



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109642243 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201780039032.4

(22)申请日 2017.04.20

(30)优先权数据

16305468.7 2016.04.21 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/059435 2017.04.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/182585 EN 2017.10.26

(71)申请人 里昂高等师范学院

地址 法国里昂

申请人 国家科学研究中心 里昂第一大学

国家医疗保健研究所

(72)发明人 卡洛琳·科斯塔·费霍兹

埃尔斯·维霍伊恩

弗朗索瓦-卢瓦克·科塞

鲁本·本德尔

克里斯蒂安·巴克霍尔兹 周琦

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 刘明海 宁涛

(51)Int.Cl.

C12N 15/86(2006.01)

权利要求书2页 说明书34页

序列表46页 附图13页

(54)发明名称

用于选择性地调节细胞的不同亚型的活性的方法

(57)摘要

本发明涉及假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其包含与细胞靶向结构域融合和与功能结构域融合的源自副粘病毒科病毒的工程化包膜糖蛋白两者。本发明还涉及所述假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体用于选择性地调节特定细胞亚群,特别是特定免疫细胞的活性的用途。这些假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体特别适用于基因疗法、免疫疗法和/或疫苗接种。

1. 一种假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其包含:
 - a) 至少一种细胞靶向融合蛋白,其包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或跨膜结构域,和 (ii) 至少一个细胞靶向结构域,
 - b) 至少一种调节融合蛋白,其包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或跨膜结构域,和 (ii) 至少一个功能结构域,和
 - c) 至少一种源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白,其中所述细胞靶向融合蛋白和/或所述调节融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白;
其中所述源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白缺少所述包膜糖蛋白G或H的胞质区的至少一部分。
2. 根据权利要求1所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其中所述副粘病毒科的病毒是麻疹病毒属或亨尼帕病毒属的病毒。
3. 根据权利要求1或2所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其中所述源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白至少部分不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其中所述源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白缺少所述包膜糖蛋白F的胞质区的至少一部分。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其中所述细胞靶向结构域选自由DARPin、ScFv、靶向肽及其组合组成的组。
6. 根据权利要求1至4中任一项所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其中所述功能结构域选自由细胞因子、生长因子、激素、神经递质、凋亡配体及其组合组成的组。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体用于选择性地调节靶细胞的活性和任选地选择性地转导所述靶细胞的用途。
8. 一种用于选择性地调节靶细胞的活性和/或选择性地转导靶细胞的方法,其中所述方法包括使根据权利要求1至6中任一项所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体与包含所述靶细胞的细胞接触。
9. 根据权利要求1至6中任一项所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体用作药物的用途。
10. 根据权利要求9所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其用于免疫疗法、基因疗法和/或疫苗接种中。
11. 根据权利要求9或10所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其用于预防和/或治疗免疫疾病、癌症、遗传疾病、过敏性疾病、炎性疾病、传染病、代谢疾病、神经疾病、肌肉疾病及其组合。
12. 一种核酸,其包含编码细胞靶向融合蛋白的序列和/或编码调节融合蛋白的序列,其中:
 - 所述细胞靶向融合蛋白包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或跨膜结构域,和 (ii) 至少一个细胞靶向结构域,和
 - 所述调节融合蛋白包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或跨膜结

构域,和(ii)至少一个功能结构域。

13.根据权利要求12所述的核酸,其中所述核酸包含选自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:13组成的组的序列,和/或包含编码选自由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:14组成的组的序列的序列。

14.一种载体,其包含权利要求12或13所述的核酸。

15.用于制备根据权利要求1至6中任一项所述的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的方法,其中所述方法包括用以下物质共转染包装细胞系:

(i)至少一种编码细胞靶向融合蛋白的核酸,所述细胞靶向融合蛋白包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或跨膜结构域,和(ii)至少一个细胞靶向结构域,

(ii)至少一种编码调节融合蛋白的核酸,所述调节融合蛋白包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或跨膜结构域,和(ii)至少一个功能结构域,

(iii)至少一种编码源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白的核酸,以及

(iv)至少一种载体,其包含编码源自所述逆转录病毒的核心蛋白的核酸,其中所述细胞靶向融合蛋白和/或所述调节融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白。

用于选择性地调节细胞的不同亚型的活性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于选择性地调节细胞的不同亚型的活性的方法。

背景技术

[0002] 许多类型的病理涉及免疫系统的细胞。因此，增强或减少其活性是许多治疗策略的焦点。功能非常不同的多种类型的免疫细胞可以通过某些细胞表面蛋白的表达来区分。迄今为止还没有技术能够仅选择性激活或失活单独的细胞亚型，尤其是在体内。

[0003] 使用细胞因子诱导或促进所需免疫应答的产生是针对癌症的免疫疗法中有吸引力的方法。细胞因子通常用作非特异性辅助物质以支持其他免疫疗法或者作为化学疗法的补充而施用。但到目前为止，由于全身毒性未解决，基于细胞因子的治疗很少被使用。此外，细胞因子通常全身应用，从而击中表达相关细胞因子受体的所有细胞类型。因此，在疾病相关部位的微调调整是不可能的。

[0004] 为了克服这个缺点，可以将细胞因子与抗肿瘤抗体融合或与抗肿瘤抗体一起连接到微米颗粒或纳米颗粒，从而将细胞因子靶向肿瘤并减少全身副作用。然而，这些融合蛋白或负载细胞因子-抗体的颗粒不太稳定并且在体内被快速清除，导致疾病部位的细胞因子浓度较低。此外，负载细胞因子-抗体的颗粒释放细胞因子取决于pH。此外，通过这些先前方法递送至肿瘤的细胞因子（例如IL-2）非选择性地刺激复杂肿瘤微环境中的各种类型的不同免疫细胞，包括免疫效应细胞和免疫抑制细胞，因此限制了它们在癌症治疗中的应用。

[0005] 对于基因疗法，重要的靶细胞如静息人T细胞、B细胞和HSC（造血干细胞）很难用慢病毒载体转导。常规VSV-LV介导的转导仅在T细胞已经被激活时发生。在迄今为止进行的基因疗法试验中，T细胞已经通过同源抗原受体激活，同源抗原受体通常诱导T细胞中的表型和功能变化并最终导致体内T细胞持久性和抗肿瘤效应降低。

[0006] 为了促进静息T细胞中的基因转移，生成了几种嵌合慢病毒载体。例如，Verhoeven等人（Blood, 2003, vol. 101, n°6）公开了用如下两种类型的包膜糖蛋白假型化的HIV衍生载体：N-末端与IL-7融合的嵌合MLV（小鼠白血病病毒）包膜糖蛋白和VSV-G（水泡性口炎病毒糖蛋白）。这些IL-7载体颗粒可以有效地转导静息T细胞并诱导T细胞活化，但同样转导CD4⁺和CD8⁺T细胞。因此，它们不能区分不同的T细胞子集。此外，需要非靶向包膜gp（例如VSV-G gp）这一事实可能会转导不需要的造血细胞或内皮细胞。麻疹病毒（MeV）糖蛋白假型慢病毒载体（MV-LV）是一个例外。MV-LV可以介导静息T淋巴细胞的转导，而不改变G0/G1a细胞周期状态。周等人（J Immunol, 2015, vol. 195, n°5）也公开了CD4靶向的LV可以转导新分离的静息T细胞，但在高颗粒剂量下效率非常低（小于10%）。

[0007] 最后，用于产生用于过继性T细胞疗法的低分化肿瘤特异性T细胞的当前策略依赖于优化T细胞刺激和培养方案。例如，为了产生更多T_{SCM}细胞（干记忆T细胞）或T_{CM}细胞（中枢记忆T细胞），使用IL-15和IL-7或IL-21和IL-7的组合进行T细胞刺激和扩增。该培养系统非常昂贵，因为需要常规细胞因子补充（每两天一次）。然后，为了获得所需的细胞类型通常要实施数次细胞分选步骤。

[0008] 因此,仍然需要提供选择性地和有效地调节免疫细胞的不同亚型的活性的方法。

发明内容

[0009] 本发明人出人意料地发现,通过使用假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体(例如慢病毒样颗粒(VLP)或慢病毒载体(LV))可以选择性地调节免疫细胞的不同亚型的活性,所述假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体携带细胞特异性靶向结构域(例如特异于CD4+T细胞或CD8+T细胞)和功能结构域(例如细胞因子),所述细胞特异性靶向结构域和功能结构域各自与副粘病毒(Paramyxoviridae)科病毒的糖蛋白融合。所述逆转录病毒载体还特异性地且有效地将包装的基因递送到靶细胞中。

[0010] 事实上,出乎意料地发现,与仅包含细胞特异性靶向结构域的相应颗粒或载体相比,将功能结构域与假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体上的细胞特异性靶向结构域结合极大地改善了免疫细胞的靶亚型的选择性活性调节。

[0011] 例如,发明人已经表明,呈现刺激性细胞因子的T细胞靶向颗粒在细胞类型混合培养物中和在体内人血液系统小鼠模型中选择性地激活靶T细胞亚群,并且还将包装的基因递送到靶T细胞亚型中,而无需任何刺激性培养条件。基于MeV(麻疹病毒)糖蛋白(4^H/IL7^H-VLP)的呈现IL-7(白细胞介素-7)的CD4靶向的颗粒确实特异性地激活并促进培养的原代CD4+细胞的存活,而基于NiV(尼帕(Nipah)病毒)糖蛋白(8^G/IL7^G-VLP)的呈现IL7的CD8靶向的颗粒选择性地激活并促进CD8+T细胞的存活。此外,4^H/IL7^H-LV以剂量依赖性方式有效地且特异性地将GFP转基因递送至细胞混合物中的CD4+T细胞中。与亲本CD4靶向的LV(不共同呈现IL-7)相比,在将治疗性ErbB2CAR转基因选择性地递送到静息CD4+T细胞方面,4^H/IL7^H-LV更有效。用共同呈现CD8/IL-7的NiV糖蛋白假型化慢病毒载体(8^G/IL7^G-LV)也观察到了类似的独特的基因转移和CD8+T细胞的刺激。实际上,在选择性CD8+T细胞活化和靶基因递送方面,8G/IL7G-LV比8^G-LV更有效(参见实施例)。

[0012] 根据本发明的逆转录病毒样颗粒和逆转录病毒载体具有许多优点,例如:

[0013] -在细胞靶位点提供高局部浓度的细胞因子,从而提高效率并预防细胞因子疗法的严重副作用,

[0014] -与可溶性细胞因子相比,提供更稳定且恒定的靶细胞刺激,从而提高细胞因子疗法的效率,

[0015] -提供一个非常灵活的体系,允许在单个颗粒或逆转录病毒载体上结合不同类型的细胞因子和不同类型的靶向结构域,

[0016] -允许在体外或体内将细胞刺激与细胞特异性基因转移偶联,从而更有效地转导特异性静息T细胞亚群,

[0017] -允许在体外或体内将T细胞表型诱导与基因转移偶联,由于与颗粒或载体表面上所呈现的细胞因子相互作用,转导细胞的分化受到控制,以及更一般地:

[0018] -允许在体外或体内向特定细胞或细胞亚群递送生物材料和/或治疗药物,包括但不限于基因、mRNA、shRNA、microRNA、肽、蛋白、蛋白片段及其组合,

[0019] -为过继疗法提供了更简单的细胞制备过程(例如T细胞或造血细胞制备过程)

[0020] -由于人类中预存在的抗体量低,因此当使用由来自尼帕病毒的糖蛋白假型化的逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体时,防止了体内抗性问题的。

[0021] 本发明因此涉及一种假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其包含:

[0022] a) 至少一种细胞靶向融合蛋白,其包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,所述蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白G或H的胞质区的至少一部分并且优选至少部分不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合,或跨膜结构域,和(ii) 至少一个细胞靶向结构域,

[0023] b) 至少一种调节融合蛋白,其包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,所述蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白G或H的胞质区的至少一部分并且优选至少部分不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合,或跨膜结构域,和(ii) 至少一个功能结构域,以及

[0024] c) 至少一种源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白,并且所述糖蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白F的胞质区的至少一部分,

[0025] 其中所述细胞靶向融合蛋白和/或所述调节融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白。

[0026] 所述副粘病毒科病毒可以是麻疹病毒属(Morbillivirus)的病毒,例如选自由以下组成的组:麻疹病毒(MeV)、犬瘟热病毒、鲸类麻疹病毒、小反刍兽疫病毒(Peste-des-petits-ruminants virus)、海豹瘟热病毒和牛瘟病毒,或亨尼帕病毒属(Henipavirus)的病毒,例如选自由以下组成的组:尼帕病毒(NiV)、雪松病毒(Cedar virus)和亨德拉(Hendra)病毒。

[0027] 与所述包膜糖蛋白G或H的序列相比,a)和/或b)的蛋白优选包含至少两个突变,所述至少两个突变导致至少部分不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合。

[0028] 所述细胞靶向结构域可以选自由DARPin、scFv、靶向肽及其组合组成的组和/或所述功能结构域可以选自由细胞因子、生长因子、激素、神经递质、凋亡配体及其组合组成的组。

[0029] 靶细胞可选自由以下组成的组:造血系统的细胞(包括T细胞、B细胞、单核细胞、Th1细胞、Th2细胞、Treg细胞、肥大细胞、树突状细胞(DC)、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、造血干细胞、T和/或B祖细胞、成红细胞、血小板和/或中性粒细胞)、基质细胞、内皮细胞、肝细胞、肌肉细胞、神经系统的细胞、患病细胞及其组合。

[0030] 本发明还涉及如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体用于选择性地调节靶细胞活性和/或选择性地转导靶细胞的用途,所述靶细胞例如如上所定义。

[0031] 本发明还涉及一种用于选择性地调节靶细胞活性和/或选择性地转导靶细胞的方法,其中所述方法包括使如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体与包含所述靶细胞的细胞接触,所述靶细胞例如如上所定义。

[0032] 本发明还涉及如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体用作药物,优选用于免疫疗法基因疗法和/或疫苗接种,例如用于预防和/或治疗免疫疾病(例如自身免疫疾病)、癌症、遗传病、过敏性疾病、炎性疾病、传染病、代谢疾病、神经疾病(例如,神经营养不良、帕金森病、亨廷顿病、阿尔茨海默病)、肌肉疾病及其组合。

[0033] 本发明还涉及一种核酸,其包含编码细胞靶向融合蛋白的序列和/或编码调节融合蛋白的序列,其中:

[0034] -所述细胞靶向融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或

跨膜结构域,和(ii)至少一个细胞靶向结构域,并且

[0035] -所述调节融合蛋白包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或跨膜结构域,和(ii)至少一个功能结构域。

[0036] 本发明还涉及一种载体,其包含如上定义的核酸。

[0037] 本发明还涉及一种用于制备如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的方法,其中所述方法包括用以下物质共转染包装细胞系:

[0038] (i)至少一种编码细胞靶向融合蛋白的核酸,所述细胞靶向融合蛋白包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或跨膜结构域,和(ii)至少一个细胞靶向结构域,

[0039] (ii)至少一种编码调节融合蛋白的核酸,所述调节融合蛋白包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或跨膜结构域,和(ii)至少一个功能结构域,

[0040] (iii)至少一种核酸,其编码源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白,

[0041] (iv)至少一种载体,其包含编码源自所述逆转录病毒的核心蛋白的核酸,和

[0042] (v)任选地,至少一种载体,其包含具有包装能力的逆转录病毒衍生的基因组,其中所述细胞靶向融合蛋白和/或所述调节融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白。

[0043] 假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体

[0044] 如本文所用的“逆转录病毒样颗粒”是指包含逆转录病毒蛋白Gag、Pol和Env(包膜),但不包含任何逆转录病毒衍生的遗传信息的颗粒。

[0045] Gag、Pol和Env蛋白源自逆转录病毒,并且通过包装细胞系的手段反式提供。

[0046] 如本文所用,“逆转录病毒载体”包含Gag、Pol和Env(包膜)蛋白和RNA分子。所述RNA分子不含任何gag、env或pol基因,但包含将RNA分子有效包装成所得颗粒所需的psi元件和LTR。所述RNA分子可以进一步包含目的基因,该目的基因受合适的启动子控制,并因此在将所述基因整合到宿主细胞或靶细胞的基因组中后表达。

[0047] 逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体分别是病毒样颗粒或病毒载体,其核心蛋白(即由Gag和Pol基因编码的蛋白)源自逆转录病毒。

[0048] 术语“逆转录病毒”在本文中是指其基因组由RNA分子组成并且包含逆转录酶的病毒。

[0049] 逆转录病毒是逆转录病毒科的成员。逆转录病毒可以是肿瘤病毒、慢病毒或泡沫病毒。

[0050] 肿瘤病毒可以是 α 逆转录病毒、 β 逆转录病毒、 δ 逆转录病毒、 ϵ 逆转录病毒或 γ 逆转录病毒。

[0051] 当逆转录病毒是肿瘤病毒时,所述逆转录病毒可以是MLV(鼠白血病病毒)、ASV(禽肉瘤病毒)、猫白血病病毒、牛白血病病毒、RSV(Rous肉瘤病毒)、MPMV(Mason-Pfizer猴病毒)、HTLV I(人T细胞白血病病毒-I)或HTLV II(人T细胞白血病病毒-II)。

[0052] 当逆转录病毒是慢病毒时,所述逆转录病毒可以是HIV(人类免疫缺陷病毒)优选HIV-1或HIV-2、SIV(猿猴免疫缺陷病毒)、EIAV(马传染性贫血病毒)、FIV(猫免疫缺陷病毒)或CAEV(山羊关节炎脑炎病毒)。

[0053] 当逆转录病毒是泡沫病毒时,所述逆转录病毒可以是HFV(人类泡沫病毒)。

[0054] 例如,逆转录病毒载体可以是慢病毒载体、 α 逆转录病毒载体、鼠逆转录病毒载体或FIV载体。

[0055] 这种逆转录病毒的基因组在基因数据库中是容易获得的。

[0056] 在一个优选的实施方案中,所述逆转录病毒是慢病毒,更优选HIV,例如HIV-1或HIV-2。

[0057] 因此,本发明优选涉及慢病毒样颗粒(LVP)或慢病毒载体(LV),优选HIV衍生的LVP或LV。

[0058] 本文表述“假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体”中的术语“假型”是指逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体携带包膜糖蛋白,所述包膜糖蛋白源自至少另一种病毒而非所述逆转录病毒,和/或所述包膜糖蛋白是工程化的包膜糖蛋白,例如嵌合的和/或突变的包膜糖蛋白。

[0059] 根据本发明的逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体例如用源自副粘病毒科病毒(优选源自如下所述的麻疹病毒属或亨尼帕病毒属糖蛋白的病毒)的工程化糖蛋白假型化。

[0060] 副粘病毒科的包膜糖蛋白

[0061] 用于假型化本发明的逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的修饰型包膜糖蛋白源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白。

[0062] 副粘病毒科病毒优选是麻疹病毒属或亨尼帕病毒属的病毒。

[0063] 麻疹病毒属和亨尼帕病毒属的病毒使用两种类型的糖蛋白进入靶细胞中:附着蛋白(在亨尼帕病毒属的病毒中称为糖蛋白G或在麻疹病毒属的病毒中称为糖蛋白H)和糖蛋白F(也称为融合蛋白或蛋白F)。蛋白F介导病毒膜与宿主细胞细胞膜的融合。糖蛋白G/H识别靶膜上的受体并支持F蛋白的膜融合功能。糖蛋白G/H和糖蛋白F均以修饰形式用于假型化本发明的逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体。

[0064] 麻疹病毒属的病毒例如选自自由麻疹病毒、犬瘟热病毒、鲸类麻疹病毒、小反刍兽疫病毒、海豹瘟热病毒和牛瘟病毒组成的组。

[0065] 优选的麻疹病毒属病毒是麻疹病毒(MeV)。

[0066] 亨尼帕病毒属的病毒例如选自自由尼帕病毒、雪松病毒和亨德拉病毒组成的组。

[0067] 优选的亨尼帕病毒属病毒是尼帕病毒(NiV)。

[0068] 在一个优选的实施方案中,修饰型包膜糖蛋白源自麻疹病毒的包膜糖蛋白H和糖蛋白F或源自尼帕病毒的包膜糖蛋白G和糖蛋白F。

[0069] 尼帕病毒包膜糖蛋白G的序列的一个实例是序列SEQ ID NO:9。

[0070] 尼帕病毒包膜糖蛋白F的序列的一个实例是序列SEQ ID NO:11。

[0071] 麻疹病毒包膜糖蛋白H(称为糖蛋白H)的序列的一个实例是序列SEQ ID NO:10。

[0072] 麻疹病毒包膜糖蛋白F的序列的一个实例是序列SEQ ID NO:12。

[0073] 源自包膜糖蛋白G/H的蛋白

[0074] 根据本发明的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体包含至少一种细胞靶向融合蛋白和至少一种调节融合蛋白。细胞靶向融合蛋白和/或调节融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的第一蛋白。

[0075] 包膜糖蛋白G或H如上文“副粘病毒科的包膜糖蛋白”部分中所定义。

[0076] 副粘病毒科的病毒如上文“假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体”部分中所

定义。

[0077] 表述“源自包膜糖蛋白G或H的蛋白”在本文中是指与包膜糖蛋白G或H的序列相比，该蛋白包含至少一种修饰。

[0078] 优选的包膜糖蛋白G是尼帕病毒包膜糖蛋白G，也称为NiV包膜糖蛋白G、NiV G糖蛋白或NiV-G。

[0079] 优选的包膜糖蛋白H是麻疹病毒包膜糖蛋白H，也称为MeV糖蛋白H、MeV血凝素或MV-H。

[0080] 包膜糖蛋白G或H是野生型或疫苗株病毒包膜糖蛋白或其变体，条件是所述变体保留了所述野生型或疫苗株糖蛋白识别靶膜上的受体并支持F蛋白的膜融合功能的能力。

[0081] NiV包膜糖蛋白G的标准序列是序列SEQ ID NO:9。

[0082] NiV包膜糖蛋白G可以是与SEQ ID NO:9至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列。例如，NiV包膜糖蛋白可以是序列SEQ ID NO:9。

[0083] MeV血凝素的标准序列是序列SEQ ID NO:10。

[0084] MeV血凝素可以是与SEQ ID NO:10至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列。例如，MeV血凝素可以是序列SEQ ID NO:10。

[0085] 在一个优选的实施方案中，源自包膜糖蛋白G的蛋白缺少所述包膜糖蛋白G的胞质区的至少一部分。

[0086] 缺少所述包膜糖蛋白G的胞质区的至少一部分的蛋白也被称为其胞质区被截短的蛋白。

[0087] 表述“缺少胞质区的x个氨基酸的蛋白”、“在其胞质区截短了x个氨基酸的蛋白”和“蛋白 Δ cx”在本文中是同义的并且可以互换使用。

[0088] 使用其胞质区有所截短的包膜糖蛋白G大大改善了其向逆转录病毒样粒子和逆转录病毒载体的掺入，从而允许产生具有更高滴度和产量的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体。

[0089] 包膜糖蛋白G的胞质区位于N末端。

[0090] 因此，当通过对照未截短的糖蛋白G来确定糖蛋白 Δ cx的截短部分的位置时，在包膜糖蛋白G的N-末端的第二个氨基酸残基处开始计数，即省略第一个甲硫氨酸残基。

[0091] 例如，序列SEQ ID NO:Z的糖蛋白G的胞质区中缺少X个氨基酸的蛋白与所述糖蛋白G的不同之处在于它缺少序列SEQ ID NO:Z的2至1+X位氨基酸。

[0092] 本领域技术人员可以容易地确定包膜糖蛋白G序列中胞质区的定位。

[0093] MeV H糖蛋白的胞质区例如由序列SEQ ID NO:10的1至34位氨基酸组成。

[0094] NiV G糖蛋白的胞质区例如由序列SEQ ID NO:9的1至45位氨基酸组成。

[0095] 例如，源自包膜糖蛋白G或H的蛋白可能在胞质区中缺少至少10个氨基酸、至少15个氨基酸、至少18个氨基酸、至少20个氨基酸。

[0096] 例如，源自麻疹病毒包膜的糖蛋白H的蛋白可能在胞质区缺少至少10个氨基酸、至少15个氨基酸、至少18个氨基酸、至少20个氨基酸、至少24个氨基酸。在一个优选的实施方案中，源自麻疹病毒包膜糖蛋白H的蛋白缺少15、18、20或24个氨基酸。

[0097] 例如，源自尼帕病毒包膜糖蛋白G的蛋白可能在胞质区缺少至少10个氨基酸、至少15个氨基酸、至少18个氨基酸、至少20个氨基酸、至少25个氨基酸或至少30个氨基酸。在一

个优选的实施方案中,源自尼帕病毒包膜糖蛋白G的蛋白缺少34个氨基酸。

[0098] 在一个优选的实施方案中,源自包膜糖蛋白G或H的蛋白至少部分不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合。

[0099] 至少部分不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合的能力可以通过在所述包膜糖蛋白G或H的序列中引入至少一种突变而获得。

[0100] 例如,与所述包膜糖蛋白的序列相比,源自包膜糖蛋白G或H的蛋白可包含至少一个点突变,优选至少两个点突变。

[0101] 点突变可以是氨基酸缺失、添加或取代。

[0102] 在一个优选的实施方案中,点突变是取代。

[0103] 在一个优选的实施方案中,源自包膜糖蛋白G或H的蛋白不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合,即完全不能结合。

[0104] 源自包膜糖蛋白G或H的蛋白不与其天然受体结合的能力大大提高了细胞靶向效率。

[0105] 评估与包膜糖蛋白G的至少一种天然受体结合的能力可以通过技术人员熟知的任意方法评估。

[0106] 天然NiV受体是Ephrin-B2和Ephrin-B3NiV受体。

[0107] 因此,源自NiV包膜糖蛋白G的蛋白优选至少部分不能与Ephrin-B2受体和/或Ephrin-B3NiV受体结合,优选不能与Ephrin-B2受体和Ephrin-B3NiV受体结合。

[0108] 例如,与序列SEQ ID NO:9相比,包膜糖蛋白NiV-G可包含至少两个或至少三个点突变,其中所述点突变选自由E501A、W504A、Q530A和E533A组成的组。

[0109] 在一个优选的实施方案中,糖蛋白NiV-G包含或由以下点突变组成:E501A、W504A、Q530A和E533A,因此导致了不能与Ephrin-B2受体和Ephrin-B3NiV受体结合的能力。

[0110] 天然MeV受体是SLAM、nectin-4和CD46。

[0111] 因此,源自MeV包膜糖蛋白H的蛋白优选至少部分不能与SLAM、nectin-4和/或CD46结合,优选至少不能与SLAM和CD46结合。

[0112] 例如,与序列SEQ ID NO:10相比,包膜糖蛋白MV-H可包含至少两个或至少三个点突变,其中所述点突变选自由Y481A、R533A、S548L和F549S组成的组。

[0113] 在一个优选的实施方案中,包膜糖蛋白MV-H包含或由以下点突变组成:Y481A、R533A、S548L和F549S,因此导致了不能与SLAM和CD46结合的能力。

[0114] 因此,源自包膜糖蛋白G或H的蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白G或H的胞质区的至少一部分和/或至少部分不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合。

[0115] 在一个更优选的实施方案中,源自包膜糖蛋白G或H的蛋白缺少所述包膜糖蛋白G或H的胞质区的至少一部分并且至少部分不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合。

[0116] “与标准序列至少x%相同的序列”在本文中意指该序列与标准序列相同或通过每100个标准序列的氨基酸有至多100-x个氨基酸改变而与标准序列不同。

[0117] 可以用例如用于多肽序列比较的以下参数:比较矩阵:BL0SUM62,缺口开放罚分:10,缺口延伸罚分:0.5,末端缺口罚分:错误,末端缺口开放罚分=10,末端缺口延伸罚分=0.5;和用于多核苷酸序列比较的以下参数:比较矩阵:DNAFULL;缺口开放罚分=10,缺口延

伸罚分=0.5,末端缺口罚分:错误,末端缺口开放罚分=10,末端缺口延伸罚分=0.5,手动或使用例如基于Needleman和Wunsch算法(描述于Needleman and Wunsch(1970) J.Mol Biol.48:443-453中)的Needle程序自动进行比对和确定同一性百分比。

[0118] 如本文所定义,与标准序列相比,与标准序列“至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同”的氨基酸序列可包含突变,例如缺失、插入和/或取代。

[0119] 在取代的情况下,取代优选对应于下表1所示的保守取代如。在一个优选的实施方案中,与标准序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列仅通过保守取代与标准序列不同。

[0120] 表1

[0121]

保守取代	氨基酸的类型
Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Phe、Trp	具有脂肪族疏水侧链的氨基酸
Ser、Tyr、Asn、Gln、Cys	具有不带电但有极性的侧链的氨基酸
Asp、Glu	具有酸性侧链的氨基酸
Lys、Arg、His	具有碱性侧链的氨基酸
Gly	中性侧链

[0122] 在另一个优选的实施方案中,与标准序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列相当于标准序列的天然存在的等位基因变体。

[0123] 源自包膜糖蛋白F的糖蛋白

[0124] 根据本发明的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体还包含至少一种源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白,其中所述糖蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白F的胞质区的至少一部分。

[0125] 包膜糖蛋白F如上文“副粘病毒科的包膜糖蛋白”部分中所定义。

[0126] 副粘病毒科的病毒如上文“假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体”部分中所定义。

[0127] 表述“源自包膜糖蛋白F的蛋白”在本文意指,与包膜糖蛋白F的序列相比,该蛋白包含至少一种修饰。

[0128] 一种优选的包膜糖蛋白F是尼帕病毒包膜糖蛋白F,也称为NiV包膜糖蛋白F、NiV F糖蛋白或NiV-F。

[0129] 另一种优选的包膜糖蛋白F是麻疹病毒包膜糖蛋白F,也称为MeV糖蛋白F或MeV-F。

[0130] 包膜糖蛋白F是野生型病毒或疫苗株包膜糖蛋白或其变体,条件是所述变体保留了野生型或疫苗株糖蛋白F介导病毒膜与靶细胞或宿主细胞的细胞膜融合的能力。

[0131] NiV包膜糖蛋白F的标准序列是序列SEQ ID NO:11。NiV包膜糖蛋白F可以是与SEQ ID NO:11至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列。例如,NiV包膜糖蛋白F可以是序列SEQ ID NO:11。

[0132] MeV包膜糖蛋白F的标准序列是序列SEQ ID NO:12。

[0133] MeV包膜糖蛋白F可以是与SEQ ID NO:12至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列。例如,MeV包膜糖蛋白F可以是序列SEQ ID NO:12。

[0134] 在一个优选的实施方案中,源自包膜糖蛋白F的蛋白缺少所述包膜糖蛋白F的胞质区的至少一部分。

[0135] 缺少所述包膜糖蛋白F的胞质区的至少一部分的蛋白也被称为其胞质区被截短的蛋白。

[0136] 表述“缺少胞质区的x个氨基酸的蛋白”、“在其胞质区截短了x个氨基酸的蛋白”和“蛋白 Δ_{cx} ”在本文中是同义的并且可以互换使用。

[0137] 使用其胞质区截短了的包膜糖蛋白F大大改善了其向逆转录病毒样粒子和逆转录病毒载体的掺入,从而允许产生具有更高滴度和产量的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体。

[0138] 包膜糖蛋白F的胞质区位于C末端。

[0139] 因此,当通过对照未截短的糖蛋白G来确定糖蛋白 Δ_{cx} 的截短部分的位置时,从糖蛋白F的C-末端开始计数。

[0140] 例如,与由n个氨基酸组成的序列SEQ ID NO:Z的糖蛋白F相比,在其胞质区缺少X个氨基酸的糖蛋白与所述糖蛋白F的不同之处在于它缺少序列SEQ ID NO:Z的n-x+1至n位氨基酸。

[0141] 本领域技术人员可以容易地确定包膜糖蛋白F序列中胞质区的定位。

[0142] MeV糖蛋白F的胞质区例如由序列SEQ ID NO:12的518至550位氨基酸(33个氨基酸)组成。

[0143] NiV糖蛋白F的胞质区例如由序列SEQ ID NO:11的519至546位氨基酸(28个氨基酸)组成。

[0144] 例如,源自包膜糖蛋白F的蛋白可能在胞质区中缺少至少10个氨基酸、至少15个氨基酸、至少20个氨基酸、至少25个或至少30个氨基酸。

[0145] 例如,与所述麻疹病毒包膜糖蛋白F相比,源自麻疹病毒包膜糖蛋白F的蛋白在胞质区中可能缺少30个氨基酸。例如,源自麻疹病毒包膜糖蛋白F并且在胞质区中缺少30个氨基酸的所述蛋白包含或由序列SEQ ID NO:15组成。

[0146] 例如,与所述尼帕病毒包膜糖蛋白F相比,源自尼帕病毒包膜糖蛋白F的蛋白在胞质区中可能缺少22个氨基酸。例如,源自尼帕病毒包膜糖蛋白F并且在胞质区中缺少22个氨基酸的所述蛋白包含或由序列SEQ ID NO:16组成。

[0147] 靶细胞

[0148] 靶细胞是其活性待调节的目的细胞和/或待用至少一种目的基因转导的目的细胞。

[0149] 靶细胞在其表面表达特异性细胞表面受体,从而允许特异性靶向这些细胞而不靶向不表达所述细胞表面受体的细胞。

[0150] 表述“靶细胞”和“靶细胞亚群”在本文中是同义的并且可以互换使用。

[0151] 靶细胞可选自由造血细胞、基质细胞、内皮细胞、肝细胞、肌细胞(例如心脏细胞)、神经系统的细胞和/或患病细胞组成的组。

- [0152] 神经系统的细胞例如是神经元和/或神经胶质细胞。
- [0153] “造血细胞”在本文中是指造血系统的细胞。
- [0154] 优选的靶细胞是造血细胞。
- [0155] 造血细胞可以选自由T细胞、B细胞、单核细胞、Th1细胞、Th2细胞、Treg细胞、肥大细胞、树突状细胞(DC)、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、造血干细胞、T和/或B祖细胞、成红细胞、血小板、嗜中性粒细胞及其组合组成的组。
- [0156] 更优选的靶造血细胞是T细胞,更优选CD8+T细胞或CD4+T细胞。
- [0157] 患病细胞可以是肿瘤细胞、肿瘤干细胞、缺乏特定功能基因、过表达特定基因和/或表达特定基因的截短或突变形式的细胞、感染细胞和/或功能受损细胞。
- [0158] 细胞特异性靶向结构域
- [0159] 细胞特异性靶向结构域(也称为“细胞靶向结构域”)允许本发明的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体与由靶细胞选择性表达的表面受体特异性结合。
- [0160] 靶细胞可以如上面在同名部分中所定义。
- [0161] 靶向融合蛋白的细胞靶向结构域优选选自由DARPin、scFv、靶向肽及其组合组成的组。
- [0162] 术语“DARPin”是指设计的锚蛋白重复蛋白。
- [0163] 术语scFv是指抗体的单链可变片段。
- [0164] 例如,细胞靶向结构域对CD3、CD8、CD4、癌细胞标记物、CD11b、CD19、CD62L、CD56、Glut-1(葡萄糖转运体)、CD19、CD22、CD20、CCR5或CXCR4具有特异性。
- [0165] 优选的细胞靶向结构域是对CD4特异的DARPin或对CD8特异的scFv。
- [0166] 功能结构域
- [0167] 功能结构域允许调节靶细胞的活性。
- [0168] “调节靶细胞的活性”在本文中意指激活或抑制、诱导所述靶细胞的表型改变(例如成熟和/或分化)、诱导增殖和/或诱导凋亡。调节靶细胞的活性例如包括增强或抑制免疫、促进细胞类型特异性免疫应答。
- [0169] 调节融合蛋白的功能结构域优选是受体配体。
- [0170] “受体配体”在本文中是指优选通常由细胞释放,并且改变在其细胞表面表达同源受体的细胞的生理状态的分子,优选蛋白。受体配体例如选自由以下组成的组:细胞因子、生长因子、激素、神经介质、凋亡配体、趋化因子、葡萄糖转运蛋白及其组合。
- [0171] 例如,细胞因子可选自由白细胞介素(IL) TNF(肿瘤坏死因子)或干扰素组成的组。
- [0172] 白细胞介素可以是例如IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL15、IL21、IL-17或IL-12。
- [0173] 例如,凋亡配体可以是FAS配体、CD40配体或TNF α 。
- [0174] 例如,趋化因子可以是CXCL4、CCL5或CXCL10。
- [0175] 例如,生长因子可以是GM-SCF(粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)或Flt-3配体。
- [0176] 例如,激素可以是胰岛素、生长激素或激素肽,例如加压素。例如,神经介质可以是神经肽,例如选自胰岛素、胰高血糖素、降钙素、神经降压素或缓激肽。
- [0177] 优选的功能结构域是细胞因子,优选白细胞介素,更优选IL-7。
- [0178] 细胞靶向融合蛋白和调节融合蛋白

[0179] 根据本发明的逆转录病毒样颗粒和逆转录病毒载体包含两种类型的融合蛋白：一种细胞靶向融合蛋白和一种调节融合蛋白。

[0180] 细胞靶向融合蛋白包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白，或跨膜结构域，和 (ii) 至少一个细胞靶向结构域。

[0181] 调节融合蛋白包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白，或跨膜结构域，和 (ii) 至少一个功能结构域。

[0182] 跨膜结构域可以是任意天然存在的或非天然存在的跨膜结构域。

[0183] 跨膜结构域可以是受体的跨膜结构域、跨膜蛋白（优选病毒跨膜蛋白）、跨膜蛋白的片段、跨膜肽或其变体，例如基因修饰的受体跨膜结构域、基因修饰的跨膜蛋白、基因修饰的跨膜蛋白片段或基因修饰的跨膜肽。

[0184] 跨膜结构域的实例是血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 的跨膜结构域 (TMD)、CD34 的跨膜结构域或VSVG糖蛋白跨膜结构域。

[0185] 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白的C末端优选直接或间接（例如通过接头）与细胞靶向结构域或功能结构域的N末端融合。

[0186] 跨膜结构域的C末端优选直接或间接（例如通过接头）与细胞靶向结构域或功能结构域的N末端融合。

[0187] 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白、源自包膜糖蛋白F的糖蛋白、细胞靶向结构域和功能结构域如上所定义。

[0188] 当两者都存在于假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体中时，细胞靶向融合蛋白和调节融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白可以源自相同的副粘病毒科病毒或源自不同的副粘病毒科病毒。

[0189] 当细胞靶向融合蛋白和调节融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白源自不同的副粘病毒科病毒时，它们优选源自相同属的病毒，更优选源自相同物种的病毒。

[0190] 细胞靶向融合蛋白和调节融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白优选是相同的。在一个优选的实施方案中，因此，细胞靶向融合蛋白与调节融合蛋白的不同之处在于其靶向结构域而非功能结构域，并且可能在于（当存在时）至少一个接头和/或至少一个标签。

[0191] 融合蛋白的两种蛋白可以用接头连接在一起。可以使用本领域技术人员公知的任意合适的接头。

[0192] 例如，接头可以是 $(G_4S)_3$ 、 G_4S 、因子Xa切割位点或螺旋接头（例如HL3、HL7、.....）。

[0193] 融合蛋白可以加标签，例如以有助于它们的纯化和/或检测。

[0194] 当存在时，标签优选位于融合蛋白的C末端，即与细胞靶向结构域和/或功能结构域的N末端融合。可以使用本领域技术人员公知的任意合适的标签。

[0195] 例如，标签可以是His-标签、RGS-His标签例如RGSH6、HA标签或c-myc标签。

[0196] 特异性假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体

[0197] 本发明特别涉及一种假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体，其包含：

[0198] a) 至少一种细胞靶向融合蛋白，其包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或

H的蛋白,或跨膜结构域,和(ii)至少一个细胞靶向结构域,

[0199] b)至少一种调节融合蛋白,其包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,或跨膜结构域,和(ii)至少一个功能结构域,和

[0200] c)至少一种源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白,

[0201] 其中所述细胞靶向融合蛋白和/或所述调节融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白。

[0202] 因此,所述假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体包含至少一种融合蛋白,所述融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,所述融合蛋白是细胞靶向融合蛋白或调节融合蛋白。在一个实施方案中,假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体包含两种融合蛋白,其各自包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,其中一个融合蛋白是细胞靶向融合蛋白,第二个融合蛋白是调节融合蛋白。

[0203] 在一个实施方案中,所述假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体包含:

[0204] a)至少一种细胞靶向融合蛋白,其包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白和(ii)至少一个细胞靶向结构域,

[0205] b)至少一种调节融合蛋白,其包含(i)跨膜结构域和(ii)至少一个功能结构域,和

[0206] c)至少一种源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白。在一个实施方案中,所述假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体包含:

[0207] a)至少一种细胞靶向融合蛋白,其包含(i)跨膜结构域和(ii)至少一个细胞靶向结构域,

[0208] b)至少一种调节融合蛋白,其包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白和(ii)至少一个功能结构域,和

[0209] c)至少一种源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白。在一个实施方案中,所述假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体包含:

[0210] a)至少一种细胞靶向融合蛋白,其包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白和(ii)至少一个细胞靶向结构域,

[0211] b)至少一种调节融合蛋白,其包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白和(ii)至少一个功能结构域,和

[0212] c)至少一种源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白。

[0213] 细胞靶向融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白、调节融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白和源自包膜糖蛋白F的糖蛋白可以源自相同的副粘病毒科病毒或源自不同的副粘病毒科病毒。

[0214] 当细胞靶向融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白、调节融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白和/或源自包膜糖蛋白F的糖蛋白源自不同的副粘病毒科病毒时,它们优选源自相同属的病毒,更优选源自相同物种的病毒。

[0215] 在一个实施方案中,细胞靶向融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白、调节融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白和源自包膜糖蛋白F的糖蛋白源自相同的副粘病毒科病毒。

[0216] 在另一个实施方案中,细胞靶向融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白和源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白源自相同的副粘病毒科病毒,而调

节融合蛋白包含 (i) 跨膜结构域, 例如血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 的跨膜结构域 (TMD), 和 (ii) 至少一个功能结构域。

[0217] 在另一个实施方案中, 调节融合蛋白中源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白和源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白源自相同的副粘病毒科病毒, 而细胞靶向融合蛋白包含 (i) 跨膜结构域, 例如血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 的跨膜结构域 (TMD), 和 (ii) 至少一个细胞靶向结构域。

[0218] 假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的不同组分, 特别是细胞靶向融合蛋白、调节融合蛋白、源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白和跨膜结构域如上所定义。

[0219] 优选的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体包含:

[0220] a) 至少一种细胞靶向融合蛋白, 其包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白, 所述蛋白缺少所述包膜糖蛋白G的胞质区的至少一部分并且至少部分不能与所述包膜糖蛋白G的至少一种天然受体结合, 或跨膜结构域, 和 (ii) 至少一个细胞靶向结构域,

[0221] b) 至少一种调节融合蛋白, 其包含 (i) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白, 所述蛋白缺少所述包膜糖蛋白G的胞质区的至少一部分并且至少部分不能与所述包膜糖蛋白G的至少一种天然受体结合, 或跨膜结构域, 和 (ii) 至少一个功能结构域, 以及

[0222] c) 至少一种源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白, 并且所述糖蛋白缺少所述包膜糖蛋白F的胞质区的至少一部分,

[0223] 其中所述细胞靶向融合蛋白和/或所述调节融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白。

[0224] 假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的实例在下表2中给出。

[0225] 表2

[0226]

名称	细胞靶向融合蛋白		调节融合蛋白		源自包膜糖蛋白 F 的糖蛋白
	源自包膜糖蛋白 G 或 H 的蛋白	细胞靶向结构域	源自包膜糖蛋白 G 或 H 的蛋白	功能结构域	
MeV 4 ^H /IL7 ^H	- HcΔ15、 HcΔ18 或 HcΔ20 - 4 突变 Y481A 、 R533A 、	DARpin 特异性人 CD4	- HΔ15、 HΔ18 或 HΔ20 - 4 突变 Y481A 、 R533A 、	IL-7	FΔ30

[0227]

	S548L 、 F549S		S548L 、 F549S		
	例如包含 HcΔ15 和 His 标签的 SEQ ID NO: 2	例如包含 HcΔ15 和 His 标签的 SEQ ID NO: 14			例如 SEQ ID NO: 15
NiV 8 ^G /IL7 ^G	- GcΔ34 - 4 突变: E501A 、 W504A、 Q530A 、 E533A	scFv 特异 性人 CD8	- GcΔ34 - 4 突变: E501A 、 W504A、 Q530A 、 E533A	IL-7	FΔ22
	例如包含 His 标签和 接头(G ₄ S) ₃ 的 SEQ ID NO: 4	例如包含 His 标签的 SEQ ID NO: 6			例 如 SEQ ID NO: 16

[0228] 在一个优选的实施方案中,所述假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体可通过下文“用于产生假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的方法”部分中描述的制备方法

获得。

[0229] 核酸和载体

[0230] 本发明还涉及一种核酸,所述核酸编码细胞靶向融合蛋白和/或调节融合蛋白,其用于假型化本发明的逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体。

[0231] 因此,本发明具体涉及一种核酸,其包含编码细胞靶向融合蛋白的序列和/或编码调节融合蛋白的序列,其中:

[0232] -所述细胞靶向融合蛋白包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白,所述蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白G的胞质区的至少一部分并且优选至少部分不能与所述包膜糖蛋白G的至少一种天然受体结合,或跨膜结构域,和(ii)至少一个细胞靶向结构域,

[0233] -所述调节融合蛋白包含(i)源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G的蛋白,所述蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白G的胞质区的至少一部分并且优选至少部分不能与所述包膜糖蛋白G的至少一种天然受体结合,或跨膜结构域,和(ii)至少一个调节结构域。

[0234] 当核酸包含编码细胞靶向融合蛋白的序列和编码调节融合蛋白的序列时,所述细胞靶向融合蛋白和/或所述调节融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白。

[0235] 核酸优选包含或由以下组成:

[0236] (i) 编码源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白的蛋白的序列,所述蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白G的胞质区的至少一部分并且优选至少部分不能与所述包膜糖蛋白G的至少一种天然受体结合,

[0237] (ii) 编码一个细胞靶向结构域或一个功能结构域的序列,以及

[0238] (iii) 任选地,序列(i)和(ii)之间的接头序列,

[0239] (iv) 任选地,编码标签的序列,优选在序列(ii)的3'末端,其中序列(i)和(ii)同框融合。

[0240] 接头序列编码如上定义的接头,例如编码(G₄S)₃。

[0241] 序列(i)位于核酸的5',与之相比,序列(ii)位于核酸的3'。

[0242] 在一个实施方案中,核酸包含或由如下序列组成,该序列与选自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:13组成的组的序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同,和/或包含或由如下序列组成,该序列编码与选自由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:14组成的组的序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列。

[0243] 在一个优选的实施方案中,核酸包含或由如下序列组成,该序列选自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:13组成的组,和/或包含或由如下序列组成,该序列编码选自由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:14组成的组的序列。

[0244] 以上提供了序列同一性百分比的定义。

[0245] 与标准序列相比,核酸序列与标准序列“至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同”可包含突变,例如缺失、插入和/或取代。

[0246] 在取代的情况下,与标准序列相比,取代优选对应于沉默取代或在翻译后氨基酸序列中导致保守取代的取代,例如如上表1中所示。

[0247] 在一个优选的实施方案中,与标准序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的核酸序列与标准序列的不同之处仅在于沉默取代和/或导致保守氨基酸取代的取代。

[0248] 本发明还涉及一种核酸,其编码源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白,并且所述糖蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白F的胞质区的至少一部分。

[0249] 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白如上定义。

[0250] 核酸优选是分离的核酸。

[0251] 表述“核酸”在本文中是指单链形式或双链形式的核糖核苷(也称为“RNA分子”)、脱氧核糖核苷(也称为“DNA分子”)或其任意磷酸酯类似物(如硫代磷酸酯和硫酯)的磷酸酯聚合物形式。

[0252] 关于生物组分(例如核酸、载体或蛋白)的术语“分离的”是指生物组分已经基本上与生物体细胞中天然存在的其他生物组分(例如其他的染色体和染色体外DNA和RNA、蛋白、细胞和细胞器)或与该生物体本身分离或纯化。“分离的核酸”或“分离的载体”包括通过标准纯化方法纯化的核酸分子。这些术语还包括通过扩增和/或克隆制备的核酸和载体,以及化学合成的核酸和载体。

[0253] 优选将根据本发明的核酸克隆到载体中。

[0254] 因此,术语“载体”具有与“逆转录病毒载体”不同的含义。

[0255] 术语“载体”在本文中是指核酸载体。

[0256] 载体通常包含复制起点、多克隆位点和选择标记。

[0257] 载体优选包含表达盒,即根据本发明的核酸置于至少一种允许其表达的表达信号的控制下。

[0258] 表达信号特别选自启动子、终止子、增强子及其组合。

[0259] 合适的启动子、终止子和增强子是本领域技术人员公知的。

[0260] 载体的实例是例如质粒。

[0261] “质粒”在本文中是指双链环状DNA。质粒可以包括能够选择包含所述质粒的细胞的标记基因、允许细胞复制该质粒的复制起点和/或允许插入根据本发明的核酸的多克隆位点。

[0262] 因此,本发明还涉及一种载体,其包含如上定义的核酸。

[0263] 载体优选是分离的载体。

[0264] 载体可包括或由以下组成:

[0265] -第一核酸,其包含或由以下组成:

[0266] (i) 一个序列,其编码a) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,所述蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白G或H的胞质区的至少一部分并且优选至少部分不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合,或b) 跨膜结构域,

[0267] (ii) 编码一个细胞靶向结构域的序列,

[0268] (iii) 任选地,序列(i)和(ii)之间的接头序列,

[0269] (iv) 任选地,编码标签的序列,优选在序列(ii)的3'末端,其中序列(i)和(ii)同框融合,

[0270] -第二核酸,其包含或由以下组成:

[0271] (i) 一个序列,其编码a) 源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白,所述蛋白优选缺少所述包膜糖蛋白G或H的胞质区的至少一部分并且优选至少部分不能与所述包膜糖蛋白G或H的至少一种天然受体结合,或b) 跨膜结构域,

[0272] (ii) 编码一个功能结构域的序列,

[0273] (iii) 任选地,序列(i) 和(ii) 之间的接头序列,

[0274] (iv) 任选地,编码标签的序列,优选在序列(ii) 的3'末端,其中序列(i) 和(ii) 同框融合,

[0275] 其中第一核酸和/或第二核酸包含编码源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白的序列。

[0276] 因此,所述第一核酸编码细胞靶向融合蛋白,所述第二核酸编码调节融合蛋白。

[0277] 目的基因

[0278] 当使用假型逆转录病毒载体时,在所述逆转录病毒载体的逆转录病毒衍生基因组中可存在至少一种目的基因。

[0279] 目的基因可编码治疗性蛋白、凋亡蛋白、嵌合抗原受体、细胞表面受体、抗体、抗体片段、shRNA、抗原、细胞因子、microRNA、CRISPR((成簇规则间隔短回文重复))/CAS元件(例如CAS9和/或指导RNA,特别是用于特定基因破坏或修正)、其他核酸酶系统如锌指核酸酶、S/MAR(支架/基质附着区)-附加体、配体和/或受体。

[0280] 通过逆转录病毒载体将S/MAR-附加体插入细胞核中,然后与宿主细胞DNA一起复制。

[0281] 目的基因的实例包括珠蛋白基因、造血生长因子基因(例如促红细胞生成素(EPO)基因)、白细胞介素基因(特别是白细胞介素-1、白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-6或白细胞介素-12基因)、集落刺激因子基因(如粒细胞集落刺激因子基因、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子基因或干细胞集落刺激因子基因)、血小板特异性整合素 α IIb β 基因、多药耐药基因、慢性肉芽肿病(CGD)患者中有缺陷的gp91或gp 47基因、使细胞对病原体(例如人类免疫缺陷病毒)感染具有抗性的抗病毒基因、编码血友病中突变的血液凝固因子VIII或IX的基因、编码参与T细胞介导的免疫应答的配体(如T细胞抗原受体、嵌合抗原受体(CAR)、B细胞抗原受体(免疫球蛋白、抗HIV、丙型肝炎、乙型肝炎和/或其他传染病的中和抗体)的基因、白细胞介素受体常见 γ 链基因、TNF基因、 γ 干扰素基因、CTLA4基因、肿瘤细胞中表达的基因如Melana、MAGE基因(如MAGE-1、MAGE-3)、P198基因、P1A基因、gp100基因。

[0282] 用于制备假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的方法

[0283] 本发明还涉及一种用于制备如上定义的真型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的方法,其中所述方法包括用以下物质共转染包装细胞系:

[0284] (i) 至少一种编码细胞靶向融合蛋白的核酸,

[0285] (ii) 至少一种编码调节融合蛋白的核酸,

[0286] (iii) 至少一种编码糖蛋白的核酸,所述糖蛋白源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F,并且优选缺少所述包膜糖蛋白F的胞质区的至少一部分,

[0287] (iv) 至少一种载体,其包含编码源自所述逆转录病毒的核心蛋白的核酸,以及

[0288] (v) 任选地,至少一种载体,其包含具有包装能力的逆转录病毒衍生的基因组,由此获得共转染的细胞。

[0289] 所述细胞靶向融合蛋白和所述调节融合蛋白包含源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白G或H的蛋白。

[0290] 需要至少一种包含具有包装能力的逆转录病毒衍生的基因组的载体仅用于制备逆转录病毒载体。

[0291] 可以使用本领域技术人员熟知的任意合适的包装细胞系。

[0292] “包装细胞系”在本文中是指能够表达本发明的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的不同组分的细胞系。

[0293] 编码本发明的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的不同组分的核酸和载体可以整合到包装细胞系的基因组中，例如在基于鼠白血病的载体的情况下。

[0294] 包装细胞系优选与慢病毒Gag和Pol基因的表达兼容。

[0295] 例如，包装细胞系可选自由293T细胞、昆虫细胞、TE 671细胞和HT1080细胞组成的组。

[0296] 术语“转染”是指将至少一种外来核酸或载体（例如DNA、cDNA或RNA）引入细胞中，使得宿主细胞会表达由所述核酸或载体编码的蛋白。外源核酸或载体可包括调节序列或控制序列，例如起始序列、终止序列、启动子序列、信号序列、分泌序列或细胞遗传机制使用的其他序列。

[0297] 包含衣壳化所必需的psi序列的载体称为psi阳性载体，而不包含所述psi序列的载体称为psi阴性载体。

[0298] 只有包含具有包装能力的逆转录病毒衍生的基因组的载体是psi阳性载体。用于共转染的其他核酸和载体是psi阴性的。

[0299] 编码细胞靶向融合蛋白的核酸、编码调节融合蛋白的核酸和编码源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白的核酸如上所定义。它们可以以两个或三个单独的载体的形式提供：例如，两个单独的载体，例如第一个包含或由以下组成：编码细胞靶向融合蛋白的核酸和编码调节融合蛋白的核酸，第二个包含或由以下组成：编码源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白的核酸；或者三个单独的载体，第一个包含或由以下组成：编码细胞靶向融合蛋白的核酸，第二个包含或由以下组成：编码调节融合蛋白的核酸，第三个包含或由以下组成：编码源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白的核酸。或者，编码细胞靶向融合蛋白的核酸、编码调节融合蛋白的核酸和编码源自副粘病毒科病毒的包膜糖蛋白F的糖蛋白的核酸可以在单个载体中提供，所述单个载体包含或由这三种核酸组成。

[0300] 还使用了包含编码所述逆转录病毒的核心蛋白的核酸的载体。

[0301] “逆转录病毒的核心蛋白”在本文中是指由gag和pol基因编码的蛋白。gag基因编码多蛋白，该多蛋白被逆转录病毒蛋白酶进一步加工成包含核心的结构蛋白。pol基因特别编码逆转录病毒蛋白酶、逆转录酶和整合酶。

[0302] 编码逆转录病毒的核心蛋白的核酸因此包含所述逆转录病毒的gag基因和pol基因。

[0303] 逆转录病毒的至少一种核心蛋白可以是经修饰的，例如，与野生型逆转录病毒的相应核心蛋白相比。

[0304] 在一个实施方案中，逆转录病毒的至少一种核心蛋白经过至少一个氨基酸突变例如氨基酸缺失、插入或取代而被修饰。

[0305] 在一个优选的实施方案中,所述至少一种经修饰的核心蛋白是缺陷型整合酶。缺陷型整合酶的实例具有D116A突变。

[0306] 编码核心蛋白的核酸因此可以包含pol基因中的至少一个突变和/或gag基因中的至少一个突变。所述至少一个突变可以是核苷酸缺失、插入或取代。

[0307] 在一个优选的实施方案中,编码核心蛋白的核酸包含pol基因中的至少一个突变,从而编码缺陷型整合酶。

[0308] 包含缺陷型整合酶的逆转录病毒载体称为整合缺陷型逆转录病毒载体。这种载体允许瞬时转移编码目的基因的衣壳化RNA分子。

[0309] 优选的整合缺陷型逆转录病毒载体是IDLV (整合缺陷型慢病毒载体)。

[0310] gag和pol基因的来源为逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体命名。例如,表述“HIV-1衍生的逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体”通常表明gag和pol基因是HIV-1的基因或是HIV-1的经修饰的gag和pol基因。

[0311] 包含具有包装能力的逆转录病毒衍生的基因组的载体也可用于共转染,特别是用于产生逆转录病毒载体。

[0312] “包含具有包装能力的逆转录病毒衍生的基因组的载体”在本文中是指包含称为“顺式作用”序列的逆转录病毒核酸序列的载体。这些序列包括用于控制转录和整合的长末端重复序列(LTR)或修饰型(LTR)例如缺少U3区的至少一部分、衣壳化所必需的psi序列和逆转录病毒基因组的逆转录所必需的引物结合位点(PBS)和多嘌呤追踪(polypurine track)(PPT)序列。

[0313] 使用包含缺少U3区的至少一部分的LTR的载体产生的逆转录病毒载体是例如自失活(SIN-LTR)载体。

[0314] 在一个实施方案中,所述包含具有包装能力的逆转录病毒衍生的基因组的载体还包含目的基因,其包括CRISPR/CAS元件和/或S/MAR-附加体。

[0315] 当使用CRISPR/CAS体系时,包含具有包装能力的逆转录病毒衍生的基因组的载体通常包含编码内切核酸酶CAS (例如CAS9) 的基因、对应于目的基因特异性指导RNA (gRNA) 的DNA序列和任选地用于基因纠正的序列。

[0316] 在不存在任何反式互补功能的情况下,所述逆转录病毒衍生基因组优选是复制缺陷型的。具有复制能力的基因组将进一步包含gag、pol和env逆转录病毒基因。在复制缺陷型基因组中,病毒基因gag、pol和env缺失。本发明的逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的组装是通过反式提供另一种编码gag和pol,但对于“顺式”序列(例如(iv)的载体)有缺陷的载体,以及至少另一种编码假型化包膜糖蛋白的载体或核酸(例如(i)、(ii)和(iii)的核酸或包含所述核酸的载体)而实现的。它们的表达允许目的基因的衣壳化,不包括病毒基因组增殖和形成完整病毒颗粒所必需的基因。

[0317] 用于制备如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的方法还可以包含以下步骤:

[0318] b) 将共转染细胞培养足够的时间以允许由所述核酸和载体编码的蛋白的表达;

[0319] c) 使所编码的蛋白形成逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体。

[0320] 调节特定细胞或细胞亚型的活性和/或转导特定细胞或细胞亚型

[0321] 本发明的另一个目的是如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体选

择性地调节靶细胞的活性和任选地选择性地转导靶细胞的用途,优选体外或离体用途。

[0322] 本发明的另一个目的是用于选择性地调节靶细胞的活性和任选地选择性地转导靶细胞的方法,优选体外或离体方法,其中所述方法包括使如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体与包含所述靶细胞的细胞接触。

[0323] 表述“选择性地调节靶细胞活性”中的术语“选择性地”意指基本上只有所述靶细胞的活性被假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体调节。例如,其活性被调节的细胞包含小于10%,例如小于5%或小于1%的非靶细胞。

[0324] 表述“选择性地转导靶细胞”中的术语“选择性地”意指基本上只有靶细胞被转导。例如,被转导的细胞包含少于10%,例如少于5%或少于1%的非靶向细胞被转导。

[0325] 表述“调节靶细胞的活性”如上文“功能结构域”部分中所定义。

[0326] 如本文所用,术语“转移”或“转导”涉及逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体在与靶细胞结合后,将生物材料递送至靶细胞的膜或细胞质的能力。递送后,生物材料可以易位至细胞的其他区室。

[0327] 如本文所用,表述“生物材料”涉及一种或多种易于改变细胞结构和/或功能的化合物。在本发明的上下文中,优选地,生物材料是包含目的基因的一种或多种核酸,该目的基因可以被包含在逆转录病毒载体的基因组内,如上所述。

[0328] 进行细胞转导的条件是本领域技术人员所熟知的,并且通常包括优选以0.5至100的MOI(感染复数),将优选在例如用重组人纤维蛋白片段(retronectin)包被的烧瓶、平板或培养皿中培养的并任选地用细胞因子混合物预刺激的待转导细胞与假型化逆转录病毒载体孵育。

[0329] 靶细胞特别如上同名部分中所定义。

[0330] 假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体可以在培养基中与包含靶细胞的细胞接触。

[0331] 技术人员知道适合于给定细胞的培养基。

[0332] 假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体因此可以在体外或体内用于改变确定的细胞功能,从而为基础研究提供新的工具。

[0333] 药物组合物

[0334] 本发明还涉及一种药物组合物,其包含至少一种如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体。

[0335] 药物组合物中待使用的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的量取决于例如免疫原性、意图给药的受试者的状况(例如,体重、年龄、性别、健康、同时治疗(如果有的话)和治疗频率)、施用方式、制剂类型和/或靶细胞数。

[0336] 药物组合物优选包含至少一种假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体和至少一种药学上可接受的载体。

[0337] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”意指包括不干扰活性成分的生物活性的有效性并且优选对施用的宿主无毒的任意载体。

[0338] 可用于本发明药物组合物的药学上可接受的载体是本领域技术人员公知的。例如,它们包括离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、自乳化药物递送系统(SEDSS)、例如d- α -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯、用于药物剂型的表面活性剂如吐温或其他类似聚合物递

送基质、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、钾磷酸氢盐、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。环糊精如 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精，或化学改性的衍生物如羟烷基环糊精(包括2-羟丙基- β -环糊精和3-羟丙基- β -环糊精)，或者其它溶解的衍生物也可有利地用于增强本发明组合物的递送。

[0339] 药物组合物可包含 10^6 IU至 10^{12} IU的假型逆转录病毒载体，优选 10^7 IU至 10^9 IU，更优选 10^7 IU至 10^8 IU。

[0340] 术语“IU”或“感染单位”在本文中是指在细胞系上通过滴定测定的感染性载体颗粒的量，并表示为IU/ml。

[0341] 给药可以在单个剂量或数个剂量的本发明药物组合物中实现，所述数个剂量同时注射或随时间分开注射。

[0342] 在一个实施方案中，药物组合物以单位剂型存在，以促进精确给药。术语“单位剂型”是指适合作为人类受试者和其他哺乳动物的单位剂量的物理离散单位，每个单位含有经计算可产生所需治疗效果的预定量的活性物质，以及合适的药物赋形剂。典型的单位剂型包括液体组合物的预填充的、预先测量的安瓿或注射器。在这样的组合物中，假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体通常是次要组分，其余为有助于形成所需剂型的各种媒介物或载体和加工助剂。

[0343] 本发明还提供了试剂盒，其包含如上定义的含有假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的药物组合物，和关于给药方式的说明书。这些说明书可以例如注明医学适应症、给药途径、剂量和/或待治疗患者组。

[0344] 待治疗的受试者

[0345] 待治疗的受试者可以是哺乳动物，例如人或非人哺乳动物。

[0346] 人也称为“个体”或“患者”。

[0347] 所述人类可以是任意年龄，例如婴儿、儿童、青少年、成年人、老年人和任意性别。

[0348] 非人类哺乳动物优选是啮齿动物(例如小鼠、大鼠或兔子)、猫科动物(例如猫)、犬科动物(例如狗)或灵长类动物(例如黑猩猩)。

[0349] 待治疗的受试者优选是人。

[0350] 疾病的预防和/或治疗

[0351] 本发明特别适用于预防和/或治疗可通过选择性地调节特定细胞或细胞亚群的活性和任选地通过选择性地转导所述特定细胞或细胞亚群来预防和/或治愈的疾病。

[0352] 所述疾病优选包括特定细胞或细胞亚群。

[0353] 待治疗的受试者因此可能患有可通过选择性地调节特定细胞或细胞亚群的活性和任选地通过选择性地转导所述特定细胞或细胞亚群来预防和/或治愈的疾病，或可能受到该疾病的影响。

[0354] 所述疾病可选自由以下组成的组：免疫疾病(例如自身免疫疾病)、癌症、遗传疾病、过敏性疾病、炎症疾病、传染病(特别是细菌和/或病毒感染)、代谢疾病、神经退行性疾病(例如神经营养不良、帕金森病、亨廷顿病、阿尔茨海默病)、肌肉疾病及其组合。

[0355] 如本文中所使用,表述“自身免疫疾病”是指由于机体对通常存在于机体中的物质和/或组织的过度活跃的免疫应答导致的疾病。因此,通过特异性靶向参与该过度活跃的免疫应答的免疫细胞,本发明的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体是预防和/或治疗自身免疫疾病的有用工具。

[0356] 自身免疫疾病特别包括急性播散性脑脊髓炎、急性出血性脑白质炎、阿狄森氏病(Addison's disease)、丙种球蛋白血症、斑秃、肌萎缩性侧索硬化症、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、抗合成酶综合征、特应性变态反应、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性心肌病、自身免疫性肠病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴增生综合征、自身免疫性周围神经病、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺病综合征、自身免疫性孕酮性皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、巴洛(Balo)病、巴洛同心圆硬化、Bechets综合征、伯格氏病(Berger's disease)、比克斯塔夫氏脑炎(Bickerstaff's encephalitis)、Blau综合征、大疱性类天疱疮、卡尔斯曼氏病(Castleman's disease)、乳糜泻、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性复发性多灶性骨髓炎、Churg-Strauss综合征、瘢痕性类天疱疮、Cogan综合征、冷凝集素病、补体组分2缺乏症、颅动脉炎、CREST综合征、克罗恩病(Crohn's disease)、库欣氏综合征(Cushing's syndrome)、皮肤白血球血管炎、德戈氏病(Dego's disease)、德尔肯氏病(Dercum's disease)、疱疹样皮炎、皮肤炎、1型糖尿病、弥漫性皮肤全身性硬化症、德雷斯勒氏综合征(Dressler's syndrome)、盘状红斑性狼疮、湿疹、接骨点炎相关的关节炎、嗜酸细胞性筋膜炎、嗜酸细胞性胃肠炎、获得性大疱性表皮松解症、结节性红斑、原发性混合型冷球蛋白血症、埃文氏综合征(Evan's syndrome)、进行性骨化性纤维发育不良(fibrodysplasia ossificans progressiva)、纤维化肺泡、胃炎、胃肠道类天疱疮、巨细胞动脉炎、肾小球肾炎、肺出血肾炎综合征、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、Guillain-Barré综合征(GBS)、桥本氏脑炎(Hashimoto's encephalitis)、桥本氏甲状腺炎、溶血性贫血、Henoch-Schönlein紫癜、妊娠疱疹、低丙球蛋白血症、特发性炎症性脱髓鞘疾病、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜、IgA肾病、包涵体肌炎、炎症性脱髓鞘性多发性神经病、间质性膀胱炎、幼年特发性关节炎、幼年型类风湿关节炎、川崎病(Kawasaki's disease)、Lambert-Eaton肌无力综合征、白血球破裂性血管炎、扁平苔癣、硬化性苔癣、线状IgA病(LAD)、卢伽雷氏病(Lou Gehrig's disease)、狼疮性肝炎、红斑狼疮、Majeed综合征、美尼尔氏病(Ménière's disease)、显微性多血管炎、Miller-Fisher综合征、混合性结缔组织病、硬皮病、Mucha-Habermann病、多发性硬化、重症肌无力、肌炎、正视神经脊髓炎(neuropylitis optica)、神经性肌强直、眼瘢痕性类天疱疮、斜视性阵挛肌阵挛综合征、奥德甲状腺炎(orbitopathy)、复发性风湿、副肿瘤性小脑变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、Parry Romberg综合征、Parsonage-Turner综合征、扁平部睫状体炎、天疱疮、寻常型天疱疮、恶性贫血、静脉周围性脑脊髓炎、POEMS综合征、结节性多动脉炎、风湿性多肌痛、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、进行性炎性病变、银屑病、银屑病关节炎、坏疽性脓皮病、纯红细胞再生障碍、Rasmussen氏脑炎、雷诺氏症(Raynaud phenomenon)、复发性多软骨炎、莱特尔氏综合征(Reiter's syndrome)、多动腿综合征、腹膜后纤维化、类风湿性关节炎、类风湿性发热、结节病、施密特综合征(Schmidt syndrome)、施尼茨勒综合征(Schnitzler syndrome)、巩膜炎、硬皮病、干燥综合征(Sjögren's

syndrome)、脊椎关节病、斯蒂尔病(Still's disease)、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎、Susac氏综合征、Sweet氏综合征、西德纳姆舞蹈病(Sydenhamchorea)、交感性眼炎、高安氏动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎、Tolosa-Hunt综合征、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病、未分化脊柱关节病、血管炎、白癜风和韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

[0357] 如本文所用,术语“癌症”包括任意类型的癌症,例如成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、乳腺癌、肝细胞癌、由造血细胞引起的癌症包括白血病特别是B-CLL(B细胞慢性淋巴细胞性白血病)、CML(慢性粒细胞白血病)或基于T细胞的白血病如ATL(急性T细胞白血病)、ALL(急性淋巴细胞白血病)、AML(急性髓性白血病)和/或黑色素瘤。

[0358] 治疗应用

[0359] 本发明还涉及如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体作为药物,优选用于免疫疗法基因治疗和/或疫苗接种。

[0360] 基因疗法是使用基因作为药物的疗法,其可以例如通过在细胞中递送目的基因和/或纠正内源性部位的目的基因而获得。在基因疗法中,将包含目的基因的核酸递送到患者的细胞中,由目的基因编码的蛋白的表达和/或目的基因的纠正从而允许预防和/或治疗疾病。

[0361] 所述目的基因可以存在于本发明逆转录病毒载体所包含的RNA分子中。

[0362] 基因的纠正可以由CRISPR/CAS体系进行。

[0363] 免疫疗法(immune therapy),也称为免疫疗法(immunotherapy),是基于调节免疫系统活性(例如,刺激或抑制)以预防和/或治疗疾病的疗法。

[0364] 在本发明的上下文中,免疫疗法包括通过使用本发明的逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体来仅调节特定靶向免疫细胞的活性,并任选地选择性地转导所述靶免疫细胞。例如,逆转录病毒载体可用于激活B细胞,例如使它们在浆细胞中分化,并任选地用编码抗感染物(例如抗HIV、HCV或HBC)的异位抗体的核酸转导它们。

[0365] 免疫疗法还包括T细胞疗法。在T细胞疗法中,除了对其功能进行调节外,T细胞可能更容易进行基因转移,例如T细胞受体(CAR)基因转移。

[0366] 过继性T细胞疗法是一种疗法,其中将T细胞输注给需要的受试者。在本发明的上下文中,通过使用本发明的逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,可以在输注之前调节所述T细胞的活性。

[0367] 在本发明的上下文中,疫苗接种包括在逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的表面呈现特异性病毒表位,所述特异性病毒表位会同时靶向并激活抗原呈递细胞(例如巨噬细胞),随后抗原呈递细胞将表位呈递给免疫系统(T和B细胞)。

[0368] 本发明还涉及如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体用作药物,其中所述假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体选择性地调节靶细胞的活性并任选地选择性地转导靶细胞。

[0369] 本发明特别涉及如上定义假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体用于预防和/或治疗如上述“疾病的预防和/或治疗”部分中所定义的疾病。

[0370] 所述疾病例如是免疫疾病(例如自身免疫疾病)、癌症、遗传疾病、过敏性疾病、炎

性疾病、传染病(特别是细菌和/或病毒感染)、代谢疾病、神经退行性疾病(例如神经营养不良、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病)、肌肉疾病及其组合。

[0371] 在一个实施方案中,假型逆转录病毒类似颗粒或逆转录病毒载体用于改善DC(树突细胞)疫苗,例如,通过在载体的表面上共同呈现呈现DC细胞特异性配体(如CD11b)和GM-SCF(粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子),例如蛋白和基因转移。

[0372] 在一个有利的实施方案中,T细胞活化与T细胞特异性基因转移结合,这显著增强静息T细胞中的基因转移效率,例如在基于T细胞的基因疗法中。将基因有效体内转移到T细胞亚群中是基因和细胞疗法领域的一次革命,因为它允许省略导致临床应用高成本的离体培养和转导过程。此外,将细胞留在体内正常微环境中使它们能够保持其表型并长期持续存在于患者体内(例如肿瘤特异性CD8细胞毒性细胞)。

[0373] 在另一个实施方案中,本发明可用于增强选择性基因递送至静息B淋巴细胞,例如在基于B细胞的基因疗法中,例如允许B细胞产生抗感染物的中和抗体或允许B细胞分泌被免疫系统耐受的重组蛋白的免疫疗法,因为B细胞可以作为致耐受性细胞。

[0374] 此外,在假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的表面上呈现一种或多种细胞因子可诱导T细胞亚群分化成表型如TSCM或TCM,它可能在体内长期存在。

[0375] 在另一个实施方案中,本发明可用于体内扩增(自体)抗癌自然杀伤细胞,用于癌症治疗。

[0376] 在一个实施方案中,通过共呈现凋亡配体和肿瘤或免疫细胞特异性靶向结构域,使用假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体诱导确定细胞亚群的细胞凋亡。

[0377] 假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体可以以药物组合物的形式提供。

[0378] 药物组合物优选如上文同名部分中所定义。

[0379] 本发明还涉及一种治疗有需要的受试者的方法,其包括施用治疗有效量的如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,优选在免疫疗法、基因疗法和/或疫苗接种的框架内。

[0380] 本发明还涉及一种治疗有需要的受试者的方法,其包括施用治疗有效量的如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其中所述假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体选择性地调节靶细胞的活性并任选地选择性地转导靶细胞。

[0381] 本发明还涉及一种预防和/或治疗疾病的方法,其包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的如上定义的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体,其中所述疾病优选如上所述。

[0382] 可以使用本领域技术人员已知的任意合适的施用方法。特别地,根据本发明的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体可以通过口服途径、肠胃外途径(优选通过静脉内注射)、髓内途径特别是股骨内(如骨髓腔内)或肱骨髓内途径注射和/或局部肿瘤内注射施用。

[0383] 当选择肠胃外途径时,假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体可以是例如在安瓿或烧瓶中调理的可注射溶液或悬浮液的形式。

[0384] 假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体优选以治疗有效量使用或给药。

[0385] “治疗有效量”是指赋予被治疗受试者治疗效果的假型逆转录病毒类似颗粒或逆转录病毒载体的量。治疗效果可以是客观的(即,可通过一些测试或标记测量)或是主观的

(即,受试者给出效果的指示或感受效果)。如技术人员已知,有效剂量将取决于施用途径、受试者的大小和/或重量以及与其他试剂共同使用的可能性而变化。

[0386] 本文所用的术语“包含”包括术语“由...组成”。

[0387] 本发明将根据以下实施例和附图进一步说明。

[0388] 本文引用的所有参考文献,包括期刊文章或摘要、已公开或未公开的专利申请、授权专利或任意其他参考文献,均通过引用的方式整体并入本文,包括引用的参考文献中呈现的所有数据、表格、图形和文本。

[0389] 序列的简要说明

[0390] SEQ ID NO:1对应于编码截短且突变的(Y481A、R533A、S548L、F549S)MV H蛋白(Hc Δ 18)的核酸序列,所述MV H蛋白与对人CD4具有特异性的设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)-29.2融合。

[0391] SEQ ID NO:2对应于由序列SEQ ID NO:1编码的氨基酸序列。

[0392] SEQ ID NO:3对应于编码截短且突变的(E501A、W504、Q530A、E533A)NiV G蛋白(Gc Δ 34)的核酸序列,所述NiV G蛋白与针对人CD8的单链抗体(scFvC8-Vh1)融合,用另外的(G₄S)₃接头连接。

[0393] SEQ ID NO:4对应于由序列SEQ ID NO:3编码的氨基酸序列。

[0394] SEQ ID NO:5对应于编码截短且突变的(E501A、W504、Q530A、E533A)NiV G蛋白(Gc Δ 34)的核酸序列,所述NiV G蛋白与IL-7融合。

[0395] SEQ ID NO:6对应于由序列SEQ ID NO:5编码的氨基酸序列。

[0396] SEQ ID NO:7对应于编码截短且突变的(E501A、W504、Q530A、E533A)NiV G蛋白(Gc Δ 34)的核酸序列,所述NiV G蛋白与针对人EpCAM的设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)融合。

[0397] SEQ ID NO:8对应于由序列SEQ ID NO:7编码的氨基酸序列。

[0398] SEQ ID NO:9对应于尼帕病毒包膜糖蛋白G的全长氨基酸序列。

[0399] SEQ ID NO:10对应于麻疹病毒包膜糖蛋白H的全长氨基酸序列。

[0400] SEQ ID NO:11对应于尼帕病毒包膜糖蛋白F的全长氨基酸序列。

[0401] SEQ ID NO:12对应于麻疹病毒包膜糖蛋白F的全长氨基酸序列。

[0402] SEQ ID NO:13对应于编码截短且突变的MeV H蛋白(Hc Δ 15)的核酸序列,所述MeV H蛋白与IL-7融合。

[0403] SEQ ID NO:14对应于由序列SEQ ID NO:13编码的氨基酸序列。

[0404] SEQ ID NO:15对应于在细胞质尾部截短了30个氨基酸的麻疹病毒F蛋白(Fc Δ 30)的氨基酸序列。

[0405] SEQ ID NO:16对应于在细胞质尾部截短了22个氨基酸的尼帕病毒F蛋白(Fc Δ 22)的氨基酸序列。

[0406] 附图简要说明

[0407] 图1:通过4^H/IL7^H-LV将ErbB2-CAR基因有效且稳定地转移到静息CD4⁺T细胞中。为了评估4^H/IL7^H-LV是否可以有效地将治疗基因(ErbB2特异性CAR, ErbB2-CAR)转移到静息T细胞中,用4^H-LV或4^H/IL7^H-LV转导新鲜分离的CD3⁺T细胞。用VSV-LV转导或不经转导(ut)的细胞用作阴性对照。三天后,通过FACS分析一半的转导的细胞,以确定CD4或CD8门控的细胞中ErbB2-CAR⁺细胞的百分比。为了确认稳定的ErbB2-CAR表达,在洗涤步骤之后,将另外一

半的转导的细胞在抗CD3/抗CD28/IL-2刺激的存在下再培养另外三天。然后,通过FACS测定CD4⁺/ErbB2⁺细胞和CD8⁺/ErbB2⁺细胞的百分比。

[0408] 图2: NiV包膜糖蛋白G的突变以消除天然受体识别。示出了Ephrin-B2 (A) 和B3 (B) 与NiV-G突变体的结合。将293T细胞用模拟物、编码Gc $\Delta 34^{His}$ 的质粒或用不同的Gc $\Delta 34^{EpCAM}$ 突变体转染: 未突变的 (Gc $\Delta 34^{EpCAM}$)、E533A (Gc $\Delta 34^{EpCAM}_{mut1}$)、Q530A+E533A (Gc $\Delta 34^{EpCAM}_{mut2.1}$)、E501A+W504A (Gc $\Delta 34^{EpCAM}_{mut2.2}$) 或E501A+W504A+Q530A+E533A (Gc $\Delta 34^{EpCAM}_{mut4}$) , 并与1 μ g/ml重组Fc-EphrinB2或B3一起孵育。不同突变体对受体的结合量记为MFI值。统计数据涉及未突变的G $\Delta 34$ -DARPin-Ac1 (n=3; 示出了平均值 $\pm$ 标准差 (SD) ; 通过非配对t检验*, P<0.1**, P<0.01; ***, P<0.001)。

[0409] 图3: 通过4^H/IL7^H-VLP选择性活化CD4⁺T细胞。新鲜分离的CD3⁺T细胞不经转导 (ut) 或用不同类型的VLP转导, 所述VLP用CD4-DARPin-Hmut (4^H-VLP)、CD4-DARPin/IL7-Hmut (4^H/IL7^H-VLP) 或IL7-Hnse (Hnse/IL7^H-VLP) 假型化。三天后, 细胞被CD8、CD4和CD71抗体染色。示出了CD4或CD8门控的T细胞中的CD71表达。

[0410] 图4: 在靶向VLP上功能性显示的IL7促进T细胞存活。用病毒样颗粒 (VLP) 孵育6天的成人静息CD3⁺T细胞的前向/侧向散射图, 所述病毒样颗粒用CD4靶向的MV-H (4^H-VLP)、CD8靶向的MV-H (8^H-VLP)、呈现IL7的CD4靶向的MV-H (4^H/IL7^H-VLP)、或呈现IL7的CD8靶向的MV-H (8^H/IL7^H-VLP) 假型化。单独在培养基中培养的细胞 (未转导的, ut) 或在15ng/ml IL7存在下培养的细胞用作对照。活细胞的百分比指示于各斑点印记中。

[0411] 图5: 在CD4靶向的LV上功能性显示的IL7促进T细胞存活。用慢病毒载体 (LV) 孵育6天的成人静息CD3⁺T细胞的前向/侧向散射图, 所述慢病毒载体用VSVG (VSV-LV)、MV-Hmut (Hnse-LV)、CD4靶向的MV-H (4^H-LV)、或呈现IL7的CD4靶向的MV-H (4^H/IL7^H-LV) 假型化。单独在培养基中培养的细胞 (未转导的, ut) 或在15ng/ml IL7存在下培养的细胞用作对照。活细胞的百分比指示于各斑点印记中。

[0412] 图6: 通过4^H/IL7^H-LV选择性活化CD4⁺T细胞。新鲜分离的CD3⁺T细胞不经转导 (ut) 或用不同类型的LV转导, 所述LV用CD4-DARPin-Hmut (4^H Δ 18-LV)、Hnse (Hnse-LV)、或VSVG (VSVG-LV) 假型化。在这里, IL7呈现在两种不同版本的Hmut上, 20个氨基酸C-截短型 (H Δ 20) 或15个氨基酸C-截短型 (H Δ 15)。因此, 产生了两种类型的4^H/IL7^H-LV并转导静息T细胞。三天后, 细胞被CD3、CD8、CD69和CD71抗体染色。示出了CD8⁺和CD8⁻ (CD4⁺) 细胞中活化标记CD69和CD71的表达。

[0413] 图7: 假型慢病毒载体 (LV) 的示意图。4^H-LV是基于MeV糖蛋白假型的CD4靶向的LV。4^H/IL7^H-LV是基于MeV糖蛋白假型的展示IL7的CD4靶向的LV。包膜糖蛋白H (MV-H) 在其细胞质尾部被截短, 例如截短15、18或20个氨基酸, 并且引入四个点突变 (Y481A、R533A、S548L和F549S) 中的至少两个以使其不能天然受体识别SLAM和CD46, 从而得到包膜糖蛋白Hmut。然后, 用或不用接头将靶向结构域 (例如CD4-DARPin) 和/或细胞因子 (例如IL7) 与突变体H (Hmut) 融合。MV包膜糖蛋白F在其细胞质尾部被截短30个氨基酸 (MV-F Δ 30)。

[0414] 图8: 假型病毒样颗粒 (VLP) 的示意图。8^G-VLP是基于NiV糖蛋白假型的CD8靶向的VLP。8^G/IL7^G-VLP是基于NiV糖蛋白假型的呈现IL7的CD8靶向的VLP。NiV-G包膜糖蛋白在其细胞质尾部被截短34个氨基酸 ($\Delta 34$) , 并且引入四个点突变 (E501A、W504A、Q530A和E533A) 以使其不能天然受体识别Ephrin-B2/B3, 从而得到包膜糖蛋白NiV-G Δ 34。然后, 用或不用接

头将靶向结构域(CD8-scFv)和/或细胞因子(IL7)与突变G蛋白(NiV-G Δ ₃₄)融合。NiV包膜糖蛋白F在其细胞质尾部被截短22个氨基酸(NiV-F Δ ₂₂)。

[0415] 图9:通过4^H/IL7^H-LV高效且选择性地转导静息CD4⁺T细胞。新鲜分离的CD3⁺T细胞不经转导(ut)或用不同类型的LV转导,所述LV用CD4-DARPin-Hmut(4H Δ ¹⁸-LV)、Hnse(Hnse-LV)或VSVG(VSVG-LV)假型化。在这里,IL7呈现在两种不同版本的Hmut上,20个氨基酸C-截短型(H Δ 20)或15个氨基酸C-截短型(H Δ 15)。因此,产生了两种类型的4^H/IL7^H-LV(4H Δ ¹⁸/IL7H Δ ¹⁵-LV和4H Δ ¹⁸/IL7H Δ ²⁰-LV)并转导静息T细胞。三天后,细胞被CD3、CD8和CD4抗体染色。示出了CD4或CD8门控的T细胞中的GFP表达。

[0416] 图10:NiV糖蛋白假型化LV的中和。与连续稀释的合并人血清(IVIG)在37℃孵育2小时后,以0.4的MOI用NiVmutEpCAM-LV(圆圈)、MVEpCAM-LV(方块)、NiVwt-LV(三角)、或VSVG-LV(菱形)转导CHO-EpCAM或CHO-Ephrin-B2细胞。72小时后,通过流式细胞术测定GFP+细胞,并示出相对于未处理对照的GFP+细胞数(n=3)。

[0417] 图11:通过8^G/IL7^G-LV选择性活化CD8⁺T细胞。新鲜分离的CD3⁺T细胞不经转导(ut)或用不同类型的LV转导,所述LV用CD8-scFv-Gmut(8^G-LV)或CD8-scFv-Gmut/IL7-Gmut(8^G/IL7^G-LV)假型化。三天后,细胞被CD8、CD4和CD71抗体染色。示出了CD4或CD8门控的T细胞中的CD71表达。

[0418] 图12:通过8^G/IL7^G-LV高效且选择性地转导静息CD8⁺T细胞。新鲜分离的CD3⁺T细胞不经转导(ut)或用不同类型的LV转导,所述LV用CD8-scFv-Gmut(8^G-LV)或CD8-scFv-Gmut/IL7-Gmut(8^G/IL7^G-LV)假型化。三天后,细胞被CD3、CD8和CD4抗体染色。示出了CD4或CD8门控的T细胞中的GFP表达。

[0419] 图13:通过8^G/IL7^G-LV将CAR19高效转移到静息CD8⁺T细胞中。新鲜分离的CD3⁺T细胞不经转导(ut)或用不同类型的LV转导,所述LV用CD8-scFv-Gmut(8^G-LV)或CD8-scFv-Gmut/IL7-Gmut(8^G/IL7^G-LV)或VSVG(VSV-LV)假型化。由LV递送编码CD19特异性CAR(CAR19)的治疗基因。转导后3天,通过抗cmv抗体检测CAR19表达。示出了CD4⁺或CD8⁺T细胞中CAR19表达细胞的百分比。

[0420] 图14:4^H/IL7^H-LV允许人源化小鼠中CD4⁺T细胞的靶向体内活化。

[0421] NOD/SCID gc-/-小鼠注射脐带血T细胞,移植后2个月(20%T细胞重建),IV注射100微升的4^H/IL7^H-LV(1E6IU)或4^H/IL7^H-LV。注射载体两周后,处死小鼠并评估脾细胞中CD71+CD4⁺T细胞(活化标志物)的%。

实施例

[0422] 材料和方法

[0423] 构建体的产生

[0424] 将PCR扩增的来自pQE30ss_Ac1_corr的EpCAM特异性DARPin Ac1的编码序列(Stefan等人2011)通过SfiI/NotI插入到质粒pHL3-HRS3opt2#2(Friedel等人2015)的骨架中,产生编码截短且突变的MVHc Δ 18mut蛋白以及编码H和His标签之间的(G4S)₃接头的质粒pHL3-Ac1。

[0425] 编码尼帕病毒G蛋白变体的所有质粒均源自质粒pCAGGS-NiV-codonop-Gn。通过PCR扩增每个片段将Ac1靶向结构域的编码序列与G蛋白阅读框的C-末端融合,同时引入用

于连接的常见AgeI限制性酶切位点,得到质粒pCAGGS-NiV-G-DARPin-Ac1。所有其他靶标结构域通过AgeI/NotI进行交换。通过PCR扩增G蛋白阅读框并将PCR片段插入到pCAGGS-NiV-G-DARPin-Ac1中而引入G蛋白细胞质尾部的截短,得到质粒pCAGGS-NiV-Gc Δ 33-DARPin-Ac1和pCAGGS-NiV-Gc Δ 34-DARPin-Ac1。通过PCR扩增从pCAGGS-NiV-codonop-Gn生成带His标签的G蛋白和Gc Δ 34蛋白。通过PacI/NotI限制性酶切将片段克隆到pCAGGS-NiV-G-DARPin-Ac1的质粒骨架中,分别得到pCAGGS-NiV-G-His和pCAGGS-NiV-Gc Δ 34-His。通过定点突变将干扰天然受体识别的突变引入NiV-Gc Δ 34-DARPin-Ac1蛋白编码序列中。通过用突变位点的同源区扩增携带指定突变的两个片段来产生每个突变。通过侧翼引物对融合并扩增这些片段。通过RsrII/AgeI将所得片段克隆到pCAGGS-NiV-Gc Δ 34-DARPin-Ac1中,生成质粒pCAGGS-NiV-Gc Δ 34EpCAMmut。

[0426] 为了生成NiV-F变体,从pCAGGS-NiV-F扩增Fc Δ 22和Fc Δ 25的编码序列,并通过PacI/SacI限制性酶切克隆到pCAGGS-NiV-codonop-Gn的质粒骨架中,得到质粒pCAGGS-NiV-Fc Δ 22和pCAGGS-NiV-Fc Δ 25。通过从pCAGGS-NiV-F扩增NiV-F变体并同时在N-末端添加AU1标签,生成带AU1标签的NiV-F变体,将其用于载体颗粒的Western印迹分析。将所得PCR片段通过PacI/SacI限制性酶切克隆到pCAGGS-NiV-codonop-Gn的骨架中,得到质粒pCAGGS-AU1-NiV-F、pCAGGS-AU1-NiV-Fc Δ 22和pCAGGS-AU1-NiV-Fc Δ 25。

[0427] 载体制备

[0428] 通过使用聚乙烯亚胺(PEI)瞬时转染HEK-293T细胞生成了载体颗粒。转染前24小时,将 2.5×10^7 个细胞接种到T175烧瓶中。在转染当天,将细胞培养基替换为含有15%FCS和3mM L-谷氨酰胺的10ml DMEM。通过将35 μ g总DNA与2.3ml不含添加剂的DMEM混合来制备DNA混合物。

[0429] 例如,在优化G与F的比例后,将0.9 μ g编码Gc Δ 34DARPin/scFv变体的质粒与4.49 μ g编码F变体的质粒混合。使用14.4 μ g的HIV-1包装质粒pCMV Δ R8.9和15.1 μ g的转移-LV质粒。通过将140 μ l的18mM PEI水溶液与2.2ml不含添加剂的DMEM混合来制备转染试剂混合物。将该溶液与DNA混合物混合,涡旋,在室温下孵育20分钟并加入到HEK-293T细胞中,得到总共含有10%FCS、2mM L-谷氨酰胺的DMEM。24小时后,将培养基用含有10%FCS、2mM L-谷氨酰胺的DMEM替换,以除去剩余的PEI/DNA复合物。在转染后第2天,将含有慢病毒载体的细胞上清液通过0.45 μ m过滤器过滤。如果需要,通过在20%蔗糖垫上以450 $\times$ g离心24小时来纯化载体颗粒。将沉淀重悬于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。对于转导,将 8×10^3 个CHO-EpCAM和SK-OV-3细胞或 2×10^4 Mo1t4.8和Raji细胞接种到96孔板的单个孔中并在第二天转导。需要时,在加入载体之前,用含有不同浓度的巴弗洛霉素A1(Bafilomycin A1)(Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA)的培养基替换细胞培养基,并将细胞在37 $^{\circ}$ C预孵育30分钟。对于滴定,使用至少四个连续稀释的载体颗粒。72小时后,通过流式细胞术测定绿色荧光蛋白(GFP)阳性细胞的百分比。通过选择在稀释因子与GFP阳性细胞数量(转导细胞数/载体体积,以 μ l/0.001表示)之间显示线性相关性的稀释液来计算转导单位/ml(t.u./ml)

[0430] 本发明的假型逆转录病毒样颗粒或逆转录病毒载体的示意图示出于图7和8中。

[0431] 实施例1:CD4⁺T细胞的选择性活化

[0432] 为了激活CD4⁺淋巴细胞而不激活CD8⁺淋巴细胞,生成了VLP,其在MV H蛋白以及融合蛋白(F)上呈现CD4特异性DARPin作为靶向配体并呈现IL-7作为激活结构域,得到4^H/

IL7^H-VLP (包含序列SEQ ID NO:2、14和15的蛋白)。为了生成颗粒,建立了转染方案。简而言之,使用0.45μg的pCG-Hmut-CD4-DARPin (Zhou等人, J Immunol, 2015)、0.45μg的pCG-H Δ 15-IL7 (由Els Verhoeyen提供)、4.7μg的pCG-Fc Δ 30 (Funke等人, Molecular therapy, 2008)、14.4μg的HIV-1包装质粒pCMV Δ R8.9 (Funke等人, Molecular therapy, 2008) 和15.1 μg的pCG-1在一个T175烧瓶中转染HEK293T细胞。收获后,通过超速离心进一步浓缩载体颗粒。获得了LV的滴度为~10⁷tu/ml,获得了VLP的滴度为~1.5μg p24/ml。

[0433] 在新鲜分离的静息T细胞上证实了4^H/IL7^H-VLP的功能。简而言之,使用Pan T细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotech) 通过阴性选择从成人外周血中分离CD3⁺T细胞。随后,在没有任何刺激的情况下将细胞与4^H/IL7^H-VLP一起孵育。三天后,如通过FACS分析CD71活化标记所证实的,细胞培养物中的CD4⁺T细胞而非CD4⁻T细胞被激活 (图3)。呈现IL-7的非靶向颗粒激活CD4⁺T细胞和CD4⁻T细胞。已知IL-7是T细胞存活细胞因子。因此,证明所有呈现IL7的VLP在防止原代T细胞死亡方面与重组人IL-7一样有效,而在常规的IL7缺陷型VLP颗粒的存在下6天后,培养物中放置的大多数静息T细胞死亡 (图4)。

[0434] 呈现IL7的CD4靶向的LV (4^H/IL7^H-LV) 也获得了促进T细胞存活和选择性激活CD4⁺T细胞的能力。如上所述制备病毒颗粒,除了用编码GFP的转移质粒取代pCG-1。另外,为了测试系统的灵活性以及颗粒的功能是否可以通过使用其他形式的Hmut增强,使用编码Hmut-IL7的两种不同的质粒来制备载体。pCG-H Δ 15-IL7是Hmut-IL7的15个氨基酸细胞质截短型 (用于4^H/IL7^{HΔ15}-LV制备), pCG-H Δ 20-IL7是Hmut-IL7的20个氨基酸细胞质截短型 (用于4^H/IL7^{HΔ20}-LV制备)。没有特别指示,用pCG-H Δ 15-IL7制备呈现IL7的VLP和LV。与4^H/IL7^H-VLP所达到的结果相似,当新鲜分离的人CD3⁺T细胞与指定的LV在没有刺激的情况下孵育6天时,与亲本4^H-LV和非靶向Hnse-LV相比,4^H/IL7^H-LV显著促进T细胞存活 (图5)。如所预期的,在rhIL-7处理的阳性组中观察到了最高百分比的活细胞,在VSV-LV转导或未转导 (ut) 组中观察到了最少的存活细胞 (图5)。此外,在选择性刺激混合细胞培养物中的其靶细胞群方面,4^H/IL7^H-LV与4^H/IL7^H-VLP一样有效。如图6所示,4^H/IL7^H-LV选择性地上调激活因子CD69和CD71表达CD4⁺细胞而非CD4⁻细胞。在CD4⁺T细胞刺激方面4^H/IL7^{HΔ15}-LV和4^H/IL7^{HΔ20}-LV之间没有差异。因此,成功生成了功能性呈现IL7的靶向LV。

[0435] 实施例2:将肿瘤特异性嵌合抗原受体递送到静息T细胞中

[0436] 由于IL7呈现载体引发静息T细胞活化,因此预期这些细胞允许慢病毒转导。为了证明这一点,生成了两种版本的4^H/IL7^H-LV递送GFP转基因。如图9所示,4^H/IL7^{HΔ15}-LV和4^H/IL7^{HΔ20}-LV均可有效地且选择性地转导细胞混合物中的静息CD4⁺T细胞。

[0437] 嵌合抗原受体 (CAR) 是癌症治疗的有力工具。到目前为止,对于CAR的遗传递送,必须将T细胞亚群纯化并激活。在此,证明CAR可以选择性地递送到静息CD4⁺细胞中。所述颗粒如实施例1所述产生,不同之处在于pCG-1被编码CAR的转移质粒取代。当静息T细胞用递送4^H/IL7^H-LV的ErbB2特异性嵌合抗原受体 (ErbB2-CAR) 转导时,仅在CD4⁺T细胞群中观察到ErbB2-CAR表达。与IL7缺陷型CD4靶向LV (4^H-LV) 相比,4^H/IL7^H-LV在递送CAR基因方面更有效,同时保留了对CD4⁺T细胞的选择性 (图1)。

[0438] 实施例3:MV糖蛋白可被NiV的MV糖蛋白替代以选择性地激活和转导静息的人CD8⁺T细胞

[0439] 为了有效地用NiV糖蛋白假型化VLP或LV,将NiV-G的细胞质尾部截短34个氨基酸

(Gc Δ 34), 并将NiV-F的细胞质尾部截短22个氨基酸(F Δ 22)。接下来, 通过向Gc Δ 34中引入四个点突变(E501A、W504A、Q530A、E533A), 破坏了Gc Δ 34对于Ephrin-B2/B3的天然受体识别。用该工程化G蛋白假型化的LV完全丧失了与天然Ephrin-B2和Ephrin-B3NiV受体的结合(图2), 并且不进入表达这些受体的细胞中。

[0440] 此外, NiV假型化的LV具有一些有吸引力的特征, 如高产量和对静脉内免疫球蛋白的抗性。由于没有针对NiV的疫苗接种, 并且少数疫情仅限于马来西亚、孟加拉国和印度(SEARO|WHO东南亚地区)的少数病例, 因此人类中不应存在中和抗体。为了证明这一点, 在转导靶细胞之前, 将覆盖了最广泛的人血清供体的静脉注射免疫球蛋白(IVIG; Intratect®)以增加的浓度与NiVwt-LV、NiVmut^{EpCAM}-LV、MV^{EpCAM}-LV和VSV-LV一起孵育。然后在转导后三天通过流式细胞术测定GFP表达。如所预期的, 由VSVG-LV和NiVwt-LV介导的转导不受IVIG处理的影响。另一方面, 在转导率上MV^{EpCAM}-LV显示剂量依赖性降低, 在100 μ g/ml的IVIG下完全中和。相比之下, NiVmut^{EpCAM}-LV在使用的所有浓度下都对IVIG具有抗性, 因此, 与相应的基于MV的载体相比, NiVmut^{EpCAM}-LV对人免疫球蛋白的敏感性低至少10000倍(图10)。这些结果表明, 基于NiV糖蛋白的受体靶向载体在注入人体时不会被中和。

[0441] 因此, 由于NiV-G的上述特征, 进一步使用NiV假型来产生呈现细胞因子的CD8靶向颗粒。这里, 在NiV-G Δ 34mut4上呈现源自OKT8的CD8特异性scFv以产生包膜质粒pCG-Gmut-CD8scFv, 并且在NiV-G Δ 34mut4上呈现人IL7以产生包膜质粒pCG-Gmut-IL7。为了产生8^G/IL7^G-LV, 使用0.45 μ g的pCG-Gmut-CD8scFv、0.45 μ g的pCG-Gmut-IL7、4.7 μ g的pCG-Fc Δ 22、14.4 μ g的HIV-1包装质粒pCMV Δ R8.9和15.1 μ g的转移-LV质粒在一个T175烧瓶中转染HEK293T细胞。获得了LV的滴度为 $\sim 10^7$ tu/ml, 获得了VLP的滴度为 $\sim 1.5 \times 10^6$ vp24/ml。

[0442] 与4^H/IL7^H-LV所达到的结果相似, 8^G/IL7^G-LV(包含序列SEQ ID NO:4、6和16的蛋白)能够选择性地刺激和转导外周血混合物中的CD8⁺T细胞。如图11所示, 当新鲜分离的人CD3⁺T细胞与8^G/IL7^G-LV一起孵育3天时, 不仅培养物中的CD8⁺T细胞亚群上调CD71表达, 而且只有该细胞群有效地表达报告基因转基因GFP(图12)或治疗性转基因CAR19(图13)。此外, 与亲本IL7缺陷型CD8靶向LV(8^G-LV)相比, 8^G/IL7^G-LV在激活靶细胞和递送转基因方面更有效, 而不损害转导CD8⁺T细胞的特异性。

[0443] 实施例4: 鉴定靶向CD8的NiV-G与呈现IL7的NiV-G的最佳比例

[0444] 为了击中更多靶细胞、改善滴度并增强颗粒选择性激活和转导不同细胞群的特异性同时最大限度地降低脱靶效应, 进一步优化转染方案的载体生产, 并仔细确定包装细胞中维持的NiV-G^{靶向结构域}(或MV-H^{靶向结构域})和NiV-G^{功能结构域}(MV-H^{功能结构域})的量。

[0445] 对于8^G/IL7^G-LV的产生, 如实施例3中所述, 使用总量为0.9 μ g的pCG-Gmut质粒以及4.7 μ g的pCG-Fc Δ 22、14.4 μ g的HIV-1包装质粒pCMV Δ R8.9和15.1 μ g的pSEW在一个T175烧瓶中转染HEK293T细胞。同时, 将pCG-Gmut-CD8scFv和pCG-Gmut-IL7质粒以20:1、10:1、5:1、1:1或1:5的不同比例混合。使用含有8^G/IL7^G-LV的各细胞上清液转导CD8⁺Molt或A301细胞, 转导后48小时, 通过FACS测量GFP⁺细胞的百分比以计算滴度。另外, 使用8^G/IL7^G-LV转导新分离的CD3⁺T细胞, 然后测定CD8⁺和CD8⁻细胞中的CD71和GFP表达。将最佳比例确定为滴度最高、在靶群体中CD71和GFP的表达最高且在非靶群体中表达最低。

[0446] 实施例5: 通过呈现IL7的靶向VLP和LV转导的静息T细胞的表征

[0447] T细胞区室是高度异质的, 并且T细胞亚组在表型上和功能上是不同的。就癌症的T

细胞疗法而言,分化细胞较少通常与更好的体内抗肿瘤效果相关。因此,鉴定由本发明载体颗粒激活或修饰的T细胞亚群是重要的。以 $8^G/IL7^G-LV-CAR$ 为例,转导的静息T细胞的表型应与转导的预刺激T细胞(最广泛使用的CD3/CD28刺激方案)进行比较。简而言之,在转导静息CD3⁺T细胞或预刺激的CD3⁺T细胞后3天,监测多种T细胞标志物的表达,包括CD11a、CD11b、CD25、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD69、CD71、CD95、CD127和CCR7。选择这些分子是因为它们过去曾用于区分CD45RA⁺CD45RO⁻CD62L^高CD95⁻CD27^高CCR7^高天然T细胞(T_N)、CD45RA⁺CD45RO⁻CD62L^高CD95⁺CD27^高CCR7^高干细胞记忆T细胞(T_{SCM})、CD45RA⁻CD45RO^高CD62L⁺CD95⁺CD27⁺中枢记忆T细胞(T_{CM})、CD45RA^{-/+}CD45RO^高CD62L⁻CD95⁺CD27^{-/+}CCR7⁻效应记忆T细胞(T_{EM})和CD45RA^{-/+}CD45RO⁺CD62L⁻CD95^高CD27⁻CD28⁻CCR7⁻效应T细胞(T_E)。通过流式细胞术分析CAR⁺T细胞的表型。

[0448] 另外,预先分选的CD4⁺T细胞亚群(T_{SCM}、T_{CM}、T_{EM}和T_E)例如与 $4^H/IL7^H-VLP$ 一起孵育,以证明本发明对T细胞活化优于传统TCR刺激的优势。简言之,在用 $4^H/IL7^H-VLP$ 孵育或用CD3/28抗体刺激后3天,分析上述T细胞亚群的表型偏度和活化水平。预期呈现IL7的T细胞靶向载体颗粒激活并转导分化程度较低的T细胞。

[0449] 实施例6:增强离体产生的CART细胞的功能并简化CART细胞生产程序

[0450] 已证明过继性T细胞免疫疗法是临床上用于治疗多种类型疾病的有效方案。但是,其更广泛的应用受到几个问题的限制。一方面,由于体外刺激、长期扩增和细胞分离和纯化,CAR工程化或TCR工程化T细胞的生产是非常昂贵且劳动密集的。另一方面,体外扩增的效应T细胞通常在体内持续性不佳,并且不能表现出持久的抗肿瘤效果。本发明通过将细胞刺激和基因转移结合在单一步骤中并实现静息T细胞转导,为这些挑战提供了潜在的解决方案。使用本发明,可以显著简化T细胞生产过程,从而降低T细胞生产的成本。此外,与常规产生的细胞相比,由于如实施例5中所证明的有效工程化的低分化细胞的潜力,本发明产生的CAR/TCR工程化T细胞在体内可以更有效。

[0451] 为了证明这些特征,用例如 $8^G/IL7^G-LV-CAR$ 或VSV-LV-CAR作为对照转导新鲜分离的人PBMC或CD8⁺T细胞。同时,根据最广泛使用的方案,并行制备常规CAR T细胞。简而言之,用CD3/CD28抗体和IL2刺激来自相同供体的分离的人PBMC或CD8⁺T细胞。然后用 $8^G/IL7^G-LV-CAR$ 或VSV-LV-CAR转导细胞,然后在IL2的存在下扩增10天。载体转导静息T细胞后2-3天或转导刺激的T细胞后12天,将这些细胞与靶肿瘤细胞体外共培养或将这些细胞注入带有肿瘤的人源化小鼠中。然后,评估体外肿瘤细胞裂解和体内肿瘤缓解、动物存活、肿瘤反应性T细胞持久性和增殖。

[0452] 实施例7:在类似体内的条件下通过呈现IL7的靶向颗粒选择性活化和转导

[0453] 在下一步中,研究了使用病毒颗粒靶向和功能修饰体内环境中的不同细胞的可行性。因此,用病毒颗粒,例如用 $G^8/G^{IL7}-LV$ 转导新鲜人外周血。这允许在活动人补体系统(病毒颗粒在体内遇到的障碍)的存在下评估CD8⁺T细胞群中的靶向活化和基因转移。

[0454] 简而言之,将新鲜外周血与 $8^G/IL7^G-LV-GFP$ 或其他对照载体(VSV-LV、 $8^H/IL7^H-LV$ 、 8^G-LV 或VSV/IL7^G-LV)一起孵育6-8小时。然后,从血液中分离总PBMC并在T细胞培养基中进一步培养,不添加任何刺激性试剂。3-4天后,评估培养物中的CD8⁺和CD8⁻细胞的CD71和GFP表达。为了确认稳定的基因转移,在分析GFP⁺细胞的百分比之前,将一小部分细胞转移到补充有CD3/CD28抗体和IL2的培养基中另外3天。

[0455] 实施例8: 呈现IL7的靶向颗粒选择性激活和转导人源化小鼠模型中的循环静息T细胞

[0456] 为了证明根据本发明的颗粒能够在体内局部地或系统地应用以允许细胞类型特异性激活或修饰,将它们应用于被植入来自健康供体的人CD34⁺造血干细胞(HSC)的小鼠中。在该小鼠模型中,可以产生多系人造血细胞,并且小鼠宿主可以耐受这些细胞。

[0457] 这里,以将G⁸/G^{IL7}-假型化颗粒应用于人CD8⁺T细胞活化和修饰为例。简而言之,在通过检测到约10%的人CD3⁺T细胞证实成功建立了人免疫系统后,通过静脉内注射(iv)全身施用G⁸/G^{IL7}-假型化颗粒或通过脾内或胸内注射局部施用。注射G⁸/G^{IL7}-VLP以评估体内选择性激活人CD8⁺T细胞的可行性。在该实验设置中,在VLP注射后的不同时间点分析活化水平/持续时间和CD8⁺T细胞增殖。注射G⁸/G^{IL7}-LV-GFP以评估体内基因递送的功能。在该实验设置中,在LV注射后的不同时间点分析GFP表达、转导细胞的表型及其增殖和持久性。注射G⁸/G^{IL7}-LV-CAR以评估治疗性基因递送和体内产生CAR⁺T细胞的可行性。在该实验设置中,在LV注射后的不同时间点分析CAR表达、转导细胞的表型、在存在/不存在靶肿瘤细胞/抗原的情况下转导细胞的增殖和持久性、局部/全身肿瘤的消除。

[0458] 实施例9: 选择性激活恒河猴CD4⁺T细胞

[0459] 非人类灵长类动物(NHP)的细胞在表型上与人类T细胞相似,使其成为人类免疫和免疫疗法的最佳动物模型。就T细胞疗法而言,NHP模型在预测潜在药物的效果、剂量、应用途径和安全性方面可能更可靠。因此,非常需要一种在NHP中特异性修饰或诱导不同细胞类型的功能变化的工具。

[0460] 这里,作为一个实例详细描述了用于恒河猴的4^H/IL7^H-SIV载体及其应用。首先,将恒河猴CD4特异性DARPin57.2(CD4^{D57.2})用作Hmut蛋白上呈现的靶向结构域(H-CD4^{D57.2}),将恒河猴反应性IL7用作Hmut上呈现的功能结构域(H-rmIL7)。然后使用上述两种H蛋白(例如用实施例4中测定的比例)假型化猿免疫缺陷病毒mac 251(SIVmac251)衍生的LV。在通过P27ELISA/Nano-sight确定载体产量和滴度并转导CD4⁺猴细胞后,用递送GFP或CAR的4^H/IL7^H-SIV转导新鲜分离的猴CD3⁺T细胞。然后,如上所述测定CD4⁺与CD4⁻T细胞中的激活因子和转基因表达。接下来,在NHP模型中评估体内应用的可能性。为此目的,将单剂量的载体缓慢注射到每只登记动物(例如恒河猴)的两个腋窝淋巴结中。注射后一周,收集血样并通过手术取出两个注射后淋巴结中的一个并解离成单细胞悬浮液。进行详细分析以分析体内转导的T细胞的表型、特异性激活、转基因表达水平和/或功能(当递送治疗性转基因时)。此外,第二淋巴结接受了第二剂量的相同载体,并监测登记动物六个月,以评估体内转导的T细胞的增殖、持久性和/或功能(当递送治疗性转基因时)。

[0461] 实施例10: 在免疫活性小鼠模型中选择性活化和扩增抗原特异性T细胞

[0462] 在免疫活性小鼠黑色素瘤肿瘤模型中可以很好地评估靶向细胞因子在疾病部位起作用同时避免全身毒性的可能性。以呈现IL12的鼠CD8靶向的VLP(m8^G/mIL12^G-VLP)为例。以往的研究表明,IL12应用可以增强转移的肿瘤反应性T细胞耐受性和抗肿瘤效果,但它在全身上是非常有毒的。为了克服这个缺点,在我们的研究中,使用m8^G/mIL12^G-VLP控制IL12在肿瘤部位发生功能。用B16/OVA黑色素瘤细胞移植野生型C57/B16小鼠,肿瘤建立后,通过照射处理小鼠并用从C57/B160T-I转基因小鼠分离的T细胞转移。在OT-I⁺T细胞移植后,用m8^G/mIL12^G-VLP或用鼠IL12通过静脉内注射处理小鼠,或用PBS作为对照。分析肿瘤体积、

OT-I T细胞的体内持久性和功能以及小鼠存活率。

[0463] 实施例11:人CD4⁺T细胞的体内靶向靶向激活。

[0464] 为了评价MV-4^H/IL7^H-LV激活人CD4⁺T细胞的体内性能,将CD3⁺脐带血T细胞植入NOD/SCID gc^{-/-} (NSG) 小鼠。每周测定血液中的hT细胞重建。当检测到20%的hT细胞(% hCD3⁺细胞/总hCD45⁺+mCD45⁺细胞)时,用1E6IUMV-4^H/IL7^H-LV或MV-4^H-LV静脉内注射小鼠。注射载体后两周,处死小鼠并分离脾细胞和外周血单核细胞。值得注意的是,与MV-4^H-LV (8%CD4+CD71+细胞)相比,在MV-4^H/IL7^H-LV (25%CD4+CD71+细胞)的情况下,发现了由人CD4⁺T细胞的CD71晚期激活标记物揭示的更强的特异性IL-7活化(图14)。此外,代表CD8⁺T细胞的CD4⁻T细胞显示两种靶向载体的CD71表达相同。后者强调IL-7存活信号仅激活靶向的CD4⁺T细胞而不激活CD8⁺细胞。

[0465] 总之,用MV-4^H/IL7^H-LV实现了靶细胞的体外特异性活化后,在人血液系统小鼠模型中体内证实了MV-4^H/IL7^H-LV对CD4⁺T细胞的特异性活化。

序列表

<110>	里昂高等师范学院 (ENS LYON)	
	国家科学研究中心 (CNRS)	
	里昂第一大学 (UCBL)	
	国家医疗保健研究所 (INSERM)	
<120>	用于选择性地调节细胞的不同亚型的活性的方法	
<130>	BET 17L1339	
<150>	EP16305468.7	
<151>	2016-04-21	
<160>	16	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	2217	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	截短且突变的 (Y481A、R533A、S548L、F549S) MV H蛋白 (Hc Δ 18), 其与对人CD4具有特异性的设计的锚蛋白重复蛋白 (DARPin)-29.2融合	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1) .. (2217)	
<400>	1	
	atg gga agt agg ata gtc att aac aga gaa cat ctt atg att gat aga	48
	Met Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg	
	1 5 10 15	
	cct tat gtt ttg ctg gct gtt ctg ttt gtc atg ttt ctg agc ttg atc	96
	Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Phe Leu Ser Leu Ile	
	20 25 30	
	ggg ttg cta gcc att gca gga att cga ctt cat cgg gca gcc atc tac	144
	Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala Ala Ile Tyr	
	35 40 45	
	acc gca gag atc cat aaa agc ctc agc acc aat cta gat gta act aac	192
	Thr Ala Glu Ile His Lys Ser Leu Ser Thr Asn Leu Asp Val Thr Asn	
	50 55 60	
	tca atc gag cat cag gtc aag gac gtg ctg aca cca ctc ttc aaa atc	240
	Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu Phe Lys Ile	
	65 70 75 80	

atc ggt gat gaa gtg ggc ctg agg aca cct cag aga ttc act gac cta	288
Ile Gly Asp Glu Val Gly Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe Thr Asp Leu	
85 90 95	
gtg aaa ttc atc tct gac aag att aaa ttc ctt aat ccg gat agg gag	336
Val Lys Phe Ile Ser Asp Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro Asp Arg Glu	
100 105 110	
tac gac ttc aga gat ctc act tgg tgt atc aac ccg cca gag aga atc	384
Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro Glu Arg Ile	
115 120 125	
aaa ttg gat tat gat caa tac tgt gca gat gtg gct gct gaa gag ctc	432
Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala Glu Glu Leu	
130 135 140	
atg aat gca ttg gtg aac tca act cta ctg gag acc aga aca acc aat	480
Met Asn Ala Leu Val Asn Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg Thr Thr Asn	
145 150 155 160	
cag ttc cta gct gtc tca aag gga aac tgc tca ggg ccc act aca atc	528
Gln Phe Leu Ala Val Ser Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro Thr Thr Ile	
165 170 175	
aga ggt caa ttc tca aac atg tcg ctg tcc ctg tta gac ttg tat tta	576
Arg Gly Gln Phe Ser Asn Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp Leu Tyr Leu	
180 185 190	
ggt cga ggt tac aat gtg tca tct ata gtc act atg aca tcc cag gga	624
Gly Arg Gly Tyr Asn Val Ser Ser Ile Val Thr Met Thr Ser Gln Gly	
195 200 205	
atg tat ggg gga act tac cta gtg gaa aag cct aat ctg agc agc aaa	672
Met Tyr Gly Gly Thr Tyr Leu Val Glu Lys Pro Asn Leu Ser Ser Lys	
210 215 220	
agg tca gag ttg tca caa ctg agc atg tac cga gtg ttt gaa gta ggt	720
Arg Ser Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Tyr Arg Val Phe Glu Val Gly	
225 230 235 240	
gtt atc aga aat ccg ggt ttg ggg gct ccg gtg ttc cat atg aca aac	768
Val Ile Arg Asn Pro Gly Leu Gly Ala Pro Val Phe His Met Thr Asn	
245 250 255	
tat ctt gag caa cca gtc agt aat gat ctc agc aac tgt atg gtg gct	816
Tyr Leu Glu Gln Pro Val Ser Asn Asp Leu Ser Asn Cys Met Val Ala	
260 265 270	
ttg ggg gag ctc aaa ctc gca gcc ctt tgt cac ggg gaa gat tct atc	864
Leu Gly Glu Leu Lys Leu Ala Ala Leu Cys His Gly Glu Asp Ser Ile	
275 280 285	

aca att ccc tat cag gga tca ggg aaa ggt gtc agc ttc cag ctc gtc	912
Thr Ile Pro Tyr Gln Gly Ser Gly Lys Gly Val Ser Phe Gln Leu Val	
290 295 300	
aag cta ggt gtc tgg aaa tcc cca acc gac atg caa tcc tgg gtc ccc	960
Lys Leu Gly Val Trp Lys Ser Pro Thr Asp Met Gln Ser Trp Val Pro	
305 310 315 320	
tta tca acg gat gat cca gtg ata gac agg ctt tac ctc tca tct cac	1008
Leu Ser Thr Asp Asp Pro Val Ile Asp Arg Leu Tyr Leu Ser Ser His	
325 330 335	
aga ggt gtt atc gct gac aac caa gca aaa tgg gct gtc ccg aca aca	1056
Arg Gly Val Ile Ala Asp Asn Gln Ala Lys Trp Ala Val Pro Thr Thr	
340 345 350	
cga aca gat gac aag ttg cga atg gag aca tgc ttc caa cag gcg tgt	1104
Arg Thr Asp Asp Lys Leu Arg Met Glu Thr Cys Phe Gln Gln Ala Cys	
355 360 365	
aag ggt aaa atc caa gca ctc tgc gag aat ccc gag tgg gca cca ttg	1152
Lys Gly Lys Ile Gln Ala Leu Cys Glu Asn Pro Glu Trp Ala Pro Leu	
370 375 380	
aag gat aac agg att cct tca tac ggg gtc ttg tct gtt gat ctg agt	1200
Lys Asp Asn Arg Ile Pro Ser Tyr Gly Val Leu Ser Val Asp Leu Ser	
385 390 395 400	
ctg aca gtt gag ctt aaa atc aaa att gct tcg gga ttc ggg cca ttg	1248
Leu Thr Val Glu Leu Lys Ile Lys Ile Ala Ser Gly Phe Gly Pro Leu	
405 410 415	
atc aca cac ggt tca ggg atg gac cta tac aaa tcc aac cac aac aat	1296
Ile Thr His Gly Ser Gly Met Asp Leu Tyr Lys Ser Asn His Asn Asn	
420 425 430	
gtg tat tgg ctg act atc ccg cca atg aag aac cta gcc tta ggt gta	1344
Val Tyr Trp Leu Thr Ile Pro Pro Met Lys Asn Leu Ala Leu Gly Val	
435 440 445	
atc aac aca ttg gag tgg ata ccg aga ttc aag gtt agt ccc gca ctc	1392
Ile Asn Thr Leu Glu Trp Ile Pro Arg Phe Lys Val Ser Pro Ala Leu	
450 455 460	
ttc act gtc cca att aag gaa gca ggc gga gac tgc cat gcc cca aca	1440
Phe Thr Val Pro Ile Lys Glu Ala Gly Gly Asp Cys His Ala Pro Thr	
465 470 475 480	
tac cta cct gcg gag gtg gat ggt gat gtc aaa ctc agt tcc aat ctg	1488
Tyr Leu Pro Ala Glu Val Asp Gly Asp Val Lys Leu Ser Ser Asn Leu	
485 490 495	

gtg att cta cct ggt caa gat ctc caa tat gtt ttg gca acc tac gat	1536
Val Ile Leu Pro Gly Gln Asp Leu Gln Tyr Val Leu Ala Thr Tyr Asp	
500 505 510	
act tcc gcg gtt gaa cat gct gtg gtt tat tac gtt tac agc cca agc	1584
Thr Ser Ala Val Glu His Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr Ser Pro Ser	
515 520 525	
cgc cta tcg tct tac ttt tat cct ttt agg ttg cct ata aag ggg gtc	1632
Arg Leu Ser Ser Tyr Phe Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile Lys Gly Val	
530 535 540	
ccc atc gaa tta caa gtg gaa tgc ttc aca tgg gac caa aaa ctc tgg	1680
Pro Ile Glu Leu Gln Val Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln Lys Leu Trp	
545 550 555 560	
tgc cgt cac ttc tgt gtg ctt gcg gac tca gaa tct ggt gga cat atc	1728
Cys Arg His Phe Cys Val Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly Gly His Ile	
565 570 575	
act cac tct ggg atg gtg ggc atg gga gtc agc tgc aca gtc acc cgg	1776
Thr His Ser Gly Met Val Gly Met Gly Val Ser Cys Thr Val Thr Arg	
580 585 590	
gaa gat gga acc aat gcg gcc cag ccg gcc gac ctg ggt aag aaa ctg	1824
Glu Asp Gly Thr Asn Ala Ala Gln Pro Ala Asp Leu Gly Lys Lys Leu	
595 600 605	
ctg gaa gct gct cgt gct ggt cag gac gac gaa gtt cgt atc ctg atg	1872
Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met	
610 615 620	
gct aac ggt gct gac gtt aac gct act gac act ctt ggt cgt act ccg	1920
Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Thr Asp Thr Leu Gly Arg Thr Pro	
625 630 635 640	
cta cac ctg gct gct cag aat ggt cac ctg gaa atc gtt gaa gtt ctg	1968
Leu His Leu Ala Ala Gln Asn Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu	
645 650 655	
ctg aag cac agt gct gac gtt aac gct att gaa gag gtt ggt atg act	2016
Leu Lys His Ser Ala Asp Val Asn Ala Ile Glu Glu Val Gly Met Thr	
660 665 670	
ccg ctg cac ctg gct gtt gtt gct ggt cac ctg gaa atc gtt gaa gtt	2064
Pro Leu His Leu Ala Val Val Ala Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val	
675 680 685	
ctg ctg aag aac ggt gct gac gtt aac gct cag gac aaa ttc ggt aag	2112
Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys	
690 695 700	

acc gct ttc gac atc tcc atc gac tac ggt aac gag gac ctg gct gaa	2160
Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Tyr Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu	
705 710 715 720	
atc ctg caa aag ctt aat gcg gcc gca aga ggt tct cat cac cat cac	2208
Ile Leu Gln Lys Leu Asn Ala Ala Ala Arg Gly Ser His His His His	
725 730 735	
cat cac taa	2217
His His	
<210> 2	
<211> 738	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建体	
<400> 2	
Met Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg	
1 5 10 15	
Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Phe Leu Ser Leu Ile	
20 25 30	
Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala Ala Ile Tyr	
35 40 45	
Thr Ala Glu Ile His Lys Ser Leu Ser Thr Asn Leu Asp Val Thr Asn	
50 55 60	
Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu Phe Lys Ile	
65 70 75 80	
Ile Gly Asp Glu Val Gly Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe Thr Asp Leu	
85 90 95	
Val Lys Phe Ile Ser Asp Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro Asp Arg Glu	
100 105 110	
Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro Glu Arg Ile	
115 120 125	
Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala Glu Glu Leu	
130 135 140	
Met Asn Ala Leu Val Asn Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg Thr Thr Asn	
145 150 155 160	
Gln Phe Leu Ala Val Ser Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro Thr Thr Ile	
165 170 175	
Arg Gly Gln Phe Ser Asn Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp Leu Tyr Leu	
180 185 190	

Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Val	Ser	Ser	Ile	Val	Thr	Met	Thr	Ser	Gln	Gly
195								200						205	
Met	Tyr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Leu	Val	Glu	Lys	Pro	Asn	Leu	Ser	Ser	Lys
210							215					220			
Arg	Ser	Glu	Leu	Ser	Gln	Leu	Ser	Met	Tyr	Arg	Val	Phe	Glu	Val	Gly
225					230					235					240
Val	Ile	Arg	Asn	Pro	Gly	Leu	Gly	Ala	Pro	Val	Phe	His	Met	Thr	Asn
				245					250					255	
Tyr	Leu	Glu	Gln	Pro	Val	Ser	Asn	Asp	Leu	Ser	Asn	Cys	Met	Val	Ala
				260				265					270		
Leu	Gly	Glu	Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	His	Gly	Glu	Asp	Ser	Ile
				275				280					285		
Thr	Ile	Pro	Tyr	Gln	Gly	Ser	Gly	Lys	Gly	Val	Ser	Phe	Gln	Leu	Val
290							295						300		
Lys	Leu	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Pro	Thr	Asp	Met	Gln	Ser	Trp	Val	Pro
305					310					315					320
Leu	Ser	Thr	Asp	Asp	Pro	Val	Ile	Asp	Arg	Leu	Tyr	Leu	Ser	Ser	His
				325					330					335	
Arg	Gly	Val	Ile	Ala	Asp	Asn	Gln	Ala	Lys	Trp	Ala	Val	Pro	Thr	Thr
				340					345					350	
Arg	Thr	Asp	Asp	Lys	Leu	Arg	Met	Glu	Thr	Cys	Phe	Gln	Gln	Ala	Cys
				355				360					365		
Lys	Gly	Lys	Ile	Gln	Ala	Leu	Cys	Glu	Asn	Pro	Glu	Trp	Ala	Pro	Leu
				370			375					380			
Lys	Asp	Asn	Arg	Ile	Pro	Ser	Tyr	Gly	Val	Leu	Ser	Val	Asp	Leu	Ser
385					390					395					400
Leu	Thr	Val	Glu	Leu	Lys	Ile	Lys	Ile	Ala	Ser	Gly	Phe	Gly	Pro	Leu
				405					410					415	
Ile	Thr	His	Gly	Ser	Gly	Met	Asp	Leu	Tyr	Lys	Ser	Asn	His	Asn	Asn
				420				425					430		
Val	Tyr	Trp	Leu	Thr	Ile	Pro	Pro	Met	Lys	Asn	Leu	Ala	Leu	Gly	Val
				435				440					445		
Ile	Asn	Thr	Leu	Glu	Trp	Ile	Pro	Arg	Phe	Lys	Val	Ser	Pro	Ala	Leu
				450			455				460				
Phe	Thr	Val	Pro	Ile	Lys	Glu	Ala	Gly	Gly	Asp	Cys	His	Ala	Pro	Thr
465					470					475					480
Tyr	Leu	Pro	Ala	Glu	Val	Asp	Gly	Asp	Val	Lys	Leu	Ser	Ser	Asn	Leu
				485					490					495	
Val	Ile	Leu	Pro	Gly	Gln	Asp	Leu	Gln	Tyr	Val	Leu	Ala	Thr	Tyr	Asp

500	505	510
Thr Ser Ala Val Glu His Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr Ser Pro Ser		
515	520	525
Arg Leu Ser Ser Tyr Phe Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile Lys Gly Val		
530	535	540
Pro Ile Glu Leu Gln Val Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln Lys Leu Trp		
545	550	555
Cys Arg His Phe Cys Val Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly Gly His Ile		
565	570	575
Thr His Ser Gly Met Val Gly Met Gly Val Ser Cys Thr Val Thr Arg		
580	585	590
Glu Asp Gly Thr Asn Ala Ala Gln Pro Ala Asp Leu Gly Lys Lys Leu		
595	600	605
Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met		
610	615	620
Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Thr Asp Thr Leu Gly Arg Thr Pro		
625	630	635
Leu His Leu Ala Ala Gln Asn Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu		
645	650	655
Leu Lys His Ser Ala Asp Val Asn Ala Ile Glu Glu Val Gly Met Thr		
660	665	670
Pro Leu His Leu Ala Val Val Ala Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val		
675	680	685
Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys		
690	695	700
Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Tyr Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu		
705	710	715
Ile Leu Gln Lys Leu Asn Ala Ala Ala Arg Gly Ser His His His His		
725	730	735

His His

<210> 3

<211> 2529

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 截短且突变的 (E501A、W504、Q530A、E533A) NiV G蛋白
(Gc Δ 34), 其与针对人CD8的单链抗体 (scFvC8-Vh1) 融合,
用另外的 (G4S) 3接头连接。

<220>

gag ggc tac ttc gcc tac agc cac ctg gaa cgg atc ggc agc tgc agc	624
Glu Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Arg Ile Gly Ser Cys Ser	
195 200 205	
agg ggc gtg tcc aag cag cgg atc atc ggc gtg ggc gag gtg ctg gac	672
Arg Gly Val Ser Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu Asp	
210 215 220	
cgg ggc gac gag gtg ccc agc ctg ttc atg acc aac gtg tgg acc ccc	720
Arg Gly Asp Glu Val Pro Ser Leu Phe Met Thr Asn Val Trp Thr Pro	
225 230 235 240	
ccc aac ccc aac acc gtg tac cac tgc agc gcc gtg tac aac aac gag	768
Pro Asn Pro Asn Thr Val Tyr His Cys Ser Ala Val Tyr Asn Asn Glu	
245 250 255	
ttc tac tac gtg ctg tgc gcc gtg agc acc gtg ggc gac ccc atc ctg	816
Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile Leu	
260 265 270	
aac agc acc tac tgg tcc ggc agc ctg atg atg acc cgg ctg gcc gtg	864
Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala Val	
275 280 285	
aag cct aag agc aat ggc ggc gga tac aac cag cac cag ctg gcc ctg	912
Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala Leu	
290 295 300	
cgg agc atc gag aag ggc aga tac gac aaa gtg atg ccc tac ggc ccc	960
Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro	
305 310 315 320	
agc ggc atc aag cag ggc gac aca ctg tac ttc ccc gcc gtg ggc ttc	1008
Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe	
325 330 335	
ctg gtc cgg acc gag ttc aag tac aac gac agc aac tgc ccc atc acc	1056
Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Thr	
340 345 350	
aag tgc cag tac agc aag ccc gag aac tgc aga ctg agc atg ggc atc	1104
Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Ile	
355 360 365	
cgg ccc aac agc cac tac atc ctg cgg agc ggc ctg ctg aag tac aac	1152
Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn	
370 375 380	
ctg agc gac ggc gag aac ccc aaa gtc gtc ttt att gag atc agc gac	1200
Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro Lys Val Val Phe Ile Glu Ile Ser Asp	
385 390 395 400	

cag cgg ctg tcc atc ggc agc ccc agc aag atc tac gac agc ctg ggc	1248
Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu Gly	
405 410 415	
cag ccc gtg ttc tac cag gcc agc ttc agc tgg gac acc atg atc aag	1296
Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys	
420 425 430	
ttc ggc gac gtg ctg acc gtg aac ccc ctg gtg gtg aac tgg cgg aac	1344
Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg Asn	
435 440 445	
aat acc gtg atc agc aga ccc ggc cag agc cag tgc ccc cgg ttc aac	1392
Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn	
450 455 460	
acc tgc ccc gcg atc tgc gcg gag ggc gtg tac aac gac gcc ttc ctg	1440
Thr Cys Pro Ala Ile Cys Ala Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe Leu	
465 470 475 480	
atc gac cgg atc aac tgg atc tct gcc ggc gtg ttc ctg gac tcc aac	1488
Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser Asn	
485 490 495	
gcg acc gcc gcg aat ccc gtg ttc acc gtg ttt aag gac aac gag atc	1536
Ala Thr Ala Ala Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile	
500 505 510	
ctg tac cgg gcc cag ctg gcc agc gag gac acc aac gcc cag aaa acc	1584
Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr	
515 520 525	
atc acc aac tgc ttt ctg ctg aag aac aag atc tgg tgc atc agc ctg	1632
Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser Leu	
530 535 540	
gtg gag atc tac gat acc ggc gac aac gtg atc agg ccc aag ctg ttc	1680
Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe	
545 550 555 560	
gcc gtg aag atc ccc gag cag tgc acc ggt gga ggt ggc tct ggt gga	1728
Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
565 570 575	
gga ggc tct gga ggt ggt gga tca gcg gcc cag ccg gcc cag gtg cag	1776
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Gln Pro Ala Gln Val Gln	
580 585 590	
ctg gtg cag agc gga gcc gag gat aag aaa cct ggc gct agc gtg aag	1824
Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Asp Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys	
595 600 605	

gtg tcc tgc aag gcc agc ggc ttc aac atc aag gac acc tac atc cac	1872
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His	
610 615 620	
tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg gaa tgg atg ggc cgg atc	1920
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile	
625 630 635 640	
gac ccc gcc aac gac aac acc ctg tac gcc agc aag ttc cag ggc aga	1968
Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg	
645 650 655	
gtg acc atc acc gcc gac acc agc agc aac acc gcc tac atg gaa ctg	2016
Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu	
660 665 670	
agc agc ctg aga agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgt ggc aga ggc	2064
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly	
675 680 685	
tac ggc tac tac gtg ttc gac cac tgg ggc cag ggc acc acc gtg aca	2112
Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr	
690 695 700	
gtg tct agc ggc gga ggc gga agt gga ggc gga gga agc gga ggc ggc	2160
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
705 710 715 720	
gga tcc gac atc gtg atg acc cag agc cct agc agc ctg tct gcc agc	2208
Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser	
725 730 735	
gtg ggc gac cgc gtg acc att acc tgc cgg acc agc cgg tcc atc agc	2256
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser	
740 745 750	
cag tac ctg gcc tgg tat cag gaa aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg	2304
Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu	
755 760 765	
ctg atc tac agc ggc agc acc ctg cag agc ggc gtg cca agc aga ttc	2352
Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe	
770 775 780	
agc ggc agc ggc tcc gcc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg	2400
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu	
785 790 795 800	
cag ccc gag gac ttc gcc acc tac tac tgc cag cag cac aac gag aac	2448
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn	
805 810 815	

ccc ctg acc ttc ggg cag gga aca aag gtg gag atc aag aga gcg gcc	2496
Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala	
820 825 830	
gca aga ggt tct cat cac cat cac cat cac taa	2529
Ala Arg Gly Ser His His His His His His	
835 840	
<210> 4	
<211> 842	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建体	
<400> 4	
Met Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser Ala	
1 5 10 15	
Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val Met	
20 25 30	
Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln Ala	
35 40 45	
Val Ile Lys Asp Ala Leu Gln Gly Ile Gln Gln Gln Ile Lys Gly Leu	
50 55 60	
Ala Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp	
65 70 75 80	
Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser	
85 90 95	
Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ala Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Glu Lys	
100 105 110	
Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser	
115 120 125	
Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Gln Thr Glu Gly	
130 135 140	
Val Ser Asn Leu Val Gly Leu Pro Asn Asn Ile Cys Leu Gln Lys Thr	
145 150 155 160	
Ser Asn Gln Ile Leu Lys Pro Lys Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro Val	
165 170 175	
Val Gly Gln Ser Gly Thr Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Met Asp	
180 185 190	
Glu Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Arg Ile Gly Ser Cys Ser	
195 200 205	

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

515	520	525
Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser Leu		
530	535	540
Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe		
545	550	555
Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
565	570	575
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Gln Pro Ala Gln Val Gln		
580	585	590
Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Asp Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys		
595	600	605
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His		
610	615	620
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile		
625	630	635
Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg		
645	650	655
Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu		
660	665	670
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly		
675	680	685
Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		
690	695	700
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
705	710	715
Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser		
725	730	735
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser		
740	745	750
Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
755	760	765
Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe		
770	775	780
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu		
785	790	795
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn		
805	810	815
Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala		
820	825	830

Ala Arg Gly Ser His His His His His His

835

840

<210> 5

<211> 2211

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 截短且突变的 (E501A、W504、Q530A、E533A)NiV G蛋白

(Gc Δ 34), 其与IL-7融合。

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (2211)

<400> 5

atg aag aag atc aac gag ggc ctg ctg gac agc aag atc ctg agc gcc 48

Met Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser Ala

1 5 10 15

ttc aac acc gtg atc gcc ctg ctg ggc agc atc gtg atc att gtg atg 96

Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val Met

20 25 30

aac atc atg atc atc cag aac tac acc aga agc acc gac aac cag gcc 144

Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln Ala

35 40 45

gtg atc aag gac gct ctc cag ggg atc cag cag cag atc aag ggc ctg 192

Val Ile Lys Asp Ala Leu Gln Gly Ile Gln Gln Gln Ile Lys Gly Leu

50 55 60

gcc gac aag atc ggc acc gag atc ggc ccc aag gtg tcc ctg atc gac 240

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

65 70 75 80

acc agc agc acc atc acc atc ccc gcc aac atc ggc ctg ctg ggg tcc 288

Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser

85 90 95

aag atc agc cag agc acc gcc agc atc aac gag aac gtg aac gag aag 336

Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ala Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Glu Lys

100 105 110

tgc aag ttc acc ctg ccc ccc ctg aag atc cac gag tgc aac atc agc 384

Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser

115 120 125

tgc ccc aac ccc ctg ccc ttc cgg gag tac cgg ccc cag acc gag ggc 432

Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Gln Thr Glu Gly

130	135	140	
gtg agc aac ctg gtc ggc ctg ccc aac aac atc tgc ctg cag aaa acc			480
Val Ser Asn Leu Val Gly Leu Pro Asn Asn Ile Cys Leu Gln Lys Thr			
145	150	155	160
agc aac cag atc ctg aag ccc aag ctc att tcc tac acc ctg ccc gtg			528
Ser Asn Gln Ile Leu Lys Pro Lys Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro Val			
165	170	175	
gtg ggc cag agc ggc acc tgc atc acc gac ccc ctg ctg gcc atg gac			576
Val Gly Gln Ser Gly Thr Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Met Asp			
180	185	190	
gag ggc tac ttc gcc tac agc cac ctg gaa cgg atc ggc agc tgc agc			624
Glu Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Arg Ile Gly Ser Cys Ser			
195	200	205	
agg ggc gtg tcc aag cag cgg atc atc ggc gtg ggc gag gtg ctg gac			672
Arg Gly Val Ser Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu Asp			
210	215	220	
cgg ggc gac gag gtg ccc agc ctg ttc atg acc aac gtg tgg acc ccc			720
Arg Gly Asp Glu Val Pro Ser Leu Phe Met Thr Asn Val Trp Thr Pro			
225	230	235	240
ccc aac ccc aac acc gtg tac cac tgc agc gcc gtg tac aac aac gag			768
Pro Asn Pro Asn Thr Val Tyr His Cys Ser Ala Val Tyr Asn Asn Glu			
245	250	255	
ttc tac tac gtg ctg tgc gcc gtg agc acc gtg ggc gac ccc atc ctg			816
Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile Leu			
260	265	270	
aac agc acc tac tgg tcc ggc agc ctg atg atg acc cgg ctg gcc gtg			864
Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala Val			
275	280	285	
aag cct aag agc aat ggc ggc gga tac aac cag cac cag ctg gcc ctg			912
Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala Leu			
290	295	300	
cgg agc atc gag aag ggc aga tac gac aaa gtg atg ccc tac ggc ccc			960
Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro			
305	310	315	320
agc ggc atc aag cag ggc gac aca ctg tac ttc ccc gcc gtg ggc ttc			1008
Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe			
325	330	335	
ctg gtc cgg acc gag ttc aag tac aac gac agc aac tgc ccc atc acc			1056
Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Thr			

340	345	350	
aag tgc cag tac agc aag ccc gag aac tgc aga ctg agc atg ggc atc			1104
Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Ile			
355	360	365	
cgg ccc aac agc cac tac atc ctg cgg agc ggc ctg ctg aag tac aac			1152
Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn			
370	375	380	
ctg agc gac ggc gag aac ccc aaa gtc gtc ttt att gag atc agc gac			1200
Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro Lys Val Val Phe Ile Glu Ile Ser Asp			
385	390	395	400
cag cgg ctg tcc atc ggc agc ccc agc aag atc tac gac agc ctg ggc			1248
Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu Gly			
405	410	415	
cag ccc gtg ttc tac cag gcc agc ttc agc tgg gac acc atg atc aag			1296
Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys			
420	425	430	
ttc ggc gac gtg ctg acc gtg aac ccc ctg gtg gtg aac tgg cgg aac			1344
Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg Asn			
435	440	445	
aat acc gtg atc agc aga ccc ggc cag agc cag tgc ccc cgg ttc aac			1392
Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn			
450	455	460	
acc tgc ccc gcg atc tgc gcg gag ggc gtg tac aac gac gcc ttc ctg			1440
Thr Cys Pro Ala Ile Cys Ala Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe Leu			
465	470	475	480
atc gac cgg atc aac tgg atc tct gcc ggc gtg ttc ctg gac tcc aac			1488
Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser Asn			
485	490	495	
gcg acc gcc gcg aat ccc gtg ttc acc gtg ttt aag gac aac gag atc			1536
Ala Thr Ala Ala Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile			
500	505	510	
ctg tac cgg gcc cag ctg gcc agc gag gac acc aac gcc cag aaa acc			1584
Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr			
515	520	525	
atc acc aac tgc ttt ctg ctg aag aac aag atc tgg tgc atc agc ctg			1632
Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser Leu			
530	535	540	
gtg gag atc tac gat acc ggc gac aac gtg atc agg ccc aag ctg ttc			1680
Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe			

545	550	555	560	
gcc gtg aag atc ccc gag cag tgc acc ggt atg gcc gat tgt gat att				1728
Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr Gly Met Ala Asp Cys Asp Ile				
	565	570	575	
gaa ggt aaa gat ggc aaa caa tat gag agt gtt cta atg gtc agc atc				1776
Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile				
	580	585	590	
gat caa tta ttg gac agc atg aaa gaa att ggt agc aat tgc ctg aat				1824
Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn				
	595	600	605	
aat gaa ttt aac ttt ttt aaa aga cat atc tgt gat gct aat aag gaa				1872
Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu				
	610	615	620	
ggt atg ttt tta ttc cgt gct gct cgc aag ttg agg caa ttt ctt aaa				1920
Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys				
	625	630	635	640
atg aat agc act ggt gat ttt gat ctc cac tta tta aaa gtt tca gaa				1968
Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu				
	645	650	655	
ggc aca aca ata ctg ttg aac tgc act ggc cag gtt aaa gga aga aaa				2016
Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys				
	660	665	670	
cca gct gcc ctg ggt gaa gcc caa cca aca aag agt ttg gaa gaa aat				2064
Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn				
	675	680	685	
aaa tct tta aag gaa cag aaa aaa ctg aat gac ttg tgt ttc cta aag				2112
Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys				
	690	695	700	
aga cta tta caa gag ata aaa act tgt tgg aat aaa att ttg atg ggc				2160
Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly				
	705	710	715	720
act aaa gaa cac gcg gcc gca aga ggt tct cat cac cat cac cat cac				2208
Thr Lys Glu His Ala Ala Ala Arg Gly Ser His His His His His His				
	725	730	735	
taa				2211
<210> 6				
<211> 736				
<212> PRT				
<213> 人工序列				

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

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

Lys	Pro	Lys	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asn	Gln	His	Gln	Leu	Ala	Leu
290							295				300				
Arg	Ser	Ile	Glu	Lys	Gly	Arg	Tyr	Asp	Lys	Val	Met	Pro	Tyr	Gly	Pro
305					310					315					320
Ser	Gly	Ile	Lys	Gln	Gly	Asp	Thr	Leu	Tyr	Phe	Pro	Ala	Val	Gly	Phe
				325					330					335	
Leu	Val	Arg	Thr	Glu	Phe	Lys	Tyr	Asn	Asp	Ser	Asn	Cys	Pro	Ile	Thr
			340					345					350		
Lys	Cys	Gln	Tyr	Ser	Lys	Pro	Glu	Asn	Cys	Arg	Leu	Ser	Met	Gly	Ile
	355						360					365			
Arg	Pro	Asn	Ser	His	Tyr	Ile	Leu	Arg	Ser	Gly	Leu	Leu	Lys	Tyr	Asn
370						375					380				
Leu	Ser	Asp	Gly	Glu	Asn	Pro	Lys	Val	Val	Phe	Ile	Glu	Ile	Ser	Asp
385					390					395					400
Gln	Arg	Leu	Ser	Ile	Gly	Ser	Pro	Ser	Lys	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu	Gly
				405					410					415	
Gln	Pro	Val	Phe	Tyr	Gln	Ala	Ser	Phe	Ser	Trp	Asp	Thr	Met	Ile	Lys
			420					425					430		
Phe	Gly	Asp	Val	Leu	Thr	Val	Asn	Pro	Leu	Val	Val	Asn	Trp	Arg	Asn
	435						440					445			
Asn	Thr	Val	Ile	Ser	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Arg	Phe	Asn
450						455					460				
Thr	Cys	Pro	Ala	Ile	Cys	Ala	Glu	Gly	Val	Tyr	Asn	Asp	Ala	Phe	Leu
465					470					475					480
Ile	Asp	Arg	Ile	Asn	Trp	Ile	Ser	Ala	Gly	Val	Phe	Leu	Asp	Ser	Asn
				485					490					495	
Ala	Thr	Ala	Ala	Asn	Pro	Val	Phe	Thr	Val	Phe	Lys	Asp	Asn	Glu	Ile
			500					505					510		
Leu	Tyr	Arg	Ala	Gln	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Thr	Asn	Ala	Gln	Lys	Thr
	515					520					525				
Ile	Thr	Asn	Cys	Phe	Leu	Leu	Lys	Asn	Lys	Ile	Trp	Cys	Ile	Ser	Leu
530						535					540				
Val	Glu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Gly	Asp	Asn	Val	Ile	Arg	Pro	Lys	Leu	Phe
545					550					555					560
Ala	Val	Lys	Ile	Pro	Glu	Gln	Cys	Thr	Gly	Met	Ala	Asp	Cys	Asp	Ile
				565					570					575	
Glu	Gly	Lys	Asp	Gly	Lys	Gln	Tyr	Glu	Ser	Val	Leu	Met	Val	Ser	Ile
			580					585					590		
Asp	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Met	Lys	Glu	Ile	Gly	Ser	Asn	Cys	Leu	Asn

595	600	605
Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu		
610	615	620
Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys		
625	630	635
Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu		
645	650	655
Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys		
660	665	670
Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn		
675	680	685
Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys		
690	695	700
Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly		
705	710	715
Thr Lys Glu His Ala Ala Ala Arg Gly Ser His His His His His His		
725	730	735

<210> 7

<211> 2229

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 截短且突变的 (E501A、W504、Q530A、E533A)NiV G蛋白
(Gc Δ 34), 其与针对人EpCAM的设计的锚蛋白重复蛋 (DARPin)
融合。

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (2229)

<400> 7

atg aag aag atc aac gag ggc ctg ctg gac agc aag atc ctg agc gcc	48
Met Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser Ala	
1 5 10 15	
ttc aac acc gtg atc gcc ctg ctg ggc agc atc gtg atc att gtg atg	96
Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val Met	
20 25 30	
aac atc atg atc atc cag aac tac acc aga agc acc gac aac cag gcc	144
Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln Ala	
35 40 45	
gtg atc aag gac gct ctc cag ggg atc cag cag cag atc aag ggc ctg	192

Val	Ile	Lys	Asp	Ala	Leu	Gln	Gly	Ile	Gln	Gln	Gln	Ile	Lys	Gly	Leu	
50						55				60						
gcc	gac	aag	atc	ggc	acc	gag	atc	ggc	ccc	aag	gtg	tcc	ctg	atc	gac	240
Ala	Asp	Lys	Ile	Gly	Thr	Glu	Ile	Gly	Pro	Lys	Val	Ser	Leu	Ile	Asp	
65					70				75						80	
acc	agc	agc	acc	atc	acc	atc	ccc	gcc	aac	atc	ggc	ctg	ctg	ggg	tcc	288
Thr	Ser	Ser	Thr	Ile	Thr	Ile	Pro	Ala	Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	
			85					90						95		
aag	atc	agc	cag	agc	acc	gcc	agc	atc	aac	gag	aac	gtg	aac	gag	aag	336
Lys	Ile	Ser	Gln	Ser	Thr	Ala	Ser	Ile	Asn	Glu	Asn	Val	Asn	Glu	Lys	
			100					105						110		
tgc	aag	ttc	acc	ctg	ccc	ccc	ctg	aag	atc	cac	gag	tgc	aac	atc	agc	384
Cys	Lys	Phe	Thr	Leu	Pro	Pro	Leu	Lys	Ile	His	Glu	Cys	Asn	Ile	Ser	
			115					120						125		
tgc	ccc	aac	ccc	ctg	ccc	ttc	cgg	gag	tac	cgg	ccc	cag	acc	gag	ggc	432
Cys	Pro	Asn	Pro	Leu	Pro	Phe	Arg	Glu	Tyr	Arg	Pro	Gln	Thr	Glu	Gly	
			130					135						140		
gtg	agc	aac	ctg	gtc	ggc	ctg	ccc	aac	aac	atc	tgc	ctg	cag	aaa	acc	480
Val	Ser	Asn	Leu	Val	Gly	Leu	Pro	Asn	Asn	Ile	Cys	Leu	Gln	Lys	Thr	
145					150				155						160	
agc	aac	cag	atc	ctg	aag	ccc	aag	ctc	att	tcc	tac	acc	ctg	ccc	gtg	528
Ser	Asn	Gln	Ile	Leu	Lys	Pro	Lys	Leu	Ile	Ser	Tyr	Thr	Leu	Pro	Val	
			165						170					175		
gtg	ggc	cag	agc	ggc	acc	tgc	atc	acc	gac	ccc	ctg	ctg	gcc	atg	gac	576
Val	Gly	Gln	Ser	Gly	Thr	Cys	Ile	Thr	Asp	Pro	Leu	Leu	Ala	Met	Asp	
			180						185					190		
gag	ggc	tac	ttc	gcc	tac	agc	cac	ctg	gaa	cgg	atc	ggc	agc	tgc	agc	624
Glu	Gly	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Ser	His	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Ser	Cys	Ser	
			195						200					205		
agg	ggc	gtg	tcc	aag	cag	cgg	atc	atc	ggc	gtg	ggc	gag	gtg	ctg	gac	672
Arg	Gly	Val	Ser	Lys	Gln	Arg	Ile	Ile	Gly	Val	Gly	Glu	Val	Leu	Asp	
			210						215					220		
cgg	ggc	gac	gag	gtg	ccc	agc	ctg	ttc	atg	acc	aac	gtg	tgg	acc	ccc	720
Arg	Gly	Asp	Glu	Val	Pro	Ser	Leu	Phe	Met	Thr	Asn	Val	Trp	Thr	Pro	
225					230					235					240	
ccc	aac	ccc	aac	acc	gtg	tac	cac	tgc	agc	gcc	gtg	tac	aac	aac	gag	768
Pro	Asn	Pro	Asn	Thr	Val	Tyr	His	Cys	Ser	Ala	Val	Tyr	Asn	Asn	Glu	
			245							250				255		
ttc	tac	tac	gtg	ctg	tgc	gcc	gtg	agc	acc	gtg	ggc	gac	ccc	atc	ctg	816

Phe	Tyr	Tyr	Val	Leu	Cys	Ala	Val	Ser	Thr	Val	Gly	Asp	Pro	Ile	Leu	
260				265				270								
aac	agc	acc	tac	tgg	tcc	ggc	agc	ctg	atg	atg	acc	cgg	ctg	gcc	gtg	864
Asn	Ser	Thr	Tyr	Trp	Ser	Gly	Ser	Leu	Met	Met	Thr	Arg	Leu	Ala	Val	
275				280				285								
aag	cct	aag	agc	aat	ggc	ggc	gga	tac	aac	cag	cac	cag	ctg	gcc	ctg	912
Lys	Pro	Lys	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asn	Gln	His	Gln	Leu	Ala	Leu	
290				295				300								
cgg	agc	atc	gag	aag	ggc	aga	tac	gac	aaa	gtg	atg	ccc	tac	ggc	ccc	960
Arg	Ser	Ile	Glu	Lys	Gly	Arg	Tyr	Asp	Lys	Val	Met	Pro	Tyr	Gly	Pro	
305				310				315				320				
agc	ggc	atc	aag	cag	ggc	gac	aca	ctg	tac	ttc	ccc	gcc	gtg	ggc	ttc	1008
Ser	Gly	Ile	Lys	Gln	Gly	Asp	Thr	Leu	Tyr	Phe	Pro	Ala	Val	Gly	Phe	
325				330				335								
ctg	gtc	cgg	acc	gag	ttc	aag	tac	aac	gac	agc	aac	tgc	ccc	atc	acc	1056
Leu	Val	Arg	Thr	Glu	Phe	Lys	Tyr	Asn	Asp	Ser	Asn	Cys	Pro	Ile	Thr	
340				345				350								
aag	tgc	cag	tac	agc	aag	ccc	gag	aac	tgc	aga	ctg	agc	atg	ggc	atc	1104
Lys	Cys	Gln	Tyr	Ser	Lys	Pro	Glu	Asn	Cys	Arg	Leu	Ser	Met	Gly	Ile	
355				360				365								
cgg	ccc	aac	agc	cac	tac	atc	ctg	cgg	agc	ggc	ctg	ctg	aag	tac	aac	1152
Arg	Pro	Asn	Ser	His	Tyr	Ile	Leu	Arg	Ser	Gly	Leu	Leu	Lys	Tyr	Asn	
370				375				380								
ctg	agc	gac	ggc	gag	aac	ccc	aaa	gtc	gtc	ttt	att	gag	atc	agc	gac	1200
Leu	Ser	Asp	Gly	Glu	Asn	Pro	Lys	Val	Val	Phe	Ile	Glu	Ile	Ser	Asp	
385				390				395				400				
cag	cgg	ctg	tcc	atc	ggc	agc	ccc	agc	aag	atc	tac	gac	agc	ctg	ggc	1248
Gln	Arg	Leu	Ser	Ile	Gly	Ser	Pro	Ser	Lys	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu	Gly	
405				410				415								
cag	ccc	gtg	ttc	tac	cag	gcc	agc	ttc	agc	tgg	gac	acc	atg	atc	aag	1296
Gln	Pro	Val	Phe	Tyr	Gln	Ala	Ser	Phe	Ser	Trp	Asp	Thr	Met	Ile	Lys	
420				425				430								
ttc	ggc	gac	gtg	ctg	acc	gtg	aac	ccc	ctg	gtg	gtg	aac	tgg	cgg	aac	1344
Phe	Gly	Asp	Val	Leu	Thr	Val	Asn	Pro	Leu	Val	Val	Asn	Trp	Arg	Asn	
435				440				445								
aat	acc	gtg	atc	agc	aga	ccc	ggc	cag	agc	cag	tgc	ccc	cgg	ttc	aac	1392
Asn	Thr	Val	Ile	Ser	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Arg	Phe	Asn	
450				455				460								
acc	tgc	ccc	gcg	atc	tgc	gcg	gag	ggc	gtg	tac	aac	gac	gcc	ttc	ctg	1440

Thr	Cys	Pro	Ala	Ile	Cys	Ala	Glu	Gly	Val	Tyr	Asn	Asp	Ala	Phe	Leu	
465					470					475					480	
atc	gac	cgg	atc	aac	tgg	atc	tct	gcc	ggc	gtg	ttc	ctg	gac	tcc	aac	1488
Ile	Asp	Arg	Ile	Asn	Trp	Ile	Ser	Ala	Gly	Val	Phe	Leu	Asp	Ser	Asn	
				485					490						495	
gcg	acc	gcc	gcg	aat	ccc	gtg	ttc	acc	gtg	ttt	aag	gac	aac	gag	atc	1536
Ala	Thr	Ala	Ala	Asn	Pro	Val	Phe	Thr	Val	Phe	Lys	Asp	Asn	Glu	Ile	
			500					505					510			
ctg	tac	cgg	gcc	cag	ctg	gcc	agc	gag	gac	acc	aac	gcc	cag	aaa	acc	1584
Leu	Tyr	Arg	Ala	Gln	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Thr	Asn	Ala	Gln	Lys	Thr	
		515					520				525					
atc	acc	aac	tgc	ttt	ctg	ctg	aag	aac	aag	atc	tgg	tgc	atc	agc	ctg	1632
Ile	Thr	Asn	Cys	Phe	Leu	Leu	Lys	Asn	Lys	Ile	Trp	Cys	Ile	Ser	Leu	
	530					535				540						
gtg	gag	atc	tac	gat	acc	ggc	gac	aac	gtg	atc	agg	ccc	aag	ctg	ttc	1680
Val	Glu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Gly	Asp	Asn	Val	Ile	Arg	Pro	Lys	Leu	Phe	
545				550				555						560		
gcc	gtg	aag	atc	ccc	gag	cag	tgc	acc	ggt	gac	ctg	ggt	aag	aaa	ctg	1728
Ala	Val	Lys	Ile	Pro	Glu	Gln	Cys	Thr	Gly	Asp	Leu	Gly	Lys	Lys	Leu	
			565					570					575			
ctg	gaa	gct	gct	cgt	gct	ggt	cag	gac	gac	gaa	gtt	cgt	atc	ctg	atg	1776
Leu	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Gly	Gln	Asp	Asp	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Met	
		580					585					590				
gct	aac	ggt	gct	gac	gtt	aac	gct	aag	gac	gag	tat	ggt	tct	act	ccg	1824
Ala	Asn	Gly	Ala	Asp	Val	Asn	Ala	Lys	Asp	Glu	Tyr	Gly	Ser	Thr	Pro	
	595					600				605						
ctg	cac	cta	gct	gct	act	ctt	ggt	cac	ctg	gaa	atc	gtt	gaa	gtt	ctg	1872
Leu	His	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	His	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	
	610					615				620						
ctg	aag	cac	ggt	gct	gac	gtt	aac	gct	gat	gac	gct	act	ggt	ctt	act	1920
Leu	Lys	His	Gly	Ala	Asp	Val	Asn	Ala	Asp	Asp	Ala	Thr	Gly	Leu	Thr	
625				630				635						640		
ccg	ctg	cac	ctg	gct	gct	tgg	aat	ggt	cac	ctg	gag	atc	gtt	gaa	gtt	1968
Pro	Leu	His	Leu	Ala	Ala	Trp	Asn	Gly	His	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	
			645					650					655			
ctg	ctg	aag	tac	ggt	gct	gac	gtt	aac	gct	atg	gac	ttt	gag	ggt	tgg	2016
Leu	Leu	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asp	Val	Asn	Ala	Met	Asp	Phe	Glu	Gly	Trp	
		660				665						670				
act	ccg	ctg	cac	ctg	gct	gct	cat	ttt	ggt	cac	ctg	gaa	atc	gtt	gaa	2064

Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Phe Gly His Leu Glu Ile Val Glu	
675	680
ggt gct gac gtt aac gct cag gac aaa ttc ggt	2112
Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly	
690	700
aag acc ccg ttc gac cta gcg atc gac aac ggt aac gag gac att gct	2160
Lys Thr Pro Phe Asp Leu Ala Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp Ile Ala	
705	710
gaa gtg ctg caa aaa gcg gcg aag ctt aat gcg gcc gca aga ggt tct	2208
Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Lys Leu Asn Ala Ala Ala Arg Gly Ser	
725	730
cat cac cat cac cat cac taa	2229
His His His His His His	
740	
<210> 8	
<211> 742	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建体	
<400> 8	
Met Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser Ala	
1	5
Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val Met	
20	25
Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln Ala	
35	40
Val Ile Lys Asp Ala Leu Gln Gly Ile Gln Gln Gln Ile Lys Gly Leu	
50	55
Ala Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp	
65	70
Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser	
85	90
Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ala Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Glu Lys	
100	105
Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser	
115	120
Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Gln Thr Glu Gly	
130	135
	140

Val	Ser	Asn	Leu	Val	Gly	Leu	Pro	Asn	Asn	Ile	Cys	Leu	Gln	Lys	Thr
145					150					155					160
Ser	Asn	Gln	Ile	Leu	Lys	Pro	Lys	Leu	Ile	Ser	Tyr	Thr	Leu	Pro	Val
				165						170					175
Val	Gly	Gln	Ser	Gly	Thr	Cys	Ile	Thr	Asp	Pro	Leu	Leu	Ala	Met	Asp
				180						185					190
Glu	Gly	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Ser	His	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Ser	Cys	Ser
				195						200					205
Arg	Gly	Val	Ser	Lys	Gln	Arg	Ile	Ile	Gly	Val	Gly	Glu	Val	Leu	Asp
										210					220
Arg	Gly	Asp	Glu	Val	Pro	Ser	Leu	Phe	Met	Thr	Asn	Val	Trp	Thr	Pro
225										230					240
Pro	Asn	Pro	Asn	Thr	Val	Tyr	His	Cys	Ser	Ala	Val	Tyr	Asn	Asn	Glu
										245					255
Phe	Tyr	Tyr	Val	Leu	Cys	Ala	Val	Ser	Thr	Val	Gly	Asp	Pro	Ile	Leu
										260					270
Asn	Ser	Thr	Tyr	Trp	Ser	Gly	Ser	Leu	Met	Met	Thr	Arg	Leu	Ala	Val
										275					285
Lys	Pro	Lys	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asn	Gln	His	Gln	Leu	Ala	Leu
										290					300
Arg	Ser	Ile	Glu	Lys	Gly	Arg	Tyr	Asp	Lys	Val	Met	Pro	Tyr	Gly	Pro
305										310					320
Ser	Gly	Ile	Lys	Gln	Gly	Asp	Thr	Leu	Tyr	Phe	Pro	Ala	Val	Gly	Phe
										325					335
Leu	Val	Arg	Thr	Glu	Phe	Lys	Tyr	Asn	Asp	Ser	Asn	Cys	Pro	Ile	Thr
										340					350
Lys	Cys	Gln	Tyr	Ser	Lys	Pro	Glu	Asn	Cys	Arg	Leu	Ser	Met	Gly	Ile
										355					365
Arg	Pro	Asn	Ser	His	Tyr	Ile	Leu	Arg	Ser	Gly	Leu	Leu	Lys	Tyr	Asn
										370					380
Leu	Ser	Asp	Gly	Glu	Asn	Pro	Lys	Val	Val	Phe	Ile	Glu	Ile	Ser	Asp
385										390					400
Gln	Arg	Leu	Ser	Ile	Gly	Ser	Pro	Ser	Lys	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu	Gly
										405					415
Gln	Pro	Val	Phe	Tyr	Gln	Ala	Ser	Phe	Ser	Trp	Asp	Thr	Met	Ile	Lys
										420					430
Phe	Gly	Asp	Val	Leu	Thr	Val	Asn	Pro	Leu	Val	Val	Asn	Trp	Arg	Asn
										435					445
Asn	Thr	Val	Ile	Ser	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Arg	Phe	Asn

450	455	460
Thr Cys Pro Ala Ile Cys Ala Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe Leu		
465	470	475
Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser Asn		480
	485	490
Ala Thr Ala Ala Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile		495
	500	505
Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr		510
	515	520
Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser Leu		525
	530	535
Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe		540
545	550	555
Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr Gly Asp Leu Gly Lys Lys Leu		560
	565	570
Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met		575
	580	585
Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Ser Thr Pro		590
	595	600
Leu His Leu Ala Ala Thr Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu		605
	610	615
Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Asp Asp Ala Thr Gly Leu Thr		620
625	630	635
Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Asn Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val		640
	645	650
Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala Met Asp Phe Glu Gly Trp		655
	660	665
Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Phe Gly His Leu Glu Ile Val Glu		670
	675	680
Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly		685
	690	695
Lys Thr Pro Phe Asp Leu Ala Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp Ile Ala		700
705	710	715
Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Lys Leu Asn Ala Ala Ala Arg Gly Ser		720
	725	730
His His His His His His		735
	740	
<210>	9	
<211>	602	

<212> PRT

<213> 尼帕病毒

<400> 9

```

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

```

Glu Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile		
290	295	300
Leu Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala		
305	310	315 320
Val Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala		
	325	330 335
Leu Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly		
	340	345 350
Pro Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly		
	355	360 365
Phe Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile		
	370	375 380
Thr Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly		
385	390	395 400
Ile Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr		
	405	410 415
Asn Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro Lys Val Val Phe Ile Glu Ile Ser		
	420	425 430
Asp Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu		
	435	440 445
Gly Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile		
	450	455 460
Lys Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg		
465	470	475 480
Asn Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe		
	485	490 495
Asn Thr Cys Pro Glu Ile Cys Trp Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe		
	500	505 510
Leu Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser		
	515	520 525
Asn Gln Thr Ala Glu Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asp Asn Glu		
	530	535 540
Ile Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys		
545	550	555 560
Thr Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser		
	565	570 575
Leu Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu		
	580	585 590
Phe Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr		

	595	600
<210>	10	
<211>	617	
<212>	PRT	
<213>	麻疹病毒	
<400>	10	
Met Ser Pro Gln Arg Asp Arg Ile Asn Ala Phe Tyr Lys Asp Asn Pro		
1	5	10 15
His Pro Lys Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met Ile		
	20	25 30
Asp Arg Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Phe Leu Ser		
	35	40 45
Leu Ile Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala Ala		
	50	55 60
Ile Tyr Thr Ala Glu Ile His Lys Ser Leu Ser Thr Asn Leu Asp Val		
65	70	75 80
Thr Asn Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu Phe		
	85	90 95
Lys Ile Ile Gly Asp Glu Val Gly Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe Thr		
	100	105 110
Asp Leu Val Lys Phe Ile Ser Asp Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro Asp		
	115	120 125
Arg Glu Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro Glu		
	130	135 140
Arg Ile Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala Glu		
145	150	155 160
Glu Leu Met Asn Ala Leu Val Asn Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg Thr		
	165	170 175
Thr Asn Gln Phe Leu Ala Val Ser Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro Thr		
	180	185 190
Thr Ile Arg Gly Gln Phe Ser Asn Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp Leu		
	195	200 205
Tyr Leu Gly Arg Gly Tyr Asn Val Ser Ser Ile Val Thr Met Thr Ser		
	210	215 220
Gln Gly Met Tyr Gly Gly Thr Tyr Leu Val Glu Lys Pro Asn Leu Ser		
225	230	235 240
Ser Lys Arg Ser Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Tyr Arg Val Phe Glu		
	245	250 255
Val Gly Val Ile Arg Asn Pro Gly Leu Gly Ala Pro Val Phe His Met		

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

Leu Trp Cys Arg His Phe Cys Val Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly Gly
 580 585 590
 His Ile Thr His Ser Gly Met Val Gly Met Gly Val Ser Cys Thr Val
 595 600 605
 Thr Arg Glu Asp Gly Thr Asn Arg Arg
 610 615
 <210> 11
 <211> 546
 <212> PRT
 <213> 尼帕病毒
 <400> 11
 Met Val Val Ile Leu Asp Lys Arg Cys Tyr Cys Asn Leu Leu Ile Leu
 1 5 10 15
 Ile Leu Met Ile Ser Glu Cys Ser Val Gly Ile Leu His Tyr Glu Lys
 20 25 30
 Leu Ser Lys Ile Gly Leu Val Lys Gly Val Thr Arg Lys Tyr Lys Ile
 35 40 45
 Lys Ser Asn Pro Leu Thr Lys Asp Ile Val Ile Lys Met Ile Pro Asn
 50 55 60
 Val Ser Asn Met Ser Gln Cys Thr Gly Ser Val Met Glu Asn Tyr Lys
 65 70 75 80
 Thr Arg Leu Asn Gly Ile Leu Thr Pro Ile Lys Gly Ala Leu Glu Ile
 85 90 95
 Tyr Lys Asn Asn Thr His Asp Leu Val Gly Asp Val Arg Leu Ala Gly
 100 105 110
 Val Ile Met Ala Gly Val Ala Ile Gly Ile Ala Thr Ala Ala Gln Ile
 115 120 125
 Thr Ala Gly Val Ala Leu Tyr Glu Ala Met Lys Asn Ala Asp Asn Ile
 130 135 140
 Asn Lys Leu Lys Ser Ser Ile Glu Ser Thr Asn Glu Ala Val Val Lys
 145 150 155 160
 Leu Gln Glu Thr Ala Glu Lys Thr Val Tyr Val Leu Thr Ala Leu Gln
 165 170 175
 Asp Tyr Ile Asn Thr Asn Leu Val Pro Thr Ile Asp Lys Ile Ser Cys
 180 185 190
 Lys Gln Thr Glu Leu Ser Leu Asp Leu Ala Leu Ser Lys Tyr Leu Ser
 195 200 205
 Asp Leu Leu Phe Val Phe Gly Pro Asn Leu Gln Asp Pro Val Ser Asn
 210 215 220

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

530	535	540
Gly Thr		
545		
<210> 12		
<211> 553		
<212> PRT		
<213> 麻疹病毒		
<400> 12		
Met Ser Ile Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala		
1 5 10 15		
Val Leu Leu Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asn		
20 25 30		
Leu Ser Lys Ile Gly Val Val Gly Ile Gly Ser Ala Ser Tyr Lys Val		
35 40 45		
Met Thr Arg Ser Ser His Gln Ser Leu Val Ile Lys Leu Met Pro Asn		
50 55 60		
Ile Thr Leu Leu Asn Asn Cys Thr Arg Val Glu Ile Ala Glu Tyr Arg		
65 70 75 80		
Arg Leu Leu Arg Thr Val Leu Glu Pro Ile Arg Asp Ala Leu Asn Ala		
85 90 95		
Met Thr Gln Asn Ile Arg Pro Val Gln Ser Val Ala Ser Ser Arg Arg		
100 105 110		
His Lys Arg Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val		
115 120 125		
Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Met		
130 135 140		
Leu Asn Ser Gln Ala Ile Asp Asn Leu Arg Ala Ser Leu Glu Thr Thr		
145 150 155 160		
Asn Gln Ala Ile Glu Ala Ile Arg Gln Ala Gly Gln Glu Met Ile Leu		
165 170 175		
Ala Val Gln Gly Val Gln Asp Tyr Ile Asn Asn Glu Leu Ile Pro Ser		
180 185 190		
Met Asn Gln Leu Ser Cys Asp Leu Ile Gly Gln Lys Leu Gly Leu Lys		
195 200 205		
Leu Leu Arg Tyr Tyr Thr Glu Ile Leu Ser Leu Phe Gly Pro Ser Leu		
210 215 220		
Arg Asp Pro Ile Ser Ala Glu Ile Ser Ile Gln Ala Leu Ser Tyr Ala		
225 230 235 240		
Leu Gly Gly Asp Ile Asn Lys Val Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Ser Gly		

	245		250		255
Gly Asp Leu Leu Gly Ile Leu Glu Ser Arg Gly Ile Lys Ala Arg Ile					
	260		265		270
Thr His Val Asp Thr Glu Ser Tyr Phe Ile Val Leu Ser Ile Ala Tyr					
	275		280		285
Pro Thr Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly					
	290		295		300
Val Ser Tyr Asn Ile Gly Ser Gln Glu Trp Tyr Thr Thr Val Pro Lys					
305		310		315	320
Tyr Val Ala Thr Gln Gly Tyr Leu Ile Ser Asn Phe Asp Glu Ser Ser					
	325		330		335
Cys Thr Phe Met Pro Glu Gly Thr Val Cys Ser Gln Asn Ala Leu Tyr					
	340		345		350
Pro Met Ser Pro Leu Leu Gln Glu Cys Leu Arg Gly Ser Thr Lys Ser					
	355		360		365
Cys Ala Arg Thr Leu Val Ser Gly Ser Phe Gly Asn Arg Phe Ile Leu					
370		375		380	
Ser Gln Gly Asn Leu Ile Ala Asn Cys Ala Ser Ile Leu Cys Lys Cys					
385		390		395	400
Tyr Thr Thr Gly Thr Ile Ile Asn Gln Asp Pro Asp Lys Ile Leu Thr					
	405		410		415
Tyr Ile Ala Ala Asp His Cys Pro Val Val Glu Val Asn Gly Val Thr					
	420		425		430
Ile Gln Val Gly Ser Arg Arg Tyr Pro Asp Ala Val Tyr Leu His Arg					
	435		440		445
Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr					
	450		455		460
Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Asp Ala Lys Glu Leu Leu					
465		470		475	480
Glu Ser Ser Asp Gln Ile Leu Arg Ser Met Lys Gly Leu Ser Ser Thr					
	485		490		495
Ser Ile Val Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly					
	500		505		510
Ile Pro Ala Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly					
	515		520		525
Glu Gln Val Gly Met Ser Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly					
	530		535		540
Thr Ser Lys Ser Tyr Val Arg Ser Leu					
545		550			

<210>	13	
<211>	2328	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	截短且突变的 (Y481A、R533A、S548L、F549S)MeV H蛋白 (Hc Δ 15), 其与IL-7融合。	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1) .. (2328)	
<400>	13	
atg cat ccc aag gga agt agg ata gtc att aac aga gaa cat ctt atg		48
Met His Pro Lys Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met		
1 5 10 15		
att gat aga cct tat gtt ttg ctg gct gtt ctg ttt gtc atg ttt ctg		96
Ile Asp Arg Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Phe Leu		
20 25 30		
agc ttg atc ggg ttg cta gcc att gca ggc att aga ctt cat cgg gca		144
Ser Leu Ile Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala		
35 40 45		
gcc atc tac acc gca gag atc cat aaa agc ctc agc acc aat cta gat		192
Ala Ile Tyr Thr Ala Glu Ile His Lys Ser Leu Ser Thr Asn Leu Asp		
50 55 60		
gta act aac tca atc gag cat cag gtc aag gac gtg ctg aca cca ctc		240
Val Thr Asn Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu		
65 70 75 80		
ttc aaa atc atc ggt gat gaa gtg ggc ctg agg aca cct cag aga ttc		288
Phe Lys Ile Ile Gly Asp Glu Val Gly Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe		
85 90 95		
act gac cta gtg aaa ttc atc tct gac aag att aaa ttc ctt aat ccg		336
Thr Asp Leu Val Lys Phe Ile Ser Asp Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro		
100 105 110		
gat agg gag tac gac ttc aga gat ctc act tgg tgt atc aac ccg cca		384
Asp Arg Glu Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro		
115 120 125		
gag aga atc aaa ttg gat tat gat caa tac tgt gca gat gtg gct gct		432
Glu Arg Ile Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala		
130 135 140		
gaa gag ctc atg aat gca ttg gtg aac tca act cta ctg gag acc aga		480

Glu	Glu	Leu	Met	Asn	Ala	Leu	Val	Asn	Ser	Thr	Leu	Leu	Glu	Thr	Arg	
145					150					155					160	
aca	acc	aat	cag	ttc	cta	gct	gtc	tca	aag	gga	aac	tgc	tca	ggg	ccc	528
Thr	Thr	Asn	Gln	Phe	Leu	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Asn	Cys	Ser	Gly	Pro	
				165					170						175	
act	aca	atc	aga	ggg	caa	ttc	tca	aac	atg	tcg	ctg	tcc	ctg	tta	gac	576
Thr	Thr	Ile	Arg	Gly	Gln	Phe	Ser	Asn	Met	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Asp	
			180						185						190	
ttg	tat	tta	ggg	cga	ggg	tac	aat	gtg	tca	tct	ata	gtc	act	atg	aca	624
Leu	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Val	Ser	Ser	Ile	Val	Thr	Met	Thr	
			195						200						205	
tcc	cag	gga	atg	tat	ggg	gga	act	tac	cta	gtg	gaa	aag	cct	aat	ctg	672
Ser	Gln	Gly	Met	Tyr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Leu	Val	Glu	Lys	Pro	Asn	Leu	
			210						215						220	
agc	agc	aaa	agg	tca	gag	ttg	tca	caa	ctg	agc	atg	tac	cga	gtg	ttt	720
Ser	Ser	Lys	Arg	Ser	Glu	Leu	Ser	Gln	Leu	Ser	Met	Tyr	Arg	Val	Phe	
225					230					235					240	
gaa	gta	ggg	gtt	atc	aga	aat	ccg	ggg	ttg	ggg	gct	ccg	gtg	ttc	cat	768
Glu	Val	Gly	Val	Ile	Arg	Asn	Pro	Gly	Leu	Gly	Ala	Pro	Val	Phe	His	
				245						250					255	
atg	aca	aac	tat	ctt	gag	caa	cca	gtc	agt	aat	gat	ctc	agc	aac	tgt	816
Met	Thr	Asn	Tyr	Leu	Glu	Gln	Pro	Val	Ser	Asn	Asp	Leu	Ser	Asn	Cys	
			260							265					270	
atg	gtg	gct	ttg	ggg	gag	ctc	aaa	ctc	gca	gcc	ctt	tgt	cac	ggg	gaa	864
Met	Val	Ala	Leu	Gly	Glu	Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	His	Gly	Glu	
			275							280					285	
gat	tct	atc	aca	att	ccc	tat	cag	gga	tca	ggg	aaa	ggg	gtc	agc	ttc	912
Asp	Ser	Ile	Thr	Ile	Pro	Tyr	Gln	Gly	Ser	Gly	Lys	Gly	Val	Ser	Phe	
			290							295					300	
cag	ctc	gtc	aag	cta	ggg	gtc	tgg	aaa	tcc	cca	acc	gac	atg	caa	tcc	960
Gln	Leu	Val	Lys	Leu	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Pro	Thr	Asp	Met	Gln	Ser	
305					310					315					320	
tgg	gtc	ccc	tta	tca	acg	gat	gat	cca	gtg	ata	gac	agg	ctt	tac	ctc	1008
Trp	Val	Pro	Leu	Ser	Thr	Asp	Asp	Pro	Val	Ile	Asp	Arg	Leu	Tyr	Leu	
				325						330					335	
tca	tct	cac	aga	ggg	gtt	atc	gct	gac	aat	caa	gca	aaa	tgg	gct	gtc	1056
Ser	Ser	His	Arg	Gly	Val	Ile	Ala	Asp	Asn	Gln	Ala	Lys	Trp	Ala	Val	
			340							345					350	
ccg	aca	aca	cga	aca	gat	gac	aag	ttg	cga	atg	gag	aca	tgc	ttc	caa	1104

Pro Thr Thr Arg Thr Asp Asp Lys Leu Arg Met Glu Thr Cys Phe Gln	
355	360
cag gcg tgt aag ggt aaa atc caa gca ctc tgc gag aat ccc gag tgg	1152
Gln Ala Cys Lys Gly Lys Ile Gln Ala Leu Cys Glu Asn Pro Glu Trp	
370	375
gca cca ttg aag gat aac agg att cct tca tac ggg gtc ttg tct gtt	1200
Ala Pro Leu Lys Asp Asn Arg Ile Pro Ser Tyr Gly Val Leu Ser Val	
385	390
gat ctg agt ctg aca gtt gag ctt aaa atc aaa att gct tgc gga ttc	1248
Asp Leu Ser Leu Thr Val Glu Leu Lys Ile Lys Ile Ala Ser Gly Phe	
405	410
ggg cca ttg atc aca cac ggt tca ggg atg gac cta tac aaa tcc aac	1296
Gly Pro Leu Ile Thr His Gly Ser Gly Met Asp Leu Tyr Lys Ser Asn	
420	425
cac aac aat gtg tat tgg ctg act atc ccg cca atg aag aac cta gcc	1344
His Asn Asn Val Tyr Trp Leu Thr Ile Pro Pro Met Lys Asn Leu Ala	
435	440
tta ggt gta atc aac aca ttg gag tgg ata ccg aga ttc aag gtt agt	1392
Leu Gly Val Ile Asn Thr Leu Glu Trp Ile Pro Arg Phe Lys Val Ser	
450	455
ccc gcg ctc ttc aat gtc cca att aag gaa gca ggc gaa gac tgc cat	1440
Pro Ala Leu Phe Asn Val Pro Ile Lys Glu Ala Gly Glu Asp Cys His	
465	470
gcc cca aca tac cta cct gcg gag gtg gat ggt gat gtc aaa ctc agt	1488
Ala Pro Thr Tyr Leu Pro Ala Glu Val Asp Gly Asp Val Lys Leu Ser	
485	490
tcc aat ctg gtg att cta cct ggt caa gat ctc caa tat gtt ttg gca	1536
Ser Asn Leu Val Ile Leu Pro Gly Gln Asp Leu Gln Tyr Val Leu Ala	
500	505
acc tac gat act tcc gcg gtt gaa cat gct gtg gtt tat tac gtt tac	1584
Thr Tyr Asp Thr Ser Ala Val Glu His Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr	
515	520
agc cca agc cgc tca ttt tct tac ttt tat cct ttt agg ttg cct ata	1632
Ser Pro Ser Arg Ser Phe Ser Tyr Phe Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile	
530	535
aag ggg gtc ccc atc gaa tta caa gtg gaa tgc ttc aca tgg gac caa	1680
Lys Gly Val Pro Ile Glu Leu Gln Val Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln	
545	550
aaa ctc tgg tgc cgt cac ttc tgt gtg ctt gcg gac tca gaa tct ggt	1728

Lys	Leu	Trp	Cys	Arg	His	Phe	Cys	Val	Leu	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Gly	
				565					570						575	
gga	cat	atc	act	cac	tct	ggg	atg	gag	ggc	atg	gga	gtc	agc	tgc	aca	1776
Gly	His	Ile	Thr	His	Ser	Gly	Met	Glu	Gly	Met	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	
			580					585						590		
gtc	acc	cgg	gaa	gat	gga	acc	aat	atc	gag	gga	agg	gcg	gcc	cag	ccg	1824
Val	Thr	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Asn	Ile	Glu	Gly	Arg	Ala	Ala	Gln	Pro	
			595					600						605		
gcc	atg	gcc	gat	tgt	gat	att	gaa	ggt	aaa	gat	ggc	aaa	caa	tat	gag	1872
Ala	Met	Ala	Asp	Cys	Asp	Ile	Glu	Gly	Lys	Asp	Gly	Lys	Gln	Tyr	Glu	
	610						615							620		
agt	gtt	cta	atg	gtc	agc	atc	gat	caa	tta	ttg	gac	agc	atg	aaa	gaa	1920
Ser	Val	Leu	Met	Val	Ser	Ile	Asp	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Met	Lys	Glu	
625						630					635				640	
att	ggt	agc	aat	tgc	ctg	aat	aat	gaa	ttt	aac	ttt	ttt	aaa	aga	cat	1968
Ile	Gly	Ser	Asn	Cys	Leu	Asn	Asn	Glu	Phe	Asn	Phe	Phe	Lys	Arg	His	
				645						650					655	
atc	tgt	gat	gct	aat	aag	gaa	ggt	atg	ttt	tta	ttc	cgt	gct	gct	cgc	2016
Ile	Cys	Asp	Ala	Asn	Lys	Glu	Gly	Met	Phe	Leu	Phe	Arg	Ala	Ala	Arg	
				660						665					670	
aag	ttg	agg	caa	ttt	ctt	aaa	atg	aat	agc	act	ggt	gat	ttt	gat	ctc	2064
Lys	Leu	Arg	Gln	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Leu	
			675					680							685	
cac	tta	tta	aaa	gtt	tca	gaa	ggc	aca	aca	ata	ctg	ttg	aac	tgc	act	2112
His	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	Ile	Leu	Leu	Asn	Cys	Thr	
			690					695							700	
ggc	cag	gtt	aaa	gga	aga	aaa	cca	gct	gcc	ctg	ggt	gaa	gcc	caa	cca	2160
Gly	Gln	Val	Lys	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Pro	
705						710					715				720	
aca	aag	agt	ttg	gaa	gaa	aat	aaa	tct	tta	aag	gaa	cag	aaa	aaa	ctg	2208
Thr	Lys	Ser	Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Ser	Leu	Lys	Glu	Gln	Lys	Lys	Leu	
				725						730					735	
aat	gac	ttg	tgt	ttc	cta	aag	aga	cta	tta	caa	gag	ata	aaa	act	tgt	2256
Asn	Asp	Leu	Cys	Phe	Leu	Lys	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Ile	Lys	Thr	Cys	
				740						745					750	
tgg	aat	aaa	att	ttg	atg	ggc	act	aaa	gaa	cac	gcg	gcc	gca	aga	gga	2304
Trp	Asn	Lys	Ile	Leu	Met	Gly	Thr	Lys	Glu	His	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	
				755						760					765	
tcg	cat	cac	cat	cac	cat	cac	tga									2328

Ser His His His His His His

770

775

<210> 14

<211> 775

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

Met His Pro Lys Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met

1

5

10

15

Ile Asp Arg Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Phe Leu

20

25

30

Ser Leu Ile Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala

35

40

45

Ala Ile Tyr Thr Ala Glu Ile His Lys Ser Leu Ser Thr Asn Leu Asp

50

55

60

Val Thr Asn Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu

65

70

75

80

Phe Lys Ile Ile Gly Asp Glu Val Gly Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe

85

90

95

Thr Asp Leu Val Lys Phe Ile Ser Asp Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro

100

105

110

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

115

120

125

Glu Arg Ile Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala

130

135

140

Glu Glu Leu Met Asn Ala Leu Val Asn Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg

145

150

155

160

Thr Thr Asn Gln Phe Leu Ala Val Ser Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro

165

170

175

Thr Thr Ile Arg Gly Gln Phe Ser Asn Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp

180

185

190

Leu Tyr Leu Gly Arg Gly Tyr Asn Val Ser Ser Ile Val Thr Met Thr

195

200

205

Ser Gln Gly Met Tyr Gly Gly Thr Tyr Leu Val Glu Lys Pro Asn Leu

210

215

220

Ser Ser Lys Arg Ser Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Tyr Arg Val Phe

225

230

235

240

Glu Val Gly Val Ile Arg Asn Pro Gly Leu Gly Ala Pro Val Phe His		
245	250	255
Met Thr Asn Tyr Leu Glu Gln Pro Val Ser Asn Asp Leu Ser Asn Cys		
260	265	270
Met Val Ala Leu Gly Glu Leu Lys Leu Ala Ala Leu Cys His Gly Glu		
275	280	285
Asp Ser Ile Thr Ile Pro Tyr Gln Gly Ser Gly Lys Gly Val Ser Phe		
290	295	300
Gln Leu Val Lys Leu Gly Val Trp Lys Ser Pro Thr Asp Met Gln Ser		
305	310	315
320		
Trp Val Pro Leu Ser Thr Asp Asp Pro Val Ile Asp Arg Leu Tyr Leu		
325	330	335
Ser Ser His Arg Gly Val Ile Ala Asp Asn Gln Ala Lys Trp Ala Val		
340	345	350
Pro Thr Thr Arg Thr Asp Asp Lys Leu Arg Met Glu Thr Cys Phe Gln		
355	360	365
Gln Ala Cys Lys Gly Lys Ile Gln Ala Leu Cys Glu Asn Pro Glu Trp		
370	375	380
Ala Pro Leu Lys Asp Asn Arg Ile Pro Ser Tyr Gly Val Leu Ser Val		
385	390	395
400		
Asp Leu Ser Leu Thr Val Glu Leu Lys Ile Lys Ile Ala Ser Gly Phe		
405	410	415
Gly Pro Leu Ile Thr His Gly Ser Gly Met Asp Leu Tyr Lys Ser Asn		
420	425	430
His Asn Asn Val Tyr Trp Leu Thr Ile Pro Pro Met Lys Asn Leu Ala		
435	440	445
Leu Gly Val Ile Asn Thr Leu Glu Trp Ile Pro Arg Phe Lys Val Ser		
450	455	460
Pro Ala Leu Phe Asn Val Pro Ile Lys Glu Ala Gly Glu Asp Cys His		
465	470	475
480		
Ala Pro Thr Tyr Leu Pro Ala Glu Val Asp Gly Asp Val Lys Leu Ser		
485	490	495
Ser Asn Leu Val Ile Leu Pro Gly Gln Asp Leu Gln Tyr Val Leu Ala		
500	505	510
Thr Tyr Asp Thr Ser Ala Val Glu His Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr		
515	520	525
Ser Pro Ser Arg Ser Phe Ser Tyr Phe Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile		
530	535	540
Lys Gly Val Pro Ile Glu Leu Gln Val Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln		

545	550	555	560
Lys Leu Trp Cys Arg His Phe Cys Val Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly			
	565	570	575
Gly His Ile Thr His Ser Gly Met Glu Gly Met Gly Val Ser Cys Thr			
	580	585	590
Val Thr Arg Glu Asp Gly Thr Asn Ile Glu Gly Arg Ala Ala Gln Pro			
	595	600	605
Ala Met Ala Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu			
	610	615	620
Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu			
625	630	635	640
Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His			
	645	650	655
Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg			
	660	665	670
Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu			
	675	680	685
His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr			
	690	695	700
Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro			
705	710	715	720
Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu			
	725	730	735
Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys			
	740	745	750
Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His Ala Ala Ala Arg Gly			
	755	760	765
Ser His His His His His His			
	770	775	
<210>	15		
<211>	523		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	截短型MeV融合糖蛋白 (Fc Δ 30)		
<400>	15		
Met Ser Ile Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala			
1	5	10	15
Val Leu Leu Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asn			

	20		25		30										
Leu	Ser	Lys	Ile	Gly	Val	Val	Gly	Ile	Gly	Ser	Ala	Ser	Tyr	Lys	Val
	35						40				45				
Met	Thr	Arg	Ser	Ser	His	Gln	Ser	Leu	Val	Ile	Lys	Leu	Met	Pro	Asn
	50					55					60				
Ile	Thr	Leu	Leu	Asn	Asn	Cys	Thr	Arg	Val	Glu	Ile	Ala	Glu	Tyr	Arg
65					70					75				80	
Arg	Leu	Leu	Arg	Thr	Val	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Asp	Ala	Leu	Asn	Ala
				85					90					95	
Met	Thr	Gln	Asn	Ile	Arg	Pro	Val	Gln	Ser	Val	Ala	Ser	Ser	Arg	Arg
			100					105						110	
His	Lys	Arg	Phe	Ala	Gly	Val	Val	Leu	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Gly	Val
	115						120						125		
Ala	Thr	Ala	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Gly	Ile	Ala	Leu	His	Gln	Ser	Met
	130						135						140		
Leu	Asn	Ser	Gln	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Thr	Thr
145					150					155				160	
Asn	Gln	Ala	Ile	Glu	Ala	Ile	Arg	Gln	Ala	Gly	Gln	Glu	Met	Ile	Leu
				165						170				175	
Ala	Val	Gln	Gly	Val	Gln	Asp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Glu	Leu	Ile	Pro	Ser
	180								185					190	
Met	Asn	Gln	Leu	Ser	Cys	Asp	Leu	Ile	Gly	Gln	Lys	Leu	Gly	Leu	Lys
	195							200						205	
Leu	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	Gly	Pro	Ser	Leu
	210						215							220	
Arg	Asp	Pro	Ile	Ser	Ala	Glu	Ile	Ser	Ile	Gln	Ala	Leu	Ser	Tyr	Ala
225					230					235					240
Leu	Gly	Gly	Asp	Ile	Asn	Lys	Val	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Tyr	Ser	Gly
				245						250				255	
Gly	Asp	Leu	Leu	Gly	Ile	Leu	Glu	Ser	Arg	Gly	Ile	Lys	Ala	Arg	Ile
				260					265					270	
Thr	His	Val	Asp	Thr	Glu	Ser	Tyr	Phe	Ile	Val	Leu	Ser	Ile	Ala	Tyr
	275							280						285	
Pro	Thr	Leu	Ser	Glu	Ile	Lys	Gly	Val	Ile	Val	His	Arg	Leu	Glu	Gly
	290						295							300	
Val	Ser	Tyr	Asn	Ile	Gly	Ser	Gln	Glu	Trp	Tyr	Thr	Thr	Val	Pro	Lys
305					310					315					320
Tyr	Val	Ala	Thr	Gln	Gly	Tyr	Leu	Ile	Ser	Asn	Phe	Asp	Glu	Ser	Ser
				325						330					335

Cys Thr Phe Met Pro Glu Gly Thr Val Cys Ser Gln Asn Ala Leu Tyr		
340	345	350
Pro Met Ser Pro Leu Leu Gln Glu Cys Leu Arg Gly Ser Thr Lys Ser		
355	360	365
Cys Ala Arg Thr Leu Val Ser Gly Ser Phe Gly Asn Arg Phe Ile Leu		
370	375	380
Ser Gln Gly Asn Leu Ile Ala Asn Cys Ala Ser Ile Leu Cys Lys Cys		
385	390	395
400		
Tyr Thr Thr Gly Thr Ile Ile Asn Gln Asp Pro Asp Lys Ile Leu Thr		
405	410	415
Tyr Ile Ala Ala Asp His Cys Pro Val Val Glu Val Asn Gly Val Thr		
420	425	430
Ile Gln Val Gly Ser Arg Arg Tyr Pro Asp Ala Val Tyr Leu His Arg		
435	440	445
Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr		
450	455	460
Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Asp Ala Lys Glu Leu Leu		
465	470	475
480		
Glu Ser Ser Asp Gln Ile Leu Arg Ser Met Lys Gly Leu Ser Ser Thr		
485	490	495
Ser Ile Val Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly		
500	505	510
Ile Pro Ala Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg		
515	520	
<210>	16	
<211>	524	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	截短型NiV融合糖蛋白 (Fc Δ 22)	
<400>	16	
Met Val Val Ile Leu Asp Lys Arg Cys Tyr Cys Asn Leu Leu Ile Leu		
1	5	10
15		
Ile Leu Met Ile Ser Glu Cys Ser Val Gly Ile Leu His Tyr Glu Lys		
20	25	30
Leu Ser Lys Ile Gly Leu Val Lys Gly Val Thr Arg Lys Tyr Lys Ile		
35	40	45
Lys Ser Asn Pro Leu Thr Lys Asp Ile Val Ile Lys Met Ile Pro Asn		
50	55	60

Val	Ser	Asn	Met	Ser	Gln	Cys	Thr	Gly	Ser	Val	Met	Glu	Asn	Tyr	Lys
65					70				75						80
Thr	Arg	Leu	Asn	Gly	Ile	Leu	Thr	Pro	Ile	Lys	Gly	Ala	Leu	Glu	Ile
			85						90					95	
Tyr	Lys	Asn	Asn	Thr	His	Asp	Leu	Val	Gly	Asp	Val	Arg	Leu	Ala	Gly
		100						105					110		
Val	Ile	Met	Ala	Gly	Val	Ala	Ile	Gly	Ile	Ala	Thr	Ala	Ala	Gln	Ile
		115					120					125			
Thr	Ala	Gly	Val	Ala	Leu	Tyr	Glu	Ala	Met	Lys	Asn	Ala	Asp	Asn	Ile
	130					135					140				
Asn	Lys	Leu	Lys	Ser	Ser	Ile	Glu	Ser	Thr	Asn	Glu	Ala	Val	Val	Lys
145				150						155					160
Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Glu	Lys	Thr	Val	Tyr	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Gln
			165						170					175	
Asp	Tyr	Ile	Asn	Thr	Asn	Leu	Val	Pro	Thr	Ile	Asp	Lys	Ile	Ser	Cys
		180						185					190		
Lys	Gln	Thr	Glu	Leu	Ser	Leu	Asp	Leu	Ala	Leu	Ser	Lys	Tyr	Leu	Ser
		195					200					205			
Asp	Leu	Leu	Phe	Val	Phe	Gly	Pro	Asn	Leu	Gln	Asp	Pro	Val	Ser	Asn
	210					215					220				
Ser	Met	Thr	Ile	Gln	Ala	Ile	Ser	Gln	Ala	Phe	Gly	Gly	Asn	Tyr	Glu
225				230						235					240
Thr	Leu	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Tyr	Ala	Thr	Glu	Asp	Phe	Asp	Asp	Leu
			245						250					255	
Leu	Glu	Ser	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	Gln	Ile	Ile	Tyr	Val	Asp	Leu	Ser
		260					265					270			
Ser	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Val	Arg	Val	Tyr	Phe	Pro	Ile	Leu	Thr	Glu	Ile
	275					280					285				
Gln	Gln	Ala	Tyr	Ile	Gln	Glu	Leu	Leu	Pro	Val	Ser	Phe	Asn	Asn	Asp
	290					295					300				
Asn	Ser	Glu	Trp	Ile	Ser	Ile	Val	Pro	Asn	Phe	Ile	Leu	Val	Arg	Asn
305				310						315					320
Thr	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	Ile	Gly	Phe	Cys	Leu	Ile	Thr	Lys	Arg
			325						330					335	
Ser	Val	Ile	Cys	Asn	Gln	Asp	Tyr	Ala	Thr	Pro	Met	Thr	Asn	Asn	Met
		340						345					350		
Arg	Glu	Cys	Leu	Thr	Gly	Ser	Thr	Glu	Lys	Cys	Pro	Arg	Glu	Leu	Val
	355						360					365			
Val	Ser	Ser	His	Val	Pro	Arg	Phe	Ala	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Leu	Phe

370	375	380
Ala Asn Cys Ile Ser Val Thr Cys Gln Cys Gln Thr Thr Gly Arg Ala		
385	390	395
Ile Ser Gln Ser Gly Glu Gln Thr Leu Leu Met Ile Asp Asn Thr Thr		400
	405	410
Cys Pro Thr Ala Val Leu Gly Asn Val Ile Ile Ser Leu Gly Lys Tyr		415
	420	425
Leu Gly Ser Val Asn Tyr Asn Ser Glu Gly Ile Ala Ile Gly Pro Pro		430
	435	440
Val Phe Thr Asp Lys Val Asp Ile Ser Ser Gln Ile Ser Ser Met Asn		445
450	455	460
Gln Ser Leu Gln Gln Ser Lys Asp Tyr Ile Lys Glu Ala Gln Arg Leu		
465	470	475
Leu Asp Thr Val Asn Pro Ser Leu Ile Ser Met Leu Ser Met Ile Ile		480
	485	490
Leu Tyr Val Leu Ser Ile Ala Ser Leu Cys Ile Gly Leu Ile Thr Phe		495
	500	505
Ile Ser Phe Ile Ile Val Glu Lys Lys Arg Asn Thr		510
515	520	

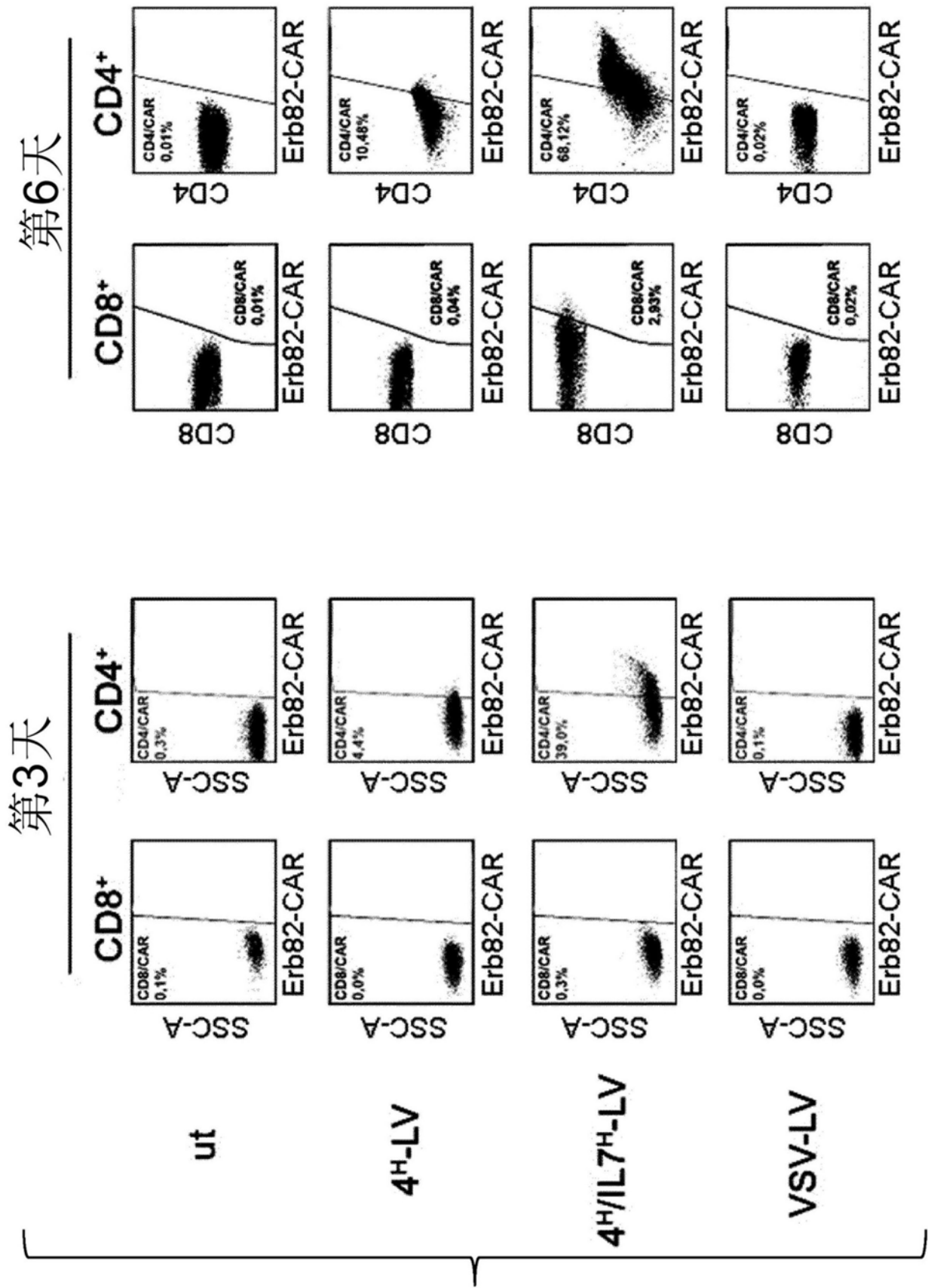


图1

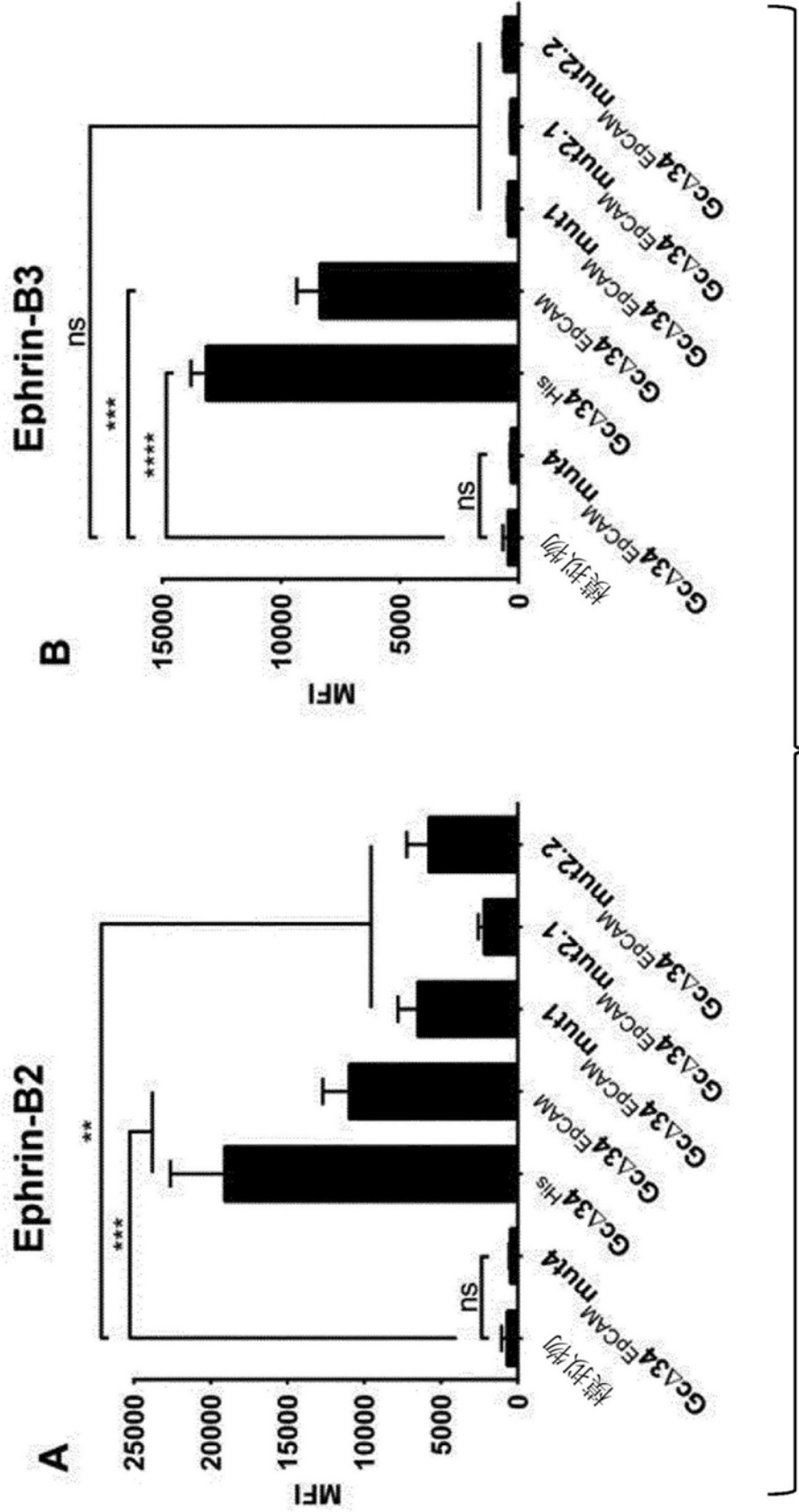
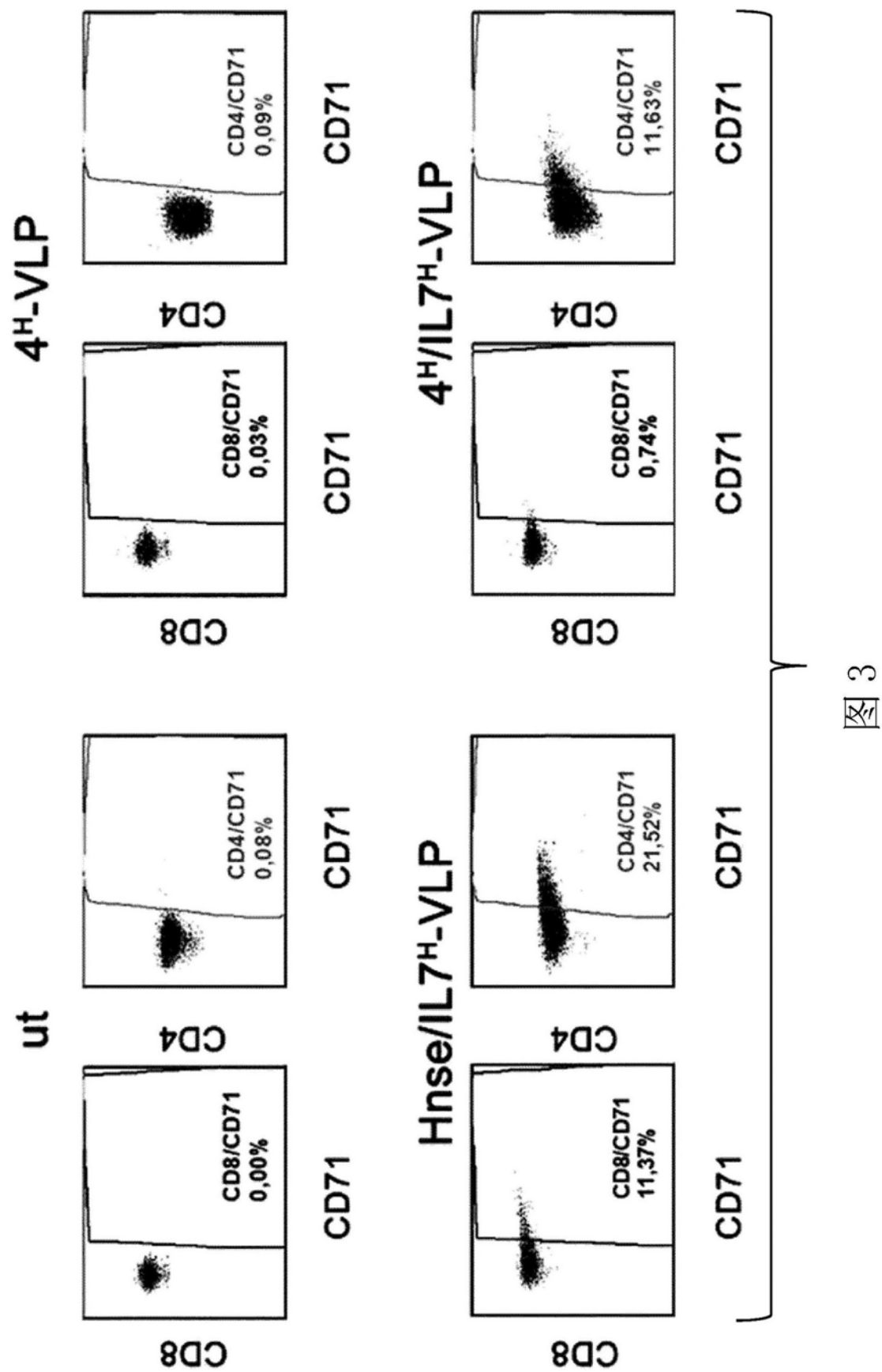


图 2



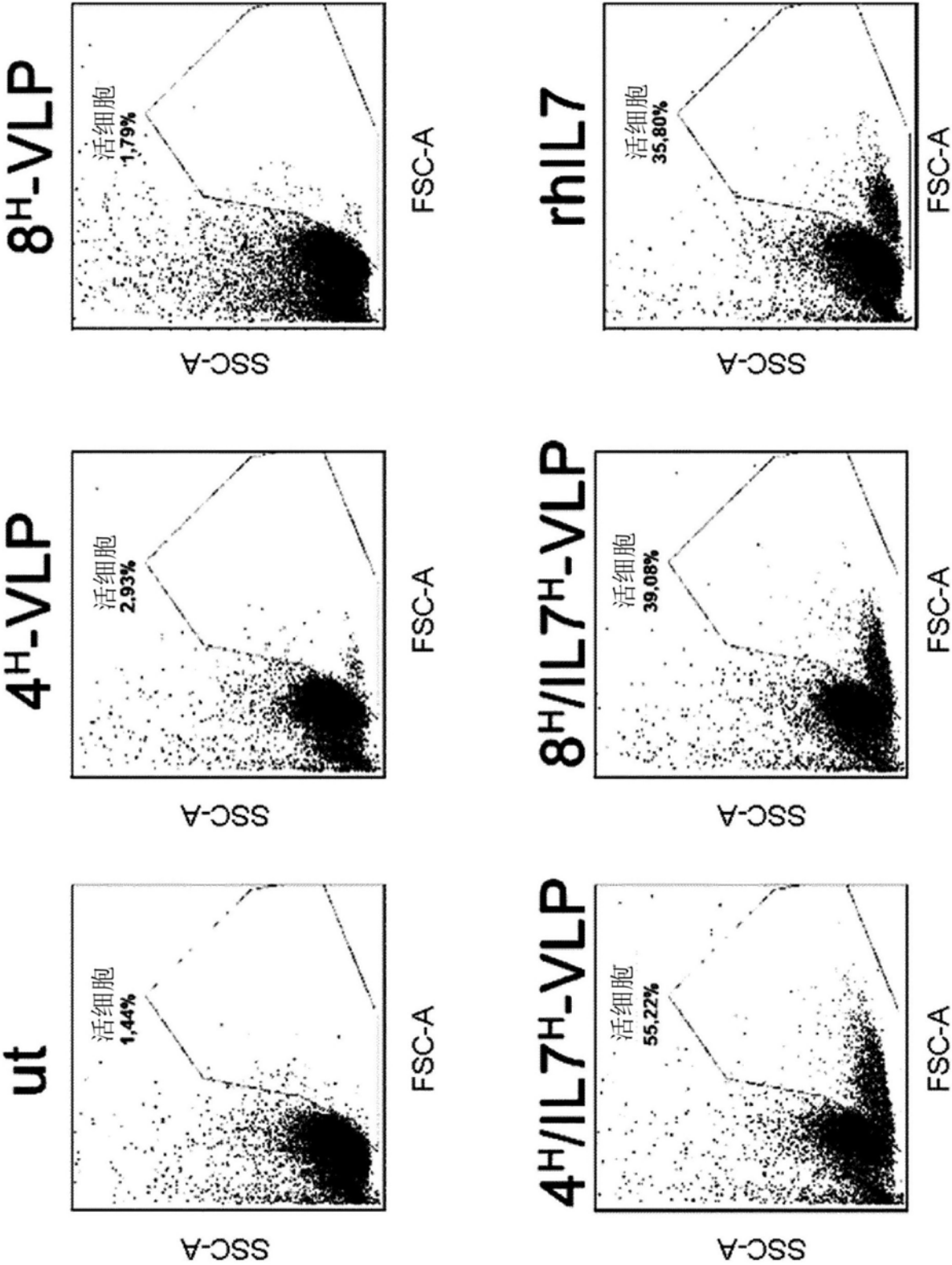


图4

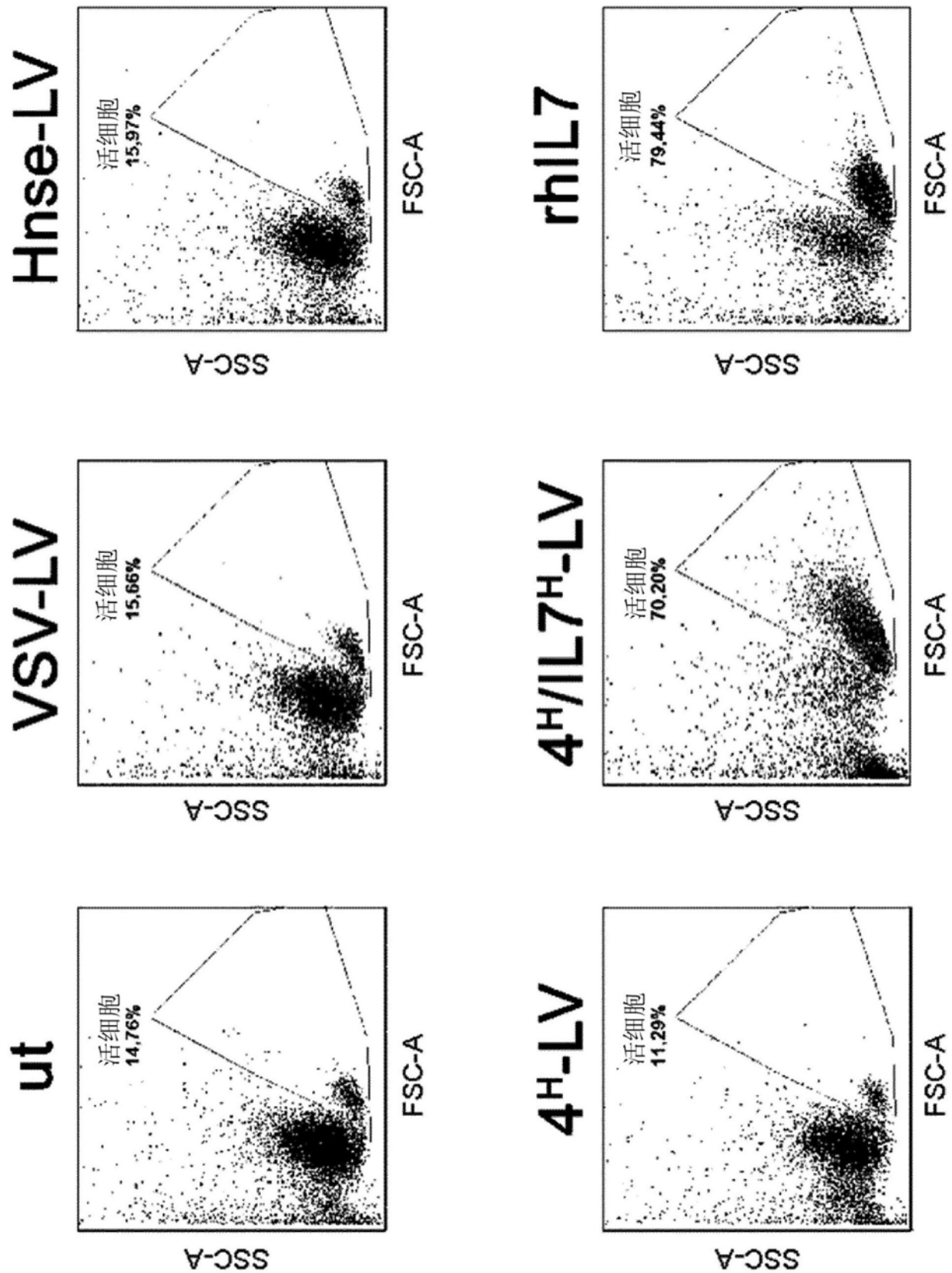


图5

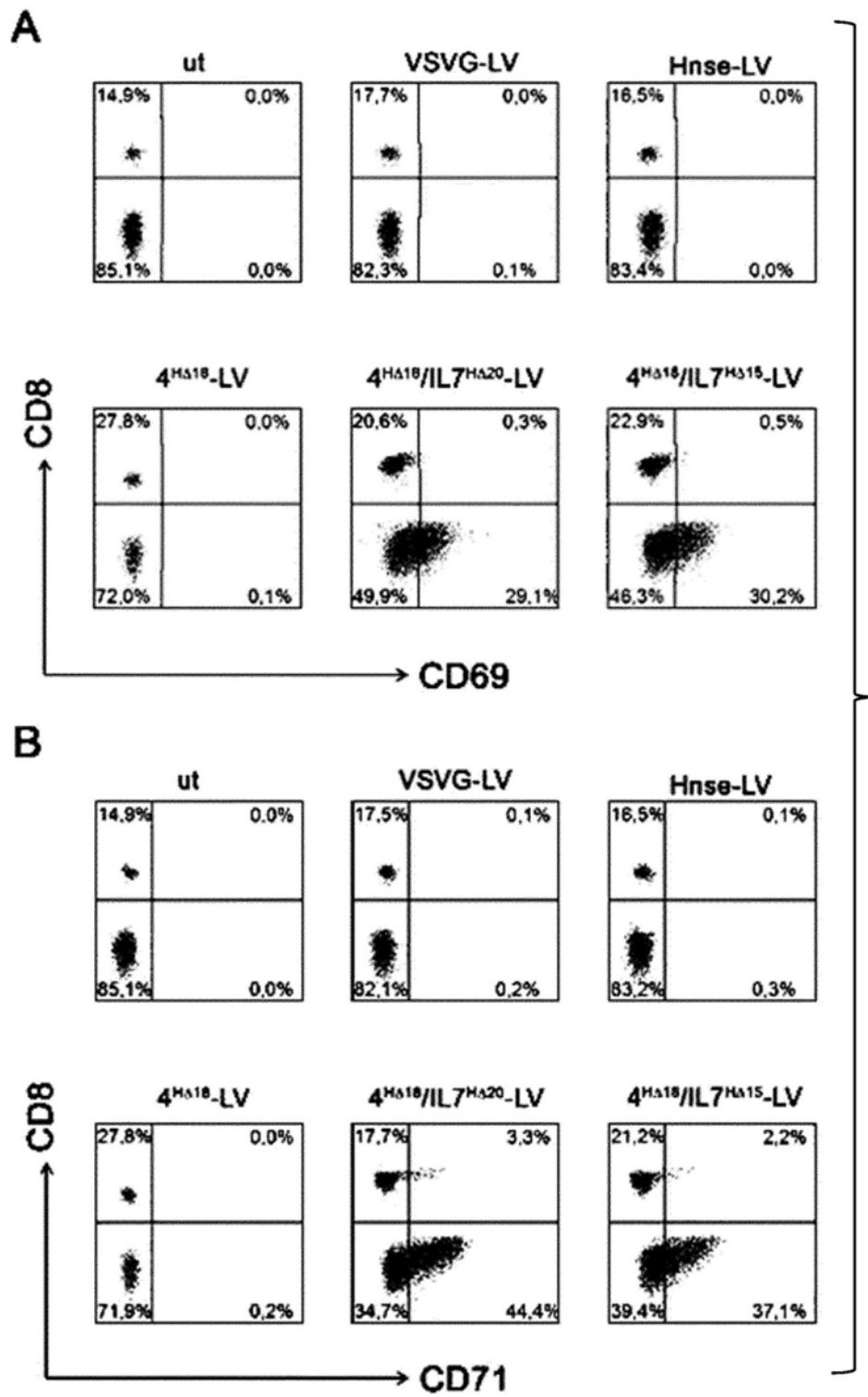


图6

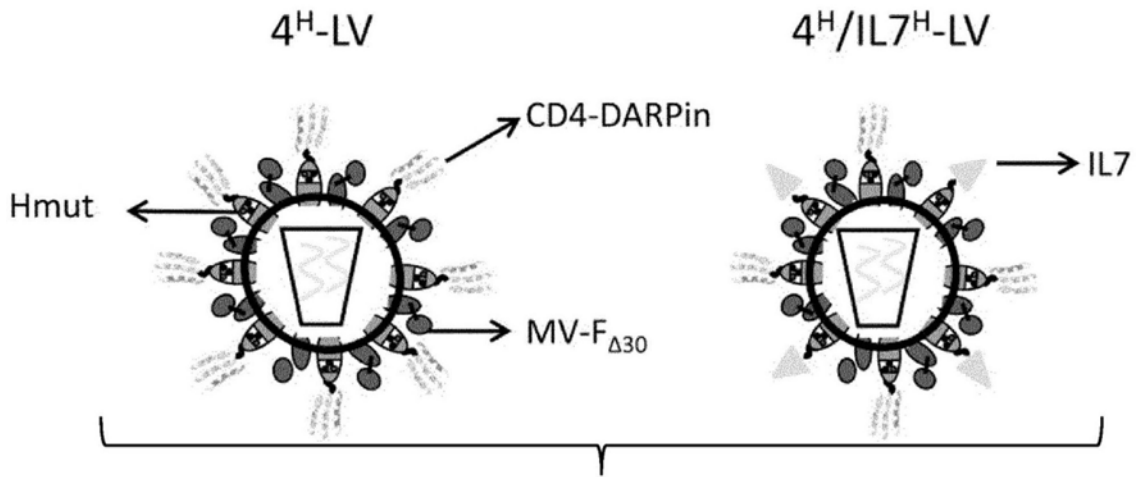


图 7

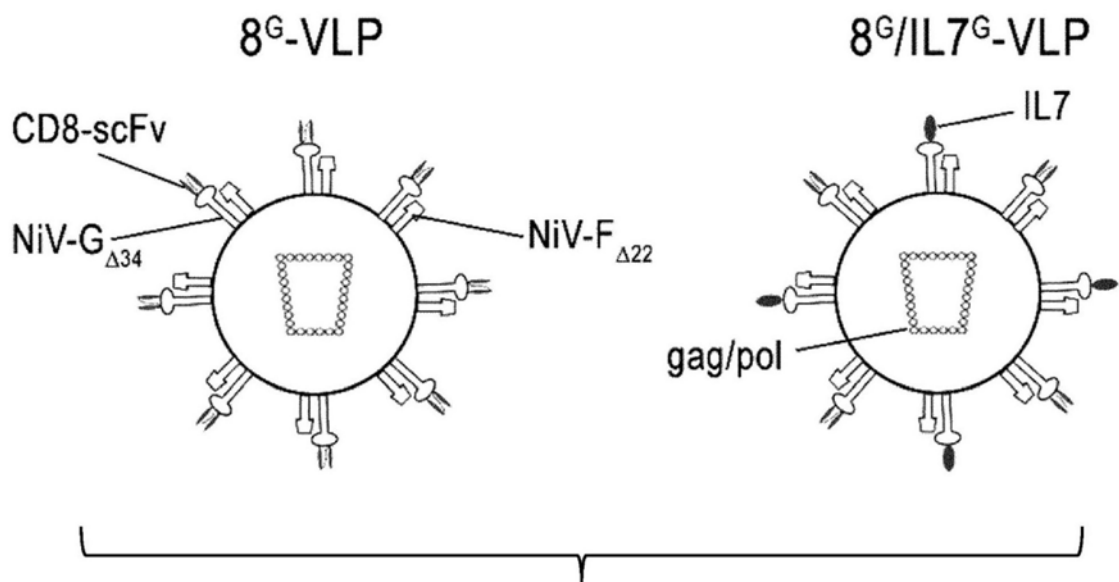


图 8

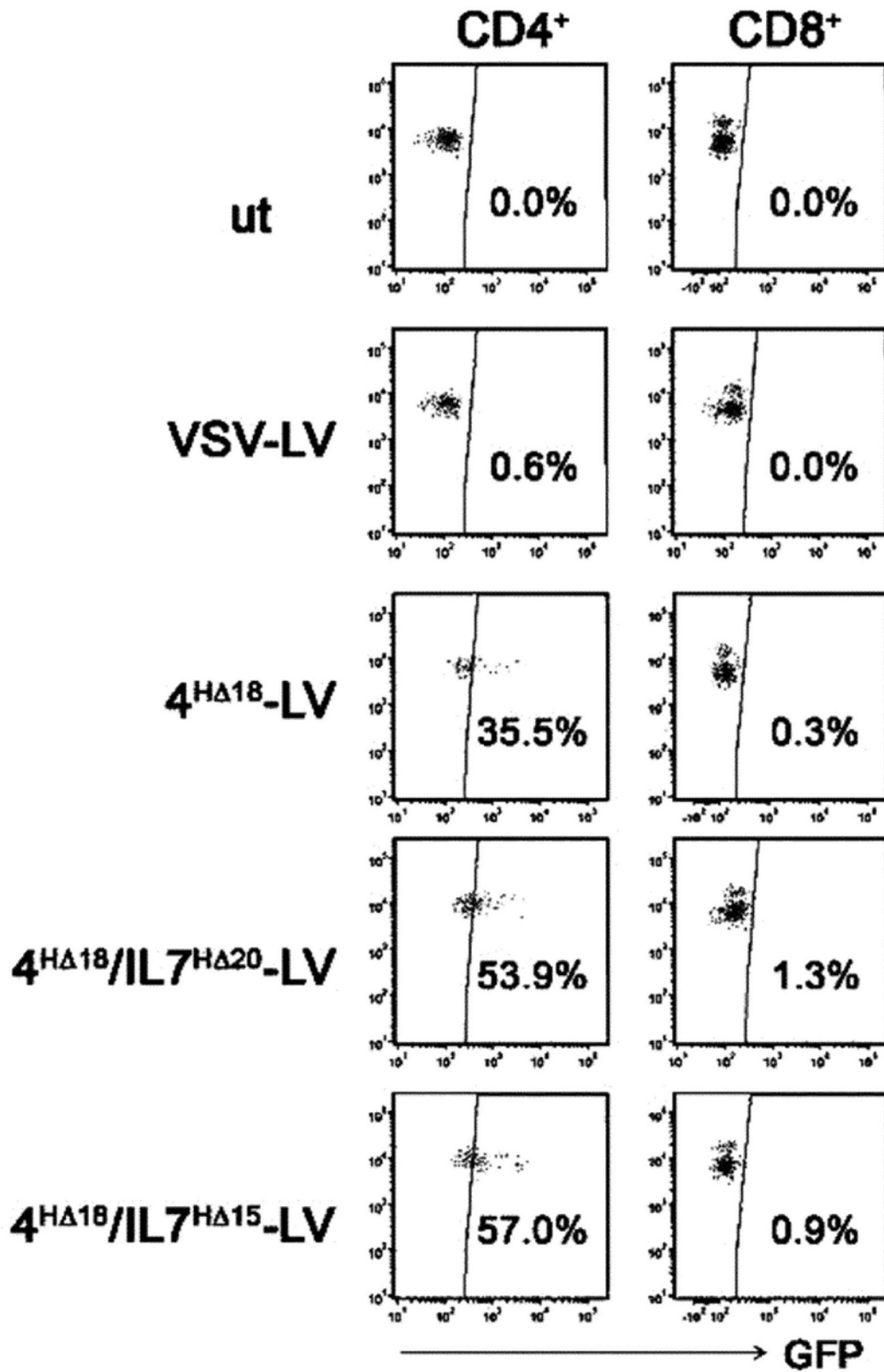


图9

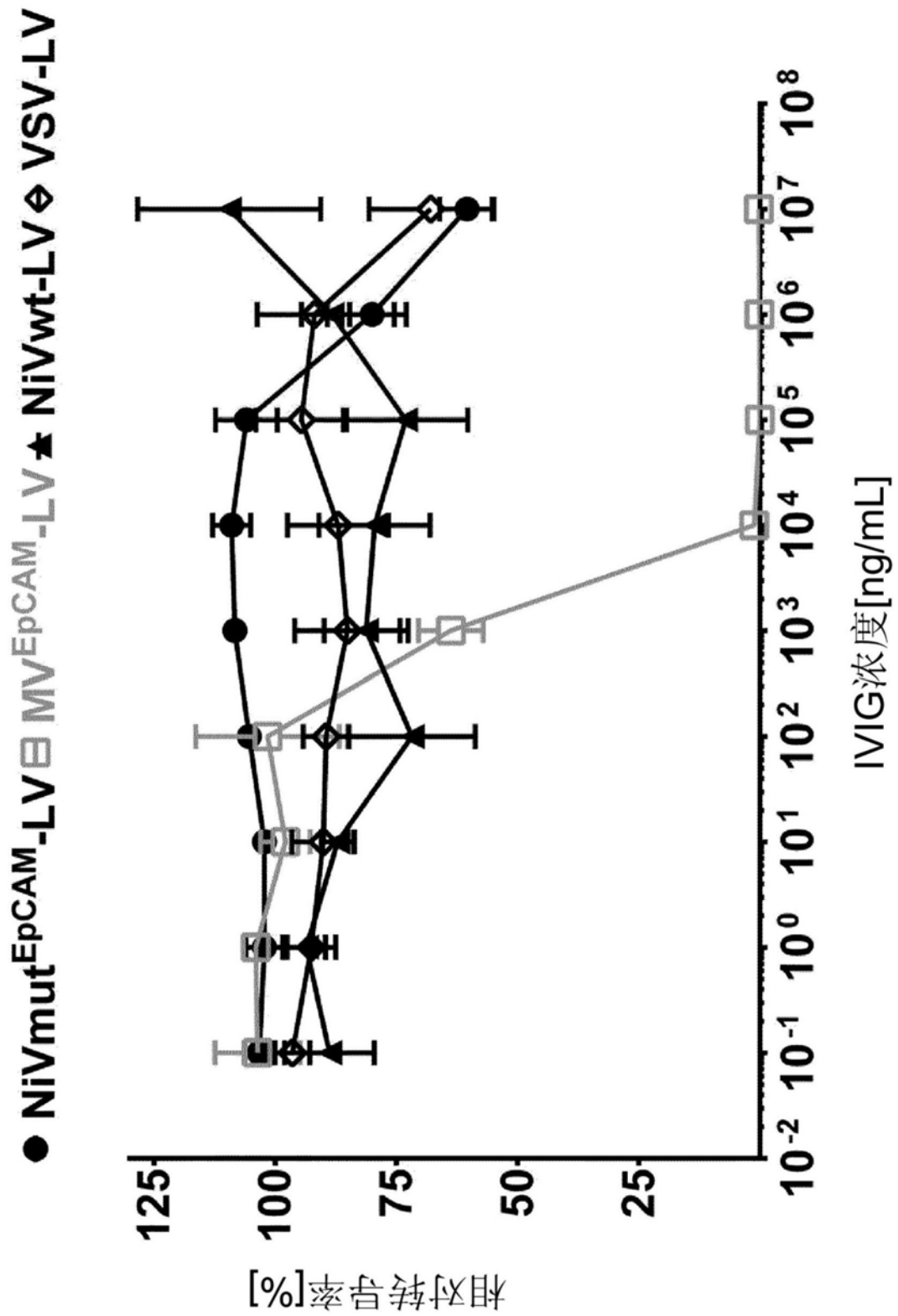


图10

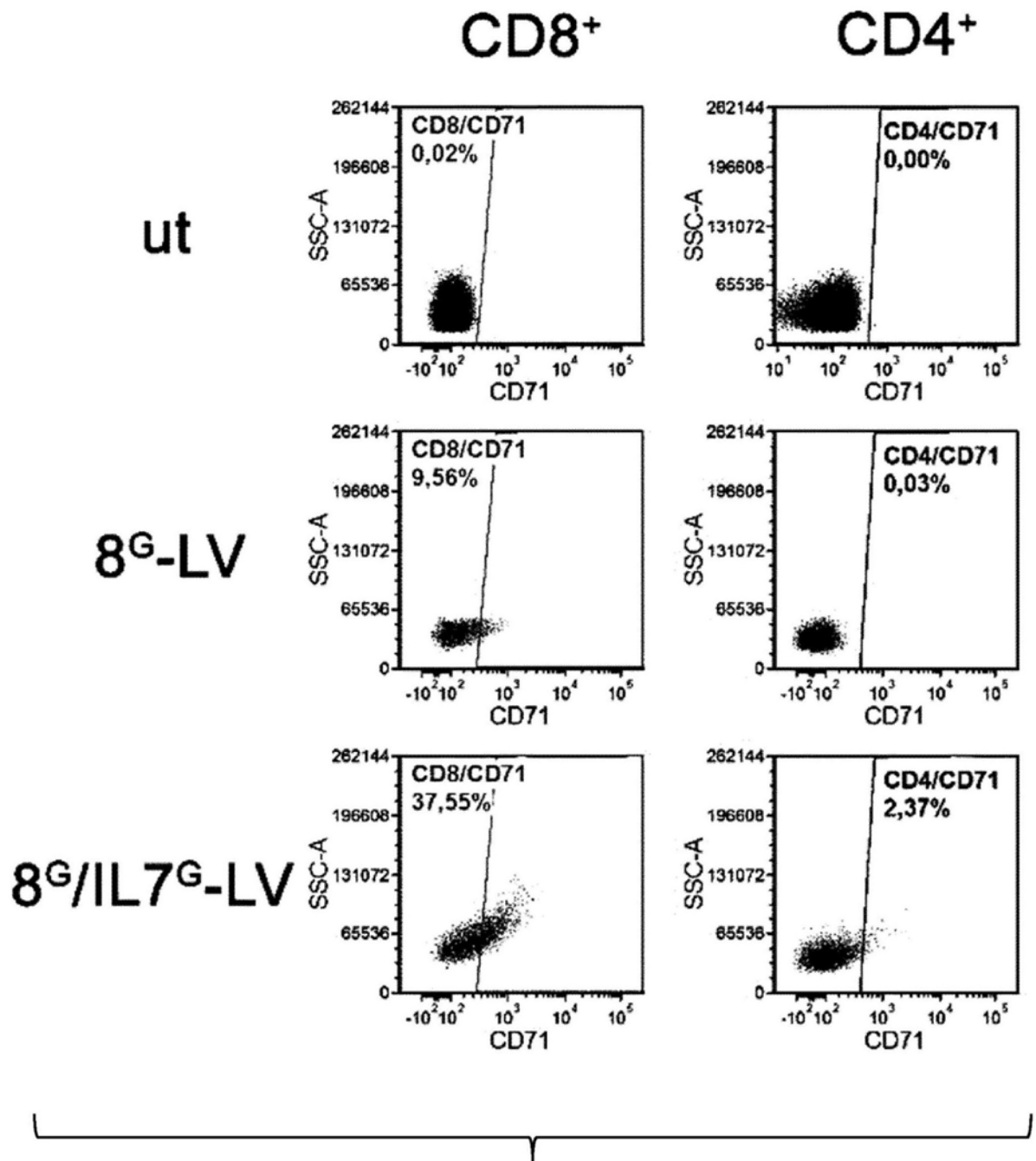


图 11

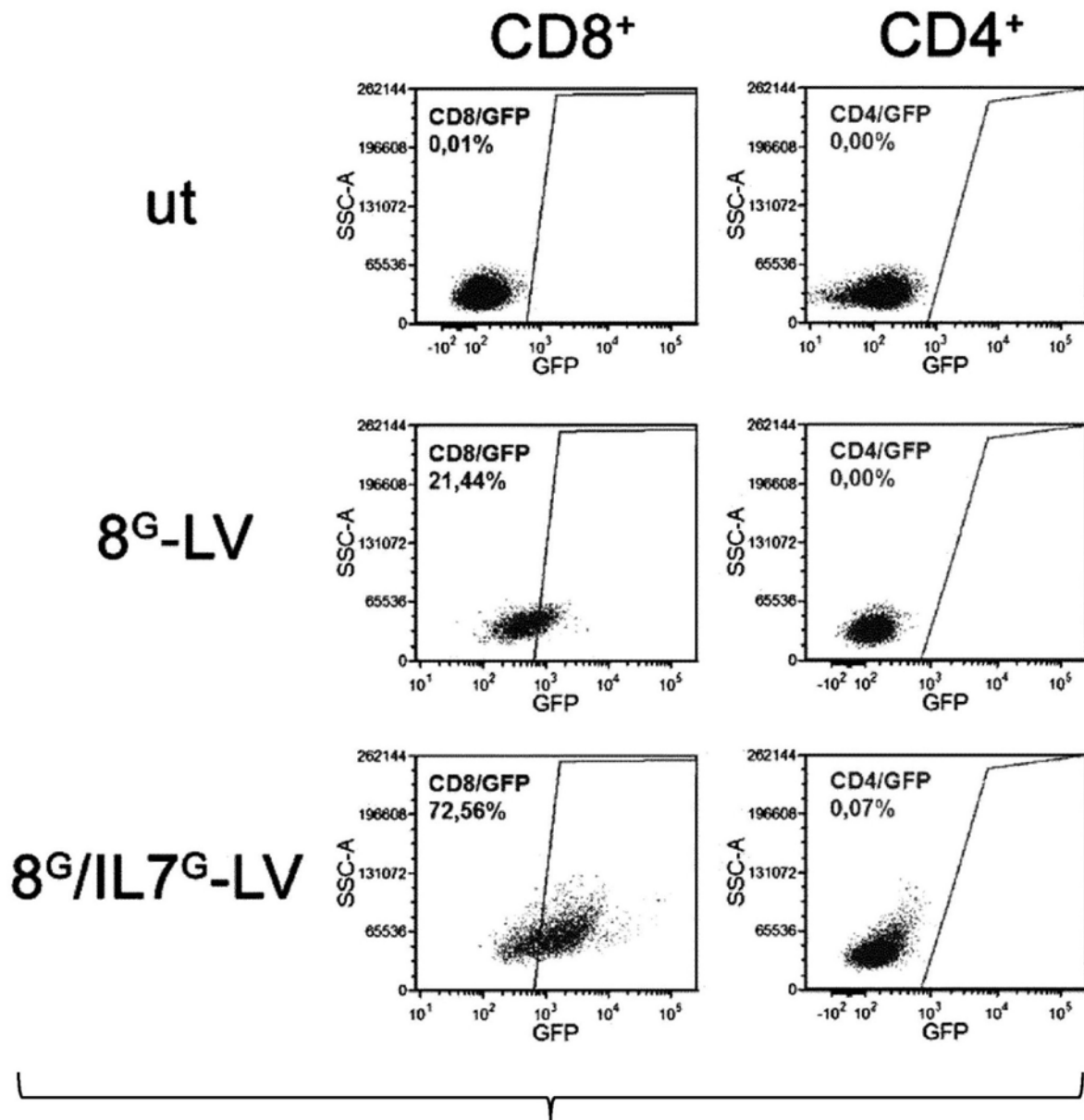


图 12

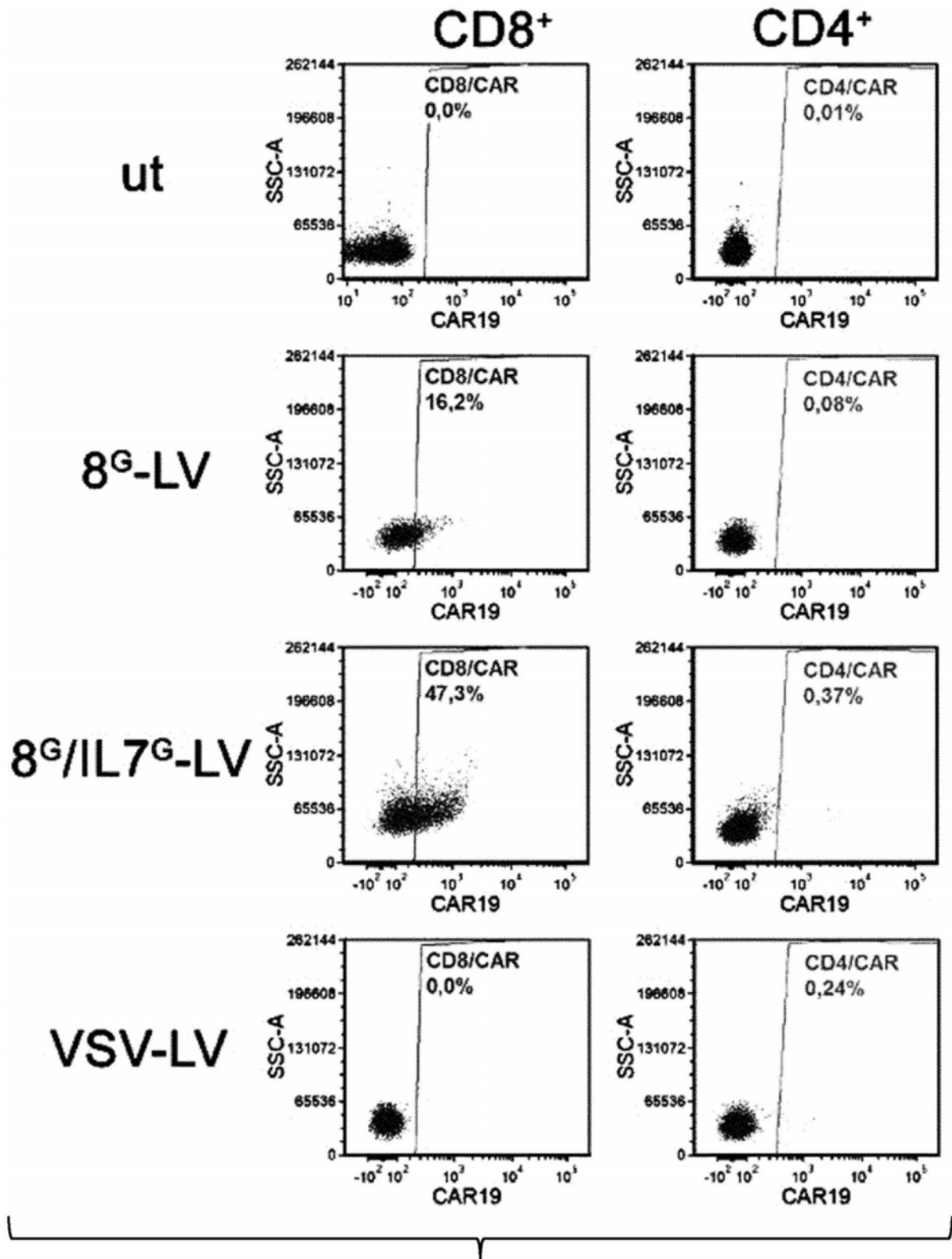


图 13

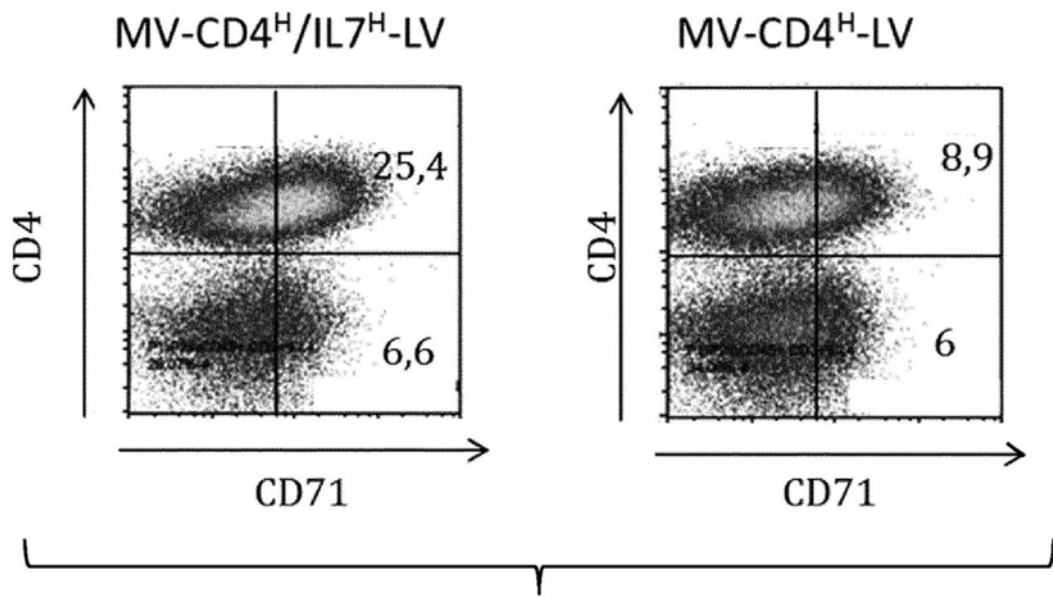


图 14