



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201412984 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：102129605

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 16 日

(51)Int. Cl.：

C12N15/74 (2006.01)

C12N15/62 (2006.01)

A61K35/74 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/08/16

世界智慧財產權組織

PCT/US2012/051187

(71)申請人：艾德凡斯有限公司 (美國) ADVAXIS, INC. (US)

美國

(72)發明人：夏哈畢 瓦法 SHAHABI, VAFA (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：82 項 圖式數：6 共 138 頁

(54)名稱

用於在 H E R 2 / N E U 過度表現腫瘤之治療中預防逃脫突變之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREVENTION OF ESCAPE MUTATION IN THE
TREATMENT OF HER2/NEU OVER-EXPRESSING TUMORS

(57)摘要

本發明提供用於針對非人類動物之表現 Her2/neu 抗原之腫瘤進行治療及疫苗接種及誘導免疫反應之組合物及方法。

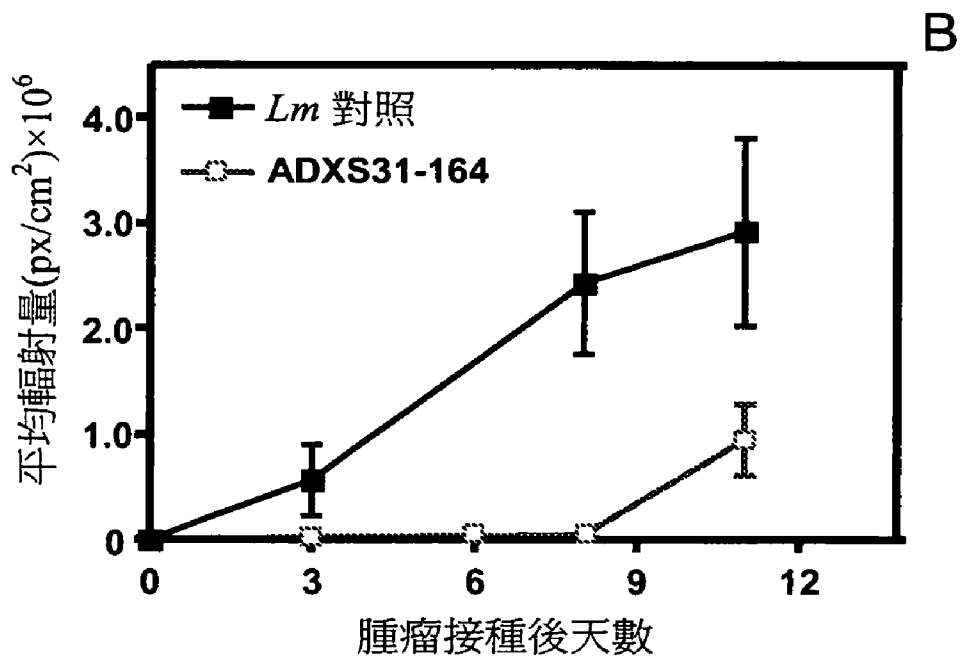


圖 6



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201412984 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：102129605

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 16 日

(51)Int. Cl.：

C12N15/74 (2006.01)

C12N15/62 (2006.01)

A61K35/74 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/08/16

世界智慧財產權組織

PCT/US2012/051187

(71)申請人：艾德凡斯有限公司 (美國) ADVAXIS, INC. (US)

美國

(72)發明人：夏哈畢 瓦法 SHAHABI, VAFA (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：82 項 圖式數：6 共 138 頁

(54)名稱

用於在 H E R 2 / N E U 過度表現腫瘤之治療中預防逃脫突變之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREVENTION OF ESCAPE MUTATION IN THE
TREATMENT OF HER2/NEU OVER-EXPRESSING TUMORS

(57)摘要

本發明提供用於針對非人類動物之表現 Her2/neu 抗原之腫瘤進行治療及疫苗接種及誘導免疫反應之組合物及方法。

發明摘要

※ 申請案號：102129605

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

※ 申請日：

102.8.16

※IPC 分類：A61K 35/74 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

用於在HER2/NEU過度表現腫瘤之治療中預防逃脫突變之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREVENTION OF
ESCAPE MUTATION IN THE TREATMENT OF HER2/NEU
OVER-EXPRESSING TUMORS

【中文】

本發明提供用於針對非人類動物之表現Her2/neu抗原之腫瘤進行治療及疫苗接種及誘導免疫反應之組合物及方法。

【英文】

This invention provides compositions and methods for treating and vaccinating and inducing an immune response against a Her2/neu antigen-expressing tumor in a non-human animal.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（6B）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於在HER2/NEU過度表現腫瘤之治療中預防逃脫突變之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREVENTION OF
ESCAPE MUTATION IN THE TREATMENT OF HER2/NEU
OVER-EXPRESSING TUMORS

相關申請案交叉參照

本申請案主張對2011年8月16日申請之美國專利申請案第13/210,696號之優先權，其係2010年11月12日申請之共同待決之美國專利申請案第12/945,386號之部分連續案，其主張2009年11月11日申請之美國臨時申請案第61/260,277號之權益。該等申請案係全文以引用方式併入本文中。

【技術領域】

本發明提供用於針對非人類動物之表現Her2/neu抗原之腫瘤進行治療及疫苗接種及誘導免疫反應之組合物及方法。

【先前技術】

Her-2/neu (下文稱作「Her-2」)係185 kDa糖蛋白，其係酪胺酸激酶之表皮生長因子受體(EGFR)家族之成員，且係由細胞外結構域、跨膜結構域及已知參與細胞信號傳導之細胞內結構域組成(Bargmann CI等人，Nature 319: 226, 1986；King CR等人，Science 229: 974, 1985)。在人類中，HER2抗原在25%至40%之所有乳癌中過度表現，且在卵巢、肺、胰臟、腦及胃腸道之多種癌症中亦過度表現。Her-2之過度表現與不受控之細胞生長及信號傳導相關，二者皆有助於產生

腫瘤。過度表現Her-2之癌症患者甚至對可檢測之針對Her-2之體液CD8⁺ T細胞及CD4⁺ T細胞反應展現耐受性。

單核球增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)係主要感染抗原呈現細胞且已適應在該等細胞之細胞質中的生活的細胞內病原體。宿主細胞(例如巨噬細胞)主動吞噬單核球增多性李斯特菌且該等細菌中的大部分在吞噬溶酶體中降解。一些該等細菌藉由憑溶血素(李斯特菌溶解素O (LLO))之作用穿過吞噬體膜上之孔逃脫至宿主胞質液中。一旦進入胞質液中，單核球增多性李斯特菌即可使宿主肌動蛋白聚合且在細胞間直接傳送，從而進一步避開宿主免疫系統並產生可忽略不計的針對單核球增多性李斯特菌之抗體反應。

已報導多種獨立地表現來自人類Her2/neu蛋白質之細胞外及細胞內結構域之該蛋白質之小片段之基於單核球增多性李斯特菌(*Lm*)之疫苗。Her2/neu過大而不適合*Lm*，從而使得需要生成Her2/neu片段。所有該等疫苗皆顯示具有免疫原性，且可有效消退FVB/N小鼠中之預建立腫瘤，並延遲表現Her2/neu之轉基因動物中自發性乳房腫瘤之發作。該等初步實驗之有利結果表明，可生成可破壞對Her2/neu自體抗原之耐受性之重組李斯特菌-Her2/neu疫苗。然而，迄今研發之李斯特菌-Her2/neu疫苗係基於減毒李斯特菌平臺，其使用抗生素標記(*cat*)在氯黴素存在下在活體外篩選重組細菌。對於臨床應用，不僅高減毒很重要，不存在對抗生素之抗性亦很重要。

犬科骨肉瘤係長骨(腿骨)癌症，其係10歲以上大型犬隻的頭號殺手。標準治療係診斷後立即截肢，之後實施化學療法。然而，該癌症常轉移至肺。使用化學療法，狗存活約12個月，與之相比，不經治療可存活6個月。HER2抗原存於至多50%之骨肉瘤中。

腫瘤經由逃脫突變避開宿主免疫反應已多有記載且仍係腫瘤治療中之重大障礙。因此，業內需要研發具有高治療效力且不引起逃脫

突變之疫苗。在上文所論述每一片段疫苗中發現活性後，本發明納入每一獨立片段之所有活性位點，從而獲得用於生成疫苗之新穎免疫原性組合物。此外，動物市場中仍非常需要安全有效之癌症療法。本發明藉由提供重組李斯特菌-Her2/neu疫苗(ADXS31-164)來滿足此需要，該疫苗係使用具有明確定義之減毒機制且無抗生素篩選標記之*LmddA*疫苗載體來生成。使用此嵌合抗原不引起逃脫突變，表明腫瘤不會突變躲開對使用此新穎抗原治療之治療有效反應。

【發明內容】

在一個實施例中，本文所提供之發明係關於包含融合多肽之免疫原性組合物，其中該融合多肽包含融合至另一多肽之Her2/neu嵌合抗原，且其中將融合蛋白質投與患有表現Her2/neu之腫瘤之個體引起突變避免。在另一個實施例中，突變避免係由於表位擴展所致。在另一個實施例中，突變避免係由於抗原之嵌合性質所致。

在另一個實施例中，本文所提供之發明係關於包含核酸分子之重組李斯特菌疫苗菌株，其中及在另一個實施例中，該核酸分子包含編碼多肽之第一開放閱讀框，其中該多肽包含Her2/neu嵌合抗原，其中該核酸分子進一步包含編碼代謝酶之第二開放閱讀框，且其中該代謝酶與該重組李斯特菌菌株之染色體中缺少之內源基因互補。

在一個實施例中，本文所提供之發明係關於治療非人類動物之表現Her-2/neu之腫瘤生長或癌症之方法，該方法包含投與包含編碼融合多肽之核酸之重組李斯特菌之步驟，其中該融合多肽包含融合至另一輔助多肽之Her2/neu嵌合抗原。

在另一個實施例中，本文所提供之發明係關於預防非人類動物之表現Her-2/neu之腫瘤生長或癌症之方法，該方法包含投與包含編碼融合多肽之核酸之重組李斯特菌之步驟，其中該融合多肽包含融合至另一輔助多肽之Her2/neu嵌合抗原。

在一個實施例中，本文所提供之發明係關於引發針對非人類動物之表現Her-2/neu之腫瘤生長或癌症之增強免疫反應之方法，該方法包含投與包含編碼融合多肽之核酸之重組李斯特菌之步驟，其中該融合多肽包含融合至另一輔助多肽之Her2/neu嵌合抗原。

【圖式簡單說明】

圖1. 顯示ADXS31-164之構造。(A) pAdv164之質粒圖譜，其帶有在組成型李斯特菌p60啟動子控制下與*LmddA*菌株中之染色體*dal-dal*缺失互補之枯草桿菌(*bacillus subtilis*) *dal*基因。其亦含有截短LLO₍₁₋₄₄₁₎與嵌合人類Her2/neu基因之融合物，該融合物係藉由直接融合Her2/neu之3個片段來構築：EC1 (aa 40-170)、EC2 (aa 359-518)及ICI (aa 679-808)。(B) 藉由經抗LLO抗體印跡之TCA沈澱之細胞培養上清液之西方墨點(western blot)分析來檢測tLLO-ChHer2在*Lm*-LLO-ChHer2 (*Lm*-LLO-138)及*LmddA*-LLO-ChHer2 (ADXS31-164)中之表現及分泌。約104 KD之差異帶對應於tLLO-ChHer2。內源LLO經檢測為58 KD帶。李斯特菌對照缺少ChHer2表現。

圖2. 顯示ADXS31-164之免疫原性。(A) 使用NT-2細胞作為刺激劑且使用3T3/neu細胞作為靶來測試基於Her2/neu李斯特菌之疫苗在來自經免疫小鼠之脾細胞中引發之細胞毒性T細胞反應。*Lm*對照係基於在所有方面皆相同但表現無關抗原(HPV16-E7)之*LmddA*背景。(B) 在經絲裂黴素C處理之NT-2細胞活體外刺激24小時後，藉由ELISA量測來自經免疫FVB/N小鼠之脾細胞分泌至細胞培養基中之IFN- γ 。(C) 來自經嵌合疫苗免疫之HLA-A2轉基因小鼠之脾細胞因應使用來自蛋白質不同區域之肽之活體外培育的IFN- γ 分泌。使用重組ChHer2蛋白質作為陽性對照且無關肽或無肽組構成如圖例中所列示之陰性對照。藉由ELISA分析使用在共培育72小時後採集之細胞培養上清液來檢測IFN- γ 分泌。每一數據點皆係一式三份數據之平均值 $\pm$ 標準誤差。* P

值 < 0.001 。

圖3. 顯示李斯特菌-ChHer2/neu疫苗之腫瘤預防研究。用每一種重組李斯特菌-ChHer2或對照李斯特菌疫苗向Her2/neu轉基因小鼠注射6次。在6週齡開始免疫且每三週繼續進行直至第21週。每週監測腫瘤外觀且表現為無腫瘤小鼠之百分比。 $*p<0.05$ ， $N = 9/\text{組}$ 。

圖4. 顯示用 *LmddA*-LLO-ChHer2 (ADXS31-164) 免疫對脾中Treg%之效應。向FVB/N小鼠皮下接種 1×10^6 個NT-2細胞且以一週間隔用每一種疫苗免疫三次。在第二次免疫後7天採集脾。在分離免疫細胞後，藉由抗CD3、CD4、CD25及FoxP3抗體將其染色以供檢測Treg。來自代表性實驗之Treg之點圖顯示CD25⁺/FoxP3⁺ T細胞之頻率，該頻率表現為不同治療組之間之總CD3⁺或CD3⁺CD4⁺ T細胞之百分比。

圖5. 顯示用 *LmddA*-LLO-ChHer2 (ADXS31-164) 免疫對NT-2腫瘤中腫瘤浸潤Treg%之效應。向FVB/N小鼠皮下接種 1×10^6 個NT-2細胞且以一週間隔用每一種疫苗免疫三次。在第二次免疫後7天採集腫瘤。在分離免疫細胞後，藉由抗CD3、CD4、CD25及FoxP3抗體將其染色以供檢測Treg。(A). 代表性實驗之Treg點圖。(B). CD25⁺/FoxP3⁺ T細胞之頻率，其表現為不同治療組之間總CD3⁺或CD3⁺CD4⁺ T細胞之百分比(左圖)及腫瘤內CD8/Treg比率(右圖)。數據顯示為自2個獨立實驗獲得之平均值 $\pm$ SEM。

圖6. 顯示用 *LmddA*-LLO-ChHer2 (ADXS31-164) 進行疫苗接種可延遲乳癌細胞系在腦中之生長。用ADXS31-164或對照李斯特菌疫苗將Balb/c小鼠免疫三次。在麻醉小鼠中顱內注射EMT6-Luc細胞(5,000)。(A) 在所指示天數使用Xenogen X-100 CCD照相機對小鼠實施離體成像。(B) 將像素強度以光子數目/秒/cm²表面積繪圖；此顯示為平均輻射量。(C) 藉由西方墨點法使用抗Her2/neu抗體檢測

EMT6-Luc細胞、4T1-Luc及NT-2細胞系之Her2/neu之表現。使用J774.A2細胞(一種鼠類類巨噬細胞細胞系)作為陰性對照。

【實施方式】

在一個實施例中，本文提供用於針對表現Her2-neu抗原之腫瘤進行預防、治療及疫苗接種，以及誘導針對Her2-neu抗原之亞優勢表位之免疫反應，同時引起突變避免之組合物及方法。在另一個實施例中，突變避免係由於表位擴展所致。在另一個實施例中，突變避免係由於抗原之嵌合性質所致。

在另一個實施例中，本文提供包含融合多肽之免疫原性組合物，其中該融合多肽包含融合至另一多肽之Her2/neu嵌合抗原，且其中將融合蛋白質投與患有表現Her2/neu之腫瘤之個體預防腫瘤內之逃脫突變。在另一個實施例中，本文提供包含免疫原性組合物之重組李斯特菌疫苗菌株。

在一個實施例中，本文提供引發針對非人類動物之表現Her-2/neu之腫瘤生長或癌症之增強免疫反應之方法，該方法包含投與包含編碼融合多肽之核酸分子之重組李斯特菌之步驟，其中該融合多肽包含融合至另一輔助多肽之Her2/neu嵌合抗原。

在另一個實施例中，本文提供預防非人類動物之表現Her-2/neu之腫瘤生長或癌症之方法，該方法包含投與包含編碼融合多肽之核酸之重組李斯特菌之步驟，其中該融合多肽包含融合至另一輔助多肽之Her2/neu嵌合抗原。

在一個實施例中，本文提供治療非人類動物之表現Her-2/neu之腫瘤生長或癌症之方法，該方法包含投與包含編碼融合多肽之核酸分子之重組李斯特菌之步驟，其中該融合多肽包含融合至另一輔助多肽之Her2/neu嵌合抗原。在另一個實施例中，非人類動物係犬科動物。在另一個實施例中，犬科動物係狗。

在一個實施例中，本文提供包含核酸分子之重組李斯特菌疫苗菌株，其中該核酸分子包含編碼多肽之第一開放閱讀框，其中該多肽包含Her2/neu嵌合抗原，其中該核酸分子進一步包含編碼代謝酶之第二開放閱讀框，且其中該代謝酶與該重組李斯特菌菌株之染色體中缺少之內源基因互補。在另一個實施例中，重組李斯特菌疫苗菌株進一步包含具有編碼代謝酶之第三開放閱讀框之核酸分子，且其中該代謝酶與該重組李斯特菌菌株之染色體中缺少之內源基因互補。

在另一個實施例中，本文提供包含核酸分子之重組李斯特菌疫苗菌株，其中該核酸分子包含編碼多肽之第一開放閱讀框，其中該多肽包含Her2/neu嵌合抗原，其中該核酸分子進一步包含各自編碼代謝酶之第二及第三開放閱讀框，且其中該代謝酶與該重組李斯特菌菌株之染色體中缺少之內源基因互補。在一個實施例中，核酸分子整合至李斯特菌基因組中。在另一個實施例中，核酸分子位於重組李斯特菌疫苗菌株之質粒中。在另一個實施例中，質粒在不存在抗生素篩選時穩定維持在重組李斯特菌疫苗菌株中。在另一個實施例中，質粒不賦予重組李斯特菌抗生素抗性。在另一個實施例中，重組李斯特菌菌株經減毒。在另一個實施例中，重組李斯特菌係減毒營養缺陷型菌株。在另一個實施例中，外來抗原之表現對細菌(例如本發明細菌)施加之高代謝負擔亦係重要減毒機制。

在一個實施例中，減毒菌株係*LmddA*。在另一個實施例中，此菌株發揮強輔助效應，該效應係基於李斯特菌之疫苗之固有性質。此輔助效應之一種表現係將由無關李斯特菌或ADXS-31-164疫苗引起之腫瘤內Treg數目降低4/5 (參見本文圖5)。在另一個實施例中，表現無關抗原(HPV16 E7)之*LmddA*載體亦與腫瘤中Treg頻率之顯著降低相關，此可能係因先天免疫反應所致。

在一個實施例中，本發明提供用於選殖her-2-嵌合體之核酸序列

(參見本文實例中之表1)。

Her-2/neu嵌合體構築物係藉由SOEing PCR方法且以每一單獨hHer-2/neu區段作為模板進行直接融合來生成。引物顯示於表2中(參見本文中之實例)。

在一個實施例中，*LmddA*-LLO-ChHer2 (ADXS31-164)係根據本文所提供實例來生成。在一個實施例中，使用XhoI及SpeI限制酶自pAdv138切除嵌合Her2基因(ChHer2)，且將其在*Lmdd*穿梭載體pAdv134中與LLO之截短非溶血片段一起選殖在框中。在另一個實施例中，藉由DNA測序分析來確認插入物、LLO及*hly*啟動子之序列。在另一個實施例中，然後將此質粒電穿孔至電勝任*actA*、*dal*、*dat*突變體單核球增多性李斯特菌菌株中，在含有鏈黴素(250 µg/ml)之腦心浸液(BHI)瓊脂板上篩選*LmddA*及陽性純系。在另一個實施例中，使用表現hHer2/neu (*Lm*-hHer2)片段之類似李斯特菌菌株來達成比較目的。在另一個實施例中，包括無關李斯特菌構築物(*Lm*對照)以引起李斯特菌對免疫系統之非抗原依賴性效應。在另一個實施例中，*Lm*對照係基於與*LmddA*-LLO-ChHer2 (ADXS31-164)相同但表現不同抗原(例如HPV16-E7或NY-ESO-1)之李斯特菌平臺。在另一個實施例中，使用業內已知之方法(包括但不限於免疫印跡、RNA印跡、免疫螢光及諸如此類)測試並確認李斯特菌中融合蛋白質之表現及分泌。在另一個實施例中，將每一構築物在活體內繼代兩次(參見本文中之實例)。

在一個實施例中，減毒營養缺陷型李斯特菌疫苗菌株*LmddA*-LLO-ChHer2 (ADXS31-164)係基於因缺失毒力基因*actA*而減毒且保留用於在活體內及在活體外藉由互補*dal*基因表現Her2/neu之質粒之李斯特菌疫苗載體。在一個實施例中，ADXS31-164表現並分泌融合至李斯特菌溶解素O (LLO)之前441個胺基酸之嵌合Her2/neu蛋白質。在另



一個實施例中，構築物採用業內已知之適宜啟動子及信號序列或信號肽以使得能表現並分泌融合蛋白質。一些該等啟動子及信號序列包括(但不限於)李斯特菌*actA*啟動子及信號序列、*hly*啟動子及信號序列、*p60*啟動子及其他業內已知之啟動子及信號序列，其中之一些闡述於全文以引用方式併入本文中之美國專利第5,830,702號中。

在一個實施例中，ADXS31-164以破壞轉基因動物對HER2/neu之耐受性之能力施加強抗原特異性抗腫瘤反應(參見實例2)。在另一個實施例中，ADXS31-164能引發針對位於靶抗原中不同結構域之人類表位之抗Her2/neu特異性免疫反應(參見實例2)。在另一個實施例中，ADXS31-164菌株經高度減毒且由於其更快地自經免疫小鼠之脾清除而具有高於先前李斯特菌疫苗世代之安全性。在另一個實施例中，ADXS31-164儘管經更強減毒，但在預防Her2/neu轉基因動物之自發性乳房腫瘤發作中仍較*Lm*-LLO-ChHer2更有效(參見實例3)。

在另一個實施例中，ADXS31-164較*Lm*-LLO-ChHer2 (此疫苗之具有抗生素抗性且毒力更強之形式)使轉基因動物之腫瘤發作延遲更久(參見圖3)。在另一個實施例中，ADXS31-164菌株在Her2/neu轉基因動物中具有高免疫原性，能破壞對HER2/neu自體抗原之耐受性且預防腫瘤形成。在另一個實施例中，ADXS31-164使腫瘤內T調節細胞(Treg)顯著減少(參見本文中之實例5)。在另一個實施例中，經*LmddA*疫苗治療之腫瘤中之Treg之較低頻率使腫瘤內CD8/Treg比率升高，表明在用*LmddA*疫苗免疫後獲得更有利之腫瘤微環境(參見本文中之實例5)。在另一個實施例中，使用此嵌合抗原不引起逃脫突變，表明腫瘤不會突變躲開對使用此新穎抗原治療之治療有效反應(參見本文中之實例6)。在另一個實施例中，用ADXS31-164周圍免疫延遲轉移性乳癌細胞系在腦中之生長(參見本文中之實例7)。在另一個實施例中，周圍投與ADXS31-164到達中樞神經系統，顯示基於*LmddA*之疫

苗提供對CNS腫瘤之潛在治療(參見本文中之實例7)。

犬科骨肉瘤係長骨(腿骨)癌症，其係10歲以上大型犬隻之頭號殺手。標準治療係診斷後立即截肢，之後實施化學療法。然而，該癌症常轉移至肺。使用化學療法，狗存活約18個月，與之相比，不經治療可存活6-12個月。人們相信，HER2抗原存於至多50%之骨肉瘤中。在一個實施例中，本文所提供疫苗ADXS31-164對表現此抗原之細胞產生免疫攻擊並治療人類乳癌。

經組織學診斷患有骨肉瘤之狗顯示惡性細胞表現HER2/neu之證據。因此，在一個實施例中，本文提供治療犬科骨肉瘤之方法，該方法包含將包括ADXS31-164及佐劑之疫苗組合物投與患有骨肉瘤之犬科動物，由此治療犬科骨肉瘤之步驟(參見本文中之實例8)。在另一個實施例中，本文提供治療犬科骨肉瘤之方法，該方法包含將由ADXS31-164及佐劑組成之疫苗組合物投與患有骨肉瘤之犬科動物，由此治療犬科骨肉瘤之步驟(參見本文中之實例8)。在另一個實施例中，本文提供治療犬科骨肉瘤之方法，該方法包含將由ADXS31-164組成之疫苗組合物投與患有骨肉瘤之犬科動物，由此治療犬科骨肉瘤之步驟(參見本文中之實例8)。

在另一個實施例中，使用業內已知之各種方法(如熟習此項技術者可理解，包括靜脈內、腹膜內、肌內、經口、鼻內等)將本發明疫苗投與犬科動物。在另一個實施例中，以在犬科動物個體之舌之基細胞處或其附近遞送疫苗之方式來投與疫苗。

在另一個實施例中，投與可為單一事件，或可以不同時間間隔投與多個加強劑量以增強免疫反應。在投與犬科動物幼崽之情形中，典型投與方案可為在(例如) 2-3週齡起始投與，之後在4週及6週投與加強劑量。在另一個實施例中，投與係預防性的，即在腫瘤生長已發生或懷疑已發生之前投與；但亦可在該事實發生後投與，即治療性投

與，例如在與腫瘤或癌性生長相關之疾病症狀出現後投與。

在一個實施例中，*Lm*-LLO-ChHer2菌株係*Lm*-LLO-138。

在一個實施例中，表現嵌合抗原之重組減毒之無抗生素李斯特菌可用於預防及治療癌症或實體腫瘤，如本文所例示。在另一個實施例中，腫瘤係Her2/neu陽性腫瘤。在另一個實施例中，癌症係表現Her2/neu之癌症。在另一個實施例中，癌症係乳癌、中樞神經系統(CNS)癌症、頭頸癌、骨肉瘤、犬科骨肉瘤或任何業內已知癌症。在另一個實施例中，腫瘤係骨腫瘤、乳房腫瘤、頭頸腫瘤或任何業內已知表現抗原之腫瘤。在另一個實施例中，表現嵌合Her2/neu之重組李斯特菌可用作用於治療Her2/neu過度表現實體腫瘤之治療性疫苗。在另一個實施例中，本文提供之Her2/neu嵌合抗原可用於治療表現Her2/neu之腫瘤及預防該等腫瘤之逃脫突變。在另一個實施例中，術語「逃脫突變」係指突變躲開對治療之治療有效反應之腫瘤。

在一個實施例中，本文提供包含編碼免疫原性組合物之第一開放閱讀框之核酸分子，其中該核酸分子位於重組李斯特菌疫苗菌株內。在另一個實施例中，使用本文提供之核酸分子來轉化李斯特菌以獲得重組李斯特菌。在另一個實施例中，本文提供之核酸缺少毒力基因。在另一個實施例中，整合至李斯特菌基因組中之核酸分子載有無功能毒力基因。在另一個實施例中，重組李斯特菌中之毒力基因發生突變。在另一個實施例中，使用核酸分子鈍化存於李斯特菌基因組中之內源基因。在另一個實施例中，毒力基因係ActA基因。在另一個實施例中，毒力基因係PrfA基因。如熟習此項技術者可理解，毒力基因可為業內已知與重組李斯特菌中之毒力相關之任何基因。

在一個實施例中，在李斯特菌菌株之染色體中缺少代謝基因、毒力基因等。在另一個實施例中，在李斯特菌菌株之染色體中及任何游離體遺傳元件中缺少代謝基因、毒力基因等。在另一個實施例中

在毒力菌株之基因組中缺少代謝基因、毒力基因等。在一個實施例中，染色體中之毒力基因發生突變。在另一個實施例中，自染色體缺失毒力基因。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，在李斯特菌菌株之染色體中缺少代謝基因、毒力基因等。在另一個實施例中，在李斯特菌菌株之染色體中及任何游離體遺傳元件中缺少代謝基因、毒力基因等。在另一個實施例中，在毒力菌株之基因組中缺少代謝基因、毒力基因等。在一個實施例中，染色體中之毒力基因發生突變。在另一個實施例中，自染色體缺失毒力基因。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，本文提供之核酸及質粒不賦予重組李斯特菌抗生素抗性。

在另一個實施例中，「核酸分子」係指質粒。在另一個實施例中，該術語係指整合載體。在另一個實施例中，該術語係指包含整合載體之質粒。在另一個實施例中，整合載體係位點特異性整合載體。在另一個實施例中，本發明方法及組合物之核酸分子係由業內已知任何類型之核苷酸組成。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，「代謝酶」係指參與合成宿主細菌所需營養素之酶。在另一個實施例中，該術語係指合成宿主細菌所需營養素所需之酶。在另一個實施例中，該術語係指參與合成宿主細菌利用之營養素之酶。在另一個實施例中，該術語係指參與合成宿主細菌持續生長所需營養素之酶。在另一個實施例中，營養素之合成需要該酶。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，「穩定維持」係指在不存在篩選(例如抗生素篩選)時將核酸分子或質粒維持10個世代且無可檢測損失。在另一個實施例中，該階段係15個世代。在另一個實施例中，該階段係20個世代。在另一個實施例中，該階段係25個世代。在另一個實施例中，該

階段係30個世代。在另一個實施例中，該階段係40個世代。在另一個實施例中，該階段係50個世代。在另一個實施例中，該階段係60個世代。在另一個實施例中，該階段係80個世代。在另一個實施例中，該階段係100個世代。在另一個實施例中，該階段係150個世代。在另一個實施例中，該階段係200個世代。在另一個實施例中，該階段係300個世代。在另一個實施例中，該階段係500個世代。在另一個實施例中，該階段係超過個世代。在另一個實施例中，在活體外(例如在培養中)將核酸分子或質粒維持穩定。在另一個實施例中，在活體內將核酸分子或質粒維持穩定。在另一個實施例中，在活體外及在活體內皆將核酸分子或質粒維持穩定。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，本發明提供表現抗原之重組李斯特菌菌株。本發明亦提供包含融合至Her-2嵌合蛋白質或其片段之李斯特菌溶解素(LLO)蛋白質片段或PEST肽或N-末端ActA片段之重組肽、包含該等重組肽之疫苗及免疫原性組合物以及包含該等疫苗及免疫原性組合物之針對表現Her-2之腫瘤誘導抗Her-2免疫反應並進行治療及疫苗接種之方法。

在另一個實施例中，本發明之重組李斯特菌菌株已經由動物宿主繼代。在另一個實施例中，繼代使菌株作為疫苗載體之效力最大化。在另一個實施例中，繼代穩定李斯特菌菌株之免疫原性。在另一個實施例中，繼代穩定李斯特菌菌株之毒力。在另一個實施例中，繼代增強李斯特菌菌株之免疫原性。在另一個實施例中，繼代增強李斯特菌菌株之毒力。在另一個實施例中，繼代移除李斯特菌菌株之不穩定亞菌株。在另一個實施例中，繼代降低李斯特菌菌株之不穩定亞菌株之盛行率。在另一個實施例中，李斯特菌菌株含有基因組插入之編碼含有抗原之重組肽之基因。在另一個實施例中，李斯特菌菌株載有

包含編碼含有抗原之重組肽之基因之質粒。在另一個實施例中，繼代係藉由業內已知之任何其他方法來實施。

在一個實施例中，本文提供之多肽係包含選自由以下組成之群之另一多肽之融合蛋白質：a) 非溶血LLO蛋白質或N-末端片段，b) PEST序列，或c) N-末端ActA片段，且另外其中該另一多肽融合至Her2/neu嵌合抗原。在另一個實施例中，另一多肽係功能多肽。在另一個實施例中，另一多肽之片段具有免疫原性。在另一個實施例中，另一多肽具有免疫原性。

在另一個實施例中，本文提供之多肽係包含融合至Her2/neu嵌合抗原之非溶血LLO蛋白質或N-末端片段之融合蛋白質。在另一個實施例中，本發明方法及組合物之融合蛋白質包含來自李斯特菌生物體之ActA序列。ActA蛋白質及其片段以與LLO類似之方式增強抗原呈現及免疫力。

在本發明方法及組合物之另一個實施例中，融合蛋白質包含Her2/neu抗原及另一輔助多肽。在一個實施例中，另一多肽係非溶血LLO蛋白質或其片段(參見本文中之實例)。在另一個實施例中，另一多肽係PEST序列。在另一個實施例中，另一多肽係ActA蛋白質或其片段。ActA蛋白質及其片段以與LLO類似之方式增強抗原呈現及免疫力。

在另一個實施例中，本發明方法及組合物之另一多肽係李斯特菌溶解素(LLO)肽。在另一個實施例中，另一多肽係ActA肽。在另一個實施例中，另一多肽係PEST樣序列肽。在另一個實施例中，另一多肽係能增強抗原肽之免疫原性之任何其他肽。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

包含Her2/neu嵌合抗原之融合蛋白質可藉由任何適宜方法來製備，包括(例如)選殖並限制適宜序列或藉由下文論述之方法直接化學

合成。或者，可選殖子序列且可使用適宜限制酶裂解適宜子序列。然後可連接該等片段以產生期望DNA序列。在一個實施例中，編碼抗原之DNA可使用DNA擴增方法(例如聚合酶鏈式反應(PCR))來產生。首先，單獨擴增新末端任一側上之天然DNA區段。一個經擴增序列之5'端編碼肽連接體，同時另一個經擴增序列之3'端亦編碼肽連接體。由於第一片段之5'端與第二片段之3'端互補，兩個片段(在(例如) LMP瓊脂糖上部分純化後)可在第三PCR反應中用作重疊模板。經擴增序列將含有密碼子、開放位點羧基側上之區段(現形成胺基序列)、連接體及開放位點胺基側上之序列(現形成羧基序列)。將抗原連接至質粒中。每一方法代表本發明之單獨實施例。

本發明之結果顯示，投與本發明組合物可用於誘導形成識別並殺滅腫瘤細胞之抗原特異性T細胞(例如細胞毒性T細胞，參見本文中之實例)。

在一個實施例中，本發明提供包含融合至Her-2嵌合蛋白質或融合至其片段之LLO蛋白質之N-末端片段之重組多肽。在一個實施例中，本發明提供由融合至Her-2嵌合蛋白質或融合至其片段之LLO蛋白質之N-末端片段組成之重組多肽。

在另一個實施例中，本發明方法及組合物之Her-2嵌合蛋白質係人類Her-2嵌合蛋白質。在另一個實施例中，Her-2蛋白質係小鼠Her-2嵌合蛋白質。在另一個實施例中，Her-2蛋白質係大鼠Her-2嵌合蛋白質。在另一個實施例中，Her-2蛋白質係靈長類Her-2嵌合蛋白質。在另一個實施例中，Her-2蛋白質係人類或業內已知之任何其他動物物種或其組合之Her-2嵌合蛋白質。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，Her-2蛋白質係稱作「HER-2/neu」、「ErbB2」、「v-erb-b2」、「c-erb-b2」、「neu」或「cNeu」之蛋白質。每

一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，Her2-neu嵌合蛋白質帶有Her2/neu抗原中顯示致癌基因之MHC-I類表位簇之兩個細胞外片段及一個細胞內片段，其中，在另一個實施例中，嵌合蛋白質帶有Her2/neu抗原(片段EC1、EC2及IC1)之3個H2Dq及至少17個已定位人類MHC-I類表位(參見圖1及實例1)。在另一個實施例中，嵌合蛋白質帶有至少13個已定位人類MHC-I類表位(片段EC2及IC1)。在另一個實施例中，嵌合蛋白質帶有至少14個已定位人類MHC-I類表位(片段EC1及IC1)。在另一個實施例中，嵌合蛋白質帶有至少9個已定位人類MHC-I類表位(片段EC1及IC2)。在另一個實施例中，Her2-neu嵌合蛋白質融合至非溶血李斯特菌溶解素O (LLO)。在另一個實施例中，Her2-neu嵌合蛋白質融合至單核球增多性李斯特菌李斯特菌溶解素O (LLO)蛋白質之前441個胺基酸且係由單核球增多性李斯特菌減毒營養缺陷型菌株*LmddA*表現並分泌。在另一個實施例中，融合蛋白質tLLO-ChHer2在本文提供之表現嵌合Her2/neu抗原/LLO融合蛋白質之減毒營養缺陷型菌株中之表現及分泌與*Lm-LLO-ChHer2*在活體外生長8小時後在TCA沈澱之細胞培養上清液中之表現及分泌相當(參見圖1B)。

在一個實施例中，在經無關李斯特菌疫苗注射之純真(naïve)動物或小鼠中未檢測到CTL活性(參見圖2A)。而在另一個實施例中，本文提供之減毒營養缺陷型菌株(ADXS31-164)能刺激來自野生型FVB/N小鼠之脾細胞分泌IFN- γ (圖2B)。

在另一個實施例中，本文提供之方法及組合物之代謝酶係胺基酸代謝酶，其中，在另一個實施例中，代謝酶係丙胺酸消旋酶。在另一個實施例中，代謝酶係D-胺基酸轉移酶。在另一個實施例中，代謝酶催化形成用於在重組李斯特菌菌株中合成細胞壁之胺基酸，其中，在另一個實施例中，代謝酶係丙胺酸消旋酶。

在另一個實施例中，編碼代謝酶之基因係在李斯特菌p60啟動子控制下表現。在另一個實施例中，使用inlA（編碼內化素(internalin)）啟動子。在另一個實施例中，使用hly啟動子。在另一個實施例中，使用ActA啟動子。在另一個實施例中，整合酶基因係在任何其他革蘭氏(gram)陽性啟動子控制下表現。在另一個實施例中，編碼代謝酶之基因係在任何其他在李斯特菌中起作用之啟動子控制下表現。熟習此項技術者將瞭解，可使用其他啟動子或多順反子表現卡匣來驅動基因表現。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，Her-2嵌合蛋白質係由SEQ ID NO:1中顯示之以下核酸序列編碼

```
gagacccacctggacatgctccgccacctctaccagggtgccaggtggtgcagggaacctggaactcacctacctgccaccaatg
ccagcctgtccttctgcaggatccaggaggtgcagggtacgtgctcatcgtcacaaccaagtgaggcaggtcccactgcagag
gctgcggatgtgcgagggcaccagctcttgaggacaactatgccctggccgtgctagacaatggagacccgctgaacaataccaccc
ctgtcacaggggcctcccaggaggcctgcgggagctgcagcttcgaagcctcacagagatctgaaaggagggtcttgatccagc
ggaacccccagctctgctaccaggacacgattttgtggaagaataccaggagtttgctggctgcaagaagatcttgggagcctggcatl
tctgccggagagcttgatggggaccagcctccaacactgccccgtccagccagagcagctccaagtgttgagactctggaagaga
tcacaggttacctatacatctcagcatggccggacagcctgacctcagcgtcttccagaacctgcaagtaatccggggacgaattct
gcacaatggcgctactcgtgacctgcaagggtgggcatcagctggctggggctgcgctcactgagggaactgggcagtggact
ggccctcatccaccataacacccacctctgcttctgtcacacgggtgccctgggaccagctcttctggaacccgaccaagctctgctcca
cactccaaccggccagaggacgagtggtgtggcgagggcctggcctgccaccagctgtgcgccgaggggcagcagaagatccgg
aagtacacgatgcggagactgctgcaggaaacggagctgggtggagccgctgacacctagcggagcgatgccaaccaggcgcagat
gcggatcctgaaagagacggagctgaggaagggtgaagggtgcttgatctggcgcttttggcacagtctacaagggaatctggaicctg
atggggagaatgtgaaaattccagtggccatcaaagtgttgagggaacacatccccaaagccaacaaagaaatcttagacgaagc
atacgtgatggctggtgtgggtccccatagtctccgccttctgggcatctgctgacatccacggtgcagctggtgacacagcttatg
ccctatggctgcctcttagactaa (SEQ ID NO: 1)。
```

在另一個實施例中，Her-2嵌合蛋白質具有以下序列：

```

ETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTLYLPTNASLS
FLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGT
QLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLR
ELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKNI
QEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPE
QLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFNLQ
VIRGRILHNGAYSLLTLQGLGISWLGLRSLRELGS
GLALIHNNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHT
ANRPEDECVGEGLACHQLCARGQQKIRKYTMR
RLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELR
KVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKV
LRENTSPKANKEILD EAYVMAGVGSPYVSRLGIC
LTSTVQLVTQLMPYGCLLD (SEQ ID NO: 2)。

```

在一個實施例中，本文提供之方法及組合物之Her2嵌合蛋白質或其片段不包括其信號序列。在另一個實施例中，由於信號序列之高疏水性，省略信號序列使得Her2片段能在李斯特菌中順利表現。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，本發明方法及組合物之Her2嵌合蛋白質之片段不包括其跨膜結構域(TM)。在一個實施例中，由於TM之高疏水性，省略TM使得Her-2片段能在李斯特菌中順利表現。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，大鼠Her2/neu基因之核酸序列係

CCGGAATCGCGGGCACCCAAGTGTGTACCGGCACAGACATGAAGTTGCGGCTCC
CTGCCAGTCCTGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTGTACCAGGGCTGTCA
GGTAGTGCAGGGCAACTTGGAGCTTACCTACGTGCCTGCCAATGCCAGCCTCTCA
TTCCTGCAGGACATCCAGGAAGTTCAGGGTTACATGCTCATCGCTCACAACCAGG
TGAAGCGCGTCCCCTGCAAAGGCTGCGCATCGTGAGAGGGACCCAGCTCTTTG
AGGACAAGTATGCCCTGGCTGTGCTAGACAACCGAGATCCTCAGGACAATGTCTG
CCGCCTCCACCCCAGGCAGAACCCACAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAA
GTCTCACAGAGATCCTGAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCTCAGCTCTG
CTACCAGGACATGGTTTTGTGGAAGGACGTCTTCCGCAAGAATAACCAACTGGCT
CCTGTGATATAGACACCAATCGTTCCCGGGCCTGTCCACCTTGTGCCCCCGCT
GCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCCGGAAGACTGTCAGATCTTGACTG
GCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCCGGTGCAAGGGCCGGCTGCCCACTGACTG
CTGCCATGAGCAGTGTGCCGCAGGCTGCACGGGGCCCCAAGCATTCTGACTGCCTG
GCCTGCCTCCACTTCAATCATAGTGGTATCTGTGAGCTGCACTGCCCAGCCCTCGT
CACCTACAACACAGACACCTTTGAGTCCATGCACAACCCTGAGGGTCGCTACACC
TTTGGTGCCAGCTGCGTGACCACCTGCCCTACAACCTACCTGTCTACGGAAGTGG
GATCCTGCACTCTGGTGTGTCCCCGAATAACCAAGAGGTACAGCTGAGGACG
GAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCTCGAGTGTGCTATGGTCT
GGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGACAATGTCCAGGA
GTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTTTTGCCGGAGAGCTTT
GATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTGT
TCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACA
GTCTCCGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTCGGGGACGGATTCT

CCACGATGGCGCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGG
CTGCGCTCACTGCGGGAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCGCAACGCCC
ATCTCTGCTTTGTACACACTGTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCA
GGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGGCCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTT
GGTCTGTAACTCACTGTGTGCCACGGGCACTGCTGGGGGCCAGGGCCCCACCCAG
TGTGTCAACTGCAGTCATTTCTTCGGGGCCAGGAGTGTGTGGAGGAGTGCCGAG
TATGGAAGGGGCTCCCCCGGGAGTATGTGAGTGACAAGCGCTGTCTGCCGTGTCA
CCCCGAGTGTACGCCTCAAAACAGCTCAGAGACCTGCTTTGGATCGGAGGCTGAT
CAGTGTGCAGCCTGCGCCCACTACAAGGACTCGTCCTCCTGTGTGGCTCGCTGCC
CCAGTGGTGTGAAACCGGACCTCTCCTACATGCCCATCTGGAAGTACCCGGATGA
GGAGGGCATATGCCAGCCGTGCCCCATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGATCTG
GATGAACGAGGCTGCCCAGCAGAGCAGAGAGCCAGCCCGGTGACATTCATCATT
GCAACTGTAGTGGGCGTCTGCTGTTCTGATCTTAGTGGTGGTCGTTGGAATCCT
AATCAAACGAAGGAGACAGAAGATCCGGAAGTATACGATGCGTAGGCTGCTGCA
GGAAACTGAGTTAGTGGAGCCGCTGACGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGC
TCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGCTAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATC
AGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCAGATGGGGAGAATGT
GAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACATCTCCTAAAGCCAA
CAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTCCGTATGTG
TCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGCTTA
TGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCCGCTAGGCTC
CCAGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAG
GACGTGCGGCTTGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGT
CCCAACCACGTCAAGATTACAGATTTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATG
AGACAGAGTACCATGCAGATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGG
AATCTATTCTCAGACGCCGGTTCACCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGT
GACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGGCCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCC
CGGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAACGCCTACCTCAGCCTCCAATCT
GCACCATGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTTGGATGATTGACTCTGAATG
TCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTGAGAATTTTACGTATGGCGAGGGACCCC
CAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTTGGGCCCATCCAGCCCCATGGACA
GTACCTTCTACCGTTCACTGCTGGAAGATGATGACATGGGTGACCTGGTAGACGC
TGAAGAGTATCTGGTGCCCCAGCAGGGATTCTTCTCCCCGGACCCTACCCAGGC
ACTGGGAGCACAGCCCATAGAAGGCACCGCAGCTCGTCCACCAGGAGTGGAGGT
GGTGAGCTGACACTGGGCCTGGAGCCCTCGGAAGAAGGGCCCCCCCAGATCTCCA



CTGGCTCCCTCGGAAGGGGCTGGCTCCGATGTGTTTGATGGTGACCTGGCAATGG
GGGTAACCAAAGGGCTGCAGAGCCTCTCTCCACATGACCTCAGCCCTCTACAGCG
GTACAGCGAGGACCCACATTACCTCTGCCCCCGAGACTGATGGCTATGTTGCT
CCCCTGGCCTGCAGCCCCCAGCCCGAGTATGTGAACCAATCAGAGGTTTCAGCCTC
AGCCTCCTTTAACCCAGAGGGTCTCTGCCTCCTGTCCGGCCTGCTGGTGCTACT
CTAGAAAGACCCAAGACTCTCTCTCCTGGGAAGAATGGGGTTGTCAAAGACGTTT
TTGCCTTCGGGGGTGCTGTGGAGAACCCTGAATACTTAGTACCGAGAGAAGGCA
CTGCCTCTCCGCCCCACCCTTCTCCTGCCTTCAGCCCAGCCTTTGACAACCTCTAT
TACTGGGACCAGAACTCATCGGAGCAGGGGCCTCCACCAAGTAACCTTTGAAGGG
ACCCCACTGCAGAGAACCCTGAGTACCTAGGCCTGGATGTACCTGTA (SEQ ID
NO: 45)。

在一個實施例中，編碼大鼠/her2/neu EC1片段之核酸序列係
CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGA
GATCCTGAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCTCAGCTCTGCTACCAGGAC
ATGGTTTTGTGGAAGGACGTCTTCCGCAAGAATAACCAACTGGCTCCTGTGCGATA
TAGACACCAATCGTTCCCGGGCCTGTCCACCTTGTGCCCCCGCCTGCAAAGACAA
TCACTGTTGGGGTGAGAGTCCGGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGT
ACCAGTGGTTGTGCCCCGGTGCAAGGGCCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGC
AGTGTGCCGCAGGCTGCACGGGCCCCAAGCA (SEQ ID NO: 46)。

在另一個實施例中，編碼大鼠her2/neu EC2片段之核酸序列係：
GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGC
TCGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCAC
CAGTGACAATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGC
ATTTTTGCCGGAGAGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGG
CCTGAGCAGCTCCAAGTGTTGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACA
TCTCAGCATGGCCAGACAGTCTCCGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAAT
CATTGCGGGACGGATTCTCCACGATGGCGCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTG
GGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGGGAGCTGGGCAGTGGATTGGCTC
TGATTCACCGCAACGCCCATCTCTGCTTTGTACACACTGTACCTTGGGACCAGCTC
TTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGGCCGGAAGAGGAT
TGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAACCTACTGTGTGCCACGGGCACTGCTGGG
GGCCAGGGCCCCACCCA (SEQ ID NO: 47)。

在另一個實施例中，編碼大鼠her2/neu IC1片段之核酸序列係：

CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAG
ACGGAGCTAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTAC
AAGGGCATCTGGATCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAG
GTGTTGAGAGAAAAACACATCTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCG
TATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTCCGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCT
GACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGCTTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGAC
CATGTCCGAGAACACCGAGGTCCGCTAGGCTCCCAGGACCTGCTCAACTGGTGTG
TTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGCGGCTTGTACACAGGG
ACCTGGCTGCCCCGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCAAGATTACAG
ATTTCCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAGATGG
GGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTC
ACCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGAATGTGTGGGAGCTGATGACTT
TTGGGGCCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTTGCTGGA
GAAGGGAGAACGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATT
ATGGTCAAATGTTGGATGATTGACTCTGAATGTGCGCCCGAGATTCCGGGAGTTGG
TGTCAGAAATTTTCACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAA
CGAGGACTTGGGCCCATCCAGCCCCATGGACAGTACCTTCTACCGTTCACTGCTG
GAA (SEQ ID NO: 48)。

在一個實施例中，人類Her2/neu基因之核酸序列係：

ATGGAGCTGGCGGCCTTGTGCCGCTGGGGGCTCCTCCTCGCCCTCTTGCCCCCG
GAGCCGCGAGCACCCAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTG
CCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGT
GGTGCAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCCACCAATGCCAGCCTGTCCTTC
CTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTG
AGGCAGGTCCCCTGTCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAG
GACAACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACC
CCTGTACAGGGGCCTCCCCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTC
ACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAGCTCTGCTAC
CAGGACACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCA
CACTGATAGACACCAACCGCTCTCGGGCCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAA
GGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCAGAGCCTGACGCGCAC

TGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCCGCTGCAAGGGGCCACTGCCCCACTGACTGCTGC
CATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGGCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCT
GCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCCAGCCCTGGTCAC
CTACAACACAGACACGTTTGTAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATACATTC
GGCGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACTACCTTTCTACGGACGTGGGAT
CCTGCACCCTCGTCTGCCCCCTGCACAACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAA
CACAGCGGTGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCCCGAGTGTGCTATGGTCTGG
GCATGGAGCACTTGCGAGAGGTGAGGGCAGTTACCAAGTGCCAATATCCAGGAGT
TTGCTGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTCTGCCGGAGAGCTTTGA
TGGGGACCCAGCCTCCAACACTGCCCCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTTT
GAGACTCTGGAAGAGATCACAGGTTACCTATACATCTCAGCATGGCCGGACAGC
CTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCTGCAAGTAATCCGGGGACGAATTCTGC
ACAATGGCGCCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGCTGGGCATCAGCTGGCTGGGGCT
GCGCTCACTGAGGGAACTGGGCAGTGGACTGGCCCTCATCCACCATAACACCCA
CCTCTGCTTCGTGCACACGGTGCCCTGGGACCAGCTCTTTCGGAACCCGCACCAA
GCTCTGCTCCACACTGCCAACC GGCCAGAGGACGAGTGTGTGGGGCAGGGCCTG
GCCTGCCACCAGCTGTGCGCCCGAGGGCACTGCTGGGGTCCAGGGCCCACCCAG
TGTGTCAACTGCAGCCAGTTCCTTCGGGGCCAGGAGTGCGTGGAGGAATGCCGA
GTA CTGCAGGGGGCTCCCCAGGGAGTATGTGAATGCCAGGCACTGTTTGCCGTGCC
ACCCTGAGTGTACGCCCCAGAATGGCTCAGTGACCTGTTTTGGACCGGAGGCTGA
CCAGTGTGTGGCCTGTGCCCCACTATAAGGACCCTCCCTTCTGCGTGGCCCCGCTGC
CCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACATGCCCATCTGGAAGTTTCCAGATG
AGGAGGGCGCATGCCAGCCTTGCCCCATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGACCT
GGATGACAAGGGCTGCCCCGCGGAGCAGAGAGCCAGCCCTCTGACGTCCATCGT
CTCTGCGGTGGTTGGCATTCTGCTGGTCTGTGGTCTTGGGGGTGGTCTTTGGGATCC
TCATCAAGCGACGGCAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTGC
AGGAAACGGAGCTGGTGGAGCCGCTGACACCTAGCGGAGCGATGCCCAACCAGG
CGCAGATGCGGATCCTGAAAGAGACGGAGCTGAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGAT
CTGGCGCTTTTGGCACAGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGT
GAAAATTCCAGTGGCCATCAAAGTGTTGAGGGGAAAACACATCCCCCAAAGCCAA
CAAAGAAATCTTAGACGAAGCATACGTGATGGCTGGTGTGGGCTCCCCATATGTC
TCCCGCCTTCTGGGCATCTGCCTGACATCCACGGTGCAGCTGGTGACACAGCTTA
TGCCCTATGGCTGCCTCTTAGACCATGTCCGGGAAAACCGCGGACGCCTGGGCTC
CCAGGACCTGCTGAACTGGTGTATGCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGA
GGATGTGCGGCTCGTACACAGGGACTTGGCCGCTCGGAACGTGCTGGTCAAGAG

TCCCAACCATGTCAAAATTACAGACTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGAC
 GAGACAGAGTACCATGCAGATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAGTGGATGGCGCTG
 GAGTCCATTCTCCGCCGGCGGTTACCCACCAGAGTGATGTGTGGAGTTATGGTG
 TGA CTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGGCCAAACCTTACGATGGGATCCCAGC
 CCGGGAGATCCCTGACCTGCTGGAAAAGGGGGAGCGGCTGCCCCAGCCCCCAT
 CTGCACCATTTGATGTCTACATGATCATGGTCAAATGTTGGATGATTGACTCTGAA
 TGTCGGCCAAGATTCCGGGAGTTGGTGTCTGAATTCTCCCGCATGGCCAGGGACC
 CCCAGCGCTTTGTGGTCATCCAGAATGAGGACTTGGGCCCAGCCAGTCCCTTGGA
 CAGCACCTTCTACCGCTCACTGCTGGAGGACGATGACATGGGGGACCTGGTGGAT
 GCTGAGGAGTATCTGGTACCCCAGCAGGGCTTCTTCTGTCCAGACCCTGCCCCGG
 GCGCTGGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCG
 GTGGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCCCAGGTCTC
 CACTGGCACCTCCGAAGGGGCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAAT
 GGGGGCAGCCAAGGGGCTGCAAAGCCTCCCCACACATGACCCCAGCCCTCTACA
 GCGGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGATGGCTACGTT
 GCCCCCTGACCTGCAGCCCCCAGCCTGAATATGTGAACCAGCCAGATGTTTCGGC
 CCCAGCCCCCTTCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGCTGCCCCGACCTGCTGGTGC
 CACTCTGGAAAGGGCCAAGACTCTCTCCCAGGGAAGAATGGGGTCGTCAAAGA
 CGTTTTTGCTTTGGGGGTGCCGTGGAGAACCCCGAGTACTTGACACCCCAGGGA
 GGAGCTGCCCTCAGCCCCACCTCCTCCTGCCTTCAGCCCAGCCTTCGACAACC
 TCTATTACTGGGACCAGGACCCACCAGAGCGGGGGGCTCCACCCAGCACCTTCA
 AAGGGACACCTACGGCAGAGAACCCAGAGTACCTGGGTCTGGACGTGCCAGTGT
 GAACCAGAAGGCCAAGTCCGCAGAAGCCCTGA (SEQ ID NO: 49)。

在另一個實施例中，植入嵌合體中之編碼人類her2/neu EC1片段之核酸序列跨越人類EC1區之120-510 bp且顯示於(SEQ ID NO: 50)中。

GAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAG
 GGAAACCTGGAACTCACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCTGTCCTTCCTGCAGG
 ATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGG
 TCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAATA
 TGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTCACA
 GGGGCCTCCCCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATC
 TTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAGCTCTGCTACCAGGACACG
 ATTTTGTGGAAG (SEQ ID NO: 50)。

在一個實施例中，完整EC1人類her2/neu片段跨越人類her2/neu基因之58-979 bp且顯示於(SEQ ID NO: 54)中。

GCCGCGAGCACCCAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCC
 AGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGG
 TGCAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCCACCAATGCCAGCCTGTCTTCCT
 GCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAG
 GCAGGTCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGAC
 AACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTG
 TCACAGGGGCCTCCCCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAG
 AGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAGCTCTGCTACCAGGA
 CACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCACACTG
 ATAGACACCAACCGCTCTCGGGCCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCT
 CCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTCTG
 TGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCACTGCCCACTGACTGCTGCCATGAG
 CAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTCC
 ACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCCAGCCCTGGTCACCTACAA
 CACAGACACGTTTGAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATACATTCCGGCGCC
 AGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACTACCTTTCTACGGACGTGGGATCCTGCAC
 CCTCGTCTGCCCCCTGCACAACCAAGAGGTGACAGCAGAGGAT (SEQ ID NO: 54)。

在另一個實施例中，植入嵌合體中之編碼人類her2/neu EC2片段之核酸序列跨越人類her2/neu EC2片段之1077-1554 bp且包括50 bp延伸，且顯示於(SEQ ID NO: 51)中。

AATATCCAGGAGTTTGCTGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTCTGCC
 GGAGAGCTTTGATGGGGACCCAGCCTCCAACACTGCCCCGCTCCAGCCAGAGCAG
 CTCCAAGTGTTTGAGACTCTGGAAGAGATCACAGGTTACCTATACATCTCAGCATG
 GCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCTGCAAGTAATCCGGGGA
 CGAATTCTGCACAATGGCGCCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGCTGGGCATCAGCTG
 GCTGGGGCTGCGCTCACTGAGGGAAGTGGGCAGTGGACTGGCCCTCATCCACCAT
 AACACCCACCTCTGCTTCGTGCACACGGTGCCCTGGGACCAGCTCTTTCGGAACCC
 GCACCAAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCAGAGGACGAGTGTGTGGGCGAG
 GGCCTGGCCTGCCACCAGCTGTGCGCCCGAGGG (SEQ ID NO:51)。

在一個實施例中，完整EC2人類her2/neu片段跨越人類her2/neu基因之907-1504 bp且顯示於(SEQ ID NO: 55)中。

TACCTTTCTACGGACGTGGGATCCTGCACCCTCGTCTGCCCCCTGCACAACCAAG
 AGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGGTGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTG
 CCCGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACTTGCGAGAGGTGAGGGCAGTTAC
 CAGTGCCAATATCCAGGAGTTTGCTGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCA
 TTTCTGCCGGAGAGCTTTGATGGGGACCCAGCCTCCAACACTGCCCCGCTCCAGC
 CAGAGCAGCTCCAAGTGTTTGAGACTCTGGAAGAGATCACAGGTTACCTATACAT
 CTCAGCATGGCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCTGCAAGTA
 ATCCGGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGCTGG
 GCATCAGCTGGCTGGGGCTGCGCTCACTGAGGGAACTGGGCAGTGGACTGGCCCT
 CATCCACCATAACACCCACCTCTGCTTCGTGCACACGGTGCCCTGGGACCAGCTC
 TTTCCGAACCCGCACCAAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCAGAG (SEQ ID
 NO: 55)。

在另一個實施例中，植入嵌合體中之編碼人類her2/neu IC1片段之核酸序列顯示於(SEQ ID NO: 52)中。

CAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTGCAGGAAACGGAGCTG
 GTGGAGCCGCTGACACCTAGCGGAGCGATGCCCAACCAGGCGCAGATGCGGATC
 CTGAAAGAGACGGAGCTGAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCTGGCGCTTTTGGC
 ACAGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGTGAAAATTCCAGTG
 GCCATCAAAGTGTTGAGGGAAAACACATCCCCCAAAGCCAACAAAGAAATCTTA
 GACGAAGCATACGTGATGGCTGGTGTGGGCTCCCATATGTCTCCCGCCTTCTGG
 GCATCTGCCTGACATCCACGGTGACAGCTTATGCCCTATGGCTG
 CCTCTTAGACT (SEQ ID NO:52)。

在另一個實施例中，編碼完整人類her2/neu IC1片段之核酸序列跨越人類her2/neu基因之2034-3243 bp且顯示於(SEQ ID NO: 56)中。

CAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTGCAGGAAACGGAGCTG
 GTGGAGCCGCTGACACCTAGCGGAGCGATGCCCAACCAGGCGCAGATGCGGATC
 CTGAAAGAGACGGAGCTGAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCTGGCGCTTTTGGC
 ACAGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGTGAAAATTCCAGTG
 GCCATCAAAGTGTTGAGGGAAAACACATCCCCCAAAGCCAACAAAGAAATCTTA

GACGAAGCATACGTGATGGCTGGTGTGGGCTCCCCATATGTCTCCCGCCTTCTGG
GCATCTGCCTGACATCCACGGTGCAGCTGGTGACACAGCTTATGCCCTATGGCTG
CCTCTTAGACCATGTCCGGGAAAACCGCGGACGCCTGGGCTCCCAGGACCTGCTG
AACTGGTGTATGCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGATGTGCGGCTC
GTACACAGGGACTTGGCCGCTCGGAACGTGCTGGTCAAGAGTCCCAACCATGTCA
AAATTACAGACTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGACGAGACAGAGTACCA
TGCAGATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAGTGGATGGCGCTGGAGTCCATTCTCCGC
CGGCGGTTACCCACCAGAGTGATGTGTGGAGTTATGGTGTGACTGTGTGGGAGC
TGATGACTTTTGGGGCCAAACCTTACGATGGGATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGA
CCTGCTGGAAAAGGGGGAGCGGCTGCCCCAGCCCCCATCTGCACCATTGATGTC
TACATGATCATGGTCAAATGTTGGATGATTGACTCTGAATGTCGGCCAAGATTCC
GGGAGTTGGTGTCTGAATTCTCCCGCATGGCCAGGGACCCCCAGCGCTTTGTGGT
CATCCAGAATGAGGACTTGGGCCCAGCCAGTCCCTTGGACAGCACCTTCTACCGC
TCACTGCTGGAGGACGATGACATGGGGGACCTGGTGGATGCTGAGGAGTATCTG
GTACCCCAGCAGGGCTTCTTCTGTCCAGACCCTGCCCCGGGCGCTGGGGGCATGG
TCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGTGGGGACCTGACACT
AGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGA
AGGGGCT (SEQ ID NO: 56)。

在一個實施例中，用於本發明方法及組合物中之LLO係李斯特菌LLO。在一個實施例中，產生LLO之李斯特菌係單核球增多性李斯特菌(LM)。在另一個實施例中，李斯特菌係伊氏李斯特菌(*Listeria ivanovii*)。在另一個實施例中，李斯特菌係威爾斯李斯特菌(*Listeria welshimeri*)。在另一個實施例中，李斯特菌係斯氏李斯特菌(*Listeria seeligeri*)。在另一個實施例中，LLO蛋白質係非李斯特菌LLO蛋白質。在另一個實施例中，LLO蛋白質係合成LLO蛋白質。在另一個實施例中，其係重組LLO蛋白質。

在一個實施例中，LLO蛋白質係由(SEQ ID NO: 3)中顯示之以下核酸序列編碼

atgaaaaaataatgctagttttattacattatattagtttagtctaccaattgcgcaacaaactgaagcaaaggatgcattctgcattcaataa
agaaaattcaatttcatccatggcaccaccagcatctccgcctgcaagtcctaagacgccaatcgaaaagaaacacgcggatgaaatcg
ataagtatatataaggatggattacaataaaaaacaatgtattagtagtaccacggagatgcagtgcacaaatgtgccccaagaaaaggta
caaagatggaaatgaatatattgttgggagaaaaagaagaatccatcaatcaaaataatgcagacattcaagttgtgaatgaatttga
gcctaacctatccaggtgctctcgtaaaagcgaattcggaaattagtagaaaatcaaccagatgttctccctgtaaaacgtgattcattaacac
tcagcattgattgccaggtatgactaatcaagacaataaaatagttgtaaaaatgccactaaatcaaacgttaacaacgcagtaaatatcat

tagtggaaagatggaatgaaaaatatgctcaagcttatccaaatgtaagtgcataaattgattatgatgacgaaatggcttacagtgaatca
 caattaattgcgaaattggtacagcattaaagctgtaataatagcttgaatgtaaacttcggcgcaatcagtgaaaggaaaaatgaaga
 agaagtcattagtgttaacaaattactataacgtgaatgttaatgaacctacaagacctccagatttttcggcaaaagcgttactaaagagc
 agttgcaagcgcttggagtgaatgcagaaaatcctcctgcataatcctcaagtggtggcgtalggccgtcaagttatttgaaattatcaacta
 attcccatagctactaaagtaaaagctgcttttgatgctgccgtaagcggaaaatcgtctcaggtgatgtagaactaacaatatcatcaaaa
 atttctcttcaaagccgtaatttacggaggttccgcaaaaagatgaagttcaaatcatcgacggcaacctcggagacttacgcgatatttga
 aaaaaggcgctacttttaacgagaaacaccaggaggttccattgcttatacaacaacttctctaaaagacaatgaattgctgttattaaa
 acaactcagaatatattgaaacaacttcaaaagcttatacatgatggaataaatacatcgatcactctggaggatacgttgcataattcaaca
 tttcttgggatgaagtaattatgat (SEQ ID NO: 3)。

在另一個實施例中，LLO蛋白質具有序列SEQ ID NO: 4

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 E I D K Y I Q G
 L D Y N K N N V L V Y H G D A V T N V P P R K G Y K D G N E Y I
 V V E K K K K S I N Q N N A D I Q V V N A I S S L T Y P G A L V K
 A N S E L V E N Q P D V L P V K R D S L T L S I D L P G M T N Q D
 N K I V V K N A T K S N V N N A V N T L V E R W N E K Y A Q A Y
 P N V S A K I D Y D D E M A Y S E S Q L I A K F G T A F K A V N N
 S L N V N F G A I S E G K M Q E E V I S F K Q I Y Y N V N V N E P
 T R P S R F F G K A V T K E Q L Q A L G V N A E N P P A Y I S S V
 A Y G R Q V Y L K L S T N S H S T K V K A A F D A A V S G K S V
 S G D V E L T N I I K N S S F K A V I Y G G S A K D E V Q I I D G
 N L G D L R D I L K K G A T F N R E T P G V P I A Y T T N F L K D
 N E L A V I K N N S E Y I E T T S K A Y T D G K I N I D H S G G Y
 V A Q F N I S W D E V N Y D (SEQ ID NO: 4)

對應於此序列之前蛋白之前25個胺基酸係信號序列且係在細菌分泌LLO時自其裂解。因此，在此實施例中，全長活性LLO蛋白質長504個殘基。在另一個實施例中，LLO蛋白質具有以下基因庫(GenBank)登錄號中顯示之序列：DQ054588、DQ054589、AY878649、U25452或U25452。在另一個實施例中，LLO蛋白質係LLO蛋白質之變體。在另一個實施例中，LLO蛋白質係LLO蛋白質之同系物。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，「截短LLO」或「tLLO」係指LLO中包含PEST樣結構域之片段。在另一個實施例中，該等術語係指在胺基末端不含活化結構域且不包括胱胺酸484之LLO片段。在另一個實施例中，LLO片段係由PEST序列組成。在另一個實施例中，LLO片段包含PEST序列。在另一個實施例中，LLO片段係由全長LLO蛋白質之529

個胺基酸中之約前400至441個胺基酸組成。在另一個實施例中，LLO片段係LLO蛋白質之非溶血形式。

在本發明方法及組合物之另一個實施例中，本發明方法及組合物之核酸序列編碼之多肽係包含嵌合Her-2/neu抗原及另一多肽之融合蛋白質，其中，在另一個實施例中，融合蛋白質尤其包含LM非溶血LLO蛋白質(本文中之實例)。

在一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-25組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-50組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-75組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-100組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-125組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-150組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-175組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-200組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-225組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-250組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-275組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-300組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-325組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-350組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-375組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-400組成。在另一個實施例中，LLO片段係由約殘基1-425組成。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，本發明方法及組合物之融合蛋白質包含來自LLO蛋白質或來自另一生物體(例如原核生物體)之PEST序列。

在另一個實施例中，PEST樣AA序列具有選自SEQ ID NO: 5-9之序列。在另一個實施例中，PEST樣序列係來自LM ActA蛋白質之PEST樣序列。在另一個實施例中，PEST樣序列係

KTEEQPSEVNTGPR (SEQ ID NO: 5) 、
 KASVTDTSEGLDSSMQSADESTPQPLK (SEQ ID NO: 6) 、
 KNEEVNASDFPPPPTDEELR (SEQ ID NO: 7) 或
 RGGIPTSEEFSSLNSGDFDENSETTEEEIDR (SEQ ID NO: 8) 。在另一
 一個實施例中，PEST樣序列來自鏈球菌(*Streptococcus sp*)之鏈球菌溶
 血素O蛋白質。在另一個實施例中，PEST樣序列來自釀膿鏈球菌
 (*Streptococcus pyogenes*) 鏈球菌溶血素O，例如在AA 35-51之
 KQNTASTETTTTNEQPK (SEQ ID NO: 9) 。在另一個實施例中，PEST
 樣序列來自類馬鏈球菌(*Streptococcus equisimilis*)鏈球菌溶血素O，例
 如在AA 38-54之KQNTANTETTTTNEQPK (SEQ ID NO: 10) 。在另一
 一個實施例中，PEST樣序列係源自原核生物體之另一PEST樣AA序列。
 在另一個實施例中，PEST樣序列係業內已知之任一其他PEST樣序
 列。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，抗原與LM之PEST樣序列之融合物增強抗原之
 細胞介導之抗腫瘤免疫力。因此，抗原與源自其他原核生物體之其他
 PEST樣序列之融合物亦可增強抗原之免疫原性。其他原核生物體之
 PEST樣序列可根據(例如) Rechsteiner及Rogers所述用於LM之方法
 (1996, Trends Biochem. Sci. 21:267-271)來鑑別。或者，來自其他原核
 生物體之PEST樣AA序列亦可基於此方法來鑑別。預期其中PEST樣
 AA序列之其他原核生物體可包括(但不限於)其他李斯特菌。在另一個
 實施例中，PEST樣序列包埋於抗原性蛋白質內。因此，在另一個實
 施例中，「融合物」係指包含抗原及連接抗原之一端或包埋於抗原內
 之PEST樣胺基酸序列二者之抗原性蛋白質。

在另一個實施例中，本文提供包含本發明重組多肽之疫苗。在
 另一個實施例中，本文提供由本發明重組多肽組成之疫苗。

在另一個實施例中，本文提供編碼本發明重組多肽之核苷酸分

子。在另一個實施例中，本文提供包含核苷酸分子之疫苗。

在另一個實施例中，本文提供編碼本發明重組多肽之核苷酸分子。

在另一個實施例中，本文提供本發明核苷酸分子編碼之重組多肽。

在另一個實施例中，本文提供包含本發明核苷酸分子或重組多肽之疫苗。

在另一個實施例中，本文提供包含本發明核苷酸分子或重組多肽之免疫原性組合物。

在另一個實施例中，本文提供包含本發明核苷酸分子或重組多肽之載體。

在另一個實施例中，本文提供包含本發明核苷酸分子之李斯特菌之重組形式。

在另一個實施例中，本文提供包含本發明之李斯特菌之重組形式之疫苗。

在另一個實施例中，本文提供本發明之李斯特菌之重組形式之培養物。

在一個實施例中，用於本發明方法中之疫苗包含呈本文所述任一形式或實施例之重組單核球增多性李斯特菌。在一個實施例中，用於本發明中之疫苗係由呈本文所述任一形式或實施例之本發明之重組單核球增多性李斯特菌組成。在另一個實施例中，用於本發明方法中之疫苗基本上係由呈本文所述任一形式或實施例之本發明之重組單核球增多性李斯特菌組成。在一個實施例中，術語「包含」係指在疫苗中包括重組單核球增多性李斯特菌，以及包括業內可知之其他疫苗或治療。在另一個實施例中，術語「基本上由.....組成」係指疫苗，其功能性組份係重組單核球增多性李斯特菌，然而，該疫苗可包括未直

接參與該疫苗之治療效應之其他組份，且該等其他組份可係指(例如)有助於重組單核球增多性李斯特菌之效應(例如穩定、保藏等)之組份。在另一個實施例中，術語「由.....組成」係指含有重組單核球增多性李斯特菌之疫苗。

在另一個實施例中，本發明方法包含投與呈本文所述任一形式或實施例之重組單核球增多性李斯特菌之步驟。在一個實施例中，本發明方法係由投與呈本文所述任一形式或實施例之本發明之重組單核球增多性李斯特菌之步驟組成。在另一個實施例中，本發明方法基本上係由投與呈本文所述任一形式或實施例之本發明之重組單核球增多性李斯特菌之步驟組成。在一個實施例中，術語「包含」係指在該方法中包括投與重組單核球增多性李斯特菌之步驟，以及包括業內可知之其他方法或治療。在另一個實施例中，術語「基本上由.....組成」係指一種方法，其功能性組份係投與重組單核球增多性李斯特菌，然而，該等方法可包括不直接參與該等方法之治療效應之其他步驟，且該等其他步驟可係指(例如)有助於投與重組單核球增多性李斯特菌之效應之步驟。在一個實施例中，術語「由.....組成」係指投與重組單核球增多性李斯特菌且無其他步驟之方法。

在另一個實施例中，本發明方法及組合物之李斯特菌係單核球增多性李斯特菌。在另一個實施例中，李斯特菌係伊氏李斯特菌。在另一個實施例中，李斯特菌係威爾斯李斯特菌。在另一個實施例中，李斯特菌係斯氏李斯特菌。每一類型之李斯特菌皆代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，本發明方法及組合物之李斯特菌菌株係 ADXS31-164 菌株。在另一個實施例中，ADXS31-164 刺激來自野生型 FVB/N 小鼠之脾細胞分泌 IFN- γ 。此外，本文呈現之數據顯示，ADXS31-164 能引發針對位於靶抗原中不同結構域之人類表位之抗

Her2/neu特異性免疫反應。

在另一個實施例中，本發明提供包含編碼Her-2嵌合蛋白質或其片段之核苷酸分子之李斯特菌之重組形式。

在一個實施例中，本發明提供誘導個體之抗Her-2免疫反應之方法，其包含向該個體投與包含融合至Her-2嵌合蛋白質或融合至其片段之LLO蛋白質之N-末端片段之重組多肽，由此誘導個體之抗Her-2免疫反應。

在一個實施例中，本發明方法及組合物之融合蛋白質包含來自LLO之LLO信號序列。在另一個實施例中，該蛋白質之兩個分子(LLO片段及抗原)直接接合。在另一個實施例中，兩個分子藉由由一或多個胺基酸組成之短間隔肽接合。在一個實施例中，除了接合蛋白質或在該等蛋白質之間保持一定最小距離或其他空間關係以外，間隔體不具有特殊生物活性。在另一個實施例中，間隔體之組成胺基酸經篩選以影響分子之某一性質，例如摺疊、淨電荷或疏水性。在另一個實施例中，蛋白質之兩個分子(LLO片段及抗原)係單獨合成或未融合。在另一個實施例中，蛋白質之兩個分子係自相同核酸單獨合成。在另一個實施例中，兩個分子係自單獨核酸個別合成。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，本文提供誘導個體之抗Her-2免疫反應之方法，其包含向該個體投與重組核苷酸，其編碼包含融合至Her-2嵌合蛋白質或融合至其片段之LLO蛋白質之N-末端片段之重組多肽，由此誘導個體之抗Her-2免疫反應。

在一個實施例中，本文提供引發針對個體之表現Her2/neu之腫瘤之增強之免疫反應之方法，其中，在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文提供之重組李斯特菌疫苗菌株之組合物。在另一個實施例中，針對表現Her-2之腫瘤之免疫反應包含針對Her-2蛋白質

之亞優勢表位之免疫反應。在另一個實施例中，針對表現Her-2之腫瘤之免疫反應包含針對Her-2蛋白質之若干個亞優勢表位之免疫反應。在另一個實施例中，針對表現Her-2之腫瘤之免疫反應包含針對Her-2蛋白質之至少1-5個亞優勢表位之免疫反應。在另一個實施例中，針對表現Her-2之腫瘤之免疫反應包含針對Her-2蛋白質之至少1-10個亞優勢表位之免疫反應。在另一個實施例中，針對表現Her-2之腫瘤之免疫反應包含針對Her-2蛋白質之至少1-17個亞優勢表位之免疫反應。在另一個實施例中，針對表現Her-2之腫瘤之免疫反應包含針對Her-2蛋白質之至少17個亞優勢表位之免疫反應。

已報導，在抗性腫瘤已藉由基於小片段李斯特菌之疫苗或曲妥珠單抗(trastuzumab，針對位於Her2/neu抗原之細胞外結構域之表位之單株抗體)靶向時，致癌蛋白質Her2/neu中之點突變或胺基酸缺失可介導該等腫瘤細胞之治療。本文闡述基於嵌合Her2/neu之組合物，其帶有Her2/neu抗原中顯示致癌基因之MHC-I類表位簇之兩個細胞外片段及一個細胞內片段。此帶有Her2/neu抗原之3個H2Dq及至少17個已定位人類MHC-I類表位之嵌合蛋白質融合至單核球增多性李斯特菌李斯特菌溶解素O蛋白質之前441個胺基酸且係由單核球增多性李斯特菌減毒菌株*LmddA*表現並分泌。

先前報導已顯示，在用單獨表現並分泌Her2/neu抗原之小片段(其各自僅帶有一個Her2/neu致癌基因之H2Dq表位)之基於李斯特菌之疫苗對Her2/neu轉基因小鼠進行免疫時，Her2/neu過度表現腫瘤可因每一疫苗靶向之Her2/neu抗原之該等表位中之突變而逃脫(參見Singh R、Paterson Y. Immunoeediting sculpts tumor epitopes during immunotherapy. *Cancer Res* 2007;67: 1887-92)。本文顯示以下以外結果：在將Her2/neu蛋白質之三或更多個表位納入嵌合疫苗中時，其可消除該等腫瘤藉由逃脫突變之篩選及逃脫。用新穎Her2/neu嵌合李

斯特菌疫苗免疫不引起任何可能與Her2/neu抗原中之點突變或胺基酸缺失相關之逃脫突變(參見本文中之實例4)。

在一個實施例中，本文提供改造李斯特菌疫苗菌株以表現Her-2嵌合蛋白質或表現該嵌合蛋白質之重組多肽之方法，該方法包含用核酸分子轉化李斯特菌菌株。在另一個實施例中，該核酸分子包含編碼多肽之第一開放閱讀框，其中該多肽包含Her2/neu嵌合抗原。在另一個實施例中，核酸分子進一步包含編碼代謝酶之第二開放閱讀框，且其中該代謝酶與該重組李斯特菌菌株之染色體中缺少之內源基因互補，由此改造李斯特菌疫苗菌株以表現Her-2嵌合蛋白質。

在一個實施例中，本文提供之方法及組合物進一步包含佐劑，其中，在另一個實施例中，佐劑包含顆粒球/巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)蛋白質、編碼GM-CSF蛋白質之核苷酸分子、皂素QS21、單磷醯脂A或含有未甲基化CpG之寡核苷酸。

在一個實施例中，在本發明中使用減毒李斯特菌菌株，例如LM δ -actA 突變體(Brundage等人，1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:11890-11894)、單核球增多性李斯特菌 δ -plcA (Camilli等人，1991, J. Exp. Med., 173:751-754)或 δ -ActA、 δ INL-b (Brockstedt等人，2004, PNAS, 101:13832-13837)。在另一個實施例中，減毒李斯特菌菌株係藉由引入一或多個減毒突變來構築，如熟習此項技術者在瞭解本文揭示內容時可理解。該等菌株之實例包括(但不限於)對於芳香族胺基酸為營養缺陷型之李斯特菌菌株(Alexander等人，1993, Infection and Immunity 10 61:2245-2248)及用於形成酯磷壁酸之突變體(Abachin等人，2002, Mol. Microbiol. 43:1-14)及彼等因缺少毒力基因而減毒者(參見本文中之實例)。

在另一個實施例中，本發明方法及組合物之核酸分子可操作連接至啟動子/調節序列。在另一個實施例中，本發明方法及組合物之

第一開放閱讀框可操作連接至啟動子/調節序列。在另一個實施例中，本發明方法及組合物之第二開放閱讀框可操作連接至啟動子/調節序列。在另一個實施例中，每一開放閱讀框可操作連接至啟動子/調節序列。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

熟習此項技術者在瞭解本揭示內容及本文提供之方法後可容易地理解，可在本發明方法及組合物中順利使用不同轉錄啟動子、終止子、載體或特殊基因序列(例如市售選殖載體中之彼等)。如本發明中所涵蓋，例如稱為pUC系列之市售載體中提供該等功能。在另一個實施例中，移除非必需DNA序列(例如抗生素抗性基因)。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。在另一個實施例中，本發明中使用市售質粒。該等質粒可自多個來源獲得，例如Invitrogen (La Jolla, CA)、Stratagene (La Jolla, CA)、Clontech (Palo Alto, CA)或可使用業內熟知之方法來構築。

另一實施例係例如pCR2.1 (Invitrogen, La Jolla, CA)之質粒，其係具有原核複製起點及啟動子/調節元件以有助於在原核生物體中之表現之原核表現載體。在另一個實施例中，移除外源核苷酸序列以減小質粒之大小並增加可置於其中之卡匣之大小。

該等方法為業內所熟知，且闡述於(例如)以下文獻中：Sambrook等人(1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)及 Ausubei等人(1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green & Wiley, New York)。

在分子生物學及疫苗製備中常用之習用篩選及選殖過程中使用抗生素抗性基因。本發明中涵蓋之抗生素抗性基因包括(但不限於)賦予針對以下抗生素之抗性之基因產物：胺苄青黴素(ampicillin)、青黴素(penicillin)、二甲苯青黴素(methicillin)、鏈黴素、紅黴素(erythromycin)、康黴素(kanamycin)、四環素(tetracycline)、氯黴素



(CAT)、新黴素(neomycin)、潮黴素(hygromycin)、正大黴素(gentamicin)及業內熟知之其他抗生素。每一基因代表本發明之單獨實施例。

用於轉化細菌之方法為業內所熟知，且包括基於氯化鈣勝任細胞之方法、電穿孔方法、噬菌體介導之轉導、化學及物理轉化技術(de Boer等人，1989, Cell 56:641-649；Miller等人，1995, FASEB J., 9:190-199；Sambrook等人，1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York；Ausubel等人，1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York；Gerhardt等人編輯，1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC；Miller, 1992, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。在另一個實施例中，本發明之李斯特菌疫苗菌株係藉由電穿孔轉化。每一方法代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，使用偶聯將遺傳材料及/或質粒引入細菌中。偶聯方法為業內所熟知，且闡述於(例如)以下文獻中：Nikodinovic J等人(A second generation snp-derived *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle expression vector that is generally transferable by conjugation. Plasmid. 2006年11月；56(3):223-7)及Auchtung JM等人(Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005年8月30日；102 (35):12554-9)。每一方法代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，「轉化」與術語「轉染」以同樣方式使用且係指改造細菌細胞以攝取質粒或其他異源DNA分子。在另一個實施例

中，「轉化」係指改造細菌細胞以表現質粒或其他異源DNA分子之基因。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

可用於本發明中之質粒及其他表現載體闡述於本文中之其他地方，且可包括諸如以下等特徵：啓動子/調節序列、用於革蘭氏陰性細菌及革蘭氏陽性細菌之複製起點、編碼融合蛋白質之分離核酸及編碼胺基酸代謝基因之分離核酸。此外，編碼融合蛋白質及胺基酸代謝基因之分離核酸將具有適於驅動此一分離核酸表現之啓動子。可用於在細菌系統中驅動表現之啓動子為業內所熟知，且包括噬菌體 λ 、pBR322之 β -內醯胺酶基因之bla啓動子及pBR325之氯黴素乙醯轉移酶基因之CAT啓動子。原核啓動子之其他實例包括5種噬菌體 λ 之主要右向及左向啓動子(PL及PR)、大腸桿菌(*E. coli*) α -澱粉酶之trp、recA、lacZ、lad及gal啓動子(Ulmanen等人，1985, *J. Bacteriol.* 162:176-182)及枯草桿菌之S28特異性啓動子(Gilman等人，1984 *Gene* 32:11-20)、芽孢桿菌(*Bacillus*)噬菌體之啓動子(Gryczan, 1982, *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academic Press, Inc., New York)及鏈黴菌(*Streptomyces*)啓動子(Ward等人，1986, *Mol. Gen. Genet.* 203:468-478)。本發明中涵蓋之其他原核啓動子綜述於(例如)以下文獻中：Glick (1987, *J. Ind. Microbiol.* 1:277-282)；Cenatiempo, (1986, *Biochimie*, 68:505-516)；及Gottesman, (1984, *Ann. Rev. Genet.* 18:415-442)。本發明中涵蓋之啓動子/調節元件之其他實例包括(但不限於)李斯特菌prfA啓動子、李斯特菌hly啓動子、李斯特菌p60啓動子及李斯特菌ActA啓動子(基因庫登錄號NC_003210)或其片段。

在另一個實施例中，本發明方法及組合物之質粒包含編碼融合蛋白質之基因。在另一個實施例中，選殖子序列且使用適宜限制酶裂解適宜子序列。在另一個實施例中，然後連接該等片段以產生期望DNA序列。在另一個實施例中，編碼抗原之DNA係使用DNA擴增方



法(例如聚合酶鏈式反應(PCR))來產生。首先，單獨擴增新末端任一側上之天然DNA區段。一個經擴增序列之5'端編碼肽連接體，同時另一個經擴增序列之3'端亦編碼肽連接體。由於第一片段之5'端與第二片段之3'端互補，兩個片段(在(例如) LMP瓊脂糖上部分純化後)可在第三PCR反應中用作重疊模板。經擴增序列將含有密碼子、開放位點羧基側上之區段(現形成胺基序列)、連接體及開放位點胺基側上之序列(現形成羧基序列)。將抗原連接至質粒中。每一方法代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，本發明進一步包含用於臨床應用之基於噬菌體之染色體整合系統。將使用對於必需酶(包括(但不限於) d-丙胺酸消旋酶)為營養缺陷型之宿主菌株，例如Lmdal(-)dat(-)。在另一個實施例中，為避免「噬菌體自愈步驟」，使用基於PSA之噬菌體整合系統(Lauer等人，2002 J Bacteriol, 184:4177-4186)。在另一個實施例中，此需要藉由抗生素連續篩選以維持整合基因。因此，在另一個實施例中，本發明使得能建立不需要使用抗生素篩選之基於噬菌體之染色體整合系統。而是將補充營養缺陷型宿主菌株。

在另一個實施例中，本發明重組蛋白質係使用重組DNA方法來合成。在一個實施例中，此合成涉及產生編碼融合蛋白質之DNA序列，將該DNA置於在具體啟動子/調節元件控制下之表現卡匣(例如本發明質粒)中，及表現該蛋白質。在另一個實施例中，編碼本發明融合蛋白質(例如非溶血LLO/抗原)之DNA係藉由任何適宜方法來製備，包括(例如)選殖並限制適宜序列或藉由諸如以下等方法直接化學合成：Narang等人之磷酸三酯方法(1979, Meth. Enzymol. 68: 90-99)；Brown等人之磷酸二酯方法(1979, Meth. Enzymol 68: 109-151)；Beaucage等人之二乙基亞磷醯胺方法(1981, Tetra. Lett., 22: 15 1859-1862)；及美國專利第4,458,066號之固體載體方法。

在另一個實施例中，使用化學合成來產生單股寡核苷酸。在多個實施例中，此單股寡核苷酸藉由與互補序列雜交或藉由用DNA聚合酶使用該單股作為模板進行聚合來轉化為雙股DNA。熟習此項技術者可瞭解，儘管DNA之化學合成受限於約100個鹼基之序列，但可藉由連接較短序列來獲得較長序列。在另一個實施例中，選殖子序列且使用適宜限制酶裂解適宜子序列。然後連接該等片段以產生期望DNA序列。

在另一個實施例中，使用DNA擴增方法(例如聚合酶鏈式反應(PCR))選殖編碼本發明融合蛋白質或重組蛋白質之DNA。因此，使用包含適宜限制位點之正義引物及包含另一限制位點(例如有助於選殖之不一致限制位點)之反義引物對非溶血LLO之基因進行PCR擴增。對於編碼抗原之分離核酸重複該擴增。連接非溶血LLO與抗原序列並插入質粒或載體中，產生編碼接合至抗原末端之非溶血LLO之載體。兩個分子係直接接合或藉由靠限制位點引入之短間隔體接合。

在另一個實施例中，分子藉由由一或多個胺基酸組成之肽間隔體隔開，除了接合蛋白質或在該等蛋白質之間保持一定最小距離或其他空間關係以外，該間隔體一般將不具有特殊生物活性。在另一個實施例中，間隔體之組成AA經篩選以影響分子之某一性質，例如摺疊、淨電荷或疏水性。在另一個實施例中，將編碼融合物或重組蛋白質之核酸序列轉化至多種宿主細胞中，該等宿主細胞包括大腸桿菌、其他細菌宿主(例如李斯特菌)、酵母及各種高等真核細胞(例如COS、CHO及HeLa細胞系)及骨髓瘤細胞系。對於每一宿主，重組融合蛋白質基因將可操作連接至適宜表現控制序列。啟動子/調節序列詳細闡述於本文中之其他地方。在另一個實施例中，質粒進一步包含其他啟動子調節元件，以及核糖體結合位點及轉錄終止信號。對於真核細胞，控制序列將包括源自(例如)免疫球蛋白基因、SV40、細胞巨大病

毒等之啟動子及增強子以及多聚腺苷酸化序列。在另一個實施例中，該等序列包括剪接供體及受體序列。

在一個實施例中，術語「可操作連接」係指並置，其中如此闡述之組份具有允許其以其既定方式起作用之關係。「可操作連接」至編碼序列之控制序列之連接方式應使該編碼序列之表現係在與該等控制序列相容之條件下達成。

在另一個實施例中，為篩選包含質粒之營養缺陷型細菌，使經轉化營養缺陷型細菌在將針對胺基酸代謝基因之表現進行篩選之培養基上生長。在另一個實施例中，用包含用於D-麩胺酸合成之基因之質粒轉化對於D-麩胺酸合成為營養缺陷型之細菌，且該等營養缺陷型細菌將在不存在D-麩胺酸之情況下生長，而未經該質粒轉化或不表現編碼用於D-麩胺酸合成之蛋白質之質粒之營養缺陷型細菌將不生長。在另一個實施例中，若本發明質粒包含編碼用於D-丙胺酸合成之胺基酸代謝酶之分離核酸，則對於D-丙胺酸合成為營養缺陷型之細菌在經該質粒轉化且表現該質粒時將在不存在D-丙胺酸之情況下生長。該等製備包含或缺少所需生長因子、補充物、胺基酸、維生素、抗生素及諸如此類之適宜培養基之方法為業內所熟知，且可自市場購得(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)。每一方法代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，在適宜培養基上篩選包含本發明質粒之營養缺陷型細菌後，使該等細菌在篩選壓力存在下繁殖。該繁殖包含使細菌在不含營養缺陷因子之培養基中生長。營養缺陷型細菌中表現胺基酸代謝酶之質粒之存在確保該質粒將與細菌一起複製，由此不斷篩選帶有該質粒之細菌。熟習此項技術者在瞭解本揭示內容及本文中之方法後將能容易地藉由調節其中生長包含質粒之營養缺陷型細菌之培養基之體積成比例放大李斯特菌疫苗載體之產生。

熟習此項技術者將瞭解，在另一個實施例中，其他營養缺陷型

菌株及互補系統適用於本發明中。

在一個實施例中，本文提供阻礙個體之表現Her-2之腫瘤生長之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文所述重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在另一個實施例中，本文提供阻礙個體之表現Her-2之腫瘤生長之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文所述重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在另一個實施例中，本文提供引發針對個體之表現Her2/neu之腫瘤之增強之免疫反應之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文所述重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。在另一個實施例中，針對表現Her2/neu之腫瘤之免疫反應包含針對Her2/neu蛋白質之至少一個亞優勢表位之免疫反應。

在一個實施例中，本文提供在Her2/neu過度表現腫瘤之治療中預防逃脫突變之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文提供之重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在另一個實施例中，本文提供預防個體之表現Her2/neu抗原之腫瘤發作之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文提供之重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在一個實施例中，本文提供減小腫瘤內T調節細胞之頻率之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文提供之重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在另一個實施例中，本文提供減小腫瘤內T調節細胞之頻率之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文提供之重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在一個實施例中，本文提供減小腫瘤內骨髓源壓製細胞之頻率之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本

文提供之重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在另一個實施例中，本文提供減小骨髓源壓製細胞之頻率之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文提供之重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在一個實施例中，本文提供預防在個體中形成表現Her2/neu之腫瘤之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文提供之重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在另一個實施例中，本文提供預防在個體中形成表現Her2/neu之腫瘤之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文提供之重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在一個實施例中，本文提供治療個體之表現Her2/neu之腫瘤之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本文提供之重組李斯特菌疫苗菌株之組合物之步驟。

在一個實施例中，本文提供投與本發明組合物之方法。在另一個實施例中，本文提供投與本發明疫苗之方法。在另一個實施例中，本文提供投與本發明重組多肽或重組核苷酸之方法。在另一個實施例中，投與本發明之組合物、疫苗、重組多肽或重組核苷酸之步驟係用包含該組合物、疫苗、重組核苷酸或表現該重組多肽(其各自呈其自身之離散實施例)之李斯特菌之減毒重組形式來實施。在另一個實施例中，投與係用不同減毒細菌載體來實施。在另一個實施例中，投與係用DNA疫苗(例如裸露DNA疫苗)來實施。在另一個實施例中，本發明重組多肽之投與係藉由以重組方式產生該蛋白質、然後將該重組蛋白質投與個體來實施。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，藉由本發明方法及組合物引發之免疫反應包含CD8⁺ T細胞介導之反應。在另一個實施例中，免疫反應主要由CD8⁺ T細胞介導之反應組成。在另一個實施例中，免疫反應中僅可檢

測組份係係CD8⁺ T細胞介導之反應。

在另一個實施例中，藉由本文提供之方法及組合物引發之免疫反應包含CD4⁺ T細胞介導之反應。在另一個實施例中，免疫反應主要由CD4⁺ T細胞介導之反應組成。在另一個實施例中，免疫反應中僅可檢測組份係係CD4⁺ T細胞介導之反應。在另一個實施例中，CD4⁺ T細胞介導之反應伴隨可量測之針對抗原之抗體反應。在另一個實施例中，CD4⁺ T細胞介導之反應不伴隨可量測之針對抗原之抗體反應。

在另一個實施例中，本發明提供誘導個體之CD8⁺ T細胞介導之針對抗原之亞優勢CD8⁺ T細胞表位之免疫反應之方法，其包含以下步驟：(a) 將編碼Her2-neu嵌合抗原或其片段之核苷酸分子融合至編碼LLO蛋白質之N-末端片段之核苷酸分子，由此產生編碼LLO-抗原融合蛋白質之重組核苷酸；及(b) 將重組核苷酸或LLO-抗原融合物投與個體；由此誘導CD8⁺ T細胞介導之針對抗原之亞優勢CD8⁺ T細胞表位之免疫反應。

在一個實施例中，本文提供提高腫瘤內CD8⁺/T調節細胞比率之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本發明重組多肽、重組李斯特菌或重組載體之組合物之步驟。

在另一個實施例中，本文提供提高腫瘤內CD8⁺/T調節細胞比率之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本發明重組多肽、重組李斯特菌或重組載體之組合物之步驟。

在另一個實施例中，藉由本文提供之方法及組合物引發之免疫反應包含針對抗原之至少一個亞優勢表位之免疫反應。在另一個實施例中，免疫反應包含針對至少一個優勢表位之免疫反應。在另一個實施例中，免疫反應主要由針對至少一個亞優勢表位之免疫反應組成。在另一個實施例中，僅免疫反應中之可量測組份係針對至少一個亞優勢表位之免疫反應。每一類型之免疫反應代表本發明之單獨實施例。

量測免疫反應之方法為業內所熟知，且包括(例如)量測對腫瘤生長之壓製、流式細胞術、靶細胞溶解分析(例如鉻釋放分析)、使用四聚體及其他方法。每一方法代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，本發明提供阻礙個體之表現Her-2之腫瘤生長之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含融合至Her-2嵌合蛋白質或其片段之LLO蛋白質之N-末端片段之重組多肽或編碼該重組多肽之重組核苷酸，其中該個體建立針對表現Her-2之腫瘤之免疫反應，由此阻礙個體之表現Her-2之腫瘤生長。

在另一個實施例中，本發明提供提高Her-2嵌合蛋白質之抗原性之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含將編碼LLO蛋白質之N-末端片段之核苷酸融合至編碼Her-2蛋白質或其片段之核苷酸以產生重組核苷酸、由此提高Her-2嵌合蛋白質之抗原性之步驟。

在另一個實施例中，本文提供提高Her-2嵌合蛋白質之抗原性之方法，其中及在另一個實施例中，該方法包含改造李斯特菌菌株以表現重組核苷酸。在另一個實施例中，使用不同細菌載體來表現重組核苷酸。在另一個實施例中，細菌載體經減毒。在另一個實施例中，使用DNA疫苗(例如裸露DNA疫苗)來表現重組核苷酸。在另一個實施例中，該核苷酸編碼之LLO-Her-2嵌合體融合肽之投與係藉由以重組方式產生該蛋白質、然後將重組蛋白質投與個體來實施。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，本發明提供用於腫瘤之「表位擴展」之方法。在另一個實施例中，使用本文提供之組合物及方法進行免疫誘導表位擴展至具有除了本發明疫苗載有之抗原以外之抗原之其他腫瘤上。

在另一個實施例中，優勢表位或亞優勢表位分別係所治療個體中之優勢或亞優勢表位。在另一個實施例中，優勢表位或亞優勢表位⁵

在所治療群體中係優勢或亞優勢表位。

在一個實施例中，本文提供藉由表位擴展治療、壓製或抑制個體之癌症或腫瘤生長之方法，其中且在另一個實施例中，癌症與本發明組合物中包含之抗原或其片段之表現相關。在另一個實施例中，該方法包含向該個體投與包含本發明之重組多肽、重組李斯特菌或重組載體之組合物。在另一個實施例中，個體建立針對表現抗原之癌症或表現抗原之腫瘤之免疫反應，由此治療、壓製或抑制個體之癌症或腫瘤生長。

在一個實施例中，「優勢CD8⁺ T細胞表位」係指由超過30%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位，該等抗原特異性CD8⁺ T細胞係藉由使用蛋白質或病原體或含有該蛋白質之癌症細胞進行疫苗接種、感染或惡性生長而引發。在另一個實施例中，該術語係指由超過35%之由此引發之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過40%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過45%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過50%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過55%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過60%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過65%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過70%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過75%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過80%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過85%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過90%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一



個實施例中，該術語係指由超過95%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過96%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過97%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過98%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。

在一個實施例中，「亞優勢CD8⁺ T細胞表位」係指識別之表位由少於30%之抗原特異性CD8⁺ T細胞，該等抗原特異性CD8⁺ T細胞係藉由使用蛋白質或病原體或含有該蛋白質之癌症細胞進行疫苗接種、感染或惡性生長而引發。在另一個實施例中，該術語係指由少於28%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過26%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由少於24%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過22%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由少於20%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過18%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由少於16%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過14%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過12%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由少於10%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過8%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由少於6%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由少於5%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由超過4%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由少於3%之抗原特異性

CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由少於2%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由少於1%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。在另一個實施例中，該術語係指由少於0.5%之抗原特異性CD8⁺ T細胞識別之表位。

每一類型之優勢表位及亞優勢表位代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，本發明方法及組合物中之抗原係以可檢測量在個體之非腫瘤細胞上表現。在另一個實施例中，抗原係以可檢測量在個體之至少一定百分比(例如0.01%、0.03%、0.1%、0.3%、1%、2%、3%或5%)之非腫瘤細胞上表現。在一個實施例中，「非腫瘤細胞」係指腫瘤本體以外之細胞。在另一個實施例中，「非腫瘤細胞」係指非惡性細胞。在另一個實施例中，「非腫瘤細胞」係指未轉化細胞。在另一個實施例中，非腫瘤細胞係體細胞。在另一個實施例中，非腫瘤細胞係生殖細胞。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，「可檢測量」係指藉由標準分析可檢測之量。在一個實施例中，分析係免疫學分析。在一個實施例中，分析係酶聯免疫分析(ELISA)。在另一個實施例中，分析係西方墨點法。在另一個實施例中，分析係FACS。熟習此項技術者應理解，業內可獲得之任何其他分析皆可用於本文提供之方法中。在另一個實施例中，可檢測量係相對於具體分析之背景量來確定。用於實施該等技術中之每一者之方法為熟習此項技術者所熟知，且每一技術代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，用表現重組抗原之LM進行疫苗接種誘導表位擴展。在另一個實施例中，用LLO-抗原融合物(即使在Her2範圍以外)進行疫苗接種亦誘導表位擴展。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，本發明提供阻礙個體之表現Her-2之腫瘤生



長之方法，其包含向該個體投與包含融合至Her-2嵌合抗原之LLO蛋白質之N-末端片段之重組多肽，其中該抗原具有一或多個亞優勢CD8⁺ T細胞表位，其中該個體建立針對表現抗原之腫瘤之免疫反應，由此阻礙個體之表現Her-2之腫瘤生長。在另一個實施例中，抗原不含任何優勢CD8⁺ T細胞表位。在另一個實施例中，本文提供阻礙個體之表現Her-2之腫瘤生長之方法，其包含向該個體投與包含編碼本文提供之重組多肽之重組核苷酸之李斯特菌之重組形式。

在另一個實施例中，本發明提供在患有癌症之宿主中誘導形成細胞毒性T細胞之方法，其包含向該宿主投與本發明組合物，由此在患有癌症之宿主中誘導形成細胞毒性T細胞。

在另一個實施例中，本發明提供降低癌症發病率之方法，其包含投與本發明組合物。在另一個實施例中，本發明提供改善癌症之方法，其包含投與本發明組合物。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，將組合物投與個體之離體細胞；在另一個實施例中，將組合物投與供體之離體細胞；在另一個實施例中，將組合物投與供體之活體內細胞，然後轉移至個體。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，藉由本發明方法治療之癌症係乳癌。在另一個實施例中，癌症係含有Her2之癌症。在另一個實施例中，癌症係黑色素瘤。在另一個實施例中，癌症係胰臟癌。在另一個實施例中，癌症係卵巢癌。在另一個實施例中，癌症係胃癌。在另一個實施例中，癌症係胰臟之癌性損傷。在另一個實施例中，癌症係肺腺癌。在另一個實施例中，癌症係結腸直腸腺癌。在另一個實施例中，癌症係肺鱗狀腺癌。在另一個實施例中，癌症係胃腺癌。在另一個實施例中，癌症係卵巢表面上皮性瘤(例如其良性、增生性或惡性變體)。在另一個

實施例中，癌症係口腔鱗狀細胞癌。在另一個實施例中，癌症係非小細胞肺癌。在另一個實施例中，癌症係CNS癌。在另一個實施例中，癌症係子宮內膜癌。在另一個實施例中，癌症係膀胱癌。在另一個實施例中，癌症係頭頸癌。在另一個實施例中，癌症係前列腺癌。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在本發明方法之另一個實施例中，個體建立針對表現抗原之腫瘤或靶抗原之免疫反應，由此介導抗腫瘤效應。

在另一個實施例中，本發明提供用於治療癌症之免疫原性組合物，該組合物包含截短LLO與Her-2嵌合蛋白質之融合物。在另一個實施例中，免疫原性組合物進一步包含表現融合物之李斯特菌菌株。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。在另一個實施例中，本發明提供用於治療癌症之免疫原性組合物，該組合物包含表現Her-2嵌合蛋白質之李斯特菌菌株。

在一個實施例中，本發明之治療方案係治療性的。在另一個實施例中，該方案係預防性的。在另一個實施例中，使用本發明疫苗來保護由於家族遺傳或如熟習此項技術者可理解之其他使其易患該等類型疾病之情況而具有癌症(例如乳癌或其他類型之含有Her2之腫瘤)風險者。在另一個實施例中，可在藉由手術、習用化學療法或放射治療使腫瘤生長減量後使用疫苗作為癌症免疫療法。在該等治療後，投與本發明疫苗以使得該疫苗針對腫瘤抗原之CTL反應破壞殘留轉移物並延長癌症之減輕。在另一個實施例中，使用本發明疫苗來影響先前建立之腫瘤之生長並殺滅現有腫瘤細胞。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，在上文所述任一方法中利用之疫苗及免疫原性組合物具有本發明疫苗及免疫原性組合物之任一特徵。每一特徵代表本發明之單獨實施例。

本發明涵蓋劑量範圍之多個實施例。在一個實施例中，在疫苗載體情形中，劑量在 0.4 LD_{50} /劑量範圍內。在另一個實施例中，劑量為約 $0.4\text{-}4.9 \text{ LD}_{50}$ /劑量。在另一個實施例中，劑量為約 $0.5\text{-}0.59 \text{ LD}_{50}$ /劑量。在另一個實施例中，劑量為約 $0.6\text{-}0.69 \text{ LD}_{50}$ /劑量。在另一個實施例中，劑量為約 $0.7\text{-}0.79 \text{ LD}_{50}$ /劑量。在另一個實施例中，劑量為約 0.8 LD_{50} /劑量。在另一個實施例中，劑量為 0.4 LD_{50} /劑量至 0.8 LD_{50} /劑量。

在另一個實施例中，劑量為 10^7 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 1.5×10^7 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 2×10^7 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 3×10^7 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 4×10^7 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 6×10^7 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 8×10^7 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 1×10^8 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 1.5×10^8 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 2×10^8 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 3×10^8 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 4×10^8 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 6×10^8 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 8×10^8 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 1×10^9 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 1.5×10^9 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 2×10^9 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 3×10^9 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 5×10^9 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 6×10^9 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 8×10^9 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 1×10^{10} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 1.5×10^{10} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 2×10^{10} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 3×10^{10} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 5×10^{10} 個細菌/劑量。在另

一個實施例中，劑量為 6×10^{10} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 8×10^{10} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 8×10^9 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 1×10^{11} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 1.5×10^{11} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 2×10^{11} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 3×10^{11} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 5×10^{11} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 6×10^{11} 個細菌/劑量。在另一個實施例中，劑量為 8×10^{11} 個細菌/劑量。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，將本發明疫苗或免疫原性組合物單獨投與個體。在另一個實施例中，將疫苗或免疫原性組合物與另一癌症療法一起投與。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，本發明方法及組合物之重組李斯特菌經編碼 Her-2 嵌合抗原或 LLO-Her-2 嵌合抗原融合物之構築物穩定轉化。在一個實施例中，構築物含有聚合連接體以有助於進一步亞選殖。已知若干種用於產生重組李斯特菌之技術。

在一個實施例中，使用同源重組將構築物或核酸分子整合至李斯特菌染色體中。同源重組技術為業內所熟知，且闡述於(例如)以下文獻中：Baloglu S、Boyle SM 等人 (Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. Vet Microbiol 2005, 109(1-2): 11-7)；及 Jiang LL、Song HH 等人 (Characterization of a mutant *Listeria monocytogenes* strain expressing green fluorescent protein. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2005, 37(1): 19-24)。在另一個實施例中，同源重組係根據美國專利第 6,855,320 號中提供之說明來實施。在此情形中，藉由在 hly 啟動子控制下染色體整合 E7 基因及引入 hly 信號序列以確保分泌基因產物來製



備表現E7之重組LM菌株，由此產生稱作Lm-AZ/E7之重組體。在另一個實施例中，使用溫度敏感質粒來篩選重組體。每一技術代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，使用轉位子插入將構築物或核酸分子整合至李斯特菌染色體中。轉位子插入技術為業內所熟知且尤其由Sun等人(Infection and Immunity 1990, 58: 3770-3778)在DP-L967之構築中闡述。在另一個實施例中，轉位子誘變之優點在於可形成穩定基因組插入突變體，但缺點在於無法得知外來基因插入基因組中之位置。

在另一個實施例中，使用噬菌體整合位點將構築物或核酸分子整合至李斯特菌染色體中(Lauer P、Chow MY等人，Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors. J Bacteriol 2002；184(15): 4177-86)。在此方法之某些實施例中，使用噬菌體(例如U153或PSA李斯特噬菌體)之整合酶基因及附著位點將異源基因插入相應附著位點，該位點可係基因組中之任何適宜位點(例如comK或arg tRNA基因之3'端)。在另一個實施例中，內源原噬菌體自所用附著位點自愈，之後整合構築物或異源基因。在另一個實施例中，此方法產生單拷貝整合體。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，使用多種啓動子中之一種來表現抗原或含有抗原之融合蛋白質。在一個實施例中，使用LM啓動子，例如用於分別編碼李斯特菌蛋白質溶血素、actA、磷脂酰肌醇特異性磷脂酶、磷脂酶C及金屬蛋白酶之hly、actA、plca、plcB及mpl基因之啓動子。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，本發明方法及組合物利用本發明之Her-2嵌合蛋白質之同系物或LLO序列。在另一個實施例中，本發明方法及組合物利用來自非人類哺乳動物之Her-2嵌合蛋白質。在一個實施例

中，術語「同源性」、「同源的」等在涉及任何蛋白質或肽時係指，在比對序列並引入空位(若需要)以獲得最大同源性百分比之後，且不將任何保守取代視為序列一致性之一部分，候選序列中與相應天然多肽之殘基一致之胺基酸殘基之百分比。用於比對之方法及電腦程式為業內所熟知。

在另一個實施例中，術語「同源性」在涉及任何核酸序列時類似地指示候選序列中與相應天然核酸序列之核苷酸一致之核苷酸之百分比。

在一個實施例中，同源性係藉由用於序列比對之電腦算法藉由文獻中詳細闡述之方法來測定。舉例而言，核酸序列同源性之電腦算法分析可包括利用任何數目之可用軟體包，例如BLAST、DOMAIN、BEAUTY (BLAST強化比對效用)、GENPEPT及TREMBL包。

在另一個實施例中，「同源性」係指與選自SEQ ID No: 1-4之序列之一致性大於70%。在另一個實施例中，「同源性」係指與選自SEQ ID No: 1-4之序列之一致性大於72%。在另一個實施例中，一致性大於75%。在另一個實施例中，一致性大於78%。在另一個實施例中，一致性大於80%。在另一個實施例中，一致性大於82%。在另一個實施例中，一致性大於83%。在另一個實施例中，一致性大於85%。在另一個實施例中，一致性大於87%。在另一個實施例中，一致性大於88%。在另一個實施例中，一致性大於90%。在另一個實施例中，一致性大於92%。在另一個實施例中，一致性大於93%。在另一個實施例中，一致性大於95%。在另一個實施例中，一致性大於96%。在另一個實施例中，一致性大於97%。在另一個實施例中，一致性大於98%。在另一個實施例中，一致性大於99%。在另一個實施例中，一致性為100%。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，同源性係經由測定候選序列雜交來測定，

該方法已詳細闡述於文獻中(例如,參見「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D.及Higgins S. J.編輯(1985); Sambrook等人, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; 及 Ausubel 等人, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.)。舉例而言,雜交方法可在中等至嚴格條件下對編碼天然半胱天冬酶肽之DNA之補體實施。雜交條件係(例如)在42°C下在包含以下之溶液中培育過夜: 10-20%甲醯胺5 × SSC (150 mM NaCl, 15 mM檸檬酸三鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 7.6)、5 × 鄧哈特溶液(Denhardt's solution)、10%硫酸葡聚糖及20 µg/ml經變性經剪切之鮭魚精DNA。

在本發明之一個實施例中,「核酸」係指一串至少兩個鹼基-糖-磷酸酯組合。在一個實施例中,該術語包括DNA及RNA。在一個實施例中,「核苷酸」係指核酸聚合物之單體單元。在一個實施例中,RNA可呈以下形式:tRNA(轉移RNA)、snRNA(小核RNA)、rRNA(核糖體RNA)、mRNA(信使RNA)、反義RNA、小抑制RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)及核酶。siRNA及miRNA之使用已有闡述(Caudy AA等人, Genes & Devel 16: 2491-96及其中引用之參考文獻)。DNA可呈以下形式:質粒DNA、病毒DNA、線狀DNA或染色體DNA或該等基團之衍生物。另外,DNA及RNA之該等形式可為單股、雙股、三股或四股。在另一個實施例中,該術語亦包括可含有其他類型之主鏈但鹼基相同之人工核酸。在一個實施例中,人工核酸係PNA(肽核酸)。PNA含有肽主鏈及核苷酸鹼基且在一個實施例中能結合DNA及RNA分子二者。在另一個實施例中,核苷酸經氧雜環丁烷修飾。在另一個實施例中,核苷酸係藉由用硫代磷酸酯鍵置換一或多個磷酸二酯鍵來修飾。在另一個實施例中,人工核酸含有業內已知之天然核酸之磷酸酯主鏈之任何其他變體。硫代磷酸酯核酸及PNA之使用

為熟習此項技術者已知，且闡述於(例如)以下文獻中：Neilsen PE, Curr Opin Struct Biol 9:353-57；及Raz NK等人，Biochem Biophys Res Commun. 297:1075-84。核酸之產生及使用為熟習此項技術者已知且闡述於(例如)以下文獻中：Molecular Cloning, (2001), Sambrook及Russell編輯；及Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio及G. C. Fareed。每一核酸衍生物代表本發明之單獨實施例。

在一個實施例中，本文列示之任何胺基酸序列之蛋白質及/或肽同源性係藉由文獻中詳細闡述之方法來測定，包括免疫印跡分析，或利用多種可用軟體包中之任一者經由已確立方法經由胺基酸序列之電腦算法分析來測定。例如，一些該等軟體包可包括FASTA、BLAST、MPsrch或Scanps包，且可利用Smith及Waterman算法及/或用於分析之全體/局部或BLOCKS比對。每一同源性測定方法代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，本發明提供包含用於實施本發明方法之試劑之套組。在另一個實施例中，本發明提供包含本發明之組合物、工具或儀器之套組。

在一個實施例中，術語「接觸」或「投與」係指使癌症細胞或腫瘤與本發明組合物直接接觸。在另一個實施例中，該等術語係指使癌症細胞或腫瘤與本發明組合物間接接觸。在另一個實施例中，本發明方法包括使個體與本發明組合物接觸之方法，在該接觸後藉由擴散或業內已知之化合物藉由其在體內循環之任何其他主動運輸或被動運輸過程使該組合物與癌症細胞或腫瘤接觸。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

在另一個實施例中，術語「基因」及「重組基因」係指包含編碼本發明多肽之開放閱讀框之核酸分子。該等天然對偶基因變異通常



可在給定基因之核苷酸序列中產生1-5%差異。替代性對偶基因可藉由在多個不同個體或生物體中對所關注基因進行測序來鑑別。此可藉由使用雜交探針鑑別多種個體或生物體中之相同遺傳基因座來容易地實施。因天然對偶基因變異而產生且不改變功能活性之任一及所有該等核苷酸變異及所得胺基酸多型性或變異皆意欲在本發明範圍內。

醫藥組合物

在另一個實施例中，含有本發明疫苗及組合物之醫藥組合物係藉由熟習此項技術者已知之任一方法投與個體，該投與方法例如非經腸、癌旁側(paracancerally)、跨黏膜、經皮、肌內、靜脈內、真皮內、皮下、腹膜內、室內、顱內、陰道內或腫瘤內。

在本文提供之方法及組合物之另一個實施例中，疫苗及組合物係經口投與，且因此調配為適於經口投與之形式，即呈固體或液體製劑形式。適宜固體經口調配物包括錠劑、膠囊、丸劑、顆粒劑、丸粒劑及諸如此類。適宜液體經口調配物包括溶液、懸浮液、分散液、乳液、油及諸如此類。在本發明之另一個實施例中，將活性成份調配於膠囊中。根據此實施例，本發明組合物除了活性化合物及惰性載劑或稀釋劑以外包含硬膠化膠囊。

在另一個實施例中，疫苗或組合物係藉由靜脈內、動脈內或肌內注射液體製劑來投與。適宜液體調配物包括溶液、懸浮液、分散液、乳液、油及諸如此類。在一個實施例中，醫藥組合物係靜脈內投與且因此調配為適於靜脈內投與之形式。在另一個實施例中，醫藥組合物係動脈內投與且因此調配為適於動脈內投與之形式。在另一個實施例中，醫藥組合物係肌內投與且因此調配為適於肌內投與之形式。

在一個實施例中，術語「治療」係指治癒疾病。在另一個實施例中，「治療」係指預防疾病。在另一個實施例中，「治療」係指降低疾病之發病率。在另一個實施例中，「治療」係指改善疾病之症狀。S

在另一個實施例中，「治療」係指延長患者之無表現存活或總體存活。在另一個實施例中，「治療」係指穩定疾病之進展。在另一個實施例中，「治療」係指誘導減輕。在另一個實施例中，「治療」係指減慢疾病進展。在另一個實施例中，術語「降低」、「壓製」及「抑制」係指減輕或減小。每一可能性均代表本發明之單獨實施例。

本文所用術語「約」在定量術語中意指加或減5%，或在另一個實施例中意指加或減10%，或在另一個實施例中意指加或減15%，或在另一個實施例中意指加或減20%。

在一個實施例中，術語「個體」係指需要治療病況或其後遺症或易患該病況或其後遺症之包括犬科動物在內之哺乳動物。個體可包括各種品種之狗、包括狼之動物園動物、貓、豬、牛、綿羊、山羊、馬、大鼠及小鼠以及人類。術語「個體」不排除在所有方面皆正常之個體。

在一個實施例中，用於治療目的之術語「哺乳動物」係指任何歸類為哺乳動物之動物，包括人類、家畜及農場動物，以及動物園動物、運動動物或寵物，例如犬科動物(包括狗)及馬、貓、牛、豬、山羊等。

在一個實施例中，犬科動物可為成年或幼年犬科動物。

「治療有效量」在涉及腫瘤治療時係指能引起以下效應中之一或多者之量：(1) 在一定程度上抑制腫瘤生長，包括減慢生長及完全阻止生長；(2) 減少腫瘤細胞數目；(3) 減小腫瘤大小；(4) 抑制(即，降低、減慢或或完全停止)腫瘤細胞浸潤至周圍器官中；(5) 抑制(即，降低、減慢或完全停止)轉移；(6) 增強抗腫瘤免疫反應，其可能但不一定導致腫瘤消退或排斥；及/或(7) 在一定程度上緩解與病症相關之一或多種症狀。本文出於治療腫瘤之目的提供之疫苗之「治療有效量」可憑經驗且以常規方式來確定。



闡述以下實例以更全面地闡釋本發明之較佳實施例。然而，其決不應理解為限制本發明之寬廣範圍。

實例

材料和方法

寡核苷酸係由Invitrogen (Carlsbad, CA)合成且DNA測序係由Genewiz公司(South Plainfield, NJ)實施。流式細胞術試劑購自Becton Dickinson Biosciences (BD, San Diego, CA)。除非指出，否則細胞培養基、補充物及所有其他試劑皆來自Sigma (St. Louise, MO)。Her2/neu HLA-A2肽係由EZbiolabs (Westfield, IN)合成。完全RPMI 1640 (C-RPMI)培養基含有2 mM麩醯胺酸、0.1 mM非必需胺基酸及1 mM丙酮酸鈉、10%胎牛血清、青黴素/鏈黴素、Hepes (25 mM)。先前已闡述多株抗LLO抗體且抗Her2/neu抗體購自Sigma。

小鼠及細胞系

所有動物實驗皆係根據IACUC已批准之協議在賓夕法尼亞大學(University of Pennsylvania)或羅格斯大學(Rutgers University)實施。FVB/N小鼠購自Jackson實驗室(Bar Harbor, ME)。在賓夕法尼亞大學之動物核心設施飼養並繁殖過度表現大鼠Her2/neu腫瘤蛋白質之FVB/N Her2/neu轉基因小鼠。NT-2腫瘤細胞系表現大量大鼠Her2/neu蛋白質，其係源自該等小鼠中之自發性乳房腫瘤且如先前所述生長。DHFR-G8 (3T3/neu)細胞得自ATCC且係根據ATCC建議來生長。EMT6-Luc細胞系係由John Ohlfest博士(明尼蘇達大學(University of Minnesota), MN)慷慨贈送且使其在完全C-RPMI培養基中生長。在賓夕法尼亞大學(Philadelphia, PA)由小動物成像設施(SAIF)在指導下實施生物發光工作。

李斯特菌構築物及抗原表現

Her2/neu-pGEM7Z係由賓夕法尼亞大學之Mark Greene博士友姪

地提供且含有選殖至pGEM7Z質粒(Promega, Madison WI)中之全長人類Her2/neu (hHer2)基因。使用此質粒作為模板藉由PCR使用pfx DNA聚合酶(Invitrogen)及表1中所示之寡聚物來擴增hHer-2/neu之三個區段(即EC1、EC2及IC1)。

表1：用於選殖人類her-2-嵌合體之引物

	DNA序列	鹼基對區域	胺基酸區域或接合區
Her-2- 嵌合體(F)	TGATCTCGAGACCCACCTGGACATGCTC (SEQ ID NO: 57)	120-510	40-170
HerEC1-EC2F (接合區)	CTACCAGGACACGATTTTGTGGAAG-AATATCCA GGAGTTTGCTGGCTGC (SEQ ID NO: 58)	510/1077	170/359
HerEC1-EC2R (接合區)	GCAGCCAGCAAACCTCCTGGATATT-CTTCCACAA AATCGTGTCCTGGTAG (SEQ ID NO: 59)		
HerEC2-ICIF (接合區)	CTGCCACCAGCTGTGCGCCCGAGGG-CAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGA (SEQ ID NO: 60)	1554/2034	518/679
HerEC2-ICIR (接合區)	TCGTGTACTTCCGGATCTTCTGCTGCCCTCGGGC GCACAGCTGGTGGCAG (SEQ ID NO: 61)		
Her-2- 嵌合體(R)	GTGGCCCGGGTCTAGATTAGTCTAAGAGGCAGCCATAGG (SEQ ID NO: 62)	2034-2424	679-808

Her-2/neu嵌合體構築物係藉由SOEing PCR方法且以每一單獨hHer-2/neu區段作為模板進行直接融合來生成。引物顯示於表2中。

用於擴增人類Her2區域之不同區段之引物序列

	DNA序列	鹼基對區域	胺基酸區域
Her-2-	CCGCCTCGAGGCCGCGAGCACCCAA	58-979	20-326

EC1(F)	GTG (SEQ ID NO: 63)		
Her-2- EC1(R)	CGCG <u>ACTAGTT</u> TAATCCTCTGCTGTC ACCTC (SEQ ID NO: 64)		
Her-2- EC2(F)	CCGCCTCGAGTACCTTTCTACGGACG TG (SEQ ID NO: 65)	907-1504	303-501
Her- 2- EC2(R)	CGCG <u>ACTAGTT</u> TACTCTGGCCGGTTG GCAG (SEQ ID NO: 66)		
Her-2- Her-2- IC1(F)	CCGCCTCGAGCAGCAGAAGATCCGG AAGTAC (SEQ ID NO: 67)	2034-3243	679-1081
Her-2- IC1(R)	CGCG <u>ACTAGTT</u> AAGCCCCTTCGGAG GGTG (SEQ ID NO: 68)		

使用 XhoI 及 SpeI 限制酶自 pAdv138 切除 ChHer2 基因，且將其在 *Lmdd* 穿梭載體 pAdv134 中與 LLO 之截短非溶血片段一起選殖於框中。藉由 DNA 測序分析確認插入物、LLO 及 *hly* 啟動子之序列。將此質粒電穿孔至電勝任 *actA*、*dal*、*dat* 突變體單核球增多性李斯特菌菌株中，在含有鏈黴素 (250 µg/ml) 之腦心浸液 (BHI) 瓊脂板上篩選 *LmddA* 及陽性純系。在一些實驗中，出於比較目的使用表現 hHer2/neu (*Lm-hHer2*) 片段之類似李斯特菌菌株。先前已闡述該等菌株。在所有研究中，皆包括無關李斯特菌構築物 (*Lm* 對照) 以引起李斯特菌對免疫系統之非抗原依賴性效應。*Lm* 對照係基於與 ADXS31-164 相同但表現不同抗原 (例如 HPV16-E7 或 NY-ESO-1) 之李斯特菌平臺。測試李斯特菌中融合蛋白質之表現及分泌。在活體內將每一構築物繼代兩次。

細胞毒性分析

以一週間隔用 1×10^8 群落形成單位 (CFU) 之 *Lm*-LLO-ChHer2、ADXS31-164、*Lm*-hHer2 ICI 或 *Lm* 對照 (表現無關抗原) 將 3-5 隻 FVB/N 小鼠之組免疫三次或使其保持純真。使 NT-2 細胞在活體外生長，藉由胰蛋白酶脫離並用絲裂黴素 C (250 µg/ml，存於無血清 C-RPMI 培養基

中)在37°C下處理45分鐘。在5次洗滌後，將其與自經免疫或純真動物採集之脾細胞以1:5 (刺激劑:反應者)之比率在37°C及5% CO₂下共培育5天。使用經銷標記之3T3/neu (DHFR-G8)細胞作為靶根據先前所闡述之方法實施標準細胞毒性分析。在培育4小時後使用分光光度計(Perkin Elmer, Victor²)在590 nm下量測已殺滅靶細胞釋放之鎢。特異性溶解百分比定義為(實驗組中之溶解-自發溶解)/(最大溶解-自發溶解)。

經免疫小鼠之脾細胞之干擾素- γ 分泌

以一週間隔用 1×10^8 CFU之ADXS31-164、陰性李斯特菌對照(表現無關抗原)將3-5隻FVB/N或HLA-A2轉基因小鼠之組免疫三次或使其保持純真。在最後一次免疫後一週時自FVB/N小鼠分離脾細胞，且在24孔板中以 5×10^6 個細胞/孔在經絲裂黴素C處理之NT-2細胞存在下在C-RPMI培養基中共培養。在大腸桿菌產生之1 μ M HLA-A2特異性肽或1 μ g/ml重組His標記之ChHer2蛋白質存在下培育HLA-A2轉基因小鼠之脾細胞，且藉由基於鎳之親和層析系統來純化。在24或72小時後獲得上清液樣品，且使用小鼠IFN- γ 酶聯免疫吸附分析(ELISA)套組根據製造商之建議測試干擾素- γ (IFN- γ)之存在。

Her2轉基因動物中之腫瘤研究

用 5×10^8 CFU之*Lm*-LLO-ChHer2、ADXS31-164或*Lm*對照將6週齡FVB/N大鼠Her2/neu轉基因小鼠(9-14/組)免疫6次。經至多52週每週兩次觀察自發性乳房腫瘤之出現並使用電子測徑器量測該等腫瘤。在逃脫腫瘤達到平均直徑1 cm²大小時將其切除並在-20°C下保藏在RNAlater中。為測定Her2/neu蛋白質中之突變對該等腫瘤之逃脫之效應，使用基因組DNA分離套組提取基因組DNA並測序。

ADXS31-164對脾及腫瘤中之調節性T細胞之效應

向小鼠皮下(s.c.)植入 1×10^6 個NT-2細胞。在第7、14及21天，用

1×10^8 CFU之ADXS31-164、*LmddA*對照將該等小鼠免疫或使其保持純真。在第28天提取腫瘤及脾且藉由FACS分析測試CD3⁺/CD4⁺/FoxP3⁺ Treg之存在。簡言之，藉由在兩個載玻片之間在C-RPMI培養基中使脾均質化來分離脾細胞。使用無菌保險刀片切碎腫瘤且用在PBS中含有DNase (12 U/ml)及膠原酶(2 mg/ml)之緩衝液進行消化。在RT下攪動培育60 min後，藉由劇烈吸液分離細胞。藉由RBC溶解緩衝液溶解紅血球，之後用含有10% FBS之完全RPMI-1640培養基洗滌若干次。在經由耐倫篩網過濾後，使腫瘤細胞及脾細胞再懸浮於FACS緩衝液(2% FBS/PBS)中並用抗CD3-PerCP-Cy5.5、CD4-FITC、CD25-APC抗體染色，之後實施通透化處理並用抗Foxp3-PE染色。使用4色FACS calibur (BD)實施流式細胞術分析且使用細胞詢問(cell quest)軟體(BD)分析數據。

統計分析

使用對數秩卡方(Chi-Squared)測試獲得存活數據且使用司徒頓(student's) *t*-測試進行CTL及ELISA分析，其係一式三份實施。在該等分析中，*p*值小於0.05 (標為*)視為統計學上顯著。所有統計分析皆係用Prism軟體4.0a版(2006)或SPSS軟體15.0版(2006)來實施。除非另外說明，否則對於所有FVB/N大鼠Her2/neu轉基因研究，皆使用8-14只小鼠/組，對於所有野生型FVB/N研究，皆使用至少8隻小鼠/組。除了在Her2/neu轉基因小鼠模型中之長期腫瘤研究，所有研究皆重複至少一次。

實例1

分泌融合至Her-2片段之LLO片段之單核球增多性李斯特菌菌株之生成：ADXS31-164之構築

嵌合*Her2/neu*基因(ChHer2)係如先前所述來構築。簡言之，*ChHer2*基因係藉由SOEing PCR方法直接融合Her2/neu蛋白質之兩個

細胞外片段(aa 40-170及aa 359-433)及一個細胞內片段(aa 678-808)來生成。嵌合蛋白質帶有蛋白質之大部分已知人類MHC I類表位。自質粒pAdv138 (其用於構築*Lm*-LLO-ChHer2)切除*ChHer2*基因且將其選殖至*LmddA*穿梭質粒中，從而產生質粒 pAdv164 (圖1A)。該兩個質粒主鏈之間有兩個主要差異。1) pAdv138使用氯黴素抗性標記(*cat*)進行重組細菌之活體外篩選，而pAdv164帶有來自枯草桿菌之D-丙胺酸消旋酶基因(*dal*)，其使用代謝互補路徑進行活體外篩選及在缺少*dal-dat*基因之*LmddA*菌株中之活體內質粒保留。此疫苗平臺經設計及研發以解決FDA關於經改造李斯特菌疫苗菌株之抗生素抗性之憂慮。2) 與pAdv138不同，pAdv164在質粒中不帶有*prfA*基因拷貝(參見下文及圖1A中之序列)，此乃因*Lmdd*菌株之活體內互補無需此基因。*LmddA*疫苗菌株亦缺少*actA*基因(負責李斯特菌之細胞內移動及細胞間傳播)，故源自此主鏈之重組疫苗菌株之毒力係彼等源自其親代菌株*Lmdd*者之百分之一。基於*LmddA*之疫苗亦較基於*Lmdd*之疫苗自經免疫小鼠之脾更快清除(在少於48小時內)。融合蛋白質tLLO-ChHer2在此菌株中之表現及分泌與*Lm*-LLO-ChHer2在TCA沈澱之細胞培養上清液中活體外生長8小時後之表現及分泌相當(圖1B)，此乃因藉由抗LLO抗體使用西方墨點分析檢測到約104 KD之帶。使用僅表現tLLO之李斯特菌主鏈菌株作為陰性對照。

pAdv164序列(7075個鹼基對)(參見圖1)：

cggagtgatactggcttactatgttggcactgatgaggggtgcagtgaagtgcctcatgtggcaggagaaaaaggctgcaccgggtgc
gtcagcagaatatgtgatacaggatatattccgcttcctcgcctcactgactcgtacgctcggctcgttcgactgcggcgagcgggaaatgg
cttacgaacggggcggagatttcctggaagatgccagggaagatacctaacagggaagtgaaggggccgcggcaaacggcttttcca
taggctccgccccctgacaagcatcacgaaatctgacgctcaaactcagtggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggc
gtttccccctggcgggtccctcgtgcgctcctgttctgcctttcggtttaccgggtgtcattccgctgttatggccgcttctcattcca
cgcctgacactcagttccgggtaggcagttcgtccaagctggactgtatgcacgaacccccgttcagtcggaccgctgcgccttacc
cggtaactatcgtcttgagtccaacccggaaagacatgcaaaagcaccactggcagcagccactggtaattgatttagaggagttagtc
ttgaagtcacgcgccggttaaggctaaactgaaaggacaagttttggtgactgcgctcctccaagccagttacctcggttcaaagagttg
gtagctcagagaaccttcgaaaaaccgccctgcaaggcgggtttttcgtttcagagcaagagattacgcgcagaccaaagcgaatctca
agaagatcatcttattaatcagataaaaatatttctagccctcctttgattagttatctttaaagttacttttatgtggaggcattaacattt
gttaatgacgtcaaaaggatagcaagactagaataaagctataaagcaagcatataatattgcgtttcatctttagaagcgaatttcgcca
atattataattaatacaaaagagaggggtggcaaacgggtatttggcattattagggttaaaaaatgtagaaggagagtgaacccatgaaaaa

aataatgctagttttattacacttatattagttagtctaccaattgcgcaacaaactgaagcaaaggatgcatctgcattcaataaagaaaa
tcaatttcacccatggcaccaccagcatciccgcctgcaagtcctaagacgccaatcgaagaaacacgcggatgaaatcgataagta
tatacaaggattggattacaataaaaaacaatgtattagtataccacggagatgcagtgacaaatgtgccccaagaaaagggttacaag
atggaaatgaalatattgtgtggagaaaaagaagaatccatcaatcaaaataatgcagacattcaagttgtgaatgcaatttcgagcct
aacctatccagggtgctctcgtaaaagcgaaatcggaaatagtagaaaatcaaccagatgttctccctgtaaaacgtgattcattaacactca
gcattgatttgcagggtatgactaatcaagacaataaaatagttgtaaaaaatgccactaaatcaaacgttaaacacgcagtaataacatta
gtggaaagatggaaatgaaaaatagctcaagcttatccaaatgtaagtgcataaattgattatgatgacgaaatggcttacagtgaatcac
aattaattgcgaaatttggtagcagcattiaaagctgtaataatagcttgaatgtaaaactcggcgcaatcagtgagggaatgcaaga
agaagtcaltagttttaaacaatttactataacgtgaatgtaatgaacctacaagaccttccagatttccggcaagctgttactaaagag
cagttgcaagcgcttggagtgatgcagaaaatccctcgtcatatatacagtggtggcgtatggccgcaagtttattgaaattatcaac
taattcccatagtactaaagtaaaagctgtttgatgctgccgtaagcggaaaatctgtctcagggtgatgtagaactaacaataatcatca
aaaattcttcttcaaaagccgtaattacggagggttccgcaaaagatgaagtcaaatcatcgacggcaacctcggagactacgcgatat
tttgaaaaagggcgtacttttaacgagaaacaccaggagttccattgcttatacaacaacttccataaagacaatgaattagctgttat
taaaaacaactcagaatatattgaacaacttcaaaagcttatacagatggaaaattaacatcgatcactctggaggatagctgtcgaat
tcaacatttcttgggatgaagtaattatgatcgcgagacccacctggacatgctccgccaccttaccaggggctgccagggtgtgcagg
gaaacctggaactcacctacctgccaccaatgccagcctgtcttctcgtcagggatccaggagggtgcagggtacgtgtcctatcgct
cacaaccaagtgaggcagggtccactgcagaggctgcggattgtgcgaggcaccagctcttggaggacaactatgccctggccgtg
ctagacaatggagacccgctgaacaataccacctgtcacaggggccctcccaggaggcctgcgggagctgcagcttcgaagcct
cacagagatcttgaagagggggtcttgatccagcggaaacccccagctctgtaccaggacacgatttltggaagaatatccaggag
tttctgtgctgcaagaagatcttgggagcctggcatttctgccggagagcttltgatggggacccagcctccaacactgccccgtcca
gccagagcagctccaagtgttggagactctggaagagatcacaggttaacctatacatctcagcatggccggacagcctgtcctgacctca
gcgtcttcagaacctgcaagtaatccggggacgaattctgcacaatggcgccctactcgtgacctgcaagggtgggcatcagctg
gctggggctgcgctcactgagggaactgggcagtgaggactggccctatccaccataacacccacctctgtctcgtgcacacgggtgcc
ctgggaccagctcttctggaacccgcaccaagctctgtccacactgccaaaccggccagaggacgagtggtgtgggcgaggggcctgg
cctgccaccagctgtgcgccgagggcagcagaagatccggaggtacacgatgcggagactgtcgcaggaaacggagctgggtgg
agccgctgacacctagcggagcgtatcccaaccaggcgcagatgcggatcctgaaagagacggagctgaggaaaggtgaaggtgc
ttggatctggcgcttttggcacagcttacaagggcactctggatccctgatggggagaatgtgaaattccagtgccatcaaaagtgtga
gggaaaacacatccccaaaagccaacaaagaaatcttagacgaagcatacgtgatggctggtgtgggtccccatatgtctccgcct
tctgggcatctgcctgacatccacgggtgcagctggtgacacagcttatgcctatggctgacctttagactaatctagacccgggcccact
aacicaacgctagtagtggatttaatcccaaatgagccaacagaaccagaaccagaacagaacaagtaacattggaggttagaatgg
aagaagaaaaagcaatgatttcgtgtgaataatgcaggaatcattgcttatttttaaaaagcgatatactagatataacgaaacaacg
aactgaataaagaatacaaaaaagagccacgaccagttaaagcctgagaacttaactgcgagccttaattgattaccaccaatcaat
taaagaagtcgagacccaaaatttggtaaagtatttaattactttattaatcagatacttaaatatctgtaaacccattatacgggttttgag
gggatttcaagctttaaagaagataccaggcaatcaattaagaaaaacttagttgattgcccttttgtgtgattcaactttgaltgtagcttct
aactaattatttctgtaagaaggagaacagctgaatgaataatcccttttgttagaaactgtgcttcatgacggctgttaaggtacaat

ttaaaaatagtaaaattcgtcaatcactaccagccaggtaaaagtaaaggggctatttttgcgtatcgctcaaaaaaagcatgattgg
 cggacgtggcgtgttctgacttccgaagaagcgattcacgaaaatcaagatacattacgcattggacaccaaagctttatcgttatggt
 acgtatgcagacgaaaaccgttcatacactaaaggacattctgaaaacaatttaagacaaatcaatccttctttattgatttgaattacaca
 cggaaaaagaaactatttcagcaagcgalattttaacaacagctattgatttaggtttatgcctacgttaattatcaaatctgataaaggttat
 caagcatattttgttagaaacgccagtcctatgtgacttcaaaatcagaatttaaatctgtcaaaagcagccaaaataatctcgcaaaatc
 cgagaatatgttgaaagctttgccagttgatctaactgcaatcattttgggattgctcgtataccaagaacggacaatgtagaatttttg
 atcccaattaccgttattctttcaagaatggcaagattggtctttcaacaacagataataagggctttactcgtcaagctaacggtttt
 aagcggtagcagaaggcaaaaaacaagtagatgaacctggtttaatctcttattgcacgaaacgaaattttcaggagaaaagggttagt
 agggcgcaatagcgttatgttaccctctttagcctactttagtcaggctattcaatcgaacgtgcgaatataatgtttgagtttaata
 atcgattagatcaaccttagaagaaaaagaaagtaataaaaattgttagaagtgctattcagaaaatcaatcaaggggctaatagggaat
 acattaccattctttgcaaaagcttgggtatcaagtgaatttaaccagtaaaagatttttgcctgcaagggtggtttaaatcaagaaaaaag
 aagcgaacgtcaacgtgttcatttgcagaatggaaagaagatttaattggcttatattagcgaaaaaagcgaatgatacaagccttattag
 cgacgacaaaaaagagattagagaagtgctagggcattcctgaacggacattagataaattgctgaaggtagcgaagcgaatcagga
 aattttttaagattaaaccaggaagaaatggtggcattcaacttgcagtggttaaatcattgttgcctatcgaatcattaaataaaaaagaa
 gaacgagaaagctataaaaggcgtgacagcttctttaaattagaacgtacatttattcaagaactctaaacaaattggcagaacgcc
 ccaaaacggaccacaactcgtattgttagctacgatacaggctgaaaataaaacccgcactatgccattacattatctatgatacgt
 gtttgtttttcttgcctgctagcttaattgcttatattacctgcaataaaaggatttcttacttccattatactcccattttccaaaaacatacggg
 gaacacgggaacttattgtacaggccacctcatagtttaagggttcgagccttctgcaatctcatccatggaaatatattcatccccctgc
 cggcctattaatgtgactttgtgccggcgatattcctgatccagctccaccataaattggtcctgcaaatcggccggcaattttcag
 gcgttttcccttcaaaaggtgctggtccctttcaatttccggagccagccgtccgcatagcctacaggcaccgtccgatccatgtgtctt
 ttccgctgtgtactcggctccgtagctgacgcctcgccttttctgacagtttgacatgtgacagtgctgaatgcagggttaaatgccgga
 cgcagctgaaacggtatctcgtccgacatgtcagcagacgggcgaaggccatacatgccgatgccgaatctgactgcattaaaaag
 cctttttcagccggagtcacgcggcgtgttcgcgcagtggaaccattagattctttaacggcagcggagcaatcagctctttaagcgt
 caaactgcattagaaatagcccttctttttcatccgtgtcgcgaatgggtaataaccccttgcactttaaacgagggttgcgggtcaa
 gaattgccatcacgttctgaacttcttctctgttttacaccaagtctgttcaccccgatcgaacttcagatgaaatgaagagaacctttt
 ttctgtgtggcggggtgcctcctgaagccattcaacagaataacctgttaaggtcacgtcactacagcagcgattgccacatactccggg
 ggaaccgcgccaagcacaatataggcgccttcaatcccttttgcgcagtgaaatcgcttcatccaaatggccacggccaagcatga
 agcacctgcgtcaagagcagccttctgttctgtcatccatgcccgtaggcgtttgctttcacaactgccatcaagtggacatgttca
 ccgatatgtttttcatattgtgacattttctttatcgcggacaagtcatttccgccacgtatctctgtaaaaagggtttgtgtcatggaa
 aactcctctctttttcagaaaatccagtagtaattaagatttgagaattaattttaattgattaataactaagtttaccagttttcacctaaa
 aaacaaatgatgagataatagctccaaaggctaaagaggactataccaactatttgttaattaa (SED ID NO: 53)

實例2：ADXS31-164之免疫原性與LM-LLO-ChHER2相當

在標準CTL分析中比較ADXS31-164與Lm-LLO-ChHer2疫苗之生成抗Her2/neu特異性細胞毒性T細胞之免疫原性。兩種疫苗皆引發針對3T3/neu靶細胞表現之Her2/neu抗原之相當之強細胞毒性T細胞反應。因此，經僅表現與LLO融合之Her2之細胞內片段之李斯特菌免疫

之小鼠顯示之溶解活性低於含有更多MHC I類表位之嵌合體。在注射無關李斯特菌疫苗之純真動物或小鼠中未檢測到CTL活性(圖2A)。ADXS31-164亦能刺激來自野生型FVB/N小鼠之脾細胞分泌IFN- γ (圖2B)。此係在共培養該等細胞與表現大量Her2/neu抗原之經絲裂黴素C處理之NT-2細胞之培養上清液中檢測(圖5C)。

在用ADXS31-164免疫後，在HLA-A2小鼠中測試人類MHC I類表位之適當處理及呈現。將來自經免疫HLA-A2轉基因動物之脾細胞與對應於位於Her2/neu分子之細胞外結構域(HLYQGCQVV SEQ ID NO: 11或KIFGSLAFL SEQ ID NO: 12)或細胞內結構域(RLLQETELV SEQ ID NO: 13)之已定位HLA-A2限制表位共培育72小時(圖2C)。使用重組ChHer2蛋白質作為陽性對照且使用無關肽或不使用肽作為陰性對照。此實驗之數據顯示，ADXS31-164能引發針對位於靶抗原不同結構域之人類表位之抗Her2/neu特異性免疫反應。

實例3：在預防自發性乳房腫瘤發作中，ADXS31-164較LM-LLO-ChHER2更有效

在產生緩慢生長之自發性乳房腫瘤之20-25週齡Her2/neu轉基因動物中比較ADXS31-164與*Lm*-LLO-ChHer2之抗腫瘤效應。所有經無關李斯特菌對照疫苗免疫之動物皆在第21-25週內產生乳房腫瘤，且在第33週前殺死。與之相比，李斯特菌-Her2/neu重組疫苗顯著延遲乳房腫瘤之形成。在第45週，超過50%經ADXS31-164疫苗接種之小鼠(9隻中之5隻)仍無腫瘤，與之相比，25%經*Lm*-LLO-ChHer2免疫之小鼠無腫瘤。在第52週，8隻經ADXS31-164免疫之小鼠中之2隻仍保持無腫瘤，而所有其他實驗組中之小鼠皆已因其疾病而死亡(圖3)。該等結果表明，儘管減毒程度更高，但在預防Her2/neu轉基因動物之自發性乳房腫瘤發作中，ADXS31-164較*Lm*-LLO-ChHer2更有效。

實例4：在經ADXS31-164免疫後HER2/NEU基因中之突變。

一直認為，在經小片段疫苗或曲妥珠單抗(賀癌平(Herceptin)，靶向Her2/neu細胞外結構域中之表位之單株抗體)免疫後，Her2/neu之MHC I類表位中之突變對腫瘤逃脫負責。為對此進行評價，自轉基因動物之逃脫腫瘤提取基因組材料，且對經嵌合疫苗或對照疫苗免疫之腫瘤中之*neu*基因之相應片段進行測序。在任一經疫苗接種之腫瘤樣品之Her-2/neu基因內皆未觀察到突變，表明有替代性逃脫機制(數據未顯示)。

實例5：ADXS31-164顯著減少腫瘤內T調節細胞

為闡明ADXS31-164對脾及腫瘤中之調節性T細胞頻率之效應，向小鼠植入NT-2腫瘤細胞。在三次免疫後分離脾細胞及腫瘤內淋巴球並針對定義為 $CD3^+/CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ 細胞之Treg進行染色，但在單獨分析時使用FoxP3或CD25標記亦獲得相當之結果。結果表明，與無關李斯特菌疫苗或純真動物相比，用ADXS31-164免疫對脾中之Treg之頻率無影響(參見圖4)。與之相比，用李斯特菌疫苗免疫顯著影響腫瘤中Treg之存在(圖5A)。未治療腫瘤中，所有 $CD3^+$ T細胞中平均19.0%係Treg，對於無關疫苗，此頻率減小至4.2%，且對於ADXS31-164減小至3.4%，腫瘤內Treg之頻率減小了五分之四(圖5B)。經任一種*Lmdda*疫苗治療之小鼠中腫瘤內Treg之頻率之減小可並非因腫瘤大小之差異所致。在代表性實驗中，經ADXS31-164免疫之小鼠之腫瘤[平均直徑(mm) $\pm$ SD, 6.71 ± 0.43 , $n=5$]顯著小於未治療小鼠(8.69 ± 0.98 , $n=5$, $p<0.01$)或經無關疫苗治療之小鼠(8.41 ± 1.47 , $n=5$, $p=0.04$)，而該後兩組之比較顯示腫瘤大小無統計學上顯著之差異($p=0.73$)。經*Lmdda*疫苗治療之腫瘤中Treg之較低頻率升高腫瘤內CD8/Treg比率，表明在用*Lmdda*疫苗免疫後可獲得更有利之腫瘤微環境。然而，只有表現靶抗原HER2/neu之疫苗(ADXS31-164)能降低腫瘤生長，表明Treg之減少僅在腫瘤中之抗原特異性反應存在下有影響。

S

實例6：表現HER-2嵌合體之李斯特菌疫苗不引入逃脫突變

採集經不同疫苗(例如Lm-LLO-138、LmddA164及無關疫苗Lm-LLO-NY)免疫之小鼠之腫瘤樣品。自該等樣品純化DNA並擴增對應於Her-2/neu區域IC1、EC1及EC2之DNA片段，並對其進行測序以確定是否存在任何免疫逃脫突變。每一DNA之序列比對皆係使用CLUSTALW來實施。分析結果表明，在自腫瘤採集之DNA序列中無突變。該等序列之詳細分析顯示於下文中。

EC2之比對(Her-2-neu之975 -1029 bp)**參考**

GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT (SEQ ID NO:14)
 Lm-LLO-138-2 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT
 Lm-LLO-138-3 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT
 Lm-ddA-164-1 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT
 LmddA164-2 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT
 Lm-ddA-164-3 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT
 LmddA164-4 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT
 Lm-ddA-164-5 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT
 LmddA-164-6 GGTCACAGCTGAGGACGGAACACAGCGTTCTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

參考

CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC (SEQ ID NO:15)
 Lm-LLO-138-2
 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 Lm-LLO-138-3
 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 Lm-ddA-164-1
 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 LmddA164-2
 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 Lm-ddA-164-3
 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 LmddA164-4
 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 Lm-ddA-164-5
 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC
 LmddA-164-6
 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCTTCGAGGGGCGAGGGCCATCACCAGTGAC



参考

AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATT TTTGCCGGAG

(SEQ ID No:16)

Lm-LLO-138-2

AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATT TTTGCCGGAG

Lm-LLO-138-3

AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATT TTTGCCGGAG

Lm-ddA-164-1

AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATT TTTGCCGGAG

LmddA164-2

AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATT TTTGCCGGAG

Lm-ddA-164-3

AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATT TTTGCCGGAG

LmddA164-4

AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATT TTTGCCGGAG

Lm-ddA-164-5

AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATT TTTGCCGGAG

LmddA-164-6

AATGTCCAGGAGTTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATT TTTGCCGGAG

参考

AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG

(SEQ ID No:17)

Lm-LLO-138-2

AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG

Lm-LLO-138-3

AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG

Lm-ddA-164-1

AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG

LmddA164-2

AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG

Lm-ddA-164-3

AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG

LmddA164-4

AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG

Lm-ddA-164-5

AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG

LmddA-164-6

AGCTTTGATGGGGACCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCTGAGCAGCTCCAAGTG

参考

TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC

(SEQ ID NO: 18)

Lm-LLO-138-2

TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC

Lm-LLO-138-3

TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC

Lm-ddA-164-1

TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC

LmddA164-2

TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC

Lm-ddA-164-3

TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC

LmddA164-4

TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCTC

Lm-ddA-164-5

TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCANACAGTCTC

LmddA-164-6

TTCGAAACCCTGGAGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCATGGCCAGACAGTCT

参考

CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTGCGGGACGGATTCTCCACGATGGC

(SEQ ID NO: 19)

Lm-LLO-138-2

CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTGCGGGACGGATTCTCCACGATGGC

Lm-LLO-138-3

CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTGCGGGACGGATTCTCCACGATGGC

Lm-ddA-164-1

CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTGCGGGACGGATTCTCCACGATGGC

LmddA164-2

CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTGCGGGACGGATTCTCCACGATGGC

Lm-ddA-164-3

CGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAACCTTCGAATCATTGCGGGACGGATTCTCCACGATGGC

LmddA164-4

CGTGACCTCAGTGTCTTCCAAAACCTTCGAATCATTGCGGGACGGATTCTCCACGATGGC

Lm-ddA-164-5

CGTGACCTCAGTGTCTTCCAAAACCTTCGAATCATTGCGGGACGGATTCTCCACGATGGC

LmddA-164-6

CGTGACCTCAGTGTCTTCCAAAACCTTCGAATCATTGCGGGACGGATTCTCCACGATGGC

参考



GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG

(SEQ ID NO: 20)

Lm-LLO-138-2

GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG

Lm-LLO-138-3

GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG

Lm-ddA-164-1

GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG

LmddA164-3

GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG

Lm-ddA-164-5

GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG

Lm-ddA-164-6

GCGTACTCATTGACACTGCAAGGCCTGGGGATCCACTCGCTGGGGCTGCGCTCACTGCGG

参考

GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCGCAACGCCCATCTCTGCTTTGTACACACT

(SEQ ID NO: 21)

Lm-LLO-138-2

GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCGCAACGCCCATCTCTGCTTTGTACACACT

Lm-LLO-138-3

GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCGCAACGCCCATCTCTGCTTTGTACACACT

Lm-ddA-164-1

GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCGCAACGCCCATCTCTGCTTTGTACACACT

LmddA164-3

GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCGCAACGCCCATCTCTGCTTTGTACACACT

Lm-ddA-164-5

GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCGCAACGCCCATCTCTGCTTTGTACACACT

Lm-ddA-164-6

GAGCTGGGCAGTGGATTGGCTCTGATTACCGCAACGCCCATCTCTGCTTTGTACACACT

参考

GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG

(SEQ ID NO: 22)

Lm-LLO-138-2

GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG

Lm-LLO-138-3

GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG

Lm-ddA-164-1

GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG

LmddA164-3

GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG

Lm-ddA-164-5

GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG

Lm-ddA-164-6

GTACCTTGGGACCAGCTCTTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTCCACAGTGGGAACCGG

参考

CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAAC TCACTGTGTGCCACGGGCAC

(SEQ ID NO: 23)

Lm-LLO-138-2

CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAAC TCACTGTGTGCCACGGGCAC

Lm-LLO-138-3

CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAAC TCACTGTGTGCCACGGGCAC

Lm-ddA-164-1

CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAAC TCACTGTGTGCCACGGGCAC

LmddA164-3

CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAAC TCACTGTGTGCCACGGGCAC

Lm-ddA-164-6

CCGGAAGAGGATTGTGGTCTCGAGGGCTTGGTCTGTAAC TCACTGTGTGCCACGGGCAC

参考

TGCTGGGGGCCAGGGCCCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTCTTCGGGGGCCAGGAG

(SEQ ID NO: 24)

Lm-LLO-138-2

TGCTGGGGGCCAGGGCCCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTCTTCGGGGGCCAGGAG

Lm-LLO-138-3

TGCTGGGGGCCAGGGCCCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTCTTCGGGGGCCAGGAG

Lm-ddA-164-1

TGCTGGGGGCCAGGGCCCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTCTTCGGGGGCCAGGAG

LmddA164-3

TGCTGGGGGCCAGGGCCCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTCTTCGGGGGCCAGGAG

Lm-ddA-164-6 TGCTGGGGGCCAGGGCCCCACCA-----

IC1之比對 (Her-2-neu之2114-3042 bp)

参考

CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC (SEQ ID NO: 25)

Lm-LLO-NY-2

CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC

Lm-LLO-138-4

CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC

Lm-ddA-164-2

CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC

Lm-ddA-164-3

CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC

Lm-ddA164-6

CGCCCAGCGGAGCAATGCCCAACCAGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGC

参考



TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

(SEQ ID NO: 26)

Lm-LLO-NY-1

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-LLO-NY-2

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-LLO-138-1

TAAGGAAGGTGAACGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-LLO-138-2

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-LLO-138-3

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-LLO-138-4

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-ddA-164-1

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-ddA-164-2

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-ddA-164-3

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-ddA-164-4

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-ddA-164-5

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

Lm-ddA-164-6

TAAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTTGGCACTGTCTACAAGGGCATCTGGA

参考

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

(SEQ ID NO: 27)

Lm-LLO-NY-1

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-LLO-NY-2

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-LLO-138-1

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-LLO-138-2

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-LLO-138-3

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-LLO-138-4

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA-164-1

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA-164-2

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA-164-3

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA-164-4

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA-164-5

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA-164-6

TCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAATCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

参考

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC
(SEQ ID NO: 28)

Lm-LLO-NY-1

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

Lm-LLO-NY-2

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

Lm-LLO-138-1

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

Lm-LLO-138-2

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

Lm-LLO-138-3

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

Lm-LLO-138-4

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

Lm-ddA-164-1

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

Lm-ddA-164-2

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC



Lm-ddA-164-3

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

Lm-ddA-164-4

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

Lm-ddA-164-5

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

Lm-ddA164-6

CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

参考

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

(SEQ ID NO: 29)

Lm-LLO-NY-1

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-LLO-NY-2

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-LLO-138-1

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-LLO-138-2

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-LLO-138-3

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-LLO-138-4

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA-164-1

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA-164-2

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA-164-3

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA-164-4

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA-164-5

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA164-6

CGTATGTGTCCCGCCTCCTGGGCATCTGCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

参考

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

(SEQ ID NO: 30)

Lm-LLO-NY-1

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-LLO-NY-2

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-LLO-138-1

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-LLO-138-2

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-LLO-138-3

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-LLO-138-4

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-ddA-164-1

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-ddA-164-2

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-ddA-164-3

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-ddA-164-4

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-ddA-164-5

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

Lm-ddA-164-6

TTATGCCCTACGGCTGCCTTCTGGACCATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCTAGGCTCCC

参考

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC(SE
Q ID NO: 31)

Lm-LLO-NY-1

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

Lm-LLO-NY-2

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

Lm-LLO-138-1

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

Lm-LLO-138-2

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

Lm-LLO-138-3

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

Lm-LLO-138-4

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

Lm-ddA-164-1

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

Lm-ddA-164-2

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC



Lm-ddA-164-3

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

Lm-ddA-164-4

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

Lm-ddA-164-5

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

Lm-ddA164-6

AGGACCTGCTCAACTGGTGTGTTTCAGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGACGTGC

参考

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA(SEQ ID NO: 32)

Lm-LLO-NY-1

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-LLO-NY-2

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-LLO-138-1

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-LLO-138-2

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-LLO-138-3

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-LLO-138-4

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-ddA-164-1

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-ddA-164-2

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-ddA-164-4

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-ddA-164-3

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-ddA-164-5

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

Lm-ddA164-6

GGCTTGACACAGGGACCTGGCTGCCCCGGAATGTGCTAGTCAAGAGTCCCAACCACGTCA

参考

AGATTACAGATTTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG
(SEQ ID NO: 33)

Lm-LLO-NY-1

AGATTACAGATTTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-LLO-NY-2

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-LLO-138-1

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-LLO-138-2

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-LLO-138-3

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-LLO-138-4

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-ddA-164-1

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-ddA-164-2

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-ddA-164-3

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-ddA-164-4

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-ddA-164-5

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

Lm-ddA-164-6

AGATTACAGATTTCTGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAG

参考

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA(SE
Q ID NO: 34)

Lm-LLO-NY-1

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-LLO-NY-2

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-LLO-138-1

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-LLO-138-2

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-LLO-138-3

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-LLO-138-4

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-ddA-164-1

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-ddA-164-2

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-ddA-164-3

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-ddA-164-4

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-ddA-164-5

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

Lm-ddA-164-6

ATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATTCTCAGACGCCGGTTCA

参考**CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG****(SEQ ID NO: 35)**

Lm-LLO-NY-1

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-LLO-NY-2

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-LLO-138-1

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-LLO-138-2

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-LLO-138-3

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-LLO-138-4

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-ddA-164-1

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-ddA-164-2

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-ddA-164-3

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-ddA-164-4

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-ddA-164-5

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

Lm-ddA-164-6

CCCATCAGAGTGATGTGTGGAGCTATGGAGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGGGG

参考**CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA****(SEQ ID NO: 36)**

Lm-LLO-NY-1

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-LLO-NY-2

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-LLO-138-1

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-LLO-138-3

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-LLO-138-4

CCAAACCTTACGATGNAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-ddA164-6

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-ddA-164-2

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-LLO-138-2

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-ddA-164-3

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-ddA-164-5

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-ddA-164-1

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

Lm-ddA-164-4

CCAAACCTTACGATGGAATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGATTGCTGGAGAAGGGAGAA

参考

CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT (SEQ ID NO: 37)

Lm-LLO-NY-1

CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-LLO-NY-2

CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-LLO-138-1

CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-LLO-138-2

CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-LLO-138-3

CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-LLO-138-4

CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-ddA-164-1 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-ddA-164-2 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-ddA-164-3 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-ddA-164-4 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-ddA-164-5 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT

Lm-ddA164-6 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTGATGTCTACATGATTATGGTCAAATGTT



参考 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

(SEQ ID NO: 38)

Lm-LLO-NY-1 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

Lm-LLO-NY-2 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

Lm-LLO-138-2 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

Lm-LLO-138-3 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

Lm-LLO-138-4 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

Lm-ddA-164-1 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

Lm-ddA-164-2 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

Lm-ddA-164-3 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

Lm-ddA-164-5 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

Lm-ddA-164-4 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

Lm-ddA-164-6 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCAAGATTTT

参考 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

(SEQ ID NO: 39)

Lm-LLO-NY-1 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

Lm-LLO-NY-2 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

Lm-LLO-138-2 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

Lm-LLO-138-3 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

Lm-LLO-138-4 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

Lm-ddA-164-1 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

Lm-ddA-164-2 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

Lm-ddA-164-3 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

Lm-ddA-164-5 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

Lm-ddA-164-6 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT

EC1之比對(Her-2-neu之399-758 bp)

參考

CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

(SEQ ID NO: 40)

Lm-LLO-138-1

CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

Lm-LLO-138-2

CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

Lm-ddA-164-1

CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

LmddA-164-2

CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

LmddA-164-3

CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

LmddA-164-4

CCCAGGCAGAACCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

參考

GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG

(SEQ ID NO: 41)

Lm-LLO-138-1

GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG

Lm-LLO-138-2

GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG

Lm-ddA-164-1

GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG

LmddA-164-2

GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG

LmddA-164-3

GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG

LmddA164-4

GAAGGGAGGAGTTTTGATCCGTGGGAACCCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTTGTG

参考

CCGGGCCTGTCCACCTTGTGCCCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC

(SEQ ID NO: 42)

Lm-LLO-138-1

CCGGGCCTGTCCACCTTGTGCCCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC

Lm-LLO-138-2

CCGGGCCTGTCCACCTTGTGCCCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC

Lm-ddA-164-1

CCGGGCCTGTCCACCTTGTGCCCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC

LmddA-164-2

CCGGGCCTGTCCACCTTGTGCCCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC

LmddA-164-3

CCGGGCCTGTCCACCTTGTGCCCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC

LmddA164-4

CCGGGCCTGTCCACCTTGTGCCCCCGCCTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAGAGTCC

参考

GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

(SEQ ID NO: 43)

Lm-LLO-138-1

GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

Lm-LLO-138-2

GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

Lm-ddA-164-1

GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

LmddA-164-2

GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

LmddA-164-3

GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG

LmddA164-4

GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTACCAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGG



参考 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCCAAGCA
 (SEQ ID NO: 44)
 Lm-LLO-138-1
 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCCAAGCA
 Lm-LLO-138-2
 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCCAAGCA
 Lm-ddA-164-1
 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCCAAGCA
 LmddA-164-2
 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCCAAGTA
 LmddA-164-3
 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCCAAGTA
 LmddA164-4
 CCGGCTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGAGGCTGCACGGGCCCCAAGTA

實例7：用ADXS31-164進行周圍免疫可延遲轉移性乳癌細胞系在腦中之生長

用ADXS31-164或無關*Lm*對照疫苗對小鼠進行IP免疫且然後顱內植入5,000個表現螢光素酶及少量Her2/neu之EMT6-Luc腫瘤細胞(圖6C)。在接種後不同時間藉由麻醉小鼠之離體成像監測腫瘤。在腫瘤接種後第8天，在所有對照動物中皆檢測到腫瘤，但ADXS31-164組中之小鼠皆未顯示任何可檢測腫瘤(圖6A及B)。ADXS31-164可顯著延遲該等腫瘤之發作，此乃因在腫瘤接種後第11天陰性對照組中之所有小鼠皆已因其腫瘤而死亡，但ADXS31-164組中之所有小鼠仍存活且僅顯示較小腫瘤生長體徵。該等結果明確表明，使用周圍投與之ADXS31-164獲得之免疫反應有可能可到達中樞神經系統且基於*LmddA*之疫苗可能具有治療CNS腫瘤之潛在用途。

實例8：藉由用ADXS31-164免疫來治療犬科骨肉瘤

犬科骨肉瘤係長骨(腿骨)癌症，其係10歲以上大型犬隻之頭號殺手。標準治療係診斷後立即截肢，之後實施化學療法。然而，該癌症常轉移至肺。使用化學療法，狗存活約18個月，與之相比，不經治療可存活6-12個月。人們相信，HER2抗原存於至多50%之骨肉瘤中。ADXS31-164對表現此抗原之細胞產生免疫攻擊且已經研發用於治療

人類乳癌。

經組織學診斷患有骨肉瘤且具有惡性細胞表現HER2/neu之證據之狗有資格入選。

犬科骨肉瘤試驗

在第一團中將四肢截肢，之後進行一輪化學療法治療。隨後投與3次劑量之Her-2疫苗且進行或不進行6個月間隔之加強。

所有狗皆接受4週之卡鉑(carboplatin)治療。在最後一次卡鉑劑量後4週，狗每三週一次接受ADXS-HER2，總計3次劑量。第1組(3隻狗)接受 1×10^8 CFU/劑量，第2組(3隻狗)各自接受 5×10^8 CFU/劑量且第3組(3隻狗)接受 1×10^9 CFU/劑量。如果觀察到潛在劑量限制性毒性，則將其他狗合成一組以收集更多數據。因此，在初始研究中治療9-18隻狗。

在第二團中，重複與第一團相同之步驟，但在化學療法前(1個月前)僅投與單一劑量之疫苗，總計4次劑量。

此外，在兩個團中，在化學療法後1個月投與單一劑量。

儘管本文已闡釋並闡述了本發明之某些特徵，但熟習此項技術者現在將能想到多種修改、取代、改變及等效形式。因此應理解，隨附申請專利範圍意欲涵蓋在本發明之真正精神內之所有該等修改及改變。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商艾德凡斯有限公司
 <120> 用於在 HER2/NEU 過度表現腫瘤之治療中預防逃脫突變之組合物及方法
 <130> P-73423-PC1
 <140> PCT/US12/999,999
 <141> 2012-08-16
 <150> 12/945,386
 <151> 2010-11-12
 <150> 13/210,696
 <151> 2011-08-16
 <150> 61/260,277
 <151> 2009-11-11
 <160> 68
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1263
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Her-2 嵌合蛋白質
 <400> 1
 gagacccacc tggacatgct ccgccacctc taccagggct gccagggtggt gcagggaaac 60
 ctggaactca cctacctgcc caccaatgcc agcctgtcct tcctgcagga tatccaggag 120
 gtgcagggct acgtgctcat cgctcacaac caagtgaggc aggtcccact gcagaggctg 180
 cggattgtgc gaggcaccca gctctttgag gacaactatg ccctggccgt gctagacaat 240
 ggagacccgc tgaacaatac caccctgtgc acaggggcct cccagggagg cctgcgggag 300
 ctgcagcttc gaagcctcac agagatcttg aaaggagggg tcttgatcca gcggaacccc 360
 cagctctgct accaggacac gatcttgtgg aagaatatcc aggagtgtgc tggctgcaag 420
 aagatctttg ggagcctggc atttctgccg gagagctttg atggggaccc agcctccaac 480
 actgccccgc tccagccaga gcagctccaa gtgtttgaga ctctggaaga gatcacaggt 540
 tacctataca tctcagcatg gccggacagc ctgcctgacc tcagcgtctt ccagaacctg 600
 caagtaatcc ggggacgaat tctgcacaat ggcgcctact cgctgaccct gcaagggctg 660
 ggcatcagct ggctggggct gcgctcactg agggaaactgg gcagtggact ggccctcatc 720
 caccataaca cccacctctg ctctgtgcac acggtgccct gggaccagct ctttcggaac 780
 ccgcaccaag ctctgctcca cactgccaac cggccagagg acgagtgtgt gggcgagggc 840
 ctggcctgcc accagctgtg cgcccagggg cagcagaaga tccggaagta cacgatgcgg 900

```

agactgctgc aggaaacgga gctggtggag ccgctgacac ctagcggagc gatgcccac      960
caggcgcaga tgcggatcct gaaagagacg gagctgagga aggtgaaggt gcttggatct      1020
ggcgcttttg gcacagtcta caagggcatc tggatccctg atggggagaa tgtgaaaatt      1080
ccagtggcca tcaaagtgtt gagggaaaac acatcccca aagccaacaa agaaatctta      1140
gacgaagcat acgtgatggc tgggtgtggc tccccatatg tctccgcct tctgggcatc      1200
tgcctgacat ccacggtgca gctggtgaca cagcttatgc cctatggctg cctcttagac      1260
taa                                                                    1263

```

<210> 2
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Her-2 嵌合蛋白質

<400> 2

Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val
 1 5 10 15

Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu
 20 25 30

Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala
 35 40 45

His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg
 50 55 60

Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn
 65 70 75 80

Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly
 85 90 95

Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly
 100 105 110

Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile
 115 120 125

Leu Trp Lys Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly
 130 135 140

Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160



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

Cys Leu Leu Asp
420

<210> 3
<211> 1323
<212> DNA
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 3
atgaaaaaaa taatgctagt ttttattaca cttatattag ttagtctacc aattgcgcaa 60
caaaactgaag caaaggatgc atctgcattc aataaagaaa attcaatttc atccatggca 120
ccaccagcat ctccgcctgc aagtcctaag acgccaatcg aaaagaaaca cgcggatgaa 180
atcgataagt atatacaagg attggattac aataaaaaaca atgtattagt ataccacgga 240
gatgcagtga caaatgtgcc gccaaagaaa ggttacaaag atggaaatga atatattggt 300
gtggagaaaa agaagaaatc catcaatcaa aataatgcag acattcaagt tgtgaatgca 360
atttcgagcc taacctatcc aggtgctctc gtaaaagcga attcggaatt agtagaaaat 420
caaccagatg ttctccctgt aaaacgtgat tcattaacac tcagcattga ttgcccaggt 480
atgactaatc aagacaataa aatagttgta aaaaatgcc ctaaatcaaa cgttaacaac 540
gcagtaaata cattagtggg aagatggaat gaaaaatatg ctcaagctta tccaaatgta 600
agtgcaaaaa ttgattatga tgacgaaatg gcttacagtg aatcacaatt aattgcgaaa 660
tttggtacag catttaaagc tgtaaataat agcttgaatg taaacttcgg cgcaatcagt 720
gaagggaaaa tgcaagaaga agtcattagt tttaaacaaa ttactataa cgtgaatggt 780
aatgaacctt caagaccttc cagatTTTTT ggcaaagctg ttactaaaga gcagttgcaa 840
gcgcttgag tgaaatgcaga aaatcctcct gcatatatct caagtgtggc gtatggccgt 900
caagtttatt tgaaattatc aactaattcc catagtacta aagtaaaagc tgcttttgat 960
gctgccgtaa gcggaaaatc tgtctcaggt gatgtagaac taacaaatat catcaaaaat 1020
tcttccttca aagccgtaat ttacggaggt tccgcaaaag atgaagttca aatcatcgac 1080
ggcaacctcg gagacttacg cgatattttg aaaaaaggcg ctacttttaa tcgagaaaca 1140
ccaggagttc ccattgctta tacaacaaac ttcctaaaag acaatgaatt agctgttatt 1200
aaaaacaact cagaatatat tgaaacaact tcaaaagctt atacagatgg aaaaattaac 1260
atcgatcact ctggaggata cgttgctcaa ttcaacattt cttgggatga agtaaattat 1320
gat 1323

<210> 4
<211> 441
<212> PRT
<213> 單核球增多性李斯特菌
<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 Glu Ile Asp Lys Tyr
 50 55 60
 Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly
 65 70 75 80
 Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn
 85 90 95
 Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn
 100 105 110
 Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly
 115 120 125
 Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val
 130 135 140
 Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser
 165 170 175
 Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys
 180 185 190
 Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp
 195 200 205
 Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala
 210 215 220
 Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser
 225 230 235 240
 Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr
 245 250 255

Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys
 260 265 270
 Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn
 275 280 285
 Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu
 290 295 300
 Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn
 325 330 335
 Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
 340 345 350
 Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
 355 360 365
 Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro
 370 375 380
 Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile
 385 390 395 400
 Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp
 405 410 415
 Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn
 420 425 430
 Ile Ser Trp Asp Glu Val Asn Tyr Asp
 435 440

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 單核球增多性李斯特菌
 <400> 5

Lys Thr Glu Glu Gln Pro Ser Glu Val Asn Thr Gly Pro Arg
 1 5 10

<210> 6
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 單核球增多性李斯特菌



<400> 6

Lys Ala Ser Val Thr Asp Thr Ser Glu Gly Asp Leu Asp Ser Ser Met
 1 5 10 15

Gln Ser Ala Asp Glu Ser Thr Pro Gln Pro Leu Lys
 20 25

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 7

Lys Asn Glu Glu Val Asn Ala Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp
 1 5 10 15

Glu Glu Leu Arg
 20

<210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 8

Arg Gly Gly Ile Pro Thr Ser Glu Glu Phe Ser Ser Leu Asn Ser Gly
 1 5 10 15

Asp Phe Thr Asp Asp Glu Asn Ser Glu Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp
 20 25 30

Arg

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 釀膿鏈球菌

<400> 9

Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro
 1 5 10 15

Lys

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 類馬鏈球菌

<400> 10

Lys Gln Asn Thr Ala Asn Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro
 1 5 10 15

Lys

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val
 1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
 1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val
 1 5

<210> 14

<211> 55

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 14

Gly Gly Thr Cys Ala Cys Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys Gly Thr Thr Gly Thr Gly
 20 25 30

Ala Gly Ala Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Gly Cys Cys
 35 40 45

Cys Thr Gly Thr Gly Cys Thr



50

55

<210> 15
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 15

Cys Gly Ala Gly Thr Gly Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Cys
 1 5 10 15

Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Cys Ala Cys Cys Thr
 20 25 30

Thr Cys Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys
 35 40 45

Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys
 50 55 60

<210> 16
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 16

Ala Ala Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr
 20 25 30

Cys Thr Thr Thr Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Cys Ala
 35 40 45

Thr Thr Thr Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly
 50 55 60

<210> 17
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 17

Ala Gly Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys
 1 5 10 15

Cys Cys Thr Cys Cys Thr Cys Cys Gly Gly Cys Ala Thr Thr Gly Cys
 20 25 30

Thr Cys Cys Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly
 35 40 45

Cys Ala Gly Cys Thr Cys Cys Ala Ala Gly Thr Gly
 50 55 60

<210> 18
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 18

Thr Thr Cys Gly Ala Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Thr Cys Ala Cys Ala Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Thr
 20 25 30

Gly Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Thr Gly Gly
 35 40 45

Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys
 50 55 60

<210> 19
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 19

Cys Gly Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Gly Thr Cys Thr
 1 5 10 15

Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Ala Ala Thr
 20 25 30

Cys Ala Thr Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly Ala Thr Thr
 35 40 45

Cys Thr Cys Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys
 50 55 60

<210> 20
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 20

Gly Cys Gly Thr Ala Cys Thr Cys Ala Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys
 1 5 10 15



Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr
20 25 30

Cys Cys Ala Cys Thr Cys Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly
35 40 45

Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Thr Gly Cys Gly Gly
50 55 60

<210> 21
<211> 60
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 21

Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr
1 5 10 15

Thr Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Gly
20 25 30

Cys Ala Ala Cys Gly Cys Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Thr Gly Cys
35 40 45

Thr Thr Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Ala Cys Thr
50 55 60

<210> 22
<211> 60
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 22

Gly Thr Ala Cys Cys Thr Thr Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Gly Cys
1 5 10 15

Thr Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Ala Cys Cys Cys Ala Cys Ala
20 25 30

Thr Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Cys Ala Cys
35 40 45

Ala Gly Thr Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys Gly Gly
50 55 60

<210> 23
<211> 60
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 23

Cys Cys Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Thr Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Thr Thr Gly Gly Thr
 20 25 30

Cys Thr Gly Thr Ala Ala Cys Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr
 35 40 45

Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Gly Cys Ala Cys
 50 55 60

<210> 24

<211> 60

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 24

Thr Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys
 1 5 10 15

Cys Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Thr Gly Thr Gly Thr Cys Ala Ala
 20 25 30

Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Cys Ala Thr Thr Thr Cys Cys Thr Thr
 35 40 45

Cys Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly
 50 55 60

<210> 25

<211> 57

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 25

Cys Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Ala Thr
 1 5 10 15

Gly Cys Cys Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Ala Gly
 20 25 30

Ala Thr Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Thr Ala Ala Ala Ala Gly
 35 40 45

Ala Gly Ala Cys Gly Gly Ala Gly Cys
 50 55



<210> 26
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 26

Thr Ala Ala Gly Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Gly Cys Thr Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Gly Ala Gly Cys Thr
 20 25 30

Thr Thr Thr Gly Gly Cys Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Ala Cys Ala
 35 40 45

Ala Gly Gly Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Gly Ala
 50 55 60

<210> 27
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 27

Thr Cys Cys Cys Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala
 1 5 10 15

Thr Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr Cys Cys Cys Cys Gly Thr Gly
 20 25 30

Gly Cys Thr Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala
 35 40 45

Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Cys Ala Cys Ala Thr
 50 55 60

<210> 28
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 28

Cys Thr Cys Cys Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala
 20 25 30

Gly Cys Gly Thr Ala Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Thr Gly
 35 40 45

Gly Thr Gly Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys Thr Cys
50 55 60

<210> 29
<211> 60
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 29

Cys Gly Thr Ala Thr Gly Thr Gly Thr Cys Cys Cys Gly Cys Cys Thr
1 5 10 15

Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly
20 25 30

Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Cys Ala Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys
35 40 45

Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys
50 55 60

<210> 30
<211> 60
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 30

Thr Thr Ala Thr Gly Cys Cys Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Thr Gly
1 5 10 15

Cys Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala Cys Cys Ala Thr Gly Thr Cys
20 25 30

Cys Gly Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr Cys
35 40 45

Gly Cys Cys Thr Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Cys
50 55 60

<210> 31
<211> 60
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 31

Ala Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Ala Ala Cys Thr Gly
1 5 10 15

Gly Thr Gly Thr Gly Thr Thr Cys Ala Gly Ala Thr Thr Gly Cys Cys
20 25 30

Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Ala Cys Cys
 35 40 45

Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Cys Gly Thr Gly Cys
 50 55 60

<210> 32
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 32

Gly Gly Cys Thr Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Cys Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala Thr
 20 25 30

Gly Thr Gly Cys Thr Ala Gly Thr Cys Ala Ala Gly Ala Gly Thr Cys
 35 40 45

Cys Cys Ala Ala Cys Cys Ala Cys Gly Thr Cys Ala
 50 55 60

<210> 33
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 33

Ala Gly Ala Thr Thr Ala Cys Ala Gly Ala Thr Thr Thr Cys Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Cys Thr Gly Gly Cys Thr Cys Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly
 20 25 30

Gly Ala Cys Ala Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly
 35 40 45

Ala Gly Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly
 50 55 60

<210> 34
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 34

Ala Thr Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Cys Cys

1					5					10					15				
Cys	Ala	Thr	Cys ₂₀	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly ₂₅	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly ₃₀	Cys	Ala			
Thr	Thr	Gly ₃₅	Gly	Ala	Ala	Thr	Cys ₄₀	Thr	Ala	Thr	Thr	Cys ₄₅	Thr	Cys	Ala				
Gly ₅₀	Ala	Cys	Gly	Cys	Cys	Gly ₅₅	Gly	Thr	Thr	Cys	Ala ₆₀								

<210>	35
<211>	60
<212>	PRT
<213>	小家鼠

<400> 35

Cys Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Thr Gly Thr
1 5 10 15

Gly Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly
20 25 30

Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala
35 40 45

Thr Gly Ala Cys Thr Thr Thr Thr Gly Gly Gly Gly
50 55 60

<210>	36
<211>	59
<212>	PRT
<213>	小家鼠

<400> 36

Cys Cys Ala Ala Ala Cys Cys Thr Thr Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ala Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Ala Gly
20 25 30

Ala Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr Gly Cys Thr Gly Gly
35 40 45

Ala Gly Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala
50 55

<210>	37
<211>	58
<212>	PRT

<213> 小家鼠

<400> 37

Cys Gly Cys Cys Thr Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys
1 5 10 15

Cys Ala Ala Thr Cys Thr Gly Cys Ala Cys Cys Ala Thr Thr Gly Ala
20 25 30

Thr Gly Thr Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Ala Thr Thr Ala Thr Gly
35 40 45

Gly Thr Cys Ala Ala Ala Thr Gly Thr Thr
50 55

<210> 38

<211> 54

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 38

Gly Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Gly Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala
1 5 10 15

Ala Thr Gly Thr Cys Gly Cys Cys Cys Gly Ala Gly Ala Thr Thr Cys
20 25 30

Cys Gly Gly Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Thr Gly Thr Cys Ala Gly
35 40 45

Ala Ala Thr Thr Thr Thr
50

<210> 39

<211> 52

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 39

Cys Ala Cys Gly Thr Ala Thr Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Ala
1 5 10 15

Cys Cys Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly
20 25 30

Gly Thr Cys Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Gly Ala Gly Gly
35 40 45

Ala Cys Thr Thr
50

<210> 40
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 40

Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Cys Cys Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Cys Gly Gly Gly Ala Gly Cys
 20 25 30

Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Gly Ala Ala Gly Thr Cys Thr
 35 40 45

Cys Ala Cys Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Thr
 50 55 60

<210> 41
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 41

Gly Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Thr Cys Cys Gly Thr Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Cys
 20 25 30

Ala Gly Cys Thr Cys Thr Gly Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala
 35 40 45

Cys Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

<210> 42
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 42

Cys Cys Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Thr Cys Cys Ala Cys Cys Thr
 1 5 10 15

Thr Gly Thr Gly Cys Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala
 20 25 30

Ala Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr Thr Gly



35

40

45

Gly Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Thr Cys Cys

505560

<210> 43

<211> 60

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 43

Gly Gly Ala Ala Gly Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Ala Thr Cys

151015

Thr Thr Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr

202530

Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Thr Gly Gly Thr Thr Gly Thr Gly Cys

354045

Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly

505560

<210> 44

<211> 60

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 44

Cys Cys Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Ala Cys Thr Gly Ala Cys

151015

Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Thr

202530

Gly Thr Gly Cys Cys Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys

354045

Gly Gly Gly Cys Cys Cys Cys Ala Ala Gly Cys Ala

505560

<210> 45

<211> 3716

<212> DNA

<213> 褐家鼠

<400> 45

ccggaatcgc gggcacccaa gtgtgtaccg gcacagacat gaagttgcgg ctccctgcc

60

gtcctgagac ccacctggac atgctccgcc acctgtacca gggctgtcag gtagtgcagg

120

gcaacttgga gcttacctac gtgcctgcc atgccagcct ctattcctg caggacatcc

180

aggaagttca	gggttacatg	ctcatcgctc	acaaccaggt	gaagcgcgtc	ccactgcaaa	240
ggctgcgcat	cgtgagaggg	acccagctct	ttgaggacaa	gtatgccctg	gctgtgctag	300
acaaccgaga	tcctcaggac	aatgtcgccg	cctccacccc	aggcagaacc	ccagaggggc	360
tgcgggagct	gcagcttcga	agtctcacag	agatcctgaa	gggaggagtt	ttgatccgtg	420
ggaaccctca	gctctgctac	caggacatgg	ttttgtggaa	ggacgtcttc	cgcaagaata	480
accaactggc	tcctgtcgat	atagacacca	atcgttcccc	ggcctgtcca	ccttgtgccc	540
ccgcctgcaa	agacaatcac	tgttgggggtg	agagtccgga	agactgtcag	atcttgactg	600
gcaccatctg	taccagtggg	tgtgcccggg	gcaaggggcg	gctgcccact	gactgctgcc	660
atgagcagtg	tgccgcaggc	tgcacggggc	ccaagcattc	tgactgcctg	gcctgcctcc	720
acttcaatca	tagtggtatc	tgtgagctgc	actgcccagc	cctcgtcacc	tacaacacag	780
acacctttga	gtccatgcac	aaccctgagg	gtcgctacac	ctttggtgcc	agctgcgtga	840
ccacctgccc	ctacaactac	ctgtctacgg	aagtgggagc	ctgcactctg	gtgtgtcccc	900
cgaataacca	agaggtcaca	gctgaggacg	gaacacagcg	ttgtgagaaa	tgcagcaagc	960
cctgtgctcg	agtgtgctat	ggctctgggca	tggagcacct	tcgaggggcg	agggccatca	1020
ccagtgacaa	tgtccaggag	tttgatggct	gcaagaagat	ctttgggagc	ctggcatttt	1080
tgccggagag	ctttgatggg	gacccctcct	ccggcattgc	tccgctgagg	cctgagcagc	1140
tccaagtgtt	cgaaaccctg	gaggagatca	caggttacct	gtacatctca	gcatggccag	1200
acagtctccg	tgacctcagt	gtcttccaga	accttcgaat	cattcgggga	cggattctcc	1260
acgatggcgc	gtactcattg	acactgcaag	gcctggggat	ccactcgctg	gggctgcgct	1320
cactgcggga	gctgggcagt	ggattggctc	tgattcaccg	caacgcccac	ctctgctttg	1380
tacacactgt	accttgggac	cagctcttcc	ggaaccacac	tcaggccctg	ctccacagtg	1440
ggaaccggcc	ggaagaggat	tgtgggtctcg	agggcttggt	ctgtaactca	ctgtgtgccc	1500
acgggcactg	ctggggggcca	ggggccaccc	agtgtgtcaa	ctgcagtcac	ttccttcggg	1560
gccaggagtg	tgtggaggag	tgccgagtat	ggaaggggct	ccccgggag	tatgtgagtg	1620
acaagcgctg	tctgccgtgt	caccccgagt	gtcagcctca	aaacagctca	gagacctgct	1680
ttggatcgga	ggctgatcag	tgtgcagcct	gcgcccacta	caaggactcg	tcctcctgtg	1740
tggctcgctg	ccccagtggg	gtgaaaccgg	acctctccta	catgcccata	tgggaagtacc	1800
cggatgagga	gggcatatgc	cagccgtgcc	ccatcaactg	caccactccc	tgtgtggatc	1860
tggatgaacg	aggctgcccc	gcagagcaga	gagccagccc	ggtgacattc	atcattgcaa	1920
ctgtagtggg	cgctctgctg	ttcctgatct	tagtggtggg	cggttgaatc	ctaatcaaac	1980
gaaggagaca	gaagatccgg	aagtatacga	tgcgtaggct	gctgcaggaa	actgagttag	2040
tggagccgct	gacgcccagc	ggagcaatgc	ccaaccaggc	tcagatgcgg	atcctaaaag	2100



```

agacggagct aaggaagggtg aagggtgcttg gatcaggagc ttttggcact gtctacaagg 2160
gcatctggat cccagatggg gagaatgtga aaatccccgt ggctatcaag gtgttgagag 2220
aaaacacatc tcctaaagcc aacaaagaaa ttctagatga agcgtatgtg atggctgggtg 2280
tgggttctcc gtatgtgtcc cgcctcctgg gcatctgcct gacatccaca gtacagctgg 2340
tgacacagct tatgccctac ggctgccttc tggaccatgt ccgagaacac cgaggctgcc 2400
taggctccca ggacctgctc aactgggtgtg ttcagattgc caaggggatg agctacctgg 2460
aggacgtgcg gcttgtagac agggacctgg ctgcccggaa tgtgctagtc aagagtccca 2520
accacgtcaa gattacagat ttcgggctgg ctcggtgct ggacattgat gagacagagt 2580
accatgcaga tgggggcaag gtgcccacat aatggatggc attggaatct attctcagac 2640
gccggttcac ccatcagagt gatgtgtgga gctatggagt gactgtgtgg gagctgatga 2700
cttttggggc caaaccttac gatggaatcc cagcccggga gatccctgat ttgctggaga 2760
agggagaacg cctacctcag cctccaatct gcaccattga tgtctacatg attatggtca 2820
aatgttggat gattgactct gaatgtcgcc cgagattccg ggagttgggtg tcagaatttt 2880
cacgtatggc gagggacccc cagcgttttg tggcatcca gaacgaggac ttggggccat 2940
ccagcccat ggacagtacc ttctaccgtt cactgctgga agatgatgac atgggtgacc 3000
tggtagacgc tgaagagtat ctggtgcccc agcagggtt cttctccccg gaccctaccc 3060
caggcactgg gagcacagcc catagaaggc accgcagctc gtccaccagg agtggagggtg 3120
gtgagctgac actgggcctg gagccctcgg aagaagggcc cccagatct cactggctc 3180
cctcggaagg ggctggctcc gatgtgtttg atggtgacct ggcaatgggg gtaaccaaag 3240
ggctgcagag cctctctcca catgacctca gccctctaca gcggtacagc gaggacccca 3300
cattacctct gcccccgag actgatggct atgttgctcc cctggcctgc agccccagc 3360
ccgagtatgt gaaccaatca gaggttcagc ctacgcctcc tttaaccca gagggctctc 3420
tgcctcctgt ccggcctgct ggtgctactc tagaaagacc caagactctc tctcctggga 3480
agaatggggt tgtcaaagac gtttttgcct tcgggggtgc tgtggagAAC cctgaatact 3540
tagtaccgag agaaggcact gcctctccgc cccacccttc tcctgccttc agccccagct 3600
ttgacaacct ctattactgg gaccagaact catcgagca ggggcctcca ccaagtaact 3660
ttgaagggac cccactgca gagaacctg agtacctagg cctggatgta cctgta 3716

```

<210> 46
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 褐家鼠

```

<400> 46
cccaggcaga accccagagg ggctgcggga gctgcagctt cgaagtctca cagagatcct 60

```

gaagggagga gttttgatcc gtgggaaccc tcagctctgc taccaggaca tggttttgtg	120
gaaggacgtc ttccgcaaga ataaccaact ggctcctgtc gatatagaca ccaatcgttc	180
ccgggcctgt ccaccttgtg ccccgccctg caaagacaat cactgttggg gtgagagtcc	240
ggaagactgt cagatcttga ctggcaccat ctgtaccagt ggttgtgccc ggtgcaaggg	300
ccggctgccc actgactgct gccatgagca gtgtgccgca ggctgcacgg gcccgaagca	360

<210> 47
 <211> 618
 <212> DNA
 <213> 褐家鼠

<400> 47	
ggtcacagct gaggacggaa cacagcgttg tgagaaatgc agcaagccct gtgctcgagt	60
gtgctatggg ctgggcatgg agcaccttcg aggggagagg gccatcacca gtgacaatgt	120
ccaggagttt gatggctgca agaagatctt tgggagcctg gcatttttgc cggagagctt	180
tgatggggac cctcctccg gcattgtctc gctgaggcct gagcagctcc aagtgttcga	240
aacctggag gagatcacag gttacctgta catctcagca tggccagaca gtctccgtga	300
cctcagtgtc ttccagaacc ttcgaatcat tcggggacgg attctccacg atggcgcgta	360
ctcattgaca ctgcaaggcc tggggatcca ctgctgagg ctgcgctcac tgcgggagct	420
gggcagtgga ttggctctga ttcaccgcaa cgcccatctc tgctttgtac acactgtacc	480
ttgggaccag ctcttccgga acccacatca ggccctgctc cacagtggga accggccgga	540
agaggattgt ggtctcgagg gcttggctctg taactcactg tgtgcccacg ggcactgctg	600
ggggccaggg cccaccca	618

<210> 48
 <211> 929
 <212> DNA
 <213> 褐家鼠

<400> 48	
cgcccagcgg agcaatgccc aaccaggctc agatgcggat cctaaaagag acggagctaa	60
ggaaggtgaa ggtgcttgga tcaggagctt ttggcactgt ctacaagggc atctggatcc	120
cagatgggga gaatgtgaaa atccccgtgg ctatcaagggt gttgagagaa aacacatctc	180
ctaaagccaa caaagaaatt ctataggaag cgtatgtgat ggctgggtgtg ggttctccgt	240
atgtgtcccc cctcctgggc atctgcctga catccacagt acagctggtg acacagctta	300
tgccctacgg ctgccttctg gaccatgtcc gagaacaccg aggtcgcccta ggctcccagg	360
acctgctcaa ctggtgtgtt cagattgcca aggggatgag ctacctggag gacgtgcggc	420
ttgtacacag ggacctggct gcccggaatg tgctagtcaa gagtcccaac cacgtcaaga	480
ttacagattt cgggctggct cggctgctgg acattgatga gacagagtac catgcagatg	540

```

ggggcaagggt gcccatcaaa tggatggcat tggaaatctat tctcagacgc cggttcaccc 600
atcagagtga tgtgtggagc tatggagtga ctgtgtggga gctgatgact tttggggcca 660
aaccttacga tggaaatccca gcccgggaga tccctgattt gctggagaag ggagaacgcc 720
tacctcagcc tccaatctgc accattgatg tctacatgat tatgggtcaaa tgttggatga 780
ttgactctga atgtcgcccc agattccggg agttgggtgtc agaattttca cgtatggcga 840
gggaccccca gcgtttttgtg gtcattccaga acgaggactt gggcccatcc agcccatgg 900
acagtacctt ctaccgttca ctgctggaa 929

```

<210> 49
 <211> 3798
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 49
atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctctctctcg cctctctgcc ccccgagacc 60
gcgagcacc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccag 120
accacactgg acatgtctcg ccacctctac cagggtctgc aggtgggtgca gggaaacctg 180
gaactcacct acctgccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240
cagggtctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg 300
attgtgagag gcacccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360
gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420
cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaacccccag 480
ctctgtctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540
ctcactctga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600
ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660
gccggtggct gtgcccgtg caaggggcca ctgcccactg actgctgcca tgagcagtgt 720
gctgccggct gcacggggcc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac 780
agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctgggtcacct acaacacaga cacgtttgag 840
tccatgcccc atcccagggg ccggtataca ttcggcgcca gctgtgtgac tgctgtctcc 900
tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcacccctg tctgccccct gcacaaccaa 960
gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020
gtgtgtctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagagggtga gggcagttac cagtgccaat 1080
atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140
tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200
gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260
gacctcagcg tcttcagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320

```

tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa	1380
ctgggcagt gactggccct catccaccat aacacccacc tctgcttcgt gcacacggtg	1440
ccctgggacc agctctttcg gaacccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca	1500
gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc	1560
tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc	1620
gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt	1680
ttgccgtgcc accctgagtgc tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag	1740
gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgtgc	1800
cccagcgtg tgaaacctga cctctcctac atgcccactc ggaagtttc agatgaggag	1860
ggcgcagtgc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag	1920
ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcgtctctgc ggtggttggc	1980
attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag	2040
aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgtg	2100
acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg	2160
aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc	2220
cctgatgggg agaattgtga aattccagt gccatcaaag tgttgaggga aaacacatcc	2280
cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggctggtgt gggctcccca	2340
tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt	2400
atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag	2460
gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg	2520
ctcgtacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca agagtccaa ccatgtcaaa	2580
attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat	2640
gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccg gcggttcacc	2700
caccagagt atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc	2760
aaaccttacg atgggatccc agccccggag atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg	2820
ctgccccagc ccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtcaa atgttgatg	2880
attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc ccgcatggcc	2940
agggaccccc agcgttttgt ggtcatccag aatgaggact tgggccagc cagtcccttg	3000
gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct	3060
gaggagtatc tggtagccca gcagggcttc ttctgtccag accctgcccc gggcgtggg	3120
ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca	3180
ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccagggtct cactggcacc ctccgaagg	3240



```

gctggctccg atgtatttga tggtagacctg ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc 3300
ctccccacac atgaccccgag ccctctacag cggtacagtg aggaccccac agtaccctg 3360
ccctctgaga ctgatggcta cgttgcccc ctgacctgca gccccagcc tgaatatgtg 3420
aaccagccag atgttcggcc ccagccccct tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc 3480
cgacctgctg gtgccactct ggaaagggcc aagactctct cccagggaa gaatggggtc 3540
gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacacccag 3600
ggaggagctg cccctcagcc ccaccctcct cctgccttca gcccagcctt cgacaacctc 3660
tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaagggaca 3720
cctacggcag agaaccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtgaac cagaaggcca 3780
agtccgcaga agccctga 3798

```

<210> 50
<211> 393
<212> DNA
<213> 智人

```

<400> 50
gagacccacc tggacatgct ccgccacctc taccagggt gccaggtggt gcagggaac 60
ctggaactca cctacctgcc caccaatgcc agcctgtcct tcctgcagga tatccaggag 120
gtgcagggt acgtgtcat cgctcacaac caagtgagge aggtccact gcagaggctg 180
cggattgtgc gaggcacca gctctttgag gacaactatg ccctggccgt gctagacaat 240
ggagaccgc tgaacaatac caccctgtc acaggggcct cccagaggag cctgcgggag 300
ctgcagcttc gaagcctcac agagatcttg aaaggagggg tcttgatcca gcggaacccc 360
cagctctgct accaggacac gattttgtgg aag 393

```

<210> 51
<211> 477
<212> PRT
<213> 智人

```

<400> 51
Ala Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly
1      5      10      15

Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr
20      25      30

Cys Thr Thr Thr Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Cys Ala
35      40      45

Thr Thr Thr Cys Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Ala Gly Cys Thr
50      55      60

```

Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Cys
 65 70 75 80
 Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Gly
 85 90 95
 Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys
 100 105 110
 Thr Cys Cys Ala Ala Gly Thr Gly Thr Thr Thr Gly Ala Gly Ala Cys
 115 120 125
 Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Cys Ala
 130 135 140
 Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Thr Ala Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr
 145 150 155 160
 Cys Ala Gly Cys Ala Thr Gly Gly Cys Cys Gly Gly Ala Cys Ala Gly
 165 170 175
 Cys Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys
 180 185 190
 Gly Thr Cys Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Cys
 195 200 205
 Ala Ala Gly Thr Ala Ala Thr Cys Cys Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly
 210 215 220
 Ala Ala Thr Thr Cys Thr Gly Cys Ala Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys
 225 230 235 240
 Gly Cys Cys Thr Ala Cys Thr Cys Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys
 245 250 255
 Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr
 260 265 270
 Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly
 275 280 285
 Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Thr Gly Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys
 290 295 300
 Thr Gly Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys
 305 310 315 320



Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Ala Ala Cys
325 330 335
Ala Cys Cys Cys Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly Cys Thr Thr Cys Gly
340 345 350
Thr Gly Cys Ala Cys Ala Cys Gly Gly Thr Gly Cys Cys Cys Thr Gly
355 360 365
Gly Gly Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Cys Thr Thr Thr Cys Gly Gly
370 375 380
Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Cys
385 390 395 400
Thr Gly Cys Thr Cys Cys Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala Ala
405 410 415
Cys Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Ala Gly Gly Ala Cys Gly Ala Gly
420 425 430
Thr Gly Thr Gly Thr Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys
435 440 445
Thr Gly Gly Cys Cys Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr
450 455 460
Gly Thr Gly Cys Gly Cys Cys Cys Gly Ala Gly Gly Gly
465 470 475

<210> 52
<211> 391
<212> DNA
<213> 智人

<400> 52
cagcagaaga tccggaagta cacgatgctg agactgctgc aggaaacgga gctggtggag 60
ccgctgacac ctagcggagc gatgcccaac caggcgcaga tgcggatcct gaaagagacg 120
gagctgagga aggtgaaggt gcttggatct ggcgcttttg gcacagtcta caagggcatc 180
tggatccctg atggggagaa tgtgaaaatt ccagtggcca tcaaagtgtt gagggaaaac 240
acatccccc aagccaacaa agaaatctta gacgaagcat acgtgatggc tgggtgtggc 300
tccccatatg tctccgcct tctgggcatc tgcctgacat ccacggtgca gctggtgaca 360
cagcttatgc cctatggctg cctcttagac t 391

<210> 53

<211> 7075
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> pAdv164 之質粒序列

<400> 53
 cggagtgtat actggcttac tatgttggca ctgatgaggg tgtcagtga gtgcttcatg 60
 tggcaggaga aaaaaggctg caccggtgcg tcagcagaat atgtgataca ggatatattc 120
 cgcttcctcg ctactgact cgctacgctc ggctcggtcga ctgcggcgag cggaaatggc 180
 ttacgaacgg ggcggagatt tcctggaaga tgccaggaag atacttaaca gggaagtgag 240
 agggccgcgg caaagccgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc 300
 tgacgctcaa atcagtgggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 360
 cctggcggct ccctcgtgcg ctctcctgtt cctgcctttc ggtttaccgg tgtcattccg 420
 ctgttatggc cgcgtttgtc tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg 480
 ctccaagctg gactgtatgc acgaaccccc cgttcagtcc gaccgctgcg ctttatccgg 540
 taactatcgt cttgagtcca acccggaag acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac 600
 tggtaattga tttagaggag ttagtcttga agtcatgcmc cggttaaggc taaactgaaa 660
 ggacaagttt tggtgactgc gctcctccaa gccagttacc tcggttcaaa gagttggtag 720
 ctcagagaac cttcgaaaaa ccgccctgca aggcggtttt ttcgttttca gagcaagaga 780
 ttacgcgcag accaaaacga tctcaagaag atcatcttat taatcagata aaatatttct 840
 agccctcctt tgattagtat attcctatct taaagttact tttatgtgga ggcattaaca 900
 tttgttaatg acgtcaaaaag gatagcaaga ctagaataaa gctataaagc aagcatataa 960
 tattgcgttt catctttaga agcgaatttc gccaatatta taattatcaa aagagagggg 1020
 tggcaaacgg tatttggcat tattagggtta aaaaatgtag aaggagagtg aaacccatga 1080
 aaaaaataat gctagttttt attacactta tattagttag tctaccaatt gcgcaacaaa 1140
 ctgaagcaaa ggatgcatct gcattcaata aagaaaattc aatttcatcc atggcaccac 1200
 cagcatctcc gcctgcaagt cctaagacgc caatcgaaaa gaaacacgcg gatgaaatcg 1260
 ataagtatat acaaggattg gattacaata aaaacaatgt attagtatac cacggagatg 1320
 cagtgacaaa tgtgccgcca agaaaagggtt acaaagatgg aaatgaatat attgttgtgg 1380
 agaaaaagaa gaaatccatc aatcaaaaata atgcagacat tcaagttgtg aatgcaattt 1440
 cgagcctaac ctatccaggt gctctcgtaa aagcgaattc ggaattagta gaaaatcaac 1500
 cagatgttct ccctgtaaaa cgtgattcat taacactcag cattgatttg ccaggtatga 1560
 ctaatcaaga caataaaaata gttgtaaaaa atgccactaa atcaaacgtt aacaacgcag 1620
 taaatacatt agtggaaaga tggaatgaaa aatatgctca agcttatcca aatgtaagtg 1680



caaaaattga	ttatgatgac	gaaatggcctt	acagtgaatc	acaattaatt	gcgaaatttg	1740
gtacagcatt	taaagctgta	aataatagct	tgaatgtaaa	cttcggcgca	atcagtgaag	1800
ggaaaatgca	agaagaagtc	attagtttta	aacaaattta	ctataacgtg	aatgttaatg	1860
aacctacaag	accttccaga	tttttcggca	aagctgttac	taaagagcag	ttgcaagcgc	1920
ttggagtgaa	tgcagaaaat	cctcctgcat	atatctcaag	tgtggcgtat	ggccgtcaag	1980
tttatttgaa	attatcaact	aattcccata	gtactaaagt	aaaagctgct	tttgatgctg	2040
ccgtaagcgg	aaaatctgtc	tcagggtgatg	tagaactaac	aaatatcatc	aaaaattcct	2100
ccttcaaagc	cgtaattttac	ggaggttccg	caaaagatga	agttcaaatc	atcgacggca	2160
acctcggaga	cttacgcgat	attttgaaaa	aaggcgctac	ttttaatcga	gaaacaccag	2220
gagttcccat	tgcttataca	acaaacttcc	taaaagacaa	tgaattagct	gttattaaaa	2280
acaactcaga	atatattgaa	acaacttcaa	aagcttatac	agatggaaaa	attaacatcg	2340
atcactctgg	aggatacggt	gctcaattca	acatttcttg	ggatgaagta	aattatgatc	2400
tcgagaccca	cctggacatg	ctccgccacc	tctaccaggg	ctgccagggtg	gtgcagggaa	2460
acctggaact	cacctacctg	cccaccaatg	ccagcctgtc	cttcctgcag	gatatccagg	2520
aggtgcaggg	ctacgtgctc	atcgctcaca	accaagtgag	gcaggtccca	ctgcagaggc	2580
tgcggattgt	gcgaggcacc	cagctctttg	aggacaacta	tgccctggcc	gtgctagaca	2640
atggagaccc	gctgaacaat	accacccctg	tcacaggggc	ctccccagga	ggcctgcggg	2700
agctgcagct	tcgaagcctc	acagagatct	tgaaggagg	ggtcttgatc	cagcggaaacc	2760
cccagctctg	ctaccaggac	acgattttgt	ggaagaatat	ccaggagttt	gctggctgca	2820
agaagatctt	tgggagcctg	gcatttctgc	cggagagctt	tgatggggac	ccagcctcca	2880
acactgcccc	gctccagcca	gagcagctcc	aagtgtttga	gactctggaa	gagatcacag	2940
gttacctata	catctcagca	tggccggaca	gcctgcctga	cctcagcgtc	ttccagaacc	3000
tgcaagtaat	ccggggacga	attctgcaca	atggcgcccta	ctcgctgacc	ctgcaagggc	3060
tgggcatcag	ctggctgggg	ctgcgctcac	tgagggaact	gggcagtgga	ctggccctca	3120
tccaccataa	caccacctc	tgcttcgtgc	acacgggtgcc	ctgggaccag	ctctttcgga	3180
acccgcacca	agctctgctc	cacactgcca	accggccaga	ggacgagtgt	gtgggcgagg	3240
gcctggcctg	ccaccagctg	tgcgcccag	ggcagcagaa	gatccggaag	tacacgatgc	3300
ggagactgct	gcaggaaacg	gagctggtgg	agccgctgac	acctagcgga	gcgatgcccc	3360
accaggcgca	gatgcggatc	ctgaaagaga	cggagctgag	gaagggtgaag	gtgcttggat	3420
ctggcgcttt	tggcacagtc	tacaagggca	tctggatccc	tgatggggag	aatgtgaaaa	3480
ttccagtggc	catcaaagtg	ttgagggaaa	acacatcccc	caaagccaac	aaagaaatct	3540
tagacgaagc	atacgtgatg	gctgggtgtgg	gctccccata	tgtctcccg	cttctgggca	3600

tctgcctgac atccacggtg cagctggtga cacagcttat gccctatggc tgcctcttag	3660
actaatctag acccgggcca ctaactcaac gctagtagtg gatttaatcc caaatgagcc	3720
aacagaacca gaaccagaaa cagaacaagt aacattggag ttagaaatgg aagaagaaaa	3780
aagcaatgat ttcgtgtgaa taatgcacga aatcattgct tattttttta aaaagcgata	3840
tactagatat aacgaaacaa cgaactgaat aaagaataca aaaaaagagc cacgaccagt	3900
taaagcctga gaaactttaa ctgcgagcct taattgatta ccaccaatca attaaagaag	3960
tcgagaccca aaatttggtg aagtatttaa ttactttatt aatcagatac ttaaatatct	4020
gtaaacccat tatatcgggt ttttgagggg atttcaagtc tttaagaaga taccaggcaa	4080
tcaattaaga aaaacttagt tgattgcctt ttttgttgtg attcaacttt gatcgtagct	4140
tctaactaat taattttcgt aagaaaggag aacagctgaa tgaatatccc ttttgttgta	4200
gaaactgtgc ttcattgacgg cttgttaaag taaaaattta aaaatagtaa aattcgctca	4260
atcactacca agccaggtaa aagtaaaggg gctatttttg cgtatcgctc aaaaaaagc	4320
atgattggcg gacgtggcgt tgttctgact tccgaagaag cgattcacga aaatcaagat	4380
acatttacgc attggacacc aaacgtttat cgttatggta cgtatgcaga cgaaaaccgt	4440
tcataacta aaggacattc tgaaaacaat ttaagacaaa tcaatacctt ctttattgat	4500
tttgatattc acacggaaaa agaaactatt tcagcaagcg atattttaac aacagctatt	4560
gatttaggtt ttatgcctac gttaattatc aaatctgata aaggttatca agcatatttt	4620
gttttagaaa cgccagtcta tgtgacttca aaatcagaat ttaaactctgt caaagcagcc	4680
aaaataatct cgcaaaatat ccgagaatat tttggaaagt ctttgccagt tgatctaacg	4740
tgcaatcatt ttgggattgc tcgtatacca agaacggaca atgtagaatt ttttgatccc	4800
aattaccgtt atttcttcaa agaattggcaa gattggtctt tcaaacaaac agataataag	4860
ggctttactc gttcaagtct aacggtttta agcggtagag aaggcaaaaa acaagtagat	4920
gaaccctggt ttaatctctt attgcacgaa acgaaatttt caggagaaaa gggtttagta	4980
gggcgcaata gcgttatgtt taccctctct ttagcctact ttagttcagg ctattcaatc	5040
gaaacgtgcg aatataatat gtttgagttt aataatcgat tagatcaacc cttagaagaa	5100
aaagaagtaa tcaaaattgt tagaagtgcc tattcagaaa actatcaagg ggctaatagg	5160
gaatacatta ccattctttg caaagcttgg gtatcaagtg atttaaccag taaagattta	5220
tttggtccgtc aagggtgggt taaattcaag aaaaaagaa gcgaacgtca acgtgttcat	5280
ttgtcagaat ggaaagaaga tttaatggct tatattagcg aaaaaagcga tgtatacaag	5340
ccttatttag cgacgaccaa aaaagagatt agagaagtgc taggcatttc tgaacggaca	5400
ttagataaat tgctgaagggt actgaaggcg aatcaggaaa ttttctttaa gattaaacca	5460
ggaagaaatg gtggcattca acttgctagt gttaaatcat tgttgctatc gatcattaa	5520

```

ttaaaaaaag aagaacgaga aagctatata aaggcgctga cagcttcggt taatttagaa 5580
cgtacattta ttcaagaaac tctaaacaaa ttggcagaac gccccaaaac ggaccacaa 5640
ctcgatttgt ttagctacga tacaggctga aaataaaacc cgcactatgc cattacattt 5700
atatctatga tacgtgtttg tttttctttg ctggctagct taattgctta tatttacctg 5760
caataaagga tttcttactt ccattatact cccattttcc aaaaacatac ggggaacacg 5820
ggaacttatt gtacaggcca cctcatagtt aatggtttcg agccttcctg caatctcatc 5880
catggaaata tattcatccc cctgccggcc tattaatgtg acttttgtgc ccggcggata 5940
ttcctgatcc agctccacca taaattgggt catgcaaatt cggccggcaa ttttcaggcg 6000
ttttcccttc acaaggatgt cgggtccctt caattttcgg agccagccgt ccgcatagcc 6060
tacaggcacc gtcccgatcc atgtgtcttt ttccgctgtg tactcggctc cgtagctgac 6120
gctctcgctt tttctgatca gtttgacatg tgacagtgtc gaatgcaggg taaatgccgg 6180
acgcagctga aacggatatc cgtccgacat gtcagcagac gggcgaaggc catacatgcc 6240
gatgccgaat ctgactgcat taaaaaagcc ttttttcagc cggagtccag cggcgctgtt 6300
cgcgcagtgg accattagat tctttaacgg cagcggagca atcagctctt taaagcgctc 6360
aaactgcatt aagaaatagc ctctttcttt ttcatccgtg gtcgcaaaat gggtaaatac 6420
ccctttgcac tttaaacgag ggttgcggtc aagaattgcc atcacgttct gaacttcttc 6480
ctctgttttt acaccaagtc tgttcatccc cgtatcgacc ttcagatgaa aatgaagaga 6540
accttttttc gtgtggcggg ctgcctcctg aagccattca acagaataac ctgttaaggt 6600
cacgtcatac tcagcagcga ttgccacata ctccggggga accgcgcaa gcaccaatat 6660
aggcgcttc aatccctttt tgcgcagtga aatcgcttca tccaaaatgg ccacggccaa 6720
gcatgaagca cctgcgtcaa gagcagcctt tgctgtttct gcatcaccat gcccgtaggc 6780
gtttgctttc acaactgcc acaagtggac atgttcaccg atatgttttt tcatattgct 6840
gacattttcc tttatcgcg acaagtcaat ttccgcccac gtatctctgt aaaaagggtt 6900
tgtgctcatg gaaaactcct ctcttttttc agaaaatccc agtacgtaat taagtatttg 6960
agaattaatt ttatattgat taatactaag tttaccaggt tttcacctaa aaaacaaatg 7020
atgagataat agctccaaag gctaaagagg actataccaa ctatttggtta attaa 7075

```

```

<210> 54
<211> 921
<212> DNA
<213> 智人

```

```

<400> 54
gccgcgagca cccaagtgtg caccggcaca gacatgaagc tgcggctccc tgccagtccc 60
gagaccacc tggacatgct ccgccacctc taccagggtg gccagggtgg gcagggaaac 120
ctggaactca cctacctgcc caccaatgcc agcctgtcct tcctgcagga tatccaggag 180

```

```

gtgcagggct acgtgctcat cgctcacaac caagtgaggc aggtcccact gcagaggctg 240
cggattgtgc gaggcaccca gctctttgag gacaactatg ccctggccgt gctagacaat 300
ggagacccgc tgaacaatac caccctgtc acaggggcct ccccaggagg cctgcgggag 360
ctgcagcttc gaagcctcac agagatcttg aaaggagggg tcttgatcca gcggaacccc 420
cagctctgct accaggacac gattttgtgg aaggacatct tccacaagaa caaccagctg 480
gctctcacac tgatagacac caaccgctct cgggcctgcc acccctgttc tccgatgtgt 540
aagggctccc gctgctgggg agagagtctt gaggattgtc agagcctgac gcgcaactgtc 600
tgtgccggtg gctgtgcccc ctgcaagggg ccactgcccc ctgactgctg ccatgagcag 660
tgtgctgccg gctgcacggg cccaagcac tctgactgcc tggcctgcct ccacttcaac 720
cacagtggca tctgtgagct gcactgcccc gccctgggtca cctacaacac agacacgttt 780
gagtccatgc ccaatcccga gggccggtat acattcggcg ccagctgtgt gactgcctgt 840
ccctacaact acctttctac ggacgtggga tcctgcaccc tcgtctgccc cctgcacaac 900
caagaggtga cagcagagga t 921

```

<210> 55
 <211> 597
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 55
tacctttcta cggacgtggg atcctgcacc ctgctctgcc ccctgcacaa ccaagaggtg 60
acagcagagg atggaacaca gcggtgtgag aagtgcagca agccctgtgc ccgagtgtgc 120
tatggtctgg gcatggagca cttgcgagag gtgagggcag ttaccagtgc caatatccag 180
gagtttctgt gctgcaagaa gatctttggg agcctggcat ttctgcgga gagctttgat 240
ggggacccag cctccaacac tgccccgctc cagccagagc agctccaagt gtttgagact 300
ctggaagaga tcacaggtta cctatacatc tcagcatggc cggacagcct gcctgacctc 360
agcgtcttcc agaacctgca agtaatccgg ggacgaattc tgcacaatgg cgcctactcg 420
ctgaccctgc aagggctggg catcagctgg ctggggctgc gctcactgag ggaactgggc 480
agtggactgg ccctcatcca ccataacacc cacctctgct tcgtgcacac ggtgccctgg 540
gaccagctct ttcggaaccc gcaccaagct ctgctccaca ctgccaaccg gccagag 597

```

<210> 56
 <211> 1209
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 56
cagcagaaga tccggaagta cacgatgcgg agactgctgc aggaaacgga gctggtggag 60
ccgctgacac ctagcggagc gatgccaac caggcgcaga tgcggatcct gaaagagacg 120

```



```

gagctgagga aggtgaaggt gcttggaatct ggcgccttttg gcacagtcta caagggcatc      180
tggatccctg atggggagaa tgtgaaaatt ccagtggcca tcaaagtgtt gagggaaaac      240
acatcccca aagccaacaa agaaatctta gacgaagcat acgtgatggc tgggtgtgggc      300
tccccatatg tctcccgctt tctgggcatc tgcctgacat ccacggtgca gctggtgaca      360
cagcttatgc cctatggctg cctcttagac catgtccggg aaaaccgcgg acgcctgggc      420
tcccaggacc tgctgaactg gtgtatgcag attgccaagg ggatgagcta cctggaggat      480
gtgcggtctg tacacagga cttggccgct cggaacgtgc tggtaagag tccaaccat      540
gtcaaaatta cagacttcgg gctggctcgg ctgctggaca ttgacgagac agagtaccat      600
gcagatgggg gcaaggtgcc catcaagtgg atggcgctgg agtccattct ccgccggcgg      660
ttcaccacc agagtgatgt gtggagttat ggtgtgactg tgtgggagct gatgactttt      720
ggggccaaac cttacgatgg gatcccagcc cgggagatcc ctgacctgct ggaaaagggg      780
gagcggctgc cccagcccc catctgcacc attgatgtct acatgatcat ggtcaaatgt      840
tggatgattg actctgaatg tcggccaaga ttccgggagt tgggtgtctga attctccgc      900
atggccaggg accccagcg ctttgtggtc atccagaatg aggacttggg cccagccagt      960
cccttgaca gcaccttcta ccgctcactg ctggaggacg atgacatggg ggacctggtg     1020
gatgctgagg agtatctggt accccagcag ggcttcttct gtccagacct tgccccgggc     1080
gctgggggca tgggtccacca caggcaccgc agctcatcta ccaggagtgg cgggtggggac     1140
ctgacactag ggctggagcc ctctgaagag gaggcccca ggtctccact ggcaccctcc     1200
gaaggggct                                     1209

```

<210> 57
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Her-2-嵌合體(F)

<400> 57
 tgatctcgag acccacctgg acatgctc 28

<210> 58
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HerEC1-EC2F (接合區)

<400> 58
 ctaccaggac acgattttgt ggaagaatat ccaggagttt gctggctgc 49

<210> 59
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HerEC1-EC2R (接合區)

<400> 59
 gcagccagca aactcctgga tattcttcca caaaatcgtg tcctggtag 49

<210> 60
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HerEC2-ICIF (接合區)

<400> 60
 ctgccaccag ctgtgcgccc gagggcagca gaagatccgg aagtacacga 50

<210> 61
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HerEC2-ICIR (接合區)

<400> 61
 tcgtgtactt ccggatcttc tgctgccctc gggcgcacag ctggtggcag 50

<210> 62
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Her-2-嵌合體(R)

<400> 62
 gtggcccggg tctagattag tctaagaggc agccatagg 39

<210> 63
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Her-2-EC1(F)

<400> 63
 ccgcctcgag gccgcgagca cccaagtg 28

<210> 64
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列



<220>
<223> Her-2-EC1(R)
<400> 64
cgcgactagt ttaatcctct gctgtcacct c 31

<210> 65
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Her-2-EC2(F)
<400> 65
ccgcctcgag tacctttcta cggacgtg 28

<210> 66
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Her- 2- EC2(R)
<400> 66
cgcgactagt ttactctggc cggttggcag 30

<210> 67
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Her-2-Her-2-IC1(F)
<400> 67
ccgcctcgag cagcagaaga tccggaagta c 31

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Her-2-IC1(R)
<400> 68
cgcgactagt ttaagcccct tcggagggtg 30

申請專利範圍

1. 一種治療非人類動物之表現Her-2/neu之腫瘤生長或癌症之方法，該方法包含投與包含編碼融合多肽之核酸分子之重組李斯特菌(*Listeria*)之步驟，其中該融合多肽包含融合至另一輔助多肽之Her2/neu嵌合抗原。
2. 如請求項1之方法，其中該非人類動物係狗。
3. 如請求項1之方法，其中將該融合多肽投與患有表現Her2/neu之腫瘤之個體預防該腫瘤內之逃脫突變。
4. 如請求項1之方法，其中該核酸分子包含編碼該免疫原性組合物之第一開放閱讀框，其中該核酸分子位於該重組李斯特菌疫苗菌株內。
5. 如請求項4之方法，其中該核酸分子進一步包含編碼代謝酶之第二開放閱讀框，且其中該代謝酶與該重組李斯特菌疫苗菌株之染色體中缺少之內源基因互補。
6. 如請求項1之方法，其中該Her2/neu嵌合抗原包含至少5、9、13、14或17個已定位人類MHC-I類表位。
7. 如請求項4之方法，其中該核酸分子整合至該李斯特菌基因組中。
8. 如請求項4之方法，其中該核酸分子位於該重組李斯特菌疫苗菌株之質粒中。
9. 如請求項8之方法，其中該質粒在不存在抗生素篩選時穩定維持在該重組李斯特菌疫苗菌株中。
10. 如請求項8之方法，其中該質粒不賦予該重組李斯特菌抗生素抗性。
11. 如請求項1之方法，其中該重組李斯特菌菌株經減毒。

12. 如請求項1之方法，其中該重組李斯特菌缺少ActA毒力基因。
13. 如請求項1之方法，其中該另一多肽係非溶血LLO蛋白質或N-末端片段。
14. 如請求項1之方法，其中該另一多肽係PEST序列。
15. 如請求項1之方法，其中該另一多肽係N-末端ActA片段。
16. 如請求項13至15中任一項之方法，其中該另一多肽融合至該Her2/neu嵌合抗原。
17. 如請求項5之方法，其中該第二開放閱讀框編碼之該代謝酶係胺基酸代謝酶。
18. 如請求項5之方法，其中該第二開放閱讀框編碼之該代謝酶係丙胺酸消旋酶或D-胺基酸轉移酶。
19. 如請求項5之方法，其中該核酸分子進一步包含第三開放閱讀框。
20. 如請求項19之方法，其中該第三開放閱讀框編碼之該代謝酶係D-胺基酸轉移酶或丙胺酸消旋酶。
21. 如請求項1之方法，其中該重組李斯特菌菌株已經由動物宿主繼代。
22. 如請求項1之方法，其進一步包含獨立佐劑。
23. 如請求項22之方法，其中該佐劑包含顆粒球/巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)蛋白質、編碼GM-CSF蛋白質之核苷酸分子、皂素QS21、單磷醯脂A或含有未甲基化CpG之寡核苷酸。
24. 如請求項1之方法，其中該腫瘤係Her2/neu陽性腫瘤。
25. 如請求項1之方法，其中該癌症係表現Her2/neu之癌症。
26. 如請求項1之方法，其中該癌症係骨肉瘤、卵巢癌、胃癌或中樞神經系統(CNS)癌症。
27. 如請求項1之方法，其中該骨肉瘤癌症係犬科骨肉瘤。

28. 一種預防非人類動物之表現Her-2/neu之腫瘤生長或癌症之方法，該方法包含投與包含編碼融合多肽之核酸之重組李斯特菌之步驟，其中該融合多肽包含融合至另一輔助多肽之Her2/neu嵌合抗原。
29. 如請求項28之方法，其中該非人類動物係狗。
30. 如請求項28之方法，其中將該融合多肽投與患有表現Her2/neu之腫瘤之個體預防該腫瘤內之逃脫突變。
31. 如請求項28之方法，其中該核酸分子包含編碼該免疫原性組合物之第一開放閱讀框，其中該核酸分子位於該重組李斯特菌疫苗菌株內。
32. 如請求項31之方法，其中該核酸分子進一步包含編碼代謝酶之第二開放閱讀框，且其中該代謝酶與該重組李斯特菌疫苗菌株之染色體中缺少之內源基因互補。
33. 如請求項28之方法，其中該Her2/neu嵌合抗原包含至少5、9、13、14或17個已定位人類MHC-I類表位。
34. 如請求項32之方法，其中該核酸分子整合至該李斯特菌基因組中。
35. 如請求項32之方法，其中該核酸分子位於該重組李斯特菌疫苗菌株之質粒中。
36. 如請求項35之方法，其中該質粒在不存在抗生素篩選時穩定維持在該重組李斯特菌疫苗菌株中。
37. 如請求項35之方法，其中該質粒不賦予該重組李斯特菌抗生素抗性。
38. 如請求項28之方法，其中該重組李斯特菌菌株經減毒。
39. 如請求項28之方法，其中該重組李斯特菌缺少ActA毒力基因。
40. 如請求項28之方法，其中該另一多肽係非溶血LLO蛋白質或N-末

端片段。

41. 如請求項28之方法，其中該另一多肽係PEST序列。
42. 如請求項28之方法，其中該另一多肽係N-末端ActA片段。
43. 如請求項40至42中任一項之方法，其中該另一多肽融合至該Her2/neu嵌合抗原。
44. 如請求項32之方法，其中該第二開放閱讀框編碼之該代謝酶係胺基酸代謝酶。
45. 如請求項32之方法，其中該第二開放閱讀框編碼之該代謝酶係丙胺酸消旋酶或D-胺基酸轉移酶。
46. 如請求項32之方法，其中該核酸分子進一步包含第三開放閱讀框。
47. 如請求項46之方法，其中該第三開放閱讀框編碼之該代謝酶係D-胺基酸轉移酶或丙胺酸消旋酶。
48. 如請求項28之方法，其中該重組李斯特菌菌株已經由動物宿主繼代。
49. 如請求項28之方法，其進一步包含獨立佐劑。
50. 如請求項49之方法，其中該佐劑包含顆粒球/巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)蛋白質、編碼GM-CSF蛋白質之核苷酸分子、皂素QS21、單磷醯脂A或含有未甲基化CpG之寡核苷酸。
51. 如請求項28之方法，其中該腫瘤係Her2/neu陽性腫瘤。
52. 如請求項28之方法，其中該癌症係表現Her2/neu之癌症。
53. 如請求項28之方法，其中該癌症係骨肉瘤、卵巢癌、胃癌或中樞神經系統(CNS)癌症。
54. 如請求項28之方法，其中該骨肉瘤癌症係犬科骨肉瘤。
55. 一種引發針對非人類動物之表現Her-2/neu之腫瘤生長或癌症之增強免疫反應之方法，該方法包含投與包含編碼融合多肽之核

酸之重組李斯特菌之步驟，其中該融合多肽包含融合至另一輔助多肽之Her2/neu嵌合抗原。

56. 如請求項55之方法，其中該非人類動物係狗。
57. 如請求項55之方法，其中將該融合多肽投與患有表現Her2/neu之腫瘤之個體預防該腫瘤內之逃脫突變。
58. 如請求項55之方法，其中該核酸分子包含編碼該免疫原性組合物之第一開放閱讀框，其中該核酸分子位於該重組李斯特菌疫苗菌株內。
59. 如請求項58之方法，其中該核酸分子進一步包含編碼代謝酶之第二開放閱讀框，且其中該代謝酶與該重組李斯特菌疫苗菌株之染色體中缺少之內源基因互補。
60. 如請求項55之方法，其中該Her2/neu嵌合抗原包含至少5、9、13、14或17個已定位人類MHC-I類表位。
61. 如請求項58之方法，其中該核酸分子整合至該李斯特菌基因組中。
62. 如請求項58之方法，其中該核酸分子位於該重組李斯特菌疫苗菌株之質粒中。
63. 如請求項62之方法，其中該質粒在不存在抗生素篩選時穩定維持在該重組李斯特菌疫苗菌株中。
64. 如請求項62之方法，其中該質粒不賦予該重組李斯特菌抗生素抗性。
65. 如請求項55之方法，其中該重組李斯特菌菌株經減毒。
66. 如請求項55之方法，其中該重組李斯特菌缺少ActA毒力基因。
67. 如請求項55之方法，其中該另一多肽係非溶血LLO蛋白質或N-末端片段。
68. 如請求項55之方法，其中該另一多肽係PEST序列。

69. 如請求項55之方法，其中該另一多肽係N-末端ActA片段。
70. 如請求項67至69中任一項之方法，其中該另一多肽融合至該Her2/neu嵌合抗原。
71. 如請求項59之方法，其中該第二開放閱讀框編碼之該代謝酶係胺基酸代謝酶。
72. 如請求項59之方法，其中該第二開放閱讀框編碼之該代謝酶係丙胺酸消旋酶或D-胺基酸轉移酶。
73. 如請求項59之方法，其中該核酸分子進一步包含第三開放閱讀框。
74. 如請求項73之方法，其中該第三開放閱讀框編碼之該代謝酶係D-胺基酸轉移酶或丙胺酸消旋酶。
75. 如請求項55之方法，其中該重組李斯特菌菌株已經由動物宿主繼代。
76. 如請求項55之方法，其進一步包含獨立佐劑。
77. 如請求項76之方法，其中該佐劑包含顆粒球/巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)蛋白質、編碼GM-CSF蛋白質之核苷酸分子、皂素QS21、單磷醯脂A或含有未甲基化CpG之寡核苷酸。
78. 如請求項55之方法，其中該腫瘤係Her2/neu陽性腫瘤。
79. 如請求項55之方法，其中該癌症係表現Her2/neu之癌症。
80. 如請求項55之方法，其中該癌症係骨肉瘤、卵巢癌、胃癌或中樞神經系統(CNS)癌症。
81. 如請求項55之方法，其中該骨肉瘤癌症係犬科骨肉瘤。
82. 如請求項1、28或55中任一項之方法，其中針對該表現Her2/neu之腫瘤之該免疫反應包含針對該Her2/neu蛋白質之亞優勢表位之免疫反應。

圖式

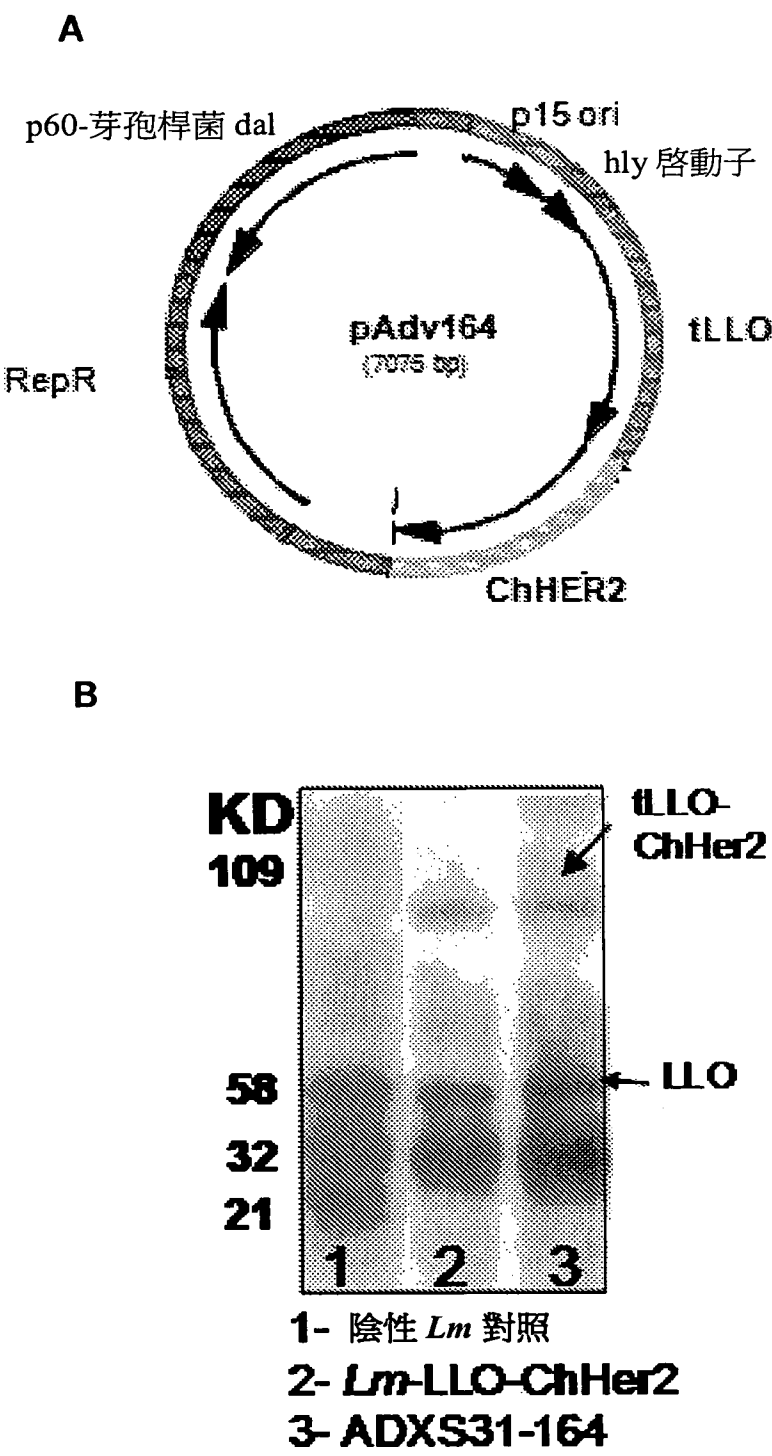


圖 1

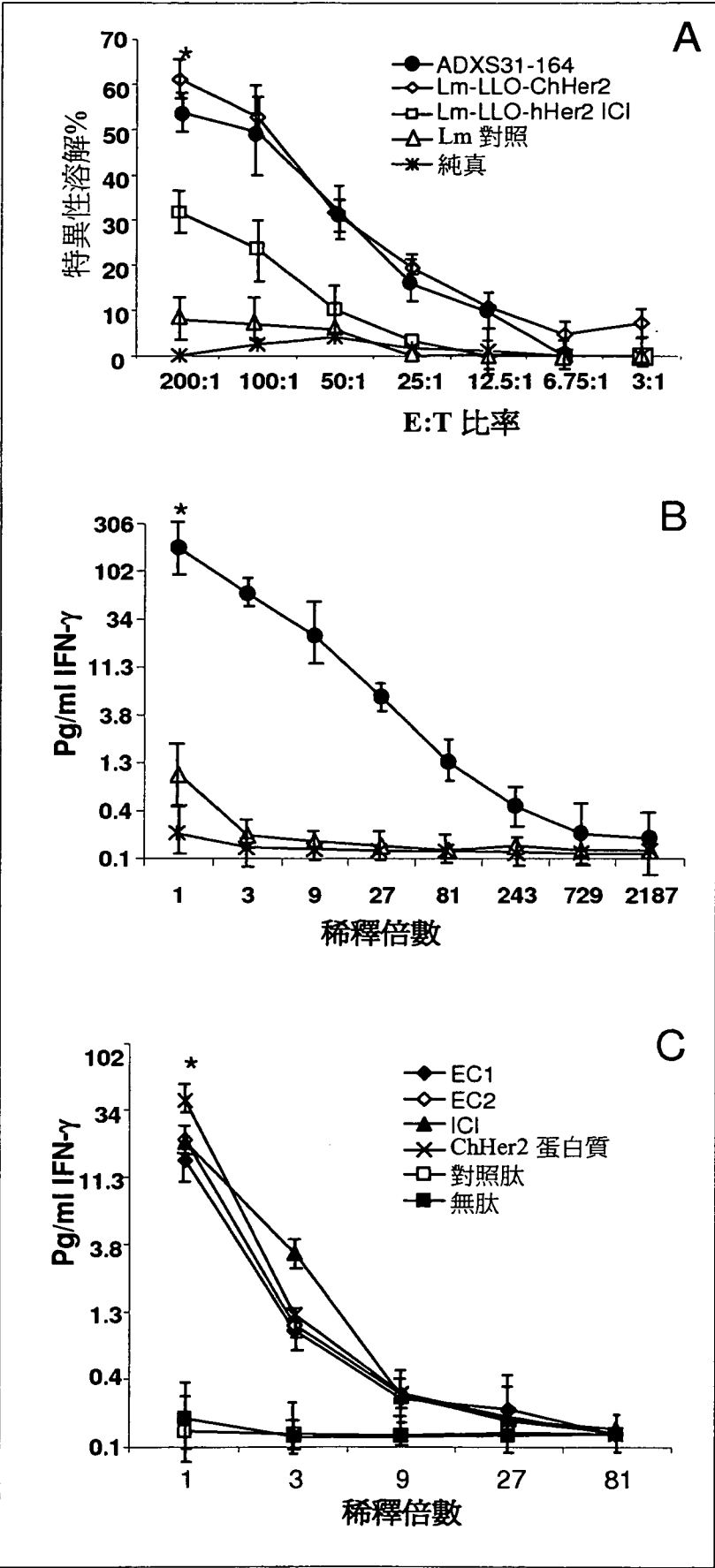


圖 2



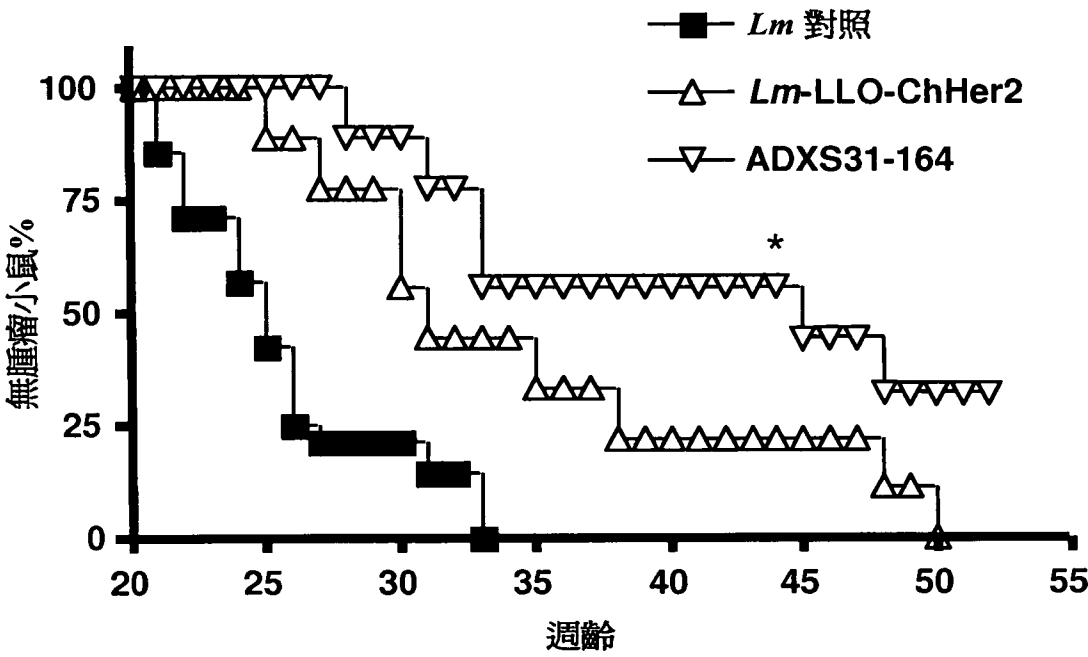


圖 3

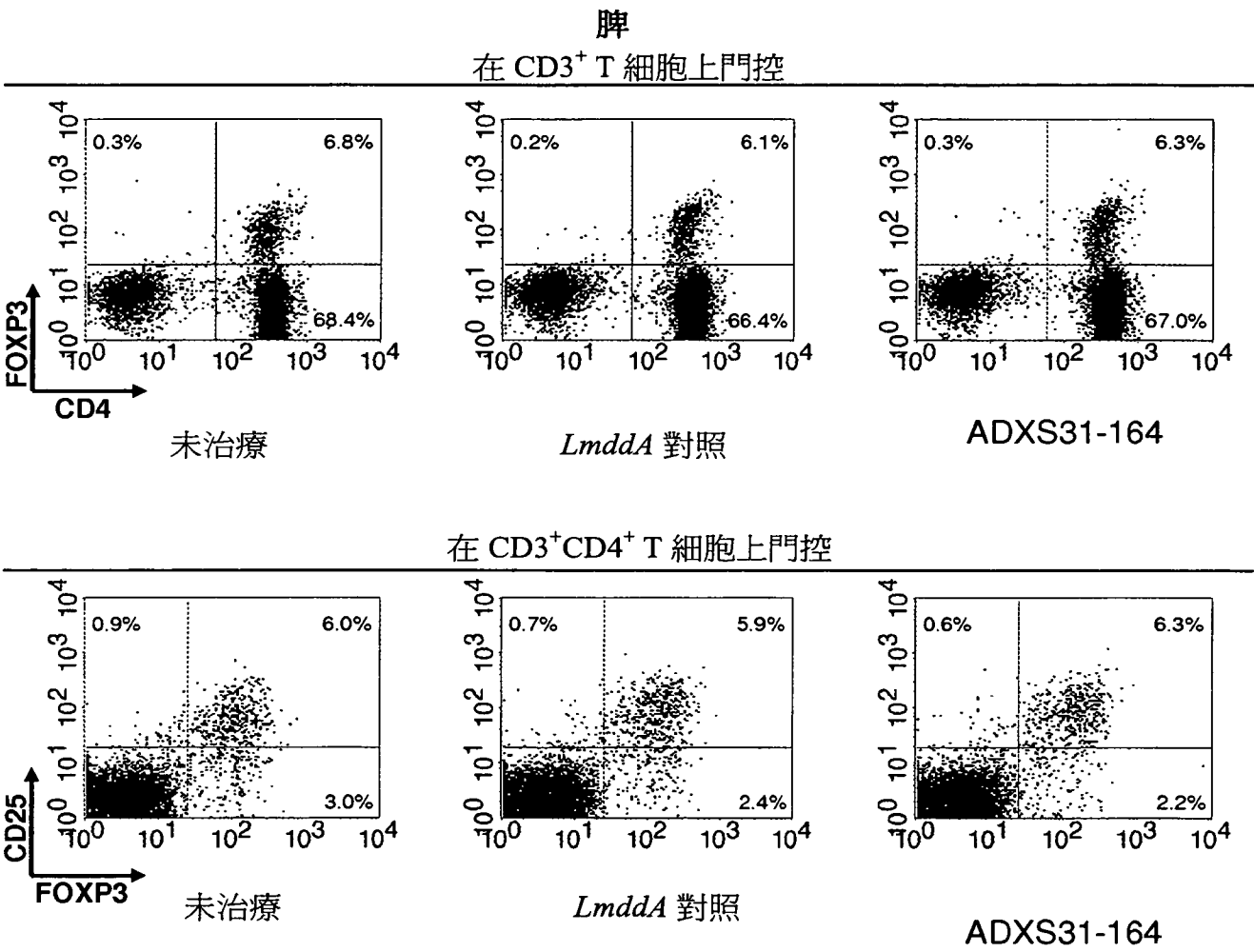
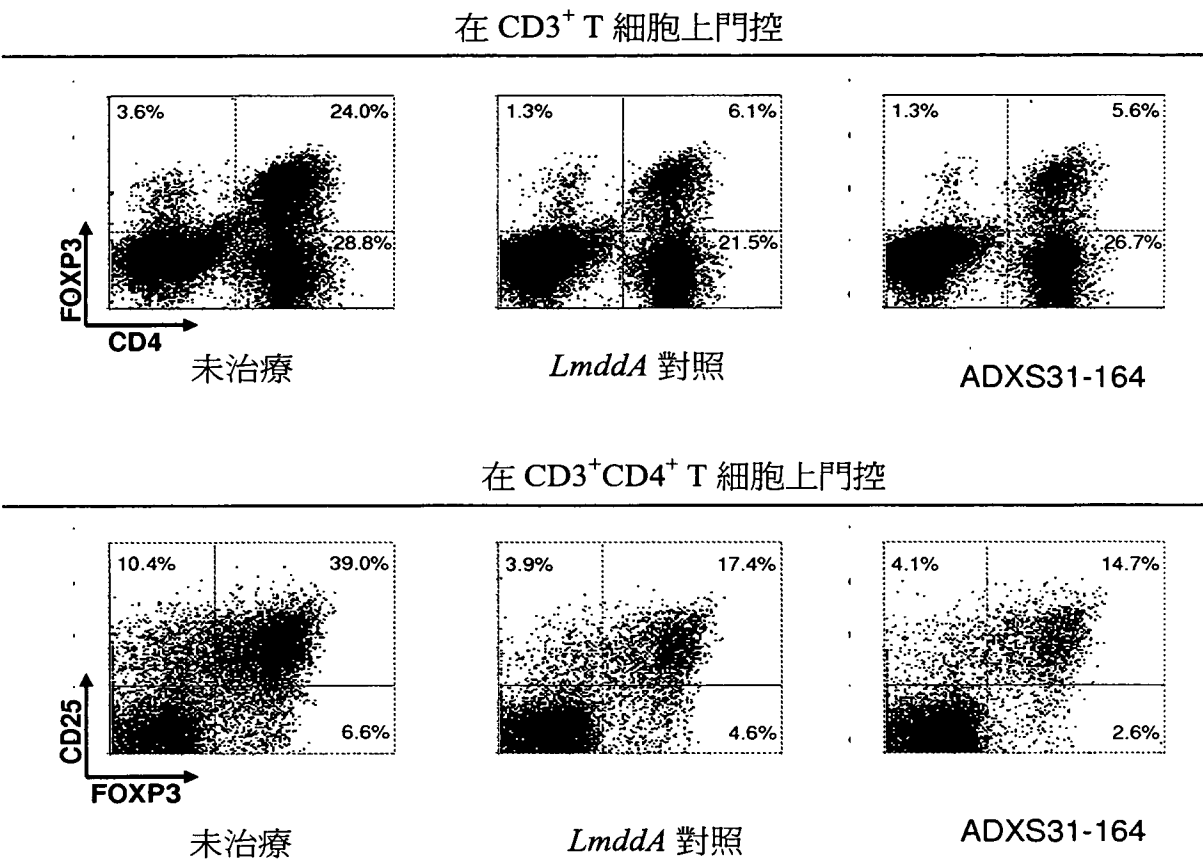


圖 4



A



B

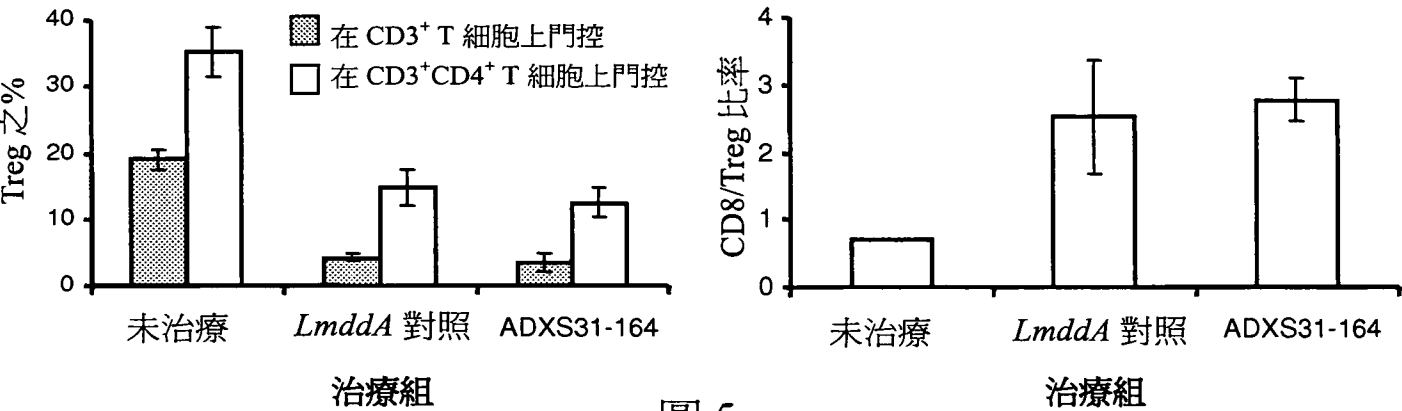


圖 5

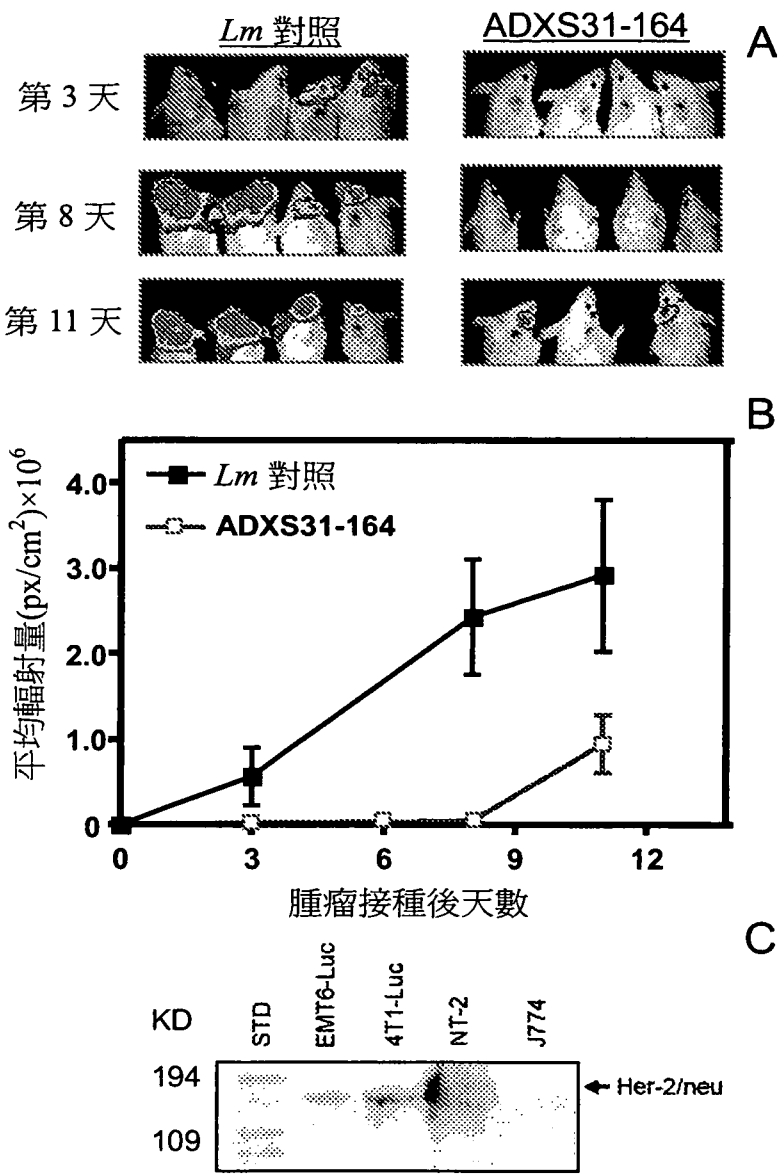


圖 6

