF信号序列,在其C末端融合至源自CD16b的GPI锚定连接序列;并且两者都在本申请提供的重组逆转录病毒的表面表达。在一些实施例中,DAF信号序列包括DAF蛋白的氨基酸残基1-30。

[0476] 膜结合细胞因子

[0477] 本申请提供的方法和组合物方面的一些实施例,包括膜结合细胞因子或对膜结合细胞因子进行编码的多核苷酸。细胞因子通常是但不总是分泌蛋白。自然分泌的细胞因子可以作为融合蛋白工程化,以与膜结合。膜结合细胞因子融合多肽包括在本发明公开的方法和组合物中,也是本申请的一个方面。在一些实施例中,重组逆转录病毒包括位于其表面的膜结合细胞因子融合多肽,所述多肽能够与T细胞和/或NK细胞结合并促进其增殖和/或存活。通常,膜结合多肽被合并进重组逆转录病毒的膜中;当细胞被重组逆转录病毒转导时,逆转录病毒和宿主细胞膜的融合会促使多肽与转导细胞的膜结合。

[0478] 在一些实施例中,细胞因子融合多肽包括IL-7、IL-15或其活性片段。膜结合细胞因子融合多肽通常为融合到异源信号序列和/或异源膜连接序列的细胞因子。在一些实施例中,异源膜连接序列是GPI锚定连接序列。异源GPI锚定连接序列可以来源于任何已知的GPI锚定蛋白(在Ferguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW.《糖基化磷脂酰肌醇锚》中进行了评述。Varki A, Cummings RD, Esko JD等人编辑,《糖生物学基础》第2版.冷泉港(NY):美国冷泉港实验室期刊;2009.第11章)。在一些实施例中,异源GPI锚定连接序列是源自CD14、CD16、CD48、CD55(DAF)、CD59、CD80和CD87的GPI锚定连接序列。在一些实施例中,异源GPI锚定连接序列源自CD16。在一个说明性实施例中,异源GPI锚定连接序列源自Fc受体Fc γ RIIIb(CD16b)。在一些实施例中,GPI锚是DAF的GPI锚。

[0479] 在各说明性实施例中,膜结合细胞因子是融合到DAF的细胞因子的融合多肽。众所周知,DAF积聚在脂筏中,这些脂筏被整合到包装细胞芽出的逆转录病毒膜中。因此,不囿于理论限制,认为DAF融合蛋白优选靶向包装细胞的部分膜,这些膜将成为重组逆转录病毒膜的一部分。

[0480] 在非限制的说明性实施例中,细胞因子融合多肽是IL-7,或与DAF融合的IL-7的活性片段。在特定的非限制性说明性实施例中,融合细胞因子多肽依次包括:DAF信号序列(DAF的残基1-31)、没有其信号序列的IL-7和DAF的残基36-525。

[0481] 体内控制组件

[0482] 核糖开关

[0483] 本申请提供的一些组合物和方法包括一种或多种核糖开关或多核苷酸,所述核糖开关或多核苷酸包括一种或多种核糖开关,这些核糖开关本身构成了本公开的不同方面。核糖开关是可用于调节基因表达的细菌中的共同特征,也是实现对生物功能进行RNA控制的手段。核糖开关是多核苷酸,在mRNA的5'-非翻译区出现,并能与诱导或抑制核糖开关活性的小分子配体结合,从而调节基因表达。通常,核糖开关对生成小分子配体时相关的基因

产物加以控制,从而形成反馈回路。尽管已经发现核糖开关也会以反式方式起作用,但大多数情况下核糖开关以顺式方式起作用。天然核糖开关由适配体结构域和功能切换域组成,前者通过三维折叠RNA结构与配体结合,后者基于配体的缺失或存在可诱导或抑制核糖开关的活性。因此,核糖开关实现了两种配体敏感构象,分别代表开和关状态(Garst等人,2011年)。功能切换域可以通过调节以下内容影响多核苷酸的表达:内部核糖体进入位点、逆转录病毒基因构建体中mRNA剪接前供体的可及性、翻译、转录终止、转录物降解、miRNA表达或shRNA表达(Dambach和Winkler 2009)。适配体结构域和功能切换域可用作使合成RNA装置能够控制基因表达的模块化成分,或用作天然适配体、突变/进化的天然适配体,或用作从筛选的随机RNA文库中鉴定的完全合成适配体(McKeague等人,2016年)。

[0484] 嘌呤核糖开关家族经发现有500多个序列,是最大家族之一(Mandal等人2003;US20080269258;和W02006055351)。嘌呤核糖开关具有相似的结构,由具有干预环/结合组件(J1-2、L2、J2-3、L3、J3-1)的三个保守螺旋单体/茎杆结构(P1、P2、P3)组成。核糖开关嘌呤家族的适配体结构域由于序列变异因各种嘌呤化合物,如腺嘌呤、鸟嘌呤、腺苷、鸟苷、脱氧腺苷、脱氧鸟苷(图5)等,其亲和力/调节自然有所不同(Kim等人2007)。

[0485] 一方面,本申请提供了一种用于调节靶多核苷酸表达的分离多核苷酸,包括:对与启动子和核糖开关可操作地连接的靶多核苷酸进行编码的多核苷酸,其中所述核糖开关包括:a.)适配体结构域,其能够与核苷类似物抗病毒药物结合,并且相对于核苷类似物抗病毒药物,与鸟嘌呤或2'-脱氧鸟苷的结合能力降低;和b)能够调节靶多核苷酸表达的功能切换域,其中核酸类似物通过适配体结构域的结合可诱导或抑制功能切换域的表达调节活性,从而调节靶基因的表达。在一些实施例中,靶多核苷酸可以是对区、miRNA或shRNA进行编码的多肽。在非限制性示例中,核糖开关可操作地连接到对具有体内活性的多肽、miRNA或shRNA进行编码的核酸,例如有效治疗疾病的核酸。例如,在这种非限制性示例中,核糖开关可操作地连接到对嵌合抗原受体进行编码的核酸。在本申请提供的非限制性的说明性示例中,靶多核苷酸对本公开中其他各方面的一种或多种工程化信号多肽进行编码。在这些非限制性的说明性示例中,对一种或多种工程化信号多肽的核糖开关和靶多核苷酸可以在包装细胞、重组逆转录病毒、T细胞和/或NK细胞的基因组中发现。

[0486] 在一些实施例中,适配体结构域的长度可为30、35、40、45、50、60、65和70个核苷酸(按下限),或35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95和100个核苷酸(按上限),例如长度为45至80个核苷酸、长度为45至60个核苷酸,或长度为45至58个核苷酸。在各说明性实施例中,核苷类似物抗病毒药物可以是药物配体阿昔洛韦(也称为阿昔洛韦和无环鸟苷)或喷昔洛韦(图5)。在一些实施例中,适配体结构域对核苷类似物抗病毒药物的结合亲和力比对核苷或核苷酸的结合亲和力大,例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。

[0487] 体内控制组件促进了转导T细胞的体内扩增。在一些实施例中,扩增取决于是否存在控制组件。然而,在其他实施例中,转导T细胞的扩增可以至少部分地由其他因素驱动,例如个体体内存在的白介素以及重组T细胞上CAR的ASTR与其配体的结合。

[0488] 在一些实施例中,在从血液中分离PBL之前、期间和/或之后,以及在T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触之前,对个体施用核苷类似物抗病毒药物,例如阿昔洛韦或喷昔洛韦;其中所述重组逆转录病毒包括体内控制组件,在说明性的非限制示例中体内控制

组件是与核苷类似物抗病毒药物结合并调节一个或多个靶多核苷酸表达的核糖开关。所述一种或多种靶多核苷酸可对一种或多种多肽进行编码,在非限制性说明性示例中,所述多肽是一种或多种工程化信号多肽,其中至少一种对淋巴增殖组件进行编码。在一些实施例中,在从血液中分离PBL之前或在T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触之前5、10、15、30和60分钟(按下限)或1.5、2、3、4、5、6、8、12、24、48或72小时,对个体施用核苷类似物抗病毒药物,例如阿昔洛韦或喷昔洛韦。在一些实施例中,在从血液中分离PBL后或在T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触后1.5、2、3、4、5、6、8、12或24小时(按下限)或 $\frac{1}{2}$ 、1、2、3、4、5、6、7、10、14、21或28天(按上限)对个体施用核苷类似物抗病毒药物,例如阿昔洛韦或喷昔洛韦。在一些实施例中,按本申请提供的方法,在从血液中分离PBL后或在T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触后至少1.5、2、3、4、5、6、8、12或24小时或至少2、3、4、5、6、7、10、14、21或28天,对个体施用核苷类似物抗病毒药物,例如阿昔洛韦或喷昔洛韦。在一些实施例中,在将PBL重新输注到个体体内后至少1、2、3、4、5、7、10、14、21、28、30、60、90或120天或5、6、9、12、24、36、48、60、72、84、96、120个月或无限期,对个体施用核苷类似物抗病毒药物,例如阿昔洛韦或喷昔洛韦。在本申请公开的任何一个实施例中,在重新输注PBL之前和/或期间和/或重新输注PBL之后给予核苷类似物抗病毒药物。在一些实施例中,给予核苷类似物抗病毒药物,直到个体不再出现与靶多核苷酸相关的疾病的症状或受其折磨。

[0489] 在一些实施例中,适配体结构域相对于阿昔洛韦或另一种抗病毒药物可以优先与喷昔洛韦结合,从而可以采用联合抗病毒治疗而不影响核糖开关。在一些实施例中,适配体结构域可以与喷昔洛韦结合,其结合亲和力比适配体结构域与阿昔洛韦或其他抗病毒药物的结合亲和力大至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。在一些实施例中,适配体结构域相对于喷昔洛韦或另一种抗病毒药物可以优先与阿昔洛韦结合,从而可以采用联合抗病毒治疗而不影响核糖开关。在一些实施例中,适配体结构域可以与阿昔洛韦结合,其结合亲和力比适配体结构域与喷昔洛韦或其他抗病毒药物的结合亲和力大至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。在一些实施例中,可给予个体喷昔洛韦(泛昔洛韦)和阿昔洛韦(伐昔洛韦)的口服前药。

[0490] 在一些实施例中,分离多核苷酸的适配体结构域与SEQ ID NOs:87-93中任一序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性,并且相对于核苷类似物抗病毒药物保留了与阿昔洛韦结合的能力但与鸟嘌呤或2'-脱氧鸟苷的结合能力下降,并且其中适配体结构域保留了通过与阿昔洛韦结合诱导或抑制表达调节活性的能力。在一些实施例中,分离多核苷酸的适配体结构域与SEQ ID NOs:94-100的适配体结构域具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性,或者与SEQ ID NOs:94-100的适配体结构域相同,并且相对于核苷类似物抗病毒药物保留了与喷昔洛韦结合的能力但鸟嘌呤或2'-脱氧鸟苷的结合能力下降,并且其中适配体结构域保留了通过与喷昔洛韦结合来诱导或抑制表达调节活性的能力。在一些实施例中,分离多核苷酸的区域或核糖开关的区域与SEQ ID NOs:87-100的序列中任一序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性,或与SEQ ID NOs:87-100的序列中的任个序列相同。

[0491] 在一些实施例中,包含分离多核苷酸的适配体结构域区域的DNA序列可与SEQ ID NOs:108-221的序列中的任一序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%或99%的序列一致性,或与SEQ ID NOs:108-221的序列中的任一序列相同。在一些实施例中,分离多核苷酸的区域可与SEQ ID NOs:108-221的序列中的任一序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性,或与SEQ ID NOs:108-221的序列中的任一序列相同。

[0492] 在一些实施例中,包含分离多核苷酸的适配体结构域区域的DNA序列可与SEQ ID NO:108的序列具有至少80%、85%、90%、91%、91.84%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性,或与SEQ ID NO:108的序列相同。在一些实施例中,包含分离多核苷酸的适配体结构域区域的DNA序列可与SEQ ID NO:147的序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.83%、96%、97%、98%或99%的序列一致性,或与SEQ ID NO:147的序列相同。在一些实施例中,包含分离多核苷酸的适配体结构域区域的DNA序列可与SEQ ID NO:164的序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、93.88%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性,或与SEQ ID NO:164的序列相同。在一些实施例中,包含分离多核苷酸的适配体结构域区域的DNA序列可与SEQ ID NO:183的序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.83%、96%、97%、98%或99%的序列一致性,或与SEQ ID NO:183的序列相同。在一些实施例中,包含分离多核苷酸的适配体结构域区域的DNA序列可与SEQ ID NO:198的序列具有至少80%、85%、90%、91%、91.84%、92%、93%、94%、95%、95.83%、96%、97%、98%或99%的序列一致性,或与SEQ ID NO:198的序列相同。

[0493] 在一些实施例中,分离多核苷酸的区域可包括SEQ ID NOs:222-226的共有序列中的任何一个。在一些实施例中,分离多核苷酸的区域可与SEQ ID NOs:222-226的序列中任一序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.83%、96%、97%、98%或99%的序列一致性,或与SEQ ID NOs:222-226的序列中任一序列相同。

[0494] 在本申请公开的任何一个实施例中,分离多核苷酸可以保留与阿昔洛韦和/或喷昔洛韦结合的能力。在本申请公开的任何一个实施例中,分离多核苷酸可以是SEQ ID NOs:87-100或SEQ ID NOs:108-221的序列中任一序列的反向互补序列。在本申请公开的任何一个实施例中,分离多核苷酸可以是SEQ ID NOs:108-221的DNA序列或与SEQ ID NO:108-221互补的DNA序列的转录或RNA形式。在本申请公开的任何一个实施例中,分离多核苷酸可以是SEQ ID NOs:87-100的任一RNA序列的逆转录或DNA形式,或与SEQ ID NOs:87-100的序列中任一RNA序列的逆转录互补的DNA链。

[0495] 在本申请提供的一些实施例中,核糖开关支架可用于突变分析或分子进化。选择用于突变分析或分子进化的核糖开关可以来自任何已知的生物体,例如细菌。在一些实施例中,来自花中间原体属的I-A型脱氧鸟苷核糖开关可用于分子进化。在一些实施例中,衍生的适配体结构域可与来自花中间原体属的I-A型脱氧鸟苷核糖开关的适配体结构域(SEQ ID NO:237)具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的一致性。在其他实施例中,可以使用来自枯草芽孢杆菌的xpt核糖开关。在一些实施例中,衍生的适配体结构域可与来自枯草芽孢杆菌的xpt核糖开关的适配体结构域(SEQ ID NO:243)具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的一致性。

[0496] 适配体结构域可用作模块化成分,并与任何功能切换域结合以影响RNA转录物。在本申请公开的任何一个实施例中,核糖开关可通过调节以下任何活性影响RNA转录物:内部

核糖体进入位点(IRES)、mRNA剪接前供体的可及性、翻译、转录终止、转录物降解、miRNA表达或shRNA表达。在一些实施例中,功能切换域可以控制抗IRES与IRES的结合(参见,例如Ogawa, RNA (2011), 17:478-488,其公开内容通过引用全部并入本申请中)。在本申请公开的任何一个实施例中,不论是否存在小分子配体核糖开关都会影响RNA转录物。在一些实施例中,核糖开关可包括核糖酶。存在小分子配体时,带有核糖酶的核糖开关可抑制或增强靶多核苷酸的转录物降解。在一些实施例中,核糖酶可以是手枪状核糖酶、锤头状核糖酶、扭曲状核糖酶、斧头状核糖酶或HDV(丁型肝炎病毒)核糖酶。

[0497] 在本申请公开的任何一个实施例中,核糖开关可以位于相对于靶多核苷酸的不同位置,所述靶多核苷酸对于核糖开关通常已知的。在一些实施例中,核糖开关可调节mRNA剪接前供体的可及性,并位于靶多核苷酸之前。在一些实施例中,核糖开关可调节多poly(A)尾部的内含物,并位于靶多核苷酸之后。在一些实施例中,核糖开关可调节抗IRES并位于IRES的上游。在非限制性的说明性实施例中,本申请提供的核糖开关可位于与对本申请提供的一种或多种工程化信号多肽进行编码的核酸相对的这些位置中的任何一个位置。

[0498] 在一些实施例中,核糖开关可以在高于37.5℃、38℃、38.5℃、39℃、39.5℃或40℃的温度下变得不稳定,使得核糖开关不再对配体有反应。在一些实施例中,分子进化可用于选择在高于37.5℃、38℃、38.5℃、39℃、39.5℃或40℃的温度下不稳定的核糖开关。

[0499] 在一些实施例中,靶多核苷酸可对miRNA、shRNA和/或多肽进行编码,其中所述靶多核苷酸可操作地连接到启动子。在一些实施例中,靶多核苷酸可以对淋巴增殖组件进行编码。在一些实施例中,靶多核苷酸可以是miRNA或shRNA。在一些实施例中,miRNA或shRNA可以增强STAT5通路或抑制SOCS通路。在一些实施例中,miRNA或shRNA可以SOCS1、SMAD2、TGFb或PD-1的转录物为靶标。在一些实施例中,miRNA是miR-155。在一些实施例中,靶多核苷酸对多肽进行编码,所述多肽可包括CAR,所述CAR包括抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域。

[0500] 另一方面,本申请提供了一种用于调节靶多核苷酸表达的分离多核苷酸,包括:对可操作地连接到启动子的靶多核苷酸进行编码的多核苷酸,以及核糖开关,其中所述核糖开关包括:a)能够与核苷类似物抗病毒药物结合的适配体结构域,其结合亲和力是结合鸟嘌呤或2'-脱氧鸟苷的适配体结构域的至少两倍;和b)能够调节靶多核苷酸的表达的功能切换域,其中核酸类似物通过适配体结构域的结合可诱导或抑制功能切换域的表达调节活性。在一些实施例中,适配体结构域可与核苷类似物抗病毒药物结合,其结合亲和力是结合鸟嘌呤或2'-脱氧鸟苷的适配体结构域的至少3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。在一些实施例中,适配体结构域可以为30、35、40、45、50、55、60、65和70个核苷酸长度(按下限),或35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95和100个核苷酸长度(按上限),例如45至80个核苷酸长度或45至58个核苷酸长度。在各说明性实施例中,核苷类似物抗病毒药物可以是药物配体阿昔洛韦(也称为阿昔洛韦和无环鸟苷)或喷昔洛韦。在一些实施例中,适配体结构域对核苷类似物抗病毒药物的结合亲和力是对核苷或核苷酸的结合亲和力的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。在一些实施例中,核苷类似物通过适配体结构域的结合可诱导核糖开关中的活性。

[0501] 在一些实施例中,适配体结构域对于喷昔洛韦可具有特异性,并且对阿昔洛韦或另一种抗病毒药物缺乏反应性,从而可以采用联合抗病毒治疗而不影响核糖开关。在一些

实施例中,适配体结构域可与喷昔洛韦结合,其结合亲和力是结合阿昔洛韦或其他抗病毒药物的适配体结构域的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。在一些实施例中,适配体结构域对于阿昔洛韦可具有特异性,并且对喷昔洛韦或另一种抗病毒药物缺乏反应性,从而可以采用联合抗病毒治疗而不影响核糖开关。在一些实施例中,适配体结构域可以与阿昔洛韦结合,其结合亲和力是结合喷昔洛韦或其他抗病毒药物的适配体结构域的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。在一些实施例中,可给予个体喷昔洛韦(泛昔洛韦)和阿昔洛韦(伐昔洛韦)的口服前药。在一些实施例中,衍生的适配体结构域可与来自花中间原体属的I-A型脱氧鸟苷核糖开关的适配体结构域具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的一致性。在一些实施例中,衍生的适配体结构域可与来自枯草芽孢杆菌的xpt核糖开关的适配体结构域具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的一致性。在本申请公开的任何一个实施例中,核糖开关可通过调节以下任何活性影响RNA转录物:内部核糖体进入位点、逆转录病毒基因构建体中mRNA剪接前供体的可及性、翻译、转录终止、转录物降解、miRNA表达或shRNA表达。在一些实施例中,功能切换域可以控制反IRES与IRES的结合。在本申请公开的任何一个实施例中,不论是否存在小分子配体核糖开关都会影响RNA转录物。在一些实施例中,核糖开关可包括核糖酶。存在小分子配体时,具有核糖酶的核糖开关可抑制或增强相关基因的转录物降解。在一些实施例中,核糖酶可以是手枪状核糖酶、锤头状核糖酶、扭曲状核糖酶、斧头状核糖酶或HDV(丁型肝炎病毒)核糖酶。在一些实施例中,核糖开关可以在高于37.5℃、38℃、38.5℃、39℃、39.5℃或40℃的温度下变得不稳定,使得核糖开关不再对配体有反应。在一些实施例中,分子进化可用于选择在高于37.5℃、38℃、38.5℃、39℃、39.5℃或40℃的温度下不稳定的核糖开关。在一些实施例中,靶多核苷酸可对miRNA、shRNA和/或多肽进行编码,其中所述靶多核苷酸可操作地连接到启动子。在一些实施例中,靶多核苷酸可以对淋巴增殖组件进行编码。在一些实施例中,靶多核苷酸可以是miRNA,同时miRNA可根据需要刺激STAT5通路或抑制SOCS通路。在一些实施例中,miRNA可以SOCS1、SHP、SMAD2、TGF β 或PD-1的转录物为靶标。在这些实施例中,miRNA可以是miR-155。在一些实施例中,靶多核苷酸对多肽进行编码,所述多肽可包括CAR,所述CAR包括抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域。本申请的其他段落还公开了CAR的其他实施例。

[0502] 在一些实施例中,使用SELEX(通过指数富集配体的系统进化技术)方法,包括但不限于在选择过程和筛选中使用氧化石墨烯等方法,从随机天然嘌呤或鸟嘌呤适配体文库中选择适配体来实现适配体进化。在其他实施例中,随机诱变方法如易错PCR可用于进化适配体构建体或核糖开关构建体,其中适配体通过在试管内或哺乳动物细胞中的筛选结合到本申请所述的任何核糖开关活性中。在其他实施例中,核苷酸的随机文库可用于核糖开关的进化。在本申请公开的任何一个实施例中,可以通过在试管内或哺乳动物细胞中筛选这些文库来识别核糖开关。

[0503] 在一些实施例中,进化的或衍生的适配体结构域可使与天然配体类似物的结合能力增强或与天然配体的结合能力降低。在一些实施例中,适配体结构域可以被配置成与天然配体类似物的结合能力增强或与天然配体的结合能力降低。在一些实施例中,适配体结构域可以衍生自嘌呤核糖开关家族。在一些实施例中,天然配体可以是核苷或核苷酸,类似物可以是核苷类似物或核苷酸类似物。在一些实施例中,核苷类似物是抗病毒药物。在各说

明性实施例中,适配体结构域可以衍生自2'-脱氧鸟苷和鸟嘌呤核糖开关支架,并且衍生的适配体结构域与野生型核糖开关相比与2'-脱氧鸟苷和鸟嘌呤的结合能力降低。

[0504] 在一些实施例中,核糖开关可调节逆转录病毒基因构建体中mRNA剪接前供体的可及性,其中逆转录病毒构建体在一般启动子或T细胞特异性启动子下从反向链驱动CAR基因或其他相关基因。在其他实施例中,核糖开关可调节逆转录病毒基因构建体中的IRES,其中逆转录病毒构建体驱动CAR基因或其他相关基因的翻译。在其他实施例中,核糖开关可控制RNA、miRNA或基因转录物的转录终止,或控制转录物的翻译。在其他实施例中,核苷类似物核糖开关可与核糖酶整合,以在核苷类似物存在时抑制或增强CAR基因或其他相关基因的转录物降解。

[0505] 在一些实施例中,用于调节靶多核苷酸表达的分离多核苷酸是分子克隆载体,其中所述靶多核苷酸包括对可操作地连接到启动子上的靶多核苷酸进行抑制或增强在的多核苷酸和与核苷类似物抗病毒药物结合的核糖开关。分子克隆载体可以是本领域已知的任何类型的分子克隆载体。作为非限制性示例,载体可以是质粒载体、病毒载体或逆转录病毒载体,其中任何一种都可以是表达载体。这种表达载体可以对上文提供的任何靶多核苷酸进行编码。一个或多个限制性位点和/或多个克隆位点可包含在本申请提供的核糖开关的分子克隆载体5'或3'上,使得核糖开关可操作地连接到插入限制性位点和/或多个克隆位点的靶多核苷酸。

[0506] 分子伴侣

[0507] 一方面,本申请提供了一种对个体的淋巴细胞进行基因修饰和扩增的方法,包括:

[0508] 通常在不需事先体外刺激的情况下,使所述个体的休眠T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒进行体外接触,所述重组逆转录病毒包括:

[0509] i. 位于其表面的假型化组件,能够结合T细胞和/或NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合;和

[0510] ii. 多核苷酸,包括可操作地与T细胞和/或NK细胞中的活性启动子连接的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对由体内控制组件调节的第一工程化信号多肽进行编码,其中所述第一工程化信号多肽包括淋巴增殖组件和/或嵌合抗原受体,

[0511] 其中所述接触促进所述重组逆转录病毒转导至少一部分休眠T细胞和/或NK细胞,从而生成基因修饰的T细胞和/或NK细胞;

[0512] B. 将基因修饰的T细胞和/或NK细胞引入所述个体;和

[0513] C. 使基因修饰的T细胞和/或NK细胞与一种化合物进行体内接触,所述化合物作为体内控制组件,影响所述第一工程化信号多肽的表达并促进所述淋巴细胞在体内扩增,从而实现所述个体淋巴细胞的基因修饰和扩增。

[0514] 在各说明性实施例中,转导在没有体外刺激的情况下进行。在各说明性实施例中,化合物是分子伴侣,例如小分子的分子伴侣。在各说明性实施例中,分子伴侣可与淋巴增殖组件和/或CAR成分结合,以增加淋巴增殖组件和/或CAR的增殖活性。可在采集血液之前、接触期间和/或将T细胞和/或NK细胞引入个体体内之后,对个体施用分子伴侣。这方面的一些实施例包括对个体采血。在这些实施例中,引入指细胞的重新引入,这些细胞在重新引入之前已经收集并进行了基因修饰。在各说明性实施例中,如本申请的其他方面,整个过程比现有技术方法更短。例如,整个过程可以在48小时、24小时或12小时内完成。在其他实施例中,

整个过程可以在2、4、6或8小时内(按下限)或12、24、36或48小时内(按上限)完成。

[0515] 因此,在本申请提供的方法和组合物的一些实施例中,体内控制组件是分子伴侣。与本申请中具有体内控制组件(如核糖开关,通常与化合物结合以影响本申请第一或第二工程化信号多肽的淋巴增殖组件或其他成分的表达)的其他实施例相比,分子伴侣是化合物,这种化合物也是体内控制组件,因此,通常通过与本申请第一或第二工程化信号多肽的淋巴增殖组件或其他成分结合从而直接影响其活性。在本申请的方法(包括给予分子伴侣)的这些实施例的说明性示例中,淋巴增殖组件、膜结合细胞因子和/或CAR成分可以是活性较低或无活性的淋巴增殖组件、膜结合细胞因子和/或CAR成分,与分子伴侣结合后可增加其活性。因此,分子伴侣结合的靶标通常是靶多肽。在一些实施例中,提到的多肽可以是第一和/或第二工程化信号多肽或其多肽成分,其活性在与分子伴侣结合后受到影响;在各说明性实施例中,分子伴侣是小分子的分子伴侣。在一些实施例中,多肽可包括淋巴增殖组件,在各说明性实施例中,淋巴增殖组件的活性由分子伴侣、优选小分子的分子伴侣上调。在本申请提供的方法中,分子伴侣可以是与突变淋巴增殖组件和/或无活性CAR成分结合,从而具有活性的化合物。

[0516] 在其他实施例中,淋巴增殖组件或其他信号域已经突变,以允许仅在小分子合成伴侣存在时转运到质膜。在其他实施例中,分子伴侣可促进淋巴增殖组件或其他信号域或蛋白的稳定性以及作为增效剂的半衰期。

[0517] 应了解的是,本发明的各方面和实施例包括许多在此详细提供的相同步骤和组合物。因此,应当理解,本说明书中涉及这些共同组件的教导适用于利用分子伴侣作为体内控制组件的各方面和实施例;除了或代替本申请提供的其他体内控制组件,例如核糖开关,其通常利用与核糖开关结合的分子,例如药物,所述体内控制组件通常与淋巴增殖组件或其他靶分子直接结合。

[0518] 在一些实施例中,分子伴侣是化合物,所述化合物可调节靶标的亚细胞定位,例如,靶蛋白如淋巴增殖组件和/或CAR成分从内质网到质膜的适当折叠和转运或其在表面的半衰期。在其他实施例中,分子伴侣可促进功能失调性靶标的功能性构象,因此充当了增效剂。对于充当天然突变蛋白的分子伴侣或增效剂的分子,其示例包括lumacaftor和ivacaftor。这些蛋白作用于突变的CFTR氯离子通道变体,如G551D或F508del。Ivacaftor增强了G551D或F508del突变离子通道的活性,而lumacaftor则促进了突变氯离子通道的稳定性并随后通过ivacaftor得到增强。这种分子伴侣相关蛋白可以从天然功能的蛋白中产生,并且只有在分子伴侣存在时才能进行功能活性的筛选。因此,这些蛋白只有分子伴侣存在具有活性。可以进行特定伴侣活性筛选的这种分子的示例包括对正常人蛋白没有活性的小分子抗病毒药物或抗感染药物。因此,在一个实施例中,本申请方法中使用的分子伴侣是对正常人蛋白没有活性的小分子抗病毒或抗感染化合物。

[0519] 在一些实施例中,可接触基因修饰的淋巴细胞和/或对个体施用分子伴侣。在一些实施例中,在从血液中分离PBL之前、期间和/或之后,以及在T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触之前,对个体施用化合物。在所述实施例中,重组逆转录病毒包括与分子伴侣化合物结合并受其调节的,活性较低或无活性的淋巴增殖组件和/或CAR成分。

[0520] 对于本申请提供的对淋巴细胞进行基因修饰和扩增的任何实施例,其可作为过继细胞治疗方法的一部分,在从血液中分离PBL之前,或使T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病

毒接触之前的5、10、15、30和60分钟(按下限)或1.5、2、3、4、5、6、8、12或24小时(按下限),对个体施用化合物。在一些实施例中,在从血液中分离PBL之后,或使T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触之后的1.5、2、3、4、5、6、8、12或24小时(按下限)或 $1/2$ 、1、2、3、4、5、6、7、10、14、21或28天(按上限),对个体施用化合物。在一些实施例中,在从血液中分离PBL后或使T细胞和/或NK细胞与重组逆转录病毒接触后至少1.5、2、3、4、5、6、8、12或24小时,或至少2、3、4、5、6、7、10、14、21或28天,对个体施用化合物。在一些实施例中,在将PBL重新输注到个体体内后至少1、2、3、4、5、7、10、14、21、28、30、60、90或120天或5、6、9、12、24、36、48、60、72、84、96、120个月或无限期,对个体施用化合物。在本申请公开的任何一个实施例中,可在PBL再次输注之前和/或期间和/或PBL再输注之后给予化合物。

[0521] 对于本申请的任何实施例,分子伴侣并不在被调节和/或激活它们的化合物结合的体内控制组件中。分子伴侣是化合物,优选小分子化合物,其是体内控制组件并调节淋巴增殖组件和/或CAR的功能性成分的活性。

[0522] 包装细胞系/生成重组逆转录病毒的方法

[0523] 另一方面,本申请提供了一种逆转录病毒包装系统,包括:哺乳动物细胞,包括:a)通过组成型启动子表达,并且能够结合第一配体和第一诱导型启动子,在所述第一配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达式的第一反式激活因子;b)能够结合第二配体和第二诱导型启动子,同时在所述第二配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达式第二反式激活因子;和c)用于逆转录病毒粒子的可包装RNA基因组,其中所述第一反式激活因子调节所述第二反式激活因子的表达,并且其中所述第二反式激活因子调节病毒包装涉及的逆转录病毒多肽的表达,例如gag多肽、pol多肽和/或假型化组件,以及任选的其他多肽,这些多肽将被掺入重组逆转录病毒中或重组逆转录病毒上,并且被认为对包装细胞系例如HEK-293有毒。在某些方面,第二反式激活因子本身对包装细胞系具有细胞毒性。如本申请详细讨论的,假型化组件通常能够与靶细胞的细胞膜结合并促进其融合。因此,不囿于理论限制,该系统能够聚集某些多肽/蛋白,这些多肽/蛋白不抑制、或基本上不抑制、或据信不抑制哺乳动物细胞例如无毒蛋白的增殖或存活,同时培养哺乳动物细胞群体数天或无限期,并逆转录病毒产物所需多肽的诱导加以控制,但这些多肽会抑制或可能抑制或据报道会抑制哺乳动物细胞例如有毒多肽的存活和/或增殖,直到更接近逆转录病毒产生和/或增殖的时间。可包装RNA基因组通常由可操作地连接到启动子的多核苷酸进行编码,为了方便起见,本申请中有时称为第三启动子,其中所述第三启动子通常由第一反式激活因子或第二反式激活因子诱导。在各说明性实施例中,可包装RNA基因组由可操作地连接到第三启动子的多核苷酸进行编码,其中所述第三启动子可由第二反式激活因子诱导。因此,可包装RNA基因组可在更晚的时间点产生,更接近逆转录病毒的收获时间。

[0524] 技术人员应了解可用于逆转录病毒包装系统中的许多不同反式激活因子、配体和诱导型启动子。这种诱导型启动子可以从许多生物体中分离和衍生出来,例如真核生物和原核生物。在本领域中是众所周知的是,衍生自第一生物体的诱导型启动子经修饰可以用于第二生物体,例如第一原核生物和第二真核生物、第一真核生物和第二原核生物等。这种诱导型启动子以及基于这种诱导型启动子但也包括额外调控蛋白的系统包括但不限于:乙醇调节启动子(例如,乙醇脱氢酶I(A1cA)基因启动子、对乙醇反式激活因子蛋白(A1cR)响

应的启动子等)、四环素调节启动子(例如,包括TetActivator、TetON、TetOFF等的启动子系统)、类固醇调节启动子(例如,大鼠糖皮质激素受体启动子系统、人雌激素受体启动子系统、类维生素A启动子系统、甲状腺启动子系统、蜕皮激素启动子系统、米非司酮启动子系统等)、金属调节启动子(例如,金属硫蛋白启动子系统等)、发病相关调节启动子(例如,水杨酸调节启动子、乙烯调节启动子、苯并噻二唑调节启动子等)、温度调节启动子(例如,热休克诱导型启动子(例如,HSP-70、HSP-90、大豆热休克启动子等))、光调节启动子、合成诱导型启动子等。在一些实施例中,可使用米非司酮调节系统。在一些实施例中,可使用具有自动调节反馈回路的米非司酮诱导系统。在一些实施例中,GAL4调节融合蛋白通过一种构建体表达,该构建体也包含转座子末端重复序列以及lox和FRT位点。在一些实施例中,GAL4调节融合蛋白可控制反向tet反式激活因子(rtTA)和BiTRE的表达。在一些实施例中,具有lox和FRT位点的另一构建体包含GAL4上游激活序列(UAS)和E1b TATA盒启动子,该启动子驱动mCherry这样的受体。在一些实施例中,GAL4调节融合蛋白在控制GAL4调节融合蛋白表达的启动子和控制靶多核苷酸表达的启动子中与GAL4上游激活序列(UAS)结合。在一些实施例中,米非司酮、多西环素和嘌呤霉素将用来诱导和选择包装细胞系。

[0525] 在一些实施例中,一种或两种反式激活因子可以被分成两种或多种多肽。在一些实施例中,两种或多种多肽可包括DNA结合域以及能够刺激单独多肽上转录的活化域。该“活化域”不应与“活化组件”混淆,例如与CD3结合的多肽,所述多肽能够激活T细胞和/或NK细胞,并且与T细胞和/或NK细胞接触时,通常会激活所述细胞,如本申请详细讨论的那样。分开的多肽还可包括通过添加配体与能够二聚化的多肽融合物。在一些实施例中,活化域可以是p65活化域或其功能片段。在本申请包装系统的各说明性实施例中,DNA结合域可以是来自ZFHD1的DNA结合域或其功能片段。在一些实施例中,一种多肽可以是与FKBP或其功能突变体和/或片段的融合物,或者多个FKBP和另一种多肽可以是与mTOR的FRB域或其功能突变体和/或片段的融合物,并且配体可以是雷帕霉素或功能性rapalog。在一些实施例中,FRB包括突变K2095P、T2098L和/或W2101F。在一些实施例中,分开的多肽可以是FKBP或其功能片段,钙调磷酸酶A或其功能片段,二聚剂可以是FK506。在一些实施例中,分开的多肽可以是FKBP或其功能片段,以及CyP-Fas或其功能片段,二聚剂可以是FKCsA。在一些实施例中,分开的多肽可以是GAI或其功能片段,GID1或其功能片段,二聚剂可以是赤霉素。在一些实施例中,分开的多肽可以是Snap-tag和HaloTag,或其功能片段,二聚剂可以是HaXS。在一些实施例中,分开的多肽可包括相同多肽。例如,DNA结合域和活化域可表达为具有FKBP或GyrB的融合蛋白,二聚剂可以分别是FK1012或香豆霉素。在一些实施例中,诱导型启动子可以是DNA结合域通常结合的DNA序列。在一些实施例中,诱导型启动子可以不同于DNA结合域通常结合的DNA序列。在一些实施例中,反式激活因子可以是rtTA,配体可以是四环素或多西环素,诱导型启动子可以是TRE。在各说明性实施例中,第一反式激活因子是与FRB融合的p65活化域和与三种FKBP多肽融合的ZFHD1DNA结合域,第一配体是雷帕霉素。在更多说明性实施例中,第二反式激活因子可以是rtTA,第二配体可以是四环素或多西环素,诱导型启动子可以是TRE。

[0526] 在一些实施例中,第一反式激活因子可调节组件的表达,以控制包含共有序列(例如HIV Rev)的转录物的核输出,并且共有序列可以是Rev应答组件。在各说明性实施例中,靶细胞是T细胞。

[0527] 在一些实施例中,假型化组件是逆转录病毒包膜多肽如本申请更详细讨论的那样,假型化组件通常包括结合多肽和融合多肽,这些多肽可与靶细胞结合并促进靶细胞和病毒膜的膜融合。在一些实施例中,假型化组件是猫内源性病毒(RD114)包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒双嗜性包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒亲嗜性包膜蛋白和/或水泡性口膜炎病毒(VSV-G)包膜蛋白。在各说明性实施例中,如本申请进一步详述的,假型化组件包括衍生自不同蛋白的结合多肽和融合多肽。例如,在一个说明性实施例中,特别是当靶细胞是T细胞和/或NK细胞时,结合多肽是麻疹病毒的血凝素(H)多肽(如麻疹病毒的Edmonston菌株)或其胞质域缺失变体,而融合多肽是麻疹病毒的融合(F)多肽(如麻疹病毒的Edmonston菌株)或其胞质域缺失变体。在一些实施例中,融合多肽可以包括表达为一种多肽的多个组件。在一些实施例中,结合多肽和融合多肽可通过相同的转录物翻译,但需要通过单独的核糖体结合位点翻译,或如本申请其他部分所公开的,在翻译后使用肽裂解信号或核糖体跳跃序列裂解多肽,以产生结合多肽和融合多肽。在一些实施例中,其中结合多肽是麻疹病毒H多肽或其胞质域缺失变体,融合多肽是麻疹病毒F多肽或其胞质域缺失变体;与H多肽相比,从单独的核糖体结合位点翻译的F和H多肽中F多肽的量更大。在一些实施例中,F多肽(或其胞质域缺失变体)与H多肽(或其胞质域缺失变体)的比率为至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1、至少6:1、至少7:1或至少8:1。

[0528] 在一些实施例中,第一反式激活因子可调节能够结合和激活靶细胞如T细胞的活化组件的表达。本申请公开的任何活化组件都可以被表达。例如,在这些实施例中,活化组件可包括:a)能够结合和激活CD3的膜结合多肽;和/或b)能够结合和激活CD28的膜结合多肽。在一些实施例中,能够结合和激活CD28的膜结合多肽包括CD80、CD86或其功能片段,例如CD80的胞外域。

[0529] 在一些实施例中,第二反式激活因子可调节RNA的表达;其中RNA对一种或多种靶多肽进行编码;包括作为非限制性示例,本申请公开的任何工程化信号多肽。应注意的是,逆转录病毒包装系统方面及生成重组逆转录病毒方面的方法不限于生成用于T细胞和/或NK细胞转导的重组逆转录病毒,还可生成由重组逆转录病毒转导的任何细胞类型。在某些说明性实施例中,RNA在相反的方向(例如,在相反的链上和相反的方向进行编码)包括逆转录病毒成分,例如gag和pol。例如,RNA可包括长度为5'至3':a5'的末端重复序列或其活性截短片段、对逆转录病毒顺式作用RNA包装组件进行编码的核酸序列、对第一和任选第二靶多肽进行编码的核酸序列(例如,但不限于可被启动子驱动的工程化信号多肽,在一些实施例中仅为了方便起见将启动子称为“第四”启动子)、在靶细胞中具有活性的启动子和长度为3'的末端重复序列或其活性截短片段。在一些实施例中,RNA可包括中心聚嘌呤管道(cPPT)/中心终止序列(CTS)组件。在一些实施例中,逆转录病毒顺式作用RNA包装组件可以是HIV Psi。在一些实施例中,逆转录病毒顺式作用RNA包装组件可以是Rev应答组件。在各说明性实施例中,工程化信号多肽是本申请公开的一种或多种工程化信号多肽。

[0530] 应理解,启动子编号,例如第一、第二、第三、第四启动子等只是为了方便。将一个启动子称为“第四”启动子时,并不暗示还存在任何额外启动子,例如第一、第二或第三启动子,除非明确说明存在这样的额外启动子。

[0531] 在一些实施例中,工程化信号多肽可包括第一淋巴增殖组件。在本申请的其他部分中公开了适合的淋巴增殖组件。作为非限制性示例,淋巴增殖组件可表达为与本申请所

公开的识别域如eTag的融合物。在一些实施例中,可包装RNA基因组可进一步包括对第二工程多肽进行编码的核酸序列,所述第二工程多肽包括在本申请提供的任何实施例中对CAR进行编码的嵌合抗原受体。例如,第二工程多肽可以包括第一抗原特异性靶向区、第一跨膜域和第一胞内激活域。在本申请的其他部分公开了抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域的示例。在靶细胞是T细胞的一些实施例中,如本申请其他部分所公开的,在靶细胞中具有活性的启动子在T细胞中也具有活性。

[0532] 在一些实施例中,可包装RNA基因组可进一步包括如本申请其他部分所讨论的核糖开关。在一些实施例中,对工程化信号多肽进行编码的核酸序列可以为反向。在另一实施例中,可包装RNA基因组可进一步包括核糖开关,并且可选择地,核糖开关可为反向。在本申请公开的任何一个实施例中,包括任何组件的多核苷酸可包括引物结合位点。在各说明性实施例中,转录阻断剂或polyA序列可置于基因附近,以防止或减少未受控制的转录。在本申请公开的任何一个实施例中,对Vpx进行编码的核酸序列可在第二或任选的第三转录单元上,或在可操作地连接到第一诱导型启动子的附加转录单元上。

[0533] 另一方面,本申请提供了一种生成重组逆转录病毒的方法,包括:培养包装细胞群体以使第一反式激活因子聚集,其中所述包装细胞包括通过组成型启动子表达的第一反式激活因子,其中所述第一反式激活因子能够结合第一配体和第一诱导型启动子,用于在所述第一配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达,并且其中通过所述第一反式激活因子调节第二反式激活因子的表达;在所述第一配体参与下培养包括聚集的第一反式激活因子的包装细胞群体,从而使所述第二反式激活因子聚集,其中所述第二反式激活因子能够与第二配体和第二诱导型启动子结合,用于在所述第二配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达;以及在第二配体的参与下培养包装细胞群体,包括聚集的第二反式激活因子,从而诱导病毒包装中涉及的逆转录病毒多肽的表达,例如gag多肽、pol多肽和/或假型化组件,以及可选择的认为可抑制哺乳动物细胞增殖或存活的其他多肽,这些多肽将被掺入重组逆转录病毒中或其上,从而生成重组逆转录病毒。在各说明性实施例中,可包装RNA基因组由可操作地连接到启动子的多核苷酸进行编码,为了方便起见,有时将启动子称为“第三”启动子,这里所述第三启动子具有组成型活性或由第一反式激活因子或在各说明性实施例中由第二反式激活因子诱导,从而生成重组逆转录病毒。假型化组件通常能够结合到靶细胞的细胞膜上,并促进靶细胞膜与重组逆转录病毒膜的融合。假型化组件可以是本领域已知的任何包膜蛋白。在一些实施例中,包膜蛋白可以是水泡性口膜炎病毒(VSV-G)包膜蛋白、猫内源性病毒(RD114)包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒双嗜性包膜蛋白和/或肿瘤逆转录病毒亲嗜性包膜蛋白。本领域技术人员应理解,在生成重组逆转录病毒的方法中可使用许多不同的反式激活因子、配体和诱导型启动子。在本申请的其他部分包括上文中公开了适合的反式激活因子、配体和诱导型启动子。本领域技术人员还应理解,上文关于本申请提供的逆转录病毒包装系统方面的教导也适用于生成重组逆转录病毒方面的方法,反之亦然。

[0534] 在一些实施例中,第一反式激活因子可调节组件的表达,以控制包含共有序列(例如HIV Rev)的转录物的核输出,并且共有序列可以是Rev应答组件(RRE)。在各说明性实施例中,靶细胞通常是T细胞。在一些实施例中,HIV RRE和对HIV Rev进行编码的多核苷酸区域可以分别被HIV-2RRE和对HIV-2Rev进行编码的多核苷酸区域取代。在一些实施例中,HIV

RRE和对HIV Rev进行编码的多核苷酸区域可以分别被SIV RRE和对SIV Rev进行编码的多核苷酸区域取代。在一些实施例中,HIV RRE和对HIV Rev进行编码的多核苷酸区域可以分别被RemRE和对 β 逆转录病毒Rem进行编码的多核苷酸区域取代。在一些实施例中,HIV RRE和对HIV Rev进行编码的多核苷酸区域可以分别被 δ 逆转录病毒rexre和对 δ 逆转录病毒Rex进行编码的多核苷酸区域取代。在一些实施例中,不需要Rev样蛋白,并且RRE可以被顺式作用RNA组件替代,例如组成型转运组件(CTE)。

[0535] 在一些实施例中,假型化组件是病毒包膜蛋白。假型化组件通常包括结合多肽和融合多肽,用于结合和促进病毒与靶细胞膜的膜融合。在一些实施例中,假型化组件可以是猫内源性病毒(RD114)包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒双嗜性包膜蛋白、肿瘤逆转录病毒亲嗜性包膜蛋白和/或水泡性口膜炎病毒(VSV-G)包膜蛋白包膜蛋白。在各说明性实施例中,如本申请进一步详述的,假型化组件包括衍生自不同蛋白的结合多肽和融合多肽。例如,在一个说明性实施例中,特别是当靶细胞是T细胞和/或NK细胞时,结合多肽可以是麻疹病毒H多肽的胞质域缺失变体,融合多肽可以是麻疹病毒F多肽的胞质域缺失变体。在一些实施例中,融合多肽可包括表达为一种多肽的多个组件。在一些实施例中,结合多肽和融合多肽可通过相同的转录物翻译并通过单独的核糖体结合位点翻译,或如本申请其他部分所公开的,在翻译后使用肽裂解信号或核糖体跳跃序列裂解多肽,以产生结合多肽和融合多肽。在一些实施例中,与结合多肽相比,从单独的核糖体结合位点翻译结合多肽和融合多肽会产生更多的融合多肽。在一些实施例中,融合多肽与结合多肽的比率为至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1、至少6:1、至少7:1或至少8:1。

[0536] 在一些实施例中,第一反式激活因子可调节能够结合和激活靶细胞如T细胞的活化组件的表达。在这些实施例中,活化组件可包括:a)能够结合和激活CD3的膜结合多肽;和/或b)能够结合和激活CD28的膜结合多肽。在一些实施例中,能够结合和激活CD28的膜结合多肽包括CD80、CD86或其功能片段,例如CD80的胞外域。在一些实施例中,重组逆转录病毒可包括逆转录病毒膜上的活化组件和核衣壳内的逆转录病毒RNA,从而生成重组逆转录病毒。

[0537] 在一些实施例中,第二反式激活因子可调节RNA的表达,包括从5'至3':5'的末端重复序列或其活性截短片段、对逆转录病毒顺式作用RNA包装组件进行编码的核酸序列、对第一靶多肽和可选择的第二靶多肽进行编码的核酸序列(在非限制性实例中为一种或两种工程化信号多肽)、在靶细胞中具有活性的启动子和长度为3'的末端重复序列或其活性截短片段。在一些实施例中,RNA可以包括cPPT/CTS组件。在一些实施例中,RNA可包括引物结合位点。在一些实施例中,逆转录病毒顺式作用RNA包装组件可以是HIV Psi。在一些实施例中,逆转录病毒顺式作用RNA包装组件可以是Rev应答组件。如本领域技术人员应理解的,在本申请公开的任何一个实施例中,RNA上的逆转录病毒成分,包括RRE和Psi,可以位于任何位置。在各说明性实施例中,工程化信号多肽是本申请公开的一种或多种工程化信号多肽。

[0538] 在一些实施例中,工程化信号多肽可包括第一淋巴增殖组件。在本申请的其他部分中公开了适合的淋巴增殖组件。在一些说明性实施例中,淋巴增殖组件是融合到识别域如eTag的IL-7受体突变体。在一些实施例中,可包装RNA基因组可进一步包括对第二工程多肽进行编码的核酸序列,所述第二工程多肽包括在本申请提供的任何实施例中对CAR进行编码的嵌合抗原受体。例如,第二工程多肽可包括第一抗原特异性靶向区、第一跨膜域和第

一胞内激活域。在本申请的其他部分公开了抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域的示例。在靶细胞是T细胞的一些实施例中,如本申请其他部分所公开的,在靶细胞中具有活性的启动子在T细胞中也具有活性。

[0539] 在一些实施例中,可包装RNA基因组可进一步包括如本申请其他部分所讨论的核糖开关。在一些实施例中,对工程化信号多肽进行编码的核酸序列可以为反向。在另一实施例中,可包装RNA基因组可进一步包括核糖开关,并且可选择地,核糖开关可为反向。在本申请公开的任何一个实施例中,包括任何组件的多核苷酸可包括引物结合位点。在各说明性实施例中,转录阻断剂或polyA序列可置于基因附近,以防止或减少未受控制的转录。在本申请公开的任何一个实施例中,对Vpx进行编码的核酸序列可在第二或任选的第三转录单元上,或在可操作地连接到第一诱导型启动子的附加转录单元上。

[0540] 在用于生成逆转录病毒方面的包装系统或方法的一些实施例中,编码的RNA可包括内含子,所述内含子可以例如通过用于表达靶多肽的相同启动子转录。在某些说明性实施例中,这种内含子可对1、2、3或4个miRNA进行编码。在生成逆转录病毒方面的包装系统或方法的这些和其他实施例中,可包装RNA基因组为11,000KB或更小,在某些情况下为10,000KB或更小。

[0541] 在一些实施例中,第一反式激活因子可以影响一种或多种无毒多肽的表达。在一些实施例中,第二反式激活因子可以影响一种或多种有毒多肽的表达。例如,除了将被转运到包装细胞的细胞膜的多肽外,第一反式激活因子还可诱导逆转录病毒蛋白Rev和Vpx的表达,同时第二反式激活因子可诱导逆转录病毒蛋白GAG、POL、MV (Ed) -F Δ 30和MV (Ed) -H Δ 18或MV (Ed) -H Δ 24的表达以及慢病毒基因组的表达。在一些实施例中,第一反式激活因子可影响一种或多种有毒多肽的表达,和/或第二反式激活因子可以影响一种或多种无毒多肽的表达。

[0542] 另一方面,本申请提供了一种逆转录病毒包装系统,包括:a)哺乳动物包装细胞基因组中的第一转录单元,包括对第一反式激活因子进行编码的核酸序列,其中所述第一转录单元可操作地连接到组成型启动子,并且其中所述反式激活因子能够结合第一诱导型启动子并在所述第一配体参与或未参与的情况下影响可操作地连接到其上的核酸序列的表达,并且其中所述第一反式激活因子能够结合所述第一配体;b.)哺乳动物包装细胞基因组中的第二和可选择的第三转录单元,包括对逆转录病毒REV蛋白进行编码的核酸序列和对第二反式激活因子进行编码的核酸序列,所述第二反式激活因子能够结合第二诱导型启动子并在第二配体参与或未参与的情况下影响可操作地与其连接的核酸序列的表达,其中第二反式激活因子能够结合第二配体,并且其中第二和可选择的第三转录单元可操作地连接到第一诱导型启动子;c.)哺乳动物包装细胞基因组中的第四和可选择的第五转录单元,包括对逆转录病毒gag多肽和逆转录病毒pol多肽进行编码的核酸序列,以及能够结合并促进靶细胞膜与逆转录病毒膜融合的结合多肽和融合多肽,其中所述第四和可选择的第五转录单元可操作地连接到第二诱导型启动子;和d)哺乳动物包装细胞基因组中的第六转录单元,包括,从5'-3'、5'LTR或其活性截短片段、对逆转录病毒顺式作用RNA包装组件进行编码的核酸序列、cPPT/CTS组件、工程化信号多肽进行编码的核酸序列的反向互补序列、内含子、靶细胞中具有活性的启动子、3'LTR或其活性截短片段,其中所述第六转录单元可操作地连接到第二诱导型启动子。

[0543] 另一方面,本申请提供了一种生成重组逆转录病毒的方法,包括:1.) 培养包装细胞群体以使第一反式激活因子聚集,其中所述包装细胞包括:a.) 哺乳动物包装细胞基因组中的第一转录单元,包括对第一反式激活因子进行编码的核酸序列,其中所述第一转录单元可操作地连接到组成型启动子,并且其中所述反式激活因子能够结合第一诱导型启动子并在所述第一配体参与或未参与的情况下影响可操作地连接到其上的核酸序列的表达,并且其中所述第一反式激活因子能够结合所述第一配体;b) 哺乳动物包装细胞基因组中的第二和可选择的第三转录单元,包括对逆转录病毒REV蛋白进行编码的核酸序列和对第二反式激活因子进行编码的核酸序列,所述第二反式激活因子能够结合第二诱导型启动子并在第二配体参与或未参与的情况下影响可操作地与其连接的核酸序列的表达,其中第二反式激活因子能够结合第二配体,并且其中第二和可选择的第三转录单元可操作地连接到第一诱导型启动子;c) 哺乳动物包装细胞基因组中的第四和可选择的第五转录单元,包括对逆转录病毒gag多肽和逆转录病毒pol多肽进行编码的核酸序列,以及能够结合逆转录病毒膜并促进其与靶细胞膜融合的结合多肽和融合多肽,其中所述第四和可选的第五转录单元可操作地连接到第二诱导型启动子;和d.) 哺乳动物包装细胞基因组中的第六转录单元,包括5'至3'、5'LTR或其活性截短片段、引物结合位点(PBS)、对逆转录病毒顺式作用RNA包装组件进行编码的核酸序列、cPPT/CTS组件、对工程化信号多肽进行编码的核酸序列的反向互补序列、内含子、靶细胞中具有活性的靶细胞启动子、3'LTR或其活性截短片段,其中所述第五转录单元可操作地连接到第二诱导型启动子;和2) 在第一配体参与下培养包括第一反式激活因子的包装细胞群体,以聚集第二反式激活因子和逆转录病毒REV蛋白;和3.) 在第二配体参与下培养包含第二反式激活因子和逆转录病毒REV蛋白的包装细胞群体,从而诱导逆转录病毒gag多肽、逆转录病毒pol多肽、结合多肽、融合多肽和逆转录病毒RNA的表达,所述逆转录病毒RNA包括5'至3'、5'LTR或其活性片段、PBS、逆转录病毒顺式作用RNA包装组件、对工程化信号多肽进行编码的核酸序列的反向互补序列、靶细胞启动子和3'LTR或其活性截短片段,其中所述重组逆转录病毒形成并从包装细胞中释放,并且其中所述重组逆转录病毒包括逆转录病毒膜上的结合多肽和/或融合多肽以及核衣壳内的逆转录病毒RNA,从而生成重组逆转录病毒。

[0544] 在本申请提供的一个方面,逆转录病毒包装系统可包括哺乳动物细胞,包括:1.) 通过组成型启动子表达,并且能够结合第一配体和第一诱导型启动子,在所述第一配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达的第一反式激活因子;2.) 能够结合第二配体和第二诱导型启动子,同时在所述第二配体参与或未参与的情况下影响与其可操作地连接的核酸序列的表达的第二反式激活因子;和3) 用于逆转录病毒粒子的可包装RNA基因组,其中所述第一反式激活因子调节第二反式激活因子HIV REV、IL7GPI DAF和活化组件的表达,并且其中所述第二反式激活因子调节gag多肽、pol多肽、逆转录病毒顺式作用RNA包装组件和一种或多种包膜多肽的表达。在各说明性实施例中,第一反式激活因子可以是融合到p65激活域的FRB域和融合到zfh D1DNA结合域的一个或多个FKBP域,第一配体可以是雷帕霉素,第一诱导型启动子可以是一个或多个zfh D1结合位点在各说明性实施例中,第二反式激活因子可以是rtTA蛋白,第二配体可以是四环素或多西环素,第二诱导型启动子可以是TRE启动子或双向TRE启动子。在各说明性实施例中,逆转录病毒顺式作用RNA包装组件可以是HIV Psi。在各说明性实施例中,一种或多种包膜蛋白包括麻疹病毒F和

H多肽的胞质域缺失变体。在各说明性实施例中,转录阻断剂或polyA序列可置于基因附近,以防止或减少未受控制的转录。在一些实施例中,可使用具有核糖开关的雷帕霉素-多西环素诱导慢病毒基因组 (SEQ ID NO:83)。在一些实施例中,可使用雷帕霉素-多西环素诱导型GAG POL ENV (SEQ ID NO:84)。在一些实施例中,可使用雷帕霉素诱导的TET活化剂 (SEQ ID NO:85)。在一些实施例中,可以使用雷帕霉素诱导物诱导的REV srcVpx (SEQ ID NO:86)。

[0545] 本公开的一些方面包括细胞或是细胞,在说明性示例中,所述细胞为哺乳动物细胞,可用作包装细胞以生成逆转录病毒,例如慢病毒,用于T细胞和/或NK细胞的转导。根据本发明,可以选择多种细胞中的任何一种用于在试管内生成病毒,例如重新定向逆转录病毒。通常使用真核细胞,特别是哺乳动物细胞,包括人、猿猴、犬、猫、马和啮齿动物细胞。在说明性示例中,所指细胞是人类细胞。在更多说明性实施例中,细胞无限繁殖,因此是永生性的。可有利地用于本发明的细胞的示例包括NIH 3T3细胞、COS细胞、小猎犬肾细胞、人胚胎293T细胞和源自这些细胞的任何细胞,例如源自293T细胞的gpn1slacZ ϕ NX细胞。可使用高度转染的细胞,例如人胚肾293T细胞。“高度可转染”指至少约50%,更优选至少约70%,最优选至少约80%的细胞可以表达导入的DNA的基因。

[0546] 适合的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生细胞系。适合的哺乳动物细胞系包括人类细胞系、非人类灵长类细胞系、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠)细胞系等。适合的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如美国菌种保藏中心(ATCC) CCL-2)、CHO细胞(例如ATCC CRL 9618、CCL 61、CRL 9096)、293细胞(例如ATCC CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如ATCC CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如ATCC CCL10)、PC12细胞(ATCC CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC CCLI.3)、人胚肾(HEK)细胞(ATCC CRL1573)、HLHepG2细胞、Hut-78、Jurkat、HL-60、NK细胞系(例如NKL、NK92和YTS)等。

[0547] 在本申请公开的任何一个实施例中,生成重组逆转录病毒的方法可包括使哺乳动物包装细胞生长至50%、60%、70%、80%、90%或95%汇合或25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%峰值细胞密度,然后分裂或稀释细胞。在一些实施例中,可用搅拌釜反应器培养细胞。在一些实施例中,可使用技术人员理解的方法将细胞分裂为至少约1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:15或1:20。在一些实施例中,可将细胞稀释至25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的峰值细胞密度。在一些实施例中,在分裂或稀释细胞后,可在加入第一配体之前使细胞生长1、2、3、4、5、6、7、8、10或16小时或1、2、3、4、5、6或7天。在一些实施例中,细胞在第一配体参与下生长1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21或28天,在各说明性实施例中第一配体可以是雷帕霉素或rapalog。在一些实施例中,可以加入第二配体,并且细胞可生长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21或28天,在各说明性实施例中第二配体可以是四环素或多西环素。培养条件取决于所用的细胞和配体以及本领域已知的方法。在示例8中给出了培养和诱导HEK293S细胞的条件的具体示例。

[0548] 如本申请所公开的,重组逆转录病毒是基因传递的常用工具(Miller,《自然》(1992) 357:455-460)。重组逆转录病毒能将未重组的核酸序列传递到广泛的啮齿动物、灵长类和人类体细胞中,这种能力使得重组逆转录病毒非常适于将基因转移到细胞中。在一些实施例中,重组逆转录病毒可以衍生自 α 逆转录病毒属、 β 逆转录病毒属、 γ 逆转录病毒属、 δ 逆转录病毒属、 ϵ 病毒属、慢病毒属或泡沫病毒属。在本申请公开的方法中又多种适合

的逆转录病毒。例如,可以使用小鼠白血病病毒 (MLV)、人类免疫缺陷病毒 (HIV)、马传染性贫血病毒 (EIAV)、小鼠乳腺瘤病毒 (MMTV)、劳氏肉瘤病毒 (RSV)、藤浪肉瘤病毒 (FuSV)、莫洛尼小鼠白血病病毒 (Mo-MLV)、FBR小鼠骨肉瘤病毒 (fr MSV)、莫洛尼小鼠肉瘤病毒 (Mo-MSV)、艾贝尔森鼠白血病病毒 (A-MLV)、禽骨髓细胞瘤病毒-29 (MC29) 和禽成红血细胞病毒 (AEV)。在Coffin等人(“逆转录病毒”1997美国冷泉港实验室期刊,编辑J M Coffin,S M Hughes,H E Varmus pp 758-763)中可找到逆转录病毒的详细清单。一些逆转录病毒基因组结构的细节可以在本领域中寻找。举例来说,关于HIV的细节可以从NCBI Genbank上找到(即基因组登录号AF033819)。

[0549] 在各说明性实施例中,重组逆转录病毒可衍生自慢病毒属。在一些实施例中,重组逆转录病毒可衍生自HIV、SIV或FIV。在更多说明性实施例中,重组逆转录病毒可衍生自慢病毒属中的人类免疫缺陷病毒 (HIV)。慢病毒是复杂的逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env之外,它还含有其他具有调节或结构功能的基因。更高复杂性使慢病毒能在潜伏感染过程中够调节其生命周期。人类免疫缺陷病毒 (HIV) 是一种典型的慢病毒,它是艾滋病的病原体。在体内,HIV可感染很少分裂的终末分化细胞,如淋巴细胞和巨噬细胞。

[0550] 在各说明性实施例中,本申请提供的重组逆转录病毒含有Vpx多肽。在将对Vpx进行编码的核酸整合到其基因组中之后,Vpx多肽可作为例如整合到逆转录病毒膜中的细胞膜结合蛋白(Durand等人《病毒学杂志》(2013) 87:234-242),在包装细胞系中表达。逆转录病毒膜结合的Vpx可通过病毒蛋白酶的处理序列构建,使游离的Vpx一旦掺入病毒颗粒中就会释放出来。具有该功能的Vpx融合的一个示例是Src-Flag-Vpx,其包括c-Src的前11个氨基酸的膜靶向域(MGSSKSKPKDP) (SEQ ID NO:227),接着是病毒蛋白酶裂解域KARVLAEA (SEQ ID NO:228),接着是带Flag标签的Vpx。

[0551] 不囿于理论限制,Vpx多肽通过降解限制因子SAMHD1来刺激逆转录过程的效率,从而有助于休眠细胞的转导。因此,有人认为,在本申请提供的方法中,如果Vpx出现在重组逆转录病毒中以转导T细胞和/或NK细胞,那么一旦含有Vpx的重组逆转录病毒转导细胞时,Vpx会释放到休眠T细胞或休眠NK细胞的细胞质中。然后,Vpx降解SAMHD1,导致游离dNTP增加,这反过来又刺激逆转录病毒基因组的逆转录。

[0552] 逆转录病毒基因组大小

[0553] 在本申请提供的方法和组合物中,重组逆转录病毒基因组(在非限制性的说明性示例中)和慢病毒基因组限制了可包装到病毒颗粒中的多核苷酸的数量。在本申请提供的一些实施例中,由多核苷酸编码区进行编码的多肽可以是保留功能活性的截短多肽或其他缺失变体,从而使多核苷酸编码区编码的核苷酸少于野生型多肽的多核苷酸编码区。在一些实施例中,由多核苷酸编码区进行编码的多肽可以通过一个启动子表达的融合多肽。在一些实施例中,融合多肽可产生裂解信号,以通过一种融合多肽和一种启动子产生两种或多种功能多肽。此外,最初体外转导后一些不需要的功能并未包括在逆转录病毒基因组中,而是通过包装细胞膜出现在病毒或逆转录病毒的表面。本申请中适用这些不同的策略可最大化在逆转录病毒中包装的功能组件。

[0554] 在一些实施例中,待包装的重组逆转录病毒基因组可以是1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000和8,000个核苷酸(按下限)或2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000和11,000个核苷酸(按上限)。待包装的逆转录病毒基因组包括

对本申请详细公开的第一和第二工程化信号多肽进行编码的一个或多个多核苷酸区域。在一些实施例中,待包装的重组逆转录病毒基因组可少于5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000或11,000个核苷酸。本申请其他部分讨论的可包装的功能包括逆转录病毒组装和包装所需的逆转录病毒序列,如逆转录病毒rev、gag和pol编码区,以及5'LTR和3'LTR或其活性截短片段,对逆转录病毒顺式作用RNA包装组件进行编码的核酸序列,和cPPT/CTS组件。此外,在各说明性实施例中,本申请中的重组病毒或逆转录病毒可包括以下任何一种或多种或全部,在一些实施例中,这些逆转录病毒功能区的方向相反:对第一和第二工程化信号多肽进行编码的一个或多个多核苷酸区,其中至少一个包括淋巴增殖组件,且进一步包括ASTR;第二工程化信号多肽,包括嵌合抗原受体;体内控制组件,例如核糖开关,其通常调节第一和/或第二工程化信号多肽的表达;识别域、内含子、在靶细胞如T细胞中具有活性的启动子、2A裂解信号和/或IRES。

[0555] 重组逆转录病毒

[0556] 本申请提供的方法和组合物中公开了重组逆转录病毒,例如,转化T细胞和/或NK细胞以生成基因修饰的T细胞和/或NK细胞。重组逆转录病毒本身就是本发明的方面。在一些实施例中,重组逆转录病毒不能复制,这意味着逆转录病毒一旦离开包装细胞便无法复制。在一些实施例中,重组逆转录病毒可以是腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、巨细胞病毒、痘病毒、禽痘病毒、流感病毒、水泡性口膜炎病毒(VSV)或辛德毕斯病毒。本领域技术人员应了解如何修改本申请公开的用于不同逆转录病毒的方法。例如,在一些实施例中,HIV RRE和对HIV Rev进行编码的多核苷酸区域可以被N末端RGG盒RNA结合基序和对ICP27进行编码的多核苷酸区域取代。在一些实施例中,对HIV Rev进行编码的多核苷酸区域可以被对腺病毒E1B55-kDa和E40rf6进行编码的一个或多个多核苷酸区域取代。

[0557] 因此,在一些实施例中本申请提供了一种重组逆转录病毒,包括(i)假型化组件,能够结合T细胞和/或NK细胞并促进所述重组逆转录病毒的膜融合;(ii)多核苷酸,包括可操作地与T细胞和/或NK细胞中的活性启动子连接的一个或多个转录单元,其中所述一个或多个转录单元对具有嵌合抗原受体的第一工程化信号多肽以及包括淋巴增殖组件的第二工程化信号多肽进行编码,所述嵌合抗原受体包括抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域;其中所述第一工程化信号多肽和/或第二工程化信号多肽的表达通过体内控制组件调节;和(iii)位于其表面的活化组件,其中所述活化组件能够结合T细胞和/或NK细胞,并且不被所述重组逆转录病毒中的多核苷酸进行编码。在一些实施例中,T细胞和/或NK细胞中的活化组件在包装细胞系中无活性。在本申请公开的任何一个实施例中,第一和第二工程化信号多肽均包括嵌合抗原受体,而其他工程化信号多肽则包括淋巴增殖组件。

[0558] 基因修饰T细胞和NK细胞

[0559] 在本申请的方法和组合物的实施例中,产生基因修饰的淋巴细胞,这本身便是本发明的另一方面。在一些实施例中,基因修饰的淋巴细胞是诸如T细胞和/或NK细胞这样的淋巴细胞,这些细胞通过基因修饰表达包括淋巴增殖组件的第一工程化信号多肽和/或包括嵌合抗原受体的第二工程化信号多肽,所述嵌合抗原受体包含抗原特异性靶向区(ASTR)、跨膜域和胞内激活域。

[0560] 在本申请公开的方法和组合物中,一种或两种工程化信号多肽的表达通常由体内控制组件调节,在一些实施例中,体内控制组件是包括核糖开关的多核苷酸。在某些实施例

中,核糖开关能够结合核苷类似物,并且在核苷类似物存在时,表达一种或两种工程化信号多肽。

[0561] 本申请公开的基因修饰的淋巴细胞还包括在其表面表达的多肽,例如用作活化组件的一种或多种多肽、用作假型化组件的一种或多种多肽和/或包含细胞因子的一种或多种融合多肽。在一些实施例中,基因修饰的淋巴细胞包括位于其表面的活化组件。活化组件可包括能够与CD3结合的膜结合多肽;和/或能够与CD28结合的膜结合多肽。在一些实施例中,活化组件是融合到异源GPI锚定连接序列的抗CD3scFvFc和/或融合到异源GPI锚定连接序列的CD80。在一些实施例中,基因修饰的淋巴细胞包括位于其表面的假型化组件。在一些实施例中,基因修饰的淋巴细胞包括位于其表面的融合多肽,其中所述融合多肽是共价连接到DAF的细胞因子。在一些实施例中,细胞因子是IL-7或IL-15。在各说明性实施例中,细胞因子是IL-7。在一些实施例中,细胞因子没有信号序列。在各说明性实施例中,细胞因子在其信号序列后面插入DAF。

[0562] 核酸

[0563] 本申请提供了对本申请的多肽进行编码的核酸。在一些实施例中,核酸是DNA,包括例如重组表达载体。在一些实施例中,核酸是RNA,例如在试管内合成的RNA。

[0564] 在某些情况下,提供了核酸以生成本申请的多肽,例如在哺乳动物细胞中提供。在其他情况下,提供了个体核酸以扩增对本公开的多肽进行编码的核酸。

[0565] 对本公开的多肽进行编码的核苷酸序列能够可操作地连接到转录控制组件,例如启动子和增强剂等。

[0566] 适合的启动子和增强剂组件是本领域已知的。为了在细菌细胞中表达,适合的启动子包括但不限于lacI、lacZ、T3、T7、gpt、lambda P和trc。为了在真核细胞中表达,适合的启动子包括但不限于轻链和/或重链免疫球蛋白基因启动子和增强剂组件、巨细胞病毒立即早期启动子、单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、逆转录病毒长末端重复序列中出现的启动子、小鼠金属硫蛋白-1启动子和各领域已知的组织特异性启动子。

[0567] 适合的可逆启动子,包括可逆诱导型启动子在本领域中是已知的。这种可逆启动子可以从许多生物体例如真核生物和原核生物中分离和衍生出来。将衍生自第一生物体的可逆启动子加以修饰,以用于第二生物体,例如第一原核生物和第二真核生物、第一真核生物和第二原核生物等,这在本领域是众所周知的。这种可逆启动子和基于这种可逆启动子但也包括额外调控蛋白的系统包括但不限于:乙醇调节启动子(例如,乙醇脱氢酶I(alcA)基因启动子、对乙醇反式激活因子蛋白(AlcR)响应的启动子等)、四环素调节启动子(例如,包括TetActivator、TetON、TetOFF等的启动子系统)、类固醇调节启动子(例如,大鼠糖皮质激素受体启动子系统、人雌激素受体启动子系统、类维生素A启动子系统、甲状腺启动子系统、蜕皮激素启动子系统、米非司酮启动子系统等)、金属调节启动子(例如,金属硫蛋白启动子系统等)、发病相关调节启动子(例如,水杨酸调节启动子、乙烯调节启动子、苯并噻二唑调节启动子等)、温度调节启动子(例如,热休克诱导型启动子(例如,HSP-70、HSP-90、大豆热休克启动子等))、光调节启动子、合成诱导型启动子等。

[0568] 在某些情况下,含有合适启动子的基因座或构建体或反式基因通过诱导系统的诱导性进行不可逆转换。用于诱导不可逆开关的合适系统在本领域是众所周知的,例如,诱导不可逆开关可以利用Cre-lox介导的重组(参见,例如,Fuhrmann-Benzakein等人《美国国家

科学院院刊》(2000) 28:e99,其公开内容通过引用并入本文)。本领域已知的重组酶、核酸内切酶、连接酶、重组位点等的任何合适组合可用于产生不可逆的可切换启动子。本申请其他部分描述的用于进行位点特异性重组的方法、机制和要求,可用于产生不可逆的切换启动子,并且在本领域中是众所周知的;参见例如Grindley等人(2006)《生物化学评论年报》567-605和Tropp(2012)《分子生物学》(Jones&Bartlett Publishers,Sudbury,MA),其公开内容通过引用并入本申请。

[0569] 在某些情况下,启动子是CD8细胞特异性启动子、CD4细胞特异性启动子、中性粒细胞特异性启动子或NK特异性启动子。例如,可使用CD4基因启动子;参见例如Salmon等人(1993)《美国国家科学院院刊》90:7739;和Marodon等人(2003)《血液》101:3416。作为另一个示例,可使用CD8基因启动子。NK细胞特异性表达可以通过使用Neri (p46) 启动子来实现;参见,例如,Eckelhart等人(2011)《血液》117:1565。

[0570] 在一些实施例中,例如,为了在酵母细胞中表达,适合的启动子是组成型启动子,例如ADH1启动子、PGK1启动子、ENO启动子、PYK1启动子等;或可调节启动子,例如GALI启动子、GAL10启动子、ADH2启动子、PH05启动子、CUP1启动子、GAL7启动子、MET25启动子、MET3启动子、CYC1启动子、HIS3启动子、ADH1启动子、PGK启动子、GAPDH启动子、ADC1启动子、TRP1启动子、URA3启动子、LEU2启动子、ENO启动子、TP1启动子和AOX1(例如用于毕赤酵母)。选择合适的载体和启动子是本领域普通技术人员已知的。

[0571] 用于原核宿主细胞中的适合启动子包括但不限于:噬菌体T7RNA聚合酶启动子、色氨酸启动子、lac操纵子启动子、杂合启动子(例如lac/tac杂合启动子、tac/trc杂合启动子、trp/lac启动子、T7/lac启动子)、trc启动子、tac启动子等;araBAD启动子、体内调节启动子,例如ssaG启动子或相关启动子(参见,例如美国专利公开第20040131637号)、pagC启动子(Pulkkinen和Miller,《细菌学杂志》1991:173(1):86-93;Alpuche-Aranda等人,《美国国家科学院院刊》,1992;89(21):10079-83)、nirB启动子(Harborne等人(1992)Mal.Micro.6:2805-2813)等(参见,例如Dunstan等人(1999)《感染与免疫》67:5133-5141;McKelvie等人(2004)《疫苗》22:3243-3255;和Chatfield等人(1992)《生物技术》10:888-892)、sigma70启动子,例如共同 Σ 70启动子(参见,例如GenBank登录号AX798980、AX798961和AX798183)、固定相启动子(例如dps启动子、spv启动子等)、毒力岛SPI-2衍生的启动子(参见,例如W096/17951)、actA启动子(参见,例如Shetron-Rama等人(2002)《感染与免疫》70:1087-1096)、rpsM启动子(参见,例如Valdivia和Falkow(1996).Mal.Microbial.22:367)、tet启动子(参见,例如Hillen,W.和Wissmann,A.(1989)In Saenger,W.和Heinemann,U.(eds),分子和结构生物学,蛋白质-核酸相互作用主题Macmillan,London,UK,第10卷,pp.143-162)、SP6启动子(参见,例如Melton等人(1984)《核酸研究》12:7035)等。用于原核生物如大肠杆菌的合适强启动子包括但不限于Trc、Tac、T5、T7和PLambda。用于细菌宿主细胞的操纵子的非限制性示例包括乳糖启动子操纵子(与乳糖接触时,Laci阻遏蛋白改变构象,从而防止Laci阻遏蛋白与操纵子结合)、色氨酸启动子操纵子(与色氨酸复合时,TrpR阻遏蛋白具有与操纵子结合的构象;在没有色氨酸的情况下,TrpR操纵子具有不与操纵子结合的构象)和tac启动子操纵子(例如,参见deBoer等人(1983)《美国国家科学院院刊》80:21-25)。

[0572] 对本公开的多肽进行编码的核苷酸序列可以出现在表达载体和/或克隆载体中。

对两种独立多肽进行编码的核苷酸序列可以在相同或独立的载体中克隆。表达载体可包括可选择标记、复制起点和提供载体复制和/或维护的其他功能。适合的表达载体包括例如质粒、病毒载体等。

[0573] 大量合适载体和启动子是本领域技术人员已知的;许多可商购以用于生成个体重组构建体。以示例方式提供了以下细菌载体:pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene, La Jolla, CA, USA)、pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540和pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。以示例方式提供了以下真核载体:pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL (Pharmacia)。

[0574] 表达载体通常包括位于启动子序列附近的方便限制性位点,以插入对异源蛋白进行编码的核酸序列。存在可在表达宿主中操作的可选择标记。适合的表达载体包括但不限于:病毒载体(例如,基于痘苗病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒的病毒载体(参见,例如,Li等人,《眼科研究与视光学》35:2543-2549,1994;Borras等人,《基因治疗》6:515-524,1999;Li和Davidson),《美国国家科学院院刊》92:7700-7704,1995;Sakamoto等人,《人类基因治疗》5:1088-1097,1999;WO 94/12649,WO 93/03769;WO 93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984和WO95/00655)、腺相关病毒(参见,例如Ali等人,《人类基因治疗》9:81-86,1998,Flannery等人,PNAS 94:6916-6921,1997;Bennett等人,《眼科研究与视光学》38:2857-2863,1997;Jomary等人,《基因治疗》4:683-690,1997,Rolling等人,《人类基因治疗》10:641-648,1999;Ali等人,《人类分子遗传学》5:591-594,1996;Srivastava in WO 93/09239, Samulski等人,《生物学杂志》(1989) 63:3822-3828;Mendelson等人,《生物学》(1988) 166:154-165;和Flotte等人,《美国国家科学院院刊》(1993) 90:10613-10617)、SV40、单纯疱疹病毒、 γ 逆转录病毒、人类免疫缺陷性病毒(参见,例如Miyoshi等人,《美国国家科学院院刊》94:10319-23,1997;Takahashi等人,《生物学杂志》73:78127816,1999)、逆转录病毒载体(例如小鼠白血病病毒、脾坏死病毒和源自逆转录病毒的载体,例如劳氏肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病病毒、人类免疫缺陷性病毒、骨髓增生性肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒)等。

[0575] 如上所述,在一些实施例中,对本申请多肽的进行编码的核酸在一些实施例中是RNA,例如在试管内合成的RNA。在试管内合成RNA的方法是本领域已知的;任何已知的方法都可以用于合成RNA,包括对本申请的多肽进行编码的核苷酸序列。将RNA导入宿主细胞的方法是本领域已知的。例如参见Zhao等人(2010)《细胞研究》15:9053。将包含核苷酸序列的RNA导入宿主细胞可以在试管内、体外或体内进行,其中所述核苷酸序列对本申请的多肽进行编码。例如宿主细胞(例如NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞等)可以用包含对本公开多肽进行编码的核苷酸序列对RNA进行试管内或体外电穿孔。

[0576] 细胞

[0577] 本公开提供了生成重组逆转录病毒的哺乳动物细胞系,其他重组逆转录病毒对靶哺乳动物细胞和靶哺乳动物细胞本身进行基因修饰。

[0578] 适合的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生细胞系。适合的哺乳动物细胞系包括人类细胞系、非人类灵长类细胞系、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠)细胞系等。适合的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如美国菌种保藏中心(ATCC) CCL-2)、CHO细胞(例如ATCC CRL 9618、CCL 61、CRL 9096)、293细胞(例如ATCC CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如ATCC CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如ATCC CCL10)、PC12细胞(ATCC CRL1721)、COS

细胞、COS-7细胞(ATCC CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC CCLI.3)、人胚肾(HEK)细胞(ATCC CRL1573)、HLHepG2细胞、Hut-78、Jurkat、HL-60、NK细胞系(例如NKL、NK92和YTS)等。

[0579] 在某些情况下,细胞不是永生细胞系,而是从个体或前体细胞获得的细胞(例如,主细胞)。例如,在某些情况下,细胞是从个体获得的免疫细胞。作为另一个示例,细胞是从个体获得的干细胞或祖细胞。

[0580] 激活免疫细胞的方法

[0581] 本申请提供了一种在试管内、体外或体内激活免疫细胞的方法。这些方法通常包括使免疫细胞与一个或多个靶抗原接触(在试管内、体外或体内),其中所述免疫细胞经过基因修饰,生成了本公开的微环境限制的CAR。在一个或多个靶抗原参与的情况下,微环境限制的CAR会激活免疫细胞,从而生成活化免疫细胞。免疫细胞包括细胞毒性T淋巴细胞、NK细胞、CD4⁺T细胞、T调节(Treg)细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NK-T细胞、中性粒细胞等。

[0582] 与所述一个或多个靶抗原未参与的情况下免疫细胞生成的细胞因子数量相比,使基因修饰的免疫细胞(例如T淋巴细胞、NK细胞)与一个或多个靶抗原与接触后,可将免疫细胞生成的细胞因子增加至少约10%、至少约15%、至少约为20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。生成数量可增加的细胞因子包括但不限于IL-2和干扰素- γ 。

[0583] 与一个或多个靶抗原未参与的情况下细胞毒性细胞的细胞毒性活性相比,使基因修饰的细胞毒性细胞(如细胞毒性T淋巴细胞)与AAR接触后,可将细胞毒性细胞的细胞毒性活性提高至少约10%、至少约15%、至少约为20%、至少约为25%、至少约30%、至少约40%、在至少50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。

[0584] 与一个或多个靶抗原未参与的情况下细胞毒性细胞的细胞毒性活性相比,使基因修饰的细胞毒性细胞(如细胞毒性T淋巴细胞)与一个或多个靶抗原接触后,可将细胞毒性细胞的细胞毒性活性提高至少约10%、至少约为15%、至少约为20%、至少约为25%、至少约为30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。

[0585] 在其他实施例中,例如,根据宿主免疫细胞,使用基因修饰的宿主细胞与抗原接触可增加或减少细胞增殖、细胞存活、细胞死亡等。

[0586] 生成微环境限制的抗原特异性靶向区的方法

[0587] 在一些实施例中,CAR的抗原结合域(在本发明中也称为“抗原特异性靶向区”或“ASTR”)组成性地结合其同源抗原。在其他实施例中,所述ASTR可能受微环境限制,并且优选地或只在某些异常条件下与其同源抗原,例如本发明公开的肿瘤微环境中存在的同源抗原结合。因为优选地或只在肿瘤微环境的异常条件下与其同源抗原结合的微环境限制ASTR在正常生理条件下会减少与抗原的结合,在某些情况下甚至低于免疫测定水平,所以所述ASTR可降低肿瘤脱靶效应。在某些方面,本申请提供的CAR包括特异性结合靶蛋白的微环境限制的ASTR,其中,所述ASTR是包含重链可变区和轻链可变区的scFv片段。

[0588] 本发明公开的各方面(例如本发明公开的方法、细胞、细胞系、逆转录病毒、多核苷酸或载体)的某些说明性实施例包括含微环境限制的抗原特异性靶向区的CAR。

[0589] 相应地,一方面,本申请提供了一种用于结合靶抗原的嵌合抗原受体,包括:

[0590] a) 微环境限制的抗原特异性靶向区,其在异常条件下与靶抗原结合的能力比在正常生理环境下更强,其中,所述抗原特异性靶向区与所述靶标结合;

[0591] b) 跨膜域;和

[0592] c) 胞内激活域。

[0593] 另一方面,本申请提供了一种用于结合靶抗原的嵌合抗原受体,包括:

[0594] a) 至少一个微环境限制的抗原特异性靶向区,其通过淘选多肽文库选择,并且与正常生理条件相比,在异常条件下靶抗原结合测定的活性更强;

[0595] b) 跨膜域;和

[0596] c) 胞内激活域。

[0597] 在本发明公开的任一方面的一些实施例中,任何嵌合抗原受体均可受微环境限制,使其在异常条件下表现出比在正常生理条件下更强的结合活性。在本发明公开的任一方面的一些说明性实施例中,微环境限制的ASTR从初始多肽文库中确定,并且所述文库在筛选/进化前没有突变/进化的成员和/或在任意多轮重复筛选期间或之间未发生突变。示例性跨膜域和胞内激活域可为本发明公开的CAR的域中的任何一种。

[0598] 一方面,本申请提供了选择微环境限制的ASTR的方法,包括以下淘选多肽展示文库的方式:

[0599] a. 分别在正常生理条件和异常条件下对多肽展示文库中的多肽进行靶抗原结合测定;和

[0600] b. 筛选出在异常条件下表现出的靶抗原结合活性比在生理条件下更强的多肽,从而选定所述微环境限制的抗原特异性靶向区。

[0601] 另一方面,本申请提供了分离微环境限制的ASTR的方法,包括以下淘选多肽文库的方式:

[0602] 使异常条件下的多肽文库与结合到载体上的靶抗原接触,其中用于表达与所述靶抗原结合的多肽的克隆体通过所述靶抗原保持与载体的结合;

[0603] 在生理条件下用结合多肽培育载体;和

[0604] 收集在生理条件下从载体洗脱的克隆体,从而分离微环境限制的抗原特异性靶向区。

[0605] 在本发明公开的任一方面的一些说明性实施例中,微环境限制的抗原特异性靶向区从初始多肽文库中筛选确定,并且所述库在筛选前没有突变/进化的成员和/或在任意多轮重复筛选或淘选期间或之间未发生突变/进化。

[0606] 正常生理条件包括温度、pH值、渗透压、渗透重摩、氧化应激和电解质浓度等条件,并且在个体的施用部位或起效部位的组织或器官处,所述条件属于正常范围内。异常条件指偏离通常可接受范围的条件。一方面,微环境限制的抗原特异性靶向区(即多肽)在正常条件下几乎无活性,但在非正常条件下的活性水平等于或优于正常条件下的活性水平。例如,一方面,微环境限制的抗原特异性靶向区在体温下几乎无活性,但在较低温度下具有活性。另一方面,微环境限制的抗原特异性靶向区在正常条件下可逆或不可逆失活。又一方面,微环境限制的抗原特异性靶向区为治疗性蛋白。又一方面,微环境限制的抗原特异性靶向区用作药物或治疗剂。再一方面,微环境限制的抗原特异性靶向区在高氧血中具有更高或更低活性,例如,穿过肺部或肾脏中的低pH值环境后。

[0607] 在一些实施例中,通过一轮筛选获得微环境限制的抗原特异性靶向区。在某些实施例中,当确定了在异常条件下结合抗原而在生理条件下不结合的游离多肽,或者表达具有所述特性的测试多肽的细胞,或者被具有所述特性的测试多肽包被的噬菌体后,再次使用筛选或淘选法。在一些方法中,收集的噬菌体通过感染细胞实现扩增,所述细胞也可以被辅助噬菌体感染。在其他对细胞表面的多肽进行测试的方法中,可对收集的细胞进行培养,从而通过扩增细胞中对多肽进行编码的多核苷酸来“扩增”由细胞表达的多肽。在一些实施例中,培养表达已确定的多肽的细胞,同时在每轮筛选之间使多核苷酸不发生突变,从而实现所述扩增。所述多核苷酸对所述已确定的多肽进行编码。因此,可通过扩增细胞富集上一轮中收集的多肽,所述细胞所含的多核苷酸对收集的所述多肽进行编码。

[0608] 淘选或筛选方法可仅使用一次,或重复使用1至1000次。在各说明性实施例中,淘选可重复1至20次,或2至10次,或2至5次。

[0609] 在其他方法中,在多轮淘选之间通过一轮或多轮突变/进化产生针对相关抗原(即,靶抗原)的微环境限制的ASTR。在一种方法中确定了一种野生型蛋白,例如,通过生成多肽或蛋白文库并筛选多肽或蛋白文库,获得对靶抗原具有所需亲和力的多肽或蛋白。在以野生型蛋白为抗体的一些实施例中,可以生成和筛选多株抗体文库或单株抗体文库,包括噬菌体展示人源化抗体文库等噬菌体展示抗体文库,从而发现野生型抗体。

[0610] 使野生型蛋白或对野生型蛋白进行编码的核酸序列经历诱变过程,生成可供筛选的突变多肽群,以便确定在肿瘤环境和/或试管内肿瘤替代测定条件下的活性比在正常生理环境下更强(即,与靶抗原的亲合力更强)的突变ASTR,从而生成进化的ASTR。所述方法的示例见W02016033331(“针对修饰的T细胞的条件活性嵌合抗原受体”)或美国第8,709,755号专利,两者的全部内容均以引用方式并入本文。所述生成微环境限制的抗体的方法以引用方式全部并入本文。

[0611] 在其他实施例中,可以通过在异常和生理条件下对比筛选初始多肽文库,并确定所述初始多肽文库中的测试多肽,从而确定微环境限制的抗原特异性多肽(即靶向区,如抗体),与生理条件相比,所述测试多肽优选地或只在异常条件下结合。在一些示例中,与生理条件相比,从筛选的初始多肽文库中确定和分离的微环境限制的抗原特异性多肽(即靶向区,如抗体)优选地或只在异常条件下结合其同源抗原。在这种情况下,任何轮次均不得产生变异/进化。因此,执行各说明性实施例中的方法不会在各轮筛选(即,各轮淘选)之间使多核苷酸突变(所述多核苷酸用于对所述分离出的微环境限制的抗原特异性靶向区进行编码),或与生理条件相比,所述方法仅在异常条件下的单次结合测定中用于分离和确定微环境限制的抗原特异性多肽(即靶向区,如抗体)。所述方法可以通过在各轮筛选和/或淘选之间培养,高保真度扩增和/或稀释对抗原特异性靶向区进行编码的多核苷酸或包含所述区域的宿主生物体来执行,同时不产生任何突变/进化。此外,当微环境限制的抗原特异性多肽(即靶向区,如抗体)分离后,无需重复所述筛选和/或淘选即可执行所述方法,并且多核苷酸不会发生突变/进化,所述多核苷酸对所述分离出的微环境限制的抗原特异性靶向区进行编码。

[0612] 本申请提供的方法中采用的测定用于检测多肽与同源结合配偶体的结合性,包括基于细胞的测定,特别是使用细胞表面展示系统进行的测定,例如哺乳动物细胞表面展示系统。在一种示例性方法中,可将核酸引入适于在细胞中表达的载体,如哺乳动物细胞。所

述核酸对多肽或变体多肽文库进行编码,包括修饰的多肽文库。然后用所述载体转染细胞,并且用所述细胞表达所述多肽。含表面表达的多肽的细胞文库可以与含可溶性或表面结合的同源结合配偶体的溶液接触。可通过能检测与细胞表面结合性的任何测定来检测结合活性。还可以通过评估多肽的功能活性或多肽来测定活性。本领域技术人员已知的任何基于细胞的测定均考虑用于本申请提供的方法,包括细胞增殖测定、细胞死亡测定、流式细胞术、细胞分离技术、荧光激活细胞分选术(FACS)、相显微术、荧光显微术、受体结合测定、细胞信号传导测定、免疫细胞化学和荧光素酶报告基因测定。在一些示例中,采用荧光激活细胞分选术(FACS)进行测定。

[0613] 多肽或蛋白可以由哺乳动物细胞表达为分泌型分子、可溶性分子、细胞表面分子或胞内抗体。在一个示例性方法中,可在大多数或所有细胞展示了锚定在细胞表面的蛋白文库成员的条件下用所述蛋白文库转染所述细胞。可选地,可以使用大多数哺乳动物细胞转染子仅向基因组整合了一个质粒的表达系统。因此,大多数(即,至少约70%、80%或90%)的转染子表达一个多肽中的一个或多个分子。这可以进行验证,例如,分离和培养单个转染子,对表达的序列进行扩增和测序,以确定其是否具有单一序列。

[0614] 在本申请提供的方法的一些示例中,多肽是在哺乳动物细胞表面展示的抗体。本发明所述的任何抗体均可在哺乳动物细胞表面进行表达,包括全长抗体、二价抗体和功能性抗体,如IgG抗体。抗体可为片段,例如Fab片段或scFv片段。抗体可包括Fc区,例如scFv-Fc或全长抗体,其中包含两条重链和两条轻链。本领域技术人员可以选择合适的抗体片段。例如,在哺乳动物细胞中制备的ScFv-Fc和全长抗体可比scFv'或Fab片段具有更多优势。

[0615] 本申请提供的结合测定中可使用的载体包括能固定多肽的结合配偶体(例如配体、受体或抗原)的任何载体。为便于高通量筛选,通常将同源结合配偶体固定在载体上。在本申请提供的方法中,用作载体的载体示例包括但不限于玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡萄聚糖、尼龙、直链淀粉、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁性载体,例如含磁铁的载体。载体可为一颗或多颗珠体或颗粒、微球体、管或平板表面、滤膜和本领域已知的其他载体。示例性载体系统包括但不限于由玻璃、硅、金属、尼龙、纤维素、塑料或复合材料等构成的平整表面,包括多孔板或膜;或者可为珠体形式,如硅胶、可控孔度玻璃以及磁性或纤维素珠。此外,所述方法适用于悬浮液或试柱形式。在一些实施例,通过固定化靶抗原对噬菌体展示或酵母表面展示抗体(例如人源化抗体)文库进行生物淘选(Colby等人,“酵母表面展示的工程抗体亲和力”《酶学方法》388页,26卷(2004)),从而确定和分离微环境限制的抗原特异性多肽(即靶向区,例如抗体)。例如,可以使用本申请提供的噬菌体展示或酵母表面展示方法淘选天然人源化抗体文库或合成的人源化抗体文库。在一些实施例中,初始噬菌体展示过程中,噬菌体克隆体可以转移至哺乳动物载体并用于哺乳动物细胞表面筛选法(如,参见Yoon等人,《BMC生物技术》12:62;1472-6750(2012))。示例2中提供了用于执行噬菌体展示,从而分离微环境限制的抗原特异性靶向区的示例性方法。

[0616] 使用本申请提供的方法确定的微环境限制的ASTR可以为抗体、抗原、配体、配体的受体结合域、受体、受体的配体结合域或亲和体。在微环境限制的ASTR为抗体的实施例中,微环境限制的ASTR可以为全长抗体、单链抗体、Fab片段、Fab'片段、(Fab')₂片段、Fv片段和二价单链抗体或双抗体,其中,抗原特异性靶向区包括抗体的重链和轻链。在一些实施例中,微环境限制的ASTR为单链可变片段所述单链可变片段可具有通过连接子分开的重链和

轻链,其中连接子长度在6-100个氨基酸之间。在一些实施例中,所述重链位于所述嵌合抗原受体的所述轻链的N端。在其他实施例中,所述轻链位于所述重链的N端。微环境限制的ASTR可以为双特异性ASTR。

[0617] 使用本申请提供的方法确定的微环境限制的ASTR通常为多肽,更具体地,为多肽抗体,并且在各说明性实施例中为单链抗体。所述多肽可以与在异常条件下具有比正常条件下更高或更低亲和力的同源抗原结合,但在各说明性实施例中,会与在异常条件下具有比正常条件下更高亲和力的同源抗原结合。在一些实施例中,所述多肽在异常条件下与其同源抗原的亲和力可比在生理(即正常)条件下高10%、20%、25%、50%、75%、90%、95%或99%。在一些实施例中,使用本申请提供的方法确定的ASTR在正常生理条件下与其同源抗原结合的水平不高于使用阴性对照获得的背景水平之上的任何可检测水平,例如阴性对照抗体。

[0618] 可以对表达微环境限制的抗原特异性靶向区的已收集细胞的核苷酸进行测序,从而确定核苷酸序列,所述核苷酸序列对通过本申请提供的方法分离的微环境限制的ASTR进行编码。通过生成可对多肽进行编码的多核苷酸来获得微环境限制的生物嵌合抗原受体(MRB-CAR),所述多肽包括所述微环境限制的抗原特异性靶向区、跨膜域和胞内激活域。可以将微环境限制的抗原特异性靶向区克隆至CAR构建体表达系统,所述系统可用于在其基因组中产生包含CAR的重组慢病毒,然后所述重组慢病毒可以用于转导T细胞,以便对比测试在生理条件和肿瘤选择性环境中表达靶细胞杀伤的CAR-介导的肿瘤抗原。

[0619] 条件活性的条件

[0620] 在本申请提供的方法中,在两组不同的条件下筛选或测试一个或多个多肽(例如单链抗体)的活性,所述条件模拟两种不同生理环境下的一个或多个条件,例如,病态微环境以及非病态微环境下的正常生理条件。所述条件通常为可以在试管内模拟或复制的条件。一组条件可包括一个或多个用于模拟有关疾病的微环境的条件。疾病可以改变胞内和胞外稳态。例如,病态微环境可以模拟肿瘤微环境或癌症微环境下的一个或多个条件。两组条件下的差异活性通常会导致分子产生条件活性。因此,与第二组条件(如,模拟正常或非病态环境下的条件)相比,在第一组条件下(如,模拟肿瘤微环境下的条件)表现出更高活性的分子被确定为微环境限制的候选分子。

[0621] 可以选择两组条件,并随着两种生理环境中的一个或多个不同参数变化,例如,包括但不限于本发明所述或本领域技术人员已知的化学条件、生物条件或物理条件。在两组条件之间变化的参数可包括压力、温度、pH值、离子强度、渗透压、同渗重摩、氧化应激、浊度、曝光量(包括UV、红外或可见光),以及一种或多种溶质的浓度,如电解质、葡萄糖浓度、透明质酸浓度、乳酸或乳酸酯浓度、白蛋白浓度、腺苷水平、R-2-羟戊二酸水平、丙酮酸酯浓度、氧浓度和/或参与氧化剂、还原剂或辅助因子等一种或多种条件。通过改变校准液中的电解质和缓冲系统,可根据需模拟的生物环境调整pH值、缓冲容量、离子环境、温度、葡萄糖浓度和离子强度等生理条件。根据本发明所述的一个或多个条件,可以选择一组模拟正常生理环境的条件,以区别于模拟病态微环境(例如肿瘤微环境)所述条件组。

[0622] 例如,如下文所述,肿瘤微环境的各种参数不同于非肿瘤微环境的相应参数,其中包括但不限于氧浓度、压力、参与的辅助因子、pH值、透明质酸浓度、乳酸脂浓度、白蛋白浓度、腺苷水平、R-2-羟戊二酸水平和丙酮酸酯浓度。与非肿瘤或正常环境中的条件相比,所

述任一参数均可在试管内复制,以模拟肿瘤或癌症环境中的一个或多个条件。可以模拟的正常生理条件包括在身体任何部位的健康或非患病组织中发现的环境,例如胃肠道、皮肤、脉管系统、血液和胞外基质。在本申请提供的测定中,通常可以选择用于评估蛋白活性的缓冲液试管内模拟生理条件。例如,在测定中,可以通过调整用于评估活性的测定缓冲液来模拟病态微环境(例如肿瘤微环境)和非病态环境的任意一个或多个条件。因此,在本申请提供的方法中,在首次测定中改变测定缓冲液的一种成分或多种成分或一个特征或多个特征,或使其产生差异,随后在第一种条件下测试活性,并在第二种条件下对活性进行第二次测定,从而确定微环境限制的多肽。例如,如本发明所述,与非肿瘤环境相比,肿瘤微环境中的参数各不相同,包括但不限于氧、压力、参与的辅助因子、pH值、透明质酸浓度(如较高或较低的透明质酸浓度)、乳酸脂浓度(如较高或较低的乳酸脂浓度)、白蛋白浓度(如较高或较低的白蛋白浓度)、腺苷水平(如较高或较低的腺苷水平),R-2-羟戊二酸水平(如较高或较低的R-2-羟戊二酸水平)和丙酮酸脂浓度(如较高或较低的丙酮酸脂浓度)。更具体地,肿瘤微环境中的条件可包括与非肿瘤微环境条件相比的低pH值,较高浓度的透明质酸,较高浓度的乳酸脂和丙酮酸脂,较高浓度的白蛋白,较高浓度的腺苷,较高浓度的R-2-羟戊二酸,低氧,较低浓度的葡萄糖与略高的温度。例如,微环境限制的ASTR在正常体温下几乎无活性,但在肿瘤微环境中的较高温度下具有活性。另一方面,微环境限制的抗体在正常含氧血中的活性较低,但在含氧较少的肿瘤环境下具有较高活性。又一方面,微环境限制的抗体在pH7.2-7.8的正常生理条件下活性较低,但在肿瘤微环境中的酸性条件(pH5.8-7.0或6.0-6.8)下更具活性。例如,微环境限制的抗体在pH6.7的环境下比在pH7.4的环境下更具活性。本领域技术人员已知的肿瘤微环境中的其他条件也可用作本发明的条件,在所述条件下,有条件的活性ASTR具有不同的亲和力。模拟所述体内肿瘤条件的试管内测定条件在本发明中被称为试管内肿瘤替代测定条件。

[0623] 可以通过选择特定的测定缓冲液在试管内模拟一个或多个所述条件。可选择与模拟正常环境的测定缓冲液成分相同的测定缓冲液模拟病态微环境,已知的或本发明描述的会在病态微环境中改变的一个或多个条件除外。此外,在两组不同条件下筛选或确定一个或多个多肽的活性时,通常只有涉及模拟体内微环境的缓冲液条件的条件会在测定中发生变化。在两组条件下,测定中的其他条件,例如时间、温度和培养条件均可相同。在模拟病态微环境的条件组和模拟正常微环境的条件组中,通常使用相同的碱基缓冲液,但缓冲液成分设计可通过修改一个或多个参数加以区分,例如pH值、氧、压力、参与的辅助因子、pH值、透明质酸浓度(如较高或较低的透明质酸浓度)、乳酸脂浓度(如较高或较低的乳酸脂浓度)、白蛋白浓度(如较高或较低的透明质酸浓度)和/或丙酮酸脂浓度(如较高或较低的丙酮酸脂浓度)。在模拟病态微环境的条件和模拟正常微环境的条件下,可以使用本领域技术人员已知的任何碱基缓冲液。

[0624] 生成微环境限制的细胞的方法

[0625] 本公开涉及提供一种生成微环境限制的细胞的方法所述方法通常涉及含表达载体(如,质粒或逆转录病毒)或RNA(如,在试管内转录RNA)的基因修饰的哺乳动物细胞,包括对本发明公开的微环境限制的CAR进行编码的核苷酸序列。当存在一个或多个靶抗原时,所述基因修饰的细胞受微环境限制。所述基因修饰可在体内、试管内或体外状态下进行。所述细胞可能为免疫细胞(如,T淋巴细胞、辅助T细胞或NK细胞)、干细胞和祖细胞等。

[0626] 部分情况下,所述基因修饰离体执行。例如,从个体中获得T淋巴细胞、干细胞、辅助T细胞或NK细胞;并且从所述个体获得的细胞通过基因修饰表达本公开提供的CAR。当存在一个或多个靶抗原时,所述基因修饰的细胞受微环境限制。部分情况下,所述基因修饰的细胞会在离体后被激活。在其他情况下,所述基因修饰的细胞被引入个体(如,细胞来源的个体);并且所述基因修饰的细胞在体内被激活。例如,当所述个体的细胞表面存在一个或多个所述靶抗原时,不需施用所述抗原。所述基因修饰的细胞与所述个体中的细胞表面存在的所述抗原接触,并且所述基因修饰的细胞被激活。例如,当所述基因修饰的细胞为T淋巴细胞时,所述基因修饰的细胞可对细胞表现出细胞毒性,所述细胞表达在其表面结合CAR的一个或多个靶抗原。

[0627] 暂时降低肿瘤微环境敏感性CAR-T靶向结合能力的方法

[0628] 本申请提供了通过血管和组织pH值的药理学修饰暂时降低肿瘤微环境敏感性CAR-T靶向结合能力的方法。CAR-T细胞中的微环境控制的scFv针对肿瘤脱靶毒性提供了额外保护,这需要局部肿瘤环境条件,以实现T细胞结合。虽然对某些单株抗体治疗具有吸引力,但过继细胞治疗可能形成暂时允许其CAR-T靶标存在的局部环境。例如,根据CAR构建体中存在的胞质域,在局部组织中激活的CAR-T细胞可进一步降低局部pH值。在其他情况下,细胞因子释放综合征和其他与过继细胞治疗相关的病状可能导致血液丧失碳酸氢盐缓冲能力,并导致乳酸酸中毒。目前已确定,通过静脉注射实施的过继细胞治疗会导致暂时性肺萎陷。对于一些细胞疗法,输注速率取决于持续监测的溶解氧(Fischer等人《干细胞与发育》2009年6月;18(5):肺萎陷的程度取决于细胞大小、激活状态、细胞剂量和输注速率.683-691页)。Cruz等人(《细胞疗法》2010年10月;12(6):743-749页)报道了300多次T细胞输注中的不良表现,说明低剂量和缓慢输注可减少肺萎陷。但对于某些高效CAR-T细胞,甚至在肺血管内皮细胞上也存在少量靶标,如Her2(Morgan等人《分子治疗》2010年4月;18(4):843-851页),因为在输注后肺内形成初始高CAR-T细胞浓度,并且这些组织中存在T细胞靶标,所以可产生不受控的即时毒性,使患者病情迅速恶化。在其他情况下,胆管等其他靶外组织中存在的T细胞靶标可能产生不受控的肿瘤脱靶毒性(Lamers《分子治疗》2013年4月;21(4):904-12页),以致在能使用类固醇等其他药物或消除细胞表位之前产生严重的器官毒性。虽然静脉和动脉血浆对酸中毒具有强大的缓冲能力,但通过过继细胞疗法治疗的癌症患者可能出现呼吸性酸中毒、休克、代谢性酸中毒和缺血性酸中毒的情况。

[0629] 一些实施例中提供了在某些条件下暂时提高血管pH值,以降低微环境控制的scFv对其抗原的亲和方法。血液pH值只需变化0.4U即可使某些scFv的亲合力降低10倍以上。在一些实施例中,治疗性pH值控制可通过静脉输注或口服给药的方式实现。在一些实施例中,可以用碳酸氢盐使亲合力失活。在其他实施例中,利用三羟甲基氨基甲烷(也称为氨丁三醇、缓血酸铵和THAM)和CarbicarbTM(以及碳酸氢钠和碳酸钠的等摩尔高渗溶液)不断提高血液pH值,直至减轻肿瘤脱靶毒性。在其他实施例中,小分子质子泵抑制剂也可用于不断提高血液pH值和/或组织pH值,直至减轻肿瘤脱靶毒性。质子泵抑制剂包括但不限于埃索美拉唑(Nexium)、埃索美拉唑和萘普生(Vimovo)、兰索拉唑(Prevacid)、奥美拉唑(Prilosec和Zegerid)和雷贝拉唑(Aciphex)。施用质子泵抑制剂可长期有效调节抗原结合域与其同源抗原的亲合力,这可能长达数天、数周、数月或数年。在其他实施例中,也可控制转运蛋白与泵的转录、翻译,膜表达和稳定性来改变血液pH值和/或组织pH值,从而调节抗

原结合结构域对其同源抗原的亲合力。用于调节pH值的所述转运蛋白和泵的示例包括但不限于钠质子交换家族 (NHE)、碳酸氢根转运蛋白家族 (BCT) 和单羧酸转运蛋白家族的质子泵以及成员。在某些实施例中,碳酸氢盐、THAM或Caricarb™可在输注表达pH值受控的scFv的患者的CAR-T细胞之前或同时施用。所述治疗将减轻与CAR-T细胞输注导致的暂时性肺萎陷相关的即时细胞毒性。

[0630] 更多实施例

[0631] 在某些实施例中,本公开提供的方法包括抑制通过T细胞和/或NK细胞表达的一个或多个内源基因的表达。本申请提供的方法说明了生成表达miRNA或shRNA的重组逆转录病毒的能力,例如,可用于所述方法的miRNA或shRNA。事实上,本申请提供的方法说明可在内含子内对所述miRNA或shRNA进行编码,例如,包括Ef1a内含子。这利用了本方法的优点,使可包装的逆转录病毒基因组中可包含的功能组件数量最大化,以克服现有技术的缺点,同时将所述重组逆转录病毒在过继性T细胞疗法中的有效性最大化。

[0632] 在一些实施例中,有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个miRNA,在各说明性实施例中,有2至5个miRNA,例如4个,与核酸接合,所述核酸对以下一个或多个靶内源性T细胞表达基因进行编码。所述miRNA可纳入重组逆转录病毒基因组中,并通过本申请提供的方法导入T细胞和/或NK细胞。事实上,如本发明所述,可向单个内含子(例如EF1a内含子)中导入1、2、3或4个miRNA。在T细胞上表达的靶内源基因可以包括以下内容,括号中为非限制性的预期失活效应:PD-1 (防止失活);CTLA4 (防止失活);TCRa (安全-预防自身免疫);TCRb (安全-防止自身免疫);CD3Z (安全-防止自身免疫);SOCS (防止失活);SMAD2 (防止失活);miR-155 (促进激活);IFN- γ (降低CRS);cCBL (延长信号传导);TRAIL2 (防止死亡);PP2A (延长信号传导);ABCG1 (通过限制消除胆固醇来增加胆固醇微区含量)。

[0633] 在某些实施例中,可以针对具有类似预期效用的靶基因组合miRNA。在其他实施例中,可以针对具有互补效用的靶基因组合miRNA。在一些实施例中,所述组合可包括CD3Z、PD1、SOCS1和/或IFN- γ 。

[0634] 治疗方法

[0635] 本公开提供了各种使用CAR的治疗方法。当T淋巴细胞或NK细胞中存在本公开涉及的CAR时,所述CAR可介导对靶细胞的细胞毒性。本公开涉及的CAR与靶细胞表面的抗原结合,从而通过基因修饰的T淋巴细胞或NK细胞介导对靶细胞的杀伤,所述T淋巴细胞或NK细胞通过基因修饰生成CAR。CAR的ASTR与靶细胞表面存在的抗原结合。

[0636] 本公开提供了杀死或抑制靶细胞生长的方法,所述方法涉及接触基因修饰的细胞毒性免疫效应细胞(如,细胞毒性T细胞或NK细胞),使T淋巴细胞或NK细胞识别靶细胞表面存在的抗原,并介导对靶细胞的杀伤。所述细胞毒性免疫效应细胞经基因修饰可产生个体CAR。

[0637] 本公开提供了治疗患病个体的所述疾病和病症的方法,包括:a.将包含编码了CAR的多核苷酸序列的表达载体导入从个体获得的外周血细胞,以生成基因工程细胞毒性细胞;和b.对个体施用基因工程细胞毒性细胞。

[0638] 适合治疗的个体

[0639] 本申请提供的方法和组合物适于治疗各种个体。合适的个体包括人类或非人类动物等任何患有疾病或病症的个体,已被诊断出疾病或病症的个体,有罹患疾病或病症的风

险的个体,曾患有疾病或病症并且所述疾病或病症有复发风险的个体,已对所述疾病或病症进行药物治疗,但治疗无效的个体,或已对所述疾病或病症进行药物治疗,但在初始治疗生效后疾病或病症复发的个体。

[0640] 适合通过免疫调节法治疗的个体包括患自身免疫性疾病的个体;器官或组织移植受者的个体等;免疫功能低下的个体;和感染病原体的个体。

[0641] 以下非限制性示例仅供说明示例性实施例,绝非限制本公开的范围和精神。此外,应理解本文公开或主张的任何发明包括本文所述的任一特征或多种特征的所有变化、组合和排列。即使本文未明确阐述特约除外事项,也可从权利要求中明确排除任一特征或多种特征。还应理解,对方法中使用的试剂进行公开旨在根据本发明公开的具体方法,或本领域已知的其他方法与涉及使用所述试剂的方法使用同义词(并提供支持),除非本领域普通技术人员另有理解。此外,在说明书和/或权利要求公开的方法中,除非本领域普通技术人员另有理解,否则本发明公开的任何一种或多种试剂均可用于所述方法。

[0642] 示例

[0643] 示例1.对核苷类似物抗病毒药物有特异性反应的核糖开关的生成

[0644] 该示例提供了在结合鸟苷和脱氧鸟苷的天然结构核糖开关的基础上进行文库筛选的方法。这些核糖开关可作为开发偏性文库的支架,以选择与配体核苷类似物特异性结合的适配体。以前,曾采用等温滴定量热法来显示这些天然核糖开关与其天然配体的结合。其他试验显示,脱氧鸟苷开关与核苷类似物阿昔洛韦和喷昔洛韦的相互作用较弱,这使得该序列被重新设计成新文库。核糖开关的单链区域靶向用于突变,并选择对阿昔洛韦或喷昔洛韦有特异性反应的变异序列。

[0645] 物料

[0646] 选择成分(鸟嘌呤、鸟苷、脱氧鸟苷、阿昔洛韦和喷昔洛韦)从Sigma-Aldrich公司(St.Louis,MO)购得。阿昔洛韦是初始靶,而喷昔洛韦是后几轮使用的特别关注分析物;鸟嘌呤、鸟苷和脱氧鸟苷被用作反向靶。用作分配介质的氧化石墨烯(GrO)从Angstrom Materials公司(Dayton,OH)购得。HEPES(pH 7.3)和MgCl₂从Amersco LLC公司(Solon,OH)购得。KCl从Teknova公司(Hollister,CA)采购。制备5X选择缓冲液(1X,50mM HEPES,100mM KCl,20mM MgCl₂,pH值为7.3)。在无核酸酶的水中对靶标、反向靶和寡核苷酸进行重组,以便进行初步分析和适配体筛选。为所有靶标制备等分试样,并将其储存在-20℃下以获得最长的保质期。

[0647] 生成适配体文库

[0648] 初始适配体文库模板由IBA GmbH公司(Gottingen,Germany)合成,以作为图14中序列的反向互补序列。在图14中,框中的核苷酸在已知序列中是单链核苷酸,其中通过合成过程中引入“突变”与原始靶的类似物更好地结合。实线框内的核苷酸允许进行置换突变;而虚线框内的核苷酸允许进行置换突变以及插入或删除。通过IDT(Coralville,IA)将引物合成为单链DNA。将T7引物(SEQ ID NO:240)与文库模板序列组合以使用钛Taq DNA聚合酶(Clontech;Mountain View,CA)进行引物延伸。在进行选择之前,使用Ampliscribe T7高产转录试剂盒(Epicenter;Madison,WI)对引物延伸材料进行转录,然后使用8M尿素通过10%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化。在选择过程中,使用SuperScript IV逆转录酶(Invitrogen;Carlsbad,CA)和反向引物(SEQ ID NO:241)对文库进行逆转录,使用钛Taq

DNA聚合酶(Clontech;Mountain View,CA)进行扩增。SEQ ID NO:248的适配体的J2-3环变异性为-3至-1,多样性为 $\sim 2.25 \times 10^{10}$ 。SEQ ID NO:250的适配体的J2-3环变异性为0(天然)至+5,多样性为 $\sim 9.38 \times 10^{14}$ 。将两种寡核苷酸(SEQ ID NO:249和250)以1:4160的比例混合,在组合文库池中产生等摩尔多样性,总多样性为 $\sim 9.38 \times 10^{13}$ 。

[0649] 文库筛选

[0650] 氧化石墨烯的 π - π 相互作用使氧化石墨烯对单链核酸具有高亲和力(Zeng等人,2015),鉴于此,可使用指数富集的配基系统进化技术(GO-SELEX)方法(图15)(Park等人,2012)进行文库筛选。其目的是选择不与1X选择缓冲液或反向靶(鸟嘌呤、鸟苷和脱氧鸟苷)相互作用、但可与阳性靶阿昔洛韦结合的序列。

[0651] 每一轮中,首先在1X选择缓冲液中重新折叠给定量的文库(在90℃下变性5分钟,在4℃下变性5分钟,然后在室温下变性)。然后,将反向靶加入重新折叠的文库中,并在37℃下培养30分钟。但第1轮和第2轮例外,其中仅短暂(<1分钟)包括反向靶,以便将文库加载到Gr0上。使文库与反向靶和缓冲成分相互作用后,在37℃下培养10分钟;期间将未结合的文库加载到Gr0上(质量为该轮开始时文库质量的100倍)。然后以7,000×g的速度离心分离溶液,沉淀Gr0。除去含有与反向靶和/或缓冲液结合的序列的上清液。然后用200μL 1X选择缓冲液洗涤沉淀物两次,以7,000×g的速度进行离心分离并在每次洗涤后除去上清液。然后加入含有阳性靶的溶液,并在表1所示条件下在37℃下从Gr0洗脱文库最多60分钟,本质上允许靶标与氧化石墨烯竞争以结合文库。与靶标结合更紧密的序列将从氧化石墨烯中解吸并在培养结束时仍与靶标结合。最后的离心步骤是从仍然与氧化石墨烯结合的非反应性文库中分离出上清液中的释放物质。

[0652] 在阳性选择后,使用含有8M尿素的10%变性PAGE纯化已回收的RNA,然后用分光光度计读数(表1)量化,用SuperScript IV进行逆转录,并使用钛DNA聚合酶PCR扩增。将扩增产物转录成RNA以进行下一轮选择。

[0653] 选择过程的严格性分为三级(表1)。前两轮选择不包括针对反向靶的筛选,以最大化Gr0上样文库。另外,在阳性培养中使用过量阿昔洛韦,从而在最大程度上恢复文库,因此严格性等级较低。在文库恢复后引入反向靶,严格性等级为中等。在这三轮中,通过降低阿昔洛韦与文库的比例来增加文库与靶标结合的竞争力。在回收率超过10%后,实施最后一轮的高严格性选择。反向靶/文库比率保持高水平,阳性靶/文库比率达到1:1,同时阳性培养时间减少,以选择更快的结合序列。在超过两轮高严格条件后,在文库恢复显示超过10%时进行平行评估。

[0654]

代 (严格性)	文库: X-靶标 (培养 30 分钟)	文库: (+)靶标	(+)培养时间 (分钟)	回收率 (%)
G0/R1 (低)	1:1000*	1:1000	60	0.43
G1/R2 (低)	1:1000*	1:1000	60	2.00
G2/R3 (中)	1:1000	1:500	60	3.60
G3/R4 (中)	1:1000	1:100	60	8.73
G4/R5 (中)	1:1000	1:10	60	10.20
G5/R6 (高)	1:1000	1:1	60	12.00
G6/R7 (高)	1:1000	1:1	60	8.60
G7/R8 (高)	1:1000	1:1	60	9.72
G8/R9 (高)	1:1000	1:1	30	20.08
G9/R10 (高)	1:1000	1:1	30	10.62
G10(-) ⁺ (平行评估 1)	-	-	30	3.74
G10(X) ⁺ (平行评估 1)	1:40	-	30	3.60
G10(†) ⁺ ((平行评估 1)	-	1:4	30	14.14
G10(P) ⁺ (平行评估 1)	-	1:4	30	5.46
G11(-) [‡] (平行评估 2)	-	-	30	4.60
G11(X) [‡] (平行评估 2)	1:40	-	30	5.26
G11(†) [‡] (平行评估 2)	-	1:2	30	9.34
G11(P) [‡] (平行评估 2)	-	1:4	30	6.32

[0655] 表1. 选择和评估条件。指每轮的选择或培养条件,回收率指每轮回回收样品和输入文库的比率。在选择过程中监控文库富集情况。*反向靶用于上样,而非延长培养。†上样前培养使用合并反向靶进行。‡用阳性靶阿昔洛韦进行上样前培养。这样做是为了使交叉反应物质的回收率最小化。表格中采用的缩写如下:“X-Targets”指反向靶;“(+)靶”指阿昔洛韦或喷昔洛韦;“(+)培养时间(分钟)”指“文库: (+)靶”溶液在Gr0上培养的时间。G0指0代,依此类推;R1指第1轮,依此类推。对于平行评估(平行评估1和并行评估2),仅用以下进行培养: (-) 仅1X选择缓冲液、(X) 1X选择缓冲液中的反向靶、1X选择缓冲液中的 (+) 阿昔洛韦和1X选择缓冲液中的 (P) 喷昔洛韦。

[0656] 对于两次平行评估,将待评估的文库分成四等份,以进行以上制备和重新折叠(图2)。根据每项条件,将50皮摩尔的文库与1X选择缓冲液组合,重新折叠(在90℃下进行5分钟,在4℃下进行5分钟),然后与1X选择缓冲液中的200μL 10μM组合反向靶在37℃下培养30分钟。然后将这些样品上样到一定量的氧化石墨烯上,上样量为样品中文库质量的100倍,并在37℃下培养10分钟,然后如前文所述用200μL的1X选择缓冲液洗涤两次。然后,将上样的氧化石墨烯样品与200μL反向靶在适当的评估条件并行培养(第一次平行评估使用仅1X选择缓冲液,10μM合并反向靶,1μM喷昔洛韦,1μM阿昔洛韦,或第二次平行评估中使用0.5μM阿昔洛韦;在表1中,这些条件显示为: (-)、(X)、(P)、(+)和(+)),即在37℃下在1X选择缓冲液中培养30分钟。最后的离心步骤是从无反应的氧化石墨烯结合文库中分离解吸的反应文库。使用分光光度读数(表1)量化反应文库,使用含有8M尿素的10%变性PAGE进行验证,并准备进行第二次平行评估。该后续评估继续使用反向靶进行阳性样品的上样前培养,但使用阳性靶阿昔洛韦进行其他样品的预培养。这样做是使给定样品中交叉反应序列的表示最小化(即对阳性样品中反向靶的反应,对阴性样品中的阿昔洛韦、反向靶或喷昔洛韦样品的

反应)。使用分光光度读数(表1)量化第二次平行评估中回收材料,使用含有8M尿素的10%变性PAGE进行验证,并通过逆转录和PCR进行测序以产生双链DNA。

[0657] 测序

[0658] 初始文库进行了10轮基于Gr0的选择和平行评估(表1)。G0-SELEX方法旨在丰富多轮选择中的序列,这些序列与给定的相关靶标结合并去除与非靶化合物或缓冲成分结合的序列。结果,待测序的群体可能包括多个潜在候选适配体的备份。

[0659] 在使用单端读取技术进行平行评估后,采用Illumina MiSeq系统(San Diego,CA)对适配体文库测序。深度测序和后续数据分析减少了传统SELEX所需的大量筛选轮次,但筛选过程可能出现错误和偏差(Schütze等人,2011)。对5个样本进行了测序:对阿昔洛韦反应的最终生成文库、对反向靶反应的最终生成文库、对1X选择缓冲液反应的最终生成文库(阴性条件)、对阿昔洛韦反应的倒数第二代文库、对其他相关靶标喷昔洛韦反应的最后一代文库。这些数据表明,构建的序列家族具有95%的同源性(考虑突变、删除和插入后的序列相似性),以用于候选适配体识别。对阿昔洛韦反应的文库中有1,711,535个原始序列(124,600个单一序列),对喷昔洛韦反应的文库中有2,074,832个原始序列(110,149个单一序列)。

[0660] 候选适配体的选择

[0661] 构建序列家族时主要考虑序列相似性。这意味着阳性靶群体中的序列频率也在考虑范围内,但更强调相似序列之间的变异程度,最低要求是具有95%的同源性(不要求整个序列100%匹配才能加入某一序列家族,但最多只能有2个碱基不匹配,插入或删除。)因此,作为候选适配体,排名靠前的可能是那些拥有最多成员的家族。构建家族后,可考虑特定群体中家族的相对存在性——阴性群体和反向靶群体中频繁出现的家族被认为是较弱的候选适配体,因为他们与缓冲液成分或反向靶成分结合时具有非特异性相互作用。此外,富集率较高的家族(即最终阳性群体与倒数第二个阳性群体的比率较大)提高了他们的候选资格,因为相对于其他群体,富集率与候选适配体的结合亲和力有关(Levay等人,2015; Wang等人,2014)等。在这些条件下,几个候选家族似乎是结合阿昔洛韦(表2)和喷昔洛韦的强候选家族。

[0662]

候选家族 序列号	SEQ ID NO:	序列	长度	一致性%	
				共有	野生型
582-1	108	ACAGCTTAGCGTAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	100	80.77
582-2	109	ACAGCTTAGGATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	95.92	80.77
582-3	110	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	95.92	80.77

[0663]

582-4	111	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTGACAGACT	49	95.92	80.77
582-5	112	ACAGCATAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	95.92	82.69
582-6	113	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATGTACAGACT	49	95.92	80.77
582-7	114	ACAGCTAGCGTAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	48	97.96	80.77
582-8	115	ACAGCTTAGCATTATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	95.92	80.77
582-9	116	ACAGTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	48	95.92	82.69
582-10	117	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCGGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95.92	80.77
582-11	118	ACAGCTTAGCTTAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	97.96	80.77
582-12	119	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCCATTACAGACT	49	95.92	80.77
582-13	120	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCAATTACAGACT	49	95.92	80.77
582-14	121	ACAGCTTAGCATAATGGATACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95.92	80.77
582-15	122	ACAGCTTAGCATTGTGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	93.88	78.85
582-16	123	ACAGGTTAGCATAATGGCTACCGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	93.88	82.69
582-17	124	ACAGCTTAGCGTAATGGCTACTGAC GCCGCCAAACCTATTACAGACT	49	97.96	82.69
582-18	125	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAAACCTATTCCAGACT	49	93.88	80.77
582-19	126	ACAGCCTAGCATAAGGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	93.88	82.69
582-20	127	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAG GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	95.92	80.77
582-21	128	ACAGCTTACCTTAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	95.92	78.85
582-22	129	ACAGCTTAGCATAATGGCTACCGAC GCTGTCCAAACCTATTACAGACT	49	93.88	78.85
582-23	130	ACAGCTTAGCGTAATGGCTACTGGC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	97.96	78.85
582-24	131	ACAGCTTAGCATACTGGCTACTGAC GCCGCCAAACCTATTACAGACT	49	93.88	82.69
582-25	132	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCTAACCTATTACAGACT	49	95.92	80.77
582-26	133	ACAGGTTAGCATAATGCCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTACAGACT	49	93.88	82.69

[0664]

582-27	134	ACAGCTTAGCATAATTGCTACTGAC GCCGTTCAAACCTATTTACAGACT	49	93.88	82.69
582-28	135	ACAGCTTAGCATAAAGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95.92	80.77
582-29	136	ACAGCTTAGCGTAATGGCTACTGAC GCCGTCTAAACCTATTTCCAGACT	49	95.92	80.77
582-30	137	ACAGGTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTAGAGACT	49	93.88	86.54
582-31	138	ACAGGGTAGCGTAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95.92	84.62
582-32	139	ACAGCGTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTTCAAACCTATTTACAGACT	49	93.88	86.54
582-33	140	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACTCATTTACAGACT	49	93.88	78.85
582-34	141	ACAGCGTAGCATAAGTGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	93.88	82.69
582-35	142	ACAGCTTAGTGTAATGGCTACTGAC GCTGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95.92	76.92
582-36	143	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GGCGTTCAAACCTATTTACAGACT	49	93.88	82.69
582-37	144	ACAGGTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTATAGACT	49	93.88	84.62
582-38	145	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTGTGCGACT	48	91.84	80.77
582-39	146	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTACGACT	48	95.92	80.77
582 共有 序列	222	ACAGNNTASBDTWVDKSMTACYGR SGSBGYYYWAAMYHATKBHBNGAC T 当位置5的N可以是C、G或无核苷酸时， 位置6的N可以是A、C、G、T或无核苷 酸，位置45的N可以是A或无核苷酸。	49	-	-
769-1	147	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGC GCCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	100	82.69
769-2	148	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGC GCCCTCAAACCTATTTAGAGACT	48	97.92	80.77
769-3	149	ACAGGTTAGCATAATGTGCTATTGCG CCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95.83	84.62
769-4	150	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGC GCATTCAAACCTATTTAGAGACT	48	97.92	80.77
769-5	151	ACAGGTTAGCATAATGTGCTAGTGC GCCTTCAAACCTATTTTGAGACT	48	95.83	84.62
769-6	152	ACAGGTTATCATAATGTGCTAGTGCG CCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95.83	82.69
769-7	153	ACAGGTTAGCATGATGTGCTAGTGC GCCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95.83	82.69
769-8	154	ACAGGTTAGCATAATGGGCTAGTGC GCCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95.83	86.54

[0665]

769-9	155	ACAGGTCAGCAAAATGTGCAAGTG CGCCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95.83	78.85
769-10	156	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGC GCCTTCAAACCTATCTGGAGACT	48	95.83	82.69
769-11	157	ACAGCTTAGCATAATGTGCTAGTGC GCCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95.83	82.69
769-12	158	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGC GCCTTCAAACCTATTTACAGACT	48	97.92	80.77
769-13	159	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGC GCCTTCAAACATATTTAGAGACT	48	97.92	80.77
769-14	160	ACAGGGTAGCATAATGTGCTAGTGC GCCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95.83	86.54
769-15	161	ACAGGTTAGCATAATGTGCTAGTGC GCCCTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95.83	82.69
769-16	162	ACAGGTTAGCATAATGTGCCAGTGC GCCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95.83	82.69
769-17	163	ACAGGTCAGCATAATGGGCTAGTGC GCCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	97.92	84.62
769 共有 序列	223	ACAGSKYAKCAWRATGKGCHAKTG CGCMYTCAAACMTATYTDSAGACT	48	-	-
795-1	164	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	100	83.02
795-2	165	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTACAGACT	49	97.96	81.13
795-3	166	ACAGCGAAGCATAATGGCTTCTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97.96	81.13
795-4	167	ACAGCCAAGCATACTGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	95.92	79.25
795-5	168	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCGCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97.96	81.13
795-6	169	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GGCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97.96	80.77
795-7	170	ACAGCGAGGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97.96	81.13
795-8	171	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCTTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97.96	84.91
795-9	172	ACAGCGAAGCATAATGGCTACAGAC GCCCTCAAACCTATTTGCAGACT	49	95.92	80.77
795-10	173	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGAGACT	48	97.96	83.02
795-11	174	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTGTCGACT	48	93.88	76.92
795-12	175	ACAGCCAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97.96	81.13
795-13	176	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGGCGACT	49	95.92	83.02

[0666]

795-14	177	ACAGCGAAGCATAATGTCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97.96	81.13
795-15	178	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCAAACCCTATTTGTAGACT	49	95.92	83.02
795-16	179	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97.96	83.02
795-17	180	ACAGGTAGCATAATGGCTACTGACG CCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	48	95.92	84.91
795-18	181	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTCTAGACT	49	95.92	81.13
795-19	182	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGTAGACT	49	97.96	83.02
795 共有 序列	224	ACAGNSWRGCATAMTGKCTWCWG ACGSCBKCAAAMCYTANTTVNMGA CT 当位置5的N可以是C或无核苷酸时，位 置40的N可以是T或无核苷酸，位置44的 N可以是C、G、T或无核苷酸。	49	-	-
935-1	183	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	100	86.79
935-2	184	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGAGACT	47	97.92	86.79
935-3	185	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTT ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97.92	84.62
935-4	186	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTCTAGACT	48	97.92	84.91
935-5	187	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGGAGACT	48	97.92	88.68
935-6	188	ACAGGGTAGCATAAGTGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97.92	84.91
935-7	189	ACAGGGTAGCATGATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97.92	84.91
935-8	190	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTAGTAGACT	48	97.92	84.91
935-9	191	ACAGGGTAGCATAATGGGCTATTTG ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97.92	84.91
935-10	192	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG CCGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97.92	86.54
935-11	193	ACAGTGTAGCATAATTGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	95.83	83.02
935-12	194	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCTTTCACCTTTTGTAGACT	48	95.83	83.02
935-13	195	ACAGGGTAGCATAAGGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97.92	84.91
935-14	196	ACAGGGTAGCATAATGGACTACTTG ACGCCTCCACCTATTTGTAGACT	48	95.83	81.13

[0667]

935-15	197	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG TCGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97.92	84.62
935 共有 序列	225	ACAGKGTGCGCATRRKKGRCTAYTTK HCGCYTYCACCTWTTWSNAGACT 位置43的N可以是G、T或无核苷酸	48	-	-
946-1	198	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	100	84.62
946-2	199	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCAGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97.96	82.69
946-3	200	ACATGTAGCATAATGGGCTACTGAC GCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	48	91.84	86.54
946-4	201	ACAGCGTAGCATAAGTGGGCTGCAGA CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97.96	82.69
946-5	202	ACAGTGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCCTTCAAACCTATTTGGAGACT	49	93.88	88.46
946-6	203	ACAGTGTAGCATAATGGGCTGCTGA CGCCGTCAAACCTATTTGAAGACT	49	93.88	86.54
946-7	204	ACAGCGTAGCATAATGGGCTACAGG CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	95.92	84.62
946-8	205	ACAGCGTAGCATAATGGGCTACTGG CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	93.88	86.54
946-9	206	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCCGTCAAACCTATTTGAGACT	48	97.96	84.62
946-10	207	ACAGGTAGCATAATGGGCTGCAGAC GCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	48	97.96	84.62
946-11	208	ACAGGTAGCATAATGGGCTGCTGAC GCCGTCAAACCTATTTACAGACT	48	93.88	84.62
946-12	209	ACAGCGTAGCATATTGGGCTGCAGA CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97.96	82.69
946-13	210	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCCTTCAAACCTATTTGGAGACT	49	95.92	88.46
946-14	211	ACAGTGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCCGTCAAACCTATTTGAGACT	48	95.92	84.62
946-15	212	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCTGA CGCCGTCAAACCTATTTGGAGACT	49	95.92	88.46
946-16	213	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCCGTCAAACCTATTTACAGACT	49	97.96	82.69
946-17	214	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCTGA CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97.96	86.54
946-18	215	ACAGGGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCCGTCAAACCTATTTGGAGACT	49	95.92	88.46
946-19	216	ACAGCGTAGCATAATGGGCTACAGA CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97.96	86.54
946-20	217	ACAGCGTCGCATAATGGGCTGCAGA CGCCGTCAAATCTATTTGCAGACT	49	95.92	80.77
946-21	218	ACAGCGTAGCATAATGGGCTTCAGA CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97.96	84.62

[0668]

946-22	219	ACATGTAGCATAATGGGCTGCAGAC GCCGTCAAACCTATTTGGAGACT	48	93.88	84.62
946 共有 序列	226	ACANNGTMGCATADTGGGCTDCWG RCGCMKTCAAAYCTATTTTRNAGACT 当位置4的N可以是G或无核苷酸时，位 置5的N可以是C、G、T或无核苷酸，位 置44的N可以是A、C、G或无核苷酸。	49	-	-
961-1	220	ACACCGTAGCATAATGGGCTACTGC CGCCGTCGACCTTTTGGAGACT	47	100%	82.69
996-1	221	ACAGGGTAGCATAATGGCTTAGGAC GCCTCAAACCTATCAAGACT	46	100%	76.92

[0669] 表2. 与RNA核糖开关结合的阿昔洛韦非茎部区对应的DNA序列。在筛选中识别了7个家族：582、769、795、935、946、961和996，每个家族包括1至39个序列。比较了家族中每个序列的一致性百分比与每个家族中最普遍的序列（582-1、769-1、795-1、935-1、946-1、961-1和996-1）。还比较了家族中每个序列的一致性百分比与野生型序列。

[0670] 阳性靶阿昔洛韦产生了与582-1 (SEQ ID NO:108)、769-1 (SEQ ID NO:147)、795-1 (SEQ ID NO:164)、935-1 (SEQ ID NO:183)、946-1 (SEQ ID NO:198)、961-1 (SEQ ID NO:220)和996-1 (SEQ ID NO:221)对应的七个强候选家族，均命名为F1A (图17)。这些序列是每个家族中最普遍的序列（每个家族所有成员的DNA序列是：582 (SEQ ID NO:108-146)、769 (SEQ ID NO:147-163)、795 (SEQ ID NO:164-182)、935 (SEQ ID NO:183-197)、946 (SEQ ID NO:198-219)、961 (SEQ ID NO:220)和996 (SEQ ID NO:221)）。共有序列显示了每个家族中每个核苷酸位置的所有可能取代或间隙 (SEQ ID NO:222-226)。由于目标是从基于已知与脱氧鸟苷结合的RNA的文库中识别适配体，在反向靶群体中出现的强候选家族应最少。候选家族F1A-795、F1A-935和F1A-946非常符合这一标准，因为他们在反向靶群体中未被发现。F1A-996和F1A-961在反向靶群体中很少出现，因此就这方面而言被认为是下一个最佳候选家族。此外，在阴性群体中出现的候选家族应最少，因为这些序列在不影响阿昔洛韦的情况下从GrO解吸并且可能代表假阳性。F1A-935和F1A-946也在这个标准下表现理想，因为在阴性群体中没有发现它们。候选家族F1A-769在阴性群体中检测率最低，候选家族F1A-961、F1A-795和F1A-996的表现较差。富集率是最后需要考虑的条件，F1A-935、F1A-946和F1A-769表现充分。由于候选家族F1A-582具有最大富集率，尽管在其他标准下表现不佳，仍将其包括在内。其余候选家族在这四个方面均表现不佳，但其特征仍可接受。

[0671] 其他靶向喷昔洛韦产生了七个强候选家族 (SEQ ID NOs:94-100)，均命名为F1P (图2)。和以前一样，目的是从基于已知与脱氧鸟苷结合的RNA的文库中识别适配体，与第10轮后用来与阿昔洛韦 (阿昔洛韦) 结合的富集文库不同。在阿昔洛韦和反向靶群体中出现的强候选家族应最少，从而尽量减少交叉反应。候选家族F1P-923符合第一个标准，候选家族F1P-710符合第二个标准，候选家族F1P-584两个标准都符合。在阴性条件下，候选家族F1P-584也表现出对喷昔洛韦的适度有利性，以及相对于上一代对阿昔洛韦的反应的中度富集。其余候选家族表现出的最小支持性依次是阿昔洛韦、喷昔洛韦或反向靶 (分别为F1P-837和F1P-932、F1P-991和F1P-718)。这四个候选家族相对于阴性条件对喷昔洛韦具有一些有利性，这使得假阳性的可能性最小化，尽管如果候选家族没有表现出针对喷昔洛韦对其类似物的选择性时，则该标准不那么重要。富集率是最后需要考虑的条件；F1P-923、F1P-932和

F1P-584表现充分。

[0672] 对所选适配体进行定性PAGE评估。在生理条件下 (Mg^{++} (0.5mM)) 下对单独合成和转录的适配体进行氧化石墨烯 (GrO) 的选择,并用阿昔洛韦 (+) 或反向靶 (x) 洗脱。对每个样品的特异性洗脱的适配体片段进行PAGE分析。

[0673] 将100皮摩尔的每个候选家族 (每个试验/道) 重新悬浮在1X修饰选择缓冲液 (50mM HEPES, 100mM KCl, 0.5mM $MgCl_2$, pH 7.3) 中,并重新折叠 (在90℃下进行5分钟,然后在4℃下进行5分钟),然后在37℃下与200皮摩尔 (每个) 的合并反向靶或靶标一起培养30分钟。最终文库浓度为0.5 μ M,靶标/反向靶浓度为1 μ M (培养体积为200 μ l)。

[0674] 在靶标/反向靶培养后,加入250 μ g GrO (Angstrom Materials公司 (Dayton, OH)) 以吸附未结合的候选家族 (在37℃下培养10分钟)。

[0675] 以7,000xg的速度离心分离样品5分钟。回收上清液,使用含有40mM EDTA的2X甲酰胺进行变性,并在含有8M尿素的10%变性PAGE上运行 (供应商:American Bioanalytical公司;产品分类编号为AB13021-01000.AB13022-01000)。电泳缓冲液为1X TBE (供应商:Amresco/VWR;产品分类编号0658-20L,用去离子水稀释)。DNA梯采用20/100DNA梯 (IDT)。用Gel Star (Lonza, 50535) 染色凝胶并在蓝光透照仪上成像。

[0676] 候选家族F1A-769、F1A-795、F1A-946和F1A-996似乎在这种定性PAGE评估中表现出选择性阳性反应 (利用阿昔洛韦靶标从GrO洗脱适配体以及用反向靶进行相对较低或最小的洗脱)。

[0677] 结论

[0678] 经过12轮迭代筛选和平行评估,确定了阿昔洛韦的强候选家族;经过两轮筛选和平行评估后,确定了喷昔洛韦的合理候选家族。

[0679] 示例2. 条件scFv的分离。

[0680] 去除潜在的剪接位点负荷,通过重叠寡核苷酸合成肿瘤抗原特异性scFv,然后克隆到含有阿昔洛韦应答组件和灵长类动物CD3- ζ 启动子的CAR穿梭构建体中。作为初始原型,利用含有CD8- α 信号肽、茎部和跨膜域的EPCAM或ERBB2scFv的抗ECD。使用美国专利第8,709,755号和PCT公开号W0/2016/033331A1中描述的方法或通过许可和非许可条件下从人噬菌体文库中直接选择来产生实体瘤微环境限制的CAR产物。简言之,清除与生物素化的人IgG结合的链亲和素磁珠 (ThermoFisher, Carlsbad, CA) 后,在以下肿瘤允许条件下淘选 Creative Biolabs (Shirley, NY) 的人 $V_H \times V_L$ 文库:100 μ g/ml透明质酸、100kDa片段 (Lifecore Biomedical, Chaska, MN)、20mg/ml重组HSA (Cyagen, Santa Clara, CA)、25mM碳酸氢钠缓冲液中的200ng/ml重组人VEGF、2 μ M腺苷、pH值为6.7的10mM乳酸钠。在允许条件下,在37℃下与EPCAM和ERBB2结合磁珠的生物素化靶受体ECD结合,然后在许可条件下连续洗涤。在生理条件下释放噬菌体 (1 μ g/ml透明质酸、20mg/ml HAS、25mM碳酸氢盐、pH值为7.2的1mM乳酸钠),然后通过酸洗脱并用1M Tris快速中和洗脱紧密变体。扩增噬菌体并使用long-read测序 (PacBio, Menlo Park, CA) 分离基因组DNA,以进行 $V_H \times V_L$ 链的深度序列分析。可重复淘选以进行富集。进一步分析时,不包括显示了噬菌体培养过程中相比富集至靶标,优选扩增读数的 $V_H \times V_L$ 序列。为了进一步表征与靶选择性结合的噬菌体 (其在肿瘤允许条件下富集但在生理条件下释放),需克隆到CAR构建体表达系统、产生慢病毒并转导到T细胞,以测试较之生理条件在肿瘤选择性环境中杀死的CAR介导肿瘤抗原。

[0681] 示例3.使用微环境限制的scFv生成MRB-CAR

[0682] 如申请W0/2016/033331A1所述,通过对肿瘤微环境的低选择性的V_H和V_L序列进化来获得微环境限制的ASTR。与正常组织相比,通过将微环境限制的单链抗体的重链和轻链与其他CAR结构域一起并入慢病毒表达载体以产生MRB-CAR,从而生成与两种肿瘤抗原Ax1或Ror2中的任一种结合的嵌合抗原受体(CAR);在肿瘤环境的pH降低时活性增加(这种微环境限制的生物制剂有时在本文中称为(MRB-CAR))。这些CAR包括从氨基端到羧基端的各种模块的组合,其包括CD8信号肽(P1)(SEQ ID NO:74)、微环境限制的抗Ror2和抗Ax1 V_H和V_L组合、CD8(SEQ ID NO:75)或CD28(SEQ ID NO:76)(P5)的茎部和跨膜域、CD137(SEQ ID NO:1)或ICΔ(SEQ ID NO:3)(P6)的共刺激域、CD3Z的激活域(SEQ ID NO:13)(P7)、2A-1核糖体跳跃序列(SEQ ID NO:77)(P8)和示例性eTAG(SEQ ID NO:78)(P9)。

[0683] 用表达候选CAR的重组慢病毒颗粒转导Pan T细胞,并使用FACS测定表达eTag的细胞百分数,从而进一步确定转染细胞百分比。用对候选CAR进行编码的重组慢病毒颗粒成功转导Pan T细胞,这些细胞在pH 6.7和pH 7.4时在转导T细胞测定中具有条件活性。

[0684] 在pH7.4(生理pH)或pH6.7(pH替代肿瘤测定条件)下分析候选CAR对表达Ax1或Ror2的靶细胞的细胞毒活性。许多候选CAR在pH值为6.7时比pH值为7.4时裂解靶细胞的效率更高。

[0685] 示例4.配体诱导型核糖开关的构建。

[0686] 将脱氧鸟苷核糖开关适配体和鸟嘌呤核糖开关适配体(Pikovskaya,2014;Kim,2007)或其他嘌呤核糖开关适配体作为寡核苷酸合成。在一个示例中,选择来自花中间原体属的脱氧鸟苷IA核糖开关(在图6、图7中加下划线并以粗体显示)进化,以产生阿昔洛韦反应性核糖开关。在另一示例中,选择来自枯草芽孢杆菌的鸟嘌呤xpt核糖开关(在图10、图11中加下划线并以粗体显示)进化,以产生阿昔洛韦反应性核糖开关。对于这两个示例中的每一个,在P2、P3、J1-2和J2-3片段中的靶序列位置处产生具有交替核苷酸的随机RNA文库(图7和图11)。每个片段允许在每个靶序列位置处有3个备选核酸,或者在每个靶序列位置的+1位点中碱基删除和插入4个核苷酸用于饱和和诱变,如图8A-8B、图9(M.florum IA)和图12A-12B、13(枯草芽孢杆菌xpt)所示。引物延伸和试剂制备后,进行RNA转录。在鸟嘌呤,鸟嘌呤和脱氧鸟苷的参与下,所得RNA文库在氧化石墨烯上进行阴性选择,然后用阿昔洛韦或喷昔洛韦进行阳性选择。在阴性和阳性选择过程中,使用0.5mM至1.2mM的人类细胞生理镁水平并将温度保持在37℃。将回收的适配体进行逆转录并进行PCR扩增,然后进行转录并在后续筛选时进行至少8轮的连续选择。在平行方法中,在40℃下用其他阴性筛选筛选出适配体。通过NextGen测序和分析检查得到的阳性池。合成单个适配体并通过等温量热法在35-40℃下检测人类细胞生理镁水平的亲和力。在选择阳性阿昔洛韦和喷昔洛韦特异性适配体后,适配体与锤头状核糖酶和手枪状核糖酶整合。将阳性阿昔洛韦选择性适配体与手枪状核糖酶组合以鉴定阿昔洛韦调节的核糖酶。(Harris KA RNA.2015年11月;21(11):1852-8.doi:10.1261/rna)。在阿昔洛韦参与和喷昔洛韦未参与的情况下,对变体进行基于凝胶迁移的PAGE纯化。此外,将无环鸟苷选择性核糖开关立即置于环中3'处至CAR/IL-7构建体上游的剪接受体中。在阿昔洛韦未参与的情况下,剪接位点在核糖开关复合物中结合,但在阿昔洛韦参与的情况下更容易获得,从而产生功能性CAR转录物。

[0687] 示例5.体内增殖结构域的构建

[0688] 通过重叠寡核苷酸合成 (DNA2.0, Newark, California) 来合成源自T细胞淋巴性白血病 (243InsPPCL (SEQ ID NO:82)、246InsKCH (SEQ ID NO:101)、241InsFSCGP (SEQ ID NO:102)、244InsCHL (SEQ ID NO:103) 和244InsPPVCSVT (SEQ ID NO:104), 均来自Shochat等人2011,《实验医学杂志》第208卷第5期901-908) 的一系列组成性活化IL7受体 (IL7R)。将合成的组成性活化IL7R跨膜突变体插入组成性表达的慢病毒载体骨架中, 紧接在2A核糖体跳跃序列后面, 接着是抗CD19CD3- ζ 表达盒, 其包括CD8A茎部 (SEQ ID NO:79) 和前导肽 (SEQ ID NO:74)。用IL7R跨膜突变体慢病毒载体和慢病毒包装构建体转染HEK293包装细胞、使其生长, 并使用本领域已知的方法收集病毒上清液。用病毒上清液转导CD3/CD28刺激的T细胞, 并在IL2缺陷型AIM V、CTS OpTmizer T细胞扩增SFM或X-VIVO 15培养基中生长4周, 每周补充来自相同供体的冷冻PBMC。通过FACS分选, 克隆得到的表达IL7R变体的扩增转导T细胞, 并通过对RT-PCR产物测序来鉴定IL7R构建体的序列。243InsPPCL变体 (PPCL) (SEQ ID NO:82) 用于进一步演化以产生具有条件活性的CAR。

[0689] 示例6. 筛选CAR-T活化和增殖的辅助成分

[0690] 构建一系列蛋白编码结构域 (ABCG1、SOCS1、SMAD2、TGFB2、cCBL和PD1) 和miRNA序列, 以并入CD3-启动子驱动的CAR盒的反向链上的合成内含子中。含有CD3-启动子驱动的CAR盒和蛋白编码结构域或miRNA序列的每个构建体均包括唯一条形码, 用于深度测序; 并通过Gibson组装然后在大肠杆菌中转化和文库扩增进行组装。产生的病毒原液用于转导AIM V、CTS OpTmizer T细胞扩增SFM或不含IL2的X-VIVO15培养基中的CD3/CD28刺激的T细胞, 并允许在培养物中生长4周, 其中进行DNA连续取样以便扩增, 同时进行深度测序以便代码识别。文库还需要进行PACBio全长测序, 以确定文库多样性并解码条形码组件。对于miRNA序列和蛋白编码结构域, 测试CAR CD3- ζ 结构域的协同激活。

[0691] 示例7. 设计逆转录病毒包装和转导系统以休眠T细胞为靶标, 用于对PBMC进行选择性地整合和表达

[0692] 尽管也可以通过瞬时转染产生高效价慢病毒载体, 但该方法具有生成可复制性逆转录病毒 (RCR) 的风险, 无法进行临床应用。本文中, 将对诱导型启动子及其调节剂进行编码的多种构建体同时引入HEK293悬浮适应细胞 (HEK293S), 可生成稳定的逆转录病毒包装细胞系, 从而稳定产生病毒成分、CAR基因及其调节成分。两种不同的诱导系统可用于暂时控制基因表达。一种系统基于雷帕霉素或rapalog诱导的两种转录因子的二聚化。一种转录因子由与ZFHD1DNA结合域融合的FKBP蛋白的三个拷贝组成, 另一转录因子由与p65活化域融合的FRB蛋白组成。雷帕霉素或rapalog使转录因子二聚化, 从而形成ZFHD1/p65AD, 并可在12xZFHD1结合位点激活基因转录。

[0693] 图3A-3E所示的一系列载体生成了转座子侧翼序列, 用于整合到HEK293S基因组中。一旦整合到细胞的基因组中, 这些序列用作调节成分和lox和/或FRT位点, 以使用Cre和/或flp重组酶 (本文称为着陆垫) 进行后续整合。最初5个构建体包含对嘌呤霉素抗性进行编码的多核苷酸序列、GFP、RFP和胞外MYC标签, 其中胞外MYC标签通过N-末端PLss (牛催乳素信号肽) 靶向细胞膜并通过血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) C末端跨膜锚定结构域锚定至细胞膜。最初5个构建体还可包括组成型的最小CMV和最小IL-2启动子、雷帕霉素调节的ZFHD1启动子、四环素反应组件 (TRE) 启动子或双向TRE (BiTRE) 启动子。图3A中的构建体包含对融合至NF κ Bp65激活域 (p65AD) 的FRB结构域以及融合至三个FKBP重复序列的ZFHD1

DNA结合域进行编码的多核苷酸序列,其中三个FKBP重复序列为组成性表达。图3A中的构建体还包括在雷帕霉素诱导的ZFHD1/p65AD启动子作用下的HIV1REV和HSV VP65结构域SrcFlagVpx。图3B中的构建体包括在ZFHD1/p65AD启动子的控制下对rtTA序列进行编码的多核苷酸。图3C中的构建体包括对侧翼为loxP位点的嘌呤霉素抗性基因和侧翼为lox2272位点的胞外MYC标签进行编码的多核苷酸。两种可选标记都通过BiTRE启动子调节,BiTRE启动子的两侧为FRT位点。图3D中的构建体包括对GFP编码的多核苷酸,GFP的两侧为受TRE启动子控制的loxP位点。图3D中的构建体还包括TRE启动子和GFP的5'loxP位点之间的单个FRT位点。图3E中的构建体包括对RFP编码的多核苷酸,RFP的两侧为受ZFHD1/p65AD启动子控制的loxP位点。图3E中的构建体还包括ZFHD1/p65AD启动子和RFP的5'loxP位点之间的单个FRT位点。图3C-3E中的构建体用作其他多核苷酸序列的着陆垫以插入包装细胞系的基因组中。待插入的多核苷酸序列,其两侧可为lox位点,并使用Cre重组酶和loxP位点将多核苷酸序列插入基因组中。这导致插入和同时去除对嘌呤霉素抗性进行编码的基因组区域、胞外MYC标签、GFP和RFP。或者,多核苷酸序列两侧可为FRT位点,并使用flp重组酶和FRT位点将多核苷酸序列插入基因组中,然后使用Cre重组酶除去对嘌呤霉素抗性编码的多核苷酸序列、胞外MYC标签、GFP和RFP。

[0694] 为了生成将着陆垫整合到基因组中的包装细胞系,可使用阳离子多肽混合物,用等摩尔浓度的5种质粒(图3A-3E)和5 μ g试管内转录的piggybac转座酶mRNA或带启动子的5 μ g质粒或2-5 μ g piggybac转座酶蛋白共转染HEK293S细胞,其中所述启动子可在PEI参与下按2:1或3:1的PEI与DNA比(w/w)表达piggybac转座酶。在100nm雷帕霉素和1 μ g/mL多西环素的参与下,用嘌呤霉素选择转染的细胞2-5天,然后进行荧光激活细胞分选以收集表达GFP和RFP的细胞。在没有嘌呤霉素、雷帕霉素和多西环素的情况下使分选的细胞生长5天,并除去表达GFP和RFP的细胞,同时用myc磁珠法除去myc阳性细胞。然后通过雷帕霉素和多西环素筛选来自阴性分选细胞的单个克隆,以诱导GFP和RFP并克隆单细胞。收集来自克隆的DNA并测序以进行整合分析。在雷帕霉素和多西环素存在时,扩增和储存GFP和RFP强诱导表达的阳性克隆,但在雷帕霉素和多西环素不存在时背景表达有限。

[0695] 对于整合到基因组的具有图3A-3E的构建体的HEK293S细胞,可通过含有以下方面的构建体转染:对DAF信号序列/抗CD3scFvFc (UCHT1)/CD14GPI锚定连接位点(SEQ ID NO: 252)进行编码的三顺反子多核苷酸、能够结合CD28/CD16B GPI锚定连接位点(SEQ ID NO: 253)的DAF信号序列/CD80胞外域、DAF信号序列/IL-7/DAF(SEQ ID NO:107)和转座子序列;其中转座子序列的两侧为多核苷酸区,以整合到HEK293S基因组(图4A)中。转染后,在不存在雷帕霉素和多西环素的情况下使细胞扩增2天,并选择组成型红色的菌落。然后通过用来表达Cre重组酶的构建体瞬时转染阳性菌落,以除去剩余基因组DNA和RFP编码区。同时转染另一构建体(图4B),其中所述构建体包括多核苷酸和多核苷酸区;所述多核苷酸包括BiTRE启动子和在一个方向上对gag和pol多肽进行编码的多核苷酸区;所述多核苷酸区在另一方向上对麻疹病毒F和H蛋白进行编码。Cre重组酶将构建体整合到基因组中以产生图4B所示的整合序列。在多西环素和雷帕霉素存在时评估所得菌落的蛋白表达,并通过深度测序分析基因组整合。保留剩余的TRE反应GFP位点用于慢病毒基因组插入。

[0696] 示例8.慢病毒载体和逆转录病毒包装的生成

[0697] 在HEK293S细胞中不活跃的CD3Z启动子的控制下,将示例7中产生的逆转录病毒包

装稳定细胞系用表达Flp重组酶的构建体(图4C)和含有编码CAR的多核苷酸序列和淋巴细胞增殖组件IL7 α -insPPCL的构建体转染;其中CAR和IL7 α -insPPCL被编码T2A核糖体跳跃序列的多核苷酸序列分开,并且IL7 α -insPPCL具有阿昔洛韦核糖开关控制的核糖酶。含CAR的构建体还包括cPPT/CTS和RRRE序列以及对HIV-1Psi进行编码的多核苷酸序列。将整合到基因组中的含CAR构建体上的整个多核苷酸序列侧接FRT位点。含CAR构建体的成功整合导致GFP的组成型表达,其随后通过表达Cre重组酶的构建体瞬时转染除去。HEK293S系在无血清培养基中生长。在搅拌釜反应器中生长至峰值细胞密度后,将细胞稀释至70%峰值细胞密度并用100nM雷帕霉素处理2天,以诱导早期基因REV,Vpx和aCD3scFv CD16B GPI、aCD28scFv CD16B GPI和IL-7SD GPI DAF的表达,然后在培养基中加入1 μ g/mL多西环素以诱导结构组件的表达,如Gag Pol、MV (Ed) -F Δ 30、MV (Ed) -H Δ 18和包括治疗靶标的慢病毒基因组。通过包装序列的qPCR和p24ELISA检查病毒产生水平。通过细胞的深度过滤收集病毒,并使用TFF柱进行浓缩/渗滤,然后快速冷冻以装入小瓶。

[0698] 示例9.外周血单核细胞(PBMC)的分离、转导和扩增

[0699] 以下示例举例说明了在体内扩增之前使用封闭系统进行PBMC的体外处理。作为一个示例,用枸橼酸葡萄糖溶液(ACD)作为抗凝血剂从个体抽取30至200ml人血并置于采血袋中。或者,将血液抽取到真空采血管、注射器或等同物中,并转移到空的采血袋或IV袋中。根据制造商的说明,在Sepax 2细胞处理系统(BioSafe)上使用Neat Cell试剂盒(产品分类编号CS-900.2,Omniamed)处理全血。将外周血单核细胞(PBMC)收集到培养袋或者注射器中。无菌取出等分试样用于细胞计数,以确定活细胞数量。在含有10-300IU/ml IL-2(产品分类编号202-IL-010,研发系统)的X-VIVO 15(产品分类编号08-879H,瑞士龙沙集团)或CTS OpTmizer细胞扩增SFM(产品分类编号A1048501,赛默飞世尔科技公司)培养基中(最终体积可达200ml),以0.1-1.0 $\times 10^6$ 活细胞/ml的最终浓度将PBMC转移至G-Rex100MCS气体渗透细胞培养系统装置上(Wilson Wolf)。除IL-2外,还可向培养基中添加CTS免疫细胞SR(产品分类编号A2596101,赛默飞世尔科技公司)。根据制造商的说明,封闭的G-Rex气体渗透细胞培养系统装置可预涂Retronectin(产品分类编号CH-296,Takara)或类似纤连蛋白衍生的等同物。

[0700] 将从外周血中分离的PBMC上样到PALL PBMC过滤器上,在过滤器中用10ml AIM V(赛默飞世尔科技公司)或X-VIVO 15培养基洗涤一次,然后在37 $^{\circ}$ C下以5ml/h的速率灌注10-60ml慢病毒原液(按示例8中制备方法进行)。然后用AIM V、CTS OpTmizer T细胞扩增SFM或含有重组人DNase(Pulmozyme,基因技术公司)的X-VIVO 15培养基再次洗涤PBMC,然后用不含DNA酶的乳酸林格氏液(产品分类编号L7500,Braun)洗涤。然后将PBMC通过过滤器反向灌注到注射器中。然后通过静脉输注将细胞(目标细胞水平为5 $\times 10^5$ 至1 $\times 10^6$ 个细胞/kg)重新注入个体体内。

[0701] 根据逆转录病毒基因组中包含的核糖开关,给予个体相应的核苷类似物抗病毒药物或核苷类似物抗病毒前药(阿昔洛韦、伐昔洛韦、喷昔洛韦或泛昔洛韦)。个体可口服任何治疗有效剂量,例如500mg核苷类似物抗病毒药物或前药,每天三次。用核苷类似物抗病毒药物,优选核苷类似物抗病毒前药治疗时,可在输液前例如输液前2小时进行,并且也可以在输液时或在输液后的某个时间进行。治疗可持续至少1、2、3、4、5、7、10、14、21、28、30、60、90、120天或5、6、9、12、24、36或48个月或更长时间。治疗可包括每天一次、两次、三次或四次

服用核苷类似物抗病毒药物或前药。在输液和治疗开始后,使用qPCR通过输液后第2、5、7、11、13、18、28和56天的血细胞计数来确定感染细胞的数量,从而量化病毒基因组。出现过发热或患有细胞因子释放综合征的个体可减少核苷类似物抗病毒药物或前药的剂量或频率或停药。如果感染的T细胞在第18天未能扩增10,000-100,000倍,可增加核苷类似物抗病毒药物或前药的剂量或频率。可以通过FDG PET成像和全身CT扫描来测量个体的临床反应。在长期缓解后或过量T细胞增殖超过总外周T细胞计数的30%时,可减少核苷类似物抗病毒药物或前药的口服剂量或停药。

[0702] 示例10.提高血管或组织pH的治疗干预

[0703] 为了减少抗原结合域与其同源抗原的结合,NaHCO₃以静脉推注或静脉输注给药。标准剂量为每千克体重1mg,这是初始剂量,然后每10分钟按每千克体重0.5mg剂量给药。推注50ml的NaHCO₃将使血清的pH升高约0.1个单位。pH为7.0时,需要四个50mEq安瓿的NaHCO₃来将pH校正到7.40。

[0704] 公开的实施例、示例和实验并非为了限制本公开的范围,也不表示以下实验是全部实验或仅进行的实验。已尽力确保所使用数字(例如,数量、温度等)的准确性,但是也应应对一些实验误差和偏差加以解释。应了解,在不改变实验旨在说明的基本方面的情况下可改变所描述的方法。

[0705] 本领域技术人员可以在本公开的范围和精神内设计出许多修改例和其他实施例。实际上,本领域技术人员可以在不改变本公开的基本方面的情况下更改所描述的材料、方法、附图、实验、示例和实施例。任何公开的实施例可以与任何其他公开的实施例结合使用。

[0706] 示例11.测试PBMC中IL-7受体淋巴增殖组件/存活组件的活性

[0707] 为了测试IL-7R α 变体介导T细胞抗原非依赖性存活的能力,用枸橼酸葡萄糖(ACD)作为抗凝血剂,抽取30ml人血置于真空采血管中。按照制造商的说明,使用Ficoll-PaqueTM(General Electric)以密度梯度离心分离法处理全血,从而获得外周血单核细胞(PBMC)。将PBMC的等分试样连同X-VivoTM 15培养基(Lonza)一起无菌转移至12孔细胞培养板的孔中,获得500,000活细胞/mL的最终浓度,最终体积为1mL。在一些样品中还加入重组人白细胞介素-2(IL-2)(Novoprotein)至浓度为100IU/ml。以50ng/ml的浓度添加激活的抗CD3抗体(OKT3,Novoprotein),以激活PBMC进行病毒转导。在37℃下,将平板在含5%二氧化碳的标准湿润组织培养箱中培养一整夜。培养一整夜后,将含有所需测试构建体的慢病毒颗粒制剂(图19A)以5的感染复数(MOI)加入各孔中。在37℃下,将平板在含5%二氧化碳的标准湿润组织培养箱中培养一整夜。培养一整夜后,收集12孔板的每孔内容物,通过离心分离得到颗粒。样品用D-PBS+2%人血清白蛋白(HSA)洗涤一次后,重悬于X-Vivo15TM培养基中,然后转移至G-Rex[®]6孔透气细胞培养装置的孔中(Wilson Wolf)。添加额外的X-VivoTM 15培养基,使每孔的最终体积达到30ml。将每种构建体的匹配对照样品转移到G-Rex[®]6孔透气细胞培养装置(Wilson Wolf)的孔中,并添加额外培养基,使最终体积达到30ml,其他包括某些对照样品的100IU/ml IL-2。在37℃下,将G-Rex[®]装置在含5%二氧化碳的标准湿润组织培养箱中培养7天。培养期间,每2-3天向含IL-2的对照样品中添加新鲜的IL-2。未补充无IL-2的匹配试样。在第7天取出样品,以跟踪扩增期间的细胞数和活性(细胞计数仪,赛默飞世尔科技公司)。

[0708] 图19A是测试的IL7R α 构建体的示意图。将这些构建体被插入重组慢病毒基因组

中。用重组逆转录病毒来转导PBMC。图19A是由信号序列(SS)、胞外域(ECD)、跨膜(TM)和胞内域(ICD)组成的野生型IL7R α (SEQ ID NO:229)的示意图。“1”表示纤连蛋白III型结构域的位点;“2”表示WSXWS基序的位点;“3”表示Box 1位点,“4”表示蛋白激酶C(PKC)磷酸化位点,“5”表示Box 2位点。

[0709] 变体“A”是在243位具有InsPPCL的IL-7R α (Shochat等人,2011,《实验医学杂志》第208卷,第5期901-908)但没有S185C突变,在具有GFP多肽、GSG连接子和融合至其N-末端P2A核糖体跳跃序列的转录物上表达。变体“B”是IL-7R α InsPPCL,其具有GFP多肽、GSG连接子和与其N-末端融合的P2A核糖体跳跃序列以及位于信号序列和胞外结构域之间的Myc标签。除了其胞内结构域在292位截短外,变体“C”与变体“B”类似。除了其胞内结构域在292位截短外,变体“D”与变体“A”类似。变体“E”是在其N末端截短的IL-7R α InsPPCL变体,这样便不会出现信号序列和大多数胞外域(残基1-228);变体“E”还包括GFP多肽、GSG连接子、P2A核糖体跳跃序列和与N末端融合的eTag,从氨基末端开始依次排列。氨基酸残基的编号基于IL7R α (NCBI GI No. 使用台盼蓝排除法在IL-2参与或未参与的情况下测试含有每种变体的T细胞的活性。

[0710] 如图19B所示,PBMC需要IL-2才能在试管内存活。如图19B所示,存在IL-2时未转染PBMC的活性为约80%,不存在IL-2时活性为0%。不存在IL-2时,具有全长形式的IL-7R α InsPPCL (图19A中的IL-7R α 变体A和B)的PBMC的活性超过20%,表明组成性活化的IL-7R α InsPPCL受体的表达在这些细胞中具有存活活性。此外,与野生型IL-7受体相比,用于表达具有截短胞内域(ICD)的IL-7R α InsPPCL变体(图19A中的IL-7R α 变体C和D)的T细胞,其活性更强。最后,如图19B所示,N-末端IL-7受体突变体(图19A中的IL-7R α 变体E)在这些细胞中具有存活活性。因此,该示例说明在PBMC中表达时IL-7受体具有存活活性。

[0711] 示例12.MeVpp对新鲜分离的未受刺激的人类T细胞的转导效率

[0712] 通过慢病毒表达载体瞬时转染293T细胞(Lenti-X 293T,Clontech),以生成慢病毒。通过在Freestyle 293表达培养基(ThermoFisher Scientific)中连续生长,使细胞适应悬浮培养。将悬浮液中的细胞以每mL 1×10^6 个细胞(30mL)的速率接种在125mL的锥形烧瓶中,并立即用溶解在弱酸中的PEI (Polysciences)转染。

[0713] 将质粒DNA在1.5ml OptiMax培养基中稀释,以获得30mL细胞。对于VSV-G假型化颗粒,总DNA(1 μ g/mL培养体积)是4种质粒的混合物,摩尔比如下:2x基因组质粒、1x含Rev的质粒、1x含VSVg的质粒和1x含Gagpol的质粒。对于MV (Ed) -F Δ 30/H Δ 18假型化颗粒,总DNA(1 μ g/mL培养体积)是5种质粒的混合物,摩尔比如下:2x基因组质粒、1x含Rev的质粒(2/3,三分之二) $\times$ 含MV (Ed) -F Δ 30的质粒(1/3,三分之一) $\times$ 含MV (Ed) -H Δ 18的质粒和1x含Gagpol的质粒。对于MV (Ed) -F Δ 30/H Δ 24假型化颗粒,总DNA(1 μ g/mL培养体积)是5种质粒的混合物,摩尔比如下:2x基因组质粒、1x含Rev的质粒(2/3,三分之二) $\times$ 含MV (Ed) -F Δ 30的质粒(1/3,三分之一) $\times$ 含MV (Ed) -H Δ 24的质粒和1x含Gagpol的质粒。另外,将PEI在1.5ml OptiMax中稀释,以获得2 μ g/mL(培养体积,与DNA的比例为2:1)。室温培养5分钟后,将两种溶液充分混合在一起,并在室温下再培养20分钟。将最终体积(3ml)加入细胞中。然后,将细胞在37 $^{\circ}$ C下培养48小时,同时以120rpm的速率旋转,其中CO₂的含量为5-8%。

[0714] 48小时后,以1,000g的速率离心分离10分钟,收集上清液。将上清液倒入新管中,在PEG溶液(PEG-IT,System Biosciences公司)中加入 $1/4$ 上清液。在4 $^{\circ}$ C下培养整夜,沉淀出

假型化慢病毒,然后在4℃下以1,500g的速率离心分离20分钟。除去上清液,将病毒重悬于1:100体积的PBS中。通过连续稀释和在Raji细胞上进行GFP表达来滴定病毒,其中Raji细胞通过流式细胞术在转导后48小时表达CD46和SLAM。

[0715] 首先从加利福尼亚州圣地亚哥血库收集和分发的新鲜白细胞层中分离富集的外周血T细胞。简而言之,根据制造商的说明,在Ficoll-PaquePLUS® (GE医疗生命科学部) 上进行基于SepMate™ (Stemcell™) 的PBMC梯度密度分离。然后根据制造商的说明,使用未受影响的T细胞Dynabeads®试剂盒 (Invitrogen), 通过从新鲜分离的总PBMC中进行阴性选择, 以进一步富集未受影响的T细胞。分离后,用不同载体以不同的感染复数(MOI) 转导2.6E5的富集、新鲜分离和未刺激的外周血T淋巴细胞,进行两次。以100uL RPMI-2%HIFCS的最终浓度,按96孔板形式,在37℃下转导14小时。用载体培养14小时后,用PBS-2%HIFCS洗涤细胞三次,最后在37℃下以0.5E6/mL的细胞密度在RPMI-10%HIFCS中培养直至第3天。

[0716] 用VSV-Gpp或MeVpp转导后3天,收集1E5细胞并通过流式细胞术分析CD3+细胞群体中GFP的表达。图20是阴性选择和未刺激的T细胞的MOI转导效率图。为了更清晰,符号交错排列。与MOV为1的VSV-Gpp(约0-5%) 相比,使用MV (Ed) -F Δ 30/MV (Ed) -H Δ 18假型化颗粒(约70-80%) 能更有效地转导未刺激的T细胞。与MOV为6的VSV-Gpp相比(约5-10%), MOI为5(约70-80%) 时,使用MV (Ed) -F Δ 30/MV (Ed) -H Δ 24假型化颗粒传导未受刺激的T细胞的效率更高。使用截短的MeV-包膜多肽假型化时,通过假型型慢病毒载体传导新鲜分离的未刺激人类T细胞的效率比使用VSV-G高得多。

[0717] 示例13. 证明插入EF-1α启动子内含子的miRNA的功能

[0718] 设计了四个独立的 gBlocks®基因片段,每个片段含有miR-155框架。对于每个gBlock®,使用CD3-ζmRNA转录物为靶标的唯一miRNA替代miR-155靶序列。每个gBlock®都包含一个40bp的重叠序列,设计用于促进将所有四个 gBlocks®以单链形式组装到EF-1α启动子内含子中。gBlocks®使用商用试剂盒进行Gibson®超级组装 (NEBuilder, New England Biolabs 公司)。

[0719] EF-1α启动子和内含子A (SEQ ID NO:255) 是转基因表达盒的一部分,其驱动慢病毒载体骨架中包含的GFP和eTag的表达(本文中,具有西妥昔单抗识别的GFP和示例性eTag的慢病毒载体骨架称为F02)。表3中标示了SEQ ID NO:255中每种gBlock®及其相应成分的核苷酸位置。通过EF-1α启动子的全面测序确认四种miRNA是否正常组装到慢病毒载体骨架中。

[0720]

特征	核苷酸在SEQ ID NO:255中的位置
gBlock® 1	927-1138
EF1 α 重叠	927-966
miR155框架-5'臂	967-994
siRNA1	995-1015
miR末端环	1016-1034
siRNA1	1035-1042
siRNA1	1043-1053
miR155框架-3'臂	1054-1098
gBlock® 2	1099-1310
40bp 50% GC连接子1	1099-1138
miR155框架-5'臂	1139-1166
siRNA2	1167-1187
miR末端环	1188-1206
siRNA2	1207-1214
siRNA2	1215-1225

[0721]

miR155框架-3'臂	1226-1270
gBlock® 3	1271-1482
40bp 50% GC连接子2	1271-1310
miR155框架-5'臂	1311-1338
siRNA3	1339-1359
miR末端环	1360-1378
siRNA3	1379-1386
siRNA3	1387-1397
miR155框架-3'臂	1398-1442
gBlock® 4	1443-1654
40bp 50% GC连接子4	1443-1482
miR155框架-5'臂	1483-1510
siRNA4	1511-1531
miR末端环	1532-1550
siRNA4	1551-1558
siRNA4	1559-1569
miR155框架-3'臂	1570-1614
EF-1 α 重叠	1615-1654

[0722] 表3SEQ ID NO:255的核苷酸位置特征

[0723] 通过将四种质粒瞬时共转染到悬浮液HEK293细胞中,以生成含有针对CD3- ζ 的四种miRNA的慢病毒:含有以CD3- ζ mRNA转录物为靶标的四种miRNA的质粒、含有VSV-G的质粒、含有REV的质粒和含有GAG-POL的质粒。48小时后收集病毒上清液,然后沉淀PEG 24小时。离心分离上清液,将颗粒状病毒重悬于不含IL-2的完全PBMC生长培养基中。转导Jurkat细胞

48小时以计算病毒滴度。

[0724] 为进行转导,在第0天解冻PBMC并用100U/mL hrIL-2培养24小时。在第1天,通过CD3/CD28缀合的磁珠激活PBMC。在第2天,用MOI为10的含有miRNA的慢病毒转导活化的PBMC。细胞扩增至第11天,期间每两天加入新鲜的hrIL-2。在第7、9和11天,收集了1百万个细胞用于FACS分析。

[0725] 使用PE缀合的OKT-3抗体(Biolegend)对细胞进行CD3Epsilon表面表达染色。通过GFP阳性群体(转导细胞)中PE的平均荧光强度(MF)确定表达水平。比较野生型(F02)病毒与含有CD3z miRNA的F02病毒的转导细胞表达水平。图21所示为EF-1 α 启动子内含子中以CD3- ζ 为靶标的miRNAs能够敲减CD3复合物的表达。

[0726] 在某些情况下,描述某些概念时参考了具体实施例描。然而,本领域普通技术人员应了解,在不脱离权利要求所阐述的本发明的范围的情况下,可以进行各种修改和变更。因此,应将说明书和附图视为说明性的而非限制性的,并且所有这些修改内容应包括在本发明的范围内。

[0001] 序列表

[0002] <110> F1 Oncology, Inc.

[0003] F1 Oncology, SEZC

[0004] <120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TRANSDUCING LYMPHOCYTES AND

[0005] REGULATED EXPANSION THEREOF

[0006] <130> F1.001.W0.01

[0007] <140> Not yet assigned

[0008] <141> 2017-03-18

[0009] <150> 62/467,039

[0010] <151> 2017-03-03

[0011] <150> 62/390,093

[0012] <151> 2016-03-19

[0013] <150> 62/360,041

[0014] <151> 2016-07-08

[0015] <160> 255

[0016] <170> PatentIn version 3.5

[0017] <210> 1

[0018] $\langle 211 \rangle$ 42

[0019] $\langle 212 \rangle$ PRT

[0020] <213> Homo sapiens

[0021] <400> 1

[0022] Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

[0023] 1 5 10 15

[0024] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

[0025] 20 25 30

[0026] Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

[0027] 35 40

[0028] $\langle 210 \rangle$ 2

[0029] $\langle 211 \rangle$ 41

[0030] $\langle 212 \rangle$ PRT

[0031] $\langle 213 \rangle$ Homo sapiens

[0032] <400> 2

[0033] Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

[0034] 1 5 10 15

[0035] Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

[0036] 20 25 30

[0037] Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

[0038]	35	40
--------	----	----

[0039] $\langle 210 \rangle$ 3

[0040] <211> 41

[0041] <212> PRT

[0042]	<213>	Homo sapiens
[0043]	<400>	3
[0044]	Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr	
[0045]	1	5 10 15
[0046]	Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala	
[0047]	20	25 30
[0048]	Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser	
[0049]	35	40
[0050]	<210>	4
[0051]	<211>	35
[0052]	<212>	PRT
[0053]	<213>	Homo sapiens
[0054]	<400>	4
[0055]	Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr	
[0056]	1	5 10 15
[0057]	Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp	
[0058]	20	25 30
[0059]	Val Thr Leu	
[0060]	35	
[0061]	<210>	5
[0062]	<211>	37
[0063]	<212>	PRT
[0064]	<213>	Homo sapiens
[0065]	<400>	5
[0066]	Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly	
[0067]	1	5 10 15
[0068]	Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser	
[0069]	20	25 30
[0070]	Thr Leu Ala Lys Ile	
[0071]	35	
[0072]	<210>	6
[0073]	<211>	49
[0074]	<212>	PRT
[0075]	<213>	Homo sapiens
[0076]	<400>	6
[0077]	His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu	
[0078]	1	5 10 15
[0079]	Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser	
[0080]	20	25 30
[0081]	Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser	
[0082]	35	40 45
[0083]	Pro	

[0084] <210> 7
 [0085] <211> 114
 [0086] <212> PRT
 [0087] <213> Homo sapiens
 [0088] <400> 7
 [0089] Cys Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr
 [0090] 1 5 10 15
 [0091] Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln
 [0092] 20 25 30
 [0093] Thr Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr
 [0094] 35 40 45
 [0095] Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly
 [0096] 50 55 60
 [0097] Ser Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile
 [0098] 65 70 75 80
 [0099] Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu
 [0100] 85 90 95
 [0101] Ala Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val
 [0102] 100 105 110
 [0103] Arg Ser
 [0104] <210> 8
 [0105] <211> 187
 [0106] <212> PRT
 [0107] <213> Homo sapiens
 [0108] <400> 8
 [0109] Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr
 [0110] 1 5 10 15
 [0111] Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg Pro
 [0112] 20 25 30
 [0113] Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu Pro
 [0114] 35 40 45
 [0115] Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys
 [0116] 50 55 60
 [0117] His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala
 [0118] 65 70 75 80
 [0119] Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg
 [0120] 85 90 95
 [0121] Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met
 [0122] 100 105 110
 [0123] Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu
 [0124] 115 120 125
 [0125] Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu

[0126]	130	135	140
[0127]	Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro		
[0128]	145	150	155
[0129]	Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys		
[0130]		165	170
[0131]	Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys		175
[0132]		180	185
[0133]	<210> 9		
[0134]	<211> 54		
[0135]	<212> PRT		
[0136]	<213> Homo sapiens		
[0137]	<400> 9		
[0138]	His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln		
[0139]	1	5	10
[0140]	Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln		15
[0141]		20	25
[0142]	Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg		30
[0143]		35	40
[0144]	Leu Gly Asp Leu Trp Val		45
[0145]	50		
[0146]	<210> 10		
[0147]	<211> 60		
[0148]	<212> PRT		
[0149]	<213> Homo sapiens		
[0150]	<400> 10		
[0151]	Cys Val Lys Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val		
[0152]	1	5	10
[0153]	Ser Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile		15
[0154]		20	25
[0155]	Glu Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu		30
[0156]		35	40
[0157]	Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His		45
[0158]	50	55	60
[0159]	<210> 11		
[0160]	<211> 163		
[0161]	<212> PRT		
[0162]	<213> Homo sapiens		
[0163]	<400> 11		
[0164]	Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu		
[0165]	1	5	10
[0166]	Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys		15
[0167]		20	25
			30

[0168]	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Leu	Thr	Ala
[0169]		35					40					45				
[0170]	Leu	Phe	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr
[0171]		50					55					60				
[0172]	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg
[0173]	65					70					75				80	
[0174]	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met
[0175]				85					90					95		
[0176]	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu
[0177]			100					105					110			
[0178]	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys
[0179]		115						120					125			
[0180]	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu
[0181]		130					135					140				
[0182]	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu
[0183]	145					150					155				160	
[0184]	Pro	Pro	Arg													
[0185]	<210>	12														
[0186]	<211>	164														
[0187]	<212>	PRT														
[0188]	<213>	Homo sapiens														
[0189]	<400>	12														
[0190]	Met	Lys	Trp	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Gln	Ala	Gln	Leu
[0191]	1			5					10					15		
[0192]	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Leu	Cys
[0193]			20						25					30		
[0194]	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Leu	Thr	Ala
[0195]		35					40					45				
[0196]	Leu	Phe	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr
[0197]		50					55					60				
[0198]	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg
[0199]	65					70					75				80	
[0200]	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met
[0201]				85					90					95		
[0202]	Gly	Gly	Lys	Pro	Gln	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn
[0203]			100						105					110		
[0204]	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met
[0205]		115							120					125		
[0206]	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly
[0207]		130					135					140				
[0208]	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala
[0209]	145					150					155				160	

[0210] Leu Pro Pro Arg
 [0211] <210> 13
 [0212] <211> 112
 [0213] <212> PRT
 [0214] <213> Homo sapiens
 [0215] <400> 13
 [0216] Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 [0217] 1 5 10 15
 [0218] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 [0219] 20 25 30
 [0220] Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 [0221] 35 40 45
 [0222] Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 [0223] 50 55 60
 [0224] Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 [0225] 65 70 75 80
 [0226] Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 [0227] 85 90 95
 [0228] Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 [0229] 100 105 110
 [0230] <210> 14
 [0231] <211> 21
 [0232] <212> PRT
 [0233] <213> Homo sapiens
 [0234] <400> 14
 [0235] Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 [0236] 1 5 10 15
 [0237] Val Leu Asp Lys Arg
 [0238] 20
 [0239] <210> 15
 [0240] <211> 22
 [0241] <212> PRT
 [0242] <213> Homo sapiens
 [0243] <400> 15
 [0244] Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 [0245] 1 5 10 15
 [0246] Ser Glu Ile Gly Met Lys
 [0247] 20
 [0248] <210> 16
 [0249] <211> 21
 [0250] <212> PRT
 [0251] <213> Homo sapiens

[0252] <400> 16
 [0253] Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 [0254] 1 5 10 15
 [0255] Ala Leu His Met Gln
 [0256] 20
 [0257] <210> 17
 [0258] <211> 171
 [0259] <212> PRT
 [0260] <213> Homo sapiens
 [0261] <400> 17
 [0262] Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
 [0263] 1 5 10 15
 [0264] Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
 [0265] 20 25 30
 [0266] Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
 [0267] 35 40 45
 [0268] Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
 [0269] 50 55 60
 [0270] Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
 [0271] 65 70 75 80
 [0272] Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
 [0273] 85 90 95
 [0274] Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
 [0275] 100 105 110
 [0276] Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
 [0277] 115 120 125
 [0278] Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
 [0279] 130 135 140
 [0280] Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr
 [0281] 145 150 155 160
 [0282] Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
 [0283] 165 170
 [0284] <210> 18
 [0285] <211> 127
 [0286] <212> PRT
 [0287] <213> Homo sapiens
 [0288] <400> 18
 [0289] Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
 [0290] 1 5 10 15
 [0291] Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
 [0292] 20 25 30
 [0293] Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val

[0294]	35	40	45
[0295]	Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile		
[0296]	50	55	60
[0297]	Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys		
[0298]	65	70	75
[0299]	Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Thr Ala Asp Thr Gln		
[0300]	85	90	95
[0301]	Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp		
[0302]	100	105	110
[0303]	Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys		
[0304]	115	120	125
[0305]	<210> 19		
[0306]	<211> 21		
[0307]	<212> PRT		
[0308]	<213> Homo sapiens		
[0309]	<400> 19		
[0310]	Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Ala Gln Tyr Ser		
[0311]	1	5	10
[0312]	His Leu Gly Gly Asn		
[0313]	20		
[0314]	<210> 20		
[0315]	<211> 206		
[0316]	<212> PRT		
[0317]	<213> Homo sapiens		
[0318]	<400> 20		
[0319]	Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser		
[0320]	1	5	10
[0321]	Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr		
[0322]	20	25	30
[0323]	Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr		
[0324]	35	40	45
[0325]	Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys		
[0326]	50	55	60
[0327]	Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp		
[0328]	65	70	75
[0329]	His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr		
[0330]	85	90	95
[0331]	Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu		
[0332]	100	105	110
[0333]	Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Met Ser		
[0334]	115	120	125
[0335]	Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu		

[0336]	130	135	140
[0337]	Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro		
[0338]	145	150	155 160
[0339]	Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys		
[0340]	165	170	175
[0341]	Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys		
[0342]	180	185	190
[0343]	Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile		
[0344]	195	200	205
[0345]	<210> 21		
[0346]	<211> 21		
[0347]	<212> PRT		
[0348]	<213> Homo sapiens		
[0349]	<400> 21		
[0350]	Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser		
[0351]	1 5 10 15		
[0352]	Gly Leu Asn Gln Arg		
[0353]	20		
[0354]	<210> 22		
[0355]	<211> 182		
[0356]	<212> PRT		
[0357]	<213> Homo sapiens		
[0358]	<400> 22		
[0359]	Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu		
[0360]	1 5 10 15		
[0361]	Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys		
[0362]	20 25 30		
[0363]	Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala		
[0364]	35 40 45		
[0365]	Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe		
[0366]	50 55 60		
[0367]	Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp		
[0368]	65 70 75 80		
[0369]	Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro		
[0370]	85 90 95		
[0371]	Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala		
[0372]	100 105 110		
[0373]	Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val		
[0374]	115 120 125		
[0375]	Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln		
[0376]	130 135 140		
[0377]	Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr		

[0378]	145	150	155	160
[0379]	Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly			
[0380]		165	170	175
[0381]	Asn Gln Leu Arg Arg Asn			
[0382]		180		
[0383]	<210> 23			
[0384]	<211> 21			
[0385]	<212> PRT			
[0386]	<213> Homo sapiens			
[0387]	<400> 23			
[0388]	Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser			
[0389]	1	5	10	15
[0390]	His Leu Gln Gly Asn			
[0391]		20		
[0392]	<210> 24			
[0393]	<211> 226			
[0394]	<212> PRT			
[0395]	<213> Homo sapiens			
[0396]	<400> 24			
[0397]	Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe			
[0398]	1	5	10	15
[0399]	Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala			
[0400]		20	25	30
[0401]	Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu			
[0402]		35	40	45
[0403]	Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val			
[0404]	50	55	60	
[0405]	Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe			
[0406]	65	70	75	80
[0407]	Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val			
[0408]		85	90	95
[0409]	Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn			
[0410]		100	105	110
[0411]	Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro			
[0412]		115	120	125
[0413]	Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile			
[0414]	130	135	140	
[0415]	Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly			
[0416]	145	150	155	160
[0417]	Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu			
[0418]		165	170	175
[0419]	Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn			

[0420]	180	185	190
[0421]	Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly		
[0422]	195	200	205
[0423]	Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu		
[0424]	210	215	220
[0425]	Lys Pro		
[0426]	225		
[0427]	<210> 25		
[0428]	<211> 188		
[0429]	<212> PRT		
[0430]	<213> Homo sapiens		
[0431]	<400> 25		
[0432]	Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe		
[0433]	1 5 10 15		
[0434]	Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala		
[0435]	20 25 30		
[0436]	Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu		
[0437]	35 40 45		
[0438]	Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val		
[0439]	50 55 60		
[0440]	Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe		
[0441]	65 70 75 80		
[0442]	Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Glu Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu		
[0443]	85 90 95		
[0444]	Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile		
[0445]	100 105 110		
[0446]	Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe Arg		
[0447]	115 120 125		
[0448]	Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp Glu Tyr		
[0449]	130 135 140		
[0450]	Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met		
[0451]	145 150 155 160		
[0452]	Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly		
[0453]	165 170 175		
[0454]	Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys Pro		
[0455]	180 185		
[0456]	<210> 26		
[0457]	<211> 21		
[0458]	<212> PRT		
[0459]	<213> Homo sapiens		
[0460]	<400> 26		
[0461]	Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu		

[0462]	1	5	10	15
[0463]	Asp Ile Ser Arg Gly			
[0464]	20			
[0465]	<210> 27			
[0466]	<211> 113			
[0467]	<212> PRT			
[0468]	<213> Homo sapiens			
[0469]	<400> 27			
[0470]	Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu			
[0471]	1	5	10	15
[0472]	Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp			
[0473]	20	25	30	
[0474]	Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met			
[0475]	35	40	45	
[0476]	Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu			
[0477]	50	55	60	
[0478]	Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg			
[0479]	65	70	75	80
[0480]	Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly			
[0481]	85	90	95	
[0482]	Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr			
[0483]	100	105	110	
[0484]	Lys			
[0485]	<210> 28			
[0486]	<211> 107			
[0487]	<212> PRT			
[0488]	<213> Homo sapiens			
[0489]	<400> 28			
[0490]	Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu			
[0491]	1	5	10	15
[0492]	Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp			
[0493]	20	25	30	
[0494]	Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met			
[0495]	35	40	45	
[0496]	Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu			
[0497]	50	55	60	
[0498]	Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Thr Arg Lys			
[0499]	65	70	75	80
[0500]	Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln			
[0501]	85	90	95	
[0502]	Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln			
[0503]	100	105		

[0504]	<210>	29
[0505]	<211>	102
[0506]	<212>	PRT
[0507]	<213>	Homo sapiens
[0508]	<400>	29
[0509]	Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu	
[0510]	1	5 10 15
[0511]	Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu	
[0512]	20	25 30
[0513]	Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu	
[0514]	35	40 45
[0515]	Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala	
[0516]	50	55 60
[0517]	Glu Ala Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr	
[0518]	65	70 75 80
[0519]	Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr	
[0520]	85	90 95
[0521]	Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys	
[0522]	100	
[0523]	<210>	30
[0524]	<211>	101
[0525]	<212>	PRT
[0526]	<213>	Homo sapiens
[0527]	<400>	30
[0528]	Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu	
[0529]	1	5 10 15
[0530]	Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu	
[0531]	20	25 30
[0532]	Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu	
[0533]	35	40 45
[0534]	Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala	
[0535]	50	55 60
[0536]	Glu Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln	
[0537]	65	70 75 80
[0538]	Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln	
[0539]	85	90 95
[0540]	Arg Pro Tyr Tyr Lys	
[0541]	100	
[0542]	<210>	31
[0543]	<211>	21
[0544]	<212>	PRT
[0545]	<213>	Homo sapiens

[0546]	<400>	31
[0547]	Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser	
[0548]	1	5 10 15
[0549]	Asp Leu Asn Thr Gln	
[0550]		20
[0551]	<210>	32
[0552]	<211>	86
[0553]	<212>	PRT
[0554]	<213>	Homo sapiens
[0555]	<400>	32
[0556]	Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala	
[0557]	1	5 10 15
[0558]	Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu	
[0559]		20 25 30
[0560]	Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile	
[0561]		35 40 45
[0562]	Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val	
[0563]		50 55 60
[0564]	Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys	
[0565]	65	70 75 80
[0566]	His Glu Lys Pro Pro Gln	
[0567]		85
[0568]	<210>	33
[0569]	<211>	21
[0570]	<212>	PRT
[0571]	<213>	Homo sapiens
[0572]	<400>	33
[0573]	Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu	
[0574]	1	5 10 15
[0575]	Thr Leu Lys His Glu	
[0576]		20
[0577]	<210>	34
[0578]	<211>	20
[0579]	<212>	PRT
[0580]	<213>	Homo sapiens
[0581]	<400>	34
[0582]	Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met	
[0583]	1	5 10 15
[0584]	Pro Gly Arg Gly	
[0585]		20
[0586]	<210>	35
[0587]	<211>	68

[0588] <212> PRT
 [0589] <213> Homo sapiens
 [0590] <400> 35
 [0591] Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 [0592] 1 5 10 15
 [0593] Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
 [0594] 20 25 30
 [0595] Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
 [0596] 35 40 45
 [0597] Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
 [0598] 50 55 60
 [0599] Ala Tyr Arg Ser
 [0600] 65
 [0601] <210> 36
 [0602] <211> 619
 [0603] <212> PRT
 [0604] <213> Homo sapiens
 [0605] <400> 36
 [0606] Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser
 [0607] 1 5 10 15
 [0608] Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly
 [0609] 20 25 30
 [0610] Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu
 [0611] 35 40 45
 [0612] Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His His Phe Pro Ile Glu Arg Gln
 [0613] 50 55 60
 [0614] Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly Gly Lys Ala His Cys Gly Pro
 [0615] 65 70 75 80
 [0616] Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys
 [0617] 85 90 95
 [0618] Asn Leu Arg Lys Pro Cys Asn Arg Pro Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro
 [0619] 100 105 110
 [0620] Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
 [0621] 115 120 125
 [0622] Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
 [0623] 130 135 140
 [0624] Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
 [0625] 145 150 155 160
 [0626] Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
 [0627] 165 170 175
 [0628] Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
 [0629] 180 185 190

[0630]	Lys	Glu	Gln	Gly	Thr	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Gly	Lys	Thr	Val
[0631]			195					200					205			
[0632]	Tyr	His	Tyr	Leu	Ile	Ser	Gln	Asp	Lys	Ala	Gly	Lys	Tyr	Cys	Ile	Pro
[0633]			210				215					220				
[0634]	Glu	Gly	Thr	Lys	Phe	Asp	Thr	Leu	Trp	Gln	Leu	Val	Glu	Tyr	Leu	Lys
[0635]		225				230					235					240
[0636]	Leu	Lys	Ala	Asp	Gly	Leu	Ile	Tyr	Cys	Leu	Lys	Glu	Ala	Cys	Pro	Asn
[0637]				245					250						255	
[0638]	Ser	Ser	Ala	Ser	Asn	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ala	Pro	Thr	Leu	Pro	Ala
[0639]				260					265						270	
[0640]	His	Pro	Ser	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Gln	Arg	Arg	Ile	Asp	Thr	Leu	Asn
[0641]			275						280					285		
[0642]	Ser	Asp	Gly	Tyr	Thr	Pro	Glu	Pro	Ala	Arg	Ile	Thr	Ser	Pro	Asp	Lys
[0643]		290					295					300				
[0644]	Pro	Arg	Pro	Met	Pro	Met	Asp	Thr	Ser	Val	Tyr	Glu	Ser	Pro	Tyr	Ser
[0645]		305				310					315					320
[0646]	Asp	Pro	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Lys	Lys	Leu	Phe	Leu	Lys	Arg	Asp	Asn
[0647]				325						330					335	
[0648]	Leu	Leu	Ile	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Gly	Cys	Gly	Asn	Phe	Gly	Ser	Val
[0649]			340						345					350		
[0650]	Arg	Gln	Gly	Val	Tyr	Arg	Met	Arg	Lys	Lys	Gln	Ile	Asp	Val	Ala	Ile
[0651]		355					360						365			
[0652]	Lys	Val	Leu	Lys	Gln	Gly	Thr	Glu	Lys	Ala	Asp	Thr	Glu	Glu	Met	Met
[0653]		370					375					380				
[0654]	Arg	Glu	Ala	Gln	Ile	Met	His	Gln	Leu	Asp	Asn	Pro	Tyr	Ile	Val	Arg
[0655]		385				390					395					400
[0656]	Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Gln	Ala	Glu	Ala	Leu	Met	Leu	Val	Met	Glu	Met
[0657]			405							410					415	
[0658]	Ala	Gly	Gly	Gly	Pro	Leu	His	Lys	Phe	Leu	Val	Gly	Lys	Arg	Glu	Glu
[0659]			420						425					430		
[0660]	Ile	Pro	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Glu	Leu	Leu	His	Gln	Val	Ser	Met	Gly
[0661]		435						440						445		
[0662]	Met	Lys	Tyr	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Phe	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala
[0663]		450					455					460				
[0664]	Arg	Asn	Val	Leu	Leu	Val	Asn	Arg	His	Tyr	Ala	Lys	Ile	Ser	Asp	Phe
[0665]		465				470					475					480
[0666]	Gly	Leu	Ser	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Thr	Ala	Arg
[0667]				485						490					495	
[0668]	Ser	Ala	Gly	Lys	Trp	Pro	Leu	Lys	Trp	Tyr	Ala	Pro	Glu	Cys	Ile	Asn
[0669]			500						505					510		
[0670]	Phe	Arg	Lys	Phe	Ser	Ser	Arg	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr
[0671]		515						520						525		

[0672]	Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys
[0673]	530 535 540
[0674]	Gly Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys
[0675]	545 550 555 560
[0676]	Pro Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp
[0677]	565 570 575
[0678]	Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg
[0679]	580 585 590
[0680]	Met Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro
[0681]	595 600 605
[0682]	Gly Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala
[0683]	610 615
[0684]	<210> 37
[0685]	<211> 9
[0686]	<212> PRT
[0687]	<213> Artificial sequence
[0688]	<220>
[0689]	<223> synthetic HA Epitope
[0690]	<400> 37
[0691]	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
[0692]	1 5
[0693]	<210> 38
[0694]	<211> 8
[0695]	<212> PRT
[0696]	<213> Artificial sequence
[0697]	<220>
[0698]	<223> synthetic FLAG Epitope
[0699]	<400> 38
[0700]	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
[0701]	1 5
[0702]	<210> 39
[0703]	<211> 10
[0704]	<212> PRT
[0705]	<213> Artificial sequence
[0706]	<220>
[0707]	<223> synthetic c-myc Epitope
[0708]	<400> 39
[0709]	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
[0710]	1 5 10
[0711]	<210> 40
[0712]	<211> 5
[0713]	<212> PRT

[0714] <213> Artificial sequence
[0715] <220>
[0716] <223> synthetic His5 Affinity
[0717] <400> 40
[0718] His His His His His
[0719] 1 5
[0720] <210> 41
[0721] <211> 6
[0722] <212> PRT
[0723] <213> Artificial sequence
[0724] <220>
[0725] <223> synthetic HisX6 Affinity
[0726] <400> 41
[0727] His His His His His His
[0728] 1 5
[0729] <210> 42
[0730] <211> 8
[0731] <212> PRT
[0732] <213> Artificial sequence
[0733] <220>
[0734] <223> synthetic Strep Tag Affinity
[0735] <400> 42
[0736] Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
[0737] 1 5
[0738] <210> 43
[0739] <211> 5
[0740] <212> PRT
[0741] <213> Artificial sequence
[0742] <220>
[0743] <223> synthetic HisX6 Affinity
[0744] <400> 43
[0745] Arg Tyr Ile Arg Ser
[0746] 1 5
[0747] <210> 44
[0748] <211> 4
[0749] <212> PRT
[0750] <213> Artificial sequence
[0751] <220>
[0752] <223> synthetic Affinity
[0753] <400> 44
[0754] Phe His His Thr
[0755] 1

[0756]	<210>	45
[0757]	<211>	17
[0758]	<212>	PRT
[0759]	<213>	Artificial sequence
[0760]	<220>	
[0761]	<223>	synthetic Affinity
[0762]	<400>	45
[0763]	Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg	
[0764]	1	5 10 15
[0765]	Ala	
[0766]	<210>	46
[0767]	<211>	24
[0768]	<212>	PRT
[0769]	<213>	Homo sapiens
[0770]	<400>	46
[0771]	Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu	
[0772]	1	5 10 15
[0773]	Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys	
[0774]	20	
[0775]	<210>	47
[0776]	<211>	23
[0777]	<212>	PRT
[0778]	<213>	Homo sapiens
[0779]	<400>	47
[0780]	Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly	
[0781]	1	5 10 15
[0782]	Val Ala Ile His Leu Cys Cys	
[0783]	20	
[0784]	<210>	48
[0785]	<211>	25
[0786]	<212>	PRT
[0787]	<213>	Homo sapiens
[0788]	<400>	48
[0789]	Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly	
[0790]	1	5 10 15
[0791]	Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys	
[0792]	20 25	
[0793]	<210>	49
[0794]	<211>	23
[0795]	<212>	PRT
[0796]	<213>	Homo sapiens
[0797]	<400>	49

[0798]	Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu
[0799]	1 5 10 15
[0800]	Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val
[0801]	20
[0802]	<210> 50
[0803]	<211> 27
[0804]	<212> PRT
[0805]	<213> Homo sapiens
[0806]	<400> 50
[0807]	Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
[0808]	1 5 10 15
[0809]	Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
[0810]	20 25
[0811]	<210> 51
[0812]	<211> 26
[0813]	<212> PRT
[0814]	<213> Homo sapiens
[0815]	<400> 51
[0816]	Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro
[0817]	1 5 10 15
[0818]	Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
[0819]	20 25
[0820]	<210> 52
[0821]	<211> 24
[0822]	<212> PRT
[0823]	<213> Homo sapiens
[0824]	<400> 52
[0825]	Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Val Ile Ser Phe Leu Leu Gly Leu Gly
[0826]	1 5 10 15
[0827]	Leu Gly Val Ala Cys Val Leu Ala
[0828]	20
[0829]	<210> 53
[0830]	<211> 15
[0831]	<212> PRT
[0832]	<213> Artificial sequence
[0833]	<220>
[0834]	<223> synthetic Linker 1
[0835]	<400> 53
[0836]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0837]	1 5 10 15
[0838]	<210> 54
[0839]	<211> 30

[0840] <212> PRT
[0841] <213> Artificial sequence
[0842] <220>
[0843] <223> synthetic Linker 2
[0844] <400> 54
[0845] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[0846] 1 5 10 15
[0847] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0848] 20 25 30
[0849] <210> 55
[0850] <211> 14
[0851] <212> PRT
[0852] <213> Artificial sequence
[0853] <220>
[0854] <223> synthetic Linker 3
[0855] <400> 55
[0856] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0857] 1 5 10
[0858] <210> 56
[0859] <211> 4
[0860] <212> PRT
[0861] <213> Artificial sequence
[0862] <220>
[0863] <223> synthetic Linker 4
[0864] <400> 56
[0865] Gly Gly Ser Gly
[0866] 1
[0867] <210> 57
[0868] <211> 5
[0869] <212> PRT
[0870] <213> Artificial sequence
[0871] <220>
[0872] <223> synthetic Linker 5
[0873] <400> 57
[0874] Gly Gly Ser Gly Gly
[0875] 1 5
[0876] <210> 58
[0877] <211> 5
[0878] <212> PRT
[0879] <213> Artificial sequence
[0880] <220>
[0881] <223> synthetic Linker 6

[0882] <400> 58
[0883] Gly Ser Gly Ser Gly
[0884] 1 5
[0885] <210> 59
[0886] <211> 5
[0887] <212> PRT
[0888] <213> Artificial sequence
[0889] <220>
[0890] <223> synthetic Linker 7
[0891] <400> 59
[0892] Gly Ser Gly Gly Gly
[0893] 1 5
[0894] <210> 60
[0895] <211> 5
[0896] <212> PRT
[0897] <213> Artificial sequence
[0898] <220>
[0899] <223> synthetic Linker 8
[0900] <400> 60
[0901] Gly Gly Gly Ser Gly
[0902] 1 5
[0903] <210> 61
[0904] <211> 5
[0905] <212> PRT
[0906] <213> Artificial sequence
[0907] <220>
[0908] <223> synthetic Linker 9
[0909] <400> 61
[0910] Gly Ser Ser Ser Gly
[0911] 1 5
[0912] <210> 62
[0913] <211> 4
[0914] <212> PRT
[0915] <213> Artificial sequence
[0916] <220>
[0917] <223> synthetic Hinge 1
[0918] <400> 62
[0919] Cys Pro Pro Cys
[0920] 1
[0921] <210> 63
[0922] <211> 5
[0923] <212> PRT

[0924]	<213>	Artificial sequence
[0925]	<220>	
[0926]	<223>	synthetic Hinge 2
[0927]	<400>	63
[0928]		Asp Lys Thr His Thr
[0929]	1	5
[0930]	<210>	64
[0931]	<211>	15
[0932]	<212>	PRT
[0933]	<213>	Artificial sequence
[0934]	<220>	
[0935]	<223>	synthetic Hinge 3
[0936]	<400>	64
[0937]		Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
[0938]	1	5 10 15
[0939]	<210>	65
[0940]	<211>	12
[0941]	<212>	PRT
[0942]	<213>	Artificial sequence
[0943]	<220>	
[0944]	<223>	synthetic Hinge 4
[0945]	<400>	65
[0946]		Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
[0947]	1	5 10
[0948]	<210>	66
[0949]	<211>	10
[0950]	<212>	PRT
[0951]	<213>	Artificial sequence
[0952]	<220>	
[0953]	<223>	synthetic Hinge 5
[0954]	<400>	66
[0955]		Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
[0956]	1	5 10
[0957]	<210>	67
[0958]	<211>	7
[0959]	<212>	PRT
[0960]	<213>	Artificial sequence
[0961]	<220>	
[0962]	<223>	synthetic Hinge 6
[0963]	<400>	67
[0964]		Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro
[0965]	1	5

[0966]	<210>	68
[0967]	<211>	7
[0968]	<212>	PRT
[0969]	<213>	Artificial sequence
[0970]	<220>	
[0971]	<223>	synthetic Hinge 7
[0972]	<400>	68
[0973]	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro	
[0974]	1	5
[0975]	<210>	69
[0976]	<211>	15
[0977]	<212>	PRT
[0978]	<213>	Artificial sequence
[0979]	<220>	
[0980]	<223>	synthetic Hinge 8
[0981]	<400>	69
[0982]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	
[0983]	1	5 10 15
[0984]	<210>	70
[0985]	<211>	12
[0986]	<212>	PRT
[0987]	<213>	Artificial sequence
[0988]	<220>	
[0989]	<223>	synthetic Hinge 9
[0990]	<400>	70
[0991]	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	
[0992]	1	5 10
[0993]	<210>	71
[0994]	<211>	17
[0995]	<212>	PRT
[0996]	<213>	Artificial sequence
[0997]	<220>	
[0998]	<223>	synthetic Hinge 10
[0999]	<400>	71
[1000]	Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys	
[1001]	1	5 10 15
[1002]	Pro	
[1003]	<210>	72
[1004]	<211>	12
[1005]	<212>	PRT
[1006]	<213>	Artificial sequence
[1007]	<220>	

[1008]	<223>	synthetic Hinge 11
[1009]	<400>	72
[1010]		Ser Pro Asn Met Val Pro His Ala His His Ala Gln
[1011]	1	5 10
[1012]	<210>	73
[1013]	<211>	45
[1014]	<212>	PRT
[1015]	<213>	Artificial sequence
[1016]	<220>	
[1017]	<223>	synthetic Hinge 12
[1018]	<400>	73
[1019]		Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
[1020]	1	5 10 15
[1021]		Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
[1022]		20 25 30
[1023]		Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
[1024]		35 40 45
[1025]	<210>	74
[1026]	<211>	21
[1027]	<212>	PRT
[1028]	<213>	Homo sapiens
[1029]	<400>	74
[1030]		Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[1031]	1	5 10 15
[1032]		His Ala Ala Arg Pro
[1033]		20
[1034]	<210>	75
[1035]	<211>	24
[1036]	<212>	PRT
[1037]	<213>	Homo sapiens
[1038]	<400>	75
[1039]		Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
[1040]	1	5 10 15
[1041]		Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
[1042]		20
[1043]	<210>	76
[1044]	<211>	27
[1045]	<212>	PRT
[1046]	<213>	Homo sapiens
[1047]	<400>	76
[1048]		Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
[1049]	1	5 10 15

[1050]	Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val		
[1051]		20	25
[1052]	<210>	77	
[1053]	<211>	21	
[1054]	<212>	PRT	
[1055]	<213>	Artificial sequence	
[1056]	<220>		
[1057]	<223>	synthetic 2A-1 Cleavage signal	
[1058]	<400>	77	
[1059]	Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu		
[1060]	1	5	10 15
[1061]	Glu Asn Pro Gly Pro		
[1062]		20	
[1063]	<210>	78	
[1064]	<211>	357	
[1065]	<212>	PRT	
[1066]	<213>	Homo sapiens	
[1067]	<400>	78	
[1068]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro		
[1069]	1	5	10 15
[1070]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly		
[1071]		20	25 30
[1072]	Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe		
[1073]		35	40 45
[1074]	Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala		
[1075]		50	55 60
[1076]	Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu		
[1077]	65	70	75 80
[1078]	Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile		
[1079]		85	90 95
[1080]	Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu		
[1081]		100	105 110
[1082]	Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala		
[1083]		115	120 125
[1084]	Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu		
[1085]		130	135 140
[1086]	Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr		
[1087]	145	150	155 160
[1088]	Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys		
[1089]		165	170 175
[1090]	Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly		
[1091]		180	185 190

[1092]	Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
[1093]	195 200 205
[1094]	Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
[1095]	210 215 220
[1096]	Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
[1097]	225 230 235 240
[1098]	Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
[1099]	245 250 255
[1100]	Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
[1101]	260 265 270
[1102]	His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
[1103]	275 280 285
[1104]	Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
[1105]	290 295 300
[1106]	Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
[1107]	305 310 315 320
[1108]	Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
[1109]	325 330 335
[1110]	Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
[1111]	340 345 350
[1112]	Ile Gly Leu Phe Met
[1113]	355
[1114]	<210> 79
[1115]	<211> 45
[1116]	<212> PRT
[1117]	<213> Homo sapiens
[1118]	<400> 79
[1119]	Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
[1120]	1 5 10 15
[1121]	Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
[1122]	20 25 30
[1123]	Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
[1124]	35 40 45
[1125]	<210> 80
[1126]	<211> 39
[1127]	<212> PRT
[1128]	<213> Homo sapiens
[1129]	<400> 80
[1130]	Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
[1131]	1 5 10 15
[1132]	Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
[1133]	20 25 30

[1134]	Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
[1135]	35
[1136]	<210> 81
[1137]	<211> 113
[1138]	<212> PRT
[1139]	<213> Homo sapiens
[1140]	<400> 81
[1141]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
[1142]	1 5 10 15
[1143]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
[1144]	20 25 30
[1145]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
[1146]	35 40 45
[1147]	Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
[1148]	50 55 60
[1149]	Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
[1150]	65 70 75 80
[1151]	Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
[1152]	85 90 95
[1153]	Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
[1154]	100 105 110
[1155]	Arg
[1156]	<210> 82
[1157]	<211> 463
[1158]	<212> PRT
[1159]	<213> Homo sapiens
[1160]	<400> 82
[1161]	Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln
[1162]	1 5 10 15
[1163]	Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp
[1164]	20 25 30
[1165]	Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val
[1166]	35 40 45
[1167]	Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val
[1168]	50 55 60
[1169]	Asn Thr Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val
[1170]	65 70 75 80
[1171]	Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr
[1172]	85 90 95
[1173]	Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly
[1174]	100 105 110
[1175]	Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys

[1176]	115	120	125
[1177]	Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn		
[1178]	130	135	140
[1179]	Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val		
[1180]	145	150	155
[1181]	Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn		
[1182]	165	170	175
[1183]	Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln		
[1184]	180	185	190
[1185]	Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile		
[1186]	195	200	205
[1187]	Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr		
[1188]	210	215	220
[1189]	Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro		
[1190]	225	230	235
[1191]	Ile Leu Leu Pro Pro Cys Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser		
[1192]	245	250	255
[1193]	Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile		
[1194]	260	265	270
[1195]	Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu		
[1196]	275	280	285
[1197]	His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro		
[1198]	290	295	300
[1199]	Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala		
[1200]	305	310	315
[1201]	Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu		
[1202]	325	330	335
[1203]	Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn		
[1204]	340	345	350
[1205]	Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Val Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp		
[1206]	355	360	365
[1207]	Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro		
[1208]	370	375	380
[1209]	Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn		
[1210]	385	390	395
[1211]	Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn		
[1212]	405	410	415
[1213]	Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu		
[1214]	420	425	430
[1215]	Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn		
[1216]	435	440	445
[1217]	Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln		

[1218]	450	455	460	
[1219]	<210>	83		
[1220]	<211>	13673		
[1221]	<212>	DNA		
[1222]	<213>	Artificial sequence		
[1223]	<220>			
[1224]	<223>	synthetic Dox-rapamycin inducible lentiviral genome with		
[1225]		riboswitch		
[1226]	<400>	83		
[1227]	gatatctata	acaagaaaat	atatatataa	taagttatca cgtaagtaga acatgaaata 60
[1228]	acaatataat	tatcgtatga	gttaaattctt	aaaagtcacg taaaagataa tcatgcgtca 120
[1229]	ttttgactca	cgcggtcgtt	atagttcaaa	atcagtgaca cttaccgcat tgacaagcac 180
[1230]	gcctcacggg	agctccaagc	ggcgactgag	atgtcctaaa tgcacagcga cggattcgcg 240
[1231]	ctatttagaa	agagagagca	atatttcaag	aatgcatgcg tcaattttac gcagactatc 300
[1232]	tttctagggt	taagacggat	cgggagatct	cccgatcccc tatggtgcac tctcagtaca 360
[1233]	atctgctctg	atgccgcata	gttaagccag	tatctgctcc ctgcttgtgt gttggaggtc 420
[1234]	gctgagtagt	gcgcgagcaa	aatttaagct	acaacaaggc aaggcttgac cgacaattgc 480
[1235]	atgaagaatc	tgcttagggt	taggcgtttt	gcgctgcttc gcgatgtacg ggccagatat 540
[1236]	acgcgttgac	attgattatt	gactagtatt	taatagtaat caattacggg gtcattagtt 600
[1237]	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	taacttacgg taaatggccc gcctggctga 660
[1238]	ccgccaacg	acccccgcc	attgacgtca	ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca 720
[1239]	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtatttac ggtaaactgc ccacttgcca 780
[1240]	gtacatcaag	tgtatcatat	gccaaagtag	ccccctattg acgtcaatga cggtaaattg 840
[1241]	cccgcctggc	attatgcccc	gtacatgacc	ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc 900
[1242]	tacgtattag	tcatcgctat	taccatgggt	atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt 960
[1243]	ggatagcggt	ttgactcacg	gggatttcca	agtctccacc ccattgacgt caatgggagt 1020
[1244]	ttgttttga	acaaaaatca	acgggacttt	ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg 1080
[1245]	acgcaaatgg	gcggtaggcg	tgtacggtgg	gaggtctata taagcagagc tctccctatc 1140
[1246]	agtgatagag	atctccctat	cagtgataga	gatcgtcgac gagctcgttt agtgaaccgt 1200
[1247]	cagatcgctt	ggagacgccc	tcgaagccgc	ggtgcgggtg ccagggcgtg ccctgggtct 1260
[1248]	ctctggttag	accagatctg	agcctgggag	ctctctggct aactagggaa cccactgctt 1320
[1249]	aagcctcaat	aaagcttgcc	ttgagtgcct	caagtagtgt gtgcccgtct gttgtgtgac 1380
[1250]	tctggtaact	agagatccct	cagacccttt	tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc 1440
[1251]	gcccgaacag	ggacttgaaa	gcgaaaggga	aaccagagga gctctctcga cgcaggactc 1500
[1252]	ggcttgctga	agcgcgcacg	gcaagaggcg	aggggcggcg actggtgagt acgccaacaaa 1560
[1253]	ttttgactag	cggaggctag	aaggagagag	atgggtgcga gagcgtcagt attaaagcggg 1620
[1254]	ggagaattag	atcgcgatgg	gaaaaaatc	ggttaaggcc agggggaaag aaaaaatata 1680
[1255]	aattaaaaca	tatagtatgg	gcaagcaggg	agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc 1740
[1256]	tgtagaaac	atcagaaggc	tgtagacaaa	tactgggaca gctacaacca tcccttcaga 1800
[1257]	caggatcaga	agaacttaga	tcattatata	atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc 1860
[1258]	aaaggataga	gataaaagac	accaaggaag	ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca 1920
[1259]	aaagtaagac	caccgcacag	caagcgcccg	ctgatcttca gacctggagg aggagatatg 1980

[1260]	agggacaatt ggagaagtga attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga	2040
[1261]	gtagcaccca ccaaggcaaa gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata	2100
[1262]	ggagctttgt tccttgggtt cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg	2160
[1263]	acgctgacgg tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg	2220
[1264]	ctgagggcta ttgaggcgca acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag	2280
[1265]	ctccaggcaa gaatcctggc tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt	2340
[1266]	tggggttgct ctggaaaact catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt	2400
[1267]	aataaatctc tggaacagat ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt	2460
[1268]	aacaattaca caagcttaat acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag	2520
[1269]	aatgaacaag aattattgga attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata	2580
[1270]	acaaattggc tgtgttatat aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta	2640
[1271]	agaatagttt ttgctgtact ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttcaccatta	2700
[1272]	tcgtttcaga cccacctccc aaccccgagg ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa	2760
[1273]	gaaggtggag agagagacag agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggtat	2820
[1274]	cgattagact gtagcccagg aatatggcag ctagattgta cacatttaga aggaaaagtt	2880
[1275]	atcttggtag cagttcatgt agccagtgga tatatagaag cagaagtaat tccagcagag	2940
[1276]	acagggaag aaacagcata cttcctctta aaattagcag gaagatggcc agtaaaaaca	3000
[1277]	gtacatacag acaatggcag caatttcacc agtactacag ttaaggccgc ctgttggtag	3060
[1278]	gcggggatca agcaggaatt tggcattccc tacaatcccc aaagtcaagg agtaatagaa	3120
[1279]	tctatgaata agaattaaa gaaaattata ggacaggtaa gagatcaggc tgaacatctt	3180
[1280]	aagacagcag taaaaatggc agtattcatc cacaatttta aaagaaaagg ggggattggg	3240
[1281]	gggtacagtg caggggaaag aatagtagac ataatagcaa cagacataca aactaaagaa	3300
[1282]	ttacaaaaac aaattacaaa aattcaaat tttcgggttt attacaggga cagcagagat	3360
[1283]	ccagtttggc tgcattgatc acgtgagggg ctctagactc tagacacaca aaaaaccaac	3420
[1284]	acacagatct aatgaaaata aagatctttt attgagaaac ttatacaggg tagcataatg	3480
[1285]	ggctactgac cccgccttca aacctatttg gagactataa gtgaaaatta tcaactggtt	3540
[1286]	tggtagaagc tggacatggt gacatatgct tcttcttgat ttgatccag ggaagtaaga	3600
[1287]	atgggctgac cctgagcaac tgggttcaat gtcaggattc cagattggag agaaaatgga	3660
[1288]	gggggcagcg tgctgtttgt agtcccaagg ctaagcagga ggtcctggta cacatgaggc	3720
[1289]	ccattcttgc cactctccct gcagtctagg gacctggaag aggagagaat aggggcgtca	3780
[1290]	catgcactga cattcccagc caggcatgtg agggatgaat ctcttccaaa gctttctgga	3840
[1291]	gtgacgacta catcctcaga tgggcagttg gggctctgca catcccctcc aagcctctgc	3900
[1292]	ttctcagatt cttctagttg ctgaggaaac gtatcttgca gaaaacctc cacttcatct	3960
[1293]	ctagcttgaa tgtcatccac cctatgaatc tggcagtgca ggaaactttc aggattgaaa	4020
[1294]	ctcacattta aattttttct tggtttctta caaagatgtt ccagagtctt cttatgatcg	4080
[1295]	gggagactgg gccatacgat aggcttaatc ctttttttcc ataacacaca ggccaagatg	4140
[1296]	accaacagag cgacagagaa aaaactcaaa atgctgatgg tcaggcatgg tggtagtaag	4200
[1297]	ataggatcca tctcccctga gctattattg atctctggag ttctgaagta ataacttgga	4260
[1298]	ctccattcac tccagaagcc tttaaaatag tgatcaggga tggatcgaac tttaatctca	4320
[1299]	tacattgctg ccggttggag ctttctctgc aggagtgtca gctttgtgct ggataaatc	4380
[1300]	acatgcgtcc atttgttttc atccttttcc tggcggttaag ctacatcatg cattaaaact	4440
[1301]	tttacatact tcttttgcaa gtgtgatgta ttaaatgtca ccacaaagtc attggctcct	4500

[1302]	tcccgataga tgacactcag gtcaaaagga gcctcagggt taactatagt ggtaggtct	4560
[1303]	atTTTTttgc aggttagact ctttttcca accttcacac atatattgct ctttccaatc	4620
[1304]	agtaagaatt tctttgtctc gatgaaatat atctcttgta gtttctgaa attcaggcac	4680
[1305]	tttacctcca cgaggccccc acatatitca aattccagat tgggtggtgt gacatctggg	4740
[1306]	tcctcaaaag cacatgtcag tgaatgtcgc gatccattca cttccaactg gctatagcat	4800
[1307]	gagaatgagt agtcatccag ttctgcatct tccaagtctc cattttgagc atagccactt	4860
[1308]	tctccagaaa cgacttgaag taaagaaaaa accatgccaa aagttgtacc tagaattgtc	4920
[1309]	attggggccgg gattttctc caggtccccc catgttagta gacttcccct gccctcgccg	4980
[1310]	gagcgagggg gcaggccctg catgtgaagg gcgtcgtagg tgtccttggg ggctgtactg	5040
[1311]	agacctggt aaaggccatc gtgccccttg cccctccggc gctcgccctt catcccaatc	5100
[1312]	tcactgtagg cctccgccat cttatctttc tgcagttcat tgtacaggcc ttctgaggg	5160
[1313]	ttcttccttc tcggcttcc ccccatctca gggccccggc cagttctctt gtccaaaaca	5220
[1314]	tcgtactcct ctcttcgtcc tagattgagc tcgttataga gctggttctg gccctgcttg	5280
[1315]	tacgcggggg cgtctgcgt cctgctgaac ttactctca gttcacatcc tccttcttct	5340
[1316]	tcttctggaa atcggcagct acagccatct tcctcttgag tagtttgtac tggctcata	5400
[1317]	aatggttgtt tgaatatata caggagtctc tttctgcccc gtttgagta aagggtgata	5460
[1318]	accagtgaca ggagaaggac cccacaagtc ccggccaagg gcgcccagat gtagatatca	5520
[1319]	caggcgaagt ccagccccct cgtgtgcact gcgccccccg ccgctggccg gcacgcctct	5580
[1320]	gggcgcaggg acaggggctg cgacgcgatg gtgggcgccg gtgttggtgg tcgcggcgt	5640
[1321]	ggcgtcgtgg ttgaggagac ggtgactgag gttccttggc cccagtagtc catagcatag	5700
[1322]	ctaccaccgt agtaataatg tttggcacag tagtaaattg ctgtgtcatc agtttgaga	5760
[1323]	ctgttcattt ttaagaaaac ttggctcttg gagttgtcct tgatgatggt cagtctggat	5820
[1324]	ttgagagctg aattatagta tgtgtgttca ctaccccata ttactcccag ccactccaga	5880
[1325]	cccttctgtg gaggtggcg aatccagctt acaccatagt cgggtaatga gaccctgag	5940
[1326]	acagtgcattg tgacggacag gctctgtgag ggcgccacca ggccagggtc tgactcctgc	6000
[1327]	agtttcacct cagatccgcc gccaccggc ccaccaccgc ccgagccacc gccacctgtg	6060
[1328]	atctccagct tgggtccccc tccgaacgtg tacggaagcg tattaccctg ttggcgaagt	6120
[1329]	aggtggcaat atcttcttgc tccaggttgc taattgtcag agaataatct gttccagacc	6180
[1330]	cactgccact gaaccttgat gggactcctg agtgtaatct tgatgtatgg tagatcagga	6240
[1331]	gtttaacagt tccatctggt ttctgtgat accaatttaa atatttacta atgtcctgac	6300
[1332]	ttgccctgca actgatggtg actctgtctc ccagagaggc agacaggag gatgtagtct	6360
[1333]	gtgtcatctg gatgtccggc ctggcggcgt ggagcagcaa ggccagcggc aggagcaagg	6420
[1334]	cggtcactgg taaggccatg gatcctctag atcacgacac ctgaaatgga agaaaaaac	6480
[1335]	tttgaaccac tgtctgaggc ttgagaatga accaagatcc aaactcaaaa agggcaaatt	6540
[1336]	ccaaggagaa ttacatcaag tgccaagctg gcctaacttc agtctccacc cactcagtgt	6600
[1337]	ggggaaactc catcgcataa aacccctccc cccaacctaa agacgacgta ctccaaaagc	6660
[1338]	tcgagaacta atcgaggtgc ctggacggcg cccggtactc agtggagtca catgaagcga	6720
[1339]	cggctgagga cggaaggcc cttttccttt gtgtgggaga aacttataca gggtagcata	6780
[1340]	atgggtact gacccgcct tcaaacctat ttggagacta taagtgaata tgactcaccc	6840
[1341]	gcccgtctc ccggcacctt catcttgtcc tttccctcag aaagaggctg ggaggcagag	6900
[1342]	gctgaggcag cgggtggccgg gacggttagg agaaaaggag tctctgctgg ttttattctg	6960
[1343]	cagctacctc cccaggaagt ggaggactgt ggggcctttg agaagcacct gccgacaggg	7020

[1344]	ccaagaaatt cgcactcccc ctttcggttc acaggcagga agccctggag gtttgagggt	7080
[1345]	ttgggggtgtg tgtatgtatc tgtctgtctg aattttgctt tttctctcat ttgaccattg	7140
[1346]	ttttaatgct ctttttttta aaaaaataa ttcttatcta attcctatct tgattggtaa	7200
[1347]	agtccatctc taggcaaata caagttctcg atggaaaaca ataagtaatg taaaatacag	7260
[1348]	catagcaaaa ctttaacctc caaatcaagc ctctacttga atccttttct gagggatgaa	7320
[1349]	taaggcatag gcatcagggg ctgttgccaa tgtgcattag ctgtttgcag cctcaccttc	7380
[1350]	tttcatggag tttaagatat agtgtatttt cccaaggttt gaactagctc ttcattttctt	7440
[1351]	tatgttttaa atgcactgac ctcccacatt cccttttttag taaaatatc agaaataatt	7500
[1352]	taaaatacatc attgcaatga aaataaatgt tttttattag gcagaatcca gatgctcaag	7560
[1353]	gcccttcata atatcccca gtttagtagt tggacttagg gaacaaagga acctttaata	7620
[1354]	gaaattggac agcaagaaag cgagcttagt gatacttggt atcctctaga tcacgacacc	7680
[1355]	tgaaatggaa gaaaaaaact gcaccttcac cttgtccttt ccttcagaaa gaggctggga	7740
[1356]	ggcagaggct gaggcagcgg tggccgggac ggtaggaga aaaggagtct ctgctggttt	7800
[1357]	tattctgcag ctacctcccc aggaagtgga ggactgtggg gcctttgaga agcacctgcc	7860
[1358]	gacaggcca agaaattcgc actccccctt tcggttcaca ggcaggaagc cctggaggtt	7920
[1359]	tgagggtttg ggggtgtgtg atgtatctgt ctgtctgaat ttgtctttt ctctcatttg	7980
[1360]	accattgttt taatgctcct ttttttaaaa aaaataattc ttatctaatt cctatcttga	8040
[1361]	ttggtaaagt ccatctctag gcaatacaa gttctcgatg gaaaacaata agtaatgtaa	8100
[1362]	aatacagcat agcaaaactt taacctcaa atcaagcctc tacttgaatc cttttctgag	8160
[1363]	ggatgaataa ggcataggca tcaggggctg ttgccaatgt gcattagctg tttgcagcct	8220
[1364]	caccttcttt catggagttt aagatatagt gtattttccc aaggtttgaa ctagctcttc	8280
[1365]	atttctttat gttttaaatg cactgacctc ccacattccc tttttagtaa aatattcaga	8340
[1366]	aataatttaa atacatcatt gcaatgaaaa taaatgtttt ttattaggca gaatccagat	8400
[1367]	gctcaaggcc cttcataata tccccagtt tagtagttgg acttagggaa caaaggaacc	8460
[1368]	tttaatagaa attggacagc aagaaagcga gcttagtgat acttgtaaaa agagacgcgt	8520
[1369]	ctctaaaagt cttttccatg gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg	8580
[1370]	tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg	8640
[1371]	ccggctctgc ggccctcttc gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt	8700
[1372]	tgggccgect ccccgcttg aattcgagct cggtagcttt aagaccaatg acttacaagg	8760
[1373]	cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg actggaaggg ctaattcact	8820
[1374]	cccaacgaag acaagatctg ctttttgctt gtactgggtc tctctggtta gaccagatct	8880
[1375]	gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct taagcctcaa taaagcttgc	8940
[1376]	cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgccgctc tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc	9000
[1377]	tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtag tagttcatgt catcttatta	9060
[1378]	ttcagtattt ataacttgca aagaaatgaa tatcagagag tgagaggaac ttgtttattg	9120
[1379]	cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt	9180
[1380]	tttcaactgca ttctagtgtg ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctggc	9240
[1381]	tctagctatc ccgcccctaa ctccgcccac ccgccccta actccgccc a gttccgccc	9300
[1382]	ttctccgccc catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgctcggc	9360
[1383]	ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggcctaggga cgtatggcca	9420
[1384]	caacctgggc tcccgggcg cgtactccac ctcacccatc atccacgctg ttttatgagt	9480
[1385]	aaaggagaag aacttttcac tggagtgtgc ccaattcttg ttgaattaga tggtagtgtt	9540

[1386]	aatgggcaca aattttctgt cagtggagag ggtgaagggtg atgcaacata cggaaaactt	9600
[1387]	acccttaaat ttatttgac tactggaaaa ctacctgttc catggccaac acttgctact	9660
[1388]	actttctctt atgggtgtca atgcttttca agatacccag atcatatgaa acggcatgac	9720
[1389]	tttttcaaga gtgccatgcc cgaaggttat gtacaggaaa gaactatatt tttcaaagat	9780
[1390]	gacgggaact acaagacacg tgctgaagtc aagtttgaag gtgataccct tgttaataga	9840
[1391]	atcgagttaa aaggatttga ttttaaagaa gatggaaaca ttcttggaca caaattggaa	9900
[1392]	tacaactata actcacacaa tgtatacatc atggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa	9960
[1393]	gttaacttca aaattagaca caacattgaa gatggaagcg ttcaactagc agaccattat	10020
[1394]	caacaaaata ctccaattgg cgatggccct gtccttttac cagacaacca ttacctgtcc	10080
[1395]	acacaatctg ccctttcgaa agatcccaac gaaaagagag accacatgggt ccttcttgag	10140
[1396]	tttghtaacag ctgctgggat tacacatggc atggatgaac tatacaaata ggacctccat	10200
[1397]	agaagacacc gggaccgatc caataacttc gtatagcata cattatacga agttatgcct	10260
[1398]	ccgactcta gcgtttaaac ttaagcttgg gaagttccta ttccgaagtt cctattctct	10320
[1399]	agaaagtata ggaacttcta ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc	10380
[1400]	agatatccag cacagtggcg gccgctcgag tctagaggcg ccgtttaaac ccgctgatca	10440
[1401]	gcctcgactg tgcttcttag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc	10500
[1402]	ttgaccttg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg	10560
[1403]	cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg	10620
[1404]	gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag	10680
[1405]	gcggaaagt aaccctagaa agataatcat attgtgacgt acgttaaaga taatcatgcg	10740
[1406]	taaaattgac gcatgtgtt tatcggtctg tatatcgagg ttattttatt aatttgaata	10800
[1407]	gatattaagt ttattatat ttacacttac atactaataa taaattcaac aaacaattta	10860
[1408]	tttatgttta ttattttatt aaaaaaaac aaaaactcaa aatttcttct ataaagtaac	10920
[1409]	aaaaaccagc tggggctcga agttcctata ctttctagag aataggaact tctatagtga	10980
[1410]	gtcgaataag ggcgacacaa aattttattc aaatgcataa taaatactga taacatctta	11040
[1411]	tagtttgtat tatattttgt attatcgttg acatgtataa ttttgataac aaaaactgat	11100
[1412]	tttcccttta ttattttcga gatttatttt cttaattctc tttaacaaac tagaaatatt	11160
[1413]	gtatatacaa aaaatcataa ataatagatg aatagtttaa ttataggtgt tcatcaatcg	11220
[1414]	aaaaagcaac gtatcttatt taaagtgcgt tgcttttttc tcattttataa ggttaaataa	11280
[1415]	ttctcatata tcaagcaaag tgacaggcgc ctttaaatat tctgacaaat gctctttccc	11340
[1416]	taaactcccc ccataaaaaa acccgccgaa gcgggttttt acgtttattg cggattaacg	11400
[1417]	attactcggt atcagaaccg cccagggggc ccgagcttaa gactggccgt cgtttttacaa	11460
[1418]	cacagaaaga gttttagtaa acgcaaaaag gccatccgtc aggggccttc tgcttagttt	11520
[1419]	gatgcctggc agttccctac tctgccttc cgttctctcg ctactgact cgtgcgctc	11580
[1420]	ggctgctcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag gcggtataac gggttatccac	11640
[1421]	agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	11700
[1422]	ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	11760
[1423]	caaaaatcga cgtcgaagtc agaggtggcg aaaccgcaga ggactataaa gataccaggc	11820
[1424]	gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata	11880
[1425]	cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	11940
[1426]	tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca	12000
[1427]	gccccaccgc tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga	12060

[1428]	cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg	12120
[1429]	tgctacagag ttcttgaagt ggtgggctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	12180
[1430]	tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	12240
[1431]	caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	12300
[1432]	aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa	12360
[1433]	cgacgcgcgc gtaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gcttgcgccg tcccgtaag	12420
[1434]	tcagcgtaat gctctgcttt tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat	12480
[1435]	tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa	12540
[1436]	actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc	12600
[1437]	gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga	12660
[1438]	aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc	12720
[1439]	agacttggtc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac	12780
[1440]	cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga ggcgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac	12840
[1441]	aattacaaac aggaatcgag tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat	12900
[1442]	tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaacgc tgtttttccg gggatcgag	12960
[1443]	tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagtggca	13020
[1444]	taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac	13080
[1445]	ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaag cgatagattg	13140
[1446]	tcgcacctga ttgcccagaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca	13200
[1447]	tgttggaatt taatcgcggc ctgcagttt cccgttgaat atggctcata ttcttccttt	13260
[1448]	ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat	13320
[1449]	gtatttagaa aaataaacia ataggggtca gtgttacaac caattaacca attctgaaca	13380
[1450]	ttatcgcgag cccatttata cctgaatatg gtcataaca ccccttggtt gcctggcggc	13440
[1451]	agtagcgcg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag aagtgaacg ccgtagcgcc	13500
[1452]	gatggtagtg tggggactcc ccatgcgaga gtagggact gccaggcatc aaataaaacg	13560
[1453]	aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg cccgggctaa ttagggggtg tcgcccttat	13620
[1454]	tcgactctat agtgaagttc ctattctcta gaaagtatag gaacttctga agt	13673
[1455]	<210> 84	
[1456]	<211> 15025	
[1457]	<212> DNA	
[1458]	<213> Artificial sequence	
[1459]	<220>	
[1460]	<223> synthetic Dox-rapamycin inducible GAG POL ENV	
[1461]	<400> 84	
[1462]	gatatctata acaagaaaat atatatataa taagttatca cgtaagtaga acatgaaata	60
[1463]	acaatataat tatcgtatga gttaaatctt aaaagtcacg taaaagataa tcatgcgtca	120
[1464]	ttttgactca cgcggtcggt atagttcaaa atcagtgaca cttaccgcat tgacaagcac	180
[1465]	gcctcacggg agctccaagc ggcgactgag atgtcctaaa tgcacagcga cggattcgcg	240
[1466]	ctatttagaa agagagagca atatttcaag aatgcatgcg tcaattttac gcagactatc	300
[1467]	tttctagggt taagacggat cgggagatct cccgatcccc tatggtgcac tctcagtaca	360
[1468]	atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatctgctcc ctgcttgtgt gttggaggtc	420
[1469]	gctgagtagt gcgcgagcaa aatttaagct acaacaaggc aaggcttgac cgacaattgc	480

[1470]	atgaagaatc tgcttagggg taggcgtttt gaagttccta tactttctag agaataggaa	540
[1471]	cttcggaata ggaacttcgg atgcaatttc ctcattttat taggaaagga cagtgggagt	600
[1472]	ggcaccttcc aggggtcaagg aaggcacggg ggaggggcaa acaacagatg gctggcaact	660
[1473]	agaaggcaca gcgttagtga tacttgtggg ccagggcatt agccacacca gccaccactt	720
[1474]	tctgataggc agcctgcact ggtgggggtga attccgcgga agcttgtgta attgttaatt	780
[1475]	tctctgtccc actccatcca ggtcgtgtga ttccaaatct gttccagaga tttattactc	840
[1476]	caactagcat tccaaggcac agcagtgggtg caaatgagtt ttccagagca accccaaatc	900
[1477]	cccaggagct gttgatcctt taggtatcct tccacagcca ggattcctgc ctggagctgc	960
[1478]	ttgatgcccc agactgtgag ttgcaacaga tgctgttgcg cctcaatagc cctcagcaaa	1020
[1479]	ttgttctgct gctgcactat accagacaat aattgtctgg cctgtaccgt cagcgtcatt	1080
[1480]	gacgtctgcg ccatagtgt tctgtctgt cccaagaacc caaggaacaa agctcctgcg	1140
[1481]	gccgtccgg aattccatgt gttaatcctc atcctgtcta cttgccacac aatcatcacc	1200
[1482]	tgccatctgt tttccataat ccctgatgat ctttgccttt cttcttggca ctacttttat	1260
[1483]	gtcactatta tcttgtatta ctactgcccc ttcaccttc cagaggagct ttgctggtcc	1320
[1484]	tttccaaact ggatctctgc tgtccctgta ataaaccga aaattttgaa tttttgtaat	1380
[1485]	ttgttttgt aattcttttag ttgtatgtc tgttgcatt atgtctacta ttctttcccc	1440
[1486]	tgactgtac ccccaatcc cccctttct tttaaaattg tggatgaata ctgccatttg	1500
[1487]	tactgtctgc ttaagatgt cagcctgatc tcttacctgt cctataattt tctttaattc	1560
[1488]	tttattcata gattctatta ctcttgact ttggggattg tagggaatgc caaattcctg	1620
[1489]	cttgatcccc gccaccaac aggcggcctt aactgtagta ctggtgaaat tgctgccatt	1680
[1490]	gtctgtatgt actgttttta ctggccatct tctgtcta ttttaagagga agtatgtgt	1740
[1491]	ttcttgccct gtctctgtg gaattacttc tgcttctata tatccactgg ctacatgaac	1800
[1492]	tgctaccaag ataacttttc cttctaaatg tgtacaatct agctgccata ttcttgggt	1860
[1493]	acagtctact tgtccatgca tggttcccc ttttagctga catttatcac agctggctac	1920
[1494]	tatttctttt gctactacag gtggtaggtt aaaatcacta gccattgctc tccaattact	1980
[1495]	gtgatatttc tcatgttctt cttgggcctt atctattcca tctaaaaata gtactttcct	2040
[1496]	gattccagca ctgaccaatt tatctacttg ttcatttcct ccaattcctt tgtgtgtggtg	2100
[1497]	taccatgcc aggtagactt tttccttttt tattaactgc tctattattt gactgactaa	2160
[1498]	ctctgattca ctcttatctg gttgtgcttg aatgattccc aatgcataatt gtgagtctgt	2220
[1499]	cactatgttt acttctaate ccgaatcctg caaagctaga tgaattgctt gtaactcagt	2280
[1500]	cttctgattt gttgtgtccg ttagggggac aactttttgt cttcctctgt cagttacata	2340
[1501]	tctgtctttt cctaatttag tttccctatt ggctgcccc tctacataga aagtttctgc	2400
[1502]	tctattatg ggttctttct ctaactggta ccataacttc actaaggag gggatttgac	2460
[1503]	aaactccac tcaggaatcc aggtggcttg ccaatactct gtccaccatg cttcccatgt	2520
[1504]	ttccttttgt atgggtaatt taaatttagg agtctttccc catattacta tgctttctgt	2580
[1505]	ggctattttt tgtactgcct ctgttaattg tttcacatca ttagtgtggg cacccttcat	2640
[1506]	tcttgcatatc tttcctgttt tcagattttt aaatggctct tgataaattt gatatgtcca	2700
[1507]	ttggccttgc cctgtctct gtatttctgc tattaagtct tttgatgggt cataatacac	2760
[1508]	tccatgtacc ggttctttta gaatctccct gttttctgce agttctagct ctgcttcttc	2820
[1509]	tgtagtggt actacttctg ttagtgcttt ggttccccta agaagtttac ataattgcct	2880
[1510]	tactttaatc cctgcataaa tctgacttgc ccaattcaat tttcccata atttctgtat	2940
[1511]	gtcattgaca gtccagctgt cttttcttgg cagcactata ggctgtactg tccatttata	3000

[1512]	aggatggagt tcataaccca tccaaaggaa tggaggttct ttctgatgtt ttttgtctgg	3060
[1513]	tgtggtaaat cccacacctca acagatgttg tctcagttcc tctatTTTTg ttctatgctg	3120
[1514]	ccctatttct aagtcagatc ctacatacaa atcatccatg tattgataga tgactatgtc	3180
[1515]	tggattttgt tttctaaaag gctctaagat ttttgtcatg ctacactgga atattgctgg	3240
[1516]	tgatcccttc catccctgtg gaagcacatt gtactgatat ctaatccctg gtgtctcatt	3300
[1517]	gtttatacta ggtatggtaa atgcagtata ctccctgaag tctttatcta agggaaactga	3360
[1518]	aaaatatgca tcgccacat ccagtaactgt tactgatTTTt ttctgtTTTa accctgcagg	3420
[1519]	atgtggattt cctaattgaa ctccccagaa atcttgagtt ctcttattaa gttctctgaa	3480
[1520]	atctactaat tttctccatt tagtactgtc ttttttcttt atggcaaata ctggagtatt	3540
[1521]	gtatggattt tcaggcccaa tttttgaaat ttttccttcc ttttccattt ctgtacaaat	3600
[1522]	ttctactaat gcttttattt tttcttctgt caatggccat tgTTTaaact ttggggccatc	3660
[1523]	cattccctggc tTTaattTTa ctggtacagt ctcaatagga ctaatgggaa aattTaaagt	3720
[1524]	gcagccaatc tgagtcaaca gatttcttcc aattatgttg acaggtgtag gtcctactaa	3780
[1525]	tactgtacct atagctttat gtccgcagat ttctatgagt atctgatcat actgtcttac	3840
[1526]	tttgataaaa cctccaattc cccctatcat ttttggttcc catcttccctg gcaaattcat	3900
[1527]	ttcttctaact actgtatcat ctgctcctgt atctaataga gcttccTTTa attgcccccc	3960
[1528]	tatctttatt gtgacgaggg gtcgctgcca aagagtgatc tgagggaagc taaaggatac	4020
[1529]	agttccttgt ctatcgctc ctgcttctga gagggagttg ttgtctcttc cccaaacctg	4080
[1530]	aagctctctt ctggtggggc tgttggtctt ggtctgctct gaagaaaatt ccctggcctt	4140
[1531]	cccttgTggg aaggccagat ctccctaaa aaattagcct gtctctcagt acaatcttTc	4200
[1532]	atttggtgtc ctcccttTcc acatttccaa cagccctttt tcttaggggc cctgcaattt	4260
[1533]	ttggctatgt gcccttcttt gccacaattg aaacactTaa cagtctttct ttggttccTa	4320
[1534]	aaattgcctt tctgtatcat tatggtagct ggatttgTTa ctTggctcat tgcttcagcc	4380
[1535]	aaaactcttg ctttatggcc gggTcccccc actccctgac atgctgtcat catttcttct	4440
[1536]	agtgtcgtc ctggtcccaa TgctttTaaa atagtcttac aatctgggtt cgcattttTg	4500
[1537]	accaacaagg tttctgtcat ccaattttt acctctTgtg aagcttgctc ggctcttaga	4560
[1538]	gttttataga atcggtctac atagtctcta aagggtTcct ttggTccttg tcttatgtcc	4620
[1539]	agaatgctgg tagggctata cattcttact attttattTa atcccaggat tatccatctt	4680
[1540]	ttatagattt ctctactgg gataggtTga ttatgtgtca tccatcctat ttgttctTga	4740
[1541]	agggtactag tagttcctgc tatgtcactt cccctTggtt ctctcatctg gcctggTgca	4800
[1542]	ataggccctg catgcactgg atgcactcta tccattctg cagcttccTc attgatggTc	4860
[1543]	tctTTTaaaca tttgcatggc Tgcttgatgt cccccactg Tgttttagcat ggtgtTTTaaa	4920
[1544]	tcttgTgggg Tggtcccttc Tgataatgct gaaaacatgg gtatcactTc Tgggctgaaa	4980
[1545]	gccttctctt ctactacttt Taccatgca tTTaaagtTc taggtgatat ggctgatgt	5040
[1546]	accattTgcc cctggatgtt ctgcactata gggTaatTTt ggctgacctg attgctgtgt	5100
[1547]	cctgtgtcag ctgctgcttg ctgtgctttt ttcttacttt Tgttttgctc ttctctatc	5160
[1548]	ttgtctaaag ctccctTggt gtcttttatc tctatccttt gatgcacaca atagagggtt	5220
[1549]	gctactgtat tatataatga tctaagttct tctgatcctg tctgaaggga TggtTgtagc	5280
[1550]	TgtcccagTa tttgtctaca gccttctgat gtttctaaca ggccaggatt aactgcgaat	5340
[1551]	cgttctagct ccctgctTgc ccatactata TgtttTaat tatattttt ctttccccct	5400
[1552]	ggcctTaaac gaattttTtc ccatcgatct aattctcccc cgctTaatac Tgacgctctc	5460
[1553]	gcacccatgg cggcggcaga tctcgaattc agatctcacg TgctttTcca aagtgatggg	5520

[1554]	ccagcacaca gaccagcacg ttgccagga gctgtgggag gaagataaga ggtatgaaca	5580
[1555]	tgattagcaa aagggcctag cttggactca gaataatcca gccttatccc aaccataaaa	5640
[1556]	taaaagcaga atggtagctg gattgtagct gctattagca atatgaaacc tcttacatca	5700
[1557]	gttacaattt atatgcagaa atatttatat gcagaaatat tgctattgcc ttaaccaga	5760
[1558]	aattatcact gttattcttt agaattgtgc aaagaggcat gatacattgt atcattattg	5820
[1559]	ccctgaaaga aagagattag ggaaagtatt agaaataaga taaacaaaaa agtatattaa	5880
[1560]	aagaagaaag cattttttta aattacaaat gcaaaattac cctgatttgg tcaatatgtg	5940
[1561]	taccctgtta cttctccctt tcctatgaca tgaacttaac catagaaaag aaggggaaag	6000
[1562]	aaaacatcaa ggggtccata gactcacctt gaagttctca ggatccgagc tcggtaccac	6060
[1563]	atgtaagctt cgaggggagg ctggatcggt cccggtgtct tctatggagg tcaaaacagc	6120
[1564]	gtggatggcg tctccaggcg atctgacggt tactaaacg ctgcttcgag atgtacgggc	6180
[1565]	cagatatacg cgttgcgac tgacgggtca ctaaagcagc tctgcttata taggcctccc	6240
[1566]	accgtacacg ccacctgac atactcgagt ttactcccta tcagtgatag agaacgtatg	6300
[1567]	aagagtttac tccctatcag tgatagagaa cgtatgcaga ctttactccc tatcagtgat	6360
[1568]	agagaacgta taaggagttt actccctatc agtgatagag aacgtatgac cagtttactc	6420
[1569]	cctatcagtg atagagaacg tatctacagt ttactcccta tcagtgatag agaacgtata	6480
[1570]	tccagtttac tccctatcag tgatagagaa cgtataagct ttaggcgtgt acgggtggcg	6540
[1571]	cctataaaaag cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagcaat tccacaacac	6600
[1572]	ttttgtctta taccaacttt ccgtaccact tcctaccctc gtaaatacgtc gacgagctcg	6660
[1573]	tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg cctcgaagc cgcggtgcgg gtgccagggc	6720
[1574]	gtgcccttgg gtcctatgct catcatgggt ctcaaggtga acgtctctgc catattcatg	6780
[1575]	gcagtactgt taactctcca aacaccacc ggtcaaatcc attggggcaa tctctctaag	6840
[1576]	ataggggtgg taggaatagg aagtgaagc tacaagttta tgactcgtc cagccatcaa	6900
[1577]	tcattagtca taaaattaat gcccaatata actctctca ataactgcac gagggtagag	6960
[1578]	attgcagaat acaggagact actgagaaca gttttggaac caattagaga tgcacttaat	7020
[1579]	gcaatgaccc agaataaag accggttcag agtgtagctt caagtaggag acacaagaga	7080
[1580]	tttgcgagg tagtcctggc aggtgcggcc ctaggcgttg ccacagctgc tcagataaca	7140
[1581]	gccggcattg cacttcacca gtccatgctg aactctcaag ccatcgacaa tctgagagcg	7200
[1582]	agcctggaaa ctactaatca ggcaattgag gcaatcagac aagcagggca ggagatgata	7260
[1583]	ttggctgttc aggggtgtcca agactacatc aataatgagc tgataccgtc tatgaaccaa	7320
[1584]	ctatctgtg atttaatcgg ccagaagctc gggctcaaat tgctcagata ctatacagaa	7380
[1585]	atcctgtcat tatttgccc cagcttacgg gaccccatat ctgcggagat atctatccag	7440
[1586]	gctttgagct atgcgcttgg aggagacatc aataaggtgt tagaaaagct cggatacagt	7500
[1587]	ggaggtgatt tactgggcat cttagagagc agaggaataa agggccggat aactcacgtc	7560
[1588]	gacacagagt cctacttcat tgtctcagt atagcctatc cgacgtgtc cgagattaag	7620
[1589]	ggggtgattg tccaccggct agagggggc tcgtacaaca taggctctca agagtgtat	7680
[1590]	accactgtgc ccaagtatgt tgcaacccaa gggtagctta tctcgaattt tgatgagtca	7740
[1591]	tcgtgtactt tcatgccaga ggggactgtg tgcagccaaa atgccttcta cccgatgagt	7800
[1592]	cctctgctcc aagaatgcct ccgggggtcc accaagtcct gtgctcgtac actcgtatcc	7860
[1593]	gggtcttttg ggaaccggtt cattttatca caagggaacc taatagccaa ttgtgcatca	7920
[1594]	atcctttgca agtgttacac aacaggaacg atcattaatc aagaccctga caagatccta	7980
[1595]	acatacattg ctgccgatca ctgcccggta gtcagagtga acggcgtgac catccaagtc	8040

[1596]	gggagcagga ggtatccaga cgctgtgtac ttgcacagaa ttgacctcgg tcctcccata	8100
[1597]	tcattggaga ggttggacgt agggacaaat ctgggggaatg caattgctaa gttggaggat	8160
[1598]	gccaaaggaat tgttggagtc atcggaccag atattgagga gtatgaaagg tttatcgagc	8220
[1599]	actagcatag tctacatcct gattgcagtg tgtcttggag ggttgatagg gatccccgct	8280
[1600]	ttaatatgtt gctgcagggg gcgttgaccc ctctccctcc ccccccccta acgttactgg	8340
[1601]	ccgaagccgc ttggaataag gccggtgtgc gtttgtctat atgttatttt ccacatatatt	8400
[1602]	gccgtctttt ggcaatgtga gggcccgga acctggccct gtcttcttga cgagcattcc	8460
[1603]	taggggtctt tcccctctcg ccaaaggaat gcaaggtctg ttgaatgtcg tgaaggaagc	8520
[1604]	agttcctctg gaagcttctt gaagacaaac aacgtctgta gcgaccttt gcaggcagcg	8580
[1605]	gaacccccca cctggcgaca ggtgcctctg cggccaaaag ccacgtgtat aagatacacc	8640
[1606]	tgcaaaggcg gcacaacccc agtgccacgt tgtgagttgg atagttgtgg aaagagtcaa	8700
[1607]	atggctctcc tcaagcgtat tcaacaagg gctgaaggat gccagaagg taccctattg	8760
[1608]	tatgggatct gatctggggc ctcggtacac atgctttaca tgtgtttagt cgaggttaaa	8820
[1609]	aaaacgtcta ggcccccg accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa cacgatgata	8880
[1610]	atatggccac aacctggga agtaggatag tattaacag agaacatctt atgattgata	8940
[1611]	gaccttatgt tttgctggtt gttctgtttg tcatgtttct gagcttgatc gggttgctag	9000
[1612]	ccattgcagg cattagactt catcgggcag ccatctacac cgcagagatc cataaaagcc	9060
[1613]	tcagcaccaa tctagatgta actaactcaa tcgagcatca ggtcaaggac gtgctgacac	9120
[1614]	cactcttcaa aatcatcggg gatgaagtgg gcctgaggac acctcagaga ttactgacc	9180
[1615]	tagtgaaatt catctctgac aagattaaat tccttaatcc ggataggagac tacgacttca	9240
[1616]	gagatctcac ttggtgtatc aaccgccag agagaatcaa attggattat gatcaatact	9300
[1617]	gtgcagatgt ggctgctgaa gagctcatga atgcattggt gaactcaact ctactggaga	9360
[1618]	ccagaacaac caatcagttc ctagctgtct caaagggaaa ctgctcaggg cccactacaa	9420
[1619]	tcagaggtca attctcaaac atgtcgtgtt ccctgttaga cttgtattta ggtcgaggtt	9480
[1620]	acaatgtgtc atctatagtc actatgacat cccagggaat gtatggggga acttacctag	9540
[1621]	tggaaaagcc taatctgagc agcaaaaggt cagagttgtc acaactgagc atgtaccgag	9600
[1622]	tgtttgaagt aggtgttatc agaaatccgg gtttgggggc tccggtgttc catatgacaa	9660
[1623]	actatcttga gcaaccagtc agtaatgac tcagcaactg tatggtggct ttgggggagc	9720
[1624]	tcaaacctgc agccctttgt cacggggaag attctatcac aattccctat cagggatcag	9780
[1625]	ggaaagggtg cagcttccag ctctgcaagc taggtgtctg gaaatcccca accgacatgc	9840
[1626]	aatcctgggt ccccttatca acggatgac cagtgataga caggctttac ctctcatctc	9900
[1627]	acagaggtgt tatcgtgac aaycaagcaa aatgggctgt cccgacaaca cgaacagatg	9960
[1628]	acaagttgag aatggagaca tgcttccaac aggcgtgtaa gggtaaaatc caagcactct	10020
[1629]	gcgagaatcc cgagtgggca ccattgaagg ataacaggat tccttcatac ggggtcttgt	10080
[1630]	ctgttgatct gagtctgaca gttgagctta aaatcaaaat tgcttcggga ttcgggcat	10140
[1631]	tgatcacaca cggttcaggg atggacctat acaaatccaa ccacaacaat gtgtattggc	10200
[1632]	tgactatccc rccaatgaag aacctagcct taggtgtaat caacacattg gagtgatgac	10260
[1633]	cgagattcaa ggttagtccc tacctcttca mtgtcccaat taaggaagca gggaagact	10320
[1634]	gccatgcccc aacataccta cctgcggagg tggatggtga tgtcaaactc agttccaatc	10380
[1635]	tggtgattct acctggtcaa gatctccaat atgttttggc aacctacgat acttccaggg	10440
[1636]	ttgaacatgc tgtggtttat tacgtttaca gcccaagccg ctcatcttct tacttttatc	10500
[1637]	cttttaggtt gcctataaag ggggtcccca tcgaattaca agtggaatgc ttcacatggg	10560

[1638]	accaaaaact ctggtgccgt cacttctgtg tgcttgcgga ctcagaatct ggtggacata	10620
[1639]	tcactcactc tgggatgggt ggcatgggag tcagctgcac agtcaccccg gaagatggaa	10680
[1640]	ccaatcgcag atagggtgc tagtgaacya atcwcagtat gtcaccaga catcaggcat	10740
[1641]	accactagt gtgaaataga catcagaatt aagaaaaatg ggctcccccg gcgcgtactc	10800
[1642]	cacctacccc atcatccacg ctccggcaata aaaagacaga ataaaacgca cgggtgttgg	10860
[1643]	gtcgtttgtt cgccgggcgc gtactccacc tcacccatca tccacgtgt tttatggata	10920
[1644]	gcactgagaa cgtcatcaag ccttcatgc gcttcaaggt gcacatggag ggctccgtga	10980
[1645]	acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggcaa gccctacgag ggcaccaga	11040
[1646]	ccgccaagct gcaggtgacc aaggcgggcc cctgccctt cgctgggac atcctgtccc	11100
[1647]	cccagtcca gtacggctcc aagggtgacg tgaagcacc cgccgacatc ccgactaca	11160
[1648]	agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgt gatgaacttc gaggacggcg	11220
[1649]	gcgtgggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg caccttcac taccacgtga	11280
[1650]	agttcatcgg cgtgaacttc cctccgacg gccccgaat gcagaagaag actctgggct	11340
[1651]	gggagccctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc gagatccaca	11400
[1652]	aggcgtgaa gctgaagggc ggccggccact acctggtgga gttcaagtca atctacatgg	11460
[1653]	ccaagaagcc cgtgaagctg cccggctact actacgtgga ctccaagctg gacatcacct	11520
[1654]	cccacaacga ggactacacc gtggtggagc agtacgagcg cgccgaggcc cgccaccacc	11580
[1655]	tgttccagta ggacctccat agaagacacc gggaccgatc caataacttc gtatagcata	11640
[1656]	cattatacga agttatgcct ccggactcta gcgtttaaac ttaagcttgg taccgagctc	11700
[1657]	ggatccacta gtccagtgtg gtggaattct gcagatatcc agcacagtgg cggccgctcg	11760
[1658]	agtctagagg gcccgtttaa acccgctgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc	11820
[1659]	catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg	11880
[1660]	tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc	11940
[1661]	tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg	12000
[1662]	ctggggatgc ggtgggctct atggcttctg aggcggaaag ttaaccctag aaagataatc	12060
[1663]	atattgtgac gtacgtttaa gataatcatg cgtaaaattg acgcatgtgt tttatcggtc	12120
[1664]	tgtatatcga ggtttattta ttaattgaa tagatatata gttttattat atttacactt	12180
[1665]	acatactaata aataaattca acaacaatt tatttatgtt tattttattta ttaaaaaaaa	12240
[1666]	acaaaaactc aaaatttctt ctataaagta acaaaaacca gctggggctc gaagttccta	12300
[1667]	tactttctag agaataggaa cttctatagt gagtcgaata agggcgacac aaaatttatt	12360
[1668]	ctaaatgcat aataaatact gataacatct tatagtttgt attatatatt gtattatcgt	12420
[1669]	tgacatgtat aattttgata tcaaaaactg attttccctt tattattttc gagattttatt	12480
[1670]	ttcttaattc tctttaacaa actagaaata ttgtatatac aaaaaatcat aaataataga	12540
[1671]	tgaatagttt aattataggt gttcatcaat cgaaaaagca acgtatctta tttaaagtgc	12600
[1672]	gttgcttttt tctcatttat aaggttaaat aattctcata tatcaagcaa agtgacaggc	12660
[1673]	gcccttaaat attctgacaa atgctctttc cctaaactcc ccccataaaa aaacccgccg	12720
[1674]	aagcgggttt ttacgttatt tgcggattaa cgattactcg ttatcagaac cgcccagggg	12780
[1675]	gcccagctt aagactggcc gtctgtttac aacacagaaa gagttttag aaacgcaaaa	12840
[1676]	aggccatccg tcaggggcct tctgcttagt ttgatgcctg gcagttccct actctgcct	12900
[1677]	tccgcttcct cgctcactga ctgcgtgcgc tcggctgttc ggctgcggcg agcggtatca	12960
[1678]	gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac	13020
[1679]	atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgtt gctggcgttt	13080

[1680]	ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg	13140
[1681]	cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc	13200
[1682]	tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc	13260
[1683]	gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg cgttcgctcc	13320
[1684]	aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac	13380
[1685]	tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt	13440
[1686]	aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtgggt	13500
[1687]	aactacggct acactagaag aacagtatit ggtatctgct ctctgctgaa gccagttacc	13560
[1688]	ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt	13620
[1689]	ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg	13680
[1690]	atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgacgcgc gcgtaactca cgtaaggga	13740
[1691]	tttttgatcat gagcttgccg cgtcccgta agtcagcgta atgctctgct tttagaaaaa	13800
[1692]	ctcatcgagc atcaaatgaa actgcaatit attcatatca ggattatcaa taccatattt	13860
[1693]	ttgaaaaagc cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc	13920
[1694]	aagatcctgg tatcggctcg cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt	13980
[1695]	ccctcgtca aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtacga ctgaatccgg	14040
[1696]	tgagaatggc aaaagtittat gcatttcttt ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg	14100
[1697]	ctcgtcatca aaatcactcg catcaaccaa accgttatit attcgtgatt gcgcctgagc	14160
[1698]	gaggcgaaat acgcgatcgc tgtaaaaagg acaattacaa acaggaatcg agtgaaccg	14220
[1699]	gcgcaggaa actgccagcg catcaacaat attttcacct gaatcaggat attcttctaa	14280
[1700]	tacctggaac gctgtttttc cggggatcgc agtggtgagt aaccatgcat catcaggagt	14340
[1701]	acggataaaa tgcttgatgg tcggaagtgg cataaatcc gtcagccagt ttagtctgac	14400
[1702]	catctcatct gtaacatcat tggcaacgct acctttgcca tgtttcagaa acaactctgg	14460
[1703]	cgcacgggct ttccataca agcgatagat tgctgcacct gattgcccga cattatcgcg	14520
[1704]	agcccatit taccatata aatcagcatc catgttgtaa tttaatcgcg gcctcgacgt	14580
[1705]	ttccggttga atatggctca tattcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg	14640
[1706]	ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt	14700
[1707]	cagtgttaca accaattaac caattctgaa cattatcgcg agcccatit tacctgaata	14760
[1708]	tggtcataa cacccttgt ttgcctggcg gcagtagcgc ggtggtccca cctgacccca	14820
[1709]	tgccgaactc agaagtgaaa cgccgtagcg ccgatgtag tgtggggact ccccatgcga	14880
[1710]	gagtagggaa ctgccaggca tcaataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt	14940
[1711]	cgcccgggct aattaggggg tgctgcctt attcgactct atagtgaagt tcctattctc	15000
[1712]	tagaaagtat aggaacttct gaagt	15025
[1713]	<210> 85	
[1714]	<211> 6584	
[1715]	<212> DNA	
[1716]	<213> Artificial sequence	
[1717]	<220>	
[1718]	<223> synthetic Rapamycin-inducible TET activator	
[1719]	<400> 85	
[1720]	gatatctata acaagaaaat atatatataa taagttatca cgtaagtaga acatgaaata	60
[1721]	acaatataat tatcgtatga gttaaactct aaaagtcacg taaaagataa tcatgcgtca	120

[1722]	ttttgactca cgcggtcgtt atagttcaaa atcagtgaca cttaccgcat tgacaagcac	180
[1723]	gcctcacggg agctccaagc ggcgactgag atgtcctaaa tgcacagcga cggattcgcg	240
[1724]	ctatttagaa agagagagca atatttcaag aatgcatgcg tcaattttac gcagactatc	300
[1725]	tttctagggt taagacggat cgggagatct cccgatcccc tatggtgcac tctcagtaca	360
[1726]	atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatctgctcc ctgcttgtgt gttggaggtc	420
[1727]	gctgagtagt gcgcgagcaa aatttaagct acaacaaggc aaggcttgac cgacaattgc	480
[1728]	atgaagaatc tgcttagggt taggcgtttt gcgctgcttc gcgatgtacg ggccagatat	540
[1729]	acgcgttctc catagaagac accgaataaa atatctttat ttccattaca tctgtgtgtt	600
[1730]	ggttttttgt gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc atcaaaacaa aacgaaacaa	660
[1731]	aacaaactag caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag gtgccagaac atttctctgg	720
[1732]	accgatccaa taacttcgta tagcatacat tatacgaagt tatgcctccg gactctagcg	780
[1733]	ttttagttat tactagcgt accggactca gatctcgagc tcaagcttcg aattctgcag	840
[1734]	tcgacggtac cgcggttac gcgtgctagc taatgatggg cgctcgagta atgatggcg	900
[1735]	gtcgactaat gatgggcgct cgagtaatga tgggcgtcta gctaataatg ggcgctcgag	960
[1736]	taatgatggg cggctgacta atgatggcg ctcgagtaat gatgggcgtc tagctaata	1020
[1737]	tgggcgctcg agtaatgatg ggcggtcgac taatgatggg cgctcgagta atgatggcg	1080
[1738]	tctagaacgc gaattaattc aacattttga ccccccata atatttttcc agaattaaca	1140
[1739]	gtataaattg catctcttgt tcaagagttc cctatcactc tctttaatca ctactcacag	1200
[1740]	taacctcaac tctgccaca agcttgccct gcagcgggaa ttccaaactt aagcttggt	1260
[1741]	ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc agatatccag cacagtggcg	1320
[1742]	gccgctcgag tctagaggc ccgtttaaac ccgctgatca atgtctagac tggacaagag	1380
[1743]	caaagtcata aactctgctc tggaattact caatggagtc ggtatcgaag gcctgacgac	1440
[1744]	aaggaaactc gctcaaaagc tgggagtga gcagcctacc ctgtactggc acgtgaagaa	1500
[1745]	caagcgggcc ctgctcgatg ccctgccaat cgagatgctg gacaggcatc atacccactc	1560
[1746]	ctgccccctg gaaggcgagt catggcaaga ctttctgcgg aacaacgcca agtcataccg	1620
[1747]	ctgtgctctc ctctcacatc gcgacggggc taaagtgcac ctcggcaccc gcccaacaga	1680
[1748]	gaaacagtac gaaaccctgg aaaatcagct cgcgttctg tgtcagcaag gcttctcct	1740
[1749]	ggagaacgca ctgtacgctc tgtccgccgt gggccacttt acactgggct gcgtattgga	1800
[1750]	ggaacaggag catcaagtag caaaagagga aagagagaca cctaccaccg attctatgcc	1860
[1751]	cccacttctg aaacaagcaa ttgagctgtt cgaccggcag ggagccgaac ctgccttct	1920
[1752]	tttcggcctg gaactaatca tatgtggcct ggagaaacag ctaaagtgcg aaagcggcgg	1980
[1753]	gccgaccgac gcccttgacg attttgactt agacatgctc ccagccgatg cccttgacga	2040
[1754]	ctttgacctt gatatgctgc ctgctgacgc tcttgacgat ttgaccttg acatgctccc	2100
[1755]	cgggtaagtc cctccccccc ccctaacgtt actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg	2160
[1756]	tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc	2220
[1757]	cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa	2280
[1758]	ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaa	2340
[1759]	caaacacgt ctgtagcgac cttttgcagg cagcggaaacc cccacctgg cgacaggtgc	2400
[1760]	ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc	2460
[1761]	cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac	2520
[1762]	aaggggctga aggatgccca gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg	2580
[1763]	tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg	2640

[1764]	gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataaatgga tagcactgag aacgtcatca	2700
[1765]	agcccttcat gcgcttcaag gtgcacatgg agggctccgt gaacggccac gagttcgaga	2760
[1766]	tcgagggega gggcgagggc aagccctacg agggcaccga gaccgccaag ctgcaggtga	2820
[1767]	ccaagggcgg cccctgccc ttgcctggg acatcctgtc ccccagttc cagtacggct	2880
[1768]	ccaaggtgta cgtgaagcac cccgccgaca tccccgacta caagaagctg tccttccccg	2940
[1769]	agggttcaa gtgggagcgc gtgatgaact tcgaggacgg cggcgtggtg accgtgaccc	3000
[1770]	aggactcctc cctgcaggac ggcaccttca tctaccacgt gaagttcatc ggctgaact	3060
[1771]	tcccctccga cggccccgta atgcagaaga agactctggg ctgggagccc tccaccgagc	3120
[1772]	gcctgtaccc ccgcgacggc gtgctgaagg gcgagatcca caaggcgtg aagctgaagg	3180
[1773]	gcgcgggcca ctacctggtg gagttcaagt caatctacat ggccaagaag cccgtgaagc	3240
[1774]	tgccccgcta ctactacgtg gactccaagc tggacatcac ctcccacaac gaggactaca	3300
[1775]	ccgtggtgga gcagtacgag cgcgccgagg cccgccacca cctgttccag tagctcgact	3360
[1776]	gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgccccctcc cctgccttc cttgacctg	3420
[1777]	gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg	3480
[1778]	agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg	3540
[1779]	gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctga ggcggaaggt	3600
[1780]	taaccctaga aagataatca tattgtgacg tacgttaaag ataatcatgc gtaaaattga	3660
[1781]	cgcatgtgtt ttatcggctc gtatatcgag gtttatttat taatttgaat agatattaag	3720
[1782]	ttttattata ttactactta catactaata ataaattcaa caaacaattt atttatgttt	3780
[1783]	atttatattat taaaaaaaa caaaaactca aaatttcttc tataaagtaa caaaaaccag	3840
[1784]	ctggggctcg aagttcctat actttctaga gaataggaac ttctatagtg agtcgaataa	3900
[1785]	gggcgacaca aaatttattc taaatgcata ataaatactg ataacatctt atagtttgta	3960
[1786]	ttatattttg tattatcggt gacatgtata attttgatat caaaaactga ttttcccttt	4020
[1787]	attattttcg agatttattt tcttaattct ctttaacaaa ctagaaatat tgtatataca	4080
[1788]	aaaaatcata aataatagat gaatagttaa attataggtg ttcatcaatc gaaaaagcaa	4140
[1789]	cgtatcttat ttaaagtgcg ttgctttttt ctcatctata aggttaaata attctcatat	4200
[1790]	atcaagcaaa gtgacaggcg cccttaaata ttctgacaaa tgctctttcc ctaaaactccc	4260
[1791]	cccataaaaa aaccgccgga agcgggtttt tacgttattt gcggattaac gattactcgt	4320
[1792]	tatcagaacc gccaggggg cccgagctta agactggccg tcgtttttaca acacagaaag	4380
[1793]	agtttgtaga aacgcaaaaa ggccatccgt caggggcctt ctgcttagtt tgatgcctgg	4440
[1794]	cagttcccta ctctcgctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgctcg	4500
[1795]	gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg	4560
[1796]	ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa	4620
[1797]	ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggtc ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg	4680
[1798]	acgtcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc	4740
[1799]	tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc	4800
[1800]	ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc	4860
[1801]	ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg	4920
[1802]	ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc	4980
[1803]	actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga	5040
[1804]	gttcttgaag tggtaggcta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc	5100
[1805]	tctgtgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac	5160

[1806]	caccgctggt agcgggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg	5220
[1807]	atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg acgacgcgcg	5280
[1808]	cgtaactcac gttaagggat tttggatcatg agcttgccgc gtcccgtaa gtcagcgtaa	5340
[1809]	tgctctgctt ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag	5400
[1810]	gattatcaat accatatattt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga	5460
[1811]	ggcagttcca taggatggca agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat	5520
[1812]	caatacaacc tattaatttc cctcgtcaa aaataagggt atcaagtggg aaatcaccat	5580
[1813]	gagtgcgcac tgaatccggt gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttggt	5640
[1814]	caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacaaa ccgttattca	5700
[1815]	ttcgtgattg cgcctgagcg aggcgaaata cgcgatcgtt gttaaaagga caattacaaa	5760
[1816]	caggaatcga gtgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg	5820
[1817]	aatcaggata ttcttctaata acctggaacg ctgtttttcc ggggatcgcg gtggtgagta	5880
[1818]	accatgcac atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagtggc ataaattccg	5940
[1819]	tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat	6000
[1820]	gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct tcccatataa gcgatagatt gtcgcacctg	6060
[1821]	attgcccgcac attatcgcga gccatttat accatataa atcagcatcc atgttggaat	6120
[1822]	ttaatcgcgg cctcgcggt tcccgttgaa tatggctcat attcttcctt tttcaatatt	6180
[1823]	attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga	6240
[1824]	aaaataaaca aataggggtc agtgttacaa ccaattaacc aattctgaac attatcgca	6300
[1825]	gccatttat acctgaatat ggctcataac accccttggt tgcctggcgg cagtagcgcg	6360
[1826]	gtggtccac ctgaccccat gccgaactca gaagtgaac gccgtagcgc cgatggtagt	6420
[1827]	gtggggactc cccatgcgag agtaggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca	6480
[1828]	gtcgaaagac tgggcctttc gcccggtcta attaggggtt gtcgcccta ttcgactcta	6540
[1829]	tagtgaagtt cctattctct agaaagtata ggaacttctg aagt	6584
[1830]	<210> 86	
[1831]	<211> 11528	
[1832]	<212> DNA	
[1833]	<213> Artificial sequence	
[1834]	<220>	
[1835]	<223> synthetic Rapamycin inducer inducible REV srcVpx	
[1836]	<400> 86	
[1837]	gatatctata acaagaaaat atatatataa taagtattca cgtaagtaga acatgaaata	60
[1838]	acaatataat tatcgtatga gttaaattctt aaaagtcacg taaaagataa tcatgcgtca	120
[1839]	ttttgactca cgcggtcggt atagttcaaa atcagtgaca cttaccgcat tgacaagcac	180
[1840]	gcctcacggg agctccaagc ggcgactgag atgtcctaaa tgcacagcga cggattcgcg	240
[1841]	ctatttagaa agagagagca atatttcaag aatgcatcgc tcaattttac gcgactatc	300
[1842]	tttctagggt taagacggat cgggagatct cccgatcccc tatggtgcac tctcagtaca	360
[1843]	atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatctgctcc ctgcttgtgt gttggaggtc	420
[1844]	gctgagtagt gcgcgagcaa aatttaagct acaacaaggc aaggcttgac cgacaattgc	480
[1845]	atgaagaatc tgcttagggt taggcgtttt gcgctgcttc gcgatgtacg ggccagatat	540
[1846]	acgcgttgac attgattatt gactagtatt taatagtaat caattacggg gtcattagtt	600
[1847]	catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga	660

[1848]	ccgcccacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcc	720
[1849]	atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttggca	780
[1850]	gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtac cccctattg acgtcaatga cggtaaattg	840
[1851]	cccgctggc attatgccc gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc	900
[1852]	tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt	960
[1853]	ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt	1020
[1854]	ttgttttga accaaaatca acgggacttt ccaaaatgta gtaacaactc cgccccattg	1080
[1855]	acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc tcggcattga	1140
[1856]	ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag cccatatatg	1200
[1857]	gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc	1260
[1858]	cgccccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat	1320
[1859]	tgacgtcaat gggtaggagta ttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat	1380
[1860]	catatgccaa gtccgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat	1440
[1861]	gcccagtaca tgacctacg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcac	1500
[1862]	gctattacca tggtagtcg gttttggcag tacaccaatg ggcgtggata gcggtttgac	1560
[1863]	tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa	1620
[1864]	aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactgcgac gcccgcccc ttgacgcaa	1680
[1865]	tggcggttag gcgtgtacg tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc	1740
[1866]	agatcactag aagctttatt gcggtagttt atcacagta aattgctaac gcagtcatg	1800
[1867]	cttctgacac aacagtctcg aacttaagct gcagtactc tcttaaggta gccttgcaga	1860
[1868]	agttggtcgt gaggcactgg gcaggttaagt atcaaggta caagacaggt ttaaggagac	1920
[1869]	caatagaaac tgggcttgc gagacagaga agactcttgc gtttctgata ggcacctatt	1980
[1870]	ggtcttactg acatccactt tgctttctc tccacagggt tccactccca gttcaattac	2040
[1871]	agctcttaag gctagagtac ttaatacgac tcaactatag ctagcctcga gaattcatgg	2100
[1872]	cttctagaat cctctggcat gagatgtggc atgaaggcct ggaagaggca tctcgtttgt	2160
[1873]	actttgggga aaggaacgtg aaaggcatgt ttgaggtgct ggagcccttg catgctatga	2220
[1874]	tggaaacggg ccccagact ctgaaggaaa catccttaa tcaggcctat ggtcgagatt	2280
[1875]	taatggaggc ccaagagtgg tgcaggaagt acatgaaatc agggaaatgc aaggacctc	2340
[1876]	tccaagcctg ggacctctat tatcatgtgt tccgacgaat ctcaaagact agagatgagt	2400
[1877]	ttcccaccat ggtgtttcct tctgggcaga tcagccaggc ctcggccttg gccccggccc	2460
[1878]	ctccccagt cctgccccag gctccagccc ctgcccctgc tccagccatg gtatcagctc	2520
[1879]	tggcccaggc ccagcccct gtcccagtc tagccccagg ccctcctcag gctgtggccc	2580
[1880]	cacctgcccc caagcccacc caggctgggg aaggaacgct gtcagaggcc ctgctgcagc	2640
[1881]	tgagtttga tgatgaagac ctgggggcct tgcttggcaa cagcacagac ccagctgtgt	2700
[1882]	tcacagacct ggcattccgtc gacaactccg agtttcagca gctgctgaac cagggcatac	2760
[1883]	ctgtggcccc ccacacaact gagcccatgc tgatggagta ccctgaggct ataactcgcc	2820
[1884]	tagtgacagg ggcccagagg cccccgacc cagctcctgc tccactgggg gccccggggc	2880
[1885]	tccccaatgg cctcctttca ggagatgaag acttctctc cattgcggac atggacttct	2940
[1886]	cagccctgct gagtcagatc agctccacta gttattaaga attcacgcgt cgagcatgca	3000
[1887]	tctagggcgg ccaattccgc ccctctcccc cccccctc tccctcccc cccctaacg	3060
[1888]	ttactggccg aagccgcttg gaataaggcc ggtgtgcgtt tgtctatatg ttattttcca	3120
[1889]	ccatattgcc gtcttttggc aatgtgaggg cccggaaacc tggccctgtc ttcttgacga	3180

[1890]	gcattcctag gggctctttcc cctctcgcca aaggaatgca aggtctgttg aatgtcgtga	3240
[1891]	aggaagcagt tcctctggaa gcttcttgaa gacaaacaac gtctgttagcg accctttgca	3300
[1892]	ggcagcggaa cccccacct ggcgacaggt gcctctgcgg ccaaaagcca cgtgtataag	3360
[1893]	atacacctgc aaaggcggca caacccagct gccacgttgt gagttggata gttgtggaaa	3420
[1894]	gagtcaaatg gctctcctca agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc cagaaggtac	3480
[1895]	cccattgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg ctttacatgt gtttagtcga	3540
[1896]	ggttaaaaaa acgtctagge cccccgaacc acggggacgt ggttttcctt tgaaaaacac	3600
[1897]	gatgataagc ttgccacaac ccgggatcct ctagagtcga catggactat cctgtcgcca	3660
[1898]	agagggtcaa gttggactct agagaacgcc catatgcttg ccctgtcgag tcctgcgatc	3720
[1899]	gccgcttttc tcgctcggat gagcttacct gccatatccg catccacaca ggccagaagc	3780
[1900]	ccttccagtg tcgaatctgc atgcgtaact tcagtcgtag tgaccacctt accaccacaca	3840
[1901]	tccgcaccca cacaggcggc ggccgcagga ggaagaaacg caccagcata gagaccaaca	3900
[1902]	tccgtgtggc cttagagaag agtttcttgg agaatacaaaa gcctacctcg gaagagatca	3960
[1903]	ctatgattgc tgatcagctc aatatggaaa aagaggatgat tcgtgtttgg ttctgtaacc	4020
[1904]	gccgccagaa agaaaaaga atcaacacta gaggagtgc ggtggaaacc atctccccgg	4080
[1905]	gagacgggag caccctcccc aagcgcggcc agacctgcgt ggtgcactac accgggatgc	4140
[1906]	ttgaagatgg aaagaaattt gattcctccc gggacagaaa caagcccttt aagtttatgc	4200
[1907]	taggcaagca ggaggatgat cgaggctggg aagaaggggt tgcccagatg agtgtgggtc	4260
[1908]	agagagccaa actgactata tctccagatt atgcctatgg tgccactggg caccaggga	4320
[1909]	tcacccacc acatgccact ctgctcttcg atgtggagct tctaaaactg gaagtcgagg	4380
[1910]	gcgtgcaggt ggaaccatc tccccaggag acgggcgcac cttccccaag cgcggccaga	4440
[1911]	cctgcgtggt gcactacacc gggatgcttg aagatggaaa gaaatttgat tcctcccggg	4500
[1912]	acagaaacaa gccctttaag tttatgctag gcaagcagga ggtgatccga ggctgggaag	4560
[1913]	aaggggttgc ccagatgagt gtgggtcaga gagccaaact gactatatct ccagattatg	4620
[1914]	cctatggtgc cactgggcac ccaggcatca tcccaccaca tgccactctc gtcttcgatg	4680
[1915]	tggagcttct aaaactggaa actagaggag tgcaggtgga aaccatctcc ccaggagacg	4740
[1916]	ggcgcacctt cccaagcgc ggccagacct gcgtggtgca ctacaccggg atgcttgaag	4800
[1917]	atggaaagaa atttgattcc tcccgggaca gaaacaagcc ctttaagttt atgctaggca	4860
[1918]	agcaggaggt gatccgagc tgggaagaag gggttgcccc gatgagtgtg ggtcagagag	4920
[1919]	ccaaactgac tatacttcca gattatgcct atggtgccac tgggcacca ggcacatcc	4980
[1920]	caccacatgc cactctcgtc ttcgatgtgg agcttctaaa actggaaact agttattaag	5040
[1921]	tcgaccggg cggccgttc ctttagtga gggttaatgc ttcgagcaga catgataaga	5100
[1922]	tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt	5160
[1923]	gaaatttgtg atgctattgc tttatttga accattataa gctgcaataa acaagttaac	5220
[1924]	ctccatagaa gacaccggga ccgatccaat aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt	5280
[1925]	atggctgcta gtgaacyaat cwcatgatgt caccagaca tcaggcatac ccactagtgt	5340
[1926]	gaaatagaca tcagaattaa gaaaaatggg ctccccgggc gcgtactcca cctcacccat	5400
[1927]	catccacgct cggcaataaa aagacagaat aaaacgcacg ggtgttgggt cgtttgttcg	5460
[1928]	ttttatggat agcactgaga acgtcatcaa gcccttcagt cgcttcaagg tgcacatgga	5520
[1929]	gggctccgtg aacggccacg agttcgagat cgaggcgag ggcgaggga agccctacga	5580
[1930]	gggcacccag accgccaagc tgcaggtgac caaggcggc cccctgccct tcgcctggga	5640
[1931]	catcctgtcc ccccagttcc agtacggctc caaggtgtac gtgaagcacc ccgccacat	5700

[1932]	ccccgactac aagaagctgt ccttccccga gggcttcaag tgggagcgcg tgatgaactt	5760
[1933]	cgaggacggc ggcgtggtga ccgtgaccca ggactcctcc ctgcaggacg gcaccttcat	5820
[1934]	ctaccacgtg aagttcatcg gcgtgaactt cccctccgac ggccccgtaa tgcagaagaa	5880
[1935]	gactctgggc tgggagccct ccaccgagcg cctgtacccc cgcgacggcg tgctgaaggg	5940
[1936]	cgagatccac aaggcgctga agctgaaggg cggcggccac tacctggtgg agttcaagtc	6000
[1937]	aatctacatg gccaaagaagc ccgtgaagct gcccggctac tactacgtgg actccaagct	6060
[1938]	ggacatcacc tcccacaacg aggactacac cgtggtggag cagtacgagc gcgccgaggc	6120
[1939]	ccgccaccac ctgttccagt aggacctcca tagaagacac cgaataaaat atctttatatt	6180
[1940]	tcattacatc tgtgtgttgg ttttttgtgt gaatcgatag tactaacata cgctctccat	6240
[1941]	caaaacaaaa cgaaacaaaa caaactagca aaataggctg tccccagtgc aagtgcaggt	6300
[1942]	gccagaacat ttctctggac cgatccaata acttcgtata gcatacata tacgaagtta	6360
[1943]	tgctccgga ctctagcgtt ttagttatta ctagecgtac cggactcaga tctcgagctc	6420
[1944]	aagcttcgaa ttctgcagtc gacggtaccg cggcttacgc gtgctagcta atgatgggcg	6480
[1945]	ctcgagtaat gatgggcggt cgactaatga tgggcgctcg agtaatgatg ggcgtctagc	6540
[1946]	taatgatggg cgctcgagta atgatgggcg gtcgactaat gatgggcgct cgagtaatga	6600
[1947]	tgggcgtcta gctaatgatg ggcgctcgag taatgatggg cggtcgacta atgatgggcg	6660
[1948]	ctcgagtaat gatgggcgct tagaacgca attaatcaa cattttgaca cccccataat	6720
[1949]	atttttccag aattaacagt ataaattgca tctcttgttc aagagttccc tatcactctc	6780
[1950]	tttaatcact actcacagta acctcaactc ctgccacaag cttgccctgc agcgggaatt	6840
[1951]	ccaaacttaa gcttggtagc gagctcggat ccactagtcc agtgtggtgg aattctgcag	6900
[1952]	atatccagca cagtggcggc cgctcgagtc tagagggccc gtttaaaccg gctgatcaga	6960
[1953]	tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag acctcctcaa ggcagtcaga ctcatcaagt	7020
[1954]	ttctctatca aagcaacca cctcccaacc ccgaggggac cgcacaggcc cgaaggaata	7080
[1955]	gaagaagaag gtggagagag agacagagac agatccattc gattagtga cggatcctta	7140
[1956]	gcacttattt gggacgatct gcggacgctg tgctcttcca gctaccaccg cttgagagac	7200
[1957]	ttactcttga ttgtgacgag gattgtggaa cttctgggac gcagggggtg ggaagccctc	7260
[1958]	aaatattggt ggaatctcct acaatattgg agtcaggagc taaagaatag tccctcccc	7320
[1959]	ccccctaacg ttactggccg aagccgcttg gaataaggcc ggtgtgcgtt tgtctatatg	7380
[1960]	ttatittcca ccatttgcc gtcttttggc aatgtgaggg cccggaaacc tggeccctgtc	7440
[1961]	ttcttgacga gcattcctag gggctcttcc cctctcgcca aaggaatgca aggtctgttg	7500
[1962]	aatgtcgtga aggaagcagt tcctctggaa gcttcttgaa gacaaacaac gtctgtagcg	7560
[1963]	accctttgca ggcagcggaa cccccacct ggcgacaggt gcctctgcgg ccaaaagcca	7620
[1964]	cgtgtataag atacacctgc aaaggcggca caacccagct gccacgttgt gagttggata	7680
[1965]	gttgtgaaa gagtcaaatg gctctcctca agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc	7740
[1966]	cagaaggtag ccattgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg ctttacatgt	7800
[1967]	gtttagtcca ggttaaaaaa cgtctaggcc ccccgaacca cggggacgtg gttttccttt	7860
[1968]	gaaaaacacg atgataatgg ggaggaggaa gaggaagccg aaggatccga aggcgagggt	7920
[1969]	gttggcggag gcggattaca aggacgacga tgacaagatg tcagatccca gggagagaat	7980
[1970]	cccacctgga aacagtggag aagagacaat aggagaggcc ttcgaatggc taaacagaac	8040
[1971]	agtagaggag ataaacagag aggcagtaaa ccacctacca agggagctga ttttccaggt	8100
[1972]	ttggcaaagg tcttggaat actggcatga tgaacaaggg atgtcacaaa gctatgtaaa	8160
[1973]	atacagatac ttgtgtttaa tgcaaaaggc tttatttatg cattgcaaga aaggctgtag	8220

[1974]	atgtctaggg gaaggacacg gggcaggagg atggagacca ggacctctc ctcctcccc	8280
[1975]	tccaggacta gcataacctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc	8340
[1976]	cccccggtgc cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat	8400
[1977]	gaggaaattg catcgcatg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg	8460
[1978]	caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc	8520
[1979]	tctatggcct ctgaggcgga aagttaaccc tagaaagata atcatattgt gacgtacgtt	8580
[1980]	aaagataatc atgcgtaaaa ttgacgcattg tgttttatcg gtctgtatat cgaggtttat	8640
[1981]	ttattaattt gaatagatat taagttttat tatatttaca cttacatact aataataaat	8700
[1982]	tcaacaaaca atttatttat gtttatttat ttattaaaaa aaaacaaaaa ctcaaaattt	8760
[1983]	cttctataaa gtaacaaaaa ccagctgggg ctggaagttc ctatactttc tagagaatag	8820
[1984]	gaacttctat agtgagtcga ataaggcgga cacaaaattt attctaaatg cataataaat	8880
[1985]	actgataaca tcttatagtt tgtattatat tttgtattat cgttgacatg tataattttg	8940
[1986]	atatcaaaaa ctgattttcc ctttattatt ttcgagattt attttcttaa ttctctttaa	9000
[1987]	caaactagaa atattgtata tacaacaaat cataaataat agatgaatag tttaattata	9060
[1988]	ggtgttcac aatcgaaaaa gcaacgtatc ttatttaaag tgcgttgctt ttttctcatt	9120
[1989]	tataaggtta aataattctc atatatcaag caaagtgaca ggcgccctta aatattctga	9180
[1990]	caaatgctct ttccctaaac tcccccata aaaaaacccg ccgaagcggg tttttacgtt	9240
[1991]	atttgcggat taacgattac tcgttatcag aaccgcccag ggggcccag cttagactg	9300
[1992]	gccgtcgttt tacaacacag aaagagtttg tagaaacgca aaaaggccat ccgtcagggg	9360
[1993]	ccttctgctt agtttgatgc ctggcagttc cctactctcg ctttccgctt cctcgctcac	9420
[1994]	tgactcgctg cgctcggtcg ttccgctcg gcgagcggtc tcagctcact caaaggcgtt	9480
[1995]	aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca	9540
[1996]	gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc	9600
[1997]	ccctgacgag catcacaaaa atcgacgtc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact	9660
[1998]	ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacct	9720
[1999]	gccgttacc ggatacctgt ccgcctttct ccttcggga agcgtggcg tttctcatag	9780
[2000]	ctcacgtgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca	9840
[2001]	cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa	9900
[2002]	cccgtaaga cagacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc	9960
[2003]	gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgttg gctaactacg gctacactag	10020
[2004]	aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg	10080
[2005]	tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca	10140
[2006]	gcagattacg cgcagaaaaa aggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc	10200
[2007]	tgacgtcag tggaacgacg cgcgcgtaac tcacgttaag ggatttttgg catgagcttg	10260
[2008]	cgccgtccc tcaagtcagc gtaatgctct gcttttagaa aaactcatcg agcatcaaat	10320
[2009]	gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa agccgtttct	10380
[2010]	gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc tggtatcggg	10440
[2011]	ctgcgattcc gactcgcca acatcaatac aacctattaa ttccccctcg tcaaaaataa	10500
[2012]	ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat ggcaaaagtt	10560
[2013]	tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca tcaaaatcac	10620
[2014]	tcgcatcaac caaacgtta ttattcgtg attgcgcctg agcgaggcga aatacgcgat	10680
[2015]	cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgagtgcaa ccggcgcagg aacactgcca	10740

[2016]	gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc taataacctg aacgctgttt	10800
[2017]	ttccggggat cgcagtgggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata aaatgcttga	10860
[2018]	tggtcggaag tggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca tctgtaacat	10920
[2019]	cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg ggcttcccat	10980
[2020]	acaagcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat ttatacccat	11040
[2021]	ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga cgtttcccg tgaatatggc	11100
[2022]	tcatattctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg	11160
[2023]	gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggtcagtgtt acaaccaatt	11220
[2024]	aaccaattct gaacattatc gcgagcccat ttatacctga atatggctca taacaccct	11280
[2025]	tgtttgccgt gcggcagtag cgcggtggtc ccacctgacc ccatgccgaa ctcagaagtg	11340
[2026]	aaacgccgta gcgccgatgg tagtgtgggg actccccatg cgagagtagg gaactgccag	11400
[2027]	gcatcaaata aaacgaaagg ctcatcgaa agactgggcc tttcgcccgg gctaattagg	11460
[2028]	gggtgtcgcc cttattcgac tctatagtga agttcctatt ctctagaaag tataggaact	11520
[2029]	tctgaagt	11528
[2030]	<210> 87	
[2031]	<211> 76	
[2032]	<212> RNA	
[2033]	<213> Artificial sequence	
[2034]	<220>	
[2035]	<223> synthetic Evolved aptamer	
[2036]	<400> 87	
[2037]	gggcggcacu uauacagcga agcauaaugg cuacugacgc ccucaaacc uauuugcaga	60
[2038]	cuauaagugu cgcgcg	76
[2039]	<210> 88	
[2040]	<211> 73	
[2041]	<212> RNA	
[2042]	<213> Artificial sequence	
[2043]	<220>	
[2044]	<223> synthetic Evolved aptamer	
[2045]	<400> 88	
[2046]	gggcggcacu uauacagggg agcauaaugg cuuaggacgc cuucaaaccu aucaagacua	60
[2047]	uaagugucgc gcg	73
[2048]	<210> 89	
[2049]	<211> 75	
[2050]	<212> RNA	
[2051]	<213> Artificial sequence	
[2052]	<220>	
[2053]	<223> synthetic Evolved aptamer	
[2054]	<400> 89	
[2055]	gggcggcacu uauacagggg agcauaaugg gcuacuugac gccuucaccu auuuguagac	60
[2056]	uauaaguguc gcg	75
[2057]	<210> 90	

[2058]	<211>	76	
[2059]	<212>	RNA	
[2060]	<213>	Artificial sequence	
[2061]	<220>		
[2062]	<223>	synthetic Evolved aptamer	
[2063]	<400>	90	
[2064]	gggcggcacu uauacagcgu agcauaaugg gcugcagacg ccgucaaacc uauuugcaga	60	
[2065]	cuauaagugu cgcgcg	76	
[2066]	<210>	91	
[2067]	<211>	74	
[2068]	<212>	RNA	
[2069]	<213>	Artificial sequence	
[2070]	<220>		
[2071]	<223>	synthetic Evolved aptamer	
[2072]	<400>	91	
[2073]	gggcggcacu uauacaccgu agcauaaugg gcuacugccg ccgucgaccu uuuggagacu	60	
[2074]	auaagugucg cgcg	74	
[2075]	<210>	92	
[2076]	<211>	75	
[2077]	<212>	RNA	
[2078]	<213>	Artificial sequence	
[2079]	<220>		
[2080]	<223>	synthetic Evolved aptamer	
[2081]	<400>	92	
[2082]	gggcggcacu uauacagguc agcauaaugu gcuagugcgc cuucaaaccu auuuagagac	60	
[2083]	uauaaguguc cgcgcg	75	
[2084]	<210>	93	
[2085]	<211>	76	
[2086]	<212>	RNA	
[2087]	<213>	Artificial sequence	
[2088]	<220>		
[2089]	<223>	synthetic Evolved aptamer	
[2090]	<400>	93	
[2091]	gggcggcacu uauacagcuu agcguaaugg cuacugacgc cguccaaacc uauuuacaga	60	
[2092]	cuauaagugu cgcgcg	76	
[2093]	<210>	94	
[2094]	<211>	76	
[2095]	<212>	RNA	
[2096]	<213>	Artificial sequence	
[2097]	<220>		
[2098]	<223>	synthetic Evolved aptamer	
[2099]	<400>	94	

[2100]	gggcggcacu uauacagggg agcauaaugg gcuacugacg ccuuuaaacc uauuugagga	60
[2101]	cuauaagugu cgcgcg	76
[2102]	<210> 95	
[2103]	<211> 74	
[2104]	<212> RNA	
[2105]	<213> Artificial sequence	
[2106]	<220>	
[2107]	<223> synthetic Evolved aptamer	
[2108]	<400> 95	
[2109]	gggcggcacu uauacaugga agcauaaugg gcugccgacg gcccuuaacc uuuggagacu	60
[2110]	auaagugucg cgcg	74
[2111]	<210> 96	
[2112]	<211> 79	
[2113]	<212> RNA	
[2114]	<213> Artificial sequence	
[2115]	<220>	
[2116]	<223> synthetic Evolved aptamer	
[2117]	<400> 96	
[2118]	gggcggcacu uauacagauu agcauaaugg gcuacugacc ccgccggcaa accuauuuga	60
[2119]	agacuauaag ugucgcgcg	79
[2120]	<210> 97	
[2121]	<211> 75	
[2122]	<212> RNA	
[2123]	<213> Artificial sequence	
[2124]	<220>	
[2125]	<223> synthetic Evolved aptamer	
[2126]	<400> 97	
[2127]	gggcggcacu uauacagugu agcauaaugg gcuacugucg caucuaaacc auuuggagac	60
[2128]	uauaaguguc cgcg	75
[2129]	<210> 98	
[2130]	<211> 76	
[2131]	<212> RNA	
[2132]	<213> Artificial sequence	
[2133]	<220>	
[2134]	<223> synthetic Evolved aptamer	
[2135]	<400> 98	
[2136]	gggcggcacu uauacaguga agcauaaugg gcuacugaca ccuuuaaacc uauuugcaga	60
[2137]	cuauaagugu cgcgcg	76
[2138]	<210> 99	
[2139]	<211> 76	
[2140]	<212> RNA	
[2141]	<213> Artificial sequence	

[2142]	<220>	
[2143]	<223>	synthetic Evolved aptamer
[2144]	<400>	99
[2145]	gggcggcacu uauacagagu agcauaaugg gcuacagacg ccgucaaacc uauuuaccga	60
[2146]	cuauaagugu cgcgcg	76
[2147]	<210>	100
[2148]	<211>	75
[2149]	<212>	RNA
[2150]	<213>	Artificial sequence
[2151]	<220>	
[2152]	<223>	synthetic Evolved aptamer
[2153]	<400>	100
[2154]	gggcggcacu uauacagggg gcauaauggg cuagugacgc cuucaaaccu auuuguagac	60
[2155]	uauaaguguc gcgcg	75
[2156]	<210>	101
[2157]	<211>	461
[2158]	<212>	PRT
[2159]	<213>	Homo sapiens
[2160]	<400>	101
[2161]	Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln	
[2162]	1 5 10 15	
[2163]	Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp	
[2164]	20 25 30	
[2165]	Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val	
[2166]	35 40 45	
[2167]	Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val	
[2168]	50 55 60	
[2169]	Asn Thr Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val	
[2170]	65 70 75 80	
[2171]	Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr	
[2172]	85 90 95	
[2173]	Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly	
[2174]	100 105 110	
[2175]	Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys	
[2176]	115 120 125	
[2177]	Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn	
[2178]	130 135 140	
[2179]	Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val	
[2180]	145 150 155 160	
[2181]	Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn	
[2182]	165 170 175	
[2183]	Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln	

[2184]	180	185	190
[2185]	Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile		
[2186]	195	200	205
[2187]	Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr		
[2188]	210	215	220
[2189]	Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro		
[2190]	225	230	235
[2191]	Ile Leu Leu Thr Ile Ser Lys Cys His Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala		
[2192]	245	250	255
[2193]	Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro		
[2194]	260	265	270
[2195]	Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu		
[2196]	275	280	285
[2197]	Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser		
[2198]	290	295	300
[2199]	Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp		
[2200]	305	310	315
[2201]	Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu		
[2202]	325	330	335
[2203]	Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro		
[2204]	340	345	350
[2205]	Ser Glu Asp Val Val Val Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser		
[2206]	355	360	365
[2207]	Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu		
[2208]	370	375	380
[2209]	Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro		
[2210]	385	390	395
[2211]	His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr		
[2212]	405	410	415
[2213]	Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro		
[2214]	420	425	430
[2215]	Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu		
[2216]	435	440	445
[2217]	Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln		
[2218]	450	455	460
[2219]	<210> 102		
[2220]	<211> 463		
[2221]	<212> PRT		
[2222]	<213> Homo sapiens		
[2223]	<400> 102		
[2224]	Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln		
[2225]	1	5	10
			15

[2226]	Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp
[2227]	20 25 30
[2228]	Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val
[2229]	35 40 45
[2230]	Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val
[2231]	50 55 60
[2232]	Asn Thr Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val
[2233]	65 70 75 80
[2234]	Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr
[2235]	85 90 95
[2236]	Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly
[2237]	100 105 110
[2238]	Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys
[2239]	115 120 125
[2240]	Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn
[2241]	130 135 140
[2242]	Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val
[2243]	145 150 155 160
[2244]	Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn
[2245]	165 170 175
[2246]	Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln
[2247]	180 185 190
[2248]	Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile
[2249]	195 200 205
[2250]	Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr
[2251]	210 215 220
[2252]	Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro
[2253]	225 230 235 240
[2254]	Ile Phe Ser Cys Gly Pro Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser
[2255]	245 250 255
[2256]	Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile
[2257]	260 265 270
[2258]	Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu
[2259]	275 280 285
[2260]	His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro
[2261]	290 295 300
[2262]	Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala
[2263]	305 310 315 320
[2264]	Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu
[2265]	325 330 335
[2266]	Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn
[2267]	340 345 350

[2268]	Cys	Pro	Ser	Glu	Asp	Val	Val	Val	Thr	Pro	Glu	Ser	Phe	Gly	Arg	Asp
[2269]				355					360					365		
[2270]	Ser	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Val	Ser	Ala	Cys	Asp	Ala	Pro
[2271]			370					375						380		
[2272]	Ile	Leu	Ser	Ser	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Cys	Arg	Glu	Ser	Gly	Lys	Asn
[2273]		385				390					395					400
[2274]	Gly	Pro	His	Val	Tyr	Gln	Asp	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Thr	Thr	Asn
[2275]					405					410						415
[2276]	Ser	Thr	Leu	Pro	Pro	Pro	Phe	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu
[2277]				420						425					430	
[2278]	Asn	Pro	Val	Ala	Gln	Gly	Gln	Pro	Ile	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Asn
[2279]			435						440					445		
[2280]	Gln	Glu	Glu	Ala	Tyr	Val	Thr	Met	Ser	Ser	Phe	Tyr	Gln	Asn	Gln	
[2281]		450						455					460			
[2282]	<210>	103														
[2283]	<211>	462														
[2284]	<212>	PRT														
[2285]	<213>	Homo sapiens														
[2286]	<400>	103														
[2287]	Met	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	Thr	Phe	Gly	Met	Val	Phe	Ser	Leu	Leu	Gln
[2288]	1			5						10				15		
[2289]	Val	Val	Ser	Gly	Glu	Ser	Gly	Tyr	Ala	Gln	Asn	Gly	Asp	Leu	Glu	Asp
[2290]				20						25				30		
[2291]	Ala	Glu	Leu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Phe	Ser	Cys	Tyr	Ser	Gln	Leu	Glu	Val
[2292]			35						40				45			
[2293]	Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val
[2294]		50						55				60				
[2295]	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Val
[2296]	65				70					75					80	
[2297]	Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Glu	Thr
[2298]				85						90				95		
[2299]	Lys	Lys	Phe	Leu	Leu	Ile	Gly	Lys	Ser	Asn	Ile	Cys	Val	Lys	Val	Gly
[2300]			100						105					110		
[2301]	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys
[2302]			115						120					125		
[2303]	Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala	Asn
[2304]		130					135						140			
[2305]	Asp	Phe	Val	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val
[2306]	145					150					155				160	
[2307]	Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu	Asn
[2308]					165					170					175	
[2309]	Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln

[2310]	180	185	190
[2311]	Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile		
[2312]	195	200	205
[2313]	Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr		
[2314]	210	215	220
[2315]	Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro		
[2316]	225	230	235
[2317]	Ile Leu Leu Thr Cys His Leu Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val		
[2318]	245	250	255
[2319]	Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys		
[2320]	260	265	270
[2321]	Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His		
[2322]	275	280	285
[2323]	Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu		
[2324]	290	295	300
[2325]	Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg		
[2326]	305	310	315
[2327]	Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu		
[2328]	325	330	335
[2329]	Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys		
[2330]	340	345	350
[2331]	Pro Ser Glu Asp Val Val Val Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser		
[2332]	355	360	365
[2333]	Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile		
[2334]	370	375	380
[2335]	Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly		
[2336]	385	390	395
[2337]	Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser		
[2338]	405	410	415
[2339]	Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn		
[2340]	420	425	430
[2341]	Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln		
[2342]	435	440	445
[2343]	Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln		
[2344]	450	455	460
[2345]	<210> 104		
[2346]	<211> 466		
[2347]	<212> PRT		
[2348]	<213> Homo sapiens		
[2349]	<400> 104		
[2350]	Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln		
[2351]	1	5	10

[2352]	Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp
[2353]	20 25 30
[2354]	Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val
[2355]	35 40 45
[2356]	Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val
[2357]	50 55 60
[2358]	Asn Thr Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val
[2359]	65 70 75 80
[2360]	Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr
[2361]	85 90 95
[2362]	Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly
[2363]	100 105 110
[2364]	Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys
[2365]	115 120 125
[2366]	Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn
[2367]	130 135 140
[2368]	Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val
[2369]	145 150 155 160
[2370]	Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn
[2371]	165 170 175
[2372]	Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln
[2373]	180 185 190
[2374]	Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile
[2375]	195 200 205
[2376]	Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr
[2377]	210 215 220
[2378]	Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro
[2379]	225 230 235 240
[2380]	Ile Leu Leu Thr Pro Pro Val Cys Ser Val Thr Ile Ser Ile Leu Ser
[2381]	245 250 255
[2382]	Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys
[2383]	260 265 270
[2384]	Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys
[2385]	275 280 285
[2386]	Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser
[2387]	290 295 300
[2388]	Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp
[2389]	305 310 315 320
[2390]	Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro
[2391]	325 330 335
[2392]	Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln
[2393]	340 345 350

[2394]	Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Val Thr Pro Glu Ser Phe
[2395]	355 360 365
[2396]	Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys
[2397]	370 375 380
[2398]	Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser
[2399]	385 390 395 400
[2400]	Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly
[2401]	405 410 415
[2402]	Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile
[2403]	420 425 430
[2404]	Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu
[2405]	435 440 445
[2406]	Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln
[2407]	450 455 460
[2408]	Asn Gln
[2409]	465
[2410]	<210> 105
[2411]	<211> 523
[2412]	<212> PRT
[2413]	<213> Artificial sequence
[2414]	<220>
[2415]	<223> synthetic Fc-delta-30
[2416]	<400> 105
[2417]	Met Ser Ile Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala
[2418]	1 5 10 15
[2419]	Val Leu Leu Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asn
[2420]	20 25 30
[2421]	Leu Ser Lys Ile Gly Val Val Gly Ile Gly Ser Ala Ser Tyr Lys Val
[2422]	35 40 45
[2423]	Met Thr Arg Ser Ser His Gln Ser Leu Val Ile Lys Leu Met Pro Asn
[2424]	50 55 60
[2425]	Ile Thr Leu Leu Asn Asn Cys Thr Arg Val Glu Ile Ala Glu Tyr Arg
[2426]	65 70 75 80
[2427]	Arg Leu Leu Arg Thr Val Leu Glu Pro Ile Arg Asp Ala Leu Asn Ala
[2428]	85 90 95
[2429]	Met Thr Gln Asn Ile Arg Pro Val Gln Ser Val Ala Ser Ser Arg Arg
[2430]	100 105 110
[2431]	His Lys Arg Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val
[2432]	115 120 125
[2433]	Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Met
[2434]	130 135 140
[2435]	Leu Asn Ser Gln Ala Ile Asp Asn Leu Arg Ala Ser Leu Glu Thr Thr

[2436]	145	150	155	160
[2437]	Asn Gln Ala Ile Glu Ala Ile Arg Gln Ala Gly Gln Glu Met Ile Leu			
[2438]		165	170	175
[2439]	Ala Val Gln Gly Val Gln Asp Tyr Ile Asn Asn Glu Leu Ile Pro Ser			
[2440]		180	185	190
[2441]	Met Asn Gln Leu Ser Cys Asp Leu Ile Gly Gln Lys Leu Gly Leu Lys			
[2442]		195	200	205
[2443]	Leu Leu Arg Tyr Tyr Thr Glu Ile Leu Ser Leu Phe Gly Pro Ser Leu			
[2444]		210	215	220
[2445]	Arg Asp Pro Ile Ser Ala Glu Ile Ser Ile Gln Ala Leu Ser Tyr Ala			
[2446]	225	230	235	240
[2447]	Leu Gly Gly Asp Ile Asn Lys Val Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Ser Gly			
[2448]		245	250	255
[2449]	Gly Asp Leu Leu Gly Ile Leu Glu Ser Arg Gly Ile Lys Ala Arg Ile			
[2450]		260	265	270
[2451]	Thr His Val Asp Thr Glu Ser Tyr Phe Ile Val Leu Ser Ile Ala Tyr			
[2452]		275	280	285
[2453]	Pro Thr Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly			
[2454]		290	295	300
[2455]	Val Ser Tyr Asn Ile Gly Ser Gln Glu Trp Tyr Thr Thr Val Pro Lys			
[2456]	305	310	315	320
[2457]	Tyr Val Ala Thr Gln Gly Tyr Leu Ile Ser Asn Phe Asp Glu Ser Ser			
[2458]		325	330	335
[2459]	Cys Thr Phe Met Pro Glu Gly Thr Val Cys Ser Gln Asn Ala Leu Tyr			
[2460]		340	345	350
[2461]	Pro Met Ser Pro Leu Leu Gln Glu Cys Leu Arg Gly Ser Thr Lys Ser			
[2462]		355	360	365
[2463]	Cys Ala Arg Thr Leu Val Ser Gly Ser Phe Gly Asn Arg Phe Ile Leu			
[2464]		370	375	380
[2465]	Ser Gln Gly Asn Leu Ile Ala Asn Cys Ala Ser Ile Leu Cys Lys Cys			
[2466]	385	390	395	400
[2467]	Tyr Thr Thr Gly Thr Ile Ile Asn Gln Asp Pro Asp Lys Ile Leu Thr			
[2468]		405	410	415
[2469]	Tyr Ile Ala Ala Asp His Cys Pro Val Val Glu Val Asn Gly Val Thr			
[2470]		420	425	430
[2471]	Ile Gln Val Gly Ser Arg Arg Tyr Pro Asp Ala Val Tyr Leu His Arg			
[2472]		435	440	445
[2473]	Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr			
[2474]		450	455	460
[2475]	Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Asp Ala Lys Glu Leu Leu			
[2476]	465	470	475	480
[2477]	Glu Ser Ser Asp Gln Ile Leu Arg Ser Met Lys Gly Leu Ser Ser Thr			

[2478]	485	490	495
[2479]	Ser Ile Val Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly		
[2480]	500	505	510
[2481]	Ile Pro Ala Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg		
[2482]	515	520	
[2483]	<210> 106		
[2484]	<211> 599		
[2485]	<212> PRT		
[2486]	<213> Artificial sequence		
[2487]	<220>		
[2488]	<223> synthetic Hc-delta-18		
[2489]	<400> 106		
[2490]	Met Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg		
[2491]	1 5 10 15		
[2492]	Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Ser Leu Ser Leu Ile		
[2493]	20 25 30		
[2494]	Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala Ala Ile Tyr		
[2495]	35 40 45		
[2496]	Thr Ala Glu Ile His Lys Ser Leu Ser Thr Asn Leu Asp Val Thr Asn		
[2497]	50 55 60		
[2498]	Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu Phe Lys Ile		
[2499]	65 70 75 80		
[2500]	Ile Gly Asp Glu Val Gly Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe Thr Asp Leu		
[2501]	85 90 95		
[2502]	Val Lys Phe Ile Ser Asp Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro Asp Arg Glu		
[2503]	100 105 110		
[2504]	Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro Glu Arg Ile		
[2505]	115 120 125		
[2506]	Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala Glu Glu Leu		
[2507]	130 135 140		
[2508]	Met Asn Ala Leu Val Asn Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg Thr Thr Asn		
[2509]	145 150 155 160		
[2510]	Gln Phe Leu Ala Val Ser Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro Thr Thr Ile		
[2511]	165 170 175		
[2512]	Arg Gly Gln Phe Ser Asn Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp Leu Tyr Leu		
[2513]	180 185 190		
[2514]	Ser Arg Gly Tyr Asn Val Ser Ser Ile Val Thr Met Thr Ser Gln Gly		
[2515]	195 200 205		
[2516]	Met Tyr Gly Gly Thr Tyr Leu Val Glu Lys Pro Asn Leu Ser Ser Lys		
[2517]	210 215 220		
[2518]	Arg Ser Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Tyr Arg Val Phe Glu Val Gly		
[2519]	225 230 235 240		

[2520]	Val	Ile	Arg	Asn	Pro	Gly	Leu	Gly	Ala	Pro	Val	Phe	His	Met	Thr	Asn
[2521]					245					250						255
[2522]	Tyr	Leu	Glu	Gln	Pro	Val	Ser	Asn	Asp	Leu	Ser	Asn	Cys	Met	Val	Ala
[2523]					260					265						270
[2524]	Leu	Gly	Glu	Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	His	Gly	Glu	Asp	Ser	Ile
[2525]					275					280						285
[2526]	Thr	Ile	Pro	Tyr	Gln	Gly	Ser	Gly	Lys	Gly	Val	Ser	Phe	Gln	Leu	Val
[2527]					290					295						300
[2528]	Lys	Leu	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Pro	Thr	Asp	Met	Gln	Ser	Trp	Val	Pro
[2529]	305							310				315				320
[2530]	Leu	Ser	Thr	Asp	Asp	Pro	Val	Ile	Asp	Arg	Leu	Tyr	Leu	Ser	Ser	His
[2531]								325				330				335
[2532]	Arg	Gly	Val	Ile	Ala	Asp	Asn	Gln	Ala	Lys	Trp	Ala	Val	Pro	Thr	Thr
[2533]								340								350
[2534]	Arg	Thr	Asp	Asp	Lys	Leu	Arg	Met	Glu	Thr	Cys	Phe	Gln	Gln	Ala	Cys
[2535]								355								365
[2536]	Lys	Gly	Lys	Ile	Gln	Ala	Leu	Cys	Glu	Asn	Pro	Glu	Trp	Ala	Pro	Leu
[2537]								370								380
[2538]	Lys	Asp	Asn	Arg	Ile	Pro	Ser	Tyr	Gly	Val	Leu	Ser	Val	Asp	Leu	Ser
[2539]	385							390								400
[2540]	Leu	Thr	Val	Glu	Leu	Lys	Ile	Lys	Ile	Ala	Ser	Gly	Phe	Gly	Pro	Leu
[2541]								405								415
[2542]	Ile	Thr	His	Gly	Ser	Gly	Met	Asp	Leu	Tyr	Lys	Ser	Asn	His	Asn	Asn
[2543]								420								430
[2544]	Val	Tyr	Trp	Leu	Thr	Ile	Pro	Pro	Met	Lys	Asn	Leu	Ala	Leu	Gly	Val
[2545]								435								445
[2546]	Ile	Asn	Thr	Leu	Glu	Trp	Ile	Pro	Arg	Phe	Lys	Val	Ser	Pro	Asn	Leu
[2547]								450								460
[2548]	Phe	Thr	Val	Pro	Ile	Lys	Glu	Ala	Gly	Glu	Asp	Cys	His	Ala	Pro	Thr
[2549]	465							470								480
[2550]	Tyr	Leu	Pro	Ala	Glu	Val	Asp	Gly	Asp	Val	Lys	Leu	Ser	Ser	Asn	Leu
[2551]								485								495
[2552]	Val	Ile	Leu	Pro	Gly	Gln	Asp	Leu	Gln	Tyr	Val	Leu	Ala	Thr	Tyr	Asp
[2553]								500								510
[2554]	Thr	Ser	Arg	Val	Glu	His	Ala	Val	Val	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Ser	Pro	Gly
[2555]								515								525
[2556]	Arg	Ser	Phe	Ser	Tyr	Phe	Tyr	Pro	Phe	Arg	Leu	Pro	Ile	Lys	Gly	Val
[2557]								530								540
[2558]	Pro	Ile	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Cys	Phe	Thr	Trp	Asp	Gln	Lys	Leu	Trp
[2559]	545							550								560
[2560]	Cys	Arg	His	Phe	Cys	Val	Leu	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Gly	Gly	His	Ile
[2561]								565								575

[2562]	Thr His Ser Gly Met Val Gly Met Gly Val Ser Cys Thr Val Thr Arg
[2563]	580 585 590
[2564]	Glu Asp Gly Thr Asn Arg Arg
[2565]	595
[2566]	<210> 107
[2567]	<211> 529
[2568]	<212> PRT
[2569]	<213> Artificial sequence
[2570]	<220>
[2571]	<223> synthetic DAFss-IL7-DAF fusion
[2572]	<400> 107
[2573]	Met Thr Val Ala Arg Pro Ser Val Pro Ala Ala Leu Pro Leu Leu Gly
[2574]	1 5 10 15
[2575]	Glu Leu Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Leu Leu Cys Leu Pro Ala Asp
[2576]	20 25 30
[2577]	Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met
[2578]	35 40 45
[2579]	Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn
[2580]	50 55 60
[2581]	Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala
[2582]	65 70 75 80
[2583]	Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln
[2584]	85 90 95
[2585]	Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys
[2586]	100 105 110
[2587]	Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys
[2588]	115 120 125
[2589]	Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu
[2590]	130 135 140
[2591]	Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys
[2592]	145 150 155 160
[2593]	Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile
[2594]	165 170 175
[2595]	Leu Met Gly Thr Lys Glu His Cys Gly Leu Pro Pro Asp Val Pro Asn
[2596]	180 185 190
[2597]	Ala Gln Pro Ala Leu Glu Gly Arg Thr Ser Phe Pro Glu Asp Thr Val
[2598]	195 200 205
[2599]	Ile Thr Tyr Lys Cys Glu Glu Ser Phe Val Lys Ile Pro Gly Glu Lys
[2600]	210 215 220
[2601]	Asp Ser Val Ile Cys Leu Lys Gly Ser Gln Trp Ser Asp Ile Glu Glu
[2602]	225 230 235 240
[2603]	Phe Cys Asn Arg Ser Cys Glu Val Pro Thr Arg Leu Asn Ser Ala Ser

[2604]	245							250							255				
[2605]	Leu	Lys	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Gln	Asn	Tyr	Phe	Pro	Val	Gly	Thr	Val			
[2606]	260							265							270				
[2607]	Val	Glu	Tyr	Glu	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Arg	Arg	Glu	Pro	Ser	Leu	Ser			
[2608]	275							280							285				
[2609]	Pro	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	Asn	Leu	Lys	Trp	Ser	Thr	Ala	Val	Glu			
[2610]	290							295							300				
[2611]	Phe	Cys	Lys	Lys	Lys	Ser	Cys	Pro	Asn	Pro	Gly	Glu	Ile	Arg	Asn	Gly			
[2612]	305							310							315			320	
[2613]	Gln	Ile	Asp	Val	Pro	Gly	Gly	Ile	Leu	Phe	Gly	Ala	Thr	Ile	Ser	Phe			
[2614]	325							330							335				
[2615]	Ser	Cys	Asn	Thr	Gly	Tyr	Lys	Leu	Phe	Gly	Ser	Thr	Ser	Ser	Phe	Cys			
[2616]	340							345							350				
[2617]	Leu	Ile	Ser	Gly	Ser	Ser	Val	Gln	Trp	Ser	Asp	Pro	Leu	Pro	Glu	Cys			
[2618]	355							360							365				
[2619]	Arg	Glu	Ile	Tyr	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Gln	Ile	Asp	Asn	Gly	Ile	Ile			
[2620]	370							375							380				
[2621]	Gln	Gly	Glu	Arg	Asp	His	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Gln	Ser	Val	Thr	Tyr	Ala			
[2622]	385							390							395			400	
[2623]	Cys	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Met	Ile	Gly	Glu	His	Ser	Ile	Tyr	Cys	Thr			
[2624]	405							410							415				
[2625]	Val	Asn	Asn	Asp	Glu	Gly	Glu	Trp	Ser	Gly	Pro	Pro	Pro	Glu	Cys	Arg			
[2626]	420							425							430				
[2627]	Gly	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser	Lys	Val	Pro	Pro	Thr	Val	Gln	Lys	Pro	Thr			
[2628]	435							440							445				
[2629]	Thr	Val	Asn	Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Val	Ser	Pro	Thr	Ser	Gln	Lys	Thr			
[2630]	450							455							460				
[2631]	Thr	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Asn	Ala	Gln	Ala	Thr	Arg	Ser	Thr	Pro			
[2632]	465							470							475			480	
[2633]	Val	Ser	Arg	Thr	Thr	Lys	His	Phe	His	Glu	Thr	Thr	Pro	Asn	Lys	Gly			
[2634]	485							490							495				
[2635]	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Arg	Leu	Leu	Ser	Gly	His	Thr	Cys			
[2636]	500							505							510				
[2637]	Phe	Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Met	Gly	Leu	Leu			
[2638]	515							520							525				
[2639]	Thr																		
[2640]	<210>	108																	
[2641]	<211>	49																	
[2642]	<212>	DNA																	
[2643]	<213>	Artificial sequence																	
[2644]	<220>																		
[2645]	<223>	synthetic 582-1																	

[2646]	<400> 108	
[2647]	acagcttagc gtaatggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2648]	<210> 109	
[2649]	<211> 49	
[2650]	<212> DNA	
[2651]	<213> Artificial sequence	
[2652]	<220>	
[2653]	<223> synthetic 582-2	
[2654]	<400> 109	
[2655]	acagcttagg ataatggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2656]	<210> 110	
[2657]	<211> 49	
[2658]	<212> DNA	
[2659]	<213> Artificial sequence	
[2660]	<220>	
[2661]	<223> synthetic 582-3	
[2662]	<400> 110	
[2663]	acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaacctat tcacagact	49
[2664]	<210> 111	
[2665]	<211> 49	
[2666]	<212> DNA	
[2667]	<213> Artificial sequence	
[2668]	<220>	
[2669]	<223> synthetic 582-4	
[2670]	<400> 111	
[2671]	acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaacctat tgacagact	49
[2672]	<210> 112	
[2673]	<211> 49	
[2674]	<212> DNA	
[2675]	<213> Artificial sequence	
[2676]	<220>	
[2677]	<223> synthetic 582-5	
[2678]	<400> 112	
[2679]	acagcatagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2680]	<210> 113	
[2681]	<211> 49	
[2682]	<212> DNA	
[2683]	<213> Artificial sequence	
[2684]	<220>	
[2685]	<223> synthetic 582-6	
[2686]	<400> 113	
[2687]	acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaacctat gtacagact	49

[2688]	<210>	114	
[2689]	<211>	48	
[2690]	<212>	DNA	
[2691]	<213>	Artificial sequence	
[2692]	<220>		
[2693]	<223>	synthetic 582-7	
[2694]	<400>	114	
[2695]		acagctagcg taatggctac tgacgccgtc caaacctatt tacagact	48
[2696]	<210>	115	
[2697]	<211>	49	
[2698]	<212>	DNA	
[2699]	<213>	Artificial sequence	
[2700]	<220>		
[2701]	<223>	synthetic 582-8	
[2702]	<400>	115	
[2703]		acagcttagc attatggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2704]	<210>	116	
[2705]	<211>	48	
[2706]	<212>	DNA	
[2707]	<213>	Artificial sequence	
[2708]	<220>		
[2709]	<223>	synthetic 582-9	
[2710]	<400>	116	
[2711]		acagcttagca taatggctac tgacgccgtc caaacctatt tacagact	48
[2712]	<210>	117	
[2713]	<211>	49	
[2714]	<212>	DNA	
[2715]	<213>	Artificial sequence	
[2716]	<220>		
[2717]	<223>	synthetic 582-10	
[2718]	<400>	117	
[2719]		acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2720]	<210>	118	
[2721]	<211>	49	
[2722]	<212>	DNA	
[2723]	<213>	Artificial sequence	
[2724]	<220>		
[2725]	<223>	synthetic 582-11	
[2726]	<400>	118	
[2727]		acagcttagc ttaatggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2728]	<210>	119	
[2729]	<211>	49	

[2730]	<212>	DNA	
[2731]	<213>	Artificial sequence	
[2732]	<220>		
[2733]	<223>	synthetic 582-12	
[2734]	<400>	119	
[2735]		acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaaccat ttacagact	49
[2736]	<210>	120	
[2737]	<211>	49	
[2738]	<212>	DNA	
[2739]	<213>	Artificial sequence	
[2740]	<220>		
[2741]	<223>	synthetic 582-13	
[2742]	<400>	120	
[2743]		acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaaccaat ttacagact	49
[2744]	<210>	121	
[2745]	<211>	49	
[2746]	<212>	DNA	
[2747]	<213>	Artificial sequence	
[2748]	<220>		
[2749]	<223>	synthetic 582-14	
[2750]	<400>	121	
[2751]		acagcttagc ataatggata ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2752]	<210>	122	
[2753]	<211>	49	
[2754]	<212>	DNA	
[2755]	<213>	Artificial sequence	
[2756]	<220>		
[2757]	<223>	synthetic 582-15	
[2758]	<400>	122	
[2759]		acagcttagc attgtggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2760]	<210>	123	
[2761]	<211>	49	
[2762]	<212>	DNA	
[2763]	<213>	Artificial sequence	
[2764]	<220>		
[2765]	<223>	synthetic 582-16	
[2766]	<400>	123	
[2767]		acaggttagc ataatggcta ccgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2768]	<210>	124	
[2769]	<211>	49	
[2770]	<212>	DNA	
[2771]	<213>	Artificial sequence	

[2772]	<220>	
[2773]	<223>	synthetic 582-17
[2774]	<400>	124
[2775]	acagcttagc gtaatggcta ctgacgccgc ccaaacctat ttacagact	49
[2776]	<210>	125
[2777]	<211>	49
[2778]	<212>	DNA
[2779]	<213>	Artificial sequence
[2780]	<220>	
[2781]	<223>	synthetic 582-18
[2782]	<400>	125
[2783]	acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaaactat ttccagact	49
[2784]	<210>	126
[2785]	<211>	49
[2786]	<212>	DNA
[2787]	<213>	Artificial sequence
[2788]	<220>	
[2789]	<223>	synthetic 582-19
[2790]	<400>	126
[2791]	acagcctagc ataagggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2792]	<210>	127
[2793]	<211>	49
[2794]	<212>	DNA
[2795]	<213>	Artificial sequence
[2796]	<220>	
[2797]	<223>	synthetic 582-20
[2798]	<400>	127
[2799]	acagcttagc ataatggcta ctgaggccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2800]	<210>	128
[2801]	<211>	49
[2802]	<212>	DNA
[2803]	<213>	Artificial sequence
[2804]	<220>	
[2805]	<223>	synthetic 582-21
[2806]	<400>	128
[2807]	acagcttacc ttaatggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2808]	<210>	129
[2809]	<211>	49
[2810]	<212>	DNA
[2811]	<213>	Artificial sequence
[2812]	<220>	
[2813]	<223>	synthetic 582-22

[2814]	<400> 129	
[2815]	acagcttagc ataatggcta ccgacgctgt ccaaacctat ttacagact	49
[2816]	<210> 130	
[2817]	<211> 49	
[2818]	<212> DNA	
[2819]	<213> Artificial sequence	
[2820]	<220>	
[2821]	<223> synthetic 582-23	
[2822]	<400> 130	
[2823]	acagcttagc gtaatggcta ctggcgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2824]	<210> 131	
[2825]	<211> 49	
[2826]	<212> DNA	
[2827]	<213> Artificial sequence	
[2828]	<220>	
[2829]	<223> synthetic 582-24	
[2830]	<400> 131	
[2831]	acagcttagc atactggcta ctgacgccgc ccaaacctat ttacagact	49
[2832]	<210> 132	
[2833]	<211> 49	
[2834]	<212> DNA	
[2835]	<213> Artificial sequence	
[2836]	<220>	
[2837]	<223> synthetic 582-25	
[2838]	<400> 132	
[2839]	acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt cctaacctat ttacagact	49
[2840]	<210> 133	
[2841]	<211> 49	
[2842]	<212> DNA	
[2843]	<213> Artificial sequence	
[2844]	<220>	
[2845]	<223> synthetic 582-26	
[2846]	<400> 133	
[2847]	acagcttagc ataatgccta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2848]	<210> 134	
[2849]	<211> 49	
[2850]	<212> DNA	
[2851]	<213> Artificial sequence	
[2852]	<220>	
[2853]	<223> synthetic 582-27	
[2854]	<400> 134	
[2855]	acagcttagc ataattgcta ctgacgccgt tcaaacctat ttacagact	49

[2856]	<210>	135	
[2857]	<211>	49	
[2858]	<212>	DNA	
[2859]	<213>	Artificial sequence	
[2860]	<220>		
[2861]	<223>	synthetic 582-28	
[2862]	<400>	135	
[2863]		acagcttagc ataaaggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2864]	<210>	136	
[2865]	<211>	49	
[2866]	<212>	DNA	
[2867]	<213>	Artificial sequence	
[2868]	<220>		
[2869]	<223>	synthetic 582-29	
[2870]	<400>	136	
[2871]		acagcttagc gtaatggcta ctgacgccgt ctaaacctat ttccagact	49
[2872]	<210>	137	
[2873]	<211>	49	
[2874]	<212>	DNA	
[2875]	<213>	Artificial sequence	
[2876]	<220>		
[2877]	<223>	synthetic 582-30	
[2878]	<400>	137	
[2879]		acaggtagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttagagact	49
[2880]	<210>	138	
[2881]	<211>	49	
[2882]	<212>	DNA	
[2883]	<213>	Artificial sequence	
[2884]	<220>		
[2885]	<223>	synthetic 582-31	
[2886]	<400>	138	
[2887]		acaggtagc gtaatggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacagact	49
[2888]	<210>	139	
[2889]	<211>	49	
[2890]	<212>	DNA	
[2891]	<213>	Artificial sequence	
[2892]	<220>		
[2893]	<223>	synthetic 582-32	
[2894]	<400>	139	
[2895]		acagcgtagc ataatggcta ctgacgccgt tcaaacctat ttacagact	49
[2896]	<210>	140	
[2897]	<211>	49	

[2898]	<212>	DNA	
[2899]	<213>	Artificial sequence	
[2900]	<220>		
[2901]	<223>	synthetic 582-33	
[2902]	<400>	140	
[2903]		acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaactcat ttacagact	49
[2904]	<210>	141	
[2905]	<211>	49	
[2906]	<212>	DNA	
[2907]	<213>	Artificial sequence	
[2908]	<220>		
[2909]	<223>	synthetic 582-34	
[2910]	<400>	141	
[2911]		acagcgtagc atagtggcta ctgacgccgt ccaaacttat ttacagact	49
[2912]	<210>	142	
[2913]	<211>	49	
[2914]	<212>	DNA	
[2915]	<213>	Artificial sequence	
[2916]	<220>		
[2917]	<223>	synthetic 582-35	
[2918]	<400>	142	
[2919]		acagcttagt gtaatggcta ctgacgctgt ccaaacttat ttacagact	49
[2920]	<210>	143	
[2921]	<211>	49	
[2922]	<212>	DNA	
[2923]	<213>	Artificial sequence	
[2924]	<220>		
[2925]	<223>	synthetic 582-36	
[2926]	<400>	143	
[2927]		acagcttagc ataatggcta ctgacggcgt tcaaacttat ttacagact	49
[2928]	<210>	144	
[2929]	<211>	49	
[2930]	<212>	DNA	
[2931]	<213>	Artificial sequence	
[2932]	<220>		
[2933]	<223>	synthetic 582-37	
[2934]	<400>	144	
[2935]		acaggttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaacttat ttatagact	49
[2936]	<210>	145	
[2937]	<211>	48	
[2938]	<212>	DNA	
[2939]	<213>	Artificial sequence	

[2940]	<220>	
[2941]	<223>	synthetic 582-38
[2942]	<400>	145
[2943]	acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaacctat tgtcgact	48
[2944]	<210>	146
[2945]	<211>	48
[2946]	<212>	DNA
[2947]	<213>	Artificial sequence
[2948]	<220>	
[2949]	<223>	synthetic 582-39
[2950]	<400>	146
[2951]	acagcttagc ataatggcta ctgacgccgt ccaaacctat ttacgact	48
[2952]	<210>	147
[2953]	<211>	48
[2954]	<212>	DNA
[2955]	<213>	Artificial sequence
[2956]	<220>	
[2957]	<223>	synthetic 769-1
[2958]	<400>	147
[2959]	acaggtcagc ataatgtgct agtgcgccct caaacctatt tagagact	48
[2960]	<210>	148
[2961]	<211>	48
[2962]	<212>	DNA
[2963]	<213>	Artificial sequence
[2964]	<220>	
[2965]	<223>	synthetic 769-2
[2966]	<400>	148
[2967]	acaggtcagc ataatgtgct agtgcgccct caaacctatt tagagact	48
[2968]	<210>	149
[2969]	<211>	48
[2970]	<212>	DNA
[2971]	<213>	Artificial sequence
[2972]	<220>	
[2973]	<223>	synthetic 769-3
[2974]	<400>	149
[2975]	acaggttagc ataatgtgct attgcgccct caaacctatt tagagact	48
[2976]	<210>	150
[2977]	<211>	48
[2978]	<212>	DNA
[2979]	<213>	Artificial sequence
[2980]	<220>	
[2981]	<223>	synthetic 769-4

[2982]	<400> 150	
[2983]	acaggtcagc ataatgtgct agtgcgctt caaacctatt tagagact	48
[2984]	<210> 151	
[2985]	<211> 48	
[2986]	<212> DNA	
[2987]	<213> Artificial sequence	
[2988]	<220>	
[2989]	<223> synthetic 769-5	
[2990]	<400> 151	
[2991]	acaggttagc ataatgtgct agtgcgctt caaacctatt ttgagact	48
[2992]	<210> 152	
[2993]	<211> 48	
[2994]	<212> DNA	
[2995]	<213> Artificial sequence	
[2996]	<220>	
[2997]	<223> synthetic 769-6	
[2998]	<400> 152	
[2999]	acaggttatc ataatgtgct agtgcgctt caaacctatt tagagact	48
[3000]	<210> 153	
[3001]	<211> 48	
[3002]	<212> DNA	
[3003]	<213> Artificial sequence	
[3004]	<220>	
[3005]	<223> synthetic 769-7	
[3006]	<400> 153	
[3007]	acaggttagc atgatgtgct agtgcgctt caaacctatt tagagact	48
[3008]	<210> 154	
[3009]	<211> 48	
[3010]	<212> DNA	
[3011]	<213> Artificial sequence	
[3012]	<220>	
[3013]	<223> synthetic 769-8	
[3014]	<400> 154	
[3015]	acaggttagc ataatgggct agtgcgctt caaacctatt tagagact	48
[3016]	<210> 155	
[3017]	<211> 48	
[3018]	<212> DNA	
[3019]	<213> Artificial sequence	
[3020]	<220>	
[3021]	<223> synthetic 769-9	
[3022]	<400> 155	
[3023]	acaggtcagc aaaatgtgca agtgcgctt caaacctatt tagagact	48

[3024]	<210>	156	
[3025]	<211>	48	
[3026]	<212>	DNA	
[3027]	<213>	Artificial sequence	
[3028]	<220>		
[3029]	<223>	synthetic 769-10	
[3030]	<400>	156	
[3031]		acaggtcagc ataatgtgct agtgcgcctt caaacctatc tggagact	48
[3032]	<210>	157	
[3033]	<211>	48	
[3034]	<212>	DNA	
[3035]	<213>	Artificial sequence	
[3036]	<220>		
[3037]	<223>	synthetic 769-11	
[3038]	<400>	157	
[3039]		acagcttagc ataatgtgct agtgcgcctt caaacctatt tagagact	48
[3040]	<210>	158	
[3041]	<211>	48	
[3042]	<212>	DNA	
[3043]	<213>	Artificial sequence	
[3044]	<220>		
[3045]	<223>	synthetic 769-12	
[3046]	<400>	158	
[3047]		acaggtcagc ataatgtgct agtgcgcctt caaacctatt tacagact	48
[3048]	<210>	159	
[3049]	<211>	48	
[3050]	<212>	DNA	
[3051]	<213>	Artificial sequence	
[3052]	<220>		
[3053]	<223>	synthetic 769-13	
[3054]	<400>	159	
[3055]		acaggtcagc ataatgtgct agtgcgcctt caaacatatt tagagact	48
[3056]	<210>	160	
[3057]	<211>	48	
[3058]	<212>	DNA	
[3059]	<213>	Artificial sequence	
[3060]	<220>		
[3061]	<223>	synthetic 769-14	
[3062]	<400>	160	
[3063]		acagggtagc ataatgtgct agtgcgcctt caaacctatt tagagact	48
[3064]	<210>	161	
[3065]	<211>	48	

[3066]	<212>	DNA	
[3067]	<213>	Artificial sequence	
[3068]	<220>		
[3069]	<223>	synthetic 769-15	
[3070]	<400>	161	
[3071]		acaggttagc ataatgtgct agtgcgcctt caaacctatt tagagact	48
[3072]	<210>	162	
[3073]	<211>	48	
[3074]	<212>	DNA	
[3075]	<213>	Artificial sequence	
[3076]	<220>		
[3077]	<223>	synthetic 769-16	
[3078]	<400>	162	
[3079]		acaggttagc ataatgtgcc agtgcgcctt caaacctatt tagagact	48
[3080]	<210>	163	
[3081]	<211>	48	
[3082]	<212>	DNA	
[3083]	<213>	Artificial sequence	
[3084]	<220>		
[3085]	<223>	synthetic 769-17	
[3086]	<400>	163	
[3087]		acaggtcagc ataatgggct agtgcgcctt caaacctatt tagagact	48
[3088]	<210>	164	
[3089]	<211>	49	
[3090]	<212>	DNA	
[3091]	<213>	Artificial sequence	
[3092]	<220>		
[3093]	<223>	synthetic 795-1	
[3094]	<400>	164	
[3095]		acagcgaagc ataatggcta ctgacgcctt caaacctat ttgcagact	49
[3096]	<210>	165	
[3097]	<211>	49	
[3098]	<212>	DNA	
[3099]	<213>	Artificial sequence	
[3100]	<220>		
[3101]	<223>	synthetic 795-2	
[3102]	<400>	165	
[3103]		acagcgaagc ataatggcta ctgacgcctt caaacctat ttacagact	49
[3104]	<210>	166	
[3105]	<211>	49	
[3106]	<212>	DNA	
[3107]	<213>	Artificial sequence	

[3108]	<220>	
[3109]	<223>	synthetic 795-3
[3110]	<400>	166
[3111]	acagcgaagc ataatggctt ctgacgccct caaacctat ttgcagact	49
[3112]	<210>	167
[3113]	<211>	49
[3114]	<212>	DNA
[3115]	<213>	Artificial sequence
[3116]	<220>	
[3117]	<223>	synthetic 795-4
[3118]	<400>	167
[3119]	acagccaagc atactggcta ctgacgccct caaacctat ttgcagact	49
[3120]	<210>	168
[3121]	<211>	49
[3122]	<212>	DNA
[3123]	<213>	Artificial sequence
[3124]	<220>	
[3125]	<223>	synthetic 795-5
[3126]	<400>	168
[3127]	acagcgaagc ataatggcta ctgacgcccg caaacctat ttgcagact	49
[3128]	<210>	169
[3129]	<211>	49
[3130]	<212>	DNA
[3131]	<213>	Artificial sequence
[3132]	<220>	
[3133]	<223>	synthetic 795-6
[3134]	<400>	169
[3135]	acagcgaagc ataatggcta ctgacggcct caaacctat ttgcagact	49
[3136]	<210>	170
[3137]	<211>	49
[3138]	<212>	DNA
[3139]	<213>	Artificial sequence
[3140]	<220>	
[3141]	<223>	synthetic 795-7
[3142]	<400>	170
[3143]	acagcgaggc ataatggcta ctgacgccct caaacctat ttgcagact	49
[3144]	<210>	171
[3145]	<211>	49
[3146]	<212>	DNA
[3147]	<213>	Artificial sequence
[3148]	<220>	
[3149]	<223>	synthetic 795-8

[3150]	<400> 171	
[3151]	acagcgaagc ataatggcta ctgacgcctt caaacctat ttgcagact	49
[3152]	<210> 172	
[3153]	<211> 49	
[3154]	<212> DNA	
[3155]	<213> Artificial sequence	
[3156]	<220>	
[3157]	<223> synthetic 795-9	
[3158]	<400> 172	
[3159]	acagcgaagc ataatggcta cagacgcctt caaacctat ttgcagact	49
[3160]	<210> 173	
[3161]	<211> 48	
[3162]	<212> DNA	
[3163]	<213> Artificial sequence	
[3164]	<220>	
[3165]	<223> synthetic 795-10	
[3166]	<400> 173	
[3167]	acagcgaagc ataatggcta ctgacgcctt caaacctat ttgagact	48
[3168]	<210> 174	
[3169]	<211> 48	
[3170]	<212> DNA	
[3171]	<213> Artificial sequence	
[3172]	<220>	
[3173]	<223> synthetic 795-11	
[3174]	<400> 174	
[3175]	acagcgaagc ataatggcta ctgacgcctt caaacctat tgtcgact	48
[3176]	<210> 175	
[3177]	<211> 49	
[3178]	<212> DNA	
[3179]	<213> Artificial sequence	
[3180]	<220>	
[3181]	<223> synthetic 795-12	
[3182]	<400> 175	
[3183]	acagccaagc ataatggcta ctgacgcctt caaacctat ttgcagact	49
[3184]	<210> 176	
[3185]	<211> 49	
[3186]	<212> DNA	
[3187]	<213> Artificial sequence	
[3188]	<220>	
[3189]	<223> synthetic 795-13	
[3190]	<400> 176	
[3191]	acagcgaagc ataatggcta ctgacgcctt caaacctat ttggcgact	49

[3192]	<210>	177	
[3193]	<211>	49	
[3194]	<212>	DNA	
[3195]	<213>	Artificial sequence	
[3196]	<220>		
[3197]	<223>	synthetic 795-14	
[3198]	<400>	177	
[3199]		acagcgaagc ataatgtcta ctgacgccct caaacctat ttgcagact	49
[3200]	<210>	178	
[3201]	<211>	49	
[3202]	<212>	DNA	
[3203]	<213>	Artificial sequence	
[3204]	<220>		
[3205]	<223>	synthetic 795-15	
[3206]	<400>	178	
[3207]		acagcgaagc ataatggcta ctgacgccgt caaacctat ttgtagact	49
[3208]	<210>	179	
[3209]	<211>	49	
[3210]	<212>	DNA	
[3211]	<213>	Artificial sequence	
[3212]	<220>		
[3213]	<223>	synthetic 795-16	
[3214]	<400>	179	
[3215]		acagcgaagc ataatggcta ctgacgccct caaacctat ttgcagact	49
[3216]	<210>	180	
[3217]	<211>	48	
[3218]	<212>	DNA	
[3219]	<213>	Artificial sequence	
[3220]	<220>		
[3221]	<223>	synthetic 795-17	
[3222]	<400>	180	
[3223]		acaggtagca taatggctac tgacgccctc aaacctatt tgcagact	48
[3224]	<210>	181	
[3225]	<211>	49	
[3226]	<212>	DNA	
[3227]	<213>	Artificial sequence	
[3228]	<220>		
[3229]	<223>	synthetic 795-18	
[3230]	<400>	181	
[3231]		acagcgaagc ataatggcta ctgacgccct caaacctat ttctagact	49
[3232]	<210>	182	
[3233]	<211>	49	

[3234]	<212>	DNA	
[3235]	<213>	Artificial sequence	
[3236]	<220>		
[3237]	<223>	synthetic 795-19	
[3238]	<400>	182	
[3239]		acagcgaagc ataatggcta ctgacgccct caaacctat ttgtagact	49
[3240]	<210>	183	
[3241]	<211>	48	
[3242]	<212>	DNA	
[3243]	<213>	Artificial sequence	
[3244]	<220>		
[3245]	<223>	synthetic 935-1	
[3246]	<400>	183	
[3247]		acagggtagc ataatgggct acttgacgcc ttcacctatt tgtagact	48
[3248]	<210>	184	
[3249]	<211>	47	
[3250]	<212>	DNA	
[3251]	<213>	Artificial sequence	
[3252]	<220>		
[3253]	<223>	synthetic 935-2	
[3254]	<400>	184	
[3255]		acagggtagc ataatgggct acttgacgcc ttcacctatt tgagact	47
[3256]	<210>	185	
[3257]	<211>	48	
[3258]	<212>	DNA	
[3259]	<213>	Artificial sequence	
[3260]	<220>		
[3261]	<223>	synthetic 935-3	
[3262]	<400>	185	
[3263]		acagggtagc ataatgggct actttacgcc ttcacctatt tgtagact	48
[3264]	<210>	186	
[3265]	<211>	48	
[3266]	<212>	DNA	
[3267]	<213>	Artificial sequence	
[3268]	<220>		
[3269]	<223>	synthetic 935-4	
[3270]	<400>	186	
[3271]		acagggtagc ataatgggct acttgacgcc ttcacctatt tctagact	48
[3272]	<210>	187	
[3273]	<211>	48	
[3274]	<212>	DNA	
[3275]	<213>	Artificial sequence	

[3276]	<220>	
[3277]	<223>	synthetic 935-5
[3278]	<400>	187
[3279]	acagggtagc ataatgggct acttgacgcc ttcacctatt tggagact	48
[3280]	<210>	188
[3281]	<211>	48
[3282]	<212>	DNA
[3283]	<213>	Artificial sequence
[3284]	<220>	
[3285]	<223>	synthetic 935-6
[3286]	<400>	188
[3287]	acagggtagc atagtgggct acttgacgcc ttcacctatt tgtagact	48
[3288]	<210>	189
[3289]	<211>	48
[3290]	<212>	DNA
[3291]	<213>	Artificial sequence
[3292]	<220>	
[3293]	<223>	synthetic 935-7
[3294]	<400>	189
[3295]	acagggtagc atgatgggct acttgacgcc ttcacctatt tgtagact	48
[3296]	<210>	190
[3297]	<211>	48
[3298]	<212>	DNA
[3299]	<213>	Artificial sequence
[3300]	<220>	
[3301]	<223>	synthetic 935-8
[3302]	<400>	190
[3303]	acagggtagc ataatgggct acttgacgcc ttcacctatt agtagact	48
[3304]	<210>	191
[3305]	<211>	48
[3306]	<212>	DNA
[3307]	<213>	Artificial sequence
[3308]	<220>	
[3309]	<223>	synthetic 935-9
[3310]	<400>	191
[3311]	acagggtagc ataatgggct atttgacgcc ttcacctatt tgtagact	48
[3312]	<210>	192
[3313]	<211>	48
[3314]	<212>	DNA
[3315]	<213>	Artificial sequence
[3316]	<220>	
[3317]	<223>	synthetic 935-10

[3318]	<400> 192	
[3319]	acagggtagc ataatgggct acttgccgcc ttcacctatt ttagact	48
[3320]	<210> 193	
[3321]	<211> 48	
[3322]	<212> DNA	
[3323]	<213> Artificial sequence	
[3324]	<220>	
[3325]	<223> synthetic 935-11	
[3326]	<400> 193	
[3327]	acagtgtagc ataattggct acttgacgcc ttcacctatt ttagact	48
[3328]	<210> 194	
[3329]	<211> 48	
[3330]	<212> DNA	
[3331]	<213> Artificial sequence	
[3332]	<220>	
[3333]	<223> synthetic 935-12	
[3334]	<400> 194	
[3335]	acagggtagc ataatgggct acttgacgct ttcacctttt ttagact	48
[3336]	<210> 195	
[3337]	<211> 48	
[3338]	<212> DNA	
[3339]	<213> Artificial sequence	
[3340]	<220>	
[3341]	<223> synthetic 935-13	
[3342]	<400> 195	
[3343]	acagggtagc ataaggggct acttgacgcc ttcacctatt ttagact	48
[3344]	<210> 196	
[3345]	<211> 48	
[3346]	<212> DNA	
[3347]	<213> Artificial sequence	
[3348]	<220>	
[3349]	<223> synthetic 935-14	
[3350]	<400> 196	
[3351]	acagggtagc ataatggact acttgacgcc ttcacctatt ttagact	48
[3352]	<210> 197	
[3353]	<211> 48	
[3354]	<212> DNA	
[3355]	<213> Artificial sequence	
[3356]	<220>	
[3357]	<223> synthetic 935-15	
[3358]	<400> 197	
[3359]	acagggtagc ataatgggct acttgtcgcc ttcacctatt ttagact	48

[3360]	<210>	198	
[3361]	<211>	49	
[3362]	<212>	DNA	
[3363]	<213>	Artificial sequence	
[3364]	<220>		
[3365]	<223>	synthetic 946-1	
[3366]	<400>	198	
[3367]		acagcgtagc ataatgggct gcagacgccg tcaaacctat ttgcagact	49
[3368]	<210>	199	
[3369]	<211>	49	
[3370]	<212>	DNA	
[3371]	<213>	Artificial sequence	
[3372]	<220>		
[3373]	<223>	synthetic 946-2	
[3374]	<400>	199	
[3375]		acagcgtagc ataatgggct gcagacgcag tcaaacctat ttgcagact	49
[3376]	<210>	200	
[3377]	<211>	48	
[3378]	<212>	DNA	
[3379]	<213>	Artificial sequence	
[3380]	<220>		
[3381]	<223>	synthetic 946-3	
[3382]	<400>	200	
[3383]		acatgtagca taatgggcta ctgacgccgt caaacctatt tgcagact	48
[3384]	<210>	201	
[3385]	<211>	49	
[3386]	<212>	DNA	
[3387]	<213>	Artificial sequence	
[3388]	<220>		
[3389]	<223>	synthetic 946-4	
[3390]	<400>	201	
[3391]		acagcgtagc atagtgggct gcagacgccg tcaaacctat ttgcagact	49
[3392]	<210>	202	
[3393]	<211>	49	
[3394]	<212>	DNA	
[3395]	<213>	Artificial sequence	
[3396]	<220>		
[3397]	<223>	synthetic 946-5	
[3398]	<400>	202	
[3399]		acagtgtagc ataatgggct gcagacgcct tcaaacctat ttggagact	49
[3400]	<210>	203	
[3401]	<211>	49	

[3402]	<212>	DNA	
[3403]	<213>	Artificial sequence	
[3404]	<220>		
[3405]	<223>	synthetic 946-6	
[3406]	<400>	203	
[3407]		acagtgtagc ataatgggct gctgacgccg tcaaacctat ttgaagact	49
[3408]	<210>	204	
[3409]	<211>	49	
[3410]	<212>	DNA	
[3411]	<213>	Artificial sequence	
[3412]	<220>		
[3413]	<223>	synthetic 946-7	
[3414]	<400>	204	
[3415]		acagcgtagc ataatgggct acaggcgccg tcaaacctat ttgcagact	49
[3416]	<210>	205	
[3417]	<211>	49	
[3418]	<212>	DNA	
[3419]	<213>	Artificial sequence	
[3420]	<220>		
[3421]	<223>	synthetic 946-8	
[3422]	<400>	205	
[3423]		acagcgtagc ataatgggct actggcgccg tcaaacctat ttgcagact	49
[3424]	<210>	206	
[3425]	<211>	48	
[3426]	<212>	DNA	
[3427]	<213>	Artificial sequence	
[3428]	<220>		
[3429]	<223>	synthetic 946-9	
[3430]	<400>	206	
[3431]		acagcgtagc ataatgggct gcagacgccg tcaaacctat ttgagact	48
[3432]	<210>	207	
[3433]	<211>	48	
[3434]	<212>	DNA	
[3435]	<213>	Artificial sequence	
[3436]	<220>		
[3437]	<223>	synthetic 946-10	
[3438]	<400>	207	
[3439]		acaggtagca taatgggctg cagacgccgt caaacctatt tgcagact	48
[3440]	<210>	208	
[3441]	<211>	48	
[3442]	<212>	DNA	
[3443]	<213>	Artificial sequence	

[3444]	<220>	
[3445]	<223>	synthetic 946-11
[3446]	<400>	208
[3447]	acaggtagca taatgggctg ctgacgccgt caaacctatt tacagact	48
[3448]	<210>	209
[3449]	<211>	49
[3450]	<212>	DNA
[3451]	<213>	Artificial sequence
[3452]	<220>	
[3453]	<223>	synthetic 946-12
[3454]	<400>	209
[3455]	acagcgtagc atattgggct gcagacgccg tcaaacctat ttgcagact	49
[3456]	<210>	210
[3457]	<211>	49
[3458]	<212>	DNA
[3459]	<213>	Artificial sequence
[3460]	<220>	
[3461]	<223>	synthetic 946-13
[3462]	<400>	210
[3463]	acagcgtagc ataatgggct gcagacgcct tcaaacctat ttggagact	49
[3464]	<210>	211
[3465]	<211>	48
[3466]	<212>	DNA
[3467]	<213>	Artificial sequence
[3468]	<220>	
[3469]	<223>	synthetic 946-14
[3470]	<400>	211
[3471]	acagtgtagc ataatgggct gcagacgccg tcaaacctat ttgagact	48
[3472]	<210>	212
[3473]	<211>	49
[3474]	<212>	DNA
[3475]	<213>	Artificial sequence
[3476]	<220>	
[3477]	<223>	synthetic 946-15
[3478]	<400>	212
[3479]	acagcgtagc ataatgggct gctgacgccg tcaaacctat ttggagact	49
[3480]	<210>	213
[3481]	<211>	49
[3482]	<212>	DNA
[3483]	<213>	Artificial sequence
[3484]	<220>	
[3485]	<223>	synthetic 946-16

[3486]	<400> 213	
[3487]	acagcgtagc ataatgggct gcagacgccg tcaaacctat ttacagact	49
[3488]	<210> 214	
[3489]	<211> 49	
[3490]	<212> DNA	
[3491]	<213> Artificial sequence	
[3492]	<220>	
[3493]	<223> synthetic 946-17	
[3494]	<400> 214	
[3495]	acagcgtagc ataatgggct gctgacgccg tcaaacctat ttgcagact	49
[3496]	<210> 215	
[3497]	<211> 49	
[3498]	<212> DNA	
[3499]	<213> Artificial sequence	
[3500]	<220>	
[3501]	<223> synthetic 946-18	
[3502]	<400> 215	
[3503]	acaggtagc ataatgggct gcagacgccg tcaaacctat ttggagact	49
[3504]	<210> 216	
[3505]	<211> 49	
[3506]	<212> DNA	
[3507]	<213> Artificial sequence	
[3508]	<220>	
[3509]	<223> synthetic 946-19	
[3510]	<400> 216	
[3511]	acagcgtagc ataatgggct acagacgccg tcaaacctat ttgcagact	49
[3512]	<210> 217	
[3513]	<211> 49	
[3514]	<212> DNA	
[3515]	<213> Artificial sequence	
[3516]	<220>	
[3517]	<223> synthetic 946-20	
[3518]	<400> 217	
[3519]	acagcgtagc ataatgggct gcagacgccg tcaaacttat ttgcagact	49
[3520]	<210> 218	
[3521]	<211> 49	
[3522]	<212> DNA	
[3523]	<213> Artificial sequence	
[3524]	<220>	
[3525]	<223> synthetic 946-21	
[3526]	<400> 218	
[3527]	acagcgtagc ataatgggct tcagacgccg tcaaacctat ttgcagact	49

[3528]	<210>	219	
[3529]	<211>	48	
[3530]	<212>	DNA	
[3531]	<213>	Artificial sequence	
[3532]	<220>		
[3533]	<223>	synthetic 946-22	
[3534]	<400>	219	
[3535]		acatgtagca taatgggctg cagacgccgt caaacctatt tggagact	48
[3536]	<210>	220	
[3537]	<211>	47	
[3538]	<212>	DNA	
[3539]	<213>	Artificial sequence	
[3540]	<220>		
[3541]	<223>	synthetic 961-1	
[3542]	<400>	220	
[3543]		acaccgtagc ataatgggct actgccgccg tcgacctttt ggagact	47
[3544]	<210>	221	
[3545]	<211>	46	
[3546]	<212>	DNA	
[3547]	<213>	Artificial sequence	
[3548]	<220>		
[3549]	<223>	synthetic 996-1	
[3550]	<400>	221	
[3551]		acagggtagc ataatggcctt aggacgcctt caaacctatc aagact	46
[3552]	<210>	222	
[3553]	<211>	49	
[3554]	<212>	DNA	
[3555]	<213>	Artificial sequence	
[3556]	<220>		
[3557]	<223>	synthetic Family 582 Consensus	
[3558]	<220>		
[3559]	<221>	misc_feature	
[3560]	<222>	(5) .. (5)	
[3561]	<223>	n at position 5 can be C, G, or no nucleotide	
[3562]	<220>		
[3563]	<221>	misc_feature	
[3564]	<222>	(6) .. (6)	
[3565]	<223>	n at position 6 can be A, C, G, T, or no nucleotide	
[3566]	<220>		
[3567]	<221>	misc_feature	
[3568]	<222>	(45) .. (45)	
[3569]	<223>	n at position 45 can be A or no nucleotide	

[3570]	<400> 222	
[3571]	acagnntasb dtwvdksmta cygrsgsbgy yywaamyhat kbhbngact	49
[3572]	<210> 223	
[3573]	<211> 48	
[3574]	<212> DNA	
[3575]	<213> Artificial sequence	
[3576]	<220>	
[3577]	<223> synthetic Family 769 Consensus	
[3578]	<400> 223	
[3579]	acagskyakc awratgkgch aktgcgcmtyt caaacmtaty tdsagact	48
[3580]	<210> 224	
[3581]	<211> 49	
[3582]	<212> DNA	
[3583]	<213> Artificial sequence	
[3584]	<220>	
[3585]	<223> synthetic Family 795 Consensus	
[3586]	<220>	
[3587]	<221> misc_feature	
[3588]	<222> (5) .. (5)	
[3589]	<223> n at position 5 can be C or no nucleotide	
[3590]	<220>	
[3591]	<221> misc_feature	
[3592]	<222> (40) .. (40)	
[3593]	<223> n at position 40 can be T or no nucleotide	
[3594]	<220>	
[3595]	<221> misc_feature	
[3596]	<222> (44) .. (44)	
[3597]	<223> n at position 44 can be C, G, T, or no nucleotide	
[3598]	<400> 224	
[3599]	acagnswrgc atamtgkctw cwgacgscbk caaamcytan ttvnmgact	49
[3600]	<210> 225	
[3601]	<211> 48	
[3602]	<212> DNA	
[3603]	<213> Artificial sequence	
[3604]	<220>	
[3605]	<223> synthetic Family 935 Consensus	
[3606]	<220>	
[3607]	<221> misc_feature	
[3608]	<222> (43) .. (43)	
[3609]	<223> n at position 43 can be G, T, or no nucleotide	
[3610]	<400> 225	
[3611]	acagkgtegc atrrkkgret ayttkhegcy tycacctwtt wsnagact	48

[3612]	<210>	226	
[3613]	<211>	49	
[3614]	<212>	DNA	
[3615]	<213>	Artificial sequence	
[3616]	<220>		
[3617]	<223>	synthetic Family 946 Consensus	
[3618]	<220>		
[3619]	<221>	misc_feature	
[3620]	<222>	(4) .. (4)	
[3621]	<223>	n at position 4 can be G or no nucleotide	
[3622]	<220>		
[3623]	<221>	misc_feature	
[3624]	<222>	(5) .. (5)	
[3625]	<223>	n at position 5 can be C, G, T, or no nucleotide	
[3626]	<220>		
[3627]	<221>	misc_feature	
[3628]	<222>	(44) .. (44)	
[3629]	<223>	n at position 44 can be A, C, G, or no nucleotide	
[3630]	<400>	226	
[3631]		acanngtmgc atadtgggct dcwgrcgcmk tcaaayctat ttrnagact	49
[3632]	<210>	227	
[3633]	<211>	11	
[3634]	<212>	PRT	
[3635]	<213>	Artificial sequence	
[3636]	<220>		
[3637]	<223>	synthetic Membrane-targeting domain of Src-Flag-Vpx	
[3638]	<400>	227	
[3639]		Met Gly Ser Ser Lys Ser Lys Pro Lys Asp Pro	
[3640]	1	5	10
[3641]	<210>	228	
[3642]	<211>	8	
[3643]	<212>	PRT	
[3644]	<213>	Artificial sequence	
[3645]	<220>		
[3646]	<223>	synthetic Viral protease cleavage domain	
[3647]	<400>	228	
[3648]		Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala	
[3649]	1	5	
[3650]	<210>	229	
[3651]	<211>	458	
[3652]	<212>	PRT	
[3653]	<213>	Homo sapiens	

[3654]	<400>	229														
[3655]	Met	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	Thr	Phe	Gly	Met	Val	Phe	Ser	Leu	Leu	Gln
[3656]	1			5						10					15	
[3657]	Val	Val	Ser	Gly	Glu	Ser	Gly	Tyr	Ala	Gln	Asn	Gly	Asp	Leu	Glu	Asp
[3658]				20					25					30		
[3659]	Ala	Glu	Leu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Phe	Ser	Cys	Tyr	Ser	Gln	Leu	Glu	Val
[3660]			35					40					45			
[3661]	Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val
[3662]		50					55					60				
[3663]	Asn	Ile	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Val
[3664]	65				70					75					80	
[3665]	Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Glu	Thr
[3666]				85					90						95	
[3667]	Lys	Lys	Phe	Leu	Leu	Ile	Gly	Lys	Ser	Asn	Ile	Cys	Val	Lys	Val	Gly
[3668]			100					105						110		
[3669]	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys
[3670]		115						120					125			
[3671]	Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Val	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala	Asn
[3672]		130					135					140				
[3673]	Asp	Phe	Val	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val
[3674]	145				150					155					160	
[3675]	Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu	Asn
[3676]				165					170						175	
[3677]	Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln
[3678]			180						185					190		
[3679]	Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile
[3680]		195					200						205			
[3681]	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser	Tyr
[3682]		210					215					220				
[3683]	Tyr	Phe	Arg	Thr	Pro	Glu	Ile	Asn	Asn	Ser	Ser	Gly	Glu	Met	Asp	Pro
[3684]	225				230					235					240	
[3685]	Ile	Leu	Leu	Thr	Ile	Ser	Ile	Leu	Ser	Phe	Phe	Ser	Val	Ala	Leu	Leu
[3686]				245					250						255	
[3687]	Val	Ile	Leu	Ala	Cys	Val	Leu	Trp	Lys	Lys	Arg	Ile	Lys	Pro	Ile	Val
[3688]			260						265					270		
[3689]	Trp	Pro	Ser	Leu	Pro	Asp	His	Lys	Lys	Thr	Leu	Glu	His	Leu	Cys	Lys
[3690]		275					280						285			
[3691]	Lys	Pro	Arg	Lys	Asn	Leu	Asn	Val	Ser	Phe	Asn	Pro	Glu	Ser	Phe	Leu
[3692]		290					295					300				
[3693]	Asp	Cys	Gln	Ile	His	Arg	Val	Asp	Asp	Ile	Gln	Ala	Arg	Asp	Glu	Val
[3694]	305				310					315					320	
[3695]	Glu	Gly	Phe	Leu	Gln	Asp	Thr	Phe	Pro	Gln	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser	Gln

[3696]	325	330	335
[3697]	Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu		
[3698]	340	345	350
[3699]	Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr		
[3700]	355	360	365
[3701]	Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser		
[3702]	370	375	380
[3703]	Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val		
[3704]	385	390	395
[3705]	Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro		
[3706]	405	410	415
[3707]	Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala		
[3708]	420	425	430
[3709]	Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala		
[3710]	435	440	445
[3711]	Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn		
[3712]	450	455	
[3713]	<210> 230		
[3714]	<211> 723		
[3715]	<212> PRT		
[3716]	<213> Artificial sequence		
[3717]	<220>		
[3718]	<223> synthetic GFP - linker - P2A -IL7Ra IncPPCL codon(exceptP2A) and		
[3719]	splice optimized		
[3720]	<400> 230		
[3721]	Met Ser Gly Gly Glu Glu Leu Phe Ala Gly Ile Val Pro Val Leu Ile		
[3722]	1 5 10 15		
[3723]	Glu Leu Asp Gly Asp Val His Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu		
[3724]	20 25 30		
[3725]	Gly Glu Gly Asp Ala Asp Tyr Gly Lys Leu Glu Ile Lys Phe Ile Cys		
[3726]	35 40 45		
[3727]	Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu		
[3728]	50 55 60		
[3729]	Cys Tyr Gly Ile Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Glu His Met Lys Met		
[3730]	65 70 75 80		
[3731]	Asn Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Ile Gln Glu Arg		
[3732]	85 90 95		
[3733]	Thr Ile Gln Phe Gln Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Gly Glu Val		
[3734]	100 105 110		
[3735]	Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Lys		
[3736]	115 120 125		
[3737]	Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Ser		

[3738]	130	135	140
[3739]	Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Arg Pro Asp Lys Ala Asn Asn Gly		
[3740]	145	150	155 160
[3741]	Leu Glu Ala Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Gly Gly Gly Val		
[3742]		165	170 175
[3743]	Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Thr Asn Val Pro Leu Gly Asp Gly Pro		
[3744]		180	185 190
[3745]	Val Leu Ile Pro Ile Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Thr Lys Ile Ser		
[3746]		195	200 205
[3747]	Lys Asp Arg Asn Glu Ala Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Ser Phe		
[3748]	210	215	220
[3749]	Ser Ala Cys Cys His Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Arg Gly Ser		
[3750]	225	230	235 240
[3751]	Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu		
[3752]		245	250 255
[3753]	Asn Pro Gly Pro Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe		
[3754]		260	265 270
[3755]	Ser Leu Leu Gln Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly		
[3756]		275	280 285
[3757]	Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser		
[3758]	290	295	300
[3759]	Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu		
[3760]	305	310	315 320
[3761]	Asp Pro Asp Val Asn Ile Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala		
[3762]		325	330 335
[3763]	Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr		
[3764]		340	345 350
[3765]	Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys		
[3766]		355	360 365
[3767]	Val Lys Val Gly Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr		
[3768]	370	375	380
[3769]	Thr Ile Val Lys Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Val Tyr Arg		
[3770]	385	390	395 400
[3771]	Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln		
[3772]		405	410 415
[3773]	Lys Lys Tyr Val Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu		
[3774]		420	425 430
[3775]	Lys Asp Glu Asn Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu		
[3776]		435	440 445
[3777]	Thr Leu Leu Gln Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys		
[3778]	450	455	460
[3779]	Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp		

[3780]	465	470	475	480
[3781]	Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly			
[3782]		485	490	495
[3783]	Glu Met Asp Pro Ile Leu Leu Pro Pro Cys Leu Thr Ile Ser Ile Leu			
[3784]		500	505	510
[3785]	Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp			
[3786]		515	520	525
[3787]	Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys			
[3788]		530	535	540
[3789]	Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val			
[3790]	545	550	555	560
[3791]	Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp			
[3792]		565	570	575
[3793]	Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe			
[3794]		580	585	590
[3795]	Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val			
[3796]		595	600	605
[3797]	Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser			
[3798]		610	615	620
[3799]	Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala			
[3800]	625	630	635	640
[3801]	Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu			
[3802]		645	650	655
[3803]	Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu			
[3804]		660	665	670
[3805]	Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly			
[3806]		675	680	685
[3807]	Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser			
[3808]		690	695	700
[3809]	Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr			
[3810]	705	710	715	720
[3811]	Gln Asn Gln			
[3812]	<210>	231		
[3813]	<211>	733		
[3814]	<212>	PRT		
[3815]	<213>	Artificial sequence		
[3816]	<220>			
[3817]	<223>	synthetic GFP - linker - P2A - Myc Tag - IL7Ra IncPPCL		
[3818]		codon(exceptP2A) and splice optimized		
[3819]	<400>	231		
[3820]	Met Ser Gly Gly Glu Glu Leu Phe Ala Gly Ile Val Pro Val Leu Ile			
[3821]	1	5	10	15

[3822]	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	His	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Arg	Gly	Glu
[3823]				20					25					30		
[3824]	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Asp	Tyr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Phe	Ile	Cys
[3825]			35					40					45			
[3826]	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu
[3827]		50					55					60				
[3828]	Cys	Tyr	Gly	Ile	Gln	Cys	Phe	Ala	Arg	Tyr	Pro	Glu	His	Met	Lys	Met
[3829]	65				70				75					80		
[3830]	Asn	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gln	Glu	Arg
[3831]				85					90					95		
[3832]	Thr	Ile	Gln	Phe	Gln	Asp	Asp	Gly	Lys	Tyr	Lys	Thr	Arg	Gly	Glu	Val
[3833]			100					105					110			
[3834]	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Lys
[3835]		115					120					125				
[3836]	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Ser
[3837]	130					135					140					
[3838]	Phe	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Arg	Pro	Asp	Lys	Ala	Asn	Asn	Gly
[3839]	145				150				155					160		
[3840]	Leu	Glu	Ala	Asn	Phe	Lys	Thr	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Gly	Gly	Gly	Val
[3841]				165					170					175		
[3842]	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Thr	Asn	Val	Pro	Leu	Gly	Asp	Gly	Pro
[3843]			180					185					190			
[3844]	Val	Leu	Ile	Pro	Ile	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Thr	Lys	Ile	Ser
[3845]		195				200					205					
[3846]	Lys	Asp	Arg	Asn	Glu	Ala	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Ser	Phe
[3847]	210				215				220							
[3848]	Ser	Ala	Cys	Cys	His	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gly	Ser
[3849]	225				230				235					240		
[3850]	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu
[3851]			245					250					255			
[3852]	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	Thr	Phe	Gly	Met	Val	Phe
[3853]			260					265					270			
[3854]	Ser	Leu	Leu	Gln	Val	Val	Ser	Gly	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu
[3855]		275				280						285				
[3856]	Asp	Leu	Glu	Ser	Gly	Tyr	Ala	Gln	Asn	Gly	Asp	Leu	Glu	Asp	Ala	Glu
[3857]	290				295				300							
[3858]	Leu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Phe	Ser	Cys	Tyr	Ser	Gln	Leu	Glu	Val	Asn	Gly
[3859]	305				310				315					320		
[3860]	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Ile
[3861]			325					330					335			
[3862]	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Val	Lys	Cys
[3863]			340					345					350			

[3864]	Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys	
[3865]	355	360 365
[3866]	Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys	
[3867]	370	375 380
[3868]	Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys Pro Glu	
[3869]	385	390 395 400
[3870]	Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Val Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe	
[3871]	405	410 415
[3872]	Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val Lys Val	
[3873]	420	425 430
[3874]	Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn Lys Trp	
[3875]	435	440 445
[3876]	Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln Arg Lys	
[3877]	450	455 460
[3878]	Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp	
[3879]	465	470 475 480
[3880]	His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe	
[3881]	485	490 495
[3882]	Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro Ile Leu	
[3883]	500	505 510
[3884]	Leu Pro Pro Cys Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala	
[3885]	515	520 525
[3886]	Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro	
[3887]	530	535 540
[3888]	Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu	
[3889]	545	550 555 560
[3890]	Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser	
[3891]	565	570 575
[3892]	Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp	
[3893]	580	585 590
[3894]	Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu	
[3895]	595	600 605
[3896]	Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro	
[3897]	610	615 620
[3898]	Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser	
[3899]	625	630 635 640
[3900]	Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu	
[3901]	645	650 655
[3902]	Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro	
[3903]	660	665 670
[3904]	His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr	
[3905]	675	680 685

[3906]	Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro
[3907]	690 695 700
[3908]	Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu
[3909]	705 710 715 720
[3910]	Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
[3911]	725 730
[3912]	<210> 232
[3913]	<211> 572
[3914]	<212> PRT
[3915]	<213> Artificial sequence
[3916]	<220>
[3917]	<223> synthetic GFP - linker - P2A - IL7RaSP - Myc Tag - IL7RaIncPPCL
[3918]	C-terminal truncation codon(exceptP2A) and splice
[3919]	<400> 232
[3920]	Met Ser Gly Gly Glu Glu Leu Phe Ala Gly Ile Val Pro Val Leu Ile
[3921]	1 5 10 15
[3922]	Glu Leu Asp Gly Asp Val His Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu
[3923]	20 25 30
[3924]	Gly Glu Gly Asp Ala Asp Tyr Gly Lys Leu Glu Ile Lys Phe Ile Cys
[3925]	35 40 45
[3926]	Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
[3927]	50 55 60
[3928]	Cys Tyr Gly Ile Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Glu His Met Lys Met
[3929]	65 70 75 80
[3930]	Asn Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Ile Gln Glu Arg
[3931]	85 90 95
[3932]	Thr Ile Gln Phe Gln Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Gly Glu Val
[3933]	100 105 110
[3934]	Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Lys
[3935]	115 120 125
[3936]	Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Ser
[3937]	130 135 140
[3938]	Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Arg Pro Asp Lys Ala Asn Asn Gly
[3939]	145 150 155 160
[3940]	Leu Glu Ala Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Gly Gly Gly Val
[3941]	165 170 175
[3942]	Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Thr Asn Val Pro Leu Gly Asp Gly Pro
[3943]	180 185 190
[3944]	Val Leu Ile Pro Ile Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Thr Lys Ile Ser
[3945]	195 200 205
[3946]	Lys Asp Arg Asn Glu Ala Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Ser Phe
[3947]	210 215 220

[3948]	Ser Ala Cys Cys His Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Arg Gly Ser		
[3949]	225	230	235 240
[3950]	Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu		
[3951]		245	250 255
[3952]	Asn Pro Gly Pro Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe		
[3953]		260	265 270
[3954]	Ser Leu Leu Gln Val Val Ser Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu		
[3955]		275	280 285
[3956]	Asp Leu Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu		
[3957]		290	295 300
[3958]	Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val Asn Gly		
[3959]	305	310	315 320
[3960]	Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val Asn Ile		
[3961]		325	330 335
[3962]	Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val Lys Cys		
[3963]		340	345 350
[3964]	Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys		
[3965]		355	360 365
[3966]	Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys		
[3967]		370	375 380
[3968]	Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys Pro Glu		
[3969]	385	390	395 400
[3970]	Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Val Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe		
[3971]		405	410 415
[3972]	Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val Lys Val		
[3973]		420	425 430
[3974]	Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn Lys Trp		
[3975]		435	440 445
[3976]	Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln Arg Lys		
[3977]		450	455 460
[3978]	Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp		
[3979]	465	470	475 480
[3980]	His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe		
[3981]		485	490 495
[3982]	Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro Ile Leu		
[3983]		500	505 510
[3984]	Leu Pro Pro Cys Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala		
[3985]		515	520 525
[3986]	Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro		
[3987]		530	535 540
[3988]	Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu		
[3989]	545	550	555 560

[3990]	Cys Lys Lys Pro Arg Lys Val Ser Val Phe Gly Ala
[3991]	565 570
[3992]	<210> 233
[3993]	<211> 562
[3994]	<212> PRT
[3995]	<213> Artificial sequence
[3996]	<220>
[3997]	<223> synthetic GFP - linker - P2A - IL7RaSP - IL7RaIncPPCL C-terminal
[3998]	truncation codon(exceptP2A) and splice optimized
[3999]	<400> 233
[4000]	Met Ser Gly Gly Glu Glu Leu Phe Ala Gly Ile Val Pro Val Leu Ile
[4001]	1 5 10 15
[4002]	Glu Leu Asp Gly Asp Val His Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu
[4003]	20 25 30
[4004]	Gly Glu Gly Asp Ala Asp Tyr Gly Lys Leu Glu Ile Lys Phe Ile Cys
[4005]	35 40 45
[4006]	Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
[4007]	50 55 60
[4008]	Cys Tyr Gly Ile Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Glu His Met Lys Met
[4009]	65 70 75 80
[4010]	Asn Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Ile Gln Glu Arg
[4011]	85 90 95
[4012]	Thr Ile Gln Phe Gln Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Gly Glu Val
[4013]	100 105 110
[4014]	Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Lys
[4015]	115 120 125
[4016]	Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Ser
[4017]	130 135 140
[4018]	Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Arg Pro Asp Lys Ala Asn Asn Gly
[4019]	145 150 155 160
[4020]	Leu Glu Ala Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Gly Gly Gly Val
[4021]	165 170 175
[4022]	Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Thr Asn Val Pro Leu Gly Asp Gly Pro
[4023]	180 185 190
[4024]	Val Leu Ile Pro Ile Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Thr Lys Ile Ser
[4025]	195 200 205
[4026]	Lys Asp Arg Asn Glu Ala Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Ser Phe
[4027]	210 215 220
[4028]	Ser Ala Cys Cys His Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Arg Gly Ser
[4029]	225 230 235 240
[4030]	Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu
[4031]	245 250 255

[4032]	Asn Pro Gly Pro Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe		
[4033]		260	265 270
[4034]	Ser Leu Leu Gln Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly		
[4035]		275	280 285
[4036]	Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser		
[4037]		290	295 300
[4038]	Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu		
[4039]		305	310 315 320
[4040]	Asp Pro Asp Val Asn Ile Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala		
[4041]		325	330 335
[4042]	Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr		
[4043]		340	345 350
[4044]	Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys		
[4045]		355	360 365
[4046]	Val Lys Val Gly Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr		
[4047]		370	375 380
[4048]	Thr Ile Val Lys Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Val Tyr Arg		
[4049]		385	390 395 400
[4050]	Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln		
[4051]		405	410 415
[4052]	Lys Lys Tyr Val Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu		
[4053]		420	425 430
[4054]	Lys Asp Glu Asn Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu		
[4055]		435	440 445
[4056]	Thr Leu Leu Gln Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys		
[4057]		450	455 460
[4058]	Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp		
[4059]		465	470 475 480
[4060]	Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly		
[4061]		485	490 495
[4062]	Glu Met Asp Pro Ile Leu Leu Pro Pro Cys Leu Thr Ile Ser Ile Leu		
[4063]		500	505 510
[4064]	Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp		
[4065]		515	520 525
[4066]	Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys		
[4067]		530	535 540
[4068]	Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Val Ser Val Phe		
[4069]		545	550 555 560
[4070]	Gly Ala		
[4071]	<210>	234	
[4072]	<211>	824	
[4073]	<212>	PRT	

[4074] <213> Artificial sequence
 [4075] <220>
 [4076] <223> synthetic GFP - linker - P2A - eTag - IL7RaIncPPCL N-terminal
 [4077] deletion codon(exceptP2A) and splice optimized
 [4078] <400> 234
 [4079] Met Ser Gly Gly Glu Glu Leu Phe Ala Gly Ile Val Pro Val Leu Ile
 [4080] 1 5 10 15
 [4081] Glu Leu Asp Gly Asp Val His Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu
 [4082] 20 25 30
 [4083] Gly Glu Gly Asp Ala Asp Tyr Gly Lys Leu Glu Ile Lys Phe Ile Cys
 [4084] 35 40 45
 [4085] Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 [4086] 50 55 60
 [4087] Cys Tyr Gly Ile Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Glu His Met Lys Met
 [4088] 65 70 75 80
 [4089] Asn Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Ile Gln Glu Arg
 [4090] 85 90 95
 [4091] Thr Ile Gln Phe Gln Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Gly Glu Val
 [4092] 100 105 110
 [4093] Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Lys
 [4094] 115 120 125
 [4095] Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Ser
 [4096] 130 135 140
 [4097] Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Arg Pro Asp Lys Ala Asn Asn Gly
 [4098] 145 150 155 160
 [4099] Leu Glu Ala Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Gly Gly Gly Val
 [4100] 165 170 175
 [4101] Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Thr Asn Val Pro Leu Gly Asp Gly Pro
 [4102] 180 185 190
 [4103] Val Leu Ile Pro Ile Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Thr Lys Ile Ser
 [4104] 195 200 205
 [4105] Lys Asp Arg Asn Glu Ala Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Ser Phe
 [4106] 210 215 220
 [4107] Ser Ala Cys Cys His Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Arg Gly Ser
 [4108] 225 230 235 240
 [4109] Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu
 [4110] 245 250 255
 [4111] Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu
 [4112] 260 265 270
 [4113] Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly
 [4114] 275 280 285
 [4115] Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn

[4116]	290	295	300
[4117]	Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile		
[4118]	305	310	315
[4119]	Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu		
[4120]		325	330
[4121]	Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly		335
[4122]		340	345
[4123]	Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala		350
[4124]		355	360
[4125]	Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln		365
[4126]	370	375	380
[4127]	Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg		
[4128]	385	390	395
[4129]	Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys		
[4130]		405	410
[4131]	Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr		415
[4132]		420	425
[4133]	Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys		430
[4134]		435	440
[4135]	Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys		445
[4136]	450	455	460
[4137]	Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg		
[4138]	465	470	475
[4139]	Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg		
[4140]		485	490
[4141]	Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu		495
[4142]		500	505
[4143]	Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys		510
[4144]		515	520
[4145]	Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys		525
[4146]	530	535	540
[4147]	Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala		
[4148]	545	550	555
[4149]	Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly		560
[4150]		565	570
[4151]	Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Glu Ile		575
[4152]		580	585
[4153]	Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro Ile Leu Leu Pro Pro Cys Leu		590
[4154]		595	600
[4155]	Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile Leu		605
[4156]	610	615	620
[4157]	Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser		

[4158]	625	630	635	640
[4159]	Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg			
[4160]		645	650	655
[4161]	Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln			
[4162]		660	665	670
[4163]	Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe			
[4164]		675	680	685
[4165]	Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg			
[4166]		690	695	700
[4167]	Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val			
[4168]	705	710	715	720
[4169]	Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala			
[4170]		725	730	735
[4171]	Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser			
[4172]		740	745	750
[4173]	Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp			
[4174]		755	760	765
[4175]	Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe			
[4176]		770	775	780
[4177]	Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln			
[4178]	785	790	795	800
[4179]	Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr			
[4180]		805	810	815
[4181]	Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln			
[4182]		820		
[4183]	<210>	235		
[4184]	<211>	593		
[4185]	<212>	PRT		
[4186]	<213>	Artificial sequence		
[4187]	<220>			
[4188]	<223>	synthetic MV(ed)-HD24		
[4189]	<400>	235		
[4190]	Met Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg Pro Tyr Val Leu Leu Ala			
[4191]	1	5	10	15
[4192]	Val Leu Phe Val Met Ser Leu Ser Leu Ile Gly Leu Leu Ala Ile Ala			
[4193]		20	25	30
[4194]	Gly Ile Arg Leu His Arg Ala Ala Ile Tyr Thr Ala Glu Ile His Lys			
[4195]		35	40	45
[4196]	Ser Leu Ser Thr Asn Leu Asp Val Thr Asn Ser Ile Glu His Gln Val			
[4197]		50	55	60
[4198]	Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu Phe Lys Ile Ile Gly Asp Glu Val Gly			
[4199]	65	70	75	80

[4200]	Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe Thr Asp Leu Val Lys Phe Ile Ser Asp		
[4201]		85	90 95
[4202]	Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro Asp Arg Glu Tyr Asp Phe Arg Asp Leu		
[4203]		100	105 110
[4204]	Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro Glu Arg Ile Lys Leu Asp Tyr Asp Gln		
[4205]		115	120 125
[4206]	Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala Glu Glu Leu Met Asn Ala Leu Val Asn		
[4207]		130	135 140
[4208]	Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg Thr Thr Asn Gln Phe Leu Ala Val Ser		
[4209]		145	150 155 160
[4210]	Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro Thr Thr Ile Arg Gly Gln Phe Ser Asn		
[4211]		165	170 175
[4212]	Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp Leu Tyr Leu Ser Arg Gly Tyr Asn Val		
[4213]		180	185 190
[4214]	Ser Ser Ile Val Thr Met Thr Ser Gln Gly Met Tyr Gly Gly Thr Tyr		
[4215]		195	200 205
[4216]	Leu Val Glu Lys Pro Asn Leu Ser Ser Lys Arg Ser Glu Leu Ser Gln		
[4217]		210	215 220
[4218]	Leu Ser Met Tyr Arg Val Phe Glu Val Gly Val Ile Arg Asn Pro Gly		
[4219]		225	230 235 240
[4220]	Leu Gly Ala Pro Val Phe His Met Thr Asn Tyr Leu Glu Gln Pro Val		
[4221]		245	250 255
[4222]	Ser Asn Asp Leu Ser Asn Cys Met Val Ala Leu Gly Glu Leu Lys Leu		
[4223]		260	265 270
[4224]	Ala Ala Leu Cys His Gly Glu Asp Ser Ile Thr Ile Pro Tyr Gln Gly		
[4225]		275	280 285
[4226]	Ser Gly Lys Gly Val Ser Phe Gln Leu Val Lys Leu Gly Val Trp Lys		
[4227]		290	295 300
[4228]	Ser Pro Thr Asp Met Gln Ser Trp Val Pro Leu Ser Thr Asp Asp Pro		
[4229]		305	310 315 320
[4230]	Val Ile Asp Arg Leu Tyr Leu Ser Ser His Arg Gly Val Ile Ala Asp		
[4231]		325	330 335
[4232]	Asn Gln Ala Lys Trp Ala Val Pro Thr Thr Arg Thr Asp Asp Lys Leu		
[4233]		340	345 350
[4234]	Arg Met Glu Thr Cys Phe Gln Gln Ala Cys Lys Gly Lys Ile Gln Ala		
[4235]		355	360 365
[4236]	Leu Cys Glu Asn Pro Glu Trp Ala Pro Leu Lys Asp Asn Arg Ile Pro		
[4237]		370	375 380
[4238]	Ser Tyr Gly Val Leu Ser Val Asp Leu Ser Leu Thr Val Glu Leu Lys		
[4239]		385	390 395 400
[4240]	Ile Lys Ile Ala Ser Gly Phe Gly Pro Leu Ile Thr His Gly Ser Gly		
[4241]		405	410 415

[4242]	Met Asp Leu Tyr Lys Ser Asn His Asn Asn Val Tyr Trp Leu Thr Ile	
[4243]	420	425 430
[4244]	Pro Pro Met Lys Asn Leu Ala Leu Gly Val Ile Asn Thr Leu Glu Trp	
[4245]	435	440 445
[4246]	Ile Pro Arg Phe Lys Val Ser Pro Asn Leu Phe Thr Val Pro Ile Lys	
[4247]	450	455 460
[4248]	Glu Ala Gly Glu Asp Cys His Ala Pro Thr Tyr Leu Pro Ala Glu Val	
[4249]	465	470 475 480
[4250]	Asp Gly Asp Val Lys Leu Ser Ser Asn Leu Val Ile Leu Pro Gly Gln	
[4251]	485	490 495
[4252]	Asp Leu Gln Tyr Val Leu Ala Thr Tyr Asp Thr Ser Arg Val Glu His	
[4253]	500	505 510
[4254]	Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr Ser Pro Gly Arg Ser Phe Ser Tyr Phe	
[4255]	515	520 525
[4256]	Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile Lys Gly Val Pro Ile Glu Leu Gln Val	
[4257]	530	535 540
[4258]	Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln Lys Leu Trp Cys Arg His Phe Cys Val	
[4259]	545	550 555 560
[4260]	Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly Gly His Ile Thr His Ser Gly Met Val	
[4261]	565	570 575
[4262]	Gly Met Gly Val Ser Cys Thr Val Thr Arg Glu Asp Gly Thr Asn Arg	
[4263]	580	585 590
[4264]	Arg	
[4265]	<210> 236	
[4266]	<211> 1275	
[4267]	<212> DNA	
[4268]	<213> Mesoplasma florum	
[4269]	<400> 236	
[4270]	aaaaaaaaata aatcaatag caaatattaa gatttttaag aaataaaaaa ttaatattaa	60
[4271]	tttacaactg aatataaaag aaacttatac agggtagcat aatgggctac tgacccccgcc	120
[4272]	ttcaaaccta tttggagact ataagtga aaaccactctt taattattaa agttttctttt	180
[4273]	tatgtccaaa agacaagaag aaactttttt atttagttga atttataata agagaaaaag	240
[4274]	aaaggatatt atatggcaaa aataaaaaac caatattaca acgagtctgt ttcgccaatt	300
[4275]	gaatatgcgc aacaaggatt taaaggaaaa atgcgttcag taaactgaaa cgtagtaaat	360
[4276]	gatgaaaaag atttagaggt atgaaataga attacacaaa acttctgatt gcctgaaaaa	420
[4277]	attccagttt caaatgattt aacttcatga agaactttga caccagaatg acaagaatta	480
[4278]	attacaagaa cttttacagg attaacattg ttagatacaa ttcaagctac tgttgggtgat	540
[4279]	gtggctcaag ttcctaactc attaactgac catgaacaag taattttacac aaacttttgc	600
[4280]	tttttggttg cagttcacgc tagatcatat ggttcaatct tttcaacttt atgttcaagt	660
[4281]	gaacaaattg aagaggctca tgaatgagtt atcaatacag aaacattaca agaaagagct	720
[4282]	aaagcattaa ttccttatta tgtgaatgat gaccctttaa agtcaaaagt tgcagctgct	780
[4283]	ttaatgccag gcttcttatt atatggaggc ttctatttac cattttacct atcagctaga	840

[4284]	ggtaaattac caaacacttc agatattatt agattaatat taagagataa agttatacat	900
[4285]	aactactata gtggttataa atatcaaaag aaagttgcta aactttctcc agaaaaacaa	960
[4286]	gctgaaatga aagaatttgt ttttaaatTA ttatatgaat taatagattt agaaaaagct	1020
[4287]	tatttgaaag aattgtatga ggattttgga ttagctgatg atgctattag atttagtggt	1080
[4288]	tacaacgcag gtaaattttt acaaaattta ggttatgatt caccgtttac agaagaagaa	1140
[4289]	acaagaattg agccagaaat attcacacaa ttatcagcta gagctgatga aaaccatgat	1200
[4290]	ttcttttcag ggaatggctc atcatatatt atgggagttt cagaagaaac tgaagatgac	1260
[4291]	gattgggagt tttaa	1275
[4292]	<210>	237
[4293]	<211>	64
[4294]	<212>	RNA
[4295]	<213>	Mesoplasma florum
[4296]	<400>	237
[4297]	acuuauacag gguagcauaa ugggcuacug accccgccuu caaaccuauu uggagacuau	60
[4298]	aagu	64
[4299]	<210>	238
[4300]	<211>	69
[4301]	<212>	RNA
[4302]	<213>	Artificial sequence
[4303]	<220>	
[4304]	<223>	synthetic Deoxyguanosine riboswitch aptamer mutations
[4305]	<220>	
[4306]	<221>	misc_feature
[4307]	<222>	(10) .. (13)
[4308]	<223>	n at positions 10-13 can be A, C, G, or T
[4309]	<220>	
[4310]	<221>	misc_feature
[4311]	<222>	(27) .. (29)
[4312]	<223>	n at positions 27-29 can be A, C, G, or T
[4313]	<220>	
[4314]	<221>	misc_feature
[4315]	<222>	(31) .. (32)
[4316]	<223>	n at positions 31-32 can be A, C, G, or T
[4317]	<220>	
[4318]	<221>	misc_feature
[4319]	<222>	(33) .. (40)
[4320]	<223>	n at positions 33-40 can be A, C, G, T, or no nucleotide
[4321]	<220>	
[4322]	<221>	misc_feature
[4323]	<222>	(44) .. (46)
[4324]	<223>	n at positions 44-46 can be A, C, G, or T
[4325]	<220>	

[4326]	<221>	misc_feature	
[4327]	<222>	(57) .. (59)	
[4328]	<223>	n at positions 57-59 can be A, C, G, or T	
[4329]	<400>	238	
[4330]		acuuauacan nnnagcauaa ugggcunnnng nnnnnnnnnn gccnnnaaac cuauuunnnng	60
[4331]		acuauaagu	69
[4332]	<210>	239	
[4333]	<211>	84	
[4334]	<212>	DNA	
[4335]	<213>	Artificial sequence	
[4336]	<220>		
[4337]	<223>	synthetic Oligo library for screen	
[4338]	<220>		
[4339]	<221>	misc_feature	
[4340]	<222>	(19) .. (21)	
[4341]	<223>	n at positions 19-21 can be A, C, G, or T	
[4342]	<220>		
[4343]	<221>	misc_feature	
[4344]	<222>	(32) .. (34)	
[4345]	<223>	n at positions 32-34 can be A, C, G, or T	
[4346]	<220>		
[4347]	<221>	misc_feature	
[4348]	<222>	(38) .. (39)	
[4349]	<223>	n at positions 38-39 can be A, C, G, or T	
[4350]	<220>		
[4351]	<221>	misc_feature	
[4352]	<222>	(40) .. (47)	
[4353]	<223>	n at positions 40-47 can be A, C, G, T, or no nucleotide	
[4354]	<220>		
[4355]	<221>	misc_feature	
[4356]	<222>	(49) .. (51)	
[4357]	<223>	n at positions 49-51 can be A, C, G, or T	
[4358]	<220>		
[4359]	<221>	misc_feature	
[4360]	<222>	(65) .. (68)	
[4361]	<223>	n at positions 65-68 can be A, C, G, or T	
[4362]	<400>	239	
[4363]		cgcgcgacac ttatagtcnn naaataaggtt tnnnggcnnn nnnnnnnncnn nageccatta	60
[4364]		tgctnnnntg tataagtgcc gcc	84
[4365]	<210>	240	
[4366]	<211>	33	
[4367]	<212>	DNA	

[4368]	<213> Artificial sequence	
[4369]	<220>	
[4370]	<223> synthetic T7 promoter amplification primer	
[4371]	<400> 240	
[4372]	taatacgact cactataggg cggcacttat aca	33
[4373]	<210> 241	
[4374]	<211> 18	
[4375]	<212> DNA	
[4376]	<213> Artificial sequence	
[4377]	<220>	
[4378]	<223> synthetic Reverse amplification primer	
[4379]	<400> 241	
[4380]	cgcgcgacac ttatagtc	18
[4381]	<210> 242	
[4382]	<211> 915	
[4383]	<212> DNA	
[4384]	<213> Bacillus subtilis	
[4385]	<400> 242	
[4386]	tcaaaagcct ggcggcgcgg tcgtcagact cttttatatac gaatccccctt gaaatacgaa	60
[4387]	tgatatctaa aaaaacaaaa ttaaagtctg ggaattttta ttttcagcct atgcaagaga	120
[4388]	ttagaatctt gatataattt attacaatat aataggaaca ctcatataat cgcgtggata	180
[4389]	tggcacgcaa gtttctaccg ggcaccgtaa atgtccgact atgggtgagc aatggaaccg	240
[4390]	cacgtgtacg gttttttgtg atatcagcat tgcttgctct ttatttgagc gggcaatgct	300
[4391]	ttttttattc tcataacgga ggtagacagg atggaagcac tgaaacggaa aatagaggaa	360
[4392]	gaaggcgtcg tattatctga tcaggtattg aaagtggatt cttttttgaa tcaccaaatt	420
[4393]	gatccgctgc ttatgcagag aattggtgat gaatttgcgt ctaggtttgc aaaagacggt	480
[4394]	attacaaaaa ttgtgacaat cgaatcatca ggtatcgctc ccgctgtaat gacgggcttg	540
[4395]	aagctgggtg tgccagttgt cttcgcgaga aagcataaat cgttaacact caccgacaac	600
[4396]	ttgtgtacag cgtctgttta ttcttttacg aagcaaacag aaagccaaat cgcagtgtct	660
[4397]	gggaccacc tgtcggatca ggatcatgtg ctgattatcg atgatttttt ggcaaatgga	720
[4398]	caggcagcgc acgggcttgt gtcgattgtg aagcaagcgg gagcttctat tgcgggaatc	780
[4399]	ggcattgtta ttgaaaagtc atttcagccg ggaagagatg aacttgtaaa actgggctac	840
[4400]	cgagtggaat ctttggaag aattcagtct ttagaagaag gaaaagtgtc cttcgtagag	900
[4401]	gaggttcatt catga	915
[4402]	<210> 243	
[4403]	<211> 69	
[4404]	<212> RNA	
[4405]	<213> Bacillus subtilis	
[4406]	<400> 243	
[4407]	cacucauaua aucgcgugga uauggcacgc aaguuuacuac cgggcaccgu aaauguccga	60
[4408]	cuaugggug	69
[4409]	<210> 244	

[4410]	<211>	74	
[4411]	<212>	RNA	
[4412]	<213>	Artificial sequence	
[4413]	<220>		
[4414]	<223>	synthetic Guanosine xpt riboswitch aptamer mutations	
[4415]	<220>		
[4416]	<221>	misc_feature	
[4417]	<222>	(11) .. (14)	
[4418]	<223>	n at positions 11-14 can be A, C, G, or T	
[4419]	<220>		
[4420]	<221>	misc_feature	
[4421]	<222>	(30) .. (35)	
[4422]	<223>	n at positions 30-35 can be A, C, G, or T	
[4423]	<220>		
[4424]	<221>	misc_feature	
[4425]	<222>	(36) .. (43)	
[4426]	<223>	n at positions 36-43 can be A, C, G, T, or no nucleotide	
[4427]	<220>		
[4428]	<221>	misc_feature	
[4429]	<222>	(47) .. (49)	
[4430]	<223>	n at positions 47-49 can be A, C, G, or T	
[4431]	<220>		
[4432]	<221>	misc_feature	
[4433]	<222>	(61) .. (63)	
[4434]	<223>	n at positions 61-63 can be A, C, G, or T	
[4435]	<400>	244	
[4436]		cacucauaua nnnncgugga uauggcacgn nngnnnnnnnn nnnaccnnnu accguaaaug	60
[4437]		nnngacuaug ggug	74
[4438]	<210>	245	
[4439]	<211>	89	
[4440]	<212>	DNA	
[4441]	<213>	Artificial sequence	
[4442]	<220>		
[4443]	<223>	synthetic Oligo library for screen	
[4444]	<220>		
[4445]	<221>	misc_feature	
[4446]	<222>	(20) .. (22)	
[4447]	<223>	n at positions 20-22 can be A, C, G, or T	
[4448]	<220>		
[4449]	<221>	misc_feature	
[4450]	<222>	(34) .. (36)	
[4451]	<223>	n at positions 34-36 can be A, C, G, or T	

[4452]	<220>	
[4453]	<221>	misc_feature
[4454]	<222>	(40) .. (41)
[4455]	<223>	n at positions 40-41 can be A, C, G, or T
[4456]	<220>	
[4457]	<221>	misc_feature
[4458]	<222>	(42) .. (49)
[4459]	<223>	n at positions 42-49 can be A, C, G, T, or no nucleotide
[4460]	<220>	
[4461]	<221>	misc_feature
[4462]	<222>	(51) .. (53)
[4463]	<223>	n at positions 51-53 can be A, C, G, or T
[4464]	<220>	
[4465]	<221>	misc_feature
[4466]	<222>	(69) .. (72)
[4467]	<223>	n at positions 69-72 can be A, C, G, or T
[4468]	<400>	245
[4469]		cgcgcgacca cccatagtcn nncatttacg gtgnnnnggtn nnnnnnnnnc nnncgtgcca 60
[4470]		tatccacggn nntatatgag tggccgccc 89
[4471]	<210>	246
[4472]	<211>	34
[4473]	<212>	DNA
[4474]	<213>	Artificial sequence
[4475]	<220>	
[4476]	<223>	synthetic T7 promoter amplification primer
[4477]	<400>	246
[4478]		taatacgact cactataggg cgccactca tata 34
[4479]	<210>	247
[4480]	<211>	19
[4481]	<212>	DNA
[4482]	<213>	Artificial sequence
[4483]	<220>	
[4484]	<223>	synthetic Reverse amplification primer
[4485]	<400>	247
[4486]		cgcgcgacca cccatagtc 19
[4487]	<210>	248
[4488]	<211>	152
[4489]	<212>	RNA
[4490]	<213>	Artificial sequence
[4491]	<220>	
[4492]	<223>	synthetic Oligo 1 Transcribed RNA
[4493]	<400>	248

[4494]	gggcggcacu uauacagggg agcauaaugg gcuacugacg ccuucuaacc uauuuggaga	60
[4495]	cuauaagugu cgcgcggggc ggcacuuaua cagggguagca uauugggcua cugacgccuu	120
[4496]	caaaccuauu uggagacuau aagugucgcg cg	152
[4497]	<210>	249
[4498]	<211>	76
[4499]	<212>	DNA
[4500]	<213>	Artificial sequence
[4501]	<220>	
[4502]	<223>	synthetic Oligo 1 Synthesized template
[4503]	<400>	249
[4504]	cgcgcgacac ttatagtctc caaataggtt tgaaggcgtc agtagcccat tatgtaccc	60
[4505]	tgtataagtg ccgccc	76
[4506]	<210>	250
[4507]	<211>	79
[4508]	<212>	RNA
[4509]	<213>	Artificial sequence
[4510]	<220>	
[4511]	<223>	synthetic Oligo 2 Transcribed RNA
[4512]	<400>	250
[4513]	gggcggcacu uauacagggg agcauaaugg gcuacugacc ccgccucaa accuauuugg	60
[4514]	agacuauaag ugucgcgcg	79
[4515]	<210>	251
[4516]	<211>	79
[4517]	<212>	DNA
[4518]	<213>	Artificial sequence
[4519]	<220>	
[4520]	<223>	synthetic Oligo 2 Synthesized template
[4521]	<400>	251
[4522]	cgcgcgacac ttatagtctc caaataggtt tgaaggcggg gtcagtagcc cattatgcta	60
[4523]	ccctgtataa gtgccgccc	79
[4524]	<210>	252
[4525]	<211>	560
[4526]	<212>	PRT
[4527]	<213>	Artificial sequence
[4528]	<220>	
[4529]	<223>	synthetic DAFss-aCD3scFv (UCHT1) IgG1 Fc-CD14GPI
[4530]	<400>	252
[4531]	Met Thr Val Ala Arg Pro Ser Val Pro Ala Ala Leu Pro Leu Leu Gly	
[4532]	1 5 10 15	
[4533]	Glu Leu Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Leu Leu Cys Leu Pro Asp Ile	
[4534]	20 25 30	
[4535]	Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg	

[4536]	35	40	45
[4537]	Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn		
[4538]	50	55	60
[4539]	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr		
[4540]	65	70	75
[4541]	Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly		
[4542]	85	90	95
[4543]	Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp		
[4544]	100	105	110
[4545]	Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe		
[4546]	115	120	125
[4547]	Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[4548]	130	135	140
[4549]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly		
[4550]	145	150	155
[4551]	Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala		
[4552]	165	170	175
[4553]	Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala		
[4554]	180	185	190
[4555]	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly		
[4556]	195	200	205
[4557]	Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val		
[4558]	210	215	220
[4559]	Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala		
[4560]	225	230	235
[4561]	Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp		
[4562]	245	250	255
[4563]	Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
[4564]	260	265	270
[4565]	Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
[4566]	275	280	285
[4567]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[4568]	290	295	300
[4569]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[4570]	305	310	315
[4571]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
[4572]	325	330	335
[4573]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[4574]	340	345	350
[4575]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[4576]	355	360	365
[4577]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		

[4578]	370	375	380
[4579]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
[4580]	385	390	395 400
[4581]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
[4582]	405	410	415
[4583]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[4584]	420	425	430
[4585]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[4586]	435	440	445
[4587]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[4588]	450	455	460
[4589]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[4590]	465	470	475 480
[4591]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[4592]	485	490	495
[4593]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Val Asp Asn Leu Thr Leu Asp		
[4594]	500	505	510
[4595]	Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro His Glu Gly Ser		
[4596]	515	520	525
[4597]	Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser Thr Leu Ser Val		
[4598]	530	535	540
[4599]	Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Gly Ala Arg Gly Phe Ala		
[4600]	545	550	555 560
[4601]	<210>	253	
[4602]	<211>	276	
[4603]	<212>	PRT	
[4604]	<213>	Artificial sequence	
[4605]	<220>		
[4606]	<223>	synthetic DAFss-CD80ECD-CD16GPI	
[4607]	<400>	253	
[4608]	Met Thr Val Ala Arg Pro Ser Val Pro Ala Ala Leu Pro Leu Leu Gly		
[4609]	1	5	10 15
[4610]	Glu Leu Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Leu Leu Cys Leu Pro Val Ile		
[4611]	20	25	30
[4612]	His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys Gly His		
[4613]	35	40	45
[4614]	Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp Gln Lys		
[4615]	50	55	60
[4616]	Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn Ile Trp		
[4617]	65	70	75 80
[4618]	Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn Leu Ser		
[4619]	85	90	95

[4620]	Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Glu Cys
[4621]	100 105 110
[4622]	Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His Leu Ala
[4623]	115 120 125
[4624]	Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser Ile Ser
[4625]	130 135 140
[4626]	Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys Ser Thr
[4627]	145 150 155 160
[4628]	Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn Gly Glu
[4629]	165 170 175
[4630]	Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu Thr Glu
[4631]	180 185 190
[4632]	Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr Asn His
[4633]	195 200 205
[4634]	Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn Gln Thr
[4635]	210 215 220
[4636]	Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn Val Ser
[4637]	225 230 235 240
[4638]	Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu
[4639]	245 250 255
[4640]	Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val
[4641]	260 265 270
[4642]	Lys Thr Asn Ile
[4643]	275
[4644]	<210> 254
[4645]	<211> 533
[4646]	<212> PRT
[4647]	<213> Artificial sequence
[4648]	<220>
[4649]	<223> synthetic DAFss-IL7-DAF
[4650]	<400> 254
[4651]	Met Ala Thr Thr Met Thr Val Ala Arg Pro Ser Val Pro Ala Ala Leu
[4652]	1 5 10 15
[4653]	Pro Leu Leu Gly Glu Leu Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Leu Leu Cys
[4654]	20 25 30
[4655]	Leu Pro Ala Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu
[4656]	35 40 45
[4657]	Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu
[4658]	50 55 60
[4659]	Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His
[4660]	65 70 75 80
[4661]	Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg

[4662]	85																90				95			
[4663]	Lys	Leu	Arg	Gln	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Leu								
[4664]	100								105				110											
[4665]	His	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	Ile	Leu	Leu	Asn	Cys	Thr								
[4666]	115					120					125													
[4667]	Gly	Gln	Val	Lys	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Pro								
[4668]	130					135					140													
[4669]	Thr	Lys	Ser	Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Ser	Leu	Lys	Glu	Gln	Lys	Lys	Leu								
[4670]	145		150						155						160									
[4671]	Asn	Asp	Leu	Cys	Phe	Leu	Lys	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Ile	Lys	Thr	Cys								
[4672]	165								170				175											
[4673]	Trp	Asn	Lys	Ile	Leu	Met	Gly	Thr	Lys	Glu	His	Cys	Gly	Leu	Pro	Pro								
[4674]	180								185				190											
[4675]	Asp	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Pro	Ala	Leu	Glu	Gly	Arg	Thr	Ser	Phe	Pro								
[4676]	195					200					205													
[4677]	Glu	Asp	Thr	Val	Ile	Thr	Tyr	Lys	Cys	Glu	Glu	Ser	Phe	Val	Lys	Ile								
[4678]	210				215						220													
[4679]	Pro	Gly	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Ile	Cys	Leu	Lys	Gly	Ser	Gln	Trp	Ser								
[4680]	225		230						235						240									
[4681]	Asp	Ile	Glu	Glu	Phe	Cys	Asn	Arg	Ser	Cys	Glu	Val	Pro	Thr	Arg	Leu								
[4682]	245								250				255											
[4683]	Asn	Ser	Ala	Ser	Leu	Lys	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Gln	Asn	Tyr	Phe	Pro								
[4684]	260								265				270											
[4685]	Val	Gly	Thr	Val	Val	Glu	Tyr	Glu	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Arg	Arg	Glu								
[4686]	275					280					285													
[4687]	Pro	Ser	Leu	Ser	Pro	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	Asn	Leu	Lys	Trp	Ser								
[4688]	290			295						300														
[4689]	Thr	Ala	Val	Glu	Phe	Cys	Lys	Lys	Lys	Ser	Cys	Pro	Asn	Pro	Gly	Glu								
[4690]	305					310					315					320								
[4691]	Ile	Arg	Asn	Gly	Gln	Ile	Asp	Val	Pro	Gly	Gly	Ile	Leu	Phe	Gly	Ala								
[4692]	325								330				335											
[4693]	Thr	Ile	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Thr	Gly	Tyr	Lys	Leu	Phe	Gly	Ser	Thr								
[4694]	340								345				350											
[4695]	Ser	Ser	Phe	Cys	Leu	Ile	Ser	Gly	Ser	Ser	Val	Gln	Trp	Ser	Asp	Pro								
[4696]	355					360					365													
[4697]	Leu	Pro	Glu	Cys	Arg	Glu	Ile	Tyr	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Gln	Ile	Asp								
[4698]	370				375					380														
[4699]	Asn	Gly	Ile	Ile	Gln	Gly	Glu	Arg	Asp	His	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Gln	Ser								
[4700]	385		390						395						400									
[4701]	Val	Thr	Tyr	Ala	Cys	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Met	Ile	Gly	Glu	His	Ser								
[4702]	405								410				415											
[4703]	Ile	Tyr	Cys	Thr	Val	Asn	Asn	Asp	Glu	Gly	Glu	Trp	Ser	Gly	Pro	Pro								

[4704]	420	425	430
[4705]	Pro Glu Cys Arg Gly Lys Ser Leu Thr Ser Lys Val Pro Pro Thr Val		
[4706]	435	440	445
[4707]	Gln Lys Pro Thr Thr Val Asn Val Pro Thr Thr Glu Val Ser Pro Thr		
[4708]	450	455	460
[4709]	Ser Gln Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Pro Asn Ala Gln Ala Thr		
[4710]	465	470	475
[4711]	Arg Ser Thr Pro Val Ser Arg Thr Thr Lys His Phe His Glu Thr Thr		
[4712]	485	490	495
[4713]	Pro Asn Lys Gly Ser Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Arg Leu Leu Ser		
[4714]	500	505	510
[4715]	Gly His Thr Cys Phe Thr Leu Thr Gly Leu Leu Gly Thr Leu Val Thr		
[4716]	515	520	525
[4717]	Met Gly Leu Leu Thr		
[4718]	530		
[4719]	<210> 255		
[4720]	<211> 1823		
[4721]	<212> DNA		
[4722]	<213> Artificial sequence		
[4723]	<220>		
[4724]	<223> synthetic EF-1a promoter with miRs		
[4725]	<400> 255		
[4726]	ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg	60	
[4727]	ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt	120	
[4728]	gatgtcgtgt actggctccg cttttttccc gaggggtggg gagaaccgta tataagtga	180	
[4729]	gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgc	240	
[4730]	gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgct gccttgaatt	300	
[4731]	acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatcccagc ttcgggttg aagtgggtg	360	
[4732]	gagagttega ggcttgccg ttaaggagcc ctttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctg	420	
[4733]	cctgggcgct ggggcccgcg cgtgcgaatc tgggtggcacc ttcgcgcctg tctcgtgct	480	
[4734]	ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg ctgcgacgt ttttttctg	540	
[4735]	caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc	600	
[4736]	gcgggcggcg acggggcccc tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga	660	
[4737]	gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct	720	
[4738]	ggcctcgcgc cgccgtgtat cgccccgccc tgggcgcaa ggctggcccc gtcggcacca	780	
[4739]	gttgcgtgag cggaagatg gccgcttccc ggccctgctg caggagctc aaaatggagg	840	
[4740]	acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag taccacac aaaggaaaag ggcctttccg	900	
[4741]	tcctcagccg tcgttcatg tgactccact gactaccggg cgccgtccag gcacctgat	960	
[4742]	tagttcctgg aggttctgtg aaggtgtat gctgacatgg tacagttcaa tgggtggttt	1020	
[4743]	ggccactgac tgaccacat tgctgtacca tgtcaggaca caaggcctgt tactagcact	1080	
[4744]	cacatggaac aaatggcccc cattgtgtcc ggatgaagct cttatgttgc acggtcatct	1140	
[4745]	ggaggcttgc tgaaggctgt atgctgtcag tctgttcac tcttggcgtt ttggccactg	1200	

[4746]	actgacgcca gaaggaacag actgacagga cacaaggcct gttactagca ctcacatgga	1260
[4747]	acaaatggcc gttgccggag tcttggcagc gagagatcac tatcaactaa ctggaggctt	1320
[4748]	gctgaaggct gtatgctgaa gcgtgaagtg aatcaacggg ttttggccac tgactgaccc	1380
[4749]	gttgatactt cacgcttcag gacacaaggc ctgttactag cactcacatg gaacaaatgg	1440
[4750]	ccgtgttaat tgtccatgta gcgaggcatc cttatggcgt ggctggaggc ttgctgaagg	1500
[4751]	ctgtatgctg gcagtatcct agtacattga cgttttggcc actgactgac gtcaatgtta	1560
[4752]	ggatactgcc aggacacaag gcctgttact agcactcaca tggaacaaat ggccgctttt	1620
[4753]	ggagtacgtc gtcttttaggt tggggggagg ggttttatgc gatggagttt cccacactg	1680
[4754]	agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat gtaattctcc ttggaatttg	1740
[4755]	ccctttttga gtttggatct tggttcatc tcaagcctca gacagtggtt caaagttttt	1800
[4756]	ttcttccatt tcaggtgtcg tga	1823

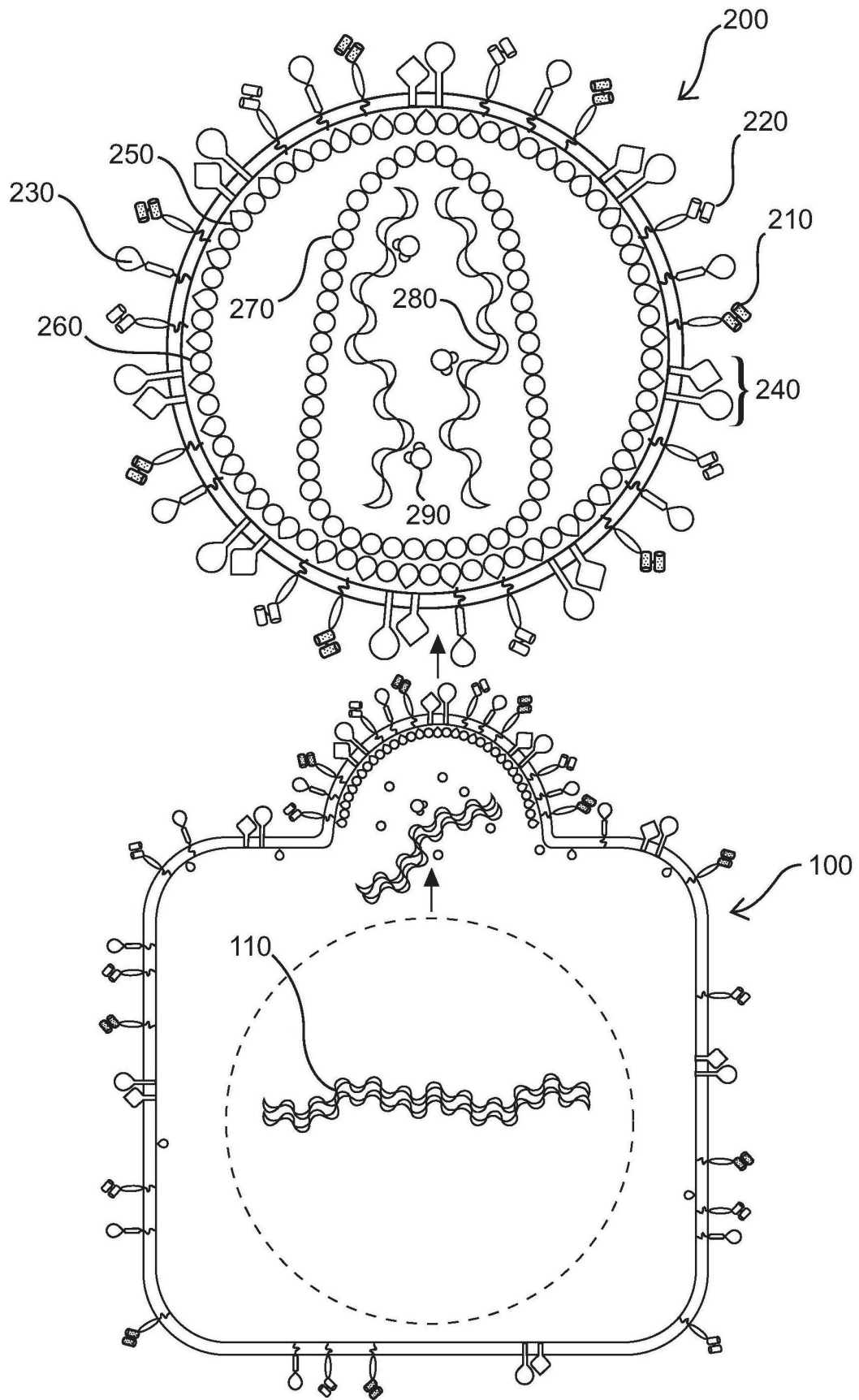


图1

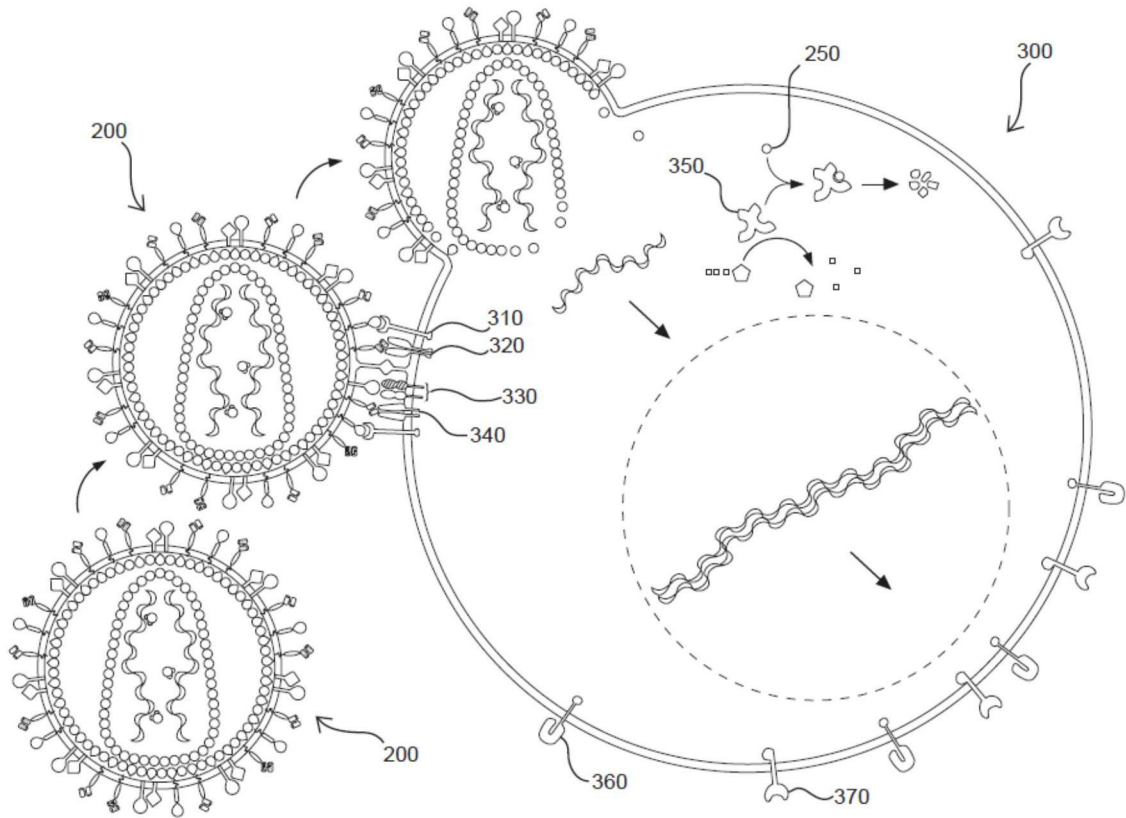


图2

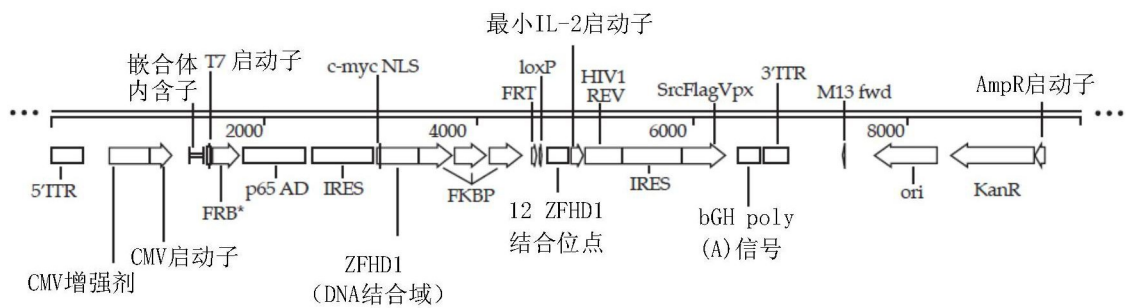


图3A

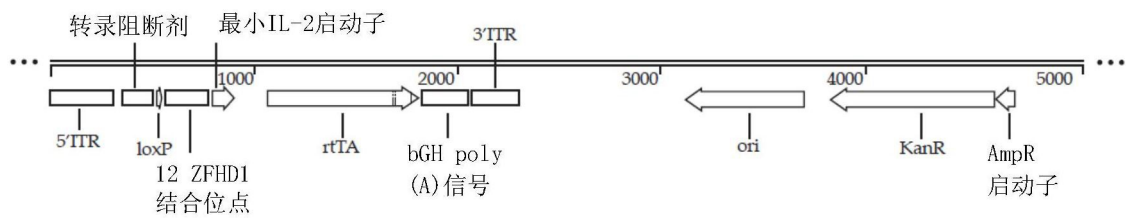


图3B

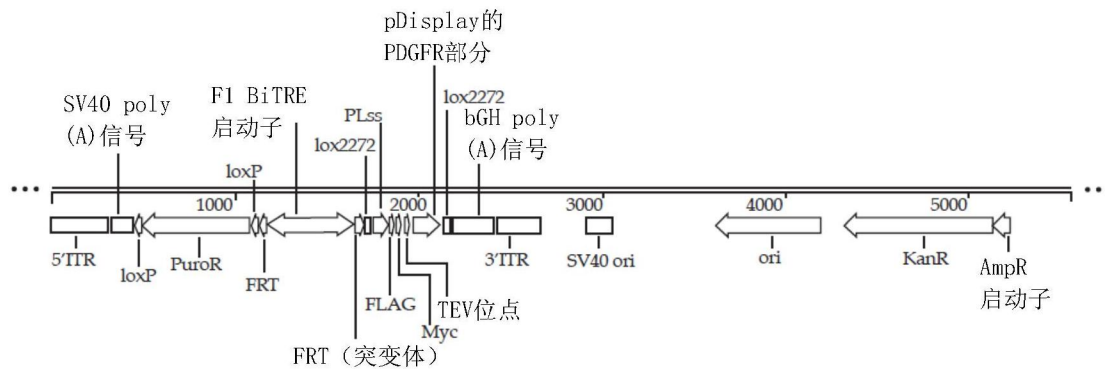


图3C

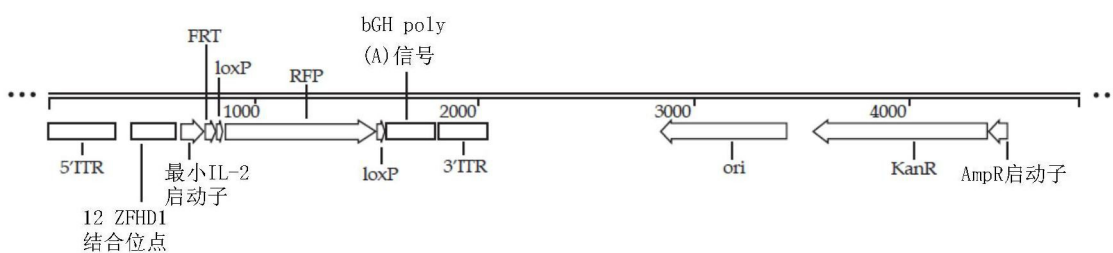


图3D

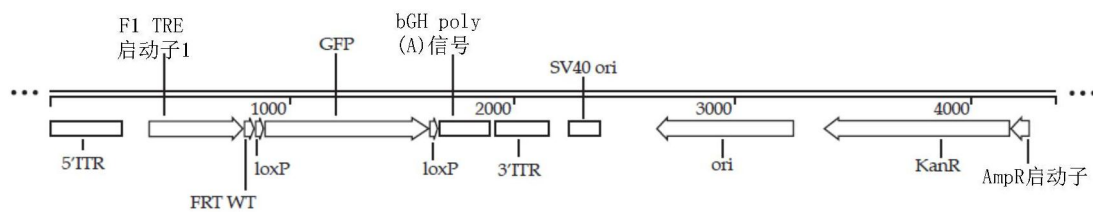


图3E

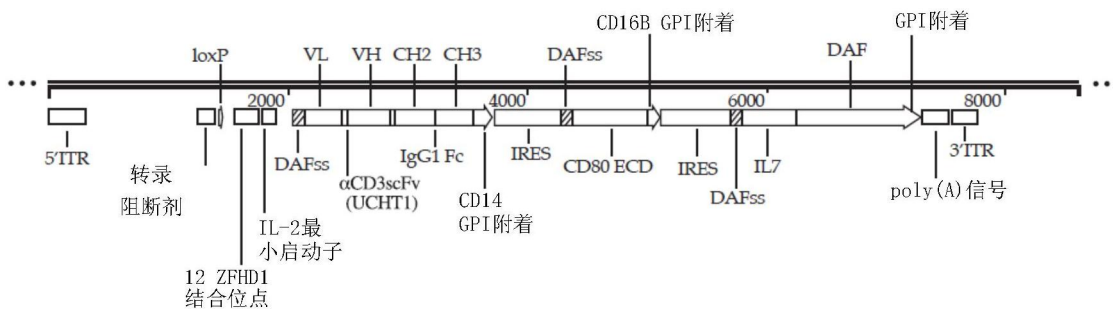


图4A

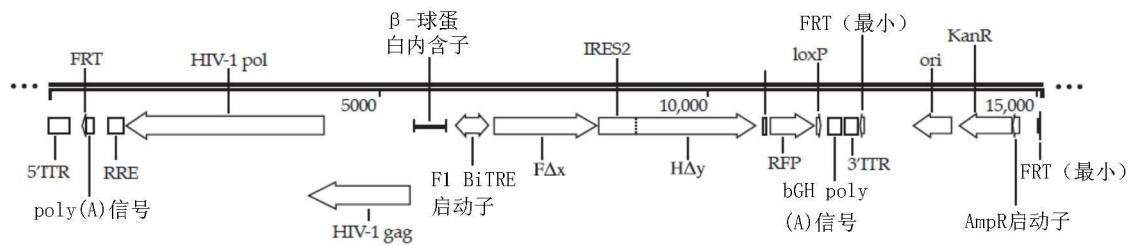


图4B

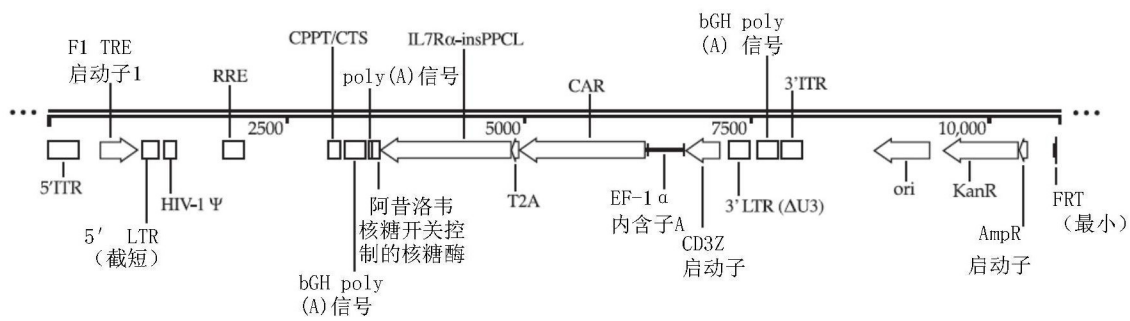
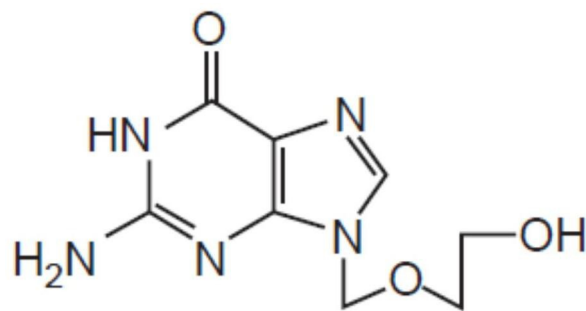
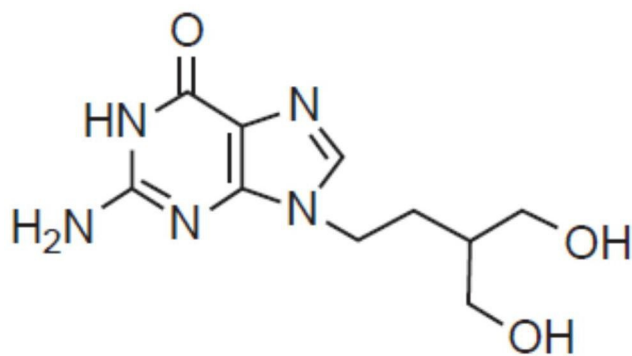


图4C



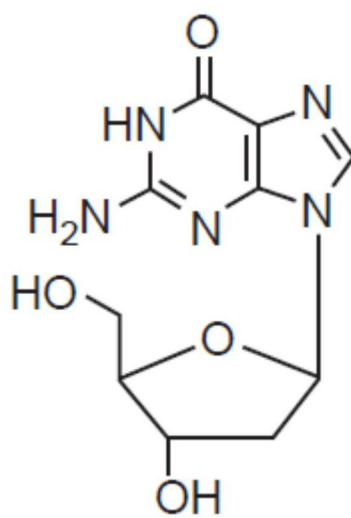
阿昔洛韦

图5A



喷昔洛韦

图5B



2'-脱氧鸟苷

图5C

aaaaaaataaaatcaatagcaaatattaagatttttaagaaataaaaaattaatattaatttacaactgaatataaaagaa**actta**
tacagggtagcataatgggctactgaccccgcccttcaaacctatttggagactataagtgaaaaaccactctttaattatta
 aagtttctttttatgtccaaaagacaagaagaaactttttatttagttgaatttataataagagaaaaagaaaggatatttatGGC
 AAAAATAAAAAACCAATATTACAACGAGTCTGTTTCGCCAATTGAATATGCGCAACAAGGATTTA
 AAGGAAAAATGCGTTCAGTAAACTGAAACGTAGTAAATGATGAAAAAGATTTAGAGGTATGAAAT
 AGAATTACACAAAACCTTCTGATTGCCTGAAAAAATTCCAGTTTCAAATGATTTAACTTCATGAAGA
 ACTTTGACACCAGAATGACAAGAATTAATTACAAGAACTTTTACAGGATTAACATTGTTAGATACA
 ATTCAAGCTACTGTTGGTGATGTGGCTCAAGTTCCTAACTCATTAACTGACCATGAACAAGTAATT
 TACACAAACTTTGCATTTATGGTTGCAGTTCACGCTAGATCATATGGTTCAATCTTTTCAACTTTAT
 GTTCAAGTGAACAAATTGAAGAGGCTCATGAATGAGTTATCAATACAGAAACATTACAAGAAAGA
 GCTAAAGCATTAATTCCTTATTATGTGAATGATGACCCTTTAAAGTCAAAAAGTTGCAGCTGCTTTA
 ATGCCAGGCTTCTTATTATATGGAGGCTTCTATTTACCATTTTACCTATCAGCTAGAGGTAAATTACC
 AAACACTTCAGATATTATTAGATTAATATTAAGAGATAAAGTTATACATACTACTATAGTGGTTATA
 AATATCAAAAGAAAGTTGCTAAACTTTCTCCAGAAAAACAAGCTGAAATGAAAGAATTTGTTTTT
 AAATTATTATATGAATTAATAGATTTAGAAAAAGCTTATTGAAAGAATTGTATGAGGATTTTGGATT
 AGCTGATGATGCTATTAGATTTAGTGTTTACAACGCAGGTAAATTTTACAAAATTTAGGTTATGAT
 TCACCGTTTACAGAAGAAGAAACAAGAATTGAGCCAGAAATATTCACACAATTATCAGCTAGAGC
 TGATGAAAACCATGATTTCTTTTCAGGGAATGGCTCATCATATATTATGGGAGTTTCAGAAGAAAC
 TGAAGATGACGATTGGGAGTTTtaa (SEQ ID NO:236)

图6

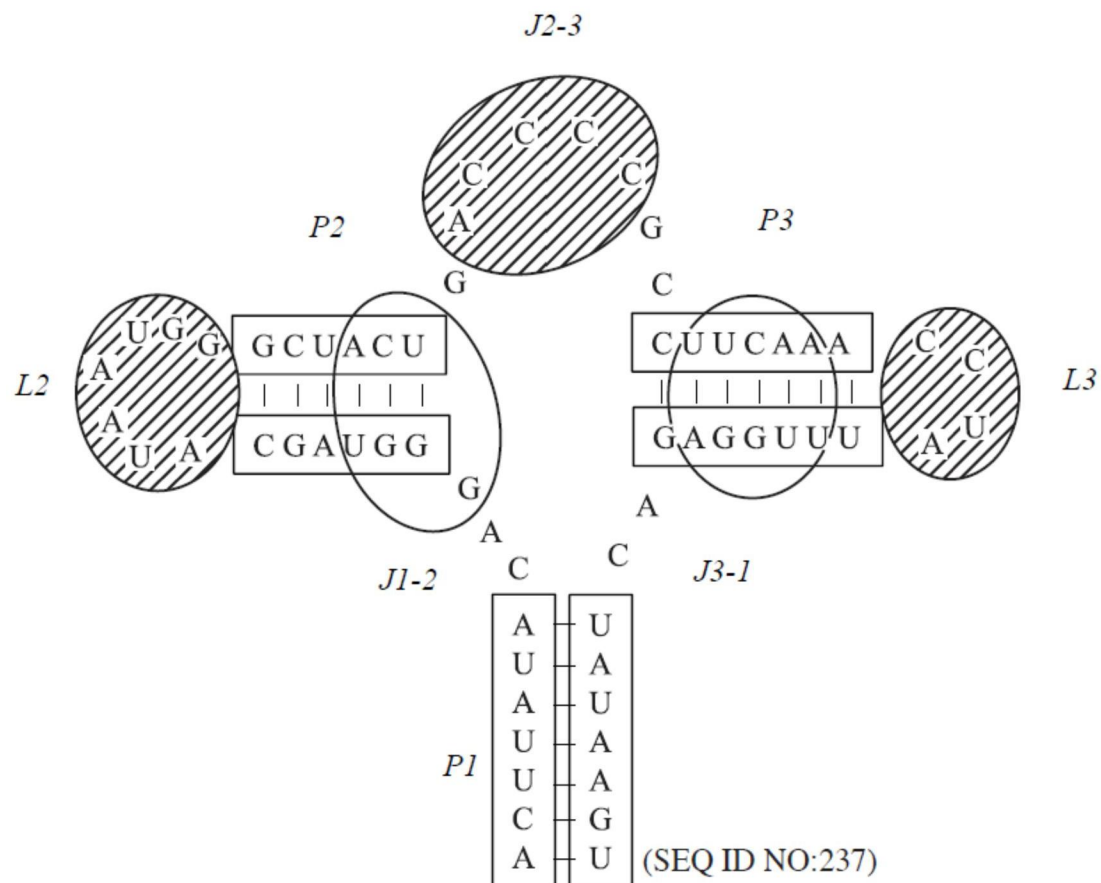


图7

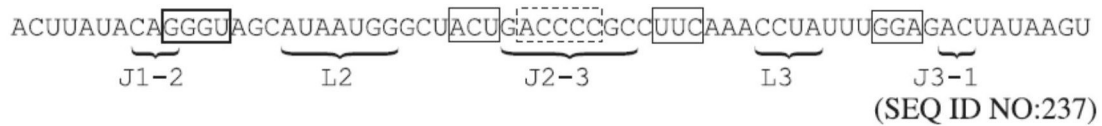


图8A

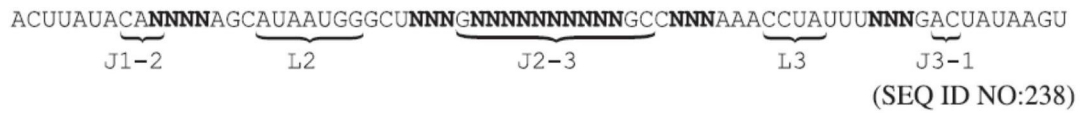


图8B

供筛选的寡核苷酸文库

CGCGCGACACTTATAGTCNNAAATAGGTTTNNNGGCNNNNNNNNNNC^{NNN}AGCCATTATGCTNNNTGTATAAGTGCCGCC
 (SEQ ID NO:239)

T7启动子扩增引物

TAATACGACTCACTATAGGGCGGCACTTATACA (SEQ ID NO:240)

反向扩增引物

CGCGCGACACTTATAGTC (SEQ ID NO:241)

图9

tcaaaagcctggcgggcgcggtcgtcagactctttatatcgaatcccctgaaatacgaatgatatactaaaaaac
 aaaattaaagtcgggaattttattttcagcctatgcaagagattagaatcttgatataattattacaataatagg
aacactcatataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaagtgtccgactatgggtg
 agcaatggaaccgcacgtgtacggtttttgtgatcagcattgcttcttatttgagcgggcaatgctttttta
 ttctcataacggaggtagacaggATGGAAGCACTGAAACGGAAAATAGAGGAAGAAGGCGTC
 GTATTATCTGATCAGGTATTGAAAGTGGATTCTTTTTGAATCACCAAATTGATCCGCTG
 CTTATGCAGAGAATTGGTGATGAATTTGCGTCTAGGTTTGCAAAAGACGGTATTACCAA
 AATTGTGACAATCGAATCATCAGGTATCGCTCCCGCTGTAATGACGGGCTTGAAGCTG
 GGTGTGCCAGTTGTCTTCGCGAGAAAGCATAAATCGTTAACTCACCGACAACCTTGC
 TGACAGCGTCTGTTTATTCTTTACGAAGCAAACAGAAAGCCAAATCGCAGTGTCTGG
 GACCCACCTGTTCGGATCAGGATCATGTGCTGATTATCGATGATTTTTTGGCAAATGGAC
 AGGCAGCGCACGGGCTTGTGTGCTGATTGTGAAGCAAGCGGGAGCTTCTATTGCGGGAA
 TCGGCATTGTTATTGAAAAGTCATTTACGCCGGGAAGAGATGAACTTGTAACCTGGG
 CTACCGAGTGGAATCTTTGGCAAGAATTCAGTCTTTAGAAGAAGGAAAAGTGTCTTC
 GTACAGGAGGTTTCATTCatga (SEQ ID NO:242)

图10

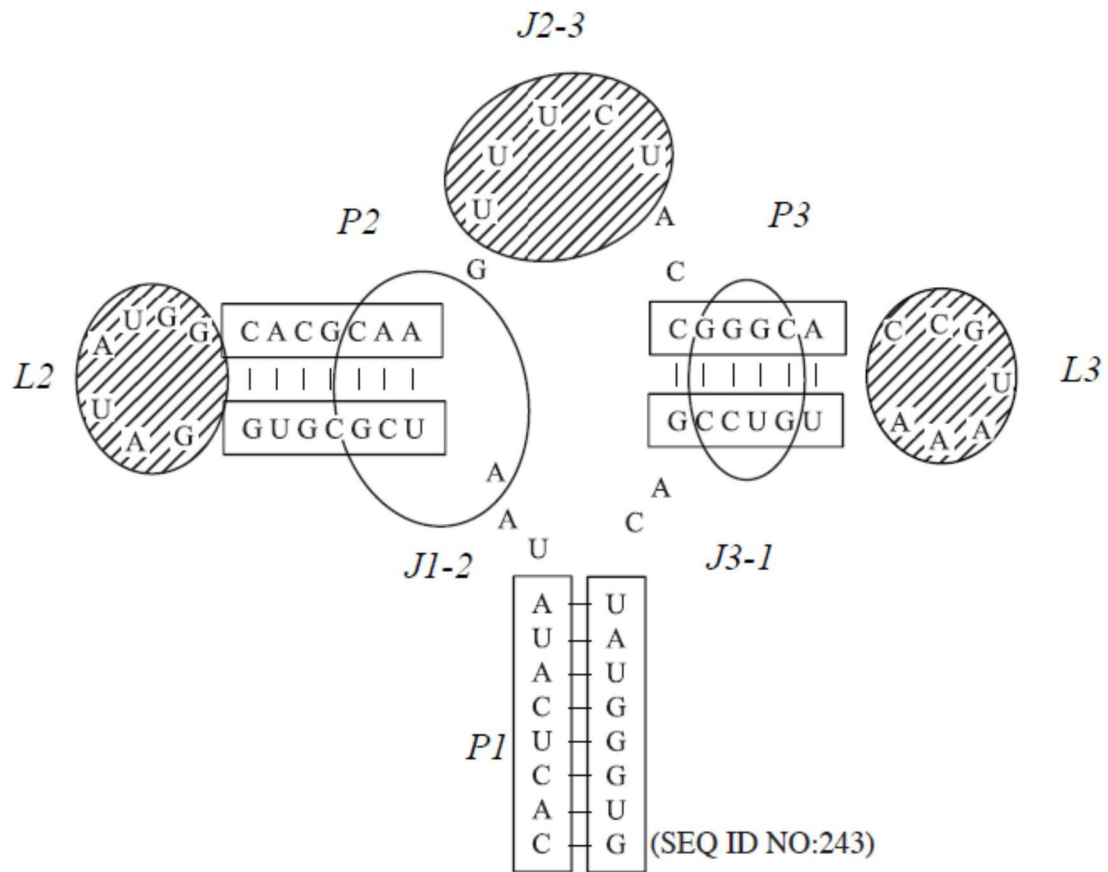


图11

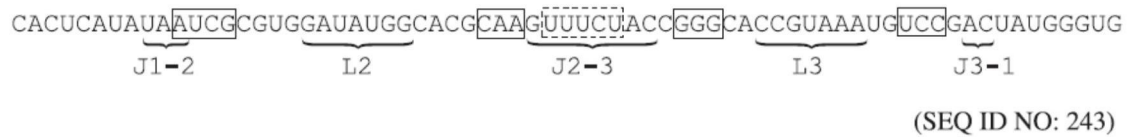


图12A

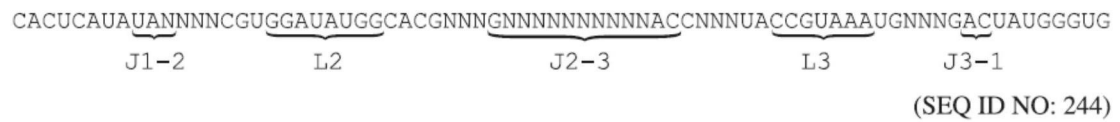


图12B

供筛选的寡核苷酸文库

CGCGCGACCA~~CC~~CATAGTCNNNCATTTACGGTGNNNGGTNNNNNNNNNNNCNNNCGTGCCATATCCACG
NNNTATATGAGTGGCCGCCC (SEQ ID NO:245)

T7启动子扩增引物

TAATACGACTCACTATAAGGGCGGCCACTCATATA (SEQ ID NO:246)

反向扩增引物

CGCGCGACCA~~CC~~CATAGTC (SEQ ID NO:247)

图13

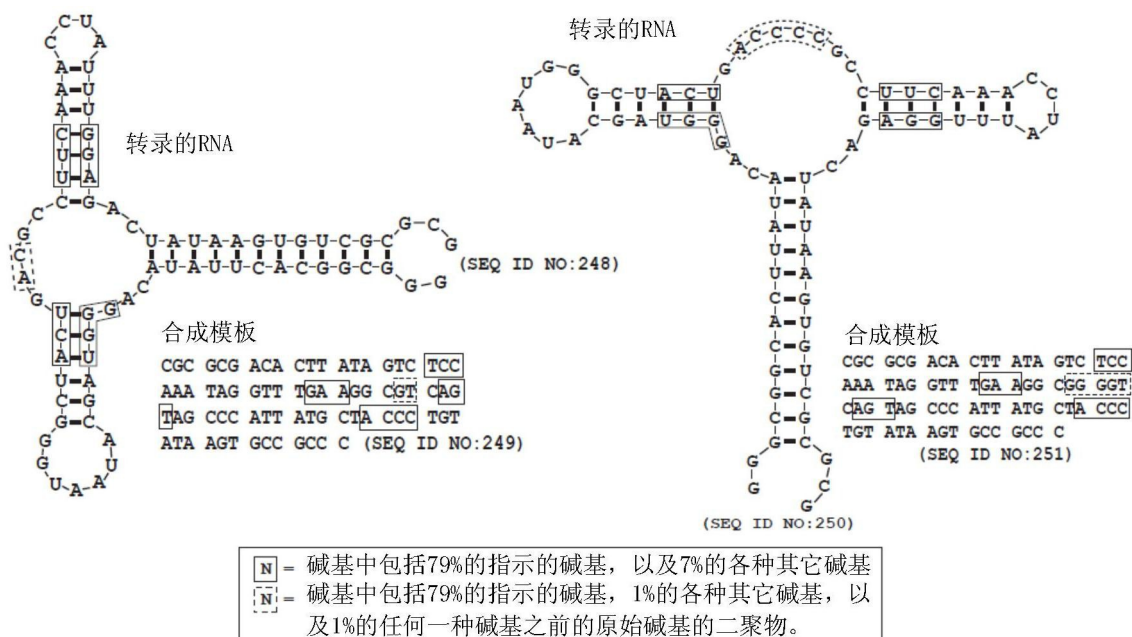


图14

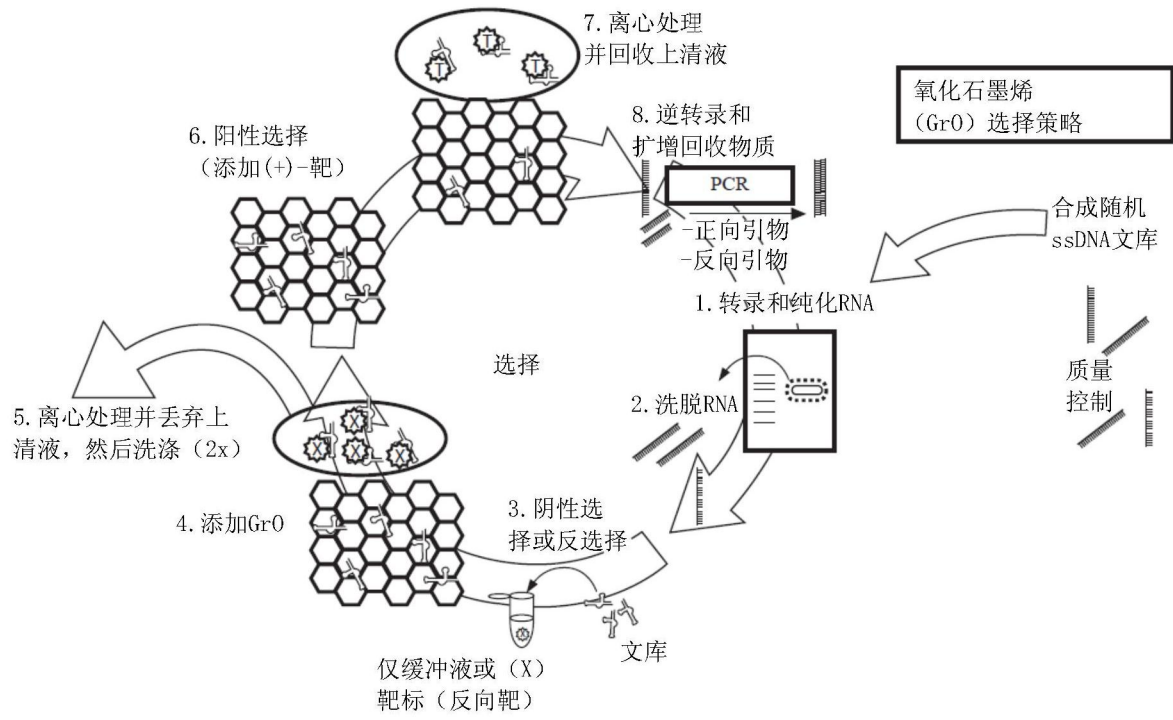


图15

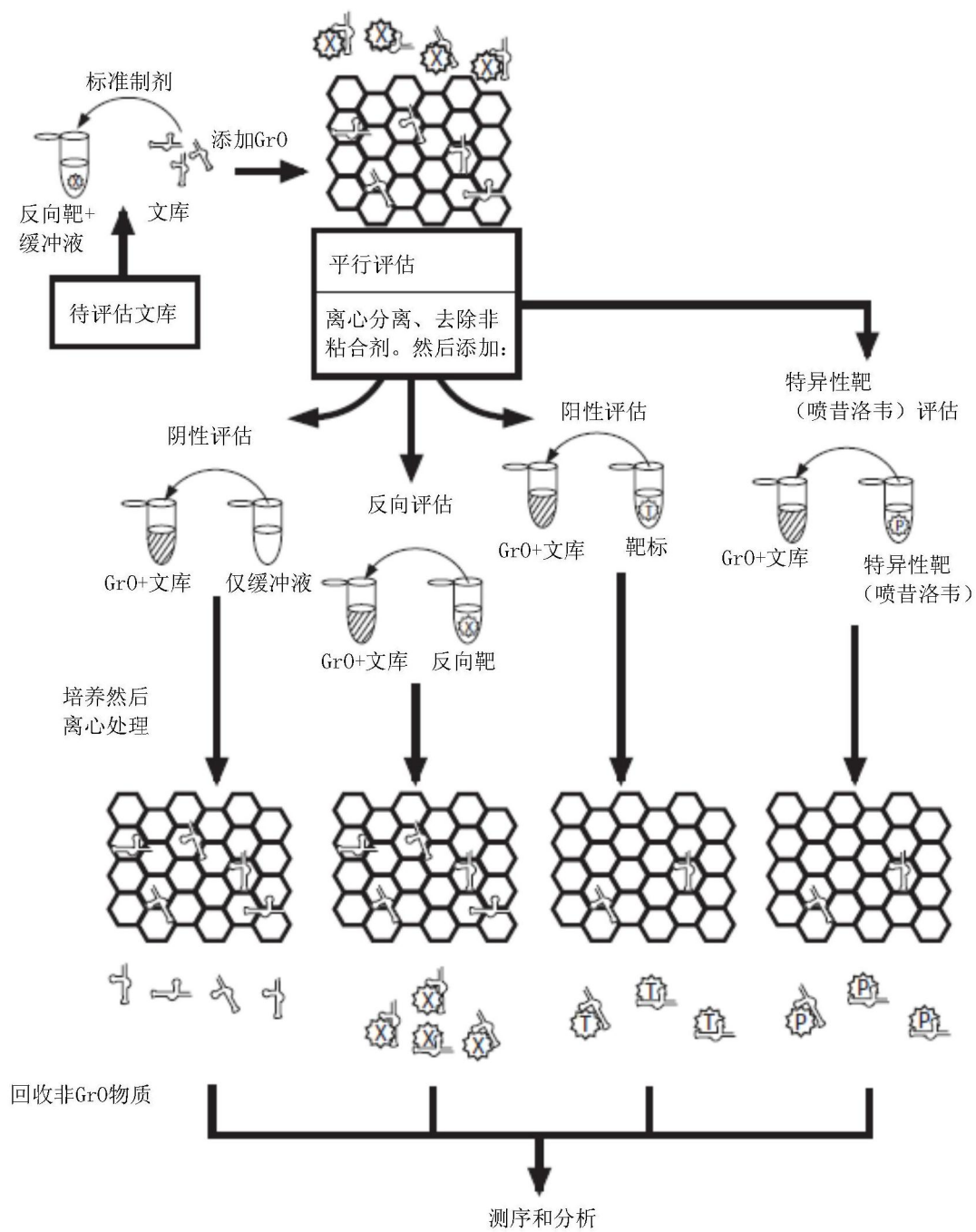


图16

F1A-795 $\Delta G = -23.30$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGC GAA GCA UAA UGG CUA CUG ACG CCC UCA AAC CCU AUU UGC AGA CUA UAA GUG UCG CGC G	F1A-996 $\Delta G = -25.50$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGG GUA GCA UAA UGG CUU AGG ACG CCU UCA AAC CUA UCA AGA CUA UAA GUG UCG CGC G	F1A-935 $\Delta G = -25.40$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGG GUA GCA UAA UGG GCU ACU UGA CGC CUU CAC CUA UUU GUA GAC UAU AAG UGU CGC GCG	F1A-946 $\Delta G = -25.10$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGC GUA GCA UAA UGG GCU GCA GAC GCC GUC AAA CCU AUU UGC AGA CUA UAA GUG UCG CGC G	F1A-961 $\Delta G = -27.40$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC ACC GUA GCA UAA UGG GCU ACU GCC GCC GUC GAC CUU UUG GAG ACU AUA AGU GUC GCG CG	F1A-769 $\Delta G = -23.70$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGG UCA GCA UAA UGU GCU AGU GCG CCU UCA AAC CUA UUU AGA GAC UAU AAG UGU CGC GCG	F1A-582 $\Delta G = -23.10$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGC UUA GCG UAA UGG CUA CUG ACG CCG UCC AAA CCU AUU UAC AGA CUA UAA GUG UCG CGC G
--	--	--	--	---	--	--

(SEQ ID NO:87)

(SEQ ID NO:88)

(SEQ ID NO:89)

(SEQ ID NO:90)

(SEQ ID NO:91)

(SEQ ID NO:92)

(SEQ ID NO:93)

图17

F1P-584 $\Delta G = -24.10$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGG GGA GCA UAA UGG GCU ACU GAC GCC UUU AAA CCU AUU UGA GGA CUA UAA GUG UCG CGC G	F1P-710 $\Delta G = -28.90$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AUG GAA GCA UAA UGG GCU GCC GAC GGC CCU UAA CCU UUG GAG ACU AUA AGU GUC GCG CG	F1P-923 $\Delta G = -23.00$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGA UUA GCA UAA UGG GCU ACU GAC CCC GCC GGC AAA CCU AUU UGA AGA CUA UAA GUG UCG CGC G	F1P-991 $\Delta G = -25.00$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGU GUA GCA UAA UGG GCU ACU GUC GCA UCA AAC CUA UUU GGA GAC UAU AAG UGU CGC GCG	F1P-837 $\Delta G = -23.70$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGU GAA GCA UAA UGG GCU ACU GAC ACC CUU AAA CCU AUU UGC AGA CUA UAA GUG UCG CGC G	F1P-718 $\Delta G = -25.00$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGA GUA GCA UAA UGG GCU ACA GAC GCC GUC AAA CCU AUU UAC CGA CUA UAA GUG UCG CGC G	F1P-932 $\Delta G = -27.70$ kcal/mol 序列 (5'->3'): GGG CGG CAC UUA UAC AGG GUG CAU AAU GGG CUA GUG ACG CCU UCA AAC CUA UUU GUA GAC UAU AAG UGU CGC GCG
--	---	--	--	--	--	--

(SEQ ID NO:94) (SEQ ID NO:95) (SEQ ID NO:96) (SEQ ID NO:97) (SEQ ID NO:98) (SEQ ID NO:99) (SEQ ID NO:100)

图18

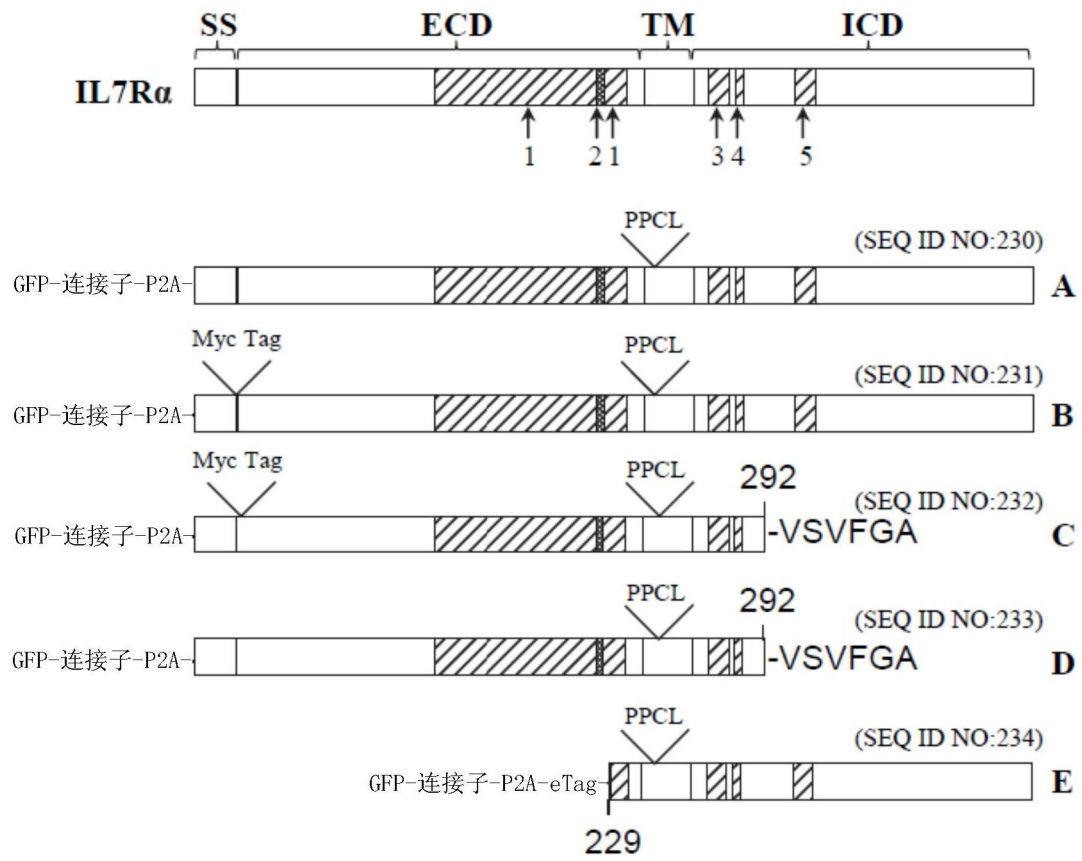


图19A

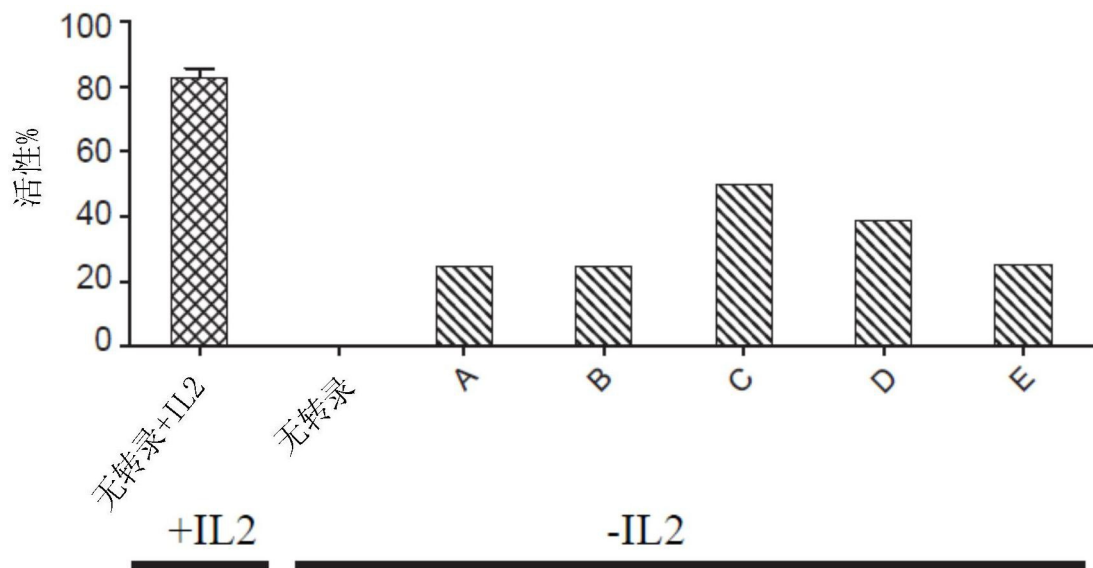


图19B

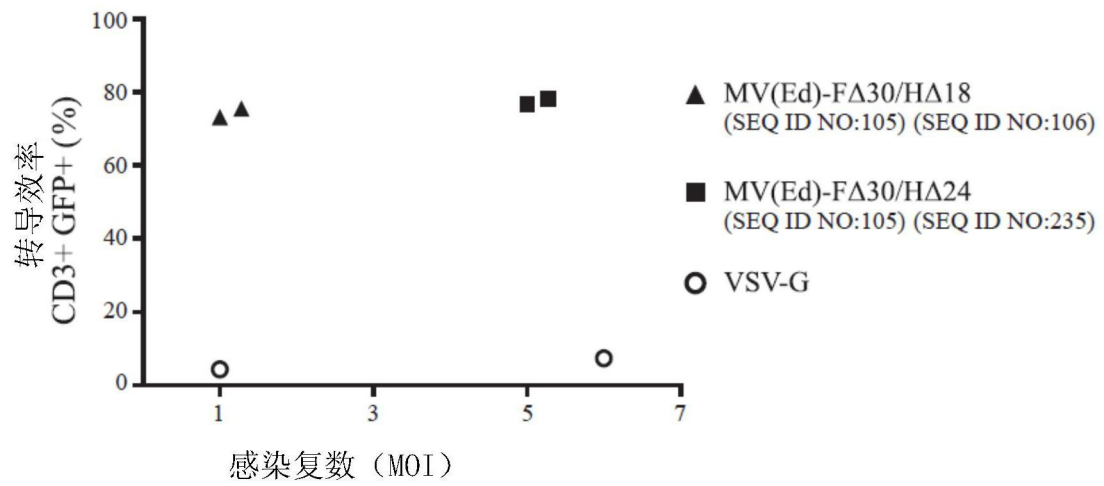


图20

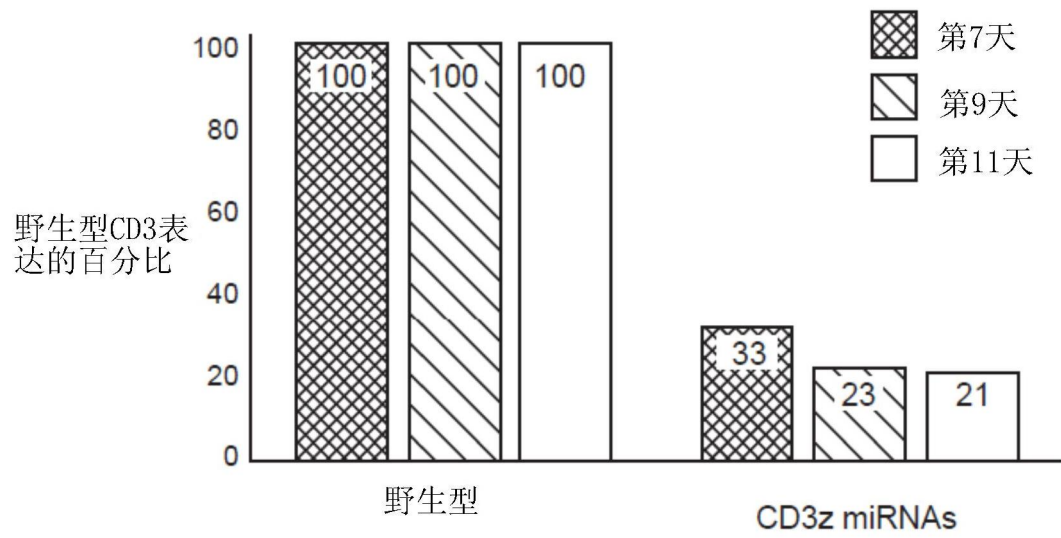


图21