



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112262214 A

(43) 申请公布日 2021.01.22

(21) 申请号 201980037729.7

(22) 申请日 2019.04.11

(30) 优先权数据

62/656,823 2018.04.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/026923 2019.04.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/200056 EN 2019.10.17

(71) 申请人 优莫佳生物制药股份有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 A·沙伦伯格 L·贝茨

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书5页 说明书22页

序列表39页 附图17页

(54) 发明名称

病毒载体及包装细胞系

(57) 摘要

本公开总体涉及用于体内扩增T细胞的核酸载体和包装细胞系。更具体地,本公开涉及慢病毒载体的直接瘤内注射,所述慢病毒载体适于体内肿瘤浸润淋巴细胞的转导和药物介导的扩增。

1. 一种用于激活并有效转导T细胞的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒包含编码小分子可控T细胞/NK细胞活化受体的核酸序列,所述核酸序列可操作地连接到启动子,其中所述T细胞/NK细胞活化受体能够被小分子激活。

2. 如权利要求1所述的慢病毒颗粒,其中所述慢病毒颗粒是包含T细胞活化或共刺激分子的表面工程改造的慢病毒颗粒。

3. 如权利要求2所述的慢病毒颗粒,其中所述T细胞活化或共刺激分子包含以下中的一个或多个:抗CD3抗体、CD28配体和41bb配体。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的慢病毒颗粒,其中所述T细胞/NK细胞活化受体包含选自以下组成的组的信号传导结构域:(i) 细胞因子受体信号传导结构域、(ii) 共刺激受体信号传导结构域、(iii) T细胞受体亚基信号传导结构域、(iv) NK细胞受体亚基信号传导结构域、以及(v) 生长因子受体信号传导结构域。

5. 如权利要求4所述的慢病毒颗粒,其中所述信号传导结构域包含常见细胞因子受体 γ 链的细胞因子受体信号传导结构域。

6. 如权利要求4或权利要求5所述的慢病毒颗粒,其中所述信号传导结构域包含常见细胞因子受体 β 链的细胞因子受体信号传导结构域。

7. 如权利要求4至6中任一项所述的慢病毒颗粒,其中所述信号传导结构域包含ITAM。

8. 如权利要求4至7中任一项所述的慢病毒颗粒,其中所述信号传导结构域包含能够在酪氨酸磷酸化时结合SH2结构域的所述酪氨酸。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的慢病毒颗粒,所述T细胞/NK细胞活化受体包含FK506结合蛋白(FKBP)或其功能同源物。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的慢病毒颗粒,所述T细胞/NK细胞活化受体包含FKBP12-雷帕霉素结合(FRB)蛋白或其功能同源物。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的慢病毒颗粒,其中所述慢病毒颗粒还包含编码检查点抑制配体的核酸序列。

12. 如权利要求11所述的慢病毒颗粒,其中所述检查点抑制配体能够阻断PD-1/PD-L1检查点。

13. 如权利要求11至或权利要求12所述的慢病毒颗粒,其中所述检查点抑制配体能够阻断Tim-3检查点。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒还包含编码提供对免疫抑制药物的耐药性的蛋白质的核酸序列。

15. 如权利要求14所述的慢病毒颗粒,其中所述免疫抑制药物选自以下组成的组:甲氨蝶呤、雷帕霉素、拉帕洛、他克莫司和环孢霉素。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒还包含编码2A肽的核酸序列。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒还包含wPRE核酸序列。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒还包含编码TGF β 显性负抑制受体的核酸序列。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的慢病毒颗粒,其中所述启动子选自以下组成的

组:MND启动子、T细胞特异性启动子、CD4 T细胞特异性启动子、CD8 T细胞特异性启动子、NK细胞特异性启动子、T细胞和NK细胞特异性启动子、CD4 T细胞和NK细胞特异性启动子、以及CD8 T细胞和NK细胞特异性启动子。

20.如权利要求1至19中任一项所述的慢病毒颗粒,其中所述启动子的序列与选自SEQ ID NO:1-4组成的组的序列至少90%相同。

21.一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:

a)所述受试者施用如权利要求1至20中任一项所述的慢病毒颗粒,以及

b)所述受试者施用小分子,

其中在所述受试者中治疗癌症。

22.一种用于扩增能够识别并杀死有此需要的受试者中肿瘤细胞的T细胞的方法,所述方法包括:

i)所述受试者施用如权利要求1至20中任一项所述的慢病毒颗粒,以及

b)所述受试者施用小分子,

其中能够识别并杀死所述受试者中肿瘤细胞的T细胞得以扩增。

23.如权利要求21或权利要求22所述的方法,其中通过静脉内注射施用所述慢病毒颗粒。

24.如权利要求21或权利要求22所述的方法,其中通过瘤内注射施用所述慢病毒颗粒。

25.如权利要求21至24中任一项所述的方法,其中通过静脉内注射施用所述小分子。

26.如权利要求21至24中任一项所述的方法,其中经口服施用所述小分子。

27.如权利要求21至26中任一项所述的方法,其中以足以激活所述T细胞/NK细胞活化受体的浓度施用所述小分子。

28.如权利要求21至27中任一项所述的方法,其中所述小分子是雷帕霉素。

29.如权利要求28所述的方法,其中以足以维持雷帕霉素的血清浓度大于0.1nM、1nM或10nM的浓度施用雷帕霉素。

30.如权利要求21至27中任一项所述的方法,其中所述小分子是拉帕洛。

31.如权利要求30所述的方法,其中以足以维持拉帕洛的血清浓度大于0.1nM、1nM或10nM的浓度施用拉帕洛。

32.如权利要求21至31中任一项所述的方法,其中所述小分子引起所述T细胞/NK细胞活化受体的二聚化,从而产生细胞活化信号。

33.如权利要求21至32中任一项所述的方法,其中

i)述小分子与所述慢病毒颗粒同时施用;或

ii)述小分子在施用所述慢病毒颗粒之前或之后约30分钟、约1小时、约2小时、约4小时、约5小时或约10小时施用。

34.如权利要求21至33中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用免疫抑制剂。

35.如权利要求34所述的方法,其中所述免疫抑制剂是他克莫司。

36.如权利要求35所述的方法,其中以足以维持他克莫司的血清浓度大于0.1nM、1nM或10nM的浓度施用他克莫司。

37.如权利要求34所述的方法,其中所述免疫抑制剂是环孢霉素。

38. 如权利要求37所述的方法,其中以足以维持环孢霉素的血清浓度大于0.1nM、1nM或10nM的浓度施用环孢霉素。

39. 一种包含对T细胞、NK细胞、或T细胞和NK细胞有特异性的启动子的核酸,其中所述核酸的序列与选自SEQ ID NO:1-4组成的组的序列至少90%相同。

40. 一种用于产生能够激活并有效转导T细胞的慢病毒颗粒的包装细胞系,所述包装细胞系包含能够包装慢病毒载体的培养细胞,其中所培养的细胞被基因工程改造以表达T细胞活化或共刺激分子。

41. 如权利要求40所述的包装细胞系,其中所述T细胞活化或共刺激分子选自由以下组成的组:抗CD3抗体、CD28配体和41bb配体。

42. 如权利要求40或权利要求41所述的包装细胞系,其中所述包装细胞系是HEK-293T细胞系。

43. 如权利要求40至42中任一项所述的包装细胞系,其中所述包装细胞系被基因修饰以缺乏MHCI类表达。

44. 如权利要求40至43中任一项所述的包装细胞系,其中所述包装细胞系被基因修饰以缺乏MHCII类表达。

45. 如权利要求40至44中任一项所述的包装细胞系,其中所述包装细胞系被基因修饰以缺乏抑制性受体配体的表达。

46. 如权利要求45所述的包装细胞系,其中所述抑制剂受体配体是PD-L1配体或Tim3配体。

47. 一种包含T细胞和/或NK细胞特异性启动子的核酸载体,所述T细胞和/或NK细胞特异性启动子可操作地连接到编码T细胞/NK细胞活化受体的核酸序列,其中所述T细胞/NK细胞活化受体能够被小分子激活。

48. 一种包含强启动子的核酸载体,所述强启动子可操作地连接到编码T细胞/NK细胞活化受体的核酸序列,其中所述T细胞/NK细胞活化受体能够被小分子激活。

49. 如权利要求48所述的核酸载体,其中所述启动子选自由以下组成的组:MND启动子、T细胞特异性启动子、CD4 T细胞特异性启动子、CD8 T细胞特异性启动子、NK细胞特异性启动子、T细胞和NK细胞特异性启动子、CD4 T细胞和NK细胞特异性启动子、以及CD8 T细胞和NK细胞特异性启动子。

50. 如权利要求47至49中任一项所述的核酸载体,其中所述启动子的序列与选自SEQ ID NO:1-4组成的组的序列至少90%相同。

51. 如权利要求47至50中任一项所述的核酸载体,其中所述T细胞/NK细胞活化受体包含选自由以下组成的组的信号传导结构域:细胞因子受体信号传导结构域、共刺激受体信号传导结构域、T细胞受体亚基信号传导结构域、NK细胞受体亚基信号传导结构域、以及生长因子受体信号传导结构域。

52. 如权利要求51所述的核酸载体,其中所述信号传导结构域包含常见细胞因子受体 γ 链的细胞因子受体信号传导结构域。

53. 如权利要求51或权利要求52所述的核酸载体,其中所述信号传导结构域包含常见细胞因子受体 β 链的细胞因子受体信号传导结构域。

54. 如权利要求51至53中任一项所述的核酸载体,其中所述信号传导结构域包含ITAM。

55. 如权利要求51至54中任一项所述的核酸载体,其中所述信号传导结构域包含能够在酪氨酸磷酸化时结合SH2结构域的所述酪氨酸。

56. 如权利要求47至55中任一项所述的核酸载体,所述核酸载体还包含编码检查点抑制配体的核酸序列。

57. 如权利要求56所述的核酸载体,其中所述检查点抑制配体能够阻断PD-1/PD-L1检查点。

58. 如权利要求56所述的核酸载体,其中所述检查点抑制配体能够阻断Tim-3检查点。

59. 如权利要求47至58中任一项所述的核酸载体,所述核酸载体还包含编码提供对免疫抑制药物的耐药性的蛋白质的核酸序列。

60. 如权利要求59所述的核酸载体,其中所述免疫抑制药物选自以下组成的组:甲氨蝶呤、雷帕霉素、拉帕洛、他克莫司和环孢霉素。

61. 如权利要求47至60中任一项所述的核酸载体,所述核酸载体还包含编码FK506结合蛋白(FKPB)或其功能同源物和FKBP12-雷帕霉素结合(FRB)蛋白或其功能同源物中的一者或两者的一种或多种核酸序列。

62. 如权利要求47至61中任一项所述的核酸载体,所述核酸载体还包含编码2A肽的核酸序列。

63. 如权利要求47至62中任一项所述的核酸载体,所述核酸载体还包含wPRE核酸序列。

64. 如权利要求47至62中任一项所述的核酸载体,所述核酸载体还包含编码TGFβ显性负抑制受体的核酸序列。

65. 如权利要求47至63中任一项所述的核酸载体,其中所述核酸载体是慢病毒载体。

66. 如权利要求47至64中任一项所述的核酸载体,其中所述核酸载体是腺相关病毒(AAV)载体。

67. 如权利要求47至64中任一项所述的核酸载体,其中所述核酸载体是腺病毒载体。

68. 一种核酸载体,所述核酸载体包含与选自SEQ ID NO:6-11的序列至少70%、80%、90%、95%或99%相同的序列。

69. 一种慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒通过用如权利要求67所述的核酸载体转染包装细胞系而产生。

70. 如权利要求68所述的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒还包含T细胞活化或共刺激分子。

71. 如权利要求69所述的慢病毒颗粒,其中所述T细胞活化或共刺激分子选自以下组成的组:抗CD3抗体、CD28配体和41bb配体。

72. 如权利要求1至20或68至70中任一项所述的慢病毒颗粒、如权利要求21至38中任一项所述的方法或如权利要求47至67中任一项所述的核酸载体,其中所述T细胞/NK细胞活化受体包含:

(a) 一链,所述第一链包含以下中的一者或两者:(i) 与SEQ ID NO:13共享至少95%、99%或100%序列同一性的功能性FKPB结构域,以及(ii) 与SEQ ID NO:14共享至少95%、99%或100%序列同一性的功能性IL2Rβ结构域;和/或

(b) 二链,所述第二链包含以下中的一者或两者:(i) 与SEQ ID NO:16共享至少95%、99%或100%序列同一性的功能性FRB结构域,以及(ii) 与SEQ ID NO:17共享至少95%、

99%或100%序列同一性的功能性IL2Rg结构域。

73. 如权利要求1至20或68至70中任一项所述的慢病毒颗粒、如权利要求21至38中任一项所述的方法或如权利要求47至67中任一项所述的核酸载体,其中T细胞/NK细胞活化受体包含:

(a) 一链,所述第一链包含功能性FKPB结构域和功能性IL2Rb结构域,其中所述第一链与SEQ ID NO:12共享至少95%、99%或100%序列同一性;和/或

(b) 第二链,所述第二链包含功能性FRB结构域和功能性IL2Rg结构域,其中所述第二链与SEQ ID NO:15共享至少95%、99%或100%序列同一性。

病毒载体及包装细胞系

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年4月12日提交的美国临时专利申请号62/656,823的优先权,其公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0003] 以电子方式提交的文本文件的说明

[0004] 与本申请相关的序列列表以文本格式而非纸质副本形式提供,并据此以引用的方式并入本说明书。含有序列表的文本文件的名称为VITI_001_01W0_SeqList_ST25.txt。文本文件为94KB,创建于2019年4月11日,并且通过EFS-Web以电子方式提交。

技术领域

[0005] 本公开总体涉及病毒载体、包装细胞系及相关使用方法,且具体来说用于在体内扩增免疫细胞群以治疗疾病病状的相关方法。

背景技术

[0006] 癌症免疫疗法是一种以治疗性诱导对肿瘤的免疫反应为基础的治疗模式。过继性T细胞疗法(ACT)是癌症免疫疗法的一种形式。将淋巴细胞,特别是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),从体内分离、离体培养、扩增,然后再灌注。扩增步骤可包括TIL的抗原特异性扩增或基因工程改造。ACT于Rosenberg等人,Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer.Science.348:62-8(2015)中综述。

[0007] 本发明人已意识到,作为ACT的替代方案,在体内转导TIL或其他免疫细胞可增强细胞在体内而非离体的扩增。此外,本发明人已意识到,在体内转导TIL或其他免疫细胞将允许治疗癌症或其他疾病病状,而不会有ACT所需的昂贵、耗时且有风险的程序。

[0008] 因此,需要在体内扩增TIL或其他免疫细胞群的手段。具体地,需要能够在体内选择性地扩增TIL或其他免疫细胞的期望群体的治疗剂。本公开提供了病毒载体、包装细胞系以及用于在体内扩增TIL或其他免疫细胞以治疗疾病病状的相关方法。

发明内容

[0009] 本公开部分地基于以下发现:设计来表达T细胞/NK细胞活化受体(以及任选的其他效应蛋白)的慢病毒载体和包装细胞系对于T细胞的体内扩增是有用的。本公开的慢病毒载体和包装细胞系可适于肿瘤浸润淋巴细胞在体内的转导和药物介导的扩增,诸如当使用包装细胞系将慢病毒载体包装成慢病毒颗粒并将所产生的慢病毒颗粒递送至受试者的体内时。根据本公开的慢病毒颗粒的瘤内注射导致肿瘤浸润淋巴细胞的体内扩增。当T细胞/NK细胞活化受体能够被小分子激活(或失活)时,肿瘤浸润淋巴细胞的扩增可通过使用此种小分子来控制。任选地,包装细胞系表达T细胞活化或共刺激分子,从而在不存在外源性活化剂的情况下,促进来源于包装细胞系的慢病毒颗粒对T细胞的转导。任选地,慢病毒载体赋予对一种或多种免疫抑制药物的耐药性,从而促进靶细胞的选择性扩增。

[0010] 在一个方面,本公开提供了一种包含T细胞和/或NK细胞特异性启动子的核酸载

体,所述T细胞和/或NK细胞特异性启动子可操作地连接到编码T细胞/NK细胞活化受体的核酸序列,其中T细胞/NK细胞活化受体能够被小分子激活。在一个实施方案中,核酸载体为慢病毒载体。在一个实施方案中,核酸载体包含与SEQ ID NO:6-11或其片段至少部分相同的序列。

[0011] 在另一方面,本公开提供了一种包含强启动子的核酸载体,所述强启动子可操作地连接到编码T细胞/NK细胞活化受体的核酸序列,其中T细胞/NK细胞活化受体能够被小分子激活。在一个实施方案中,强启动子选自SEQ ID NO:1-5。

[0012] 在另一方面,本公开提供了一种用于产生能够激活并有效转导T细胞的慢病毒颗粒的包装细胞系,所述包装细胞系包含能够包装慢病毒载体的培养的细胞,其中所培养的细胞被基因工程改造以表达T细胞活化或共刺激分子。

[0013] 在另一方面,本公开提供了一种慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒包含核酸载体,诸如本公开的任意核酸载体。在一个实施方案中,慢病毒颗粒包含T细胞活化或共刺激分子,例如抗CD3抗体、CD28配体或41bb配体。

[0014] 在另一方面,本公开提供了一种用于激活并有效转导T细胞的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒通过将如权利要求19所述的核酸载体转导到经基因工程改造以表达T细胞活化或共刺激分子的培养细胞中来制备。

[0015] 在另一方面,本公开提供了一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的任何慢病毒颗粒,以及向受试者施用小分子(慢病毒颗粒的T细胞/NK细胞活化受体能够被小分子激活),其中在受试者中治疗癌症。

[0016] 在另一方面,本公开提供了一种用于扩增能够识别并杀死有此需要的受试者中肿瘤细胞的T细胞的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的任何慢病毒颗粒,以及向受试者施用小分子(慢病毒颗粒的T细胞/NK细胞活化受体能够被小分子激活),其中能够识别并杀死受试者中肿瘤细胞的T细胞得到扩增。

[0017] 在另一方面,本公开提供了一种包含对T细胞、NK细胞、或T细胞和NK细胞有特异性的启动子的核酸,其中核酸的序列与选自由SEQ ID NO:1-4组成的组的序列至少90%相同。

[0018] 本公开的另外的方面和实施方案将从下面的详细描述中显而易见。

附图说明

[0019] 图1A至图1B描绘了慢病毒颗粒。图1A是表面工程改造的慢病毒颗粒的一个实施方案的示意图,其包含图1B所示的慢病毒颗粒中不存在的表面表达的抗CD3和T细胞共刺激分子。

[0020] 图2描绘了用于从用编码抗CD3 scFV、CD86和CD137L的慢病毒载体转导的HEK-293T细胞产生HATSE-293包装细胞系的实验方案。将CD86⁺CD137L⁺通过荧光活化细胞分选法分离,扩增,并冷冻以供长期储存和使用。

[0021] 图3A至图3K描绘了对CD46的亲代293细胞系和HATSE-293包装细胞系(两种细胞系上的预期组成性表达)以及CD86⁺/CD137L⁺表达(仅在HATSE-293细胞系中预期的表达)的FACS分析。

[0022] 图3A至图3E描绘了对CD46的亲代HEK-293细胞系(预期组成性表达)以及CD86/CD137L表达(预期无表达)的分析。在未染色(模拟)样品中未观察到可检测的荧光标记(图

3A)。通过抗CD46抗体染色(图3A至图3B;PE抗人CD46)检测到CD46的高表达,并且分别通过CD86和CD137L的特异性染色未检测到CD86(图3E;太平洋蓝(pacific blue)抗人CD86)或CD137L(图3D;PE抗人4-1BB配体(CD137L))的表达。

[0023] 图3F至图3K描绘了对CD46的HATSE-293细胞系(两种细胞系上的预期组成性表达)以及CD86/CD137L表达(预期的CD86⁺/CD137L⁺表达)的分析。图3F和图3G展示了未染色(模拟)样品中没有可检测的荧光标记。图3H和图3I展示了通过抗CD46抗体染色检测到的CD46(PE抗人CD46)的一致高表达。图3J和图3K展示了分别使用抗CD86(图3J)和抗CD137L(图3K)抗体检测到表达低量和高量的CD86或CD137L的两个群体。

[0024] 图4描绘了由对照慢病毒颗粒或由以下定义和实施例中所述的HATSE细胞系产生的慢病毒颗粒所转导的T细胞的生长曲线。作为阳性对照,在刺激珠的存在下用对照慢病毒颗粒转导T细胞。“转导后天数”是指细胞暴露于颗粒(第0天)后经过的天数。

[0025] 图5描绘了暴露于以下各物的细胞的荧光显微照片:293T对照颗粒[293T无刺激];293T对照颗粒和刺激珠[293T刺激];1X分选的HATSE颗粒[1x分选的HATSE(无刺激)];或2x分选的HATSE颗粒[2x分选的HATSE(无刺激)]。

[0026] 图6描绘了vivo-TIL 104 LNGFR(SEQ ID NO:6)的载体图。

[0027] 图7描绘了vivo-TIL 105 TCP1(SEQ ID NO:7)的载体图。

[0028] 图8描绘了vivo-TIL 106 TCP2(SEQ ID NO:8)的载体图。

[0029] 图9描绘了vivo-TIL 107 TCP3(SEQ ID NO:9)的载体图。

[0030] 图10描绘了vivo-TIL 108 TCP4(SEQ ID NO:10)的载体图。

[0031] 图11描绘了vivo-TIL 109 hPerfP(SEQ ID NO:11)的载体图。

[0032] 图12A至图12F示出了示例性小分子可控的T细胞/NK细胞活化受体(称为RACCR)的结果。图12A示出了所例示的RACCR分子的设计。图12A示出了用表达GFP的对照慢病毒颗粒转导的细胞。图12B示出了用表达mCherry的表面工程改造的颗粒转导的细胞。图12C示出了用表达RACCR的表面工程改造的颗粒转导的细胞。

[0033] 图12E示出了在IL-2或雷帕霉素存在下,用各种表面工程改造的慢病毒颗粒(SE-LVP),包括表达RACCR的SE-LVP转导的T细胞的T细胞扩增图。

[0034] 图12F示出了证实由RACCR驱动的T细胞扩增可用雷帕霉素控制的数据。

具体实施方式

[0035] 本发明人已意识到,作为ACT的替代方案,在体内转导TIL或其他免疫细胞可增强细胞在体内而非离体的扩增。此外,本发明人已意识到,在体内转导TIL或其他免疫细胞允许治疗癌症或其他疾病病状,而没有免疫细胞离体扩增的缺点。

[0036] 因此,本公开提供了在体内扩增TIL或其他免疫细胞群体的手段。具体地,本公开提供了能够在体内选择性地扩增TIL或其他免疫细胞的期望群体的治疗剂。本公开提供了病毒载体以及用于在体内扩增TIL或其他免疫细胞以治疗疾病病状的相关方法。

[0037] 本公开部分地基于以下发现:设计来表达T细胞/NK细胞活化受体(以及任选的其他效应蛋白)的慢病毒载体和包装细胞系对于T细胞的体内扩增是有用的。本公开的慢病毒载体和包装细胞系可适于肿瘤浸润淋巴细胞在体内的转导和药物介导的扩增,诸如当使用包装细胞系将慢病毒载体包装成慢病毒颗粒并将所产生的慢病毒颗粒递送至受试者的体

内,诸如递送至患有实体肿瘤的患者时。所公开的慢病毒载体和颗粒可通过自体或同种异体T细胞或其他免疫细胞的体外转导用于ACT。在一些情况下,所公开的慢病毒载体和颗粒被配置为在体内使用。瘤内注射慢病毒颗粒导致肿瘤浸润淋巴细胞在体内扩增,因为慢病毒载体被配置为提供能够向体外或体内转导的靶细胞提供有丝分裂信号的T细胞/NK细胞活化受体的表达。

[0038] 1.1核酸载体

[0039] 如本文所用,术语“核酸载体”旨在表示携带、容纳或表达目标核酸的任何核酸。核酸载体可具有诸如表达、包装、假型化或转导的特有功能。如果核酸载体适合用作克隆载体或穿梭载体,则其还可具有操纵功能。载体的结构可包括制作可行且适合于特定用途的任何期望的形式。此类形式包括例如环状形式诸如质粒和噬菌粒,以及线性或分支形式。核酸载体可由例如DNA或RNA构成,以及含有部分或全部核苷酸衍生物、类似物和模拟物。此类核酸载体可从自然来源获得、重组产生或以化学方式合成。

[0040] 本公开的载体系统的非限制性实例包括逆转录病毒、慢性病、泡沫病毒和睡美人(Sleeping Beauty)转座子。

[0041] 1.1.1慢病毒载体

[0042] 慢病毒是复杂的逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env外,其还含有其他具有调控或结构功能的基因。较高的复杂性使得病毒能够调节其生命周期,就像在潜伏感染过程中一样。慢病毒的一些实例包括人免疫缺陷病毒(HIV-1和HIV-2)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。慢病毒载体已通过对HIV毒力基因的多次减毒而产生,例如,基因env、vif、vpr、vpu和nef被删除,使得载体具有生物安全性。

[0043] 慢病毒载体为基因疗法提供了巨大的优势。除非工程改造成非整合型,否则慢病毒载体稳定地整合到靶细胞的染色体中,从而允许长期表达递送的转基因。此外,它们不转移病毒基因,因此避免了产生可被细胞毒性T细胞破坏的转导细胞的问题。此外,它们具有相对较大的克隆能力,足以满足大多数预期的临床应用。另外,与其他逆转录病毒相比,慢病毒能够转导非分裂细胞。这在诸如造血系统、脑、肝、肺和肌肉的组织的基因疗法中非常重要。例如,来源于HIV-1的载体允许高效的体内和离体递送、整合和稳定表达转基因到诸如神经元、肝细胞和心肌细胞的细胞中(Blomer等人,1997;Kafri等人,1997;Naldini等人,1996;Naldini等人,1998)。

[0044] 慢病毒载体是本领域中已知的,参见Naldini等人(1996)Science272:263-7; Zufferey等人(1998)J.Virol.72:9873-9880;Dull等人(1998)J.Virol.72:8463-8471;美国专利号6,013,516;和美国专利号5,994,136,其各自以引用的方式整体并入本文。一般来讲,这些载体被配置成携带用于选择含有载体的细胞、用于将外来核酸并入慢病毒颗粒中以及用于将核酸转移到靶细胞中的基本序列。

[0045] 常用的慢病毒载体系统是所谓的第三代系统。第三代慢病毒载体系统包括四种质粒。“转移质粒”编码由慢病毒载体系统递送到靶细胞中的多核苷酸序列。转移质粒通常具有一个或多个侧接有长末端重复(LTR)序列的目标转基因序列,这有助于将转移质粒序列整合到宿主基因组中。出于安全原因,转移质粒通常被设计成使所产生的载体复制不起作用。例如,转移质粒缺乏在宿主细胞中产生感染颗粒所必需的基因元件。此外,可将转移质粒设计成缺失3' LTR,从而使病毒“自身失活”(SIN)。参见Dull等人(1998)J.Virol.72:

8463-71;Miyoshi等人(1998) J.Virol.72:8150-57。

[0046] 第三代系统通常还包括两个“包装质粒”和一个“包膜质粒”。“包膜质粒”通常编码可操作地连接到启动子的Env基因。在示例性第三代系统中,Env基因为VSV-G,且启动子为CMV启动子。第三代系统使用两个包装质粒,一个编码gag和pol,而另一个编码rev作为进一步的安全特征,这是对所谓的第二代系统的单个包装质粒的改进。虽然更安全,但第三代系统使用起来可能更麻烦,并且由于添加另外的质粒而导致病毒滴度降低。示例性包装质粒包括但不限于pMD2.G、pRSV-rev、pMDLG-pRRE和pRRL-GOI。

[0047] 慢病毒载体系统依赖于使用“包装细胞系”。一般来讲,包装细胞系是在将转移质粒、一个或多个包装质粒和包膜质粒导入细胞时,其细胞能够产生传染性慢病毒颗粒的细胞系。可使用将质粒导入细胞中的各种方法,包括转染或电穿孔。在一些情况下,包装细胞系适于将慢病毒载体系统高效包装成慢病毒颗粒。

[0048] 如本文所用,术语“慢病毒载体”旨在表示编码基因组包装所需的慢病毒顺式核酸序列的核酸。慢病毒载体还可编码有益于基因递送的其他顺式核酸序列,包括例如,逆转录、前病毒整合或基因组转录所需的顺式序列。慢病毒载体执行慢病毒载体的转导功能。因此,载体基因组的确切组成将取决于希望导入靶细胞中的遗传物质。因此,载体基因组可编码,例如,除了包装、逆转录、整合或转录所需以外的另外的多肽或功能。此类功能通常包括编码表达目标核酸所需的顺式元件。慢病毒顺式序列或元件可来源于慢病毒基因组或其他病毒或载体基因组,只要慢病毒载体基因组可通过包装细胞系包装成慢病毒颗粒并导入靶细胞中即可。

[0049] 慢病毒载体的非限制性实例包括SEQ ID NO:6-11,它们在图6至图11中示出。

[0050] 所产生的慢病毒颗粒通常包括RNA基因组(来源于转移质粒)、包埋Env蛋白的脂质双层包膜以及其他辅助蛋白,包括整合酶、蛋白酶和基质蛋白(参见图1B)。如本文所用,术语“慢病毒颗粒”旨在表示包括包膜、具有慢病毒的一种或多种特征并且能够侵入靶宿主细胞的病毒颗粒。此类特征包括,例如,感染非分裂宿主细胞;转导非分裂宿主细胞;感染或转导宿主免疫细胞;含有包括gag结构多肽p7、p24和p17中的一个或多个的慢病毒病毒体;含有包括env编码的糖蛋白p41、p120和p160中的一个或多个的慢病毒包膜;含有包括作用于复制、前病毒整合或转录的一个或多个慢病毒顺式作用序列的基因组;含有编码慢病毒蛋白酶、逆转录酶或整合酶的基因组;或含有编码调控活性的基因组,诸如Tat或Rev。转移质粒可包含cPPT序列,如描述于美国专利号8,093,042中。

[0051] 系统的效率是载体工程改造中的重要问题。可以本领域已知的各种方式来评估慢病毒载体系统的效率,这些方式包括诸如通过定量聚合酶链反应(qPCR)来测量载体拷贝数(VCN)或载体基因组(vg),或以感染单位/毫升(IU/mL)为单位的病毒滴度。例如,可使用对培养的肿瘤细胞系HT1080执行的功能性测定来评估滴度,如描述于Humbert等人Development of Third-generation Cocult Envelope Producer Cell Lines for Robust Lentiviral Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells and T-cells.Molecular Therapy 24:1237-1246(2016)中。当在持续分裂的培养细胞系上评估滴度时,不需要刺激,且因此测得的滴度不受慢病毒颗粒表面工程改造的影响。用于评估慢病毒载体系统的效率的其他方法提供于Gaererts等人Comparison of lentiviral vector titration methods.BMC Biotechnol.6:34(2006)中。

[0052] 众所周知,慢病毒载体系统具有有限的效率,并且试图改变慢病毒载体系统常常将导致效率下降。本发明人惊奇地发现,慢病毒载体系统(例如,第三代系统)的包膜质粒可被修饰来除了融合糖蛋白或其功能变体之外还编码多个多肽。

[0053] 在一些情况下,本公开的载体和包装细胞系能够以至少约 1×10^6 IU/mL、至少约 2×10^6 IU/mL、至少约 3×10^6 IU/mL、至少约 4×10^6 IU/mL、至少约 5×10^6 IU/mL、至少约 6×10^6 IU/mL、至少约 7×10^6 IU/mL、至少约 8×10^6 IU/mL、至少约 9×10^6 IU/mL、或至少约 1×10^7 IU/mL的滴度产生表面工程改造的慢病毒颗粒。在一些情况下,本公开的多顺反子载体能够以至少约 1×10^7 IU/mL、至少约 2×10^7 IU/mL、至少约 3×10^7 IU/mL、至少约 4×10^7 IU/mL、至少约 5×10^7 IU/mL、至少约 6×10^7 IU/mL、至少约 7×10^7 IU/mL、至少约 8×10^7 IU/mL、至少约 9×10^7 IU/mL、或至少约 1×10^8 IU/mL的滴度产生表面工程改造的慢病毒颗粒。

[0054] 1.2 T细胞/NK细胞活化受体

[0055] 本公开设想了编码T细胞/NK细胞活化受体的核酸载体、慢病毒载体和AAV载体。如本文所用,术语“T细胞/NK细胞活化受体”是指一种或多种跨膜蛋白,所述一种或多种跨膜蛋白被配置成在转导细胞的细胞表面上表达,使得T细胞/NK细胞活化受体向转导细胞提供有丝分裂信号。使用T细胞/NK细胞活化受体是因为在大多数情况下,靶细胞为T细胞或NK细胞。通过使用在另一种细胞类型中保持活性的活化受体,本发明方法可适于与其他细胞类型一起使用。此处有用的T细胞/NK细胞活化受体可包括信号传导结构域,即细胞因子受体信号传导结构域、共刺激受体信号传导结构域、T细胞受体亚基信号传导结构域、NK细胞受体亚基信号传导结构域、生长因子受体信号传导结构域等。

[0056] 1.2.1 T细胞/NK细胞活化受体的非限制性实例

[0057] 所使用的信号传导结构域可为常见的细胞因子受体 γ 链的信号传导结构域,也可为常见的细胞因子受体 β 链的信号传导结构域。信号传导结构域可包括能够在酪氨酸磷酸化时结合SH2结构域的ITAM或酪氨酸。在一些情况下,信号传导可通过活化受体的同源或异源二聚化触发。在一些情况下,活化受体的胞内结构域上的一个或多个酪氨酸残基的磷酸化可导致与SH2结构域的二聚化,从而启动有丝分裂信号级联。在一些情况下,本公开的信号传导结构域可能能够在酪氨酸残基上磷酸化,并且之后与另一分子上的SH2结构域结合。

[0058] 在一些情况下,T细胞/NK细胞活化受体是天然存在的活化受体。可替代地,从不同活化受体提取的一个或多个基因元件的复合物是本领域中已知的。在本发明中有用的工程改造的T细胞/NK细胞活化受体的实例包括但不限于组成活性IL2受体或IL7受体,如描述于Hunter等人Chimeric γ c cytokine receptors confer cytokine independent engraftment of human T lymphocytes.Mol Immunol.2013年11月;56(1-2):1-11.;Shum等人Constitutive Signaling from an Engineered IL7 Receptor Promotes Durable Tumor Elimination by Tumor-Redirected T Cells.Cancer Discov.2017年11月;7(11):1238-1247中。

[0059] 1.2.2小分子可控的T细胞/NK细胞活化受体

[0060] 在一些情况下,提供一种控制身体内转导细胞的扩增的手段可为有利的。在一些情况下,这可作为防止细胞过度扩增的安全保护。在其他情况下,可控制转导细胞的扩增以用于治疗目的。因此,本公开提供了可通过使用小分子控制的T细胞/NK细胞活化受体。当慢病毒载体编码此种可控的T细胞/NK细胞活化受体时,施用小分子将允许活化受体的激活以

向转导细胞提供有丝分裂信号,而停止施用小分子将阻止活化受体向转导细胞提供有丝分裂信号。以此方式,通过向受试者施用慢病毒颗粒而产生的体内TIL将仅在小分子存在于受试者中时扩增。小分子可全身地或局部地提供,并在与施用慢病毒颗粒的同时或之后的期间内提供。可通过血样、活检或医学成像监测TIL的扩增,并且如果观察到过度扩增,则撤回小分子。在一些情况下,小分子的脉冲或间歇施用可用于优化治疗方案。在一些情况下,小分子将被滴定以调节TIL的扩增。在一些情况下,响应于肿瘤的缓解或复发或出于其他治疗原因,小分子可被撤回或施用。

[0061] 在一些情况下,T细胞/NK细胞活化受体可被配置成通过用蛋白质亚基取代二聚T细胞/NK细胞活化受体的胞外结构域来由小分子控制,所述蛋白质亚基在小分子存在的情况下诱导二聚化,或在小分子不存在的情况下诱导二聚化,并且在去除、降解或稀释小分子时回到单体状态。设想在异源二聚T细胞/NK细胞活化受体的情况下,可对T细胞/NK细胞活化受体进行修饰,使得T细胞/NK细胞活化受体的一个单元的胞外结构域包含诱导二聚化的蛋白质亚基的一个单体,并且T细胞/NK细胞活化受体的另一个单元的胞外结构域包含诱导二聚化的蛋白质亚基的其他单体。异源二聚T细胞/NK细胞活化受体可以使用诱导二聚化的同源二聚蛋白质亚基或诱导二聚化的异源二聚蛋白质亚基的这种方式来修饰。在其他情况下,同源二聚T细胞/NK细胞活化受体可以使用诱导二聚化的同源二聚蛋白质亚基或诱导二聚化的异源二聚蛋白质亚基的这种方式来修饰。如果小分子可控的T细胞/NK细胞活化受体是同源二聚体,则其可由单个转基因编码;如果它是异源二聚体,则可由两个转基因编码。

[0062] 诱导二聚化的蛋白质亚基的实例包括但不限于FK506结合蛋白(FKBP)和FKBP12雷帕霉素结合(FRB)结构域。FK506结合蛋白在他克莫司(FK506)存在下二聚化。FKBP12-雷帕霉素结合(FRB)结构域在雷帕霉素存在下二聚化。因此,根据本公开的小分子可为他克莫司、雷帕霉素或拉帕洛(rapalog)(雷帕霉素类似物)。可控制小分子可控受体的小分子的其他实例包括但不限于雷帕霉素、拉帕洛、香豆霉素、赤霉素、脱落酸(ABA)、甲氨蝶呤、环孢霉素A、FKCsA、甲氧苄啶(Tmp)-FKBP的合成配体(SLF)或其任何衍生物。适于作为本公开的受体中的融合蛋白的示例性结构域对包括但不限于选自以下的对:FKBP和FRB、FKBP和钙调磷酸酶、FKBP和亲环蛋白、FKBP和细菌DHFR、钙调磷酸酶和亲环蛋白、PYL1和ABI1、或GIB1和GAI、或其变体。

[0063] 在一些情况下,小分子可控受体包含胞外结构域,所述胞外结构域包含一个或多个小分子结合结构域。小分子与一个或多个胞外结构域的结合导致受体分子的分子内相互作用(例如,同源二聚化或异源二聚化),从而激活来自一个或多个胞内结构域的下流信号。小分子可控受体的一个或多个胞内结构域可包含选自以下结构域或片段中的一个或多个结构域:CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1(PD-1)、诱导性T细胞共刺激因子(ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig α (CD79a)、DAP-10、Fc γ 受体、MHC 1类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、IL-21R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD1

1b、ITGAX、CD1 1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、TGFbR1、TGFbRII、myd88、CD40和任何其他TNF受体超家族成员特异性结合的配体,及他们的组合。

[0064] 目标蛋白质的“同源物”,诸如FKBP或FRB,包括包含氨基酸序列或由其组成的蛋白质,所述氨基酸序列与蛋白质的氨基酸序列具有至少约70%、80%、90%、95%、98%或99%的同一性。同源物还可以是由与核苷酸序列具有至少约70%、80%、90%、95%、98%或99%同一性的核酸编码的蛋白质。

[0065] 目标蛋白质的“功能同源物”是指具有蛋白质的至少一种生物学活性的蛋白质同源物。例如,FKBP的功能同源物是指在雷帕霉素(或相关拉帕洛)存在下与FRB异源二聚化或在诸如AP1903的分子存在下同源二聚化的FKBP同源物;FRB的功能同源物是指在雷帕霉素(或相关拉帕洛)存在下与FKBP异源二聚化的FRB同源物。

[0066] 在一些实施方案中,T细胞/NK细胞活化受体包含(a)第一链,所述第一链包含以下中的一者或两者:(i)与SEQ ID NO:13共享至少95%、99%或100%序列同一性的功能性FKBP结构域,和(ii)与SEQ ID NO:14共享至少95%、99%或100%序列同一性的功能性IL2Rb结构域;和/或(b)第二链,所述第二链包含以下中的一者或两者:(i)与SEQ ID NO:16共享至少95%、99%或100%序列同一性的功能性FRB结构域,和(ii)与SEQ ID NO:17共享至少95%、99%或100%序列同一性的功能性IL2Rg结构域。

[0067] 在一些实施方案中,T细胞/NK细胞活化受体包含(a)第一链,所述第一链包含功能性FKBP结构域和功能性IL2Rb结构域,其中第一链与SEQ ID NO:12共享至少95%、99%或100%序列同一性;和/或(b)第二链,所述第二链包含功能性FRB结构域和功能性IL2Rg结构域,其中第二链与SEQ ID NO:15共享至少95%、99%或100%序列同一性。

[0068] 1.2.3嵌合抗原受体

[0069] 在一些情况下,提供一种将转导的细胞靶向特定细胞或组织的手段可为有利的。在一些情况下,慢病毒载体包含(代替或除了其他基因之外)编码嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸。可采用本领域中已知的各种CAR。可替代地,可使用T细胞受体(TCR)融合物。当载体编码CAR时,CAR可包含选自以下结构域或片段中的一个或多个结构域:CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1 (PD-1)、诱导性T细胞共刺激分子(ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD247、CD276 (B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig α (CD79a)、DAP-10、Fc γ 受体、MHC 1类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、IL-21R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD1 1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD1 1a、LFA-1、ITGAM、CD1 1b、ITGAX、CD1 1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、

PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELP (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a, 与CD83、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、CD40、RANK/TRANSCENDENT-1、OX40、TGFbR1、TGFbRII、myd88、尚未列出的其他TNF受体超家族成员特异性结合的配体, 及他们的组合。

[0070] 1.2.4小分子可控的嵌合抗原受体

[0071] 在一些情况下, 提供一种控制靶向转导细胞的手段可为有利的。在一些情况下, 这可作为防止细胞活性过度的安全保护。在其他情况下, 可控制转导细胞的活性以用于治疗目的。因此, 本公开提供了CAR或类似的靶向受体, 例如TCR融合物, 所述TCR融合物可通过使用小分子来控制。当慢病毒载体编码此种可控靶向受体时, 施用小分子将允许激活靶向受体以将转导细胞靶向靶细胞, 而停止施用小分子将阻止受体将转导细胞靶向靶细胞。以此方式, 通过向受试者施用慢病毒颗粒而产生的体内TIL将仅在小分子存在于受试者中时活化。小分子可全身地或局部地提供, 并在与施用慢病毒颗粒的同时或之后的期间内提供。可通过血样、活检或医学成像监测TIL的活性, 并且如果观察到活性过度, 则撤回小分子。在一些情况下, 小分子的脉冲或间歇施用可用于优化治疗方案。在一些情况下, 小分子将被滴定以调节TIL活性。在一些情况下, 响应于肿瘤的缓解或复发或出于其他治疗原因, 小分子可被撤回或施用。

[0072] 在一些情况下, 靶向受体 (例如CAR) 可被配置成通过融合到蛋白质亚基中来由小分子控制, 所述蛋白质亚基在小分子存着的情况下诱导二聚化, 或在小分子不存在的情况下诱导二聚化, 并且在去除、降解或稀释小分子时回到单体状态。设想在异源二聚靶向受体的情况下, 可对T细胞/NK细胞活化受体进行修饰, 使得靶向受体的一个单元的胞外结构域包含诱导二聚化的蛋白质亚基的一个单体, 并且靶向受体的另一个单元的胞外结构域包含诱导二聚化的蛋白质亚基的其他单体。异源二聚靶向受体可以使用诱导二聚化的同源二聚蛋白质亚基或诱导二聚化的异源二聚蛋白质亚基的这种方式来修饰。在其他情况下, 同源二聚靶向受体可以使用诱导二聚化的同源二聚蛋白质亚基或诱导二聚化的异源二聚蛋白质亚基的这种方式来修饰。如果小分子可控靶向受体是同源二聚体, 则其可由单个转基因编码; 如果是异源二聚体, 则其可由两个转基因编码。

[0073] 诱导二聚化的蛋白质亚基的实例包括但不限于FK506结合蛋白 (FKBP) 和FKBP12-雷帕霉素结合 (FRB) 结构域。FK506结合蛋白在他克莫司 (FK506) 存在下二聚化。FKBP12-雷帕霉素结合 (FRB) 结构域在雷帕霉素存在下二聚化。因此, 根据本公开的小分子可为他克莫司、雷帕霉素或拉帕洛 (雷帕霉素类似物)。可控制小分子可控受体的小分子的其他实例包括但不限于雷帕霉素、拉帕洛、香豆霉素、赤霉素、脱落酸 (ABA)、甲氨基蝶呤、环孢霉素A、FKCsA、甲氧苄啶 (Tpm) -FKBP的合成配体 (SLF) 或其任何衍生物。适于作为本公开的受体中的融合蛋白的示例性结构域对包括但不限于选自以下的对: FKBP和FRB、FKBP和钙调磷酸酶、FKBP和亲环蛋白、FKBP和细菌DHFR、钙调磷酸酶和亲环蛋白、PYL1和ABI1、或GIB1和GAI、或其变体。

[0074] 在一些情况下, 小分子可控靶向受体包含胞外结构域, 所述胞外结构域包含一个或多个小分子结合结构域。小分子与一个或多个胞外结构域的结合导致受体分子的分子内相互作用 (例如, 同源二聚化或异源二聚化), 从而激活与靶细胞的结合和/或来自一个或多个胞内结构域的下流信号。小分子可控受体的一个或多个胞内结构域可包含选自以下结构

域或片段中的一个或多个结构域:CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1 (PD-1)、诱导性T细胞共刺激因子 (ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD247、CD276 (B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig α (CD79a)、DAP-10、Fc γ 受体、MHC 1类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子 (SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、IL-21R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a, 与CD83、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、TGF β R1、TGF β R2、myd88、CD40和任何其他TNF受体超家族成员特异性结合的配体, 及他们的组合。其他示例性可控CAR是由美国专利号10,196,444提供, 该专利通过引用的方式并入本文。

[0075] 在一些实施方案中, 诱导二聚化的两个蛋白质亚基各自分别融合到包含一个或多个信号传导结构域的跨膜蛋白和结合剂 (例如单链可变片段, scFv)。结合剂能够特异性结合到目标靶上。小分子诱导的二聚化重构了二聚单元, 所述二聚单元经由跨膜蛋白的跨膜区从结合剂穿过二聚化蛋白质亚基到达一个或多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中, 采用两种跨膜蛋白, 并且其响应于一个或两个小分子而彼此诱导二聚化并诱导二聚化为结合剂融合蛋白。在一些实施方案中, 小分子可控CAR包含两种或更多种结合剂融合蛋白, 其各自单独二聚化为包含一个或多个信号传导结构域的跨膜蛋白。

[0076] 1.4启动子和基因控制元件

[0077] 本公开还设想慢病毒载体, 所述慢病毒载体包含对T细胞、NK细胞、或T细胞和NK细胞有特异性的启动子和/或增强子。本公开提供了T细胞和/或NK细胞特异性启动子的核酸序列 (SEQ ID NO:1-4)。这些核酸序列通常可通过将启动子序列插入由慢病毒载体编码的基因的5'处来可操作地连接到T细胞/NK细胞活化受体。所用的启动子可与SEQ ID NO:1-4中列出的序列相同, 或与SEQ ID NO:1-4中列出的序列80%、85%、90%、95%或99%相同, 只要启动子在T细胞和/或NK细胞中保持启动子活性即可。

[0078] 在一些情况下, 其他启动子可用于控制T细胞/NK细胞活化受体的表达。本公开中有用的启动子的实例包括但不限于MND启动子、T细胞特异性启动子、CD4 T细胞特异性启动子、CD8 T细胞特异性启动子、NK细胞特异性启动子、T细胞和NK细胞特异性启动子、CD4 T细胞和NK细胞特异性启动子、以及CD8 T细胞和NK细胞特异性启动子。

[0079] 在一些情况下, 使用“强”启动子。应当理解, 启动子的强度部分取决于该启动子在细胞中操作的该细胞的属性。在一些情况下, 本公开的强启动子导致其在靶细胞 (诸如TIL) 中可操作地连接到的基因元件的高水平表达。强启动子包括但不限于巨细胞病毒 (CMV) 和鼠干细胞病毒 (MSCV)、磷酸甘油酸激酶 (PGK)、由CMV增强子和部分鸡 β 肌动蛋白启动子和兔 β 珠蛋白基因 (CAG) 构成的启动子序列、由部分SV40启动子和CD43启动子 (SV40/CD43) 构成

的启动子序列、以及含有具有骨髓增生性肉瘤病毒增强子 (MND) 的修饰的MoMuLV LTR的U3区的合成启动子。本公开的组合物和方法中有用的示例性强启动子由Jones等人Lentiviral vector design for optimal T cell receptor gene expression in the transduction of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes.Hum Gene Ther.2009年6月;20 (6) :630-40提供。

[0080] 在一些情况下,强启动子可为合成的强启动子。示例性合成的强启动子由Schlabach等人(2010)Proc Natl Acad Sci USA.10:2538-2543提供。在一些情况下,使用其他启动子。在一些情况下,使用在包装细胞系中有活性的任何启动子。在一些情况下,使用诱导型启动子,例如药物诱导型启动子。

[0081] 在一些情况下,本公开的载体可包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(wPRE)或与wPRE大体相同的核酸序列。参见,美国专利号6,136,597;Lee等人(2005)Exp Physiol.90:33-7。具有减小尺寸的wPRE元件的变体是本领域中已知的。wPRE-0是指具有中等尺寸的wPRE的变体。

[0082] 在一些情况下,本公开的慢病毒载体可包含编码2A肽的核苷酸序列。术语“2A肽”是指被配置成从单个开放阅读框生成两种或更多种蛋白质的自裂解肽。2A肽是在真核细胞中介导翻译期间多肽的“裂解”的18至22个残基长的病毒寡肽。“2A肽”可指代具有不同氨基酸序列的肽。在本公开中,应当理解,在慢病毒载体包含两个或更多个2A肽的情况下,2A肽可彼此相同或不同。用于设计和使用2A肽的详细方法由Szymczak-Workman等人(2012)Cold Spring Harb.Protoc.2012:199-204提供。在文献中,2A肽经常被称为自裂解肽,但机制研究表明,所观察到的“自裂解”实际上是核糖体跳过了在2A肽C端处形成甘氨酸脯氨酸肽键的结果。Donnelly等人(2001)J Gen Virol.82:1027-41。

[0083] 在一些情况下,本公开的慢病毒载体可包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(wPRE)或与wPRE大体相同的核酸序列。参见Lee等人Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors.Exp Physiol.90 (1) :33-7 (2005)。在本公开的病毒载体中,wPRE序列增加由所述病毒载体递送的基因的表达。

[0084] 1.5融合糖蛋白

[0085] 各种融合糖蛋白可用于假型化慢病毒载体。虽然最常用的实例是来自水泡性口炎病毒(VSVG)的包膜糖蛋白,但许多其他病毒蛋白也用于慢病毒载体的假型化。参见Joglekar等人(2017)Human Gene Therapy Methods 28:291-301。本公开设想了各种融合糖蛋白的取代。值得注意的是,一些融合糖蛋白导致载体效率更高。

[0086] 在一些实施方案中,对融合糖蛋白或其功能变体进行假型化有助于靶向转导特定的细胞类型,包括但不限于T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,融合糖蛋白或其功能变体是以下的一个或多个全长多肽、一个或多个功能片段、一个或多个同源物、或一个或多个功能变体:人免疫缺陷病毒(HIV) gp160、鼠白血病病毒(MLV) gp70、长臂猿白血病病毒(GALV) gp70、猫白血病病毒(RD114) gp70、双嗜性逆转录病毒(Ampho) gp70、10A1 MLV(10A1) gp70、亲嗜性逆转录病毒(Eco) gp70、狒狒猿白血病病毒(BaEV) gp70、麻疹病毒(MV) H和F、尼帕病毒(NiV) H和F、狂犬病病毒(RabV) G、莫科拉病毒(MOKV) G、埃博拉扎伊尔型病毒(EboZ) G、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV) GP1和GP2、杆状病毒GP64、基孔肯雅病毒(CHIKV) E1和E2、罗斯河病毒(RRV) E1和E2、塞姆利基森林病毒(SFV) E1和E2、辛德毕斯病毒(SV) E1和E2、

委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV) E1和E2、西方马脑炎病毒 (WEEV) E1和E2、甲型、乙型、丙型或丁型流感病毒HA、禽瘟疫病毒 (FPV) HA、水泡性口炎病毒VSV-G、或金迪普拉病毒和皮里病毒CNV-G和PRV-G。在一些情况下,融合糖蛋白或其功能变体是以下的G蛋白的全长多肽、功能片段、同源物或功能变体:阿拉戈斯水泡性口炎病毒 (VSAV)、卡拉加斯水泡性病毒 (CJSV)、金迪普拉水泡性病毒 (CHPV)、可卡耳水泡性病毒 (COCV)、印第安纳水泡性口炎病毒 (VSIV)、伊斯法罕水泡性病毒 (ISFV)、马拉巴水泡性病毒 (MARAV)、新泽西水泡性口炎病毒 (VSNJV)、下刚果热病毒 (BASV)。在一些实施方案中,融合糖蛋白或其功能变体是可卡耳病毒G蛋白。

[0087] 1.6检查点抑制配体

[0088] 在一些情况下,本公开的慢病毒载体还包含编码检查点抑制配体的核酸序列。任选地,检查点抑制配体能够阻断PD-1/PD-L1检查点。任选地,检查点抑制配体能够阻断Tim-3检查点。

[0089] 检查点抑制剂疗法是一种癌症治疗形式,其使用剂来刺激或抑制免疫检查点,从而调节免疫反应。肿瘤可使用检查点来保护自身免受受试者免疫系统或癌症免疫疗法中使用的治疗剂的影响。本公开提供了一种慢病毒载体,所述慢病毒载体包含编码检查点抑制配体的核酸序列,其中由慢病毒载体产生的慢病毒颗粒在其表面上展示检查点抑制配体,且因此,施用慢病毒颗粒导致检查点抑制配体递送到受试者的治疗使用部位处。本公开还提供了慢病毒载体,所述慢病毒载体包含编码检查点抑制配体的核酸序列,其中施用由慢病毒载体产生的慢病毒颗粒将多核苷酸序列递送到靶细胞,然后所述多核苷酸序列在治疗使用的部位处表达检查点抑制配体。

[0090] 本公开提供的检查点抑制剂配体的实例包括但不限于抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L1抗体或分别与CTLA4、PD-1或PD-L1相互作用的任何非抗体配体(例如纳米体、DARPin)。在一些情况下,检查点抑制配体能够阻断PD-1/PD-L1检查点和/或Tim-3检查点和/或CTLA-4检查点。检查点抑制的使用于例如,Anderson等人Tim-3:an emerging target in the cancer immunotherapy landscape.Cancer Immunol Res.2014年5月;2(5):393-8中综述。

[0091] 1.5对免疫抑制药物的耐药性

[0092] 在一些情况下,本公开的慢病毒载体还包含提供对免疫抑制药物的耐药性的核酸序列(例如,在转移质粒上)。在一些情况下,当在用于治疗受试者的任何方法或用于扩增能够识别和杀死由本公开提供的有此需要的受试者中肿瘤细胞的T细胞的任何方法期间向患者施用免疫抑制药物时,提供对免疫抑制药物的耐药性的核酸序列将促进靶细胞的选择性扩增。在一些情况下,免疫抑制药物是甲氨蝶呤、雷帕霉素、拉帕洛、他克莫司、环孢霉素或其任何组合。免疫抑制药物可与小分子相同或不同,即慢病毒载体可被设计成使得由免疫抑制药物诱导小分子可控的T细胞/NK细胞活化受体,使得每当向受试者施用免疫抑制药物时,都触发转导细胞的扩增。可替代地,设计慢病毒载体以允许在不受免疫抑制的情况下控制转导细胞的扩增可为有利的。

[0093] 在一些情况下,慢病毒载体有助于通过赋予转导细胞对免疫抑制药物的耐药性来选择性扩增靶细胞,有助于选择性扩增靶细胞。本公开提供了慢病毒载体,所述慢病毒载体包含赋予对本领域已知的免疫抑制药物的耐药性的任何核酸序列。免疫抑制药物的实例包括但不限于雷帕霉素或其衍生物、拉帕洛或其衍生物、他克莫司或其衍生物、环孢霉素或其

衍生物、甲氨蝶呤或其衍生物、和霉酚酸酯 (MMF) 或其衍生物。各种耐药性基因是本领域中已知的。对雷帕霉素的耐药性可由编码蛋白结构域FRb的多核苷酸序列赋予, 见于mTOR结构域中并且已知是FKBP-雷帕霉素复合物的靶标。对他克莫司的耐药性可由编码钙调磷酸酶突变体CNa22或钙调磷酸酶突变体CNb30的多核苷酸序列赋予。对环孢霉素的耐药性可由编码钙调磷酸酶突变体CNa12或钙调磷酸酶突变体CNb30的多核苷酸序列赋予。这些钙调磷酸酶突变体描述于Brewin等人 (2009) Blood 114:4792-803中。对甲氨蝶呤的耐药性可由二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的多种突变体形式提供, 参见Volpato等人 (2011) J Mol Recognition 24:188-198, 并且对MMF的耐药性可由肌苷一磷酸脱氢酶 (IMPDH) 的多种突变体形式提供, 参见Yam等人 (2006) Mol Ther 14:236-244。

[0094] 通常在ACT之前、期间和/或之后使用免疫抑制药物。在一些情况下, 使用免疫抑制药物可改善治疗效果。在一些情况下, 使用免疫抑制药物可减少治疗的副作用, 诸如但不限于急性移植物抗宿主病、慢性移植物抗宿主病以及移植后淋巴增生性疾病。本公开设想将免疫抑制药物与治疗或预防本公开的疾病或病状的任何方法一起使用, 所述方法包括但不限于本公开的方法, 其中慢病毒载体赋予转导细胞对免疫抑制药物的耐药性。

[0095] 2.1 包装细胞系

[0096] 在另一方面, 本公开提供了用于产生能够激活并有效转导T细胞的慢病毒颗粒的包装细胞系, 所述包装细胞系包含能够包装慢病毒载体的培养细胞, 其中所培养的细胞被基因工程改造以表达T细胞活化或共刺激分子, 或被诱导以经由瞬时转染瞬时表达T细胞活化或共刺激分子。本公开的包装细胞系可与任何慢病毒载体一起使用, 包括但不限于先前描述的那些。在一些情况下, 使用具有包含编码T细胞/NK细胞活化受体的核酸序列的慢病毒载体的包装细胞系将是有利的。在一些情况下, T细胞/NK细胞活化受体能够被小分子激活将是有利的。但是, 所公开的包装细胞系也可与其他慢病毒载体一起使用。

[0097] 在一些情况下, 包装细胞系是HEK-293T细胞系。类似的结果可在其他细胞系中实现, 包括但不限于被设计成缺乏B2M或其他免疫活性表面蛋白的HEK-293T细胞系。可使用可在体外转染且能够产生高滴度慢病毒载体的其他细胞系-例如, 包含可操作地连接到启动子上的多瘤病毒大T抗原基因序列的细胞系。

[0098] 在一些情况下, 包装细胞系可经基因修饰以缺乏MHC I类表达、MHC II类表达或抑制性检查点配体 (诸如PD-L1 (PD-1配体) 或TIM3配体) 的表达。因为由包装细胞系表达抑制性配体可限制慢病毒颗粒对T细胞的活化, 所以这些基因修饰在一些情况下起到消除此类抑制信号的作用, 从而进一步促进慢病毒颗粒对T细胞的活化和转导。

[0099] 在一些情况下, 包装细胞系经基因工程改造以包含适用于将慢病毒载体包装成慢病毒颗粒的一个或多个基因。在一些情况下, 包装细胞系可包含编码基因gag-pol、env和rev的多核苷酸序列。在本发明的典型慢病毒载体中, 一个或多个gag-pol和env蛋白编码区中的至少一部分可从慢病毒载体中移除并由包装细胞系提供。慢病毒载体可根据Du11等人 (1998) J Virol 72:8463-71 (其整体并入本文) 中所提供的方法包装。示例性包装细胞系提供于Retroviruses. Cold Spring Harbour Laboratory (Coffin等人, 编) (1997) 中。

[0100] 本公开还提供对包装细胞系进行基因工程改造, 以便以其他方式改善本公开的慢病毒载体和颗粒的免疫属性, 所述其他方式包括但不限于添加基因、删除基因及将点突变引入基因中。

[0101] 2.2 T细胞活化或共刺激分子

[0102] 按照惯例,慢病毒体外转导需要另外的外源活化剂,诸如“刺激珠”,例如,Dynabeads™人T-活化因子CD3/CD28。使用本公开的包装细胞系制得的慢病毒颗粒将由包装细胞系表达的T细胞活化或共刺激分子的一个或多个拷贝并入到慢病毒颗粒中;并且将一个或多个T细胞活化或共刺激分子并入到慢病毒颗粒中将使慢病毒颗粒能够在没有外源性活化剂(即没有刺激珠或等效剂)的情况下激活并有效转导T细胞。这允许由这些包装细胞系制得的慢病毒颗粒可在外源性递送活化剂可能不切实际的情况下在体内使用。

[0103] 在一些情况下,T细胞活化或共刺激分子可选自由以下组成的组:抗CD3抗体、CD28配体(CD28L)和41bb配体(41BBL或CD137L)。各种T细胞活化或共刺激分子是本领域中已知的,并且包括但不限于特异性结合T细胞表达蛋白CD3、CD28、CD134(也称为OX40)或41bb(也称为4-1BB或CD137或TNFRSF9)的剂。例如,特异性结合CD3的剂可为抗CD3抗体(例如,OKT3、CRIS-7或I2C)或抗CD3抗体的抗原结合片段。在一些方面中,特异性结合CD3的剂是抗CD3抗体的单链Fv片段(scFv)。在一些情况下,本公开设想了T细胞活化或共刺激分子选自由以下组成的组:抗CD3抗体、CD28配体(CD28L)和41bb配体(41BBL或CD137L)。CD86(也称为B7-2)是CD28和CTLA-4的配体。在某些情况下,CD28L可为CD86。CD80是CD28的另一个配体。在一些情况下,CD28的配体是CD80。在一些情况下,CD28的配体是融合至跨膜结构域以展示在慢病毒颗粒表面上的抗CD28抗体或抗CD28 scFv。包含一个或多个T细胞活化或共刺激分子的慢病毒颗粒可通过WO2016/139463提供的方法制备。

[0104] 3慢病毒颗粒

[0105] 在另一方面,本公开还提供了慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒包含本公开的任意慢病毒载体。本公开的慢病毒颗粒可用本公开的包装细胞系或另一包装细胞系来制备,或通过培养细胞(例如HEK-293T细胞)与慢病毒载体和辅助质粒的共转染来制备。本公开的慢病毒颗粒可通过例如将本公开的慢病毒载体转导到经基因工程改造以表达T细胞活化或共刺激分子的培养细胞中来制备。在一些情况下,由于慢病毒载体、所选择的包装细胞系或共转染的辅助质粒,慢病毒颗粒将包含T细胞活化或共刺激分子,所述分子可以是但不限于抗CD3抗体、CD28配体或41bb配体。经基因工程改造以表达T细胞活化或共刺激分子的培养细胞可为HEK-293T细胞。在一些情况下,所培养的细胞经基因修饰以缺乏MHC I类表达、MHC II类表达或抑制性检查点配体诸如PD-L1(PD-1配体)或TIM3配体的表达。

[0106] 4使用方法

[0107] 在另一方面,本公开提供了用于治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的任何慢病毒颗粒,以及向受试者施用小分子,其中在受试者中治疗癌症。

[0108] 在一些实施方案中,本公开提供了一种用于疗法中的表面工程改造的慢病毒颗粒。在其他实施方案中,本公开提供了一种用于治疗癌症的方法中的表面工程改造的慢病毒颗粒。在其他实施方案中,本公开提供了一种用于制造治疗癌症的药剂的表面工程改造的慢病毒颗粒。

[0109] 在一些情况下,癌症是实体肿瘤,诸如黑色素瘤、非小细胞肺癌或乳腺癌。本公开的方法可包括治疗任何癌症,包括但不限于急性粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、腺癌、腺肉瘤、肾上腺癌、肾上腺皮质癌、肛门癌、间变性星形细胞瘤、血管肉

瘤、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、B细胞淋巴瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、肠癌、脑癌、脑干胶质瘤、脑瘤、乳腺癌、类癌瘤、宫颈癌、胆管癌、软骨肉瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、结肠癌、结直肠癌、颅咽管瘤、皮肤淋巴瘤、皮肤黑色素瘤、弥漫性星形细胞瘤、导管原位癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮样肉瘤、食管癌、尤文式肉瘤 (Ewing sarcoma)、肝外胆管癌、眼癌、输卵管癌、纤维肉瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道癌、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤、普通生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞疾病、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤、毛细细胞白血病、头颈部癌、血管内皮瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、下咽癌、浸润性导管癌、浸润性小叶癌、炎性乳腺癌、肠癌、肝内胆管癌、侵袭性/浸润性乳腺癌、胰岛细胞癌、颌部癌、卡波西肉瘤 (kaposi sarcoma)、肾癌、喉癌、平滑肌肉瘤、软脑膜转移瘤、白血病、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、小叶原位癌、低度星形细胞瘤、肺癌、淋巴结癌、淋巴瘤、男性乳腺癌、髓样癌、髓母细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、默克尔细胞癌、间充质软骨肉瘤、间质瘤、间皮瘤、转移性乳腺癌、转移性黑色素瘤、转移性鳞状颈癌、混合性胶质瘤、口腔癌 (mouth cancer)、粘液癌、黏膜黑色素瘤、多发性骨髓瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、鼻腔癌、鼻咽癌、颈部癌、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、非霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、燕麦细胞癌、眼癌、眼部黑色素瘤、少突胶质瘤、口癌、口腔癌 (oral cavity cancer)、口咽癌、骨原性肉瘤、骨肉瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞瘤、卵巢原发性腹膜癌、卵巢性索间质瘤、佩吉特病 (paget's disease)、胰腺癌、乳头状癌、鼻窦癌、甲状旁腺癌、盆腔癌、阴茎癌、周围神经癌、腹膜癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、毛细细胞星形细胞瘤、松果体区肿瘤、松果体母细胞瘤、垂体瘤、初级中枢神经系统、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂癌、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、肉瘤、骨、肉瘤、软组织、肉瘤、子宫、鼻窦癌、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、脊椎癌、脊柱癌、脊髓癌、脊椎肿瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、t细胞淋巴瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺癌 (thymoma/thymic carcinoma)、甲状腺癌、舌癌、扁桃体癌、移行细胞癌、移行细胞癌、移行细胞癌、三阴性乳腺癌、输卵管癌、肾小管癌、未诊断癌、输尿管癌、输尿管癌、尿道癌、子宫腺癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌。

[0110] 在另一方面，本公开提供了一种用于扩增能够识别并杀死有此需要的受试者中肿瘤细胞的T细胞的方法，所述方法包括以下步骤：向受试者施用本公开的慢病毒颗粒，使得能够识别并杀死受试者中肿瘤细胞的T细胞通过慢病毒颗粒得以转导并扩增。在一些实施方案中，通过静脉内注射或通过瘤内注射施用慢病毒颗粒。

[0111] 在一些情况下，慢病毒颗粒包含靶向剂或编码靶向剂的核酸载体。示例性靶向剂包括抗体和嵌合抗原受体 (“CAR”)。术语“抗体”是指任何种类的完整抗原结合免疫球蛋白或其自身特异性结合抗体靶抗原的片段，并且包括例如嵌合、人源化、全人和双特异性抗体。在一些情况下，本公开中使用的CAR包含对B细胞有特异性的结合结构域，例如对可见于B细胞淋巴瘤上的CD标记 (诸如CD19、CD22、CD20或CD79a，优选为CD19) 具有特异性。在WO2007/131092中例示经基因工程改造以表达CAR (例如，T细胞CAR) 的T细胞。在一些情况下，靶向剂用于将细胞介导的免疫导向其他特定的细胞类型，诸如肿瘤细胞。

[0112] 在另一方面，本公开提供了用于扩增能够识别并杀死有此需要的受试者中肿瘤细胞的T细胞的方法，所述方法包括向受试者施用本公开的任何慢病毒颗粒，以及向受试者施用小分子，其中能够识别并杀死受试者中肿瘤细胞的T细胞得到扩增。

[0113] 在某些实施方案中，通过本文所述的方法治疗的受试者可为哺乳动物。在一些情

况下,受试者是人、非人灵长类动物、猪、马、奶牛、狗、猫、兔子、小鼠或大鼠。受试者可为人、类女性或人类男性。

[0114] 本发明还设想了组合疗法。如本文所用,组合包括同时治疗或顺序治疗。特别设想了本发明的方法与标准医学治疗(例如皮质类固醇)的组合,与新型疗法的组合也是如此。在一些情况下,可使用类固醇(例如强的松、泼尼松龙(prednisolone)、地塞米松)治疗受试者,以防止或减少对施用本文所述的慢病毒颗粒的免疫反应。在某些情况下,如果受试者表达对本文所述的慢病毒颗粒的抗体,则受试者可接受单采或另一种免疫调节剂。在一些情况下,此类免疫调节剂可能是不必要的,特别是在施用免疫抑制剂(例如他克莫司或西罗莫司)时。在一些情况下,与用慢病毒颗粒的治疗同时或顺序施用利妥昔单抗。在一些情况下,利妥昔单抗可用于阻断针对慢病毒颗粒的免疫反应。

[0115] 本公开的慢病毒颗粒、小分子和免疫抑制药物可通过任何途径施用,包括经口、经鼻、静脉内、动脉内、肌肉内或腹腔内途径。在一些情况下,通过静脉内注射或通过瘤内注射施用慢病毒颗粒。在一些情况下,通过静脉内注射或经口服施用来施用小分子。在一些情况下,以足以激活T细胞/NK细胞活化受体的浓度施用小分子。在一些情况下,小分子是雷帕霉素,任选地以足以维持雷帕霉素的血清浓度大于0.1nM、1nM或10nM的浓度施用。在一些情况下,小分子是拉帕洛,任选地以足以维持拉帕洛的血清浓度大于0.1nM、1nM或10nM的浓度施用。在一些情况下,小分子能够引起T细胞/NK细胞活化受体的二聚化,从而产生细胞活化信号。

[0116] 在一些情况下,小分子与慢病毒颗粒同时施用;或小分子在施用慢病毒颗粒之前或之后约30分钟、约1小时、约2小时、约4小时、约5小时或约10小时施用。在一些情况下,方法还包括向受试者施用免疫抑制剂。在一些情况下,免疫抑制剂是他克莫司,任选地以足以维持他克莫司的血清浓度大于0.1nM、1nM或10nM的浓度施用。在一些情况下,免疫抑制剂是环孢霉素,任选地以足以维持环孢霉素的血清浓度大于0.1nM、1nM或10nM的浓度施用。在一些情况下,免疫抑制剂是免疫抑制药物。在一些情况下,免疫抑制剂是免疫抑制药物,并且慢病毒载体包含编码提供针对所述免疫抑制药物的耐药性的蛋白质的核酸序列。

[0117] 适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。在所有情况下,该形式必须是无菌的且必须具有一定的流动性,以达到易于注射的目的。该形式在制造和储存条件下必须稳定,并且必须进行防腐以防止诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。载剂可为溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、其合适的混合物、和植物油。适当的流动性可例如,通过使用诸如卵磷脂的包衣,通过在分散液的情况下维持需要的粒度以及通过使用表面活性剂来保持。防止微生物的作用可通过各种抗细菌和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞(thimerosal)等)来达成。在许多情况下,最好包括等张剂,例如糖或氯化钠。可通过使用延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶,实现可注射组合物的吸收延长。

[0118] 通过以下方式制备无菌可注射溶液:根据需要,将rAAV以所要求的量与上文列举的各种其他成分一起并入适当的溶剂中。可注射溶液可以无菌制备或过滤灭菌。

[0119] 5定义

[0120] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通

技术人员通常所理解的相同的含义。出于本发明的目的,下面定义以下术语。

[0121] 如本文所用,“293T对照颗粒”或“模拟(293T载体)”是指用慢病毒载体转导293T细胞产生的慢病毒颗粒。如本文所用,“刺激珠”是指在转导期间用于刺激T细胞的珠基试剂。标记“+对照(载体+刺激珠)”是指用刺激珠转导293T对照颗粒。

[0122] 如本文所用,术语“HATSE细胞”或“HATSE细胞系”或“HATSE-293”是指通过用编码CD86和CD137L的一个或多个慢病毒载体转导293T细胞而产生并且关于高度表达CD86和CD137L的细胞经受荧光活化细胞分选(FACS)一次或多次的包装细胞系。标记“(1x分选)HATSE细胞载体”是指在对HATSE细胞进行一次CD86⁺/CD173L⁺双阳性细胞的FACS分选后,用慢病毒载体转导HATSE细胞而产生的慢病毒颗粒。标记“(2x分选)HATSE细胞载体”是指在对HATSE细胞进行一次CD86⁺/CD173L⁺双阳性细胞的FACS分选后,用慢病毒载体转导HATSE细胞产生的慢病毒颗粒。

[0123] 冠词“一个/种(a/an)”和所述在本文中用来指代一个/种或多于一个/种(即,至少一个/种)的冠词的语法对象。以举例的方式,“一个/种要素”是指一个/种要素或多于一个/种要素。

[0124] 替代方案(例如,“或”)的使用应理解是指替代方案中的一个、两个或其任何组合。

[0125] 术语“和/或”应理解是指一种或两种替代方案。

[0126] 如本文所用,术语“约”或“大约”是指与参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度相比变化高达15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。在一个实施方案中,术语“约”或“大约”是指关于参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、或±1%的数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度范围。

[0127] 除非另有说明,任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数的值,以及在适当情况下,其分数(诸如整数的十分之一和百分之一)。当紧跟在数字或数值前面时,术语“约”是指数字或数值范围的正或负10%。

[0128] 本说明书全文中,除非上下文另外要求,词语“包含(comprise/comprises/comprising)”将理解为意味着包含规定的步骤、或元素、或步骤或元素的组,但不排除任何其它步骤、或元素、或步骤或元素的组。在特定的实施方案中,术语“包括”、“具有”、“含有”和“包含”同义使用。

[0129] “由...组成”是指包括并限于短语“由...组成”之后的任何内容。因此,短语“由...组成”指示所列的元素是必需的或强制性的,并且不可能存在其他元素。

[0130] “基本上由...组成”是指包括在短语之后列出的任何元素,并且仅限于不干扰或促成本公开中针对所列元素所指定的活性或作用的其他元素。

[0131] 在本说明书通篇中提及“一个实施方案”、“实施方案”、“特定的实施方案”、“相关实施方案”、“某个实施方案”、“另一实施方案”或“其他实施方案”或其组合是指结合实施方案加以描述的特定特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,本说明书通篇在各个地方出现前述短语不必要全部是指相同的实施方案。此外,特定的特征、结构或特性可以任何适合的方式组合在一个或多个实施方案中。

[0132] 如本文所用,术语“分离的”是指大体或基本上不含通常伴随在其自然状态下的组分材料。在特定的实施方案中,术语“获得”或“源自”与分离同义使用。

[0133] 如本文所使用的“受试者”、“患者”或“个体”包括表现出可使用本文所设想的载体、组合物和方法治疗的疼痛的任何动物。合适的受试者(例如患者)包括实验动物(诸如小鼠、大鼠、兔子或豚鼠)、农场动物和家养动物或宠物(诸如猫或狗)。包括非人灵长类动物,并且任选人患者。

[0134] 如本文所使用的“治疗(treatment/treating)”包括与治疗相关的任何有益或期望的效果。“治疗”并不一定指示完全根除或治愈疾病或病状,或其相关症状。

[0135] 如本文所用,“防止(prevent)”和类似的词,诸如“防止(prevented)”、“防止(preventing)”等,指示用于防止、抑制或降低病症发生或复发的可能性的方法。如本文所用,“预防”和类似的词还包括在发病或复发之前减轻疾病或病症的强度、效果、症状和/或负担。

[0136] 如本文所用,病毒或慢病毒颗粒的“治疗有效量”或“有效的量”或“有效量”是指实现有益或期望的预防或治疗结果(包括临床结果)所需的病毒或慢病毒颗粒的量。

[0137] “预防性有效量”是指有效实现期望的预防效果的病毒或慢病毒颗粒的量。通常但不一定,因为预防剂量在疾病之前或在疾病早期阶段用于受试者,所以预防有效量少于治疗有效量。

[0138] 病毒或慢病毒颗粒的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重的因素,以及干细胞和祖细胞在个体中引起期望反应的能力而变化。治疗有效量还是其中病毒的任何毒性或有害效果都超过治疗上有益效果的量。术语“治疗有效量”包括对“治疗”受试者(例如,患者)有效的量。

[0139] 生理反应的“增加”或“升高”量(例如,电生理活性或细胞活性)通常是“统计上显著”的量,并且可包括1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多倍(例如,500、1000倍)(包括介于1与大于1之间的所有整数和小数点,例如1.5、1.6、1.7、1.8等)未治疗的受试者中活性水平的增加。

[0140] 生理反应的“降低”或“减小”量(例如,电生理活性或细胞活性)通常是“统计上显著”的量,并且可包括1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多倍(例如,500、1000倍)(包括介于1与大于1之间的所有整数和小数点,例如1.5、1.6、1.7、1.8等)未治疗的受试者中的活性水平的降低。

[0141] 通过“保持”、或“保留”、或“维持”、或“无变化”、或“无实质性变化”或“无实质性减少”通常是指与由媒介物或对照分子/组合物引起的反应相当的生理反应。相当的反应是参考反应无显著差异或可测量差异的反应。

[0142] “受体-配体结合”、“配体结合”和“结合”在本文中可互换使用,意指受体与配体或合成配体之间的物理相互作用。配体结合可通过本领域已知的多种方法来测量(例如,检测与放射性标记配体的缔合)。

[0143] 如本文所用,术语“特异性结合亲和力”或“特异性结合(specifically binds/specifically bound/specific binding)”在说明书和权利要求书中可互换使用,并且是指发生在成对分子种类(例如受体与配体)之间的结合。当两个种类的相互作用产生非共价结合的复合物时,发生的结合通常是静电、氢键结合或亲脂性相互作用的结果。在各种实施

方案中,一个或多个种类之间的特异性结合是直接的。在一个实施方案中,特异性结合的亲和力和背景结合(非特异性结合的约2倍、大背景结合的约5倍、背景结合的约10倍、背景结合的约20倍、背景结合的约50倍、背景结合的约100倍、或背景结合的约1000倍或更多倍。

[0144] 一般来讲,“序列同一性”或“序列同源性”分别是指两个多核苷酸或多肽序列的核苷酸与核苷酸或氨基酸与氨基酸的精确对应。通常,用于测定序列同一性的技术包括确定多核苷酸的核苷酸序列和/或确定由此编码的氨基酸序列,以及将这些序列与第二核苷酸或氨基酸序列进行比较。两个或更多个序列(多核苷酸或氨基酸)可通过测定它们的“同一性百分比”来比较。无论是核酸还是氨基酸序列,两个序列的同一性百分比,是两个比对序列之间的精确匹配数目除以较短序列的长度,再乘以100。例如,还可使用可购自美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)的高级BLAST计算机程序(包括版本2.2.9)来比较序列信息,从而确定同一性百分比。BLAST程序基于以下比对方法:Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268(1990)并且讨论于Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410(1990);Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877(1993);和Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402(1997)中。简而言之,BLAST程序将同一性定义为相同的比对符号(通常是核苷酸或氨基酸)的数目除以两个序列中较短符号的总数。程序可用于确定所比较的整个蛋白质长度上的同一性百分比。例如,在blastp程序中,提供了默认参数来用短查询序列优化搜索。程序还允许使用SEG过滤器屏蔽由Wootton和Federhen,Computers and Chemistry 17:149-163(1993)的SEG程序确定的查询序列段。期望的序列同一性程度的范围为约80%至100%,以及介于它们之间的整数值。典型地,所公开序列与所要求保护的序列之间的同一性百分比为至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%。

[0145] 在本文使用的术语“外源性”是指来源于生物体外部的任何分子,包括核酸、蛋白质或肽、小分子化合物等。相比之下,术语“内源性”是指来源于生物体内部的任何分子(即生物体自然产生的)。

[0146] 本文使用的术语“MOI”是指感染复数,也就是剂(例如病毒颗粒)与感染靶标(例如细胞)的比率。

[0147] 本文所有出版物和提及的专利特此以引用的方式整体并入,如同将每个单独的出版物或专利特定地和单独地指示未以引用的方式并入。在冲突的情况下,以本申请(包括本文中的任何定义)为准。然而,本文所引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请,并不也不应被视为承认或任何形式的建议,它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家的公知常识的一部分。

[0148] 本文所使用的小节标题仅出于组织性目的并且不解释为限制所描述的主题。

[0149] 在以下实施例中进一步描述了本发明,所述实施例并不限制权利要求中所述的本发明的范围。

[0150] 实施例

[0151] 实施例1:HATSE-293包装细胞系

[0152] 如下生成用于产生慢病毒颗粒的包装细胞系(称为HATSE-293),所述慢病毒颗粒能够激活并有效转导T细胞。构建一种慢病毒载体,所述慢病毒载体包含MND启动子和2A肽连接的多顺反子开放阅读框,所述多顺反子开放阅读框编码单克隆抗体OKT3;CD86和

CD137L (抗CD3scFv-2A-CD86-2A-CD137L) 的抗CD3单链Fv片段(scFv)。将慢病毒载体转导到在细胞培养中生长的HEK-293T细胞中,从而致使MND启动子和多顺反子开放阅读框稳定整合到宿主细胞的基因组中。对所转导的HEK-293T细胞进行荧光活化细胞分选(FACS),以筛选出高表达CD86和CD137L的细胞(图2)。由于多顺反子开放阅读框的结构,故CD86⁺/CD137L⁺细胞也必然表达抗CD3scFv⁺。在培养中扩增CD86⁺/CD137L⁺细胞群,以产生HATSE-293包装细胞系,并将等分试样冷冻以便长期储存和使用。通过流式细胞术证实CD86和CD137的表达(图3)。

[0153] 用pMND-GFP慢病毒载体和四种慢病毒包装质粒(pMD2.G、pRSV-rev、pMDLG-pRRE和pRRL-GOI)共转染HATSE-293细胞,并从细胞上清液中收获病毒颗粒以产生慢病毒颗粒(称为HATSE颗粒)。作为对照,用pMND-GFP慢病毒载体和四种慢病毒包装质粒(pMD2.G、pRSV-rev、pMDLG-pRRE和pRRL-GOI)共转染HEK-293T细胞,并从细胞上清液中收获病毒颗粒以产生慢病毒颗粒(293T对照颗粒)。

[0154] 在存在或不存在外源性T细胞活化刺激物(Dynabeads™人T活化剂CD3/CD28-“刺激珠”)的情况下,将人原代T细胞(2.5x 10⁵个细胞)一式两份在MOI 5或MOI 20下暴露于HATSE颗粒或293T颗粒。通过自动细胞计数器(Countess™ II, Thermo Fisher)评估7天内细胞的生长(图3)。暴露于HATSE颗粒的细胞的生长类似于用对照颗粒转导的珠刺激的T细胞,并且在第7天为293T对照颗粒的约略两倍大。通过荧光显微镜评估GFP表达(图4)。暴露于HATSE颗粒的细胞表现出破裂并显示高GFP表达,类似于用对照颗粒转导的珠刺激的T细胞,这证实了HATSE颗粒暴露的T细胞的有效转导,尽管没有暴露于异源性T细胞活化刺激物(即刺激珠)。

[0155] 实施例2:Lenti-RACCR

[0156] Lenti-RACCR是一种慢病毒载体,所述慢病毒载体含有编码雷帕霉素激活的嵌合细胞表面受体(RACCR)的转基因。具体地,此示例性RACCR是由两种融合蛋白制成,这两种融合蛋白被设计成在雷帕霉素存在下二聚化,从而激活信号传导(图12A)。第一融合蛋白是将IL-2受体β链(IL2Rb)的胞质结构域与FK506结合蛋白(FKBP)融合,使得FKBP形成融合蛋白的胞外结构域的结果。第二融合蛋白是将IL-2受体γ链(IL2Rg)的胞质结构域与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的FKBP-雷帕霉素结合(FRB)结构域融合,使得FRB形成融合蛋白的胞外结构域的结果。已知胞外结构域在雷帕霉素的存在下形成三聚复合物,致使受体亚基二聚化以形成活性信号传导受体复合物。

[0157] RACCR-β-FKBP-IL2Rb融合蛋白,其中信号肽(括号内)具有2A肽(斜体):

[0158] (MALPVTALLPLALLLHAARP)ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLE
PLHAMMERGPOTLKETSFNQAYGRDLMEAEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDL
YYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFILVYLLINCRNTGPWLKKVLK
CNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKV
TQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDP
YSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFSPSRDDLLLFSPSLGGPS
PPSTAPGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQPPPEL
VLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQEL
QGQDPHTLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPG

(SEQ ID NO: 12)。

[0159] FKBP结构域具有以下序列:

[0160] EMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPOTLKETSFNQAYG
RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK

(SEQ ID NO: 13)。

[0161] IL2Rb结构域具有以下序列：

[0162] **GKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFHILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPS**
KFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLL
LQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYS
EEDPDEGVAGAPTGSSPQLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFPSLLGGPS
PPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPPQLGPPTPGVPDLVDFQPPP
ELVLRAGEEVPDAGPREGVSFPSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSL
QELQGQDPHTLV

(SEQ ID NO: 14)。

[0163] RACCR- γ -FRB-IL2Rg融合蛋白，其中信号肽(括号内)具有2A肽(斜体)

[0164] (MPLGLLWLGLALLGALHAQA)GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLED
GKKFDSSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLITSPDYAYGAT
GHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMLIISLLCV
YFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLC
LVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPLYWAPPCYTLKPETGSGATNFSLLKQAG
DVEENPG

(SEQ ID NO: 15)。

[0165] FRB结构域具有以下序列：

[0166] GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSSRDRNKPFFKMLG
KQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLITSPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL
KLGE

(SEQ ID NO: 16)。

[0167] IL2Rg结构域具有以下序列：

[0168] **GSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLE**
DLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPG
ASPCNQHSPLYWAPPCYTLKPET

(SEQ ID NO: 17)。

[0169] 使用标准包装质粒pMD2.G将编码绿色荧光蛋白的慢病毒转移质粒包装成慢病毒颗粒，并将所得慢病毒颗粒用于转导人原代T细胞作为对照实验。只观察到低水平的转导(图12B)。

[0170] 使用编码T细胞活化和共刺激分子的质粒将编码mCherry的慢病毒转移质粒包装成慢病毒颗粒，从而产生表面工程改造的慢病毒颗粒(SE-LVP)。作为对照实验，将所得的慢病毒颗粒(mCherry:SE-LVP)用于转导人原代T细胞。只观察到低水平的转导(图12C)。

[0171] 使用编码T细胞活化和共刺激分子的质粒将编码RACCR的慢病毒转移质粒包装成慢病毒颗粒，从而产生表面工程改造的慢病毒颗粒(SE-LVP)。将所得的慢病毒颗粒(RACCR:SE-LVP)用于转导人原代T细胞。只观察到低水平的转导(图12D)。

[0172] 将用mCherry:SE-LVP或RACCR:SE-LVP转导的人原代T细胞在IL-2(“IL2”)、雷帕霉素(“rapa”)或无治疗(“NT”)存在下培养。作为对照，使用标准包装质粒pMD2.G包装的mCherry构建体也用IL-2测试。在存在雷帕霉素但没有外源性IL-2的情况下，RACCR:SE-LVP

介导T细胞持续扩增18天(图12E)。T细胞的扩增依赖于雷帕霉素或IL-2的存在(图12F)。这构成了表面工程改造的颗粒可递送生长刺激受体有效载荷并扩增人原代T细胞的体外概念证明。转导不需要慢病毒颗粒的离心(spinoculation)或其他操作。在感染复数(MOI)为10时,细胞的转导提供约20%的转导效率。

[0173] 本领域技术人员仅仅使用常规试验将认识到或者能够确定本文所描述的发明的具体实施方案的很多等效方案。此类等效物意图由以下权利要求涵盖。

序列表

<110> 优莫佳生物制药股份有限公司

A·沙伦伯格

L·贝茨

<120> 病毒载体及包装细胞系

<130> VITI-001/01W0 332134-2003

<150> US 62/656,823

<151> 2018-04-12

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1485

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> TCP1 - 具有Dap10最小启动子的鼠Tce1核心增强子

<400> 1

```
gtgcacagtc caggcaggtc tccagcttgc aaacctcctg actcagtggc tgggattaca 60
gatttgtgtg agcagcaggc atagattttt ctttaaaaaa aataaaataa aataaaaaat 120
aaagcccagt gttttttcac atggtctggg aagggcctaa caagtgggtt tcctgcagag 180
gaagaggaga gcgttgccct gactctcacc tgctggaggg ggtagagagg ggcctgcagc 240
caagtcatca tttttgaatg tgtgtcagtt acaactacaa aggcaaccaa aaggaggtct 300
tatccgttgt ctgtgagctt cagttgggaa cagcaggcag catttaggtt tggggttttt 360
tttgttgttt ttttttcacc cccaaagcta taaatagccc agcatgtggg gcatcctggc 420
tgctctacct tacacttgag atccaagcag gtagccaccc ctttctcccc tgcagacatt 480
ttccacaaca cgtatgtgat gagaagaaat gtctcccgga gtgggggtgtg tgtgtgtatt 540
cgtatgttgt tattttggtc ttaactttga tgcatgccac ccacgctctc agccaggggt 600
gcgagtcctc cttgatgcct taacgaagtg gtgggcttcg aaggaagaga ggaaggaaga 660
aaacaactct actgtccaga tatgctctta ctttaagttt ttgttactta aagtttgttg 720
atagtctata aactgacttt gttctatgtg tctctaggaa gctatgcttt ctgcagattt 780
tcttaactac ctcccaactc tttggtgaag aaaatggtct ttactctttg ccctttatga 840
gtgagtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt atgcaacagt tgttgtcctt 900
gcttattctc catcatTTTT ttccacatag actagctggc gaatgagctg caggatttca 960
agtctttcta ccctgacccc agtgccgggg ttacggacat gcctgcctgc aacatgagga 1020
cttttcaagt ggacgctgag ggcgctgata tcaggccctt gtgttctcgt ggaaaacact 1080
ttacaaacag aaccatctcc caagcctgtc ttctcacagt tcatgaactc aggggcgtgt 1140
ctctctgtgg ttagactatg aagccactgt gtcaacgcca ttctcctcga gttttcttgg 1200
ccctacctcc aaaaatattc cagatctccc tagcctgcac acccttgcca cctgtcattc 1260
```

ccacttggac caggccagca gcctccctgg tctctctgac cctccccctg agttcgttca 1320
 ccaaaggcag taacggagac accccctcaa cacacacagg aagcagatgg ccttgacacc 1380
 agcaggggtga catccgctat tgctacttct ctgctcccc acagttcctc tggacttctc 1440
 tggaccacag tcctctgcca gaccctgcc agacccagc ccacc 1485

<210> 2

<211> 1540

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> TCP1 - 具有Dap10最小启动子的鼠Tce1核心增强子

<400> 2

cacaatactt tggataaat ttgggattaa ttcgaaagtt cttgattgta aataataaac 60
 tttccccaag aaaaggagta cgatgaactt tctttaagaa aaaaaaaaaa aatccaatgc 120
 atttcacatg accaaggatt gcacagatgc atttctggac caaggaggag aagattgaac 180
 gttggagggg ggctgcccggt ctgacttcct cacctgttcg aggggggtcgg gaaggggggt 240
 taccgctaag tcatcacttt tttatgtgtg tcggttaaaa ctacaaaggc aaccaaagg 300
 aggtcttatac cgttttttgt gagcttcagt tgggagcagc aggtagaaga agctgcactc 360
 tggttttact ttttcaccac cgggacctat aaatagatga ggctgtgttg ctttctcgct 420
 gagttacctc caccttcttg cctgggacct cacgatccag gcggctctaa ctcccacatg 480
 aacattcgca gctcactgcc cccgcagtca tttccacaa catgtgtgtg acatgaagaa 540
 gtgcgtctca gcatgggtgtg tttgtgtgtg ttgttgttat ttttgtttta gcgttgagtt 600
 ctagatgtct tccgccaca ctgccaactc tggaagcaag gctttctaaa tgtctcgaag 660
 aggtcctcga tatttgttga aggaagaaaa cattgctctt gggtattttt gctcccatg 720
 tatccaaaaa tacactaact tttatgtttc ataactatc aatactagtc cctcgccgc 780
 tcttacatga tgatgtacag tgtttatctg ccaggccgcg ttttgtacaa actgccttta 840
 ctctcccca ctatttggta aagaaaatta tttcacttt ttttgttgtt gttgtttgtt 900
 tttgtttgtt ttgagaggga atattgctct gttgccaggc tggagtgcag tggagtgatc 960
 tcggcttact gcaacctcca cctccgggt tcaagcgatt ctctgcctc agcctcctga 1020
 gtcactggga ttacaggcgt gcgccaacac acacagctaa ttttgtatt tttagtagag 1080
 ctgggggttt accatgttgg ccaggatgat ctcaatctc tgacctcgtg atctgcccgc 1140
 ttcagcctcc caaagtgtg ggattacagg cgtgagccac cgcgccggc ctattttcac 1200
 ttttagtaaa tggaaatctg ggtatcaaga gaagtcagtt tctatttttt cttggcccta 1260
 cctccaaaat atttccagat ctccctagcc tgcacacct tgccacctgt cattcccact 1320
 tggaccaggc cagcagcctc cctggtctct ctgacctcc cctgagttc gttcaccaaa 1380
 ggcagtaacg gagacacccc ctcaacacac acaggaagca gatggccttg acaccagcag 1440
 ggtgacatcc gctattgcta cttctctgct ccccccagc tcctctggac ttctctggac 1500
 cacagtcctc tgccagaccc ctgccagacc ccagtccacc 1540

<210> 3

<211> 2416

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> TCP3 - 具有Dap10最小启动子的完全CD2增强子

<400> 3

```

agctttgact agacccgtgt ctgctcattg tgtgaaggat cccagtgtcg aggagaggaa 60
gctgccgaat aagaaaagagc ctcgctgggtg tgacagcagg atcaaattca gtcaactcaa 120
tccggctgag acctccttag tcctcaccag aatgacccga acatgctccc caggtctcag 180
ctgcaaagct ggggtccaaca acctatttgt agatttccat aatgaattaa agcctccatg 240
cacaaacgtt aacaggagtc accagaaaac ttaacatttt aggtcttact ttcttgactg 300
ttcagacacg gtcataatga cctgtactgt catccttcaa aacaaggga tctatggata 360
ctggagggtg catgaactca tcagatgaca tacaaaaaga taggctaaga gacaactcag 420
ttgaatcaaa tcttaagtgt cttaaatgac tatgattaaa aggtcagacc ccatccccag 480
ctagcagtca tgcagctgta ctttgaggga agtggggaga aaaaaatagt tttcagttag 540
agttctaaaa caataggtgg tgagaaggca cctgctttga aatgctgggtg cttgtctgt 600
ggctctgtct gcccgccttc tccttggtt cttagacttg ctaaaccttg ttacactctg 660
gcaggaagct ctgagggcta aaccacaaaa actaagtaca ttcaggactt cctgtgacag 720
ctcactgagg attgaactac ttttctctct gaatctgaga gtctatTTTT ccagcaacca 780
gagttaatta ctaagggcaa tgatgaatga aacctcatcg cctcccaaaa ttcaaacaca 840
aaatccagct aggtacaat tgccacagga tctaccagat agagagatga gggctctggc 900
cgggcatggg ggctcgtgcc agtaatccta acactttggg aggccaaagc aggtagatca 960
cctgagggtca ggagtttgag accagcctgg ccaacatggt gaaaccctt ctctacttaa 1020
aaaaaaaaaa aaaaaaatta gccgggcata gtggcacgca cctataacc cagctactcg 1080
ggagggtgag gcagaataat tgcttgaacc ctgggggtgtg gaggttgag tgaggtgaga 1140
tcgtgtcact tcgctctagc ctgggcaaaa gagcaaaact ccgtctaaaa aaaaaaagga 1200
gagagagaga gagagagaga gagagatgag ggtcctagct ctgcccctt ctctattctt 1260
atgataccca tgagtgattt cattggctat ctcaccagaa cagctcatac gccattccct 1320
taagaaaatc ttccctggtc tattcagccc tgggctctgc ctttcttctg aactcctgtg 1380
gcattacata tggtaaaaa cacatacacc ctattcaatc cttcatcggt cattcattca 1440
acgaacattt attgaacttc tactatgtgt caggtctgtg gctaggcact aggaaaacag 1500
aggtgtacaa ttgcatctct gctttcaagg agctcaccac ctggtaggca agaaacggac 1560
caaccatggg acaaatgcaa tgcatgatga taaatatagg tcagaggcaa gtgcatgaac 1620
ccagaggaag gactttgaac ccagactgag tggttaagact ggggtgacaa agagggttct 1680
ctagaggagg gacgtttggg ttgcgttgta atagattaat tgaactgggt aagcagaggt 1740
acagaattac ccatgtagag gcaacagcat gagcaaggct ctttggtt tctgtttaca 1800
caaacatgta gtttcttttt caactactgt atttaactga tttgaagatg tcattgattt 1860
ttcaactact gttttcaact ttttgattt ctttttcttt ttttaacaact atatttaact 1920
aatttgaaga tggcattgat ttttaagtggc atcattcttt tacatgccac taagaaagag 1980
aagaacactt ctcagttgca ttgtaacaaa tactaagata cagtcaactt tcagtcacaa 2040

```

tcccatcct gagatattaa aatgtgaaaa aatgttattt tatgttagtg catttttagaa 2100
 ttgatgaaat gcatagtaaa gattttcttg gccctacctc caaaatattt ccagatctcc 2160
 ctagcctgca cacccttgcc acctgtcatt ccacttgga ccaggccagc agcctccctg 2220
 gtctctctga ccttccccct gagttcggtc accaaaggca gtaacggaga caccctctca 2280
 acacacacag gaagcagatg gccttgacac cagcagggtg acatccgcta ttgctacttc 2340
 tctgtctccc cacagttcct ctggacttct ctggaccaca gtcctctgcc agaccctgc 2400
 cagaccccag tccacc 2416

<210> 4

<211> 824

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> TCP4 - 具有Dap10最小启动子的完全CD2增强子

<400> 4

ttaagtgtct taaatgacta tgattaaaag gtcagacccc atccccagct agcagtcattg 60
 cagctgtact ttgagggaag tggggagaaa aaaatagttt tcagttagag ttctaaaaca 120
 atagggtgtg agaaggcacc tgctttgaaa tgctggtgcc ttgtctgtgg tcctgtctgc 180
 ccgccttctc cttggcttct tagacttgct aaaccttggt acactctggc aggaagctct 240
 gagggctaaa ccacaaaaac taagtacatt caggacttcc tgtgacagct cactgaggat 300
 tgaactactt tttcctctga atctgagagt ctatttttcc agcaaccaga gttaattact 360
 aagggcaatg atgaatgaaa cctcatcgcc tcccaaaatt caaacacaaa atccagctag 420
 gtaacaattg ccacaggatc taccagtag agagatgagg gctctggccg ggcatggtgg 480
 ctcgtgccag taatcctaac actttgggag gccaaagcag gtagatcacc ttttcttggc 540
 cctacctcca aaatatttcc agatctccct agcctgcaca cccttgccac ctgtcattcc 600
 cacttgacc aggccagcag cctccctggt ctctctgacc ctccccctga gtctgttcac 660
 caaaggcagt aacggagaca cccctcaac acacacagga agcagatggc cttgacacca 720
 gcagggtgac atccgctatt gctacttctc tgctcccca cagttcctct ggacttctct 780
 ggaccacagt cctctgccag acccctgcca gacccagtc cacc 824

<210> 5

<211> 347

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> MND启动子

<400> 5

gaacagagaa acaggagaat atgggcaaaa caggatatct gtggtagca gttcctgccc 60
 cggctcaggg ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt 120
 aagcagttcc tgccccggt cagggccaag aacagatggt cccagatgc ggtcccgccc 180
 tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc 240

ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc 300
 tccccgagct ctatataagc agagctcggt tagtgaaccg tcagatc 347
 <210> 6
 <211> 9859
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 慢病毒载体vivo-TIL 104 - LNGFR
 <400> 6
 agcttaatatgt agtcttatgc aatactcttg tagtcttgca acatggtaac gatgagttag 60
 caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc gattggtgga agtaagggtg 120
 tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga catggattgg acgaaccact 180
 gaattgccgc attgcagaga tattgtatgt aagtgcctag ctcgatacaa taaacgggtc 240
 tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300
 taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtg 420
 cgcccgaaaca gggacttgaa agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
 cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa 540
 attttgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgag agagcgtagc tattaagcgg 600
 gggagaatta gatcgcatg ggaaaaaatt cggttaaggc cagggggaaa gaaaaaatat 660
 aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgtagt taatcctggc 720
 ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
 acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
 caaaggatag agataaaaga caccaaggaa gctttagaca agatagagga agagcaaaac 900
 aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gagagatat 960
 gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
 agtagcaccc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
 aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggag cagcctcaat 1140
 gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
 gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
 gctccaggca agaatacctg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat 1320
 ttgggggttg tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag 1380
 taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcactgg atggagtggg acagagaaat 1440
 taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
 gaatgaacaa gaattatttg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
 aacaaattgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtagggtt 1620
 aagaatagtt ttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
 atcgtttcag acccacctcc caaccccgag gggacccgac aggccgaag gaatagaaga 1740
 agaagggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacgat ctcgacggt 1800

```

tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tgggggggtac agtgcagggg aaagaatagt 1860
agacataata gcaacagaca taaaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca 1920
aaattttata gatcacgaga ctagcctcga gaagcttgat atcgaattcc cacgggggtg 1980
gacgcgtagg aacagagaaa caggagaata tgggccaac aggatatctg tggtaaagcag 2040
ttcctgcccc ggctcagggc caagaacagt tggaacagca gaatatgggc caaacaggat 2100
atctgtggta agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagatggtc cccagatgcg 2160
gtccccccct cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct 2220
gaaatgaccc tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gcttctcgct tctgttcgcg 2280
cgcttctgct ccccgagctc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgcta 2340
gcaccgggtcc tgcagggccg ccaccatgcc tctgggcctg ctgtggctgg gcctggccct 2400
gctgggcgcc ctgcacgccc aggccggcgt gcaggtggag acaatctccc caggcgacgg 2460
acgcacattc cctaagcggg gccagacctg cgttgtgcac tatacaggca tgctggagga 2520
tggcaagaag tttgacagct cccgggatag aaacaagcca ttcaagttta tgctgggcaa 2580
gcaggaagtg atcagaggct gggaggaggc cgtggcccag atgtctgttg gccagagggc 2640
caagctgacc atcagcccag actacgccta tggagcaaca ggccaccag gaatcatccc 2700
acctcacgcc accctggtgt tcgatgtgga gctgctgaag ctgggcgagg gatccaacac 2760
atcaaaagag aacccctttc tgttcgcatt ggaggccgta gtcatatctg ttgatccat 2820
gggacttatt atctccctgt tgtgtgtgta cttctggctg gaacggacta tgcccaggat 2880
ccccacgctc aagaatctgg aagatctcgt cacagaatac catggtatt tcagcgcctg 2940
gagcggagtc tctaagggtc tggccgaatc cctccaaccc gattattctg aacggttgtg 3000
cctcgatatc gaaataccac caaaaggcgg ggctctgggt gagggcccag gggcgagtcc 3060
gtgcaatcaa cacagcccgt attgggcccc tccttgttat acgttgaagc ccgaaactgg 3120
aagcggagct actaacttca gcctgctgaa gcaggctgga gacgtggagg agaaccctgg 3180
acctatggca ctgcccgtga ccgccctgct gctgcctctg gccctgctgc tgcacgcagc 3240
ccggcctatc ctgtggcacg agatgtggca cgagggcctg gaggaggcca gcaggctgta 3300
ttttggcgag cgcaacgtga agggcatgtt cgagggtgct gagcctctgc acgccatgat 3360
ggagagaggc ccacagaccc tgaaggagac atcctttaac caggcctatg gacgggacct 3420
gatggaggca caggagtgtt gcagaaagta catgaagtct ggcaatgtga aggacctgct 3480
gcaggcctgg gatctgtact atcacgtgtt tcggagaatc tccaagggca aagacacgat 3540
tccgtggctt gggcactctc tcgttgggct gagggtgctg tttggtttca tcatcttgg 3600
ctatctcttg atcaattgca gaaatacagg cccttggctg aaaaaagtgc tcaagtgtaa 3660
tacccccgac ccaagcaagt tcttctccca gcttcttca gagcatggag gcgatgtgca 3720
gaaatggctc tcttcacctt ttccctctc aagcttctc ccgggagggc tggcgcccg 3780
gatttcacct cttgaggtag ttgaacgaga caaggttacc caacttctc ttcaacagga 3840
taaggtagcc gaacctgcga gccttagctc caaccactc cttacgagct gcttcaccaa 3900
tcagggatac ttctttttcc accttcccga tgcgctggaa atcgaagctt gtcaagttta 3960
ctttacctat gatccatata gcgaggaaga tcccgacgaa ggagtcgccg gtgcgcccac 4020
gggttctca ccccaacctc tccagcctc ctcaggagaa gatgatgctt attgcacttt 4080
tcccagtaga gacgatctcc tcctcttttc tccatctctt ttggggggac cttccccccc 4140

```

```

ttctacggca cctggcgggt ctggtgctgg cgaggagcgg atgccgccgt ccctccagga 4200
gcgagtacca cgagattggg atccccagcc acttggaacc cccacccccg gcgtacctga 4260
ccttgtcgat tttcaacctc cccctgaatt ggtgctgcga gaggctgggg aggaagttcc 4320
ggacgctggg ccgagggagg gcgtgtcctt tccatggagt aggcctccag gtcaaggcga 4380
gttttagggct ctcaacgcgc ggctgccgtt gaatacagac gcttatctct cactgcagga 4440
actgcaaggt caggacccaa cacatcttgt aggatctggt gctactaatt tttctctttt 4500
gaagcaagct ggagatgttg aagagaacct cgggccggag atgtggcatg agggctctga 4560
agaagcgtct cgactgtact ttggtgagcg caatgtgaag ggcatgtttg aagtcctcga 4620
accccttcat gccatgatgg aacgcggacc ccagacctg aaggagacaa gttttaacca 4680
agcttacgga agagacctga tggaagccca ggaatggtgc aggaaataca tgaaaagcgg 4740
gaatgtgaag gacttgctcc aagcgtggga cctgtactat catgtcttta ggcgcattag 4800
taagggcagc ggcgccacca acttcagcct gctgaagcag gccggcgacg tggaggagaa 4860
ccccggcccc ggtgctggcg caactggacg cgctatggat ggacctcgct tgcctcttct 4920
tctgcttctc ggggtctctt tgggtggtgc taaggaagca tgcccaacgg gactttatac 4980
gcatagcggg gagtggtgca aagcttgtaa cctgggcgaa ggcgtcgcgc aacctgttg 5040
tgcaaatcaa accgtctgcg agccatgttt ggactctgtt acgttttagt acgtagtatc 5100
tgcgacagag ccatgcaagc cttgtacgga atgtgtagga ttgcagagca tgtctgcccc 5160
ttgtgtagaa gccgacgatg cagtttgag gtgcgcgtat ggctattacc aagacgaaac 5220
aaccggacga tgtgaagctt gccgagttt tgaagcgggt tccgggcttg tattctcctg 5280
tcaggataag cagaacaccg tctgcgaaga gtgccccgat ggtacctaca gcgatgaagc 5340
gaaccatgta gacctatgcc tgccttgcac cgtttgtaga gacacggaac gacagttgcg 5400
ggaatgtacc cgggtgggcag acgccgagtg cgaagagatt ccaggccgct ggatcacgcg 5460
aagtaccccc ccagaaggtt ccgacagtac tgcaccaagc acccaagaac cagaggcgcc 5520
ccccgagcag gacctgattg cctccaccgt ggcggtgtt gttactacgg ttatgggctc 5580
atcccagccc gttgttacct gaggaactac agacaacctg attccggtat attgttctat 5640
cttggcggct gtagtagttg gcttggtcgc gtacatcgct ttcaaaagat gaacgccggc 5700
gctagtgtcg acaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tggatttctt 5760
aactatgttg ctctttttac gctatgtgga tacgtgctt taatgccttt gtatcatgct 5820
attgcttccc gtatggcttt cattttctcc tccttgata aatcctggtt gctgtctctt 5880
tatgaggagt tgtggcccg tctcaggcaa cgtggcgtgg tgtgcactgt gtttgctgac 5940
gcaacccccca ctggttgggg cattgccacc acctgtcagc tcctttccgg gactttcgct 6000
ttccccctcc ctattgccac ggcggaactc atcgccgctt gccttgcccg ctgctggaca 6060
ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc gtggtgttgt cggggaagct gacgtccttt 6120
ccatggctgc tcgcctgtgt tgccacctgg attctgcgcg ggacgtcctt ctgctacgtc 6180
ccttcggccc tcaatccagc ggaccttctt tcccgcggcc tgctgccggc tctgcggcct 6240
cttcgcgtc ttgccttcg ccctcagacg agtcggatct ccctttgggc cgcctccccg 6300
cctggaattc gagctcggtc cctttaagac caatgactta caaggcagct gtagatctta 6360
gccacttttt aaaagaaaag gggggactgg aagggtctat tcactcccaa cgaagacaag 6420
atctgctttt tgcttgactt gggctctctt ggtagacca gatctgagcc tgggagctct 6480

```

```

ctggctaact aggggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag 6540
tagtgtgtgc ccgctctgtt tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt 6600
cagtgtggaa aatctctagc agtagtagtt catgtcatct tattattcag tatttataac 6660
ttgcaaagaa atgaatatca gagagtgaga ggaacttggt tattgcagct tataatgggt 6720
acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta 6780
gttgtgggtt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctggctctag ctatcccgcc 6840
cctaactccg ccaggttccg ccattctcc gcccatggc tgactaattt tttttattta 6900
tgcagaggcc gaggccgcct cggcctctga gctattccag aagtagtgag gaggcttttt 6960
tggaggccta ggcttttgcg tcgagacgta cccaattcgc cctatagtga gtcgtattac 7020
gcgcgctcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa 7080
cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga agaggccgcg 7140
accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgca cgcgccctgt 7200
agcggcgcat taagcgcggc ggggtgtgtg gttacgcga gcgtgaccg tacacttgcc 7260
agcgccctag cgcccgctcc tttcgcttc ttccttctt ttctcgccac gttecgccgc 7320
tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc ctttaggtt tccgatttag tgctttacgg 7380
cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga 7440
tagacggttt ttcgcccttt gacgttgag tccacgttct ttaatagtgg actcttgttc 7500
caaactggaa caacactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg 7560
ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cggaatttt 7620
aacaaaatat taacgtttac aatttccag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa 7680
cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac 7740
cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg 7800
tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttctgt ttttgctcac ccagaaacgc 7860
tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg 7920
atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga 7980
gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc 8040
aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttgggt tgagtactca ccagtcacag 8100
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga 8160
gtgataacac tgcgccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg 8220
cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga 8280
atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt 8340
tgcgcaaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact 8400
ggatggaggc ggataaaagt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctgggt 8460
ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggatatcatt gcagcactgg 8520
ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 8580
tggtgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag catttgtaac 8640
tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 8700
aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt 8760
tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 8820

```

tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 8880
 gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 8940
 agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 9000
 tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg 9060
 ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg 9120
 cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac 9180
 tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 9240
 acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgga caggagagcg cacgaggag cttccagggg 9300
 gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcc cctctgactt gagcgtcgat 9360
 ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 9420
 tacggttcct ggccctttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttctgcg ttatccccctg 9480
 attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 9540
 cgaccgagcg cagcagagca gtgagcgagg aagcgggaaga gcgccaata cgcaaaccgc 9600
 ctctccccgc gcgttgccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga 9660
 aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg 9720
 ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc 9780
 acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagcgcgc aattaaccct cactaaaggg 9840
 aacaaaagct ggagctgca 9859

<210> 7

<211> 10997

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 慢病毒载体vivo-TIL 105 - TCP1

<400> 7

agcttaatgt agtcctatgc aatactcttg tagtcttgca acatggtaac gatgagttag 60
 caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc gattggtgga agtaaggtgg 120
 tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga catggattgg acgaaccact 180
 gaattgccgc attgcagaga tattgtatct aagtgcctag ctcgatacaa taaacgggtc 240
 tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300
 taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagttg 420
 cgcgccgaaca gggacttgaa agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
 cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgcaaaa 540
 attttgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg 600
 gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cggttaaggc cagggggaaa gaaaaatat 660
 aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc 720
 ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
 acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840

```

caaaggatag agataaaaga caccaaggaa gctttagaca agatagagga agagcaaaac 900
aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
agtagcaccc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcctcaat 1140
gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat 1320
ttgggggttg tctgaaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag 1380
taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcactgg atggagtggg acagagaaat 1440
taacaattac acaagcttaa tacaactcct aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
aacaaattgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
atcgtttcag acccacctcc caaccccgag gggacccgac aggccgaag gaatagaaga 1740
agaagggtga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacgat ctcgacgta 1800
tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tgggggtac agtgcagggg aaagaatagt 1860
agacataata gcaacagaca taaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca 1920
aaattttatc gatcacgaga ctagcctcga gaagcttgat atcgaattcc cacggggttg 1980
gacgcgtagg tgcacagtcc aggcaggtct ccagcttgca aacctcctga ctcagtggct 2040
gggattacag atttgtgtga gcagcaggca tagatttttc tttaaaaaaa ataaaataaa 2100
ataaaaaata aagcccagtg tttttcaca tggctctggga agggcctaac aagtgggttt 2160
cctgcagagg aagaggagag cgttgccctg actctcacct gctggagggg gtagagaggg 2220
gcctgcagcc aagtcatcat ttttgatgt gtgtcagtta caactacaaa ggcaacaaa 2280
aggaggtctt atccgttgtc tgtgagcttc agttgggaac agcaggcagc atttaggttt 2340
gggggttttt ttgttgtttt tttttcacc ccaaagctat aaatagccca gcatgtgggg 2400
catcctggct gctctacctt acacttgaga tccaagcagg tagccacccc cttctcccct 2460
gcagacattt tccacaacac gtatgtgatg agaagaaatg tctcccggag tggggtgtgt 2520
gtgtgtattc gtatgttgtt attttggct taactttgat gcatgccacc cacgctctca 2580
gccaggggtg cgagtcctcc ttgatgcctt aacgaagtgg tgggcttcga aggaagagag 2640
gaaggaagaa aacaactcta ctgtccagat atgctcttac ttttaagttt tgttacttaa 2700
agtttgttga tagtctataa actgactttg ttctatgtgt ctctaggaag ctatgctttc 2760
tgcagatttt cttaactacc tcccaactct ttggtgaaga aaatggtctt tactctttgc 2820
cctttatgag tgagtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tgcaacagtt 2880
gttgtccttg ctattctcc atcatttttt tccacataga ctagctggcg aatgagctgc 2940
aggatttcaa gtctttctac cctgaccca gtgccgggt tacggacatg cctgcctgca 3000
acatgaggac ttttcaagt gacgctgagg gcgctgatct caggcccttg tgttctcgtg 3060
gaaaacactt tacaacaga accatctccc aagcctgtct tctcacagtt catgaactca 3120
ggggcgtgtc tctctgttgt tagactatga agccactgtg tcaacgcat tctcctcgag 3180

```

```

ttttcttggc cctacctcca aaatatattcc agatctccct agcctgcaca cccttgccac 3240
ctgtcattcc cacttggacc aggccagcag cctccctggt ctctctgacc ctccccctga 3300
gttcgttcac caaaggcagt aacggagaca cccctcaac acacacagga agcagatggc 3360
cttgacacca gcagggtgac atccgctatt gctacttctc tgctcccca cagttcctct 3420
ggacttctct ggaccacagt cctctgccag acccctgcc gacccagtc caccgctagc 3480
accggtcctg cagggccgcc accatgcctc tgggcctgct gtggctgggc ctggccctgc 3540
tgggcgccct gcacgcccag gccggcgtgc aggtggagac aatctccca ggcgacggac 3600
gcacattccc taagcggggc cagacctgcg ttgtgacta tacaggcatg ctggaggatg 3660
gcaagaagtt tgacagctcc cgggatagaa acaagccatt caagtttatg ctgggcaagc 3720
aggaagtgat cagaggctgg gaggagggcg tggcccagat gtctgtgggc cagagggcca 3780
agctgaccat cagcccagac tacgcctatg gagcaacagg ccaccagga atcatccac 3840
ctcacgccac cctggtgttc gatgtggagc tgctgaagct gggcgaggga tccaacacat 3900
caaaagagaa cccctttctg ttgcattgg aggcctagt catatctgtt ggatccatgg 3960
gacttattat ctccctgttg tgtgtgtact tctggctgga acgactatg cccaggatcc 4020
ccacgtcaa gaatctggaa gatctcgtca cagaatacca tggtaatttc agcgcttga 4080
gcggagtctc taagggtctg gccgaatccc tccaaccga ttattctgaa cggttgtgcc 4140
tcgtatccga aataccacca aaaggcgggg ctctgggtga gggcccagg gcgagtccgt 4200
gcaatcaaca cagcccgtat tgggcccctc cttgttatac gttgaagccc gaaactggaa 4260
gcggagctac taacttcagc ctgctgaagc aggttgaga cgtggaggag aaccctggac 4320
ctatggcact gccctgacc gccctgctgc tgcctctggc cctgctgctg cagcagccc 4380
ggcctatcct gtggcacgag atgtggcacg agggcctgga ggaggccagc aggtgtatt 4440
ttggcgagcg caacgtgaag ggcatgttcg aggtgctgga gcctctgcac gccatgatgg 4500
agagaggccc acagaccctg aaggagacat ctttaacca ggcctatgga cgggacctga 4560
tggaggcaca ggagtggcgc agaaagtaca tgaagtctgg caatgtgaag gacctgctgc 4620
aggcctggga tctgtactat cacgtgtttc ggagaatctc caagggcaa gacacgattc 4680
cgtggcttgg gcatctgctc gttgggctga gtggcgtt tggtttcatc atcttggctc 4740
atctcttgat caattgcaga aatacaggcc cttggctgaa aaaagtgtc aagtgtata 4800
ccccgaccc aagcaagttc ttctcccagc ttcttcaga gcatggaggc gatgtgcaga 4860
aatggctctc ttcacctttt cctcctcaa gcttctccc gggagggtg gcgcccgaga 4920
tttcacctct tgaggtactt gaacgagaca aggttaccca acttctcctt caacaggata 4980
aggtacccga acctgcgagc cttagctcca accactctct tacgagctgc ttcaccaatc 5040
agggatactt ctttttccac cttcccgatg cgctggaaat cgaagcttgt caagtttact 5100
ttacctatga tccatatagc gaggaagatc ccgacgaagg agtcgccggt gcgcccacgg 5160
gttcctcacc ccaacctctc cagcctctct caggagaaga tgatgcttat tgcacttttc 5220
ccagtagaga cgatctcctc ctcttttctc catctctttt ggggggacct tccccctt 5280
ctacggcacc tggcgggtct ggtgctggcg aggagcgat gccgccgtcc ctccaggagc 5340
gagtaccacg agattgggat cccagccac ttggacccc caccgccgc gtacctgacc 5400
ttgtcgattt tcaacctccc cctgaattgg tgctgcgaga ggctggggag gaagttccgg 5460
acgctgggcc gagggagggc gtgtcctttc catggagtag gcctccaggt caaggcgagt 5520

```

```

ttagggctct caacgcgcgg ctgccgttga atacagacgc ttatctctca ctgcaggaac 5580
tgcaagggtca ggacccaaca catctttag gatctggtgc tactaatttt tctcttttga 5640
agcaagctgg agatgttgaa gagaaccccg gtccggagat gtggcatgag ggtctggaag 5700
aagcgtctcg actgtacttt ggtgagcgca atgtgaagg catgtttgaa gtcctcgaac 5760
cccttcatgc catgatggaa cgcggacccc agaccttgaa ggagacaagt tttaaccaag 5820
cttacggaag agacctgatg gaagcccagg aatggtgcag gaaatacatg aaaagcggga 5880
atgtgaagga cttgctccaa gcgtgggacc tgtactatca tgtctttagg cgcattagta 5940
agggcagcgg cgccaccaac ttcagcctgc tgaagcaggc cggcgacgtg gaggagaacc 6000
ccggccccgg tgctggcgca actggacgcg ctatggatgg acctcgcttg ctgcttcttc 6060
tgcttctcgg ggtctctttg ggtggtgcta aggaagcatg cccaacggga ctttatacgc 6120
atagcggaga gtgttgcaaa gcttgtaacc tgggcgaagg cgtcgcgcaa cttgtggtg 6180
caaatcaaac cgtctgcgag ccatgtttgg actctgttac gtttagtgac gtagtatctg 6240
cgacagagcc atgcaagcct tgtacggaat gtgtaggatt gcagagcatg tctgccctt 6300
gtgtagaagc cgacgatgca gtttgaggt gcgcgtatgg ctattacca gacgaaaca 6360
ccggacgatg tgaagcttgc cgagtttgtg aagcgggttc cgggcttgta ttctcctgtc 6420
aggataagca gaacaccgtc tgcgaagagt gcccgatgg tacctacagc gatgaagcga 6480
accatgtaga cccatgcctg ccttgaccg tttgtgaaga cacggaacga cagttgcggg 6540
aatgtacccg gtgggcagac gccgagtgcg aagagattcc aggccgtgg atcacgcgaa 6600
gtaccccgcc agaaggttcc gacagtactg caccaagcac ccaagaacca gaggcgcccc 6660
ccgagcagga cctgattgcc tccaccgtgg cgggtgttgt tactacggtt atgggctcat 6720
cccagccgtg tgttaccga ggaactacag acaacctgat tccggtatat tgttctatct 6780
tggcggctgt agtagttggc ttggtcgcgt acatcgcttt caaaagatga cgccggcgac 6840
tagtgtcgac aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa 6900
ctatgttgct ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat 6960
tgcttcccgt atggctttca tttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta 7020
tgaggagttg tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcaactgtt ttgctgacgc 7080
aacccccact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttcggga ctttcgcttt 7140
ccccctccct attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg 7200
ggctcggctg ttgggcactg acaattccgt ggtgtgtgcg gggaagctga cgtcctttcc 7260
atggctgctc gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc 7320
ttcggccctc aatccagcgg accttcctc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct 7380
tccgcgtctt cgcttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccc cctccccgcc 7440
tggaattcga gctcgttacc tttagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc 7500
cactttttta aagaaaagg gggactggaa gggctaattc actccaacg aagacaagat 7560
ctgctttttg cttgtactgg gtctctctgg ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct 7620
ggctaactag ggaacccact gcttaagcct caataaagct tgccttgagt gcttcaagta 7680
gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctggt aactagagat ccctcagacc cttttagtca 7740
gtgtggaaaa tctctagcag tagtagttca tgtcatctta ttattcagta tttataactt 7800
gcaaagaaat gaatatcaga gagtgagagg aacttgttta ttgcagctta taatggttac 7860

```

```

aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt 7920
tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggctctagct atcccccccc 7980
taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg 8040
cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg 8100
gaggcctagg cttttgcgtc gagacgtacc caattcgccc tatagtgagt cgtattacgc 8160
gcgctcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg ttaccaact 8220
taatgcctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac 8280
cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgcgacg cgccctgtag 8340
cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag 8400
cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt ctgccacgt tcgccggctt 8460
tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca 8520
cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata 8580
gacggttttt cgccctttga cgttgagtc cagttctttt aatagtggac tcttgttcca 8640
aactggaaca acactcaacc ctatctcgtt ctattctttt gatttataag ggattttgcc 8700
gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttta 8760
caaaatatta acgtttacaa tttcccaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc 8820
cctatttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc 8880
tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc 8940
gcccttattc cttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctaccc agaaacgctg 9000
gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat 9060
ctcaacacg cgtaatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc 9120
acttttaaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtt ttgacgccgg gcaagagcaa 9180
ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa 9240
aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aaccatgagt 9300
gataacactg cgccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct 9360
tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat 9420
gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg 9480
cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg 9540
atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgtcgg cccttcggc tggctggttt 9600
attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctcgcg gtatcattgc agcactgggg 9660
ccagatggta agccctccc tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg 9720
gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggttaactg 9780
tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa 9840
aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt 9900
tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt 9960
tttctgcgcg taatctgctg cttgcaacaa aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt 10020
ttgccgcatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag 10080
ataccaaata ctgtccttct agttagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta 10140
gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat 10200

```

aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg 10260
 ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgacctt caccgaactg 10320
 agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac 10380
 aggtatccgg taagcggcag ggtcggaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga 10440
 aacgcctggg atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt 10500
 ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta 10560
 cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttcctgcgtt atcccctgat 10620
 tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg 10680
 accgagcgca gcgagtcagt gagcaggagaa gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct 10740
 ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcagc acaggtttcc cgactggaaa 10800
 gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcatagc accccaggct 10860
 ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac 10920
 acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagcgcgcaa ttaacctca ctaaagggaa 10980
 caaaagctgg agctgca 10997

<210> 8

<211> 11035

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 慢病毒载体vivo-TIL 106 - TCP2

<400> 8

agcttaatgt agtcttatgc aatactcttg tagtcttgca acatggtaac gatgagttag 60
 caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc gattggtgga agtaaggtgg 120
 tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga catggattgg acgaaccact 180
 gaattgccgc attgcagaga tattgtattt aagtgcctag ctcgatacaa taaacgggtc 240
 tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300
 taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg 420
 cgcccgaaca gggacttgaa agcgaagagg aaaccagagg agctctctcg acgaggact 480
 cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgcaaaa 540
 attttgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgag agagcgtcag tattaagcgg 600
 gggagaatta gatcgcatg ggaaaaaatt cggttaaggc cagggggaaa gaaaaaatat 660
 aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc 720
 ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactggac agctacaacc atcccttcag 780
 acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
 caaaggatag agataaaaga caccaaggaa gcttttagaca agatagagga agagcaaac 900
 aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcgcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
 gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
 agtagcacc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaagag cagtgggaat 1080

aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcctcaat 1140
 gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctgggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
 gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
 gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat 1320
 ttgggggttg tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag 1380
 taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcactgg atggagtggg acagagaaat 1440
 taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
 gaatgaacaa gaattatttg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
 aacaaattgg ctgtgggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
 aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
 atcgtttcag acccacctcc caaccccgag gggacccgac aggccgaag gaatagaaga 1740
 agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctgcacggta 1800
 tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tggggggtac agtgcagggg aaagaatagt 1860
 agacataata gcaacagaca tacaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca 1920
 aaattttatc gatcacgaga ctagcctcga gaagcttgat atcgaattcc cacggggttg 1980
 gacgcgtaga caatactttg gtataaattt gggattaatt cgaaagtctt tgattgtaaa 2040
 taataaactt tccccagaa aaggagtacg atgaactttc ttttaagaaa aaaaaaaaaa 2100
 tccaatgcat ttcacatgac caaggattgc acagatgcat ttctggacca aggaggagaa 2160
 gattgaacgt tggagggggg ctgccgtct gacttctca cctgttcgag ggggtcggga 2220
 aggggggtta ccgctaagtc atcacttttt tatgtgtgtc ggttaaaact acaaaggcaa 2280
 ccaaaggag gtcttatccg tttttgtga gcttcagttg ggagcagcag gtagaagaag 2340
 ctgcactctg gttttacttt ttcaccaccg ggacctataa atagatgagg ctgtgtggct 2400
 ttctcgtga gttacctcca cttcttgcc tgggacctca cgatccaggc ggctctaact 2460
 cccacatgaa cattcgcagc tcttgcccc cgcagtcatt ttccacaaca tgtgtgtgac 2520
 atgaagaagt gcgtctcagc atgggtgtgtt tgtgtgtgtt gttgttattt ttgttttagc 2580
 gttgagttct agatgtcttc cgccacact gccactctg gaagcaaggc tttctaaatg 2640
 tctcgaagag gtcctcgata tttgttgaag gaagaaaaca ttgctcttg tttttttgc 2700
 tccccatgta tccaaaaata cactaacttt tatgtttcat aactattcaa tactagtccc 2760
 tcggccgctc ttacatgatg atgtacagt tttatctgcc agcccgctt ttgtacaaac 2820
 tgcctttact ctccccaact atttggtaaa gaaattatt ttcacttttt ttgttgttgt 2880
 tgtttgtttt tgtttgttt gagagggaat attgctctgt tgccaggctg gagtgcagtg 2940
 gagtgatctc ggcttactgc aacctccacc tcccgggttc aagcgattct cctgcctcag 3000
 cctcctgagt cactgggatt acaggcgtgc gccaacacac acagctaatt tttgtatttt 3060
 tagtagagct ggggtttcac catgttgcc aggatgatct caatctctg acctcgtgat 3120
 ctgcccgtt cagcctccca aagtgtggg attacaggcg tgagccaccg cgcccgcct 3180
 attttcactt ttagtaaatg gaaatctggg tatcaagaga agtcagtttc tttttttct 3240
 tggccctacc tccaaaatat ttccagatct cctagcctg cacacccttg ccacctgtca 3300
 ttcccacttg gaccaggcca gcagcctccc tggctctctt gaccctcccc ctgagttcgt 3360
 tcaccaaagg cagtaacgga gacacccct caacacacac aggaagcaga tggccttgac 3420

accagcaggg tgacatccgc tattgctact tctctgctcc cccacagttc ctctggactt 3480
 ctctggacca cagtcctctg ccagaccctt gccagacccc agtccaccgc tagcaccggt 3540
 gccgccacca tgcctctggg cctgctgtgg ctgggcctgg ccctgctggg cgccctgcac 3600
 gcccaggccg gcgtgcaggt ggagacaatc tccccaggcg acggacgcac attccctaag 3660
 cggggccaga cctgcgttgt gcactataca ggcatgctgg aggatggcaa gaagtttgac 3720
 agctcccggg atagaaacaa gccattcaag tttatgctgg gcaagcagga agtgatcaga 3780
 ggctgggagg agggcgtggc ccagatgtct gtgggccaga gggccaagct gaccatcagc 3840
 ccagactacg cctatggagc aacaggccac ccaggaatca tcccacctca cgccaccctg 3900
 gtgttcgatg tggagctgct gaagctgggc gagggatcca acacatcaaa agagaacccc 3960
 tttctgttcg cattggaggc cgtagtcata tctgttggat ccatgggact tattatctcc 4020
 ctgttggtgtg tgtacttctg gctggaacgg actatgccc ggatccccac gctcaagaat 4080
 ctggaagatc tcgtcacaga ataccatggt aatttcagcg cctggagcgg agtctctaag 4140
 ggtctggccg aatccctcca acccgattat tctgaacggt tgtgcctcgt atccgaaata 4200
 ccacaaaag gcggggctct gggtgagggc ccaggggcga gtccgtgcaa tcaacacagc 4260
 ccgtattggg cccctccttg ttatacgttg aagcccgaaa ctggaagcgg agtactaac 4320
 ttcagcctgc tgaagcaggc tggagacgtg gaggagaacc ctggacctat ggcactgccc 4380
 gtgaccgccc tgctgctgcc tctggccctg ctgctgcacg cagcccgcc tatcctgttg 4440
 cacgagatgt ggcacgaggg cctggaggag gccagcaggc tgtattttg cgagcgcaac 4500
 gtgaagggca tgttcgaggt gctggagcct ctgcacgcca tgatggagag agggccacag 4560
 accctgaagg agacatcctt taaccaggcc tatggacggg acctgatgga ggcacaggag 4620
 tggcgcagaa agtacatgaa gtctggcaat gtgaaggacc tgctgcaggc ctgggatctg 4680
 tactatcacg tgtttcggag aatctccaag ggcaaagaca cgattccgtg gcttgggcat 4740
 ctgctcgttg ggctgagtgg tgcgtttggt ttcacatct tggtctatct cttgatcaat 4800
 tgcagaaata caggcccttg gctgaaaaaa gtgctcaagt gtaatacccc cgaccaagc 4860
 aagtctctct cccagctttc ttcagagcat ggaggcgatg tgcagaaatg gctctcttca 4920
 ccttttccct cctcaagctt ctccccggga gggctggcgc ccgagatttc acctcttgag 4980
 gtacttgaac gagacaaggt tacccaactt ctcttcaac aggataaggt acccgaaact 5040
 gcgagcctta gctccaacca ctctcttacg agctgcttca ccaatcaggg atacttcttt 5100
 ttccaccttc ccgatgcgct ggaaatcgaa gcttgctcaag tttactttac ctatgatcca 5160
 tatagcgagg aagatcccg cgaaggagtc gccggtgcgc ccacgggttc ctcaccccaa 5220
 cctctccagc ctctctcagg agaagatgat gcttattgca cttttcccag tagagacgat 5280
 ctctctctct tttctccatc tcttttgggg ggaccttccc ccccttctac ggcacctggc 5340
 gggctctggtg ctggcgagga gcggatgccg ccgtccctcc aggagcgagt accacgagat 5400
 tgggatcccc agccacttgg accccccacc cccggcgtag ctgaccttgt cgattttcaa 5460
 cctccccctg aattgggtgct gcgagaggct ggggaggaag ttccggacgc tgggccgagg 5520
 gagggcggtg cctttccatg gagtaggcct ccaggtcaag gcgagtttag ggctctcaac 5580
 gcgcggctgc cgttgaatac agacgcttat ctctcactgc aggaactgca aggtcaggac 5640
 ccaacacatc ttgtaggatc tgggtgctact aatttttctc ttttgaagca agctggagat 5700
 gttgaagaga accccggtcc ggagatgtgg catgagggtc tggaagaagc gtctcgactg 5760

tactttggtg agcgcaatgt gaagggcatg tttgaagtcc tcgaaccctt tcatgccatg 5820
 atggaacgcg gaccccagac cttgaaggag acaagtttta accaagctta cggaagagac 5880
 ctgatggaag cccaggaatg gtgcaggaaa tacatgaaaa gcgggaatgt gaaggacttg 5940
 ctccaagcgt gggacctgta ctatcatgtc tttaggcgca ttagtaaggg cagcggcgcc 6000
 accaacttca gcctgctgaa gcaggccggc gacgtggagg agaaccctcg ccccggtgct 6060
 ggcgcaactg gacgcgctat ggatggacct cgcttgctgc ttcttctgct tctcggggtc 6120
 tctttgggtg gtgctaagga agcatgcccc acgggacttt atacgcatag cggagagtgt 6180
 tgcaaagctt gtaacctggg cgaaggcgtc gcgcaacctt gtggtgcaaa tcaaaccgtc 6240
 tgcgagccat gtttgactc tgttacgttt agtgacgtag tatctgcgac agagccatgc 6300
 aagccttgta cggaatgtgt aggattgcag agcatgtctg ccccttggtg agaagccgac 6360
 gatgcagttt gcaggtgcgc gtatggctat taccaagacg aaacaaccgg acgatgtgaa 6420
 gcttgccgag tttgtgaagc gggttccggg cttgtattct cctgtcagga taagcagaac 6480
 accgtctgcg aagagtcccc cgatggtacc tacagcgatg aagcgaacca tgtagacca 6540
 tgctgcctt gcaccgtttg tgaagacacg gaacgacagt tgcgggaatg taccgggtgg 6600
 gcagacgccg agtgcaaga gattccaggc cgctggatca cgcgaagtac cccgccagaa 6660
 ggttccgaca gtactgcacc aagcacccaa gaaccagagg cgcccccgca gcaggacctg 6720
 attgcctcca ccgtggcggg tgttggtact acggttatgg gctcatcca gcccgttggt 6780
 acccgaggaa ctacagacaa cctgattccg gtatattggt ctatcttggc ggctgtagta 6840
 gttggcttgg tcgctacat cgctttcaaa agatgaacta gtgtcgacaa tcaacctctg 6900
 gattacaaaa tttgtgaaag attgactggg attcttaact atgttgctcc ttttacgcta 6960
 tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat ggctttcatt 7020
 ttctcctcct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagttgtg gcccgttgtc 7080
 aggcaacgtg gcgtgggtgt cactgtgttt gctgacgcaa cccctactgg ttggggcatt 7140
 gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc cctccctat tgccacggcg 7200
 gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgtgc tggacagggg ctcggtgtt gggcactgac 7260
 aattccgtgg tgtgtcggg gaagctgacg tcctttccat ggctgctgc ctgtgttgcc 7320
 acctggattc tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt cggccctcaa tccagcggac 7380
 cttccttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcgtcttcg ccttcgcctt 7440
 cagacgagtc ggatctccct ttgggccgcc tccccgctg gaattcgagc tcggtacctt 7500
 taagaccaat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg 7560
 gactggaagg gctaattcac tccaacgaa gacaagatct gctttttgct tgtactgggt 7620
 ctctctggtt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg aaccactgc 7680
 ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgcccgt ctgttgtgtg 7740
 actctggtaa ctagagatcc ctacagacct ttagtcagt gtggaaaatc tctagcagta 7800
 gtagttcatg tcatcttatt attcagtatt tataacttgc aaagaaatga atatcagaga 7860
 gtgagaggaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia 7920
 atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca 7980
 atgtatctta tcatgtctgg ctctagctat cccgcccta actccgcca gttccgcca 8040
 ttctccgcc catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc 8100

```

ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttttga ggcctaggct tttgcgtcga 8160
gacgtaccca attcgcccta tagtgagtcg tattacgcgc gctcactggc cgctcgtttta 8220
caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcggt acccaactta atcgcccttg agcacatccc 8280
cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgccacc atcgcccttc ccaacagttg 8340
cgcagcctga atggcgaatg gcgcgacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt 8400
gtgggtggta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 8460
gctttcttcc cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg 8520
gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 8580
tagggtagtg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg 8640
ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 8700
atctcggtct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 8760
aatgagctga tttacaacaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt 8820
tcccagtggt cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa 8880
tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt 8940
gaaaaaggaa gaggatgagt attcaacatt tccgtgtcgc cttatttccc ttttttgcgg 9000
cattttgcct tcctgttttt gtcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag 9060
atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg 9120
agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg 9180
gcgcggtatt atcccgatg gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt 9240
ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga 9300
cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac 9360
ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc 9420
atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc 9480
gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac 9540
tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag 9600
gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg 9660
gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg 9720
tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg 9780
ctgagatagg tgcctcactg attaaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata 9840
tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt 9900
ttgataatct catgacaaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc 9960
ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct 10020
tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa 10080
ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcatg accaaatact gtcttcttag 10140
tgtagccgta gtaggcccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc 10200
tgtaaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 10260
actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca 10320
cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 10380
gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg 10440

```

tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 10500
 ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 10560
 ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttgctggc 10620
 cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgttgataac cgtattaccg 10680
 cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga 10740
 gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc 10800
 attaattgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagttag cgcaacgcaa 10860
 ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac ccaggtttt acactttatg cttccggctc 10920
 gtatgtttgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg 10980
 attacgcaa gcgcgcaatt aaccctcact aaaggaaca aaagctggag ctgca 11035

<210> 9

<211> 11912

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 慢病毒载体vivo-TIL 107 - TCP3

<400> 9

agcttaatgt agtcttatgc aatactcttg tagtcttgca acatggtaac gatgagttag 60
 caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc gattggtgga agtaaggtgg 120
 tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga catggattgg acgaaccact 180
 gaattgccgc attgcagaga tattgtatgt aagtgcctag ctcgatacaa taaacgggtc 240
 tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300
 taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg 420
 cgcccgaaca gggacttgaa agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
 cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggc gaggggaggc gactggtgag tacgcaaaa 540
 attttgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgag agagcgtcag tattaagcgg 600
 gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cggttaaggc cagggggaaa gaaaaaatat 660
 aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgagcgt taatcctggc 720
 ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
 acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
 caaaggatag agataaaaaga caccaaggaa gcttttagaca agatagagga agagcaaaac 900
 aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
 gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
 agtagcacc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
 aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggag cagcctcaat 1140
 gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
 gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
 gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat 1320

```

ttgggggttgc tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag 1380
taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcacctgg atggagtggg acagagaaat 1440
taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
aacaaattgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
atcgtttcag acccacctcc caaccccgag gggacccgac aggcccgaag gaatagaaga 1740
agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctgcacggta 1800
tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tgggggggtac agtgcagggg aaagaatagt 1860
agacataata gcaacagaca taaaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca 1920
aaattttata gatcacgaga ctagcctcga gaagcttgat atcgaattcc cacggggttg 1980
gacgcgtaga gctttgacta gacccgtgtc tgctcattgt gtgaaggatc ccagtgtcga 2040
ggagaggaag ctgccgaata agaaagagcc tcgctggtgt gacagcagga tcaaattcag 2100
tcaactcaat ccggctgaga cctccttagt cctcaccaga atgaccgaa catgctcccc 2160
aggtctcagc tgcaaagctg ggtccaacaa cctatttcta gatttcata atgaattaaa 2220
gcctccatgc acaaacgtta acaggagtca ccagaaaact taacatttta ggtcttactt 2280
tcttgactgt tcagacacgg tcataatgac ctgtactgtc atccttcaaa acaagggaat 2340
ctatggatac tggagggtgc atgaactcat cagatgacat acaaaaagat aggctaagag 2400
acaactcagt tgaatcaaat cttaagtgtc ttaaatgact atgattaaaa ggtcagaccc 2460
catccccagc tagcagtcac gcagctgtac tttgagggaa gtggggagaa aaaaatagtt 2520
ttcagttaga gttctaaaac aataggtggt gagaaggcac ctgctttgaa atgctggtgc 2580
cttgtctgtg gtctgtctg cccgccttct ccttggttc ttagacttgc taaaccttgt 2640
tacactctgg caggaagctc tgagggctaa accacaaaaa ctaagtacat tcaggacttc 2700
ctgtgacagc tcaactgagga ttgaactact ttttctctg aatctgagag tctatttttc 2760
cagcaaccag agttaattac taagggaat gatgaatgaa acctcatcgc ctcccaaaat 2820
tcaaacacaa aatccagcta ggtaacaatt gccacaggat ctaccagta gagagatgag 2880
ggctctggcc gggcatggtg gctcgtgcca gtaatcctaa cactttggga ggccaaagca 2940
ggtagatcac ctgaggtcag gagtttgaga ccagcctggc caacatggtg aaacccttc 3000
tctacttaaa aaaaaaaaaa aaaaaattag ccgggcacgc tggcacgcac ctataacccc 3060
agctactcgg gaggttgagg cagaataatt gcttgaacct tggggtgtgg aggttgacgt 3120
gaggtgagat cgtgtcactt cgctctagcc tgggcaaaag agcaaaactc cgtctaaaaa 3180
aaaaaaggag agagagagag agagagagag agagatgagg gtccctagctc tgcccccttc 3240
tcattcttca tgatacccat gagtgatttc attggctatc tcaccagaac agctcatacg 3300
ccattccctt aagaaaatct tccttgggtt attcagccct gggctctgcc tttcttctga 3360
actcctgtgg cattacatat ggtacaaaac acatacacc tattcaatcc ttcacgttc 3420
attcattcaa cgaacattta ttgaacttct actatgtgtc aggctctgtg ctaggcacta 3480
ggaaaacaga ggtgtacaat tgcactctct ctttcaagga gctcaccacc tggtaggcaa 3540
gaaacggacc aaccatggga caaatgcaat gcagtatgat aaatataggt cagaggcaag 3600
tgcatagaacc cagaggaagg actttgaacc cagactgagt ggtaagactg gggtgacaaa 3660

```

gagggcttcc tagaggaggg acgtttgggt tgcgttgtaa tagattaatt gaactggtga 3720
 agcagaggta cagaattacc catgtagagg caacagcatg agcaaggctc atttggcttt 3780
 ctgtttacac aaacatgtag tttctttttc aactactgta tttaactgat ttgaagatgt 3840
 cattgatttt tcaactactg ttttcaactt tttgtatttc tttttctttt ttaacaacta 3900
 tattttaacta atttgaagat ggcatgtgatt ttaagtggca tcattctttt acatgccact 3960
 aagaaaagaga agaacacttc tcagttgcat tgtaacaaat actaagatac agtcaacttt 4020
 cagtcacaat cccattcctg agatattaaa atgtgaaaaa atgttatttt atgttagtgc 4080
 attttagaat tgatgaaatg catagtaaag attttcttgg ccctacctcc aaaatatttc 4140
 cagatctccc tagcctgcac acccttgcca cctgtcattc ccacttggac caggccagca 4200
 gcctccctgg tctctctgac cctccccctg agttcgttca ccaaaggcag taacggagac 4260
 accccctcaa cacacacagg aagcagatgg ccttgacacc agcaggggtga catccgctat 4320
 tgctacttct ctgctcccc acagtctctc tggacttctc tggaccacag tctcttgcca 4380
 gaccctgcc agaccccagt ccaccgtag caccggtgcc gccaccatgc ctctgggcct 4440
 gctgtggctg ggccctggccc tgctgggcgc cctgcacgcc caggccggcg tgcaggtgga 4500
 gacaatctcc ccaggcgacg gacgcacatt ccctaagcgg ggccagacct gcgttgtgca 4560
 ctatacaggc atgctggagg atggcaagaa gtttgacagc tcccgggata gaaacaagcc 4620
 attcaagttt atgctgggca agcaggaagt gatcagaggc tgggaggagg gcgtggccca 4680
 gatgtctgtg ggccagaggg ccaagctgac catcagccca gactacgcct atggagcaac 4740
 aggccacca ggaatcatcc cacctcacgc caccctggtg ttcgatgtgg agctgctgaa 4800
 gctgggcgag ggatccaaca catcaaaaga gaacccttt ctgttcgcat tggaggccgt 4860
 agtcatatct gttggatcca tgggacttat tatctccctg ttgtgtgtgt acttctggct 4920
 ggaacggact atgcccagga tccccacgct caagaatctg gaagatctcg tcacagaata 4980
 ccatggtaat ttcagcgctt ggagcggagt ctctaagggt ctggccgaat ccctccaacc 5040
 cgattattct gaacggttgt gcctcgtatc cgaaatacca ccaaaggcg gggctctggg 5100
 tgagggccca ggggcgagtc cgtgcaatca acacagcccc tattgggccc ctcttgttta 5160
 tacgttgaag cccgaaactg gaagcggagc tactaacttc agcctgctga agcaggctgg 5220
 agacgtggag gagaaccctg gacctatggc actgcccgtg accgccctgc tgctgcctct 5280
 ggccctgctg ctgcacgcag cccggcctat cctgtggcac gagatgtggc acgagggcct 5340
 ggaggaggcc agcaggctgt attttggcga gcgcaacgtg aagggcattgt tcgagggtgt 5400
 ggagcctctg cacgccatga tggagagagg cccacagacc ctgaaggaga catcctttaa 5460
 ccaggcctat ggacgggacc tgatggaggc acaggagtgg tgcagaaagt acatgaagtc 5520
 tggcaatgtg aaggacctgc tgcaggcctg ggatctgtac tatcacgtgt ttcggagaat 5580
 ctccaagggc aaagacacga ttccgtggct tgggcatctg ctcttgggc tgagtgtgtc 5640
 gtttggtttc atcatcttgg tctatctctt gatcaattgc agaaatacag gcccttggct 5700
 gaaaaaagtg ctcaagtgtg atacccccga cccaagcaag ttcttctccc agctttcttc 5760
 agagcatgga ggcatgtgc agaaatggct ctcttcacct ttccctctct caagcttctc 5820
 cccgggaggg ctggcgcccc agatttcacc tcttgaggta cttgaacgag acaaggttac 5880
 ccaacttctc cttcaacagg ataaggtacc cgaacctgcg agccttagct ccaaccactc 5940
 tcttacgagc tgcttcacca atcagggata cttctttttc caccttcccg atgcgctgga 6000

```

aatcgaagct tgtcaagttt actttaccta tgatccatat agcgaggaag atccccgacga 6060
aggagtcgcc ggtgcgcccc cgggttcctc accccaacct ctccagcctc tctcaggaga 6120
agatgatgct tattgcactt ttcccagtag agacgatctc ctctctttt ctccatctct 6180
tttgggggga ctttcccccc cttctacggc acctggcggg tctggtgctg gcgaggagcg 6240
gatgccgccc tccctccagg agcgagtacc acgagattgg gatccccagc cacttgacc 6300
ccccaccccc ggcgtacctg acctgtcga ttttcaacct cccctgaat tgggtgctgcg 6360
agaggctggg gaggaagtgc cggacgctgg gccgaggag ggctgtcct ttccatggag 6420
taggcctcca ggtcaaggcg agtttagggc tctcaacgcg cggctgccgt tgaatacaga 6480
cgcttatctc tcactgcagg aactgcaagg tcaggacca acacatcttg taggatctgg 6540
tgctactaat ttttctcttt tgaagcaagc tggagatgtt gaagagaacc ccggtccgga 6600
gatgtggcat gagggtctgg aagaagctc tcgactgtac tttggtgagc gcaatgtgaa 6660
gggcatgttt gaagtcctcg aacccttca tgccatgatg gaacgcggac ccagacctt 6720
gaaggagaca agttttaacc aagcttacgg aagagacctg atggaagccc aggaatggtg 6780
caggaaatac atgaaaagcg ggaatgtgaa ggacttgctc caagcgtggg acctgtacta 6840
tcatgtcttt aggcgcatta gtaagggcag cggcgccacc aacttcagcc tgctgaagca 6900
ggccggcgac gtggaggaga accccggccc cgggtgctggc gcaactggac gcgctatgga 6960
tggaacctgc ttgtgcttc ttctgcttct cggggtctct ttgggtggtg ctaaggaagc 7020
atgccaacg ggactttata cgcatagcgg agagtgttg aaagcttgta acctgggcga 7080
aggcgtcgcg caaccttggt gtgcaaatca aaccgtctgc gagccatgtt tggactctgt 7140
tacgtttagt gacgtagtat ctgcgacaga gccatgcaag ccttgtagcg aatgtgtagg 7200
attgcagagc atgtctgccc cttgtgtaga agccgacgat gcagtttgca ggtgcgcgta 7260
tggtatttac caagacgaaa caaccggacg atgtgaagct tgccgagttt gtgaagcggg 7320
ttccgggctt gtattctcct gtcaggataa gcagaacacc gtctgcgaag agtgccccga 7380
tggtacctac agcgatgaag cgaacctgt agacctatgc ctgccttgca ccgtttgtga 7440
agacacggaa cgacagtgc gggaatgtac ccggtgggca gacgccgagt gcgaagagat 7500
tccaggccgc tggatcacgc gaagtacccc gccagaaggt tccgacagta ctgcaccaag 7560
cacccaagaa ccagaggcgc ccccgagca ggacctgatt gcctccaccg tggcgggtgt 7620
tgttactacg gttatgggct catcccagcc cgttggtacc cgaggaacta cagacaacct 7680
gattccggta tattgttcta tcttggcggc tgtagtagtt ggcttggtcg cgtacatcgc 7740
tttcaaaaga tgaactagt tgcacaatca acctctggat taaaaattt gtgaaagatt 7800
gactggatatt cttaactatg ttgctccttt tacgctatgt ggatacgtg ctttaatgcc 7860
tttgatatcat gctattgctt cccgtatggc ttctatttct tctccttgat ataaatcctg 7920
gttgctgtct ctttatgagg agttgtggcc cgttgtcagg caacgtggcg tgggtgtgcac 7980
tgtgtttgct gacgcaaccc ccaactggtg gggcattgcc accacctgtc agctccttct 8040
cgggactttc gctttcccc tccctattgc cacggcgga ctcctcgccg cctgccttgc 8100
ccgctgctgg acaggggctc ggctgttggg cactgacaat tccgtggtgt tgctggggaa 8160
gctgacgtcc ttccatggc tgctcgctg tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc 8220
cttctgtac gtcccttcgg cctcaatcc agcggacctt ccttcccgcg gcctgctgcc 8280
ggctctgcgg cctcttccgc gtcttcgct tcgcctcag acgagtcgga tctccctttg 8340

```

ggccgcctcc ccgcctggaa ttcgagctcg gtacctttaa gaccaatgac ttacaaggca 8400
 gctgtagatc ttagccactt tttaaaagaa aaggggggac tggaagggtt aattcactcc 8460
 caacgaagac aagatctgct ttttgcttgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga 8520
 gcctgggagc tctctggcta actaggggaa ccactgctta agcctcaata aagcttgccct 8580
 tgagtgcctc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc 8640
 agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtagta gttcatgtca tcttattatt 8700
 cagtattttat aacttgcaaa gaaatgaata tcagagagtg agaggaaactt gtttattgca 8760
 gcttataatg gttacaaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt 8820
 tctactgcatt ctagttgttg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggctc 8880
 tagctatccc gccccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa 8940
 ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt 9000
 gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt gcgtcgagac gtaccaatt cgccctatag 9060
 tgagtcgtat tacgcgcgct cactggccgt cgttttacia cgctgtgact gggaaaaccc 9120
 tggcgttacc caacttaatc gccttgagc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag 9180
 cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcg 9240
 cgacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 9300
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgct ttcttccctt cttttctcgc 9360
 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttttag ggttccgatt 9420
 tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 9480
 gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 9540
 tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 9600
 ataagggtt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 9660
 taacgcgaat ttttaacaaa tattaacgtt tacaatttcc caggtggcac ttttcgggga 9720
 aatgtgcgcg gaacccttat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc 9780
 atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt 9840
 caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct 9900
 caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt 9960
 tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt 10020
 tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtattgac 10080
 gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac 10140
 tcaccagtca cagaaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc 10200
 gccataacca tgagtataaa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg 10260
 aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgctt tgatcgttgg 10320
 gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca 10380
 atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa 10440
 caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt 10500
 ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc 10560
 attgcagcac tggggccaga tggttaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg 10620
 agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt 10680

aagcattggg aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt 10740
cattttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaatac 10800
ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct 10860
tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 10920
ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc 10980
ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac 11040
ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct 11100
gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat 11160
aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggg tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg 11220
acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga 11280
gggagaaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg 11340
gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctg tcgggtttcg ccacctctga 11400
cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc 11460
aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct 11520
gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct 11580
cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca 11640
atacgaaac cgctctccc cgcgcttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 11700
tttcccgaact ggaaagcggg cagtgagcg aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat 11760
taggcacccc aggttttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc 11820
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagcg cgcaattaac 11880
cctcactaaa gggaacaaaa gctggagctg ca 11912

<210> 10

<211> 10320

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 慢病毒载体vivo-TIL 108 - TCP4

<400> 10

agcttaatgt agtcttatgc aatactcttg tagtcttgca acatggtaac gatgagttag 60
caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc gattgggtga agtaaggtgg 120
tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga catggattgg acgaaccact 180
gaattgccgc attgcagaga tattgtatctt aagtgcctag ctcgatacaa taaacgggtc 240
tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300
taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtg 420
cgcccgaaac gggacttgaa agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgcaaaaa 540
atcttgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgag agagcgtcag tattaagcgg 600
gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cggttaaggc cagggggaaa gaaaaaatat 660

```

aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc 720
ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
caaaggatag agataaaaga caccaaggaa gcttttagaca agatagagga agagcaaaac 900
aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
agtagcacc cccaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggag cagcctcaat 1140
gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
gctccaggca agaattcctg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat 1320
ttggggttgc tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag 1380
taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcactgg atggagtggg acagagaaat 1440
taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
aacaattgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcaggat attcaccatt 1680
atcgtttcag acccacctcc caaccccgag gggacccgac aggccgaag gaatagaaga 1740
agaagggtga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacgat ctcgacggta 1800
tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tgggggtac agtgcagggg aaagaatagt 1860
agacataata gcaacagaca tacaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca 1920
aaattttata gatcacgaga ctagcctcga gaagcttgat atcgaattcc cacggggttg 1980
gacgcgtagt taagtgtctt aaatgactat gattaaaagg tcagaccca tccccagcta 2040
gcagtcatgc agctgtactt tgagggaagt ggggagaaaa aaatagtttt cagttagagt 2100
tctaaaacaa taggtggtga gaaggcacct gctttgaaat gctggtgcct tgtctgtggt 2160
cctgtctgcc cgcttctcc ttggcttctt agacttgcta aaccttgta cactctggca 2220
ggaagctctg agggctaaac caaaaaact aagtacattc aggacttcct gtgacagctc 2280
actgaggatt gaactacttt ttcctctgaa tctgagagtc ttttttcca gcaaccagag 2340
ttaattacta agggcaatga tgaatgaaac ctcatgcct cccaaaattc aaacacaaaa 2400
tccagctagg taacaattgc cacaggatct acccagtaga gagatgaggg ctctggccgg 2460
gcatggtggc tcgtgccagt aatcctaaca ctttgggagg ccaaagcagg tagatcacct 2520
tttcttggcc ctacctcaa aatatttcca gatctcccta gcctgcacac ctttgccacc 2580
tgtcattccc acttggaaca ggccagcagc ctccctggte tctctgacce tccccctgag 2640
ttcgttcacc aaaggcagta acggagacac cccctcaaca cacacaggaa gcagatggcc 2700
ttgacaccag cagggtgaca tccgtattg ctacttctct gctccccac agttcctctg 2760
gacttctctg gaccacagtc ctctgccaga cccctgccag accccagtec accgctagca 2820
ccggtgccgc caccatgcct ctgggcctgc tgtggctggg cctggccctg ctgggcgccc 2880
tgcacgcca ggccggcgtg caggtggaga caatctcccc aggcgacgga cgcacattcc 2940
ctaagcgggg ccagacctgc gttgtgcact atacaggcat gctggaggat ggcaagaagt 3000

```

```

ttgacagctc cccggataga aacaagccat tcaagtttat gctgggcaag caggaagtga 3060
tcagaggctg ggaggagggc gtggcccaga tgtctgtggg ccagagggcc aagctgacca 3120
tcagcccaga ctacgcctat ggagcaacag gccaccagg aatcatccca cctcacgcca 3180
ccctgggtgtt cgatgtggag ctgctgaagc tgggcgaggg atccaacaca tcaaaagaga 3240
accccttttct gttcgcattg gaggccgtag tcatactgtt tggatccatg ggacttatta 3300
tctccctgtt gtgtgtgtac ttctggctgg aacggactat gccaggatc cccacgtca 3360
agaatctgga agatctcgtc acagaatacc atggtaatth cagcgcctgg agcggagtct 3420
ctaagggtct ggccgaatcc ctccaacccg attattctga acggttgtgc ctctatccg 3480
aaataccacc aaaaggcggg gctctgggtg agggcccagg ggcgagtccg tgcaatcaac 3540
acagcccgtg ttgggcccct ccttggtata cgttgaagcc cgaaactgga agcggagcta 3600
ctaacttcag cctgctgaag caggtctggg acgtggaggga gaacctgga cctatggcac 3660
tgcccgtgac cgccctgctg ctgcctctgg ccctgctgct gcacgcagcc cggcctatcc 3720
tgtggcacga gatgtggcac gagggcctgg aggaggccag caggtgttat tttggcgagc 3780
gcaacgtgaa gggcatgttc gaggtgctgg agcctctgca cgccatgatg gagagaggcc 3840
cacagaccct gaaggagaca tcctttaacc aggcctatgg acgggacctg atggaggcac 3900
aggagtgggtg cagaaaagta atgaagtctg gcaatgtgaa ggacctgctg caggcctggg 3960
atctgtacta tcacgtgttt cggagaatct ccaagggcaa agacacgatt ccgtggcttg 4020
ggcatctgct cgttgggctg agtgggtgct ttggtttcat catcttggtc tatctcttga 4080
tcaattgcag aaatacaggc ccttggctga aaaaagtgtc caagtgtaat acccccgacc 4140
caagcaagtt cttctcccag ctttcttcag agcatggagg cgatgtgcag aaatggctct 4200
cttcaccttt tccctcctca agcttctccc cgggagggtt ggcgcccag atttcacctc 4260
ttgagggtact tgaacgagac aaggttacc aacttctct tcaacaggat aaggtaccgc 4320
aacctgcgag ccttagctcc aaccactctc ttacgagctg cttaccaat cagggatact 4380
tctttttcca ccttcccgat gcgctggaaa tcgaagcttg tcaagtttac tttacctatg 4440
atccatatag cgaggaagat cccgacgaag gactcgccgg tgcgcccacg ggttcctcac 4500
cccaacctct ccagcctctc tcaggagaag atgatgctta ttgcactttt cccagtagag 4560
acgatctcct cctcttttct ccatctcttt tgggggggacc ttccccccct tctacggcac 4620
ctggcgggtc tgggtgctggc gaggagcgga tgccgccgtc cctccaggag cgagtaccac 4680
gagattggga tccccagcca cttggacccc ccacccccgg cgtacctgac cttgtcgatt 4740
ttcaacctcc ccctgaattg gtgctgcgag aggctgggga ggaagttccg gacgtgggc 4800
cgagggaggg cgtgtccttt ccatggagta ggctccagg tcaaggcgag tttagggtct 4860
tcaacgcgcg gctgccgttg aatacagacg cttatctctc actgcaggaa ctgcaaggtc 4920
aggacccaac acatcttgta ggatctggtg ctactaatth ttctcttttg aagcaagctg 4980
gagatgttga agagaacccc ggtccggaga tgtggcatga gggctctgga gaagcgtctc 5040
gactgtactt tggtagcgcc aatgtgaagg gcatgtttga agtcctcgaa ccccttcattg 5100
ccatgatgga acgcggaccc cagaccttga aggagacaag ttttaaccaa gcttacggaa 5160
gagacctgat ggaagcccag gaatggtgca ggaaatacat gaaaagcggg aatgtgaagg 5220
acttgctcca agcgtgggac ctgtactatc atgtctttag gcgcattagt aagggcagcg 5280
gcgccaccaa cttcagcctg ctgaagcagg ccggcgacgt ggaggagaa cccggccccg 5340

```

gtgctggcgc aactggacgc gctatggatg gacctcgctt gctgcttctt ctgcttctcg 5400
 gggctctcttt ggggtgggtgct aaggaagcat gcccaacggg actttatacg catagcggag 5460
 agtggtgcaa agcttgtaac ctgggcgaag gcgtcgcgca accttggtgt gcaaatcaaa 5520
 ccgtctgcga gccatgtttg gactctgtta cgttttagtga cgtagtatct gcgacagagc 5580
 catgcaagcc ttgtacggaa tgtgtaggat tgcagagcat gtctgcccct tgtgtagaag 5640
 ccgacgatgc agtttgagg tgcgcgtatg gctattacca agacgaaaca accggacgat 5700
 gtgaagccttg ccgagtttgt gaagcgggtt ccgggcttgt attctcctgt caggataagc 5760
 agaacaccgt ctgcgaagag tgccccgatg gtacctacag cgatgaagcg aaccatgtag 5820
 acccatgcct gccttgaccc gtttgtgaag acacggaacg acagttgcgg gaatgtaccc 5880
 ggtgggcaga cgccgagtgc gaagagattc caggccgctg gatcacgca agtaccgccg 5940
 cagaaggttc cgacagtact gcaccaagca cccaagaacc agaggcgccc ccgagcagg 6000
 acctgattgc ctccaccgtg gcgggtgttg ttactacggt tatgggctca tcccagcccc 6060
 ttgttaccgc aggaactaca gacaacctga ttccggtata ttgttctatc ttggcggctg 6120
 tagtagttgg ctgtgtcgcg tacatcgctt tcaaaagatg aactagtgtc gacaatcaac 6180
 ctctggatta caaaatttgt gaaagattga ctggtattct taactatgtt gctcctttta 6240
 cgctatgtgg atacgtgct ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc cgtatggctt 6300
 tcattttctc ctcttgtat aaatcctggt tgctgtctct ttatgaggag ttgtggcccc 6360
 ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgactg tgtttgtga cgcaaccccc actggttggg 6420
 gcattgccac cacctgtcag ctcttttccg ggactttcgc tttccccctc cctattgcc 6480
 cggcggaaact catcgccgc tgcttggcc gctgctggac aggggctcgg ctgttgggca 6540
 ctgacaattc cgtgggtgtg tcggggaagc tgacgtcctt tccatggctg ctgcctgtg 6600
 ttgccacctg gattctgcgc gggacgtcct tctgctacgt cccttcggcc ctcaatccag 6660
 cggaccttcc ttcccgcggc ctgctgccgg ctctgccggc tcttcgcgt cttegccttc 6720
 gccctcagac gagtcggatc tccctttggg ccgcctcccc gcctggaatt cgagctcgg 6780
 acctttaaga ccaatgactt acaaggcagc tgtagatctt agccactttt taaaagaaaa 6840
 ggggggactg gaagggctaa ttcactccca acgaagacaa gatctgcttt ttgcttgtag 6900
 tgggtctctc tgggttagacc agatctgagc ctgggagctc tctggctaac tagggaaccc 6960
 actgcttaag cctcaataaa gcttgcttg agtgcttcaa gtagtgtgtg cccgtctgtt 7020
 gtgtgactct ggtaactaga gatccctcag acccttttag tcagtgtgga aaatctctag 7080
 cagtagtagt tcatgtcatc ttattattca gtatttataa cttgcaaaga aatgaatata 7140
 agagagttag aggaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat 7200
 cacaaatttc acaataaaag ctttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact 7260
 catcaatgta tcttatcatg tctggtctta gctatccgc ccctaactcc gccagttcc 7320
 gccattctc cgcccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaggccgc 7380
 tcggcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct aggcctttgc 7440
 gtcgagacgt acccaattcg ccctatagt agtcgtatta cgcgcgctca ctggccgtcg 7500
 ttttacaacg tcgtgactgg gaaaacctg gcgttacc 7560
 atccccctt cgccagctgg cgtaatagc aagaggccc caccgatcg ccttcccaac 7620
 agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgc acgcgcctg tagcggcgca ttaagcgcg 7680

cgggtgtggt gggttacgcg agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgccccgctc 7740
 ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa 7800
 atcgggggct ccctttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac 7860
 ttgattaggg tgatgggtca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt 7920
 tgacgttgga gtccacgttc tttaatagt gactcttggt ccaaactgga acaaacactca 7980
 accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggtttt gccgatttcg gcctattggt 8040
 taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta 8100
 caatttccca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt 8160
 ctaaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata 8220
 atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt 8280
 tgcggcattt tgcccttctg tttttgtca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 8340
 tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtgaagat 8400
 ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgat agcactttta aagttctgct 8460
 atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 8520
 ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 8580
 catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataacctat agtgataaca ctgcggccaa 8640
 cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 8700
 ggatcatgta actcgccctg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 8760
 cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 8820
 cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 8880
 tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 8940
 agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 9000
 ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 9060
 gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtta ctgtcagacc aagtttactc 9120
 atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 9180
 cttttttgat aatctcatga ccaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 9240
 agacccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg 9300
 ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgtacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 9360
 accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 9420
 tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 9480
 cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 9540
 gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc 9600
 gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 9660
 gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 9720
 cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 9780
 tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 9840
 ggggctggag ctatggaaaa acgccagcaa cgcgcccttt ttacggttcc tggccttttg 9900
 ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat 9960
 taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc 10020

agtgagcgag gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc 10080
 gattcattaa tgcagctggc acgacagggt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa 10140
 cgcaattaat gtgagttagc tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc 10200
 ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga 10260
 ccatgattac gccaaagcgc caattaaccc tcactaaagg gaacaaaagc tggagctgca 10320

<210> 11

<211> 10949

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 慢病毒载体vivo-TIL 109 - hPerfP

<400> 11

agcttaatgt agtcttatgc aatactcttg tagtcttgca acatggtaac gatgagttag 60
 caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc gattggtgga agtaaggtgg 120
 tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga catggattgg acgaaccact 180
 gaattgccgc attgcagaga tattgtattt aagtgcctag ctcgatacaa taaacgggtc 240
 tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300
 taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagt tggaaaatct ctagcagtgg 420
 cgcccgaaca gggacttgaa agcgaaagg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
 cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggc gagggcgccg gactggtgag tacgcaaaa 540
 attttgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg 600
 gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cggttaaggc cagggggaaa gaaaaaatat 660
 aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc 720
 ctgttagaaa catcagaagg ctgtagaca atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
 acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
 caaaggatag agataaaaaga caccaaggaa gcttagaca agatagagga agagcaaac 900
 aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
 gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
 agtagcacc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
 aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcctcaat 1140
 gacgtgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
 gctgagggtc attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
 gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat 1320
 ttgggggttg tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttggag 1380
 taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcactgg atggagtggg acagagaaat 1440
 taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaac accagcaaaaa 1500
 gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
 aacaaattgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620

aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
atcgttttcag acccacctcc caaccccgag gggacccgac aggcccgaag gaatagaaga 1740
agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctcgacggta 1800
tcgggttaact tttaaaagaa aaggggggat tgggggggtac agtgcagggg aaagaatagt 1860
agacataata gcaacagaca tacaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca 1920
aaatttttatc gatcacgaga ctagcctcga gaagcttgat atcgaattcc cacgggggttg 1980
gacgcgtagt tccaaagtcc tctctttgat tttataggtg aggaaactaa cgctcagaaa 2040
gggggttgat atctatcgcc gtgaggcata cggttaagttt ctggtgaagc tgggatcaga 2100
acctgttttag actttgcctc tcttttcccg cagatacttt gcaggacttc tatgtccctc 2160
aaaccggcct tcctgtcatg gtcaggaaag aaactcctca cagcctcagc atccaagtca 2220
ggccatgggt gacagctgga aagtgatcag gaggtgcag tttctagaag aggggtgggga 2280
cactgcggag agaagatggg gccagattcc gagaagacag cataagcccc tgttcctgta 2340
agagcaggga cggaagcagg gacataaacg caagggatga gcccacaaagt gtgacccatg 2400
agacatgatg tcacatgtgg tctggagcct gcggccactt cttcccatca tatacacagt 2460
tatgagaaca agttgtgaga accacctcct cccttaccga gctgccccca cccagaagc 2520
cgtgtgattt tgccccccag tgccctgtga gtcactccac ccatggaaac ctcacccac 2580
cctgacctca agcaaggcag agtgcagaag acatgtcctc cggtgctacc agaccactct 2640
caccagcacc cacgacctca gcagggtgag agccagcgtg gaggccactg gctgtcctca 2700
caaagcgagg agcaggagcc cctgttcgag gaacatgctt ggagttcgga gcctgggcta 2760
gggtgggatg taggttgagc aggaagtga tggcaagatt agagcaacat ctctcttctc 2820
ccactcaggg aggagggaat ggccacaggc tctgacactc aagaagggcc aggcacagtt 2880
ccaagcactt cacaacaacc cctaggttct acatgaccta caatcccaat tgttcagtga 2940
agaaactgag gcacagtgag gctgaagaac cctaccagtc cacactgctg gtgcataacc 3000
gagctgcccc agccccggcg gtctggcgtg taggccccatg ctctgagccg ccgcctctgc 3060
ttgcctctta catcccacac atgcgatgct gtgcatcaga agcaaggaga tggccctgct 3120
ggcctgttca tcaacaccag ggccgagtct caaagtctc agcgccccgc cctcctccgc 3180
ctgtgtgccc tgagtccccg agccccagca gctctactcg gcagatgagc ctctggccct 3240
gctgctcgct tcctgagggc tgtcagtggg gagccggatg agggctgagg acagggtggg 3300
tgcttgtggg aggggagagc acaaaggacc tgtgaccaca gctgggggagc gggcaggaag 3360
tagaagtgat gtgagtgggt gctgggtgcaa ggagccacag tgggctgcct ggggggctga 3420
tgccacgcta gcaccggtcc tgcaggggccg ccacatgcc tctgggcctg ctgtggctgg 3480
gcctggccct gctgggagcc ctgcacgccc aggcggcggt gcagggtggag acaatctccc 3540
caggcgacgg acgcacattc cctaagcggg gccagacctg cgttgtgcac tatacaggca 3600
tgctggagga tggcaagaag tttgacagct cccgggatag aaacaagcca ttcaagttta 3660
tgctgggcaa gcagggaagt atcagaggct gggaggaggc cgtggcccag atgtctgtgg 3720
gccagagggc caagctgacc atcagcccag actacgcta tggagcaaca ggccaccag 3780
gaatcatccc acctcacgcc accctggtgt tcgatgtgga gctgctgaag ctgggcgagg 3840
gatccaacac atcaaaagag aacccctttc tgttcgcatt ggaggccgta gtcatactctg 3900
ttggatccat gggacttatt atctccctgt tgtgtgtgta cttctggctg gaacggacta 3960

```

tgcccaggat ccccacgctc aagaatctgg aagatctcgt cacagaatac catggtaatt 4020
tcagcgccctg gagcggagtc tctaagggtc tggccgaatc cctccaaccc gattattctg 4080
aacggttgtg cctcgtatcc gaaataccac caaaaggcgg ggctctgggt gagggcccag 4140
gggcgagtcc gtgcaatcaa cacagcccgt attgggcccc tccttggtat acgttgaagc 4200
ccgaaactgg aagcggagct actaacttca gcctgctgaa gcaggctgga gacgtggagg 4260
agaaccctgg acctatggca ctgcccgtga ccgccctgct gctgcctctg gccctgctgc 4320
tgcacgcagc ccggcctatc ctgtggcacg agatgtggca cgagggcctg gaggaggcca 4380
gcaggctgta ttttggcgag cgcaacgtga agggcatgtt cgagggtctg gacgctctgc 4440
acgccatgat ggagagaggc ccacagaccc tgaaggagac atcctttaac caggcctatg 4500
gacgggacct gatggaggca caggagtggg gcagaaagta catgaagtct ggcaatgtga 4560
aggacctgct gcaggcctgg gatctgtact atcacgtgtt tcggagaatc tccaagggca 4620
aagacacgat tccgtggctt gggcatctgc tcgttgggct gagtgggtgcg tttggtttca 4680
tcactttggg ctatctcttg atcaattgca gaaatacagg cccttggtg aaaaaagtgc 4740
tcaagtgtaa taccctcgac ccaagcaagt tcttctccca gctttcttca gagcatggag 4800
gcatgtgca gaaatggctc tcttcacctt ttccctctc aagcttctcc ccgggagggc 4860
tggcgcccgga gatttcacct cttgaggtac ttgaacgaga caaggttacc caacttctcc 4920
ttcaacagga taaggtaccc gaacctgcga gccttagctc caaccactct cttacagact 4980
gcttcaccaa tcagggatac ttctttttcc accttcccga tgcgctggaa atcgaagctt 5040
gtcaagttta ctttacctat gatccatata gcgaggaaga tcccgacgaa ggagtcgccg 5100
gtgcgcccac gggttcctca cccaacctc tccagcctct ctcaggagaa gatgatgctt 5160
attgcacttt tcccagtaga gacgatctcc tctcttttc tccatctctt ttggggggac 5220
cttccccccc ttctacggca cctggcgggt ctggtgctgg cgaggagcgg atgccgccgt 5280
ccctccagga gcgagtacca cgagattggg atccccagcc acttggaacc cccacccccg 5340
gcgtacctga ccttgtcgat tttcaacctc ccctgaatt ggtgctgcga gaggctgggg 5400
aggaagttcc ggacgtggg ccgaggggagg gcgtgtcctt tccatggagt aggcctccag 5460
gtcaaggcga gtttagggct ctcaacgcgc ggctgccgtt gaatacagac gcttatctct 5520
cactgcagga actgcaaggt caggaccaa cacatcttgt aggatctggt gctactaatt 5580
tttctctttt gaagcaagct ggagatgttg aagagaacct cgggtccggag atgtggcatg 5640
agggctctgga agaagcgtct cgactgtact ttggtgagcg caatgtgaag ggcattgttg 5700
aagtcctcga accccttcat gccatgatgg aacgcggacc ccagaccttg aaggagacaa 5760
gttttaacca agcttacgga agagacctga tggaagccca ggaatggtgc aggaaataca 5820
tgaaaagcgg gaatgtgaag gacttgctcc aagcgtggga cctgtactat catgtcttta 5880
ggcgcattag taagggcagc ggcgccacca acttcagcct gctgaagcag gccggcgacg 5940
tgaggagaaa ccccgcccc ggtgctggcg caactggacg cgctatggat ggacctcgct 6000
tgctgcttct tctgcttctc ggggtctctt tgggtggtgc taaggaagca tgcccaacgg 6060
gactttatac gcatagcgga gagtgttgca aagcttgtaa cctgggcgaa ggcgtcgcgc 6120
aaccttgtgg tgcaaatcaa accgtctgcg agccatgttt ggactctgtt acgttttagtg 6180
acgtagtatc tgcgacagag ccatgcaagc cttgtacgga atgtgtagga ttgcagagca 6240
tgtctgcccc ttgtgtagaa gccgacgatg cagtttgcag gtgcgcgtat ggctattacc 6300

```

aagacgaaac aaccggacga tgtgaagctt gccgagtttg tgaagcgggt tccgggcttg 6360
tattctcctg tcaggataag cagaacaccg tctgcgaaga gtgccccgat ggtacctaca 6420
gcgatgaagc gaacatgta gacccatgcc tgccttgac cgtttgtgaa gacacggaac 6480
gacagttgcg ggaatgtacc cgggtgggcag acgccgagtg cgaagagatt ccaggccgct 6540
ggatcacgcg aagtaccccc ccagaagggt cgcacagtac tgcaccaagc acccaagaac 6600
cagaggcgcc ccccgagcag gacctgattg cctccaccgt ggcgggtgtt gttactacgg 6660
ttatgggctc atcccagccc gttgttacc gaggaactac agacaacctg attccggtat 6720
attgttctat cttggcggtg gtagtagttg gcttggtcgc gtacatcgct ttcaaaagat 6780
gaacgccggc gctagtgtcg acaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac 6840
tggtattctt aactatgttg ctctttttac gctatgtgga tacgctgctt taatgccttt 6900
gtatcatgct attgcttccc gtatggcttt cattttctcc tccttgata aatcctggtt 6960
gctgtctctt tatgaggagt tgtggcccgt tgcaggcaa cgtggcgtgg tgtgactgt 7020
gtttgctgac gcaaccccc ctggttgggg cattgccacc acctgtcagc tcctttccgg 7080
gactttcgct tccccctcc ctattgccac ggcggaactc atcgccgct gccttgccc 7140
ctgctggaca ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc gtggtgttgt cggggaagct 7200
gacgtccttt ccatggctgc tcgcctgtgt tgccacctgg attctgcgcg ggacgtcctt 7260
ctgctacgtc ctttcggccc tcaatccagc ggaccttct tcccgcggcc tgctgccggc 7320
tctgcggcct cttccgcgc ttcgccttcg cctcagacg agtcggatct ccctttgggc 7380
cgctccccg cctggaattc gagctcggtc ctttaagac caatgactta caaggcagct 7440
gtagatctta gccacttttt aaaagaaaag gggggactgg aagggtaat tcaactccaa 7500
cgaagacaag atctgctttt tgctgtact ggtctctct gttagacca gatctgagcc 7560
tgaggactct ctggctaact agggaaacca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga 7620
gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgtt gtgactctg gtaactagag atccctcaga 7680
cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc agtagtagtt catgtcatct tattattcag 7740
tatttataac ttgcaaagaa atgaatatca gagagtgaga ggaacttggt tattgcagct 7800
tataatgggt acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca 7860
ctgcattcta gttgtggtt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctggctctag 7920
ctatcccgcc cctaactccg ccagttccg ccattctcc gcccattggc tgactaattt 7980
tttttattta tgcagaggcc gaggcgcct cggcctctga gctattccag aagtagtgag 8040
gaggcttttt tggaggccta ggcttttgcg tcgagacgta cccaattcgc cctatagtga 8100
gtcgtattac gcgcgtcac tggccgtcgt ttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 8160
cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga 8220
agaggccgc accgatcgcc cttccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcga 8280
cgcgccctgt agcggcgcat taagcgcggc ggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc 8340
tacacttgcc agcgcctag cgccgctcc tttcgcttcc ttcccttctt ttctcgccac 8400
gttcgcccgc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cttttagggt tccgatttag 8460
tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggcc 8520
atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttgag tccacgttct ttaatagtgg 8580
actcttgctc caaactggaa caacactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata 8640

```

agggatTTTtg cCGatttcgG cctattggTt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa 8700
cgCGaattttt aacaaaatat taacgtttac aatttccag gtggcacttt tcggggaaat 8760
gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 8820
agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa 8880
catttccgtg tcgcccTtat tccctTTTTt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac 8940
ccagaaacgc tggTgaaaGt aaaagatgct gaagatcagT tgggtgcacg agtgggttac 9000
atcgaactgg atctcaacag cggtAagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt 9060
ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgG tattatcccg tattgacgcc 9120
gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca 9180
ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgcc 9240
ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgG aggaccgaag 9300
gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa 9360
ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg 9420
gcaacaacgt tgcgcaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 9480
ttaatagact ggatggagGc ggataaaGtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg 9540
gctggctggT ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 9600
gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 9660
caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag 9720
cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 9780
ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 9840
taacgtgagt tttcgTtcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct 9900
tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca 9960
gcggTggTtt gTttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc 10020
agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 10080
aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct 10140
gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 10200
gcgcagcggT cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc 10260
tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggG 10320
agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggag 10380
cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 10440
gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggG gggcgagcc tatggaaaaa cgccagcaac 10500
gcggcctttt tacggttcct ggccTTTTgc tggcTTTTg ctacatgtt ctttctgcg 10560
ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcTTTTg agtgagctga taccgctcg 10620
cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata 10680
cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt 10740
cccactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag 10800
gcaccccagg ctttacactt tatgttccg gctcgatgt tgtgtggaat tgtgagcgga 10860
taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagcgcgc aattaaccct 10920
cactaaaggG aacaaaagct ggagctgca 10949

```

<210> 12

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> RACCR- β - FKBP-IL2R β 融合蛋白,其中信号肽具有2A肽

<400> 12

```

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1           5           10           15
His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
          20           25           30
Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
          35           40           45
Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
          50           55           60
Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
65           70           75           80
Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
          85           90           95
Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
          100          105          110
Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
          115          120          125
Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
          130          135          140
Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
145          150          155          160
Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
          165          170          175
Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
          180          185          190
Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
          195          200          205
Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
          210          215          220
Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
225          230          235          240
Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
          245          250          255

```

Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu			
260	265	270	
Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro			
275	280	285	
Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp			
290	295	300	
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser			
305	310	315	320
Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser			
325	330	335	
Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro			
340	345	350	
Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu			
355	360	365	
Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg			
370	375	380	
Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe			
385	390	395	400
Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser			
405	410	415	
Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val Gly Ser Gly			
420	425	430	
Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn			
435	440	445	
Pro Gly			
450			
<210> 13			
<211> 89			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial sequence)			
<220>			
<223> FKBP结构域			
<400> 13			
Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala			
20	25	30	
Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln			
35	40	45	

Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr
 50 55 60
 Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr
 65 70 75 80
 Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys
 85

<210> 14

<211> 315

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> IL2Rb结构域

<400> 14

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

Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln
 210 215 220
 Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr
 225 230 235 240
 Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu Leu Val
 245 250 255
 Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg Glu Gly
 260 265 270
 Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala
 275 280 285
 Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln
 290 295 300
 Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
 305 310 315

<210> 15

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> RACCR- γ - FRB-IL2Rg融合蛋白,其中信号肽具有2A肽

<400> 15

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu
 1 5 10 15
 His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly
 20 25 30
 Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
 35 40 45
 Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys
 50 55 60
 Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
 65 70 75 80
 Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
 100 105 110
 Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu
 115 120 125
 Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala
 130 135 140

Val	Val	Ile	Ser	Val	Gly	Ser	Met	Gly	Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Leu	Cys
145					150				155						160
Val	Tyr	Phe	Trp	Leu	Glu	Arg	Thr	Met	Pro	Arg	Ile	Pro	Thr	Leu	Lys
				165					170						175
Asn	Leu	Glu	Asp	Leu	Val	Thr	Glu	Tyr	His	Gly	Asn	Phe	Ser	Ala	Trp
			180						185					190	
Ser	Gly	Val	Ser	Lys	Gly	Leu	Ala	Glu	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Tyr	Ser
		195					200						205		
Glu	Arg	Leu	Cys	Leu	Val	Ser	Glu	Ile	Pro	Pro	Lys	Gly	Gly	Ala	Leu
		210					215					220			
Gly	Glu	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	Cys	Asn	Gln	His	Ser	Pro	Tyr	Trp
225					230					235					240
Ala	Pro	Pro	Cys	Tyr	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Thr	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr
				245					250						255
Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly
			260						265					270	

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> FRB结构域

<400> 16

Gly	Val	Gln	Val	Glu	Thr	Ile	Ser	Pro	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Phe	Pro
1			5						10					15	
Lys	Arg	Gly	Gln	Thr	Cys	Val	Val	His	Tyr	Thr	Gly	Met	Leu	Glu	Asp
			20					25					30		
Gly	Lys	Lys	Phe	Asp	Ser	Ser	Arg	Asp	Arg	Asn	Lys	Pro	Phe	Lys	Phe
		35					40					45			
Met	Leu	Gly	Lys	Gln	Glu	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Glu	Glu	Gly	Val	Ala
		50					55				60				
Gln	Met	Ser	Val	Gly	Gln	Arg	Ala	Lys	Leu	Thr	Ile	Ser	Pro	Asp	Tyr
65				70						75					80
Ala	Tyr	Gly	Ala	Thr	Gly	His	Pro	Gly	Ile	Ile	Pro	Pro	His	Ala	Thr
				85					90					95	
Leu	Val	Phe	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Lys	Leu	Gly	Glu				
			100						105						

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> IL2Rg结构域

<400> 17

Gly	Ser	Asn	Thr	Ser	Lys	Glu	Asn	Pro	Phe	Leu	Phe	Ala	Leu	Glu	Ala
1				5					10					15	
Val	Val	Ile	Ser	Val	Gly	Ser	Met	Gly	Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Leu	Cys
				20				25						30	
Val	Tyr	Phe	Trp	Leu	Glu	Arg	Thr	Met	Pro	Arg	Ile	Pro	Thr	Leu	Lys
				35				40						45	
Asn	Leu	Glu	Asp	Leu	Val	Thr	Glu	Tyr	His	Gly	Asn	Phe	Ser	Ala	Trp
				50				55						60	
Ser	Gly	Val	Ser	Lys	Gly	Leu	Ala	Glu	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Tyr	Ser
65					70					75					80
Glu	Arg	Leu	Cys	Leu	Val	Ser	Glu	Ile	Pro	Pro	Lys	Gly	Gly	Ala	Leu
					85					90					95
Gly	Glu	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	Cys	Asn	Gln	His	Ser	Pro	Tyr	Trp
					100					105					110
Ala	Pro	Pro	Cys	Tyr	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Thr					
					115					120					

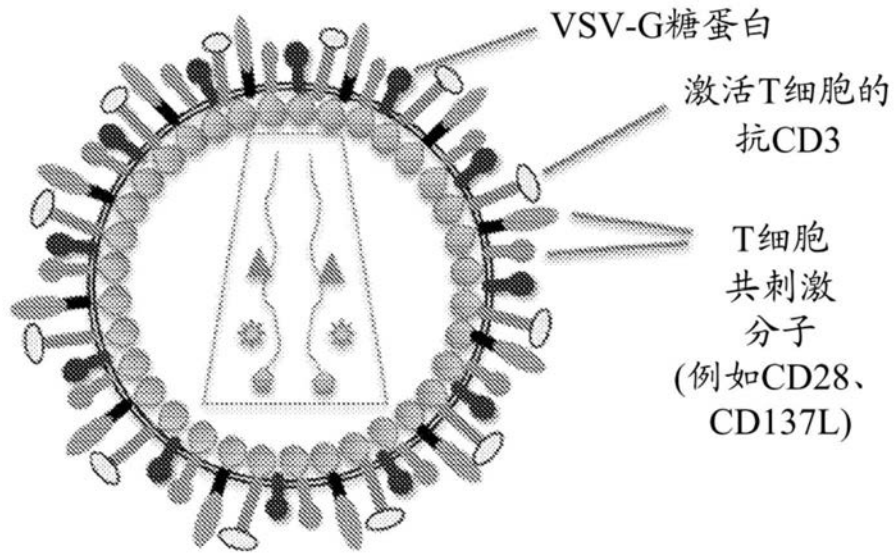


图1A

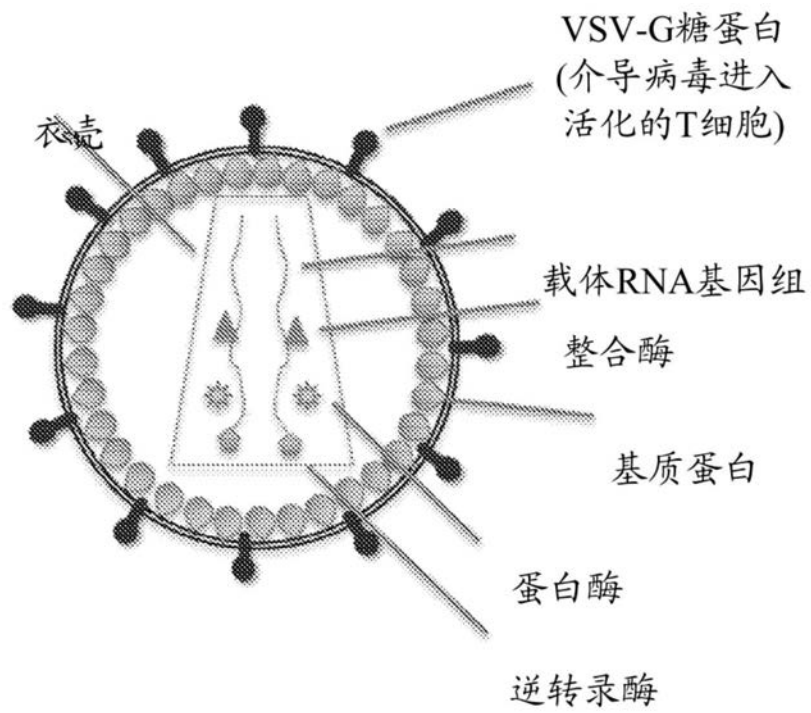


图1B

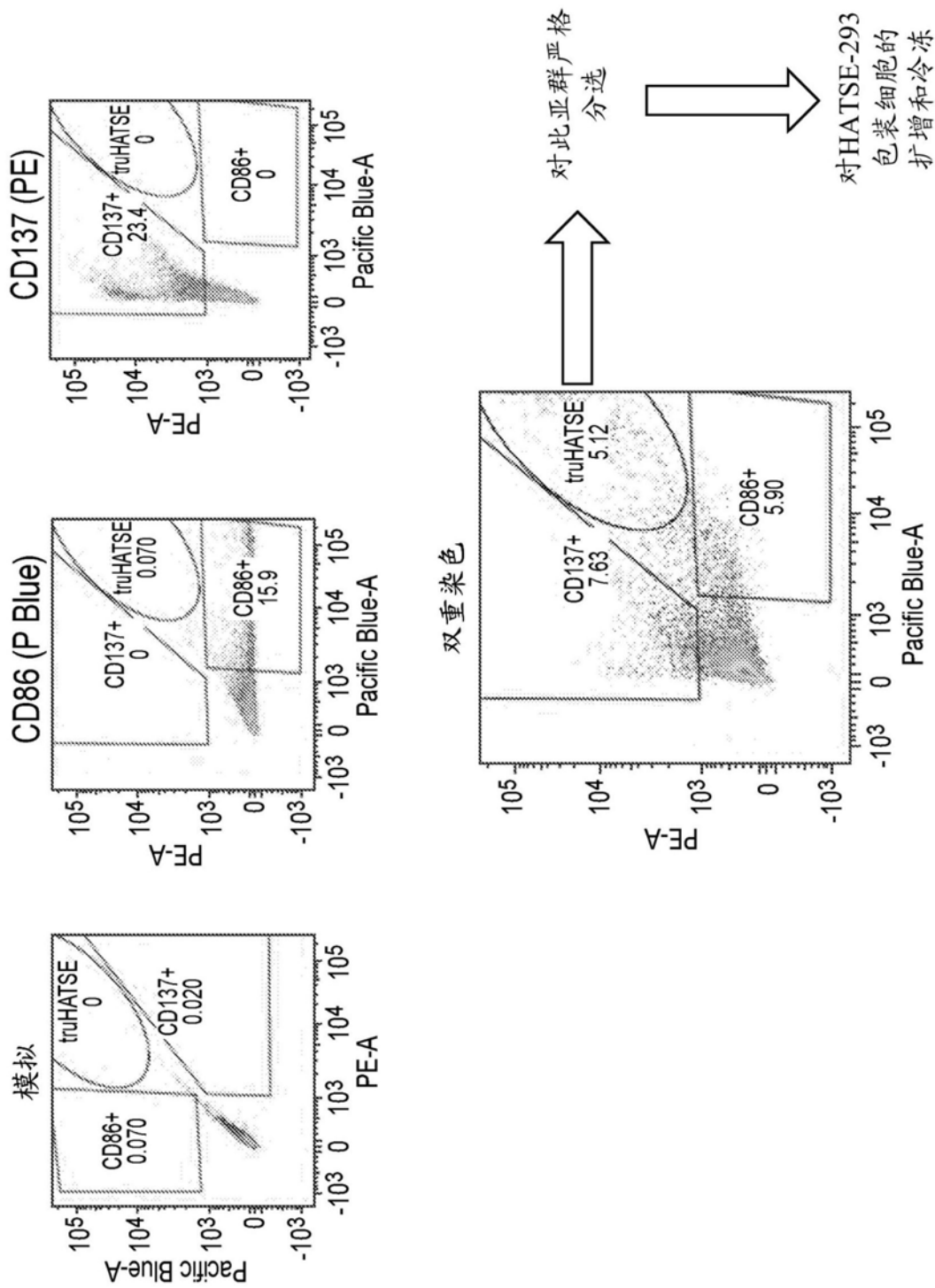


图2

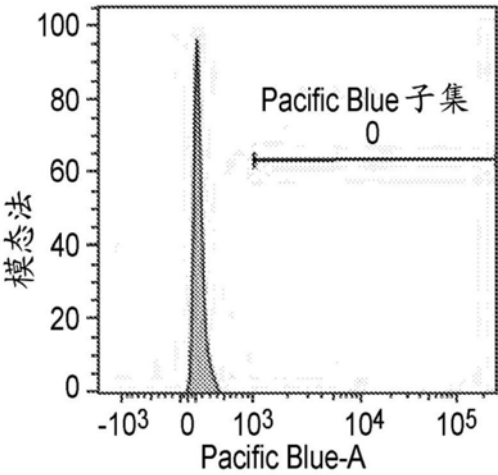


图3A

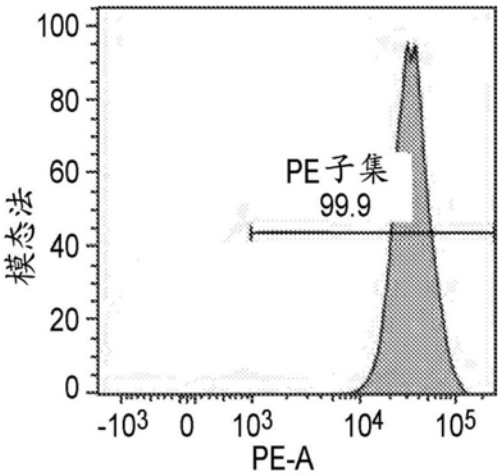


图3B

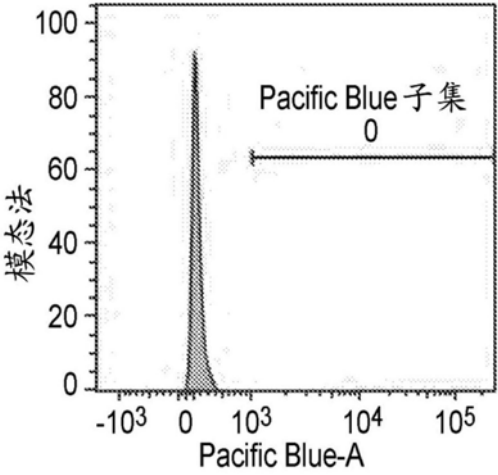


图3C

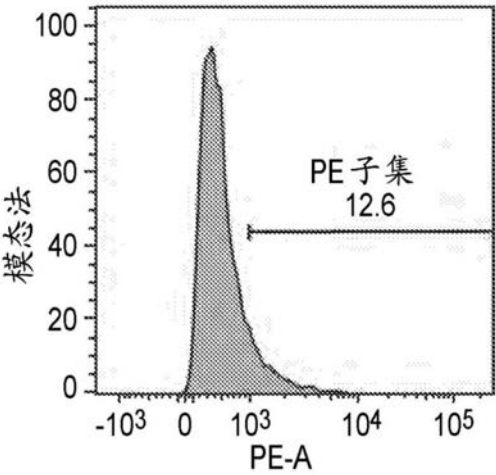


图3D

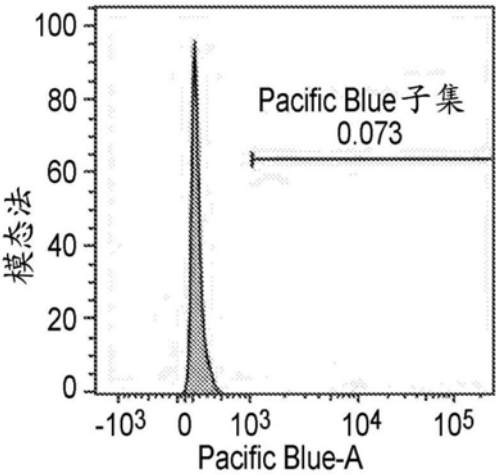


图3E

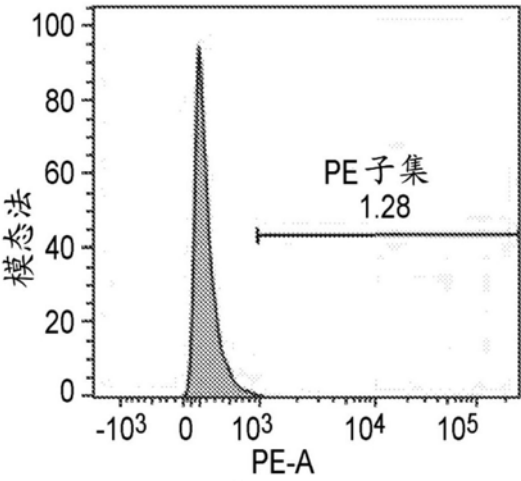


图3F

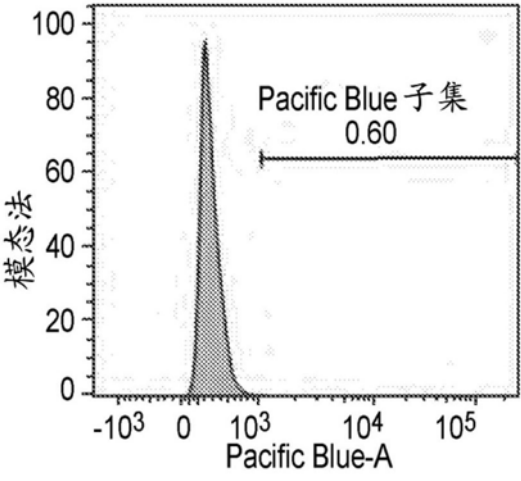


图3G

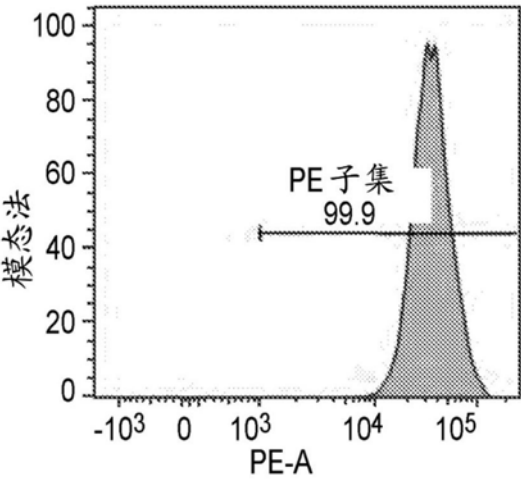


图3H

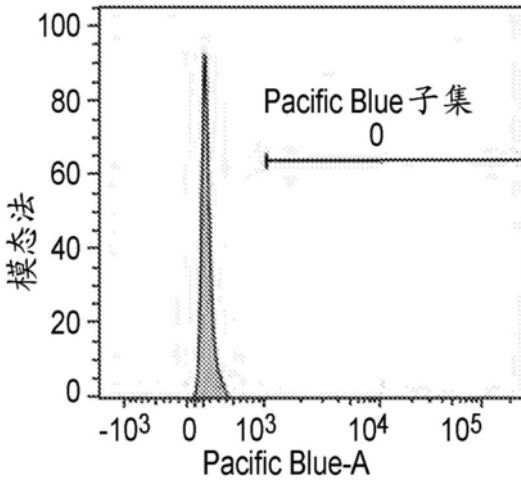


图3I

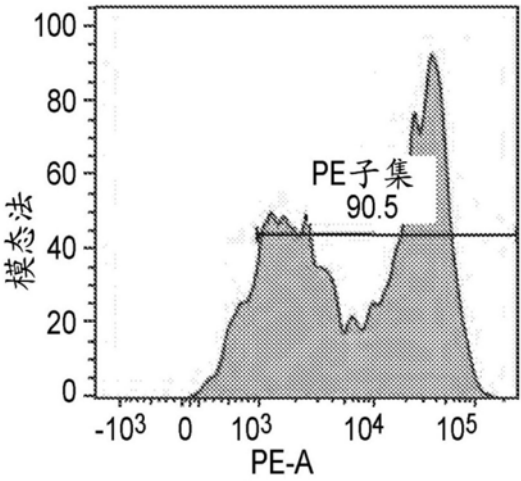


图3J

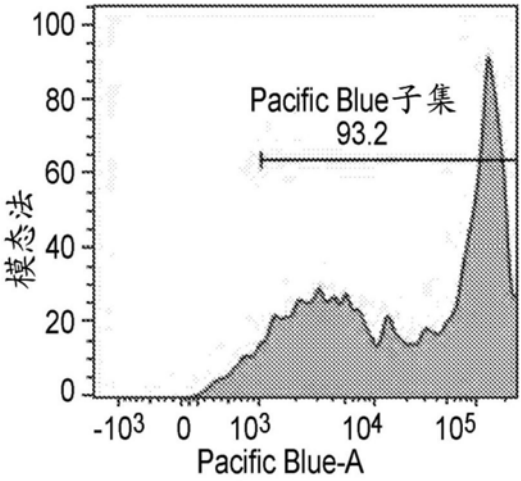


图3K

转导的T细胞生长

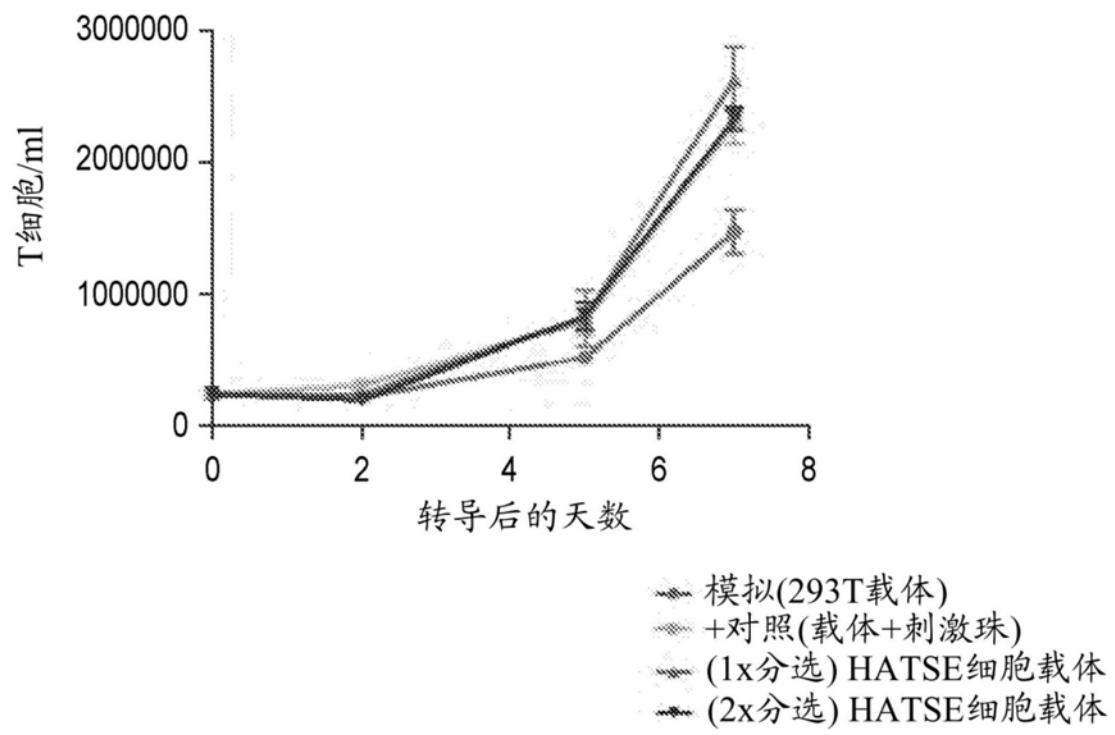


图4

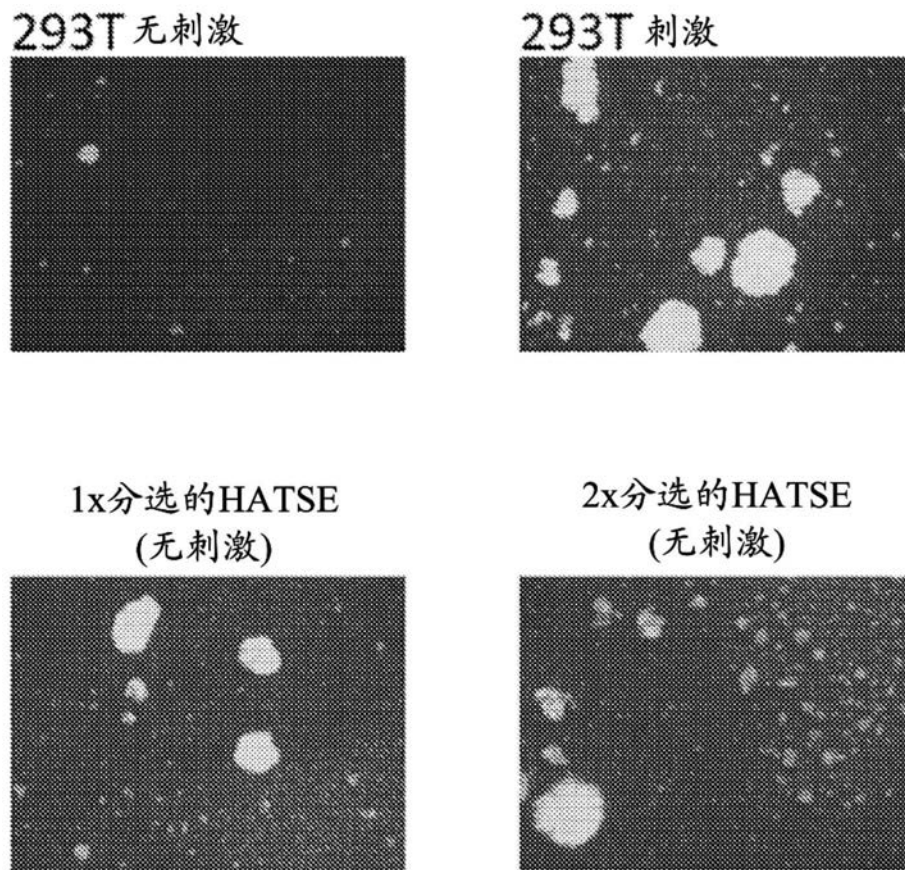


图5

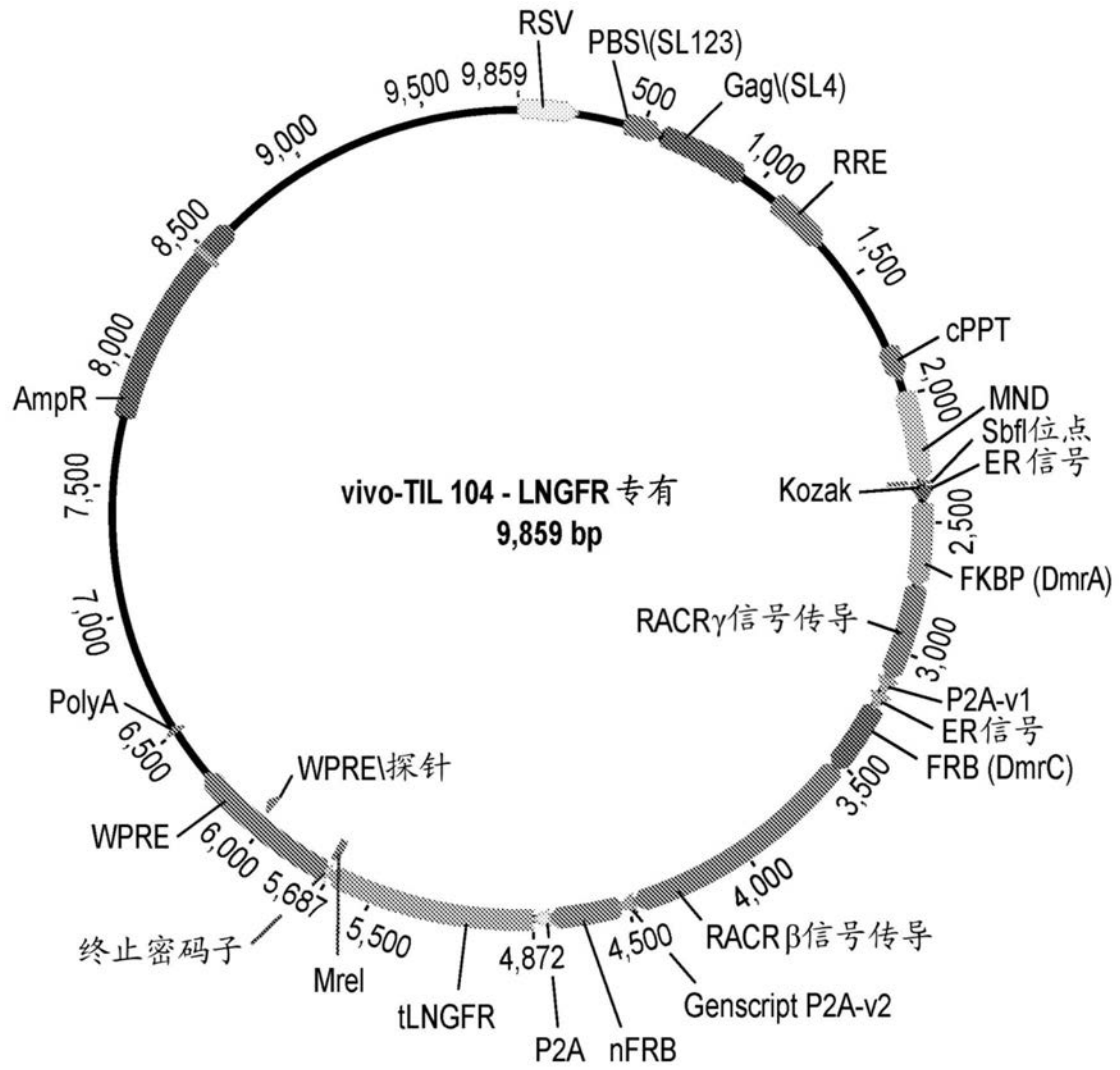


图6

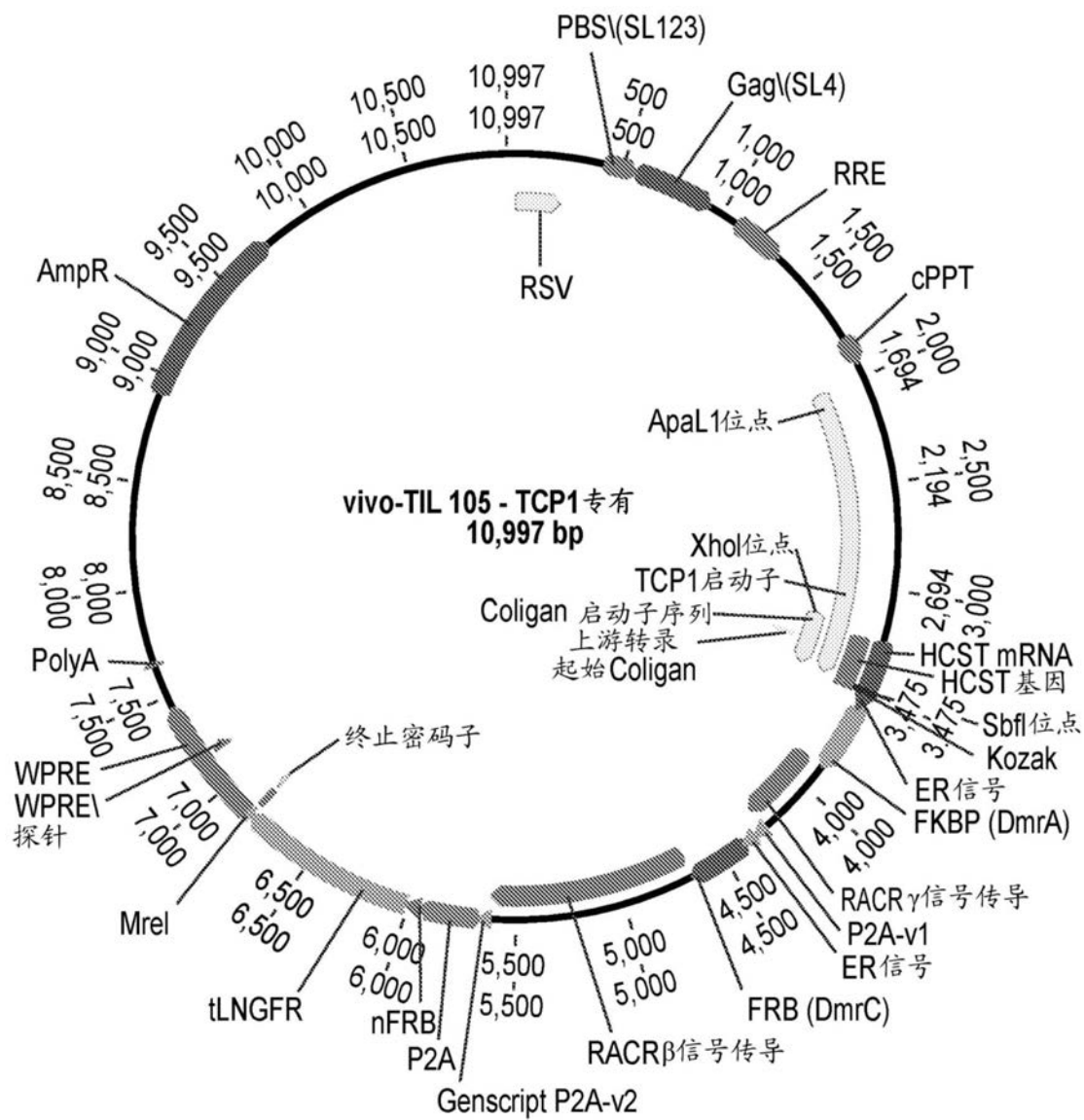


图7

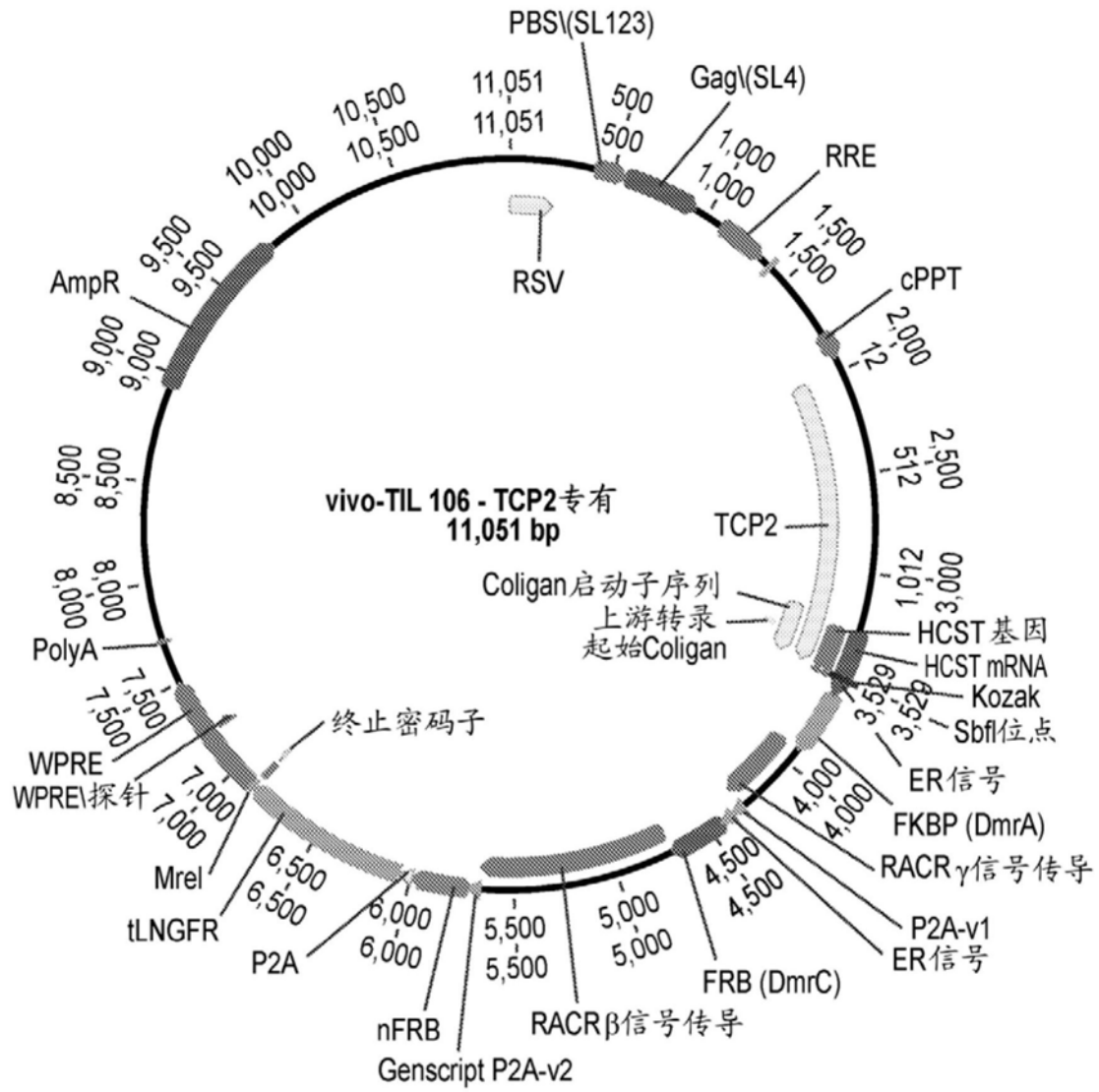


图8

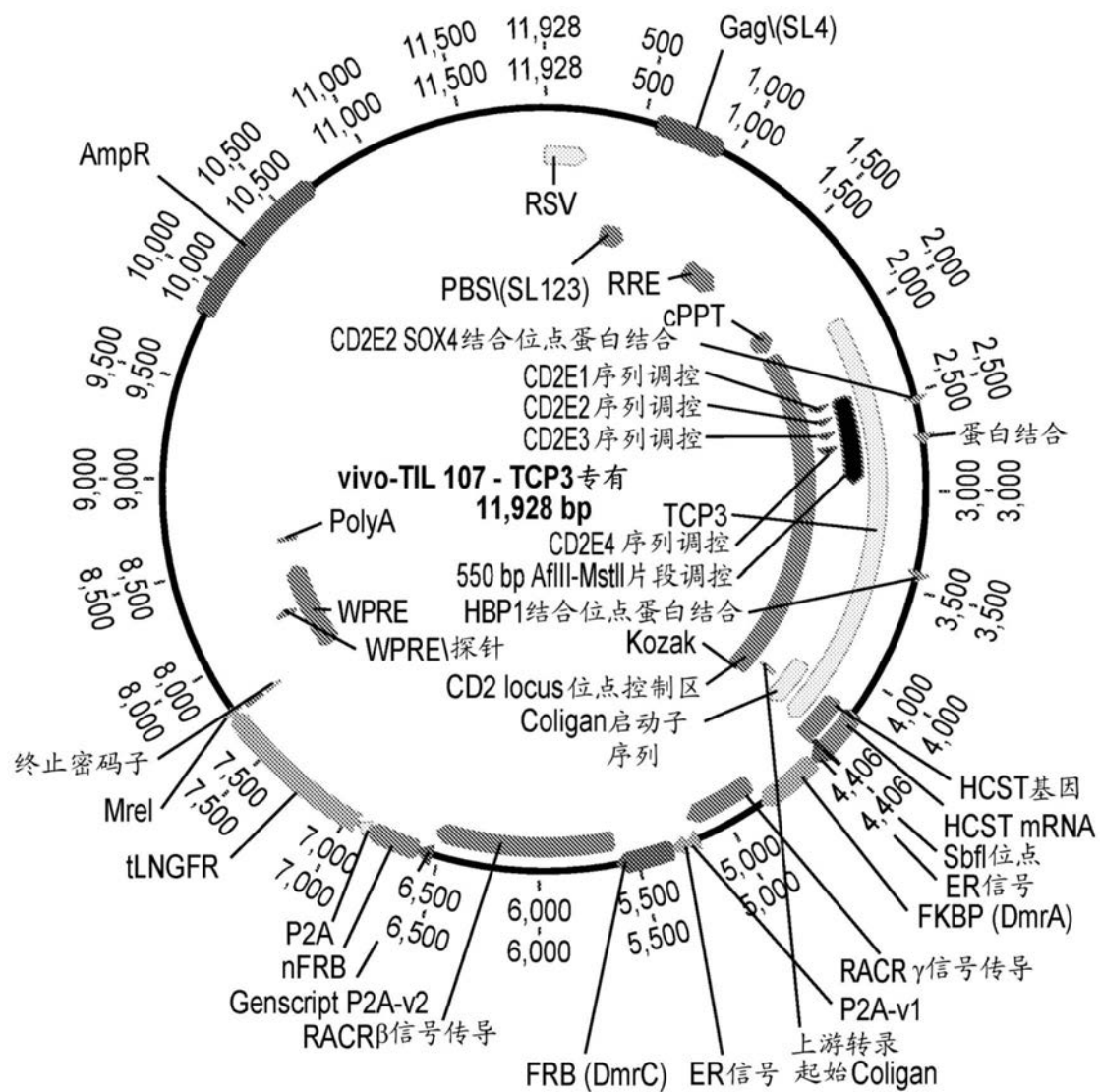


图9

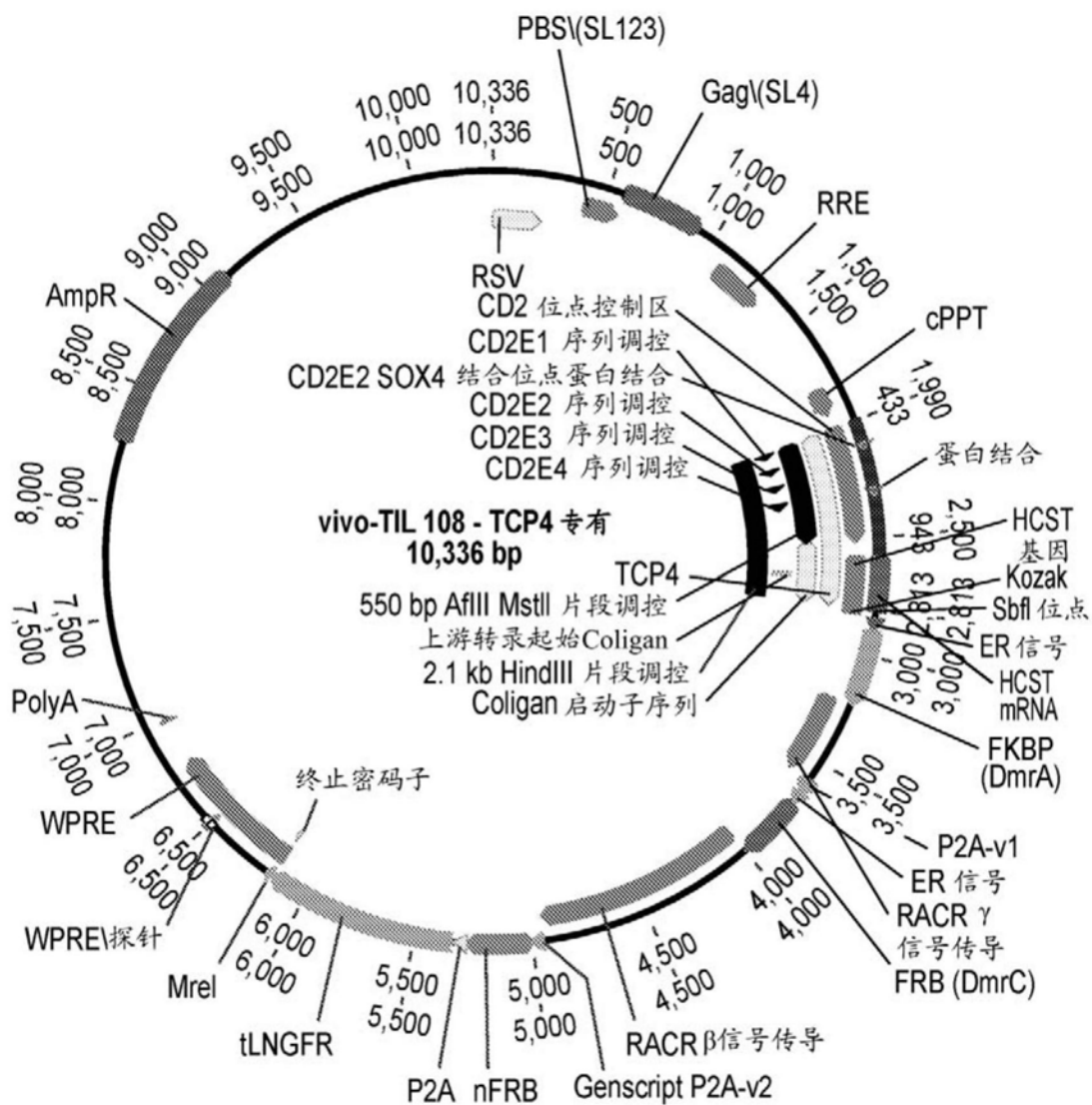


图10

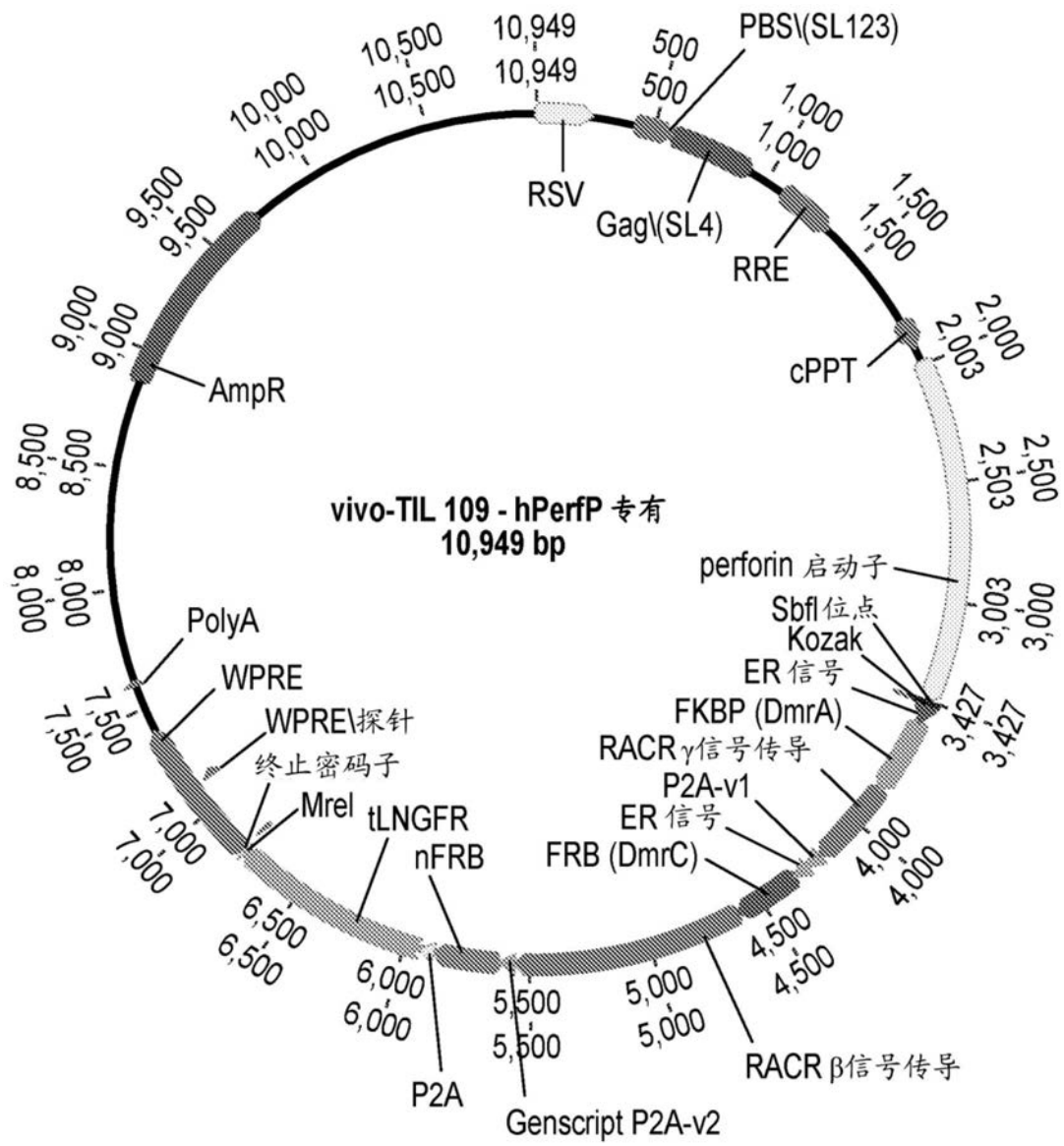


图11

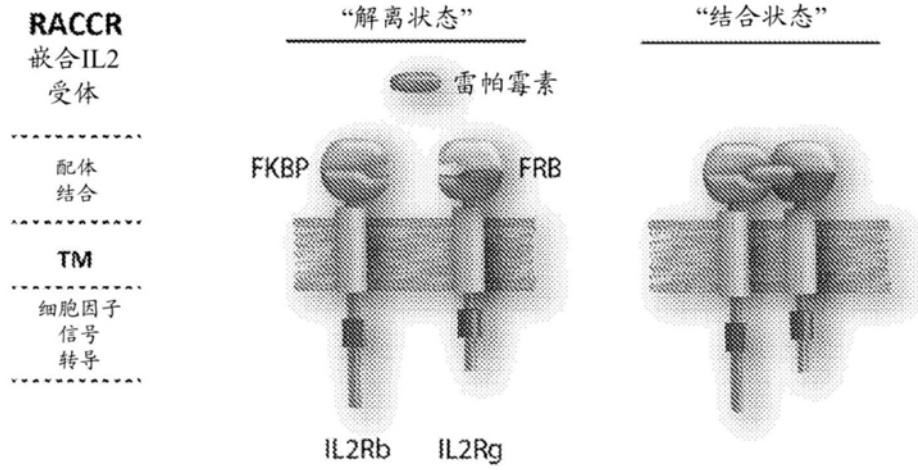


图12A

有效载荷: prom-GFP
包装: pMD2.G (std)

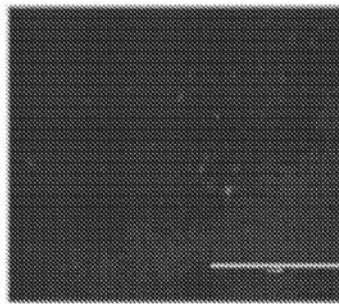


图12B

有效载荷: prom-Cherry
包装: pVT-SEC



图12C

有效载荷:prom-RACCR

包装:pVT-SEC

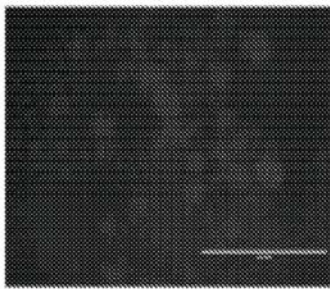


图12D

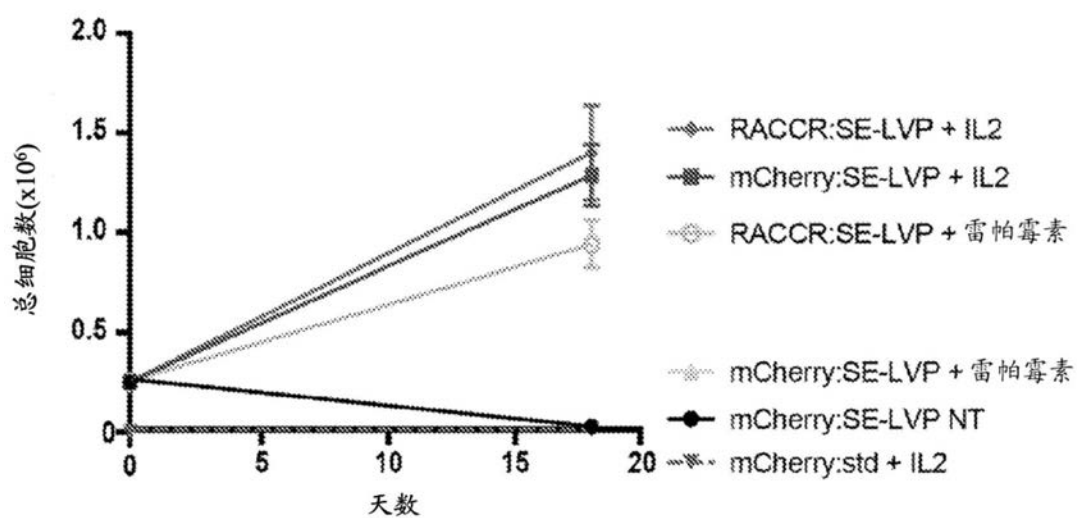


图12E

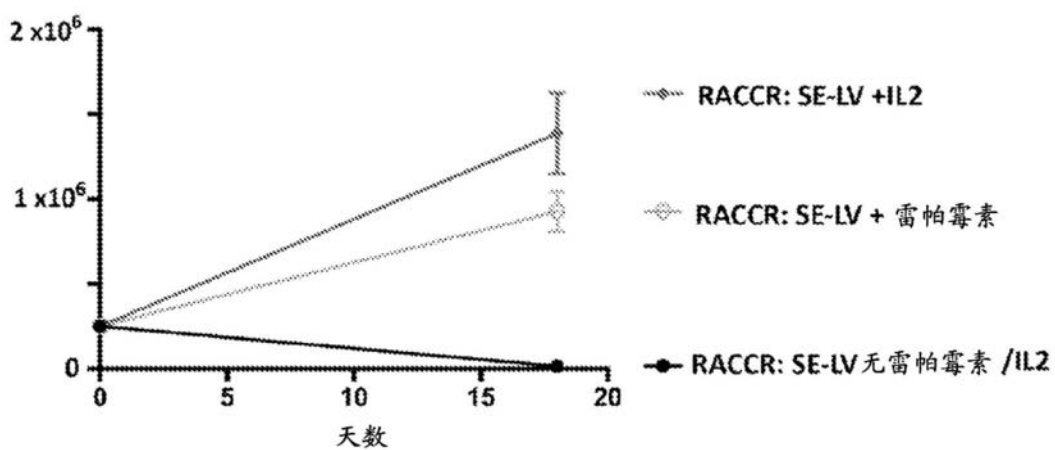


图12F