



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101760475 A

(43) 申请公布日 2010.06.30

(21) 申请号 200810240970.3

(22) 申请日 2008.12.25

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 2810 2008.12.22

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路  
15号

(72) 发明人 秦志海 吕继洲 徐迎新

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C12N 15/867(2006.01)

C12N 15/24(2006.01)

C12N 7/01(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

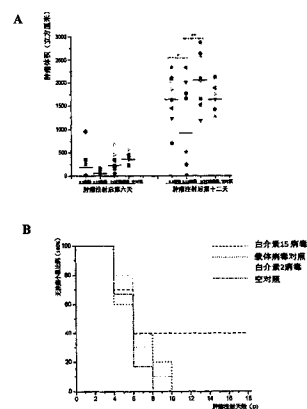
权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 6 页

(54) 发明名称

重组逆转录病毒载体

(57) 摘要

本发明提供一种新型重组逆转录病毒载体,其包括人白介素 15 基因和胸苷激酶基因 HSV-TK。所述重组逆转录病毒载体可在体外大量扩增 T 淋巴细胞并且保持其肿瘤抗原特异性;该载体可将人白介素 15 基因导入 T 淋巴细胞中,使其自我分泌白介素 15 刺激自身增殖,同时也可保持其肿瘤抗原特异性。本发明还涉及所述重组逆转录病毒载体的应用。



1. 一种重组逆转录病毒载体,所述重组逆转录病毒载体特征在于,其包含人白介素 15 基因和自杀基因,以及加强型真核启动子等。
2. 权利要求 1 所述的重组逆转录病毒载体,其中所述自杀基因是单纯疱疹病毒胸苷激酶 HSV-TK 基因,其存在于逆转录病毒载体 tglS(+)<sub>hytk</sub> 上。
3. 权利要求 1 或 2 所述的重组逆转录病毒载体,其中所述加强型真核启动子是 hEF1-HTLV。
4. 构建权利要求 3 所述的重组逆转录病毒载体的方法,所述方法包括:先将 hIL15 基因片段克隆到具有 hEF1-HTLV 启动子的质粒中,然后利用特异性 PCR 引物通过 PCR 扩增获得 hEF1-HTLV-hIL15 的融合基因片段,最后经过标准分子克隆技术克隆到 tglS(+)<sub>HyTKEF1a</sub> 载体中。
5. 权利要求 1-3 任一项所述的逆转录病毒载体的应用,其用于促进免疫细胞 T 细胞的存活、提高抗肿瘤免疫活性,进而抑制肿瘤的生长以及转移。
6. 权利要求 5 所述的应用,所述免疫细胞包括 CD4T 细胞、CD8T 细胞和 NK 细胞。
7. 权利要求 5 所述的应用,所述肿瘤是淋巴瘤 J558-0va。
8. 权利要求 1-3 任一项所述的重组逆转录病毒载体的应用,其用于制备抑制肿瘤体内生长以及转移的药物或试剂盒。
9. 一种抑制肿瘤体内生长以及转移的试剂盒,其包括治疗有效量的权利要求 1-3 任一项所述的重组逆转录病毒载体以及药用载体等。
10. 携带权利要求 3 所述的重组逆转录病毒载体的反转录病毒 TK-L15Retrovirus(CGMCC No. 2810)。

## 重组逆转录病毒载体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型重组逆转录病毒载体,其可应用于临床肿瘤免疫治疗,隶属于医学生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 恶性肿瘤是一种严重威胁人类健康的疾病。由于传统的化学疗法、放射性疗法以及手术疗法难以治疗患有转移瘤的肿瘤病人,肿瘤免疫学疗法受到免疫学家和医疗工作者的广泛关注与研究。在临床治疗领域,T细胞过继转移疗法作为重要的被动免疫疗法已经被成功地应用于血液系统来源的肿瘤疾病(1,2)。但是对于实体瘤的治疗,T细胞过继转移疗法的局限性在于:从肿瘤患者体内分离到的T淋巴细胞数量不足;其免疫活性、肿瘤特异性不高(4)。目前,临床上普遍的做法是在体外培养肿瘤特异性T淋巴细胞过程中加入重组白介素2(5),但是其临床应用的效果不明显。主要原因如下:白介素2可以引起T淋巴细胞对于Fas受体介导的凋亡途径敏感而使特异性的T细胞凋亡(6);白介素2还可以促进调节性T细胞的产生从而抑制肿瘤特异性T细胞功能,进而阻止免疫系统清除肿瘤(7,8)。过继转移免疫细胞进入肿瘤病人体内也有一定风险,即转入的免疫细胞可能会引起严重的自身免疫性疾病以及T细胞淋巴瘤。这种风险在将白介素2基因或白介素15基因转染入T细胞后会增加。

[0003] 因此,为了克服T细胞过继转移疗法的上述缺点,本发明人进行了本发明。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服T细胞过继转移疗法的上述缺点,提供一种新型重组逆转录病毒载体,所述重组逆转录病毒载体不但能够大量扩增肿瘤患者的T淋巴细胞并保持其肿瘤抗原特异性从而提高治疗效果,而且同时可以清除基因改造过的细胞,避免其在体内增殖所导致的自身免疫性疾病以及淋巴瘤,确保生物治疗的安全性。

[0005] 因此,本发明提供一种新型重组逆转录病毒载体,其特征在于包括人白介素15基因(SEQ. ID. No. 1,全长490bp,NCBI GeneBank序列登记号为:NM000585)和胸苷激酶基因(HSV-TK,SEQ. ID. No. 3,全长序列:1131bp,NCBI GeneBank序列登记号为:AB178228),以及真核启动子hEF1-HTLV序列,其中所述胸苷激酶基因是一种自杀基因。将该重组逆转录病毒载体命名为IL15-TK,本发明人已于2008年12月22日将携带该重组逆转录病毒载体IL15-TK的反转录病毒TK-L15 Retrovirus保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC,中国北京朝阳区大屯路中科院微生物研究所,100101),保藏登记号为:CGMCCNo. 2810。

[0006] 本发明的重组逆转录病毒载体IL15-TK可在体外大量扩增T淋巴细胞并且保持其肿瘤抗原特异性;该载体可将人白介素15基因导入T淋巴细胞中,使其自我分泌白介素15刺激自身增殖,同时也可保持其肿瘤抗原特异性。但是,自我分泌白介素15的T淋巴细胞

有可能导致自身免疫性疾病以及 T 淋巴细胞瘤, 而将自杀基因 (胸苷激酶) 一同导入 T 淋巴细胞能够避免这种情况发生, 从而确保生物医学治疗的安全性。

[0007] 本新型重组逆转录病毒载体 IL15-TK 含有人白介素 15 和胸苷激酶基因, 可感染包括人源、鼠源的各种原代细胞 (primary cells) 以及细胞系列 (cell lines)。在载体上强启动子的作用下, 被感染细胞可大量表达白介素 15 和胸苷激酶。

[0008] 在本发明的一个实施方案中, 利用含有 HSV-TK 的重组逆转录病毒载体 tglS(+)-HyTkEF1a-mIL4 (质粒图谱参见图 1E) (该质粒由德国 MDC 实验室 Thomas Blankenstein 博士馈赠, 构建方法参见参考文献 16), 酶切去除插入片段 mIL4 后载体自连获得 tglS(+)-HyTkEF1a (在下文中也简称为 TK 载体), 在此基础上构建了本发明的重组逆转录病毒载体 IL2-TK 和 IL15-TK, 其中已将携带 IL15-TK 的逆转录病毒 TK-IL15 Retrovirus 于 2008 年 12 月 22 日保藏于 CGMCC, 保藏号为 CGMCC No. 2810。本发明人重点研究 IL15-TK, IL2-TK 作为 IL15-TK 的功能研究的对照。

[0009] 在本发明的另一个实施方案中, 使用本发明构建的重组逆转录病毒载体 IL15-TK 和 IL2-TK 分别转染细胞, 被转染的细胞分泌的白介素 15 或白介素 2 可有效促进鼠源原代 T 细胞的增殖 (图 4)。

[0010] 在本发明的一个优选实施方案中, 证明了自分泌白介素 15 可维持 Ova 抗原特异性 CD4T 淋巴细胞的存活。

[0011] 在本发明的另一个优选实施方案中, 证明了自分泌白介素 15 的肿瘤特异性 T 淋巴细胞可以更好地介导肿瘤排斥, 而自分泌白介素 2 的肿瘤特异性 T 淋巴细胞不能达到上述效果。

[0012] 在本发明的实施方案中, 描述了本发明所述的重组逆转录病毒载体的应用, 其可以用于制备提供临床肿瘤免疫辅助治疗的药物或试剂盒, 可以配合传统的化学疗法、放射性疗法抑制肿瘤的复发以及转移。

[0013] 在本发明的优选实施方案中, 本发明提供一种试剂盒, 其包括治疗有效量的本发明的重组逆转录病毒载体以及药用载体等。该试剂盒可以用于提供临床肿瘤免疫辅助治疗, 可以配合传统的化学疗法、放射性疗法抑制肿瘤的复发以及转移。

[0014] 自分泌白介素 15 能刺激 T 淋巴细胞自我增殖, 帮助其摆脱对外界细胞因子的依赖, 加强对肿瘤靶细胞的识别与杀伤能力, 提高过继转移疗法的疗效。人白介素 15 与人白介素 2 一样同属  $\alpha$  受体家族, 可有效刺激 T 淋巴细胞 (T lymphocytes) 和天然杀伤细胞 (Nature killer cells) 等免疫细胞的增殖 (9), 增强免疫细胞的免疫活性, 并且能够维持免疫细胞的抗原特异性, 不引起 T 淋巴细胞丢失肿瘤特异性以及分化凋亡等 (10, 11)。Greenberg 发表在 Nature 上的文献证明: 在动物体内实验中, 人白介素 15 能打破肿瘤特异性 T 淋巴细胞的免疫耐受状态, 使其遇到肿瘤抗原后表现出更高的细胞因子分泌、更强的靶细胞杀伤活性及更好的体内治疗效果 (12, 13)。

[0015] 过继转移免疫细胞进入肿瘤病人体内也有一定风险, 即转入的免疫细胞可能会引起严重的自身免疫性疾病以及 T 细胞淋巴瘤。这种风险在将白介素 2 基因或白介素 15 基因转染入 T 细胞后会增加。为了避免这种情况出现, 我们将 HSV-TK 基因与白介素 15 基因一起转入免疫细胞。HSV-TK (herpes simplex virus thymidine kinase, 单纯疱疹病毒胸苷激酶) 是一种单纯疱疹病毒来源的自杀性基因, 在遇见化学药物丙氧鸟苷 (ganciclovir,

GCV) 后能将表达该基因的细胞杀死。GCV 是一种化疗药物,已在临床上使用。白介素 15 基因与 TK 基因重组在一起导入免疫细胞中,将使免疫细胞过继转移疗法的安全性增加。

[0016] 目前,有两种自杀系统被应用于临床治疗,分别是 HSV-TK(GCV) 系统和胞嘧啶脱氨酶 CD(5-FC) 系统。表达胞嘧啶脱氨酶 (cytosinedeaminase) 的可将细胞基因组内的 5 氟胞嘧啶转化为 5 氟尿嘧啶,最终诱导细胞凋亡。在本发明中,本发明人集中研究了 HSV-TK(GCV) 系统。

[0017] 综上所述,本新型重组逆转录病毒载体的有益效果包括:使 T 淋巴细胞或 NK 细胞自分泌白介素 15,能有效的刺激免疫细胞增殖并保持其抗肿瘤活性;同时,胸苷激酶(自杀基因)的引入又有效避免了 T 淋巴细胞的所导致的自身免疫性疾病以及 T 淋巴瘤,确保了生物技术治疗的安全性。

### 附图说明

[0018] 从下面结合附图对重组逆转录病毒载体的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

[0019] 图 1 显示本发明的重组逆转录病毒载体的示意图。其中:

[0020] A. 重组逆转录病毒载体 IL15-TK:1. 5' 端 LTR;2. 包装信号  $\Psi$  信号;3. RNA 选择性剪切位点 SD-SA;4. 胸苷激酶基因 HSV-TK;5. 真核启动子 hEF1-HTLV;6. 人白介素 15 基因 (hIL15);7. 3' 端 LTR。

[0021] B. 重组逆转录病毒载体 IL2-TK:1. 5' 端 LTR;2. 包装信号  $\Psi$  信号;3. RNA 选择性剪切位点 SD-SA;4. 胸苷激酶基因 HSV-TK;5. 真核启动子 hEF1a;6. 人白介素 2 基因 (hIL2);7. 3' 端 LTR。

[0022] C. 携带人白介素 15 基因的 InvivoGen 公司商业化质粒 pORF-hIL15 的图谱,其上的真核启动子为 hEF1-HTLV。

[0023] D. 携带人白介素 2 基因的质粒载体 pCDNA3-hIL2 的图谱。

[0024] E. 携带胸苷激酶 TK 自杀基因的重组逆转录病毒载体 tg1s(+)HyTKEF1a-mIL4 的图谱,以此示意 tg1s(+)HyTKEF1a 的图谱,前者与后者的区别在于前者插入了小鼠 mIL4 基因。

[0025] 图 2 显示成功构建了 IL2-TK,并且转染了 IL2-TK 的 293T 细胞可分泌人白介素 2。A,构建的 IL2-TK 质粒的酶切消化测定,经过 BamHI 消化处理,IL2-TK 可被切成两个片段(506bp 的人白介素 2 基因与 8200bp 的其他载体组件);B,转染了 IL2-TK 的 293T 细胞分泌人白介素 2 的 ELISA 测定,结果表明导入 IL2-TK 的 293T 可分泌大量的人重组白介素 2。

[0026] 图 3 显示成功构建了 IL15-TK,并且转染了 IL15-TK 的 293T 细胞可分泌人白介素 15。A,构建的 IL15-TK 质粒的酶切消化测定,经过 BamHI 消化处理,IL15-TK 可被切成两个片段(512bp 的人白介素 2 基因与 8200bp 的其他载体组件);B,转染了 IL15-TK 的 293T 细胞分泌人白介素 15 的 ELISA 测定,结果表明导入 IL15-TK 的 293T 可分泌大量的人重组白介素 15。

[0027] 图 4 显示转染了 IL15-TK 以及 IL2-TK 的 293T 细胞分泌的白介素 15 与白介素 2 可有效促进鼠源原代 Do11. 10CD4T 细胞的增殖。

[0028] 图 5 显示转染了重组逆转录病毒载体以及包装载体的细胞可生产含有 IL2-TK(A) 与 IL15-TK(B) 的逆转录病毒。提取包装细胞培养上清中的 RNA 后,利用对人白介素 15 与

人白介素 2 基因特异性的引物检测到含有白介素 15 与白介素 2 重组逆转录病毒载体。

[0029] 图 6 显示含有 IL2-TK 以及 IL15-TK 的逆转录病毒可成功感染人 JurkatT 淋巴细胞系。感染逆转录病毒的 Jurkat 细胞可分泌人白介素 2(A) 和人白介素 15(B)。6C 和 D 显示胞内染色结果, 同样也证明感染 Re-IL2(IL2-TK) 逆转录病毒的 Jurkat 细胞可产生人白介素 2(6C), 以及感染 Re-IL15(IL15-TK) 逆转录病毒的 Jurkat 细胞可产生人白介素 15(6D)。

[0030] 图 7 显示转移到 GCV 细胞培养基 (0uM, 0.2uM, 1uM 以及 5uM) 中可以引起表达 TK 基因的 293T 细胞死亡。

[0031] 图 8 显示自分泌白介素 15 可维持 Ova 抗原特异性 Do11.10CD4T 淋巴细胞的存活。在 T 细胞刺激信号 aCD3 和 aCD28 的作用下, 自分泌人白介素 15 的抗原特异性 CD4T 细胞能够维持存活, 而自分泌人白介素 2 的 CD4T 细胞则更容易凋亡。

[0032] 图 9 显示自分泌白介素 15 的肿瘤特异性 T 淋巴细胞可更好地介导肿瘤排斥。A, 在对小鼠模型注射 J558-Ova 肿瘤后第 2 天通过尾静脉注射过继体外培养的 Ova 特异性 CD4T 细胞, 在第 6 天和第 12 天, 观察并记录肿瘤生长情况。小鼠分为 4 组, 每组分别注射自分泌白介素 15 的 T 细胞、自分泌白介素 2 的 T 细胞、对照病毒感染 T 细胞, 在同一组中, 相同的符号代表同一只小鼠在不同检测时间的肿瘤大小。结果表明, 自分泌白介素 15 的 Do11.10CD4T 细胞在体内可更好的抑制 J558-Ova 肿瘤生长; B, 分泌白介素 2 的 T 淋巴细胞没有上述效果; 而且, 在过继转移小鼠模型中, 自分泌白介素 15 的 Do11.10CD4T 细胞可介导小鼠体内的 J558-Ova 肿瘤排斥。

### 具体实施方式

[0033] 以下通过实施例来进一步阐明本发明。但是应该理解, 所述实施例只是举例说明的目的, 并不意欲限制本发明的范围和精神。

[0034] 实施例 1: 构建重组逆转录病毒载体

[0035] 重组逆转录病毒载体 IL15-TK 和 IL2-TK 的示意图参考图 1A 和 1B。

[0036] 重组逆转录病毒载体的构建是基于携带 TK 自杀基因的逆转录病毒载体 tglS(+)-HyTKEF1a (简称 TK 载体) 进行的。tglS(+)-HyTKEF1a 由 tglS(+)-HyTK 质粒 (14) 引入真核启动子 EF1a 改造获得。tglS(+)-HyTKEF1a 上携带的 TyTK 融合基因编码 hph 和 HSV-1TK 酶活性。

[0037] IL2-TK 重组逆转录病毒载体构建:

[0038] a) 获得 hIL2 基因片段:

[0039] 以携带人白介素 2 基因的质粒载体 pcDNA3-hIL2 (质粒图谱见图 1D, 其序列为 SEQ. ID. No. 6, 其中人白介素 2 基因位于碱基 913-1374 处) (该质粒由河北医科大学王永祥实验室馈赠, 参见参考文献 15) 为模板, 设计人白介素 2 基因引物, 正向引物 1 (CgC ggATCC gCgATgTACAggATgC) 和反向引物 1 (CgC ggATCC gCgCTCAAgtCAgTgT), PCR 扩增, PCR 的条件为: 94°C 变性 1 分钟; 94°C 变性 30 秒, 60°C 退火 30 秒, 72°C 延伸 30 秒, 30 个循环; 72°C 10 分钟; 由此获得 hIL2 基因片段。

[0040] b) 人白介素 2 基因片段处理:

[0041] 将步骤 1 中通过 PCR 获得的 hIL2 基因片段连接到 promega 公司的 T 载体上, 而后用 BamHI 处理获得带有 BamHI 粘端的 hIL2 基因片段。

- [0042] c) 携带 TK 逆转录病毒载体 tg1s(+):HyTKEF1a 的处理 :
- [0043] 用 BamHI 酶切 tg1s(+):HyTKEF1a 质粒, 获得 7.6Kb 大小 BamHI 粘端 TK 逆转录病毒载体。
- [0044] d) 连接构建 hIL2-TK 逆转录病毒载体 :
- [0045] 将步骤 b) 获得的带有 BamHI 粘端的基因片段与步骤 c) 获得的酶切的载体片段相连接, 获得 hIL2-TK 重组逆转录病毒载体, 其中连接的体系和条件如下 :
- [0046] T4DNA 连接酶 :2 单位
- [0047] 10× 连接酶缓冲液 :2ul
- [0048] 酶切处理的 hIL2 片段 :80ng
- [0049] 酶切处理的载体片段 :1ug
- [0050] 双蒸水 :总体积补到 20ul
- [0051] 16°C 连接过夜。
- [0052] IL15-TK 重组逆转录病毒载体构建 :
- [0053] 我们在构建重组白介素 2 与白介素 15 重组逆转录病毒载体的过程中, 发现在相同启动子 EF1a 下人白介素 15 的表达产量与白介素 2 相比较低得多 (结果未显示)。为了解决这个问题, 我们采用了启动子替换策略, 即用 hEF1-HTLV 融合启动子替换 EF1a 启动子。本领域的技术人员应该理解, 启动子替换的策略有很多方法可以实现。例如, 可以先将 hIL15 基因片段克隆到具有 hEF1-HTLV 启动子的质粒中, 然后利用特异性 PCR 引物通过 PCR 扩增获得 hEF1-HTLV-hIL15 的融合片段, 最后经过标准分子克隆技术克隆到 TK 载体中。在本实施例中, 我们试图利用购自 InvivoGen 公司的原始白介素 15 质粒 (pORF-hIL15) 上的 hEF1-HTLV 融合启动子进行启动子替换, 提高人白介素 15 表达产量。
- [0054] IL15-TK 重组逆转录病毒载体构建过程如下 :
- [0055] a) 获得包括 hEF1-HTLV 融合启动子以及人重组白介素 15 基因的 PCR 片段 :
- [0056] 以携带 hEF1-HTLV 融合启动子以及人白介素 15 基因的质粒载体 pORF-hIL15 (质粒图谱见图 1C, 质粒序列为 SEQ. ID. No. 5) (InvivoGen 公司, 目录号 :porf-hil15, 其中人白介素 15 基因 hIL15 位于碱基 690-1178 处, hEF1-HTLV 启动子位于碱基 1-544 处 (SEQ. ID. No. 4)) 为模板, 设计正向引物 2 (CCCggg gCTCCggTgCCCgTC) 和反向引物 2 (ggATCC TCAATT gCA ATC), PCR 扩增, PCR 的条件为 :94°C 变性 1 分钟 ;94°C 变性 30 秒, 60°C 退火 30 秒, 72°C 延伸 30 秒, 30 个循环 ;72°C 10 分钟 ;由此获得包括 hEF1-HTLV 融合启动子以及人重组白介素 15 基因的 PCR 片段 hEF1-HTLV-hIL15。
- [0057] b) 人白介素 15 基因片段处理 :
- [0058] 将步骤 1 获得的 hEF1-HTLV-hIL15 片段连接到 promega 公司的 T 载体上, 使用 SmaI 与 BamHI 双酶切处理质粒, 获得 SmaI 平末端以及 BamHI 粘末端。
- [0059] c) 携带 TK 逆转录病毒载体 tg1s(+):HyTKEF1a 的处理 :
- [0060] 使用 HindIII 处理 tg1s(+):HyTKEF1a 质粒, 而后用 T4DNA 聚合酶补成平末端, 而后 BamHI 处理获得粘末端。
- [0061] d) 连接构建 hIL15-TK 逆转录病毒载体 :
- [0062] 将步骤 b) 获得的基因片段与步骤 c) 获得的载体片段相连接, 获得 hIL15-TK 重组逆转录病毒载体。该 hIL15-TK 重组逆转录病毒载体携带 hEF1-HTLV 加强型启动子。

[0063] 其中连接的体系和条件如下：

[0064] T4DNA 连接酶 :2 单位

[0065] 10× 连接酶缓冲液 :2u1

[0066] 酶切处理的 hEF1-HTLV-hIL15 片段 :80ng

[0067] 酶切处理的载体片段 :1ug

[0068] 双蒸水 :总体积补到 20u1

[0069] 16℃连接过夜

[0070] 本发明人对携带 IL15-TK 的反转录病毒 TK-L15 Retrovirus 进行了保藏,保藏号为 CGMCC No. 2810,保藏日期为 2008 年 12 月 22 日。

[0071] 本发明所用的基因序列说明见下表 1。

[0072] 表 1 :本发明所用的基因序列说明

[0073]

| SEQ. ID. No. | 名称                                 |
|--------------|------------------------------------|
| 1            | 人 IL-15 (GeneBank 序列登记号 :NM000585) |
| 2            | 人 IL-2 (GeneBank 序列登记号 :NM000586)  |
| 3            | HSV-TK 全长序列                        |
| 4            | 启动子 hEF1-HTLV                      |
| 5            | pORF-hIL15 质粒                      |
| 6            | pcDNA3-hIL2 质粒                     |

[0074] 然而,本领域的技术人员应该理解,插入的基因片段 IL2 和 IL15 还可以通过本领域公知的分子克隆方法获得,例如,从样品组织中提取总 RNA,设计特异性引物,进行 RT-PCR 可获得目的插入片段。

[0075] 因此,IL2-TK 和 IL15-TK 分别采用两种不同的启动子,即 EF1a 和 hEF1-HTLV。EF1a 真核启动子源于人真核翻译延伸因子 1a 的启动子 (Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1), EF1a 启动子可在人类脑部、胎盘、肺部、肝脏、肾脏以及前列腺等部位大量启动表达下游基因。实际应用于生物技术领域后,该启动子无组织特异性,可在各种真核细胞中高水平启动表达,是目前真核表达最常用的启动子之一。hEF1-HTLV 加强型启动子是将人 T 细胞白血病病毒 (HTLV) 的 I 型 LTR 序列中的 R 组件以及部分 U5 序列重组到 EF1a 启动子的后面,该融合型启动子可增强下游 DNA 与 RNA 序列的稳定性。因此,融合启动子也可通过加强 RNA 转录产物的稳定性增加下游基因的表达产物的量。

[0076] 对于 IL2-TK, IL2 的表达受启动子 EF1a 的控制,而对于 IL15-TK, hEF1-HTLV 融合启动子替换了 EF1a 启动子,能够提高人白介素 15 表达产量。然而,实验结果证明:融合启动子能够将白介素 15 的产量提高,但是依然达不到白介素 2 的表达水平。



[0077] 在 Rosenberg 先生 2008 年 5 月发表在 Human Gene Therapy 上的文章表明：自分泌人白介素 2 的肿瘤特异性 CD8T 细胞不能比未经改造过的 T 细胞更好的介导肿瘤排斥。这与我们的实验结果相一致（图 9）。因此，本发明重点研究 IL15-TK。

[0078] 人白介素 15 在天然状态下转录产物 RNA 不稳定，在同等转录水平下蛋白翻译产物的量不高。可以换用其他真核启动子能够进一步提高人白介素 15 的表达水平，但是表达量的高低与实际医药治疗效果不成比例。这需要进一步检验。我们所能确定的是在目前的表达水平下，自分泌白介素 15 可有效加强特异性 T 细胞的肿瘤抑制效果。

[0079] 实施例 2：构建逆转录病毒包装载体细胞

[0080] 1. 将  $5 \times 10^5$  的人胚肾细胞系 293T 铺六孔板，每孔加入 1ml 无血清、无抗生素的 1640 培养基，在 pH 值 7.2-7.4、温度 37℃、相对湿度 95%、5% CO<sub>2</sub> 培养条件下孵育 12 小时。

[0081] 2. 在 100ul 无血清、无抗生素的 1640 培养基中加入 3ul lipofectamine2000 转染试剂，同时在 100ul 无血清、无抗生素的 1640 培养基中加入 0.2ug 重组逆转录病毒载体 (IL2-TK, IL15-TK 或 TK) 以及 1ug 病毒包装载体 10A1，室温放置 5 分钟。

[0082] 3. 混合溶于培养基中的转染质粒与转染试剂，室温下放置 15 分钟。

[0083] 4. 用 800ul 无血清、无抗生素 1640 培养基更换原始 293T 细胞培养基。

[0084] 5. 将转染质粒、转染试剂的混合液加入 293T 细胞培养基中。37℃ 孵育 4 小时。

[0085] 6. 用含有 10% 小牛血清以及 10% 抗生素的 1640 培养基更换含有转染试剂的培养基。

[0086] 7. 在 pH 值 7.2-7.4、温度 37℃、相对湿度 95%、5% CO<sub>2</sub> 培养条件下孵育 72 小时。

[0087] 8. 加入 75ug/ml 潮霉素 B 进行阳性克隆筛选。

[0088] 9. 7 天后，保存阳性克隆。收取细胞培养上清即可获得病毒。

[0089] 实施例 3：重组逆转录病毒载体感染人 Jurkat 细胞系

[0090] 感染实验按照本领域技术人员已知的常规方法进行。简述感染步骤如下：

[0091] 1. 在直径 8cm 细胞培养皿中铺  $5 \times 10^6$  实施例 2 中获得的病毒包装细胞。加入 5ml 1640 培养基。在 pH 值 7.2-7.4、温度 37℃、相对湿度 95%、5% CO<sub>2</sub> 培养条件下中孵育 48 小时。

[0092] 2. 收集含有逆转录病毒的包装细胞培养上清，使用 0.45 μm 滤膜过滤消除细胞碎片。

[0093] 3. 将步骤 2 收集的病毒滴度调整到  $2 \times 10^6$ /ml，加入 polybrene（聚凝胺）到终浓度 6ng/ml。

[0094] 4. 将  $2 \times 10^5$  Jurkat 细胞重悬在 1ml 步骤 3 的病毒上清中（病毒：靶细胞（个数比）= 10 : 1）。

[0095] 5. 在 1500g, 30℃ 下离心 90min，而后在培养箱中放置 150min。

[0096] 6. 为感染过的 Jurkat 细胞更换新鲜 1640 培养基。

[0097] 7. 感染 72 小时后，可利用人白介素 15 与人白介素 2 胞内抗体染色检测细胞的感染率。

[0098] 经过潮霉素 (200ug/ml) 两周的筛选，感染 IL15-TK 病毒的 Jurkat 细胞的上清中可以检测到白介素 15 的表达。同理，感染 IL2-TK 病毒的 Jurkat 细胞的上清中也可以检测到白介素 2 的表达。表明逆转录病毒成功感染了 Jurkat 细胞。

[0099] 实施例 4 :重组逆转录病毒载体的效果检测

[0100] 1. 重组逆转录病毒载体上人白介素 15 与白介素 2 基因功能检测。

[0101] 在直径 8cm 的培养皿中铺  $5 \times 10^6$  个 293T 细胞 (包括四种 293T 细胞 :转染了 IL2-TK 的、转染了 IL15-TK 的、转染了对照组载体的 mock-TK 以及没有转染载体的对照组), 加入 7ml 1640 培养基。60 小时, 收集细胞培养上清 ELISA 检测白介素 2。结果表明导入重组逆转录病毒载体 IL2-TK 的 293T 细胞可分泌大量的人重组白介素 2, 分泌量达到 32.3ng/ml (图 2B), 导入重组逆转录病毒载体 IL15-TK 的 293T 细胞可分泌大量的人重组白介素 15, 分泌量达到 1315pg/ml (图 3B)。

[0102] 分别收集上述四种 293T 细胞的培养上清 (转染了 IL2-TK 的、转染了 IL15-TK 的、转染了对照组载体的 mock-TK 以及没有转染载体的对照组)。使用重组人白介素 2 或人白介素 15 (浓度分别为 0u/ml, 20u/ml 以及 50u/ml) 作对照, 用 MTT 的方法比较含有 50% 培养上清孵育原代 CD4T (Do11.10) 细胞增殖情况。在 450nm 下读取 OD 值, 活细胞数越多, OD 值越高。图 4 的结果表明, 导入重组逆转录病毒载体的 293T 细胞分泌的白介素 2 或白介素 15 都可以促进原代 Do11.10CD4T 细胞的增殖。

[0103] 参考图 6, 将  $2 \times 10^6$ /ml 的 Jurkat 细胞悬液铺 24 孔板, 60 小时后收集细胞培养上清, ELISA 检测细胞因子人白介素 2 与人白介素 15 的分泌。所述 Jurkat 细胞包括四种 :感染 IL15-TK 的, 感染 IL2-TK 的, 感染 TK 病毒的, 以及没有处理过的对照组 Jurkat 细胞。从图 6 可看出, 含有 IL2-TK 以及 IL15-TK 的逆转录病毒可成功感染人 Jurkat T 淋巴细胞系。感染逆转录病毒的 Jurkat 细胞可分泌人白介素 2 (图 6A) 和人白介素 15 (图 6B)。而胞内染色结果同样也证明了, 感染 Re-IL2 (IL2-TK) 逆转录病毒的 Jurkat 细胞可产生人白介素 2 (图 6C), 以及感染 Re-IL15 (IL15-TK) 逆转录病毒的 Jurkat 细胞可产生人白介素 15 (图 6D)。

[0104] 2. 重组逆转录病毒载体上自杀基因 TK 基因的功能检测。

[0105] 在 96 孔板每孔中铺  $3 \times 10^4$  个 293T 细胞 (分别是转染了 IL15-TK 载体, IL2-TK 载体以及未转染任何载体的对照 293T 细胞), 以包含四个浓度梯度的 GCV (0uM, 0.2uM, 1uM 以及 5uM) 的细胞培养基孵育上述 293T 细胞。在 pH 值 7.2-7.4、温度 37℃、相对湿度 95%、5% CO<sub>2</sub> 的培养条件下培养 60 小时, 用 MTT 法检测活细胞数目。

[0106] 从图 7 的结果可以看出, 与未转染任何载体的对照细胞相比较, 将表达 TK 基因的 293T 细胞转移到含有 GCV 的培养基中可以引起表达 TK 基因的 293T 细胞死亡。这也说明, 本发明实施例 1 中所构建的 IL2-TK 和 IL15-TK 重组逆转录病毒载体都成功转入了自杀基因 TK 基因。

[0107] 3. 体外实验证明自分泌白介素 15 可以促进激活的 CD4T 细胞存活。

[0108] 参考图 8, 将来源于 Do11.10 的 CD4T 细胞以每孔  $5 \times 10^6$ /ml 铺在 24 孔板的孔中。利用板结合的 aCD3 (500ng/ml) 与游离的 aCD28 (300ng/ml) 激活抗原特异性 T 细胞, 72 小时后用 PI (FL2) 与 Annexin V FITC (FL1) 双染色通过流式细胞计数法检测 T 细胞凋亡情况。实验表明 :自分泌白介素 15 的 T 细胞 46% 存活而自分泌白介素 2 的 T 细胞只有 9.8% 存活。

[0109] 图 8 的实验结果表明, 在 T 细胞刺激信号 aCD3 和 aCD28 的作用下, 自分泌人白介素 15 的 Ova 抗原特异性 CD4T 细胞能够维持存活, 而自分泌人白介素 2 的 CD4T 细胞则更容易凋亡。

[0110] 本领域的技术人员应该理解,因为白介素 15 是一种多功能的细胞生长因子,其在天然条件下可促进 CD4T 细胞、CD8T 细胞以及 NK 细胞的存活,加强免疫反应中的特异性 CD4、CD8T 细胞的记忆效应,所以,结合图 8 的实验结果,本发明的重组逆转录病毒载体 IL15-TK 还可以促进 CD4T 细胞、CD8T 细胞以及 NK 细胞的存活,加强免疫反应中的特异性 CD4、CD8T 细胞的记忆效应。

[0111] 4. 体内实验验证自分泌白介素 15 的 Ova 抗原特异性 CD4T 细胞的抗 J558-Ova 的作用。

[0112] 体内实验通过小鼠 T 细胞过继转移实验模型进行。所述小鼠 T 细胞过继转移实验模型按下述方法构建:

[0113] a) 第零天时 Ba1b/C 鼠腹侧(野生型小鼠,年龄 6 至 8 周)接种  $2 \times 10^6$  J558-Ova 细胞;

[0114] b) 第二天时通过尾静脉注射过继转移体外培养的 Ova 特异性 CD4T 细胞,所述细胞分为四个组:自分泌白介素 15 的 T 细胞、自分泌白介素 2 的 T 细胞、对照病毒感染 T 细胞以及磷酸盐缓冲液对照组;

[0115] c) 在 J558-Ova 肿瘤注射后第 6 天和第 12 天,观察并记录肿瘤生长情况。

[0116] 实验结果表明,在小鼠体内自分泌白介素 15 的 T 淋巴细胞能够更好的抑制 J558-Ova 肿瘤的生长(图 9A),自分泌白介素 2 的 T 淋巴细胞没有上述效果;而且,在过继转移小鼠模型中,T 淋巴细胞介导的肿瘤排斥能够有效地保护荷瘤小鼠(图 9B)。

[0117] 在 J558-Ova 与 Ova 特异性 CD4T 细胞模型中,我们证明了自分泌白介素 15 的 CD4T 细胞的抗肿瘤效果,但是在其他肿瘤模型中的自分泌白介素 15 的 CD4T 细胞以及 CD8T 细胞的作用还有待检验。

[0118] 应该理解,尽管参考其示例性的实施方案,已经对本发明进行具体地显示和描述,但是本领域的普通技术人员应该理解,可以在其中进行各种形式和细节的变化,而不背离由后附的权利要求所定义的本发明的精神和范围。

[0119] 参考文献:

[0120] 1. Kolb, H. J., C. Schmid, A. J. Barrett, and D. J. Schendel 2004. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 103:767-776.

[0121] 2. Kolb, H. J., A. Schattenberg, J. M. Goldman, B. Hertenstein, N. Jacobsen, W. Arcese, P. Ljungman, A. Ferrant, L. Verdonck, D. Niederwieser, F. vanRhee, J. Mittermuller, T. de Witte, E. Holler, and H. Ansari. 1995. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrowgrafted patients. *Blood* 86:2041-2050.

[0122] 3. Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White, and S. A. Rosenberg. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-854.

[0123] 4. Gattinoni, L. et al. Acquisition of full effector function

in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumour efficacy of adoptively transferred CD8<sup>+</sup>T cells. *J. Clin. Invest.* 115, 1616–1626 (2005).

[0124] 5. S A Rosenberg, and, M T Lotze Cancer Immunotherapy Using Interleukin-2 and Interleukin-2-Activated Lymphocytes Annual Review of Immunology. Volume 4, Page 681–709, Apr 1986

[0125] 6. Yosef Refaeli, Luk Van Parijs, Cheryl A London, Jürg Tschopp, and Abul K Abbas Biochemical Mechanisms of IL-2-Regulated Fas-Mediated T Cell Apoptosis *Immunity* 1998;6:615–623

[0126] 7. Shimon Sakaguchi, Tomoyuki Yamaguchi, Takashi Nomura, and Masahiro Ono Regulatory T Cells and Immune Tolerance Cell, Vol 133, 775–787, 30 May 2008

[0127] 8. Antony, P. A. et al. CD8<sup>+</sup>T cell immunity against a tumour/self-antigen is augmented by CD4<sup>+</sup>T helper cells and hindered by naturally occurring Tregulatory cells. *J. Immunol.* 174, 2591–2601 (2005).

[0128] 9. Gattinoni, L. et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumour efficacy of adoptively transferred CD8<sup>+</sup>T cells. *J. Clin. Invest.* 115, 1616–1626 (2005).

[0129] 10. Opferman, J. T. et al. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426, 671–676 (2003).

[0130] 11. Hsu, C. et al. Primary human T lymphocytes engineered with a codon-optimized IL-15 gene resist cytokine withdrawal-induced apoptosis and persist long-term in the absence of exogenous cytokine. *J. Immunol.* 175, 7226–7234 (2005).

[0131] 12. Klebanoff, C. A. et al. Central memory self/tumour-reactive CD8<sup>+</sup>T cells confer superior antitumour immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 9571–9576 (2005).

[0132] 13. Teague, R. M., B. D. Sather, J. A. Sacks, M. Z. Huang, M. L. Dossett, J. Morimoto, X. Tan, S. E. Sutton, M. P. Cooke, C. Ohlen, and P. D. Greenberg. 2006. Interleukin-15 rescues tolerant CD8<sup>+</sup>T cells for use in adoptive immunotherapy of established tumors. *Nat Med* 12 :335–341.

[0133] 14. ROBERT W. OVERELL Dominant Positive and Negative Selection Using a Hygromycin Phosphotransferase-Thymidine Kinase Fusion Gene *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, June 1991

[0134] 15. 方艳辉, 金玉怀, 王永祥, 于丹军, 金士香, 谢立新, 人 IL-2 信号肽基因增强柯萨奇病毒 B3 型 VP1 DNA 疫苗诱导的中和抗体应答, *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004 年, 第 24 卷, 第 3 期

[0135] 16. Gabriele Nofz, Zhihai Qin, Manfred Kopf, and Thomas Blankenstein, Neutrophils but Not Eosinophils Are Involved in Growth Suppression of IL-4-Secreting Tumors. *The Journal of Immunology*, 1998, 160 :345–350

[0136] SEQUENCE LISTING

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| [0137] | <110> 中国科学院生物物理研究所  |     |
| [0138] | <120> 重组逆转录病毒载体   |     |
| [0139] | <130>IB089435   |     |
| [0140] | <160>6  |     |
| [0141] | <170>PatentIn version 3.1   |     |
| [0142] | <210>1  |     |
| [0143] | <211>489  |     |
| [0144] | <212>DNA  |     |
| [0145] | <213> 智人  |     |
| [0146] | <400>1  |     |
| [0147] | atgagaattt cgaaaccaca ttgagaagt atttccatcc agtgctactt gtgtttactt  | 60  |
| [0148] | ctaaacagtc attttctaac tgaagctggc attcatgtct tcattttggg ctgtttcagt | 120 |
| [0149] | gcagggttc ctaaacacaga agccaactgg gtgaatgtaa taagtgattt gaaaaaatt  | 180 |
| [0150] | gaagatctta ttcaatctat gcatattgat gctactttat atacggaaag tgatgttcac | 240 |
| [0151] | cccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc tttctcttgg agttacaagt tatttcactt | 300 |
| [0152] | gagtccggag atgcaagtat tcatgataca gtagaaaatc tgatcatcct agcaacaac  | 360 |
| [0153] | agtttgtctt ctaatgggaa tgtaacagaa tctggatgca aagaatgtga ggaactggag | 420 |
| [0154] | gaaaaaata ttaaagaatt ttgacagagt ttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac   | 480 |
| [0155] | acttcttga   | 489 |
| [0156] | <210>2  |     |
| [0157] | <211>462  |     |
| [0158] | <212>DNA  |     |
| [0159] | <213> 智人  |     |
| [0160] | <400>2  |     |
| [0161] | atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt | 60  |
| [0162] | gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat | 120 |
| [0163] | ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaate ccaaactcac caggatgctc | 180 |
| [0164] | acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa  | 240 |
| [0165] | gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta  | 300 |
| [0166] | agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa  | 360 |
| [0167] | acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga | 420 |
| [0168] | tggattacct tttgtcaaag catcatctca aactgactt ga                     | 462 |
| [0169] | <210>3  |     |
| [0170] | <211>1131   |     |
| [0171] | <212>DNA  |     |
| [0172] | <213> 单纯疱疹病毒  |     |
| [0173] | <400>3  |     |
| [0174] | atggcttctc acgccggcca acagcacgcg cctgcgttcg gtcaggctgc tcgtgcgagc | 60  |
| [0175] | gggcctaccg acggccgcgc ggcgtcccgt cctagccatc gccagggggc ctccggagcc | 120 |

|        |   |      |
|--------|---|------|
| [0176] | cgcggggatc cggagctgcc cacgctgctg cgggtttata tagacggacc ccacggggtg | 180  |
| [0177] | gggaagacca ccacctccgc gcagctgatg gaggccctgg ggccgcgcga caatategtc | 240  |
| [0178] | tacgtccccg agccgatgac ttactggcag gtgctggggg cctccgagac cctgacgaac | 300  |
| [0179] | atctacaaca cgcagcaccg tctggaccgc ggcgagatat cggccgggga ggccggcgtg | 360  |
| [0180] | gtaatgacca gcgccagat aacaatgagc acgccttatg cggcgacgga cgccgttttg  | 420  |
| [0181] | gctcctcata tcggggggga ggctgtgggc ccgcaagccc cgccccggc cctcacctt   | 480  |
| [0182] | gttttcgacc ggcacctat cgcctccctg ctgtgctacc cggccgcgcg gtacctcatg  | 540  |
| [0183] | ggaagcatga cccccaggc cgtgttggcg ttcgtggccc tcatgcccc gaccgcgcc    | 600  |
| [0184] | ggcacgaacc tggcctggg tgccttccg gaggccgaac acgccgaccg cctggccaga   | 660  |
| [0185] | cgccaacgcc cggcgagcg gcttgacctg gccatgctgt ccgccattcg ccgtgtctac  | 720  |
| [0186] | gatctactcg ccaacacggt gcggtacctg cagcgcggcg ggaggtggcg ggaggactgg | 780  |
| [0187] | ggccggctga cgggggtcgc cgcggcgacc ccgcgccccg accccgagga cggcgcgggg | 840  |
| [0188] | tctctgcccc gcacgagga cacgctgttt gccctgttcc gcgttcccga gctgctggcc  | 900  |
| [0189] | cccaacgggg acttgacca ctttttgcc tgggtcttgg acgtcttggc cgaccgctc    | 960  |
| [0190] | cttccgatgc atctatttgt cctggattac gatcagtcgc ccgtcgggtg tcgagacgcc | 1020 |
| [0191] | ctgttgccgc tcaccgccg gatgatccca acccgctca caaccgccg gtccatgcc     | 1080 |
| [0192] | gagatacgcg acctggcgcg cacgtttgcc cgcgaggtgg ggggagtta g           | 1131 |
| [0193] | <210>4  |      |
| [0194] | <211>544  |      |
| [0195] | <212>DNA  |      |
| [0196] | <213> 人工的   |      |
| [0197] | <400>4  |      |
| [0198] | ggatctgcga tcgctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg | 60   |
| [0199] | agaagtggg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa  | 120  |
| [0200] | actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgaggtggg ggagaaccgt  | 180  |
| [0201] | atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc ttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac  | 240  |
| [0202] | agctgaagct tcgaggggct cgcattcttc cttcacgcgc ccgccccct acctgagcc   | 300  |
| [0203] | gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctcccgc ctgtggtgcc tctgaactg  | 360  |
| [0204] | cgctcccgct ctaggtaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgtcc  | 420  |
| [0205] | cttggagcct acctagaact agccgctct ccacgcttg cctgacctg cttgctcaac    | 480  |
| [0206] | tctacgtctt tgtttcgtt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggegc  | 540  |
| [0207] | ctac  | 544  |
| [0208] | <210>5  |      |
| [0209] | <211>4101   |      |
| [0210] | <212>DNA  |      |
| [0211] | <213> 人工的   |      |
| [0212] | <400>5  |      |
| [0213] | ggatctgcga tcgctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg | 60   |
| [0214] | agaagtggg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa  | 120  |

|        |  |      |
|--------|--|------|
| [0215] | actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt  | 180  |
| [0216] | atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac  | 240  |
| [0217] | agctgaagct tcgaggggct cgcactctctc cttcacgcgc ccgccccct acctgaggcc  | 300  |
| [0218] | gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctcccgc ctgtgggtgcc tcctgaactg | 360  |
| [0219] | cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca ggctgagacc gggcctttgt ccggcgctcc  | 420  |
| [0220] | cttggagcct acctagactc agccggctct ccacgctttg cctgaccctg cttgctcaac  | 480  |
| [0221] | tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc  | 540  |
| [0222] | ctacgtaagt gatattact agatttatca aaaagagtgt tgactttgta gcgctcacia   | 600  |
| [0223] | ttgatactta gattcatcga gagggacacg tcgactacta accttcttct ctttctaca   | 660  |
| [0224] | gctgagatca ccggcgaagg agggccacca tgcgaattc gaaaccacat ttgagaagta   | 720  |
| [0225] | tttccatcca gtgctacttg tgtttacttc taaacagtca ttttctaact gaagctggca  | 780  |
| [0226] | ttcatgtctt cttttgggc tgtttcagtg cagggtctcc taaaacagaa gccactggg    | 840  |
| [0227] | tgaatgtaat aagtgtttg aaaaaaattg aagatcttat tcaatctatg catattgatg   | 900  |
| [0228] | ctactttata tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca atgaagtgt   | 960  |
| [0229] | ttctcttgga gttacaagtt atttcacttg agtccggaga tgcaagtatt catgatacag  | 1020 |
| [0230] | tagaaaatct gatcatccta gcaacaaca gtttgcctc taatgggaat gtaacagaat    | 1080 |
| [0231] | ctggatgcaa agaattgtgag gaactggagg aaaaaatat taaagaattt ttgcagagtt  | 1140 |
| [0232] | ttgtacatat tgtccaaatg ttcataca cttcttgatt gcaattgagc tagcattatc    | 1200 |
| [0233] | cctaatacct gccacccac tcttaatcag tgggtggaaga acggtctcag aactgtttgt  | 1260 |
| [0234] | ttcaattggc catttaagtt tagtagtaaa agactggta atgataacaa tgcactgtaa   | 1320 |
| [0235] | aaccttcaga aggaaaggag aatgttttgt ggaccacttt ggttttcttt ttgctgtg    | 1380 |
| [0236] | gcagttttaa gttattagtt tttaaaatca gtactttta atggaaacaa cttgacaaa    | 1440 |
| [0237] | aatttgtcac agaattttga gaccattaa aaaagttaaa tgagaaacct gtgtgttct    | 1500 |
| [0238] | ttggtaaca ccgagacatt taggtgaaag acatctaatt ctggttttac gaatctggaa   | 1560 |
| [0239] | acttcttgaa aatgtaattc ttgagttaac acttctgggt ggagaatagg gttgtttcc   | 1620 |
| [0240] | ccccacataa ttggaagggg aaggaatata atttaaagct atgggaggggt ttctttgatt | 1680 |
| [0241] | acaacactgg agagaaatgc agcatgttgc tgattgctg tcaactaaaac aggccaaaaa  | 1740 |
| [0242] | ctgagtcctt ggttgcata gaaagcttca tgttgctaaa ccaatgttaa gtgaatctt    | 1800 |
| [0243] | ggaaacaaaa tgtttccaaa ttactgggat gtgcatgttg aaacctgggt taattaagaa  | 1860 |
| [0244] | catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt  | 1920 |
| [0245] | tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagaggtg    | 1980 |
| [0246] | gcgaaaccgg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg  | 2040 |
| [0247] | ctctctgtt ccgacctgc cgttaccgg ataactgtcc gcctttctcc cttcgggaag     | 2100 |
| [0248] | cgtggcgctt tetcaatgct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc  | 2160 |
| [0249] | caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg teagcccagc cgctgcgctt tatecggtaa  | 2220 |
| [0250] | ctatcgtctt gactccaacc cggtaagaca cgaactatcg ccaactggcag cagccactgg | 2280 |
| [0251] | taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagttcttga agtgggtggc  | 2340 |
| [0252] | taactacggc tacaactagaa gaacagtatt tggatctgc gctctgctga agccagttac  | 2400 |
| [0253] | cttcggaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaacaa accaccgctg gtagcgggtg   | 2460 |

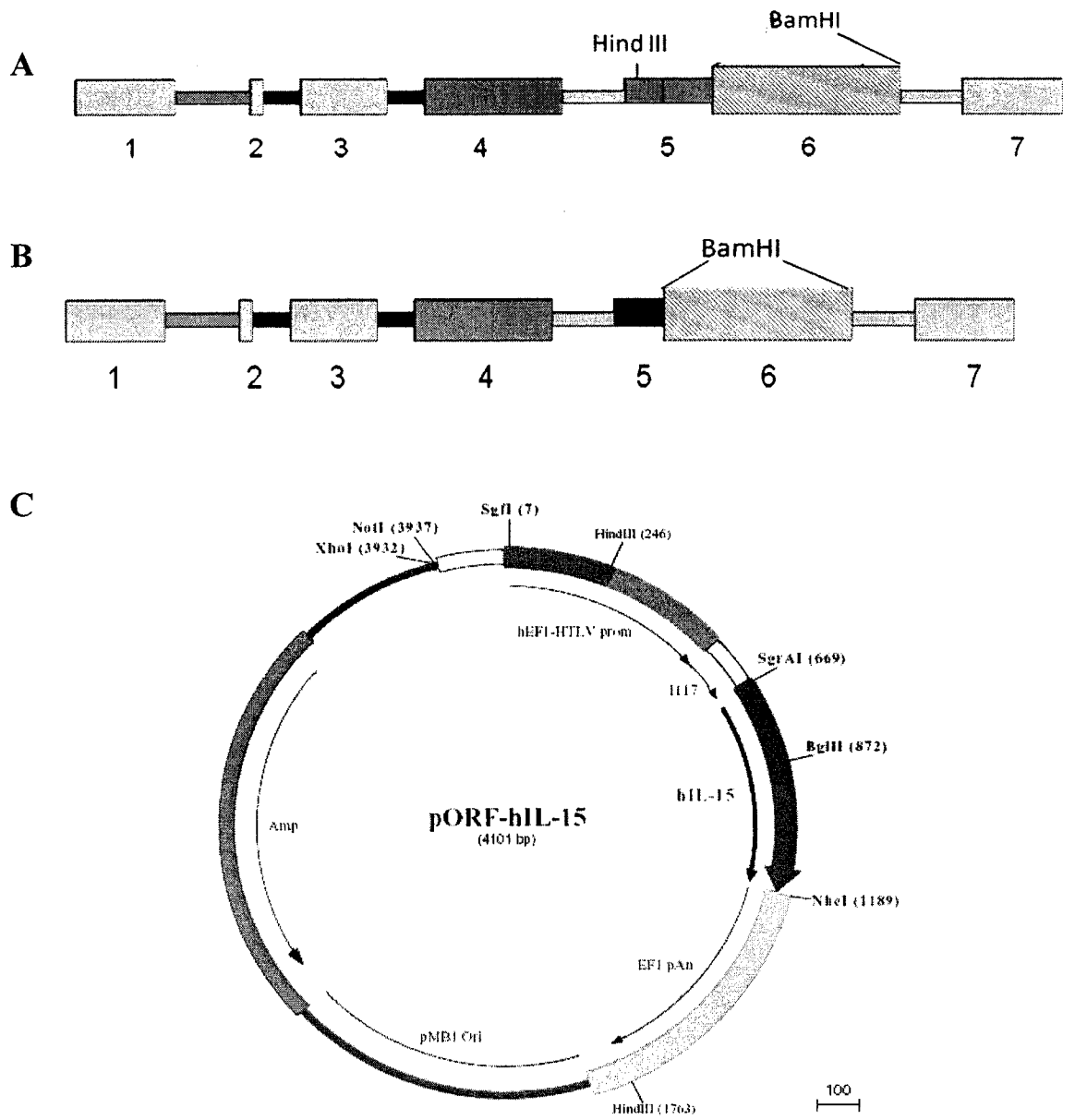
|        |   |      |
|--------|---|------|
| [0254] | tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt   | 2520 |
| [0255] | gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttgggt  | 2580 |
| [0256] | catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaat gaagttttaa    | 2640 |
| [0257] | atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga   | 2700 |
| [0258] | ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcacataa gttgcctgac tccccgtcgt    | 2760 |
| [0259] | gtagataact acgatacggg agggccttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg  | 2820 |
| [0260] | agaccacgc tcaccggctc cagattttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga   | 2880 |
| [0261] | gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga   | 2940 |
| [0262] | agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg   | 3000 |
| [0263] | catcgtgggtg tcacgctcgt cgttttggtat ggcttcattc agctccgggt cccaacgatc | 3060 |
| [0264] | aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctctcc   | 3120 |
| [0265] | gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagtg gttatcactc atggttatgg cagcactgca  | 3180 |
| [0266] | taattctctt actgcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac   | 3240 |
| [0267] | caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgccccg cgtcaatacg   | 3300 |
| [0268] | ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc    | 3360 |
| [0269] | ggggcgaaaa cttcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg     | 3420 |
| [0270] | tgcaccaac tgatcttcag catcttttac tttaccagc gtttctgggt gagcaaaaac     | 3480 |
| [0271] | aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggggaat aaggcgaca cggaaatgtt gaatactcat   | 3540 |
| [0272] | actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata   | 3600 |
| [0273] | catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa   | 3660 |
| [0274] | agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg   | 3720 |
| [0275] | tatcacgagg cctttcgtc tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat   | 3780 |
| [0276] | gcagctcccc gagacggtca cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc   | 3840 |
| [0277] | tcaggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga     | 3900 |
| [0278] | gcagattgta ctgagagtgc accatatgga tctcgagcgg ccgcaataaa atatctttat   | 3960 |
| [0279] | tttcattaca tctgtgtgtt ggttttttgt gtgaatcgta actaacatac gctctccatc   | 4020 |
| [0280] | aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt cccagtgca agtgcaggtg    | 4080 |
| [0281] | ccagaacatt tctctatcga a   | 4101 |
| [0282] | <210>6  |      |
| [0283] | <211>5914   |      |
| [0284] | <212>DNA  |      |
| [0285] | <213>人工的  |      |
| [0286] | <400>6  |      |
| [0287] | gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcagctct cagtacaatc tgctctgatg   | 60   |
| [0288] | ccgcatagtt aagccagtat ctgctcccctg cttgtgtgtt ggaggtcgt gagtagtgcg   | 120  |
| [0289] | cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc   | 180  |
| [0290] | ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt   | 240  |
| [0291] | gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata   | 300  |
| [0292] | tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggccccgc tggtgaccg cccaacgacc    | 360  |



|        |  |      |
|--------|--|------|
| [0293] | cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc   | 420  |
| [0294] | attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt  | 480  |
| [0295] | atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt   | 540  |
| [0296] | atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca  | 600  |
| [0297] | tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacaatca tgggcgtgga tagcggtttg  | 660  |
| [0298] | actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc  | 720  |
| [0299] | aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg  | 780  |
| [0300] | gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca   | 840  |
| [0301] | ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gcttgggtacc  | 900  |
| [0302] | gagctcggat ccatgtacag gatgcaactc ctgtcttga ttgactaag tcttgcactt    | 960  |
| [0303] | gtcacaaaca gtgcacctac ttcaagttct acaaagaaaa cacagctaca actggagcat  | 1020 |
| [0304] | ttactgctgg atttacagat gattttgaat ggaattaata attacaagaa tcccaaactc  | 1080 |
| [0305] | accaggatgc tcacatttaa gttttacatg cccaagaagg ccacagaact gaaacatctt  | 1140 |
| [0306] | cagtgtctag aagaagaact caaacctctg gaggaagtgc taaatttagc tcaaagcaaa  | 1200 |
| [0307] | aactttcact taagaccag ggacttaate agcaatatca acgtaatagt tctggaacta   | 1260 |
| [0308] | aagggatctg aaacaacatt catgtgtgaa tatgctgatg agacagcaac cattgtagaa  | 1320 |
| [0309] | tttctgaaca gatggattac cttttgtcaa agcatcatct caacactgac ttgaggatcc  | 1380 |
| [0310] | actagtaacg gccgccagtg tgctggaatt ctgcagatat ccatcacact ggccggccgct | 1440 |
| [0311] | cgagcatgca tctagagggc cctattctat agtgtcacct aatgctaga gctcgtgat    | 1500 |
| [0312] | cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccccc cccgtgcctt   | 1560 |
| [0313] | ccttgacctt ggaaggtgcc actcccactg tcttttcta ataaaatgag gaaattgcat   | 1620 |
| [0314] | cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggtgg ggtggggcag gacagcaagg   | 1680 |
| [0315] | gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggcttctg  | 1740 |
| [0316] | aggcggaaag aaccagctgg ggctctaggg ggtatcccca cgcgccctgt agcggcgcac  | 1800 |
| [0317] | taagcgcggc ggggtgtgtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag  | 1860 |
| [0318] | cgcccgtcc tttcgtttc ttcccttct ttctcgccac gttegcggc tttccccgtc      | 1920 |
| [0319] | aagctctaaa tcggggcatc cctttagggt tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc  | 1980 |
| [0320] | ccaaaaaact tgattagggt gatggttccac gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt | 2040 |
| [0321] | ttgccccctt gacgttggag tccacgttct ttaatagtg actcttgttc caaactggaa   | 2100 |
| [0322] | caacactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg gggatttcgg  | 2160 |
| [0323] | cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaattaa ttctgtggaa  | 2220 |
| [0324] | tgtgtgtcag ttaggtgtg gaaagtcccc aggtcccca ggcaggcaga agtatgcaaa    | 2280 |
| [0325] | gcatgcatct caattagtca gcaaccaggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca  | 2340 |
| [0326] | gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaacct agtccccccc ctaactccgc   | 2400 |
| [0327] | ccatcccccc cctaactccg cccagttccg cccattctcc gccccatggc tgactaattt  | 2460 |
| [0328] | tttttattta tgcagaggcc gaggcgcct ctgctctga gctattccag aagtagtgag    | 2520 |
| [0329] | gaggcttttt tggaggccta ggcttttgca aaaagctccc gggagcttgt atatecattt  | 2580 |
| [0330] | tcggatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa gatggattgc  | 2640 |
| [0331] | acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga  | 2700 |

|        |  |      |
|--------|--|------|
| [0332] | caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggagc ccggttcttt  | 2760 |
| [0333] | ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat  | 2820 |
| [0334] | cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg  | 2880 |
| [0335] | gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcacctg   | 2940 |
| [0336] | ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc  | 3000 |
| [0337] | cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga  | 3060 |
| [0338] | tggaagccgg tcttgcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag    | 3120 |
| [0339] | ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcg cgaggatctc gtcgtgacct   | 3180 |
| [0340] | atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg  | 3240 |
| [0341] | actgtggccc gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata  | 3300 |
| [0342] | ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg  | 3360 |
| [0343] | ctccccattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac   | 3420 |
| [0344] | tctggggttc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag atttcgattc  | 3480 |
| [0345] | caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaaatcgtt ttccgggacg ccggctggat | 3540 |
| [0346] | gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccceact tgtttattgc   | 3600 |
| [0347] | agcttataat gttacaaat aaagcaatag catcacaat ttacacaata aagcattttt    | 3660 |
| [0348] | ttcactgcat tctagtgtg gtttgcctca actcatcaat gtatcttata atgtctgtat   | 3720 |
| [0349] | accgtcgacc tctagctaga gcttggcgta atcatggca tagctgtttc ctgtgtgaaa   | 3780 |
| [0350] | ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg    | 3840 |
| [0351] | gggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgtt cgctcactgc ccgctttcca   | 3900 |
| [0352] | gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg  | 3960 |
| [0353] | tttgcgtatt gggcgtctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg    | 4020 |
| [0354] | gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg   | 4080 |
| [0355] | ggataacgca gaaagaaca tgtgagcaaa aggccagca aagccagga accgtaaaaa     | 4140 |
| [0356] | ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg   | 4200 |
| [0357] | acgctcaagt cagaggcggc gaaaccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc    | 4260 |
| [0358] | tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc gacctgcg cttaccggat acctgtccgc     | 4320 |
| [0359] | ctttctcct tcgggaagcg tggecctttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc   | 4380 |
| [0360] | gggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg   | 4440 |
| [0361] | ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc    | 4500 |
| [0362] | actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga  | 4560 |
| [0363] | gttcttgaag tggcggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc  | 4620 |
| [0364] | tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac  | 4680 |
| [0365] | caccgctggt agcggcgtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg    | 4740 |
| [0366] | atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc  | 4800 |
| [0367] | acgttaaggg attttggca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa    | 4860 |
| [0368] | ttaaaaatga agttttaa atcaatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta  | 4920 |
| [0369] | ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt  | 4980 |
| [0370] | tgectgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag  | 5040 |

|        |  |      |
|--------|--|------|
| [0371] | tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggtcca gatttatcag caataaacca    | 5100 |
| [0372] | gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact ttatccgct ccatccagtc    | 5160 |
| [0373] | tattaattgt tgccggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt   | 5220 |
| [0374] | tgttgccatt gctacagga tcgtggtgtc acgtcgtcg ttgggtatgg cttcattcag    | 5280 |
| [0375] | ctccggttc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttggtgca aaaaagcgg    | 5340 |
| [0376] | tagctccttc ggtcctccga tcgttggtcag aagtaagttg gccgcagtgt taccactcat | 5400 |
| [0377] | ggttatggca gactgcata attctcttac tgatgcca tccgtaagat gcttttctgt     | 5460 |
| [0378] | gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagttg atgcggcgac cgagttgctc  | 5520 |
| [0379] | ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat  | 5580 |
| [0380] | cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag  | 5640 |
| [0381] | ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt  | 5700 |
| [0382] | ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aaggaataa gggcgacacg   | 5760 |
| [0383] | gaaatggtga atactcatac tcttctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta   | 5820 |
| [0384] | ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttc   | 5880 |
| [0385] | gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtc                              | 5914 |



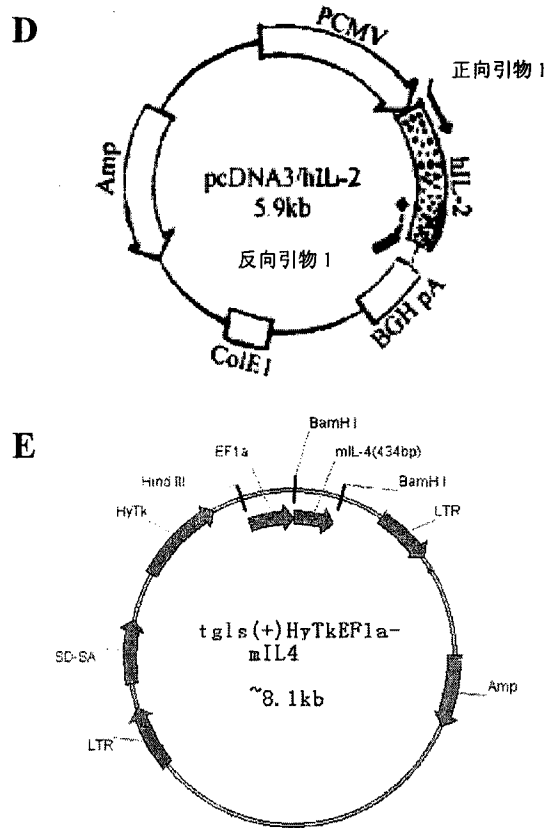


图 1

A



B

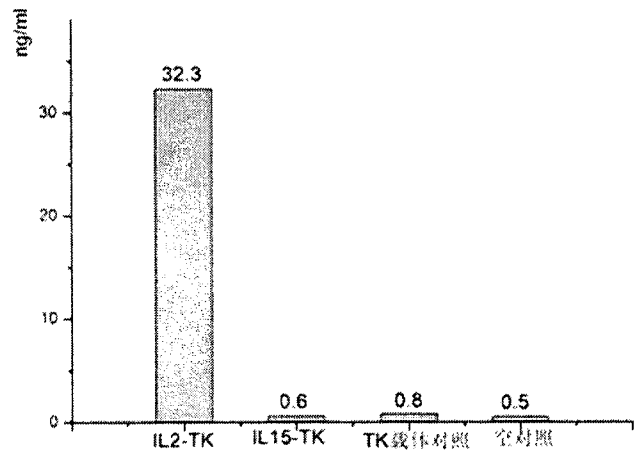


图 2

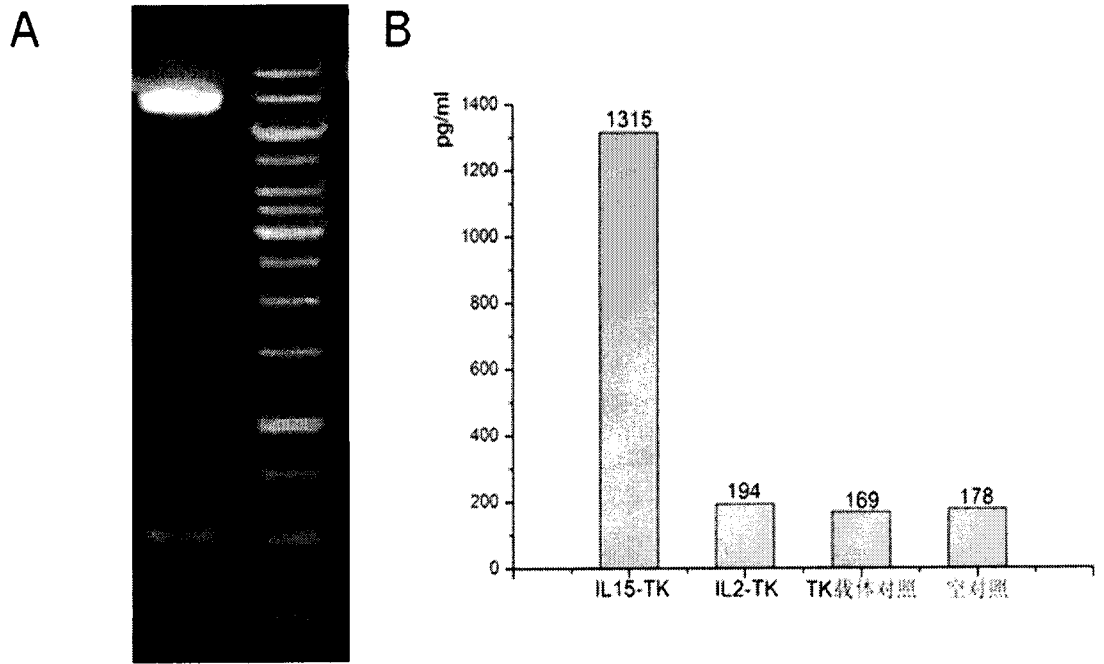


图 3

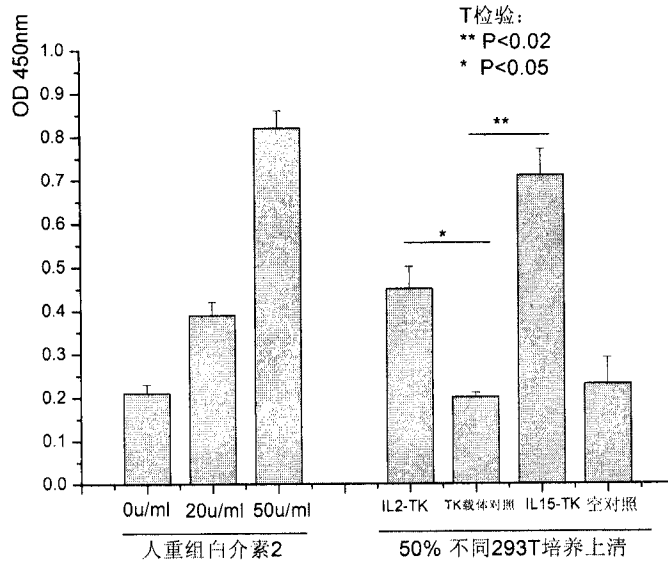


图 4

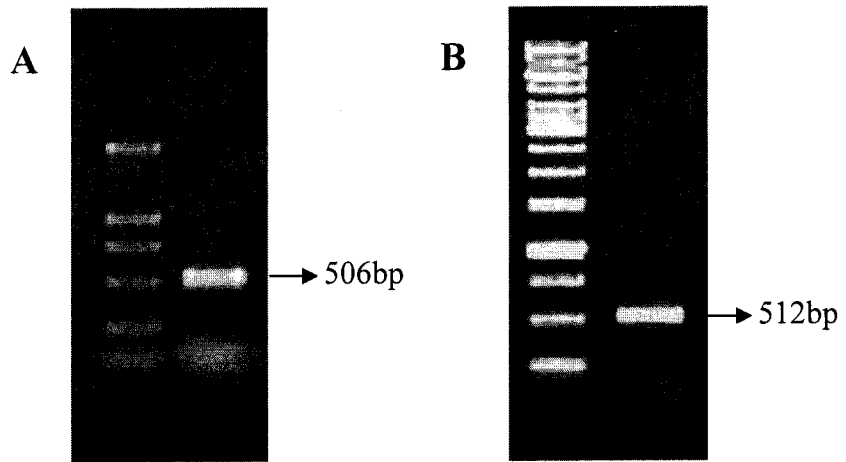
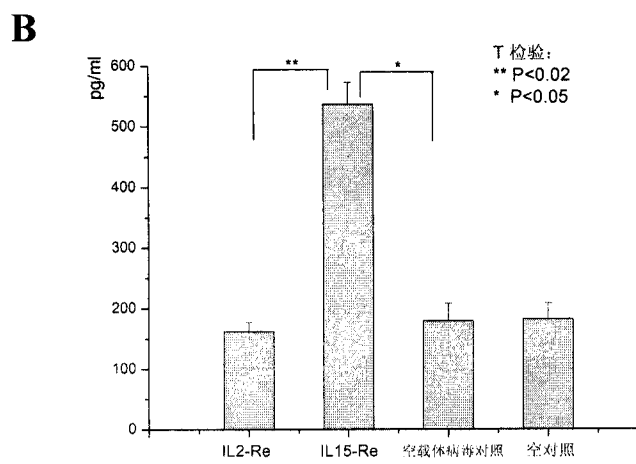
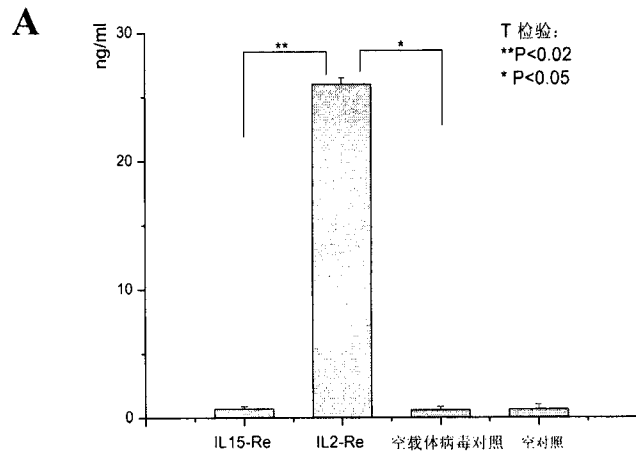


图 5



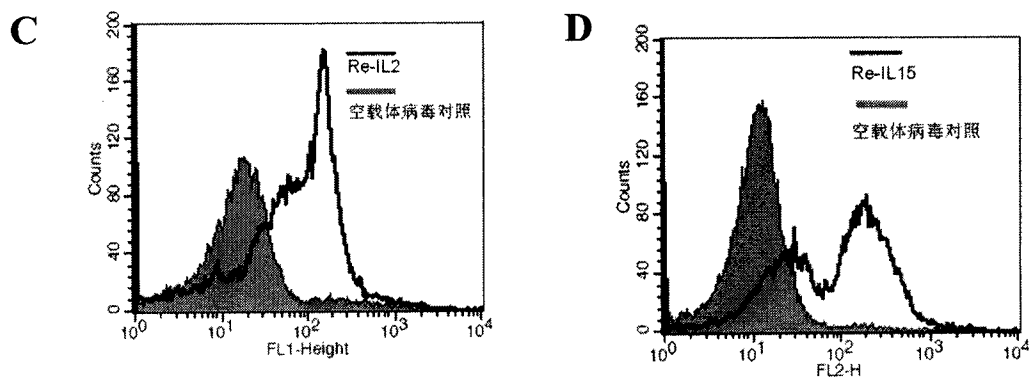


图 6

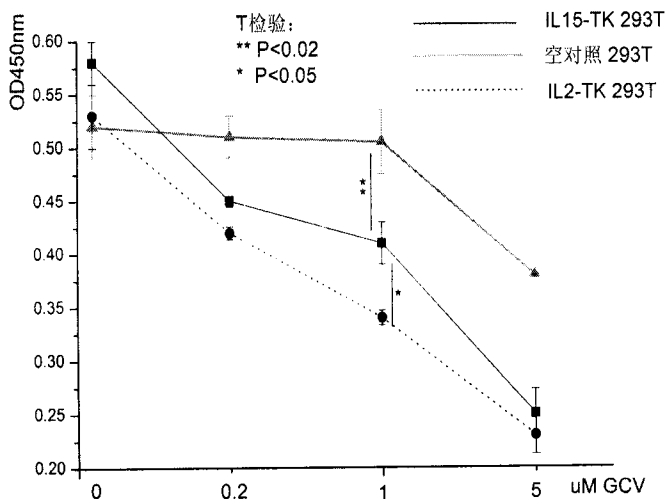


图 7

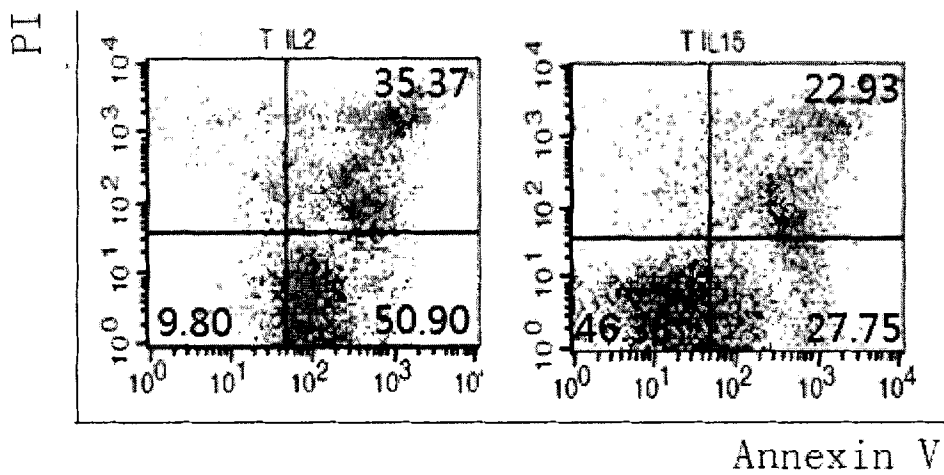


图 8



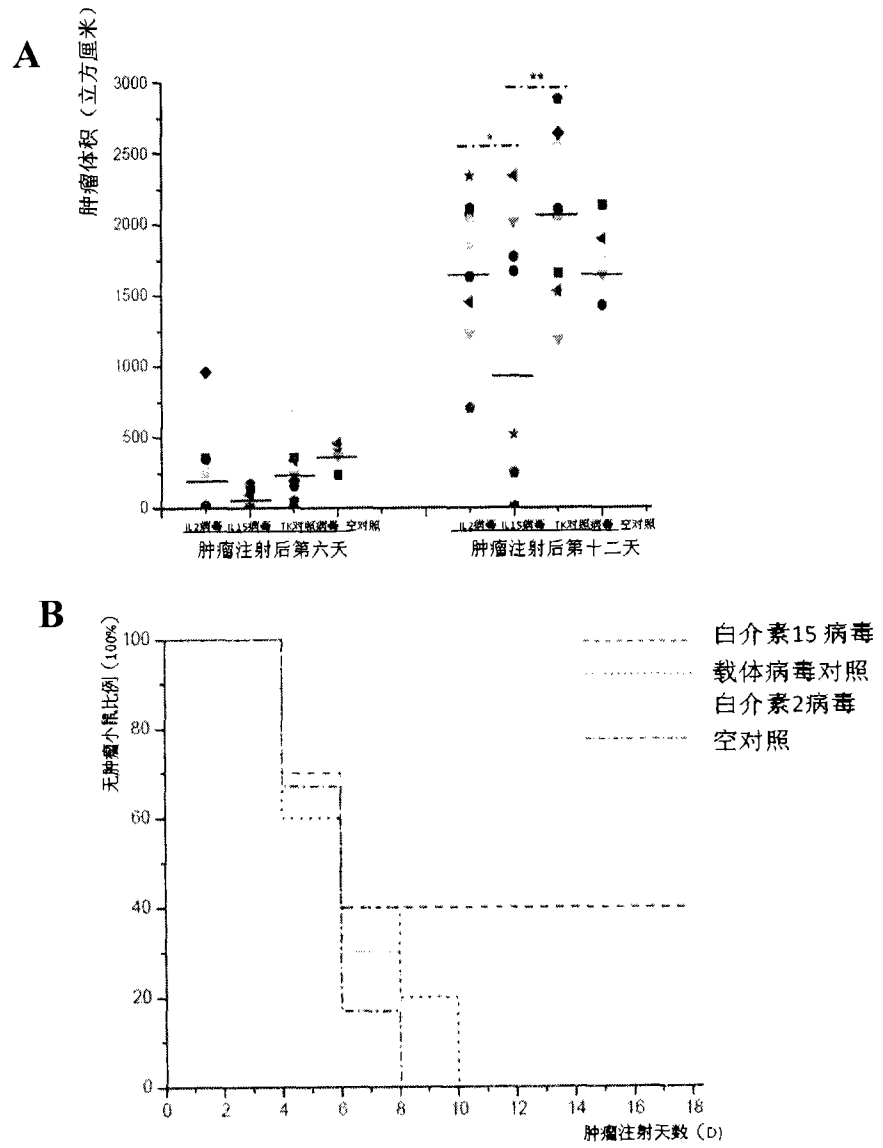


图 9