



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110770338 A

(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201880039828.4

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

(22)申请日 2018.06.15

司 31100

(30)优先权数据

代理人 余颖 杨昀

62/521,274 2017.06.16 US

(51)Int.Cl.

62/633,461 2018.02.21 US

C12N 9/10(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 15/113(2006.01)

2019.12.13

C12N 15/86(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12N 5/0783(2006.01)

PCT/US2018/037924 2018.06.15

G01N 33/573(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/232359 EN 2018.12.20

(71)申请人 美国基因技术国际有限公司

权利要求书4页 说明书69页 附图29页

地址 美国马里兰州

(72)发明人 C·D·鲍扎 T·劳森 李海山

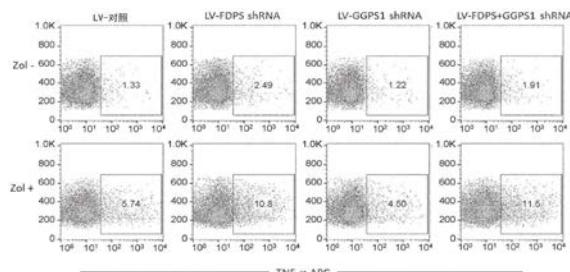
刘美龄 肖玲芝

(54)发明名称

由人 γ - δ T细胞激活肿瘤细胞毒性的方法
和组合物

(57)摘要

当前公开总体上涉及用于活化 γ - δ (GD)T
细胞的方法和组合物。所述方法和组合物可用于
治疗癌症。



1. 一种病毒载体,其包含第一和第二编码遗传元件,所述第一编码遗传元件包含至少一个小RNA,所述小RNA能够抑制甲羟戊酸通路所涉至少一种酶的产生,并且所述第二编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一。

2. 如权利要求1所述的病毒载体,还包含第三编码遗传元件,所述第三编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一。

3. 如权利要求2所述的病毒载体,还包含第四编码遗传元件,所述第四编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一。

4. 如权利要求1所述的病毒载体,所述至少一种酶是法尼基二磷酸合酶 (FDPS)、香叶基香叶基二磷酸合酶1 (GGPS1)、异戊烯基二磷酸δ-异构酶1 (IDI1) 或法尼基转移酶 (F-Tase)。

5. 如权利要求1所述的病毒载体,所述第一编码遗传元件包含微小RNA或shRNA。

6. 如权利要求5所述的病毒载体,所述微小RNA包含与以下序列至少80%或至少85%或至少90%或至少95%相同的序列:

a)

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAG
GAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:68) ;或

b)

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAG
GGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:69) 。

7. 如权利要求6所述的病毒载体,所述微小RNA包含:

a)

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAG
GAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:68) ;或

b)

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAG
GGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:69) 。

8. 如权利要求5所述的病毒载体,所述shRNA包含与以下序列至少80%或至少85%或至少90%或至少95%相同的序列:

a)

GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT (SEQ ID NO:1) ;

b)

GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT (SEQ ID NO:2) ;

c)

GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCTGCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO:3) ;

d)

GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:4) ;

e)

ACTTCTCAGCCTCCTCTGCCCTCGAGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTTTT (SEQ ID NO:64) ;

f) GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGAGCTCACTTCTCAGCCTCCTCTG (SEQ ID NO:65) ;

g) GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:66) ;或

h) GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:67)。

9. 如权利要求8所述的病毒载体,所述shRNA包含:

a)

GTCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT (SEQ ID NO:1) ;

b)

GCAGGATTCGTTCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT (SEQ ID NO:2) ;

c)

GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO:3) ;

d)

GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:4) ;

e)

ACTTCTCAGCCTCCTCTGCCTCGAGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTTTT (SEQ ID NO:64) ;

f) GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGAGCTCACTTCTCAGCCTCCTCTG (SEQ ID NO:65) ;

g) GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:66) ;或

h) GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:67)。

10. 如权利要求1所述的病毒载体,所述嗜乳脂蛋白家族成员包括BTN3A3、BTN3A2或BTN3A1。

11. 如权利要求1所述的病毒载体,所述嗜乳脂蛋白家族成员包括BTN3A3 (R381H)。

12. 如权利要求1所述的病毒载体,所述细胞因子包括IL-1、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-33、IL-36、TNF- α 或干扰素- γ 。

13. 如权利要求1所述的病毒载体,所述趋化因子包括CC趋化因子、CXC趋化因子、CX3C趋化因子、C趋化因子或XC趋化因子。

14. 如权利要求13所述的病毒载体,所述CC趋化因子包括RANTES。

15. 如权利要求1所述的病毒载体,所述病毒载体是慢病毒载体。

16. 一种用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统,所述系统包括:

如权利要求15所述的慢病毒载体;

至少一种包膜质粒,用于表达优化了靶细胞感染的包膜蛋白;和

至少一种辅助质粒,用于表达gag、pol和rev基因,

其中,当所述慢病毒载体、所述至少一种包膜质粒和所述至少一种

辅助质粒转染进入包装细胞,所述包装细胞生产所述慢病毒颗粒,

其中,所述慢病毒颗粒能够感染所述靶细胞并抑制所述靶细胞内甲羟戊酸通路所涉所述至少一种酶。

17. 一种能够感染靶细胞的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒包含优化了对所述靶细胞感染的包膜蛋白和权利要求15所述的慢病毒载体。

18. 如权利要求17所述的慢病毒颗粒,所述靶细胞是癌细胞。

19. 一种活化 γ δ (GD) T细胞的方法,所述方法包括:

在GD T细胞存在下用慢病毒颗粒感染靶细胞或已在GD T细胞存在下用慢病毒颗粒感染靶细胞,

其中,所述慢病毒颗粒含有病毒载体,所述病毒载体包含第一和第二编码遗传元件,

其中,所述第一编码遗传元件包含至少一个小RNA,所述小RNA能够抑制甲羟戊酸通路所涉至少一种酶的产生,并且所述第二编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一;并且

当所述至少一种酶在所述靶细胞中被抑制时,所述靶细胞激活GD T细胞。

20. 如权利要求19所述的方法,所述靶细胞是癌细胞。

21. 如权利要求19所述的方法,还包括使靶细胞和GD T细胞与一定量的氨基双膦酸类药物接触或已经使靶细胞和GD T细胞与一定量的氨基二膦酸类药物接触。

22. 如权利要求21所述的方法,所述氨基双膦酸类药物是唑来膦酸。

23. 如权利要求19或权利要求21所述的方法,所述至少一种酶是法尼基二磷酸合酶(FDPS)、香叶基香叶基二磷酸合酶1(GGPS1)、异戊烯基二磷酸δ-异构酶1(IDI1)或法尼基转移酶(F-Tase)。

24. 一种治疗对象癌症的方法,所述方法包括给予所述对象或已经给予所述对象治疗有效量的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒含有病毒载体,所述载体包含第一和第二编码遗传元件,所述第一编码遗传元件包含至少一个小RNA,所述小RNA能够抑制甲羟戊酸通路所涉至少一种酶的产生,并且所述第二编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一;当所述至少一种酶在GD T细胞存在下在癌细胞中被抑制时,所述靶细胞激活GD T细胞,由此治疗癌症。

25. 如权利要求24所述的方法,还包括给予所述对象或已经给予所述对象治疗有效量的氨基双膦酸类药物。

26. 如权利要求25所述的方法,所述氨基双膦酸类药物是唑来膦酸。

27. 如权利要求24或权利要求25所述的方法,所述至少一种酶是法尼基二磷酸合酶(FDPS)、香叶基香叶基二磷酸合酶1(GGPS1)、异戊烯基二磷酸δ-异构酶1(IDI1)或法尼基转移酶(F-Tase)。

28. 如权利要求24所述的方法,所述嗜乳脂蛋白家族成员包括BTN3A3或BTN3A3(R381H)。

29. 一种病毒载体,包含:

第一小RNA,所述第一小RNA靶向甲羟戊酸通路第一靶标并且能够增加甲羟戊酸通路第一种产物;和

第二小RNA,所述第二小RNA靶向甲羟戊酸通路第二靶标并且能够减少甲羟戊酸通路第二种产物。

30. 如权利要求29所述的病毒载体,所述第一靶标是甲羟戊酸通路第一种酶,所述第二靶标是甲羟戊酸通路第二种酶。

31. 如权利要求30所述的病毒载体,所述第一种酶和所述第二种酶中至少其一包含法尼基二磷酸合酶(FDPS)、香叶基香叶基二磷酸合酶1(GGPS1)、异戊烯基二磷酸δ-异构酶1(IDI1)或法尼基转移酶(F-Tase)。

32. 如权利要求29所述的病毒载体,所述甲羟戊酸通路第一种产物包含异戊烯基焦磷酸(IPP)。

33. 如权利要求29所述的病毒载体,所述甲羟戊酸通路第二种产物包含香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)。

34. 一种治疗对象癌症的方法,所述方法包括给予或已经给予对象治疗有效量的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒包含权利要求29所述的病毒载体。

35. 如权利要求34所述的方法,还包括给予所述对象或已经给予所述对象治疗有效量的氨基双膦酸类药物。

由人 γ - δ T细胞激活肿瘤细胞毒性的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年6月16日提交的题为“由人 γ - δ T细胞激活肿瘤细胞毒性的方法和组合物”的第62/521,274号美国临时专利申请和2018年2月21日提交的题为“由人 γ - δ T细胞激活肿瘤细胞毒性的方法和组合物”的第62/633,461号美国临时专利申请的优先权,上述临时申请均通过引用纳入本文。

技术领域

[0003] 当前公开总体上涉及基因治疗和免疫疗法领域,特别与提高 γ δ (“GD”) T细胞活化及其效应细胞功能有关。

背景技术

[0004] 人T细胞的T细胞受体结构是不同的。主要群体,包括CD4+和CD8+亚群,表达由 α 和 β 链构成的受体。较小的亚群表达由 γ 和 δ 链形成的T细胞受体。 γ δ (“GD”) T细胞构成循环淋巴细胞的3-10%,V δ 2+亚群构成血液中GD T细胞的75%。V δ 2+细胞识别非肽表位并且不需要主组织相容性复合物 (“MHC”) 或人白细胞抗原 (“HLA”) 的抗原呈递。大多数V δ 2+T细胞也表达V γ 9链,并且通过暴露于5-碳焦磷酸化合物而被激发,所述5-碳焦磷酸化合物是甲羟戊酸和非甲羟戊酸甾醇/类异戊二烯合成通路中的中间体。健康人几乎都有对异戊烯基焦磷酸 (5-碳) 的反应。

[0005] GD T细胞的另一个亚群V δ 1+占血液中循环T细胞很小的百分比,但V δ +1细胞最常见于上皮粘膜和皮肤。一些小细胞群表达其他V δ 链并可能与过敏、移植或病毒性和细菌性疾病过程中的特定反应有关。

[0006] 总体说来,GD T细胞具有多种功能,包括杀灭肿瘤细胞和被病原体感染的细胞。通过它们独特的T细胞受体 (“TCR”) 传导的刺激提高细胞毒性、细胞因子分泌及其他效应功能的能力,它们独特的T细胞受体由两条糖蛋白链 γ 和 δ 组成,这两条链与CD3复合蛋白相互作用形成功能性TCR。GD T细胞的TCR具有独特的特异性,并且这些细胞本身以高克隆频率出现,由此能够形成对肿瘤和病原体的快速先天样反应。

[0007] 双膦酸类药物和法尼基二磷酸合酶 (“FDPS”) 的其他抑制剂—它们处于甲羟戊酸通路中异戊烯基焦磷酸 (“IPP”) 的下游 (参见例如图1) —已经用于治疗各种疾病,包括癌症,特别是那些骨转移相关的疾病。双膦酸类药物包括例如 Zometa[®] (诺华)、Actonel[®] (宝洁)、Aredia[®] (诺华) 和 Fosamax[®] (默克) 等商品名。

[0008] 还对有些双膦酸盐或酯进行过用于刺激GD T细胞的研究。这可能是因为骨髓细胞或肿瘤细胞中的FDPS抑制阻止IPP向法尼基二磷酸转化,导致IPP积累同时降低了香叶基香叶基焦磷酸 (GGPP) 的水平,GGPP是FDPS的下游产物,通常情况下抑制NLRP3炎性体通路的活化。GGPP的减少消除了半胱天冬酶依赖性炎性体通路的抑制剂,允许细胞因子的分泌,包括白细胞介素-1 β 和白细胞介素-18,后者对于 γ δ T细胞活化尤其重要。

[0009] 因此,当FDPS被阻断时,IPP增加和GGPP减少改变了骨髓细胞或肿瘤细胞,被改变

的细胞令GD T细胞尤其是V δ 2+子集活化的能力提高。活化的V δ 2+细胞迅速增殖,表达多种细胞因子和趋化因子,并具有以细胞毒性方式破坏肿瘤细胞或病原体感染细胞的功能。GD T细胞的效应细胞活性包括IFN- γ 的分泌,这激活巨噬细胞和抗原呈递细胞;TNF- α 等细胞因子和趋化因子的分泌,它们激活其他先天性和获得性免疫机制;粒酶B活化,粒酶B攻击并破坏靶细胞和FasL的细胞表面表达,FasL触发Fas+靶细胞的细胞凋亡。

[0010] 传统癌症治疗的一个重要问题是患者对化疗变得不敏感。尤其,化疗抗性肿瘤细胞变得很难对付。作为治疗化疗抗性患者的替代疗法,或者作为替代化疗和/或放疗的基本疗法,本申请提出用重组慢病毒在肿瘤部位表达基因,于此操控影响GD T细胞活性的蛋白质可减缓肿瘤生长并激活患者自身的先天性免疫应答从而识别并消灭癌症。

[0011] 发明概述

[0012] 本文在一个方面公开了一种病毒载体,其包含第一和第二编码遗传元件。所述第一编码遗传元件包含至少一个小RNA,所述小RNA能够抑制甲羟戊酸通路所涉至少一种酶的产生,并且所述第二编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一。一些实施方式中,所述病毒载体还包含第三编码遗传元件,所述第三编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一。一些实施方式中,所述病毒载体还包含第四编码遗传元件,所述第四编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一。一些实施方式中,所述至少一种酶是法尼基二磷酸合酶(FDPS)、香叶基香叶基二磷酸合酶1(GGPS1)、异戊基二磷酸 δ -异构酶1(IDI1)或法尼基转移酶(F-Tase)。一些实施方式中,所述第一编码遗传元件包含微小RNA或shRNA。

[0013] 一些实施方式中,所述微小RNA包含与以下序列至少80%或至少85%或至少90%或至少95%相同的序列:AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAA GCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:68),或AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAAGCCACAGATGGCAGAAGGG CTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:69)。

[0014] 一些实施方式中,所述微小RNA包含AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCA GCCTCCTCTGCGTGAAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGG CT (SEQ ID NO:68),或AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAAGC CACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:69)。

[0015] 一些实施方式中,所述shRNA包含与以下序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少95%或超过95%相同的序列:

[0016] GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT (SEQ ID NO:1);

[0017] GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT (SEQ ID NO:2);

[0018] GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCTGCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO:3);

[0019] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:4)。一些实施方式中,所述shRNA包含与以下序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少95%或超过95%相同的序列:SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76。

- [0020] 一些实施方式中,所述shRNA包含:
- [0021] GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT (SEQ ID NO:1) ;
- [0022] GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT (SEQ ID NO:2) ;
- [0023] GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCCTGCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO:3) ;或
- [0024] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:4) 。一些实施方式中,所述shRNA包含:SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76。
- [0025] 一些实施方式中,所述嗜乳脂蛋白家族成员包括BTN3A3、BTN3A2或BTN3A1,或其变体。一些实施方式中,所述嗜乳脂蛋白家族成员包括BTN3A3 (R381H) 。一些实施方式中,所述细胞因子包括IL-1、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-33、IL-36、TNF- α 或干扰素- γ 。一些实施方式中,所述趋化因子包括CC趋化因子、CXC趋化因子、CX3C趋化因子、C趋化因子或XC趋化因子。另一些实施方式中,CC趋化因子包括RANTES。一些实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体。
- [0026] 另一方面公开了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。该系统包括本文中详细描述的慢病毒载体;至少一种包膜质粒,用于表达优化了靶细胞感染的包膜蛋白;和用于表达gag、pol和rev基因的至少一种辅助质粒;其中,当慢病毒载体、至少一种包膜质粒和至少一种辅助质粒转染进入包装细胞时,所述包装细胞生产慢病毒颗粒,其中所述慢病毒颗粒能够感染靶细胞并抑制靶细胞内甲羟戊酸通路所涉的至少一种酶。
- [0027] 另一方面公开了能够感染靶细胞的慢病毒颗粒。所述慢病毒颗粒包含优化了靶细胞感染的包膜蛋白和如本文所述的慢病毒载体。一些实施方式中,靶细胞是癌细胞。
- [0028] 另一个方面公开了活化 $\gamma\delta$ (GD) T细胞的方法。该方法包括在GD T细胞存在下用慢病毒颗粒感染靶细胞或已经在GD T细胞存在下用慢病毒颗粒感染靶细胞,所述慢病毒颗粒含有病毒载体,所述载体包含第一和第二编码遗传元件,所述第一编码遗传元件包含至少一个小RNA,所述小RNA能够抑制甲羟戊酸通路所涉至少一种酶的产生,并且所述第二编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一;当所述至少一种酶在所述靶细胞中被抑制时,所述靶细胞激活GD T细胞。一些实施方式中,靶细胞是癌细胞。一些实施方式中,所述方法还包括使靶细胞和GD T细胞与一定量的氨基双膦酸类药物接触或已经使靶细胞和GD T细胞与一定量的氨基二膦酸类药物接触。一些实施方式中,所述氨基双膦酸类药物是唑来膦酸。一些实施方式中,所述至少一种酶是法尼基二磷酸合酶 (FDPS) 、香叶基香叶基二磷酸合酶1 (GGPS1) 、异戊烯基二磷酸 δ -异构酶1 (IDI1) 或法尼基转移酶 (F-Tase) 。
- [0029] 另一方面公开了一种治疗对象癌症的方法。所述方法包括给予所述对象或已经给予所述对象治疗有效量的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒含有病毒载体,所述载体包含第一和第二编码遗传元件,所述第一编码遗传元件包含至少一个小RNA,所述小RNA能够抑制甲羟戊酸通路所涉至少一种酶的产生,并且所述第二编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一;当所述至少一种酶在癌细胞中在GD T细胞存在下被抑制时,所述靶细胞激活GD T细胞,由此治疗癌症。一些实施方式中,所述方法还包括使靶细胞和GD T细胞与一定量的氨基双膦酸类药物接触或已经使靶细胞和GD T细胞与一定量的氨基二膦酸类药物接触。一些实施方式中,所述氨基双膦酸类药物是唑来膦酸。一些实施方式中,所

述嗜乳脂蛋白家族成员包括BTN3A3 (SEQ ID NO:17) 或BTN3A3 (R381H) (SEQ ID NO:54)。另一些实施方式中,所述细胞因子包括IL-1、IL-2、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23或IL-36。

[0030] 另一方面公开了病毒载体。所述病毒载体包含第一小RNA和第二小RNA,所述第一小RNA靶向甲羟戊酸通路第一靶标并能够增加甲羟戊酸通路第一种产物,所述第二小RNA靶向甲羟戊酸通路第二靶标并能够减少甲羟戊酸通路第二种产物。一些实施方式中,所述第一靶标是甲羟戊酸通路第一种酶,所述第二靶标是甲羟戊酸通路第二种酶。一些实施方式中,所述第一种酶和第二种酶中至少其一是法尼基二磷酸合酶 (FDPS)、香叶基香叶基二磷酸合酶1 (GGPS1)、异戊烯基二磷酸δ-异构酶1 (IDI1) 或法尼基转移酶 (F-Tase)。一些实施方式中,所述甲羟戊酸通路第一种产物包含异戊烯基焦磷酸 (IPP)。一些实施方式中,所述甲羟戊酸通路第二种产物包含异香叶基香叶基焦磷酸 (GGPP)。

[0031] 另一方面公开了一种治疗对象癌症的方法。所述方法包括给予对象或已经给予对象治疗有效量的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒包含本文所述的病毒载体。一些实施方式中,所述方法还包括给予所述对象或已经给予所述对象治疗有效量的氨基双膦酸类药物。

[0032] 附图简述

[0033] 图1显示生物合成类固醇和类异戊二烯的甲羟戊酸通路中主要步骤的概要。

[0034] 图2显示环化形式的3-载体慢病毒载体系统示例。

[0035] 图3显示环化形式的4-载体慢病毒载体系统示例。

[0036] 图4显示各种慢病毒载体的线性图谱,各病毒载体表达FDPS shRNA靶向序列与BTN3A3和/或IL-2、IL-15和IL-18的组合。

[0037] 图5中的FACS数据显示含慢病毒的PC3前列腺癌细胞对V82+T细胞的活化,其中的慢病毒表达BTN3A3 (R381H) 或BTN3A3 (WT),如文中所述。

[0038] 图6中的FACS数据显示含慢病毒的HepG2细胞对V82+T细胞的活化,其中的慢病毒表达BTN3A3 (R381H) 或BTN3A3 (R381H) 和shRNA#4,如文中所述。

[0039] 图7中的FACS数据显示含慢病毒的PC3前列腺癌细胞对V82+T细胞的活化,其中的慢病毒表达BTN3A3 (R381H) 或BTN3A3 (R381H) 和shRNA#4,如文中所述。

[0040] 图8中的FACS数据显示含慢病毒的HepG2细胞对V82+T细胞的活化,其中的慢病毒表达shFDPS-IL-2,如文中所述。

[0041] 图9中的FACS数据显示含慢病毒的PC3细胞对V82+T细胞的活化,其中的慢病毒表达shFDPS-IL-2,如文中所述。

[0042] 图10中的FACS数据显示含慢病毒的PC3细胞对V82+T细胞的活化,其中的慢病毒表达shFDPS-IL-15,如文中所述。

[0043] 图11中的数据显示含慢病毒的PC3细胞和HepG2细胞的BTN3A3胞外表达,其中的慢病毒表达BTN3A3 (R381H) 或BTN3A3 (R381H) 和shFDPS。

[0044] 图12中的FACS数据显示慢病毒转导的HepG2细胞对V82+T细胞的活化,其中的慢病毒表达Lv-shFDPS,如文中所述。

[0045] 图13中的数据显示注射了慢病毒转导的PC3细胞的小鼠中肿瘤生长减缓,其中的慢病毒表达Lv-shFDPS,如文中所述。

[0046] 图14中的数据显示注射Lv-shFDPS表达性慢病毒然后接受PBMC和/或唑来膦酸处

理小鼠的生存率。

[0047] 图15中的数据显示注射Lv-shFDPS表达性慢病毒然后接受PBMC和/或唑来膦酸处理小鼠的肿瘤体积。

[0048] 图16显示经PBMC处理和未经PBMC处理的Lv-shFDPS PC3异种移植瘤大体外观。

[0049] 图17显示含有H1启动子和靶向FDPS、GGPS1或IDI1的合成shRNA序列的慢病毒载体,以及含有延长因子1 α 启动子和含FDPS靶向序列的合成微小RNA的慢病毒载体。

[0050] 图18中的数据显示经慢病毒转导并经唑来膦酸处理或未经唑来膦酸处理的HepG2细胞内FDPS蛋白表达降低,所述慢病毒表达shFDPS#1 (SEQ ID N0:1) 或shFDPS#4 (SEQ ID N0:4),如文中所述。

[0051] 图19A和19B中的数据显示慢病毒转导的PC3细胞内FDPS RNA (图19A) 和蛋白表达 (图19B) 的降低,所述慢病毒表达shFDPS-A (SEQ ID N0:64) 、shFDPS-R (SEQ ID N0:65) 、shFDPS-TT (SEQ ID N0:66) 和shFDPS-L (SEQ ID N0:67) ,如文中所述。

[0052] 图20显示慢病毒转导的HepG2细胞内FDPS蛋白表达降低,所述慢病毒表达shFDPS-4 (SEQ ID N0:4) 、miR30-FDPS-1 (SEQ ID N0:68) 和miR30-FDPS-3 (SEQ ID N0:69) ,如文中所述。

[0053] 图21中的FACS数据显示慢病毒转导并经唑来膦酸处理或未经唑来膦酸处理的THP-1细胞对V δ 2+T细胞的活化,其中的慢病毒表达miR30-FDPS#1 (SEQ ID N0:68) ,如本文所述。

[0054] 图22显示慢病毒转导的HeLa细胞内GGPS1蛋白表达降低,所述慢病毒表达shGGPS1#1 (SEQ ID N0:70) 、shGGPS1#2 (SEQ ID N0:71) 和shGGPS1#3 (SEQ ID N0:73) ,如文中所述。

[0055] 图23中的FACS数据显示经慢病毒转导并经唑来膦酸处理或未经唑来膦酸处理的PC3细胞对V δ 2+T细胞的活化,所述慢病毒表达shFDPS序列#4 (SEQ ID N0:4) 或shGGPS1序列#1 (SEQ ID N0:70) ,如本文所述。

[0056] 图24中的FACS数据显示经慢病毒转导并经唑来膦酸处理或未经唑来膦酸处理的HepG2细胞对V δ 2+T细胞的活化,所述慢病毒表达shFDPS序列#4 (SEQ ID N0:4) 或shGGPS1序列#1 (SEQ ID N0:70) ,如本文所述。

[0057] 图25中的FACS数据显示经慢病毒转导并经唑来膦酸处理或未经唑来膦酸处理的THP-1细胞对V δ 2+T细胞的活化,所述慢病毒表达shFDPS序列#4 (SEQ ID N0:4) 和/或shGGPS1序列#1 (SEQ ID N0:70) ,如本文所述。

[0058] 图26显示慢病毒转导的PC3细胞内IDI1蛋白表达降低,其中的慢病毒表达shIDI1 (SEQ ID N0:76) ,如本文所述。

[0059] 图27中的FACS数据显示经慢病毒转导的PC3细胞对V δ 2+T细胞的活化,所述慢病毒表达shFDPS序列#4 (SEQ ID N0:4) 或shIDI1序列#1 (SEQ ID N0:76) ,如文中所述。

[0060] 图28中的数据显示经唑来膦酸、FTI277或萨拉戈萨酸(zaragozic acid) 处理的THP-1细胞对V δ 2+T细胞的活化,如本文所述。

[0061] 图29中的FACS数据显示经慢病毒转导并经唑来膦酸、FTI277或萨拉戈萨酸处理的PC3细胞对V δ 2+T细胞的活化,其中的慢病毒表达shFDPS序列#4 (SEQ ID N0:4) ,如本文所述。

[0062] 图30中的FACS数据显示经慢病毒转导并经唑来膦酸、FTI277或萨拉戈萨酸处理的HepG2细胞对V82+T细胞的活化,其中的慢病毒表达shFDPS序列#4 (SEQ ID NO:4),如本文所述。

具体实施方式

[0063] 概述

[0064] 本文涉及基因治疗构建体及其向细胞的递送,导致法尼基二磷酸合酶(“FDPS”)或甲羟戊酸通路中其他酶的抑制,这些酶是异戊烯基磷酸(IPP)转化为法尼基二磷酸(FDP)以及甲羟戊酸通路的其它下游产物所必需的,例如图1所示。一些实施方式中,使一种或多种病毒载体具有靶向FDPS、GGPS1、IDI1、F-Tase或鲨烯合酶中一种或多种的微小RNA或短发卡RNA(shRNA),由此降低这些酶的表达水平。病毒载体包括慢病毒载体和AAV载体。调节FDPS及甲羟戊酸通路其他酶的表达其结果之一是要增加IPP的积累,IPP是GD T细胞增殖和分化的刺激物。调节GGPS1及甲羟戊酸通路其他酶的表达其结果之一是要降低GGPP水平,从而允许包括白介素1 β 和白介素18在内细胞因子的分泌。因此,本文提供的构建体用于活化GD T细胞并用于治疗癌症和感染性疾病。

[0065] 定义和解释

[0066] 除非另作说明,本方面所用的科技术语与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同。此外,除非另有说明,单数术语包括复数含意且复数术语包括单数含意。通常,本文中细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质及核酸化学及杂交中使用的命名和技术是本领域公知且常用的。除非另有说明,本发明的方法和技术总体遵循如本领域熟知并如各种通识或专题参考文献中所述的常规方法进行,本文全文多处引用并论及此类参考文献。参见,例如:Sambrook J.和Russell D.《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第三版,冷泉港实验室出版社,纽约冷泉港(2000);和Ausubel等人,《精编细胞生物学实验指南:当代分子生物学实验指南方法简编》(Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology),Wiley,John&Sons股份有限公司(2002);Harlow和Lane,《抗体的使用:实验手册》(Using Antibodies:A Laboratory Manual);纽约州冷泉港冷泉港实验室出版社(1998年);和Coligan等人,《精编蛋白质科学实验指南》(Short Protocols in Protein Science),Wiley,John&Sons股份有限公司(2003)。各种酶促反应或纯化技术按照生产商的说明如本领域常规实践或本文所述进行。本文所述分析化学、合成有机化学以及医学和药学化学中使用的命名以及实验室方法和技术是本领域公知且常用的。

[0067] 如说明书和所附权利要求所用,单数形式“一”和“这一”可互换使用并包括复数形式并符合每种含义,除非文本中另有明确指示。本文中,“和/或”表示并涵盖列出的一个或多个事项的任意及所有可能以及按照或选(“或”)解释时组合的缺失。

[0068] 所有指定数值例如pH、温度、时间、浓度和分子量,包括范围,都涵盖(+)或(-)0.1幅度变动的近似值。应理解,尽管并非均为明示,所有指定数值之前都有“约”。“约”在诸如“X+0.1”或“X-0.1”这样“X”的微小改变之外还包括精确的“X”值。还应理解,尽管并非均为明示,本文述及的试剂仅仅是示例性的,其等同物是本领域所知的。

[0069] 本文中，“约”是本领域普通技术人员所理解的并会视其使用所在的上下文而存在一定程度的差异。如果该词的用意结合其使用所在上下文对于本领域普通技术人员来说仍不清楚，则“约”意味某特定项的至多正负10%。

[0070] 本文中，“给药”或“施用”指将活性物质以一定的形式给予需要治疗的对象，所述形式能以治疗有用形式和治疗有效量导入个体的机体。

[0071] 本文中，“嗜乳脂蛋白3A”亦称“BTN3A”。另外，“嗜乳脂蛋白3A1”在本文中亦称“BTN3A1”，并可包括SEQ ID NO:53的BTN3A1部分。嗜乳脂蛋白3A3在本文中亦称“BTN3A3”(SEQ ID NO:17)。BTN3A3的变体包括但不限BTN3A3 (R381H)，并可包括SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:59的BTN3A3部分。“R381H”指氨基酸位第381位的精氨酸(R)被组氨酸(H)取代。氨基酸取代的这一常规表示方式在本文中亦用于其他位置、其他氨基酸。

[0072] 本文中，“CA19-9”指糖抗原19-9。本文中，“CC趋化因子”指以其氨基末端附近两个相邻半胱氨酸为特征的一类趋化因子蛋白。“CXC趋化因子”指以其氨基末端附近被一个氨基酸隔开的两个半胱氨酸为特征的一类趋化因子蛋白。“CX3C趋化因子”指以其氨基末端附近被三个氨基酸隔开的两个半胱氨酸为特征的一类趋化因子蛋白。“XC趋化因子”指以其氨基末端附近与某氨基酸相邻的一个半胱氨酸为特征的一类趋化因子蛋白。

[0073] 本文中，“CD”指分化簇蛋白。此类蛋白的例子包括但不限于CD4和CD8。举例来说，CD4+表示CD4蛋白表达阳性。

[0074] 本文中，“CEA”指癌胚抗原。

[0075] 本文中，“双膦酸盐或酯”和“双膦酸类药物”指各种实施方案的治疗剂，包括氨基双膦酸盐或酯、二膦酸盐或酯、双膦酸和二膦酸中之任选，以及它们的药学上可接受的盐和衍生物。使用任一特定的双膦酸盐或酯类物质名称并非要限定本发明的范围，除非特别指明。

[0076] 本文中，“共同给药”或“联合给药”或“联用”或“联合治疗”或类似表述指将治疗载体或慢病毒颗粒和双膦酸类药物或这些物质之任意组合施用于单独一个有此需要的对象(即患者)，并旨在包括治疗方案，所述治疗方案中药物不必按相同给药途径和/或在相同时刻给药。

[0077] 本文中，“固定组合”指实质上(essentially)以组合方式(例如基本上同时、以单个实体或剂量或是组合实体或剂型的形式(例如一片片剂或一颗胶囊的形式或多片剂或多胶囊组合或多份液体组合的形式))给予患者的两种或更多种活性成分或组分(包括各种它们的相应组合物、配方制剂或药物形式，例如治疗载体或慢病毒颗粒和双膦酸类药物或它们的任意组合)。

[0078] 本文中，“非固定组合”指作为各自独立的实体、同时(simultaneously)、并行(concurrently)或按序但没有特定时间限制地联合给予患者的两种或更多种活性成分或组分(包括各种它们的相应组合物、配方制剂或药物形式，例如治疗载体或慢病毒颗粒和双膦酸类药物或它们的任意组合)，如此给药在患者中提供治疗有效水平的活性组分。非固定组合可以各自独立给药或采用不同的固定组合给药，例如同时或在不同的时间点。活性成分可以作为各自独立的药物剂型或药物制剂给药，所述药物剂型或药物制剂可以例如彼此独立销售，带有或不带有关于联合使用可能性的标签说明。此类说明可在包装装置例如插页之类或其他信息中提供，例如提供给医生或医务人员。非固定组合，其各自的活性成分

或组分,包括其各自的任何组合物、制剂或药物形式,或其部分,可以同时或在时间上错开给药,例如就给药的任何部分而言在不同的时间点并按照相等或不同的时间间隔。可对所述时间间隔进行选择以至于就所治疗的效果而言,联合治疗时比任一活性组分单用都更有效。

[0079] 本文中,“组合”、“联合地”以及“联合治疗”总体指前文所述“固定组合”或“非固定组合”或其两者的定义和实施方式。

[0080] 本文中,过渡词“包含”在用于定义组合物和方法时表示所述组合物和方法包括列明的元素,但也不排除还包括其他元素。本文中“主要由……组成”在用于定义组合物和方法时表示所述组合物和方法包括其他元素,但仅当那些其他元素不实质性影响所述组合物或方法的基本的和新的特征时。本文中,“由……组成”在用于定义组合物和方法时表示所述组合物和方法不包括就组合物而言的任何超过痕量的其他成分元素和除主要方法步骤之外的元素。用这些过渡词定义的实施方式都属于本公开范围之内。例如,应当理解:所述方法和组合物可以包括其他步骤和组分(包含)或者或选性地包括不重要的步骤和组成(基本上由……组成)或者仅包括列明的方法步骤或组成(由……组成)。

[0081] 本文中,“表达(性)”、“表达(的)”或“编码”指多核苷酸转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。表达可以包括真核细胞中的mRNA剪接或其他形式的转录后修饰或翻译后修饰。

[0082] 本文中,“法尼基二磷酸合酶”亦称FDPS,且亦称法尼基焦磷酸合酶或FPPS。

[0083] 本文中,“伽马德耳塔T细胞”亦称“ $\gamma\delta$ T细胞”、V γ 9V82T细胞、V伽马9V德耳塔2T细胞、V γ 2V82T细胞、V伽马2V德耳塔2T细胞,或亦称GD T细胞。“ $\gamma\delta$ T细胞活化/激活”指与 $\gamma\delta$ T细胞相关的、代表此类T细胞被活化的任何可测的生物学现象。此类生物学现象的非限制性例子包括细胞因子生产增加、细胞表面蛋白组成质或量的变化、T细胞增殖增加和/或T细胞效应功能(例如杀灭靶细胞或辅助其他效应细胞杀灭靶细胞)升高。

[0084] 本文中,“F-Tase”指法尼基转移酶。

[0085] 本文中,“GGPP”指香叶基香叶基焦磷酸,亦称香叶基香叶基二磷酸。

[0086] 本文中,“GGDPS”、“GGPPS”、“GGDPS1”、“GGPS1”和“GGPPS1”指香叶基香叶基二磷酸合酶1、亦称香叶基香叶基焦磷酸合酶或香叶基香叶基-二磷酸合酶。

[0087] 本文中,“HER-2”指人表皮生长因子受体2。

[0088] 本文中,细胞因子例如“白介素2”之类也可以称为“IL-2”,“IL2”等。IL-2还可包括SEQ ID NO:56。与此相关地,“白介素15”可包括SEQ ID NO:57。与此相关地,“白介素18”可包括SEQ ID NO:58。与此相关地,“白介素23”可包括SEQ ID NO:60。与此相关地,“白介素36”可包括SEQ ID NO:61-63之任选。一般说来,前缀“IL”表示白介素。

[0089] 本文中,“IDI1”指异戊烯基二磷酸 δ -异构酶1。

[0090] 本文中,“IFN”指干扰素,术语IFN-伽马和IFN- γ 指干扰素-伽马。

[0091] 本文中,“个体”、“对象”和“患者”可互换使用,指各种个体哺乳动物对象,例如牛、犬、猫、马和/或人。

[0092] 本文中,“IPP”指异戊烯基焦磷酸。

[0093] 本文中,“M2-PK”指M2型丙酮酸激酶同工酶。

[0094] 本文中,“MHC”指主组织相容性复合物。

- [0095] 本文中,“miRNA”指微小RNA,亦称“miR”。
- [0096] 本文中,“NK细胞”或“NK受体家族”分别指“天然杀伤细胞”或“天然杀伤细胞受体家族”。
- [0097] 本文中,“包装细胞系”指可用于表达慢病毒颗粒的任何细胞系。
- [0098] 本文中,“PBMC”是指外周血单核细胞。
- [0099] 本文中,“同源性”指相同或构成保守取代的氨基酸、核酸或其类似物的百分数。同源性可以用序列比较程序例如GAP (Deveraux等,1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395) 来确定。此时,可以通过在比对中插入空位来比较与本文中序列长度相似或显著不同的序列,所述空位可用例如GAP使用的比较算法来确定。
- [0100] 本文中,“序列相同性”,也可能出现在作为非限定行举例的与某指定序列“50%相同的序列”和“具有至少80%或至少85%或至少90%或至少95%相同性”等类似表述中,指在比较窗口中序列的逐个核苷酸的相同程度或逐个氨基酸的相同程度。因此,“序列相同性百分比”可如此计算:在比较窗中比较两条最优化对齐的序列,确定两条序列上出现相同核酸碱基(例如A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)位点的数目得出匹配位点数,将匹配位点数除以比较窗中位点总数(即窗口大小),再将结果乘以100得出序列相同性百分比。用于与比对窗口对齐的序列最优化对齐可通过计算机运行的算法(威斯康星遗传软件软件包7.0版中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA(遗传计算机集团,美国威斯康星州麦迪逊市科学路(Science Drive) 575))或通过检查和各种选定方法产生的最佳对齐(即,在比较窗口中获得最高的同源性百分比)来进行。也可参考BLAST程序家族,例如Altschul等在Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997中所述。
- [0101] 本文中,就两个或更多个核酸或多肽序列而言,“百分比相同性”指,当进行比较并以最大对应性对齐时,用后文所述序列比较算法(例如BLASTP和BLASTN或本领域技术人员可用的其他算法)之一或通过视觉检查测定,具有特定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列。根据应用,“百分比相同性”可以存在于比较序列的某区域,例如功能域,或者存在于比较的两个序列的全长上。对于序列比较,一般将一条序列作为参考序列,测试序列则与之比较。使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,视必要指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法根据指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列相同性百分数。
- [0102] 用于比较的序列的最佳对齐可以例如采用Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981) 的局部同源算法、采用Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) 的同源性比对算法、采用Pearson&Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) 的相似度检索法、采用这些算法的计算机运行(威斯康星遗传软件软件包7.0版中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA(遗传计算机集团,美国威斯康星州麦迪逊市科学路(Science Drive) 575))或通过目测检查(总体见Ausubel等,见前文)来进行。
- [0103] 确定百分比序列相同性的合适算法包括BLAST算法,可见Altschul等, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) 中的描述。进行BLAST分析的软件可从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。
- [0104] 两个核苷酸序列之间的相同性百分比可用GCG软件包中的GAP程序(可从<http://>

www.gcg.com获取)来确定,采用NWSgapdna.CMP矩阵和40、50、60、70或80的空位权重以及1、2、3、4、5或6的长度权重。两个核苷酸或氨基酸序列之间的相同性百分比也可用E.Meyers和W.Miller(CABIOS,4:11-17(1989))的算法确定,该算法已被整合到ALIGN程序(版本2.0)中,采用PAM120权重残基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。此外,两个氨基酸序列之间的百分比相同性可用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法确定,该算法已经整合到GCG软件包(可从http://www.gcg.com获取)的GAP程序中,采用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0105] 本文中的核酸和蛋白质序列还可以用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索,例如由此鉴定相关序列。这样的检索可用Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行。可用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索(得分=100,字长=12)来获取与本文中核酸分子同源的核苷酸序列。可用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索(得分=50,字长=3)来获取与本文中蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获取为用于比较目的的空位比对结果,可采用Altschul等Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402(1997)中所述的空位BLAST。采用BLAST和空位BLAST程序时,可采用各程序(如XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见http://www.ncbi.nlm.nih.gov。

[0106] 本文中,“药学上可接受的”指那些化合物、材料、组合物和/或剂型,在确信的医疗判断范围内适合用于接触人体和动物的组织、器官和/或体液,不会产生过度毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症,符合合理的效益/风险比。

[0107] 本文中,“药学上可接受的运载体”表示并包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。组合物可包括药学上可接受的盐,例如酸加成盐或碱加成盐(参见例如Berge等J Pharm Sci 66:1-19)(1977)。

[0108] 本文中,“药学上可接受的盐”指化合物或其他活性成分的衍生物,其中,母本化合物或活性成分被修饰,所述修饰是通过将其现有的酸或碱部分转化为其盐形式。药学上可接受的盐的例子包括但不限于:碱性残基(如胺)的无机酸或有机酸盐;酸性残基(如羧酸)的碱金属盐或有机盐;碱金属、碱土金属、铵和单、二、三或四-C1-C30烷基取代的铵;等等。各种实施方式的药学上可接受的盐包括化合物或活性成分的常规无毒盐,例如由无毒无机酸或有机酸形成的那些。合适的有机酸是例如羧酸或磺酸,例如乙酸、琥珀酸、富马酸或甲磺酸。本文中的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的母本化合物或活性成分合成。通常,这样的盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的合适碱或酸在水或有机溶剂或此两者的混合物中反应来制备;通常,优选非水介质如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第17版,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Company, Easton,Pa.),1985,第1418页和Journal of Pharmaceutical Science,66,2(1977)中有合适盐的列表,均通过引用整体纳入本文。

[0109] 本文中,“PSA”指前列腺特异性抗原。

[0110] 本文中,“RANTES”与趋化因子(C-C基序)配体5同义,亦与CCL5同义。

[0111] 本文中,“SEQ ID NO”与“序列ID No.”同义。

[0112] 本文中,“小RNA”指非编码RNA,长度通常约200个核苷酸或更短,且具有沉默或干扰功能。一些实施方式中,小RNA长度为约175个核苷酸或更短,约150个核苷酸或更短,约

125个核苷酸或更短,约100个核苷酸或更短,或约75个核苷酸或更短。此类RNA包括微小RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA)、双链RNA (dsRNA) 和短发卡RNA (shRNA)。一些实施方式中,“小RNA”能够抑制或敲低靶基因的基因表达,一般是通过会导致靶基因mRNA被抑制或破坏的途径。

[0113] 本文中,“TCR”指T细胞受体,“TCRs”是其复数形式。

[0114] 本文中,“治疗有效量”指在合适的组合物中、在合适的剂型中、就治疗或避免给定异常、损伤、疾病或病症的患者中所见症状、进展或并发症发生而言足够量的本文活性剂。治疗有效量将取决于患者病症状态或其严重程度,以及治疗对象的年龄、体重等。治疗有效量可根据各种因素而不同,包括例如给药途径、对象的状况以及本领域技术人员理解的其他因素。

[0115] 本文中,“治疗载体”包括但不限于提及慢病毒载体和例如在本文图2和3中提及的慢病毒质粒。

[0116] 本文中,“TNF”指肿瘤坏死因子,而TNF-阿尔法或TNF- α 是指肿瘤坏死因子-阿尔法。

[0117] 本文中,“疗法”和“治疗”指按预期靶向某疾病状态并对其进行攻击,即改善或避免疾病状态。因此,具体疗法将取决于将要靶向的疾病状态以及当前或未来药物治疗和治疗方法的状态。治疗可能具有相关的毒性。

[0118] 本文中,“疗法”或“治疗”一般指试图改变接受治疗的对象的自然进程的干预,并且可以用于预防进行或在临床病理过程中进行。理想的效果包括但不限于避免疾病的发生或复发,缓解症状,遏制、减少或抑制疾病的各种直接或间接病理后果,改善或平息疾病状态,以及引起缓解或改善预后。

[0119] 本文中,“VSVG”或“VSV-G”指疱疹性口炎病毒G包膜糖蛋白。

[0120] 本文各个方面的描述

[0121] 本文在一个方面公开了一种病毒载体,其包含第一和第二编码遗传元件。所述第一编码遗传元件包含小RNA,所述小RNA能够抑制甲羟戊酸通路所涉酶的产生,并且所述第二编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一。一些实施方式中,所述病毒载体还包含第三编码遗传元件,所述第三编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一。一些实施方式中,所述病毒载体还包含第四编码遗传元件,所述第四编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一。一些实施方式中,所述酶是法尼基二磷酸合酶 (FDPS) 或其功能性变体。一些实施方式中,所述第一编码遗传元件包含微小RNA或shRNA。一些实施方式中,所述shRNA包含与以下序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少95%或更高百分比相同性的序列:

[0122] GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT (SEQ ID NO:1) ;

[0123] GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT (SEQ ID NO:2) ;

[0124] GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCCTGCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO:3) ;或

[0125] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:4) 。

[0126] 一些实施方式中,所述shRNA包含:

[0127] GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT (SEQ ID NO:1) ;

- [0128] GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT (SEQ ID NO:2) ;
- [0129] GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCCTGCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO:3) ;或
- [0130] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:4) 。
- [0131] 一些实施方式中,所述shRNA包含与以下序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的序列:SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67。
- [0132] 一些实施方式中,所述miRNA包含与以下序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的序列:SEQ ID NO:68或SEQ ID NO:69。
- [0133] 一些实施方式中,所述酶是GGPS1或其功能性变体。一些实施方式中,所述shRNA包含与以下序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的序列:SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72。
- [0134] 一些实施方式中,所述酶是IDI1或其功能性变体。一些实施方式中,所述shRNA包含与SEQ ID NO:76具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同性的序列。
- [0135] 一些实施方式中,所述酶是F-Tase或鲨烯合酶,或其功能变体。
- [0136] 一些实施方式中,所述嗜乳脂蛋白家族成员包括BTN3A3、BTN3A3或BTN3A1。一些实施方式中,所述嗜乳脂蛋白家族成员包括BTN3A3 (R381H)。一些实施方式中,所述嗜乳脂蛋白家族成员包括嗜乳脂蛋白样分子。一些实施方式中,所述嗜乳脂蛋白样分子包含BTNL3或BTNL8。一些实施方式中,所述细胞因子包括IL-1、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-33、IL-36、TNF- α 或干扰素- γ 。
- [0137] 一些实施方式中,所述趋化因子包括CC趋化因子、CXC趋化因子、CX3C趋化因子、C趋化因子或XC趋化因子。另一些实施方式中,CC趋化因子包括RANTES。一些实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体。另一些实施方式中,所述C趋化因子包括XCL1 (淋巴细胞趋化因子)。
- [0138] 另一方面公开了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。所述系统包括本文中详细描述的慢病毒载体;至少一种包膜质粒,用于表达优化了靶细胞感染的包膜蛋白;和用于表达gag、pol和rev基因或它们的功能性变体的至少一种辅助质粒;其中,当慢病毒载体、至少一种包膜质粒和至少一种辅助质粒转染进入包装细胞时,所述包装细胞生产慢病毒颗粒,其中所述慢病毒颗粒能够感染靶细胞并抑制靶细胞内甲羟戊酸通路中的酶。
- [0139] 一些实施方式中,所述慢病毒颗粒能够引起甲羟戊酸通路第一种产物水平升高。一些实施方式中,所述第一种产物包括IPP。一些实施方式中,所述慢病毒颗粒能够引起甲羟戊酸通路第二种产物水平降低。一些实施方式中,所述第二种产物包括GGPP。一些实施方式中,慢病毒产物提高所述第一种产物并降低所述第二种产物。

[0140] 一些实施方式中，慢病毒颗粒编码小RNA，所述小RNA能够靶向甲羟戊酸通路第一靶标。一些实施方式中，慢病毒颗粒还编码能够靶向甲羟戊酸通路第二靶标的小RNA。一些实施方式中，第一靶标和第二靶标至少其一是酶。一些实施方式中，第一靶标和第二靶标至少其一是FDPS、GGPS1、IDI1、F-Tase或鲨烯合酶。

[0141] 一些实施方式中，小RNA靶向第一靶标导致甲羟戊酸通路第一种产物的存在性、水平或浓度升高。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第一种产物的存在性、水平或浓度相比第一产物对照升高多达10%，其中，所述第一产物对照的意思可以是第一靶标没有被小RNA靶定时第一种产物的存在性、水平或浓度。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第一种产物的存在性、水平或浓度相比第一产物对照升高多达10%至多达20%，如文中所述。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第一种产物的存在性、水平或浓度相比第一产物对照升高多达20%至多达30%，如文中所述。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第一种产物的存在性、水平或浓度相比第一产物对照升高多达30%至多达40%，如文中所述。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第一种产物的存在性、水平或浓度相比第一产物对照升高多达40%至多达50%，如文中所述。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第一种产物的存在性、水平或浓度相比第一产物对照升高超过50%，如文中所述。一些实施方式中，所述甲羟戊酸通路第一种产物包含IPP。

[0142] 一些实施方式中，小RNA靶向第二靶标导致甲羟戊酸通路第二种产物的存在性、水平或浓度降低。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第二种产物的存在性、水平或浓度相比第二产物对照降低多达10%，其中，所述第二产物对照的意思可以是第二靶标没有被小RNA靶定时第二种产物的存在性、水平或浓度。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第二种产物的存在性、水平或浓度相比第二产物对照降低多达10%至多达20%，如文中所述。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第二种产物的存在性、水平或浓度相比第二产物对照降低多达20%至多达30%，如文中所述。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第二种产物的存在性、水平或浓度相比第二产物对照降低多达30%至多达40%，如文中所述。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第二种产物的存在性、水平或浓度相比第二产物对照降低多达40%至多达50%，如文中所述。一些实施方式中，甲羟戊酸通路第二种产物的存在性、水平或浓度相比第二产物对照降低超过50%，如文中所述。一些实施方式中，所述甲羟戊酸通路第二种产物包含GGPP。

[0143] 一些实施方式中，甲羟戊酸通路的第一种产物的存在性、水平或浓度升高引起 $\gamma\delta$ (GD)T细胞活化升高。一些实施方式中，GD T细胞活化相比第一活化对照升高多达10%，其中，所述第一活化对照的意思可以是第一靶标没有被小RNA靶定时的GD T细胞活化水平。一些实施方式中，第一种产物调节引起的GD T细胞活化相比第一活化对照升高多达10%至多达20%，如文中所述。一些实施方式中，第一种产物调节引起的GD T细胞活化相比第一活化对照升高多达20%至多达30%，如文中所述。一些实施方式中，第一种产物调节引起的GD T细胞活化相比第一活化对照升高多达30%至多达40%，如文中所述。一些实施方式中，第一种产物调节引起的GD T细胞活化相比第一活化对照升高多达40%至多达50%，如文中所述。一些实施方式中，第一种产物调节引起的GD T细胞活化相比第一活化对照升高超过50%，如文中所述。

[0144] 一些实施方式中，甲羟戊酸通路的第二种产物的存在性、水平或浓度降低引起 $\gamma\delta$ (GD)T细胞活化升高。一些实施方式中，第二种产物调节引起的GD T细胞活化相比第二活化对照升高多达10%，其中，所述第二活化对照的意思可以是第二靶标没有被小RNA靶定时的

GD T细胞活化水平。一些实施方式中,第二种产物调节引起的GD T细胞活化相比第二活化对照升高多达10%至多达20%,如文中所述。一些实施方式中,第二种产物调节引起的GD T细胞活化相比第二活化对照升高多达20%至多达30%,如文中所述。一些实施方式中,第二种产物调节引起的GD T细胞活化相比第二活化对照升高多达30%至多达40%,如文中所述。一些实施方式中,第二种产物调节引起的GD T细胞活化相比第二活化对照升高多达40%至多达50%,如文中所述。一些实施方式中,第二种产物调节引起的GD T细胞活化相比第二活化对照升高超过50%,如文中所述。

[0145] 另一方面公开了能够感染靶细胞的慢病毒颗粒。所述慢病毒颗粒包含优化了靶细胞感染的包膜蛋白和如本文所述的慢病毒载体。一些实施方式中,靶细胞是癌细胞。

[0146] 另一个方面公开了活化 $\gamma\delta$ (GD)T细胞的方法。所述方法包括在GD T细胞存在下用慢病毒颗粒感染靶细胞,所述慢病毒颗粒含有病毒载体,所述载体包含第一和第二编码遗传元件,所述第一编码遗传元件包含小RNA,所述小RNA能够抑制甲羟戊酸通路所涉酶的产生,并且所述第二编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一,当所述酶在所述靶细胞中被抑制时,所述靶细胞激活GD T细胞。一些实施方式中,所涉酶包含FDPS、GGPS1、IDI1、F-Tase和/或鲨烯合酶至少其一或其功能性变体。

[0147] 一些实施方式中,靶细胞是癌细胞。一些实施方式中,所述方法还包括使靶细胞和GD T细胞与一定量的氨基双膦酸类药物接触。一些实施方式中,所述氨基双膦酸类药物是唑来膦酸。

[0148] 另一方面公开了一种治疗对象癌症的方法。所述方法包括给予所述对象治疗有效量的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒含有病毒载体,所述载体包含第一和第二编码遗传元件,所述第一编码遗传元件包含小RNA,所述小RNA能够抑制甲羟戊酸通路所涉酶的产生,并且所述第二编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员、细胞因子或趋化因子之一;当所述酶在GD T细胞存在下在癌细胞中被抑制时,所述靶细胞激活GD T细胞,由此治疗癌症。一些实施方式中,所涉酶包含FDPS、GGPS1、IDI1、F-Tase、鲨烯合酶和/或它们的功能性变体至少其一。

[0149] 一些实施方式中,所述方法还包括使靶细胞和GD T细胞与一定量的氨基双膦酸类药物接触。一些实施方式中,所述方法包括向对象施用治疗有效量的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒含有病毒载体,所述病毒载体包含第一、第二和第三编码遗传元件,所述第一编码遗传元件包含能够抑制产生甲羟戊酸通路所涉一种或多种酶的一种或多种小RNA,所涉第二编码遗传元件包含嗜乳脂蛋白家族成员,所涉第三遗传元件编码细胞因子或趋化因子,其中,当所述酶在GD T细胞存在下在癌细胞中被抑制时,靶细胞激活GD T细胞,嗜乳脂蛋白提高GD T细胞活化效率,细胞因子提高GD T细胞的活化与增殖,且趋化因子提高肿瘤部位GD T细胞的存在性,由此治疗癌症。一些实施方式中,所述方法还包括使靶细胞和GD T细胞暴露于一定量的氨基双膦酸类药物。一些实施方式中,所述氨基双膦酸类药物是唑来膦酸。

[0150] 一些实施方式中,所述嗜乳脂蛋白家族成员包括BTN3A3 (SEQ ID NO:17) 或BTN3A3 (R381H) (SEQ ID NO:54)。一些实施方式中,细胞因子包括IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-23或IL-36,但也可以包括已知活化免疫细胞例如T细胞的其他细胞因子。一些实施方式中,趋化因子可包括CCL5基因编码的趋化因子(C-C基序)配体5或已知能被GD T细胞受体识别且已知能够将GD T细胞引向肿瘤生长部位的其他趋化因子。

[0151] 癌症

[0152] 本文提供的组合物和方法用于治疗癌症。细胞、组织或靶标可以是癌细胞、癌组织、携癌组织或是某疾病或病症的确诊或风险对象或患者。在某些方面,细胞可以是上皮细胞、内皮细胞、间皮细胞、神经胶质细胞、基质细胞或粘膜细胞。癌细胞群可包括但不限于脑、神经元、血液、子宫内膜、脑膜、食道、肺、心血管、肝脏、淋巴、乳房、骨骼、结缔组织、脂肪、视网膜、甲状腺、腺体、肾上腺、胰、胃、肠、肾、膀胱、结肠、前列腺、子宫、卵巢、子宫颈、睾丸、脾脏、皮肤、平滑肌、心肌或横纹肌细胞,还可包括来自以上任何一种的癌细胞群,并可与以下一种或多种相关:癌、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、以上所述之混合型或混合物。在另一方面,癌症包括但不限于星形细胞瘤、急性髓性白血病、间变性大细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、血管肉瘤、B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、乳腺癌、膀胱癌、头颈癌、宫颈癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、结直肠癌、子宫内膜癌、食管鳞状细胞癌、尤文氏肉瘤、纤维肉瘤、胶质瘤、胶质母细胞瘤、胃泌素瘤、胃癌、肝母细胞瘤、肝细胞癌、卡波西肉瘤、霍奇金淋巴瘤、喉鳞状细胞癌、喉癌、白血病、平滑肌肉瘤、脂肪瘤、脂肪肉瘤、黑色素瘤、套细胞淋巴瘤、成神经管细胞瘤、间皮瘤、粘液纤维肉瘤、髓样白血病、粘膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、高危骨髓增生异常综合征、鼻咽癌、神经母细胞瘤、神经纤维瘤、高级非霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、食管癌、骨肉瘤、胰腺癌、嗜铬细胞瘤、前列腺癌、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、许旺氏细胞瘤、小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、睾丸肿瘤、甲状腺癌、尿路上皮癌和威尔姆氏肿瘤。

[0153] 本文提供的组合物和方法还用于治疗NSCLC(非小细胞肺癌)、小儿恶性肿瘤、由人乳头瘤病毒(HPV)引起或促成的宫颈和其他肿瘤、黑素瘤、巴雷特食道(恶变前综合征)、肾上腺癌和皮肤癌及自身免疫病、肿瘤性皮肤病。

[0154] 感染性疾病

[0155] 本文公开的组合物和方法可用于治疗感染性疾病。“感染性疾病”一词包括由感染性物质引起的各种疾病。“感染性物质”包括各种外源性病原体,包括但不限于细菌、真菌、病毒、支原体和寄生虫。可用本文提供的组合物治疗的感染性物质包括所有本领域所知在动物中致病的感染性生物,包括以下所述的生物体,例如:属于革兰氏阴性或革兰氏阳性球菌或杆菌的细菌,DNA和RNA病毒,包括但不限于如乳头瘤病毒、细小病毒、腺病毒、疱疹病毒和痘苗病毒等DNA病毒,以及如沙粒病毒、冠状病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、流感病毒、小核糖核酸病毒、副粘病毒、呼肠孤病毒、逆转录病毒和弹状病毒等RNA病毒。可用本文组合物和方法治疗的真菌的例子包括:霉菌或酵母样生长的真菌,例如引起诸如癣、组织胞浆菌病、芽生菌病、曲霉菌病、隐球菌病、孢子丝菌病、球孢子菌病、副球菌病和念珠菌病等疾病的真菌。本文提供的组合物和方法可用于治疗寄生虫感染,这包括但不限于由体细胞绦虫、血吸虫、组织蛔虫、阿米巴和疟原虫、锥虫、利什曼原虫和弓形虫物种引起的感染。

[0156] GD T细胞活化的方法

[0157] 本文提供用于活化个体中GD T细胞的组合物和方法以及治疗肿瘤和感染性疾病的方法。例如,一些实施方式中,本文提供的组合物和方法可用于治疗所有已知癌症的方法,因为活化的GD T细胞含有对肿瘤的天然免疫监视机制(参见例如:Pauza等,Frontiers in Immunol. 5:687 (2014))。同样,一些实施方式中,本文提供的组合物和方法可用于治疗感染性疾病,包括但不限于黄病毒、流感病毒、人逆转录病毒、分枝杆菌、疟原虫和各种其他

病毒,真菌和细菌感染。参见例如Pauza和Cairo,2015Cell Immunol.296 (1)。

[0158] 总体来说,用本文所述构建体将载体系统给药至个体从而转染或转导靶细胞群由此降低FDPS表达并在其他实施方式中提高趋化因子或细胞因子的表达。给药和转染/转导可以发生在体内(*in vivo*)或离体(*ex vivo*)发生,后一种情况中转染细胞随后回输给对象。

[0159] 所述载体给药和所述构建体转染或转导至对象细胞中引起FDPS表达降低、细胞因子或趋化因子表达升高、IPP累积且在许多情况下引起遗传修饰肿瘤细胞生长速率降低。所有这些特征共同作用令GD T细胞活化并共定位到肿瘤或感染部位。

[0160] 本文所述方法还可以提高NK细胞识别和破坏肿瘤细胞和/或感染细胞的能力。GD T细胞和NK细胞之间的信号交互(crosstalk)是调节免疫和炎性反应的重要方面。此外,GT T细胞能够引发树突细胞成熟、募集B细胞和巨噬细胞并参与多种细胞溶解活性,例如干扰素- γ 和TNF- α 的分泌。

[0161] 一些实施方式中,本文提供的组合物和方法包括用于在肿瘤部位活化GD T细胞的基因疗法形式。在一个方面,本文提供的组合物和方法通过促进特定细胞因子的产生来活化GD T细胞并支持它们的增殖、分化和功能能力,所述特定细胞因子是能够杀灭癌细胞或治疗感染性疾病的细胞溶解活性所需的细胞因子。

[0162] 一些实施方式中,基因治疗序列(例如FDPS shRNA、FDPS miRNA、GGPS1 shRNA、IDI1 shRNA、F-Tase小RNA或鲨烯合酶小RNA)由治疗载体携带,包括但不限于病毒载体,例如慢病毒或腺相关病毒,但其他病毒载体也会是合适的。基因治疗构建体也可以DNA或RNA的形式递送,包括但不限于质粒形式。一些实施方式中,本文所述基因治疗构建体还可以蛋白质-核酸复合物或脂质核酸复合物和这些制剂的混合物的形式递送。例如,蛋白质-核酸复合物可包含与阳离子肽(如赖氨酸和精氨酸)复合的目标核酸。脂质-核酸复合物可包含脂质乳液、胶束、脂质体和/或中性和阳离子脂质的混合物,例如DOTMA、DOSPA、DOTAP和DMRIE。

[0163] 一些实施方式中,治疗载体可包含单一构建体或至少两种,至少三种,至少四种或至少五种不同构建体。当载体中存在多于一个构建体时,这些构建体可以相同的或者不同。例如,构建体之间的区别可在于它们的启动子、是否存在整合元件和/或它们的序列。

[0164] 一些实施方式中,治疗载体将包含至少一个构建体,该构建体编码能够敲低FDPS、GGPS1、IDI1、F-Tase、鲨烯合酶和/或其功能变体中至少其一表达的小RNA。一些实施方式中,治疗载体还将编码特定细胞因子和/或趋化因子,包括但不限于TNF- α 、干扰素- γ 、IL-1、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-33、L-36或RANTES。一些实施方式中,单个构建体可既编码能够敲低FDPS表达的小RNA又编码特定细胞因子或趋化因子,包括但不限于TNF- α 、干扰素- γ 、IL-1、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-33、L-36或RANTES。

[0165] 一些实施方式中,病毒载体可将核酸构建体导入而所述核酸构建体整合到宿主染色体中。或者,可用瞬时递送载体避免染色体整合并限制基因治疗构建体的寿命。

[0166] 一些实施方式中,本文所述构建体和载体包含能够降低或敲低FDPS、香叶基焦磷酸合酶(“GPPS”)、法尼基转移酶(“F-Tase”)、IDI1和/或鲨烯合酶基因表达的siRNA或短发卡RNA(“shRNA”)、微小RNA(“miRNA”)。通过下调控制类固醇和类异戊二烯合成的这些基因,

异戊烯焦磷酸(“IPP”)水平升高和/或GGPP水平降低。IPP升高和累积是一种提高GD T细胞活化的机制。此外,这些焦磷酸合酶基因的下调消除了炎性体功能的重要负调节物,这继而引起对GD T细胞活化和效应细胞功能来说重要的细胞因子的表达升高。癌细胞表面的BTN3A3和高细胞质水平的IPP强有力地激活V伽马9V德耳塔2T细胞(亦称V γ 9V δ 2T细胞)。

[0167] 一些实施方式中,本文所述构建体受特异性启动子调节,其能够产生白细胞介素-2和/或白细胞介素-15以维持GD T细胞增殖。然而,如文中所述,也可选用其他细胞因子,包括IL-18、IL-23和IL-36。此外,本文所述构建体可由特异性启动子调节,其能够生产GD T细胞分化和实现所有效应细胞功能所需的白细胞介素-1 β 和/或白细胞介素-18和/或干扰素- γ 。理想的效果细胞功能包括就以下各项而言的能力:直接由细胞毒性细胞击杀肿瘤和/或感染细胞,有益细胞因子和/或趋化因子的分泌,癌细胞或感染细胞识别所需NK受体表达增加以及结合靶向抗体以使GD T细胞与癌细胞或感染的细胞靶标共定位所需Fc受体表达增加。

[0168] 一些实施方式中,本文所述方法活化GD T细胞,引起的间接效果是NK细胞进攻并破坏癌细胞、肿瘤或感染细胞的能力提升。NK细胞活化需要GD T细胞受激增殖并分化,并表达结合NK细胞上4-1BB共刺激受体所需的4-1BBL共刺激配体。这种形式的信号交互被认为是活化NK细胞的重要机制,在此通过本文所述方法和组合物的作用得以实现。

[0169] 另一方面中,GD T细胞和NK细胞之间的信号交互是消除患病组织中积累的炎性树突细胞的重要机制。单独的GD T细胞和NK细胞都不能破坏树突细胞,但是一旦发生上述信号交互相互作用,NK细胞就会变得对炎性树突细胞具有细胞毒性。这种免疫调节机制依赖于GD T细胞的强效活化和增殖。

[0170] 一些实施方式中,本文所述活化GD T细胞的方法还包括抑制病理性炎性反应的步骤,所述病理性炎性反应可包括造成动脉粥样硬化的细胞增殖、激发肿瘤生长的慢性免疫活化、自身免疫疾病(包括牛皮癣和其他表皮表现)、中枢神经系统炎性疾病、关节炎和其他免疫反应失调性疾病。

[0171] 一些实施方式中,治疗载体与双膦酸类药物并行给药以实现 $\gamma\delta$ T细胞的协同性活化。这种协同效应能够允许替代性、改变的或降低的双膦酸类药物剂量,并可减少对双膦酸类药物的不良反应,包括急性炎性反应和慢性疾病。

[0172] 一些实施方式中,治疗载体与双膦酸类药物联合给药。各种实施方式中,这样的组合获得了协同性、正向的或提高的 $\gamma\delta$ T细胞活化。正向的活化可允许替代性、改变的或降低的双膦酸类药物剂量,并可减少对双膦酸类药物的不良反应,包括急性炎性反应和慢性疾病。治疗载体与双膦酸盐或酯的组合可以在一起或是分开,有或没有用于联合使用或将产品组合的说明。治疗载体和/或双膦酸盐或酯可以完全分开放药,并且可以配制为完全不同的药物剂型。治疗载体和/或双膦酸盐或酯可以彼此独立销售,带有或不带有关于联合使用可能性的标签说明。此类说明也可在包装装置例如插页之类或其他信息中提供,例如提供给医生或医务人员,例如口头交流、书面交流等等。所述标签或其他说明可以指单剂量单位形式的固定组合,也可以指用于联合用药的多组件试剂盒形式的非固定组合,在试剂盒的情形中治疗载体可以独立于双膦酸类药物同时给药或在时间间隔期间内另行给药。各种实施方式中,所述组合表现出协作或联合效应,或是治疗的毒性或并发症的减少。实施方式之一中,组合的效果是协同性的。当活性成分一起使用的效果超出各化合物分别使用所

得效果的总和时即获得协同效应。协同效应的获得可以是当活性成分：(1)以合并单位剂量制剂形式配制在一起和同时给药或递送时；(2)作为各自独立的制剂交替或并行递送时；或(3)采用其他方案时。在以交替治疗递送时，当化合物依次给药或递送时—例如通过用各自独立的注射器进行不同的注射—可获得协同效应。总体上，交替治疗期间，有效剂量的各活性成分依次给药即连续给药，而在联合治疗中，有效剂量的两种或更多种活性成分一起给药，但如文中所述可能在不同的时刻。

[0173] 本文所述组合可以由同一或不同的制造商制造和/或配制。可以如下所述令活性成分在一起从而成为联合治疗：(i)在组合产品发放到医师之前(例如试剂盒的情形下，所述试剂盒包含本文所述化合物和其他治疗药物)；(ii)由实施治疗的医生(或在医生指导下)在邻近给药之前；(iii)在实际患者中，例如本文所述化合物和其他治疗药物依次给药过程中。

[0174] 一些实施方式中，治疗有效量的各组合可以同时或按任何顺序依次给药，并且多个组分可以一起或分开给药。例如，本文所述用于治疗增生性疾病的方法可以包括：(i)第一药物(例如形成慢病毒颗粒一部分的治疗载体)给药和/或(ii)第二药物(例如游离形式或药学上可接受盐形式的双膦酸类药物)给药。药物(i)和/或(ii)的给药可以按治疗有效量、优选协作性、联合性有效量和/或协同有效量—例如对应于本文所述量的日剂量或间歇性剂量—同时给药或任意顺序依次给药。这些组合可以在治疗过程中分开在不同时间给药，或者以分开的药物形式或单一的药物形式并行给药。并且，“给药”还包括施用组合中组分的前药，前药会在体内转化为组合中的所述组分。因此，本文应理解为包括所有这些同时或交替治疗的方案，“给药”也应照此解释。

[0175] 一些实施方式中，药物(i)和(ii)可以采用任意药学上可接受的方法给药，例如鼻内、口颊、舌下、口服、直肠、眼、胃肠外(静脉内、皮内、肌肉内、皮下、腹膜内)、经肺、阴道内、局部(locally)给药、局部外用(topically)、划破后局部外用、经粘膜给药、通过气溶胶、含于半固介质如琼脂糖或明胶中或通过口颊喷剂或鼻喷剂给药。例如，治疗载体和/或双膦酸类药物可静脉内给药。此外，药物(i)和(ii)可以配制成任意药学上可接受的剂型，例如固体剂型，片剂，丸剂，锭剂，胶囊，液体分散体，凝胶，气溶胶，肺气雾剂，鼻气雾剂，软膏，乳膏，半-固体剂型，溶液，乳剂和悬混剂。例如，双膦酸类药物可配制成片剂口服给药。

[0176] 可以是在化疗、放疗、免疫疗法、手术干预或其联合之外再施用本文所述联合治疗专用于癌症治疗。就以上其他治疗策略而言，与辅助治疗同样可能的是长期治疗。其他可能的治疗是在肿瘤消退后用来维持患者状态的治疗，或者甚至是预防性化疗(例如在风险患者中)。

[0177] 用于GD T细胞活化的构建体

[0178] FDPS、GGPS1、IDI1和/或其功能性变体的抑制会导致IPP累积和/或GGPP水平消减，由此活化V82+GD T细胞和使干扰素 γ 、TNF- α 和IL-18表达，干扰素 γ 、TNF- α 和IL-18表达对GD T细胞来说也很重要。法尼基转移酶和/或鲨烯合酶抑制导致蛋白质异戊烯化降低。可将本文所述构建体转染或转导到特定的靶细胞中(如肿瘤细胞或感染细胞)，它们在靶细胞中表达RNA序列(即siRNA、shRNA或微小RNA)，这些RNA序列抑制FDPS、GGPS1、IDI1、F-Tase、鲨烯合酶和/或它们功能变体的翻译并编码和表达细胞毒性细胞因子或趋化因子。

[0179] 本文公开了用于降低FDPS、GGPS1、IDI1、F-Tase、鲨烯合酶和/或它们功能变体的

表达、提高细胞因子表达和提高包括RANTES在内趋化因子表达的构建体。例如,一些实施方式中,所述构建体编码干扰素- γ 、IL-1、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-33、IL-36或TNF- α 。

[0180] 细胞因子和趋化因子的表达,如上述那些,将导致肿瘤细胞或病原生物感染细胞的局部细胞毒性破坏。因此,肿瘤细胞表达所述构建体会导致肿瘤细胞协助其自身毁灭并激活能够摧毁未经慢病毒载体遗传改造的其他肿瘤细胞的免疫机制。遗传改造细胞活化GD T细胞的能力涉及GD T细胞受体、嗜乳脂蛋白识别和针对常规 γ 链细胞因子的GT T细胞受体的活化。肿瘤细胞的杀灭依赖于GD T细胞表面受体家族,这些受体总体来说属于NK受体家族成员,它们将肿瘤细胞区分子正常细胞并在细胞杀灭过程中提供选择性。结果,少量遗传改造的肿瘤细胞能够活化足量的GD T细胞以获得广泛的肿瘤破坏,包括在相同或远位肿瘤中既杀灭遗传改造的细胞也杀灭非改造细胞。因此,肿瘤细胞或感染细胞表达这些构建体将导致这些不利的细胞协助自身破坏。

[0181] 同样,如果肿瘤细胞或感染细胞中表达本文所述构建体,FDPS、GGPS1、IDI1、F-Tase、鲨烯合酶和/或它们功能性变体表达降低会导致GD T细胞活化并募集到肿瘤部位或细胞感染部位。提高RANTES的表达将进一步将GD T细胞引向预期的组织位置。因为GD T细胞能够击杀广泛的上皮来源肿瘤以及多种白血病和淋巴瘤,并且还能够产生高水平的抗肿瘤细胞因子IFN γ ,GD T细胞向肿瘤部位募集能够成为诱导抗肿瘤免疫力特别有效的手段。

[0182] FDPS、GGPS1、IDI1、F-Tase、鲨烯合酶和/或其功能变体表达降低可通过shRNA、微小RNA、siRNA或本领域所知其他方式实现。例如,据SEQ ID NO:1、2、3或4所示的shRNA或其变体能够用于本文所述构建体和方法,本例不是限定性的。据SEQ ID NO:64-67、70-72、76所示的shRNA或其变体能够用于本文所述构建体和方法,本例不是限定性的。据SEQ ID NO:68或69所示的miRNA或其变体能够用于本文所述构建体和方法,本例不是限定性的。用于降低FDPS、GGPS1、IDI1、F-Tase、鲨烯合酶和/或其功能变体表达的RNA的编码区以及细胞因子和趋化因子的编码区可以在同一构建体中或在不同的构建体上。

[0183] 产生包括小RNA在内重组多肽或基因调节分子的经典方法是采用稳定的表达构建体。这些构建体基于转导的表达质粒(或至少其部分)染色体性整合到宿主细胞的基因组中,短期质粒转染或半衰期有限的非整合性病毒载体。基因整合的位点通常是随机的,并且任意具体位点处整合基因的数量和比例一般不可预测;同样,非整合质粒或病毒载体也产生核DNA但它们通常缺乏DNA复制和持续维持所需的序列。因此,依赖于染色体整合的构建体导致可能超过治疗间隔的重组基因的永久维持。

[0184] 用于基因表达的稳定表达构建体的替代方案是瞬时表达构建体。这后一种基因表达构建体的表达是基于非整合的质粒,因此当细胞分裂或质粒载体被内源性核酸酶破坏时表达通常会丢失。

[0185] 本文所述构建体优选瞬时表达的游离型(episomal)构建体。游离型构建体随时间降解或稀释,使得它们不会对对象的基因组造成永久性改变,它们也不会整合到靶细胞的染色体中。游离型复制过程通常包括宿主细胞复制机制和病毒反式作用因子两者。

[0186] 避免染色体整合减少了体内基因递送的某些屏障。然而,即使是整合缺陷型构建体也会有背景频率的整合,且任何DNA分子都会发现与宿主序列重组的罕见同源性;但这些整合率非常罕见,通常没有临床意义。

[0187] 因此,一些实施方式中,本文所述载体可为期一段时间地支持活跃的基因和/或小RNA递送,所述时间为约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、或约12周。一些实施方式中,所述载体为期约1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月或更长的时间地支持活跃的基因和/或小RNA递送。这些时长的任何组合也都可用于本发明的方法,例如1个月又1周,或3个月又2个星期。

[0188] 然而,一些实施方式中,构建体包含依赖于逆转录病毒整合酶基因的整合元件,使得构建体整合到对象的染色体中。逆转录转座和转座是移动性遗传元件整合或插入染色体机制的另外的例子。质粒可以通过重组整合到染色体中,并且,基因编辑技术(包括CRISPR和TALEN)利用引导RNA序列并通过基因缺失或基因转换机制改变染色体基因座。

[0189] 构建体可包含针对细胞因子表达的特异性启动子,所述细胞因子是参与维持GD T细胞的细胞因子(即IL-2,IL-7,IL-12,IL-15,IL-17,IL-18,IL-23或IL-36)。例如,可以纳入所述构建体的启动子包括但不限于TATA-盒启动子,CpG-盒启动子,CCAAT-盒启动子,TTGACA-盒启动子,BRE-盒启动子,INR-盒启动子,AT-基启动子,CG基启动子,ATCG-紧密启动子,ATCG-平衡启动子,中ATCG-启动子,低ATCG启动子,低AT启动子,低CG启动子,AT-刺突启动子和CG-刺突启动子。参见例如Gagniuc和Ionescu-Tirgoviste,真核基因组可表现出多达10大类基因启动子(Eukaryotic genomes may exhibit up to 10 generic classes of gene promoters),BMC GENOMICS 13:512 (2012)。

[0190] 治疗载体

[0191] 构建体可以通过公知的转染和/或转导载体递送,包括但不限于慢病毒载体、腺相关病毒、痘病毒、疱疹病毒载体、蛋白质和/或脂质复合物,脂质体、胶束、细菌产生的囊泡、真核细胞产生的囊泡、外泌体等。

[0192] 可令病毒载体优先靶向可用于本文所述方法的细胞类型(即肿瘤细胞或骨髓细胞或淋巴细胞)。因为特异性的病毒包膜-宿主细胞受体相互作用和病毒基因表达机制,可用病毒载体将基因转导到靶细胞中。因此,病毒载体已被用作运载剂将基因转移到多种不同的细胞类型中,所述细胞类型包括完整胚胎、受精卵、分离的组织样品、原位组织靶标和培养细胞系。将外源基因导入细胞并在细胞中表达的能力可用于基因表达的研究,细胞谱系的阐明以及提供治疗性干预的潜力,例如基因治疗、诱导多能干细胞的体细胞重编程以及各类免疫疗法。来自病毒诸如乳多空病毒科(例如牛乳头瘤病毒或BPV)或疱疹病毒科(例如Epstein Barr病毒或EBV)或嗜肝DNA病毒科(例如乙型肝炎病毒或HBV)或包括痘苗病毒(vaccinia)的痘病毒载体的病毒成分可用于本文所述载体。

[0193] 慢病毒载体是本文所述组合物和方法的优选载体类型,但本文内容不特别局限于慢病毒载体。慢病毒是能够将大量病毒核酸传递到宿主细胞中的一类病毒。慢病毒的特征在于具有感染/转导非分裂期细胞的独特能力,并且,在转导后慢病毒将其核酸整合到宿主细胞的染色体中。

[0194] 感染性慢病毒有编码毒力蛋白的三个主要基因gag, pol和env,以及包括tat和rev的两个调控基因。根据具体的血清型和病毒,可能还有编码调节、合成和/或加工病毒核酸以及其他复制功能所涉蛋白质的其他辅助基因。

[0195] 此外,慢病毒具有长末端重复(LTR)区,可长约600nt。LTR可以分段为U3区、R区和U5区。LTR能通过整合酶的作用介导逆转录病毒DNA整合到宿主染色体中。或者,在没有功能

性整合酶的情况下,LTR可用于使病毒核酸环化。

[0196] 参与慢病毒复制早期阶段的病毒蛋白包括逆转录酶和整合酶。逆转录酶是病毒编码的RNA依赖性DNA聚合酶。该酶使用病毒RNA基因组作为模板合成互补的DNA拷贝。逆转录酶还具有RNA酶H活性以破坏RNA模板。整合酶结合宿主DNA和逆转录酶产生的病毒cDNA。整合酶在将病毒基因组插入宿主DNA之前加工LTR。Tat在转录过程中作为反式激活元件增强启动和延伸。rev反应元件在转录后起作用,调节mRNA剪接和向细胞质转运。

[0197] 通常,病毒载体包含糖蛋白,而各种糖蛋白可以提供特异性亲和力。例如,疱疹性口炎病毒G (VSVG) 肽能增加进入骨髓细胞的转染。或者,病毒载体还可以具有与其壳肽连接的靶向部分,例如抗体。靶向抗体可特异于肿瘤上过表达抗原—例如HER-2、PSA、CEA、M2-PK和CA19-9。

[0198] 其他病毒载体特异性也是本领域所知的,并可用于靶向特定细胞群。例如,痘病毒和疱疹病毒载体可靶向巨噬细胞、树突状细胞和上皮细胞,麻疹病毒载体可靶向B细胞,狂犬病病毒载体可靶向神经细胞。

[0199] 慢病毒载体系统

[0200] 慢病毒病毒体(颗粒)由编码病毒体(病毒颗粒)生产必需病毒蛋白的载体系统表达。至少有一载体含有编码慢病毒pol蛋白的核酸序列,该核酸序列与启动子操作性连接,病毒pol蛋白是逆转录和整合所必需的。另一些实施方式中, pol蛋白由多载体表达。另有载体含有编码慢病毒gag蛋白的核酸序列,该核酸序列与启动子操作性连接,慢病毒gag蛋白是形成病毒衣壳所必需的。实施方式之一中,该gag核酸序列与至少部分pol核酸序列分开位于另一载体上。另一些实施方式中, gag核酸与编码pol蛋白的所有pol核酸序列分开位于另外的载体上。

[0201] 可以对载体进行各种修饰用于产生进一步将得到野生型回复体的可能性降至最低的颗粒。这些修饰包括但不限于LTR的U3区缺失, tat缺失和基质(MA)缺失。

[0202] 一个或多个gag、pol和env载体不含称为慢病毒包装序列的包装慢病毒RNA的慢病毒基因组核苷酸。

[0203] 形成颗粒的载体优选不含表达包膜蛋白的慢病毒基因组核酸序列。优选地,采用含有与启动子操作性连接的包膜蛋白编码核酸序列的另外的载体。该env载体也不含慢病毒包装序列。一些实施方式中, env核酸序列编码慢病毒包膜蛋白。

[0204] 另一些实施方式中,包膜蛋白不是慢病毒包膜蛋白,而是其他病毒的。所得颗粒称为假型颗粒。通过适当选择包膜几乎可以“感染”任何细胞。例如,可以采用编码靶向内吞区室的包膜蛋白的env基因,例如下述病毒的基因:流感病毒, VSV-G, α病毒(西门利克森林病毒, 辛德毕斯病毒), 沙粒病毒(淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒), 黄病毒(蜱传脑炎病毒, 登革热病毒, 丙型肝炎病毒, GB病毒), 弹状病毒(水疱性口炎病毒, 狂犬病病毒), 副粘病毒(腮腺炎或麻疹)和正粘病毒(流感病毒)。可优选采用的其他包膜包括Moloney白血病病毒例如MLV-E、MLV-A和GALV的包膜。当宿主细胞是原代细胞时特别优选后者的包膜。可以根据所需的宿主细胞选择其他包膜蛋白。例如,可将靶向特定受体如多巴胺受体用于脑递送。另一靶标可以是血管内皮。可用丝状病毒包膜制定这些细胞的靶向。例如, 埃博拉(Ebola)GP通过转录后修饰成为GP和GP₂糖蛋白。另一些实施方式中,可采用具有假型包膜的不同的慢病毒衣壳(例如FIV或SHIV[美国专利号5,654,195])。SHIV假型载体在动物模型例如猴子中很好

用。

[0205] 如本文所述,慢病毒载体系统通常包括至少一种辅助质粒,其包含gag、pol或rev基因或它们的功能性变体至少其一。gag、pol或rev基因或它们的功能性变体可以各自位于各自独立的质粒上,或者一个或多个基因可共同位于同一质粒上。实施方式之一中,gag、pol和rev基因位于同一质粒上(例如图2)。另一些实施方式中,gag和pol基因在第一质粒上,rev基因在第二质粒上(例如图3)。因此,3-载体和4-载体系统均可用于生产慢病毒,如实施例部分及本文其他部分所述。将治疗载体、包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞系中。包装细胞系的非限制性例子是293T/17HEK细胞系。当治疗载体、包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞系中时,最终生产出慢病毒颗粒。

[0206] 另一方面公开了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。该系统包括如本文所述的慢病毒载体;表达优化了细胞感染的包膜蛋白的包膜质粒;和表达gag、pol和rev基因或它们功能性变体的至少一种辅助质粒,其中当慢病毒载体、包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞系中时,包装细胞系产生慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒能够抑制趋化因子受体CCR5的产生或能靶向HIV RNA序列。

[0207] 另一方面,如图2所示,慢病毒载体—本文中亦称治疗载体—可包含以下元件:杂合5'长末端重复序列(RSV/5'LTR)(SEQ ID NO:5-6),Psi序列(RNA包装位点)(SEQ ID NO:7),RRE(Rev-应答元件)(SEQ ID NO:8),cPPT(聚嘌呤序列)(SEQ ID NO:9),H1启动子(SEQ ID NO:10),shFDPS(SEQ ID NO:1、2、3、4),CMV(SEQ ID NO:19),BTN3A3(R381H)-T2A-IL-2(一起,SEQ ID NO:55),Woodchuck转录后调节元件(WPRE)(SEQ ID NO:11)和3'LTR(SEQ ID NO:12)。在另一方面,可用通过取代、缺失、添加或突变的序列变异来修改本文的序列参考本。

[0208] 另一方面,如文中所述,辅助质粒已指定包含以下元件:CMV(CAG)增强子(SEQ ID NO:21);鸡β肌动蛋白(CAG)启动子(SEQ ID NO:13);鸡β肌动蛋白内含子(SEQ ID NO:22);HIV gag(SEQ ID NO:14);HIV Pol(SEQ ID NO:15);HIV Int(SEQ ID NO:16);HIV RRE(SEQ ID NO:8);HIV Rev(SEQ ID NO:18)和兔β珠蛋白多聚A(SEQ ID NO:23)。另一方面,可以修饰辅助质粒以包括用于表达gag和pol基因的第一辅助质粒,和用于表达rev基因的另外的第二质粒。另一方面中,可用通过取代、缺失、添加或突变的序列变异来修改本文的序列参考本。

[0209] 另一方面在,如文中所述,包膜质粒已指定从左至右包含以下元件:RNA聚合酶II启动子(CMV)(SEQ ID NO:19)和疱疹性口炎病毒G糖蛋白(VSV-G)(SEQ ID NO:20)。另一方面中,可用通过取代、缺失、添加或突变的序列变异来修改本文的序列参考本。

[0210] 另一个方面,用于慢病毒包装的质粒可以用类似的元件修饰并且有可能可以去除内含子序列而不丢失载体功能。例如,以下元件可替换包装系统所在质粒中的类似元件:延长因子-1(EF-1),磷酸甘油酸激酶(PGK)和遍在蛋白C(UbC)启动子可替换CMV或CAG启动子。SV40多聚A和bGH多聚A可替换兔β珠蛋白多聚A。辅助质粒中的HIV序列可由不同的HIV株或进化枝构建。VSV-G糖蛋白可用以下所示病毒的膜糖蛋白替代:猫内源性病毒(RD114),长臂猿白血病病毒(GALV),狂犬病毒(FUG),淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV),甲型鸡瘟病毒(FPV),罗斯河甲病毒(RRV),鼠白血病病毒10A1(MLV)或埃博拉病毒(EboV)。

[0211] 值得注意的是,慢病毒包装系统可通过商业途径获得(例如OriGene技术公司的

Lenti-vpac包装试剂盒,马里兰州罗克维尔),也可以如本文所述进行设计。此外,替代或修改慢病毒包装系统的各个项以改善任意数量的相关因素(包括慢病毒颗粒的生产效率)属于本领域技术人员的技能范围之内。

[0212] 剂量和剂型

[0213] 本文所述载体允许目标基因或序列的短期、中期或长期表达以及本文所述载体的游离型维持。因此,给药方案可以根据所治疗的病症和给药方法而不同。

[0214] 实施方式之一中,转导载体可按不同的剂量对有需要的对象给药。具体来说,可给对象施用约 $\geq 10^6$ 个感染剂量(平均需要1剂量来转导1个靶细胞)。更具体地,可给对象施用约 $\geq 10^7$ 、约 $\geq 10^8$ 、约 $\geq 10^9$ 、或约 $\geq 10^{10}$ 个感染剂量,或以上数值之间任意数量的剂量。转导载体剂量的上限针对各个疾病指征来确定,且取决于各产品或产品批次各自的毒性/安全性情况。

[0215] 另外,本文载体可以定期给予,例如一天一次或两次,或任何其他合适时间段。例如,给对象的载体给药可以按照每周一次、隔周一次、三周一次、每月一次、隔月一次、每三个月一次、每六个月一次、每九个月一次、每年一次,每十八个月一次、每两年一次、每三十个月一次、或每三年一次。

[0216] 实施方式之一中,本文所述载体以药物组合物的形式给药。一些实施方式中,包含本文所述载体的药物组合物可以配制成多种剂型,包括但不限于用于临床的鼻、肺、口服、局部外用(topical)或肠胃外剂型。各种剂型都可包含各种增溶剂、崩解剂、表面活性剂、填充剂、增稠剂、粘合剂、稀释剂如润湿剂或其它药学上可接受的赋形剂。含载体的药物组合物也可以配制用于注射、吹入、输注或皮内暴露。例如,可注射制剂可将本文所述载体包含在合适pH和张力下的水性或非水性溶液中。

[0217] 本文所述载体可通过直接向肿瘤部位或感染部位内注射来施用于对象。一些实施方式中,载体可以全身性给药。一些实施方式中,载体可以通过引导插管给药到紧邻肿瘤或感染部位的周围组织。

[0218] 本文所述载体组合物可以采用各种药学上可接受的方法给药,例如鼻内、口颊、舌下、口服、直肠、眼、胃肠外(静脉内、皮内、肌肉内、皮下、腹膜内)、经肺、阴道内、局部(locally)给药、局部外用(topically)、划开后局部外用、经粘膜给予、通过气溶胶、含于半固介质如琼脂糖或明胶中或通过口颊喷剂或鼻喷剂给药。

[0219] 此外,本文所述载体组合物可以配制成任何药学上可接受的剂型,例如固体剂型,片剂,丸剂,锭剂,胶囊,液体分散体,凝胶,气溶胶,肺气雾剂,鼻气雾剂,软膏,乳膏,半-固体剂型,溶液,乳剂和悬混剂。此外,组合物可以是控释制剂、缓释制剂、速释制剂,或以上之任意组合。并且,组合物可以是透皮递送系统。

[0220] 一些实施方式中,含载体的药物组合物可以配制成口服给药的固体剂型,而固体剂型可以是粉末、颗粒剂、胶囊、片剂或丸剂。一些实施方式中,固体剂型可包括一种或多种赋形剂,例如碳酸钙、淀粉、蔗糖、乳糖、微晶纤维素或明胶。此外,固体剂型在赋形剂外还可包括润滑剂,例如滑石或硬脂酸镁。一些实施方式中,口服剂型可以是立即释放或调节释放形式。释放调节型剂型包括控释或延长释放、肠释放等。调节释放调节型剂型中使用的赋形剂是本领域普通技术人员公知的。

[0221] 另一些实施方式中,含载体的药物组合物可以配制成舌下或口颊剂型。这样的剂

型包括经舌下给药的舌下片剂或溶液组合物和放置在脸颊和牙龈之间的口颊片剂。

[0222] 一些实施方式中,含载体的药物组合物可以配制成为鼻用剂型。本发明的这种剂型包括用于经鼻递送的溶液、悬混剂和凝胶组合物。

[0223] 一些实施方式中,含载体的药物组合物可以配制成为口服给药的液体剂型,例如悬混剂、乳剂或糖浆剂。一些实施方式中,液体剂型在常用的简单稀释剂如水和液体石蜡之外还可包括各种赋形剂,如保湿剂、甜味剂、芳香剂或防腐剂。一些特定的实施方式中,可将含载体的组合物配制成为适合向儿科患者给药。

[0224] 一些实施方式中,药物组合物可以配制成为胃肠外给药剂型,例如无菌水性溶液、悬混剂、乳剂、非水溶液或栓剂。一些实施方式中,溶液剂或悬混剂可包括丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)或可注射酯(如油酸乙酯)。

[0225] 药物组合物的剂量可根据患者的体重、年龄、性别、给药时间和方式、排泄率(excretion rate)和疾病的严重程度而不同。

[0226] 一些实施方式中,癌症的治疗是用针或血管内插管将本文所述载体构建体向肿瘤内直接有导注射来实现。一些实施方式中,采用静脉或动脉插管或注射、皮内递送、肌内递送或向疾病部位附近引流器官(draining organ)内注射将本文所述载体向脑脊髓液、血液或淋巴循环中给药。

[0227] 提供以下实施例来说明本发明。然而应该理解的是本发明不局限于这些实施例中所述具体病症或细节。本文引用的所有印刷出版物均通过引用具体纳入本文。

[0228] 实施例

[0229] 实施例1-慢病毒载体系统的开发

[0230] 如图2和图3(显示的是环化形式)中的概括,开发了一种慢病毒载体系统。在293T/17 HEK细胞(购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),弗吉尼亚州玛纳萨斯)中,在用治疗载体、包膜质粒和辅助质粒转染后,生产慢病毒颗粒。293T/17 HEK细胞(由其生产功能性病毒颗粒)的转染使用聚(乙烯亚胺)(PEI)来提高质粒DNA的摄取效率。先将质粒和DNA按照3:1(PEI比DNA的质量比)的比例分别加入不含血清的培养基中。2-3天后,收集细胞培养基,通过高速离心和/或过滤然后阴离子交换色谱纯化慢病毒颗粒。慢病毒颗粒的浓度可以用转导单位/ml(TU/ml)表示。如下确定TU:测定培养液中的HIV p24水平(p24蛋白包含于慢病毒颗粒内),定量PCR测定每个细胞的病毒DNA拷贝数,或通过感染细胞和采用光学手段(如果载体编码荧光素酶或荧光蛋白标志物)。

[0231] 如上所述,设计了一种3-载体系统(即2-载体慢病毒包装系统)用于生产慢病毒颗粒。3-载体系统的示意图如图2所示。简而言之,并参照图2,最上方的载体是辅助质粒,此例中包含Rev。图2中部的载体是包膜质粒。最下面的载体是治疗载体,如文中所述。

[0232] 参照图2更具体地说,加Rev的辅助质粒包含CMV(CAG)增强子(SEQ ID NO:21);鸡β肌动蛋白(CAG)启动子(SEQ ID NO:13);鸡β肌动蛋白内含子(SEQ ID NO:22);HIV gag(SEQ ID NO:14);HIV Po1(SEQ ID NO:15);HIV Int(SEQ ID NO:16);HIV RRE(SEQ ID NO:8);HIV Rev(SEQ ID NO:18);和兔β珠蛋白多聚A(SEQ ID NO:23)。

[0233] 包膜质粒包含CMV启动子(SEQ ID NO:19);β珠蛋白内含子(SEQ ID NO:24);VSV-G(SEQ ID NO:20);和兔β珠蛋白多聚A(SEQ ID NO:25)。

[0234] 合成包含辅助质粒(+Rev)和包膜质粒的2-载体慢病毒包装系统。

[0235] 材料和方法:

[0236] 辅助质粒的构建:辅助质粒的构建先从pNL4-3 HIV质粒(美国国立卫生研究院艾滋病试剂计划(NIH Aids Reagent Program))PCR扩增含有Gag、Pol和整合酶基因的DNA片段。将引物设计成扩增带有EcoRI和NotI限制性位点的片段,这些限制性位点可用于插入pCDNA3质粒(英杰公司(Invitrogen))中的相同位点。正向引物是(5' -TAAGCAGAATTCATGAATTGCCAGGAAGAT-3') (SEQ ID NO:26),反向引物是(5' -CCATACAATGAA TGGACACTAGGCAGGCCACGAAT-3') (SEQ ID NO:27)。

[0237] Gag、Pol、整合酶片段的序列如下所示:

[0238] GAATTCATGAATTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAATGATAGGGGAATTGGAGGTTTATCAAAGT AAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTCGGCACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCT GTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACCTTAAATTTCCTAGTCCTATTGAGACTG TACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGCCAAAAGTTAACAAATGCCATTGACAGAAGAAAAATAAAAGC ATTAGTAGAAATTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGAAAATTCAAAAATTGGCCTGAAAATCCATACAATACT CCAGTATTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAATAAGAGAA CTCAAGATTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTAAACAGAAAAATCAGAACAGTACT GGATGTGGCGATGCATATTTCAGTTCCCTAGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTACCATACCTAGT ATAAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATAT TCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTAGAAAACAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGG TGATTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGCAGCATAGAACAAAATAGAGGAACGTGAGACAACATCTGTT AGGTGGGATTTCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCCTGGATGGTTATGAACCTCCATC CTGATAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAGT GGGAAAATTGAATTGGCAAGTCAGATTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAACCTCTAGGGAAAC AAAGCACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAG AACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAACAGCAGGGCAAGGCCAATG GACATATCAAATTATCAAGAGCCATTAAAAATCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAACAGGGTGCACACT AATGATGTGAAACAATTAAACAGAGGCAGTACAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGAAAGACTCCTA AATTAAATTACCCATACAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGA GTGGGAGTTGTCAATAACCCCTCCCTAGTGAAGTTAGGTACCAAGTTAGAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAA ACTTCTATGTAGATGGGCAGCCAATAGGAAACTAAATTAGGAAAGCAGGATATGTAACGTGACAGAGGAAGAC AAAAGTTGCCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAACAGACTGAGTTACAAGCAATTCTAGCTTGCAGGATTC GGGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAAATATGCATTGGAAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAA TCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAGGAAAAGTCTACCTGGCATGGTACCGACACACA AAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAATTGGTCAGTGCTGGAAATCAGGAAAGTACTATTAGGAGCAGAA AGATAAGGCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTAACCTACCACCT GTACTAGCAAAAGAAATAGTACGCCAGCTGTGATAATGTCAGCTAAAGGGAAAGCCATGCATGGACAACTAGACT GTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTAGAAGGAAAAGTTCTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAG TGGATATATAGAAGCAGAACAGTAATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAACAGCATACTCCTCTAAAATTAGCAGGA AGATGGCCAGTAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTCAAGGAGTACTACAGTTAAGGCCGCTGTTGGT GGGCGGGGATCAAGCAGGAATTGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGA

ATTAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTAACATCTAACAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCACTCACAATTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGTACAGTGCAGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTGGTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTGGAAAGGACCGAACAGCTCCTCTGAAAGGTGAAGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTACATAAAAAGTAGTGCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA (SEQ ID NO:28)。

[0239] 然后,由Eurofins Genomics公司合成含有Rev、RRE和兔β珠蛋白多聚A序列及两侧XbaI和XmaI限制性位点的DNA片段。然后将该DNA片段在XbaI和XmaI限制性位点处插入质粒。该DNA序列如下所示:

[0240] TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCAATCCGAGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTGGCACTTATCTGGACGATCTGGAGGCCTGTGCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTGATTGTAACGAGGATTGTGAACTCTGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAACTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTGTTCCTGGGTTCTGGGAGCAGCAGGAAGCAGCTATGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGCTGGTATAGTCAGCAGCAGAACATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAACCTGGCTGTGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTATTGTTCATGCAATAGTGTGTTGAATTTTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGAGGGCAAATCATTAAAACATCAGAATGAGTATTGGTTAGAGTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAGAGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCTGACTTGAGGTAGATTTTTTATTTGTTGTATTGTTCTTAAACATCCAAAATTTCCTTACATGTTTACTAGCCAGATTTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCTCTCTTATGAAGATCCCTGACCTGCAGGCCAGCTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCACATTAAATTGCGTTGCGCTACTGCCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCAGGCCCTAACCTCGCCCATCCGCCCCCTAATCCGCCCAGTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTATTATGCAGAGGCCAGGCCCTGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTGAGGCTAGGCTTTGCAAAAAGCTAACTGTTATTGCAGCTTATAATGGTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTCAAAATAAGCATTTCCTGACCTGCAGGCCAGCTGGCGTAATCATGGCTGTGTTGCAAAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCCGGG (SEQ ID NO:29)。

[0241] 最后,用CAG增强子/启动子和鸡β肌动蛋白内含子序列替换pCDNA3.1的CMV启动子。由Eurofins Genomics公司合成含有CAG增强子/启动子/内含子序列及两侧M1uI和EcoRI限制性位点的DNA片段。然后将DNA片段在M1uI和EcoRI限制性位点处插入质粒。该DNA序列如下所示:

[0242] ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGTCTAGTCATAGCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCGCCTGGCTGACGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTAATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGTGGACTATTCAGGTAAACTGCCACTTGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCCTGGCATT

ATGCCCAAGTACATGACCTTATGGGACTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGG
 TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTGTATTTATTTAT
 TTTTAATTATTTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCAGGGCGGGCGGGCGAGGG
 GCAGGGCGGGCGAGGGAGAGGTGCGGCGCAGCCAATCAGAGCGCGCGCTCCGAAAGTTCTTTATGGCG
 AGGCAGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAGCGAAGCGCGCGCGGGAGTCGCTGCCTGCCTCGCCCCGTG
 CCCCCTCCCGCGCCCTCGCGCCCGCCCGCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGA
 CGGCCCTCTCCCTGGCTGTAATTAGCGCTGGTTAATGACGGCTCGTTCTTCTGTGGCTGCGTGAAGGC
 CTTAAAGGGCTCCGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGCGTGGGG
 AGCGCCGCGTGCAGGGCGCGCTGCCCGCGCTGTGAGCGCTGCCCGCGCGCGGGCTTGTGCGTCCCGT
 GTGCGCGAGGGAGCGCGGGCGGTGCCCCCGCGTGCAGGGGGCTGCGAGGGAAACAAAGGCTGCGTGC
 GGGTGTGTGCGTGGGGGGTGAACAGGGGGTGTGGCGCGCGCTGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCC
 CCGAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTCGGGTGCAGGGCTCCGTGCAGGGCGTGGCGCGGGCTGCCGTGCCGGC
 GGGGGTGGCGGCAGGTGGGGTGCAGGGGGCGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTGGGGAGGGCGCG
 GCGGCCCGAGCGCCGGCTGAGCCATTGCGTTATGGTAATCGTGCAGAG
 GCGCAGGGACTCCTTGTCCAAATCTGGCGAGCCAAATCTGGGAGGCAGCCACCCCCCTAGCGGCG
 CGGGCGAAGCGGTGCGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGCGGGAGGGCTCGTGCCTGCGCGCCGCCCC
 TTCTCCATCTCCAGCCTCGGGCTGCCGAGGGGACGGCTGCCTCGGGGGACGGGAGGGGTTCTGGC
 TTCTGGCGTGTGACCGCGGGAAATTC (SEQ ID NO:30)。

[0243] 构建VSV-G包膜质粒：

[0244] 由Eurofins Genomics合成两侧带有EcoRI限制性位点的痘疹性口炎印第安纳病毒糖蛋白(VSV-G)序列。然后将该DNA片段在EcoRI限制性位点处插入pCDNA3.1质粒(英杰公司),并用CMV特异性引物测序确定方向正确。该DNA序列如下所示：

[0245] GAATTCATGAAGTGCCTTTGACTTAGCCTTTATTCAATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGT
 TTTCCACACAACCAAAAGGAAACTGGAAAATGTTCTCTAATTACCAATTGCCGTCAAGCTCAGATTAA
 AATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTACAAGTCAAAATGCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACG
 GTTGGATGTGTCATGCTCAAATGGTCACTACTTGTGATTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACATT
 CATCCGATCCTCACTCCATCTGTAGAACATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACCTGGCTGAAT
 CCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCTC
 ACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTGATTCACAGTCATCAACGGAAAATGCAGCAATTACAT
 ATGCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATT
 TCCATGGACATCACCTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGAAAGGAGGGCACAGGGTCAGAAGTA
 ACTACTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAATGCAACTGCAAGCATTGGGAGTCAGACTCCCAC
 AGGTGCTGGTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGT
 ATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAAGGACGTTGAGAGGATCTGGATTATTCCCTCT
 GCCAAGAAACCTGGAGCAAATCAGAGCGGTCTTCAAATCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTGCTCCTAAAAA
 CCCAGGAACCGGCTGCTTCAACCATAATCAATGGTACCCCTAAATACTTGAGGACCAATCAGAGTCGAT
 ATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGAACTGTGGATGACT
 GGGCACCATAATGAAGACGTGAAATTGGACCAATGGAGTTCTGAGGACCAAGTCAGGATATAAGTTCTTATA
 CATGATTGGACATGGTATGTTGACTCCGATCTCATCTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTGAACATCCTCACATT

CAAGACGCTGCTTCGCAACTCCTGATGATGAGAGTTATTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAATCCAATCG
AGCTTGTAGAAGGTTGGTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCCTTTTCTTATCATAGGGTTAATCATTGG
ACTATTCTGGTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTGCAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTATACA
GACATAGAGATGAGAATTC (SEQ ID NO:31)。

[0246] 还用本文所述的方法和材料设计并生产了4-载体系统(即3-载体慢病毒包装系统)。4-载体系统的示意图如图3所示。简而言之,并参照图3,最上方的载体是辅助质粒,此例中不含Rev。上数第二个载体是独立的Rev质粒。下数第二个载体是包膜质粒。最下方的载体是前文所述的治疗载体。

[0247] 部分参照图3,辅助质粒包含CMV (CAG) 增强子 (SEQ ID NO:21) ; 鸡 β 肌动蛋白 (CAG) 启动子 (SEQ ID NO:13) ; 鸡 β 肌动蛋白内含子 (SEQ ID NO:22) ; HIV gag (SEQ ID NO:14) ; HIV Pol (SEQ ID NO:15) ; HIV Int (SEQ ID NO:16) ; HIV RRE (SEQ ID NO:8) ; 和兔 β 珠蛋白多聚A (SEQ ID NO:23) 。

[0248] Rev质粒包含RSV启动子和HIV Rev (SEQ ID NO:33) ; 以及兔 β 珠蛋白多聚A (SEQ ID NO:23) 。

[0249] 包膜质粒包含CMV启动子 (SEQ ID NO:19) ; β 珠蛋白内含子 (SEQ ID NO:24) ; VSV-G (SEQ ID NO:20) 和兔 β 珠蛋白多聚A (SEQ ID NO:23) 。

[0250] 合成包含辅助质粒、Rev质粒和包膜质粒的3-载体慢病毒包装系统。

[0251] 材料和方法:

[0252] 无Rev辅助质粒的构建:

[0253] 通过插入含有RRE和兔 β 珠蛋白聚A序列的DNA片段构建不含Rev的辅助质粒。该序列由Eurofins Genomics合成,两侧为XbaI和XmaI限制性位点。然后将RRE/兔多聚AB珠蛋白序列在XbaI和XmaI限制性位点处插入辅助质粒。该DNA序列如下所示: TCTAGAAGGAGCTTGT
TCCTGGGTTCTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATT
ATTGTCTGGTATAGTCAGCAGCAGACAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGAACAGCATCTGGCAACTCACA
GTCTGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAACCTGGCTGTGAAAGATACTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATC
TTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATT
TATTTTATTGCAATAGTGTGTTGGAATTGGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAA
AACATCAGAATGAGTATTGGTTAGAGTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTA
TAAAGAGGTCACTAGTATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTT
AGATTTTTTATATTGTTGTGTTATTGGTCTCTTAAACATCCCTAAATTCCATTGCTACATGTTTACTAGC
CAGATTTCCTCCTCTGACTACTCCCAGTCAGCTGTCCCTCTTATGAAGATCCCTGACCTGCAG
CCCAAGCTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCACATTCCACACAACATA
CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTGCCTAATGAGTGTGAGCTAACATTAATTGCGTGCCTCAG
TGCCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATACTCCGCC
CTAACTCCGCCATCCGCCCTAACTCCGCCAGTCCGCCATTCTCCGCCATGGCTGACTAATTGTTTA
TTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTGGAGGCCTAGG
CTTTGCAAAAGCTAACTGTTATTGCAGCTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTCA
ATAAAGCATTTCCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCAAACATCATCAATGTATCTTACCCGGG (SEQ ID NO:32) 。

[0254] Rev质粒的构建：

[0255] 由Eurofins Genomics将RSV启动子和HIV Rev序列合成为单个DNA片段,两侧为MfeI和XbaI限制性位点。然后将该DNA片段在MfeI和XbaI限制性位点处插入pCDNA3.1质粒(英杰公司)中,以RSV启动子替换CMV启动子。该DNA序列如下所示:

[0256] CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACCGTATCTGAGGGACTAGGGTGTGTTAGCGAAAAGCGGGCTTCGGTTGTACCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTCGCTTGCATAGGGAGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCCTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGAGATAATTGTATTAAAGTGCCTAGCTCGATAACAATAACGCCATTGACCATTCACCACATTGGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATGCCCTGGAGACGCCATCCACCGCTGTTGACCTCCATAGAACGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCTGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTCTATCAAGAACCCACCTCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGAGTAGTGAACGGATCCTAGCACTTATCTGGGACGATCTGGGAGCCTGTGCCTCTCAGCTACCCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTGGGACGCAGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA (SEQ ID NO:33)。

[0257] 可用类似元件修饰2-载体和3-载体包装系统的质粒,并且或许可以去除内含子序列而不丢失载体功能。例如,可用以下元件替换2-载体和3-载体包装系统中的类似元件:

[0258] 启动子:延长因子-1 (EF-1) (SEQ ID NO:34),磷酸甘油酸激酶 (PGK) (SEQ ID NO:35) 和遍在蛋白C (UbC) (SEQ ID NO:36) 可替换CMV (SEQ ID NO:19) 或鸡β肌动蛋白 (CAG) 启动子 (SEQ ID NO:13)。这些序列还可以通过添加、取代、缺失或突变进一步改变。

[0259] 多聚A序列:SV40多聚A (SEQ ID NO:37) 和bGH多聚A (SEQ ID NO:38) 可替换兔β珠蛋白多聚A (SEQ ID NO:23)。这些序列还可以通过添加、取代、缺失或突变进一步改变。

[0260] HIV Gag、Po1和整合酶序列:辅助质粒中的HIV序列可由不同的HIV株或进化枝构建。例如,可用Bal株的HIV Gag (SEQ ID NO:14),HIV Po1 (SEQ ID NO:15) 和HIV Int (SEQ ID NO:16) 替换辅助质粒/加Rev的辅助质粒中的gag、pol和int序列,如本文所述。这些序列还可以通过添加、取代、缺失或突变进一步改变。

[0261] 包膜:可用以下病毒的膜糖蛋白替换VSV-G糖蛋白:猫科内源性病毒 (RD114) (SEQ ID NO:39),长臂猿白血病病毒 (GALV) (SEQ ID NO:40),狂犬病病毒 (FUG) (SEQ ID NO:41),淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) (SEQ ID NO:42),甲型鸡瘟病毒 (FPV) (SEQ ID NO:43),罗斯河α病毒 (RRV) (SEQ ID NO:44),鼠白血病病毒10A1 (MLV) (SEQ ID NO:45) 或埃博拉病毒 (EboV) (SEQ ID NO:46)。这些包膜的序列详见本文序列部分。此外,这些序列还可以通过添加、取代、缺失或突变进一步改变。

[0262] 概括地说,如下所示,可按部分比较和对照3-载体系统和4-载体系统。3-载体慢病毒系统包含:1.辅助质粒:HIV Gag、Po1、整合酶和Rev/Tat;2.包膜质粒:VSV-G/FUG包膜;和3.质粒载体:RSV、5'LTR、Psi包装信号、RRE、cPPT、H1、shFDPS、CMV、BTN3A3 (R381H) T2A IL-2、WPRE和3'LTR。4-载体慢病毒系统包含:1.辅助质粒:HIV Gag、Po1和整合酶;2. Rev质粒:Rev;3.包膜质粒:VSV-G/FUG包膜;和4.质粒载体:RSV、5'LTR、Psi包装信号、RRE、cPPT、H1、shFDPS、CMV、BTN3A3 (R381H) T2A IL-2、WPRE和3'LTR。与上述元件相对应的序列详见序列

表部分。

- [0263] 实施例2-抑制FDPS的慢病毒载体系统的开发
- [0264] 本实施例的目的是开发一种FDPS抑制性慢病毒载体,本文亦称LV-shFDPS。
- [0265] 抑制性RNA设计:用人法尼基二磷酸合酶(FDPS)(NM_002004.3)mRNA序列检索用于敲低人细胞中FDPS水平的siRNA或shRNA潜在候选者。用siRNA或shRNA设计程序鉴定潜在RNA干扰序列,例如博德研究所(Broad Institute)的GPP门户网站(<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/>)上的那些或赛默科技(Thermo Scientific)的BLOCK-iT RNAi设计器(<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>)。各个选定的shRNA序列分别插入慢病毒载体,紧接在RNA聚合酶III启动子(例如H1(SEQ ID NO:10)、U6(SEQ ID NO:47)或7SK(SEQ ID NO:48))的3侧来调控shRNA表达。用这些慢病毒shRNA构建体转导细胞并测定特定mRNA水平的变化。将降低mRNA水平最有效的shRNA各自单独插入微小RNA骨架内以便由EF-1 α 或CMV RNA聚合酶II启动子驱动表达。微小RNA骨架选自mirbase.org。还将RNA序列合成为合成siRNA寡核苷酸并直接导入细胞而不用慢病毒载体。
- [0266] 慢病毒载体构建:就FDPS shRNA而言,由Eurofins Genomics合成含有BamHI和EcoRI限制性位点的寡核苷酸序列。将重叠的有义和反义寡核苷酸序列混合并在从70摄氏度冷却至室温的过程中退火。慢病毒载体用限制酶BamHI和EcoRI在37摄氏度消化1小时。琼脂糖凝胶电泳纯化经消化的慢病毒载体,并用赛默科技的DNA凝胶提取试剂盒从凝胶中提取经消化的慢病毒载体。测定DNA浓度,并混合载体与寡核苷酸(3:1比例),退火,然后连接。用T4 DNA连接酶在室温下进行连接反应30分钟。将2.5微升的连接混合物加入25微升的STBL3感受态细菌细胞中。42摄氏度热激完成转化。将细菌细胞涂布在含有氨苄青霉素的琼脂平板上,回收抗药性菌落(表明存在氨苄青霉素抗性质粒),然后在LB肉汤中扩增。为了确认寡核苷酸序列的插入,用赛默科技的迷你DNA制备试剂盒(DNA mini prep kit)从收获的细菌培养物中提取质粒DNA。采用shRNA表达调控启动子特异性引物进行DNA测序来确认shRNA序列在慢病毒载体中的插入。使用以下靶序列测定例举的shRNA序列对FDPS的敲低:
- [0267] GTCCTGGAGTACAATGCCATT
- [0268] (FDPS靶序列#1;SEQ ID NO:49) ;
- [0269] GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT (FDPS shRNA序列#1;SEQ ID NO:1) ;
- [0270] GCAGGATTCGTTCAGCACTT
- [0271] (FDPS靶序列#2;SEQ ID NO:50) ;
- [0272] GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT (FDPS shRNA序列#2;SEQ ID NO:2) ;
- [0273] GCCATGTACATGGCAGGAATT
- [0274] (FDPS靶序列#3;SEQ ID NO:51) ;
- [0275] GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCCTGCCATGTACATGGCTTTT (FDPS shRNA序列#3;SEQ ID NO:3) ;
- [0276] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGT
- [0277] (FDPS靶序列#4;SEQ ID NO:52) ;和
- [0278] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (FDPS shRNA序列#

4;SEQ ID NO:4)。

[0279] 可如图2-4中所示构建治疗载体(本文亦称慢病毒质粒),这不对前文所述任何内容构成限定。继续参照图4:

[0280] 载体1从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;CMV序列;BTN3A1序列;WPRE序列;和3'LTR序列。

[0281] 载体2从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;CMV序列;BTN3A3序列;WPRE序列和3'LTR序列。

[0282] 载体3从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;CMV序列;BTN3A3(R381H)序列;WPRE序列和3'LTR序列。

[0283] 载体4从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;H1序列;shFDPS序列;CMV序列;BTN3A1序列;WPRE序列和3'LTR序列。

[0284] 载体5从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;H1序列;shFDPS序列;CMV序列;BTN3A3序列;WPRE序列和3'LTR序列。

[0285] 载体6从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;H1序列;shFDPS序列;CMV序列;BTN3A3(R381H)序列;WPRE序列和3'LTR序列。

[0286] 载体7从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;H1序列;shFDPS序列;AFP序列;BTN3A3(R381H)序列;WPRE序列和3'LTR序列。

[0287] 载体8从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;H1序列;shFDPS序列;CMV序列;IL-2序列;WPRE序列和3'LTR序列。

[0288] 载体9从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;H1序列;shFDPS序列;CMV序列;IL-15序列;WPRE序列和3'LTR序列。

[0289] 载体10从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;H1序列;shFDPS序列;CMV序列;IL-18序列;WPRE序列和3'LTR序列。

[0290] 载体11从左至右包含5'LTR序列;Psi序列;RRE序列;H1序列;shFDPS序列;CMV序列;BTN3A3(R381H)序列;T2A序列;IL-2序列;WPRE序列和3'LTR序列。

[0291] 实施例3-PC3前列腺癌细胞中BTN3A3(R381H)或BTN3A3(WT)的表达

[0292] 本实施例显示表达BTN3A3(R381H)或BTN3A3(WT)的慢病毒(LV)在PC3细胞中所致BTN3A3(R381H)或BTN3A3(WT)表达激发GD T细胞的TNF- α 表达,如图5所示。

[0293] 用LV-载体、LV-BTN3A3(R381H)或用LV-BTN3A3(WT)转导PC3细胞。转导后三天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,转导PC3细胞与 5×10^5 个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞用唑来膦酸和IL-2预先激发11天以扩增V γ 9V δ 2T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V δ 2抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V δ 2和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上选择V δ 2+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V δ 2T细胞出现在流式细胞图的右上象限。不用唑来膦酸,LV-载体所得TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞百分比为0.37%,BTN3A3(R381H)为26.7%,LV-BTN3A3(WT)为0.44%。用唑来膦酸,LV-载体所得TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞百分比为8.91%,BTN3A3(R381H)为35.2%,LV-BTN3A3(WT)为8.76%。

[0294] 实施例4-shRNA#4在HepG2肝癌细胞中的FDPS敲低和BTN3A3(R381H)表达

[0295] 本实施例显示表达BTN3A3(R381H)和FDPS shRNA#4的慢病毒(LV)所致BTN3A3

(R381H) 表达和FDPS敲低激发GD T细胞的TNF- α 表达,如图6所示。

[0296] 用LV-载体、LV-BTN3A3 (R381H) 或LV-shFDPS-BTN3A3 (R381H) 转导HepG2细胞。转导后三天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导HepG2细胞与 5×10^5 个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞用唑来膦酸和IL-2预先激发11天以扩增V γ 9V82T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V82抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V82和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上选择V82+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82T细胞出现在流式细胞图的右上象限。不用唑来膦酸,LV-载体所得TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞百分比为0.6%,BTN3A3 (R381H) 为9.5%,LV-shFDPS-BTN3A3 (R381H) 组合为13.2%。用唑来膦酸,LV-载体所得TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞百分比为7.2%,BTN3A3 (R381H) 为17.8%,LV-shFDPS-BTN3A3 (R381H) 组合为30.1%。

[0297] 实施例5-shRNA#4在PC3前列腺癌细胞中的FDPS敲低和BTN3A3 (R381H) 表达

[0298] 本实施例显示表达BTN3A3 (R381H) 和FDPS shRNA#4的慢病毒 (LV) 所致BTN3A3 (R381H) 表达和FDPS敲低激发GD T细胞的TNF- α 表达,如图7所示。

[0299] 用LV-载体、LV-BTN3A3 (R381H) 或LV-shFDPS-BTN3A3 (R381H) 转导PC3细胞。转导后三天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,转导PC3细胞与 5×10^5 个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞用唑来膦酸和IL-2预先激发11天以扩增V γ 9V82T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V82抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V82和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上选择V82+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82T细胞出现在流式细胞图的右上象限。不用唑来膦酸,LV-载体所得TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞百分比为0.1%,BTN3A3 (R381H) 为21.1%,LV-shFDPS-BTN3A3 (R381H) 组合为18.2%。用唑来膦酸,LV-载体所得TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞百分比为13.6%,BTN3A3 (R381H) 为25.5%,LV-shFDPS-BTN3A3 (R381H) 组合为39.6%。

[0300] 实施例6-shRNA#4在HepG2肝癌细胞中的FDPS敲低和IL-2表达

[0301] 本实施例显示表达IL-2和FDPS shRNA#4的慢病毒 (LV) 所致IL-2表达和FDPS敲低激发GD T细胞的TNF- α 表达,如图8所示。

[0302] 用LV-shFDPS或LV-shFDPS-IL-2转导HepG2细胞。转导后三天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导HepG2细胞与 5×10^5 个PBMC细胞且有或无IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞用唑来膦酸和IL-2预先激发11天以扩增V γ 9V82T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V82抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V82和TNF- α 染色后对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上选择V82+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82T细胞出现在流式细胞图的右上象限。仅用唑来膦酸,LV-shFDPS所得TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞百分比为7.5%,LV-shFDPS-IL-2为20.1%。用唑来膦酸和IL-2,LV-shFDPS所得TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞百分比为27.8%,LV-shFDPS-IL-2为24.7%。

[0303] 实施例7-shRNA#4在PC3癌细胞中的FDPS敲低和IL-2表达

[0304] 本实施例显示表达IL-2和FDPS shRNA#4的慢病毒 (LV) 所致IL-2表达和FDPS敲低激发GD T细胞的TNF- α 表达,如图9所示。

[0305] 用LV-shFDPS或LV-shFDPS-IL-2转导PC3细胞。转导后三天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导PC3细胞与 5×10^5 个PBMC细胞且有或无IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞用唑来膦酸和IL-2预先激发11天以扩增V γ 9V82T细胞。用偶联荧光团

的抗TCR-V δ 2抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V δ 2和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上选择V δ 2+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V δ 2T细胞出现在流式细胞图的右上象限。仅用唑来膦酸,LV-shFDPS所得TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞百分比为24.6%,LV-shFDPS-IL-2为46.8%。用唑来膦酸和IL-2,LV-shFDPS所得TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞百分比为48.6%,LV-shFDPS-IL-2为41%。

[0306] 实施例8-shRNA#4在PC3癌细胞中的FDPS敲低和IL-15表达

[0307] 本实施例显示表达IL-15和FDPS shRNA#4的慢病毒(LV)所致IL-15表达和FDPS敲低激发GD T细胞的TNF- α 表达,如图10所示。

[0308] 用LV-载体、LV-shFDPS或LV-shFDPS-IL-15转导PC3细胞。转导后三天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导PC3细胞与 5×10^5 个PBMC细胞且有或无IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞用唑来膦酸和IL-2预先激发11天以扩增V γ 9V δ 2T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V δ 2抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V δ 2和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上选择V δ 2+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V δ 2T细胞出现在流式细胞图的右上象限。仅用唑来膦酸,LV载体所得TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞百分比为10%,LV-shFDPS为13%,LV-shFDPS-IL-15为14.6%。用唑来膦酸和IL-2,LV载体所得TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞百分比为14.5%,LV-shFDPS为21.7%,LV-shFDPS-IL-15为21%。

[0309] 实施例9-LV-BTN3A3 (R381H) 和LV-shFDPS-BTN3A3 (R381H) 在PC3和HepG2癌细胞中的BTN3A3表达

[0310] 本实施例显示仅表达BTN3A3 (R381H) 和共表达shFDPS的慢病毒(LV) 在PC3和HepG2癌细胞中提高BTN3A3表达,如图11所示。

[0311] PC3前列腺癌细胞和HepG2肝癌细胞用LV-载体或LV-BTN3A3 (R381H) 转导3天,如图11A和11B所示。用偶联荧光团的抗BTN3A3 (CD277) 抗体进行BTN3A3染色后,对细胞进行流式细胞术分析。PC3和HepG2细胞的平均荧光强度(MFI) 分别从6升至21,从3升至10。HepG2肝癌细胞用LV-载体或LV-shFDPS-BTN3A3 (R381H) 转导3天,如图11C所示。平均荧光强度(MFI) 从4升至18。

[0312] 实施例10-用Lv-shFDPS转导细胞和唑来膦酸激活细胞毒性V γ 2V δ 2细胞

[0313] 本实施例显示表达shFDPS (LV-shFDPS) 的慢病毒和唑来膦酸处理增强细胞毒性V γ 2V δ 2细胞的活化,如图12所示。

[0314] HepG2肝癌细胞用Lv-shFDPS、Lv-FDPS-IL-15(表达shRNAFDPS和人细胞因子白介素15两者)或Lv-对照转导,并培养72小时。将唑来膦酸(1 μ M)加入(1)Lv-shFDPS转导的细胞,(2)Lv-FDPS-IL-15转导的细胞和(3)Lv-对照转导的HepG2细胞。经处理的细胞培养24小时。Lv-shFDPS转导细胞、Lv-FDPS-IL-15转导细胞和Lv-对照转导细胞与富集了V γ 9V δ 2细胞的PBMC和转运蛋白抑制剂(BD GolgiStop)共培养4小时。4小时的激发后,收集细胞并用V δ 2藻红蛋白(PE)和TNF α 别藻蓝蛋白(APC)标记,然后对标记细胞进行流式细胞术分析。

[0315] 结果显示,Lv-FDPS组的1 μ M唑来膦酸存在下的反应性V γ 9V δ 2T细胞(据胞内细胞因子染色测定为表达TNF- α)频率高于Lv-对照组,Lv-FDPS-IL-15组更高。与Lv-对照相比,添加100单位/m¹白介素-2(IL-2)增强Lv-FDPS转导HepG2细胞对V γ 9V δ 2T细胞的活化,但用IL-2替换IL-15降低了Lv-FDPS与Lv-FDPS-IL-15处理的HepG2之间V γ 9V δ 2T细胞活化的差

异。

[0316] 实施例11-小鼠中Lv-shFDPS比之Lv-对照转导PC3肿瘤的生长曲线

[0317] 本实施例显示Lv-shFDPS处理后小鼠中人前列腺癌 (PC3) 细胞肿瘤生长速度降低,如图13所示。

[0318] NSGTM小鼠皮下注射Matrigel®和三百万个Lv-shFDPS转导或Lv-对照转导的PC3细胞。监测肿瘤,每周测量两次。用卡尺测量各个肿瘤的垂直两径来测定肿瘤大小。用以下公式计算肿瘤体积 (mm³) : $d^2 \times (D/2)$, 其中,d=最短直径,D=最长直径。

[0319] Lv-shFDPS转导和/或处理的异种移植PC3肿瘤比Lv对照转导和/或处理的异种移植PC3肿瘤生长慢。例如,Lv对照异种移植PC3肿瘤长到300mm³需21天,而Lv-shFDPS异种移植PC3肿瘤长到300mm³需30天。

[0320] 实施例12-Lv-FDPS或Lv-对照转导PC3肿瘤异种移植小鼠接受用或不用V γ 9V δ 2T细胞和/或唑来膦酸治疗时的肿瘤生长和生存

[0321] 本实施例显示用或不用唑来膦酸处理、Lv-shFDPS转导后V γ 9V δ 2T细胞处理的异种移植PC3肿瘤减慢肿瘤生长并提高生存率。

[0322] NSGTM小鼠右侧腹皮下注射 Matrigel® 和三百万个Lv-shFDPS (图14和15中亦作FDPS敲低或“FDPS KD”) 或Lv-对照 (图14和15中亦作“Lv”或“对照”) 之一转导的PC3细胞。监测肿瘤并测量肿瘤大小,直至达到约300mm³。用卡尺测量各个肿瘤的垂直两径来测定肿瘤大小。用以下公式计算肿瘤体积 (mm³) : $d^2 \times (D/2)$, 其中,d=最短直径,D=最长直径。

[0323] 当所得肿瘤大小达到300mm³时,将小鼠随机分成8组:四组Lv-shFDPS-转导小鼠和四组Lv-对照-转导小鼠。Lv-shFDPS-转导小鼠和Lv-对照-转导小鼠各抽一组每周一次腹膜内注射PBMC,共4周。Lv-shFDPS-转导小鼠和Lv-对照-转导小鼠各抽一组接受100 μ g/kg唑来膦酸处理。Lv-shFDPS-转导小鼠和Lv-对照-转导小鼠各抽一组接受PBMC和唑来膦酸联合处理。Lv-shFDPS-转导小鼠和Lv-对照-转导小鼠各抽一组每周一次腹膜内注射PBS,共4周(对照)。观测小鼠生存率,为期95天或直至肿瘤大小到达2000mm³,两者取其短者。研究末尾摘取肿瘤进行观测。

[0324] 如图14所示,Kaplan Meier生存曲线显示Lv-shFDPS PC3异种移植小鼠的生存率显著高于Lv-对照PC3异种移植(乱序(scramble))小鼠。接受PBMC(多数为V γ 9V δ 2细胞)处理的Lv-shFDPS异种移植小鼠的生存率高于没有接受PBMC处理的Lv-shFDPS异种移植小鼠的生存率。PBMC处理Lv-对照PC3异种移植小鼠对生存率没有显著影响。

[0325] 如图15所示,对Lv-shFDPS异种移植PC3肿瘤的大体观测显示肿瘤体积小于Lv-对照异种移植PC3肿瘤。PBMC(多数为V γ 9V δ 2细胞)处理的Lv-shFDPS异种移植PC3肿瘤的肿瘤体积显著小于未经PBMC处理的Lv-shFDPS PC3肿瘤的肿瘤体积。接受PBMC处理与未经PBMC处理的Lv-对照异种移植小鼠之间未见显著差异,组员肿瘤大小达到2000mm³时处死。100 μ g/kg唑来膦酸处理Lv-shFDPS-转导小鼠和Lv-对照-转导小鼠对肿瘤大小或生存率未见显著影响。

[0326] 如图16所示,对Lv-shFDPS异种移植PC3肿瘤外观的大体观测显示经PBMC处理的肿瘤体积明显小于未经PBMC处理的Lv-shFDPS PC3肿瘤。部分经PBMC处理的Lv-shFDPS PC3肿瘤表现为无可测肿瘤。

[0327] 实施例13-开发抑制FDPS、GGPS1和IDI1的慢病毒载体

[0328] 本实施例说明抑制FDPS、GGPS1和IDI1的慢病毒载体的开发,如图17所示。

[0329] shRNA序列克隆:用博德研究所(<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/seq/search>)的shRNA设计程序或赛默科技(Thermo Scientific)的BLOCK-iT RNAi设计器(<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>)鉴定潜在RNA干扰序列。含BamHI和EcoRI限制性位点的短发卡寡核苷酸序列或含BsrGI和EcoRI限制性位点的微小RNA序列由Eurofins Genomics合成。70摄氏度孵育后冷却至室温1小时令寡核苷酸序列退火。与之并行地,慢病毒载体用限制酶BamHI和EcoRI或BsrGI和EcoRI在37摄氏度消化1小时。琼脂糖凝胶电泳纯化经消化的慢病毒载体,并用DNA凝胶提取试剂盒(赛默科技)从凝胶中提取经消化的慢病毒载体。测定各自DNA浓度,将50ng载体加入2微升退火寡核苷酸。用T4 DNA连接酶在室温下进行连接反应30分钟。将2.5微升的连接混合物加入25微升的StbI3感受态细菌细胞中。42摄氏度热激转化。将细菌细胞划线接种在含有氨苄青霉素的琼脂平板上,选得的菌落在LB肉汤中扩增。为了确认寡核苷酸序列的插入,用赛默科技的迷你DNA制备试剂盒(DNA mini prep kit)从收获的细菌培养物中提取质粒DNA。用H1或EF-1引物进行DNA测序来确认shRNA序列在慢病毒载体中的插入。用含有正确shRNA序列的慢病毒载体包装慢病毒颗粒用于监测它们敲低mRNA的能力。用慢病毒颗粒转导细胞并于3天后收集细胞;进行蛋白质分析和mRNA分析。

[0330] FDPS shRNA序列鉴定用人法尼基二磷酸合酶(FDPS)(NM_002004.3)mRNA序列检索用于降低人细胞中FDPS水平的shRNA潜在候选者。在上述FDPS shRNA序列#1-4之外,测定以下举例的shRNA和微小RNA序列对FDPS的敲低:

[0331] ACTTTCTCAGCCTCCTCTGCCTCGAGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTTTTT

[0332] (FDPS shRNA序列#4A; SEQ ID NO:64) ;

[0333] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGAGCTCACTTCTCAGCCTCCTCTG

[0334] (FPDS shRNA序列#4R; SEQ ID NO:65) ;

[0335] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTTT

[0336] (FDPS shRNA序列#4TT; SEQ ID NO:66) ;

[0337] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTTT

[0338] (FDPS shRNA序列#4L; SEQ ID NO:67) ;

[0339] AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAG
AAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT

[0340] (FDPS miR30序列#1; SEQ ID NO:68) ;

[0341] AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAG
AAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT

[0342] (FDPS miR30序列#3; SEQ ID NO:69) 。

[0343] GGPS1 shRNA序列鉴定用人香叶基香叶基焦磷酸合酶(GGPS1)(NM_001037277.1)mRNA序列检索用于降低人细胞中GGPS1水平的shRNA潜在候选者。使用以下靶序列测定例举的shRNA序列对GGPS1的敲低:

[0344] GCTTGAAGCTAAAGCCTATAA

[0345] (GGPS1靶序列#1; SEQ ID NO:73) ;

[0346] GCTTGAAGCTAAAGCCTATAACTCGAGTTAGGCTTAGCTCAAGCTTTT

- [0347] (GGPS1 shRNA序列#1;SEQ ID NO:70) ;
- [0348] GTACATTATCTTGAGGATGTA
- [0349] (GGPS1靶序列#2;SEQ ID NO:74) ;
- [0350] GTACATTATCTTGAGGATGACTCGAGTACATCCTCAAGATAATGTACTTTT
- [0351] (GGPS1 shRNA序列#2;SEQ ID NO:71) ;
- [0352] CCTGAGCTAGTAGCCTAGTA
- [0353] (GGPS1靶序列#3;SEQ ID NO:75) ;和
- [0354] CCTGAGCTAGTAGCCTAGTACTCGAGTACTAAGGCTACTAGCTCAGGTTTT
- [0355] (GGPS1 shRNA序列#3;SEQ ID NO:72) 。
- [0356] IDI1 shRNA序列鉴定用人异戊烯基二磷酸δ-异构酶1 (IDI1) (NM_004508.3) mRNA 序列检索用于降低人细胞中 IDI1 水平的 shRNA 潜在候选者。使用以下靶序列测定例举的 shRNA 序列对 IDI1 的敲低：
- [0357] GCCAGTGGTGAAATTAAGATA
- [0358] (IDI1靶序列;SEQ ID NO:77) ;和
- [0359] GCCAGTGGTGAAATTAAGATACTCGAGTATCTTAATTCAACCTGGCTTTT
- [0360] (IDI1 shRNA序列;SEQ ID NO:76) 。
- [0361] 实施例14-shFDPS表达性慢病毒转导HepG2肝细胞癌细胞中的FDPS RNA和蛋白质表达
- [0362] 本实施例显示shFDPS在HepG2细胞中降低FDPS RNA和蛋白质表达。
- [0363] 图18显示shFDPS降低FDPS蛋白表达。用含有shCon或两种不同FDPS shRNA序列即 LV-shFDPS#1 (SEQ ID NO:1) 或 LV-shFDPS#4 (SEQ ID NO:4) 的慢病毒载体按5MOI感染HepG2 细胞。48小时后,用或不用1μM唑来膦酸 (Zol) 处理细胞。72小时后,裂解细胞并用抗FDPS抗体和作为蛋白质上样对照的抗肌动蛋白抗体进行免疫印迹。定量测定免疫印迹带的光密度,并将LV-sh对照 (LV-shControl) 设为1 (100%)。FDPS蛋白表达降低62% (LV-shFDPS#1 (SEQ ID NO:1)) ,48% (LV-shFDPS#1+Zol (SEQ ID NO:1)) ,44% (LV-shFDPS#4 (SEQ ID NO:4)) 和32% (LV-shFDPS#4+Zol (SEQ ID NO:4)) 。
- [0364] 实施例15-shFDPS发卡环变异表达性慢病毒转导的PC3前列腺癌细胞中的FDPS蛋白表达
- [0365] 本实施例显示shFDPS发夹环变异:A(反义-环-有义),R(有义-反向环-反义),TT(有义-TT-反义)和L(有义-反义)有效降低PC3细胞中的FDPS蛋白表达。
- [0366] 用慢病毒载体按5MOI感染PC3细胞,所述慢病毒载体包含非靶向序列(shCon)或不同的shFDPS变体,即shFDPS#4 (SEQ ID NO:4) 、shFDPS-A (SEQ ID NO:64) 、shFDPS-R (SEQ ID NO:65) 、shFDPS-TT (SEQ ID NO:66) 或shFDPS-L (SEQ ID NO:67) 。72小时后,将细胞裂解并使用RNeasy迷你试剂盒 (RNeasy mini kit) 提取RNA。用SuperScript VILO cDNA合成试剂盒由RNA合成cDNA。用“TaqMan快速高级主混合物” (TaqMan Fast Advanced Master Mix) 进行PCR反应,然后用Applied Biosystems QuantStudio3 qPCR仪 (赛默科技) 通过定量PCR (qPCR) 分析样品。
- [0367] 用TaqMan FDPS探针和FDPS引物通过定量PCR测定FDPS cDNA的表达。就图19A而言,用Fam-标记的TaqMan探针 (5' -TAGCATCTCCTATCTCTGGGTGCC-3') (SEQ ID NO:78) 、用

FDPS正向引物(5'-GTGCTGACTGAGGATGAGATG-3')(SEQ ID NO:79)和反向引物(5'-CCGGTTATACTTGCCTCCAAT-3')(SEQ ID NO:80)检测FDPS表达。将样品相对于肌动蛋白表达标准化。用Fam-标记的TaqMan探针(5'-AGCGGGAAATCGTGCAC-3')(SEQ ID NO:81)、用肌动蛋白正向引物(5'-GGACCTGACTGACTACCTCAT-3')(SEQ ID NO:82)和反向引物(5'-CGTAGCACAGCTCTCCTTAAT-3')(SEQ ID NO:83)检测肌动蛋白。将shCon样品的相对FDPS RNA表达设为100%。如图19A所示,FDPS蛋白表达降低95%(shFDPS#4(SEQ ID NO:4)),75%(shFDPS-A(SEQ ID NO:64)),95%(shFDPS-R(SEQ ID NO:65)),90%(shFDPS-TT(SEQ ID NO:66))和72%(FDPS-L(SEQ ID NO:67))。

[0368] 为了检查shFDPS变异对蛋白质表达的影响,用含有sh对照(shControl)或shFDPS#4变体的慢病毒载体按5MOI感染PC3细胞。72小时后,裂解细胞并使用抗FDPS抗体和作为蛋白质上样对照的抗肌动蛋白抗体进行免疫印迹。定量测定免疫印迹带的光密度,并将LV-sh对照设为1(100%)。如图19B所示,FDPS蛋白表达降低87%(LV-shFDPS#4(SEQ ID NO:4)),13%(LV-shFDPS-A(SEQ ID NO:64)),88%(LV-shFDPS-R(SEQ ID NO:65)),81%(LV-FDPS-TT(SEQ ID NO:66))和37%(LV-FDPS-L(SEQ ID NO:67))。

[0369] 实施例16-miR30-FDPS表达性慢病毒转导HepG2肝细胞癌细胞中的FDPS蛋白表达

[0370] 本实施例显示用表达miR30-FDPS的慢病毒转导的细胞中FDPS蛋白表达降低。

[0371] 为了测量FDPS蛋白的表达,用慢病毒载体按5MOI感染HepG2人肝细胞癌细胞,所用慢病毒载体含有sh对照、shFDPS#3(SEQ ID NO:3)、miR30-FDPS#1(SEQ ID NO:68)或miR30-FDPS#3(SEQ ID NO:69)。72小时后,用NP-40裂解缓冲液裂解细胞,用Bio-Rad蛋白质检测试剂测定蛋白质。将50微克蛋白质样品在4-12% Bis-Tris凝胶(赛默科技)上电泳并转移至PVDF膜。用5%的印迹级封闭剂封闭印迹。用抗FDPS抗体(Bethyl实验室(Bethyl Laboratories))和作为蛋白质上样对照的抗肌动蛋白抗体(密理博西格玛公司(Millipore Sigma))进行免疫印迹。用HRP偶联的第二抗体(赛默科技)结合抗体,并用Licor c-Digit印迹扫描仪和Immobilon Western ECL试剂(密理博西格玛公司)进行检测。用NIH成像软件定量测定免疫印迹带的光密度,并将LV-sh对照设为1(100%)。如图20所示,FDPS蛋白表达的降低分别为85%(LV-shFDPS#4(SEQ ID NO:4)),59%(LV-miR30-FDPS#1(SEQ ID NO:68))和53%(LV-miR30-FDPS#3(SEQ ID NO:69))。

[0372] 实施例17-表达miR30-FDPS#1的慢病毒转导的THP-1单核细胞白血病癌细胞对V γ 9V δ 2T细胞的活化

[0373] 本实施例显示表达miR30-FDPS miRNA#1(SEQ ID NO:68)的LV联合或不联合唑来膦酸处理在THP-1单核细胞白血病癌细胞中FDPS敲低7天激发V γ 9V δ 2T细胞的TNF- α 表达,如图21所示。

[0374] 用LV对照或LV-miR30 FDPS#1(SEQ ID NO:68)转导THP1细胞(2×10^5 个细胞)7天。用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导THP-1细胞与 2×10^5 个PBMC细胞在5mL圆底试管中共培养4小时。PBMC细胞已用唑来膦酸和IL-2预刺激至少11天以扩增V γ 9V δ 2T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V δ 2抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V δ 2和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上鉴定V δ 2+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V δ 2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。不用唑来膦酸,LV-对照激发2.44%的TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞,LV-miR30 FDPS#1(SEQ ID NO:68)激发28.4%。有唑来膦酸处理,

LV-对照激发23.8%的TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞, LV-miR30 FDPS#1 (SEQ ID NO:68) 激发61.4%。

[0375] 实施例18-shGGPS1表达性慢病毒转导HeLa宫颈癌细胞中的GGPS1蛋白表达

[0376] 用含有sh对照 (shCon) 或三种不同GGPS1 shRNA序列即LV-shGGPS1#1 (SEQ ID NO:70)、LV-shGGPS1#2 (SEQ ID NO:71) 或LV-shGGPS1#3 (SEQ ID NO:73) 的慢病毒载体按5MOI 感染HeLa细胞。72小时后, 裂解细胞并用圣克鲁斯生物技术 (Santa Cruz Biotechnology) 的抗GGPS1抗体 (目录号sc-271680) 和作为蛋白质上样对照的抗肌动蛋白抗体进行免疫印迹。定量测定免疫印迹带的光密度, 并将LV-sh对照设为1 (100%)。如图22所示, FDPS蛋白表达降低分别为54% (LV-shGGPS1#1 (SEQ ID NO:70)) , 69% (LV-shGGPS1#2 (SEQ ID NO:71)) 和51% (LV-shGGPS1#3 (SEQ ID NO:72))。

[0377] 实施例19-表达shFDPS或shGGPS1的慢病毒转导并经唑来膦酸处理的PC3前列腺癌细胞对V γ 9V δ 2T细胞的活化。

[0378] 本实施例显示表达FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 或表达GGPS1 shRNA#1 (SEQ ID NO:1) 的LV转导并经唑来膦酸处理的PC3细胞中FDPS或GGPS1敲低3天激发V γ 9V δ 2T细胞中的TNF- α 表达, 如图23所示。

[0379] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 或LV-GGPS1 shRNA#1 (SEQ ID NO:70) 转导PC3细胞3天。转导后两天, 用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后, 将转导PC3细胞与5 \times 10⁵个PBMC细胞在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞已用唑来膦酸和IL-2预刺激至少11天以扩增V γ 9V δ 2T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V82抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V δ 2和TNF- α 染色后, 对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞, 并在斑点印迹上鉴定V δ 2+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V δ 2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。不用唑来膦酸, LV-对照激发2.78%的TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞, LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 则激发0.77%, LV-GGPS1#1shRNA (SEQ ID NO:70) 激发1.23%。有唑来膦酸处理, LV-对照激发5.71%的TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞, LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 则激发11.4%, LV-GGPS1#1shRNA (SEQ ID NO:70) 激发10%。

[0380] 实施例20-表达shFDPS或shGGPS1的慢病毒转导并经唑来膦酸处理的HepG2肝癌细胞对V82+T细胞的活化

[0381] 本实施例显示表达FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 或表达GGPS1 shRNA#1 (SEQ ID NO:70) 的LV转导并经唑来膦酸处理的HepG2细胞中FDPS或GGPS1敲低3天激发V γ 9V δ 2T细胞中的TNF- α 表达, 如图24所示。

[0382] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 或LV-GGPS1 shRNA#1 (SEQ ID NO:70) 转导HepG2细胞3天。转导后两天, 用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后, 将转导HepG2细胞与5 \times 10⁵个PBMC细胞在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞已用唑来膦酸和IL-2预刺激至少11天以扩增V γ 9V δ 2T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V82抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V δ 2和TNF- α 染色后, 对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞, 并在斑点印迹上鉴定V δ 2+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V δ 2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。不用唑来膦酸, LV-对照激发0.36%的TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞, LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 则激发0.9%, LV-GGPS1#1shRNA (SEQ ID NO:70) 激发0.58%。有唑来膦酸处理, LV-对照激发6.88%的TNF- α 表达性V γ 9V δ 2T细胞, LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 则激发

21.1%，LV-GGPS1#1shRNA (SEQ ID NO:70) 激发12%。

[0383] 实施例21-表达shFDPS或shGGPS1的慢病毒转导并经唑来膦酸处理的THP-1细胞对V γ 9V82T细胞的活化。

[0384] 本实施例显示表达FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 或表达GGPS1 shRNA#1 (SEQ ID NO:70) 的Lv转导并经唑来膦酸处理的THP-1细胞中FDPS或GGPS1敲低3天激发V γ 9V82T细胞中的TNF- α 表达,如图25所示。

[0385] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 或LV-GGPS1 shRNA#1 (SEQ ID NO:70) 转导THP-1细胞3天。转导后两天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导THP-1细胞与5 \times 10⁵个PBMC细胞在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞已用唑来膦酸和IL-2预先激发至少11天以扩增V γ 9V82T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V82抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V82和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上鉴定V82+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。不用唑来膦酸,LV-对照激发1.33%的TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞,LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 则激发2.49%,LV-GGPS1#1shRNA (SEQ ID NO:70) 激发1.22%,两者组合激发1.91%。用唑来膦酸处理,LV-对照激发5.74%的TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞,LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 则激发10.8%,LV-GGPS1#1shRNA (SEQ ID NO:70) 激发4.5%,两者组合激发11.5%。

[0386] 实施例22-shIDI1表达性慢病毒转导PC3前列腺癌细胞中的IDI1蛋白表达

[0387] 本实施例显示据免疫印迹分析确定,编码IDI1 shRNA序列的慢病毒载体转导对IDI1表达的影响。

[0388] 用包含sh对照或IDI1 shRNA序列 (SEQ ID NO:76) 的慢病毒载体按5MOI感染PC3细胞。72小时后,裂解细胞并用赛默科技的抗IDI1抗体(目录号PA5-44207)和作为蛋白质上样对照的抗肌动蛋白抗体进行免疫印迹。定量测定免疫印迹带的光密度,并将Lv-sh对照设为1(100%)。如图26所示,IDI1蛋白表达降低88%。

[0389] 实施例23-表达shFDPS或shIDI1的慢病毒转导并经唑来膦酸处理的PC3前列腺癌细胞对V γ 9V82T细胞的活化。

[0390] 本实施例显示表达FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 或IDI1 shRNA#1 (SEQ ID NO:76) 的Lv转导并经唑来膦酸处理的PC3细胞中FDPS或IDI1敲低3天激发V γ 9V82T细胞中的TNF- α 表达,如图27所示。

[0391] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 或LV-IDII shRNA#1 (SEQ ID NO:76) 转导PC3细胞3天。转导后两天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导PC3细胞与5 \times 10⁵个PBMC细胞在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞已用唑来膦酸和IL-2预先激发至少11天以扩增V γ 9V82T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V82抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V82和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上鉴定V82+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。不用唑来膦酸,LV-对照激发3.82%的TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞,LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 则激发2.28%,LV-IDII shRNA#1 (SEQ ID NO:76) 激发1.92%。有唑来膦酸处理,LV-对照激发8.66%的TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞,LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 则激发36.9%,LV-IDII shRNA#1 (SEQ ID NO:76) 激发12.9%。

[0392] 实施例24-唑来膦酸(Zol)、FTI277(FTI)或萨拉戈萨酸(ZA)处理的THP-1急性单核细胞白血病细胞对V γ 9V82T细胞的活化。

[0393] 本实施例显示唑来膦酸处理激发V γ 9V82T细胞中的TNF- α 表达,如图28所示。

[0394] ZA是固醇合成专门通路中鲨烯合酶的小分子抑制剂。THP-1细胞用FDPS抑制剂Zol(10 μ M)、法尼基转移酶抑制剂FTI(10 μ M)或ZA(50 μ M)处理24小时。THP-1细胞(2.5 \times 10⁵个)与2.5 \times 10⁵个PBMC细胞在圆底96孔板中共培养5小时。PBMC细胞已用唑来膦酸和IL-2预先激发至少11天以扩增V γ 9V82T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V82抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V82和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上鉴定V82+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。未处理的细胞激发3.08%的TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞,唑来膦酸处理激发40.1%,FTI277处理激发11.7%,萨拉戈萨酸激发2.13%。

[0395] 实施例25-表达shFDPS的慢病毒转导并经唑来膦酸(Zol)、FTI277(FTI)或萨拉戈萨酸(ZA)处理的PC3前列腺癌细胞对V γ 9V82T细胞的活化。

[0396] 本实施例显示表达FDPS shRNA#4的LV转导并经唑来膦酸处理的PC3细胞激发V γ 9V82T细胞中的TNF- α 表达,如图29所示。

[0397] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)转导PC3细胞3天。转导后2天,细胞用1 μ M唑来膦酸、1 μ M FTI277或5 μ M萨拉戈萨酸处理。24小时后,将转导PC3细胞与5 \times 10⁵个PBMC细胞在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞已用唑来膦酸和IL-2预先激发至少11天以扩增V γ 9V82T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V82抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V82和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上鉴定V82+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。LV-转导细胞中,未处理细胞激发1.73%的TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞,唑来膦酸处理激发2.87%,FTI277激发1.64%,萨拉戈萨酸激发1.57%。LV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)转导细胞中,未处理细胞激发1.77%的TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞,唑来膦酸激发50.3%,FTI277激发2.44%,萨拉戈萨酸激发2.66%。

[0398] 实施例26-表达shFDPS的慢病毒转导并经唑来膦酸(Zol)、FTI277(FTI)或萨拉戈萨酸(ZA)处理的HepG2肝细胞癌细胞对V γ 9V82T细胞的活化。

[0399] 本实施例显示用表达FDPS shRNA#4的LV转导并经唑来膦酸处理的HepG2细胞处理激发V γ 9V82T细胞中的TNF- α 表达,如图30所示。

[0400] HepG2细胞用LV对照或LV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)转导3天。转导后2天,细胞用1 μ M唑来膦酸、1 μ M FTI277或5 μ M萨拉戈萨酸处理。24小时后,将转导HepG2细胞与5 \times 10⁵个PBMC细胞在圆底96孔板中共培养4小时。PBMC细胞已用唑来膦酸和IL-2预先激发至少11天以扩增V γ 9V82T细胞。用偶联荧光团的抗TCR-V82抗体和抗TNF- α 抗体进行V γ 9V82和TNF- α 染色后,对细胞进行流式细胞术分析。门选活细胞,并在斑点印迹上鉴定V82+且TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。LV-转导细胞中,未处理细胞激发1.82%的TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞,唑来膦酸处理激发3.02%,FTI277激发1.72%,萨拉戈萨酸激发1.63%。LV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)转导细胞中,未处理细胞激发1.86%的TNF- α 表达性V γ 9V82T细胞,唑来膦酸激发50.8%,FTI277激发2.69%,萨拉戈萨酸激发2.82%。

[0401] 尽管以上描述并具体例举了本文某些优选实施方式,但本文所有发明均不局限于这些实施方式。

[0402] 序列

[0403] 文中提及以下序列,因此本文公开的内容包含以下序列:

SEQ ID NO:	说明	序列
1	FDPS shRNA 序列#1	GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT
2	FDPS shRNA 序列#2	GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT
3	FDPS shRNA 序列#3	GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCTGCCATGTACATGGCTTTT
4	FDPS shRNA 序列#4	GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCTCCTCTGCTTTT
5	劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子	GTAGTCTTATGCAATACTCTTAGTCTTGCACATGGTACGATGAGTTAGCAACATGCCCTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACAGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTAAAGTGCTAGCTGATACAATAACG
6	5'长末端重复序列(LTR)	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTCAAGTAGTGTGTGCCGTCTGTTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTAGTCAGTGAAAATCTCTAGCA
7	Psi 包装信号	TACGCCAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAG
8	Rev 应答元件(RRE)	AGGAGCTTGTTCCTGGGTTCTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCAGACAAATTATTGCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGAACAGCAGCTCTGCAACTCACAGTCTGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGAAAGATACTAAAGGATCAACAGCTCC
9	中央聚嘌呤序列(cPPT)	TTTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATAACAACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTATA
10	聚合酶 III shRNA 启动子; H1 启动子	GAACGCTGACGTCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGCCAGTGTCACTAGGCAGGAACACCCAGCGCGTGCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGAGTGGCCTGGCAATATTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTGATTTGGAAATCTTAAAGTTCTGTATGAGACCACT
11	长 WPRE 序列	AATCAACCTCTGATTACAAAATTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATGTTGCTCCTTACGCTATGTGGATAC

[0405]

		GCTGCTTAAATGCCCTTGATCATGCTATTGCTTCCCGTAT GGCTTCACTTTCTCCTCCTGTATAAATCCTGGTTGCTGT CTCTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG CGTGGTGTGCACTGTGTTGCTGACGCAACCCCCACTGGT TGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTT TCGCTTCCCCCTCCATTGCCACGGCGGAACTCATCGC CGCCTGCCTTGCCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTG GGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGAAATCATCG TCCTTCCTGGCTGCTGCCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT GCGCGGGACGTCTCTGCTACGTCCTCGGCCCTCAAT CCAGCGGACCTCCTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGC GGCCTTCGCCGCTTCGCCCTGCCCTCAGACGAGTCG GATCTCCCTTGGGCCCTCCCCGCCT
12	3' δ LTR	TGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGATAAGATCTGC TTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAAGATCTG AGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAAGGGAAACCCACTGCT TAAGCCTCAATAAAGCTGCTTGAGTGCTCAAGTAGTG TGTGCCGCTGTGACTCTGGTAAGTAGAGATCCC TCAGACCCCTTGTAGTCAGTGAAATCTAGCAGTAG TAGTTCATGTCA
13	辅助质粒/Rev; 鸡 β 肌动蛋白 (CAG)启动子; 转录	GCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTC ACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTGGTA TTTATTATTTTAATTATTTGTGCAAGCGATGGGGCG GGGGGGGGGGGGCGCGCGCAGGGCGGGGGCGGG GCGAGGGGGCGGGCGGGCGAGGGCGAGAGGTGCGCG GCAGCCAATCAGAGCGCGCGCTCCGAAAGTTCCCTTT ATGGCGAGGCAGCGCGCGCGCGCCCTATAAAAGCG AAGCGCGCGGGCG
14	辅助质粒/Rev; HIV Gag; 病毒衣 壳蛋白	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTA GATCGATGGAAAAAAATCGGTTAAGGCCAGGGGAAA AAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGCAAGCAG GGAGCTAGAACGATTGCACTGAGTTAACCTGGCTGTTAGA AACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGACAGCTACA ACCATCCCTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATT ATATAATACAGTAGCAACCTCTATTGTGTCATCAAAG GATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTAGACAAGA TAGAGGAAGAGCAAACAAAAGTAAGAAAAAGCACAG CAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGC CAAAATTACCCATAGTGCAGAACATCCAGGGCAAATG GTACATCAGGCCATATCACCTAGAACCTAAATGCATGG GTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTCAGGCCAGAAGTG ATACCCATGTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCAC AAGATTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGACATC AAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGG AAGCTGAGAATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAG GGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGA AGTGACATAGCAGGAACTACTAGTACCCCTCAGGAACAA ATAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCCAGTAGGA GAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAA ATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATA AGACAAGGACCAAAGGAACCCCTTAGAGAGACTATGTAGAC CGATTCTATAAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAA GAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAACCTTGTGTC AATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTAAAAGCATTG

		GGACCAAGGAGCGACACTAGAAGAAATGATGACAGCATG TCAGGGAGTGGGGGACCCGCCATAAAGCAAGAGTTT GGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCAT AATGATACAGAAAGCAATTAGGAACCAAAGAAAGA CTGTTAAGTGTTCATTGTCAGGAAAGAAGGGCACATAG CCAAAATTGCAGGGCCCTAGGAAAAGGGCTGTTGGA AATGTGGAAGGAAGGACACCAATGAAAGATTGTACTG AGAGACAGGCTAATTAGGAAGATCTGGCCTTCCC ACAAGGGAAAGGCCAGGGATTTCAGAGCAGACCAG AGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTGGGG AAGAGACAACAACCTCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAG ACAAGGAACGTATCCTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTT TGGCAGCGACCCCTCGTCACAATAA	
[0406]	15	辅助质粒/Rev; HIV Pol; 蛋白酶 和逆转录酶	ATGAATTGCCAGGAAGATGGAACAAAAATGATAGGG GGAATTGGAGGTTTATCAAAGTAGGACAGTATGATCAG ATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACA GTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGA AATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTAAATTTC TTAGTCCTATTGAGACTGTACAGTAAATTAAAGCCAG GAATGGATGCCAAAAGTTAACAAATGCCATTGACAG AAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTGTACAGAAA TGGAAAAGGAAGGAAAATTCAAAAATTGGCCTGAA AATCCATACAATACTCCAGTATTGCCATAAAGAAAAAA GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAA CTTAATAAGAGAACTCAAGATTCTGGAAAGTTCAATT GGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAACAGAAAAATCA GTAACAGTACTGGATGTGGCGATGCATATTTCAGTT CCTAGATAAAGACTTCAGGAAGTACTGCATTACCAT ACCTAGTATAAACAAATGAGACACCAGGGATTAGATATCA GTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGC AATATCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTT AGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATG GATGATTGTATGAGGACTGACTTAGAAATTAGGGCAG CATAGAACAAAATAGAGGAACTGAGACAAACATCTGTT AGGTGGGATTACACACCAGACAAAAACATCAGAAA GAACCTCCATTCTTGGATGGTTATGAACCTCCATCCTG ATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGTGCCAGAAAAGG ACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAGTGGAA AATTGAATTGGCAAGTCAGATTATGCAGGGATTAAAG TAAGGCAATTATGTAACCTCTTAGGGGAACCAAAGCAC TAACAGAACAGTACCAACTACAGAACAGCAGAGCTA GAACCTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAGAACCGGT ACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAGC AGAAATACAGAACAGCAGGGCAAGGCCATGGACATATC AAATTATCAAGAGCCATTAAAATCTGAAAACAGGAA AATATGCAAGAACATGAGGGTCCCCACACTAATGATGTA AACAAATTAAACAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCACAGAA AGCATAGTAATATGGGAAAGACTCCTAAATTAAATT CCCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGA GTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGAGTTGTC AATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAAGTTAGAGA AAGAACCCATAATAGGAGCAGAAACTTCTATGTAGATG GGCAGCCAATAGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGA TATGTAACGTACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTA ACGGACACAAACAAATCAGAACAGACTGAGTTACAAGCAATT

[0407]

		CATCTAGCTTGCAGGATTCGGGATTAGAAGTAAACATA GTGACAGACTCACAAATATGCATTGGAAATCATTCAAGCA CAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAGCAAATA ATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCA TGGGTACCAAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACA AGTAGATGGGTTGGTCAGTGTGGAATCAGGAAAGTACT A
16	辅助质粒 Rev; HIV 整合酶; 病 毒 RNA 整合	TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCAAGAAGAACATGAG AAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTT AACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGC TGTGATAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGGA CAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGT ACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTGGTAGCAGTTCAT GTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCA GAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTCCTCTAAAATTA GCAGGAAGATGCCAGTAAAACAGTACATACAGACAA TGGCAGCAATTTCACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCTGT TGGTGGCGGGGATCAAGCAGGAATTGGCATTCCCTAC AATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAA GAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAAAGAGATCAGGCT GAACATCTTAAGACAGCAGTACAATGGCAGTATTCTAC ACAATTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGT GCAGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACAT ACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCA AAATTTCGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGT TTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGG GGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGCACATAAAAGTAGT GCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAA AACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGG ATGAGGATTAA
17	慢病毒-BTN3A3 ("BTN3A3")	ATGAAAATGGCAAGTCCCTGGCTTCTCTGCTC AACTTTCATGTCCTCCCTCTTCTTGGTCCAGCTGCTCACT CCTTGGCTCAGCTCAGTTCTGTGCTTGGACCCCTGGGG CCCATCCTGGCCATGGTGGGTGAAGACGCTGATCTGCC CTGTCACCTGTTCCCACCATGAGTGCAGAGACCATGG AGCTGAGGTGGGTGAGTTCCAGCCTAAGGCAGGTGGT GAACGTGTATGCAGATGGAAAGGAAGTGGAAAGACAGG CAGAGTGCACCGTATCGAGGGAGAACTTCGATTCTCG GGATGGCATCACTGCAGGGAAAGGCTGCTCTCCGAATAC ACAACGTACAGCCTCTGACAGTGGAAAGTACTTGTGT TATTTCAAGATGGTACTTCTACGAAAAGCCCTGGT GGAGCTGAAGGTTGCAGCATTGGTTCTGATCTTCACA TTGAAGTGAAGGTTATGAGGATGGAGGGATCCATCT GGAGTGCAGGTCCACTGGCTGGTACCCCCAACCCAAA TAAAGTGGAGCGACGCCAAGGGAGAGAACATCCCGC TGTGGAAGCACCTGTGGTTGCAGATGGAGTGGCCTGT ATGCAGTAGCAGCATCTGTGATCATGAGAGGGAGCTCT GGTGGGGGTGATCCTGCATCATCAGAAATTCCCTCT CGGCCTGGAAAAGACAGCCAGCATATCCATCGCAGAC CCCTTCTCAGGAGCGCCCAGCCCTGGATCGCGCCCT GGCAGGGACCCCTGCCTATCTCGTTGCTGCTTCTCGCAG GAGCCAGTTACTTCTGTGGAGACAACAGAAGGAAAA AATTGCTCTGTCAGGGAGACAGAAAGAGAGCGAGAG ATGAAAGAAATGGGATACGCTGCAACAGAGCAAGAAA

[0408]

		TAAGCCTAAGAGAGAAGCTCCAGGAGGAACCTCAAGTG GAGGAAAATCCAGTACATGGCTCGTGGAGAGAAGTCT TTGGCCTATCATGAATGGAAAATGGCCCTTCTCAAACC TGC GGATGTGATTCTGGATCCAGACACGGCAAACGCCA TCCTCCTGTTCTGAGGACCAGAGGAGTGTGCAGCGT GCTGAAGAGCCCGGGATCTGCCAGACAACCCGTGAGA GATTTGAATGGCGTTACTGTGTCCTGGCTGTGAAAAC TTCACATCAGGGAGACATTACTGGGAGGTGGAAGTGG GGGACAGAAAAGAGTGGCATATTGGGTATGTAGTAA GAACGTGGAGAGGAAAAAAGGTTGGGTCAAATGACA CCGGAGAACGGATACTGGACTATGGCCTGACTGATG GGAATAAGTATCGGGCTCTCACTGAGCCCAGAACCAA CCTGAAACTTCTGAGCCTCAGGAAAGTGGGATCT TCCTGGACTATGAGACTGGAGAGATCTCGTTCTATAAT GCCACAGATGGATCTCATATCTACACCTTCCGCACGC CTCTTCTCTGAGCCTCTATATCCTGTTTCAGAATTT GACCTTGGAGCCCCTGCCCTGACCATTGCCAATAC CAAAAGAAGTAGAGAGAGTTCCCCGATCCTGACCTAGTG CCTGATCATTCCCTGGAGACACCCTGACCCGGCTT AGCTAATGAAAGTGGGAGCCTCAGGCTGAAGTAACA TCTCTGCTTCTCCCTGCCACCCTGGAGCTGAGGTCTCC CCTCTGCAACAAACCAATCAGAACCATAAAGCTACAGGC ACGCACTGAAGCACTTACTGA
18	辅助质粒/Rev; HIV Rev; 核输出 并 稳 定 病 毒 mRNA	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCT CAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTCTCTATCAAAGCAA CCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCGAAG GAATAGAAGAAGAAGGTTGGAGAGAGAGAGACAGAGACAGA TCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGG ACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTCAGCTACCACCGCTT GAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTT CTGGGACGCAAGGGGGTGGGAAGCCTCAAATATTGGTGG AATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG
19	包膜; CMV 启动 子; 转录	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTACG GGGT CATTAGTTCATAGCCCATAATATGGAGTTCCCGCGTTA CATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACGCCA ACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC CATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATG GGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACA TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTC AATGACGGTAAATGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTAC ATGACCTTATGGGACTTCCACTTGGCAGTACATCTACG TATTAGTCATCGCTATTACCATGGT GATGCCGTTTGGCA GTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGG ATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGAGTTG TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTA ACAACCTCGCCCCATTGACGCAAATGGCGTAGGCGTG TACGGTGGGAGGTCTATATAAGC
20	包膜; VSV-G; 糖蛋白包膜-细 胞进入	ATGAAGTGCCTTTGACTTAGCCTTTATTCAATTGGG GAATTGCAAGTTCACCATAGTTTCCACACAACCAAAA AGGAAACTGGAAAATGTCCTCTAATTACCAATTATTGC CCGTCAAGCTCAGATTAAATTGGCATAATGACTTAATAG GCACAGCCTTACAAGTCAAATGCCAAGAGTCACAAGG CTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCAAATG GGTCACTACTTGTGATTCCGCTGGTATGGACCGAAGTAT

		ATAACACATTCCATCGATCCTCACTCCATCTGTAGAAC AATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAAC TGGCTGAATCCAGGCTCCCTCTCAAAGTTGTGGATATG CAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTATTGTCCAGGTGA CTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAAT GGGTTGATTACAGTTCATCAACGGAAATGCAGCAATT ACATATGCCCACTGTCCATAACTCTACAAACCTGGCATT TGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATT TCCATGGACATCACCTCTCAGAGGACGGAGAGCTAT CATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTCAGAAGTAAC ACTTTGCTTATGAAACTGGAGGAAGGCCGAAAGGCTGCAAATGC AATACTGCAAGCATTGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTG TCTGGTCAGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTGCTGCAGC CAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAGTATCTGTG CCATCTCAGACCTCAGGGATGTAAGTCTAATTAGGAC GTTGAGAGGATCTGGATTATCCCTCTGCCAAGAACCT GGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTCCAATCTCCAGTGG ATCTCAGCTATCTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCC TGCTTCACCATAATCAATGGTACCCCTAAATACTTGAG ACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCT CAAGAATGGCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAA GGGAACGTGGGATGACTGGCACCATATGAAGACGTGG AAATTGGACCAATGGAGTTCTGAGGACCAAGTCAGGAT ATAAGTTCCCTTATACATGATTGGACATGGTATGG CTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTGAA CATCCTCACATTCAAGACGCTGCTCGCAACTCCTGATG ATGAGAGTTATTTTGGTGTAGAAGGTTGGTCAGTAGTTGGAA AAGCTCTATTGCCTCTTTCTTATCATAGGGTTAATCA TTGGACTATTCTGGTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTGCA ATTAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTATACA GACATAGAGATGA
21	辅助质粒/Rev； CMV 早期(CAG) 增强子；增强转 录	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGTCATTAGTCAT AGCCCATAATGGAGTCCCGCTTACATAACTACGGTAA ATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCAT TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAAT AGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTACGG TAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGC CAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC CCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTT TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
22	辅助质粒/Rev； 鸡 β 肌动蛋白内 含子；增强基因 表达	GGAGTCGCTGCGTTGCCCTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCG CCGCCTCGCGCCGCCGCCGGCTCTGACTGACCGCGTT ACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTCTCCTCC GGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTCT TTCTGTGGCTGCGTAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAG GCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGGCTCGGGGGGTGCGTG CGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCAGGCCCGCG CTGCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGGGCGCGGGGG CTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGGCG GGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGA ACAAAGGCTCGTGCAGGGGTGTGCGTGGGGGGGTGAG CAGGGGGTGTGGGCGCGGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCC CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGCTT

		<p>CGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGCTCG CCGTGCCGGGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGTGC GGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGAGGGCTCGGG GGAGGGGCGCGGCCCTCGGGAGCGCCGGCTGT AGGCAGCGAGCCATTGCTTTATGGTAATC GTGCAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTGTCCAAATCTG GCGGAGCCAAATCTGGAGGCGCCGCACCCCTCT AGCGGGCGGGCGAAGCGGTGCGGCAGGAAG GAAATGGGCGGGAGGGCTCGTGCCTGCCGC CGTCCCCCTCTCCATCTCCAGCCTCGGGCTGCCGCAGGG GGACGGCTGCCCTCGGGGGACGGGGCAGGGCGGGTT CGGCTCTGGCGTGTGACCGGC</p>
[0410]	23 辅助质粒/Rev; 兔 β 珠蛋白多聚 A; RNA 稳定性	<p>AGATCTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATG AAGCCCTTGAGCATCTGACTCTGGCTAATAAAGGAAA TTTATTTCATGCAATAGTGTGTTGAATTTTGTGTCT CTCACTCGGAAGGCATATGGGAGGGCAAATCATTTAAA ACATCAGAATGAGTATTGGTTAGAGTTGGCAACATAT GCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAG AGGTCACTAGTATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCC TTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATT TTATATTTGTTGTGTTATTTTCTTAAACATCCCTAA AATTTCCTTACATGTTTACTAGCCAGATTTCCTCCTC TCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGCCCTCTCTTATG AAGATC</p>
	24 包膜; β 珠蛋白 内含子; 增强基 因表达	<p>GTGAGTTGGGGACCTTGATTGTTCTTCTTTCGCTAT TGTAAAATTCTATGTTATGGAGGGGCAAAGTTTCAG GGTGTTGTTAGAATGGGAAGATGTCCTGTATCACC GGACCCCTCATGATAATTGTTCTTCACTTCTACTCTG TTGACAACCATTGTCCTCTTATTTCATTTCATTCTG TAACTTTCTGTTAAACTTAGCTTGATTTGAACGAATT TTTAAATTCACTTTGTTATTGTCAGATTGTAAGTACTT TCTCTAACTCACTTTTCAGGCAATCAGGGTATA TATTGTAATTCACTGAGCTTAAAGAGAACATTGTTATA TAAATGATAAGGTAGAATATTCTGCATATAAATTCTGG CTGGCGTGGAAATATTCTATTGGTAGAAACAACAC CCTGGTCATCATCCTGCCCTCTTATGGTTACAATGAT ATACACTGTTGAGATGAGGATAAAACTCTGAGTCCA AACCGGGCCCTGCTAACCATGTTCATGCCCTCTTC TTTCTACAG</p>
	25 包膜; 兔 β 珠蛋白 多聚 A; RNA 稳定性	<p>AGATCTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATG AAGCCCTTGAGCATCTGACTCTGGCTAATAAAGGAAA TTTATTTCATGCAATAGTGTGTTGAATTTTGTGTCT CTCACTCGGAAGGCATATGGGAGGGCAAATCATTTAAA ACATCAGAATGAGTATTGGTTAGAGTTGGCAACATAT GCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAA AGAGGTCACTAGTATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATT CCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATT TTTTATTTGTTGTGTTATTTTCTTAAACATCCCT AAAATTTCCTTACATGTTTACTAGCCAGATTTCCTC TCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGCCCTCTCTTA TGGAGATC</p>
	26 引物	TAAGCAGAATTGAGATTTGCCAGGAAGAT

27	引物	CCATACAATGAATGGACACTAGGCAGGCCACGAAT
28	Gag、Pol、整合酶片段	<p>GAATTCATGAATTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAATG ATAGGGGAATTGGAGGTTTATCAAAGTAAGACAGTAT GATCAGATACTCATAGAAATCTCGGGACATAAAGCTATA GGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATT GGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTAAATT TTCCCATAGTCCTATTGAGACTGTACAGTAAATTAA GCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAACAAATGGCCATT GACAGAAGAAAAATAAAGCATTAGTAGAAATTGTAC AGAAATGGAAAAGGAAGGAAAATTCAAAAATTGGGC CTGAAAATCCATACAATACTCCAGTATTGCCATAAAGA AAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTCA GAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTCTGGGAAGTTC AATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAACAGAAAA AATCAGTAACAGTACTGGATGTGGCGATGCATATTTC AGTCCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGTACTGCATT ACCATACCTAGTATAAACAAATGAGACACCAGGGATTAGA TATCAGTACAATGTGCTTCACAGGGATGGAAAGGATCA CCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTAGAG CCTTTAGAAAACAAATCCAGACATAGTCATCTATCAAT ACATGGATGATTGTATGAGGACTGACTAGAAATAG GGCAGCATAGAACAAAATAGAGGAACTGAGACAAACAT CTGTTGAGGTGGGGATTACACACCAGACAAAAACAT CAGAAAGAACCTCATTCTGGATGGTTATGAACCTCC ATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAG AAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAG TGGGAAAATTGAATTGGCAAGTCAGATTATGCAGGGA TTAAAGTAAGGCAATTATGTAACCTTCTAGGGAAACCA AAGCACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAC GAGCTAGAACCTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGA ACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTT AATAGCAGAAATACAGAACGCAGGGCAAGGCCATGG CATATCAAATTATCAAGAGCCATTAAAATCTGAAAA CAGGAAAGTATGCAAGAACATGAAGGGTCCCACACTAATG ATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCA CAGAAAGCATAGTAATATGGGAAAGACTCCTAAATTAA AATTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGG CAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGAGT TTGTCATAACCCCTCCCTAGTGAAGTTATGGTACCAAGT AGAGAAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAAACTTCTATGT AGATGGGGCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAG CAGGATATGTAACTGACAGAGGAAGAACAAAAGTTGTCC CCCTAACGGACACAACAAATCAGAACAGACTGAGTTACAAG CAATTCTAGCTTGCAGGATTGGGATTAGAAGTAA ACATAGTGACAGACTCACAAATATGCATTGGGAATCATT AAGCACAAACAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTC AAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAGTCTACC TGGCATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAATG AACAAAGTAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAG TACTATTTAGATGGAATAGATAAGGCCAAGAAC ATGAGAAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTG ATTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAG CCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAGGGGAAGCCATGC ATGGACAAGTAGACTGTAGCCAGGAATATGGCAGCTAG ATTGTACACATTAGAAGGAAAAGTTATCTGGTAGCAG</p>

[0411]

		<p>TTCATGTAGCCAGTGGATATAGAAGCAGAAGTAATTC CAGCAGAGACAGGGCAAGAACAGCATACTCCTCTAA AATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAACAGTACATACAG ACAATGGCAGCAATTCAACAGTACTACAGTTAAGGCCG CCTGTTGGTGGCGGGGATCAAGCAGGAATTGGCATT CCTACAATCCCCAAAGTCAGGAGTAATAGAATCTATGA ATAAAGAATTAAAGAAATTATAGGACAGGTAAGAGATC AGGCTGAACATCTAACAGCAGTACAAATGGCAGTAT TCATCCACAATTAAAAGAAAGGGGGATTGGGGGT ACAGTGCAGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACA GACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAA ATTCAAAATTTCGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGAT CCAGTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGAAAGGT GAAGGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTACATAAA AGTAGTGCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATT ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTCAGTA GACAGGATGAGGATTAA</p>
[0412]	29 含 Rev、RRE 和 兔 β 珠蛋白多聚 A 的 DNA 片段	<p>TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA GCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTCTATCAA AGCAACCCACCTCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCC CGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAG ACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACTTAT CTGGGACGATCTCGGAGCCTGTGCCTCTCAGCTACCAC CGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGG AACCTTCTGGGACGCAGGGGTGGGAAGCCTCAAATATT GGTGGAATCTCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGA ATAGAGGAGCTTGTCCCTGGGTTCTGGGAGCAGCAG GAAGCACTATGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTAC AGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGA ACAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCAGAACAGCATCTGT TGCAACTCACAGTCTGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAA GAATCCTGGCTGTGGAAAGATACTAAAGGATCAACAGC TCCTAGATCTTTCCCTGCAAAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAG GAAATTATTTCAATTGCAATAGTGTGTTGAATTTTGT GTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATT TAAAACATCAGAATGAGTATTGGGTTAGAGTTGGCAA CATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTA TAAAGAGGTACAGTATATGAAACAGCCCCCTGTC CATTCCATTCCATAGAAAAGCCTGACTGAGGTTAGA TTTTTTATATTGTTGTGTTATTGTTCTTAACAT CCCTAAAATTCCTTACATGTTACTAGCCAGATTTC CTCCTCTCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGCCCTCT CTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAAGCCCAAGCTTGGCGTA ATCATGGTCAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCG CTCACAATTCCACACACATAGCAGGCCAGCATAAAG TGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAAGTACA TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGGAA ACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCA ACCATAGTCCCCCCCCTAACCTCGCCCATCCGCCCTAA CTCGCCAGTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACT AATTTTTTATTGAGAGGCCAGGCCCTGCC TCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTGGAG GCCTAGGCTTGCAAAAGCTAACATTGTTATTGCAGCT TATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTTC</p>

		ACAAATAAAGCATTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTT TGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCCG GG
30	含 CAG 增强子/启动子/内含子序列的 DNA 片段	<pre> ACCGCTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCTTA GTTCATAGCCCATAATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTA CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTA TTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTAT CATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTAT GGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT CGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGGCCACGTTCTGCTT CACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTGTT ATTTATTATTTTAATTATTTGTGCAAGCGATGGGGC GGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGGGGAGAGGTGCGGC GGCAGCCAATCAGAGCGCGCGCTCCGAAAGTTCTTT TATGGCGAGGGCGGGCGGGCGGGCGGCCCTATAAAAGCG AAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCC CCGTGCCCCGCTCCCGCGCCCTCGCGCCGCCGCCCCG GCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCG GGACGGCCCTTCTCCCTCCGGCTGTAATTAGCGCTTGGTT TAATGACGGCTCGTTCTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCC TTAAAGGGCTCCGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGGAGC GGCTGGGGGGTGCCTGCGTGTGTGTGCGTGAGCGCT GCCCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGCGCTGTGAGCGCT GCGGGCGCGCGCGGGGCTTGTGCGCTCCCGCGTGTGCG CGAGGGGAGCGCGGGCGGGCGGTGCCCGCGGTGCG GGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTG TGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGCGCGCG GTCGGGCTGTAACCCCCCTGACCCCCCTCCCCGAGTT GCTGAGCACGGCCGGCTTCGGGTGCGGGCTCCGTGCG GGCGTGGCGGGGCTCGCCGTGCCGGCGGGGGTGG CGGCAGGTGGGGTGCCTGGGGCGGGGGCGCCCTCG GGCGGGGAGGGCTGGGGGAGGGGCGCGGGCGCCCCG GAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGCGAGCCGAGCCA TTGCCTTTATGTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTT CCTTGTCCTAAATCTGGCGAGCGAAATCTGGGAGGC GCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGGGCGAAGCGGTG CGGCAGGCTGCGCCGCGCCGCTCCCTCTCCATCTCCAGCC TCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGA CGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGC GGGAATT </pre>
31	含 VSV-G 的 DNA 片段	<pre> GAATTCATGAAGTGCCTTTGTACTTAGCCTTTATTAT TGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTCCACACAAC CAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCTCTAATTACCAT TATTGCCGTCAAGCTCAGATTAAATTGGCATAATGACT TAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAATGCCAAGAGTC ACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTT CCAAATGGGTCACTACTTGTGATTCCGCTGGTATGGACC GAAGTATATAACACATTCCATCCGATCCTCACTCCATCT GTAGAACATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACA </pre>

[0414]

		<p>AGGAACCTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCTCAAAGTTGT GGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTC CAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACA GGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACGGAAAATGC AGCAATTACATATGCCCACTGTCCATAACTCTACAAACCT GGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTA ACCTCATTCCATGGACATCACCTTCTCAGAGGACGG AGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTCAG AAGTAACTACTTGCTTATGAAACTGGAGGAAGGCCTG CAAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGAGTCAGACTCCC ATCAGGTGTCGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTT GCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGT ATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAA TTCAGGACGTTGAGAGGATCTGGATTATTCCCTCTGCCA AGAAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGCTTCCAATCTC TCCAGTGGATCTCAGCTATCTGCTCCTAAAAACCCAGGA ACCGGCCTGCTTCACCATAATCAATGGTACCCCTAAAAT ACTTTGAGACCAGATACTCAGAGTCGATATTGCTGCTCC AATCCTCTCAAGAATGGTGGAAATGATCAGTGGAACTAC CACAGAAAGGAACTGTGGGATGACTGGCACCATATGA AGACGTGGAAATTGGACCAATGGAGTTCTGAGGACAG TTCAGGATATAAGTTCCCTTATACATGATTGGACATGGT ATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGG TGTTCGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTCGCAACT TCCTGATGATGAGAGTTATTTTGGTGTACTGGGCTA TCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTCAGT AGTTGAAAAGCTCTATTGCCTCTTTTCTTATCATAG GGTTAATCATTGGACTATTCTGGTCTCCGAGTTGGTAT CCATCTTGCATTAATAAAGCACACCAAGAAAAGACA GATTATACAGACATAGAGATGAGAATT</p>
32	含 RRE 和兔 β 珠蛋白多聚 A 的无 Rev 辅助质粒 DNA 片段	<p>TCTAGAAGGAGCTTGTTCCTGGGTTCTGGGAGC AGCAGGAAGCACTATGGCGCAGCGTCAATGACGC TGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCGGTATAG TGCAGCAGCAGAACAAATTGCTGAGGGTATTGAGG CGCAACAGCATCTGTCGAACTCACAGTCTGGGCA TCAAGCAGCTCCAGGCAAGAACCTGGCTGTGGAAA GATACTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTC CCTCTGCCAAAAATTATGGGACATCATGAAGCCCC TTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTAA TTTTCATTGCAATAGTGTGTGAATTTTGTGTCT CTCACTCGGAAGGACATATGGAGGGCAAATCATT AAAACATCAGAACATGAGTATTGGTTAGAGTTGGC AACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGT GGCTATAAAGAGGTCACTAGTATATGAAACAGCCCC CTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGAC TTGAGGTTAGATTTTTATATTGTTGTGTAT TTTTCTTAACATCCCTAAAATTCTCTTACATGTT TTACTAGCCAGATTCTCCTCTCCTGACTACTCC CAGTCATAGCTGTCCTCTTCTTATGAAGATCCCT CGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCAT AGCTGTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAT TCCACACAAACATACGAGGCCGGAAGCATAAAAGTGT AAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACAT</p>

		TAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGG AAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAG TCAGCAACCATAGTCCC GCCCTA ACTCCGCCATC CCGCCCTA ACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGC CCC ATGGCTGACTA ATT TTTT ATT TATGCAGAGGC CGAGGCCGCCTCGGCCTTGAGCTATTCCAGAAGTA GTGAGGAGGCTTTGGAGGCCTAGGCTTGCAA AAAGCTA ACTTGTT ATT GCAGCTTATAATGGTTACA AATAAAGCAATAGCATCACAAATTCAACAAATAAAG CATTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCAA ACTCATCAATGTATCTTATCACCCGGG	
[0415]	33	RSV 启动子和 HIV Rev	
	34	延 长 因 子 -1 α (EF1- α)启动子	CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACCGTATCTGAGG GGACTAGGGTGTGTTAGGCAGAAAAGCGGGGCTTCGGTT GTACCGGTTAGGAGTCCCTCAGGATATAAGTAGTTGC TTTGCA TAGGGAGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATAC ACTTGAGTCTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAAC ATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCAT TGGTGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAA GGCAACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTG AATTCCGCATTGCAAGAGATAATTGATTAAAGTGCCTAGC TCGATACAATAACGCCATTGACCATTCAACCACATTGGT GTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAG ATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTTTGACCTCCATA GAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCTCGAAGCTAG CGATTAGGCATCTCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAG CGACGAAGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTT TCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGAC CCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCC TTAGCACTTATCTGGGACGATCTCGGAGCCTGTGCCTCT TCAGCTACCACCGCTTGGAGAGACTTACTCTTGATTGAA GAGGATTGTGGAACTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGC CCTCAAATATTGGTGGAAATCTCCTACAATATTGGAGTCAG GAGCTAAAGAATAGTCTAGA

		GCTCAAAATGGAGGACGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCG GGTAGTCACCCACACAAAGGAAAGGGCCTTCGGTCC TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCG CCGTCAGGCACCTCGATTAGTCTCGAGCTTGAGTA CGTCGCTTAGGTTGGGGAGGGGTTATGCGATGG AGTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGC CAGCTGGCACTTGTATGTAATTCTCCTGGAAATTGCCCT TTTGAGTTGGATCTGTTCAAGCCTCAGACACA GTGGTCAAAGTTCTTCAGGTGTCGTGA
35	启动子： PGK	GGGGTTGGGTTGCGCCTTCCAAGGCAGCCCTGGGTT GCGCAGGGACGCGCTGCTCTGGCGTGGTCCGGAAA CGCAGCGCGCCGACCCCTGGGCTCGCACATTCTCACGT CCGTCGAGCGTCACCCGGATCTCGCCGCTACCCCTGT GGGCCCCCGGGGACGCTCCTGCTCCGCCCCTAAGTCGG GAAGGTTCTTGCCTCGGGTCTCGCGCGTGCGGGACGTGACAA ACGGAAGCCGACGTCTACTAGTACCCCTCGCAGACGGA CAGGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCCGACCGCGATG GGCTGTGGCCAATAGCGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGA GAGCAGCGGCCGGGAAGGGGGCGGTGCGGGAGGCAGGGGT GTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCTGCCCCGCGCGGT GTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCACGTGGCAG TCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCCCCA G
36	启动子： UbC [0416]	GCGCCGGTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCTC ACGGCGAGCGCTGCCACGTAGACGAAGGGCGCAGGAG CGTCTGATCCTCCGCCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCC CGCTGCTATAAGACTCGGCCTAGAACCCAGTATCAG CAGAAGGACATTTAGGACGGGACTTGGGTACTCTAGG GCACTGGTTTCTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAA AAGTAGTCCCTCTCGGCATTCTCGGGAGGGATCTCGT GGGGCGGTGAACGCCATGATTATAAGGACGCCGG GTGTGGCACAGCTAGTCCGTCGAGCCGGATTGGGT CGCGGTTCTGTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGT GAGTTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTCGTGCC GCCGGCCGCTCGGTGGACGGAAGCGTGTGGAGAGACC GCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCC TGAACTGGGGTTGGGGAGCGCACAAATGGCGCTG TTCCCGAGTCTGAATGGAAGACGCTTGTAAAGGCGGGCT GTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGCATGGTGGCGG CAAGAACCCAAAGGTCTGAGGCCTCGCTAATGCGGGAA AGCTCTATTGGGTGAGATGGGCTGGGCACCATCTGG GGACCTGACGTGAAGTTGCACTGACTGGAGAACTCG GGTTTGTGCTGGGTGGGGCGGCAGTTATCGGGTGC CGTTGGCAGTCACCCGTACCTTGGGAGCGCGCCT CGTCGTGTCGTGACGTACCCGTTCTGTTGGCTATAATG CAGGGTGGGCACCTGCCGGTAGGTGTGCCGTAGGCTT TTCTCCGTCGCAAGGACGCAAGGGTCTGGGCTAGGGTAGG CTCTCCTGAATCGACAGGGCGCCGACCTCTGGTAGGGGG AGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTCTTGGTCGGTTTATG TACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTGA ATGCGCTCGGGTTGGCGAGTGTGTTTGTGAAGTTTT AGGCACCTTGAAATGTAATTGGGTCAATATGAA TTTCAGTGTAGACTAGTAAA
37	多聚 A： SV40	GTTCATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGC

		ATCACAAATTCAAAATAAAGCATTTCAGTCATT CTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA
38	多聚 A; bGH	GACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCC TCCCCCGTGCCTTCCTGACCTGGAAGGTGCCACTCC CTGTCCCTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTG TCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGGGGGGGGG GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA GGCATGCTGGGATCGGGTGGCTATGG
39	包膜; RD114	ATGAAACTCCAAACAGGAATGGTCATTTATGTAGCCTA ATAATAGTTGGGCAGGGTTGACGACCCCCGCAAGGCT ATCGCATTAGTACAAAAACACATGGTAAACCATGCGAA TGCAGCGGAGGGCAGGTATCCGAGGCCACCAGAAGCTCC ATCCAACAGGTAACTTCCCAGGCAAGACGGCCTACTTA ATGACCAACCAAAATGAAATGAGTCAGACTCCAA AATCTCACCCCTAGCGGGGGAGAACTCCAGAACTGCC TGTAAACACTTCCAGGACTCGATGCACAGTTCTGTTATA CTGAATACCGGCAATGCAGGGCGAATAATAAGACATACT ACACGGCCACCTTGCTAAAATACGGTCTGGAGCCTCA ACGAGGTACAGATATTACAAAACCCAATCAGCTCCTAC AGTCCCCTTGTAGGGCTCTATAAATCAGCCCCTGCTG GAGTGCCACAGCCCCCATCCATATCTCGATGGTGGAGG ACCCCTCGATACTAAGAGAGTGTGGACAGTCCAAAAAAG GCTAGAACAAATTCTAGGCTATGCATCTGAACCTCA ATACCACCCCTTAGCCCTGCCAAAGTCAGAGATGACCTT AGCCTTGATGCACGGACTTTGATATCCTGAATAACCACTT TTAGGTTACTCCAGATGTCCTAGGCTTACCTGCCAAGA TTGTTGGCTCTGTTAAAAGTAGGTACCCCTACCCCTTT GCGATAACCACTCCCTTTAACCTACTCCCTAGCAGACT CCCTAGCGAATGCCCTGTCAGATTACCTCCCTTT GGTTCAACCGATGCGAGTCTCCAACTCGTCTGTTATCT TCCCCTTCATTAACGATAACGGAAACAAATAGACTTAGGTG CAGTCACCTTACTAAGTCACCTCTGAGCCAATGTCAG TAGTCCTTATGTGCCCTAACGGGTCAAGTCTCCTCTGT GGAAATAACATGGCATACACCTATTTACCCAAAAGTGG ACAGGACTTGCCTCAAGCCTCCCTCCCCGACATTG ACATCATCCCAGGGGATGAGCCAGTCCCCATTCTGCCAT TGATCATTATACATAGACCTAACGAGCTGTACAGTTC ATCCCTTACTAGCTGGACTGGAAATCACCGCAGCATTCA CCACCGGAGCTACAGGCCAGGTCTCCGTCACCCAGT ATACAAAATTATCCCATCAGTTAATATCTGATGTCCAAGT CTTATCCGGTACCATACAAGATTACAAGACCAGGTAGA CTCGTTAGCTGAAGTAGTTCTCCAAAATAGGAGGGACT GGACCTACTAACGGCAGAACAAAGGAGGAATTGTTAGC CTTACAAGAAAATGCTTTTATGCTAACAAAGTCAGG AATTGTGAGAAACAAAATAAGAACCCCTACAAGAAGAATT ACAAAAACGCAGGGAAAGCCTGGCATCCAACCCCTCTG GACCGGGCTGCAGGGCTTCTCCGTACCTCCCTACCTCTC CTGGGACCCCTACTCACCCCTACTCATAACTAACATTG GGCCATGCGTTTCAATCGATTGGTCCAATTGTTAAAGA CAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTACTCAGCAA TATCACCAGCTAAACCCATAGAGTACGAGCCATGA
40	包膜; GALV	ATGCTCTCACCTCAAGCCCGCACCACCTCGGCACC AGATGAGTCCTGGAGCTGGAAAAGACTGATCATCC TCTTAAGCTCGTATTGGAGACGGCAAAACGAGTC

[0417]

[0418]

	<p>TGCAGAATAAGAACCCCCACCAGCCTGTGACCCCTA CCTGGCAGGTACTGTCCAAACTGGGGACGTTGTCT GGGACAAAAAGGCAGTCCAGCCCCTTGGACTTGGT GGCCCTCTCTTACACCTGATGTATGTGCCCTGGGGC CGGTCTTGAGTCCTGGGATATCCCAGGATCCGATGT ATCGTCCTCTAAAAGAGTTAGACCTCTGATTAGAC TATACTGCCGCTTATAAGCAAATCACCTGGGAGCC ATAGGGTGCAGCTACCCCTGGGCTAGGACCAGGATG GCAAATTCCCCCTTACGTGTGCCCCGAGCTGGCC GAACCCATTAGAAGCTAGGGAGGTGTGGGGGGCTAG AATCCCTATACTGTAAAGAATGGAGTTGTGAGACCA CGGGTACCGTTATTGGCAACCCAAGTCCTCATGGG ACCTCATAACTGTAAAATGGGACCAAAATGTGAAAT GGGAGCAAAATTCAAAAGTGTGAACAAACCGGCT GGTGTAACCCCTCAAGATAGACTTCACAGAAAAAG GAAAACCTCCAGAGATTGGATAACGGAAAAAACCT GGGAAATTAAGGTTCTATGTATATGGACACCCAGGCA TACAGTTGACTATCCGCTTAGAGGTCACTAACATGCC GGTTGTGGCAGTGGGCCAGACCCCTGTCTTGCAGGA ACAGGGACCTCCTAGCAAGCCCCCACTCTCCCTCTC TCCCCACGGAAAGCGCCGCCACCCCTACCCCCG GCGGCTAGTGGAGCAAACCCCTGGGTGCATGGAGAA ACTGTTACCCCTAAACTCTCCGCCTCCCACCAAGTGGCG ACCGACTCTTGGCCTTGTGCAGGGGCCCTAAGTCTG CTTGAATGCTACCAACCCAGGGGCCACTAAGTCTG CTGGCTCTGTTGGCATGAGCCCCCTTATTATGAA GGGATAGCCTCTCAGGAGAGGTGCGTTATACCTCC AACCATACCCGATGCCACTGGGGGCCAAGGAAAG CTTACCCCTACTGAGGTCTCCGGACTCGGGTATGCA TAGGGAAGGTGCCTTACCCATCAACATCTTGAA CCAGACCTTACCCATCAATTCTCTAAAAACCATCAG TATCTGCTCCCTCAAACCATAGCTGGTGGCCTGCA GCACTGGCCTACCCCTGCCTCTCCACCTCAGTTT TAATCAGTCTAAAGACTCTGTGTCCAGGTCCAGCTG ATCCCCCGCATCTATTACCATTCTGAAGAAACCTTGT TACAAGCCTATGACAAATACCCCCCAGGTTAAAA GAGAGCCTGCCTCACTTACCCTAGCTGTCTTCTGGG GTTAGGGATTGGCGCAGGTATAAGGTACTGGCTAAC CGCCCTAATTAAAGGGCCATAGACCTCCAGCAAGG CCTAACCAAGCCTCCAAATGCCATTGACGCTGACCTC CGGGCCCTCAGGACTCAATCAGCAAGCTAGAGGAC TCACTGACTTCCCTATCTGAGGTAGTACTCCAAAATA GGAGAGGCCTGACTTACTATTCTTAAAGAAGGAG GCCTCTGCGCGGCCCTAAAAGAAGAGTGTGTTTTT ATGTAGACCACTCAGGTGCAGTACGAGACTCCATGA AAAAACTAAAGAAAGACTAGATAAAAGACAGTTA GAGCGCCAGAAAACCAAAACTGGTATGAAGGGTG GTTCAATAACTCCCCCTGGTTACTACCCACTATCA ACCATCGCTGGGCCCTATTGCTCCTCCTTGTAC TCACTCTGGGCCCTGCATCATCAATAAATTAAATCCA ATTCAATGATAGGATAAGTGCAGTCAAAATTAA </p>
--	---

		AGTCCTTAGACAGAAATATCAGACCCTAGATAACGA GGAAAACCTTAA
41	包膜; FUG [0419]	ATGGTTCCGCAGGTTCTTGTTGTACTCCTCTGG GTTTTCGTTGTGTTCGGGAAGTCCCCATTACAC GATACCAGACGAACCTGGTCCCTGGAGGCCATTG CATACACCCTCAGCTGTCCAAATAACCTGGTGTG GAGGATGAAGGATGTACCAACCTGTCCGAGTTCTCC TACATGGAACCTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCATC AAAGTGAACGGGTTCACTTGCACAGGTGTTGTGACA GAGGCAGAGACCTACACCAACTTGTGTTATGTC ACAACCACATTCAAGAGAAAGCATTCCGCCACC CCAGACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGAAGATG GCCGGTGACCCCCAGATATGAAGAGTCCCTACACAAT CCATACCCGACTACCAACTGGCTTCGAACTGTAAGA ACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCCAAGT GTGACAGATTGGACCCATATGACAAATCCCTCACT CAAGGGTCTCCCTGGCGGAAAGTGCTCAGGAATAA CGGTGCTCTACCTACTGCTCAACTAACCATGATTA CACCATTTGGATGCCGAGAATCCGAGACCAAGGAC ACCTTGTGACATTTCACCAATAGCAGAGGGAAGAG AGCATCCAACGGGAACAAGACTTGGCTTGTGGA TGAAAGAGGCCTGTATAAGTCTCTAAAAGGAGCATG CAGGCTCAAGTTATGTGGAGTTCTGGACTTAGACTT ATGGATGGAACATGGGTCGCGATGCAAACATCAGAT GAGACCAAATGGTGCCTCCAGATCAGTTGGTGAAT TTGCACGACTTTCGCTCAGACGAGATCGAGCATCTC GTTGTGGAGGAGTTAGTTAAGAAAAGAGAGGAATGT CTGGATGCATTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTCA GTAAGTTTCAGACGTCTCAGTCACCTGAGAAAACCT GTCCCAGGGTTGGAAAAGCATATACCATATTCAAC AAAACCTTGATGGAGGCTGATGCTCACTACAAGTCA GTCCGGACCTGGAATGAGATCATCCCCTCAAAAGGG TGTGAAAGTTGGAGGAAGGTGCCATCCTCATGTG AACGGGGTGTTCATGGTATAATATTAGGGCCTG ACGACCATGTCCTAATCCAGAGATGCAATCATCCC TCCTCCAGCAACATATGGAGTTGGAAATCTTCAGT TATCCCCCTGATGCACCCCCTGGCAGACCCCTCTACA GTTTCAAAGAAGGTGATGAGGCTGAGGATTGGT GAAGTTCACCTCCCCGATGTGACAAACAGATCTCA GGGGTTGACCTGGGTCTCCCGAACTGGGGAAAGTAT GTATTGATGACTGCAGGGGCCATGATTGGCCTGGT TTGATATTTCCTAATGACATGGTGCAGAGTTGGTA TCCATTTGCATTAATTAAAGCACACCAAGAAAA GACAGATTATACAGACATAGAGATGAACCGACTG GAAAGTAA
42	包膜; LCMV	ATGGGTCAGATTGTGACAATGTTGAGGCTCTGCCTC ACATCATCGATGAGGTGATCAACATTGTCATTATTGT GCTTATCGTGTACCGGGTATCAAGGCTGTCTACAAT TTGCCACCTGTGGGATATTGCATTGATCAGTTCC TACTTCTGGCTGGCAGGTCTGTGGCATGTACGGTCT

[0420]		TAAGGGACCCGACATTACAAAGGAGTTACCAATT TAAGTCAGTGGAGTTGATATGTCACATCTGAACCTG ACCATGCCAACGCATTTGAGCCAACAACTCCCAC CATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGACTAGAATTG ACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCACAACCTTT GCAATCTGACCTCTGCCTCAACAAAAAGACCTTG ACCACACACTCATGAGTATAGTTGAGCCTACACCT CAGTATCAGAGGAACTCCAACATAAGGCAGTATC CTGCGACTTCACAAATGGCATAACCACATCAA CTTGACATTCTCAGATCGACAAAGTGCTCAGAGCCA GTGTAGAACCTTCAGAGGTAGAGTCCTAGATATGTT TAGAACTGCCTCGGGGGAAATACATGAGGAGTGG CTGGGGCTGGACAGGCTCAGATGGCAAGACCACCTG GTGTAGCCAGACGAGTTACCAATACCTGATTATA AAATAGAACCTGGAAAACCACACTGCACATATGCAG TCCTTTGGGATGTCCAGGATTCTCCTTCCAAAGAG AAGACTAAGTCTTCACTAGGAGACTAGCGGGCACA TTCACCTGGACTTGTCAAGACTCTCAGGGGTGGAGA ATCCAGGTGGTATTGCCTGACCAATGGATGATTCT TGCTGCAGAGCTTAAGTGTTCGGAAACACAGCAGT TGCACATGCAATGTAATCATGATGCCAATTCTG TGACATGCTGCAGTAACTGACTACAACAAGGCTGC TTTGAGTAAGTCAAAGAGGACGTAGAATCTGCCT GCACTTATTCAAAACACAGTGAATTCTTGATTCA GATCAACTACTGATGAGGAACCACTTGAGAGATCTG ATGGGGTGCATATTGCAATTACTCAAAGTTTG ACCTAGAACATGCAAAGACCGGGCAAACACTAGTGT CCAAGTGCTGGCTTGTCAACAAATGGTCTACTTAA TGAGACCCACTTCAGTGATCAAATGAAACAGGAAGC CGATAACATGATTACAGAGATGTTGAGGAAGGATTA CATAAAGAGGCAGGGAGTACCCCCCTAGCATTGAT GGACCTTCTGATGTTTCCACATCTGCATATCTAGTC AGCATCTCCTGCACCTGTCAAAATACCAACACAC AGGCACATAAAAGGTGGCTATGTCAAAGCCACAC CGATTAACCAACAAAGGAATTGTTAGTTGTGGTGCA TTAAGGTGCCTGGTGTAAAAACCGTCTGGAAAAGA CGCTGA
43	包膜: FPV	ATGAACACTCAAATCCTGGTTTCGCCCTGTGGCAG TCATCCCCACAAATGCAGACAAATTTGCTTGGAC ATCATGCTGTATCAAATGGCACCAAGTAAACACAC TCACTGAGAGAGGAGTAGAAGTTGTCAATGCAACGG AAACAGTGGAGCGGGACAAACATCCCCAAATTGCT CAAAAGGGAAAAGAACCACTGATCTGGCCAATGCG GACTGTTAGGGACCATTACCGGACCACCTCAATGCG ACCAATTCTAGAATTTCAGCTGATCTAATAATCGA GAGACGAGAAGGAAATGATGTTGTTACCCGGGAA GTTTGTAAATGAAGAGGCATTGCGACAAATCCTCAG AGGATCAGGTGGGATTGACAAAGAAACAATGGGATT CACATATAGTGAATAAGGACCAACGGAACAACTAG TGCATGTAGAAGATCAGGGTCTTCATTCTATGCAGA AATGGAGTGGCTCTGTCAAATACAGACAAATGCTGC

[0421]		TTTCCCACAAATGACAAAATCATACAAAAACACAAG GAGAGAATCAGCTCTGATAGTCTGGGAATCCACCA TTCAGGATCAACCACCGAACAGACCAAACATATA GAGTGGAAATAAACTGATAACAGTCGGAGTTCAA ATATCATCAATCTTTGTGCCAGTCCAGGAACACG ACCGCAGATAAATGGCCAGTCCGGACGGATTGATT TCATTGGTTGATCTGGATCCCAATGATAACAGTT TTTAGTTCAATGGGGCTTCATAGCTCCAAATCGT CCAGCTTCTGAGGGAAAGTCCATGGGGATCCAGA GCGATGTGCAGGTTGATGCCAATTGCGAAGGGAAAT GCTACCACAGTGGAGGGACTATAACAAGCAGATTG CTTTCAAAACATCAATAGCAGAGCAGTTGGCAAAT GCCCAAGATATGAAAACAGGAAAGTTATTATTGG CAACTGGGATGAAGAACGTTCCGAACCTTCCAAA AAAGGAAAAAAAGAGGCCTGTTGGCCTATAGCAG GGTTATTGAAAATGGTGGGAAGGTCTGGTCGACG GGTGGTACGGTTTCAGGCATCAGAATGCACAAGGAG AAGGAAC TG CAG CAG ACT AC AAA AGC ACCA AT CG GCAATTGATCAGATAACCGGAAAGTTAAATAGACTC ATTGAGAAAACCAACCAGCAATTGAGCTAATAGAT AATGAATTCACTGAGGTGGAAAAGCAGATTGGCAAT TTAATTAACTGGACCAAAGACTCCATCACAGAAGTA TGGTCTTACAATGCTGAACCTCTTGTGGCAATGGAAA ACCAGCACACTATTGATTGGCTGATT CAGAGATGA ACAAGCTGTATGAGCGAGTGAGGAAACAATTAAAGG GAAAATGCTGAAGAGGATGGCACTGGTTGCTTGAA ATTTTCATAAATGTGACGATGATTGTATGGCTAGTA TAAGGAACAATACTTATGATCACAGCAAATACAGAG AAGAACGATGCAAATAGAATACAAATTGACCCA GTCAAATTGAGTAGTGGCTACAAAGATGTGATACTT TGGTTAGCTCGGGCATCATGCTTTGCTTCTG CCATTGCAATGGGCCTGTTCATATGTGTGAAGAA CGGAAACATGCGGTGCACTATTGTATATAA
44	包膜：RRV	AGTGTAACAGAGCACTTAATGTGTATAAGGCTACT AGACCATACCTAGCACATTGCCCGATTGCGGGGAC GGGTACTTCTGCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGAG ATCCGAGATGAGGCCTGATGGCATGCTTAAGATC CAAGTCTCCGCCAAATAGGTCTGGACAAGGCAGGC ACCCACGCCAACAGAACGCTCCGATATATGGCTGGT CATGATGTTAGGAATCTAAGAGAGATTCCCTGAGG GTGTACACGTCCGCAGCGTGTCCATACATGGGACG ATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAGGC GAECTACCTCAAGGTTCGTTGAGGACGCAGATTG CACGTGAAGGCATGTAAGGTCAAATACAAGCACAAT CCATTGCCGGTGGTAGAGAGAGAAGTCTGTGGTTAGA CCACACTTGGCTAGAGCTGCCATGCACCTCATACC AGCTGACAACGGCTCCACCGACGAGGGAGATTGACA TGCATACACCGCCAGATATACCGGATCGCACCTGC TATCACAGACGGCGGGCAACGTCAAATAACAGCAG GCGGCAGGACTATCAGGTACAACACTGTACCTGCGGCC GTGACAACGTAGGCACTACCACTGTACTGACAAGACCA

		TCAACACATGCAAGATTGACCAATGCCATGCTGCCG TCACCAGCCATGACAAATGGCAATTACCTCTCCATT TGTCCCAGGGCTGATCAGACAGCTAGGAAAGGAA GGTACACGTTCCGTTCCCTCTGACTAACGTCACCTGC CGAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGGATGCCACCTAT GGTAAGAAGGAGGTGACCTGAGATTACACCCAGAT CATCCGACGCTCTCTCCTATAGGAGTTAGGAGCCG AACCGCACCGTACGAGGAATGGGTGACAAGTTCT CTGAGCGCATCATCCCAGTGACGGAAGAAGGGATTG AGTACCACTGGGGCAACAACCCGCCGGTGCCTGT GGCGCAACTGACGACCGAGGGCAAACCCCATGGCT GGCCACATGAAATCATCAGTACTATTATGGACTAT ACCCCGCCGCACTATTGCCGAGTATCCGGGGCA GTCTGATGGCCCTCTAACTCTGGCGGCCACATGCTG CATGCTGCCACCGCGAGGAGAAAGTGCCTAACACC GTACGCCCTGACGCCAGGAGCGGTGGTACCGTTGAC ACTGGGGCTGCTTGCTGCGCACCGAGGGCGAATGC A
45 [0422]	包 膜 ; MLV 10A1	ATGGAAGGTCCAGCGTTCTCAAAACCCCTAAAGAT AAGATTAACCCGTGGAAGTCCTTAATGGTCATGGGG GTCTATTAAAGAGTAGGGATGGCAGAGAGCCCCAT CAGGTCTTAATGTAACCTGGAGAGTCACCAACCTG ATGACTGGCGTACCGCCAATGCCACCTCCCTTTAG GAACGTACAAGATGCCCTCCCAAGATTATATTGA TCTATGTGATCTGGTCGGAGAAGAGTGGGACCCCTC AGACCAGGAACCATATGTCGGGTATGGCTGCAAATA CCCCGGAGGGAGAAAGCGGACCCGGACTTTGACTT TTACGTGTGCCCTGGGCATACCGTAAAATCGGGGTG TGGGGGCAAGAGAGGGCTACTGTGGTGAATGGG GTTGTGAAACCACCGGACAGGCTTACTGGAAGCCA CATCATCATGGGACCTAATCTCCCTTAAGCGCGGT ACACCCCTGGGACACGGGATGCTCCAAAATGGCTT GTGGCCCTGCTACGACCTCTCCAAAGTATCCAATT CTTCCAAGGGCTACTCGAGGGGGCAGATGCAACCC TCTAGCCTAGAATTCACTGATGCAGGAAAAAGGC TAATTGGGACGGGCCAAATCGTGGGACTGAGACT GTACCGGACAGGAACAGATCCTATTACCATGTTCTC CCTGACCCGCCAGGTCTCAATATAGGGCCCGCAT CCCCATTGGGCTAATCCGTGATCACTGGTCAACTA CCCCCCTCCGACCCGTGCAGATCAGGCTCCCCAGG CCTCCTCAGCCTCCTACAGGCGCAGCCTCTATAG TCCCTGAGACTGCCAACCTCTCAACAAACCTGGGAC GGGAGACAGGCTGCTAAACCTGGTAGAAGGAGCCTA TCAGGCCTAACCTCACCAATCCGACAAGACCCA AGAATGTTGGCTGTGCTTAGTGTGGGACCTCCTTAT TACGAAGGAGTAGCGGTGCGTGGGACTTATACCAAT CATTCTACCGCCCCGGCCAGCTGTACGGCCACTTCCC AACATAAGCTTACCCCTATCTGAAGTGCACAGGACAGG GCCTATGCATGGGAGCACTACCTAAAACCTCACCAGG CCTTATGTAACACCACCCAAAGTGCCTGGCTCAGGAT CCTACTACCTTGCAACCGCTGGAACAAATGTGGG

		CTTGTAGCACTGGATTGACTCCCTGCTTGTCCACAC GATGCTCAATCTAACACAGACTATTGTGTATTAGTT GAGCTCTGGCCCAGAATAATTACCACTCCCCGATT ATATGTATGGTCAGCTTGAACAGCGTACCAAATATA AGAGGGAGCCAGTATCGTTGACCTGGCCCTCTGC TAGGAGGATTAACCATGGGAGGGATTGCAGCTGGAA TAGGGACGGGACCACTGCCCTAATCAAACCCAGC AGTTTGAGCAGCTCACGCCGTATCCAGACAGACC TCAACGAAGTCGAAAATCAATTACCAACCTAGAAA AGTCACTGACCTCGTTGTCTGAAGTAGTCCTACAGA ACCGAAGAGGCCAGTATTCCTCTAAAGAGGG GAGGTCTCTGCGCAGCCTAAAGAAGAATGTTGTT TTTATGCAGACCAACACGGGACTAGTGAGAGACAGCA TGGCCAAACTAAGGGAAAGGCTTAATCAGAGACAA AAACTATTGAGTCAGGCCAAGGGTGGTCAAGGG CAGTTAATAGATCCCCCTGGTTACCACCTTAATCT CCACCATCATGGGACCTTAATAGTACTCTTACTGAT CTTACTCTTGACCCCTGCATTCTCAATCGATTGGTC CAATTGTTAAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCT CTGGTTTGACTCAACAATATCACCAGCTAAACCTA TAGAGTACGAGCCATGA
[0423]	46	包膜：埃博拉

[0424]

		CATCTGACAACCCTGCCACAATCTCCACGAGTCCTC AACCCCCACAACCAACCAGGTCCGGACAACAGCA CCCACAATACACCCGTGTATAAACTTGACATCTCTGA GGCAACTCAAGTTGAAACAACATCACCGCAGAACAGA CAACGACAGCACAGCCTCCGACACTCCCCCGCCAC GACCGCAGCCGGACCCCTAAAAGCAGAGAACACCA ACACGAGCAAGGGTACCGACCTCCTGGACCCCGCCA CCACAACAAGTCCCCAAAACCACAGCGAGACCGCTG GCAACAACAACACTCATCACCAAGATACCGGAGAAG AGAGTGCAGCAGCGGGAGCTAGGCTTAATTACCA ATACTATTGCTGGAGTCGCAGGACTGATCACAGGCG GGAGGAGAGCTCGAAGAGAACATTGCAATGCTC AACCCAAATGCAACCCTAATTACATTACTGGACTA CTCAGGATGAAAGGTGCTGCAATCGGACTGGCCTGGA TACCATATTGCCGGCAGCAGCCGAGGGAAATTACA TAGAGGGGCTGATGCACAATCAAGATGGTTAATCT GTGGGTTGAGACAGCTGCCAACGAGACGACTCAAG CTCTTCAACTGTTCCCTGAGAGCCACAACCGAGCTAC GCACCTTTCAATCCTCAACCGTAAGGCAATTGATT CTTGCTGCAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATT GGGACCGGACTGCTGTATCGAACACATGATTGGAC CAAGAACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTCA TGATTTGTTGATAAAACCTCCGGACCAGGGGA CAATGACAATTGGTGGACAGGATGGAGAACATGGAT ACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCCTATAATTGC AGTTATCGCTTATTCTGTATATGCAAATTGTCTTT AG
47	聚 合 酶 III shRNA 启动子; U6 启动子	TTTCCCATGATTCTTCATATTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGAAATTAAATTGACTG TAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTA GAAAGTAATAATTCTTGGTAGTTGCAGTTAAA ATTATGTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTA ACTTGAAAGTATTGCTTGGCTTATATATCTT GTGGAAAGGACGAAAC
48	聚 合 酶 III shRNA 启动子; 7SK 启动子	CTGCAGTATTAGCATGCCCAACCCATCTGCAAGGC ATTCTGGATAGTGTCAAAACAGCCGGAAATCAAGTC CGTTTATCTCAAACCTTAGCATTGGGAATAATGA TATTGCTATGCTGGTAAATTAGATTAGTTAGTTAAAT TTCCTGCTGAAGCTCTAGTACGATAAGCAACTTGACC TAAGTGTAAAGTTGAGATTCCCTCAGGTTATATAG CTTGTGCGCCGCCCTGGCTACCTC
49	FDPS 靶序列 #1	GTCCTGGAGTACAATGCCATT
50	FDPS 靶序列 #2	GCAGGATTCGTTCAGCACTT
51	FDPS 靶序列 #3	GCCATGTACATGGCAGGAATT
52	FDPS 靶序列 #4	GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGT
53	慢 病 毒	ATGAAAATGGCAAGTTCCCTGGCCTTCCTCTGCTCA

[0425]	-BTN3A1 ("LV-BTN3A1, 表达BTN3A1的 慢病毒")	<p>ACTTTCGTGTCTGCCTCCTTGCTTCAGCTGCTCATG CCTCACTCAGCTCAGTTTCTGTGCTTGGACCCCTTG GGCCCATCCTGGCCATGGTGGGTGAAGACGCTGATC TGCCCTGTCACCTGTTCCCACCATGAGTGCAGAGA CCATGGAGCTGAAGTGGGTGAGTCCAGCCTAAGGC AGGTGGTGAACGTGTATGCAGATGGAAAGGAAGTG GAAGACAGGCAGAGTGCACCGTATCGAGGGAGAAC TTCGATTCTGCAGGGATGGCATCACTGCAGGGAGGC TGCTCTCGAATACACAACGTACAGCCTGACAG TGGAAAGTACTTGTGTTATTCCAAGATGGTGAAC TATCCTGTACCATCAGAAGTCCCTCCTCGGCCTGGA AAAGACAGCCAGCATTCCATCGCAGACCCCTTCTC AGGAGCGCCAGAGGTGGATGCCGCCCTGGCAGGG ACCCCTGCCTGTCTTGCTGCTGTTCTGGGGAGCCG GTTACTTCCTGTGGCAACAGCAGGAGGAAAAAAAAGA CTCAGTTCAGAAAGAAAAAGAGAGAGCAAGAGTTG AGAGAAATGGCATGGAGCACAATGAAGCAAGAAC AAGCACAAGAGTGAAGCTCTGGAGGAACACTCAGATG GAGAAGTATCCAGTATGCATCTGGGGAGAGAGACA TTCAGCCTATAATGAATGGAAAAAGGCCCTTCAA GCCTGCGGATGTGATTCTGGATCCAAAAACAGCAAA CCCCATCCTCCTTGTGTTCTGAGGACCAGAGGAGTGTG CAGCGTGCCAAGGAGCCCCAGGATCTGCCAGACAAAC CCTGAGAGATTAAATTGGCATTATTGTGTTCTGGCT GTGAGAGCTTCATATCAGGGAGACATTACTGGGAGG TGGAGGTAGGGGACAGGAAAGAGTGGCATATAGGG GTGTGCAGTAAGAATGTGAGAGAAAAGGCTGGGTC AAAATGACACCTGAGAATGGATTCTGGACTATGGGG CTGACTGATGGGATAAGTATCGGACTCTAACTGAG CCCAGAACCAACCTGAAACTTCTTAAGCCCCCTAAG AAAGTGGGGTCTCCTGGACTATGAGACTGGAGAT ATCTCATTCTACAATGCTGTGGATGGATCGCATATT ATACTTCCTGGACGTCTCCTCTGAGGCTCTATA TCCTGTTTCAGAATTGACCTTGGAGGCCACGGCC CTGACTATTGTCCAGCGTGA</p>
54	慢 病 -BTN3A3 (R381H)	<p>ATGAAAATGGCAAGTCCCTGGCTTCCCTCTGCTCA ACTTTCATGTCTCCCTCTTGTGCTTCAGCTGCTCACT CCTTGCTCAGCTCAGTTTCTGTGCTTGGACCCCTTG GGCCCATCCTGGCCATGGTGGGTGAAGACGCTGATC TGCCCTGTCACCTGTTCCCACCATGAGTGCAGAGA CCATGGAGCTGAGGTGGGTGAGTCCAGCCTAAGGC AGGTGGTGAACGTGTATGCAGATGGAAAGGAAGTG GAAGACAGGCAGAGTGCACCGTATCGAGGGAGAAC TTCGATTCTGCAGGGATGGCATCACTGCAGGGAGGC</p>

[0426]		TGCTCTCCGAATAACACAACGTACAGCCTCTGACAG TGGAAAGTACTTGTGTTATTCCAAGATGGTGACTTC TACGAAAAAGCCCTGGTGGAGCTGAAGGTTGCAGCA TTGGGTTCTGATCTTCACATTGAAGTGAAGGGTTATG AGGATGGAGGGATCCATCTGGAGTGCAGGTCCACTG GCTGGTACCCCCAACCCAAATAAAAGTGGAGCGACA CCAAGGGAGAGAACATCCCGCTGTGGAAGCACCTG TGGTTGCAGATGGAGTGGCCTGTATGCAGTAGCAG CATCTGTGATCATGAGAGGCAGCTCTGGTGGGGTG TATCCTGCATCATCAGAAATTCCCTCCTCGGCCTGGA AAAGACAGCCAGCATATCCATCGCAGACCCCTTCTT CAGGAGCGCCCAGCCCTGGATCGCGGCCCTGGCAGG GACCCCTGCCTATCTGTTGCTGCTCTCGCAGGAGCC AGTTACTTCTTGTGGAGACAACAGAAGGAAAAATT GCTCTGTCCAGGGAGACAGAAAGAGAGCGAGAGAT GAAAGAAATGGGATACGCTGCAACAGAGCAAGAAA TAAGCCTAAGAGAGAACGCTCCAGGAGGAACACTAAGT GGAGGAAAATCCAGTACATGGCTCGTGGAGAGAAGT CTTGCCCTATCATGAATGGAAAATGGCCCTTTCAA ACCTGCGGATGTGATTCTGGATCCAGACACGGCAA CGCCATCCTCCTTGTGAGGACCAGAGGAGTGTG CAGCGTGTGAAGAGCCGCGGATCTGCCAGACAAAC CCTGAGAGATTGAATGGCACTACTGTGTCCTGGCT GTGAAAACCTCACATCAGGGAGACATTACTGGGAGG TGGAAAGTGGGGACAGAAAAGAGTGGCATATTGGG GTATGTAGTAAGAACGTGGAGAGGAAAAAGGTTG GGTCAAAATGACACCGGAGAACGGATACTGGACTAT GGGCCTGACTGATGGAAATAAGTATCGGGCTCTCAC TGAGCCCAGAACCAACCTGAAACTCCTGAGCCTCC TAGGAAAGTGGGATCTCCTGGACTATGAGACTGG AGAGATCTGTTCTATAATGCCACAGATGGATCTCAT ATCTACACCTTCCGCACGCCCTTTCTGAGCCTC TATATCCTGTTTCAGAATTGACCTTGGAGCCAC TGCCTGACCATTGCCAATACCAAAAGAAGTAGA GAGTTCCCCGATCCTGACCTAGTGCCTGATCATCC CTGGAGACACCACTGACCCGGCTAGCTAATGAA AGTGGGGAGCCTCAGGCTGAAGTAACATCTGCTT CTCCCTGCCAACCTGGAGCTGAGGTCTCCCTCTG CAACACCACAGAACATAAGCTACAGGCACGCA CTGAAGCACTTACTGA
55	BTN3A3-FDPS sh-IL-2 ("BTN3A3 (R381H) T2A IL-2")	ATGAAAATGGCAAGTCCCTGGCTTCCCTCTGCTCA ACTTTCATGTCTCCCTCTTCTTGGTCCAGCTGCTCACT CCTTGCCTCAGCTCAGTTTCTGTGCTTGGACCCCTTG GGCCCATCCTGCCATGGTGGGTGAAGACGCTGATC TGCCCTGTACCTGTTCCGACCATGAGTGCAGAGA CCATGGAGCTGAGGTGGGTGAGTCCAGCCTAACGG AGGTGGTGAACGTGTATGCAGATGGAAAGGAAGTG GAAGACAGGCAGAGTGCACCGTATCGAGGGAGAAC TTCGATTCTGCGGGATGGCATCACTGCAGGGAGGC TGCTCTCCGAATAACACAACGTACAGCCTCTGACAG TGGAAAGTACTTGTGTTATTCCAAGATGGTGAACCTC

[0427]

	TACGAAAAAGCCCTGGTGGAGCTGAAGGTTGCAGCA TTGGTTCTGATCTCACATTGAAGTGAAGGGTTATG AGGATGGAGGGATCCATCTGGAGTGCAGGTCCACTG GCTGGTACCCCCAACCCAAATAAAGTGGAGCGACA CCAAGGGAGAGAACATCCCGGCTGTGGAAGGCACCTG TGGTTGCAGATGGAGTGGGCTGTATGCAGTAGCAG CATCTGTGATCATGAGAGGCAGCTCTGGTGGGGTG TATCCTGCATCATCAGAAATTCCCTCCTCGGCCTGGA AAAGACAGCCAGCATATCCATCGCAGACCCCTTCT CAGGAGCGCCCAGCCCTGGATCGCGGCCCTGGCAGG GACCCCTGCCTATCTCGTTGCTGCTCTCGCAGGAGCC AGTTACTTCTTGTGGAGACAACAGAAGGAAAAATT GCTCTGTCCAGGGAGACAGAAAGAGAGCGAGAGAT GAAAGAAATGGGATACGCTGCAACAGAGCAAGAAA TAAGCCTAAGAGAGAACGCTCCAGGAGGAACACTAAGT GGAGGAAAATCCAGTACATGGCTCGTGGAGAGAAGT CTTGGCCTATCATGAATGGAAAATGGCCCTCTCAA ACCTGCGGATGTGATTCTGGATCCAGACACGGCAAA CGCCATCCTCCTGTTCTGAGGACCAGAGGAGTGTG CAGCGTCTGAAGAGGCCGGATCTGCCAGACAAC CCTGAGAGATTGAATGGCACTACTGTGTCCTGGCT GTGAAAACCTCACATCAGGGAGACATTACTGGGAGG TGGAAAGTGGGGGACAGAAAAGAGTGGCATATTGGG GTATGTAGTAAGAACGTGGAGAGGAAAAAGGTTG GGTCAAAATGACACCAGAGAACGGATACTGGACTAT GGGCCTGACTGATGGGAATAAGTATCGGGCTCTCAC TGAGCCCAGAACCAACCTGAAACTCCTGAGCCTCC TAGGAAAAGTGGGGATCTCCTGGACTATGAGACTGG AGAGATCTCGTTCTATAATGCCACAGATGGATCTCAT ATCTACACCTTCCGCACGCCTCTTCTGAGCCTC TATATCCTGTTTCAGAATTGACCTTGGAGGCCAC TGCCCTGACCATTGCCAACACAAAAGAAGTAGA GAGTTCCCCGATCCTGACCTAGTGCCTGATCATCC CTGGAGACACCACTGACCCGGCTTAGCTAATGAA AGTGGGGAGCCTCAGGCTGAAGTAACATCTGCTT CTCCCTGCCCACCCCTGGAGCTGAGGTCTCCCTCTG CAACAAACCAATCAGAACATAAGCTACAGGCACGCA CTGAAGCACTTACCGTAGACGAAAGCGCGGAAGCG GAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGAC GTCGAGGAGAACCTGGACCTATGTACAGGATGAA CTCCTGTCTGCATTGCACTAAGTCTGCACTGTCA CAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAA CACAGCTACAACGGACATTACTGCTGGATTAC AGATGATTTGAATGGAATTAAATAATTACAAGAAC CCAAACTCACCAGGATGCTCACATTAAAGTTTACAT GCCCAAGAAGGCCACAGAACACTGAAACATCTCAGTG TCTAGAAGAAGAACCTCAAACCTCTGGAGGAAGTGT AAATTAGCTCAAAGCAAAAACTTCACTTAAGGACC CAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTCT GGAACCTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGA ATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTCT
--	--

[0428]

		GAACAGATGGATTACCTTGTCAAAGCATCATCTCA ACACTGACTTGA
56	细胞因子 <i>IL-2</i> ("IL-2 或 <i>IL2</i> ")	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTGCATTGCACTAA GTCTTGCACTTGTACAAAACAGTCACCTACTTCAAG TTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACTGGAGCATT ACTGCTGGATTACAGATGATTTGAATGGAATTAAT AATTACAAGAATCCCAAACTCACCCAGGATGCTCACA TTAAGTTTACATGCCAAGAAGGCCACAGAACTG AACACATCTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCT CTGGAGGAAGTGCTAAATTAGCTCAAAGCAAAAAC TTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATC AACGTAATAGTTCTGGAACAAAGGGATCTGAAACAA ACATTCAATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACC ATTGAGAATTCTGAACAGATGGATTACCTTTGTC AAAGCATCATCTCAACACTGACTTGA
57	细胞因子 <i>IL-15</i> ("IL15" 或 "IL-15")	ATGAGAATTTCGAAACACATTGAGAAGTATTCC ATCCAGTGCTACTTGTGTTACTTCTAAACAGTCATT TTCTAACTGAAGCTGGCATTCATGTCTCATTGGG CTGTTTCAGTGCAGGGCTCCTAAACAGAAGCCAA CTGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAAATTGA AGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTA TATACGGAAAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGTA ACAGCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTA TTTCACCTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTGATGATAC AGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACACAGTTT GTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAA AGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAAATTAAAG AATTTTGAGAGTTGTACATATTGTCAAATGTT CATCAACACTTCTGA

[0429]

58	细胞因子IL-18 ("IL-18" 或 "IL18")	CTGGACAGTCAGCAAGGAATTGTCTCCCAGTCATTGCTCCCTGGCTGCTAAAGCGGCTGCCACCTGCTGCAGTCTACACAGCTTCGGGAAGAGGAAAGAACCTCAGACCTCCAGATCGCTTCTCTCGCAACAACTATTGTCGCAGGAATAAAGATGGCTGCTGAACAGTAGAAGACAATTGCATCAACTTTGTGCAATGAAATTATTGACAATACGCTTACTTTATAGCTGAAGATGATGAAAACCTGGAATCAGATTACTTTGCAAGCTTGAATCTAAATTATCAGTCATAAGAAATTGAAATGACCAAGTTCTCTTATTGACCAAGGAAATCGCCTCTATTGAAAGATATGACTGATTCTGACTGTAGAGATAATGCACCCCCGACCATATTATTATAAGTATGTATAAAGATAGCCAGCCTAGAGGTATGGCTGTAACTATCTCTGTGAAGTGTGAGAAAATTCAACTCTCTCCATTGAGAACAAAATTATTCCCTTAAGGAAATGAACACCTCCTGATAACATCAAGGATACAAAAGTGACATCATTCTTCAGAGAAGTGTCCCAGGACATGATAATAAGATGCAATTGAATCTTCATCATACGAAGGATACTTCTAGCTTGAAAAAGAGAGAGACCTTTAAACTCATTTGAAAAAGAGGGATGAATTGGGGGATAGATCTATAATGTTCACTGTTCAAAACGAAGACTAG
59	慢病毒-AFP 肿瘤特异性启动子 (BTN3A3) ["LTSP-AFP BTN3A3"]	CGATAGTTGAGGAGAATATTGTTATTTGCAAAATAAAAATAGTTGCAAGTTTTTTCTGCCCAAAAGAGCTCTGTGCCTTGAACATAAAATACAATAACCCTATGCTGTTAATTATTGGCAAATGTCCCATTTCACCTAAGGAAATACCATAAAGTAACAGATATACCAAACAAAGGTTACTAGTTAACAGGCATTGCCTGAAAAGAGTATAAAAGAATTTCAGCATGATTTCATATTGTGCTTCCACACTGCCATAAACACG
60	细胞因子IL-23 ("IL-23" 或 "IL23") ^a 亚基 p19	AGAGCCAGCCAGATTGAGAAGAAGGCAAAAGATGCTGGGGAGCAGAGCTGTAATGCTGCTGTTGCTACTGCCCTGGACAGCTCAGGGCAGAGCTGTGCCTGGGGCAGCAGCTTCACAGAAGCTCTGCACACTGGCCTGGAGTGCACATCCACTAGTGGACACATGGATCTAAGAGAAGAGGGAGATGAAGAGACTACAAATGATGTTCCCCATATCCAGTGTGGAGATGGCTGTGACCCCCAAGGACTCAGGGACACAGTCAGTTCTGCTTGCAAAGGATCCACCAAGGGTC TGATTTTATGAGAAGCTGCTAGGATCGGATATTTCACAGGGGAGCCTCTGCTCCCTGATAGCCCTGTGGCCAGCTTCATGCCTCCCTACTGGGCTCAGCCAACTCCTGCAGCCTGAGGGTCACCAACTGGGAGACTCAGCAGATTCCAAGCCTCAGTCCCAGCCATGGCAGCAGCTCAGTCTCCTCTCCGCTTCAAGATCCTTCGAGCCTCCAAGGACTCAGGGCAGCAGCTCAGGCTTGTGGCGTAGCCGCCGGGTCTTGCCCATGGAGCAGCAACCCTGAGTCCCTAAAGGCAGCAGCTCAAG
61	细胞因子IL-36A ("IL-36A" 或	AAAACCCAAGTGCAGTAGAAGCCATTGTTCATAATGTTAGGGATACAGGGCTCTCGTAACAGATTACTAGT

	“IL36A”) α	GTGGCCTATGCTGGAAAGTCTGGTGACCTCTGATTT TTTGCTTCCAGGTCTTGGCCTTGGCACTCTTGCA TATTAGAGTCTGGGTCTAGGCTGGCAGGATTC ATAGGTGCAGCTGCTCTGCTGGAGGTAGACTGCAT CCAACAAAGTAAGGGTGCTGGGTGAGTTCTGGGAGT ATAGATTCTGACTGGGGTCACTGCTGGGCTGGCCGC CAGTCTTCATCTGACCCAGGGTAAACTGTGGCTTG GGACTGACTCAGGTCTCTTGGGTGGTCTGCAC ATAAAAGGACTCCTATCCTTGGCAGTCTGAAACAA CACCAACACAATGGAAAAAGCATTGAAAATTGACAC ACCTCAGCAGGGGAGCATTCAAGGATATCAATCATCG GGTGTGGTTCTCAGGACCAGACGCTCATAGCACT CCCGAGGAAGGACCGTATGTCTCCAGTCAGTATTGC CTTAATCTCATGCCGACATGTGGAGACCCCTGAGAA AGACAGAGGAAACCCATCTACCTGGGCTGAATGG ACTCAATCTCTGCCTGATGTGTCTAAAGTCGGGGA CCAGCCCACACTGCAGCTGAAGGAAAAGGATATAAT GGATTGTACAACCAACCCGAGCCTGTGAAGTCCTT CTCTTCTACCAACAG CCAGAGTGGCAGG AACTCCACCTCGAGTCTGTGGCTTCCCTGGCTGGT TCATCGCTGTCAAGCTCTGAAGGAGGCTGCCTCTCAT CCTTACCCAAGAACTGGGAAAGCCAACACTACTGA CTTGGA TTAACTATGCTTTAA
62 [0430]	细胞因子IL-36B (“IL-36B” 或 “IL36B”) β	CACGGGTTCCCTCCCCACTCTGTCTTCTCACCTCTCCT TCACTTTCTCTAGCCTCCTCACCAACCATCTGATCTAT CTTGTCTCTCACAAAAGGCTCTGAAGACATCATGA ACCCACAACGGGAGGCAGCACCCAAATCCTATGCTA TTCGTGATTCTCGACAGATGGTGTGGGTCTGAGTGG AAATTCTTAATAGCAGCTCCTTAGCCGCAGCATT AAGCCTGTCACTCTTCATTAATAGCCTGTAGAGACA CAGAATTCACTGACAAGGAAAAGGTAATATGGTTT ACCTGGGAATCAAGGAAAAGATCTCTGTCTCTTCT GTGCAGAAATTCAAGGGCAAGCCTACTTGCAGCTTA AGCTTCAGGGCTCCAAAGATAACATAGGGAAGGACA CTTGCTGGAAACTAGTGGAAATTACACACATGCATAA ACCTGGATGTGAGAGAGAGCTGCTTCATGGGAACCC TTGACCAATGGGAATAGGAGTGGTAGAAAGAAG TGGAAAGAGTTCTTCAACATCACCCTCAGGAAG AAGGACAAAGATTCTCATCCATGCGGACCAACATA GGAATGCCAGGAAGGATGTAGAAATAAGGGGAGGA AGATTCCCACATCTACAATCTTGAGTGGGTTGCTA TCAATGAAATGCTACAAATGGAATAAGTGCAGAAA TTTTCTCTTTCTTGGGTCTGGAGAGTTGTAAAAC AAGGACACTATGTATTAAAGAGTTGTAAATCTT ACCTGTAAAGCTAGAGAAGGTGGAGTCTTTAGG AGTAGATTGGACTACATAACCTGTAAATGTGTTTG TCCAGTCCTAGAGTGTAAAAAATTGT AAAGTCAAGGTTTCATGAAAATGGGAAGATCAGA CAACATTGCTCCTGAATTCCCACAGAGCAGCAAGCT ACTAGAGCTCAATCTGTTATTCTTCTGATGTAC AGGGGTTAAGTCCTATGGAAGAAACAGCAGAATTAT

		TCAAAATTATTACATAATGTGCAATTATTCACTAGA GCATGAGGAGTGAAACGCTCTGTTAGTATGTATAA CTTAAAAGGAACACATACAATTAAAAGTAATTGAAA GACATTCTTCTTAAAATTCTATAATCTTACACTGG TAAAATAAACTAGTTTCCCATGT
63	细胞因子 <i>IL-36G</i> (“ <i>IL-36G</i> ” 或 “ <i>IL-36G</i> ”) γ	GAAGCTGCTGGAGCCACGATTCACTCAGTCCCCTGGACTG TAGATAAAAGACCCCTTCTGCCAGGTGCTGAGACAA CCACACTATGAGAGGCCACTCCAGGAGACGCTGATGG TGGAGGAAGGGCCGTCTATCAATCAATCACTGTTGC TGTTATCACATGCAAGTATCCAGAGGCTTGTGAGCA AGGCAGAGGGGATCCCATTATTTGGGAATCCAGAA TCCAGAAATGTGTTGTATTGTGAGAAGGGTGGAGA ACAGCCCACATTGCAGCTAAAAGAGCAGAAGATCAT GGATCTGTATGGCCAACCCGAGCCCCTGAAACCCCT CCTTTCTACCGTGCAAGACTGGTAGGACCTCCACC CTTGAGTCTGTGGCCTTCCCGACTGGTTCATGGCCT CCTCCAAGAGAGACCAGCCCCTCATCTGACTTCAG AACTTGGGAAGTCATACAACACTGCCTTGAATTAA ATATAAATGACTGAACTCAGCCTAGAGGTGGCAGCT TGGTCTTGTCTAAAGTTCTGGTCCCAATGTGTT TCGTCTACATTCTTAGTGTCTTCACGCTGGTGC TGAGACAGGGCAAGGCTGCTGTATCATCTCATTT ATAATGAAGAAGAAGCAATTACTCATAGCAACTGA AGAACAGGATGTGGCCTCAGAACAGCAGGAGAGCTGG GTGGTATAAGGCTGTCCTCTCAAGCTGGTGTGTA GCCACAAGGCATCTGCATGAGTGAACCTTAAGACTC AAAGACCAAAACTGAGCTTCTTAGGGGTGGGT ATGAAGATGCTTCAGAGCTCATGCGCGTTACCCACG ATGGCATGACTAGCACAGAGCTGATCTCTGTTCT GTTTGCTTATTCCCTCTGGGATGATATCATCCAG TCTTATATGTTGCCAATATACCTCATTGTGTGTAAT AGAACCTCTTAGCATTAAAGACCTGTAAACAAAAAA TAATTCTGTGTTAAGTAAATCATTTGTCCTAATT GTAATGTGTAATCTTAAAGTAAATAAAACTTGTGTA TTTATATAATAAAAGCTAAAACGTATATAAAATA AAGAAAGAGTAAACTG
64	<i>FDPS shRNA</i> 序 列#4A	ACTTTCTCAGCCTCCTCTGCCTCGAGGCAGAAGGAG GCTGAGAAAGTTTTTT
65	<i>FDPS shRNA</i> 序 列#4R	GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGTGAGCTACTTCTCA GCCTCCTCTG
66	<i>FDPS shRNA</i> 序 列#4TT	GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTACTTCTCAGCCT CCTCTGCTTTTT
67	<i>FDPS</i> 序列#4L	GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTACTTCTCAGCCTCC TTCTGCTTTTT
68	<i>FDPS miR30</i> 序 列#1	AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTC AGCCTCCTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGG AGGCTGAGAAAGTGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCA

		AGGGGCT
69	<i>FDPS miR30</i> 序列#3	AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGCT
70	<i>GGPS1 shRNA</i> 序列#1	GCTTGAAGCTAAAGCCTATAACTCGAGTTAGGCTTAGCTTCAGCTTTTT
71	<i>GGPS1 shRNA</i> 序列#2	GTACATTATCTTGAGGATGTACTCGAGTACATCCTCAAGATAATGTACTTTTT
72	<i>GGPS1 shRNA</i> 序列#3	CCTGAGCTAGTAGCCTTAGTACTCGAGTACTAAGGCTACTAGCTCAGGTTTT
73	<i>GGPS1 靶序列</i> #1	GCTTGAAGCTAAAGCCTATAA
74	<i>GGPS1 靶序列</i> #2	GTACATTATCTTGAGGATGTA
75	<i>GGPS1 靶序列</i> #3	CCTGAGCTAGTAGCCTTAGTA
76	<i>IDII shRNA</i> 序列	GCCAGTGGTAAATTAAAGATACTCGAGTATCTTAATTTCACCACTGGCTTTTT
77	<i>IDII 靶序列</i>	GCCAGTGGTAAATTAAAGATA
78	Fam- 标记的 TaqMan 探针	TAGCATCTCCTATCTCTGGGTGCC
79	FDPS 正向引物	GTGCTGACTGAGGATGAGATG
80	FDPS 反向引物	CCGGTTATACTTGCCTCCAAT
81	Fam- 标记的 TaqMan 探针	AGCGGGAAATCGTGCCTGAC
82	肌动蛋白正向引物	GGACCTGACTGACTACCTCAT
83	肌动蛋白反向引物	CGTAGCACAGCTCTCCTTAAT

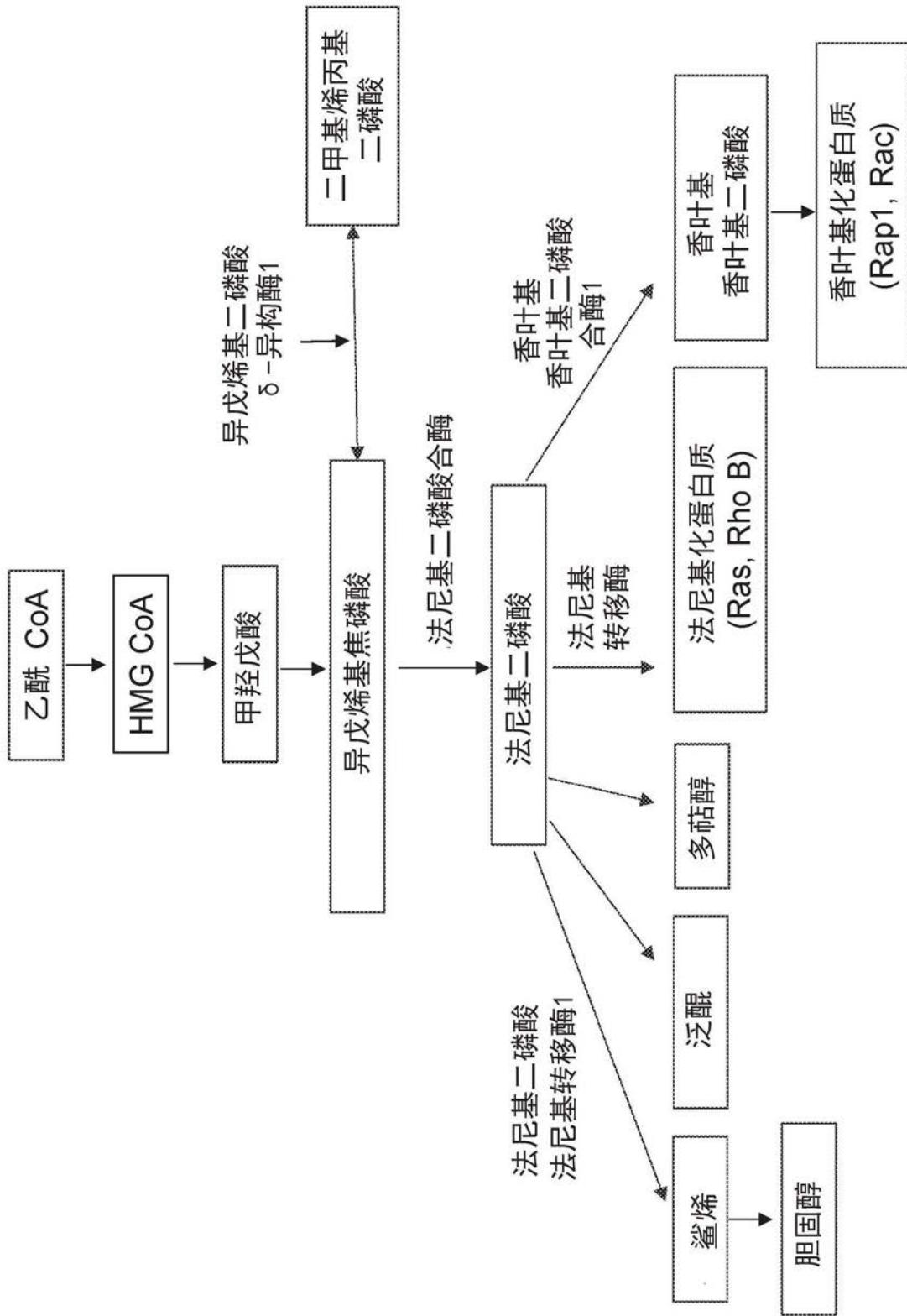


图1

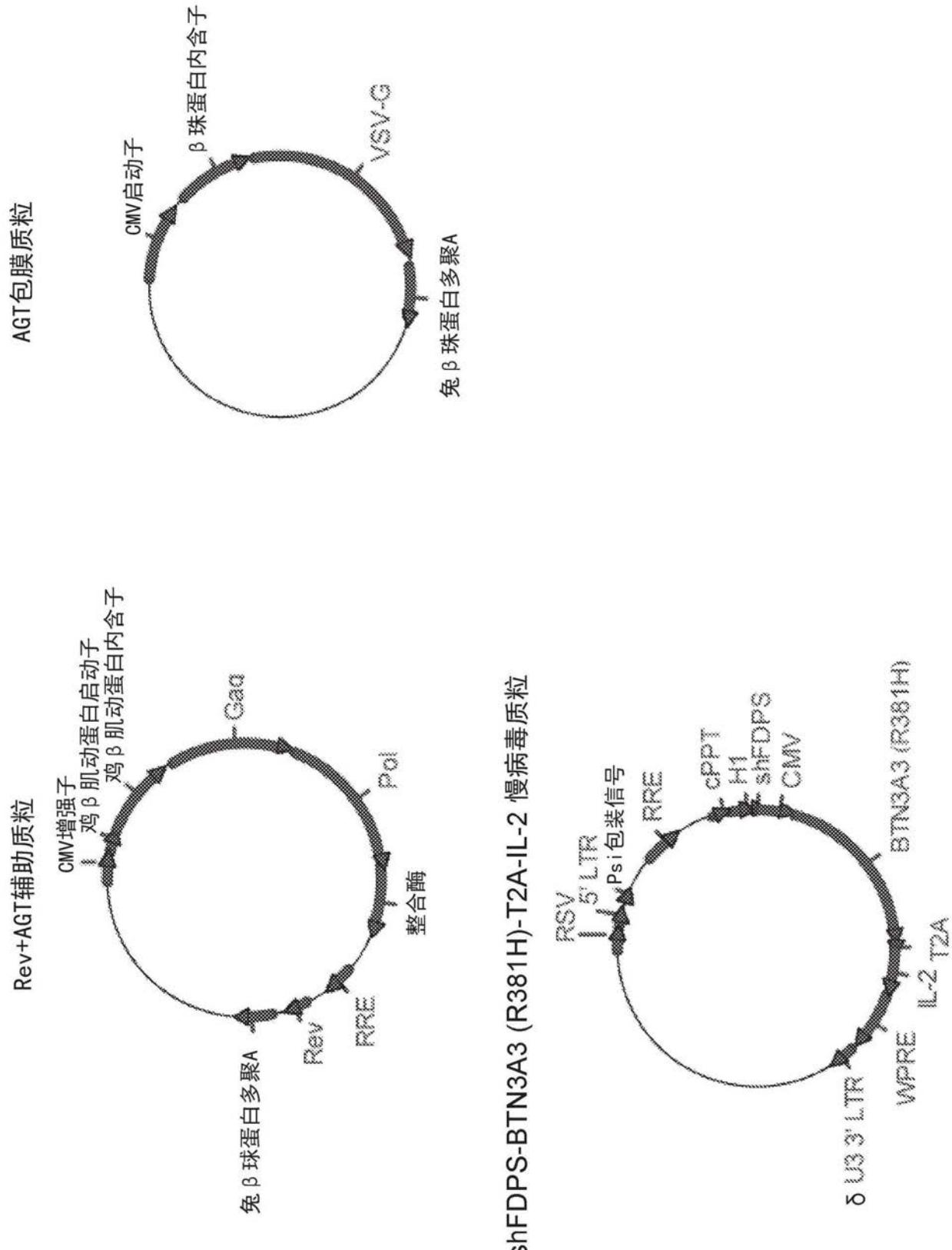


图2

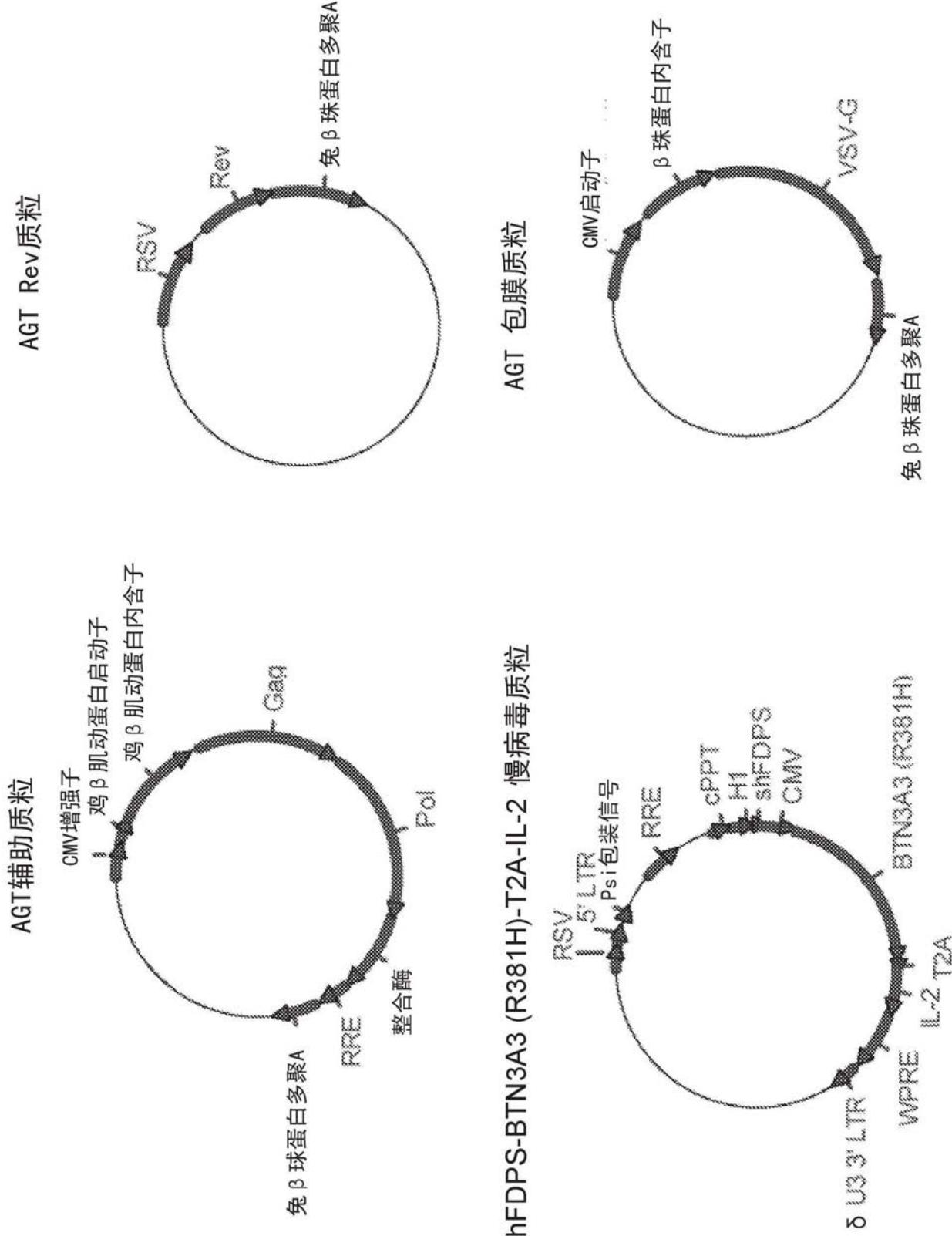
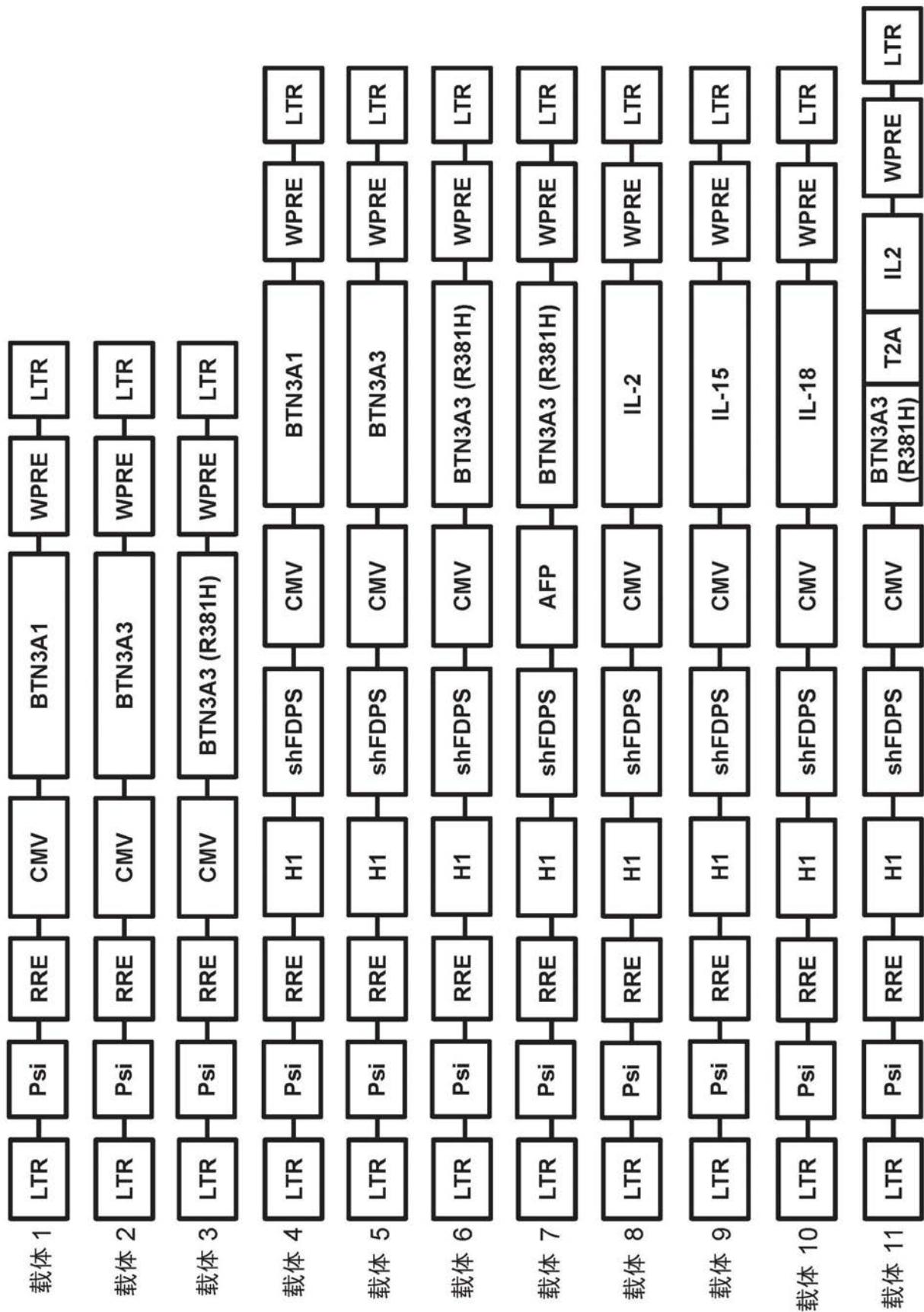


图3



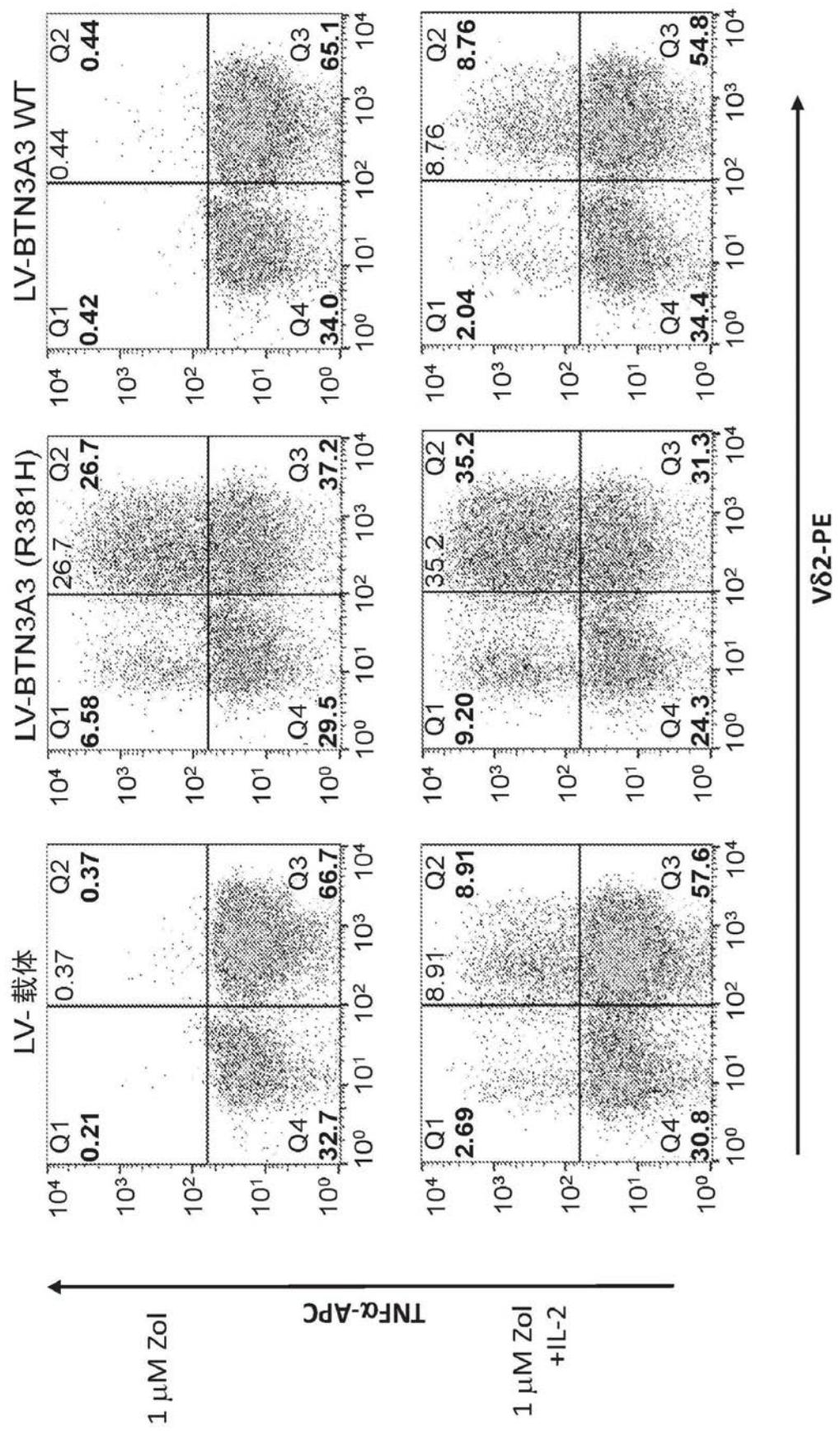


图5

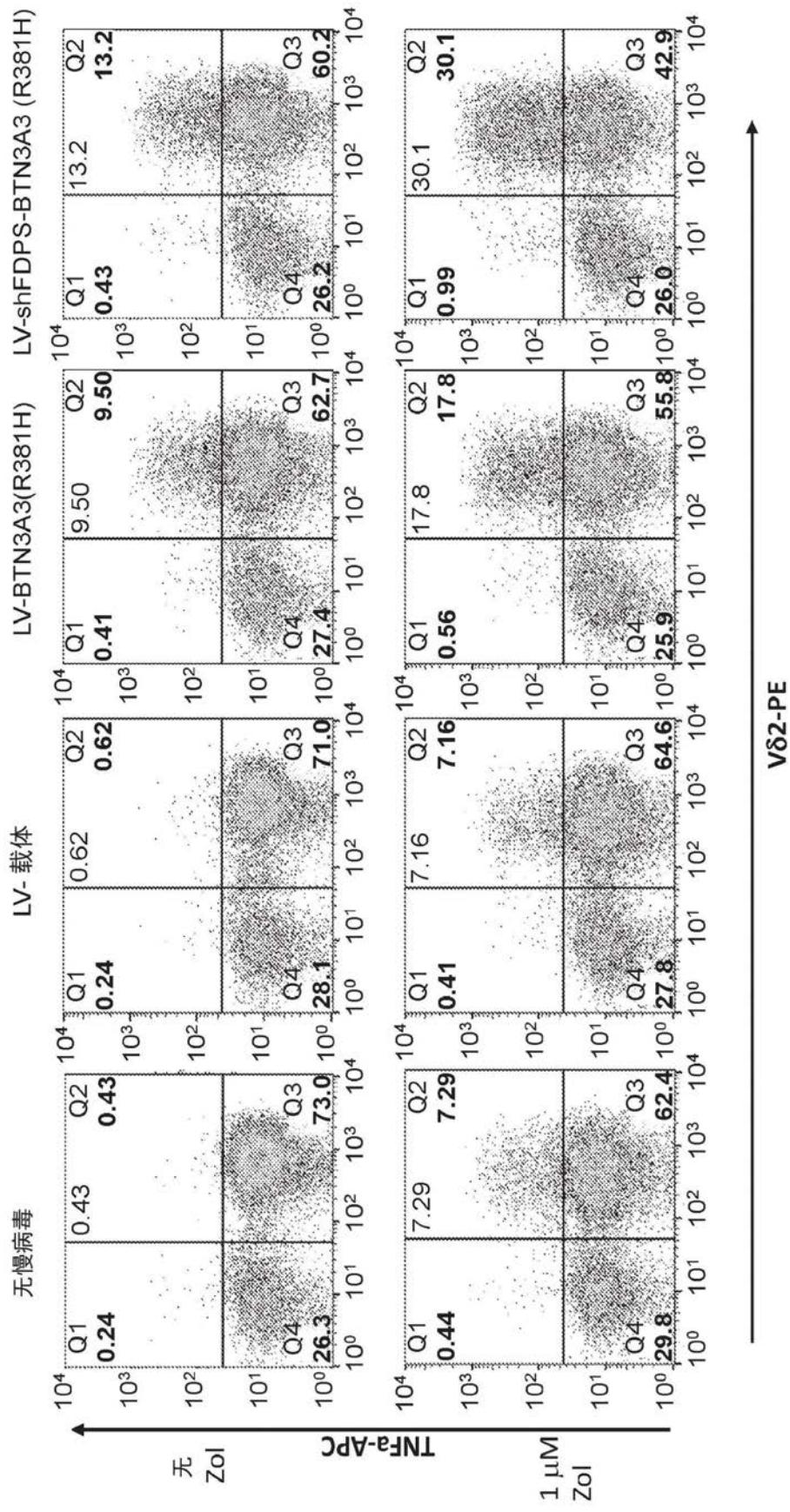


图6

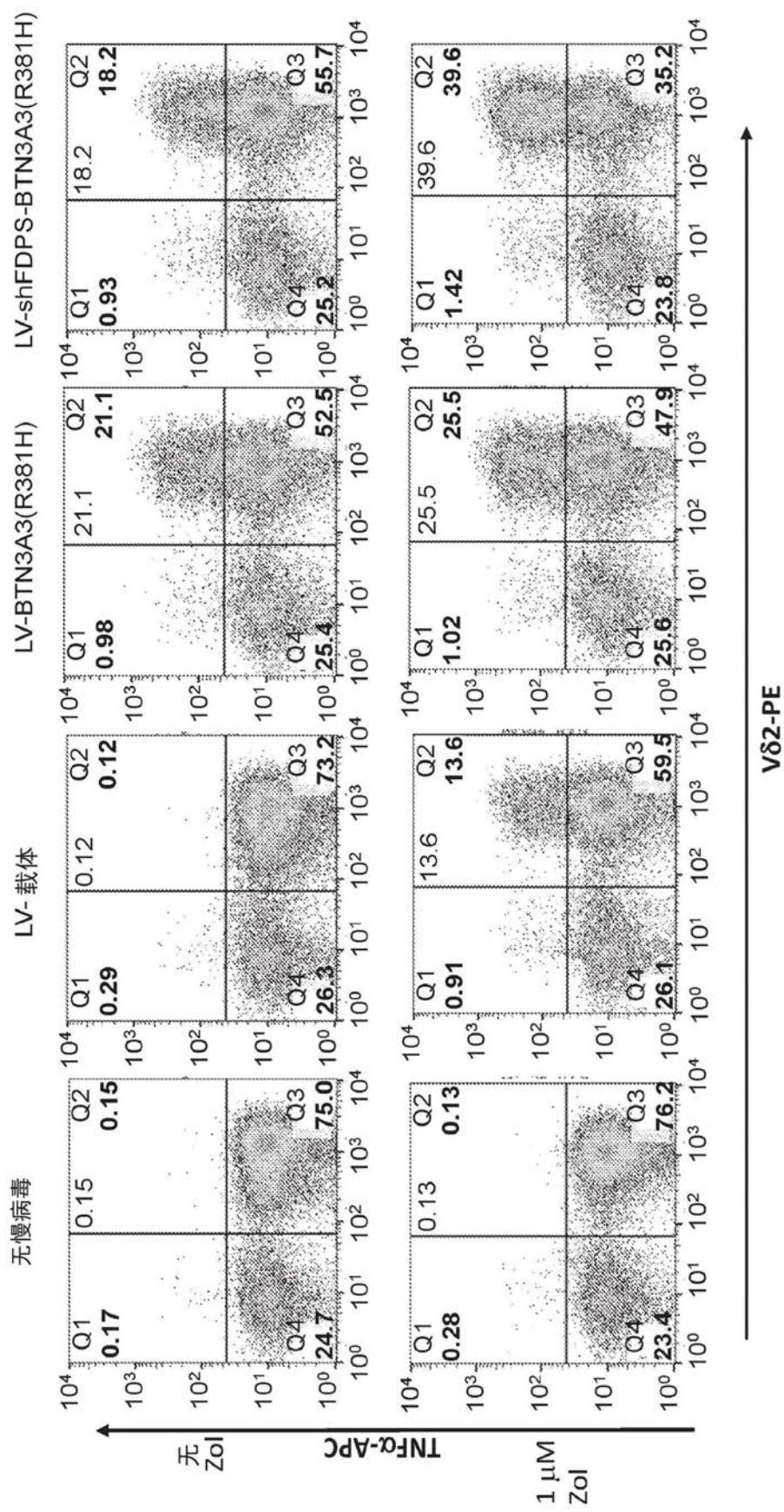


图7

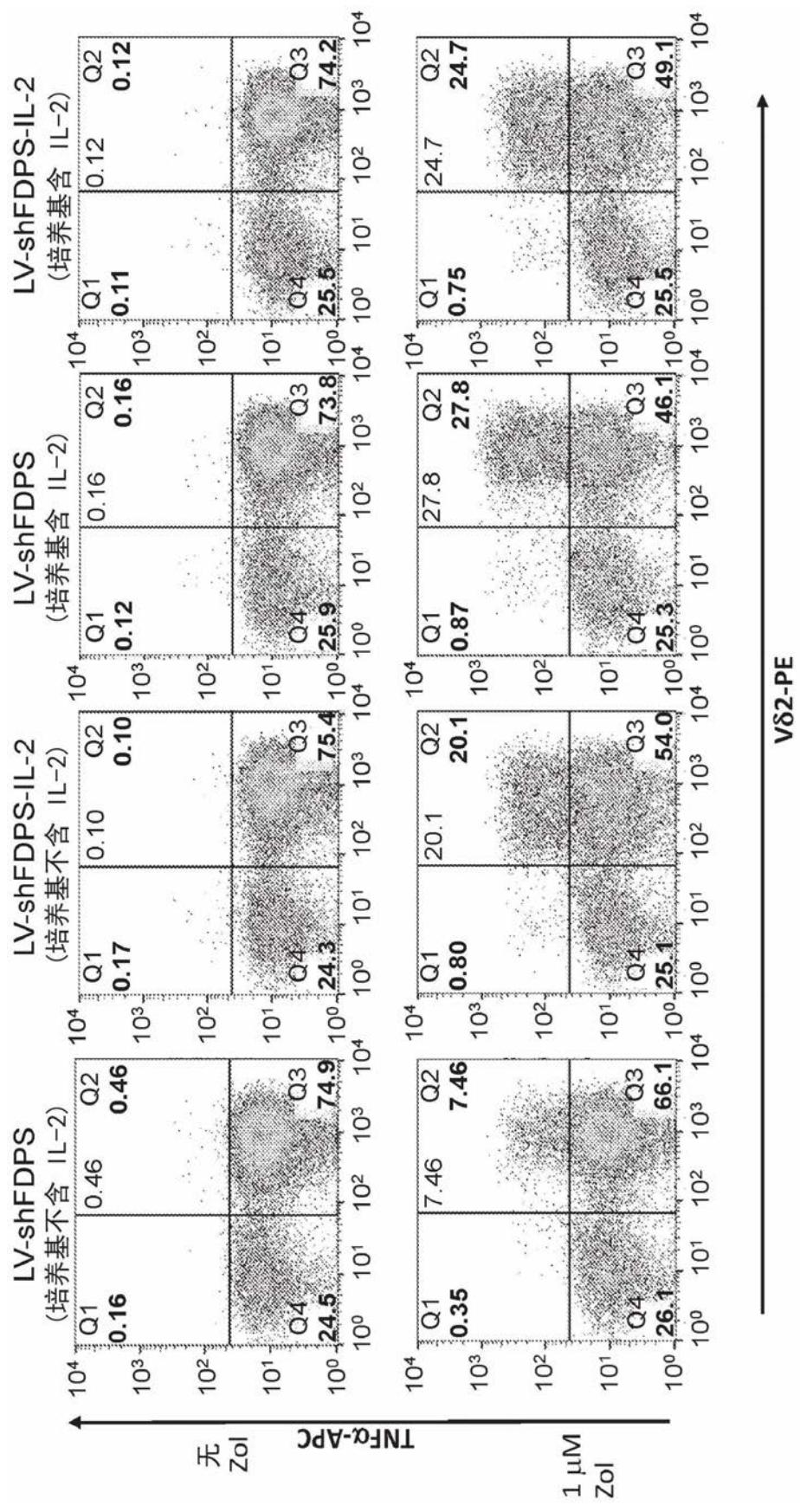


图8

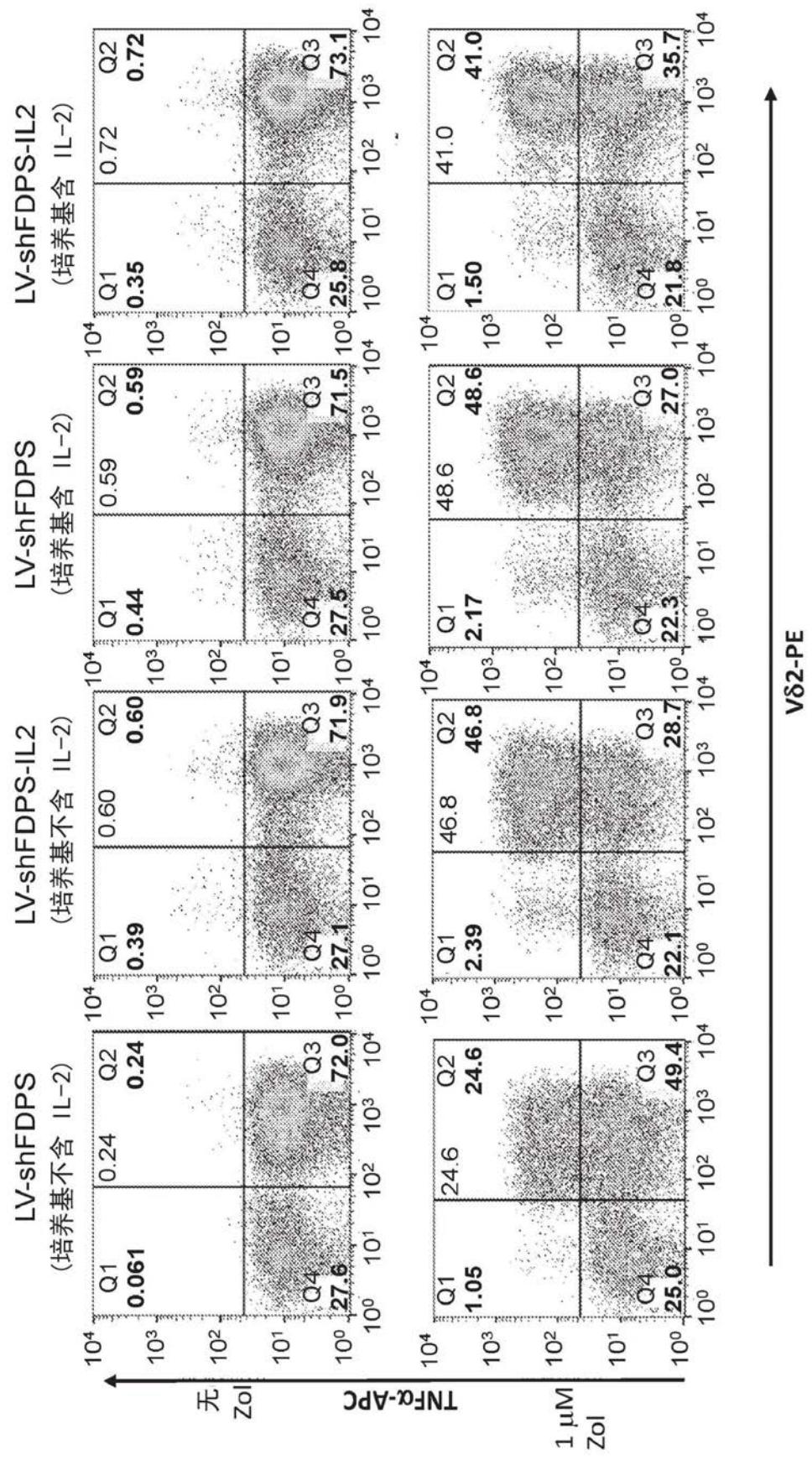


图9

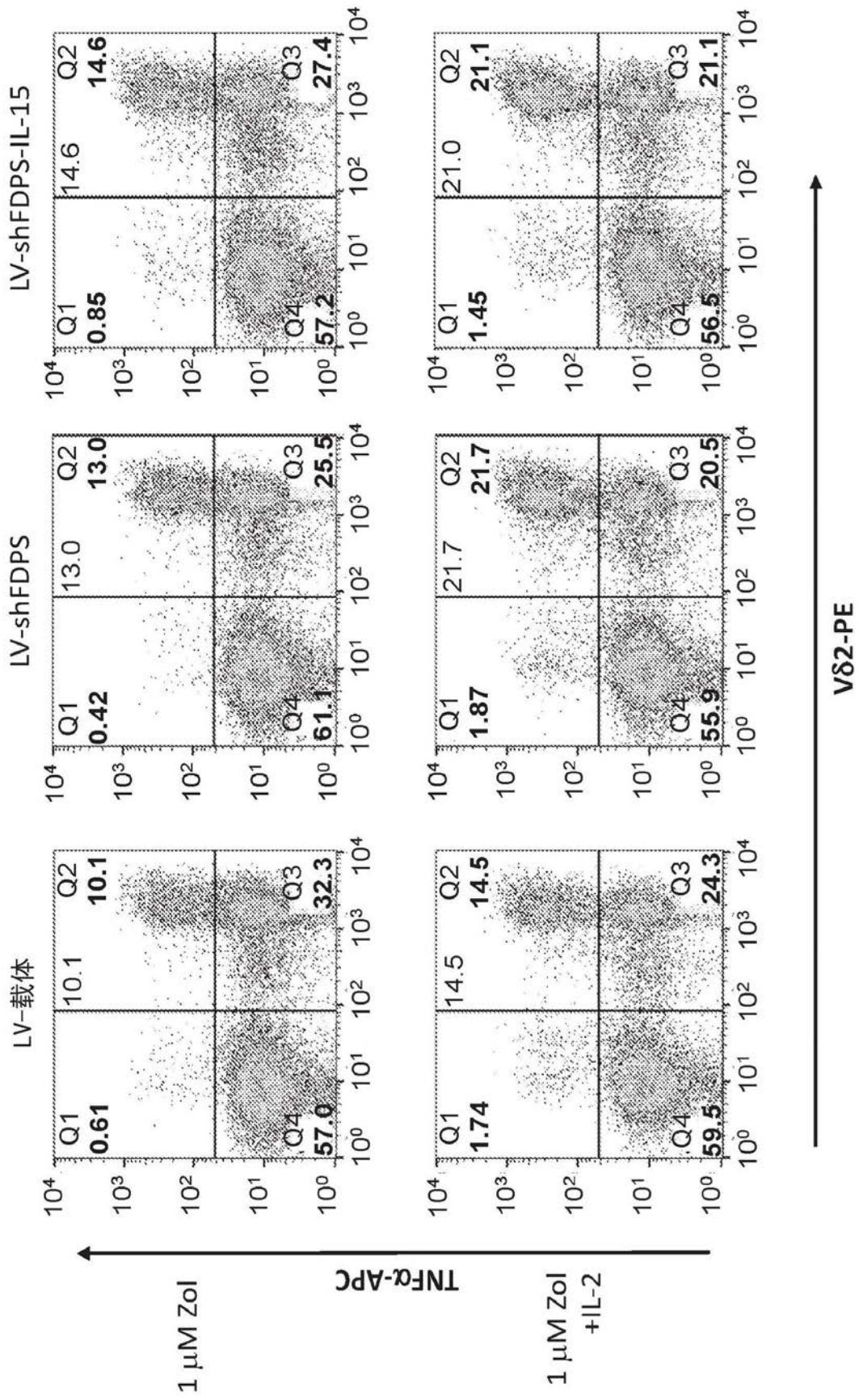


图 10

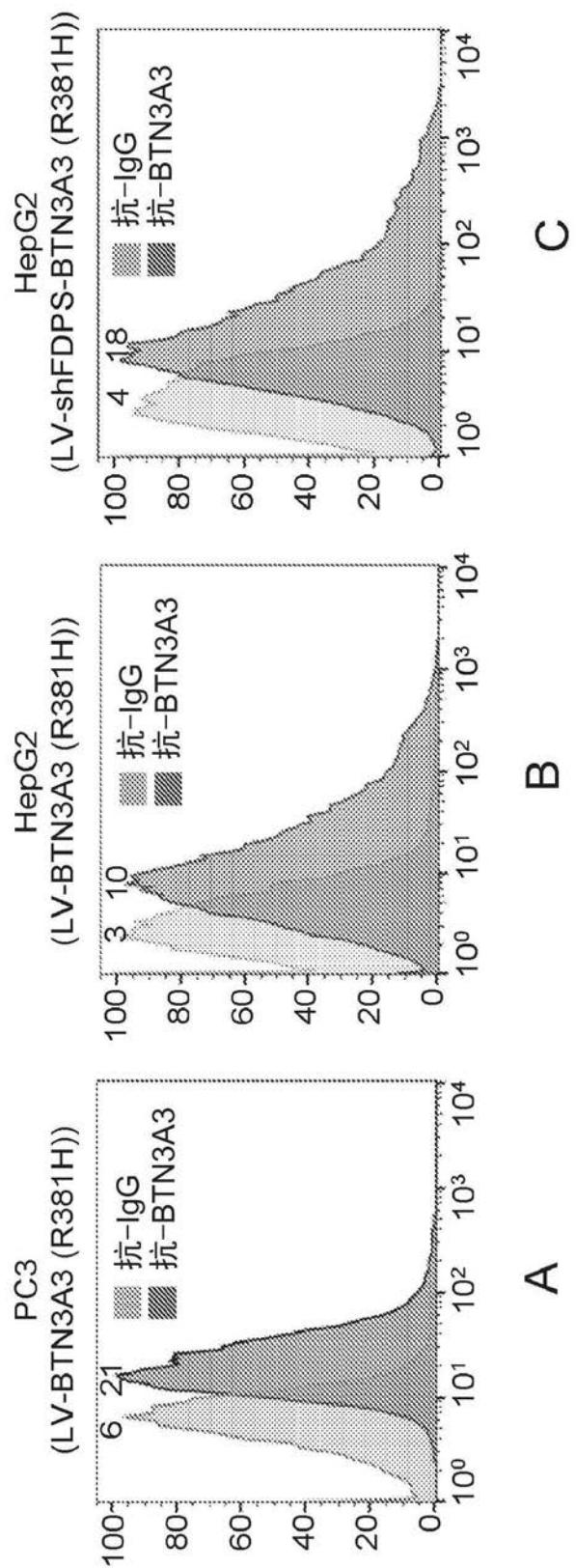


图11

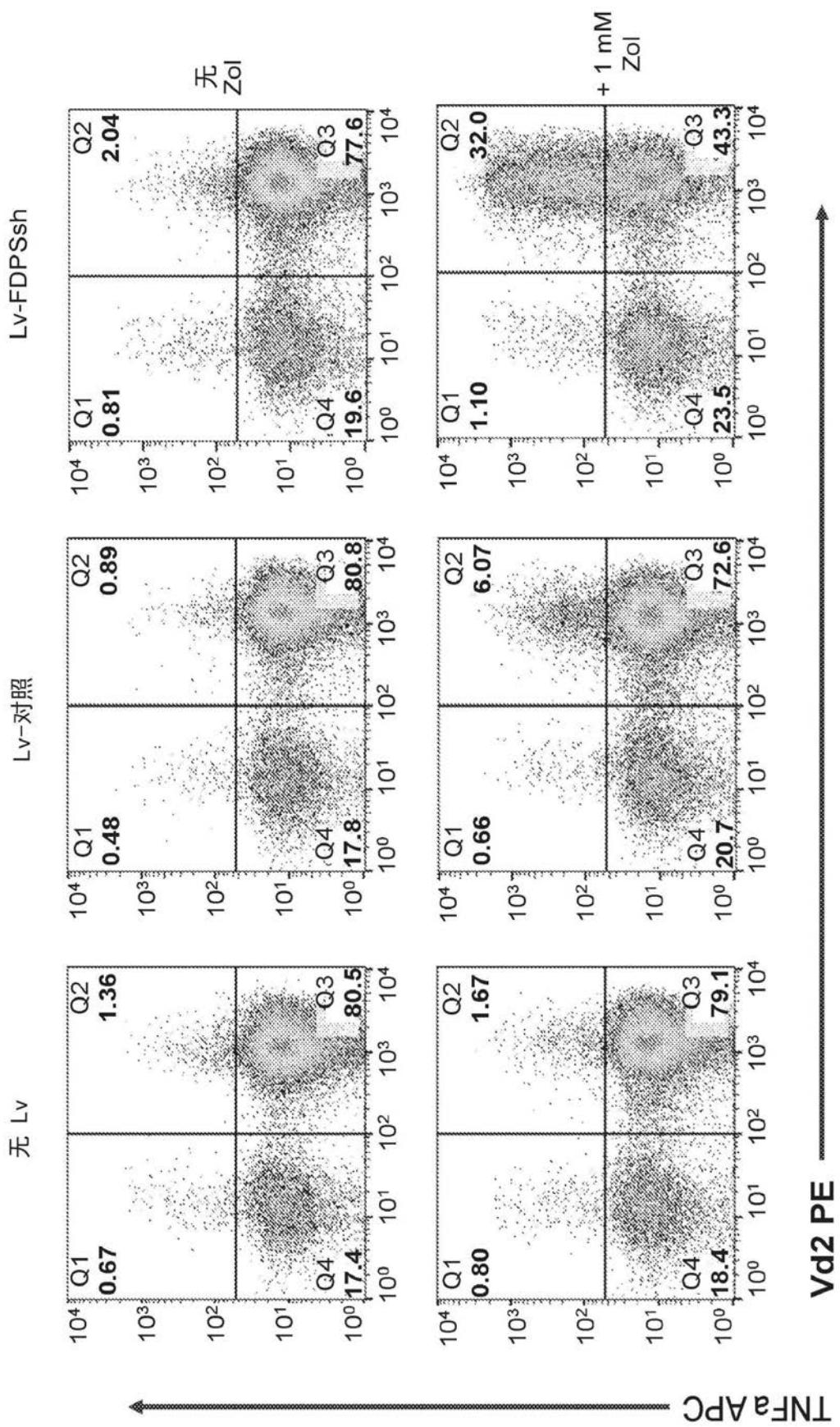


图12

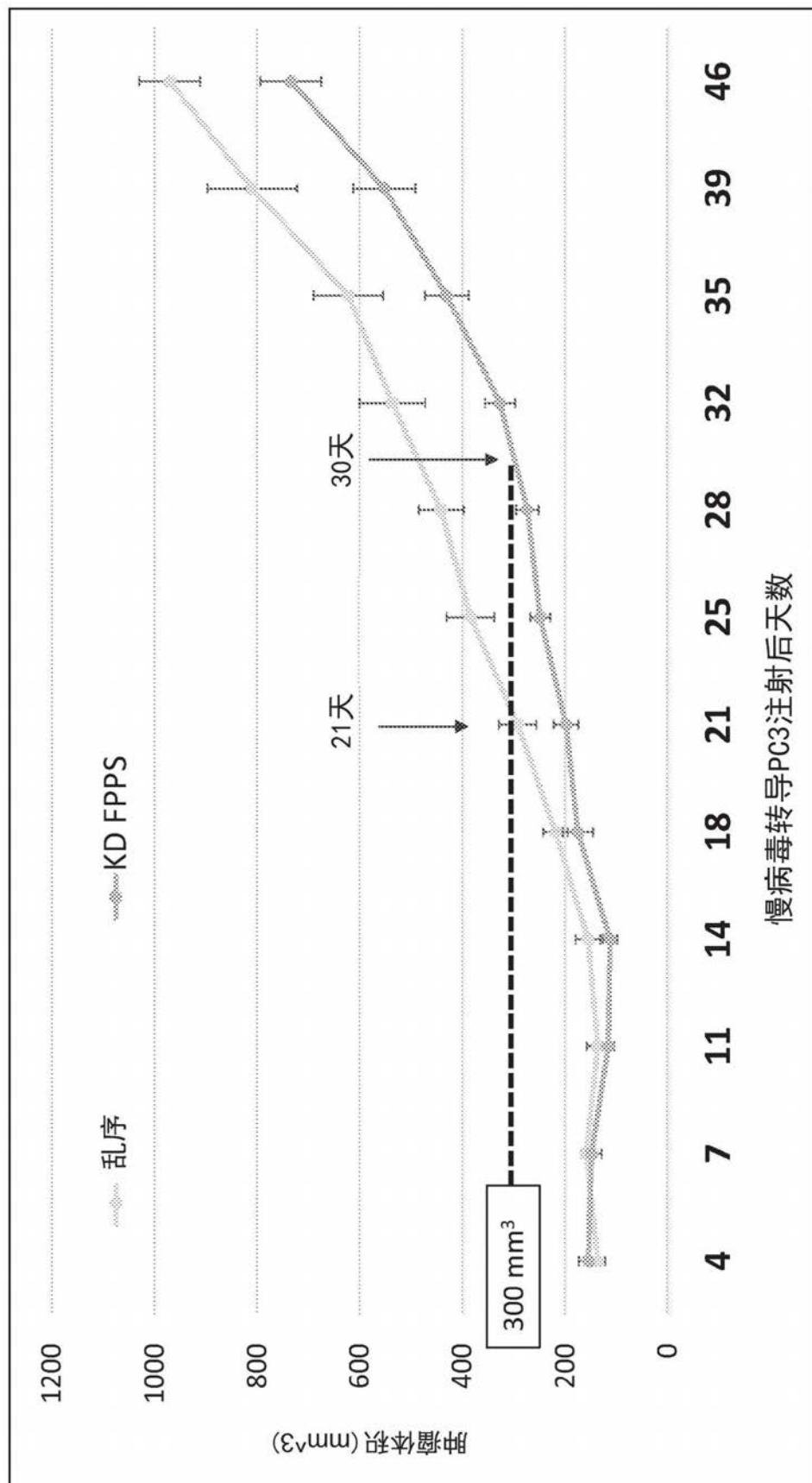


图13

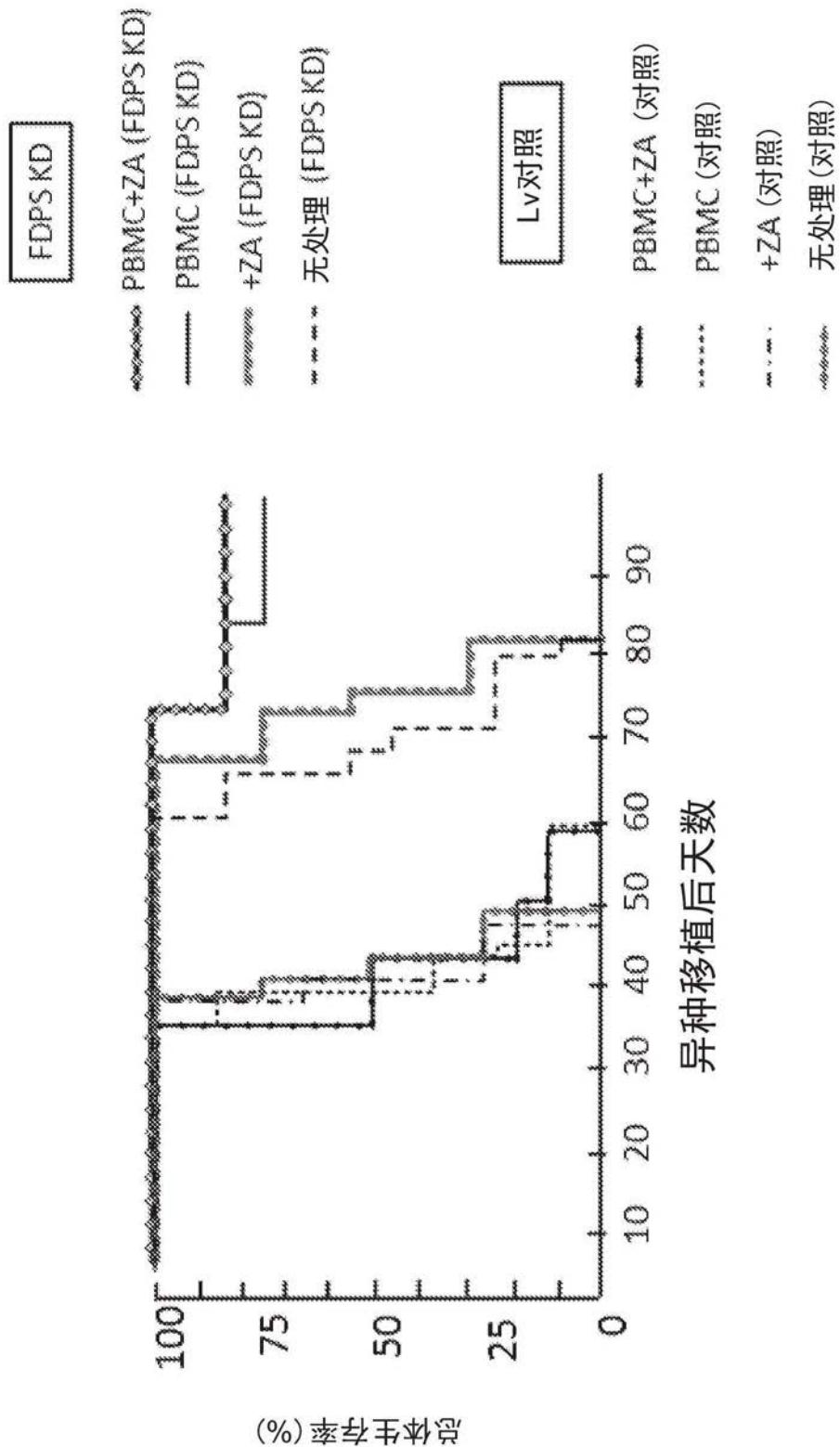
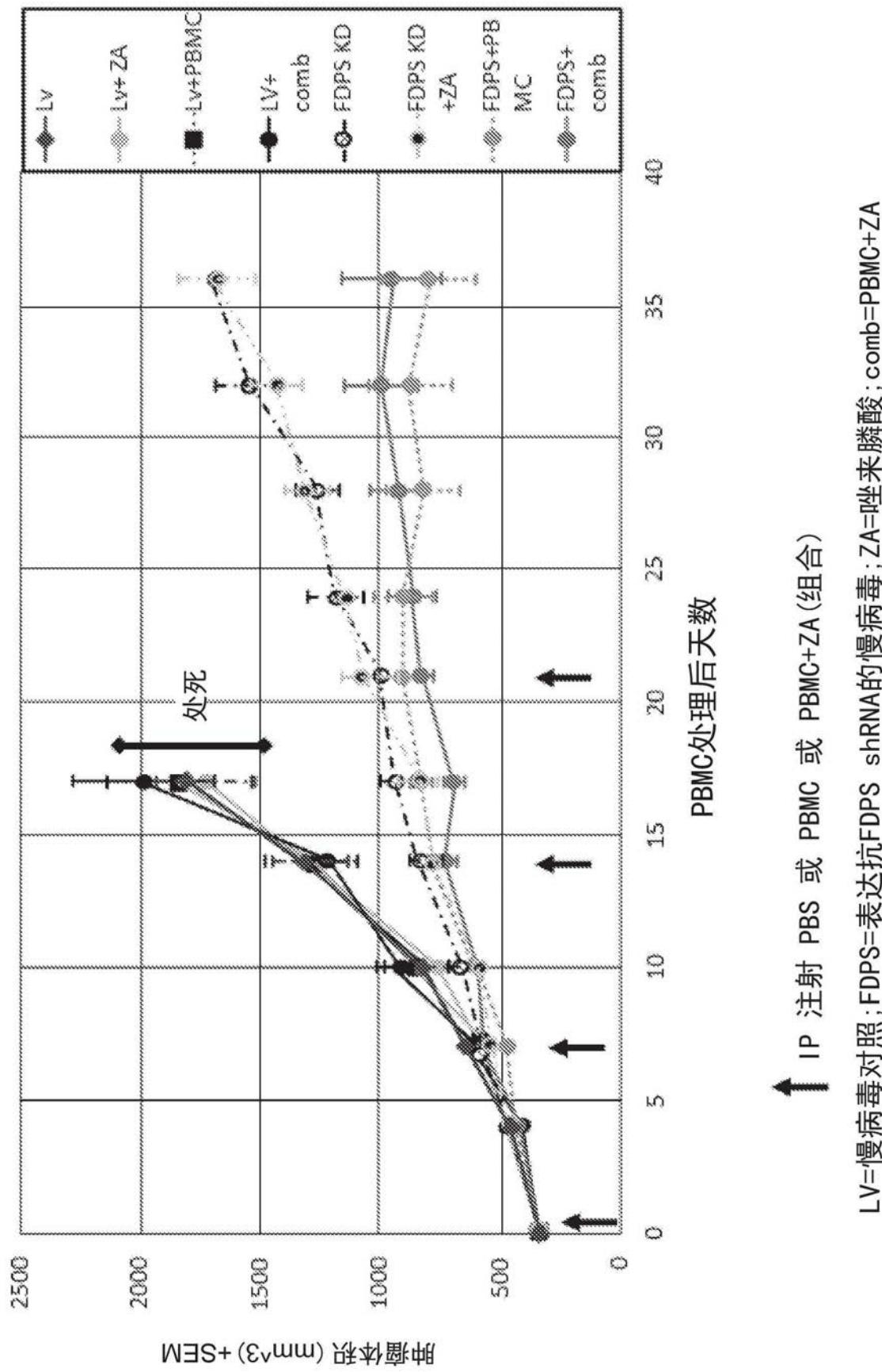


图14



无处理 Lv-FDPSSh (N=2)

$\gamma\delta T$ 处理的 Lv-FDPSSh (N=6)



图16

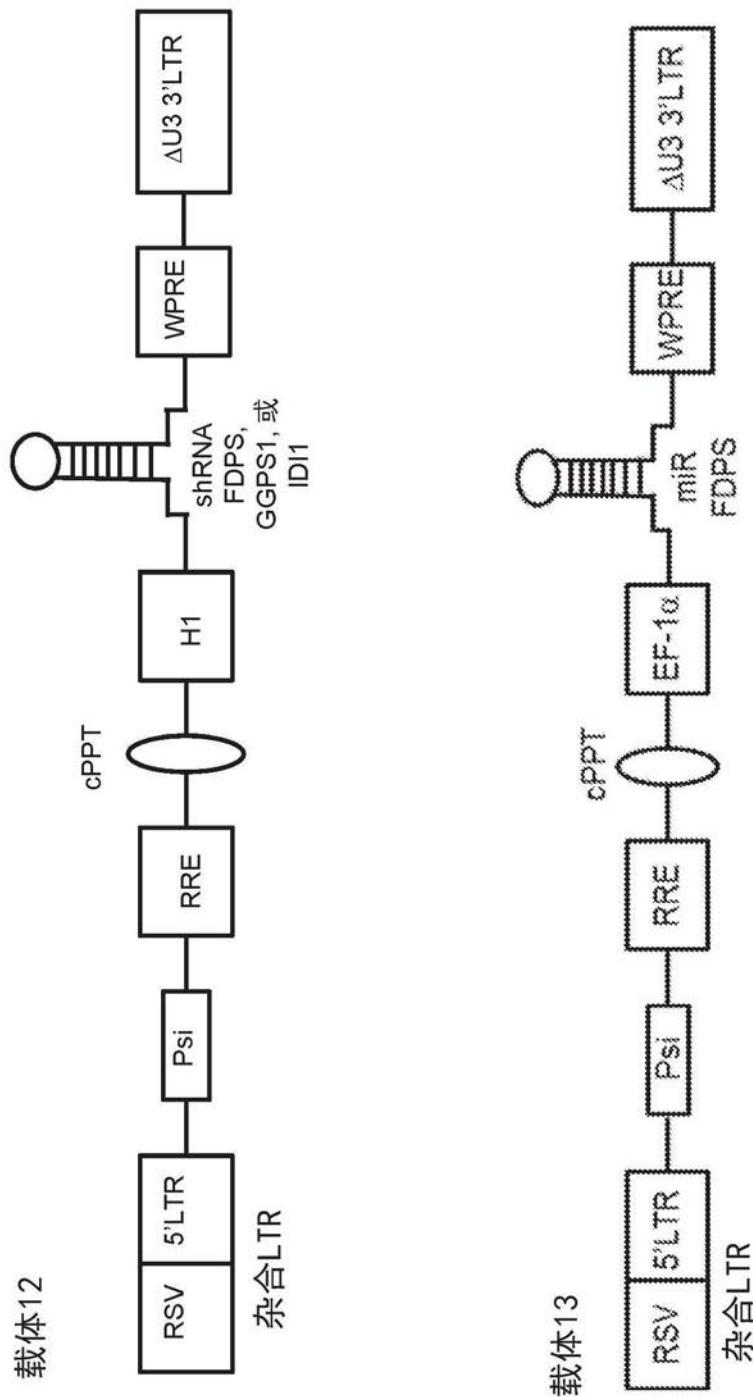


图17

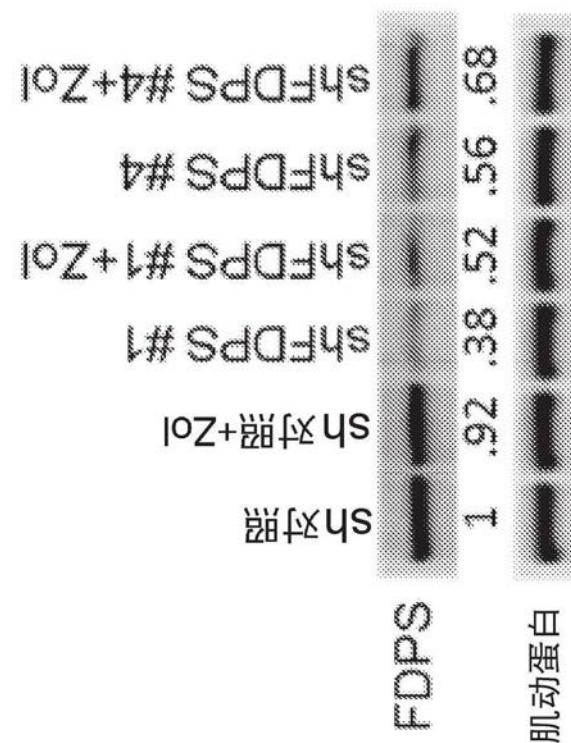


图18

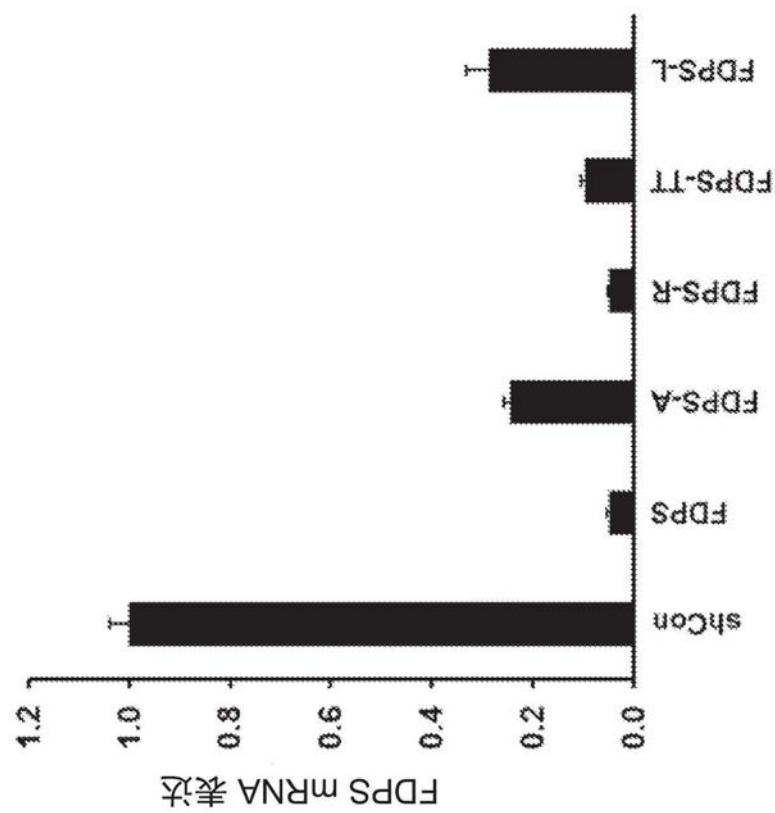


图19A

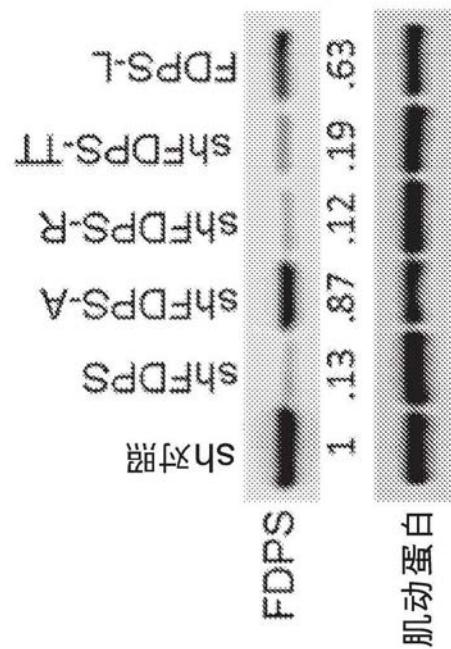


图19B

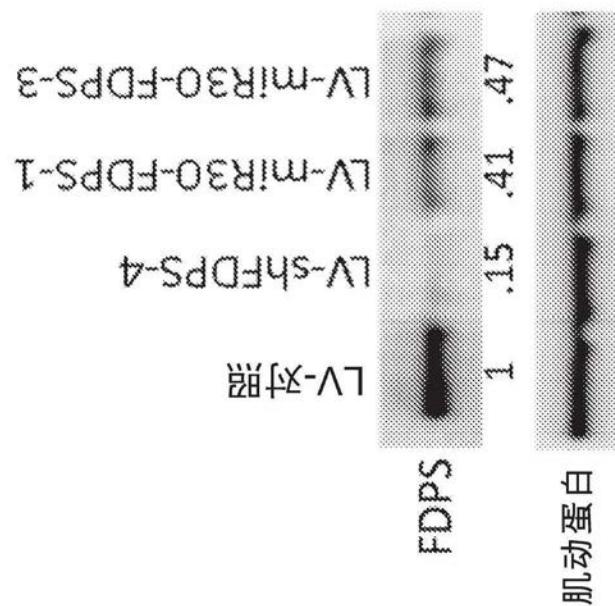
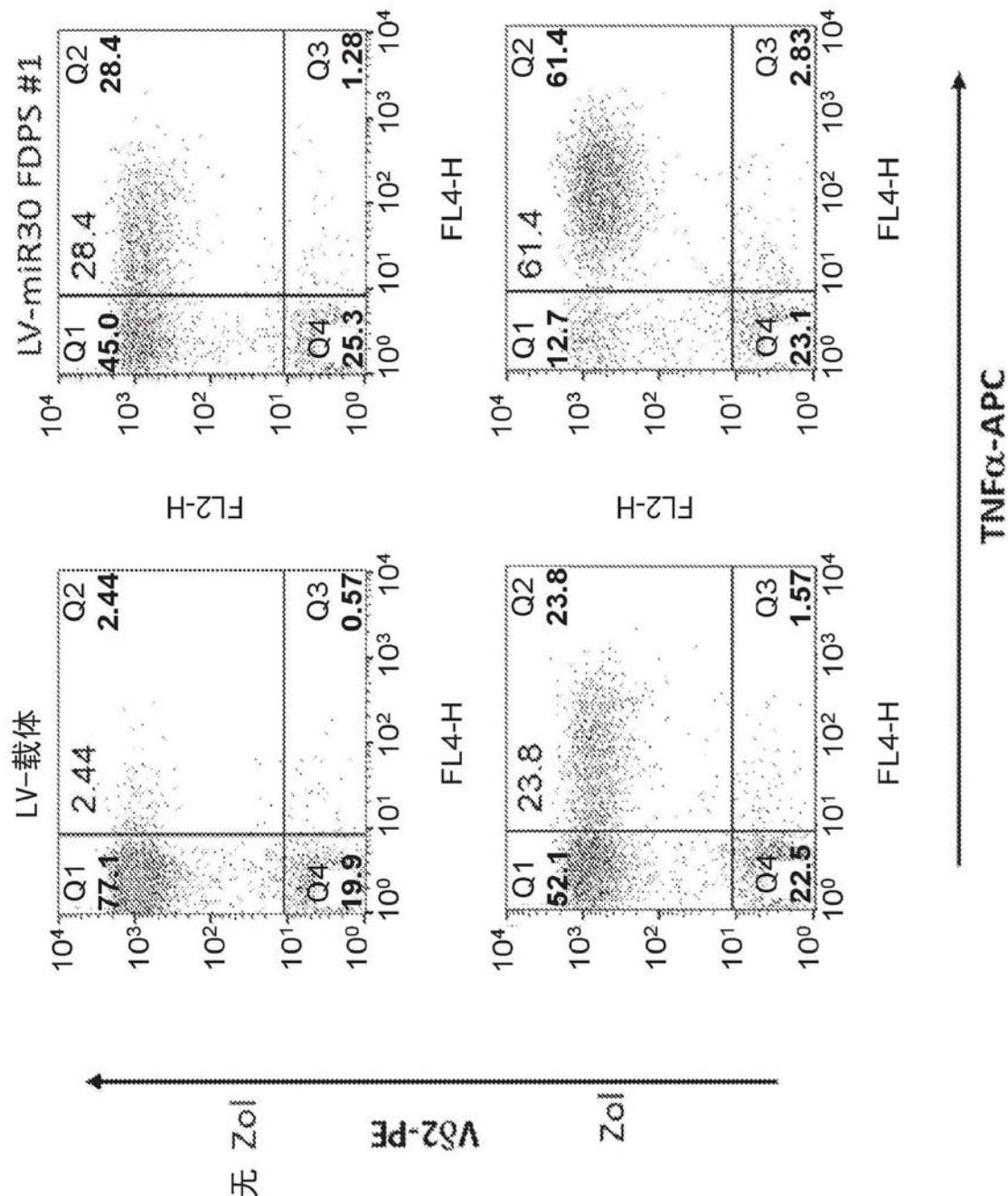


图20



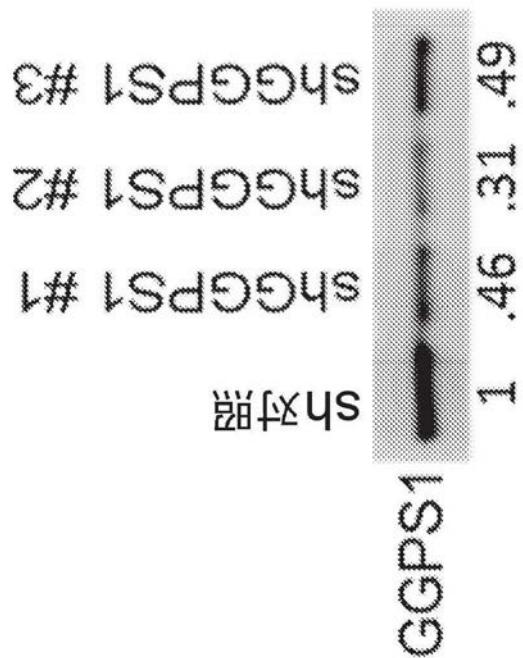


图22

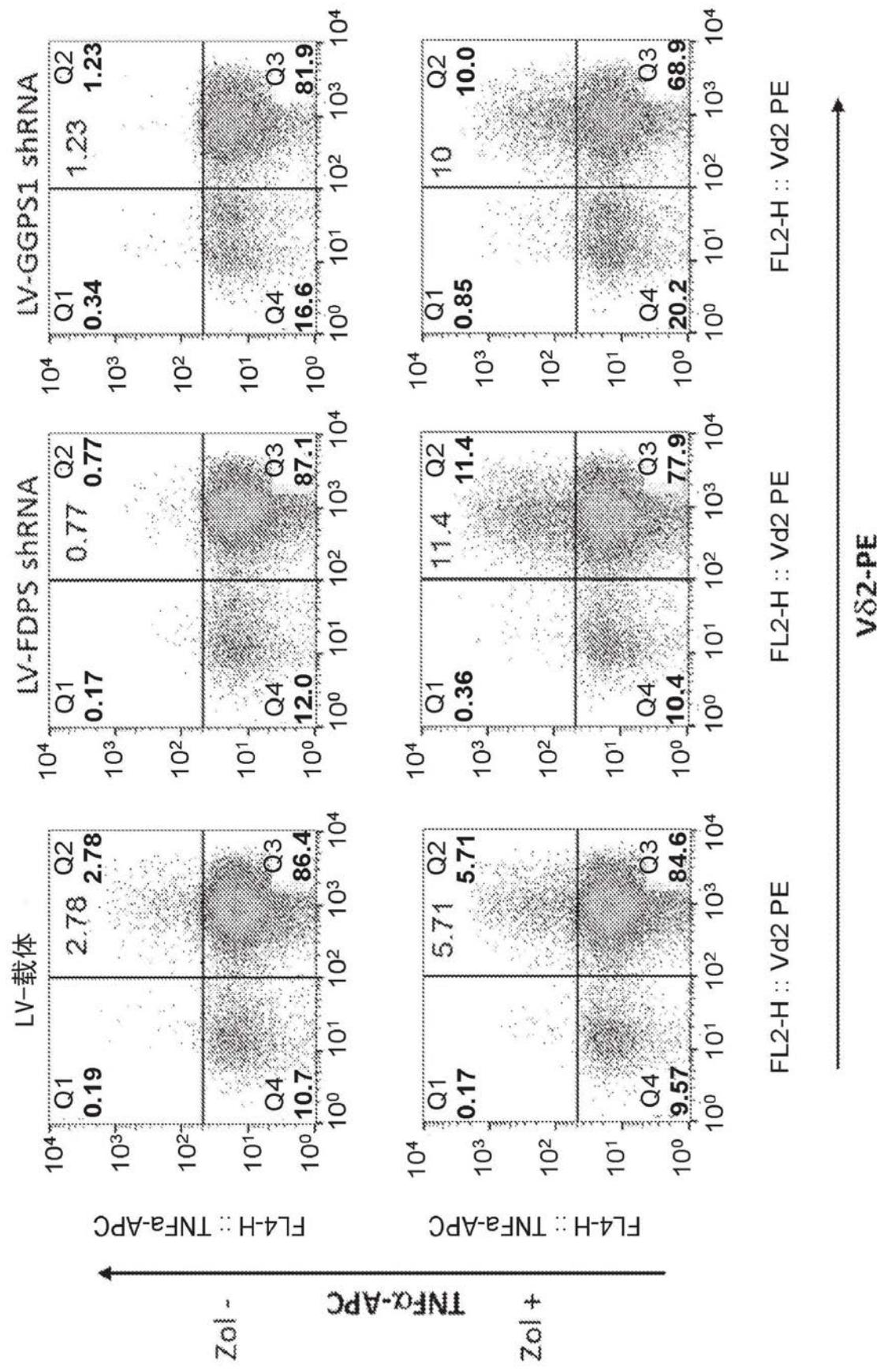


图23

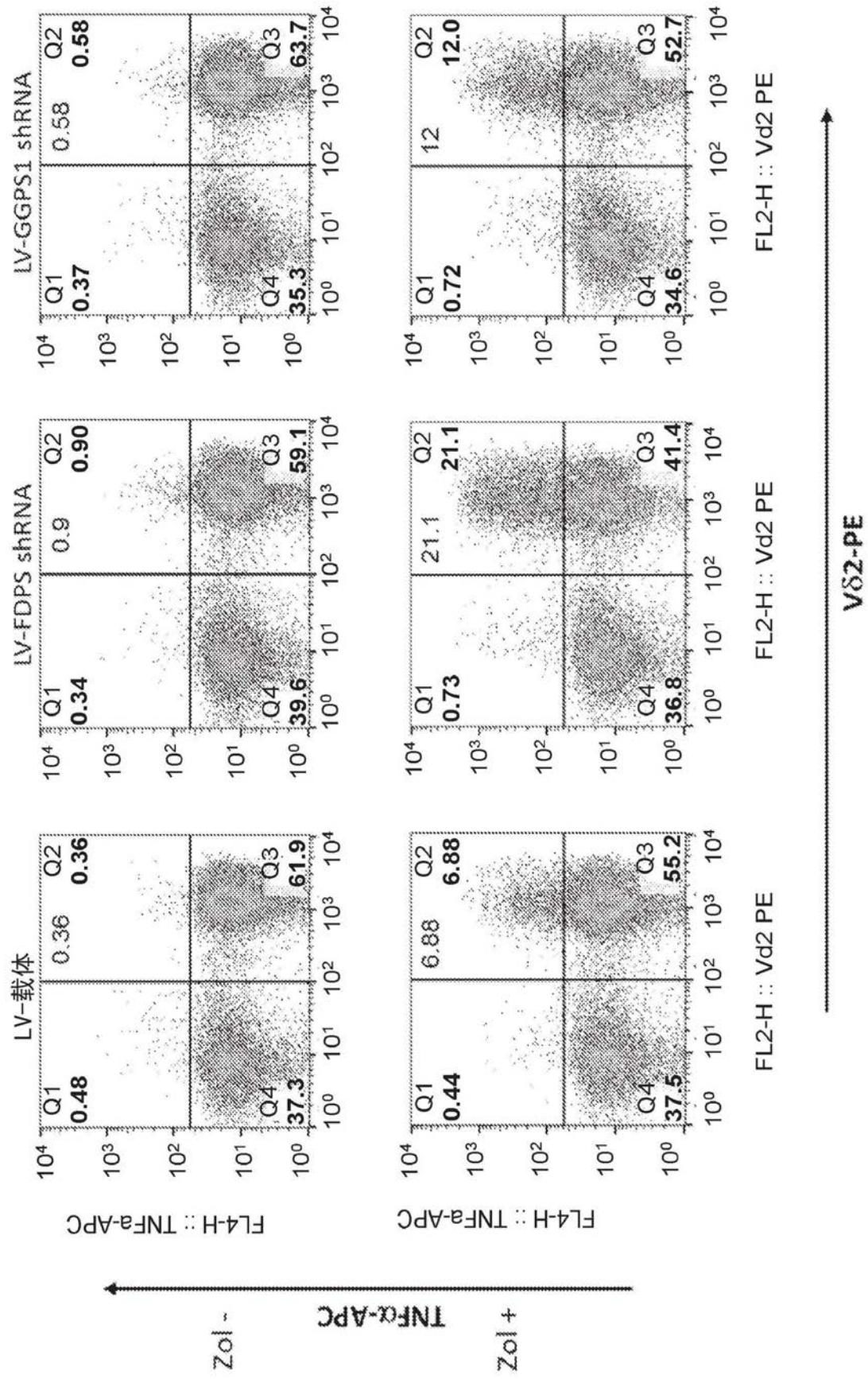


图24

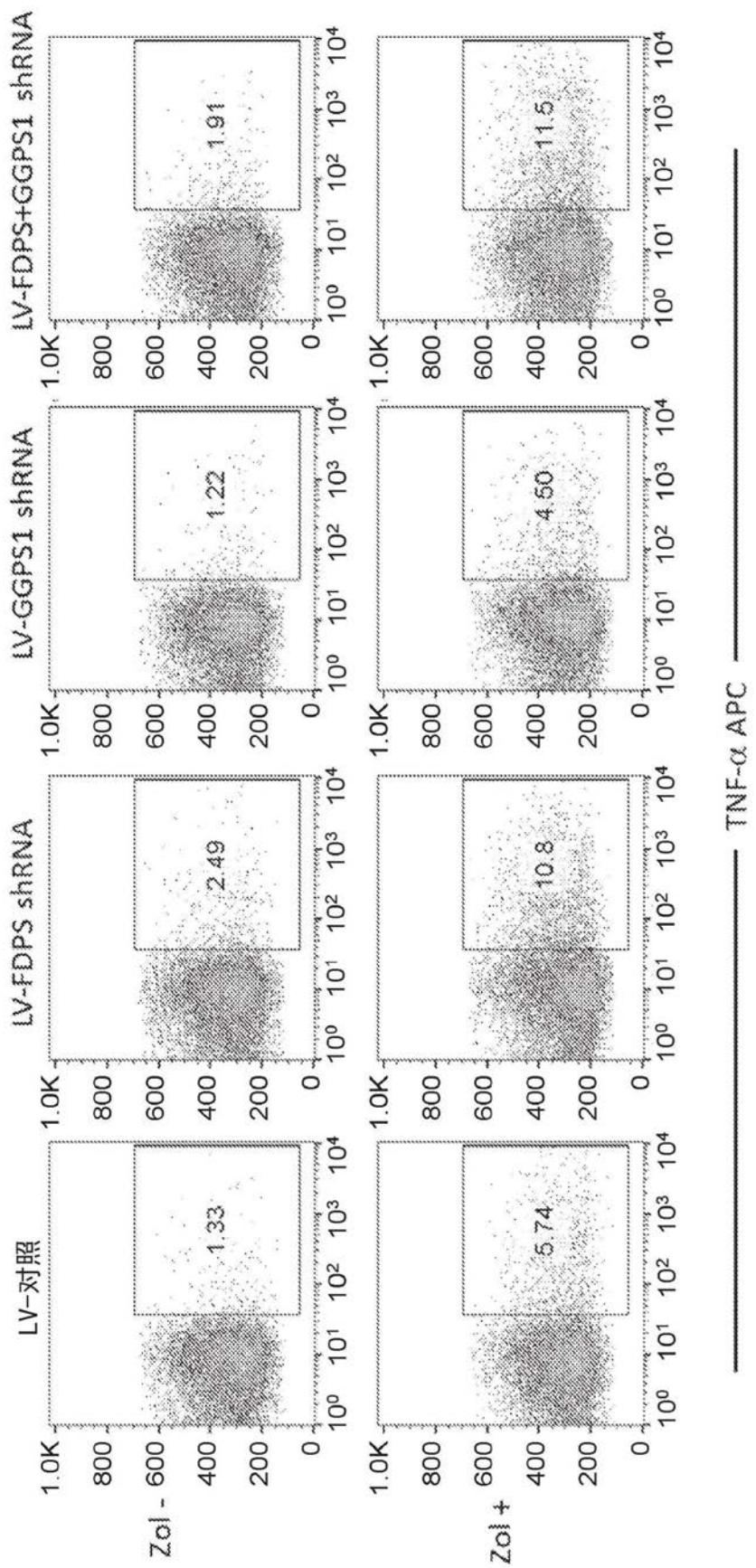


图25

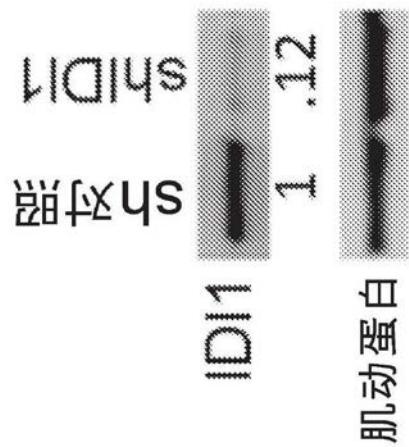


图26

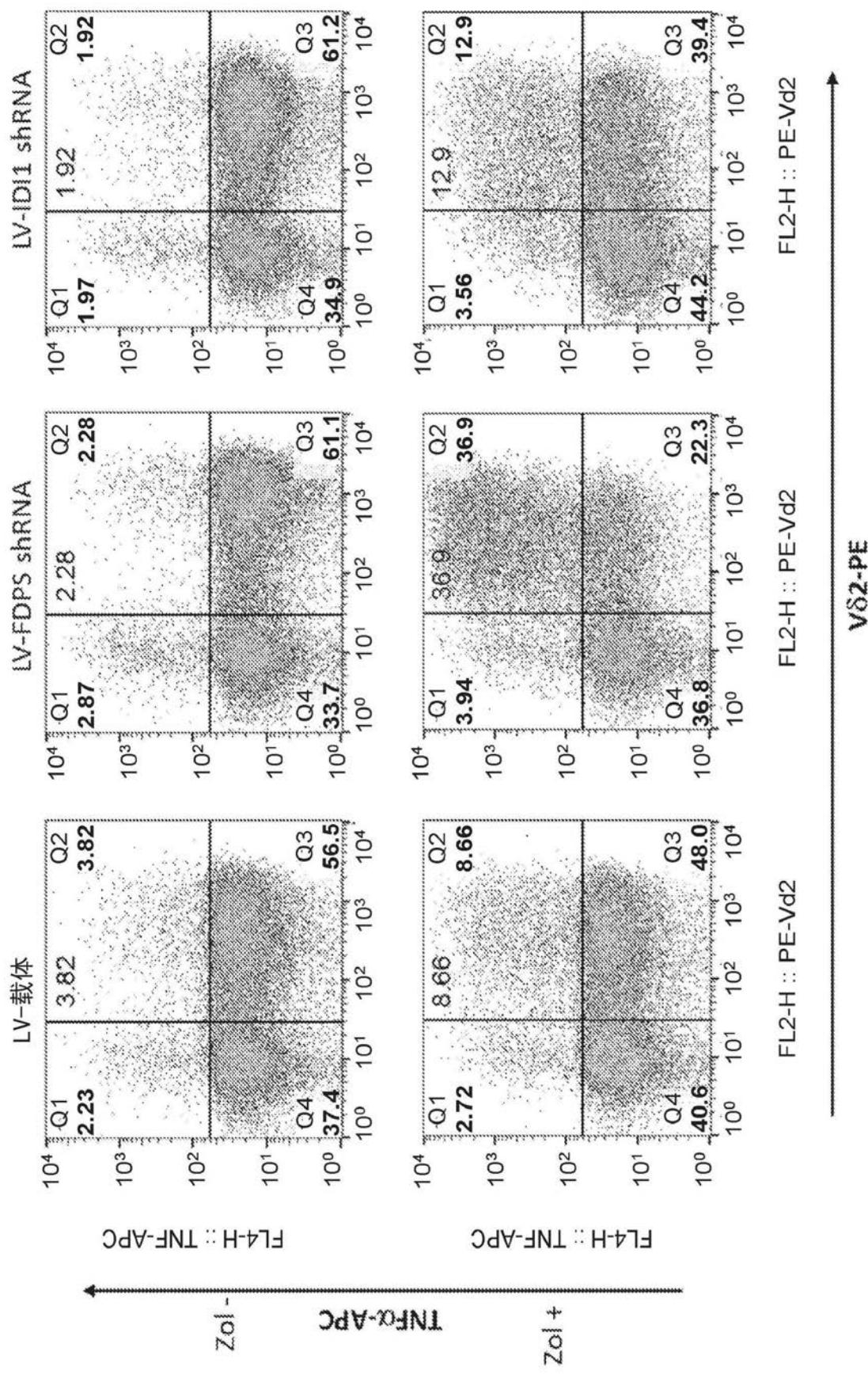


图27

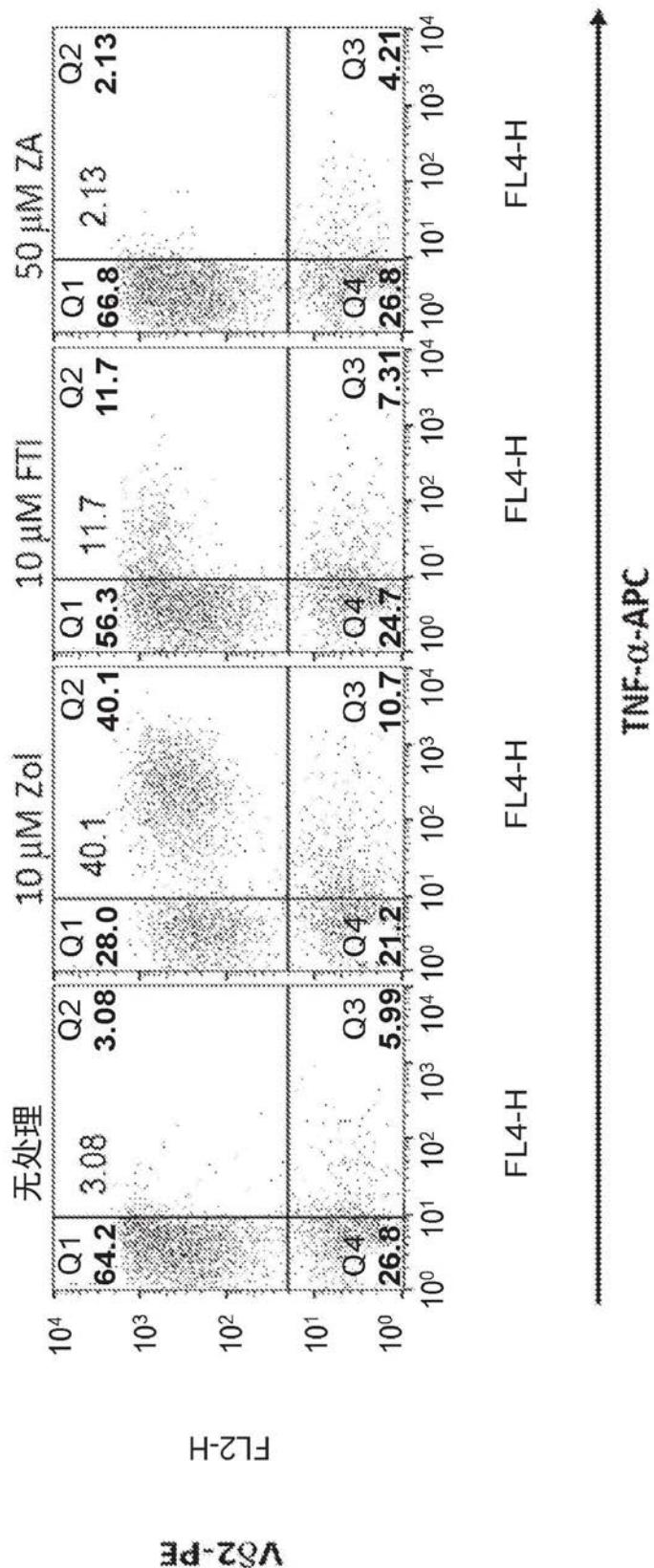


图28

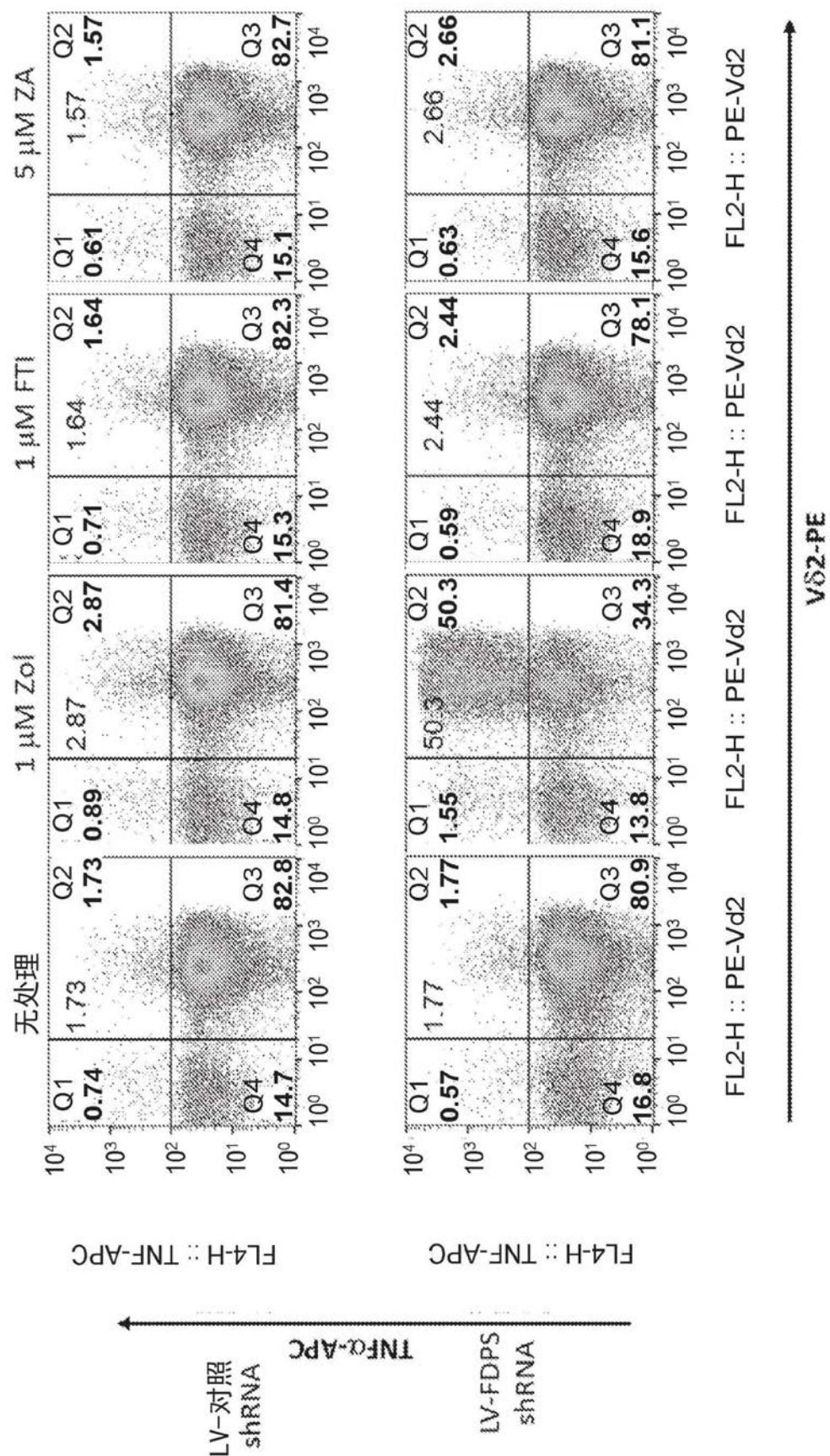


图29

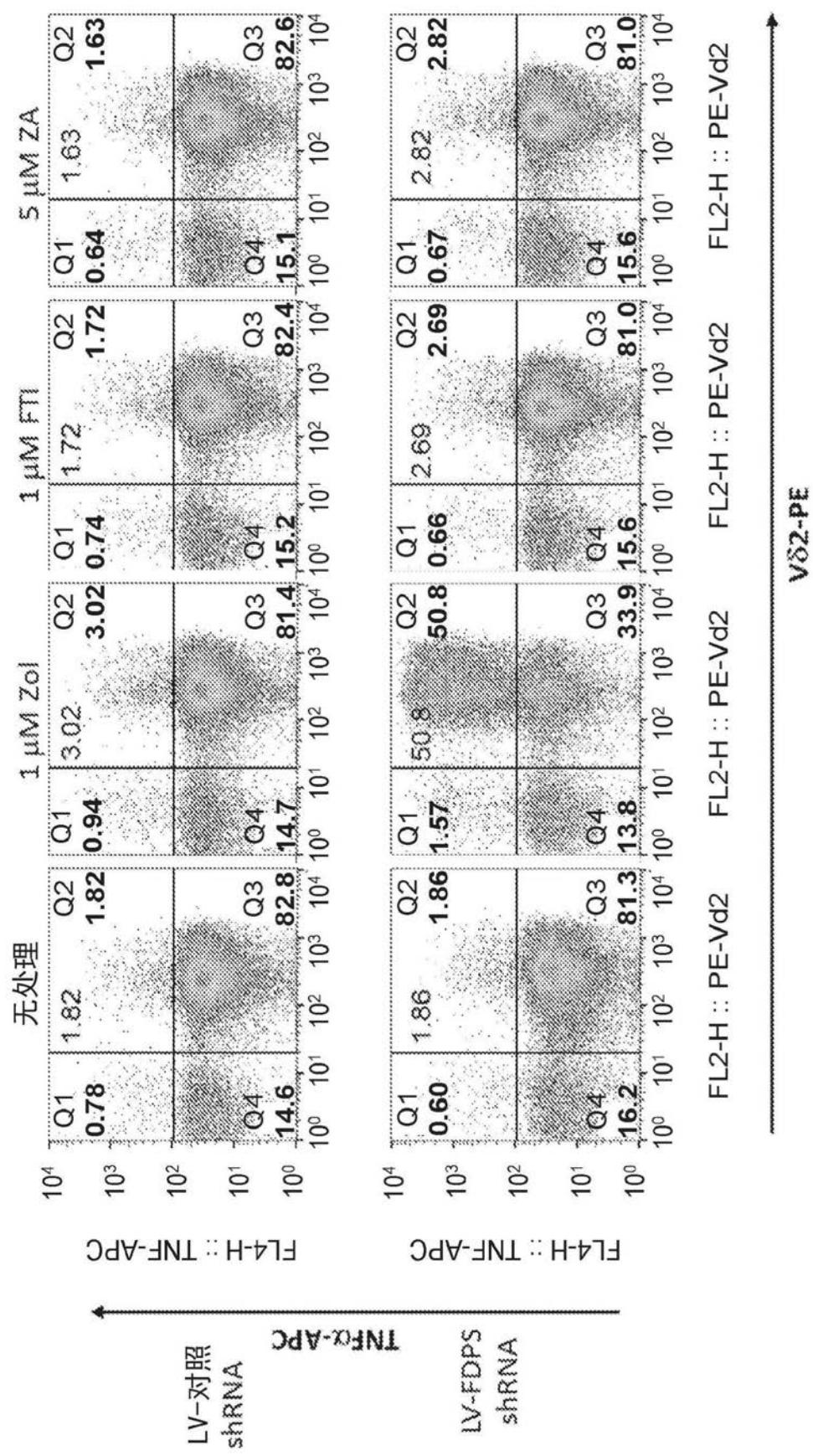


图30