



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117203223 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 08

(21) 申请号 202280028023.6

(22) 申请日 2022.02.25

(30) 优先权数据

63/154,639 2021.02.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/018027 2022.02.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/183072 EN 2022.09.01

(71) 申请人 凯洛尼亚疗法有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 莫莉·R·珀金斯

凯文·M·弗里德曼

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

专利代理师 辛怡 杨青

(51) Int.Cl.

C07K 14/145 (2006.01)

权利要求书12页 说明书89页
序列表77页 附图20页

(54) 发明名称

淋巴细胞靶向慢病毒载体

(57) 摘要

本文提供了慢病毒载体,所述慢病毒载体包含突变的异源包膜蛋白、靶向蛋白和至少一种转基因,所述转基因用于递送到以所述靶向蛋白为特征的细胞并由其表达。还提供了用于产生本文所述的慢病毒载体的方法和材料、用于转导靶细胞的方法以及由根据本公开的慢病毒载体转导的细胞。

1. 一种慢病毒载体,所述慢病毒载体包括:
 - (a) 病毒包膜,所述病毒包膜包含:
异源淋巴细胞靶向蛋白,所述淋巴细胞靶向蛋白包含:
胞外结构域,所述胞外结构域包含淋巴细胞靶向结构域;和
跨膜结构域;和
 - (b) 突变的VSV-G包膜蛋白,所述突变的VSV-G包膜蛋白表现出与LDL-R的结合被抑制但介导膜融合;和
 - (c) 表达盒,所述表达盒包含异源转基因。
2. 根据权利要求1所述的慢病毒载体,其中所述异源淋巴细胞靶向蛋白是包含含T细胞靶向结构域的胞外结构域的异源T细胞靶向蛋白。
3. 根据权利要求1所述的慢病毒载体,其中所述异源淋巴细胞靶向蛋白是包含含NK细胞靶向结构域的胞外结构域的异源自然杀伤(NK)细胞靶向蛋白。
4. 根据权利要求1所述的慢病毒载体,其中所述异源淋巴细胞靶向蛋白是包含含B细胞靶向结构域的胞外结构域的异源B细胞靶向蛋白。
5. 根据权利要求1或2所述的慢病毒载体,其中所述异源淋巴细胞靶向蛋白是异源T细胞靶向蛋白,所述异源T细胞靶向蛋白特异性结合至:
 - (a) T细胞标志物,其选自CD3、CD28、CD80、4-1BB、AhR、CD3、CD2、CD7、CD4、CD8、CD25、CD44、CD45RA、CD47、CD62L、CD69、CD94、CD95、CD127、CD161、CD183(CXCR3)、CD184(CXCR4)、CD185(CXCR5)、CD193(CCR3)、CD194(CCR4)、CD195(CCR5)、CD196(CCR6)、CD197(CCR7)、CCR10、PD-1、TCRa/b、CD5、CD27、CD45RO、CD45RB、CD57、CD103、CD122、P2RX7、TIGIT、LAG-3、TIM-3和IL6ST,或其任何组合;
 - (b) $\gamma\delta$ T细胞标志物,其选自 $\gamma\delta$ TCR、V δ 1、V δ 2和NKG2D(KLRK1、CD314);
 - (c) NK T细胞标志物,其选自恒定TCR(Va24-Ja18)、CD185(CXCR5)、CXCR6和IL-21R,或其任何组合;或者
 - (d) MAIT细胞标志物,其选自Va7.2、Ja33、CXCR6、IL-18R、KLRB1(CD161)和VLA4($\alpha 4\beta 1$ 整合素)或其任何组合。
6. 根据权利要求1、2或5所述的慢病毒载体,其中所述异源淋巴细胞靶向蛋白是包含胞外结构域的异源T细胞靶向蛋白,所述胞外结构域包含特异性结合至CD3蛋白或CD28蛋白的T细胞靶向结构域。
7. 根据权利要求1或3所述的慢病毒载体,其中所述异源淋巴细胞靶向蛋白是特异性结合至NK细胞标志物的异源NK细胞靶向蛋白,所述NK细胞标志物选自CD56、NKp46、CD16、KIR(s)、NKG2蛋白(例如,NKG2D(KLRK1、CD314))、KLRB1(CD161)、KLRD1(cd94)、IL2Rb(CD122)、IL-21R、SLAMF6(CD352)、SLAMF7(CD319)和IL-18R,或其任何组合。
8. 根据权利要求1或4所述的慢病毒载体,其中所述异源淋巴细胞靶向蛋白是特异性结合至B细胞标志物的B细胞靶向蛋白,所述B细胞标志物选自CD19、CD20、CD21、CD22、CD24、CD38、CD40、CD72、CD32b、CD268、CD269、CD267、CD86、CD80、CD52、CD138、CD27、CD28、CD23、CD84、CD257、CD270、CD37、CD74和CD269,或其任何组合。
9. 根据权利要求1、2、5和6中任一项所述的慢病毒载体,其中所述靶向蛋白包含CD80蛋白,所述CD80蛋白包含与SEQ ID NO:6具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的胞外结构域。

10. 根据权利要求1、2、5、6和9中任一项所述的慢病毒载体,其中所述靶向蛋白包含CD80蛋白,所述CD80蛋白包含与SEQ ID NO:8具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的跨膜和胞内结构域。

11. 根据权利要求1、2、5、6、9或10所述的慢病毒载体,其中所述靶向蛋白包含CD80蛋白,所述CD80蛋白包含SEQ ID NO:2或不存在SEQ ID NO:4的信号肽的SEQ ID NO:2。

12. 根据权利要求1、2、5和6中任一项所述的慢病毒载体,其中所述靶向蛋白包含抗CD3 scFv,所述抗CD3 scFv具有与SEQ ID NO:14具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:18具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的重链可变区。

13. 根据权利要求12所述的慢病毒载体,其中所述靶向蛋白包含抗CD3靶向蛋白,所述抗CD3靶向蛋白包含:(i) SEQ ID NO:10或不存在SEQ ID NO:12的信号肽的SEQ ID NO:10;或者(ii) SEQ ID NO:117或不存在SEQ ID NO:12的信号肽的SEQ ID NO:117。

14. 根据任一前述权利要求所述的慢病毒载体,其中如在宿主细胞中表达的所述靶向蛋白包含信号序列。

15. 根据任一前述权利要求所述的慢病毒载体,其中所述成熟靶向蛋白缺乏信号序列。

16. 根据权利要求1-14中任一项所述的慢病毒载体,其中所述成熟靶向蛋白包含至少一个来自信号序列的氨基酸。

17. 根据任一前述权利要求所述的慢病毒载体,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含选自以下各项中的一个或多个的突变:

H8、N9、Q10、K47、K50、A51、S183、S179、N180、I182、M184、Y209、I347、T350、T352、E353和R354处的突变;

N9与Q10之间的TT插入、H8与N9之间的GGG插入、N9与Q10之间的GGG插入、N208与Y209之间的TT插入、P46与K47之间的GGG插入、以及N208与Y209之间的GGG插入;以及
残基1-8的缺失。

18. 根据任一前述权利要求所述的慢病毒载体,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含选自以下各项中的两个或更多的突变:

H8、N9、Q10、K47、K50、A51、S183、S179、N180、I182、M184、Y209、I347、T350、T352、E353和R354处的突变;

N9与Q10之间的TT插入、H8与N9之间的GGG插入、N9与Q10之间的GGG插入、N208与Y209之间的TT插入、P46与K47之间的GGG插入、以及N208与Y209之间的GGG插入;以及
残基1-8的缺失。

19. 根据任一前述权利要求所述的慢病毒载体,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含选自H8A、N9A、Q10A、K47A、K47Q、N180A、I182A、Y209A、T352A、T352W、E353A、R354A和R354Q中的一者或多者的突变。

20. 根据任一前述权利要求所述的慢病毒载体,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含选自H8A、K47A、K47Q、Y209A、R354A和R354Q中的一者或多者的突变。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的慢病毒载体,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含:

- (a) K47突变和R354突变;
- (b) N180突变、I182突变、T352突变和E353突变;
- (c) T352突变和E353突变;
- (d) N9突变、Q10突变和N180突变;或者
- (e) H8与N9之间的GGS插入和N9与Q10之间的GGS插入;
- (f) N9与Q10之间的TT插入;或者
- (g) P46与K47之间的GGS插入。

22. 根据权利要求21所述的慢病毒载体,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含:

- (a) K47Q突变和R354A突变;
- (b) N180A突变、I182A突变、T352A突变和E353A突变;
- (c) T352W突变和E353A突变;或者
- (d) N9A突变、Q10A突变和N180A突变。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的慢病毒载体,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含SEQ ID NO:74、93、95、97、99和103中任一者的氨基酸序列。

24. 根据任一前述权利要求所述的慢病毒载体,其中所述异源转基因编码嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含:胞外结构域,所述胞外结构域包含特异性结合至靶分子的结合结构域;胞内信号传导结构域,其中所述胞内信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)和任选的共刺激信号传导结构域;以及跨膜结构域,所述跨膜结构域连接所述胞外结构域和所述胞内信号传导结构域。

25. 根据权利要求24所述的慢病毒载体,其中由所述转基因编码的所述CAR包含:

(a) 结合结构域,所述结合结构域特异性结合CD19、BCMA、 α 叶酸受体、5T4、Ab整合素、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD52、CD70、CD79a、CD79b、CD80、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、ErbB2 (HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EpCAM、FAP、胎儿AChR、FLT3、Fra、GD2、GD3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、HLADR、IL-11R α 1、IL-13R α 2、Lambda、Lewis-Y、Kappa、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2d配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、存活素、TAG72、TEM、VEGFR2、BAFF-R、紧密连接蛋白18.2、CD86、FcRL5、GPC5和TACI中的一者或多者;

(b) 跨膜结构域,所述跨膜结构域选自CD28、CD2、CD4、CD8a、CD5、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD9、CD16、CD22、CD25、CD27、CD33、CD37、CD40、CD45、CD64、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD95 (Fas)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD154 (CD40L)、CD200R、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD272 (BTLA)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、CD279 (PD-1)、CD300、CD357 (GITR)、A2aR、DAP10、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、GAL9、KIR、Lck、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、PTCH2、ROR2、Ryk、Slp76、SIRP α 、pT α 、TCR α 、TCR β 、TIM3、TRIM、LPA5和Zap70跨膜结构域;

(c) 胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域选自CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD5、CD22、CD79a、CD278 (ICOS)、DAP10、DAP12、FcR γ 和CD66d结构域;

(d) 共刺激结构域,所述共刺激结构域选自CD27、CD28、CD40L、GITR、NKG2C、CARD1、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD226、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、LFA-1、LIGHT、NKG2C、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70结构域中的一者或者多者;以及

(e) 任选的胞外非信号传导接头结构域,所述非信号传导接头结构域位于所述结合结构域与所述跨膜结构域之间,其中所述非信号传导接头结构域选自:

(i) 免疫球蛋白铰链区,所述免疫球蛋白铰链区选自野生型或经修饰的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgD铰链区;

(ii) 铰链区,所述铰链区选自野生型或经修饰的CD8a、CD4、CD28和CD7铰链区;

(iii) Fc结构域的全部或一部分,所述Fc结构域选自CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域中的一者或者多者;以及

(iv) II型C-凝集素的茎区,其来源于CD23、CD69、CD72、CD94、NKG2A和NKG2D的茎区。

26. 根据权利要求24或25中任一项所述的慢病毒载体,其中由所述转基因编码的所述CAR是抗CD19 CAR,其包含:

包含抗CD19 scFv的结合结构域,所述抗CD19 scFv包含与SEQ ID NO:46具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:50具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的重链可变区;

CD8a铰链和跨膜结构域,其与SEQ ID NO:52具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性;

CD3 ζ 效应结构域,其与SEQ ID NO:56具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性;以及

4-1BB共刺激结构域,其与SEQ ID NO:54具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

27. 根据权利要求26所述的慢病毒载体,其中由所述转基因编码的所述CAR包含SEQ ID NO:42或不存在SEQ ID NO:44的信号肽的SEQ ID NO:42。

28. 根据权利要求24或25中任一项所述的慢病毒载体,其中由所述转基因编码的所述CAR是抗BCMACAR,其包含:

包含抗BCMA scFv的结合结构域,所述抗BCMA scFv包含与SEQ ID NO:62具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:66具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的重链可变区;

CD8a铰链和跨膜结构域,其与SEQ ID NO:52具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性;

CD3 ζ 效应结构域,其与SEQ ID NO:122具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性;以及

4-1BB共刺激结构域,其与SEQ ID NO:54具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

29. 根据权利要求26所述的慢病毒载体,其中由所述转基因编码的所述CAR包含SEQ ID NO:58或不存在SEQ ID NO:60的信号肽的SEQ ID NO:58。

30. 一种用于产生根据前述权利要求中任一项所述的淋巴细胞靶向慢病毒载体的方法,所述方法包括:

(a) 用GagPol质粒、Rev质粒、转基因质粒和VSV-G env质粒转染生产细胞,其中;

(i) 所述GagPol质粒包含一种或多种编码慢病毒gag基因和慢病毒pol基因的多核苷酸,并且能够在所述生产细胞中表达慢病毒Gag多蛋白和慢病毒Pol多蛋白;

(ii) 所述Rev质粒包含编码慢病毒rev基因的多核苷酸,并且能够在所述生产细胞中表达慢病毒Rev蛋白;

(iii) 所述转基因质粒包含表达盒,所述表达盒包含编码CAR的多核苷酸;并且

(iv) 所述VSV-G env质粒包含串联表达盒,其中所述串联表达盒包含编码突变的VSV-G包膜蛋白的多核苷酸和编码淋巴细胞靶向蛋白的多核苷酸,并且所述VSV-G env质粒能够在所述生产细胞内表达所述突变的VSV-G包膜蛋白和所述淋巴细胞靶向蛋白;

(b) 在培养基中培养所述生产细胞;以及

(c) 从所述培养基中收获慢病毒载体。

31. 一种用于产生根据权利要求1-29中任一项所述的淋巴细胞靶向慢病毒载体的方法,所述方法包括:

(a) 用GagPol质粒、Rev质粒、转基因质粒和VSV-G env质粒转染生产细胞,其中;

(i) 所述GagPol质粒包含编码所述Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体和淋巴细胞靶向蛋白的串联表达盒,并且所述GagPol质粒能够在所述生产细胞内表达慢病毒Gag多蛋白、慢病毒Pol多蛋白和所述淋巴细胞靶向蛋白;

(ii) 所述Rev质粒包含编码慢病毒rev基因的多核苷酸,并且能够在所述生产细胞中表达慢病毒Rev蛋白;

(iii) 所述转基因质粒包含表达盒,所述表达盒包含编码CAR的多核苷酸;并且

(iv) 所述VSV-G env质粒包含编码突变的VSV-G包膜蛋白的多核苷酸,并且所述VSV-G env质粒能够在所述生产细胞内表达所述突变的VSV-G包膜蛋白;

(b) 在培养基中培养所述生产细胞;以及

(c) 从所述培养基中收获慢病毒载体。

32. 一种用于产生根据权利要求1-29中任一项所述的淋巴细胞靶向慢病毒载体的方法,所述方法包括:

(a) 用GagPol质粒、Rev质粒、转基因质粒和VSV-G env质粒转染生产细胞,其中;

(i) 所述GagPol质粒包含一种或多种编码慢病毒gag基因和慢病毒pol基因的多核苷酸,并且能够在所述生产细胞中表达慢病毒Gag多蛋白和慢病毒Pol多蛋白;

(ii) 所述Rev质粒包含串联表达盒,其中所述串联表达盒包含编码慢病毒rev基因的多核苷酸和编码淋巴细胞靶向蛋白的多核苷酸,并且所述Rev质粒能够在所述生产细胞内表达慢病毒Rev蛋白和所述淋巴细胞靶向蛋白;

(iii) 所述转基因质粒包含表达盒,所述表达盒包含编码CAR的多核苷酸;并且

(iv) 所述VSV-G env质粒包含编码突变的VSV-G包膜蛋白的多核苷酸,并且所述VSV-G env质粒能够在所述生产细胞内表达所述突变的VSV-G包膜蛋白;

(b) 在培养基中培养所述生产细胞;以及

(c) 从所述培养基中收获慢病毒载体。

33. 一种用于产生根据权利要求1-29中任一项所述的淋巴细胞靶向慢病毒载体的方法,所述方法包括:

(a) 用GagPol质粒、Rev质粒、转基因质粒、VSV-G env质粒和淋巴细胞靶向蛋白质粒转染生产细胞;

(i) 所述GagPol质粒包含一种或多种编码慢病毒gag基因和慢病毒pol基因的多核苷酸,并且能够在所述生产细胞中表达慢病毒Gag多蛋白和慢病毒Pol多蛋白;

(ii) 所述Rev质粒包含编码慢病毒rev基因的多核苷酸,并且能够在所述生产细胞中表达慢病毒Rev蛋白;

(iii) 所述转基因质粒包含表达盒,所述表达盒包含编码CAR的多核苷酸;并且

(iv) 所述VSV-G env质粒包含编码突变的VSV-G包膜蛋白的多核苷酸,并且能够在所述生产细胞中表达所述突变的VSV-G包膜蛋白;并且

(v) 所述淋巴细胞靶向蛋白质粒包含编码淋巴细胞靶向蛋白的多核苷酸,并且能够在所述生产细胞内表达所述淋巴细胞靶向蛋白;

(b) 在培养基中培养所述生产细胞;以及

(c) 从所述培养基中收获慢病毒载体。

34. 根据权利要求30-33中任一项所述的方法,其中由所述淋巴细胞靶向蛋白质粒编码的所述淋巴细胞靶向蛋白是T细胞靶向蛋白。

35. 根据权利要求30-33中任一项所述的方法,其中由所述淋巴细胞靶向蛋白质粒编码的所述淋巴细胞靶向蛋白是NK细胞靶向蛋白。

36. 根据权利要求30-33中任一项所述的方法,其中由所述淋巴细胞靶向蛋白质粒编码的所述淋巴细胞靶向蛋白是B细胞靶向蛋白。

37. 根据权利要求30-33和34中任一项所述的方法,其中由所述淋巴细胞靶向蛋白质粒编码的所述淋巴细胞靶向蛋白是特异性结合至以下各项的T细胞靶向蛋白:

(a) T细胞标志物,所述T细胞标志物选自CD3、CD28、CD80、4-1BB、AhR、CD3、CD2、CD7、CD4、CD8、CD25、CD44、CD45RA、CD47、CD62L、CD69、CD94、CD95、CD127、CD161、CD183 (CXCR3)、CD184 (CXCR4)、CD185 (CXCR5)、CD193 (CCR3)、CD194 (CCR4)、CD195 (CCR5)、CD196 (CCR6)、CD197 (CCR7)、CCR10、PD-1、TCRa/b、CD5、CD27、CD45RO、CD45RB、CD57、CD103、CD122、P2RX7、TIGIT、LAG-3、TIM-3和IL6ST,或其任何组合;

(b) $\gamma\delta$ T细胞标志物,其选自 $\gamma\delta$ TCR、V δ 1、V δ 2和NKG2D (KLRK1、CD314或其任何组合);

(c) NK T细胞标志物,其选自恒定TCR (Va24-Ja18)、CD185 (CXCR5)、CXCR6和IL-21R,或其任何组合;或者

(d) MAIT细胞标志物,其选自Va7.2、Ja33、CXCR6、IL-18R、KLRB1 (CD161) 和VLA4 ($\alpha 4\beta 1$ 整合素)或其任何组合。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述靶向蛋白包含CD80蛋白,所述CD80蛋白包含与SEQ ID NO:6具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的胞外结构域。

39. 根据权利要求37和38中任一项所述的方法,其中所述靶向蛋白包含CD80蛋白,所述

CD80蛋白包含与SEQ ID NO:8具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的跨膜和胞内结构域。

40. 根据权利要求37、38和39中任一项所述的方法,其中所述靶向蛋白包含CD80蛋白,所述CD80蛋白包含SEQ ID NO:2或不存在SEQ ID NO:4的信号肽的SEQ ID NO:2。

41. 根据权利要求30-34和37中任一项所述的方法,其中所述靶向蛋白包含:(i)抗CD3 scFv,其具有与SEQ ID NO:14具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:18具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的重链可变区;或者(ii)抗CD3 scFv,其具有与SEQ ID NO:115具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:113具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的重链可变区。

42. 根据权利要求30-34、37和41中任一项所述的方法,其中所述靶向蛋白包含抗CD3靶向蛋白,其包含:(i)SEQ ID NO:10或不存在SEQ ID NO:12的信号肽的SEQ ID NO:10;或者(ii)SEQ ID NO:117或不存在SEQ ID NO:12的信号肽的SEQ ID NO:117。

43. 根据权利要求30-33和35中任一项所述的方法,其中由所述淋巴细胞靶向蛋白质粒编码的所述淋巴细胞靶向蛋白是特异性结合至NK细胞标志物的NK细胞靶向蛋白,所述NK细胞标志物选自CD56、NKp46、CD16、KIR(s)、NKG2蛋白(例如,NKG2D(KLRK1、CD314))、KLRB1(CD161)、KLRD1(cd94)、IL2Rb(CD122)、IL-21R、SLAMF6(CD352)、SLAMF7(CD319)和IL-18R,或其任何组合。

44. 根据权利要求30-33和36中任一项所述的方法,其中由所述淋巴细胞靶向蛋白质粒编码的所述淋巴细胞靶向蛋白是特异性结合至B细胞标志物的B细胞靶向蛋白,所述B细胞标志物选自CD19、CD20、CD21、CD22、CD24、CD38、CD40、CD72、CD32b、CD268、CD269、CD267、CD86、CD80、CD52、CD138、CD27、CD28、CD23、CD84、CD257、CD270、CD37、CD74和CD269,或其任何组合。

45. 根据权利要求30-44中任一项所述的方法,其中由所述VSV-Genv质粒编码的所述突变的VSV-G包膜蛋白包含选自以下各项中的一个或多个的突变:

H8、N9、Q10、K47、K50、A51、S183、S179、N180、I182、M184、Y209、I347、T350、T352、E353和R354处的突变;

N9与Q10之间的TT插入、H8与N9之间的GGG插入、N9与Q10之间的GGG插入、N208与Y209之间的TT插入、P46与K47之间的GGG插入、以及N208与Y209之间的GGG插入;以及
残基1-8的缺失。

46. 根据权利要求30-45中任一项所述的方法,其中由所述VSV-Genv质粒编码的所述突变的VSV-G包膜蛋白包含选自以下各项中的两个或更多个的突变:H8、N9、Q10、K47、K50、A51、S183、S179、N180、I182、M184、Y209、I347、T350、T352、E353和R354处的突变;

N9与Q10之间的TT插入、H8与N9之间的GGG插入、N9与Q10之间的GGG插入、N208与Y209之间的TT插入、P46与K47之间的GGG插入、以及N208与Y209之间的GGG插入;以及
残基1-8的缺失。

47. 根据权利要求30-46中任一项所述的方法,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含选

自H8A、N9A、Q10A、K47A、K47Q、N180A、I182A、Y209A、T352A、T352W、E353A、R354A和R354Q中的一者或多者的突变。

48. 根据权利要求30-47中任一项所述的方法,其中由所述VSV-Genv质粒编码的所述突变的VSV-G包膜蛋白包含选自H8A、K47A、K47Q、Y209A、R354A和R354Q中的一者或多者的突变。

49. 根据权利要求30-48中任一项所述的方法,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含:

- (a) K47突变和R354突变;
- (b) N180突变、I182突变、T352突变和E353突变;
- (c) T352突变和E353突变;
- (d) N9突变、Q10突变和N180突变;或者
- (e) H8与N9之间的GGG插入和N9与Q10之间的GGG插入;
- (f) N9与Q10之间的TT插入;或者
- (g) P46与K47之间的GGG插入。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含:

- (a) K47Q突变和R354A突变;
- (b) N180A突变、I182A突变、T352A突变和E353A突变;
- (c) T352W突变和E353A突变;或者
- (d) N9A突变、Q10A突变和N180A突变。

51. 根据权利要求30-50中任一项所述的方法,其中所述突变的VSV-G包膜蛋白包含SEQ ID NO: 74、93、95、97、99和103中任一者的氨基酸序列。

52. 根据权利要求30-51中任一项所述的方法,其中由所述转基因质粒编码的所述CAR包含胞外结构域,所述胞外结构域包含特异性结合至靶分子的结合结构域;胞内信号传导结构域,其中所述胞内信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)和任选的共刺激信号传导结构域;以及跨膜结构域,所述跨膜结构域连接所述胞外结构域和所述胞内信号传导结构域。

53. 根据权利要求30-52中任一项所述的方法,其中由所述转基因质粒编码的所述CAR包含:

(a) 结合结构域,所述结合结构域特异性结合CD19、BCMA、 α 叶酸受体、5T4、Ab整合素、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD52、CD70、CD79a、CD79b、CD80、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、ErbB2 (HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EpCAM、FAP、胎儿AchR、FLT3、Fra、GD2、GD3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、HLADR、IL-11R α 1、IL-13R α 2、Lambda、Lewis-Y、Kappa、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2d配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、存活素、TAG72、TEM、VEGFR2、BAFF-R、紧密连接蛋白18.2、CD86、FcRL5、GPRC5和TACI中的一者或多者;

(b) 跨膜结构域,所述跨膜结构域选自CD28、CD2、CD4、CD8a、CD5、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD9、CD16、CD22、CD25、CD27、CD33、CD37、CD40、CD45、CD64、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD95 (Fas)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD154 (CD40L)、CD200R、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD272 (BTLA)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、CD279

(PD-1)、CD300、CD357 (GITR)、A2aR、DAP10、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、GAL9、KIR、Lck、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、PTCH2、ROR2、Ryk、Slp76、SIRP α 、pT α 、TCR α 、TCR β 、TIM3、TRIM、LPA5和Zap70跨膜结构域；

(c) 胞内信号传导结构域，所述胞内信号传导结构域选自CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD5、CD22、CD79a、CD278 (ICOS)、DAP10、DAP12、FcR γ 和CD66d结构域；

(d) 共刺激结构域，所述共刺激结构域选自CD27、CD28、CD40L、GITR、NKG2C、CARD1、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD226、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、LFA-1、LIGHT、NKG2C、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70结构域中的一者或多者；以及

(e) 任选的胞外非信号传导接头结构域，所述非信号传导接头结构域位于所述结合结构域与所述跨膜结构域之间，其中所述非信号传导接头结构域选自：

(i) 免疫球蛋白铰链区，所述免疫球蛋白铰链区选自野生型或经修饰的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgD铰链区；

(ii) 铰链区，所述铰链区选自野生型或经修饰的CD8a、CD4、CD28和CD7铰链区；

(iii) Fc结构域的全部或一部分，所述Fc结构域选自CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域中的一者或多者；以及

(iv) II型C-凝集素的茎区，其来源于CD23、CD69、CD72、CD94、NKG2A和NKG2D的茎区。

54. 根据权利要求30-53中任一项所述的方法，其中由所述转基因质粒编码的所述CAR是抗CD19 CAR，其包含：

(a) 包含抗CD19 scFv的结合结构域，所述抗CD19 scFv包含与SEQ ID NO:46具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:50具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的重链可变区；

(b) CD8a铰链和跨膜结构域，其与SEQ ID NO:52具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性；

(c) CD3 ζ 效应结构域，其与SEQ ID NO:56具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性；以及

(d) 4-1BB共刺激结构域，其与SEQ ID NO:54具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

55. 根据权利要求54所述的方法，其中由所述转基因编码的所述CAR包含SEQ ID NO:42或不存在SEQ ID NO:44的信号肽的SEQ ID NO:42。

56. 根据权利要求30-53中任一项所述的方法，其中由所述转基因质粒编码的所述CAR是抗BCMACAR，其包含：

(a) 包含抗BCMA scFv的结合结构域，所述抗BCMA scFv包含与SEQ ID NO:62具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:66具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的重链可变区；

(b) CD8a铰链和跨膜结构域，其与SEQ ID NO:52具有至少约75%、80%、85%、90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性；

(c) CD3 ζ 效应结构域,其与SEQ ID NO:122具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性；以及

(d) 4-1BB共刺激结构域,其与SEQ ID NO:54具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

57.根据权利要求56所述的方法,其中由所述转基因编码的所述CAR包含SEQ ID NO:58或不存在SEQ ID NO:60的信号肽的SEQ ID NO:58。

58.根据权利要求30-57中任一项所述的方法,其中所述生产细胞用限定比率的转基因质粒、GagPol质粒和VSV-G env质粒和Rev质粒转导,任选地其中所述转基因质粒、GagPol质粒和VSV-G env质粒和Rev质粒的限定比率分别为约1:1:1:1至约5:4:1:1。

59.如权利要求58所述的方法,其中用约4:2:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒何VSV-G env质粒和Rev质粒转导所述生产细胞。

60.如权利要求58所述的方法,其中用约3.125:3.125:2.5:1.25的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒和VSV-G env质粒和Rev质粒转导所述生产细胞。

61.如权利要求30-60中任一项所述的方法,其中从所述培养基中收获慢病毒载体包括离心、阴离子交换、色谱法或其任何组合。

62.如权利要求30-61中任一项所述的方法,其中从所述培养基中收获的LVV产物在浓缩的LVV产物中具有约 $1e7$ TU/mL至约 $1e12$ TU/mL的病毒滴度。

63.一种用于产生表达异源转基因的T细胞的方法,所述方法包括:

用一种或多种根据权利要求1、2、5、6和9-29中任一项所述的LVV转导所述T细胞,其中所述T细胞的转导导致所述T细胞表达所述异源转基因。

64.根据权利要求63所述的方法,其中所述T细胞是静息T细胞。

65.根据权利要求63或64所述的方法,其中转导所述T细胞在体内或离体进行。

66.根据权利要求63-65中任一项所述的方法,其中所述一种或多种LVV静脉内、腹膜内、肿瘤内、骨内或结节内施用给受试者。

67.根据权利要求63-66中任一项所述的方法,其中转导所述T细胞包括使从受试者获得的全血或外周血单核细胞(PBMC)内的T细胞与所述一种或多种LVV接触。

68.根据权利要求63-67中任一项所述的方法,其中转导在不使用外源T细胞刺激剂的情况下完成。

69.根据权利要求68所述的方法,其中所述外源T细胞刺激剂包含抗CD3抗体或其抗原结合片段、抗CD28抗体或其抗原结合片段、或两者。

70.一种用于产生表达CAR的T细胞的方法,所述方法包括:

用一种或多种根据权利要求24-29中任一项所述的LVV转导所述T细胞,并且转导所述T细胞导致所述T细胞表达所述CAR转基因。

71.根据权利要求70所述的方法,其中所述T细胞是静息T细胞。

72.根据权利要求70或71所述的方法,其中转导所述T细胞在体内或离体进行。

73.根据权利要求70-72中任一项所述的方法,其中所述一种或多种LVV静脉内、腹膜内、肿瘤内、骨内或结节内施用给受试者。

74.根据权利要求70-72中任一项所述的方法,其中转导所述T细胞包括使从受试者获

得的全血或外周血单核细胞(PBMC)内的T细胞与所述一种或多种LVV接触。

75.根据权利要求70-74中任一项所述的方法,其中转导在不使用外源T细胞刺激剂的情况下完成。

76.如权利要求75所述的方法,其中所述外源T细胞刺激剂包含抗CD3抗体或其抗原结合片段、抗CD28抗体或其抗原结合片段、或两者。

77.一种用于产生表达异源转基因的NK细胞的方法,所述方法包括:

用一种或多种根据权利要求1、3、7和14-29中任一项所述的LVV转导所述NK细胞,其中所述NK细胞的转导导致所述NK细胞表达所述异源转基因。

78.根据权利要求77所述的方法,其中所述NK细胞是静息NK细胞。

79.根据权利要求77或78所述的方法,其中转导所述NK细胞在体内或离体进行。

80.根据权利要求77-79中任一项所述的方法,其中所述一种或多种LVV静脉内、腹膜内、肿瘤内、骨内或结节内施用给受试者。

81.根据权利要求77-79中任一项所述的方法,其中转导所述NK细胞包括接触从受试者获得的全血或外周血单核细胞(PBMC)中的NK细胞。

82.根据权利要求77-81中任一项所述的方法,其中转导在不使用外源NK细胞刺激剂的情况下完成。

83.一种用于产生表达CAR的NK细胞的方法,所述方法包括:

用一种或多种根据权利要求24-29中任一项所述的LVV转导所述NK细胞,并且转导所述NK细胞导致所述NK细胞表达所述CAR转基因。

84.根据权利要求83所述的方法,其中所述NK细胞是静息NK细胞。

85.根据权利要求83或84所述的方法,其中转导所述NK细胞在体内或离体进行。

86.根据权利要求83-85中任一项所述的方法,其中所述一种或多种LVV静脉内、腹膜内、肿瘤内、骨内或结节内施用给受试者。

87.根据权利要求83-85中任一项所述的方法,其中转导所述NK细胞包括使从受试者获得的全血或外周血单核细胞(PBMC)内的NK细胞与所述一种或多种LVV接触。

88.根据权利要求83-87中任一项所述的方法,其中转导在不使用外源NK细胞刺激剂的情况下完成。

89.一种用于产生表达异源转基因的B细胞的方法,所述方法包括:

用一种或多种根据权利要求1、4、8和14-29中任一项所述的LVV转导所述B细胞,其中所述B细胞的转导导致所述B细胞表达所述异源转基因。

90.根据权利要求89所述的方法,其中所述B细胞是静息B细胞。

91.根据权利要求89或90所述的方法,其中转导所述B细胞在体内或离体进行。

92.根据权利要求89-91中任一项所述的方法,其中所述一种或多种LVV静脉内、腹膜内、肿瘤内、骨内或结节内施用给受试者。

93.根据权利要求89-91中任一项所述的方法,其中转导所述B细胞包括接触从受试者获得的全血或外周血单核细胞(PBMC)中的B细胞。

94.根据权利要求89-93中任一项所述的方法,其中转导在不使用B细胞刺激剂的情况下完成。

95.一种用于产生表达CAR的B细胞的方法,所述方法包括:

用一种或多种根据权利要求24-29中任一项所述的LVV转导所述B细胞,并且转导NK细胞导致所述B细胞表达所述CAR转基因。

96. 根据权利要求95所述的方法,其中所述B细胞是静息B细胞。

97. 根据权利要求95或96所述的方法,其中转导所述B细胞在体内或离体进行。

98. 根据权利要求95-97中任一项所述的方法,其中所述一种或多种LVV静脉内、腹膜内、肿瘤内、骨内或结节内施用给受试者。

99. 根据权利要求95-97中任一项所述的方法,其中转导所述B细胞包括使从受试者获得的全血或外周血单核细胞(PBMC)内的B细胞与所述一种或多种LVV接触。

100. 根据权利要求95-99中任一项所述的方法,其中转导在不使用外源B细胞刺激剂的情况下完成。

淋巴细胞靶向慢病毒载体

[0001] 关于序列表的声明

[0002] 与本申请相关的序列表以文本格式而不是纸质副本提供,并且据此以引用方式并入本说明书中。包含序列表的文本文件的名称是930207_401WO_SEQUENCE_LISTING.txt。文本文件为158KB,创建于2022年2月25日,并经由EFS-Web以电子方式提交。

背景技术

[0003] 慢病毒载体在基因修饰细胞疗法,特别是T细胞疗法中起关键作用。最近批准的T细胞疗法依赖于逆转录病毒载体以将治疗性分子(例如,嵌合抗原受体(CAR))转导到T淋巴细胞中。与CAR T细胞产生相关的风险是用转基因转导其他细胞类型。使用具有广泛细胞向性的整合载体(例如用VSV-G包膜蛋白假型化的慢病毒载体)可带来严重但罕见的安全问题。

附图说明

[0004] 图1是适用于第三代LVV产生系统的辅助质粒的示意图。

[0005] 图2A至图2B描绘了图表(图2A)和FACS图(图2B),示出携带突变VSV-G包膜的慢病毒载体中靶和脱靶进入Jurkat T细胞和Raji B细胞以破坏LDL受体结合(Trop-002、Trop-051、Trop-052、Trop-055和Trop-061)和T细胞靶向蛋白CD80。在图2A中,左侧条柱是每个样本的中靶进入,而右侧条柱是脱靶进入。T细胞靶向蛋白与其在T细胞上的同源配体的结合导致慢病毒载体进入,测量报告绿色荧光蛋白(GFP)的后续表达。

[0006] 图3A至图3B描绘了示出以下的图:(图3A)由VSV-G包装质粒表达的T细胞靶向蛋白CD80以与HEK293生产细胞表面上的突变VSV-G相对等同的水平表达;并且(图3B)用该方法生成的LVV可以转导靶向的Jurkat T细胞,但不转导Raji B细胞。

[0007] 图4描绘了示出以下的图:(顶行)使用通过将CD80靶向蛋白克隆到Rev包装质粒或突变的VSV-G包装质粒中而生成的LVV,HEK293T生产细胞表面上CD80和突变的VSV-G的表达水平;(底行)通过将CD80靶向蛋白克隆到Rev包装质粒或突变的VSV-G包装质粒中而生成的LVV转导靶向的Jurkat T细胞。

[0008] 图5描绘了(左)使用五质粒包装体系的HEK293T生产细胞表面上的CD80靶向蛋白表达作为CD80质粒浓度的函数;以及(右)用五质粒包装体系生成的LVV转导靶向的Jurkat T细胞,并且转导效率与CD80包装质粒浓度相关。

[0009] 图6A至图6D描绘了在贴壁HEK293或悬浮HEK293生产细胞中产生的靶向LVV的淋巴细胞的滴度。通过离心(图6A)或通过阴离子交换色谱法后接切向流过滤(图6B)从HEK293贴壁细胞培养基收获LVV。通过阴离子交换色谱法从HEK293悬浮细胞培养基收获LVV(图6C)。通过AEX/TFF浓缩得到具有高纯度和回收率水平的LVV制剂(图6D)。

[0010] 图7描绘了用包含BCMA CAR转基因的LVV或包含BCMA CAR转基因的靶向LVV的T细胞(抗CD3和CD80)测试来自健康人供体的PBMC中的T细胞转导的示意图。右下方示出的图表明,即使在低MOI下,靶向LVV的T细胞以比标准LVV更高的水平转导T细胞,并且与标准LVV不

同,靶向LVV的T细胞能够在不存在IL-2和外源性激活抗体(抗CD3和抗CD28)的情况下转导T细胞。

[0011] 图8描绘了示出在存在或不存在外源性激活抗CD3和抗CD28抗体的情况下,从获自三个不同供体并使用标准LVV或T细胞重定向的LVV(抗CD3和CD80)转导的PBMC进行的T细胞扩增的图。

[0012] 图9描绘了用包含CD19 CAR转基因的LVV或包含CD19 CAR转基因的靶向LVV的T细胞(抗CD3和CD80)测试来自健康人供体的PBMC中的T细胞转导的示意图。右下方的图示出,靶向LVV的T细胞以比标准LVV更高的水平转导T细胞,并且与标准LVV不同,靶向LVV的T细胞能够在不存在外源性激活抗体(抗CD3和抗CD28)的情况下转导T细胞。

[0013] 图10描绘了示出用于生成靶向LVV的T细胞的抗CD3靶向蛋白(12F6, VH-VL取向和VL-VH取向)的T细胞转导效率和T细胞激活水平的图。

[0014] 图11描绘了示出BCMA CAR T细胞与BCMA阳性细胞系一起培养后表现出增加的T细胞效应细胞因子($\text{TNF}\alpha$ -左; $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{IFN}\gamma$ -右),所述BCMA阳性细胞系未用BCMA-阴性细胞系观察是由标准LVV还是T细胞重定向LVV(抗CD3和CD80)生成的。

[0015] 图12A至图12B描绘了示出使用靶向LVV的T细胞体内递送转基因的图:(图12A)靶向LVV(抗CD3和CD80)的T细胞在人源化小鼠模型($n=5$)中特异性地转导人T细胞(CD3+)而非人B细胞(CD20+);并且(图12B)与没有靶向LVV的标准LVV相比,靶向LVV的T细胞转导CD8+和CD8-(CD4)T细胞。

[0016] 图13描绘了示出与标准LVV相比,靶向LVV的CD80增强CD4T细胞的转导的图。

[0017] 图14描绘了示出与标准LVV相比,靶向(抗CD3和CD80)LVV的T细胞转导靶Jurkat T细胞,但不转导脱靶肿瘤细胞(Raji、Ramos、Jeko-1和NALM-6)的图。

具体实施方式

[0018] 本文描述了工程化慢病毒载体。该慢病毒载体包含突变的异源包膜蛋白、靶向蛋白和至少一种转基因,所述转基因用于递送到以靶向蛋白为特征的细胞并由所述细胞表达。在一些实施方案中,靶向蛋白被选择为靶向免疫细胞,包括例如淋巴细胞或T细胞。在某些此类实施方案中,本文所述的慢病毒载体能够选择性地靶向并有效转导静息淋巴细胞,例如T细胞。在一些实施方案中,本文所述的慢病毒载体能够在不存在外源T细胞刺激剂的情况下转导和/或激活T细胞。在一些实施方案中,与标准慢病毒载体相比,本文所述的慢病毒载体增强CD4 T细胞的转导。

[0019] 在一些实施方案中,与掺入另一种促融合env蛋白(例如,cocal env、副粘病毒env、截短的VSV-G env)的标准LVV相比,掺入如本文所述的突变的env和靶向蛋白的慢病毒载体能够产生高滴度LVV产物。

[0020] 还提供了用于产生本文所述的慢病毒载体的方法和材料、用于转导靶细胞的方法以及由根据本公开的慢病毒载体转导的细胞。在一些实施方案中,如本文所述的慢病毒载体和/或由这种载体转导的细胞可用于治疗对表达由载体递送的转基因的细胞的存在有响应的疾病或病症。

[0021] 定义

[0022] 在更详细地阐述本公开之前,提供将在本文中使用的某些术语的定义可能有助于

对本公开的理解。

[0023] 在本说明书中,除非另外指明,否则任何浓度范围、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值,并且在适当的情况下包括其分数(诸如整数的十分之一和百分之一)。此外,除非另外指明,否则本文所述的涉及任何物理特征(诸如聚合物亚基、大小或厚度)的任何数值范围应理解为包括所述范围内的任何整数。如本文所用,除非另外指明,否则术语“约”意指所述范围、值或结构的 $\pm 20\%$ 。应当理解,如本文所用的术语“一个”和“一种”是指列举的组分中的“一种或多种”。替代方案(例如,“或”)的使用应理解为意指多个替代方案中的任一者、两者或其任何组合。如本文所用,术语“包括”、“具有”和“包含”同义使用,这些术语及其变体旨在被解释为非限制性的。

[0024] 除非本文中明确不同地定义,否则抗体技术领域中的技术人员所理解的术语各自具有本领域中获得的含义。术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且包括多克隆抗体和单克隆抗体。“抗体”可以指完整抗体,其包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链,以及完整抗体的具有或保留结合靶分子的能力的抗原结合部分(或抗原结合结构域)。抗体可以是天然存在的、重组产生的、遗传工程化的或修饰形式的免疫球蛋白,例如内抗体、肽抗体、纳米抗体、单结构域抗体、SMIP、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双抗体、三抗体、四抗体、串联双scFv、串联三scFv、ADAPTIR)。单克隆抗体或其抗原结合部分可以是非人的、嵌合的、人源化的或人的,优选地人源化的或人的。免疫球蛋白结构和功能例如在Harlow等人编辑, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988) 中进行了综述。完整抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合结构域”意在包括“抗体片段”,其表示完整抗体的一部分并且指完整抗体的抗原决定可变区或互补决定区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、Fab'-SH、F(ab')₂、双抗体、线性抗体、scFv抗体、VH和由抗体片段形成的多特异性抗体。“Fab”(抗原结合片段)是抗体的与抗原结合的一部分,并且包含经由链间二硫键与轻链连接的重链的可变区和CH1。抗体可以是任何类型或亚类,包括IgG及其亚类(IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、IgM、IgE、IgA和IgD。

[0025] 在抗体的上下文中,术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链(分别为VH和VL)的可变结构域(或可变区)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个互补决定区(CDR)。(参见例如Kindt等人, *Kuby Immunology*, 第6版, W.H. Freeman and Co., 第91页(2007))。单个VH或VL结构域可以足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可使用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域分离,以分别筛选互补VL或VH结构域的文库。参见例如Portolano等人, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson等人, *Nature* 352:624-628 (1991)。

[0026] 与“高变区”或“HVR”同义的术语“互补决定区”和“CDR”在本领域中已知是指抗体可变区内的氨基酸的非连续序列,其赋予抗原特异性和/或结合亲和力。一般来讲,每个重链可变区中有三个CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3),并且每个轻链可变区中有三个CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

[0027] 如本文所用,术语“结合结构域”、“结合区”和“结合部分”是指具有与靶分子(例如,肿瘤抗原)特异性和非共价结合、缔合、联合、识别或组合的能力的分子,诸如肽、寡肽、

多肽或蛋白质。结合结构域包括任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的生物分子或其他目标靶标的结合配偶体。在一些实施方案中,结合结构域是抗原结合结构域,诸如抗体或其功能性结合结构域或抗原结合部分。示例性结合结构域包括单链抗体可变区(例如,结构域抗体、sFv、scFv、Fab)、受体胞外结构域(例如,TNF- α)、配体(例如,细胞因子、趋化因子)、或针对结合生物分子的特异性能力而选择的合成多肽。

[0028] “主要组织相容性复合物分子”(MHC分子)是指将肽抗原递送到细胞表面的糖蛋白。MHC I类分子是由跨膜 α 链(具有三个 α 结构域)和非共价缔合的 β 2微球蛋白组成的异二聚体。MHC II类分子由两个跨膜糖蛋白 α 和 β 组成,这两个跨膜糖蛋白都跨越膜。每条链具有两个结构域。MHC I类分子将源自胞质溶胶的肽递送到细胞表面,其中肽:MHC复合物被CD8⁺ T细胞识别。MHC II类分子将源自囊泡系统的肽递送到细胞表面,在此它们被CD4⁺ T细胞识别。MHC分子可以来自各种动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0029] “嵌合抗原受体”(CAR)是指包含两个或更多个不同结构域的嵌合融合蛋白,所述两个或更多个不同结构域以不天然存在于宿主细胞中的方式连接在一起并且当在细胞表面上表达时可充当受体。CAR通常由包含结合靶抗原的结合结构域的胞外结构域、任选的胞外间隔区结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域(例如,包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM))、以及任选的胞内共刺激结构域组成。在某些实施方案中,CAR的胞内信号传导结构域具有包含胞内信号传导结构域和胞内共刺激结构域(例如,4-1BB)的ITAM(例如,CD3 ζ)。在某些实施方案中,CAR被合成为单一多肽链或由核酸分子编码为单链多肽。

[0030] 已知多种测定法用于鉴定特异性结合特定靶标的本公开的结合结构域,以及测定结合结构域亲和力,诸如蛋白质印迹、ELISA、分析超速离心、光谱法、表面等离子共振(BIACORE®)分析和MHC四聚体分析(还参见例如Scatchard等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.51:660,1949;Wilson,Science 295:2103,2002;Wolff等人,Cancer Res.53:2560,1993;Altman等人,Science 274:94-96,1996;以及美国专利号5,283,173、5,468,614,或等同物)。如本文所用,“特异性结合”是指结合结构域或其融合蛋白以等于或大于 10^5M^{-1} 的亲和力或 K_d (即,具有1/M单位的特定结合相互作用的平衡缔合常数)与靶分子缔合或联合,同时不与样品中的任何其他分子或组分显著缔合或联合。

[0031] 术语“抗原”和“Ag”是指能够诱导免疫响应的分子。诱导的免疫响应可包括抗体产生、特异性免疫感受态细胞的激活、或两者。包括蛋白质、糖蛋白和糖脂在内的大分子可用作抗原。抗原可以来源于重组或基因组DNA。如本文所设想的那样,抗原不需要(i)仅由基因的全长核苷酸序列编码或(ii)完全由“基因”编码。抗原可以生成或合成,或者抗原可来源于生物样品。这样的生物样品可包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0032] 术语“表位”或“抗原表位”包括抗原内的任何分子、结构、氨基酸序列或蛋白质决定簇,其通过同源免疫结合分子诸如抗体或其片段(例如,scFv)、T细胞受体(TCR)、CAR或其他结合分子、结构域或蛋白质特异性结合。表位决定簇通常含有化学活性表面分子组,诸如氨基酸或糖侧链,并且可具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位可以是线性表位或构象表位。

[0033] 如本文所用,“效应结构域”是融合蛋白或嵌合受体的胞内部分,当接收到适当的信号时,其可直接或间接地促进表达效应结构域的细胞中的生物或生理响应。在某些实施方案中,效应结构域是当结合时接收信号的蛋白质或蛋白质复合物的一部分。在其他实施

方案中,效应结构域是直接结合至靶分子的蛋白质或蛋白质复合物的一部分,所述靶分子触发自效应结构域的信号。例如,响应于CAR与靶分子的结合,效应结构域可将信号转导至宿主细胞内部,从而引发效应功能。当效应结构域含有一个或多个信号传导结构域或基序时,它可以直接地促进细胞响应。在其他实施方案中,效应结构域将通过与一种或多种直接促进细胞响应的其他蛋白质缔合而间接地促进细胞响应。

[0034] “接点氨基酸”或“接点氨基酸残基”是指多肽的两个相邻基序、区域或结构域之间的一个或多个(例如,约2-20个)氨基酸残基。接点氨基酸可以由嵌合蛋白的构建体设计产生(例如,由在构建编码融合蛋白的核酸分子期间使用限制性酶切位点产生的氨基酸残基)。

[0035] “疾病”是受试者的健康状态,其中受试者不能维持稳态,并且其中如果疾病未改善,则受试者的健康继续恶化。相反,受试者的“病症”或“不良状况”是其中受试者能够维持稳态的健康状态,但其中受试者的健康状态不如不存在病症或不良状况时有利。在不治疗的情况下,病症或不良状况不一定导致受试者的健康状态进一步降低。

[0036] “核酸分子”和“多核苷酸”可以是RNA或DNA的形式,其包括cDNA、基因组DNA和合成DNA。核酸分子可以由天然存在的核苷酸(诸如脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸)、天然存在的核苷酸的类似物(例如,天然存在的核苷酸的 α -对映体形式)或两者的组合组成。经修饰的核苷酸可具有糖部分或嘧啶或嘌呤碱基部分的修饰或置换。核酸单体可通过磷酸二酯键或此类键的类似物连接。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、氨基苯基硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等。核酸分子可以是双链的或单链的,如果是单链的,可以是编码链或非编码链(反义链)。编码分子可具有与本领域已知的编码序列相同的编码序列,或者可具有不同的编码序列,由于遗传密码的冗余或简并性或通过剪接,其可编码相同的多肽。

[0037] “编码”是指特定多核苷酸序列(诸如DNA、cDNA和mRNA序列)在生物过程中用作合成其他聚合物和大分子的模板的固有特性,所述模板具有限定的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或限定的氨基酸序列以及由此产生的生物特性。因此,如果对应于多核苷酸的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则该多核苷酸编码该蛋白质。编码链和非编码链都可称为编码蛋白质或多核苷酸的其他产物。除非另外指明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并型式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。

[0038] 如本文所用,术语“内源”或“天然”是指通常存在于宿主或宿主细胞中的基因、蛋白质、化合物、分子或活性,包括基因、蛋白质、化合物、分子或活性的天然存在的变体。

[0039] 如本文所用,“同源的”或“同源物”是指来自宿主细胞的分子或活性,其通过祖先与例如来自相同宿主细胞、来自不同宿主细胞、来自不同生物体、来自不同菌株、来自不同物种的第二基因或活性相关。例如,异源分子或编码该分子的异源基因可以分别与天然宿主细胞分子或编码该分子的基因同源,并且可以任选地具有改变的结构、序列、表达水平或其任何组合。

[0040] 如本文所用,“异源”核酸分子、构建体或序列是指并非宿主细胞天然的,但可与来自宿主细胞的核酸分子或核酸分子部分同源的核酸分子或核酸分子部分。异源核酸分子、构建体或序列的来源可以来自不同的属或种。在一些实施方案中,异源核酸分子不是天然

存在的。在某些实施方案中,异源核酸分子通过例如缀合、转化、转染、转导、电穿孔等被添加(即,不是内源的或天然的)到宿主细胞或宿主基因组中,其中添加的分子可整合到宿主细胞基因组中或作为染色体外遗传物质(例如,作为质粒或其他形式的自我复制载体)存在,并且可以多个拷贝存在。此外,“异源”是指由引入宿主细胞中的非内源核酸分子编码的非天然酶、蛋白质或其他活性,即使该宿主细胞编码同源蛋白质或活性。

[0041] 如本文所用,术语“工程化的”、“重组的”、“突变体”、“经修饰的”或“非天然的”是指已通过引入异源核酸分子而被修饰的生物体、微生物、细胞、核酸分子或载体,或者指已通过人为干预而被遗传工程化(即,通过引入异源核酸分子而被修饰)的细胞或微生物,或者指已被改变为使得内源核酸分子或基因的表达被控制、失调或为组成型的细胞或微生物,其中这种改变或修饰可通过基因工程引入。人为产生的遗传改变可包括例如引入编码一种或多种蛋白质、嵌合受体或酶的核酸分子(其可包含表达控制元件,诸如启动子)的修饰,或者其他核酸分子添加、缺失、置换,或者细胞遗传物质的其他功能破坏或添加。示例性修饰包括编码区或其功能片段中来自参考或亲本分子的异源或同源多肽的修饰。另外的示例性修饰包括例如非编码调控区中的修饰,其中该修饰改变基因或操纵子的表达。

[0042] 如本文所用,术语“转基因”是指编码感兴趣的蛋白质(例如,CAR)的基因或多核苷酸,所述感兴趣的蛋白质的表达在宿主细胞中是期望的并且已通过基因工程技术转移到细胞中。转基因可以编码有治疗意义的蛋白质以及作为报告子、标签、标志物、自杀蛋白等的蛋白质。转基因可以来自天然来源、天然基因的修饰、或者重组或合成分子。在某些实施方案中,转基因是载体的组分。

[0043] 术语抗原的“过表达的”或“过表达”是指细胞中异常高水平的抗原表达。过表达的抗原或抗原的过表达通常与疾病状态相关,诸如在血液恶性肿瘤和在受试者的特定组织或器官内形成实体瘤的细胞中。以肿瘤抗原过表达为特征的实体瘤或血液恶性肿瘤可通过本领域已知的标准测定法确定。

[0044] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对可构成蛋白质或肽的序列的氨基酸的最大数目没有限制。多肽包括含有通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,该术语是指短链,其在本领域中通常也被称为例如肽、寡肽和寡聚物,以及长链,其在本领域中通常被称为蛋白质,其中存在许多类型。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或它们的组合。

[0045] 如本文所用,术语“成熟多肽”或“成熟蛋白质”是指分泌或定位于细胞膜中或某些细胞器(例如,内质网、高尔基体或核内体)内部的蛋白质或多肽,并且包含部分切割的N-末端信号序列(例如,保留信号序列的一个或多个氨基酸,但小于整个信号序列),或者不包含N-末端信号序列(即,N-末端信号序列已被诸如通过内源切割过程从蛋白质或多肽完全去除)。

[0046] “信号序列”也称为“信号肽”、“前导序列”、“前导肽”、“定位信号”或“定位序列”,是存在于新合成的蛋白质的N-末端的短肽(长度通常为13-36个氨基酸),所述蛋白质专用于质膜或分泌途径。信号序列通常在N-末端包含一段短的亲水性、带正电荷的氨基酸、5-15

个残基的中心疏水结构域以及具有信号序列切割位点的C-末端区。在真核生物中,信号序列促使新合成的蛋白质易位至内质网,在此该蛋白质被信号肽酶切割,产生成熟蛋白质,然后进入其适当的目的地。信号序列长度和氨基酸组成的多样性使得难以精确预测切割位点。对于本文公开的多肽序列,当提及信号序列时,还设想了不存在信号序列或具有部分信号序列的多肽序列。

[0047] 两个或更多个核酸或氨基酸序列之间的“同一性百分比”是序列共有的相同位置的数目的函数(即,同一性% = 相同位置的数目/位置的总数 × 100),将缺口的数目和需要引入以优化两个或更多个序列的比对的每个缺口的长度考虑在内。可使用数学算法诸如BLAST和Gapped BLAST程序在它们的默认参数下进行序列的比较以及两个或更多个序列之间的同一性百分比的确定(例如,Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403,1990;还参见www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST的BLASTN)。

[0048] “保守取代”在本领域中被认为是用一个氨基酸取代具有相似特性的另一个氨基酸。示例性保守取代是本领域熟知的(参见例如WO 97/09433,第10页,1997年3月13日公布;Lehninger,Biochemistry,第二版;Worth Publishers,Inc.NY:NY(1975),第71-77页;Lewin,Genes IV,Oxford University Press,NY and Cell Press,Cambridge,MA(1990),第8页)。

[0049] 术语“嵌合”是指非内源的并且包含接合或连接在一起的序列的组合的任何核酸分子或蛋白质,所述序列在自然界中并非天然接合或连接在一起的。例如,嵌合核酸分子可包含编码来自多个不同基因的各种结构域的核酸。又如,嵌合核酸分子可包含来源于不同来源的调控序列和编码序列,或者来源于相同来源但以不同于天然存在的方式排列的调控序列和编码序列。

[0050] 如本文所用的术语“启动子”被定义为由起始多核苷酸序列特异性转录所需的细胞合成机制或引入的合成机制识别的DNA序列。

[0051] 如本文所用,术语“启动子/调控序列”意指表达与启动子/调控序列可操作地连接的基因产物所需的核酸序列。在一些情况下,该序列可以是核心启动子序列,并且在其他情况下,该序列可包含增强子序列和表达基因产物所需的其他调控元件。启动子/调控序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的序列。

[0052] “组成型”启动子是当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时在细胞的大多数或所有生理条件下引起细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0053] “诱导型”启动子是当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅在细胞中存在对应于该启动子的诱导物时才引起细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0054] “组织特异性”启动子是当与编码或由基因指定的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅在细胞是对应于该启动子的组织类型的细胞时才引起细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0055] 如本文所用的短语“在转录控制下”或“可操作地连接”意指启动子相对于多核苷酸处于正确的位置和取向,以控制RNA聚合酶的转录起始和多核苷酸的表达。

[0056] “载体”是能够转运另一种核酸的核酸分子。载体可以是例如质粒、粘粒、病毒或噬菌体。该术语还应当解释为包括促进核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物。“表达载体”是当存在于适当的环境中时能够指导由载体携带的一种或多种转基因所编码的蛋白质

的表达的载体。由如本文所述的载体表达的一种或多种转基因在表达盒中编码。

[0057] “慢病毒载体”是来源于慢病毒的载体,并且包含一种或多种慢病毒包装蛋白和/或表达由载体携带的一种或多种基因所必需的慢病毒蛋白。缩写“LVV”在本文中用于指一个慢病毒载体(单数)以及多个慢病毒载体(复数)。

[0058] “慢病毒”是指能够感染分裂细胞和非分裂细胞的逆转录病毒属。慢病毒的实例包括但不限于HIV(人免疫缺陷病毒,包括HIV 1型和HIV 2型)、马传染性贫血病毒、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)和猿免疫缺陷病毒(SIV)。

[0059] “逆转录病毒”是指具有单链正义RNA分子的RNA病毒。逆转录病毒包含逆转录酶和整合酶。进入靶细胞后,逆转录病毒利用其逆转录酶将其RNA分子转录成DNA分子。随后,使用整合酶将DNA分子整合到宿主细胞基因组中。整合到宿主细胞基因组中后,来自逆转录病毒的序列被称为前病毒(例如,前病毒的序列或前病毒序列)。

[0060] 如本文所用,术语“表达盒”是指包含至少一种转基因和控制其在宿主细胞中表达的调控序列(例如,启动子、3'UTR)的载体核酸的独特组分。串联表达盒是指包含至少两种转基因的载体核酸的组分,所述转基因处于用于串联表达所述至少两种转基因的一组相同调控序列的控制下。在某些实施方案中,串联表达盒包含至少两种处于相同启动子控制下的转基因。在某些实施方案中,第一转基因和第二转基因被内部核糖体进入位点(IRES)、弗林蛋白酶切割位点或自切割病毒2A肽分开,以允许由单个mRNA共表达两种蛋白质。

[0061] 术语“免疫系统细胞”或“免疫细胞”意指源自骨髓中造血干细胞的免疫系统的任何细胞。造血干细胞产生两种主要谱系:髓样祖细胞(其产生骨髓细胞,诸如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、巨核细胞和粒细胞)和淋巴样祖细胞(其产生淋巴样细胞,诸如T细胞、B细胞和自然杀伤(NK)细胞)。示例性免疫系统细胞包括CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、调节性T细胞、自然杀伤细胞和树突细胞。巨噬细胞和树突细胞也可被称为“抗原呈递细胞”或“APC”,它们是当与肽复合的APC的表面上的主要组织相容性复合体(MHC)受体与T细胞表面上的TCR相互作用时可激活T细胞的特化细胞。

[0062] 术语“淋巴细胞”是指淋巴来源的免疫细胞,其是显示出淋巴细胞或其前体或祖细胞的至少一种表型特征的细胞,所述表型特征将所述细胞与红细胞谱系或髓样谱系的细胞区分开。术语“淋巴细胞”包括T细胞、B细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0063] 术语“T细胞”是指T细胞谱系的细胞。“T细胞谱系的细胞”是指显示出T细胞或其前体或祖细胞的至少一种表型特征的细胞,所述表型特征将所述细胞与其他淋巴样细胞以及红细胞谱系或髓样谱系的细胞区分开。此类表型特征可包括对T细胞(例如,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)具有特异性的一种或多种蛋白质的表达,或者对T细胞具有特异性的生理学、形态学、功能性或免疫学特征。例如,T细胞谱系的细胞可以是定型为T细胞谱系的祖细胞或前体细胞;CD25⁺未成熟的和灭活的T细胞;已经历CD4或CD8谱系定型的细胞;CD4⁺CD8⁺双阳性胸腺细胞祖细胞;单一阳性CD4⁺或CD8⁺;TCR $\alpha\beta$ 或TCR $\gamma\delta$;或者成熟的和功能性的或激活的T细胞。术语“T细胞”包括天然T细胞(CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD45RO⁻)、中枢记忆T细胞(CD45RA⁻、CD45RO⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺)、效应记忆T细胞(CD45RA⁻、CD45RO⁺、CCR7⁻、CD62L⁻、CD27⁻)、粘膜相关恒定T(MAIT)细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、Treg、自然杀伤T细胞和组织驻留T细胞。

[0064] 术语“自然杀伤细胞”或“NK细胞”是指大颗粒淋巴细胞(LGL)并且构成从共同的生

成淋巴样祖细胞的B淋巴细胞和T淋巴细胞分化的第三类细胞。已知NK细胞在骨髓、淋巴结、脾、扁桃体和胸腺中分化和成熟,然后进入循环。NK细胞与自然杀伤T细胞(NKT)在表型、起源和相应效应功能方面有所不同;通常,NKT细胞活性通过分泌IFN γ 促进NK细胞活性。与NKT细胞不同,NK细胞不表达T细胞抗原受体(TCR)或泛T标志物CD3或表面免疫球蛋白(Ig)B细胞受体,但其通常在人中表达表面标志物CD16(Fc γ RIII)和CD56,在C57BL/6小鼠中表达NK1.1或NK1.2。高达80%的人NK细胞也表达CD8。

[0065] 术语“B细胞”是指B细胞谱系的细胞。“B细胞谱系的细胞”是指显示出B细胞或其前体或祖细胞的至少一种表型特征的细胞,所述表型特征将所述细胞与其他淋巴样细胞以及红细胞谱系或髓样谱系的细胞区分开。此类表型特征可包括对B细胞(例如,对CD19+、CD72+、CD24+、CD20+、CD21+、CD22+、CD38+、CD40+、CD72+、CD32b+、CD268+、CD269+、CD267+、CD86+、CD80+、CD40+、CD52+、CD138+、CD27+、CD28+、CD21+、CD23+、CD84+、CD257+、CD270+、CD37+和CD74+中的一者或多者呈阳性的细胞)具有特异性的一种或多种蛋白质的表达,或者对B细胞具有特异性的生理学、形态学、功能性或免疫学特征。例如,B细胞谱系的细胞可以是定型为B细胞谱系的祖细胞或前体细胞(例如,前-祖-B细胞、祖B细胞和前B细胞);未成熟的和失活的B细胞或者成熟的和功能性的或激活的B细胞。因此,“B细胞”包括天然B细胞、浆细胞、调节性B细胞、边缘区B细胞、滤泡B细胞、淋巴浆细胞样细胞、浆母细胞和记忆B细胞(例如,CD27+、IgD-)。

[0066] 关于在其表面上表达免疫受体(例如,CAR)的细胞(例如,T细胞),术语“细胞毒活性”也称为“细胞溶解活性”,意指在抗原特异性信号传导(例如,经由CAR)后,细胞诱导靶细胞经历细胞凋亡。在一些实施方案中,细胞毒性细胞可经由从颗粒释放细胞毒素诸如穿孔素、颗粒酶和颗粒溶解素来诱导靶细胞的细胞凋亡。穿孔素插入靶细胞膜并形成允许水和盐快速进入靶细胞的孔。颗粒酶是诱导靶细胞凋亡的丝氨酸蛋白酶。颗粒溶解素还能够中靶细胞膜中形成孔,并且是促炎分子。在一些实施方案中,细胞毒性细胞可通过Fas配体与中靶细胞上表达的Fas分子的相互作用中靶细胞中诱导凋亡,所述Fas配体在抗原特异性信号传导后在T细胞上上调。Fas是多种不同细胞表面上的细胞凋亡信号传导受体分子。

[0067] “疾病”是受试者的健康状态,其中受试者不能维持稳态,并且其中如果疾病未改善,则受试者的健康继续恶化。相反,受试者的“病症”或“不良状况”是其中受试者能够维持稳态的健康状态,但其中受试者的健康状态不如不存在病症或不良状况时有利。在不治疗的情况下,病症或不良状况不一定导致受试者的健康状态进一步降低。

[0068] 如本文所用的术语“癌症”被定义为以异常细胞的快速且不受控制的生长为特征的疾病。异常细胞可形成实体瘤或者构成血液恶性肿瘤。癌细胞可以局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其他部位。各种癌症的实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。

[0069] 术语“受试者”、“患者”和“个体”在本文中可互换使用,并且旨在包括其中可引发免疫响应的活生物体(例如,哺乳动物)。受试者的实例包括人、灵长类动物、牛、马、山羊、绵羊、狗、猫、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猪以及它们的转基因物种。

[0070] “过继性细胞免疫疗法”或“过继性免疫疗法”是指施用天然存在的或遗传工程化的疾病抗原特异性免疫细胞(例如,T细胞)。过继性细胞免疫疗法可以是自体的(免疫细胞来自受体)、同种异体的(免疫细胞来自相同物种的供体)或同基因的(免疫细胞来自与受体

在遗传方面相同的供体)。

[0071] “自体的”是指来源于随后其将再次被引入的相同受试者的移植物(例如,器官、组织、细胞)。

[0072] “同种异体的”是指来源于相同物种的不同受试者的移植物。

[0073] 慢病毒载体或由本文所述的慢病毒载体转导的细胞(例如,表达如由慢病毒载体的转基因编码的CAR的T细胞)的“治疗有效量”或“有效量”是指足以导致所治疗的疾病、病症或不期望病况的一种或多种症状改善的慢病毒颗粒或细胞的量。

[0074] “治疗(Treat)”或“治疗(treatment)”或“改善(ameliorate)”是指受试者的疾病、病症或不期望病况的医学管理。一般来讲,包含表达本公开CAR的慢病毒载体或细胞的适当剂量或治疗方案以足以引发治疗或预防有益效果的量施用。治疗或预防/防止有益效果包括改善临床结果;减轻或缓解与疾病、病症或不期望病况相关的症状;降低症状发生率;改善生活质量;延长无病状态;减少疾病、病症或不期望病况的程度;稳定疾病状态;延迟疾病进展;缓解;存活;延长存活时间;或其任何组合。

[0075] 术语“抗肿瘤效应”是指可通过肿瘤体积的减小、肿瘤细胞数目的减少、转移瘤数目的减少、预期寿命的增加或与癌症病况相关的各种生理症状的改善来表现的生物效应。“抗肿瘤效应”还可通过预防血液恶性肿瘤或肿瘤形成来表现。

[0076] 另外的定义在本公开中通篇提供。

[0077] 慢病毒载体

[0078] 慢病毒是一类逆转录病毒,由于其能够整合到宿主基因组中而通常引起缓慢发展的疾病。经修饰的慢病毒基因组可用作将核酸递送到宿主细胞的病毒载体。

[0079] 本公开提供了包含病毒包膜的自灭活慢病毒载体(“LVV”),所述病毒包膜包含突变的异源包膜蛋白和向性限定分子(也称为“靶向蛋白”)。本文所述的LVV还包含转基因,其中LVV能够特异性结合至靶免疫细胞并转导靶免疫细胞,使得转基因由免疫细胞表达。在一些实施方案中,LVV可以携带多于一种转基因。在另外的具体实施方案中,转基因编码嵌合抗原受体(CAR)。

[0080] 突变病毒包膜蛋白

[0081] 如本文所述的慢病毒载体是用突变的异源病毒包膜蛋白假型化的,该突变的异源病毒包膜蛋白在不存在突变的情况下介导细胞附着和膜融合。在特定实施方案中,突变的包膜蛋白包含至少一个突变,其抑制包膜蛋白结合其天然靶标的能力,同时保持包膜蛋白的融合特性。在具体实施方案中,异源包膜蛋白是水疱性口炎病毒G蛋白(“VSV-G”、“VSV-G包膜蛋白”或“VSV-G蛋白”),其包含抑制VSV-G与低密度脂蛋白受体(“LDL-R”)的结合,同时保持VSV-G蛋白的融合功能的一个或多个突变。

[0082] 当提及包膜蛋白结合其天然靶标的能力时,术语“抑制”包括完全消除包膜蛋白与其天然靶标的结合,以及显著减少包膜蛋白与其天然靶标的结合。在具体实施方案中,“显著减少”是指选自与天然靶标结合减少至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%、至少50%、至少45%、至少40%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%、至少15%和至少10%的减少。

[0083] 表10中列出的核酸和氨基酸序列提供了野生型VSV-G包膜蛋白的参考序列和根据本公开的突变VSV-G包膜蛋白的实例。SEQ ID NO:77是编码VSV-G包膜蛋白的参考核酸序

列,并且SEQ ID NO:78是参考VSV-G包膜蛋白的氨基酸序列。SEQ ID NO:87是编码参考VSV-G包膜蛋白的可切割信号肽的核酸序列。SEQ ID NO:88是参考VSV-G包膜蛋白的可切割信号肽的氨基酸序列。SEQ ID NO:89是编码VSV-G包膜蛋白的参考核酸序列,其缺少信号序列。SEQ ID NO:90是参考VSV-G包膜蛋白的氨基酸序列,其缺少序列。本文所公开的VSV-G突变的位置和性质分别参考不存在SEQ ID NO:87的N-末端信号序列的SEQ ID NO:77和不存在SEQ ID NO:88的N-末端信号序列的SEQ ID NO:78所提供的核酸序列和氨基酸序列进行描述。因此,为了鉴定突变位置而提及VSV-G env氨基酸序列的第1位是指SEQ ID NO:78的野生型VSV-G氨基酸序列的第17位(其为赖氨酸(K)),或SEQ ID NO:90的野生型VSV-G氨基酸序列的第1位。

[0084] 在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含氨基酸位置H8、N9、Q10、K47、K50、A51、S183、S179、N180、I182、M184、Y209、I347、T350、T352、E353、R354处的突变、N9与Q10之间的TT插入、H8与N9之间的GGG插入、N9与Q10之间的GGG插入、N208与Y209之间的TT插入、P46与K47之间的GGG插入、N208与Y209之间的GGG插入、和/或残基1-8的缺失。在某些实施方案中,VSV-G包膜蛋白包含选自H8、N9、Q10、K47、K50、A51、S183、S179、N180、I182、M184、Y209、I347、T350、T352、E353、R354的氨基酸位置处的两个或更多个突变、N9与Q10之间的TT插入、H8与N9之间的GGG插入、N9与Q10之间的GGG插入、N208与Y209之间的TT插入、P46与K47之间的GGG插入、N208与Y209之间的GGG插入、以及残基1-8的缺失。在其他实施方案中,VSV-G包膜蛋白包含选自H8、N9、Q10、K47、K50、A51、S183、S179、N180、I182、M184、Y209、I347、T350、T352、E353、R354的氨基酸位置处的三个或更多个突变、N9与Q10之间的TT插入、H8与N9之间的GGG插入、N9与Q10之间的GGG插入、N208与Y209之间的TT插入、P46与K47之间的GGG插入、N208与Y209之间的GGG插入、以及残基1-8的缺失。在其他实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含H8A、K47A、K47Q、Y209A、R354A和/或R354Q突变。在其他实施方案中,VSV-G包膜蛋白包含选自N9、Q10、K50、A51、S183、S179、N180、I182、M184、I347、T350、T352和E353的一个或多个突变、N9与Q10之间的TT插入、H8与N9之间的GGG插入、N9与Q10之间的GGG插入、N208与Y209之间的TT插入、P46与K47之间的GGG插入、N208与Y209之间的GGG插入、以及残基1-8的缺失。在其他实施方案中,VSV-G包膜蛋白包含选自N9、Q10、K50、A51、S183、S179、N180、I182、M184、I347、T350、T352和E353中的一者或多者处的突变的两个或更多个突变、N9与Q10之间的TT插入、H8与N9之间的GGG插入、N9与Q10之间的GGG插入、N208与Y209之间的TT插入、P46与K47之间的GGG插入、N208与Y209之间的GGG插入、以及残基1-8的缺失。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白选自H8A、N9A、Q10A、K47A、K47Q、N180A、I182A、Y209A、T352A、T352W、E353A、R354A和R354Q突变中的一种或多种。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白选自H8A、K47A、K47Q、Y209A、R354A和R354Q突变中的一种或多种。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含K47突变和R354突变。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含K47Q突变和R354A突变。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含N180突变、I182突变、T352突变和E353突变。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含N180A突变、I182A突变、T352A突变和E353A突变。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含T352突变和E353突变。在另外的实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含T352W突变和E353A突变。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含N9突变、Q10突变和N180突变。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含N9A突变、Q10A突变和N180A突变。在一些实施方案

中,突变的VSV-G包膜蛋白包含H8与N9之间的GGG插入和N9与Q10之间的GGG插入。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含N9与Q10之间的TT插入。在一些实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白包含P46与K47之间的GGG插入。在其他实施方案中,突变的VSV-G包膜蛋白如Nikolic等人,“Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein.”Nature Comm.,2018,9:1029中所述,该文献的相关公开内容以引用方式并入本文。

[0085] 在具体实施方案中,突变VSV包膜蛋白包含K47Q突变和R354A突变。在具体实施方案中,突变VSV-G包膜蛋白具有根据SEQ ID NO:74的氨基酸序列。

[0086] 在具体实施方案中,突变VSV包膜蛋白包含N180A突变、I182A突变、T352A突变和E353A突变。在具体实施方案中,突变VSV-G包膜蛋白具有根据SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

[0087] 在具体实施方案中,突变VSV包膜蛋白包含T352W突变和E353A突变。在具体实施方案中,突变VSV-G包膜蛋白具有根据SEQ ID NO:95的氨基酸序列。

[0088] 在具体实施方案中,突变VSV包膜蛋白包含N9A突变、Q10A突变和N180A突变。在具体实施方案中,突变VSV-G包膜蛋白具有根据SEQ ID NO:97的氨基酸序列。

[0089] 在具体实施方案中,突变VSV包膜蛋白包括N9与Q10突变之间的TT插入。在具体实施方案中,突变VSV-G包膜蛋白具有根据SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

[0090] 在具体实施方案中,突变VSV包膜蛋白包括P46与K47突变之间的GGG插入。在具体实施方案中,突变VSV-G包膜蛋白具有根据SEQ ID NO:101的氨基酸序列。

[0091] 在具体实施方案中,突变VSV包膜蛋白包含H8与N9之间的GGG插入和N9与Q10之间的GGG插入。在具体实施方案中,突变VSV-G包膜蛋白具有根据SEQ ID NO:103的氨基酸序列。

[0092] 靶向蛋白

[0093] 靶向蛋白是展示在病毒包膜上的膜结合蛋白,并且包含胞外结构域,该胞外结构域包括淋巴细胞靶向结构域和跨膜结构域。淋巴细胞靶向结构域是具有氨基酸序列并且是靶淋巴细胞表面上的靶分子或配体(例如,同源蛋白质或配体)的结合配偶体的任何蛋白质或肽。在一些实施方案中,淋巴细胞靶向结构域是T细胞靶向结构域。在一些实施方案中,淋巴细胞靶向结构域是NK细胞靶向结构域。在一些实施方案中,淋巴细胞靶向结构域是B细胞靶向结构域。例如,在某些实施方案中,靶向蛋白的胞外结构域包括淋巴细胞靶向结构域,其特异性结合限定细胞群体(诸如特征在于细胞表面上存在靶向蛋白或配体的淋巴细胞群体)表面上的蛋白质或配体。在一些实施方案中,淋巴细胞靶向结构域靶向特定类型的淋巴细胞,诸如T细胞、B细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,靶向蛋白还包括位于跨膜结构域与胞外结构域之间的胞外接头或铰链结构域。

[0094] 在一些实施方案中,靶向蛋白是全长细胞表面蛋白或受体,其中每种组分(例如,胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域中的每一者)来源于单一蛋白或受体。在其他实施方案中,靶向蛋白是具有至少两种来源于不同蛋白或受体的组分的嵌合蛋白。在一些实施方案中,靶向蛋白从哺乳动物物种获得,包括人、灵长类动物、牛、马、山羊、绵羊、狗、猫、小鼠、大鼠、兔、豚鼠和猪。在一些实施方案中,靶向蛋白是全人序列。在一些实施方案中,靶向蛋白是包含人序列组分和来自另一物种的组分或合成组分的嵌合序列。在一些实施方案中,嵌合靶向蛋白可以是全合成蛋白。在其他实施方案中,嵌合靶向蛋白可包含胞外结构域、胞

外结合结构域、跨膜结构域、胞内结构域、铰链结构域或作为全合成蛋白的接头中的一者或多者。

[0095] 在一些实施方案中,淋巴细胞靶向结构域包含抗体。在此类实施方案中,胞外靶向结构域可以是全长抗体、抗体片段、纳米抗体或单链Fv片段(scFv)。

[0096] 在特定实施方案中,靶向分子包含特异性结合T细胞表面标志物的T细胞靶向结构域,所述T细胞表面标志物包括例如T细胞抗原、T细胞表面受体或存在于靶向T细胞的表面上的任何其他蛋白质。在一些实施方案中,靶向蛋白特异性结合选自CD3、CD28、CD80、4-1BB、AhR、CD3、CD2、CD7、CD4、CD8、CD25、CD44、CD45RA、CD47、CD62L、CD69、CD94、CD95、CD127、CD161、CD183(CXCR3)、CD184(CXCR4)、CD185(CXCR5)、CD193(CCR3)、CD194(CCR4)、CD195(CCR5)、CD196(CCR6)、CD197(CCR7)、CCR10、PD-1、TCRa/b、CD5、CD27、CD45RO、CD45RB、CD57、CD103、CD122、P2RX7、TIGIT、LAG-3、TIM-3、IL6ST以及其任何组合的T细胞标志物。

[0097] 在另外的实施方案中,靶向蛋白特异性结合选自 $\gamma\delta$ TCR、V δ 1、V δ 2、NKG2D(KLRK1、CD314)以及其任何组合的 $\gamma\delta$ T细胞标志物。

[0098] 在其他实施方式中,靶向蛋白特异性结合选自恒定TCR(Va24-Ja18)、CD185(CXCR5)、CXCR6、IL-21R以及其任何组合的NK T细胞标志物。

[0099] 在其他实施方案中,靶向蛋白特异性结合选自Va7.2、Ja33、CXCR6、IL-18R、KLRB1(CD161)、VLA4(α 4 β 1整合素)以及其任何组合的MAIT细胞标志物。

[0100] 在其他实施方案中,靶向蛋白特异性结合选自CD56、NKp46、CD16、KIR(s)、NKG2蛋白(例如,NKG2D(KLRK1、CD314))、KLRB1(CD161)、KLRD1(cd94)、IL2Rb(CD122)、IL-21R、SLAMF6(CD352)、SLAMF7(CD319)、IL-18R以及其任何组合的NK细胞标志物。

[0101] 在其他实施方案中,靶向蛋白特异性结合选自CD19、CD20、CD21、CD22、CD24、CD38、CD40、CD72、CD32b、CD268、CD269、CD267、CD86、CD80、CD52、CD138、CD27、CD28、CD23、CD84、CD257、CD270、CD37、CD74和CD269以及其任何组合的B细胞标志物。

[0102] 在实施方案中,靶向蛋白特异性结合选自CD80、CD27、CD28以及其任何组合的淋巴细胞标志物(例如,B细胞和T细胞)。

[0103] 中靶向蛋白的一些实施方案中,接头位于跨膜结构域与淋巴细胞靶向结构域之间。接头是氨基酸接头并且可以是刚性接头、柔性接头或寡聚化接头。刚性接头是缺乏柔性的氨基酸序列(例如,可包含至少一个脯氨酸)。在一些实施方案中,刚性接头包含血小板源生长因子受体(PDGFR)茎或CD8a茎。在一些实施方案中,PDGFR茎包含含有AVGQDTQEVIVPHSLPFFK(SEQ ID NO:104)的氨基酸序列。在一些实施方案中,PDGFR茎包含含有ASAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAARPAAGGAVHTRGLDFAK(SEQ ID NO:105)的氨基酸序列。

[0104] 柔性接头是具有许多自由度的氨基酸序列(例如,可包含多个具有小侧链的氨基酸,例如甘氨酸或丙氨酸)。在一些实施方案中,柔性接头包含含有GAPGAS的氨基酸序列。在一些实施方案中,柔性接头包含由GAPGSGGGGSGGGGSAS(SEQ ID NO:106)组成的氨基酸序列。在一些实施方案中,柔性接头包含含有GGGS的氨基酸序列。在一些实施方案中,柔性接头包含含有(GAPGAS)_N、(G₃S)_N或(G₄S)_N的氨基酸序列,其中N为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大。

[0105] 寡聚化接头是可寡聚化到另一个相关氨基酸的氨基酸。在一些实施方案中,寡聚

化接头是可形成二聚体、三聚体或四聚体的氨基酸序列。在一些实施方案中,寡聚化接头包含IgG4铰链结构域(例如,ESKYGPPCPPCPAVGQDTQEIVVPHSLPFK (SEQ ID NO:107))。在一些实施方案中,寡聚化接头包含可形成四聚体卷曲螺旋的氨基酸序列(例如,ASGGGSGELAAIKQELAAIKKELAAIKWELAAIKQGAG (SEQ ID NO:108))。在一些实施方案中,寡聚化接头包含可形成二聚体卷曲螺旋的氨基酸序列(例如,ASESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:109))。

[0106] 靶向蛋白通常将包含信号序列(也称为定位序列的信号肽)。信号序列可位于靶向蛋白的N-末端或C-末端。信号序列用于将靶向蛋白易位到用作慢病毒载体包膜的膜上。可包含在如本文所述的靶向蛋白中的信号序列的非限制性实例包括Igκ前导序列(例如,鼠Igκ前导序列,其包含:METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO:110))、CD8a信号肽序列(例如,CD8a信号肽,其包含:MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:12))和B2M信号肽序列(例如,B2M信号肽序列,其包含:MSRSVALAVLALLSLSGLEA (SEQ ID NO:123))。在某些实施方案中,成熟靶向蛋白具有部分切割的信号序列,其保留全长信号序列的一个或多个氨基酸。在其他实施方案中,信号肽酶的切割导致信号序列的完全去除,得到完全缺乏信号序列的成熟靶向蛋白。

[0107] 在一些实施方案中,靶向蛋白是CD80蛋白。当靶向蛋白是CD80蛋白时,它可包含根据SEQ ID NO:6的胞外结构域。在此类实施方案中,CD80蛋白可包含根据SEQ ID NO:4的信号肽和根据SEQ ID NO:8的跨膜和胞内结构域。在一个具体实施方案中,包含在如本文所述的慢病毒载体中的CD80靶向蛋白包含根据SEQ ID NO:2或不存在SEQ ID NO:4的信号肽的SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0108] 在一些实施方案中,当靶向蛋白是CD80蛋白时,它可包含与SEQ ID NO:6具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的胞外结构域。在此类实施方案中,CD80蛋白可包含与SEQ ID NO:4具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的信号肽,和/或与SEQ ID NO:8具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的跨膜和胞内结构域。在一个具体实施方案中,包含在如本文所述的慢病毒载体中的CD80靶向蛋白包含与SEQ ID NO:2或不存在SEQ ID NO:4的信号肽的SEQ ID NO:2具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。

[0109] 表1:CD80 T细胞靶向分子

	全分子	
	核苷酸	氨基酸(信号肽加下划线)
[0110]	ATGGGTCATACACGCCGCCAA	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFF
	GGAACCTCACCATCTAAGTGCC	QLLVLAGLSHFCSGVIHVTKE
	CATATCTGAATTTCTTTCAACT	VKEVATLSCGHNVSVEELAQ
	TCTCGTGCTGGCGGGGCTCAGT	TRIYWQKEKKMVLTMMSGD
	CATTTCTGCAGTGGGGTCATTC	MNIWPEYKNRTIFDITNNLSIV
	ACGTTACTAAAGAGGTCAAGG	ILALRPSDEGTYECVVLKYEK

[0111]

AGGTCGCAACATTGAGTTGTGG CCATAACGTATCAGTTGAAGA ACTCGCGCAGACACGGATTTAC TGGCAAAAGGAAAAGAAGATG GTGTTGACAATGATGAGCGGT GACATGAACATTTGGCCAGAG TACAAAAATCGAACGATATTC GATATAACCAATAACTTGTCCA TAGTAATACTTGCCTTGCGACC TTCTGACGAGGGAACGTATGA ATGTGTAGTGCTTAAGTATGAA AAAGATGCCTTTAAGCGGGAA CACTTGGCTGAGGTTACACTCT CCGTAAAGGCGGACTTTCCTAC GCCGTCTATATCCGACTTCGAG ATACCCACTTCTAACATTCGAC GCATCATTTGCTCAACCTCAGG TGGTTTCCCAGAGCCTCACTTG AGCTGGCTGGAGAATGGCGAA GAACTTAACGCAATCAATACC ACGGTGTCCCAAGACCCGGAG ACAGAGCTGTACGCCGTGTCAT CCAACTGGATTTTAACATGAC GACAAATCATAGTTTCATGTGT CTGATCAAATATGGGCATCTCA GGGTGAATCAGACTTTTAATTG GAACACTACCAAACAAGAGCA CTTCCCAGATAATCTGTTGCCA AGCTGGGCGATAACTCTTATCT CCGTCAACGGTATCTTCGTAAT TTGCTGCCTCACCTATTGTTTC GCGCCTCGATGCCGAGAA (SEQ ID NO: 1)	DAFKREHLAEVTL SVKADFP TPSISDFEIP TSNIRRIICSTSGG FPEPHLSWLENGEELNAIN TT VSQDPETELYAVSSKLDFNM TTNHSFMCLIKYGH LRVNQT FNWNTTKQEHF PDNLLPSWA ITLISVNGIFVICCLTYCFAPRC RE (SEQ ID NO: 2)
CD80 信号肽	
核苷酸	氨基酸
ATGGGTCATACACGCCGCCAA GGAACCTCACCATCTAAGTGCC CATATCTGAATTTCTTTCAACT TCTCGTGCTGGCGGGGCTCAGT CATTTCTGCAGTGGGGTC (SEQ ID NO: 3)	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFF QLLVLAGLSHFCSGV (SEQ ID NO: 4)
CD80 胞外结构域(ECD)	
核苷酸	氨基酸
ATTCACGTTACTAAAGAGGTCA AGGAGGTCGCAACATTGAGTT GTGGCCATAACGTATCAGTTGA	IHVTKEVKEVATLSCGHNVS VEELAQTRIYWQKEK MVL T MMSGDMNIWPEYKNRTIFDI

[0112]

AGAACTCGCGCAGACACGGAT TTACTGGCAAAAGGAAAAGAA GATGGTGTGACAATGATGAG CGGTGACATGAACATTTGGCCA GAGTACAAAAATCGAACGATA TTCGATATAACCAATAACTTGT CCATAGTAATACTTGCCTTGCG ACCTTCTGACGAGGGAACGTAT GAATGTGTAGTGCTTAAGTATG AAAAAGATGCCTTTAAGCGGG AACACTTGGCTGAGGTTACACT CTCCGTTAAGGCGGACTTTCCT ACGCCGTCTATATCCGACTTCG AGATACCCACTTCTAACATTTCG ACGCATCATTTGCTCAACCTCA GGTGGTTTCCCAGAGCCTCACT TGAGCTGGCTGGAGAATGGCG AAGAACTTAACGCAATCAATA CCACGGTGTCCCAAGACCCGG AGACAGAGCTGTACGCCGTGT CATCCAACTGGATTTTAACAT GACGACAAATCATAGTTTCATG TGTCTGATCAAATATGGGCATC TCAGGGTGAATCAGACTTTTAA TTGGAACACTACCAAACAAGA GCACTTCCCAGATAATCTGTTG CCAAGC (SEQ ID NO: 5)	TNNLSIVILALRPSDEGTYECV VLKYEKDAFKREHLAEVTL VKADFPTPSISDFEIPTSNIRRI CSTSGGFPEPHLSWLENGEEL NAINTTVSQDPETELYAVSSK LDFNMTTNHSMCLIKYGH RVNQTFNWNTTKQEHFPDNL LPS (SEQ ID NO: 6)
CD80 跨膜和胞内结构域	
核苷酸	氨基酸
TGGGCGATAACTCTTATCTCCG TCAACGGTATCTTCGTAATTTG CTGCCTCACCTATTGTTTCGCG CCTCGATGCCGAGAA (SEQ ID NO: 7)	WAITLISVNGIFVICCLTYCFA PRCRE (SEQ ID NO: 8)

[0113] 在一些实施方案中,与标准LVV转导相比,包含CD80靶向蛋白的慢病毒载体以总CD4和CD8⁺ T细胞的相对百分比表现出增强的CD4⁺ T细胞相对于CD8⁺ T细胞的转导。如本文所用,“标准慢病毒载体”或“标准LVV”是指不含突变的VSV-G包膜蛋白和本公开的淋巴细胞靶向蛋白的慢病毒载体。在一些实施方案中,使用第3代LVV包装系统生成标准LVV。在一些实施方案中,与标准LVV相比,包含CD80靶向蛋白的慢病毒载体以总CD4和CD8⁺ T细胞的相对百分比使CD4⁺ T细胞相对于CD8⁺ T细胞的转导增强至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更高。

[0114] 在一些实施方案中,靶向蛋白是抗CD3靶向蛋白。在一些实施方案中,抗CD3靶向蛋白是抗体或其结合片段,包括例如scFv。当靶向蛋白是抗CD3靶向蛋白时,它可包含具有根据SEQ ID NO:14的轻链可变区、根据SEQ ID NO:16的G₃S接头和根据SEQ ID NO:18的重链可变区的抗CD3 scFv。在一些实施方案中,抗CD3靶向蛋白可包含具有根据SEQ ID NO:115的轻链可变区、根据SEQ ID NO:16的G₃S接头和根据SEQ ID NO:113的重链可变区的抗CD3 scFv。所述抗CD3靶向蛋白可包含根据SEQ ID NO:12的信号肽和根据SEQ ID NO:20的铰链

和跨膜结构域。在一个具体实施方案中,包含在如本文所述的慢病毒载体中的抗CD3靶向蛋白包含根据SEQ ID NO:10或不存在SEQ ID NO:12的信号肽的SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个具体实施方案中,包含在如本文所述的慢病毒载体中的抗CD3靶向蛋白包含根据SEQ ID NO:117或不存在SEQ ID NO:12的信号肽的SEQ ID NO:117的氨基酸序列。

[0115] 在一些实施方案中,当靶向蛋白是抗CD3靶向蛋白时,它可包含具有与SEQ ID NO:14具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:18具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的重链可变区的抗CD3 scFv。所述抗CD3靶向蛋白可包含与SEQ ID NO:12具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的信号肽和与SEQ ID NO:20具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的铰链和跨膜结构域。在一个具体实施方案中,包含在如本文所述的慢病毒载体中的抗CD3靶向蛋白包含与SEQ ID NO:10或不存在SEQ ID NO:12的信号肽的SEQ ID NO:10具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中,当靶向蛋白是抗CD3靶向蛋白时,它可包含具有与SEQ ID NO:115具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:113具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的重链可变区的抗CD3 scFv。所述抗CD3靶向蛋白可包含与SEQ ID NO:12具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的信号肽和与SEQ ID NO:20具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的铰链和跨膜结构域。在一个具体实施方案中,包含在如本文所述的慢病毒载体中的抗CD3靶向蛋白包含与SEQ ID NO:117或不存在SEQ ID NO:12的信号肽的SEQ ID NO:117具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。

[0117] 表2:抗CD3 T细胞靶向分子

抗 CD3 (UCTH1)全分子	
核苷酸	氨基酸(信号肽加下划线)
ATGGCCTTACCA GTGACCGCCT	<u>MALPVTALLPLALLHAAR</u>
TGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCT	<u>PDIQMTQTTSSLASLGDRVTI</u>
GCTCCACGCCGCCAGGCCGGA	SCRASQDIRNYLNWYQQKPD
CATCCAGATGACCCAGACCAC	GTVKLLIYYTSRLHSGVPSKF
CTCCTCCCTGTCTGCCTCTCTG	SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA
GGAGACAGAGTCACCATCAGT	TYFCQQGNTLPWTFAGGTKL
TGCAGGGCAAGTCAGGACATT	EIKRAGGGSGGGSGGGSGGG
AGAAATTATTTAAACTGGTATC	SEVQLQQSGPELVKPGASMKI
AACAGAAACCAGATGGAAC TG	SCKASGYSFTGYTMNWVKQS
TTAAACTCCTGATCTACTACAC	HGKNLEWMGLINPYKGVSTY
ATCAAGATTACACTCAGGAGTC	NQKFKDKATLTVDKSSSTAY
CCATCAAAGTTCAGTGGCAGTG	MELLSLTSEDSAVYYCARSG

[0119]

GGTCTGGAACAGATTATTCTCT CACCATTAGCAACCTGGAGCA AGAGGATATTGCCACTTACTTT TGCCAACAGGGTAATACGCTTC CGTGGACGTTTCGCTGGAGGCA CCAAGCTGGAAATCAAACGGG CTGGAGGCGGTAGTGGCGGTG GATCAGGTGGAGGCAGCGGTG GCGGATCTGAGGTGCAGCTCC AGCAGTCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGAGCTTCAATGAA GATATCCTGCAAGGCTTCTGGT TACTCATTCAGTGGCTACACCA TGAAGTGGGTGAAGCAGAGTC ATGGAAAGAACCTTGAGTGGA TGGGACTTATTAATCCTTACAA AGGTGTTAGTACCTACAACCAG AAGTTCAAGGACAAGGCCACA TTAACTGTAGACAAGTCATCCA GCACAGCCTACATGGAACCTCCT CAGTCTGACATCTGAGGACTCT GCAGTCTATTACTGTGCAAGAT CGGGGTACTACGGTGATAGTG ACTGGTACTTCGATGTCTGGGG CGCAGGGACCACGGTCACCGT CTCCTCAACCACtACaCCAGCaC CtaGACCACCAACACCTGCGCCa ACCATCGCaTCGCAGCCaCTGT CtCTGCGCCCAGAGGCaTGCCG GCCAGCaGCtGGGGGCGCAGTG CACACaAGGGGGCTGGACTTCG CaTGTGATATCTACATCTGGGCa CCaTTGGCaGGGACTTGTGGGG TCCTTCTCCTGTCACTGGTTAT CACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 9)	YYGDSDWYFDVWGAGTTVT VSSTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYC (SEQ ID NO: 10)
CD8a 信号肽	
核苷酸 ATGGCCTTACCAGTGACCGCCT TGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCT GCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO: 11)	氨基酸 MALPVTALLPLALLLHAAR P (SEQ ID NO: 12)
抗 CD3 (UCTH1)轻链可变区	
核苷酸 GACATCCAGATGACCCAGACC ACCTCCTCCCTGTCTGCCTCTC	氨基酸 DIQMTQTSSLSASLGDRVITIS CRASQDIRNYLNWYQQKPDG

[0120]

TGGGAGACAGAGTCACCATCA GTTGCAGGGCAAGTCAGGACA TTAGAAATTATTTAAACTGGTA TCAACAGAAACCAGATGGAAC TGTTAAACTCCTGATCTACTAC ACATCAAGATTACACTCAGGA GTCCCATCAAAGTTCAGTGGCA GTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTCACCATTAGCAACCTGGAG CAAGAGGATATTGCCACTTACT TTTGCCAACAGGGTAATACGCT TCCGTGGACGTTCGCTGGAGGC ACCAAGCTGGAAATCAAACGG GCT (SEQ ID NO: 13)	TVKLLIYYTSRLHSGVPSKFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPWTFAGGTKLE IKRA (SEQ ID NO: 14)
G₃S 接头	
核苷酸	氨基酸
GGAGGCGGTAGTGGCGGTGGA TCAGGTGGAGGCAGCGGTGGC GGATCT (SEQ ID NO: 15)	GGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 16)
抗 CD3 (UCTH1)重链可变区	
核苷酸	氨基酸
GAGGTGCAGCTCCAGCAGTCT GGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCT GCAAGGCTTCTGGTTACTCATT CACTGGCTACACCATGAACTGG GTGAAGCAGAGTCATGGAAAG AACCTTGAGTGGATGGGACTTA TTAATCCTTACAAAGGTGTTAG TACCTACAACCAGAAGTTCAA GGACAAGGCCACATTAAGTGT AGACAAGTCATCCAGCACAGC CTACATGGAACTCCTCAGTCTG ACATCTGAGGACTCTGCAGTCT ATTACTGTGCAAGATCGGGGTA CTACGGTGATAGTGAAGTGGTAC TTCGATGTCTGGGGCGCAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 17)	EVQLQQSGPELVKPGASMKIS CKASGYSFTGYTMNWVKQS HGKNLEWMGLINPYKGVSTY NQKFKDKATLTVDKSSSTAY MELLSLTSEDSAVYYCARSG YYGDS DWYFDVWGAGTTVT VSS (SEQ ID NO: 18)
CD8a 铰链和跨膜	
核苷酸	氨基酸
ACCACTACACCAGCACCTAGA CCACCAACACCTGCGCCAACC ATCGCATCGCAGCCACTGTCTC TGCGCCCAGAGGCATGCCGGC CAGCAGCTGGGGGCGCAGTGC	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYC (SEQ ID NO: 20)

[0121]

ACACAAGGGGGCTGGACTTCG CATGTGATATCTACATCTGGGC ACCATTGGCAGGGACTTGTGG GGTCCTTCTCCTGTCACTGGTT ATCACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 19)	
抗 CD3 (12F6)重链可变区	
核苷酸	氨基酸
CAAGTGCAGCTCCAGCAGAGC GGCGCTGAGCTGGCCCGGCC GGCGCCAGCGTGAAGATGAGC TGTAAGCCAGCGGCTATACAT TTACCAGCTACACCATGCACTG GGTCAAGCAGCGGCCTGGCCA GGGCCTGGAATGGATTGGATA TATCAACCCAGCAGCGGCTAC ACCAAGTACAACCAGAAATTC AAGGACAAGGCCACCCTGACC GCCGACAAGAGCTCCTCAACA GCCTACATGCAACTGAGCAGC CTGACCAGCGAGGATAGCGCC GTGTACTACTGCGCCAGATGGC AGGACTACGACGTGTACTTCGA CTACTGGGGCCAAGGCACAAC ACTGACCGTGTCCAGC (SEQ ID NO: 112)	QVQLQQSGAELARPGASVKM SCKASGYTFTSYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSSGYTKYN QKFKDKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARWQD YDVYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 113)
抗 CD3 (12F6)轻链可变区	
核苷酸	氨基酸
CAGATCGTGCTGAGCCAGTCCC CAGCCATCCTGTCTGCCAGCCC TGGCGAGAAGGTGACCATGAC CTGCAGAGCCTCTTCTTCTGTT TCCTACATGCACTGGTATCAGC AAAAGCCCGGCAGCTCTCCTA AGCCTTGATCTACGCCACAAG CAACCTGGCTAGCGGCGTGCCT GCTCGCTTCAGCGGCAGCGGC AGCGGCACCAGCTACAGCCTG ACCATCAGCAGAGTGGAAGCC GAGGACGCCGCCACCTACTACT GCCAGCAGTGGTCCTCTAATCC TCCAACATTCGGCGGCGGCACC AAGCTGGAAACCAAAAGA (SEQ ID NO: 114)	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVSYMHWYQQKPGSS PKPWYATSNLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISRVEAEDAAT YYCQQWSSNPPTFGGGTKLE TKR (SEQ ID NO: 115)
抗 CD3 (12F6)全分子	
核苷酸	氨基酸(信号肽加下划线)

[0122]

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCT
 TGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCT
 GCTCCACGCCGCCAGGCCGCA
 AGTGCAGCTCCAGCAGAGCGG
 CGCTGAGCTGGCCCGGCCCGG
 CGCCAGCGTGAAGATGAGCTG
 TAAAGCCAGCGGCTATACATT
 ACCAGCTACACCATGCACTGG
 GTCAAGCAGCGGCCTGGCCAG
 GGCCTGGAATGGATTGGATAT
 ATCAACCCAGCAGCGGCTAC
 ACCAAGTACAACCAGAAATTC
 AAGGACAAGGCCACCCTGACC
 GCCGACAAGAGCTCCTCAACA
 GCCTACATGCAACTGAGCAGC
 CTGACCAGCGAGGATAGCGCC
 GTGTACTACTGCGCCAGATGGC
 AGGACTACGACGTGTACTTCGA
 CTACTGGGGCCAAGGCACAAC
 ACTGACCGTGTCCAGCGGAGG
 CGGTAGTGGCGGTGGATCAGG
 TGGAGGCAGCGGTGGCGGATC
 TCAGATCGTGTCTGAGCCAGTCC
 CCAGCCATCCTGTCTGCCAGCC
 CTGGCGAGAAGGTGACCATGA
 CCTGCAGAGCCTCTTCTTCTGT
 TTCCTACATGCACTGGTATCAG
 CAAAAGCCCGGCAGCTCTCCTA
 AGCCTTGGATCTACGCCACAAG
 CAACCTGGCTAGCGGCGTGCCT
 GCTCGCTTCAGCGGCAGCGGC
 AGCGGCACCAGCTACAGCCTG
 ACCATCAGCAGAGTGGAAGCC
 GAGGACGCCGCCACCTACTACT
 GCCAGCAGTGGTCCTCTAATCC
 TCCAACATTCGGCGGCGGCACC
 AAGCTGGAAACCAAAAGAACC
 ACTACACCAGCACCTAGACCA
 CCAACACCTGCGCCAACCATCG
 CATCGCAGCCACTGTCTCTGCG
 CCCAGAGGCATGCCGGCCAGC
 AGCTGGGGGCGCAGTGCACAC
 AAGGGGGCTGGACTTCGCATG
 TGATATCTACATCTGGGCACCA
 TTGGCAGGGACTTGTGGGGTCC
 TTCTCCTGTCACTGGTTATCAC
 CCTTTACTGC (SEQ ID NO: 116)

MALPVTALLPLALLHAAR
P
 QVQLQQSGAELARPGASVKM
 SCKASGYTFTSYTMHWVKQR
 PGQGLEWIGYINPSSGYTKYN
 QKFKDKATLTADKSSSTAYM
 QLSSLTSEDSAVYYCARWQD
 YDVYFDYWGQGTTLTVSSGG
 GSGGGSGGGSGGGGS
 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMT
 CRASSSVSYMHWYQKPGSS
 PKPWIYATSNLASGVPARFSG
 SSGSITSYSLTISRVEAEDAAT
 YYCQQWSSNPPTFGGGTKLE
 TKRTTTPAPRPPTPAPTIASQP
 LSLRPEACRPAAGGAVHTRG
 LDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
 LSLVITLYC (SEQ ID NO: 117)

[0123] 在另外的实施方案中,根据本说明书的慢病毒载体可包含多个靶向蛋白或具有多个不同淋巴细胞靶向结构域的单个靶向蛋白。例如,本文所述的慢病毒载体可包含至少两种靶向蛋白,其中每种靶向蛋白具有特异性结合不同靶标的NK细胞靶向结构域。在另一个实例中,本文所述的慢病毒载体可包含至少两种靶向蛋白,其中每种靶向蛋白具有特异性

结合不同靶标的T细胞靶向结构域。在另一个实例中,本文所述的慢病毒载体可包含至少两种靶向蛋白,其中每种靶向蛋白具有特异性结合不同靶标的B细胞靶向结构域。在又一个实例中,本文所述的慢病毒载体可包含至少两种靶向蛋白,其中第一靶向蛋白具有T细胞靶向结构域,并且第二靶向蛋白具有NK细胞靶向结构域。在又一个实例中,本文所述的慢病毒载体可包含至少两种靶向蛋白,其中第一靶向蛋白具有T细胞靶向结构域,并且第二靶向蛋白具有B细胞靶向结构域。在又一个实例中,本文所述的慢病毒载体可包含至少两种靶向蛋白,其中第一靶向蛋白具有B细胞靶向结构域,并且第二靶向蛋白具有NK细胞靶向结构域。在另选的实施方案中,本文所述的慢病毒载体包含具有两个或更多个不同淋巴细胞靶向结构域、两个或更多个不同T细胞靶向结构域、两个或更多个不同NK细胞靶向结构域或者两个或更多个不同B细胞靶向结构域的单一靶向蛋白(例如,双特异性或多特异性靶向蛋白)。在任何此类实施方案中,包含中靶向蛋白中的T淋巴细胞靶向结构域可选自本文所述的那些中的任一种。在又一个实例中,本文所述的慢病毒载体可包含至少两种靶向蛋白,其中第一靶向蛋白具有淋巴细胞靶向结构域,并且第二靶向蛋白具有T细胞靶向结构域。在又一个实例中,本文所述的慢病毒载体可包含至少两种靶向蛋白,其中第一靶向蛋白具有淋巴细胞靶向结构域,并且第二靶向蛋白具有B细胞靶向结构域。

[0124] 在一个示例性实施方案中,具有多个靶向蛋白的慢病毒载体包含分别如表1和表2中详述的CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白。在一些实施方案中,CD80靶向蛋白包含根据SEQ ID NO:2或不存在SEQ ID NO:4的信号肽的SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3靶向蛋白包含根据SEQ ID NO:10或不存在SEQ ID NO:12的信号肽的SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD3靶向蛋白包含根据SEQ ID NO:117或不存在SEQ ID NO:12的信号肽的SEQ ID NO:117的氨基酸序列。当慢病毒载体包含CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白时,靶向蛋白可在用于产生慢病毒载体的单独表达载体上编码。另选地,CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白均可在串联表达盒上编码,从而在单一表达载体中提供单一表达盒,所述单一表达载体提供两种靶向蛋白的表达以产生慢病毒载体。由相同表达盒表达的CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白的核酸序列和对应氨基酸序列的示例性实施方案提供于表3中。在这样的实施方案中,两个靶向蛋白可通过P2A自切割肽连接。表3提供了可用于串联表达盒的示例性核酸,所述串联表达盒包含经由P2A序列连接到抗CD3结合蛋白的CD80结合蛋白。在一个特定实施方案中,P2A序列由与SEQ ID NO:29具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的核酸序列编码,并且P2A序列的氨基酸序列具有与SEQ ID NO:30具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,包含与抗CD3结合蛋白连接的CD80结合蛋白的串联表达盒包含SEQ ID NO:21的核酸序列或与SEQ ID NO:21具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。在一些实施方案中,包含与抗CD3结合蛋白连接的CD80结合蛋白的串联表达盒编码SEQ ID NO:22或不含SEQ ID NO:24的信号肽的SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一些实施方案中,包含与抗CD3结合蛋白连接的CD80结合蛋白的串联表达盒编码与SEQ ID NO:22或不存在SEQ ID NO:24的信号肽的SEQ ID NO:22具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。

[0125] 表3:共表达CD80和抗CD3 T细胞靶向分子

全分子	氨基酸(信号肽加下划线)
核苷酸	
ATGGGTCATACACGCCGCCAA GGAACCTCACCATCTAAGTGCC CATATCTGAATTTCTTTCAACT TCTCGTGCTGGCGGGGCTCAGT CATTTCTGCAGTGGGGTCATTC ACGTTACTAAAGAGGTCAAGG AGGTCGCAACATTGAGTTGTGG CCATAACGTATCAGTTGAAGA ACTCGCGCAGACACGGATTTAC TGGCAAAAGGAAAAGAAGATG GTGTTGACAATGATGAGCGGT GACATGAACATTTGGCCAGAG TACAAAAATCGAACGATATTC GATATAACCAATAACTTGTCCA TAGTAATACTTGCCTTGCGACC TTCTGACGAGGGAACGTATGA ATGTGTAGTGCTTAAGTATGAA AAAGATGCCTTTAAGCGGGAA CACTTGGCTGAGGTTACACTCT CCGTTAAGGCGGACTTTCCTAC GCCGTCTATATCCGACTTCGAG ATACCCACTTCTAACATTCGAC GCATCATTTGCTCAACCTCAGG TGGTTTCCCAGAGCCTCACTTG AGCTGGCTGGAGAATGGCGAA GAACTTAACGCAATCAATACC ACGGTGTCCCAAGACCCGGAG ACAGAGCTGTACGCCGTGTCAT CCAAACCTGGATTTTAAACATGAC GACAAATCATAGTTTCATGTGT CTGATCAAATATGGGCATCTCA GGGTGAATCAGACTTTTAATTG GAACACTACCAAACAAGAGCA CTTCCCAGATAATCTGTTGCCA AGCTGGGCGATAACTCTTATCT CCGTCAACGGTATCTTCGTAAT TTGCTGCCTCACCTATTGTTTC GCGCCTCGATGCCGAGAAGGC AGCGGCGCCACCAACTTCTCCC TGCTGAAGCAGGCCGGCGACG TGGAAGAAAACCCTGGCCCCA TGGCCTTACCAAGTGACCGCCTT GCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTG CTCCACGCCGCCAGGCCGGAC	<u>MGHTRRQGTSPSKCPYLNFF</u> <u>QLLVLAGLSHFCSGVIHVTKE</u> VKEVATLSCGHNVSVEELAQ TRIYWQKEKKMVLTMMSGD MNIWPEYKNRTIFDITNNLSIV ILALRPSDEGTYECVVLKYEK DAFKREHLAEVTL SVKADFP TPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGG FPEPHLSWLENGEELNAINTT VSQDPETELYAVSSKLDFNM TTNHSFMCLIKYGH LRVNQT FNWNTTKQEHFPDNL LPSWA ITLISVNGIFVICCLTYCFAPRC REGSGATNFSLLKQAGDVEE NPGPMALPVTALLLPLALLH <u>AARPD</u> IQMTQTTSSLSASLGD RVTISCRASQDIRNYLNWYQ QKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV PSKFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGNTLPWTFAG GTKLEIKRAGGSGGGSGGG SGGGSEVQLQQSGPELVKPG ASMKISCKASGYSFTGYTMN WVKQSHGKNLEWMGLINPY KGVSTYNQKFKDKATLTVDK SSSTAYMELLSLTSEDSAVYY CARSGYYGDS DWYFDVWGA GTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 22)

[0126]

[0127]

ATCCAGATGACCCAGACCACCT
 CCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGG
 AGACAGAGTCACCATCAGTTG
 CAGGGCAAGTCAGGACATTAG
 AAATTATTTAAACTGGTATCAA
 CAGAAACCAGATGGAAGTGT
 AAACCTCCTGATCTACTACACAT
 CAAGATTACACTCAGGAGTCCC
 ATCAAAGTTCAGTGGCAGTGG
 GTCTGGAACAGATTATTCTCTC
 ACCATTAGCAACCTGGAGCAA
 GAGGATATTGCCACTTACTTTT
 GCCAACAGGGTAATACGCTTCC
 GTGGACGTTGCTGGAGGCAC
 CAAGCTGGAAATCAAACGGGC
 TGGAGGCGGTAGTGGCGGTGG
 ATCAGGTGGAGGCAGCGGTGG
 CGGATCTGAGGTGCAGCTCCA
 GCAGTCTGGACCTGAGCTGGTG
 AAGCCTGGAGCTTCAATGAAG
 ATATCCTGCAAGGCTTCTGGTT
 ACTCATTCACTGGCTACACCAT
 GAACTGGGTGAAGCAGAGTCA
 TGGAAGAAGCCTTGAGTGGAT
 GGGACTTATTAATCCTTACAAA
 GGTGTTAGTACCTACAACCAGA
 AGTTCAAGGACAAGGCCACAT
 TAACTGTAGACAAGTCATCCAG
 CACAGCCTACATGGAACCTCCTC
 AGTCTGACATCTGAGGACTCTG
 CAGTCTATTACTGTGCAAGATC
 GGGGTACTACGGTGATAGTGA
 CTGGTACTTCGATGTCTGGGGC
 GCAGGGACCACGGTCACCGTC
 TCCTCAACCACtACaCCAGCaCCt
 aGACCACCAACACcTGCGCCaAC
 CATCGCaTCGCAGCCaCTGTCTC
 TGCGCCCAGAGGCaTGCCGGCC
 AGCaGCtGGGGGCGCAGTGCAC
 ACaAGGGGGGCTGGACTTCGCaT
 GTGATATCTACATCTGGGCaCC
 aTTGGCaGGGACTTGTGGGGTC
 CTTCTCCTGTCACTGGTTATCA
 CCCTTTACTGC
 (SEQ ID NO: 21)

CD80 信号肽

[0128]

核苷酸	氨基酸
ATGGGTCATACACGCCGCCAA GGAACCTCACCATCTAAGTGCC CATATCTGAATTTCTTTCAACT TCTCGTGCTGGCGGGGCTCAGT CATTTCTGCAGTGGGGTC (SEQ ID NO: 23)	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFF QLLVLAGLSHFCSGV (SEQ ID NO: 24)
CD80 胞外结构域(ECD)	
核苷酸	氨基酸
ATTCACGTTACTAAAGAGGTCA AGGAGGTCGCAACATTGAGTT GTGGCCATAACGTATCAGTTGA AGAACTCGCGCAGACACGGAT TACTGGCAAAAGGAAAAGAA GATGGTGTTGACAATGATGAG CGGTGACATGAACATTTGGCCA GAGTACAAAAATCGAACGATA TTCGATATAACCAATAACTTGT CCATAGTAATACTTGCCTTGCG ACCTTCTGACGAGGGAACGTAT GAATGTGTAGTGCTTAAGTATG AAAAAGATGCCTTTAAGCGGG AACACTTGGCTGAGGTTACACT CTCCGTTAAGGCGGACTTTCCT ACGCCGTCTATATCCGACTTCG AGATACCCACTTCTAACATTCG ACGCATCATTGCTCAACCTCA GGTGGTTTCCCAGAGCCTCACT TGAGCTGGCTGGAGAATGGCG AAGAACTTAACGCAATCAATA CCACGGTGTCCCAAGACCCGG AGACAGAGCTGTACGCCGTGT CATCCAAACTGGATTTTAAAT GACGACAAATCATAGTTTCATG TGTCTGATCAAATATGGGCATC TCAGGGTGAATCAGACTTTTAA TTGGAACACTACCAACAAGA GCACTTCCCAGATAATCTGTTG CCAAGC (SEQ ID NO: 25)	IHVTKEVKEVATLSCGHNV VEELAQTRIYWQKEKMMVLT MMSGDMNIWPEYKNRTIFDI TNNLSIVILALRPSDEGTYESV VLKYEKDAFKREHLAEVTL VKADFPTPSISDFEIPSNIRRI CSTSGGFPEPHLSWLENHEEL NAINTTVSQDPETELYAVSSK LDFNMTTNHFSMCLIKYGH RVNQTFNWNTTKQEHFPDNL LPS (SEQ ID NO: 26)
CD80 跨膜和胞内结构域	
核苷酸	氨基酸
TGGGCGATAACTCTTATCTCCG TCAACGGTATCTTCGTAATTG CTGCCTCACCTATTGTTTCGCG CCTCGATGCCGAGAA (SEQ ID NO: 27)	WAITLISVNGIFVICCLTYCFA PRCRE (SEQ ID NO: 28)

[0129]

P2A 自切割肽	
核苷酸	氨基酸
GGCAGCGGCGCCACCAACTTCT CCCTGCTGAAGCAGGCCGGCG ACGTGGAAGAAAACCTGGCC CC (SEQ ID NO: 29)	GSGATNFSLLKQAGDVEENP GP (SEQ ID NO: 30)
CD8a 信号肽	
核苷酸	氨基酸
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCT TGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCT GCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO: 31)	MALPVTALLPLALLHAAR P (SEQ ID NO: 32)
抗 CD3 轻链可变区	
核苷酸	氨基酸
GACATCCAGATGACCCAGACC ACCTCCTCCCTGTCTGCCTCTC TGGGAGACAGAGTCACCATCA GTTGCAGGGCAAGTCAGGACA TTAGAAATTATTTAACTGGTA TCAACAGAAACCAGATGGAAC TGTTAACTCCTGATCTACTAC ACATCAAGATTACACTCAGGA GTCCCATCAAAGTTCAGTGGA GTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTACCATTAGCAACCTGGAG CAAGAGGATATTGCCACTTACT TTTGCCAACAGGGTAATACGCT TCCGTGGACGTTCGCTGGAGGC ACCAAGCTGGAAATCAAACGG GCT (SEQ ID NO: 33)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVITIS CRASQDIRNYLNWYQQKPDG TVKLLIYYTSRLHSGVPSKFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPWTFAGGTKLE IKRA (SEQ ID NO: 34)
G₃S 接头	
核苷酸	氨基酸
GGAGGCGGTAGTGGCGGTGGA TCAGGTGGAGGCAGCGGTGGC GGATCT (SEQ ID NO: 35)	GGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 36)
抗 CD3 重链可变区	
核苷酸	氨基酸
GAGGTGCAGCTCCAGCAGTCT GGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCT GCAAGGCTTCTGGTTACTCATT CACTGGCTACACCATGAACTGG GTGAAGCAGAGTCATGGAAAG AACCTTGAGTGGATGGGACTTA TTAATCCTTACAAAGGTGTTAG	EVQLQQSGPELVKPGASMKIS CKASGYSFTGYTMNWVKQS HGKNLEWMGLINPYKGVSTY NQKFKDKATLTVDKSSSTAY MELLSLTSEDSAVYYCARS YYGDS DWYFDVWGAGTTVT VSS (SEQ ID NO: 38)

	TACCTACAACCAGAAGTTCAA GGACAAGGCCACATTAAGTGT AGACAAGTCATCCAGCACAGC CTACATGGAACCTCCTCAGTCTG ACATCTGAGGACTCTGCAGTCT ATTACTGTGCAAGATCGGGGTA CTACGGTGATAGTGACTGGTAC TTCGATGTCTGGGGCGCAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 37)	
	CD8a 铰链和跨膜	
[0130]	核苷酸	氨基酸
	ACCACTACACCAGCACCTAGA CCACCAACACCTGCGCCAACC ATCGCATCGCAGCCACTGTCTC TGCGCCCAGAGGCATGCCGGC CAGCAGCTGGGGGCGCAGTGC ACACAAGGGGGCTGGACTTCG CATGTGATATCTACATCTGGGC ACCATTGGCAGGGACTTGTGG GGTCCTTCTCCTGTCACTGGTT ATCACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 39)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYC (SEQ ID NO: 40)

[0131] 转基因

[0132] 本文所述的慢病毒载体包含编码一种或多种蛋白质的转基因,被递送到淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)并由其表达。在特定实施方案中,转基因编码嵌合抗原受体(CAR),该CAR包含:胞外结构域,其包含特异性结合靶分子的结合结构域;胞内信号传导结构域,其中胞内信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM);以及跨膜结构域,该跨膜结构域连接胞外结构域和胞内信号传导结构域。

[0133] 适用于本公开的CAR的结合结构域包含任何抗原结合多肽。结合结构域可包含抗体或其抗原结合片段,包括例如全长重链、Fab片段、Fab'、F(ab')₂、sFv、VH结构域、VL结构域、dAb、VHH、CDR和scFv,其对靶疾病抗原具有特异性。在某些实施方案中,CAR结合结构域是鼠的、嵌合的、人的或人源化的。在另外的实施方案中,CAR结合结构域是具有人或人源化的V_H区和V_L区的scFv。在另外的实施方案中,CAR结合结构域是具有连接V_H区和V_L区的(GGGS)_N接头或(GGGGS)_N接头的scFv,其中N=1-10。在其他实施方案中,CAR结合结构域是具有连接V_H区和V_L区的包含SEQ ID NO:64的接头的scFv。

[0134] 被本公开的CAR的胞外结构域结合的靶分子可存在于靶细胞上或与靶细胞缔合。示例性靶细胞包括癌细胞、与自身免疫疾病或病症、神经退行性疾病或与炎性疾病或病症相关的细胞、传染性微生物(例如,细菌、病毒或真菌)和受感染细胞(例如,病毒感染细胞)。传染性生物体诸如哺乳动物寄生虫的细胞也被认为是靶细胞。

[0135] 包含在如本文所述的CAR中的胞外结构域可包含靶向多种靶分子中的一种或多种的结合结构域。在某些实施方案中,CAR包含特异性结合肿瘤抗原的结合结构域。在一些此类实施方案中,CAR结合结构域特异性结合CD19、BCMA、 α 叶酸受体、5T4、Ab整合素、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD52、CD70、

CD79a、CD79b、CD80、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、ErbB2 (HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EpCAM、FAP、胎儿AChR、FLT3、Fra、GD2、GD3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、HLADR、IL-11R α 、IL-13R α 2、Lambda、Lewis-Y、Kappa、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2d配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、存活素、TAG72、TEM、VEGFR2、BAFF-R、紧密连接蛋白 (Claudin) 18.2、CD86、FcRL5、GPRC5和TACI中的一者或多者。

[0136] 在某些实施方案中,由本公开所述的慢病毒载体的转基因编码的CAR的胞外结构域任选地包含位于结合结构域与跨膜结构域之间的胞外非信号传导间隔区或接头结构域。当包含时,这样的间隔区或接头结构域可以将结合结构域远离宿主细胞表面定位,以进一步实现适当的细胞-细胞接触、结合和激活。胞外间隔区结构域通常位于CAR的胞外结合结构域与跨膜结构域之间。胞外间隔区的长度可以变化,以基于选择的靶分子、选择的结合表位、结合结构域大小和亲和力优化靶分子结合(参见例如Guest等人,J. Immunother. 28: 203-11, 2005; PCT公布号W0 2014/031687)。在某些实施方案中,胞外间隔区结构域是免疫球蛋白铰链区(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD)。免疫球蛋白铰链区可以是野生型免疫球蛋白铰链区或改变的野生型免疫球蛋白铰链区。改变的IgG₄铰链区描述于PCT公布号W02014/031687中,该PCT公布全文以引用方式并入本文。在一些实施方案中,胞外间隔区结构域包含具有ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 118)的氨基酸序列的经修饰的IgG₄铰链区。

[0137] 可用于本文所述CAR中的铰链区的其他实例包括来自I型膜蛋白诸如CD8a、CD4、CD28和CD7的胞外区的铰链区,其可以是野生型或其变体。在一些实施方案中,胞外间隔区结构域包含选自以下的免疫球蛋白Fc结构域的全部或一部分: CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域或它们的组合(参见例如PCT公布W02014/031687,其间隔区全文以引用方式并入本文)。在另外的实施方案中,胞外间隔区结构域可包含II型C-凝集素的茎区(位于C-型凝集素结构域与跨膜结构域之间的胞外结构域)。II型C-凝集素包括CD23、CD69、CD72、CD94、NKG2A和NKG2D。

[0138] 本公开的CAR包含连接胞外结构域和胞内信号传导结构域并位于胞外结构域与胞内信号传导结构域之间的跨膜结构域。跨膜结构域的长度通常在约15个氨基酸至约30个氨基酸的范围内。跨膜结构域是疏水性 α 螺旋,其横穿宿主细胞膜并将CAR锚定在宿主细胞膜中。跨膜结构域可直接融合到结合结构域或胞外间隔区结构域(如果存在)。在某些实施方案中,跨膜结构域来源于整合膜蛋白(例如,受体、分化簇(CD)分子、酶、转运蛋白、细胞粘附分子等)。跨膜结构域可选自与胞外结构域或胞内信号传导结构域相同的分子。在一些实施方案中,跨膜结构域和胞外结构域各自选自不同的分子。在一些实施方案中,跨膜结构域和胞内信号传导结构域各自选自不同的分子。在其他实施方案中,跨膜结构域、胞外结构域和胞内信号传导结构域各自选自不同的分子。

[0139] 用于本公开的CAR中的示例性跨膜结构域包括CD28、CD2、CD4、CD8a、CD5、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD9、CD16、CD22、CD25、CD27、CD33、CD37、CD40、CD45、CD64、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD95 (Fas)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD154 (CD40L)、CD200R、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD272 (BTLA)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、CD279 (PD-1)、CD300、CD357 (GITR)、A2aR、DAP10、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、GAL9、KIR、Lck、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、PTCH2、ROR2、Ryk、Slp76、SIRP α 、

pTα、TCRα、TCRβ、TIM3、TRIM、LPA5和Zap70跨膜结构域。具有CD8a铰链区的示例性CD8a跨膜结构域包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0140] CAR的胞内信号传导结构域是胞内效应结构域,并且能够响应于CAR的胞外结构域与靶分子的结合而将功能信号传递到细胞,并且激活免疫细胞(例如,经工程化以表达CAR的T细胞)的正常效应功能或响应中的至少一种。在一些实施方案中,CAR诱导T细胞的功能,诸如细胞溶解活性或T辅助活性,诸如细胞因子或其他因子的分泌。胞内信号传导结构域可以是胞内信号传导分子的保留足够信号传导活性的任何部分。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域从抗原受体组分(例如,TCR)或共刺激分子获得。在一些实施方案中,使用抗原受体或共刺激分子的全长胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,使用抗原受体或共刺激分子的胞内信号传导结构域的截短部分,条件是该截短部分保留足够的信号转导活性。在另外的实施方案中,胞内信号传导结构域是抗原受体共刺激分子的胞内信号传导结构域的全长或截短部分的变体,条件是该变体保留足够的信号转导活性(即,是功能性变体)。

[0141] 在某些实施方案中,CAR的胞内信号传导结构域包含含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的信号传导结构域。含ITAM的信号传导结构域通常含有至少一个(一个、两个、三个、四个或更多个)ITAM,该ITAM是指YXXL/I-X₆₋₈-YXXL/I的保守基序。含ITAM的信号传导结构域可以在抗原结合或配体接合后起始T细胞激活信号传导。ITAM-信号传导结构域包括例如CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD3ζ、CD5、CD22、CD79a、CD278(ICOS)、DAP10、DAP12、FcRγ和CD66d的胞内信号传导结构域。可用于本公开的CAR中的示例性CD3ζ信号传导结构域包含SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:122的氨基酸序列。

[0142] CAR胞内信号传导结构域任选地包含共刺激信号传导结构域,其当与初级或经典(例如,ITAM驱动的)激活信号结合激活时,促进或增强T细胞响应,诸如T细胞激活、细胞因子产生、增殖、分化、存活、效应功能或它们的组合。用于CAR的共刺激信号传导结构域包括例如CD27、CD28、CD40L、GITR、NKG2C、CARD1、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX-40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG3)、CD226、CD270(HVEM)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、LFA-1、LIGHT、NKG2C、NKD2C、SLP76、TRIM、ZAP70或其任何组合。在一个特定实施方案中,共刺激信号传导结构域包括OX40、CD2、CD27、CD28、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)或4-1BB(CD137)信号传导结构域。示例性4-1BB共刺激信号传导结构域包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在某些实施方案中,CAR包含一个、两个或更多个共刺激信号传导结构域。

[0143] 在一些实施方案中,本公开的CAR是第一代CAR、第二代CAR或第三代CAR。第一代CAR通常具有胞内信号传导结构域,其包括CD3ζ、FcγRI或其他含ITAM的激活结构域的胞内信号传导结构域以提供T细胞激活信号。第二代CAR还包含共刺激信号传导结构域(例如,来自内源性T细胞共刺激受体诸如CD28、4-1BB或ICOS的共刺激信号传导结构域)。第三代CAR包含含ITAM的激活结构域、第一共刺激信号传导结构域和第二共刺激信号传导结构域。

[0144] 在一些实施方案中,胞外结构域、结合结构域、接头、跨膜结构域、胞内信号传导结构域或共刺激结构域中的一者或多者包含接点氨基酸。“接点氨基酸”或“接点氨基酸残基”是指蛋白质的两个相邻结构域、基序、区域、模块或片段之间诸如结合结构域与相邻接头之间、跨膜结构域与相邻胞外或胞内结构域之间或在连接两个结构域、基序、区域、模块或片

段的接头的一端或两端上(例如,接头与相邻结合结构域之间或接头与相邻铰链之间)的一个或多个(例如,约2-20个)氨基酸残基。接点氨基酸可以由融合蛋白的构建体设计产生(例如,由在构建编码融合蛋白的多核苷酸期间使用限制性酶切位点或自切割肽序列产生的氨基酸残基)。例如,融合蛋白的跨膜结构域可以在氨基末端、羧基末端或两者处具有一个或多个接点氨基酸。

[0145] 在具体实施方案中,转基因编码抗CD19 CAR分子。在此类实施方案中,胞外结合结构域可包含如表4中详述的scFv,其具有SEQ ID NO:46的抗CD19轻链可变区、SEQ ID NO:48的G4S接头和SEQ ID NO:50的抗CD19重链可变区。可用于本说明书上下文的抗CD19 CAR可包含SEQ ID NO:52的CD8a铰链和跨膜结构域。在某些实施方案中,抗CD19 CAR包含根据SEQ ID NO:54的4-1BB共刺激结构域和根据SEQ ID NO:56的CD3 ζ 效应子结构域。在一个具体实施方案中,由转基因编码的抗CD19 CAR具有根据SEQ ID NO:42或不存在SEQ ID NO:44的信号肽的SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0146] 在其他实施方案中,转基因编码抗CD19 CAR分子,并且胞外结合结构域可包含具有与SEQ ID NO:46具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的抗CD19轻链可变区和与SEQ ID NO:50具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的抗CD19重链可变区的scFv。可用于本说明书上下文的抗CD19 CAR可包含与SEQ ID NO:52具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的CD8a铰链和跨膜结构域。在某些实施方案中,抗CD19 CAR包含与SEQ ID NO:54具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的4-1BB共刺激结构域和与SEQ ID NO:56具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的CD3 ζ 效应结构域。在一个具体实施方案中,由转基因编码的抗CD19 CAR具有与SEQ ID NO:42或不存在SEQ ID NO:44的信号肽的SEQ ID NO:42具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。

[0147] 表4:抗CD19 CAR分子

[0148]

全分子	
核苷酸	氨基酸(信号肽加下划线)
ATGGCCTTACCAGTGACCGCC	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u>
TTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGC	DIQMTQTTSSLSASLGDRVITIS
TGCTCCACGCCGCCAGGCCGG	CRASQDISKYLNWYQQKPDGT
ACATCCAGATGACACAGACTA	VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS
CATCCTCCCTGTCTGCCTCTCT	GSGTDYSLTISNLEQEDIATYF
GGGAGACAGAGTCACCATCAG	CQQGNTLPYTFGGGKLEITG
TTGCAGGGCAAGTCAGGACAT	GGGSGGGGSGGGGSEVKLQES
TAGTAAATATTTAAATTGGTA	GPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL
TCAGCAGAAACCAGATGGAAC	PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGV
TGTAAACTCCTGATCTACCA	IWGSETTYYNSALKSRLTIKD
TACATCAAGATTACACTCAGG	NSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY
AGTCCCATCAAGGTTCAGTGG	YCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
CAGTGGGTCTGGAACAGATTA	GTSVTVSSTTTPAPRPPTPPTI
TTCTCTCACCATTAGCAACCT	ASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
GGAGCAAGAAGATATTGCCAC	TRGLDFACDIYIWAPLAGTCG
TTACTTTTGCCAACAGGGTAA	VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI
TACGCTTCCGTACACGTTCCG	FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR
AGGGGGGACCAAGCTGGAGA	FPEEEEGGCELRVKFSRSADAP

[0149]

TCACAGGTGGaGGTGGaTCGG
GCGGTGGTGGGTCGGGTGGCG
GCGGATCTGAGGTGAACTGC
AGGAGTCAGGACCTGGCCTGG
TGGCGCCCTCACAGAGCCTGT
CCGTCACATGCACTGTCTCAG
GGGTCTCATTACCCGACTATG
GTGTAAGCTGGATTTCGCCAGC
CTCCACGAAAGGGTCTGGAGT
GGCTGGGAGTAATATGGGGTA
GTGAAACCACTACTATAATT
CAGCTCTCAAATCCAGACTGA
CCATCATCAAGGACAACTCCA
AGAGCCAAGTTTTCTTAAAAA
TGAACAGTCTGCAAACCTGATG
ACACAGCCATTTACTACTGTG
CCAAACATTATTACTACGGTG
GTAGCTATGCTATGGACTACT
GGGGCCAAGGAACCTCAGTCA
CCGTCTCCTCAACCACtACaCC
AGCaCCtaGACCACCAACACCTG
CGCCaACCATCGCaTCGCAGCC
aCTGTCTCTGCGCCCAGAGGCa
TGCCGGCCAGCaGCTGGGGGC
GCAGTGCACACaAGGGGGCTG
GACTTCGCaTGTGATATCTACA
TCTGGGCaCCaTTGGCaGGGAC
TTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCA
CTGGTTATCACCTTTACTGCA
AACGGGGCAGAAAGAACTC
CTGTATATATTCAAACAACCA
TTTATGAGACCAGTACAACT
ACTCAAGAGGAAGATGGCTGT
AGCTGCCGATTTCCAGAAGAA
GAAGAAGGAGGATGTGAACT
GAGAGTGAAGTTCAGCAGGA
GCGCAGACGCCCCCGCGTACA
AGCAGGGCCAGAACCAGCTCT
ATAACGAGCTCAATCTAGGAC
GAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGG
GACCCTGAGATGGGGGGAAA
GCCGAGAAGGAAGAACCCTC
AGGAAGGCCTGTACAATGAAC
TGCAGAAAGATAAGATGGCG
GAGGCCTACAGTGAGATTGGG
ATGAAAGGCGAGCGCCGGAG

AYKQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDLGYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR
(SEQ ID NO: 42)

[0150]

GGGCAAGGGGCACGATGGCCT TTACCAGGGTCTCAGTACAGC CACCAAGGACACCTACGACGC CCTTCACATGCAGGCCCTGCC CCCTCGC (SEQ ID NO: 41)	
CD8a 信号肽	
核苷酸	氨基酸
ATGGCCTTACCAGTGACCGCC TTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGC TGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO: 43)	MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 44)
抗 CD19 轻链可变区	
核苷酸	氨基酸
GACATCCAGATGACACAGACT ACATCCTCCCTGTCTGCCTCTC TGGGAGACAGAGTCACCATCA GTTGCAGGGCAAGTCAGGACA TTAGTAAATATTTAAATTGGT ATCAGCAGAAACCAGATGGA ACTGTAAACTCCTGATCTAC CATACATCAAGATTACACTCA GGAGTCCCATCAAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGAACAGAT TATTCTCTCACCATTAGCAAC CTGGAGCAAGAAGATATTGCC ACTTACTTTTGCCAACAGGGT AATACGCTTCCGTACACGTT GGAGGGGGGACCAAGCTGGA GATCACA (SEQ ID NO: 45)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVITIS CRASQDISKYNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGKLEIT (SEQ ID NO: 46)
G₄S 接头	
核苷酸	氨基酸
GGTGGaGGTGGaTCGGGCGGT GGTGGGTCGGGTGGCGGCGGA TCT (SEQ ID NO: 47)	GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 48)
抗 CD19 重链可变区	
核苷酸	氨基酸
GAGGTGAAACTGCAGGAGTCA GGACCTGGCCTGGTGGCGCCC TCACAGAGCCTGTCCGTCACA TGCACTGTCTCAGGGGTCTCA TTACCCGACTATGGTGTAAGC TGGATTCGCCAGCCTCCACGA AAGGGTCTGGAGTGGCTGGGA GTAATATGGGGTAGTGAAACC ACATACTATAATTCAGCTCTC	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTC TVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWGETTYYNLSALK SRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 50)

[0151]	AAATCCAGACTGACCATCATC AAGGACAACTCCAAGAGCCA AGTTTTCTTAAAAATGAACAG TCTGCAAACCTGATGACACAGC CATTTACTACTGTGCCAAACA TTATTACTACGGTGGTAGCTA TGCTATGGACTACTGGGGCCA AGGAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 49)	
	CD8a 铰链和跨膜	
	核苷酸	氨基酸
	ACCACTACACCAGCACCTAGA CCACCAACACCTGCGCCAACC ATCGCATCGCAGCCACTGTCT CTGCGCCCAGAGGCATGCCGG CCAGCAGCTGGGGGCGCAGTG CACACAAGGGGGCTGGACTTC GCATGTGATATCTACATCTGG GCACCATTTGGCAGGGACTTGT GGGGTCCTTCTCCTGTCACTG GTTATCACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 51)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYC (SEQ ID NO: 52)
	4-1BB 共刺激结构域	
[0152]	核苷酸	氨基酸
	AAACGGGGCAGAAAGAAACT CCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAAAC TACTCAAGAGGAAGATGGCTG TAGCTGCCGATTTCCAGAAGA AGAAGAAGGAGGATGTGAAC TG (SEQ ID NO: 53)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 54)
	CD3 ζ 效应结构域#1	
	核苷酸	氨基酸
	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC GCAGACGCCCCGCGTACAAG CAGGGCCAGAACCAGCTCTAT AACGAGCTCAATCTAGGACGA AGAGAGGAGTACGATGTTTTG GACAAGAGACGTGGCCGGGA CCCTGAGATGGGGGGAAAGCC GAGAAGGAAGAACCCTCAGG AAGGCCTGTACAATGAACTGC AGAAAGATAAGATGGCGGAG GCCTACAGTGAGATTGGGATG AAAGGCGAGCGCCGGAGGGG CAAGGGGCACGATGGCCTTTA	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR (SEQ ID NO: 56)
	CCAGGGTCTCAGTACAGCCAC CAAGGACACCTACGACGCCCT TCACATGCAGGCCCTGCCCCC TCGC (SEQ ID NO: 55)	

[0153] 在其他实施方案中,转基因编码抗BCMA CAR分子。在此类实施方案中,胞外结合结构域可包含如表5中详述的scFv,其具有SEQ ID NO:62的抗BCMA轻链可变区、SEQ ID NO:64的接头和SEQ ID NO:66的抗BCMA重链可变区。可用于本说明书上下文的抗BCMA CAR可包含SEQ ID NO:52的CD8a铰链和跨膜结构域。在某些实施方案中,抗BCMA CAR包含根据SEQ ID NO:54的4-1BB共刺激结构域和根据SEQ ID NO:122的CD3 ζ 效应子结构域。在一个具体实施方案中,由转基因编码的抗BCMA CAR具有根据SEQ ID NO:58或不存在SEQ ID NO:60的信号肽的SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0154] 在一些实施方案中,转基因编码抗BCMA CAR分子。在此类实施方案中,胞外结合结构域可包含具有与SEQ ID NO:62具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的抗BCMA轻链可变区和与SEQ ID NO:66具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的抗BCMA重链可变区的scFv。可用于本说明书上下文的抗BCMA CAR可包含与SEQ ID NO:52具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的CD8a铰链和跨膜结构域。在某些实施方案中,抗BCMA CAR包含与SEQ ID NO:54具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的4-1BB共刺激结构域和与SEQ ID NO:122具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的CD3 ζ 效应结构域。在一个具体实施方案中,由转基因编码的抗BCMA CAR具有与SEQ ID NO:58或不存在SEQ ID NO:60的信号肽的SEQ ID NO:58具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。

[0155] 表5:抗BCMA CAR分子

[0156]

全分子	
核苷酸	氨基酸(信号肽加下划线)
ATGGCACTCCCCGTCACCGCCC TTCTCTTGCCCCTCGCCCTGCT GCTGCATGCTGCCAGGCCCGAC ATTGTGCTCACTCAGTCACCTC CCAGCCTGGCCATGAGCCTGG GAAAAAGGGCCACCATCTCCT GTAGAGCCAGTGAGTCCGTCA CAATCTTGGGGAGCCATCTTAT TCACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGGCAGCCTCCAACCCTTCTTA TTCAGCTCGCGTCAAACGTCCA GACGGGTGTACCTGCCAGATTT TCTGGTAGCGGGTCCCGCACTG ATTTTACACTGACCATAGATCC AGTGAAGAAGACGATGTGGC CGTGTATTATTGTCTGCAGAGC AGAACGATTCTCTGCACATTTG GTGGGGGTACTAAGCTGGAGA TTAAGGGAAGCACGTCCGGCT CAGGGAAGCCGGGCTCCGGCG AGGGAAGCACGAAGGGGCAAA TTCAGCTGGTCCAGAGCGGACC TGAGCTGAAAAAACC CGGCGA GACTGTTAAGATCAGTTGTAAA GCATCTGGCTATACCTTCACCG ACTACAGCATAAATTGGGTGA AACGAGCCCCTGGAAAGGGCC TCAAATGGATGGGTTGGATCA ATACCGAAACTAGGGAGCCTG CTTATGCATATGACTTCCGCGG GAGATTCGCCTTTTCACTCGAG ACATCTGCCTCTACTGCTTACC TCCAAATAAACAACCTCAAGT ATGAAGATACAGCCACTTACTT TTGCGCCCTCGACTATAGTTAC GCCATGGACTACTGGGGACAG GGAACCTCCGTTACCGTCAGTT CCGCGGCCGCAACCACAACAC CTGCTCCAAGGCCCCCACACC CGCTCCAACTATAGCCAGCCAA CCATTGAGCCTCAGACCTGAAG	<u>MALPVTALLLPLALLLHAAR</u> <u>PDIVLTQSPPSLAMSLGKRATI</u> SCRASESVTILGSHLIHWYQQ KPGQPPTLLIQLASNVQTGVP ARFSGSGSRTDFTLTIDPVEED DVAVYYCLQSRTIPRTFGGGT KLEIKGSTSGSGKPGSGEGST KGQIQLVQSGPELKKPGETVK ISCKASGYTFTDYSINWVKRA PGKGLKWMGWINTETREPAY AYDFRGRFAFSLETSASTAYL QINNLYEDTATYFCALDYS YAMDYWGQGTSTVSSAAA TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 58)

[0157]

CTTGCAGGCCCCGCAGCAGGAG GCGCCGTCCATACGCGAGGCCT GGACTTCGCGTGTGATATTTAT ATTTGGGCACCTTTGGCCGAA CATGTGGGGTGTGCTTCTCTC CCTTGTGATCACTCTGTATTGT AAGCGCGGGAGAAAGAAGCTC CTGTACATCTTCAAGCAGCCTT TTATGCGACCTGTGCAAACCAC TCAGGAAGAAGATGGGTGTTT ATGCCGCTTCCCCGAGGAGGA AGAAGGAGGGTGTGAACTGAG GGTGAAATTTTCTAGAAGCGCC GATGCTCCCGCATATCAGCAGG GTCAGAATCAGCTCTACAATGA ATTGAATCTCGGCAGGCGAGA AGAGTACGATGTTCTGGACAA GAGACGGGGCAGGGATCCCGA GATGGGGGGAAAGCCCCGAG AAAAAATCCTCAGGAGGGGTT GTACAATGAGCTGCAGAAGGA CAAGATGGCTGAAGCCTATAG CGAGATCGGAATGAAAGGCGA AAGACGCAGAGGCAAGGGGCA TGACGGTCTGTACCAGGGTCTC TCTACAGCCACCAAGGACACTT ATGATGCGTTGCATATGCAAGC CTTGCCACCCCGC (SEQ ID NO: 57)	
CD8a 信号肽	
核苷酸	氨基酸
ATGGCACTCCCCGTCACCGCCC TTCTCTTGCCCCTCGCCCTGCT GCTGCATGCTGCCAGGCCC (SEQ ID NO: 59)	MALPVTALLPLALLHAAR P (SEQ ID NO: 60)
抗 BCMA 轻链可变区	
核苷酸	氨基酸
GACATTGTGCTCACTCAGTCAC CTCCCAGCCTGGCCATGAGCCT GGGAAAAAGGGCCACCATCTC CTGTAGAGCCAGTGAGTCCGTC ACAATCTTGGGGAGCCATCTTA TTCCTGGTATCAGCAGAAGCC CGGGCAGCCTCCAACCCTTCTT ATTCAGCTCGCGTCAAACGTCC AGACGGGTGTACCTGCCAGATT	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATIS CRASESVTILGSHLIHWYQQK PGQPPTLLIQLASNVQTGVPA RFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDD VAVYYCLQSRTIPRTFGGGK LEIK (SEQ ID NO: 62)

[0158]

TTCTGGTAGCGGGTCCCGCACT GATTTTACACTGACCATAGATC CAGTGGAAGAAGACGATGTGG CCGTGTATTATTGTCTGCAGAG CAGAACGATTCCTCGCACATTT GGTGGGGGTACTAAGCTGGAG ATTAAG (SEQ ID NO: 61)	
218 接头	
核苷酸	氨基酸
GGAAGCACGTCCGGCTCAGGG AAGCCGGGCTCCGGCGAGGGA AGCACGAAGGGG (SEQ ID NO: 63)	GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 64)
抗 BCMA 重链可变区	
核苷酸	氨基酸
CAAATTCAGCTGGTCCAGAGC GGACCTGAGCTGAAAAAACCC GGCGAGACTGTTAAGATCAGTT GTAAAGCATCTGGCTATACCTT CACCGACTACAGCATAAATTG GGTGAAACGAGCCCCTGGAAA GGGCCTCAAATGGATGGGTTG GATCAATACCGAAACTAGGGA GCCTGCTTATGCATATGACTTC CGCGGGAGATTTCGCTTTTCAC TCGAGACATCTGCCTCTACTGC TTACCTCCAAATAAACAACCTC AAGTATGAAGATACAGCCACT TACTTTTGCGCCCTCGACTATA GTTACGCCATGGACTACTGGGG ACAGGGAACCTCCGTTACCGTC AGTTCC (SEQ ID NO: 65)	QIQLVQSGPELKKPGETVKIS CKASGYTFTDYSINWVKRAP GKGLKWMGWINTETREPAY AYDFRGRFAFSLETSASTAYL QINNLYEDTATYFCALDYS YAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 66)
CD8a 铰链和跨膜	
核苷酸	氨基酸
ACCACAACACCTGCTCCAAGG CCCCCACACCCGCTCCAATA TAGCCAGCCAACCATTGAGCCT CAGACCTGAAGCTTGCAGGCC CGCAGCAGGAGGCGCCGTCCA TACGCGAGGCCTGGACTTCGCG TGTGATATTTATATTTGGGCAC CTTTGGCCGGAACATGTGGGGT GTTGCTTCTCTCCCTTGTGATC ACTCTGTATTGT (SEQ ID NO: 119)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYC (SEQ ID NO: 52)
4-1BB 共刺激结构域	

[0159]

核苷酸	氨基酸
AAGCGCGGGAGAAAGAAGCTC CTGTACATCTTCAAGCAGCCTT TTATGCGACCTGTGCAAACCAC TCAGGAAGAAGATGGGTGTTC ATGCCGCTTCCCCGAGGAGGA AGAAGGAGGGTGTGAACTG (SEQ ID NO: 120)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L (SEQ ID NO: 54)
CD3 ζ 效应结构域#2	
核苷酸	氨基酸
AGGGTGAAATTTTCTAGAAGC GCCGATGCTCCCGCATATCAGC AGGGTCAGAATCAGCTCTACA ATGAATTGAATCTCGGCAGGC GAGAAGAGTACGATGTTCTGG ACAAGAGACGGGGCAGGGATC CCGAGATGGGGGGAAGCCCC GGAGAAAAAATCCTCAGGAGG GGTTGTACAATGAGCTGCAGA AGGACAAGATGGCTGAAGCCT ATAGCGAGATCGGAATGAAAG GCGAAAGACGCAGAGGCAAGG GGCATGACGGTCTGTACCAGG GTCTCTCTACAGCCACCAAGGA CACTTATGATGCGTTGCATATG CAAGCCTTGCCACCCCGC (SEQ ID NO: 121)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 122)

[0160] 本公开的CAR可包含来源于任何哺乳动物物种的多核苷酸序列,所述哺乳动物物种包括人、灵长类动物、牛、马、山羊、绵羊、狗、猫、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猪、它们的转基因物种或其任何组合。在一些实施方案中,嵌合抗原受体是鼠的、嵌合的、人的或人源化的。

[0161] 制备慢病毒载体的方法

[0162] 本文提供了用于产生所公开的LVV的方法。已开发出LVV,并且通过将其组分合并到重组质粒DNA载体中而基于逆转录病毒基因组。然后可将质粒DNA载体转染到生产细胞系中以转移慢病毒颗粒制备所需的基因。LVV包装系统通常包含编码感兴趣的转基因的转移质粒、包膜质粒(例如,VSV-G)和包装质粒。第二代LVV包装系统包含编码Gag、Pol、Rev和Tat基因的单一包装质粒和单独的Env质粒。在一些实施方案中,本文所述的方法利用第三代载体系统来制备LVV。第三代载体产生系统改进了第2代LVV包装系统的安全性,并且通常是包含与三种包装质粒VSV-G、GagPol和Rev组合的转基因质粒的四质粒系统。因此,Rev和GagPol被分成两种质粒。还通过在转移质粒上添加与异源启动子(例如,CMV或RSV启动子)融合的嵌合5'LTR来从第3代LVV包装系统中消除TAT。gag基因编码包含慢病毒结构蛋白的Gag多蛋白前体,其包含基质、衣壳和核衣壳。pol基因编码提供复制所必需的慢病毒酶功能的Pol多蛋白前体,其包含蛋白酶、逆转录酶和整合酶。rev基因编码Rev蛋白,其结合Rev响应元件(RRE)以允许在病毒复制期间未剪接和单剪接的HIV RNA的核输出。Gag和Pol多蛋白前体在病毒颗粒制备期间被切割。

[0163] 可用于制备本公开的LVV的生产细胞包含人胚肾(HEK) 293细胞及其衍生物。生产

细胞可以是贴壁细胞系诸如HEK293T生产细胞,或悬浮细胞系诸如HEK293T/17SF生产细胞。

[0164] 转基因质粒与三种包装质粒GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒组合,并且用于转染生产细胞,诸如HEK293生产细胞。在一些实施方案中,用限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,包装质粒的比率通过质量确定。在一些实施方案中,转基因质粒和GagPol质粒中每一种的质量高于VSV-G env质粒和Rev质粒中每一种的质量。在一些实施方案中,转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒的限定比率为约1:1:1:1至约5:4:1:1。在一些实施方案中,用约2:1:1:1至约5:4:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,用约2:1:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,用约3:1:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,用约3.125:3.125:2.5:1.25的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,用约4:2:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,用约5:4:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。从生产细胞培养基收获生产性慢病毒颗粒。用于产生LVV颗粒的示例性材料和方法描述于Production of Lentiviral Vectors, Merten等人, Molecular Therapy-Methods&Clinical Development (2016), 3, 16017中,该文献的内容以引用方式并入本文。第三代产生系统用于研发和临床目的。适用于第三代LVV产生系统的辅助质粒的示意图提供于图1中。

[0165] 转基因质粒编码转移到所得LVV靶向的淋巴细胞(例如,T细胞或NK细胞)的唯一遗传物质,并且包含含有转基因表达盒的慢病毒骨架,所述转基因表达盒侧接用于衣壳化、逆转录和整合的顺式作用元件。在具体实施方案中,转基因质粒包含3'LTR的U3元件中的缺失,一旦转移到靶细胞中,其导致病毒LTR的转录能力的丧失。包含在转基因质粒中的表达盒可以编码单一异源蛋白(例如,如本文所述的单个CAR)或多个异源蛋白(例如,如本文所述的多个CAR),以引入靶细胞中并由靶细胞表达。

[0166] 在四质粒LVV系统的一些实施方案中,VSV-G env质粒包含编码突变VSV-G包膜蛋白和如本文所公开的靶向蛋白的串联表达盒。在具体实施方案中,包含在VSV-G env质粒中的串联表达盒包含编码第一信号肽的多核苷酸、编码靶向蛋白的多核苷酸、编码内部核糖体进入位点(IRES)、弗林蛋白酶切割位点或病毒2A肽中的一者的多核苷酸、编码第二信号肽的多核苷酸以及编码突变的VSV-G包膜蛋白的多核苷酸。在某些实施方案中,编码突变VSV-G包膜蛋白的多核苷酸位于编码靶向蛋白的多核苷酸的5'。在其他实施方案中,编码突变VSV-G包膜蛋白的多核苷酸位于编码靶向蛋白的多核苷酸的3'。编码靶向蛋白的多核苷酸和编码突变的VSV-G的多核苷酸在串联盒中被编码IRES、弗林蛋白酶切割位点或病毒2A肽的多核苷酸分开,该多核苷酸允许由单个mRNA共表达两种蛋白。在某些实施方案中,病毒2A肽是猪捷申病毒-1(P2A)、明脉扁刺蛾(Thomomys asiana)病毒(T2A)、马甲型鼻病毒(E2A)、口蹄疫病毒(F2A)或它们的变体。病毒2A肽的氨基酸和核苷酸序列的具体实例提供于表7中。

[0167] 表7:2A序列

[0168]	来自明脉扁刺蛾病毒衣壳蛋白的 T2A 肽	EGRGSLTTCG DVEENPGP (SEQ ID NO: 79)	GAGGGCAGGGGAAGTC TTCTAACATGCGGGGAC GTGGAGGAAAATCCCCG CCCC (SEQ ID NO: 80)
	来自猪捷申病毒-1多蛋白的 P2A 肽	ATNFSLLKQA GDVEENPGP (SEQ ID NO: 81)	GCCACGAACTTCTCTCT GTAAAGCAAGCAGGA GACGTGGAAGAAAACC CCGGTCCT (SEQ ID NO: 82)
	来自口蹄疫病毒多蛋白的 F2A 肽	VKQTLNFDLL KLAGDVESNP GP (SEQ ID NO: 83)	GTGAAACAGACTTTGAA TTTTGACCTTCTCAAGTT GGCGGGAGACGTCGAGT CCAACCCTGGGCCC (SEQ ID NO: 84)
	来自马甲型鼻病毒多蛋白的 E2A 肽	QCTNYALLKL AGDVESNPGP (SEQ ID NO: 85)	CAGTGTACTAATTATGC TCTCTTGAAATTGGCTG GAGATGTTGAGAGCAAC CCAGGTCCC (SEQ ID NO: 86)

[0169] 在某些实施方案中,本公开提供了一种用于产生根据前述权利要求中任一项所述的淋巴细胞靶向慢病毒载体的方法,该方法包括:用GagPol质粒、Rev质粒、转基因质粒和VSV-G env质粒转染生产细胞,其中GagPol质粒包含一种或多种编码慢病毒gag基因和慢病毒pol基因的多核苷酸并且能够在生产细胞内表达慢病毒gag多蛋白和慢病毒pol多蛋白;

[0170] Rev质粒包含编码慢病毒rev基因的多核苷酸并且能够在生产细胞内表达慢病毒rev蛋白;转基因质粒包含含有编码CAR的多核苷酸的表达盒;并且VSV-G env质粒包含串联表达盒,其中串联表达盒包含编码如本文所公开的突变VSV-G包膜蛋白的多核苷酸和编码如本文所公开的淋巴细胞靶向蛋白的多核苷酸,并且VSV-G env质粒能够在生产细胞内表达突变VSV-G包膜蛋白和淋巴细胞靶向蛋白;在培养基中培养生产细胞;以及从所述培养基中收获慢病毒载体。

[0171] 在一些实施方案中,用限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒的限定比率为约1:1:1:1至约5:4:1:1。在一些实施方案中,用约2:1:1:1至约5:4:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,用约2:1:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,用约3:1:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,用约3.125:3.125:2.5:1.25的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,用约4:2:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。在一些实施方案中,用约5:4:1:1的限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒和Rev质粒转染生产细胞。

[0172] 在一个实施方案中,VSV-G env质粒的串联表达盒编码抗CD3靶向蛋白和突变的VSV-G包膜蛋白。例如,在一个具体实施方案中,串联表达盒可包含与SEQ ID NO:67具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或

100%同一性的多核苷酸,其编码与SEQ ID NO:68具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。这样的实施方案在表8中更详细地描述。在另一个实施方案中,串联表达盒可包含与不存在SEQ ID NO:31的信号肽的SEQ ID NO:67具有约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的多核苷酸,其编码与不存在SEQ ID NO:32的信号肽的SEQ ID NO:68具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。如表8所示,抗CD3靶向蛋白经由P2A自切割肽与突变的VSV-G包膜蛋白分离。在某些实施方案中,P2A肽可由与SEQ ID NO:69具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的核酸序列编码,并且P2A肽可具有与SEQ ID NO:70具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。

[0173] 表8:与突变体VSV-G共表达的抗CD3靶向分子

[0174]

全分子	
核苷酸	氨基酸(信号肽加下划线)
ATGGCCTTACCAGTGACCGCC	<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u>
TTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGC	DIQMTQTTSSLASLGDRVITIS
TGCTCCACGCCGCCAGGCCGG	CRASQDIRNYLNWYQQKPDGT
ACATCCAGATGACCCAGACCA	VKLLIYYTSRLHSGVPSKFSGS
CCTCCTCCCTGTCTGCCTCTCT	GSGTDYSLTISNLEQEDIATYF
GGGAGACAGAGTCACCATCAG	CQQGNTLPWTFAGGTKLEIKR
TTGCAGGGCAAGTCAGGACAT	AGGGSGGGSGGGSGGGSEVQL
TAGAAATTATTTAAACTGGTA	QQSGPELVKPGASMKISCKAS
TCAACAGAAACCAGATGGAAC	GYSFTGYTMNWVKQSHGKNL
TGTTAAACTCCTGATCTACTA	EWMGLINPYKGVSTYNQKFK
CACATCAAGATTACACTCAGG	DKATLTVDKSSSTAYMELLSL
AGTCCCATCAAAGTTCAGTGG	TSEDSAVYYCARSGYYGDS
CAGTGGGTCTGGAACAGATTA	WYFDVWGAGTTVTVSSTTPA
TTCTCTCACCATTAGCAACCT	PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR
GGAGCAAGAGGATATTGCCAC	PAAGGAVHTRGLDFACDIYIW
TTACTTTTGCCAACAGGGTAA	APLAGTCGVLLLSLVITLYCGS
TACGCTTCCGTGGACGTTTCGC	<u>GATNFSLLKQAGDVEENPGPM</u>
TGGAGGCACCAAGCTGGAAAT	<u>KCLLYLAFLFIGVNC</u> KFTIVFP
CAAACGGGCTGGAGGCGGTA	HNQKGNWKNVPSNYHYCPSS
GTGGCGGTGGATCAGGTGGAG	SDLNWHNDLIGTALQVKMPQS
GCAGCGGTGGCGGATCTGAGG	HKAIQADGWMCHASKWVTTC
TGCAGCTCCAGCAGTCTGGAC	DFRWYGPKYITHSIRSFTPSVE
CTGAGCTGGTGAAGCCTGGAG	QCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQ
CTTCAATGAAGATATCCTGCA	SCGYATVTDAAEAVIVQVTPHH
AGGCTTCTGGTTACTCATTCA	VLVDEYTG EWVDSQFINGKCS
CTGGCTACACCATGAACTGGG	NYICPTVHNSTTWHSYKVKG
TGAAGCAGAGTCATGGAAAG	LCDSNLISMDITFFSEDGELSSL
AACCTTGAGTGGATGGGACTT	GKEGTGFRSNYFAYETGGKAC
ATTAATCCTTACAAAGGTGTT	KMQYCKHWGVRLPSGVWFE
AGTACCTACAACCAGAAGTTC	MADKDLFAAARFPECPEGSSIS
AAGGACAAGGCCACATTA	APSQTSVDVSLIQDVERILDYS

[0175]

GTAGACAAGTCATCCAGCACA GCCTACATGGAACCTCCTCAGT CTGACATCTGAGGACTCTGCA GTCTATTACTGTGCAAGATCG GGGTACTACGGTGATAGTGAC TGGTACTTCGATGTCTGGGGC GCAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCAACCACTACACCAGCA CCTAGACCACCAACACCTGCG CCAACCATCGCATCGCAGCCA CTGTCTCTGCGCCAGAGGCA TGCCGGCCAGCAGCTGGGGGC GCAGTGCACACAAGGGGGCTG GACTTCGCATGTGATATCTAC ATCTGGGCACCATTTGGCAGGG ACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGT CACTGGTTATCACCCTTTACTG CGGCAGCGGCGCCACCAACTT CTCCCTGCTGAAGCAGGCCGG CGACGTGGAAGAAAACCCTGG CCCCATGAAGTGTCTGCTGTA CCTGGCGTTCCCTGTTTATCGG GGTGAAGTGAAGTTCATCTAT CGTGTTTCCGCACAACCAAAA GGGCAACTGGAAAAACGTGCC TTCAAATTACCATTATTGCCCC AGCAGCTCGGACCTGAACTGG CACAATGACCTCATTGGAACC GCGCTGCAGGTGAAGATGCCA CAGAGCCACAAGGCTATCCAG GCTGACGGATGGATGTGCCAC GCGTCAAAATGGGTGACTACC TGCGATTTCCGCTGGTACGGA CCAAAATACATCACGCACAGC ATCAGATCATTACCCCGTCA GTGGAACAATGCAAAGAATCC ATCGAACAGACTAAGCAGGG AACCTGGCTGAACCCTGGATT TCCGCCGCAGTCGTGTGGGT CGCAACCGTGACCGATGCAGA GGCCGTGATCGTGCAAGTCAC GCCGCATCACGTGCTTGTGGA CGAGTACACCGGAGAATGGGT CGATTCCCAGTTCATCAACGG CAAGTGCTCCAACCTACATTG CCCAACCGTGCAACAGCAC TACTTGGCATAGCGACTACAA	LCQETWSKIRAGLPISPVDLSY LAPKNPGTGPAFTIINGTLKYF ETRYIRVDIAAPILSRMVGMI GTTTEAELWDDWAPYEDVEIG PNGVLRTSSGYKFPLYMIGHG MLDSDLHLSSKAQVFEHPHIQ DAASQLPDDESLFFGDTGLSK NPIELVEGWFSWKSSIASFFFII GLIIGLFLVLRVGIHLCKIKHT KKRQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 68)
---	---

[0176]

AGTGAAGGGTCTGTGTGATTC
CAACCTGATCTCCATGGATAT
CACTTTCTTCTCGGAAGACGG
CGAACTGTCCTCACTGGGCAA
AGAAGGAACTGGGTTTCGCTC
AAATTACTTCGCCTACGAAAC
TGGAGGAAAAGCCTGCAAGAT
GCAGTACTGCAAGCACTGGGG
CGTGAGACTACCCAGCGGTGT
CTGGTTCGAGATGGCCGATAA
GGACCTGTTTGCAGCAGCGAG
ATTCCCGGAATGCCCTGAGGG
ATCGAGCATCTCCGCTCCAAG
CCAAACTTCAGTGGACGTGAG
CCTGATCCAGGACGTGGAACG
GATTCTCGACTACTCGCTGTG
CCAGGAGACCTGGTCGAAGAT
CAGAGCGGGACTGCCCATCTC
ACCGGTGGACCTGTCCTACCT
GGCGCCAAAGAATCCGGGCAC
TGGACCGGCGTTCAACATCAT
CAACGGCACCCCTCAAATACTT
CGAGACGCGGTACATCCGGGT
GGACATCGCAGCTCCGATCCT
CTCCCGGATGGTGGGAATGAT
CTCGGGGACTACTACCGAAGC
CGAGCTCTGGGACGACTGGGC
ACCTTACGAGGATGTCGAGAT
CGGACCTAACGGAGTGCTCCG
GACCTCCTCCGGGTACAAGTT
CCCTCTGTACATGATCGGCCA
TGGCATGCTGGACTCGGATCT
GCATCTGTCTGTCCTCAAAGCACA
GGTGTTTGAACACCCACACAT
TCAAGACGCCGCCAGCCAGCT
GCCGGACGATGAGTCGCTGTT
CTTCGGAGACACGGGCTTGTC
AAAGAATCCCATCGAGCTGGT
GGAAGGATGGTTTTTCATCCTG
GAAAAGCAGCATCGCTTCATT
CTTCTTCATCATTGGCCTGATC
ATCGGCCTATTTCTAGTCCTGC
GGGTGGGAATTCATCTGTGCA
TCAAGCTCAAGCACACTAAGA
AGCGGCAAATCTACACTGATA
TCGAGATGAATCGCCTGGGCA
AG (SEQ ID NO: 67)

[0177]

CD8a 信号肽	
核苷酸	氨基酸
ATGGCCTTACCAGTGACCGCC TTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGC TGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO: 31)	MALPVTALLPLALLHAARP (SEQ ID NO: 32)
抗 CD3 轻链可变区	
核苷酸	氨基酸
GACATCCAGATGACCCAGACC ACCTCCTCCCTGTCTGCCTCTC TGGGAGACAGAGTCACCATCA GTTGCAGGGCAAGTCAGGACA TTAGAAATTATTTAACTGGT ATCAACAGAAACCAGATGGA ACTGTAAACTCCTGATCTAC TACACATCAAGATTACACTCA GGAGTCCCATCAAAGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGAACAGAT TATTCTCTCACCATTAGCAAC CTGGAGCAAGAGGATATTGCC ACTTACTTTTGCCAACAGGGT AATACGCTTCCGTGGACGTTT GCTGGAGGCACCAAGCTGGAA ATCAAACGGGCT (SEQ ID NO: 33)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS CRASQDIRNYLNWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSKFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPWTFAGGTKLEIKR A (SEQ ID NO: 34)
G₃S 接头	
核苷酸	氨基酸
GGAGGCGGTAGTGGCGGTGG ATCAGGTGGAGGCAGCGGTGG CGGATCT (SEQ ID NO: 35)	GGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 36)
抗 CD3 重链可变区	
核苷酸	氨基酸
GAGGTGCAGCTCCAGCAGTCT GGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCC TGCAAGGCTTCTGGTTACTCA TTCCTGGCTACACCATGAAC TGGGTGAAGCAGAGTCATGGA AAGAACCCTTGAGTGGATGGGA CTTATTAATCCTTACAAAGGT GTTAGTACCTACAACCAGAAG TTCAAGGACAAGGCCACATTA ACTGTAGACAAGTCATCCAGC ACAGCCTACATGGAACCTCCTC AGTCTGACATCTGAGGACTCT	EVQLQQSGPELVKPGASMKIS CKASGYSFTGYTMNWVKQSH GKNLEWMGLINPYKGVSTYN QKFKDKATLTVDKSSSTAYME LLSLTSEDSAVYYCARSYYG DSDWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 38)

[0178]

GCAGTCTATTACTGTGCAAGA TCGGGGTACTACGGTGATAGT GACTGGTACTTCGATGTCTGG GGCGCAGGGACCACGGTCACC GTCTCCTCA (SEQ ID NO: 37)	
CD8a 铰链和跨膜	
核苷酸	氨基酸
ACCACTACACCAGCACCTAGA CCACCAACACCTGCGCCAACC ATCGCATCGCAGCCACTGTCT CTGCGCCCAGAGGCATGCCGG CCAGCAGCTGGGGGCGCAGTG CACACAAGGGGGGCTGGACTTC GCATGTGATATCTACATCTGG GCACCATTTGGCAGGGACTTGT GGGGTCCTTCTCCTGTCACTG GTTATCACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 39)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYC (SEQ ID NO: 40)
P2A 自切割肽	
核苷酸	氨基酸
GGCAGCGGCGCCACCAACTTC TCCCTGCTGAAGCAGGCCGGC GACGTGGAAGAAAACCCTGGC CCC (SEQ ID NO: 69)	GSGATNFSLLKQAGDVEENPG P (SEQ ID NO: 70)
VSV-G 信号序列	
核苷酸	氨基酸
ATGAAGTGTCTGCTGTACCTG GCGTTCCTGTTTATCGGGGTG AACTGC (SEQ ID NO: 71)	MKCLLYLAFLFIGVNC (SEQ ID NO: 72)
突变体 VSV-G (Trop-002)	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCACCTATCGTGTTTCCG CACAACCAAAAGGGCAACTG GAAAAACGTGCCTTCAAATTA CCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAATGA CCTCATTGGAACCGCGCTGCA GGTGAAGATGCCACAGAGCCA CAAGGCTATCCAGGCTGACGG ATGGATGTGCCACGCGTCAAA ATGGGTGACTACCTGCGATTT CCGCTGGTACGGACCAAAATA CATCACGCACAGCATCAGATC ATTCACCCCGTCAGTGGAACA ATGCAAAGAATCCATCGAACA	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNY HYCPSSDLNWHNDLIGTALQ VKMPQSHKAIQADGWMCHAS KWVTTCDFRWYGPKYITHSIR SFTPSVEQCKESIEQTKQGTWL NPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIV QVTPHHVLVDEYTGEWVDSQ FINGKCSNYICPTVHNSTTWHS DYKVKGLCDSNLISMDITFFSE DGELSSLGKEGTGFRSNYFAY ETGGKACKMQYCKHWGVRLP SGVWFEMADKDLFAAARFPEC PEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVE RILDYSLCQETWSKIRAGLPISP

[0179]

GACTAAGCAGGGAACCTGGCT GAACCCTGGATTTCCGCCGCA GTCGTGTGGGTACGCAACCGT GACCGATGCAGAGGCCGTGAT CGTGCAAGTCACGCCGCATCA CGTGCTTGTGGACGAGTACAC CGGAGAATGGGTTCGATTCCCA GTTTCATCAACGGCAAGTGCTC CAACTACATTTGCCCAACCGT GCACAACAGCACTACTTGGCA CAGCGACTACAAAGTGAAGG GTCTGTGTGATTCCAACCTGA TCTCCATGGATATCACTTTCTT CTCGGAAGACGGCGAACTGTC CTCACTGGGCAAAGAAGGAAC TGGGTTTCGCTCAAATTACTTC GCCTACGAAACTGGAGGAAA AGCCTGCAAGATGCAGTACTG CAAGCACTGGGGCGTGAGACT ACCCAGCGGTGTCTGGTTCGA GATGGCCGATAAAGGACCTGTT TGCAGCAGCGAGATTCCCGGA ATGCCCTGAGGGATCGAGCAT CTCCGCTCCAAGCCAACTTC AGTGGACGTGAGCCTGATCCA GGACGTGGAACGGATTCTCGA CTACTCGCTGTGCCAGGAGAC CTGGTCGAAGATCAGAGCGGG ACTGCCCATCTCACCGGTGGA CCTGTCCTACCTGGCGCCAAA GAATCCGGGCACTGGACCGGC GTTCAACCATCATCAACGGCAC CCTCAAATACTTCGAGACGCG GTACATCCGGGTGGACATCGC AGCTCCGATCCTCTCCCGGAT GGTGGGAATGATCTCGGGGAC TACTACCGAAGCCGAGCTCTG GGACGACTGGGCACCTTACGA GGATGTCGAGATCGGACCTAA CGGAGTGCTCCGGACCTCCTC CGGGTACAAGTTCCCTCTGTA CATGATCGGCCATGGCATGCT GGACTCGGATCTGCATCTGTC GTCCAAAGCACAGGTGTTTGA ACACCCACACATTCAAGACGC CGCCAGCCAGCTGCCGGACGA TGAGTCGCTGTTCTTCGGAGA	VDLSYLAPKNPGTGPAFTIING TLKYFETRYIRVDIAAPILSRM VGMISGTTTEAELWDDWAPYE DVEIGPNGVLRTSSGYKFPLY MIGHGMLDSDLHLSSKAQVFE HPHIQDAASQLPDDESFFGDT GLSKNPIELVEGWFWSSWKSSIA SFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCK LKHTKKRQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 74)
--	--

[0180]

CACGGGCTTGTCAAAGAATCC CATCGAGCTGGTGGAAAGGATG GTTTTCATCCTGGAAAAGCAG CATCGCTTCATTCTTCTTCATC ATTGGCCTGATCATCGGCCTA TTTCTAGTCCTGCGGGTGGGA ATTCATCTGTGCATCAAGCTC AAGCACACTAAGAAGCGGCA AATCTACACTGATATCGAGAT GAATCGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 73)	
---	--

[0181] 在另一个实施方案中,VSV-G env质粒的串联表达盒编码CD80靶向蛋白和突变的VSV-G包膜蛋白。例如,在一个具体实施方案中,串联表达盒可包含根据SEQ ID NO:75的多核苷酸,其编码SEQ ID NO:76的氨基酸序列。这样的实施方案在表9中更详细地描述。如表9所示,CD80靶向蛋白通过由SEQ ID NO:69编码并且具有根据SEQ ID NO:70的氨基酸序列的P2A自切割肽与突变的VSV-G包膜蛋白分离。

[0182] 在一些实施方案中,当VSV-G env质粒的串联表达盒编码CD80靶向蛋白和突变的VSV-G包膜蛋白时,串联表达盒可包含与SEQ ID NO:75具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的多核苷酸,其编码与SEQ ID NO:76具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,CD80靶向蛋白经由P2A自切割肽与突变的VSV-G包膜蛋白分离,所述自切割肽由与SEQ ID NO:69具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的核酸序列编码,并且P2A自切割肽包含与SEQ ID NO:70具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸。

[0183] 表9:与突变体VSV-G共表达的CD80 T细胞靶向分子

[0184]

全分子	
核苷酸	氨基酸(信号序列加下划线)
ATGGGTCATACACGCCGCCAA	<u>MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQ</u>
GGAACCTCACCATCTAAGTGC	<u>LLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVK</u>
CCATATCTGAATTTCTTTCAAC	EVATLSCGHNVSVVEE LAQTRIY
TTCTCGTGCTGGCGGGGCTCA	WQKEKKMVLTMMSGDMNIW
GTCATTTCTGCAGTGGGGTCA	PEYKNRTIFDITNNLSIVILALR
TTCACGTTACTAAAGAGGTCA	PSDEGTYECVVLKYEKDAFKR
AGGAGGTCGCAACATTGAGTT	EHLAEVTL SVKADFPTPSISDF
GTGGCCATAACGTATCAGTTG	EIPTS NIRRIICSTSGGFPEPHLS
AAGAACTCGCGCAGACACGG	WLENGEELNAINTTVSQDPETE
ATTTACTGGCAAAAGGAAAAG	LYAVSSKLDFNMTTNHSHFMCL
AAGATGGTGTGACAATGATG	IKYGHLRVNQTFNWNTTKQEH
AGCGGTGACATGAACATTTGG	FPDNLLPSWAITLISVNGIFVIC
CCAGAGTACAAAAATCGAACG	CLTYCFAPRCREGSGATNFSLL
ATATTCGATATAACCAATAAC	<u>KQAGDVEENPGPMKCLLYLAF</u>
TTGTCCATAGTAATACTTGCCT	<u>LFIGVNC</u> KFTIVFPHNQKGNW
TGCGACCTTCTGACGAGGGAA	KNVPSNYHYCPSSSDLNWHND
CGTATGAATGTGTAGTGCTTA	LIGTALQVKMPQSHKAIQADG
AGTATGAAAAAGATGCCTTTA	WMCHASKWVTTCDFRWYGP
AGCGGGAACACTTGGCTGAGG	KYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQ
TTACACTCTCCGTTAAGGCGG	TKQGTWLNPGFPPQSCGYATV
ACTTTCCTACGCCGTCTATATC	TDAEAVIVQVTPHHVLVDEYT
CGACTTCGAGATACCCACTTC	GEWVDSQFINGKCSNYICPTV
TAACATTGACGCATCATTTG	HNSTTWHSDYKVKGLCDNLI
CTCAACCTCAGGTGGTTTCCC	SMDITFFSEDGELSSLGKEGTG
AGAGCCTCACTTGAGCTGGCT	FRSNYFAYETGGKACKMQYC
GGAGAATGGCGAAGAACTTA	KHWGVRLPSGVWFEMADKDL
ACGCAATCAATACCACGGTGT	FAAARFPECPEGSSISAPSQTSV
CCCAAGACCCGGAGACAGAG	DVSLIQDVERILDYSLCQETWS
CTGTACGCCGTGTCATCCAAA	KIRAGLPISPVDLSYLAPKNPG
CTGGATTTTAACATGACGACA	TGPAFTIINGTLKYFETRYIRVD
AATCATAGTTTTCATGTGTCTG	IAAPILSRMVGMISGTTTEAEL
ATCAAATATGGGCATCTCAGG	WDDWAPYEDVEIGPNGVLRTS
GTGAATCAGACTTTTAATTGG	SGYKFPLYMIGHGMLDSDLHL
AACACTACCAAACAAGAGCAC	SSKAQVFEHPHIQDAASQLPDD
TTCCCAGATAATCTGTTGCCA	ESLFFGDTGLSKNPIELVEGWF
AGCTGGGCGATAACTCTTATC	SSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVL
TCCGTCAACGGTATCTTCGTA	RVGIHLCKIKLKHKKRQIYTDI
ATTTGCTGCCTCACCTATTGTT	EMNRLGK
TCGCGCCTCGATGCCGAGAAG	(SEQ ID NO: 76)
GCAGCGGCGCCACCAACTTCT	
CCCTGCTGAAGCAGGCCGGCG	
ACGTGGAAGAAAACCCTGGCC	
CCATGAAGTGTCTGCTGTACC	

[0185]

TGGCGTTCCTGTTTATCGGGG
TGAAGTCAAGTTCAGTATCG
TGTTTCCGCACAACCAAAAGG
GCAAGTGGAAAAACGTGCCTT
CAAATTACCATTATTGCCCA
GCAGCTCGGACCTGAAGTGGC
ACAATGACCTCATTGGAACCG
CGCTGCAGGTGAAGATGCCAC
AGAGCCACAAGGCTATCCAGG
CTGACGGATGGATGTGCCACG
CGTCAAAATGGGTGACTACCT
GCGATTTCCGCTGGTACGGAC
CAAAATACATCACGCACAGCA
TCAGATCATTACCCCGTCAG
TGGAACAATGCAAAGAATCCA
TCGAACAGACTAAGCAGGGA
ACCTGGCTGAACCCTGGATTT
CCGCCGCAGTCGTGTGGGTAC
GCAACCGTGACCGATGCAGAG
GCCGTGATCGTGCAAGTCACG
CCGCATCACGTGCTTGTGGAC
GAGTACACCGGAGAATGGGTC
GATTCCCAGTTCATCAACGGC
AAGTGCTCCAAGTACATTTGC
CCAACCGTGCAACAGCACT
ACTTGGCACAGCGACTACAAA
GTGAAGGGTCTGTGTGATTCC
AACCTGATCTCCATGGATATC
ACTTTCTTCTCGGAAGACGGC
GAACTGTCCTCACTGGGCAAA
GAAGGAACTGGGTTTCGCTCA
AATTACTTCGCCTACGAACT
GGAGGAAAAGCCTGCAAGAT
GCAGTACTGCAAGCACTGGGG
CGTGAGACTACCCAGCGGTGT
CTGGTTCGAGATGGCCGATAA
GGACCTGTTTGCAGCAGCGAG
ATTCCCGGAATGCCCTGAGGG
ATCGAGCATCTCCGCTCCAAG
CCAAACTTCAGTGGACGTGAG
CCTGATCCAGGACGTGGAACG
GATTCTCGACTACTCGCTGTG
CCAGGAGACCTGGTCGAAGAT
CAGAGCGGGACTGCCCATCTC
ACCGGTGGACCTGTCCTACCT
GGCGCCAAAGAATCCGGGCAC
TGGACCGGCGTTCACCATCAT

[0186]

CAACGGCACCCTCAAATACTT CGAGACGCGGTACATCCGGGT GGACATCGCAGCTCCGATCCT CTCCCGGATGGTGGGAATGAT CTCGGGGACTACTACCGAAGC CGAGCTCTGGGACGACTGGGC ACCTTACGAGGATGTCGAGAT CGGACCTAACGGAGTGCTCCG GACCTCCTCCGGGTACAAGTT CCCTCTGTACATGATCGGCCA TGGCATGCTGGACTCGGATCT GCATCTGTCGTCCAAAGCACA GGTGTTTGAACACCCACACAT TCAAGACGCCGCCAGCCAGCT GCCGGACGATGAGTCGCTGTT CTTCGGAGACACGGGCTTGTC AAAGAATCCCATCGAGCTGGT GGAAGGATGGTTTTTCATCCTG GAAAAGCAGCATCGCTTCATT CTTCTTCATCATTGGCCTGATC ATCGGCCTATTTCTAGTCCTGC GGGTGGGAATTCATCTGTGCA TCAAGCTCAAGCACACTAAGA AGCGGCAAATCTACACTGATA TCGAGATGAATCGCCTGGGCA AG (SEQ ID NO: 75)	
CD80 信号肽	
核苷酸	氨基酸
ATGGGTCATACACGCCGCCAA GGAACCTCACCATCTAAGTGC CCATATCTGAATTTCTTTCAAC TTCTCGTGCTGGCGGGGCTCA GTCATTTCTGCAGTGGGGTC (SEQ ID NO: 3)	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQ LLVLAGLSHFCSGV (SEQ ID NO: 4)
CD80 胞外结构域(ECD)	
核苷酸	氨基酸
ATTCACGTTACTAAAGAGGTC AAGGAGGTCGCAACATTGAGT TGTGGCCATAACGTATCAGTT GAAGAACTCGCGCAGACACG GATTTACTGGCAAAAGGAAAA GAAGATGGTGTGACAATGAT GAGCGGTGACATGAACATTTG GCCAGAGTACAAAAATCGAAC GATATTCGATATAACCAATAA	IHVTKEVKEVATLSCGHNVS EELAQTRIYWQKEKKMVLTM MSGDMNIWPEYKNRTIFDITN NLSIVILALRPSDEGTYECVVL KYEKDAFKREHLAEVTLVKA DFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTS GGFPEPHLSWLENGEELNAINT TVSQDPETELYAVSSKLDFNM TTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF

[0187]

CTTGTCCATAGTAATACTTGC CTTGCGACCTTCTGACGAGGG AACGTATGAATGTGTAGTGCT TAAGTATGAAAAAGATGCCTT TAAGCGGGAACACTTGGCTGA GGTTACACTCTCCGTTAAGGC GGACTTTCCTACGCCGTCTAT ATCCGACTTCGAGATACCCAC TTCTAACATTTCGACGCATCAT TTGCTCAACCTCAGGTGGTTT CCCAGAGCCTCACTTGAGCTG GCTGGAGAATGGCGAAGAAGT TAACGCAATCAATACCACGGT GTCCCAAGACCCGGAGACAGA GCTGTACGCCGTGTCATCCAA ACTGGATTTTAACATGACGAC AAATCATAGTTTCATGTGTCT GATCAAATATGGGCATCTCAG GGTGAATCAGACTTTTAATTG GAACACTACCAAACAAGAGC ACTTCCCAGATAATCTGTTGC CAAGC (SEQ ID NO: 5)	NWNTTKQEHFPDNLPS (SEQ ID NO: 6)
CD80 跨膜和胞内结构域	
核苷酸	氨基酸
TGGGCGATAACTCTTATCTCC GTCAACGGTATCTTCGTAATT TGCTGCCTCACCTATTGTTTCG CGCCTCGATGCCGAGAA (SEQ ID NO: 7)	WAITLISVNGIFVICCLTYCFAP RCRE (SEQ ID NO: 8)
P2A 自切割	
核苷酸	氨基酸
GGCAGCGGCGCCACCAACTTC TCCCTGCTGAAGCAGGCCGGC GACGTGGAAGAAAACCCTGGC CCC (SEQ ID NO: 69)	GSGATNFSLLKQAGDVEENPG P (SEQ ID NO: 70)
VSV-G 信号序列	
核苷酸	氨基酸
ATGAAGTGTCTGCTGTACCTG GCGTTCCTGTTTATCGGGGTG AACTGC (SEQ ID NO: 71)	MKCLLYLAFLFIGVNC (SEQ ID NO: 72)
突变体 VSV-G	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCATATCGTGTTTCCG CACAACCAAAAGGGCAACTG GAAAAACGTGCCTTCAAATTA	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNY HYCPSSSDLNWHNDLIGTALQ VKMPQSHKAIQADGWMCHAS

[0188]

CCATTATTGCCCCAGCAGCTC
GGACCTGAACTGGCACAATGA
CCTCATTGGAACCGCGCTGCA
GGTGAAGATGCCACAGAGCCA
CAAGGCTATCCAGGCTGACGG
ATGGATGTGCCACGCGTCAAA
ATGGGTGACTACCTGCGATTT
CCGCTGGTACGGACCAAAATA
CATCACGCACAGCATCAGATC
ATTCACCCCGTCAGTGGAACA
ATGCAAAGAATCCATCGAACA
GACTAAGCAGGGAACCTGGCT
GAACCCTGGATTTCCGCCGCA
GTCGTGTGGGTACGCAACCGT
GACCGATGCAGAGGCCGTGAT
CGTGCAAGTCACGCCGCATCA
CGTGCTTGTGGACGAGTACAC
CGGAGAATGGGTTCGATTCCCA
GTTTCATCAACGGCAAGTGCTC
CAACTACATTTGCCCAACCGT
GCACAACAGCACTACTTGGCA
CAGCGACTACAAAGTGAAGG
GTCTGTGTGATTCCAACCTGA
TCTCCATGGATATCACTTTCTT
CTCGGAAGACGGCGAACTGTC
CTCACTGGGCAAAGAAGGAAC
TGGGTTTCGCTCAAATTACTTC
GCCTACGAAACTGGAGGAAA
AGCCTGCAAGATGCAGTACTG
CAAGCACTGGGGCGTGAGACT
ACCCAGCGGTGTCTGGTTCGA
GATGGCCGATAAAGGACCTGTT
TGCAGCAGCGAGATTCCCGGA
ATGCCCTGAGGGATCGAGCAT
CTCCGCTCCAAGCCAACTTC
AGTGGACGTGAGCCTGATCCA
GGACGTGGAACGGATTCTCGA
CTACTCGCTGTGCCAGGAGAC
CTGGTCGAAGATCAGAGCGGG
ACTGCCCATCTCACCGGTGGA
CCTGTCCTACCTGGCGCCAAA
GAATCCGGGCACTGGACCGGC
GTTCAACCATCATCAACGGCAC
CCTCAAATACTTCGAGACGCG
GTACATCCGGGTGGACATCGC
AGCTCCGATCCTCTCCCGGAT
GGTGGGAATGATCTCGGGGAC

KWVTTCDFRWYGPKYITHSIR
SFTPSVEQCKESIEQTKQGTWL
NPGFPPQSCGYATVTDAEAVIV
QVTPHHVLVDEYTGEWVDSQ
FINGKCSNYICPTVHNSTTWSH
DYKVKGLCDSNLISMDITFFSE
DGELSSLGKEGTGFRSNYFAY
ETGGKACKMQYCKHWGVRLP
SGVWFEMADKDLFAAARFPEC
PEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVE
RILDYSLCQETWSKIRAGLPISP
VDLSYLAPKNPGTGPAFTIING
TLKYFETRYIRVDIAAPILSRM
VGMISGTTTEAELWDDWAPYE
DVEIGPNGVLRTSSGYKFPLY
MIGHGMLDSDLHLSSKAQVFE
HPHIQDAASQLPDDESLEFFGDT
GLSKNPIELVEGWFWSSWKSSIA
SFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCK
LKHTKKRQIYTDIEMNRLGK
(SEQ ID NO: 74)

[0189]

TACTACCGAAGCCGAGCTCTG
 GGACGACTGGGCACCTTACGA
 GGATGTCGAGATCGGACCTAA
 CGGAGTGCTCCGGACCTCCTC
 CGGGTACAAGTTCCCTCTGTA
 CATGATCGGCCATGGCATGCT
 GGACTCGGATCTGCATCTGTC
 GTCCAAAGCACAGGTGTTTGA
 ACACCCACACATTCAAGACGC
 CGCCAGCCAGCTGCCGGACGA
 TGAGTCGCTGTTCTTCGGAGA
 CACGGGCTTGTCAAAGAATCC
 CATCGAGCTGGTGGAAGGATG
 GTTTTCATCCTGGAAAAGCAG
 CATCGCTTCATTCTTCTTCATC
 ATTGGCCTGATCATCGGCCTA
 TTTCTAGTCCTGCGGGTGGGA
 ATTCATCTGTGCATCAAGCTC
 AAGCACACTAAGAAGCGGCA
 AATCTACACTGATATCGAGAT
 GAATCGCCTGGGCAAG (SEQ
 ID NO: 73)

[0190] 在另一个实施方案中,VSV-G env质粒的串联表达盒编码CD80靶向蛋白、抗CD3靶向蛋白和突变的VSV-G包膜蛋白。例如,在一个具体实施方案中,串联表达盒可包含根据SEQ ID NO:1的CD80靶向多核苷酸,其编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在一个具体实施方案中,串联表达盒可包含根据SEQ ID NO:9的抗CD3靶向多核苷酸,其编码SEQ ID NO:10的氨基酸序列。这样的实施方案在表3中更详细地描述。如表3所示,CD80靶向蛋白通过由SEQ ID NO:29编码并且具有根据SEQ ID NO:30的氨基酸序列的P2A自切割肽与抗CD3靶向蛋白分离。

[0191] 在一些实施方案中,当VSV-G env质粒的串联表达盒编码CD80靶向蛋白、抗CD3靶向蛋白和突变的VSV-G包膜蛋白时,串联表达盒可包含与SEQ ID NO:21具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的编码CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白的多核苷酸,其编码与SEQ ID NO:22具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,CD80靶向蛋白经由P2A自切割肽与抗CD3靶向蛋白分离,所述自切割肽由与SEQ ID NO:29具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的核酸序列编码,并且P2A自切割肽包含与SEQ ID NO:30具有至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸。

[0192] 在一些实施方案中,其中VSV-G env质粒的串联表达盒编码CD80靶向蛋白、抗CD3靶向蛋白和突变的VSV-G包膜蛋白,CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白经由2A自切割肽与突变的VSV-G包膜蛋白分离。

[0193] 在四质粒LVV系统的一些实施方案中,GagPol质粒包含编码Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体的串联表达盒以及如本文所公开的靶向蛋白。在具体实施方案中,包含在GagPol质粒中的串联表达盒包含编码第一信号肽的多核苷酸、编码靶向蛋白的多核苷酸、

编码内部核糖体进入位点 (IRES)、弗林蛋白酶切割位点或病毒2A肽中的一者的多核苷酸、编码第二信号肽的多核苷酸以及编码Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体的多核苷酸。在某些实施方案中,编码Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体的多核苷酸位于编码靶向蛋白的多核苷酸的5'。在其他实施方案中,编码Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体的多核苷酸位于编码靶向蛋白的多核苷酸的3'。编码靶向蛋白的多核苷酸和编码Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体的多核苷酸在串联盒中被编码IRES、弗林蛋白酶切割位点或病毒2A肽的多核苷酸分开,该多核苷酸允许由单个mRNA共表达Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体和靶向蛋白。在某些实施方案中,病毒2A肽是猪捷申病毒-1 (P2A)、明脉扁刺蛾病毒 (T2A)、马甲型鼻病毒 (E2A)、口蹄疫病毒 (F2A) 或它们的变体。病毒2A肽的氨基酸和核苷酸序列的具体实例提供于表7中。

[0194] 在一些实施方案中,将含有编码Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体和靶向蛋白的串联表达盒的GagPol质粒以高于VSV-G env质粒的摩尔浓度转染到生产细胞中。在一些实施方案中,将含有编码Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体和靶向蛋白的串联表达盒的GagPol质粒以低于VSV-G env质粒的摩尔浓度转染到生产细胞中。

[0195] 在一个实施方案中,GagPol质粒的串联表达盒编码抗CD3靶向蛋白和Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体。在一些实施方案中,抗CD3靶向蛋白经由P2A自切割肽与Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体分离。

[0196] 在另一个实施方案中,GagPol质粒的串联表达盒编码CD80靶向蛋白和Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体。在一些实施方案中,CD80靶向蛋白经由P2A自切割肽与Gag多蛋白前体和Pol多蛋白前体分离。

[0197] 在四质粒LVV系统的一些实施方案中,Rev质粒包含编码Rev蛋白和如本文所公开的靶向蛋白的串联表达盒。在具体实施方案中,包含在Rev质粒中的串联表达盒包含编码第一信号肽的多核苷酸、编码靶向蛋白的多核苷酸、编码内部核糖体进入位点 (IRES)、弗林蛋白酶切割位点或病毒2A肽中的一者的多核苷酸、编码第二信号肽的多核苷酸以及编码Rev蛋白的多核苷酸。在某些实施方案中,编码Rev蛋白的多核苷酸位于编码靶向蛋白的多核苷酸的5'。在其他实施方案中,编码Rev蛋白的多核苷酸位于编码靶向蛋白的多核苷酸的3'。编码靶向蛋白的多核苷酸和编码Rev蛋白的多核苷酸在串联盒中被编码IRES、弗林蛋白酶切割位点或病毒2A肽的多核苷酸分开,该多核苷酸允许由单个mRNA共表达Rev蛋白和靶向蛋白。在某些实施方案中,病毒2A肽是猪捷申病毒-1 (P2A)、明脉扁刺蛾病毒 (T2A)、马甲型鼻病毒 (E2A)、口蹄疫病毒 (F2A) 或它们的变体。病毒2A肽的氨基酸和核苷酸序列的具体实例提供于表7中。

[0198] 在一些实施方案中,将含有编码Rev蛋白和靶向蛋白的串联表达盒的Rev质粒以高于VSV-G env质粒的摩尔浓度转染到生产细胞中。在一些实施方案中,将含有编码Rev蛋白和靶向蛋白的串联表达盒的Rev质粒以低于VSV-G env质粒的摩尔浓度转染到生产细胞中。

[0199] 在一个实施方案中,Rev质粒的串联表达盒编码抗CD3靶向蛋白和Rev蛋白。在一些实施方案中,抗CD3靶向蛋白经由P2A自切割肽与Rev蛋白分离。

[0200] 在另一个实施方案中,GagPol质粒的串联表达盒编码CD80靶向蛋白和Rev蛋白。在一些实施方案中,CD80靶向蛋白经由P2A自切割肽与Rev蛋白分离。

[0201] 可用于本公开的四质粒第3代慢病毒载体系统的突变VSV-G序列的实例提供于表10中。

[0202] 表10:WT VSV-G参考和突变体序列

WT VSV-G	
核苷酸	氨基酸(信号序列加下划线)
ATGAAGTGTCTGCTGTACCTG	<u>MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIV</u>
GCGTTCCTGTTTATCGGGGTG	FPHNQKGNWKNVPSNYHYCP
AACTGCAAGTTCACATATCGTG	SSSDLNWHNDLIGTALQVKM
TTTCCGCACAACCAAAAGGGC	PKSHKAIQADGWMCHASKW
AACTGGAAAAACGTGCCTTCA	VTTCDFRWYGPKYITHSIRSFT
AATTACCATTATTGCCCCAGC	PSVEQCKESIEQTKQGTWLN
AGCTCGGACCTGAACTGGCAC	GFPPQSCGYATVTDAEAVIVQ
AATGACCTCATTGGAACCGCG	VTPHHVLVDEYTG EWVDSQFI
CTGCAGGTGAAGATGCCAAA	NGKCSNYICPTVHNSTTWHS
GAGCCACAAGGCTATCCAGG	YKVKGLCDSNLISMDITFFSE
CTGACGGATGGATGTGCCACG	DGELSSLGKEGTGFRSNYFAY
CGTCAAAATGGGTGACTACCT	ETGGKACKMQYCKHWGVRL
GCGATTTCCGCTGGTACGGAC	PSGVWFEMADKDLFAAARFP
CAAAATACATCACGCACAGC	ECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQ
ATCAGATCATTCACCCCGTCA	DVERILDYSLCQETWSKIRAG
GTGGAACAATGCAAAGAATC	LPISPVDLSYLAPKNPGTGPAF
CATCGAACAGACTAAGCAGG	TIINGTLKYFETRYIRVDIAAPI
GAACCTGGCTGAACCCTGGAT	LSRMVGMISGTTTERELWDD
TTCCGCCGCAGTCGTGTGGGT	WAPYEDVEIGPNGVLRTSSGY
ACGCAACCGTGACCGATGCA	KFPLYMIGHGMLDSDLHLSSK
GAGGCCGTGATCGTGCAAGTC	AQVFEHPHIQDAASQLPDDES

[0203]

[0204]

ACGCCGCATCACGTGCTTGTG GACGAGTACACCGGAGAATG GGTCGATTCCCAGTTCATCAA CGGCAAGTGCTCCAACACTACAT TTGCCCAACCGTGCACAACAG CACTACTTGGCACAGCGACTA CAAAGTGAAGGGTCTGTGTGA TTCCAACCTGATCTCCATGGA TATCACTTTCTTCTCGGAAGA CGGCGAACTGTCCTCACTGGG CAAAGAAGGAACTGGGTTTC GCTCAAATTACTTCGCCTACG AAACTGGAGGAAAAGCCTGC AAGATGCAGTACTGCAAGCA CTGGGGCGTGAGACTACCCA GCGGTGTCTGGTTCGAGATGG CCGATAAGGACCTGTTTGCAG CAGCGAGATTCCCGGAATGCC CTGAGGGATCGAGCATCTCCG CTCCAAGCCAACTTCAGTGG ACGTGAGCCTGATCCAGGAC GTGGAACGGATTCTCGACTAC TCGCTGTGCCAGGAGACCTGG TCGAAGATCAGAGCGGGACT GCCCATCTCACCGGTGGACCT GTCCTACCTGGCGCCAAAGAA TCCGGGCACTGGACCGGCGTT CACCATCATCAACGGCACCT CAAATACTTCGAGACGCGGTA CATCCGGGTGGACATCGCAGC TCCGATCCTCTCCCGGATGGT GGGAATGATCTCGGGGACTAC TACCGAACGCGAGCTCTGGG ACGACTGGGCACCTTACGAG GATGTCGAGATCGGACCTAAC GGAGTGCTCCGGACCTCCTCC GGGTACAAGTTCCCTCTGTAC ATGATCGGCCATGGCATGCTG GACTCGGATCTGCATCTGTCTG TCCAAAGCACAGGTGTTTGAA CACCCACACATTCAAGACGCC GCCAGCCAGCTGCCGGACGA TGAGTCGCTGTTCTTCGGAGA CACGGGCTTGTCAAAGAATCC CATCGAGCTGGTGGAAGGAT GGTTTTCATCCTGGAAAAGCA GCATCGCTTCATTCTTCTTCAT	LFFGDTGLSKNPIELVEGWFS WKSSIASFFFFIIGLIIGLFLVLR VGIHLCIKLKHTKKRQIYTDIE MNRLGK (SEQ ID NO: 78)
--	---

[0205]

CATTGGCCTGATCATCGGCCT ATTTCTAGTCCTGCGGGTGGG AATTCATCTGTGCATCAAGCT CAAGCACACTAAGAAGCGGC AAATCTACACTGATATCGAGA TGAATCGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 77)	
WT VSV-G 信号序列	
核苷酸	氨基酸
ATGAAGTGTCTGCTGTACCTG GCGTTCCTGTTTATCGGGGTG AACTGC (SEQ ID NO: 87)	MKCLLYLAFLFIGVNC (SEQ ID NO: 88)
无信号序列的 WT VSV-G	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCACTATCGTGTTTCCG CACAACCAAAAGGGCAACTG GAAAAACGTGCCTTCAAATTA CCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAATG ACCTCATTGGAACCGCGCTGC AGGTGAAGATGCCAAAGAGC CACAAGGCTATCCAGGCTGAC GGATGGATGTGCCACGCGTCA AAATGGGTGACTACCTGCGAT TTCCGCTGGTACGGACCAAAA TACATCACGCACAGCATCAGA TCATTACCCCGTCAGTGGAA CAATGCAAAGAATCCATCGA ACAGACTAAGCAGGGAACCT GGCTGAACCCTGGATTTCCGC CGCAGTCGTGTGGGTACGCAA CCGTGACCGATGCAGAGGCC GTGATCGTGCAAGTCACGCCG CATCACGTGCTTGTGGACGAG TACACCGGAGAATGGGTCGAT TCCAGTTCATCAACGGCAAG TGCTCCAACACTACATTTGCCA ACCGTGCAACAGCACTACT TGGCACAGCGACTACAAAGT GAAGGGTCTGTGTGATTCCAA CCTGATCTCCATGGATATCAC TTTCTTCTCGGAAGACGGCGA ACTGTCCTCACTGGGCAAAGA AGGAACTGGGTTTCGCTCAA TTACTTCGCCTACGAACTGG AGGAAAAGCCTGCAAGATGC	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSN YHYCPSSSDLNWHNDLIGTAL QVKMPKSHKAIQADGWMCH ASKWVTTCDFRWYGPKYITH SIRSFTPSVEQCKESIEQTKQG TWLNPGFPPQSCGYATVTDAE AVIVQVTPHHVLVDEYTGWE VDSQFINGKCSNYICPTVHNS TTWHSYKVKGLCDNLISM DITFFSEDGELSSLGKEGTGFR SNYFAYETGGKACKMQYCKH WGVRLPSGVWFEMADKDLF AAARFPECPEGSSISAPSQTSV DVS LIQDVERILDYSLCQETW SKIRAGLPISPVDLSYLAPKNP GTGPAFTIINGTLKYFETRYIR VDIAAPILSRMVGMISGTTTER ELWDDWAPYEDVEIGPNGVL RTSSGYKFPLYMIGHGMLDSD LHLSSKAQVFEHPHIQDAASQ LPDDESLFFGDTGLSKNPIELV EGWFSSWKSSIASFFFIIGLIIG LFLVLRVGIHLCKIKLHKKR QIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 90)

[0206]

AGTACTGCAAGCACTGGGGC GTGAGACTACCCAGCGGTGTC TGGTTCGAGATGGCCGATAAG GACCTGTTTGCAGCAGCGAGA TTCCCGGAATGCCCTGAGGGA TCGAGCATCTCCGCTCCAAGC CAAACCTTCAGTGGACGTGAGC CTGATCCAGGACGTGGAACG GATTCTCGACTACTCGCTGTG CCAGGAGACCTGGTCGAAGA TCAGAGCGGGACTGCCCATCT CACCGGTGGACCTGTCCTACC TGGCGCCAAAGAATCCGGGC ACTGGACCGGCGTTCACCATC ATCAACGGCACCCCTCAAATAC TTCGAGACGCGGTACATCCGG GTGGACATCGCAGCTCCGATC CTCTCCCGGATGGTGGGAATG ATCTCGGGGACTACTACCGAA CGCGAGCTCTGGGACGACTG GGCACCTTACGAGGATGTCGA GATCGGACCTAACGGAGTGCT CCGGACCTCCTCCGGGTACAA GTTCCCTCTGTACATGATCGG CCATGGCATGCTGGACTCGGA TCTGCATCTGTCGTCCAAAGC ACAGGTGTTTGAACACCCACA CATTCAAGACGCCGCCAGCCA GCTGCCGGACGATGAGTCGCT GTTCTTCGGAGACACGGGCTT GTCAAAGAATCCCATCGAGCT GGTGGAAGGATGGTTTTTCATC CTGGAAGAGCAGCATCGCTTC ATTCTTCTTCATCATTGGCCTG ATCATCGGCCTATTTCTAGTC CTGCGGGTGGGAATTCATCTG TGCATCAAGCTCAAGCACACT AAGAAGCGGCAAATCTACAC TGATATCGAGATGAATCGCCT GGGCAAG (SEQ ID NO: 89)	
Trop-002 突变 VSV-G	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCACTATCGTGTTTCCG CACAACCAAAAGGGCAACTG GAAAAACGTGCCTTCAAATTA	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSN YHYCPSSDLNWHNDLIGTAL QVKMPQSHKAIQADGWMCH

[0207]

CCATTATTGCCCCAGCAGCTC
GGACCTGAACTGGCACAATG
ACCTCATTGGAACCGCGCTGC
AGGTGAAGATGCCACAGAGC
CACAAGGCTATCCAGGCTGAC
GGATGGATGTGCCACGCGTCA
AAATGGGTGACTACCTGCGAT
TTCCGCTGGTACGGACCAAAA
TACATCACGCACAGCATCAGA
TCATTACCCCGTCAGTGGAA
CAATGCAAAGAATCCATCGA
ACAGACTAAGCAGGGAACCT
GGCTGAACCCTGGATTTCCGC
CGCAGTCGTGTGGGTACGCAA
CCGTGACCGATGCAGAGGCC
GTGATCGTGCAAGTCACGCCG
CATCACGTGCTTGTGGACGAG
TACACCGGAGAATGGGTTCGAT
TCCAGTTCATCAACGGCAAG
TGCTCCAACCTACATTTGCCCA
ACCGTGCAACAGCACTACT
TGGCACAGCGACTACAAAGT
GAAGGGTCTGTGTGATTCCAA
CCTGATCTCCATGGATATCAC
TTTCTTCTCGGAAGACGGCGA
ACTGTCCTCACTGGGCAAAGA
AGGAACTGGGTTTCGCTCAAA
TACTTCGCCTACGAAACTGG
AGGAAAAGCCTGCAAGATGC
AGTACTGCAAGCACTGGGGC
GTGAGACTACCCAGCGGTGTC
TGGTTCGAGATGGCCGATAAG
GACCTGTTTGCAGCAGCGAGA
TTCCCGGAATGCCCTGAGGGA
TCGAGCATCTCCGCTCCAAGC
CAAACCTTCAGTGGACGTGAGC
CTGATCCAGGACGTGGAACG
GATTCTCGACTACTCGCTGTG
CCAGGAGACCTGGTCGAAGA
TCAGAGCGGGACTGCCCATCT
CACCGGTGGACCTGTCCTACC
TGGCGCCAAAGAATCCGGGC
ACTGGACCGGCGTTCAACATC
ATCAACGGCACCCCTCAAATAC
TTCGAGACGCGGTACATCCGG
GTGGACATCGCAGCTCCGATC
CTCTCCCGGATGGTGGGAATG

ASKWVTTCDFRWYGPKYITH
SIRSFTPSVEQCKESIEQTKQG
TWLNPGFPPQSCGYATVTDAE
AVIVQVTPHHVLVDEYTG EW
VDSQFINGKCSNYICPTVHNS
TTWHS DYKVKGLCDSNLISM
DITFFSEDGELSSLGKEGTGFR
SNYFAYETGGKACKMQYCKH
WGVRLPSGVWFEMADKDLF
AAARFPECPEGSSISAPSQTSV
DVSLIQDVERILDYSLCQETW
SKIRAGLPISPVDLSYLAPKNP
GTGPAFTIINGTLKYFETRYIR
VDIAAPILSRMVGMISGTTTE
AELWDDWAPYEDVEIGPNGV
LRTSSGYKFPLYMIGHGMLDS
DLHLSSKAQVFEHPHIQDAAS
QLPDDSLFFGDTGLSKNPIEL
VEGWFSWKSSIASFFFIIGLII
GLFLVLRVGIHLCKLKHHTKK
RQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID
NO: 74)

[0208]

ATCTCGGGGACTACTACCGAA GCCGAGCTCTGGGACGACTG GGCACCTTACGAGGATGTCGA GATCGGACCTAACGGAGTGCT CCGGACCTCCTCCGGGTACAA GTTCCCTCTGTACATGATCGG CCATGGCATGCTGGACTCGGA TCTGCATCTGTCGTCCAAAGC ACAGGTGTTTGAACACCCACA CATTCAAGACGCCGCCAGCCA GCTGCCGGACGATGAGTCGCT GTTCTTCGGAGACACGGGCTT GTCAAAGAATCCCATCGAGCT GGTGGAAGGATGGTTTTTCATC CTGGAAAAGCAGCATCGCTTC ATTCTTCTTCATCATTGGCCTG ATCATCGGCCTATTTCTAGTC CTGCGGGTGGGAATTCATCTG TGCATCAAGCTCAAGCACACT AAGAAGCGGCAAATCTACAC TGATATCGAGATGAATCGCCT GGGCAAG (SEQ ID NO: 73)	
Trop-002 突变 VSV-G	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCACTATCGTGTTTCCG CACAACCAAAAGGGCAACTG GAAAAACGTGCCTTCAAATTA CCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAAATG ACCTCATTGGAACCGCGCTGC AGGTGAAGATGCCACAGAGC CACAAGGCTATCCAGGCTGAC GGATGGATGTGCCACGCGTCA AAATGGGTGACTACCTGCGAT TTCCGCTGGTACGGACCAAAA TACATCACGCACAGCATCAGA TCATTACCCCGTCAGTGGAA CAATGCAAAGAATCCATCGA ACAGACTAAGCAGGGAACCT GGCTGAACCCTGGATTTCCGC CGCAGTCGTGTGGGTACGCAA CCGTGACCGATGCAGAGGCC GTGATCGTGCAAGTCACGCCG CATCACGTGCTTGTGGACGAG TACACCGGAGAATGGGTCGAT TCCCAGTTCATCAACGGCAAG	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSN YHYCPSSSDLNWHNDLIGTAL QVKMPQSHKAIQADGWMCH ASKWVTTCDFRWYGPKYITH SIRSFTPSVEQCKESIEQTKQG TWLNPGFPPQSCGYATVTDAE AVIVQVTPHHVLVDEYTGWE VDSQFINGKCSNYICPTVHNS TTWHSDYKVKGLCDSNLISM DITFFSEDGELSSLGKEGTGFR SNYFAYETGGKACKMQYCKH WGVRLPSGVWFEMADKDLF AAARFPECPEGSSISAPSQTSV DVSLIQDVERILDYSLCQETW SKIRAGLPISPVDLSYLAPKNP GTGPAFTIINGTLKYFETRYIR VDIAAPILSRMVGMISGTTTE AELWDDWAPYEDVEIGPNGV LRTSSGYKFPLYMIGHGMLDS DLHLSSKAQVFEHPHIQDAAS QLPDDESLFFGDTGLSKNPIEL VEGWFSSWKSSIASFFFIIGLII

[0209]

TGCTCCAAC TACATTTGCCCA ACCGTGCACAACAGCACTACT TGGCATAGCGACTACAAAGTG AAGGGTCTGTGTGATTCCAAC CTGATCTCCATGGATATCACT TTCTTCTCGGAAGACGGCGAA CTGTCCTCACTGGGCAAAGAA GGAAGTGGGTTTCGCTCAAAT TACTTCGCCTACGAAACTGGA GGAAAAGCCTGCAAGATGCA GTACTGCAAGCACTGGGGCGT GAGACTACCCAGCGGTGTCTG GTTCGAGATGGCCGATAAGG ACCTGTTTGCAGCAGCGAGAT TCCCGGAATGCCCTGAGGGAT CGAGCATCTCCGCTCCAAGCC AAACTTCAGTGGACGTGAGCC TGATCCAGGACGTGGAACGG ATTCTCGACTACTCGCTGTGC CAGGAGACCTGGTCGAAGAT CAGAGCGGGACTGCCCATCTC ACCGGTGGACCTGTCCTACCT GGCGCCAAAGAATCCGGGCA CTGGACCGGCGTTCAACCATCA TCAACGGCACCCCTCAAATACT TCGAGACGCGGTACATCCGG GTGGACATCGCAGCTCCGATC CTCTCCCGGATGGTGGGAATG ATCTCGGGGACTACTACCGAA GCCGAGCTCTGGGACGACTG GGCACCTTACGAGGATGTCGA GATCGGACCTAACGGAGTGCT CCGGACCTCCTCCGGGTACAA GTTCCCTCTGTACATGATCGG CCATGGCATGCTGGACTCGGA TCTGCATCTGTCGTCCAAAGC ACAGGTGTTTGAACACCCACA CATTCAAGACGCCGCCAGCCA GCTGCCGGACGATGAGTCGCT GTTCTTCGGAGACACGGGCTT GTCAAAGAATCCCATCGAGCT GGTGGAAGGATGGTTTTTCATC CTGGAAAAGCAGCATCGCTTC ATTCTTCTTCATCATTGGCCTG ATCATCGGCCTATTTCTAGTC CTGCGGGTGGGAATTCATCTG TGCATCAAGCTCAAGCACACT	GLFLVLRVGIHLCKIKLKHKK RQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 74)
---	--

[0210]

AAGAAGCGGCAAATCTACAC TGATATCGAGATGAATCGCCT GGGCAAGTAG (SEQ ID NO: 91)	
Trop-051 突变 VSV-G	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCACCTATCGTGTTTCCG CACAACCAAAAGGGCAACTG GAAAAACGTGCCTTCAAATTA CCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAATG ACCTCATTGGAACCGCGCTGC AGGTGAAGATGCCAAAGAGC CACAAGGCTATCCAGGCTGAC GGATGGATGTGCCACGCGTCA AAATGGGTGACTACCTGCGAT TTCCGCTGGTACGGACCAAAA TACATCACGCACAGCATCAGA TCATTACCCCGTCAGTGGAA CAATGCAAAGAATCCATCGA ACAGACTAAGCAGGGAACCT GGCTGAACCCTGGATTTCCGC CGCAGTCGTGTGGGTACGCAA CCGTGACCGATGCAGAGGCC GTGATCGTGCAAGTCACGCCG CATCACGTGCTTGTGGACGAG TACACCGGAGAATGGGTCGAT TCCCAGTTCATCAACGGCAAG TGCTCCAACCTACATTTGCCCA ACCGTGCAACAGCACTACT TGGCACAGCGACTACAAAGT GAAGGGTCTGTGTGATTCCGC CCTGGCCTCCATGGATATCAC TTTCTTCTCGGAAGACGGCGA ACTGTCCTCACTGGGCAAAGA AGGAACTGGGTTTCGCTCAA TACTTCGCCTACGAAACTGG AGGAAAAGCCTGCAAGATGC AGTACTGCAAGCACTGGGGC GTGAGACTACCCAGCGGTGTC TGGTTCGAGATGGCCGATAAG GACCTGTTTGCAGCAGCGAGA TTCCCGGAATGCCCTGAGGGA TCGAGCATCTCCGCTCCAAGC CAAACCTCAGTGGACGTGAGC CTGATCCAGGACGTGGAACG GATTCTCGACTACTCGCTGTG	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSN YHYCPSSDLNWHNDLIGTAL QVKMPKSHKAIQADGWMCH ASKWVTTCDFRWYGPYITH SIRSFTPSVEQCKESIEQTKQG TWLNPGFPPQSCGYATVTDAE AVIVQVTPHHVLVDEYTG EW VDSQFINGKCSNYICPTVHNS TTWHSDYKVKGLCDSALASM DITFFSEDGELSSLGKEGTGFR SNYFAYETGGKACKMQYCKH WGVRLPSGVWFEMADKDLF AAARFPECPEGSSISAPSQTSV DVS LIQDVERILDYSLCQETW SKIRAGLPISPVDLSYLAPKNP GTGPAFTIINGTLKYFETRYIR VDIAAPILSRMVGMISGTTAA RELWDDWAPYEDVEIGPNGV LRTSSGYKFPLYMIGHGMLDS DLHLSSKAQVFEHPHIQDAAS QLPDDES LFFGDTGLSKNPIEL VEGW FSSWKSSIASFFFIIIGLII GLFLVLRVGIHL CIKLKHTKK RQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 93)

[0211]

CCAGGAGACCTGGTCGAAGA TCAGAGCGGGACTGCCCATCT CACCGGTGGACCTGTCCTACC TGCGGCCAAAGAATCCGGGC ACTGGACCGGCGTTCACCATC ATCAACGGCACCCCTCAAATAC TTCGAGACGCGGTACATCCGG GTGGACATCGCAGCTCCGATC CTCTCCCGGATGGTGGGAATG ATCTCGGGGACTACTGCCGCC CGCGAGCTCTGGGACGACTG GGCACCTTACGAGGATGTCGA GATCGGACCTAACGGAGTGCT CCGGACCTCCTCCGGGTACAA GTTCCCTCTGTACATGATCGG CCATGGCATGCTGGACTCGGA TCTGCATCTGTCGTCCAAAGC ACAGGTGTTTGAACACCCACA CATTCAAGACGCCGCCAGCCA GCTGCCGGACGATGAGTCGCT GTTCTTCGGAGACACGGGCTT GTCAAAGAATCCCATCGAGCT GGTGGAAGGATGGTTTTCATC CTGGAAAAGCAGCATCGCTTC ATTCTTCTTCATCATTGGCCTG ATCATCGGCCTATTTCTAGTC CTGCGGGTGGGAATTCATCTG TGCATCAAGCTCAAGCACACT AAGAAGCGGCAAATCTACAC TGATATCGAGATGAATCGCCT GGGCAAGTAG (SEQ ID NO: 92)	
Trop-052 突变 VSV-G	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCACTATCGTGTTTCCG CACAACCAAAAGGGCAACTG GAAAAACGTGCCTTCAAATTA CCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAAATG ACCTCATTGGAACCGCGCTGC AGGTGAAGATGCCAAAGAGC CACAAGGCTATCCAGGCTGAC GGATGGATGTGCCACGCGTCA AAATGGGTGACTACCTGCGAT TTCCGCTGGTACGGACCAAAA TACATCACGCACAGCATCAGA TCATTACCCCGTCAGTGGAA	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSN YHYCPSSDLNWHNDLIGTAL QVKMPKSHKAIQADGWMCH ASKWVTTCDFRWYGPKYITH SIRSFTPSVEQCKESIEQTKQG TWLNPGFPPQSCGYATVTDAE AVIVQVTPHHVLVDEYTGWE VDSQFINGKCSNYICPTVHNS TTWHSDYKVKGLCDNLISM DITFFSEDGELSSLGKEGTGFR SNYFAYETGGKACKMQYCKH WGVRLPSGVWFEMADKDLF AAARFPECPEGSSISAPSQTSV

[0212]

CAATGCAAAGAATCCATCGA
ACAGACTAAGCAGGGAACCT
GGCTGAACCCTGGATTTCCGC
CGCAGTCGTGTGGGTACGCAA
CCGTGACCGATGCAGAGGCC
GTGATCGTGCAAGTCACGCCG
CATCACGTGCTTGTGGACGAG
TACACCGGAGAATGGGTCGAT
TCCAGTTCATCAACGGCAAG
TGCTCCAACCTACATTTGCCCA
ACCGTGACACAACAGCACTACT
TGGCACAGCGACTACAAAGT
GAAGGGTCTGTGTGATTCCAA
CCTGATCTCCATGGATATCAC
TTTCTTCTCGGAAGACGGCGA
ACTGTCCTCACTGGGCAAAGA
AGGAACTGGGTTTCGCTCAAA
TACTTCGCCTACGAAACTGG
AGGAAAAGCCTGCAAGATGC
AGTACTGCAAGCACTGGGGC
GTGAGACTACCCAGCGGTGTC
TGGTTCGAGATGGCCGATAAG
GACCTGTTTGCAGCAGCGAGA
TTCCCGGAATGCCCTGAGGGA
TCGAGCATCTCCGCTCCAAGC
CAAACCTTCAGTGGACGTGAGC
CTGATCCAGGACGTGGAACG
GATTCTCGACTACTCGCTGTG
CCAGGAGACCTGGTCGAAGA
TCAGAGCGGGACTGCCCATCT
CACCGGTGGACCTGTCCTACC
TGGCGCCAAAGAATCCGGGC
ACTGGACCGGCGTTCACCATC
ATCAACGGCACCCCTCAAATAC
TTCGAGACGCGGTACATCCGG
GTGGACATCGCAGCTCCGATC
CTCTCCCGGATGGTGGGAATG
ATCTCGGGGACTACTTGGGCC
CGCGAGCTCTGGGACGACTG
GGCACCTTACGAGGATGTCGA
GATCGGACCTAACGGAGTGCT
CCGGACCTCCTCCGGGTACAA
GTTCCCTCTGTACATGATCGG
CCATGGCATGCTGGACTCGGA
TCTGCATCTGTCTGTCCTCAAAGC
ACAGGTGTTTGAACACCCACA
CATTCAAGACGCCGCCAGCCA

DVSLIQDVERILDYSLCQETW
SKIRAGLPISPVDLSYLAPKNP
GTGPAFTIINGTLKYFETRYIR
VDIAAPILSRMVGMISGTTWA
RELWDDWAPYEDVEIGPNGV
LRTSSGYKFPLYMIGHGMLDS
DLHLSSKAQVFEHPHIQDAAS
QLPDDESLEFFGDTGLSKNPIEL
VEGWFFSSWKSSIASFFFHGLII
GLFLVLRVGIHLCKIKLKHTKK
RQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID
NO: 95)

[0213]

GCTGCCGGACGATGAGTCGCT GTTCTTCGGAGACACGGGCTT GTCAAAGAATCCCATCGAGCT GGTGGAAGGATGGTTTTTCATC CTGGAAAAGCAGCATCGCTTC ATTCTTCTTCATCATTGGCCTG ATCATCGGCCTATTTCTAGTC CTGCGGGTGGGAATTCATCTG TGCATCAAGCTCAAGCACACT AAGAAGCGGCAAATCTACAC TGATATCGAGATGAATCGCCT GGGCAAGTAG (SEQ ID NO: 94)	
Trop-055 突变 VSV-G	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCACTATCGTGTTTCCG CACGCCGCCAAGGGCAACTG GAAAAACGTGCCTTCAAATTA CCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAATG ACCTCATTGGAACCGCGCTGC AGGTGAAGATGCCAAAGAGC CACAAGGCTATCCAGGCTGAC GGATGGATGTGCCACGCGTCA AAATGGGTGACTACCTGCGAT TTCCGCTGGTACGGACCAAAA TACATCACGCACAGCATCAGA TCATTACCCCGTCAGTGGAA CAATGCAAAGAATCCATCGA ACAGACTAAGCAGGGAACCT GGCTGAACCCTGGATTTCCGC CGCAGTCGTGTGGGTACGCAA CCGTGACCGATGCAGAGGCC GTGATCGTGCAAGTCACGCCG CATCACGTGCTTGTGGACGAG TACACCGGAGAATGGGTCGAT TCCAGTTCATCAACGGCAAG TGCTCCAACACTATTTGCCCA ACCGTGCAACAGCACTACT TGGCACAGCGACTACAAAGT GAAGGGTCTGTGTGATTCCGC CCTGATCTCCATGGATATCAC TTTCTTCTCGGAAGACGGCGA ACTGTCCTCACTGGGCAAAGA AGGAACTGGGTTTCGCTCAAA TACTTCGCCTACGAAACTGG AGGAAAAGCCTGCAAGATGC	KFTIVFPHAAKGNWKNVPSN YHYCPSSDLNWHNDLIGTAL QVKMPKSHKAIQADGWMCH ASKWVTTCDFRWYGPKYITH SIRSFTPSVEQCKESIEQTKQG TWLNPGFPPQSCGYATVTDAE AVIVQVTPHHVLVDEYTG EW VDSQFINGKCSNYICPTVHNS TTWHSDYKVKGLCDSALISM DITFFSEDGELSSLGKEGTGFR SNYFAYETGGKACKMQYCKH WGVRLPSGVWFEMADKDLF AAARFPECPEGSSISAPSQTSV DVSLIQDVERILDYSLCQETW SKIRAGLPISPVDLSYLAPKNP GTGPAFTIINGTLKYFETRYIR VDIAAPILSRMVGMISGTTTER ELWDDWAPYEDVEIGPNGVL RTSSGYKFPLYMIGHGMLDSD LHLSSKAQVFEHPHIQDAASQ LPDDESLFFGDTGLSKNPIELV EGWFSSWKSSIASFFFIIIGLIIG LFLVLRVGIHLCKLKHKKR QIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 97)

[0214]

AGTACTGCAAGCACTGGGGC GTGAGACTACCCAGCGGTGTC TGGTTCGAGATGGCCGATAAG GACCTGTTTGCAGCAGCGAGA TTCCCGGAATGCCCTGAGGGA TCGAGCATCTCCGCTCCAAGC CAAACCTTCAGTGGACGTGAGC CTGATCCAGGACGTGGAACG GATTCTCGACTACTCGCTGTG CCAGGAGACCTGGTCGAAGA TCAGAGCGGGACTGCCCATCT CACCGGTGGACCTGTCCTACC TGGCGCCAAAGAATCCGGGC ACTGGACCGGCGTTCACCATC ATCAACGGCACCCCTCAAATAC TTCGAGACGCGGTACATCCGG GTGGACATCGCAGCTCCGATC CTCTCCCGGATGGTGGGAATG ATCTCGGGGACTACTACCGAA CGCGAGCTCTGGGACGACTG GGCACCTTACGAGGATGTCGA GATCGGACCTAACGGAGTGCT CCGGACCTCCTCCGGGTACAA GTTCCCTCTGTACATGATCGG CCATGGCATGCTGGACTCGGA TCTGCATCTGTCGTCCAAAGC ACAGGTGTTTGAACACCCACA CATTCAAGACGCCGCCAGCCA GCTGCCGGACGATGAGTCGCT GTTCTTCGGAGACACGGGCTT GTCAAAGAATCCCATCGAGCT GGTGGAAGGATGGTTTTTCATC CTGGAAAAGCAGCATCGCTTC ATTCTTCTTCATCATTGGCCTG ATCATCGGCCTATTTCTAGTC CTGCGGGTGGGAATTCATCTG TGCATCAAGCTCAAGCACACT AAGAAGCGGCAAATCTACAC TGATATCGAGATGAATCGCCT GGGCAAGTAG (SEQ ID NO: 96)	
Trop-056 突变 VSV-G	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCACTATCGTGTTTCCG CACAACACCACACAAAAGGG CAACTGGAAAAACGTGCCTTC AAATTACCATTATTGCCCCAG	KFTIVFPHNTTQKGNWKNVPS NYHYCPSSDLNWHNDLIGTA LQVKMPKSHKAIQADGWMC HASKWVTTCDFRWYGPKYIT

[0215]

CAGCTCGGACCTGAACTGGCA CAATGACCTCATTGGAACCGC GCTGCAGGTGAAGATGCCAA AGAGCCACAAGGCTATCCAG GCTGACGGATGGATGTGCCAC GCGTCAAAATGGGTGACTACC TGCGATTTCCGCTGGTACGGA CCAAAATACATCACGCACAG CATCAGATCATTACCCCGTC AGTGGAACAATGCAAAGAAT CCATCGAACAGACTAAGCAG GGAACCTGGCTGAACCCTGG ATTTCCGCCGCAGTCGTGTGG GTACGCAACCGTGACCGATGC AGAGGCCGTGATCGTGCAAGT CACGCCGCATCACGTGCTTGT GGACGAGTACACCGGAGAAT GGGTCGATTCCCAGTTCATCA ACGGCAAGTGCTCCAACACTACA TTTGCCCAACCGTGCAACA GCACTACTTGGCACAGCGACT ACAAAGTGAAGGGTCTGTGTG ATTCCAACCTGATCTCCATGG ATATCACTTTCTTCTCGGAAG ACGGCGAACTGTCCTCACTGG GCAAAGAAGGAACTGGGTTT CGCTCAAATTACTTCGCCTAC GAAACTGGAGGAAAAGCCTG CAAGATGCAGTACTGCAAGC ACTGGGGCGTGAGACTACCC AGCGGTGTCTGGTTCGAGATG GCCGATAAGGACCTGTTTGCA GCAGCGAGATTCCCGGAATG CCCTGAGGGATCGAGCATCTC CGCTCCAAGCCAACTTCAGT GGACGTGAGCCTGATCCAGG ACGTGGAACGGATTCTCGACT ACTCGCTGTGCCAGGAGACCT GGTCGAAGATCAGAGCGGGA CTGCCCATCTCACCGGTGGAC CTGTCCTACCTGGCGCCAAAG AATCCGGGCACTGGACCGGC GTTCAACCATCATCAACGGCAC CCTCAAATACTTCGAGACGCG GTACATCCGGGTGGACATCGC AGCTCCGATCCTCTCCCGGAT GGTGGAATGATCTCGGGGA	HSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQ GTWLNPGFPPQSCGYATVTD AEAVIVQVTPHHVLVDEYTGE WVDSQFINGKCSNYICPTVHN STTWHSDYKVKGLCDSNLIS MDITFFSEDGELSSLGKEGTGF RSNYFAYETGGKACKMQYCK HWGVRLPSGVWFEMADKDL FAAARFPECPEGSSISAPSQTS VDVSLIQDVERILDYSLCQET WSKIRAGLPISPVDLSYLAPK NPGTGPAFTIINGTLKYFETRY IRVDIAAPILSRMVGMISGTTT ERELWDDWAPYEDVEIGPNG VLRTSSGYKFPLYMIGHGMLD SDLHLSSKAQVFEHPHIQDAA SQLPDDESLEFFGDTGLSKNPIE LVEGWFSWKSSIASFFFIIGLI IGLFLVLRVGIHLCKLKHKK RQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 99)
---	---

[0216]

CTACTACCGAACGCGAGCTCT GGGACGACTGGGCACCTTAC GAGGATGTCGAGATCGGACCT AACGGAGTGCTCCGGACCTCC TCCGGGTACAAGTTCCTCTG TACATGATCGGCCATGGCATG CTGGACTCGGATCTGCATCTG TCGTCCAAAGCACAGGTGTTT GAACACCCACACATTCAAGA CGCCGCCAGCCAGCTGCCGG ACGATGAGTCGCTGTTCTTCG GAGACACGGGCTTGTCAAAG AATCCCATCGAGCTGGTGGAA GGATGGTTTTTCATCCTGGAAA AGCAGCATCGCTTCATTCTTC TTCATCATTGGCCTGATCATC GGCCTATTTCTAGTCCTGCGG GTGGGAATTCATCTGTGCATC AAGCTCAAGCACACTAAGAA GCGGCAAATCTACACTGATAT CGAGATGAATCGCCTGGGCA AGTAG (SEQ ID NO: 98)	
Trop-058 突变 VSV-G	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCACTATCGTGTTTCCG CACAACCAAAAGGGCAACTG GAAAAACGTGCCTTCAAATTA CCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAAATG ACCTCATTGGAACCGCGCTGC AGGTGAAGATGCCAGGCGGC AGCAAGAGCCACAAGGCTAT CCAGGCTGACGGATGGATGTG CCACGCGTCAAAATGGGTGA CTACCTGCGATTTCCGCTGGT ACGGACCAAAATACATCACG CACAGCATCAGATCATTACC CCGTCAGTGGAACAATGCAA AGAATCCATCGAACAGACTA AGCAGGGAACCTGGCTGAAC CCTGGATTTCGCGCCGAGTCG TGTGGGTACGCAACCGTGACC GATGCAGAGGCCGTGATCGTG CAAGTCACGCCGCATCACGTG CTTGTGGACGAGTACACCGGA GAATGGGTGCGATTCCCAGTTC	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSN YHYCPSSSDLNWHNDLIGTAL QVKMPGGSKSHKAIQADGW MCHASKWVTTCDFRWYGP YITHSIRSFTPSVEQCKESIEQT KQGTWLNPGFPPQSCGYATV TDAEAVIVQVTPHHVLVDEYT GEWVDSQFINGKCSNYICPTV HNSTTWHSYKVKGLCDSNL ISMDITFFSEDGELSSLGKEGT GFRSNYFAYETGGKACKMQY CKHWGVRLPSGVWFEMADK DLFAAARFPECPEGSSISAPSQ TSVDVSLIQDVERILDYSLCQE TWSKIRAGLPISPVDLSYLAPK NPGTGPAFTIINGTLKYFETRY IRVDIAAPILSRMVGMISGTTT ERELWDDWAPYEDVEIGPNG VLRTSSGYKFPLYMIGHGMLD SDLHLSSKAQVFEHPHIQDAA SQLPDDESLEFFGDTGLSKNPIE LVEGWFSWKSSIASFFFIIGLI

[0217]

ATCAACGGCAAGTGCTCCAAC TACATTTGCCCAACCGTGAC AACAGCACTACTTGGCACAGC GACTACAAAGTGAAGGGTCT GTGTGATTCCAACCTGATCTC CATGGATATCACTTTCTTCTC GGAAGACGGCGAACTGTCCT CACTGGGCAAAGAAGGAACT GGGTTTCGCTCAAATTACTTC GCCTACGAAACTGGAGGAAA AGCCTGCAAGATGCAGTACTG CAAGCACTGGGGCGTGAGAC TACCCAGCGGTGTCTGGTTCG AGATGGCCGATAAGGACCTGT TTGCAGCAGCGAGATTCCCGG AATGCCCTGAGGGATCGAGC ATCTCCGCTCCAAGCCAACT TCAGTGGACGTGAGCCTGATC CAGGACGTGGAACGGATTCTC GACTACTCGCTGTGCCAGGAG ACCTGGTCGAAGATCAGAGC GGGACTGCCCATCTCACCGGT GGACCTGTCTTACCTGGCGCC AAAGAATCCGGGCACTGGAC CGGCGTTCACCATCATCAACG GCACCCTCAAATACTTCGAGA CGCGGTACATCCGGGTGGAC ATCGCAGCTCCGATCCTCTCC CGGATGGTGGGAATGATCTCG GGGACTACTACCGAACGCGA GCTCTGGGACGACTGGGCACC TTACGAGGATGTCGAGATCGG ACCTAACGGAGTGCTCCGGAC CTCCTCCGGGTACAAGTTCCC TCTGTACATGATCGGCCATGG CATGCTGGACTCGGATCTGCA TCTGTCGTCCAAAGCACAGGT GTTTGAACACCCACACATTCA AGACGCCGCCAGCCAGCTGC CGGACGATGAGTCGCTGTTCT TCGGAGACACGGGCTTGTCAA AGAATCCCATCGAGCTGGTGG AAGGATGGTTTTTCATCCTGGA AAAGCAGCATCGCTTCATTCT TCTTCATCATTGGCCTGATCA TCGGCCTATTTCTAGTCCTGC GGGTGGGAATTCATCTGTGCA	IGLFLVLRVGIHLCKLKHKK RQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 101)
---	--

[0218]

TCAAGCTCAAGCACACTAAG AAGCGGCAAATCTACACTGAT ATCGAGATGAATCGCCTGGGC AAGTAG (SEQ ID NO: 100)	
Trop-061 突变 VSV-G	
核苷酸	氨基酸
AAGTTCACTATCGTGTTTCC GCACGGCGGAAGCAACGGC GGGAGCCAAAAGGGCAACT GGAAAAACGTGCCTTCAAA TTACCATTATTGCCCCAGCA GCTCGGACCTGAACTGGCAC AATGACCTCATTGGAACCGC GCTGCAGGTGAAGATGCCA AAGAGCCACAAGGCTATCC AGGCTGACGGATGGATGTG CCACGCGTCAAAATGGGTG ACTACCTGCGATTTCCGCTG GTACGGACCAAAATACATC ACGCACAGCATCAGATCATT CACCCCGTCAGTGGAACAAT GCAAAGAATCCATCGAACA GACTAAGCAGGGAACCTGG CTGAACCTTGATTTCCGCC GCAGTCGTGTGGGTACGCA ACCGTGACCGATGCAGAGG CCGTGATCGTGCAAGTCACG CCGCATCACGTGCTTGTGGA CGAGTACACCGGAGAATGG GTCGATTCCCAGTTCATCAA CGGCAAGTGCTCCAACCTACA TTTGCCCAACCGTGCACAAC AGCACTACTTGGCACAGCG ACTACAAAGTGAAGGGTCT GTGTGATTCCAACCTGATCT CCATGGATATCACTTTCTTC TCGGAAGACGGCGAACTGT CCTCACTGGGCAAAGAAGG AACTGGGTTTCGCTCAAATT ACTTCGCCTACGAACTGGA GGAAAAGCCTGCAAGATGC AGTACTGCAAGCACTGGGG CGTGAGACTACCCAGCGGT GTCTGGTTCGAGATGGCCGA TAAGGACCTGTTTGCAGCAG CGAGATTCCCGGAATGCCCT	KFTIVFPHGGSNNGGSQKGNWK NVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLI GTALQVKMPKSHKAIQADGW MCHASKWVTTCDFRWYGPYI THSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQ GTWLNPGFPPQSCGYATVTDAE AVIVQVTPHHVLVDEYTG EWV DSQFINGKCSNYICPTVHNSTT WHSYKVKGLCDNLISMDITF FSEDGELSSLGKEGTGFRSNYF AYETGGKACKMQYCKHWGVR LPSGVWFEMADKDLFAAARFP ECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQD VERILDYSLCQETWSKIRAGLPI SPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIIN GTLKYFETRYIRVDIAAPILSRM VGMISGTTTERELWDDWAPYE DVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYM IGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHP HIQDAASQLPDDESLFFGDTGL SKNPIELVEGWFSWKSSIASFF FIIGLIIGLFLVLRVGIHLCLK HTKKRQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 103)

[0219]

GAGGGATCGAGCATCTCCG
 CTCCAAGCCAACTTCAGTG
 GACGTGAGCCTGATCCAGG
 ACGTGGAACGGATTCTCGAC
 TACTCGCTGTGCCAGGAGAC
 CTGGTCGAAGATCAGAGCG
 GGACTGCCCATCTCACCGGT
 GGACCTGTCCTACCTGGCGC
 CAAAGAATCCGGGCACTGG
 ACCGGCGTTTACCATCATCA
 ACGGCACCCTCAAATACTTC
 GAGACGCGGTACATCCGGG
 TGGACATCGCAGCTCCGATC
 CTCTCCCGGATGGTGGGAAT
 GATCTCGGGGACTACTACCG
 AACGCGAGCTCTGGGACGA
 CTGGGCACCTTACGAGGATG
 TCGAGATCGGACCTAACGG
 AGTGCTCCGGACCTCCTCCG
 GGTACAAGTTCCTCTGTAC
 ATGATCGGCCATGGCATGCT
 GGACTCGGATCTGCATCTGT
 CGTCCAAAGCACAGGTGTTT
 GAACACCCACACATTCAAG
 ACGCCGCCAGCCAGCTGCC
 GGACGATGAGTCGCTGTTCT
 TCGGAGACACGGGCTTGTC
 AAGAATCCCATCGAGCTGGT
 GGAAGGATGGTTTTTCATCCT
 GGAAAAGCAGCATCGCTTC
 ATTCTTCTTCATCATTGGCCT
 GATCATCGGCCTATTTCTAG
 TCCTGCGGGTGGGAATTCAT
 CTGTGCATCAAGCTCAAGCA
 CACTAAGAAGCGGCAAATC
 TAACTGATATCGAGATGAA
 TCGCCTGGGCAAGTAG (SEQ
 ID NO: 102)

[0220] 在其他实施方案中,用于产生根据本公开的LVV的方法可利用五质粒系统。当使用五质粒系统时,LVV产生系统利用来自第三代载体系统的四种质粒(即,转基因质粒、GagPol质粒、Env质粒和VSV-G env质粒)。此外,本文所述的五质粒系统包含编码靶向蛋白的第五质粒(“靶向蛋白质质粒”)。包含在五质粒系统中的GagPol和Env包装质粒可以是如Production of Lentiviral Vectors,Merten等人,Molecular Therapy-Methods& Clinical Development(2016),3,16017中所述的标准包装质粒。转基因质粒包含编码根据本公开的一种或多种CAR转基因的表达盒,并且VSV-G env质粒包含编码如本文所述的突变VSV-G的表达盒。

[0221] 在一些实施方案中,第五质粒包含编码CD80靶向蛋白的表达盒。在一些实施方案中,第五质粒包含编码抗CD3靶向蛋白的表达盒。在一些实施方案中,第五质粒包含编码

CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白的表达盒。可用于第五质粒的CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白的实例提供于表1-3中。

[0222] 在某些实施方案中,本公开提供了一种用于产生根据前述权利要求中任一项所述的淋巴细胞靶向慢病毒载体的方法,该方法包括:用GagPol质粒、Rev质粒、转基因质粒、VSV-G env质粒和淋巴细胞靶向蛋白质质粒转染生产细胞;GagPol质粒包含一种或多种编码慢病毒gag基因和慢病毒pol基因的多核苷酸并且能够在生产细胞内表达慢病毒gag蛋白和慢病毒pol蛋白;Rev质粒包含编码慢病毒rev基因的多核苷酸并且能够在生产细胞内表达慢病毒rev蛋白;转基因质粒包含含有编码CAR的多核苷酸的表达盒;并且VSV-G env质粒包含编码如本文所述的突变VSV-G包膜蛋白的多核苷酸并且能够在生产细胞内表达突变VSV-G包膜蛋白;并且淋巴细胞靶向蛋白质质粒包含编码如本文所述的淋巴细胞靶向蛋白的多核苷酸并且能够在生产细胞内表达淋巴细胞靶向蛋白;在培养基中培养生产细胞;以及从培养基中收获慢病毒载体。

[0223] 在一些实施方案中,用限定比率的转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒、Rev质粒和淋巴细胞靶向质粒转染生产细胞。淋巴细胞靶向质粒相对于VSV-G env质粒的比率可为约0.25-约5(按质量计)。例如,使用本文所述的四包装质粒系统(转基因质粒、GagPol质粒、VSV-G env质粒、Rev质粒)的限定比率,可调节淋巴细胞靶向蛋白质质粒相对于VSV-G env质粒的比率。例如,淋巴细胞靶向质粒相对于VSV-G env质粒的比率可为约0.25:1、0.5:1、1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、2.25:1、2.5:1、2.75:1、3:1、3.25:1、3.5:1、3.75:1、4:1、4.25:1、4.5:1、4.75:1或5:1。

[0224] 在利用五种质粒的组合物LTV制备方法的实施方案中,第五种质粒是靶向蛋白质质粒并且包含编码一种或多种靶向蛋白的表达盒。例如,靶向蛋白质质粒可包含表达盒,该表达盒包含编码CD80靶向蛋白、抗CD3靶向蛋白或CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白两者的多核苷酸。在某些实施方案中,靶向蛋白载体质粒包含表达盒,该表达盒包含根据SEQ ID NO:1的多核苷酸,其编码根据SEQ ID NO:2的CD80靶向蛋白。在其他实施方案中,靶向蛋白质质粒包含表达盒,该表达盒包含根据SEQ ID NO:9的多核苷酸,其编码根据SEQ ID NO:10的抗CD3靶向蛋白。在其他实施方案中,靶向蛋白质质粒包含表达盒,该表达盒包含根据SEQ ID NO:116的多核苷酸,其编码根据SEQ ID NO:117的抗CD3靶向蛋白。在其他实施方案中,靶向蛋白质质粒包含串联表达盒,该串联表达盒包含根据SEQ ID NO:21的多核苷酸,其编码根据SEQ ID NO:22的多肽。可用于本公开的五质粒第三代慢病毒载体系统中的突变VSV-G序列的实例提供于表10中。

[0225] 在四质粒包装系统中,转导细胞的表面上的淋巴细胞靶向蛋白的浓度可与包含靶向蛋白的质粒的浓度相关。例如,如果淋巴细胞靶向蛋白质质粒包含在VSV-G env质粒中,则转导细胞的表面上的淋巴细胞靶向蛋白的浓度可与VSV-G env质粒的浓度相关。在另一个实例中,如果淋巴细胞靶向蛋白质质粒包含在GagPol质粒中,则转导细胞的表面上的淋巴细胞靶向蛋白的浓度可与GagPol质粒的浓度相关。在另一个实例中,如果淋巴细胞靶向蛋白质质粒包含在Rev质粒中,则转导细胞的表面上的淋巴细胞靶向蛋白的浓度可与Rev质粒的浓度相关。在五质粒包装系统中,转导细胞的表面上的淋巴细胞靶向蛋白的浓度可与包含靶向蛋白的质粒的浓度相关。

[0226] 在四质粒包装系统中,转导效率可与包含靶向蛋白的质粒的浓度相关。例如,如果

淋巴细胞靶向蛋白质粒包含在VSV-G env质粒中,则转导效率可与VSV-G env质粒的浓度相关。在另一个实例中,如果淋巴细胞靶向蛋白质粒包含在GagPol质粒中,则转导效率可与GagPol质粒的浓度相关。在另一个实例中,如果淋巴细胞靶向蛋白质粒包含在Rev质粒中,则转导效率可与Rev质粒的浓度相关。在五质粒包装系统中,转导效率可与淋巴细胞靶向蛋白质粒的浓度相关。

[0227] 转染生产细胞后,可从细胞上清液或培养基中收获慢病毒颗粒产物。使LVV回收最大化同时使可能负面影响功效或安全性的组分最小化的LVV下游方法是本领域已知的。典型的方法包括连续的纯化步骤,包括去除细胞及其碎片,然后富集LVV并去除宿主细胞或血清蛋白、核酸和脂质。LVV产物可以在交换到合适的制剂缓冲液中以实现稳定性之前进一步浓缩,然后最终在储存或应用之前进行无菌过滤。最初可对收获的LVV上清液进行澄清步骤以去除大的杂质,诸如聚集体和细胞碎片。在一些实施方案中,澄清步骤包括离心和/或常规流动过滤。在一些实施方案中,澄清步骤包括核酸酶消化步骤。在一些实施方案中,LVV产物经历进一步的纯化步骤,包括例如离子交换色谱法(例如,阴离子交换色谱法)。LVV还可例如通过切向流过滤或超滤/渗滤来浓缩。在一些实施方案中,从培养基中收获LVV包括离心。在一些实施方案中,从培养基中收获细胞LVV包括阴离子交换色谱法。在一些实施方案中,从培养基中收获细胞LVV包括阴离子交换色谱法和切向流过滤。

[0228] 在一些实施方案中,与掺入另一种促融合env蛋白(例如,cocl env、副粘病毒env、截短的VSV-G env)的标准LVV相比,掺入突变的VSV-Genv和一种或多种淋巴细胞靶向蛋白的本文所述慢病毒载体能够产生高滴度LVV产物。如本文所用,病毒滴度是指如通过转导单位(TU)/mL测量的传染性病毒颗粒滴度。在一些实施方案中,本文所述的LVV的滴度为至少 $1e7$ TU/mL、至少 $1e8$ TU/mL、至少 $1e9$ TU/mL、至少 $1e10$ TU/mL、至少 $1e11$ TU/mL或至少 $1e12$ TU/mL,如在浓缩的LVV产品中测量。在一些实施方案中,本文所述LVV的滴度在浓缩的LVV产品中为约 $1e7$ TU/mL至约 $1e12$ TU/mL。

[0229] 工程化淋巴细胞

[0230] 本文所述的LVV可用于修饰靶向淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)以表达由LVV携带的转基因所编码的CAR。在某些实施方案中,工程化淋巴细胞已通过使淋巴细胞与本公开的LVV接触而被根据本公开的LVV转导。在此类实施方案中,工程化淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)表达由LVV携带的转基因所编码的CAR。这些淋巴细胞在本文中也称为“经CAR修饰的淋巴细胞”。在具体实施方案中,工程化T细胞在本文中称为“经CAR修饰的T细胞”。在其他具体实施方案中,工程化NK细胞在本文中称为“经CAR修饰的NK细胞”。在具体实施方案中,工程化T细胞在本文中称为“经CAR修饰的B细胞”。在具体实施方案中,经CAR修饰的T细胞表达由本文所述的LVV携带的转基因所编码的CAR,并且选自天然T细胞(CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD45RO⁻)、中枢记忆T细胞(CD45RA⁻、CD45RO⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺)、效应记忆T细胞(CD45RA⁻、CD45RO⁺、CCR7⁻、CD62L⁻、CD27⁻)、 $\gamma\delta$ T细胞、粘膜相关恒定T(MAIT)细胞、Treg、自然杀伤T细胞和组织驻留T细胞。

[0231] 本文所述的LVV对靶向淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)的转导可以离体或体内进行。

[0232] 在某些实施方案中,淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)可以是来源于人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物的原代细胞或细胞系。如果从哺乳动物获得,则淋巴细胞可从多种

来源获得,包括血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或流体。可以富集或纯化淋巴细胞组合物(例如,T细胞组合物、B细胞组合物或NK细胞组合物)。T细胞系是本领域熟知的,其中一些描述于Sandberg等人,Leukemia 21:230,2000中。在某些实施方案中,T细胞缺乏TCR α 基因、TCR β 基因或两者的内源性表达。此类T细胞可天然缺乏TCR α 和 β 链的内源性表达,或者可经修饰以阻断表达(例如,来自不表达TCR α 和 β 链的转基因小鼠的T细胞或经操纵以抑制TCR α 和 β 链表达的细胞)或敲除TCR α 链、TCR β 链或两种基因。

[0233] 在一些实施方案中,在用编码CAR分子的多核苷酸遗传修饰淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)之前,可以从受试者(例如,全血、外周血单核细胞(PBMC)、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织)获得淋巴细胞来源(例如,T细胞或NK细胞)。可使用本领域已知的方法从取自受试者的样品中富集或分离淋巴细胞、T细胞、B细胞或NK细胞。例如,可使用已知的用于低渗裂解红细胞的方法在取自受试者的全血样品中富集T细胞,或者可使用已知的梯度沉降(例如,Ficoll®减少)技术从取自受试者的样品中分离T细胞。另选地,可使用磁性抗体标记的珠粒从全血中分离T细胞,然后进行柱分离。可根据已知技术收集特定的宿主细胞亚群,并通过已知技术诸如与抗体的亲和结合、流式细胞术和/或免疫磁性选择来进行富集或耗尽。在一些实施方案中,在富集和/或耗尽步骤后,将T细胞与所公开的LVV接触,使得从受试者获得的T细胞被LVV转导并表达由LVV携带的转基因所编码的CAR。在一些实施方案中,在富集和/或耗尽步骤后,将NK细胞与所公开的LVV接触,使得从受试者获得的NK细胞被LVV转导并表达由LVV携带的转基因所编码的CAR。在一些实施方案中,在富集和/或耗尽步骤后,将B细胞与所公开的LVV接触,使得从受试者获得的B细胞被LVV转导并表达由LVV携带的转基因所编码的CAR。

[0234] 通常,静息T细胞诸如静息CD4和CD8淋巴细胞、静息B细胞和静息NK细胞难以被慢病毒载体遗传转导。静息T细胞也称为静止T细胞或天然T细胞,是指不具有有丝分裂活性或未暴露于抗原呈递细胞(诸如巨噬细胞或树突细胞)上呈递的同源抗原的T细胞。静息T细胞的标志物的实例是CD28。另选地,在激活T细胞上表达但不在静息T细胞上表达的标志物包括例如4-1BB、PD-1和HLA-DR。类似地,静息B细胞和静息NK细胞分别指不具有有丝分裂活性或未暴露于同源抗原的B细胞和NK细胞。静息B细胞的标志物的实例包括CD21和CD23,以及不存在CD80、CD86、CD95或CD25。在激活NK细胞上表达的CD137和GITR在静息NK细胞上不存在。因此,为了促进使用慢病毒载体转导T细胞、B细胞或NK细胞,通常在经由慢病毒载体进行遗传修饰之前使用刺激试剂在体外激活T细胞、B细胞或NK细胞。在刺激和转导后,经遗传修饰的细胞通常在体外扩增,随后再引入患者体内。然而,本文所述的LVV能够转导静息T细胞、B细胞和/或静息NK细胞。在某些实施方案中,用根据本说明书的LVV转导T细胞的方法包括使LVV与T细胞群体接触,其中在转导过程中T细胞未被激活并且T细胞未暴露于外源刺激剂。在一些此类实施方案中,转导T细胞的方法包括用包含CD80靶向蛋白、抗CD3靶向蛋白、或CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白两者的LVV转导T细胞,其中在转导过程中T细胞未被激活并且T细胞未暴露于外源刺激剂。外源T细胞刺激剂的实例包括抗CD3抗体或其抗原结合片段(即,并非LVV的一部分的抗CD3抗体或其抗原结合片段)、抗CD28抗体或其抗原结合片段(即,并非LVV的一部分的抗CD28抗体或其抗原结合片段)、抗CD2抗体或其抗原结合片段、IL-2、IL-7、IL-15、PHA或其任何组合。外源刺激剂可以可溶形式与T细胞接触或固定在固体基底诸如珠粒或细胞培养板上。在一些实施方案中,抗CD3抗体或其抗原结合片段、抗CD28

抗体或其抗原结合片段、或者抗CD3抗体和抗CD28抗体或它们的抗原结合片段以可溶形式与T细胞接触或固定在固体基底上。抗CD3抗体的实例包括OKT3、UCHL1和BW264/56。抗CD28抗体的实例是LT2。抗CD28抗体的实例是15E8。在某些实施方案中,用根据本说明书的LVV转导NK细胞的方法包括使LVV与NK细胞群体接触,其中在转导过程中NK细胞未被激活并且NK细胞未暴露于外源刺激剂。外源NK细胞刺激剂的实例包括抗CD2抗体或其抗原结合片段、抗CD335抗体或其抗原结合片段、IL-2、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21或其任何组合。在某些实施方案中,用根据本说明书的LVV转导B细胞的方法包括使LVV与B细胞群体接触,其中在转导过程中B细胞未被激活并且B细胞未暴露于外源刺激剂。外源B细胞刺激剂的实例包括CD154和混合Ig F(ab)₂。

[0235] 在一些实施方案中,与标准LVV相比,具有CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白的慢病毒载体能够有效转导CD4和CD8 T细胞。

[0236] 在一些实施方案中,具有CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白的慢病毒载体能够在没有外源刺激(例如,T细胞刺激剂)的情况下将T细胞激活至与用外源刺激处理的用标准LVV转导的T细胞相当的水平。外源T细胞刺激剂的实例包括抗CD3抗体或其抗原结合片段(即,并非LVV的一部分的抗CD3抗体或其抗原结合片段)、抗CD28抗体或其抗原结合片段(即,并非LVV的一部分的抗CD28抗体或其抗原结合片段)、抗CD2抗体或其抗原结合片段、IL-2、IL-7、IL-15、PHA或其任何组合。

[0237] 在某些实施方案中,与标准LVV相比,用根据本说明书的LVV转导T细胞的方法表现出增强的CD4 T细胞转导。在一些此类实施方案中,增强T细胞混合群体(例如,由CD4和CD8 T细胞组成)中CD4T细胞转导的方法包括用根据本说明书的包含CD80靶向蛋白的LVV转导T细胞混合群体。

[0238] 在某些实施方案中,用根据本说明书的LVV转导T细胞的方法有效地转导CD4和CD8 T细胞。在一些此类实施方案中,其中CD4和CD8 T细胞都被有效转导的转导T细胞的方法包括用包含CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白的LVV转导T细胞。

[0239] 在某些实施方案中,根据本说明书的LVV能够在“应激”条件下转导T细胞,例如在低感染复数(MOI)下或在转导期间不用外源IL-2处理。在一些实施方案中,LVV包含CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白。在一些实施方案中,根据本说明书的LVV能够以非淋巴细胞靶向LVV的约1/5至约1/25的LVV浓度转导T细胞。

[0240] CAR分子在宿主细胞上的表达可通过本领域已知的方法评估,诸如定量PCR或流式细胞术,随后用荧光标记的抗原对CAR结合结构域染色。

[0241] CAR分子在宿主细胞上的表达可根据大量本领域接受的用于测定宿主T细胞活性的方法中的任一种进行功能性表征,所述方法包括确定T细胞结合、激活或诱导,还包括确定抗原特异性的T细胞响应。实例包括确定T细胞增殖、T细胞细胞因子释放、抗原特异性T细胞刺激、CTL活性(例如,通过检测从预加载的靶细胞的⁵¹Cr或铀释放、靶细胞中半胱天冬酶活性的诱导、靶细胞的乳酸脱氢酶胞外释放)、T细胞表型标志物表达的变化和T细胞功能的其他量度。测定宿主NK细胞活性也可使用类似方法测定。用于执行上述和类似测定的方法可见于例如Lefkovits(Immunology Methods Manual:The Comprehensive Sourcebook of Techniques,1998)中。还可参见Current Protocols in Immunology;Weir,Handbook of Experimental Immunology,Blackwell Scientific,Boston,MA(1986);Mishell和Shigii

(编辑)Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green和Reed, Science 281:1309 (1998) 及其中引用的参考文献。细胞因子水平可根据本领域已知的方法测定, 包括例如ELISA、ELISPOT、胞内细胞因子染色、流式细胞术以及其任何组合(例如, 胞内细胞因子染色和流式细胞术)。由抗原特异性激发或刺激免疫响应引起的免疫细胞增殖和克隆扩增可通过分离淋巴细胞诸如外周血细胞样品中的循环淋巴细胞或来自淋巴结的细胞, 用抗原刺激细胞, 并测量细胞因子产生、细胞增殖和/或细胞活力(诸如通过掺入氘化的胸苷或非放射性测定如MTT测定等)来测定。

[0242] 用于治疗的方法和组合物

[0243] 在一个方面, 本公开提供了治疗受试者的疾病的方法, 该方法包括向受试者施用有效量的如本文所述的LVV、如本文所述的经CAR修饰的淋巴细胞(例如, T细胞、B细胞或NK细胞)或它们的药物组合物。在另一方面, 根据本说明书的治疗受试者的疾病的方法包括向受试者施用有效量的如本文所述的LVV、如本文所述的经CAR修饰的淋巴细胞(例如, T细胞、B细胞或NK细胞)或它们的药物组合物与一种或多种另外的治疗剂的组合。

[0244] 可用根据本说明书的经LVV或CAR修饰的淋巴细胞(例如, T细胞、B细胞或NK细胞)治疗的疾病包括癌症。过继性免疫和基因疗法是各种类型癌症(Morgan等人, Science 314:126, 2006; Schmitt等人, Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009; June, J. Clin. Invest. 117:1466, 2007)和传染性疾病(Kitchen等人, PLoS One 4:38208, 2009; Rossi等人, Nat. Biotechnol. 25:1444, 2007; Zhang等人, PLoS Pathog. 6:e1001018, 2010; Luo等人, J. Mol. Med. 89:903, 2011)的有前景的治疗方法。

[0245] 包括实体瘤和白血病在内的各种癌症适于本文所公开的组合物和方法。可使用本文所述的受体、经修饰的宿主细胞和组合物治疗的示例性癌症包括乳腺、前列腺和结肠的腺癌; 所有形式的支气管源性肺癌; 髓样白血病; 黑素瘤; 肝细胞瘤; 成神经细胞瘤; 乳头状瘤; APUD瘤; 迷离瘤; 鳃原瘤; 恶性类癌综合征; 类癌心脏病; 以及癌(例如, Walker癌、基底细胞癌、基底鳞状细胞癌、布-皮瘤、导管癌、Ehrlich肿瘤、Krebs 2、Merkel细胞癌、粘液癌、非小细胞肺癌、燕麦细胞癌、乳头状癌、硬癌、细支气管癌、支气管源性、鳞状细胞癌和移行细胞癌)。可使用本文所述的受体、经修饰的宿主细胞和组合物治疗的其他类型的癌症包括组织细胞病症; 恶性组织细胞增多症; 白血病; 霍奇金病; 免疫增殖性小; 非霍奇金淋巴瘤; 浆细胞瘤; 多发性骨髓瘤; 慢性髓样白血病(CML); 急性髓样白血病(AML); 浆细胞瘤; 网状内皮增生症; 黑素瘤; 成软骨细胞瘤; 软骨瘤; 软骨肉瘤; 纤维瘤; 纤维肉瘤; 巨细胞瘤; 组织细胞瘤; 脂肪瘤; 脂肪肉瘤; 间皮瘤; 粘液瘤; 粘液肉瘤; 骨瘤; 骨肉瘤; 脊索瘤; 颅咽管瘤; 无性细胞瘤; 错构瘤; 间质瘤; 中肾瘤; 肌肉瘤; 成釉细胞瘤; 牙骨质瘤; 牙瘤; 畸胎瘤; 胸腺瘤; 滋养细胞肿瘤。此外, 以下类型的癌症也被视为适于使用本文所述的受体、经修饰的宿主细胞和组合物治疗: 腺瘤; 胆管瘤; 胆脂瘤; 圆柱瘤; 囊腺瘤; 囊腺瘤; 颗粒细胞瘤; 两性母细胞瘤; 肝细胞瘤; 汗腺瘤; 胰岛细胞瘤; 莱迪希细胞瘤; 乳头状瘤; 支持细胞瘤; 卵泡膜细胞肿瘤; 平滑肌瘤; 平滑肌肉瘤; 成肌细胞瘤; 肌瘤; 肌肉瘤; 横纹肌瘤; 横纹肌肉瘤; 室管膜瘤; 神经节瘤; 神经胶质瘤; 成神经管细胞瘤; 脑膜瘤; 神经鞘瘤; 成神经细胞瘤; 神经上皮瘤; 神经纤维瘤; 神经瘤; 副神经节瘤; 非嗜铬性副神经节瘤。可治疗的癌症类型还包括血管角化瘤; 血管淋巴样增生伴嗜酸细胞增多; 血管瘤硬化; 血管瘤病; 血管球瘤; 血管内皮瘤; 血管瘤; 血管外皮细胞瘤; 血管肉瘤; 淋巴管瘤; 淋巴管肌瘤; 淋巴管肉瘤; 松果体瘤; 癌肉瘤; 软骨肉瘤; 叶

状囊肉瘤;纤维肉瘤;血管肉瘤;平滑肌肉瘤;白血病肉瘤;脂肪肉瘤;淋巴管肉瘤;肌肉瘤;粘液肉瘤;卵巢癌;横纹肌肉瘤;肉瘤;赘生物;多发性神经纤维瘤;宫颈不典型增生和腹膜癌。

[0246] 适于使用本文所述的受体、经修饰的宿主细胞和组合物治疗的过度增殖性病症的实例包括B细胞癌(B细胞恶性肿瘤),包括B细胞淋巴瘤(诸如各种形式的霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或中枢神经系统淋巴瘤)、白血病(诸如急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病、慢性髓样白血病的B细胞母细胞转化、急性髓样白血病(AML)、慢性髓样白血病和骨髓瘤(诸如多发性骨髓瘤)。可使用本文所述的受体、经修饰的宿主细胞和组合物治疗的其他B细胞癌症包括小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关(MALT)淋巴组织的结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤/白血病、恶性潜能不确定的B细胞增殖、淋巴瘤样肉芽肿病和移植后淋巴组织增生性病症。

[0247] 包含在本文所公开的组合物中并施用给受试者的经CAR修饰的淋巴细胞可包括经CAR修饰的T细胞,例如CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、自然杀伤T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或MAIT细胞;经CAR修饰的B细胞、或经CAR修饰的NK细胞。在某些实施方案中,治疗受试者的方法包括施用有效量的如本文所述的LVV或根据本公开的经CAR修饰的淋巴细胞(即,表达一种或多种CAR的重组细胞)。在一些实施方案中,将经CAR修饰的T细胞施用给受试者。在一些实施方案中,将经CAR修饰的NK细胞施用给受试者。在一些实施方案中,将经CAR修饰的B细胞施用给受试者。经CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)对于受试者可以是异基因的、同基因的、同种异体的或自体的。

[0248] 包含LVV或CAR工程化淋巴细胞的药物组合物可以医学领域技术人员确定的适于待治疗(或预防)的疾病或病症的方式施用。组合物的适当剂量、合适持续时间和施用频率将由诸如患者的状况、尺寸、体重、体表面积、年龄、性别、疾病的类型和严重程度、待施用的特定疗法、活性成分的特定形式、施用时间和方法以及同时施用的其他药物等因素决定。本公开提供了包含经LVV或CAR修饰的淋巴细胞和药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物。合适的赋形剂包括水、盐水、葡萄糖、甘油等以及它们的组合。其他合适的输注介质可以是任何等渗介质制剂,包括盐水、Normosol R (Abbott)、Plasma-Lyte A (Baxter)、5%葡萄糖水溶液或林格氏乳酸盐。

[0249] 治疗有效量的药物组合物中的工程化淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)的治疗有效量是至少一种细胞(例如,一种经CAR修饰的T细胞),并且更典型地大于 10^2 个细胞,例如高达 10^6 、高达 10^7 、高达 10^8 个细胞、高达 10^9 个细胞、高达 10^{10} 个细胞或高达 10^{11} 个细胞或更多。在某些实施方案中,以约 10^6 至约 10^{10} 个细胞/ m^2 的范围、优选地约 10^7 至约 10^9 个细胞/ m^2 的范围施用细胞。细胞的数量将取决于组合物的最终用途以及其中包含的细胞类型。例如,包含被修饰以含有CAR的T细胞的组合物将包含含有约5%至约95%或更多此类细胞的T细胞群体。在某些实施方案中,包含经CAR修饰的T细胞的组合物包含含有至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的此类细胞的细胞群体。在某些实施方案中,包含经CAR修饰的NK细

胞的组合物包含含有至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的此类细胞的细胞群体。在某些实施方案中,包含经CAR修饰的B细胞的组合物包含含有至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的此类细胞的细胞群体。对于本文提供的用途,淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)的体积通常为一升或更少、500ml或更少、250ml或更少、或100ml或更少。因此,所需细胞的密度通常大于 10^4 个细胞/ml,并且通常大于 10^7 个细胞/ml,通常为 10^8 个细胞/ml或更大。淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)可作为单次输注或在一定时间范围内以多次输注施用。如果存在疾病复发或疾病活性,经CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)的重复输注可以按天、周、月或甚至年分开。临床上相关数量的免疫细胞可分配到累积等于或超过 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 或 10^{11} 个细胞的多次输注中。施用包含如本文所述的重组表达载体的宿主细胞的优选剂量为约 10^7 个细胞/ m^2 、约 5×10^7 个细胞/ m^2 、约 10^8 个细胞/ m^2 、约 5×10^8 个细胞/ m^2 、约 10^9 个细胞/ m^2 、约 5×10^9 个细胞/ m^2 、约 10^{10} 个细胞/ m^2 、约 5×10^{10} 个细胞/ m^2 或约 10^{11} 个细胞/ m^2 。

[0250] 如本文所述的LVV和/或经CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)组合物可静脉内、腹膜内、瘤内、骨髓内(例如,骨内施用)、淋巴结内(结节内)和/或脑脊液内施用给受试者。

[0251] LVV载体和/或经CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)组合物可以与一种或多种另外的治疗剂组合施用给受试者。可与根据本说明书的LVV载体或经CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)组合施用的治疗剂的实例包括放射疗法、过继性细胞免疫疗法剂(例如,重组TCR、增强亲和力TCR、CAR、TCR-CAR、scTCR融合蛋白、树突细胞疫苗)、抗体疗法、免疫检查点分子抑制剂疗法、UV光疗法、电脉冲疗法、高强度聚焦超声疗法、溶瘤病毒疗法或药物疗法,诸如化疗剂、治疗性肽、激素、适体、抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂、抗炎剂、小分子疗法或其任何组合。

[0252] 放射疗法包括外部射束放射疗法(例如,常规外部射束放射疗法、立体定向放射、3维适形放射疗法、调强放射疗法、容积旋转调强放射疗法、粒子疗法、质子疗法和螺旋疗法)、近距离放射疗法、全身放射性同位素疗法、术中放射疗法或其任何组合。

[0253] 可与本文所述的经LVV或CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)组合物结合使用的示例性抗体包括利妥昔单抗、帕妥珠单抗、曲妥单抗、阿仑单抗、替伊莫单抗、本妥昔单抗、西妥昔单抗、贝伐单抗、阿昔单抗、阿达木单抗、阿法西普、巴利昔单抗、贝利木单抗、贝洛托单抗、卡那单抗、培塞利珠单抗、达克珠单抗、地诺单抗、依法珠单抗、戈利木单抗、奥拉妥单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗和托珠单抗。

[0254] 可与本文所述的经LVV或CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)组合物结合使用的免疫检查点分子的示例性抑制剂包括靶向PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、HVEM、腺苷、GAL9、VISTA、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、PVRL2、PD-1、CTLA-4、BTLA、KIR、LAG3、TIM3、A2aR、CD244/2B4、CD160、TIGIT、LAIR-1、PVRIG/CD112R或其任何组合的检查点抑制剂。在某些实施方案中,免疫检查点抑制剂可以是抗体、肽、RNAi剂或小分子。对CTLA-4具有特异性的抗体可以是伊匹单抗或曲美木单抗。对PD-1具有特异性的抗体可以是pidilizumab、纳武单抗或派姆单抗。对PD-L1具有特异性的抗体可以是德瓦鲁单抗、阿替利

珠单抗或阿维鲁单抗。

[0255] 可与本文所述的经LVV或CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)组合物结合使用的示例性化疗剂可包括烷化剂、基于铂的药剂、细胞毒性剂、染色质功能抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制药物、DNA损伤剂、抗代谢物(诸如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和糖修饰类似物)、DNA合成抑制剂、DNA相互作用剂(诸如插入剂)和DNA修复抑制剂。

[0256] 如本文所提及,化疗剂包括抑制有丝分裂或细胞分裂的非特异性细胞毒性剂,以及通过靶向参与肿瘤生长、进展和转移的特异性分子(例如,致癌基因)来阻断癌细胞生长和扩散的分子靶向疗法。与本文所述的表达盒组合物结合使用的示例性非特异性化疗剂可包括烷化剂、基于铂的药剂、细胞毒性剂、染色质功能抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制药物、DNA损伤剂、抗代谢物(诸如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和糖修饰类似物)、DNA合成抑制剂、DNA相互作用剂(诸如插入剂)、低甲基化剂和DNA修复抑制剂。

[0257] 被考虑用于本文设想的联合疗法的化疗剂的实例包括维罗非尼、达拉菲尼、曲美替尼、考比替尼、阿那曲唑(Arimidex®)、比卡鲁胺(Casodex®)、硫酸博来霉素(Blenoxane®)、白消安(Myleran®)、白消安注射液(Busulfex®)、卡培他滨(Xeloda®)、N4-戊氧羰基-5-脱氧-5-氟胞嘧啶核苷、卡铂(Paraplatin®)、卡莫司汀(BiCNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、顺铂(Platinol®)、克拉屈滨(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytosan®或Neosar®)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射液(DepoCyt®)、达卡巴嗪(DTIC-Dome®)、更生霉素(放线菌素D,Cosmegen)、盐酸柔红霉素(Cerubidine®)、柠檬酸柔红霉素脂质体注射液(DaunoXome®)、地塞米松、多西他赛(Taxotere®)、盐酸多柔比星(Adriamycin®、Rubex®)、依托泊苷(Vepesid®)、磷酸氟达拉滨(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®)、氟他胺(Eulexin®)、tezacitibine、吉西他滨(二氟脱氧胞苷)、羟基脲(Hydrea®)、伊达比星(Idamycin®)、异环磷酰胺(Ifex®)、伊立替康(Camptosar®)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR®)、亚叶酸钙、美法仑(Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲氨蝶呤(Folex®)、米托蒽醌(Novantrone®)、吉妥单抗、紫杉醇(Taxol®)、phoenix(Yttrium90/MX-DTPA)、喷司他丁、聚苯丙生20和卡莫司汀植入物(Gliadel®)、fdabra枸橼酸他莫昔芬(Nolvadex®)、替尼泊苷(Vumon®)、6-巯鸟嘌呤、噻替派、替拉扎明(Tirazone®)、注射用盐酸拓扑替康(Hycamptin®)、长春花碱(Velban®)、长春新碱(Oncovin®)、依鲁替尼、维奈托克、克唑替尼、阿来替尼、布格替尼、塞瑞替尼和长春瑞滨(Navelbine®)。

[0258] 用于本文设想的组合疗法的示例性烷化剂包括氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸酯、亚硝基脲和三氮烯:尿嘧啶氮芥(Aminouracil

Mustard®、Chlorethaminacil®、Demethyldopan®、Desmethyldopan®、

Haemanthamine®、Nordopan®、Uracil nitrogenMustard®、Uracillost®、

Uracilmustaza®、Uramustin®、Uramustine®)、氮芥(Mustargen®)、环磷酰胺(

Cytosan®、Neosar®、Clafen®、Endoxan®、Procytox®、Revimmune™)、异环磷酰胺

(Mitoxana®)、美法仑(Alkeran®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、哌泊溴烷(Amedel®、Vercyte®)、

三亚乙基三聚氰胺(Hemel®、Hexalen®、Hexastat®)、三亚乙基硫代磷酰胺、替莫唑胺

(Temodar®)、噻替派(Thioplex®)、白消安(Busilvex®、 Myleran®)、卡莫司汀(BiCNU®)、洛莫司汀(CeeNU®)、链脲霉素(Zanosar®)和达卡巴嗪(DTIC-Dome®)。用于本文设想的组合疗法的另外的示例性烷化剂包括但不限于奥沙利铂(Eloxatin®);替莫唑胺(Temodar®和 Temodal®);更生霉素(也称为放线菌素D, Cosmegen®);美法仑(也称为L-PAM、L-肉溶素和苯丙氨酸氮芥, Alkeran®);六甲蜜胺(也称为六甲基三聚氰胺(HMM), Hexalen®);卡莫司汀(BiCNU®);苯达莫司汀(Treanda®);白消安(Busulfex®和 Myleran®);卡铂(Paraplatin®);洛莫司汀(也称为CCNU, CeeNU®);顺铂(也称为CDDP, Platinol®和Platinol®-AQ);苯丁酸氮芥(Leukeran®);环磷酰胺(Cytosan®和Neosar®);达卡巴嗪(也称为DTIC、DIC和咪唑甲酰胺, DTIC-Dome®);六甲蜜胺(也称为六甲基三聚氰胺(HMM), Hexalen®);异环磷酰胺(Ifex®);泼尼莫司汀;丙卡巴肼(Matulane®);二氯甲基二乙胺(也称为氮芥、盐酸氮芥和二氯甲基二乙胺盐酸盐, Mustargen®);链脲霉素(Zanosar®);噻替派(也称为硫代磷酰胺、TESPA和TSPA, Thioplex®);环磷酰胺(Endoxan®、Cytosan®、 Neosar®、 Procytox®、 Revimmune®);以及盐酸苯达莫司汀(Treanda®)。

[0259] 用于本文设想的组合疗法的示例性铂基药剂包括卡铂、顺铂、奥沙利铂、奈达铂、吡铂、沙铂、菲铂和四硝酸三铂。

[0260] 用于组合疗法的示例性低甲基化剂包括阿扎胞苷和地西他滨。

[0261] 用于本文设想的组合疗法的示例性分子靶向抑制剂包括靶向涉及癌细胞生长和存活的分子的小分子,包括例如受体酪氨酸激酶抑制剂、RAF抑制剂、BCL-2抑制剂、ABL抑制剂、TRK抑制剂、c-KIT抑制剂、c-MET抑制剂、CDK4/6抑制剂、FAK抑制剂、FGFR抑制剂、FLT3抑制剂、IDH1抑制剂、IDH2抑制剂、PDGFRA抑制剂和RET抑制剂。

[0262] 示例性分子靶向疗法包括激素拮抗剂、信号转导抑制剂、基因表达抑制剂(例如,翻译抑制剂)、细胞凋亡诱导剂、血管生成抑制剂(例如,VEGF途径抑制剂)、酪氨酸激酶抑制剂(例如,EGF/EGFR途径抑制剂)、生长因子抑制剂、GTP酶抑制剂、丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂、转录因子抑制剂、与癌症相关的驱动突变抑制剂、B-Raf抑制剂、RAF抑制剂、MEK抑制剂、mTOR抑制剂、腺苷途径抑制剂、EGFR抑制剂、PI3K抑制剂、BCL2抑制剂、VEGFR抑制剂、MET抑制剂、MYC抑制剂、BCR-ABL抑制剂、ABL抑制剂、HER2抑制剂、H-RAS抑制剂、K-RAS抑制剂、PDGFR抑制剂、ALK抑制剂、ROS1抑制剂、BTK抑制剂、TRK抑制剂、c-KIT抑制剂、c-MET抑制剂、CDK4/6抑制剂、FAK抑制剂、FGFR抑制剂、FLT3抑制剂、IDH1抑制剂、IDH2抑制剂、PARP抑制剂、PARP抑制剂、PDGFRA抑制剂和RET抑制剂。

[0263] 示例性血管生成抑制剂包括但不限于A6 (Angstrom Pharmaceuticals)、ABT-510 (Abbott Laboratories)、ABT-627 (阿曲生坦) (Abbott Laboratories/Xinlay)、ABT-869 (Abbott Laboratories)、Actimid (CC4047, 泊马来酰胺) (Celgene Corporation)、AdGVPEDF.11D (GenVec)、ADH-1 (Exherin) (Adherex Technologies)、AEE788 (Novartis)、AG-013736 (阿昔替尼) (Pfizer)、AG3340 (普马司他) (Agouron Pharmaceuticals)、AGX1053 (AngioGenex)、AGX51 (AngioGenex)、ALN-VSP (ALN-VSP 02) (Alnylam Pharmaceuticals)、AMG 386 (Amgen)、AMG706 (Amgen)、阿帕替尼 (YN968D1) (江苏恒瑞医药公司 (Jiangsu Hengrui Medicine))、AP23573 (利达福尼/MK8669) (Ariad Pharmaceuticals)、AQ4N (Novavea)、ARQ 197 (ArQule)、ASA404 (Novartis/Antisoma)、阿替莫德 (Callisto

Pharmaceuticals)、ATN-161 (Attenuon)、AV-412 (Aveo Pharmaceuticals)、AV-951 (Aveo Pharmaceuticals)、安维汀 (贝伐单抗) (Genentech)、AZD2171 (西地尼布/Recentin) (AstraZeneca)、BAY 57-9352 (替拉替尼) (Bayer)、BEZ235 (Novartis)、BIBF1120 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)、BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)、BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb)、BMS-582664 (布立尼布) (Bristol-Myers Squibb)、BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb)、骨化三醇、CCI-779 (默瑞塞尔) (Wyeth)、CDP-791 (ImClone Systems)、Ceflatonin (高三尖杉酯碱/HHT) (ChemGenex Therapeutics)、Celebrex (塞来昔布) (Pfizer)、CEP-7055 (Cephalon/Sanofi)、CHIR-265 (Chiron Corporation)、NGR-TNF、COL-3 (Metastat) (Collagenex Pharmaceuticals)、康普瑞汀 (Oxigene)、CP-751,871 (芬妥木单抗) (Pfizer)、CP-547,632 (Pfizer)、CS-7017 (Daichi Sankyo Pharma)、CT-322 (Angiocept) (Adnexus)、姜黄素、达肝素钠 (Fragmin) (Pfizer)、双硫仑 (Antabuse)、E7820 (Eisai Limited)、E7080 (Eisai Limited)、EMD 121974 (西仑吉肽) (EMD Pharmaceuticals)、ENMD-1198 (EntreMed)、ENMD-2076 (EntreMed)、恩度 (Simcere)、爱必妥 (ImClone/Bristol-Myers Squibb)、EZN-2208 (Enzon Pharmaceuticals)、EZN-2968 (Enzon Pharmaceuticals)、GC1008 (Genzyme)、染料木素、GSK1363089 (福瑞替尼) (GlaxoSmithKline)、GW786034 (帕唑帕尼) (GlaxoSmithKline)、GT-111 (Vascular Biogenics Ltd.)、IMC-1121B (雷莫芦单抗) (ImClone Systems)、IMC-18F1 (ImClone Systems)、IMC-3G3 (ImClone LLC)、INCB007839 (Incyte Corporation)、INGN 241 (Introgen Therapeutics)、Iressa (ZD1839/吉非替尼)、LBH589 (Faridak/Panobinostat) (Novartis)、Lucentis (兰尼单抗) (Genentech/Novartis)、LY317615 (恩扎妥林) (Eli Lilly and Company)、马库根 (哌加他尼) (Pfizer)、MEDI522 (Abrigine) (MedImmune)、MLN518 (坦度替尼) (Millennium)、新伐司他 (AE941/氟草氨) (Aeterna Zentaris)、Nexavar (Bayer/Onyx)、NM-3 (Genzyme Corporation)、诺司卡品 (Cougar Biotechnology)、NPI-2358 (Nereus Pharmaceuticals)、OSI-930 (OSI)、Palomid 529 (Paloma Pharmaceuticals, Inc.)、Panzem 胶囊 (2ME2) (EntreMed)、Panzem NCD (2ME2) (EntreMed)、PF-02341066 (Pfizer)、PF-04554878 (Pfizer)、PI-88 (Progen Industries/Medigen Biotechnology)、PKC412 (Novartis)、Polyphenon E (绿茶提取物) (Polyphenon E International, Inc.)、PPI-2458 (Praecis Pharmaceuticals)、PTC299 (PTC Therapeutics)、PTK787 (瓦他拉尼) (Novartis)、PXD101 (贝利司他) (CuraGen Corporation)、RAD001 (依维莫司) (Novartis)、RAF265 (Novartis)、瑞戈非尼 (BAY73-4506) (Bayer)、雷利度胺 (Celgene)、Retaane (Alcon Research)、SN38 (脂质体) (Neopharm)、SNS-032 (BMS-387032) (Sunesis)、SOM230 (帕西瑞肽) (Novartis)、角鲨胺 (Genaera)、苏拉明、索坦 (Pfizer)、特罗凯 (Genentech)、TB-403 (Thrombogenics)、Tempostat (Collard Biopharmaceuticals)、四硫钼酸盐 (Sigma-Aldrich)、TG100801 (TargeGen)、沙利度胺 (Celgene Corporation)、亭扎肝素钠、TKI258 (Novartis)、TRC093 (Tracon Pharmaceuticals Inc.)、VEGF Trap (阿柏西普) (Regeneron Pharmaceuticals)、VEGF Trap-Eye (Regeneron Pharmaceuticals)、Veglin (VasGene Therapeutics)、硼替佐米 (Millennium)、XL184 (Exelixis)、XL647 (Exelixis)、XL784 (Exelixis)、XL820 (Exelixis)、XL999 (Exelixis)、ZD6474 (AstraZeneca)、伏立诺他 (Merck) 和 ZSTK474。

- [0264] 示例性B-Raf抑制剂包括维莫非尼、达拉菲尼和康奈非尼。
- [0265] 示例性MEK抑制剂包括比美替尼、考比替尼、瑞法替尼、司美替尼和曲美替尼。
- [0266] 示例性BTK抑制剂包括依鲁替尼、Loxo-305、替拉鲁替尼、GDC-0853、阿卡替尼、ONO-4059、司培替尼、BGB-3111、HM71224和M7583。
- [0267] 示例性TRK抑制剂包括恩曲替尼、拉罗替尼、CH7057288、ONO-7579、LOX0-101、来他替尼和LOX0-195。
- [0268] 示例性c-KIT抑制剂包括伊马替尼、苏尼替尼和帕纳替尼。
- [0269] 示例性c-MET抑制剂包括卡马替尼、克唑替尼、替凡替尼、奥那妥组单抗、INCB28060、AMG-458、赛沃替尼和特泊替尼。
- [0270] 示例性CDK4/6抑制剂包括哌柏西利、瑞博西利、阿贝西利和曲拉西利。
- [0271] 示例性FAK抑制剂包括地法替尼、GSK2256098、BI853520和PF-00562271。
- [0272] 示例性FGFR抑制剂包括厄达替尼、佩米替尼、英菲格拉替尼、罗加替尼、AZD4547、BGJ398、FP-1039和ARQ087。
- [0273] 示例性FLT-3抑制剂包括奎扎替尼、克莱拉尼、吉瑞替尼、米哌妥林和来他替尼。
- [0274] 示例性IDH1抑制剂包括艾伏尼布、BAY-1436032和AGI-5198。
- [0275] 示例性IDH2抑制剂包括恩西地平。
- [0276] 示例性PARP抑制剂包括他拉唑帕尼、尼拉帕利、卢卡帕尼、奥拉帕尼、维利帕尼、CEP 9722、E7016、AG014699、MK4827、BMN-673和帕米帕利 (BGB-290)。
- [0277] 示例性PDGFRA抑制剂包括伊马替尼、瑞戈非尼、克莱拉尼和奥拉妥单抗。
- [0278] 示例性pan-RAF抑制剂包括贝伐拉非尼、LXH254、LY3009120、INU-152和HM95573。
- [0279] 示例性RET抑制剂包括乐伐替尼、阿来替尼、凡德他尼、卡博替尼、BLU-667和LOX0-292。
- [0280] 示例性ROS1抑制剂包括塞瑞替尼、劳拉替尼、恩曲替尼、克唑替尼、TPX-0005和DS-6051b。
- [0281] 示例性血管内皮生长因子 (VEGF) 受体抑制剂包括但不限于贝伐单抗(Avastin®)、阿昔替尼(Inlyta®);丙氨酸布立尼布 (BMS-582664, (S) - ((R) - 1 - (4 - (4 - 氟 - 2 - 甲基 - 1H - 吡啶 - 5 - 基氧基) - 5 - 甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪 - 6 - 基氧基) 丙 - 2 - 基) 2 - 氨基丙酸酯);索拉非尼(Nexavar®);帕唑帕尼(Votrient®);苹果酸舒尼替尼(Sutent®);西地尼布 (AZD2171, CAS288383-20-1);Vargatef (BIBF1120, CAS928326-83-4);福瑞替尼 (GSK1363089);替拉替尼 (BAY57-9352, CAS 332012-40-5);阿帕替尼 (YN968D1, CAS 811803-05-1);伊马替尼 (Gleevec®);帕纳替尼 (AP24534, CAS 943319-70-8);替沃扎尼 (AV951, CAS 475108-18-0);瑞戈非尼 (BAY73-4506, CAS 755037-03-7);瓦他拉尼二盐酸盐 (PTK787, CAS212141-51-0);布立尼布 (BMS-540215, CAS 649735-46-6);凡德他尼 (Caprelsa®或AZD6474);二磷酸莫替沙尼 (AMG706, CAS 857876-30-3, N - (2,3 - 二氢 - 3,3 - 二甲基 - 1H - 吡啶 - 6 - 基) - 2 - [(4 - 吡啶基甲基) 氨基] - 3 - 吡啶甲酰胺, 描述于PCT公布号WO 02/066470中);多韦替尼二乳酸 (TKI258, CAS 852433-84-2);利尼伐尼 (ABT869, CAS 796967-16-3);卡博替尼 (XL184, CAS 849217-68-1);来他替尼 (CAS111358-88-4);N - [5 - [[5 - (1,1 - 二甲基乙基) - 2 - 噁唑基] 甲基] 硫代] - 2 - 噻唑基] - 4 - 哌啶甲酰胺 (BMS38703, CAS 345627-80-7);(3R,4R) - 4 - 氨基 - 1 - ((4 -

((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514); N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3 α ,5 β ,6 α)-八氢-2-甲基环戊并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647,CAS 781613-23-8);4-甲基-3-[[1-甲基-6-(3-吡啶基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]-N-[3-(三氟甲基)苯基]-苯甲酰胺(BHG712,CAS 940310-85-0);以及阿柏西普(Eylea®)。

[0282] 示例性EGF途径抑制剂包括但不限于酪氨酸磷酸化抑制剂46、EKB-569、埃罗替尼(Tarceva®)、吉非替尼(Iressa®)、爱必妥、尼妥珠单抗、拉帕替尼(Tykerb®)、西妥昔单抗(抗EGFR mAb)、¹⁸⁸Re标记的尼妥珠单抗(抗EGFR mAb)、以及在WO 97/02266、EP 0 564 409、WO 99/03854、EP 0 520 722、EP 0 566 226、EP 0 787 722、EP 0 837 063、美国专利号5,747, 498、WO 98/10767、WO 97/30034、WO 97/49688、WO 97/38983和WO 96/33980中一般性和具体公开的那些化合物。示例性EGFR抗体包括但不限于西妥昔单抗(Erbix®);帕尼单抗(Vectibix®);马妥珠单抗(EMD-72000);曲妥单抗(Herceptin®);尼妥珠单抗(hR3);扎妥木单抗;TheraCIM h-R3;MDX0447(CAS 339151-96-1);以及ch806(mAb-806,CAS 946414-09-1)。示例性表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂包括但不限于盐酸埃罗替尼(Tarceva®);塞瑞替尼;布格替尼;奥希替尼;埃克替尼;吉非替尼(Iressa®);N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[(3''S'')-四氢-3-呋喃基]氧基]-6-喹唑啉基]-4(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺,Tovok®;凡德他尼(Caprelsa®);拉帕替尼(Tykerb®);(3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514);卡纽替尼二盐酸盐(CI-1033);6-[4-[(4-乙基-1-哌嗪基)甲基]苯基]-N-[(1R)-1-苯乙基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺(AEE788,CAS 497839-62-0);木利替尼(TAK165);培利替尼(EKB569);阿法替尼(BIBW2992);来那替尼(HKI-272);N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吡唑-5-基]氨基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-氨基甲酸(3S)-3-吗啉基甲酯(BMS599626);N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3 α ,5 β ,6 α)-八氢-2-甲基环戊并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647,CAS 781613-23-8);4-[4-[(1R)-1-苯乙基]氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚(PKI166,CAS187724-61-4);罗西替尼。

[0283] 示例性mTOR抑制剂包括但不限于雷帕霉素(Rapamune®)及其类似物和衍生物;SDZ-RAD;替西罗莫司(Torisel®;还称为CCI-779);利达福尼(形式上称为deferolimus,(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧代-11,36-二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.0^{4,9}]己三酮-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环己基二甲基次膦酸盐,也称为AP23573和MK8669,并且描述于PCT公布号WO 03/064383中)、依维莫司(Afinitor®或RAD001);雷帕霉素(AY22989, Sirolimus®);Simapimod(CAS164301-51-3);(5-{2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055);2-氨基-8-[反式-4-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502,CAS1013101-36-4);以及N²-[1,4-二氧代-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酸基甘氨酸基-L- α -天冬氨酸基-L-丝氨酸-,内盐(SF1126,CAS 936487-67-1)。

[0284] 示例性磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂包括但不限于度维利塞、艾德拉尼、4-[2-

(1H-吡啶-4-基)-6-[[4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基]甲基]噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基]吗啉(也称为GDC 0941,并且描述于PCT公布号W0 09/036082和W0 09/055730中);2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-氧代-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氢咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈(也称为BEZ 235或NVP-BEZ 235,并且描述于PCT公布号W0 06/122806中);4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉并嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(亦称为BKM120或NVP-BKM120,并且描述于PCT公布号W02007/084786中);陶扎色替(VX680或MK-0457,CAS 639089-54-6);(5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基]亚甲基]-2,4-噻唑烷二酮(GSK1059615,CAS 958852-01-2);(1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(乙酰氧基)-1-[(二-2-丙烯基氨基)亚甲基]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-八氢-11-羟基-4-(甲氧基甲基)-4a,6a-二甲基-环戊并[5,6]萘并[1,2-c]吡喃-2,7,10(1H)-三酮(PX866,CAS 502632-66-8);以及8-苯基-2-(吗啉-4-基)-色满-4-酮(LY294002,CAS154447-36-6)。

[0285] 示例性蛋白激酶B(PKB)或AKT抑制剂包括但不限于8-[4-(1-氨基环丁基)苯基]-9-苯基-1,2,4-三唑并[3,4-f][1,6]萘啶-3(2H)-酮(MK-2206,CAS1032349-93-1);哌立福辛(KRX0401);4-十二烷基-N-1,3,4-噻二唑-2-基-苯磺酰胺(PHT-427,CAS1191951-57-1);4-[2-(4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-基)-1-乙基-7-[(3S)-3-哌啶基甲氧基]-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-4-基]-2-甲基-3-丁炔-2-醇(GSK690693,CAS 937174-76-0);8-(1-羟乙基)-2-甲氧基-3-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-6H-二苯并[b,d]吡喃-6-酮(palomid 529、P529或SG-00529);曲西立滨(6-氨基-4-甲基-8-(β-D-呋喃核糖基)-4H,8H-吡咯并[4,3,2-de]嘧啶并[4,5-c]哒嗪);(αS)-α-[[[5-(3-甲基-1H-吡啶-5-基)-3-吡啶基]氧基]甲基]-苄乙胺(A674563,CAS 552325-73-2);4-[(4-氯苯基)甲基]-1-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-哌啶胺(CCT128930,CAS 885499-61-6);4-(4-氯苯基)-4-[4-(1H吡啶-4-基)苯基]-哌啶(AT7867,CAS 857531-00-1);以及Archexin(RX-0201,CAS 663232-27-7)。

[0286] 在某些实施方案中,与经LVV或CAR修饰的T细胞组合使用的酪氨酸激酶抑制剂是间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂。示例性ALK抑制剂包括克唑替尼、塞瑞替尼、阿来替尼、布格替尼、dalantercept、恩曲替尼和劳拉替尼。

[0287] 在其中经LVV或CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞或NK细胞)与一种或多种另外的疗法组合施用的某些实施方案中,经LVV、CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞或NK细胞)或一种或多种另外的疗法可以如果作为单一疗法施用则可能被认为是亚治疗的剂量施用。组合疗法包括在另外的疗法之前(例如,在另外的疗法之前1天至30天或更多天)、与另外的疗法同时(在同一天)或在另外的疗法之后(例如,在另外的疗法之后1天至30天或更多天)施用如本文所述的经LVV或CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞或NK细胞)组合物。在某些实施方案中,经LVV或CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞或NK细胞)与一种或多种另外的疗法同时施用。在另外的实施方案中,经LVV或CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞或NK细胞)在施用一种或多种另外的疗法之前或之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天施用。在其他实施方案中,经LVV或CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞或NK细胞)在施用一种或多种另外的疗法之前或之后4周内、3周内、2周内或1周内施用。当一种或多种另外的疗法涉及多个剂量时,经LVV或CAR修饰的淋巴细胞(例如,T细胞或NK细胞)可以在一种或多种另外的疗法的初始剂量之前或之后、在一种或多种另外的疗法的最终剂量之后、或在一种或多种另外的疗法的多个剂量之间施用。

[0288] 可通过本公开的组合物和方法治疗的受试者包括动物,诸如人、灵长类动物、牛、马、绵羊、狗、猫、小鼠、大鼠、兔、豚鼠或猪。受试者可以是男性或女性,并且可以是任何合适的年龄,包括婴儿、少年、青年、成人和老年受试者。

[0289] 实施例

[0290] 实施例1:用于生成具有限定向性的慢病毒载体的方法

[0291] 使用第三代产生系统产生如本文所述的自灭活慢病毒载体 (LVV)。将含有LVV递送所需的基因序列的表达质粒以限定比率与三种包装质粒VSV-G、GagPol和Rev组合,并用于转染HEK293生产细胞。2-3天后从HEK293培养基中收获生产性病毒颗粒。

[0292] 测试所得LVV的向性以确定其是否可使用如本文所述的由三种包装质粒之一表达的非病毒靶向蛋白或通过向转染混合物中添加第五种质粒来重定向。LVV载体包含突变的VSV-G包膜蛋白,其中突变的VSV-G包含破坏突变VSV-G与其天然受体的结合的突变,使得经由非病毒、向性限定的靶向蛋白发生病毒进入。据发现,VSV-G的LDL-受体结合位点中的突变可以消除与其天然受体的结合。携带多种突变(Trop-002 (SEQ ID NO:74)、Trop-051 (SEQ ID NO:93)、Trop-052 (SEQ ID NO:95)、Trop-055 (SEQ ID NO:97)或Trop-061 (SEQ ID NO:103))的VSV-G与CD80 (SEQ ID NO:2)一起在LVV上表达。CD80是T细胞表面受体CD28和CTLA4的天然配体,并且为T细胞而非B细胞提供向性。通过Raji B细胞的转导评估VSV-G与天然受体的结合。VSV-G中的若干种突变阻止Raji B细胞的转导,但Jurkat T细胞的转导仍得以维持(图2A-2B)。

[0293] 在第一种方法中,由VSV-G包装质粒表达来源于CD80 (SEQ ID NO:76)的向性限定靶向蛋白。CD80是至T细胞表面受体CD28和CTLA4的天然配体,并且为T细胞提供向性。将经密码子优化的CD80分子(编码SEQ ID NO:2)克隆到突变的VSV-G (Trop-002, 编码SEQ ID NO:74)的下游,其含有消除LDL受体结合的突变并且用于包装表达绿色荧光蛋白(GFP)的LVV。CD80和VSV-G以相对等同的水平在HEK293生产细胞的表面上表达,表明LVV颗粒具有相当的修饰(图3A)。用这种方法生成的LVV能够转导T细胞,如通过GFP表达所评估(图3B)。

[0294] 在第二种方法中,将向性限定的CD80靶向蛋白(编码SEQ ID NO:2)克隆到Rev包装质粒中,并以较低的摩尔浓度转染到VSV-G env(编码Trop-002 (SEQ ID NO:74))质粒。经修饰的质粒用于包装表达GFP的LVV。对HEK-293生产细胞上VSV-G和CD80表达的评估表明,相对表达水平随包装质粒的摩尔浓度而变化。用这些包装方法生成的LVV能够转导T细胞,如通过GFP表达所评估(图4)。由于Rev质粒的比率较低,在用包含在Rev包装质粒中的CD80靶向蛋白所包装的LVV中观察到CD80表达降低。

[0295] 在第三种方法中,在意在产生LVV (Trop-002 VSV-G env)的HEK293细胞的转染过程中,添加向性限定的CD80靶向蛋白(编码SEQ ID NO:2)作为附加质粒。在LVV制备期间使用的CD80质粒的量与HEK293生产细胞上的表达相关,并且可能代表LVV颗粒的修饰。用这种包装方法生成的LVV能够转导T细胞,如通过GFP表达所评估,并且转导效率与LVV颗粒上的CD80水平相关(图5)。

[0296] 不考虑所选择的方法,高滴度、向性重定向的LVV可以用贴壁或悬浮的HEK293生产细胞生成,并通过离心或阴离子交换色谱法(AEX)然后切向流过滤(TFF)来浓缩(图6A至图6C)。通过AEX/TFF浓缩得到具有高纯度和回收率水平的LVV制剂(图6D)。

[0297] 实施例2:通过CD80 LVV富集的CD4 T细胞

[0298] 向性限定的靶向分子精确地限定用该LVV转导的特定细胞类型。CD80、CD28的配体在T细胞上天然表达。然而,与CD8 T细胞相比,CD4 T细胞在人外周血中表达CD28的频率更高(80%对比50%)。当包装LVV以用CD80靶向蛋白(SEQ ID NO:76)修饰Trop-002 VSV-G包膜来转导人PBMC时,与转导的CD8 T细胞相比,观察到转导的CD4T细胞的组成更高,并且在培养物中维持达一周(图13)。

[0299] 实施例3:使用含有T细胞特异性向性的慢病毒载体离体生成经工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)的肿瘤反应性T细胞的方法

[0300] 与使用普通第三代包装系统的标准慢病毒载体(LVV)相比,如本文提供的经包装以重定向向性的LVV可具有改善的转导效率和特异性。当作为异质混合物的一部分转导特定细胞类型时,可用的病毒颗粒的水平可能增加,因为LVV颗粒不被其他非期望的细胞类型吸收。评价在异种外周血单核细胞(PBMC)混合物中是否可以用CAR分子改善T细胞的转导。使用用于治疗多发性骨髓瘤的代表性抗BCMA CAR(SEQ ID NO:58)或用于治疗非霍奇金淋巴瘤的代表性抗CD19 CAR(SEQ ID NO:42)。GFP报告子用作对照。LVV被包装以用抗CD3靶向蛋白和CD80靶向蛋白修饰包膜,并且将向性重定向到T细胞表面分子CD3、CD28和CTLA4。将CD80靶向蛋白克隆到Trop-002 VSV-G env包装质粒(SEQ ID NO:76)中,并由第五包装质粒表达抗CD3靶向蛋白(编码SEQ ID NO:10)。

[0301] 测试在知情同意后从健康供体白细胞单采获得的PBMC中T细胞转导的效率。使用红细胞裂解来富集PBMC,并用标准LVV或T细胞重定向向性的LVV(抗CD3和CD80)以通常用于CAR T细胞转导的浓度的1/5至1/25的LVV浓度转导匹配的供体。在用荧光标记的BCMA分子染色以特异性检测抗BCMA CAR T细胞后,通过流式细胞术评估抗BCMA CAR的表达。即使在极低的病毒水平下,与标准LVV相比,使用T细胞向性LVV转导的T细胞显示出较高水平的转导(图7)。

[0302] 在相同的研究中,评价是否可以在没有抗体激活T细胞的情况下生成抗BCMA CAR T细胞。在CAR T细胞生成期间使用标准LVV转导通常需要T细胞激活抗体(例如,抗CD28和抗CD3)。证实了标准LVV确实需要使用抗体进行激活以转导正常人原代T细胞(图7)。相比之下,T细胞重定向的LVV(抗CD3和CD80)甚至在不存在先前的T细胞激活(不存在IL-2和外源性激活抗体抗CD3和抗CD28)的情况下也可引起转导(图7)。T细胞激活的结果是当在含有IL-2的培养基中培养时的后续细胞扩增。在标准LVV或T细胞重定向的LVV(抗CD3和CD80)之后,在存在或不存在外源激活的抗CD3和抗CD28抗体的情况下转导的PBMC显示出T细胞重定向的LVV能够独特地扩增T细胞,甚至在不存在抗体激活的情况下也是如此(图8)。在另一个实例中,当使用T细胞重定向的LVV(抗CD3和CD80)时,在没有预先T细胞激活的情况下也实现抗CD19 CAR的转导(图9)。

[0303] T细胞激活和转导效率可由用于生成T细胞重定向的LVV的抗CD3抗体的选择决定。具有VH(SEQ ID NO:113)-VL(SEQ ID NO:115)取向和VL(SEQ ID NO:115)-VH(SEQ ID NO:113)取向的12F6结合结构域的包膜结合的抗CD3结合蛋白的实例被证明能够引起可变量的T细胞转导以及T细胞激活(图10)。

[0304] 实施例4:T细胞靶向慢病毒载体的T细胞特异性

[0305] 被包装以用抗CD3靶向蛋白(SEQ ID NO:10)和CD80靶向蛋白(SEQ ID NO:2)修饰包膜(Trop-002 VSV-G env)的LVV的T细胞特异性通过T细胞系和一组B细胞系(Raji、

Ramos、Jeko-1、NALM-6)的转导来证实。将通过流式细胞术评估的GFP转基因对这些细胞系的转导与标准LVV进行比较。标准LVV和T细胞靶向LVV均有效地转导T细胞系(Jurkat)。标准LVV有效地转导所有B细胞系,证实这些细胞系对LVV转导敏感,但在任何B细胞系中均未检测到T细胞靶向LVV的实质性转导(图14)。

[0306] 实施例5:使用T细胞靶向慢病毒载体生成的肿瘤特异性T细胞

[0307] 使用本文所述的方法,通过用具有Trop-002 VSV-G env和CD80靶向蛋白和抗CD3靶向蛋白的LVV转导来自健康供体的PBMC,从而生成表达抗BCMA CAR (SEQ ID NO:58)的T细胞。将CD80靶向蛋白克隆到Trop-002 VSV-G env包装质粒 (SEQ ID NO:76)中,并由第五包装质粒表达抗CD3靶向蛋白 (编码SEQ ID NO:10)以产生T细胞靶向LVV。在不存在LVV介导的基因转移 (外源性抗CD3和抗CD28)通常所需的有效的任何T细胞刺激的情况下进行T细胞转导。

[0308] 首先,与标准LVV相比,检测由T细胞重定向LVV生成的抗BCMA CAR T细胞的活性。在与BCMA阴性细胞系 (Nalm-6)或BCMA阳性细胞系 (RPMI-8826)共培养后,通过干扰素- γ 和肿瘤坏死因子- α 的胞内细胞因子染色评估抗肿瘤活性。抗BCMA CAR T细胞在与BCMA阳性细胞系培养后表现出增加的T细胞效应细胞因子的表达,这在无论是通过标准LVV还是T细胞重定向LVV生成的BCMA阴性细胞系中均未观察到 (图11)。

[0309] 实施例6:使用T细胞靶向慢病毒载体体内递送遗传物质的T细胞特异性方法

[0310] 用T细胞靶向LVV对T细胞的有效且特异性的转导可允许将遗传物质安全且有效地体内递送至T细胞。使用静脉内输注表达GFP的T细胞靶向LVV的人源化小鼠模型来检测该假设。产生具有Trop-002突变VSV-G并用抗CD3靶向蛋白和CD80靶向蛋白包被的LVV。将CD80靶向蛋白克隆到Trop-002 VSV-G env包装质粒 (SEQ ID NO:76)中,并由第五包装质粒表达抗CD3靶向蛋白 (编码SEQ ID NO:10)以产生T细胞靶向LVV。经由静脉内注射人PBMC使免疫受损的NCG小鼠人源化,并通过每天腹膜内施用重组IL-2并持续4天进行支持。施用PBMC后一天,将T细胞靶向慢病毒载体静脉内施用于小鼠。在第7天收集外周血和脾细胞,并通过流式细胞术评估T细胞特异性。仅在人T细胞 (CD3+)而非人B细胞 (CD20+)中检测到GFP阳性细胞,证实了LVV转导的T细胞特异性 (图12A)。在CD8+和CD8- (CD4) T细胞中均检测到GFP,表明T细胞特异性LVV在体内转导CD4和CD8 T细胞两者 (图12B)。

[0311] 通过最小化转导肿瘤细胞的风险,特异性T细胞转导相对于其他体内CAR递送方法具有关键的安全性优势。使用来自具有可检测的CD19肿瘤细胞的慢性淋巴细胞性白血病患者的PBMC评价在没有肿瘤细胞转导的情况下的T细胞转导。用T细胞靶向LVV转导PBMC,并使用流式细胞术评估转导的细胞。

[0312] 上述各种实施方案可以组合以提供另外的实施方案。在本说明书中提及的和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公布、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公布,包括但不限于在2021年2月26日提交的美国临时专利申请号63/154,639,全文以引用方式并入本文。如果需要,则可以修改实施方案的各方面以采用各个专利、申请和出版物的概念来提供另外的实施方案。

[0313] 根据上面的详细描述,可以对实施方案进行这些和其他改变。一般来讲,在下面的权利要求中,所使用的术语不应被解释为将权利要求限制为在说明书和权利要求中公开的具体实施方案,而应被解释为包括所有可能的实施方案以及授予这些权利要求的等同物的

全部范围。因此,权利要求不受本公开的限制。

序列表

<110> 维拉逻辑治疗公司(ViraLogic Therapeutics, Inc.)

<120> 淋巴细胞靶向慢病毒载体

<130> 930207.401W0

<150> 63/154639

<151> 2021-02-26

<160> 123

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 819

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80靶向全分子

<400> 1

```
atgggtcata cacgccgcca aggaacctca ccatctaagt gcccatatct gaatttcttt 60
caacttctcg tgctggcggg gctcagtcac ttctgcagtg gggtcattca cgttactaaa 120
gagggtcaagg aggtcgcaac attgagttgt ggccataacg tatcagttga agaactcgcg 180
cagacacgga ttactggca aaaggaaaag aagatggtgt tgacaatgat gagcggtgac 240
atgaacattt ggccagagta caaaaatcga acgatattcg atataaccaa taacttgtcc 300
atagtaatac ttgccttgcg accttctgac gagggaacgt atgaatgtgt agtgcttaag 360
tatgaaaaag atgcctttaa gcgggaacac ttggctgagg ttacactctc cgtaagggcg 420
gactttccta cgccgtctat atccgacttc gagataccca cttctaacat tcgacgcac 480
atttgctcaa cctcaggtgg tttcccagag cctcacttga gctggctgga gaatggcgaa 540
gaacttaacg caatcaatac cacggtgtcc caagaccggg agacagagct gtacgccgtg 600
tcatccaaac tggattttaa catgacgaca aatcatagtt tcatgtgtct gatcaaatat 660
gggcatctca ggggtgaatca gacttttaat tggaacacta ccaaacaaga gcacttccca 720
gataatctgt tgccaagctg ggcgataact cttatctccg tcaacggtat cttcgtaatt 780
tgctgcctca cctattgttt cgcgctcga tgccgagaa 819
```

<210> 2

<211> 273

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80靶向全分子

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (35)

<223> 信号肽

<400> 2

Met	Gly	His	Thr	Arg	Arg	Gln	Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Lys	Cys	Pro	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Asn	Phe	Phe	Gln	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	His	Phe	Cys
			20					25					30		
Ser	Gly	Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu
		35					40					45			
Ser	Cys	Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile
	50					55					60				
Tyr	Trp	Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp
65					70				75						80
Met	Asn	Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr
				85					90					95	
Asn	Asn	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly
			100					105					110		
Thr	Tyr	Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg
		115					120					125			
Glu	His	Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr
		130				135					140				
Pro	Ser	Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile
145					150				155						160
Ile	Cys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu
				165					170					175	
Glu	Asn	Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp
			180					185				190			
Pro	Glu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met
		195					200					205			
Thr	Thr	Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg
		210				215					220				
Val	Asn	Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro
225					230					235					240
Asp	Asn	Leu	Leu	Pro	Ser	Trp	Ala	Ile	Thr	Leu	Ile	Ser	Val	Asn	Gly
				245					250					255	
Ile	Phe	Val	Ile	Cys	Cys	Leu	Thr	Tyr	Cys	Phe	Ala	Pro	Arg	Cys	Arg
			260					265					270		

Glu

<210> 3

<211> 105

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80信号肽

<400> 3

atgggtcata cacgccgcca aggaacctca ccatactagt gcccatatct gaatttcttt 60
caacttctcg tgctggcggg gctcagtcac ttctgcagtg gggtc 105

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80信号肽

<400> 4

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
1 5 10 15
Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
 20 25 30
Ser Gly Val
 35

<210> 5

<211> 633

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80胞外结构域(ECD)

<400> 5

attcacgtta ctaaagaggt caaggaggtc gcaacattga gttgtggcca taacgtatca 60
gttgaagaac tcgcgcagac acggatttac tggcaaaagg aaaagaagat ggtgttgaca 120
atgatgagcg gtgacatgaa catttggcca gactacaaaa atcgaacgat attcgatata 180
accaataact tgtccatagt aatacttgcc ttgcgacctt ctgacgaggg aacgtatgaa 240
tgtgtagtgc ttaagtatga aaaagatgcc tttaagcggg aacacttggc tgagggtaca 300
ctctccgtta aggcggactt tcctacgccg tctatatccg acttcgagat acccacttct 360
aacattcgac gcatcatttg ctcaacctca ggtggtttcc cagagcctca cttgagctgg 420
ctggagaatg gcgaagaact taacgcaatc aataccacgg tgtcccaaga cccggagaca 480
gagctgtacg ccgtgtcatc caaactggat tttaacatga cgacaaatca tagtttcatg 540
tgtctgatca aatatgggca tctcagggtg aatcagactt ttaattggaa cactaccaaa 600
caagagcact tcccagataa tctgttgcca agc 633

<210> 6

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80胞外结构域(ECD)

<400> 6

Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys Gly

1 5 10 15

His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp Gln

20 25 30

Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn Ile

35 40 45

Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn Leu

50 55 60

Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Glu

65 70 75 80

Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His Leu

85 90 95

Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser Ile

100 105 110

Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys Ser

115 120 125

Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn Gly

130 135 140

Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu Thr

145 150 155 160

Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr Asn

165 170 175

His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn Gln

180 185 190

Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn Leu

195 200 205

Leu Pro Ser

210

<210> 7

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80跨膜和胞内结构域

<400> 7

tgggcgataa ctcttatctc cgtcaacggg atcttcgtaa ttgctgcct cacctattgt 60
ttcgcgcctc gatgccgaga a 81

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80跨膜和胞内结构域

<400> 8

Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly Ile Phe Val Ile Cys Cys
1 5 10 15
Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg Glu
20 25

<210> 9

<211> 1011

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (UCTH1)全分子

<400> 9

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccggacatcc agatgacca gaccacctcc tccctgtctg cctctctggg agacagagtc 120
accatcagtt gcagggaag tcaggacatt agaaattatt taaactggta tcaacagaaa 180
ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac tacacatcaa gattacactc aggagtccca 240
tcaaagttca gtggcagtgg gtctggaaca gattattctc tcaccattag caacctggag 300
caagaggata ttgccactta cttttgccaa cagggttaata cgcttccgtg gacgttcgct 360
ggaggcacca agctggaaat caaacgggct ggaggcggtg gtggcggtgg atcaggtgga 420
ggcagcgggtg gcggtctga ggtgcagctc cagcagctctg gacctgagct ggtgaagcct 480
ggagcttcaa tgaagatata ctgcaaggct tctggttact cattcactgg ctacaccatg 540
aactgggtga agcagagtca tggaaagaac cttgagtggg tgggacttat taatccttac 600
aaaggtgtta gtacctacaa ccagaagttc aaggacaagg ccacattaac tgtagacaag 660
tcatccagca cagcctacat ggaactcctc agtctgacat ctgaggactc tgcagtctat 720
tactgtgcaa gatcggggta ctacggtgat agtgactggt acttcgatgt ctggggcgca 780
gggaccacgg tcaccgtctc ctcaaccact acaccagcac ctagaccacc aacacctgcg 840
ccaaccatcg catcgcagcc actgtctctg cgcccagagg catgccggcc agcagctggg 900
ggcgcagtg acacaagggg gctggacttc gcatgtgata tctacatctg ggcaccattg 960
gcagggactt gtggggctct tctcctgtca ctggttatca ccctttactg c 1011

<210> 10

<211> 337

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (UCTH1)全分子

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (21)

<223> 信号肽

<400> 10

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

Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp
 245 250 255
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 275 280 285
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 305 310 315 320
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335

Cys

<210> 11

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a信号肽

<400> 11

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
 ccg 63

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a信号肽

<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
 20

<210> 13

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (UCTH1)轻链可变区

<400> 13

gacatccaga tgaccagac cacctcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gggcaagtca ggacattaga aattatttaa actggtatca acagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
aagttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
gaggatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtggac gttcgctgga 300
ggcaccaagc tggaatatca acgggct 327

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (UCTH1)轻链可变区

<400> 14

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

<210> 15

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> G3S接头

<400> 15

ggaggcggtg gtggcggtg atcaggtgga ggcagcggtg gcggatct 48

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> G3S接头

<400> 16

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 17

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (UCTH1) 重链可变区

<400> 17

gaggtgcagc tccagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcatcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagt 120
 catggaaaga accttgagt gatgggactt attaatcctt acaaaggtgt tagtacctac 180
 aaccagaagt tcaaggacaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240
 atggaactcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatcgggg 300
 tactacgggtg atagtgactg gtacttcgat gtctggggcg cagggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 18

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (UCTH1) 重链可变区

<400> 18

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19

<211> 207

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a铰链和跨膜

<400> 19

accactacac cagcacctag accaccaaca cctgcgcca ccatcgcatc gcagccactg 60
 tctctgcgcc cagaggcatg ccggccagca gctgggggcg cagtgcacac aagggggctg 120
 gacttcgcat gtgatatcta catctgggca ccattggcag ggacttgtgg ggtccttctc 180
 ctgtcactgg ttatcacctt ttactgc 207

<210> 20

<211> 69

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a铰链和跨膜

<400> 20

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 35 40 45
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 50 55 60
 Ile Thr Leu Tyr Cys

65

<210> 21

<211> 1896

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 共表达CD80和抗CD3 T细胞靶向分子

<400> 21

```

atgggtcata cacgccgcca aggaacctca ccatctaagt gcccatatct gaatttcttt 60
caacttctcg tgctggcggg gctcagtcac ttctgcagtg gggtcattca cgttactaaa 120
gaggtcaagg aggtcgcaac attgagttgt ggccataacg tatcagttga agaactcgcg 180
cagacacgga ttactggca aaaggaaaag aagatgggtg tgacaatgat gagcgggtgac 240
atgaacattt ggccagagta caaaaatcga acgatattcg atataaccaa taacttgtcc 300
atagtaatac ttgccttgcg accttctgac gagggaaact atgaatgtgt agtgcttaag 360
tatgaaaaag atgcctttaa gcgggaacac ttggctgagg ttacactctc cgtaaggcg 420
gactttccta cgccgtctat atccgacttc gagataccca cttctaacat tcgacgcatc 480
atgtgtctca cctcaggtgg tttcccagag ctcacttga gctggctgga gaatggcgaa 540
gaacttaacg caatcaatac cacggtgtcc caagaccgg agacagagct gtacgccgtg 600
tcattccaaac tggattttaa catgacgaca aatcatagtt tcatgtgtct gatcaaatat 660
gggcatctca gggatgaatca gacttttaat tggaacacta ccaaacaaga gcaattccca 720
gataatctgt tgccaagctg ggcgataact cttatctccg tcaacggtat cttcgtaatt 780
tgctgcctca cctattgttt cgcgcctcga tgccgagaag gcagcggcgc caccaacttc 840
tcctgtctga agcaggccgg cgacgtggaa gaaaaccctg gccccatggc cttaccagt 900
accgccttgc tcctgccgtt ggccctgtct ctccacgccg ccaggccgga catccagatg 960
accagacca cctcctccct gtctgcctct ctgggagaca gagtcacat cagttgcagg 1020
gcaagtcagg acattagaaa ttatttaaac tggtatcaac agaaaccaga tggaactgtt 1080
aaactcctga tctactacac atcaagatta cactcaggag tcccatcaaa gttcagtggc 1140
agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc attagcaacc tggagcaaga ggatattgcc 1200
acttactttt gccaacaggg taatacgctt ccgtggacgt tcgctggagg caccaagctg 1260
gaaatcaaac gggctggagg cggtagtggc ggtggatcag gtggaggcag cggtggcgga 1320
tctgaggtgc agctccagca gtctggacct gagctggtga agcctggagc ttcaatgaag 1380
atatcctgca aggttcttg ttactcattc actggctaca ccatgaactg ggtgaagcag 1440
agtcatggaa agaaccttga gtggatggga cttattaatc cttacaaagg tgtagtacc 1500
tacaaccaga agttcaagga caaggccaca ttaactgtag acaagtcac cagcacagcc 1560
tacatggaa tcctcagtt gacatctgag gactctgcag tctattactg tgcaagatcg 1620
gggtactacg gtgatatga ctggtacttc gatgtctggg gcgcaggac cacggtcacc 1680
gtctcctcaa ccaactacac agcacctaga ccaccaacac ctgcgccaac catcgcatcg 1740
cagccactgt ctctgcgccc agaggcatgc cggccagcag ctggggggcg agtgacacaca 1800
agggggctgg acttcgcatg tgatatctac atctgggcac cattggcagg gacttgtggg 1860
gtccttctcc tgctactggt tatcaccctt tactgc 1896

```

<210> 22

<211> 632

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 共表达CD80和抗CD3 T细胞靶向分子

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (35)

<223> 信号肽

<400> 22

```

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

```

260	265	270
Glu Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe	Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp	
275	280	285
Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met	Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu	
290	295	300
Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His	Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met	
305	310	315
Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser	Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr	
325	330	335
Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp	Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr	
340	345	350
Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val	Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser	
355	360	365
Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser	Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
370	375	380
Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser	Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala	
385	390	395
Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn	Thr Leu Pro Trp Thr Phe Ala Gly	
405	410	415
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
420	425	430
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser	
435	440	445
Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly	Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys	
450	455	460
Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly	Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln	
465	470	475
Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp	Met Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys	
485	490	495
Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys	Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr	
500	505	510
Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala	Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr	
515	520	525
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr	Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly	
530	535	540
Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val	Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr	
545	550	555
Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala	Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro	
565	570	575

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
 580 585 590
 Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 595 600 605
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 610 615 620
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 625 630

<210> 23

<211> 105

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80信号肽

<400> 23

atgggtcata cacgccgcca aggaacctca ccatctaagt gcccatatct gaatttcttt 60
 caacttctcg tgctggcggg gctcagtcatt ttctgcagtg gggtc 105

<210> 24

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80信号肽

<400> 24

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
 1 5 10 15
 Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
 20 25 30

Ser Gly Val

35

<210> 25

<211> 633

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80胞外结构域(ECD)

<400> 25

attcacgtta ctaaagaggt caaggaggtc gcaacattga gttgtggcca taacgtatca 60
 gttgaagaac tcgcgcagac acggaattac tggcaaaagg aaaagaagat ggtgttgaca 120

atgatgagcgtgtgacatgaa catttggcca gactacaaaa atcgaacgat attcgatata 180
 accaataact tgtccatagt aatacttgcc ttgcgacctt ctgacgaggg aacgtatgaa 240
 tgtgtagtgc ttaagtatga aaaagatgcc ttttaagcggg aacacttggc tgaggttaca 300
 ctctccgtta aggcggactt tcctacgccg tctatatccg acttcgagat acccacttct 360
 aacattcgac gcatcatttg ctcaacctca ggtgggtttcc cagagcctca cttgagctgg 420
 ctggagaatg gcgaagaact taacgcaatc aataccacgg tgtcccaaga cccggagaca 480
 gagctgtacg ccgtgtcatc caaactggat ttttaacatga cgacaaatca tagtttcatg 540
 tgtctgatca aatatgggca tctcagggtg aatcagactt ttaattggaa cactaccaa 600
 caagagcact tcccagataa tctgttgcca agc 633

<210> 26

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD80胞外结构域(ECD)

<400> 26

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

180	185	190
Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr	Lys Gln Glu His Phe Pro	Asp Asn Leu
195	200	205
Leu Pro Ser		
210		
<210> 27		
<211> 81		
<212> DNA		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> CD80跨膜和胞内结构域		
<400> 27		
tgggcgataa ctcttatctc cgtcaacggt atcttcgtaa tttgctgcct cacctattgt	60	
ttcgcgccctc gatgccgaga a	81	
<210> 28		
<211> 27		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> CD80跨膜和胞内结构域		
<400> 28		
Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly Ile Phe Val Ile Cys Cys		
1	5	10
15		
Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg Glu		
20	25	
<210> 29		
<211> 66		
<212> DNA		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> P2A自切割肽		
<400> 29		
ggcagcggcg ccaccaactt ctccctgctg aagcaggccg gcgacgtgga agaaaaccct	60	
ggcccc	66	
<210> 30		
<211> 22		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		

<223> P2A自切割肽

<400> 30

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 31

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a信号肽

<400> 31

atggccttac cagtgaccgc cttgtcctg ccgctggcct tgctgtcca cgccgccagg 60

ccg 63

<210> 32

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a信号肽

<400> 32

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

20

<210> 33

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3轻链可变区

<400> 33

gacatccaga tgacccagac cacctcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gggcaagtca ggacattaga aattatttaa actggtatca acagaaacca 120

gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180

aagttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240

gaggatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtggac gttcgctgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa acgggct 327

<210> 34

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3轻链可变区

<400> 34

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

<210> 35

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> G3S接头

<400> 35

```
ggaggcggta gtggcggtag atcaggtgga ggcagcggtag gcggatct 48
```

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> G3S接头

<400> 36

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1           5           10           15
```

<210> 37

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3重链可变区

<400> 37

```
gaggtgcagc tccagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
tcctgcaagg cttctgggta ctcattcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagt 120
catggaaaga accttgagtg gatgggactt attaatcett acaaaggtgt tagtacctac 180
aaccagaagt tcaaggacaa ggccacatta actgtagaca agtcattccag cacagcctac 240
atggaactcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatcgggg 300
tactacgggtg atagtgactg gtacttcgat gtctggggcg cagggaccac ggtcaccgtc 360
tcctca 366
```

<210> 38

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3重链可变区

<400> 38

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

<210> 39

<211> 207

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a铰链和跨膜

<400> 39

```
accactacac cagcacctag accaccaaca cctgcgccaa ccatcgcatc gcagccactg 60
tctctgcgcc cagaggcatg ccggccagca gctgggggcg cagtgcacac aagggggctg 120
gacttcgcat gtgatatcta catctgggca ccattggcag ggacttgtgg ggtccttctc 180
ctgtcactgg ttatcaccct ttactgc 207
```

<210> 40

<211> 69

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a铰链和跨膜

<400> 40

```
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1          5          10          15
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
          20          25          30
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
          35          40          45
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
          50          55          60
Ile Thr Leu Tyr Cys
65
```

<210> 41

<211> 1458

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD19 CAR分子

<400> 41

```
atggccttac cagtgaccgc cttgtctctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccggacatcc agatgacaca gactacatcc tcctgtctg cctctctggg agacagagtc 120
accatcagtt gcagggaag tcaggacatt agtaaattatt taaattggta tcagcagaaa 180
ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac catacatcaa gattacactc aggagtccca 240
tcaaggttca gtggcagtgg gtctggaaca gattattctc tcaccattag caacctggag 300
caagaagata ttgccactta cttttgccaa cagggttaata cgcttccgta cacgttcgga 360
ggggggacca agctggagat cacaggtgga ggtggatcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
```

ggcgatctg aggtgaaact gcaggagtca ggacctggcc tgggtggcgcc ctcacagagc 480
 ctgtccgtca catgcaactgt ctcaggggtc tcattaccgc actatggtgt aagctggatt 540
 cgccagcctc cacgaaaggg tctggagtgg ctgggagtaa tatggggtag tgaaccaca 600
 tactataatt cagctctcaa atccagactg accatcatca aggacaactc caagagccaa 660
 gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccatttacta ctgtgccaaa 720
 cattattact acggtggtag ctatgctatg gactactggg gccaaagAAC ctcaGtCacc 780
 gtctcctcaa ccactacacc agcacctaga ccaccaacac ctgcgccaac catcgcatcg 840
 cagccactgt ctctgcgccc agaggcatgc cggccagcag ctggggggcgc agtgcacaca 900
 agggggctgg acttcgcatg tgatatctac atctgggcac cattggcagg gacttgtggg 960
 gtccttctcc tgtcaactgt tatcaccctt tactgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg 1020
 tatatatcca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt 1080
 agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg 1140
 agcgcagacg ccccccgcga caagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200
 ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggacc tgaatgggg 1260
 ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggctgtaca atgaactgca gaaagataag 1320
 atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcagc gccggagggg caaggggcac 1380
 gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg 1440
 caggccctgc cccctcgc 1458

<210> 42

<211> 486

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD19 CAR分子

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (21)

<223> 信号肽

<400> 42

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	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu
			20					25					30		
Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln
			35				40					45			
Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr
			50				55				60				
Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro
65				70						75				80	

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile		
85	90	95
Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly		
100	105	110
Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr		
115	120	125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu		
130	135	140
Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser		
145	150	155
Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly		
165	170	175
Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly		
180	185	190
Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser		
195	200	205
Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys		
210	215	220
Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys		
225	230	235
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
245	250	255
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro		
260	265	270
Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu		
275	280	285
Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp		
290	295	300
Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly		
305	310	315
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg		
325	330	335
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln		
340	345	350
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu		
355	360	365
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala		
370	375	380
Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu		

385	390	395	400
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp			
	405	410	415
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu			
	420	425	430
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile			
	435	440	445
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr			
	450	455	460
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met			
465	470	475	480
Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	485		

<210> 43

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a信号肽

<400> 43

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccg 63

<210> 44

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a信号肽

<400> 44

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

20

<210> 45

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD19轻链可变区

<400> 45

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aaatatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gatctaccat acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
gaagatatgt ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggagatcac a 321

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD19轻链可变区

<400> 46

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

<210> 47

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> G4S接头

<400> 47

ggtggaggtg gatcgggcgg tgggtgggtcg ggtggcggcg gatct 45

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> G4S接头

<400> 48

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 49

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD19重链可变区

<400> 49

gaggtgaaac tgcaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccgtc 60
acatgcactg tctcaggggt ctcatcacc gactatgggtg taagctggat tcgccagcct 120
ccacgaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggta gtgaaaccac atactataat 180
tcagctctca aatccagact gaccatcatc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatttact actgtgccaa acattattac 300
tacggtggta gctatgctat ggactactgg ggccaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD19重链可变区

<400> 50

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

100	105	110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 51		
<211> 207		
<212> DNA		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> CD8a铰链和跨膜		
<400> 51		
accactacac cagcacctag accaccaaca cctgcgcca ccatcgcac gcagccactg 60		
tctctgcgcc cagaggcatg ccggccagca gctgggggcg cagtgcacac aagggggctg 120		
gacttcgcat gtgatattcta catctgggca ccattggcag ggacttgtgg ggtccttctc 180		
ctgtcactgg ttatcacctt ttactgc 207		
<210> 52		
<211> 69		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> CD8a铰链和跨膜		
<400> 52		
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala		
1 5 10 15		
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly		
20 25 30		
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile		
35 40 45		
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val		
50 55 60		
Ile Thr Leu Tyr Cys		
65		
<210> 53		
<211> 126		
<212> DNA		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 4-1BB共刺激结构域		
<400> 53		
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60		

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126

<210> 54

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 4-1BB共刺激结构域

<400> 54

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 55

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD3 ζ 效应结构域#1

<400> 55

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 56

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD3 ζ 效应结构域#1

<400> 56

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 57

<211> 1479

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗BCMA CAR全分子

<400> 57

```

atggcactcc ccgtcaccgc ctttctcttg cccctcgccc tgctgctgca tgctgccagg 60
cccgacattg tgctcactca gtcacctccc agcctggcca tgagcctggg aaaaagggcc 120
accatctcct gtagagccag tgagtccgtc acaatcttgg ggagccatct tattcactgg 180
tatcagcaga agcccgggca gcctccaacc cttcttattc agctcgcgtc aaacgtccag 240
acgggtgtac ctgccagatt ttctggtagc ggggtcccga ctgattttac actgaccata 300
gatccagtgg aagaagacga tgtggccgtg tattattgtc tgcagagcag aacgattcct 360
cgcacatttg gtgggggtac taagctggag attaaggga gacgtccgg ctcaggaag 420
ccgggctccg gcgagggaag cacgaagggg caaattcagc tgggtccagag cggacctgag 480
ctgaaaaaac ccggcgagac tgtaagatc agttgtaaag catctggcta taccttcacc 540
gactacagca taaattgggt gaaacgagcc cctggaaagg gcctcaaag gatgggttgg 600
atcaataccg aaactagga gcctgcttat gcatatgact tccgcgggag attcgccttt 660
tcaactcgaga catctgcctc tactgcttac ctcaaataa acaacctcaa gtatgaagat 720
acagccactt acttttgcgc cctcgactat agttacgcca tggactactg gggacaggga 780
acctccgtta ccgtcagttc cgcggccgca accacaacac ctgctccaag gccccccaca 840
cccgtccaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccgca 900
gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggca 960
cctttggccg gaacatgtgg ggtgttgett ctctcccttg tgatcactct gtattgtaag 1020
cgcgggagaa agaagtcct gtacatcttc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc 1080
actcaggaag aagatgggtg ttcatgccgc ttccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa 1140
ctgagggtga aattttctag aagcgccgat gctcccgc atcagcaggg tcagaatcag 1200
ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg 1260
ggcagggatc ccgagatggg gggaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggttgtac 1320

```

aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa 1380
agacgcagag gcaaggggca tgacggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac 1440
acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccg 1479

<210> 58

<211> 493

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗BCMA CAR全分子

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (21)

<223> 信号肽

<400> 58

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

195	200	205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr		
210	215	220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp		
225	230	235
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr		
245	250	255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr		
260	265	270
Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln		
275	280	285
Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala		
290	295	300
Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala		
305	310	315
Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr		
325	330	335
Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln		
340	345	350
Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser		
355	360	365
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys		
370	375	380
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln		
385	390	395
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu		
405	410	415
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg		
420	425	430
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met		
435	440	445
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly		
450	455	460
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp		
465	470	475
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
485	490	

<210> 59

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a信号肽

<400> 59

atggcactcc ccgtcaccgc ctttctcttg cccctcgccc tgctgctgca tgctgccagg 60
ccc 63

<210> 60

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a信号肽

<400> 60

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

20

<210> 61

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗BCMA轻链可变区

<400> 61

gacattgtgc tactcagtc acctcccagc ctggccatga gcctgggaaa aagggccacc 60
atctcctgta gagccagtga gtccgtcaca atcttgggga gccatcttat tacttggtat 120
cagcagaagc ccgggcagcc tccaaccctt cttattcagc tcgctgcaaa cgtccagacg 180
ggtgtacctg ccagattttc tggtagcggg tcccgactg attttacact gaccatagat 240
ccagtgaag aagacgatgt ggccgtgtat tattgtctgc agagcagaac gattcctcgc 300
acatttggtg ggggtactaa gctggagatt aag 333

<210> 62

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗BCMA轻链可变区

<400> 62

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Met Ser Leu Gly

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

<210> 63

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 218接头

<400> 63

ggaagcacgt ccggctcagg gaagccgggc tccggcgagg gaagcacgaa gggg 54

<210> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 218接头

<400> 64

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys Gly

<210> 65

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗BCMA重链可变区

<400> 65

caaattcagc tgggtccagag cggacctgag ctgaaaaaac ccggcgagac tgtttaagatc 60

agttgtaaag catctggcta taccttcacc gactacagca taaattgggt gaaacgagcc 120
 cctggaaagg gcctcaaatg gatgggttgg atcaataccg aaactaggga gcctgcttat 180
 gcatatgact tccgcgggag attcgccttt tctactcgaga catctgcctc tactgcttac 240
 ctccaaataa acaacctcaa gtatgaagat acagccactt acttttgccg cctcgactat 300
 agttacgcca tggactactg gggacaggga acctccgta ccgtcagttc c 351

<210> 66

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗BCMA重链可变区

<400> 66

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

<210> 67

<211> 2610

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 与突变VSV-G全分子共表达的抗CD3靶向分子

<400> 67

atggccttac cagtgaccgc cttgtctctg ccgttggect tgctgctcca cgccgccagg 60
 ccggacatcc agatgacca gaccacctcc tccctgtctg cctctctggg agacagagtc 120
 accatcagtt gcagggaag tcaggacatt agaaattatt taaactgta tcaacagaaa 180
 ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac tacacatcaa gattacactc aggagtccca 240

```

tcaaagttca gtggcagtgg gtctggaaca gattattctc tcaccattag caacctggag 300
caagaggata ttgccactta cttttgccaa cagggttaata cgcttccgtg gacgttcgct 360
ggaggcacca agctggaaat caaacgggct ggaggcggtg gtggcggtgg atcaggtgga 420
ggcagcggtg gcgcatctga ggtgcagctc cagcagtctg gacctgagct ggtgaagcct 480
ggagcttcaa tgaagatata ctgcaaggct tctggttact cattcactgg ctacaccatg 540
aactgggtga agcagagtca tggaaagaac cttgagtgga tgggacttat taatccttac 600
aaaggtgtta gtacctacaa ccagaagttc aaggacaagg ccacattaac tgtagacaag 660
tcatccagca cagcctacat ggaactcctc agtctgacat ctgaggactc tgcagtctat 720
tactgtgcaa gatcggggta ctacggtgat agtgactggt acttcgatgt ctggggcgca 780
gggaccacgg tcaccgtctc ctcaaccact acaccagcac ctagaccacc aacacctgcg 840
ccaaccatcg catcgagcc actgtctctg cgcccagagg catgccggcc agcagctggg 900
ggcgcagtgc acacaagggg gctggacttc gcatgtgata tctacatctg ggcaccattg 960
gcagggactt gtggggtcct tctcctgtca ctggttatca ccttttactg cggcagcggc 1020
gccaccaact tctccctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aagaaaacc tggccccatg 1080
aagtgtctgc tgtacctggc gttcctgttt atcggggtga actgcaagtt cactatcgtg 1140
tttccgcaca accaaaaggg caactggaaa aacgtgcctt caaattacca ttattgcccc 1200
agcagctcgg acctgaactg gcacaatgac ctcatggaa ccgcgctgca ggtgaagatg 1260
ccacagagcc acaaggctat ccaggctgac ggatggatgt gccacgcgtc aaaatgggtg 1320
actacctgcg atttccgctg gtacggacca aaatacatca cgcacagcat cagatcattc 1380
accccgtcag tggaacaatg caaagaatcc atcgaacaga ctaagcaggg aacctggctg 1440
aaccctggat ttccgccgca gtcgtgtggg tacgcaaccg tgaccgatgc agaggccgtg 1500
atcgtgcaag tcacgccgca tcacgtgctt gtggacgagt acaccggaga atgggtcgat 1560
tcccagttca tcaacggcaa gtgctccaac tacatttgcc caaccgtgca caacagcact 1620
acttggcata gcgactacaa agtgaagggt ctgtgtgatt ccaacctgat ctccatggat 1680
atcactttct tctcgaaga cggcgaactg tcctcactgg gcaaagaagg aactgggttt 1740
cgctcaaatt acttcgccta cgaaactgga ggaaaagcct gcaagatgca gtactgcaag 1800
cactggggcg tgagactacc cagcgggtgc tggttcgaga tggccgataa ggacctgttt 1860
gcagcagcga gattcccgga atgccctgag ggatcgagca tctccgctcc aagccaaact 1920
tcagtggacg tgagcctgat ccaggacgtg gaacggattc tcgactactc gctgtgccag 1980
gagacctggt cgaagatcag agcgggactg cccatctcac cgggtggacct gtccctacctg 2040
gcgccaaaga atccgggcac tggaccggcg ttcaccatca tcaacggcac cctcaaatac 2100
ttcgagacgc ggtacatccg ggtggacatc gcagctccga tcctctcccg gatggtggga 2160
atgatctcgg ggactactac cgaagccgag ctctgggacg actgggcacc ttacgaggat 2220
gtcgagatcg gacctaacgg agtgtcccg acctctccg ggtacaagtt ccctctgtac 2280
atgatcggcc atggcatgct ggactcggat ctgcatctgt cgtccaaagc acaggtgttt 2340
gaacaccac acattcaaga cgccgccagc cagctgccgg acgatgagtc gctgtttctc 2400
ggagacacgg gcttgtcaaa gaatcccatc gagctggtgg aaggatggtt ttcactctgg 2460
aaaagcagca tcgcttcatt cttcttcac attggcctga tcatcgccct atttctagtc 2520
ctgcgggtgg gaattcatct gtgcatcaag ctcaagcaca ctaagaagcg gcaaactctac 2580

```

actgatatcg agatgaatcg cctgggcaag 2610

<210> 68

<211> 870

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 与突变VSV-G全分子共表达的抗CD3靶向分子

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (21)

<223> 信号肽

<400> 68

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 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu

20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln

35 40 45

Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr

50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100 105 110

Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

Arg Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro

145 150 155 160

Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

165 170 175

Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu

180 185 190

Trp Met Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln

195 200 205

Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr

210	215	220
Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr		
225	230	235
Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp		240
	245	250
Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro		255
	260	265
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		270
	275	280
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		285
290	295	300
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		
305	310	315
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr		320
	325	330
Cys Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp		335
	340	345
Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe		350
	355	360
Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn		365
370	375	380
Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro		
385	390	395
Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu		400
	405	410
Gln Val Lys Met Pro Gln Ser His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp		415
	420	425
Met Cys His Ala Ser Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr		430
	435	440
Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val		445
	450	455
Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu		460
465	470	475
Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp		480
	485	490
Ala Glu Ala Val Ile Val Gln Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp		495
	500	505
Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys		510
515	520	525

Ser	Asn	Tyr	Ile	Cys	Pro	Thr	Val	His	Asn	Ser	Thr	Thr	Trp	His	Ser
530															
Asp	Tyr	Lys	Val	Lys	Gly	Leu	Cys	Asp	Ser	Asn	Leu	Ile	Ser	Met	Asp
545															
Ile	Thr	Phe	Phe	Ser	Glu	Asp	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu
Gly	Thr	Gly	Phe	Arg	Ser	Asn	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Glu	Thr	Gly	Gly	Lys
Ala	Cys	Lys	Met	Gln	Tyr	Cys	Lys	His	Trp	Gly	Val	Arg	Leu	Pro	Ser
Gly	Val	Trp	Phe	Glu	Met	Ala	Asp	Lys	Asp	Leu	Phe	Ala	Ala	Ala	Arg
Phe	Pro	Glu	Cys	Pro	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Pro	Ser	Gln	Thr
Ser	Val	Asp	Val	Ser	Leu	Ile	Gln	Asp	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Asp	Tyr
Ser	Leu	Cys	Gln	Glu	Thr	Trp	Ser	Lys	Ile	Arg	Ala	Gly	Leu	Pro	Ile
Ser	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu	Ala	Pro	Lys	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly
Pro	Ala	Phe	Thr	Ile	Ile	Asn	Gly	Thr	Leu	Lys	Tyr	Phe	Glu	Thr	Arg
Tyr	Ile	Arg	Val	Asp	Ile	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Arg	Met	Val	Gly
Met	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Glu	Leu	Trp	Asp	Asp	Trp	Ala
Pro	Tyr	Glu	Asp	Val	Glu	Ile	Gly	Pro	Asn	Gly	Val	Leu	Arg	Thr	Ser
Ser	Gly	Tyr	Lys	Phe	Pro	Leu	Tyr	Met	Ile	Gly	His	Gly	Met	Leu	Asp
Ser	Asp	Leu	His	Leu	Ser	Ser	Lys	Ala	Gln	Val	Phe	Glu	His	Pro	His
Ile	Gln	Asp	Ala	Ala	Ser	Gln	Leu	Pro	Asp	Asp	Glu	Ser	Leu	Phe	Phe
Gly	Asp	Thr	Gly	Leu	Ser	Lys	Asn	Pro	Ile	Glu	Leu	Val	Glu	Gly	Trp
Phe	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Ser	Ile	Ala	Ser	Phe	Phe	Phe	Ile	Ile	Gly
Leu	Ile	Ile	Gly	Leu	Phe	Leu	Val	Leu	Arg	Val	Gly	Ile	His	Leu	Cys

835 840 845
Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu
850 855 860
Met Asn Arg Leu Gly Lys
865 870
<210> 69
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> P2A自切割肽
<400> 69
ggcagcggcg ccaccaactt ctccctgctg aagcaggccg gcgacgtgga agaaaaccct 60
ggcccc 66
<210> 70
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> P2A自切割肽
<400> 70
Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15
Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20
<210> 71
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VSV-G信号序列
<400> 71
atgaagtgtc tgctgtacct ggcgttcctg tttatcgggg tgaactgc 48
<210> 72
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VSV-G信号序列

<400> 72

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys

1

5

10

15

<210> 73

<211> 1485

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 突变VSV-G (Trop-002)

<400> 73

```

aagttcacta tcgtgtttcc gcacaaccaa aagggaact ggaaaaacgt gccttcaaat 60
taccattatt gcccagcag ctcggacctg aactggcaca atgacctcat tggaaccgcg 120
ctgcaggtga agatgccaca gagccacaag gctatccagg ctgacggatg gatgtgccac 180
gcgtcaaaat ggggtgactac ctgcgatttc cgctggtacg gaccaaata catcacgcac 240
agcatcagat cattcacccc gtcagtggaa caatgcaaag aatccatcga acagactaag 300
cagggaacct ggctgaaccc tggatttccg ccgcagtcgt gtgggtacgc aaccgtgacc 360
gatgcagagg ccgtgatcgt gcaagtcacg ccgcatcacg tgcttgtgga cgagtacacc 420
ggagaatggg tcgattccca gttcatcaac ggcaagtgt ccaactacat ttgccaacc 480
gtgcacaaca gcactacttg gcacagcgac tacaaagtga aggtctgtg tgattccaac 540
ctgatctcca tggatatcac tttcttctcg gaagacggcg aactgtcctc actgggcaaa 600
gaaggaactg ggtttcgctc aaattacttc gcctacgaaa ctggaggaaa agcctgcaag 660
atgcagtact gcaagcactg gggcgtgaga ctaccacgcg gtgtctggtt cgagatggcc 720
gataaggacc tgtttgcagc agcgagattc ccggaatgcc ctgagggatc gagcatctcc 780
gctccaagcc aaacttcagt ggacgtgagc ctgatccagg acgtggaacg gattctcgac 840
tactcgtgt gccaggagac ctggtcgaag atcagagcgg gactgcccac ctcaccggtg 900
gacctgtcct acctggcgcc aaagaatccg ggcactggac cggcgttcac catcatcaac 960
ggcaccctca aatacttcca gacgcggtac atccgggtgg acatcgagc tccgatcctc 1020
tcccggatgg tgggaatgat ctcggggact actaccgaag ccgagctctg ggacgactgg 1080
gcaccttacg aggatgtcga gatcggacct aacggagtgc tccggacctc ctccgggtac 1140
aagttccctc tgtacatgat cggccatggc atgctggact cggatctgca tctgtcgtcc 1200
aaagcacagg tgtttgaaca cccacacatt caagacgccg ccagccagct gccggacgat 1260
gagtcgctgt tcttcggaga cacgggcttg tcaaagaatc ccatcgagct ggtggaagga 1320
tggttttcat cctggaaaag cagcatcgct tcattcttct tcattcattgg cctgatcatc 1380
ggcctatttc tagtcctgcg ggtgggaatt catctgtgca tcaagctcaa gcacactaag 1440
aagcggcaaa tctacactga tatcgagatg aatcgctgg gcaag 1485

```

<210> 74

<211> 495

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 突变VSV-G (Trop-002)

<400> 74

Lys	Phe	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	His	Asn	Gln	Lys	Gly	Asn	Trp	Lys	Asn
1				5					10					15	
Val	Pro	Ser	Asn	Tyr	His	Tyr	Cys	Pro	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Asn	Trp
			20					25					30		
His	Asn	Asp	Leu	Ile	Gly	Thr	Ala	Leu	Gln	Val	Lys	Met	Pro	Gln	Ser
		35					40					45			
His	Lys	Ala	Ile	Gln	Ala	Asp	Gly	Trp	Met	Cys	His	Ala	Ser	Lys	Trp
	50					55				60					
Val	Thr	Thr	Cys	Asp	Phe	Arg	Trp	Tyr	Gly	Pro	Lys	Tyr	Ile	Thr	His
65				70					75					80	
Ser	Ile	Arg	Ser	Phe	Thr	Pro	Ser	Val	Glu	Gln	Cys	Lys	Glu	Ser	Ile
			85					90					95		
Glu	Gln	Thr	Lys	Gln	Gly	Thr	Trp	Leu	Asn	Pro	Gly	Phe	Pro	Pro	Gln
		100					105					110			
Ser	Cys	Gly	Tyr	Ala	Thr	Val	Thr	Asp	Ala	Glu	Ala	Val	Ile	Val	Gln
	115					120				125					
Val	Thr	Pro	His	His	Val	Leu	Val	Asp	Glu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Trp	Val
	130				135				140						
Asp	Ser	Gln	Phe	Ile	Asn	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Tyr	Ile	Cys	Pro	Thr
145				150					155					160	
Val	His	Asn	Ser	Thr	Thr	Trp	His	Ser	Asp	Tyr	Lys	Val	Lys	Gly	Leu
			165					170					175		
Cys	Asp	Ser	Asn	Leu	Ile	Ser	Met	Asp	Ile	Thr	Phe	Phe	Ser	Glu	Asp
		180					185						190		
Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu	Gly	Thr	Gly	Phe	Arg	Ser	Asn
	195				200							205			
Tyr	Phe	Ala	Tyr	Glu	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Cys	Lys	Met	Gln	Tyr	Cys
	210				215					220					
Lys	His	Trp	Gly	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Trp	Phe	Glu	Met	Ala
225				230					235					240	
Asp	Lys	Asp	Leu	Phe	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Pro	Glu	Cys	Pro	Glu	Gly
			245					250					255		
Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Pro	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Asp	Val	Ser	Leu	Ile
		260					265					270			
Gln	Asp	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Asp	Tyr	Ser	Leu	Cys	Gln	Glu	Thr	Trp
	275					280						285			

Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr
 290 295 300
 Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn
 305 310 315 320
 Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala
 325 330 335
 Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr
 340 345 350
 Glu Ala Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile
 355 360 365
 Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu
 370 375 380
 Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser
 385 390 395 400
 Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln
 405 410 415
 Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
 420 425 430
 Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser
 435 440 445
 Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
 450 455 460
 Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
 465 470 475 480
 Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 485 490 495

<210> 75

<211> 2418

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 与突变VSV-G全分子共表达的CD80 T细胞靶向分子

<400> 75

atgggtcata cacgccgcca aggaacctca ccatctaagt gcccatactt gaatttcttt 60
 caacttctcg tgctggcggg gctcagtcatt ttctgcagtg gggtcattca cgttactaaa 120
 gaggtcaagg aggtcgcaac attgagttgt ggccataacg tatcagttga agaactcgcg 180
 cagacacgga ttactggca aaaggaaaag aagatggtgt tgacaatgat gagcgggtgac 240
 atgaacattt ggccagagta caaaaatcga acgatattcg atataaccaa taacttgtcc 300
 atagtaatac ttgccttgcg accttctgac gagggaaact atgaatgtgt agtgcttaag 360

tatgaaaaag atgccttttaa gcgggaacac ttggctgagg ttacactctc cgттаaggcg 420
gactttccta cgccgtctat atccgacttc gagataccca cttctaacat tgcacgcatc 480
atttgctcaa cctcagggtg tttcccagag cctcacttga gctggctgga gaatggcgaa 540
gaacttaacg caatcaatac cacggtgtcc caagaccgg agacagagct gtacgccgtg 600
tcattccaaac tggatttttaa catgacgaca aatcatagtt tcatgtgtct gatcaaatat 660
gggcatctca gggatgaatca gacttttaat tggaacacta ccaaacaaga gcacttccca 720
gataatctgt tgccaagctg ggcgataact cttatctccg tcaacggtat cttcgtaatt 780
tgctgcctca cctattgttt cgcgcctcga tgccgagaag gcagcggcgc caccaacttc 840
tcctgtctga agcaggccgg cgacgtggaa gaaaaccctg gccccatgaa gtgtctgctg 900
tacctggcgt tcctgtttat cgggggtgaac tgcaagttca ctatcgtgtt tccgcacaac 960
caaaagggca actggaaaaa cgtgccttca aattaccatt attgccccag cagctcggac 1020
ctgaactggc acaatgacct cattggaacc gcgctgcagg tgaagatgcc acagagccac 1080
aaggtatcc aggtgacgg atggatgtgc cacgcgtcaa aatgggtgac tacctgcgat 1140
ttccgctggt acggacaaaa atacatcacg cacagcatca gatcattcac cccgtcagt 1200
gaacaatgca aagaatccat cgaacagact aagcaggaa cctggctgaa ccctggattt 1260
ccgccgcagt cgtgtgggta cgcaaccgtg accgatgcag aggccgtgat cgtgcaagtc 1320
acgccgcatac acgtgcttgt ggacgagtac accggagaat gggtcgattc ccagttcatc 1380
aacggcaagt gctccaacta catttgccca accgtgcaca acagcactac ttggcacagc 1440
gactacaaag tgaagggtct gtgtgattcc aacctgatct ccatggatat cactttcttc 1500
tcggaagacg gcgaactgtc ctactgggc aaagaaggaa ctgggtttcg ctcaaattac 1560
ttgcctacg aaactggagg aaaagcctgc aagatgcagt actgcaagca ctggggcgtg 1620
agactaccca gcggtgtctg gttcgagatg gccgataagg acctgtttgc agcagcgaga 1680
ttcccgaat gccctgaggg atcgagcatc tccgtccaa gccaaacttc agtggacgtg 1740
agcctgatcc aggacgtgga acggattctc gactactcgc tgtgccagga gacctggtcg 1800
aagatcagag cgggactgcc catctaccg gtggacctgt cctacctggc gccaaagaat 1860
ccgggcactg gaccggcgtt caccatcatc aacggcacc tcaaatactt cgagacgcgg 1920
tacatccggg tggacatcgc agtccgatc ctctcccga tgggtgggaat gatctcgggg 1980
actactaccg aagccgagct ctgggacgac tgggcacctt acgaggatgt cgagatcgga 2040
cctaaccggag tgctccggac ctctccggg tacaagttcc ctctgtacat gatcggccat 2100
ggcatgctgg actcggtatc gcatctgtcg tccaaagcac aggtgtttga acaccacac 2160
attcaagacg ccgccagcca gctgccggac gatgagtcgc tgttcttcgg agacacgggc 2220
ttgtcaaaga atcccatcga gctgggtggaa ggatggtttt catcctggaa aagcagcatc 2280
gcttcattct tcttcatcat tggcctgac atcggcctat ttctagtctt gcgggtggga 2340
attcatctgt gcatcaagct caagcacact aagaagcggc aaatctacac tgatatcgag 2400
atgaatcgcc tgggcaag 2418

<210> 76

<211> 806

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 与突变VSV-G全分子共表达的CD80 T细胞靶向分子

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (35)

<223> 信号序列

<400> 76

```

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

```

Ile Phe Val	Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
260	265 270
Glu Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp	
275	280 285
Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe	
290	295 300
Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn	
305	310 315 320
Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro	
	325 330 335
Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu	
	340 345 350
Gln Val Lys Met Pro Gln Ser His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp	
	355 360 365
Met Cys His Ala Ser Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr	
	370 375 380
Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val	
	385 390 395 400
Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu	
	405 410 415
Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp	
	420 425 430
Ala Glu Ala Val Ile Val Gln Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp	
	435 440 445
Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys	
	450 455 460
Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser	
	465 470 475 480
Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp	
	485 490 495
Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu	
	500 505 510
Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys	
	515 520 525
Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser	
	530 535 540
Gly Val Trp Phe Glu Met Ala Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg	
	545 550 555 560
Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr	

565	570	575
Ser Val Asp Val Ser Leu Ile Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr		
580	585	590
Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile		
595	600	605
Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly		
610	615	620
Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg		
625	630	635
Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly		
645	650	655
Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr Glu Ala Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala		
660	665	670
Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser		
675	680	685
Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp		
690	695	700
Ser Asp Leu His Leu Ser Ser Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His		
705	710	715
Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe		
725	730	735
Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp		
740	745	750
Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly		
755	760	765
Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys		
770	775	780
Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu		
785	790	795
Met Asn Arg Leu Gly Lys		800
805		

<210> 77

<211> 1533

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> WT VSV-G

<400> 77

atgaagtgtc tgctgtacct ggcgttcctg tttatcgggg tgaactgcaa gttcactatc 60

gtgtttccgc acaaccaaaa gggcaactgg aaaaacgtgc cttcaaatta ccattattgc 120
 cccagcagct cggacctgaa ctggcacaat gacctcattg gaaccgcgct gcaggtgaag 180
 atgccaaaga gccacaaggc tatccaggct gacggatgga tgtgccacgc gtcaaaatgg 240
 gtgactacct gcgatttccg ctggtacgga ccaaaatata tcacgcacag catcagatca 300
 ttcaccccggt cagtgaaca atgcaaagaa tccatcgaac agactaagca gggaacctgg 360
 ctgaaccctg gatttccgcc gcagtcgtgt gggtagca ccgtagacca tgcagaggcc 420
 gtgatcgtgc aagtcacgcc gcatcacgtg cttgtggacg agtacaccgg agaatgggtc 480
 gattcccagt tcatcaacgg caagtgtctc aactacattt gccaacctg gcacaacagc 540
 actacttggc acagcgacta caaagtgaag ggtctgtgtg attccaacct gatctccatg 600
 gatatacatt tcttctcgga agacggcgaa ctgtctctac tgggcaaaga aggaactggg 660
 tttcgctcaa attacttcgc ctacgaaact ggaggaaaag cctgcaagat gcagtactgc 720
 aagcactggg gcgtgagact acccagcggg gtctggttcg agatggccga taaggacctg 780
 tttgcagcag cgagattccc ggaatgcctt gagggatcga gcattctcgc tccaagccaa 840
 acttcagtgg acgtgagcct gatccaggac gtggaacgga ttctcgacta ctgcgtgtgc 900
 caggagacct ggtcgaagat cagagcggga ctgcccattt caccggtgga cctgtctctc 960
 ctggcgccaa agaattccggg cactggaccg gcgttcacca tcatcaacgg caccctcaa 1020
 tacttcgaga cgcggtacat ccgggtggac atcgcagctc cgatcctctc ccgatgggtg 1080
 ggaatgatct cggggactac taccgaacgc gagctctggg acgactgggc accttacgag 1140
 gatgtcgaga tcggacctaa cggagtgtct cggacctcct ccgggtacaa gttccctctg 1200
 tacatgatcg gccatggcat gctggactcg gatctgcatc tgtcgtccaa agcacagggtg 1260
 tttgaacacc cacacattca agacgccgcc agccagctgc cggacgatga gtcgctgttc 1320
 ttcggagaca cgggcttgtc aaagaatccc atcgagctgg tggaaggatg gttttcatcc 1380
 tggaaaagca gcacgcctc attcttcttc atcattggcc tgatcatcgg cctattttcta 1440
 gtcctgcggg tgggaattca tctgtgcatc aagctcaagc aactaagaa gcggcaaadc 1500
 tacactgata tcgagatgaa tcgcctgggc aag 1533

<210> 78

<211> 511

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> WT VSV-G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (16)

<223> 信号序列

<400> 78

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys

1

5

10

15

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn

20	25	30
Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys	Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp	
35	40	45
His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu Gln Val Lys Met Pro Lys Ser		
50	55	60
His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp		
65	70	75
Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His		
85	90	95
Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile		
100	105	110
Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln		
115	120	125
Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln		
130	135	140
Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val		
145	150	155
Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr		
165	170	175
Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu		
180	185	190
Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp		
195	200	205
Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn		
210	215	220
Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys		
225	230	235
Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala		
245	250	255
Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly		
260	265	270
Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile		
275	280	285
Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp		
290	295	300
Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr		
305	310	315
Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn		
325	330	335

Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala
 340 345 350
 Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr
 355 360 365
 Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile
 370 375 380
 Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu
 385 390 395 400
 Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser
 405 410 415
 Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln
 420 425 430
 Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
 435 440 445
 Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser
 450 455 460
 Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
 465 470 475 480
 Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
 485 490 495
 Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 500 505 510

<210> 79

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 来自明脉扁刺蛾病毒衣壳蛋白的T2A肽

<400> 79

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
 1 5 10 15

Gly Pro

<210> 80

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 来自明脉扁刺蛾病毒衣壳蛋白T2A肽

<400> 80

gagggcaggg gaagtcttct aacatgcggg gacgtggagg aaaatcccgg cccc 54

<210> 81

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 来自猪捷申病毒-1多蛋白的P2A肽

<400> 81

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1

5

10

15

Pro Gly Pro

<210> 82

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 来自猪捷申病毒-1多蛋白的P2A肽

<400> 82

gccacgaact tctctctgtt aaagcaagca ggagacgtgg aagaaaaccc cggtcct 57

<210> 83

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 来自口蹄疫病毒多蛋白的F2A肽

<400> 83

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1

5

10

15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 84

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 来自口蹄疫病毒多蛋白的F2A肽

<400> 84

gtgaaacaga ctttgaattt tgaccttctc aagttggcgg gagacgtcga gtccaaccct 60

gggccc 66

<210> 85

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 来自马甲型鼻病毒多蛋白的E2A肽

<400> 85

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 86

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 来自马甲型鼻病毒多蛋白的E2A肽

<400> 86

cagtgtacta attatgctct cttgaaattg gctggagatg ttgagagcaa cccaggtccc 60

<210> 87

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> WT VSV-G信号序列

<400> 87

atgaagtgtc tgctgtacct ggcgttcctg tttatcgggg tgaactgc 48

<210> 88

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> WT VSV-G信号序列

<400> 88

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys

1 5 10 15

<210> 89

<211> 1485

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 无信号序列的WT VSV-G

<400> 89

```

aagttcacta tcgtgtttcc gcacaaccaa aagggaact ggaaaaacgt gccttcaa 60
taccattatt gcccagcag ctcggacctg aactggcaca atgacctcat tggaaccg 120
ctgcaggatga agatgcaaaa gagccacaag gctatccagg ctgacggatg gatgtgcc 180
gcgtcaaaaat ggggtgactac ctgcgatttc cgctggtagc gacaaaata catcacgc 240
agcatcagat cattcacccc gtcagtggaa caatgcaaag aatccatcga acagactaag 300
cagggaaacct ggctgaaccc tggatttccg ccgcagtcgt gtgggtacgc aaccgtgacc 360
gatgcagagg ccgtgatcgt gcaagtcacg ccgcacacg tgcttgtgga cgagtacacc 420
ggagaatggg tcgattccca gttcatcaac ggcaagtgt ccaactacat ttgccaacc 480
gtgcacaaca gcactacttg gcacagcgac tacaaagtga aggtctgtg tgattccaac 540
ctgatctcca tggatatcac tttcttctcg gaagacggcg aactgtctc actgggcaa 600
gaaggaactg ggtttcgctc aaattacttc gcctacgaaa ctggaggaaa agcctgcaag 660
atgcagtact gcaagcactg gggcgtgaga ctaccagcg gtgtctggtt cgagatggcc 720
gataaggacc tgtttgcagc agcgagattc ccggaatgcc ctgagggatc gagcatctcc 780
gctccaagcc aaacttcagt ggacgtgagc ctgatccagg acgtggaacg gattctcgac 840
tactcgtgt gccaggagac ctggtcgaag atcagagcgg gactgcccac ctcaccggtg 900
gacctgtcct acctggcgcc aaagaatccg ggcaactggac cggcgttcac catcatcaac 960
ggcaccctca aatacttcga gacgcgttac atccgggtgg acatcgagc tccgatctc 1020
tcccggatgg tgggaatgat ctcggggact actaccgaac gcgagctctg ggacgactgg 1080
gcaccttacg aggatgtcga gatcggacct aacggagtgc tccggacctc ctccgggtac 1140
aagttccctc tgtacatgat cggccatggc atgctggact cggatctgca tctgtcgtcc 1200
aaagcacagg tgtttgaaca cccacacatt caagacgccg ccagccagct gccggacgat 1260
gagtcgctgt tcttcggaga cacgggcttg tcaaagaatc ccatcgagct ggtggaagga 1320
tggttttcat cctgaaaag cagcatcgct tcattcttct tcattattgg cctgatcatc 1380
ggcctatttc tagtcctgcg ggtgggaatt catctgtgca tcaagctcaa gcacactaag 1440
aagcggcaaaa tctacactga tatcgagatg aatcgctgg gcaag 1485

```

<210> 90

<211> 495

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 无信号序列的WT VSV-G

<400> 90

```

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn
1           5           10           15
Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp

```

20	25	30
His Asn Asp Leu Ile Gly Thr	Ala Leu Gln Val Lys Met	Pro Lys Ser
35	40	45
His Lys Ala Ile Gln Ala Asp	Gly Trp Met Cys His Ala	Ser Lys Trp
50	55	60
Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg	Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr	Ile Thr His
65	70	75
Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro	Ser Val Glu Gln Cys Lys	Glu Ser Ile
85	90	95
Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr	Trp Leu Asn Pro Gly Phe	Pro Pro Gln
100	105	110
Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val	Thr Asp Ala Glu Ala Val	Ile Val Gln
115	120	125
Val Thr Pro His His Val Leu	Val Asp Glu Tyr Thr Gly	Glu Trp Val
130	135	140
Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly	Lys Cys Ser Asn Tyr Ile	Cys Pro Thr
145	150	155
Val His Asn Ser Thr Thr Trp	His Ser Asp Tyr Lys Val	Lys Gly Leu
165	170	175
Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser	Met Asp Ile Thr Phe Phe	Ser Glu Asp
180	185	190
Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly	Lys Glu Gly Thr Gly Phe	Arg Ser Asn
195	200	205
Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly	Gly Lys Ala Cys Lys Met	Gln Tyr Cys
210	215	220
Lys His Trp Gly Val Arg Leu	Pro Ser Gly Val Trp Phe	Glu Met Ala
225	230	235
Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala	Ala Arg Phe Pro Glu Cys	Pro Glu Gly
245	250	255
Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser	Gln Thr Ser Val Asp Val	Ser Leu Ile
260	265	270
Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu	Asp Tyr Ser Leu Cys Gln	Glu Thr Trp
275	280	285
Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu	Pro Ile Ser Pro Val Asp	Leu Ser Tyr
290	295	300
Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly	Thr Gly Pro Ala Phe Thr	Ile Ile Asn
305	310	315
Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu	Thr Arg Tyr Ile Arg Val	Asp Ile Ala
325	330	335

Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr		
340	345	350
Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile		
355	360	365
Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu		
370	375	380
Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser		
385	390	395
Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln		
405	410	415
Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys		
420	425	430
Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser		
435	440	445
Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu		
450	455	460
Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys		
465	470	475
Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys		
485	490	495

<210> 91

<211> 1488

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-002突变VSV-G

<400> 91

```

aagttcacta tcgtgtttcc gcacaaccaa aagggcaact ggaaaaacgt gccttcaa 60
taccattatt gccccagcag ctcggacctg aactggcaca atgacctcat tggaaccgcg 120
ctgcaggtga agatgccaca gagccacaag gctatccagg ctgacggatg gatgtgccac 180
gcgtcaaaaat gggtgactac ctgcgatttc cgctggtagc gacaaaata catcacgcac 240
agcatcagat cattcacccc gtcagtggaa caatgcaaag aatccatcga acagactaag 300
cagggaacct ggctgaaccc tggatttccg ccgcagtcgt gtgggtacgc aaccgtgacc 360
gatgcagagg ccgtgatcgt gcaagtcacg ccgcacacg tgcttgtgga cgagtacacc 420
ggagaatggg tcgattccca gttcatcaac ggcaagtgt ccaactacat ttgcccacc 480
gtgcacaaca gcaactactg gcatagcgac tacaaagtga aggtctgtg tgattccaac 540
ctgatctcca tggatatcac tttcttctcg gaagacggcg aactgtctc actgggcaaa 600
gaaggaactg ggtttcgctc aaattacttc gcctacgaaa ctggaggaaa agcctgcaag 660
atgcagtact gcaagcactg gggcgtgaga ctaccacgcg gtgtctggtt cgagatggcc 720

```

gataaggacc tgtttgcagc agcgagattc ccggaatgcc ctgagggatc gagcatctcc 780
 gctccaagcc aaacttcagt ggacgtgagc ctgatccagg acgtggaacg gattctcgac 840
 tactcgctgt gccaggagac ctggtcgaag atcagagcgg gactgccccat ctcaccggtg 900
 gacctgtcct acctggcgcc aaagaatccg ggcactggac cggcgttcac catcatcaac 960
 ggcaccctca aatacttcga gacgcggtac atccgggtgg acatcgagc tccgatcctc 1020
 tcccggatgg tgggaatgat ctcggggact actaccgaag ccgagctctg ggacgactgg 1080
 gcaccttacg aggatgtcga gatcggacct aacggagtgc tccggacctc ctccgggtac 1140
 aagttccctc tgtacatgat cggccatggc atgctggact cggatctgca tctgtcgtcc 1200
 aaagcacagg tgtttgaaca cccacacatt caagacgccg ccagccagct gccggacgat 1260
 gagtcgctgt tcttcggaga cacgggcttg tcaaagaatc ccatcgagct ggtggaagga 1320
 tggttttcat cctggaaaag cagcatcgct tcattcttct tcattattgg cctgatcatc 1380
 ggcctatttc tagtcctgcg ggtgggaatt catctgtgca tcaagctcaa gcacactaag 1440
 aagcggcaaa tctacactga tatcgagatg aatcgcttg gcaagtag 1488

<210> 92

<211> 1488

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-051突变VSV-G

<400> 92

aagttcacta tcgtgtttcc gcacaaccaa aagggaact ggaaaaacgt gccttcaaat 60
 taccattatt gccccagcag ctcgacctg aactggcaca atgacctcat tggaaccgcg 120
 ctgcaggatga agatgcaaaa gagccacaag gctatccagg ctgacggatg gatgtgccac 180
 gcgtcaaaaat ggggtgactac ctgcgatttc cgctgggtacg gacaaaata catcacgcac 240
 agcatcagat cattcacccc gtcagtggaa caatgcaaag aatccatcga acagactaag 300
 cagggaacct ggctgaacct tggatttccg ccgcagtcgt gtgggtacgc aaccgtgacc 360
 gatgcagagg ccgtgatcgt gcaagtcacg ccgcatacag tgcttgtgga cgagtacacc 420
 ggagaatggg tcgattccca gttcatcaac ggcaagtgt ccaactacat ttgccaacc 480
 gtgcacaaca gcactacttg gcacagcgac tacaaagtga aggtctctgt tgattccgcc 540
 ctggcctcca tggatatcac tttcttctcg gaagacggcg aactgtcctc actgggcaaa 600
 gaaggaactg ggtttcgctc aaattacttc gcctacgaaa ctggaggaaa agcctgcaag 660
 atgcagtact gcaagcactg gggcgtgaga ctaccacgag gtgtctggtt cgagatggcc 720
 gataaggacc tgtttgcagc agcgagattc ccggaatgcc ctgagggatc gagcatctcc 780
 gctccaagcc aaacttcagt ggacgtgagc ctgatccagg acgtggaacg gattctcgac 840
 tactcgctgt gccaggagac ctggtcgaag atcagagcgg gactgccccat ctcaccggtg 900
 gacctgtcct acctggcgcc aaagaatccg ggcactggac cggcgttcac catcatcaac 960
 ggcaccctca aatacttcga gacgcggtac atccgggtgg acatcgagc tccgatcctc 1020
 tcccggatgg tgggaatgat ctcggggact actgccgccc gcgagctctg ggacgactgg 1080
 gcaccttacg aggatgtcga gatcggacct aacggagtgc tccggacctc ctccgggtac 1140

aagttccctc tgtacatgat cggccatggc atgctggact cggatctgca tctgtcgtcc 1200
 aaagcacagg tgtttgaaca cccacacatt caagacgccg ccagccagct gccggacgat 1260
 gagtcgctgt tcttcggaga cacgggcttg tcaaagaatc ccatcgagct ggtggaagga 1320
 tggttttcat cctggaaaag cagcatcgct tcattcttct tcatcattgg cctgatcatc 1380
 ggcctatttc tagtcctgcg ggtgggaatt catctgtgca tcaagctcaa gcacactaag 1440
 aagcggcaaaa tctacactga tatcgagatg aatcgcctgg gcaagtag 1488

<210> 93

<211> 495

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-051突变VSV-G

<400> 93

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

Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys		
210	215	220
Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala		
225	230	235 240
Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly		
	245	250 255
Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile		
	260	265 270
Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp		
	275	280 285
Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr		
	290	295 300
Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn		
305	310	315 320
Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala		
	325	330 335
Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Ala		
	340	345 350
Ala Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile		
	355	360 365
Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu		
	370	375 380
Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser		
385	390	395 400
Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln		
	405	410 415
Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys		
	420	425 430
Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser		
	435	440 445
Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu		
	450	455 460
Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys		
465	470	475 480
Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys		
	485	490 495

<210> 94

<211> 1488

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-052突变VSV-G

<400> 94

```

aagttcacta tcgtgtttcc gcacaaccaa aagggaact ggaaaaacgt gccttcaa 60
taccattatt gcccagcag ctcggacctg aactggcaca atgacctcat tggaaccgcg 120
ctgcaggtga agatgccaaa gagccacaag gctatccagg ctgacggatg gatgtgccac 180
gcgtcaaaat ggggtgactac ctgcgatttc cgctggtagc gaccaaata catcacgcac 240
agcatcagat cattcacccc gtcagtggaa caatgcaaag aatccatcga acagactaag 300
cagggaaacct ggctgaaccc tggatttccg ccgcagtcgt gtgggtacgc aaccgtgacc 360
gatgcagagg ccgtgatcgt gcaagtcacg ccgcacacg tgcttgtgga cgagtacacc 420
ggagaatggg tcgattccca gttcatcaac ggcaagtgt ccaactacat ttgcccacc 480
gtgcacaaca gcactacttg gcacagcgac tacaaagtga aggtctgtg tgattccaac 540
ctgatctcca tggatatcac tttcttctcg gaagacggcg aactgtctc actgggcaa 600
gaaggaactg ggtttcgctc aaattacttc gcctacgaaa ctggaggaaa agcctgcaag 660
atgcagtact gcaagcactg gggcgtgaga ctaccagcg gtgtctggtt cgagatggcc 720
gataaggacc tgtttgcagc agcgagattc ccggaatgcc ctgagggatc gagcatctcc 780
gctccaagcc aaacttcagt ggacgtgagc ctgatccagg acgtggaacg gattctcgac 840
tactcgtgt gccaggagac ctggtcgaag atcagagcgg gactgcccac ctcaccggtg 900
gacctgtcct acctggcgcc aaagaatccg ggcactggac cggcgttcac catcatcaac 960
ggcaccctca aatacttcga gacgcgttac atccgggtgg acatcgagc tccgatctc 1020
tcccggatgg tgggaatgat ctcggggact acttgggccc gcgagctctg ggacgactgg 1080
gcaccttacg aggatgtcga gatcggacct aacggagtgc tccggacctc ctccgggtac 1140
aagttccctc tgtacatgat cggccatggc atgctggact cggatctgca tctgtcgtcc 1200
aaagcacagg tgtttgaaca cccacacatt caagacgccg ccagccagct gccggacgat 1260
gagtcgctgt tcttcggaga cacgggcttg tcaaagaatc ccatcgagct ggtggaagga 1320
tggttttcat cctgaaaag cagcatcgct tcattcttct tcattattgg cctgatcatc 1380
ggcctatttc tagtcctgcg ggtgggaatt catctgtgca tcaagctcaa gcacactaag 1440
aagcggcaaa tctacactga tatcgagatg aatcgctgg gcaagtag 1488

```

<210> 95

<211> 495

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-052突变VSV-G

<400> 95

```

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn
1           5           10           15
Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp

```

20	25	30
His Asn Asp Leu Ile Gly Thr	Ala Leu Gln Val Lys Met	Pro Lys Ser
35	40	45
His Lys Ala Ile Gln Ala Asp	Gly Trp Met Cys His Ala	Ser Lys Trp
50	55	60
Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg	Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr	Ile Thr His
65	70	75
Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro	Ser Val Glu Gln Cys Lys	Glu Ser Ile
85	90	95
Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr	Trp Leu Asn Pro Gly Phe	Pro Pro Gln
100	105	110
Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val	Thr Asp Ala Glu Ala Val	Ile Val Gln
115	120	125
Val Thr Pro His His Val Leu	Val Asp Glu Tyr Thr Gly	Glu Trp Val
130	135	140
Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly	Lys Cys Ser Asn Tyr Ile	Cys Pro Thr
145	150	155
Val His Asn Ser Thr Thr Trp	His Ser Asp Tyr Lys Val	Lys Gly Leu
165	170	175
Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser	Met Asp Ile Thr Phe Phe	Ser Glu Asp
180	185	190
Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly	Lys Glu Gly Thr Gly Phe	Arg Ser Asn
195	200	205
Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly	Gly Lys Ala Cys Lys Met	Gln Tyr Cys
210	215	220
Lys His Trp Gly Val Arg Leu	Pro Ser Gly Val Trp Phe	Glu Met Ala
225	230	235
Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala	Ala Arg Phe Pro Glu Cys	Pro Glu Gly
245	250	255
Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser	Gln Thr Ser Val Asp Val	Ser Leu Ile
260	265	270
Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu	Asp Tyr Ser Leu Cys Gln	Glu Thr Trp
275	280	285
Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu	Pro Ile Ser Pro Val Asp	Leu Ser Tyr
290	295	300
Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly	Thr Gly Pro Ala Phe Thr	Ile Ile Asn
305	310	315
Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu	Thr Arg Tyr Ile Arg Val	Asp Ile Ala
325	330	335

Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Trp		
340	345	350
Ala Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile		
355	360	365
Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu		
370	375	380
Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser		
385	390	395
Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln		
405	410	415
Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys		
420	425	430
Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser		
435	440	445
Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu		
450	455	460
Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys		
465	470	475
Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys		
485	490	495

<210> 96

<211> 1488

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-055突变VSV-G

<400> 96

```

aagttcacta tcgtgtttcc gcacgccgcc aagggaact ggaaaaacgt gccttcaa 60
taccattatt gccccagcag ctcggacctg aactggcaca atgacctcat tggaaccg 120
ctgcaggtga agatgccaaa gagccacaag gctatccagg ctgacggatg gatgtgcc 180
gcgtcaaaaat ggggtgactac ctgcgatttc cgctggtagc gacaaaata catcacgc 240
agcatcagat cattcacccc gtcagtggaa caatgcaaag aatccatcga acagacta 300
cagggaacct ggctgaaccc tggatttcg ccgcagtcgt gtgggtacgc aaccgtgac 360
gatgcagagg ccgtgatcgt gcaagtcacg ccgcacacg tgcttgtgga cgagtacac 420
ggagaatggg tcgattccca gttcatcaac ggcaagtgt ccaactacat ttgccaacc 480
gtgcacaaca gcactacttg gcacagcgac tacaaagtga aggtctgtg tgattccgc 540
ctgatctcca tggatatcac tttcttctcg gaagacggcg aactgtctc actgggcaa 600
gaaggaactg ggtttcgctc aaattacttc gcctacgaaa ctggaggaaa agcctgca 660
atgcagtact gcaagcactg gggcgtgaga ctaccacgcg gtgtctggtt cgagatgg 720

```

gataaggacc tgtttgcagc agcgagattc ccggaatgcc ctgagggatc gagcatctcc 780
 gctccaagcc aaacttcagt ggacgtgagc ctgatccagg acgtggaacg gattctcgac 840
 tactcgctgt gccaggagac ctggtcgaag atcagagcgg gactgcccac ctcaccggtg 900
 gacctgtcct acctggcgcc aaagaatccg ggcactggac cggcgttcac catcatcaac 960
 ggcaccctca aatacttcga gacgcggtac atccgggtgg acatcgagc tccgatcctc 1020
 tcccggatgg tgggaatgat ctcggggact actaccgaac gcgagctctg ggacgactgg 1080
 gcaccttacg aggatgtcga gatcggacct aacggagtgc tccggacctc ctccgggtac 1140
 aagttccctc tgtacatgat cggccatggc atgctggact cggatctgca tctgtcgtcc 1200
 aaagcacagg tgtttgaaca cccacacatt caagacgccg ccagccagct gccggacgat 1260
 gagtcgctgt tcttcggaga cacgggcttg tcaaagaatc ccatcgagct ggtggaagga 1320
 tggttttcat cctggaaaag cagcatcgct tcattcttct tcatcattgg cctgatcatc 1380
 ggcctatttc tagtcctgcg ggtgggaatt catctgtgca tcaagctcaa gcacactaag 1440
 aagcggcaaa tctacactga tatcgagatg aatcgctgg gcaagtag 1488

<210> 97

<211> 495

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-055突变VSV-G

<400> 97

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

145	150	155	160
Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu			
	165	170	175
Cys Asp Ser Ala Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp			
	180	185	190
Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn			
	195	200	205
Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys			
	210	215	220
Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala			
225	230	235	240
Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly			
	245	250	255
Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile			
	260	265	270
Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp			
	275	280	285
Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr			
	290	295	300
Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn			
305	310	315	320
Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala			
	325	330	335
Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr			
	340	345	350
Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile			
	355	360	365
Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu			
	370	375	380
Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser			
385	390	395	400
Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln			
	405	410	415
Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys			
	420	425	430
Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser			
	435	440	445
Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu			
450	455	460	

Val	Leu	Arg	Val	Gly	Ile	His	Leu	Cys	Ile	Lys	Leu	Lys	His	Thr	Lys
465							470				475				480
Lys	Arg	Gln	Ile	Tyr	Thr	Asp	Ile	Glu	Met	Asn	Arg	Leu	Gly	Lys	
							485				490				495

<210> 98

<211> 1494

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-056突变VSV-G

<400> 98

```

aagttcacta tcgtgtttcc gcacaacacc acacaaaagg gcaactggaa aaacgtgcct 60
tcaaattacc attattgccc cagcagctcg gacctgaact ggcacaatga cctcattgga 120
accgcgctgc aggtgaagat gccaaagagc cacaaggcta tccaggctga cggatggatg 180
tgccacgcgt caaaatgggt gactacctgc gatttccgct ggtacggacc aaaatacatc 240
acgcacagca tcagatcatt caccctgtca gtggaacaat gcaaagaatc catcgaacag 300
actaagcagg gaacctggct gaaccttgga tttccgccgc agtcgtgtgg gtacgcaacc 360
gtgaccgatg cagaggccgt gatcgtgcaa gtcacgccgc atcacgtgct tgtggacgag 420
tacaccggag aatgggtcga ttcccagttc atcaacggca agtgctccaa ctacatttgc 480
ccaaccgtgc acaacagcac tacttggcac agcgactaca aagtgaaggg tctgtgtgat 540
tccaacctga tctccatgga tatcactttc ttctcggaag acggcgaact gtcctcactg 600
ggcaaagaag gaactgggtt tcgctcaa at tacttgcct acgaaactgg aggaaaagcc 660
tgcaagatgc agtactgcaa gcaactggggc gtgagactac ccagcgggtg ctggttcgag 720
atggccgata aggacctgtt tgcagcagcg agattcccgg aatgccctga gggatcgagc 780
atctccgctc caagccaaac ttcagtggac gtgagcctga tccaggacgt ggaacggatt 840
ctcgactact cgctgtgccg ggagacctgg tcgaagatca gagcgggact gcccatctca 900
ccggtggacc tgtcctacct ggcgcccagg aatccgggca ctggaccggc gttcaccatc 960
atcaacggca ccctcaaata cttcgagacg cggtacatcc ggttgacat cgcagctccg 1020
atcctctccc ggatggtggg aatgatctcg gggactacta ccgaacgcga gctctgggac 1080
gactgggcac cttacgagga tgtcgagatc ggacctaacg gagtgtccg gacctcctcc 1140
gggtacaagt tccctctgta catgatcggc catggcatgc tggactcgga tctgcatctg 1200
tcgtccaaaag cacaggtggt tgaacacca cacattcaag acgccgccag ccagctgccg 1260
gacgatgagt cgctgttctt cggagacacg ggcttgtcaa agaatcccat cgagctggtg 1320
gaaggatggt tttcatcctg gaaaagcagc atcgcttcat tcttcttcat cattggcctg 1380
atcatcggcc tatttctagt cctgcgggtg ggaattcatc tgtgcatcaa gctcaagcac 1440
actaagaagc ggcaaatcta cactgatata gagatgaatc gcctgggcaa gtag 1494

```

<210> 99

<211> 497

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-056突变VSV-G

<400> 99

Lys	Phe	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	His	Asn	Thr	Thr	Gln	Lys	Gly	Asn	Trp
1				5					10					15	
Lys	Asn	Val	Pro	Ser	Asn	Tyr	His	Tyr	Cys	Pro	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu
			20					25					30		
Asn	Trp	His	Asn	Asp	Leu	Ile	Gly	Thr	Ala	Leu	Gln	Val	Lys	Met	Pro
		35					40					45			
Lys	Ser	His	Lys	Ala	Ile	Gln	Ala	Asp	Gly	Trp	Met	Cys	His	Ala	Ser
	50					55					60				
Lys	Trp	Val	Thr	Thr	Cys	Asp	Phe	Arg	Trp	Tyr	Gly	Pro	Lys	Tyr	Ile
65					70					75					80
Thr	His	Ser	Ile	Arg	Ser	Phe	Thr	Pro	Ser	Val	Glu	Gln	Cys	Lys	Glu
			85						90					95	
Ser	Ile	Glu	Gln	Thr	Lys	Gln	Gly	Thr	Trp	Leu	Asn	Pro	Gly	Phe	Pro
			100					105					110		
Pro	Gln	Ser	Cys	Gly	Tyr	Ala	Thr	Val	Thr	Asp	Ala	Glu	Ala	Val	Ile
		115					120					125			
Val	Gln	Val	Thr	Pro	His	His	Val	Leu	Val	Asp	Glu	Tyr	Thr	Gly	Glu
	130						135				140				
Trp	Val	Asp	Ser	Gln	Phe	Ile	Asn	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Tyr	Ile	Cys
145				150					155					160	
Pro	Thr	Val	His	Asn	Ser	Thr	Thr	Trp	His	Ser	Asp	Tyr	Lys	Val	Lys
			165						170				175		
Gly	Leu	Cys	Asp	Ser	Asn	Leu	Ile	Ser	Met	Asp	Ile	Thr	Phe	Phe	Ser
			180					185					190		
Glu	Asp	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu	Gly	Thr	Gly	Phe	Arg
		195					200					205			
Ser	Asn	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Glu	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Cys	Lys	Met	Gln
	210					215					220				
Tyr	Cys	Lys	His	Trp	Gly	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Trp	Phe	Glu
225					230					235				240	
Met	Ala	Asp	Lys	Asp	Leu	Phe	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Pro	Glu	Cys	Pro
			245						250				255		
Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Pro	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Asp	Val	Ser
		260						265					270		
Leu	Ile	Gln	Asp	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Asp	Tyr	Ser	Leu	Cys	Gln	Glu

275	280	285
Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu		
290	295	300
Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile		
305	310	315
Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp		
325	330	335
Ile Ala Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr		
340	345	350
Thr Thr Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val		
355	360	365
Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe		
370	375	380
Pro Leu Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu		
385	390	395
Ser Ser Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala		
405	410	415
Ser Gln Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu		
420	425	430
Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys		
435	440	445
Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu		
450	455	460
Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His		
465	470	475
Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly		
485	490	495

Lys

<210> 100

<211> 1497

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-058突变VSV-G

<400> 100

aagttcacta tcgtgtttcc gcacaaccaa aagggaact ggaaaaacgt gccttcaaat 60
taccattatt gccccagcag ctcggaactg aactggcaca atgacctcat tggaaccgcg 120
ctgcaggtga agatgccagg cggcagcaag agccacaagg ctatccaggc tgacggatgg 180
atgtgccacg cgtcaaaaatg ggtgactacc tgcgatttcc gctggtacgg accaaaatac 240

atcacgcaca gcatcagatc attcaccccg tcagtgaac aatgcaaaga atccatcgaa 300
 cagactaagc agggaaacctg gctgaaccct ggatttccgc cgcagtcgtg tgggtacgca 360
 accgtgaccg atgcagaggc cgtgatcgtg caagtcacgc cgcatcacgt gcttgtggac 420
 gagtacaccg gagaatgggt cgattcccag ttcatcaacg gcaagtgtc caactacatt 480
 tgcccaaccg tgcacaacag cactacttgg cacagcgact acaaagtga gggctctgtgt 540
 gattccaacc tgatctccat ggatatcact ttcttctcgg aagacggcga actgtcctca 600
 ctgggcaaag aaggaactgg gtttcgtca aattacttcg cctacgaaac tggaggaaaa 660
 gcctgcaaga tgcagtactg caagcactgg ggcgtgagac taccagcgg tgtctgttc 720
 gagatggccg ataaggacct gtttcagca gcgagattcc cggaatgcc tgagggatcg 780
 agcatctccg ctccaagcca aacttcagtg gacgtgagcc tgatccagga cgtggaacgg 840
 attctcgact actcgctgtg ccaggagacc tggtcgaaga tcagagcggg actgcccac 900
 tcaccggtgg acctgtccta cctggcgcca agaatecgg gcaactggacc ggcgttcacc 960
 atcatcaacg gcaccctcaa atacttcgag acgcggtaca tccgggtgga catcgagct 1020
 ccgatcctct cccggatggg gggaatgatc tcggggacta ctaccgaac cgagctctgg 1080
 gacgactggg caccttacga ggatgtcgag atcgaccta acggagtgt cggacctcc 1140
 tccgggtaca agttccctct gtacatgatc ggccatggca tgctggactc ggatctgcat 1200
 ctgtcgtcca aagcacaggt gtttgaacac ccacacattc aagacgccgc cagccagctg 1260
 ccggacgatg agtcgctgtt cttcggagac acgggcttgt caaagaatcc catcgagctg 1320
 gtggaaggat ggttttcatc ctggaaaagc agcatcgctt cattcttctt catcattggc 1380
 ctgatcatcg gcctatttct agtcctgcgg gtgggaattc atctgtgcat caagctcaag 1440
 cacactaaga agcggcaa atctacactgat atcgagatga atgcctggg caagtag 1497

<210> 101

<211> 498

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-058突变VSV-G

<400> 101

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

				85					90					95			
Glu	Ser	Ile	Glu	Gln	Thr	Lys	Gln	Gly	Thr	Trp	Leu	Asn	Pro	Gly	Phe		
			100					105					110				
Pro	Pro	Gln	Ser	Cys	Gly	Tyr	Ala	Thr	Val	Thr	Asp	Ala	Glu	Ala	Val		
		115					120					125					
Ile	Val	Gln	Val	Thr	Pro	His	His	Val	Leu	Val	Asp	Glu	Tyr	Thr	Gly		
	130					135					140						
Glu	Trp	Val	Asp	Ser	Gln	Phe	Ile	Asn	Gly	Lys	Cys	Ser	Asn	Tyr	Ile		
145					150				155					160			
Cys	Pro	Thr	Val	His	Asn	Ser	Thr	Thr	Trp	His	Ser	Asp	Tyr	Lys	Val		
			165					170				175					
Lys	Gly	Leu	Cys	Asp	Ser	Asn	Leu	Ile	Ser	Met	Asp	Ile	Thr	Phe	Phe		
		180					185				190						
Ser	Glu	Asp	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu	Gly	Thr	Gly	Phe		
	195					200					205						
Arg	Ser	Asn	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Glu	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Cys	Lys	Met		
	210					215					220						
Gln	Tyr	Cys	Lys	His	Trp	Gly	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Trp	Phe		
225				230					235					240			
Glu	Met	Ala	Asp	Lys	Asp	Leu	Phe	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Pro	Glu	Cys		
			245					250			255						
Pro	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Pro	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Asp	Val		
		260						265				270					
Ser	Leu	Ile	Gln	Asp	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Asp	Tyr	Ser	Leu	Cys	Gln		
	275						280				285						
Glu	Thr	Trp	Ser	Lys	Ile	Arg	Ala	Gly	Leu	Pro	Ile	Ser	Pro	Val	Asp		
	290					295					300						
Leu	Ser	Tyr	Leu	Ala	Pro	Lys	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Pro	Ala	Phe	Thr		
305				310					315					320			
Ile	Ile	Asn	Gly	Thr	Leu	Lys	Tyr	Phe	Glu	Thr	Arg	Tyr	Ile	Arg	Val		
			325					330				335					
Asp	Ile	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Arg	Met	Val	Gly	Met	Ile	Ser	Gly		
		340						345				350					
Thr	Thr	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Trp	Asp	Asp	Trp	Ala	Pro	Tyr	Glu	Asp		
		355					360					365					
Val	Glu	Ile	Gly	Pro	Asn	Gly	Val	Leu	Arg	Thr	Ser	Ser	Gly	Tyr	Lys		
	370					375					380						
Phe	Pro	Leu	Tyr	Met	Ile	Gly	His	Gly	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Leu	His		
385				390					395					400			

Leu Ser Ser Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala		
405	410	415
Ala Ser Gln Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly		
420	425	430
Leu Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp		
435	440	445
Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly		
450	455	460
Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys		
465	470	475
His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu		
485	490	495

Gly Lys

<210> 102

<211> 1506

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-061突变VSV-G

<400> 102

```

aagttcacta tcgtgtttcc gcacggcgga agcaacggcg ggagccaaaa gggcaactgg 60
aaaaacgtgc cttcaaatta ccattattgc cccagcagct cggacctgaa ctggcacaaat 120
gacctcattg gaaccgcgct gcaggtgaag atgccaaaga gccacaaggc tatccaggct 180
gacggatgga tgtgccacgc gtcaaaatgg gtgactacct gcgatttccg ctggtacgga 240
ccaaaataca tcacgcacag catcagatca ttcaccccggt cagtggaaca atgcaaagaa 300
tccatcgaac agactaagca gggaacctgg ctgaacctg gatttccgcc gcagtcgtgt 360
gggtacgcaa ccgtgaccga tgcagaggcc gtgatcgtgc aagtcacgcc gcatcacgtg 420
cttgtggacg agtacaccgg agaatgggtc gattcccagt tcatcaacgg caagtgtcc 480
aactacatatt gcccaaccgt gcacaacagc actacttggc acagcgacta caaagtgaag 540
ggctctgtgtg attccaacct gatctccatg gatatactt tcttctcgga agacggcgaa 600
ctgtcctcac tgggcaaaga aggaactggg tttcgtcaa attacttcgc ctacgaaact 660
ggaggaaaaag cctgcaagat gcagtactgc aagcactggg gcgtgagact acccagcgg 720
gtctggttcg agatggccga taaggacctg tttgcagcag cgagattccc ggaatgccct 780
gagggatcga gcatctccgc tccaagccaa acttcagtgg acgtgagcct gatccaggac 840
gtggaacgga ttctcgacta ctcgctgtgc caggagacct ggtcgaagat cagagcggga 900
ctgcccattc caccggtgga cctgtcctac ctggcgccaa agaattccggg cactggaccg 960
gcgttcacca tcatcaacgg caccctcaaa tacttcgaga cgcggtacat ccgggtggac 1020
atcgcagctc cgatcctctc ccggtatggtg ggaatgatct cggggactac taccgaacgc 1080
gagctctggg acgactgggc accttacgag gatgtcgaga tcggacctaa cggagtgtct 1140

```

cggacctcct ccgggtacaa gttccctctg tacatgatcg gccatggcat gctggactcg 1200
 gatctgcatc tgtcgtccaa agcacagggtg tttgaacacc cacacattca agacgccgcc 1260
 agccagctgc cggacgatga gtcgctgttc ttcgagaca cgggcttgtc aaagaatccc 1320
 atcgagctgg tggaaggatg gttttcatcc tggaaaagca gcatcgcttc attcttcttc 1380
 atcattggcc tgatcatcgg cctatttcta gtctgcggg tgggaattca tctgtgcatc 1440
 aagctcaagc acactaagaa gcggcaaadc tacactgata tcgagatgaa tcgcctgggc 1500
 aagtag 1506

<210> 103

<211> 501

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Trop-061突变VSV-G

<400> 103

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

195	200	205
Thr Gly Phe Arg Ser Asn Tyr	Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala	
210	215	220
Cys Lys Met Gln Tyr Cys Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly		
225	230	235
Val Trp Phe Glu Met Ala Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe		
245	250	255
Pro Glu Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser		
260	265	270
Val Asp Val Ser Leu Ile Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser		
275	280	285
Leu Cys Gln Glu Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser		
290	295	300
Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro		
305	310	315
Ala Phe Thr Ile Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr		
325	330	335
Ile Arg Val Asp Ile Ala Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met		
340	345	350
Ile Ser Gly Thr Thr Thr Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro		
355	360	365
Tyr Glu Asp Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser		
370	375	380
Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Leu His Leu Ser Ser Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile		
405	410	415
Gln Asp Ala Ala Ser Gln Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly		
420	425	430
Asp Thr Gly Leu Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe		
435	440	445
Ser Ser Trp Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu		
450	455	460
Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile		
465	470	475
Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met		
485	490	495
Asn Arg Leu Gly Lys		
500		

<210> 104

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PDGFR茎

<400> 104

Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu

1 5 10 15

Pro Phe Lys

<210> 105

<211> 49

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PDGFR茎

<400> 105

Ala Ser Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro

1 5 10 15

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ala

20 25 30

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala

35 40 45

Lys

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 柔性接头

<400> 106

Gly Ala Pro Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala

1 5 10 15

Ser

<210> 107

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IgG4铰链结构域

<400> 107

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Val Gly Gln
1 5 10 15
Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu Pro Phe Lys
 20 25 30

<210> 108

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 四聚体卷曲螺旋接头

<400> 108

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Glu Leu Ala Ala Ile Lys Gln Glu
1 5 10 15
Leu Ala Ala Ile Lys Lys Glu Leu Ala Ala Ile Lys Trp Glu Leu Ala
 20 25 30
Ala Ile Lys Gln Gly Ala Gly
 35

<210> 109

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 二聚体卷曲螺旋接头

<400> 109

Ala Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig κ前导序列

<400> 110

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly
 20

<210> 111

<400> 111

000

<210> 112

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (12F6) 重链可变区

<400> 112

caagtgcagc tccagcagag cggcgctgag ctggcccggc ccggcgccag cgtgaagatg 60
 agctgtaaag ccagcggcta tacatttacc agctacacca tgcactgggt caagcagcgg 120
 cctggccagg gcctggaatg gattggatat atcaacccca gcagcggcta caccaagtac 180
 aaccagaaat tcaaggacaa ggccaccctg accgccgaca agagctctc aacagcctac 240
 atgcaactga gcagcctgac cagcgaggat agcgccgtgt actactgcgc cagatggcag 300
 gactacgacg tgtacttcga ctactggggc caaggcacia cactgaccgt gtccagc 357

<210> 113

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (12F6) 重链可变区

<400> 113

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

<210> 114

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (12F6)轻链可变区

<400> 114

cagatcgtgc tgagccagtc cccagccatc ctgtctgccg gccctggcga gaaggtgacc 60
atgacctgca gagcctcttc ttctgtttcc tacatgcact ggtatcagca aaagcccggc 120
agctctccta agccttggat ctacgccaca agcaacctgg ctagcggcgt gcctgctcgc 180
ttcagcggca gcggcagcgg caccagctac agcctgacca tcagcagagt ggaagccgag 240
gacgccgcca cctactactg ccagcagtgg tcctctaate ctccaacatt cggcggcggc 300
accaagctgg aaacccaaaag a 321

<210> 115

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (12F6)轻链可变区

<400> 115

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

<210> 116

<211> 996

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (12F6)全分子

<400> 116

```

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccgcaagtgc agctccagca gagcggcgct gagctggccc ggcccggcgc cagcgtgaag 120
atgagctgta aagccagcgg ctatacattt accagctaca ccatgcaactg ggtcaagcag 180
cggcctggcc agggcctgga atggattgga tatatcaacc ccagcagcgg ctacaccaag 240
tacaaccaga aattcaagga caaggccacc ctgaccgccg acaagagctc ctcaacagcc 300
tacatgcaac tgagcagcct gaccagcgag gatagcgccg tgtactactg cgccagatgg 360
caggactacg acgtgtactt cgactactgg ggccaaggca caaactgac cgtgtccagc 420
ggaggcggta gtggcggtgg atcaggtgga ggcagcgggtg gcggatctca gatcgtgctg 480
agccagtccc cagccatcct gtctgccagc cctggcgaga aggtgacat gacctgcaga 540
gcctcttctt ctgtttccta catgcaactgg tatcagcaaa agcccggcag ctctcctaag 600
ccttggatct acgccacaag caacctggtt agcggcgctgc ctgctcgctt cagcggcagc 660
ggcagcggca ccagctacag cctgaccatc agcagagtgg aagccgagga cgccgccacc 720
tactactgcc agcagtggtc ctctaatacct ccaacattcg gcggcggcac caagctggaa 780
accaaaagaa ccactacacc agcacctaga ccaccaacac ctgcgccaac catcgcatcg 840
cagccactgt ctctgcgccc agaggcatgc cggccagcag ctggggggcgc agtgcacaca 900
agggggctgg acttcgcatg tgatatctac atctgggcac cattggcagg gacttgtggg 960
gtccttctcc tgtcactggt tatcaccctt tactgc 996

```

<210> 117

<211> 332

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD3 (12F6)全分子

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (21)

<223> 信号肽

<400> 117

```

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 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
           20           25           30
Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
           35           40           45
Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln
           50           55           60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys

```

65	70	75	80
Tyr Asn Gln Lys Phe	Lys Asp Lys Ala Thr	Leu Thr Ala Asp	Lys Ser
85	90	95	
Ser Ser Thr Ala Tyr	Met Gln Leu Ser	Ser Leu Thr Ser	Glu Asp Ser
100	105	110	
Ala Val Tyr Tyr Cys	Ala Arg Trp Gln	Asp Tyr Asp Val	Tyr Phe Asp
115	120	125	
Tyr Trp Gly Gln Gly	Thr Thr Leu Thr	Val Ser Ser Gly	Gly Gly Ser
130	135	140	
Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Ser Gln	Ile Val Leu
145	150	155	160
Ser Gln Ser Pro Ala	Ile Leu Ser Ala	Ser Pro Gly Glu	Lys Val Thr
165	170	175	
Met Thr Cys Arg Ala	Ser Ser Ser Val	Ser Tyr Met His	Trp Tyr Gln
180	185	190	
Gln Lys Pro Gly Ser	Ser Pro Lys Pro	Trp Ile Tyr Ala	Thr Ser Asn
195	200	205	
Leu Ala Ser Gly Val	Pro Ala Arg Phe	Ser Gly Ser Gly	Ser Gly Thr
210	215	220	
Ser Tyr Ser Leu Thr	Ile Ser Arg Val	Glu Ala Glu Asp	Ala Ala Thr
225	230	235	240
Tyr Tyr Cys Gln Gln	Trp Ser Ser Asn	Pro Pro Thr Phe	Gly Gly Gly
245	250	255	
Thr Lys Leu Glu Thr	Lys Arg Thr Thr	Thr Pro Ala Pro	Arg Pro Pro
260	265	270	
Thr Pro Ala Pro Thr	Ile Ala Ser Gln	Pro Leu Ser Leu	Arg Pro Glu
275	280	285	
Ala Cys Arg Pro Ala	Ala Gly Gly Ala	Val His Thr Arg	Gly Leu Asp
290	295	300	
Phe Ala Cys Asp Ile	Tyr Ile Trp Ala	Pro Leu Ala Gly	Thr Cys Gly
305	310	315	320
Val Leu Leu Leu Ser	Leu Val Ile Thr	Leu Tyr Cys	
325	330		

<210> 118

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IgG4铰链区

<400> 118

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1

5

10

<210> 119

<211> 207

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD8a铰链和跨膜

<400> 119

accacaacac ctgctccaag gccccccaca cccgctccaa ctatagccag ccaaccattg 60
agcctcagac ctgaagcttg caggcccgca gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg 120
gacttcgcgt gtgatattta tatttgggca cttttggccg gaacatgtgg ggtgttgctt 180
ctctcccttg tgatcactct gtattgt 207

<210> 120

<211> 126

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 4-1BB共刺激结构域

<400> 120

aagcgcgggga gaaagaagct cctgtacatc ttcaagcagc cttttatgcg acctgtgcaa 60
accactcagg aagaagatgg gtgttcatgc cgcttccccg aggaggaaga aggagggtgt 120
gaactg 126

<210> 121

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD3 ζ效应结构域#2

<400> 121

agggtgaaat tttctagaag cgccgatgct cccgcatac agcagggtca gaatcagctc 60
tacaatgaat tgaatctcgg caggcgagaa gactacgatg ttctggacaa gagacggggc 120
agggatcccc agatgggggg aaagccccgg agaaaaaatc ctcaggaggg gttgtacaat 180
gagctgcaga aggacaagat ggctgaagcc tatagcgaga tcggaatgaa aggcgaaaga 240
cgcagaggca aggggcatga cggctctgtac cagggtctct ctacagccac caaggacact 300
tatgatgcgt tgcatatgca agccttgcca cccgc 336

<210> 122

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD3 ζ效应结构域#2

<400> 122

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

<210> 123

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> B2M信号肽

<400> 123

Met	Ser	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser
1				5					10					15	
Gly	Leu	Glu	Ala												
			20												

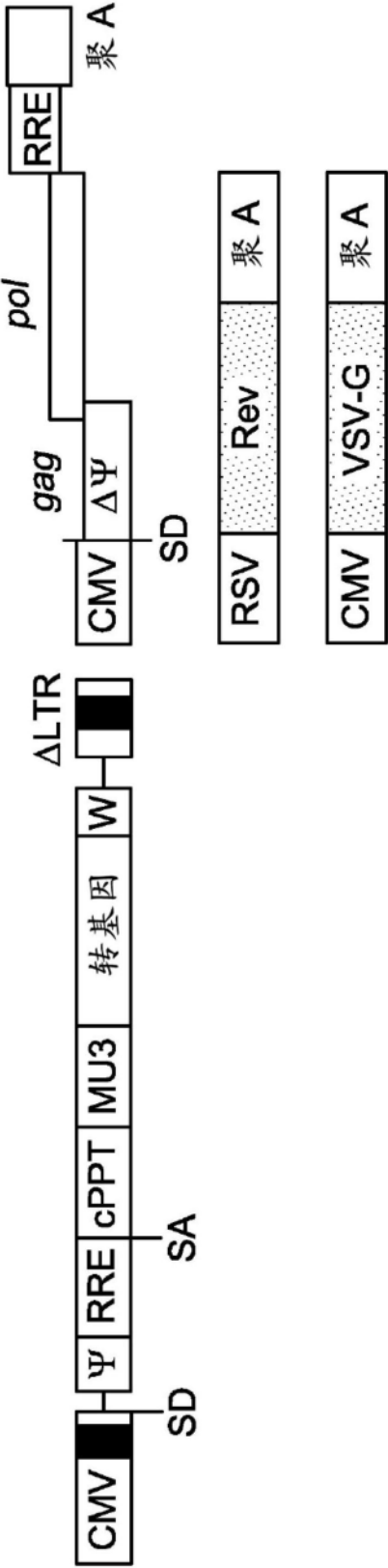
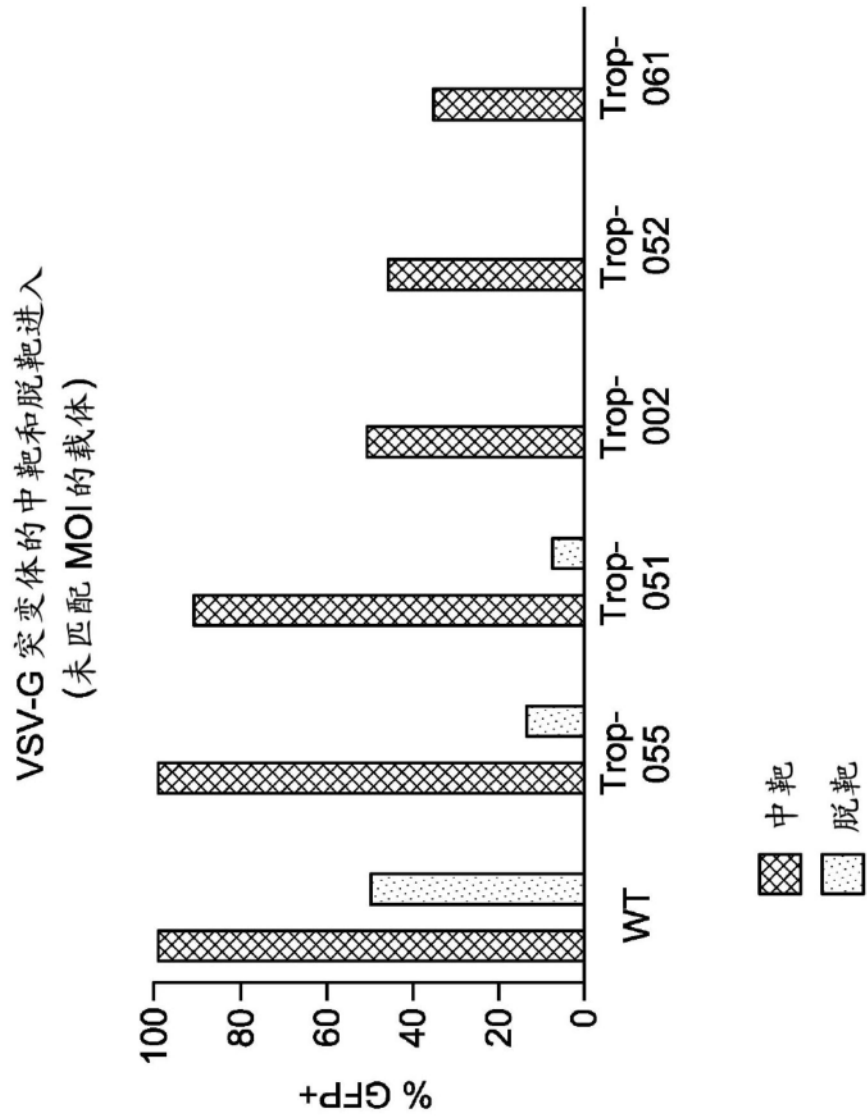


图1



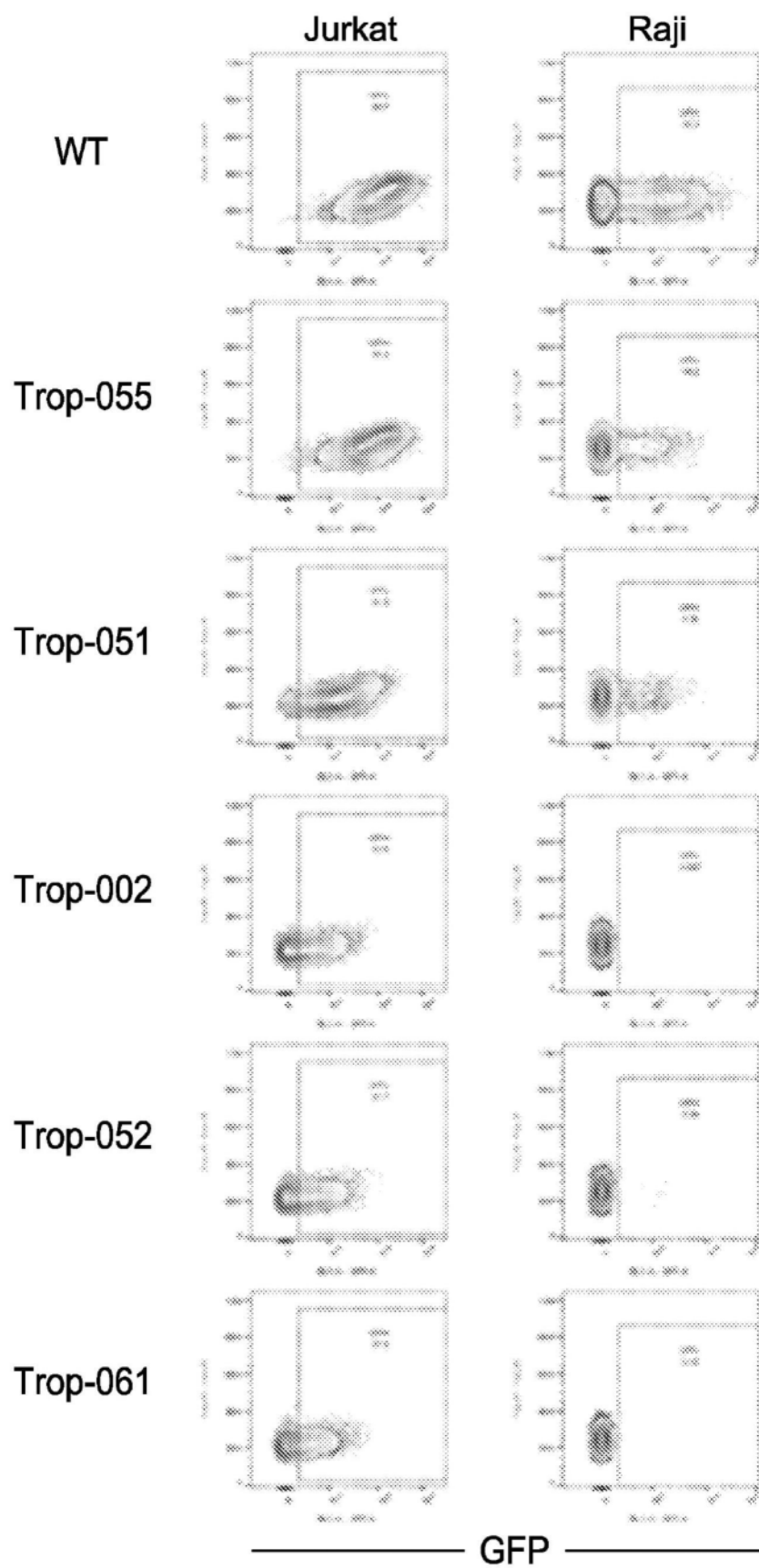


图2B

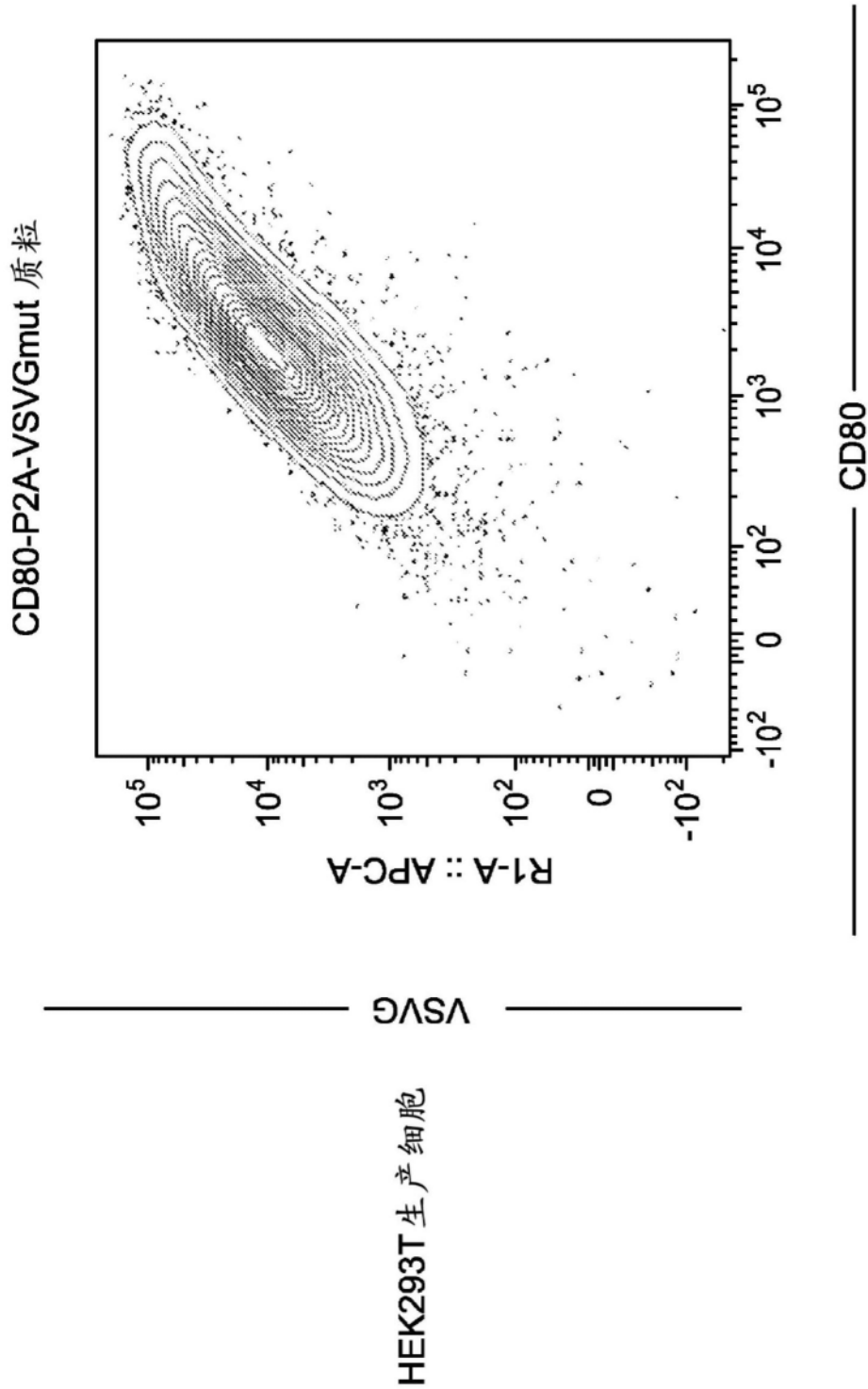


图3A

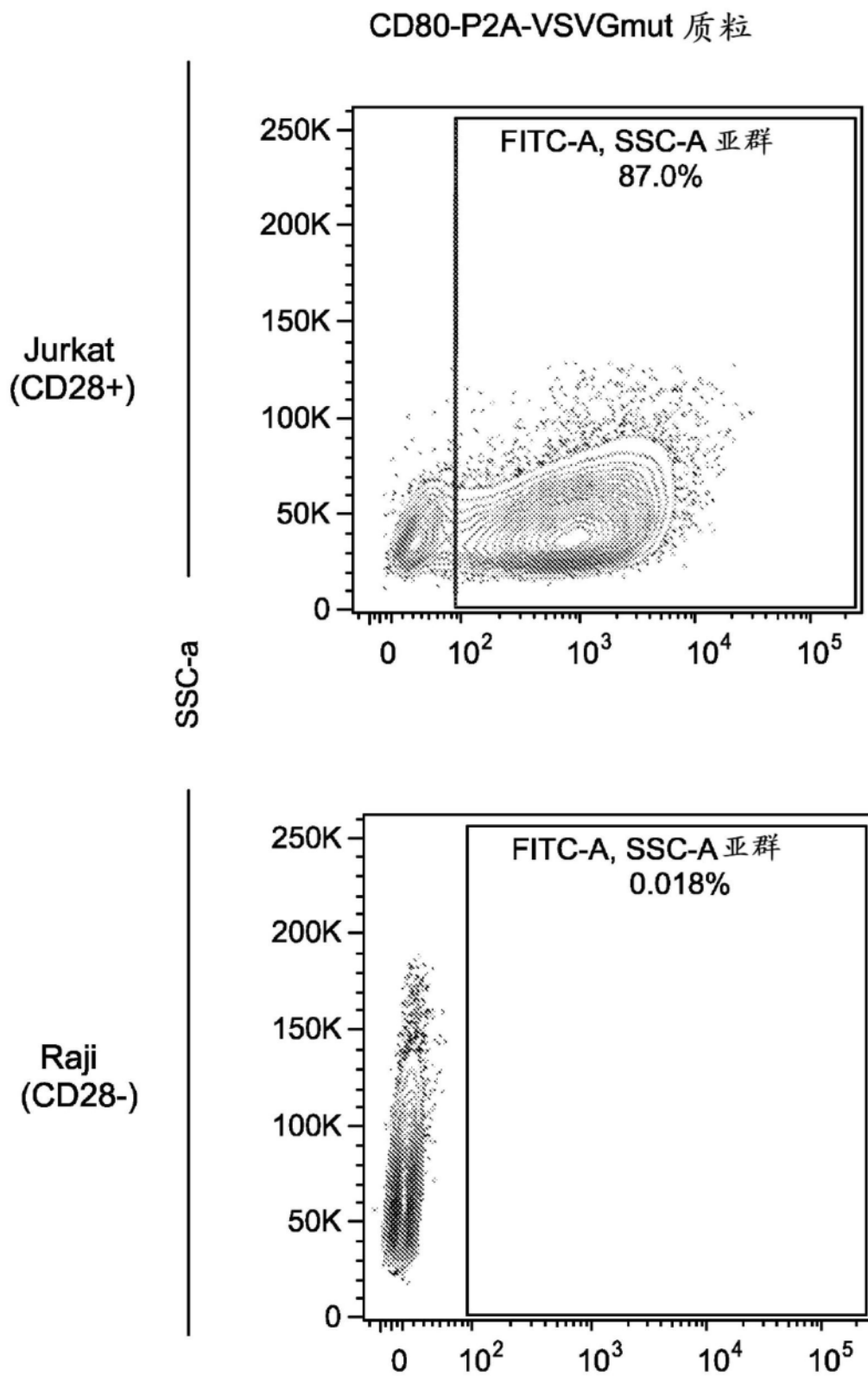


图3B

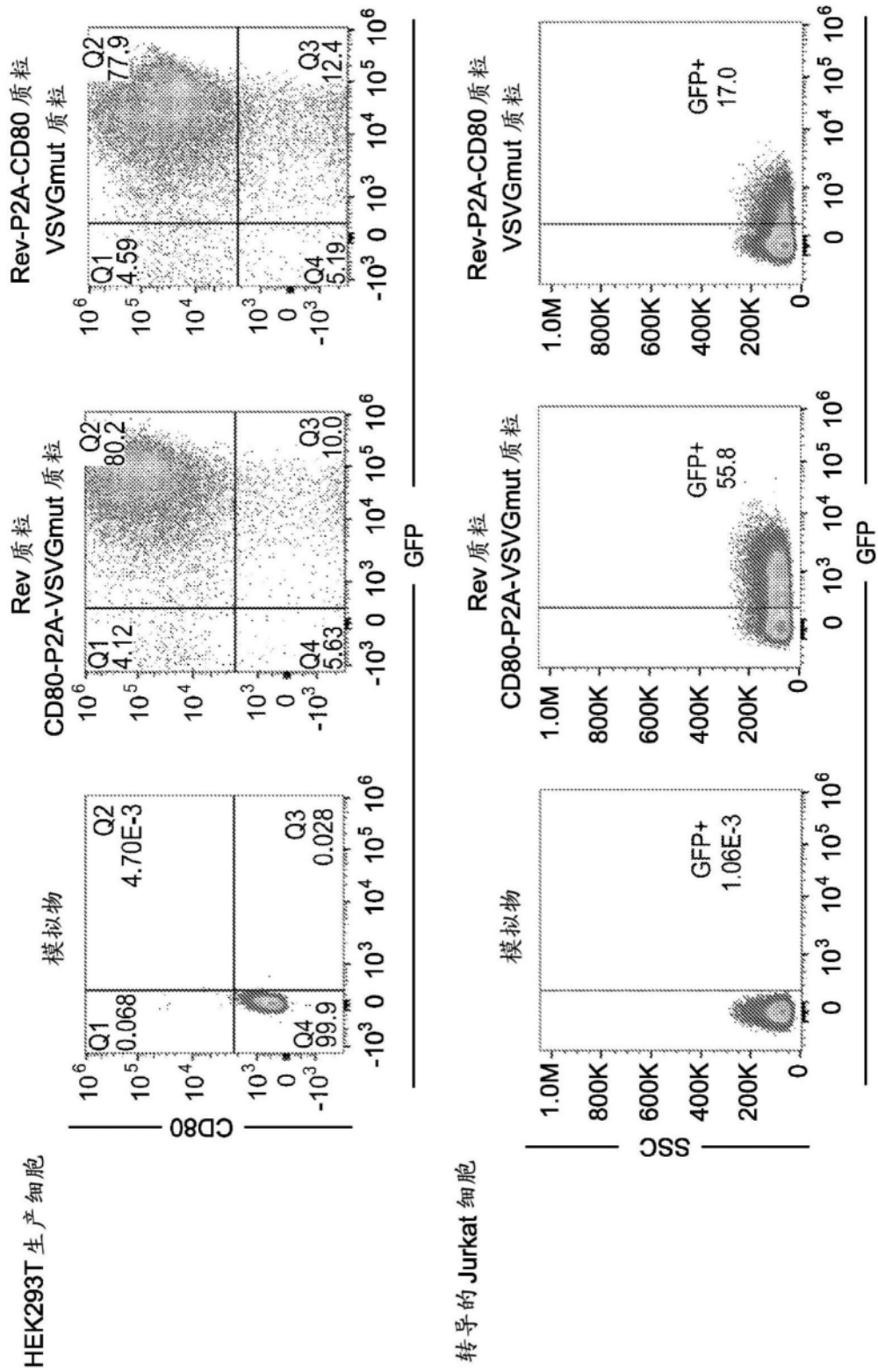


图4

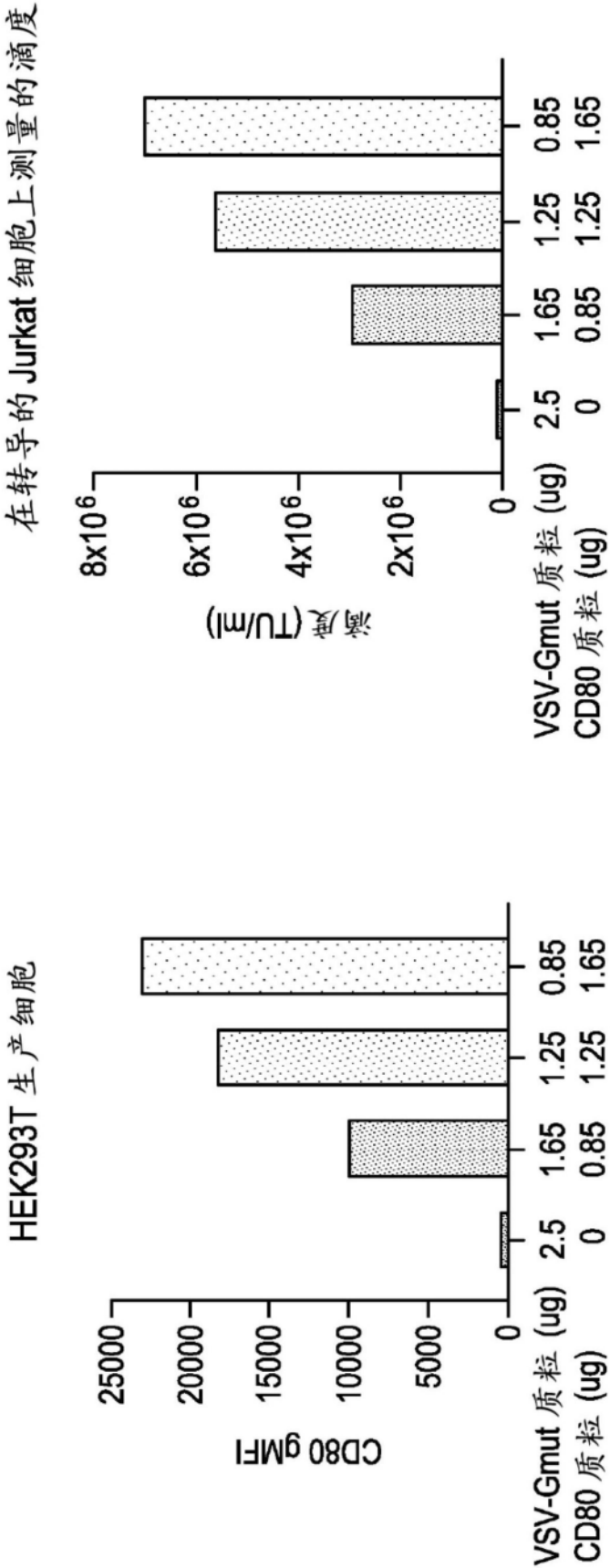


图5

重靶向LW产生
4和5质粒
贴壁并离心

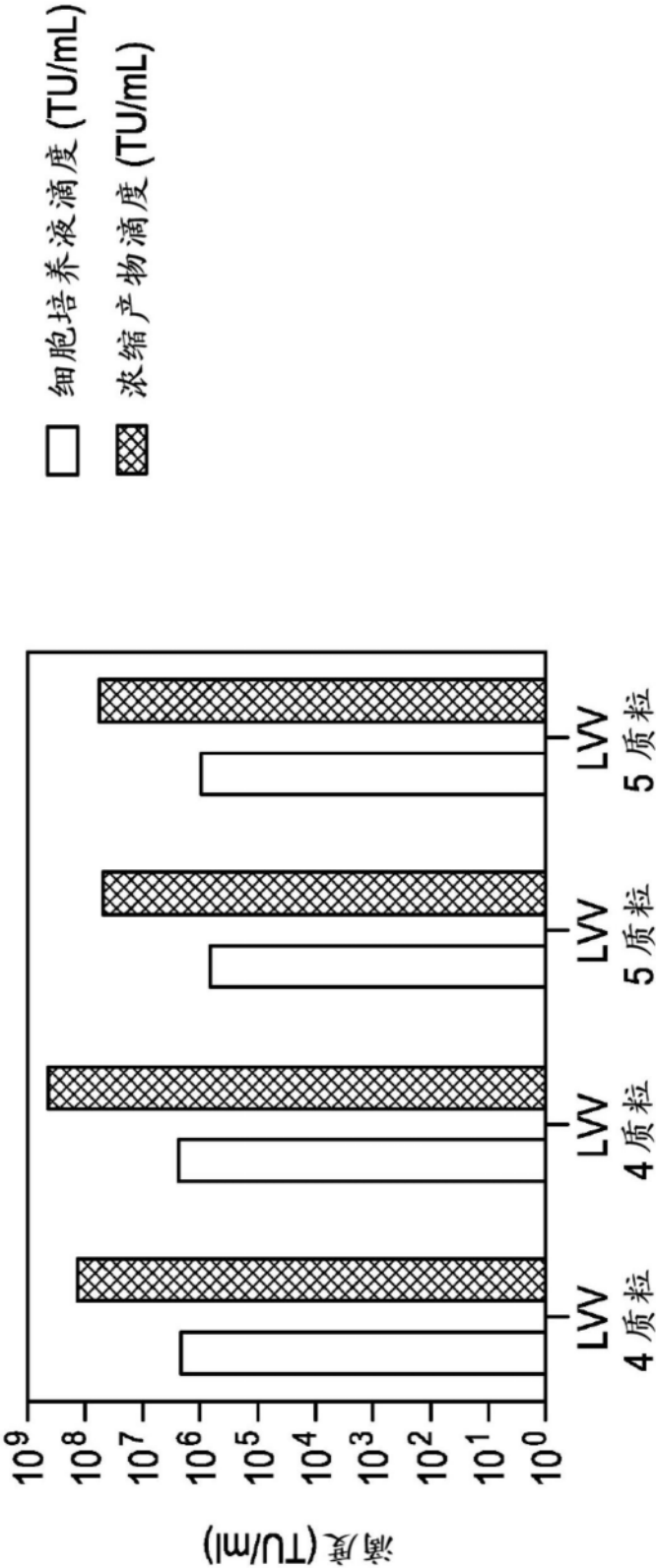


图6A

重靶向 LW 产生
4 和 5 质粒
贴壁并且 AEX 和 TFF

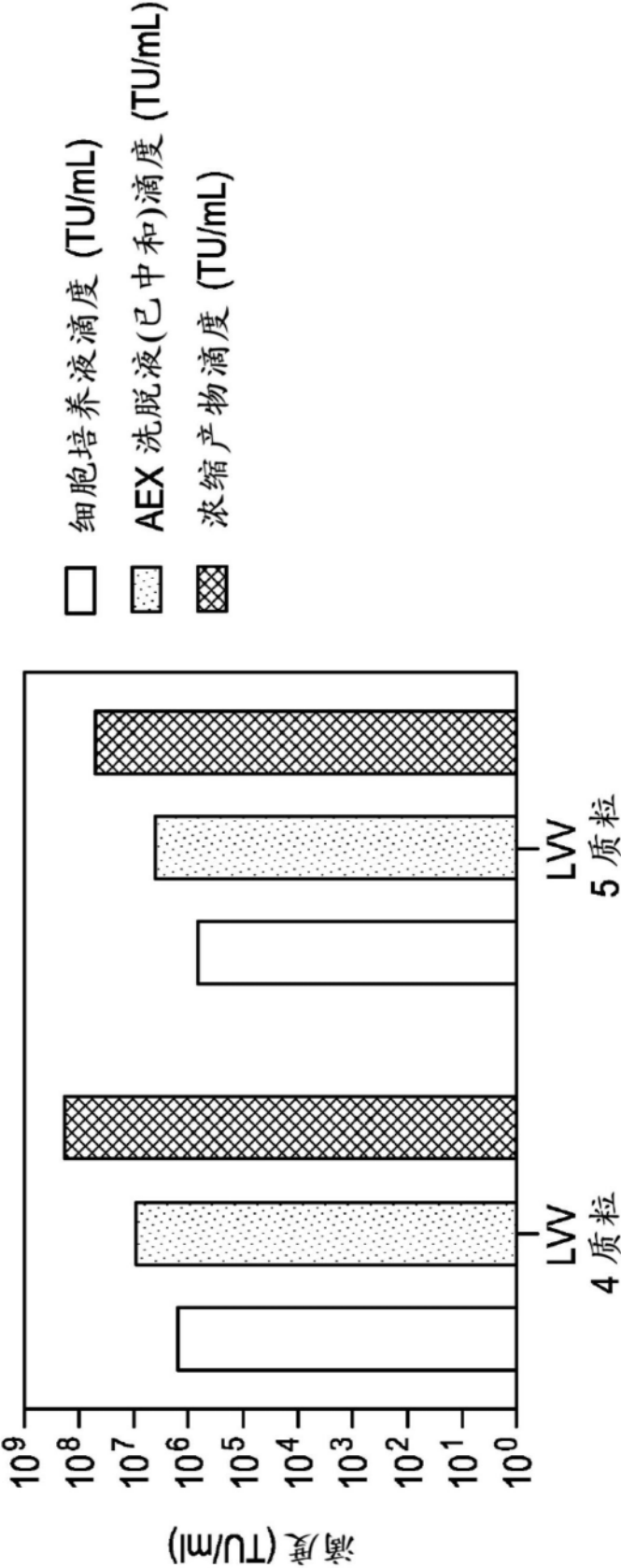


图6B

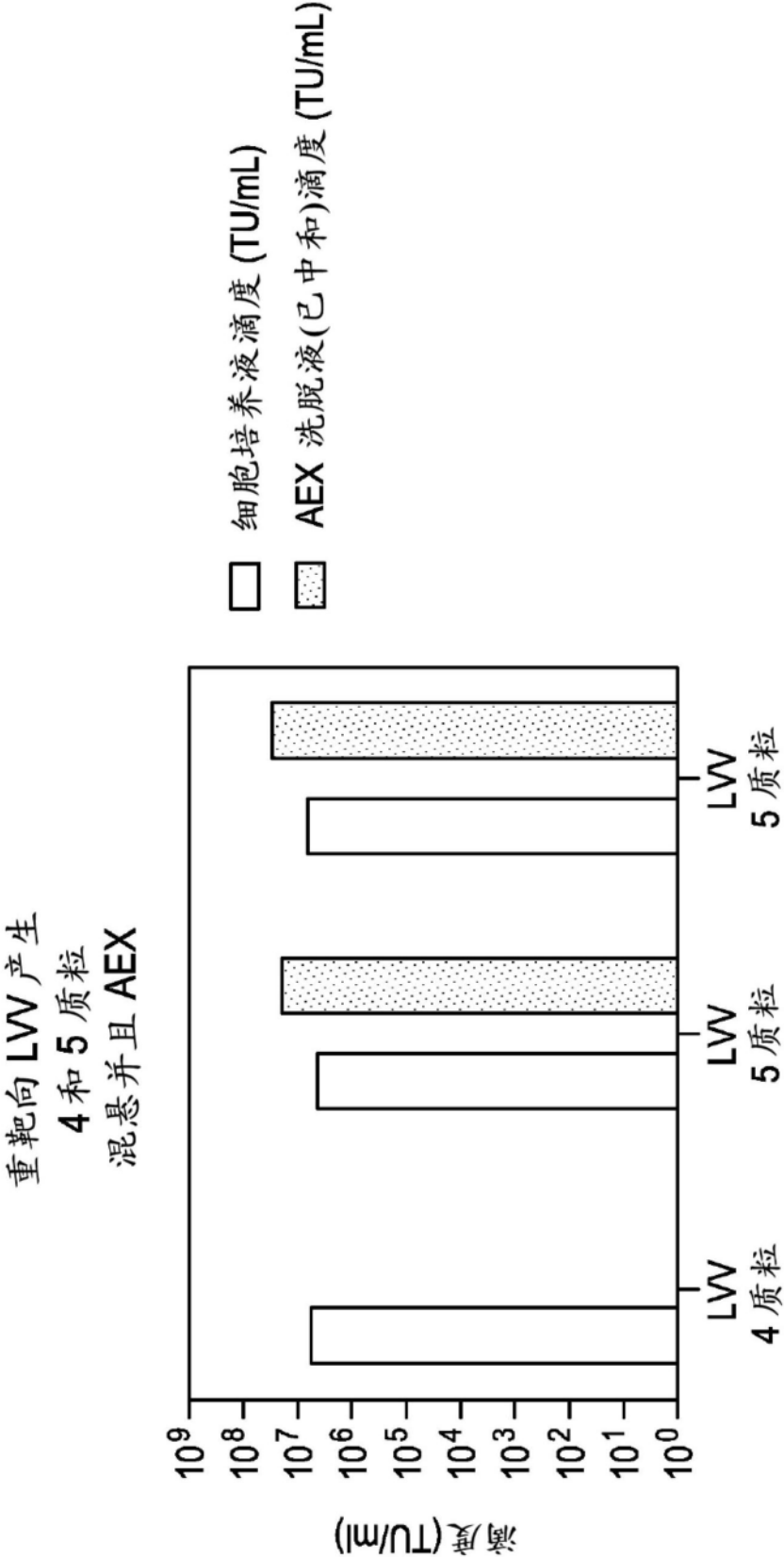


图6C

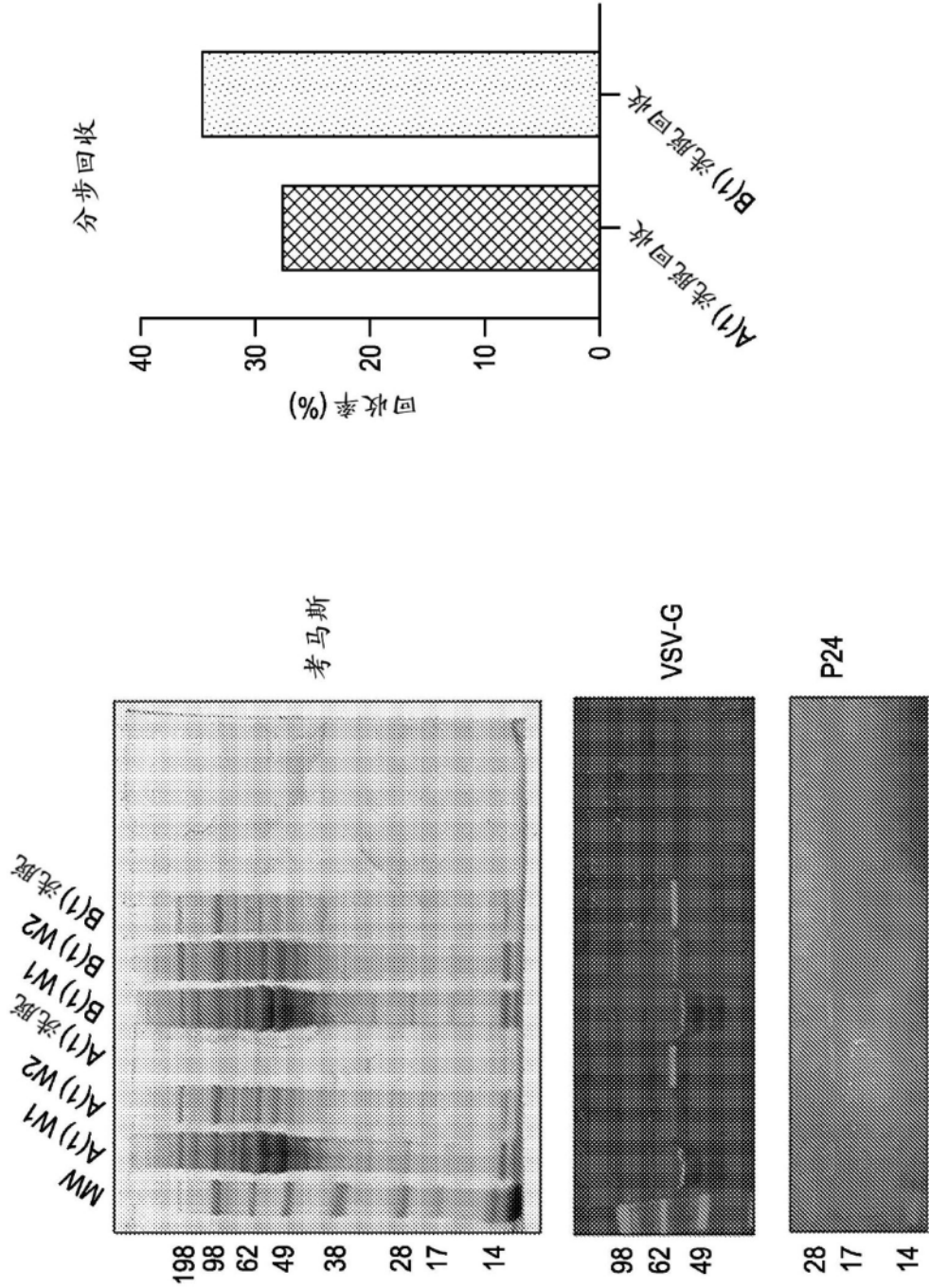


图6D

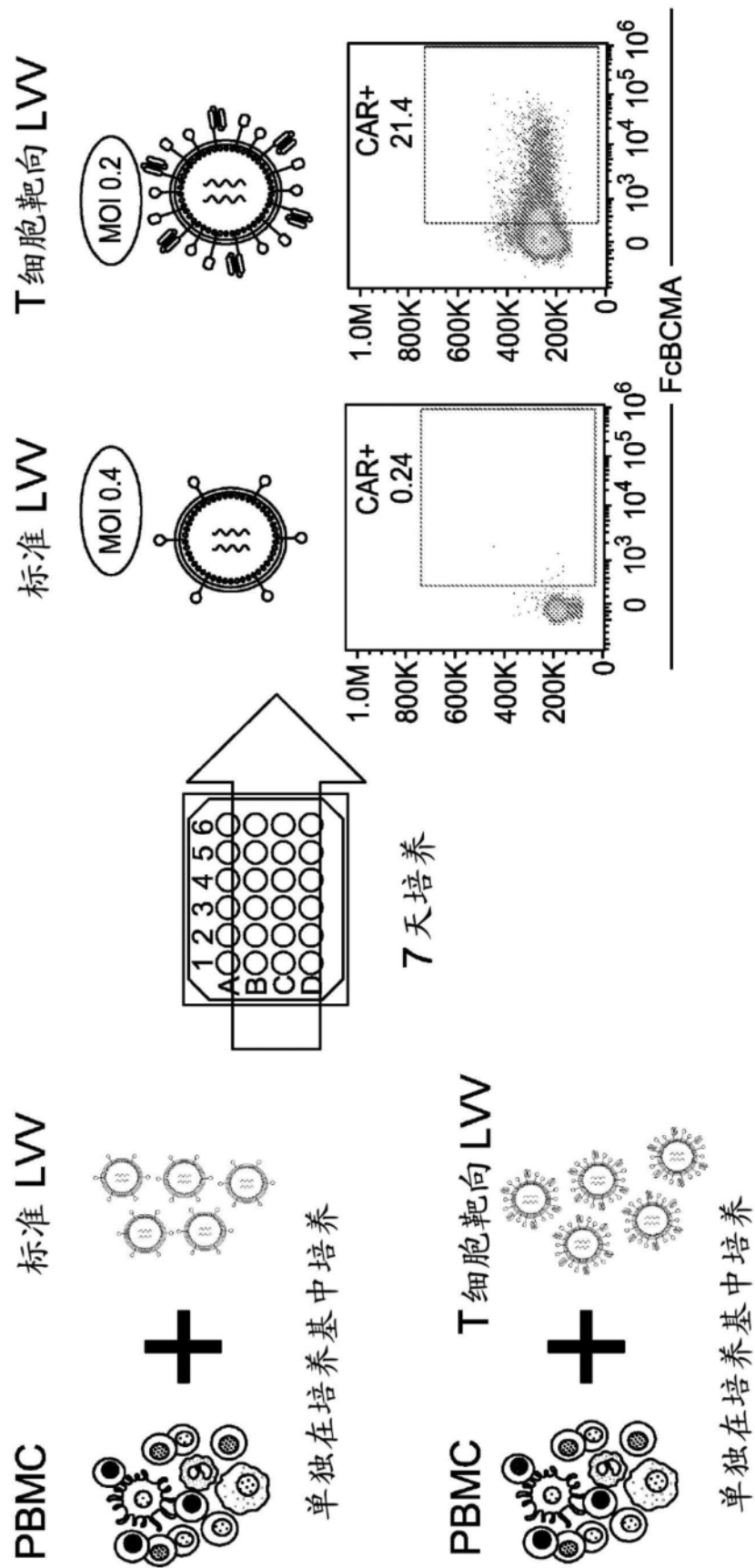


图7

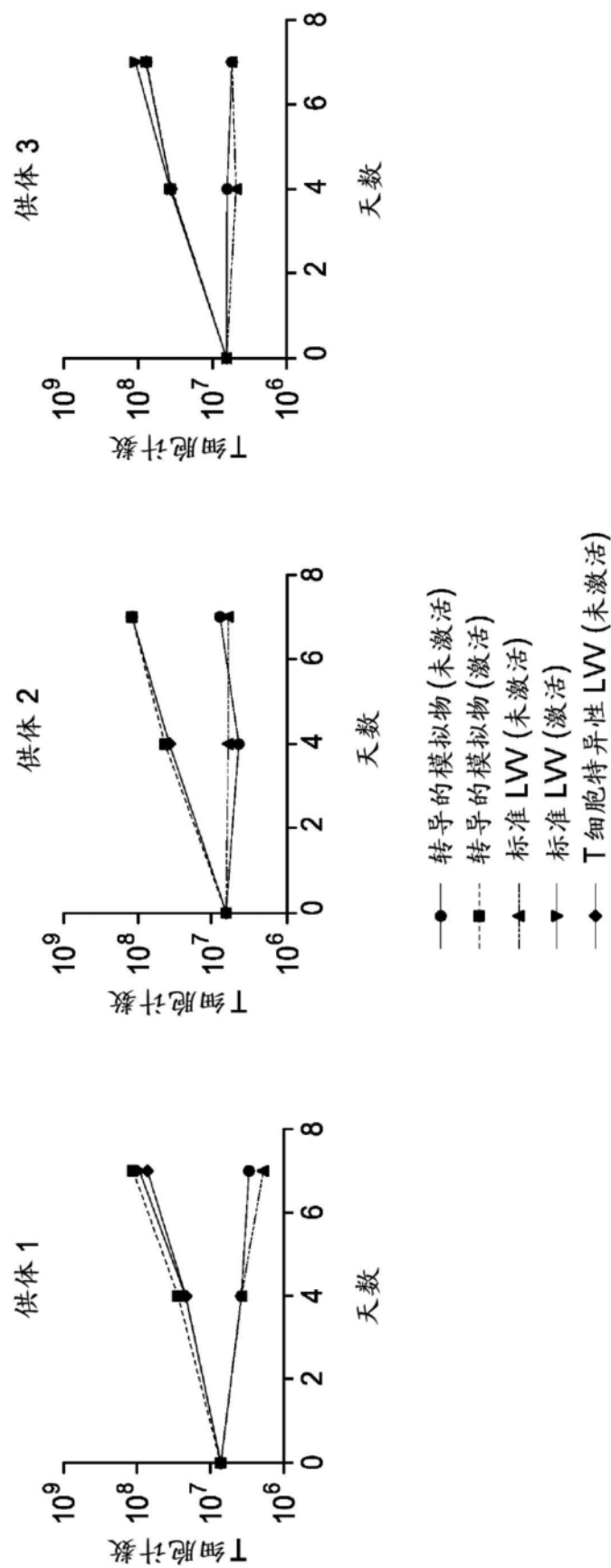


图8

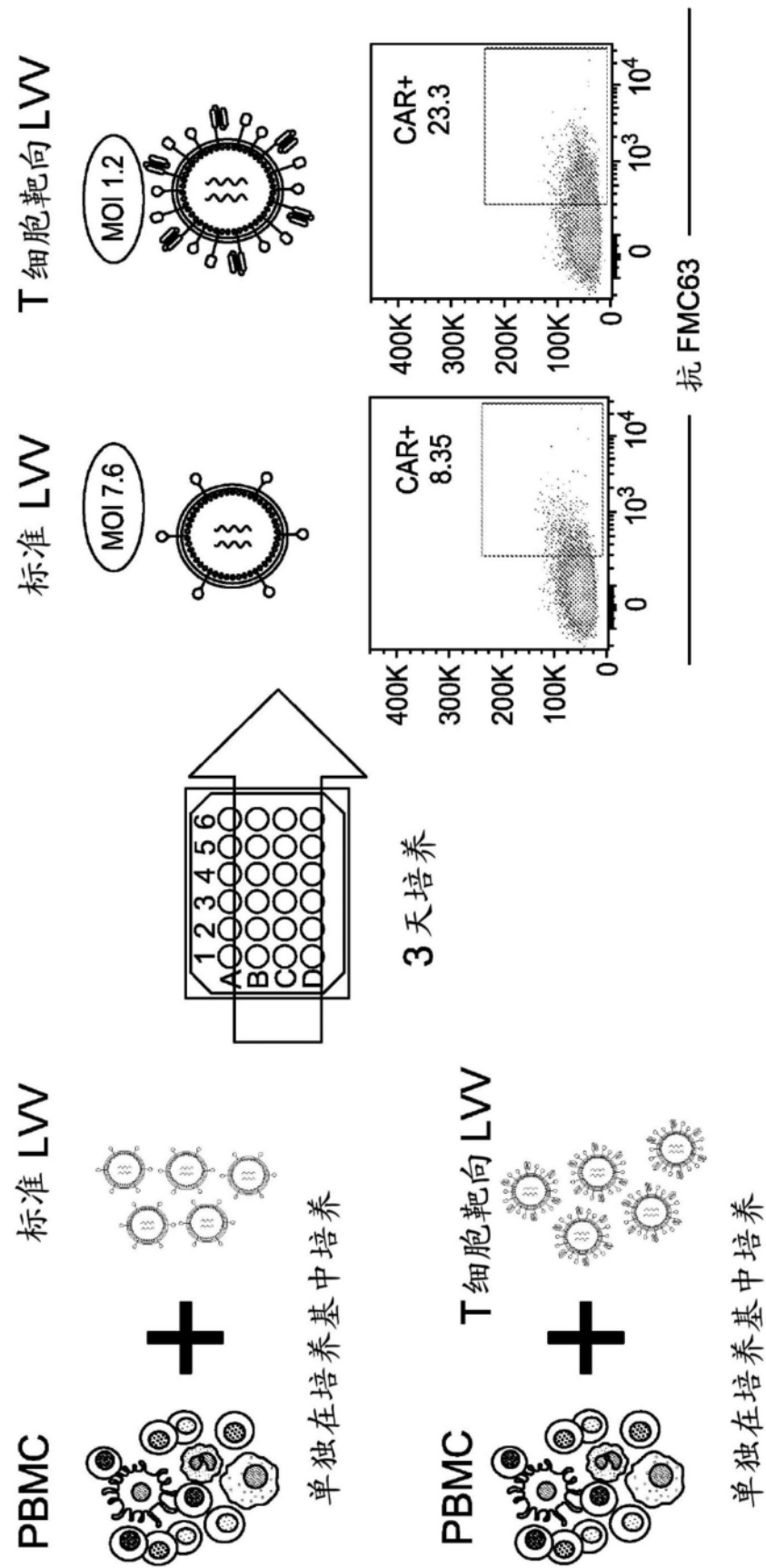


图9

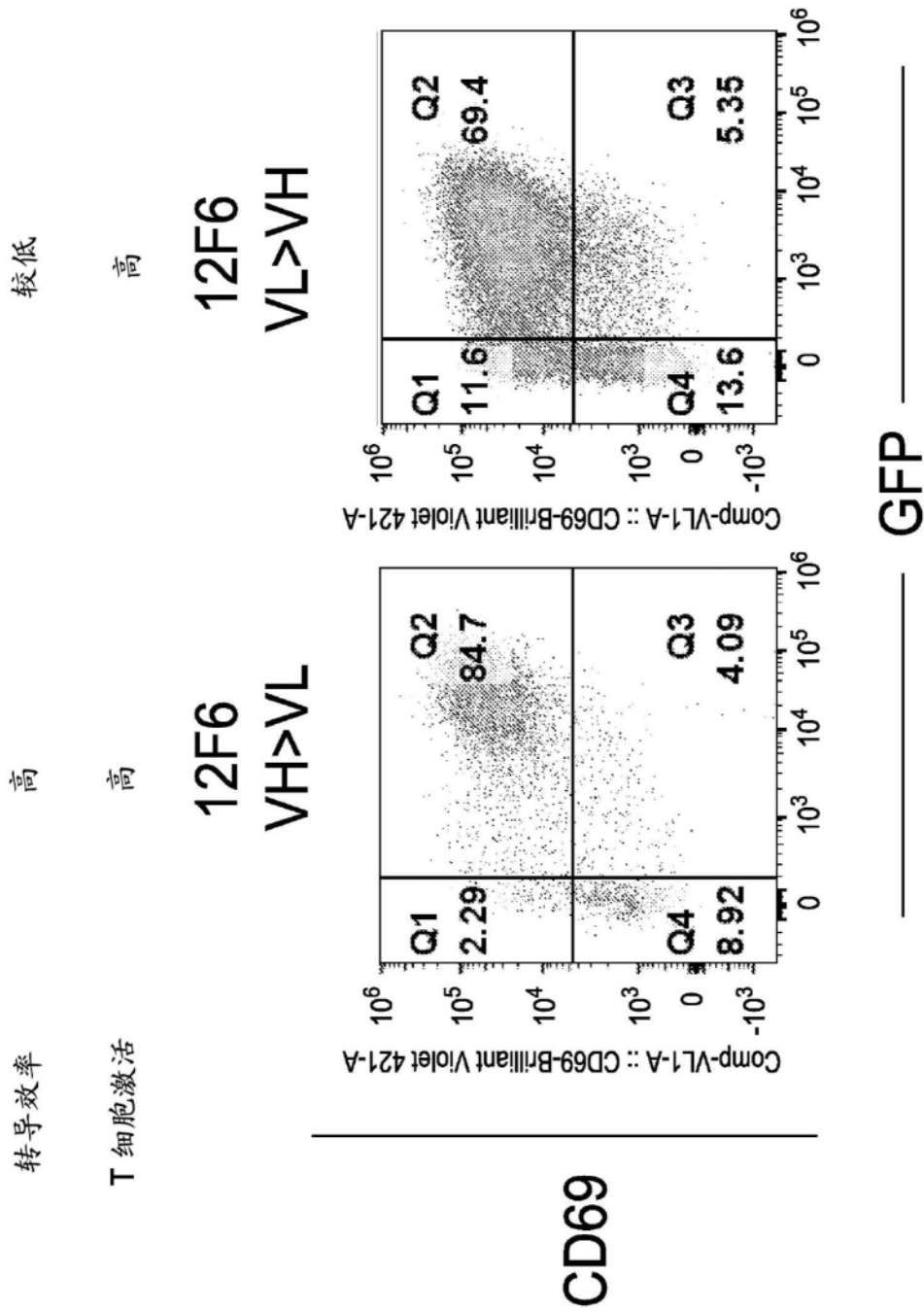


图10

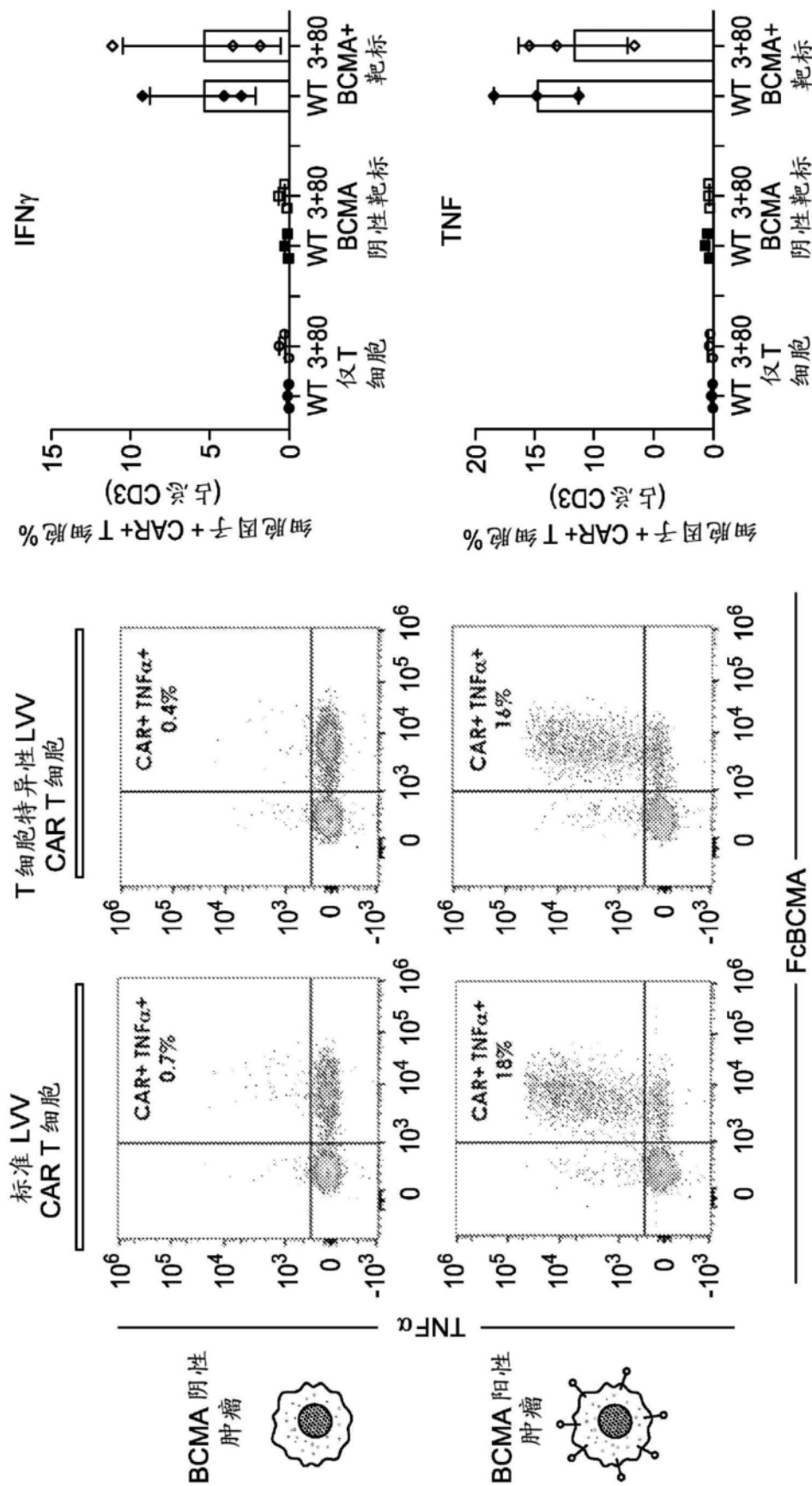


图11

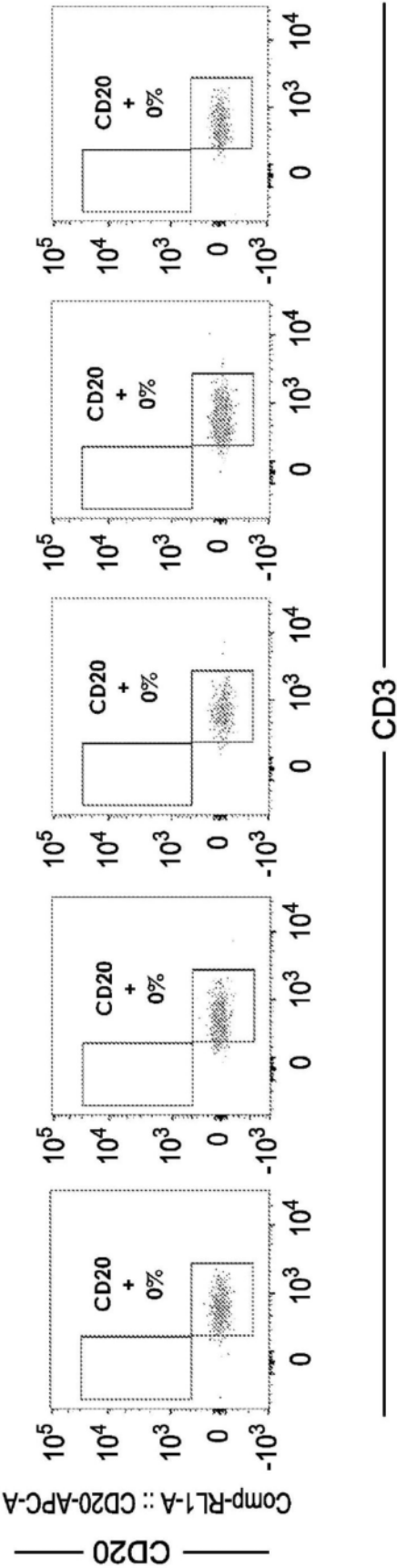


图12A

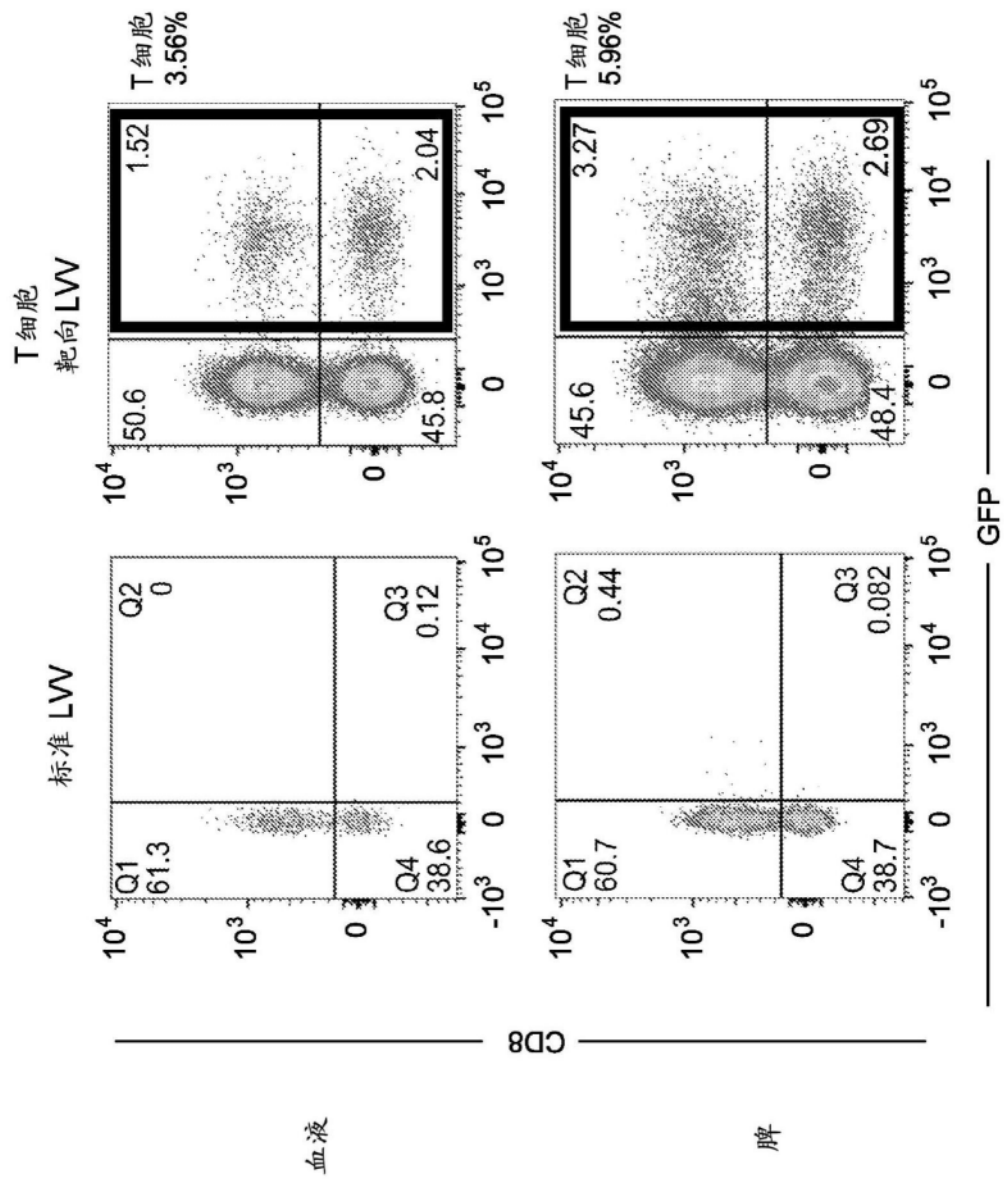


图12B

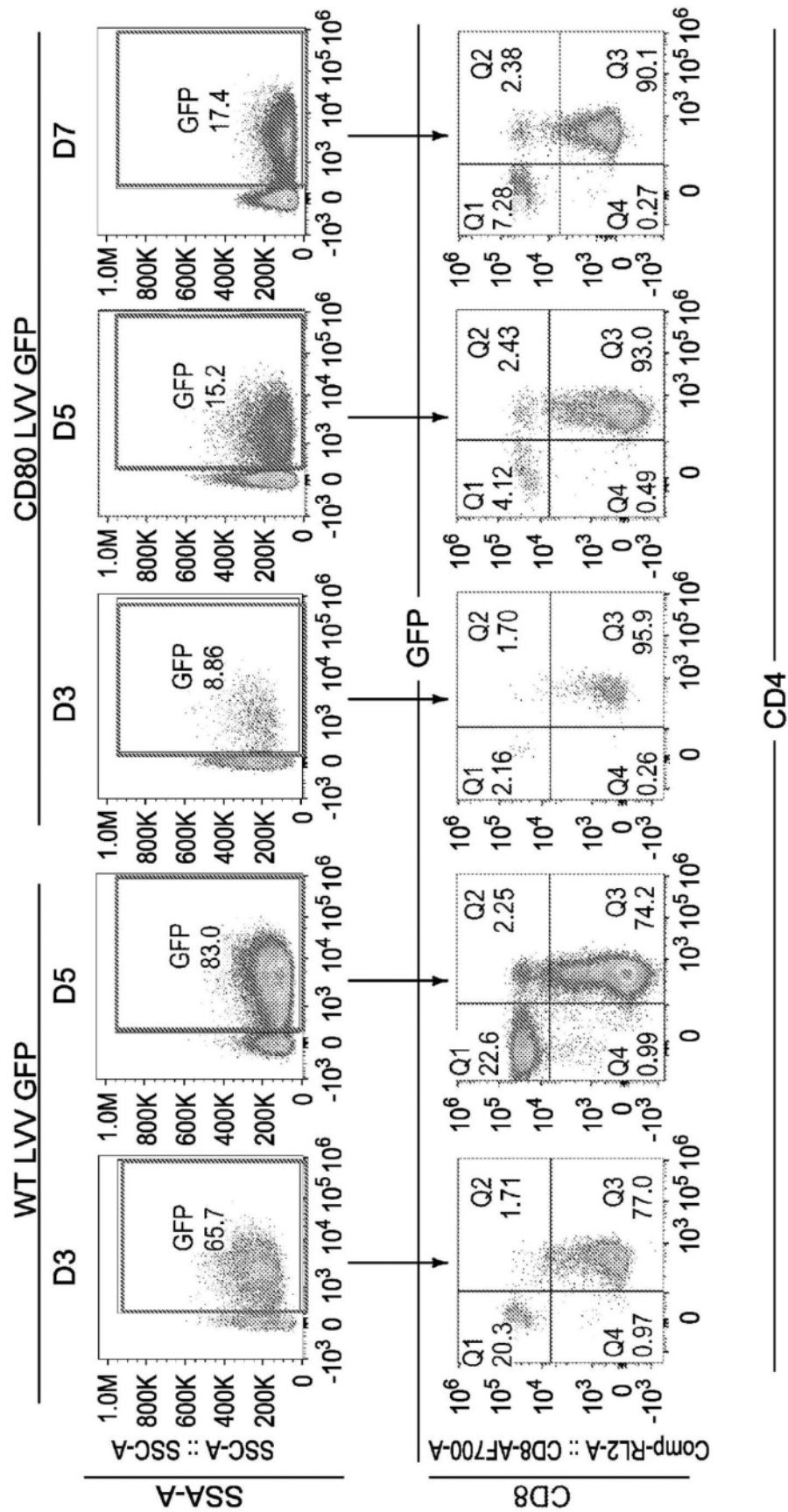


图13

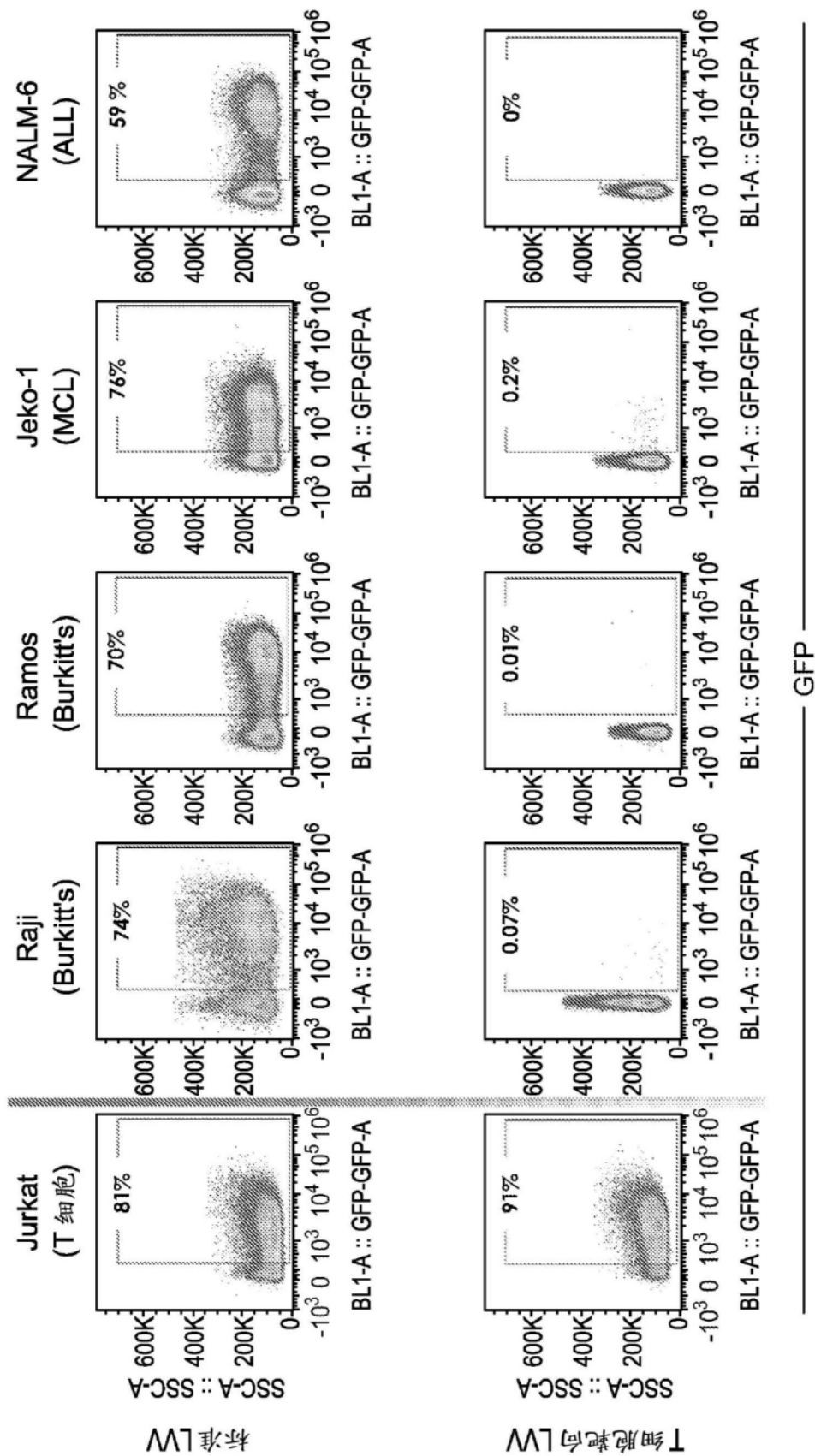


图14