發明專利說明書 200530399

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：93140-81

※ 申請日期：93.12.23　　※IPC 分類：C12N 15/11 C12N 15/62 A61K 39/00

一、發明名稱：（中文/英文）

重組核酸分子、表現卡匣及細菌及其使用方法

RECOMBINANT NUCLEIC ACID MOLECULES, EXPRESSION CASSETTES, AND BACTERIA, AND METHODS OF USE THEREOF

二、申 請 人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

美商西勒斯股份有限公司

CERUS CORPORATION

代表人：（中文/英文）

哈維德 G 爾文

ERVIN, HOWARD G.

住居所或營業所地址：（中文/英文）

美國加州康寇市史丹維爾街 2411 號

2411 STANWELL DRIVE, CONCORD, CA 94520, U.S.A.

國　籍：（中文/英文）

美國　　U.S.A.

三、發明人：（共 4 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 湯瑪仕　W　杜賓司基二世
   DUBENSKY, THOMAS W. JR
2. 丹尼爾　A　波依
   PORTNOY, DANIEL A.
3. 威廉　史丹福　路克特二世
   LUCKETT, WILLIAM STANFORD JR.
4. 大衛　N　庫克
   COOK, DAVID N.

國　籍：（中文/英文）

1.-4.均美國　U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2003 年 12 月 24 日；60/532,598
2. 美國；2004 年 02 月 02 日；60/541,515
3. 美國；2004 年 03 月 26 日；60/556,744
4. 美國；2004 年 08 月 05 日；60/599,377
5. 美國；2004 年 10 月 01 日；60/615,287
6. 美國；2004 年 10 月 06 日；60/616,750
7. 專利合作條約；2004 年 07 月 23 日；PCT/US04/23881
8. 美國；2004 年 06 月 30 日；10/883,599
9. 美國；2004 年 02 月 06 日；10/773,618
10. 美國；2004 年 02 月 06 日；10/773,792

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☑ 主張專利法第三十條生物材料：

☑ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

1. 台灣；食品工業發展研究所; 2005/03/15; BCRC910289
2. 台灣；食品工業發展研究所; 2005/03/15; BCRC910290
3. 台灣；食品工業發展研究所; 2005/03/15; BCRC910291

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

1. 美國；ATCC；2003/10/03；PTA-5562
2. 美國；ATCC；2003/10/03；PTA-5563
3. 美國；ATCC；2004/02/20；PTA-5825

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明之領域通常與新穎的多核苷酸和用來在重組細菌中表現多肽，包括異種多肽的表現卡匣有關。特定而言，本發明係關於重組細菌，包括新穎的表現卡匣及/或核酸分子，其可用在疫苗組合物中。

【先前技術】

為了用來作為遞送異種抗原之疫苗，已經開始發展方法。已經對某些編碼起源於不同物種之蛋白質或抗原的核酸序列，修改了藉著微生物提供的異種抗原遞送。對於治療或預防主要起因於有毒力或致死來源，如癌症或病原體(例如HIV或B型肝炎)的疾病或病況，異種抗原遞送是特別有利的，其中注射天然的傳染原或癌症細胞對接受生物可能是有害的，且已經證實投與減毒或殺死之製劑或細胞無法成功地誘發有效的免疫反應，或在那裡不能確保傳染原或癌症細胞的充分減毒是確定可接受的。最近，已經將某些細菌品系發展成為重組疫苗。例如，已經顯示修改減毒之沙門氏桿菌的口服疫苗，表現鼠瘧原蟲(Plasmodium berghei)周圍子孢子(circumsporozite)抗原，保護老鼠對抗瘧疾(Aggarwal等人1990, J. Exp. Med. 172:1083)。

單核細胞增多性李斯特菌(單核增多性李斯特菌)(李斯特菌屬(Listeria))是革蘭氏-陽性兼性細胞內細菌，正為了用在抗原-專一之疫苗上而發展它，因為它經由MHC第I類和第II類抗原提供路徑，而提供有效CD4+/CD8+T-細胞調解之反

應的能力。參見，例如美國專利第6,051,237、6,565,852和5,830,702號。

已經以刺激先天和適應性T細胞-依賴性抗細菌免疫力兩者的模式，研究李斯特菌屬許多年了。李斯特菌屬有效刺激細胞免疫的能力是以其細胞內生命週期為基礎。在感染宿主時，細菌被吞噬細胞，包括巨噬細胞和樹突細胞(DC)迅速攝入噬菌消解體的隔間內。隨後降解大部分的細菌。在被感染之APCs的吞噬體內，起因於病原體之蛋白水解降解的肽，被直接裝載於MHC第II類分子上，並經由第II類內囊胞路徑，在提供抗原之細胞的表面上表現經過加工的抗原，而這些MHC II-肽複合物激活CD4+"協助者"T細胞，其刺激抗體的產生。在酸性的隔間中，某些細菌基因被激活，包括膽固醇-依賴性的溶細胞素，LLO，其可降解噬菌消解體，將細菌釋放至宿主細胞的胞液隔間內，存活的李斯特菌屬便在那裡繁殖。有效地經由MHC第I類路徑提供異種抗原，需要由李斯特菌屬重新表現內源的蛋白質。在提供抗原之細胞(APC)的細胞質中，採樣由李斯特菌屬合成並分泌的蛋白質，並藉著蛋白質解體(proteosome)降解。藉著TAP蛋白質使所得的肽穿梭於內質網內，並裝載於MHC第I類分子上。將MHC I-肽複合物遞送至細胞表面，其與充分的共同-刺激(信號2)混合，激活並刺激具有同族T細胞受體之細胞毒性T淋巴細胞(CTLs)，擴大並隨後認出展示在例如腫瘤細胞上的MHC I-肽複合物。在適當的微環境中，激活的T細胞瞄準並殺死癌細胞。

藉著李斯特菌屬提供的機制，寫出經由MHC第I類路徑提供異種抗原的計畫，表現異種基因並從細菌中將新近合成的蛋白質分泌至被感染(提供抗原)細胞之細胞質內兩者的效力，直接與CD8+T細胞觸發及/或激活的潛力有關。因為Ag-專一之T細胞觸發的程度與疫苗效力直接相關，故異種蛋白質表現和分泌的效力與疫苗潛力直接相關。

因此，在最優化異種蛋白質表現和分泌之效力的技藝上需要新穎的方法，以便使以李斯特菌屬為基礎之疫苗，以及以其他細菌為基礎之疫苗的效力達到最大。在細菌宿主表現系統中使異種蛋白質表現和分泌之效力最優化亦將是有益的，在那裡希望有大量異種蛋白質的表現和分泌。

【發明內容】

本發明通常提供用來在細菌中，尤其是李斯特菌屬中表現及/或分泌多肽(例如異種多肽)的新穎多核苷酸，包括新穎的重組核酸分子、表現卡匣和載體。在一些具體實施例中，這些多核苷酸在細菌中提供了多肽的增強表現及/或分泌。本發明通常亦提供包括重組核酸分子、表現卡匣或載體的細菌，以及包括該細菌之藥學、免疫原和疫苗組合物。這些細菌和組合物可用來誘導免疫反應，並治療及/或預防各種疾病或其他病況，包括癌症、感染及自體免疫力。

本發明一方面提供重組的核酸分子，包括編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現而將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及編碼多肽(例如抗原)的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相

同的轉譯編閱架構，且其中該重組核酸分子編碼融合蛋白質，其包括信號肽和該多肽。在一些具體實施例中，亦為了在細菌中表現，如李斯特菌屬，將第二個多核苷酸密碼子-最優化。本發明亦提供包括該重組核酸分子的表現卡匣，並更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子連接的啟動基因。亦提供包括重組核酸分子及/或表現卡匣的載體和細菌，就像包括該細菌之醫藥組合物、免疫原組合物及疫苗。亦提供在宿主中使用該細菌或包括該細菌之組合物，誘導免疫反應及/或預防或治療病況，如疾病的方法。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，包括(a)編碼對細菌而言為天然之信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現將第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及(b)編碼多肽之第二個多核苷酸，其中第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼融合蛋白質，包括信號肽和該多肽。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼之多肽，是與信號肽異種的。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼的多肽對細菌而言是外來的。本發明亦提供包括該重組核酸分子的表現卡匣，並更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子連接的啟動基因。亦提供包括重組核酸分子及/或表現卡匣的載體和細菌，就像包括該細菌的醫藥組合物、免疫原組合物及疫苗。亦提供在宿主中使用該細菌或包括該細菌之醫藥組合物，誘導免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。

另一方面，本發明提供包括重組核酸分子的重組李斯特菌屬細菌，其中該重組核酸分子包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現將第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及(b)編碼多肽之第二個多核苷酸，其中第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼融合蛋白質，包括信號肽和該多肽。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼之多肽對信號肽而言是異種的。在一些具體實施例中，該信號肽對李斯特菌屬而言是天然的。亦提供在宿主中使用李斯特菌屬(或包括李斯特菌屬之組合物)，誘導免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，包括編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸，以及編碼多肽(如抗原)的第二個多核苷酸，其中第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼融合蛋白質，包括信號肽和該多肽。在一些具體實施例中，為了在細菌，如李斯特菌屬中表現，將第一個及/或第二個多核苷酸密碼子-最優化。本發明亦提供包括該重組核酸分子的表現卡匣，並更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子連接的啟動基因。亦提供包括重組核酸分子及/或表現卡匣的載體和細菌，就像包括該細菌之醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。亦提供在宿主中使用該細菌或包括該細菌之組合物，誘導免疫反應及/或治療病況，如疾病的方法。

另一方面，本發明提供包括重組核酸分子的重組李斯特菌屬細菌，其中該重組核酸分子包括(a)編碼非-sec-A1細菌信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)編碼對信號肽為異種或對細菌為外來之多肽的第二個多核苷酸，其中第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼融合蛋白質，包括信號肽和該多肽。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼的多肽對信號肽為異種的或對細菌為外來的(即對細菌為異種的)，或對兩者皆是。亦提供包括李斯特菌屬之醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。亦提供在宿主中使用該李斯特菌屬(或包括該李斯特菌屬之組合物)，誘導免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，其中該重組的核酸分子包括編碼對李斯特菌屬為外來之多肽的多核苷酸(例如，癌症或非-李斯特菌屬的傳染病抗原)，其中為了在李斯特菌屬中表現，將該編碼外來多肽的多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，該重組核酸分子更進一步包括與編碼對李斯特菌屬為外來之多肽的多核苷酸相同的轉譯編閱架構之編碼信號肽的多核苷酸。在一些具體實施例中，該信號肽對李斯特菌屬細菌而言是天然的。在其他的具體實施例中，該信號肽對李斯特菌屬而言是外來的。在一些具體實施例中，亦為了在李斯特菌屬中表現，而將編碼該信號肽的多核苷酸密碼子-最優化。亦提供包括該重組核酸分子的李斯特菌屬。亦提供包括李斯特菌屬之醫藥

組合物、免疫原組合物和疫苗。此外，本發明亦提供在宿主中使用該重組的李斯特菌屬誘導免疫反應及/或預防或治療病況(像是但不限於疾病)的方法。

另一方面，本發明提供包括表現卡匣的重組李斯特菌屬細菌，其中該表現卡匣包括編碼對李斯特菌屬為外來之多肽(例如癌症或非-李斯特菌屬傳染病抗原)的多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現，將該編碼外來多肽的多核苷酸密碼子-最優化，以及以可操作之方式與編碼外來多肽的多核苷酸連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該表現卡匣更進一步包括以與編碼對李斯特菌屬為外來之多肽的多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼信號肽(對李斯特菌屬細菌而言為天然或外來之信號肽)的多核苷酸，並以可操作之方式與啟動基因連接，而得以以包括信號肽和外來多肽的融合蛋白之方式表現該表現卡匣。在一些具體實施例中，亦為了在李斯特菌屬中表現，而將編碼該信號肽的多核苷酸密碼子-最優化。亦提供包括該李斯特菌屬之醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。此外，本發明提供在宿主中使用該重組的李斯特菌屬誘導免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，其中該重組的核酸分子包括(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該重組核酸分子編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該多肽的融合蛋白。本發明亦提

供包括該重組核酸分子的表現卡匣，其中該表現卡匣更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子之第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因。亦提供包括重組核酸分子及/或表現卡匣的載體。此外，亦提供包括該重組核酸分子及/或表現卡匣的李斯特菌屬細菌。亦提供包括該李斯特菌屬細菌之醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。本發明提供在宿主中使用該李斯特菌屬細菌(或包括該李斯特菌屬細菌之組合物)誘導免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。

另一方面，本發明提供包括重組核酸分子的重組李斯特菌屬細菌，其中該重組核酸分子包括(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該重組核酸分子編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該多肽的融合蛋白。亦提供包括該李斯特菌屬之醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。亦提供在宿主中使用該李斯特菌屬(或包括該李斯特菌屬之組合物)誘導免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。

另一方面，本發明提供包括表現卡匣的李斯特菌屬細菌(例如得自物種單核細胞增多性李斯特菌)，該表現卡匣包括編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸，以與以第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽(例如抗原)的第二個多核苷酸，以及以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。該表現卡匣編碼包括非-李斯特

菌屬信號肽和該多肽兩者的融合蛋白。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬中表現，將第一個及/或第二個多核苷酸密碼子-最優化。亦提供包括該李斯特菌屬之醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。此外，本發明亦提供在宿主中使用該重組的李斯特菌屬細菌誘導免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。

本發明亦提供重組的核酸分子，包括(a)編碼細菌自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括由第二個多核苷酸編碼之多肽和自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的蛋白質嵌合體，其中，在該蛋白質嵌合體中，該多肽與自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合，或位在其內。亦提供包括該重組核酸分子及/或表現卡匣的載體和細菌，就像包括該細菌的醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。亦提供在宿主中使用該細菌或組合物誘導免疫反應及/或治療病況，如疾病的方法。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，其中該核酸分子編碼至少兩個分離的非-李斯特菌屬多肽。本發明更提供表現卡匣，其包括重組核酸分子，並更進一步包括啟動基因，其中該啟動基因以可操作之方式與該重組核酸分子連接。更進一步提供包括該重組核酸分子及/或表現卡匣的載體。此外，亦提供包括該重組核酸分子(及/或表現卡匣)的

重組李斯特菌屬細菌。亦提供包括該李斯特菌屬的醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。亦提供在宿主中使用該李斯特菌屬(或包括該李斯特菌屬的組合物)誘導免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。

另一方面，本發明提供包括多順反子之表現卡匣的重組李斯特菌屬細菌，其中該多順反子之表現卡匣編碼至少兩個分離的非-李斯特菌屬多肽。亦提供包括該李斯特菌屬的醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。亦提供在宿主中使用該李斯特菌屬(或包括該李斯特菌屬的組合物)誘導免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，其包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，(b)編碼分泌性蛋白質或其片段的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，以及(c)編碼與該分泌性蛋白質或其片段異種之多肽的第三個多核苷酸，其中該第三個多核苷酸是與第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽、由第三個多核苷酸編碼之多肽，以及分泌性蛋白質或其片段的蛋白質嵌合體，且在該蛋白質嵌合體中，其中由該第三個多核苷酸編碼之多肽與該分泌性蛋白質或其片段融合，或位在該分泌性蛋白質或其片段內。亦提供包括重組核酸分子，並更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子之第一個、第二個和第三個多核苷酸連接的啟動基因的表現卡匣。亦提供包括重組核酸分子及/或表現卡匣的載體和細菌，就像

包括該細菌之醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。亦提供在宿主中使用該細菌或包括該細菌之組合物誘導免疫反應及/或預防或治療病況的方法。

在一些具體實施例中，在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量之組合物，其包括在本文中描述之重組細菌(例如在上文的任何觀點中，或在下文的實施方法或實例中)，其中由該重組核酸分子、表現卡匣及/或在細菌中之載體編碼的多肽包括該抗原。在一些具體實施例中，在宿主中預防或治療病況，如疾病的方法包括對該宿主投與有效含量的組合物，其包括在本文中描述的重組細菌。

本發明更提供在本文中描述之重組細菌(例如在上文的任何觀點中，或在下文的實施方法或實例中)，在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該重組核酸分子、表現卡匣及/或在細菌中之載體編碼的多肽包括該抗原。在一些具體實施例中，該抗原為異種抗原。本發明亦提供在本文中描述之重組細菌，在製造在宿主中預防或治療病況(例如癌症或傳染病)之醫藥品上的用途。本發明更提供可用來在宿主中誘導對抗原之免疫反應的在本文中描述之重組細菌，其中由該重組核酸分子、表現卡匣及/或在細菌中之載體編碼的多肽包括該抗原。本發明更提供在本文中描述的重組細菌，用來在宿主中預防或治療病況(如疾病)。

在更多方面，本發明提供在宿主細菌中表現和篩選異種

蛋白質的改良方法。

亦提供製造包括上述每個重組核酸分子和表現卡匣之細菌的方法。亦提供使用該細菌來產生疫苗的方法。

本發明更提供各種編碼信號肽及/或抗原的多核苷酸，包括為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，而已經被密碼子-最優化了的多核苷酸。

【實施方式】

I.簡介

本發明提供各種多核苷酸，包括重組的核酸分子、表現卡匣，以及用來在細菌中，如李斯特菌屬中表現及/或分泌多肽，包括異種多肽(例如抗原及/或哺乳動物蛋白質)的表現載體。在一些具體實施例中，可使用這些多核苷酸提高多肽在細菌中的表現及/或分泌。一些表現卡匣包括為了多肽及/或對信號肽，密碼子-最優化了的密碼序列。此外，一些用在細菌上的表現卡匣，含有衍生自其他細菌來源及/或得自各種不同的分泌路徑之信號肽序列。亦提供包括該表現卡匣的細菌，就像含有該細菌之組合物，如疫苗。亦提供在宿主中使用該多核苷酸、細菌和組合物，誘導免疫反應及/或預防或治療病況，如疾病(例如癌症)的方法。

本發明一部分是以在表現卡匣中，信號肽序列的密碼子最優化作用，提高了得自重組細菌(特別是與異種多肽之密碼子最優化結合)之異種多肽(如抗原)的表現及/或分泌的發現為基礎，即使是在該信號肽序列對細菌而言是天然的時(參見，例如下文的實例19和27)。此外，已經發現亦可使

用得自非-secA1分泌路徑之信號肽序列及/或得自非-李斯特菌屬細菌來源之信號肽序列，完成得自李斯特菌屬之異種多肽的有效表現及/或分泌(參見，例如下文的實例19、27和30)。本發明一部分亦以異種多肽之密碼序列的密碼子-最優化作用，提高了異種多肽在李斯特菌屬中之表現及/或分泌的額外發現為基礎(參見，例如下文的實例19)。亦已經顯示，經由表現卡匣之最優化作用而獲得提高的異種蛋白質之表現及/或分泌，導致提高了包括該最優化表現卡匣之細菌的免疫原性(參見，例如下文的實例20)。此外，亦已經顯示編碼包括埋入自溶素內之異種抗原的蛋白質嵌合體的表現卡匣，可在李斯特菌屬中用來完成異種抗原的有效表現和分泌(參見，例如下文的實例29)。亦已經顯示自溶素蛋白質嵌合體是免疫原性的(參見，例如下文的實例31A)。此外，亦已經顯示包括密碼子-最優化之表現卡匣的李斯特菌屬及/或包括非-李斯特菌屬信號肽之表現卡匣，在老鼠模式中是免疫原性的、降低腫瘤體積，並增加存活(參見，例如下文的實例31B-E)。

因此，本發明一方面提供重組的核酸分子，包括編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及與第一個多核苷酸相同之轉譯編閱架構而編碼多肽(例如抗原)的第二個多核苷酸，且其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，也將第二個多核苷酸密碼子-最優化(通常是為了在與第一個多核苷酸相同的細菌類

型中表現)。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬、芽胞桿菌屬(Bacillus)、鼠疫耶爾森氏菌(Yersinia pestis)、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬(Shigella)、布氏桿菌屬(Brucella)、分枝桿菌或大腸桿菌中表現，將第一個多核苷酸或第一和第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬，如單核細胞增多性李斯特菌中表現，將多核苷酸(們)密碼子-最優化。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼之多肽為(或包括)抗原，在一些情況下，其可以是非-細菌的抗原。例如，在一些具體實施例中，抗原是與腫瘤有關的抗原，或衍生自這類與腫瘤有關的抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原為K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素(mesothelin)、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質(survivin)、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA，或衍生自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA。例如，在一些具體實施例中，該抗原為間皮素，或間皮素之抗原性片段或抗原性變體。在一些其他的具體實施例中，該抗原為NY-ESO-1，或NY-ESO-1之抗原性片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，該抗原為傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原。在一些具體實施例中，該信號肽是細菌的(李斯特菌屬或非-李斯特菌屬的)。在一些具體實施例中，由密碼子-最優化之第一個多核苷酸編碼的信號肽，對細菌而言是天然的。在另外的具體實施例中，由密碼子-最優化之第一個

多核苷酸編碼的信號肽，對細菌而言是外來的。在一些具體實施例中，該信號肽是secA1信號肽，如得自單核細胞增多性李斯特菌的LLO信號肽、得自乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)的Usp45信號肽，或得自炭疽桿菌(Bacillus anthracis)的保護性抗原信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽。例如，該信號肽可以是得自單核細胞增多性李斯特菌的p60信號肽。此外，該重組核酸分子可視需要包括以與第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼p60或其片段的第三個多核苷酸序列，其中該第二個多核苷酸係位在第三個多核苷酸內，或在第一和第三個多核苷酸之間。在另一個具體實施例中，信號肽為Tat信號肽，如枯草桿菌Tat信號肽(例如PhoD)。本發明亦提供包括重組核酸分子的表現卡匣，並更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子(例如與第一和第二個多核苷酸(若存在與第三個多核苷酸))連接的啟動基因。亦提供包括該表現卡匣的表現載體和重組細菌(例如李斯特菌屬)，就像包括該細菌的醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。亦提供使用該細菌或包括該細菌之組合物誘導免疫反應及/或預防或治療病況，如疾病的方法。亦提供在宿主中使用該細菌來製造誘導對抗原之免疫反應的醫藥品，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括該抗原。

在次要方面，本發明提供重組的核酸分子，包括(a)編碼對細菌而言為天然之信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是

與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該信號肽而言為異種的。在一些具體實施例中，該第二個多核苷酸對第一個多核苷酸而言為異種的。在一些具體實施例中，該多肽對細菌而言為外來的，但信號肽對該細菌而言卻是天然的。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼之多肽對該信號肽而言為異種的，對細菌而言為外來的，或兩者皆是。在一些具體實施例中，從其中衍生信號肽的細菌是細胞內的細菌。在一些具體實施例中，該細菌係選自李斯特菌屬、芽胞桿菌屬、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬、布氏桿菌屬、分枝桿菌或大腸桿菌所組成之群。在一些具體實施例中，該細菌為李斯特菌屬的細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌)。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現將第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，第一及/或第二個多核苷酸的密碼子-最優化作用提高了在編碼融合蛋白之細菌中的表現，或從其中分泌(相對於非-密碼子-最優化之序列)。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。由第二個多核苷酸編碼之多肽是抗原。在一些具體實施例中，該抗原是非-細菌的抗原。在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關的抗原，或包括衍生自與腫瘤有關之抗原的抗原。在一些具體實施例中，該抗原係選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP

或CEA所組成之群，或衍生自選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA所組成之群的抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原是間皮素，或其抗原性片段或變體，或是NY-ESO-1，或其抗原性片段或變體。在一些交替的具體實施例中，該抗原是傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原。在一些具體實施例中，該信號肽是secA1信號肽(例如得自單核細胞增多性李斯特菌的LLO信號肽)。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽(例如，得自單核細胞增多性李斯特菌的p60信號肽)。亦提供包括重組核酸分子的表現卡匣，並更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子的第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因。亦提供包括該表現卡匣的表現載體。亦提供包括該重組核酸分子的重組細菌，其中為了在該重組細菌中表現，將第一個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，該重組細菌是細胞內的細菌。在一些具體實施例中，該重組細菌係選自李斯特菌屬、芽胞桿菌屬、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬、布氏桿菌屬、分枝桿菌或大腸桿菌所組成之群。在一些具體實施例中，該細菌為重組的李斯特菌屬細菌(例如重組的單核細胞增多性李斯特菌)。更進一部提供包括該重組細菌的免疫原組合物，其中由第二個多核苷酸編碼之多肽是抗原。亦提供在宿主中對抗原誘導免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括該重組細菌之組合物，其中由該第二個多核苷酸編碼的多肽是抗原。亦提

供該細菌在製造在宿主中對抗原誘導免疫反應之醫藥品上的用途，其中由第二個多核苷酸編碼之多肽包括該抗原。

在第三方面，本發明提供包括重組核酸分子的重組李斯特菌屬(例如單核細胞增多性李斯特菌屬)，其中該重組核酸分子包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬的細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽與該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼之多肽對該信號肽而言為異種的。在一些具體實施例中，該重組核酸分子為表現卡匣的一部分，其更進一步包括以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。換句話說，在一些具體實施例中，該重組的李斯特菌屬係菌包括表現卡匣，其包括重組的核酸分子，其中該表現卡匣更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子的第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該表現卡匣是多順反子的表現卡匣。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬的細菌中表現，將第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，第一及/或第二個多核苷酸的密碼子-最優化作用，提高了在編碼融合蛋白在李斯特菌屬細菌中的表現，及/或從其中分泌(相對於未-密碼子-最優化的序列)。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼的多肽對李斯特菌屬的細菌而言為外來的(即對李斯特菌

屬的細菌而言是異種的)。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原(例如非-李斯特菌屬的或非-細菌的抗原)。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼的多肽為抗原。在一些具體實施例中，該抗原為與腫瘤有關的抗原或衍生自與腫瘤有關的抗原。在一些具體實施例中，該抗原係選自由K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群，或衍生自選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原為間皮素或其抗原性片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，該抗原為人類間皮素。在一些具體實施例中，該抗原為刪除其信號肽和GPI交聯劑功能部位的人類間皮素。在一些交替的具體實施例中，該抗原為NY-ESO-1，或其抗原性片段或抗原性變體。在一些交替的具體實施例中，該抗原為傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原的抗原。在一些具體實施例中，該信號肽為非-李斯特菌屬的。在一些具體實施例中，該信號肽為細菌的。在一些具體實施例中，該信號肽對李斯特菌屬而言是外來的。在其他的具體實施例中，該信號肽對李斯特菌屬而言是天然的。在一些具體實施例中，該信號肽是secA1信號肽(例如得自單核細胞增多性李斯特菌的LLO信號肽、得自乳酸乳球菌的Usp45信號肽，以

及得自炭疽桿菌的保護性抗原信號肽)。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽(例如得自單核細胞增多性李斯特菌的p60信號肽)。在一些具體實施例中，該信號肽為Tat信號肽(例如得自枯草桿菌的PhoD信號肽)。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬的細菌是減毒的。例如，可用細胞-對-細胞擴散，進入非-吞噬細胞內，或增殖，將李斯特菌屬減毒。在一些具體實施例中，重組的李斯特菌屬細菌對於ActA、表面蛋白(Internalin)B或ActA和表面蛋白B兩者是有缺陷的(例如ΔactAΔinlB雙重刪除的突變種)。在一些具體實施例中，重組的李斯特菌屬細菌刪除了有功能的ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者。在一些具體實施例中，已經藉著與瞄準化合物(例如補骨脂素(psoralen)化合物)之核酸起反應，來修改重組細菌的核酸。本發明亦提供包括重組李斯特菌屬細菌和在藥學上可接受之載劑的醫藥組合物，以及包括重組李斯特菌屬細菌的免疫原組合物，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽為抗原。本發明亦提供包括重組之李斯特菌屬細菌的疫苗。亦提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括重組細菌之組合物，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽為抗原。亦提供在宿主中預防或治療病況(例如疾病，如癌症或傳染病)的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括重組李斯特菌屬細菌之組合物。亦提供該細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼的多肽是抗原。

在第四方面，本發明提供重組的核酸分子，其包括編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸，以及編碼多肽(例如抗原)的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，且其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，為了在特殊類型的細菌中表現，將第一個多核苷酸及/或第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，第一及/或第二個多核苷酸的密碼子-最優化作用提高了融合蛋白在該細菌中的表現及/或從其中分泌(相對於未-密碼子-最優化的序列)。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬、芽胞桿菌屬、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬、布氏桿菌屬、分枝桿菌或大腸桿菌中表現，將第一個多核苷酸及/或第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬，例如單核細胞增多性李斯特菌中表現，將多核苷酸(們)密碼子-最優化。在一些具體實施例中，由密碼子-最優化之第一個多核苷酸編碼的信號肽，對該細菌而言是天然的，為此將其密碼子-最優化。在一些具體實施例中，該第一個多核苷酸編碼之信號肽對於第二個多核苷酸而言是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該信號肽而言是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽為抗原，其在一些情況下可以是非-細菌的抗原。在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關的抗原，

或衍生自這類與腫瘤有關之抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原為K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA，或衍生自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA。例如，在一些具體實施例中，該抗原是間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。在一些其他的具體實施例中，該抗原為NY-ESO-1，或NY-ESO-1的抗原性片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，該抗原為傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原。在一些具體實施例中，由該重組核酸分子之第一個多核苷酸編碼的信號肽士李斯特菌屬的。在其他的具體實施例中，該信號肽是非-李斯特菌屬的。在一些具體實施例中，該信號肽係衍生自革蘭氏陽性細菌。在一些具體實施例中，該信號肽係衍生自屬於芽胞桿菌屬、葡萄球菌屬或乳球菌屬的細菌。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽。例如，該信號肽可以是得自單核細胞增多性李斯特菌的p60信號肽。此外，該重組核酸分子亦可視需要包括編碼p60或其片段的第三個多核苷酸序列，其為與位在第三個多核苷酸內，或在第一和第三個多核苷酸之間的第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構。在另外的具體實施例中，該信號肽是Tat信號肽，如枯草桿菌Tat信號肽(例如枯草桿菌PhoD信號肽)。本發明亦提供包括該重組核酸分子的表現卡匣，

其更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子之第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因。亦提供包括表現卡匣及/或重組核酸分子的表現載體和細菌，就像包括該細菌的醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。在一些具體實施例中，包括表現卡匣或重組核酸分子的重組細菌是細胞內的細菌。在一些具體實施例中，該細菌是選自李斯特菌屬、芽胞桿菌屬、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬、布氏桿菌屬、分枝桿菌或大腸桿菌所組成之群的細菌。在一些具體實施例中，該細菌是李斯特菌屬的細菌(例如物種單核細胞增多性李斯特菌的成員)。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該細菌而言是外來的(即對該細菌而言是異種的)。亦提供在宿主中使用該細菌或包括該細菌之組合物誘導免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。在一些具體實施例中，該病況為癌症。在其他的具體實施例中，該病況為傳染病。亦提供該細菌在製造在宿主中誘導對抗原之反應之醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

在其他方面，本發明提供包括重組核酸分子的重組李斯特菌屬細菌，其中該重組核酸分子包括(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該信號肽而言是異種的，或對該細菌

而言是外來的，或兩者皆是。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬的細菌屬於物種單核細胞增多性李斯特菌。在一些具體實施例中，該重組的核酸分子是表現卡匣的一部分，其更進一步包括以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。換句話說，在一些具體實施例中，該重組的李斯特菌屬細菌包括表現卡匣，其包括重組核酸分子，其中該表現卡匣更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子的第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該表現卡匣是多順反子的表現卡匣。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬的細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌)中表現，將第一個多核苷酸、第二個多核苷酸或第一和第二個多核苷酸兩者密碼子-最優化。在一些具體實施例中，第一及/或第二個多核苷酸的密碼子-最優化作用，提高了在該細菌中的表現及/或從其中分泌(相對於未-密碼子-最優化的序列)。在一些具體實施例中，該第一和第二個多核苷酸彼此是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼的多肽和該信號肽彼此是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該李斯特菌屬細菌而言是外來的(例如對該李斯特菌屬細菌是異種的)。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽是抗原(例如非-李斯特菌屬的或非-細菌的抗原)。在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關的抗原，或衍生自與腫瘤有關的抗原。在一些

具體實施例中，該抗原係選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群，或衍生自選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原為間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，該抗原是人類間皮素。在一些具體實施例中，該抗原是刪除其信號肽和GPI交聯劑功能部位的人類間皮素。在一些交替的具體實施例中，該抗原是傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原。在一些具體實施例中，該信號肽是非-李斯特菌屬的。在一些具體實施例中，該非-secA1信號肽是李斯特菌屬的信號肽。在其他的具體實施例中，該非-secA1信號肽是非-李斯特菌屬的信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽(例如得自單核細胞增多性李斯特菌的p60信號肽)。在一些具體實施例中，該重組核酸分子包括secA2信號肽，更進一步包括編碼secA2自溶素(例如p60或N-乙醯胞壁質酶)，或其片段(例如具有催化活性之片段)的第三個多核苷酸，其以與第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該第二個多核苷酸係位在該重組核酸分子的第三個多核苷酸內，或在第一和第三個多核苷酸之間。在一些具體實施例中，該第二個多核苷酸係位在第三個多核苷酸內。在一些具體實施例中，該信號肽為

Tat信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是衍生自枯草桿菌之Tat信號肽(例如得自枯草桿菌的PhoD信號肽)。在一些具體實施例中，將該李斯特菌屬的細菌減毒。例如，可用細胞-對-細胞擴散，進入非-吞噬細胞內，或增殖，將李斯特菌屬減毒。在一些具體實施例中，重組的李斯特菌屬細菌對於ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者是有缺陷的(例如ΔactAΔinlB雙重刪除的突變種)。在一些具體實施例中，重組的李斯特菌屬細菌刪除了有功能的ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者。在一些具體實施例中，已經藉著與瞄準化合物(例如補骨脂素化合物)之核酸起反應，來修改重組細菌的核酸。本發明亦提供包括重組的李斯特菌屬細菌和在藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。本發明亦提供包括重組細菌的免疫原組合物，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽為抗原。本發明亦提供包括重組之李斯特菌屬細菌的疫苗。亦提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括該重組細菌之組合物，其中由該第二個多核苷酸編碼的多肽是抗原。亦提供在宿主中預防或治療病況(例如疾病，如癌症或傳染病)的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括該重組李斯特菌屬細菌之組合物。亦提供該細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

在其他方面，本發明提供重組的核酸分子，其包括編碼對李斯特菌屬細菌而言為外來的多肽(如抗原，像是癌症抗

原或非-李斯特菌屬細菌的抗原)之多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現，將該多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，該多核苷酸的密碼子-最優化作用提高了該多肽在李斯特菌屬細菌中的表現及/或從其中分泌(相對於未-密碼子-最優化的序列)。在一些具體實施例中，該外來多肽包括抗原。在一些具體實施例中，該外來多肽是抗原。在一些具體實施例中，該抗原是非-細菌的抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關的抗原，或衍生自這類與腫瘤有關的抗原。例如，在一些具體實施例中，該多肽為K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA，或衍生自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA。在一些具體實施例中，該抗原為間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。在一些其他的具體實施例中，該抗原是NY-ESO-1，或NY-ESO-1之抗原性片段或變體。在一些其他的具體實施例中，該抗原是傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原。在一些具體實施例中，該重組核酸分子更進一步包括以與該外來多肽相同的轉譯編閱架構，編碼信號肽的多核苷酸，使該重組核酸分子得以編碼包括信號肽和該外來多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼信號肽(其對李斯特菌屬而言可以是或可以不是天然的)的多核

苷酸密碼子-最優化。本發明更提供包括該重組核酸分子的表現卡匣，其更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子之第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因。亦提供包括該重組核酸分子及/或表現卡匣的載體(例如表現載體)。本發明亦提供包括該重組核酸分子及/或表現卡匣的重組李斯特菌屬細菌。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬之細菌屬於物種單核細胞增多性李斯特菌。亦提供包括該重組李斯特菌屬細菌的醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。本發明更提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括重組李斯特菌屬細菌之組合物，其中該多肽是抗原。此外，本發明亦提供使用該重組李斯特菌屬細菌在宿主中誘導對抗原之免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。亦提供該細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中該外來多肽包括抗原。

在其他方面，本發明提供包括表現卡匣的重組李斯特菌屬細菌，其中該表現卡匣包括編碼對李斯特菌屬細菌而言為外來的多肽(如抗原，像是癌症抗原或非-李斯特菌屬細菌的抗原)之多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現，將該多核苷酸密碼子-最優化，以及以可操作之方式與編碼該外來多肽之多核苷酸連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬細菌屬於物種單核細胞增多性李斯特菌。在一些具體實施例中，該多核苷酸的密碼子-最優化作用提高了該多肽在李斯特菌屬細菌中的表現及/或從其中

分泌(相對於未-密碼子-最優化的序列)。在一些具體實施例中，該外來多肽包括抗原。在一些具體實施例中，該外來多肽是抗原，在一些案例中，它可能是非-細菌的抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關的抗原，或衍生自這類與腫瘤有關的抗原。例如，在一些具體實施例中，該多肽為K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA，或衍生自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA。在一些具體實施例中，該抗原為間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。在一些其他的具體實施例中，該抗原是NY-ESO-1，或NY-ESO-1之抗原性片段或抗原性變體。在一些其他的具體實施例中，該抗原是傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原。在一些具體實施例中，該表現卡匣更進一步包括以與該外來多肽相同的轉譯編閱架構，編碼信號肽的多核苷酸，其以可操作之方式與啟動基因連接，使該表現卡匣得以編碼包括信號肽和該外來多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼信號肽(其對李斯特菌屬而言可以是或可以不是天然的)的多核苷酸密碼子-最優化。亦提供包括該重組李斯特菌屬細菌的醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。本發明更提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效

含量的包括重組李斯特菌屬細菌之組合物。此外，本發明亦提供使用該重組李斯特菌屬細菌在宿主中誘導對抗原之免疫反應及/或預防或治療病況(例如疾病)的方法。亦提供該細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中該外來多肽包括抗原。

在其他方面，本發明提供包括重組核酸分子的重組李斯特菌屬細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌)，其中該重組核酸分子包括(a)編碼非-李斯特菌屬細菌之信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括非-李斯特菌屬細菌之信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，該重組核酸分子係位在表現卡匣中，其更進一步包括以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。因此，在一些具體實施例中，該重組的李斯特菌屬細菌包括表現卡匣，其包括重組的核酸分子，其中該表現卡匣更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子的第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該表現卡匣是多順反子的表現卡匣(例如雙順反子的表現卡匣)。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬(例如單核細胞增多性李斯特菌)中表現，將第一個多核苷酸、第二個多核苷酸或第一和第二個多核苷酸兩者密碼子-最優化。在一些具體實施例中，第一及/或第二個多核苷酸的密碼子-最優化作用，提高了在該細菌中融合蛋白的表現，及/或從其中

該融合蛋白的分泌(相對於未-密碼子-最優化的序列)。在一些具體實施例中，該第一和第二個多核苷酸彼此是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼的多肽和該信號肽彼此是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該李斯特菌屬細菌而言是外來的(即對該李斯特菌屬細菌是異種的)。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原(例如非-李斯特菌屬的抗原)。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽是抗原。在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關的抗原，或衍生自與腫瘤有關的抗原。在一些具體實施例中，該抗原係選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群，或衍生自選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原為間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，該抗原是人類間皮素。在一些具體實施例中，該抗原是刪除其信號肽和GPI交聯劑功能部位的人類間皮素。在一些交替的具體實施例中，該抗原是傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原。在一些具體實施例中，該信號肽是細菌的。在一些具體實施例中，該信號肽係衍生自細胞內的細菌。在一些具體實施例中，該信號肽係衍生自革蘭氏

陽性的細菌。在一些具體實施例中，該信號肽得自屬於芽胞桿菌屬、葡萄球菌屬或乳球菌屬(例如炭疽桿菌、枯草桿菌、金黃色葡萄球菌或乳酸乳球菌)的細菌。在一些具體實施例中，該信號肽是secA1信號肽(例如得自乳酸乳球菌的Usp45信號肽或得自炭疽桿菌的保護性抗原信號肽)。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是Tat信號肽(例如得自枯草桿菌的PhoD信號肽)。在一些具體實施例中，將該李斯特菌屬的細菌減毒。例如，在一些具體實施例中，可用細胞-對-細胞擴散，進入非-吞噬細胞內，或增殖，將李斯特菌屬減毒。在一些具體實施例中，重組的李斯特菌屬細菌對於ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者是有缺陷的(例如ΔactAΔinlB雙重刪除的突變種)。在一些具體實施例中，重組的李斯特菌屬細菌刪除了有功能的ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者。在一些具體實施例中，已經藉著與瞄準化合物(例如補骨脂素化合物)之核酸起反應，來修改重組細菌的核酸。本發明亦提供包括重組的李斯特菌屬細菌和在藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。本發明更提供包括重組細菌的免疫原組合物，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽為抗原。本發明亦提供包括重組之李斯特菌屬細菌的疫苗。亦提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括該重組李斯特菌屬細菌之組合物，其中由該第二個多核苷酸編碼的多肽是抗原。亦提供在宿主中預防或治療病況(例如疾病，如癌症或傳染病)的方

法，包括對該宿主投與有效含量的包括該重組李斯特菌屬細菌之組合物。亦提供該細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

在其他方面，本發明提供包括表現卡匣的重組李斯特菌屬細菌(例如得自物種單核細胞增多性李斯特菌)，其包括編碼非-李斯特菌屬之信號肽的第一個多核苷酸、以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽的第二個多核苷酸，以及以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。該表現卡匣編碼包括非-李斯特菌屬之信號肽和該多肽兩者的融合蛋白。在一些具體實施例中，可用細胞-對-細胞擴散，進入非-吞噬細胞內，或增殖，將李斯特菌屬細菌減毒。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬中表現，將第一個多核苷酸、第二個多核苷酸或第一和第二個多核苷酸兩者密碼子-最優化。在一些具體實施例中，第一及/或第二個多核苷酸的密碼子-最優化作用，提高了所編碼之融合蛋白在該細菌中的表現，及/或從其中分泌(相對於未-密碼子-最優化的序列)。在一些具體實施例中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將第一個多核苷酸及/或第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽是抗原，在一些案例中，它可以是非-細菌的抗原。例如在一些具體實施例中，該抗原是與癌症有關的抗原，或衍生自這類與癌

症有關的抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原為K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA，或衍生自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA。例如，在一些具體實施例中，該抗原為間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。在一些其他的具體實施例中，該抗原是NY-ESO-1，或NY-ESO-1的抗原性片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，該抗原是傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原。在較佳的具體實施例中，該信號肽是細菌的。在一些具體實施例中，該信號肽得自屬於芽胞桿菌屬、葡萄球菌屬或乳球菌屬的細菌。例如，在一些具體實施例中，該信號肽得自炭疽桿菌、枯草桿菌、金黃色葡萄球菌或乳酸乳球菌。在一些具體實施例中，該信號肽是secA1信號肽，如得自乳酸乳球菌的Usp45信號肽或得自炭疽桿菌的保護性抗原信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽。在更多的具體實施例中，該信號肽是Tat信號肽，如枯草桿菌Tat信號肽(例如PhoD)。亦提供包括在本文中描述之重組李斯特菌屬細菌的醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。此外，本發明亦提供使用該重組的李斯特菌屬細菌誘導免疫反應，及/或預防或治療病況，如疾病的方法。亦提供該細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核

苷酸編碼之多肽包括抗原。

本發明更提供重組的核酸分子，包括(a)編碼細菌自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸；以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組的核酸分子編碼包括由第二個多核苷酸編碼之多肽和自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的蛋白質嵌合體，其中在該蛋白質嵌合體中，該多肽與自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合，或位在自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體內。在一些具體實施例中，該第一個多核苷酸編碼細菌之自溶素。在一些具體實施例中，該蛋白質嵌合體是像自溶素一樣具有催化活性的。在一些具體實施例中，該細菌之自溶素係得自細胞內的細菌(如李斯特菌屬)。在一些具體實施例中，該細菌自溶素是李斯特菌屬的自溶素。在一些具體實施例中，編碼該多肽的第二個多核苷酸係位在編碼自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸內，且該重組的核酸分子編碼蛋白質嵌合體，其中該多肽係位在自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體內(即該多肽埋入自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體內)。在一些交替的具體實施例中，該第二個多核苷酸係位在編碼自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸外面，且該重組的核酸分

子編碼蛋白質嵌合體，其中該多肽與自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合。在一些具體實施例中，該多肽對自溶素而言是異種的。在一些具體實施例中，第一個多核苷酸和第二個多核苷酸彼此是異種的。在一些具體實施例中，該重組核酸分子更進一步包括(c)以與第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼信號肽的第三個多核苷酸，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽、由該第二個多核苷酸編碼之多肽，以及自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的蛋白質嵌合體。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽(如p60)。在一些具體實施例中，該信號肽在性質上是與自溶素有關的信號肽(例如該信號肽為p60，且該自溶素為p60)。在一些具體實施例中，該自溶素是secA2-依賴性的自溶素。在一些具體實施例中，該自溶素是肽聚醣水解酶(例如N-乙醯胞壁質酶或p60)。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。在一些具體實施例中，該多肽為抗原(例如與腫瘤有關的抗原、衍生自與腫瘤有關之抗原的抗原、傳染病抗原或衍生自傳染病抗原的抗原)。在一些具體實施例中，該抗原係選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群，或衍生自選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP

和CEA所組成之群的抗原。例如在一些具體實施例中，該抗原是間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，該抗原是人類間皮素。在一些具體實施例中，該抗原是刪除其信號肽和GPI錨定的人類間皮素。本發明亦提供包括該重組核酸分子的表現卡匣，更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子的第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，以及包括該表現卡匣的表現載體。本發明更提供包括該重組核酸分子的重組細菌。在一些具體實施例中，該重組細菌是細胞內的細菌，如李斯特菌屬的細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌)。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該重組細菌而言是外來的。亦提供包括(a)該重組細菌和(b)在藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。此外，亦提供包括該重組細菌的免疫原組合物，其中由該第二個多核苷酸編碼的多肽是抗原。亦提供包括該重組細菌的疫苗，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽是抗原。本發明亦提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括該重組細菌之組合物，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽是抗原。亦提供在宿主中預防或治療病況的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括該重組細菌之組合物。亦提供該細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

另一方面，本發明提供包括多順反子之表現卡匣的重組李斯特菌屬細菌，其中該多順反子之表現卡匣編碼至少兩

個分離的非-李斯特菌屬之多肽。例如，在在一些具體實施例中，該表現卡匣包括編碼第一個非-李斯特菌屬多肽的第一個多核苷酸、編碼第二個非-李斯特菌屬多肽的第二個多核苷酸，以及以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該表現卡匣更進一步在第一和第二個多核苷酸之間包括基因間序列。在一些具體實施例中，該多順反子之表現卡匣是雙順反子的表現卡匣，其編碼兩個分離的非-李斯特菌屬多肽。在一些具體實施例中，該重組的李斯特菌屬細菌屬於物種單核細胞增多性李斯特菌。在一些具體實施例中，至少一個由多順反子之表現卡匣編碼的非-李斯特菌屬多肽包括抗原。在一些具體實施例中，至少兩個非-李斯特菌屬多肽分別包括相同抗原的片段。在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關的抗原，或衍生自與腫瘤有關的抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原是選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原，或衍生自選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原。在一些具體實施例中，該抗原為間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，該抗原是人類間皮素。在一些具體實施例中，該抗原是刪除其信號肽和GPI錨定的人類間皮素。在一些具體

實施例中，該抗原是傳染病抗原或衍生自傳染病抗原。在一些具體實施例中，由該多順反子之表現卡匣編碼的至少兩個非-李斯特菌屬多肽包括信號肽(李斯特菌屬的信號肽或非-李斯特菌屬的信號肽)。在一些具體實施例中，該信號肽是secA1信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽。在其他的具體實施例中，該信號肽是Tat信號肽。在一些具體實施例中，該表現卡匣包括編碼信號肽的多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現，將編碼該信號肽的多核苷酸密碼子-最優化。本發明亦提供醫藥組合物，包括：(a)重組的李斯特菌屬細菌，和(b)在藥學上可接受之載劑。亦提供包括該重組之李斯特菌屬細菌的免疫原組合物。亦提供包括該重組之李斯特菌屬細菌的疫苗。亦提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括該重組李斯特菌屬細菌之組合物，其中該至少一個非-李斯特菌屬多肽是抗原。亦提供在宿主中預防或治療病況的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括該重組李斯特菌屬細菌之組合物。亦提供該細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中一個由該多順反子之表現卡匣編碼之非-李斯特菌屬多肽包括抗原。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，(b)編碼分泌蛋白質或其片段的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，以及(c)編碼對該分泌蛋白質或其

片段而言為異種之多肽的第三個多核苷酸，其中該第三個多核苷酸是與第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽、由第三個多核苷酸編碼之多肽，以及分泌蛋白質或其片段的蛋白質嵌合體，且其中在該蛋白質嵌合體中，由該第三個多核苷酸編碼之多肽與該分泌蛋白質或其片段融合，或位在該分泌蛋白質或其片段內。在一些具體實施例中，該分泌蛋白質是天然分泌的蛋白質(即從其天然細胞中分泌的蛋白質)。在一些具體實施例中，該第三個多核苷酸係位在該重組核酸分子中之第二個多核苷酸內，且在由該重組核酸分子編碼的蛋白質嵌合體中，由該第三個多核苷酸編碼之多肽係位在分泌蛋白質或其片段內。在一些具體實施例中，該第三個多核苷酸係位在重組核酸分子中之第二個多核苷酸的外側，且在該蛋白質嵌合體中，由該第三個多核苷酸編碼的多肽與分泌蛋白質或其片段融合。亦提供表現卡匣，其包括該重組核酸分子，且更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子的第一、第二和第三個多核苷酸連接的啟動基因。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽是抗原。例如，在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關的抗原，或衍生自與腫瘤有關的抗原(例如，選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原，

或衍生自選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原)。在一些具體實施例中，該抗原為間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。例如，在一些具體實施例中，該抗原是人類間皮素，或刪除其信號肽和GPI錨定的人類間皮素。在一些具體實施例中，該抗原是傳染病抗原或衍生自傳染病抗原。亦提供包括該表現卡匣的表現載體。亦提供包括該重組核酸分子的重組細菌。亦提供重組的李斯特菌屬細菌(例如單核白血球李斯特菌)，且在一些具體實施例中，由該第三個多核苷酸編碼之多肽對該李斯特菌屬細菌而言是外來的。本發明亦提供包括該重組細菌的免疫原組合物，其中由該第三個多核苷酸編碼之多肽是抗原。亦提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括該重組細菌之組合物，其中由該第三個多核苷酸編碼之多肽是抗原。亦提供包括該細菌的醫藥組合物和疫苗，就像在宿主中使用該重組細菌或包括該細菌之組合物，來預防或治療病症的方法。亦提供該細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第三個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

在更多方面，本發明提供在宿主細菌中表現和分泌異種蛋白質的改良方法。本發明亦提供改良異種蛋白質在細菌中之表現和分泌的方法。本發明更提供製造在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣、表現載體和重組細菌的方法。

應了解在馬庫氏(Markush)族群、馬庫氏申請專利範圍中或經由"語言"陳述的具體實施例，除非另行明確地或藉著上下文敘述，包括每個個別的具體實施例、每個個別的具體實施例之任何組合，以及由所有每個個別的具體實施例所組成的本發明。

下文提供上述觀點和具體實施例的更多說明，以及本發明的額外具體實施例和觀點。

李斯特菌重組的核酸分子

本發明提供各種用來在細菌，如李斯特菌屬中表現多核苷酸，如異種多核苷酸的多核苷酸。例如，提供包括編碼信號肽(或包括信號肽的多肽)之序列與多肽之密碼序列，如異種抗原之新穎組合的重組核酸分子。提供包括密碼子-最優化之多核苷酸序列的重組核酸分子。在一些具體實施例中，這些重組的核酸分子是異種的，因為它們所包括的多核苷酸(即多核苷酸序列)，不是天然在彼此成為相同核酸分子之一部分的組合中找到的。在一些具體實施例中，該重組核酸分子是分開的。在一些具體實施例中，該重組核酸分子係位在表現卡匣、表現載體、在細菌中之質體DNA及/或甚至是在細菌之基因組DNA內(在插入之後)。在一些具體實施例中，該重組核酸分子提供了該多肽(例如異種多肽)在細菌中提高的表現及/或分泌。

在一些具體實施例中，該重組的核酸分子是DNA。在一些具體實施例中，該重組的核酸分子是RNA。在一些具體實施例中，該重組的核酸是單股的。在其他的具體實施例

中，該重組的核酸是雙股的。

在一些具體實施例中，在本文中描述之重組核酸分子編碼融合蛋白，如包括信號肽和其他多肽的融合蛋白，如對該信號肽而言為異種的多肽。在一些具體實施例中，該信號肽是細菌的信號肽。了解所列舉之融合蛋白的多肽組份可以是，但不一定是，直接彼此融合。在一些具體實施例中，融合蛋白的多肽組份可在多肽序列上，被一或多個介入的胺基酸序列分開。在一些具體實施例中，另一個多肽是非-細菌的，例如是哺乳動物或病毒的。

例如，本發明一方面提供重組的核酸分子，其包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；以及(b)編碼多肽(例如抗原)的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和該多肽的融合蛋白。在額外的具體實施例中，亦為了在細菌中表現，將該第二個多核苷酸(編碼多肽，如抗原的多核苷酸)密碼子-最優化。為其而將第一及/或第二個多核苷酸密碼子-最優化的細菌，應該是一類企圖將該重組核酸分子放置於其中的細菌。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，其包括(a)編碼對該細菌而言為天然之信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在該細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；和(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核

酸分子編碼包括信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該信號肽而言是異種的。在一些具體實施例中，該第二個多核苷酸對第一個多核苷酸而言是異種的。在一些具體實施例中，該多肽對對該信號肽而言為天然之細菌而言是異種的(即對該細菌是外來的)。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該信號肽而言是異種的，對該細菌而言是外來的，或兩者皆是。在一些具體實施例中，從其中衍生出信號肽的細菌是細胞內的細菌。在一些具體實施例中，該細菌係選自李斯特菌屬、芽胞桿菌屬、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬、布氏桿菌屬、分枝桿菌和大腸桿菌所組成之群。在一些具體實施例中，該信號肽對李斯特菌屬之細菌而言是天然的。在一些具體實施例中，該信號肽對屬於物種單核細胞增多性李斯特菌之李斯特菌屬細菌而言是天然的。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，將第二個多核苷酸密碼子-最優化。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，其中該重組核酸分子包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬之細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，該信號肽對李斯特菌屬之細菌而言是天然的。在一些具體實施例中，該信號肽對李斯特菌屬之

細菌而言是外來的。在一些具體實施例中，該信號肽對由第二個多核苷酸編碼之多肽而言是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對李斯特菌屬之細菌而言是異種的。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬之細菌屬於物種單核細胞增多性李斯特菌。

本發明亦提供重組的核酸分子，其包括編碼對李斯特菌屬細菌而言為外來之多肽(例如癌症或非-李斯特菌屬之傳染病抗原)的多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬細菌中表現，將編碼該外來多肽的多核苷酸密碼子-最優化。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，包括：(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)編碼多肽，如抗原之第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，該非-secA1細菌信號肽是secA2信號肽或Tat信號肽。在一些具體實施例中，為了在企圖將該重組核酸分子放置在其中的細菌(例如李斯特菌屬)中表現，將編碼非-secA1信號肽的第一個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了在企圖將該重組核酸分子放置在其中的細菌中表現，將編碼該多肽，如抗原的第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該信號肽而言是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對欲將該重組核酸分子併入或已經導入其中的細菌而言是外來的。在一些具體

實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對欲將該重組核酸分子併入或已經導入的細菌而言是外來的，且由該第二個多核苷酸編碼之多肽亦對該信號肽而言是異種的。

本發明更提供重組的核酸分子，包括編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸、編碼多肽(例如異種蛋白質及/或抗原)的第二個多核苷酸，以及以與第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼SecA2自溶素或其片段的第三個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸係位在第三個多核苷酸內，或在第一和第三個多核苷酸之間。在一些具體實施例中，該重組核酸分子編碼包括信號肽、多肽和自溶素的融合蛋白。在一些具體實施例中，該自溶素的片段是像自溶素一樣具有催化活性的。在一些具體實施例中，該自溶素係得自細胞內的細菌。在一些具體實施例中，該自溶素是肽聚醣水解酶。在一些具體實施例中，該細菌自溶素是李斯特菌屬的自溶素。在一些具體實施例中，該自溶素是p60。在一些具體實施例中，該自溶素是N-乙醯胞壁質酶。

本發明亦提供重組的核酸分子，其中該重組核酸分子包括(a)編碼非-李斯特菌屬之信號肽的第一個多核苷酸；以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其為與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括非-李斯特菌屬之信號肽和該多肽兩者的融合蛋白。在一些具體實施例中，該非-李斯特菌屬之信號肽對由第二個多核苷酸編碼之多肽而言是異種的。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬之細菌中表現，將第一個多核苷酸、第二個多核

苷酸，或第一和第二個多核苷酸兩者密碼子-最優化。

本發明亦提供重組的核酸分子，包括(a)編碼細菌自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括由該第二個多核苷酸編碼之多肽和自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的蛋白質嵌合體，其中在該蛋白質嵌合體中，該多肽與自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合，或位在自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體內。在一些具體實施例中，該第二個多核苷酸係位在第一個多核苷酸內，且該重組核酸分子編碼蛋白質嵌合體，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽係位在自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體內。在一些具體實施例中，該第二個多核苷酸係位在第一個多核苷酸的外側，且該重組核酸分子編碼蛋白質嵌合體，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽與自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合。在一些具體實施例中，該第一個多核苷酸編碼自溶素。在一些具體實施例中，該重組核酸分子更進一步包括(c)以與第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼信號肽的第三個多核苷酸，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽、由第二個多核苷酸編碼之多肽和自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的蛋白質嵌合體。在一些

具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對自溶素而言是異種的。在一些具體實施例中，該自溶素之片段的長度為至少大約30、至少大約40、至少大約50或至少大約100個胺基酸。在一些具體實施例中，該自溶素係得自細胞內的細菌。在一些具體實施例中，該細菌自溶素為李斯特菌屬的自溶素。自溶素之具有催化活性的變體包括與原始自溶素之差異為一或多個取代、刪除、添加及/或插入的變體。在一些具體實施例中，該自溶素為肽聚醣水解酶。在一些具體實施例中，該自溶素為p60。在一些具體實施例中，該自溶素為N-乙醯胞壁質酶。

可藉著酶譜，一種熟諳此藝者已知的技術(參見，例如Lenz 等人 (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 12432-12437)，來確認額外的自溶素並定出特徵。亦可使用酶譜來判定自溶素的特定片段及/或變體是否像自溶素一樣是具有催化活性的。亦可使用該技術來評估特殊的蛋白質嵌合體是否像自溶素一樣是具有催化活性的。

在一些具體實施例中，自溶素之具有催化活性的片段及/或變體，具有至少大約10%、至少大約30%、至少大約50%、至少大約75%、至少大約90%或至少大約95%像天然自溶素一樣的催化活性。

在一些具體實施例中，該蛋白質嵌合體具有像自溶素一樣的催化活性。在一些具體實施例中，該蛋白質嵌合體具有至少大約10%、至少大約30%、至少大約50%、至少大約75%、至少大約90%或至少大約95%像天然自溶素一樣的催

化活性。

異種蛋白質表現的其他選擇是使用蛋白質"鷹架"，在其中以有功能之方式將該異種蛋白質插入"架構中"。在該組合中，將完整基因或相當於例如MHC第I類或MHC第II類抗原決定位的基因組份插入並遍及鷹架蛋白質內。鷹架蛋白質可以是高度表現的細菌蛋白質(如李斯特菌屬蛋白質，如LLO或p60)，但在其他的具體實施例中，可以是因其高度表現、穩定性、分泌及/或(缺乏)免疫原性而選出的異種蛋白質。鷹架蛋白質的代表性實例是雞卵清蛋白或其他人類蛋白質，如β-血球蛋白或白蛋白。

本發明亦提供重組的核酸分子，包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，(b)編碼分泌蛋白質或其片段的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與該第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，以及(c)編碼對該分泌蛋白質或其片段而言為異種之多肽的第三個多核苷酸，其中該第三個多核苷酸是與該第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽、由該第二個多核苷酸編碼之多肽和分泌蛋白質或其片段的蛋白質嵌合體，且其中在該蛋白質嵌合體中，該多肽與該分泌蛋白質或其片段融合，或位在該分泌蛋白質或其片段內。在一些具體實施例中，該第二個多核苷酸編碼分泌蛋白質。在一些具體實施例中，該分泌蛋白質是從其天然細胞中分泌出的蛋白質。在一些具體實施例中，該第三個多核苷酸係位在該重組核酸分子的第二個多核苷酸內，且在由該重組核酸分子

編碼的蛋白質嵌合體中，由該第三個多核苷酸編碼之多肽係位在該分泌蛋白質或其片段內。在一些具體實施例中，在該核酸分子中，該第三個多核苷酸係位在第二個多核苷酸之外側，且在該蛋白質嵌合體中，由該第三個多核苷酸編碼的多肽與該分泌蛋白質或其片段融合。在一些具體實施例中，該分泌蛋白質為卵清蛋白。在一些具體實施例中，使用卵清蛋白的截短形式。在一些具體實施例中，該分泌蛋白質為p60。在一些具體實施例中，該分泌蛋白質為N-乙醯胞壁質酶。在一些具體實施例中，該信號肽為正常與該分泌蛋白質有關的信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽對該分泌蛋白質而言是異種的。在一些具體實施例中，該分泌蛋白質的片段長度為至少大約30、至少大約40、至少大約50或至少大約100個胺基酸。

在一些具體實施例中，包括對該細菌而言為外來的多肽之密碼序列的重組核酸分子、表現卡匣或表現載體，埋入在該細菌中高度表現之蛋白質的部分或全部密碼序列內。在一些具體實施例中，該高度表現的序列對欲在其中表現該序列的細菌而言為天然的。在其他的具體實施例中，該高度表現的序列對欲在其中表現該序列之細菌而言不是天然的，然而卻提供足夠的表現。

另一方面，本發明提供重組的核酸分子，其中該核酸分子編碼至少兩個分離的非-李斯特菌屬之多肽。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬細菌中表現，將編碼該非-李斯特菌屬多肽的多核苷酸密碼子-最優化。

製備重組核酸分子的方法，包括上述的那些，為熟諳此藝者已熟知的。例如，可藉著在DNA合成器上合成長的寡核苷酸，其彼此重疊，然後進行延伸反應及/或PCR，產生想要量的雙股DNA，來製備重組的核酸分子。可利用限制酵素切開雙股的DNA，並插入想要的表現或選殖載體內。可進行定序，證實已經獲得了正確的序列。亦經由非-限制性的實例，可另行從含有蛋白質之質體中獲得一或多個部分的重組核酸分子。可進行質體之相關部分的PCR，或質體之相關部分的限制酵素切除，接著連接及/或PCR，混合相關的多核苷酸，產生想要的重組核酸分子。這類技術再此項技藝是標準的。亦可使用標準選殖技術，將重組核酸序列插入質體內，並在宿主細胞，如細菌中複製該重組核酸。然後可從宿主細胞中分離該重組核酸。

本發明亦提供使用任何在本文中描述的重組核酸分子，產生重組細菌(例如重組的李斯特菌屬細菌)的方法。在一些具體實施例中，使用在本文中描述之重組核酸分子製造重組細菌的方法，包括將該重組核酸分子導入細菌內。在一些具體實施例中，將該重組核酸分子整合到細菌的基因組內。在一些其他的具體實施例中，該重組核酸分子是在被併入細菌內的質體上。在一些具體實施例中，藉著共軛作用將該重組核酸分子併入細菌內。可藉著任何此項技藝中已知的標準技術，完成併入細菌內的作用。例如，可藉著共軛作用、轉導作用(轉移感染)或轉化作用，將重組核酸分子併入細菌內。

III.信號肽

在一些具體實施例中，本發明之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體編碼包括信號肽的融合蛋白或蛋白質嵌合體，並適合在宿主細胞，如細菌中表現，以及從其中分泌。因此，在一些具體實施例中，本發明之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體，包括編碼該信號肽的多核苷酸。

在本文中交替地使用名詞"信號肽"和"信號序列"。在一些具體實施例中，信號肽幫助使與該信號肽融合之多肽跨越細胞(例如細菌細胞)之細胞膜的運動更容易，而得以從該細胞中分泌多肽。在一些具體實施例中，該信號肽是"分泌性信號肽"或"分泌性序列"。在一些具體實施例中，該信號肽係位在欲分泌之多肽的N-終端。

在一些具體實施例中，在重組核酸分子或表現卡匣中編碼信號肽的序列係位在重組核酸分子或表現卡匣中，使得所編碼之信號肽將完成從想要之宿主細胞(例如細菌)中分泌與其融合的多肽。在一些具體實施例中，在重組核酸分子或表現卡匣中，編碼信號肽的多核苷酸係位在架構中(直接或被介入的多核苷酸分開)，在與編碼待分泌之多肽(例如包括抗原之多肽)的多核苷酸的5'端。

在一些具體實施例中，信號肽是由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼之融合蛋白或蛋白質嵌合體的一部分，其對於在該融合蛋白及/或蛋白質嵌合體之至少一個其他的多肽序列而言是異種的。在一些具體實施例中，由該重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼之信號肽，

對欲在其中導入或已經導入該重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體而言是異種的(外來的)。在一些具體實施例中，該信號肽對欲在其中導入該重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的細菌而言是天然的。

在一些具體實施例中，為了在細菌(例如李斯特菌屬，如單核細胞增多性李斯特菌)中表現，將編碼該信號肽的多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了特殊細菌而被密碼子-最優化的多核苷酸對於該細菌而言是外來的。在其他的具體實施例中，為了特殊細菌而被密碼子-最優化的多核苷酸對該細菌而言是天然的。

在此項技藝中已知各種信號肽。此外，亦可使用各種演算法和軟體程式，如"SignalP"演算法，預測在此項技藝中可利用的信號肽序列。例如，參見Antelmann等人，Genome Res., 11:1484-502(2001)；Menne等人，Bioinformatics, 16:741-2(2000)；Nielsen等人，Protein Eng., 10:1-6(1997)；Zhang等人，Protein Sci., 13:2819-24(2004)；Bendtsen等人，J. Mol. Biol., 340:783-95(2004)(關於SignalP 3.0)；Hiller等人，Nucleic Acids Res., 32:W375-9(2004)；Schneider等人，Proteomics 4:1571-80(2004)；Chou, Curr. Protein Pept. Sci., 3:615-22(2002)；Shah等人，Bioinformatics, 19:1985-96(2003)；以及Yuan等人，Biochem. Biophys. Res. Commun. 312:1278-83(2003)。

在一些具體實施例中，該信號肽是原核生物的。在一些交替的具體實施例中，該信號肽是真核生物的。在

Humphreys 等人，Protein Expression and Purification, 20:252-264(2000)中描述了為了在例如大腸桿菌中表現蛋白質，使用真核生物的信號肽。

在一些具體實施例中，該信號肽是細菌的信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是非-李斯特菌屬的信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是李斯特菌屬的信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽係衍生自革蘭氏陽性的細菌。在一些具體實施例中，該信號肽係衍生自細胞內的細菌。

在一些具體實施例中，在重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體中使用的信號肽(例如非-secA1細菌信號肽)係衍生自李斯特菌屬。在一些具體實施例中，該信號肽係衍生自單核細胞增多性李斯特菌。在一些具體實施例中，該信號肽是得自單核細胞增多性李斯特菌的信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽不是衍生自李斯特菌屬的，但改而衍生自屬於李斯特菌屬之細菌以外的細菌。在一些具體實施例中，該細菌信號肽係衍生自枯草桿菌。在一些具體實施例中，該細菌信號肽係衍生自屬於葡萄球菌屬之細菌。在一些具體實施例中，該細菌信號肽係衍生自乳球菌屬的細菌。在一些具體實施例中，該細菌信號肽係衍生自芽胞桿菌屬、葡萄球菌屬或乳球菌屬的細菌。在一些具體實施例中，該細菌信號肽是得自芽胞桿菌屬、葡萄球菌屬或乳球菌屬的細菌。在一些具體實施例中，該細菌信號肽是衍生自炭疽桿菌、枯草桿菌、金黃色葡萄球菌或乳酸乳球菌

的信號肽。在一些具體實施例中，該細菌信號肽是得自炭疽桿菌的信號肽。在一些具體實施例中，該細菌信號肽是得自枯草桿菌的信號肽。在一些具體實施例中，該細菌信號肽是得自乳酸乳球菌的信號肽。在一些具體實施例中，該細菌信號肽是得自金黃色葡萄球菌的信號肽。

在本文中描述之多肽的一些具體實施例中，衍生自生物，如細菌的信號肽，是與獲自該生物之天然存在的信號肽序列相同的。在其他的具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼之信號肽序列係衍生自天然存在的信號肽序列，即天然存在之信號肽序列的片段及/或變體，其中該片段或變體仍具有像該信號肽一樣的功能。變體包括與原始序列之差異僅為一或多個取代、刪除、添加及/或插入的多肽。例如，在一些具體實施例中，由該多核苷酸編碼之信號肽含有一或多個保留性突變。可能的保留性胺基酸改變為熟諳此藝者已熟知的。參見，例如下文詳細說明的第IV章，關於保留性胺基酸改變的額外資訊。

衍生自其他信號肽的信號肽(即其他信號肽的片段及/或變體)最好實質上相當於原始的信號肽。例如，衍生自其他信號肽的信號肽，具有像該信號肽一樣之功能的能力，應該實質上不受對該天然信號肽序列進行之變化(刪除、突變等等)的影響。在一些具體實施例中，衍生之信號肽至少大約70%、至少大約80%、至少大約90%或至少大約95%能夠具有像天然信號肽序列一樣的信號肽功能。在一些具體實施例中，該信號肽在胺基酸序列上，對原始的信號肽具有

至少大約70%、至少大約80%、至少大約90%或至少大約95%同一性。在一些具體實施例中，僅在信號肽序列中進行的變化是保留性胺基酸置換。信號肽的片段最好是原始信號肽長度的至少大約80%或至少大約90%。

在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體中之多核苷酸編碼的信號肽是secA1信號肽、secA2信號肽或雙-精胺酸移位(Tat)信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是secA1信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是非-secA1信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是雙-精胺酸移位(Tat)信號肽。在一些具體實施例中，這些secA1、secA2或Tat信號肽係衍生自李斯特菌屬。在一些具體實施例中，這些secA1、secA2或Tat信號肽是非-李斯特菌屬的。例如，在一些具體實施例中，這些secA1、secA2和Tat信號肽係衍生自屬於下列屬之一的細菌：芽胞桿菌屬、葡萄球菌屬或乳球菌屬。

細菌為了蛋白質分泌，利用多種路徑，包括secA1、secA2和雙-Arg移位(Tat)。主要藉著位在前-蛋白質之N-終端處的信號肽類型，來判定所利用的路徑。大多數的分泌蛋白質利用Sec路徑，其中蛋白質以未經摺疊之構形，經由埋入細胞膜的蛋白質Sec孔移位。相反的，利用Tat路徑的蛋白質以摺疊過的構形分泌。編碼符合任何這些蛋白質分泌路徑之信號肽的核苷酸序列，在遺傳上均可在架構中與想要的異種蛋白質密碼序列融合。信號肽最好在其羧基終端含有

信號肽酶切開位置，以便將可靠想要的蛋白質釋放到細胞外的環境中(Sharkov和Cai. 2002 J. Biol. Chem. 277:5796-5803；Nielsen等人1997 Protein Engineering 10:1-6；以及www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)。

在本發明之多核苷酸中使用的信號肽，不僅可衍生自各種分泌路徑，亦可衍生自各種細菌屬。信號肽通常具有共同的結構組織化，具有帶電荷的N-終端(N-功能部位)、忌水性核心區(H-功能部位)，以及較具極性的C-終端區(C-功能部位)，然而，它們未顯示序列保留。在一些具體實施例中，信號肽的C-終端帶有第I型信號肽酶(SP酶I)切開位置，在相對於切開位置的位置-1和-3處具有A-X-A的一致序列。經由sec路徑分泌的蛋白質具有平均28個殘基的信號肽。首先在單核細胞增多性李斯特菌中發現secA2蛋白質分泌路徑；藉著在瓊脂介質上的粗菌落表現型，以及在老鼠中之減毒毒力表現型，定出在secA2同種異型基因(paralogue)中之突變種的特徵(Lenz和Portnoy, 2002 Mol. Microbiol. 45:1043-1056；以及Lenz等人2003 PNAS 100:12432-12437)。與由Tat路徑分泌之蛋白質有關的信號肽，具有類似Sec信號肽的三部分組織化，但其特徵為在N-功能部位/H-功能部位界限處具有RR-基序(R-R-X-#-#，其中#為忌水性殘基)。細菌的Tat信號肽平均為14個胺基酸，比sec信號肽更長。枯草桿菌分泌體(secretome)可含有多達69個假定的蛋白質，其利用Tat分泌路徑，其中14個含有SP酶I切開位置(Jongbloed等人2002 J. Biol. Chem. 277:44068-

44078；Thalsma等人，2000 Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 515-547)。

在下文表1中出示非-限制性的信號肽實例，可用在與選出之其他多肽，如異種多肽的融合組合(包括蛋白質嵌合組合物)中，導致從編碼蛋白質之細菌中分泌。

表1.一些代表性的信號肽

分泌路徑	信號肽胺基酸序列(NH_2-CO_2)	信號肽酶位置(以'代表切開位置)	基因	屬/種
secA1	MKKIMLVFITLILVSLPIAQQ TEAKD(序列第45號)	TEA'KD(序列第54號)	hly(LLO)	單核細胞增多性李斯特菌
	MKKKIISAILMSTVILSAAAP LSGVYADT(序列第46號)	VYA'DT(序列第55號)	Usp45	乳酸乳球菌
	MKKRKVLIPLMALSTILVSS TGNLEVIQAEV(序列第47號)	IQA'EV(序列第56號)	pag(保護性抗體)	炭疽桿菌
secA2	MNMKKATIAATAGIAVTAF AAPTIASAST(序列第48號)	ASA'ST(序列第57號)	iap與侵入有關的蛋白質p60	單核細胞增多性李斯特菌
	MQKTRKERILEALQEEKKN KKSKKFKTGATIAGVTAIAT SITVPGIEVIVSADE(序列第49號)	VSA'DE(序列第58號)	NamA lmo2691(自溶素)	單核細胞增多性李斯特菌
	MKKLKMASCALVAGLMFS GLTPNAFAED(序列第50號)	AFA'ED(序列第59號)	*BA_0281(NLP/P60家族)	炭疽桿菌
	MAKKFNYKLPSMVALTLVG SAVTAHQVQAAE(序列第51號)	VQA'AE(序列第60號)	*atl(自溶素)	金黃色葡萄球菌
Tat	MTDKKSENQTEKTETKENK GMTRREMLKLSAVAGTGIA VGATGLGTILNVVDQVDKA LT(序列第52號)	DKA'LT(序列第61號)	lmo0367	單核細胞增多性李斯特菌
	MAYDSRFDEWVQKLKEESF QNNTFDRRKFIQGAGKIAGL SLGLTIAQSVGAFG(序列第53號)	VGA'FG(序列第62號)	PhoD(鹼性磷酸酶)	枯草桿菌

*由sec路徑分泌之細菌自溶素(未判定是否為secA1或secA2)

因此，在一些具體實施例中，編碼信號肽的序列編碼secA1信號肽。secA1信號肽的實例為得自單核細胞增多性李斯特菌的李斯特菌溶解素(Listeriolysin)O(LLO)信號

肽。在一些具體實施例中，該重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體包括編碼LLO信號肽的多核苷酸，更進一步包括編碼LLO PEST序列的多核苷酸序列。適合用在本發明中之secA1信號肽的其他實例，包括得自乳酸乳球菌中之Usp45基因的信號肽(參見上文表1，以及下文的實例12)和得自炭疽桿菌之Pag(保護性抗原)基因。因此，在一些具體實施例中，該信號肽是得自炭疽桿菌的保護性抗原信號肽。在一些其他的具體實施例中，該信號肽是得自炭疽桿菌之保護性抗原信號肽以外的secA1信號肽。secA1信號肽的其他實例是得自金黃色葡萄球菌的SpsB信號肽(Sharkov等人，J. of Biological Chemistry, 277:5796-5803 (2002))。

在一些交替的具體實施例中，在遺傳上將異種密碼序列與被secA2路徑蛋白質分泌複合物認出的信號肽融合。已經在9個引起嚴重或致死之人類傳染病的革蘭氏陽性細菌中確認了輔助的SecA橫向同源物(paralog)(SecA2)。SecA2為分泌李斯特菌屬、分枝桿菌屬和鏈球菌屬之輸出蛋白質組(分泌體)的亞組所必需的(Braunstein等人，Mol. Microbiol. 48:453-64(2003)；Bensing等人，Mol. Microbiol., 44:1081-94 (2002)；Lenz等人，Mol. Microbiol., 45:1043-1056(2000)；以及Braunstein等人，J. Bacteriology, 183:6979-6990 (2001))。經由其與細胞平滑-粗糙變化的關聯，以及在單核細胞增多性李斯特菌和結核分枝桿菌之secA2降低毒力上的突變，確認單核細胞增多性李斯特菌SecA2。

例如，李斯特菌屬之蛋白質p60是藉著secA2路徑分泌的

肽聚醣自溶素。舉例來說，可在遺傳上將secA2信號肽和得自p60之信號肽酶切開位置與編碼想要蛋白質(例如抗原)之基因的胺基終端連接。在一個具體實施例中，在細菌內從表現卡匣中轉譯包括secA2信號肽和信號肽酶-抗原融合的前-蛋白質，經由革蘭氏-陽性細胞壁運送，在其中將可靠的異種蛋白質釋放細胞外環境中。

或者，亦可將異種序列"在架構中"併入p60內，而得以嵌合型p60-異種蛋白質的形式分泌該異種蛋白質。可發生異種蛋白質密碼序列在p60內的架構中插入，例如在信號肽酶切開位置和成熟p60蛋白質之間的接合處。在該具體實施例中，嵌合的蛋白質保留了適當的secA2分泌信號，還有其自溶素活性，意味著以p60之免費乘客的形式分泌異種蛋白質。可在任何點設計異種抗原在p60內的架構中併入，而p60仍保留該p60蛋白質之分泌和自溶素兩種活性。在下文實例13中描述適合插入想要抗原或其他異種多肽密碼序列之部分表現卡匣的實例。

在一些具體實施例中，由重組核酸分子編碼之融合蛋白是包括具有特殊想要特性之細菌蛋白質(除了想要的異種蛋白質，如抗原之外)的嵌合體。在一些具體實施例中，該嵌合體包括水解酶。在一些具體實施例中，該重組核酸分子編碼包括肽鏈內切酶p60，一種降解細菌細胞壁之肽聚醣水解酶的p60嵌合體。在一些具體實施例中，由該重組核酸分子編碼之融合蛋白包括單核細胞增多性李斯特菌水解酶，例如p60(參見，例如Genbank登錄編號NP_464110)或N-

乙醯胞壁質酶(NamA)(Genbank登錄編號NP466213)，兩者皆是降解細胞壁的secA2依賴性分泌蛋白質。這類特殊的蛋白質嵌合體組合不僅利用細菌蛋白質分泌所需的分子伴侶，還有可促使其分泌的細菌蛋白質活性。特殊的蛋白質嵌合體包括異種蛋白質編碼序列與單核細胞增多性李斯特菌水解酶的正確配置，結果有效地表現和分泌異種蛋白質。(參見，例如下文實例29的特定實例)。因此，在一些具體實施例中，由該重組核酸分子編碼，並成為融合蛋白之一部分的信號肽是p60信號肽。在一些具體實施例中，由該重組核酸分子編碼，並成為融合蛋白之一部分的信號肽是NamA信號肽。

在一些具體實施例中，該重組核酸分子包括以與編碼p60信號肽之第一個多核苷酸和編碼其他多肽(例如抗原)之第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼p60蛋白質或其片段的第三個多核苷酸序列。然後，該重組核酸分子編碼包括信號肽、由第二個多核苷酸編碼之多肽(例如抗原)和p60蛋白質或其片段的融合蛋白。在這類具體實施例中，該第二個多核苷酸最好是位在第三個多核苷酸內，或在第一和第三個多核苷酸之間。

在一些具體實施例中，secA2信號肽是衍生自李斯特菌屬的secA2信號肽。例如，在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽，如得自單核細胞增多性李斯特菌的p60信號肽或N-乙醯胞壁質酶(NamA)信號肽。此外，已經確認在缺乏secA2下不分泌的其他單核細胞增多性李斯特菌蛋白質

(Lenz等人，Mol. Microbiology 45:1043-1056(2002))，並可在一些具體實施例中，使用編碼得自這些蛋白質之信號肽的多核苷酸。此外，亦可利用得自李斯特菌屬以外之細菌的secA2信號肽，從重組的李斯特菌屬或其他細菌中表現和分泌異種蛋白質。例如，舉解釋性但非限制性之實例來說，可在重組核酸分子及/或表現卡匣中使用得自炭疽桿菌之secA2信號肽。在其他的具體實施例中，使用得自金黃色葡萄球菌的secA2信號肽。參見表1。亦已經確認在其他細菌中，經由secA2路徑分泌的蛋白質(參見，例如Braunstein等人，Mol. Microbiol., 48:453-64(2003)和Bensing等人，Mol. Microbiol. 44:1081-94(2002))。

可確認經由secA2路徑分泌的其他蛋白質。已經在許多細菌物種中確認SecA2同系物(參見，例如Lenz等人，Mol. Microbiology 45:1043-1056(2002)和Braunstein等人，J. Bacteriology, 183:6979-6990(2001))。可藉著更多序列比較，使用熟諳此藝者已知的技術，確認額外的secA2同系物。一旦確認同系物，便可從細菌生物中刪除同系物，產生ΔsecA2突變種。可經TCA-沉澱野外型和突變細菌培養物的上清液蛋白質，並藉著任何此項技藝中已知的蛋白質組技術分析，判定由野外型細菌，但不是ΔsecA2突變種分泌的蛋白質。例如，可經由SDS-PAGE和鍍銀染色分析分泌的蛋白質。可比較所得的譜帶，確認在缺乏secA2之下未分泌的那些蛋白質(參見，例如Lenz等人，Mol. Microbiology 45:1043-1056(2002))。然後可分析這些蛋白質的N-終端序列

(例如利用演算法，預測信號肽切開位置)，判定該蛋白質所使用的secA2信號肽序列。亦可進行藉著自動化Edman降解的N-終端定序，確認該信號肽的序列。

在交替的具體實施例中，多核苷酸編碼多肽(例如異種多肽序列)，其通常與可被Tat路徑蛋白質分泌複合物認出的信號肽融合。為了分泌在細菌中被摺疊的蛋白質，由細菌，包括李斯特菌屬使用Tat分泌路徑。例如，無害李斯特菌(Listeria innocua)蛋白質YwbN在其胺基終端具有假定的Tat基序，並因此使用Tat路徑來分泌(Genbank登錄編號NP_469731[gi|16799463|ref|NP_469731.1|保留的假定蛋白質，類似枯草桿菌YwbN蛋白質(無害李斯特菌)]，以引用的方式併入本文中)。其他含有Tat信號肽的蛋白質是得自單核細胞增多性李斯特菌品系EGD(e)的YwbN蛋白質(Genbank登錄編號NP_463897[gi|16802412|ref|NP_463897.1|保留的假定蛋白質，類似枯草桿菌YwbN蛋白質(單核細胞增多性李斯特菌EGD(e))])。舉例來說，可在遺傳上將得自YwbN之YwbN信號肽和信號肽酶切開位置與編碼想要蛋白質(例如抗原)之胺基終端的基因連接。在該組合中，前-蛋白質包括Tat信號肽，並從在細菌中的表現卡匣中轉譯信號肽酶-抗原融合，經由革蘭氏陽性細胞壁運送，在其中將該可靠的異種蛋白質分泌至細胞外環境中。其他預測從無害李斯特菌中經由Tat路徑分泌的蛋白質為3-氧代氧醯基(oxoxacyl)-醯基載劑蛋白質合成酶(Genbank登錄編號NP_471636[gi|16801368|ref|NP_471636.1|類似3(氧醯基(醯

基(載劑蛋白質合成酶(無害李斯特菌)])。在本文中描述的多核苷酸、表現卡匣及/或表現載體中可使用編碼得自任何預測從李斯特菌屬中經由Tat分泌路徑分泌的這些蛋白質之信號序列的多核苷酸。

亦可使用得自其他細菌的Tat信號序列作為信號肽，包括但不限於得自枯草桿菌的phoD。在Jongbloed等人，J. of Biological Chemistry, 277:44068-44078(2002)；Jongbloed等人，J. of Biological Chemistry, 275:41350-41357(2000)，Pop等人，J. of Biological Chemistry, 277:3268-3273(2002)；van Dijl等人，J. of Biotechnology, 98:243-254(2002)；和Tjalsma等人，Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64:515-547(2000)中描述了得自枯草桿菌之Tat信號肽的實例，全部以引用的方式併入本文中。其他在枯草桿菌中確認，已經預測藉著Tat路徑分泌之Tat蛋白質，包括具有下列Genbank/Embl登錄編號的那些序列：CAB15017[gi|2635523|emb|CAB15017.1|類似兩個(組份感應器組胺酸激酶(YtsA)(枯草桿菌)]；CAB12056[gi|2632548|emb|CAB12056.1|磷酸二酯酶/鹼性磷酸酶D(枯草桿菌)]；CAB12081[gi|2632573|emb|CAB12081.1|類似假定的蛋白質(枯草桿菌)]；CAB13278[gi|2633776|emb| CAB13278.1|類似假定的蛋白質(枯草桿菌)]；CAB14172[gi|2634674|emb|CAB14172.1|甲基萘醌醇(menaquinol):細胞色素c氧化還原酶(鐵(硫次單元))(枯草桿菌)]；CAB15089 [gi|

2635595|emb|CAB15089.1|yubF(枯草桿菌)]；以及CAB15852 [gi|2636361|emb|CAB15852.1|交替的基因名稱：ipa(29d~類似假定的蛋白質)(枯草桿菌)]，將其序列全部以引用的方式併入本文中。因此，在一些具體實施例中，由在重組核酸分子及/或表現卡匣中之多核苷酸編碼的信號肽是衍生自枯草桿菌的Tat信號肽。在Ochsner等人，PNAS, 99:8312-8317 (2002)中提供了得自綠膿桿菌(Pseudomonas aeruginosa)之Tat信號肽的資訊。亦在Dilks等人，J. of Bacteriology, 185:1478-1483(2003)和Berks等人，Molecular Microbiology, 35:260-274(2000)中描述了得自各種其他細菌的Tat信號肽，兩者全部以引用的方式併入本文中。

可藉著其"雙-精胺酸"一致基序，確認額外的Tat信號肽，並與Sec-型的信號肽區別。如同上文注意到的，與藉著Tat路徑分泌之蛋白質有關的信號肽，具有三部分的組織，類似Sec信號肽，但其特徵為在N-功能部位/H-功能部位界限處具有RR-基序(R-R-X-#-#，其中#為忌水性殘基)。Tat信號肽通常比Sec-型的信號肽更長，且忌水性較低。參見，例如Berks等人，Adv. Microb. Physiol., 47:187-254(2003)和Berks等人，Mol. Microbiol. 35:260-74(2000)。

此外，亦可使用類似上述那些用來確認由SecA2路徑分泌之新穎蛋白質，及其相對應SecA2信號肽的技術，來確認經由Tat路徑分泌之新穎蛋白質，及其信號肽。參考文獻Jongbloed等人，J. Biological Chem., 277:44068-44078 (2002)提供了可用來確認由某一類型細菌表現的蛋白質，為經由

雙-精胺酸移位路徑分泌之蛋白質的技術實例。

IV.多肽

可使用在本文中描述的重組核酸分子，以及在本文中描述的表現卡匣或表現載體，編碼任何想要的多肽。特定而言，該重組核酸分子、表現卡匣和表現載體可用來在細菌中表現異種多肽。

在一些具體實施例中(視所使用的重組核酸分子、表現卡匣或表現載體而定)，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼的多肽，以帶有信號肽之融合蛋白的一部分來編碼。在其他的具體實施例中，以個別多肽之方式，由該重組核酸分子、表現卡匣或表現載體編碼經過編碼之多肽。在另外的具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣或表現載體之多核苷酸編碼的多肽，以不包括信號肽之融合蛋白的一部分來編碼。在另外的具體實施例中，由本發明之重組核酸分子、表現卡匣或表現載體的多核苷酸編碼之多肽，以融合蛋白(在本文中亦稱為蛋白質嵌合體)的一部分來編碼，其中該多肽被埋在其他多肽的序列內。

因此，在本文(下文或其他地方)中列舉，由本發明之重組核酸分子、表現卡匣或表現載體的多核苷酸編碼的每個多肽，其可以融合蛋白(與信號肽融合及/或與其他多肽融合或在其中)，或以個別多肽之方式，由重組核酸分子、表現卡匣或表現載體表現，將視所使用的特殊重組核酸分子、表現卡匣或表現載體而定。例如，在一些具體實施例中，包括編碼抗原CEA之多核苷酸的重組核酸分子，將以帶有

信號肽之融合蛋白的形式編碼CEA。

在一些具體實施例中，該多肽是由重組核酸分子、表現卡匣或表現載體編碼之融合蛋白的一部分，並對該融合蛋白之信號肽而言為異種的。在一些具體實施例中，該多肽係位在對它而言為異種的其他多肽序列(例如分泌蛋白質或自溶素，或其片段或變體)內。

在一些具體實施例中，該多肽是細菌的(李斯特菌屬的或非-李斯特菌屬的)。在一些具體實施例中，該多肽不是細菌的。在一些具體實施例中，由該多核苷酸編碼之多肽是哺乳動物多肽。例如，該多肽可能相當於在人類中找到的多肽序列(即人類多肽)。在一些具體實施例中，該多肽是李斯特菌屬的。在一些具體實施例中，該多肽是非-李斯特菌屬的。在一些具體實施例中，該多肽對欲在其中或已在其中併入該重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的細菌而言不是天然的(即外來的)。

在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，將編碼多肽的多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了再細菌中表現，將編碼多肽的多核苷酸完全密碼子-最優化。在一些具體實施例中，由該密碼子-最優化之多核苷酸編碼的多肽對該細菌而言是外來的(即對該細菌而言是異種的)。

在本文中，可交替使用名詞"多肽"與"肽"和"蛋白質"，且不限於其中所含之胺基酸序列的長度或尺寸。然而，該多肽通常將包括至少大約6個胺基酸。在一些具體實施例中，該多肽將包括至少大約9個、至少大約12個、至少大約20

個、至少大約30個或至少大約50個胺基酸。在一些具體實施例中，該多肽包括至少大約100個胺基酸。在一些具體實施例中，該多肽是蛋白質的一個特定功能部位(例如細胞外功能部位、細胞內功能部位、催化功能部位或結合功能部位)。在一些具體實施例中，該多肽包括完整(即全長的)蛋白質。

在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體之多核苷酸編碼的多肽，包括抗原或蛋白質，其對疾病提供減輕之治療。在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體之多核苷酸編碼的多肽是抗原或蛋白質，其對疾病提供減輕之治療。在一些具體實施例中，所編碼之多肽是治療性蛋白質(或包括治療性蛋白質)。

在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體之多核苷酸編碼的多肽包括抗原(例如任何在本文中描述的抗原)。在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體之多核苷酸編碼的多肽是抗原。在一些具體實施例中，該抗原是細菌抗原。在一些具體實施例中，該抗原是非-李斯特菌屬的細菌抗原。然而，在一些具體實施例中，該抗原是非-李斯特菌屬的抗原。在其他的具體實施例中，該抗原是非-細菌抗原。在一些具體實施例中，該抗原是哺乳動物的抗原。在一些具體實施例中，該抗原是人類抗原。在一些具體實施例中，該多肽是(或包括)包括一或多個免疫原性之抗原決定位的抗原。在一些

具體實施例中，該抗原包括一或多個MHC第I類抗原決定位。在其他的具體實施例中，該抗原包括一或多個MHC第II類抗原決定位。在一些具體實施例中，該抗原決定位是CD4+T-細胞抗原決定位。在其他的具體實施例中，該抗原決定位是CD8+T-細胞抗原決定位。

多核苷酸編碼的抗原，不限於任何精確的核酸序列(例如編碼天然存在、全長的抗原)，但可以是編碼多肽的任何序列，該多肽在本發明之細菌或組合物內，當將其投與個體時，足以誘發想要的免疫反應的。當在本文中使用'抗原'一詞時，亦了解其包括較大抗原蛋白質的片段，只要該片段是抗原性的(即免疫原性的)即可。此外，在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣或表現載體之多核苷酸編碼的抗原可以是天然存在之抗原序列的變體。(類似編碼其他非-抗原蛋白質的多核苷酸，可改變編碼特定蛋白質之多核苷酸的序列，只要表現想要的蛋白質，當投與個體時提供想要的效果(例如減輕的效果)即可)。

衍生自其他抗原的抗原，包括為其他抗原之抗原性(即免疫原性)片段的抗原、其他抗原的抗原性變體，或其他抗原之片段的抗原性變體。抗原的變體包括與原始抗原不同之處在於一或多個取代、刪除、添加及/或插入的抗原。

抗原性片段可以是任何長度的，但大多數通常是至少大約6個胺基酸、至少大約9個胺基酸、至少大約12個胺基酸、至少大約20個胺基酸、至少大約30個胺基酸、至少大約50個胺基酸或至少大約100個胺基酸。抗原的抗原性片段包括

得自該抗原的至少一個抗原決定位。在一些具體實施例中，該抗原決定位是MHC第I類抗原決定位。在其他的具體實施例中，該抗原決定位是MHC第II類抗原決定位。在一些具體實施例中，該抗原決定位是CD4+T-細胞抗原決定位。在其他的具體實施例中，該抗原決定位是CD8+T-細胞抗原決定位。

熟諳此藝者可利用各種用來預測蛋白質內之抗原性區域(包括抗原決定位)的演算法和套裝軟體。例如，可用來選擇與MHC第I類和第II分子結合之抗原決定位的演算法是可公開獲得的。例如，可使用可公開獲得的"SYFPEITHI"演算法來預測與MHC結合的肽(Rammensee等人(1999) Immunogenetics 50:213-9)。至於可公開獲得之演算法的其他實例，參見下列的參考文獻：Parker等人(1994) J. Immunol 152:163-75；Singh和Raghava(2001) Bioinformatics 17:1236-1237；Singh和Raghava(2003) Bioinformatics 19:1009-1014；Mallios(2001) Bioinformatics 17:942-8；Nielsen等人(2004) Bioinformatics 20:1388-97；Donnes等人(2002) BMC Bioinformatics 3:25；Bhasin等人(2004) Vaccine 22:3195-204；Guan等人(2003) Nucleic Acids Res 31:3621-4；Reche等人(2002) Hum. Immunol. 63:701-9；Schirle等人(2001) J. Immunol Methods 257:1-16；Nussbaum等人(2001) Immunogenetics (2001) 53:87-94；Lu等人(2000) Cancer Res. 60:5223-7。亦參見，例如Vector NTI®套組(Informax, Inc., Bethesda, MD)、GCG Wisconsin套裝軟體

(Accelrys, Inc., San Diego, CA), Welling等人(1985) FEBS Lett. 188:215-218，Parker等人(1986) Biochemistry 25:5425-5432，Van Regenmortel和Pellequer(1994) Pept. Res. 7:224-228，Hopp和Woods(1981) PNAS 78:3824-3828，以及Hopp(1993) Pept. Res. 6:183-190。一些在本段落中之上文列舉的參考文獻中討論的演算法或套裝軟體，係針對與MHC第I類及/或第II類結合之肽的預測，其他的是確認蛋白質解體之切開位置，而另外的則是以親水性為基礎來預測抗原性。

一旦已經確認相信含有至少一個具有想要性質之抗原決定位的候選抗原性片段，便可將編碼該序列之多核苷酸序列併入表現卡匣內，並導入李斯特菌屬疫苗載體或其他細菌的疫苗載體內。然後可藉著評估由表現該片段之李斯特菌屬或其他細菌產生的免疫反應，證實該抗原性片段的免疫原性。可使用標準免疫學測定，如ELISPOT測定、細胞內細胞素染色(ICS)測定、細胞毒性T-細胞活性測定或其類似者，證實所選出之抗原的片段仍維持想要的免疫原性。在下文的實例中提供了這些類型測定的實例(參見，例如實例21)。此外，亦使用在下文實例中描述的方法(例如植入在老鼠中表現抗原片段的CT26老鼠結腸細胞，接著以候選的疫苗免疫接種老鼠，並觀察相對於對照組及/或全長抗原，對腫瘤尺寸、轉移、存活等等的影響、)，評估李斯特菌屬及/或細菌疫苗的抗-腫瘤效力。

此外，用來確認抗原性片段之含有抗原決定位及/或MHC

配體資訊的大資料庫是可公開獲得的。參見，例如Brusic等人(1998) Nucleic Acids Res. 26:368-371；Schonbach等人(2002) Nucleic Acids Research 30:226-9；和Bhasin等人(2003) Bioinformatics 19:665-666；以及Rammensee等人(1999) Immunogenetics 50:213-9。

抗原性變體之胺基酸序列與原始抗原具有至少大約60%、至少大約70%、至少大約80%、至少大約90%、至少大約95%或至少大約98%的同一性。

在一些具體實施例中，該抗原性變體是保留性變體，其與原始抗原具有至少大約80%的同一性，且在抗原性變體與原始抗原的序列之間的取代是保留性胺基酸置換。將下列的取代視為保留性胺基酸置換：以纈胺酸取代丙胺酸、異亮胺酸或亮胺酸；以離胺酸取代精胺酸、穀胺醯胺或天冬醯胺；以穀胺醯胺取代天冬醯胺、組胺酸、離胺酸或精胺酸；以穀胺酸取代天冬胺酸；以絲胺酸取代半胱胺酸；以天冬醯胺取代穀胺醯胺；以天冬胺酸取代穀胺酸；以脯胺酸或丙胺酸取代甘胺酸；以天冬醯胺、穀胺醯胺、離胺酸或精胺酸取代組胺酸；以亮胺酸、纈胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸或去甲亮胺酸取代異亮胺酸；以去甲亮胺酸、異亮胺酸、纈胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸或苯丙胺酸取代亮胺酸；以精胺酸、穀胺醯胺或天冬醯胺取代離胺酸；以亮胺酸、苯丙胺酸或異亮胺酸取代甲硫胺酸；以亮胺酸、纈胺酸、異亮胺酸、丙胺酸或酪胺酸取代苯丙胺酸；以丙胺酸取代脯胺酸；以蘇胺酸取代絲胺酸；以絲胺酸取代蘇

代蘇胺酸；以酪胺酸或苯丙胺酸取代色胺酸；以色胺酸、苯丙胺酸、蘇胺酸或絲胺酸取代酪胺酸；以色胺酸、苯丙胺酸、蘇胺酸或絲胺酸取代酪胺酸；以異亮胺酸、亮胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、丙胺酸或去甲亮胺酸取代纈胺酸。在一些具體實施例中，該抗原性變體是保留性變體，其對原始抗原具有至少大約90%的同一性。

在一些具體實施例中，衍生自其他抗原的抗原實質上相當於其他抗原。若該衍生抗原在胺基酸序列上與原始抗原具有至少大約70%之同一性，並保持該原始抗原之至少大約70%的免疫原性，則該衍生自其他抗原的抗原實質上相當於從其中衍生的原始抗原。在一些具體實施例中，該實質上相等的抗原在胺基酸序列上與原始抗原具有至少大約80%、至少大約90%、至少大約95%或至少大約98%的同一性。在一些具體實施例中，該實質上相等的抗原相對於原始抗原，僅包括保留性置換。在一些具體實施例中，該實質上相等的抗原保持該原始抗原之至少大約80%、至少大約90%或至少大約95%的免疫原性。欲判定特定衍生抗原之免疫原性，並與原始抗原相比較，判定該衍生抗原實質上是否與該原始抗原相等，可以熟諳此藝者已知的許多免疫原性測定中的任一種，測試衍生的和原始抗原兩者。例如，可按照在本文中的描述，製備表現原始抗原或衍生抗原的李斯特菌屬。可藉著以李斯特菌屬免疫接種老鼠，然後使用ELISPOT測定、細胞內細胞素染色(ICS)測定、細胞毒性之T-細胞活性測定或其類似者的標準技術，評估免疫原反

應，來測量那些表現不同抗原之李斯特菌屬產生免疫反應的能力。在下文實例中提供了這類測定的實例(參見，例如實例21)。

在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或載體之多核苷酸編碼的多肽包括抗原。在一些具體實施例中，該抗原係選自與腫瘤有關之抗原、衍生自與腫瘤有關之抗原的多肽、傳染病抗原和衍生自傳染病抗原之多肽所組成之群。

在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或載體之多核苷酸編碼的多肽包括與腫瘤有關之抗原，或包括衍生自與腫瘤有關之抗原的抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括與腫瘤有關之抗原。在一些具體實施例中，該編碼多肽包括一個以上的抗原，其為與腫瘤有關之抗原，或衍生自與腫瘤有關之抗原的抗原。例如，在一些具體實施例中，該編碼多肽包括間皮素(或其抗原性片段或抗原性變體)和K-Ras、12-K-Ras或PSCA(或K-Ras、12-K-Ras或PSCA之抗原性片段或抗原性變體)兩者。

在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體之多核苷酸編碼的抗原是與腫瘤有關之抗原或是衍生自與腫瘤有關之抗原的抗原。在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關之抗原。

在一些具體實施例中，在重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體中之多核苷酸編碼抗原(或編碼包括抗原之多肽)，其不是與與腫瘤有關之抗原相同的，但寧可是衍生自

與腫瘤有關之抗原的抗原。例如，在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體之多核苷酸編碼的抗原可包括與腫瘤有關之抗原的片段、與腫瘤有關之抗原的變體，或與腫瘤有關之抗原之片段的變體。在一些情況下，該抗原，如腫瘤抗原，當其胺基酸序列與宿主內源的稍有不同時，在疫苗中能夠誘導更明顯的免疫反應。在其他情況下，衍生的抗原誘導出比原始抗原更不明顯的免疫反應，但例如因為其較小的尺寸，而較有利於在李斯特菌屬之疫苗載體中進行異種表現。在一些具體實施例中，與腫瘤有關之抗原的變體，或與腫瘤有關之抗原之片段的變體之胺基酸序列，與該與腫瘤有關之抗原或其相對應片段的差異為一或多個胺基酸。衍生自與腫瘤有關之抗原的抗原將包括至少一個抗原決定位序列，當在宿主中表現編碼該抗原之多核苷酸時，能夠誘導想要的免疫反應。

因此，在一些具體實施例中，在重組核酸分子、表現卡匣或載體中之多核苷酸，編碼包括衍生自與腫瘤有關之抗原的抗原的多肽，其中該抗原包括至少一個與腫瘤有關之抗原的抗原性片段。在一些具體實施例中，在重組核酸分子、表現卡匣或載體中之多核苷酸，編碼衍生自與腫瘤有關之抗原的抗原，其中該抗原包括至少一個與腫瘤有關之抗原的抗原性片段。該抗原性片段包括至少一個與腫瘤有關之抗原的抗原決定位。在一些具體實施例中，衍生自其他抗原之抗原是其他抗原之抗原性(即免疫原性)片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，該抗原是其他抗原的抗

原性片段。在一些具體實施例中，該抗原是其他抗原的抗原性變體。

已經確認了被T細胞認出的許多與腫瘤有關之抗原(Renkvist等人，Cancer Immunol Innumother 50:3-15 (2001))。這些與腫瘤有關之抗原可以是分化抗原(例如PSMA、酪胺酸酶、gp100)、組織-專一的抗原(例如PAP、PSA)、發育抗原、與腫瘤有關之病毒抗原(例如HPV 16 E7)、癌症-睪丸抗原(例如MAGE、BAGE、NY-ESO-1)、胚胎抗原(例如CEA、α-胎兒蛋白)、腫瘤蛋白抗原(例如Ras、p53)、過度-表現之蛋白質抗原(例如ErbB2(Her2/Neu)、MUC1)或突變的蛋白質抗原。可由異種核酸序列編碼的與腫瘤有關之抗原，包括但不限於707-AP、膜聯蛋白(Annexin)II、AFP、ART-4、BAGE、β-連鎖蛋白(catenin)/m、BCL-2、bcr-abl、bcr-ablp190、bcr-ablp210、BRCA-1、BRCA-2、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CDC27/m、CDK-4/m、CEA(Huang等人，Exper Rev. Vaccines(2002) 1:49-63)、CT9、CT10、Ctp-B、Dek-cain、DAM-6(MAGE-B2)、DAM-10(MAGE-B1)、EphA2(Zantek等人，Cell Growth Differ.(1999) 10:629-38；Carles-Kinch等人，Cancer Res.(2002) 62:2840-7)、ELF2M、EphA2(Zantek等人，Cell Growth Differ.(1999) 10:629-38；Carles-Kinch等人，Cancer Res.(2002) 62:2840-7)、ETV6-AML1、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GnT-V、gp100、HAGE、HER2/neu、

HLA-A*0201-R170I、HPV-E7、H-Ras、HSP70-2M、HST-2、hTERT、hTRT、iCE、細胞凋零的抑制劑(例如生存蛋白質)、KIAA0205、K-Ras、12-K-Ras(有密碼子12突變的K-Ras)、LAGE、LAGE-1、LDLR/FUT、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-D、MART-1、MART-1/Melan-A、MC1R、MDM-2、間皮素、肌球蛋白/m、MUC1、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、新-聚A聚合酶、NA88-A、N-Ras、NY-ESO-1、NY-ESO-1a(CAG-3)、PAGE-4、PAP、蛋白酶3(PR3) (Molldrem等人，Blood(1996) 88:2450-7；Molldrem等人，Blood(1997) 90:2529-34)、P15、p190、Pm1/RARα、PRAME、PSA、PSM、PSMA、RAGE、RAS、RCAS1、RU1、RU2、SAGE、SART-1、SART-2、SART-3、SP17、SPAS-1、TEL/AML1、TPI/m、酪胺酸酶、TARP、TRP-1(gp75)、TRP-2、TRP-2/INT2、WT-1，以及交替轉譯的NY-ESO-ORF2和CAMEL蛋白質，衍生自NY-ESO-1和LAGE-1基因。

在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣及/或載體中之多核苷酸編碼的抗原可包括任何與腫瘤有關之抗原，其可誘發腫瘤-專一的免疫反應，包括業已確認的抗原。在一些具體實施例中，在重組核酸分子、表現卡匣及/或載體中之多核苷酸編碼一個以上與腫瘤有關之抗原。

在一些具體實施例中，該抗原為間皮素(Argani等人，Clin

Cancer Res. 7(12):3862-8(2001))、Sp17(Lim等人，Blood 97(5):1508-10(2001))、gp100(Kawakami等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6458(1994))、PAGE-4(Brinkmann等人，Cancer Res. 59(7):1445-8(1999))、TARP(Wolfgang等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(17):9437-42(2000))、EphA2(Tatsumi等人，Cancer Res. 63(15):4481-9(2003))、PR3(Muller-Berat等人，Clin. Immunol. Immunopath. 70(1):51-9(1994))、前列腺幹細胞抗原(PSCA)(Reiter等人，Proc. Natl. Acad. Sci., 95:1735-40(1998)；Kiessling等人，Int. J. Cancer, 102:390-7(2002))或SPAS-1(美國專利第2002/0150588號)。

在本發明的一些具體實施例中，由重組核酸分子或表現卡匣編碼之抗原是CEA。在其他的具體實施例中，該抗原是CEA的抗原性片段及/或抗原性變體。CEA是180-kDa膜細胞間黏連糖蛋白，其在顯著比例的人類腫瘤中過度-表現，包括90%的結直腸、胃和胰臟癌，70%非-小細胞肺癌，以及50%乳癌(Hammarstrom, Semin. Cancer Biol., 9:67- 81)。已經調查各種模仿CEA的免疫治療劑，如抗-遺傳性型單株抗體(Foon等人，Clin. Cancer Res., 87:982-90(1995)，或使用表現CEA之重組疫苗病毒的免疫接種(Tsang等人，J. Natl. Cancer Inst., 87:982-90(1995))，然而不幸的是只有有限的成功。儘管如此，研究者已經確認出HLA*0201-限制抗原決定位，CAP-1(CEA605-613)，其被得從接種疫苗之患者中產生的人類T細胞株認出。以該抗原決定位脈衝利用DC免疫接種的患者，無法誘導臨床反應(Morse等人，Clin. Cancer

Res., 5:1331-8(1999))。最近，確認CEA605-613肽激動劑在位置610處以不規則變化的天冬胺酸取代天冬醯胺(CAP1-6D)。雖然該胺基酸取代並未改變該肽的MHC結合親和力，但使用該經過改變的肽配體(APL)，結果改善了在活體外CEA-專一之細胞毒性T淋巴細胞(CTL)的產製。CAP1-6D-專一之CTL維持其認出並溶解表現天然CEA之腫瘤細胞的能力(Zaremba等人，Cancer Res., 57:4570-7(1997)；Salazar等人，Int. J. Cancer, 85:829-38(2000))。Fong等人證實在以Flt3-配體擴大，並與該APL一起培養之DC免疫接種的結腸癌患者中誘導CEA-專一的免疫性。令人鼓舞的是，12個患者中有2個在接種疫苗之後，體驗到戲劇化的腫瘤退化，這與肽-MHC四聚體$^{+}$T細胞的誘導有關(Fong等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98:8809-14(2001))。

在其他的具體實施例中，該抗原是蛋白酶-3或衍生自蛋白酶-3。例如，在一個具體實施例中，該抗原包括HLA-A2.1-限制肽PR1(胺基酸169-177；VLQELNVTV(序列第63號))。可在下列的參考文獻中獲得關於蛋白酶-3及/或PR1抗原決定位的資訊：美國專利第5,180,819號，Molldrem等人，Blood, 90:2529-2534(1997)；Molldrem等人，Cancer Research, 59:2675-2681(1999)；Molldrem等人，Nature Medicine, 6:1018-1023(2000)；以及Molldrem等人，Oncogene, 21:8668-8673(2002)。

在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣及/或載體中之多核苷酸編碼的多肽，包括選自K-Ras、H-Ras、

N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原，或包括衍生自選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群之抗原的抗原。

在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體中之多核苷酸編碼的多肽，包括選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA由所組成之群的抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括K-Ras。在一些具體實施例中，該多肽包括H-Ras。在一些具體實施例中，該多肽包括N-Ras。在一些具體實施例中，該多肽包括K-Ras。在一些具體實施例中，該多肽包括間皮素(例如人類間皮素)。在一些具體實施例中，該多肽包括PSCA。在一些具體實施例中，該多肽包括NY-ESO-1。在一些具體實施例中，該多肽包括WT-1。在一些具體實施例中，該多肽包括生存蛋白質。在一些具體實施例中，該多肽包括gp100。在一些具體實施例中，該多肽包括PAP。在一些具體實施例中，該多肽包括蛋白酶3。在一些具體實施例中，該多肽包括SPAS-1。在一些具體實施例中，該多肽包括SP-17。在一些具體實施例中，該多肽包括PAGE-4。在一些具體實施例中，該多肽包括TARP。在

一些具體實施例中，該多肽包括CEA。

在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣及/或載體中之多核苷酸編碼的抗原係選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA所組成之群。在一些具體實施例中，該抗原為K-Ras。在一些具體實施例中，該抗原為H-Ras。在一些具體實施例中，該抗原為N-Ras。在一些具體實施例中，該抗原為K-Ras。在一些具體實施例中，該抗原為間皮素。在一些具體實施例中，該抗原為PSCA。在一些具體實施例中，該抗原為NY-ESO-1。在一些具體實施例中，該抗原為WT-1。在一些具體實施例中，該抗原為生存蛋白質。在一些具體實施例中，該抗原為gp100。在一些具體實施例中，該抗原為PAP。在一些具體實施例中，該抗原為蛋白酶3。在一些具體實施例中，該抗原為SPAS-1。在一些具體實施例中，該抗原為SP-17。在一些具體實施例中，該抗原為PAGE-4。在一些具體實施例中，該抗原為TARP。在一些具體實施例中，該抗原為CEA。在一些具體實施例中，該抗原為人類間皮素。

在一些具體實施例中，該抗原為間皮素、SPAS-1、蛋白酶-3、EphA2、SP-17、gp100、PAGE-4、TARP或CEA，或衍生自那些蛋白質之一的抗原。在一些具體實施例中，該抗原為間皮素或衍生自間皮素。在其他的具體實施例中，該抗原為EphA2或是衍生自EphA2之抗原。在一些具體實施

例中，由在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣或表現載體中之多核苷酸編碼的抗原不是Epha2(或衍生自Epha2的抗原)。在一些具體實施例中，該抗原是Epha2以外的與腫瘤有關之抗原。在一些具體實施例中，該抗原係衍生自Epha2以外的與腫瘤有關之抗原。在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體中之多核苷酸編碼的多肽包括Epha2以外的抗原。在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體中之多核苷酸編碼的多肽包括Epha2或衍生自Epha2之抗原以外的抗原。

在一些具體實施例中，在重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體中之多核苷酸編碼包括衍生自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA之抗原的多肽。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自K-Ras之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自H-Ras之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自N-Ras之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自12-K-Ras之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自間皮素之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自PSCA之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自NY-ESO-1之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自WT-1之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自生存蛋白質之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自gp100之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括

衍生自PAP之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自蛋白酶3之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自SPAS-1之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自SP-17之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自PAGE-4之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自TARP之抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括衍生自CEA之抗原。

在一些具體實施例中，在重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體中之多核苷酸編碼衍生自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA的抗原。在一些具體實施例中，該抗原係衍生自K-Ras。在一些具體實施例中，該抗原係衍生自H-Ras。在一些具體實施例中，該抗原係衍生自N-Ras。在一些具體實施例中，該抗原係衍生自12-K-Ras。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自間皮素之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自PSCA之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自NY-ESO-1之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自WT-1之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自生存蛋白質之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自gp100之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自PAP之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自蛋白酶3之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自SPAS-1之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自SP-17之抗

原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自PAGE-4之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自TARP之抗原。在一些具體實施例中，該抗原是衍生自CEA之抗原。

在一些具體實施例中，該抗原為間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。因此，在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣及/或載體中之多核苷酸編碼的多肽包括間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，由該多核苷酸編碼之多肽是間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。

在一些具體實施例中，該抗原是間皮素(例如人類間皮素)，其中已經刪除間皮素信號肽及/或GPI(糖基磷脂醯肌醇)錨定。因此，在一些具體實施例中，由該多核苷酸編碼之多肽包括其中已經刪除間皮素信號肽及/或GPI錨定的間皮素。在一些具體實施例中，由該多核苷酸編碼之多肽是其中已經刪除間皮素信號肽及/或GPI錨定的間皮素。在一些具體實施例中，由該多核苷酸編碼之多肽是其中已經刪除間皮素信號肽及/或GPI錨定的人類間皮素。在一些具體實施例中，由該多核苷酸編碼之多肽是其中已經刪除間皮素信號肽和GPI錨定兩者的人類間皮素。

在一些具體實施例中，該抗原為NY-ESO-1，或其抗原性片段或抗原性變體。因此，在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣及/或載體中之多核苷酸編碼的多肽包括抗原，其為NY-ESO-1或其抗原性片段或抗原性變體。在一些具體實施例中，該多肽是抗原，其為NY-ESO-1或其

抗原性片段或抗原性變體。

在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣或載體中之多核苷酸編碼的多肽，包括至少一個與腫瘤有關之抗原的抗原性片段，例如人類前列腺幹細胞抗原(PSCA；GenBank登錄編號AF043498)、人類睪丸抗原(NY-ESO-1；GenBank登錄編號NM_001327)、人類癌胚抗原(CEA；GenBank登錄編號M29540)、人類間皮素(GenBank登錄編號U40434)、人類生存蛋白質(GenBank登錄編號U75285)、人類蛋白酶3(GenBank登錄編號X55668)、人類K-Ras(GenBank登錄編號M54969&P01116)、人類H-Ras(GenBank登錄編號P01112)、人類N-Ras(GenBank登錄編號P01111)，以及人類12-K-Ras(K-Ras包括Gly12Asp突變)(參見，例如GenBank登錄編號K00654)。在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣或表現載體中之多核苷酸編碼的多肽包括與腫瘤有關之抗原的抗原性片段，具有至少一個保留性置換的胺基酸。在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣或表現載體中之多核苷酸編碼的多肽包括具有至少一個刪除胺基酸殘基的抗原性片段。在一些具體實施例中，由在重組核酸分子、表現卡匣或表現載體中之多核苷酸編碼的多肽包括衍生自一種以上類型的與腫瘤有關之抗原的抗原性序列之組合，例如衍生自間皮素和Ras兩者之抗原性片段的組合。

預測為抗原性之腫瘤抗原的代表性區域包括下列：在GenBank登錄編號AF043498中之PSCA胺基酸序列的胺基

酸25-35；70-80和90-118；GenBank登錄編號NM_001327之NY-ESO-1的胺基酸40-55、75-85、100-115和128-146；GenBank登錄編號M29540之CEA胺基酸序列的胺基酸70-75、150-155、205-225、330-340和510-520；GenBank登錄編號U40434之間皮素多肽序列的胺基酸90-110、140-150、205-225、280-310、390-410、420-425和550-575；GenBank登錄編號U75285之生存多肽序列的胺基酸12-20、30-40、45-55、65-82、90-95、102-115和115-130；在GenBank登錄編號X55668中發現之蛋白酶3胺基酸序列的胺基酸10-20、30-35、65-75、110-120和160-170；GenBank登錄編號P01117或M54968(人類K-Ras)之胺基酸10-20、30-50、55-75、85-110、115-135、145-155和160-185；GenBank登錄編號P01112(人類H-Ras)之胺基酸10-20、25-30、35-45、50-70、90-110、115-135和145-175；GenBank登錄編號P01111(人類N-Ras)之胺基酸10-20、25-45、50-75、85-110、115-135、140-155和160-180；以及12-K-Ras(在GenBank登錄編號K00654中揭示之序列)的前25個胺基酸。藉著Hopp-Woods和Welling抗原性作圖來預測這些抗原性區域。

在一些具體實施例中，作為分離的多肽，或作為帶有選出之信號肽的融合蛋白，或作為其中已經將該多肽插入其他多肽內的蛋白質嵌合體，由本發明之多核苷酸編碼的多肽均是包括人類間皮素之一或多個下列肽的多肽：SLLFLLFSL(胺基酸序列20-28；(序列第64號))、

VLPLTVAEV(胺基酸序列530-538；(序列第65號))、ELAVALAQK(胺基酸序列83-92；(序列第66號))、ALQGGGPPY(胺基酸序列225-234；(序列第67號))、FYPGYLCSL(胺基酸序列435-444；(序列第68號))；以及LYPKARLAF(胺基酸序列475-484；(序列第69號))。例如，在一些具體實施例中，由本發明之多核苷酸編碼的抗原是包括一或多個這些肽的人類間皮素之(抗原性)片段。關於這些間皮素肽序列的額外資訊，及其與在醫學上相關之免疫反應的關係，可在PCT公開案WO 2004/006837中找到。

或者，在重組核酸分子、表現卡匣或表現載體中之多核苷酸可編碼自體免疫疾病-專一性抗原(或包括自體免疫疾病-專一性抗原的多肽)。在T細胞調解之自體免疫疾病中，T細胞對自己的抗原起反應，結果產生自體免疫疾病。為了將這類型的抗原用在治療自體免疫疾病上，本發明之疫苗可瞄準負責自體免疫反應的特定T細胞。例如，該抗原可以是T細胞受體的一部分，對那些T細胞專一的遺傳性型引起自體免疫反應，其中將該抗原併入本發明之疫苗中，將誘發對引起自體免疫反應之那些T細胞專一的免疫反應。排除那些T細胞將是減輕自體免疫疾病的治療機制。其他的可能性則是將編碼抗原之多核苷酸併入重組的核酸分子內，該抗原結果將產生瞄準在自體免疫疾病中對自己抗原產生之抗體，或瞄準分泌該抗體之特定B細胞純種系的免疫反應。例如，可將編碼遺傳性型抗原之多核苷酸併入重組核酸分子內，其將導致對抗這類B細胞及/或在自體免疫疾病中與

自己抗原反應之抗體的抗-遺傳性型免疫反應。可利用包括細菌(其包括本發明之表現卡匣和重組核酸分子)之疫苗處理的自體免疫疾病，包括但不限於風濕性關節炎、多發性硬化症、克隆氏(Crohn's)症、狼瘡、重症肌無力、白癜風、硬皮病、牛皮癬、尋常性天疱瘡、纖維肌痛(fibromyalgia)、結腸炎和糖尿病。可採用類似的方法治療過敏反應，其中將抗原併入疫苗細菌內，瞄準T細胞、B細胞或在調節過敏反應上有效的抗體。在一些自體免疫疾病，如牛皮癬中，該疾病結果是過度增殖的細胞生長，同樣也可瞄準抗原的表現。認為這類抗原結果將對過度增殖之細胞產生免疫反應。

在一些具體實施例中，該抗原是瞄準與獨特疾病有關之蛋白質結構的抗原。一個實例是使用上文討論的遺傳性型抗原瞄準抗體、B細胞或T細胞。其他的可能性則是瞄準起因於特殊疾病的獨特蛋白質結構。一個實例是併入將會對蛋白質產生免疫反應的抗原，觀察到該蛋白質在疾病，如阿茲海默氏症、亞急性海綿狀腦病(CJD)和牛海綿樣腦病(BSE)中引起澱粉樣蛋白斑。雖然該方法僅提供斑塊形成上的降低，但在像CJD之疾病的案例中，它可能提供治病的疫苗。該疾病是由朊蛋白之感染形式引起的。在一些具體實施例中，本發明之多核苷酸編碼對抗該朊蛋白之感染形式的抗原，使得由該疫苗產生之免疫反應得以排除、減少獲控制引起CJD的感染性蛋白質。

在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或

表現載體之多核苷酸編碼的多肽包括傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原的抗原。在一些具體實施例中，該多肽包括傳染病抗原。在一些其他的具體實施例中，該多肽包括衍生自傳染病抗原的抗原。在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體之多核苷酸編碼的多肽是傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原的抗原。在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼的多肽是傳染病抗原。在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼的多肽係衍生自傳染病抗原。

在本發明其他的具體實施例中，該抗原係衍生自人類或動物病原。病原可視需要為病毒、細菌、真菌或原蟲。例如，該抗原可以是病毒或真菌或細菌的抗原。在一個具體實施例中，由衍生自病原之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼的抗原是由病原產生之蛋白質，或衍生自由病原產生之蛋白質。例如，在一些具體實施例中，由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼之多肽是由病原產生之蛋白質的片段及/或變體。

例如，在一些具體實施例中，該抗原係衍生自人類免疫缺陷病毒(如gp120、gp160、gp41、gag抗原，如p24gag和p55gag，以及衍生自HIV之pol、env、tat、vif、rev、nef、vpr、vpu和LTR區的蛋白質)、貓免疫缺陷病毒或人類或動物疱疹病毒。例如，在一些具體實施例中，該抗原是gp120。在一個具體實施例中，該抗原係衍生自單純疱疹病毒(HSV)

第1和第2型(如gD、gB、gH、速發早期蛋白質，如ICP27)、得自細胞巨大病毒(如gB和gH)、得自間質肺病毒(metapneumovirus)、得自愛氏頓病毒或得自帶狀疱疹病毒(如gpI、II或III)。(參見，例如Chee等人(1990) Cytomegaloviruses(J. K. McDougall編輯，Springer Verlag, 第125-169頁；McGeoch等人(1988) J. Gen. Virol. 69:1531-1574；美國專利第5,171,568號；Baer等人(1984) Nature 310:207-211；以及Davison等人(1986) J. Gen. Virol. 67:1759-1816)。

在其他的具體實施例中，該抗原係衍生自肝炎病毒，如B型肝炎病毒(例如B型肝炎表面抗原)、A型肝炎抗原、C型肝炎病毒、δ肝炎病毒、E型肝炎病毒或G型肝炎病毒。參見，例如WO 89/04669、WO 90/11089和WO 90/14436。肝炎抗原可以是表面、核心或其他有關的抗原。HCV基因組編碼數個病毒蛋白質，包括E1和E2。參見，例如Houghton等人，Hepatology 14:381-388(1991)。

為病毒抗原的抗原，可視需要衍生自得自任一下列的病毒：細小核糖核酸病毒(Picornaviridae)科(例如脊髓灰白質炎病毒(polioviruses)、鼻病毒(rhinoviruses)等等)；杯狀病毒科(Caliciviridae)；披衣病毒科(Togaviridae)(例如風疹病毒、登革熱病毒等等)；黃質病毒科(Flaviviridae)；冠狀病毒科(Coronaviridae)；呼腸孤病毒科(Reoviridae)(例如輪狀病毒(rotavirus)等等)；雙RNA病毒科(Birnaviridae)；桿狀病毒科(Rhabodoviridae)(例如狂犬病病毒等等)；正黏液病

毒科(Orthomyxoviridae)(例如A型、B型和C型流感病毒等等)；線狀病毒科(Filoviridae)；副黏液病毒科(Paramyxoviridae)(例如流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道融合病毒、副流感病毒等等)；布尼亞病毒科(Bunyaviridae)；沙狀病毒科(Arenaviridae)；逆轉錄病毒科(Retroviridae)(例如HTLV-I、HTLV-11、HIV-1(亦稱為HTLV-111、LAV、ARV、hTLR等等))，包括但不限於得自分離株HIVI11b、HIVSF2、HTVLAV、HIVLAI、HIVMN之抗原)；HIV-1CM235、HIV-1、HIV-2等等；猿免疫缺陷病毒(SIV))；乳頭狀瘤病毒、壁蝨攜帶的腦炎病毒；及其類似物。關於這些及其他病毒的描述，參見，例如Virology, 第3版(W. K. Joklik編輯 1988)；Fundamental Virology, 第3版(B. N. Fields, D. M. Knipe和P. M. Howley,編輯1996)。在一個具體實施例中，該抗原是Flu-HA(Morgan等人，J. Immunol. 160:643(1998))。

在一些交替的具體實施例中，該抗原係衍生自細菌病原，如分枝桿菌屬、芽胞桿菌屬、耶爾森氏菌屬、沙門氏桿菌屬、奈瑟菌屬(Neisseria)、疏螺旋體屬(Borrelia)(例如OspA或OspB或其衍生物)、衣原體屬(Chlamydia)或博代氏菌屬(Bordetella)(例如P.69、PT和FHA)，或衍生自寄生蟲，如瘧原蟲屬(Plasmodium)或弓漿蟲屬(Toxoplasma)。在一個具體實施例中，該抗原係衍生自結核分枝桿菌(例如ESAT-6、85A、85B、85C、72F)、炭疽桿菌(例如PA)或鼠疫耶爾森氏菌(例如F1、V)。此外，適合用在本發明中的抗

原，可獲自或衍生自引起疾病的已知原因，包括但不限於白喉、百日咳、破傷風、結核病、細菌或真菌性肺炎、內耳炎、淋病、霍亂、傷寒、腦炎、單核細胞增多症、鼠疫、志賀桿菌病或沙門氏桿菌病、軍團病、萊姆病、麻風、瘧疾、鉤蟲、蟠尾絲蟲病、住血吸蟲病、錐蟲病、利什曼原蟲症、梨形蟲、阿米巴蟲病、絲蟲病、疏螺旋體屬和旋毛蟲病。更多抗原可獲自或衍生自非傳統的病原，像是庫魯病、亞急性海綿狀腦病(CJD)、羊搔癢症(scrapie)、傳染性貂腦病和慢性消耗性疾病的致病原，或得自蛋白質傳染性顆粒，如與狂牛病有關的朊病毒。

在其他的具體實施例中，該抗原得自或衍生自涉及神經變性疾病(如阿茲海默氏症)、代謝性疾病(如第I型糖尿病)和藥物成癮(如尼古丁成癮)之發作或進行的生物製劑。或者，由重組核酸分子編碼的抗原是用於疼痛管理，且該製劑是疼痛受體，或涉及疼痛信號傳播的其他製劑。

在一些具體實施例中，該抗原為人類蛋白質或衍生自人類蛋白質。在其他的具體實施例中，該抗原為非-人類蛋白質或衍生自非-人類蛋白質(其片段及/或變體)。在一些具體實施例中，由重組卡匣編碼之融合蛋白的抗原部分是得自非-人類動物的蛋白質，或衍生自非-人類動物的蛋白質。例如，即使欲在以李斯特菌屬-為基礎之疫苗中表現的抗原是要用在人類上的，在一些具體實施例中，該抗原可以是老鼠間皮素或衍生自老鼠間皮素。

V.密碼子-最優化

在一些具體實施例中，將在重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體內之一或多個多核苷酸(即多核苷酸序列)密碼子-最優化(相對於天然的密碼序列)。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，將在本文中描述之編碼信號肽的重組核酸分子(及/或在表現卡匣及/或表現載體)中之多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，將編碼信號肽以外之多肽，如抗原或其他治療蛋白質的多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，將編碼信號肽之多核苷酸和編碼其他與信號肽融合之多肽的多核苷酸兩者密碼子-最優化。在一些具體實施例中，將用來作為鷹架之編碼分泌蛋白質(或其片段)的多核苷酸，或編碼自溶素(或其片段或變體)之多核苷酸密碼子-最優化。

若已經利用比天然密碼序列之原始密碼子更常被欲在其中表現該密碼序列之生物("標靶生物")使用的密碼子取代該多核苷酸之天然密碼序列的至少一個密碼子，則該多核苷酸包括被"密碼子-最優化"了的密碼序列。例如，若利用優先在欲在其中表現非-細菌抗原之特定細菌物種中表現的密碼子，置換至少一個得自天然細菌多核苷酸序列的密碼子，便是將編碼欲在細菌之特殊物種中表現的非-細菌抗原之多核苷酸密碼子-最優化。舉另一個例子來說，若利用比在原始人類序列中之密碼子更常被單核細胞增多性李斯特菌用於胺基酸的密碼子，置換多核苷酸序列中的至少一個密碼子，便是將編碼成為重組單核細胞增多性李斯特菌

中之表現卡匣一部分之人類癌症抗原的多核苷酸密碼子-最優化。同樣地，若利用比在原始(天然)序列中之密碼子更常被單核細胞增多性李斯特菌用於胺基酸的密碼子，置換編碼信號肽之多核苷酸序列中的至少一個密碼子，便是將成為在重組之單核細胞增多性李斯特菌中編碼包括人類癌症抗原之融合蛋白的表現卡匣之一部分的編碼對單核細胞增多性李斯特菌而言為天然之信號肽(如得自單核細胞增多性李斯特菌之LLO信號肽)的多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，以標靶生物編碼相同胺基酸最常使用的密碼子置換在密碼子-最優化序列中被置換的至少一個密碼子。

在一些具體實施例中，已經利用比天然密碼序列之原始密碼子更常被欲在其中表現該密碼序列之生物使用的密碼子，置換多核苷酸之天然密碼序列的至少兩個密碼子。在一些具體實施例中，已經利用比天然密碼序列之原始密碼子更常被欲在其中表現該密碼序列之生物使用的密碼子，置換多核苷酸之天然密碼序列的至少大約5個密碼子、至少大約10個密碼子或至少大約20個密碼子。

在一些具體實施例中，已經利用(比天然序列之原始密碼子)更常(或最常)被標靶生物使用之密碼子，置換在密碼子-最優化之多核苷酸中至少大約10%的密碼子。在其他具體實施例中，已經利用(比天然序列之原始密碼子)更常(或最常)被標靶生物使用之密碼子，置換在密碼子-最優化之多核苷酸中至少大約25%的密碼子。在其他的具體實施例中，

已經利用(比天然序列之原始密碼子)更常(或最常)被標靶生物使用之密碼子，置換在密碼子-最優化之多核苷酸中至少大約50%的密碼子。在另外的具體實施例中，已經利用(比天然序列之原始密碼子)更常(或最常)被標靶生物使用之密碼子，置換在密碼子-最優化之多核苷酸中至少大約75%的密碼子。

已經由熟諳此藝者廣泛地研究了不同生物的密碼子優勢。例如，參見Sharp等人，Nucleic Acids Res., 15:1281-95 (1987)和Uchijima等人，The Journal of Immunology, 161:5594-9(1998)。結果，可公開獲得各種生物的密碼子利用表。例如，可在網際網路上，在www.kazusa.or.jp/codon/，以及在其他公開可利用的地方找到各種生物的密碼子利用表。(參見，例如Nakamura等人(2000) Nucleic Acids Research 28:292)。為了方便，在下文表2A中再現得自www.kazusa.or.jp/codon/的代表性密碼子利用表，單核細胞增多性李斯特菌之密碼子利用表(http://www.kazusa.or.jp/codon/cgibin/showcodon.cgi?species=Listeria+monocytogenes+[gbbct])。亦在下文表2B、2C、2D、2E和2F中分別提供炭疽桿菌、結核桿菌、鼠傷寒沙門氏桿菌、牛分枝桿菌(Mycobacterium bovis)BCG和副痢疾志賀桿菌(Shigella flexneri)的代表性密碼子利用表。

表2A：單核細胞增多性李斯特菌之密碼子利用表(得自www.kazusa.or.jp/codon/)。

單核細胞增多性李斯特菌：3262個CDS's(1029006個密碼子)

範圍：[三聯體][頻率：每一千個]([數目])

UUU 29.4(30274)	UCU 13.2(13586)	UAU 22.9(23604)	UGU 3.8(3960)
UUC 14.1(14486)	UCC 6.5(6714)	UAC 10.7(11055)	UGC 1.9(1972)
UUA 36.8(37821)	UCA 10.4(10751)	UAA 2.2(2307)	UGA 0.6(583)
UUG 12.3(12704)	UCG 6.1(6278)	UAG 0.4(372)	UGG 9.3(9580)
CUU 21.0(21567)	CCU 8.4(8622)	CAU 12.0(12332)	CGU 12.6(12930)
CUC 5.4(5598)	CCC 1.7(1780)	CAC 5.2(5336)	CGC 7.0(7215)
CUA 12.9(13279)	CCA 18.5(18996)	CAA 29.9(30719)	CGA 5.6(5732)
CUG 5.0(5120)	CCG 7.0(7219)	CAG 5.1(5234)	CGG 2.8(2884)
AUU 49.3(50692)	ACU 17.1(17614)	AAU 33.0(33908)	AGU 14.1(14534)
AUC 18.4(18894)	ACC 6.9(7089)	AAC 15.3(15790)	AGC 8.8(9031)
AUA 9.4(9642)	ACA 26.5(27318)	AAA 61.6(63379)	AGA 6.9(7111)
AUG 25.9(26651)	ACG 12.9(13285)	AAG 10.4(10734)	AGG 1.2(1254)
GUU 26.4(27202)	GCU 24.3(24978)	GAU 39.8(40953)	GGU 24.2(24871)
GUC 8.7(8990)	GCC 8.4(8612)	GAC 14.3(14751)	GGC 14.2(14581)
GUA 21.6(22247)	GCA 28.6(29401)	GAA 60.4(62167)	GGA 19.1(19612)
GUG 13.1(13518)	GCG 16.6(17077)	GAG 13.1(13507)	GGG 8.7(9003)

表2B：炭疽桿菌之密碼子利用表(得自 www.kazusa.or.jp/codon/)。

炭疽桿菌[gbbct]：312個CDS's(90023個密碼子)

範圍：[三聯體][頻率：每一千個]([數目])

UUU 32.4(2916)	UCU 17.2(1547)	UAU 31.9(2876)	UGU 5.1(455)
UUC 10.4(934)	UCC 5.0(453)	UAC 9.5(853)	UGC 1.8(164)
UUA 43.7(3931)	UCA 14.8(1330)	UAA 2.2(199)	UGA 0.5(47)
UUG 11.4(1024)	UCG 4.2(375)	UAG 0.7(66)	UGG 9.3(835)
CUU 14.4(1300)	CCU 10.7(967)	CAU 15.5(1392)	CGU 9.8(883)
CUC 3.7(335)	CCC 2.7(242)	CAC 4.2(379)	CGC 2.5(223)
CUA 12.4(1117)	CCA 17.8(1599)	CAA 32.3(2912)	CGA 6.3(569)
CUG 4.4(392)	CCG 5.9(534)	CAG 9.5(859)	CGG 2.0(179)
AUU 44.5(4009)	ACU 21.0(1890)	AAU 44.0(3959)	AGU 17.4(1565)
AUC 11.9(1072)	ACC 5.0(453)	AAC 14.1(1268)	AGC 5.2(467)
AUA 22.7(2042)	ACA 26.8(2414)	AAA 64.3(5786)	AGA 13.7(1236)
AUG 23.3(2098)	ACG 9.4(844)	AAG 22.7(2047)	AGG 4.1(368)
GUU 20.3(1824)	GCU 17.8(1598)	GAU 39.3(3536)	GGU 17.9(1611)
GUC 4.6(414)	GCC 4.1(372)	GAC 9.0(811)	GGC 5.8(524)
GUA 26.4(2374)	GCA 23.5(2117)	GAA 53.9(4855)	GGA 24.5(2203)
GUG 10.8(973)	GCG 7.9(709)	GAG 17.9(1614)	GGG 12.0(1083)

密碼GC34.55%第一個字母GC44.99%第二個字母GC33.16%

第三個字母GC25.51%

表2C：結核桿菌之密碼子利用表(得自www.kazusa.or.jp/codon/)。

結核桿菌[gbbct]：363個CDS's(131426個密碼子)

範圍：[三聯體][頻率：每一千個]([數目])

UUU	5.4(709)	UCU	2.0(265)	UAU	6.0(788)	UGU	2.5(326)
UUC	25.6(3359)	UCC	11.4(1499)	UAC	17.6(2307)	UGC	5.6(738)
UUA	1.8(231)	UCA	4.3(571)	UAA	0.4(52)	UGA	1.5(201)
UUG	14.8(1945)	UCG	19.2(2522)	UAG	0.8(103)	UGG	17.9(2352)
CUU	5.9(778)	CCU	3.9(511)	CAU	5.4(711)	CGU	8.0(1048)
CUC	17.7(2329)	CCC	18.3(2411)	CAC	14.7(1928)	CGC	26.7(3508)
CUA	4.0(521)	CCA	6.4(843)	CAA	7.8(1030)	CGA	5.8(764)
CUG	45.9(6032)	CCG	33.2(4359)	CAG	24.2(3176)	CGG	21.1(2772)
AUU	7.6(993)	ACU	4.1(545)	AAU	4.8(637)	AGU	4.0(531)
AUC	32.7(4300)	ACC	36.0(4735)	AAC	26.3(3451)	AGC	15.0(1976)
AUA	2.1(282)	ACA	4.7(616)	AAA	5.8(761)	AGA	1.5(192)
AUG	19.7(2591)	ACG	16.4(2158)	AAG	26.5(3485)	AGG	3.3(429)
GUU	8.3(1095)	GCU	11.2(1473)	GAU	15.6(2046)	GGU	18.7(2455)
GUC	32.3(4249)	GCC	51.5(6769)	GAC	44.6(5858)	GGC	48.6(6383)
GUA	4.7(622)	GCA	12.4(1625)	GAA	16.8(2211)	GGA	9.0(1183)
GUG	35.7(4687)	GCG	41.7(5482)	GAG	35.8(4702)	GGG	16.9(2215)

密碼GC64.43%第一個字母GC65.27%第二個字母GC48.28%

第三個字母GC79.75%

表2D：鼠傷寒沙門氏桿菌之密碼子利用表(得自www.kazusa.or.jp/codon/)。

鼠傷寒沙門氏桿菌[gbbct]：1322個CDS's(416065個密碼子)

範圍：[三聯體][頻率：每一千個]([數目])

UUU	21.7(9041)	UCU	8.5(3518)	UAU	16.5(6853)	UGU	4.6(1920)
UUC	15.1(6265)	UCC	10.6(4430)	UAC	11.6(4826)	UGC	6.1(2524)
UUA	13.6(5650)	UCA	7.9(3286)	UAA	1.8(731)	UGA	1.1(465)
UUG	12.1(5025)	UCG	9.4(3924)	UAG	0.3(121)	UGG	14.1(5851)
CUU	12.1(5038)	CCU	7.9(3290)	CAU	12.1(5047)	CGU	18.1(7542)
CUC	10.6(4396)	CCC	7.0(2921)	CAC	9.2(3818)	CGC	20.8(8659)
CUA	4.7(1958)	CCA	6.5(2712)	CAA	12.8(5315)	CGA	4.1(1695)
CUG	49.3(20508)	CCG	22.7(9463)	CAG	30.8(12803)	CGG	7.2(3004)

AUU	28.1(11700)	ACU	8.2(3401)	AAU	19.5(8107)	AGU	8.6(3569)
AUC	23.9(9941)	ACC	24.0(9980)	AAC	21.4(8920)	AGC	18.0(7485)
AUA	6.7(2771)	ACA	8.0(3316)	AAA	33.0(13740)	AGA	3.2(1348)
AUG	26.1(10842)	ACG	18.6(7743)	AAG	12.4(5151)	AGG	2.3(959)
GUU	16.4(6831)	GCU	14.4(5985)	GAU	32.9(13700)	GGU	18.1(7541)
GUC	17.7(7367)	GCC	27.5(11462)	GAC	21.5(8949)	GGC	33.0(13730)
GUA	11.9(4935)	GCA	14.8(6156)	GAA	36.1(15021)	GGA	9.1(3788)
GUG	24.3(10092)	GCG	37.0(15387)	GAG	20.9(8715)	GGG	11.6(4834)

密碼GC52.45%第一個字母GC58.32%第二個字母GC41.31%第三個字母GC57.71%

表2E：牛分枝桿菌BCG之密碼子利用表(得自www.kazusa.or.jp/codon/)。

牛分枝桿菌BCG[gbbct]：51個CDS's(16528個密碼子)

範圍：[三聯體][頻率：每一千個]([數目])

UUU	4.7(77)	UCU	1.9(31)	UAU	6.6(109)	UGU	2.0(33)
UUC	27.4(453)	UCC	11.4(189)	UAC	17.0(281)	UGC	6.7(110)
UUA	1.6(26)	UCA	4.5(74)	UAA	0.9(15)	UGA	1.3(22)
UUG	14.7(243)	UCG	20.8(343)	UAG	0.8(14)	UGG	14.3(237)
CUU	5.6(92)	CCU	2.9(48)	CAU	4.9(81)	CGU	9.4(155)
CUC	14.8(244)	CCC	16.3(270)	CAC	17.2(285)	CGC	33.8(559)
CUA	5.1(85)	CCA	5.1(84)	CAA	7.3(120)	CGA	7.1(118)
CUG	51.5(852)	CCG	31.0(512)	CAG	25.5(421)	CGG	26.7(441)
AUU	6.1(100)	ACU	3.1(51)	AAU	4.8(80)	AGU	2.8(46)
AUC	39.6(654)	ACC	36.8(609)	AAC	22.3(369)	AGC	14.5(240)
AUA	2.2(37)	ACA	4.4(73)	AAA	6.2(102)	AGA	1.1(19)
AUG	20.2(334)	ACG	17.4(288)	AAG	24.5(405)	AGG	3.8(62)
GUU	7.8(129)	GCU	9.6(158)	GAU	13.4(222)	GGU	16.9(280)
GUC	30.1(497)	GCC	54.3(898)	GAC	45.6(754)	GGC	42.6(704)
GUA	4.1(67)	GCA	12.5(206)	GAA	16.5(273)	GGA	7.3(120)
GUG	37.6(621)	GCG	41.7(689)	GAG	32.7(541)	GGG	16.7(276)

密碼GC64.82%第一個字母GC65.36%第二個字母GC48.07%第三個字母GC81.04%

表2F：副痢疾志賀桿菌之密碼子利用表(得自www.kazusa.or.jp/codon/)。

副痢疾志賀桿菌[gbbct]：706個CDS's(180312個密碼子)

範圍：[三聯體][頻率：每一千個]([數目])

UUU	25.8(4658)	UCU	16.6(2986)	UAU	21.9(3945)	UGU	6.9(1252)
UUC	15.1(2714)	UCC	9.5(1717)	UAC	11.0(1992)	UGC	5.6(1011)
UUA	20.8(3756)	UCA	15.6(2821)	UAA	2.0(362)	UGA	1.4(254)
UUG	13.4(2424)	UCG	6.9(1241)	UAG	0.5(91)	UGG	13.1(2357)
CUU	17.6(3169)	CCU	9.2(1656)	CAU	15.1(2725)	CGU	15.0(2707)
CUC	10.4(1878)	CCC	5.9(1072)	CAC	8.2(1472)	CGC	12.6(2269)
CUA	7.2(1295)	CCA	9.7(1744)	CAA	15.9(2861)	CGA	5.8(1046)
CUG	33.5(6045)	CCG	12.2(2199)	CAG	23.6(4255)	CGG	9.0(1627)
AUU	30.0(5417)	ACU	13.8(2480)	AAU	33.5(6044)	AGU	15.3(2764)
AUC	16.7(3018)	ACC	13.4(2413)	AAC	18.6(3348)	AGC	12.7(2281)
AUA	18.9(3402)	ACA	16.2(2930)	AAA	41.6(7507)	AGA	10.3(1865)
AUG	23.3(4198)	ACG	10.0(1809)	AAG	16.4(2961)	AGG	5.7(1029)
GUU	19.8(3576)	GCU	19.6(3527)	GAU	34.0(6123)	GGU	19.2(3468)
GUC	11.8(2126)	GCC	18.5(3338)	GAC	16.3(2939)	GGC	15.3(2754)
GUA	13.1(2370)	GCA	22.2(4009)	GAA	37.5(6763)	GGA	15.1(2727)
GUG	16.1(2910)	GCG	15.2(2732)	GAG	21.7(3913)	GGG	10.9(1970)

密碼GC44.63%第一個字母GC51.72%第二個字母GC38.85%第三個字母GC43.32%

在本發明的一些具體實施例中，在密碼子-最優化之密碼序列中至少大約10%、至少大約25%、至少大約50%或至少大約75%的密碼子，對於在標靶生物中使用之胺基酸而言是最佳的密碼子。在其他的具體實施例中，在密碼子-最優化之密碼序列中100%的密碼子，對於在標靶生物中之胺基酸而言是最佳的密碼子(即該序列是"完全密碼子-最優化了的")。例如，在下文出示的實例中，其特徵為密碼子-最優化之序列的所有密碼子均是標靶生物最常用的密碼子；然而，可將任何其結果為比原始(天然)序列更常用之密碼子的密碼子取代視為"密碼子-最優化的"。下文表3顯示在單核細胞增多性李斯特菌中，每個胺基酸的最佳密碼子利用。

表3：在單核細胞增多性李斯特菌中的最佳密碼子利用表

胺基酸	一個字母密碼	最佳李斯特菌屬密碼子
丙胺酸	A	GCA
精胺酸	R	CGU
天冬醯胺	N	AAU
天冬胺酸	D	GAU
半胱胺酸	C	UGU
穀胺醯胺	Q	CAA
穀胺酸	E	GAA
甘胺酸	G	GGU
組胺酸	H	CAU
異亮胺酸	I	AUU
亮胺酸	L	UUA
離胺酸	K	AAA
甲硫胺酸	M	AUG
苯丙胺酸	F	UUU
脯胺酸	P	CCA
絲胺酸	S	AGU
蘇胺酸	T	ACA
色胺酸	W	UGG
酪胺酸	Y	UAU
纈胺酸	V	GUU

在一些具體實施例中，該密碼子-最優化之多核苷酸編碼信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽對為其將該序列密碼子-最優化之細菌而言是外來的。在其他的具體實施例中，該信號肽對為其將該序列密碼子-最優化之細菌而言是天然的。例如，在一些具體實施例中，該密碼子-最優化之多核苷酸編碼選自得自單核細胞增多性李斯特菌之LLO信號肽、得自乳酸乳球菌之Usp45信號肽、得自炭疽桿菌之保護性抗原信號肽、得自單核細胞增多性李斯特菌之p60信號肽和得自枯草桿菌之PhoD信號肽所組成之群的信號肽。在

一些具體實施例中，該密碼子-最優化之多核苷酸編碼得自炭疽桿菌之保護性抗原信號肽以外的信號肽。在一些具體實施例中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼信號肽之多核苷酸密碼子-最優化。

在一些具體實施例中，該密碼子-最優化之多核苷酸編碼的(非-信號肽)蛋白質，對已經為其將該多核苷酸序列密碼子-最優化的細菌而言是外來的。在一些具體實施例中，該密碼子-最優化之多核苷酸編碼的多肽包括抗原。例如，在一些具體實施例中，該密碼子-最優化之多核苷酸編碼的多肽包括抗原，其為與腫瘤有關的抗原或衍生自與腫瘤有關之抗原的抗原。

在一些具體實施例中，編碼信號肽及/或其他多肽之多核苷酸的密碼子-最優化作用，相對於無密碼子-最優化之相對應的多核苷酸，提高了包括該信號肽及/或其他多肽之多肽(如融合蛋白、蛋白質嵌合體及/或由重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼之外來多肽)在細菌中的表現。在一些具體實施例中，該多核苷酸之密碼子-最優化作用，提高表現至少大約2倍、至少大約5倍、至少大約10倍或至少大約20倍(相對於無密碼子-最優化的相對應之多核苷酸)。在一些具體實施例中，編碼信號肽及/或其他多肽之多核苷酸的密碼子-最優化作用，相對於無密碼子-最優化的相對應之多核苷酸，提高了包括該信號肽及/或其他多肽之多肽(如融合蛋白、蛋白質嵌合體及/或外來多肽)在細菌中的分泌。在一些具體實施例中，該多核苷酸之密碼子-最優化作用，提高

分泌至少大約2倍、至少大約5倍、至少大約10倍或至少大約20倍(相對於無密碼子-最優化的相對應之多核苷酸)。在一些具體實施例中，提高了表現和分泌程度兩者。可使用此項技藝中的標準技術，如各種相關細菌培養溶離份的西方墨點，迅速地評估表現及/或分泌程度。

VI.表現卡匣

亦由本發明提供表現卡匣。例如，在一些具體實施例中，本發明提供包括任何在本文中描述之重組核酸分子的表現卡匣，且更進一步包括以可操作之方式與在該重組核酸分子中之密碼序列(例如編碼信號肽的第一個多核苷酸和編碼其他多肽的第二個多核苷酸)連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該表現卡匣是經過分離的。在一些其他的具體實施例中，將該表現卡匣納入表現載體內，其可以是經過分離或納入細菌內的。在更進一步的具體實施例中，該表現卡匣係位在細菌的染色體DNA中。例如，在一些具體實施例中，已經將該表現卡匣整合到細菌的基因組內。在一些具體實施例中，整合到細菌之基因組內的表現卡匣包括一或多個得自基因組DNA的元件。例如，在一些具體實施例中，將該重組核酸分子插入細菌之基因組DNA的某個位置中(例如經由指定位置之整合或同種重組作用)，使得該重組核酸分子以可操作之方式與業已出現在基因組DNA中的啟動基因連接，藉此產生整合到基因組DNA內的新表現卡匣。在一些其他的具體實施例中，以包括啟動基因和該重組核酸分子兩者的完整單位，將表現卡匣整合到基因組

DNA內(例如經由指定位置之整合或同種重組作用)。

在一些具體實施例中，設計該表現卡匣，以便在細菌中表現該多肽。在一些具體實施例中，設計該表現卡匣，以便在細菌中表現異種多肽，如異種抗原。在一些具體實施例中，該表現卡匣提供該多肽提高的表現及/或分泌。

表現卡匣通常包括下列順序的元件：(1)啟動基因，和(2)編碼多肽之多核苷酸。在一些具體實施例中，該表現卡匣包括下列的元件：(1)啟動基因；(2)編碼信號肽的多核苷酸；以及(3)編碼多肽(例如異種蛋白質)之多核苷酸。在其他的具體實施例中，該表現卡匣包括下列的元件：(1)原核生物啟動基因；(2)Shine-Dalgarno序列；(3)編碼信號肽的多核苷酸；以及(4)編碼多肽(例如異種蛋白質)之多核苷酸。在一些具體實施例中，該表現卡匣包括一個以上的啟動基因。

在一些具體實施例中，該表現卡匣亦可含有相對於該異種多肽，插在轉譯終止密碼子之C-終端下游的轉錄終止序列。例如，在一些具體實施例中，可在為了穩定整合至細菌染色體內的構築體中使用轉錄終止序列。雖然不需要，但轉錄終止序列的納入，成為在異種基因表現卡匣中最後有規律的元件，可防止因為讀過轉錄而對相鄰基因之表現調節的極性影響。因此，在一些具體實施例中，可將熟諳此藝者已知促進rho-依賴性或rho-獨立性之轉錄終止的適當序列元件放在異種蛋白質表現卡匣中。

本發明一方面提供包括下列的表現卡匣：(a)編碼信號肽

的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

另一方面，本發明提供表現卡匣，其包括(a)編碼對細菌而言為天然之信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與該表現卡匣之第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，其中該重組核酸分子編碼包括該信號肽和多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該信號肽而言是異種的。在一些具體實施例中，該第二個多核苷酸對第一個多核苷酸是異種的。在一些具體實施例中，該多肽對細菌而言是異種的，而信號肽對其則是天然的(即對細菌而言是外來的)。在一些具體實施例中，從其中衍生信號肽之細菌是細胞內的細菌。在一些具體實施例中，該細菌係選自李斯特菌屬、芽胞桿菌屬、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬、布氏桿菌屬、分枝桿菌和大腸桿菌所組成之群。在一些具體實施例中，該細菌為李斯特菌屬的細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌)。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，將該第二個多核苷

酸密碼子-最優化。

另一方面，本發明提供表現卡匣，其中該表現卡匣包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬細菌中表現，將第一個多核苷酸密碼子-最優化，(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，以及(c)以可操作之方式與表現卡匣之第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，其中該重組核酸分子編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，該表現卡匣是多順反子的表現卡匣。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬細菌中表現，將該第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對李斯特菌屬的細菌而言是外來的(即對李斯特菌屬之細菌而言是異種的)。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該信號肽而言是異種的。在一些具體實施例中，該表現卡匣包括一個以上的啟動基因。

另一方面，本發明提供表現卡匣，包括(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，如李斯特菌屬、芽胞桿菌屬、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬、布氏桿菌屬、分枝桿菌或大腸桿菌，將第一

個多核苷酸及/或第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬，如單核細胞增多性李斯特菌中表現，將該多核苷酸(們)密碼子-最優化。在一些具體實施例中，由密碼子-最優化之第一個多核苷酸編碼的信號肽對為其進行密碼子-最優化之細菌而言是天然的。在一些具體實施例中，該第一個多核苷酸編碼之信號肽對該第二個多核苷酸而言是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼的多肽對該信號肽而言是異種的。在一些具體實施例中，該表現卡匣是多順反子的表現卡匣。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌)中表現，將第一個多核苷酸、第二個多核苷酸或第一個多核苷酸和第二個多核苷酸兩者密碼子-最優化。在一些具體實施例中，該第一和第二個多核苷酸彼此是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽和信號肽彼此是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對李斯特菌屬細菌是外來的(即對李斯特菌屬細菌而言是異種的)。在一些具體實施例中，該表現卡匣包括一個以上的啟動基因。

本發明亦提供包括下列的表現卡匣：(a)編碼對李斯特菌屬而言為外來之多肽的多核苷酸；以及(b)以可操作之方式與編碼該外來多肽之多核苷酸連接的啟動基因。在一些具體實施例中，由該表現卡匣編碼之多肽是抗原(例如，參見上文一些可能抗原的說明)。在一些具體實施例中，該表現卡匣更進一步包括編碼信號肽的多核苷酸。該編碼信號肽

之多核苷酸亦以可操作之方式與啟動基因連接，使該表現卡匣得以表現包括該外來多肽和信號肽的融合蛋白。適合用在表現卡匣中之編碼信號肽的多核苷酸，包括但不限於上述的那些。在一些具體實施例中，按照上述，為了在細菌，如李斯特菌屬(例如單核細胞增多性李斯特菌)中表現，將納入該表現卡匣中，編碼信號肽之多核苷酸密碼子-最優化。

本發明亦提供包括下列的表現卡匣：(a)編碼非-李斯特菌屬之信號肽的第一個多核苷酸；(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其為與該第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括該非-李斯特菌屬之信號肽和該多肽兩者的融合蛋白。在一些具體實施例中，該表現卡匣是多順反子的表現卡匣。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬(例如單核細胞增多性李斯特菌)中表現，將第一個多核苷酸、第二個多核苷酸或第一和第二個多核苷酸兩者密碼子-最優化。在一些具體實施例中，該第一和第二個多核苷酸彼此是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽和信號肽彼此是異種的。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該李斯特菌屬之細菌是外來的(即對李斯特菌屬細菌而言是異種的)。在一些具體實施例中，該表現卡匣包括一個以上的啟動基因。

本發明更提供表現卡匣，其中該表現卡匣包括(a)編碼細

菌自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸；(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括由該第二個多核苷酸編碼之多肽和自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的蛋白質嵌合體，其中在該蛋白質嵌合體中，該多肽與自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合，或插入該自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體中。在一些具體實施例中，該蛋白質嵌合體像自溶素一樣具有催化活性。在一些具體實施例中，該多肽對自溶素而言是異種的。在一些具體實施例中，該細菌自溶素係得自細胞內的細菌(例如李斯特菌屬)。在一些具體實施例中，將該第二個多核苷酸編碼之多肽插入第一個多核苷酸編碼之自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體內，且該表現卡匣編碼其中將該多肽插入自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體內的蛋白質嵌合體(即將該多肽埋入自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體內)。在交替的具體實施例中，該第二個多核苷酸係位在編碼自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸的外側，且該表現卡匣編碼其中將該多肽與自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合的蛋白質嵌合體。在一些具體實施例中，該多肽對自溶素而言是異種

的。在一些具體實施例中，該第一個多核苷酸和第二個多核苷酸彼此是異種的。在一些具體實施例中，該自溶素是SecA2-依賴性自溶素。在一些具體實施例中，該自溶素是肽聚醣水解酶(例如N-乙醯胞壁質酶或p60)。在一些具體實施例中，該表現卡匣更進一步包括編碼信號肽(例如正常與自溶素結合的信號肽，或對該信號肽而言為異種之信號肽)的多核苷酸。例如，在一些具體實施例中，該表現卡匣編碼包括p60信號肽、p60蛋白質(或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體)，以及埋在p60序列內對p60為異種之多肽的蛋白質嵌合體。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽是非-李斯特菌屬的多肽。

另一方面，本發明提供表現卡匣，包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，(b)編碼分泌蛋白質或其片段的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，(c)編碼對該分泌蛋白質或其片段為異種之多肽的第三個多核苷酸，其中該第三個多核苷酸是與該第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，以及(d)以可操作之方式與該第一、第二和第三個多核苷酸連接的啟動基因，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽、由該第二個多核苷酸編碼之多肽，以及分泌蛋白質或其片段的蛋白質嵌合體，其中在該蛋白質嵌合體中，由該第三個多核苷酸編碼之多肽與該分泌蛋白質或其片段融合，或位在該分泌蛋白質或其片段內。

在一些具體實施例中，在本文中描述之表現卡匣(或在本

文中描述之重組核酸分子)中的啟動基因是原核生物的啟動基因。例如，原核生物啟動基因可以是李斯特菌屬之啟動基因。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬之啟動基因是hly啟動基因。在一些具體實施例中，該啟動基因是prfA-依賴性啟動基因(例如actA啟動基因)。在一些具體實施例中，該啟動基因是組成的啟動基因(例如p60啟動基因)。在一些具體實施例中，包括在本文中描述之重組核酸分子的表現卡匣包括以可操作之方式與該重組核酸分子之多核苷酸連接的hly、actA或p60啟動基因。由於企圖使用該表現卡匣及其中將放置該表現卡匣的宿主細菌，熟諳此藝者將能夠迅速地確認適用於該表現卡匣中的額外原核生物及/或李斯特菌屬之啟動基因。

例如，適合用在分枝桿菌及其他細菌內之重組表現卡匣上的各種分枝桿菌之啟動基因為已知的。這些包括牛分枝桿菌BCG啟動基因HSP60和HSP70，且亦包括諸如結核桿菌和BCG的分枝桿菌素(mycobactin)啟動基因、α-抗原啟動基因和45 kDa抗原啟動基因、超氧物歧化酶啟動基因、MBP-70、分枝桿菌的asd啟動基因、分枝桿菌的14 kDa和12 kDa抗原啟動基因、分枝桿菌噬菌體(mycobacteriophage)啟動基因，如Bxb1、Bxb2和Bxb3啟動基因、L1和L5啟動基因、D29啟動基因和TM4啟動基因(參見美國專利第6,566,121號)之類的啟動基因。適合用在炭疽桿菌中的啟動基因包括，但不限於pagA啟動基因、α-澱粉酶啟動基因(Pamy)和Pntr(參見，例如Gat等人，Infect. Immun., 71:801-13

(2003))。適合用在重組沙門氏桿菌屬表現卡匣和疫苗中的啟動基因是已知的，並包括nirB啟動基因、osmC啟動基因、P(pagC)和P(tac)(參見，例如Bumann, Infect. Immun., 69:7493-500(2001)；Wang等人，Vaccine, 17:1-12 (1999)；McSorley等人，Infect. Immun. 65:171-8(1997))。各種大腸桿菌啟動基因亦為熟諳此藝者已知的。

在一些具體實施例中，在本文中描述之表現卡匣中使用的啟動基因是組成的啟動基因。在其他的具體實施例中，在本文中描述之表現卡匣中使用的啟動基因是可誘導的啟動基因。可藉著對欲在其中使用該表現卡匣之細菌而言為內源的分子(例如蛋白質)，來誘導可誘導之啟動基因。或者，可藉著對欲在其中使用該表現卡匣之細菌而言為異種的分子(例如小分子或蛋白質)，來誘導可誘導之啟動基因。各種可誘導之啟動基因均為熟諳此藝者已熟知的。

在表現卡匣的一些具體實施例中，該啟動基因的3'-末端是聚-嘌呤Shine-Dalgarno序列，使30S核糖體次單元(經由16S rRNA)與異種基因RNA轉錄本吻合，並發動轉譯所必需的元件。Shine-Dalgarno序列通常具有下列的一致序列：5'-NAGGAGGU-N_{5-10}-AUG(起始密碼子)-3'(序列第85號；序列第125-129號)。有變種的聚嘌呤Shine-Dalgarno序列。值得注意的是，編碼李斯特菌溶解素O(LLO)的李斯特菌屬hly基因具有下列的Shine-Dalgarno序列：AAGGAGAGTGAAACCC**ATG**(序列第70號)(將Shine-Dalgarno序列加下標線，並以粗體表示轉譯開始密碼

子)。

用在細菌中之表現卡匣的建構，即使是特別用在重組細菌疫苗中之表現卡匣的建構，為此項技藝中已知的。例如，可在下列的參考文獻中找到產製和使用各種細菌表現卡匣及/或重組細菌疫苗的說明，全部以引用的方式併入本文中：Horwitz等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:13853-8 (2000)；Garmory等人，J. Drug Target, 11:471-9(2003)；Kang等人，FEMS Immunol. Med. Microbiol., 37:99-104(2003)；Garmory等人，Vaccine, 21:3051-7(2003)；Kang等人，Infect. Immun., 1739-49(2002)；Russman等人，J. Immunol., 167: 357-65(2001)；Harth等人，Microbiology, 150:2143-51 (2004)；Varaldo等人，Infect. Immun., 72:3336-43(2004)；Goonetilleke等人，J. Immunol., 171:1602-9(2003)；Uno-Furuta等人，Vaccine, 21:3149-56(2003)；Biet等人，Infect. Immun., 71:2933-7(2003)；Bao等人，Infect. Immun., 71: 1656-61(2003)；Kawahara等人，Clin. Immunol., 105:326-31 (2002)；Anderson等人，Vaccine, 18:2193-202(2000)；Bumann, Infect. Immun., 69:7493-500(2001)；Wang等人，Vaccine, 17: 1-12(1999)；McSorley等人，Infect. Immun., 65:171-8 (1997)；Gat等人，Infect. Immun., 71:801-13(2003)；美國專利第5,504,005號；美國專利第5,830,702號；美國專利第6,051,237號；美國專利公開案第2002/0025323號；美國專利公開案第2003/0202985號；WO 04/062597；美國專利第6,566,121號；和美國專利第6,270,776號。

在一些具體實施例中，想要建構利用異種密碼序列之雙順反子、多順反子(亦稱為多順反子)表現的表現卡匣。這類表現卡匣可利用，例如以可操作之方式與二或多個獨立密碼序列連接的單一啟動基因。這些密碼序列，例如可符合個別的基因，或可符合整個經過設計之基因的想要及/或選出的亞-片段。在後者的實例中，該基因可含有編碼忌水性穿透膜功能部位的序列，其有可能抑制從李斯特菌屬中有效地分泌。因此，可能想要從該忌水性功能部位，將該基因的密碼序列分成兩個亞-片段；在該案例中，然後以雙順反子之信息表現這兩個亞-片段。利用多順反子的表現，需要30s核糖體次單元留住多順反子RNA信息，接著是第一個密碼序列的轉譯終止，並釋放50s核糖體次單元，然後"讀過"RNA信息，至下一個開始密碼子，在這期間50s核糖體次單元與RNA-結合之30s核糖體次單元結合，並再度-發動轉譯作用。

單核細胞增多性李斯特菌，像其他的細菌一樣，利用其基因組節目的多順反子表現。舉例來說，可使用得自選出之多順反子信息的單核細胞增多性李斯特菌基因間區域之序列，建構多順反子表現卡匣，來表現從重組李斯特菌屬物種中選出之異種蛋白質。例如，從多順反子之信息中，表現得自單核細胞增多性李斯特菌之數個prfA-依賴性毒力因子。例如，以雙順反子之信息的形式，表現單核細胞增多性李斯特菌ActA和PlcB蛋白質。在下文中出示符合單核細胞增多性李斯特菌actA-plcB基因間序列(5'-3')的DNA

序列：

5'-TAAAAACACAGAACGAAAGAAAAA**GTGAGG**TGAA TGA-3'(序列第71號)

(以粗體顯示plcB之轉譯開始的Shine-Dalgarno序列。序列的前3個核苷酸與Ochre終止密碼子一致)。關於雙順反子表現載體的非-限制性實例，用在單核細胞增多性李斯特菌中的雙順反子hEphA2表現載體，參見下文實例28。

或者，可使用其他已知的基因間或合成序列，建構用在李斯特菌屬或其他細菌中的多順反子表現卡匣。應阻止引導實質二級RNA結構之基因間區域的建構，藉著rho-獨立性機制避免不想要的轉錄終止。

重要的是，若想要分泌從多順反子信息中表現的任何或全部經轉譯之蛋白質，則必須在功能上將信號肽與每個密碼區連接。在一些具體實施例中，這些信號肽彼此是不同的。

因此，在一些具體實施例中，在本文中描述用在李斯特菌屬或其他細菌中的表現卡匣是多順反子的(例如雙順反子的)。由雙順反子或多順反子表現卡匣編碼的二或多個多肽，成為分離的多肽。在一些具體實施例中，該雙順反子或多順反子表現卡匣包括基因間序列(例如得自雙順反子或多順反子之基因)，其位在兩個多肽的密碼序列之間。在一些具體實施例中，該基因間序列包括促使核糖體進入並發動轉譯的序列。在一些具體實施例中，該基因間序列包括Shine-Dalgarno序列。在一些具體實施例中，該基因間序

列是單核細胞增多性李斯特菌actA-plcB基因間序列。通常，該基因間序列係位在編碼第一個多肽之多核苷酸序列(或第一個融合蛋白，包括第一個多肽和信號肽)與編碼第二個多肽之多核苷酸序列(或第二個融合蛋白，包括第二個多肽和信號肽)之間。

因此，本發明一方面提供表現卡匣，包括下列的：(a)編碼第一個多肽的第一個多核苷酸；(b)編碼第二個多肽的多核苷酸；(c)位在第一和第二個多核苷酸之間的基因間序列；以及(d)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，其中該表現卡匣以兩個分開多肽的方式編碼第一和第二個多肽。在一些具體實施例中，該第一和第二個多核苷酸是選自任何在本文中描述之多肽(例如在上文第Ⅳ章中)的多核苷酸。在一些具體實施例中，第一和第二個多核苷酸中至少一個包括抗原。在一些具體實施例中，第一和第二個多核苷酸分別包括相同抗原的(不同或相同的)片段。在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關之抗原或衍生自與腫瘤有關之抗原。

本發明更提供包括下列的表現卡匣：(a)編碼第一個信號肽的第一個多核苷酸；(b)編碼第一個(非-信號)多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與該第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；(c)編碼第二個信號肽的第三個多核苷酸；(d)編碼第二個(非-信號)多肽的第四個多核苷酸，其中該第四個多核苷酸是與該第三個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；(e)位在第二個多核苷酸和第三個多核苷酸之間

的基因間序列；以及(f)以可操作之方式與第一個多核苷酸、第二個多核苷酸、第三個多核苷酸和第四個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括第一個信號肽和第一個多肽的第一個融合蛋白，以及包括第二個信號肽和第二個多肽的第二個融合蛋白兩者。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，將一或多個編碼信號肽的多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，將第三及/或第四個多核苷酸密碼子-最優化(最好是除了編碼信號肽之多核苷酸的密碼子-最優化作用之外)。在一些具體實施例中，該第一及/或第二個信號肽是非-secA1細菌的信號肽。在一些具體實施例中，該基因間序列是單核細胞增多性李斯特菌actA-plcB基因間序列。在一些具體實施例中，該第二和第三個多肽是選自任何在本文中(例如在上文第Ⅳ章中)描述之多肽的多肽。在一些具體實施例中，該第一和第二個多肽是選自任何在本文中(例如在上文第Ⅳ章中)描述之多肽的多肽。在一些具體實施例中，第一或第二個多肽中至少一個包括抗原。在一些具體實施例中，第一和第二個多核苷酸分別包括相同抗原的片段。在一些具體實施例中，該抗原是與腫瘤有關之抗原或衍生自與腫瘤有關之抗原。

例如，為了在李斯特菌屬中表現異種多肽，本發明提供多順反子的表現卡匣，其中該表現卡匣編碼至少兩個分離的非-李斯特菌屬多肽。在一些具體實施例中，該多順反子表現卡匣是雙順反子表現卡匣，其編碼兩個分離的非-李斯

特菌屬多肽。在一些具體實施例中，該表現卡匣包括下列的：(a)編碼第一個非-李斯特菌屬多肽的第一個多核苷酸；(b)編碼第二個非-李斯特菌屬多肽的第二個多核苷酸；(c)位在第一和第二個多核苷酸之間的基因間序列；以及(d)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因；其中該表現卡匣以兩個分離多肽之方式編碼第一和第二個多肽。若該表現卡匣是以分離多肽之方式編碼三個多肽的多順反子表現卡匣，則該表現卡匣將包括以可操作之方式與啟動基因以及位在第二和第三個多核苷酸之間的第二個基因間序列連接的第三個多核苷酸。在一些具體實施例中，至少一個非-李斯特菌屬多肽包括抗原。在一些具體實施例中，至少兩個非-李斯特菌屬多肽分別包括相同抗原的片段。

在一些具體實施例中，該表現卡匣包括下列的：(a)編碼第一個信號肽的第一個多核苷酸；(b)編碼第一個(非-信號)非-李斯特菌屬多肽的第二個多核苷酸；其中該第二個多核苷酸是與該第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；(c)編碼第二個信號肽的第三個多核苷酸；(d)編碼第二個(非-信號)非-李士得菌屬多肽的第四個多核苷酸，其中該第四個多核苷酸是與該第三個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；(e)位在第二個多核苷酸和第三個多核苷酸之間的基因間序列；以及(f)以可操作之方式與第一個多核苷酸、第二個多核苷酸、第三個多核苷酸和第四個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括第一個信號肽和第一個多肽的

第一個融合蛋白，以及包括第二個信號肽和第二個多肽的第二個融合蛋白兩者。在一些具體實施例中，至少一個非-李斯特菌屬多肽是抗原。在一些具體實施例中，至少兩個非-李斯特菌屬多肽分別是相同抗原的片段。

本發明亦提供使用在本文中描述之任何表現卡匣，產生重組細菌(例如重組的李斯特菌屬細菌)的方法。在一些具體實施例中，使用在本文中描述之表現卡匣來製造重組細菌的方法，包括將該表現卡匣導入細菌內。在一些具體實施例中，將該表現卡匣整合到細菌的基因組內。在一些其他的具體實施例中，該表現卡匣係位在被併入細菌中的質體上。在一些具體實施例中，藉著共軛作用將該表現卡匣併入細菌內。可藉著此項技藝中已知的任何標準技術，完成將表現卡匣導入細菌內的工作。例如，可藉著共軛作用、轉導作用(轉移感染)或轉化作用，將表現卡匣導入併入細菌內。

VII.載體

本發明更提供載體，如表現載體，其包括任一個在本文中描述的表現卡匣及/或重組核酸分子。在一些具體實施例中，該載體為質體。在一些具體實施例中，該載體為直線的。在一些具體實施例中，該載體為環狀的。在一些具體實施例中，該載體是整合或同種重組載體。在一些具體實施例中，該載體為pAM401。在一些具體實施例中，該載體為pPL2。在一些具體實施例中，該載體是經過分離的。

如同上文指示的，在一些具體實施例中，在本文中描述

的表現卡匣被納入表現載體內。在一些具體實施例中，該載體為質體。在其他的具體實施例中，該載體為直線的。在交替的具體實施例中，使用該表現載體將表現卡匣插入(即整合)至細菌的基因組DNA中。在一些具體實施例中，該表現載體為直線的。在其他的具體實施例中，該表現載體為環狀的。

適合用在細菌，如李斯特菌屬中之表現載體為熟諳此藝者已知的。為了組裝表現卡匣，有各種適合用來作為質體構築體主鏈的適當載體。以是否想要從細菌染色體或從染色體外之附加體中表現多核苷酸(即編碼異種抗原之多核苷酸)為基礎，來選擇特殊的質體構築體主鏈。

在一些具體實施例中，利用含有催化載體之特定序列整合到李斯特菌屬染色體內的李斯特菌噬菌體(Listeriophage)接合酶之表現卡匣的整合載體，完成將表現卡匣(及/或重組核酸分子)併入單核細胞增多性李斯特菌(李斯特菌屬)之細菌染色體內。例如，稱為pPL1和pPL2的整合載體計畫異種蛋白質表現卡匣在細菌基因組之無害區域中的穩定單一-副本整合，且已經在文獻中描述過了(Lauer等人，2002 J. Bacteriol. 184:4177-4178；美國專利公開案第20030203472號)。整合載體在大腸桿菌中穩定地成為質體，並經由共軛作用被導入想要的李斯特菌屬之主鏈內。每個載體均缺乏李斯特菌屬-特定的複製起點，並編碼噬菌體接合酶，使得該載體僅在整合到染色體的噬菌體附接位置內時是穩定的。從想要的質體構築體開始，產生表現想要蛋白質(們)

之重組李斯特菌屬品系的過程花費大約1週。pPL1和pPL2整合載體分別以U153和PSA李斯特菌噬菌體為基礎。pPL1載體整合到comK基因的開放編閱架構內，同時pPL2整合到tRNAArg基因內，以此方式，當成功整合時便恢復基因的天然序列，因此完整地保持其天然表現功能。pPL1和pPL2整合載體含有多個選殖位置序列，以便促進含有重組核酸分子或表現卡匣，如異種蛋白質表現卡匣之質體的建構。在下文實例2和實例3中描述了使用pPL2整合載體的一些特定實例。

或者，可經由熟諳此藝者已知的對偶基因交換法，將表現卡匣(及/或重組核酸分子)併入李斯特菌屬之染色體內。特定而言，其中想要不併入編碼抗生素抗藥性蛋白質之基因成為含有表現卡匣之構築體的一部分的組合物，對偶基因交換的方法是想要的。例如，pKSV7載體(Camilli等人Mol. Microbiol.(1993) 8, 143-157)，含有感溫的李斯特菌屬革蘭氏陽性複製起點，在不-許可的溫度下用它來選擇重組純種系，代表重組至李斯特菌屬之染色體內的pKSV7質體。pKSV7對偶基因交換質體載體含有多個選殖位置序列，以便使含有蛋白質表現卡匣和氯黴素抗藥性基因之質體的建構更為容易。為了插入李斯特菌屬的染色體內，表現卡匣構築體可位在大約1 kb之染色體DNA序列的側面，其相當於想要整合的精確位置。可藉著電穿透作用，根據革蘭氏陽性細菌之電穿透作用的標準方法，將pKSV7-表現卡匣質體導入想要的細菌品系內。在下文實例16中提供使用

pKSV7載體實行對偶基因交換方法的非限制性實例。

在其他的具體實施例中，可能想要從穩定的質體附加體來表現多肽(包含包括多肽之融合蛋白)。經由通過多個世代維持質體附加體，需要蛋白質的共同-表現，其賦與含有質體之細菌選擇優勢。作為非-限制性之實例，與多肽一起從質體中共同-表現的蛋白質，可以是抗生素抗藥性蛋白質，例如氯黴素，或可以是細菌蛋白質(在野外型細菌中，從染色體中表現的)，其亦可賦與選擇優勢。細菌蛋白質的非-限制性實例包括嘌呤或胺基酸生物合成所需的酵素(選擇使用缺乏相關胺基酸或其他必要前驅物大分子的限定培養基)，或表現在活體外或在活體內賦與選擇優勢之基因所需的轉錄因子(Gunn等人2001 J. Immunol. 167:6471-6479)。作為非-限制性之實例，pAM401是適合在多種革蘭氏陽性細菌屬中，選出多肽之附加體表現的質體(Wirth等人，1986 J. Bacteriol 165:831-836)。至於pAM401之典型用途的更多說明，參見下文實例3和13。

例如，可利用含有噬菌體接合酶之表現卡匣的整合載體，將表現卡匣併入炭疽桿菌的細菌染色體內，該接合酶催化載體的特定序列整合到炭疽桿菌染色體內。可使用炭疽桿菌噬菌體的接合酶和附接位置，衍生接合載體，將想要的抗原表現卡匣併入疫苗組合物內。作為非-限制性之實例，使用得自炭疽桿菌溫和噬菌體w-α的接合酶和附接位置，衍生炭疽桿菌特定的整合載體(McCloy, E.W. 1951. 對溶原芽胞桿菌品系的研究。I.對炭疽桿菌專一的噬菌體

(Studies on a lysogenic Bacillus stain. I. A bacteriophage specific for Bacillus anthracis.) J. Hyg. 49:114-125)。

或者，可經由熟諳此藝者已知的對偶基因交換方法，將抗原表現卡匣併入炭疽桿菌染色體內。參見，例如Gat等人，Infect. Immun., 71:801-13(2003)。特定而言，其中想要不併入編碼抗生素抗藥性蛋白質之基因成為含有表現卡匣之構築體的一部分的組合物，對偶基因交換的方法是想要的。例如，pKSV7載體(Camilli等人Mol. Microbiol. 1993 8, 143-157)，含有感溫的李斯特菌屬-衍生之革蘭氏陽性複製起點，在不-許可的溫度下用它來選擇重組純種系，代表重組至細菌染色體內的pKSV7質體。pKSV7對偶基因交換質體載體含有多個選殖位置序列，以便使含有表現卡匣和氯黴素抗藥性基因之質體的建構更為容易。為了插入炭疽桿菌的染色體內，表現卡匣構築體可位在大約1 kb之染色體DNA序列的側面，其相當於想要整合的精確位置。可藉著電穿透作用，根據革蘭氏陽性細菌之電穿透作用的標準方法，將pKSV7-表現卡匣質體導入想要的細菌品系內。在美國專利申請案第10/883,599號中提供了在炭疽桿菌中實行對偶基因交換之方法的非-限制性實例，全部以引用的方式併入本文中。特定而言，可在炭疽桿菌之品系中使用利用pKSV7載體的對偶基因交換，將想要的抗原表現卡匣加在細菌染色體中任何想要的地方。

上述的使用pKSV7之對偶基因交換方法可廣泛地應用在革蘭氏陽性細菌上。此外，在細菌中有用的各種表現載體，

包括重組細菌載體，為熟諳此藝者已知的。實例包括在下列文獻中描述的那些載體，分別以引用的方式全部併入本文中：Horwitz等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:13853-8(2000)；Garmory等人，J. Drug Target, 11:471-9 (2003)；Kang等人，FEMS Immunol. Med. Microbiol., 37:99-104 (2003)；Garmory等人，Vaccine, 21:3051-7(2003)；Kang等人，Infect. Immun., 1739-49(2002)；Russman等人，J. Immunol., 167:357-65(2001)；Harth等人，Microbiology, 150:2143-51(2004)；Varaldo等人，Infect. Immun., 72:3336-43(2004)；Goonetilleke等人，J. Immunol., 171:1602-9 (2003)；Uno-Furuta等人，Vaccine, 21:3149-56(2003)；Biet等人，Infect. Immun., 71:2933-7(2003)；Bao等人，Infect. Immun., 71:1656-61(2003)；Kawahara等人，Clin. Immunol., 105:326-31 (2002)；Anderson等人，Vaccine, 18:2193-202(2000)；Bumann等人，Infect. Immun., 69:7493-500 (2001)；Wang等人，Vaccine, 17:1-12(1999)；McSorley等人，Infect. Immun., 65:171-8(1997)；Gat等人，Infect. Immun., 71:801-13(2003)；美國專利第5,504,005號；美國專利第5,830,702號；美國專利第6,051,237號；美國專利公開案第2002/0025323號；美國專利公開案第2003/0202985號；WO 04/062597；美國專利第6,566,121號；以及美國專利第6,270,776號。

本發明更提供使用任何在本文中描述之表現載體，產生重組細菌(例如重組的李斯特菌屬細菌)的方法。在一些具體

實施例中，使用在本文中描述之表現卡匣來製造重組細菌的方法，包括將該表現卡匣導入細菌內。

VIII.細菌和其他宿主細胞

本發明更提供包括在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體(參見，例如上文的發明內容和實施方式的第I、II、VI和VII章，以及下文之特定實例)的宿主細胞。在一些具體實施例中，該細胞為原核生物的。在一些具體實施例中，該細胞為真核生物的。在一些具體實施例中，該細胞為哺乳動物的。在一些具體實施例中，該細胞為提供-抗原之細胞，如樹突細胞。在一些具體實施例中，該細胞為細菌的細胞。在一些具體實施例中，該宿主細胞是經過分離的。

例如，本發明提供包括在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體(參見，例如上文的發明內容和實施方式的第I、II、VI和VII章，以及下文之特定實例)的細菌。包括這些多核苷酸的細菌，在本文中可交替地稱為"重組細菌"，且包括在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體的細菌，在本文中可交替地稱為"重組細菌"。在一些具體實施例中，包括重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的細菌是經過分離的。在一些具體實施例中，包括重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的重組細菌，表現由其中所含有之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼的多肽或融合蛋白。在一些具體實施例中，該重組細菌分泌由其中所含有之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼的

多肽或融合蛋白。在一些具體實施例中，當將該細菌(或包括該細菌之組合物)投與宿主(例如人類個體)時，該重組細菌以足以在宿主中產生免疫反應的量表現並分泌多肽及/或融合蛋白。

在一些具體實施例中，該細菌選自革蘭氏陽性細菌、革蘭氏陰性細菌、細胞內細菌和分枝桿菌所組成之群。在一些具體實施例中，該細菌為革蘭氏陽性細菌。在本發明的一些具體實施例中，該細菌為細胞內細菌(例如兼性的細胞內細菌)。在一些具體實施例中，該細菌屬於李斯特菌屬。在其他的具體實施例中，該細菌是單核細胞增多性李斯特菌物種的成員。在一些其他的具體實施例中，該細菌是依氏李斯特菌(Listeria ivanovii)、斯氏李斯特菌(Listeria seeligeri)或無害李斯特菌的成員。在一些具體實施例中，該細菌是芽胞桿菌屬的成員。在另一個具體實施例中，該細菌是炭疽桿菌。在另一個具體實施例中，該細菌是鼠疫耶爾森氏菌。在本發明其他的具體實施例中，該細菌是鼠傷寒沙門氏桿菌。在一些具體實施例中，該細菌屬於志賀桿菌屬。例如，在一些具體實施例中，該細菌是副痢疾志賀桿菌。在一些具體實施例中，該細菌是布氏桿菌屬的成員。在交替的具體實施例中，該細菌是分枝桿菌屬。分枝桿菌可視需要為結核桿菌物種的成員。在一些具體實施例中，該細菌為卡介苗(BCG)。在一些具體實施例中，該細菌為大腸桿菌，例如已經修改以便表現李斯特菌溶解素O(LLO)的大腸桿菌。因此，在一些具體實施例中，包括在

本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體的細菌係選自李斯特菌屬、炭疽桿菌、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬和分枝桿菌屬所組成之群。在一些其他的具體實施例中，包括在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體的細菌係選自李斯特菌屬、炭疽桿菌、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬、布氏桿菌屬、分枝桿菌屬和大腸桿菌所組成之群。

在一些具體實施例中，經由插入在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體(例如，參見上文的發明內容和實施方式的第I、II、VI和VII章，以及下文之特定實例)而加以修改，以便表現多肽，且在至少一些具體實施例中，分泌多肽的細菌，是野外型的李斯特菌屬細菌，如單核細胞增多性李斯特菌細菌，其包括重組核酸分子、表現卡匣及/或載體。然而，在本發明的一些具體實施例中，包括表現卡匣及/或載體的細菌是細菌的突變品系。在一些具體實施例中，該細菌是減毒的。在一些具體實施例中，該細菌是細菌的減毒突變品系。在本文中將其中已經刪除基因"xyz"之突變種稱為Δxyz或xyz^-或xyz刪除突變種。例如，在本文中將其中已經刪除uvrA基因的細菌品系交替地稱為uvrA突變種、ΔuvrA或$uvrA^-$。此外，熟諳此藝者亦了解當以"xyz"突變種或"xyz"品系提及特殊的突變種或品系時，有時將意指其中已經刪除xyz基因的突變種或品系。

在包括表現卡匣及/或表現載體之突變種細菌中的突變，可以是任何類型的突變。例如，該突變可為點突變、

移碼突變、插入、部分或全部基因的刪除。此外，在經過修改之品系的一些具體實施例中，已經利用異種多核苷酸置換部分的細菌基因組。在一些具體實施例中，該突變士天然存在的。在其他的具體實施例中，該突變是人為突變壓力的結果。在另外的具體實施例中，在細菌基因組中的突變是遺傳工程的結果。

在一些具體實施例中，為了細胞-對-細胞傳播、進入非-吞噬細胞內或增殖(相對於野外型細菌)，將包括在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體的細菌減毒。可藉著突變或藉著其他的修改，將細菌減毒。在一些具體實施例中，為了細胞-對-細胞傳播(例如單核細胞增多性李斯特菌actA突變種)，將包括任一個在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的細菌減毒。在一些具體實施例中，為了進入非-吞噬細胞內(例如單核細胞增多性李斯特菌表面蛋白(internalin)突變種，如inlB刪除突變種)，將包括任一個在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的細菌減毒。在一些具體實施例中，為了增殖，將包括任一個在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的細菌減毒。在一些具體實施例中，為了細胞-對-細胞傳播並為了進入非-吞噬細胞內，將細菌減毒。

在一些具體實施例中，為了細胞-對-細胞傳播，將包括在本文中描述之表現卡匣及/或表現載體的細菌減毒。在一些具體實施例中，該細菌是在ActA方面有缺陷的(相對於未-突變種或野外型細菌)或其相等物(視生物而定)。在一些具

體實施例中，該細菌在actA中包括一或多個突變。例如，細菌(例如李斯特菌屬)可以是actA刪除突變種。ActA是由actA基因編碼的肌動蛋白聚合酶(Kocks等人，Cell, 68:521-531(1992)；Genbank登錄編號AL591974，核苷酸9456-11389)。肌動蛋白聚合酶蛋白質涉及宿主F-肌動蛋白在李斯特菌屬細菌之一極點的招募和聚合作用。肌動蛋白的後續聚合和溶解作用，導致李斯特菌屬通過細胞溶質推進，並進入鄰近的細胞內。該移動性使細菌能夠直接從細胞-至-細胞傳播，但不會進一步暴露在細胞外的環境，因此逃脫了宿主的防禦，如抗體發展。在一些具體實施例中，減毒的李斯特菌屬可視需要包括在表面蛋白基因，如inlB，以及在actA兩者中的突變。為了進入非-吞噬細胞內，以及為了細胞-對-細胞傳播，將本發明之該具體實施例的李斯特菌屬品系減毒。

在一些具體實施例中，相對於無減毒突變之細菌(例如野外型細菌)，減毒細菌之細胞-對-細胞傳播的能力降低了至少大約10%、至少大約25%、至少大約50%、至少大約75%或至少大約90%。在一些具體實施例中，相對於無減毒突變之細菌，減毒細菌之細胞-對-細胞傳播的能力降低了至少大約25%。在一些具體實施例中，相對於無減毒突變之細菌，減毒細菌之細胞-對-細胞傳播的能力降低了至少大約50%。

判定是否為了細胞-對-細胞傳播而將細菌，如李斯特菌屬細菌減毒的活體外測定，為熟諳此藝者已知的。例如，

可測量在感染選擇培養之細胞單層之後一段時間所形成的溶菌斑之直徑。可按照先前在Sun, A., A. Camilli和D.A. Portnoy. 1990, 單核細胞增多性李斯特菌小-溶菌斑突變種的分離，對於細胞內生長和細胞-對-細胞傳播是有缺陷的(Isolation of 單核增多性李斯特菌 small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread.) Infect. Immun. 58:3770-3778的描述，按照由Skoble, J., D.A. Portnoy 和M.D. Welch. 2000, 在ActA內的三個區域促進Arp2/3複合物-調解之肌動蛋白的成核現象和單核細胞增多性李斯特菌之移動性(Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and 單核增多性李斯特菌 motility.) J. Cell Biol. 150:527-538的描述修改測量方法，來進行在L2細胞單層內的溶菌斑測定。簡言之，使L2細胞在6-孔組織培養皿上生長至匯合，然後以細菌感染1小時。在感染之後，以加溫至40℃的培養基覆蓋細胞，其包括含有0.8%瓊脂、胎牛血清(例如2%)和想要濃度之健大黴素的DME。在培養基中的健大黴素濃度戲劇化地影響溶菌斑尺寸，並為選出之李士德桿菌品系影響細胞-對-細胞傳播之能力的測量(Glomski, I. J., M. M. Gedde, A.W. Tsang, J.A. Swanson 和 D. A. Portnoy. 2002, J. Cell Biol. 156:1029-1038)。例如，在感染單層之後3天，當以含有濃度50微克/毫升之健大黴素的培養基覆蓋時，與野外型李斯特菌屬相比較，具有細胞-對-細胞傳播缺陷之表現型的李斯特菌屬品系之溶菌斑尺寸減少至少50%。另一方面，當以

培養基+僅含5微克/毫升健大黴素之瓊脂糖覆蓋被感染的單層時，在具有細胞-對-細胞傳播缺陷之表現型的李斯特菌屬品系與野外型李斯特菌屬之間的溶菌斑尺寸是類似的。因此，可藉著改變健大黴素在含有瓊脂糖之培養基中的濃度，判定所選出之品系，相對於野外型李斯特菌屬，在被感染細胞單層中影響細胞-對-細胞傳播的相對能力。可視需要藉著在感染之後48小時，加入含有中性紅(GIBCO BRL；以DME+瓊脂糖培養基稀釋1:250)的培養基，使溶菌斑直徑的顯色和測量更容易。此外，可在衍生自其他原始細胞或連續細胞的單層中，進行溶菌斑測定。例如，可使用HepG2細胞，一種肝細胞-衍生之細胞株，或原始人類肝細胞，與野外型李斯特菌屬相比較，評估選出之李斯特菌屬突變種影響細胞-對-細胞傳播的能力。在一些具體實施例中，包括減弱李斯特菌屬之細胞-對-細胞傳播的突變或其他修改的李斯特菌屬，在高濃度的健大黴素(大約50微克/毫升)下，產生"針尖"溶菌斑。

在一些具體實施例中，包括在本文中描述之表現卡匣及/或表現載體的細菌是減弱核酸修補的突變種細菌(相對於野外型，如沒有減弱遺傳突變的細菌)。例如，在一些具體實施例中，細菌在至少一個DNA修補酵素上是有缺陷的(例如單核細胞增多性李斯特菌uvrAB突變種)。在一些具體實施例中，該細菌在PhrB、UvrA、UvrB、UvrC、UvrD及/或RecA，或它們相等物之一上是有缺陷的(視細菌之屬和種而定)。在一些具體實施例中，該細菌在UvrA、UvrB及/或UvrC

上是有缺陷的。在一些具體實施例中，該細菌在phrB、uvrA、uvrB、uvrC、uvrD及/或recA基因中包括減毒突變。在一些具體實施例中，該細菌在uvrA、uvrB及/或uvrC基因中包括一或多個突變。在一些具體實施例中，該細菌刪除了UvrA、UvrB及/或UvrC功能。在一些具體實施例中，該細菌刪除了有功能的UvrA和UvrB。在一些具體實施例中，該細菌為uvrAB刪除突變種。在一些具體實施例中，該細菌為ΔuvrABΔactA突變種。在一些具體實施例中，藉著與以核酸為標的化合物(參見下文)反應，修改減弱核酸修補及/或在至少一個DNA修補酵素上有缺陷之細菌的核酸。在美國專利公開案第2004/0197343號中詳細描述了核酸修補突變種，如ΔuvrAB單核細胞增多性李斯特菌突變種，以及製造該突變種的方法(參見，例如美國專利公開案第2004/0197343號的實例7)。

在一些具體實施例中，相對於無減毒突變的細菌(例如野外型細菌)，減毒細菌之核酸修補的能力降低至少大約10%、至少大約25%、至少大約50%、至少大約75%或至少大約90%。在一些具體實施例中，相對於無減毒突變的細菌，減毒細菌之核酸修補的能力降低至少大約25%。在一些具體實施例中，相對於無減毒突變的細菌，減毒細菌之核酸修補的能力降低至少大約50%。

可經由熟諳此藝者已知的各種方法，證實出現在細菌品系中的特殊突變。例如，可選殖並定序該品系之基因組的相關部分。或者，可經由PCR，使用編碼與該刪除或其他

突變相鄰之區域的成對引子，來確認特定突變。亦可使用南方墨點法，檢測在細菌基因組中的改變。亦可使用此項技藝的標準技術，如西方墨點法，分析是否由該品系表現特殊的蛋白質。亦可經由比較該品系之表現型與先前報告的表現型，證實該品系在想要基因中含有突變。例如，可使用測試細菌使用核苷酸切除修補(NER)機制修補其核酸之能力的測定，並與野外型細菌比較該能力，評估核苷酸切除修補突變，如uvrAB刪除的存在。這類功能測定為此項技藝中已知的。例如，可測量環丁烷二聚體切除或UV-誘導(6-4)產物的切除，判定在突變種中在NER酵素上的缺陷(參見，例如Franklin等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3821-3824(1984))。或者，可進行存活測定，評估在核酸修補中的缺陷。例如，可使該細菌經歷補骨脂素/UVA處理，然後與野外型相比較，評估其增殖及/或存活的能力。

在一些具體實施例中，為了進入非-吞噬細胞內，將該細菌減毒(相對於非-突變種或野外型細菌)。在一些具體實施例中，細菌(例如李斯特菌屬)在一或多個表面蛋白(或相等物)上是有缺陷的。在一些具體實施例中，該細菌在表面蛋白A上是有缺陷的。在一些具體實施例中，該細菌在表面蛋白B上是有缺陷的。在一些具體實施例中，該細菌在inlA中包括突變。在一些具體實施例中，該細菌在inlB中包括突變。在一些具體實施例中，該細菌在actA和inlB兩者中包括突變。在一些具體實施例中，該細菌刪除了有功能的ActA和表面蛋白B。在一些具體實施例中，該細菌是ΔactAΔinlB

雙重刪除突變種。在一些具體實施例中，該細菌在ActA和表面蛋白B兩者上是有缺陷的。

在一些具體實施例中，相對於無減毒突變的細菌(例如野外型細菌)，減毒細菌之進入非-吞噬細胞內的能力降低至少大約10%、至少大約25%、至少大約50%、至少大約75%或至少大約90%。在一些具體實施例中，相對於無減毒突變的細菌，減毒細菌之進入非-吞噬細胞內的能力降低至少大約25%。在一些具體實施例中，相對於無減毒突變的細菌，減毒細菌之進入非-吞噬細胞內的能力降低至少大約50%。在一些具體實施例中，相對於無減毒突變的細菌，減毒細菌之進入非-吞噬細胞內的能力降低至少大約75%。

在一些具體實施例中，該減毒細菌，如李斯特菌屬品系，不是為了進入一種以上類型的非-吞噬細胞內而減毒。例如，可為了進入肝細胞內而將減毒品系減毒，但不為了進入上皮細胞內而減毒。舉另一個例子來說，可為了進入上皮細胞而將減毒品系減毒，但不是肝細胞。亦了解為了進入非-吞噬細胞內將特別修改的細菌減毒，是使經過設計之基因突變的結果，例如刪除突變，編碼侵入蛋白(invasin)蛋白質，其與特殊細胞受體反應，並成為有助於感染非-吞噬細胞的結果。例如，為了進入表現肝細胞生長因子受體(c-met)的非-吞噬細胞，包括肝細胞株(例如HepG2)和原始人類肝細胞內，將李斯特菌屬ΔinlB突變種品系減毒。

在一些具體實施例中，雖然為了進入非-吞噬細胞內而將細菌(例如突變種李斯特菌屬)減毒，但李斯特菌屬仍能夠被

吞噬細胞攝入，如至少有樹突細胞及/或巨噬細胞。在一個具體實施例中，並未藉著對該品系進行修改，如侵入蛋白之修改，而減少減毒細菌進入吞噬細胞內的能力(即在修改後仍測量到大約95%或更高之該品系被吞噬細胞攝取的能力)。在其他的具體實施例中，減毒細菌進入吞噬細胞之能力的減少，不超過大約10%、不超過大約25%、不超過大約50%或不超過大約75%。

在本發明的一些具體實施例中，在細菌(例如李斯特菌屬細菌)進入非-吞噬細胞內之能力上減弱的量，範圍從2倍降低到相當大的減毒程度。在一些具體實施例中，細菌進入非-吞噬細胞內之能力上的減弱，為至少大約0.3對數、大約1對數、大約2對數、大約3對數、大約4對數、大約5對數或至少大約6對數。在一些具體實施例中，減弱是在大約0.3至>8對數、大約2至>8對數、大約4至>8對數、大約6至>8對數、大約0.3-8對數、還有大約0.3-7對數、還有大約0.3-6對數、還有大約0.3-5對數、還有大約0.3-4對數、還有大約0.3-3對數、還有大約0.3-2對數、還有大約0.3-1對數的範圍內。在一些具體實施例中，減弱是在大約1至>8對數、1-7對數、1-6對數、還有大約2-6對數、還有大約2-5對數、還有大約3-5對數的範圍內。

已經在單核細胞增多性李斯特菌中確認許多表面蛋白(Boland等人，Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14:584-640)。這些表面蛋白包括但不限於InlA、InlB、InlC、InlC2、InlD、InlE、InlF、InlG和InlH(Dramsi等人，Infection

and Immunity, 65:1615-1625(1997)；Raffelsbauer等人，Mol. Gen. Genet. 260:144-158(1988))。先前已經報告了編碼這些蛋白質的基因序列。例如，已經在Gaillard等人，Cell, 65:1127-1141(1991)中報告了inlA和inlB兩者的序列，並如同GenBank登錄編號M67471。在Glaser等人，Science, 294:849-852(2001)之附錄Web材料的Web表2中確認了編碼表面蛋白-相關蛋白質家族之其他成員的基因，(www.sciencemag.org/cgi/content/full/294/5543/849/DC1)，包括lmo0327、lmo0331、lmo0514、lmo0610、lmo0732、lmo1136、lmo1289、lmo2396、lmo0171、lmo0333、lmo0801、lmo1290、lmo2026和lmo2821。(可在單核細胞增多性李斯特菌品系EGD基因組，GenBank登錄編號AL 591814及/或單核細胞增多性李斯特菌品系EGD-e基因組、GenBank登錄編號NC_003210中找到表面蛋白-相關蛋白質家族之每個成員的序列。在Glaser等人中指示各種表面蛋白-相關基因的位置)。

InlA(表面蛋白A)(Gaillard等人，Cell, 65:1127-1141(1991)；Genbank登錄編號NC_003210)指揮李斯特菌屬被上皮細胞攝入，如小腸的那些。

InlB(表面蛋白B)(Gaillard等人，Cell, 65:1127-1141(1991)；Genbank登錄編號AL591975(單核細胞增多性李斯特菌品系EGD，完全的基因組，斷片3/12，inlB基因區：核苷酸97008-98963)；以及Genbank登錄編號NC_003210(單核細胞增多性李斯特菌EGD，完全的基因組，inlB基因區：核

苷酸457008-458963)，分別以引用的方式全部併入本文中)，指揮李斯特菌屬被肝細胞或被內皮細胞攝入，如腦微血管系統(microvasculature)的血管內皮細胞，其包括血腦障礙。(關於表面蛋白B的更多說明，參見Ireton等人，J. of Biological Chemistry, 274:17025-17032(1999)；Dramsi等人，Molecular Microbiology 16:251-261(1995)；Mansell等人，J. of Biological Chemistry, 276:43597-43603(2001)；以及Bierne等人，J. of Cell Science 115:3357-3367(2002)，全部以引用的方式併入本文中)。

在一些具體實施例中，該細菌在ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者方面是有缺陷的。在一些具體實施例中，該細菌刪除了有功能的ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者。在一些具體實施例中，該細菌刪除了有功能的ActA。在一些具體實施例中，該細菌刪除了有功能的表面蛋白B。在一些具體實施例中，該細菌刪除了有功能的ActA和表面蛋白B。

判定是否為了進入非-吞噬細胞內而將細菌(例如突變種李斯特菌屬品系)減毒的活體外測定，為熟諳此藝者已知的。例如，Dramsi等人，Molecular Microbiology 16:251-261(1995)和Gaillard等人，Cell 65:1127-1141(1991)兩者描述了篩選突變種單核細胞增多性李斯特菌進入某些細胞株之能力的測定。例如，欲判定是否為了進入特殊類型之非-吞噬細胞內而將帶有特殊修改之李斯特菌屬細菌減毒，判定減毒之李斯特菌屬細菌進入該特殊類型之非-吞

噬細胞內的能力，並與無修改之相同李斯特菌屬細菌進入非-吞噬細胞內的能力相比較。同樣地，欲判定是否為了進入特殊類型之非-吞噬細胞內而將帶有特殊突變之李斯特菌屬品系減毒，判定突變種李斯特菌屬品系進入該特殊類型之非-吞噬細胞內的能力，並與無突變之李斯特菌屬品系進入非-吞噬細胞內的能力相比較。此外，亦經由比較該品系之表現型與先前報告之表面蛋白B突變種的表現型，證實該品系在表面蛋白B方面是有缺陷的。

在一些具體實施例中，可自李斯特菌屬對宿主之生物學影響的觀點，來測量細菌的減毒。可藉著測量在老鼠或其他脊椎動物中的LD_{50}，來評估細菌品系的致病性。LD_{50}是注射至脊椎動物中必然引起50%脊椎動物死亡之李斯特菌屬的用量或劑量。可比較具有特殊修改(例如突變)之細菌對無該特殊修改之細菌的LD_{50}值，作為減毒程度的測量值。例如，若無特殊突變之細菌品系具有10^3個細菌的LD_{50}，而有特殊突變之細菌品系具有10^5個細菌的LD_{50}，則該品系已經被減毒，使得LD_{50}增加100倍或2對數。

或者，可在活體外更直接地評估細菌(例如李斯特菌屬細菌)感染非-吞噬細胞之能力的減毒程度。例如，可比較經過修改之李斯特菌屬細菌感染非-吞噬細胞，如肝細胞的能力，與未-經修改之李斯特菌屬或野外型李斯特菌屬感染吞噬細胞的能力。在這樣的測定中，通常在活體外將經過修改和未-經修改的李斯特菌屬加至非-吞噬細胞中，一段有限的時間(例如1小時)，然後以含有健大黴素的溶液沖洗細

胞，殺死任何細胞外的細菌，並將細胞溶解，然後平鋪來評估力價。在美國專利公開案第2004/0228877號中找到這類測定的實例。

舉例來說，亦可藉著其他的生物學影響，定量地測量減毒程度，如組織病理學或血清肝酵素含量的大小。在臨床實驗室，判定以李斯特菌屬(或其他細菌)注射之老鼠血清中的丙胺酸轉胺酶(ALT)、天冬胺酸轉胺酶(AST)、白蛋白和膽紅素含量。比較在老鼠或其他脊椎動物中，可能由有與無特殊修改/突變之李斯特菌屬造成的這些影響，成為評估李斯特菌屬之減毒的方法。亦可藉著組織病理學，測量李斯特菌屬的減毒。藉著比較在注射突變種對非-突變種李斯特菌屬之脊椎動物中的這些值，可從被感染之脊椎動物的各種組織，如肝臟、脾臟和神經系統中回收之李斯特菌屬的數量，亦可用來作為減毒的程度。例如，藉著比較在注射突變種對非-突變種李斯特菌屬之老鼠中的這些值，可使用按時間之函數，從被感染組織，如肝臟或脾臟中回收之李斯特菌屬的數量作為減毒之測量。

因此，可從在老鼠中已知被野外型李斯特菌屬瞄準之特別選出的器官中之細菌負荷的觀點，測量李斯特菌屬的減毒。例如，可藉著由於將肝臟或脾臟勻漿(在H_2O+0.2%NP40中均質化)之稀釋液平鋪在BHI瓊脂培養基上的菌落計數(菌落形成單位；CFU)，測量李斯特菌屬的減毒。例如，可在經由任何路徑，包括靜脈內、腹腔內、肌肉內和皮下，投與經過修改的李斯特菌屬之後一段時間，測量肝臟或脾

臟的cfu。此外，亦可按照說明，在投藥之後一段時間，藉著競爭性指標測定，測量在肝臟或脾臟(或任何其他選擇之器官)中的李斯特菌屬，並與藥物-抗藥性、野外型李斯特菌屬(或任何其他選擇之李斯特菌屬品系)相比較。

在減毒細菌被非-吞噬細胞攝入上的減弱程度，不必是絕對減毒，以便提供安全且有效的疫苗。在一些具體實施例中，減毒的程度是提供毒性的降低，其足以預防或降低毒性症狀至無生命威脅的程度。

在本發明的一些具體實施例中，包括在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的細菌，是李斯特菌屬的突變種品系。在更進一步的具體實施例中，該細菌是單核細胞增多性李斯特菌的減毒突變種品系。在美國專利公開案第60/446,051號(2003年2月6日申請)、60/449,153號(2003年2月21日申請)、60/511,719號(2003年10月15日)、60/511,919號(2003年10月15日申請)、60/511,869號(2003年10月15日申請)、60/541,515號(2004年2月2日申請)和10/883,599號(2004年6月30日)，以及在美國專利公開案第2004/0197343和2004/0228877號中描述了減毒之李斯特菌屬的各種代表性突變種品系，分別以引用的方式全部併入本文中。亦在2004年7月23日申請之國際專利申請案第PCT/US2004/23881中描述了李斯特菌屬的突變種品系，以引用之方式全部併入本文中。例如，包括表現卡匣及/或載體的細菌可視需要為單核細胞增多性李斯特菌的突變種品系，其在ActA或表面蛋白B，或ActA和表面蛋白B兩者上是

有缺陷的。在一些具體實施例中，該細菌是單核細胞增多性李斯特菌的突變種品系，其為actA⁻(例如DP-L4029(在Skoble等人，J. of Cell Biology, 150:527-537 (2000)中描述的DP-L3078品系，以引用的方式全部併入本文中，如同在(Lauer等人，J. Bacteriol. 184:4177(2002)；美國專利公開案第2003/0203472號)中的描述，已經革除其原噬菌體)、actA⁻inlB⁻(例如DP-L4029inlB，在為了專利程序之國際認可之微生物存放的布達佩斯條約的規定下，於2003年10月3日存放在美國典型培養物收集中心(ATCC)，10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, United States of America，並以登錄編號PTA-5562命名之)、actA⁻uvrAB⁻(例如DP-L4029uvrAB，在為了專利程序之國際認可之微生物存放的布達佩斯條約的規定下，於2003年10月3日存放在美國典型培養物收集中心(ATCC)，10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, United States of America，以登錄編號PTA-5563命名之)，或actA⁻inlB⁻uvrAB⁻。在一些具體實施例中，減毒的李斯特菌屬細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌)是ΔactAΔinlB雙重刪除突變種。

可經由傳統的致突變方法完成細菌的突變作用，如致突變之化學物質或輻射，接著選擇突變種。亦可藉著熟諳此藝者經由重組DNA技術，完成細菌的突變作用。例如，在Camilli等人，Molecular Micro. 8:143-157(1993)中描述之使用pKSV7載體的對偶基因交換法，以及上述關於將異種表

現卡匣導入細菌基因組內的方法，適合用來產製突變種，包括刪除突變種。(將Camilli等人(1993)以引用的方式全部併入本文中)。在下文實例24中提供使用pKSV7載體產生單核細胞增多性李斯特菌表面蛋白B突變種的代表性實例。或者，亦可使用在Biswas等人，J. Bacteriol. 175:3628-3635(1993)中描述的基因置換草案。其他類似的方法為熟諳此藝者已知的。

在美國專利申請案第10/883,599號、美國專利公開案第2004/0197343號和美國專利公開案第2004/0228877號中描述了各種細菌突變種的建構，分別以引用的方式全部併入本文中。

在本發明的一些具體實施例中，包括重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的細菌是炭疽桿菌。在一些具體實施例中，該細菌是史特內(Sterne)品系。在一些具體實施例中，該細菌是安姆斯(Ames)品系。在一些具體實施例中，該炭疽桿菌是uvrAB突變種。在一些具體實施例中，該炭疽桿菌是uvrC突變種。在一些具體實施例中，該炭疽桿菌是recA突變種。在一些具體實施例中，該細菌是炭疽桿菌之ΔuvrAB突變種(例如炭疽桿菌史特內ΔuvrAB突變種，在為了專利程序之國際認可之微生物存放的布達佩斯條約的規定下，於2004年2月20日存放在美國典型培養物收集中心(ATCC)，108011 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, United States of America，以登錄編號PTA-5825命名之)。

改變炭疽桿菌之基因組的方法為熟諳此藝者已知的。在炭疽桿菌中產生突變的一種方法，是藉著對偶基因交換，使用熟諳此藝者已知的對偶基因交換載體。代表性的對偶基因交換質體是在Camilli等人，Molecular Microbiology, 8:143-147(1993)中描述的pKSV7。在產製突變種炭疽桿菌中的第一個步驟，以PCR-擴大欲刪除或另行突變的基因組區域，以及在炭疽桿菌基因組之上游和下游兩者大約1000個鹼基對，然後選殖到pKSV7質體載體(或類似的載體)內。(可以出現在pKSV7對偶基因交換質體載體中的李斯特菌屬ts複製子，取代芽胞桿菌屬-特定的或炭疽桿菌-特定的溫度(ts)複製子)。可使用在欲刪除或突變之區域中的核酸限制內切酶認知位置，刪除在該區域中標靶基因的想要部分。或者，可移除在該區域內的部分標靶基因，並以含有想要突變或其他改變的序列置換。例如，可使用限制酵素或限制酵素與合成基因序列的組合，在選殖到對偶基因交換質體內之前或之後，改變被擴大的炭疽桿菌基因組織區域。在一些具體實施例中，可將該序列改變成PCR擴大區，然後選殖到pKSV7內。在交替的具體實施例中，首先將擴大區插入其他的質體內，然後改變、切開，並插入pKSV7內。或者，將PCR擴大區直接插入pKSV7質體內，然後使用便利的限制酵素改變之。然後將含有已經改變之序列的pKSV7質體導入炭疽桿菌內。這可經由電穿透作用進行。然後在氯黴素的存在下，在許可的溫度下在培養基上選擇細菌。接著藉著在氯黴素的存在下使多個世代在不-許可的

溫度下繼代，針對單一交叉整合到細菌染色體內來進行選擇。最後，在許可的溫度下，在不含抗生素的培養基中，使菌落通過多個世代，達成質體刪除和矯正(雙重交叉)。美國臨時申請案第60/584,886號和60/599,522號，以及美國專利公開案第2004/0197343號，以引用的方式全部併入本文中，提供關於不同類型之炭疽桿菌突變種之建構的額外說明。

在本發明的一些具體實施例中，包括重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的細菌是已經修改而使該細菌在增殖方面減毒的細菌(相對於未-經修改之細菌)。較佳的是，該經過修改的細菌不管修改，仍維持足夠程度的基因表現。例如，在一些具體實施例中，基因表現的程度實質上不受修改的影響，而得以在將表現抗原之細菌投與宿主時，以足以刺激對該抗原之免疫反應的程度來表現抗原。在一些具體實施例中，已經藉著與以核酸為標的化合物反應來修改細菌的核酸。在一些具體實施例中，已經藉著與以核酸為標的化合物(其直接與核酸反應)反應來修改經過修改之細菌的核酸，而得以減弱細菌的增殖。在一些具體實施例中，瞄準核酸的化合物是核酸烷化劑，如β-丙胺酸、N-(吖啶-9-基)、2-[雙(2-氯乙基)胺基]乙酯。在一些具體實施例中，藉著輻射，如UVA輻射激活以核酸為標的化合物。在一些具體實施例中，已經利用補骨脂素處理細菌。例如，在一些具體實施例中，已經藉著以補骨脂素，如4'-(4-胺基-2-噁)丁基-4,5',8-三甲基補骨脂素("S-59")和UVA光處理來

修改細菌。在一些具體實施例中，已經藉著以補骨脂素化合物和UVA輻射處理來修改細菌的核酸。在下列的美國專利申請案或公開案中描述了使用以核酸為標的化合物，修改細菌以便減弱其增殖之方法的說明，分別以引用的方式全部併入本文中：第60/446,051號(2003年2月6日申請)、第60/449,153號(2003年2月21日申請)、第60/490,089號(2003年7月24日申請)、第60/511,869號(2003年10月15日申請)、第60/541,515號(2004年2月2日申請)、第10/883,599號(2004年6月30日申請)和US 2004/0197343。亦在2004年7月23日申請之國際申請案第PCT/US 2004/23881號中描述了經過修改的細菌及其用途，以引用的方式全部併入本文中。

例如，關於ΔactAΔuvrAB單核細胞增多性李斯特菌的處理，在一些具體實施例中，可在(大約)OD_{600}=0.5之對數-期培養物中加入S-59補骨脂素至200 nM，接著以6焦耳/平方公尺之UVA光使其失活，此時培養物達到1之光密度。藉著改變S-59之濃度、UVA劑量、在UVA處理之前的S-59暴露時間，以及在李斯特菌屬actA/uvrAB品系之細菌生長期間改變處理時間，使失活條件發揮最大效用。使用親代的李斯特菌屬品系作為對照組。藉著細菌不能在BHI(腦心浸液)瓊脂盤上形成菌落，判定李斯特菌屬的失活(對數-殺傷(log-kill))。此外，使用^{35}S-脈衝-追逐實驗，證實異種蛋白質和S-59/UVA失活之李斯特菌屬的毒力因子，如LLO和p60的表現，判定新表現之蛋白質在S-59/UVA失活作用之後的合成及分泌。可使用^{35}S-代謝標示，例行地判定LLO和p60

的表現。在^{35}S-甲硫胺酸的存在下，可將S-59/UVA失活之李斯特菌屬actA/uvrAB培養1小時。可判定整個細胞之溶胞產物和細菌培養液之TCA沉澱兩者的抗原表現和異種蛋白質，內源LLO和p60的分泌。可使用LLO-、p60-和異種蛋白質-專一之單株抗體進行免疫沉澱，證實在失活之後，來自重組李斯特菌屬的連續表現和分泌。

在一些具體實施例中，在增殖方面被減毒之細菌，亦可針對核酸修補及/或與至少一個DNA修補酵素有關之缺陷將其減毒。例如，在一些具體實施例中，其中已經藉著以核酸為標的化合物，如補骨脂素(與UVA處理併用)來修改核酸的細菌是uvrAB刪除突變種。

在一些具體實施例中，減弱細菌的增殖至少大約0.3對數，還有至少大約1對數、大約2對數、大約3對數、大約4對數、大約6對數，或至少大約8對數。在其他的具體實施例中，減弱細菌的增殖至少大約0.3至>10對數、大約2至>10對數、大約4至>10對數、大約6至>10對數、大約0.3-8對數、大約0.3-6對數、大約0.3-5對數、大約1-5對數或大約2-5對數。在一些具體實施例中，由該細菌表現之抗原，是由其中未修改細菌核酸之細菌表現之抗原的至少大約10%、大約25%、大約50%、大約75%或至少大約90%。

在一些具體實施例中，該細菌的核酸尚未被與以核酸為標的化合物反應修改。在一些具體實施例中，重組細菌尚未在增殖方面被減毒。在一些具體實施例中，重組細菌並未在其核酸修補的能力上被減毒。在一些具體實施例中，

重組核酸在至少一個DNA修補酵素方面並沒有缺陷。

在一些具體實施例中，由在重組細菌中所含有之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體中的第一個多核苷酸編碼的信號肽，對該重組細菌而言是天然的。在一些具體實施例中，為了在重組細菌中表現，已經將編碼對於該重組細菌而言為天然的信號肽之多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，已經將該多核苷酸完全密碼子-最優化。在一些具體實施例中，由在重組細菌中所含有之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的第一個多核苷酸編碼的信號肽，對於宿主重組細菌而言是外來的。在一些具體實施例中，為了在重組細菌中表現，已經將編碼對於該重組細菌而言為外來的信號肽之多核苷酸密碼子-最優化。

在一些具體實施例中，為了在重組細菌中表現，已經將在該重組細菌中所含有之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了在重組細菌中表現，已經將第二個多核苷酸完全密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了在重組細菌中表現，已經將在該重組細菌中的第一和第二個多核苷酸兩者密碼子最優化。在一些具體實施例中，為了在重組細菌中表現，已經將在該重組細菌中的第一和第二個多核苷酸兩者完全密碼子最優化。

本發明一方面提供包括表現卡匣的細菌，其中該表現卡匣包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；(b)編碼多肽

的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括信號肽和多肽的融合蛋白。如同在本文中描述的，例如在第III章中，在一些具體實施例中，其所編碼之信號肽係衍生自細菌。在一些具體實施例中，由表現卡匣編碼之細菌信號肽係衍生自與包括該表現卡匣之細菌相同屬及/或種的細菌。在一些具體實施例中，該信號肽對宿主重組細菌而言是天然的。在其他的具體實施例中，由表現卡匣編碼之細菌信號肽係衍生自與包括該表現卡匣之細菌不同屬及/或種的細菌。在一些具體實施例中，該信號肽對宿主重組細菌而言是外來的。在一些具體實施例中，該信號肽是secA1、secA2或Tat信號肽。在一些具體實施例中，由第二個多核苷酸編碼之多肽對細菌而言是異種的(即外來的)。

另一方面，本發明提供包括重組核酸分子的細菌，包括(a)編碼對該細菌而言為天然的信號肽之第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，該細菌是細胞內的細菌。在一些具體實施例中，該重組核酸分子是表現卡匣的一部分，其更進一步包括以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該細菌係選自李斯特菌

屬、芽胞桿菌屬、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬、布氏桿菌屬、分枝桿菌和大腸桿菌所組成之群。在一些具體實施例中，該細菌為李斯特菌屬(例如單核細胞增多性李斯特菌)。

另一方面，本發明提供包括重組核酸分子的重組李斯特菌屬細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌)，其中該重組核酸分子包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，該重組核酸分子是表現卡匣的一部分，其更進一步包括以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬細菌中表現，將該第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對李斯特菌屬細菌而言是外來的(即對李斯特菌屬細菌是異種的)。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬細菌是減毒的。例如，為了細胞-對-細胞傳播、進入非-吞噬細胞內或增殖，可將該李斯特菌屬減毒。在一些具體實施例中，該重組李斯特菌屬細菌在ActA、表面蛋白B，或ActA和表面蛋白B兩者上是有缺陷的(例如ΔactAΔinlB雙重刪除突變種)。在一些具體實施例中，已經藉著與以核酸為標的化合物(例如補骨脂素化合物)反應，修改該重組細菌的核酸。

另一方面，本發明提供包括重組核酸分子之細菌，其中該重組核酸分子包括編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸，以及編碼多肽(例如抗原)的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，且其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽是與信號肽異種的。在一些具體實施例中，該重組核酸分子是表現卡匣的一部分，其更進一步包括以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該細菌為選自李斯特菌屬、芽胞桿菌屬、鼠疫耶爾森氏菌、沙門氏桿菌屬、志賀桿菌屬、布氏桿菌屬、分枝桿菌和大腸桿菌所組成之群的細菌。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽對該細菌而言是外來的(即對該細菌而言是異種的)。

另一方面，本發明提供包括表現卡匣的細菌，其中該表現卡匣包括(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同之轉譯編閱架構，編碼多肽(例如對該細菌而言為異種之多肽)的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括信號肽和多肽的融合蛋白。如同在本文中描述的，例如在上文的第III章中，在一些具體實施例中，該非-secA1細菌信號肽是secA2信號肽。在一些其他的具體實施例中，該非-secA1細菌信號肽是Tat信號肽。在一些具體實施例中，由該表現卡匣編碼的

細菌信號肽係衍生自與包括該表現卡匣之細菌相同屬及/或種的細菌。在其他的具體實施例中，由該表現卡匣編碼之細菌信號肽係衍生自與包括該表現卡匣之細菌不同屬及/或種的細菌。

另一方面，本發明提供包括重組核酸分子的重組李斯特菌屬細菌，其中該重組核酸分子包括(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽和多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，該重組核酸分子是表現卡匣的一部分，其更進一步包括以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬細菌是減毒的。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬細菌是單核細胞增多性李斯特菌。例如，可為了細胞-對-細胞傳播、進入非-吞噬細胞內或增殖，將該李斯特菌屬減毒。在一些具體實施例中，該重組的李斯特菌屬細菌在ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者方面是有缺陷的(例如ΔactAΔinlB雙重刪除突變種)。在一些具體實施例中，已經藉著與以核酸為標的化合物(例如補骨脂素化合物)反應，修改該重組細菌的核酸。

另一方面，本發明提供包括重組核酸分子的重組李斯特菌屬細菌，其中該重組核酸分子包括編碼對該李斯特菌屬細菌而言是外來的多肽的多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現，將該多核苷酸密碼子-最優化。

在其他方面，本發明提供包括表現卡匣的重組李斯特菌屬細菌，其中該表現卡匣包括下列的：(a)編碼對李斯特菌屬細菌而言為外來的多肽之多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現，將該多核苷酸密碼子-最優化；以及(b)以可操作之方式與編碼該外來多肽的多核苷酸連接的啟動基因。再者，在一些具體實施例中，該李斯特菌屬是單核細胞增多性李斯特菌。在其他的具體實施例中，該李斯特菌屬細菌屬於依氏李斯特菌、斯氏李氏德菌或無害李斯特菌物種。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬細菌是如同上述之李斯特菌屬細菌的減毒品系。

另一方面，本發明提供包括重組核酸分子的重組李斯特菌屬細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌，其中該重組核酸分子包括(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸；以及(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該重組核酸分子編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該多肽兩者的融合蛋白。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬細菌是減毒的。例如，為了細胞-對-細胞傳播、進入非-吞噬細胞內或增殖，將該李斯特菌屬減毒。在一些具體實施例中，該重組李斯特菌屬細菌在ActA、表面蛋白B，或ActA和表面蛋白B兩者上是有缺陷的(例如ΔactAΔinlB雙重刪除突變種)。在一些具體實施例中，已經藉著與以核酸為標的化合物(例如補骨脂素)反應來修改該重組細菌的核酸。

在另一方面，本發明提供包括表現卡匣的重組李斯特菌

屬細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌物種)，該表現卡匣包括編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸、編碼多肽(例如非-李斯特菌屬多肽)的第二個多核苷酸，其是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，以及以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。該表現卡匣編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，為了細胞-對-細胞傳播、進入非-吞噬細胞內或增殖，將該李斯特菌屬細菌減毒。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬細菌在ActA、表面蛋白B，或ActA和表面蛋白B兩者上是有缺陷的。在一些具體實施例中，已經藉著與以核酸為標的化合物(例如補骨脂素化合物)反應，來修改該重組細菌之核酸。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬中表現，將第一個多核苷酸、第二個多核苷酸，或第一和第二個多核苷酸兩者密碼子-最優化。在一些具體實施例中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將該第一個多核苷酸及/或第二個多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽是抗原，在一些案例中其可以是非-細菌抗原。例如該多肽，在一些具體實施例中，是與腫瘤有關之抗原，或衍生自這類與腫瘤有關之抗原。例如，在一些具體實施例中，該多肽是K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA，或衍生自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、

WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP或CEA。例如，在一些具體實施例中，該多肽是間皮素，或間皮素之片段或變體。在一些其他的具體實施例中，該多肽是NY-ESO-1，或NY-ESO-1之片段或變體。在一些具體實施例中，該抗原是傳染病抗原，或衍生自傳染病抗原。在較佳的具體實施例中，該信號肽是細菌的。在一些具體實施例中，該信號肽係得自屬於芽胞桿菌屬、葡萄球菌屬或乳球菌屬的細菌。例如，在一些具體實施例中，該信號肽係得自炭疽桿菌、枯草桿菌、金黃色葡萄球菌或乳酸乳球菌。在一些具體實施例中，該信號肽是secA1信號肽，如得自乳酸乳球菌的Usp45信號肽或得自炭疽桿菌的保護性抗原信號肽。在一些具體實施例中，該信號肽是secA2信號肽。在更進一步的具體實施例中，該信號肽是Tat信號肽，如枯草桿菌Tat信號肽(例如PhoD)。

本發明更提供包括重組核酸分子的重組細菌，其中該重組核酸分子包括：(a)編碼細菌自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸；以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括由該第二個多核苷酸編碼之多肽和自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的蛋白質嵌合體，其中在蛋白質嵌合體中，該多肽係與自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合，或位在自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體

內。在一些具體實施例中，該重組細菌是細胞內的細菌，如李斯特菌屬細菌(例如單核細胞增多性李斯特菌)。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼的多肽對該重組細菌而言是外來的。

另一方面，本發明提供包括多順反子之表現卡匣的李斯特菌屬細菌，其中該多順反子表現卡匣編碼至少兩個分離的非-李斯特菌屬多肽。例如，在一些具體實施例中，該表現卡匣包括編碼第一個非-李斯特菌屬多肽的第一個多核苷酸、編碼第二個非-李斯特菌屬多肽的第二個多核苷酸，以及以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該重組李斯特菌屬細菌屬於物種單核細胞增多性李斯特菌。在一些具體實施例中，該第一及/或第二個非-李斯特菌屬多肽包括抗原(或其片段)。

在一些具體實施例中，本發明提供包括表現卡匣的重組細菌，該表現卡匣包括下列：(a)編碼第一個信號肽的第一個多核苷酸；(b)編碼第一個多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；(c)基因間序列；(d)編碼第二個信號肽的第三個多核苷酸；(e)編碼第二個多肽的第四個多核苷酸，其中該第四個多核苷酸是與第三個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(f)以可操作之方式與第一個多核苷酸、第二個多核苷酸、第三個多核苷酸、第四個多核苷酸和基因間序列連接的啟動基因，使得該表現卡匣編碼包括第一個信號肽和第一個多肽之第一個融合蛋白和包括第二個信號肽和第二個多肽

之第二個融合蛋白兩者。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，將編碼信號肽之一或多個多核苷酸密碼子最優化。在一些具體實施例中，為了在細菌中表現，將第三及/或第四個多核苷酸密碼子最優化。在一些具體實施例中，該第一及/或第二個多肽對重組細菌而言是異種的(例如異種抗原)。在一些具體實施例中，該第一及/或第二個信號肽是非-secA1細菌信號肽。該第一及/或第二個信號肽可以對重組細菌而言是天然或外來的。在一些具體實施例中，該重組細菌是李斯特菌屬細菌，且該第一及/或第二個信號肽是非-李斯特菌屬。在一些具體實施例中，該基因間序列是單核細胞增多性李斯特菌actA-plcB基因間序列。在一些具體實施例中，該細菌是單核細胞增多性李斯特菌。

另一方面，本發明提供包括重組核酸分子之細菌，包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，(b)編碼分泌蛋白質或其片段的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，以及(c)編碼對該分泌蛋白質或其片段而言為異種之多肽的第三個多核苷酸，其中該第三個多核苷酸是與第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，且其中該重組核酸分子編碼包括信號肽、由第二個多核苷酸編碼之多肽和分泌蛋白質或其片段的蛋白質嵌合體，且在該蛋白質嵌合體中，該多肽係與該分泌蛋白質或其片段融合，或位在該分泌蛋白質或其片段內。在一些具體實施例中，該細菌是李斯特菌屬細菌。在一些具體實施例中，在該細菌為李斯特菌屬細菌之處，由該第三個

多核苷酸編碼之多肽對李斯特菌屬而言是外來的。在一些具體實施例中，該細菌是單核細胞增多性李斯特菌。

在一些具體實施例中(例如在上文提及之觀點的一些具體實施例中)，將在細菌中所含有的表現卡匣整合到該細菌的基因組內。在其他的具體實施例中，在細菌中所含有的表現卡匣是在該細菌內之質體上。

通常，用在表現卡匣中的啟動基因將是適合由所選出之特殊細菌宿主完成異種表現的表現卡匣。熟諳此藝者可輕易地辨別那一個啟動基因適合用在那一個細菌中。在一些具體實施例中，該啟動基因是細菌的啟動基因。在其他的具體實施例中，在細菌中之表現卡匣上的啟動基因，是得自屬於與含有該表現卡匣之細菌相同屬的細菌的啟動基因。在其他的具體實施例中，在細菌中之表現卡匣上的啟動基因，是得自屬於與含有該表現卡匣之細菌相同物種的細菌的啟動基因。例如，若含有該表現卡匣隻細菌鼠於單核細胞增多性李斯特菌物種，此時在該表現卡匣上所使用隻啟動基因可視需要衍生自李斯特菌屬之基因，如hly。在其他的具體實施例中，該啟動基因是組成上的啟動基因(例如p60啟動基因)，或是prfA-依賴性啟動基因(例如actA啟動基因)。再者，如同上述，表現卡匣之啟動基因，在一些具體實施例中，是組成上的啟動基因。在其他的具體實施例中，該表現卡匣之啟動基因是可誘導之啟動基因，亦如同上述。

在一些具體實施例中(例如在上文提及之觀點的一些具

體實施例中)，由在細菌中之表現卡匣編碼的多肽或包括多肽的融合蛋白是抗原或其他有治療價值的蛋白質，如同例如在上文第Ⅳ章中描述的。在一些具體實施例中，從細菌中分泌多肽或包括多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，由細菌表現並/或分泌的多肽對該細菌而言是異種的。

因此，在一些具體實施例中，本發明提供包括表現卡匣的重組李斯特菌屬，其中該表現卡匣包括(a)編碼細菌(李斯特菌屬或非-李斯特菌屬的)信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現將第一個多核苷酸密碼子-最優化；(b)編碼非-李斯特菌屬抗原的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括該信號肽和該抗原的融合蛋白。在更進一步的具體實施例中，該李斯特菌屬是單核細胞增多性李斯特菌的品系，如actA⁻inlB⁻品系。在一些具體實施例中，已經將表現卡匣整合到重組李斯特菌屬的基因組內。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬中表現，將該第二個多核苷酸密碼子最優化。

本發明亦提供包括表現卡匣的李斯特菌屬，其中該表現卡匣包括(a)編碼secA2或Tat細菌信號肽的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼抗原的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括該信號肽和該抗原的融合蛋白。在一些具體實施例中，該

細菌信號肽是李斯特菌屬的。在其他的具體實施例中，該細菌信號肽是非-李斯特菌屬的。在更進一步的具體實施例中，該李斯特菌屬是單核細胞增多性李斯特菌的品系，如actA⁻inlB⁻品系。在一些具體實施例中，已經將表現卡匣整合到重組李斯特菌屬的基因組內。在一些具體實施例中，為了在李斯特菌屬中表現，將編碼信號肽(即使該信號肽是李斯特菌屬之信號肽)的多核苷酸及/或編碼抗原的多核苷酸密碼子最優化。

在更進一步的具體實施例中，本發明提供包括表現卡匣的重組李斯特菌屬，其中該表現卡匣包括下列的：(a)編碼非-李斯特菌屬之抗原的多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現，將該多核苷酸密碼子最優化；以及(b)以可操作之方式與編碼外來多肽之多核苷酸連接的啟動基因。在一些具體實施例中，該表現卡匣更進一步包括編碼細菌信號肽的多核苷酸，亦為了在李斯特菌屬中表現，將其密碼子最優化。在一個具體實施例中，該細菌信號肽是李斯特菌屬的。在另一個具體實施例中，該細菌信號肽是非-李斯特菌屬的。在一些具體實施例中，該細菌信號肽是secA1信號肽、secA2信號肽或Tat信號肽。在更進一步的具體實施例中，該李斯特菌屬是單核細胞增多性李斯特菌的品系，如actA⁻inlB⁻品系。在一些具體實施例中，已經將該表現卡匣整合到重組李斯特菌屬的基因組內

在另一個具體實施例中，本發明提供包括下列的重組李斯特菌屬細菌：(a)編碼細菌(李斯特菌屬或非-李斯特菌屬

的)信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現，將該第一個多核苷酸密碼子最優化；(b)編碼非-李斯特菌屬抗原的第二個多核苷酸，其中以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，為了在李斯特菌屬中表現，將該第二個多核苷酸密碼子最優化；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括該信號肽和該抗原的融合蛋白。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬細菌屬於物種單核細胞增多性李斯特菌。在一些具體實施例中，該李斯特菌屬細菌是單核細胞增多性李斯特菌的actA⁻inlB⁻突變種品系。

本發明更提供包括一個以上在本文中描述之表現卡匣的細菌，如李斯特菌屬。在特殊的組合中，特定蛋白質的分子量可抑制其從重組細菌中表現，如重組的李斯特菌屬。一種解決該問題的方法是在分子層面上"分開"編碼感興趣之蛋白質的基因，並將每一部分在功能上與該序列融合，這將編寫其從細菌中分泌的計畫(例如secA1、secA2或Tat元件)。一種方法是個別地駕馭重組的李斯特菌屬，表現異種基因的每個部分。或者，可經由細菌染色體，將在分子層面上被分開之基因的個別組份(亦包括分泌用的適當元件)併入基因間區域內，使用此項技藝中已完全建立的方法，例如藉著對偶基因交換。其他的實例是以單一多順反子信息之方式，表現在分子層面上被分開的基因。根據該組合，散佈在編碼蛋白質之序列之間，在分子層面上被分開的基因將是Shine-Dalgarno核糖體結合序列，以便對多順

反子信息再度-發動蛋白質合成。

在其他方面，本發明提供改善在重組細菌，如李斯特菌屬中表現及/或分泌異種多肽的方法。可在這些方法中使用在本文中描述的任何多核苷酸、表現卡匣及/或表現載體。例如，本發明提供改善在李斯特菌屬中表現及/或分泌與信號肽融合之異種多肽的方法，包括將在該表現卡匣上之編碼多肽的序列、該表現卡匣之編碼信號肽的序列，或兩者密碼子-最優化。本發明亦提供在李斯特菌屬中，改善與信號肽融合之異種多肽的表現及/或分泌的方法，包括使用得自非-李斯特菌屬之來源及/或得自secA1以外之分泌路徑的信號肽。

本發明亦提供產生重組細菌(例如重組的李斯特菌屬細菌)的方法，包括將在本文中描述的重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體導入細菌內，產生重組的細菌。例如，在一些具體實施例中，該重組核酸分子包括(a)編碼對該細菌而言為天然之信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中將編碼包括該信號肽和該多肽之融合蛋白的重組核酸分子導入細菌內，產生重組的細菌。在一些具體實施例中，重組的核酸分子包括(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，且其中將編碼包括該

信號肽和該多肽之融合蛋白的重組核酸分子導入細菌內，產生重組的細菌。在一些具體實施例中，被導入細菌內產生重組細菌的重組核酸分子是重組的核酸分子，其中該重組核酸分子包括(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該重組核酸分子編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，用來產生重組細菌的重組核酸分子是包括下列的重組核酸分子：(a)編碼細菌自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼蛋白質嵌合體，其中該非-李斯特菌屬多肽與自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合，或插入自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體內。在一些其他的具體實施例中，提供產生重組李斯特菌屬細菌的方法，其包括將多順反子之表現卡匣導入李斯特菌屬細菌內，其中該表現卡匣編碼至少兩個分離的非-李斯特菌屬多肽，產生重組的李斯特菌屬細菌。

IX.醫藥、免疫原及/或疫苗組合物

本發明亦提供各種不同的組合物，如醫藥組合物、免疫原組合物和疫苗。這些組合物包括在本文中描述的任何重組細菌(參見，例如上文的發明內容，實施方法第I和Ⅷ章，以及在說明書中的其他地方，包括下文的實例)。在一些具

體實施例中，分離該組合物。

例如，本發明提供包括下列的醫藥組合物：(i)在藥學上可接受之載劑；以及(ii)在本文中描述的重組細菌。

例如，本發明提供包括下列的醫藥組合物：(i)在藥學上可接受之載劑；以及(ii)包括表現卡匣的重組細菌，該表現卡匣包括編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，以及以可操作之方式與該第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

本發明亦提供醫藥組合物，包括：(i)在藥學上可接受之載劑；以及(ii)包括表現卡匣的重組細菌，其中該表現卡匣包括編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸、以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構編碼多肽的第二個多核苷酸，以及以可操作之方式與該第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

本發明更提供醫藥組合物，包括：(i)在藥學上可接受之載劑；以及(ii)包括表現卡匣的重組李斯特菌屬細菌，其中該表現卡匣包括下列的：(a)編碼對李斯特菌屬而言是外來的多肽的多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現，將該多核苷酸密碼子-最優化；以及(b)以可操作之方式與編碼外來多肽之多核苷酸連接的啟動基因。

本發明亦提供醫藥組合物，包括：(i)在藥學上可接受之載劑；以及(ii)包括表現卡匣的重組李斯特菌屬細菌，該表現卡匣包括：(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與該第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括該非-李斯特菌屬信號肽和該多肽的融合蛋白。

當在本文中使用時，"載劑"包括任何及所有的溶劑、分散介質、媒劑、塗料、稀釋劑、抗真菌劑、等張和吸收延遲劑、緩衝溶液、載劑溶液、懸浮液、膠體及其類似物。在藥學上可接受之載劑為熟諳此藝者已熟知的，並包括當與活性成分混合時，容許該成分保留生物活性且不與個體之免疫系統起反應的任何物質。例如，在藥學上可接受之載劑包括，但不限於水、經過緩衝之生理鹽水(例如0.9%生理鹽水)、乳劑，如油/水乳劑，以及各種類型的濕潤劑。可能的載劑亦包括，但不限於油類(例如礦物油)、右旋糖溶液、甘油溶液、白堊、澱粉、鹽類、甘油和明膠。

雖然在醫藥組合物中可使用熟諳此藝者已知的任何適當載劑，載劑之類型將視投藥的模式而改變。可為了任何適當的投藥方式，來調配本發明之組合物，包括例如局部、口服、經鼻、靜脈內、顱內、腹腔內、皮下或肌肉內投藥。在一些具體實施例中，為了非經腸投藥，如皮下注射，該載劑包括水、生理鹽水、酒精、脂質、蠟或緩衝溶液。在一些具體實施例中，為了口服投藥使用任何上述的載劑或

固體載劑，如甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、滑石、纖維素、葡萄糖、蔗糖和碳酸鎂。

藉著已熟知的傳統方法調配包括這類載劑的組合物(參見，例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, A. Gennaro編輯, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990；以及Remington, The Science and practice of Pharmacy 第20版 Mack Publishing, 2000)。

除了醫藥組合物之外，還提供免疫原組合物。例如，本發明提供包括在本文中描述之重組細菌的免疫原組合物(參見，例如上述之重組細菌，在上文的發明內容，實施方法第I和Ⅷ章，以及在說明書中的其他地方，包括下文的實例)。在一些具體實施例中，該免疫原組合物包括重組細菌，其中為藉著該重組細菌表現之多肽的一部分的多肽序列，為分離蛋白質之形式、為融合蛋白的一部分或埋入蛋白質嵌合體(視所使用的重組核酸分子或表現卡匣而定)，是抗原或包括抗原。換句話說，在一些具體實施例中，該免疫原組合物包括重組細菌，其包括編碼包括抗原之多肽的重組核酸分子或表現卡匣。適當的抗原包括，但不限於任何在本文中描述的那些(例如在上文第Ⅳ章)。在一些具體實施例中，在免疫原組合物中的重組細菌，在將該組合物投與宿主(例如哺乳動物，如人類)時，以足以誘導對抗該抗原之免疫反應的程度，表現包括抗原之多肽。在一些具體實施例中，藉著該免疫原組合物刺激之免疫反應是細胞-調解的免疫反應。在一些具體實施例中，由該免疫原組合物刺

激之免疫反應是體液免疫反應。在一些具體實施例中，由該免疫原組合物刺激之免疫反應包括體液和細胞-調解的免疫反應。

例如，本發明一方面提供包括重組細菌的免疫原組合物，其中該細菌包括表現卡匣，其包括下列的：(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；(b)編碼抗原的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與該第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該抗原的融合蛋白。

另一方面，本發明提供包括重組細菌的免疫原組合物，其中該細菌包括表現卡匣，其包括下列的：(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼抗原的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與該第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該抗原的融合蛋白。

另一方面，本發明提供包括重組李斯特菌屬細菌的免疫原組合物，其中該重組李斯特菌屬細菌包括表現卡匣，其中該表現卡匣包括下列的：(a)編碼非-李斯特菌屬抗原的多核苷酸，並為了在李斯特菌屬中表現，將其密碼子-最優化；以及(b)以可操作之方式與編碼抗原之多核苷酸連接的啟動基因。

本發明亦提供包括重組細菌之免疫原組合物，該重組細菌包括表現卡匣，其包括：(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸；(b)編碼抗原的第二個多核苷酸，其為與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與該第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該抗原的融合蛋白。

另一方面，本發明提供包括重組細菌之免疫原組合物(或疫苗)，該重組細菌包括重組核酸分子，其中該重組核酸分子包括(a)編碼對細菌而言為天然之信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及(b)編碼包括抗原之多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

另一方面，本發明提供包括重組李斯特菌屬細菌的免疫原組合物(或疫苗)，其中該重組細菌包括重組核酸分子，其包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，和(b)編碼包括抗原之多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

另一方面，本發明提供包括重組細菌的免疫原組合物(或疫苗)，其中該重組細菌包括重組核酸分子，其中該重組核

酸分子包括編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸，和編碼包括抗原之多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，且其中該重組核酸分子編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

另一方面，本發明提供包括重組李斯特菌屬細菌的免疫原組合物(或疫苗)，其中該重組細菌包括重組核酸分子，其中該重組核酸分子包括(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸，和(b)編碼對該信號肽而言為異種，或對該細菌而言為外來的多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，且其中該重組核酸分子編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。在一些具體實施例中，由該第一個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

另一方面，本發明提供包括重組李斯特菌屬細菌的免疫原組合物(或疫苗)，其中該重組李斯特菌屬細菌包括重組核酸分子，其中該重組核酸分子包括編碼對李斯特菌屬而言為外來之多肽的多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現將編碼該外來多肽的多核苷酸密碼子-最優化。在一些具體實施例中，該外來多肽包括抗原。

另一方面，本發明提供包括重組李斯特菌屬細菌的免疫原組合物(或疫苗)，其中該重組細菌包括重組核酸分子，其包括(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸，和(b)編碼包括抗原之多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多

核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，且其中該重組核酸分子編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該多肽兩者的融合蛋白。

本發明亦提供包括重組細菌的免疫原組合物(或疫苗)，其中該重組細菌包括核酸分子，其包括(a)編碼細菌自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括由該第二個多核苷酸編碼之多肽和自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的蛋白質嵌合體，其中，在蛋白質嵌合體中，該多肽與自溶素或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合，或位在其中。在一些具體實施例中，由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗體。

另一方面，本發明提供包括重組李斯特菌屬細菌的免疫原組合物(或疫苗)，其中該重組的李斯特菌屬細菌包括重組核酸分子，其中該重組核酸分子編碼至少兩個分離的非-李斯特菌屬多肽，其中至少有一個包括抗原。

另一方面，本發明提供包括重組細菌的免疫原組合物(或疫苗)，其中該重組細菌包括重組核酸分子，其包括(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，(b)編碼分泌蛋白質或其片段的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，以及(c)編碼對該分泌蛋白質或其片段而言為異種之多肽的第三個多核苷酸，其中該第三

個多核苷酸是與第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼包括信號肽、由該第三個多核苷酸編碼之多肽和該分泌蛋白質或其片段的蛋白質嵌合體，且其中在該蛋白質嵌合體中，由該第三個多核苷酸編碼之多肽與該分泌蛋白質或其片段融合，或位在該分泌蛋白質或其片段內。在一些具體實施例中，由該第三個多核苷酸編碼之異種多肽包括抗原。

可藉著在活體外或在模式系統中測試重組細菌刺激免疫反應的能力，判定在免疫原組合物(或疫苗)中有用之重組細菌的特殊形式(及/或特殊表現卡匣)。

可藉著在活體外和在活體內的方法，測量這些免疫細胞反應，判定特殊重組細菌(及/或特殊表現卡匣)的免疫反應是否是有效的。一種可能性是藉著已經與重組細菌之族群混合的提供抗原之細胞，測量感興趣之蛋白質或抗原的存在。可將重組細菌與適當的提供抗原之細胞或細胞株混合，例如樹突細胞，並可測量由樹突細胞對認得蛋白質或抗原之T細胞提交的抗原。若重組細菌正以足夠的量表現蛋白質或抗原，則其將被樹突細胞加工成肽片段，並以MHC第I類或第II類提交給T細胞。為了檢測提交的蛋白質或抗原，可使用對特殊蛋白質或抗原起反應的T細胞純種係或T細胞株。該T細胞也可以是T細胞融合瘤，其中該T細胞藉著與癌細胞株融合而成為永存不死的。這類T細胞融合瘤、T細胞純種系或T細胞株可包括CD8+或CD4+T細胞。依據由樹突細胞加工抗原的路徑，該樹突細胞可提交至CD8+或

CD4+T細胞。CD8+T細胞認得為MHC第I類的抗原，而CD4+則認得為MHC第II類的抗原。T細胞將受到所提交之抗原刺激，經由其T細胞受體的專一認知，結果產生了某些可定量測量(例如使用ELISA測定、ELISPOT測定或細胞內細胞毒性染色(ICS))的蛋白質，如IL-2、腫瘤壞死因子-α(TNF-α)或干擾素-γ(IFN-γ))。這些是此項技藝中已熟知的技術，亦在下文實例中舉例說明(參見，例如下文的實例21)。

或者，可設計包括報告者基因的融合瘤，如β-半乳糖苷酶，當T細胞融合瘤被提交之抗原刺激時將其激活。可藉著其對受質，如氯酚紅-B-半乳糖苷的活性，結果為顏色的改變，迅速地測量在β-半乳糖苷酶之產製上的增加。可按照特定抗原存在之指示劑，直接測量顏色改變。

用來評估本發明之重組細菌疫苗之抗原表現的額外在活體外和在活體內的方法是熟諳此藝者已知的。亦可能直接測量由重組細菌表現的特殊異種抗原。例如，可將放射性標示之胺基酸加至細胞族群中，並可判定併入特殊蛋白質內的放射性含量。可分離由細胞族群合成的蛋白質，例如藉著凝膠電泳或毛細管電泳，並可定量測量放射性含量，評估特殊蛋白質的表現程度。或者，可表現無放射性的蛋白質，並藉著各種方法使其顯色，如ELISA測定或藉著凝膠電泳和西方墨點法，使用酵素連接的抗體或螢光標示的抗體來檢測之。

下文的實例21提供了一些特定的範例，舉例說明可如何使用熟諳此藝者已知的一些技術，來評估免疫原性。例如，

Elispot測定、細胞內細胞毒性染色測定(ICS)、受刺激之脾臟細胞之細胞素表現的測量，以及在活體外和在活體內評估細胞毒性T細胞活性，都是此項技藝中已知用來評估免疫原性的技術。在實例21中提供利用模式抗原之這些技術的代表性說明。亦在下文的實例31A和31E中描述代表性的測定。

此外，亦可藉著將免疫原組合物或疫苗投與動物模式，如老鼠模式，接著評估存活或腫瘤生長，更直接地評估疫苗組合物的治療效力。例如，可在投藥和攻毒(例如以腫瘤或病原)之後測量存活。參見，例如在下文的實例20和31B-D中描述的測定。

可藉著先修改腫瘤細胞，使其得以表現感興趣之抗原或模式抗原，然後將表現感興趣之抗原的腫瘤細胞植入老鼠內，產生用來測試表現特殊抗原之免疫原組合物或疫苗之免疫原性的老鼠模式。可在植入腫瘤細胞之前(測試候選組合物的預防效力)或在將腫瘤細胞植入老鼠中之後(測試候選組合物的治療效力)，利用包括表現多肽之重組細菌的候選免疫原組合物或疫苗，該多肽包括感興趣之抗原或模式抗原，對老鼠接種疫苗。

舉例來說，可使用此項技藝中的標準技術，以包括編碼想要抗原或模式抗原之表現卡匣的適當載體轉移感染CT26老鼠老鼠結腸癌細胞。然後可使用標準技術，如流動細胞計數和西方墨點法，確認以足以用在免疫原性及/或效力測定中之含量表現該抗原或模式抗原的純種系。

或者，可測試候選組合物，其包括表現抗原的重組細菌，該抗原符合或衍生自對腫瘤細胞株為內源的抗原(例如逆轉錄gp70腫瘤抗原AH1對CT26老鼠老鼠結腸癌細胞是內源的，或不規則的抗原決定位AH1-A5)。在這類測定中，可將腫瘤細胞植入動物模式中，不需進一步修改，以便表現額外的抗原。然後可測試包括抗原的候選疫苗。

如同所示，亦提供包括在本文中描述之細菌的疫苗組合物。例如，本發明提供包括在本文中描述之重組細菌的疫苗(參見，例如上文的發明內容，實施方法第I和Ⅷ章，以及在說明書中的其他地方，包括下文的實例中描述之重組細菌)，其中為由該重組細菌表現之多肽的一部分的多肽序列，為分離蛋白質之形式、為融合蛋白的一部分或埋入蛋白質嵌合體(依據所使用的重組核酸分子或表現卡匣)是抗原。適當的抗原包括任何在本文中描述的那些(例如，在上文第IV章中)。

本發明一方面提供包括細菌的疫苗，其中該細菌包括表現卡匣，其包括下列的：(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；(b)編碼抗原的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

另一方面，本發明提供包括細菌之疫苗，其中該細菌包括表現卡匣，其包括下列的：(a)編碼非-secA1細菌信號肽

的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼抗原的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該多肽之融合蛋白。

另一方面，本發明提供包括重組李斯特菌屬細菌的疫苗，該細菌包括核酸分子，其中該核酸分子包括下列的：(a)編碼非-李斯特菌屬抗原的第一個多核苷酸；且為了在李斯特菌屬中表現，將其密碼子-最優化；以及(b)以可操作之方式與編碼抗原之多核苷酸連接的啟動基因。

另一方面，本發明提供包括重組李斯特菌屬細菌的疫苗，該細菌包括表現卡匣，其包括：(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼抗原的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該抗原兩者的融合蛋白。

在一些具體實施例中，疫苗組合物包括提供抗原之細胞(APC)，已經利用任何在本文中描述之重組細菌將其感染。在一些具體實施例中，疫苗(或免疫原或醫藥組合物)不包括提供抗原之細胞(即該疫苗或組合物是以細菌為基礎的疫苗或組合物，而非以APC為基礎之疫苗或組合物)。

適合投與疫苗組合物(以及醫藥和免疫原組合物)的投藥方法是此項技藝中已知的，並包括口服、靜脈內、皮內、腹腔內、肌肉內、淋巴內、鼻內和皮下投藥路徑。

疫苗調配物是此項技藝中已知的，且在一些具體實施例中，可包括各種添加物，如防腐劑(例如乙基汞硫代水楊酸鈉、2-苯氧基乙醇)、穩定劑、佐劑(例如氫氧化鋁、磷酸鋁、細胞素)、抗生素(例如新黴素、鏈黴素)及其他物質。在一些具體實施例中，加入穩定劑，如乳糖或穀胺酸單鈉(MSG)，使疫苗調配物穩定對抗各種條件，如溫度變化或冷凍乾燥過程。在一些具體實施例中，疫苗調配物亦可包括懸浮流體或稀釋劑，如無菌的水、生理鹽水或等張緩衝之生理鹽水(例如磷酸緩衝至生理學pH值)。疫苗亦可包含少量來自製造過程的剩餘物質。

例如，在一些具體實施例中，將疫苗組合物冷凍乾燥(即冷凍-乾燥)。可在投藥之前，將冷凍乾燥的製備物與無菌溶液(例如檸檬酸-碳酸氫鹽緩衝溶液、經過緩衝的水、0.4%生理鹽水或其類似物)混合。

在一些具體實施例中，疫苗組合物可更進一步包括此項技藝中已知的額外組份，改善對疫苗的免疫反應，如佐劑或共同-刺激分子。除了上文列舉的那些之外，可能的佐劑亦包括化學激動素和細菌的核酸序列，像CpG。在一些具體實施例中，疫苗包括改善對該疫苗之免疫反應的抗體，如CTLA4。在一些具體實施例中，共同-刺激分子包括一或多個選自GM-CSF、IL-2、IL-12、IL-14、IL-15、IL-18、B7.1、B7.2和B7-DC所組成之群的因子，並可視需要將其納入本發明的疫苗組合物中。其他的共同-刺激分子是熟諳此藝者已知的。

在其他方面，本發明提供改善包括表現抗原之李斯特菌屬之疫苗或免疫原組合物的方法。在這些方法中可使用任何在本文中描述之多核苷酸、表現卡匣及/或表現載體。例如，本發明提供改善包括李斯特菌屬細菌之疫苗或免疫原組合物的方法，其中該李斯特菌屬細菌表現與信號肽融合的異種抗原，包括將在表現卡匣上之編碼多肽的序列、表現卡匣之編碼信號肽的序列或兩者密碼子-最優化。本發明提供改善包括李斯特菌屬細菌之疫苗或免疫原組合物的方法，其中該李斯特菌屬細菌表現與信號肽融合的異種抗原，包括使用得自非-李斯特菌屬來源及/或得自secA1以外之分泌路徑的信號肽。

亦提供產生本發明之疫苗的方法。例如，在一個具體實施例中，產生包括重組細菌(例如重組的李斯特菌屬細菌)之疫苗的方法，包括將重組核酸分子導入細菌內、將在本文中描述之表現卡匣或表現載體導入細菌內，其中該重組核酸分子、表現卡匣或表現載體編碼抗原。例如，在一些具體實施例中，重組核酸分子包括(a)編碼對該細菌而言為天然之信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化，以及(b)編碼抗原的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中將編碼包括該信號肽和該抗原之融合蛋白的重組核酸分子導入細菌內，產生疫苗。在一些具體實施例中，該重組核酸分子包括(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)編碼抗原的

第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，且其中將編碼包括該信號肽和該多肽之融合蛋白的重組核酸分子併入細菌內，產生疫苗。在一些具體實施例中，被導入細菌內產生疫苗的重組核酸分子是重組的核酸分子，其中該重組核酸分子包括(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸，以及(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼抗原的第二個多核苷酸，其中該重組核酸分子編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該抗原的融合蛋白。在一些具體實施例中，用來產生疫苗的重組核酸分子是重組的核酸分子，包括(a)編碼細菌自溶素或其具有催化功能之片段或具有催化功能之變體的第一個多核苷酸，以及(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，其中該重組核酸分子編碼蛋白質嵌合體，其中該非-李斯特菌屬多肽與自溶素或其具有催化功能之片段或具有催化功能之變體融合，或插入自溶素或其具有催化功能之片段或具有催化功能之變體內。在一些其他的具體實施例中，產生疫苗的方法包括提供李斯特菌屬細菌，其包括將多順反子之表現卡匣，其中該多順反子之表現卡匣編碼至少兩個分離的非-李斯特菌屬多肽，導入李斯特菌屬細菌內，產生疫苗。

亦提供包括任何本發明之重組核酸分子、表現卡匣、載體、細菌及/或組合物的套組。

X.使用方法

提供在宿主中使用在本文中描述之重組細菌或醫藥、免疫原或疫苗組合物，誘導免疫反應及/或預防或治療狀況的各種方法。在一些具體實施例中，被治療或預防的狀況為疾病。在一些具體實施例中，該疾病為癌症。在一些具體實施例中，該疾病為傳染病。此外，重組細菌亦可用在異種蛋白質的產製和分離上，如哺乳動物蛋白質。

當在本文中使用時，"治療"或"治療"(關於狀況或疾病)是獲得有利或想要結果的方法，包括且最好是臨床上的結果。為了本發明，關於疾病的有利或想要結果包括，但不限於下列的一或多項：改善與疾病有關之狀況、治癒疾病、減少疾病的嚴重性、延遲疾病的進行、減輕一或多個與疾病有關的症狀、增加患病者的生命品質，及/或延長存活。同樣的，為了本發明，與狀況有關的有利或想要結果包括，但不限於下列的一或多項：改善狀況、治癒狀況、減少狀況的嚴重性、延遲狀況的進行、減輕一或多個與狀況有關的症狀、增加患有該狀況者的生命品質，及/或延長存活。例如，在其中使用在本文中描述之組合物來治療癌症的具體實施例中，有利或想要的結果包括，但不限於下列的一或多項：降低(或破壞)贅生物或癌細胞的增殖、降低在癌症中發現之贅生細胞的轉移、使腫瘤的尺寸縮小、減少起因於癌症的症狀、增加患有癌症那些人的生命品質、減少治療疾病所需之其他醫藥的劑量、延遲癌症的進行，及/或延長癌症患者的存活。

當在本文中使用時，"預防"疾病或"保護宿主"免於疾病

(在本文中可交替使用)一詞，包括但不限於下列的一或多項：中止、延緩、阻礙、減慢、妨礙及/或延後疾病的發作或進行、穩定疾病的進行，及/或延遲疾病的發展。"預防"病況或"保護宿主"免於狀況(在本文中可交替使用)一詞，包括但不限於下列的一或多項：中止、延緩、阻礙、減慢、妨礙及/或延後狀況的發作或進行、穩定狀況的進行，及/或延遲狀況的發展。可視待治療之疾病或狀況及/或個體的歷史，而改變該預防期間的時間長度。舉例來說，在設計疫苗來預防或保護對抗由病原引起之傳染病時，"預防"疾病或"保護宿主"免於疾病一詞，包括但不限於下列的一或多項：中止、延緩、阻礙、減慢、妨礙及/或延後病原感染宿主、病原感染宿主的進行，或是與病原感染宿主有關之疾病的發作或進行，及/或穩定與病原感染宿主有關之疾病的進行。再者，舉例來說，在疫苗為抗-癌症疫苗之處，"預防"疾病或"保護宿主"免於疾病一詞，包括但不限於下列的一或多項：中止、延緩、阻礙、減慢、妨礙及/或延後癌症或轉移的發展、癌症的進行或癌症的再發。

本發明一方面提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的在本文中描述之重組細菌，或有效含量的包括在本文中描述之重組細菌的組合物(例如醫藥組合物、免疫原組合物或疫苗)(參見，例如上文的發明內容，實施方法第I、VIII和IX，以及下文的實例)。在一些具體實施例中，由在重組細菌中之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體編碼的多肽包括抗原，或是包括抗

原的融合蛋白或蛋白質嵌合體。

例如，本發明一方面提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括重組細菌之組合物，其中該重組細菌包括表現卡匣，其包括下列的：(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；(b)編碼抗原的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該抗原的融合蛋白。

另一方面，本發明提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括重組細菌之組合物，該重組細菌包括表現卡匣，其中該表現卡匣包括下列的：(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼抗原的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該抗原的融合蛋白。

另一方面，本發明提供在宿主中誘導對非-李斯特菌屬抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括重組李斯特菌屬細菌之組合物，該重組李斯特菌屬細菌包括核酸分子，其中該核酸分子包括下列的：(a)編碼非-李斯特菌屬抗原的多核苷酸，並為了在李斯特菌屬中表現，將其密碼子-最優化；以及(b)以可操作之方式與編碼抗原之多

核苷酸連接的啟動基因。

另一方面，本發明提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括對該宿主投與有效含量的重組李斯特菌屬細菌，該重組李斯特菌屬細菌包括表現卡匣，其包括下列的：(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼抗原的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該多肽兩者的融合蛋白。

在本文中描述之誘導免疫反應之方法的一些具體實施例中，以醫藥組合物、免疫原組合物及/或疫苗組合物之形式投與細菌。

在一些具體實施例中，免疫反應是MHC第I類免疫反應。在其他的具體實施例中，免疫反應是MHC第II類免疫反應。在另外的具體實施例中，藉著投與細菌或組合物誘導之免疫反應是MHC第I類和MHC第II類反應兩者。因此，在一些具體實施例中，免疫反應包括CD4+T-細胞反應。在一些具體實施例中，免疫反應包括CD8+T-細胞反應。在一些具體實施例中，免疫反應包括CD4+T-細胞反應和CD8+T-細胞反應兩者。在一些具體實施例中，免疫反應包括B-細胞反應及/或T-細胞反應。可藉著使用熟諳此藝者已知的方法，判定針對該抗原之抗體的力價，來測量B-細胞反應。在一些具體實施例中，由在本文中描述之組合物誘導的免疫反應是體液反應。在其他的具體實施例中，所誘導之免

疫反應是細胞免疫反應。在一些具體實施例中，免疫反應包括細胞和體液兩種免疫反應。在一些具體實施例中，免疫反應是抗原-專一的。在一些具體實施例中，免疫反應是抗原-專一的T-細胞反應。

除了提供誘導免疫反應的方法之外，本發明亦提供在宿主(例如個體，如人類患者)中預防或治療狀況的方法。在一些具體實施例中，該狀況為疾病。該方法包括對該宿主投與有效含量的在本文中描述之重組細菌，或包括在本文中描述之重組細菌的組合物(參見，例如上文的發明內容，實施方法第I、VIII和IX章，或下文的實例)。在一些具體實施例中，該疾病為癌症。在一些具體實施例中，該疾病為傳染病。

例如，本發明一方面提供在宿主中預防或治療疾病(或狀況)的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括細菌之組合物，其中該細菌包括表現卡匣，其包括下列的：(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；(b)編碼多肽(例如抗原及/或治療性哺乳動物蛋白質)的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該抗原的融合蛋白。

另一方面，本發明提供在宿主中預防或治療疾病(或狀況)的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括重組細菌之組

合物，其中該細菌包括表現卡匣，且其中該表現卡匣包括下列的：(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽(例如抗原及/或哺乳動物蛋白質)的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因，使該表現卡匣得以編碼包括該信號肽和該抗原的融合蛋白。

另一方面，本發明提供在宿主中預防或治療疾病(或狀況)的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括重組李斯特菌屬細菌之組合物，該細菌包括核酸分子，其中該核酸分子包括下列的：(a)編碼非-李斯特菌屬多肽(例如抗原及/或治療性哺乳動物蛋白質)的多核苷酸，並為了在李斯特菌屬中表現，將其密碼子-最優化；以及(b)以可操作之方式與編碼該抗原之多核苷酸連接的啟動基因。

另一方面，本發明提供在宿主中預防或治療疾病(或狀況)的方法，包括對該宿主投與有效含量的包括重組李斯特菌屬細菌之組合物，該細菌包括表現卡匣，其包括：(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸；(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽(例如抗原及/或治療性哺乳動物蛋白質)的第二個多核苷酸；以及(c)以可操作之方式與第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因，其中該表現卡匣編碼包括非-李斯特菌屬信號肽和該多肽兩者的融合蛋白。

在一些具體實施例中，該疾病為癌症。在一些具體實施

例中，待治療或預防之狀況是癌症，該疾病為黑色素瘤、乳癌、胰臟癌、肝癌、結腸癌、結直腸癌、肺癌、腦癌、睪丸癌、卵巢癌、鱗狀細胞癌、胃腸癌、子宮頸癌、腎癌、甲狀腺癌或前列腺癌。在一些具體實施例中，該癌症為黑色素瘤。在一些具體實施例中，該癌症為胰臟癌。在一些具體實施例中，該癌症為結腸癌。在一些具體實施例中，該癌症為前列腺癌。在一些具體實施例中，該癌症為轉移的。

在其他的具體實施例中，該疾病為自體免疫疾病。在另外的具體實施例中，該疾病為傳染病，或由病原引起的其他疾病，如病毒、細菌、真菌或原蟲。在一些具體實施例中，該疾病為傳染病。

在一些具體實施例中，重組細菌在預防或治療癌症上的用途，包括將重組細菌遞送至個體之免疫系統的細胞，預防或治療現存的癌症，或有增加風險因子的個體，如環境暴露及/或家族傾向。在其他的具體實施例中，重組細菌在預防或治療癌症上的用途，包括將重組細菌遞送至已經移除腫瘤或過去曾患有癌症，但目前暫時緩和的個體。

在一些具體實施例中，將包括在本文中描述之重組細菌的組合物投與宿主，在宿主中誘發CD4+T-細胞反應。在一些其他的具體實施例中，將包括在本文中描述之重組細菌的組合物投與宿主，在宿主中誘發CD8+T-細胞反應。在一些具體實施例中，將包括在本文中描述之重組細菌的組合物投與宿主，在宿主中誘發CD4+T-細胞反應和CD8+T-細胞

反應兩者。

可在個體，例如在老鼠中評估疫苗或其他治療狀況之組合物的效力。承認老鼠模式為在人類中的效力模式，並可用來評估和定義本發明之疫苗。使用老鼠模式，在任何個體中證實疫苗之效力的可能性。可評估疫苗提供對抗特定疾病之預防或治療效力的能力。例如，在傳染病的案例中，可利用想要含量的本發明之適當疫苗將老鼠族群接種，其中該重組細菌表現與傳染病有關之抗原。隨後以與疫苗抗原有關的傳染原感染老鼠，並評估對抗感染的保護。相對於對照組族群(未接種疫苗，或僅以媒劑或不含適當抗原之細菌接種)，可觀察傳染病的進行。

在癌症疫苗的案例中，腫瘤細胞模式是可利用的，其中可在以包括本發明之含有想要腫瘤抗原之細菌的組合物接種之前(治療模式)或之後(預防模式)，將表現想要腫瘤抗原的腫瘤細胞株注射到老鼠的族群中。可將利用含有腫瘤抗原之重組細菌的疫苗接種，與未接種疫苗，以媒劑接種或以表現無關抗原之重組細菌接種的對照組族群相比較。從在腫瘤注射後按照時間函數之腫瘤體積的觀點，或從在腫瘤注射後按照時間函數之存活族群的觀點，評估在這類模式中的疫苗效力(例如實例31D)。在一個具體實施例中，在利用包括重組細菌之組合物接種的老鼠中的腫瘤體積，比在未接種疫苗或接種媒劑或表現無關抗原之細菌的老鼠中的腫瘤體積更低大約5%、大約10%、大約25%、大約50%、大約75%、大約90%或大約100%。在其他的具體實施例中，

在將腫瘤植入老鼠內之後至少大約10、大約17或大約24天時，觀察到在腫瘤體積上的差異。在一個具體實施例中，在以包括重組細菌之組合物接種的老鼠中的中間存活時間，比在未接種疫苗或以媒劑或表現無關抗原之細菌接種的老鼠中的更長至少大約2、大約5、大約7或至少大約10天。

在本文中描述之方法中的宿主(即個體)是任何的脊椎動物，最好是哺乳動物，包括家畜、競賽動物和靈長類，包括人類。在一些具體實施例中，該宿主為哺乳動物。在一些具體實施例中，該宿主為人類。

重組細菌或包括該品系之組合物的遞送，可藉著任何適合的方法，如皮內、皮下、腹腔內、靜脈內、肌肉內、淋巴內、口服或鼻內，以及藉著任何與特定惡性或傳染病或其他狀況有關的路徑。

可將包括重組細菌的組合物和免疫刺激劑同時、連續或分開投與宿主。免疫刺激劑的實例包括但不限於IL-2、IL-12、GMCSF、IL-15、B7.1、B7.2，以及B7-DC和IL-14。在上文第IX章中提供了刺激劑的額外實例。

當在本文中使用"有效含量"之細菌或組合物(如醫藥組合物或免疫原組合物)時，為足以完成有利或想要結果的含量。關於預防用途，有利或想要的結果包括排除或降低疾病之風險、減少疾病之嚴重性或延遲疾病之開始的結果，包括疾病的生化、組織學及/或行為症狀，其併發症以及在疾病發展期間出現的中間病理學表現型。至於治療用途，

有利或想要的結果包括臨床結果，如抑制或壓抑疾病、降低起因於疾病的一或多個症狀(生化的、組織學的及/或行為的)，包括其併發症，以及在疾病發展期間出現的中間病理學表現型，增加罹患疾病那些人的生命品質、降低治療疾病所需之其他醫藥的劑量、提高其他醫藥的效力、延遲疾病的進行，並/或延長患者的存活。可以一或多次投藥投與有效劑量。為了本發明，藥物、化合物或醫藥組合物的有效含量是足以直接或間接完成預防或治療的含量。如同在臨床上所了解的，連同其他的藥物、化合物或醫藥組合物，可能或可能未達到藥物、化合物或醫藥組合物的有效含量。因此，就投與一或多個治療劑而言，可考量有效劑量，且若連同一或多個其他的製劑，可能或達到想要的結果，則可將單一製劑視為以有效含量給予。

在一些具體實施例中，為了治療癌症，有效含量包括結果將產生想要之免疫反應的含量，其中該免疫反應減緩標靶腫瘤的生長、降低腫瘤的尺寸，或最好是完全排除腫瘤。可按適當的間隔，重複疫苗的投藥，並可在接種疫苗之個體中的多個不同位置同時投與。在一些具體實施例中，為了預防癌症，有效含量包括結果將產生保護性免疫反應的劑量，使個體發展出癌症的可能性明顯地降低。疫苗接種攝生法可由單一劑量組成，或以適當的間隔重複，直到建立保護性免疫反應為止。

在一些具體實施例中，可在已經診斷出個體患有癌症時開始該個體的癌症治療，或可與其他治療併用。例如，可

利用疫苗治療已經以手術移除腫瘤，或利用輻射療法或藉著化學療法治療的個體，以便降低或排除個體中任何殘餘的腫瘤，或降低癌症再發的風險。在一些具體實施例中，個體的癌症預防處理，將始於具有增加染患某些癌症之風險的個體，歸因於環境條件或遺傳優勢。

給予宿主之醫藥組合物或疫苗的劑量，將視宿主的物種、宿主的大小和宿主的狀況或疾病而改變。組合物的劑量亦將視組合物之投藥頻率及投藥路徑而定。由個別的醫師從待治療之患者的觀點來選擇精確的劑量。

在一些具體實施例中，在該方法中使用的醫藥組合物、免疫原組合物或疫苗包括重組細菌，其包括在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體。在一些具體實施例中，該重組細菌是經過修改及/或突變的細菌，如在2004年6月30日申請，Thomas W. Dubensky, Jr.等人的美國專利申請案第10/883,599號，標題為"經過修改之自由-活微生物、疫苗組合物，及其使用方法(Modified Free-Living Microbes, Vaccine Compositions and Methods of Use Thereof)"、美國專利公開案第2004/0228877號和美國專利公開案第2004/0197343號中描述的那些，分別以引用的方式全部併入本文中。在一些具體實施例中，單一劑量之包括這類經過修改的及/或突變種細菌，或任何在本文中描述之其他重組細菌的醫藥組合物或疫苗，包括從大約10^2至大約10^{12}個細菌生物。在其他的具體實施例中，單一劑量包括從大約10^5到大約10^{11}個細菌生物。在另一個具體實施例

中，單一劑量包括從大約10^6到大約10^{11}個細菌生物。在另外的具體實施例中，單一劑量的醫藥組合物或疫苗包括從大約10^7到大約10^{10}個細菌生物。在另一個具體實施例中，單一劑量的醫藥組合物或疫苗包括從大約10^7到大約10^9個細菌生物。

在一些具體實施例中，單一劑量包括至少大約$1x10^2$個細菌生物。在一些具體實施例中，單一劑量之組合物包括至少大約$1x10^5$個生物。在其他的具體實施例中，單一劑量之組合物或疫苗包括至少大約$1x10^6$個細菌生物。在另一個具體實施例中，單一劑量之組合物或疫苗包括至少大約$1x10^7$個細菌生物。

在一些具體實施例中，單一劑量的醫藥組合物、免疫原組合物或疫苗包括在本文中描述之重組的、經過修改的及/或突變種細菌，其包括從大約1 CFU/公斤到大約$1x10^{10}$CFU/公斤(CFU=菌落形成單位)。在一些具體實施例中，單一劑量的組合物包括從大約10 CFU/公斤到大約$1x10^9$CFU/公斤。在其他的具體實施例中，單一劑量的組合物或疫苗包括從大約$1x10^2$CFU/公斤到大約$1x10^8$CFU/公斤。在另外的具體實施例中，單一劑量的組合物或疫苗包括從大約$1x10^3$CFU/公斤到大約$1x10^8$CFU/公斤。在其他的具體實施例中，單一劑量的組合物或疫苗包括從大約$1x10^4$CFU/公斤到大約$1x10^7$CFU/公斤。在一些具體實施例中，單一劑量的組合物包括至少大約1 CFU/公斤。在一些具體實施例中，單一劑量的組合物包括至少大約10 CFU/

公斤。在其他的具體實施例中，單一劑量的組合物或疫苗包括至少大約$1x10^2$CFU/公斤。在另一個具體實施例中，單一劑量的組合物或疫苗包括至少大約$1x10^3$CFU/公斤。在另一個具體實施例中，單一劑量的組合物或疫苗包括至少大約$1x10^4$CFU/公斤。

在一些具體實施例中，可使用此項技藝中已知的方法，從一個宿主，如老鼠的LD_{50}資料，推測出另一個宿主，如人類的適當(及有效)劑量含量。

在一些具體實施例中，醫藥組合物、免疫原組合物或疫苗包括提供抗原之細胞，如樹突細胞，其已經被包括在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的重組細菌感染。在一些具體實施例中，該細菌已經被修改並/或是突變種，如在2004年6月30日申請之美國專利申請案第10/883,599號，以及美國專利公開案第2004/0228877號和第US 2004/0197343號中描述的那些，分別以引用的方式全部併入本文中。在例如下列的：Thomas W. Dubensky, Jr.等人的2004年7月23日申請之國際申請案第PCT/US2004/23881號，標題為"提供-抗原之細胞疫苗，及其使用方法(Antigen-Presenting Cell Vaccines and Methods of Use Thereof)"；2004年6月30日申請之美國專利申請案第10/883,599號；美國專利公開案第2004/0228877號；以及美國專利公開案第US 2004/0197343號中描述了以這類提供-抗原之細胞為基礎的疫苗，分別以引用的方式全部併入本文中。在一些具體實施例中，以提供-抗原之細胞為基礎之疫苗的個別劑量

包括細菌，如在本文中描述的那些，包括在大約$1x10^3$到大約$1x10^{10}$之間個提供-抗原之細胞。在一些具體實施例中，疫苗的個別劑量包括在大約$1x10^5$到大約$1x10^9$之間個提供-抗原之細胞。在一些具體實施例中，疫苗之個別劑量包括在大約$1x10^7$到大約$1x10^9$之間個提供-抗原之細胞。

在一些具體實施例中，劑量單位在一天中，或在一週或一個月或一年或多年的期間內多次投藥是較佳的。在一些具體實施例中，每天投與劑量單位持續數天，或一週一次持續數週。

本發明更提供任何在本文中描述之重組細菌(即包括在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣或載體的任何細菌)，在製造用來在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由在該細菌中之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體編碼的多肽包括抗原。在一些具體實施例中，該抗原為異種抗原。本發明亦提供使用在本文中描述之重組細菌，在製造用來在宿主中預防或治療狀況(例如疾病，如癌症或傳染病)之醫藥品上的用途。本發明更提供在本文中描述之重組細菌，在宿主中誘導對抗原之免疫反應的用途，其中由在該細菌中之重組核酸分子、表現卡匣及/或載體編碼的多肽包括抗原。本發明更提供在本文中描述之重組細菌，在宿主中預防或治療狀況(如疾病)的用途。

本發明亦提供誘導MHC第I類抗原或MHC第II類抗原出現在提供-抗原之細胞上的方法，包括使在本文中描述之細菌與提供-抗原之細胞接觸。

本發明更提供在宿主中誘導對抗原之免疫反應的方法，包括下列步驟：(a)在適當的條件下，使在本文中描述之重組細菌與得自宿主的提供-抗原之細胞接觸，並持續一段足以裝載提供-抗原之細胞的時間；以及(b)將該提供-抗原之細胞投與宿主。

將由熟諳此藝者認可重組核酸分子、表現卡匣和細菌的其他可能用途。例如，在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣、載體和重組細菌(以及其他宿主細胞)，可用來產生並分離異種多肽。因此，在另一方面，本發明提供在細菌中表現多肽的方法，包括(a)將在本文中描述之表現卡匣或載體導入細菌內(例如經由轉移感染、轉化作用或共軛作用)；以及(b)在適合蛋白質表現的條件下，使該細菌在培養物中生長。在其他方面，本發明提供產生經過分離之多肽的方法，包括下列的：(a)將在本文中描述之表現卡匣或載體導入細菌內(例如經由轉移感染、轉化作用或共軛作用)；(b)在適合蛋白質表現的條件下，使該細菌在細菌培養物中生長；以及(c)從細菌的細胞培養中分離蛋白質。轉化作用、轉移感染和共軛作用的適當方法，為熟諳此藝者已熟知的，像是培養細菌並使其生長，以及從細胞培養中分離分泌性或非-分泌性蛋白質的方法。

實例

提供下列的實例，用來解釋但非限制本發明。

實例1. 製備代表性的突變種李斯特菌屬品系

李斯特菌屬品系衍生自10403S(Bishop等人，J. Immunol.

139:2005(1987))。藉著SOE-PCR和利用已確立之方法的對偶基因交換(Gamilli等人，Mol. Microbiol. 8:143(1993))，產製具有指定基因之架構中刪除的李斯特菌屬品系。在Glomski等人，J. Cell. Biol. 156:1029(2002)中描述了突變種品系LLO L461T(DP-L4017)，以引用的方式併入本文中。actA⁻突變種是在Skoble等人，J. of Cell Biology, 150:527-537(2000)中描述的DP-L3078品系，全部以引用的方式併入本文中，其已經革除了它的原噬菌體。(在(Lauer等人，J. Bacteriol. 184:4177(2002)；美國專利公開案第2003/0203472號)中描述了原噬菌體的革除)。在2003年2月6日申請之美國臨時申請案第60/446,051號，以L4029/uvrAB(參見，例如該申請案的實例7)，以及在美國專利公開案第2004/0197343號中描述了actA⁻uvrAB⁻品系的建構。在為了專利程序之國際認可之微生物存放的布達佩斯條約的規定下，於2003年10月3日將DP-L4029uvrAB(單核細胞增多性李斯特菌actA⁻/uvrAB⁻雙重刪除突變種)存放在美國典型培養物收集中心(ATCC)，10801 University Blvd, Manassas, Virginia 20110-2209, United States of American，並命名為PTA-5563。在下列的申請案或公開案中提供了關於突變種李斯特菌屬的額外說明，分別以引用的方式全部併入本文中：美國專利公開案第2004/0228877號；美國專利公開案第2004/0197343號；2004年7月23日申請之PCT國際申請案第PCT/US2004/23881號；以及2004年6月30日申請之美國專利申請案第10/883,599號。此外，已經在為了專利程序之國

際認可之微生物存放的布達佩斯條約的規定下，於2003年10月3日將代表性的單核細胞增多性李斯特菌ΔactAΔinlB雙重刪除突變種存放在美國典型培養物收集中心(ATCC)，10801 University Blvd, Manassas, Virginia 20110-2209, United States of America，並命名為PTA-5562。

在單核細胞增多性李斯特菌中刪除基因之方法的一個非限制性實例，產生在下文實例24中提供的減毒突變種。

實例2.建構表現AH1/OVA或AH1-A5/OVA的李斯特菌屬品系

製備表現截短形式之模式抗原卵清蛋白(OVA)、得自老鼠結直腸癌之免疫優勢抗原決定位(CT26)，稱為AH1(SPSYVYHQF(序列第72號))，以及改變了的抗原決定位AH1-A5(SPSYAYHQF(序列第73號)；Slansky等人，Immunity, 13:529-538(2000))的突變種李斯特菌屬品系。使用pPL2整合載體(Lauer等人，J. Bacteriol. 184:4177(2002)；美國專利公開案第2003/0203472號)，駕馭含有整合至李斯特菌屬基因組的無害位置內之單一副本的OVA和AH1-A5/OVA重組李斯特菌屬品系。

A.建構表現OVA之李斯特菌屬(DP-L4056)

首先製備包括與截短之OVA融合的溶血素-刪除LLO，並納入pPL2整合載體內的抗原表現卡匣(pPL2/LLO-OVA)。藉著在PSA(得自ScottA的Phage)附接位置$tRNA^{Arg}$-attBB'處，將pPL2/LLO-OVA導入革除噬菌體之單核細胞增多性李斯特菌品系DP-L4056內，衍生出李斯特菌屬-OVA疫苗品系。

使用PCR擴大溶血素-刪除LLO，使用下列的模板和引子：

來源：DP-L4056基因組DNA

引子：

前進(KpnI-LLO核苷酸1257-1276)：

5'-CTCTGGTACCTCCTTTGATTAGTATATTC(序列第74號)

(T_m：LLO-特定的：52℃。整體：80℃。)

逆向(BamHI-XhoI-LLO核苷酸2811-2792)：

5'-CAATGGATCCCTCGAGATCATAATTTACTTCATCCC(序列第75號)

(T_m：LLO-特定的：52℃。整體：102℃。)

亦使用PCR擴大截短的OVA，使用下列的模板和引子：

來源：得自DP-E3616大腸桿菌的pDP3616質體DNA(Higgins等人，Mol. Molbiol. 31:1631-1641(1999))。

引子：

前進(XhoI-NcoI OVA cDNA核苷酸174-186)：

5'-ATTTCTCGAGTCCATGGGGGGTTCTCATCATC(序列第76號)

(T_m：OVA-特定的：60℃。整體：88℃。)

逆向(XhoI-NotI-HindIII)：

5'-GGTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTT(序列第77號)

(T_m：整體：82℃。)

一個完成建構過程的草案涉及利用KpnI和BamHI切開LLO擴大區，並將KpnI/BamHI載體插入pPL2載體內(pPL2-LLO)。然後以XhoI和NotI切開OVA擴大區，並插入

已經利用XhoI/NotI切開的pPL2-LLO內。(注意：pPL2載體不含任何XhoI位置；pDP-3616含有一個XhoI位置，其被用在OVA逆向引子的設計上)。藉著限制分析證實構築體pPL2/LLO-OVA(KpnI-LLO-XhoI-OVA-NotI)，並定序之。藉著轉化作用將質體pPL2/LLO-OVA導入大腸桿菌內，接著經由共軛作用導入並整合至李斯特菌屬(DP-L4056)內，精確地如同由Lauer等人描述的(或導入其他想要的李斯特菌屬品系內，如inlB⁻突變種或inlB⁻actA⁻雙重突變種)。

B.建構表現AH1/OVA或AH1-A5/OVA的李斯特菌屬品系

欲製備表現AH1/OVA或AH1-A5/OVA抗原序列的李斯特菌屬，首先從寡核苷酸製備攜帶抗原的插入物，然後連接到載體pPL2/LLO-OVA內(按照上述製備)。

使用下列的寡核苷酸來製備AH1或AH1-A5插入物：

AH1抗原決定位插入物(ClaI-PstI可相容的末端)：

上股寡(AH1上方)：

5'-CGATTCCCCTAGTTATGTTTACCACCAATTTGCTGCA(序列第78號)

下股寡(AH1下方)：

5'-GCAAATTGGTGGTAAACATAACTAGGGGAAT(序列第79號)

AH1-A5抗原決定位插入物(ClaI-AvaII可相容的末端)：

AH1-A5抗原決定位的序列是SPSYAYHQF(序列第73號)(5'-AGT CCA AGT TAT GCA TAT CAT CAA TTT-3'(序列第80號))。

上方：5'-**CGAT**AGTCCAAGTTATGCATATCATCAATTT**GC**(序列第81號)

下方：5'-**GTCGC**AAATTGATGATATGCATAACTTGGACT**AT**(序列第82號)

以等莫耳比例將特定抗原決定位的寡核苷酸對混合在一起，加熱至95℃5分鐘。然後容許慢慢地冷卻寡核苷酸混合物。然後以200比1之莫耳比例，將已黏接的寡核苷酸對，與藉著以相關之限制酵素消化而製備出的pPL2-LLO/OVA質體連接。可藉著限制分析及/或定序，證實新構築體的身分。

然後可藉著轉化作用將該質體導入大腸桿菌內，接著經由共軛作用，導入並整合至李斯特菌屬(DP-L4056)內，精確地如同由Lauer等人描述的，或導入其他想要的李斯特菌屬品系內，如actA⁻突變種品系(DP-L0429)、LLO L461T品系(DP-L4017)，或actA⁻/uvrAB⁻品系(DP-L4029uvrAB)。

實例3.建構李斯特菌屬多核苷酸和表現卡匣

A.選殖載體

將選出之異種抗原表現卡匣分子構築體插入pPL2(Lauer等人，J. Bacteriol. 2002)或pAM401(Wirth等人，J. Bacteriol. 165:831-836)內，加以修改使其含有pPL2的多重選殖序列(AatII小片段，171個鹼基對)，插入在四環素抗藥性基因內，弄鈍的XbaI與NruI認知位置之間(pAM401-MCS，圖32)。通常，將hly啟動基因和(選出的)信號肽序列插入pPL2或pAM401-MCS質體載體特有的KpnI與BamHI位置之間。

隨後將選出的EphA2基因(有時加以修改，使其含有N-終端和C-終端抗原決定位標籤；參見下文說明)，選殖到這些構築體特有的BamHI與SacI位置之間。藉著電穿透作用，將以pAM401-MCS質體載體為基礎的分子構築體，導入選出的單核細胞增多性李斯特菌品系內，其亦已使用熟諳此藝者常用的方法，利用溶菌酶處理過了。藉著從在含有氯黴素之BHI瓊脂盤(10微克/毫升)上形成的菌落中，藉著限制酵素分析分離DNA，證實在李斯特菌屬-轉移感染物中預期的質體結構。利用以各種pAM401-MCS為基礎之異種蛋白質表現卡匣構築體轉化的重組李斯特菌屬，測量異種蛋白質的表現和分泌，如同下述。

根據先前描述的方法[Lauer等人，J. Bacteriol. 184, 4177-4186(2002)]，將以pPL2為基礎之異種蛋白質表現卡匣構築體併入在所選出之李斯特菌屬品系之基因組中的$tRNA^{Arg}$基因內。簡言之，首先藉著電穿透作用或藉著化學工具，將pPL2異種蛋白質表現卡匣構築體質體導入大腸桿菌宿主品系SM10[Simon等人，Bio/Technology 1:784-791 (1983)]內。隨後，藉著共軛作用，將以pPL2-為基礎之質體從經過轉化的SM10轉移至選出的李斯特菌屬品系內。在每毫升含有7.5微克氯黴素和每毫升含有200微克鏈黴素的藥物-選擇BHI瓊脂盤上培養之後，藉著在具有相同組成之培養盤上繼代3次，純化所選出的菌落。欲證實pPL2載體整合在噬菌體附接位置處，挑選個別的菌落，並藉著PCR篩選，使用前進引子NC16(5'-gtcaaaacatacgctcttatg-3'(序列第94

號))和逆向引子PL95(5'-acataatcagtccaaagtagatgc-3'(序列第95號))的引子對。所選出之菌落具有以pPL2為基礎之質體，併入在選出之李斯特菌屬品系之基因組中的$tRNA^{Arg}$基因內，產生具有499個鹼基對的診斷DNA擴大區。

B.啟動基因

異種蛋白質表現卡匣含有prfA-依賴性hly啟動基因，其駕馭編碼李斯特菌溶解素O(LLO)之基因的轉錄，並在被感染細胞的顯微環境中被激活。使用下示的引子對，藉著PCR從單核細胞增多性李斯特菌，品系DP-L4056中擴大核苷酸205586-206000(414個鹼基對)。所擴大之區域包括hly啟動基因，還有LLO的前28個胺基酸，包括secA1信號肽(參見上文)和PEST功能部位。可在GenBank中找到單核細胞增多性李斯特菌品系EGD之該區域的預期序列(登錄編號：gi | 16802048 | ref | NC_003210.1 | [16802048])。在PCR反應中使用的引子如下：

引子對：

前進(KpnI-LLO核苷酸1257-1276)：

5'-CTCTGGTACCTCCTTTGATTAGTATATTC

(序列第74號)

逆向(BamHI-LLO核苷酸)：

5'-CTCTGGATCCATCCGCGTGTTTCTTTTCG

(序列第84號)

(將核酸內切限制酶認知位置加下標線)

根據製造者的說明書，將422個鹼基對的PCR擴大區選殖

到質體載體pCR-XL-TOPO(Invitrogen, Carlsbad, CA)內。判定在pCR-XL-TOPO-hly啟動基因質體純種系中之李斯特菌屬-專一之鹼基的核苷酸序列。與EGD品系相比較，單核細胞增多性李斯特菌品系DP-L4056含有8個核苷酸鹼基變化，位在hly啟動基因中prfA盒子的側面。在下文圖1中顯示，將單核細胞增多性李斯特菌DP-L4056和EGD品系的hly啟動基因排成一直線。

藉著以KpnI和BamHI消化，從pCR-XL-TOPO-hly啟動基因質體純種系中，釋放相當於hly啟動基因和secA1 LLO信號肽的422個鹼基對DNA，並根據熟諳此藝者已熟知的傳統方法，選殖到pPL2質體載體內(Lauer等人2002 J. Bact.)。將該質體稱為pPL2-hlyP(天然的)。

C.Shine-Dalgarno序列

在啟動基因的3'端含有聚-嘌呤Shine-Dalgarno序列，為使30S核糖體次單元(經由16S rRNA)與異種基因RNA轉錄本吻合，並發動轉譯所必需的元件。Shine-Dalgarno序列通常具有下列的一致序列：5'-NAGGAGGU-N_{5-10}-AUG(起始密碼子)-3'(序列第85號；序列第125-129號)。有變種的聚-嘌呤Shine-Dalgarno序列。值得注意的是，編碼李斯特菌溶解素O(LLO)的李斯特菌屬hly基因具有下列的Shine-Dalgarno序列：AAGGAGAGTGAAACCCATG(序列第70號)(將Shine-Dalgarno序列加下標線，並以粗體表示轉譯開始密碼子)。

實例4.編碼包括secA1信號肽(LLO)和人類EphA2之融合蛋白的多核苷酸

在圖2中出示編碼與secA1信號肽(LLO信號肽)加LLO PEST序列融合之全長人類EphA2抗原的表現卡匣之序列。在圖3中出示由該表現卡匣編碼之融合蛋白的胺基酸序列。

實例5.人類EphA2(EX2)之細胞外功能部位的密碼子-最優化作用

已經為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼人類EphA2之細胞外功能部位(胺基酸25-526)的序列密碼子-最優化。在圖4中出示編碼人類EphA2之細胞外功能部位的天然核苷酸序列。在圖5中出示在李斯特菌屬中之最佳密碼子利用的核苷酸序列。在圖6中出示人類EphA2之細胞外功能部位的胺基酸序列。

實例6.編碼包括secA1信號肽(LLO)和huEphA2(EX2)之細胞外功能部位之融合蛋白的多核苷酸

A.沒有密碼子-最優化作用的多核苷酸

在圖7中出示編碼與secA1信號肽(LLO信號肽)加LLO PEST序列融合的人類EphA2抗原之細胞外功能部位的多核苷酸之序列。在圖8中出示由該表現卡匣編碼之融合蛋白的胺基酸序列。

B.帶有密碼子-最優化的人類EphA2之細胞外功能部位的表現卡匣

在圖9中出示編碼與secA1信號肽(LLO信號肽)加LLO PEST序列融合的人類EphA2抗原之細胞外功能部位的表現

卡匣之序列，其中為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼EphA2之細胞外功能部位的序列密碼子-最優化。在圖10中出示由該表現卡匣編碼之融合蛋白的胺基酸序列。

C.帶有密碼子-最優化的secA1信號肽和密碼子-最優化的人類EphA2之細胞外功能部位的表現卡匣

在圖11中出示編碼與secA1信號肽(LLO信號肽)加LLO PEST序列融合的人類EphA2抗原之細胞外功能部位的表現卡匣之序列，其中為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼EphA2之細胞外功能部位、信號肽和PEST序列的序列全部密碼子-最優化。在圖12中出示由該表現卡匣編碼之融合蛋白的胺基酸序列。

實例7.編碼包括Tat信號肽(枯草桿菌phoD)和huEphA2(EX2)之細胞外功能部位的融合蛋白之密碼子-最優化的表現卡匣

在圖13中出示編碼與Tat信號肽(枯草桿菌phoD)融合的EphA2抗原之細胞外功能部位的表現卡匣之序列，其中為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼EphA2之細胞外功能部位和信號肽的序列全部密碼子-最優化。在圖14中出示由該表現卡匣編碼之融合蛋白的胺基酸序列。

實例8.人類EphA2(CO)之細胞內功能部位的密碼子-最優化作用

已經為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼人類EphA2之細胞內功能部位(胺基酸558-975)的序列密碼子-

最優化。在圖15中出示編碼人類EphA2之細胞內功能部位的天然核苷酸序列。在圖16中出示在李斯特菌屬中之最佳密碼子利用的核苷酸序列。在圖17中出示人類EphA2之細胞內功能部位的胺基酸序列。

實例9.編碼包括secA1信號肽(LLO)和huEphA2(CO)之細胞內功能部位之融合蛋白的多核苷酸

A.沒有密碼子-最優化作用的多核苷酸

在圖18中出示編碼與secA1信號肽(LLO)加LLO PEST序列融合的人類EphA2抗原之細胞內功能部位的多核苷酸之序列。在圖19中出示由該表現卡匣編碼之融合蛋白的胺基酸序列。

B.帶有密碼子-最優化的人類EphA2之細胞內功能部位的表現卡匣

在圖20中出示編碼與secA1信號肽(LLO信號肽)加LLO PEST序列融合的huEphA2抗原之細胞內功能部位的表現卡匣之序列，其中為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼EphA2之細胞內功能部位的序列密碼子-最優化。在圖21中出示由該表現卡匣編碼之融合蛋白的胺基酸序列。

C.帶有密碼子-最優化的secA1信號肽和密碼子-最優化的人類EphA2之細胞內功能部位的表現卡匣

在圖22中出示編碼與secA1信號肽(LLO信號肽)加LLO PEST序列融合的EphA2抗原之細胞內功能部位的表現卡匣之序列，其中為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼EphA2之細胞內功能部位、信號肽和PEST序列的序列

全部密碼子-最優化。在圖23中出示由該表現卡匣編碼之融合蛋白的胺基酸序列。

實例10.編碼包括枯草桿菌phoD信號肽和huEphA2(CO)之細胞內功能部位的融合蛋白之密碼子-最優化的表現卡匣

在圖24中出示編碼與Tat信號肽(枯草桿菌phoD)融合的EphA2抗原之細胞內功能部位的表現卡匣之序列，其中為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼EphA2之細胞內功能部位和信號肽的序列全部密碼子-最優化。在圖25中出示由該表現卡匣編碼之融合蛋白的胺基酸序列。

實例11.編碼包括LLO信號肽和NY-ESO-1之融合蛋白的密碼子-最優化之表現卡匣

為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現人類睪丸癌抗原NY-ESO-1(GenBank登錄編號NM_001327)，設計表現卡匣。在圖26中出示編碼與secA1信號肽(LLO)加LLO PEST序列融合之NY-ESO-1的表現卡匣之序列。為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將在該表現卡匣中編碼抗原和信號肽的序列密碼子-最優化。在圖27中出示由該表現卡匣編碼之融合蛋白的胺基酸序列。

實例12.編碼與非-李斯特菌屬secA1信號肽(乳酸乳球菌usp45)融合之抗原的密碼子-最優化之表現卡匣

為了使用非-李斯特菌屬之secA1信號肽，在單核細胞增多性李斯特菌中表現異種抗原，設計表現卡匣。在下文中出示得自乳酸乳球菌之usp45信號肽的胺基酸序列(Steidler等人，Nature Biotechnology, 21:785-9(2003))，其天然密碼

序列，以及為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現最優化了的密碼序列。

胺基酸序列：

MKKKIISAILMSTVILSAAAPLSGVYA'DT(序列第46號)

信號肽酶認知位置：VYA-DT(序列第55號)

天然的核苷酸序列：

5'ATGAAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGTCTAC
AGTGATACTTTCTGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTA
CGCTGACACA3'(序列第86號)

為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現最優化了的密碼子：

5'ATGAAAAAAAAAATTATTAGTGCAATTTTAATGAGTA
CAGTTATTTTAAGTGCAGCAGCACCATTAAGTGGTGTTT
ATGCAGATACA3'(序列第87號)

在圖28中出示部分表現卡匣的序列，其包括以可操作之方式與編碼Usp45信號肽之密碼子-最優化序列連接的得自單核細胞增多性李斯特菌之hly啟動基因。為了表現包括Usp45信號肽和想要抗原的融合蛋白，可將該序列與密碼子-最優化或未-密碼子-最優化的抗原序列混合。

實例13.編碼與secA2信號肽(p60)融合之抗原的密碼子-最優化之表現卡匣和載體

A.設計密碼子-最優化的表現卡匣

為了使用secA2分泌路徑，在單核細胞增多性李斯特菌中表現異種抗原，設計表現卡匣。在下文中出示得自單核細

胞增多性李斯特菌之p60信號肽的胺基酸序列、其天然的密碼序列，以及為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現最優化了的密碼序列。

胺基酸序列：

MNMKKATIAATAGIAVTAFAAPTIASA'ST(序列第48號)

信號肽酶認知位置：ASA-ST(序列第57號)

天然的核苷酸序列：

5'ATGAATATGAAAAAAGCAACTATCGCGGCTACAGCTG
GGATTGCGGTAACAGCATTTGCTGCGCCAACAATCGCAT
CCGCAAGCACT3'(序列第90號)

為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現最優化了的密碼子：

5'ATGAATATGAAAAAAGCAACAATTGCAGCAACAGCAG
GTATTGCAGTTACAGCATTTGCAGCACCAACAATTGCAA
GTGCAAGTACA3'(序列第91號)

在圖29中出示部分表現卡匣的序列，其包括以可操作之方式與編碼p60信號肽之天然序列連接的得自單核細胞增多性李斯特菌之hly啟動基因。在圖30中出示部分表現卡匣的序列，其包括以可操作之方式與編碼p60信號肽之密碼子-最優化序列連接的得自單核細胞增多性李斯特菌之hly啟動基因。

B. pPL2-hlypro_p60的建構

亦建構表現卡匣，其中將編碼抗原的序列在架構上插入在p60基因之密碼序列中的一或多個位置內。下文描述了可

用來將抗原序列在架構上插入p60序列內之部分表現卡匣的建構說明。該部分的表現卡匣含有hly啟動基因。

使用下列的引子和作為第一個模板的pPL2-hlyP-OVA(與在上述實例2A中的pPL2/LLO-OVA相同)，進行使用Pfx或Vent聚合酶的個別初步之PCR反應：

pPL2-5F：5'-GACGTCAATACGACTCACTATAG(序列第92號)

p60-hlyP-237R：5'-CTTTTTTCATATTCATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC(序列第93號)

所得之複製區的尺寸為285個鹼基對。

亦進行使用下列引子合作為第二個模板的pCR-TOPO-p60進行使用Pfx或Vent聚合酶的個別初步PCR反應。(該載體pCR-TOPO-p60是由獲自Invitrogen, Carlsbad, California之pCR-TOPO載體來製造的，其中已經插入得自單核細胞增多性李斯特菌的基因組p60序列。可使用任何其他可獲得的許多另類來源之p60密碼序列作為插入模板)。在該PCR反應中使用的引子如下：

hlyP-p60-1F：5'-AAGGAGAGTGAAACCCATGAATATGAAAAAAGCAAC(序列第88號)

pCR-TOPO-2283R：5'-GTGTGATGGATATCTGCAGAATTC(序列第89號)

所得之複製區的尺寸為1510個鹼基對。然後以S6管柱(Bio-Rad Laboratories, Hercules, California)清除PCR反應。

然後進行二級PCR反應，使用初步PCR反應各約5微升作

為模板。二級PCR反應使用下列的引子：KpnI-LLO 1257F(先前使用的引子)：5'CTCTGGTACCTCCTTTGATTAGTATATTC(序列第74號)和pCR-TOPO-2258R：5'-CCCTTGGGGATCCTTAATTATACG(序列第83號)。所得之複製區的尺寸為1715個鹼基對。藉著瓊脂糖凝膠分析證實在所有PCR反應中的預期複製區尺寸。以BamHI消化，清除二級PCR反應，並以KpnI消化再度清除。然後將hlyP-p60基因片段(KpnI-BamHI)(圖30)連接到pPL2和經過修改之pAM401(pAM401-MCS；圖32)質體兩者的BamHI和KpnI位置之間。

然後利用BamHI/KpnI(1697, 6024個鹼基對)和HindIII(210, 424, 3460, 3634個鹼基對)消化，證實pPL2-p60質體的建構。亦證實在pPL2-p60質體中的PstI位置是獨特的。(KpnI/PstI消化亦將產生736和6985個鹼基對的片段)。pAM401-p60質體的建構(得自p60區之KpnI/PstI和KpnI/BamHI片段是與pPL2構築體相同的)。

然後使用熟諳此藝者已知的方法，製備每個質體的大量製備分離。

然後可將想要的編碼抗原序列插入p60序列內，並以與p60序列相同的轉譯架構，使用熟諳此藝者已熟知的技術。通常，插入或插入群應該留下p60完整的N-終端信號肽序列。亦應該完整留下p60的C-終端自溶素序列。

實例14.為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，編碼人類間皮素之序列的密碼子-最優化作用

在圖33中出示編碼人類間皮素，癌症抗原的密碼子-最優

化之多核苷酸序列。為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，已經將在圖32中出示的序列密碼子-最優化。在圖34中出示由在圖32中之序列編碼的多肽序列。

實例15.為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，編碼老鼠間皮素之序列的密碼子-最優化作用

在圖35中出示編碼老鼠間皮素，癌症抗原的密碼子-最優化之多核苷酸序列。為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，已經將在圖35中出示的序列密碼子-最優化。在圖36中出示由在圖35中之序列編碼的多肽序列。

實例16.經由對偶基因交換，將表現卡匣整合到李斯特菌屬染色體內

可使用整合載體，如pPL2，將異種基因表現卡匣插入李斯特菌屬的染色體內，成為另一種可能的選擇。

簡言之，藉著將細菌平舖在含有氯黴素(10微克/毫升)的BHI瓊脂培養基上，並在30℃之許可溫度下培養，選擇以pKSV7-異種蛋白質表現卡匣質體電穿透的細菌。藉著在含有氯黴素的培養基中，在41℃的非-許可溫度下繼代數個個別的菌落多個世代，選擇至細菌染色體內的單一交叉整合作用。最後，藉著在不含氯黴素隻BHI培養基中，在30℃的許可溫度下繼代數個個別的菌落多個世代，完成質體切除和革除(雙重交叉)。藉著PCR證實異種蛋白質表現卡匣整合到細菌染色體內，使用擴大限定從異種蛋白質表現卡匣到細菌染色體標靶序列，但未納入pKSV7質體載體構築體中之區域的引子對。

實例17.為了在選出之重組單核細胞增多性李斯特菌品系中表現，選殖並將EphA2插入pPL2載體內

為了插入各種pPL2-信號肽表現卡匣內，分別選殖位在EphA2穿透膜螺旋側面的EphA2之外部(EX2)和細胞質(CO)功能部位。使用相當於天然哺乳動物序列的基因，或為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而被密碼子-最優化之EphA2 EX2和CO功能部位的基因。為了將EphA2 EX2和EphA2 CO密碼子-最優化，使用在李斯特菌屬中分別適合20個胺基酸的最佳密碼子(參見上文的表3)。藉著延伸重疊的寡核苷酸，使用熟諳此藝者常用的技術，合成密碼子-最優化的EphA2 EX2和CO功能部位。藉著核苷酸定序，證實所有合成的EphA2構築體的延伸序列。

在圖4-6(EX2序列)和圖15-17(CO功能部位序列)中，出示EphA2之EX2和CO功能部位的原始胺基酸序列，連同其天然的和密碼子-最優化的核苷酸序列。

此外，為了藉著西方墨點分析，使用對FLAG或蛋白質專一的抗體，檢測EphA2的表現和分泌，亦分別在架構中，在合成之EphA2 EX2和CO基因的胺基和羧基終端，插入FLAG(Stratagene, La Jolla, CA)和myc抗原決定位標籤。因此，所表現之蛋白質具有下列順序的元件：NH_2-信號肽-FLAG-EphA2-myc-CO_2。下文顯示FLAG和myc抗原決定位標籤胺基酸和密碼子-最優化的核苷酸序列：

FLAG：

5'-GATTATAAAGATGATGATGATAAA(序列第96號)

NH_2-DYKDDDDK-CO_2(序列第97號)

Myc：

5'-GAACAAAAATTAATTAGTGAAGAAGATTTA(序列第98號)

NH_2-EQKLISEEDL-CO_2(序列第99號)

實例18.藉著西方墨點分析檢測合成與分泌的異種蛋白質

藉著三氯乙酸(TCA)沉澱之細菌培養物流體的西方墨點分析，判定從各種選出之重組李斯特菌屬-EphA2品系中合成並分泌的EphA2蛋白質。簡言之，將生長在BHI培養基中之李斯特菌屬的中間-對數期培養物收集在50毫升錐形離心管中，使細胞形成小球，並將冰-冷的TCA加至細菌培養上清液中至終[6%]濃度，在冰上培養最少90分鐘或過夜。藉著在4℃下以2400X離心20分鐘，收集TCA-沉澱的蛋白質。然後將小球再懸浮於300-600微升體積，含有15微克/毫升酚紅的TE，pH8.0中。藉著旋轉促使試樣解離。若需要，藉著加入NH_4OH調整試樣的pH值，直到顏色變成粉紅色為止。為了電泳，藉著加入100微升4X SDS裝載緩衝溶液，並在90℃下培養10分鐘，製備所有的試樣。然後在微量離心機中以14,000 rpm離心試樣5分鐘，並收集上清液，儲存在-20℃下。至於西方墨點分析，根據熟諳此藝者常用的方法，將20微升製備好的溶離份(相當於得自1-4x10^9個細菌的培養物流體)裝入4-12%SDS-PAGE凝膠，電泳，並將蛋白質

轉移至PDDF膜上。為了與抗體一起培養，準備轉移的膜，藉著在室溫下與在PBS中之5%脫水奶粉一起培養2小時，並加以攪動。使用按照下列以PBST緩衝溶液(在PBS中之0.1%吐溫20)稀釋的抗體：(1)按1:10,000稀釋的兔抗-Myc多株抗體(ICL laboratories, Newberg, Oregon)；(2)按1:2,000稀釋的老鼠抗-FLAG單株抗體(Stratagene, La Jolla, CA)；以及(3)兔抗-EphA2(羧基終端-專一的)多株抗體(sc-924, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)。藉著與與辣根過氧化酶共軛之山羊抗-兔或抗-老鼠抗體的二次培養，並利用ECL化學發光測定套組(Amersham)檢測，使軟片曝光，評估抗體與蛋白質標靶的專一結合。

實例19.由編碼各種形式之EphA2的重組李斯特菌屬分泌EphA2蛋白質

A.李斯特菌屬：[品系DP-L4029(actA)或DP-L4017(LLO L461T)]

表現卡匣構築體：LLOss-PEST-CO-EphA2

在遺傳上將EphA2 CO功能部位之天然序列與天然secA1 LLO序列融合，並按照上述，將在李斯特菌屬hly啟動基因控制之下的異種抗原表現卡匣，在KpnI和SacI位置之間插入pPL2質體內。按照上述，藉著共軛至李斯特菌屬品系DP-L4029(actA$^-$)和DP-L4017(L461T LLO)內，導入pPL2-EphA2質體構築體。圖37顯示4029-EphA2 CO和4017-EphA2 CO的TCA-沉澱細菌培養物流體之西方墨點分析的結果。該分析證實重組的李斯特菌屬，被設計成含有異種蛋白質表

現卡匣，包括相當於secA1的天然序列，以及EphA2 CO融合蛋白，分泌多個EphA2-專一之片段，其比52 kDa之預期分子量更低，證實需要修改表現卡匣。

B.李斯特菌屬：[DP-L4029(actA⁻)]

表現卡匣構築體：

1. 天然的LLOss-PEST-FLAG-EX2_EphA2-myc-密碼子-最優化的
2. (密碼子-最優化的)LLOss-PEST-(密碼子-最優化的)FLAG-EX2_EphA2-myc

在遺傳上使天然的secA1 LLO信號肽序列，或為了在李斯特菌屬中表現而密碼子-最優化的secA1 LLO信號肽序列與為了在李斯特菌屬中表現而密碼子-最優化的EphA2 EX2功能部位序列融合，並按照上述，將在李斯特菌屬hly啟動基因控制之下的異種抗原表現卡匣，在KpnI和SacI位置之間插入pPL2質體內。按照上述，藉著共軛至李斯特菌屬品系DP-L4029(actA)內，導入pPL2-EphA2質體構築體。圖38顯示編碼與密碼子-最優化之EphA2 EX2功能部位融合的天然或密碼子-最優化之secA1 LLO信號肽的李斯特菌屬actA之TCA-沉澱細菌培養物流體的西方墨點分析之結果。該分析證實混合使用信號肽，以及針對在單核細胞增多性李斯特菌中之最佳密碼子利用而被最優化的異種蛋白質兩者的序列，結果表現預期的全長EphA2 EX2功能部位蛋白質。在僅有EphA2密碼序列之密碼子-最優化作用時，全長EphA2 EX2功能部位蛋白質的表現並不好。當利用為了在單核細

胞增多性李斯特菌中表現而被密碼子-最優化了的單核細胞增多性李斯特菌LLO secA1信號肽時，異種蛋白質表現(片段或全長)的程度是最高的。

C.李斯特菌屬：[DP-L4029(actA)]

表現卡匣構築體：

3. 天然的LLOss-PEST-(密碼子-最優化的)FLAG-EphA2_CO-myc
4. 密碼子-最優化的LLOss-PEST-(密碼子-最優化的)FLAG-EphA2_CO-myc
5. 密碼子-最優化的PhoD-(密碼子-最優化的)FLAG-EphA2_CO-myc

在遺傳上將天然的secA1 LLO信號肽序列，或為了在李斯特菌屬中表現而被密碼子-最優化的secA1 LLO信號肽序列，或者是為了在李斯特菌屬中表現而被密碼子-最優化的得自枯草桿菌之phoD基因的Tat信號肽，與為了在李斯特菌屬中表現而被密碼子-最優化的EphA2 CO功能部位序列融合，並按照上述，將在李斯特菌屬hly啟動基因的控制之下的異種抗原表現卡匣，在KpnI和SacI位置之間插入pAM401-MCS內。按照上述，藉著電穿透作用將pAM401-EphA2質體構築體導入李斯特菌屬品系DP-L4029(actA)內。圖39顯示編碼與密碼子-最優化之EphA2 CO功能部位融合之天然的或密碼子-最優化之secA1 LLO信號肽，或密碼子-最優化之枯草桿菌phoD Tat信號肽的李斯特菌屬之TCA-沉澱細菌培養物流體之西方墨點分

析的結果。該分析證實一旦再度混合使用信號肽和針對在單核細胞增多性李斯特菌中之最佳密碼子利用而最優化之異種蛋白質兩者的序列，結果表現預期之全長的EphA2 CO功能部位蛋白質。此外，預期之全長EphA2 CO功能部位蛋白質的表現和分泌，起因於編碼與密碼子-最優化之EphA2 CO功能部位融合的密碼子-最優化之枯草桿菌phoD Tat信號肽的重組李斯特菌屬。該結果證實新穎且意外地發現，可利用得自不同細菌物種之信號肽，編寫從重組李斯特菌屬中分泌異種蛋白質的程式。僅有EphA2序列的密碼子-最優化作用，全長EphA2 CO功能部位蛋白質的表現是不良的。當利用為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而被密碼子-最優化的信號肽時，異種蛋白質的表現程度是最高的。

D.以編碼全長EphA2之pCDNA4質體轉移感染293細胞

表現卡匣構築體：

6. pCDNA4-EphA2

將天然的全長EphA2基因選殖到以真核生物CMV啟動基因為基礎之表現質體pCDNA4(Invitrogen, Carlsbad, CA)內。圖40顯示從利用pCDNA4-EphA2質體轉移感染之293細胞製備的溶胞產物之西方墨點分析的結果，並證實全長EphA2蛋白質在哺乳動物細胞中的豐富表現。

實例20.利用編碼密碼子-最優化之EphA2的重組李斯特菌屬，在攜帶編碼人類EphA2之CT26腫瘤的Balb/C老鼠中的治療效力

在圖41-44中提供之下列數據，證實下列的：

以編碼OVA.AH1(MMTV gp70免疫優勢抗原決定位)或OVA.AH1-A5(MMTV gp70免疫優勢抗原決定位，具有提高T-細胞受體結合的不規則變化)之重組李斯特菌屬免疫攜帶CT26.24(huEphA2+)肺腫瘤的Balb/C老鼠，賦與長期存活。

EphA2 CO功能部位是具有強免疫原性的，且當以編碼密碼子-最優化或天然的EphA2 CO功能部位序列之重組李斯特菌屬免疫時，在攜帶CT26.24(huEphA2+)肺腫瘤之Balb/C老鼠的存活方面，觀察到明顯的長期增加(圖43)。

EphA2 EX2功能部位的免疫原性不佳，僅在以編碼與密碼子-最優化之EphA2 EX2功能部位序列融合的密碼子-最優化之secA1信號肽的重組李斯特菌屬免疫時，觀察到攜帶CT26.24(huEphA2+)肺腫瘤之Balb/C老鼠的增加存活。當以編碼與密碼子-最優化之EphA2 EX2功能部位序列融合之天然secA1信號肽的重組李斯特菌屬免疫時，在老鼠中並未觀察到治療效力(圖42)。藉著在統計學上顯著的治療性抗-腫瘤效力，支持使用密碼子-最優化之secA1信號肽和EphA2 EX2功能部位序列兩者的好處，如同在下文表4中所示。

表4.比較在圖42中出示之存活曲線的對數-排列試驗

實驗組	中間存活(天)	對HBSS群的顯著性(p值)	對actA-天然的secA1/EphA2 EX2群的顯著性(p值)
HBSS	19	-	-
actA	20	NS	NS
actA-天然的secA1-EphA2 EX2(天然的)	19	NS	-
actA-天然的secA1-EphA2 EX2(密碼子-最優化的)	24	0.0035	NS
actA-密碼子-最優化的secA1-EphA2 EX2(密碼子-最優化的)	37	0.0035	0.0162
actA-天然的secA1-EphA2 CO(密碼子-最優化的)	>99	0.0035	0.0015

顯然，即使pCDNA4-EphA2質體轉移感染293細胞，產生極高程度的蛋白質表現，以pCDNA4-EphA2質體免疫攜帶CT26.24(huEphA2+)肺腫瘤之Balb/C老鼠，結果並未遵守任何治療性的抗-腫瘤效力(圖44)。

關於治療在活體內腫瘤的研究，將雌性Balb/C老鼠IV植入穩定表現EphA2之$5x10^5$個CT26細胞。在3天之後，將老鼠隨機分組，並以IV接種各種編碼EphA2的重組李斯特菌屬品系。在一些案例中(在圖中提及)，在前脛骨肌中以100微克pCDNA4質體或pCDNA4-EphA2質體接種老鼠。作為陽性對照組，以編碼OVA.AHI或OVA.AH1-A5蛋白質嵌合體的重組李斯特菌屬品系IV接種老鼠。在腫瘤細胞植入之後第3和14天接種老鼠。以漢克氏(Hanks)平衡鹽溶液(HBSS)緩衝溶液或未經修改之李斯特菌屬注射老鼠，作為陰性對照組。所有的實驗群均含有5隻老鼠。至於存活研究，當老鼠開始顯示任何緊迫或努力呼吸的症狀時犧牲牠們。

實例21.在接種疫苗之後，評估抗原-專一之免疫反應

可使用各種在活體外和在活體內的方法，評估本發明之疫苗。一些測定涉及得自已經接種疫苗之老鼠脾臟的抗原-專一之T細胞的分析。在本實例中提供在活體外和在活體內評估免疫反應之方法的非限制性實例。在這些測定的代表性說明中提及之抗原為模式抗原，不一定是使用在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現表現載體所產生的抗原。熟諳此藝者將輕易地認出在本實例中描述的測定，可迅速地運用它們來評估包括在本文中描述之重組核酸分子、表現卡匣及/或表現載體的細菌在活體外或在活體內的免疫反應。

例如，藉著靜脈內注射0.1 LD_{50}之表現OVA(或其他適當抗原)的李斯特菌屬品系，接種C57B1/6或Balb/C。在接種疫苗之後7天，藉著將脾臟平鋪在冰冷的RPMI 1640培養基上，收穫老鼠的脾臟細胞(通常每組3隻老鼠)，並從其製備單一細胞懸浮液。或者，可以類似方式收穫老鼠的淋巴結，製備單一細胞懸浮液，並在下述的測定中取代脾臟細胞。通常，對於靜脈內或腹腔內投與的疫苗，是評估脾臟細胞，而對於肌肉內、皮下或皮內投與的疫苗，則是評估脾臟細胞和得自淋巴結的細胞。

除非另行提及，在這些實例中所使用的所有抗體均可獲自Pharmingen, San Diego, CA。

ELISPOT測定：使用具有OVA抗原之李斯特菌屬品系作為實例，使用ELISPOT測定評估當在老鼠模式中免疫時所

產生的抗原-專一之T細胞的定量頻率。評估抗原-專一之T細胞是OVA專一的CD8+或LLO專一的CD8+或CD4+T細胞。該OVA抗原模式評估對插入疫苗內之異種腫瘤抗原的免疫反應，並可以任何感興趣的抗原取代。LLO抗原是對李斯特菌屬專一的。藉著檢測在認出專一抗原時細胞素的釋放(例如INF-γ)，便可評估專一的T細胞。在4℃下以抗-老鼠IFN-γ單株抗體(mAb R4；5微克/毫升)塗覆PVDF-為基礎之96孔培養盤(BD Biosciences, San Jose, CA)過夜。在室溫下以200微升完整的RPMI沖洗該培養盤，並阻斷2小時。以每孔$2x10^5$個細胞加入得自接種老鼠(或未接種之對照組老鼠)的脾臟細胞，並在37℃下，在範圍從0.01至10 μM各種濃度之肽的存在下培養20-22小時。供OVA和LLO使用的肽是SL8、OVA之MHC第I類抗原決定位、LLO_{190}(NEKYAQAYPNVS(序列第100號)Invitrogen)，李斯特菌溶解素O的MHC第II類抗原決定位(李斯特菌屬抗原)、LLO_{296}(VAYGRQVYL(序列第101號)、李斯特菌溶解素O的MHC第I類抗原決定位，或LLO_{91}(GYKDGNEYI(序列第102號))，李斯特菌溶解素O的MHC第I類抗原決定位。在C57B1/6模式中使用LLO_{190}和LLO_{296}，而在Balb/C模式中則使用LLO_{91}。在沖洗之後，將培養盤與以PBS稀釋至0.5微克/毫升，對IFN-γ專一的二級生物素基化之抗體(XMG1.2)一起培養。在室溫下培養2小時之後，沖洗培養盤，並在37℃下，與以PBS稀釋，含有1%BSA之1毫微米金山羊抗-生物素共軛物(GAB-1；1:200稀釋；Ted Pella, Redding, CA)一起培

養1小時。在徹底沖洗之後，為了使點展開，在室溫下將該盤與受質(銀提高套組；30毫升/孔；Ted Pella)一起培養2至10分鐘。然後以蒸餾水沖洗培養盤，中止受質反應。在該盤已經風乾之後，使用自動ELISPOT培養盤讀取器(CTL, Cleveland, OH)計算在每孔中的點。以每$2x10^5$個脾臟細胞對OVA專一之T細胞或李斯特菌屬專一之T細胞形成IFN-γ點之細胞(SFCs)的數目來表示細胞素的反應。

細胞內細胞素染色測定(ICS)：為了進一步評估抗原-專一之CD8+或CD4+T細胞，並使結果與得自ELISPOT測定的那些發生關聯，進行ICS，並藉著流動細胞計數分析評估細胞。在佈雷菲德菌素(Brefeldin)A(Pharmingen)的存在下，將得自接種疫苗和對照組老鼠的脾臟細胞與SL8(刺激OVA專一之CD8+細胞)或LLO_{190}(刺激LLO專一之CD4+細胞)一起培養5分鐘。佈雷菲德菌素A抑制在刺激T細胞時所產生之細胞素的分泌。使用與無關之MHC第I類肽一起培養的脾臟細胞作為對照組。使用PMA(佛波醇-12-肉荳蔻酸-13-乙酸酯，Sigma)20毫微克/毫升和離子黴素(Sigma)2微克/毫升刺激之脾臟細胞作為IFN-γ和TNF-α細胞內細胞素染色的陽性對照組。為了檢測細胞質的細胞素表現，以FITC-抗-CD4 mAb(RM4-5)和PerCP-抗-CD8 mAb(53-6.7)將細胞染色，固定並使Cytofix/CytoPerm溶液(Pharmingen)滲透，在冰上以PE-共軛之抗-TNF-αmAb (MP6-XT22)和APC-共軛之抗-IFN-γ mAb(XMG1.2)染色30分鐘。藉著流動細胞計數分析(FACScalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA)判定

表現細胞內IFN-γ及/或TNF-α之細胞的百分比，並使用CELLQuest軟體(Becton Dickinson Immunocytometry System)分析數據。因為在各種抗體上之螢光標記均可藉著FACScalibur辨別，故可藉著為那些利用抗-IFN-γ或抗-TNF-α染色之CD8+和CD4+開門來確認適當的細胞。

受刺激之脾臟細胞表現細胞素：亦可針對對照組和接種疫苗之C57B1/6老鼠，評估由老鼠脾臟細胞分泌之細胞素的含量。以SL8或LLO_{190}刺激脾臟細胞24小時。使用以無關之肽HSV-gB2(Invitrogen, SSIEFARL，序列第124號)刺激的作為對照組。收集受刺激之細胞的上清液，並使用ELISA測定(eBiosciences, CO)或細胞計數小珠陣列套組(Pharmingen)判定T協助者-1和T協助者2細胞素的含量。

評估細胞毒性T細胞活性：藉著在活體外或直接在C57B1/6老鼠之活體中，評估其細胞毒性活性，進一步評估OVA專一之CD8+T細胞。CD8+T細胞以抗原-專一之方式，認出並溶解其個別的標靶細胞。使用鉻釋放測定，判定在活體外的細胞毒性。按10:1之比例，以放射EG7.OVA細胞(EL-4腫瘤細胞株轉移感染，以便表現OVA，ATCC, Manassas, VA)或以100 nM SL8刺激無經驗和接種李斯特菌屬-OVA(內在的)之老鼠的脾臟細胞，以便擴展在脾臟細胞族群中的OVA專一之T細胞。在培養7天之後，在標準4-小時51Cr-釋放測定中，使用EG7.OVA或SL8脈衝之EL-4細胞(ATCC, Manassas, VA)作為標靶細胞，而僅有EL-4細胞的作為陰性對照組，判定效應物細胞的細胞毒性活性。使用

YAC-1細胞株(ATCC, Manassas, VA)作為標靶，判定NK細胞活性，以便區別歸因於T細胞之活性與歸因於NK細胞之活性。按100x(實驗釋放-自發釋放)/(最大釋放-自發釋放)，來計算專一之細胞毒性的百分比。藉著在沒有效應物細胞下培養標靶細胞，判定自發釋放。藉著以0.1%三通X-100溶解細胞，來判定最大釋放。若自發釋放<20%之最大釋放，則認為實驗對分析是有效的。

為了評估OVA-專一之CD8+T細胞在活體外的細胞毒性活性，將得自無經驗之C57B1/6老鼠的脾臟細胞分成相等的兩份。每組在37℃下以0.5微克/毫升特定的肽，標靶(SL8)或對照組(HSV-gB2)脈衝90分鐘。然後以培養基沖洗細胞3次，並以PBS+0.1%BSA沖洗兩次。以每毫升$1x10^7$個細胞將細胞再懸浮於溫的PBS+0.1%BSA(10毫升或更少)中，以便利用羧基螢光素二乙酸酯琥珀醯亞胺酯(CFSE, Molecular Probes, Eugene, OR)標示。在標靶細胞懸浮液中，加入1.25微升5 mM CFSE母液，並藉著旋轉混合該試樣。在對照組細胞懸浮液中，加入10倍稀釋的CFSE母液，並藉著旋轉混合該試樣。在37℃下培養該細胞10分鐘。藉著加入大體積(>40毫升)的冰冷PBS，中止染色。在室溫下以PBS沖洗細胞兩次，然後再懸浮並計數。將每個細胞懸浮液稀釋至每毫升$50x10^6$個細胞，並混合每種族群各100微升，並經由無經驗或接種疫苗之老鼠的尾靜脈注射。在12-24小時之後，收穫脾臟，並藉著流動細胞計數分析總共$5x10^6$個細胞。列舉高(標靶)和低(對照組)螢光高峰，並使用兩者的比例來建立

標靶細胞溶解的百分比。在活體內的細胞毒性測定容許評估抗原-專一之T細胞的溶解活性，不需在活體外的再度-測試。此外，該測定評估在其天然環境中的T細胞功能。

實例22.藉著以表現EphA2之李斯特菌屬品系接種Balb/C老鼠誘導的人類EphA2-專一之免疫力

以兩週之間隔，以表現hEphA2之細胞內功能部位(在圖45中之李斯特菌屬hEphA2-ICD)的李斯特菌屬L461T，或表現得自為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而被密碼子-最優化之序列的hEphA2之細胞外功能部位(在圖45中之李斯特菌屬hEphA2-ECD)的李斯特菌屬ΔactA(actA$^-$)品系免疫Balb/C老鼠(n=3)。(在本文中將hEphA2之細胞內功能部位另行稱為hEphA2-ICD、hEphA2 ICD、EphA2 CO或CO。在本文終將hEphA2之細胞外功能部位另行稱為hEphA2-ECD、hEphA2 ECD、EphA2 EX2或EX2)。在最後的免疫之後6天將老鼠安樂死，並收獲且集合脾臟。關於ELISPOT測定，在活體外以表現全長hEphA2的P815細胞或從這些細胞製備之細胞溶胞產物再度-刺激細胞。以親代P815細胞或細胞之溶胞產物作為陰性對照組。亦利用重組的hEphA2 Fc融合蛋白刺激細胞。使用96孔點讀取器測量形成IFN-γ陽性點之菌落(SFCs)。如同在圖45中所示，利用衍生自以李斯特菌屬- hEphA2接種之老鼠的脾臟細胞，觀察到增加的IFN-γSFCs。表現hEphA2的細胞或細胞之溶胞產物刺激兩者，結果均增加了IFN-γSFC，這暗示EphA2 -專一之CD8+和CD4+T細胞反應。得自以親代李斯特菌屬對照組

接種之老鼠的脾臟細胞，未證實增加IFN-γSFC。

實例23：EphA2專一之抗-腫瘤需要CD4+和CD8+T細胞反應

在第0天以$2x10^5$個CT26- hEphA2靜脈內接種Balb/C老鼠(n=10)。在第1和第3天，藉著注射200微克抗-CD4(ATCC融合瘤GK1.5)或抗-CD8(ATCC融合瘤2.4-3)，耗盡CD4+細胞或CD8+T-細胞，其藉著FACS分析(數據未顯示)證實。然後在第4天，以0.1 LD_{50}之表現hEphA2 ICD的李斯特菌屬L461T靜脈內免疫老鼠，並監視存活。

如同在圖46中所示，CD4+和CD8+耗盡組無法證實在非-T細胞耗盡動物中看到的抗-腫瘤反應。在下文表5中概述數據：

表5

接種疫苗組	中間存活(天)	P對HBSS	存活者數目(第67天)
HBSS	17	-	0
李斯特菌屬-hEphA2-ICD	>67	<0.0001	7
李斯特菌屬-hEphA2-ICD+抗-CD4	19	0.03	2
李斯特菌屬-hEphA2-ICD+抗-CD8	24	0.0002	0

前述的數據指出在腫瘤生長的最佳抑制中需要CD4+和CD8+T細胞兩者。

實例24. 藉著對偶基因交換從李斯特菌屬中刪除inlB

在一些具體實施例中，包括在本文中描述之重組核酸分子和表現卡匣的細菌是突變的李斯特菌屬。例如，在一些具體實施例中，包括重組核酸分子和表現卡匣的細菌是其中已經刪除actA基因、inlB基因或兩者的單核細胞增多性李斯特菌品系。在下文中描述在李斯特菌屬中產製刪除突變種的一個代表性方法。

可藉著對偶基因交換，如由Camilli等人，Mol. Microbiol. 8:143-147(1993)描述的，完成從李斯特菌屬DP-L4029中(或從其他選擇之突變種品系或從野外型李斯特菌屬中)刪除表面蛋白B基因(inlB)。可使用接合重疊延伸(SOE)PCR來製備用在對偶基因交換程序中的構築體。表面蛋白B基因的來源是像GenBank登錄編號AL591975(單核細胞增多性李斯特菌品系EGD，完整的基因組，斷片3/12；inlB基因區：核苷酸97008-98963)列舉的序列，全部以引用的方式併入本文中，及/或像GenBank登錄編號NC_003210(單核細胞增多性李斯特菌品系EGD，完整的基因組，inlB基因區：核苷酸457008-458963)列舉的序列，全部以引用的方式併入本文中。

在初步的PCR反應中，使用下列的模板和引子，擴大分別來自李斯特菌屬inlB基因5'和3'末端之序列上游和下游的大約1000個鹼基對：

模板：DL-L4056或DP-L4029基因組DNA

引子對1(用來擴大得自inlB之5'端的上游區域)：

Lm-96031F：5'-GTTAAGTTTCATGTGGACGGCAAAG(序列第103號)(T_m：72℃)

Lm-(3'inlB-R+)97020R：5'-

AGGTCTTTTTCAGTTAACTATCCTCTCCTTGATTCTAGTTAT(序列第104號)(T_m：114℃)

(加下標線的序列與InlB羧基終端的下游區域互補)

擴大區尺寸(鹼基對)：1007

引子對2(用來擴大得自inlB之3'端的下游區域)：

Lm-(5'inlB-F+)98911F：5'-

CAAGGAGAGGATAGTTAACTGAAAAAGACCTAA

AAAAGAAGGC(序列第105號)(T_m：118℃)

(加下標線的序列與InlB胺基終端的上游區域互補)

Lm-99970R：5'-TCCCCTGTTCCTATAATTGTTAGCTC(序列第106號)(T_m：74℃)

擴大區尺寸(鹼基對)：1074

在二級PCR反應中，經由SOE PCR融合初步PCR擴大區，利用在來自引子對1的逆向引子與引子對2的前進引子之間的互補性。結果精確地刪除了inlB密碼序列：核苷酸97021-98910=1889個鹼基對。在二級PCR反應中使用下列的模板和引子：

模板：清潔過的初步PCR反應

引子對：

Lm-96043F：5'-GTGGACGGCAAAGAAACAACCAAAG(序列第107號)(T_m：74℃)

Lm-99964R：5'-GTTCCTATAATTGTTAGCTCATTTTTTTC(序列第108號)(T_m：74℃)

(擴大區尺寸(鹼基對)：2033)

完成該建構過程的草案如下：

使用Vent DNA聚合酶(NEB)進行初步PCR反應(3個溫度循環)，並在30℃下將10微升經過沖洗之李斯特菌屬DP-L4056或DP-L4029過夜培養。藉著1%瓊脂糖凝膠證實李

斯特菌屬擴大區的預期尺寸(1007個鹼基對和1074個鹼基對)。以凝膠純化初步的PCR反應，並以GeneClean(BIO 101)洗脫DNA。

進行二級PCR反應，利用約略相等含量的各個初步反應作為模板(約5微升)。藉著1%瓊脂糖凝膠證實得自二級PCR反應之李斯特菌屬擴大區的預期尺寸(2033個鹼基對)。在帶有Taq聚合酶之李斯特菌屬dl inlB擴大區的3'末端加入腺苷殘基。

然後將李斯特菌屬dl inlB擴大區插入pCR2.1-TOPO載體。以XhoI和KpnI消化pCR2.1-TOPO-dl inlB質體DNA，並以凝膠純化2123個鹼基對的片段。將KpnI/XhoI 2123個鹼基對之片段插入已經藉著以KpnI和XhoI消化並以CIAP(pKSV7-dl inlB)處理之pKSV7載體內。然後證實在pKSV7-dl inlB中之dl inlB序列的精確性。藉著對偶基因交換，利用pKSV7-dl inlB質體，從想要的李斯特菌屬品系中刪除inlB基因。

實例25.為了建構重組的李斯特菌屬，將信號肽密碼子-最優化

在下文表6中提供可用在重組李斯特菌屬中之表現卡匣中的一些代表性密碼子-最優化之信號肽。

表6.用來建構重組李斯特菌屬之代表性的信號肽

分泌路徑	信號肽之胺基酸序列	信號肽酶位置(')	天然的序列	為了在Lm中表現而被密碼子-最優化之序列	基因[屬/種]
secA1	MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHAD(序列第109號)[1]	TEA'KD(序列第54號)	ATGAAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGCGCAACAAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTCATCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACACGCGGAT(序列第110號)	ATGAAAAAAATTATGTTAGTTTTTATTACATTAATTTTAGTTAGTTTACCAATTGCACAACAAACAGAAGCAAAAGATGCAAGTGCATTTAATAAAGAAAATAGTATTAGTAGTATGGCACCACCAGCAAGTCCACCAGCAAGTCCAAAAACACCAATTGAAAAAAAACATGCAGAT(序列第113號)	hly(LLO)[單核細胞增多性李斯特菌]
	MKKKIISAILMSTVILSAAAPLSGVYADT(序列第46號)	VYA'DT(序列第55號)	ATGAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGTCTACAGTGATACTTTCTGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACGCTGACACA(序列第86號)	ATGAAAAAAAAAATTATTAGTGCAATTTTAATGAGTACAGTTATTTTAAGTGCAGCAGCACCATTAAGTGGTGTTTATGCAGATACA(序列第87號)	Usp45[乳酸乳球菌]
	MKKRKVLIPLMALSTILVSSTGNLEVIQAEV(序列第47號)	IQA'EV(序列第56號)	ATGAAAAAACGAAAAGTGTTAATACCATTAATGGCATTGTCTACGATATTAGTTTCAAGCACAGGTAATTTAGAGGTGATTCAGGCAGAAGTT(序列第111號)	ATGAAAAAACGTAAAGTTTTAATTCCATTAATGGCATTAAGTACAATTTTAGTTAGTAGTACAGGTAATTTAGAAGTTATTCAAGCAGAAGTT(序列第114號)	pag(保護性抗原)[炭疽桿菌]
secA2	MNMKKATIAATAGIAVTAFAAPTIASAST(序列第48號)	ASA'ST(序列第57號)	ATGAATATGAAAAAAGCAACTATCGCGGCTACAGCTGGGATTGCGGTAACAGCATTTGCTGCGCCAACAATCGCATCCGCAAGCACT(序列第90號)	ATGAATATGAAAAAAGCAACAATTGCAGCAACAGCAGGTATTGCAGTTACAGCATTTGCAGCACCAACAATTGCAAGTGCAAGTACA(序列第91號)	iap與侵入有關的蛋白質p60[單核細胞增多性李斯特菌]
Tat	MAYDSRFDEWVQKLKEESFQNNTFDRRKFIQGAGKIAGLSLGLTIAQSVGAF(序列第53號)	VGA'F(序列第62號)	ATGGCATACGACAGTCGTTTTGATGAATGGGTACAGAAACTGAAAGAGGAAAGCTTTCAAAACAATACGTTTGACCGCCGCAAATTTATTCAAGGAGCGGGGAAGATTGCAGGACTTTCTCTTGGATTAACGATTGCCCAGTCGGTTGGGGCCTTT(序列第112號)	ATGGCATATGATAGTCGTTTTGATGAATGGGTTCAAAAATTAAAAGAAGAAAGTTTTCAAAATAATACATTTGATCGTCGTAAATTTATTCAAGGTGCAGGTAAAATTGCAGGTTTAAGTTTAGGTTTAACAATTGCACAAAGTGTTGGTGCATTT(序列第115號)	PhoD鹼性磷酸酶[枯草桿菌]

[1]所示之序列包括得自LLO的PEST序列。

實例26.密碼子-最優化了的包括炭疽桿菌保護性抗原(PA)信號肽之表現卡匣

為了在單核細胞增多性李斯特菌中使用非-李斯特菌屬

secA1信號肽表現異種抗原，設計表現卡匣。下文出示得自炭疽桿菌(Ba)之保護性抗原(PA)的胺基酸序列(GenBank登錄編號NC_007322)，其天然的密碼序列，以及為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而被最優化的密碼序列。

胺基酸序列：

MKKRKVLIPLMALSTILVSSTGNLEVIQAEV(序列第47號)

信號肽酶認知位置：IQA'EV(序列第56號)

天然的核苷酸序列：

ATGAAAAAACGAAAAGTGTTAATACCATTAATGGCATT
GTCTACGATATTAGTTTCAAGCACAGGTAATTTAGAGGT
GATTCAGGCAGAAGTT(序列第111號)

為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現被最優化的密碼子：

ATGAAAAAACGTAAAGTTTTAATTCCATTAATGGCATTA
ATGGCATTAAGTACAATTTTAGTTAGTAGTACAGGTAAT
TTAGAAGTTATTCAAGCAGAAGTT(序列第114號)

在圖47中出示部分表現卡匣的序列，其包括得自單核細胞增多性李斯特菌之hly啟動基因，以可操作之方式與編碼Ba PA信號肽之密碼子-最優化的序列連接。可將該序列與密碼子-最優化或未-密碼子-最優化的抗原序列混合，以便表現包括炭疽桿菌PA信號肽和想要抗原的融合蛋白。

實例27.從包括密碼子-最優化之表現卡匣的重組李斯特菌屬中表現並分泌抗原

信號肽和腫瘤抗原兩者的密碼子-最優化作用，提供從重

組李斯特菌屬中有效的表現和分泌：信號肽和編碼異種蛋白質之遺傳元件兩者的密碼子-最優化作用，提供了從包括忌水性功能部位之人類腫瘤抗原的以重組李斯特菌屬為基礎之疫苗的最佳分泌。從細胞溶質細菌中有效地分泌抗原需要經由MHC第I類路徑的有效提交，以及CD8+T-細胞誘發，因此與以李斯特菌屬為基礎之疫苗的效力有直接關聯。從重組的李斯特菌屬中分泌兩個與惡性細胞膜結合之人類腫瘤抗原，間皮素和NY-ESO-1，其為與胰臟和卵巢癌(間皮素)和黑色素瘤(NY-ESO-1)有關的免疫標靶，在其他的固體腫瘤中，已經經由混合抗原和信號肽密碼序列兩者的密碼子-最優化作用而將其最優化。

建構包括hly啟動基因的各種表現卡匣，該表現卡匣連接編碼與secA1或包括secA2和Twin-Arg移位(Tat)之其他分泌路徑有關之信號肽的天然或密碼子-最優化之序列，其在架構中與選出之人類腫瘤抗原-人類NY-ESO-1或人類間皮素融合。(參見上文實例11-14和25，關於抗原序列及/或信號序列)。使用生長在BHI肉湯中之李斯特菌屬的TCA-沉澱培養物流體之西方墨點分析，評估得自重組李斯特菌屬之異種蛋白質的合成及分泌。(關於西方墨點分析，使用類似在上文實例18中描述的那些方法)。

在圖48A-C中出示這些實驗的結果。當針對在單核細胞增多性李斯特菌中的密碼子利用而將信號肽密碼序列，包括在衍生自單核細胞增多性李斯特菌時，以及以可操作之方式連接的外來抗原密碼序列最優化時，觀察到從重組的李

斯特菌屬中有效地表現並分泌全長的腫瘤抗原。圖48A顯示由具有包括與人類間皮素融合之LLO信號肽的構築體之ΔactA單核細胞增多性李斯特菌，使用LLO和間皮素兩者的天然密碼子，表現及/或分泌人類間皮素。藉著TCA-沉澱之細菌培養物流體的西方墨點分析，對這些構築體並未觀察到預期全長間皮素(62 kDa)的分泌，而僅觀察到數個小片段的分泌(圖48A)。

圖48B顯示由包括含有編碼與人類間皮素融合之各種信號肽的構築體之質體(pAM401)的單核細胞增多性李斯特菌ΔactA表現及/或分泌之人類間皮素的西方墨點分析。在每個構築體中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將間皮素密碼序列密碼子-最優化。在指定之處，使用含有天然序列("天然的")或為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而被密碼子-最優化("密碼子-最優化")的信號肽密碼序列。使用親和力-純化之多株抗-人類/老鼠抗體，藉著以選出之肽與IFA一起注射兔子來製備，檢測分泌的間皮素。

如同在圖48B之跑道3-5和8-9中所示，顯然僅在為了在李斯特菌屬中表現，而將信號肽和間皮素密碼序列兩者密碼子-最優化時，觀察到全長間皮素(62 kDa)的分泌。該觀察顯然亦包括得自細菌LLO和p60蛋白質之李斯特菌屬-衍生的信號肽，分別相對於secA1和secA2分泌路徑，兩者均含有不常用的密碼子。(LLO PEST序列亦被納入LLO信號肽，且亦將其密碼子密碼子-最優化)。當將密碼子-最優化之李斯特菌屬LLO信號肽與密碼子-最優化之間皮素連接時，觀

察到全長間皮素(62 kDa)的有效分泌(跑道8，圖48B)，但在使用李斯特菌屬LLO信號肽之天然密碼序列時則否(跑道7，圖48B)。此外，當密碼子-最優化之李斯特菌屬p60信號肽與密碼子-最優化之間皮素連接時，觀察到全長間皮素(62 kDa)的分泌(跑道3，圖48B)，但在使用李斯特菌屬p60信號肽之天然密碼序列時則否(跑道6，圖48B)。最後，當密碼子-最優化之得自與單核細胞增多性李斯特菌不同的細菌物種之最佳信號肽以可操作之方式與密碼子-最優化之間皮素連接時，觀察到全長間皮素(62 kDa)的分泌(圖48B)。得自炭疽桿菌保護性抗原(Ba PA)之信號肽，或得自乳酸乳球菌Usp45蛋白質(Ll Usp45)之信號肽，編寫從重組李斯特菌屬品系中有效分泌全長間皮素(62 kDa)的程式(圖48B，跑道4和5)。枯草桿菌phoD信號肽(Bs phoD)亦編寫從李斯特菌屬中有效分泌全長間皮素的程式(圖48B，跑道9)。具有大約62,000之分子量的譜帶與間皮素一致，而成對的雙重譜帶或許與未-切開加切開的間皮素多肽(即部分切開)一致。

圖48C顯示從帶有包括編碼LLO信號肽之序列的構築體之單核細胞增多性李斯特菌ΔactAΔinlB中表現/分泌NY-ESO-1，該LLO信號肽與編碼人類NY-ESO-1之序列融合，兩者均為了在李斯特菌屬中表現而被密碼子-最優化。使用NY-ESO-1單株抗體檢測分泌的NY-ESO-1。

在本實例中，利用每個胺基酸最佳的密碼子，如同藉著出現在得自李斯特菌屬基因組之密碼序列中每1000個密碼

子的頻率來定義(http://www.kazusa.or.jp/codon/cgibin/showcodon.cgi?species=Listeria+monocytogenes+[gbbct])，合成信號肽和腫瘤抗原功能部位。與得自李斯特菌屬和其他革蘭氏陽性細菌屬之secA1、secA2或twin-Arg移位(Tat)分泌路徑有關的信號肽，編寫從重組李斯特菌屬中有效分泌人類腫瘤抗原的程式。驚人的是，得自李斯特菌屬蛋白質LLO和p60之信號肽分別含有罕見的密碼子(每1000個密碼子頻率<10)，為了從重組李斯特菌屬中有效地分泌間皮素和NY-ESO-1，需要這些序列的最優化作用(圖48B)。當與得自炭疽桿菌保護性抗原(pagA)和乳酸乳球菌Usp45之secA1信號肽，以及得自枯草桿菌之磷酸二酯酶/鹼性磷酸酶D基因(PhoD)的Tat信號肽連接時，亦觀察到間皮素的分泌。

使用得自不同分泌路徑的信號肽，判定特殊路徑是否將有利於異種蛋白質的最佳分泌。例如，為了分泌在細菌中摺疊的蛋白質利用Tat路徑，並經由該機制分泌枯草桿菌phoD蛋白質。最初已經假設藉著在運送之前摺疊，可能有助於含有明顯忌水性功能部位之腫瘤抗原，如NY-ESO-1的分泌。然而，這些結果指出信號肽與編碼序列而非分泌路徑之腫瘤抗原兩者的密碼子-最優化作用，是有效分泌哺乳動物蛋白質的初步需求。

重要的是，與親代李斯特菌屬ΔactA/ΔinlB品系相比較，並未明顯地影響為了腫瘤抗原分泌而使用任何路徑之重組疫苗的表現型。李斯特菌屬ΔactA/ΔinlB的中間致死

性(LD_{50})在C57BL/6老鼠中是$1x10^8$cfu。使用pPL2整合載體，完成將腫瘤抗原表現卡匣併入在李斯特菌屬ΔactA/ΔinlB之染色體上無害位置內的穩定單一副本位置-專一併入作用。編碼李斯特菌屬ΔactA/ΔinlB之腫瘤抗原的LD_{50}是在李斯特菌屬ΔactA/ΔinlB的5倍內。

實例28.建構雙順反子hEphA2表現載體

作為非-限制性的實例，提供抗原表現卡匣的建構，其中從雙順反子信息發生hEphA2之外部(EX2)和內部(CO；激酶死亡)功能部位的表現。藉著分別在功能上連接Ba PA和Bs PhoD信號肽與EX2和CO功能部位，完成EX2和CO功能部位的分泌。

在雙順反子hEphA2表現卡匣的建構中，使用密碼子-最優化之人類EphA2激酶死亡質體，稱為phEphA2KD。(EphA2是酪胺酸激酶受體，但藉著在該酵素之活性位置處從K至M的突變，剝奪了激酶活性)。在圖49中出示phEphA2KD的密碼序列。在圖49中的phEphA2KD序列包括刪除穿透膜功能部位之hEphA2的密碼子-最優化之密碼序列，並含有獨特的5'和3' BamHI和SacI限制位置，有助於建構具有功能的抗原表現卡匣。在圖49中出示之序列中，粗體顯示MluI認知序列。

合成在兩個MluI限制酵素認知位置之間的人類EphA2之亞-片段(刪除穿透膜功能部位，激酶-死亡)(藉著在此項技藝中已知的方法，例如藉著寡核苷酸合成、PCR及/或Klenow填滿或其類似者)。在合成期間，精確地在EphA2細

胞外和細胞內功能部位之間的接合處，其在天然蛋白質中藉著忌水性穿透膜功能部位分開，插入actA-plcB基因間區域。在圖50中出示密碼子-最優化之人類EphA2的MluI亞-片段之序列，其含有actA-plcB基因間區域(以粗體顯示基因間區域)。此外，密碼子-最優化之Bs phoD信號肽係位在actA-plcB基因間序列的3'末端，並在架構中與下游EphA2 CO功能部位密碼區融合。

藉著在圖49中出示之穿透膜刪除激酶死亡人類EphA2序列中的相對應區域，取代含有actA-plcB基因間區域和Bs phoD信號肽的MluI片段，裝配有功能的人類EphA2雙順反子卡匣。所得的序列在其5'和3'末端分別含有獨特的BamHI和SacI限制酵素認知位置，有助於插入並在功能上連接hly啟動基因與最初之信號肽，例如Ba PA。

因此，雙順反子人類EphA2抗原表現卡匣的七個按順序有功能的元件如下：hly啟動基因-Ba PA信號肽-EX功能部位EphA2-終止密碼子-actA-plcB基因間區域(帶有Shine-Dalgarno序列)-Bs PhoD信號肽-CO功能部位EphA2-終止密碼子。最好將所有的EphA2和信號肽密碼序列均密碼子-最優化。

可藉著在本申請書中解釋的方法，使用pAM401、pKSV7或pPL1和pPL2整合載體，衍生出表現並分泌EphA2 EX和CO功能部位的重組李斯特菌屬品系。藉著想要細菌溶離份的西方分析，檢測EphA2蛋白質的表現及分泌，使用在本文中描述及/或熟諳此藝者已知的方法。

實例29.得自包括抗原-細菌蛋白質嵌合體之重組李斯特菌屬之抗原的表現和分泌

在本發明的一些具體實施例中，將編碼信號肽與其異種蛋白質融合夥伴兩者的序列密碼子-最優化。在一些具體實施例中，希望將密碼子-最優化之異種蛋白質序列放在蛋白質之限定區域內，從李斯特菌屬中分泌其天然形式。在功能上將異種蛋白質序列放在所選出之分泌性李斯特菌屬蛋白質序列的限定序列內，而得以合成並分泌與該分泌蛋白質之混合分子量一致的蛋白質嵌合體。可藉著利用自體細菌蛋白質之最佳分泌所需的宿主李斯特菌屬細菌之機制，促進異種蛋白質的分泌。分子伴侶有助於選出之細菌蛋白質的分泌。

作為非-限制性之實例，產製在單核細胞增多性李斯特菌蛋白質p60與人類腫瘤抗體，間皮素之間的蛋白質嵌合體。藉著將人類腫瘤抗原間皮素，在胺基酸位置70處精確地放在單核細胞增多性李斯特菌蛋白質p60內，產製蛋白質嵌合體(雖然應了解可選擇任何想要的異種蛋白質編碼序列來產製蛋白質嵌合體)。蛋白質嵌合體在p60胺基酸1-70處含有在李斯特菌屬中表現的最佳密碼子，以及整個間皮素密碼序列。此外，p60-人類間皮素蛋白質嵌合體在功能上與單核細胞增多性李斯特菌hly啟動基因連接，併入pPL2載體內，隨後按照在本文中的描述使用它來產製表現並分泌人類間皮素的重組單核細胞增多性李斯特菌品系。在下文中描述用來建構最佳表現並分泌p60-人類間皮素蛋白質嵌合

體之重組李斯特菌屬品系的實驗方法。

在一些具體實施例中，在選出之單核細胞增多性李斯特菌基因與選出之異種蛋白質序列之間的蛋白質嵌合體之重要特徵，是在功能上適當地將選出之異種蛋白質序列放在選出之單核細胞增多性李斯特菌基因內，經由單核細胞增多性李斯特菌表現之蛋白質與細菌伴侶和分泌裝置的交互作用，保留了蛋白質嵌合體的最佳分泌，並就蛋白質嵌合體而言保留單核細胞增多性李斯特菌蛋白質的功能活性。在一些具體實施例中，想要在功能上將異種蛋白質放在單核細胞增多性李斯特菌secA2-依賴性蛋白質NamA和p60內，以便保留這些蛋白質的肽聚糖細胞壁水解酶活性。(參見Lenz等人(2003 PNAS, 100:12432-12437)，例如關於SecA2-依賴性NamA和p60蛋白質的說明)。在一些具體實施例中，想要在信號序列(SS)與細胞壁結合功能部位(LySM)和催化功能部位Lyz-2(NamA)與p60-功能部位(p60)之間的異種蛋白質密碼序列的功能放置(Lenz等人(2003))。

在一些具體實施例中，抗原或異種蛋白質之表現在功能上與prfA-依賴性啟動基因連接。在重組李斯特菌屬感染細胞中誘導異種蛋白質本身的表現。

在建構p60-間皮素蛋白質嵌合體中的第一個步驟涉及prfA-依賴性hly啟動基因的DNA合成，其在功能上與編碼p60之前70個胺基酸的DNA序列連接，帶有在李斯特菌屬中最適合分泌的密碼子。(在一些具體實施例中，可進一步修改密碼子利用，以避免過量RNA二級結構的區域，其可能

抑制蛋白質轉譯效力)。合成相當於hly啟動基因-70N-終端p60胺基酸的DNA亞-片段。(這通常可藉著此項技藝中已知的基因合成方法來進行，例如藉著寡核苷酸合成、PCR及/或Klenow填滿或其類似者)。

在下文中出示得自單核細胞增多性李斯特菌品系10403S之p60的前70個胺基酸的序列：

MNMKKATIAATAGIAVTAFAAPTIASASTVVVEAGDTLW GIAQSKGTTVDAIKKANNLTTDKIVPGQKLQ(序列第116號)

熟諳此藝者可知曉現存有多個單核細胞增多性李斯特菌編碼基因的實驗室和原野分離株，包括p60，其可在核苷酸序列和胺基酸序列兩者層面含有變異性，不過基本上是相同的基因和蛋白質。此外，熟諳此藝者亦可知曉可利用得自任何單核細胞增多性李斯特菌之實驗室或原野分離株(包括食物-攜帶或臨床品系)的基因，來建構蛋白質嵌合體。

在圖51中出示相當於hly啟動基因-70N-終端p60胺基酸的合成DNA序列。此外，修改編碼p60胺基酸殘基69(L)和70(Q)的密碼子，以便含有獨特的PstI酵素認知序列，促進異種序列的功能插入。此外，合成亞-片段的5'末端含有獨特的KpnI酵素認知序列。

將447個鹼基對之以KpnI和PstI消化過的亞-片段連接到pPL2載體之相對應的KpnI和PstI位置內，並藉著以KpnI和PstI酵素消化，以及以牛腸鹼性磷酸酶(CIAP)消化處理。將該質體稱為pPL2-hlyP-Np60 CodOp。隨後，將天然p60基因

的剩餘部份，在獨特的PstI和BamHI位置之間，選殖到pPL2-hlyP-Np60 CodOp質體內。藉著PCR選殖剩下的p60基因，使用含有熱穩定聚合酶的校對，以及下列的引子對：

前進引子：

5'-CGC CTGCAGGTAAATAATGAGGTTGCTG(序列第117號)

逆向引子：

5'-CGCGGATCCTTAATTATACGCGACCGAAG(序列第118號)

以PstI和BamHI消化1241個鹼基對的擴大區，並將經過純化的1235個鹼基對連接到以PstI和BamHI消化並以CIAP處理的pPL2-hlyP-Np60 CodOp質體內。該質體含有完全的單核細胞增多性李斯特菌p60基因，具有與胺基酸1-77一致的最佳密碼子，以及與胺基酸78-478一致的天然密碼子，並在功能上與單核細胞增多性李斯特菌hly啟動基因連接。將該質體稱為pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)，並在圖52中出示KpnI-BamHI亞-片段的序列，其含有在功能上與p60編碼序列連接的hlyP。藉著定序證實pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)質體的預期序列。

在建構中的下一個步驟是在功能上將異種蛋白質編碼序列插入在像pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)質體之獨特的PstI位置，其是在N-終端信號肽序列與p60的第一個LysM細胞壁結合功能部位之間，藉此保留單核細胞增多性李斯特菌蛋白質的正常生物功能。

作為非-限制性的實例，為了在單核細胞增多性李斯特菌中的最佳表現，將人類間皮素密碼子-最優化，將該蛋白質插入像pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)之質體獨特的PstI位置內。特定而言，使用具有校對活性之熱穩定聚合酶，以及下列的引子對，從在實例27中描述之含有全長人類間皮素的質體中選殖刪除信號肽和GPI交聯劑功能部位的全長間皮素或間皮素(間皮素ΔSP/ΔGPI)，含有為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現的最佳密碼子：

1.全長

前進引子(huMeso 3F)：

5'-AAACTGCAGGCATTGCCAACTGCACGTCC(序列第119號)

逆向引子(hMeso 1935R)：

5'-AAACTGCAGAGCTAATGTACTGGCTAATAATAATGCTAAC(序列第120號)

2.Δ信號肽，ΔGPI錨定

前進引子(huMeso 133F)：

5'-CGCCTGCAGCGTACATTAGCAGGTGAAACAGG(序列第121號)

逆向引子(huMeso 1770R)：

5'-CGCCTGCAGGCCTTGTAAACCTAAACCTAATGTATC(序列第122號)

純化1932個鹼基對(全長間皮素)和1637個鹼基對(間皮素ΔSP/ΔGPI)，以PstI消化，純化，並連接到質體

pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)獨特的PstI位置內，以PstI消化處理，並以CIAP處理。藉著核酸內切限制酶作圖證實p60和間皮素功能部位的不變N-CO方位。將這些質體稱為pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)-間皮素和pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)-間皮素ΔSP/ΔGPI，並按照在納入本文之實例中的描述，將其導入選出之單核細胞增多性李斯特菌品系(如ΔactAΔinlB雙重刪除突變種)內。

在圖53中出示質體pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)-間皮素的KpnI-BamHI亞-片段，含有在功能上與p60-人類間皮素蛋白質嵌合體編碼基因連接的hly啟動基因。

在圖54中出示質體pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)-間皮素ΔSP/ΔGPI之KpnI-BamHI亞-片段的序列，其含有在功能上與p60-人類間皮素ΔSP/ΔGPI蛋白質嵌合體編碼基因連接的hly啟動基因。

p60-間皮素蛋白質嵌合體之表現與分泌的西方分析

如同在實例中所討論的，選出之異種抗原的表現與分泌結果有效地誘發MHC第I類-限制CD8+T細胞反應。藉著西方分析，藉著在納入本文之實例中描述的方法，使用間皮素-專一的多株抗體，測試由含有pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)-間皮素或pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)-間皮素ΔSP/ΔGPI質體之tRNA-Arg染色體插入的重組單核細胞增多性李斯特菌ΔactAΔinlB雙重刪除突變種表現並分泌至培養基的蛋白質嵌合體。

對於在一些跑道中出示之蛋白質，在人類間皮素中指定

設計之刪除(ΔSPΔGPI，在本文中亦稱為ΔSSΔGPI、ΔSP/ΔGPI、ΔSS/ΔGPI等等)如下：刪除信號序列(ΔSP)相當於人類間皮素的N-終端34個胺基酸(至於人類間皮素之序列，參見，例如圖34或GenBank登錄編號BC009272)。刪除的GPI(ΔGPI)功能部位相當於C-終端42個胺基酸，從胺基酸殘基Gly-Ile-Pro開始，並以胺基酸殘基Thr-Leu-Ala作為結束(參見，例如，圖34)。

該分析的結果證實從重組的單核細胞增多性李斯特菌中有效地表現和分泌包括p60，並精確插入人類間皮素或人類間皮素ΔSP/ΔGPI的蛋白質嵌合體(在架構中，在N-終端信號肽與兩個LysM細胞壁結合功能部位的第一個之間插入p60的胺基酸70處)。參見圖55。(圖55的Y-軸顯示在最左邊跑道跑出梯形中之蛋白質的分子量(按 kDa計))。特定而言，在圖55中跑道1-4證實了含有人類間皮素或人類間皮素ΔSP/ΔGPI之預期蛋白質嵌合體的表現與分泌。在跑道2和4中，相對於全長的間皮素，明顯增加了人類間皮素ΔSP/ΔGPI之表現與分泌的效力。在跑道3和4中出示的蛋白質嵌合體中，使用可靠的N-終端p60胺基酸。在圖55之跑道1和2中跑的嵌合體中，分別在位置29和64處刪除編碼胺基酸T和V的核苷酸。跑道5顯示與人類ΔSPΔGPI-間皮素融合之炭疽桿菌PA信號肽的表現和分泌(其中為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而將信號肽和間皮素密碼序列兩者密碼子-最優化)，而跑道6顯示與全長人類間皮素融合之LLO的表現和分泌(其中為了在單核細胞增多性李斯特菌中表

現而將信號肽和間皮素密碼序列兩者密碼子-最優化)。跑道8顯示由J293，人類細胞株表現的蛋白質，而跑道7顯示由含有編碼全長人類間皮素之質體的J293表現和分泌的蛋白質("J293/全長")。跑道10顯示從已經刪除內源之p60的李斯特菌屬中表現和分泌的蛋白質。在圖55中較低的方格顯示使用多株α-p60抗體，單核細胞增多性李斯特菌p60分泌的西方分析。結果證實在凝膠上裝載了等量的Lm-分泌蛋白質。

結果證實可使用p60作為分泌異種蛋白質的分子伴侶，並有助於提交MHC第I類路徑。

實例30.由重組單核細胞增多性李斯特菌表現及分泌抗原的額外實例

A.使用非-李斯特菌屬信號肽，從雙順反子構築體中表現EphA2的細胞內功能部位(ICD)

圖56顯示使用非-李斯特菌屬、非-secA1信號序列，從雙順反子信息中表現和分泌EphA2之細胞內功能部位(ICD)的西方墨點分析。

EphA2是包括細胞外功能部位(ECD)和細胞內功能部位(ICD)的蛋白質。設計李斯特菌屬ΔactAΔinlB，表現雙順反子mRNAs，其中雙順反子mRNAs以分開之多肽，編碼Epha2的細胞外功能部位和細胞內功能部位。為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將所有編碼在構築體中使用之信號序列(枯草桿菌phoD信號肽、炭疽桿菌保護性抗原信號肽和乳酸乳球菌Usp45信號肽)的序列密碼子-最優化。亦為

了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼ECD和ICD功能部位的序列密碼子-最優化。使用得自LLO基因的李斯特菌屬啟動基因hly作為這些構築體中的啟動基因。

使用整合載體pPL2將編碼雙順反子mRNA的表現卡匣整合到李斯特菌屬基因組內。使用利用標準技術之各種細菌溶離份的西方墨點分析，檢測並測量堆積的細胞內EphA2功能部位。結果證實使用由密碼子-最優化之序列編碼的非-李斯特菌屬信號肽，從雙順反子構築體中表現並分泌Epha2的細胞內功能部位。

表現構築體包括：(1)編碼以可操作之方式(在功能上)與EphA2之細胞外功能部位(第一個多肽)的密碼序列連接之乳酸乳球菌Usp45分泌序列的密碼子-最優化序列，和編碼以可操作之方式與EphA2 之細胞外功能部位(第二個多肽)的密碼序列連接之枯草桿菌phoD分泌信號的密碼子-最優化序列(跑道1)；以及(2)編碼以可操作之方式與EphA2之細胞外功能部位(第一個多肽)的密碼序列連接之炭疽桿菌保護性抗原分泌序列的密碼子-最優化序列，和編碼以可操作之方式與EphA2之細胞內功能部位(第二個多肽)的密碼序列連接的枯草桿菌phoD分泌序列的密碼子-最優化序列(跑道2-3(兩個不同的純種系)；參見在上文實例28中建構該表現卡匣的說明)。對照組研究(跑道4)利用減毒的親代李斯特菌屬ΔactAΔinlB品系，證實在一些對照組墨點中有各種含量的可檢測交叉反應性。跑道1-3顯示緩慢移動的譜帶和快速移動的譜帶，其中快速移動的譜帶相當於細胞內功能部

位(ICD)。在全部三個細菌溶離份中觀察到從所有構築體(跑道1-3)中表現的EphA2之細胞內功能部位。跑道4(對照組)僅顯示緩慢移動的譜帶。因為沒有可用於細胞外功能部位的抗體，故未測定細胞外功能部位的表現/分泌。

B.以質體為基礎之老鼠間皮素的表現和分泌，成為N-終端與各種密碼子-最優化之信號肽融合的功能

圖57顯示使用各種信號肽，包括非-李斯特菌屬信號肽和非-secA1信號肽，從密碼子-最優化之間皮素密碼序列中表現之老鼠間皮素的以質體為基礎的表現和分泌。顯示以質體為基礎之老鼠間皮素的表現和分泌，成為N-終端與各種由密碼子-最優化之序列編碼之信號肽融合的功能。在所有的案例中，將編碼間皮素融合蛋白之信號肽的序列密碼子-最優化，並為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將老鼠間皮素密碼序列密碼子-最優化。測量老鼠間皮素從單核細胞增多性李斯特菌中的表現和分泌，其中該李斯特菌屬藏有pAM401質體，且其中該質體編碼間皮素。測試各種以質體為基礎的構築體，其中改變信號肽。對從分泌蛋白質(A)、細胞壁(B)和細胞溶胞產物(C)之各種溶離份中回收的蛋白質進行西方墨點法。關於每個溶離份，跑道1-2顯示以與炭疽桿菌保護性抗原信號序列融合之形式來表現的老鼠間皮素，跑道3-4顯示以與乳酸乳球菌Usp45信號序列融合之形式來表現的老鼠間皮素，跑道5-6顯示以與枯草桿菌phoD信號序列融合之形式來表現的老鼠間皮素，跑道7-8顯示以與p60信號序列融合之形式來表現的老鼠間皮素，跑

道9-10顯示以與LLO信號序列融合之形式來表現的老鼠間皮素，跑道11顯示由對照組宿主李斯特菌屬ΔactAΔinlB表現的蛋白質。結果證實在信號序列包括炭疽桿菌保護性抗原信號序列(跑道1-2)和枯草桿菌phoD信號序列(跑道5-6)處，發現最高的表現和分泌。

C.人類間皮素以單核細胞增多性李斯特菌染色體為基礎的表現和分泌

圖58顯示在各種細菌細胞溶離份(即分泌蛋白質、細胞壁和溶胞產物)中，人類間皮素以單核細胞增多性李斯特菌染色體為基礎之表現和分泌的西方墨點分析。當與非-李斯特菌屬secA1和非-secA1信號肽融合時，測試人類間皮素的表現和分泌。受試的李斯特菌屬細菌均為ΔactA/ΔinlB李斯特菌屬，並如下：李斯特菌屬ΔactA/ΔinlB(對照組李斯特菌屬，並未被設計成表現間皮素)(跑道1)；編碼與ΔSS/ΔGPI人類間皮素融合之炭疽桿菌保護性抗原信號序列的李斯特菌屬(跑道2-3)；編碼與ΔSS/ΔGPI人類間皮素融合之枯草桿菌phoD信號序列的李斯特菌屬(跑道4-5)；編碼與全長人類間皮素融合之炭疽桿菌保護性抗原信號序列的李斯特菌屬(跑道6-7)；編碼與全長人類間皮素融合之枯草桿菌phoD信號序列的李斯特菌屬(跑道8-9)。

為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將在所有上述的李斯特菌屬中，編碼與間皮素融合之信號序列的序列密碼子-最優化。此外，在每個構築體中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將間皮素密碼序列(ΔSS/ΔGPI和全

長)密碼子-最優化。在每個表現間皮素的上述李斯特菌屬中，經由pPL2的整合作用，將間皮素表現卡匣插入李斯特菌屬染色體內。

在將人類間皮素設計成刪除其信號序列，並刪除忌水性區域(gpi區域)之處，利用枯草桿菌phoD分泌序列出現了最高的表現(跑道4-5)。

實例31.重組單核細胞增多性李斯特菌疫苗之免疫原性和抗-腫瘤效力的額外實例

下列的實例揭示以本發明之李斯特菌屬接種的結果，例如細胞素表現的疫苗-依賴性刺激、患有腫瘤之動物的疫苗-依賴性存活、在腫瘤轉移上的疫苗-依賴性降低，以及在腫瘤體積上的疫苗-依賴性降低。

A.包括P-60模式抗原嵌合體之李斯特菌屬疫苗的免疫原性

圖59A和B顯示藉著表現p60-抗原嵌合體或LLO信號肽-抗原融合蛋白之李斯特菌屬，將異種抗原遞送至MHC第I類路徑。在本實驗中使用的異種抗原是AH1-A5。利用設計成包括p60蛋白質嵌合體表現卡匣的李斯特菌屬來接種，該表現卡匣編碼被插入包括N-終端p60信號肽序列之p60多肽序列內的AH1-A5(與OVA SL8肽融合)("以p60為基礎之構築體")，或設計成編碼LLO信號肽的李斯特菌屬，其與編碼相同抗原，埋入OVA內之AH1-A5的核酸連接("以LLO為基礎之構築體")。這兩個構築體均使用李斯特菌屬啟動基因hly。p60是李斯特菌屬的肽聚糖自溶素，其由secA2路徑分泌，而LLO則是李斯特菌溶解素。

欲產製以p60為基礎之構築體，將編碼p60之核酸設計成含有PstI選殖位置，其中該PstI選殖位置代表靜默突變，即結果在編碼之胺基酸序列中沒有改變。該PstI位置係位在p60序列中N-終端信號序列與兩個LysM細胞壁結合功能部位的第一個之間。在架構中將編碼包括AH1-A5抗原決定位(SPSYAYHQF(序列第73號))和SL8抗原決定位(SIINFEKL(序列第123號))之異種多肽的多核苷酸插入PstI選殖位置內。藉著獨特的XhoI位置分開這些抗原決定位的密碼序列，並為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而將其密碼子-最優化。插入PstI位置的作用發生在p60之核苷酸鹼基編號199的相等處。為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將p60密碼序列的前1-70個胺基酸密碼子-最優化。因此，從對於在單核細胞增多性李斯特菌中表現而言最佳的密碼子來表現相當於信號肽的前27個胺基酸。抗原表現卡匣更進一步含有獨特的5'和3'KpnI和SacI位置，為了與單核細胞增多性李斯特菌基因組之$tRNA^{Arg}$基因相鄰的位置-專一之整合作用，分別插入pPL2質體的MCS內。以LLO為基礎之構築體包括編碼LLO信號肽的序列，以可操作之方式與在OVA內編碼AH1-A5的核酸連接(並未使用任何密碼子-最優化作用)。因此，在本研究中，信號肽是得自李斯特菌屬LLO或得自李斯特菌屬p60。

將構築體放在pPL2內，它是調解與李斯特菌屬基因組之位置-專一之重組作用的載體，並插入李斯特菌屬基因組內。

圖59A和B顯示對接種(尾靜脈)表現與p60信號序列/自溶素成為p60嵌合體之AH1-A5抗原的李斯特菌屬的免疫反應，以及對接種表現與LLO信號序列連接之AH1-A5抗原的李斯特菌屬的免疫反應。在圖的x-軸中，"Unstim"意指在孔中未加入肽(即該孔是未受刺激的)，而"AH1"意指在孔中加入AH1九肽，而"AH1-A5"意指在孔中加入AH1-A5九肽。設計所有的細菌疫苗，使其含有經過整合之編碼AH1-A5的核酸(細菌疫苗不編碼AH1)(參見，例如Slansky等人(2000) Immunity 13:529-538)。在以包括以p60為基礎之構築體的李斯特菌屬進行接種之處，在圖之x-軸上以"p60"表示品系。而在以包括以LLO為基礎之構築體的李斯特菌屬進行接種之處，在圖之x-軸上以"LLO"表示品系。

利用表現以p60為基礎之構築體的李斯特菌屬接種的整體草案如下：(1)以含有已經整合之核酸的李斯特菌屬(尾靜脈(靜脈內))接種老鼠，其中已經整合之核酸編碼p60，含有被插入p60之核苷酸199處的編碼AH1-A5之核酸。換句話說，編碼AH1-A5抗原之核酸，在架構中以可操作之方式與p60信號序列和p60自溶素連接。為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼AH1-A5之核酸密碼子-最優化；(2)在感染之後七天，移出脾臟；(3)將脾臟細胞分離，放在孔中，並按照在x-軸上的指示，將脾臟細胞與加入的肽或無(圖59A和59B)、與加入的AH1(圖59A)或與加入的AH1-A5(圖59B)一起培養；(4)在加入肽之後，培養細胞五小時，接著藉著FACS分析評估表現IFNγ之$CD8^{+T}$細胞的存在。至於利

用表現以LLO為基礎之構築體的李斯特菌屬接種，使用類似的草案。

結果證實在加入的肽是AH1(圖59A)或在加入的肽是AH1-A5(圖59B)之處，李斯特菌屬疫苗刺激了$CD8^{+T}$細胞表現IFNγ。在已經整合之AH1-A5以可操作之方式與LLO信號肽連接之處，刺激多少是較高的，而在已經整合之AH1-A5以可操作之方式與p60信號序列連接時，刺激多少是較低的(圖59A和B)。

圖60A和B顯示利用與上述相同的兩個李斯特菌屬進行的實驗，即如同在圖59A和B中。圖60A顯示以設計成含有以p60為基礎之構築體的李斯特菌屬("p60")或設計成含有以LLO為基礎之構築體的李斯特菌屬("LLO")接種老鼠的結果。按照在圖60A之x-軸上的指示，以無肽(未受刺激的；"unstim")或LLO_{91-99}肽("LLO91"；Badovinac和Harty(2000) J. Immunol. 164:6444-6452)補充以細胞為基礎之測定。結果證實類似的免疫反應(IFNγ表現)，其中李斯特菌屬疫苗含有以p60為基礎之構築體或以LLO為基礎之構築體。在圖60A中經過刺激之免疫反應，反映得自以細胞為基礎之策定的結果，係歸因於李斯特菌屬之天然LLO的內源表現。

圖60B顯示以設計成含有以p60為基礎之構築體的李斯特菌屬接種老鼠的結果，其中hly啟動基因和信號肽序列以可操作之方式與編碼AH1-A5的核酸連接，或以設計成含有以LLO為基礎之構築體的李斯特菌屬接種老鼠的結果，其中hly啟動基因和信號肽序列以可操作之方式與編碼AH1-A5

的核酸連接。按照在x-軸上的指示，加入的肽為無肽(未受刺激的；"unstim")或$p60_{217-225}$肽("p60-217"；Sijts等人(1997) J. Biol. Chem. 272:19261-19268)。在圖60B中經過刺激的免疫反應，反映得自以細胞為基礎之測定的結果，對於以LLO為基礎之構築體，係歸因於李斯特菌屬表現內源的p60，而對於以p60為基礎之構築體，則歸因於內源p60與表現p60蛋白質嵌合體序列的組合。

B.表現人類間皮素之李斯特菌屬的治療效力

在圖61中敘述的結果顯示利用表現人類間皮素(hu間皮素)之李斯特菌屬接種，在攜帶腫瘤之老鼠中延長了存活，其中已經將在老鼠中的腫瘤細胞設計成表現人類間皮素。該腫瘤細胞為表現人類間皮素的CT26細胞，而該老鼠為Balb/c老鼠。(所有在本文中描述的CT26腫瘤研究均涉及Balb/c老鼠)。在一個表現卡匣中，在架構中使編碼非-李斯特菌屬信號序列的序列以可操作之方式與編碼人類間皮素之密碼子-最優化的序列(刪除其信號序列和GPI錨定)連接。在李斯特菌屬疫苗中，將編碼與人類間皮素(ΔGPIΔSS)融合之信號肽的表現卡匣投與攜帶腫瘤的老鼠，研究融合蛋白對對腫瘤之免疫反應的影響。已經將編碼間皮素融合蛋白的表現卡匣整合到李斯特菌屬染色體內。在第0天，將$2x10^5$個表現人類間皮素之CT26細胞(CT.26huMeso+)靜脈內注射到Balb/c老鼠內。在尾靜脈(靜脈內)中接種老鼠。在第3天發生利用1e7菌落形成單位(CFU)李斯特菌屬(靜脈內)接種。

圖61顯示老鼠對表現人類間皮素之CT26腫瘤的存活百分比(顯示在y-軸上)，在那裡疫苗包括漢克氏平衡鹽溶液(HBSS)(假裝的疫苗；"HBSS")；李斯特菌屬ΔactAΔinlB從已經整合之表現卡匣中表現SF-AH1A5(陽性對照組疫苗；"SF-AH1A5")；或李斯特菌屬ΔactAΔinlB，其包括編碼與人類間皮素(由密碼子-最優化之序列編碼)融合之炭疽桿菌保護性抗原信號序列(由未密碼子-最優化之序列編碼)的表現卡匣，其中該人類間皮素具有刪除之信號序列和刪除之編碼忌水性gpi-錨定肽的區域("BaPA-huMesoΔgpiΔss")。攜帶SF-AH1A5構築體和BaPA-huMesoΔgpiΔss構築體的李斯特菌屬，以在染色體上整合構築體之形式含有這些構築體。已經使用pPL2，將編碼SF-AH1A5之核酸分子與編碼BaPA-huMesoΔgpiΔss構築體之核酸分子整合到李斯特菌屬基因組內。SF是衍生自卵清蛋白之八個胺基酸肽的速記，亦稱為SL8(參見，例如Shastri和Ganzalez (1993) J. Immunol. 150:2724-2736)。縮寫"SF-AH1A5"、"SF-AH1-A5"和"OVA/AH1-A5"意指與卵清蛋白鷹架連接的AH1-A5。"SF AH1-A5"意指AH1-A5(SPSYAYHQF(序列第73號))和與GenBank登錄編號P01012(卵清蛋白)之胺基酸138至386的N-終端融合的SF肽。在本實例中，編碼"SF-AH1-A5"之多核苷酸，包括編碼AH1-A5之密碼子-最優化的核酸，以及編碼卵清蛋白-衍生之序列的未密碼子-最優化之核酸。

結果證實利用表現人類間皮素之李斯特菌屬的單次免疫，延長了含有表現人類間皮素之腫瘤的老鼠的存活。利

用在染色體上已經整合，並與Δ信號序列/Δgpi人類間皮素融合的炭疽桿菌保護性抗原信號序列(BaPA-huMesoΔgpiΔss；實心正方形)，有最高的存活百分比。在以對照組鹽溶液"接種之處"，存活最低。

C.因為間皮素-專一之抗-腫瘤效力，在以表現人類間皮素之李斯特菌屬接種的攜帶腫瘤之老鼠中，降低肺腫瘤結節的程度

在圖62中的數據證實藉著接種表現人類間皮素之李斯特菌屬ΔactAΔinlB，降低肺腫瘤結節的程度，其中將該腫瘤細胞設計成表現人類間皮素。該老鼠品系為Balb/c，且該肺腫瘤細胞為藏有表現人類間皮素之載體的CT26細胞。在第0天，將$2x10^5$個表現人類間皮素的CT26細胞靜脈內投與Balb/c老鼠。在表現卡匣中，在架構中將編碼各種信號序列的序列以可操作之方式與編碼人類間皮素之密碼子-最優化的序列連接。經由包括表現卡匣的李斯特菌屬疫苗，將編碼與人類間皮素融合之各種信號肽的表現卡匣投與攜帶腫瘤的老鼠。在第3天，將$1x10^7$CFU/100微升的李斯特菌屬疫苗靜脈內投與攜帶腫瘤的老鼠。陰性對照組接種是利用HBSS或李斯特菌屬ΔactAΔinlB。陽性對照組接種則是利用表現包括AH1A5(在架構中與OVA序列融合)之OVA融合蛋白的李斯特菌屬。(由未密碼子-最優化之表現卡匣編碼包括AH1A5的OVA融合蛋白)。在第19天，犧牲老鼠，收穫牠們的肺臟，並計算肺腫瘤結節的數目。

李斯特菌屬疫苗降低了在肺中轉移的數目。對照組疫苗

僅涉及HBSS或李斯特菌屬ΔactAΔinlB，結果分別檢測到每個肺臟不變的250個轉移，以及每個肺臟平均135個轉移。攜帶編碼與人類間皮素融合之LLO信號肽的質體(pAM401)的李斯特菌屬("pAM-LLO-huMeso")顯示每個肺臟大約25個轉移。為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼LLO信號肽和人類間皮素序列之pAM-LLO-huMeso質體的多核苷酸序列密碼子-最優化。攜帶編碼與人類間皮素(Δgpi/Δ信號序列)融合之炭疽桿菌保護性抗原信號序列(BaPA)的經過整合之序列的李斯特菌屬("BaPA-HuMesoΔgpiΔss")亦顯示平均每個肺臟平均大約25個轉移。在BaPA-HuMesoΔgpiΔss中編碼炭疽桿菌保護性抗原信號序列之多核苷酸並未被密碼子-最優化，而為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼刪除間皮素信號肽和GPI錨定之人類間皮素序列的多核苷酸密碼子-最優化。

圖63顯示對照組研究的結果，其使用包括利用CT.26親代標靶細胞產製之肺腫瘤結節的老鼠。使用Balb/c老鼠，但改而注射野外型CT26(在第0天，$2x10^5$個細胞(靜脈內))。研究證實以表現間皮素融合蛋白之李斯特菌屬疫苗接種的抗-腫瘤效力是間皮素-專一的。在表現卡匣中，在架構中將編碼各種信號肽的序列以可操作之方式與編碼人類間皮素之密碼子-最優化的序列連接。(在本實例中使用的構築體與在上個實驗中使用的那些相同，產生在圖62中出示的數據)。經由包括表現卡匣的李斯特菌屬疫苗，將編碼與人類間皮

素融合之各種信號肽的表現卡匣投與攜帶腫瘤的老鼠。接種是在尾靜脈中($1x10^7$CFU/100微升，靜脈內，在第3天)。在該特殊研究中，腫瘤細胞不表現人類間皮素。判定存活。在可獲得數據之處，亦測量肺轉移的數目。在每個接種組中總共有五隻老鼠。陰性對照組接種涉及HBSS或李斯特菌屬ΔactAΔinlB。陽性對照組接種涉及表現包括AH1A5之OVA融合的李斯特菌屬(未密碼子-最優化)。

在圖63中出示結果。叉叉表示無法存活，而每個接種組含有5隻老鼠。至於陽性對照組接種，老鼠存活，且在肺臟中檢測到之轉移的數目平均每個肺臟約為25。因為並未將腫瘤細胞設計成表現人類間皮素，所以接種藏有表現與人類間皮素融合之LLO信號肽之質體的李斯特菌屬("pAM-LLO-HuMeso")的老鼠未存活。在以攜帶在染色體上已經整合，並與人類間皮素(Δgpi/Δ信號序列)融合之炭疽桿菌保護性抗原信號序列(BaPA；由未密碼子-最優化之核苷酸序列編碼)的李斯特菌屬("BaPA-HuMesoΔgpiΔss")接種老鼠之處，有些存活但其他無法存活。

D.以表現密碼子-最優化之人類間皮素的李斯特菌屬接種，降低了腫瘤體積

圖64顯示以表現得自包括密碼子-最優化之間皮素密碼序列之表現卡匣的人類間皮素之李斯特菌屬(ΔactAΔinlB)接種，降低了腫瘤體積。

在表現卡匣中，在架構中將編碼各種信號序列的序列以可操作之方式與編碼人類間皮素之密碼子-最優化的序列

連接。經由包括表現卡匣的李斯特菌屬疫苗，將編碼與人類間皮素融合之各種信號肽的表現卡匣投與攜帶腫瘤的老鼠。在本研究中，使用表現人類間皮素之李斯特菌屬疫苗接種攜帶腫瘤的老鼠，包括下列：攜帶pAM401質體之李斯特菌屬(ΔactAΔinlB單核細胞增多性李斯特菌)，表現並分泌與人類間皮素融合的LLO信號肽(由為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而被密碼子-最優化的序列編碼)("PaM opt. LLO-opt.huMeso")；攜帶pAM401質體之李斯特菌屬，表現與人類間皮素融合之炭疽桿菌保護性抗原信號序列(由未密碼子-最優化之表現卡匣編碼)("pAM non-opt.BaPA-opt.huMeso")；以及包括經過整合，編碼與人類間皮素融合之炭疽桿菌保護性抗原信號序列(由未密碼子-最優化之序列編碼)之表現卡匣的李斯特菌屬，其中該人類間皮素具有刪除之信號序列和刪除之編碼忌水性gpi-錨定肽的區域("Non-opt.BaPA-opt.huMeso delgpi-ss")。

在研究中，將Balb/c老鼠皮下植入$2x10^5$個CT26老鼠結腸腫瘤細胞，將其設計成表現人類間皮素(第0天)。在每個接種組中包括5隻老鼠。在注射CT26細胞之後第3天，以非-李斯特菌屬對照組或$1x10^7$菌落形成單位(CFU)的李斯特菌屬疫苗靜脈內接種老鼠。陰性對照組接種涉及HBSS。陽性對照組接種涉及表現SF-AH1A5(密碼子-最優化)的李斯特菌屬。(SF是衍生自卵清蛋白的八個胺基酸肽，亦稱為SL8(參見，例如Shastri和Ganzalez(1993) J. Immunol. 150: 2724-2736))。在各種時間點，判定平均腫瘤體積。

在圖64中出示本研究的結果。結果證實以表現與各種信號肽融合之人類間皮素的李斯特菌屬接種，降低了腫瘤體積。以表現與人類間皮素融合之炭疽桿菌保護性抗原信號肽的李斯特菌屬接種，是保護性的(空心圓形與虛線)。以編碼與LLO信號肽融合之人類間皮素的李斯特菌屬表現質體接種，是保護性的(空心三角形)。以包括在染色體上已經整合之表現卡匣，其編碼與人類間皮素(Δgpi/Δ信號序列)融合之炭疽桿菌保護性抗原(未密碼子-最優化之核酸)信號肽的李斯特菌屬接種(空心橢圓形與實線)，亦是有保護性的。關於陽性對照組，表現在染色體上已經整合之SF-AH1A5的李斯特菌屬(空心正方形)亦是保護性的。最高的腫瘤體積和最早發生腫瘤生長的時間，發生在接受假裝疫苗(HBSS)的老鼠中。

E.表現與非-李斯特菌屬信號序列融合之人類間皮素的李斯特菌屬疫苗的免疫原性

圖65敘述李斯特菌屬ΔactA/ΔinlB-人類間皮素品系的免疫原性，其中該李斯特菌屬含有在染色體上已經整合之核酸，其編碼與炭疽桿菌信號肽融合的人類間皮素(最優化之Ba PA hMesoΔGPIΔSS)。使用ELISPOT測定，評估免疫反應，其中該測定對干擾素-γ的表現是敏感的。

本研究包括下列步驟：(1)以李斯特菌屬接種(靜脈內)老鼠(Balb/c老鼠或C57BL/6老鼠)，該李斯特菌屬包括已經整合的表現卡匣，編碼與人類間皮素(由密碼子-最優化之序列編碼，其中已經刪除間皮素信號肽和忌水性gpi-錨定序列)

融合的炭疽桿菌保護性抗原信號肽(由未密碼子-最優化之序列編碼)；(2)在7天之後，移出脾臟；(3)將從脾臟中移出的細胞分散在孔中。每個孔接受大約200,000個脾臟細胞；(4)按照指示將三種培養基之一加至孔中。得自利用Balb/c老鼠之研究的脾臟細胞接受只有培養基("未受刺激")、間皮素肽集合("Meso集合")，或$p60_{217-225}$("$p60_{217}$")。得自利用僅接受培養基("未受刺激")、間皮素肽集合("Meso集合")，或$LLO_{296-304}$("$LLO_{296-304}$")之C57BL/6之研究的脾臟細胞；(5)進行ELISPOT測定，判定對加入之肽(們)起反應之免疫細胞的數目。間皮素肽集合包括153個不同的肽，其中這些肽跨越人類間皮素的完整序列，每個肽均為15個胺基酸長，與相鄰的肽有11個胺基酸重疊。

在圖65中出示ELISPOT測定的結果。結果指出表現與炭疽桿菌信號肽融合之人類間皮素的李斯特菌屬疫苗能夠在Balb/c老鼠中誘導對間皮素的免疫反應。在Balb/c老鼠免疫系統中觀察到比C57BL/6免疫系統更高的對抗表現人類間皮素之李斯特菌屬的IFN-γ反應。對p60或LLO的ELISPOT信號是對李斯特菌屬天然存在的p60和LLO蛋白質起反應。

文中所述所有之公開案、專利、專利申請案、網路位址和登錄編號/資料庫序列(包括多核苷酸和多肽序列兩者)係以引用的方式全部併入本文中，該引用的程度就如同已個別地及特定地將各個公開案、專利、專利申請案、網路位址或登錄編號/資料庫序列以引用的方式全部併入一般。

【圖式簡單說明】

圖1顯示hly啟動基因，將單核細胞增多性李斯特菌DP-L4056(序列第1號)(下方序列)與EGD品系(序列第2號)(下方序列)排成一直線。

圖2顯示編碼包括LLO信號肽、LLO PEST序列和全長人類EphA2抗原之融合蛋白的多核苷酸的序列(序列第3號)。

圖3顯示由在圖2中出示之多核苷酸編碼的融合蛋白的序列(序列第4號)。

圖4顯示編碼人類EphA2細胞外功能部位(EX2)的天然核苷酸序列(序列第5號)。

圖5顯示已經為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而被密碼子-最優化之編碼人類EphA2細胞外功能部位的核苷酸序列(序列第6號)。

圖6顯示人類EphA2細胞外功能部位(EX2)之胺基酸序列(序列第7號)。

圖7顯示編碼包括LLO信號肽、LLO PEST序列和人類EphA2細胞外功能部位之融合蛋白的未密碼子-最優化之多核苷酸序列(序列第8號)。

圖8顯示由在圖7中出示之密碼序列編碼之融合蛋白的序列(序列第9號)。

圖9顯示包括hly啟動基因，並編碼包括LLO信號肽、LLO PEST序列和人類EphA2細胞外功能部位之融合蛋白的表現卡匣(序列第10號)。在該序列中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼人類EphA2細胞外功能部位的序列密碼子-最優化。

圖10顯示由圖9之表現卡匣編碼的胺基酸序列(序列第11號)。

圖11顯示包括hly啟動基因，並編碼包括LLO信號肽、LLO PEST序列和人類EphA2細胞外功能部位之融合蛋白的表現卡匣(序列第12號)。在該序列中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼LLO信號肽、LLO PEST和人類EphA2細胞外功能部位的序列全部密碼子-最優化。

圖12顯示由圖11之表現卡匣編碼的胺基酸序列(序列第13號)。

圖13顯示包括hly啟動基因，並編碼包括phoD Tat信號肽和人類EphA2細胞外功能部位之融合蛋白的表現卡匣(序列第14號)。在該序列中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼phoD Tat信號肽和人類EphA2細胞外功能部位的序列密碼子-最優化。

圖14顯示由圖13之表現卡匣編碼的胺基酸序列(序列第15號)。

圖15顯示編碼人類EphA2細胞內功能部位(CO)之天然核苷酸序列(序列第16號)。

圖16顯示已經為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而被密碼子-最優化之編碼人類EphA2細胞內功能部位的核苷酸序列(序列第17號)。

圖17顯示人類EphA2細胞內功能部位(EX2)的胺基酸序列(序列第18號)。

圖18顯示編碼包括LLO信號肽、LLO PEST序列和人類

EphA2細胞內功能部位之融合蛋白的未密碼子-最優化之多核苷酸序列(序列第19號)。

圖19顯示由在圖18中出示之密碼序列編碼之融合蛋白的序列(序列第20號)。

圖20顯示包括hly啟動基因，並編碼包括LLO信號肽、LLO PEST序列和人類EphA2細胞內功能部位之融合蛋白的表現卡匣(序列第21號)。在該序列中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼人類EphA2細胞內功能部位的序列密碼子-最優化。

圖21顯示由圖20之表現卡匣編碼的胺基酸序列(序列第22號)。

圖22顯示包括hly啟動基因，並編碼包括LLO信號肽、LLO PEST序列和人類EphA2細胞內功能部位之融合蛋白的表現卡匣(序列第23號)。在該序列中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼LLO信號肽、LLO PEST和人類EphA2細胞內功能部位的序列全部密碼子-最優化。

圖23顯示由圖22之表現卡匣編碼的胺基酸序列(序列第24號)。

圖24顯示包括hly啟動基因，並編碼包括phoD Tat信號肽和人類EphA2細胞內功能部位之融合蛋白的表現卡匣(序列第25號)。在該序列中，為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼phoD Tat信號肽和人類EphA2細胞內功能部位兩者的序列密碼子-最優化。

圖25顯示由圖24之表現卡匣編碼的胺基酸序列(序列第

26號)。

圖26顯示包括hly啟動基因，並編碼包括LLO信號肽和NY-ESO-1抗原之融合蛋白的密碼子-最優化之表現卡匣(序列第27號)。為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現，將編碼該信號肽和該抗原兩者的序列密碼子-最優化。

圖27顯示由圖26之表現卡匣編碼的胺基酸序列(序列第28號)。

圖28顯示包括以可操作之方式與編碼Usp45信號肽的密碼子-最優化序列連接之hly啟動基因的多核苷酸(序列第29號)。

圖29顯示包括以可操作之方式與編碼p60信號肽的天然序列連接之hly啟動基因的多核苷酸(序列第30號)。

圖30顯示包括以可操作之方式與編碼p60信號肽的密碼子-最優化序列連接之hly啟動基因的多核苷酸(序列第31號)。

圖31顯示hlyP-p60基因片段的序列(序列第32號)。

圖32(包括圖32A、32B和32C)顯示pAM401-MCS的序列(序列第33號)，pAM401質體含有得自pPL2載體的多重選殖位置(MCS)。

圖33顯示已經為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而被密碼子-最優化之人類間皮素的密碼序列(序列第34號)。

圖34顯示人類間皮素的胺基酸序列(序列第35號)。

圖35顯示已經為了在單核細胞增多性李斯特菌中表現而被密碼子-最優化之老鼠間皮素的密碼序列(序列第36號)。

圖36顯示老鼠間皮素的胺基酸序列(序列第37號)。

圖37顯示得自編碼天然EphA2 CO功能部位序列之重組李斯特菌屬中的分泌蛋白質之西方墨點分析。

圖38顯示得自編碼與密碼子-最優化之EphA2 EX2功能部位序列融合的天然或密碼子-最優化之LLO secA1信號肽的重組李斯特菌屬中之分泌蛋白質的西方墨點分析。

圖39顯示得自編碼與密碼子-最優化之EphA2 CO功能部位融合的天然或密碼子-最優化之LLO secA1信號肽或密碼子-最優化之Tat信號肽的重組李斯特菌屬中之分泌蛋白質的西方墨點分析。

圖40顯示在以編碼全長的天然EphA2序列之pCDNA4質體DNA轉移感染之後48小時，得自293細胞之溶胞產物的西方墨點分析。

圖41為顯示以編碼OVA.AH1或OVA.AH1-A5的重組李斯特菌屬免疫攜帶CT26.24(huEphA2+)肺腫瘤之Balb/C老鼠，賦與長期存活的圖表。

圖42為顯示當以編碼與密碼子-最優化之EphA2 EX2功能部位序列融合的密碼子-最優化之secA1信號肽的重組李斯特菌屬免疫時，增加攜帶CT26.24(huEphA2+)肺腫瘤之Balb/C老鼠存活的圖表。

圖43為顯示以編碼EphA2 CO功能部位之重組李斯特菌屬免疫攜帶CT26.24(huEphA2+)肺腫瘤之Balb/C老鼠，賦與長期存活的圖表。

圖44為顯示以編碼EphA2 CO功能部位，但無編碼全長

EphA2之質體DNA的重組李斯特菌屬免疫攜帶CT26.24(huEphA2+)肺腫瘤之Balb/C老鼠，賦與長期存活的圖表。

圖45為顯示表現hEphA2之李斯特菌屬誘發EphA2專一之CD8+T細胞反應的圖表。

圖46為顯示促成表現hEphA2之李斯特菌屬的hEphA2-指揮之抗-腫瘤效力的CD4+和CD8+T細胞反應兩者的圖表。

圖47顯示單核細胞增多性李斯特菌品系10403S hly啟動基因的序列(序列第38號)，其以可操作之方式與得自炭疽桿菌的保護性抗原信號肽連接，並為了在單核細胞增多性李斯特菌中分泌而被密碼子-最優化。將相當於Bam HI限制酵素認知位置之6個額外的核苷酸(5'-GGATCC-3')納入信號肽序列的羧基終端，有助於在架構中以可操作之方式與任何選出之密碼序列連接。hly啟動基因的5'末端含有獨特的Kpn I限制酵素認知位置。

圖48顯示從重組的李斯特菌屬中有效地表現和分泌全長之人類腫瘤抗原。圖48A顯示利用由與人類間皮素融合之LLO信號肽所組成之構築體，使用天然的密碼子，表現/分泌間皮素。圖48B顯示利用包括與為了在李斯特菌屬中表現而被密碼子-最優化之人類間皮素融合的各種信號肽之構築體，表現/分泌間皮素。圖48C顯示利用包括與人類間皮素密碼子-最優化之NY-ESO-1融合的密碼子-最優化之LLO信號肽的構築體，表現/分泌NY-ESO-1。

圖49顯示phEphA2KD之密碼序列(序列第39號)。

圖50顯示含有actA-plcB基因間區域之密碼子-最優化的人類EphA2之Mlu I亞片段(序列第40號)。

圖51顯示hly啟動基因-70 N-終端p60胺基酸的序列(序列第41號)。

圖52顯示質體pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)的KpnI-BamHI亞-片段(序列第42號)。

圖53顯示質體pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)-間皮素的KpnI-BamHI亞-片段(序列第43號)。

圖54顯示質體pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)-間皮素ΔSP/ΔGPI的KpnI-BamHI亞-片段(序列第44號)。

圖55顯示從包括抗原-細菌蛋白質嵌合體之重組李斯特菌屬中表現和分泌抗原的西方墨點分析。

圖56顯示從雙順反子信息中表現EphA2之細胞內功能部位(ICD)的西方墨點分析。

圖57顯示以質體為基礎之老鼠間皮素的表現與分泌的西方墨點分析，在不同的細菌溶離份中證明為與各種密碼子-最優化之信號肽融合之N-終端融合的功能：分泌蛋白質(圖57A)；細胞壁(圖57B)；以及細胞溶胞產物(圖57C)。

圖58顯示在單核細胞增多性李斯特菌中，以染色體為基礎之人類間皮素的表現與分泌的西方墨點分析。顯示在各種細菌細胞溶離份中間皮素表現的西方墨點分析，起因於從指示之信號序列表現對照組李斯特菌屬(不編碼間皮素)和編碼間皮素的李斯特菌屬。

圖59A和59B為顯示藉著李斯特菌屬疫苗將異種抗原

(AH1-A5)遞送至MHC第I類路徑的圖表。李斯特菌屬疫苗包括表現p60-AH1-A5蛋白質嵌合體(AH1-A5埋入p60中)的李斯特菌屬(圖59A)，或表現包括LLO信號肽和AH1-A5之融合蛋白的李斯特菌屬(圖59B)。

圖60A和60B為顯示李斯特菌屬疫苗調節將細菌-專一之抗原遞送至MHC第I類路徑的圖表，其中該疫苗包括表現p60-AH1-A5蛋白質嵌合體(AH1-A5埋入p60中)的李斯特菌屬(圖60A)，或表現包括LLO信號肽和AH1-A5之融合蛋白的李斯特菌屬(圖60B)，且其中被加至以細胞為基礎之測定中的受試肽是無測試肽(未受刺激的)(圖60A)、LLO_{91-99}(圖60A)、無測試肽(圖60B)或$p60_{217-225}$(圖60B)。

圖61為顯示在經過接種之攜帶腫瘤的老鼠中，表現人類間皮素之李斯特菌屬的治療效力的圖表，其中將腫瘤細胞設計成表現人類間皮素。

圖62為顯示在以表現人類間皮素之李斯特菌屬接種的攜帶腫瘤之老鼠中，降低肺腫瘤結節程度的圖表，其中將腫瘤細胞設計成表現人類間皮素。

圖63為顯示使用CT.26親代標靶細胞之對照組研究的圖表，即未將細胞設計成表現人類間皮素，證實Lm-Meso接種疫苗的抗-腫瘤效力是間皮素-專一的。

圖64為顯示以表現密碼子-最優化之人類間皮素的李斯特菌屬接種疫苗，降低腫瘤體積的圖表。

圖65顯示ELISPOT實驗的結果，其顯示李斯特菌屬ΔactA/ΔinlB-人類間皮素品系的免疫原性，其中已經將編碼人類間皮素的核酸整合到李斯特菌屬基因組內。

序列表

<110> 西勒斯股份有限公司

<120> 重組核酸分子、表現卡匣及細菌及其使用方法

<130> 282172003941

<140> 093140281
<141> 2004-12-23

<150> US 60/616,750
<151> 2004-10-06

<150> US 60/615,287
<151> 2004-10-01

<150> US 60/599,377
<151> 2004-08-05

<150> PCT/US2004/23881
<151> 2004-07-23

<150> US 10/883,599
<151> 2004-06-30

<150> US 60/556,744
<151> 2004-03-26

<160> 129

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 240
<212> DNA
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 1
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240

<210> 2
<211> 240
<212> DNA
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 2
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagtgac ttttatgttg aggcattaac 60
atttgttaac gacgataaag ggacagcagg actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240

<210> 3
<211> 3105
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質編碼序列

<400> 3
atgaaaaaaa taatgctagt ttttattaca cttatattag ttagtctacc aattgcgcaa 60
caaactgaag caaaggatgc atctgcattc aataaagaaa attcaatttc atccatggca 120
ccaccagcat ctccgcctgc aagtcctaag acgccaatcg aaaagaaaca cgcggatctc 180
gagctccagg cagcccgcgc ctgcttcgcc ctgctgtggg gctgtgcgct ggccgcggcc 240
gcggcggcgc agggcaagga agtggtactg ctggactttg ctgcagctgg aggggagctc 300
ggctggctca cacacccgta tggcaaaggg tgggacctga tgcagaacat catgaatgac 360
atgccgatct acatgtactc cgtgtgcaac gtgatgtctg gcgaccagga caactggctc 420
cgcaccaact gggtgtaccg aggagaggct gagcgtatct tcattgagct caagtttact 480
gtacgtgact gcaacagctt ccctggtggc gccagctcct gcaaggagac tttcaacctc 540
tactatgccg agtcggacct ggactacggc accaacttcc agaagcgcct gttcaccaag 600
attgacacca ttgcgcccga tgagatcacc gtcagcagcg acttcgaggc acgccacgtg 660
aagctgaacg tggaggagcg ctccgtgggg ccgctcaccc gcaaaggctt ctacctggcc 720
ttccaggata tcggtgcctg tgtggcgctg ctctccgtcc gtgtctacta caagaagtgc 780
cccgagctgc tgcagggcct ggcccacttc cctgagacca tcgccggctc tgatgcacct 840
tccctggcca ctgtggccgg cacctgtgtg gaccatgccg tggtgccacc ggggggtgaa 900
gagccccgta tgcactgtgc agtggatggc gagtggctgg tgcccattgg gcagtgcctg 960
tgccaggcag gctacgagaa ggtggaggat gcctgccagg cctgctcgcc tggatttttt 1020
aagtttgagg catctgagag cccctgcttg gagtgccctg agcacacgct gccatcccct 1080
gagggtgcca cctcctgcga gtgtgaggaa ggcttcttcc gggcacctca ggacccagcg 1140
tcgatgcctt gcacacgacc cccctccgcc ccacactacc tcacagccgt gggcatgggt 1200
gccaaggtgg agctgcgctg gacgcccccc caggacagcg ggggccgcga ggacattgtc 1260
tacagcgtca cctgcgaaca gtgctggccc gagtctgggg aatgcgggcc gtgtgaggcc 1320
agtgtgcgct actcggagcc tcctcacgga ctgacccgca ccagtgtgac agtgagcgac 1380

ctggagcccc acatgaacta caccttcacc gtggaggccc gcaatggcgt ctcaggcctg 1440
gtaaccagcc gcagcttccg tactgccagt gtcagcatca accagacaga gccccccaag 1500
gtgaggctgg agggccgcag caccacctcg cttagcgtct cctggagcat ccccccgccg 1560
cagcagagcc gagtgtggaa gtacgaggtc acttaccgca agaagggaga ctccaacagc 1620
tacaatgtgc gccgcaccga gggtttctcc gtgaccctgg acgacctggc cccagacacc 1680
acctacctgg tccaggtgca ggcactgacg caggagggcc agggggccgg cagcagggtg 1740
cacgaattcc agacgctgtc cccggaggga tctggcaact tggcggtgat tggcggcgtg 1800
gctgtcggtg tggtcctgct tctggtgctg gcaggagttg gcttctttat ccaccgcagg 1860
aggaagaacc agcgtgcccg ccagtccccg gaggacgttt acttctccaa gtcagaacaa 1920
ctgaagcccc tgaagacata cgtggacccc cacacatatg aggaccccaa ccaggctgtg 1980
ttgaagttca ctaccgagat ccatccatcc tgtgtcactc ggcagaaggt gatcggagca 2040
ggagagtttg gggaggtgta caagggcatg ctgaagacat cctcggggaa gaaggaggtg 2100
ccggtggcca tcaagacgct gaaagccggc tacacagaga agcagcgagt ggacttcctc 2160
ggcgaggccg gcatcatggg ccagttcagc caccacaaca tcatccgcct agagggcgtc 2220
atctccaaat acaagcccat gatgatcatc actgagtaca tggagaatgg ggccctggac 2280
aagttccttc gggagaagga tggcgagttc agcgtgctgc agctggtggg catgctgcgg 2340
ggcatcgcag ctggcatgaa gtacctggcc aacatgaact atgtgcaccg tgacctggct 2400
gcccgcaaca tcctcgtcaa cagcaacctg gtctgcaagg tgtctgactt tggcctgtcc 2460
cgcgtgctgg aggacgaccc cgaggccacc tacaccacca gtggcggcaa gatccccatc 2520
cgctggaccg ccccggaggc catttcctac cggaagttca cctctgccag cgacgtgtgg 2580
agctttggca ttgtcatgtg ggaggtgatg acctatggcg agcggcccta ctgggagttg 2640
tccaaccacg aggtgatgaa agccatcaat gatggcttcc ggctccccac acccatggac 2700
tgcccctccg ccatctacca gctcatgatg cagtgctggc agcaggagcg tgcccgccgc 2760
cccaagttcg ctgacatcgt cagcatcctg gacaagctca ttcgtgcccc tgactccctc 2820
aagaccctgg ctgactttga cccccgcgtg tctatccggc tccccagcac gagcggctcg 2880
gaggggggtgc ccttccgcac ggtgtccgag tggctggagt ccatcaagat gcagcagtat 2940
acggagcact tcatggcggc cggctacact gccatcgaga aggtggtgca gatgaccaac 3000
gacgacatca agaggattgg ggtgcggctg cccggccacc agaagcgcat cgcctacagc 3060
ctgctgggac tcaaggacca ggtgaacact gtggggatcc ccatc 3105

<210> 4
<211> 1035
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質

<400> 4

```
Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
 1               5                  10                  15
Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
            20                  25                  30
Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
        35                  40                  45
```

```
Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Leu Glu Leu Gln Ala
    50                  55                  60
Ala Arg Ala Cys Phe Ala Leu Leu Trp Gly Cys Ala Leu Ala Ala Ala
65                  70                  75                  80
Ala Ala Ala Gln Gly Lys Glu Val Val Leu Leu Asp Phe Ala Ala Ala
                85                  90                  95
Gly Gly Glu Leu Gly Trp Leu Thr His Pro Tyr Gly Lys Gly Trp Asp
            100                 105                 110
Leu Met Gln Asn Ile Met Asn Asp Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser Val
        115                 120                 125
Cys Asn Val Met Ser Gly Asp Gln Asp Asn Trp Leu Arg Thr Asn Trp
    130                 135                 140
Val Tyr Arg Gly Glu Ala Glu Arg Ile Phe Ile Glu Leu Lys Phe Thr
145                 150                 155                 160
Val Arg Asp Cys Asn Ser Phe Pro Gly Gly Ala Ser Ser Cys Lys Glu
                165                 170                 175
Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Ala Glu Ser Asp Leu Asp Tyr Gly Thr Asn
            180                 185                 190
Phe Gln Lys Arg Leu Phe Thr Lys Ile Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu
        195                 200                 205
Ile Thr Val Ser Ser Asp Phe Glu Ala Arg His Val Lys Leu Asn Val
    210                 215                 220
Glu Glu Arg Ser Val Gly Pro Leu Thr Arg Lys Gly Phe Tyr Leu Ala
225                 230                 235                 240
Phe Gln Asp Ile Gly Ala Cys Val Ala Leu Leu Ser Val Arg Val Tyr
                245                 250                 255
Tyr Lys Lys Cys Pro Glu Leu Leu Gln Gly Leu Ala His Phe Pro Glu
            260                 265                 270
Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ala Pro Ser Leu Ala Thr Val Ala Gly Thr
        275                 280                 285
Cys Val Asp His Ala Val Val Pro Pro Gly Gly Glu Glu Pro Arg Met
    290                 295                 300
His Cys Ala Val Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Gln Cys Leu
305                 310                 315                 320
Cys Gln Ala Gly Tyr Glu Lys Val Glu Asp Ala Cys Gln Ala Cys Ser
                325                 330                 335
Pro Gly Phe Phe Lys Phe Glu Ala Ser Glu Ser Pro Cys Leu Glu Cys
            340                 345                 350
Pro Glu His Thr Leu Pro Ser Pro Glu Gly Ala Thr Ser Cys Glu Cys
        355                 360                 365
Glu Glu Gly Phe Phe Arg Ala Pro Gln Asp Pro Ala Ser Met Pro Cys
    370                 375                 380
Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro His Tyr Leu Thr Ala Val Gly Met Gly
385                 390                 395                 400
Ala Lys Val Glu Leu Arg Trp Thr Pro Pro Gln Asp Ser Gly Gly Arg
```

405 410 415
Glu Asp Ile Val Tyr Ser Val Thr Cys Glu Gln Cys Trp Pro Glu Ser
420 425 430
Gly Glu Cys Gly Pro Cys Glu Ala Ser Val Arg Tyr Ser Glu Pro Pro
435 440 445
His Gly Leu Thr Arg Thr Ser Val Thr Val Ser Asp Leu Glu Pro His
450 455 460
Met Asn Tyr Thr Phe Thr Val Glu Ala Arg Asn Gly Val Ser Gly Leu
465 470 475 480
Val Thr Ser Arg Ser Phe Arg Thr Ala Ser Val Ser Ile Asn Gln Thr
485 490 495
Glu Pro Pro Lys Val Arg Leu Glu Gly Arg Ser Thr Thr Ser Leu Ser
500 505 510
Val Ser Trp Ser Ile Pro Pro Pro Gln Gln Ser Arg Val Trp Lys Tyr
515 520 525
Glu Val Thr Tyr Arg Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Tyr Asn Val Arg
530 535 540
Arg Thr Glu Gly Phe Ser Val Thr Leu Asp Asp Leu Ala Pro Asp Thr
545 550 555 560
Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu Thr Gln Glu Gly Gln Gly Ala
565 570 575
Gly Ser Arg Val His Glu Phe Gln Thr Leu Ser Pro Glu Gly Ser Gly
580 585 590
Asn Leu Ala Val Ile Gly Gly Val Ala Val Gly Val Val Leu Leu Leu
595 600 605
Val Leu Ala Gly Val Gly Phe Phe Ile His Arg Arg Arg Lys Asn Gln
610 615 620
Arg Ala Arg Gln Ser Pro Glu Asp Val Tyr Phe Ser Lys Ser Glu Gln
625 630 635 640
Leu Lys Pro Leu Lys Thr Tyr Val Asp Pro His Thr Tyr Glu Asp Pro
645 650 655
Asn Gln Ala Val Leu Lys Phe Thr Thr Glu Ile His Pro Ser Cys Val
660 665 670
Thr Arg Gln Lys Val Ile Gly Ala Gly Glu Phe Gly Glu Val Tyr Lys
675 680 685
Gly Met Leu Lys Thr Ser Ser Gly Lys Lys Glu Val Pro Val Ala Ile
690 695 700
Lys Thr Leu Lys Ala Gly Tyr Thr Glu Lys Gln Arg Val Asp Phe Leu
705 710 715 720
Gly Glu Ala Gly Ile Met Gly Gln Phe Ser His His Asn Ile Ile Arg
725 730 735
Leu Glu Gly Val Ile Ser Lys Tyr Lys Pro Met Met Ile Ile Thr Glu
740 745 750
Tyr Met Glu Asn Gly Ala Leu Asp Lys Phe Leu Arg Glu Lys Asp Gly
755 760 765

Glu Phe Ser Val Leu Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Ala Ala
770 775 780
Gly Met Lys Tyr Leu Ala Asn Met Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Ala
785 790 795 800
Ala Arg Asn Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp
805 810 815
Phe Gly Leu Ser Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu Ala Thr Tyr Thr
820 825 830
Thr Ser Gly Gly Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile
835 840 845
Ser Tyr Arg Lys Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile
850 855 860
Val Met Trp Glu Val Met Thr Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Glu Leu
865 870 875 880
Ser Asn His Glu Val Met Lys Ala Ile Asn Asp Gly Phe Arg Leu Pro
885 890 895
Thr Pro Met Asp Cys Pro Ser Ala Ile Tyr Gln Leu Met Met Gln Cys
900 905 910
Trp Gln Gln Glu Arg Ala Arg Arg Pro Lys Phe Ala Asp Ile Val Ser
915 920 925
Ile Leu Asp Lys Leu Ile Arg Ala Pro Asp Ser Leu Lys Thr Leu Ala
930 935 940
Asp Phe Asp Pro Arg Val Ser Ile Arg Leu Pro Ser Thr Ser Gly Ser
945 950 955 960
Glu Gly Val Pro Phe Arg Thr Val Ser Glu Trp Leu Glu Ser Ile Lys
965 970 975
Met Gln Gln Tyr Thr Glu His Phe Met Ala Ala Gly Tyr Thr Ala Ile
980 985 990
Glu Lys Val Val Gln Met Thr Asn Asp Asp Ile Lys Arg Ile Gly Val
995 1000 1005
Arg Leu Pro Gly His Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Ser Leu Leu Gly Leu
1010 1015 1020
Lys Asp Gln Val Asn Thr Val Gly Ile Pro Ile
1025 1030 1035

<210> 5
<211> 1506
<212> DNA
<213> 現代智人

<400> 5
cagggcaagg aagtggtact gctggacttt gctgcagctg gaggggagct cggctggctc 60
acacacccgt atggcaaagg gtgggacctg atgcagaaca tcatgaatga catgccgatc 120
tacatgtact ccgtgtgcaa cgtgatgtct ggcgaccagg acaactggct ccgcaccaac 180

tgggtgtacc gaggagaggc tgagcgtatc ttcattgagc tcaagtttac tgtacgtgac 240
tgcaacagct tccctggtgg cgccagctcc tgcaaggaga ctttcaacct ctactatgcc 300
gagtcggacc tggactacgg caccaacttc cagaagcgcc tgttcaccaa gattgacacc 360
attgcgcccg atgagatcac cgtcagcagc gacttcgagg cacgccacgt gaagctgaac 420
gtggaggagc gctccgtggg gccgctcacc cgcaaaggct tctacctggc cttccaggat 480
atcggtgcct gtgtggcgct gctctccgtc cgtgtctact acaagaagtg ccccgagctg 540
ctgcagggcc tggcccactt ccctgagacc atcgccggct ctgatgcacc ttccctggcc 600
actgtggccg gcacctgtgt ggaccatgcc gtggtgccac cgggggggtga agagccccgt 660
atgcactgtg cagtggatgg cgagtggctg gtgcccattg ggcagtgcct gtgccaggca 720
ggctacgaga aggtggagga tgcctgccag gcctgctcgc ctggattttt taagtttgag 780
gcatctgaga gcccctgctt ggagtgccct gagcacacgc tgccatcccc tgagggtgcc 840
acctcctgcg agtgtgagga aggcttcttc cgggcacctc aggacccagc gtcgatgcct 900
tgcacacgac ccccctccgc cccacactac ctcacagccg tgggcatggg tgccaaggtg 960
gagctgcgct ggacgccccc tcaggacagc gggggccgcg aggacattgt ctacagcgtc 1020
acctgcgaac agtgctggcc cgagtctggg gaatgcgggc cgtgtgaggc cagtgtgcgc 1080
tactcggagc ctcctcacgg actgacccgc accagtgtga cagtgagcga cctggagccc 1140
cacatgaact acaccttcac cgtggaggcc cgcaatggcg tctcaggcct ggtaaccagc 1200
cgcagcttcc gtactgccag tgtcagcatc aaccagacag agccccccaa ggtgaggctg 1260
gagggccgca gcaccacctc gcttagcgtc tcctggagca tccccccgcc gcagcagagc 1320
cgagtgtgga agtacgaggt cacttaccgc aagaagggag actccaacag ctacaatgtg 1380
cgccgcaccg agggtttctc cgtgaccctg gacgacctgg ccccagacac cacctacctg 1440
gtccaggtgc aggcactgac gcaggagggc cagggggccg gcagcagggt gcacgaattc 1500
cagacg 1506

<210> 6
<211> 1506
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密碼子-最優化序列

<400> 6
caaggtaaag aagttgtttt attagatttt gcagcagcag gtggtgaatt aggttggtta 60
acacatccat atggtaaagg ttgggattta atgcaaaata ttatgaatga tatgccaatt 120
tatatgtata gtgtttgtaa tgttatgagt ggtgatcaag ataattggtt acgtacaaat 180
tgggtttatc gtggtgaagc agaacgtatt tttattgaat taaaatttac agttcgtgat 240
tgtaatagtt ttccaggtgg tgcaagtagt tgtaaagaaa catttaattt atattatgca 300
gaaagtgatt tagattatgg tacaaatttt caaaaacgtt tatttacaaa aattgataca 360
attgcaccag atgaaattac agttagtagt gattttgaag cacgtcatgt taaattaaat 420
gttgaagaac gtagtgttgg tccattaaca cgtaaaggtt tttatttagc atttcaagat 480
attggtgcat gtgttgcatt attaagtgtt cgtgtttatt ataaaaaatg tccagaatta 540
ttacaaggtt tagcacattt tccagaaaca attgcaggta gtgatgcacc aagtttagca 600
acagttgcag gtacatgtgt tgatcatgca gttgttccac caggtggtga agaaccacgt 660
atgcattgtg cagttgatgg tgaatggtta gttccaattg gtcaatgttt atgtcaagca 720

ggttatgaaa aagttgaaga tgcatgtcaa gcatgtagtc caggtttttt taaatttgaa 780
gcaagtgaaa gtccatgttt agaatgtcca gaacatacat taccaagtcc agaaggtgca 840
acaagttgtg aatgtgaaga aggttttttt cgtgcaccac aagatccagc aagtatgcca 900
tgtacacgtc caccaagtgc accacattat ttaacagcag ttggtatggg tgcaaaagtt 960
gaattacgtt ggacaccacc acaagatagt ggtggtcgtg aagatattgt ttatagtgtt 1020
acatgtgaac aatgttggcc agaaagtggt gaatgtggtc catgtgaagc aagtgttcgt 1080
tatagtgaac caccacatgg tttaacacgt acaagtgtta cagttagtga tttagaacca 1140
catatgaatt atacatttac agttgaagca cgtaatggtg ttagtggttt agttacaagt 1200
cgtagttttc gtacagcaag tgttagtatt aatcaaacag aaccaccaaa agttcgttta 1260
gaaggtcgta gtacaacaag tttaagtgtt agttggagta ttccaccacc acaacaaagt 1320
cgtgtttgga aatatgaagt tacatatcgt aaaaaaggtg atagtaatag ttataatgtt 1380
cgtcgtacag aaggttttag tgttacatta gatgatttag caccagatac aacatattta 1440
gttcaagttc aagcattaac acaagaaggt caaggtgcag gtagtcgtgt tcatgaattt 1500
caaaca 1506

<210> 7
<211> 502
<212> PRT
<213> 現代智人

<400> 7

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

```
Gly Ser Asp Ala Pro Ser Leu Ala Thr Val Ala Gly Thr Cys Val Asp
        195                 200                 205
His Ala Val Val Pro Pro Gly Gly Glu Glu Pro Arg Met His Cys Ala
    210                 215                 220
Val Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Gln Cys Leu Cys Gln Ala
225                 230                 235                 240
Gly Tyr Glu Lys Val Glu Asp Ala Cys Gln Ala Cys Ser Pro Gly Phe
                245                 250                 255
Phe Lys Phe Glu Ala Ser Glu Ser Pro Cys Leu Glu Cys Pro Glu His
            260                 265                 270
Thr Leu Pro Ser Pro Glu Gly Ala Thr Ser Cys Glu Cys Glu Glu Gly
        275                 280                 285
Phe Phe Arg Ala Pro Gln Asp Pro Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro
    290                 295                 300
Pro Ser Ala Pro His Tyr Leu Thr Ala Val Gly Met Gly Ala Lys Val
305                 310                 315                 320
Glu Leu Arg Trp Thr Pro Pro Gln Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Ile
                325                 330                 335
Val Tyr Ser Val Thr Cys Glu Gln Cys Trp Pro Glu Ser Gly Glu Cys
            340                 345                 350
Gly Pro Cys Glu Ala Ser Val Arg Tyr Ser Glu Pro Pro His Gly Leu
        355                 360                 365
Thr Arg Thr Ser Val Thr Val Ser Asp Leu Glu Pro His Met Asn Tyr
    370                 375                 380
Thr Phe Thr Val Glu Ala Arg Asn Gly Val Ser Gly Leu Val Thr Ser
385                 390                 395                 400
Arg Ser Phe Arg Thr Ala Ser Val Ser Ile Asn Gln Thr Glu Pro Pro
                405                 410                 415
Lys Val Arg Leu Glu Gly Arg Ser Thr Thr Ser Leu Ser Val Ser Trp
            420                 425                 430
Ser Ile Pro Pro Pro Gln Gln Ser Arg Val Trp Lys Tyr Glu Val Thr
        435                 440                 445
Tyr Arg Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Tyr Asn Val Arg Arg Thr Glu
    450                 455                 460
Gly Phe Ser Val Thr Leu Asp Asp Leu Ala Pro Asp Thr Thr Tyr Leu
465                 470                 475                 480
Val Gln Val Gln Ala Leu Thr Gln Glu Gly Gln Gly Ala Gly Ser Arg
                485                 490                 495
Val His Glu Phe Gln Thr
            500
```

<210> 8
<211> 1689
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質編碼序列

<400> 8
atgaaaaaaa taatgctagt ttttattaca cttatattag ttagtctacc aattgcgcaa 60
caaactgaag caaaggatgc atctgcattc aataaagaaa attcaatttc atccatggca 120
ccaccagcat ctccgcctgc aagtcctaag acgccaatcg aaaagaaaca cgcggatctc 180
gagcagggca aggaagtggt actgctggac tttgctgcag ctggagggga gctcggctgg 240
ctcacacacc cgtatggcaa agggtgggac ctgatgcaga acatcatgaa tgacatgccg 300
atctacatgt actccgtgtg caacgtgatg tctggcgacc aggacaactg gctccgcacc 360
aactgggtgt accgaggaga ggctgagcgt atcttcattg agctcaagtt tactgtacgt 420
gactgcaaca gcttccctgg tggcgccagc tcctgcaagg agactttcaa cctctactat 480
gccgagtcgg acctggacta cggcaccaac ttccagaagc gcctgttcac caagattgac 540
accattgcgc ccgatgagat caccgtcagc agcgacttcg aggcacgcca cgtgaagctg 600
aacgtggagg agcgctccgt ggggccgctc acccgcaaag gcttctacct ggccttccag 660
gatatcggtg cctgtgtggc gctgctctcc gtccgtgtct actacaagaa gtgccccgag 720
ctgctgcagg gcctggccca cttccctgag accatcgccg gctctgatgc accttccctg 780
gccactgtgg ccggcacctg tgtggaccat gccgtggtgc caccgggggg tgaagagccc 840
cgtatgcact gtgcagtgga tggcgagtgg ctggtgccca ttgggcagtg cctgtgccag 900
gcaggctacg agaaggtgga ggatgcctgc caggcctgct cgcctggatt ttttaagttt 960
gaggcatctg agagcccctg cttggagtgc cctgagcaca cgctgccatc ccctgagggt 1020
gccacctcct gcgagtgtga ggaaggcttc ttccgggcac ctcaggaccc agcgtcgatg 1080
ccttgcacac gacccccctc cgccccacac tacctcacag ccgtgggcat gggtgccaag 1140
gtggagctgc gctggacgcc ccctcaggac agcgggggcc gcgaggacat tgtctacagc 1200
gtcacctgcg aacagtgctg gcccgagtct ggggaatgcg ggccgtgtga ggccagtgtg 1260
cgctactcgg agcctcctca cggactgacc cgcaccagtg tgacagtgag cgacctggag 1320
ccccacatga actacacctt caccgtggag gcccgcaatg gcgtctcagg cctggtaacc 1380
agccgcagct tccgtactgc cagtgtcagc atcaaccaga cagagccccc caaggtgagg 1440
ctggagggcc gcagcaccac ctcgcttagc gtctcctgga gcatcccccc gccgcagcag 1500
agccgagtgt ggaagtacga ggtcacttac cgcaagaagg gagactccaa cagctacaat 1560
gtgcgccgca ccgagggttt ctccgtgacc ctggacgacc tggccccaga caccacctac 1620
ctggtccagg tgcaggcact gacgcaggag ggccaggggg ccggcagcag ggtgcacgaa 1680
ttccagacg 1689

<210> 9
<211> 563
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質

<400> 9

```
Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
 1               5                  10                  15
Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
            20                  25                  30
Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
        35                  40                  45
Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Leu Glu Gln Gly Lys
    50                  55                  60
Glu Val Val Leu Leu Asp Phe Ala Ala Ala Gly Gly Glu Leu Gly Trp
65                  70                  75                  80
Leu Thr His Pro Tyr Gly Lys Gly Trp Asp Leu Met Gln Asn Ile Met
                85                  90                  95
Asn Asp Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser Val Cys Asn Val Met Ser Gly
            100                 105                 110
Asp Gln Asp Asn Trp Leu Arg Thr Asn Trp Val Tyr Arg Gly Glu Ala
        115                 120                 125
Glu Arg Ile Phe Ile Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp Cys Asn Ser
    130                 135                 140
Phe Pro Gly Gly Ala Ser Ser Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr
145                 150                 155                 160
Ala Glu Ser Asp Leu Asp Tyr Gly Thr Asn Phe Gln Lys Arg Leu Phe
                165                 170                 175
Thr Lys Ile Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ile Thr Val Ser Ser Asp
            180                 185                 190
Phe Glu Ala Arg His Val Lys Leu Asn Val Glu Glu Arg Ser Val Gly
        195                 200                 205
Pro Leu Thr Arg Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Ile Gly Ala
    210                 215                 220
Cys Val Ala Leu Leu Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Lys Cys Pro Glu
225                 230                 235                 240
Leu Leu Gln Gly Leu Ala His Phe Pro Glu Thr Ile Ala Gly Ser Asp
                245                 250                 255
Ala Pro Ser Leu Ala Thr Val Ala Gly Thr Cys Val Asp His Ala Val
            260                 265                 270
Val Pro Pro Gly Gly Glu Glu Pro Arg Met His Cys Ala Val Asp Gly
        275                 280                 285
Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Gln Cys Leu Cys Gln Ala Gly Tyr Glu
    290                 295                 300
Lys Val Glu Asp Ala Cys Gln Ala Cys Ser Pro Gly Phe Phe Lys Phe
305                 310                 315                 320
Glu Ala Ser Glu Ser Pro Cys Leu Glu Cys Pro Glu His Thr Leu Pro
                325                 330                 335
Ser Pro Glu Gly Ala Thr Ser Cys Glu Cys Glu Glu Gly Phe Phe Arg
            340                 345                 350
Ala Pro Gln Asp Pro Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala
```

```
        355                 360                 365
Pro His Tyr Leu Thr Ala Val Gly Met Gly Ala Lys Val Glu Leu Arg
    370                 375                 380
Trp Thr Pro Pro Gln Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Ile Val Tyr Ser
385                 390                 395                 400
Val Thr Cys Glu Gln Cys Trp Pro Glu Ser Gly Glu Cys Gly Pro Cys
                405                 410                 415
Glu Ala Ser Val Arg Tyr Ser Glu Pro Pro His Gly Leu Thr Arg Thr
            420                 425                 430
Ser Val Thr Val Ser Asp Leu Glu Pro His Met Asn Tyr Thr Phe Thr
        435                 440                 445
Val Glu Ala Arg Asn Gly Val Ser Gly Leu Val Thr Ser Arg Ser Phe
    450                 455                 460
Arg Thr Ala Ser Val Ser Ile Asn Gln Thr Glu Pro Pro Lys Val Arg
465                 470                 475                 480
Leu Glu Gly Arg Ser Thr Thr Ser Leu Ser Val Ser Trp Ser Ile Pro
                485                 490                 495
Pro Pro Gln Gln Ser Arg Val Trp Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Arg Lys
            500                 505                 510
Lys Gly Asp Ser Asn Ser Tyr Asn Val Arg Arg Thr Glu Gly Phe Ser
        515                 520                 525
Val Thr Leu Asp Asp Leu Ala Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Val Gln Val
    530                 535                 540
Gln Ala Leu Thr Gln Glu Gly Gln Gly Ala Gly Ser Arg Val His Glu
545                 550                 555                 560
Phe Gln Thr
```

<210> 10
<211> 1989
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 表現卡匣，編碼融合蛋白質

<400> 10
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aaaaaaataa tgctagtttt tattacactt atattagtta gtctaccaat tgcgcaacaa 300
actgaagcaa aggatgcatc tgcattcaat aaagaaaatt caatttcatc catggcacca 360
ccagcatctc cgcctgcaag tcctaagacg ccaatcgaaa agaaacacgc ggatggatcc 420

gattataaag atgatgatga taaacaaggt aaagaagttg ttttattaga ttttgcagca 480
gcaggtggtg aattaggttg gttaacacat ccatatggta aaggttggga tttaatgcaa 540
aatattatga atgatatgcc aatttatatg tatagtgttt gtaatgttat gagtggtgat 600
caagataatt ggttacgtac aaattgggtt tatcgtggtg aagcagaacg tatttttatt 660
gaattaaaat ttacagttcg tgattgtaat agttttccag gtggtgcaag tagttgtaaa 720
gaaacattta atttatatta tgcagaaagt gatttagatt atggtacaaa ttttcaaaaa 780
cgtttattta caaaaattga tacaattgca ccagatgaaa ttacagttag tagtgatttt 840
gaagcacgtc atgttaaatt aaatgttgaa gaacgtagtg ttggtccatt aacacgtaaa 900
ggtttttatt tagcatttca agatattggt gcatgtgttg cattattaag tgttcgtgtt 960
tattataaaa aatgtccaga attattacaa ggtttagcac attttccaga aacaattgca 1020
ggtagtgatg caccaagttt agcaacagtt gcaggtacat gtgttgatca tgcagttgtt 1080
ccaccaggtg gtgaagaacc acgtatgcat tgtgcagttg atggtgaatg gttagttcca 1140
attggtcaat gtttatgtca agcaggttat gaaaaagttg aagatgcatg tcaagcatgt 1200
agtccaggtt tttttaaatt tgaagcaagt gaaagtccat gtttagaatg tccagaacat 1260
acattaccaa gtccagaagg tgcaacaagt tgtgaatgtg aagaaggttt ttttcgtgca 1320
ccacaagatc cagcaagtat gccatgtaca cgtccaccaa gtgcaccaca ttatttaaca 1380
gcagttggta tgggtgcaaa agttgaatta cgttggacac caccacaaga tagtggtggt 1440
cgtgaagata ttgtttatag tgttacatgt gaacaatgtt ggccagaaag tggtgaatgt 1500
ggtccatgtg aagcaagtgt tcgttatagt gaaccaccac atggtttaac acgtacaagt 1560
gttacagtta gtgatttaga accacatatg aattatacat ttacagttga agcacgtaat 1620
ggtgttagtg gtttagttac aagtcgtagt tttcgtacag caagtgttag tattaatcaa 1680
acagaaccac caaaagttcg tttagaaggt cgtagtacaa caagtttaag tgttagttgg 1740
agtattccac caccacaaca aagtcgtgtt tggaaatatg aagttacata tcgtaaaaaa 1800
ggtgatagta atagttataa tgttcgtcgt acagaaggtt ttagtgttac attagatgat 1860
ttagcaccag atacaacata tttagttcaa gttcaagcat taacacaaga aggtcaaggt 1920
gcaggtagtc gtgttcatga atttcaaaca gaacaaaaat taattagtga agaagattta 1980
tgagagctc 1989

<210> 11
<211> 581
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質

<400> 11

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

Asp Asp Asp Asp Lys Gln Gly Lys Glu Val Val Leu Leu Asp Phe Ala
65 70 75 80
Ala Ala Gly Gly Glu Leu Gly Trp Leu Thr His Pro Tyr Gly Lys Gly
85 90 95
Trp Asp Leu Met Gln Asn Ile Met Asn Asp Met Pro Ile Tyr Met Tyr
100 105 110
Ser Val Cys Asn Val Met Ser Gly Asp Gln Asp Asn Trp Leu Arg Thr
115 120 125
Asn Trp Val Tyr Arg Gly Glu Ala Glu Arg Ile Phe Ile Glu Leu Lys
130 135 140
Phe Thr Val Arg Asp Cys Asn Ser Phe Pro Gly Gly Ala Ser Ser Cys
145 150 155 160
Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Ala Glu Ser Asp Leu Asp Tyr Gly
165 170 175
Thr Asn Phe Gln Lys Arg Leu Phe Thr Lys Ile Asp Thr Ile Ala Pro
180 185 190
Asp Glu Ile Thr Val Ser Ser Asp Phe Glu Ala Arg His Val Lys Leu
195 200 205
Asn Val Glu Glu Arg Ser Val Gly Pro Leu Thr Arg Lys Gly Phe Tyr
210 215 220
Leu Ala Phe Gln Asp Ile Gly Ala Cys Val Ala Leu Leu Ser Val Arg
225 230 235 240
Val Tyr Tyr Lys Lys Cys Pro Glu Leu Leu Gln Gly Leu Ala His Phe
245 250 255
Pro Glu Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ala Pro Ser Leu Ala Thr Val Ala
260 265 270
Gly Thr Cys Val Asp His Ala Val Val Pro Pro Gly Gly Glu Glu Pro
275 280 285
Arg Met His Cys Ala Val Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Gln
290 295 300
Cys Leu Cys Gln Ala Gly Tyr Glu Lys Val Glu Asp Ala Cys Gln Ala
305 310 315 320
Cys Ser Pro Gly Phe Phe Lys Phe Glu Ala Ser Glu Ser Pro Cys Leu
325 330 335
Glu Cys Pro Glu His Thr Leu Pro Ser Pro Glu Gly Ala Thr Ser Cys
340 345 350
Glu Cys Glu Glu Gly Phe Phe Arg Ala Pro Gln Asp Pro Ala Ser Met
355 360 365
Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro His Tyr Leu Thr Ala Val Gly
370 375 380
Met Gly Ala Lys Val Glu Leu Arg Trp Thr Pro Pro Gln Asp Ser Gly
385 390 395 400
Gly Arg Glu Asp Ile Val Tyr Ser Val Thr Cys Glu Gln Cys Trp Pro
405 410 415
Glu Ser Gly Glu Cys Gly Pro Cys Glu Ala Ser Val Arg Tyr Ser Glu

```
            420                 425                 430
Pro Pro His Gly Leu Thr Arg Thr Ser Val Thr Val Ser Asp Leu Glu
        435                 440                 445
Pro His Met Asn Tyr Thr Phe Thr Val Glu Ala Arg Asn Gly Val Ser
    450                 455                 460
Gly Leu Val Thr Ser Arg Ser Phe Arg Thr Ala Ser Val Ser Ile Asn
465                 470                 475                 480
Gln Thr Glu Pro Pro Lys Val Arg Leu Glu Gly Arg Ser Thr Thr Ser
                485                 490                 495
Leu Ser Val Ser Trp Ser Ile Pro Pro Pro Gln Gln Ser Arg Val Trp
            500                 505                 510
Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Arg Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Tyr Asn
        515                 520                 525
Val Arg Arg Thr Glu Gly Phe Ser Val Thr Leu Asp Asp Leu Ala Pro
    530                 535                 540
Asp Thr Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu Thr Gln Glu Gly Gln
545                 550                 555                 560
Gly Ala Gly Ser Arg Val His Glu Phe Gln Thr Glu Gln Lys Leu Ile
                565                 570                 575
Ser Glu Glu Asp Leu
            580
```

<210> 12
<211> 1989
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 表現卡匣，編碼融合蛋白質

<400> 12

```
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aaaaaaatta tgttagtttt tattacatta attttagtta gtttaccaat tgcacaacaa 300
acagaagcaa aagatgcaag tgcatttaat aaagaaaata gtattagtag tatggcacca 360
ccagcaagtc caccagcaag tccaaaaaca ccaattgaaa aaaaacatgc agatggatcc 420
gattataaag atgatgatga taaacaaggt aaagaagttg ttttattaga ttttgcagca 480
gcaggtggtg aattaggttg gttaacacat ccatatggta aaggttggga tttaatgcaa 540
aatattatga atgatatgcc aatttatatg tatagtgttt gtaatgttat gagtggtgat 600
caagataatt ggttacgtac aaattgggtt tatcgtggtg aagcagaacg tatttttatt 660
gaattaaaat ttacagttcg tgattgtaat agttttccag gtggtgcaag tagttgtaaa 720
gaaacattta atttatatta tgcagaaagt gatttagatt atggtacaaa ttttcaaaaa 780
```

cgtttattta caaaaattga tacaattgca ccagatgaaa ttacagttag tagtgatttt 840
gaagcacgtc atgttaaatt aaatgttgaa gaacgtagtg ttggtccatt aacacgtaaa 900
ggtttttatt tagcatttca agatattggt gcatgtgttg cattattaag tgttcgtgtt 960
tattataaaa aatgtccaga attattacaa ggtttagcac attttccaga aacaattgca 1020
ggtagtgatg caccaagttt agcaacagtt gcaggtacat gtgttgatca tgcagttgtt 1080
ccaccaggtg gtgaagaacc acgtatgcat tgtgcagttg atggtgaatg gttagttcca 1140
attggtcaat gtttatgtca agcaggttat gaaaaagttg aagatgcatg tcaagcatgt 1200
agtccaggtt tttttaaatt tgaagcaagt gaaagtccat gtttagaatg tccagaacat 1260
acattaccaa gtccagaagg tgcaacaagt tgtgaatgtg aagaaggttt ttttcgtgca 1320
ccacaagatc cagcaagtat gccatgtaca cgtccaccaa gtgcaccaca ttatttaaca 1380
gcagttggta tgggtgcaaa agttgaatta cgttggacac caccacaaga tagtggtggt 1440
cgtgaagata ttgtttatag tgttacatgt gaacaatgtt ggccagaaag tggtgaatgt 1500
ggtccatgtg aagcaagtgt tcgttatagt gaaccaccac atggtttaac acgtacaagt 1560
gttacagtta gtgatttaga accacatatg aattatacat ttacagttga agcacgtaat 1620
ggtgttagtg gtttagttac aagtcgtagt tttcgtacag caagtgttag tattaatcaa 1680
acagaaccac caaaagttcg tttagaaggt cgtagtacaa caagtttaag tgttagttgg 1740
agtattccac caccacaaca aagtcgtgtt tggaaatatg aagttacata tcgtaaaaaa 1800
ggtgatagta atagttataa tgttcgtcgt acagaaggtt ttagtgttac attagatgat 1860
ttagcaccag atacaacata tttagttcaa gttcaagcat taacacaaga aggtcaaggt 1920
gcaggtagtc gtgttcatga atttcaaaca gaacaaaaat taattagtga agaagattta 1980
tgagagctc 1989

<210> 13
<211> 581
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質

<400> 13

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

Ser Val Cys Asn Val Met Ser Gly Asp Gln Asp Asn Trp Leu Arg Thr
115 120 125
Asn Trp Val Tyr Arg Gly Glu Ala Glu Arg Ile Phe Ile Glu Leu Lys
130 135 140
Phe Thr Val Arg Asp Cys Asn Ser Phe Pro Gly Gly Ala Ser Ser Cys
145 150 155 160
Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Ala Glu Ser Asp Leu Asp Tyr Gly
165 170 175
Thr Asn Phe Gln Lys Arg Leu Phe Thr Lys Ile Asp Thr Ile Ala Pro
180 185 190
Asp Glu Ile Thr Val Ser Ser Asp Phe Glu Ala Arg His Val Lys Leu
195 200 205
Asn Val Glu Glu Arg Ser Val Gly Pro Leu Thr Arg Lys Gly Phe Tyr
210 215 220
Leu Ala Phe Gln Asp Ile Gly Ala Cys Val Ala Leu Leu Ser Val Arg
225 230 235 240
Val Tyr Tyr Lys Lys Cys Pro Glu Leu Leu Gln Gly Leu Ala His Phe
245 250 255
Pro Glu Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ala Pro Ser Leu Ala Thr Val Ala
260 265 270
Gly Thr Cys Val Asp His Ala Val Val Pro Pro Gly Gly Glu Glu Pro
275 280 285
Arg Met His Cys Ala Val Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Gln
290 295 300
Cys Leu Cys Gln Ala Gly Tyr Glu Lys Val Glu Asp Ala Cys Gln Ala
305 310 315 320
Cys Ser Pro Gly Phe Phe Lys Phe Glu Ala Ser Glu Ser Pro Cys Leu
325 330 335
Glu Cys Pro Glu His Thr Leu Pro Ser Pro Glu Gly Ala Thr Ser Cys
340 345 350
Glu Cys Glu Glu Gly Phe Phe Arg Ala Pro Gln Asp Pro Ala Ser Met
355 360 365
Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro His Tyr Leu Thr Ala Val Gly
370 375 380
Met Gly Ala Lys Val Glu Leu Arg Trp Thr Pro Pro Gln Asp Ser Gly
385 390 395 400
Gly Arg Glu Asp Ile Val Tyr Ser Val Thr Cys Glu Gln Cys Trp Pro
405 410 415
Glu Ser Gly Glu Cys Gly Pro Cys Glu Ala Ser Val Arg Tyr Ser Glu
420 425 430
Pro Pro His Gly Leu Thr Arg Thr Ser Val Thr Val Ser Asp Leu Glu
435 440 445
Pro His Met Asn Tyr Thr Phe Thr Val Glu Ala Arg Asn Gly Val Ser
450 455 460
Gly Leu Val Thr Ser Arg Ser Phe Arg Thr Ala Ser Val Ser Ile Asn

```
465                 470                 475                 480
Gln Thr Glu Pro Pro Lys Val Arg Leu Glu Gly Arg Ser Thr Thr Ser
                485                 490                 495
Leu Ser Val Ser Trp Ser Ile Pro Pro Pro Gln Gln Ser Arg Val Trp
            500                 505                 510
Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Arg Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Tyr Asn
        515                 520                 525
Val Arg Arg Thr Glu Gly Phe Ser Val Thr Leu Asp Asp Leu Ala Pro
    530                 535                 540
Asp Thr Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu Thr Gln Glu Gly Gln
545                 550                 555                 560
Gly Ala Gly Ser Arg Val His Glu Phe Gln Thr Glu Gln Lys Leu Ile
                565                 570                 575
Ser Glu Glu Asp Leu
            580
```

<210> 14
<211> 1968
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 表現卡匣，編碼融合蛋白質

<400> 14

```
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
gcatacgaca gtcgttttga tgaatgggta cagaaactga aagaggaaag ctttcaaaac 300
aatacgtttg accgccgcaa atttattcaa ggagcgggga agattgcagg actttctctt 360
ggattaacga ttgcccagtc ggttggggcc tttggatccg attataaaga tgatgatgat 420
aaacaaggta aagaagttgt tttattagat tttgcagcag caggtggtga attaggttgg 480
ttaacacatc catatggtaa aggttgggat ttaatgcaaa atattatgaa tgatatgcca 540
atttatatgt atagtgtttg taatgttatg agtggtgatc aagataattg gttacgtaca 600
aattgggttt atcgtggtga agcagaacgt atttttattg aattaaaatt tacagttcgt 660
gattgtaata gttttccagg tggtgcaagt agttgtaaag aaacatttaa tttatattat 720
gcagaaagtg atttagatta tggtacaaat tttcaaaaac gtttatttac aaaaattgat 780
acaattgcac cagatgaaat tacagttagt agtgattttg aagcacgtca tgttaaatta 840
aatgttgaag aacgtagtgt tggtccatta acacgtaaag gtttttattt agcatttcaa 900
gatattggtg catgtgttgc attattaagt gttcgtgttt attataaaaa atgtccagaa 960
ttattacaag gtttagcaca ttttccagaa acaattgcag gtagtgatgc accaagttta 1020
gcaacagttg caggtacatg tgttgatcat gcagttgttc caccaggtgg tgaagaacca 1080
cgtatgcatt gtgcagttga tggtgaatgg ttagttccaa ttggtcaatg tttatgtcaa 1140
```

gcaggttatg aaaaagttga agatgcatgt caagcatgta gtccaggttt ttttaaattt 1200
gaagcaagtg aaagtccatg tttagaatgt ccagaacata cattaccaag tccagaaggt 1260
gcaacaagtt gtgaatgtga agaaggtttt tttcgtgcac cacaagatcc agcaagtatg 1320
ccatgtacac gtccaccaag tgcaccacat tatttaacag cagttggtat gggtgcaaaa 1380
gttgaattac gttggacacc accacaagat agtggtggtc gtgaagatat tgtttatagt 1440
gttacatgtg aacaatgttg gccagaaagt ggtgaatgtg gtccatgtga agcaagtgtt 1500
cgttatagtg aaccaccaca tggtttaaca cgtacaagtg ttacagttag tgatttagaa 1560
ccacatatga attatacatt tacagttgaa gcacgtaatg gtgttagtgg tttagttaca 1620
agtcgtagtt ttcgtacagc aagtgttagt attaatcaaa cagaaccacc aaaagttcgt 1680
ttagaaggtc gtagtacaac aagtttaagt gttagttgga gtattccacc accacaacaa 1740
agtcgtgttt ggaaatatga agttacatat cgtaaaaaag gtgatagtaa tagttataat 1800
gttcgtcgta cagaaggttt tagtgttaca ttagatgatt tagcaccaga tacaacatat 1860
ttagttcaag ttcaagcatt aacacaagaa ggtcaaggtg caggtagtcg tgttcatgaa 1920
tttcaaacag aacaaaaatt aattagtgaa gaagatttat gagagctc 1968

<210> 15
<211> 574
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質

<400> 15

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

```
                165                 170                 175
Phe Thr Lys Ile Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ile Thr Val Ser Ser
            180                 185                 190
Asp Phe Glu Ala Arg His Val Lys Leu Asn Val Glu Glu Arg Ser Val
        195                 200                 205
Gly Pro Leu Thr Arg Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Ile Gly
    210                 215                 220
Ala Cys Val Ala Leu Leu Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Lys Cys Pro
225                 230                 235                 240
Glu Leu Leu Gln Gly Leu Ala His Phe Pro Glu Thr Ile Ala Gly Ser
                245                 250                 255
Asp Ala Pro Ser Leu Ala Thr Val Ala Gly Thr Cys Val Asp His Ala
            260                 265                 270
Val Val Pro Pro Gly Gly Glu Glu Pro Arg Met His Cys Ala Val Asp
        275                 280                 285
Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Gln Cys Leu Cys Gln Ala Gly Tyr
    290                 295                 300
Glu Lys Val Glu Asp Ala Cys Gln Ala Cys Ser Pro Gly Phe Phe Lys
305                 310                 315                 320
Phe Glu Ala Ser Glu Ser Pro Cys Leu Glu Cys Pro Glu His Thr Leu
                325                 330                 335
Pro Ser Pro Glu Gly Ala Thr Ser Cys Glu Cys Glu Glu Gly Phe Phe
            340                 345                 350
Arg Ala Pro Gln Asp Pro Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser
        355                 360                 365
Ala Pro His Tyr Leu Thr Ala Val Gly Met Gly Ala Lys Val Glu Leu
    370                 375                 380
Arg Trp Thr Pro Pro Gln Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Ile Val Tyr
385                 390                 395                 400
Ser Val Thr Cys Glu Gln Cys Trp Pro Glu Ser Gly Glu Cys Gly Pro
                405                 410                 415
Cys Glu Ala Ser Val Arg Tyr Ser Glu Pro Pro His Gly Leu Thr Arg
            420                 425                 430
Thr Ser Val Thr Val Ser Asp Leu Glu Pro His Met Asn Tyr Thr Phe
        435                 440                 445
Thr Val Glu Ala Arg Asn Gly Val Ser Gly Leu Val Thr Ser Arg Ser
    450                 455                 460
Phe Arg Thr Ala Ser Val Ser Ile Asn Gln Thr Glu Pro Pro Lys Val
465                 470                 475                 480
Arg Leu Glu Gly Arg Ser Thr Thr Ser Leu Ser Val Ser Trp Ser Ile
                485                 490                 495
Pro Pro Pro Gln Gln Ser Arg Val Trp Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Arg
            500                 505                 510
Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Tyr Asn Val Arg Arg Thr Glu Gly Phe
        515                 520                 525
```

Ser Val Thr Leu Asp Asp Leu Ala Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Val Gln
530 535 540
Val Gln Ala Leu Thr Gln Glu Gly Gln Gly Ala Gly Ser Arg Val His
545 550 555 560
Glu Phe Gln Thr Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
565 570

<210> 16
<211> 1254
<212> DNA
<213> 現代智人

<400> 16
caccgcagga ggaagaacca gcgtgcccgc cagtccccgg aggacgttta cttctccaag 60
tcagaacaac tgaagcccct gaagacatac gtggaccccc acacatatga ggaccccaac 120
caggctgtgt tgaagttcac taccgagatc catccatcct gtgtcactcg gcagaaggtg 180
atcggagcag gagagtttgg ggaggtgtac aagggcatgc tgaagacatc ctcggggaag 240
aaggaggtgc cggtggccat caagacgctg aaagccggct acacagagaa gcagcgagtg 300
gacttcctcg gcgaggccgg catcatgggc cagttcagcc accacaacat catccgccta 360
gagggcgtca tctccaaata caagcccatg atgatcatca ctgagtacat ggagaatggg 420
gccctggaca agttccttcg ggagaaggat ggcgagttca gcgtgctgca gctggtgggc 480
atgctgcggg gcatcgcagc tggcatgaag tacctggcca acatgaacta tgtgcaccgt 540
gacctggctg cccgcaacat cctcgtcaac agcaacctgg tctgcaaggt gtctgacttt 600
ggcctgtccc gcgtgctgga ggacgacccc gaggccacct acaccaccag tggcggcaag 660
atccccatcc gctggaccgc cccggaggcc atttcctacc ggaagttcac ctctgccagc 720
gacgtgtgga gctttggcat tgtcatgtgg gaggtgatga cctatggcga gcggccctac 780
tgggagttgt ccaaccacga ggtgatgaaa gccatcaatg atggcttccg gctccccaca 840
cccatggact gcccctccgc catctaccag ctcatgatgc agtgctggca gcaggagcgt 900
gcccgccgcc ccaagttcgc tgacatcgtc agcatcctgg acaagctcat tcgtgccct 960
gactccctca agaccctggc tgactttgac ccccgcgtgt ctatccggct ccccagcacg 1020
agcggctcgg agggggtgcc cttccgcacg gtgtccgagt ggctggagtc catcaagatg 1080
cagcagtata cggagcactt catggcggcc ggctacactg ccatcgagaa ggtggtgcag 1140
atgaccaacg acgacatcaa gaggattggg gtgcggctgc ccggccacca gaagcgcatc 1200
gcctacagcc tgctgggact caaggaccag gtgaacactg tggggatccc catc 1254

<210> 17
<211> 1254
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密碼子-最優化序列

<400> 17

cacagacgta gaaaaaatca acgtgctcga caatccccag aagatgtgta tttttcgaaa 60
agtgaacaat taaaaccatt aaaaacttat gttgatccgc atacgtacga agacccaaat 120
caagcagtat taaaatttac aacagaaata cacccaagtt gtgttacaag acaaaaagtt 180
attggagcag gtgaattcgg agaggtatat aaaggtatgt taaaaacatc atcaggtaaa 240
aaagaagttc cggttgcaat taaaacctta aaggcaggat atacagaaaa acagcgagtt 300
gatttttag gtgaagcagg aattatgggt caatttagcc atcataatat tattcgtttg 360
gaaggagtaa taagtaaata taaaccaatg atgattatta cagaatacat ggaaaacggt 420
gctttagata aatttttacg tgaaaaggat ggtgaattta gtgttttaca attggttggt 480
atgttaagag gaattgctgc aggtatgaaa tatttagcta atatgaatta tgttcaccgt 540
gatttggcag caagaaatat cctagtcaat tccaatttag tatgtaaagt tagtgatttt 600
ggtttaagca gagtattaga agacgatcca gaggcaacct atacaacatc gggaggtaaa 660
attcctattc gttggacagc accagaagct atcagttacc gtaaatttac aagtgcatca 720
gacgtgtgga gttttgggat tgtaatgtgg gaagttatga catatggaga aagaccatat 780
tgggaattaa gtaatcatga agttatgaaa gcaattaacg atggatttag attaccaact 840
ccgatggatt gtccatctgc catttatcaa ctaatgatgc aatgttggca acaagaaaga 900
gcacgacgtc caaaatttgc agatattgtt agtattttag acaaattaat tcgtgcacca 960
gatagtttaa aaactttagc agactttgat cctcgtgtta gtattcgatt accaagtacg 1020
tcaggttccg aaggagttcc atttcgcaca gtctccgaat ggttggaatc aattaaaatg 1080
caacaataca ccgaacactt tatggcagca ggttacacag caatcgaaaa agttgttcaa 1140
atgacaaatg atgatattaa acgtattgga gttagattac caggccacca gaaacgtatt 1200
gcatattctt tattaggttt aaaagatcaa gttaataccg tgggaattcc aatt 1254

<210> 18
<211> 456
<212> PRT
<213> 現代智人

<400> 18

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

```
    130                 135                 140
Gly Ile Met Gly Gln Phe Ser His His Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly
145                 150                 155                 160
Val Ile Ser Lys Tyr Lys Pro Met Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu
                165                 170                 175
Asn Gly Ala Leu Asp Lys Phe Leu Arg Glu Lys Asp Gly Glu Phe Ser
            180                 185                 190
Val Leu Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met Lys
        195                 200                 205
Tyr Leu Ala Asn Met Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
    210                 215                 220
Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu
225                 230                 235                 240
Ser Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu Ala Thr Tyr Thr Thr Ser Gly
                245                 250                 255
Gly Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ser Tyr Arg
            260                 265                 270
Lys Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Val Met Trp
        275                 280                 285
Glu Val Met Thr Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His
    290                 295                 300
Glu Val Met Lys Ala Ile Asn Asp Gly Phe Arg Leu Pro Thr Pro Met
305                 310                 315                 320
Asp Cys Pro Ser Ala Ile Tyr Gln Leu Met Met Gln Cys Trp Gln Gln
                325                 330                 335
Glu Arg Ala Arg Arg Pro Lys Phe Ala Asp Ile Val Ser Ile Leu Asp
            340                 345                 350
Lys Leu Ile Arg Ala Pro Asp Ser Leu Lys Thr Leu Ala Asp Phe Asp
        355                 360                 365
Pro Arg Val Ser Ile Arg Leu Pro Ser Thr Ser Gly Ser Glu Gly Val
    370                 375                 380
Pro Phe Arg Thr Val Ser Glu Trp Leu Glu Ser Ile Lys Met Gln Gln
385                 390                 395                 400
Tyr Thr Glu His Phe Met Ala Ala Gly Tyr Thr Ala Ile Glu Lys Val
                405                 410                 415
Val Gln Met Thr Asn Asp Asp Ile Lys Arg Ile Gly Val Arg Leu Pro
            420                 425                 430
Gly His Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Ser Leu Leu Gly Leu Lys Asp Gln
        435                 440                 445
Val Asn Thr Val Gly Ile Pro Ile
    450                 455
```

<210> 19
<211> 1437

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質編碼序列

<400> 19
atgaaaaaaa taatgctagt ttttattaca cttatattag ttagtctacc aattgcgcaa 60
caaactgaag caaaggatgc atctgcattc aataaagaaa attcaatttc atccatggca 120
ccaccagcat ctccgcctgc aagtcctaag acgccaatcg aaaagaaaca cgcggatctc 180
gagcaccgca ggaggaagaa ccagcgtgcc cgccagtccc cggaggacgt ttacttctcc 240
aagtcagaac aactgaagcc cctgaagaca tacgtggacc cccacacata tgaggacccc 300
aaccaggctg tgttgaagtt cactaccgag atccatccat cctgtgtcac tcggcagaag 360
gtgatcggag caggagagtt tggggaggtg tacaagggca tgctgaagac atcctcgggg 420
aagaaggagg tgccggtggc catcaagacg ctgaaagccg gctacacaga gaagcagcga 480
gtggacttcc tcggcgaggc cggcatcatg ggccagttca gccaccacaa catcatccgc 540
ctagagggcg tcatctccaa atacaagccc atgatgatca tcactgagta catggagaat 600
ggggccctgg acaagttcct tcgggagaag gatggcgagt tcagcgtgct gcagctggtg 660
ggcatgctgc ggggcatcgc agctggcatg aagtacctgg ccaacatgaa ctatgtgcac 720
cgtgacctgg ctgcccgcaa catcctcgtc aacagcaacc tggtctgcaa ggtgtctgac 780
tttggcctgt cccgcgtgct ggaggacgac cccgaggcca cctacaccac cagtggcggc 840
aagatcccca tccgctggac cgccccggag gccatttcct accggaagtt cacctctgcc 900
agcgacgtgt ggagctttgg cattgtcatg tgggaggtga tgacctatgg cgagcggccc 960
tactgggagt tgtccaacca cgaggtgatg aaagccatca atgatggctt ccggctcccc 1020
acacccatgg actgcccctc cgccatctac cagctcatga tgcagtgctg gcagcaggag 1080
cgtgcccgcc gccccaagtt cgctgacatc gtcagcatcc tggacaagct cattcgtgcc 1140
cctgactccc tcaagaccct ggctgacttt gaccccgcg tgtctatccg gctccccagc 1200
acgagcggct cggagggggt gcccttccgc acggtgtccg agtggctgga gtccatcaag 1260
atgcagcagt atacggagca cttcatggcg gccggctaca ctgccatcga gaaggtggtg 1320
cagatgacca acgacgacat caagaggatt ggggtgcggc tgcccggcca ccagaagcgc 1380
atcgcctaca gcctgctggg actcaaggac caggtgaaca ctgtggggat ccccatc 1437

<210> 20
<211> 479
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質

<400> 20
Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
1 5 10 15
Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
20 25 30

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
35 40 45
Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Leu Glu His Arg Arg
50 55 60
Arg Lys Asn Gln Arg Ala Arg Gln Ser Pro Glu Asp Val Tyr Phe Ser
65 70 75 80
Lys Ser Glu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Thr Tyr Val Asp Pro His Thr
85 90 95
Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala Val Leu Lys Phe Thr Thr Glu Ile His
100 105 110
Pro Ser Cys Val Thr Arg Gln Lys Val Ile Gly Ala Gly Glu Phe Gly
115 120 125
Glu Val Tyr Lys Gly Met Leu Lys Thr Ser Ser Gly Lys Lys Glu Val
130 135 140
Pro Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Ala Gly Tyr Thr Glu Lys Gln Arg
145 150 155 160
Val Asp Phe Leu Gly Glu Ala Gly Ile Met Gly Gln Phe Ser His His
165 170 175
Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly Val Ile Ser Lys Tyr Lys Pro Met Met
180 185 190
Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn Gly Ala Leu Asp Lys Phe Leu Arg
195 200 205
Glu Lys Asp Gly Glu Phe Ser Val Leu Gln Leu Val Gly Met Leu Arg
210 215 220
Gly Ile Ala Ala Gly Met Lys Tyr Leu Ala Asn Met Asn Tyr Val His
225 230 235 240
Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys
245 250 255
Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu
260 265 270
Ala Thr Tyr Thr Thr Ser Gly Gly Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala
275 280 285
Pro Glu Ala Ile Ser Tyr Arg Lys Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp
290 295 300
Ser Phe Gly Ile Val Met Trp Glu Val Met Thr Tyr Gly Glu Arg Pro
305 310 315 320
Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His Glu Val Met Lys Ala Ile Asn Asp Gly
325 330 335
Phe Arg Leu Pro Thr Pro Met Asp Cys Pro Ser Ala Ile Tyr Gln Leu
340 345 350
Met Met Gln Cys Trp Gln Gln Glu Arg Ala Arg Arg Pro Lys Phe Ala
355 360 365
Asp Ile Val Ser Ile Leu Asp Lys Leu Ile Arg Ala Pro Asp Ser Leu
370 375 380
Lys Thr Leu Ala Asp Phe Asp Pro Arg Val Ser Ile Arg Leu Pro Ser

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

<210> 21
<211> 1737
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 表現卡匣，編碼融合蛋白質

<400> 21
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aaaaaaataa tgctagtttt tattacactt atattagtta gtctaccaat tgcgcaacaa 300
actgaagcaa aggatgcatc tgcattcaat aaagaaaatt caatttcatc catggcacca 360
ccagcatctc cgcctgcaag tcctaagacg ccaatcgaaa agaaacacgc ggatggatcc 420
gattataaag atgatgatga taaacacaga cgtagaaaaa atcaacgtgc tcgacaatcc 480
ccagaagatg tgtatttttc gaaaagtgaa caattaaaac cattaaaaac ttatgttgat 540
ccgcatacgt acgaagaccc aaatcaagca gtattaaaat ttacaacaga aatacaccca 600
agttgtgtta caagacaaaa agttattgga gcaggtgaat tcggagaggt atataaaggt 660
atgttaaaaa catcatcagg taaaaaagaa gttccggttg caattaaaac cttaaaggca 720
ggatatacag aaaaacagcg agttgatttt ttaggtgaag caggaattat gggtcaattt 780
agccatcata atattattcg tttggaagga gtaataagta aatataaacc aatgatgatt 840
attacagaat acatggaaaa cggtgcttta gataaatttt tacgtgaaaa ggatggtgaa 900
tttagtgttt tacaattggt tggtatgtta agaggaattg ctgcaggtat gaaatattta 960
gctaatatga attatgttca ccgtgatttg gcagcaagaa atatcctagt caattccaat 1020
ttagtatgta aagttagtga ttttggttta agcagagtat tagaagacga tccagaggca 1080
acctatacaa catcgggagg taaaattcct attcgttgga cagcaccaga agctatcagt 1140
taccgtaaat ttacaagtgc atcagacgtg tggagttttg ggattgtaat gtgggaagtt 1200
atgacatatg gagaaagacc atattgggaa ttaagtaatc atgaagttat gaaagcaatt 1260
aacgatggat ttagattacc aactccgatg gattgtccat ctgccattta tcaactaatg 1320
atgcaatgtt ggcaacaaga aagagcacga cgtccaaaat ttgcagatat tgttagtatt 1380

ttagacaaat taattcgtgc accagatagt ttaaaaactt tagcagactt tgatcctcgt 1440
gttagtattc gattaccaag tacgtcaggt tccgaaggag ttccatttcg cacagtctcc 1500
gaatggttgg aatcaattaa aatgcaacaa tacaccgaac actttatggc agcaggttac 1560
acagcaatcg aaaaagttgt tcaaatgaca aatgatgata ttaaacgtat tggagttaga 1620
ttaccaggcc accagaaacg tattgcatat tctttattag gtttaaaaga tcaagttaat 1680
accgtgggaa ttccaattga acaaaaatta atttccgaag aagacttata agagctc 1737

<210> 22
<211> 497
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質

<400> 22

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

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

<210> 23
<211> 1737
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 表現卡匣，編碼融合蛋白質

<400> 23
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aaaaaaatta tgttagtttt tattacatta attttagtta gtttaccaat tgcacaacaa 300
acagaagcaa aagatgcaag tgcatttaat aaagaaaata gtattagtag tatggcacca 360
ccagcaagtc caccagcaag tccaaaaaca ccaattgaaa aaaaacatgc agatggatcc 420
gattataaag acgatgatga taaacacaga cgtagaaaaa atcaacgtgc tcgacaatcc 480
ccagaagatg tgtatttttc gaaaagtgaa caattaaaac cattaaaaac ttatgttgat 540
ccgcatacgt acgaagaccc aaatcaagca gtattaaaat ttacaacaga aatacaccca 600
agttgtgtta caagacaaaa agttattgga gcaggtgaat tcggagaggt atataaaggt 660
atgttaaaaa catcatcagg taaaaaagaa gttccggttg caattaaaac cttaaaggca 720
ggatatacag aaaaacagcg agttgatttt ttaggtgaag caggaattat gggtcaattt 780
agccatcata atattattcg tttggaagga gtaataagta aatataaacc aatgatgatt 840
attacagaat acatggaaaa cggtgcttta gataaatttt tacgtgaaaa ggatggtgaa 900
tttagtgttt tacaattggt tggtatgtta agaggaattg ctgcaggtat gaaatattta 960
gctaatatga attatgttca ccgtgatttg gcagcaagaa atatcctagt caattccaat 1020
ttagtatgta aagttagtga ttttggttta agcagagtat tagaagacga tccagaggca 1080
acctatacaa catcgggagg taaaattcct attcgttgga cagcaccaga agctatcagt 1140
taccgtaaat ttacaagtgc atcagacgtg tggagttttg ggattgtaat gtgggaagtt 1200
atgacatatg gagaaagacc atattgggaa ttaagtaatc atgaagttat gaaagcaatt 1260
aacgatggat ttagattacc aactccgatg gattgtccat ctgccattta tcaactaatg 1320
atgcaatgtt ggcaacaaga aagagcacga cgtccaaaat ttgcagatat tgttagtatt 1380
ttagacaaat taattcgtgc accagatagt ttaaaaactt tagcagactt tgatcctcgt 1440
gttagtattc gattaccaag tacgtcaggt tccgaaggag ttccatttcg cacagtctcc 1500
gaatggttgg aatcaattaa aatgcaacaa tacaccgaac actttatggc agcaggttac 1560
acagcaatcg aaaaagttgt tcaaatgaca aatgatgata ttaaacgtat tggagttaga 1620
ttaccaggcc accagaaacg tattgcatat tctttattag gtttaaaaga tcaagttaat 1680
accgtgggaa ttccaattga acaaaaatta atttccgaag aagacttata agagctc 1737

<210> 24
<211> 497
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質

<400> 24
Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
 1   5   10   15
Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
            20   25   30
Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser

```
        35                  40                  45
Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Gly Ser Asp Tyr Lys
    50                  55                  60
Asp Asp Asp Asp Lys His Arg Arg Arg Lys Asn Gln Arg Ala Arg Gln
65                  70                  75                  80
Ser Pro Glu Asp Val Tyr Phe Ser Lys Ser Glu Gln Leu Lys Pro Leu
                85                  90                  95
Lys Thr Tyr Val Asp Pro His Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala Val
            100                 105                 110
Leu Lys Phe Thr Thr Glu Ile His Pro Ser Cys Val Thr Arg Gln Lys
        115                 120                 125
Val Ile Gly Ala Gly Glu Phe Gly Glu Val Tyr Lys Gly Met Leu Lys
    130                 135                 140
Thr Ser Ser Gly Lys Lys Glu Val Pro Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys
145                 150                 155                 160
Ala Gly Tyr Thr Glu Lys Gln Arg Val Asp Phe Leu Gly Glu Ala Gly
                165                 170                 175
Ile Met Gly Gln Phe Ser His His Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly Val
            180                 185                 190
Ile Ser Lys Tyr Lys Pro Met Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn
        195                 200                 205
Gly Ala Leu Asp Lys Phe Leu Arg Glu Lys Asp Gly Glu Phe Ser Val
    210                 215                 220
Leu Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met Lys Tyr
225                 230                 235                 240
Leu Ala Asn Met Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile
                245                 250                 255
Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser
            260                 265                 270
Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu Ala Thr Tyr Thr Thr Ser Gly Gly
        275                 280                 285
Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ser Tyr Arg Lys
    290                 295                 300
Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Val Met Trp Glu
305                 310                 315                 320
Val Met Thr Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His Glu
                325                 330                 335
Val Met Lys Ala Ile Asn Asp Gly Phe Arg Leu Pro Thr Pro Met Asp
            340                 345                 350
Cys Pro Ser Ala Ile Tyr Gln Leu Met Met Gln Cys Trp Gln Gln Glu
        355                 360                 365
Arg Ala Arg Arg Pro Lys Phe Ala Asp Ile Val Ser Ile Leu Asp Lys
    370                 375                 380
Leu Ile Arg Ala Pro Asp Ser Leu Lys Thr Leu Ala Asp Phe Asp Pro
385                 390                 395                 400
```

Arg Val Ser Ile Arg Leu Pro Ser Thr Ser Gly Ser Glu Gly Val Pro
405 410 415
Phe Arg Thr Val Ser Glu Trp Leu Glu Ser Ile Lys Met Gln Gln Tyr
420 425 430
Thr Glu His Phe Met Ala Ala Gly Tyr Thr Ala Ile Glu Lys Val Val
435 440 445
Gln Met Thr Asn Asp Asp Ile Lys Arg Ile Gly Val Arg Leu Pro Gly
450 455 460
His Gln Lys Arg Ile Ala Tyr Ser Leu Leu Gly Leu Lys Asp Gln Val
465 470 475 480
Asn Thr Val Gly Ile Pro Ile Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
485 490 495
Leu

<210> 25
<211> 1716
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 表現卡匣，編碼融合蛋白質

<400> 25
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
gcatacgaca gtcgttttga tgaatgggta cagaaactga aagaggaaag ctttcaaaac 300
aatacgtttg accgccgcaa atttattcaa ggagcgggga agattgcagg actttctctt 360
ggattaacga ttgcccagtc ggttggggcc tttggatccg attataaaga tgatgatgat 420
aaacacagac gtagaaaaaa tcaacgtgct cgacaatccc cagaagatgt gtatttttcg 480
aaaagtgaac aattaaaacc attaaaaact tatgttgatc cgcatacgta cgaagaccca 540
aatcaagcag tattaaaatt tacaacagaa atacacccaa gttgtgttac aagacaaaaa 600
gttattggag caggtgaatt cggagaggta tataaaggta tgttaaaaac atcatcaggt 660
aaaaaagaag ttccggttgc aattaaaacc ttaaaggcag gatatacaga aaaacagcga 720
gttgattttt taggtgaagc aggaattatg ggtcaattta gccatcataa tattattcgt 780
ttggaaggag taataagtaa atataaacca atgatgatta ttacagaata catggaaaac 840
ggtgctttag ataaattttt acgtgaaaag gatggtgaat ttagtgtttt acaattggtt 900
ggtatgttaa gaggaattgc tgcaggtatg aaatatttag ctaatatgaa ttatgttcac 960
cgtgatttgg cagcaagaaa tatcctagtc aattccaatt tagtatgtaa agttagtgat 1020
tttggtttaa gcagagtatt agaagacgat ccagaggcaa cctatacaac atcgggaggt 1080
aaaattccta ttcgttggac agcaccagaa gctatcagtt accgtaaatt tacaagtgca 1140
tcagacgtgt ggagttttgg gattgtaatg tgggaagtta tgacatatgg agaaagacca 1200

tattgggaat taagtaatca tgaagttatg aaagcaatta acgatggatt tagattacca 1260
actccgatgg attgtccatc tgccatttat caactaatga tgcaatgttg gcaacaagaa 1320
agagcacgac gtccaaaatt tgcagatatt gttagtattt tagacaaatt aattcgtgca 1380
ccagatagtt taaaaacttt agcagacttt gatcctcgtg ttagtattcg attaccaagt 1440
acgtcaggtt ccgaaggagt tccatttcgc acagtctccg aatggttgga atcaattaaa 1500
atgcaacaat acaccgaaca ctttatggca gcaggttaca cagcaatcga aaaagttgtt 1560
caaatgacaa atgatgatat taaacgtatt ggagttagat taccaggcca ccagaaacgt 1620
attgcatatt ctttattagg tttaaaagat caagttaata ccgtgggaat tccaattgaa 1680
caaaaattaa tttccgaaga agacttataa gagctc 1716

<210> 26
<211> 490
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質

<400> 26
Met Ala Tyr Asp Ser Arg Phe Asp Glu Trp Val Gln Lys Leu Lys Glu
1 5 10 15
Glu Ser Phe Gln Asn Asn Thr Phe Asp Arg Arg Lys Phe Ile Gln Gly
20 25 30
Ala Gly Lys Ile Ala Gly Leu Ser Leu Gly Leu Thr Ile Ala Gln Ser
35 40 45
Val Gly Ala Phe Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His Arg
50 55 60
Arg Arg Lys Asn Gln Arg Ala Arg Gln Ser Pro Glu Asp Val Tyr Phe
65 70 75 80
Ser Lys Ser Glu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Thr Tyr Val Asp Pro His
85 90 95
Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala Val Leu Lys Phe Thr Thr Glu Ile
100 105 110
His Pro Ser Cys Val Thr Arg Gln Lys Val Ile Gly Ala Gly Glu Phe
115 120 125
Gly Glu Val Tyr Lys Gly Met Leu Lys Thr Ser Ser Gly Lys Lys Glu
130 135 140
Val Pro Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Ala Gly Tyr Thr Glu Lys Gln
145 150 155 160
Arg Val Asp Phe Leu Gly Glu Ala Gly Ile Met Gly Gln Phe Ser His
165 170 175
His Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly Val Ile Ser Lys Tyr Lys Pro Met
180 185 190
Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn Gly Ala Leu Asp Lys Phe Leu
195 200 205

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

<210> 27
<211> 966
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 表現卡匣，編碼融合蛋白質

<400> 27
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aaaaaaatta tgttagtttt tattacatta attttagtta gtttaccaat tgcacaacaa 300
acagaagcaa aagatgcaag tgcatttaat aaagaaaata gtattagtag tatggcacca 360
ccagcaagtc caccagcaag tccaaaaaca ccaattgaaa aaaaacatgc agatggatcc 420
caagcagaag gtcgcggaac aggaggaagt acaggagatg cagacggacc aggaggacca 480
ggaataccag acggaccagg aggaaatgca ggaggcccag gcgaagcagg cgcaacagga 540
ggaagaggac caagaggagc aggagcagca cgagcatcag gaccaggagg cggagcacca 600
agaggaccac atggcggagc ggcaagcgga ttaaatggat gttgtagatg tggagcacgc 660
ggaccagaat caagactttt agaattttat ttagccatgc catttgcaac cccaatggaa 720
gcagaattag cacgaagatc attagcacaa gatgccccac cattaccagt accaggagtt 780
ttattaaaag agtttacagt atcaggcaat attttaacaa tacgtttaac agcagcagac 840
catcgtcaat tacaactatc tatcagttca tgtttacaac aattatcctt attaatgtgg 900
attacacaat gtttttacc agtttttta gcacaaccac catcaggaca aagaagataa 960
gagctc 966

<210> 28
<211> 240
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白質

<400> 28
Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
1 5 10 15
Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
20 25 30
Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
35 40 45
Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Gly Ser Gln Ala Glu
50 55 60
Gly Arg Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asp Gly Pro Gly Gly
65 70 75 80
Pro Gly Ile Pro Asp Gly Pro Gly Gly Asn Ala Gly Gly Pro Gly Glu
85 90 95
Ala Gly Ala Thr Gly Gly Arg Gly Pro Arg Gly Ala Gly Ala Ala Arg
100 105 110
Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Arg Gly Pro His Gly Gly Ala
115 120 125

```
Ala Ser Gly Leu Asn Gly Cys Cys Arg Cys Gly Ala Arg Gly Pro Glu
    130                 135                 140
Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met
145                 150                 155                 160
Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu
                165                 170                 175
Pro Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn Ile
            180                 185                 190
Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg Gln Leu Gln Leu Ser
        195                 200                 205
Ile Ser Ser Cys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln
    210                 215                 220
Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg
225                 230                 235                 240
```

<210> 29
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包括密碼子-最優化序列之部份表現卡匣

<400> 29
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aaaaaaaaaa ttattagtgc aattttaatg agtacagtta ttttaagtgc agcagcacca 300
ttaagtggtg tttatgcaga tacaggatcc 330

<210> 30
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 部份表現卡匣

<400> 30
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240

aatatgaaaa aagcaactat cgcggctaca gctgggattg cggtaacagc atttgctgcg 300
ccaacaatcg catccgcaag cactggatcc 330

<210> 31
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包括密碼子-最優化序列之部份表現卡匣

<400> 31
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aatatgaaaa aagcaacaat tgcagcaaca gcaggtattg cagttacagc atttgcagca 300
ccaacaattg caagtgcaag tacaggatcc 330

<210> 32
<211> 1702
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> hlyP-p60 基因片段

<400> 32
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aatatgaaaa aagcaactat cgcggctaca gctgggattg cggtaacagc atttgctgcg 300
ccaacaatcg catccgcaag cactgtagta gtcgaagctg gtgatactct ttggggtatc 360
gcacaaagta aagggactac tgttgacgca attaaaaaag caaacaattt aacaacagat 420
aaaatcgtac caggtcaaaa attacaagta aataatgagg ttgctgctgc tgaaaaaaca 480
gagaaatctg ttagcgcaac ttggttaaac gtccgtagtg gcgctggtgt tgataacagt 540
attattacgt ccatcaaagg tggaacaaaa gtaactgttg aaacaaccga atctaacggc 600
tggcacaaaa ttacttacaa cgatggaaaa actggtttcg ttaacggtaa atacttaact 660
gacaaagcag taagcactcc agttgcacca acacaagaag tgaaaaaaga aactactact 720
caacaagctg cacctgctgc agaaacaaaa actgaagtaa aacaaactac acaagcaact 780
acacctgcgc ctaaagtagc agaaacgaaa gaaactccag tagtagatca aaatgctact 840
acacacgctg ttaaaagcgg tgacactatt tgggctttat ccgtaaaata cggtgtttct 900
gttcaagaca ttatgtcatg gaataattta tcttcttctt ctatttatgt aggtcaaaag 960
cttgctatta aacaaactgc taacacagct actccaaaag cagaagtgaa aacggaagct 1020

ccagcagctg aaaaacaagc agctccagta gttaaagaaa atactaacac aaatactgct 1080
actacagaga aaaaagaaac agcaacgcaa caacaaacag cacctaaagc accaacagaa 1140
gctgcaaaac cagctcctgc accatctaca aacacaaatg ctaataaaac aaatacaaat 1200
acaaatacaa atacaaatac aaacaatact aatacaaata caccatctaa aaatactaat 1260
acaaactcaa atactaatac gaatacaaac tcaaatacga atgctaatca aggttcttcc 1320
aacaataaca gcaattcaag tgcaagtgct attattgctg aagctcaaaa acaccttgga 1380
aaagcttatt catggggtgg taacggacca actacatttg attgctctgg ttacactaaa 1440
tatgtatttg ctaaagcggg aatctccctt ccacgtactt ctggcgcaca atacgctagc 1500
actacaagaa tctctgaatc tcaagcaaaa cctggtgatt tagtattctt tgactatggt 1560
agcggaattt ctcacgttgg tatctacgtt ggtaatggtc aaatgattaa cgcgcaagac 1620
aatggcgtta aatacgataa catccacggc tctggctggg gtaaatatct agttggcttc 1680
ggtcgcgtat aattaaggat cc 1702

<210> 33
<211> 9808
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAM401-MCS 質體

<400> 33
ctttaaacgt ggatcatttt ctttaaattt atgctgacga cctttgaatt tgccttttt 60
cttagcaatt tcgattcctt gtgcctgacg ttccttaatt ttttttcgtt ctgattctgc 120
ttgatacttg tacaattcaa tgacaaggct attaatcaaa cgccttaaat tttcatcttc 180
aataccattc attgagggta aatttaagac ttccagggtt gccccttaa tttgaatttg 240
attcatcaat tctgttaatt ctttattatt tcgtcctaat cgatctaatt cagtaacaat 300
aacaatatcc ccttcacgaa tatagttaag catagcttgt aattgtgggc gttcgaccga 360
ttgaccgctt aatttgtctg aaaagacctt agaaacgccc tgtaacgctt gtaattgccg 420
atctaagttc tgttctttgc tactgacacg tgcataacca attttagcca ttttcaacca 480
acctctaaaa ttctctcggt tgcaataacc aatcagcaat atctactttt tcaatttcaa 540
attgcttatc agaaattgtc ttttcgtaag cgataaaatc ttgcgcatat tgttgctcat 600
taaaaatagc caccacttcg tcattttcta aaactcgata aataaatttt ttcattttac 660
tcctcctatt atgcccaact taaatgacct attcaccaag tcaattatac tgctaaaatc 720
atattaggac aaataggtat actctattga cctataaatg atagcaactt aaaagatcaa 780
gtgttcgctt cgctctcact gcccctcgac gttttagtag cctttccctc acttcgttca 840
gtccaagcca actaaaagtt ttcgggctac tctctccttc tccccctaat aattaattaa 900
aatcttactc tgtatatttc tgctaatcat tcactaaaca gcaaagaaaa acaaacacgt 960
atcatagata taaatgtaat ggcatagtgc gggttttatt ttcagcctgt atcgtagcta 1020
aacaaatcga gttgtgggtc cgttttgggg cgttctgcca atttgtttag agtttcttga 1080
ataaatgtac gttctaaatt aaacgaagct gtcagcgcct ttatatagct ttctcgttct 1140
tctttttta atttaatgat cgatagcaac aatgatttaa cactagcaag ttgaatgcca 1200
ccatttcttc ctggtttaat cttaaagaaa atttcctgat tcgccttcag taccttcagc 1260
aatttatcta atgtccgttc aggaatgcct agcacttctc taatctcttt tttggtcgtc 1320
gctaaataag gcttgtatac atcgcttttt tcgctaatat aagccattaa atcttctttc 1380

cattctgaca aatgaacacg ttgacgttcg cttctttttt tcttgaattt aaaccaccct 1440
tgacggacaa ataaatcttt actggttaaa tcacttgata cccaagcttt gcaaagaatg 1500
gtaatgtatt ccctattagc cccttgatag ttttctgaat aggcacttct aacaattttg 1560
attacttctt tttcttctaa gggttgatct aatcgattat taaactcaaa catattatat 1620
tcgcacgttt cgattgaata gcctgaacta aagtaggcta aagagagggt aaacataacg 1680
ctattgcgcc ctactaaacc cttttctcct gaaaatttcg tttcgtgcaa taagagatta 1740
aaccagggtt catctacttg ttttttgcct tctgtaccgc ttaaaaccgt tagacttgaa 1800
cgagtaaagc ccttattatc tgtttgtttg aaagaccaat cttgccattc tttgaaagaa 1860
taacggtaat tgggatcaaa aaattctaca ttgtccgttc ttggtatacg agcaatccca 1920
aaatgattgc acgttagatc aactggcaaa gactttccaa aatattctcg gatattttgc 1980
gagattattt tggctgcttt gacagattta aattctgatt ttgaagtcac atagactggc 2040
gtttctaaaa caaaatatgc ttgataacct ttatcagatt tgataattaa cgtaggcata 2100
aaacctaaat caatagctgt tgttaaaata tcgcttgctg aaatagtttc tttttccgtg 2160
tgaatatcaa aatcaataaa gaaggtattg atttgtctta aattgttttc agaatgtcct 2220
ttagtgtatg aacggttttc gtctgcatac gtaccataac gataaacgtt tggtgtccaa 2280
tgcgtaaatg tatcttgatt ttcgtgaatc gcttcttcgg aagtcagaac aacgccacgt 2340
ccgccaatca tgctttttt tgagcgatac gcaaaaatag ccccttttact tttacctggc 2400
ttggtagtga ttgagcgaat tttactattt ttaaatttgt actttaacaa gccgtcatga 2460
agcacagttt ctacaacaaa agggatattc attcagctgt tctcctttct tacgaaaatt 2520
aattagttag aagctacgat caaagttgaa tcacaacaaa aaaggcaatc aactaagttt 2580
ttcttaattg attgcctggt atcttcttaa agacttgaaa tcccctcaaa aacccgatat 2640
aatgggttta cagatattta agtatctgat taataaagta attaaatact ttaccaaatt 2700
ttgggtctcg acttctttaa ttgattggtg gtaatcaatt aaggctcgca gttaaaattt 2760
ctcaggcttt aactggtcgt ggctcttttt ttgtattctt tattcagttc gttgtttcgt 2820
tatatctagt atatcgcttt ttaaaaaaat aagcaatgat ttcgtgcatt attcacacga 2880
aatcattgct tttttcttct tccatttcta actccaatgt tacttgttct gtttctggtt 2940
ctggttctgt tggctcattt gggattaaat ccactactag cgttgagtta gttccgtctc 3000
taatagccgg ttaagtaata gccggttaag tggtcaaact ttgggaaaat ctcaacccgc 3060
attaagtttt gatgccatga caatcgttgg aaatttgaac aaaactaatg ctaaaaagct 3120
atctgacttt atgagtgtag agccacaaat acgactttgg gatatacttc aaacaaagtt 3180
taaagctaag gcacttcaag aaaaagttta tatcgaatat gacaaagtaa aagcagatac 3240
ttgggataga cgtaatatgc gtgttgaatt taatcccaat aaactcacac atgaagaaat 3300
gatttggtta aaacaaaata ttatcgacta catggaagat gacggtttta caagattaga 3360
cttagctttt gattttgaag atgatttgag cgattactat gcaatgactg ataaagcagt 3420
taagaaaact gttttttatg gtcgtaatgg caagccagaa acaaaatatt ttggtgtccg 3480
tgatagtgat agatttatta gaatttataa taaaaaacaa gaacgtaaag ataacgcaga 3540
tgttgaagtt gtgtttgaac atttatggcg tgtagaagtt gaattaaaaa gagatatggt 3600
tgattactgg aatgattgtt ttaatgattt acacatcttt gaaacctgcg tgggctactt 3660
tagaaaaaat taatgagcaa gctatggttt atactttgtt gcatgaagaa agtatgtggg 3720
gaaagctaag taagaatact aagactaaat ttaaaaaatt gattagagaa atatctccaa 3780
ttgatttaac ggaattaatg aaatcgactt taaaagcgaa cgaaaaacaa ttgcaaaagc 3840
agattgattt ttggcaacgt gaatttaggt tttggaagta aaataagttt tatttgataa 3900
aaattgctaa ttcagtataa ttaatattta cgaggtgaca taacgtatga aaaaatcaga 3960
ggattattcc tcctaaatat aaaaatttaa aatttaggag gaagttatat atgactttta 4020
atattattga attagaaaat tgggatagaa aagaatattt tgaacactat tttaatcagc 4080

aaactactta tagcattact aaagaaattg atattacttt gtttaaagat atgataaaaa 4140
agaaaggata tgaaatttat ccctctttaa tttatgcaat tatggaagtt gtaaataaaa 4200
ataaagtgtt tagaacagga attaatagtg agaataaatt aggttattgg gataagttaa 4260
atcctttgta tacagttttt aataagcaaa ctgaaaaatt tactaacatt tggactgaat 4320
ctgataaaaa cttcatttct ttttataata attataaaaa tgacttgctt gaatataaag 4380
ataaagaaga aatgtttcct aaaaaaccga tacctgaaaa caccataccg atttcaatga 4440
ttccttggat tgattttagt tcatttaatt taaatattgg taacaatagc agcttttttat 4500
tgcctattat tacgataggt aaattttata gtgagaataa taaaatttat ataccagttg 4560
ctctgcaact tcatcattct gtatgtgatg gttaccatgc ttcactattt atgaatgaat 4620
ttcaagatat aattcatagg gtagatgatt ggatttagtt tttagatttt gaaagtgaat 4680
ttaattttat acacgtaagt gatcataaaa tttatgaacg tataacaacc acatttttg 4740
gttgcttgtg gttttgattt tgaatttggt tttgaactta tggactgatt tattcagtcc 4800
atttttgtg cttgcacaaa aactagcctc gcagagcaca cgcattaatg acttatgaaa 4860
cgtagtaaat aagtctagtg tgttatactt tacttggaag atgcaccgaa taaaaaatat 4920
tgaagaacaa ctagcaaaag attttaaaga gttattttat tttaagtctt tataacatga 4980
gtgaagcgaa tttttaaatt tcgatagaaa tttttacatc aaaaagcccc ctgtcaaaat 5040
tgacgaaggg ggtttttttgg cgcacgcttt tcgttagaaa tatacaagat tgaaaatcgt 5100
gtataagtgc gccctttgtt ttgaacttag cacgttacat caatttttta aaatgatgta 5160
taagtgcgcc cttttaaatt ttgagtgatt atatttttttg agttagaaaa agggattggg 5220
aaaatttccc aaaataattt aaaaaataag caaaaatttt cgatagagaa tgtgctattt 5280
tttgtcaaag gtgtatacct tgactgtgct tgctgttaca ttaagtttat ttttaagtta 5340
ttaaaaaaga aatagctttt aaagtttggc tcgctgtcgc tttataaagc tgattgactt 5400
ttgattgcaa actacttaaa gaaaacaaac tcggactatt cgttttcttc tctttggttt 5460
gaacatcagc aattatcccc tcttgattgc ctattttagc ttgtttagaa gaaacaaaag 5520
ctaaaagctc ctcttgggtt ttaaaacgct gtgtggggct tagaacgccc ttaaacgacc 5580
cttggtttac ttttatacta gcttccacct cgaaaaaagg ttctttttta aaattctcta 5640
tggcttcctg gcgctgaaaa aataaggtat aaggtgggcg tttgaacacg tcctagtgaa 5700
aatgtacctt gtacgcccct tctgttgtaa atttaacgta tacaaagggc ttgcgttcat 5760
gccgatcaac caatcggcaa tttggcgtgt ttgcgcttct tgataaaagg gatagtaatt 5820
cattccaggt tgcaaatttt gaaaaccgct tcggattaca tctttttcta agctattgat 5880
ccatagtctt ttaaatgttt tatcttttga aaaggcattt gctttatgga taatcgacca 5940
ggcgatattt tcaccttctc tgtcgctatc tgttgcaaca ataattgtat ttgccttttt 6000
gagaagttct gcaacaattt taaactgctt tcccttatct tttgcaactt caaaatcgta 6060
tcgatcagga aaaatcggca aagattcaag tttccaattt tgccactttt cgtcataatg 6120
acctggttct gctaattcca ctaaatgccc aaaaccaaag gtgataaacg tttcatctgt 6180
aaatagtggg tctttgatct caaaataacc gtctttttttg gtgctttgtt ttaaagcact 6240
tgcgtaggct aatgcctggc ttggtttttc agctaaaata accgtactca ttaactatcc 6300
ctcttttcat tgtttttttct ttgatcgact gtcacgttat atcttgctcg ataccttcta 6360
aacgttcggc gattgattcc agtttgttct tcaacttctt tatcggataa accattcaaa 6420
aacaaatcga aagcatggat gcgccgcgtg cggctgctgg agatggcgga cgcgatggat 6480
atgttctgcc aagggttggt ttgcgcattc acagttctcc gcaagaattg attggctcca 6540
attcttggag tggtgaatcc gttagcgagg tgccgccggc ttccattcag gtcgaggtgg 6600
cccggctcca tgcaccgcga cgcaacgcgg ggaggcagac aaggtatagg gcggcgccta 6660
caatccatgc caacccgttc catgtgctcg ccgaggcggc ataaatcgcc gtgacgatca 6720
gcggtccagt gatcgaagtt aggctggtaa gagccgcgag cgatccttga agctgtccct 6780

gatggtcgtc atctacctgc ctggacagca tggcctgcaa cgcgggcatc ccgatgccgc 6840
cggaagcgag aagaatcata atggggaagg ccatccagcc tcgcgtcgca atacgactca 6900
ctatagggcg aattgggtac cgggcccccc ctcgaggtcg acggtatcga taagcttgat 6960
atcgaattcc tgcagcccgg gggatccact agttctagag cggccgccac cgcggtggag 7020
ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aatgctagaa atattttatc tgattaataa 7080
gatgatcttc ttgagatcgt tttggtctgc gcgtaatctc ttgctctgaa aacgaaaaaa 7140
ccgccttgca gggcggtttt tcgaaggttc tctgagctac caactctttg aaccgaggta 7200
actggcttgg aggagcgcag tcaccaaaac ttgtcctttc agtttagcct taaccggcgc 7260
atgacttcaa gactaactcc tctaaatcaa ttaccagtgg ctgctgccag tggtgctttt 7320
gcatgtcttt ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcggac 7380
tgaacggggg gttcgtgcat acagtccagc ttggagcgaa ctgcctaccc ggaactgagt 7440
gtcaggcgtg gaatgagaca aacgcggcca taacagcgga atgacaccgg taaaccgaaa 7500
ggcaggaaca ggagagcgca cgagggagcc gccaggggga aacgcctggt atctttatag 7560
tcctgtcggg tttcgccacc actgatttga gcgtcagatt tcgtgatgct tgtcaggggg 7620
gcggagccta tggaaaaacg gctttgccgc ggccctctca cttccctgtt aagtatcttc 7680
ctggcatctt ccaggaaatc tccgccccgt tcgtaagcca tttccgctcg ccgcagtcga 7740
acgaccgagc gtagcgagtc agtgagcgag gaagcggaat atatcctgta tcacatattc 7800
tgctgacgca ccggtgcagc ctttttttctc ctgccacatg aagcacttca ctgacaccct 7860
catcagtgcc aacatagtaa gccagtatac actccgctag cgctgatgtc cggcggtgct 7920
tttgccgtta cgcaccaccc cgtcagtagc tgaacaggag ggacagctga tagaaacaga 7980
agccactgga gcacctcaaa aacaccatca tacactaaat cagtaagttg gcagcatcac 8040
ccgacgcact ttgcgccgaa taaatacctg tgacggaaga tcacttcgca gaataaataa 8100
atcctggtgt ccctgttgat accgggaagc cctgggccaa cttttggcga aaatgagacg 8160
ttgatcggca cgtaagaggt tccaactttc accataatga aataagatca ctaccgggcg 8220
tatttttga gttatcgaga ttttcaggag ctaaggaagc taaaatggag aaaaaaatca 8280
ctggatatac caccgttgat atatcccaat ggcatcgtaa agaacatttt gaggcatttc 8340
agtcagttgc tcaatgtacc tataaccaga ccgttcagct ggatattacg gccttttaa 8400
agaccgtaaa gaaaaataag cacaagtttt atccggcctt tattcacatt cttgcccgcc 8460
tgatgaatgc tcatccggaa ttccgtatgg caatgaaaga cggtgagctg gtgatatggg 8520
atagtgttca cccttgttac accgttttcc atgagcaaac tgaaacgttt tcatcgctct 8580
ggagtgaata ccacgacgat ttccggcagt ttctacacat atattcgcaa gatgtggcgt 8640
gttacggtga aaacctggcc tatttcccta aagggtttat tgagaatatg tttttcgtct 8700
cagccaatcc ctgggtgagt ttcaccagtt ttgatttaaa cgtggccaat atggacaact 8760
tcttcgcccc cgttttcacc atgggcaaat attatacgca aggcgacaag gtgctgatgc 8820
cgctggcgat tcaggttcat catgccgtct gtgatggctt ccatgtcggc agaatgctta 8880
atgaattaca acagtactgc gatgagtggc agggcggggc gtaatttttt taaggcagtt 8940
attggtgccc ttaaacgcct ggtgctacgc ctgaataagt gataataagc ggatgaatgg 9000
cagaaattcg aaagcaaatt cgacccggtc gtcggttcag ggcagggtcg ttaaatagcc 9060
gcttatgtct attgctggtt taccggttta ttgactaccg gaagcagtgt gaccgtgtgc 9120
ttctcaaatg cctgaggcca gtttgctcag gctctccccg tggaggtaat aattgacgat 9180
atgatcattt attctgcctc ccagagcctg ataaaaacgg ttagcgcttc gttaatacag 9240
atgtaggtgt tccacagggt agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg aacataatgg 9300
tgcagggcgc ttgtttcggc gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttgg 9360
gcgctgccgg cacctgtcct acgagttgca tgataaagaa gacagtcata agtgcggcga 9420
cgatagtcat gccccgcgcc caccggaagg agctaccgga cagcggtgcg gactgttgta 9480

actcagaata agaaatgagg ccgctcatgg cgttgactct cagtcatagt atcgtggtat 9540
caccggttgg ttccactctc tgttgcgggc aacttcagca gcacgtaggg gacttccgcg 9600
tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgttgct caggtcgcag 9660
acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 9720
cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca 9780
cccgtggcca ggacccaacg ctgcccga 9808

<210> 34
<211> 1869
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密碼子-最優化序列

<400> 34
atggcattgc caactgcacg tccattacta ggtagttgcg gtacaccagc actaggttct 60
ttattatttt tgttattttc tctaggttgg gttcaaccaa gtcgtacatt agcaggtgaa 120
acaggtcaag aagcagcacc acttgacggt gtattaacga atccaccaaa tatatcaagt 180
ttaagtccac gtcaattatt aggttttcca tgtgcagaag tttcaggttt aagtacagaa 240
cgtgtccgtg agttagcagt tgcattagca caaaaaaacg ttaaattatc tacagaacag 300
ttacgttgtt tagcccatag attaagcgaa ccaccagaag acttagatgc acttccttta 360
gaccttcttt tattcttaaa tccagatgca ttttcaggac cacaagcatg tacacgtttt 420
tttagtcgaa ttacaaaagc caatgttgat ttattacctc gtggggctcc tgaaagacaa 480
cgtttattac ctgctgcatt agcatgctgg ggtgttcgcg gtagcttatt aagtgaagcc 540
gatgttcgtg ctttaggggg tttagcatgt gatttacctg gtcgtttcgt tgcagaatca 600
gcagaagtgt tattaccgag attagtttca tgcccaggac ctttagatca agatcaacaa 660
gaggcagcta gagcagctct tcaaggagga ggcccaccat atggcccacc aagtacatgg 720
agtgtttcta caatggatgc gttaagaggt ttattaccgg ttttaggaca accaattatt 780
cgtagtattc cacaaggcat tgtagcagca tggcgtcaac gtagttctcg tgatccgtct 840
tggcgacaac cagaacgtac aattctacgt ccaagatttc gtagagaagt agaaaaaacg 900
gcgtgtccta gtggcaaaaa agcacgtgaa attgatgaaa gtttaatttt ttataaaaaa 960
tgggaattag aagcatgtgt cgatgcagca ttactagcta cacaaatgga tcgtgttaat 1020
gctattccat tcacatatga acaattagat gttttaaagc ataaattaga cgaattatat 1080
ccacaaggtt atccagaatc agttattcaa catttaggtt acttattttt aaaaatgagt 1140
ccagaagaca tacgcaaatg gaatgttaca agtttagaaa cattaaaagc gcttttagaa 1200
gttaacaaag gtcatgaaat gagtccacaa gttgctacgt taattgatag attcgttaaa 1260
ggccgtggtc aattagataa agatacttta gatacattaa cagcatttta tcctggctac 1320
ttatgcagtt tatcaccaga agaattaagt tccgttccac cgagtagtat ctgggcagtt 1380
cgtccgcaag atttagatac atgcgaccca cgtcaattag atgttttata tccaaaagca 1440
agattagctt tccaaaatat gaacggtagt gaatatttcg taaaaattca atcctttta 1500
ggtggtgcac caactgaaga tctaaaagca ttaagccaac aaaatgtaag tatggattta 1560
gctacgttta tgaaattacg tacagatgca gttctaccat taacagttgc agaagttcaa 1620

aaattattag gtccacacgt agaaggatta aaagcagaag aacgtcaccg tccagttcgc 1680
gattggattt tacgtcaacg tcaagatgat ttagatacat taggtttagg tttacaaggc 1740
ggtattccga atggatattt agtgttagat ttatctgttc aagaagcatt aagtggtaca 1800
ccgtgtttat taggtccagg tccagtttta acagtgttag cattattatt agccagtaca 1860
ttagcttaa 1869

<210> 35
<211> 622
<212> PRT
<213> 現代智人

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

```
            260                 265                 270
Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
        275                 280                 285
Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
    290                 295                 300
Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
305                 310                 315                 320
Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met
                325                 330                 335
Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
            340                 345                 350
Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
        355                 360                 365
Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile
    370                 375                 380
Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu
385                 390                 395                 400
Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp
                405                 410                 415
Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr
            420                 425                 430
Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu
        435                 440                 445
Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp
    450                 455                 460
Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala
465                 470                 475                 480
Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile
                485                 490                 495
Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser
            500                 505                 510
Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr
        515                 520                 525
Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly
    530                 535                 540
Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg
545                 550                 555                 560
Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu
                565                 570                 575
Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser
            580                 585                 590
Val Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro
        595                 600                 605
Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala
    610                 615                 620
```

<210> 36
<211> 1878
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密碼子-最優化序列

<400> 36
atggcattac caacggctcg cccattatta ggttcttgtg gttcaccaat ttgtagtcgc 60
agtttttat tattattact atctttaggt tggattccgc gtttacaaac acaaaccact 120
aaaacaagtc aagaagctac attattgcat gcagtcaatg gcgcagcaga ttttgcaagt 180
ttaccaacag gcttatttct tggtcttaca tgtgaagaag ttagtgattt aagtatggaa 240
caagcaaaag gtttagcgat ggcggttcgc caaaaaaata ttacattacg tggtcatcaa 300
ttacgttgtt tagcacgtcg tttaccacga catttaacag atgaagaatt aaatgctcta 360
ccattagact tattattatt tttaaatcca gcaatgtttc caggtcaaca agcatgtgcc 420
catttttca gtttaatttc gaaagcaaat gtagatgttt taccgagacg tagcttagaa 480
cgtcaacgtc ttttaatgga agcattaaaa tgtcaaggtg tttatggttt ccaagttagt 540
gaagcagatg ttcgtgcact tggtggttta gcttgtgatt taccagggaa atttgtagca 600
cgttctagtg aagtattatt accatggtta gcaggttgtc aaggtccatt agatcaaagt 660
caagaaaaag cagttcgtga agtcttacgt agtggtcgta ctcaatatgg cccacctagc 720
aaatggagtg ttagtacgtt agatgcatta caaagtttag tagctgtttt agatgaaagt 780
attgttcaga gtattccaaa agatgtgaaa gcagagtggt tacaacatat ttcccgtgac 840
ccatctcgtt taggtagtaa attaacagtt attcatccac gttttcgccg cgacgcagaa 900
caaaaagcat gtccaccagg taaagaacca tataaagtag atgaagattt aatttttat 960
cagaattggg aattagaagc ctgtgttgat ggtacaatgt tagcacgtca aatggattta 1020
gttaatgaaa ttccatttac atatgaacaa ttaagtatct ttaaacataa attagataaa 1080
acatatccac aaggttatcc agaatcgtta attcaacaat taggtcattt ttttcgttat 1140
gttagtccag aagacattca tcaatggaat gttacaagtc cagatacagt taaaacttta 1200
ttaaaagtta gtaaaggtca aaaaatgaat gctcaagcaa ttgcattagt cgcatgttat 1260
ttacgtggag gtggtcaatt agatgaagat atggttaaag cattagggga tattccatta 1320
tcatatttat gtgatttctc cccacaagac ttacattcag ttccaagtag tgttatgtgg 1380
ttagttggtc cacaaggttt agataaatgt agtcaacgtc atttaggttt actttatcaa 1440
aaagcatgta gtgcgtttca aaatgttagt ggtttagaat attttgaaaa aatcaaaaca 1500
tttttaggag gtgcatctgt aaaagattta cgcgcattaa gtcaacataa tgtaagtatg 1560
gatatcgcaa catttaaacg tttacaagtc gatagtctag ttggtcttag tgtagcagaa 1620
gttcaaaaat tattagggcc gaatattgta gatttaaaaa cagaagaaga taaaagtcca 1680
gttcgtgact ggttatttcg acaacatcag aaagacttag atcgtcttgg attaggttta 1740
caaggtggta ttccaaatgg ttatttagtt ttagatttta atgtacgtga agcatttagt 1800
tcaagagcga gtttattagg tccaggtttt gtgttaattt ggattccagc attactacca 1860
gcacttcgtt tatcataa 1878

<210> 37

<211> 625
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 37

```
Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Ser Pro
 1               5                  10                  15
Ile Cys Ser Arg Ser Phe Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Gly Trp Ile
            20                  25                  30
Pro Arg Leu Gln Thr Gln Thr Thr Lys Thr Ser Gln Glu Ala Thr Leu
        35                  40                  45
Leu His Ala Val Asn Gly Ala Ala Asp Phe Ala Ser Leu Pro Thr Gly
    50                  55                  60
Leu Phe Leu Gly Leu Thr Cys Glu Glu Val Ser Asp Leu Ser Met Glu
65                  70                  75                  80
Gln Ala Lys Gly Leu Ala Met Ala Val Arg Gln Lys Asn Ile Thr Leu
                85                  90                  95
Arg Gly His Gln Leu Arg Cys Leu Ala Arg Arg Leu Pro Arg His Leu
            100                 105                 110
Thr Asp Glu Glu Leu Asn Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu
        115                 120                 125
Asn Pro Ala Met Phe Pro Gly Gln Gln Ala Cys Ala His Phe Phe Ser
    130                 135                 140
Leu Ile Ser Lys Ala Asn Val Asp Val Leu Pro Arg Arg Ser Leu Glu
145                 150                 155                 160
Arg Gln Arg Leu Leu Met Glu Ala Leu Lys Cys Gln Gly Val Tyr Gly
                165                 170                 175
Phe Gln Val Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys
            180                 185                 190
Asp Leu Pro Gly Lys Phe Val Ala Arg Ser Ser Glu Val Leu Leu Pro
        195                 200                 205
Trp Leu Ala Gly Cys Gln Gly Pro Leu Asp Gln Ser Gln Glu Lys Ala
    210                 215                 220
Val Arg Glu Val Leu Arg Ser Gly Arg Thr Gln Tyr Gly Pro Pro Ser
225                 230                 235                 240
Lys Trp Ser Val Ser Thr Leu Asp Ala Leu Gln Ser Leu Val Ala Val
                245                 250                 255
Leu Asp Glu Ser Ile Val Gln Ser Ile Pro Lys Asp Val Lys Ala Glu
            260                 265                 270
Trp Leu Gln His Ile Ser Arg Asp Pro Ser Arg Leu Gly Ser Lys Leu
        275                 280                 285
Thr Val Ile His Pro Arg Phe Arg Arg Asp Ala Glu Gln Lys Ala Cys
    290                 295                 300
Pro Pro Gly Lys Glu Pro Tyr Lys Val Asp Glu Asp Leu Ile Phe Tyr
305                 310                 315                 320
```

Gln Asn Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Gly Thr Met Leu Ala Arg
325 330 335
Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser
340 345 350
Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu
355 360 365
Ser Leu Ile Gln Gln Leu Gly His Phe Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu
370 375 380
Asp Ile His Gln Trp Asn Val Thr Ser Pro Asp Thr Val Lys Thr Leu
385 390 395 400
Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile Ala Leu
405 410 415
Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gly Gln Leu Asp Glu Asp Met Val
420 425 430
Lys Ala Leu Gly Asp Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro
435 440 445
Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser Val Met Trp Leu Val Gly Pro
450 455 460
Gln Gly Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly Leu Leu Tyr Gln
465 470 475 480
Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu
485 490 495
Lys Ile Lys Thr Phe Leu Gly Gly Ala Ser Val Lys Asp Leu Arg Ala
500 505 510
Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp Ile Ala Thr Phe Lys Arg Leu
515 520 525
Gln Val Asp Ser Leu Val Gly Leu Ser Val Ala Glu Val Gln Lys Leu
530 535 540
Leu Gly Pro Asn Ile Val Asp Leu Lys Thr Glu Glu Asp Lys Ser Pro
545 550 555 560
Val Arg Asp Trp Leu Phe Arg Gln His Gln Lys Asp Leu Asp Arg Leu
565 570 575
Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp
580 585 590
Phe Asn Val Arg Glu Ala Phe Ser Ser Arg Ala Ser Leu Leu Gly Pro
595 600 605
Gly Phe Val Leu Ile Trp Ile Pro Ala Leu Leu Pro Ala Leu Arg Leu
610 615 620
Ser
625

<210> 38
<211> 335
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 包括密碼子-最優化序列之部份表現卡匣

<400> 38
gtacctcctt tgattagtat attcctatct taaagttact tttatgtgga ggcattaaca 60
tttgttaatg acgtcaaaag gatagcaaga ctagaataaa gctataaagc aagcatataa 120
tattgcgttt catctttaga agcgaatttc gccaatatta taattatcaa aagagagggg 180
tggcaaacgg tatttggcat tattaggtta aaaaatgtag aaggagagtg aaacccatga 240
aaaaacgtaa agttttaatt ccattaatgg cattaagtac aattttagtt agtagtacag 300
gtaatttaga agttattcaa gcagaagttg gatcc 335

<210> 39
<211> 2778
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包括密碼子-最優化序列之部份表現卡匣

<400> 39
ggatcccaag gaaaagaagt cgtactttta gatttcgcag cagcaggagg agaattagga 60
tggttaactc atccatatgg caaaggctgg gatttaatgc aaaacattat gaacgatatg 120
ccaatttata tgtactccgt atgtaatgta atgagcggtg atcaagataa ctggttacgt 180
actaattggg tttatcgagg tgaagcagaa agaattttta ttgaacttaa atttactgtt 240
cgtgactgta atagttttcc aggaggggcc tcatcatgta aagaaacatt caatctatat 300
tatgccgaaa gcgatcttga ttatggtaca aatttccaaa aacgtttatt tactaaaatt 360
gatacaatag ctccagatga aatcactgta agttccgatt ttgaagctcg tcatgtaaaa 420
ttaaatgtag aagaacgcag tgttggtcca ctaactagaa aaggatttta tcttgctttc 480
caagatatag gggcttgcgt agcattgtta tccgttcgtg tatactataa aaaatgtcca 540
gaactacttc aaggcttagc acattttcca gaaacaattg cgggctcaga tgcgccatca 600
cttgcaactg tggcgggtac atgtgttgat catgctgttg tgccaccagg aggagaggaa 660
cctcgcatgc actgtgcagt agatggtgaa tggttagttc ctattggtca atgtttatgt 720
caagccggtt atgaaaaagt tgaagatgct tgtcaagcat gctccccagg ttttttaaa 780
ttcgaagcta gtgaatctcc atgcttagaa tgtccagaac acacattacc aagtccagaa 840
ggtgcaacgt cctgtgaatg cgaagaaggt ttttttcgtg ccccacaaga tccagcctca 900
atgccttgta cacgaccgcc ttctgctcca cactatttaa cagccgtagg aatgggcgct 960
aaagtagagt tacgatggac accgcctcaa gatagtggag gccgtgaaga tattgtttat 1020
tccgttactt gtgaacaatg ctggccagaa agtggtgaat gcgggccttg cgaagcatca 1080
gttagatatt cggaaccacc acacgggtta actagaacta gtgtcacagt atcagactta 1140
gaaccacaca tgaattatac atttacagtt gaggcacgta atggagtatc tggtttagtt 1200
acatcacgct cttttcgcac agcatcggtc tctattaacc aaactgaacc gccaaaagta 1260
agattagaag ggcgttcgac aacatcactt tccgtaagtt ggtcaattcc accaccacaa 1320
caatcacgcg tttggaaata tgaagttaca tacagaaaaa aaggagattc gaatagttat 1380

aatgttagac gtacagaagg attcagcgta accctagatg atttagctcc agatacaaca 1440
tatttagtac aggtgcaagc attaacacaa gaaggacaag gggcgggctc acgagttcat 1500
gaatttcaaa cattacatag aagaagaaag aatcaaagag cacgtcaatc accagaagat 1560
gtttattttt caaagtctga acagttgaaa ccattgaaaa cctatgttga tccacacaca 1620
tacgaagacc caaaccaagc ggtccttaaa tttacaaccg aaattcatcc atcatgcgta 1680
actcgtcaaa aagtgatcgg agctggagaa ttcggggagg tatacaaagg catgttgaaa 1740
acctcaagtg gtaaaaaaga agttcctgta gcaattatga ctcttaaagc agggtataca 1800
gaaaaacaac gagttgattt tttaggcgaa gctggtatca tgggacaatt ttcgcatcat 1860
aatataatta gacttgaagg tgttatctct aaatataaac caatgatgat tattactgaa 1920
tatatggaaa acggtgcttt agataaattt ctacgcgaaa aagatggtga attttctgtc 1980
cttcaattag ttggtatgtt acgtggcatc gctgcaggta tgaaatatct tgccaacatg 2040
aattatgtac atagagattt agcggctcga aatattcttg taaattccaa tttagtgtgc 2100
aaagttagtg atttcggttt aagtcgagta ttagaagatg atccagaagc aacctatact 2160
acttcggggg gtaaaattcc gatccgttgg acagcaccgg aagcaatttc atatcgtaaa 2220
tttacatctg caagcgatgt ttggagtttc ggaattgtga tgtgggaagt aatgacatac 2280
ggcgaacgtc catattggga attgtcaaac catgaagtaa tgaaagcgat taacgatggt 2340
ttcagattac caaccccaat ggactgtcca tcagcaattt atcaactaat gatgcaatgc 2400
tggcaacaag aaagagctag aagacctaaa tttgcagaca ttgtttcaat tttagacaaa 2460
ctaattcgtg cgccagatag tcttaaaacc ctagctgatt tcgatccacg cgtatcaatt 2520
cgtcttccat caacatcggg atctgaaggt gttcctttta gaacagtaag cgagtggtta 2580
gaatcgatta aaatgcaaca gtatacagaa cattttatgg cagccggata cacagcaatt 2640
gaaaaagttg tgcaaatgac aaatgatgat attaaacgta ttggagtgcg tctacctggc 2700
caccaaaaac gtattgctta ctccctttta ggtttaaaag accaagtaaa tacagtcgga 2760
attccaatat gagagctc 2778

<210> 40
<211> 1382
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含基因間區域之密碼子-最優化序列之次片段

<400> 40
acgcgtttgg aaatatgaag ttacatacag aaaaaaagga gattcgaata gttataatgt 60
tagacgtaca gaaggattca gcgtaaccct agatgattta gctccagata caacatattt 120
agtacaggtg caagcattaa cacaagaagg acaaggggcg ggctcacgag ttcatgaatt 180
tcaaacatta taaaaacaca gaacgaaaga aaaagtgagg tgaatgatat ggcatatgat 240
agtcgttttg atgaatgggt tcaaaaatta aaagaagaaa gttttcaaaa taatacattt 300
gatcgtcgta aatttattca aggtgcaggt aaaattgcag gtttaagttt aggtttaaca 360
attgcacaaa gtgttggtgc atttcataga agaagaaaga atcaaagagc acgtcaatca 420
ccagaagatg tttatttttc aaagtctgaa cagttgaaac cattgaaaac ctatgttgat 480
ccacacacat acgaagaccc aaaccaagcg gtccttaaat ttacaaccga aattcatcca 540
tcatgcgtaa ctcgtcaaaa agtgatcgga gctggagaat tcggggaggt atacaaaggc 600
atgttgaaaa cctcaagtgg taaaaaagaa gttcctgtag caattatgac tcttaaagca 660

gggtatacag aaaaacaacg agttgatttt ttaggcgaag ctggtatcat gggacaattt 720
tcgcatcata atataattag acttgaaggt gttatctcta aatataaacc aatgatgatt 780
attactgaat atatggaaaa cggtgcttta gataaatttc tacgcgaaaa agatggtgaa 840
ttttctgtcc ttcaattagt tggtatgtta cgtggcatcg ctgcaggtat gaaatatctt 900
gccaacatga attatgtaca tagagattta gcggctcgaa atattcttgt aaattccaat 960
ttagtgtgca aagttagtga tttcggttta agtcgagtat tagaagatga tccagaagca 1020
acctatacta cttcgggggg taaaattccg atccgttgga cagcaccgga agcaatttca 1080
tatcgtaaat ttacatctgc aagcgatgtt tggagtttcg gaattgtgat gtgggaagta 1140
atgacatacg gcgaacgtcc atattgggaa ttgtcaaacc atgaagtaat gaaagcgatt 1200
aacgatggtt tcagattacc aaccccaatg gactgtccat cagcaattta tcaactaatg 1260
atgcaatgct ggcaacaaga aagagctaga agacctaaat ttgcagacat tgtttcaatt 1320
ttagacaaac taattcgtgc gccagatagt cttaaaaccc tagctgattt cgatccacgc 1380
gt 1382

<210> 41
<211> 447
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合作構築
成

<400> 41
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aatatgaaaa aagctacgat tgcagctaca gccggcattg ccgtaacagc ttttgcagca 300
ccaactattg cctcagcctc tacagttgtt gtcgaagcag gagacacatt atggggaatc 360
gcacaatcaa aaggtacaac ggttgatgct attaaaaaag cgaataattt aacaacagat 420
aaaatcgtgc caggtcaaaa actgcag 447

<210> 42
<211> 1683
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 質體次片段

<400> 42
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240

aatatgaaaa aagctacgat tgcagctaca gccggcattg ccgtaacagc ttttgcagca 300
ccaactattg cctcagcctc tacagttgtt gtcgaagcag gagacacatt atggggaatc 360
gcacaatcaa aaggtacaac ggttgatgct attaaaaaag cgaataattt aacaacagat 420
aaaatcgtgc caggtcaaaa actgcaggta aataatgagg ttgctgctgc tgaaaaaaca 480
gagaaatctg ttagcgcaac ttggttaaac gtccgtactg gcgctggtgt tgataacagt 540
attattacgt ccatcaaagg tggaacaaaa gtaactgttg aaacaaccga atctaacggc 600
tggcacaaaa ttacttacaa cgatggaaaa actggtttcg ttaacggtaa atacttaact 660
gacaaagcag taagcactcc agttgcacca acacaagaag tgaaaaaaga aactactact 720
caacaagctg cacctgttgc agaaacaaaa actgaagtaa aacaaactac acaagcaact 780
acacctgcgc ctaaagtagc agaaacgaaa gaaactccag taatagatca aaatgctact 840
acacacgctg tcaaaagcgg tgacactatt tgggctttat ccgtaaaata cggtgtttct 900
gttcaagaca ttatgtcatg gaataattta tcttcttctt ctatttatgt aggtcaaaag 960
cttgctatta aacaaactgc taacacagct actccaaaag cagaagtgaa aacggaagct 1020
ccagcagctg aaaaacaagc agctccagta gttaaagaaa atactaacac aaatactgct 1080
actacagaga aaaaagaaac agcaacgcaa caacaaacag cacctaaagc accaacagaa 1140
gctgcaaaac cagctcctgc accatctaca aacacaaatg ctaataaaac gaatacaaat 1200
acaaatacaa acaatactaa tacaccatct aaaaatacta atacaaactc aaatactaat 1260
acgaatacaa actcaaatac gaatgctaat caaggttctt ccaacaataa cagcaattca 1320
agtgcaagtg ctattattgc tgaagctcaa aaacaccttg gaaaagctta ttcatggggt 1380
ggtaacggac caactacatt tgattgctct ggttacacta aatatgtatt tgctaaagcg 1440
ggtatctccc ttccacgtac atctggcgca caatatgcta gcactacaag aatttctgaa 1500
tctcaagcaa aacctggtga tttagtattc ttcgactatg gtagcggaat ttctcacatt 1560
ggtatttatg ttggtaatgg tcaaatgatt aacgcgcaag acaatggcgt taaatacgat 1620
aacatccacg gctctggctg gggtaaatat ctagttggct tcggtcgcgt ataataagga 1680
tcc 1683

<210> 43
<211> 3552
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 質體次片段

<400> 43
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aatatgaaaa aagctacgat tgcagctaca gccggcattg ccgtaacagc ttttgcagca 300
ccaactattg cctcagcctc tacagttgtt gtcgaagcag gagacacatt atggggaatc 360
gcacaatcaa aaggtacaac ggttgatgct attaaaaaag cgaataattt aacaacagat 420
aaaatcgtgc caggtcaaaa actgcaggca ttgccaactg cacgtccatt actaggtagt 480
tgcggtacac cagcactagg ttctttatta tttttgttat tttctctagg ttgggttcaa 540
ccaagtcgta cattagcagg tgaaacaggt caagaagcag caccacttga cggtgtatta 600

acgaatccac caaatatatc aagtttaagt ccacgtcaat tattaggttt tccatgtgca 660
gaagtttcag gtttaagtac agaacgtgtc cgtgagttag cagttgcatt agcacaaaaa 720
aacgttaaat tatctacaga acagttacgt tgtttagccc atagattaag cgaaccacca 780
gaagacttag atgcacttcc tttagacctt cttttattct taaatccaga tgcattttca 840
ggaccacaag catgtacacg tttttttagt cgaattacaa aagccaatgt tgatttatta 900
cctcgtgggg ctcctgaaag acaacgttta ttacctgctg cattagcatg ctggggtgtt 960
cgcggtagct tattaagtga agccgatgtt cgtgctttag ggggtttagc atgtgattta 1020
cctggtcgtt tcgttgcaga atcagcagaa gtgttattac cgagattagt ttcatgccca 1080
ggacctttag atcaagatca acaagaggca gctagagcag ctcttcaagg aggaggccca 1140
ccatatggcc caccaagtac atggagtgtt tctacaatgg atgcgttaag aggtttatta 1200
ccggttttag gacaaccaat tattcgtagt attccacaag gcattgtagc agcatggcgt 1260
caacgtagtt ctcgtgatcc gtcttggcga caaccagaac gtacaattct acgtccaaga 1320
tttcgtagag aagtagaaaa aacggcgtgt cctagtggca aaaaagcacg tgaaattgat 1380
gaaagtttaa ttttttataa aaaatgggaa ttagaagcat gtgtcgatgc agcattacta 1440
gctacacaaa tggatcgtgt taatgctatt ccattcacat atgaacaatt agatgtttta 1500
aagcataaat tagacgaatt atatccacaa ggttatccag aatcagttat tcaacattta 1560
ggttacttat ttttaaaaat gagtccagaa gacatacgca aatggaatgt tacaagttta 1620
gaaacattaa aagcgctttt agaagttaac aaaggtcatg aaatgagtcc acaagttgct 1680
acgttaattg atagattcgt taaaggccgt ggtcaattag ataaagatac tttagataca 1740
ttaacagcat tttatcctgg ctacttatgc agtttatcac cagaagaatt aagttccgtt 1800
ccaccgagta gtatctgggc agttcgtccg caagatttag atacatgcga cccacgtcaa 1860
ttagatgttt tatatccaaa agcaagatta gctttccaaa atatgaacgg tagtgaatat 1920
ttcgtaaaaa ttcaatcctt tttaggtggt gcaccaactg aagatctaaa agcattaagc 1980
caacaaaatg taagtatgga tttagctacg tttatgaaat tacgtacaga tgcagttcta 2040
ccattaacag ttgcagaagt tcaaaaatta ttaggtccac acgtagaagg attaaaagca 2100
gaagaacgtc accgtccagt tcgcgattgg attttacgtc aacgtcaaga tgatttagat 2160
acattaggtt taggtttaca aggcggtatt ccgaatggat atttagtgtt agatttatct 2220
gttcaagaag cattaagtgg tacaccgtgt ttattaggtc caggtccagt tttaacagtg 2280
ttagcattat tattagccag tacattagct ctgcaggtaa ataatgaggt tgctgctgct 2340
gaaaaaacag agaaatctgt tagcgcaact tggttaaacg tccgtactgg cgctggtgtt 2400
gataacagta ttattacgtc catcaaaggt ggaacaaaag taactgttga aacaaccgaa 2460
tctaacggct ggcacaaaat tacttacaac gatggaaaaa ctggtttcgt taacggtaaa 2520
tacttaactg acaaagcagt aagcactcca gttgcaccaa cacaagaagt gaaaaaagaa 2580
actactactc aacaagctgc acctgttgca gaaacaaaaa ctgaagtaaa acaaactaca 2640
caagcaacta cacctgcgcc taaagtagca gaaacgaaag aaactccagt aatagatcaa 2700
aatgctacta cacacgctgt caaaagcggt gacactattt gggctttatc cgtaaaatac 2760
ggtgtttctg ttcaagacat tatgtcatgg aataatttat cttcttcttc tatttatgta 2820
ggtcaaaagc ttgctattaa acaaactgct aacacagcta ctccaaaagc agaagtgaaa 2880
acggaagctc cagcagctga aaaacaagca gctccagtag ttaaagaaaa tactaacaca 2940
aatactgcta ctacagagaa aaaagaaaca gcaacgcaac aacaaacagc acctaaagca 3000
ccaacagaag ctgcaaaacc agctcctgca ccatctacaa acacaaatgc taataaaacg 3060
aatacaaata caaatacaaa caatactaat acaccatcta aaaatactaa tacaaactca 3120
aatactaata cgaatacaaa ctcaaatacg aatgctaatc aaggttcttc caacaataac 3180
agcaattcaa gtgcaagtgc tattattgct gaagctcaaa aacaccttgg aaaagcttat 3240
tcatggggtg gtaacggacc aactacattt gattgctctg gttacactaa atatgtattt 3300

gctaaagcgg gtatctccct tccacgtaca tctggcgcac aatatgctag cactacaaga 3360
atttctgaat ctcaagcaaa acctggtgat ttagtattct tcgactatgg tagcggaatt 3420
tctcacattg gtatttatgt tggtaatggt caaatgatta acgcgcaaga caatggcgtt 3480
aaatacgata acatccacgg ctctggctgg ggtaaatatc tagttggctt cggtcgcgta 3540
taataaggat cc 3552

<210> 44
<211> 3327
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 質體次片段

<400> 44
ggtacctcct ttgattagta tattcctatc ttaaagttac ttttatgtgg aggcattaac 60
atttgttaat gacgtcaaaa ggatagcaag actagaataa agctataaag caagcatata 120
atattgcgtt tcatctttag aagcgaattt cgccaatatt ataattatca aaagagaggg 180
gtggcaaacg gtatttggca ttattaggtt aaaaaatgta gaaggagagt gaaacccatg 240
aatatgaaaa aagctacgat tgcagctaca gccggcattg ccgtaacagc ttttgcagca 300
ccaactattg cctcagcctc tacagttgtt gtcgaagcag gagacacatt atggggaatc 360
gcacaatcaa aaggtacaac ggttgatgct attaaaaaag cgaataattt aacaacagat 420
aaaatcgtgc caggtcaaaa actgcagcgt acattagcag gtgaaacagg tcaagaagca 480
gcaccacttg acggtgtatt aacgaatcca ccaaatatat caagtttaag tccacgtcaa 540
ttattaggtt ttccatgtgc agaagtttca ggtttaagta cagaacgtgt ccgtgagtta 600
gcagttgcat tagcacaaaa aaacgttaaa ttatctacag aacagttacg ttgtttagcc 660
catagattaa gcgaaccacc agaagactta gatgcacttc ctttagacct tcttttattc 720
ttaaatccag atgcattttc aggaccacaa gcatgtacac gttttttag tcgaattaca 780
aaagccaatg ttgatttatt acctcgtggg gctcctgaaa gacaacgttt attacctgct 840
gcattagcat gctggggtgt tcgcggtagc ttattaagtg aagccgatgt tcgtgcttta 900
gggggtttag catgtgattt acctggtcgt ttcgttgcag aatcagcaga agtgttatta 960
ccgagattag tttcatgccc aggaccttta gatcaagatc aacaagaggc agctagagca 1020
gctcttcaag gaggaggccc accatatggc ccaccaagta catggagtgt ttctacaatg 1080
gatgcgttaa gaggtttatt accggtttta ggacaaccaa ttattcgtag tattccacaa 1140
ggcattgtag cagcatggcg tcaacgtagt tctcgtgatc cgtcttggcg acaaccagaa 1200
cgtacaattc tacgtccaag atttcgtaga gaagtagaaa aaacggcgtg tcctagtggc 1260
aaaaaagcac gtgaaattga tgaaagttta atttttata aaaaatggga attagaagca 1320
tgtgtcgatg cagcattact agctacacaa atggatcgtg ttaatgctat tccattcaca 1380
tatgaacaat tagatgtttt aaagcataaa ttagacgaat tatatccaca aggttatcca 1440
gaatcagtta ttcaacattt aggttactta tttttaaaaa tgagtccaga agacatacgc 1500
aaatggaatg ttacaagttt agaaacatta aaagcgcttt tagaagttaa caaaggtcat 1560
gaaatgagtc cacaagttgc tacgttaatt gatagattcg ttaaaggccg tggtcaatta 1620
gataaagata ctttagatac attaacagca ttttatcctg gctacttatg cagtttatca 1680
ccagaagaat taagttccgt tccaccgagt agtatctggg cagttcgtcc gcaagattta 1740
gatacatgcg acccacgtca attagatgtt ttatatccaa aagcaagatt agctttccaa 1800

aatatgaacg gtagtgaata tttcgtaaaa attcaatcct ttttaggtgg tgcaccaact 1860
gaagatctaa aagcattaag ccaacaaaat gtaagtatgg atttagctac gtttatgaaa 1920
ttacgtacag atgcagttct accattaaca gttgcagaag ttcaaaaatt attaggtcca 1980
cacgtagaag gattaaaagc agaagaacgt caccgtccag ttcgcgattg gattttacgt 2040
caacgtcaag atgatttaga tacattaggt ttaggtttac aaggcctgca ggtaaataat 2100
gaggttgctg ctgctgaaaa aacagagaaa tctgttagcg caacttggtt aaacgtccgt 2160
actggcgctg gtgttgataa cagtattatt acgtccatca aaggtggaac aaaagtaact 2220
gttgaaacaa ccgaatctaa cggctggcac aaaattactt acaacgatgg aaaaactggt 2280
ttcgttaacg gtaaatactt aactgacaaa gcagtaagca ctccagttgc accaacacaa 2340
gaagtgaaaa aagaaactac tactcaacaa gctgcacctg ttgcagaaac aaaaactgaa 2400
gtaaaacaaa ctacacaagc aactacacct gcgcctaaag tagcagaaac gaaagaaact 2460
ccagtaatag atcaaaatgc tactacacac gctgtcaaaa gcggtgacac tatttgggct 2520
ttatccgtaa aatacggtgt ttctgttcaa gacattatgt catggaataa tttatcttct 2580
tcttctattt atgtaggtca aaagcttgct attaaacaaa ctgctaacac agctactcca 2640
aaagcagaag tgaaaacgga agctccagca gctgaaaaac aagcagctcc agtagttaaa 2700
gaaaatacta acacaaatac tgctactaca gagaaaaaag aaacagcaac gcaacaacaa 2760
acagcaccta aagcaccaac agaagctgca aaaccagctc ctgcaccatc tacaaacaca 2820
aatgctaata aaacgaatac aaatacaaat acaaacaata ctaatacacc atctaaaaat 2880
actaatacaa actcaaatac taatacgaat acaaactcaa atacgaatgc taatcaaggt 2940
tcttccaaca ataacagcaa ttcaagtgca agtgctatta ttgctgaagc tcaaaaacac 3000
cttggaaaag cttattcatg gggtggtaac ggaccaacta catttgattg ctctggttac 3060
actaaatatg tatttgctaa agcgggtatc tcccttccac gtacatctgg cgcacaatat 3120
gctagcacta caagaatttc tgaatctcaa gcaaaacctg gtgatttagt attcttcgac 3180
tatggtagcg gaatttctca cattggtatt tatgttggta atggtcaaat gattaacgcg 3240
caagacaatg gcgttaaata cgataacatc cacggctctg gctggggtaa atatctagtt 3300
ggcttcggtc gcgtataata aggatcc 3327

<210> 45
<211> 26
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 45
Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
1 5 10 15
Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp
20 25

<210> 46
<211> 29
<212> PRT
<213> 乳酸乳球菌

<400> 46

Met Lys Lys Lys Ile Ile Ser Ala Ile Leu Met Ser Thr Val Ile Leu
1 5 10 15
Ser Ala Ala Ala Pro Leu Ser Gly Val Tyr Ala Asp Thr
20 25

<210> 47
<211> 31
<212> PRT
<213> 炭疽桿菌

<400> 47
Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile
1 5 10 15
Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val
20 25 30

<210> 48
<211> 29
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 48
Met Asn Met Lys Lys Ala Thr Ile Ala Ala Thr Ala Gly Ile Ala Val
1 5 10 15
Thr Ala Phe Ala Ala Pro Thr Ile Ala Ser Ala Ser Thr
20 25

<210> 49
<211> 54
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 49
Met Gln Lys Thr Arg Lys Glu Arg Ile Leu Glu Ala Leu Gln Glu Glu
1 5 10 15
Lys Lys Asn Lys Lys Ser Lys Lys Phe Lys Thr Gly Ala Thr Ile Ala
20 25 30
Gly Val Thr Ala Ile Ala Thr Ser Ile Thr Val Pro Gly Ile Glu Val
35 40 45
Ile Val Ser Ala Asp Glu
50

<210> 50
<211> 28
<212> PRT
<213>炭疽桿菌

<400> 50
Met Lys Lys Leu Lys Met Ala Ser Cys Ala Leu Val Ala Gly Leu Met
 1   5   10   15
Phe Ser Gly Leu Thr Pro Asn Ala Phe Ala Glu Asp
            20   25

<210> 51
<211> 31
<212> PRT
<213> 金黃色葡萄球菌

<400> 51
Met Ala Lys Lys Phe Asn Tyr Lys Leu Pro Ser Met Val Ala Leu Thr
 1   5   10   15
Leu Val Gly Ser Ala Val Thr Ala His Gln Val Gln Ala Ala Glu
            20   25   30

<210> 52
<211> 59
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 52
Met Thr Asp Lys Lys Ser Glu Asn Gln Thr Glu Lys Thr Glu Thr Lys
 1   5   10   15
Glu Asn Lys Gly Met Thr Arg Arg Glu Met Leu Lys Leu Ser Ala Val
            20   25   30
Ala Gly Thr Gly Ile Ala Val Gly Ala Thr Gly Leu Gly Thr Ile Leu
        35   40   45
Asn Val Val Asp Gln Val Asp Lys Ala Leu Thr
    50   55

<210> 53
<211> 53
<212> PRT
<213> 枯草桿菌

<400> 53
Met Ala Tyr Asp Ser Arg Phe Asp Glu Trp Val Gln Lys Leu Lys Glu
 1   5   10   15
Glu Ser Phe Gln Asn Asn Thr Phe Asp Arg Arg Lys Phe Ile Gln Gly
            20   25   30
Ala Gly Lys Ile Ala Gly Leu Ser Leu Gly Leu Thr Ile Ala Gln Ser
        35   40   45
Val Gly Ala Phe Gly
    50

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 54
Thr Glu Ala Lys Asp
 1   5

<210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> 乳酸乳球菌

<400> 55
Val Tyr Ala Asp Thr
 1   5

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> 炭疽桿菌

<400> 56
Ile Gln Ala Glu Val
 1   5

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 57
Ala Ser Ala Ser Thr
1 5

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 58
Val Ser Ala Asp Glu
1 5

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> 炭疽桿菌

<400> 59
Ala Phe Ala Glu Asp
1 5

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> 金黃色葡萄球菌

<400> 60
Val Gln Ala Ala Glu
1 5

<210> 61

<211> 5
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 61
Asp Lys Ala Leu Thr
1 5

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> 枯草桿菌

<400> 62
Val Gly Ala Phe Gly
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 現代智人

<400> 63
Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> 現代智人

<400> 64
Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 現代智人

<400> 65
Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 現代智人

<400> 66
Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 現代智人

<400> 67
Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 現代智人

<400> 68
Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 現代智人

<400> 69
Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe
1 5

<210> 70
<211> 19
<212> DNA
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 70
aaggagagtg aaacccatg 19

<210> 71
<211> 37
<212> DNA
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 71
taaaaacaca gaacgaaaga aaaagtgagg tgaatga 37

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 72
Ser Pro Ser Tyr Val Tyr His Gln Phe
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 改變的抗原決定位

<400> 73
Ser Pro Ser Tyr Ala Tyr His Gln Phe
1 5

<210> 74
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 74
ctctggtacc tcctttgatt agtatattc 29

<210> 75
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 75
caatggatcc ctcgagatca taatttactt catccc 36

<210> 76
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 76
atttctcgag tccatggggg gttctcatca tc 32

<210> 77
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 77
ggtgctcgag tgcggccgca agctt 25

<210> 78
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 78
cgattcccct agttatgttt accaccaatt tgctgca 37

<210> 79
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 79
gcaaattggt ggtaaacata actaggggaa t 31

<210> 80
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 改變的抗原決定位之編碼序列

<400> 80
agtccaagtt atgcatatca tcaattt 27

<210> 81
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 81
cgatagtcca agttatgcat atcatcaatt tgc 33

<210> 82
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 82
gtcgcaaatt gatgatatgc ataacttgga ctat 34

<210> 83
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 83
cccttgggga tccttaatta tacg 24

<210> 84
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 84
ctctggatcc atccgcgtgt ttcttttcg 29

<210> 85
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致性序列

<220>
<221> misc_feature
<222> 1, 9, 10, 11, 12, 13
<223> n = A,U,C or G

<400> 85
naggaggunn nnnaug 16

<210> 86
<211> 87
<212> DNA

<213> 乳酸乳球菌

<400> 86
atgaaaaaaa agattatctc agctatttta atgtctacag tgatactttc tgctgcagcc 60
ccgttgtcag gtgtttacgc tgacaca 87

<210> 87
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密碼子-最優化序列

<400> 87
atgaaaaaaa aaattattag tgcaatttta atgagtacag ttattttaag tgcagcagca 60
ccattaagtg gtgtttatgc agataca 87

<210> 88
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 88
aaggagagtg aaacccatga atatgaaaaa agcaac 36

<210> 89
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 89
gtgtgatgga tatctgcaga attc 24

<210> 90
<211> 87
<212> DNA
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 90
atgaatatga aaaaagcaac tatcgcggct acagctggga ttgcggtaac agcatttgct 60
gcgccaacaa tcgcatccgc aagcact 87

<210> 91
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密碼子-最優化序列

<400> 91
atgaatatga aaaaagcaac aattgcagca acagcaggta ttgcagttac agcatttgca 60
gcaccaacaa ttgcaagtgc aagtaca 87

<210> 92
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 92
gacgtcaata cgactcacta tag 23

<210> 93
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 93
ctttttcat attcatgggt ttcactctcc ttctac 36

<210> 94
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 94
gtcaaaacat acgctcttat c 21

<210> 95
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 95
acataatcag tccaaagtag atgc 24

<210> 96
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密碼子-最優化序列

<400> 96
gattataaag atgatgatga taaa 24

<210> 97
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗原決定位標籤

<400> 97
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 98
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 密碼子-最優化序列

<400> 98
gaacaaaaat taattagtga agaagattta 30

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> 現代智人

<400> 99
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 100
Asn Glu Lys Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn Val Ser
1 5 10

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 101
Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 102
Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile
1 5

<210> 103
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 103
gttaagtttc atgtggacgg caaag 25

<210> 104
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 104
aggtcttttt cagttaacta tcctctcctt gattctagtt at 42

<210> 105
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 105
caaggagagg atagttaact gaaaaagacc taaaaaagaa ggc 43

<210> 106
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 106
tcccctgttc ctataattgt tagctc 26

<210> 107

<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 107
gtggacggca aagaaacaac caaag 25

<210> 108
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 108
gttcctataa ttgttagctc attttttc 29

<210> 109
<211> 59
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 109
Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
1 5 10 15
Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
20 25 30
Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
35 40 45
Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp
50 55

<210> 110
<211> 177
<212> DNA
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 110
atgaaaaaaa taatgctagt ttttattaca cttatattag ttagtctacc aattgcgcaa 60
caaactgaag caaaggatgc atctgcattc aataaagaaa attcaatttc atccatggca 120

ccaccagcat ctccgcctgc aagtcctaag acgccaatcg aaaagaaaca cgcggat 177

<210> 111
<211> 93
<212> DNA
<213> 炭疽桿菌

<400> 111
atgaaaaaac gaaaagtgtt aataccatta atggcattgt ctacgatatt agtttcaagc 60
acaggtaatt tagaggtgat tcaggcagaa gtt 93

<210> 112
<211> 156
<212> DNA
<213> 枯草桿菌

<400> 112
atggcatacg acagtcgttt tgatgaatgg gtacagaaac tgaaagagga aagctttcaa 60
aacaatacgt ttgaccgccg caaatttatt caaggagcgg ggaagattgc aggactttct 120
cttggattaa cgattgccca gtcggttggg gccttt 156

<210> 113
<211> 177
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密碼子-最優化序列

<400> 113
atgaaaaaaa ttatgttagt ttttattaca ttaattttag ttagtttacc aattgcacaa 60
caaacagaag caaaagatgc aagtgcattt aataaagaaa atagtattag tagtatggca 120
ccaccagcaa gtccaccagc aagtccaaaa acaccaattg aaaaaaaaca tgcagat 177

<210> 114
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密碼子-最優化序列

<400> 114
atgaaaaaac gtaaagtttt aattccatta atggcattaa gtacaatttt agttagtagt 60
acaggtaatt tagaagttat tcaagcagaa gtt 93

<210> 115
<211> 156
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密碼子-最優化序列

<400> 115
atggcatatg atagtcgttt tgatgaatgg gttcaaaaat taaaagaaga aagttttcaa 60
aataatacat ttgatcgtcg taaatttatt caaggtgcag gtaaaattgc aggtttaagt 120
ttaggtttaa caattgcaca aagtgttggt gcattt 156

<210> 116
<211> 70
<212> PRT
<213> 單核增多性李斯特菌

<400> 116
Met Asn Met Lys Lys Ala Thr Ile Ala Ala Thr Ala Gly Ile Ala Val
 1   5   10   15
Thr Ala Phe Ala Ala Pro Thr Ile Ala Ser Ala Ser Thr Val Val Val
            20   25   30
Glu Ala Gly Asp Thr Leu Trp Gly Ile Ala Gln Ser Lys Gly Thr Thr
        35   40   45
Val Asp Ala Ile Lys Lys Ala Asn Asn Leu Thr Thr Asp Lys Ile Val
    50   55   60
Pro Gly Gln Lys Leu Gln
65   70

<210> 117
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 117
cgcctgcagg taaataatga ggttgctg 28

<210> 118
<211> 29

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 118
cgcggatcct taattatacg cgaccgaag 29

<210> 119
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 119
aaactgcagg cattgccaac tgcacgtcc 29

<210> 120
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 120
aaactgcaga gctaatgtac tggctaataa taatgctaac 40

<210> 121
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 121
cgcctgcagc gtacattagc aggtgaaaca gg 32

<210> 122
<211> 36
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 122
cgcctgcagg ccttgtaaac ctaaacctaa tgtatc 36

<210> 123
<211> 8
<212> PRT
<213> 紅原雞

<400> 123
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 124
<211> 8
<212> PRT
<213> 簡單疱疹病毒

<400> 124
Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu
1 5

<210> 125
<211> 17
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致性序列

<220>
<221> 其他類型的特徵
<222> 1, 9, 10, 11, 12, 13, 14
<223> n = A,U,C or G

<400> 125
naggaggunn nnnnaug 17

<210> 126

<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致性序列

<220>
<221> 其他類型的特徵
<222> 1, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
<223> n = A,U,C or G

<400> 126
naggaggunn nnnnnaug 18

<210> 127
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致性序列

<220>
<221> 其他類型的特徵
<222> 1, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
<223> n = A,U,C or G

<400> 127
naggaggunn nnnnnnaug 19

<210> 128
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致性序列

<220>
<221> 其他類型的特徵
<222> 1, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
<223> n = A,U,C or G

<400> 128

naggaggunn nnnnnnnaug 20

<210> 129
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致性序列

<220>
<221> 其他類型的特徵
<222> 1, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
<223> n = A,U,C or G

<400> 129
naggaggunn nnnnnnnnau g 21

五、中文發明摘要：

本發明係提供重組的核酸分子、表現卡匣，以及用來在細菌中表現多肽的載體，包括異種多肽，如抗原。一些重組的核酸分子、表現卡匣和載體，包括編碼該多肽及/或信號肽的密碼子-最優化序列。一些重組的核酸分子、表現卡匣和表現載體包括編碼用來分泌多肽之非-李斯特菌屬(Listerial)及/或非-secA1信號肽的序列。本發明亦提供包括該核酸分子、表現卡匣和表現載體的細菌，以及包括該細菌的組合物，如疫苗。亦提供製造及使用該細菌、重組之核酸分子和表現卡匣的方法。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種重組的核酸分子，包括：

(a)編碼對細菌而言為天然之信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在該細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；以及

(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，

其中該重組核酸分子編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

2. 如請求項1之重組核酸分子，其中該細菌為李斯特菌屬細菌。

3. 如請求項1之重組核酸分子，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括選自與腫瘤有關之抗原、衍生自與腫瘤有關之抗原的多肽、傳染病抗原和衍生自傳染病抗原的多肽所組成之群的抗原。

4. 如請求項1之重組核酸分子，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽對信號肽而言是異種的，對細菌或兩者而言是外來的。

5. 如請求項1之重組核酸分子，其中該信號肽是得自單核細胞增多性李斯特菌的LLO信號肽，或是得自單核細胞增多性李斯特菌的p60信號肽。

6. 一種包括如請求項1之重組核酸分子的表現卡匣，更進一步包括以可操作之方式與該重組核酸分子之第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因。

7. 一種包括如請求項1之重組核酸分子的重組細菌，其中為了在該重組細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化。

8. 一種如請求項7之重組細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應之醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼的多肽包括該抗原。

9. 一種包括重組核酸分子之重組李斯特菌屬細菌，其中該重組核酸分子包括：

(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬細菌中表現，將該第一個多核苷酸密碼子-最優化；以及

(b)編碼多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，

其中該重組核酸分子編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

10. 如請求項9之重組李斯特菌屬細菌，其包括包括重組核酸分子的表現卡匣，其中該表現卡匣更包括以可操作之方式與該重組核酸分子之第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。

11. 如請求項9之重組李斯特菌屬細菌，其中該李斯特菌屬細菌屬於物種單核細胞增多性李斯特菌。

12. 如請求項9之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽，包括選自與腫瘤有關之抗原、衍生自

與腫瘤有關之抗原的多肽、傳染病抗原和衍生自傳染病抗原的多肽所組成之群的抗原。

13. 如請求項12之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼的多肽，包括選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原，或包括衍生自選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原的多肽。

14. 如請求項13之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼的多肽，包括間皮素或其抗原性片段或抗原性變體，或包括NY-ESO-1或其抗原性片段或抗原性變體。

15. 如請求項14之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼的多肽包括刪除其信號肽和GPI交聯劑功能部位的人類間皮素。

16. 如請求項9之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼的多肽對該信號肽而言是異種的。

17. 如請求項9之重組李斯特菌屬細菌，其中該信號肽對該李斯特菌屬細菌而言是外來的。

18. 如請求項9之重組李斯特菌屬細菌，其中該信號肽對該李斯特菌屬細菌而言是天然的。

19. 如請求項9之重組李斯特菌屬細菌，其中該信號肽是選自得自單核細胞增多性李斯特菌之LLO信號肽、得自乳酸乳球菌之Usp45信號肽、得自炭疽桿菌之保護性抗原信號肽、得自單核細胞增多性李斯特菌之p60信號肽和得自枯草桿菌之phoD信號肽所組成之群的信號肽。

20. 如請求項9之重組李斯特菌屬細菌，為了細胞-對-細胞傳播、進入非-吞噬細胞內或增殖，將其減毒。

21. 如請求項9之重組李斯特菌屬細菌，其在ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者上是有缺陷的。

22. 如請求項9之重組李斯特菌屬細菌，其中已經藉著與以核酸為標的之化合物反應，修改該重組細菌的核酸。

23. 一種包括如請求項9之重組李斯特菌屬細菌的免疫原組合物或疫苗。

24. 一種如請求項9之重組李斯特菌屬細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

25. 一種如請求項9之重組李斯特菌屬細菌在製造在宿主中預防或治療疾病之醫藥品上的用途。

26. 一種重組的核酸分子，包括：

(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸；以及

(b)編碼對該信號肽而言為異種之多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，且

其中該重組核酸分子編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

27. 如請求項26之重組核酸分子，其中為了在細菌中表現，將第一個多核苷酸、第二個多核苷酸或第一和第二個多核苷酸兩者密碼子-最優化。

28. 如請求項26之重組核酸分子，其中該信號肽是李斯特菌屬信號肽。

29. 如請求項26之重組核酸分子，其中該信號肽是secA2信號肽或Tat信號肽。

30. 如請求項26之重組核酸分子，其中該信號肽是得自單核細胞增多性李斯特菌之p60信號肽或得自枯草桿菌之phoD信號肽。

31. 如請求項26之重組核酸分子，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括選自與腫瘤有關之抗原、衍生自與腫瘤有關之抗原的多肽、傳染病抗原和衍生自傳染病抗原之多肽所組成之群的抗原。

32. 一種包括如請求項26之重組核酸分子的表現卡匣，更包括以可操作之方式與該重組核酸分子之第一和第二個多核苷酸連接的啟動基因。

33. 一種包括如請求項26之重組核酸分子的重組細菌。

34. 如請求項33之重組細菌，其為李斯特菌屬細菌。

35. 一種如請求項33之重組細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

36. 一種重組李斯特菌屬細菌，其包括重組核酸分子，其中該核酸分子包括：

(a)編碼非-secA1細菌信號肽的第一個多核苷酸；以及

(b)編碼對該信號肽而言為異種的，或對該細菌或兩者而言為外來之多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，

其中該重組核酸分子編碼包括該信號肽和該多肽的融合蛋白。

37. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其包括包括重組核酸分子之表現卡匣，其中該表現卡匣更包括以可操作之方式與該重組核酸分子之第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。

38. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其中為了在李斯特菌屬細菌中表現，將該第一個多核苷酸、第二個多核苷酸或第一和第二個多核苷酸兩者密碼子-最優化。

39. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其中該細菌屬於物種單核細胞增多性李斯特菌。

40. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其中該非-secA1信號肽是非-李斯特菌屬信號肽。

41. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其中非-secA1信號肽是李斯特菌屬信號肽。

42. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其中該信號肽是secA2信號肽。

43. 如請求項42之重組李斯特菌屬，其中該重組核酸分子更包括：

(c)以與該第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼secA2自溶素或其片段的第三個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸係位在第三個多核苷酸內，或在第一和第三個多核苷酸之間。

44. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其中該信號肽是Tat信號肽。

45. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其中該信號肽是得自枯草桿菌之phoD信號肽或是得自單核細胞增多性李斯特菌之p60信號肽。

46. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括選自與腫瘤有關之抗原、衍生自與腫瘤有關之抗原的多肽、傳染病抗原和衍生自傳染病抗原的多肽所組成之群的抗原。

47. 如請求項46之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原，或包括選自衍生自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原的多肽。

48. 如請求項47之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。

49. 如請求項48之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括刪除其信號肽和GPI錨定的人類間皮素。

50. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，為了細胞-對-細胞傳播、進入非-吞噬細胞內或增殖，將其減毒。

51. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其在ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者上是有缺陷的。

52. 如請求項36之重組李斯特菌屬細菌，其中已經藉著與以核酸為標的之化合物反應，修改該重組細菌的核酸。

53. 一種包括如請求項36之重組李斯特菌屬細菌的免疫原組合物或疫苗。

54. 一種如請求項36之重組李斯特菌屬細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

55. 一種如請求項36之重組李斯特菌屬細菌在製造在宿主中預防或治療狀況之醫藥品上的用途。

56. 一種重組的李斯特菌屬細菌，其包括重組核酸分子，其中該重組核酸分子包括：

(a)編碼非-李斯特菌屬信號肽的第一個多核苷酸；以及

(b)以與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，編碼多肽的第二個多核苷酸，

其中該重組核酸分子編碼包括該非-李斯特菌屬信號肽和該多肽的融合蛋白。

57. 如請求項56之重組李斯特菌屬細菌，其包括包括重組核酸分子的表現卡匣，其中該表現卡匣更包括以可操作之方式與該重組核酸分子之第一和第二個多核苷酸兩者連接的啟動基因。

58. 如請求項56之重組李斯特菌屬細菌，其中為了在李斯特菌屬細菌中表現，將該第一個多核苷酸、第二個多核苷酸或第一和第二個多核苷酸兩者密碼子-最優化。

59. 如請求項56之重組李斯特菌屬細菌，其中該細菌為單核細胞增多性李斯特菌。

60. 如請求項56之重組李斯特菌屬細菌，其中該信號肽是細菌的。

61. 如請求項60之重組李斯特菌屬細菌，其中該信號肽係衍生自革蘭氏陽性細菌。

62. 如請求項61之重組李斯特菌屬細菌，其中該信號肽係衍生自屬於芽胞桿菌屬、葡萄球菌屬或乳球菌屬的細菌。

63. 如請求項62之重組李斯特菌屬細菌，其中該信號肽是選自得自乳酸乳球菌之Usp45信號肽、得自炭疽桿菌之保護性抗原信號肽和得自枯草桿菌之phoD信號肽所組成之群的信號肽。

64. 如請求項56之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括與腫瘤有關之抗原、衍生自與腫

瘤有關之抗原的多肽、傳染病抗原和衍生自傳染病抗原的多肽選自所組成之群的抗原。

65. 如請求項64之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原，或包括衍生自選自K-Ras、H-Ras、N-Ras、12-K-Ras、間皮素、PSCA、NY-ESO-1、WT-1、生存蛋白質、gp100、PAP、蛋白酶3、SPAS-1、SP-17、PAGE-4、TARP和CEA所組成之群的抗原的多肽。

66. 如請求項65之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括間皮素，或其抗原性片段或抗原性變體。

67. 如請求項66之重組李斯特菌屬細菌，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括刪除其信號肽和GPI錨定的人類間皮素。

68. 如請求項56之重組李斯特菌屬細菌，為了細胞-對-細胞傳播、進入非-吞噬細胞內或增殖，將其減毒。

69. 如請求項56之重組李斯特菌屬細菌，其在ActA、表面蛋白B或ActA和表面蛋白B兩者上是有缺陷的。

70. 如請求項56之重組李斯特菌屬細菌，其中已經藉著與以核酸為標的之化合物反應，修改該重組細菌的核酸。

71. 一種包括如請求項56之重組李斯特菌屬細菌的免疫原組合物或疫苗。

72. 一種如請求項56之重組李斯特菌屬細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

73. 一種如請求項56之重組李斯特菌屬細菌在製造在宿主中預防或治療疾病之醫藥品上的用途。

74. 一種重組的核酸分子，其包括：

(a)編碼細菌自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的第一個多核苷酸；以及

(b)編碼對該細菌自溶素而言為異種之多肽的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，

其中該重組核酸分子編碼包括由該第二個多核苷酸編碼之多肽和該自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體的蛋白質嵌合體，其中在該蛋白質嵌合體中，該多肽與自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體融合，或位在該自溶素，或其具有催化活性之片段或具有催化活性之變體內。

75. 一種包括如請求項74之重組核酸分子的重組細菌。

76. 一種如請求項75之重組細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

77. 一種重組的李斯特菌屬細菌，其包括多順反子之表現卡匣，其中該多順反子之表現卡匣編碼至少兩個分離的非-李斯特菌屬多肽。

78. 一種如請求項77之重組李斯特菌屬細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該多順反子表現卡匣編碼的非-李斯特菌屬多肽之一包括抗原。

79. 一種重組的李斯特菌屬細菌，其包括重組核酸分子，其中該重組核酸分子包括編碼對該李斯特菌屬細菌而言為外來之多肽的多核苷酸，其中為了在李斯特菌屬中表現將該多核苷酸密碼子-最優化。

80. 一種如請求項79之重組李斯特菌屬細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第二個多核苷酸編碼之外來多肽包括抗原。

81. 一種重組的核酸分子，其包括：

(a)編碼信號肽的第一個多核苷酸；

(b)編碼分泌蛋白質或其片段的第二個多核苷酸，其中該第二個多核苷酸是與第一個多核苷酸相同的轉譯編閱架構；以及

(c)編碼對該分泌蛋白質或其片段而言為異種之多肽的第三個多核苷酸，其中該第三個多核苷酸是與第一和第二個多核苷酸相同的轉譯編閱架構，

其中該重組核酸分子編碼包括信號肽、由第三個多核苷酸編碼之多肽和分泌蛋白質或其片段的蛋白質嵌合

體，且其中在該蛋白質嵌合體中，由該第三個多核苷酸編碼之多肽與該分泌蛋白質或其片段融合，或位在該分泌蛋白質或其片段內。

82. 一種包括如請求項81之重組核酸分子的重組細菌。

83. 一種如請求項82之重組細菌在製造在宿主中誘導對抗原之免疫反應的醫藥品上的用途，其中由該第三個多核苷酸編碼之多肽包括抗原。

十一、圖式：

李斯特菌屬 hly DP-L4056 和 EGD 排列

問題： 李斯特菌屬 EGD
主題： DP-L4056 (野外型, Portnoy 品系)

```
                                                                  prfA 盒子
問題：  1    ggtacctcctttgattagtatattcctatcttaaagtgacttttatgttgaggcattaac 60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||
主題：  1    ggtacctcctttgattagtatattcctatcttaaagttacttttatgtggaggcattaac 60

問題：  61   atttgttaacgacgataaagggacagcaggactagaataaagctataaagcaagcatata 120
             ||||||||| ||||  ||| ||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||||
主題：  61   atttgttaatgacgtcaaaaggatagcaagactagaataaagctataaagcaagcatata 120

問題：  121  atattgcgtttcatctttagaagcgaatttcgccaatattataattatcaaaagagaggg 180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
主題：  121  atattgcgtttcatctttagaagcgaatttcgccaatattataattatcaaaagagaggg 180

                                                Shine-Dalgarno     LLO 起始
問題：  181  gtggcaaacggtatttggcattattaggttaaaaaatgtagaaggagagtgaaacccatg 240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
主題：  181  gtggcaaacggtatttggcattattaggttaaaaaatgtagaaggagagtgaaacccatg 240
```

圖 1

構築體：LLOss-PEST-hEphA2
天然的 LLO 信號肽+PEST 與全長的人類 EphA2 融合
未密碼子最優化
無抗原決定位標籤(例如 myc 或 FLAG，用在該構築體中)
顯示融合蛋白密碼序列

ATGAAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGCGCAACAAACTGAA
GCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTCATCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCC
TGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACACGCGGATCTCGAGCTCCAGGCAGCCCGCGCCTGC
TTCGCCCTGCTGTGGGGCTGTGCGCTGGCCGCGGCCGCGGCGGCGCAGGGCAAGGAAGTGGTACTGCT
GGACTTTGCTGCAGCTGGAGGGGAGCTCGGCTGGCTCACACACCCGTATGGCAAAGGGTGGGACCTG
ATGCAGAACATCATGAATGACATGCCGATCTACATGTACTCCGTGTGCAACGTGATGTCTGGCGACCA
GGACAACTGGCTCCGCACCAACTGGGTGTACCGAGGAGAGGCTGAGCGTATCTTCATTGAGCTCAAGT
TTACTGTACGTGACTGCAACAGCTTCCCTGGTGGCGCCAGCTCCTGCAAGGAGACTTTCAACCTCTACT
ATGCCGAGTCGGACCTGGACTACGGCACCAACTTCCAGAAGCGCCTGTTCACCAAGATTGACACCATT
GCGCCCGATGAGATCACCGTCAGCAGCGACTTCGAGGCACGCCACGTGAAGCTGAACGTGGAGGAGC
GCTCCGTGGGGCCGCTCACCCGCAAAGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGATATCGGTGCCTGTGTGGCG
CTGCTCTCCGTCCGTGTCTACTACAAGAAGTGCCCCGAGCTGCTGCAGGGCCTGGCCCACTTCCCTGAG
ACCATCGCCGGCTCTGATGCACCTTCCCTGGCCACTGTGGCCGGCACCTGTGTGGACCATGCCGTGGTG
CCACCGGGGGGTGAAGAGCCCCGTATGCACTGTGCAGTGGATGGCGAGTGGCTGGTGCCCATTGGGC
AGTGCCTGTGCCAGGCAGGCTACGAGAAGGTGGAGGATGCCTGCCAGGCCTGCTCGCCTGGATTTTTT
AAGTTTGAGGCATCTGAGAGCCCCTGCTTGGAGTGCCCTGAGCACACGCTGCCATCCCCTGAGGGTGC
CACCTCCTGCGAGTGTGAGGAAGGCTTCTTCCGGGCACCTCAGGACCCAGCGTCGATGCCTTGCACAC
GACCCCCCTCCGCCCCACACTACCTCACAGCCGTGGGCATGGGTGCCAAGGTGGAGCTGCGCTGGACG
CCCCCTCAGGACAGCGGGGGCCGCGAGGACATTGTCTACAGCGTCACCTGCGAACAGTGCTGGCCCGA
GTCTGGGGAATGCGGGCCGTGTGAGGCCAGTGTGCGCTACTCGGAGCCTCCTCACGGACTGACCCGCA
CCAGTGTGACAGTGAGCGACCTGGAGCCCCACATGAACTACACCTTCACCGTGGAGGCCCGCAATGGC
GTCTCAGGCCTGGTAACCAGCCGCAGCTTCCGTACTGCCAGTGTCAGCATCAACCAGACAGAGCCCCC
CAAGGTGAGGCTGGAGGGCCGCAGCACCACCTCGCTTAGCGTCTCCTGGAGCATCCCCCCGCCGCAGC
AGAGCCGAGTGTGGAAGTACGAGGTCACTTACCGCAAGAAGGGAGACTCCAACAGCTACAATGTGCG
CCGCACCGAGGGTTTCTCCGTGACCCTGGACGACCTGGCCCCAGACACCACCTACCTGGTCCAGGTGC
AGGCACTGACGCAGGAGGGCCAGGGGGCCGGCAGCAGGGTGCACGAATTCCAGACGCTGTCCCCGGA
GGGATCTGGCAACTTGGCGGTGATTGGCGGCGTGGCTGTCGGTGTGGTCCTGCTTCTGGTGCTGGCAG
GAGTTGGCTTCTTTATCCACCGCAGGAGGAAGAACCAGCGTGCCCGCCAGTCCCCGGAGGACGTTTAC
TTCTCCAAGTCAGAACAACTGAAGCCCCTGAAGACATACGTGGACCCCCACACATATGAGGACCCCAA
CCAGGCTGTGTTGAAGTTCACTACCGAGATCCATCCATCCTGTGTCACTCGGCAGAAGGTGATCGGAG
CAGGAGAGTTTGGGGAGGTGTACAAGGGCATGCTGAAGACATCCTCGGGGAAGAAGGAGGTGCCGGT
GGCCATCAAGACGCTGAAAGCCGGCTACACAGAGAAGCAGCGAGTGGACTTCCTCGGCGAGGCCGGC
ATCATGGGCCAGTTCAGCCACCACAACATCATCCGCCTAGAGGGCGTCATCTCCAAATACAAGCCCAT
GATGATCATCACTGAGTACATGGAGAATGGGGCCCTGGACAAGTTCCTTCGGGAGAAGGATGGCGAG
TTCAGCGTGCTGCAGCTGGTGGGCATGCTGCGGGGCATCGCAGCTGGCATGAAGTACCTGGCCAACAT
GAACTATGTGCACCGTGACCTGGCTGCCCGCAACATCCTCGTCAACAGCAACCTGGTCTGCAAGGTGT
CTGACTTTGGCCTGTCCCGCGTGCTGGAGGACGACCCCGAGGCCACCTACACCACCAGTGGCGGCAAG
ATCCCCATCCGCTGGACCGCCCCGGAGGCCATTTCCTACCGGAAGTTCACCTCTGCCAGCGACGTGTG
GAGCTTTGGCATTGTCATGTGGGAGGTGATGACCTATGGCGAGCGGCCCTACTGGGAGTTGTCCAACC
ACGAGGTGATGAAAGCCATCAATGATGGCTTCCGGCTCCCCACACCCATGGACTGCCCCTCCGCCATC
TACCAGCTCATGATGCAGTGCTGGCAGCAGGAGCGTGCCCGCCGCCCCAAGTTCGCTGACATCGTCAG
CATCCTGGACAAGCTCATTCGTGCCCCTGACTCCCTCAAGACCCTGGCTGACTTTGACCCCCGCGTGTC
TATCCGGCTCCCCAGCACGAGCGGCTCGGAGGGGGTGCCCTTCCGCACGGTGTCCGAGTGGCTGGAGT
CCATCAAGATGCAGCAGTATACGGAGCACTTCATGGCGGCCGGCTACACTGCCATCGAGAAGGTGGTG
CAGATGACCAACGACGACATCAAGAGGATTGGGGTGCGGCTGCCCGGCCACCAGAAGCGCATCGCCT
ACAGCCTGCTGGGACTCAAGGACCAGGTGAACACTGTGGGGATCCCCATC

圖 2

構築體：LLOss-PEST-hEphA2
天然的 LLO 信號肽+PEST 與全長的人類 EphA2 融合
未密碼子最優化
無抗原決定位標籤(例如 myc 或 FLAG，用在該構築體中)
顯示預測的融合蛋白

M K K I M L V F I T L I L V S L P I A Q Q T E A K D A S A F N K E N
S I S S M A P P A S P P A S P K T P I E K K H A D L E L Q A A R A C
F A L L W G C A L A A A A A A Q G K E V V L L D F A A A G G E L G
W L T H P Y G K G W D L M Q N I M N D M P I Y M Y S V C N V M S
G D Q D N W L R T N W V Y R G E A E R I F I E L K F T V R D C N S F
P G G A S S C K E T F N L Y Y A E S D L D Y G T N F Q K R L F T K I
D T I A P D E I T V S S D F E A R H V K L N V E E R S V G P L T R K
G F Y L A F Q D I G A C V A L L S V R V Y Y K K C P E L L Q G L A
H F P E T I A G S D A P S L A T V A G T C V D H A V V P P G G E E P
R M H C A V D G E W L V P I G Q C L C Q A G Y E K V E D A C Q A C
S P G F F K F E A S E S P C L E C P E H T L P S P E G A T S C E C E E
G F F R A P Q D P A S M P C T R P P S A P H Y L T A V G M G A K V
E L R W T P P Q D S G G R E D I V Y S V T C E Q C W P E S G E C G P
C E A S V R Y S E P P H G L T R T S V T V S D L E P H M N Y T F T V
E A R N G V S G L V T S R S F R T A S V S I N Q T E P P K V R L E G
R S T T S L S V S W S I P P P Q Q S R V W K Y E V T Y R K K G D S N
S Y N V R R T E G F S V T L D D L A P D T T Y L V Q V Q A L T Q E
G Q G A G S R V H E F Q T L S P E G S G N L A V I G G V A V G V V
L L L V L A G V G F F I H R R R K N Q R A R Q S P E D V Y F S K S E
Q L K P L K T Y V D P H T Y E D P N Q A V L K F T T E I H P S C V T
R Q K V I G A G E F G E V Y K G M L K T S S G K K E V P V A I K T L
K A G Y T E K Q R V D F L G E A G I M G Q F S H H N I I R L E G V I
S K Y K P M M I I T E Y M E N G A L D K F L R E K D G E F S V L Q L
V G M L R G I A A G M K Y L A N M N Y V H R D L A A R N I L V N S
N L V C K V S D F G L S R V L E D D P E A T Y T T S G G K I P I R W
T A P E A I S Y R K F T S A S D V W S F G I V M W E V M T Y G E R P
Y W E L S N H E V M K A I N D G F R L P T P M D C P S A I Y Q L M
M Q C W Q Q E R A R R P K F A D I V S I L D K L I R A P D S L K T L
A D F D P R V S I R L P S T S G S E G V P F R T V S E W L E S I K M
Q Q Y T E H F M A A G Y T A I E K V V Q M T N D D I K R I G V R L
P G H Q K R I A Y S L L G L K D Q V N T V G I P I

圖 3

EphA2 EX2 功能部位

天然的核苷酸序列

CAGGGCAAGGAAGTGGTACTGCTGGACTTTGCTGCAGCTGGAGGGGAGCTCGGCTG
GCTCACACACCCGTATGGCAAAGGGTGGGACCTGATGCAGAACATCATGAATGACA
TGCCGATCTACATGTACTCCGTGTGCAACGTGATGTCTGGCGACCAGGACAACTGGC
TCCGCACCAACTGGGTGTACCGAGGAGAGGCTGAGCGTATCTTCATTGAGCTCAAGT
TTACTGTACGTGACTGCAACAGCTTCCCTGGTGGCGCCAGCTCCTGCAAGGAGACTT
TCAACCTCTACTATGCCGAGTCGGACCTGGACTACGGCACCAACTTCCAGAAGCGCC
TGTTCACCAAGATTGACACCATTGCGCCCGATGAGATCACCGTCAGCAGCGACTTCG
AGGCACGCCACGTGAAGCTGAACGTGGAGGAGCGCTCCGTGGGGCCGCTCACCCGC
AAAGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGATATCGGTGCCTGTGTGGCGCTGCTCTCCGTC
CGTGTCTACTACAAGAAGTGCCCCGAGCTGCTGCAGGGCCTGGCCCACTTCCCTGAG
ACCATCGCCGGCTCTGATGCACCTTCCCTGGCCACTGTGGCCGGCACCTGTGTGGAC
CATGCCGTGGTGCCACCGGGGGGTGAAGAGCCCCGTATGCACTGTGCAGTGGATGG
CGAGTGGCTGGTGCCCATTGGGCAGTGCCTGTGCCAGGCAGGCTACGAGAAGGTGG
AGGATGCCTGCCAGGCCTGCTCGCCTGGATTTTTTAAGTTTGAGGCATCTGAGAGCC
CCTGCTTGGAGTGCCCTGAGCACACGCTGCCATCCCCTGAGGGTGCCACCTCCTGCG
AGTGTGAGGAAGGCTTCTTCCGGGCACCTCAGGACCCAGCGTCGATGCCTTGCACAC
GACCCCCCTCCGCCCCACACTACCTCACAGCCGTGGGCATGGGTGCCAAGGTGGAG
CTGCGCTGGACGCCCCCTCAGGACAGCGGGGGCCGCGAGGACATTGTCTACAGCGT
CACCTGCGAACAGTGCTGGCCCGAGTCTGGGGAATGCGGGCCGTGTGAGGCCAGTG
TGCGCTACTCGGAGCCTCCTCACGGACTGACCCGCACCAGTGTGACAGTGAGCGAC
CTGGAGCCCCACATGAACTACACCTTCACCGTGGAGGCCCGCAATGGCGTCTCAGG
CCTGGTAACCAGCCGCAGCTTCCGTACTGCCAGTGTCAGCATCAACCAGACAGAGC
CCCCCAAGGTGAGGCTGGAGGGCCGCAGCACCACCTCGCTTAGCGTCTCCTGGAGC
ATCCCCCCGCCGCAGCAGAGCCGAGTGTGGAAGTACGAGGTCACTTACCGCAAGAA
GGGAGACTCCAACAGCTACAATGTGCGCCGCACCGAGGGTTTCTCCGTGACCCTGG
ACGACCTGGCCCCAGACACCACCTACCTGGTCCAGGTGCAGGCACTGACGCAGGAG
GGCCAGGGGGCCGGCAGCAGGGTGCACGAATTCCAGACG

圖 4

EphA2 EX2 功能部位

在李斯特菌屬中，最佳密碼子利用的核苷酸序列

CAAGGTAAAGAAGTTGTTTTATTAGATTTTGCAGCAGCAGGTGGTGAATTAGGTTGG
TTAACACATCCATATGGTAAAGGTTGGGATTTAATGCAAAATATTATGAATGATATG
CCAATTTATATGTATAGTGTTTGTAATGTTATGAGTGGTGATCAAGATAATTGGTTAC
GTACAAATTGGGTTTATCGTGGTGAAGCAGAACGTATTTTTATTGAATTAAAATTTA
CAGTTCGTGATTGTAATAGTTTTCCAGGTGGTGCAAGTAGTTGTAAAGAAACATTTA
ATTTATATTATGCAGAAAGTGATTTAGATTATGGTACAAATTTTCAAAAACGTTTATT
TACAAAAATTGATACAATTGCACCAGATGAAATTACAGTTAGTAGTGATTTTGAAGC
ACGTCATGTTAAATTAAATGTTGAAGAACGTAGTGTTGGTCCATTAACACGTAAAGG
TTTTTATTTAGCATTTCAAGATATTGGTGCATGTGTTGCATTATTAAGTGTTCGTGTTT
ATTATAAAAAATGTCCAGAATTATTACAAGGTTTAGCACATTTTCCAGAAACAATTG
CAGGTAGTGATGCACCAAGTTTAGCAACAGTTGCAGGTACATGTGTTGATCATGCAG
TTGTTCCACCAGGTGGTGAAGAACCACGTATGCATTGTGCAGTTGATGGTGAATGGT
TAGTTCCAATTGGTCAATGTTTATGTCAAGCAGGTTATGAAAAAGTTGAAGATGCAT
GTCAAGCATGTAGTCCAGGTTTTTTTAAATTTGAAGCAAGTGAAAGTCCATGTTTAG
AATGTCCAGAACATACATTACCAAGTCCAGAAGGTGCAACAAGTTGTGAATGTGAA
GAAGGTTTTTTTCGTGCACCACAAGATCCAGCAAGTATGCCATGTACACGTCCACCA
AGTGCACCACATTATTTAACAGCAGTTGGTATGGGTGCAAAAGTTGAATTACGTTGG
ACACCACCACAAGATAGTGGTGGTCGTGAAGATATTGTTTATAGTGTTACATGTGAA
CAATGTTGGCCAGAAAGTGGTGAATGTGGTCCATGTGAAGCAAGTGTTCGTTATAGT
GAACCACCACATGGTTTAACACGTACAAGTGTTACAGTTAGTGATTTAGAACCACAT
ATGAATTATACATTTACAGTTGAAGCACGTAATGGTGTTAGTGGTTTAGTTACAAGT
CGTAGTTTTCGTACAGCAAGTGTTAGTATTAATCAAACAGAACCACCAAAAGTTCGT
TTAGAAGGTCGTAGTACAACAAGTTTAAGTGTTAGTTGGAGTATTCCACCACCACAA
CAAAGTCGTGTTTGGAAATATGAAGTTACATATCGTAAAAAAGGTGATAGTAATAG
TTATAATGTTCGTCGTACAGAAGGTTTTAGTGTTACATTAGATGATTTAGCACCAGA
TACAACATATTTAGTTCAAGTTCAAGCATTAACACAAGAAGGTCAAGGTGCAGGTA
GTCGTGTTCATGAATTTCAAACA

圖 5

EphA2 EX2 功能部位

原始的胺基酸序列

Q G K E V V L L D F A A A G G E L G W L T H P Y G K G W D L M Q
N I M N D M P I Y M Y S V C N V M S G D Q D N W L R T N W V Y R
G E A E R I F I E L K F T V R D C N S F P G G A S S C K E T F N L Y
Y A E S D L D Y G T N F Q K R L F T K I D T I A P D E I T V S S D F E
A R H V K L N V E E R S V G P L T R K G F Y L A F Q D I G A C V A
L L S V R V Y Y K K C P E L L Q G L A H F P E T I A G S D A P S L A
T V A G T C V D H A V V P P G G E E P R M H C A V D G E W L V P I
G Q C L C Q A G Y E K V E D A C Q A C S P G F F K F E A S E S P C L
E C P E H T L P S P E G A T S C E C E E G F F R A P Q D P A S M P C
T R P P S A P H Y L T A V G M G A K V E L R W T P P Q D S G G R E
D I V Y S V T C E Q C W P E S G E C G P C E A S V R Y S E P P H G L
T R T S V T V S D L E P H M N Y T F T V E A R N G V S G L V T S R S
F R T A S V S I N Q T E P P K V R L E G R S T T S L S V S W S I P P P
Q Q S R V W K Y E V T Y R K K G D S N S Y N V R R T E G F S V T L
D D L A P D T T Y L V Q V Q A L T Q E G Q G A G S R V H E F Q T

圖 6

構築體：LLOss-PEST-EX2 hEphA2
天然的 LLO 信號肽+PEST 與人類 EphA2 之細胞外功能部位融合
未密碼子最優化
無抗原決定位標籤(例如 myc 或 FLAG，用在該構築體中)
顯示融合蛋白密碼序列

ATGAAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGCGC
AACAAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTCATCC
ATGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACA
CGCGGATCTCGAGCAGGGCAAGGAAGTGGTACTGCTGGACTTTGCTGCAGCTGGAG
GGGAGCTCGGCTGGCTCACACACCCGTATGGCAAAGGGTGGGACCTGATGCAGAAC
ATCATGAATGACATGCCGATCTACATGTACTCCGTGTGCAACGTGATGTCTGGCGAC
CAGGACAACTGGCTCCGCACCAACTGGGTGTACCGAGGAGAGGCTGAGCGTATCTT
CATTGAGCTCAAGTTTACTGTACGTGACTGCAACAGCTTCCCTGGTGGCGCCAGCTC
CTGCAAGGAGACTTTCAACCTCTACTATGCCGAGTCGGACCTGGACTACGGCACCAA
CTTCCAGAAGCGCCTGTTCACCAAGATTGACACCATTGCGCCCGATGAGATCACCGT
CAGCAGCGACTTCGAGGCACGCCACGTGAAGCTGAACGTGGAGGAGCGCTCCGTGG
GGCCGCTCACCCGCAAAGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGATATCGGTGCCTGTGTGG
CGCTGCTCTCCGTCCGTGTCTACTACAAGAAGTGCCCCGAGCTGCTGCAGGGCCTGG
CCCACTTCCCTGAGACCATCGCCGGCTCTGATGCACCTTCCCTGGCCACTGTGGCCG
GCACCTGTGTGGACCATGCCGTGGTGCCACCGGGGGGGTGAAGAGCCCCGTATGCAC
TGTGCAGTGGATGGCGAGTGGCTGGTGCCCATTGGGCAGTGCCTGTGCCAGGCAGG
CTACGAGAAGGTGGAGGATGCCTGCCAGGCCTGCTCGCCTGGATTTTTTAAGTTTGA
GGCATCTGAGAGCCCCTGCTTGGAGTGCCCTGAGCACACGCTGCCATCCCCTGAGGG
TGCCACCTCCTGCGAGTGTGAGGAAGGCTTCTTCCGGGCACCTCAGGACCCAGCGTC
GATGCCTTGCACACGACCCCCCTCCGCCCCACACTACCTCACAGCCGTGGGCATGGG
TGCCAAGGTGGAGCTGCGCTGGACGCCCCCTCAGGACAGCGGGGGCCGCGAGGACA
TTGTCTACAGCGTCACCTGCGAACAGTGCTGGCCCGAGTCTGGGGAATGCGGGCCGT
GTGAGGCCAGTGTGCGCTACTCGGAGCCTCCTCACGGACTGACCCGCACCAGTGTG
ACAGTGAGCGACCTGGAGCCCCACATGAACTACACCTTCACCGTGGAGGCCCGCAA
TGGCGTCTCAGGCCTGGTAACCAGCCGCAGCTTCCGTACTGCCAGTGTCAGCATCAA
CCAGACAGAGCCCCCCAAGGTGAGGCTGGAGGGCCGCAGCACCACCTCGCTTAGCG
TCTCCTGGAGCATCCCCCCGCCGCAGCAGAGCCGAGTGTGGAAGTACGAGGTCACT
TACCGCAAGAAGGGAGACTCCAACAGCTACAATGTGCGCCGCACCGAGGGTTTCTC
CGTGACCCTGGACGACCTGGCCCCAGACACCACCTACCTGGTCCAGGTGCAGGCAC
TGACGCAGGAGGGCCAGGGGGCCGGCAGCAGGGTGCACGAATTCCAGACG

圖 7

構築體：LLOss-PEST-EX2 hEphA2
天然的 LLO 信號肽+PEST 與人類 EphA2 之細胞外功能部位融合
未密碼子最優化
無抗原決定位標籤(例如 myc 或 FLAG，用在該構築體中)
顯示預測的融合蛋白

M K K I M L V F I T L I L V S L P I A Q Q T E A K D A S A F N K E N
S I S S M A P P A S P P A S P K T P I E K K H A D L E Q G K E V V L
L D F A A A G G E L G W L T H P Y G K G W D L M Q N I M N D M P I
Y M Y S V C N V M S G D Q D N W L R T N W V Y R G E A E R I F I E
L K F T V R D C N S F P G G A S S C K E T F N L Y Y A E S D L D Y G
T N F Q K R L F T K I D T I A P D E I T V S S D F E A R H V K L N V E
E R S V G P L T R K G F Y L A F Q D I G A C V A L L S V R V Y Y K K
C P E L L Q G L A H F P E T I A G S D A P S L A T V A G T C V D H A
V V P P G G E E P R M H C A V D G E W L V P I G Q C L C Q A G Y E
K V E D A C Q A C S P G F F K F E A S E S P C L E C P E H T L P S P
E G A T S C E C E E G F F R A P Q D P A S M P C T R P P S A P H Y L
T A V G M G A K V E L R W T P P Q D S G G R E D I V Y S V T C E Q
C W P E S G E C G P C E A S V R Y S E P P H G L T R T S V T V S D L
E P H M N Y T F T V E A R N G V S G L V T S R S F R T A S V S I N Q
T E P P K V R L E G R S T T S L S V S W S I P P P Q Q S R V W K Y E
V T Y R K K G D S N S Y N V R R T E G F S V T L D D L A P D T T Y
L V Q V Q A L T Q E G Q G A G S R V H E F Q T

圖 8

天然的 LLOss-PEST-FLAG-EX2 EphA2-myc-CodonOp
(天然的單核細胞增多性李斯特菌 LLO 信號肽+PEST-密碼子最優化的- FLAG-EX2 EphA2-Myc)
核苷酸序列(包括 hly 啟動基因)

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGAAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTA
CCAATTGCGCAACAAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTC
AATTTCATCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGA
AAAGAAACACGCGGATGGATCCGATTATAAAGATGATGATGATAAACAAGGTAAAG
AAGTTGTTTTATTAGATTTTGCAGCAGCAGGTGGTGAATTAGGTTGGTTAACACATC
CATATGGTAAAGGTTGGGATTTAATGCAAAATATTATGAATGATATGCCAATTTATA
TGTATAGTGTTTGTAATGTTATGAGTGGTGATCAAGATAATTGGTTACGTACAAATT
GGGTTTATCGTGGTGAAGCAGAACGTATTTTTATTGAATTAAAATTTACAGTTCGTG
ATTGTAATAGTTTTCCAGGTGGTGCAAGTAGTTGTAAAGAAACATTTAATTTATATT
ATGCAGAAAGTGATTTAGATTATGGTACAAATTTTCAAAAACGTTTATTTACAAAAA
TTGATACAATTGCACCAGATGAAATTACAGTTAGTAGTGATTTTGAAGCACGTCATG
TTAAATTAAATGTTGAAGAACGTAGTGTTGGTCCATTAACACGTAAAGGTTTTTATT
TAGCATTTCAAGATATTGGTGCATGTGTTGCATTATTAAGTGTTCGTGTTTATTATAA
AAAATGTCCAGAATTATTACAAGGTTTAGCACATTTTCCAGAAACAATTGCAGGTAG
TGATGCACCAAGTTTAGCAACAGTTGCAGGTACATGTGTTGATCATGCAGTTGTTCC
ACCAGGTGGTGAAGAACCACGTATGCATTGTGCAGTTGATGGTGAATGGTTAGTTCC
AATTGGTCAATGTTTATGTCAAGCAGGTTATGAAAAAGTTGAAGATGCATGTCAAGC
ATGTAGTCCAGGTTTTTTTAAATTTGAAGCAAGTGAAAGTCCATGTTTAGAATGTCC
AGAACATACATTACCAAGTCCAGAAGGTGCAACAAGTTGTGAATGTGAAGAAGGTT
TTTTTCGTGCACCACAAGATCCAGCAAGTATGCCATGTACACGTCCACCAAGTGCAC
CACATTATTTAACAGCAGTTGGTATGGGTGCAAAAGTTGAATTACGTTGGACACCAC
CACAAGATAGTGGTGGTCGTGAAGATATTGTTTATAGTGTTACATGTGAACAATGTT
GGCCAGAAAGTGGTGAATGTGGTCCATGTGAAGCAAGTGTTCGTTATAGTGAACCA
CCACATGGTTTAACACGTACAAGTGTTACAGTTAGTGATTTAGAACCACATATGAAT
TATACATTTACAGTTGAAGCACGTAATGGTGTTAGTGGTTTAGTTACAAGTCGTAGT
TTTCGTACAGCAAGTGTTAGTATTAATCAAACAGAACCACCAAAAGTTCGTTTAGAA
GGTCGTAGTACAACAAGTTTAAGTGTTAGTTGGAGTATTCCACCACCACAACAAAGT
CGTGTTTGGAAATATGAAGTTACATATCGTAAAAAAGGTGATAGTAATAGTTATAAT
GTTCGTCGTACAGAAGGTTTTAGTGTTACATTAGATGATTTAGCACCAGATACAACA
TATTTAGTTCAAGTTCAAGCATTAACACAAGAAGGTCAAGGTGCAGGTAGTCGTGTT
CATGAATTTCAAACAGAACAAAAATTAATTAGTGAAGAAGATTTATGAGAGCTC

圖 9

天然的 LLOss-PEST-FLAG-EX2 EphA2-myc-CodonOp
(天然的單核細胞增多性李斯特菌 LLO 信號肽+PEST-密碼子最優化的- FLAG-EX2 EphA2-Myc)
原始的胺基酸序列

M K K I M L V F I T L I L V S L P I A Q Q T E A K D A S A F N K E N
S I S S M A P P A S P P A S P K T P I E K K H A D G S D Y K D D D D
K Q G K E V V L L D F A A A G G E L G W L T H P Y G K G W D L M
Q N I M N D M P I Y M Y S V C N V M S G D Q D N W L R T N W V Y
R G E A E R I F I E L K F T V R D C N S F P G G A S S C K E T F N L
Y Y A E S D L D Y G T N F Q K R L F T K I D T I A P D E I T V S S D
F E A R H V K L N V E E R S V G P L T R K G F Y L A F Q D I G A C V
A L L S V R V Y Y K K C P E L L Q G L A H F P E T I A G S D A P S L
A T V A G T C V D H A V V P P G G E E P R M H C A V D G E W L V P
I G Q C L C Q A G Y E K V E D A C Q A C S P G F F K F E A S E S P C
L E C P E H T L P S P E G A T S C E C E E G F F R A P Q D P A S M P
C T R P P S A P H Y L T A V G M G A K V E L R W T P P Q D S G G R
E D I V Y S V T C E Q C W P E S G E C G P C E A S V R Y S E P P H G
L T R T S V T V S D L E P H M N Y T F T V E A R N G V S G L V T S R
S F R T A S V S I N Q T E P P K V R L E G R S T T S L S V S W S I P P
P Q Q S R V W K Y E V T Y R K K G D S N S Y N V R R T E G F S V T
L D D L A P D T T Y L V Q V Q A L T Q E G Q G A G S R V H E F Q T
E Q K L I S E E D L

圖 10

密碼子最優化之 LLOss-PEST-FLAG-EX2 EphA2-myc-CodonOp
(密碼子最優化之單核細胞增多性李斯特菌 LLO 信號肽+PEST-密碼子最優化的-FLAG-EX2 EphA2-Myc)
核苷酸序列(包括 hly 啟動基因)

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGAAAAAAATTATGTTAGTTTTTATTACATTAATTTTAGTTAGTTTAC
CAATTGCACAACAAACAGAAGCAAAAGATGCAAGTGCATTTAATAAAGAAAATAGT
ATTAGTAGTATGGCACCACCAGCAAGTCCACCAGCAAGTCCAAAAACACCAATTGA
AAAAAAACATGCAGATGGATCCGATTATAAAGATGATGATGATAAACAAGGTAAAG
AAGTTGTTTTATTAGATTTTGCAGCAGCAGGTGGTGAATTAGGTTGGTTAACACATC
CATATGGTAAAGGTTGGGATTTAATGCAAAATATTATGAATGATATGCCAATTTATA
TGTATAGTGTTTGTAATGTTATGAGTGGTGATCAAGATAATTGGTTACGTACAAATT
GGGTTTATCGTGGTGAAGCAGAACGTATTTTTATTGAATTAAAATTTACAGTTCGTG
ATTGTAATAGTTTTCCAGGTGGTGCAAGTAGTTGTAAAGAAACATTTAATTTATATT
ATGCAGAAAGTGATTTAGATTATGGTACAAATTTTCAAAAACGTTTATTTACAAAAA
TTGATACAATTGCACCAGATGAAATTACAGTTAGTAGTGATTTTGAAGCACGTCATG
TTAAATTAAATGTTGAAGAACGTAGTGTTGGTCCATTAACACGTAAAGGTTTTTATT
TAGCATTTCAAGATATTGGTGCATGTGTTGCATTATTAAGTGTTCGTGTTTATTATAA
AAAATGTCCAGAATTATTACAAGGTTTAGCACATTTTCCAGAAACAATTGCAGGTAG
TGATGCACCAAGTTTAGCAACAGTTGCAGGTACATGTGTTGATCATGCAGTTGTTCC
ACCAGGTGGTGAAGAACCACGTATGCATTGTGCAGTTGATGGTGAATGGTTAGTTCC
AATTGGTCAATGTTTATGTCAAGCAGGTTATGAAAAAGTTGAAGATGCATGTCAAGC
ATGTAGTCCAGGTTTTTTTAAATTTGAAGCAAGTGAAAGTCCATGTTTAGAATGTCC
AGAACATACATTACCAAGTCCAGAAGGTGCAACAAGTTGTGAATGTGAAGAAGGTT
TTTTTCGTGCACCACAAGATCCAGCAAGTATGCCATGTACACGTCCACCAAGTGCAC
CACATTATTTAACAGCAGTTGGTATGGGTGCAAAAGTTGAATTACGTTGGACACCAC
CACAAGATAGTGGTGGTCGTGAAGATATTGTTTATAGTGTTACATGTGAACAATGTT
GGCCAGAAAGTGGTGAATGTGGTCCATGTGAAGCAAGTGTTCGTTATAGTGAACCA
CCACATGGTTTAACACGTACAAGTGTTACAGTTAGTGATTTAGAACCACATATGAAT
TATACATTTACAGTTGAAGCACGTAATGGTGTTAGTGGTTTAGTTACAAGTCGTAGT
TTTCGTACAGCAAGTGTTAGTATTAATCAAACAGAACCACCAAAAGTTCGTTTAGAA
GGTCGTAGTACAACAAGTTTAAGTGTTAGTTGGAGTATTCCACCACCACAACAAAGT
CGTGTTTGGAAATATGAAGTTACATATCGTAAAAAAGGTGATAGTAATAGTTATAAT
GTTCGTCGTACAGAAGGTTTTAGTGTTACATTAGATGATTTAGCACCAGATACAACA
TATTTAGTTCAAGTTCAAGCATTAACACAAGAAGGTCAAGGTGCAGGTAGTCGTGTT
CATGAATTTCAAACAGAACAAAAATTAATTAGTGAAGAAGATTTATGAGAGCTC

圖 11

密碼子-最優化之 LLOss-PEST-FLAG-EX2 EphA2-myc-CodonOp
(密碼子最優化之單核細胞增多性李斯特菌 LLO 信號肽+PEST-密碼子最優化的-FLAG-EX2 EphA2-Myc)
原始的胺基酸序列

M K K I M L V F I T L I L V S L P I A Q Q T E A K D A S A F N K E N
S I S S M A P P A S P P A S P K T P I E K K H A D G S D Y K D D D D
K Q G K E V V L L D F A A A G G E L G W L T H P Y G K G W D L M
Q N I M N D M P I Y M Y S V C N V M S G D Q D N W L R T N W V Y
R G E A E R I F I E L K F T V R D C N S F P G G A S S C K E T F N L
Y Y A E S D L D Y G T N F Q K R L F T K I D T I A P D E I T V S S D
F E A R H V K L N V E E R S V G P L T R K G F Y L A F Q D I G A C V
A L L S V R V Y Y K K C P E L L Q G L A H F P E T I A G S D A P S L
A T V A G T C V D H A V V P P G G E E P R M H C A V D G E W L V P
I G Q C L C Q A G Y E K V E D A C Q A C S P G F F K F E A S E S P C
L E C P E H T L P S P E G A T S C E C E E G F F R A P Q D P A S M P
C T R P P S A P H Y L T A V G M G A K V E L R W T P P Q D S G G R
E D I V Y S V T C E Q C W P E S G E C G P C E A S V R Y S E P P H G
L T R T S V T V S D L E P H M N Y T F T V E A R N G V S G L V T S R
S F R T A S V S I N Q T E P P K V R L E G R S T T S L S V S W S I P P
P Q Q S R V W K Y E V T Y R K K G D S N S Y N V R R T E G F S V T
L D D L A P D T T Y L V Q V Q A L T Q E G Q G A G S R V H E F Q T
E Q K L I S E E D L

圖 12

PhoD-FLAG-EX2-EphA2-myc-CodonOp
(密碼子-最優化之枯草桿菌 phoD Tat 信號肽-FLAG-EX2-EphA2-Myc)
核苷酸序列(包括 hly 啟動基因)

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGGCATACGACAGTCGTTTTGATGAATGGGTACAGAAACTGAAAGA
GGAAAGCTTTCAAAACAATACGTTTGACCGCCGCAAATTTATTCAAGGAGCGGGGA
AGATTGCAGGACTTTCTCTTGGATTAACGATTGCCCAGTCGGTTGGGGCCTTTGGAT
CCGATTATAAAGATGATGATGATAAACAAGGTAAAGAAGTTGTTTTATTAGATTTTG
CAGCAGCAGGTGGTGAATTAGGTTGGTTAACACATCCATATGGTAAAGGTTGGGATT
TAATGCAAAATATTATGAATGATATGCCAATTTATATGTATAGTGTTTGTAATGTTAT
GAGTGGTGATCAAGATAATTGGTTACGTACAAATTGGGTTTATCGTGGTGAAGCAGA
ACGTATTTTTATTGAATTAAAATTTACAGTTCGTGATTGTAATAGTTTTCCAGGTGGT
GCAAGTAGTTGTAAAGAAACATTTAATTTATATTATGCAGAAAGTGATTTAGATTAT
GGTACAAATTTTCAAAAACGTTTATTTACAAAAATTGATACAATTGCACCAGATGAA
ATTACAGTTAGTAGTGATTTTGAAGCACGTCATGTTAAATTAAATGTTGAAGAACGT
AGTGTTGGTCCATTAACACGTAAAGGTTTTTATTTAGCATTTCAAGATATTGGTGCAT
GTGTTGCATTATTAAGTGTTCGTGTTTATTATAAAAAATGTCCAGAATTATTACAAG
GTTTAGCACATTTTCCAGAAACAATTGCAGGTAGTGATGCACCAAGTTTAGCAACAG
TTGCAGGTACATGTGTTGATCATGCAGTTGTTCCACCAGGTGGTGAAGAACCACGTA
TGCATTGTGCAGTTGATGGTGAATGGTTAGTTCCAATTGGTCAATGTTTATGTCAAG
CAGGTTATGAAAAAGTTGAAGATGCATGTCAAGCATGTAGTCCAGGTTTTTTTAAAT
TTGAAGCAAGTGAAAGTCCATGTTTAGAATGTCCAGAACATACATTACCAAGTCCAG
AAGGTGCAACAAGTTGTGAATGTGAAGAAGGTTTTTTTCGTGCACCACAAGATCCAG
CAAGTATGCCATGTACACGTCCACCAAGTGCACCACATTATTTAACAGCAGTTGGTA
TGGGTGCAAAAGTTGAATTACGTTGGACACCACCACAAGATAGTGGTGGTCGTGAA
GATATTGTTTATAGTGTTACATGTGAACAATGTTGGCCAGAAAGTGGTGAATGTGGT
CCATGTGAAGCAAGTGTTCGTTATAGTGAACCACCACATGGTTTAACACGTACAAGT
GTTACAGTTAGTGATTTAGAACCACATATGAATTATACATTTACAGTTGAAGCACGT
AATGGTGTTAGTGGTTTAGTTACAAGTCGTAGTTTTCGTACAGCAAGTGTTAGTATT
AATCAAACAGAACCACCAAAAGTTCGTTTAGAAGGTCGTAGTACAACAAGTTTAAG
TGTTAGTTGGAGTATTCCACCACCACAACAAAGTCGTGTTTGGAAATATGAAGTTAC
ATATCGTAAAAAAGGTGATAGTAATAGTTATAATGTTCGTCGTACAGAAGGTTTTAG
TGTTACATTAGATGATTTAGCACCAGATACAACATATTTAGTTCAAGTTCAAGCATT
AACACAAGAAGGTCAAGGTGCAGGTAGTCGTGTTCATGAATTTCAAACAGAACAAA
AATTAATTAGTGAAGAAGATTTATGAGAGCTC

圖 13

PhoD-FLAG-EX2-EphA2-myc-CodonOp
(密碼子-最優化之枯草桿菌 phoD Tat 信號肽-FLAG-EX2-EphA2-Myc)
胺基酸序列

M A Y D S R F D E W V Q K L K E E S F Q N N T F D R R K F I Q G A
G K I A G L S L G L T I A Q S V G A F G S D Y K D D D D K Q G K E
V V L L D F A A A G G E L G W L T H P Y G K G W D L M Q N I M N
D M P I Y M Y S V C N V M S G D Q D N W L R T N W V Y R G E A E
R I F I E L K F T V R D C N S F P G G A S S C K E T F N L Y Y A E S
D L D Y G T N F Q K R L F T K I D T I A P D E I T V S S D F E A R H
V K L N V E E R S V G P L T R K G F Y L A F Q D I G A C V A L L S V
R V Y Y Y K K C P E L L Q G L A H F P E T I A G S D A P S L A T V A G
T C V D H A V V P P G G E E P R M H C A V D G E W L V P I G Q C L
C Q A G Y E K V E D A C Q A C S P G F F K F E A S E S P C L E C P E
H T L P S P E G A T S C E C E E G F F R A P Q D P A S M P C T R P P
S A P H Y L T A V G M G A K V E L R W T P P Q D S G G R E D I V Y
S V T C E Q C W P E S G E C G P C E A S V R Y S E P P H G L T R T S
V T V S D L E P H M N Y T F T V E A R N G V S G L V T S R S F R T A
S V S I N Q T E P P K V R L E G R S T T S L S V S W S I P P P Q Q S R
V W K Y E V T Y R K K G D S N S Y N V R R T E G F S V T L D D L A
P D T T Y L V Q V Q A L T Q E G Q G A G S R V H E F Q T E Q K L I S
E E D L

圖 14

EphA2 CO 功能部位

天然的核苷酸序列

CACCGCAGGAGGAAGAACCAGCGTGCCCGCCAGTCCCCGGAGGACGTTTACTTCTC
CAAGTCAGAACAACTGAAGCCCCTGAAGACATACGTGGACCCCCACACATATGAGG
ACCCCAACCAGGCTGTGTTGAAGTTCACTACCGAGATCCATCCATCCTGTGTCACTC
GGCAGAAGGTGATCGGAGCAGGAGAGTTTGGGGAGGTGTACAAGGGCATGCTGAA
GACATCCTCGGGGAAGAAGGAGGTGCCGGTGGCCATCAAGACGCTGAAAGCCGGCT
ACACAGAGAAGCAGCGAGTGGACTTCCTCGGCGAGGCCGGCATCATGGGCCAGTTC
AGCCACCACAACATCATCCGCCTAGAGGGCGTCATCTCCAAATACAAGCCCATGAT
GATCATCACTGAGTACATGGAGAATGGGGCCCTGGACAAGTTCCTTCGGGAGAAGG
ATGGCGAGTTCAGCGTGCTGCAGCTGGTGGGCATGCTGCGGGGCATCGCAGCTGGC
ATGAAGTACCTGGCCAACATGAACTATGTGCACCGTGACCTGGCTGCCCGCAACATC
CTCGTCAACAGCAACCTGGTCTGCAAGGTGTCTGACTTTGGCCTGTCCCGCGTGCTG
GAGGACGACCCCGAGGCCACCTACACCACCAGTGGCGGCAAGATCCCCATCCGCTG
GACCGCCCCGGAGGCCATTTCCTACCGGAAGTTCACCTCTGCCAGCGACGTGTGGAG
CTTTGGCATTGTCATGTGGGAGGTGATGACCTATGGCGAGCGGCCCTACTGGGAGTT
GTCCAACCACGAGGTGATGAAAGCCATCAATGATGGCTTCCGGCTCCCCACACCCAT
GGACTGCCCCTCCGCCATCTACCAGCTCATGATGCAGTGCTGGCAGCAGGAGCGTGC
CCGCCGCCCCAAGTTCGCTGACATCGTCAGCATCCTGGACAAGCTCATTCGTGCCCC
TGACTCCCTCAAGACCCTGGCTGACTTTGACCCCCGCGTGTCTATCCGGCTCCCCAG
CACGAGCGGCTCGGAGGGGGTGCCCTTCCGCACGGTGTCCGAGTGGCTGGAGTCCA
TCAAGATGCAGCAGTATACGGAGCACTTCATGGCGGCCGGCTACACTGCCATCGAG
AAGGTGGTGCAGATGACCAACGACGACATCAAGAGGATTGGGGTGCGGCTGCCCGG
CCACCAGAAGCGCATCGCCTACAGCCTGCTGGGACTCAAGGACCAGGTGAACACTG
TGGGGATCCCCATC

圖 15

EphA2 CO 功能部位

在李斯特菌屬中，最佳密碼子利用的核苷酸序列

CACAGACGTAGAAAAAATCAACGTGCTCGACAATCCCCAGAAGATGTGTATTTTTCG
AAAAGTGAACAATTAAAACCATTAAAAACTTATGTTGATCCGCATACGTACGAAGA
CCCAAATCAAGCAGTATTAAAATTTACAACAGAAATACACCCAAGTTGTGTTACAA
GACAAAAAGTTATTGGAGCAGGTGAATTCGGAGAGGTATATAAAGGTATGTTAAAA
ACATCATCAGGTAAAAAAGAAGTTCCGGTTGCAATTAAAACCTTAAAGGCAGGATA
TACAGAAAAACAGCGAGTTGATTTTTTAGGTGAAGCAGGAATTATGGGTCAATTTAG
CCATCATAATATTATTCGTTTGGAAGGAGTAATAAGTAAATATAAACCAATGATGAT
TATTACAGAATACATGGAAAACGGTGCTTTAGATAAATTTTTACGTGAAAAGGATGG
TGAATTTAGTGTTTTACAATTGGTTGGTATGTTAAGAGGAATTGCTGCAGGTATGAA
ATATTTAGCTAATATGAATTATGTTCACCGTGATTTGGCAGCAAGAAATATCCTAGT
CAATTCCAATTTAGTATGTAAAGTTAGTGATTTTGGTTTAAGCAGAGTATTAGAAGA
CGATCCAGAGGCAACCTATACAACATCGGGAGGTAAAATTCCTATTCGTTGGACAG
CACCAGAAGCTATCAGTTACCGTAAATTTACAAGTGCATCAGACGTGTGGAGTTTTG
GGATTGTAATGTGGGAAGTTATGACATATGGAGAAAGACCATATTGGGAATTAAGT
AATCATGAAGTTATGAAAGCAATTAACGATGGATTTAGATTACCAACTCCGATGGAT
TGTCCATCTGCCATTTATCAACTAATGATGCAATGTTGGCAACAAGAAAGAGCACGA
CGTCCAAAATTTGCAGATATTGTTAGTATTTTAGACAAATTAATTCGTGCACCAGAT
AGTTTAAAAACTTTAGCAGACTTTGATCCTCGTGTTAGTATTCGATTACCAAGTACGT
CAGGTTCCGAAGGAGTTCCATTTCGCACAGTCTCCGAATGGTTGGAATCAATTAAAA
TGCAACAATACACCGAACACTTTATGGCAGCAGGTTACACAGCAATCGAAAAAGTT
GTTCAAATGACAAATGATGATATTAAACGTATTGGAGTTAGATTACCAGGCCACCAG
AAACGTATTGCATATTCTTTATTAGGTTTAAAAGATCAAGTTAATACCGTGGGAATT
CCAATT

圖 16

EphA2 CO 功能部位

原始的胺基酸序列

V H E F Q T L S P E G S G N L A V I G G V A V G V V L L L V L A G V
G F F I H R R R K N Q R A R Q S P E D V Y F S K S E Q L K P L K T Y
V D P H T Y E D P N Q A V L K F T T E I H P S C V T R Q K V I G A G
E F G E V Y K G M L K T S S G K K E V P V A I K T L K A G Y T E K
Q R V D F L G E A G I M G Q F S H H N I I R L E G V I S K Y K P M M
I I T E Y M E N G A L D K F L R E K D G E F S V L Q L V G M L R G I
A A G M K Y L A N M N Y V H R D L A A R N I L V N S N L V C K V S
D F G L S R V L E D D P E A T Y T T S G G K I P I R W T A P E A I S
Y R K F T S A S D V W S F G I V M W E V M T Y G E R P Y W E L S N
H E V M K A I N D G F R L P T P M D C P S A I Y Q L M M Q C W Q Q
E R A R R P K F A D I V S I L D K L I R A P D S L K T L A D F D P R
V S I R L P S T S G S E G V P F R T V S E W L E S I K M Q Q Y T E H
F M A A G Y T A I E K V V Q M T N D D I K R I G V R L P G H Q K R I
A Y S L L G L K D Q V N T V G I P I

圖 17

構築體：LLOss-PEST-CO-huEphA2
天然的 LLO 信號肽+PEST 與人類 EphA2 之細胞質功能部位融合
未密碼子最優化
無抗原決定位標籤(例如 myc 或 FLAG，用在該構築體中)
顯示融合蛋白密碼序列

ATGAAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGCGC
AACAAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTCATCC
ATGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACA
CGCGGATCTCGAGCACCGCAGGAGGAAGAACCAGCGTGCCCGCCAGTCCCCGGAGG
ACGTTTACTTCTCCAAGTCAGAACAACTGAAGCCCCTGAAGACATACGTGGACCCCC
ACACATATGAGGACCCCAACCAGGCTGTGTTGAAGTTCACTACCGAGATCCATCCAT
CCTGTGTCACTCGGCAGAAGGTGATCGGAGCAGGAGAGTTTGGGGAGGTGTACAAG
GGCATGCTGAAGACATCCTCGGGGAAGAAGGAGGTGCCGGTGGCCATCAAGACGCT
GAAAGCCGGCTACACAGAGAAGCAGCGAGTGGACTTCCTCGGCGAGGCCGGCATCA
TGGGCCAGTTCAGCCACCACAACATCATCCGCCTAGAGGGCGTCATCTCCAAATACA
AGCCCATGATGATCATCACTGAGTACATGGAGAATGGGGCCCTGGACAAGTTCCTTC
GGGAGAAGGATGGCGAGTTCAGCGTGCTGCAGCTGGTGGGCATGCTGCGGGGCATC
GCAGCTGGCATGAAGTACCTGGCCAACATGAACTATGTGCACCGTGACCTGGCTGC
CCGCAACATCCTCGTCAACAGCAACCTGGTCTGCAAGGTGTCTGACTTTGGCCTGTC
CCGCGTGCTGGAGGACGACCCCGAGGCCACCTACACCACCAGTGGCGGCAAGATCC
CCATCCGCTGGACCGCCCCGGAGGCCATTTCCTACCGGAAGTTCACCTCTGCCAGCG
ACGTGTGGAGCTTTGGCATTGTCATGTGGGAGGTGATGACCTATGGCGAGCGGCCCT
ACTGGGAGTTGTCCAACCACGAGGTGATGAAAGCCATCAATGATGGCTTCCGGCTCC
CCACACCCATGGACTGCCCCTCCGCCATCTACCAGCTCATGATGCAGTGCTGGCAGC
AGGAGCGTGCCCGCCGCCCCAAGTTCGCTGACATCGTCAGCATCCTGGACAAGCTC
ATTCGTGCCCCTGACTCCCTCAAGACCCTGGCTGACTTTGACCCCCGCGTGTCTATCC
GGCTCCCCAGCACGAGCGGCTCGGAGGGGGTGCCCTTCCGCACGGTGTCCGAGTGG
CTGGAGTCCATCAAGATGCAGCAGTATACGGAGCACTTCATGGCGGCCGGCTACAC
TGCCATCGAGAAGGTGGTGCAGATGACCAACGACGACATCAAGAGGATTGGGGTGC
GGCTGCCCGGCCACCAGAAGCGCATCGCCTACAGCCTGCTGGGACTCAAGGACCAG
GTGAACACTGTGGGGATCCCCATC

圖 18

構築體：LLOss-PEST-CO-hEphA2
天然的 LLO 信號肽+PEST 與人類 EphA2 之細胞質功能部位融合
未密碼子最優化
無抗原決定位標籤(例如 myc 或 FLAG，用在該構築體中)
顯示預測的融合蛋白

M K K I M L V F I T L I L V S L P I A Q Q T E A K D A S A F N K E N
S I S S M A P P A S P P A S P K T P I E K K H A D L E H R R R K N Q
R A R Q S P E D V Y F S K S E Q L K P L K T Y V D P H T Y E D P N Q
A V L K F T T E I H P S C V T R Q K V I G A G E F G E V Y K G M L K
T S S G K K E V P V A I K T L K A G Y T E K Q R V D F L G E A G I M
G Q F S H H N I I R L E G V I S K Y K P M M I I T E Y M E N G A L D
K F L R E K D G E F S V L Q L V G M L R G I A A G M K Y L A N M N
Y V H R D L A A R N I L V N S N L V C K V S D F G L S R V L E D D P
E A T Y T T S G G K I P I R W T A P E A I S Y R K F T S A S D V W S
F G I V M W E V M T Y G E R P Y W E L S N H E V M K A I N D G F R
L P T P M D C P S A I Y Q L M M Q C W Q Q E R A R R P K F A D I V
S I L D K L I R A P D S L K T L A D F D P R V S I R L P S T S G S E G
V P F R T V S E W L E S I K M Q Q Y T E H F M A A G Y T A I E K V
V Q M T N D D I K R I G V R L P G H Q K R I A Y S L L G L K D Q V N
T V G I P I

圖 19

天然的 LLOss-PEST-FLAG-CO-EphA2-myc-CodonOp
(天然的單核細胞增多性李斯特菌 LLO 信號肽+PEST- 密碼子最優化的-FLAG-CO-EphA2-Myc)
核苷酸序列(包括 hly 啟動基因)

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGAAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTA
CCAATTGCGCAACAAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTC
AATTTCATCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGA
AAAGAAACACGCGGATGGATCCGATTATAAAGATGATGATGATAAACACAGACGTA
GAAAAAATCAACGTGCTCGACAATCCCCAGAAGATGTGTATTTTTCGAAAAGTGAA
CAATTAAAACCATTAAAAACTTATGTTGATCCGCATACGTACGAAGACCCAAATCAA
GCAGTATTAAAATTTACAACAGAAATACACCCAAGTTGTGTTACAAGACAAAAAGT
TATTGGAGCAGGTGAATTCGGAGAGGTATATAAAGGTATGTTAAAAACATCATCAG
GTAAAAAAGAAGTTCCGGTTGCAATTAAAACCTTAAAGGCAGGATATACAGAAAAA
CAGCGAGTTGATTTTTTAGGTGAAGCAGGAATTATGGGTCAATTTAGCCATCATAAT
ATTATTCGTTTGGAAGGAGTAATAAGTAAATATAAACCAATGATGATTATTACAGAA
TACATGGAAAACGGTGCTTTAGATAAATTTTTACGTGAAAAGGATGGTGAATTTAGT
GTTTTACAATTGGTTGGTATGTTAAGAGGAATTGCTGCAGGTATGAAATATTTAGCT
AATATGAATTATGTTCACCGTGATTTGGCAGCAAGAAATATCCTAGTCAATTCCAAT
TTAGTATGTAAAGTTAGTGATTTTGGTTTAAGCAGAGTATTAGAAGACGATCCAGAG
GCAACCTATACAACATCGGGAGGTAAAATTCCTATTCGTTGGACAGCACCAGAAGC
TATCAGTTACCGTAAATTTACAAGTGCATCAGACGTGTGGAGTTTTGGGATTGTAAT
GTGGGAAGTTATGACATATGGAGAAAGACCATATTGGGAATTAAGTAATCATGAAG
TTATGAAAGCAATTAACGATGGATTTAGATTACCAACTCCGATGGATTGTCCATCTG
CCATTTATCAACTAATGATGCAATGTTGGCAACAAGAAAGAGCACGACGTCCAAAA
TTTGCAGATATTGTTAGTATTTTAGACAAATTAATTCGTGCACCAGATAGTTTAAAA
ACTTTAGCAGACTTTGATCCTCGTGTTAGTATTCGATTACCAAGTACGTCAGGTTCCG
AAGGAGTTCCATTTCGCACAGTCTCCGAATGGTTGGAATCAATTAAAATGCAACAAT
ACACCGAACACTTTATGGCAGCAGGTTACACAGCAATCGAAAAAGTTGTTCAAATG
ACAAATGATGATATTAAACGTATTGGAGTTAGATTACCAGGCCACCAGAAACGTATT
GCATATTCTTTATTAGGTTTAAAAGATCAAGTTAATACCGTGGGAATTCCAATTGAA
CAAAAATTAATTTCCGAAGAAGACTTATAAGAGCTC

圖 20

天然的 LLOss-PEST-FLAG-CO-EphA2-myc-CodonOp
(天然的單核細胞增多性李斯特菌 LLO 信號肽+PEST- 密碼子最優化的 -FLAG-CO-EphA2-Myc)
原始的胺基酸序列

M K K I M L V F I T L I L V S L P I A Q Q T E A K D A S A F N K E N
S I S S M A P P A S P P A S P K T P I E K K H A D G S D Y K D D D D
K H R R R K N Q R A R Q S P E D V Y F S K S E Q L K P L K T Y V D
P H T Y E D P N Q A V L K F T T E I H P S C V T R Q K V I G A G E F
G E V Y K G M L K T S S G K K E V P V A I K T L K A G Y T E K Q R
V D F L G E A G I M G Q F S H H N I I R L E G V I S K Y K P M M I I T
E Y M E N G A L D K F L R E K D G E F S V L Q L V G M L R G I A A
G M K Y L A N M N Y V H R D L A A R N I L V N S N L V C K V S D F
G L S R V L E D D P E A T Y T T S G G K I P I R W T A P E A I S Y R
K F T S A S D V W S F G I V M W E V M T Y G E R P Y W E L S N H E
V M K A I N D G F R L P T P M D C P S A I Y Q L M M Q C W Q Q E R
A R R P K F A D I V S I L D K L I R A P D S L K T L A D F D P R V S I
R L P S T S G S E G V P F R T V S E W L E S I K M Q Q Y T E H F M A
A G Y T A I E K V V Q M T N D D I K R I G V R L P G H Q K R I A Y S
L L G L K D Q V N T V G I P I E Q K L I S E E D L

圖 21

密碼子最優化之 LLOss-PEST-FLAG-CO-EphA2-myc-CodonOp
(密碼子最優化之單核細胞增多性李斯特菌 LLO 信號肽+PEST-密碼子最優化的-FLAG-CO-EphA2-Myc)
核苷酸序列(包括 hly 啟動基因)

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGAAAAAAATTATGTTAGTTTTTATTACATTAATTTTAGTTAGTTTAC
CAATTGCACAACAAACAGAAGCAAAAGATGCAAGTGCATTTAATAAAGAAAATAGT
ATTAGTAGTATGGCACCACCAGCAAGTCCACCAGCAAGTCCAAAAACACCAATTGA
AAAAAAACATGCAGATGGATCCGATTATAAAGACGATGATGATAAACACAGACGTA
GAAAAAATCAACGTGCTCGACAATCCCCAGAAGATGTGTATTTTTCGAAAAGTGAA
CAATTAAAACCATTAAAAACTTATGTTGATCCGCATACGTACGAAGACCCAAATCAA
GCAGTATTAAAATTTACAACAGAAATACACCCAAGTTGTGTTACAAGACAAAAAGT
TATTGGAGCAGGTGAATTCGGAGAGGTATATAAAGGTATGTTAAAAACATCATCAG
GTAAAAAAGAAGTTCCGGTTGCAATTAAAACCTTAAAGGCAGGATATACAGAAAAA
CAGCGAGTTGATTTTTTAGGTGAAGCAGGAATTATGGGTCAATTTAGCCATCATAAT
ATTATTCGTTTGGAAGGAGTAATAAGTAAATATAAACCAATGATGATTATTACAGAA
TACATGGAAAACGGTGCTTTAGATAAATTTTTACGTGAAAAGGATGGTGAATTTAGT
GTTTTACAATTGGTTGGTATGTTAAGAGGAATTGCTGCAGGTATGAAATATTTAGCT
AATATGAATTATGTTCACCGTGATTTGGCAGCAAGAAATATCCTAGTCAATTCCAAT
TTAGTATGTAAAGTTAGTGATTTTGGTTTAAGCAGAGTATTAGAAGACGATCCAGAG
GCAACCTATACAACATCGGGAGGTAAAATTCCTATTCGTTGGACAGCACCAGAAGC
TATCAGTTACCGTAAATTTACAAGTGCATCAGACGTGTGGAGTTTTGGGATTGTAAT
GTGGGAAGTTATGACATATGGAGAAAGACCATATTGGGAATTAAGTAATCATGAAG
TTATGAAAGCAATTAACGATGGATTTAGATTACCAACTCCGATGGATTGTCCATCTG
CCATTTATCAACTAATGATGCAATGTTGGCAACAAGAAAGAGCACGACGTCCAAAA
TTTGCAGATATTGTTAGTATTTTAGACAAATTAATTCGTGCACCAGATAGTTTAAAA
ACTTTAGCAGACTTTGATCCTCGTGTTAGTATTCGATTACCAAGTACGTCAGGTTCCG
AAGGAGTTCCATTTCGCACAGTCTCCGAATGGTTGGAATCAATTAAAATGCAACAAT
ACACCGAACACTTTATGGCAGCAGGTTACACAGCAATCGAAAAAGTTGTTCAAATG
ACAAATGATGATATTAAACGTATTGGAGTTAGATTACCAGGCCACCAGAAACGTATT
GCATATTCTTTATTAGGTTTAAAAGATCAAGTTAATACCGTGGGAATTCCAATTGAA
CAAAAATTAATTTCCGAAGAAGACTTATAAGAGCTC

圖 22

密碼子最優化之 LLOss-PEST-FLAG-CO-EphA2-myc-CodonOp
(密碼子最優化之單核細胞增多性李斯特菌 LLO 信號肽+PEST-密碼子最優化的-FLAG-CO-EphA2-Myc)
原始的胺基酸序列

M K K I M L V F I T L I L V S L P I A Q Q T E A K D A S A F N K E N
S I S S M A P P A S P P A S P K T P I E K K H A D G S D Y K D D D D
K H R R R K N Q R A R Q S P E D V Y F S K S E Q L K P L K T Y V D
P H T Y E D P N Q A V L K F T T E I H P S C V T R Q K V I G A G E F
G E V Y K G M L K T S S G K K E V P V A I K T L K A G Y T E K Q R
V D F L G E A G I M G Q F S H H N I I R L E G V I S K Y K P M M I I T
E Y M E N G A L D K F L R E K D G E F S V L Q L V G M L R G I A A
G M K Y L A N M N Y V H R D L A A R N I L V N S N L V C K V S D F
G L S R V L E D D P E A T Y T T S G G K I P I R W T A P E A I S Y R
K F T S A S D V W S F G I V M W E V M T Y G E R P Y W E L S N H E
V M K A I N D G F R L P T P M D C P S A I Y Q L M M Q C W Q Q E R
A R R P K F A D I V S I L D K L I R A P D S L K T L A D F D P R V S I
R L P S T S G S E G V P F R T V S E W L E S I K M Q Q Y T E H F M A
A G Y T A I E K V V Q M T N D D I K R I G V R L P G H Q K R I A Y S
L L G L K D Q V N T V G I P I E Q K L I S E E D L

圖 23

PhoD-FLAG-CO-EphA2-myc-CodonOp
(密碼子最優化之枯草桿菌 phoD Tat 信號肽-FLAG-CO-EphA2-Myc)
核苷酸序列(包括 hly 啟動基因)

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGGCATACGACAGTCGTTTTGATGAATGGGTACAGAAACTGAAAGA
GGAAAGCTTTCAAAACAATACGTTTGACCGCCGCAAATTTATTCAAGGAGCGGGGA
AGATTGCAGGACTTTCTCTTGGATTAACGATTGCCCAGTCGGTTGGGGCCTTTGGAT
CCGATTATAAAGATGATGATGATAAACACAGACGTAGAAAAAATCAACGTGCTCGA
CAATCCCCAGAAGATGTGTATTTTTCGAAAAGTGAACAATTAAAACCATTAAAAACT
TATGTTGATCCGCATACGTACGAAGACCCAAATCAAGCAGTATTAAAATTTACAACA
GAAATACACCCAAGTTGTGTTACAAGACAAAAAGTTATTGGAGCAGGTGAATTCGG
AGAGGTATATAAAGGTATGTTAAAAACATCATCAGGTAAAAAAGAAGTTCCGGTTG
CAATTAAAACCTTAAAGGCAGGATATACAGAAAAACAGCGAGTTGATTTTTTAGGT
GAAGCAGGAATTATGGGTCAATTTAGCCATCATAATATTATTCGTTTGGAAGGAGTA
ATAAGTAAATATAAACCAATGATGATTATTACAGAATACATGGAAAACGGTGCTTT
AGATAAATTTTTACGTGAAAAGGATGGTGAATTTAGTGTTTTACAATTGGTTGGTAT
GTTAAGAGGAATTGCTGCAGGTATGAAATATTTAGCTAATATGAATTATGTTCACCG
TGATTTGGCAGCAAGAAATATCCTAGTCAATTCCAATTTAGTATGTAAAGTTAGTGA
TTTTGGTTTAAGCAGAGTATTAGAAGACGATCCAGAGGCAACCTATACAACATCGG
GAGGTAAAATTCCTATTCGTTGGACAGCACCAGAAGCTATCAGTTACCGTAAATTTA
CAAGTGCATCAGACGTGTGGAGTTTTGGGATTGTAATGTGGGAAGTTATGACATATG
GAGAAAGACCATATTGGGAATTAAGTAATCATGAAGTTATGAAAGCAATTAACGAT
GGATTTAGATTACCAACTCCGATGGATTGTCCATCTGCCATTTATCAACTAATGATG
CAATGTTGGCAACAAGAAAGAGCACGACGTCCAAAATTTGCAGATATTGTTAGTATT
TTAGACAAATTAATTCGTGCACCAGATAGTTTAAAAACTTTAGCAGACTTTGATCCT
CGTGTTAGTATTCGATTACCAAGTACGTCAGGTTCCGAAGGAGTTCCATTTCGCACA
GTCTCCGAATGGTTGGAATCAATTAAAATGCAACAATACACCGAACACTTTATGGCA
GCAGGTTACACAGCAATCGAAAAAGTTGTTCAAATGACAAATGATGATATTAAACG
TATTGGAGTTAGATTACCAGGCCACCAGAAACGTATTGCATATTCTTTATTAGGTTT
AAAAGATCAAGTTAATACCGTGGGAATTCCAATTGAACAAAAATTAATTTCCGAAG
AAGACTTATAAGAGCTC

圖 24

PhoD-FLAG-CO-EphA2-myc-CodonOp
(密碼子最優化之枯草桿菌 phoD Tat 信號肽-FLAG-CO-EphA2-Myc)
胺基酸序列

M A Y D S R F D E W V Q K L K E E S F Q N N T F D R R K F I Q G A
G K I A G L S L G L T I A Q S V G A F G S D Y K D D D D K H R R R
K N Q R A R Q S P E D V Y F S K S E Q L K P L K T Y V D P H T Y E
D P N Q A V L K F T T E I H P S C V T R Q K V I G A G E F G E V Y K
G M L K T S S G K K E V P V A I K T L K A G Y T E K Q R V D F L G
E A G I M G Q F S H H N I I R L E G V I S K Y K P M M I I T E Y M E
N G A L D K F L R E K D G E F S V L Q L V G M L R G I A A G M K Y
L A N M N Y V H R D L A A R N I L V N S N L V C K V S D F G L S R
V L E D D P E A T Y T T S G G K I P I R W T A P E A I S Y R K F T S
A S D V W S F G I V M W E V M T Y G E R P Y W E L S N H E V M K
A I N D G F R L P T P M D C P S A I Y Q L M M Q C W Q Q E R A R R
P K F A D I V S I L D K L I R A P D S L K T L A D F D P R V S I R L P
S T S G S E G V P F R T V S E W L E S I K M Q Q Y T E H F M A A G Y
T A I E K V V Q M T N D D I K R I G V R L P G H Q K R I A Y S L L G
L K D Q V N T V G I P I E Q K L I S E E D L

圖 25

密碼子最優化之 LLOss-PEST-NYESO1-CodonOp
(密碼子最優化之單核細胞增多性李斯特菌 LLO 信號肽+PEST-密碼子最優化的--NYESO1)
核苷酸序列(包括 hly 啟動基因)

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGAAAAAAATTATGTTAGTTTTTATTACATTAATTTTAGTTAGTTTAC
CAATTGCACAACAAACAGAAGCAAAAGATGCAAGTGCATTTAATAAAGAAAATAGT
ATTAGTAGTATGGCACCACCAGCAAGTCCACCAGCAAGTCCAAAAACACCAATTGA
AAAAAAACATGCAGATGGATCCCAAGCAGAAGGTCGCGGAACAGGAGGAAGTACA
GGAGATGCAGACGGACCAGGAGGACCAGGAATACCAGACGGACCAGGAGGAAATG
CAGGAGGCCCAGGCGAAGCAGGCGCAACAGGAGGAAGAGGACCAAGAGGAGCAG
GAGCAGCACGAGCATCAGGACCAGGAGGCGGAGCACCAAGAGGACCACATGGCGG
AGCGGCAAGCGGATTAAATGGATGTTGTAGATGTGGAGCACGCGGACCAGAATCAA
GACTTTTAGAATTTTATTTAGCCATGCCATTTGCAACCCCAATGGAAGCAGAATTAG
CACGAAGATCATTAGCACAAGATGCCCCACCATTACCAGTACCAGGAGTTTTATTAA
AAGAGTTTACAGTATCAGGCAATATTTTAACAATACGTTTAACAGCAGCAGACCATC
GTCAATTACAACTATCTATCAGTTCATGTTTACAACAATTATCCTTATTAATGTGGAT
TACACAATGTTTTTTACCAGTTTTTTTAGCACAACCACCATCAGGACAAAGAAGATA
AGAGCTC

圖 26

密碼子最優化之 LLOss-PEST-NYESO1-CodonOp
(密碼子最優化之單核細胞增多性李斯特菌 LLO 信號肽+PEST-密碼子最優化的--NYESO1)
原始的胺基酸序列

M K K I M L V F I T L I L V S L P I A Q Q T E A K D A S A F N K E N
S I S S M A P P A S P P A S P K T P I E K K H A D G S Q A E G R G T
G G S T G D A D G P G G P G I P D G P G G N A G G P G E A G A T G
G R G P R G A G A A R A S G P G G G A P R G P H G G A A S G L N G
C C R C G A R G P E S R L L E F Y L A M P F A T P M E A E L A R R S
L A Q D A P P L P V P G V L L K E F T V S G N I L T I R L T A A D H
R Q L Q L S I S S C L Q Q L S L L M W I T Q C F L P V F L A Q P P S
G Q R R

圖 27

P*hly*(10403S)-Usp45-CodOp

(330 個核苷酸)

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGAAAAAAAAAAATTATTAGTGCAATTTTAATGAGTACAGTTATTTTA
AGTGCAGCAGCACCATTAAGTGGTGTTTATGCAGATACAGGATCC

圖 28

P*hly*(10403S)-p60SP- 天然的
(330 個核苷酸)

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGAATATGAAAAAAGCAACTATCGCGGCTACAGCTGGGATTGCGGT
AACAGCATTTGCTGCGCCAACAATCGCATCCGCAAGCACTGGATCC

圖 29

P*hly*(10403S)-p60SP-CodOp

330 個核苷酸

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGAATATGAAAAAAGCAACAATTGCAGCAACAGCAGGTATTGCAGT
TACAGCATTTGCAGCACCAACAATTGCAAGTGCAAGTACAGGATCC

圖 30

***hly*P-p60 (*KpnI-BamHI*)**

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTA
ACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAG
CATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAA
AGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGA
GTGAAACCCATGAATATGAAAAAAGCAACTATCGCGGCTACAGCTGGGATTGCGGT
AACAGCATTTGCTGCGCCAACAATCGCATCCGCAAGCACTGTAGTAGTCGAAGCTG
GTGATACTCTTTGGGGTATCGCACAAAGTAAAGGGACTACTGTTGACGCAATTAAAA
AAGCAAACAATTTAACAACAGATAAAATCGTACCAGGTCAAAAATTACAAGTAAAT
AATGAGGTTGCTGCTGCTGAAAAAACAGAGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAAA
CGTCCGTAGTGGCGCTGGTGTTGATAACAGTATTATTACGTCCATCAAAGGTGGAAC
AAAAGTAACTGTTGAAACAACCGAATCTAACGGCTGGCACAAAATTACTTACAACG
ATGGAAAAACTGGTTTCGTTAACGGTAAATACTTAACTGACAAAGCAGTAAGCACT
CCAGTTGCACCAACACAAGAAGTGAAAAAAGAAACTACTACTCAACAAGCTGCACC
TGCTGCAGAAACAAAAACTGAAGTAAAACAAACTACACAAGCAACTACACCTGCGC
CTAAAGTAGCAGAAACGAAAGAAACTCCAGTAGTAGATCAAAATGCTACTACACAC
GCTGTTAAAAGCGGTGACACTATTTGGGCTTTATCCGTAAAATACGGTGTTTCTGTTC
AAGACATTATGTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGTCAAAAGCT
TGCTATTAAACAAACTGCTAACACAGCTACTCCAAAAGCAGAAGTGAAAACGGAAG
CTCCAGCAGCTGAAAAACAAGCAGCTCCAGTAGTTAAAGAAAATACTAACACAAAT
ACTGCTACTACAGAGAAAAAAGAAACAGCAACGCAACAACAAACAGCACCTAAAG
CACCAACAGAAGCTGCAAAACCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAAATGCTAAT
AAAACAAATACAAATACAAATACAAATACAAATACAAACAATACTAATACAAATAC
ACCATCTAAAAATACTAATACAAACTCAAATACTAATACGAATACAAACTCAAATA
CGAATGCTAATCAAGGTTCTTCCAACAATAACAGCAATTCAAGTGCAAGTGCTATTA
TTGCTGAAGCTCAAAAACACCTTGGAAAAGCTTATTCATGGGGTGGTAACGGACCA
ACTACATTTGATTGCTCTGGTTACACTAAATATGTATTTGCTAAAGCGGGAATCTCCC
TTCCACGTACTTCTGGCGCACAATACGCTAGCACTACAAGAATCTCTGAATCTCAAG
CAAAACCTGGTGATTTAGTATTCTTTGACTATGGTAGCGGAATTTCTCACGTTGGTAT
CTACGTTGGTAATGGTCAAATGATTAACGCGCAAGACAATGGCGTTAAATACGATA
ACATCCACGGCTCTGGCTGGGGTAAATATCTAGTTGGCTTCGGTCGCGTATAATTAA
GGATCC

圖 31

構築體：pAM401-MCS
質體 pAM401 含有得自 pPL2 載體的多重選殖位置(MCS)
將得自 pPL2 的小 Aat II MCS 片段，在弄鈍的 Xba I 和 Nru I 位置之間，插入 pAM401 質體內
顯示完整的 pAM401-MCS 質體序列

CTTTAAACGTGGATCATTTTCTTTAAATTTATGCTGACGACCTTTGAATTTGCCTTTTTTCTTAGCAATT
TCGATTCCTTGTGCCTGACGTTCCTTAATTTTTTTTCGTTCTGATTCTGCTTGATACTTGTACAATTCAAT
GACAAGGCTATTAATCAAACGCCTTAAATTTTCATCTTCAATACCATTCATTGAGGGTAAATTTAAGAC
TTCCAGGGTTGCCCCCTTAATTTGAATTTGATTCATCAATTCTGTTAATTCTTTATTATTTCGTCCTAATC
GATCTAATTCAGTAACAATAACAATATCCCCTTCACGAATATAGTTAAGCATAGCTTGTAATTGTGGGC
GTTCGACCGATTGACCGCTTAATTTGTCTGAAAAGACCTTAGAAACGCCCTGTAACGCTTGTAATTGCC
GATCTAAGTTCTGTTCTTTGCTACTGACACGTGCATAACCAATTTTAGCCATTTTCAACCAACCTCTAA
AATTCTCTCGGTTGCAATAACCAATCAGCAATATCTACTTTTTCAATTTCAAATTGCTTATCAGAAATT
GTCTTTTCGTAAGCGATAAAATCTTGCGCATATTGTTGCTCATTAAAAATAGCCACCACTTCGTCATTT
TCTAAAACTCGATAAATAAATTTTTTCATTTTACTCCTCCTATTATGCCCAACTTAAATGACCTATTCAC
CAAGTCAATTATACTGCTAAAATCATATTAGGACAAATAGGTATACTCTATTGACCTATAAATGATAG
CAACTTAAAAGATCAAGTGTTCGCTTCGCTCTCACTGCCCCTCGACGTTTTAGTAGCCTTTCCCTCACTT
CGTTCAGTCCAAGCCAACTAAAAGTTTTCGGGCTACTCTCTCCTTCTCCCCCTAATAATTAATTAAAAT
CTTACTCTGTATATTTCTGCTAATCATTCACTAAACAGCAAAGAAAAACAAACACGTATCATAGATAT
AAATGTAATGGCATAGTGCGGGTTTTATTTTCAGCCTGTATCGTAGCTAAACAAATCGAGTTGTGGGTC
CGTTTTGGGGCGTTCTGCCAATTTGTTTAGAGTTTCTTGAATAAATGTACGTTCTAAATTAAACGAAGC
TGTCAGCGCCTTTATATAGCTTTCTCGTTCTTCTTTTTTTAATTTAATGATCGATAGCAACAATGATTTA
ACACTAGCAAGTTGAATGCCACCATTTCTTCCTGGTTTAATCTTAAAGAAAATTTCCTGATTCGCCTTC
AGTACCTTCAGCAATTTATCTAATGTCCGTTCAGGAATGCCTAGCACTTCTCTAATCTCTTTTTTGGTCG
TCGCTAAATAAGGCTTGTATACATCGCTTTTTTCGCTAATATAAGCCATTAAATCTTCTTTCCATTCTGA
CAAATGAACACGTTGACGTTCGCTTCTTTTTTTCTTGAATTTAAACCACCCTTGACGGACAAATAAATC
TTTACTGGTTAAATCACTTGATACCCAAGCTTTGCAAAGAATGGTAATGTATTCCCTATTAGCCCCTTG
ATAGTTTTCTGAATAGGCACTTCTAACAATTTTGATTACTTCTTTTTCTTCTAAGGGTTGATCTAATCGA
TTATTAAACTCAAACATATTATATTCGCACGTTTCGATTGAATAGCCTGAACTAAAGTAGGCTAAAGA
GAGGGTAAACATAACGCTATTGCGCCCTACTAAACCCTTTTCTCCTGAAAATTTCGTTTCGTGCAATAA
GAGATTAAACCAGGGTTCATCTACTTGTTTTTTGCCTTCTGTACCGCTTAAAACCGTTAGACTTGAACG
AGTAAAGCCCTTATTATCTGTTTGTTTGAAAGACCAATCTTGCCATTCTTTGAAAGAATAACGGTAATT
GGGATCAAAAAATTCTACATTGTCCGTTCTTGGTATACGAGCAATCCCAAAATGATTGCACGTTAGAT
CAACTGGCAAAGACTTTCCAAAATATTCTCGGATATTTTGCGAGATTATTTTGGCTGCTTTGACAGATT
TAAATTCTGATTTTGAAGTCACATAGACTGGCGTTTCTAAAACAAAATATGCTTGATAACCTTTATCAG
ATTTGATAATTAACGTAGGCATAAAACCTAAATCAATAGCTGTTGTTAAAATATCGCTTGCTGAAATA
GTTTCTTTTTCCGTGTGAATATCAAAATCAATAAAGAAGGTATTGATTTGTCTTAAATTGTTTTCAGAA
TGTCCTTTAGTGTATGAACGGTTTTCGTCTGCATACGTACCATAACGATAAACGTTTGGTGTCCAATGC
GTAAATGTATCTTGATTTTCGTGAATCGCTTCTTCGGAAGTCAGAACAACGCCACGTCCGCCAATCATG
CTTTTTTTTGAGCGATACGCAAAAATAGCCCCTTTACTTTTACCTGGCTTGGTAGTGATTGAGCGAATT
TTACTATTTTTAAATTTGTACTTTAACAAGCCGTCATGAAGCACAGTTTCTACAACAAAAGGGATATTC
ATTCAGCTGTTCTCCTTTCTTACGAAAATTAATTAGTTAGAAGCTACGATCAAAGTTGAATCACAACAA
AAAAGGCAATCAACTAAGTTTTTCTTAATTGATTGCCTGGTATCTTCTTAAAGACTTGAAATCCCCTCA
AAAACCCGATATAATGGGTTTACAGATATTTAAGTATCTGATTAATAAAGTAATTAAATACTTTACCA
AATTTTGGGTCTCGACTTCTTTAATTGATTGGTGGTAATCAATTAAGGCTCGCAGTTAAAATTTCTCAG
GCTTTAACTGGTCGTGGCTCTTTTTTTGTATTCTTTATTCAGTTCGTTGTTTCGTTATATCTAGTATATCG
CTTTTTAAAAAAATAAGCAATGATTTCGTGCATTATTCACACGAAATCATTGCTTTTTTCTTCTTCCATT
TCTAACTCCAATGTTACTTGTTCTGTTTCTGGTTCTGGTTCTGTTGGCTCATTTGGGATTAAATCCACTA
CTAGCGTTGAGTTAGTTCCGTCTCTAATAGCCGGTTAAGTAATAGCCGGTTAAGTGGTCAAACTTTGGG
AAAATCTCAACCCGCATTAAGTTTTGATGCCATGACAATCGTTGGAAATTTGAACAAAACTAATGCTA
AAAAGCTATCTGACTTTATGAGTGTAGAGCCACAAATACGACTTTGGGATATACTTCAAACAAAGTTT

圖 32A

(續圖 32A 的序列)

AAAGCTAAGGCACTTCAAGAAAAAGTTTATATCGAATATGACAAAGTAAAAGCAGATACTTGGGATA
GACGTAATATGCGTGTTGAATTTAATCCCAATAAACTCACACATGAAGAAATGATTTGGTTAAAACAA
AATATTATCGACTACATGGAAGATGACGGTTTTACAAGATTAGACTTAGCTTTTGATTTTGAAGATGAT
TTGAGCGATTACTATGCAATGACTGATAAAGCAGTTAAGAAAACTGTTTTTTATGGTCGTAATGGCAA
GCCAGAAACAAAATATTTTGGTGTCCGTGATAGTGATAGATTTATTAGAATTTATAATAAAAAACAAG
AACGTAAAGATAACGCAGATGTTGAAGTTGTGTTTGAACATTTATGGCGTGTAGAAGTTGAATTAAAA
AGAGATATGGTTGATTACTGGAATGATTGTTTTAATGATTTACACATCTTTGAAACCTGCGTGGGCTAC
TTTAGAAAAAATTAATGAGCAAGCTATGGTTTATACTTTGTTGCATGAAGAAAGTATGTGGGGAAAGC
TAAGTAAGAATACTAAGACTAAATTTAAAAAATTGATTAGAGAAATATCTCCAATTGATTTAACGGAA
TTAATGAAATCGACTTTAAAAGCGAACGAAAAACAATTGCAAAAGCAGATTGATTTTTGGCAACGTGA
ATTTAGGTTTTGGAAGTAAAATAAGTTTTATTTGATAAAAATTGCTAATTCAGTATAATTAATATTTAC
GAGGTGACATAACGTATGAAAAAATCAGAGGATTATTCCTCCTAAATATAAAAATTTAAAATTTAGGA
GGAAGTTATATATGACTTTTAATATTATTGAATTAGAAAATTGGGATAGAAAAGAATATTTTGAACAC
TATTTTAATCAGCAAACTACTTATAGCATTACTAAAGAAATTGATATTACTTTGTTTAAAGATATGATA
AAAAAGAAAGGATATGAAATTTATCCCTCTTTAATTTATGCAATTATGGAAGTTGTAAATAAAAATAA
AGTGTTTAGAACAGGAATTAATAGTGAGAATAAATTAGGTTATTGGGATAAGTTAAATCCTTTGTATA
CAGTTTTTAATAAGCAAACTGAAAAATTTACTAACATTTGGACTGAATCTGATAAAAACTTCATTTCTT
TTTATAATAATTATAAAAATGACTTGCTTGAATATAAAGATAAAGAAGAAATGTTTCCTAAAAAACCG
ATACCTGAAAACACCATACCGATTTCAATGATTCCTTGGATTGATTTTAGTTCATTTAATTTAAATATT
GGTAACAATAGCAGCTTTTTATTGCCTATTATTACGATAGGTAAATTTTATAGTGAGAATAATAAAATT
TATATACCAGTTGCTCTGCAACTTCATCATTCTGTATGTGATGGTTACCATGCTTCACTATTTATGAATG
AATTTCAAGATATAATTCATAGGGTAGATGATTGGATTTAGTTTTTAGATTTTGAAAGTGAATTTAATT
TTATACACGTAAGTGATCATAAAATTTATGAACGTATAACAACCACATTTTTTGGTTGCTTGTGGTTTT
GATTTTGAATTTGGTTTTGAACTTATGGACTGATTTATTCAGTCCATTTTTTGTGCTTGCACAAAAACTA
GCCTCGCAGAGCACACGCATTAATGACTTATGAAACGTAGTAAATAAGTCTAGTGTGTTATACTTTACT
TGGAAGATGCACCGAATAAAAAATATTGAAGAACAACTAGCAAAAGATTTTAAAGAGTTATTTTATTT
TAAGTCTTTATAACATGAGTGAAGCGAATTTTTAAATTTCGATAGAAATTTTTACATCAAAAAGCCCCC
TGTCAAAATTGACGAAGGGGGTTTTTTGGCGCACGCTTTTCGTTAGAAATATACAAGATTGAAAATCG
TGTATAAGTGCGCCCTTTGTTTTGAACTTAGCACGTTACATCAATTTTTTAAAATGATGTATAAGTGCG
CCCTTTTAAATTTTGAGTGATTATATTTTTTGAGTTAGAAAAAGGGATTGGGAAAATTTCCCAAAATAA
TTTAAAAAATAAGCAAAAATTTTCGATAGAGAATGTGCTATTTTTTGTCAAAGGTGTATACCTTGACTG
TGCTTGCTGTTACATTAAGTTTATTTTTAAGTTATTAAAAAAGAAATAGCTTTTAAAGTTTGGCTCGCT
GTCGCTTTATAAAGCTGATTGACTTTTGATTGCAAACTACTTAAAGAAAACAAACTCGGACTATTCGTT
TTCTTCTCTTTGGTTTGAACATCAGCAATTATCCCCTCTTGATTGCCTATTTTAGCTTGTTTAGAAGAAA
CAAAAGCTAAAAGCTCCTCTTGGGTTTTAAAACGCTGTGTGGGGCTTAGAACGCCCTTAAACGACCCT
TGGTTTACTTTTATACTAGCTTCCACCTCGAAAAAAGGTTCTTTTTTAAAATTCTCTATGGCTTCCTGGC
GCTGAAAAAATAAGGTATAAGGTGGGCGTTTGAACACGTCCTAGTGAAAATGTACCTTGTACGCCCCT
TCTGTTGTAAATTTAACGTATACAAAGGGCTTGCGTTCATGCCGATCAACCAATCGGCAATTTGGCGTG
TTTGCGCTTCTTGATAAAAGGGATAGTAATTCATTCCAGGTTGCAAATTTTGAAAACCGCTTCGGATTA
CATCTTTTTCTAAGCTATTGATCCATAGTCTTTTAAATGTTTTATCTTTTGAAAAGGCATTTGCTTTATG
GATAATCGACCAGGCGATATTTTCACCTTCTCTGTCGCTATCTGTTGCAACAATAATTGTATTTGCCTTT
TTGAGAAGTTCTGCAACAATTTTAAACTGCTTTCCCTTATCTTTTGCAACTTCAAAATCGTATCGATCA
GGAAAAATCGGCAAAGATTCAAGTTTCCAATTTTGCCACTTTTCGTCATAATGACCTGGTTCTGCTAAT
TCCACTAAATGCCCAAAACCAAAGGTGATAAACGTTTCATCTGTAAATAGTGGGTCTTTGATCTCAAA
ATAACCGTCTTTTTTGGTGCTTTGTTTTAAAGCACTTGCGTAGGCTAATGCCTGGCTTGGTTTTTCAGCT
AAAATAACCGTACTCATTAACTATCCCTCTTTTCATTGTTTTTTCTTTGATCGACTGTCACGTTATATCT
TGCTCGATACCTTCTAAACGTTCGGCGATTGATTCCAGTTTGTTCTTCAACTTCTTTATCGGATAAACCA
TTCAAAAACAAATCGAAAGCATGGATGCGCCGCGTGCGGCTGCTGGAGATGGCGGACGCGATGGATA
TGTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGCGCATTCACAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGCTCCAATTCTTGGAG
TGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCATTCAGGTCGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGC
GACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAGGTATAGGGCGGCGCCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCATGT
GCTCGCCGAGGCGGCATAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAGTGATCGAAGTTAGGCTGGTAAGA

圖 32B

(續圖 32B 的序列)

GCCGCGAGCGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTCGTCATCTACCTGCCTGGACAGCATGGCCTGCAA
CGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGCGAGAAGAATCATAATGGGGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTC
GCAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGC
TTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTC
CAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATGCTAGAAATATTTTATCTGATTAATAAGATGATCTTCTTG
AGATCGTTTTGGTCTGCGCGTAATCTCTTGCTCTGAAAACGAAAAAACCGCCTTGCAGGGCGGTTTTTC
GAAGGTTCTCTGAGCTACCAACTCTTTGAACCGAGGTAACTGGCTTGGAGGAGCGCAGTCACCAAAAC
TTGTCCTTTCAGTTTAGCCTTAACCGGCGCATGACTTCAAGACTAACTCCTCTAAATCAATTACCAGTG
GCTGCTGCCAGTGGTGCTTTTGCATGTCTTTCCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG
CAGCGGTCGGACTGAACGGGGGGTTCGTGCATACAGTCCAGCTTGGAGCGAACTGCCTACCCGGAACT
GAGTGTCAGGCGTGGAATGAGACAAACGCGGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAAACCGAAAGGC
AGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCCGCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGG
TTTCGCCACCACTGATTTGAGCGTCAGATTTCGTGATGCTTGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAA
CGGCTTTGCCGCGGCCCTCTCACTTCCCTGTTAAGTATCTTCCTGGCATCTTCCAGGAAATCTCCGCCCC
GTTCGTAAGCCATTTCCGCTCGCCGCAGTCGAACGACCGAGCGTAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGC
GGAATATATCCTGTATCACATATTCTGCTGACGCACCGGTGCAGCCTTTTTTCTCCTGCCACATGAAGC
ACTTCACTGACACCCTCATCAGTGCCAACATAGTAAGCCAGTATACACTCCGCTAGCGCTGATGTCCG
GCGGTGCTTTTGCCGTTACGCACCACCCCGTCAGTAGCTGAACAGGAGGGACAGCTGATAGAAACAGA
AGCCACTGGAGCACCTCAAAAACACCATCATACACTAAATCAGTAAGTTGGCAGCATCACCCGACGCA
CTTTGCGCCGAATAAATACCTGTGACGGAAGATCACTTCGCAGAATAAATAAATCCTGGTGTCCCTGT
TGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAACTTTTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCA
ACTTTCACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTA
AGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAA
AGAACATTTTGAGGCATTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTAC
GGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGCCCG
CCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTG
TTCACCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAAACGTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACG
ACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATT
TCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTG
ATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACTTCTTCGCCCCCGTTTTCACCATGGGCAAATATTATACGCAAG
GCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAGGTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCATGTCGGC
AGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAG
TTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTGCTACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAA
TTCGAAAGCAAATTCGACCCGGTCGTCGGTTCAGGGCAGGGTCGTTAAATAGCCGCTTATGTCTATTG
CTGGTTTACCGGTTTATTGACTACCGGAAGCAGTGTGACCGTGTGCTTCTCAAATGCCTGAGGCCAGTT
TGCTCAGGCTCTCCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATATGATCATTTATTCTGCCTCCCAGAGCCTGAT
AAAAACGGTTAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGAT
GCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCCGTGGCCG
GGGGACTGTTGGGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCG
GCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTACCGGACAGCGGTGCGGACTGTTGTAACTC
AGAATAAGAAATGAGGCCGCTCATGGCGTTGACTCTCAGTCATAGTATCGTGGTATCACCGGTTGGTT
CCACTCTCTGTTGCGGGCAACTTCAGCAGCACGTAGGGGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACA
CGGAAACCGAAGACCATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTCACGT
TCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCCTCA
ACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGCCAGGACCCAACGCTGCCCGA

圖 32C

人類間皮素基因
為了在李斯特菌屬中表現，將其密碼子最優化

ATGGCATTGCCAACTGCACGTCCATTACTAGGTAGTTGCGGTACACCAGCACTAGGT
TCTTTATTATTTTTGTTATTTTCTCTAGGTTGGGTTCAACCAAGTCGTACATTAGCAG
GTGAAACAGGTCAAGAAGCAGCACCACTTGACGGTGTATTAACGAATCCACCAAAT
ATATCAAGTTTAAGTCCACGTCAATTATTAGGTTTTCCATGTGCAGAAGTTTCAGGTT
TAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTAGCAGTTGCATTAGCACAAAAAAACGTTAAA
TTATCTACAGAACAGTTACGTTGTTTAGCCCATAGATTAAGCGAACCACCAGAAGAC
TTAGATGCACTTCCTTTAGACCTTCTTTTATTCTTAAATCCAGATGCATTTTCAGGAC
CACAAGCATGTACACGTTTTTTTAGTCGAATTACAAAAGCCAATGTTGATTTATTAC
CTCGTGGGGCTCCTGAAAGACAACGTTTATTACCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGTG
TTCGCGGTAGCTTATTAAGTGAAGCCGATGTTCGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTG
ATTTACCTGGTCGTTTCGTTGCAGAATCAGCAGAAGTGTTATTACCGAGATTAGTTTC
ATGCCCAGGACCTTTAGATCAAGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAGCTCTTCAAG
GAGGAGGCCCACCATATGGCCCACCAAGTACATGGAGTGTTTCTACAATGGATGCG
TTAAGAGGTTTATTACCGGTTTTAGGACAACCAATTATTCGTAGTATTCCACAAGGC
ATTGTAGCAGCATGGCGTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGGCGACAACCAGAA
CGTACAATTCTACGTCCAAGATTTCGTAGAGAAGTAGAAAAAACGGCGTGTCCTAGT
GGCAAAAAAGCACGTGAAATTGATGAAAGTTTAATTTTTTATAAAAAATGGGAATT
AGAAGCATGTGTCGATGCAGCATTACTAGCTACACAAATGGATCGTGTTAATGCTAT
TCCATTCACATATGAACAATTAGATGTTTTAAAGCATAAATTAGACGAATTATATCC
ACAAGGTTATCCAGAATCAGTTATTCAACATTTAGGTTACTTATTTTTAAAAATGAG
TCCAGAAGACATACGCAAATGGAATGTTACAAGTTTAGAAACATTAAAAGCGCTTTT
AGAAGTTAACAAAGGTCATGAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATTGATAGATT
CGTTAAAGGCCGTGGTCAATTAGATAAAGATACTTTAGATACATTAACAGCATTTTA
TCCTGGCTACTTATGCAGTTTATCACCAGAAGAATTAAGTTCCGTTCCACCGAGTAG
TATCTGGGCAGTTCGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGACCCACGTCAATTAGATGT
TTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTCCAAAATATGAACGGTAGTGAATATTTCGT
AAAAATTCAATCCTTTTTAGGTGGTGCACCAACTGAAGATCTAAAAGCATTAAGCCA
ACAAAATGTAAGTATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATGCAGTTCT
ACCATTAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGGTCCACACGTAGAAGGATTAA
AAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTCGCGATTGGATTTTACGTCAACGTCAAGATG
ATTTAGATACATTAGGTTTAGGTTTACAAGGCGGTATTCCGAATGGATATTTAGTGT
TAGATTTATCTGTTCAAGAAGCATTAAGTGGTACACCGTGTTTATTAGGTCCAGGTC
CAGTTTTAACAGTGTTAGCATTATTATTAGCCAGTACATTAGCTTAA

圖 33

M A L P T A R P L L G S C G T P A L G S L L F L L F S L G W V Q P S
R T L A G E T G Q E A A P L D G V L T N P P N I S S L S P R Q L L G
F P C A E V S G L S T E R V R E L A V A L A Q K N V K L S T E Q L R
C L A H R L S E P P E D L D A L P L D L L L F L N P D A F S G P Q A
C T R F F S R I T K A N V D L L P R G A P E R Q R L L P A A L A C W
G V R G S L L S E A D V R A L G G L A C D L P G R F V A E S A E V
L L P R L V S C P G P L D Q D Q Q E A A R A A L Q G G G P P Y G P P
S T W S V S T M D A L R G L L P V L G Q P I I R S I P Q G I V A A W
R Q R S S R D P S W R Q P E R T I L R P R F R R E V E K T A C P S G
K K A R E I D E S L I F Y K K W E L E A C V D A A L L A T Q M D R
V N A I P F T Y E Q L D V L K H K L D E L Y P Q G Y P E S V I Q H L
G Y L F L K M S P E D I R K W N V T S L E T L K A L L E V N K G H E
M S P Q V A T L I D R F V K G R G Q L D K D T L D T L T A F Y P G
Y L C S L S P E E L S S V P P S S I W A V R P Q D L D T C D P R Q L
D V L Y P K A R L A F Q N M N G S E Y F V K I Q S F L G G A P T E D
L K A L S Q Q N V S M D L A T F M K L R T D A V L P L T V A E V Q
K L L G P H V E G L K A E E R H R P V R D W I L R Q R Q D D L D T
L G L G L Q G G I P N G Y L V L D L S V Q E A L S G T P C L L G P G
P V L T V L A L L L A S T L A

圖 34

老鼠間皮素基因
為了在李斯特菌屬中表現，將其密碼子最優化

ATGGCATTACCAACGGCTCGCCCATTATTAGGTTCTTGTGGTTCACCAATTTGTAGTC
GCAGTTTTTTATTATTATTACTATCTTTAGGTTGGATTCCGCGTTTACAAACACAAAC
CACTAAAACAAGTCAAGAAGCTACATTATTGCATGCAGTCAATGGCGCAGCAGATT
TTGCAAGTTTACCAACAGGCTTATTTCTTGGTCTTACATGTGAAGAAGTTAGTGATTT
AAGTATGGAACAAGCAAAAGGTTTAGCGATGGCGGTTCGCCAAAAAAATATTACAT
TACGTGGTCATCAATTACGTTGTTTAGCACGTCGTTTACCACGACATTTAACAGATG
AAGAATTAAATGCTCTACCATTAGACTTATTATTATTTTTAAATCCAGCAATGTTTCC
AGGTCAACAAGCATGTGCCCATTTTTTCAGTTTAATTTCGAAAGCAAATGTAGATGT
TTTACCGAGACGTAGCTTAGAACGTCAACGTCTTTTAATGGAAGCATTAAAATGTCA
AGGTGTTTATGGTTTCCAAGTTAGTGAAGCAGATGTTCGTGCACTTGGTGGTTTAGC
TTGTGATTTACCAGGGAAATTTGTAGCACGTTCTAGTGAAGTATTATTACCATGGTT
AGCAGGTTGTCAAGGTCCATTAGATCAAAGTCAAGAAAAAGCAGTTCGTGAAGTCT
TACGTAGTGGTCGTACTCAATATGGCCCACCTAGCAAATGGAGTGTTAGTACGTTAG
ATGCATTACAAAGTTTAGTAGCTGTTTTAGATGAAAGTATTGTTCAGAGTATTCCAA
AAGATGTGAAAGCAGAGTGGTTACAACATATTTCCCGTGACCCATCTCGTTTAGGTA
GTAAATTAACAGTTATTCATCCACGTTTTCGCCGCGACGCAGAACAAAAAGCATGTC
CACCAGGTAAAGAACCATATAAAGTAGATGAAGATTTAATTTTTTATCAGAATTGGG
AATTAGAAGCCTGTGTTGATGGTACAATGTTAGCACGTCAAATGGATTTAGTTAATG
AAATTCCATTTACATATGAACAATTAAGTATCTTTAAACATAAATTAGATAAAACAT
ATCCACAAGGTTATCCAGAATCGTTAATTCAACAATTAGGTCATTTTTTTCGTTATGT
TAGTCCAGAAGACATTCATCAATGGAATGTTACAAGTCCAGATACAGTTAAAACTTT
ATTAAAAGTTAGTAAAGGTCAAAAAATGAATGCTCAAGCAATTGCATTAGTCGCAT
GTTATTTACGTGGAGGTGGTCAATTAGATGAAGATATGGTTAAAGCATTAGGGGATA
TTCCATTATCATATTTATGTGATTTCTCCCCACAAGACTTACATTCAGTTCCAAGTAG
TGTTATGTGGTTAGTTGGTCCACAAGGTTTAGATAAATGTAGTCAACGTCATTTAGG
TTTACTTTATCAAAAAGCATGTAGTGCGTTTCAAAATGTTAGTGGTTTAGAATATTTT
GAAAAAATCAAAACATTTTTAGGAGGTGCATCTGTAAAAGATTTACGCGCATTAAGT
CAACATAATGTAAGTATGGATATCGCAACATTTAAACGTTTACAAGTCGATAGTCTA
GTTGGTCTTAGTGTAGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGGGCCGAATATTGTAGATTTA
AAAACAGAAGAAGATAAAAGTCCAGTTCGTGACTGGTTATTTCGACAACATCAGAA
AGACTTAGATCGTCTTGGATTAGGTTTACAAGGTGGTATTCCAAATGGTTATTTAGTT
TTAGATTTTAATGTACGTGAAGCATTTAGTTCAAGAGCGAGTTTATTAGGTCCAGGT
TTTGTGTTAATTTGGATTCCAGCATTACTACCAGCACTTCGTTTATCATAA

圖 35

老鼠間皮素原始的胺基酸序列

M A L P T A R P L L G S C G S P I C S R S F L L L L L S L G W I P R L
Q T Q T T K T S Q E A T L L H A V N G A A D F A S L P T G L F L G L
T C E E V S D L S M E Q A K G L A M A V R Q K N I T L R G H Q L R
C L A R R L P R H L T D E E L N A L P L D L L L F L N P A M F P G Q
Q A C A H F F S L I S K A N V D V L P R R S L E R Q R L L M E A L K
C Q G V Y G F Q V S E A D V R A L G G L A C D L P G K F V A R S S
E V L L P W L A G C Q G P L D Q S Q E K A V R E V L R S G R T Q Y
G P P S K W S V S T L D A L Q S L V A V L D E S I V Q S I P K D V K
A E W L Q H I S R D P S R L G S K L T V I H P R F R R D A E Q K A C
P P G K E P Y K V D E D L I F Y Q N W E L E A C V D G T M L A R Q
M D L V N E I P F T Y E Q L S I F K H K L D K T Y P Q G Y P E S L I
Q Q L G H F F R Y V S P E D I H Q W N V T S P D T V K T L L K V S K
G Q K M N A Q A I A L V A C Y L R G G G Q L D E D M V K A L G D I
P L S Y L C D F S P Q D L H S V P S S V M W L V G P Q G L D K C S Q
R H L G L L Y Q K A C S A F Q N V S G L E Y F E K I K T F L G G A S
V K D L R A L S Q H N V S M D I A T F K R L Q V D S L V G L S V A
E V Q K L L G P N I V D L K T E E D K S P V R D W L F R Q H Q K D
L D R L G L G L Q G G I P N G Y L V L D F N V R E A F S S R A S L L
G P G F V L I W I P A L L P A L R L S

圖 36

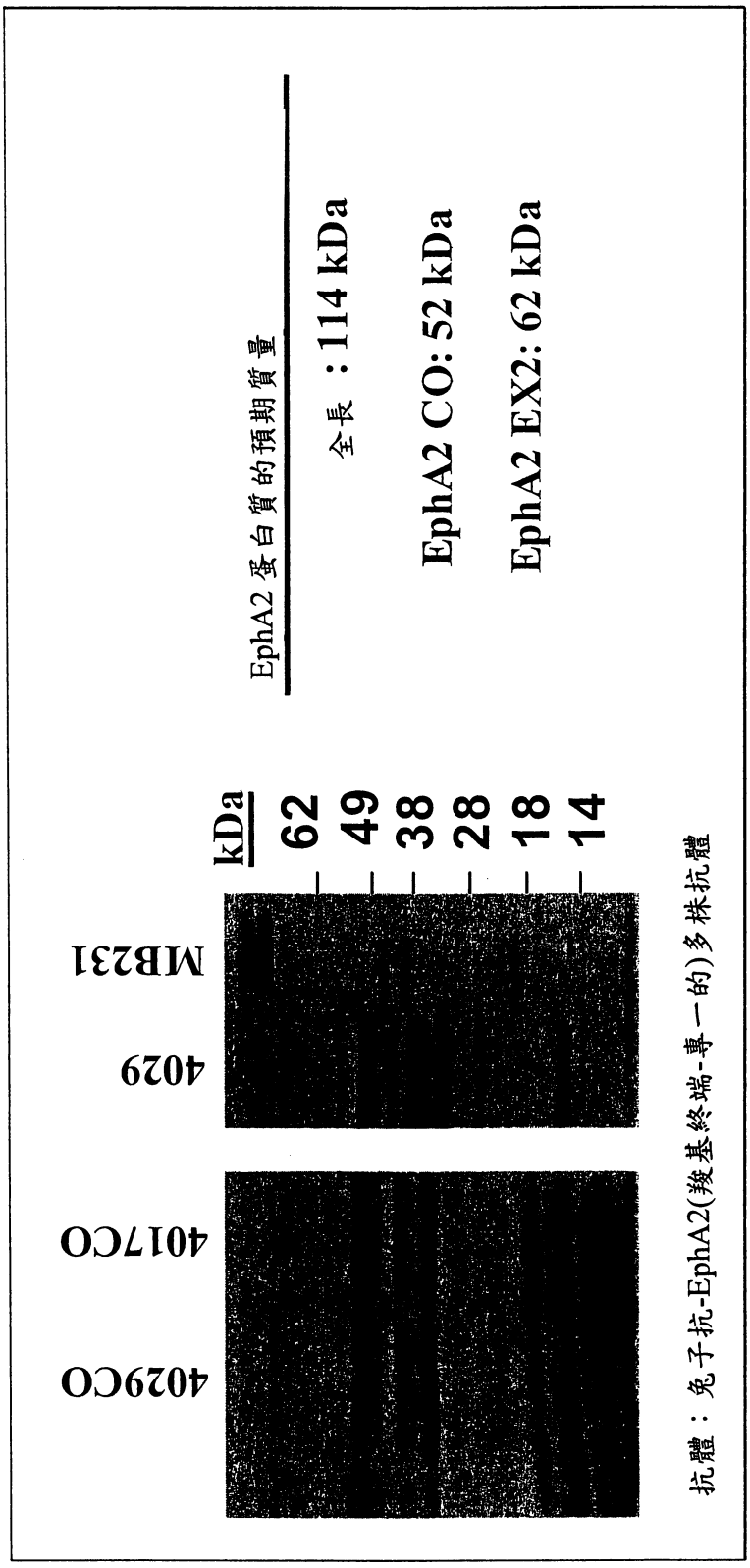

EphA2 蛋白質的預期質量
全長 ：114 kDa
EphA2 CO: 52 kDa
EphA2 EX2: 62 kDa
kDa
62
49
38
28
18
14
MB231
4029
4017CO
4029CO
抗體：兔子抗-EphA2(羧基終端-專一的)多株抗體

圖 37

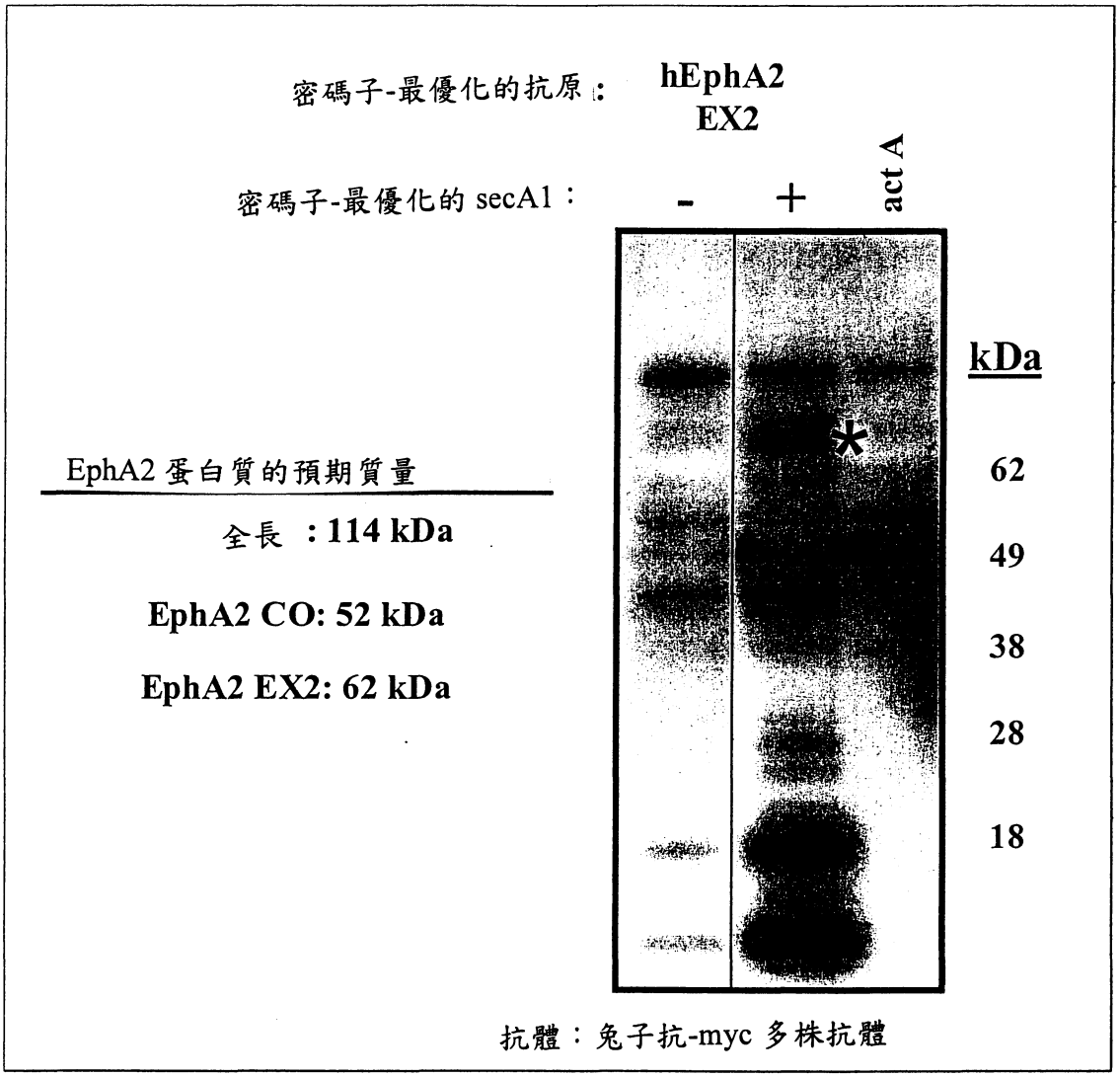

密碼子-最優化的抗原：
hEphA2
EX2
密碼子-最優化的 secA1：
-
+
act A
kDa
62
49
38
28
18
*
EphA2 蛋白質的預期質量
全長 ：114 kDa
EphA2 CO: 52 kDa
EphA2 EX2: 62 kDa
抗體：兔子抗-myc 多株抗體

圖 38

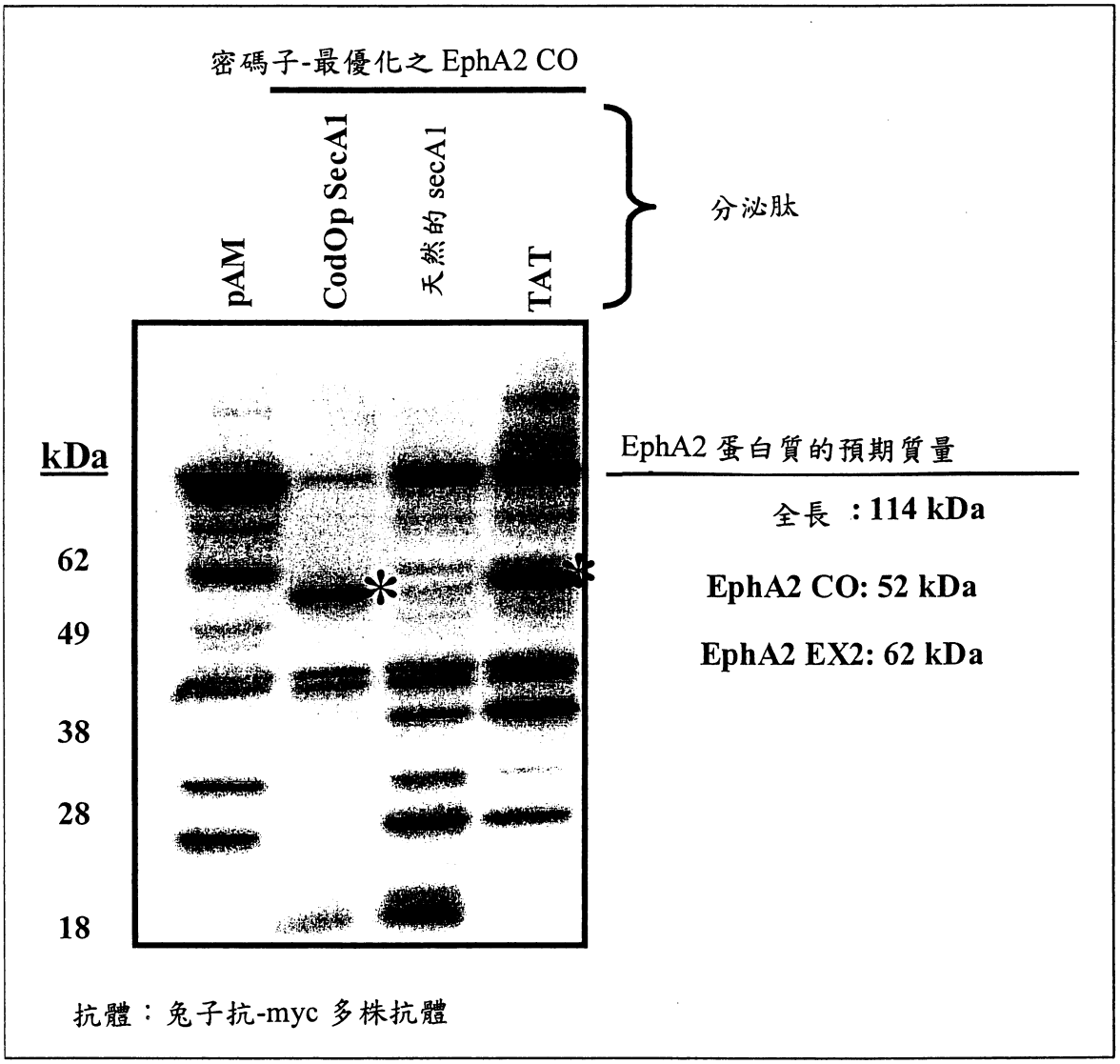

密碼子-最優化之 EphA2 CO
pAM
CodOp SecA1
天然的 secA1
TAT
分泌肽
kDa
62
49
38
28
18
EphA2 蛋白質的預期質量
全長 : 114 kDa
EphA2 CO: 52 kDa
EphA2 EX2: 62 kDa
抗體：兔子抗-myc 多株抗體

圖 39

pcDNA4
MB231
pcDNA4-huEphA2
kDa
188
62
抗體：兔子抗-EphA2(羧基終端-專一的)多株抗體
EphA2 蛋白質的預期質量
全長：114 kDa
EphA2 CO: 52 kDa
EphA2 EX2: 62 kDa

圖 40

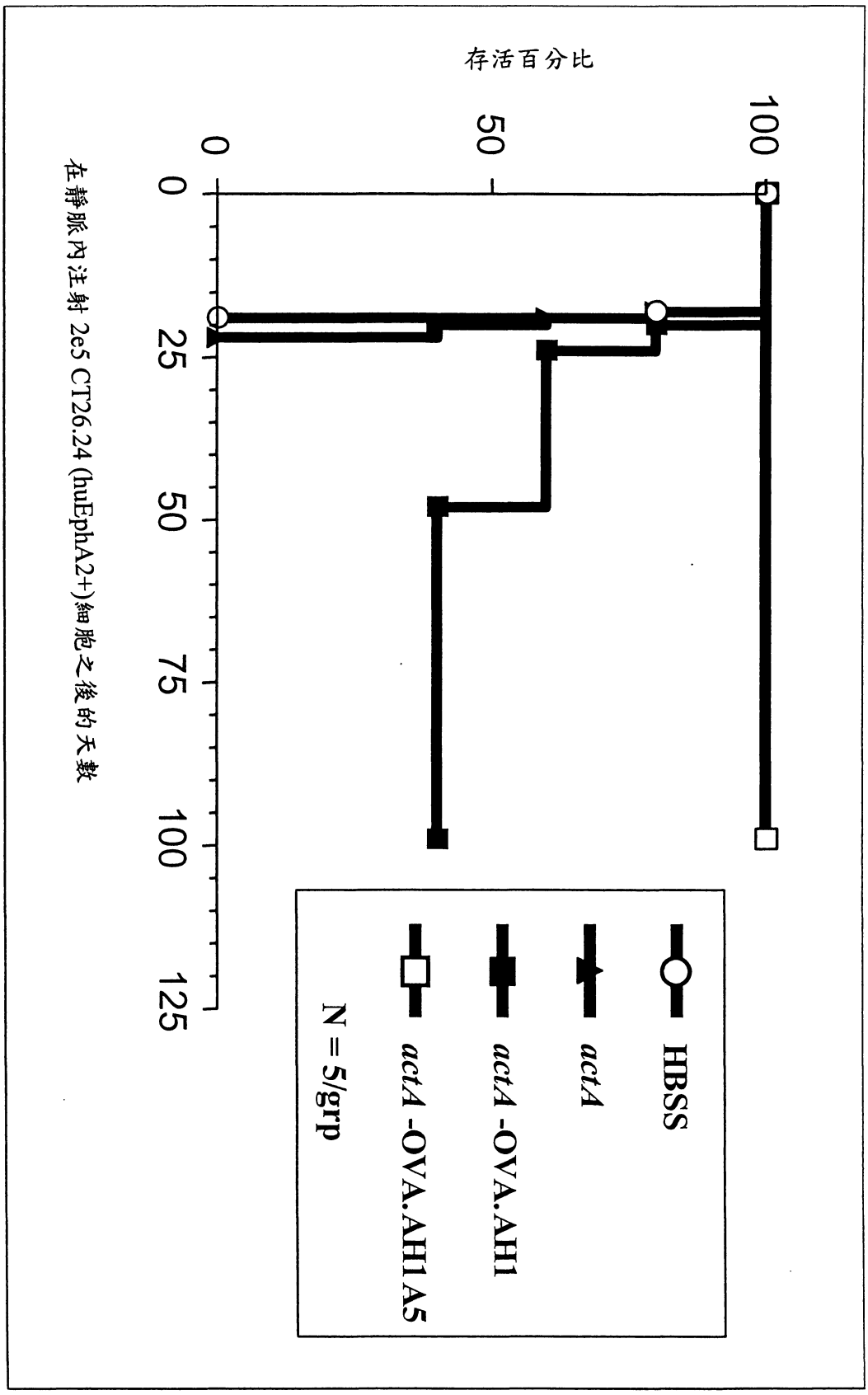

存活百分比
100
50
0
0
25
50
75
100
125
在靜脈內注射 2e5 CT26.24 (huEphA2+)細胞之後的天數
HBSS
actA
actA -OVA.AH1
actA -OVA.AH1 A5
N = 5/grp

圖 41

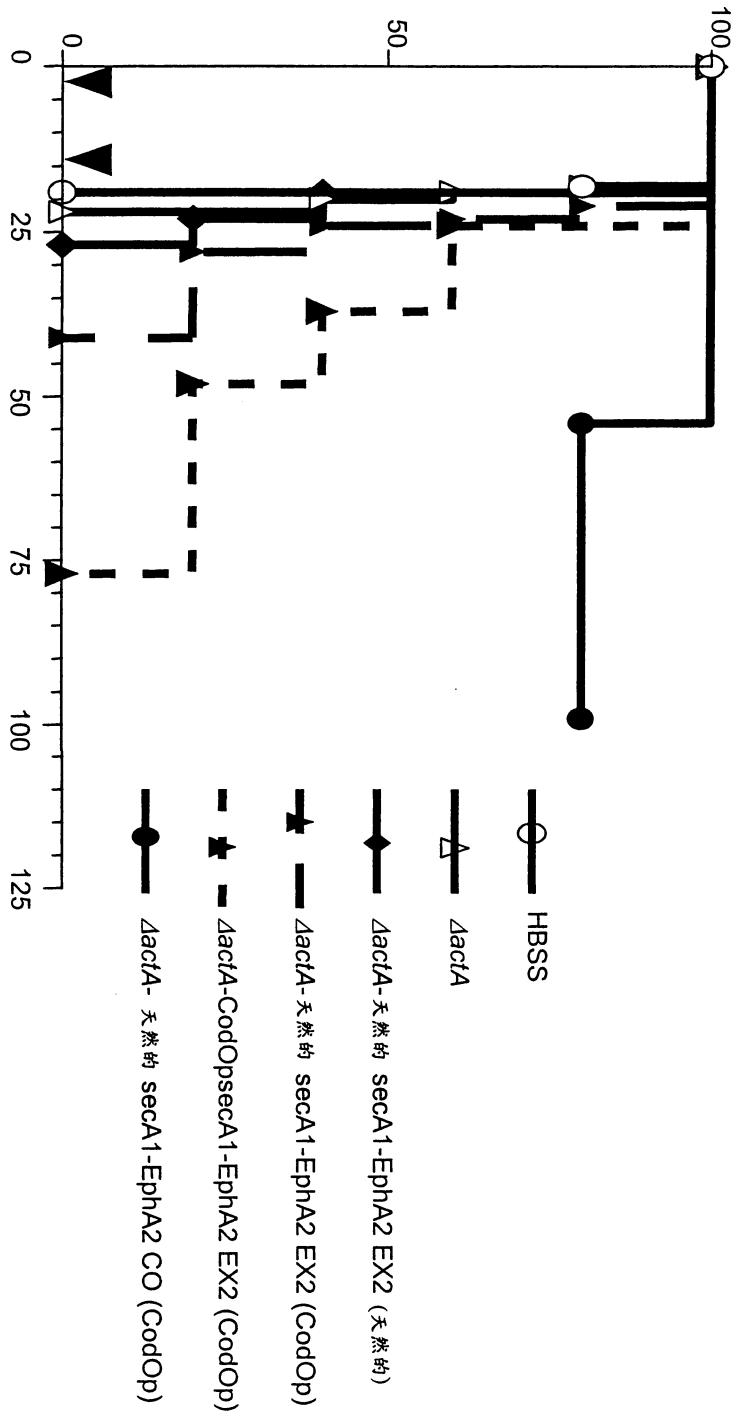
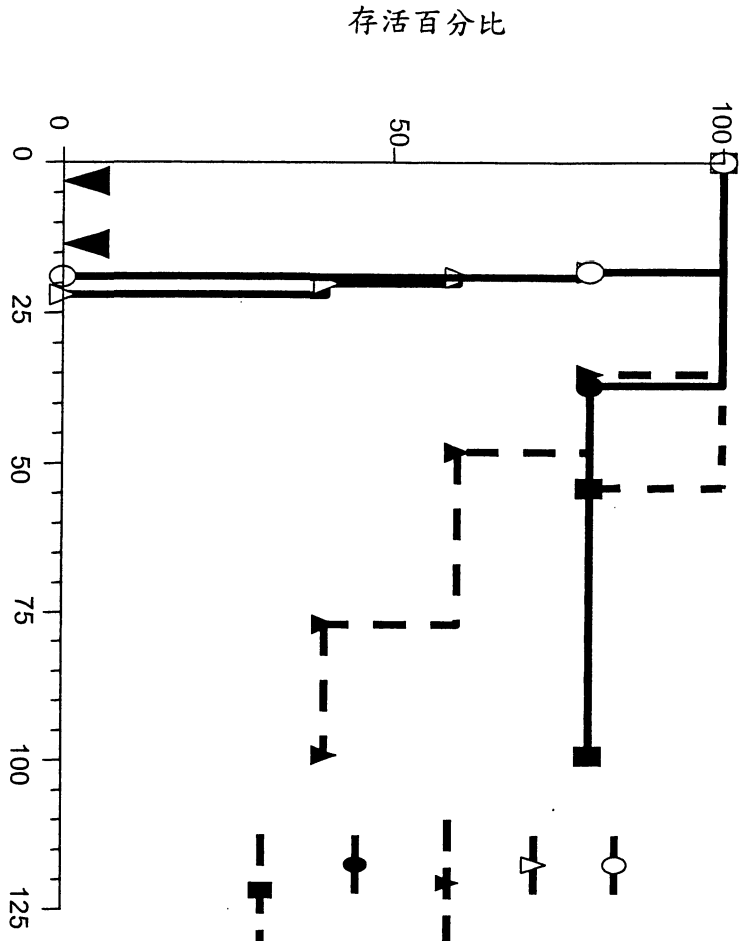

存活百分比
100
50
0
0
25
50
75
100
125
在靜脈內注射 2e5 CT26.24 (huEphA2+)細胞之後的天數
HBSS
ΔactA
ΔactA-天然的 secA1-EphA2 EX2 (天然的)
ΔactA-天然的 secA1-EphA2 EX2 (CodOp)
ΔactA-CodOpsecA1-EphA2 EX2 (CodOp)
ΔactA-天然的 secA1-EphA2 CO (CodOp)

圖 42



在靜脈內注射 2e5 CT26.24 (huEphA2+)細胞之後的天數

圖 43

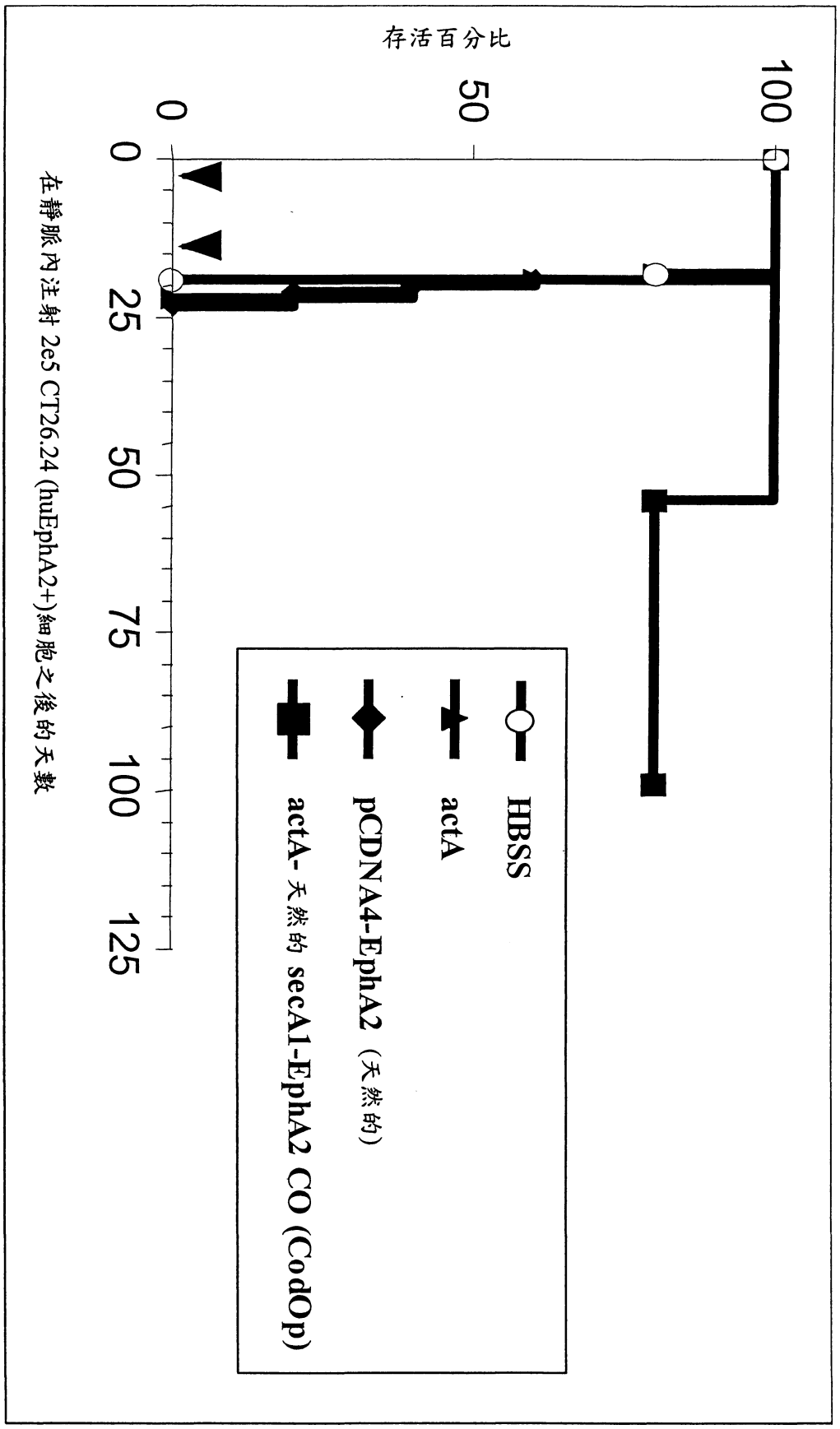

存活百分比
100
50
0
0
25
50
75
100
125
在靜脈內注射 2e5 CT26.24 (huEphA2+)細胞之後的天數
HBSS
actA
pCDNA4-EphA2 (天然的)
actA- 天然的 secA1-EphA2 CO (CodOp)

圖 44

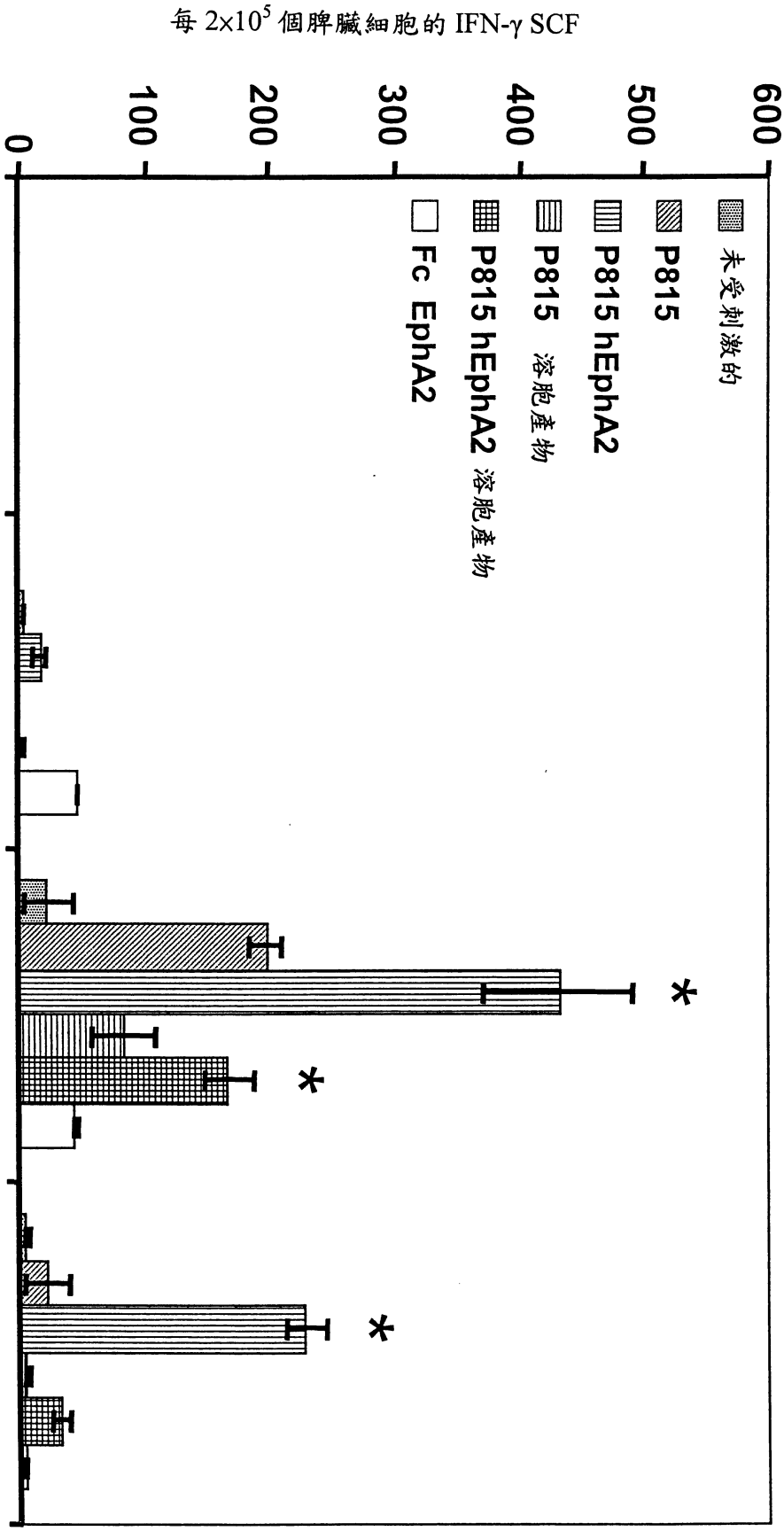

每 2x10^5 個脾臟細胞的 IFN-γ SCF
600
500
400
300
200
100
0
未受刺激的
P815
P815 hEphA2
P815 溶胞產物
P815 hEphA2 溶胞產物
Fc EphA2
*
*
*
HBSS
李斯特菌屬
對照組
李斯特菌屬
hEphA2-ICD
李斯特菌屬
hEphA2-ECD
接種疫苗組

圖 45

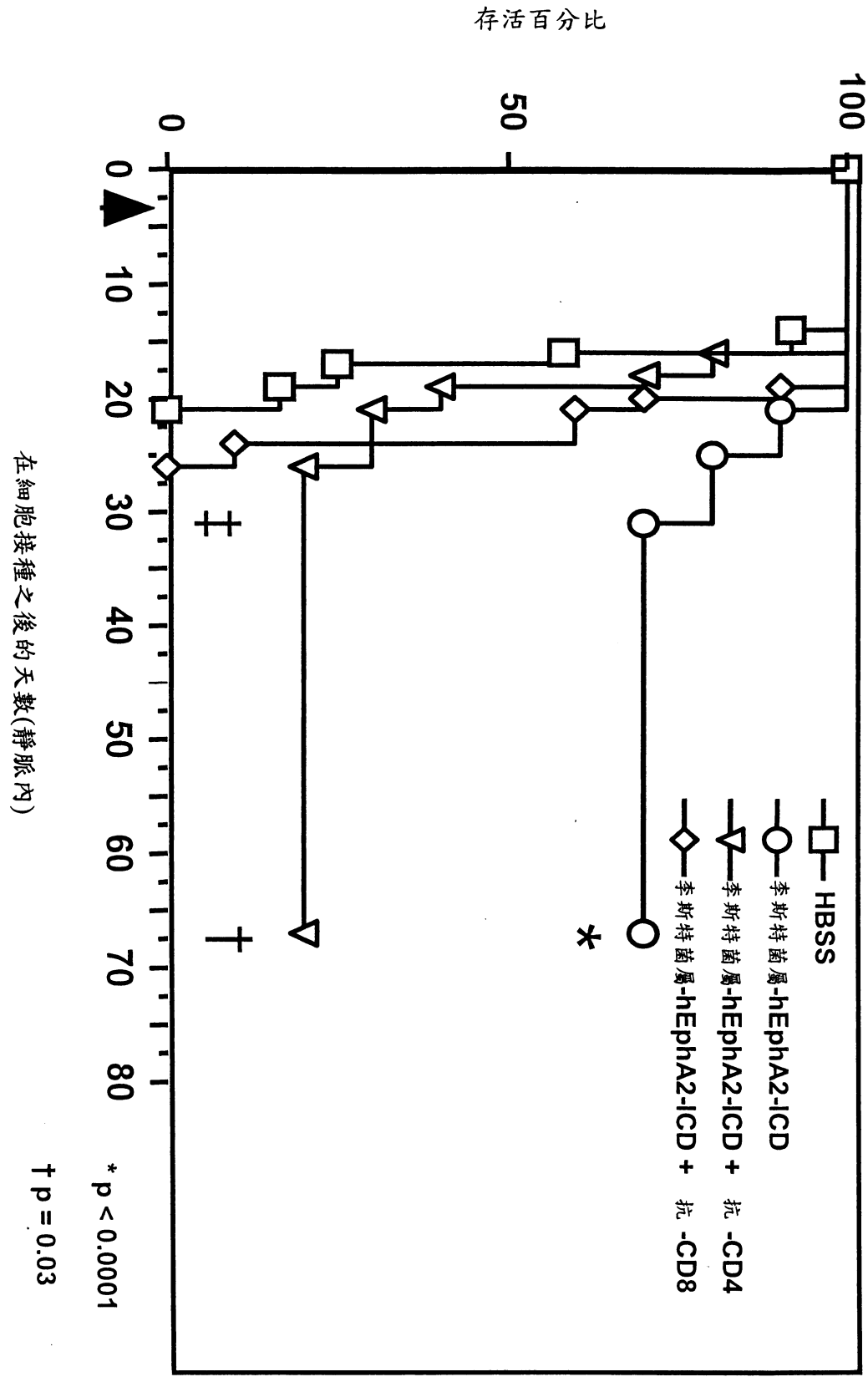

存活百分比
100
50
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
在細胞接種之後的天數(靜脈內)
HBSS
李斯特菌屬-hEphA2-ICD
李斯特菌屬-hEphA2-ICD + 抗 -CD4
李斯特菌屬-hEphA2-ICD + 抗 -CD8
* p < 0.0001
† p = 0.03
‡ p = 0.0002

圖 46

hly 啟動基因-密碼子最優化之 Ba PA 信號肽序列
(將獨特的 5'和 3' Kpn I 和 Bam HI 位置加下標線)

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGA
GGCATTAACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAA
GCTATAAAGCAAGCATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTC
GCCAATATTATAATTATCAAAAGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCAT
TATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGAGTGAAACCCATGAAAAAACGTA
AAGTTTTAATTCCATTAATGGCATTAAGTACAATTTTAGTTAGTAGTACAG
GTAATTTAGAAGTTATTCAAGCAGAAGTTGGATCC

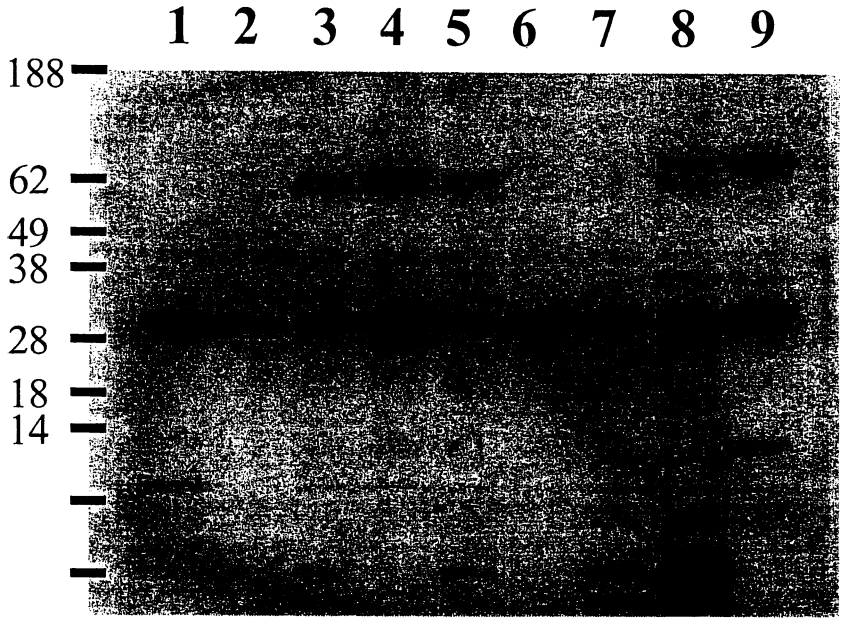
圖 47

圖例說明

1. Δ*actA*-LLO/hMeso （天然的）
2. Δ*actA*

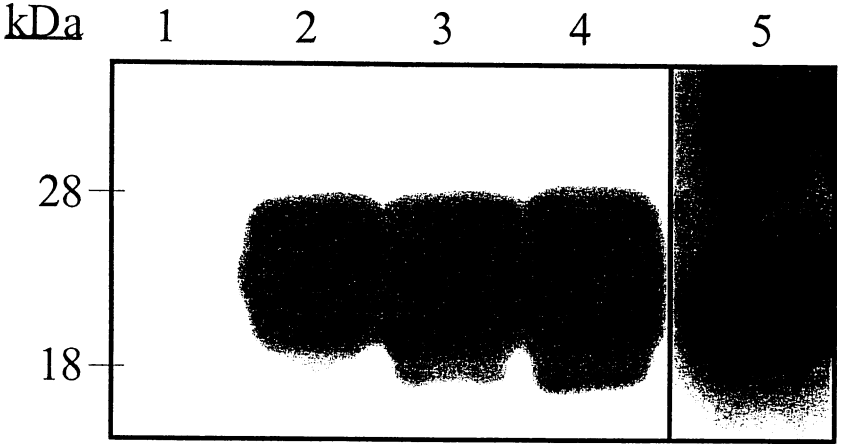
圖 48A

分泌蛋白質



圖例說明	
1	野外型
2	Δ*actA*/ΔinlB
3	**p60 CodOp**
4	***Ba* PA CodOp**
5	***Ll* Usp45 CodOp**
6	p60 天然的
7	LLO 天然的
8	**LLO CodOp**
9	***Bs* phoD CodOp**

圖 48B



圖例說明

1. *Lm* Δ*actA*/Δ*inlB*
2. *Lm* Δ*actA*/Δ*inlB*-pPL2-NYESO
3. *Lm* Δ*actA*/Δ*inlB*-pAM401-NYESO cl1
4. *Lm* Δ*actA*/Δ*inlB*-pAM401-NYESO cl2
5. NY-ESO-1 (84 毫微克)

圖 48C

phEphA2KD 的密碼序列：

GGATCCCAAGGAAAAGAAGTCGTACTTTTAGATTTCGCAGCAGCAGGAGGAGAATTAGGATGGTTAACTCATCCATATGGC
AAAGGCTGGGATTTAATGCAAAACATTATGAACGATATGCCAATTTATATGTACTCCGTATGTAATGTAATGAGCGGTGATC
AAGATAACTGGTTACGTACTAATTGGGTTTATCGAGGTGAAGCAGAAAGAATTTTTATTGAACTTAAATTTACTGTTCGTGA
CTGTAATAGTTTTCCAGGAGGGGCCTCATCATGTAAAGAAACATTCAATCTATATTATGCCGAAAGCGATCTTGATTATGGT
ACAAATTTCCAAAAACGTTTATTTACTAAAATTGATACAATAGCTCCAGATGAAATCACTGTAAGTTCCGATTTTGAAGCTC
GTCATGTAAAATTAAATGTAGAAGAACGCAGTGTTGGTCCACTAACTAGAAAAGGATTTTATCTTGCTTTCCAAGATATAGG
GGCTTGCGTAGCATTGTTATCCGTTCGTGTATACTATAAAAAATGTCCAGAACTACTTCAAGGCTTAGCACATTTTCCAGAA
ACAATTGCGGGCTCAGATGCGCCATCACTTGCAACTGTGGCGGGTACATGTGTTGATCATGCTGTTGTGCCACCAGGAGGAG
AGGAACCTCGCATGCACTGTGCAGTAGATGGTGAATGGTTAGTTCCTATTGGTCAATGTTTATGTCAAGCCGGTTATGAAAA
AGTTGAAGATGCTTGTCAAGCATGCTCCCCAGGTTTTTTTAAATTCGAAGCTAGTGAATCTCCATGCTTAGAATGTCCAGAA
CACACATTACCAAGTCCAGAAGGTGCAACGTCCTGTGAATGCGAAGAAGGTTTTTTTCGTGCCCCACAAGATCCAGCCTCAA
TGCCTTGTACACGACCGCCTTCTGCTCCACACTATTTAACAGCCGTAGGAATGGGCGCTAAAGTAGAGTTACGATGGACACC
GCCTCAAGATAGTGGAGGCCGTGAAGATATTGTTTATTCCGTTACTTGTGAACAATGCTGGCCAGAAAGTGGTGAATGCGG
GCCTTGCGAAGCATCAGTTAGATATTCGGAACCACCACACGGGTTAACTAGAACTAGTGTCACAGTATCAGACTTAGAACC
ACACATGAATTATACATTTACAGTTGAGGCACGTAATGGAGTATCTGGTTTAGTTACATCACGCTCTTTTCGCACAGCATCG
GTCTCTATTAACCAAACTGAACCGCCAAAAGTAAGATTAGAAGGGCGTTCGACAACATCACTTTCCGTAAGTTGGTCAATTC
CACCACCACAACAATC**ACGCGT**TTGGAAATATGAAGTTACATACAGAAAAAAAGGAGATTCGAATAGTTATAATGTTAGAC
GTACAGAAGGATTCAGCGTAACCCTAGATGATTTAGCTCCAGATACAACATATTTAGTACAGGTGCAAGCATTAACACAAG
AAGGACAAGGGGCGGGCTCACGAGTTCATGAATTTCAAACATTACATAGAAGAAGAAAGAATCAAAGAGCACGTCAATCA
CCAGAAGATGTTTATTTTTCAAAGTCTGAACAGTTGAAACCATTGAAAACCTATGTTGATCCACACACATACGAAGACCCAA
ACCAAGCGGTCCTTAAATTTACAACCGAAATTCATCCATCATGCGTAACTCGTCAAAAAGTGATCGGAGCTGGAGAATTCGG
GGAGGTATACAAAGGCATGTTGAAAACCTCAAGTGGTAAAAAAGAAGTTCCTGTAGCAATTATGACTCTTAAAGCAGGGTA
TACAGAAAAACAACGAGTTGATTTTTTAGGCGAAGCTGGTATCATGGGACAATTTTCGCATCATAATATAATTAGACTTGAA
GGTGTTATCTCTAAATATAAACCAATGATGATTATTACTGAATATATGGAAAACGGTGCTTTAGATAAATTTCTACGCGAAA
AAGATGGTGAATTTTCTGTCCTTCAATTAGTTGGTATGTTACGTGGCATCGCTGCAGGTATGAAATATCTTGCCAACATGAAT
TATGTACATAGAGATTTAGCGGCTCGAAATATTCTTGTAAATTCCAATTTAGTGTGCAAAGTTAGTGATTTCGGTTTAAGTCG
AGTATTAGAAGATGATCCAGAAGCAACCTATACTACTTCGGGGGGGTAAAATTCCGATCCGTTGGACAGCACCGGAAGCAAT
TTCATATCGTAAATTTACATCTGCAAGCGATGTTTGGAGTTTCGGAATTGTGATGTGGGAAGTAATGACATACGGCGAACGT
CCATATTGGGAATTGTCAAACCATGAAGTAATGAAAGCGATTAACGATGGTTTCAGATTACCAACCCCAATGGACTGTCCAT
CAGCAATTTATCAACTAATGATGCAATGCTGGCAACAAGAAAGAGCTAGAAGACCTAAATTTGCAGACATTGTTTCAATTTT
AGACAAACTAATTCGTGCGCCAGATAGTCTTAAAACCCTAGCTGATTTCGATCC**ACGCGT**ATCAATTCGTCTTCCATCAACA
TCGGGATCTGAAGGTGTTCCTTTTAGAACAGTAAGCGAGTGGTTAGAATCGATTAAAATGCAACAGTATACAGAACATTTTA
TGGCAGCCGGATACACAGCAATTGAAAAAGTTGTGCAAATGACAAATGATGATATTAAACGTATTGGAGTGCGTCTACCTG
GCCACCAAAAACGTATTGCTTACTCCCTTTTAGGTTTAAAAGACCAAGTAAATACAGTCGGAATTCCAATATGAGAGCTC

圖 49

含有 actA-plcB 基因間區域之密碼子最優化 EphA2 的 Mlu I 亞-片段

ACGCGTTTGGAAATATGAAGTTACATACAGAAAAAAAGGAGATTCGAATAGTTATAATGTTAGAC
GTACAGAAGGATTCAGCGTAACCCTAGATGATTTAGCTCCAGATACAACATATTTAGTACAGGTGC
AAGCATTAACACAAGAAGGACAAGGGGCGGGCTCACGAGTTCATGAATTTCAAACATTAT**AAAAA**
CACAGAACGAAAGAAAAAGTGAGGTGAATGATATGGCATATGATAGTCGTTTTGATGAATGGGT
TCAAAAATTAAAAGAAGAAAGTTTTCAAAATAATACATTTGATCGTCGTAAATTTATTCAAGGTGC
AGGTAAAATTGCAGGTTTAAGTTTAGGTTTAACAATTGCACAAAGTGTTGGTGCATTTCATAGAAG
AAGAAAGAATCAAAGAGCACGTCAATCACCAGAAGATGTTTATTTTTCAAAGTCTGAACAGTTGAA
ACCATTGAAAACCTATGTTGATCCACACACATACGAAGACCCAAACCAAGCGGTCCTTAAATTTAC
AACCGAAATTCATCCATCATGCGTAACTCGTCAAAAAGTGATCGGAGCTGGAGAATTCGGGGAGG
TATACAAAGGCATGTTGAAAACCTCAAGTGGTAAAAAAGAAGTTCCTGTAGCAATTATGACTCTTA
AAGCAGGGTATACAGAAAAACAACGAGTTGATTTTTTAGGCGAAGCTGGTATCATGGGACAATTTT
CGCATCATAATATAATTAGACTTGAAGGTGTTATCTCTAAATATAAACCAATGATGATTATTACTGA
ATATATGGAAAACGGTGCTTTAGATAAATTTCTACGCGAAAAAGATGGTGAATTTTCTGTCCTTCA
ATTAGTTGGTATGTTACGTGGCATCGCTGCAGGTATGAAATATCTTGCCAACATGAATTATGTACAT
AGAGATTTAGCGGCTCGAAATATTCTTGTAAATTCCAATTTAGTGTGCAAAGTTAGTGATTTCGGTT
TAAGTCGAGTATTAGAAGATGATCCAGAAGCAACCTATACTACTTCGGGGGGTAAAATTCCGATCC
GTTGGACAGCACCGGAAGCAATTTCATATCGTAAATTTACATCTGCAAGCGATGTTTGGAGTTTCG
GAATTGTGATGTGGGAAGTAATGACATACGGCGAACGTCCATATTGGGAATTGTCAAACCATGAA
GTAATGAAAGCGATTAACGATGGTTTCAGATTACCAACCCCAATGGACTGTCCATCAGCAATTTAT
CAACTAATGATGCAATGCTGGCAACAAGAAAGAGCTAGAAGACCTAAATTTGCAGACATTGTTTCA
ATTTTAGACAAACTAATTCGTGCGCCAGATAGTCTTAAAACCCTAGCTGATTTCGATCCACGCGT

圖 50

hly 啟動基因-70N-終端 p60 胺基酸：

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTT
ATGTGGAGGCATTAACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAG
CAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAGCATATAATATTGCG
TTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAA
AAGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAA
AAATGTAGAAGGAGAGTGAAACCCATGAATATGAAAAAAGC
TACGATTGCAGCTACAGCCGGCATTGCCGTAACAGCTTTTGCA
GCACCAACTATTGCCTCAGCCTCTACAGTTGTTGTCGAAGCAG
GAGACACATTATGGGGAATCGCACAATCAAAAGGTACAACG
GTTGATGCTATTAAAAAAGCGAATAATTTAACAACAGATAAA
ATCGTGCCAGGTCAAAAACTGCAG

圖 51

pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)的 KpnI-BamHI 亞-片段：

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTAACATTTG
TTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAGCATATAATATTGC
GTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAAAGAGAGGGGTGGCAAACG
GTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGAGTGAAACCCATGAATATGAAAAAA
GCTACGATTGCAGCTACAGCCGGCATTGCCGTAACAGCTTTTGCAGCACCAACTATTGCCTCA
GCCTCTACAGTTGTTGTCGAAGCAGGAGACACATTATGGGGAATCGCACAATCAAAAGGTACA
ACGGTTGATGCTATTAAAAAAGCGAATAATTTAACAACAGATAAAATCGTGCCAGGTCAAAA
ACTGCAGGTAAATAATGAGGTTGCTGCTGCTGAAAAAACAGAGAAATCTGTTAGCGCAACTTG
GTTAAACGTCCGTACTGGCGCTGGTGTTGATAACAGTATTATTACGTCCATCAAAGGTGGAAC
AAAAGTAACTGTTGAAACAACCGAATCTAACGGCTGGCACAAAATTACTTACAACGATGGAA
AAACTGGTTTCGTTAACGGTAAATACTTAACTGACAAAGCAGTAAGCACTCCAGTTGCACCAA
CACAAGAAGTGAAAAAAGAAACTACTACTCAACAAGCTGCACCTGTTGCAGAAACAAAAACT
GAAGTAAAACAAACTACACAAGCAACTACACCTGCGCCTAAAGTAGCAGAAACGAAAGAAAC
TCCAGTAATAGATCAAAATGCTACTACACACGCTGTCAAAAGCGGTGACACTATTTGGGCTTT
ATCCGTAAAATACGGTGTTTCTGTTCAAGACATTATGTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTCT
ATTTATGTAGGTCAAAAGCTTGCTATTAAACAAACTGCTAACACAGCTACTCCAAAAGCAGAA
GTGAAAACGGAAGCTCCAGCAGCTGAAAAACAAGCAGCTCCAGTAGTTAAAGAAAATACTAA
CACAAATACTGCTACTACAGAGAAAAAAGAAACAGCAACGCAACAACAAACAGCACCTAAAG
CACCAACAGAAGCTGCAAAACCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAAATGCTAATAAAACG
AATACAAATACAAATACAAACAATACTAATACACCATCTAAAAATACTAATACAAACTCAAAT
ACTAATACGAATACAAACTCAAATACGAATGCTAATCAAGGTTCTTCCAACAATAACAGCAAT
TCAAGTGCAAGTGCTATTATTGCTGAAGCTCAAAAACACCTTGGAAAAGCTTATTCATGGGGT
GGTAACGGACCAACTACATTTGATTGCTCTGGTTACACTAAATATGTATTTGCTAAAGCGGGT
ATCTCCCTTCCACGTACATCTGGCGCACAATATGCTAGCACTACAAGAATTTCTGAATCTCAAG
CAAAACCTGGTGATTTAGTATTCTTCGACTATGGTAGCGGAATTTCTCACATTGGTATTTATGT
TGGTAATGGTCAAATGATTAACGCGCAAGACAATGGCGTTAAATACGATAACATCCACGGCTC
TGGCTGGGGTAAATATCTAGTTGGCTTCGGTCGCGTATAATAAGGATCC

圖 52

質體 pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)-間皮素的 KpnI-BamHI 亞-片段：

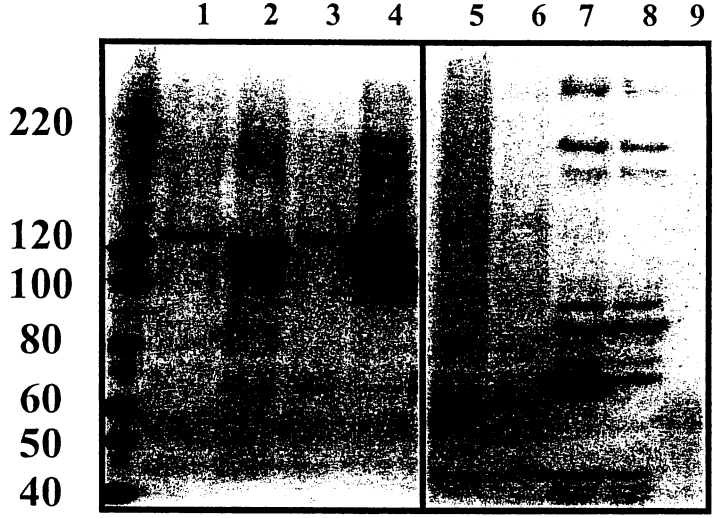
GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTAACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACT
AGAATAAAGCTATAAAGCAAGCATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAAAGAGAGGGGTGGC
AAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGAGTGAAACCCATGAATATGAAAAAAGCTACGATTGCAGCTACAGCCGGC
ATTGCCGTAACAGCTTTTGCAGCACCAACTATTGCCTCAGCCTCTACAGTTGTTGTCGAAGCAGGAGACACATTATGGGGAATCGCACAATCA
AAAGGTACAACGGTTGATGCTATTAAAAAAGCGAATAATTTAACAACAGATAAAATCGTGCCAGGTCAAAAACTGCAGGCATTGCCAACTG
CACGTCCATTACTAGGTAGTTGCGGTACACCAGCACTAGGTTCTTTATTATTTTTGTTATTTTCTCTAGGTTGGGTTCAACCAAGTCGTACATT
AGCAGGTGAAACAGGTCAAGAAGCAGCACCACTTGACGGTGTATTAACGAATCCACCAAATATATCAAGTTTAAGTCCACGTCAATTATTAG
GTTTTCCATGTGCAGAAGTTTCAGGTTTAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTAGCAGTTGCATTAGCACAAAAAAAACGTTAAATTATCTACAG
AACAGTTACGTTGTTTAGCCCATAGATTAAGCGAACCACCAGAAGACTTAGATGCACTTCCTTTAGACCTTCTTTTATTCTTAAATCCAGATG
CATTTTCAGGACCACAAGCATGTACACGTTTTTTTAGTCGAATTACAAAAGCCAATGTTGATTTATTACCTCGTGGGGCTCCTGAAAGACAAC
GTTTATTACCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGTGTTCGCGGTAGCTTATTAAGTGAAGCCGATGTTCGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTGATTT
ACCTGGTCGTTTCGTTGCAGAATCAGCAGAAGTGTTATTACCGAGATTAGTTTCATGCCCAGGACCTTTAGATCAAGATCAACAAGAGGCAG
CTAGAGCAGCTCTTCAAGGAGGAGGCCCACCATATGGCCCACCAAGTACATGGAGTGTTTCTACAATGGATGCGTTAAGAGGTTTATTACCG
GTTTTAGGACAACCAATTATTCGTAGTATTCCACAAGGCATTGTAGCAGCATGGCGTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGGCGACAACCA
GAACGTACAATTCTACGTCCAAGATTTCGTAGAGAAGTAGAAAAAACGGCGTGTCCTAGTGGCAAAAAAGCACGTGAAATTGATGAAAGTT
TAATTTTTTATAAAAAATGGGAATTAGAAGCATGTGTCGATGCAGCATTACTAGCTACACAAATGGATCGTGTTAATGCTATTCCATTCACAT
ATGAACAATTAGATGTTTTAAAGCATAAATTAGACGAATTATATCCACAAGGTTATCCAGAATCAGTTATTCAACATTTAGGTTACTTATTTT
TAAAAATGAGTCCAGAAGACATACGCAAATGGAATGTTACAAGTTTAGAAACATTAAAAGCGCTTTTAGAAGTTAACAAAGGTCATGAAAT
GAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATTGATAGATTCGTTAAAGGCCGTGGTCAATTAGATAAAGATACTTTAGATACATTAACAGCATTTTATCC
TGGCTACTTATGCAGTTTATCACCAGAAGAATTAAGTTCCGTTCCACCGAGTAGTATCTGGGCAGTTCGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGA
CCCACGTCAATTAGATGTTTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTCCAAAATATGAACGGTAGTGAATATTTCGTAAAAATTCAATCCTTTTT
AGGTGGTGCACCAACTGAAGATCTAAAAGCATTAAGCCAACAAAATGTAAGTATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATGCAG
TTCTACCATTAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGGTCCACACGTAGAAGGATTAAAAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTCGCGAT
TGGATTTTACGTCAACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGGTTTAGGTTTACAAGGCGGTATTCCGAATGGATATTTAGTGTTAGATTTATCT
GTTCAAGAAGCATTAAGTGGTACACCGTGTTTATTAGGTCCAGGTCCAGTTTTAACAGTGTTAGCATTATTATTAGCCAGTACATTAGCTCTG
CAGGTAAATAATGAGGTTGCTGCTGCTGAAAAAACAGAGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAAACGTCCGTACTGGCGCTGGTGTTGATAA
CAGTATTATTACGTCCATCAAAGGTGGAACAAAAGTAACTGTTGAAACAACCGAATCTAACGGCTGGCACAAAATTACTTACAACGATGGAA
AAACTGGTTTCGTTAACGGTAAATACTTAACTGACAAAGCAGTAAGCACTCCAGTTGCACCAACACAAGAAGTGAAAAAAGAAACTACTAC
TCAACAAGCTGCACCTGTTGCAGAAACAAAAACTGAAGTAAAACAAACTACACAAGCAACTACACCTGCGCCTAAAGTAGCAGAAACGAAA
GAAACTCCAGTAATAGATCAAAATGCTACTACACACGCTGTCAAAAGCGGTGACACTATTTGGGCTTTATCCGTAAAATACGGTGTTTCTGTT
CAAGACATTATGTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGTCAAAAGCTTGCTATTAAACAAACTGCTAACACAGCTACTCCA
AAAGCAGAAGTGAAAACGGAAGCTCCAGCAGCTGAAAAACAAGCAGCTCCAGTAGTTAAAGAAAATACTAACACAAATACTGCTACTACAG
AGAAAAAAGAAACAGCAACGCAACAACAAACAGCACCTAAAGCACCAACAGAAGCTGCAAAACCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAA
ATGCTAATAAAACGAATACAAATACAAATACAAACAATACTAATACACCATCTAAAAATACTAATACAAACTCAAATACTAATACGAATAC
AAACTCAAATACGAATGCTAATCAAGGTTCTTCCAACAATAACAGCAATTCAAGTGCAAGTGCTATTATTGCTGAAGCTCAAAAACACCTTG
GAAAAGCTTATTCATGGGGTGGTAACGGACCAACTACATTTGATTGCTCTGGTTACACTAAATATGTATTTGCTAAAGCGGGTATCTCCCTTC
CACGTACATCTGGCGCACAATATGCTAGCACTACAAGAATTTCTGAATCTCAAGCAAAACCTGGTGATTTAGTATTCTTCGACTATGGTAGCG
GAATTTCTCACATTGGTATTTATGTTGGTAATGGTCAAATGATTAACGCGCAAGACAATGGCGTTAAATACGATAACATCCACGGCTCTGGCT
GGGGTAAATATCTAGTTGGCTTCGGTCGCGTATAATAAGGATCC

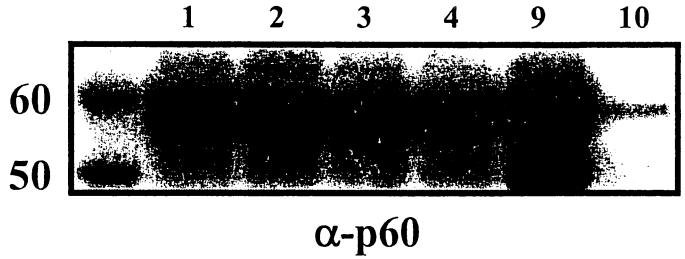
圖 53

質體 pPL2-hlyP-Np60 CodOp(1-77)-間皮素 ΔSP/ΔGPI 的 KpnI-BamHI 亞-片段：

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCATTAACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAG
ACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAGCATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTCGCCAATATTATAATTATCAAAAGAGAGG
GGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGAGTGAAACCCATGAATATGAAAAAAGCTACGATTGCAGCT
ACAGCCGGCATTGCCGTAACAGCTTTTGCAGCACCAACTATTGCCTCAGCCTCTACAGTTGTTGTCGAAGCAGGAGACACATTATGGGG
AATCGCACAATCAAAAGGTACAACGGTTGATGCTATTAAAAAAGCGAATAATTTAACAACAGATAAAATCGTGCCAGGTCAAAAACTG
CAGCGTACATTAGCAGGTGAAACAGGTCAAGAAGCAGCACCACTTGACGGTGTATTAACGAATCCACCAAATATATCAAGTTTAAGTC
CACGTCAATTATTAGGTTTTCCATGTGCAGAAGTTTCAGGTTTAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTAGCAGTTGCATTAGCACAAAAA
AACGTTAAATTATCTACAGAACAGTTACGTTGTTTAGCCCATAGATTAAGCGAACCACCAGAAGACTTAGATGCACTTCCTTTAGACCT
TCTTTTATTCTTAAATCCAGATGCATTTTCAGGACCACAAGCATGTACACGTTTTTTTAGTCGAATTACAAAAGCCAATGTTGATTTATT
ACCTCGTGGGGCTCCTGAAAGACAACGTTTATTACCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGTGTTCGCGGTAGCTTATTAAGTGAAGCCGATG
TTCGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTGATTTACCTGGTCGTTTCGTTGCAGAATCAGCAGAAGTGTTATTACCGAGATTAGTTTCATGCC
CAGGACCTTTAGATCAAGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAGCTCTTCAAGGAGGAGGCCCACCATATGGCCCACCAAGTACATGGAG
TGTTTCTACAATGGATGCGTTAAGAGGTTTATTACCGGTTTTAGGACAACCAATTATTCGTAGTATTCCACAAGGCATTGTAGCAGCATG
GCGTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGGCGACAACCAGAACGTACAATTCTACGTCCAAGATTTCGTAGAGAAGTAGAAAAAACG
GCGTGTCCTAGTGGCAAAAAAGCACGTGAAATTGATGAAAGTTTAATTTTTTATAAAAAATGGGAATTAGAAGCATGTGTCGATGCAG
CATTACTAGCTACACAAATGGATCGTGTTAATGCTATTCCATTCACATATGAACAATTAGATGTTTTAAAGCATAAATTAGACGAATTA
TATCCACAAGGTTATCCAGAATCAGTTATTCAACATTTAGGTTACTTATTTTTAAAAATGAGTCCAGAAGACATACGCAAATGGAATGT
TACAAGTTTAGAAACATTAAAAGCGCTTTTAGAAGTTAACAAAGGTCATGAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATTGATAGATTCG
TTAAAGGCCGTGGTCAATTAGATAAAGATACTTTAGATACATTAACAGCATTTTATCCTGGCTACTTATGCAGTTTATCACCAGAAGAA
TTAAGTTCCGTTCCACCGAGTAGTATCTGGGCAGTTCGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGACCCACGTCAATTAGATGTTTTATATCCA
AAAGCAAGATTAGCTTTCCAAAATATGAACGGTAGTGAATATTTCGTAAAAATTCAATCCTTTTTAGGTGGTGCACCAACTGAAGATCT
AAAAGCATTAAGCCAACAAAATGTAAGTATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATGCAGTTCTACCATTAACAGTTGCAG
AAGTTCAAAAATTATTAGGTCCACACGTAGAAGGATTAAAAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTCGCGATTGGATTTTACGTCAACG
TCAAGATGATTTAGATACATTAGGTTTAGGTTTACAAGGCCTGCAGGTAAATAATGAGGTTGCTGCTGCTGAAAAAACAGAGAAATCT
GTTAGCGCAACTTGGTTAAACGTCCGTACTGGCGCTGGTGTTGATAACAGTATTATTACGTCCATCAAAGGTGGAACAAAAGTAACTGT
TGAAACAACCGAATCTAACGGCTGGCACAAAATTACTTACAACGATGGAAAAACTGGTTTCGTTAACGGTAAATACTTAACTGACAAA
GCAGTAAGCACTCCAGTTGCACCAACACAAGAAGTGAAAAAAGAAACTACTACTCAACAAGCTGCACCTGTTGCAGAAACAAAAACT
GAAGTAAAACAAACTACACAAGCAACTACACCTGCGCCTAAAGTAGCAGAAACGAAAGAAACTCCAGTAATAGATCAAAATGCTACT
ACACACGCTGTCAAAAGCGGTGACACTATTTGGGCTTTATCCGTAAAATACGGTGTTTCTGTTCAAGACATTATGTCATGGAATAATTT
ATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGTCAAAAGCTTGCTATTAAACAAACTGCTAACACAGCTACTCCAAAAGCAGAAGTGAAAACGGAAG
CTCCAGCAGCTGAAAAACAAGCAGCTCCAGTAGTTAAAGAAAATACTAACACAAATACTGCTACTACAGAGAAAAAAGAAACAGCAA
CGCAACAACAAACAGCACCTAAAGCACCAACAGAAGCTGCAAAACCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAAATGCTAATAAAACGA
ATACAAATACAAATACAAACAATACTAATACACCATCTAAAAATACTAATACAAACTCAAATACTAATACGAATACAAACTCAAATAC
GAATGCTAATCAAGGTTCTTCCAACAATAACAGCAATTCAAGTGCAAGTGCTATTATTGCTGAAGCTCAAAAACACCTTGGAAAAGCTT
ATTCATGGGGTGGTAACGGACCAACTACATTTGATTGCTCTGGTTACACTAAATATGTATTTGCTAAAGCGGGTATCTCCCTTCCACGTA
CATCTGGCGCACAATATGCTAGCACTACAAGAATTTCTGAATCTCAAGCAAAACCTGGTGATTTAGTATTCTTCGACTATGGTAGCGGA
ATTTCTCACATTGGTATTTATGTTGGTAATGGTCAAATGATTAACGCGCAAGACAATGGCGTTAAATACGATAACATCCACGGCTCTGG
CTGGGGTAAATATCTAGTTGGCTTCGGTCGCGTATAATAAGGATCC

圖 54





圖例說明

1. 全長(-TV)
2. ΔSP/ΔGPI (-TV)
3. 全長
4. ΔSP/ΔGPI

} p60-hMeso 嵌合體

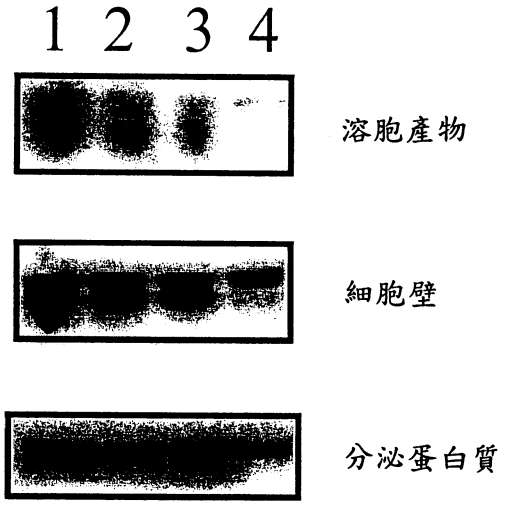
5. BaPA-ΔSP/ΔGPI
6. LLO- 全長

} SP-hMeso

7. J293/ 全長 hMeso
8. J293
9. Lm ΔactA/ΔinlB
10. Lm Δp60

圖 55

200530399

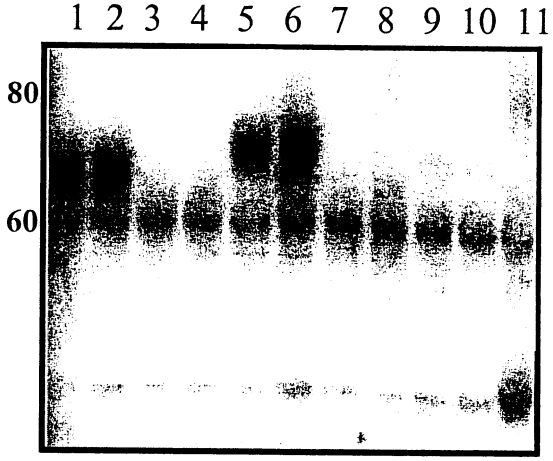


圖例說明

1. Usp45-ECD-Bs phoD-ICD
2. BaPa-ECD-Bs phoD-ICD
3. BaPa-ECD-Bs phoD-ICD
4. Lm ΔactA/ΔinlB

圖 56

分泌蛋白質

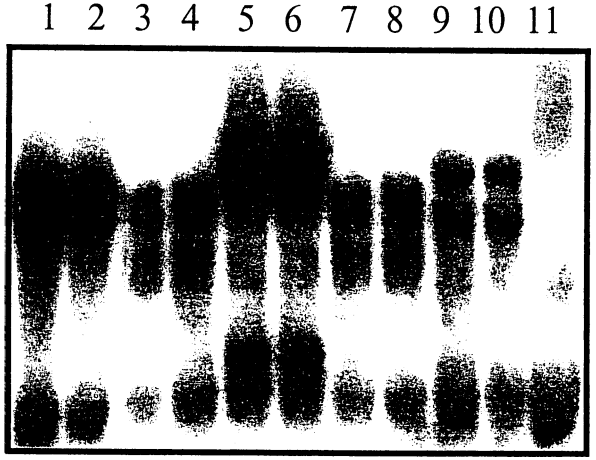


信號肽圖例說明

1-2: Ba PA
3-4: Ll Usp45
5-6: Bs phoD
7-8: p60
9-10: LLO
11: Lm ΔactA/ΔinlB

圖 57A

細胞壁

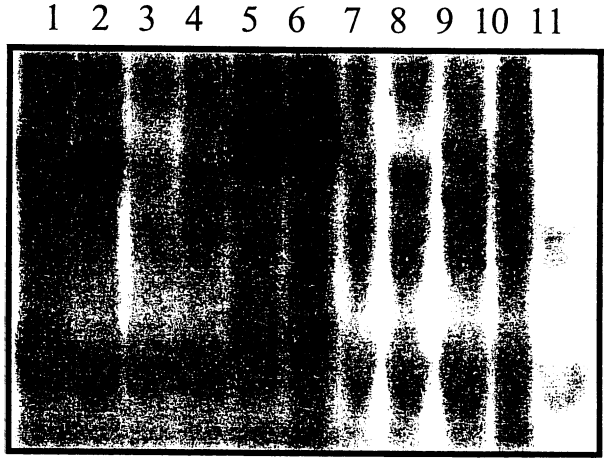


信號肽圖例說明

1-2: Ba PA
3-4: Ll Usp45
5-6: Bs phoD
7-8: p60
9-10: LLO
11: Lm ΔactA/ΔinlB

圖 57B

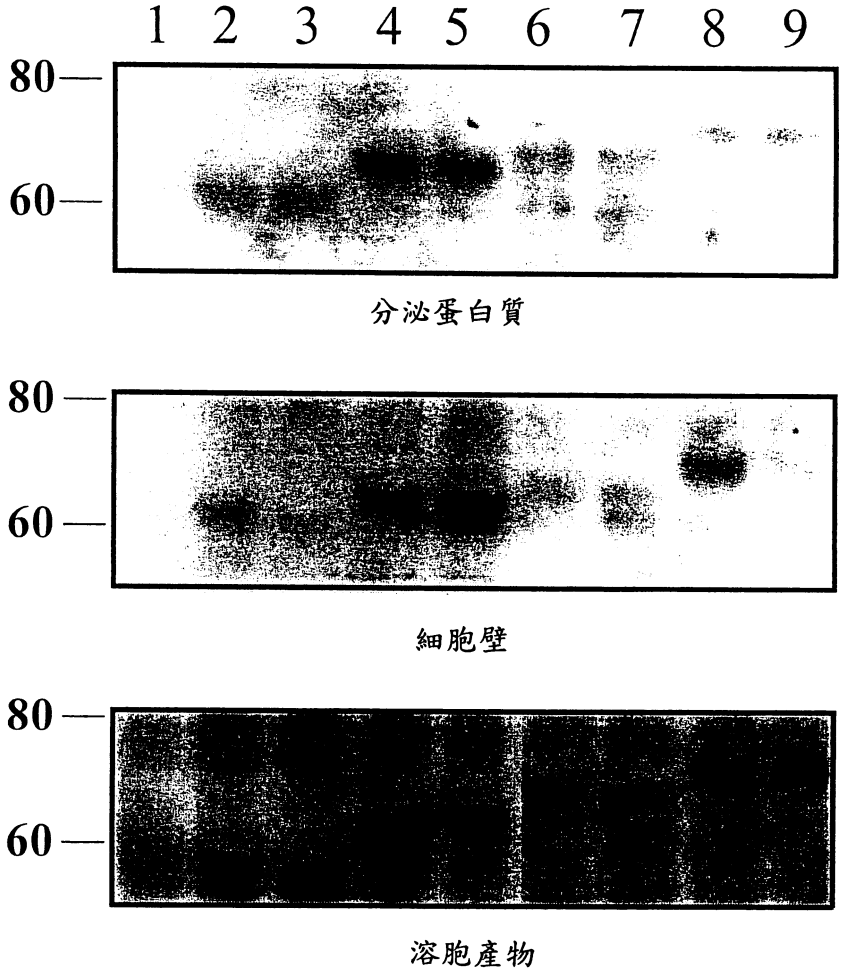
細胞之溶胞產物



信號肽圖例說明

1-2: Ba PA
3-4: Ll Usp45
5-6: Bs phoD
7-8: p60
9-10: LLO
11: Lm ΔactA/ΔinlB

圖 57C



1: Lm Δ*actA*/Δ*inlB*
2-3: Ba PA ΔSS/ΔGPI hMeso
4-5: Bs phoD ΔSS/ΔGPI hMeso
6-7: Ba PA FL hMeso
8-9: Bs phoD FL hMeso

圖 58

200530399

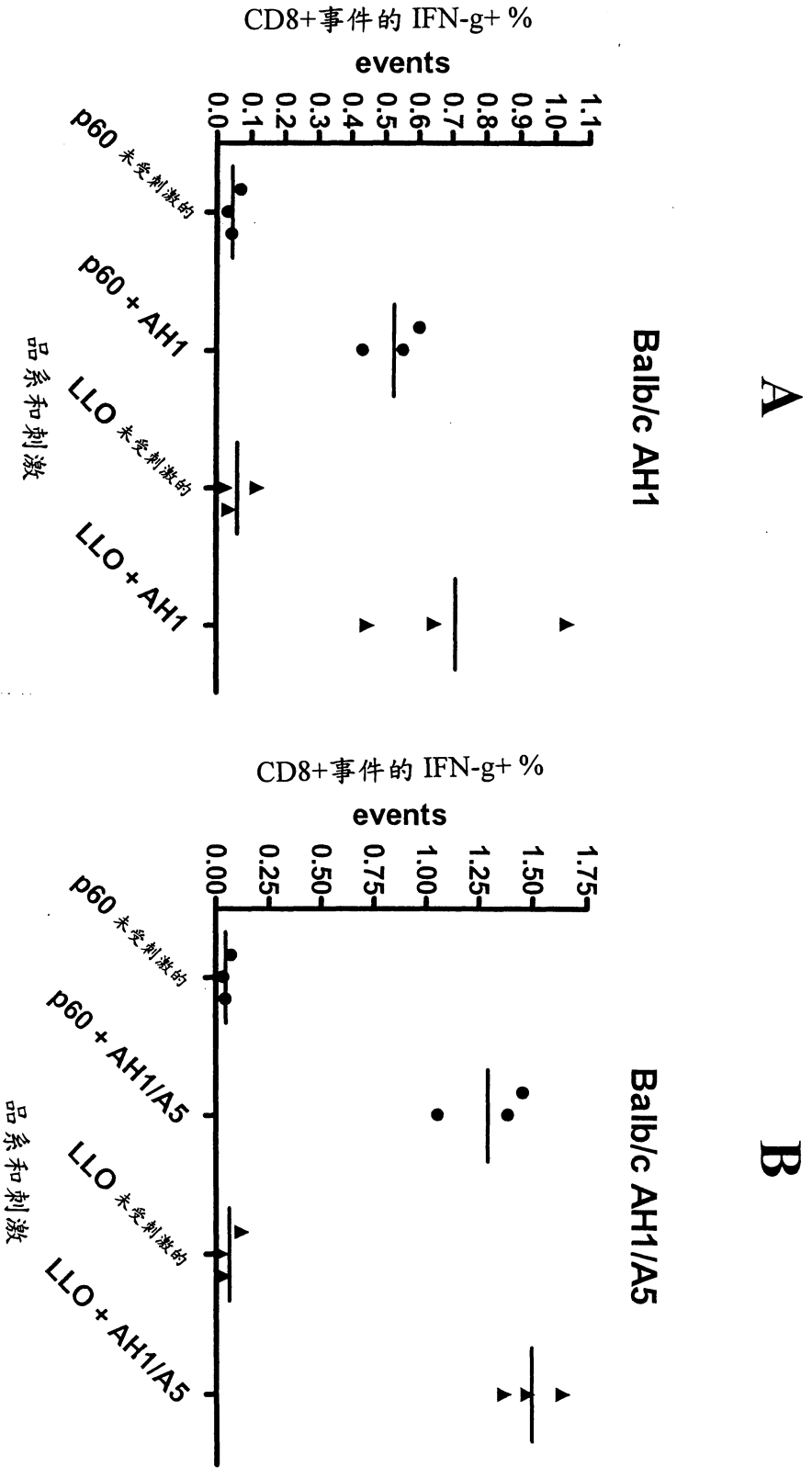

A
Balb/c AH1
CD8+事件的 IFN-g+ %
events
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
1.1
p60 未受刺激的
p60 + AH1
LLO 未受刺激的
LLO + AH1
品系和刺激
B
Balb/c AH1/A5
CD8+事件的 IFN-g+ %
events
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
1.50
1.75
p60 未受刺激的
p60 + AH1/A5
LLO 未受刺激的
LLO + AH1/A5
品系和刺激

圖 59

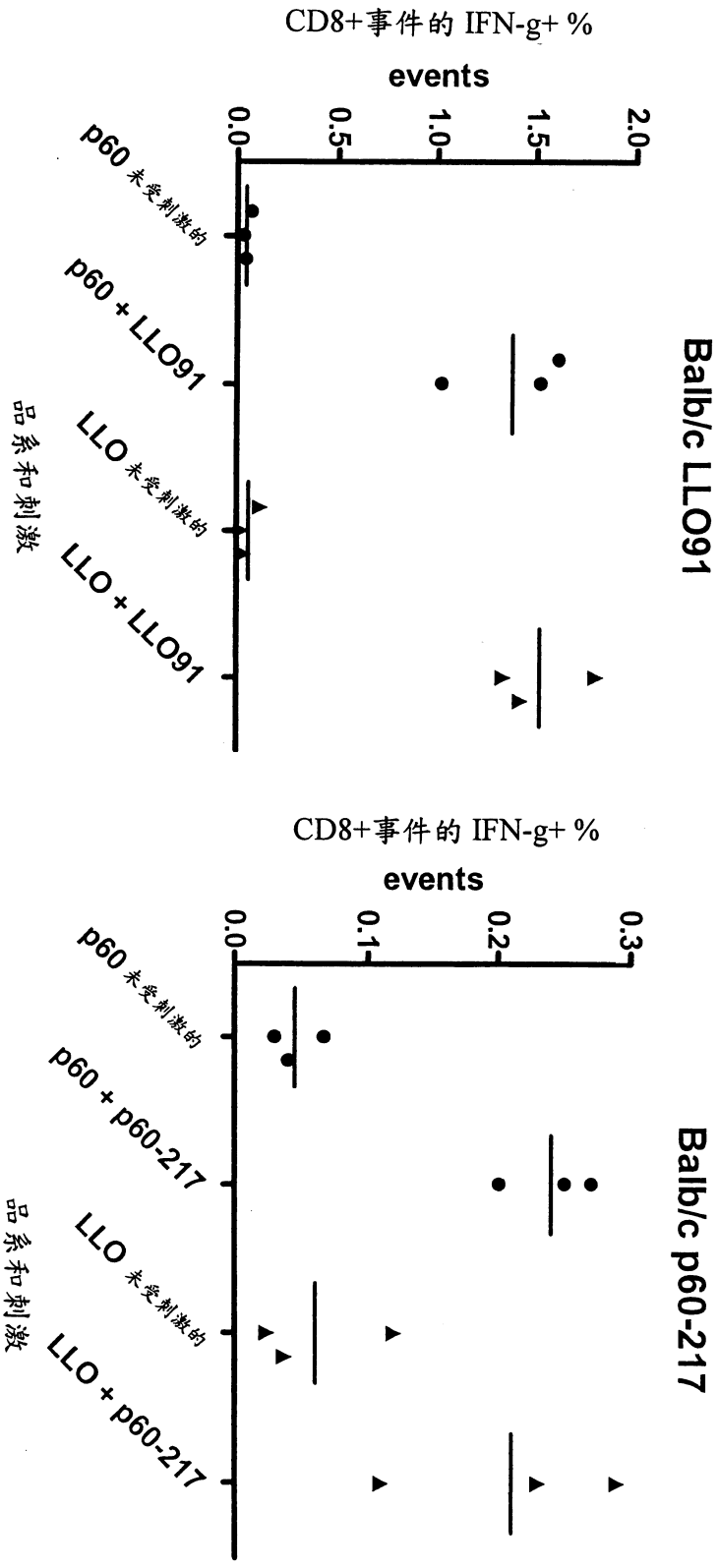

A
CD8+事件的 IFN-g+ %
events
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
Balb/c LLO91
p60 未受刺激的
p60 + LLO91
LLO 未受刺激的
LLO + LLO91
品系和刺激
B
CD8+事件的 IFN-g+ %
events
0.0
0.1
0.2
0.3
Balb/c p60-217
p60 未受刺激的
p60 + p60-217
LLO 未受刺激的
LLO + p60-217
品系和刺激

圖 60

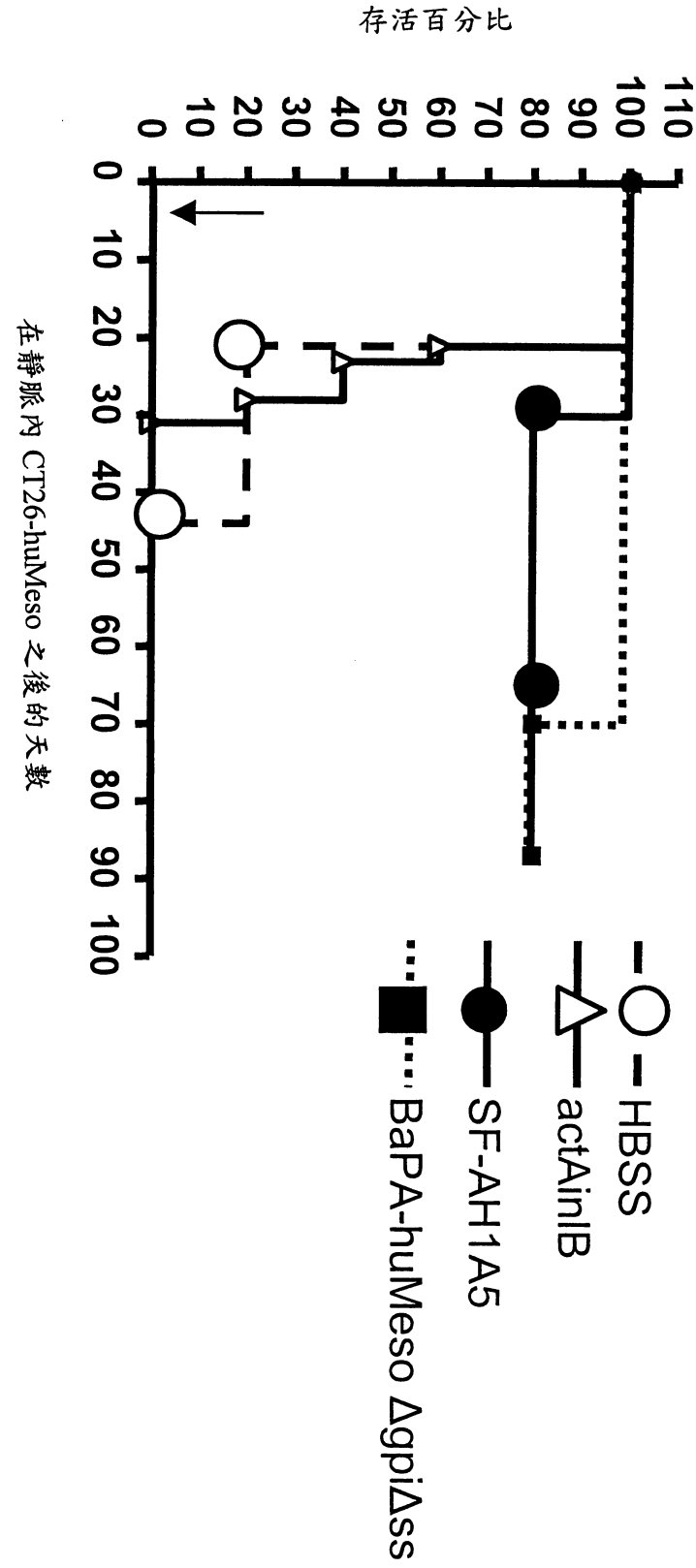

存活百分比
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
在靜脈內 CT26-huMeso 之後的天數
HBSS
actAinlB
SF-AH1A5
BaPA-huMeso ΔgpiΔss

圖 61

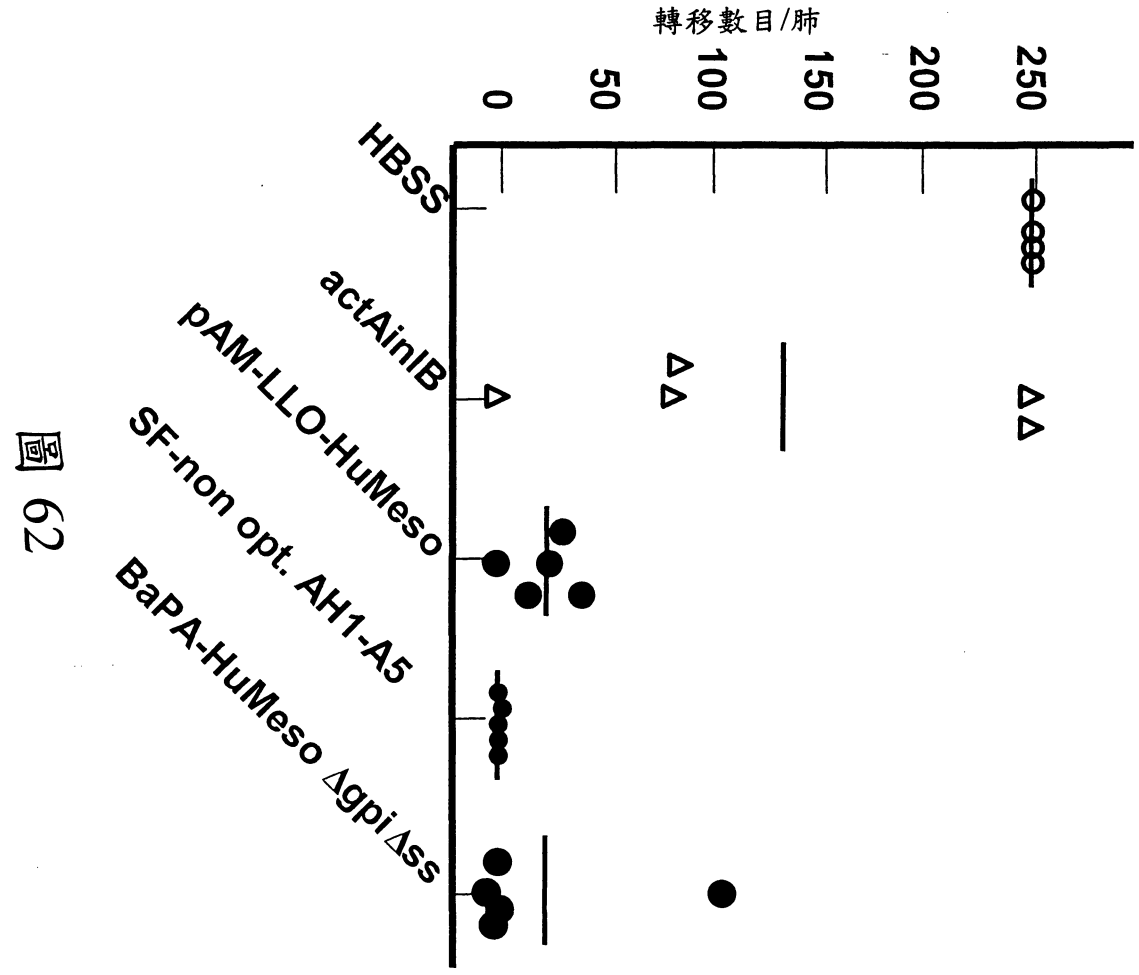

轉移數目/肺
0
50
100
150
200
250
HBSS
actAinlB
pAM-LLO-HuMeso
SF-non opt. AH1-A5
BaPA-HuMeso Δgpi Δss
Δ
ΔΔ
ΔΔ

圖 62

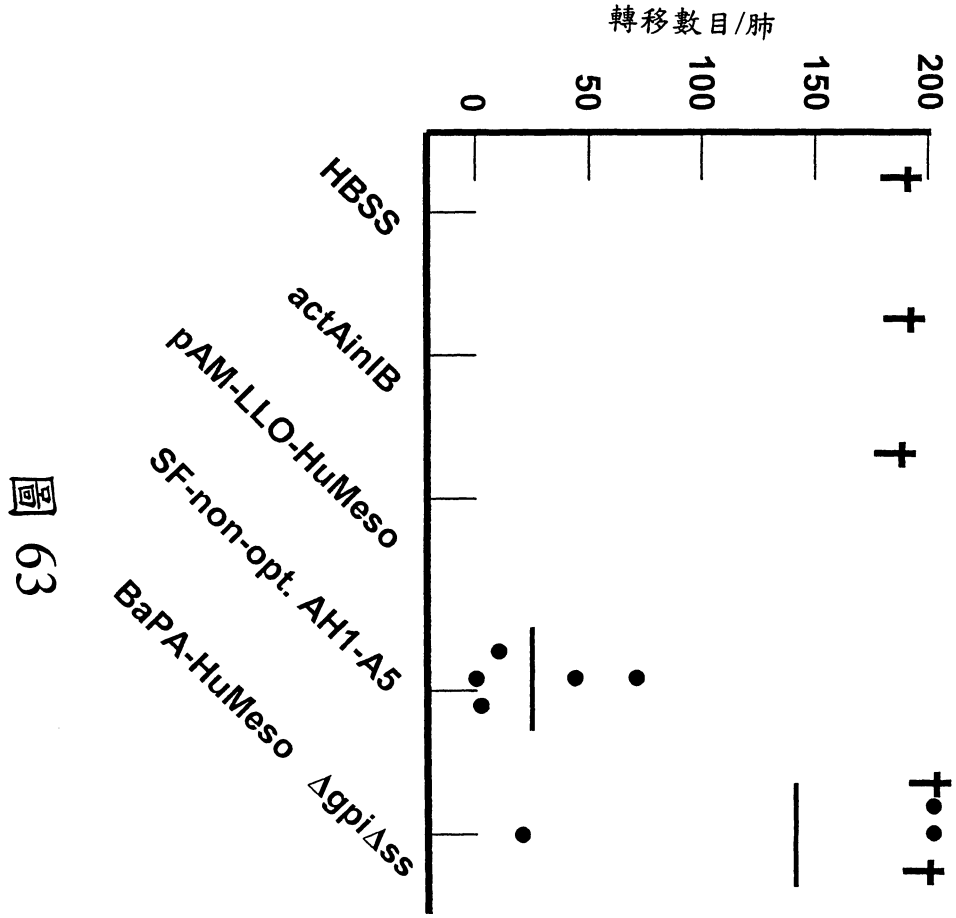

轉移數目/肺
0
50
100
150
200
HBSS
actAinlB
pAM-LLO-HuMeso
SF-non-opt. AH1-A5
BaPA-HuMeso
ΔgpiΔss

圖 63

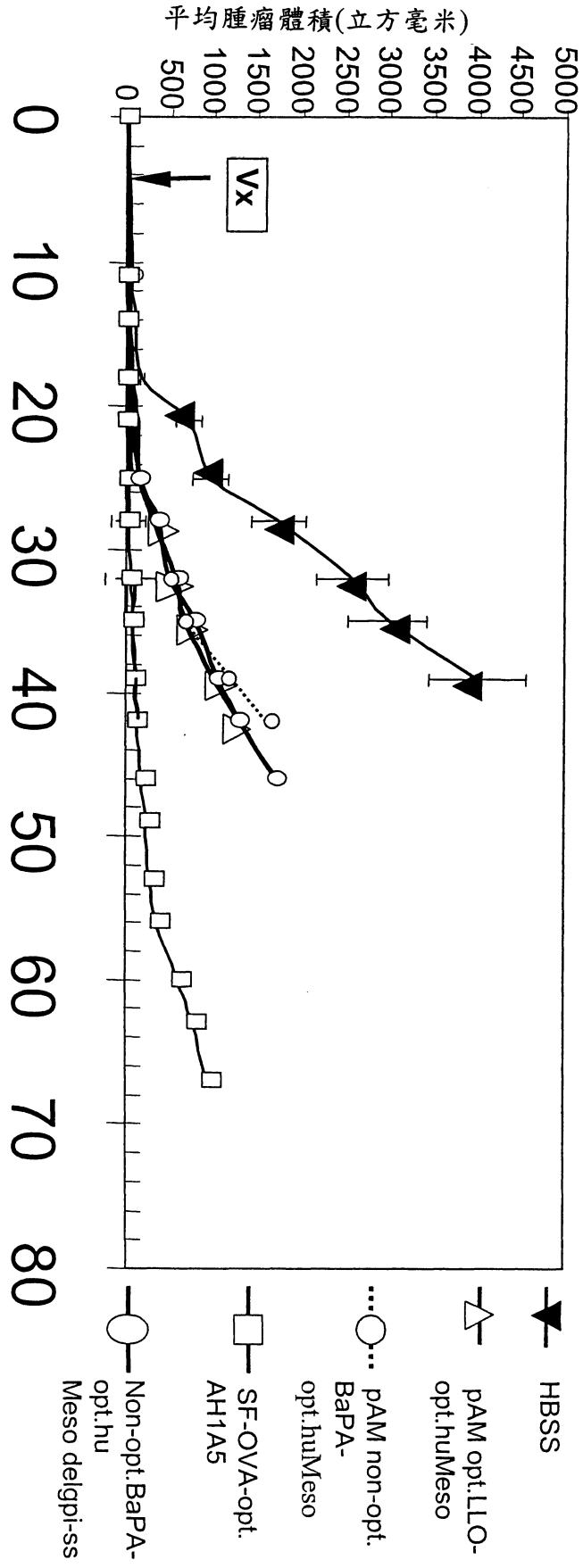

平均腫瘤體積(立方毫米)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Vx
0
10
20
30
40
50
60
70
80
時間(天數)
HBSS
pAM opt.LLO-opt.huMeso
pAM non-opt. BaPA-opt.huMeso
SF-OVA-opt. AH1A5
Non-opt.BaPA-opt.hu Meso delgpi-ss

圖 64

圖 65

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 38 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明:

（無元件符號說明）

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

（無）