(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 3 月 5 日 (05.03.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/042648 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/867 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/084828

(22) 国际申请日: 2019 年 4 月 28 日 (28.04.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810986752.8 2018年8月28日 (28.08.2018) CN

(71) 申请人: 法罗斯疫苗株式会社(**PHAROS VACCINE INC.**) [KR/KR]; 韩国京畿道城南市中院区遁村大路545, 510号, Gyeonggi-do 13215 (KR)。 北京永泰瑞科生物科技有限公司(**IMMUNOTECH BIOPHARM CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国北京市北京经济技术开发区康定街1号1幢B3座二层204室, Beijing 100176 (CN)。

(72) 发明人: 李贤秀(**LEE, Hyunsoo**); 韩国京畿道城南市中院区遁村大路545, 510号, Gyeonggi-do 13215 (KR)。 郑南哲(**JUNG, Mamchul**); 韩国京畿道城南市中院区遁村大路545, 510号, Gyeonggi-do 13215 (KR)。 王歈(**WANG, Yu**); 中国北京市北京经济技术开发区康定街1号国盛科技园1幢8层, Beijing 100176 (CN)。

(74) 代理人: 北京永新同创知识产权代理有限公司(**NTD UNIVATION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.**); 中国北京市东城区北三环东路36号北京环球贸易中心C座10层, Beijing 100013 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:
— 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括经修改的权利要求(条约第19条(1))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

WO 2020/042648 A1

(54) **Title:** IMPROVED LENTIVIRAL VECTOR

(54) 发明名称: 改进的慢病毒载体

(57) **Abstract:** Disclosed are an improved lentiviral vector and a preparation method and use thereof. Specifically, disclosed is a lentiviral vector suitable for preparing a therapeutic T cell.

(57) 摘要: 本发明公开了改进的慢病毒载体及其制备方法和用途。具体地，本发明公开了适合于制备治疗性T细胞的慢病毒载体。

改进的慢病毒载体

技术领域

本发明属于生物医药领域。具体而言，本发明涉及改进的慢病毒载体及其制备方法和用途。具体而言，本发明涉及特别适合于制备治疗性 T 细胞的慢病毒载体。

发明背景

T 细胞是体内执行肿瘤细胞杀伤和病毒感染细胞杀伤的关键免疫细胞。近年来，使用 T 细胞，包括来源于体外诱导或肿瘤浸润淋巴细胞的抗原特异性 T 细胞、基因改造的嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)、基因改造的 T 细胞受体 T 细胞(TCR-T 细胞)进行恶性肿瘤的治疗，在部分临床患者中显示了显著的肿瘤清除和控制作用。然而，由于患者体内肿瘤的免疫逃逸作用，部分肿瘤患者对回输的 T 细胞产生抵抗作用，导致 T 细胞不能发挥应有的抗肿瘤作用。

体内体外的研究均表明，TGF-β 是重要的 T 细胞抑制因子，导致 T 细胞对靶细胞的杀伤作用减弱或消失。在临床上，TGF-β 广泛表达于多种肿瘤组织中，显著抑制肿瘤特异性 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性，是免疫治疗失败的重要原因。而显性负性 TGF-βII 型受体(dominant negative TGF-βreceptor type II, DNRII)是 TGF-β 的负性调节受体，可以抑制 TGF-β 对 T 细胞的抑制作用。在动物体内，通过给予或者表达 T 细胞特异性的 DNRII，或者给予可溶性 TGF-β RII，干扰 TGF-β 信号通路，可以显著提高 T 细胞对肿瘤的杀伤作用。美国贝勒医学院 Catherin M Bollard 领导的研究团队发现，给予患者 EB 病毒特异性的 T 细胞(EBV-CTL)治疗，对 EBV 感染导致的霍杰金和非霍杰金淋巴瘤均有一定的效果。然而，在这些疾病中，由于肿瘤组织表达 TGF-β，EBV-CTL 的疗效受到干扰。该研究团队通过基因转导的方式，将 DNRII 表达于 EBV-CTL 细胞表面，用于治疗复发的霍杰金淋巴瘤。在 7 名患者可以评价的患者中，4 名患者获得了完全缓解，其中 2 例患者完全缓解持续 4 年，其中 1 例是在未经 DNRII 基因修饰的 EBV-CTL 治疗后未能获得完全缓解的患者。然而，这些 EBV-CTL 仅仅表达 DNRII 一种外源蛋白。

在目前应用与临床的 CAR-T 细胞和 TCR-T 细胞治疗中，同样面临肿瘤细胞表达 TGF-β，导致 CAR-T 细胞和 TCR-T 细胞功能受到抑制的问题。本领域也期望将 DNRII 导入 CAR-T 细胞或 TCR-T 细胞中。然而，迄今为止，尚未有将 CAR/TCR 与 DNRII 共表达于同一 T 细胞用于治疗肿瘤的报道。这可能由于现有的表达系统对两种蛋白的共表达效率低，难以满足临床需要。

为了解决该问题，需要新的改进的表达载体，如改进的慢病毒载体，其特别适合于两种或更多种蛋白的高效共表达。

附图简述

图1示出用于表达CAR-19的慢病毒载体结构及完整性鉴定策略。(A)包含$P_{EF1\alpha}$-L(长启动子，531bp)的老载体pPVLV1；(B)包括$P_{EF1\alpha}$-S(短启动子，212bp)的新载体pPVLV2。从使用随机六聚体引物逆转录的cDNA产生预期的PCR产物(F1-F5：PCR片段)，鉴定病毒载体的完整性。

图2示出pPVLV1和pPVLV2的差别。(A) 从病毒基因组的逆转录cDNA扩增出预期的DNA片段。在含有$P_{EF1\alpha}$-L的病毒基因片段中观察到缺陷的基因位点。用箭头指示具有意外大小的DNA片段(左图)。(B) 比较表达CAR-19的细胞的百分比和(C)转导293T细胞48小时后各载体的滴度。

图3示出CAR-19-Fluc的结构和荧光素酶活性。(A)和(B)使用的编码克隆在P2A-Fluc盒上游的CAR-19的双顺反子构建体。(C) 表达的CAR-19和Fluc分子的示意图。(D)在慢病毒载体转导293T细胞后48小时测定的荧光素酶活性。

图4示出CAR-19-DNRII的结构和病毒载体。(A)和(B)显示共表达截短的TGFBRII (DNRII)的CAR-19的载体图谱。(C) 共表达的CAR-19和DNRII分子的结构示意图。

图5示出转导的293T细胞中CAR-19和DNRII表达的转导效率。图中的数字表示CAR-19(上)或DNRII(下)的阳性细胞相对于未转导的293T细胞的阴性对照的百分比。给出了来自十个独立实验的代表性实验的结果。

图6示出转导的T细胞中CAR-19和DNRII的表达。用慢病毒载体转导活化的T细胞以表达CAR-19或CAR-19-DNRII，并通过流式细胞术评估。图中的数字表示CAR-19(上)或DNRII(下)的阳性细胞相对于未转导的T细胞的阴性对照的百分比。结果代表三个独立实验。

图7示出CAR-19或CAR-19-DNRII载体转导后的细胞活力和计数。数据表示为平均值±SD。

图8示出DNRII减少TGF-β1诱导的SMAD2磷酸化。

图9示出CAR-T-19和CAR-T-19-DNRII细胞中的IFN-γ和TNF-α的mRNA水平。数据表示为平均值±SEM。

图10示出CAR-T-19和CAR-T-19-DNRII细胞在TGF-β1存在下对$CD19^+$肿瘤细胞的抗原特异性杀死。在CAR T初始活化细胞12天后，通过DELFIA® EuTDA细胞毒性测定法测定细胞裂解活性。在测定前3天取T细胞，并用rhTGF-β1(10ng/ml)培养72小时。用BATDA试剂标记靶细胞15分钟，随后以指定的E:T比加入作为效应细胞的经转导的T细胞。孵育4小时后测定裂解。

发明内容

除非另有指示或定义，否则所有所用术语均具有本领域中的通常含义，该含义将为本领域技术人员所了解。参考例如标准手册，如Sambrook et al.,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”；Lewin,“Genes VIII”；及Roitt et al.,“Immunology”(第8版)，以

及本文中引用的一般现有技术；此外，除非另有说明，否则未具体详述的所有方法、步骤、技术及操作均可以且已经以本身已知的方式进行，该方式将为本领域技术人员所了解。亦参考例如标准手册、上述一般现有技术及其中引用的其他参考文献。

本发明人令人意外地发现，用包含长 EF1α 启动子(如 SEQ ID NO 7)的慢病毒载体转导细胞例如 T 细胞，会出现该启动子区域的异常，导致导入细胞的外源基因(特别是编码 CAR 或其融合蛋白的基因)的低表达率。而更意想不到的是，使用截短的 EF1α 启动子则可以避免该现象，显著提高所导入外源基因的表达率。

因此，在第一方面，本发明提供一种慢病毒载体，其包含用于指导编码感兴趣的多肽的核苷酸序列在宿主细胞中表达的截短的 EF1α 启动子。在一些实施方案中，所述截短的 EF1α 启动子是包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的 EF1α 核心启动子。

在本发明范围内，“慢病毒载体”指非复制型载体，其用于将包含顺式作用慢病毒 RNA 或 DNA 序列的转基因转导至宿主细胞，且需要以反式形式提供慢病毒蛋白(例如 Gag、Pol 和/或 Env)。慢病毒载体缺少功能性 Gag、Pol 和 Env 蛋白的编码序列。慢病毒载体可以 RNA 或 DNA 分子的形式存在，这取决于所述逆转录病毒载体的产生或发展阶段。

慢病毒载体可以是重组 DNA 分子的形式，如质粒(例如转移质粒载体)。慢病毒载体可以是慢病毒颗粒载体的形式，如慢病毒和其他蛋白质的复合物中的 RNA 分子。通常，对应于修饰或重组的慢病毒颗粒的慢病毒载体包含由两个单链 RNA 拷贝组成的基因组。这些 RNA 序列可通过从插入宿主细胞基因组的双链 DNA 序列(原病毒载体 DNA)转录获得，或者可由转化的宿主细胞中质粒 DNA(质粒载体 DNA)的瞬时表达获得。慢病毒载体也可以指整合进宿主细胞的 DNA 序列。

慢病毒载体可以来源于慢病毒，尤其是人免疫缺陷病毒(HIV-1 或 HIV-2)、猿免疫缺陷病毒(SIV)、马传染性脑炎病毒(EIAV)、山羊关节炎脑炎病毒 (CAEV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)和猫免疫缺陷病毒(FIV)，其经修饰以除去涉及致病性的遗传决定簇并导入外源表达盒。

在一些实施方案中，所述慢病毒载体还包含选自以下的至少一种元件：5’LTR、ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、用于插入编码感兴趣的多肽的核苷酸序列的多克隆位点、WPRE 元件和 3’LTR。

在一些实施方案中，所述慢病毒载体包含可操作连接的 5’LTR、ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、所述截短的 EF1α 启动子、WPRE 元件和 3’LTR，以及任选地，用于插入编码感兴趣的多肽的核苷酸序列的多克隆位点。

在一些实施方案中，所述 5’LTR 包含 SEQ ID NO:3 或 11 所示核苷酸序列；所述 ψ 元件包含 SEQ ID NO:4 或 12 所示核苷酸序列；所述 RRE 元件包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列；所述 cPPT/CTS 元件包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列；所述 WPRE 元件包含 SEQ ID NO:9 或 14 所示核苷酸序列；其中所述 3’LTR 包含 SEQ ID NO:10 或 15 所示核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述慢病毒载体包含可操作连接的包含 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列的 5' LTR，包含 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的 ψ 元件，包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列的 RRE 元件，包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列的 cPPT/CTS 元件，包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的截短的 EF1 α 启动子，包含 SEQ ID NO:14 所示核苷酸序列的 WPRE 元件，包含 SEQ ID NO: 15 所示核苷酸序列的 3' LTR，以及任选地，用于插入编码感兴趣的多肽的核苷酸序列的多克隆位点。

在一些实施方案中，所述慢病毒载体衍生自 SEQ ID NO:2。其中 SEQ ID NO:2 的 2,042-3,499 位的编码 CAR-19 的核苷酸序列可以被其他感兴趣的多肽的编码序列取代。

在一些实施方案中，所述慢病毒载体还包含编码感兴趣的多肽的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述感兴趣的多肽是包括多种蛋白的融合多肽，所述融合多肽中的所述多种蛋白由自裂解肽分隔开。

在一些实施方案中，所述感兴趣的多肽是包括第一蛋白和第二蛋白的融合多肽，所述融合多肽在第一蛋白和第二蛋白之间包含自裂解肽。

因此，在一些实施方案中，所述慢病毒载体还包含自裂解肽的编码核苷酸序列。所述自裂解肽的编码核苷酸序列用于通过所述慢病毒载体共表达两种或更多种不同蛋白。

如本文所用“自裂解肽”意指可以在细胞内实现自剪切的肽。例如，所述自裂解肽可以包含蛋白酶识别位点，从而被细胞内的蛋白酶识别并特异性切割。

或者，所述自裂解肽可以是 2A 多肽。2A 多肽是一类来自病毒的短肽，其自切割发生在翻译期间。当用 2A 多肽连接两种不同目的蛋白在同一读码框表达时，几乎以 1:1 的比例生成两种目的蛋白。常用的 2A 多肽可以是来自猪捷申病毒（porcine techovirus-1）的 P2A、来自明脉扁刺蛾 β 四体病毒（Thosea asigna virus）的 T2A、马甲型鼻病毒（equine rhinitis A virus）的 E2A 和来自口蹄疫病毒（foot-and-mouth disease virus）的 F2A。其中 P2A 的切割效率最高，因此是优选的。本领域也已知多种这些 2A 多肽的功能性变体，这些变体也可以用于本发明。

将例如第一蛋白和第二蛋白由 2A 多肽隔开，置于同一开放读码框，由同一启动子驱动表达，可以最大程度确保所获得的经转导的细胞同时表达两种蛋白。因为如果两种蛋白在不同载体中分别转导至细胞，将可能造成部分细胞仅表达第一蛋白，部分细胞仅表达第二蛋白，而共表达两种蛋白的细胞的比例将很低。另外，如果两种蛋白的表达由同一载体中不同启动子驱动表达，由于启动子效率的差异，同样会降低同时表达两种蛋白的细胞的比例。

在一些实施方案中，所述第一蛋白是癌症相关抗原特异性受体蛋白。在一些实施方案中，所述第二蛋白是显性负性 TGF-β II 型受体。

如本发明所用，“显性负性 TGF-β II 型受体”是指能够与 TGF-β RII 竞争结合 TGF-β 配体(如 TGF-β1)，但不能执行 TGF-β RII 的信号传导功能的 TGF-β II 型受体的变体。在一些实施方案中，所述显性负性 TGF-β II 型受体的胞内信号传导结构域被突变，从而丧失胞内信号传导能力。在一些实施方案中，所述显性负性 TGF-β II 型受体缺失 TGF-β II

型受体的胞内信号传导结构域。在一些具体实施方案中，所述显性负性 TGF-β II 型受体包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

本发明所述“癌症相关抗原特异性受体蛋白”可以是 T 细胞受体(TCR)或者是嵌合抗原受体(CAR)。

所述癌症相关抗原包括但不限于 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

“T 细胞受体(TCR)”又称 T 细胞抗原受体，是 T 细胞特异性识别和结合抗原肽-MHC 分子的分子结构，通常与 CD3 分子呈复合物形式存在于 T 细胞表面。大多数 T 细胞的 TCR 由 α 和 β 肽链组成，少数 T 细胞的 TCR 由 γ 和 δ 肽链组成。例如，所述 TCR 是特异性结合癌症相关抗原的 TCR(通常包含通常包含 α 和 β 链)。

“嵌合型抗原受体(CAR)”又称人工 T 细胞受体、嵌合型 T 细胞受体、嵌合型免疫受体，是一种人工设计的受体，可以赋予免疫效应细胞某一种特异性。普遍来讲，这一技术被用于赋予 T 细胞特异性识别肿瘤表面抗原的特性。通过这种方法，可以产生大量的靶向肿瘤杀伤细胞。

所述 CAR 可以包含针对癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域。所述细胞外抗原结合结构域例如可以是单克隆抗体、合成的抗体、人抗体、人源化抗体、单域抗体、抗体单链可变区(scFV)，以及其抗原结合片段。例如，所述细胞外抗原结合结构域可以衍生自一或多种已知抗体包括任何商业可获得的抗体，如 FMC63、利妥昔单抗(rituximab)、阿仑珠单抗(alemtuzumab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、比伐珠单抗(bivatuzumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、帕利珠单抗(palivizumab)、司韦单抗(sevirumab)、妥韦单抗(tuvirumab)、巴利昔单抗(basiliximab)、

达克珠单抗(daclizumab)、英利昔单抗(infliximab)、奥马珠单抗(omalizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、凯利昔单抗(Keliximab)、西利珠单抗(siplizumab)、那他珠单抗(natalizumab)、克立昔单抗(clenoliximab)、培马单抗(pemtumomab)、依屈洛单抗(Edrecolomab)、坎妥珠单抗(Cantuzumab)等。

在本发明各方面的一些实施方案中，所述 CAR 还包括跨膜结构域和细胞内信号转导结构域。根据本发明的 CAR 的细胞内信号转导结构域负责细胞外配体结合结构域与靶结合之后的细胞内信号转导，导致激活免疫细胞和免疫应答。细胞内信号转导结构域具有激活表达 CAR 的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的能力。例如，T 细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性，包括细胞因子的分泌。

用于 CAR 的细胞内信号转导结构域可以是细胞质序列，例如但不限于 T 细胞受体和共同受体(它们一致地起作用从而在抗原受体接合之后启动信号转导)的细胞质序列，以及任何这些序列的衍生物或变体以及具有相同功能能力的任何合成序列。细胞内信号转导结构域包括两种不同类型的细胞质信号转导序列：那些启动抗原依赖性初级激活的序列，以及那些以抗原非依赖性方式作用以提供次级或共刺激信号的序列。初级细胞质信号转导序列可以包括称为 ITAM 的免疫受体酪氨酸激活基序的信号转导基序。本发明中使用的 ITAM 的非限制性实例可以包括衍生自 TCR ζ、FcR γ、FcR β、FcR ε、CD3 γ、CD3 δ、CD3 ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b 和 CD66d 的那些。在一些实施方案中，CAR 的细胞内信号转导结构域可以包括 CD3 ζ 信号转导结构域。在一些实施方案中，本发明的 CAR 的细胞内信号转导结构域还包括共刺激结构域。在一些实施方案中，所述共刺激结构域选自 41BB 共刺激结构域或 CD28 共刺激结构域。

CAR 在细胞的表面上表达。因此，CAR 可以包括跨膜结构域。本发明的 CAR 的合适跨膜结构域具有以下能力：(a)在细胞表面表达，优选免疫细胞，例如但不限于淋巴细胞或自然杀伤(NK)细胞，和(b)与配体结合结构域和细胞内信号转导结构域相互作用，用于指导免疫细胞对预定靶细胞的细胞应答。跨膜结构域可以衍生自天然来源或合成来源。跨膜结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。作为非限制性实例，跨膜结构域可以衍生自 T 细胞受体的亚基如 α 亚基、β 亚基、γ 或 δ 亚基，组成 CD3 复合物的多肽，IL-2 受体的 p55(α 链)、p75(β 链)或 γ，Fc 受体的亚基链，特别是 Fc γ 受体 III 或 CD 蛋白。或者，跨膜结构域可以是合成的，并且可以主要包括疏水性残基，如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施方案中，所述跨膜结构域衍生自人 CD8 α 链。跨膜结构域可以进一步包括位于细胞外配体结合结构域和所述跨膜结构域之间的铰链区域。所述铰链区域例如来自 CD8、CD4 或 CD28 的胞外区。在一些实施方案中，所述铰链区域是人 CD8 α 链的一部分。

在一些具体实施方案中，本发明中使用的 CAR 可以包括特异性结合癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域如 scFv、CD8 铰链和跨膜结构域、CD3 ζ 信号转导结构域、和 4-1BB 共刺激结构域。

在一些具体实施方案中，所述 CAR 包含针对 CD19 的细胞外抗原结合结构域。在

一些具体实施方案中，所述 CAR 包含 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列。

将 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)和显性负性 TGF-β II 型受体在 T 细胞中共表达，可解除 TGF-β 对 T 细胞的抑制，显著提高 TCR-T 细胞或 CAR-T 细胞的活性如肿瘤杀伤活性。如实施例所示，本发明的慢病毒载体特别适合于在 T 细胞共表达 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)和显性负性 TGF-β II 型受体。

在另一方面，本发明提供一种制备慢病毒载体颗粒的方法，所述方法包括：

a) 使本发明的慢病毒载体、表达 Gag 和/或 Pol 的一或多种包装载体、表达包膜蛋白如 VSV-G 的包膜载体共转染合适的宿主细胞；

b) 培养转染的所述宿主细胞以使所述慢病毒载体包装成慢病毒载体颗粒；以及

c) 收获步骤 b)中产生的慢病毒载体颗粒。

本领域已知并且本领域技术人员可以容易获得合适的表达Gag和/或Pol的一或多种包装载体、表达包膜蛋白如 VSV-G 的包膜载体。在一些实施方式中，所述载体是质粒。

用于制备慢病毒载体颗粒的合适的宿主细胞包括但不限于 293T 细胞。

在另一方面，本发明提供一种慢病毒载体颗粒，其包含本发明的慢病毒载体或通过本发明上述的方法制备。

在另一方面，本发明提供本发明的慢病毒载体颗粒在制备治疗性 T 细胞中的用途，其中所述治疗性 T 细胞表达癌症相关抗原特异性受体蛋白，例如 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)，以及任选的显性负性 TGF-β II 型受体。

在另一方面，本发明提供一种制备治疗性 T 细胞的方法，包括用本发明的慢病毒载体颗粒转导 T 细胞。所述慢病毒载体颗粒的转导将导致所述治疗性 T 细胞表达癌症相关抗原特异性受体蛋白，例如 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)，以及任选的显性负性 TGF-β II 型受体。

本发明的 T 细胞可以通过各种非限制性方法从许多非限制性来源获得，包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些实施方案中，细胞可以衍生自健康供体或来自诊断为癌症的患者。在一些实施方案中，细胞可以是呈现不同表型特征的细胞的混合群体的一部分。例如，T 细胞可以通过分离外周血单个核细胞(PBMC)，然后用特异性抗体活化、扩增获得。

在本发明各方面的一些实施方案中，所述 T 细胞衍生自对象的自体细胞。如本文所用，“自体”是指用于治疗对象的细胞、细胞系或细胞群源自所述对象。在一些实施方案中，所述 T 细胞衍生自异体细胞，例如源自与所述对象人类白细胞抗原(HLA)相容的供体。可以使用标准方案将来自供体的细胞转化为非同种异体反应性细胞，并根据需要进行复制，从而产生可以施用至一个或多个患者的细胞。

在另一方面，本发明提供一种用于产生慢病毒载体颗粒的试剂盒，其包含本发明的慢病毒载体、合适的包装载体、合适的包膜载体和/或合适的宿主细胞如 293T 细胞。所述试剂盒还可以包括细胞转染试剂。在另一方面，本发明提供一种用于在细胞中表达感兴趣的多肽的试剂盒，其包含本发明的慢病毒载体颗粒。

实施例

实施例中的统计学分析使用 GraphPad 软件(GraphPad Prism v5.0; GraphPad Software，San Diego，CA，USA)进行。通过配对 t 检验然后进行 Newman-Keuls 检验分析数据。结果表示为平均值±SEM。p 值<0.05 被认为是显著的。

实施例 1、用于表达 CAR 的慢病毒载体的优化

用于转导 CAR 的慢病毒载体应含有所需的 CAR 转基因并能够在细胞中表达。设计了两种用于表达 CAR 的第三代慢病毒载体，分别为旧载体 pPVLV1(图 1A)和新载体 pPVLV2(图 1B)。pPVLV1 含有 531bp 的长的人延伸因子 1α (EF1α)启动子，pPVLV1 含有 212bp 的截短的人 EF1α 启动子。两种载体中包含的各种元件及其描述见于下表 1。

本申请实施例中待表达的 CAR 包含靶向 CD19 的 scFv、人 CD8 的铰链和跨膜结构域、细胞内结构域 4-1BB 和 CD3ζ。该靶向 CD19 的 CAR 的氨基酸如 SEQ ID NO:16 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。

表 1. pPVLV1 和 pPVLV2 慢病毒载体上的相关元件

特征	位置 (大小, bp)		描述
	pPVLV1[1)]	pPVLV2[2)]	
5’ LTR	1-675 (675) 5’HIV R-U5-Δgag (SEQ ID NO:3)	1-181 (181) 截短的 (SEQ ID NO:11)	来自 HIV-1 的截短的 5'LTR。对病毒转录、逆转录和整合至关重要。
HIV-psi (ψ)	703-1,560 (858) (SEQ ID NO:4)	228-353 (126) (SEQ ID NO:12)	HIV-1 的包装信号。转移质粒包装必不可少。
RRE	850-1,083 (234) (SEQ ID NO:5)	846-1,079 (234) (SEQ ID NO:5)	对于病毒转录物的 Rev 依赖性 mRNA 从细胞核输出到细胞质是必需的。
cPPT/CTS	1,610,-1,727 (118) (SEQ ID NO:6)	1,606-1,723 (118) (SEQ ID NO:6)	HIV1 的 cPPT/CTS of HIV-1。提高载体整合和转导效率。
EF1α 启动子	1,827-2,357 (531) (SEQ ID NO:7)	1,817-2,028 (212) (SEQ ID NO:13)	驱动转基因表达的启动子。
CAR-19	2,507-3,964 (1,458) (SEQ ID NO:8)	2,042-3,499 (1,458) (SEQ ID NO:8)	转基因；靶向 CD19 的嵌合抗原受体。
WPRE	4,022-4,611 (590) (SEQ ID NO:9)	3,524-4,112 (589) (SEQ ID NO:14)	通过促进 mRNA 转录物成熟来改善转基因表达。
3’ LTR	4,631-5,320 (690) 3’ SIN LTR (SEQ ID NO:10)	4,184-4,417 (234) Δ-U3 (SEQ ID NO:15)	来自 HIV-1 的自我灭活 3'LTR。对于病毒转录、逆转录和整合至关重要。包含防止病毒复制的安全措施。

1) 包括 EF1α 长启动子的 pPVLV1 载体(5,320 bp，SEQ ID NO:1)

2) 包括 EF1α 短启动子的 pPVLV2 载体(4,417 bp，SEQ ID NO:2)

通过用 gag/pol 包装质粒、VSV-G 包膜质粒和包含如上所述慢病毒载体序列的转移构建体转染 293T 细胞产生慢病毒上清液。简言之，将 DNA 混合物在 Opti-MEM (Life

Technologies，Gaithersburg，MD，USA)混合，并与等体积的含有 Lipofectamine 3000 (Life Technologies)的 Opti-MEM 混合。在室温下孵育 15 分钟后，将所得混合物施加到 293T 细胞。在转染后 24 小时收集含有慢病毒的培养基。每次收集后，将上清液通过 PVDF 膜(0.45μm)过滤。将慢病毒收获物合并，并在 4℃下储存，然后在 20,000xg 下超速离心 1 小时 30 分钟。将慢病毒颗粒重悬于 PBS 中。

图 1 示出了两种慢病毒载体的结构示意图，以及通过重叠的 PCR 产物检验慢病毒完整性的策略。设计了合适的引物，从使用随机引物逆转录的 cDNA 扩增重叠的片段 F1-F5。具有预期大小的 PCR 产物可以证明慢病毒的完整性。

图 2A 示出了从病毒基因组逆转录出的 cDNA 扩增出的各 DNA 片段。令人意想不到的是，在含有 $P_{EF1\alpha}$-L(长启动子)的病毒基因片段中观察到缺陷的基因位点。箭头指示具有非预期的 DNA 片段(左)。在含有 $P_{EF1\alpha}$-S(短启动子)的病毒基因片段中没有观察到此现象。此种缺陷的病毒基因组可能影响滴度和转导效率。

为此，测试了两种慢病毒的滴度和转导效率。对于慢病毒滴定，将 2×10^6 个 293T 细胞接种到 6 孔板的每个孔中，并用一系列体积的浓缩慢病毒转导。转导后 48 小时后，将 293T 细胞从平板上分离。使用 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗人 IgG $F(ab)_2$ 通过流式细胞术检测 CAR 的存在。使用常规 PCR 检查 5'LTR 至 3'LTR 的病毒基因组 RNA。

结果如图 2B 和 C 所示。具有 $P_{EF1\alpha}$-L 的病毒(基于 pPVLV1 载体)的转导效率(表达 CAR 的细胞比例)仅为 9.95%，远远低于具有 $P_{EF1\alpha}$-S 的病毒(基于 pPVLV2 载体)的 70.4%。此外，具有 $P_{EF1\alpha}$-L 的病毒(基于 pPVLV1 载体)的滴度也显著低于具有 $P_{EF1\alpha}$-S 的病毒(基于 pPVLV2 载体)的慢病毒。表明 pPVLV2 载体优于 pPVLV1 载体，而这可能是由于不同长度的 EF1α 启动子造成的。

实施例 2、启动子影响 CAR 基因的转导和表达

为了进一步证明不同启动子的影响，基于 pPVLV2 构建了图 3 两种 CAR-荧光素酶报告载体，其区别仅仅在与驱动转基因表达的启动子，其中 CAR-19 被克隆至 P2A-Fluc(萤火虫荧光素酶)盒的上游，形成双顺反子(图 3A 和 B)。

在所述载体转导进细胞中后，由于存在 P2A 自剪切肽的编码序列，在同一细胞将以大约 1:1 的比例表达出 CAR-19 和荧光素酶两种分子，其中荧光强度可反映出 CAR-19 转导效率(见图 3C 原理示意图)。图 3D 示出将两种慢病毒载体转导进 293T 细胞 48 小时后测定的荧光素酶活性。结果显示，用具有 $P_{EF1\alpha}$-S 的慢病毒载体转导的细胞荧光显著强于用具有 $P_{EF1\alpha}$-L 的慢病毒载体转导的细胞。进一步证明 $P_{EF1\alpha}$-S 显著改善了转基因在细胞的表达。

本实施例证明，常规的强启动子，531bp 的 EF1α 启动子，在慢病毒载体中用于蛋白表达时，将令人意想不到地导致低转导效率。通过使用截短的 EF1α 启动子(212bp)可以显著提高转导效率，改善外源蛋白例如 CAR 在细胞中的表达。

实施例 3、在细胞中共表达 CAR 和 DNRII

TGF-β 是重要的 T 细胞抑制因子，可能导致治疗性 T 细胞对靶细胞的杀伤作用减弱或消失。在临床上，TGF-β 广泛表达于多种肿瘤组织中，显著抑制肿瘤特异性 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性，是免疫治疗失败的重要原因。而显性负性 TGF-β II 型受体 (dominant negative TGF-β receptor type II, DNRII)是 TGF-β 的负性调节受体，可以抑制 TGF-β 对 T 细胞的抑制作用。以下实施例研究在 T 细胞中共表达 CAR 和 DNRII 的效果。DNRII 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:17，其核苷酸序列示于 SEQ ID NO:18。

首先，类似于实施例 2，基于 pPVLV2 构建了图 4(A 和 B)中两种 CAR-19-DNRII 载体，其区别仅仅在驱动转基因表达的启动子。其中 CAR-19 和 DNRII 位于同一开放读码框，中间包含 2A 多肽编码序列。图 4C 示出 CAR-19 和 DNRII 分子的结构示意图。其中 DNRII 缺失 TGFBRII 的胞内丝氨酸/苏氨酸激酶结构域，无法向下游传导信号。

将 CAR-19 和 DNRII 编码序列由 2A 编码序列隔开，置于同一开放读码框，由同一启动子驱动表达，可以最大程度确保所获得的经转导的细胞同时表达 CAR-19 和 DNRII。因为如果 CAR-19 和 DNRII 在不同载体中分别转导至细胞，将可能造成部分细胞仅表达 CAR-19，部分细胞仅表达 DNRII，而共表达两种蛋白的细胞的比例将很低。另外，如果两种蛋白的表达由同一载体中不同启动子驱动表达，由于启动子效率的差异，同样会降低同时表达两种蛋白的细胞的比例。

将两种 CAR-19-DNRII 慢病毒载体以相等的 MOI(感染复数)转导至 293T 细胞。使用标记的山羊抗人 IgG $F(ab)_2$ 或抗 DNRII 抗体通过流式细胞术使用 MACSQuant 分析仪 10 检测 CAR 或 DNRII 的表达，并用 FlowJo 软件分析数据。

结果如图 5 所示，用具有 $P_{EF1\alpha}$-S 的慢病毒载体转导的 293T 细胞中 CAR-19 和 DNRII 表达均显著高于用具有 $P_{EF1\alpha}$-L 的慢病毒载体转导的 293T 细胞。

此外，还测试了两种 CAR-19 慢病毒载体以及两种 CAR-19-DNRII 慢病毒载体转导 T 细胞后的 CAR-19 和 DNRII 的表达。

健康供者来源的人外周血单个核细胞(PBMC)经过抗 CD3/CD28 Dynabeads 磁珠活化 2 天(珠：细胞=3：1)，以 1×10^6 个细胞/ml 重悬于补充有 rhIL-2 (200IU/mL)的 IMSF100 无血清培养基(LONZA，比利时)中。分别加入 CAR-19 和 CAR-19-DNRII 慢病毒上清液进行转导。之后在 1,200×g 下在 32℃下离心 2 小时。24 小时后，除去含有病毒载体的上清液。将细胞以 3×10^5 个细胞/ml 悬浮于含 rhIL-2 (200IU/mL)的培养基，每 2 至 3 天更换新鲜培养基，扩增培养 12 天，获得表达 CAR-19 分子的 CAR-T-19 细胞和共表达 CAR-19 分子和 DNRII 分子的 CAR-T-19-DNRII 细胞。以在同样培养条件下进行培养，但未进行基因转导的 PBMC 为对照(NC)。使用流式细胞仪检测转导后获得的 CAR-T 细胞的各蛋白分子的表达。细胞每 2-3 天进行一次碘化丙啶(PI)染色，通过流式细胞仪检测细胞活性。细胞培养过程中，每 2-3 天使用台盼蓝染色法进行细胞计数(每个样本三次重复)，并计算细胞数量(均值±SD)。

结果如图 6 所示，未经转导的细胞(NC)不表达 CAR-19 或 DNRII。使用包含 $P_{EF1\alpha}$-S

的 pPVLV2 载体的 CAR-T-19 表达 CAR-19(表达率为 67.4%)；CAR-T-19-DNRII 细胞既表达 CAR-19(表达率为 62.9 %)，也表达 DNRII(表达率为 62.3%)。说明 CAR-T-19-DNRII 细胞中 CAR-19 和 DNRII 为共表达，且转导效率与单独转导 CAR-19 相当。使用 $P_{EF1\alpha}$-L 载体时，CAR-T-19-DNRII 细胞中 CAR-19 和 DNRII 也为共表达，但是表达率显著降低；而在 CAR-T-19 细胞中，CAR-19 的表达率也显著降低。

此外，如图 7 所示，CAR-T-19-DNRII 细胞的活性与数量与 CAR-T-19 没有差异。

因此，本实施例确定 pPVLV2 载体的骨架(包含 $P_{EF1\alpha}$-S)特别适合用于 CAR 在细胞中例如 T 细胞中的表达，尤其适合于 CAR 和其他蛋白如 DNRII 的共表达。此外，将 CAR 和 DNRII 编码序列至于同一开放读码框，可以实现两种分子的高共表达率。

实施例 4、DNRII 的表达降低 TFG-β1 诱导的 SMAD2 分子的磷酸化

TFG-β 对 T 细胞的抑制作用是通过 TFG-β 与其受体结合后，进行 SMAD2 分子磷酸化实现的。

将转导 9 天后的 CAR-T-19 细胞和 CAR-T-19-DNRII 细胞与重组人 TFG-β1(10ng/ml)共孵育 24 小时，进行被磷酸化的 SMAD2 (pSMAD2)的表达水平的分析。以 GAPDH 和未磷酸化的 SMAD2 分子作为对照，通过 Western blot 进行 pSMAD2 分子的相对定量。

具体而言，使用 Bradford 测定试剂盒(Sigma-Aldrich)测量全细胞裂解物的蛋白质浓度。将等量的蛋白质加载到 SDS-PAGE 凝胶的孔中，并将分离的蛋白质转移到 PVDF 膜(Thermo Scientific)。用 TBST 中的 10%(w/v)脱脂乳封闭膜，然后与一抗(抗 pSMAD2 和抗 SMAD2；来自 Cell signaling Technologies，Danvers，MA，USA；全部以 1:1000 稀释)一起 4℃孵育过夜。然后用 TBST 洗涤膜，并与 HRP 缀合的山羊抗兔 IgG (1:2000 稀释；Cell Signaling Technologies)在室温下孵育 2 小时。然后将膜暴露于 ECL 试剂(Thermo Scientific)，并使用发光图像分析仪（LAS-4000，Fuji Film，Tokyo，Japan）检测所得信号。

结果如图 8 所示，CAR-T-19-DNRII 细胞中 pSAMD2 的水平较 CAR-T-19 细胞显著下降。说明 DNRII 的表达抑制了 TGF-β 信号通路关键信号传导分子 SMAD2 的磷酸化。

实施例 5、经重组人 TGF-β1 处理的 CAR-T-19-DNRII 细胞和 CAR-T-19 细胞中 IFN-γ 和 TNF-α 表达

IFN-γ 和 TNF-α 是 T 细胞对靶细胞进行杀伤的标志性细胞因子。这两种细胞因子表达水平高，说明 T 细胞对靶细胞的杀伤潜能高，反之，则杀伤潜能低。

将转导 9 天后的 CAR-T-19 细胞和 CAR-T-19-DNRII 细胞与或不与重组人 TGF-β1(10ng/ml)共孵育 24 小时后，两种细胞分别与表达 CD19 分子的 $CD19^+$-K562 靶细胞共孵育 24 小时。为了定量 IFN-γ 和 TNF-α 的 mRNA 水平，收获每种混合细胞并使用 PureLink RNA Mini 试剂盒（Thermo Scientific，Waltham，MA，USA）提取总 RNA。在 DNase 消化和使用 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies，Palo Alto，USA)进

行浓度测定后，使用特异性引物和 One-step SensiFAST SYBR Low- ROX 试剂盒(Bioline，Maryland，USA)对总 RNA 样品进行实时定量 RT-PCR 分析，使用 QuantStudio3 实时 PCR 检测系统(Applied Biosystems，Foster City，CA，USA)。扩增 18s rRNA 为内部对照。通过ΔΔCt 法计算表达水平，并使用公式 2-ΔΔCt 获得表达倍数。所有实验一式三份进行。

结果显示，经重组人 TGF-β1 处理后，CAR-T-19-DNRII 细胞中 IFN-γ 和 TNF-α 表达显著高于 CAR-T-19 细胞(图 9)。

实施例 6、经重组人 TGF-β1 处理的 CAR-T-19-DNRII 细胞和 CAR-T-19 细胞对肿瘤靶细胞特异性杀伤

靶细胞杀伤实验使用转导 12 天的 CAR-T-19 细胞和 CAR-T-19-DNRII 细胞进行。

进行 TDA 释放测定以确定 TGF-β1 存在下 CAR-T-19 细胞和 CAR-T-19-DNRII 细胞对 K562 或 $CD19^{+}$-K562 的细胞毒活性。CAR-T-19 细胞和 CAR-T-19-DNRII 细胞分别与重组人 TGF-β1(10ng/ml)共孵育 72 小时。靶细胞用 BA-TDA(Perkin Elmer，Norwalk，Connecticut，USA)标记 15 分钟后，按分别 20:1、10:1、5:1、2.5:1 的效应细胞(T 细胞):靶细胞(肿瘤细胞)比例与效应细胞混合，共孵育 4 小时后检测 TDA 的释放(靶细胞裂解)。使用时间分辨荧光(TRF)读数器(Thermo Scientific)检测测定上清液的 TDA 释放。如下计算特异性裂解：%裂解=(实验裂解-自发裂解)/(最大裂解-自发裂解)×100。

结果如图 10 所示，经过重组人 TGF-β1 处理后，CAR-T-19 细胞对表达 CD19 的 K562 靶细胞杀伤作用降低至未加 CAR-T 细胞的背景水平(图 10A)；而 CAR-T-19-DNRII 细胞对表达 CD19 的 K562 靶细胞杀伤作用几乎没有下降，与未加 CAR-T 细胞的杀伤作用有显著性差异(图 10B)。说明 DNRII 有效逆转了 TGF-β 对 T 细胞杀伤的抑制作用。

序列表

SEQ ID NO:1 含 CAR-19 编码序列的 pPVLV1 载体

GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT
GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGT
GGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGC
TTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAG
AGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAA
GAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACAT
CAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACA
GTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAA
CAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAG
TGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAG
AAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACG
CTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCA
TCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGC
TCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTG
GAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGA
AGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACA
TAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTT
TCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCC
CGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCGGCACTGCGTGCGCCAA
TTCTGCAGACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGT
AGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGG
ACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAGTACCGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAGA
TCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGC
CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGT
ATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGC
ATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGG
TGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCC
TACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGC
CGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACGTAAGTGATATCTACTAGATTTATCAAAAAGAGTGTTGACTTGTGAGCGCT
CACAATTGATACTTAGATTCATCGAGAGGGACACGTCGACTACTAACCTTCTTCTCTTTCCTACAGCTGAGATCGCCGGTGGG
ATCCCCTAGGGTTAACATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGACA
TCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATT
AGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGG
AGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCA
CTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCG
GGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCT
GTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGG
AGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAAC
TCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTA
CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAC
CAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCAC
ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGT
TATCACCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTC
AAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA
AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAG
GGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAAACATGTTTAAGGGTTCC
GGTTCCACTAGGTACAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATT
CTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTT
CATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGT
GCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCC
CTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTC
CGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCT
GCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGC
CTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACCTCGATCGAGACCTAGAAAAAC
ATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGT
TTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGG
GGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTG
ATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCAA
GAGAAGGTAGAAGAAGCCAATGAAGGAGAGAACACCCGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAG
AGAAGTATTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACATGGCCCGAGAGCTGCATCCGGACTGTACTGGGTCTC
TCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA
GTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAAT
CTCTAGCA

SEQ ID NO:2 含 CAR-19 编码序列的 pPVLV2 载体

GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT
GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGT
GGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGC
TTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAG
AGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAA
GAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACAT
CAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACA
GTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAA
CAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAA
TTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAA
AAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGA
CGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTG
TTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT
GGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAAC
AGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAA
TCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAAC
AAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTA
TAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAA
GGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCGGCACTGCGTGCGCCAATTCT
GCAGACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAC
ATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG
CAGAGATCCAGTTTGGTTAAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG
CACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACT
GGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAAC
GTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTTCTAGAATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGC
TGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA
GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACT
CCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCA
CCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGG
ACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTC
AGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAA
GCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCT
CTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACAC
AGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCG
TCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAG
GCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGC
CGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCA
AACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGA
TGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA
TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGA
ACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGC
CGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGC
CCTGCCCCCTCGCTGAGGATCCACGCGTTAAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTC
TTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTC
ATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTG
CACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCC
TCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCC
GTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTG
CTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCC
TTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCGTCGACTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAG
ATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGT
ACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG
CTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAG
TGTGGAAAATCTCTAGCA

SEQ ID NO:3 5'HIV R-U5-Δgag

GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT
GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGT
GGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGC
TTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAG
AGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAA
GAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACAT
CAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACA
GTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAA
CAAAAGTAAGA

SEQ ID NO:4 HIV-psi (ψ)

GATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCAT
TAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGG

TTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGT
GCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCC
AGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGC
ACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGA
CAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAAT
TATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATG
ATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATT
ATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAG
ACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATC

SEQ ID NO:5 RRE

AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC
AATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTC
TGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT

SEQ ID NO:6 cPPT/CTS

TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAG
AATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTT

SEQ ID NO:7 EF1α 启动子长

TCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGC
CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGT
ATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGC
ATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGG
TGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCC
TACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGC
CGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACG

SEQ ID NO:8 CAR-19 编码序列

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGACATCCAGATGACACAGAC
TACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATT
GGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTC
AGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACA
GGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGG
GTGGCGGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACT
GTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAAT
ATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTT
TCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCT
ATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAC
CATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACT
TCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGC
AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTG
TAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACA
AGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG
GACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGA
GGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA
CCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO:9 WPRE

TAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACG
CTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCT
CTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGG
CATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCC
TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGG
CTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCC
TTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCG
CCTCCCCGC

SEQ ID NO:10 3’ SIN LTR

ATCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAGCACAA
GAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCA
CTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACA
CACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAG
CTAGTACCAGTTGAGCAAGAGAAGGTAGAAGAAGCCAATGAAGGAGAGAACACCCGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGG
GATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTATTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACATGGCCCGAGAGCTGCATC
CGGACTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCT

CAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTT
TTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA

SEQ ID NO:11 截短的 5'LTR
GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT
GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGT
GGAAAATCTCTAGCA

SEQ ID NO:12 HIV-psi (ψ)
CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTT
GACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTC

SEQ ID NO:13 EF1α 启动子短
GGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGC
GGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT
CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG

SEQ ID NO:14 WPRE
AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGC
TGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTC
TTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGC
ATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCT
TGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGC
TGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGC
CTCCCCGC

SEQ ID NO:15 3' LTR Δ-U3
TGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCC
TGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCG
TCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA

SEQ ID NO:16 CAR-19 氨基酸序列
MALPVTALLL PLALLLHAAR PDIQMTQTTS SLSASLGDRV TISCRASQDI SKYLNWYQQK PDGTVKLLIY HTSRLHSGVP
SRFSGSGSGT DYSLTISNLE QEDIATYFCQ QGNTLPYTFG GGTKLEITGG GGSGGGGSGG GGSEVKLQES GPGLVAPSQS
LSVTCTVSGV SLPDYGVSWI RQPPRKGLEW LGVIWGSETT YYNSALKSRL TIIKDNSKSQ VFLKMNSLQT DDTAIYYCAK
HYYYGGSYAM DYWGQGTSVT VSSTTTPAPR PPTPAPTIAS QPLSLRPEAC RPAAGGAVHT RGLDFACDIY IWAPLAGTCG
VLLLSLVITL YCKRGRKKLL YIFKQPFMRP VQTTQEEDGC SCRFPEEEEG GCELRVKFSR SADAPAYQQG QNQLYNELNL
GRREEYDVLD KRRGRDPEMG GKPRRKNPQE GLYNELQKDK MAEAYSEIGM KGERRRGKGH DGLYQGLSTA TKDTYDALHM
QALPPR

SEQ ID NO:17 DNRII 的氨基酸序列
MGRGLLRGLW PLHIVLWTRI ASTIPPHVQK SVNNDMIVTD NNGAVKFPQL CKFCDVRFST CDNQKSCMSN CSITSICEKP
QEVCVAVWRK NDENITLETV CHDPKLPYHD FILEDAASPK CIMKEKKKPG ETFFMCSCSS DECNDNIIFS EEYNTSNPDL
LLVIFQVTGI SLLPPLGVAI SVIIIFYCYR VNRQQKLSST WETGKTRKLM EFSEHCAII

SEQ ID NO:18 DNRII 的核苷酸序列
ATGGGTCGGG GGCTGCTCAG GGGCCTGTGG CCGCTGCACA TCGTCCTGTG GACGCGTATC GCCAGCACGA TCCCACCGCA
CGTTCAGAAG TCGGTTAATA ACGACATGAT AGTCACTGAC AACAACGGTG CAGTCAAGTT TCCACAACTG TGTAAATTTT
GTGATGTGAG ATTTTCCACC TGTGACAACC AGAAATCCTG CATGAGCAAC TGCAGCATCA CCTCCATCTG TGAGAAGCCA
CAGGAAGTCT GTGTGGCTGT ATGGAGAAAG AATGACGAGA ACATAACACT AGAGACAGTT TGCCATGACC CCAAGCTCCC
CTACCATGAC TTTATTCTGG AAGATGCTGC TTCTCCAAAG TGCATTATGA AGGAAAAAAA AAAGCCTGGT GAGACTTTCT
TCATGTGTTC CTGTAGCTCT GATGAGTGCA ATGACAACAT CATCTTCTCA GAAGAATATA ACACCAGCAA TCCTGACTTG
TTGCTAGTCA TATTTCAAGT GACAGGCATC AGCCTCCTGC CACCACTGGG AGTTGCCATA TCTGTCATCA TCATCTTCTA
CTGCTACCGC GTTAACCGGC AGCAGAAGCT GAGTTCAACC TGGGAAACCG GCAAGACGCG GAAGCTCATG GAGTTCAGCG
AGCACTGTGC CATCATC

权 利 要 求 书

1. 一种慢病毒载体，其包含用于指导编码感兴趣的多肽的核苷酸序列在宿主细胞中表达的截短的 EF1α 启动子，例如，所述截短的 EF1α 启动子是包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的 EF1α 核心启动子。

2. 权利要求 1 的慢病毒载体，其是非复制型慢病毒载体。

3. 权利要求 1 或 2 的慢病毒载体，其还包含选自以下的至少一种元件：5' LTR、ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、用于插入编码感兴趣的多肽的核苷酸序列的多克隆位点、WPRE 元件和 3' LTR。

4. 权利要求 1-3 中任一项的慢病毒载体，其包含可操作连接的 5' LTR、ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、所述截短的 EF1α 启动子、WPRE 元件和 3' LTR，以及任选地，用于插入编码感兴趣的多肽的核苷酸序列的多克隆位点。

5. 权利要求 3 或 4 的慢病毒载体，其中所述 5' LTR 包含 SEQ ID NO:3 或 11 所示核苷酸序列；所述 ψ 元件包含 SEQ ID NO:4 或 12 所示核苷酸序列；所述 RRE 元件包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列；所述 cPPT/CTS 元件包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列；所述 WPRE 元件包含 SEQ ID NO:9 或 14 所示核苷酸序列；其中所述 3' LTR 包含 SEQ ID NO:10 或 15 所示核苷酸序列。

6. 权利要求 1-5 中任一项的慢病毒载体，其包含可操作连接的包含 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列的 5' LTR，包含 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的 ψ 元件，包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列的 RRE 元件，包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列的 cPPT/CTS 元件，包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的截短的 EF1α 启动子，包含 SEQ ID NO:14 所示核苷酸序列的 WPRE 元件，包含 SEQ ID NO: 15 所示核苷酸序列的 3' LTR，以及任选地，用于插入编码感兴趣的多肽的核苷酸序列的多克隆位点。

7. 权利要求 1-6 中任一项的慢病毒载体，其还包含编码感兴趣的多肽的核苷酸序列。

8. 权利要求 1-7 中任一项的慢病毒载体，其中所述感兴趣的多肽是包括多种蛋白的融合多肽，所述融合多肽中的所述多种蛋白由自裂解肽分隔开。

9. 权利要求 1-8 中任一项的慢病毒载体，其中所述感兴趣的多肽是包括第一蛋白和第二蛋白的融合多肽，所述融合多肽在第一蛋白和第二蛋白之间包含自裂解肽。

10. 权利要求 8 或 9 的慢病毒载体，其中所述自裂解肽是 2A 多肽，例如，所述自裂解肽选自 P2A、F2A、E2A 或 T2A 多肽，或其功能性变体。

11. 权利要求 9 或 10 的慢病毒载体，其中所述第一蛋白是癌症相关抗原特异性受体蛋白，例如 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

12. 权利要求 9-11 中任一项的慢病毒载体，其中所述第二蛋白是显性负性 TGF-β II 型受体。

13. 权利要求 12 的慢病毒载体，其中所述显性负性 TGF-β II 型受体缺失 TGF-β II

型受体的胞内信号传导结构域，例如，所述显性负性 TGF-β II 型受体包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

14. 一种制备慢病毒载体颗粒的方法，所述方法包括：

a) 使权利要求 1-13 中任一项所述的慢病毒载体、表达 Gag 和/或 Pol 的一或多种包装载体、表达包膜蛋白如 VSV-G 的包膜载体共转染合适的宿主细胞；

b) 培养转染的所述宿主细胞以使所述慢病毒载体包装成慢病毒载体颗粒；以及

c) 收获步骤 b)中产生的慢病毒载体颗粒。

15. 一种慢病毒载体颗粒，其包含权利要求 1-13 中任一项的慢病毒载体或通过权利要求 14 的方法制备。

16. 权利要求 15 的慢病毒载体颗粒在制备治疗性 T 细胞中的用途，其中所述治疗性 T 细胞表达癌症相关抗原特异性受体蛋白，例如 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)，以及任选的显性负性 TGF-β II 型受体。

17. 一种制备治疗性 T 细胞的方法，包括用权利要求 15 的慢病毒载体颗粒转导 T 细胞。

18.权利要求 17 的方法，其中所述慢病毒载体颗粒的转导导致所述治疗性 T 细胞表达癌症相关抗原特异性受体蛋白，例如 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)，以及任选的显性负性 TGF-β II 型受体。

经修改的权利要求
国际局收到日：2019年12月30日（30.12.2019）

1. 一种慢病毒载体，其包含用于指导编码感兴趣的多肽的核苷酸序列在宿主细胞中表达的截短的 EF1α 启动子，例如，所述截短的 EF1α 启动子是包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的 EF1α 核心启动子；

其中，所述慢病毒载体是非复制型慢病毒载体；且

其中所述慢病毒载体包含可操作连接的 5' LTR、ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、所述截短的 EF1α 启动子、WPRE 元件和 3' LTR，以及任选地，用于插入编码感兴趣的多肽的核苷酸序列的多克隆位点。

2. 权利要求 1 的慢病毒载体，其中所述 5' LTR 包含 SEQ ID NO:3 或 11 所示核苷酸序列；所述 ψ 元件包含 SEQ ID NO:4 或 12 所示核苷酸序列；所述 RRE 元件包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列；所述 cPPT/CTS 元件包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列；所述 WPRE 元件包含 SEQ ID NO:9 或 14 所示核苷酸序列；其中所述 3' LTR 包含 SEQ ID NO:10 或 15 所示核苷酸序列。

3. 权利要求 1-2 中任一项的慢病毒载体，其包含可操作连接的包含 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列的 5' LTR，包含 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的 ψ 元件，包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列的 RRE 元件，包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列的 cPPT/CTS 元件，包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的截短的 EF1α 启动子，包含 SEQ ID NO:14 所示核苷酸序列的 WPRE 元件，包含 SEQ ID NO: 15 所示核苷酸序列的 3' LTR，以及任选地，用于插入编码感兴趣的多肽的核苷酸序列的多克隆位点。

4. 权利要求 1-3 中任一项的慢病毒载体，其还包含编码感兴趣的多肽的核苷酸序列。

5. 权利要求 1-4 中任一项的慢病毒载体，其中所述感兴趣的多肽是包括多种蛋白的融合多肽，所述融合多肽中的所述多种蛋白由自裂解肽分隔开。

6. 权利要求 1-5 中任一项的慢病毒载体，其中所述感兴趣的多肽是包括第一蛋白和第二蛋白的融合多肽，所述融合多肽在第一蛋白和第二蛋白之间包含自裂解肽。

7. 权利要求 5 或 6 的慢病毒载体，其中所述自裂解肽是 2A 多肽，例如，所述自裂解肽选自 P2A、F2A、E2A 或 T2A 多肽，或其功能性变体。

8. 权利要求 6 或 7 的慢病毒载体，其中所述第一蛋白是癌症相关抗原特异性受体蛋白，例如 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

9. 权利要求 6-8 中任一项的慢病毒载体，其中所述第二蛋白是显性负性 TGF-β II 型受体。

10. 权利要求 9 的慢病毒载体，其中所述显性负性 TGF-β II 型受体缺失 TGF-β II 型受体的胞内信号传导结构域，例如，所述显性负性 TGF-β II 型受体包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

11. 一种制备慢病毒载体颗粒的方法，所述方法包括：

a) 使权利要求 1-10 中任一项所述的慢病毒载体、表达 Gag 和/或 Pol 的一或多种包装载体、表达包膜蛋白如 VSV-G 的包膜载体共转染合适的宿主细胞；

b) 培养转染的所述宿主细胞以使所述慢病毒载体包装成慢病毒载体颗粒；以及

c) 收获步骤 b)中产生的慢病毒载体颗粒。

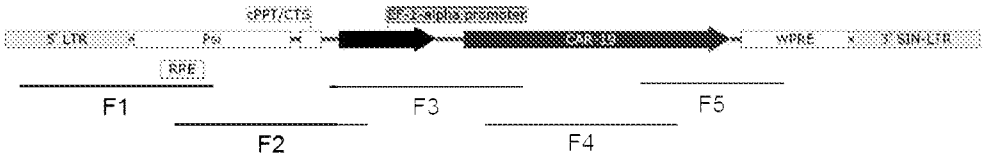
12. 一种慢病毒载体颗粒，其包含权利要求 1-10 中任一项的慢病毒载体或通过权利要求 11 的方法制备。

13. 权利要求 12 的慢病毒载体颗粒在制备治疗性 T 细胞中的用途，其中所述治疗性 T 细胞表达癌症相关抗原特异性受体蛋白，例如 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)，以及任选的显性负性 TGF-β II 型受体。

14. 一种制备治疗性 T 细胞的方法，包括用权利要求 12 的慢病毒载体颗粒转导 T 细胞。

15.权利要求 14 的方法，其中所述慢病毒载体颗粒的转导导致所述治疗性 T 细胞表达癌症相关抗原特异性受体蛋白，例如 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)，以及任选的显性负性 TGF-β II 型受体。

(A) Old vector including $P_{EF1\alpha}$-L; long promoter (531 bp)



(B) New vector including $P_{EF1\alpha}$-S; short promoter (212 bp)

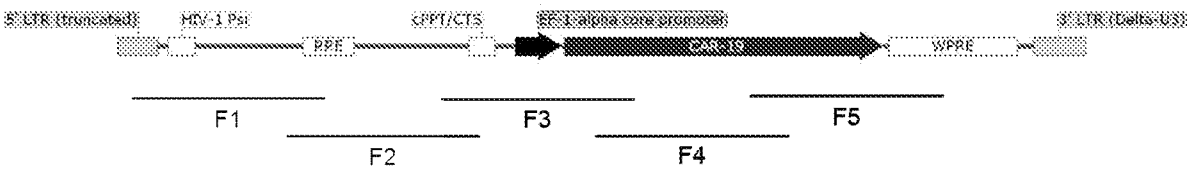


图 1

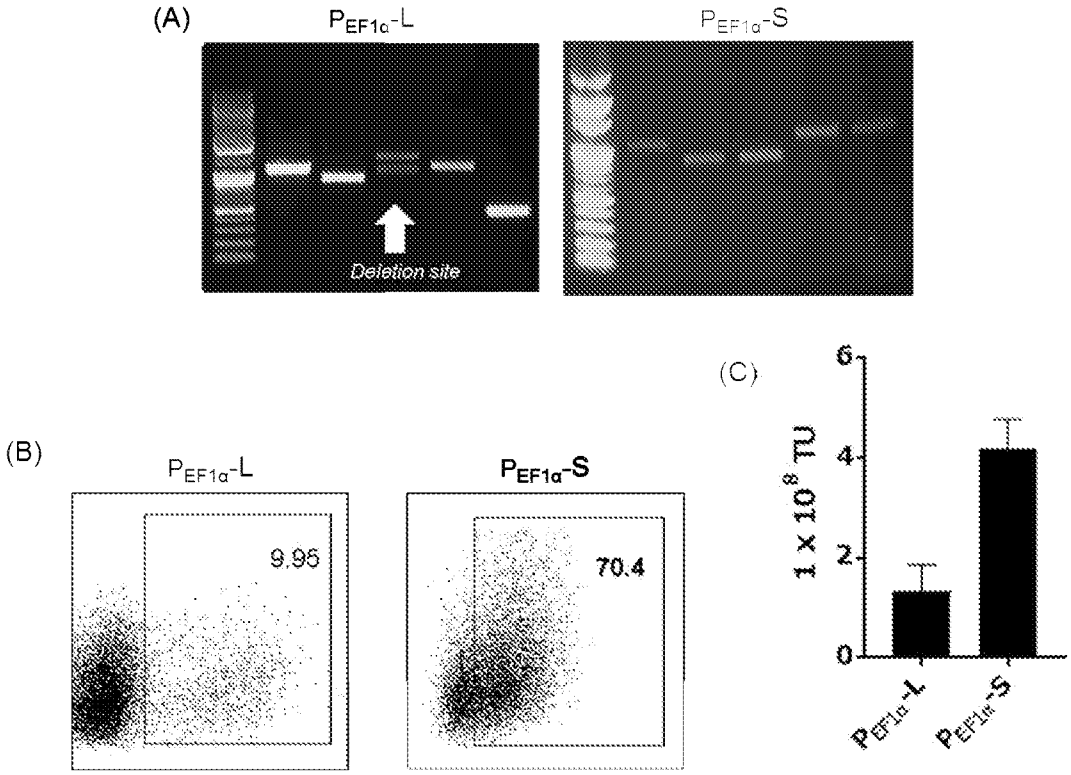

(A)
$P_{EF1\alpha}$-L
$P_{EF1\alpha}$-S
Deletion site
(B)
$P_{EF1\alpha}$-L
$P_{EF1\alpha}$-S
9.96
70.4
(C)
1×10^8 TU
6
4
2
0
$P_{EF1\alpha}$-L
$P_{EF1\alpha}$-S

图 2

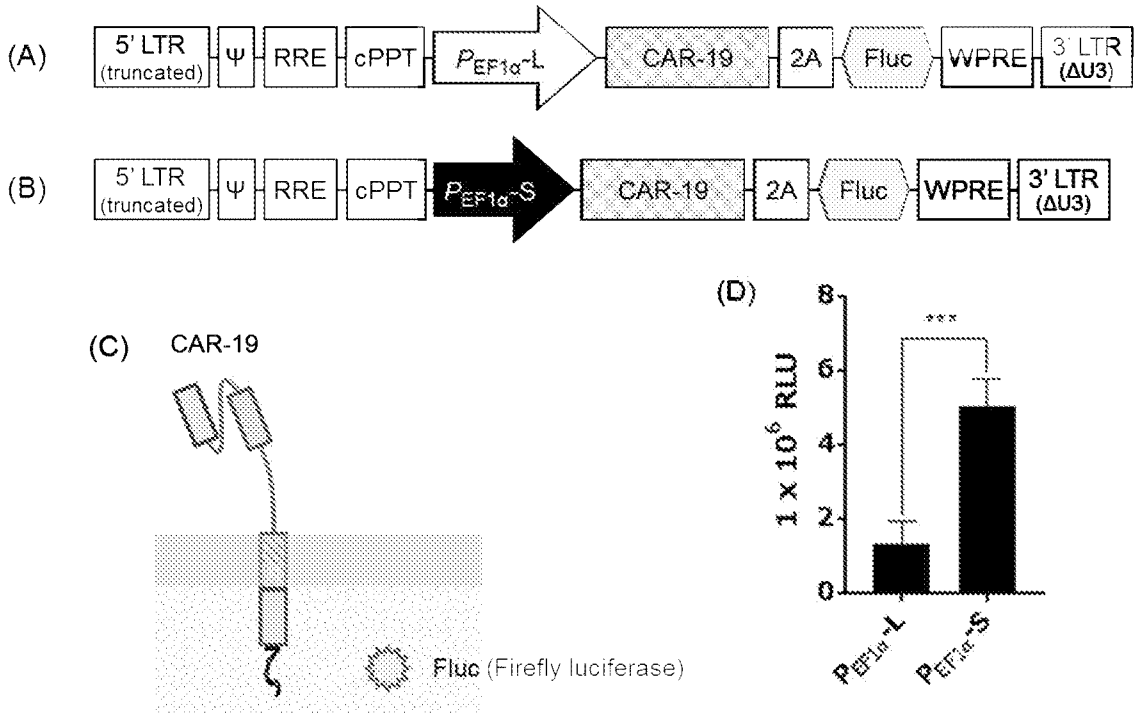

(A)
5' LTR (truncated)
Ψ
RRE
cPPT
$P_{EF1\alpha}$-L
CAR-19
2A
Fluc
WPRE
3' LTR (ΔU3)
(B)
5' LTR (truncated)
Ψ
RRE
cPPT
$P_{EF1\alpha}$-S
CAR-19
2A
Fluc
WPRE
3' LTR (ΔU3)
(C)
CAR-19
Fluc (Firefly luciferase)
(D)
1 x 10^6 RLU
8
6
4
2
0
***
$P_{EF1\alpha}$-L
$P_{EF1\alpha}$-S

图 3

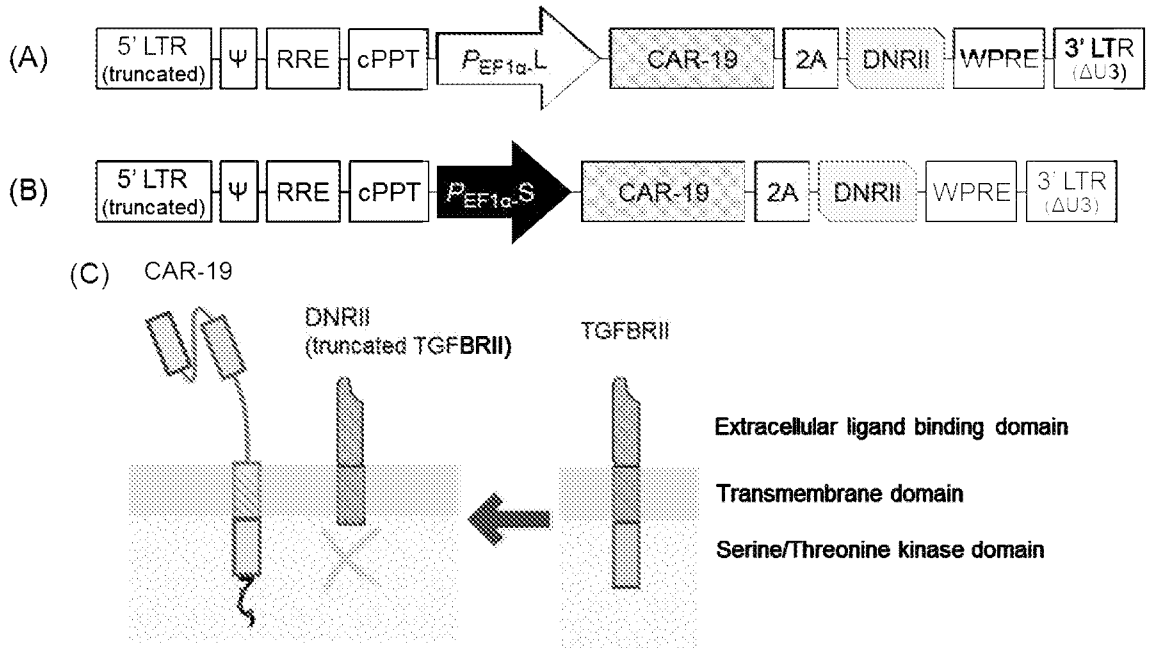

(A)
5' LTR (truncated)
Ψ
RRE
cPPT
$P_{EF1\alpha}$-L
CAR-19
2A
DNRII
WPRE
3' LTR (ΔU3)
(B)
5' LTR (truncated)
Ψ
RRE
cPPT
$P_{EF1\alpha}$-S
CAR-19
2A
DNRII
WPRE
3' LTR (ΔU3)
(C) CAR-19
DNRII (truncated TGFBRII)
TGFBRII
Extracellular ligand binding domain
Transmembrane domain
Serine/Threonine kinase domain

图 4

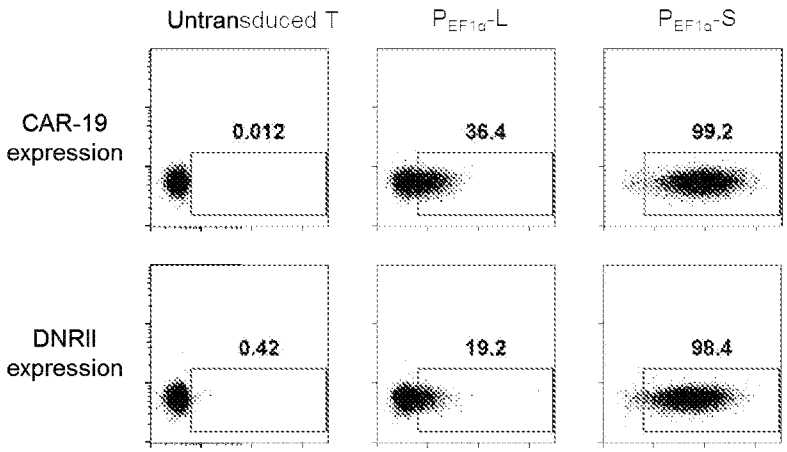

Untransduced T
$P_{EF1\alpha}$-L
$P_{EF1\alpha}$-S
CAR-19 expression
0.012
36.4
99.2
DNRII expression
0.42
19.2
98.4

图 5

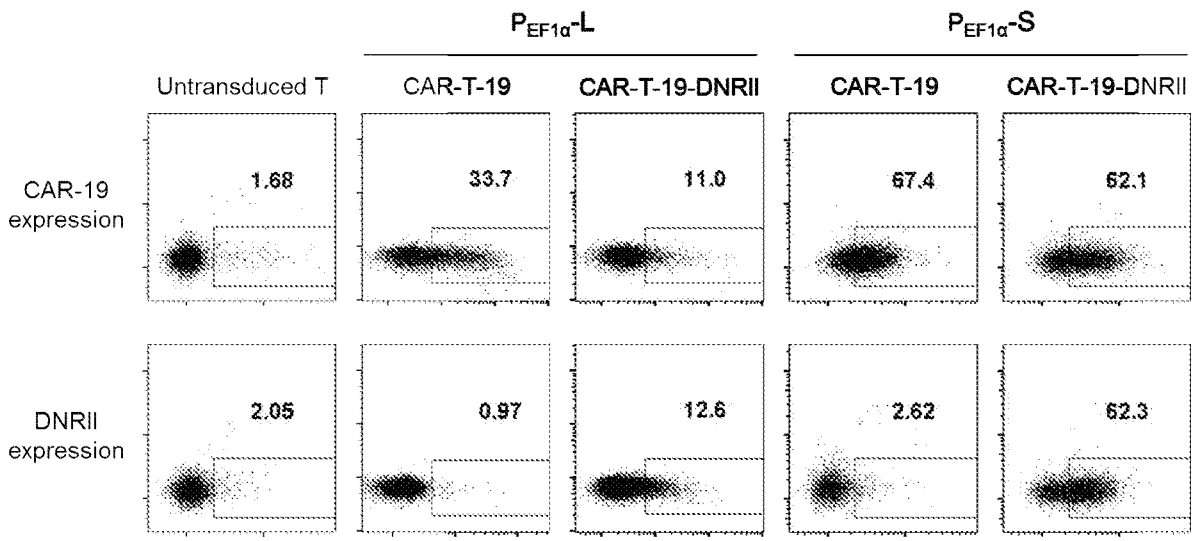

$P_{EF1\alpha}$-L
$P_{EF1\alpha}$-S
Untransduced T
CAR-T-19
CAR-T-19-DNRII
CAR-T-19
CAR-T-19-DNRII
CAR-19 expression
1.68
33.7
11.0
67.4
62.1
DNRII expression
2.05
0.97
12.6
2.62
62.3

图 6

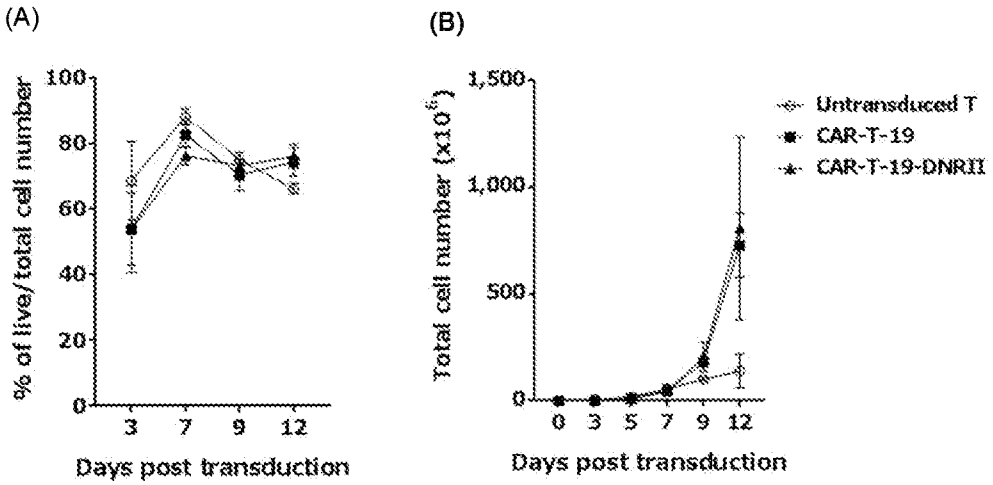

(A)
% of live/total cell number
100
80
60
40
20
0
3
7
9
12
Days post transduction
(B)
Total cell number (x10^6)
1,500
1,000
500
0
0
3
5
7
9
12
Days post transduction
Untransduced T
CAR-T-19
CAR-T-19-DNRII

图 7

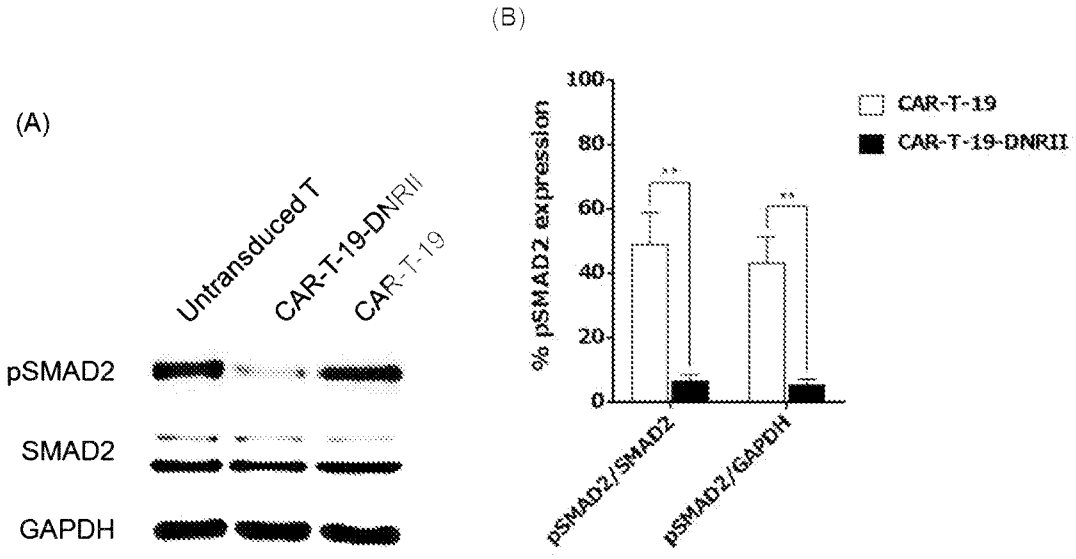

(A)
Untransduced T
CAR-T-19-DNRII
CAR-T-19
pSMAD2
SMAD2
GAPDH
(B)
% pSMAD2 expression
100
80
60
40
20
0
CAR-T-19
CAR-T-19-DNRII
**
**
pSMAD2/SMAD2
pSMAD2/GAPDH

图 8

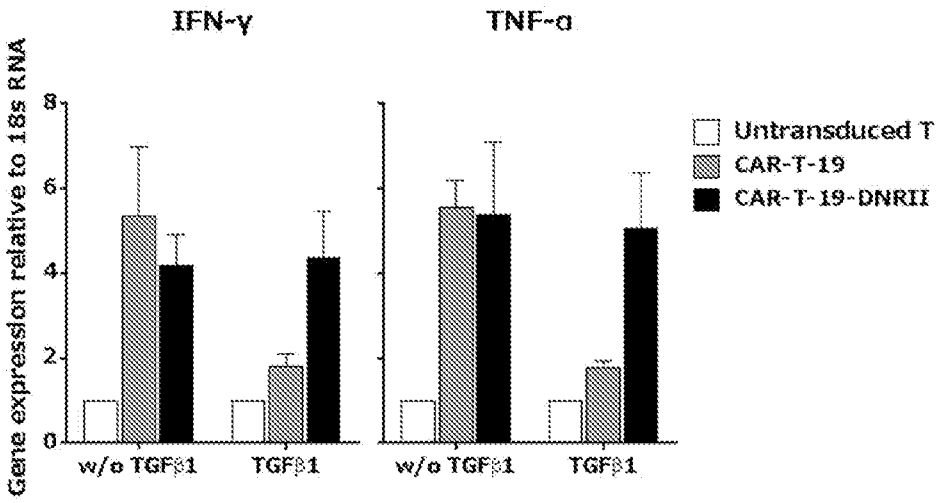

IFN-γ
TNF-α
Gene expression relative to 18s RNA
0
2
4
6
8
w/o TGFβ1
TGFβ1
w/o TGFβ1
TGFβ1
Untransduced T
CAR-T-19
CAR-T-19-DNRII

图 9

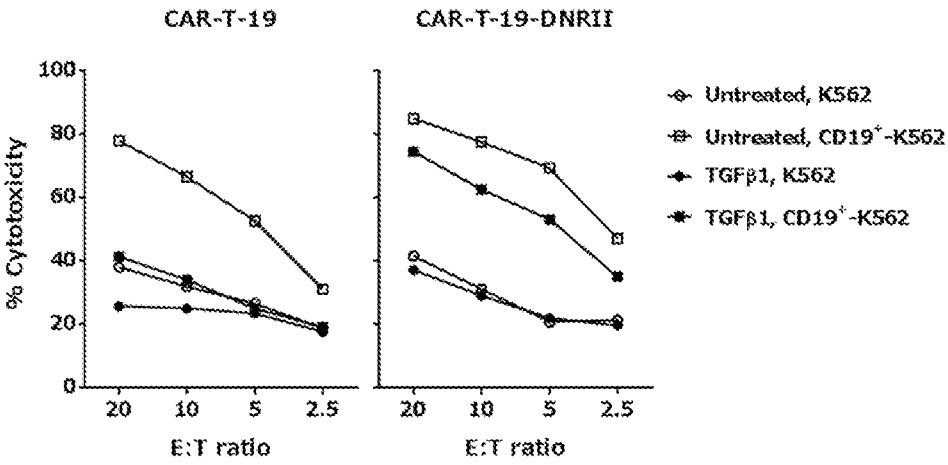

CAR-T-19
CAR-T-19-DNRII
% Cytotoxicity
100
80
60
40
20
0
20
10
5
2.5
E:T ratio
Untreated, K562
Untreated, CD19+-K562
TGFβ1, K562
TGFβ1, CD19+-K562

图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/084828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/867(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNMED; CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; JPTXT; CNKI; Pubmed; Genbank; Embl-Ebi; Google scholar; STN on the web; 中国专利生物序列检索系统; China Patents Biological Sequence Search System: 慢病毒, 延伸因子1α, 截短, 启动子, 自裂解肽, 转化生长因子受体, 显性负性, 嵌合抗原受体, 载体颗粒, lentivir+, Elongation factor, EF-1α, EF-S, short, truncated, 5'LTR, ψ, RRE, cPPT/CTS, LTR, 2A, P2A, F2A, E2A, T2A, CAR, TCR, TGF-β II, dominant negative, particle, 基于序列SEQ ID NO:13的检索, search for SEQ ID NO: 13

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017207979 A1 (UNIV OF SHEFFIELD) 07 December 2017 (2017-12-07) see claim 27, and figure 18	1-3, 14, 15, 17
Y	CN 107099546 A (SHENGWU (BEIJING) BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 29 August 2017 (2017-08-29) see claim 9	8-13, 16, 18
Y	CN 108203720 A (SHANGHAI SHENGBO BIOMEDICAL TECH CO., LTD.) 26 June 2018 (2018-06-26) see claim 4	4-13, 16, 18
A	CN 104583231 A (IMMUNE DESIGN CORP.) 29 April 2015 (2015-04-29) see entire document	1-18
A	CN 108174604 A (SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL DBA SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE) 15 June 2018 (2018-06-15) see entire document	1-18

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 July 2019	**30 October 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KLOSS, C. C. et al. "Dominant-Negative TGF-beta Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication" *MOLECULAR THERAPY,* Vol. 26, No. 7, 05 July 2018 (2018-07-05), pages 1855-1866, see abstract	12, 13, 16, 18
Y	WO 2017207979 A1 (UNIV OF SHEFFIELD) 07 December 2017 (2017-12-07) see claim 27, and figure 18	4-13, 16, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/084828

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/084828

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017207979 A1	07 December 2017	US 2019194660 A1	27 June 2019
		GB 201609597 D0	13 July 2016
		EP 3430143 A1	23 January 2019
CN 107099546 A	29 August 2017	None	
CN 108203720 A	26 June 2018	None	
CN 104583231 A	29 April 2015	EP 3480316 A1	08 May 2019
		JP 2015512263 A	27 April 2015
		BR 112014024449 A2	08 August 2017
		HK 1201853 A1	11 September 2015
		NZ 700340 A	24 February 2017
		KR 20150014440 A	06 February 2015
		JP 2018046860 A	29 March 2018
		AU 2013237900 A1	09 October 2014
		CA 2868838 A1	03 October 2013
		MX 362699 B	01 February 2019
		EP 2831095 B1	28 November 2018
		WO 2013149167 A1	03 October 2013
		ES 2707288 T3	03 April 2019
		ZA 201407174 B	25 May 2016
		SG 11201406162U A	30 October 2014
		IL 234838 D0	31 December 2014
		DK 2831095 T3	18 February 2019
		MX 2014011823 A	09 March 2015
		EP 2831095 A1	04 February 2015
		AU 2013237900 B2	27 July 2017
		EA 201491813 A1	31 August 2015
CN 108174604 A	15 June 2018	JP 2018522567 A	16 August 2018
		EP 3331920 A4	03 April 2019
		AU 2016306209 A1	15 March 2018
		EP 3331920 A1	13 June 2018
		WO 2017027291 A1	16 February 2017
		MX 2018001568 A	25 April 2019
		CA 2994829 A1	16 February 2017

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2019/084828

A. 主题的分类

C12N 15/867(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNMED;CPRSABS;CNABS;DWPI;SIPOABS;CNTXT;WOTXT;EPTXT;JPTXT;CNKI;Pubmed;Genbank;Embl-Ebi;Google scholar; STN on the web;中国专利生物序列检索系统：慢病毒，延伸因子1α，截短，启动子，自裂解肽，转化生长因子受体，显性负性，嵌合抗原受体，载体颗粒，lentivir+, Elongation factor, EF-1α, EF-S, short, truncated, 5’LTR, Ψ, RRE, cPPT/CTS, LTR, 2A, P2A, F2A, E2A, T2A, CAR, TCR, TGF-β II, dominant negative, particle, 基于序列SEQ ID NO:13的检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2017207979 A1 (UNIV OF SHEFFIELD) 2017年 12月 7日 (2017-12-07) 参见权利要求27，附图18	1-3，14，15，17
Y	CN 107099546 A (胜武北京生物科技有限公司) 2017年 8月 29日 (2017-08-29) 参见权利要求9	8-13，16，18
Y	CN 108203720 A (上海生博生物医药科技有限公司) 2018年 6月 26日 (2018-06-26) 参见权利要求4	4-13，16，18
A	CN 104583231 A (免疫设计公司) 2015年 4月 29日 (2015-04-29) 参见全文	1-18
A	CN 108174604 A (西雅图儿童医院DBA西雅图儿童研究所) 2018年 6月 15日 (2018-06-15) 参见全文	1-18

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 7月 20日	2019年 10月 30日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 李康琦 电话号码 62411034

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	Kloss Christopher C.等. "Dominant-Negative TGF-beta Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication" MOLECULAR THERAPY, 第26卷，第7期，2018年 7月 5日 (2018-07-05)， 第1855-1866页 参见摘要	12，13，16，18
Y	WO 2017207979 A1 (UNIV OF SHEFFIELD) 2017年 12月 7日 (2017-12-07) 参见权利要求27，附图18	4-13，16，18

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/084828

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/084828

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2017207979	A1	2017年 12月 7日	US	2019194660	A1	2019年 6月 27日
				GB	201609597	D0	2016年 7月 13日
				EP	3430143	A1	2019年 1月 23日
CN	107099546	A	2017年 8月 29日		无		
CN	108203720	A	2018年 6月 26日		无		
CN	104583231	A	2015年 4月 29日	EP	3480316	A1	2019年 5月 8日
				JP	2015512263	A	2015年 4月 27日
				BR	112014024449	A2	2017年 8月 8日
				HK	1201853	A1	2015年 9月 11日
				NZ	700340	A	2017年 2月 24日
				KR	20150014440	A	2015年 2月 6日
				JP	2018046860	A	2018年 3月 29日
				AU	2013237900	A1	2014年 10月 9日
				CA	2868838	A1	2013年 10月 3日
				MX	362699	B	2019年 2月 1日
				EP	2831095	B1	2018年 11月 28日
				WO	2013149167	A1	2013年 10月 3日
				ES	2707288	T3	2019年 4月 3日
				ZA	201407174	B	2016年 5月 25日
				SG	11201406162U	A	2014年 10月 30日
				IL	234838	D0	2014年 12月 31日
				DK	2831095	T3	2019年 2月 18日
				MX	2014011823	A	2015年 3月 9日
				EP	2831095	A1	2015年 2月 4日
				AU	2013237900	B2	2017年 7月 27日
				EA	201491813	A1	2015年 8月 31日
CN	108174604	A	2018年 6月 15日	JP	2018522567	A	2018年 8月 16日
				EP	3331920	A4	2019年 4月 3日
				AU	2016306209	A1	2018年 3月 15日
				EP	3331920	A1	2018年 6月 13日
				WO	2017027291	A1	2017年 2月 16日
				MX	2018001568	A	2019年 4月 25日
				CA	2994829	A1	2017年 2月 16日