(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108883100 B
(45)授权公告日 2022.11.25

(21)申请号 201780017712.6

(22)申请日 2017.01.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108883100 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(30)优先权数据
62/279,474 2016.01.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/013399 2017.01.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/123918 EN 2017.07.20

(73)专利权人 美国基因技术国际有限公司
地址 美国马里兰州

(72)发明人 C·D·保扎 李海山 T·拉胡森 刘美龄

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 陶启长 陈扬扬

(51)Int.Cl.
C12N 15/867(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 31/7105(2006.01)
A61K 31/675(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 31/10(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)
A61P 33/02(2006.01)
A61P 33/06(2006.01)
A61P 33/10(2006.01)

(56)对比文件
WO 2012/145624 A2,2012.10.26
WO 2008/025025 A2,2008.02.28
US 2015/0126580 A1,2015.05.07
US 2009/0148936 A1,2009.06.11
US 2013/0090371 A1,2013.04.11
US 2012/0027725 A1,2012.02.02
WO 2014117050 A2,2014.07.31
GOBER et al..Human T cell Receptor yb Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells.《Journal of Experimental Medicine》.2003,163-168. (续)

审查员 孙迎琪

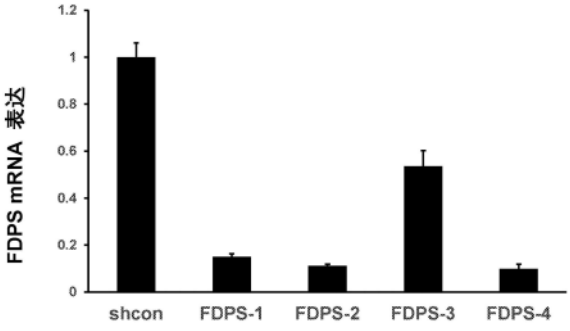
权利要求书3页 说明书65页
序列表49页 附图15页

(54)发明名称

用于活化γ-δT细胞的方法和组合物

(57)摘要

本发明一般涉及用于激活γδT细胞的基因治疗和免疫疗法的方法和组合物,特别是可用于治疗各种癌症和感染性疾病。



CN 108883100 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

THOMPSON et al..Alkylamines Cause Vy9V62 T-cell Activation and Proliferation by Inhibiting.《Blood》.2006, 651-654.

1.一种用于治疗甲羟戊酸途径相关病症的病毒载体,所述病毒载体包含:

a.至少一种编码的shRNA其能够抑制甲羟戊酸途径的酶的生产,所述酶是法尼基二磷酸合酶(FDPS),所述shRNA的序列选自下组:

i.GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTTT(SEQ ID NO:1);

ii.GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTTT(SEQ ID NO:2);

iii.GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCTGCCATGTACATGGCTTTTT(SEQ ID NO:3);或

iv.GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTT(SEQ ID NO:4);或

b.至少一种编码的microRNA,其能够抑制甲羟戊酸途径的酶的生产,所述酶是法尼基二磷酸合酶(FDPS),所述microRNA的序列选自下组:

i.AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(SEQ ID NO:5);

ii.AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(SEQ ID NO:6);

iii.TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA(SEQ ID NO:7);

iv.CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA(SEQ ID NO:8);

v.CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCCTGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA(SEQ ID NO:9);或

vi.GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTGGTCCCCTCCCCGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG(SEQ ID NO:10)。

2.如权利要求1所述的病毒载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

3.如权利要求1-2中任一项所述的病毒载体,其中所述病毒载体是腺相关病毒载体。

4.一种由包装细胞生产并能感染靶细胞的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒包含:能感染靶细胞的包膜蛋白,和如权利要求2所述的慢病毒载体。

5.如权利要求4所述的慢病毒颗粒,其中所述包膜蛋白靶向靶细胞的内吞区室。

6.如权利要求4所述的慢病毒颗粒,其中所述靶细胞是癌细胞,选自下述的一种或多种:血管肉瘤,B细胞淋巴瘤,伯基特淋巴瘤,乳腺癌,膀胱癌,头颈癌,宫颈癌,结直肠癌,子宫内膜癌,尤文氏肉瘤,纤维肉瘤,胶质瘤,胃泌素瘤,胃癌,肝细胞癌,卡波西肉瘤,白血病,平滑肌肉瘤,脂肪瘤,脂肪肉瘤,黑色素瘤,成神经管细胞瘤,间皮瘤,粘液纤维肉瘤,多发性骨髓瘤,高危骨髓增生异常综合征,鼻咽癌,神经母细胞瘤,神经纤维瘤,肺癌,卵巢癌,骨肉瘤,胰腺癌,嗜铬细胞瘤,前列腺癌,肾细胞癌,视网膜母细胞瘤,横纹肌肉瘤,唾液腺肿瘤,许旺氏细胞瘤,头颈部鳞状细胞癌,睾丸肿瘤,甲状腺癌,尿路上皮癌,和威尔姆氏肿瘤。

7.如权利要求6所述的慢病毒颗粒,其中所述癌细胞选自下述的一种或多种:霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤。

8.如权利要求6所述的慢病毒颗粒,其中所述癌细胞选自下述的一种或多种:星形细胞瘤,慢性淋巴细胞白血病,髓样白血病,急性淋巴细胞白血病,粘膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤,间变性大细胞淋巴瘤,套细胞淋巴瘤,肝母细胞瘤,喉癌,食管癌,非小细胞肺癌,和小细胞肺癌。

9.如权利要求6所述的慢病毒颗粒，其中所述癌细胞选自下述的一种或多种：胶质母细胞瘤，急性髓性白血病，慢性粒细胞白血病，喉鳞状细胞癌，和食管鳞状细胞癌。

10.如权利要求4所述的慢病毒颗粒，其中所述靶细胞是肝细胞癌中存在的一种或多种癌细胞。

11.如权利要求4所述的慢病毒颗粒，其中所述靶细胞能在用所述慢病毒颗粒感染后激活γδT细胞。

12.一种用于治疗甲羟戊酸途径相关病症的药物组合物，所述药物组合物包含：由包装细胞生产并能感染靶细胞的慢病毒颗粒，所述慢病毒颗粒包含：能感染靶细胞的包膜蛋白，和如权利要求2所述的慢病毒载体。

13.如权利要求12所述的药物组合物，其中所述药物组合物与有效量的氨基二膦酸类化合物给予。

14.如权利要求13所述的药物组合物，其中所述氨基二膦酸类化合物是唑来膦酸。

15.如权利要求12所述的药物组合物，其中所述靶细胞是癌症中存在的一种或多种癌细胞，所述癌症选自下述的一种或多种：血管肉瘤，B细胞淋巴瘤，伯基特淋巴瘤，乳腺癌，膀胱癌，头颈癌，宫颈癌，结直肠癌，子宫内膜癌，尤文氏肉瘤，纤维肉瘤，胶质瘤，胃泌素瘤，胃癌，肝细胞癌，卡波西肉瘤，白血病，平滑肌肉瘤，脂肪瘤，脂肪肉瘤，黑色素瘤，成神经管细胞瘤，间皮瘤，粘液纤维肉瘤，多发性骨髓瘤，高危骨髓增生异常综合征，鼻咽癌，神经母细胞瘤，神经纤维瘤，肺癌，卵巢癌，骨肉瘤，胰腺癌，嗜铬细胞瘤，前列腺癌，肾细胞癌，视网膜母细胞瘤，横纹肌肉瘤，唾液腺肿瘤，许旺氏细胞瘤，头颈部鳞状细胞癌，睾丸肿瘤，甲状腺癌，尿路上皮癌，和威尔姆氏肿瘤。

16.如权利要求15所述的药物组合物，其中所述癌细胞选自下述的一种或多种：霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤。

17.如权利要求15所述的药物组合物，其中所述癌细胞选自下述的一种或多种：星形细胞瘤，慢性淋巴细胞白血病，髓样白血病，急性淋巴细胞白血病，粘膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤，间变性大细胞淋巴瘤，套细胞淋巴瘤，肝母细胞瘤，喉癌，食管癌，非小细胞肺癌，和小细胞肺癌。

18.如权利要求15所述的药物组合物，其中所述癌细胞选自下述的一种或多种：胶质母细胞瘤，急性髓性白血病，慢性粒细胞白血病，喉鳞状细胞癌，和食管鳞状细胞癌。

19.如权利要求12所述的药物组合物，其中所述靶细胞存在于肝细胞癌中。

20.如权利要求12所述的药物组合物，其中所述靶细胞能在用所述慢病毒颗粒感染后激活γδT细胞。

21.基于免疫疗法的组合物在制备用于治疗患者癌症的药物中的用途，其中所述基于免疫疗法的组合物包含慢病毒颗粒，所述慢病毒颗粒包含：

a.能感染癌细胞的包膜蛋白；和

b.如权利要求2所述的慢病毒载体。

22.如权利要求21所述的用途，其中所述癌症选自下述的一种或多种：血管肉瘤，B细胞淋巴瘤，伯基特淋巴瘤，乳腺癌，膀胱癌，头颈癌，宫颈癌，结直肠癌，子宫内膜癌，尤文氏肉瘤，纤维肉瘤，胶质瘤，胃泌素瘤，胃癌，肝细胞癌，卡波西肉瘤，白血病，平滑肌肉瘤，脂肪瘤，脂肪肉瘤，黑色素瘤，成神经管细胞瘤，间皮瘤，粘液纤维肉瘤，多发性骨髓瘤，高危骨髓

增生异常综合征，鼻咽癌，神经母细胞瘤，神经纤维瘤，肺癌，卵巢癌，骨肉瘤，胰腺癌，嗜铬细胞瘤，前列腺癌，肾细胞癌，视网膜母细胞瘤，横纹肌肉瘤，唾液腺肿瘤，许旺氏细胞瘤，头颈部鳞状细胞癌，睾丸肿瘤，甲状腺癌，尿路上皮癌，和威尔姆氏肿瘤。

23.如权利要求22所述的用途，其中所述癌细胞选自下述的一种或多种：霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤。

24.如权利要求22所述的用途，其中所述癌细胞选自下述的一种或多种：星形细胞瘤，慢性淋巴细胞白血病，髓样白血病，急性淋巴细胞白血病，粘膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤，间变性大细胞淋巴瘤，套细胞淋巴瘤，肝母细胞瘤，喉癌，食管癌，非小细胞肺癌，和小细胞肺癌。

25.如权利要求22所述的用途，其中所述癌细胞选自下述的一种或多种：胶质母细胞瘤，急性髓性白血病，慢性粒细胞白血病，喉鳞状细胞癌，和食管鳞状细胞癌。

26.如权利要求21所述的用途，其中所述癌症是白血病。

27.如权利要求21所述的用途，其中所述癌细胞能在用所述基于免疫疗法的组合物感染所述癌细胞后激活对象的γδT细胞。

28.如权利要求27所述的用途，其中激活γδT细胞包括增加γδT细胞的肿瘤坏死因子(TNF)-α分泌。

29.如权利要求21所述的用途，其中所述基于免疫疗法的组合物与有效量的氨基二膦酸类药物给予。

30.如权利要求29所述的用途，其中所述氨基二膦酸类药物是唑来膦酸。

31.如权利要求29所述的用途，其中所述氨基二膦酸类药物与所述基于免疫疗法的组合物分开给予对象。

32.如权利要求29所述的用途，其中所述氨基二膦酸类药物与所述基于免疫疗法的组合物一起给予对象。

用于活化γ-δT细胞的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年1月15日提交的题为“用于激活γ-δT细胞的方法和组合物”的美国临时专利申请号62/279,474的优先权,其通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本公开一般涉及基因治疗和免疫疗法领域,特别是涉及增加的γδ(“GD”)T细胞活化。

背景技术

[0004] 人T细胞基于T细胞受体结构而区分。主要群体,包括CD4+和CD8+亚群,表达由α和β链组成的受体。较小的亚群表达由γ和δ链制成的T细胞受体。γδ(“GD”)T细胞构成3-10%的循环淋巴细胞,Vδ2+亚群构成血液中GD T细胞的75%。Vδ2+细胞识别非肽表位并且不需要主要组织相容性复合物(“MHC”)或人白细胞抗原(“HLA”)的抗原呈递。大多数Vδ2+T细胞也表达Vγ9链,并且通过暴露于5-碳焦磷酸盐化合物来刺激,该5-碳焦磷酸盐化合物是甲羟戊酸和非甲羟戊酸甾醇/类异戊二烯合成途径中的中间体。对异戊烯焦磷酸(5-碳)的反应在健康人类中是普遍的。

[0005] GD T细胞的另一个亚群,即Vδ1+,在血液中循环的T细胞中占很小的百分比,但Vδ+1细胞通常存在于上皮粘膜和皮肤中。

[0006] 通常,GD T细胞具有多种功能,包括杀死肿瘤细胞和病原体感染的细胞。通过由两条糖蛋白链γ和δ组成的独特T细胞受体(“TCR”)刺激,提高了细胞毒性、细胞因子分泌和其他效应功能的能力。GD T细胞的TCR具有独特的特异性,并且细胞本身以高克隆频率出现,因此允许对肿瘤和病原体的快速先天样反应。

[0007] 氨基二膦酸类药物(“ABP”),和法尼基二磷酸合成酶(“FDPS”)的其他抑制剂,在甲羟戊酸途径中位于异戊烯焦磷酸(“1PP”)的下游(参见例如图1),其已经用于治疗各种疾病,包括癌症,特别是那些涉及骨转移的疾病。ABP包括商品名,如Zometa®(诺华公司(Novartis))和Fosamax®(默克公司(Merck))。

[0008] ABP也已用于刺激GD T细胞。这可能是因为当FDPS在骨髓细胞中被抑制时,IPP开始积累并且香叶基香叶基焦磷酸(“GGPP”)减少,GGPP是抑制炎性体通路活化的FDPS的下游产物。GGPP的减少除去了半胱天冬酶依赖性炎性体途径的抑制剂,并允许分泌成熟细胞因子,包括白细胞介素-β和白细胞介素-18,后者对于γδT细胞活化尤其重要。

[0009] 因此,当FDPS被阻断时,增加的IPP和减少的GGPP组合以激活Vδ2+T细胞。由IPP或ABP激活的Vδ2+细胞将迅速增殖,表达多种细胞因子和趋化因子,并且可以用于以细胞毒性方式破坏肿瘤细胞或感染有病原微生物的细胞。

[0010] 然而,ABP与炎症和骨坏死有关,并且由于它们的化学性质而具有差的生物利用度。同样,IPP的半衰期非常短,难以合成。两种类型的化合物都需要在个体中进行全身给药。因此,一般的ABP和具体的IPP都为治疗目的留下了很多不足之处。

发明内容

[0011] 在一个方面，提供了激活GD T细胞的方法。该方法包括在GD T细胞存在下用编码至少一种遗传元件的病毒传递系统感染靶细胞。在实施方式中，所述至少一种遗传元件包括小RNA，其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在实施方式中，酶是FDPS。在实施方式中，当酶在靶细胞中被抑制时，靶细胞随后激活GD T细胞。在实施方式中，靶细胞是癌细胞或已经被感染剂感染的细胞。在优选的实施方式中，GD T细胞的活化导致GD T细胞杀死癌细胞或感染有感染剂的细胞。在实施方式中，至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。在进一步的实施方式中，靶细胞还与氨基二膦酸类药物接触。在实施方式中，氨基二膦酸类药物是唑来膦酸。

[0012] 在另一方面，提供了治疗对象的癌症的方法。该方法包括向对象给予治疗有效量的编码至少一种遗传元件的病毒递送系统。在实施方式中，所述至少一种遗传元件包括小RNA，其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在进一步的实施方式中，当在GD T细胞存在下在癌细胞中抑制酶时，癌细胞激活GD T细胞，从而治疗癌症。在实施方式中，酶是FDPS。在实施方式中，至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。在进一步的实施方式中，靶细胞还与氨基二膦酸类药物接触。在实施方式中，氨基二膦酸类药物是唑来膦酸。

[0013] 在另一方面，提供了治疗对象的感染疾病的方法。该方法包括向对象给予治疗有效量的编码至少一种遗传元件的病毒递送系统。在实施方式中，所述至少一种遗传元件包括小RNA，其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在进一步的实施方式中，当在GD T细胞存在下用感染剂感染的细胞中酶受到抑制时，该受感染的细胞激活GD T细胞，从而治疗受感染的细胞和感染性疾病。在实施方式中，酶是FDPS。在实施方式中，至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。在进一步的实施方式中，靶细胞还与氨基二膦酸类药物接触。在实施方式中，氨基二膦酸类药物是唑来膦酸。

[0014] 在另一方面，所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80％，或至少85％，或至少90％，或至少95％的百分比相同性的shRNA：

[0015] GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTTT(SEQ ID NO:1)；GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTTT(SEQ ID NO:2)；GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCTGCCATGTACATGGCTTTTT(SEQ ID NO:3)；或GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTT(SEQ ID NO:4)。在优选的实施方式中，shRNA包括GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTTT(SEQ ID NO:1)；GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTTT(SEQ ID NO:2)；GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCTGCCATGTACATGGCTTTTT(SEQ ID NO:3)；或GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTT(SEQ ID NO:4)。

[0016] 在另一方面，所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80％，或至少85％，或至少90％，或至少95％的百分比相同性的微小RNA：

[0017] AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(SEQ ID NO:5)；AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGAC TTCAAGGGGCT(SEQ ID NO:6)；TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA(SEQ ID NO:7)；CCTGGAGG

CTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAA GTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA(SEQ ID NO:8);CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGAC TTTCTCAGCCTCCTTCTGCC TGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTTGGTATCTTTCA TCTGACCA(SEQ ID NO:9);或GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTG GTCCCCTCCCCGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG(SEQ ID NO:10)。 在优选的实施方式中,微小RNA包括AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTT CTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(SEQ ID NO:5);AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGA AGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(SEQ ID NO:6);TGCTGTTGACAGTGAGCG ACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA(SEQ ID NO:7);CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTGGCCACTGACTGA GCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA(SEQ ID NO:8);CATCTCCATGGCTG TACCACCTTGTCGGGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCCTGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGAC ATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA(SEQ ID NO:9);或GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTTCT CAGCCTCCTTCTGCTGGTCCCCTCCCCGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGT CG(SEQ ID NO:10)。

[0018] 在另一方面,提供了包含至少一种编码的遗传元件的病毒载体。所述至少一种编码的遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在实施方式中,参与甲羟戊酸途径的酶是法尼基二磷酸合酶(FDPS)。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。

[0019] 在另一方面,所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%,或至少85%,或至少90%,或至少95%的百分比相同性的shRNA。在优选实施方式中,shRNA包括SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4。

[0020] 在另一方面,所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%,或至少85%,或至少90%,或至少95%的百分比相同性的微小RNA:SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。在优选的实施方式中,微小RNA包括SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。

[0021] 在实施方式中,病毒载体由能够有效地将小RNA转导入靶细胞的任何载体组成。在一些实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体。在其他实施方式中,该病毒载体是腺相关病毒载体。

[0022] 在另一方面,病毒载体包括第二编码的遗传元件。在实施方式中,第二遗传元件包括至少一种细胞因子或趋化因子。在实施方式中,所述至少一种细胞因子选自:IL-18,TNF-α,干扰素-γ,IL-1,IL-2,IL-15,IL-17和IL-12。在实施方式中,至少一种趋化因子是CC趋化因子或CXC趋化因子。在进一步的实施方式中,至少一种趋化因子是RANTES。

[0023] 另一方面,提供了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。该系统包括慢病毒载体,用于表达包膜蛋白的至少一个包膜质粒,该包膜蛋白经优化用于感染细胞;和至少一种用于表达gag、pol和rev基因的辅助质粒。当将慢病毒载体,至少一个包膜质粒和至少一个辅助质粒转染到包装细胞中时,通过包装细胞产生慢病毒颗粒。在实施方式中,慢病毒颗粒

能够感染靶细胞，并抑制靶细胞内甲羟戊酸途径中涉及的酶。在实施方式中，甲羟戊酸途径中涉及的酶是FDPS。在实施方式中，慢病毒载体系统包括用于表达gag和pol基因的第一辅助质粒，和用于表达rev基因的第二辅助质粒。在实施方式中，优选包膜蛋白经优化用于感染靶细胞。在实施方式中，靶细胞是癌细胞。在其他实施方式中，靶细胞是被感染剂感染的细胞。

附图说明

[0024] 图1描绘了用于类固醇和类异戊二烯的生物合成的甲羟戊酸途径中的主要步骤的概述。

[0025] 图2描绘了环化形式的示例性3-载体慢病毒载体系统。

[0026] 图3描绘了环化形式的示例性4-载体慢病毒载体系统。

[0027] 图4描绘了：(A)表达FDPS shRNA靶向序列的慢病毒载体的线性图谱；和(B)表达具有FDPS靶向序列的合成微小RNA的慢病毒载体的线性图谱。

[0028] 图5描绘了数据，其证明用具有表达FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)的慢病毒的THP-1白血病细胞激活Vδ2+T细胞，如本文所述。

[0029] 图6描绘了数据，其证明用具有表达FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)的慢病毒的THP-1白血病细胞激活Vδ2+T细胞，如本文所述。

[0030] 图7描绘了数据，其证明用具有表达FDPS shRNA#1(SEQ ID NO:1)的慢病毒的PC3前列腺癌细胞激活Vδ2+T细胞，如本文所述。

[0031] 图8描绘了数据，其证明用具有表达FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)的慢病毒的PC3前列腺癌细胞激活Vδ2+T细胞，如本文所述。

[0032] 图9描绘了数据，其证明用具有表达FDPS shRNA#1(SEQ ID NO:1)或FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)的慢病毒的HepG2癌细胞激活Vδ2+T细胞，如本文所述。

[0033] 图10描绘了数据，其证明用具有表达miR30FDPS#1(SEQ ID NO:5)的慢病毒的THP-1白血病细胞激活Vδ2+T细胞，如本文所述。

[0034] 图11描绘了证明如本文所述的各种实验条件下特异性裂解的百分比相对于E:T比的数据。

[0035] 图12描绘了数据，其证明慢病毒递送的基于shRNA的RNA干扰靶向人FDPS基因。

[0036] 图13描绘了数据，其证明慢病毒递送的基于miR的RNA干扰靶向人FDPS基因。

[0037] 图14描绘了数据，其证明用具有表达FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)的腺相关病毒的HepG2癌细胞激活Vδ2+T细胞，如本文所述。

[0038] 图15描绘了免疫印迹数据，证明在用LV-shFDPS转导并用唑来膦酸处理的细胞中缺乏RAP1异戊烯化(prenylatioin)。

具体实施方式

[0039] 公开概述

[0040] 本公开涉及基因治疗构建体及其向细胞的递送，导致对法尼基二磷酸合成酶(“FDPS”)的抑制，该酶是将异戊烯基磷酸酯(IPP)转化为法尼基二磷酸酯(FDP)所必需的，例如图1所示。在实施方式中，向一种或多种病毒载体提供靶向FDPS的微小RNA或短同源RNA

(shRNA),从而降低该酶的表达水平。病毒载体包括慢病毒载体和AAV载体。调节FDPS表达的结果是增加IPP的积累,IPP是GD T细胞增殖和分化的刺激物。因此,本文提供的构建体用于激活GD T细胞,并用于治疗癌症和感染性疾病。

[0041] 定义和解释

[0042] 除非另有说明,本方面所用的科技术语与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同。此外,除非另有说明,单数术语包括复数且复数术语包括单数。通常,本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质和核酸化学及杂交中使用的命名和技术是本领域公知且普遍使用的。除非另有说明,本发明的方法和技术一般遵循本领域熟知的传统方法进行并如若干一般的或更特定的参考文献中所述,所述参考文献贯穿本说明书引用和讨论。参见例如:Sambrook J.和Russell D.《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第三版,纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.),(2000);Ausubel等,《精编分子生物学方案:现行分子生物学方案的方法纲要》(Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology),Wiley,John&Sons出版公司(2002);Harlow和Lane,《使用抗体:实验室手册》(Using Antibodies:A Laboratory Manual);纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(1998);和Coligan等,《精编蛋白质科学方案》(Short Protocols in Protein Science),Wiley,John&Sons出版公司(2003)。任何酶促反应和纯化技术根据生产商的说明书或本领域普遍使用或本文所述的方法进行。本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药学化学中使用的命名以及实验室方法和技术是本领域公知且普遍使用的。

[0043] 如说明书和所附权利要求所用,单数形式的“一个”,“一种”和“所述”可互换使用并且旨在包括复数形式并落入各含义中,除非文本中有另外的明确表示。如本文所述,“和/或”表示涵盖了任何以及所有可能的一种或多种所列项目的组合,以及当在可选情况下解释时(“或”)缺少组合。

[0044] 所有数字标记,例如pH,温度,时间,浓度和分子量,包括范围,都是近似值,其以0.1的增量变化(+)或(-)。应理解,尽管并非总是明确指出,所有数字标记前面都有术语“约”。除了“X”的微小增量(例如“X+0.1”或“X-0.1”)之外,术语“约”还包括精确值“X”。还应理解,尽管并非总是明确说明,但本文所述的试剂仅仅是示例性的,并且其等同物是本领域已知的。

[0045] 如本文所用,术语“约”将为本领域普通技术人员所理解,并且在某种程度上取决于其使用的上下文而变化。如果在使用该术语的文中该术语对于本领域普通技术人员来说是不明确的,则“约”将意味着高达特定术语的正负10%。

[0046] 术语“给予”或“施用”活性剂应理解为向需要治疗的对象提供活性剂,其形式为可以治疗有用形式和治疗有效量引入该个体的形式。

[0047] 如本文所用,术语“包括”或“包含”意在表示所述组合物和方法包括所提及的要素,但并不排除其它要素。当用以定义组合物和方法时,“基本由……组成”应表示排除对于该组合物和方法具有任何基本意义的其它要素。“由……组成”表示排除多于所要求保护的组合物的其它成分的微量元素和基本方法步骤。通过各个这些转换术语定义的实施方式在本发明范围内。因此,意图是所述方法和组合物可以包括另外的步骤和组分(包含)或者可

选地包括不重要的步骤和组合物(基本上由.....组成)或者仅包括所述方法步骤或组合物(由...组成)。

[0048] 如本文所用,“表达”、“表达”或“编码”是指多核苷酸转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA随后被翻译成肽,多肽或蛋白质的过程。表达可以包括在真核细胞中剪接mRNA或其他形式的转录后修饰或翻译后修饰。

[0049] 术语“法尼基二磷酸合酶”在本文中也可称为FDPS,并且在本文中也可称为法尼基焦磷酸合酶或FPPS。

[0050] 术语“γδT细胞”在本文中也可称为γδT细胞,或进一步称为GD T细胞。术语“γδT细胞活化”或“γδT细胞激活”是指与γδT细胞相关的并且代表这种T细胞被激活的任何可测量的生物学现象。这种生物学现象的非限制性实例包括细胞因子生产的增加,细胞表面蛋白质的定性或定量组成的变化,T细胞增殖的增加和/或T细胞效应功能的增加,例如杀死靶细胞或辅助另一个效应细胞杀死靶细胞。

[0051] 术语“个体”,“对象”和“患者”在本文中可互换使用,并且指任何个体哺乳动物对象,例如牛,犬,猫,马或人。

[0052] 术语“miRNA”指微小RNA,并且在本文中也可称为“miR”。

[0053] 术语“包装细胞系”是指可用于表达慢病毒颗粒的任何细胞系。

[0054] 在两个或更多个核酸或多肽序列的内容中,术语“百分比相同性”是指,当进行比较并以最大对应性比对时,两个或更多个具有相同的核苷酸或氨基酸残基的特定百分比的序列或子序列,如使用下述的序列比较算法之一(例如,BLASTP和BLASTN或本领域技术人员可用的其他算法)或通过视觉检查所测量。取决于应用,“百分比相同性”可以存在于被比较的序列区域上,例如,在功能域上,或者,存在于待比较的两个序列的全长上。对于序列比较,一般将一条序列用作与测试序列比较的参比序列。使用序列比较算法时,将测试序列和参比序列输入计算机,如果必要则指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法根据指定的程序参数计算测试序列相对参比序列的序列相同性百分数。

[0055] 可进行最优序列比对以作比较,例如,通过Smith和Waterman的局部同源性算法,Adv.Appl.Math.2:482(1981);通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法,J.Mol.Biol.48:443(1970);通过Pearson和Lipman的相似性搜索法,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444(1988);通过计算机执行这些算法(遗传学计算组(Genetics Computer Group)的威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,575科学大道(Science Dr.),威斯康星州麦迪逊),或通过视觉检查。

[0056] 适用于确定序列相同性百分比和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,其在Altschul等,J.Mol.Biol.215:403-410(1990)中描述。进行BLAST分析的软件可从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。

[0057] 两个核苷酸序列之间的相同性百分比可以使用GCG软件包中(可从http://www.gcg.com获得)的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵和空位权重40、50、60、70或80,长度权重1、2、3、4、5或6。两个核苷酸或氨基酸序列之间的相同性百分比也可以使用E.Meyers和W.Miller(CABIOS,4:11-17(1989))的算法确定,该算法已被并入ALIGN程序(版本2.0),使用PAM120权重残基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。另外,两个氨基酸序列之间的百分

比相同性可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法确定,该算法已经结合到GCG软件包(可从http://www.gcg.com获得)中的GAP程序中,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0058] 本公开内容的核酸和蛋白质序列还可以用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索,以例如鉴定相关序列。这类搜索能使用Altschul等,1990,J.Mol.Biol.,215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版本)来运行。可利用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索(评分=100,字长=12),以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可利用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索(评分=50,字长=3),以获得与本发明蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得缺口比对以用于比较目的,可如Altschul等,1997,Nucleic Acids Res.,25(17):3389-3402所述利用缺口BLAST。利用BLAST和缺口BLAST程序时,可使用各程序(如XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见http://www.ncbi.nlm.nih.gov。

[0059] 本文中所用的术语“药学上可接受的”是指合理医疗判断范围内的这些化合物、材料、组合物和/或剂型,其适用于接触人体和动物的组织、器官和/或体液而不会产生过度毒性、刺激性、过敏反应或与合理的效益/风险比相适应的其它问题或并发症。

[0060] 如本文所用,“药学上可接受的运载体”表示并包括生理上相容的任何和所有溶剂,分散介质,包被,抗细菌剂和抗真菌剂,等渗剂和吸收延迟剂,等等。该组合物可包括药学上可接受的盐,例如酸加成盐或碱加成盐(参见例如Berge等(1977)J Pharm Sci 66:1-19)。

[0061] 如本文所用,术语“SEQ ID NO”与术语“序列ID No.”同义。

[0062] 如本文所用,“小RNA”是指非编码RNA,其长度通常小于约200个核苷酸或更少并且具有沉默或干扰功能。在其他实施方式中,小RNA长度为约175个核苷酸或更短,约150个核苷酸或更短,约125个核苷酸或更短,约100个核苷酸或更短,或约75个核苷酸或更短。此类RNA包括微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)和短发夹RNA(shRNA)。本公开的“小RNA”应能够抑制或敲减靶基因的基因表达,通常通过会导致靶基因mRNA破坏的途径。

[0063] 术语“治疗有效量”是指足够量的本公开的活性剂,以合适的组合物和合适的剂型来治疗或预防患有给定轻病、损伤、疾病或病症的患者中出现的症状、进展或并发症发作。“治疗有效量”取决于患者病症状态或其严重程度、所治疗对象的年龄、体重等。治疗有效量可以根据许多因素中的任何一种而变化,包括例如给药途径,对象的状况,以及本领域技术人员理解的其他因素。

[0064] 如本文所用,术语“治疗载体”包括但不限于慢病毒载体或AAV载体。

[0065] “治疗”旨在靶向疾病状态并对其进行对抗,即改善或预防疾病状态。因此,特定治疗将取决于待靶向的疾病状态以及药物治疗和治疗方法的当前或未来状态。治疗可能具有相关的毒性。

[0066] 术语“治疗”或“处理”通常是指试图改变所治疗的对象的自然进程的干预,并且可以用于预防进行或在临床病理学过程中进行。理想的效果包括但不限于预防疾病的发生或复发,缓解症状,遏制,减少或抑制疾病的任何直接或间接病理后果,改善或缓解疾病状态,以及引起缓解或改善预后。

[0067] 公开方面的描述

[0068] 在一个方面，提供了激活GD T细胞的方法。该方法包括在GD T细胞存在下用编码至少一种遗传元件的病毒传递系统感染靶细胞。在实施方式中，所述至少一种编码的遗传元件包括小RNA，其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在实施方式中，酶是FDPS。在实施方式中，当酶在靶细胞中被抑制时，靶细胞激活GD T细胞。在实施方式中，靶细胞是癌细胞或已经被感染剂感染的细胞。在实施方式中，至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。

[0069] 在实施方式中，所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％或更多百分比相同性的shRNA：

[0070] GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTTT(SEQ ID NO:1)；GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTTT(SEQ ID NO:2)；GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCTGCCATGTACATGGCTTTTT(SEQ ID NO:3)；或GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTT(SEQ ID NO:4)。

[0071] 在优选的实施方式中，shRNA包括

[0072] GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTTT(SEQ ID NO:1)；GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTTT(SEQ ID NO:2)；GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCTGCCATGTACATGGCTTTTT(SEQ ID NO:3)；或GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTT(SEQ ID NO:4)。

[0073] 在另一方面中，所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％或更多百分比相同性的微小RNA：

[0074] AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(SEQ ID NO:5)；AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(SEQ ID NO:6)；TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA(SEQ ID NO:7)；CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA(SEQ ID NO:8)；CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCC TGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA(SEQ ID NO:9)；或GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTGGTCCCCTCCCCGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG(SEQ ID NO:10)。

[0075] 在优选的实施方式中，微小RNA包括

[0076] AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(SEQ ID NO:5)；AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(SEQ ID NO:6)；TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA(SEQ ID NO:7)；CCTGGAGGC

TTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAG TCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA(SEQ ID NO:8);CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGACT TTCTCAGCCTCCTTCTGCCTG TTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTTGGTATCTTTCAT CTGACCA(SEQ ID NO:9);或GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTGG TCCCCTCCCCGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG(SEQ ID NO:10)。

[0077] 在另一方面,靶细胞还与氨基二膦酸类药物接触。在优选实施方式中,氨基二膦酸类药物是唑来膦酸。

[0078] 在另一方面,提供了治疗对象的癌症的方法。该方法包括向对象给予治疗有效量的编码至少一种遗传元件的病毒递送系统。在实施方式中,所述至少一种编码的遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在进一步的实施方式中,当在GD T细胞存在下在癌细胞中抑制酶时,癌细胞激活GD T细胞,从而治疗癌症。在实施方式中,酶是FDPS。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。

[0079] 在另一方面,提供了治疗对象的感染疾病的方法。该方法包括向对象给予治疗有效量的编码至少一种遗传元件的病毒递送系统。在实施方式中,所述至少一种编码的遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在进一步的实施方式中,当在GD T细胞存在下并且用感染剂感染的细胞中酶受到抑制时,该受感染的细胞激活GD T细胞,从而治疗受感染的细胞和感染性疾病。在实施方式中,酶是FDPS。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。

[0080] 在实施方式中,所述至少一种编码的遗传元件包括与SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的shRNA。在优选的实施方式中,shRNA包括SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4。

[0081] 在其他实施方式中,所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的微小RNA:SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。在优选的实施方式中,微小RNA包括SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。

[0082] 在另一方面,提供了包含至少一种编码的遗传元件的病毒载体。所述至少一种编码的遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在实施方式中,参与甲羟戊酸途径的酶是法尼基二磷酸合酶(FDPS)。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。

[0083] 在另一方面中,所述至少一种编码的遗传元件包括与SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的shRNA。在优选的实施方式中,shRNA包括SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4。

[0084] 在另一方面中,所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%、至

少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％或更多百分比相同性的微小RNA:SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。在优选的实施方式中,微小RNA包括SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。

[0085] 在实施方式中,病毒载体包括可以有效转导小RNA的任何载体。在一些实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体。在其他实施方式中,该病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。

[0086] 在另一方面,病毒载体包括第二编码的遗传元件。在实施方式中,第二遗传元件包括至少一种细胞因子或趋化因子。在实施方式中,所述至少一种细胞因子选自:IL-18,TNF-α,干扰素-γ,IL-1,IL-2,IL-15,IL-17和IL-12。在实施方式中,至少一种趋化因子是CC趋化因子,CXC趋化因子,CX3趋化因子或XC趋化因子。在进一步的实施方式中,至少一种趋化因子是CC趋化因子RANTES。

[0087] 另一方面,提供了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。该系统包括慢病毒载体,用于表达包膜蛋白的至少一个包膜质粒,该包膜蛋白经优化用于感染细胞;和至少一种用于表达gag、pol和rev基因的辅助质粒。当将慢病毒载体,至少一个包膜质粒和至少一个辅助质粒转染到包装细胞中时,通过包装细胞产生慢病毒颗粒。在实施方式中,慢病毒颗粒能够感染靶细胞,并抑制靶细胞内甲羟戊酸途径中涉及的酶。在实施方式中,甲羟戊酸途径中涉及的酶是FDPS。在实施方式中,慢病毒载体系统包括用于表达gag和pol基因的第一辅助质粒,和用于表达rev基因的第二辅助质粒。在实施方式中,优选包膜蛋白经优化用于感染靶细胞。在实施方式中,靶细胞是癌细胞。在其他实施方式中,靶细胞是被感染性疾病感染的细胞。

[0088] 癌症

[0089] 本文提供的组合物和方法用于治疗癌症。细胞,组织或靶标可以是癌细胞,癌组织,具癌组织,或者是被诊断出或有发展疾病或病症风险的对象或患者。在某些方面,细胞可以是上皮细胞,内皮细胞,间皮细胞,神经胶质细胞,基质细胞或粘膜细胞。癌细胞群可包括但不限于脑,神经元,血液,子宫内膜,脑膜,食道,肺,心血管,肝脏,淋巴,乳房,骨骼,结缔组织,脂肪,视网膜,甲状腺,腺体,肾上腺,胰腺,胃,肠,肾,膀胱,结肠,前列腺,子宫,卵巢,子宫颈,睾丸,脾脏,皮肤,平滑肌,心肌或横纹肌细胞。在另一方面,癌症包括但不限于星形细胞瘤,急性髓性白血病,间变性大细胞淋巴瘤,急性淋巴细胞白血病,血管肉瘤,B细胞淋巴瘤,伯基特淋巴瘤,乳腺癌,膀胱癌,头颈癌,宫颈癌,慢性淋巴细胞白血病,慢性粒细胞白血病,结直肠癌,子宫内膜癌,食管鳞状细胞癌,尤文氏肉瘤,纤维肉瘤,胶质瘤,胶质母细胞瘤,胃泌素瘤,胃癌,肝母细胞瘤,肝细胞癌,卡波西肉瘤,霍奇金淋巴瘤,喉鳞状细胞癌,喉癌,白血病,平滑肌肉瘤,脂肪瘤,脂肪肉瘤,黑色素瘤,套细胞淋巴瘤,成神经管细胞瘤,间皮瘤,粘液纤维肉瘤,髓样白血病,粘膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤,多发性骨髓瘤,高危骨髓增生异常综合征,鼻咽癌,神经母细胞瘤,神经纤维瘤,高级非霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,肺癌,非小细胞肺癌,卵巢癌,食管癌,骨肉瘤,胰腺癌,嗜铬细胞瘤,前列腺癌,肾细胞癌,视网膜母细胞瘤,横纹肌肉瘤,唾液腺肿瘤,许旺氏细胞瘤,小细胞肺癌,头颈部鳞状细胞癌,睾丸肿瘤,甲状腺癌,尿路上皮癌和威尔姆氏肿瘤。

[0090] 本文提供的组合物和方法还用于治疗NSCLC(非小细胞肺癌)、小儿恶性肿瘤、由人

乳头瘤病毒(HPV)引起或促进的宫颈和其他肿瘤、黑素瘤、巴雷特食道(恶变前综合征)、肾上腺和皮肤癌和自身免疫、肿瘤性皮肤疾病。

[0091] 感染性疾病

[0092] 本文公开的组合物和方法可用于治疗感染性疾病。术语“感染性疾病”包括由感染剂引起的任何疾病。“感染剂”包括任何外源性病原体,包括但不限于细菌,真菌,病毒,支原体和寄生虫。可用本公开内容提供的组合物治疗的感染剂包括任何本领域公认的引起动物发病的感染性生物,包括下述生物体,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性球菌或杆菌的细菌,DNA和RNA病毒,包括但不限于DNA病毒如乳头瘤病毒,细小病毒,腺病毒,疱疹病毒和痘苗病毒,以及RNA病毒,如沙粒病毒,冠状病毒,鼻病毒,呼吸道合胞病毒,流感病毒,小核糖核酸病毒,副粘病毒,呼肠孤病毒,逆转录病毒,和弹状病毒。可以用本公开的组合物和方法治疗的真菌的实例包括作为霉菌或酵母样生长的真菌,包括例如引起诸如癣,组织胞浆菌病,芽生菌病,曲霉菌病,隐球菌病,孢子丝菌病,球孢子菌病,副球菌病和念珠菌病等疾病的真菌。本文提供的组合物和方法可用于治疗寄生虫感染,包括但不限于由体细胞绦虫,血吸虫,组织蛔虫,阿米巴和疟原虫,锥虫,利什曼原虫和弓形虫物种引起的感染。

[0093] GD T细胞活化的方法

[0094] 本文提供了用于激活个体中GD T细胞的组合物和方法,以及用于治疗肿瘤和感染性疾病的方法。例如,在实施方式中,本文提供的组合物和方法可用于治疗所有已知癌症的方法,因为活化的GD T细胞包含用于肿瘤免疫监视的天然机制(参见例如:Pauza等2014 Frontiers in Immunol.5:687)。同样,在实施方式中,本文提供的组合物和方法可用于治疗感染性疾病,包括但不限于黄病毒,流感病毒,人逆转录病毒,分枝杆菌,疟原虫和各种其他病毒,真菌和细菌感染。(参见例如:Pauza和Cairo,2015 Cell Immunol.296(1)。

[0095] 通常,将载体系统给予个体以用所公开的构建体转染或转导靶细胞群用以降低FDPS的表达,并且在其他实施方式中,用以增加趋化因子或细胞因子的表达。给予和转染/转导可以在体内或离体发生,随后将转染的细胞在后一种情况下给予回对象。

[0096] 给予本公开载体并将本公开构建体转染或转导到对象的细胞中导致FDPS的表达降低,细胞因子或趋化因子的表达增加,IPP的积累,并且在许多情况下,导致遗传修饰的肿瘤细胞的生长速率降低。所有这些特征共同起作用以激活和共定位GD T细胞到肿瘤或感染部位。

[0097] 所公开的方法还可以增加NK细胞识别和破坏肿瘤细胞和/或感染细胞的能力。GD T细胞和NK细胞之间的串扰(crosstalk)是调节免疫和炎症反应的重要方面。此外,已知GD T细胞引发树突细胞成熟,募集B细胞和巨噬细胞,并参与多种细胞溶解活性,例如干扰素-γ和TNF-α的分泌。

[0098] 在实施方式中,本文提供的公开的组合物和方法包括用于在肿瘤或感染性疾病病理部位激活GD T细胞的基因疗法形式。在一个方面,本文提供的组合物和方法通过促进特定细胞因子的产生来激活GD T细胞并支持它们的增殖、分化和功能能力,所述特定细胞因子是能够杀死癌细胞或治疗感染性疾病的细胞溶解活性所需的。

[0099] 在实施方式中,基因治疗序列(例如,FDPS shRNA)由治疗载体携带,包括但不限于病毒载体,例如慢病毒或腺相关病毒,尽管其他病毒载体也可以是合适的。基因治疗构建体也可以以DNA或RNA的形式递送,包括但不限于质粒形式。在实施方式中,所公开的基因治疗

构建体还可以以蛋白质-核酸复合物或脂质核酸复合物和这些制剂的混合物的形式递送。例如,蛋白质-核酸复合物可以包含与阳离子肽如赖氨酸和精氨酸的复合物中的目标核酸。脂质-核酸复合物可包含脂质乳液,胶束,脂质体和/或中性和阳离子脂质的混合物,例如DOTMA,DOSPA,DOTAP和DMRIE。

[0100] 在实施方式中,治疗性载体可包含单一构建体或至少两种,至少三种,至少四种或至少五种不同构建体。当载体中存在多于一种构建体时,构建体可以是相同的,或者它们可以是不同的。例如,构建体可以在它们的启动子、整合元件的存在或不存在和/或它们的序列方面不同。在一些实施方式中,治疗载体将包含编码能够敲减FDPS表达的小RNA的至少一种构建体。在实施方式中,治疗载体还将编码特定细胞因子和/或趋化因子,包括但不限于TNF-α,干扰素-γ,IL-1,IL-2,IL-15,IL-17,IL-18或IL-12。在一些实施方式中,单个构建体可编码能够敲减FDPS和特定细胞因子或趋化因子,包括但不限于TNF-α,干扰素-γ,IL-1,IL-2,IL-15,IL-17,IL-18或IL-12的表达的小RNA。

[0101] 在实施方式中,病毒载体可以引入整合到宿主染色体中的核酸构建体。或者,瞬时递送载体可用于防止染色体整合并限制基因治疗构建体的寿命。

[0102] 在实施方式中,所公开的构建体和载体包含短同源区RNA(“shRNA”),微小RNA(“miRNA”)或能够降低或敲减FDPS和/或香叶基焦磷酸合酶(“GPPS”)和/或法尼基转移酶(“FT”)基因的表达的siRNA。通过下调控制类固醇和类异戊二烯合成的这些基因,异戊烯焦磷酸(“IPP”)水平升高。IPP的升高和积累是增加GD T细胞活化的已知机制。此外,这些焦磷酸合酶基因的下调消除了炎性体功能的重要负调节剂,这继而导致对GD T细胞活化和效应细胞功能重要的细胞因子的表达增加。

[0103] 在实施方式中,所公开的构建体受特异性启动子调节,能够产生白细胞介素-2和/或白细胞介素-15以维持GD T细胞增殖。另外,所公开的构建体可以通过特异性启动子调节,能够产生GD T细胞分化和获得所有效应细胞功能所需的白细胞介素-1β和/或白细胞介素-18和/或干扰素-γ。理想的效应细胞功能包括对肿瘤和/或感染细胞的直接细胞毒性细胞杀伤的能力,有益细胞因子和/或趋化因子的分泌能力,使识别癌细胞或感染细胞所需的NK受体的表达增加的能力,以及使结合靶向抗体以使GD T细胞与癌细胞或感染的细胞靶标共定位所需的Fc受体的表达增加的能力。

[0104] 在实施方式中,所公开的方法激活GD T细胞,导致NK细胞攻击和破坏癌细胞、肿瘤或感染细胞的能力增加的间接作用。NK细胞的活化需要刺激GD T细胞增殖和分化,并表达4-1BBL共刺激配体,其为与NK细胞上的4-1BB共刺激受体配合所需。这种形式的串扰被认为是激活NK细胞的重要机制,并且在此通过所公开的方法和组合物的作用实现。

[0105] 另一方面,GD T细胞和NK细胞之间的串扰是消除在患病组织中累积的炎性树突细胞的重要机制。单独地,GD T细胞和NK细胞都不能破坏树突细胞,但是一旦发生上述串扰相互作用,NK细胞就会被改变以对炎性树突细胞产生细胞毒性。这种免疫调节机制取决于GD T细胞的强烈激活和增殖。

[0106] 在实施方式中,所公开的用于激活GD T细胞的方法还包括抑制病理性炎症反应的步骤,所述病理性炎症反应可包括导致动脉粥样硬化的细胞增殖,刺激肿瘤生长的慢性免疫激活,自身免疫疾病,包括牛皮癣和表皮中的其他表现,中枢神经系统的炎症疾病,关节炎和不受调节的免疫反应的其他疾病。

[0107] 在实施方式中，治疗载体与氨基二膦酸类药物(ABP)药物同时给予以实现γδT细胞的协同激活。协同作用可以允许交替、改变或减少剂量的ABP，并且可以减少对ABP的不良反应，包括急性炎症反应和慢性疾病。

[0108] 用于GD T细胞激活的构建体

[0109] FDPS的抑制导致IPP积累，导致Vδ2+GD T细胞的活化和IL-18的表达，这在激活GD T细胞中也是重要的。法尼基转移酶的抑制导致蛋白质的异戊烯化降低。所公开的构建体可以被转染或转导到特定的靶细胞中，如肿瘤细胞或感染的细胞，在这里它们可以表达RNA序列(即siRNA，shRNA或microRNA)，其将抑制FDPS的翻译并编码和表达细胞毒性细胞因子或趋化因子。

[0110] 本文公开了用于降低FDPS和/或FT的表达，增加细胞因子的表达和增加包括RANTES的趋化因子的表达的构建体。例如，在一些实施方式中，构建体可编码干扰素-γ，IL-1，IL-2，IL-15，IL-17，IL-18或IL-12。

[0111] 细胞因子和趋化因子的表达，如上面列出的那些，将导致肿瘤细胞或感染病原生物的细胞的局部细胞毒性破坏。因此，肿瘤细胞或感染的细胞表达这些构建体将产生协助其自身的破坏的不需要的细胞。

[0112] 同样，如果公开的构建体在肿瘤细胞或感染细胞中表达，则降低FDPS和FT的表达将导致GD T细胞活化并募集到肿瘤部位或细胞感染部位。增加RANTES的表达将进一步将GD T细胞吸引到预期的组织位置。因为GD T细胞可以杀伤广泛的上皮来源的肿瘤以及许多白血病和淋巴瘤，并且还能够产生高水平的抗肿瘤细胞因子IFNγ，将GD T细胞募集到肿瘤部位可以是诱导抗肿瘤免疫力的特别有效的手段。

[0113] FDPS的表达降低可通过shRNA，微小RNA，siRNA或本领域已知的其他方法实现。例如，根据SEQ ID NO:1、2、3或4的shRNA或其变体可用于所公开的构建体和方法中，该示例不是限制性的。用于降低FDPS和FT的表达的RNA的编码区以及细胞因子和趋化因子的编码区可以在相同的构建体中或在不同的构建体上。

[0114] 用于产生包括小RNA的重组多肽或基因调节分子的经典方法是使用稳定的表达构建体。这些构建体基于转导的表达质粒(或其至少一部分)经染色体整合到宿主细胞的基因组中，短期质粒转染或具有有限半衰期的非整合病毒载体。基因整合的位点通常是随机的，并且在任何特定位点整合的基因的数量和比例通常是不可预测的；同样，非整合质粒或病毒载体也产生核DNA，但这些物质通常缺乏DNA复制和连续维持所需的序列。因此，依赖于染色体整合的构建体导致可能超过治疗间隔的重组基因的永久维持。

[0115] 用于基因表达的稳定表达构建体的替代方案是瞬时表达构建体。后一种基因表达构建体的表达基于非整合的质粒，因此当细胞经历分裂或质粒载体被内源性核酸酶破坏时，表达通常会丢失。

[0116] 所公开的构建体优选是瞬时表达的附加型构建体。游离构建体随时间降解或稀释，使得它们不会对对象的基因组进行永久性改变，也不会将它们整合到靶细胞的染色体中。游离型复制过程通常包括宿主细胞复制机制和病毒反式作用因子。

[0117] 避免染色体整合减少了体内基因递送的某些障碍。然而，即使是整合缺陷构建体也可以具有整合的背景频率，并且任何DNA分子都可以发现与宿主序列重组的罕见同源性；但这些整合率非常罕见，通常没有临床意义。

[0118] 因此，在一些实施方式中，所公开的载体在约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、或约12周的时期内支持活性基因和/或小RNA递送。在一些实施方式中，所公开的载体在约1个月，2个月，3个月，4个月，5个月，6个月，7个月，8个月，9个月，10个月，11个月，12个月或更长的时期内支持活性基因和/或小RNA递送。这些时间段的任何组合也可用于本发明的方法，例如1个月和1周，或3个月和2个星期。

[0119] 然而，在一些实施方式中，构建体包含依赖于逆转录病毒整合酶基因的整合元件，使得构建体整合到对象的染色体中。逆转录和转座是移动遗传元件整合或插入染色体的机制的另外的例子。质粒可以通过重组整合到染色体中，并且基因编辑技术(包括CRISPR和TALEN)利用引导RNA序列并通过基因转换机制改变染色体基因座。

[0120] 构建体可包含特异性启动子，用于表达参与维持GD T细胞的细胞因子(即IL-2，IL-7，IL-17和IL-15)。例如，可以纳入公开的构建体中的启动子包括但不限于TATA-盒启动子，CpG-盒启动子，CCAAT-盒启动子，TTGACA-盒启动子，BRE-盒启动子，INR-盒启动子，AT-基启动子，CG基启动子，ATCG-紧密启动子，ATCG-平衡启动子，中ATCG-启动子，低ATCG启动子，低AT启动子，低CG启动子，AT-刺突启动子和CG-刺突启动子。参见Gagniuc和lonescu-Tirgoviste，真核基因组可以展示多达10种通用类别的基因启动子(Eukaryotic genomes may exhibit up to 10 generic classes of gene promoters)，BMC GENOMICS 13:512 (2012)。

[0121] 治疗载体

[0122] 构建体可以通过已知的转染和/或转导载体递送，包括但不限于慢病毒载体，腺相关病毒，痘病毒，疱疹病毒载体，蛋白质和/或脂质复合物，脂质体，胶束等。

[0123] 病毒载体可以优先靶向可用于所公开方法的细胞类型(即肿瘤细胞或骨髓细胞)。由于特定的病毒包膜-宿主细胞受体相互作用和基因表达的病毒机制，病毒载体可用于将基因转导到靶细胞中。结果，病毒载体已被用作将基因转移到许多不同细胞类型中的载剂，所述细胞类型包括完整胚胎、受精卵、分离的组织样品、原位组织靶标和培养的细胞系。在细胞中引入和表达外源基因的能力可用于基因表达的研究，细胞系的阐明以及提供治疗干预的潜力，例如基因治疗，诱导多能干细胞的体细胞重编程，以及各类免疫疗法。来自病毒如乳多空病毒科(例如牛乳头瘤病毒或BPV)或疱疹病毒科(例如Epstein Barr病毒或EBV)或嗜肝DNA病毒科(例如乙型肝炎病毒或HBV)或包括牛痘的痘病毒载体的病毒成分可用于所公开的载体中。

[0124] 慢病毒载体是所公开的组合物和方法的优选载体类型，但本公开内容不特别限于慢病毒载体。慢病毒是可以将大量的病毒核酸传递到宿主细胞中的一类病毒。慢病毒的特征在于具有感染/转导非分裂细胞的独特能力，并且在转导后，慢病毒将它们的核酸整合到宿主细胞的染色体中。

[0125] 传染性慢病毒有编码毒力蛋白的三个主要基因gag，pol和env，以及两个调控基因，包括tat和rev。取决于特定血清型和病毒，可能存在编码参与调节、合成和/或加工病毒核酸和其他复制功能的蛋白质的其他辅助基因。

[0126] 此外，慢病毒包含长末端重复(LTR)区域，其可以是约600nt长。LTR可以分段为U3、R和U5区域。LTR可以通过整合酶的作用介导逆转录病毒DNA整合到宿主染色体中。或者，在没有功能性整合酶的情况下，LTR可用于使病毒核酸环化。

[0127] 参与慢病毒复制早期阶段的病毒蛋白包括逆转录酶和整合酶。逆转录酶是病毒编码的RNA依赖性DNA聚合酶。该酶使用病毒RNA基因组作为合成互补DNA拷贝的模板。逆转录酶还具有RNA酶H活性以破坏RNA模板。整合酶结合宿主DNA和逆转录酶产生的病毒cDNA。整合酶在将病毒基因组插入宿主DNA之前处理LTR。Tat在转录过程中充当反式激活剂以增强起始和延伸。rev反应元件在转录后起作用，调节mRNA剪接并转运至细胞质。

[0128] 通常，病毒载体包含糖蛋白，并且各种糖蛋白可以提供特异性亲和力。例如，VSVG肽可以增加向骨髓细胞中的转染。或者，病毒载体还可以具有与其壳肽连接的靶向部分，例如抗体。靶向抗体可以对肿瘤上过表达的抗原具有特异性，例如HER-2，PSA，CEA，M2-PK和CA19-9。

[0129] 其他病毒载体特异性也是本领域已知的，并且可用于靶向特定细胞群。例如，痘病毒载体靶向巨噬细胞和树突细胞。

[0130] 慢病毒载体系统

[0131] 慢病毒病毒体(颗粒)由编码必需病毒蛋白的载体系统表达，以产生病毒体(病毒颗粒)。存在至少一种载体，其含有编码逆转录和整合所必需的慢病毒pol蛋白的核酸序列，其与启动子可操作地连接。在另一个实施方式中，pol蛋白由多种载体表达。还存在含有编码慢病毒gag蛋白的核酸序列的载体，所述慢病毒gag蛋白是形成与启动子可操作连接的病毒衣壳所必需的。在一个实施方式中，该gag核酸序列位于与至少一些pol核酸序列不同的载体上。在另一个实施方式中，gag核酸位于与编码pol蛋白的所有pol核酸序列分开的载体上。

[0132] 可以对载体进行许多修饰，其用于产生颗粒以使获得野生型回复体的机会进一步最小化。这些包括但不限于LTR的U3区缺失，tat缺失和基质(MA)缺失。

[0133] gag，poi和env载体不含有包装慢病毒RNA的慢病毒基因组的核苷酸，称为慢病毒包装序列。

[0134] 形成颗粒的载体优选不含有来自表达包膜蛋白的慢病毒基因组的核酸序列。优选地，使用含有编码与启动子可操作连接的包膜蛋白的核酸序列的单独载体。该env载体也不含慢病毒包装序列。在一个实施方式中，env核酸序列编码慢病毒包膜蛋白。

[0135] 在另一个实施方式中，包膜蛋白不是来自慢病毒，而是来自不同的病毒。所得颗粒称为假型颗粒。通过适当选择包膜，可以“感染”几乎任何细胞。例如，可以使用编码靶向内吞区室的包膜蛋白的env基因，例如下述病毒的基因：流感病毒，VSV-G，α病毒(西门利克森林病毒，辛德毕斯病毒)，沙粒病毒(淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒)，黄病毒(蜱传脑炎病毒，登革热病毒，丙型肝炎病毒，GB病毒)，弹状病毒(水疱性口炎病毒，狂犬病病毒)，副粘病毒(腮腺炎或麻疹)和正粘病毒(流感病毒)。可以优选使用的其他包膜包括来自Moloney白血病病毒例如MLV-E，MLV-A和GALV的那些。当宿主细胞是原代细胞时，后者的包膜是特别优选的。可以根据所需的宿主细胞选择其他包膜蛋白。例如，靶向特定受体如多巴胺受体可用于脑递送。另一个靶标可以是血管内皮。可以使用丝状病毒包膜靶向这些细胞。例如，埃博拉病毒GP通过转录后修饰成为GP和GP_2糖蛋白。在另一个实施方式中，可以使用具有假型包膜的不同的慢病毒衣壳(例如，FIV或SHIV[美国专利号5,654,195])。SHIV假型载体可以容易地用于动物模型，例如猴子。

[0136] 如本文详述的，慢病毒载体系统通常包括至少一种辅助质粒，其包含gag，pol或

rev基因中的至少一种。可以在单独质粒上提供gag,pol和rev基因中的每一个,或者可以在同一质粒上一起提供一个或多个基因。在一个实施方式中,gag,pol和rev基因在相同质粒上提供(例如,图2)。在另一个实施方式中,gag和pol基因在第一质粒上提供,rev基因在第二质粒上提供(例如,图3)。因此,3-载体和4-载体系统均可用于产生慢病毒,如实施例部分和本文其他地方所述。将治疗载体,包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞系中。包装细胞系的非限制性实例是293T/17HEK细胞系。当将治疗载体,包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞系中时,最终产生慢病毒颗粒。

[0137] 另一方面,公开了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。该系统包括如本文所述的慢病毒载体;用于表达经优化用于感染细胞的包膜蛋白的包膜质粒;和用于表达gag,pol和rev基因的至少一种辅助质粒,其中当慢病毒载体、包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞系中时,通过包装细胞系产生慢病毒颗粒,其中,慢病毒颗粒能够抑制趋化因子受体CCR5的产生或能靶向HIV RNA序列。

[0138] 在另一方面,并且如图2中详述,慢病毒载体(其在本文中也称为治疗载体)可包括以下元件:杂合5'长末端重复序列(RSV/5'LTR)(SEQ ID NO:11-12),Psi序列(RNA包装位点)(SEQ ID NO:13),RRE(Rev-响应元件)(SEQ ID NO:14),cPPT(聚嘌呤区)(SEQ ID NO:15),H1启动子(SEQ ID NO:16),FDPS shRNA(SEQ ID NO:1,2,3,4),土拨鼠转录后调控元件(WPRE)(SEQ ID NO:17)和3'δLTR(SEQ ID NO:18)。在另一方面,通过取代、缺失、添加或突变的序列变异可用于修饰本文的序列参考。

[0139] 另一方面,如本文所详述,辅助质粒已被设计为包括以下元件:CAG启动子(SEQ ID NO:19);HIV组件gag(SEQ ID NO:20);HIV组件pol(SEQ ID NO:21);HIV Int(SEQ ID NO:22);HIV RRE(SEQ ID NO:23);和HIV Rev(SEQ ID NO:24)。另一方面,可以修饰辅助质粒以包括用于表达gag和pol基因的第一辅助质粒,和用于表达rev基因的第二和单独的质粒。在另一方面,通过取代、缺失、添加或突变的序列变异可用于修饰本文的序列参考。

[0140] 另一方面,如本文所详述,包膜质粒被设计为包括从左到右的以下元件:RNA聚合酶II启动子(CMV)(SEQ ID NO:25)和水疱性口炎病毒G糖蛋白(VSV-G)(SEQ ID NO:26)。在另一方面,通过取代、缺失、添加或突变的序列变异可用于修饰本文的序列参考。

[0141] 在另一个方面,用于慢病毒包装的质粒可以用相似的元件修饰,并且可以在不丧失载体功能的情况下去除内含子序列。例如,以下元件可以代替包含包装系统的质粒中的相似元件:延伸因子-1(EF-1),磷酸甘油酸激酶(PGK)和泛素C(UbC)启动子可以取代CMV或CAG启动子。SV40聚A和bGH聚A可以代替兔β球蛋白聚A。辅助质粒中的HIV序列可以由不同的HIV菌株或进化枝构建。VSV-G糖蛋白可被下述病毒的膜糖蛋白取代:猫内源性病毒(RD114),长臂猿白血病病毒(GALV),狂犬病毒(FUG),淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV),甲型鸡瘟流感病毒(FPV),罗斯河甲病毒(RRV),鼠白血病病毒10A1(MLV)或埃博拉病毒(EboV)。

[0142] 值得注意的是,慢病毒包装系统可以商业获得(例如,来自马里兰州罗克维尔的OriGene技术公司的Lenti-vpak包装试剂盒),并且也可以如本文所述进行设计。此外,替代或修改慢病毒包装系统的各方面以改善任何数量的相关因素(包括慢病毒颗粒的生产效率)在本领域技术人员的技能范围内。

[0143] 剂量和剂型

[0144] 所公开的载体允许感兴趣的基因或序列的短期、中期或长期表达以及所公开载体的附加型维持。因此，给药方案可以根据所治疗的病症和给药方法而变化。

[0145] 在一个实施方式中，可以以不同剂量向需要的对象给予转导载体。具体地，可以向对象给予大约≥10^6个感染剂量(其中平均需要1剂量以转导1个靶细胞)。更具体地，可以向对象给予约≥10^7、约≥10^8、约≥10^9、或约≥10^{10}个感染剂量，或这些值之间的任何数量的剂量。转导载体剂量的上限将针对每种疾病指征来确定，并且将取决于每个单独产品或产品批次的毒性/安全性概况。

[0146] 另外，本公开的载体可以定期给予，例如一天一次或两次，或任何其他合适的时间段。例如，载体可以每周一次，每隔一周一次，每三周一次，每月一次，每隔一个月，每三个月，每六个月，每九个月，每年一次，每十八个月，每两年，每三十个月或每三年一次给予有需要的对象。

[0147] 在一个实施方式中，所公开的载体作为药物组合物给予。在一些实施方式中，包含所公开的载体的药物组合物可以配制成多种剂型，包括但不限于用于临床应用的鼻，肺，口服，局部或肠胃外剂型。每种剂型可包含各种增溶剂，崩解剂，表面活性剂，填充剂，增稠剂，粘合剂，稀释剂如润湿剂或其它药学上可接受的赋形剂。包含载体的药物组合物也可以配制用于注射、吹入、输注或皮内暴露。例如，可注射制剂可以在合适的pH和张力下在水性或非水性溶液中包含所公开的载体。

[0148] 所公开的载体可以通过直接注射到肿瘤部位或感染部位而给予对象。在一些实施方式中，载体可以全身给予。在一些实施方式中，载体可以通过引导插管给予紧邻肿瘤或感染部位周围的组织。

[0149] 所公开的载体组合物可以使用任何药学上可接受的方法给予，例如鼻内，口腔，舌下，口服，直肠，眼，肠胃外(静脉内，皮内，肌肉内，皮下，腹膜内)，经肺，阴道内，局部(locally)给予，局部(topically)给予，在划痕后局部给予，经粘膜给予，通过气溶胶，在半固体培养基如琼脂糖或明胶中，或通过口腔或鼻腔喷雾制剂。

[0150] 此外，所公开的载体组合物可以配制成任何药学上可接受的剂型，例如固体剂型，片剂，丸剂，锭剂，胶囊，液体分散体，凝胶，气溶胶，肺气雾剂，鼻气雾剂，软膏，乳膏，半-固体剂型，溶液，乳液和悬浮液。此外，组合物可以是控释制剂，持续释放制剂，速释制剂或其任何组合。此外，组合物可以是透皮递送系统。

[0151] 在一些实施方式中，包含载体的药物组合物可以配制成用于口服给药的固体剂型，并且固体剂型可以是粉末，颗粒，胶囊，片剂或丸剂。在一些实施方式中，固体剂型可包括一种或多种赋形剂，例如碳酸钙，淀粉，蔗糖，乳糖，微晶纤维素或明胶。此外，除赋形剂外，固体剂型还可包括润滑剂，例如滑石或硬脂酸镁。在一些实施方式中，口服剂型可以是立即释放或调节释放形式。调节释放剂型包括控释或延长释放，肠释放等。调节释放剂型中使用的赋形剂是本领域普通技术人员公知的。

[0152] 在进一步的实施方式中，包含载体的药物组合物可以配制成舌下或口含剂型。这样的剂型包括经舌下给予的舌下片剂或溶液组合物，和放置在脸颊和牙龈之间口腔片剂。

[0153] 在一些实施方式中，包含载体的药物组合物可以配制成鼻剂型。本发明的该剂型包含用于鼻腔递送的溶液，悬浮液和凝胶组合物。

[0154] 在一些实施方式中，包含载体的药物组合物可以配制成用于口服给药的液体剂

型，例如悬浮液，乳液或糖浆。在一些实施方式中，除常用的简单稀释剂如水和液体石蜡外，液体剂型还可包括各种赋形剂，如保湿剂，甜味剂，芳香剂或防腐剂。在特定的实施方式中，可以将包含载体的组合物配制成适合给予儿科患者。

[0155] 在一些实施方式中，药物组合物可以配制成用于肠胃外给药的剂型，例如无菌水溶液、悬浮液、乳液、非水溶液或栓剂。在一些实施方式中，溶液或悬浮液可包括丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油或可注射的酯如油酸乙酯。

[0156] 药物组合物的剂量可以根据患者的体重、年龄、性别、给药时间和方式，排泄率和疾病的严重程度而变化。

[0157] 在一些实施方式中，癌症的治疗通过使用针或血管内插管将所公开的载体构建体直接注射到肿瘤中来实现。在一些实施方式中，通过静脉或动脉插管或注射、皮内递送、肌内递送或注射到疾病部位附近的引流器官(organ)中将所公开的载体给予到脑脊髓液、血液或淋巴循环中。

[0158] 给出以下实施例以说明本发明。然而，应该理解的是，本发明不限于这些实施例中描述的具体病症或细节。本文引用的所有印刷出版物均通过引用具体纳入。

[0159] 实施例

[0160] 实施例1:慢病毒载体系统的开发

[0161] 开发了慢病毒载体系统，如图4(环化形式)所总结。在用治疗载体、包膜质粒和辅助质粒转染后，在293T/17HEK细胞(购自弗吉尼亚州玛纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection))中产生慢病毒颗粒。产生功能性病毒颗粒的293T/17HEK细胞的转染，使用试剂聚(乙烯亚胺)(PEI)来提高质粒DNA摄取的效率。最初将质粒和DNA分别加入不含血清的培养基中，比例为3:1(PEI与DNA的质量比)。2-3天后，收集细胞培养基，通过高速离心和/或过滤然后阴离子交换色谱来纯化慢病毒颗粒。慢病毒颗粒的浓度可以用转导单位/ml(TU/ml)表示。通过测量培养液中的HIV p24水平(p24蛋白掺入慢病毒颗粒)，通过定量PCR测量每个细胞的病毒DNA拷贝数，或通过感染细胞和使用光(如果载体编码荧光素酶或荧光蛋白标记物)来完成TU的测定。

[0162] 如上所述，设计了3-载体系统(即2-载体慢病毒包装系统)用于生产慢病毒颗粒。3载体系统的示意图如图2所示。简而言之，并且参考图2，最顶部的载体是辅助质粒，在该情况下，其包括Rev。出现在图2中间的载体是包膜质粒。最下面的载体是治疗载体，如本文所述。

[0163] 更具体地参考图2，辅助+Rev质粒包括CAG增强子(SEQ ID NO:27)；CAG启动子(SEQ ID NO:19)；鸡β肌动蛋白内含子(SEQ ID NO:28)；HIV gag(SEQ ID NO:20)；HIV Pol(SEQ ID NO:21)；HIV Int(SEQ ID NO:22)；HIV RRE(SEQ ID NO:23)；HIV Rev(SEQ ID NO:24)；和兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:29)。

[0164] 包膜质粒包括CMV启动子(SEQ ID NO:25)；β球蛋白内含子(SEQ ID NO:30)；VSV-G(SEQ ID NO:28)；和兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:31)。

[0165] 合成包含辅助(+Rev)和包膜质粒的2-载体慢病毒包装系统。

[0166] 材料和方法：

[0167] 辅助质粒的构建：通过对来自含有Gag，Pol和整合酶基因的pNL4-3HIV质粒(NIH Aids试剂项目)的DNA片段进行初始PCR扩增来构建辅助质粒。设计引物以用EcoRI和NotI限

制性位点扩增片段,其可用于插入pCDNA3质粒(英杰(Invitrogen)公司)中的相同位点。正向引物是(5'-TAAGCAGAATTC ATGAATTTGCCAGGAAGAT-3')(SEQ ID NO:32),反向引物是(5'-CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCACGAAT-3')(SEQ ID NO:33)。

[0168] Gag,Pol,整合酶片段的序列如下所示:

[0169] GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGT
AAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCT
GTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTG
TACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAATAAAAGC
ATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATACT
CCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAATAAGAGAA
CTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACT
GGATGTGGGCGATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGT
ATAAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATAT
TCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGA
TGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTG
AGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATC
CTGATAAATGGACAG TACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAG
TGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAAACTTCTTAGGGGAAC
CAAAGCACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAA
GAACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAAT
GGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACAC
TAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCT
AAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCCTG
AGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGA
AACTTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAACTGACAGAGGAAGA
CAAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATT
CGGGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGA
ATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGCACAC
AAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATGGAA
TAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACC
TGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGAC
TGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCA
GTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGG
AAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTCACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTGTTGG
TGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAG
AATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCAT
CCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGG ATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGA
CATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGAT
CCAGTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAA

AAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAG
TAGACAGGATGAGGATTAA(SEQ ID NO:34)

[0170] 接下来,通过MWG操纵子合成含有具有XbaI和Xmal侧翼限制性位点的Rev、RRE和兔β球蛋白聚A序列的DNA片段。然后将DNA片段在XbaI和XmaI限制性位点处插入质粒中。DNA序列如下所示:

[0171] TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCT
TCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGA
GAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGC
CTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTGGGACGCAGGGGGT
GGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGTTCCT
TGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTG
TCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCT
GGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTT
TCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATT
TTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAAC
ATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAA
GAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGAT
TTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGA
TTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTAT GAAGATCCCTCGACCTGCAGCCC
AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGA
GCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGC
CCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTA
ACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTT
ATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTT
TTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATA
AAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCCGGG
(SEQ ID NO:35)

[0172] 最后,用CAG增强子/启动子和鸡β肌动蛋白内含子序列替换pCDNA3.1的CMV启动子。通过MWG操纵子合成含有具有MluI和EcoRI侧翼限制性位点的CAG增强子/启动子/内含子序列的DNA片段。然后将DNA片段在MluI和EcoRI限制性位点处插入质粒中。DNA序列如下所示:

[0173] ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCG
TTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTA
TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTG
GCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT
ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGG
TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT
TTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGG
GCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCG

AGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTG
CCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGA
CGGCCCTTCTCCTCCGGGCTG TAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAG
CCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGG
GAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCG
TGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGC
GGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTC
CCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGG
CGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGC
GGCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAG
GGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGC
GCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCC
CTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGG
CTTCTGGCGTGTGACCGGCGGGAATTC(SEQ ID NO:36)

[0174] 构建VSV-G包膜质粒：

[0175] 水泡性口炎印第安纳病毒糖蛋白(VSV-G)序列由MWG操纵子合成，具有侧翼EcoRI限制性位点。然后将DNA片段在EcoRI限制性位点插入pCDNA3.1质粒(英杰公司)，并使用CMV特异性引物通过测序确定正确的方向。DNA序列如下：

[0176] GAATTCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGT
TTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCCTTCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTA
AATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACG
GTTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACATTC
CATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTTGGCTGAAT
CCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTG ACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCT
CACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCAATTACA
TATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCAT
TTCCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGT
AACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCAT
CAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAG
TATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCCTC
TGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAA
ACCCAGGAACCGGTCCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGA
TATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAACTGTGGGATGAC
TGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTAT
ACATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTCGAACATCCTCACAT
TCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATC
GAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTG
GACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATAC
AGACATAGAGATGAGAATTC(SEQ ID NO:37)

[0177] 还使用本文所述的方法和材料设计和生产了4-载体系统(即,3-载体慢病毒包装系统)。4载体系统的示意图如图3所示。简而言之,并且参考图3,最顶部的载体是辅助质粒,在该情况下,其不包括Rev。上数第二个载体是单独的Rev质粒。下数第二个载体是包膜质粒。最底部的载体是前述的治疗载体。

[0178] 部分地参考图2,辅助质粒包括CAG增强子(SEQ ID NO:27);CAG启动子(SEQ ID NO:19);鸡β肌动蛋白内含子(SEQ ID NO:28);HIV gag(SEQ ID NO:20);HIV Pol(SEQ ID NO:21);HIV Int(SEQ ID NO:22);HIV RRE(SEQ ID NO:23);和兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:29)。

[0179] Rev质粒包含RSV启动子(SEQ ID NO:38);HIV Rev(SEQ ID NO:39);和兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:29)。

[0180] 包膜质粒包括CMV启动子(SEQ ID NO:25);β球蛋白内含子(SEQ ID NO:30);VSV-G(SEQ ID NO:28);和兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:29)。

[0181] 合成包含辅助、Rev和包膜质粒的3-载体慢病毒包装系统。

[0182] 材料和方法:

[0183] 无Rev的辅助质粒的构建:

[0184] 通过插入含有RRE和兔β球蛋白聚A序列的DNA片段构建不含Rev的辅助质粒。该序列由MWG操纵子合成,具有侧翼XbaI和XmaI限制性位点。然后将RRE/兔聚Aβ球蛋白序列在XbaI和XmaI限制性位点插入辅助质粒中。DNA序列如下所示:

[0185] TCTAGAAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCC ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCACCCGGG(SEQ ID NO:35)

[0186] Rev质粒的构建:

[0187] RSV启动子和HIV Rev序列由MWG操纵子合成为单个DNA片段,具有侧翼Mfel和XbaI限制性位点。然后将DNA片段在Mfe和XbaI限制性位点插入pCDNA3.1质粒(英杰公司)中,其中CMV启动子被RSV启动子取代。DNA序列如下:

[0188] CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGG GGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGGAAATGTAG TCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGC ACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACAGGTCTGACATG GATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCAT TTGACCATTCACCACATTGGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCC ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCT CCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAA GCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAG ACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTA CCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTC AAATATTGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA(SEQ ID NO:40)

[0189] 可以用相似的元件修饰用于2-载体和3-载体包装系统的质粒,并且可以在不损失载体功能的情况下去除内含子序列。例如,以下元件可以替换2载体和3载体包装系统中的类似元件:

[0190] 启动子:延伸因子-1(EF-1)(SEQ ID NO:41),磷酸甘油酸激酶(PGK)(SEQ ID NO:42)和泛素C(UbC)(SEQ ID NO:43)可以取代CMV(SEQ ID NO:25)或CAG启动子(SEQ ID NO:19)。这些序列还可以通过添加,取代,缺失或突变而进一步改变。

[0191] 聚A序列:SV40聚A(SEQ ID NO:44)和bGH聚A(SEQ ID NO:45)可以取代兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:29)。这些序列还可以通过添加,取代,缺失或突变而进一步改变。

[0192] HIV Gag,Pol和整合酶序列:辅助质粒中的HIV序列可以由不同的HIV菌株或进化枝构建。例如,来自Bal菌株的HIV Int(SEQ ID NO:22);HIV Gag(SEQ ID NO:20);HIV Pol(SEQ ID NO:21)可以与本文所述的辅助质粒/辅助+Rev质粒中包含的gag,pol和int序列互换。这些序列还可以通过添加,取代,缺失或突变而进一步改变。

[0193] 包膜:VSV-G糖蛋白可以被来自下述病毒的膜糖蛋白取代:猫内源病毒(RD114)(SEQ ID NO:46)、长臂猿白血病病毒(GALV)(SEQ ID NO:47)、狂犬病毒(FUG)(SEQ ID NO:48),淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)(SEQ ID NO:49),甲型鸡瘟流感病毒(FPV)(SEQ ID NO:50),罗斯河甲病毒(RRV)(SEQ ID NO:51),小鼠白血病病毒10A1(MLV)(SEQ ID NO:52),或埃博拉病毒(EboV)(SEQ ID NO:53)。这些包膜的序列在本文的序列部分中标识。此外,这些序列还可以通过添加,取代,缺失或突变而进一步改变。

[0194] 总之,可以对3-载体与4-载体系统进行比较和对比,部分如下。3-载体慢病毒载体系统包含:1.辅助质粒:HIV Gag,Pol,整合酶和Rev/Tat;2.包膜质粒:VSV-G/FUG包膜;和3.治疗载体:RSV 5'LTR,Psi包装信号,Gag片段,RRE,Env片段,cPPT,WPRE和3'δLTR。4-载体慢病毒载体系统包含:1.辅助质粒:HIV Gag,Pol,和整合酶;2.Rev质粒:Rev;3.包膜质粒:VSV-G/FUG包膜;和4.治疗载体:RSV 5'LTR,Psi包装信号,Gag片段,RRE,Env片段,cPPT,WPRE和3'δLTR。与上述元件相对应的序列在本文的序列表部分中标识。

[0195] 实施例2:表达FDPS的慢病毒载体的开发

[0196] 该实施例的目的是开发FDPS慢病毒载体。

[0197] 抑制性RNA设计:使用人类法尼基二磷酸合酶(FDPS)(NM_002004.3)mRNA的序列来

搜索潜在的siRNA或shRNA候选物以敲减人细胞中的FDPS水平。潜在的RNA干扰序列选自siRNA或shRNA设计程序选择的候选物，例如来自Broad研究所的GPP网页门户(http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/)或来自Thermo科学公司的BLOCK-iT RNAi设计器(https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/)。将单独选择的shRNA序列插入慢病毒载体中，紧邻RNA聚合酶III启动子的3'端以调节shRNA表达，所述启动子例如HI(SEQ ID NO:16)，U6(SEQ ID NO:54)或7SK(SEQ ID NO:55)。这些慢病毒shRNA构建体用于转导细胞并测量特定mRNA水平的变化。将最有效降低mRNA水平的shRNA单独包埋在微小RNA骨架内，以允许通过EF-1α或CMV RNA聚合酶II启动子表达。microRNA骨架选自mirbase.org。还将RNA序列合成为合成的siRNA寡核苷酸，并在不使用慢病毒载体的情况下直接导入细胞。

[0198] 载体构建：对于FDPS shRNA，通过Eurofins MWG操纵子合成含有BamHI和EcoRI限制性位点的寡核苷酸序列。将重叠的有义和反义寡核苷酸序列混合并在从70摄氏度冷却至室温的过程中退火。用限制酶BamHI和EcoRI在37摄氏度下消化慢病毒载体1小时。通过琼脂糖凝胶电泳纯化消化的慢病毒载体，并使用Thermo科学公司的DNA凝胶提取试剂盒从凝胶中提取。测定DNA浓度，混合载体与寡核苷酸(3:1比例)，使其退火，并连接。用T4DNA连接酶在室温下进行连接反应30分钟。将2.5微升的连接混合物加入到25微升STBL3感受态细菌细胞中。在42摄氏度的热激后实现转化。将细菌细胞涂布在含有氨苄青霉素的琼脂平板上并回收抗药性菌落(表明存在氨苄青霉素抗性质粒)，并在LB肉汤中扩增。为了检查寡核苷酸序列的插入，用Thermo科学DNA mini prep试剂盒从收获的细菌培养物中提取质粒DNA。使用用于调节shRNA表达的启动子的特异性引物通过DNA测序验证慢病毒载体中shRNA序列的插入。使用以下靶序列，确定示例性shRNA序列敲减FDPS：

[0199] GTCCTGGAGTACAATGCCATT(FDPS靶序列#1;SEQ ID NO:56)；

[0200] GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTTT(FDPS shRNA序列#1;SEQ ID NO:1)；

[0201] GCAGGATTTCGTTCAGCACTT(FDPS靶序列#2;SEQ ID NO:57)；

[0202] GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTTT(FDPS shRNA序列#2;SEQ ID NO:2)；

[0203] GCCATGTACATGGCAGGAATT(FDPS靶序列#3;SEQ ID NO:58)；

[0204] GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCTGCCATGTACATGGCTTTTT(FDPS shRNA序列#3;SEQ ID NO:3)；

[0205] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGT(FDPS靶序列#4;SEQ ID NO:59)；和

[0206] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTT(FDPS shRNA序列#4;SEQ ID NO:4)。

[0207] 然后将shRNA序列组装入在EF-1α启动子控制下的合成的微小RNA(miR)。简言之，从mirbase.org获得如下详述的miR发夹序列，例如miR30，miR21或miR185。19-22聚体shRNA靶序列用于构建合成的miR序列。将miR序列排列为反义靶序列-发夹环序列(对每种微小RNA特异)-正义靶序列。

[0208] 开发了以下miR序列：

[0209] AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCA

GAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(miR30FDPS序列#1;SEQ ID NO:5)

[0210] AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(miR30FDPS序列#2;SEQ ID NO:6)

[0211] TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA(miR30FDPS序列#3;SEQ ID NO:7)

[0212] CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA(miR155FDPS序列#1;SEQ ID NO:8)

[0213] CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCCTGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA(miR21FDPS序列#1;SEQ ID NO:9)

[0214] GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTGGTCCCCTCCCCGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG(miR185FDPS序列#1;SEQ ID NO:10)

[0215] 实施例3:通过shRNA#4在THP1单核细胞白血病中敲减FDPS 3天

[0216] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#4的慢病毒(LV)敲减THP1单核细胞白血病细胞中的FDPS会刺激γδT细胞中的TNF-α表达,如图5所示。

[0217] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4转导THP1细胞(1×10^5个细胞)3天。转导后两天,用或不用1μM唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导的THP-1细胞与5×10^5个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增Vγ9Vδ2T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-Vδ2和抗TNF-α抗体对Vγ9Vδ2和TNF-α染色后,通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控,并在斑点印迹上选择Vδ2+和TNF-α+细胞。活化的细胞毒性Vγ9Vδ2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸时,LV-对照刺激3.1%的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-FDPS shRNA#4刺激5%。用唑来膦酸处理时,LV-对照刺激7.2%的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-FDPS shRNA#4刺激56.2%。

[0218] 实施例4:通过shRNA#4在THP1白血病细胞中敲减FDPS 14天

[0219] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#4的慢病毒(LV)敲减THP1白血病细胞中的FDPS持续14天会刺激GD T细胞中的TNF-α表达,如图6所示。

[0220] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4转导THP1细胞(1×10^5个细胞)14天。转导后两天,用或不用1μM唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导的THP-1细胞与5×10^5个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增Vγ9Vδ2T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-Vδ2和抗TNF-α抗体对Vγ9Vδ2和TNF-α染色后,通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控,并在斑点印迹上选择Vδ2+和TNF-α+细胞。活化的细胞毒性Vγ9Vδ2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸时,LV-对照刺激0.9%的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)刺激15.9%。用唑来膦酸处理时,LV-对照刺激4.7%的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)刺激76.2%。

[0221] 实施例5:通过shRNA#1在PC3前列腺癌细胞中敲减FDPS 3天

[0222] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#1的慢病毒(LV)敲减PC3前列腺癌细胞中的FDPS持续3天会刺激GD T细胞中的TNF-α表达,如图7所示。

[0223] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#1(SEQ ID NO:1)转导PC3细胞3天。转导后两天,用或不用1μM唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导的PC3细胞与5×10^5个PBMC细胞和IL-2在圆

底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增Vγ9Vδ2T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-Vδ2和抗TNF-α抗体对Vγ9Vδ2和TNF-α染色后，通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控，并在斑点印迹上选择Vδ2+和TNF-α+细胞。活化的细胞毒性Vγ9Vδ2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸，LV-对照刺激0.2％的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-FDPS shRNA#1刺激0.5％。用唑来膦酸处理时，LV-对照刺激1.7％的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-FDPS shRNA#1(SEQ ID NO:1)刺激32.2％。

[0224] 实施例6:通过shRNA#4在PC3前列腺癌细胞中敲减FDPS 3天

[0225] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#4的慢病毒(LV)敲减PC3前列腺癌细胞中的FDPS持续3天会刺激GD T细胞中的TNF-α表达，如图8所示。

[0226] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)转导PC3细胞3天。转导后两天，用或不用1μM唑来膦酸处理细胞。24小时后，将转导的PC3细胞与5×10^5个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增Vγ9Vδ2T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-Vδ2和抗TNF-α抗体对Vγ9Vδ2和TNF-α染色后，通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控，并在斑点印迹上选择Vδ2+和TNF-α+细胞。活化的细胞毒性Vγ9Vδ2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸时，LV-对照刺激0.5％的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)刺激1.9％。用唑来膦酸处理时，LV-对照刺激2.1％的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-FDPS shRNA#4刺激28.7％。

[0227] 实施例7:通过shRNA#1和#4在HepG2肝癌细胞中敲减FDPS 3天

[0228] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#1(SEQ ID NO:1)和shRNA#4(SEQ ID NO:4)的慢病毒(LV)敲减HepG2肝癌细胞中的FDPS持续3天会刺激GD T细胞中的TNF-α表达，如图9所示。

[0229] 用LV对照、LV-FDPS shRNA#1(SEQ ID NO:1)或LV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)转导HepG2细胞3天。转导后两天，用或不用1μM唑来膦酸处理细胞。24小时后，将转导的HepG2细胞与5×10^5个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增Vγ9Vδ2T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-Vδ2和抗TNF-α抗体对Vγ9Vδ2和TNF-α染色后，通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控，并在斑点印迹上选择Vδ2+和TNF-α+细胞。活化的细胞毒性Vγ9Vδ2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸时，LV-对照刺激0.4％的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-FDPS shRNA#1(SEQ ID NO:1)和#4(SEQ ID NO:4)分别刺激0.7％和0.9％。用唑来膦酸处理时，LV-对照刺激6.9％的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-FDPS shRNA#1和#4分别刺激7.6％和21.1％。

[0230] 实施例8:通过微小RNA-30在THP1白血病细胞中敲减FDPS 3天

[0231] 该实施例说明通过表达FDPS靶向合成的微小RNA-30的慢病毒(LV)敲减THP1白血病细胞中的FDPS持续3天会刺激γδT细胞中的TNF-α表达，如图10所示。

[0232] 用LV对照或LV-miR30FDPS#1(SEQ ID NO:5)转导THP1细胞(1x10^5细胞)3天。转导后两天，用或不用1μM唑来膦酸处理细胞。24小时后，将转导的THP-1细胞与5×10^5个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增Vγ9Vδ2T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-Vδ2和抗TNF-α抗体对Vγ9Vδ2和TNF-α染色后，通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控，并在斑点印迹上选择Vδ2+和TNF-α+细胞。活化的细胞毒性Vγ9Vδ2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸时，LV-对照刺激

0.2％的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-miR30FDPS刺激8.1％。用唑来膦酸处理时，LV-对照刺激5.3％的表达TNF-α的Vγ9Vδ2T细胞并且LV-miR30FDPS#1(SEQ ID NO:5)刺激67.3％。

[0233] 实施例9:由THP-1细胞、培养的人GD T细胞和/或Zometa(Zol)的混合物产生的E:T比率

[0234] 该实施例证明了将经处理的THP-1单核细胞样肿瘤细胞与培养的人GD T细胞混合的结果，如图11所示。

[0235] 用对照慢病毒载体(LV)，抑制法尼基二磷酸合酶基因表达的LV(LV-FDPS)，唑来膦酸(Zol)或组合处理单核细胞样细胞系THP-1。如图11所示，图例为:慢病毒对照载体(LV-对照)，表达微小RNA以下调FDPS的慢病毒载体(LV-FPPS)，Zometa(Zol)，Zometa+慢病毒对照(Zol+LV-对照)，或Zometa+表达微小RNA以下调FPPS的慢病毒载体(Zol+LV-FPPS)。

[0236] 从匿名供体培养人GD T细胞，并以4:1、2:1或1:1的比例(GD T:THP-1)加入处理的THP-1细胞中4小时。通过荧光测定法测量细胞杀伤。当用LV-FDPS和Zol的组合处理THP-1细胞时，与单独的任一处理相比，GD T细胞的细胞毒性T细胞杀伤大大增加。当单独LV-FDPS处理与单独的Zol处理相比时，LV-FDPS导致更大的杀伤，但是在组合处理后比肿瘤细胞杀伤超过低3倍。比例为4:1下，联合LV-FDPS+Zol处理引起近70％的肿瘤细胞杀伤;这比第二好的处理(仅LV-FDPS)高出3倍多。

[0237] 实施例10-靶向人法尼基二磷酸合酶(FDPS)基因的慢病毒递送的基于shRNA的RNA干扰

[0238] 用含有H1启动子和非靶向或四种不同FDPS shRNA序列的慢病毒载体感染HepG2人肝实质细胞癌细胞，如图12所示。

[0239] 48小时后，从细胞中提取RNA并转化成cDNA。使用SYBR Green和FDPS引物通过定量PCR测定FDPS cDNA的表达。针对每个样品将FDPS表达标准化为肌动蛋白水平。

[0240] 在293T细胞中产生靶向FDPS的慢病毒载体，其含有HI启动子和非靶向序列(5'-GCCGCTTTGTAGGATAGAGCTCGAGCTCTATCCTACAAAGCGGCTTTTT-3')(SEQ ID NO:60)

[0241] 或四种不同FDPS shRNA序列之一

[0242] GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTTT(FDPS shRNA序列#1;SEQ ID NO:1)；

[0243] GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTTT(FDPS shRNA序列#2;SEQ ID NO:2)；

[0244] GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCTGCCATGTACATGGCTTTTT(FDPS shRNA序列#3;SEQ ID NO:3)；和

[0245] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTT

[0246] (FDPS shRNA序列#4;SEQ ID NO:4)。

[0247] 然后用慢病毒载体感染HepG2人肝实质细胞癌细胞以确定FDPS敲减的功效。48小时后，使用RNeasy RNA分离试剂盒(凯杰(Qiagen)公司)从细胞中提取RNA，并用Superscript VILO cDNA合成试剂盒(Thermo科学公司)转化成cDNA。使用SYBR Green PCR混合物(Thermo科学公司)和FDPS引物(正向引物:5'-AGGAATTGATGGCGAGAAGG-3'(SEQ ID NO:61)和反向引物:5'-CCCAAAGAGGTCAAGGTAATCA-3'(SEQ ID NO:62))在应用生物系统公

司StepOne qPCR机器上通过定量PCR测定FDPS cDNA的表达。针对每个样品，使用肌动蛋白引物(正向引物:5'-AGCGCGGCTACAGCTTCA-3'(SEQ ID NO:63)和反向引物:5'-GGCGACGTAGCACAGCTTCT-3'(SEQ ID NO:64))将FDPS表达标准化为肌动蛋白水平。shCon样品的相对FDPS RNA表达设定为100％。FDPS表达降低85％(FDPS序列#1)，89％(FDPS序列#2)，46％(FDPS序列#3)和98％(FDPS序列#4)。

[0248] 实施例11-靶向人法尼基二磷酸合酶(FDPS)基因的慢病毒递送的基于miR的RNA干扰

[0249] 如图13所示，用含有H1启动子(SEQ ID NO:16)和FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)序列或EF-1α启动子(SEQ ID NO:41)和基于miR30的FDPS序列的慢病毒载体感染HepG2人肝实质细胞癌细胞。48小时后，裂解细胞并使用抗FDPS(Thermo科学公司)和抗肌动蛋白(Sigma公司)抗体作为蛋白质上样对照进行免疫印迹。

[0250] 更具体地，用含有H1启动子(SEQ ID NO:16)和FDPS shRNA序列GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTT(FDPS shRNA序列#4;SEQ ID NO:4)或EF-1α启动子(SEQ ID NO:41)和基于miR30的FDPS序列AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(miR30FDPS序列#1;SEQ ID NO:5)和AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT(miR30FDPS序列#2;SEQ ID NO:6)的慢病毒载体感染HepG2人肝实质细胞癌细胞。

[0251] 48小时后，用NP-40裂解缓冲液裂解细胞，用Bio-Rad蛋白质测定试剂定量蛋白质。将50微克的蛋白质样品在4-12％Bis-Tris凝胶(Thermo科学公司)上电泳并转移至PVDF膜(EMD Millipore公司)。使用抗FDPS(Thermo科学公司)和抗肌动蛋白(Sigma公司)抗体作为蛋白质上样对照进行免疫印迹。抗体与HRP偶联的二抗结合，并使用Immobilon Western ECL试剂(EMD Millipore公司)用Licor c-DiGit印迹扫描仪检测。用NIH图像软件定量免疫印迹条带的光密度测定。具有EF-1启动子的LV对照设定为100％。FDPS蛋白表达减少68％(LV-shFDPS#4)，43％(LV-miR FDPS#1)和38％(LV-miR FDPS#3)。

[0252] 实施例12-通过表达FDPS shRNA#4的腺相关病毒(AAV)在HepG2肝癌细胞中敲减FDPS 3天

[0253] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)的腺相关病毒(AAV)在HepG2肝癌细胞中敲减FDPS 3天会刺激GD-T细胞中的TNF-α表达(图14，图B)。

[0254] 用对照或AAV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:8)转导HepG2细胞3天。转导后两天，用或不用1μM唑来膦酸处理细胞。24小时后，将转导的HepG2细胞与5×10^5个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增Vγ9Vδ2T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-Vδ2和抗TNF-α抗体对Vγ9Vδ2和TNF-α染色后，通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控，并在斑点印迹上选择Vδ2+和TNF-α+细胞。活化的细胞毒性Vγ9Vδ2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中(图14，图B)。

[0255] AAV载体构建。将FDPS shRNA序列#4(SEQ ID NO:4)插入pAAV质粒(细胞生物实验室公司(Cell Biolabs))。通过Eurofins MWG操纵子合成含有BamHI和EcoRI限制性位点的FDPS寡核苷酸序列。将重叠的有义和反义寡核苷酸序列混合并在从70摄氏度冷却至室温的过程中退火。用限制酶BamHI和EcoRI在37摄氏度下消化pAAV 1小时。通过琼脂糖凝胶电泳

纯化消化的pAAV质粒，并使用Thermo科学公司的DNA凝胶提取试剂盒从凝胶中提取。测定DNA浓度，混合载体与寡核苷酸(3:1比例)，使其退火，并连接。用T4DNA连接酶在室温下进行连接反应30分钟。将2.5微升的连接混合物加入到25微升STBL3感受态细菌细胞中。在42摄氏度的热激后实现转化。将细菌细胞涂布在含有氨苄青霉素的琼脂平板上并回收抗药性菌落(表明存在氨苄青霉素抗性质粒)，并在LB肉汤中扩增。为了检查寡核苷酸序列的插入，用Thermo科学DNA mini prep试剂盒从收获的细菌培养物中提取质粒DNA。使用用于调节shRNA表达的启动子的特异性引物通过DNA测序验证pAAV质粒中shRNA序列的插入。具有H1启动子(SEQ ID NO:16)，shFDPS序列(例如，SEQ ID NO:4)，左反向末端重复(左ITR;SEQ ID NO:65)和右反向末端重复(右ITR;SEQ ID NO:66)的示例性AAV载体可以为图14的图A所示。

[0256] 生产AAV颗粒。将AAV-FDPS shRNA质粒与质粒pAAV-RC2(细胞生物实验室公司)和pHelper(细胞生物实验室公司)组合。pAAV-RC2质粒含有Rep和AAV2衣壳基因，pHelper含有腺病毒E2A，E4和VA基因。为了产生AAV颗粒，将这些质粒以1:1:1的比例(pAAV-shFDPS:pAAV-RC2:pHelper)转染到293T细胞中。为了转染150mm培养皿(BD Falcon公司)中的细胞，将10微克每种质粒一起加入1ml DMEM中。在另一个试管中，将60微升转染试剂PEI(1微克/ml)(Polysciences公司)加入1ml DMEM中。将两个试管混合在一起并孵育15分钟。然后将转染混合物加入细胞中，3天后收集细胞。通过在干冰/异丙醇中冷冻/解冻裂解来裂解细胞。将Benzonase核酸酶(Sigma公司)在37摄氏度下加入细胞裂解物中持续30分钟。然后通过在4摄氏度下以12,000rpm离心15分钟沉淀细胞碎片。收集上清液，然后加入靶细胞中。

[0257] 实施例13-用LV-shFDPS转导并用唑来膦酸处理的细胞中RAP1异戊烯化降低

[0258] 该实施例说明靶向人法尼基二磷酸合酶(FDPS)基因的慢病毒递送的shRNA和唑来膦酸协同抑制法尼基二磷酸产生。

[0259] FDPS是类异戊二烯合成途径中的酶，其催化法尼基二磷酸的产生。通过唑来膦酸抑制FDPS的酶活性或通过shRNA介导的敲减降低蛋白质表达将导致降低的法尼基二磷酸水平。细胞蛋白的法尼基化需要法尼基二磷酸。RAPIA是一种通过法尼基化修饰的蛋白质，可用作细胞法尼基二磷酸酯水平的生物标志物。在用LV-shFDPS单独转导或与唑来膦酸组合后，使用特异性识别减少的RAPIA法尼基化的抗体来测量FDPS活性。用含有FDPS shRNA序列#4的慢病毒载体感染HepG2人肝实质细胞癌细胞。对于唑来膦酸处理的细胞，在最后24小时内加入唑来膦酸(Sigma公司)。48小时后，用NP-40裂解缓冲液裂解细胞，用Bio-Rad蛋白质测定试剂定量蛋白质。将50微克的蛋白质样品在4-12％Bis-Tris凝胶(Thermo科学公司)上电泳并转移至PVDF膜(EMD Millipore公司)。使用抗FDPS(Thermo科学公司)、抗RAP1A(Santa Cruz公司)和抗肌动蛋白(Sigma公司)抗体作为蛋白质上样对照进行免疫印迹。抗体与HRP偶联的第二抗体结合，并使用Immobilon Western ECL试剂(EMD Millipore公司)用Licor c-DiGit印迹扫描仪检测。RAPIA条带强度的增加与降低的法尼基化相关。RAPIA的脱法尼基化仅发生在用LV-shFDPS转导并用唑来膦酸处理的细胞中。

[0260] 实施例14-治疗患癌对象

[0261] LV-FDPS是由慢病毒载体通过局部给药递送到晚期不可切除的肝实质细胞癌的基因药物

[0262] I期临床试验将测试在没有伴随放疗或化疗的患者中使用超声引导的肝脏插管将LV-FDPS递送至肝细胞癌(HCC)部位的安全性和可行性。合理预测本研究将成功治疗HCC。该

研究是开放标记,4x3剂量递增(4个剂量范围,每剂最多3个对象),以确定18岁或以上患有III/IV期不可切除HCC的患者的LV-FDPS的最大耐受剂量。

[0263] LV-FDPS是一种遗传疗法,旨在减少法尼基二磷酸合酶的肿瘤细胞中的表达。实验研究表明,LV-FDPS修饰的肿瘤细胞诱导人γδT细胞的抗肿瘤活性,包括通过细胞毒性杀伤肿瘤的能力。

[0264] 目标病变最长直径≥1cm(通过螺旋CT测量)和最大直径≤4.9cm并满足下面详述的准入和排除标准的对象招募入下一个可用的给药类别。每个剂量组最多招募3名对象。剂量是通过肝内插管以单次推注递送的LV-FDPS的转导单位的数量,如产品释放标准中所述,体积不超过25mL。基于报道的用于HCC的重组腺病毒疗法的经验(Sangro等,基于胸苷激酶的基因治疗晚期肝细胞癌的I期临床试验(A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma),2010,Cancer Gene Ther.17:837-43),最小剂量为1×10^{9}转导单位,并且递增10倍至下一剂量1×10^{10}转导单位,下一剂量为1×10^{11}转导单位,且最大剂量为1×10^{12}转导单位。对象经招募,治疗和评估持续3个月。在招募和以下一更高剂量水平治疗对象之前,对每个组完成所有安全性评估。招募和剂量递增持续直至达到最大耐受剂量或终止研究。

[0265] 通过左锁骨下动脉进行插管,直到导管尖端处于适当的肝动脉连接处。插管由超声检查引导,如所述(Lin等,顺铂、丝裂霉素C、白细胞介素和5-氟尿嘧啶动脉灌注化疗对不能手术切除的晚期肝实质细胞癌的临床疗效(Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin,mitomycin C,leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma),2004,J.Chin.Med.Assoc.67:602-10)。

[0266] 主要结果测量

[0267] 安全性:根据CTCAS对系统性和局部区域不良事件进行分级,并根据MedRA进行编码。在剂量递增之前,将评估单剂量范围内所有对象的不良事件数据。最终的安全评估包含了所有剂量范围的数据。

[0268] 次要结果测量

[0269] ●局部给药以及随后的活组织检查或尸检以获得组织后的LV-FDPS病灶分布和保留。

[0270] ●在治疗后3个月内通过物理分析、医学成像或活组织检查,在目标和可测量的非局部病灶(如果存在)中的客观响应率(ORR)。

[0271] ●局部注射后10分钟,30分钟、1小时和1天的血液中LV-FDPS的水平。

[0272] ●治疗后3个月内肝功能标志物的变化,标志物包括ALP,ALT,ASAT,总胆红素和GGT。

[0273] 临时分析中无病史存活超过历史对照(无LV-FDPS)患者。

[0274] 准入标准

[0275] ●超过18岁,包括男性和女性。

[0276] ●通过组织学或细胞学或基于目前公认的实质细胞来源的肝实质细胞癌的临床标准证实诊断,在筛选时,切除、移植或其他潜在的治愈性疗法是不适合的。

[0277] ●治疗医师确定病灶适合局部区域靶向递送。

[0278] ●靶标病灶必须是通过计算机断层扫描显示一维最大直径≥1.0cm的可测量疾病;最大直径≤5.0厘米。

[0279] ●Kamofsky表现得分为ECOG值的60-80%。

[0280] ●预期寿命≥12周。

[0281] ●造血功能:WBC≥2,500/mm^3;ANC≥1000/mm^3;血红蛋白≥8g/dL;血小板计数≥50,000/mm^3;凝血INR≤1.3。

[0282] ●AST和ALT<5倍ULN;ALPS<5倍ULN。胆红素≤1.5倍ULV;肌酸≤1.5倍ULN并且eGFR≥50。

[0283] ●甲状腺功能:总T3或游离T3,总T4或游离T4和THC≤CTCAE 2级异常。

[0284] ●主治医师认为肾脏,心血管和呼吸功能充足。

[0285] ●免疫功能:循环Vγ9Vδ2+T细胞≥30/mm^3;没有免疫缺陷病。

[0286] ●血清学和病毒RNA检测对HIV为阴性。

[0287] ●书面知情同意书。

[0288] 排除标准

[0289] ●靶标病灶与血管相邻,包围或浸润血管。

[0290] ●适合切除、移植或其他潜在的治愈性疗法的原发性HCC。

[0291] ●过去4个月内的肝脏手术或化疗栓塞。

[0292] ●过去4个月内的肝脏放射或全身放射治疗。

[0293] ●化疗4周或亚硝基脲、丝裂霉素C或顺铂的任何使用。

[0294] ●目前或在过去4周内接受氨基二膦酸类药物治疗

[0295] ●4周内或<5药物半衰期的研究药物。

[0296] ●糖尿病引起的伤口愈合受损。

[0297] ●严重的精神疾病,酒精依赖或非法药物使用。

[0298] ●不愿意遵守研究方案和报告要求。

[0299] ●过去4个月内进行氨基二膦酸类药物治疗。

[0300] ●存在临床意义的心血管,脑血管(中风),免疫学(乙型或丙型肝炎病毒感染、病毒性肝炎或肝硬化除外),内分泌或中枢神经系统疾病;当前的脑病;在过去4个月内需要住院或输血的静脉曲张出血。

[0301] ●HIV或获得性免疫缺陷综合征的历史。

[0302] ●目前或之前使用抗逆转录病毒药物治疗。

[0303] ●整个试验和随访间隔期间怀孕、哺乳或拒绝采用屏障或化学避孕药。

[0304] LV-FDPS是由慢病毒载体通过局部给药递送到晚期不可切除的肝实质细胞癌的基因药物-氨基二膦酸类药物的辅助给药

[0305] I期临床试验将测试在伴随氨基二膦酸类药物化疗的患者中使用超声引导的肝脏插管将LV-FDPS递送至肝细胞癌(HCC)部位的安全性和可行性。合理预测本研究将成功治疗HCC。该研究是开放标记,4x3剂量递增(4个剂量范围,每剂最多3个对象),以确定18岁或以上患有III/IV期不可切除HCC的患者的LV-FDPS的最大耐受剂量。

[0306] LV-FDPS是一种遗传疗法,旨在减少法尼基二磷酸合酶的肿瘤细胞中的表达。实验研究表明,LV-FDPS修饰的肿瘤细胞诱导人γδT细胞的抗肿瘤活性,包括通过细胞毒性杀伤

肿瘤的能力。先前的实验研究还显示了LV-FDPS和特异性氨基二膦酸类药物的正相互作用的可能性，这些药物可以在原发性或转移性疾病中进入处方。对于该研究，根据医师的建议和对象偏好，对象将接受剂量递增量的LV-FDPS，其具有连续标准治疗剂量，使用Aredia®(帕米膦酸盐)，Zometa®(唑来膦酸)或Actonel®(利塞膦酸盐)。

[0307] 目标病灶最长直径≥1cm(通过螺旋CT测量)和最大直径<4.9cm并满足下面详述的准入和排除标准的对象在氨基二膦酸类药物治疗中招募并开始。30天后，重新评估目标病灶的大小，以确保对象仍然符合LV-FDPS的起始标准。对氨基二膦酸类药物没有客观临床响应的对象招募到下一个可用的LV-FDPS给药类别。每个剂量组最多招募3名对象，并且除非主治医生另有建议，否则所有对象均在研究期间继续使用氨基二膦酸类药物。LV-FDPS剂量是通过肝内插管以单次推注递送的LV-FDPS的转导单位的数量，如产品释放标准中所述，体积不超过25mL。基于报道的用于HCC的重组腺病毒疗法的经验(Sangro等，基于胸苷激酶的基因治疗晚期肝细胞癌的I期临床试验(A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma)，2010，Cancer Gene Ther.17:837-43)，最小剂量为1×10^{9}转导单位，并且递增10倍至下一剂量1×10^{10}转导单位，下一剂量为1×10^{11}转导单位，且最大剂量为1×10^{12}转导单位。对象经招募，治疗和评估持续3个月。在招募和以下一更高剂量水平治疗对象之前，对每个组完成所有安全性评估。招募和剂量递增持续直至达到最大耐受剂量或终止研究。

[0308] 通过左锁骨下动脉进行插管，直到导管尖端处于适当的肝动脉连接处。插管由超声检查引导，如所述(Lin等，顺铂、丝裂霉素C、白细胞介素和5-氟尿嘧啶动脉灌注化疗对不能手术切除的晚期肝实质细胞癌的临床疗效(Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin,mitomycin C,leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma)，2004，J.Chin.Med.Assoc.67:602-10)。

[0309] 主要结果测量

[0310] 安全性：根据CTCAS对系统性和局部区域不良事件进行分级，并根据MedRA进行编码。在剂量递增之前，将评估单剂量范围内所有对象的不良事件数据。最终的安全评估包含了所有剂量范围的数据。

[0311] 次要结果测量

[0312] ●局部给药以及随后的活组织检查或尸检以获得组织后的LV-FDPS病灶分布和保留。

[0313] ●在治疗后3个月内通过物理分析、医学成像或活组织检查，在目标和可测量的非局部病灶(如果存在)中的客观响应率(ORR)。

[0314] ●局部注射后10分钟、30分钟、1小时和1天的血液中LV-FDPS的水平。

[0315] ●治疗后3个月内肝功能标志物的变化，标志物包括ALP，ALT，ASAT，总胆红素和GGT。

[0316] ●临时分析中无病史存活超过历史对照(无LV-FDPS)患者。

[0317] 准入标准

[0318] ●超过18岁，包括男性和女性。

[0319] ●通过组织学或细胞学或基于目前公认的实质细胞来源的肝实质细胞癌的临床

标准证实诊断，在筛选时，切除、移植或其他潜在的治愈性疗法是不适合的。

[0320] ●治疗医师确定病灶适合局部区域靶向递送。

[0321] ●靶标病灶必须是通过计算机断层扫描显示一维最大直径≥1.0cm的可测量疾病；最大直径≤5.0厘米。

[0322] ●Kamofsky表现得分为ECOG值的60-80％。

[0323] ●预期寿命≥12周。

[0324] ●造血功能：WBC≥2,500/mm^3；ANC≥1000/mm^3；血红蛋白≥8g/dL；血小板计数≥50,000/mm^3；凝血INR≤1.3。

[0325] ●AST和ALT<5倍ULN；ALPS<5倍ULN。胆红素≤1.5倍ULV；肌酸≤1.5倍ULN并且eGFR≥50。

[0326] ●甲状腺功能：总T3或游离T3，总T4或游离T4和THC≤CTCAE 2级异常。●主治医师认为肾脏，心血管和呼吸功能充足。

[0327] ●免疫功能：循环Vγ9Vδ2+T细胞≥30/mm^3；没有免疫缺陷病。

[0328] ●血清学和病毒RNA检测对HIV为阴性。

[0329] ●书面知情同意书。

[0330] 排除标准

[0331] ●不耐受或不愿继续氨基二膦酸类药物辅助治疗。

[0332] ●氨基二膦酸类药物治疗后有客观临床响应。

[0333] ●靶标病灶与血管相邻，包围或浸润血管。

[0334] ●适合切除、移植或其他潜在的治愈性疗法的原发性HCC。

[0335] ●过去4个月内的肝脏手术或化疗栓塞。

[0336] ●过去4个月内的肝脏放射或全身放射治疗。

[0337] ●4周内的化疗(排除氨基二膦酸类药物)或亚硝基脲、丝裂霉素C或顺铂的任何使用。

[0338] ●4周内或<5药物半衰期的研究药物。

[0339] ●糖尿病引起的伤口愈合受损。

[0340] ●严重的精神疾病，酒精依赖或非法药物使用。

[0341] ●不愿意遵守研究方案和报告要求。

[0342] ●存在临床意义的心血管，脑血管(中风)，免疫学(乙型或丙型肝炎病毒感染、病毒性肝炎或肝硬化除外)，内分泌或中枢神经系统疾病；当前的脑病；在过去4个月内需要住院或输血的静脉曲张出血。

[0343] ●HIV或获得性免疫缺陷综合征的历史。

[0344] ●目前或之前使用抗逆转录病毒药物治疗。

[0345] ●整个试验和随访间隔期间怀孕、哺乳或拒绝采用屏障或化学避孕药。

[0346] 实施例15-治疗患有慢性病毒性肝病的对象

[0347] LV-FDPS是一种由慢病毒载体通过局部给药递送至肝脏的基因药物，用于治疗乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、HIV或其他肝脏病毒感染

[0348] I期临床试验将测试使用超声引导插管将LV-FDPS递送至病毒感染的肝脏的安全性和可行性。合理预测本研究将成功治疗肝脏感染。该研究是开放标记，4x3剂量递增(4个

剂量范围,每剂最多3个对象),以确定18岁或以上患有慢性病毒性肝病并对化疗耐药的患者的LV-FDPS的最大耐受剂量。

[0349] LV-FDPS是一种遗传疗法,旨在减少法尼基二磷酸合酶的肿瘤细胞中的表达。实验研究表明,LV-FDPS修饰的肿瘤细胞诱导人γδT细胞,包括对病毒感染的细胞的细胞毒性能力。

[0350] 确诊肝脏病毒感染的对象招募入下一个可用的LV-FDPS给药类别,所述肝脏病毒感染包括乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒,HIV或其他病毒。每个剂量组最多招募3名对象。LV-FDPS剂量是通过肝内插管以单次推注递送的LV-FDPS的转导单位的数量,如产品释放标准中所述,体积不超过25mL。基于报道的用于HCC的重组腺病毒疗法的经验(Sangro等,基于胸苷激酶的基因治疗晚期肝细胞癌的I期临床试验(A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma),2010,Cancer Gene Ther.17:837-43),最小剂量为1×10^{9}转导单位,并且递增10倍至下一剂量1×10^{10}转导单位,下一剂量为1×10^{11}转导单位,且最大剂量为1×10^{12}转导单位。对象经招募,治疗和评估持续3个月。在招募和以下一更高剂量水平治疗对象之前,对每个组完成所有安全性评估。招募和剂量递增持续直至达到最大耐受剂量或终止研究。

[0351] 通过左锁骨下动脉进行插管,直到导管尖端处于适当的肝动脉连接处。插管由超声检查引导,如所述(Lin等,顺铂、丝裂霉素C、白细胞介素和5-氟尿嘧啶动脉灌注化疗对不能手术切除的晚期肝实质细胞癌的临床疗效(Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin,mitomycin C,leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma),2004,J.Chin.Med.Assoc.67:602-10)。

[0352] 主要结果测量

[0353] 安全性:根据CTCAS对系统性和局部区域不良事件进行分级,并根据MedRA进行编码。在剂量递增之前,将评估单剂量范围内所有对象的不良事件数据。最终的安全评估包含了所有剂量范围的数据。

[0354] 次要结果测量

[0355] ●局部给药以及随后的活组织检查或尸检以获得组织后的LV-FDPS病灶分布和保留。

[0356] ●在治疗后3个月内在器官内或全身内作为持续病毒反应(SVR)测量的客观响应率(ORR)。

[0357] ●局部注射后10分钟、30分钟、1小时和1天的血液中LV-FDPS的水平。

[0358] ●治疗后3个月内肝功能标志物的变化,标志物包括ALP,ALT,ASAT,总胆红素和GGT。

[0359] ●临时分析中无病史存活超过历史对照(无LV-FDPS)患者。

[0360] 准入标准

[0361] ●超过18岁,包括男性和女性。

[0362] ●通过组织学或细胞学或基于目前公认的慢性病毒性肝病的临床标准证实诊断,在筛选时,切除、移植或其他潜在的治愈性疗法是不适合的。

[0363] ●治疗医师确定病灶适合局部区域靶向递送。

[0364] ●Kamofsky表现得分为ECOG值的60-80％。

[0365] ●预期寿命≥12周。

[0366] ●造血功能:WBC≥2,500/mm^3;ANC≥1000/mm^3;血红蛋白≥8g/dL;血小板计数≥50,000/mm^3;凝血INR≤1.3。

[0367] ●AST和ALT<5倍ULN;ALPS<5倍ULN。胆红素≤1.5倍ULV;肌酸≤1.5倍ULN并且eGFR≥50。

[0368] ●甲状腺功能:总T3或游离T3,总T4或游离T4和THC≤CTCAE 2级异常。

[0369] ●主治医师认为肾脏,心血管和呼吸功能充足。

[0370] ●免疫功能:循环Vγ9Vδ2+T细胞≥30/mm^3;没有免疫缺陷病。

[0371] ●血清学和病毒RNA检测对HIV为阴性。

[0372] ●书面知情同意书。

[0373] 排除标准

[0374] ●适合切除、移植或其他潜在的治愈性疗法的慢性病毒性疾病。

[0375] ●过去4个月内的肝脏手术或化疗栓塞。

[0376] ●过去4个月内的肝脏放射或全身放射治疗。

[0377] ●4周内或<5药物半衰期的研究药物。

[0378] ●当前(在过去4周内)或持续接受氨基二膦酸类药物治疗。

[0379] ●糖尿病引起的伤口愈合受损。

[0380] ●严重的精神疾病,酒精依赖或非法药物使用。

[0381] ●不愿意遵守研究方案和报告要求。

[0382] ●存在临床意义的心血管,脑血管(中风),免疫学(病毒感染、病毒性肝炎或肝硬化除外),内分泌或中枢神经系统疾病;当前的脑病;在过去4个月内需要住院或输血的静脉曲张出血。

[0383] ●整个试验和随访间隔期间怀孕、哺乳或拒绝采用屏障或化学避孕药。

[0384] LV-FDPS是一种由慢病毒载体通过局部给药递送至肝脏的基因药物,用于治疗乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、HIV或其他肝脏病毒感染-伴随的辅助氨基二膦酸类药物治疗

[0385] I期临床试验将测试使用超声引导插管将LV-FDPS递送至病毒感染的肝脏的安全性和可行性。合理预测本研究将成功治疗肝脏感染。该研究是开放标记,4x3剂量递增(4个剂量范围,每剂最多3个对象),以确定18岁或以上患有慢性病毒性肝病并对化疗耐药的患者的LV-FDPS的最大耐受剂量。

[0386] LV-FDPS是一种遗传疗法,旨在减少法尼基二磷酸合酶的肿瘤细胞中的表达。实验研究表明,LV-FDPS修饰的肿瘤细胞诱导人γδT细胞,包括对病毒感染的细胞的细胞毒性能力。先前的实验研究还显示了LV-FDPS和特异性氨基二膦酸类药物的正相互作用的可能性,这些药物可以在感染疾病期间开处方。对于该研究,根据医师的建议和对象偏好,对象将接受剂量递增量的LV-FDPS,其具有连续标准治疗剂量,使用 Aredia® (帕米膦酸盐), Zometa® (唑来膦酸)或 Actonel® (利塞膦酸盐)。

[0387] 确认肝脏病毒感染(包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、HIV或其他病毒)的对象,将在重筛选前启动氨基二膦酸类药物治疗45天,以满足LV-FDPS治疗感染性疾病的招募标

准。符合条件的对象招募入下一个可用的LV-FDPS给药类别。每个剂量组最多招募3名对象。LV-FDPS剂量是通过肝内插管以单次推注递送的LV-FDPS的转导单位的数量，如产品释放标准中所述，体积不超过25mL。基于报道的用于HCC的重组腺病毒疗法的经验(Sangro等，基于胸苷激酶的基因治疗晚期肝细胞癌的I期临床试验(A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma)，2010,Cancer Gene Ther.17:837-43)，最小剂量为1×10^{9}转导单位，并且递增10倍至下一剂量1×10^{10}转导单位，下一剂量为1×10^{11}转导单位，且最大剂量为1×10^{12}转导单位。对象经招募，治疗和评估持续3个月。在招募和以下一更高剂量水平治疗对象之前，对每个组完成所有安全性评估。招募和剂量递增持续直至达到最大耐受剂量或终止研究。

[0388] 通过左锁骨下动脉进行插管，直到导管尖端处于适当的肝动脉连接处。插管由超声检查引导，如所述(Lin等，顺铂、丝裂霉素C、白细胞介素和5-氟尿嘧啶动脉灌注化疗对不能手术切除的晚期肝实质细胞癌的临床疗效(Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin,mitomycin C,leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma)，2004,J.Chin.Med.Assoc.67:602-10)。

[0389] 主要结果测量

[0390] 安全性：根据CTCAS对系统性和局部区域不良事件进行分级，并根据MedRA进行编码。在剂量递增之前，将评估单剂量范围内所有对象的不良事件数据。最终的安全评估包含了所有剂量范围的数据。

[0391] 次要结果测量

[0392] ●局部给药以及随后的活组织检查或尸检以获得组织后的LV-FDPS病灶分布和保留。

[0393] ●在治疗后3个月内在器官内或全身内作为持续病毒反应(SVR)测量的客观响应率(ORR)。

[0394] ●局部注射后10分钟、30分钟、1小时和1天的血液中LV-FDPS的水平。

[0395] ●治疗后3个月内肝功能标志物的变化，标志物包括ALP，ALT，ASAT，总胆红素和GGT。

[0396] ●临时分析中无病史存活超过历史对照(无LV-FDPS)患者。

[0397] 准入标准

[0398] ●超过18岁，包括男性和女性。

[0399] ●通过组织学或细胞学或基于目前公认的慢性病毒性肝病的临床标准证实诊断，在筛选时，切除、移植或其他潜在的治愈性疗法是不适合的。

[0400] ●治疗医师确定病灶适合局部区域靶向递送。

[0401] ●Kamofsky表现得分为ECOG值的60-80％。

[0402] ●预期寿命≥12周。

[0403] ●造血功能：WBC≥2,500/mm^3；ANC≥1000/mm^3；血红蛋白≥8g/dL；血小板计数≥50,000/mm^3；凝血INR≤1.3。

[0404] ●AST和ALT<5倍ULN；ALPS<5倍ULN。胆红素≤1.5倍ULV；肌酸≤1.5倍ULN并且eGFR≥50。

[0405] ●甲状腺功能:总T3或游离T3,总T4或游离T4和THC≤CTCAE 2级异常。

[0406] ●主治医师认为肾脏,心血管和呼吸功能充足。

[0407] ●免疫功能:循环Vγ9Vδ2+T细胞≥30/mm^3;没有免疫缺陷病。

[0408] ●血清学和病毒RNA检测对HIV为阴性。

[0409] ●书面知情同意书。

[0410] 排除标准

[0411] ●适合切除、移植或其他潜在的治愈性疗法的慢性病毒性疾病。

[0412] ●过去4个月内的肝脏手术或化疗栓塞。

[0413] ●过去4个月内的肝脏放射或全身放射治疗。

[0414] ●4周内或<5药物半衰期的研究药物。

[0415] ●糖尿病引起的伤口愈合受损。

[0416] ●严重的精神疾病,酒精依赖或非法药物使用。

[0417] ●不愿意遵守研究方案和报告要求。

[0418] ●存在临床意义的心血管,脑血管(中风),免疫学(病毒感染、病毒性肝炎或肝硬化除外),内分泌或中枢神经系统疾病;当前的脑病;在过去4个月内需要住院或输血的静脉曲张出血。

[0419] ●整个试验和随访间隔期间怀孕、哺乳或拒绝采用屏障或化学避孕药。

[0420] 序列

[0421] 本文提及以下序列:

[0422]

SEQ ID NO:	描述	序列
1	FDPS shRNA 序列#1	GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATG GCATTGTACTCCAGGACTTTTT
2	FDPS shRNA 序列#2	GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGT GCTGAACGAAATCCTGCTTTTT
3	FDPS shRNA 序列#2	GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGT GCTGAACGAAATCCTGCTTTTT
4	FDPS shRNA 序列#4	GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTT TCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTT
5	miR30 FDPS	AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACAC

[0423]

	序列#1	TTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAG ATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCC TACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT
6	miR30 FDPS 序列#2	AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACAC TTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAG ATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTAC TGCCTCGGACTTCAAGGGGCT
7	miR30 FDPS 序列#3	TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTTCTCAGCCT CCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGG AGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA
8	miR155 FDPS 序列#1	CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAC TTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTTGGCCACTGA CTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACA CAAGGCCTGTTACTAGCACTCA
9	miR21 FDPS 序列#1	CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGAC TTTCTCAGCCTCCTTCTGCCTGTTGAATCTCA TGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTT TGGTATCTTTCATCTGACCA
10	miR185 FDPS 序列#1	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATA CTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTGGTCCCCTCCC CGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTTCCCTC CCAATGACCGCGTCTTCGTCG
11	劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子	GTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCA ACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTT ACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGA TTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCT TATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATG GATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGC AGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGAT ACAATAAACG
12	5’长末端重复(LTR)	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTG GGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTG CTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGC TTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGA CTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTT TAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA
13	Psi 包装信号	TACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAG AAGGAGAGAG
14	Rev 响应元件(RRE)	AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCA GCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCCTCAATGA CGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTC TGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTG AGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGC

[0424]

		AACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCA GGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTA AAGGATCAACAGCTCC
15	中心聚嘌呤区(cPPT)	TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTAC AGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAG CAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAA ACAAATTACAAAATTCAAAATTTTA
16	聚合酶 III shRNA 启动子; H1 启动子	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGA ATCGCGGGCCCAGTGTCACTAGGCGGGAAC ACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGA TGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCT GCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGG AAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGAT TTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCA CTT
17	长 WPRE 序列	AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAG ATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTT TTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCC TTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTT TCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTG CTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTG TCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTT TGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATT GCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTT TCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGA ACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGG ACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATT CCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTT TCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGG ATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCC CTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTC CCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTT CCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTC GGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCT
18	3' δLTR	TGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGATA AGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCT GGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTC TGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCT CAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAG TGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAA CTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTG TGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTC A
19	辅助/Rev; 鸡β肌动蛋白(CAG)启动子;	GCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACG TTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTC CCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTT

[0425]

	转录	AATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGG GGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGG GCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGC GGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCG GCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAG GCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCG AAGCGCGCGGCGGGCG
20	辅助/Rev; HIV Gag; 病毒衣壳	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGG GGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGT TAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATT AAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTA GAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAG AAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGG ACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCA GAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAG CAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGA GATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAG ATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAA AAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACA CAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATA GTGCAGAACATCCAGGGGCAAATGGTACATC AGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATG GGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGC CCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTAT CAGAAGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACAC CATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCA GCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATG AGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTGCATCC AGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAG ATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCA GGAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAG GATGGATGACACATAATCCACCTATCCCAGT AGGAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTG GGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCC CTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGACC AAAGGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCGA TTCTATAAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTT CACAAGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAAC CTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGT AAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGGAG CGACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCA GGGAGTGGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAG AGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACA AATCCAGCTACCATAATGATACAGAAAGGCA ATTTTAGGAACCAAAGAAAGACTGTTAAGTG TTTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCACATAGCC AAAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAGGGCT

[0426]

		GTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAAT GAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTT TTAGGGAAGATCTGGCCTTCCCACAAGGGAA GGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGA GCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGG TTTGGGGAAGAGACAACAACTCCCTCTCAGA AGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACTGTATCC TTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGC GACCCCTCGTCACAATAA
21	辅助/Rev; HIV Pol; 蛋白酶和逆转录酶	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAA TGATAGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGT AGGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATC TGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAG TAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAG AAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTTA AATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACC AGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCA AAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAA AAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGA AATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATT GGGCCTGAAAATCCATACAATACTCCAGTAT TTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATG GAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAAT AAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAAT TAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAACA GAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGC GATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGA CTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCT AGTATAAACAATGAGACACCAGGGATTAGAT ATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAA AGGATCACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATG ACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAACAAA ATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGA TGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATA GGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGA GACAACATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCAC ACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCA TTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTG ATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCC AGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATA CAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAA GTCAGATTTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCA ATTATGTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCA CTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAG CAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGGGAGAT TCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTAT GACCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATAC

			AGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCA AATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAA CAGGAAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCCCA CACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCA GTACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAA TATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACC CATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGG ACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCCTG AGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGT GAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCC ATAATAGGAGCAGAAACTTTCTATGTAGATG GGGCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAA AGCAGGATATGTAACTGACAGAGGAAGACAA AAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATC AGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGC TTTGCAGGATTCGGGATTAGAAGTAAACATA GTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCA TTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAATCAGA GTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATA AAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTAC CAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACA AGTAGATGGGTTGGTCAGTGCTGGAATCAGG AAAGTACTA
[0427]	22	辅助 Rev; HIV 整合酶; 病毒RNA的整合	TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAG AACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGC AATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACCTGTA GTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATA AATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGG ACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAG CTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTA TCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATA TATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACA GGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAAT TAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACA TACAGACAATGGCAGCAATTTCACCAGTACT ACAGTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGG ATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATC CCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAA TAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTA AGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAG TACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAA AGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCA GGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAG ACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAAT TACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACA GGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAAAGGAC CAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGG

[0428]

		CAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAA AGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATC AGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATG ATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTA A
23	辅助/Rev; HIV RRE; 结合 Rev 元件	AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCA GCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATG ACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGT CTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCT GAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTG CAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCC AGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCT AAAGGATCAACAGCTCCT
24	辅助/Rev; HIV Rev; 核输出和稳定化病毒 mRNA	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAA GAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGT TTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCC GAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGA AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAG ATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCA CTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCC TCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTG GGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATAT TGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGG AGCTAAAGAATAG
25	包膜; CMV 启动子; 转录	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATA TATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACC CCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCAT TGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA CTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCC AGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT ACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCA ATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGG GATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA TGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGG GACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCC CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG GTGGGAGGTCTATATAAGC
26	包膜; VSV-G; 糖蛋白包膜-细胞进入	ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATT CATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTT TTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAA

[0429]

		ATGTTCCTTCTAATTACCATTATTGCCCGTCA AGCTCAGATTTAAATTGGCATAATGACTTAA TAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAA GAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGG ATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTT GTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATAT AACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTG TAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAAC GAAACAAGGAACTTGGCTGAATCCAGGCTTC CCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGA CGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGAC TCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACA GGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACG GAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGT CCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATA AGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCAT TTCCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGAC GGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGC ACAGGGTTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATG AAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATA CTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCA GGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATC TCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCC AGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAG ACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACG TTGAGAGGATCTTGGATTATTCCCTCTGCCA AGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTT CCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTG CTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCCTGCTTT CACCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTG AGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGC TCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATC AGTGGAACTACCACAGAAAGGGAACTGTGG GATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAA TTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTC AGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGA CATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTA GCTCAAAGGCTCAGGTGTTCGAACATCCTCA CATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCCTGAT GATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGC TATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGG TTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCC TCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGG ACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATC TTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAG ACAGATTTATACAGACATAGAGATGA
27	辅 助 /Rev;	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA

[0430]

	CMV 早期(CAG)增强子；增强转录	TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCG TTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGG CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACG TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT GGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCA GTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTA TGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG TATTAGTCATC
28	辅助/Rev；鸡β肌动蛋白内含子；增强基因表达	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCC CGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCG GCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGC TGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCG TTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAA AGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGG GGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTG TGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGC GCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCG CGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTG CGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCC CCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACA AAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGG GGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCG GGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCC GAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTG CGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGC TCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGG TGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTC GGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGC GGCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAG GCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATG GTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCT TTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGG GAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCG CGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAG GAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCG CCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCATCTCCAGC CTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCT TCGGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGG CTTCTGGCGTGTGACCGGCGG
29	辅助/Rev；兔β球蛋白聚A；RNA稳定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGG GACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTT CTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCA ATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACT

[0431]

		CGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTA AAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTT TGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATG AACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTA TATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTA TTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGA TTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTT CTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTT TTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTGACT ACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTAT GAAGATC
30	包膜; β 球蛋白内含子; 增强基因表达	GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCT TTTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTATATGGA GGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTTAGAA TGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGGACC CTCATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTAC TCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTTC TTTTCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAAACTT TAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTTAAATTCA CTTTTGTTTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTT CTCTAATCACTTTTTTTTCAAGGCAATCAGGG TATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGA GAACAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAG AATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGT GGAAATATTCTTATTGGTAGAAACAACTACA CCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGG TTACAATGATATACACTGTTTGAGATGAGGA TAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCTC TGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTCTTTCC TACAG
31	包膜; 兔 β 球蛋白聚 A; RNA 稳定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGG GACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTT CTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCA ATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACT CGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTA AAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTT TGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCAT GAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAG TATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCT TATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTA GATTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTT TTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATG TTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTGA CTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTT ATGGAGATC
32	引物	TAAGCAGAATTCATGAATTTGCCAGGAAGAT
33	引物	CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCA

[0432]

		CGAAT
34	Gag, Pol, 整合酶片段	GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAAC CAAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTTAT CAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATA GAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAG TATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAAT TGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGC ACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGAC TGTACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGAT GGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAG AAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTG TACAGAAATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCA AAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATACTC CAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTAC TAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAA CTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAG TTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTT AAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGAT GTGGGCGATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAG ATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTAC CATACCTAGTATAAACAATGAGACACCAGGG ATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGG GATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAGTG TAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGA AAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAAT ACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTT AGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAG GAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGAT TTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGA ACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTC CATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAG TGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAA TGACATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAAT TGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAAG TAAGGCAATTATGTAAACTTCTTAGGGGAAC CAAAGCACTAACAGAAGTAGTACCACTAACA GAAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACA GGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGT GTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAGCA GAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGG ACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAA TCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAG GGTGCCCACACTAATGATGTGAAACAATTAA CAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCACAGAAAG CATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTT AAATTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAG CATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTG

[0433]

		GATTCCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCT CCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGA AAGAACCCATAATAGGAGCAGAAACTTTCTA TGTAGATGGGGCAGCCAATAGGGAAACTAAA TTAGGAAAAGCAGGATATGTAACTGACAGAG GAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACAC AACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATT CATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGATTAGAAG TAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATT GGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGT GAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGC AGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGC ATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGA AATGAACAAGTAGATAAATTGGTCAGTGCTG GAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATGGAAT AGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATAT CACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATT TTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAAT AGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAA GGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTA GCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACA TTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTT CATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAG TAATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGC ATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGAAGATGG CCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCA GCAATTTCACCAGTACTACAGTTAAGGCCGC CTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTT GGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAG TAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAA AATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAA CATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTAT TCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGAT TGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGT AGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAA GAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAA ATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGA TCCAGTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTC TGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATACAA GATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAA GAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAAA ACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGT AGACAGGATGAGGATTAA
35	含 Rev 的 DNA 片段，RRE 和兔 β 球蛋白聚 A	TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGC GACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCA TCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCC CAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAG

[0434]

		GAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACA GAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATC CTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGC CTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAG ACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGA ACTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCT CAAATATTGGTGGAATCTCCTACAATATTGG AGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGT TCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCAC TATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTA CAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGA GGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTC TGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCC TGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA GCTCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATT ATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCT GACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCA TTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTC TCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATC ATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTA GAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTG CCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCAT CAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATT CCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGG TTAGATTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATT TTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTAC ATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCC TGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCT CTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAG CTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCT GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCAC ACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAA AGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT TCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGAT CCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCC CGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAAC TCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCAT GGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGC CGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAG AAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG GCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCA GCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCA TCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCA CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT CAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCCGGG

[0435]

36	含 CAG 增强子/启动子/内含子序列的 DNA 片段	ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACG GGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCA TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA ATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAA GTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG ACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGG TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCT CCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTT TGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCA GCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCG CGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGG CGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCG GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGT TTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGC GGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGG CGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGC CCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCC CGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGG TGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGG GCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCT CGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTT AAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGG GGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCC GCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTG TGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTG CCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAA CAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGG GGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGT CGGGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCC CCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGT GCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGG CTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAG GTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCT CGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGC GGCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAG GCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATG GTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCT TTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGG GAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCG

[0436]

		CGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAG GAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCG CCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCATCTCCAGC CTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCT TCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGG CTTCTGGCGTGTGACCGGCGGGAATTC
37	含 VSV-G 的 DNA 片段	GAATTCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTT TTTATTCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACC ATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACT GGAAAAATGTTCCTTCTAATTACCATTATTGC CCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGCATAATG ACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAAT GCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGAC GGTTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCA CTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAA GTATATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTC CATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGA ACAAACGAAACAAGGAACTTGGCTGAATCCA GGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAA CTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCA GGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAA TACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCA TCAACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCC CACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCT GACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTA ACCTCATTTCCATGGACATCACCTTCTTCTCA GAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAG GAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTACTTTG CTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAAT GCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTC CCATCAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATA AGGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGA ATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCA TCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTC AGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCCT CTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCG GGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCT ATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCC TGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAAAT ACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATAT TGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGA ATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAAC TGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGT GGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACC AGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGAT TGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCAT CTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTCGAACATC

[0437]

		CTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCC TGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACT GGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAG AAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTAT TGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCA TTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTAT CCATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAG AAAAGACAGATTTATACAGACATAGAGATGA GAATTC
38	Rev; RSV 启动子; 转录	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAA GAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGT TTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCC GAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGA AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAG ATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCA CTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCC TCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTG GGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATAT TGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGG AGCTAAAGAATAG
39	Rev; HIV Rev; 核输出和稳定化病毒 mRNA	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAA GAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGT TTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCC GAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGA AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAG ATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCA CTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCC TCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTG GGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATAT TGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGG AGCTAAAGAATAG
40	RSV 启动子和 HIV Rev	CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGT ATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAA AAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGA GTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTG CATAGGGAGGGGGAAATGTAGTCTTATGCAA TACACTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGAT GAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAA AAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAA GGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCA ACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACC ACTGAATTCCGCATTGCAGAGATAATTGTAT TTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCA TTTGACCATTCACCACATTGGTGTGCACCTC CAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGA

[0438]

		TCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA CCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGC CTCCCCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCC TATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGA AGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAG TTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCC CGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG AAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACA GATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGC ACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGC CTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTAC TCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCT GGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATA TTGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAG GAGCTAAAGAATAGTCTAGA
41	延伸因子-1α(EF1-α)启动子	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAAC TGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTT TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAAC GGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTG TGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTT ATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGC CCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAG CTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGG CCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTT GAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCC GCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTC TCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAA TTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGG CAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTG CACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGC GGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGT TCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC GGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGT GTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCC GGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGG CCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGG TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTT CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGG GGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCAC ACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCT TGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCC TTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCC

[0439]

		TCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTT CAGGTGTCGTGA
42	启动子; PGK	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCC TGGGTTTGCGCAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCG TGGTTCCGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCCTGG GTCTCGCACATTCTTCACGTCCGTTCGCAGCGTC ACCCGGATCTTCGCCGCTACCCTTGTGGGCCCC CCGGCGACGCTTCCTGCTCCGCCCCTAAGTCGG GAAGGTTCCTTGCGGTTCGCGGCGTGCCGGACG TGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACC CTCGCAGACGGACAGCGCCAGGGAGCAATGGC AGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATA GCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGC GGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTG TGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCCTGCCCGC GCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCG CACGTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAAT CACCGACCTCTCTCCCCAG
43	启动子; UbC	GCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCC CCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGA AGGGCGCAGGAGCGTTCCTGATCCTTCCGCCCG GACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGA CTCGGCCTTAGAACCCCAGTATCAGCAGAAGGA CATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGC ACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGA GGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGA GGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATT ATATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCTAGT TCCGTCGCAGCCGGGATTTGGGTCGCGGTTCTT GTTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAG TTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGTG GCCGCCGGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTG TGGAGAGACCGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCC GCGAGCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTTGGG GGGAGCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTC TTGAATGGAAGACGCTTGTAAGGCGGGCTGTGA GGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGGCATGGTGGG CGGCAAGAACCCAAGGTCTTGAGGCCTTCGCTA ATGCGGGAAAGCTCTTATTCGGGTGAGATGGGC TGGGGCACCATCTGGGGACCCTGACGTGAAGTT TGTCACTGACTGGAGAACTCGGGTTTGTCGTCT GGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGTGCCGTTG GGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCC TCGTCGTGTCGTGACGTCACCCGTTCTGTTGGCT TATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGT GTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGCAGGACGCAG GGTTCGGGCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGA

[0440]

		CAGGCGCCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATA AGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTCGGTTTTATGT ACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTT GAACTATGCGCTCGGGGTTGGCGAGTGTGTTTT GTGAAGTTTTTTAGGCACCTTTTGAAATGTAATC ATTTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTTAGACT AGTAAA
44	聚 A; SV40	GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG CAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATT TTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAA CTCATCAATGTATCTTATCA
45	聚 A; bGH	GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT TGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA GGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAAT GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGT CATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC AGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG GCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
46	包膜; RD114	ATGAAACTCCCAACAGGAATGGTCATTTTATGT AGCCTAATAATAGTTCGGGCAGGGTTTGACGAC CCCCGCAAGGCTATCGCATTAGTACAAAAACAA CATGGTAAACCATGCGAATGCAGCGGAGGGCA GGTATCCGAGGCCCCACCGAACTCCATCCAACA GGTAACTTGCCCAGGCAAGACGGCCTACTTAAT GACCAACCAAAAATGGAAATGCAGAGTCACTC CAAAAAATCTCACCCCTAGCGGGGGAGAACTCC AGAACTGCCCCTGTAACACTTTCCAGGACTCGA TGCACAGTTCTTGTTATACTGAATACCGGCAAT GCAGGGCGAATAATAAGACATACTACACGGCC ACCTTGCTTAAAATACGGTCTGGGAGCCTCAAC GAGGTACAGATATTACAAAACCCCAATCAGCTC CTACAGTCCCCTTGTAGGGGCTCTATAAATCAG CCCGTTTGCTGGAGTGCCACAGCCCCCATCCAT ATCTCCGATGGTGGAGGACCCCTCGATACTAAG AGAGTGTGGACAGTCCAAAAAAGGCTAGAACA AATTCATAAGGCTATGCATCCTGAACTTCAATA CCACCCCTTAGCCCTGCCCAAAGTCAGAGATGA CCTTAGCCTTGATGCACGGACTTTTGATATCCTG AATACCACTTTTAGGTTACTCCAGATGTCCAATT TTAGCCTTGCCCAAGATTGTTGGCTCTGTTTAAA ACTAGGTACCCCTACCCCTCTTGCGATACCCAC TCCCTCTTTAACCTACTCCCTAGCAGACTCCCTA GCGAATGCCTCCTGTCAGATTATACCTCCCCTCT TGGTTCAACCGATGCAGTTCTCCAACTCGTCCT GTTTATCTTCCCCTTTCATTAACGATACGGAACA AATAGACTTAGGTGCAGTCACCTTTACTAACTG CACCTCTGTAGCCAATGTCAGTAGTCCTTTATGT

			GCCCTAAACGGGTCAGTCTTCCTCTGTGGAAAT AACATGGCATACACCTATTTACCCCAAAACTGG ACAGGACTTTGCGTCCAAGCCTCCCTCCTCCCC GACATTGACATCATCCCGGGGGATGAGCCAGTC CCCATTCCTGCCATTGATCATTATATACATAGAC CTAAACGAGCTGTACAGTTCATCCCTTTACTAG CTGGACTGGGAATCACCGCAGCATTCACCACCG GAGCTACAGGCCTAGGTGTCTCCGTCACCCAGT ATACAAAATTATCCCATCAGTTAATATCTGATG TCCAAGTCTTATCCGGTACCATACAAGATTTAC AAGACCAGGTAGACTCGTTAGCTGAAGTAGTTC TCCAAAATAGGAGGGGACTGGACCTACTAACG GCAGAACAAGGAGGAATTTGTTTAGCCTTACAA GAAAAATGCTGTTTTTATGCTAACAAGTCAGGA ATTGTGAGAAACAAAATAAGAACCCTACAAGA AGAATTACAAAAACGCAGGGAAAGCCTGGCAT CCAACCCTCTCTGGACCGGGCTGCAGGGCTTTC TTCCGTACCTCCTACCTCTCCTGGGACCCCTACT CACCCTCCTACTCATACTAACCATTGGGCCATG CGTTTTCAATCGATTGGTCCAATTTGTTAAAGAC AGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTTGACT CAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGTAC GAGCCATGA
[0441]	**47**	**包膜; GALV**	**ATGCTTCTCACCTCAAGCCCGCACCACCTTC GGCACCAGATGAGTCCTGGGAGCTGGAAAA GACTGATCATCCTCTTAAGCTGCGTATTCGG AGACGGCAAAACGAGTCTGCAGAATAAGAAC CCCCACCAGCCTGTGACCCTCACCTGGCAGG TACTGTCCCAAACTGGGGACGTTGTCTGGGA CAAAAAGGCAGTCCAGCCCCTTTGGACTTGG TGGCCCTCTCTTACACCTGATGTATGTGCCC TGGCGGCCGGTCTTGAGTCCTGGGATATCCC GGGATCCGATGTATCGTCCTCTAAAAGAGTT AGACCTCCTGATTCAGACTATACTGCCGCTT ATAAGCAAATCACCTGGGGAGCCATAGGGTG CAGCTACCCTCGGGCTAGGACCAGGATGGCA AATTCCCCCTTCTACGTGTGTCCCCGAGCTG GCCGAACCCATTCAGAAGCTAGGAGGTGTGG GGGGCTAGAATCCCTATACTGTAAAGAATGG AGTTGTGAGACCACGGGTACCGTTTATTGGC AACCCAAGTCCTCATGGGACCTCATAACTGT AAAATGGGACCAAAATGTGAAATGGGAGCAA AAATTTCAAAAGTGTGAACAAACCGGCTGGT GTAACCCCCTCAAGATAGACTTCACAGAAAA AGGAAAACTCTCCAGAGATTGGATAACGGAA AAAACCTGGGAATTAAGGTTCTATGTATATG GACACCCAGGCATACAGTTGACTATCCGCTT**

[0442]

		AGAGGTCACTAACATGCCGGTTGTGGCAGTG GGCCCAGACCCTGTCCTTGCGGAACAGGGAC CTCCTAGCAAGCCCCTCACTCTCCCTCTCTCC CCACGGAAAGCGCCGCCCACCCCTCTACCCC CGGCGGCTAGTGAGCAAACCCCTGCGGTGC ATGGAGAAACTGTTACCCTAAACTCTCCGCC TCCCACCAGTGGCGACCGACTCTTTGGCCTT GTGCAGGGGGCCTTCCTAACCTTGAATGCTA CCAACCCAGGGGCCACTAAGTCTTGCTGGCT CTGTTTGGGCATGAGCCCCCCTTATTATGAA GGGATAGCCTCTTCAGGAGAGGTCGCTTATA CCTCCAACCATACCCGATGCCACTGGGGGGC CCAAGGAAAGCTTACCCTCACTGAGGTCTCC GGACTCGGGTCATGCATAGGGAAGGTGCCTC TTACCCATCAACATCTTTGCAACCAGACCTTA CCCATCAATTCCTCTAAAAACCATCAGTATCT GCTCCCCTCAAACCATAGCTGGTGGGCCTGC AGCACTGGCCTCACCCCCTGCCTCTCCACCT CAGTTTTTAATCAGTCTAAAGACTTCTGTGTC CAGGTCCAGCTGATCCCCCGCATCTATTACC ATTCTGAAGAAACCTTGTTACAAGCCTATGA CAAATCACCCCCCAGGTTTAAAAGAGAGCCT GCCTCACTTACCCTAGCTGTCTTCCTGGGGT TAGGGATTGCGGCAGGTATAGGTACTGGCTC AACCGCCCTAATTAAAGGGCCCATAGACCTC CAGCAAGGCCTAACCAGCCTCCAAATCGCCA TTGACGCTGACCTCCGGGCCCTTCAGGACTC AATCAGCAAGCTAGAGGACTCACTGACTTCC CTATCTGAGGTAGTACTCCAAAATAGGAGAG GCCTTGACTTACTATTCCTTAAAGAAGGAGG CCTCTGCGCGGCCCTAAAAGAAGAGTGCTGT TTTTATGTAGACCACTCAGGTGCAGTACGAG ACTCCATGAAAAAACTTAAAGAAAGACTAGA TAAAAGACAGTTAGAGCGCCAGAAAAACCAA AACTGGTATGAAGGGTGGTTCAATAACTCCC CTTGGTTTACTACCCTACTATCAACCATCGCT GGGCCCCTATTGCTCCTCCTTTTGTTACTCAC TCTTGGGCCCTGCATCATCAATAAATTAATC CAATTCATCAATGATAGGATAAGTGCAGTCA AAATTTTAGTCCTTAGACAGAAATATCAGAC CCTAGATAACGAGGAAAACCTTTAA
48	包膜; FUG	ATGGTTCCGCAGGTTCTTTTGTTTGTACTCCT TCTGGGTTTTTCGTTGTGTTTCGGGAAGTTC CCCATTTACACGATACCAGACGAACTTGGTC CCTGGAGCCCTATTGACATACACCATCTCAG CTGTCCAAATAACCTGGTTGTGGAGGATGAA GGATGTACCAACCTGTCCGAGTTCTCCTACA

[0443]

		TGGAACTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCAT CAAAGTGAACGGGTTCACTTGCACAGGTGTT GTGACAGAGGCAGAGACCTACACCAACTTTG TTGGTTATGTCACAACCACATTCAAGAGAAA GCATTTCCGCCCCACCCCAGACGCATGTAGA GCCGCGTATAACTGGAAGATGGCCGGTGACC CCAGATATGAAGAGTCCCTACACAATCCATA CCCCGACTACCACTGGCTTCGAACTGTAAGA ACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCC CAAGTGTGACAGATTTGGACCCATATGACAA ATCCCTTCACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGA AAGTGCTCAGGAATAACGGTGTCCTCTACCT ACTGCTCAACTAACCATGATTACACCATTTG GATGCCCGAGAATCCGAGACCAAGGACACCT TGTGACATTTTTACCAATAGCAGAGGGAAGA GAGCATCCAACGGGAACAAGACTTGCGGCTT TGTGGATGAAAGAGGCCTGTATAAGTCTCTA AAAGGAGCATGCAGGCTCAAGTTATGTGGAG TTCTTGGACTTAGACTTATGGATGGAACATG GGTCGCGATGCAAACATCAGATGAGACCAAA TGGTGCCCTCCAGATCAGTTGGTGAATTTGC ACGACTTTCGCTCAGACGAGATCGAGCATCT CGTTGTGGAGGAGTTAGTTAAGAAAAGAGAG GAATGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATGA CCACCAAGTCAGTAAGTTTCAGACGTCTCAG TCACCTGAGAAAACTTGTCCCAGGGTTTGGA AAAGCATATACCATATTCAACAAAACCTTGAT GGAGGCTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGG ACCTGGAATGAGATCATCCCCTCAAAAGGGT GTTTGAAAGTTGGAGGAAGGTGCCATCCTCA TGTGAACGGGGTGTTTTTCAATGGTATAATA TTAGGGCCTGACGACCATGTCCTAATCCCAG AGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATAT GGAGTTGTTGGAATCTTCAGTTATCCCCCTG ATGCACCCCCTGGCAGACCCTTCTACAGTTT TCAAAGAAGGTGATGAGGCTGAGGATTTTGT TGAAGTTCACCTCCCCGATGTGTACAAACAG ATCTCAGGGGTTGACCTGGGTCTCCCGAACT GGGGAAAGTATGTATTGATGACTGCAGGGGC CATGATTGGCCTGGTGTTGATATTTTCCCTA ATGACATGGTGCAGAGTTGGTATCCATCTTT GCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACA GATTTATACAGACATAGAGATGAACCGACTT GGAAAGTAA
49	包膜; LCMV	ATGGGTCAGATTGTGACAATGTTTGAGGCTC TGCCTCACATCATCGATGAGGTGATCAACAT TGTCATTATTGTGCTTATCGTGATCACGGGT

[0444]

		ATCAAGGCTGTCTACAATTTTGCCACCTGTG GGATATTCGCATTGATCAGTTTCCTACTTCTG GCTGGCAGGTCCTGTGGCATGTACGGTCTTA AGGGACCCGACATTTACAAAGGAGTTTACCA ATTTAAGTCAGTGGAGTTTGATATGTCACAT CTGAACCTGACCATGCCCAACGCATGTTCAG CCAACAACTCCCACCATTACATCAGTATGGG GACTTCTGGACTAGAATTGACCTTCACCAAT GATTCCATCATCAGTCACAACTTTTGCAATCT GACCTCTGCCTTCAACAAAAAGACCTTTGAC CACACACTCATGAGTATAGTTTCGAGCCTAC ACCTCAGTATCAGAGGGAACTCCAACTATAA GGCAGTATCCTGCGACTTCAACAATGGCATA ACCATCCAATACAACTTGACATTCTCAGATC GACAAAGTGCTCAGAGCCAGTGTAGAACCTT CAGAGGTAGAGTCCTAGATATGTTTAGAACT GCCTTCGGGGGGAAATACATGAGGAGTGGC TGGGGCTGGACAGGCTCAGATGGCAAGACC ACCTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATACC TGATTATACAAAATAGAACCTGGGAAAACCA CTGCACATATGCAGGTCCTTTTGGGATGTCC AGGATTCTCCTTTCCCAAGAGAAGACTAAGT TCTTCACTAGGAGACTAGCGGGCACATTCAC CTGGACTTTGTCAGACTCTTCAGGGGTGGAG AATCCAGGTGGTTATTGCCTGACCAAATGGA TGATTCTTGCTGCAGAGCTTAAGTGTTTCGG GAACACAGCAGTTGCGAAATGCAATGTAAAT CATGATGCCGAATTCTGTGACATGCTGCGAC TAATTGACTACAACAAGGCTGCTTTGAGTAA GTTCAAAGAGGACGTAGAATCTGCCTTGCAC TTATTCAAAACAACAGTGAATTCTTTGATTTC AGATCAACTACTGATGAGGAACCACTTGAGA GATCTGATGGGGGTGCCATATTGCAATTACT CAAAGTTTTGGTACCTAGAACATGCAAAGAC CGGCGAAACTAGTGTCCCCAAGTGCTGGCTT GTCACCAATGGTTCTTACTTAAATGAGACCC ACTTCAGTGATCAAATCGAACAGGAAGCCGA TAACATGATTACAGAGATGTTGAGGAAGGAT TACATAAAGAGGCAGGGGAGTACCCCCCTAG CATTGATGGACCTTCTGATGTTTTCCACATCT GCATATCTAGTCAGCATCTTCCTGCACCTTG TCAAAATACCAACACACAGGCACATAAAAGG TGGCTCATGTCCAAAGCCACACCGATTAACC AACAAAGGAATTTGTAGTTGTGGTGCATTTA AGGTGCCTGGTGTAAAAACCGTCTGGAAAAG ACGCTGA
50	**包膜; FPV**	**ATGAACACTCAAATCCTGGTTTTCGCCCTTG**

[0445]

		TGGCAGTCATCCCCACAAATGCAGACAAAAT TTGTCTTGGACATCATGCTGTATCAAATGGC ACCAAAGTAAACACACTCACTGAGAGAGGAG TAGAAGTTGTCAATGCAACGGAAACAGTGGA GCGGACAAACATCCCCAAAATTTGCTCAAAA GGGAAAAGAACCACTGATCTTGGCCAATGCG GACTGTTAGGGACCATTACCGGACCACCTCA ATGCGACCAATTTCTAGAATTTTCAGCTGAT CTAATAATCGAGAGACGAGAAGGAAATGATG TTTGTTACCCGGGGAAGTTTGTTAATGAAGA GGCATTGCGACAAATCCTCAGAGGATCAGGT GGGATTGACAAAGAAACAATGGGATTCACAT ATAGTGGAATAAGGACCAACGGAACAACTAG TGCATGTAGAAGATCAGGGTCTTCATTCTAT GCAGAAATGGAGTGGCTCCTGTCAAATACAG ACAATGCTGCTTTCCCACAAATGACAAAATC ATACAAAAACACAAGGAGAGAATCAGCTCTG ATAGTCTGGGGAATCCACCATTCAGGATCAA CCACCGAACAGACCAAACTATATGGGAGTGG AAATAAACTGATAACAGTCGGGAGTTCCAAA TATCATCAATCTTTTGTGCCGAGTCCAGGAA CACGACCGCAGATAAATGGCCAGTCCGGACG GATTGATTTTCATTGGTTGATCTTGGATCCCA ATGATACAGTTACTTTTAGTTTCAATGGGGC TTTCATAGCTCCAAATCGTGCCAGCTTCTTG AGGGGAAAGTCCATGGGGATCCAGAGCGAT GTGCAGGTTGATGCCAATTGCGAAGGGGAAT GCTACCACAGTGGAGGGACTATAACAAGCAG ATTGCCTTTTCAAAACATCAATAGCAGAGCA GTTGGCAAATGCCCAAGATATGTAAAACAGG AAAGTTTATTATTGGCAACTGGGATGAAGAA CGTTCCCGAACCTTCCAAAAAAAGGAAAAAA AGAGGCCTGTTTGGCGCTATAGCAGGGTTTA TTGAAAATGGTTGGGAAGGTCTGGTCGACGG GTGGTACGGTTTCAGGCATCAGAATGCACAA GGAGAAGGAACTGCAGCAGACTACAAAAGCA CCCAATCGGCAATTGATCAGATAACCGGAAA GTTAAATAGACTCATTGAGAAAACCAACCAG CAATTTGAGCTAATAGATAATGAATTCACTG AGGTGGAAAAGCAGATTGGCAATTTAATTAA CTGGACCAAAGACTCCATCACAGAAGTATGG TCTTACAATGCTGAACTTCTTGTGGCAATGG AAAACCAGCACACTATTGATTTGGCTGATTC AGAGATGAACAAGCTGTATGAGCGAGTGAG GAAACAATTAAGGGAAAATGCTGAAGAGGAT GGCACTGGTTGCTTTGAAATTTTTCATAAAT GTGACGATGATTGTATGGCTAGTATAAGGAA

[0446]

		CAATACTTATGATCACAGCAAATACAGAGAA GAAGCGATGCAAAATAGAATACAAATTGACC CAGTCAAATTGAGTAGTGGCTACAAAGATGT GATACTTTGGTTTAGCTTCGGGGCATCATGC TTTTTGCTTCTTGCCATTGCAATGGGCCTTGT TTTCATATGTGTGAAGAACGGAAACATGCGG TGCACTATTTGTATATAA
51	包膜; RRV	AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGG CTACTAGACCATACCTAGCACATTGCGCCGA TTGCGGGGACGGGTACTTCTGCTATAGCCCA GTTGCTATCGAGGAGATCCGAGATGAGGCGT CTGATGGCATGCTTAAGATCCAAGTCTCCGC CCAAATAGGTCTGGACAAGGCAGGCACCCAC GCCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTGGTC ATGATGTTCAGGAATCTAAGAGAGATTCCTT GAGGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATA CATGGGACGATGGGACACTTCATCGTCGCAC ACTGTCCACCAGGCGACTACCTCAAGGTTTC GTTCGAGGACGCAGATTCGCACGTGAAGGCA TGTAAGGTCCAATACAAGCACAATCCATTGC CGGTGGGTAGAGAGAAGTTCGTGGTTAGACC ACACTTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA TACCAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGG AGATTGACATGCATACACCGCCAGATATACC GGATCGCACCCTGCTATCACAGACGGCGGGC AACGTCAAAATAACAGCAGGCGGCAGGACTA TCAGGTACAACTGTACCTGCGGCCGTGACAA CGTAGGCACTACCAGTACTGACAAGACCATC AACACATGCAAGATTGACCAATGCCATGCTG CCGTCACCAGCCATGACAAATGGCAATTTAC CTCTCCATTTGTTCCCAGGGCTGATCAGACA GCTAGGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCC CTCTGACTAACGTCACCTGCCGAGTGCCGTT GGCTCGAGCGCCGGATGCCACCTATGGTAAG AAGGAGGTGACCCTGAGATTACACCCAGATC ATCCGACGCTCTTCTCCTATAGGAGTTTAGG AGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATGGGTT GACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCCAGTGA CGGAAGAAGGGATTGAGTACCAGTGGGGCA ACAACCCGCCGGTCTGCCTGTGGGCGCAACT GACGACCGAGGGCAAACCCCATGGCTGGCC ACATGAAATCATTCAGTACTATTATGGACTAT ACCCCGCCGCCACTATTGCCGCAGTATCCGG GGCGAGTCTGATGGCCCTCCTAACTCTGGCG GCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAGGA GAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCC AGGAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCT

[0447]

		GCTTTGCTGCGCACCGAGGGCGAATGCA
52	包膜；MLV 10A1	AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGG CTACTAGACCATACCTAGCACATTGCGCCGA TTGCGGGGACGGGTACTTCTGCTATAGCCCA GTTGCTATCGAGGAGATCCGAGATGAGGCGT CTGATGGCATGCTTAAGATCCAAGTCTCCGC CCAAATAGGTCTGGACAAGGCAGGCACCCAC GCCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTGGTC ATGATGTTCAGGAATCTAAGAGAGATTCCTT GAGGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATA CATGGGACGATGGGACACTTCATCGTCGCAC ACTGTCCACCAGGCGACTACCTCAAGGTTTC GTTCGAGGACGCAGATTCGCACGTGAAGGCA TGTAAGGTCCAATACAAGCACAATCCATTGC CGGTGGGTAGAGAGAAGTTCGTGGTTAGACC ACACTTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA TACCAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGG AGATTGACATGCATACACCGCCAGATATACC GGATCGCACCCTGCTATCACAGACGGCGGGC AACGTCAAAATAACAGCAGGCGGCAGGACTA TCAGGTACAACTGTACCTGCGGCCGTGACAA CGTAGGCACTACCAGTACTGACAAGACCATC AACACATGCAAGATTGACCAATGCCATGCTG CCGTCACCAGCCATGACAAATGGCAATTTAC CTCTCCATTTGTTCCCAGGGCTGATCAGACA GCTAGGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCC CTCTGACTAACGTCACCTGCCGAGTGCCGTT GGCTCGAGCGCCGGATGCCACCTATGGTAAG AAGGAGGTGACCCTGAGATTACACCCAGATC ATCCGACGCTCTTCTCCTATAGGAGTTTAGG AGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATGGGTT GACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCCAGTGA CGGAAGAAGGGATTGAGTACCAGTGGGGCA ACAACCCGCCGGTCTGCCTGTGGGCGCAACT GACGACCGAGGGCAAACCCCATGGCTGGCC ACATGAAATCATTCAGTACTATTATGGACTAT ACCCCGCCGCCACTATTGCCGCAGTATCCGG GGCGAGTCTGATGGCCCTCCTAACTCTGGCG GCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAGGA GAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCC AGGAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCT GCTTTGCTGCGCACCGAGGGCGAATGCA
53	包膜；埃博拉	ATGGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTC GTGATCGATTCAAGAGGACATCATTCTTTCT TTGGGTAATTATCCTTTTCCAAAGAACATTTT CCATCCCACTTGGAGTCATCCACAATAGCAC ATTACAGGTTAGTGATGTCGACAAACTGGTT

[0448]

		TGCCGTGACAAACTGTCATCCACAAATCAAT TGAGATCAGTTGGACTGAATCTCGAAGGGAA TGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACT AAAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCCAC CAAAGGTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATG GGCTGAAAACTGCTACAATCTTGAAATCAAA AAACCTGACGGGAGTGAGTGTCTACCAGCAG CGCCAGACGGGATTCGGGGCTTCCCCCGGT GCCGGTATGTGCACAAAGTATCAGGAACGGG ACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCACAAA GAGGGTGCTTTCTTCCTGTATGACCGACTTG CTTCCACAGTTATCTACCGAGGAACGACTTT CGCTGAAGGTGTCGTTGCATTTCTGATACTG CCCCAAGCTAAGAAGGACTTCTTCAGCTCAC ACCCCTTGAGAGAGCCGGTCAATGCAACGGA GGACCCGTCTAGTGGCTACTATTCTACCACA ATTAGATATCAAGCTACCGGTTTTGGAACCA ATGAGACAGAGTATTTGTTCGAGGTTGACAA TTTGACCTACGTCCAACTTGAATCAAGATTC ACACCACAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGA CAATATATACAAGTGGGAAAAGGAGCAATAC CACGGGAAAACTAATTTGGAAGGTCAACCCC GAAATTGATACAACAATCGGGGAGTGGGCCT TCTGGGAAACTAAAAAAACCTCACTAGAAAA ATTCGCAGTGAAGAGTTGTCTTTCACAGCTG TATCAAACAGAGCCAAAAACATCAGTGGTCA GAGTCCGGCGCGAACTTCTTCCGACCCAGGG ACCAACACAACAACTGAAGACCACAAAATCA TGGCTTCAGAAAATTCCTCTGCAATGGTTCA AGTGCACAGTCAAGGAAGGGAAGCTGCAGT GTCGCATCTGACAACCCTTGCCACAATCTCC ACGAGTCCTCAACCCCCCACAACCAAACCAG GTCCGGACAACAGCACCCACAATACACCCGT GTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAA GTTGAACAACATCACCGCAGAACAGACAACG ACAGCACAGCCTCCGACACTCCCCCCGCCAC GACCGCAGCCGGACCCCTAAAAGCAGAGAAC ACCAACACGAGCAAGGGTACCGACCTCCTGG ACCCCGCCACCACAACAAGTCCCCAAAACCA CAGCGAGACCGCTGGCAACAACAACACTCAT CACCAAGATACCGGAGAAGAGAGTGCCAGCA GCGGGAAGCTAGGCTTAATTACCAATACTAT TGCTGGAGTCGCAGGACTGATCACAGGCGG GAGGAGAGCTCGAAGAGAAGCAATTGTCAAT GCTCAACCCAAATGCAACCCTAATTTACATTA CTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCTGCAATC GGACTGGCCTGGATACCATATTTCGGGCCAG

[0449]

		CAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGGCTGAT GCACAATCAAGATGGTTTAATCTGTGGGTTG AGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTC TTCAACTGTTCCTGAGAGCCACAACCGAGCT ACGCACCTTTTCAATCCTCAACCGTAAGGCA ATTGATTTCTTGCTGCAGCGATGGGGCGGCA CATGCCACATTTTGGGACCGGACTGCTGTAT CGAACCACATGATTGGACCAAGAACATAACA GACAAAATTGATCAGATTATTCATGATTTTGT TGATAAAACCCTTCCGGACCAGGGGGACAAT GACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAATGG ATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTA TAATTGCAGTTATCGCTTTATTCTGTATATGC AAATTTGTCTTTTAG
54	聚合酶 III shRNA 启动子; U6 启动子	TTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACG ATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATT AATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTAC AAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCT TGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTA AAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTG AAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCT TGTGGAAAGGACGAAAC
55	聚合酶 III shRNA 启动子; 7SK 启动子	CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGC AAGGCATTCTGGATAGTGTCAAAACAGCCGG AAATCAAGTCCGTTTATCTCAAACTTTAGCAT TTTGGGAATAAATGATATTTGCTATGCTGGT TAAATTAGATTTTAGTTAAATTTCCTGCTGAA GCTCTAGTACGATAAGCAACTTGACCTAAGT GTAAAGTTGAGATTTCCTTCAGGTTTATATA GCTTGTGCGCCGCCTGGCTACCTC
56	FDPS 靶标序列#1	GTCCTGGAGTACAATGCCATT
57	FDPS 靶标序列#2	GCAGGATTTCGTTCAGCACTT
58	FDPS 靶标序列#3	GCCATGTACATGGCAGGAATT
59	FDPS 靶标序列#4	GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGT
60	非靶向序列	GCCGCTTTGTAGGATAGAGCTCGAGCTCTAT CCTACAAAGCGGCTTTTT
61	正向引物	AGGAATTGATGGCGAGAAGG
62	反向引物	CCCAAAGAGGTCAAGGTAATCA
63	正向引物	AGCGCGGCTACAGCTTCA
64	反向引物	GGCGACGTAGCACAGCTTCT
65	左反向末端重	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC

		复(左 ITR)	TGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCCT
[0450]	66	右反向末端重复(右 ITR)	GAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCC GACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

[0451] 当上文中描述或特别示例了本发明的某些优选实施方式时,这并非旨在将本发明限于这些实施方式。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,可以对其进行各种修改。

序列表

<110> 美国基因技术国际有限公司（American Gene Technologies International Inc.）

<120> 用于活化γ-δ T细胞的方法和组合物

<130> 70612.00316

<140> WO PCT/US2017/013399
<141> 2017-01-13

<150> US 62/279,474
<151> 2016-01-15

<160> 67

<170> 记事本

[0001]

<210> 1
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FDPS shRNA序列#1

<400> 1
gtcctggagt acaatgccat tctcgagaat ggcattgtac tccaggactt ttt
53

<210> 2
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FDPS shRNA序列#2

<400> 2
gcaggatttc gttcagcact tctcgagaag tgctgaacga aatcctgctt ttt
53

<210> 3
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FDPS shRNA序列#3

<400> 3
gccatgtaca tggcaggaat tctcgagaat tcctgccatg tacatggctt ttt
53

<210> 4
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FDPS shRNA序列#4

[0002]

<400> 4
gcagaaggag gctgagaaag tctcgagact ttctcagcct ccttctgctt ttt
53

<210> 5
<211> 116
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miR30 FDPS序列#1

<400> 5
aaggtatatt gctgttgaca gtgagcgaca ctttctcagc ctccttctgc
gtgaagccac 60
agatggcaga aggaggctga gaaagtgctg cctactgcct cggacttcaa
ggggct 116

<210> 6
<211> 114
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miR30 FDPS序列#2

<400> 6
aaggtatatt gctgttgaca gtgagcgaca ctttctcagc ctccttctgc
gtgaagccac 60
agatggcaga agggctgaga aagtgctgcc tactgcctcg gacttcaagg ggct
114

<210> 7
<211> 91
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miR30 FDPS序列#3

<400> 7
tgctgttgac agtgagcgac tttctcagcc tccttctgcg tgaagccaca
gatggcagaa 60
ggaggctgag aaagttgcct actgcctcgg a
[0003] 91

<210> 8
<211> 115
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miR155 FDPS序列#1

<400> 8
cctggaggct tgctgaaggc tgtatgctga ctttctcagc ctccttctgc
ttttggccac 60
tgactgagca gaagggctga gaaagtcagg acacaaggcc tgttactagc actca
115

<210> 9
<211> 114
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> miR21 FDPS序列#1

<400> 9
catctccatg gctgtaccac cttgtcggga ctttctcagc ctccttctgc
ctgttgaatc 60
tcatggcaga aggaggcgag aaagtctgac attttggtat ctttcatctg acca
114

<210> 10
<211> 114
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miR185 FDPS序列#1

<400> 10
gggcctggct cgagcagggg gcgagggata ctttctcagc ctccttctgc
tggtcccctc 60
cccgcagaag gaggctgaga aagtccttcc ctcccaatga ccgcgtcttc gtcg
[0004] 114

<210> 11
<211> 228
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子

<400> 11
gtagtcttat gcaatactct tgtagtcttg caacatggta acgatgagtt
agcaacatgc 60
cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg ccgattggtg gaagtaaggt
ggtacgatcg 120
tgccttatta ggaaggcaac agacgggtct gacatggatt ggacgaacca
ctgaattgcc 180
gcattgcaga gatattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaacg
228

<210> 12
<211> 180

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5长末端重复(LTR)

<400> 12
ggtctctctg gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta
gggaacccac 60
tgcttaagcc tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc
cgtctgttgt 120
gtgactctgg taactagaga tccctcagac cctttttagtc agtgtggaaa
atctctagca 180

<210> 13
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Psi包装信号

[0005]

<400> 13
tacgccaaaa attttgacta gcggaggcta gaaggagaga g
41

<210> 14
<211> 233
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Rev响应元件(RRE)

<400> 14
aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg
cagcctcaat 60
gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc
agaacaattt 120
gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg
gcatcaagca 180
gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcc
233

<210> 15
<211> 118
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 中心聚嘌呤区(cPPT)

<400> 15
ttttaaaaga aaaggggga ttgggggta cagtgcaggg gaaagaatag
tagacataat 60
agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaattca
aaatttta 118

<210> 16
<211> 217
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 聚合酶III shRNA启动子- H1启动子

[0006]

<400> 16
gaacgctgac gtcatcaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac
taggcgggaa 60
cacccagcgc gcgtgcgccc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg
agtggcgccc 120
tgcaatattt gcatgtcgct atgtgttctg ggaaatcacc ataaacgtga
aatgtctttg 180
gatttgggaa tcttataagt tctgtatgag accactt
217

<210> 17
<211> 590
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 长WPRE序列

<400> 17
aatcaacctc tgattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac

tatgttgctc 60
cttttacgct atgtggatac gctgctttaa tgcctttgta tcatgctatt
gcttcccgta 120
tggctttcat tttctcctcc ttgtataaat cctggttgct gtctctttat
gaggagttgt 180
ggcccgttgt caggcaacgt ggcgtggtgt gcactgtgtt tgctgacgca
acccccactg 240
gttggggcat tgccaccacc tgtcagctcc tttccgggac tttcgctttc
cccctcccta 300
ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg
gctcggctgt 360
tgggcactga caattccgtg gtgttgtcgg ggaaatcatc gtcctttcct
tggctgctcg 420
cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct
tcggccctca 480
atccagcgga ccttccttcc cgcggcctgc tgccggctct gcggcctctt
ccgcgtcttc 540
gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc tttgggccgc ctccccgcct
590

<210> 18
[0007] <211> 250
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 3δLTR

<400> 18
tggaagggct aattcactcc caacgaagat aagatctgct ttttgcttgt
actgggtctc 60
tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac
ccactgctta 120
agcctcaata aagcttgcct tgagtgcttc aagtagtgtg tgcccgtctg
ttgtgtgact 180
ctggtaacta gagatccctc agacccttt agtcagtgtg gaaaatctct
agcagtagta 240
gttcatgtca
250

<210> 19
<211> 290
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 辅助/Rev-鸡β肌动蛋白(CAG)启动子-转录

<400> 19
gctattacca tgggtcgagg tgagccccac gttctgcttc actctcccca
tctccccccc 60
ctccccaccc ccaattttgt atttatttat tttttaatta ttttgtgcag
cgatgggggc 120
ggggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg cgaggggcgg
ggcggggcga 180
ggcggagagg tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgct ccgaaagttt
cctttatgg 240
cgaggcggcg gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc gcggcgggcg
290

<210> 20
<211> 1503
<212> DNA
<213> 人工序列

[0008]

<220>
<223> 辅助/Rev- HIV Gag-病毒衣壳

<400> 20
atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga
aaaaattcgg 60
ttaaggccag ggggaaagaa aaaatataaa ttaaaacata tagtatgggc
aagcagggag 120
ctagaacgat tcgcagttaa tcctggcctg ttagaaacat cagaaggctg
tagacaaata 180
ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca ggatcagaag aacttagatc
attatataat 240
acagtagcaa ccctctattg tgtgcatcaa aggatagaga taaaagacac
caaggaagct 300
ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca
agcagcagct 360
gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtgcagaa
catccagggg 420
caaatggtac atcaggccat atcacctaga actttaaatg catgggtaaa
agtagtagaa 480
gagaaggctt tcagcccaga agtgataccc atgttttcag cattatcaga

aggagccacc 540
ccacaagatt taaacaccat gctaaacaca gtgggggggac atcaagcagc
catgcaaatg 600
ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata gagtgcatcc
agtgcatgca 660
gggcctattg caccaggcca gatgagagaa ccaaggggaa gtgacatagc
aggaactact 720
agtacccttc aggaacaaat aggatggatg acacataatc cacctatccc
agtaggagaa 780
atctataaaa gatggataat cctgggatta aataaaatag taagaatgta
tagccctacc 840
agcattctgg acataagaca aggaccaaag gaacccttta gagactatgt
agaccgattc 900
tataaaactc taagagccga gcaagcttca caagaggtaa aaaattggat
gacagaaacc 960
ttgttggtcc aaaatgcgaa cccagattgt aagactattt taaaagcatt
gggaccagga 1020
gcgacactag aagaaatgat gacagcatgt cagggagtgg ggggacccgg
ccataaagca 1080
agagttttgg ctgaagcaat gagccaagta acaaatccag ctaccataat
gatacagaaa 1140

[0009] ggcaatttta ggaaccaaag aaagactgtt aagtgtttca attgtggcaa
agaagggcac 1200
atagccaaaa attgcagggc ccctaggaaa aagggctgtt ggaaatgtgg
aaaggaagga 1260
caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaagat
ctggccttcc 1320
cacaagggaa ggccagggaa ttttcttcag agcagaccag agccaacagc
cccaccagaa 1380
gagagcttca ggtttgggga agagacaaca actccctctc agaagcagga
gccgatagac 1440
aaggaactgt atcctttagc ttccctcaga tcactctttg gcagcgaccc
ctcgtcacaa 1500
taa
1503

<210> 21
<211> 1872
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 辅助/Rev- HIV Pol-蛋白酶和逆转录酶

<400> 21

[0010]

atgaatttgc caggaagatg gaaaccaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 60
gtaggacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 120
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 180
actttaaatt ttcccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg 240
gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaagc attagtagaa 300
atttgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac 360
aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat 420
ttcagagaac ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat 480
cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcatatttt 540
tcagttccct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac 600
aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca 660
ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc cttttagaaa acaaaatcca 720
gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg 780
cagcatagaa caaaaataga ggaactgaga caacatctgt tgaggtgggg atttaccaca 840
ccagacaaaa aacatcagaa agaacctcca ttcctttgga tgggttatga actccatcct 900
gataaatgga cagtacagcc tatagtgctg ccagaaaagg acagctggac tgtcaatgac 960
atacagaaat tagtgggaaa attgaattgg gcaagtcaga tttatgcagg gattaaagta 1020
aggcaattat gtaaacttct taggggaacc aaagcactaa cagaagtagt accactaaca 1080
gaagaagcag agctagaact ggcagaaaac agggagattc taaaagaacc ggtacatgga 1140
gtgtattatg acccatcaaa agacttaata gcagaaatac agaagcaggg gcaaggccaa 1200
tggacatatc aaatttatca agagccattt aaaaatctga aaacaggaaa

atatgcaaga 1260
atgaagggtg cccacactaa tgatgtgaaa caattaacag aggcagtaca
aaaaatagcc 1320
acagaaagca tagtaatatg gggaaagact cctaaattta aattacccat
acaaaaggaa 1380
acatgggaag catggtggac agagtattgg caagccacct ggattcctga
gtgggagttt 1440
gtcaataccc ctcccttagt gaagttatgg taccagttag agaaagaacc
cataatagga 1500
gcagaaactt tctatgtaga tggggcagcc aatagggaaa ctaaattagg
aaaagcagga 1560
tatgtaactg acagaggaag acaaaaagtt gtccccctaa cggacacaac
aaatcagaag 1620
actgagttac aagcaattca tctagctttg caggattcgg gattagaagt
aaacatagtg 1680
acagactcac aatatgcatt gggaatcatt caagcacaac cagataagag
tgaatcagag 1740
ttagtcagtc aaataataga gcagttaata aaaaaggaaa aagtctacct
ggcatgggta 1800
ccagcacaca aaggaattgg aggaaatgaa caagtagatg ggttggtcag
tgctggaatc 1860

[0011] aggaaagtac ta
1872

<210> 22
<211> 867
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 辅助 Rev- HIV整合酶-病毒RNA的整合

<400> 22
ttttagatg gaatagataa ggcccaagaa gaacatgaga aatatcacag
taattggaga 60
gcaatggcta gtgattttaa cctaccacct gtagtagcaa aagaaatagt
agccagctgt 120
gataaatgtc agctaaaagg ggaagccatg catggacaag tagactgtag
cccaggaata 180
tggcagctag attgtacaca tttagaagga aaagttatct tggtagcagt
tcatgtagcc 240
agtggatata tagaagcaga agtaattcca gcagagacag ggcaagaaac
agcatacttc 300

ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaaacagtac atacagacaa
tggcagcaat 360
ttcaccagta ctacagttaa ggccgcctgt tggtgggcgg ggatcaagca
ggaatttggc 420
attccctaca atccccaaag tcaaggagta atagaatcta tgaataaaga
attaaagaaa 480
attataggac aggtaagaga tcaggctgaa catcttaaga cagcagtaca
aatggcagta 540
ttcatccaca attttaaaag aaaaggggggg attgggggt acagtgcagg
ggaaagaata 600
gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac aaaaacaaat
tacaaaaatt 660
caaaattttc gggtttatta cagggacagc agagatccag tttggaaagg
accagcaaag 720
ctcctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata atagtgacat
aaaagtagtg 780
ccaagaagaa aagcaaagat catcagggat tatggaaaac agatggcagg
tgatgattgt 840
gtggcaagta gacaggatga ggattaa
867

[0012] <210> 23
<211> 234
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 辅助/Rev- HIV RRE-结合Rev元件

<400> 23
aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg
cagcgtcaat 60
gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc
agaacaattt 120
gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg
gcatcaagca 180
gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcct
234

<210> 24
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 辅助/Rev- HIV Rev-核输出和稳定化病毒mRNA

<400> 24
atggcaggaa gaagcggaga cagcgacgaa gaactcctca aggcagtcag
actcatcaag 60
tttctctatc aaagcaaccc acctcccaat cccgagggga cccgacaggc
ccgaaggaat 120
agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga
acggatcctt 180
agcacttatc tgggacgatc tgcggagcct gtgcctcttc agctaccacc
gcttgagaga 240
cttactcttg attgtaacga ggattgtgga acttctggga cgcaggggggt
gggaagccct 300
caaatattgg tggaatctcc tacaatattg gagtcaggag ctaaagaata g
351

<210> 25
<211> 577
<212> DNA
<213> 人工序列

[0013]

<220>
<223> 包膜- CMV启动子-转录

<400> 25
acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag
ttcatagccc 60
atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct
gaccgcccaa 120
cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc
caatagggac 180
tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg
cagtacatca 240
agtgtatcat atgccaagta cgcccccctat tgacgtcaat gacggtaaat
ggcccgcctg 300
gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca
tctacgtatt 360
agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc
gtggatagcg 420
gtttgactca cggggatttc caagtctcca ccccattgac gtcaatggga
gtttgttttg 480

gcaccaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat 540
gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagc 577

<210> 26
<211> 1519
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包膜-VSV-G-糖蛋白包膜-细胞进入

<400> 26
atgaagtgcc ttttgtactt agcctttta ttcattgggg tgaattgcaa gttcaccata 60
gtttttccac acaaccaaaa aggaaactgg aaaaatgttc cttctaatta ccattattgc 120
ccgtcaagct cagatttaaa ttggcataat gacttaatag gcacagcctt acaagtcaaa 180
atgcccaaga gtcacaaggc tattcaagca gacggttgga tgtgtcatgc
[0014] ttccaaatgg 240
gtcactactt gtgatttccg ctggtatgga ccgaagtata taacacattc catccgatcc 300
ttcactccat ctgtagaaca atgcaaggaa agcattgaac aaacgaaaca aggaacttgg 360
ctgaatccag gcttccctcc tcaaagttgt ggatatgcaa ctgtgacgga tgccgaagca 420
gtgattgtcc aggtgactcc tcaccatgtg ctggttgatg aatacacagg agaatgggtt 480
gattcacagt tcatcaacgg aaaatgcagc aattacatat gccccactgt ccataactct 540
acaacctggc attctgacta taaggtcaaa gggctatgtg attctaacct catttccatg 600
gacatcacct tcttctcaga ggacggagag ctatcatccc tgggaaagga gggcacaggg 660
ttcagaagta actactttgc ttatgaaact ggaggcaagg cctgcaaaat gcaatactgc 720
aagcattggg gagtcagact cccatcaggt gtctggttcg agatggctga taaggatctc 780
tttgctgcag ccagattccc tgaatgccca gaagggtcaa gtatctctgc tccatctcag 840
acctcagtgg atgtaagtct aattcaggac gttgagagga tcttggatta

ttccctctgc 900
caagaaacct ggagcaaaat cagagcgggt cttccaatct ctccagtgga
tctcagctat 960
cttgctccta aaaacccagg aaccggtcct gctttcacca taatcaatgg
taccctaaaa 1020
tactttgaga ccagatacat cagagtcgat attgctgctc caatcctctc
aagaatggtc 1080
ggaatgatca gtggaactac cacagaaagg gaactgtggg atgactgggc
accatatgaa 1140
gacgtggaaa ttggacccaa tggagttctg aggaccagtt caggatataa
gtttccttta 1200
tacatgattg gacatggtat gttggactcc gatcttcatc ttagctcaaa
ggctcaggtg 1260
ttcgaacatc ctcacattca agacgctgct tcgcaacttc ctgatgatga
gagtttattt 1320
tttggtgata ctgggctatc caaaaatcca atcgagcttg tagaaggttg
gttcagtagt 1380
tggaaaagct ctattgcctc ttttttcttt atcatagggt taatcattgg
actattcttg 1440
gttctccgag ttggtatcca tctttgcatt aaattaaagc acaccaagaa
aagacagatt 1500

[0015] tatacagaca tagagatga
1519

<210> 27
<211> 352
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 辅助/Rev- CMV 早期(CAG)增强子-增强转录

<400> 27
tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata
tggagttccg 60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc
cccgcccatt 120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc
attgacgtca 180
atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt
atcatatgcc 240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt
atgcccagta 300

catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tc
352

<210> 28
<211> 960
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 辅助/Rev-鸡β肌动蛋白内含子-增强基因表达

<400> 28
ggagtcgctg cgttgccttc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg
ccgcccgccc 60
cggctctgac tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc gggacggccc
ttctcctccg 120
ggctgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg ctcgtttctt ttctgtggct
gcgtgaaagc 180
cttaaagggc tccgggaggg ccctttgtgc ggggggggagc ggctcggggg
gtgcgtgcgt 240
gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg cccgcgctgc ccggcggctg
[0016] tgagcgctgc 300
gggcgcggcg cggggctttg tgcgctccgc gtgtgcgcga ggggagcgcg
gccgggggcg 360
gtgccccgcg gtgcgggggg gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg
gtgtgtgcgt 420
ggggggggtga gcaggggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taacccccccc
ctgcaccccc 480
ctccccgagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgcg
gggcgtggcg 540
cggggctcgc cgtgccgggc gggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc
ggggcggggc 600
cgcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccggagcg
ccggcggctg 660
tcgaggcgcg gcgagccgca gccattgcct tttatggtaa tcgtgcgaga
gggcgcaggg 720
acttcctttg tcccaaatct ggcggagccg aaatctggga ggcgccgccg
cacccccctct 780
agcgggcgcg ggcgaagcgg tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggg
gagggccttc 840
gtgcgtcgcc gcgccgccgt ccccttctcc atctccagcc tcggggctgc
cgcaggggga 900
cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg

tgaccggcgg 960

<210> 29
<211> 448
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 辅助/Rev-兔β球蛋白聚A- RNA稳定性

<400> 29
agatcttttt ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg
agcatctgac 60
ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt
ttttgtgtct 120
ctcactcgga aggacatatg ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg
agtatttggt 180
ttagagtttg gcaacatatg ccatatgctg gctgccatga acaaaggtgg
ctataaagag 240
gtcatcagta tatgaaacag ccccctgctg tccattcctt attccataga
aaagccttga 300
[0017] cttgaggtta gatttttttt atattttgtt ttgtgttatt tttttcttta
acatccctaa 360
aattttcctt acatgtttta ctagccagat ttttcctcct ctcctgacta
ctcccagtca 420
tagctgtccc tcttctctta tgaagatc
448

<210> 30
<211> 573
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包膜-β球蛋白内含子-增强基因表达

<400> 30
gtgagtttgg ggacccttga ttgttctttc tttttcgcta ttgtaaaatt
catgttatat 60
ggaggggggca aagttttcag ggtgttgttt agaatgggaa gatgtccctt
gtatcaccat 120
ggaccctcat gataattttg tttctttcac tttctactct gttgacaacc
attgtctcct 180

cttattttct tttcattttc tgtaactttt tcgttaaact ttagcttgca
tttgtaacga 240
attttaaat tcacttttgt ttatttgtca gattgtaagt actttctcta
atcacttttt 300
tttcaaggca atcagggtat attatattgt acttcagcac agttttagag
aacaattgtt 360
ataattaaat gataaggtag aatatttctg catataaatt ctggctggcg
tggaaatatt 420
cttattggta gaaacaacta caccctggtc atcatcctgc ctttctcttt
atggttacaa 480
tgatatacac tgtttgagat gaggataaaa tactctgagt ccaaaccggg
cccctctgct 540
aaccatgttc atgccttctt ctctttccta cag
573

<210> 31
<211> 450
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0018] <223> 包膜-兔β球蛋白聚A- RNA稳定性

<400> 31
agatcttttt ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagcccccttg
agcatctgac 60
ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt
ttttgtgtct 120
ctcactcgga aggacatatg ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg
agtatttggt 180
ttagagtttg gcaacatatg cccatatgct ggctgccatg aacaaaggtt
ggctataaag 240
aggtcatcag tatatgaaac agcccccctgc tgtccattcc ttattccata
gaaaagcctt 300
gacttgaggt tagatttttt ttatattttg ttttgtgtta ttttttttctt
taacatccct 360
aaaattttcc ttacatgttt tactagccag atttttcctc ctctcctgac
tactcccagt 420
catagctgtc cctcttctct tatggagatc
450

<210> 32
<211> 31

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 32
taagcagaat tcatgaattt gccaggaaga t
31

<210> 33
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 33
ccatacaatg aatggacact aggcggccgc acgaat
36

[0019]

<210> 34
<211> 2745
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Gag, Pol,整合酶片段

<400> 34
gaattcatga atttgccagg aagatggaaa ccaaaaatga taggggaat
tggaggtttt 60
atcaaagtaa gacagtatga tcagatactc atagaaatct gcggacataa
agctataggt 120
acagtattag taggacctac acctgtcaac ataattggaa gaaatctgtt
gactcagatt 180
ggctgcactt taaattttcc cattagtcct attgagactg taccagtaaa
attaaagcca 240
ggaatggatg gcccaaaagt taaacaatgg ccattgacag aagaaaaaat
aaaagcatta 300
gtagaaattt gtacagaaat ggaaaaggaa ggaaaaattt caaaaattgg
gcctgaaaat 360

ccatacaata ctccagtatt tgccataaag aaaaaagaca gtactaaatg gagaaaatta 420
gtagatttca gagaacttaa taagagaact caagatttct gggaagttca attaggaata 480
ccacatcctg cagggttaaa acagaaaaaa tcagtaacag tactggatgt gggcgatgca 540
tatttttcag ttcccttaga taaagacttc aggaagtata ctgcatttac catacctagt 600
ataaacaatg agacaccagg gattagatat cagtacaatg tgcttccaca gggatggaaa 660
ggatcaccag caatattcca gtgtagcatg acaaaaatct tagagccttt tagaaaacaa 720

aatccagaca tagtcatcta tcaatacatg gatgatttgt atgtaggatc tgacttagaa 780
atagggcagc atagaacaaa aatagaggaa ctgagacaac atctgttgag gtggggattt 840
accacaccag acaaaaaaca tcagaaagaa cctccattcc tttggatggg ttatgaactc 900
catcctgata aatggacagt acagcctata gtgctgccag aaaaggacag ctggactgtc 960

[0020] aatgacatac agaaattagt gggaaaattg aattgggcaa gtcagattta tgcagggatt 1020
aaagtaaggc aattatgtaa acttcttagg ggaaccaaag cactaacaga agtagtacca 1080
ctaacagaag aagcagagct agaactggca gaaaacaggg agattctaaa agaaccggta 1140
catggagtgt attatgaccc atcaaaagac ttaatagcag aaatacagaa gcaggggcaa 1200
ggccaatgga catatcaaat ttatcaagag ccatttaaaa atctgaaaac aggaaagtat 1260
gcaagaatga agggtgccca cactaatgat gtgaaacaat taacagaggc agtacaaaaa 1320
atagccacag aaagcatagt aatatgggga aagactccta aatttaaatt acccatacaa 1380
aaggaaacat gggaagcatg gtggacagag tattggcaag ccacctggat tcctgagtgg 1440
gagtttgtca ataccctcc cttagtgaag ttatggtacc agttagagaa agaacccata 1500
ataggagcag aaactttcta tgtagatggg gcagccaata gggaaactaa attaggaaaa 1560
gcaggatatg taactgacag aggaagacaa aaagttgtcc ccctaacgga cacaacaaat 1620

cagaagactg agttacaagc aattcatcta gctttgcagg attcgggatt agaagtaaac 1680
atagtgacag actcacaata tgcattggga atcattcaag cacaaccaga taagagtgaa 1740
tcagagttag tcagtcaaat aatagagcag ttaataaaaa aggaaaaagt ctacctggca 1800
tgggtaccag cacacaaagg aattggagga aatgaacaag tagataaatt ggtcagtgct 1860
ggaatcagga aagtactatt tttagatgga atagataagg cccaagaaga acatgagaaa 1920
tatcacagta attggagagc aatggctagt gattttaacc taccacctgt agtagcaaaa 1980
gaaatagtag ccagctgtga taaatgtcag ctaaaagggg aagccatgca tggacaagta 2040
gactgtagcc caggaatatg gcagctagat tgtacacatt tagaaggaaa agttatcttg 2100
gtagcagttc atgtagccag tggatatata gaagcagaag taattccagc agagacaggg 2160
caagaaacag catacttcct cttaaaatta gcaggaagat ggccagtaaa aacagtacat 2220
acagacaatg gcagcaattt caccagtact acagttaagg ccgcctgttg
[0021] gtgggcgggg 2280
atcaagcagg aatttggcat tccctacaat ccccaaagtc aaggagtaat agaatctatg 2340
aataaagaat taaagaaaat tataggacag gtaagagatc aggctgaaca tcttaagaca 2400
gcagtacaaa tggcagtatt catccacaat tttaaaagaa aaggggggat tgggggtac 2460
agtgcagggg aaagaatagt agacataata gcaacagaca tacaaactaa agaattacaa 2520
aaacaaatta caaaaattca aaattttcgg gtttattaca gggacagcag agatccagtt 2580
tggaaaggac cagcaaagct cctctggaaa ggtgaagggg cagtagtaat acaagataat 2640
agtgacataa aagtagtgcc aagaagaaaa gcaaagatca tcagggatta tggaaaacag 2700
atggcaggtg atgattgtgt ggcaagtaga caggatgagg attaa 2745

<210> 35
<211> 1586
<212> DNA
<213> 人工序列

〈220〉
〈223〉 含Rev, RRE和兔β球蛋白聚A的DNA片段

〈400〉 35

[0022]

tctagaatgg caggaagaag cggagacagc gacgaagagc tcatcagaac agtcagactc 60
atcaagcttc tctatcaaag caacccacct cccaatcccg aggggacccg acaggcccga 120
aggaatagaa gaagaaggtg gagagagaga cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg 180
atccttggca cttatctggg acgatctgcg gagcctgtgc ctcttcagct accaccgctt 240
gagagactta ctcttgattg taacgaggat tgtggaactt ctgggacgca gggggtggga 300
agccctcaaa tattggtgga atctcctaca atattggagt caggagctaa agaatagagg 360
agctttgttc cttgggttct tgggagcagc aggaagcact atgggcgcag cgtcaatgac 420
gctgacggta caggccagac aattattgtc tggtatagtg cagcagcaga acaatttgct 480
gagggctatt gaggcgcaac agcatctgtt gcaactcaca gtctggggca tcaagcagct 540
ccaggcaaga atcctggctg tggaaagata cctaaaggat caacagctcc tagatctttt 600
tccctctgcc aaaaattatg gggacatcat gaagcccctt gagcatctga cttctggcta 660
ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg 720
aaggacatat gggagggcaa atcatttaaa acatcagaat gagtatttgg tttagagttt 780
ggcaacatat gccatatgct ggctgccatg aacaaaggtg gctataaaga ggtcatcagt 840
atatgaaaca gccccctgct gtccattcct tattccatag aaaagccttg acttgaggtt 900
agatttttt tatattttgt tttgtgttat ttttttcttt aacatcccta aaattttcct 960
tacatgtttt actagccaga tttttcctcc tctcctgact actcccagtc atagctgtcc 1020
ctcttctctt atgaagatcc ctcgacctgc agcccaagct tggcgtaatc atggtcatag 1080
ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc 1140

ataaagtgta aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat
tgcgttgcgc 1200
tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc ggatccgcat
ctcaattagt 1260
cagcaaccat agtcccgccc ctaactccgc ccatcccgcc cctaactccg
cccagttccg 1320
cccattctcc gccccatggc tgactaattt ttttttattta tgcagaggcc
gaggccgcct 1380
cggcctctga gctattccag aagtagtgag gaggcttttt tggaggccta
ggcttttgca 1440
aaaagctaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata
gcatcacaaa 1500
tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca
aactcatcaa 1560
tgtatcttat cagcggccgc cccggg
1586

<210> 36
<211> 1614
<212> DNA
<213> 人工序列

[0023]

<220>
<223> 含CAG增强子/启动子/内含子序列的DNA片段

<400> 36
acgcgttagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc
catatatgga 60
gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca
acgacccccg 120
cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaatagggа
ctttccattg 180
acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc
aagtgtatca 240
tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct
ggcattatgc 300
ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat
tagtcatcgc 360
tattaccatg ggtcgaggtg agccccacgt tctgcttcac tctccccatc
tccccccccc 420
ccccaccccc aattttgtat ttatttattt tttaattatt ttgtgcagcg
atgggggcgg 480
gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg

[0024]

cggggcgagg 540
cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc
ttttatggcg 600
aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg
agtcgctgcg 660
ttgccttcgc cccgtgcccc gctccgcgcc gcctcgcgcc gcccgccccg
gctctgactg 720
accgcgttac tcccacaggt gagcgggcgg gacggccctt ctcctccggg
ctgtaattag 780
cgcttggttt aatgacggct cgtttctttt ctgtggctgc gtgaaagcct
taaagggctc 840
cgggagggcc ctttgtgcgg gggggagcgg ctcgggggggt gcgtgcgtgt
gtgtgtgcgt 900
ggggagcgcc gcgtgcggcc cgcgctgccc ggcggctgtg agcgctgcgg
gcgcggcgcg 960
gggctttgtg cgctccgcgt gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt
gccccgcggt 1020
gcgggggggc tgcgagggga acaaaggctg cgtgcggggt gtgtgcgtgg
gggggtgagc 1080
agggggtgtg ggcgcggcgg tcgggctgta acccccccct gcacccccct
ccccgagttg 1140
ctgagcacgg cccggcttcg ggtgcggggc tccgtgcggg gcgtggcgcg
gggctcgccg 1200
tgccgggcgg ggggtggcgg caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg
cctcgggccg 1260
gggagggctc gggggagggg cgcggcggcc ccggagcgcc ggcggctgtc
gaggcgcggc 1320
gagccgcagc cattgccttt tatggtaatc gtgcgagagg gcgcagggac
ttcctttgtc 1380
ccaaatctgg cggagccgaa atctgggagg cgccgccgca ccccctctag
cgggcgcggg 1440
cgaagcggtg cggcgccggc aggaaggaaa tgggcgggga gggccttcgt
gcgtcgccgc 1500
gccgccgtcc ccttctccat ctccagcctc ggggctgccg cagggggacg
gctgccttcg 1560
gggggggacgg ggcagggcgg ggttcggctt ctggcgtgtg accggcggga attc
1614

<210> 37
<211> 1531
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含VSV-G的DNA片段

<400> 37

gaattcatga agtgcctttt gtacttagcc tttttattca ttggggtgaa ttgcaagttc 60
accatagttt ttccacacaa ccaaaaagga aactggaaaa atgttccttc taattaccat 120
tattgcccgt caagctcaga tttaaattgg cataatgact taataggcac agccttacaa 180
gtcaaaatgc ccaagagtca caaggctatt caagcagacg gttggatgtg tcatgcttcc 240
aaatgggtca ctacttgtga tttccgctgg tatggaccga agtatataac acattccatc 300
cgatccttca ctccatctgt agaacaatgc aaggaaagca ttgaacaaac gaaacaagga 360
acttggctga atccaggctt ccctcctcaa agttgtggat atgcaactgt gacggatgcc 420
gaagcagtga ttgtccaggt gactcctcac catgtgctgg ttgatgaata cacaggagaa 480
tgggttgatt cacagttcat caacggaaaa tgcagcaatt acatatgccc
[0025] cactgtccat 540
aactctacaa cctggcattc tgactataag gtcaaagggc tatgtgattc taacctcatt 600
tccatggaca tcaccttctt ctcagaggac ggagagctat catccctggg aaaggagggc 660
acagggttca gaagtaacta ctttgcttat gaaactggag gcaaggcctg caaaatgcaa 720
tactgcaagc attggggagt cagactccca tcaggtgtct ggttcgagat ggctgataag 780
gatctctttg ctgcagccag attccctgaa tgcccagaag ggtcaagtat ctctgctcca 840
tctcagacct cagtggatgt aagtctaatt caggacgttg agaggatctt ggattattcc 900
ctctgccaag aaacctggag caaaatcaga gcgggtcttc caatctctcc agtggatctc 960
agctatcttg ctcctaaaaa cccaggaacc ggtcctgctt tcaccataat caatggtacc 1020
ctaaaatact ttgagaccag atacatcaga gtcgatattg ctgctccaat cctctcaaga 1080
atggtcggaa tgatcagtgg aactaccaca gaaagggaac tgtgggatga ctgggcacca 1140
tatgaagacg tggaaattgg acccaatgga gttctgagga ccagttcagg

atataagttt 1200
cctttataca tgattggaca tggtatgttg gactccgatc ttcatcttag
ctcaaaggct 1260
caggtgttcg aacatcctca cattcaagac gctgcttcgc aacttcctga
tgatgagagt 1320
ttatttttg gtgatactgg gctatccaaa aatccaatcg agcttgtaga
aggttggttc 1380
agtagttgga aaagctctat tgcctctttt ttctttatca tagggttaat
cattggacta 1440
ttcttggttc tccgagttgg tatccatctt tgcattaaat taaagcacac
caagaaaaga 1500
cagatttata cagacataga gatgagaatt c
1531

<210> 38
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Rev- RSV启动子-转录

[0026]

<400> 38
atggcaggaa gaagcggaga cagcgacgaa gaactcctca aggcagtcag
actcatcaag 60
tttctctatc aaagcaaccc acctcccaat cccgagggga cccgacaggc
ccgaaggaat 120
agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga
acggatcctt 180
agcacttatc tgggacgatc tgcggagcct gtgcctcttc agctaccacc
gcttgagaga 240
cttactcttg attgtaacga ggattgtgga acttctggga cgcaggggt
gggaagccct 300
caaatattgg tggaatctcc tacaatattg gagtcaggag ctaaagaata g
351

<210> 39
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Rev- HIV Rev-核输出和稳定化病毒mRNA

<400> 39
atggcaggaa gaagcggaga cagcgacgaa gaactcctca aggcagtcag
actcatcaag 60
tttctctatc aaagcaaccc acctcccaat cccgagggga cccgacaggc
ccgaaggaat 120

agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga
acggatcctt 180
agcacttatc tgggacgatc tgcggagcct gtgcctcttc agctaccacc
gcttgagaga 240
cttactcttg attgtaacga ggattgtgga acttctggga cgcaggggt
gggaagccct 300
caaatattgg tggaatctcc tacaatattg gagtcaggag ctaaagaata g
351

<210> 40
<211> 884
<212> DNA
<213> 人工序列

[0027] <220>
<223> RSV启动子和HIV Rev

<400> 40
caattgcgat gtacgggcca gatatacgcg tatctgaggg gactagggtg
tgtttaggcg 60
aaaagcgggg cttcggttgt acgcggttag gagtcccctc aggatatagt
agtttcgctt 120
ttgcataggg agggggaaat gtagtcttat gcaatacact tgtagtcttg
caacatggta 180
acgatgagtt agcaacatgc cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg
ccgattggtg 240
gaagtaaggt ggtacgatcg tgccttatta ggaaggcaac agacaggtct
gacatggatt 300
ggacgaacca ctgaattccg cattgcagag ataattgtat ttaagtgcct
agctcgatac 360
aataaacgcc atttgaccat tcaccacatt ggtgtgcacc tccaagctcg
agctcgttta 420
gtgaaccgtc agatcgcctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca
tagaagacac 480
cgggaccgat ccagcctccc ctcgaagcta gcgattaggc atctcctatg
gcaggaagaa 540

gcggagacag cgacgaagaa ctcctcaagg cagtcagact catcaagttt ctctatcaaa 600
gcaacccacc tcccaatccc gaggggaccc gacaggcccg aaggaataga agaagaaggt 660
ggagagagag acagagacag atccattcga ttagtgaacg gatccttagc acttatctgg 720
gacgatctgc ggagcctgtg cctcttcagc taccaccgct tgagagactt actcttgatt 780
gtaacgagga ttgtggaact tctgggacgc aggggtggg aagccctcaa atattggtgg 840
aatctcctac aatattggag tcaggagcta aagaatagtc taga 884

<210> 41
<211> 1104
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 延伸因子-1 α (EF1-α)启动子

[0028] <400> 41
ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc 60
gccttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc 120
tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc 180
ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg cccctggctg 240
cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct 300
tgcgcttaag gagcccctc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc 360
cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga taagtctcta 420
gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgcttttt tctggcaaga tagtcttgta 480
aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg cggcgacggg 540
gcccgtgcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg gccaccgaga 600
atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct

cgcgccgccg 660
tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc
gtgagcggaa 720
agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg
gcgctcggga 780
gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct ttccgtcctc
agccgtcgct 840
tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt
ctcgagcttt 900
tggagtacgt cgtctttagg ttgggggggag gggttttatg cgatggagtt
tccccacact 960
gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc
cttggaattt 1020
gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtggt
tcaaagtttt 1080
tttcttccat ttcaggtgtc gtga
1104

<210> 42
<211> 511
<212> DNA
[0029] <213> 人工序列

<220>
<223> 启动子- PGK

<400> 42
ggggttgggg ttgcgccttt tccaaggcag ccctgggttt gcgcagggac
gcggctgctc 60
tgggcgtggt tccgggaaac gcagcggcgc cgaccctggg tctcgcacat
tcttcacgtc 120
cgttcgcagc gtcacccgga tcttcgccgc taccttgtg ggcccccgg
cgacgcttcc 180
tgctccgccc ctaagtcggg aaggttcctt gcggttcgcg gcgtgccgga
cgtgacaaac 240
ggaagccgca cgtctcacta gtaccctcgc agacggacag cgccagggag
caatggcagc 300
gcgccgaccg cgatgggctg tggccaatag cggctgctca gcagggcgcg
ccgagagcag 360
cggccgggaa ggggcggtgc gggaggcggg gtgtggggcg gtagtgtggg
ccctgttcct 420
gcccgcgcgg tgttccgcat tctgcaagcc tccggagcgc acgtcggcag
tcggctccct 480

cgttgaccga atcaccgacc tctctcccca g
511

<210> 43
<211> 1162
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 启动子- UbC

<400> 43
gcgccgggtt ttggcgcctc ccgcgggcgc ccccctcctc acggcgagcg
ctgccacgtc 60
agacgaaggg cgcaggagcg ttcctgatcc ttccgcccgg acgctcagga
cagcggcccg 120
ctgctcataa gactcggcct tagaacccca gtatcagcag aaggacattt
taggacggga 180
cttgggtgac tctagggcac tggttttctt tccagagagc ggaacaggcg
aggaaaagta 240
gtcccttctc ggcgattctg cggagggatc tccgtggggc ggtgaacgcc
[0030] gatgattata 300
taaggacgcg ccgggtgtgg cacagctagt tccgtcgcag ccgggatttg
ggtcgcggtt 360
cttgtttgtg gatcgctgtg atcgtcactt ggtgagttgc gggctgctgg
gctggccggg 420
gctttcgtgg ccgccgggcc gctcggtggg acggaagcgt gtggagagac
cgccaagggc 480
tgtagtctgg gtccgcgagc aaggttgccc tgaactgggg gttgggggga
gcgcacaaaa 540
tggcggctgt tcccgagtct tgaatggaag acgcttgtaa ggcgggctgt
gaggtcgttg 600
aaacaaggtg gggggcatgg tgggcggcaa gaacccaagg tcttgaggcc
ttcgctaatg 660
cgggaaagct cttattcggg tgagatgggc tggggcacca tctggggacc
ctgacgtgaa 720
gtttgtcact gactggagaa ctcgggtttg tcgtctggtt gcgggggcgg
cagttatgcg 780
gtgccgttgg gcagtgcacc cgtacctttg ggagcgcgcg cctcgtcgtg
tcgtgacgtc 840
acccgttctg ttggcttata atgcagggtg gggccacctg ccggtaggtg
tgcggtaggc 900
ttttctccgt cgcaggacgc agggttcggg cctagggtag gctctcctga

atcgacaggc 960
gccggacctc tggtgagggg agggataagt gaggcgtcag tttctttggt
cggttttatg 1020
tacctatctt cttaagtagc tgaagctccg gttttgaact atgcgctcgg
ggttggcgag 1080
tgtgttttgt gaagtttttt aggcaccttt tgaaatgtaa tcatttgggt
caatatgtaa 1140
ttttcagtgt tagactagta aa
1162

<210> 44
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 聚 A- SV40

<400> 44
gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt
tcacaaataa 60
[0031] agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg
tatcttatca 120

<210> 45
<211> 227
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 聚 A- bGH

<400> 45
gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tcccccgtgc
cttccttgac 60
cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg
catcgcattg 120
tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca
agggggagga 180
ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatgg
227

<210> 46

<211> 1695
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包膜- RD114

<400> 46

[0032]
atgaaactcc caacaggaat ggtcatttta tgtagcctaa taatagttcg ggcagggttt 60
gacgaccccc gcaaggctat cgcattagta caaaaacaac atggtaaacc atgcgaatgc 120
agcggagggc aggtatccga ggccccaccg aactccatcc aacaggtaac ttgcccaggc 180
aagacggcct acttaatgac caaccaaaaa tggaaatgca gagtcactcc aaaaaatctc 240
acccctagcg ggggagaact ccagaactgc ccctgtaaca ctttccagga ctcgatgcac 300
agttcttgtt atactgaata ccggcaatgc agggcgaata ataagacata ctacacggcc 360
accttgctta aaatacggtc tgggagcctc aacgaggtac agatattaca aaaccccaat 420
cagctcctac agtccccttg taggggctct ataaatcagc ccgtttgctg gagtgccaca 480
gcccccatcc atatctccga tggtggagga cccctcgata ctaagagagt gtggacagtc 540
caaaaaaggc tagaacaaat tcataaggct atgcatcctg aacttcaata ccacccctta 600
gccctgccca aagtcagaga tgaccttagc cttgatgcac ggacttttga tatcctgaat 660
accactttta ggttactcca gatgtccaat tttagccttg cccaagattg ttggctctgt 720
ttaaaactag gtacccctac ccctcttgcg atacccactc cctctttaac ctactcccta 780
gcagactccc tagcgaatgc ctcctgtcag attatacctc ccctcttggt tcaaccgatg 840
cagttctcca actcgtcctg tttatcttcc cctttcatta acgatacgga acaaatagac 900
ttaggtgcag tcacctttac taactgcacc tctgtagcca atgtcagtag tcctttatgt 960
gccctaaacg ggtcagtctt cctctgtgga aataacatgg catacaccta tttaccccaa 1020
aactggacag gactttgcgt ccaagcctcc ctcctccccg acattgacat

catcccgggg 1080
gatgagccag tccccattcc tgccattgat cattatatac atagacctaa
acgagctgta 1140
cagttcatcc ctttactagc tggactggga atcaccgcag cattcaccac
cggagctaca 1200
ggcctaggtg tctccgtcac ccagtataca aaattatccc atcagttaat
atctgatgtc 1260
caagtcttat ccggtaccat acaagattta caagaccagg tagactcgtt
agctgaagta 1320
gttctccaaa ataggagggg actggaccta ctaacggcag aacaaggagg
aatttgttta 1380
gccttacaag aaaaatgctg tttttatgct aacaagtcag gaattgtgag
aaacaaaata 1440
agaaccctac aagaagaatt acaaaaacgc agggaaagcc tggcatccaa
ccctctctgg 1500
accgggctgc agggctttct tccgtacctc ctacctctcc tgggacccct
actcaccctc 1560
ctactcatac taaccattgg gccatgcgtt ttcaatcgat tggtccaatt
tgttaaagac 1620
aggatctcag tggtccaggc tctggttttg actcagcaat atcaccagct
aaaacccata 1680

[0033] gagtacgagc catga
1695

<210> 47
<211> 2013
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包膜- GALV

<400> 47
atgcttctca cctcaagccc gcaccacctt cggcaccaga tgagtcctgg
gagctggaaa 60
agactgatca tcctcttaag ctgcgtattc ggagacggca aaacgagtct
gcagaataag 120
aacccccacc agcctgtgac cctcacctgg caggtactgt cccaaactgg
ggacgttgtc 180
tgggacaaaa aggcagtcca gccccctttgg acttggtggc cctctcttac
acctgatgta 240
tgtgccctgg cggccggtct tgagtcctgg gatatcccgg gatccgatgt
atcgtcctct 300

aaaagagtta gacctcctga ttcagactat actgccgctt ataagcaaat cacctgggga 360
gccatagggt gcagctaccc tcgggctagg accaggatgg caaattcccc cttctacgtg 420
tgtccccgag ctggccgaac ccattcagaa gctaggaggt gtgggggggct agaatcccta 480
tactgtaaag aatggagttg tgagaccacg ggtaccgttt attggcaacc caagtcctca 540
tgggacctca taactgtaaa atgggaccaa aatgtgaaat gggagcaaaa atttcaaaag 600
tgtgaacaaa ccggctggtg taacccccctc aagatagact tcacagaaaa aggaaaactc 660
tccagagatt ggataacgga aaaaacctgg gaattaaggt tctatgtata tggacaccca 720
ggcatacagt tgactatccg cttagaggtc actaacatgc cggttgtggc agtgggccca 780
gaccctgtcc ttgcggaaca gggacctcct agcaagcccc tcactctccc tctctcccca 840
cggaaagcgc cgcccacccc tctacccccg gcggctagtg agcaaacccc tgcggtgcat 900
ggagaaactg ttaccctaaa ctctccgcct cccaccagtg gcgaccgact
[0034] ctttggcctt 960
gtgcaggggg ccttcctaac cttgaatgct accaacccag gggccactaa gtcttgctgg 1020
ctctgtttgg gcatgagccc cccttattat gaagggatag cctcttcagg agaggtcgct 1080
tatacctcca accatacccg atgccactgg ggggcccaag gaaagcttac cctcactgag 1140
gtctccggac tcgggtcatg catagggaag gtgcctctta cccatcaaca tctttgcaac 1200
cagaccttac ccatcaattc ctctaaaaac catcagtatc tgctcccctc aaaccatagc 1260
tggtgggcct gcagcactgg cctcaccccc tgcctctcca cctcagtttt taatcagtct 1320
aaagacttct gtgtccaggt ccagctgatc ccccgcatct attaccattc tgaagaaacc 1380
ttgttacaag cctatgacaa atcacccccc aggtttaaaa gagagcctgc ctcacttacc 1440
ctagctgtct tcctggggtt agggattgcg gcaggtatag gtactggctc aaccgcccta 1500
attaaagggc ccatagacct ccagcaaggc ctaaccagcc tccaaatcgc cattgacgct 1560
gacctccggg cccttcagga ctcaatcagc aagctagagg actcactgac

ttccctatct 1620
gaggtagtac tccaaaatag gagaggcctt gacttactat tccttaaaga
aggaggcctc 1680
tgcgcggccc taaaagaaga gtgctgtttt tatgtagacc actcaggtgc
agtacgagac 1740
tccatgaaaa aacttaaaga aagactagat aaaagacagt tagagcgcca
gaaaaaccaa 1800
aactggtatg aagggtggtt caataactcc ccttggttta ctaccctact
atcaaccatc 1860
gctgggcccc tattgctcct ccttttgtta ctcactcttg ggccctgcat
catcaataaa 1920
ttaatccaat tcatcaatga taggataagt gcagtcaaaa ttttagtcct
tagacagaaa 1980
tatcagaccc tagataacga ggaaaacctt taa
2013

<210> 48
<211> 1530
<212> DNA
<213> 人工序列

[0035] <220>
<223> 包膜- FUG

<400> 48
atggttccgc aggttctttt gtttgtactc cttctgggtt tttcgttgtg
tttcgggaag 60
ttccccattt acacgatacc agacgaactt ggtccctgga gccctattga
catacaccat 120
ctcagctgtc caaataacct ggttgtggag gatgaaggat gtaccaacct
gtccgagttc 180
tcctacatgg aactcaaagt gggatacatc tcagccatca aagtgaacgg
gttcacttgc 240
acaggtgttg tgacagaggc agagacctac accaactttg ttggttatgt
cacaaccaca 300
ttcaagagaa agcatttccg ccccacccca gacgcatgta gagccgcgta
taactggaag 360
atggccggtg accccagata tgaagagtcc ctacacaatc cataccccga
ctaccactgg 420
cttcgaactg taagaaccac caaagagtcc ctcattatca tatccccaag
tgtgacagat 480
ttggacccat atgacaaatc ccttcactca agggtcttcc ctggcggaaa
gtgctcagga 540

[0036]

ataacggtgt cctctaccta ctgctcaact aaccatgatt acaccatttg gatgcccgag 600
aatccgagac caaggacacc ttgtgacatt tttaccaata gcagagggaa gagagcatcc 660
aacgggaaca agacttgcgg ctttgtggat gaaagaggcc tgtataagtc tctaaaagga 720
gcatgcaggc tcaagttatg tggagttctt ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc 780
gcgatgcaaa catcagatga gaccaaatgg tgccctccag atcagttggt gaatttgcac 840
gactttcgct cagacgagat cgagcatctc gttgtggagg agttagttaa gaaaagagag 900
gaatgtctgg atgcattaga gtccatcatg accaccaagt cagtaagttt cagacgtctc 960
agtcacctga gaaaacttgt cccagggttt ggaaaagcat ataccatatt caacaaaacc 1020
ttgatggagg ctgatgctca ctacaagtca gtccggacct ggaatgagat catcccctca 1080
aaagggtgtt tgaaagttgg aggaaggtgc catcctcatg tgaacggggt gtttttcaat 1140
ggtataatat tagggcctga cgaccatgtc ctaatcccag agatgcaatc atccctcctc 1200
cagcaacata tggagttgtt ggaatcttca gttatccccc tgatgcaccc cctggcagac 1260
ccttctacag ttttcaaaga aggtgatgag gctgaggatt ttgttgaagt tcacctcccc 1320
gatgtgtaca aacagatctc aggggttgac ctgggtctcc cgaactgggg aaagtatgta 1380
ttgatgactg caggggccat gattggcctg gtgttgatat tttccctaat gacatggtgc 1440
agagttggta tccatctttg cattaaatta aagcacacca agaaaagaca gatttataca 1500
gacatagaga tgaaccgact tggaaagtaa 1530

<210> 49
<211> 1497
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包膜- LCMV

〈400〉 49

atgggtcaga ttgtgacaat gtttgaggct ctgcctcaca tcatcgatga ggtgatcaac 60

attgtcatta ttgtgcttat cgtgatcacg ggtatcaagg ctgtctacaa ttttgccacc 120

tgtgggatat tcgcattgat cagtttccta cttctggctg gcaggtcctg tggcatgtac 180

ggtcttaagg gacccgacat ttacaaagga gtttaccaat ttaagtcagt ggagtttgat 240

atgtcacatc tgaacctgac catgcccaac gcatgttcag ccaacaactc ccaccattac 300

atcagtatgg ggacttctgg actagaattg accttcacca atgattccat catcagtcac 360

aacttttgca atctgacctc tgccttcaac aaaaagacct ttgaccacac actcatgagt 420

atagtttcga gcctacacct cagtatcaga gggaactcca actataaggc agtatcctgc 480

gacttcaaca atggcataac catccaatac aacttgacat tctcagatcg acaaagtgct 540

cagagccagt gtagaacctt cagaggtaga gtcctagata tgtttagaac tgccttcggg 600

[0037] gggaaataca tgaggagtgg ctggggctgg acaggctcag atggcaagac cacctggtgt 660

agccagacga gttaccaata cctgattata caaaatagaa cctgggaaaa ccactgcaca 720

tatgcaggtc cttttgggat gtccaggatt ctcctttccc aagagaagac taagttcttc 780

actaggagac tagcgggcac attcacctgg actttgtcag actcttcagg ggtggagaat 840

ccaggtggtt attgcctgac caaatggatg attcttgctg cagagcttaa gtgtttcggg 900

aacacagcag ttgcgaaatg caatgtaaat catgatgccg aattctgtga catgctgcga 960

ctaattgact acaacaaggc tgctttgagt aagttcaaag aggacgtaga atctgccttg 1020

cacttattca aaacaacagt gaattctttg atttcagatc aactactgat gaggaaccac 1080

ttgagagatc tgatgggggt gccatattgc aattactcaa agttttggta cctagaacat 1140

gcaaagaccg gcgaaactag tgtccccaag tgctggcttg tcaccaatgg ttcttactta 1200

aatgagaccc acttcagtga tcaaatcgaa caggaagccg ataacatgat tacagagatg 1260

ttgaggaagg attacataaa gaggcagggg agtacccccc tagcattgat ggaccttctg 1320
atgttttcca catctgcata tctagtcagc atcttcctgc accttgtcaa aataccaaca 1380
cacaggcaca taaaaggtgg ctcatgtcca aagccacacc gattaaccaa caaaggaatt 1440
tgtagttgtg gtgcatttaa ggtgcctggt gtaaaaaccg tctggaaaag acgctga 1497

<210> 50
<211> 1692
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包膜- FPV

<400> 50
atgaacactc aaatcctggt tttcgccctt gtggcagtca tccccacaaa tgcagacaaa 60
atttgtcttg gacatcatgc tgtatcaaat ggcaccaaag taaacacact
[0038] cactgagaga 120
ggagtagaag ttgtcaatgc aacggaaaca gtggagcgga caaacatccc caaaatttgc 180
tcaaaaggga aaagaaccac tgatcttggc caatgcggac tgttagggac cattaccgga 240
ccacctcaat gcgaccaatt tctagaattt tcagctgatc taataatcga gagacgagaa 300
ggaaatgatg tttgttaccc ggggaagttt gttaatgaag aggcattgcg acaaatcctc 360
agaggatcag gtgggattga caaagaaaca atgggattca catatagtgg aataaggacc 420
aacggaacaa ctagtgcatg tagaagatca gggtcttcat tctatgcaga aatggagtgg 480
ctcctgtcaa atacagacaa tgctgctttc ccacaaatga caaaatcata caaaaacaca 540
aggagagaat cagctctgat agtctgggga atccaccatt caggatcaac caccgaacag 600
accaaactat atgggagtgg aaataaactg ataacagtcg ggagttccaa atatcatcaa 660
tcttttgtgc cgagtccagg aacacgaccg cagataaatg gccagtccgg acggattgat 720
tttcattggt tgatcttgga tcccaatgat acagttactt ttagtttcaa

tggggctttc 780
atagctccaa atcgtgccag cttcttgagg ggaaagtcca tggggatcca
gagcgatgtg 840
caggttgatg ccaattgcga aggggaatgc taccacagtg gagggactat
aacaagcaga 900
ttgccttttc aaaacatcaa tagcagagca gttggcaaat gcccaagata
tgtaaaacag 960
gaaagtttat tattggcaac tgggatgaag aacgttcccg aaccttccaa
aaaaaggaaa 1020
aaaagaggcc tgtttggcgc tatagcaggg tttattgaaa atggttggga
aggtctggtc 1080
gacgggtggt acggtttcag gcatcagaat gcacaaggag aaggaactgc
agcagactac 1140
aaaagcaccc aatcggcaat tgatcagata accggaaagt taaatagact
cattgagaaa 1200
accaaccagc aatttgagct aatagataat gaattcactg aggtggaaaa
gcagattggc 1260
aatttaatta actggaccaa agactccatc acagaagtat ggtcttacaa
tgctgaactt 1320
cttgtggcaa tggaaaacca gcacactatt gatttggctg attcagagat
gaacaagctg 1380

[0039] tatgagcgag tgaggaaaca attaagggaa aatgctgaag aggatggcac
tggttgcttt 1440
gaaatttttc ataaatgtga cgatgattgt atggctagta taaggaacaa
tacttatgat 1500
cacagcaaat acagagaaga agcgatgcaa aatagaatac aaattgaccc
agtcaaattg 1560
agtagtggct acaaagatgt gatactttgg tttagcttcg gggcatcatg
ctttttgctt 1620
cttgccattg caatgggcct tgttttcata tgtgtgaaga acggaaacat
gcggtgcact 1680
atttgtatat aa
1692

<210> 51
<211> 1266
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包膜- RRV

<400> 51

agtgtaacag agcactttaa tgtgtataag gctactagac catacctagc acattgcgcc 60

gattgcgggg acgggtactt ctgctatagc ccagttgcta tcgaggagat ccgagatgag 120

gcgtctgatg gcatgcttaa gatccaagtc tccgcccaaa taggtctgga caaggcaggc 180

acccacgccc acacgaagct ccgatatatg gctggtcatg atgttcagga atctaagaga 240

gattccttga gggtgtacac gtccgcagcg tgctccatac atgggacgat gggacacttc 300

atcgtcgcac actgtccacc aggcgactac ctcaaggttt cgttcgagga cgcagattcg 360

cacgtgaagg catgtaaggt ccaatacaag cacaatccat tgccggtggg tagagagaag 420

ttcgtggtta gaccacactt tggcgtagag ctgccatgca cctcatacca gctgacaacg 480

gctcccaccg acgaggagat tgacatgcat acaccgccag atataccgga tcgcaccctg 540

ctatcacaga cggcgggcaa cgtcaaaata acagcaggcg gcaggactat caggtacaac 600

tgtacctgcg gccgtgacaa cgtaggcact accagtactg acaagaccat

[0040] caacacatgc 660

aagattgacc aatgccatgc tgccgtcacc agccatgaca aatggcaatt tacctctcca 720

tttgttccca gggctgatca gacagctagg aaaggcaagg tacacgttcc gttccctctg 780

actaacgtca cctgccgagt gccgttggct cgagcgccgg atgccaccta tggtaagaag 840

gaggtgaccc tgagattaca cccagatcat ccgacgctct tctcctatag gagtttagga 900

gccgaaccgc acccgtacga ggaatgggtt gacaagttct ctgagcgcat catcccagtg 960

acggaagaag ggattgagta ccagtggggc aacaacccgc cggtctgcct gtgggcgcaa 1020

ctgacgaccg agggcaaacc ccatggctgg ccacatgaaa tcattcagta ctattatgga 1080

ctataccccg ccgccactat tgccgcagta tccggggcga gtctgatggc cctcctaact 1140

ctggcggcca catgctgcat gctggccacc gcgaggagaa agtgcctaac accgtacgcc 1200

ctgacgccag gagcggtggt accgttgaca ctggggctgc tttgctgcgc accgagggcg 1260

aatgca

1266

〈210〉 52
〈211〉 1266
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 包膜- MLV 10A1

〈400〉 52

[0041]
agtgtaacag agcactttaa tgtgtataag gctactagac catacctagc acattgcgcc 60
gattgcgggg acgggtactt ctgctatagc ccagttgcta tcgaggagat ccgagatgag 120
gcgtctgatg gcatgcttaa gatccaagtc tccgcccaaa taggtctgga caaggcaggc 180
acccacgccc acacgaagct ccgatatatg gctggtcatg atgttcagga atctaagaga 240
gattccttga gggtgtacac gtccgcagcg tgctccatac atgggacgat gggacacttc 300
atcgtcgcac actgtccacc aggcgactac ctcaaggttt cgttcgagga cgcagattcg 360
cacgtgaagg catgtaaggt ccaatacaag cacaatccat tgccggtggg tagagagaag 420
ttcgtggtta gaccacactt tggcgtagag ctgccatgca cctcatacca gctgacaacg 480
gctcccaccg acgaggagat tgacatgcat acaccgccag atataccgga tcgcaccctg 540
ctatcacaga cggcgggcaa cgtcaaaata acagcaggcg gcaggactat caggtacaac 600
tgtacctgcg gccgtgacaa cgtaggcact accagtactg acaagaccat caacacatgc 660
aagattgacc aatgccatgc tgccgtcacc agccatgaca aatggcaatt tacctctcca 720
tttgttccca gggctgatca gacagctagg aaaggcaagg tacacgttcc gttccctctg 780
actaacgtca cctgccgagt gccgttggct cgagcgccgg atgccaccta tggtaagaag 840
gaggtgaccc tgagattaca cccagatcat ccgacgctct tctcctatag gagtttagga 900
gccgaaccgc acccgtacga ggaatgggtt gacaagttct ctgagcgcat catcccagtg 960

acggaagaag ggattgagta ccagtggggc aacaacccgc cggtctgcct gtgggcgcaa 1020
ctgacgaccg agggcaaacc ccatggctgg ccacatgaaa tcattcagta ctattatgga 1080
ctataccccg ccgccactat tgccgcagta tccggggcga gtctgatggc cctcctaact 1140
ctggcggcca catgctgcat gctggccacc gcgaggagaa agtgcctaac accgtacgcc 1200
ctgacgccag gagcggtggt accgttgaca ctggggctgc tttgctgcgc accgagggcg 1260
aatgca 1266

<210> 53
<211> 2030
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包膜- 埃博拉

[0042] <400> 53
atgggtgtta caggaatatt gcagttacct cgtgatcgat tcaagaggac atcattcttt 60
ctttgggtaa ttatcctttt ccaaagaaca ttttccatcc cacttggagt catccacaat 120
agcacattac aggttagtga tgtcgacaaa ctggtttgcc gtgacaaact gtcatccaca 180
aatcaattga gatcagttgg actgaatctc gaagggaatg gagtggcaac tgacgtgcca 240
tctgcaacta aaagatgggg cttcaggtcc ggtgtcccac caaaggtggt caattatgaa 300
gctggtgaat gggctgaaaa ctgctacaat cttgaaatca aaaaacctga cgggagtgag 360
tgtctaccag cagcgccaga cgggattcgg ggcttccccc ggtgccggta tgtgcacaaa 420
gtatcaggaa cgggaccgtg tgccggagac tttgccttcc acaaagaggg tgctttcttc 480
ctgtatgacc gacttgcttc cacagttatc taccgaggaa cgactttcgc tgaaggtgtc 540
gttgcatttc tgatactgcc ccaagctaag aaggacttct tcagctcaca ccccttgaga 600
gagccggtca atgcaacgga ggacccgtct agtggctact attctaccac

aattagatat 660
caagctaccg gttttggaac caatgagaca gagtatttgt tcgaggttga caatttgacc 720
tacgtccaac ttgaatcaag attcacacca cagtttctgc tccagctgaa tgagacaata 780
tatacaagtg ggaaaaggag caataccacg ggaaaactaa tttggaaggt caaccccgaa 840
attgatacaa caatcgggga gtgggccttc tgggaaacta aaaaaacctc actagaaaaa 900
ttcgcagtga agagttgtct ttcacagctg tatcaaacag agccaaaaac atcagtggtc 960
agagtccggc gcgaacttct tccgacccag ggaccaacac aacaactgaa gaccacaaaa 1020
tcatggcttc agaaaattcc tctgcaatgg ttcaagtgca cagtcaagga agggaagctg 1080
cagtgtcgca tctgacaacc cttgccacaa tctccacgag tcctcaaccc cccacaacca 1140
aaccaggtcc ggacaacagc acccacaata cacccgtgta taaacttgac atctctgagg 1200
caactcaagt tgaacaacat caccgcagaa cagacaacga cagcacagcc tccgacactc 1260

[0043] cccccgccac gaccgcagcc ggacccctaa aagcagagaa caccaacacg agcaagggta 1320
ccgacctcct ggaccccgcc accacaacaa gtccccaaaa ccacagcgag accgctggca 1380
acaacaacac tcatcaccaa gataccggag aagagagtgc cagcagcggg aagctaggct 1440
taattaccaa tactattgct ggagtcgcag gactgatcac aggcgggagg agagctcgaa 1500
gagaagcaat tgtcaatgct caacccaaat gcaaccctaa tttacattac tggactactc 1560
aggatgaagg tgctgcaatc ggactggcct ggataccata tttcgggcca gcagccgagg 1620
gaatttacat agaggggctg atgcacaatc aagatggttt aatctgtggg ttgagacagc 1680
tggccaacga gacgactcaa gctcttcaac tgttcctgag agccacaacc gagctacgca 1740
ccttttcaat cctcaaccgt aaggcaattg atttcttgct gcagcgatgg ggcggcacat 1800
gccacatttt gggaccggac tgctgtatcg aaccacatga ttggaccaag aacataacag 1860
acaaaattga tcagattatt catgattttg ttgataaaac ccttccggac caggggggaca 1920

atgacaattg gtggacagga tggagacaat ggataccggc aggtattgga gttacaggcg 1980
ttataattgc agttatcgct ttattctgta tatgcaaatt tgtcttttag 2030

<210> 54
<211> 237
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 聚合酶III shRNA启动子- U6启动子

<400> 54
tttcccatga ttccttcata tttgcatata cgatacaagg ctgttagaga gataattgga 60
attaatttga ctgtaaacac aaagatatta gtacaaaata cgtgacgtag aaagtaataa 120
tttcttgggt agtttgcagt tttaaaatta tgttttaaaa tggactatca tatgcttacc 180
[0044] gtaacttgaa agtatttcga tttcttggct ttatatatct tgtggaaagg acgaaac 237

<210> 55
<211> 243
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 聚合酶III shRNA启动子- 7SK启动子

<400> 55
ctgcagtatt tagcatgccc cacccatctg caaggcattc tggatagtgt caaaacagcc 60
ggaaatcaag tccgtttatc tcaaacttta gcattttggg aataaatgat atttgctatg 120
ctggttaaat tagattttag ttaaatttcc tgctgaagct ctagtacgat aagcaacttg 180
acctaagtgt aaagttgaga tttccttcag gtttatatag cttgtgcgcc gcctggctac 240
ctc 243

<210> 56
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FDPS靶序列#1

<400> 56
gtcctggagt acaatgccat t
21

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FDPS靶序列#2

<400> 57
[0045] gcaggatttc gttcagcact t
21

<210> 58
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FDPS靶序列#3

<400> 58
gccatgtaca tggcaggaat t
21

<210> 59
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FDPS靶序列#4

<400> 59
gcagaaggag gctgagaaag t
21

<210> 60
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 非靶向序列

<400> 60
gccgctttgt aggatagagc tcgagctcta tcctacaaag cggcttttt
49

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

[0046]
<220>
<223> 正向引物

<400> 61
aggaattgat ggcgagaagg
20

<210> 62
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 62
cccaaagagg tcaaggtaat ca
22

<210> 63
<211> 18

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物

<400> 63
agcgcggcta cagcttca
18

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 64
ggcgacgtag cacagcttct
20

[0047]

<210> 65
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 左反向末端重复(左 ITR)

<400> 65
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg
ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa
ctccatcact 120
aggggttcct
130

<210> 66
<211> 151
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 右反向末端重复(右 ITR)

<400> 66
gagcggccgc aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg
cgctcgctcg 60
ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg
ggcggcctca 120
gtgagcgagc gagcgcgcag ctgcctgcag g
151

<210> 67
<211> 1227
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 无REV的辅助质粒

<400> 67
tctagaagga gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta
[0048] tgggcgcagc 60
gtcaatgacg ctgacggtac aggccagaca attattgtct ggtatagtgc
agcagcagaa 120
caatttgctg agggctattg aggcgcaaca gcatctgttg caactcacag
tctggggcat 180
caagcagctc caggcaagaa tcctggctgt ggaaagatac ctaaaggatc
aacagctcct 240
agatcttttt ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg
agcatctgac 300
ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt
ttttgtgtct 360
ctcactcgga aggacatatg ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg
agtatttggt 420
ttagagtttg gcaacatatg ccatatgctg gctgccatga acaaaggtgg
ctataaagag 480
gtcatcagta tatgaaacag ccccctgctg tccattcctt attccataga
aaagccttga 540
cttgaggtta gatttttttt atattttgtt ttgtgttatt tttttcttta
acatccctaa 600
aattttcctt acatgtttta ctagccagat ttttcctcct ctcctgacta
ctcccagtca 660
tagctgtccc tcttctctta tgaagatccc tcgacctgca gcccaagctt

ggcgtaatca 720

tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga 780

gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact cacattaatt 840

gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagcg gatccgcatc 900

tcaattagtc agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc catcccgccc ctaactccgc 960

[0049] ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat gcagaggccg 1020

aggccgcctc ggcctctgag ctattccaga agtagtgagg aggcttttt ggaggcctag 1080

gcttttgcaa aaagctaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag 1140

catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa 1200

actcatcaat gtatcttatc acccggg 1227

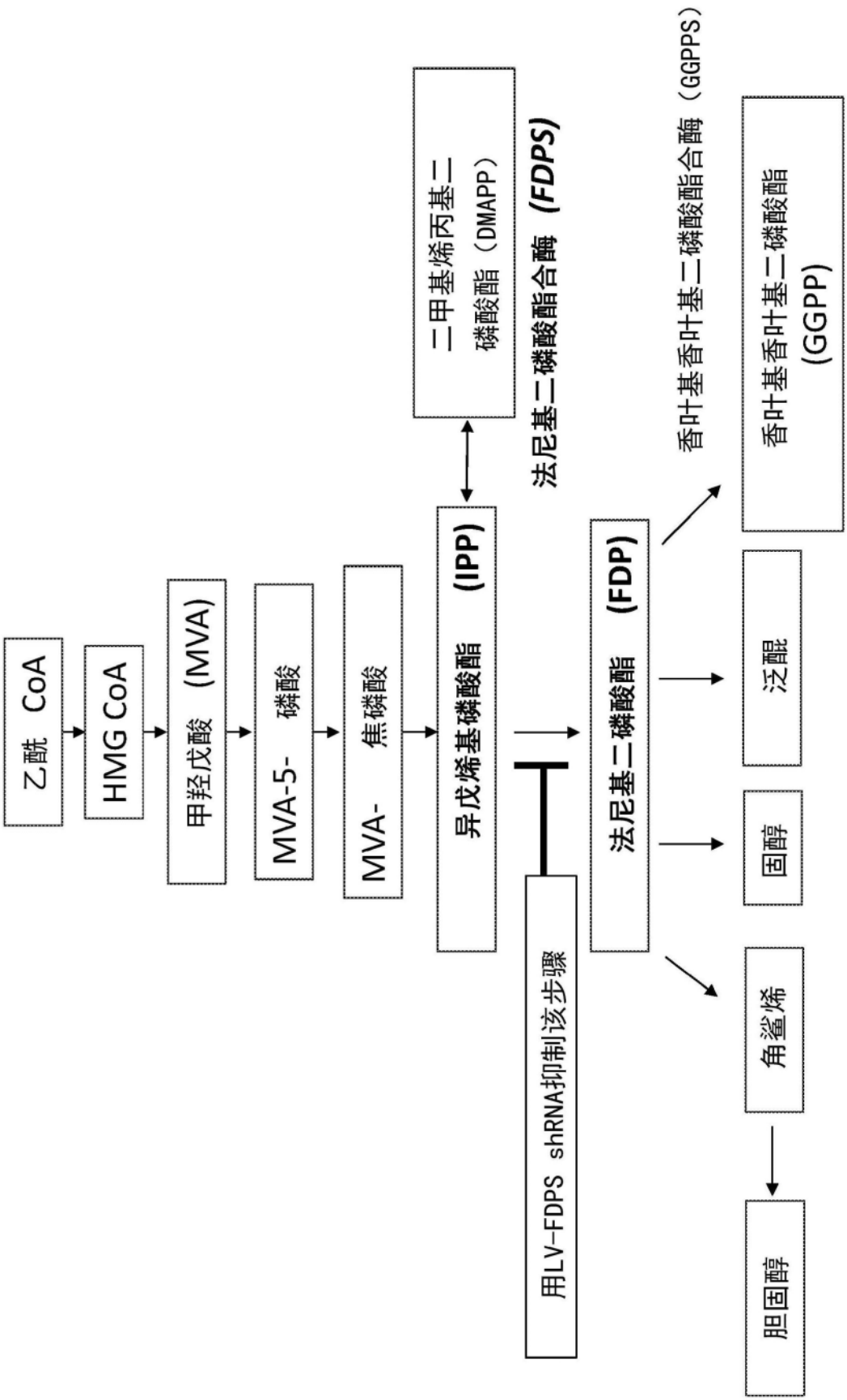

乙酰 CoA
HMG CoA
甲羟戊酸 (MVA)
MVA-5- 磷酸
MVA- 焦磷酸
异戊烯基磷酸酯 (IPP)
二甲基烯丙基二磷酸酯（DMAPP）
法尼基二磷酸酯合酶 (FDPS)
用LV-FDPS shRNA抑制该步骤
法尼基二磷酸酯 (FDP)
香叶基香叶基二磷酸酯合酶（GGPPS）
香叶基香叶基二磷酸酯 (GGPP)
泛醌
固醇
角鲨烯
胆固醇

图1

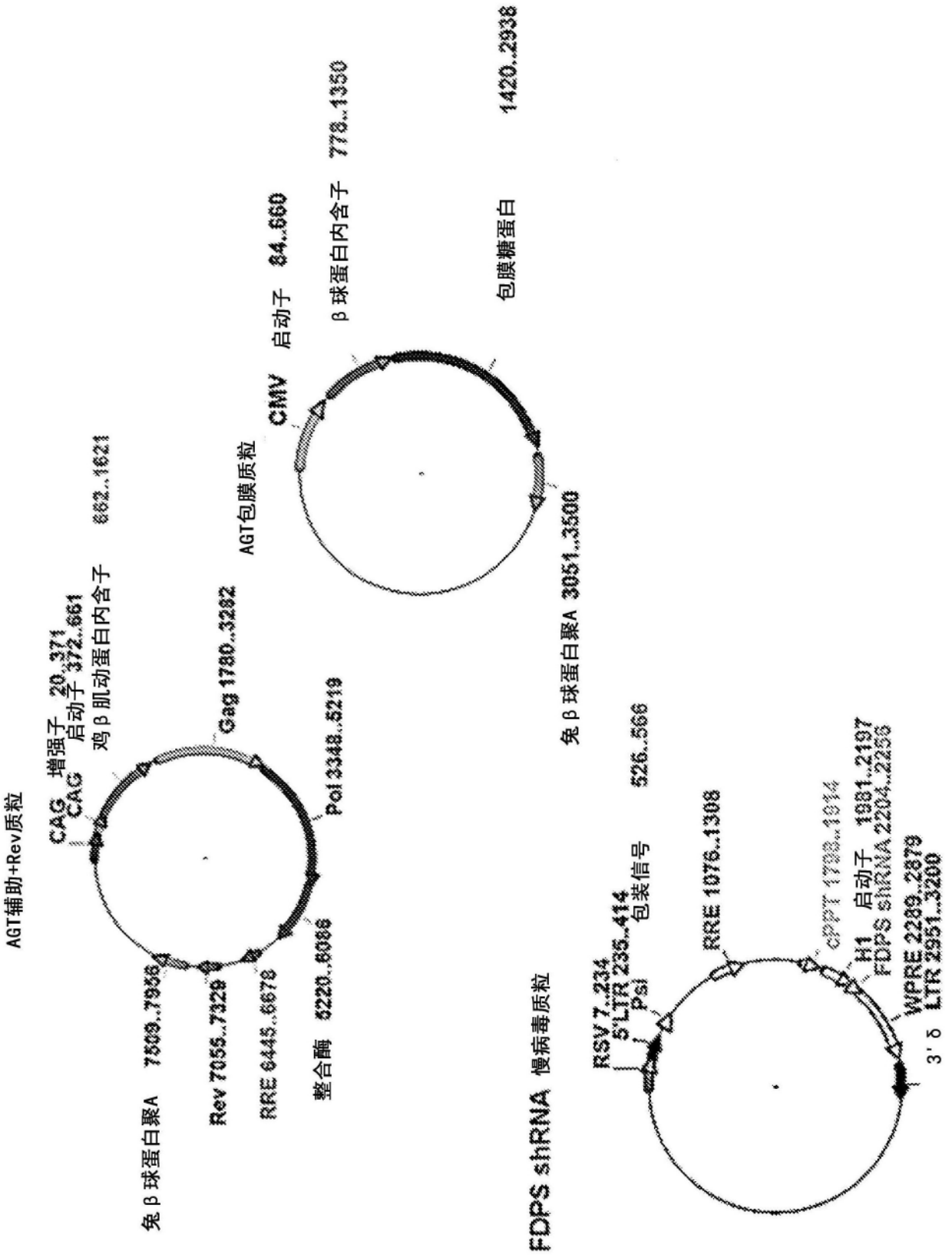

AGT辅助+Rev质粒
CAG 增强子 20..371
CAG 启动子 372..661
鸡β肌动蛋白内含子 662..1621
Gag 1780..3282
Pol 3348..5219
整合酶 5220..6086
RRE 6445..6678
Rev 7055..7329
兔β球蛋白聚A 7509..7956
AGT包膜质粒
CMV 启动子 84..660
β球蛋白内含子 778..1350
包膜糖蛋白 1420..2938
兔β球蛋白聚A 3051..3500
FDPS shRNA 慢病毒质粒
RSV 7..234
5'LTR 235..414
Psi 包装信号 526..566
RRE 1076..1308
cPPT 1788..1914
H1 启动子 1931..2197
FDPS shRNA 2204..2256
WPRE 2289..2879
3' δ LTR 2951..3200

图2

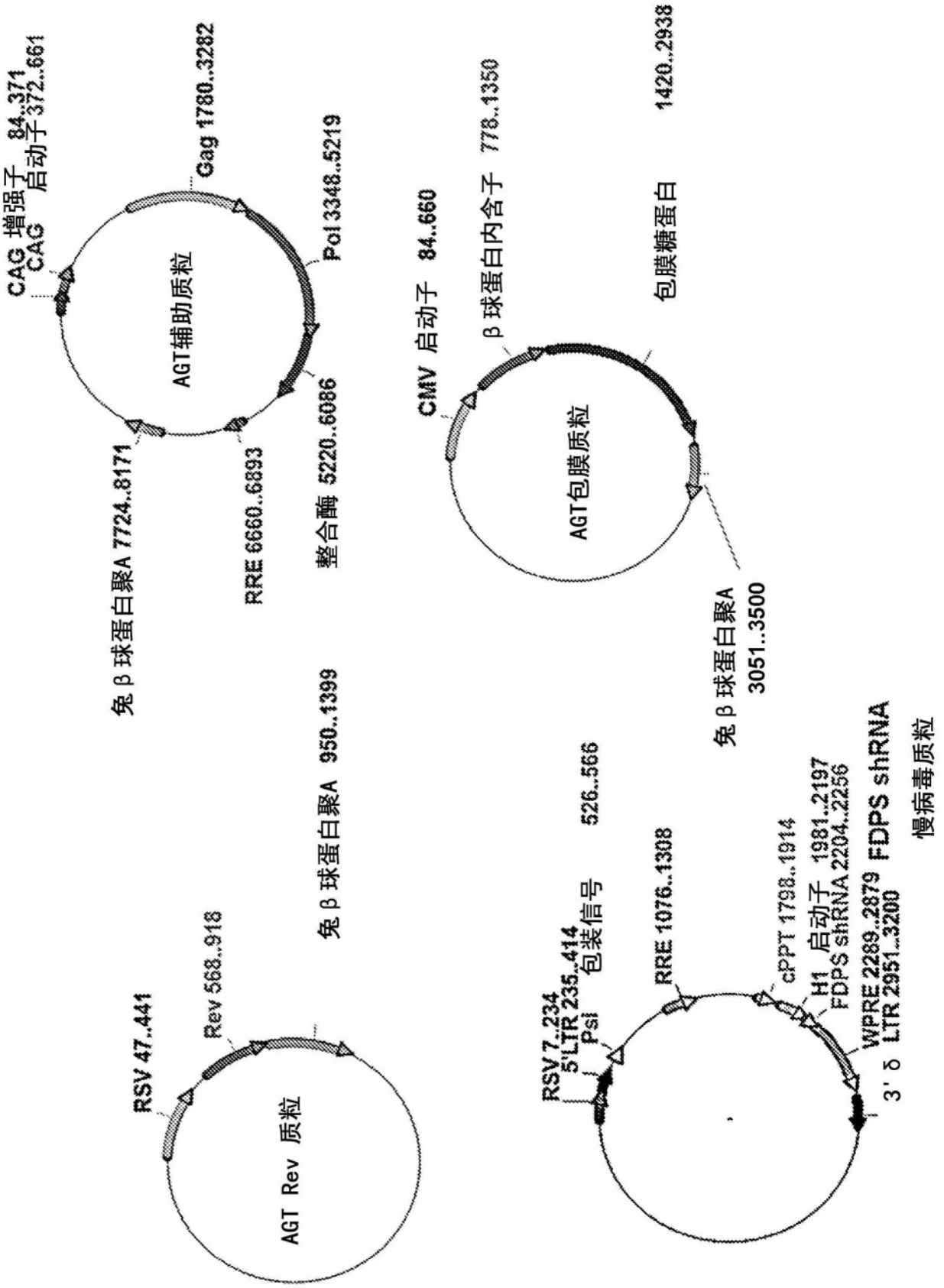

CAG 增强子 84..371
CAG 启动子 372..661
Gag 1780..3282
Pol 3348..5219
整合酶 5220..6086
RRE 6660..6893
兔 β 球蛋白聚A 7724..8171
AGT辅助质粒
CMV 启动子 84..660
β 球蛋白内含子 778..1350
包膜糖蛋白 1420..2938
兔 β 球蛋白聚A 3051..3500
AGT包膜质粒
RSV 47..441
Rev 568..918
兔 β 球蛋白聚A 950..1399
AGT Rev 质粒
RSV 7..234
5'LTR 235..414
Psi 包装信号 526..566
RRE 1076..1308
cPPT 1798..1914
H1 启动子 1981..2197
FDPS shRNA 2204..2256
WPRE 2289..2879
3' δ LTR 2951..3200
FDPS shRNA
慢病毒质粒

图3

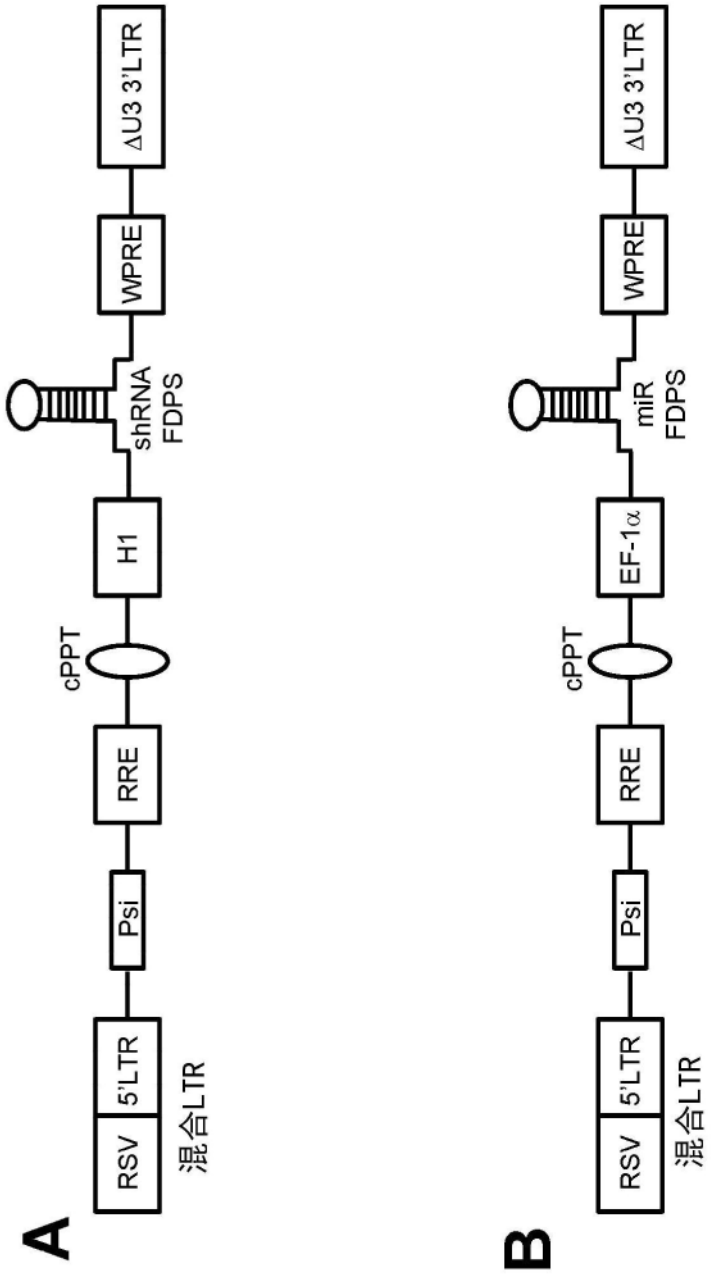

A
RSV
5'LTR
混合LTR
Psi
RRE
cPPT
H1
shRNA
FDPS
WPRE
ΔU3 3'LTR
B
RSV
5'LTR
混合LTR
Psi
RRE
cPPT
EF-1α
miR
FDPS
WPRE
ΔU3 3'LTR

图4

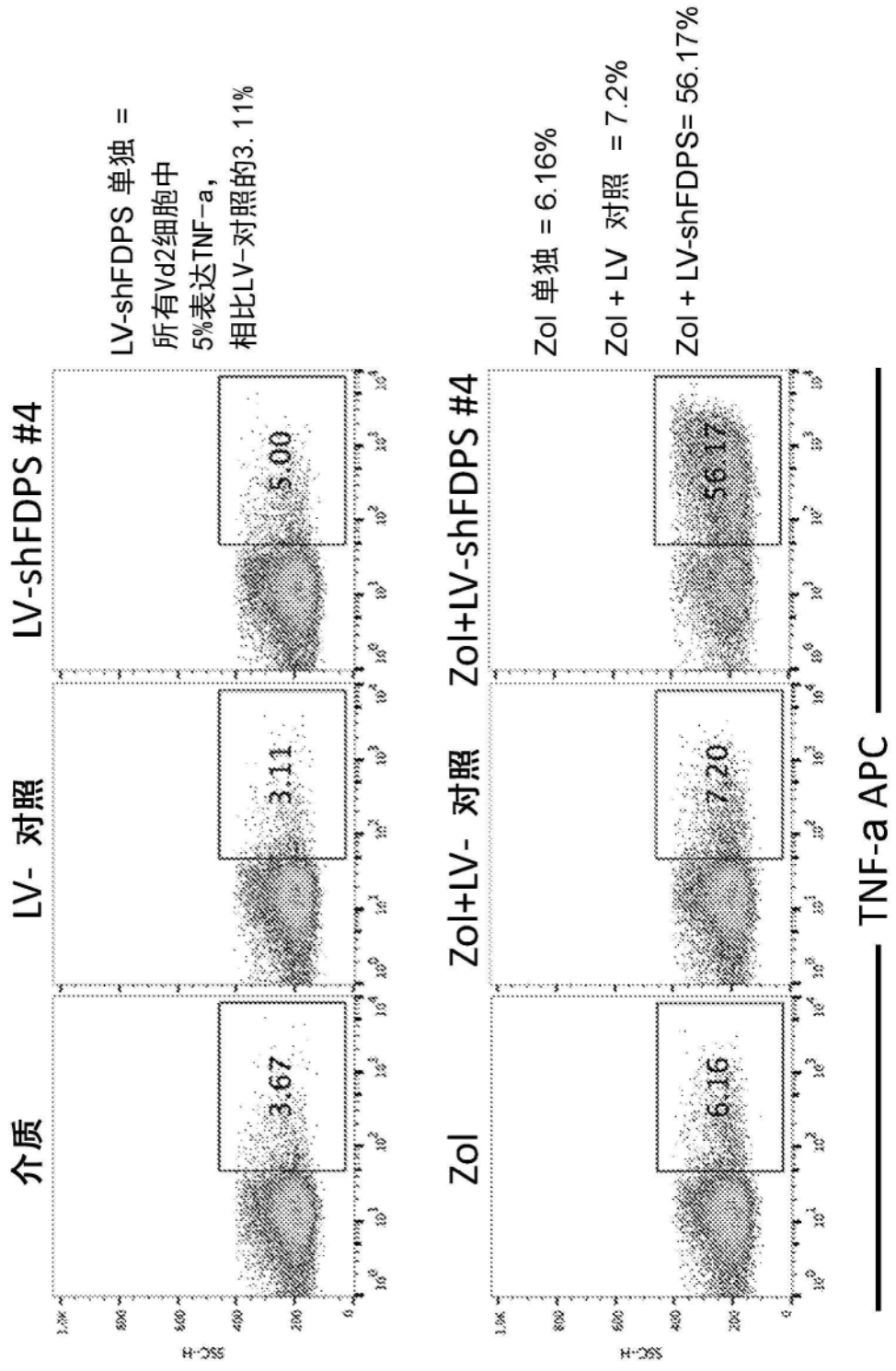

介质
LV- 对照
LV-shFDPS #4
3.67
3.11
5.00
LV-shFDPS 单独 =
所有Vd2细胞中
5%表达TNF-a,
相比LV-对照的3.11%
Zol
Zol+LV- 对照
Zol+LV-shFDPS #4
6.16
7.20
56.17
Zol 单独 = 6.16%
Zol + LV 对照 = 7.2%
Zol + LV-shFDPS= 56.17%
TNF-a APC

图5

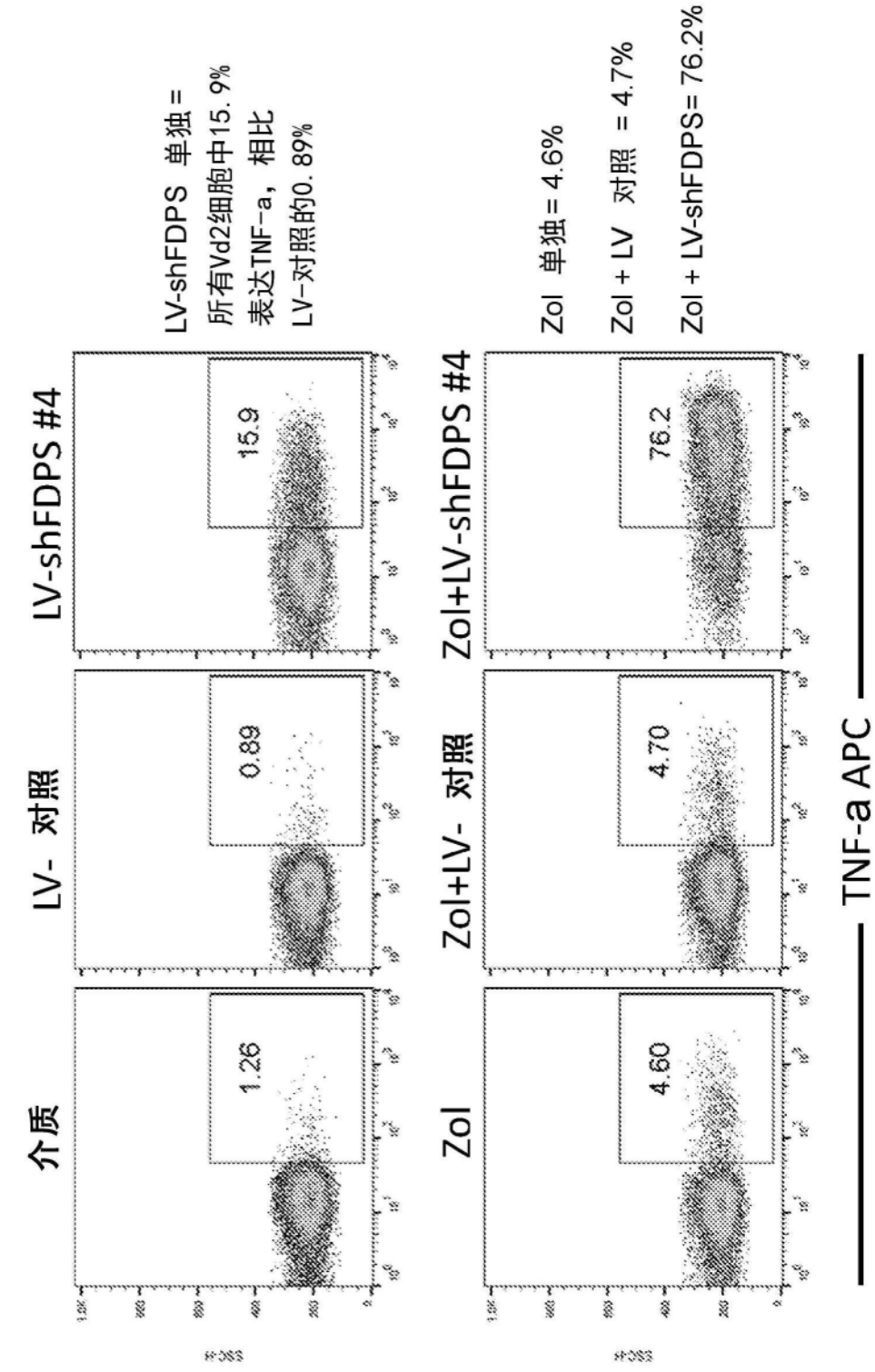

介质
LV- 对照
LV-shFDPS #4
1.26
0.89
15.9
LV-shFDPS 单独 =
所有Vd2细胞中15.9%
表达TNF-a，相比
LV-对照的0.89%
Zol
Zol+LV- 对照
Zol+LV-shFDPS #4
4.60
4.70
76.2
Zol 单独 = 4.6%
Zol + LV 对照 = 4.7%
Zol + LV-shFDPS= 76.2%
TNF-a APC

图6

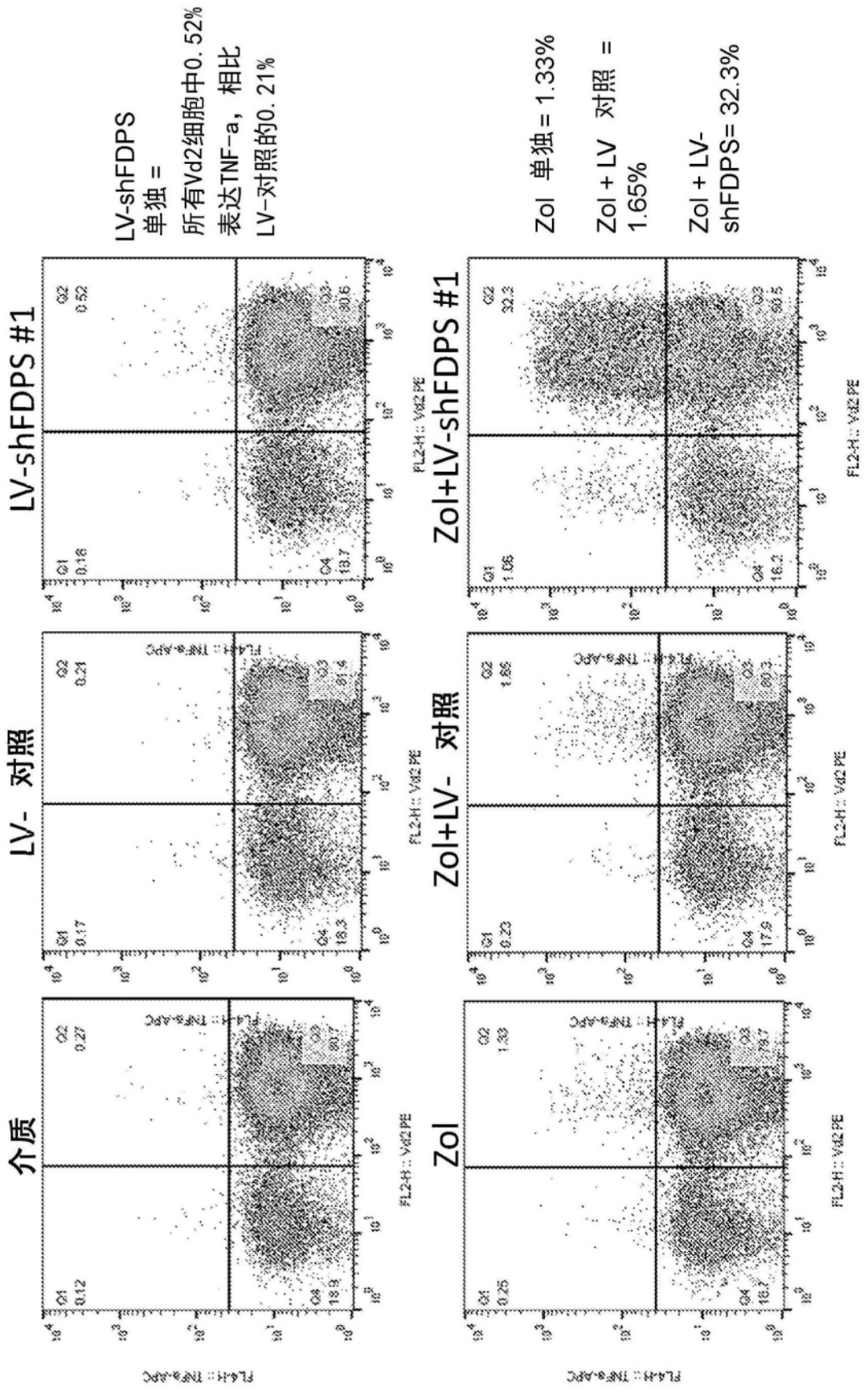

介质
LV- 对照
LV-shFDPS #1
Zol
Zol+LV- 对照
Zol+LV-shFDPS #1
LV-shFDPS 单独 = 所有Vd2细胞中0.52% 表达TNF-a，相比 LV-对照的0.21%
Zol 单独= 1.33%
Zol + LV 对照 = 1.65%
Zol + LV-shFDPS= 32.3%
FL2-H :: Vd2 PE
FL4-H :: TNFa-APC

图7

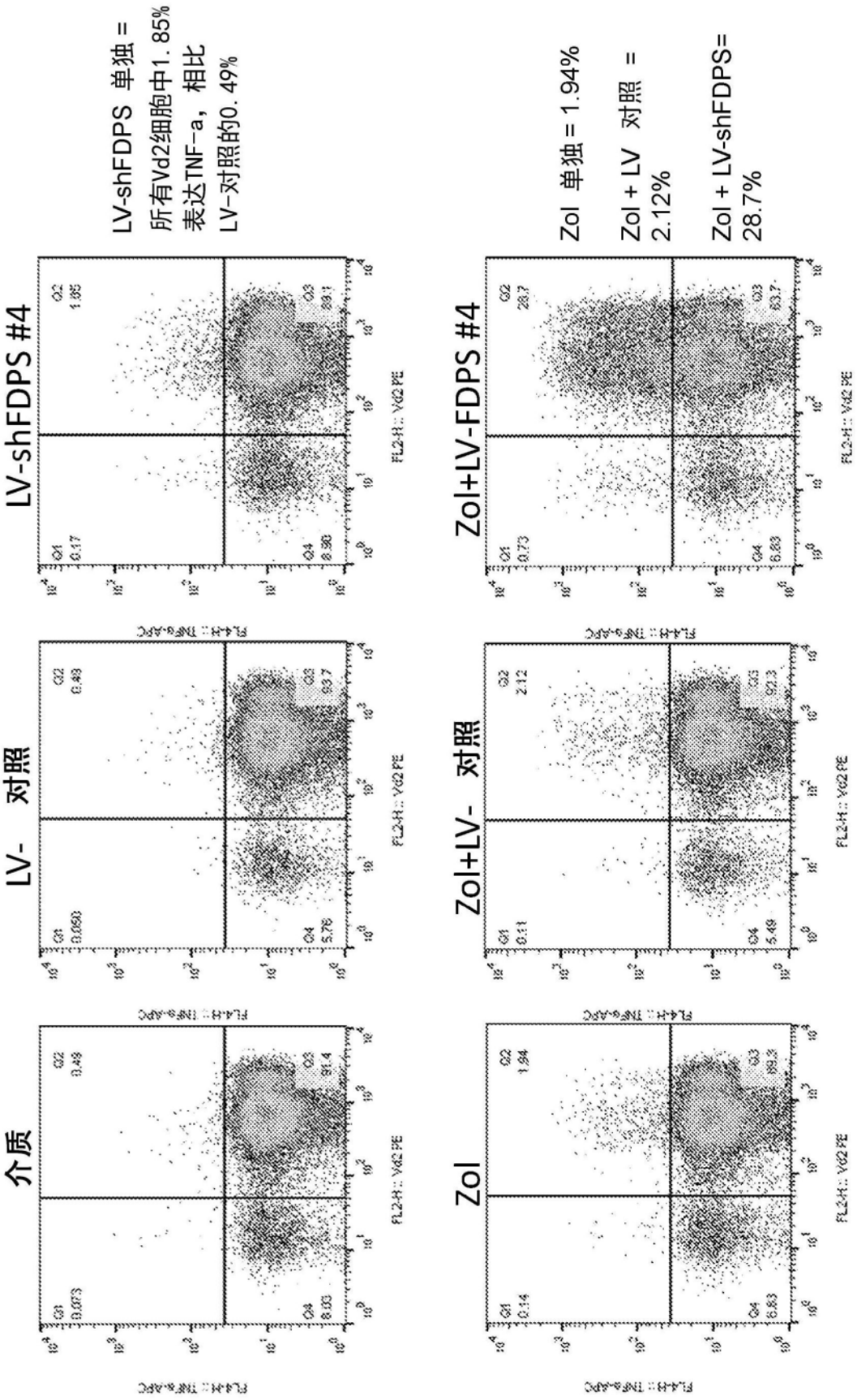

介质
LV- 对照
LV-shFDPS #4
Zol
Zol+LV- 对照
Zol+LV-FDPS #4
LV-shFDPS 单独 = 所有Vd2细胞中1.85% 表达TNF-a，相比 LV-对照的0.49%
Zol 单独 = 1.94%
Zol + LV 对照 = 2.12%
Zol + LV-shFDPS= 28.7%

图8

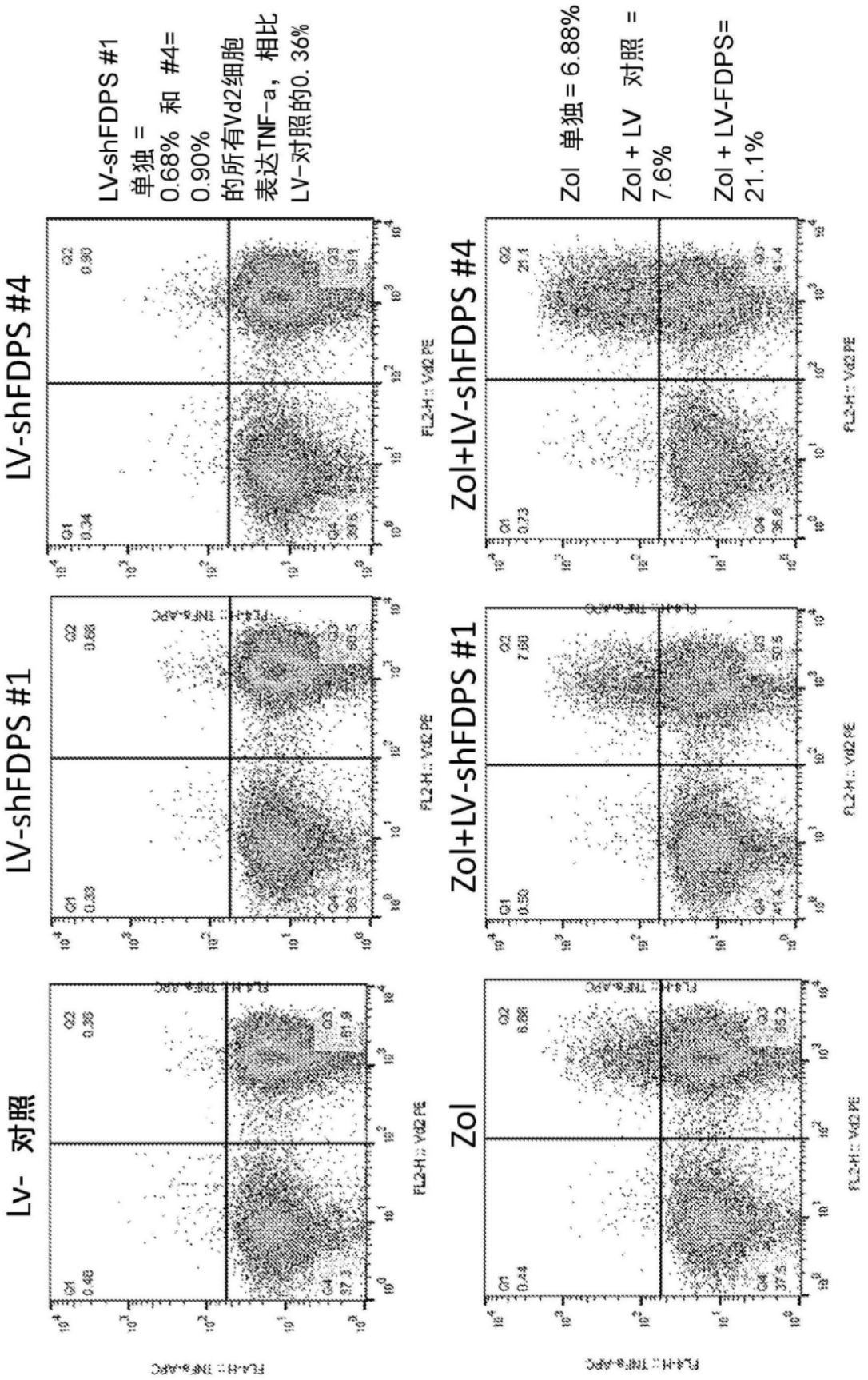

Lv- 对照
LV-shFDPS #1
LV-shFDPS #4
Zol
Zol+LV-shFDPS #1
Zol+LV-shFDPS #4
LV-shFDPS #1
单独 =
0.68% 和 #4=
0.90%
的所有Vd2细胞
表达TNF-a，相比
LV-对照的0.36%
Zol 单独 = 6.88%
Zol + LV 对照 =
7.6%
Zol + LV-FDPS=
21.1%

图9

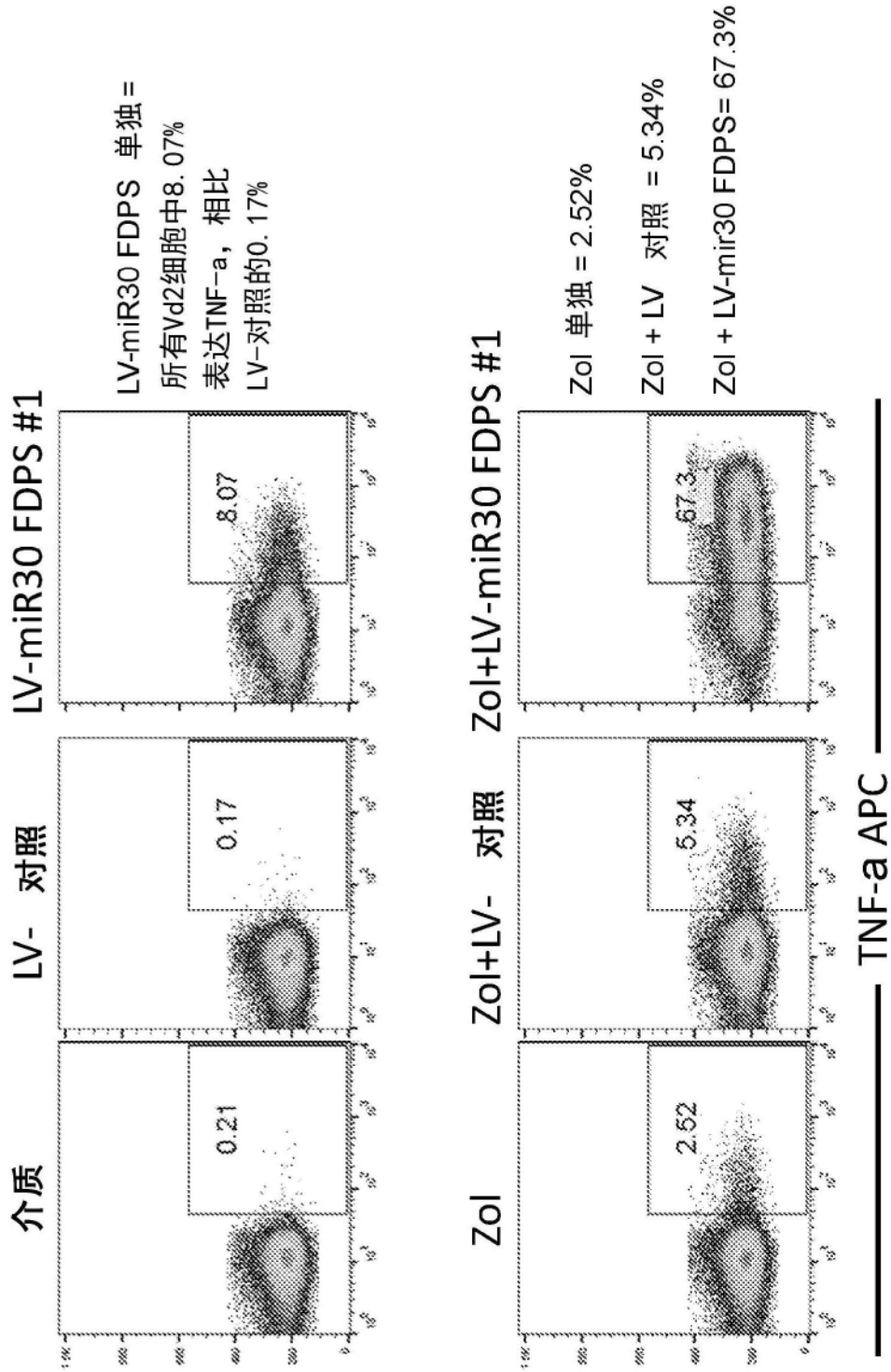

介质
LV- 对照
LV-miR30 FDPS #1
LV-miR30 FDPS 单独 = 所有Vd2细胞中8.07% 表达TNF-a，相比 LV-对照的0.17%
0.21
0.17
8.07
Zol
Zol+LV- 对照
Zol+LV-miR30 FDPS #1
Zol 单独 = 2.52%
Zol + LV 对照 = 5.34%
Zol + LV-mir30 FDPS= 67.3%
2.52
5.34
67.3
TNF-a APC

图10

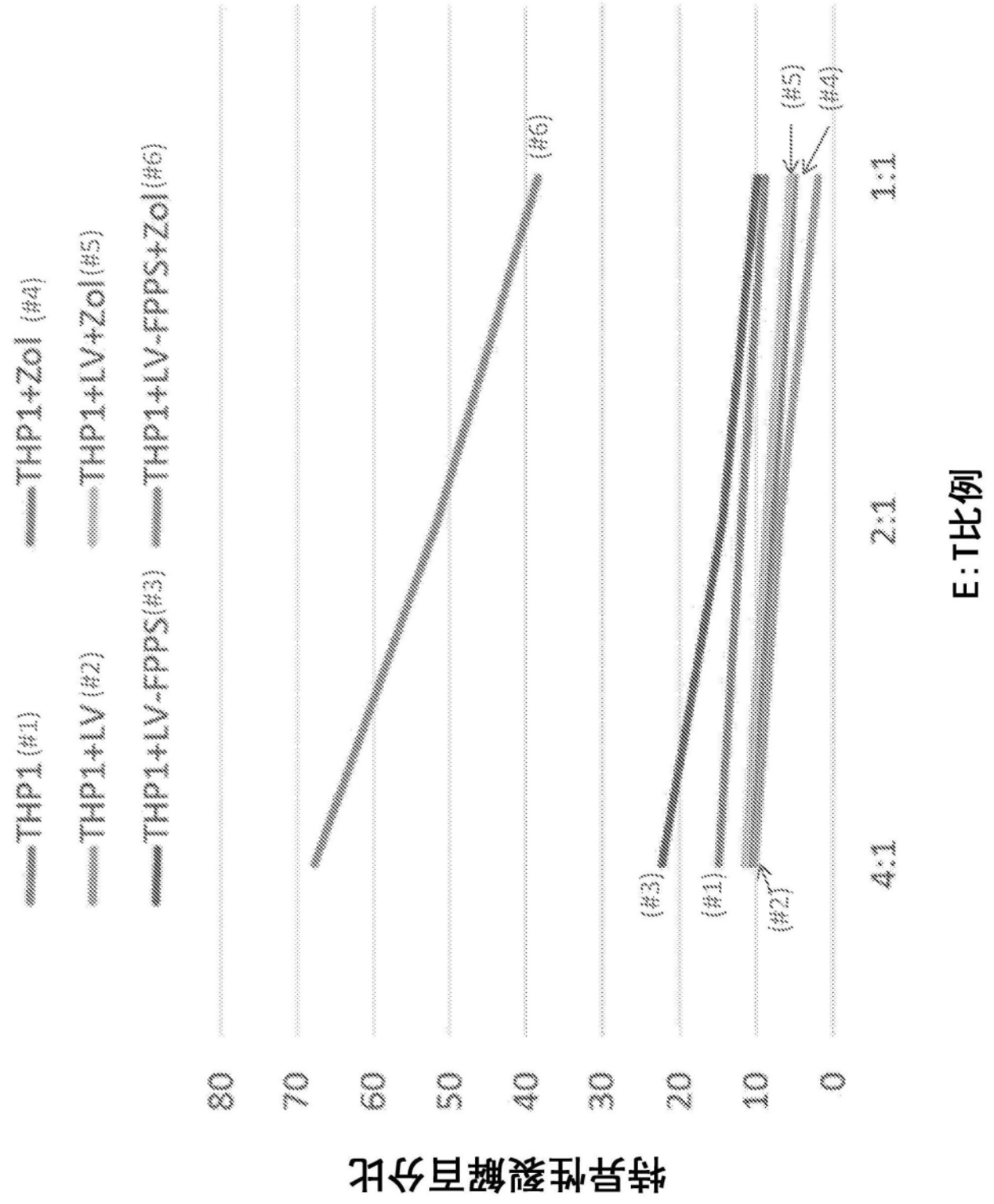

THP1 (#1)
THP1+Zol (#4)
THP1+LV (#2)
THP1+LV+Zol(#5)
THP1+LV-FPPS(#3)
THP1+LV-FPPS+Zol(#6)
特异性裂解百分比
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(#6)
(#5)
(#4)
(#3)
(#1)
(#2)
4:1
2:1
1:1
E:T比例

图11

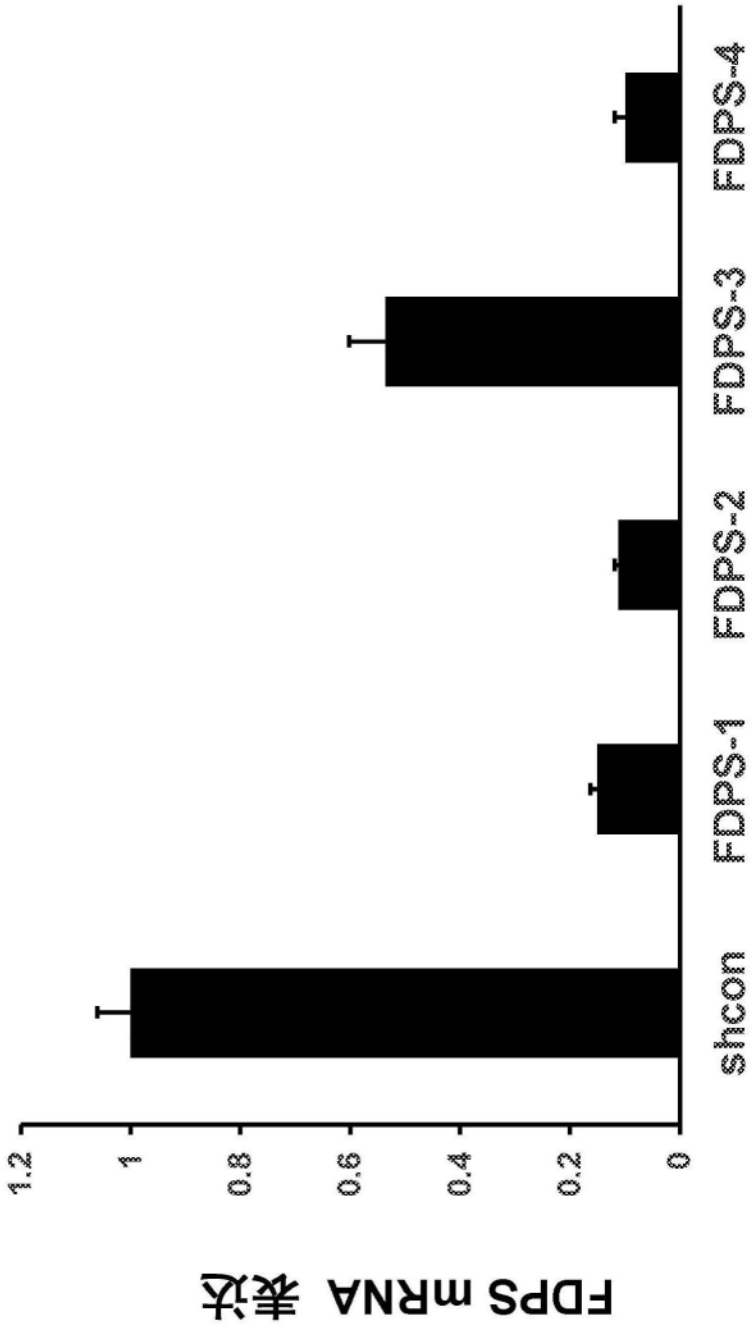


图12

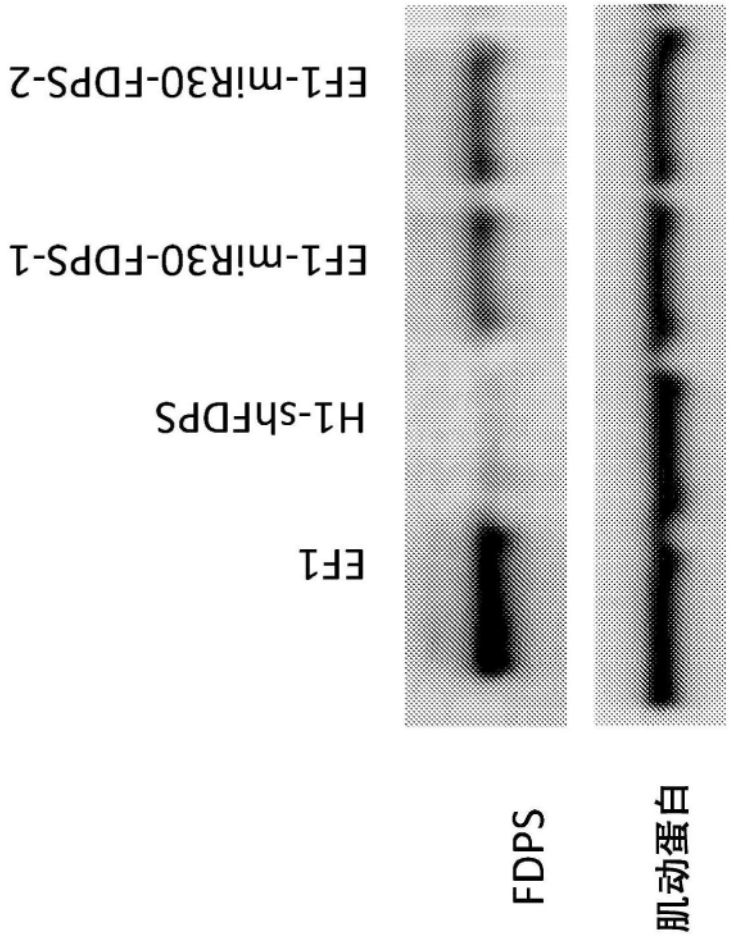


图13

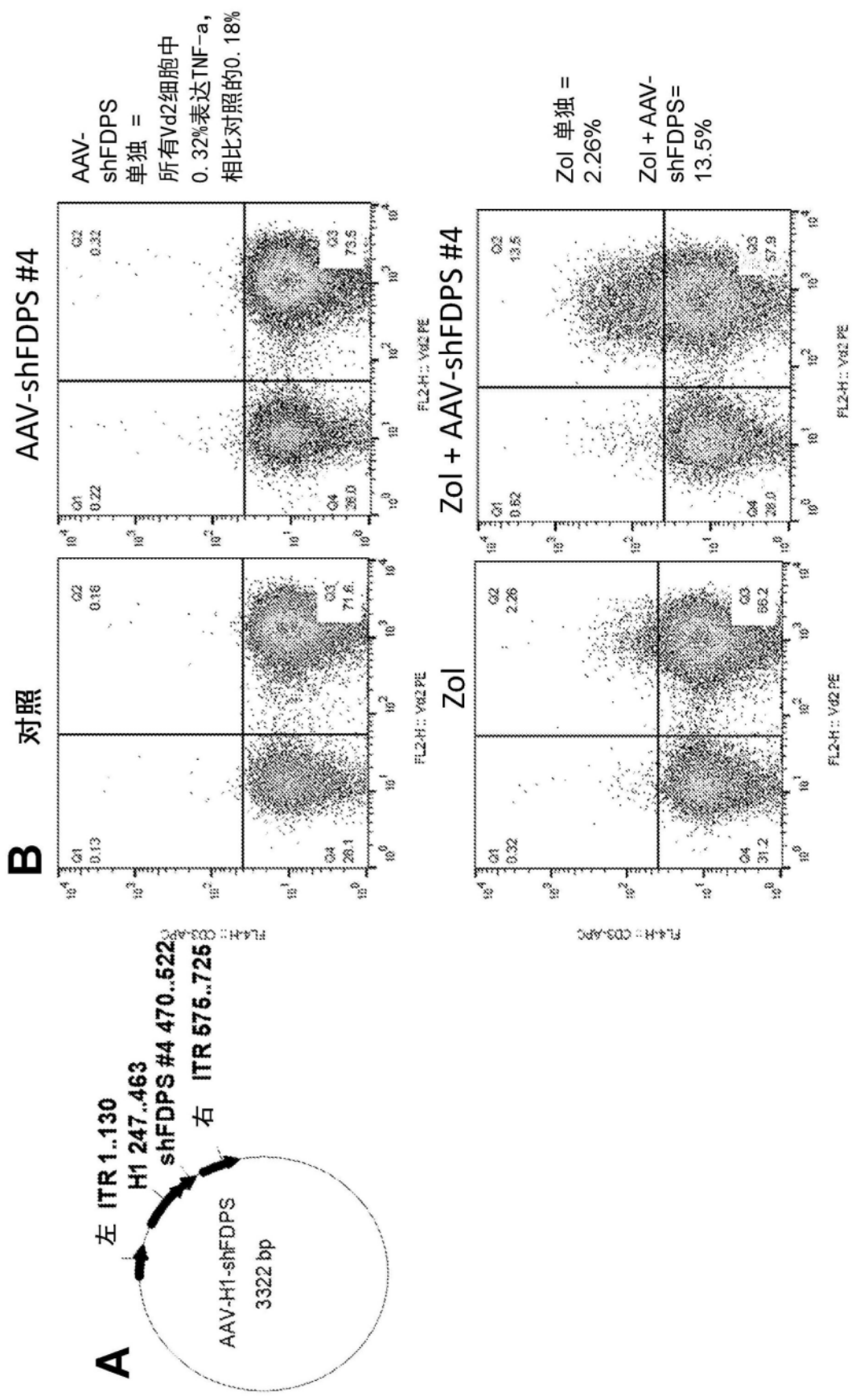

A
左 ITR 1..130
H1 247..463
shFDPS #4 470..522
右 ITR 575..725
AAV-H1-shFDPS
3322 bp
B
对照
AAV-shFDPS #4
AAV-shFDPS 单独 = 所有Vd2细胞中0.32%表达TNF-a，相比对照的0.18%
Zol
Zol + AAV-shFDPS #4
Zol 单独 = 2.26%
Zol + AAV-shFDPS= 13.5%
FL2-H :: Vd2 PE
FL4-H :: CD3-APC

图14

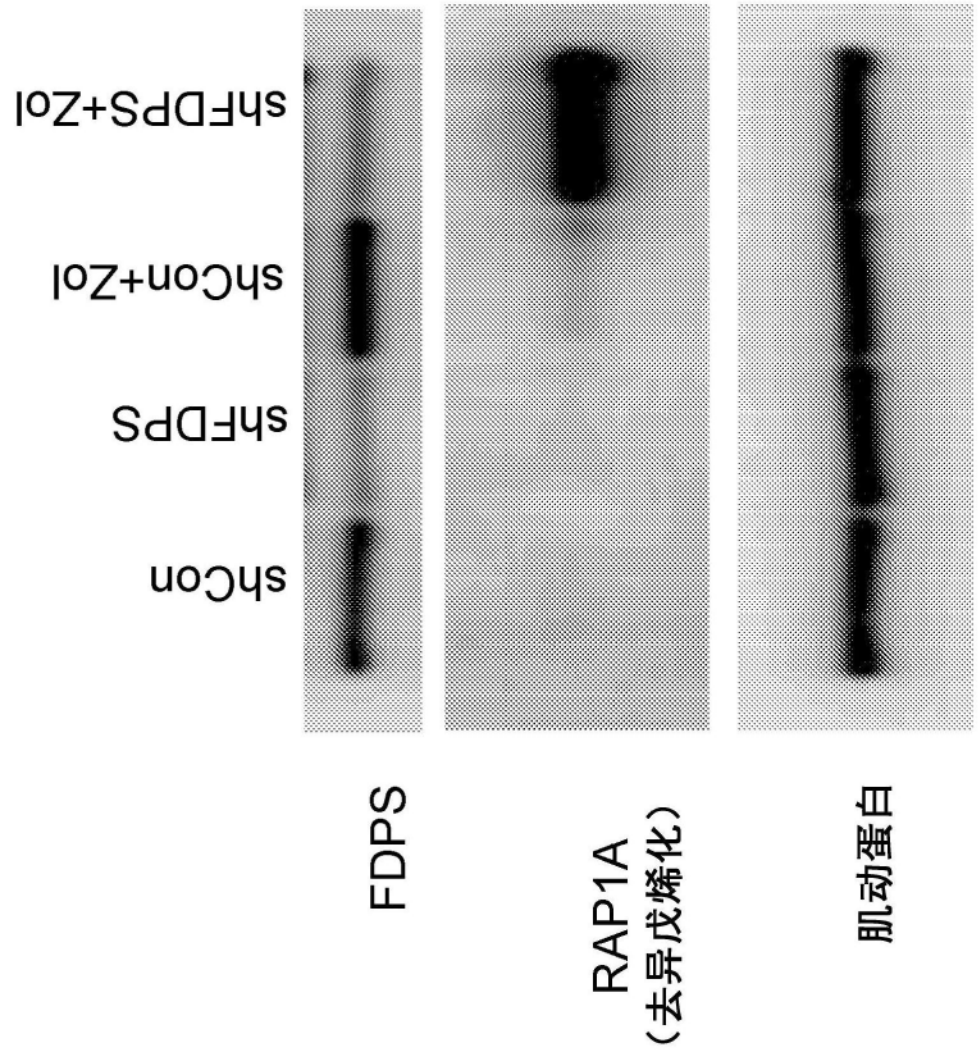


图15