(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108697775 B
(45)授权公告日 2023.05.09

(21)申请号 201680078633.1
(22)申请日 2016.11.04
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108697775 A
(43)申请公布日 2018.10.23
(30)优先权数据
62/254,654 2015.11.12 US
62/254,651 2015.11.12 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.07.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/076668 2016.11.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/080920 EN 2017.05.18
(73)专利权人 霍欧奇帕生物科技有限公司
地址 奥地利维也纳
(72)发明人 莎拉·施密特 克劳斯·奥尔林格 凯瑟琳·科恩
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 贺淑东
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 101918565 A,2010.12.15
WO 2015103602 A1,2015.07.09
CN 103536915 A,2014.01.29
Flatz L, Hegazy AN, Bergthaler A等.Development of replication-defective lymphocytic choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8+ T cell immunity.《Nature medicine》.2010,第16卷(第3期),第339-345页.
Emonet SF, Garidou L, McGavern DB等.Generation of recombinant lymphocytic choriomeningitis viruses with trisegmented genomes stably expressing two additional genes of interest.《Proc Natl Acad Sci U S A》.2009,第106卷(第9期),第3473-3478页.
(续)
审查员 王鹏

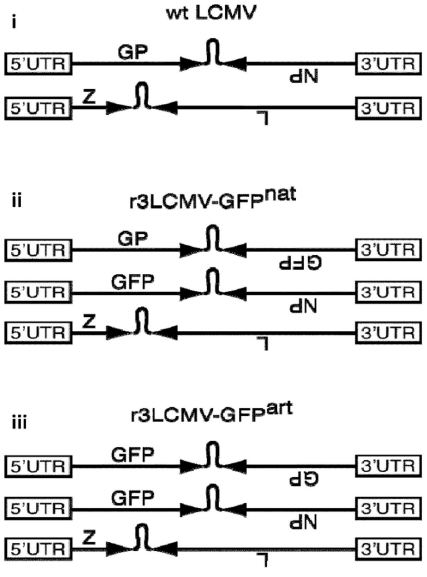
权利要求书12页 说明书94页
序列表41页 附图11页

(54)发明名称

作为癌症疫苗的沙粒病毒颗粒

(57)摘要

本申请总的来说涉及作为针对肿瘤病(例如癌症)的合适疫苗的遗传修饰的沙粒病毒。本文所述沙粒病毒可适于疫苗和/或治疗肿瘤病和/或适用于免疫疗法。具体地讲,本文提供通过给予与免疫检查点抑制剂组合的遗传修饰的沙粒病毒用于治疗肿瘤病的方法和组合物,其中沙粒病毒经改造以包括编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。



CN 108697775 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Webster RM.The immune checkpoint inhibitors: where are we now?.《 Nature reviews》.2014,第13卷(第12期),第883-884页.

Cheng BY, Ortiz-Riaño E, de la Torre JC等.Generation of recombinant arenavirus for vaccine development in FDA-approved Vero cells.《Journal of visualized experiments》.2013,(第78期),第1-9页.

Iwasaki M, Ngo N, Cubitt B等.General Molecular Strategy for Development of Arenavirus Live-Attenuated Vaccines.《Journal of virology》.2015,第89卷(第23期),第12166-12177页.

Ortiz-Riaño E, Cheng BYH, Carlos de la Torre J等.Arenavirus reverse genetics for vaccine development.《The Journal of general virology》.2013,第94卷(第6期),第1175-1188页.

1.三区段沙粒病毒颗粒在制备用于联合免疫检查点抑制剂治疗对象的肿瘤病的药物或药盒中的用途,其中所述三区段沙粒病毒颗粒包含一个L区段和两个S区段,其中两个S区段中的至少一个区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;和

其中两个S区段中的一个区段选自由以下组成的组:

(i)S区段,其中编码核蛋白"NP"的开放阅读框"ORF"在沙粒病毒基因组5'非翻译区"UTR"的控制下;

(ii)S区段,其中编码基质蛋白Z"Z蛋白"的ORF在沙粒病毒基因组5'UTR的控制下;

(iii)S区段,其中编码依赖于RNA的RNA聚合酶L"L蛋白"的ORF在沙粒病毒基因组5'UTR的控制下;

(iv)S区段,其中编码糖蛋白"GP"的ORF在沙粒病毒基因组3'UTR的控制下;

(v)S区段,其中编码所述L蛋白的ORF在沙粒病毒基因组3'UTR的控制下;或

(vi)S区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒基因组3'UTR的控制下。

2.权利要求1的用途,其中所述两个S区段中的每一个区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或者抗原片段的核苷酸序列。

3.权利要求1的用途,其中所述肿瘤抗原或肿瘤相关抗原选自致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原、癌胚抗原、组织分化抗原、突变蛋白抗原、新抗原、亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1AI、BCLX、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKKI、ENAH(hMcna)、Ga733(EpCAM)、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IDO1、IGF2B3、IL13Ralpha2、肠羧酸酯酶、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53非突变型、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1(前列腺6次跨膜上皮抗原1)、存活蛋白、端粒酶、VEGF、WT1、EGF-R、CEA、CD20、CD33、CD52、糖蛋白100(GP100或gp 100蛋白)、MELANA/MART1、MART2、NY-ESO-1、p53、MAGE A1、MAGE A3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CDK4、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL、BCR-ABL融合蛋白b3a2、B-RAF、CASP-5、CASP-8、β-联蛋白、Cdc27、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、H-ras、K-ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SSX、SSX2、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、ormdm-2、LMP2、HPV E6/E7、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、独特型GD2神经节苷脂G2、Ras-突变型、p53突变型、蛋白酶3PR1、酪氨酸酶、PSA、hTERT、肉瘤易位断裂点、EphA2、前列腺酸磷酸酶PAP、neo-PAP、ML-IAP、AFP、TMPRSS2 ETS融合基因、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN、TRP2、TRP2-Int2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、sLe、cyp1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、SART3、STn、碳酸酐酶IX、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原HMWMAA、AKAP-4、XAGE 1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-beta、MAD-CT-2、For相关抗原1、TRP1、CA-125、CA19-9、钙网膜蛋白、上皮膜抗原EMA、上皮肿瘤抗原ETA、CD19、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质细胞原纤维酸性蛋白GFAP、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、Myo-D1、肌特异性肌动蛋白MSA、神经丝、神经元特异性烯醇化酶NSE、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶M2型同功酶的二聚形式

(肿瘤M2-PK)、BAGE BAGE-1、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-SAR-35、SPANXB1、SPA17、SYCP1、TPTE、糖/神经节苷脂GM2(癌胚抗原-免疫原性-1OFA-I-1)、CA 15-3、CA 195、CA 242、CA 50、CAM 43、EBNA、EF2、Epstein-Barr病毒抗原、HLA-A2、HLA-A11、HSP70-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白I类、GnTV、Herv-K-mel、LAGE-1、LAGE-2、精子蛋白SP17、SCP-1、P15、Hom/Mel-40、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、TSP-180、P185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、TAG-72-4、CA-72-4、CAM 17.1、NuMa、13-联蛋白、P16、TAGE、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、HTgp-175、M344、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TLP、TPS、CD22、CD27、CD30、CD70、prostein、TARP(T细胞受体γ另起读框)、Trp-p8、整联蛋白αvβ3(CD61)、泌乳激素或Ral-B、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138和ROR1。

4.权利要求1的用途,其中所述核苷酸序列编码2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种肿瘤抗原或肿瘤相关抗原或其抗原片段。

5.权利要求1的用途,其中所述免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性,并且其中所述负检查点调节剂选自细胞毒性T-淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、CD80、CD86、程序性细胞死亡1(PD-1)、程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、程序性细胞死亡配体2(PD-L2)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3;亦称为CD223)、半乳凝素-3、B和T淋巴细胞弱化子(BTLA)、T细胞膜蛋白3(TIM3)、半乳凝素-9(GAL9)、B7-H1、B7-H3、B7-H4、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9、T细胞活化的V-结构域Ig抑制剂(VISTA)、糖皮质素诱导的肿瘤坏死因子受体相关GITR蛋白、疱疹病毒侵入介体HVEM、OX40、CD27、CD28、CD137、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15027、CGEN-15049、CGEN-15052和CGEN-15092。

6.权利要求1的用途,其中所述对象患有、易患选自以下的肿瘤病或有罹患该肿瘤病的风险:急性成淋巴细胞白血病;急性成淋巴细胞淋巴瘤;急性淋巴细胞白血病;急性髓细胞性白血病;急性髓细胞性白血病成人/儿童;肾上腺皮质癌;AIDS相关癌症;AIDS相关淋巴瘤;肛门癌;阑尾癌;星形细胞瘤;非典型畸胎样/横纹肌样瘤;基底细胞癌;肝外胆管癌,肝胆管型肝癌;膀胱癌;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑癌成人/儿童;脑瘤,小脑星形细胞瘤成人/儿童;脑瘤,大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤脑瘤;脑瘤,室管膜瘤;脑瘤,成神经管细胞瘤;脑瘤,幕上原始神经外胚层瘤;脑瘤,视通路和下丘脑神经胶质瘤;脑干神经胶质瘤;乳腺癌;支气管腺瘤/类癌;支气管瘤;伯基特淋巴瘤;类癌瘤;成人癌,原发部位不明;原发部位不明癌;中枢神经系统胚胎性瘤;中枢神经系统淋巴瘤,原发;宫颈癌;儿童肾上腺皮质癌;儿童癌症;儿童大脑星形细胞瘤;脊索瘤,儿童;慢性淋巴细胞白血病;慢性髓细胞性白血病;慢性髓细胞样白血病;慢性骨髓增殖性疾病;结肠癌;结肠直肠癌;颅咽管瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤;肺气肿;子宫内膜癌;室管膜母细胞瘤;室管膜瘤;食管癌;肿瘤尤因家族中的尤因肉瘤;颅外生殖细胞瘤;性腺外生殖细胞瘤;肝外胆管癌;胆囊癌;胃癌;胃类癌;胃肠类癌瘤;胃肠基质瘤;生殖细胞瘤:颅外,性腺外或妊娠滋养细胞肿瘤;妊娠滋养细胞肿瘤,原发部位不明;神经胶质瘤;脑干妊娠滋养细胞肿瘤;神经胶质瘤,儿童视通路和下丘脑;毛细胞白血病;头颈癌;心脏癌;肝细胞癌;霍奇金淋巴瘤;咽下部癌;下丘脑和视通路神经胶质瘤;眼内黑素瘤;胰岛细胞癌,内分泌胰腺;卡波西肉瘤;肾

癌，肾细胞癌；朗格汉斯细胞组织细胞增多症；喉癌；口唇口腔癌；脂肉瘤；肝癌原发性；肺癌，非小细胞；肺癌，小细胞；淋巴瘤，原发性中枢神经系统；瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症；男性乳腺癌；骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤；成神经管细胞瘤；髓质口皮瘤；黑素瘤；黑素瘤，眼内；默克尔细胞癌；默克尔细胞皮肤癌；间皮瘤；间皮瘤，成人恶性；隐匿原发转移性鳞状颈癌；多发性内分泌肿瘤综合征；多发性骨髓瘤/浆细胞瘤；蕈样肉芽肿病，骨髓增生异常综合征；骨髓增生异常/骨髓增生性疾病；髓细胞性白血病，慢性；髓细胞样白血病，成人急性；髓细胞样白血病，儿童急性；骨髓瘤，多发性骨髓癌；骨髓增生性病症，慢性；鼻腔和鼻旁窦癌；鼻咽癌；成神经细胞瘤，非小细胞肺癌；非霍奇金淋巴瘤；少突神经胶质瘤；口癌；口腔癌；口咽癌；骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤；卵巢癌；卵巢上皮癌症，表面上皮-基质瘤；卵巢生殖细胞瘤；卵巢低恶性潜能肿瘤；胰腺癌；胰腺癌，胰岛细胞；乳头状瘤病；鼻旁窦和鼻腔癌；甲状旁腺癌；阴茎癌；咽癌；嗜铬细胞瘤；松果体星形细胞瘤；松果体生殖细胞瘤；中度分化的松果体实质肿瘤；成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层瘤；垂体瘤；垂体腺瘤；浆细胞瘤形成/多发性骨髓瘤；胸膜肺胚细胞瘤；原发性中枢神经系统淋巴瘤；前列腺癌；直肠癌；肾细胞癌；肾盂和输尿管，移行细胞癌；涉及染色体15上的NUT基因的呼吸道癌；成视网膜细胞瘤；横纹肌肉瘤，儿童；涎腺癌；肉瘤，尤因肿瘤家族；塞扎里综合征；皮肤癌黑素瘤；皮肤癌非黑素瘤；小细胞肺癌；小肠癌软组织肉瘤；软组织肉瘤；脊髓肿瘤；鳞状细胞癌；胃癌；幕上原发性外胚层肿瘤；T细胞淋巴瘤，皮肤蕈样肉芽肿病和塞扎里综合征；睾丸癌；胸腺瘤；胸腺瘤和胸腺癌；甲状腺癌；甲状腺癌，儿童；肾盂和输尿管移行细胞癌；尿道癌；子宫癌，子宫内膜；子宫肉瘤；阴道癌；外阴癌和肾母细胞瘤。

7.权利要求1的用途，其中所述药物或药盒被制备为同时共同给予所述三区段沙粒病毒颗粒和所述免疫检查点抑制剂。

8.权利要求1的用途，其中所述药物或药盒被制备为在给予所述免疫检查点抑制剂之前给予所述三区段沙粒病毒颗粒。

9.权利要求1的用途，其中所述药物或药盒被制备为在给予所述免疫检查点抑制剂之后给予所述三区段沙粒病毒颗粒。

10.权利要求8的用途，其中给予所述三区段沙粒病毒颗粒和所述免疫检查点抑制剂之间的间隔为1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或更长。

11.如权利要求9所述的用途，其中所述三区段沙粒病毒颗粒和所述免疫检查点抑制剂的给药间隔为1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时，9小时，10小时，11小时，12小时，1天，2天，3天，4天，5天，6天，1周，8天，9天，10天，11天，12天，13天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或更长时间。

12.权利要求1的用途，其中所述药物或药盒被制备为以治疗有效量给予所述三区段沙粒病毒颗粒和所述免疫检查点抑制剂。

13.权利要求1的用途，其中所述药物或药盒被制备为给予所述对象第一种三区段沙粒病毒颗粒，并在一段时间后给予所述对象第二种沙粒病毒颗粒。

14.权利要求13的用途,其中所述第一种三区段沙粒病毒颗粒和所述第二种沙粒颗粒来自不同的沙粒病毒种和/或包含编码不同肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

15.权利要求1的用途,其中所述沙粒病毒基因组3'UTR是沙粒病毒S区段的3'UTR,且其中所述沙粒病毒基因组5'UTR是沙粒病毒S区段的5'UTR。

16.权利要求1的用途,其中所述沙粒病毒颗粒被减毒。

17.权利要求1的用途,其中所述三区段沙粒病毒颗粒是感染性和可复制型的。

18.权利要求1的用途,其中所述三区段沙粒病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。

19.权利要求1的用途,其中在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组激活基因1(RAG1)并用10^4PFU的所述三区段沙粒病毒颗粒感染的小鼠中在持续感染70天后所述三区段沙粒病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。

20.权利要求1的用途,其中使两种沙粒病毒ORF在一个而非两个分隔的区段上整合的两个S区段或两个L区段的区段间重组消除病毒启动子活性。

21.权利要求1的用途,其中所述第一S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码GP的ORF,所述第二S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码NP的ORF。

22.根据权利要求1所述的用途,其中所述第一S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码GP的ORF和在沙粒病毒基因组5'UTR控制下的位置编码第一肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF,并且第二个S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码NP的ORF和在沙粒病毒基因组5'UTR控制下的位置编码第二肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF。

23.权利要求1的用途,其中两个S区段包含:(i)各自编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个或两个核苷酸序列;或(ii)一个或两个重复的沙粒病毒ORF;或(iii)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个核苷酸序列和一个重复的沙粒病毒ORF。

24.权利要求1的用途,其中所述三区段沙粒病毒颗粒另包含编码免疫调节肽、多肽或蛋白质的核苷酸序列。

25.权利要求24的用途,其中所述免疫调节肽、多肽或蛋白质选自:

(i)钙网蛋白CRT或其片段;

(ii)泛素或其片段;

(iii)粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子GM-CSF或其片段;

(iv)不变链CD74或其抗原片段;

(v)结核杆菌热激蛋白70或其抗原片段;

(vi)单纯疱疹病毒1蛋白VP22或其抗原片段;

(vii)CD40配体或其抗原片段;和

(viii)Fms相关酪氨酸激酶3Flt3配体或其抗原片段。

26.权利要求1的用途,其中所述三区段沙粒病毒颗粒来源于淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒"LCMV"、Pichinde病毒"PICV"或Junin病毒"JUNV"。

27.权利要求26的用途,其中所述沙粒病毒颗粒来源于LCMV。

28.权利要求27的用途，其中所述LCMV是MP病毒毒株、WE病毒毒株、Armstrong病毒毒株或Armstrong Clone 13病毒毒株。

29.权利要求26的用途，其中所述三区段沙粒病毒颗粒来源于JUNV或PICV。

30.权利要求29的用途，其中所述JUNV是JUNV疫苗Candid#1病毒毒株或JUNV疫苗XJ Clone 3病毒毒株。

31.权利要求1-30中任一项的用途，其中所述三区段沙粒病毒颗粒的生长或感染性不受编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的所述核苷酸序列影响。

32.一种包含三区段沙粒病毒颗粒、免疫检查点抑制剂和药学上可接受的载体的药物组合物，其中所述三区段沙粒病毒颗粒包含一个L区段和两个S区段，

其中两个S区段中的至少一个区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列；和

其中两个S区段中的一个区段选自由以下组成的组：

(i)S区段，其中编码NP的ORF在沙粒病毒基因组5'UTR的控制下；

(ii)S区段，其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒基因组5'UTR的控制下；

(iii)S区段，其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒基因组5'UTR的控制下；

(iv)S区段，其中编码GP的ORF在沙粒病毒基因组3'UTR的控制下；

(v)S区段，其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒基因组3'UTR的控制下；或

(vi)S区段，其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒基因组3'UTR的控制下；

其中所述免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。

33.权利要求32的药物组合物，其中所述两个S区段中的每一个区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或者抗原片段的核苷酸序列。

34.权利要求32的药物组合物，其中所述肿瘤抗原或肿瘤相关抗原选自致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原、癌胚抗原、组织分化抗原、突变蛋白抗原、新抗原、亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1AI、BCLX、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKKI、ENAH(hMcna)、Ga733(EpCAM)、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IDO1、IGF2B3、IL13Ralpha2、肠羧酸酯酶、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53非突变型、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1(前列腺6次跨膜上皮抗原1)、存活蛋白、端粒酶、VEGF、WT1、EGF-R、CEA、CD20、CD33、CD52、糖蛋白100(GP100或gp 100蛋白)、MELANA/MART1、MART2、NY-ESO-1、p53、MAGE A1、MAGE A3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CDK4、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL、BCR-ABL融合蛋白b3a2、B-RAF、CASP-5、CASP-8、β-联蛋白、Cdc27、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、H-ras、K-ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SSX、SSX2、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、ormdm-2、LMP2、HPV E6/E7、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、独特型GD2神经节苷脂G2、Ras-突变型、p53突变型、蛋白酶3PR1、酪氨酸酶、PSA、hTERT、肉瘤易位断裂点、EphA2、前列腺酸磷酸酶PAP、neo-PAP、ML-IAP、AFP、TMPRSS2 ETS融合基因、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN、TRP2、TRP2-Int2、GD3、岩藻糖基GM1、

间皮素、PSCA、sLe、cyp1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、SART3、STn、碳酸酐酶IX、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原HMWMAA、AKAP-4、XAGE 1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-beta、MAD-CT-2、For相关抗原1、TRP1、CA-125、CA19-9、钙网膜蛋白、上皮膜抗原EMA、上皮肿瘤抗原ETA、CD19、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质细胞原纤维酸性蛋白GFAP、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、Myo-D1、肌特异性肌动蛋白MSA、神经丝、神经元特异性烯醇化酶NSE、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶M2型同功酶的二聚形式(肿瘤M2-PK)、BAGE BAGE-1、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-SAR-35、SPANXB1、SPA17、SYCP1、TPTE、糖/神经节苷脂GM2(癌胚抗原-免疫原性-1OFA-I-1)、CA 15-3、CA 195、CA 242、CA 50、CAM 43、EBNA、EF2、Epstein-Barr病毒抗原、HLA-A2、HLA-A11、HSP70-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白I类、GnTV、Herv-K-mel、LAGE-1、LAGE-2、精子蛋白SP17、SCP-1、P15、Hom/Mel-40、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、TSP-180、P185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、TAG-72-4、CA-72-4、CAM 17.1、NuMa、13-联蛋白、P16、TAGE、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、HTgp-175、M344、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TLP、TPS、CD22、CD27、CD30、CD70、prostein、TARP(T细胞受体γ另起读框)、Trp-p8、整联蛋白αvβ3(CD61)、泌乳激素或Ral-B、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138和ROR1。

35.权利要求32的药物组合物,其中所述核苷酸序列编码2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种肿瘤抗原或肿瘤相关抗原或其抗原片段。

36.权利要求32中的药物组合物,其中所述负检查点调节剂选自细胞毒性T-淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、CD80、CD86、程序性细胞死亡1(PD-1)、程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、程序性细胞死亡配体2(PD-L2)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3;亦称为CD223)、半乳凝素-3、B和T淋巴细胞弱化子(BTLA)、T细胞膜蛋白3(TIM3)、半乳凝素-9(GAL9)、B7-H1、B7-H3、B7-H4、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9、T细胞活化的V-结构域Ig抑制剂(VISTA)、糖皮质素诱导的肿瘤坏死因子受体相关GITR蛋白、疱疹病毒侵入介体HVEM、OX40、CD27、CD28、CD137、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15027、CGEN-15049、CGEN-15052和CGEN-15092。

37.权利要求32的药物组合物,用于治疗选自以下的肿瘤病:急性成淋巴细胞白血病;急性成淋巴细胞淋巴瘤;急性淋巴细胞白血病;急性髓细胞性白血病;急性髓细胞性白血病成人/儿童;肾上腺皮质癌;AIDS相关癌症;AIDS相关淋巴瘤;肛门癌;阑尾癌;星形细胞瘤;非典型畸胎样/横纹肌样瘤;基底细胞癌;肝外胆管癌,肝胆管型肝癌;膀胱癌;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑癌成人/儿童;脑瘤,小脑星形细胞瘤成人/儿童;脑瘤,大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤脑瘤;脑瘤,室管膜瘤;脑瘤,成神经管细胞瘤;脑瘤,幕上原始神经外胚层瘤;脑瘤,视通路和下丘脑神经胶质瘤;脑干神经胶质瘤;乳腺癌;支气管腺瘤/类癌;支气管瘤;伯基特淋巴瘤;类癌瘤;成人癌,原发部位不明;原发部位不明癌;中枢神经系统胚胎性瘤;中枢神经系统淋巴瘤,原发;宫颈癌;儿童肾上腺皮质癌;儿童癌症;儿童大脑星形细胞瘤;脊索瘤,儿童;慢性淋巴细胞白血病;慢性髓细胞性白血病;慢性髓细胞样白血病;慢性骨髓增殖性疾病;结肠癌;结肠直肠癌;颅咽管瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;促结缔组织增生性

小圆细胞肿瘤;肺气肿;子宫内膜癌;室管膜母细胞瘤;室管膜瘤;食管癌;肿瘤尤因家族中的尤因肉瘤;颅外生殖细胞瘤;性腺外生殖细胞瘤;肝外胆管癌;胆囊癌;胃癌;胃类癌;胃肠类癌瘤;胃肠基质瘤;生殖细胞瘤:颅外,性腺外或妊娠滋养细胞肿瘤;妊娠滋养细胞肿瘤,原发部位不明;神经胶质瘤;脑干妊娠滋养细胞肿瘤;神经胶质瘤,儿童视通路和下丘脑;毛细胞白血病;头颈癌;心脏癌;肝细胞癌;霍奇金淋巴瘤;咽下部癌;下丘脑和视通路神经胶质瘤;眼内黑素瘤;胰岛细胞癌,内分泌胰腺;卡波西肉瘤;肾癌,肾细胞癌;朗格汉斯细胞组织细胞增多症;喉癌;口唇口腔癌;脂肉瘤;肝癌原发性;肺癌,非小细胞;肺癌,小细胞;淋巴瘤,原发性中枢神经系统;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;男性乳腺癌;骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤;成神经管细胞瘤;髓质口皮瘤;黑素瘤;黑素瘤,眼内;默克尔细胞癌;默克尔细胞皮肤癌;间皮瘤;间皮瘤,成人恶性;隐匿原发转移性鳞状颈癌;多发性内分泌肿瘤综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;蕈样肉芽肿病,骨髓增生异常综合征;骨髓增生异常/骨髓增生性疾病;髓细胞性白血病,慢性;髓细胞样白血病,成人急性;髓细胞样白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性骨髓癌;骨髓增生性病症,慢性;鼻腔和鼻旁窦癌;鼻咽癌;成神经细胞瘤,非小细胞肺癌;非霍奇金淋巴瘤;少突神经胶质瘤;口癌;口腔癌;口咽癌;骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;卵巢上皮癌症,表面上皮-基质瘤;卵巢生殖细胞瘤;卵巢低恶性潜能肿瘤;胰腺癌;胰腺癌,胰岛细胞;乳头状瘤病;鼻旁窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;咽癌;嗜铬细胞瘤;松果体星形细胞瘤;松果体生殖细胞瘤;中度分化的松果体实质肿瘤;成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层瘤;垂体瘤;垂体腺瘤;浆细胞瘤形成/多发性骨髓瘤;胸膜肺胚细胞瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;前列腺癌;直肠癌;肾细胞癌;肾盂和输尿管,移行细胞癌;涉及染色体15上的NUT基因的呼吸道癌;成视网膜细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童;涎腺癌;肉瘤,尤因肿瘤家族;塞扎里综合征;皮肤癌黑素瘤;皮肤癌非黑素瘤;小细胞肺癌;小肠癌软组织肉瘤;软组织肉瘤;脊髓肿瘤;鳞状细胞癌;胃癌;幕上原发性外胚层肿瘤;T细胞淋巴瘤,皮肤蕈样肉芽肿病和塞扎里综合征;睾丸癌;胸腺瘤;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;甲状腺癌,儿童;肾盂和输尿管移行细胞癌;尿道癌;子宫癌,子宫内膜;子宫肉瘤;阴道癌;外阴癌和肾母细胞瘤。

38.权利要求32的药物组合物,其中所述沙粒病毒基因组3'UTR是沙粒病毒S区段的3'UTR,且其中所述沙粒病毒基因组5'UTR是沙粒病毒S区段的5'UTR。

39.权利要求32的药物组合物,其中所述沙粒病毒颗粒被减毒。

40.权利要求32的药物组合物,其中所述沙粒病毒颗粒是感染性和可复制型的。

41.权利要求32的药物组合物,其中所述三区段沙粒病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。

42.权利要求32的药物组合物,其中在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组激活基因1(RAG1)并用10^4PFU的所述三区段沙粒病毒颗粒感染的小鼠中在持续感染70天后所述三区段沙粒病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。

43.权利要求32的药物组合物,其中使两种沙粒病毒ORF在一个而非两个分隔的区段上整合的所述两个S区段的区段间重组消除病毒启动子活性。

44.权利要求32的药物组合物,其中所述第一S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码GP的ORF,所述第二S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码NP的ORF。

45.根据权利要求32所述的药物组合物，其中所述第一S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码GP的ORF和在沙粒病毒基因组5'UTR控制下的位置编码第一肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF，并且第二个S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码NP的ORF和在沙粒病毒基因组5'UTR控制下的位置编码第二肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF。

46.权利要求32的药物组合物，其中两个S区段包含：(i)各自编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个或两个核苷酸序列；或(ii)一个或两个重复的沙粒病毒ORF；或(iii)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个核苷酸序列和一个重复的沙粒病毒ORF。

47.权利要求32中的药物组合物，其中所述三区段沙粒病毒颗粒另包含编码免疫调节肽、多肽或蛋白质的核苷酸序列。

48.权利要求47的药物组合物，其中所述免疫调节肽、多肽或蛋白质选自：

(i)钙网蛋白CRT或其片段；

(ii)泛素或其片段；

(iii)粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子GM-CSF或其片段；

(iv)不变链CD74或其抗原片段；

(v)结核杆菌热激蛋白70或其抗原片段；

(vi)单纯疱疹病毒1蛋白VP22或其抗原片段；

(vii)CD40配体或其抗原片段；和

(viii)Fms相关酪氨酸激酶3Flt3配体或其抗原片段。

49.权利要求32的药物组合物，其中所述三区段沙粒病毒颗粒来源于淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒"LCMV"、Pichinde病毒"PICV"或Junin病毒"JUNV"。

50.权利要求49的药物组合物，其中所述沙粒病毒颗粒来源于LCMV。

51.权利要求50的药物组合物，其中所述LCMV是MP病毒毒株、WE病毒毒株、Armstrong病毒毒株或Armstrong Clone 13病毒毒株。

52.权利要求49的药物组合物，其中所述沙粒病毒颗粒来源于JUNV或PICV。

53.权利要求52的药物组合物，其中所述JUNV是JUNV疫苗Candid#1病毒毒株或JUNV疫苗XJ Clone 3病毒毒株。

54.权利要求32-53中任一项的药物组合物，其中所述三区段沙粒病毒颗粒的生长或感染性不受编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的所述核苷酸序列影响。

55.一种药盒，其包含一个或多个容器和使用说明书，其中所述一个或多个容器包含权利要求32-54中任一项的所述药物组合物。

56.一种药盒，其包含两个或更多个容器和使用说明书，其中所述容器之一包含三区段沙粒病毒颗粒，另一个所述容器包含免疫检查点抑制剂，其中所述三区段沙粒病毒颗粒包含一个L区段和两个S区段，

其中两个S区段中的至少一个区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列；

其中两个S区段中的一个区段选自由以下组成的组：

(i)S区段，其中编码NP的ORF在沙粒病毒基因组5'UTR的控制下；

(ii)S区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒基因组5'UTR的控制下;

(iii)S区段,其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒基因组5'UTR的控制下;

(iv)S区段,其中编码GP的ORF在沙粒病毒基因组3'UTR的控制下;

(v)S区段,其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒基因组3'UTR的控制下;或

(vi)S区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒基因组3'UTR的控制下;

其中所述免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。

57.权利要求56的药盒,其中所述两个S区段中的每一个区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或者抗原片段的核苷酸序列。

58.权利要求56的药盒,其中所述肿瘤抗原或肿瘤相关抗原选自致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原、癌胚抗原、组织分化抗原、突变蛋白抗原、新抗原、亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1AI、BCLX、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKKI、ENAH(hMcna)、Ga733(EpCAM)、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IDO1、IGF2B3、IL13Ralpha2、肠羧酸酯酶、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53非突变型、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1(前列腺6次跨膜上皮抗原1)、存活蛋白、端粒酶、VEGF、WT1、EGF-R、CEA、CD20、CD33、CD52、糖蛋白100(GP100或gp 100蛋白)、MELANA/MART1、MART2、NY-ESO-1、p53、MAGE A1、MAGE A3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CDK4、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL、BCR-ABL融合蛋白b3a2、B-RAF、CASP-5、CASP-8、β-联蛋白、Cdc27、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、H-ras、K-ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SSX、SSX2、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、ormdm-2、LMP2、HPV E6/E7、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、独特型GD2神经节苷脂G2、Ras-突变型、p53突变型、蛋白酶3PR1、酪氨酸酶、PSA、hTERT、肉瘤易位断裂点、EphA2、前列腺酸磷酸酶PAP、neo-PAP、ML-IAP、AFP、TMPRSS2 ETS融合基因、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN、TRP2、TRP2-Int2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、sLe、cyp1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、SART3、STn、碳酸酐酶IX、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原HMWMAA、AKAP-4、XAGE 1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-beta、MAD-CT-2、For相关抗原1、TRP1、CA-125、CA19-9、钙网膜蛋白、上皮膜抗原EMA、上皮肿瘤抗原ETA、CD19、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质细胞原纤维酸性蛋白GFAP、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、Myo-D1、肌特异性肌动蛋白MSA、神经丝、神经元特异性烯醇化酶NSE、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶M2型同功酶的二聚形式(肿瘤M2-PK)、BAGE BAGE-1、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-SAR-35、SPANXB1、SPA17、SYCP1、TPTE、糖/神经节苷脂GM2(癌胚抗原-免疫原性-1OFA-I-1)、CA 15-3、CA 195、CA 242、CA 50、CAM 43、EBNA、EF2、Epstein-Barr病毒抗原、HLA-A2、HLA-A11、HSP70-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白I类、GnTV、Herv-K-mel、LAGE-1、LAGE-2、精子蛋白SP17、SCP-1、P15、Hom/Mel-40、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、

TSP-180、P185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、TAG-72-4、CA-72-4、CAM 17.1、NuMa、13-联蛋白、P16、TAGE、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、HTgp-175、M344、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TLP、TPS、CD22、CD27、CD30、CD70、prostein、TARP(T细胞受体γ另起读框)、Trp-p8、整联蛋白αvβ3(CD61)、泌乳激素或Ral-B、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138和ROR1。

59.权利要求56的药盒,其中所述核苷酸序列编码2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种肿瘤抗原或肿瘤相关抗原或其抗原片段。

60.权利要求56的药盒,其中所述负检查点调节剂选自细胞毒性T-淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、CD80、CD86、程序性细胞死亡1(PD-1)、程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、程序性细胞死亡配体2(PD-L2)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3;亦称为CD223)、半乳凝素-3、B和T淋巴细胞弱化子(BTLA)、T细胞膜蛋白3(TIM3)、半乳凝素-9(GAL9)、B7-H1、B7-H3、B7-H4、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9、T细胞活化的V-结构域Ig抑制剂(VISTA)、糖皮质素诱导的肿瘤坏死因子受体相关GITR蛋白、疱疹病毒侵入介体HVEM、OX40、CD27、CD28、CD137、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15027、CGEN-15049、CGEN-15052和CGEN-15092。

61.权利要求56的药盒用于治疗选自以下的肿瘤病:急性成淋巴细胞白血病;急性成淋巴细胞淋巴瘤;急性淋巴细胞白血病;急性髓细胞性白血病;急性髓细胞性白血病成人/儿童;肾上腺皮质癌;AIDS相关癌症;AIDS相关淋巴瘤;肛门癌;阑尾癌;星形细胞瘤;非典型畸胎样/横纹肌样瘤;基底细胞癌;肝外胆管癌,肝胆管型肝癌;膀胱癌;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑癌成人/儿童;脑瘤,小脑星形细胞瘤成人/儿童;脑瘤,大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤脑瘤;脑瘤,室管膜瘤;脑瘤,成神经管细胞瘤;脑瘤,幕上原始神经外胚层瘤;脑瘤,视通路和下丘脑神经胶质瘤;脑干神经胶质瘤;乳腺癌;支气管腺瘤/类癌;支气管瘤;伯基特淋巴瘤;类癌瘤;成人癌,原发部位不明;原发部位不明癌;中枢神经系统胚胎性瘤;中枢神经系统淋巴瘤,原发;宫颈癌;儿童肾上腺皮质癌;儿童癌症;儿童大脑星形细胞瘤;脊索瘤,儿童;慢性淋巴细胞白血病;慢性髓细胞性白血病;慢性髓细胞样白血病;慢性骨髓增殖性疾病;结肠癌;结肠直肠癌;颅咽管瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤;肺气肿;子宫内膜癌;室管膜母细胞瘤;室管膜瘤;食管癌;肿瘤尤因家族中的尤因肉瘤;颅外生殖细胞瘤;性腺外生殖细胞瘤;肝外胆管癌;胆囊癌;胃癌;胃类癌;胃肠类癌瘤;胃肠基质瘤;生殖细胞瘤:颅外,性腺外或妊娠滋养细胞肿瘤;妊娠滋养细胞肿瘤,原发部位不明;神经胶质瘤;脑干妊娠滋养细胞肿瘤;神经胶质瘤,儿童视通路和下丘脑;毛细胞白血病;头颈癌;心脏癌;肝细胞癌;霍奇金淋巴瘤;咽下部癌;下丘脑和视通路神经胶质瘤;眼内黑素瘤;胰岛细胞癌,内分泌胰腺;卡波西肉瘤;肾癌,肾细胞癌;朗格汉斯细胞组织细胞增多症;喉癌;口唇口腔癌;脂肉瘤;肝癌原发性;肺癌,非小细胞;肺癌,小细胞;淋巴瘤,原发性中枢神经系统;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;男性乳腺癌;骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤;成神经管细胞瘤;髓质口皮瘤;黑素瘤;黑素瘤,眼内;默克尔细胞癌;默克尔细胞皮肤癌;间皮瘤;间皮瘤,成人恶性;隐匿原发转移性鳞状颈癌;多发性内分泌肿瘤综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;蕈样肉芽肿病,骨髓增生异常综合征;骨髓增生异常/骨髓增生性疾病;髓细胞性白血病,慢性;髓细胞样白血病,成人急性;髓细胞样白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性骨髓癌;骨髓增生性病症,慢性;鼻腔和鼻旁窦癌;鼻咽癌;成神经细胞瘤,非小细

胞肺癌;非霍奇金淋巴瘤;少突神经胶质瘤;口癌;口腔癌;口咽癌;骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;卵巢上皮癌症,表面上皮-基质瘤;卵巢生殖细胞瘤;卵巢低恶性潜能肿瘤;胰腺癌;胰腺癌,胰岛细胞;乳头状瘤病;鼻旁窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;咽癌;嗜铬细胞瘤;松果体星形细胞瘤;松果体生殖细胞瘤;中度分化的松果体实质肿瘤;成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层瘤;垂体瘤;垂体腺瘤;浆细胞瘤形成/多发性骨髓瘤;胸膜肺胚细胞瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;前列腺癌;直肠癌;肾细胞癌;肾盂和输尿管,移行细胞癌;涉及染色体15上的NUT基因的呼吸道癌;成视网膜细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童;涎腺癌;肉瘤,尤因肿瘤家族;塞扎里综合征;皮肤癌黑素瘤;皮肤癌非黑素瘤;小细胞肺癌;小肠癌软组织肉瘤;软组织肉瘤;脊髓肿瘤;鳞状细胞癌;胃癌;幕上原发性外胚层肿瘤;T细胞淋巴瘤,皮肤蕈样肉芽肿病和塞扎里综合征;睾丸癌;胸腺瘤;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;甲状腺癌,儿童;肾盂和输尿管移行细胞癌;尿道癌;子宫癌,子宫内膜;子宫肉瘤;阴道癌;外阴癌和肾母细胞瘤。

62.权利要求56的药盒,其中所述沙粒病毒基因组3'UTR是沙粒病毒S区段的3'UTR,且其中所述沙粒病毒基因组5'UTR是沙粒病毒S区段的5'UTR。

63.权利要求56的药盒,其中所述三区段沙粒病毒颗粒被减毒。

64.权利要求56的药盒,其中所述三区段沙粒病毒颗粒是感染性和可复制型的。

65.权利要求56的药盒,其中所述三区段沙粒病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。

66.权利要求56的药盒,其中在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组激活基因1(RAG1)并用10^4PFU的所述三区段沙粒病毒颗粒感染的小鼠中在持续感染70天后所述三区段沙粒病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。

67.权利要求56的药盒,其中使两种沙粒病毒ORF在一个而非两个分隔的区段上整合的所述两个S区段的区段间重组消除病毒启动子活性。

68.权利要求56的药盒,其中所述第一S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码GP的ORF,所述第二S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码NP的ORF。

69.根据权利要求56所述的药盒,其中所述第一S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码GP的ORF和在沙粒病毒基因组5'UTR控制下的位置编码第一肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF,并且第二个S区段被改造以在沙粒病毒基因组3'UTR控制下的位置携带编码NP的ORF和在沙粒病毒基因组5'UTR控制下的位置编码第二肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF。

70.权利要求56的药盒,其中两个S区段包含:(i)各自编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个或两个核苷酸序列;或(ii)一个或两个重复的沙粒病毒ORF;或(iii)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个核苷酸序列和一个重复的沙粒病毒ORF。

71.权利要求56的药盒,其中所述三区段沙粒病毒颗粒另包含编码免疫调节肽、多肽或蛋白质的核苷酸序列。

72.权利要求71的药盒,其中所述免疫调节肽、多肽或蛋白质选自:

(i)钙网蛋白CRT或其片段;

(ii)泛素或其片段;

(iii)粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子GM-CSF或其片段；

(iv)不变链CD74或其抗原片段；

(v)结核杆菌热激蛋白70或其抗原片段；

(vi)单纯疱疹病毒1蛋白VP22或其抗原片段；

(vii)CD40配体或其抗原片段;和

(viii)Fms相关酪氨酸激酶3Flt3配体或其抗原片段。

73.权利要求56的药盒,其中所述三区段沙粒病毒颗粒来源于淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒“LCMV”、Pichinde病毒“PICV”或Junin病毒“JUNV”。

74.权利要求73的药盒,其中所述三区段沙粒病毒颗粒来源于LCMV。

75.权利要求74的药盒,其中所述LCMV是MP病毒毒株、WE病毒毒株、Armstrong病毒毒株或Armstrong Clone 13病毒毒株。

76.权利要求73的药盒,其中所述三区段沙粒病毒颗粒来源于JUNV或PICV。

77.权利要求76的药盒,其中所述JUNV是JUNV疫苗Candid#1病毒毒株或JUNV疫苗XJ Clone 3病毒毒株。

78.权利要求56-77中任一项的药盒,其中所述三区段沙粒病毒颗粒的生长或感染性不受编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的所述核苷酸序列影响。

79.权利要求1的用途,其中所述免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。

80.权利要求1的用途,其中所述免疫检查点抑制剂是结合或抑制程序性细胞死亡1(PD1)的活性的抗体。

81.权利要求1的用途,其中所述免疫检查点抑制剂是结合或抑制程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、细胞毒性T-淋巴细胞抗原-4(CTLA4)、T细胞膜蛋白3(TIM-3)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3)或具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)的活性的抗体。

82.权利要求1的用途,其中所述三区段沙粒病毒颗粒编码新抗原。

83.权利要求82的用途,其中所述新抗原是具有R203M突变的ADP依赖性葡糖激酶(Adpgk)。

84.权利要求1的用途,其中所述三区段沙粒病毒颗粒编码黑素瘤抗原。

85.权利要求84的用途,其中所述黑素瘤抗原是糖蛋白100(GP100)。

86.权利要求84的用途,其中所述黑素瘤抗原是酪氨酸酶相关蛋白1(TRP1)。

87.权利要求84的用途,其中所述黑素瘤抗原是酪氨酸酶相关蛋白2(TRP2)。

88.权利要求82或83的用途,其中所述对象患有结肠癌。

89.权利要求84-87中任一项的用途,其中所述对象患有黑素瘤。

90.权利要求82或84中任一项的用途,其中所述免疫检查点抑制剂是结合或抑制程序性细胞死亡1(PD1)的活性的抗体。

作为癌症疫苗的沙粒病毒颗粒

[0001] 本申请要求2015年11月12日提交的美国临时申请号62/254,654和2015年11月12日提交的美国临时申请号62/254,651的优先权的权益,其完整内容各自通过引用并入本文。

[0002] 本申请含有通过EFS-Web以ASCII格式提交的序列表,通过引用以其整体并入本文。于2016年11月2日创建的所述ASCII副本名为13194-017-228_Sequence_Listing.txt,大小为112,465字节。

[0003] 1.引言

[0004] 本申请总的来说涉及作为针对肿瘤病(例如癌症)的合适疫苗的遗传修饰的沙粒病毒。本文所述沙粒病毒可适于疫苗和/或治疗肿瘤病和/或适用于免疫疗法。具体地说,本文提供通过给予与免疫检查点抑制剂组合的遗传修饰的沙粒病毒用于治疗肿瘤病的方法和组合物,其中沙粒病毒经改造以包括编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0005] 2.背景

[0006] 2.1淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒研究和人类疾病

[0007] 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV),沙粒病毒科的成员,是病毒感染研究中的一种原型小鼠模型病毒。自其于1930年代分离以来(Rivers and McNair Scott,1935,Science,81(2105):439-440),利用这种病毒的研究发现了病毒免疫学和发病机制中的许多关键概念(概括于Zinkernagel,2002,Curr Top Microbiol Immunol,263:1-5;Oldstone,2002,Curr Top Microbiol Immunol,263:83-117)。LCMV已被广泛用于研究尤其在持续感染情况下的病毒分子生物学和免疫应答。然而,LCMV的天然宿主是小鼠,若干报告显示LCMV还可能是被忽略的人类病原体(Barton,1996,Clin.Infect.Dis,22(1):197;Wright et al.,1997,Pediatrics 100(1):E9)。此外,在全世界,在啮齿动物种群中发现了沙粒病毒科的许多其它成员。除了可在非洲发现的旧世界沙粒病毒Lassa病毒(LASV)以外,若干新世界沙粒病毒像Junin、Guanarito或Machupo在南美的不同啮齿动物种群中普遍存在(Johnson et al.,1966,Am J Trop Med Hyg,15(1):103-106;Tesh et al.,1993,Am J Trop Med Hyg 49(2):227-235;Mills et al.,1994,Trop Med Hyg 51(5):554-562)。在向人类传播时,许多的这类病毒可引起病毒出血热伴高死亡率(Geisbert and Jahrling,2004,Nat Med 10(12 Suppl):S110-121)。

[0008] 2.2淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒的基因组结构

[0009] 沙粒病毒是有包膜病毒。它们的基因组由负义的单链RNA的两个区段(L:7.2kb,S:3.4kb)组成。每个区段编码呈相反方向的两个病毒基因。短区段(S区段)编码病毒糖蛋白(GP)前体(GP-C;75kDa)和核蛋白(NP;63kDa)(Salvato et al.,1988,Virology 164(2):517-522)。长区段(L区段)表达依赖于RNA的RNA聚合酶(RdRp;L蛋白;约200kDa)和基质蛋白Z(Z蛋白),一种RING指蛋白(11kDa)(图1A)(Salvato et al.,1988,Virology 164(2):517-522)。GP前体GP-C翻译后被切割成GP-1和GP-2,其保持非共价缔合(Buchmeier and Oldstone 1979,Virology 99(1):111-120)。GP-1和GP-2的三聚体病毒粒子的表面装配成

刺突,对于介导通过与细胞表面受体相互作用进入宿主细胞是必需的。长期以来据称病毒的结合和进入宿主细胞由作为LCMV GP与LCMV的唯一细胞受体的细胞受体α-营养不良蛋白聚糖的相互作用介导(Cao et al.,1998,Science,282(5396):2079-2081)。只是最近,假设另外3种人类分子(来自TAM家族的Axl和Tyro3和树突细胞特异性胞内粘附分子3-grabbing nonintegrin)为LCMV和LASV(LCMV的一个近亲)的另外的受体,其使得LCMV独立于α-营养不良蛋白聚糖地进入细胞(Shimojima and Kawaoka 2012,J Vet Med,74(10):1363-1366;Shimojima et al.,2012,J Virol 86(4):2067-2078)。NP与病毒RNA结合,形成核衣壳,其用作病毒L蛋白的模板。与病毒L蛋白缔合的核衣壳形成所谓的核糖核蛋白复合体,其在复制和转录中有活性,并代表病毒感染性的最小单位。已表明,NP和L蛋白是病毒RNA转录和复制所需的最小反式作用因子(Lee et al.,2000,J Virol 74(8):3470-3477)。每个区段上的两个基因被非编码基因间区(IGR)分隔,且两侧是5'和3'非翻译区(UTR)。IGR形成稳定的发夹结构,已表明其参与病毒mRNA转录的结构依赖性终止(Pinschewer et al.,2005,J Virol 79(7):4519-4526)。UTR的末端核苷酸显示高度互补性,导致二级结构的形成。已知这些锅柄结构用作转录和复制的病毒启动子,其通过位点定向诱变的分析显示序列依赖性和结构依赖性,容不了甚至微小的序列变化(Perez and de la Torre,2003,Virol 77(2):1184-1194)。

[0010] 2.3反向遗传系统

[0011] 负链病毒像LCMV的分离和纯化的RNA不能直接用作mRNA,即当导入细胞时不能翻译。因此细胞用病毒RNA转染不会导致感染性病毒颗粒的产生。为了在培养的允许细胞中从cDNA产生负链RNA病毒的感染性病毒颗粒,病毒RNA区段必须与转录和复制所需的最小因子反式互补。借助几年前公开的小基因组系统,终于可对参与病毒颗粒转录、复制和形成的病毒顺式作用元件和反式作用因子进行分析(Lee et al.,2000,J Virol 74(8):3470-3477;Lee et al.,2002,J Virol 76(12):6393-6397;Perez and de la Torre 2003,J Virol 77(2):1184-1194;Pinschewer et al.,2003,J Virol 77(6):3882-3887;Pinschewer et al.,2005,J Virol 79(7):4519-4526)。此外对于其它沙粒病毒像LASV和Tacaribe病毒,建立了反向遗传系统(Lopez et al.,2001,J Virol 75(24):12241-12251;Hass et al.,2004,J Virol 78(24):13793-13803)。两个出版物显示分别使用pol-I/-II或T7/pol-II驱动质粒的完全来自cDNA的感染性LCMV的回收(称为"病毒拯救")(Flatz et al.,2006,Proc Natl Acad Sci U S A 103(12):4663-4668;Sanchez and de la Torre,2006,Virology 350(2):370-380)。

[0012] 2.4表达目标基因的重组LCMV

[0013] 表达外源目标基因的重组负链RNA病毒的形成已进行了一段长的时间。已公开了用于其它病毒的不同策略(Garcia-Sastre et al.,1994,J Virol 68(10):6254-6261;Percy et al.,1994,J Virol 68(7):4486-4492;Flick and Hobom,1999,Virology 262(1):93-103;Machado et al.,2003,Virology 313(1):235-249)。在过去已表明可将额外的外源基因引入二区段LCMV颗粒的基因组(Emonet et al.,2009,PNAS,106(9):3473-3478)。将两个外源目标基因插入LCMV的二区段基因组,产生具有两个S区段和一个L区段的三区段LCMV颗粒(r3LCMV)。在由Emonet et al.,(2009)公开的三区段病毒中,NP和GP两者保留在S区段其各自天然的位置中,因此在侧翼UTR中其天然启动子之下表达。

[0014] 2.5复制缺陷型沙粒病毒

[0015] 最近,表明了可对感染性沙粒病毒颗粒进行改造以含有具有在感染细胞中扩增和表达其遗传物质的能力但不能够在正常、未遗传改造的细胞中产生进一步的子代(即感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒)的基因组(国际公布号:WO 2009/083210 A1和国际公布号:WO 2014/140301 A1)。

[0016] 2.6表达目标基因的复制缺陷型沙粒病毒载体

[0017] 报告了使用感染性复制缺陷型沙粒病毒作为抗原表达的载体(参见Flatz et.al.,2010,Nat.Med.,16(3):339-345;Flatz et al.,2012,J.Virol.,86(15),7760-7770)。这些感染性复制缺陷型沙粒病毒可感染宿主细胞,即附着于宿主细胞,将其遗传物质释放入宿主细胞中。然而,它们是复制缺陷型的,即由于编码病毒蛋白(例如GP蛋白)的开放阅读框(ORF)缺失或功能失活,沙粒病毒不能够在非补足细胞(non-complementing cell)产生进一步的感染性子代颗粒。相反地,ORF被目标抗原的核苷酸序列取代。在Flatz et al.2010中,作者使用感染性复制缺陷型沙粒病毒作为载体表达OVA(SIINFEKL表位)。在Flatz et al.2012中,作者使用复制缺陷型沙粒病毒作为载体表达HIV/SIV Env。

[0018] 3.发明概述

[0019] 本文提供使用包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒治疗肿瘤病的方法和组合物。本文还提供使用免疫检查点抑制剂治疗肿瘤病的方法和组合物。这类免疫检查点抑制剂可抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。因此,在某些实施方案中,本文提供使用包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒和抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性的免疫检查点抑制剂治疗肿瘤病的方法。此外,在某些实施方案中,本文提供含有包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒和抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性的免疫检查点抑制剂的组合物。

[0020] 在某些实施方案中,本文提供的沙粒病毒颗粒经改造含有具有编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒基因组区段和在ORF野生型位置以外位置处的至少一个沙粒病毒开放阅读框(“ORF”)。在某些实施方案中,本文提供的沙粒病毒颗粒是感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒。在其它实施方案中,本文提供的沙粒病毒颗粒是三区段沙粒病毒颗粒,其可以是复制缺陷型或可复制型的。在另外其它的实施方案中,本文提供的三区段沙粒病毒颗粒,在增殖时不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0021] 3.1具有非天然开放阅读框的沙粒病毒颗粒

[0022] 在某些实施方案中,本文提供其ORF在其基因组具有重排和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒。在一个具体的实施方案中,本文提供的沙粒病毒颗粒包括经改造在野生型位置以外的位置处携带沙粒病毒ORF的沙粒病毒基因组区段。因此,在某些具体的实施方案中,本文提供包含以下的沙粒病毒基因组区段:编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;和所述ORF的野生型位置以外位置处的至少一种沙粒病毒ORF,其中ORF编码沙粒病毒颗粒的糖蛋白(“GP”)、核蛋白(“NP”)、基质蛋白Z(“Z蛋白”)或依赖于RNA的RNA聚合酶L(“L蛋白”)。本文还提供经改造含有这类沙粒病毒基因组区段的沙粒病毒颗粒。

[0023] 在某些实施方案中,本文提供的沙粒病毒颗粒是感染性的,即它能够进入宿主细

胞或将其遗传物质注入宿主细胞中。在某些更具体的实施方案中，本文提供的沙粒病毒颗粒是感染性的，即能够进入宿主细胞或将其遗传物质注入宿主细胞中接着在宿主细胞内扩增和表达其遗传信息。在某些实施方案中，本文提供的沙粒病毒颗粒被改造为感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒，即，它含有在感染细胞中有扩增和表达其遗传信息的能力但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的基因组。

[0024] 在本文提供的沙粒病毒基因组区段或沙粒病毒颗粒内所包括的由核苷酸序列编码的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原可以是选自以下的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的一种或多种：致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原、癌胚抗原、组织分化抗原、突变蛋白抗原、新抗原、亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1AI、BCLX(L)、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKKI、ENAH(hMcna)、Ga733(EpCAM)、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IDO1、IGF2B3、IL13Ralpha2、肠羧酸酯酶、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53(非突变型)、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1(前列腺6次跨膜上皮抗原1)、存活蛋白(survivinn)、端粒酶、VEGF、WT1、EGF-R、CEA、CD20、CD33、CD52、糖蛋白100(GP 100或gp 100蛋白)、MELANA/MART1、MART2、NY-ESO-1、p53、MAGE A1、MAGE A3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CDK4、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL、BCR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-RAF、CASP-5、CASP-8、β-联蛋白、Cdc27、CDK4、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、H-ras、K-ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SSX、SSX2、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、ormdm-2、LMP2、HPV E6/E7、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、独特型GD2神经节苷脂G2)、Ras-突变型、p53(突变型)、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、PSA、hTERT、肉瘤易位断裂点、EphA2、前列腺酸磷酸酶PAP、neo-PAP、ML-IAP、AFP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN、TRP2、TRP2-Int2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、sLe(a)、cyp1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、SART3、STn、碳酸酐酶IX、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA)、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-beta、MAD-CT-2、For相关抗原1、TRP1、CA-125、CA19-9、钙网膜蛋白、上皮膜抗原(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、CD19、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、Myo-D1、肌特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白(synaptophysis)、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶M2型同功酶的二聚形式(肿瘤M2-PK)、BAGE BAGE-1、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-SAR-35、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1、TPTE、糖/神经节苷脂GM2(癌胚抗原-免疫原性-1OFA-I-1)、GM3、CA 15-3(CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA 50、CAM 43、CEA、EBNA、EF2、Epstein-Barr病毒抗原、HLA-A2、HLA-A11、HSP70-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白I类、GnTV、Herv-K-mel、LAGE-1、LAGE-2、(精子蛋白)SP17、SCP-1、P15(58)、Hom/Mel-40、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、TSP-180、P185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、

TAG-72、TAG-72-4、CA-72-4、CAM 17.1、NuMa、13-联蛋白、P16、TAGE、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、HTgp-175、M344、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TLP、TPS、CD22、CD27、CD30、CD70、prostein、TARP(T细胞受体γ另起读框)、Trp-p8、整联蛋白αvβ3(CD61)、泌乳激素或Ral-B、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138和ROR1。在某些实施方案中,核苷酸序列编码2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。在某些实施方案中,本文提供的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的抗原片段由沙粒病毒内所包括的核苷酸序列编码。

[0025] 因此,在某些实施方案中,本文提供包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒基因组区段。在某些实施方案中,基因组区段经改造在ORF野生型位置以外位置处携带沙粒病毒ORF。在一些实施方案中,沙粒病毒基因组区段选自:

[0026] (i)S区段,其中编码NP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0027] (ii)S区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0028] (iii)S区段,其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0029] (iv)S区段,其中编码GP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;

[0030] (v)S区段,其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;

[0031] (vi)S区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;

[0032] (vii)L区段,其中编码GP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0033] (viii)L区段,其中编码NP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0034] (ix)L区段,其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0035] (x)L区段,其中编码GP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;

[0036] (xi)L区段,其中编码NP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;

[0037] 和

[0038] (xii)L区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下。

[0039] 在某些实施方案中,沙粒病毒3'UTR是沙粒病毒S区段或沙粒病毒L区段的3'UTR。在某些实施方案中,沙粒病毒5'UTR是沙粒病毒S区段或沙粒病毒L区段的5'UTR。

[0040] 在某些实施方案中,本文提供的沙粒病毒颗粒包含第二沙粒病毒基因组区段使得沙粒病毒颗粒包含S区段和L区段。

[0041] 在某些实施方案中,本文提供的沙粒病毒颗粒是感染性的,即它能够进入宿主细胞或将其遗传物质注入宿主细胞中。在某些更具体的实施方案中,本文提供的沙粒病毒颗粒是感染性的,即能够进入宿主细胞或将其遗传物质注入宿主细胞中接着在宿主细胞内扩增和表达其遗传信息。在某些实施方案中,沙粒病毒颗粒是经改造含有在感染细胞中有扩增和表达其遗传信息的能力但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的基因组的感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒。在某些实施方案中,沙粒病毒颗粒是可复制型的,并且能够在正常未经遗传改造的细胞中产生进一步的感染性子代颗粒。在某些更具体的实施方案中,相对于可复制型颗粒得自其中的野生型病毒,这类可复制型颗粒是减毒的。

[0042] 在某些实施方案中,本文提供的沙粒病毒基因组区段,包括包含沙粒病毒基因组区段的沙粒病毒颗粒,包含至少部分去除或功能失活的至少一种沙粒病毒ORF。ORF可编码沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白。此外,在某些实施方案中,编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白

的至少一种ORF被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在某些实施方案中，编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的4种ORF中仅一种被去除。因此，在某些实施方案中，编码GP的ORF被去除。在某些实施方案中，编码NP的ORF被去除。在某些实施方案中，编码Z蛋白的ORF被去除。在某些实施方案中，编码L蛋白的ORF被去除。

[0043] 在某些实施方案中，本文提供的二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒包含至少部分去除或功能失活的至少一种沙粒病毒ORF。ORF可编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白。此外，在某些实施方案中，编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的至少一种ORF被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在某些实施方案中，编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的4种ORF中仅一种被去除。因此，在某些实施方案中，编码GP的ORF被去除。在某些实施方案中，编码NP的ORF被去除。在某些实施方案中，编码Z蛋白的ORF被去除。在某些实施方案中，编码L蛋白的ORF被去除。

[0044] 在某些实施方案中，包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒的二区段感染性复制缺陷型另包含编码至少一种免疫调节肽、多肽或蛋白质的至少一个核苷酸序列。在某些实施方案中，免疫调节肽、多肽或蛋白质是钙网蛋白(CRT)或其片段；泛素或其片段；粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或其片段；不变链(Invariant chain)(CD74)或其抗原片段；结核杆菌(Mycobacterium tuberculosis)热激蛋白70或其抗原片段；单纯疱疹病毒1蛋白VP22或其抗原片段；CD40配体或其抗原片段；或Fms相关酪氨酸激酶3(Flt3)配体或其抗原片段。

[0045] 在某些实施方案中，本文提供的沙粒病毒颗粒来源于特定的沙粒病毒种，例如淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(“LCMV”)或Junin病毒(“JUNV”)。换句话说，编码沙粒病毒颗粒的基因组信息来源于沙粒病毒的特定种。因此，在某些实施方案中，沙粒病毒颗粒来源于LCMV。在其它实施方案中，沙粒病毒颗粒来源于JUNV。此外，在具体实施方案中，LCMV是MP病毒毒株、WE病毒毒株、Armstrong病毒毒株或Armstrong Clone 13病毒毒株。在其它的具体实施方案中，JUNV是JUNV疫苗Candid#1病毒毒株或JUNV疫苗XJ Clone 3病毒毒株。

[0046] 3.2三区段沙粒病毒

[0047] 在某些实施方案中，本文提供包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的三区段沙粒病毒颗粒。因此，在某些实施方案中，本文提供的沙粒病毒颗粒可包含一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段。在某些实施方案中，本文提供的三区段沙粒病毒颗粒不重组成可复制型二区段沙粒病毒颗粒。因此，在某些实施方案中，在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组激活基因1(RAG1)和用10^4PFU三区段沙粒病毒颗粒感染的小鼠中在70天持续感染后，三区段沙粒病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段颗粒。在某些实施方案中，本文提供的三区段沙粒病毒颗粒，可被改造以改进遗传稳定性并确保持久性转基因表达。此外，在某些实施方案中，两个S区段或两个L区段的区段间重组，将2个沙粒病毒ORF在仅1个而不是2个单独的区段中结合，消除了病毒启动子活性。

[0048] 在某些实施方案中，本文提供的三区段沙粒病毒颗粒是感染性的，即它能够进入宿主细胞或将其遗传物质注入宿主细胞中。在某些更具体的实施方案中，本文提供的三区段沙粒病毒颗粒是感染性的，即能够进入宿主细胞或将其遗传物质注入宿主细胞中接着在宿主细胞内扩增和表达其遗传信息。在某些实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒是经改造含

有在感染细胞中有扩增和表达其遗传信息的能力但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的基因组的感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒。在某些实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒是可复制型的，并且能够在正常未经遗传改造的细胞中产生进一步的感染性子代颗粒。在某些更具体的实施方案中，相对于可复制型颗粒得自其中的野生型病毒，这类可复制型颗粒是减毒的。

[0049] 由本文提供的三区段沙粒病毒颗粒内所包括的核苷酸序列编码的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原可以是选自以下的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的一种或多种：致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原、癌胚抗原、组织分化抗原、突变蛋白抗原、新抗原、亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1AI、BCLX(L)、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKKI、ENAH(hMcna)、Ga733(EpCAM)、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IDO1、IGF2B3、IL13Ralpha2、肠羧酸酯酶、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53(非突变型)、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1(前列腺6次跨膜上皮抗原1)、存活蛋白、端粒酶、VEGF、WT1、EGF-R、CEA、CD20、CD33、CD52、糖蛋白100(GP 100或gp 100蛋白)、MELANA/MART1、MART2、NY-ESO-1、p53、MAGE A1、MAGE A3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CDK4、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL、BCR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-RAF、CASP-5、CASP-8、β-联蛋白、Cdc27、CDK4、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、H-ras、K-ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SSX、SSX2、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、ormdm-2、LMP2、HPV E6/E7、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、独特型GD2神经节苷脂G2)、Ras-突变型、p53(突变型)、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、PSA、hTERT、肉瘤易位断裂点、EphA2、前列腺酸磷酸酶PAP、neo-PAP、ML-IAP、AFP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN、TRP2、TRP2-Int2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、sLe(a)、cyp1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、SART3、STn、碳酸酐酶IX、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA)、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-beta、MAD-CT-2、For相关抗原1、TRP1、CA-125、CA19-9、钙网膜蛋白、上皮膜抗原(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、CD19、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、Myo-D1、肌特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶M2型同功酶的二聚形式(肿瘤M2-PK)、BAGE BAGE-1、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-SAR-35、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1、TPTE、糖/神经节苷脂GM2(癌胚抗原-免疫原性-1OFA-I-1)、GM3、CA 15-3(CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA 50、CAM 43、CEA、EBNA、EF2、Epstein-Barr病毒抗原、HLA-A2、HLA-A11、HSP70-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白I类、GnTV、Herv-K-mel、LAGE-1、LAGE-2、(精子蛋白)SP17、SCP-1、P15(58)、Hom/Mel-40、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、TSP-180、P185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、TAG-72-4、CA-72-4、CAM

17.1、NuMa、13-联蛋白、P16、TAGE、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、HTgp-175、M344、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TLP、TPS、CD22、CD27、CD30、CD70、prostein、TARP(T细胞受体γ另起读框)、Trp-p8、整联蛋白αvβ3(CD61)、泌乳激素或Ral-B、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138和ROR1。在某些实施方案中,核苷酸序列编码2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。在某些实施方案中,本文提供的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的抗原片段由三区段沙粒病毒内包括的核苷酸序列编码。

[0050] 在某些实施方案中,本文提供其ORF在其基因组中具有重排和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的三区段沙粒病毒。在一个具体的实施方案中,本文提供的三区段沙粒病毒颗粒经改造在野生型位置以外的位置处携带沙粒病毒ORF。因此,在某些具体的实施方案中,本文提供包含以下的三区段沙粒病毒:编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;和所述ORF的野生型位置以外位置处的至少一种沙粒病毒ORF,其中ORF编码沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白。

[0051] 在某些实施方案中,本文提供的三区段沙粒病毒颗粒中包括的两个S区段之一选自:

[0052] (i)S区段,其中编码NP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0053] (ii)S区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0054] (iii)S区段,其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0055] (iv)S区段,其中编码GP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;

[0056] (v)S区段,其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;

[0057] 和

[0058] (vi)S区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下。

[0059] 在某些实施方案中,本文提供的三区段沙粒病毒颗粒中包括的两个L区段之一选自:

[0060] (i)L区段,其中编码GP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0061] (ii)L区段,其中编码NP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0062] (iii)L区段,其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0063] (iv)L区段,其中编码GP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;

[0064] (v)L区段,其中编码NP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;和

[0065] (vi)L区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下。

[0066] 在某些实施方案中,三区段沙粒病毒颗粒3'UTR是沙粒病毒S区段或沙粒病毒L区段的3'UTR。在其它实施方案中,三区段沙粒病毒颗粒5'UTR是沙粒病毒S区段或沙粒病毒L区段的5'UTR。

[0067] 在某些实施方案中,两个S区段包含:(i)各自编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个或两个核苷酸序列;或(ii)一个或两个重复的沙粒病毒ORF;或(iii)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个核苷酸序列和一个重复的沙粒病毒ORF。

[0068] 在某些实施方案中,两个L区段包含(i)各自编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个或两个核苷酸序列;或(ii)一个或两个重复的沙粒病毒ORF;或(iii)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个核苷酸序列和一个重复的沙粒病毒ORF。

[0069] 在某些实施方案中，本文提供的三区段沙粒病毒颗粒包含至少部分去除或功能失活的至少一种沙粒病毒ORF。ORF可编码沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白。此外，在某些实施方案中，编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的至少一种ORF被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在某些实施方案中，编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的4种ORF中仅一种被去除。因此，在某些实施方案中，编码GP的ORF被去除。在某些实施方案中，编码NP的ORF被去除。在某些实施方案中，编码Z蛋白的ORF被去除。在某些实施方案中，编码L蛋白的ORF被去除。

[0070] 在某些实施方案中，本文提供的三区段沙粒病毒颗粒来源于特定的沙粒病毒种，例如淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(“LCMV”)或Junin病毒(“JUNV”)。换句话说，基因组信息编码三区段沙粒病毒颗粒来源于沙粒病毒的特定种。因此，在某些实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒来源于LCMV。在其它实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒来源于JUNV。此外，在具体实施方案中，LCMV是MP病毒毒株、WE病毒毒株、Armstrong病毒毒株或Armstrong Clone 13病毒毒株。在其它的具体实施方案中，JUNV是JUNV疫苗Candid#1病毒毒株或JUNV疫苗XJ Clone 3病毒毒株。

[0071] 3.3治疗肿瘤病的方法

[0072] 在某些实施方案中，本文提供治疗对象的肿瘤病的方法。这类方法可包括给予有需要的对象本文提供的沙粒病毒颗粒(包括三区段沙粒病毒颗粒)和本文提供的免疫检查点抑制剂。

[0073] 在某些实施方案中，所述方法使用的沙粒病毒颗粒是本文提供的感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒。在某些实施方案中，所述方法使用的沙粒病毒颗粒是本文提供的三区段沙粒病毒颗粒，包括感染性复制缺陷型三区段沙粒病毒颗粒或可复制型三区段沙粒病毒颗粒。因此，在某些实施方案中，所述方法使用的沙粒病毒颗粒(包括三区段沙粒病毒颗粒)是复制缺陷型的，其中沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组：(1)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列；和(2)在感染细胞中扩增和表达其遗传信息但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的能力。此外，在某些实施方案中，所述方法使用的三区段沙粒病毒颗粒是复制缺陷型的，其中三区段沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组：(1)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列；(2)在感染细胞中扩增和表达其遗传信息的能力；和(3)在正常的非遗传改造的细胞中产生进一步的感染性子代颗粒的能力。在某些实施方案中，免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。在某些实施方案中，所述方法使用的沙粒病毒颗粒是二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒。因此，在某些实施方案中，所述方法使用的感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组：(1)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列；和(2)在感染细胞中扩增和表达其遗传信息但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的能力。在某些实施方案中，免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。

[0074] 在某些实施方案中，本文提供的由沙粒病毒颗粒包括三区段沙粒病毒颗粒内包括的核苷酸序列编码的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原可以是选自以下的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的一种或多种：致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原、癌胚抗原、组织分化抗原、突变蛋白抗原、新抗原、亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1AI、BCLX(L)、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、

DKKI、ENAH(hMcna)、Ga733(EpCAM)、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IDO1、IGF2B3、IL13Ralpha2、肠羧酸酯酶、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53(非突变型)、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1(前列腺6次跨膜上皮抗原1)、存活蛋白、端粒酶、VEGF、WT1、EGF-R、CEA、CD20、CD33、CD52、糖蛋白100(GP 100或gp 100蛋白)、MELANA/MART1、MART2、NY-ESO-1、p53、MAGE A1、MAGE A3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CDK4、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL、BCR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-RAF、CASP-5、CASP-8、β-联蛋白、Cdc27、CDK4、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、H-ras、K-ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SSX、SSX2、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、ormdm-2、LMP2、HPV E6/E7、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、独特型GD2神经节苷脂G2)、Ras-突变型、p53(突变型)、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、PSA、hTERT、肉瘤易位断裂点、EphA2、前列腺酸磷酸酶PAP、neo-PAP、ML-IAP、AFP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN、TRP2、TRP2-Int2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、sLe(a)、cyp1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、SART3、STn、碳酸酐酶IX、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA)、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-beta、MAD-CT-2、For相关抗原1、TRP1、CA-125、CA19-9、钙网膜蛋白、上皮膜抗原(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、CD19、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、Myo-D1、肌特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶M2型同功酶的二聚形式(肿瘤M2-PK)、BAGE BAGE-1、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-SAR-35、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1、TPTE、糖/神经节苷脂GM2(癌胚抗原-免疫原性-1 OFA-I-1)、GM3、CA 15-3(CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA 50、CAM 43、CEA、EBNA、EF2、Epstein-Barr病毒抗原、HLA-A2、HLA-A11、HSP70-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白I类、GnTV、Herv-K-mel、LAGE-1、LAGE-2、(精子蛋白)SP17、SCP-1、P15(58)、Hom/Mel-40、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、TSP-180、P185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、TAG-72-4、CA-72-4、CAM 17.1、NuMa、13-联蛋白、P16、TAGE、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、HTgp-175、M344、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TLP、TPS、CD22、CD27、CD30、CD70、prostein、TARP(T细胞受体γ另起读框)、Trp-p8、整联蛋白αvβ3(CD61)、泌乳激素或Ral-B、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138和ROR1。在某些实施方案中，核苷酸序列编码2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。在某些实施方案中，本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段由沙粒病毒(包括三区段沙粒病毒)内所包括的核苷酸序列编码。

[0075] 在某些实施方案中，本文提供通过给予抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性的免疫检查点抑制剂治疗对象的肿瘤病的方法。在某些实施方案中，负检查点调节剂选自

细胞毒性T-淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、CD80、CD86、程序性细胞死亡1(PD-1)、程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、程序性细胞死亡配体2(PD-L2)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3;亦称为CD223)、半乳凝素-3、B和T淋巴细胞弱化子(BTLA)、T细胞膜蛋白3(TIM3)、半乳凝素-9(GAL9)、B7-H1、B7-H3、B7-H4、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9)、T细胞活化的V-结构域Ig抑制剂(VISTA)、糖皮质素诱导的肿瘤坏死因子受体相关(GITR)蛋白、疱疹病毒侵入介体(HVEM)、OX40、CD27、CD28、CD137、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15027、CGEN-15049、CGEN-15052和CGEN-15092。

[0076] 在某些实施方案中,使用本文提供的方法治疗的对象患有、易患肿瘤病或有肿瘤病风险。因此,在一些实施方案中,对象患有肿瘤病。在一些实施方案中,对象易患肿瘤病。在一些实施方案中,对象有肿瘤病的风险。在某些实施方案中,通过本文提供的方法可治疗的对象的肿瘤病选自急性成淋巴细胞白血病;急性成淋巴细胞淋巴瘤;急性淋巴细胞白血病;急性髓细胞性白血病;急性髓细胞性白血病(成人/儿童);肾上腺皮质癌;AIDS相关癌症;AIDS相关淋巴瘤;肛门癌;阑尾癌;星形细胞瘤;非典型畸胎样/横纹肌样瘤;基底细胞癌;肝外胆管癌(肝胆管型肝癌);膀胱癌;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑癌(成人/儿童);脑瘤,小脑星形细胞瘤(成人/儿童);脑瘤,大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤脑瘤;脑瘤,室管膜瘤;脑瘤,成神经管细胞瘤;脑瘤,幕上原始神经外胚层瘤;脑瘤,视通路和下丘脑神经胶质瘤;脑干神经胶质瘤;乳腺癌;支气管腺瘤/类癌;支气管瘤;伯基特淋巴瘤;儿童癌症;胃肠类癌瘤;类癌瘤;成人癌,原发部位不明;原发部位不明癌;中枢神经系统胚胎性瘤;中枢神经系统淋巴瘤,原发;宫颈癌;儿童肾上腺皮质癌;儿童癌症;儿童大脑星形细胞瘤;脊索瘤,儿童;慢性淋巴细胞白血病;慢性髓细胞性白血病;慢性髓细胞样白血病;慢性骨髓增殖性疾病;结肠癌;结肠直肠癌;颅咽管瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤;肺气肿;子宫内膜癌;室管膜母细胞瘤;室管膜瘤;食管癌;肿瘤尤因家族中的尤因肉瘤;颅外生殖细胞瘤;性腺外生殖细胞瘤;肝外胆管癌;胆囊癌;胃(gastric/stomach)癌;胃类癌;胃肠类癌瘤;胃肠基质瘤;生殖细胞瘤:颅外,性腺外或妊娠滋养细胞肿瘤;妊娠滋养细胞肿瘤,原发部位不明;神经胶质瘤;脑干妊娠滋养细胞肿瘤;神经胶质瘤,儿童视通路和下丘脑;毛细胞白血病;头颈癌;心脏癌;肝细胞(肝)癌;霍奇金淋巴瘤;咽下部癌;下丘脑和视通路神经胶质瘤;眼内黑素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西肉瘤;肾癌(肾细胞癌);朗格汉斯细胞组织细胞增多症;喉癌;口唇口腔癌;脂肉瘤;肝癌(原发性);肺癌,非小细胞;肺癌,小细胞;淋巴瘤,原发性中枢神经系统;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;男性乳腺癌;骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤;成神经管细胞瘤;髓质口皮瘤;黑素瘤;黑素瘤,眼内(眼);默克尔细胞癌;默克尔细胞皮肤癌;间皮瘤;间皮瘤,成人恶性;隐匿原发转移性鳞状颈癌;口癌;多发性内分泌肿瘤综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;蕈样肉芽肿病,骨髓增生异常综合征;骨髓增生异常/骨髓增生性疾病;髓细胞性白血病,慢性;髓细胞样白血病,成人急性;髓细胞样白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性(骨髓癌);骨髓增生性病症,慢性;鼻腔和鼻旁窦癌;鼻咽癌;成神经细胞瘤,非小细胞肺癌;非霍奇金淋巴瘤;少突神经胶质瘤;口癌;口腔癌;口咽癌;骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;卵巢上皮癌症(表面上皮-基质瘤);卵巢生殖细胞瘤;卵巢低恶性潜能肿瘤;胰腺癌;胰腺癌,胰岛细胞;乳头状瘤病;鼻旁窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;咽癌;嗜铬细胞瘤;松果体星形细胞瘤;松果体生殖细胞瘤;中度分化的松果体实质肿瘤;成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层瘤;垂体瘤;垂体腺瘤;浆

细胞瘤形成/多发性骨髓瘤;胸膜肺胚细胞瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;前列腺癌;直肠癌;肾细胞癌(肾癌);肾盂和输尿管,移行细胞癌;涉及染色体15上的NUT基因的呼吸道癌;成视网膜细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童;涎腺癌;肉瘤,尤因肿瘤家族;塞扎里综合征;皮肤癌(黑素瘤);皮肤癌(非黑素瘤);小细胞肺癌;小肠癌软组织肉瘤;软组织肉瘤;脊髓肿瘤;鳞状细胞癌;隐匿原发转移性鳞状颈癌;胃(stomach/gastric)癌;幕上原发性外胚层肿瘤;T细胞淋巴瘤,皮肤(蕈样肉芽肿病和塞扎里综合征);睾丸癌;喉癌;胸腺瘤;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;甲状腺癌,儿童;肾盂和输尿管移行细胞癌;尿道癌;子宫癌,子宫内膜;子宫肉瘤;阴道癌;外阴癌和肾母细胞瘤。

[0077] 在某些实施方案中,可以不同的组合给予在本文提供的方法中使用的本文提供的沙粒病毒颗粒(包括三区段沙粒病毒)和本文提供的免疫检查点抑制剂。因此,在某些实施方案中,沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂同时共同给予。在其它实施方案中,沙粒病毒颗粒在给予免疫检查点抑制剂之前给予。在另外其它的实施方案中,沙粒病毒颗粒在给予免疫检查点抑制剂之后给予。给予沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂之间的间隔可以是数小时、数天、数周或数月。因此,在一些实施方案中,间隔为约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、约9周、约10周、约11周、约12周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月或更久。

[0078] 在某些实施方案中,本文提供的方法包括以治疗有效量给予本文提供的沙粒病毒颗粒(包括三区段沙粒病毒)和本文提供的免疫检查点抑制剂。因此,在某些实施方案中,本文提供用于治疗对象的肿瘤病的方法,所述方法包括给予有需要的对象治疗有效量的沙粒病毒颗粒和治疗有效量的免疫检查点抑制剂,其中沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组区段:编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;和ORF野生型位置以外的位置处的至少一种沙粒病毒ORF,其中ORF编码沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白,且其中免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。

[0079] 在某些实施方案中,本文提供用于治疗对象的肿瘤病的方法,所述方法包括给予有需要的对象治疗有效量的二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒和治疗有效量的免疫检查点抑制剂,其中沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组:编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;和在感染细胞中扩增和表达其遗传信息但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的能力,且其中免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。

[0080] 在某些实施方案中,本文提供治疗对象的肿瘤病的方法,所述方法包括给予对象本文提供的表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的两种或更多种沙粒病毒(包括三区段沙粒病毒)。在一个更具体的实施方案中,本文提供的方法包括给予对象第一沙粒病毒颗粒,并在一段时间后给予对象第二沙粒病毒颗粒。在又一个实施方案中,第一沙粒病毒颗粒和第二沙粒病毒颗粒来源于不同的沙粒病毒种和/或包含编码不同肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0081] 在某些实施方案中,本文所述方法包括给予有需要的对象与免疫检查点抑制剂组合的编码新抗原的沙粒病毒颗粒。在一些实施方案中,新抗原是具有R203M突变的ADP依赖

性葡糖激酶(Adpgk)。在一些实施方案中,对象患有结肠癌。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是结合或抑制程序性细胞死亡1(“PD1”)的活性的抗体。因此,在一个实施方案中,本文公开了用于治疗对象的结肠癌的方法,所述方法包括给予有需要的对象沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂,其中沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的沙粒病毒基因组区段:(i)编码新抗原或其抗原片段的核苷酸序列;和(ii)在ORF野生型位置以外位置处的至少一种沙粒病毒ORF,其中ORF编码沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白,其中新抗原是具有R203M突变的Adpgk,免疫检查点抑制剂是结合或抑制PD1的抗体,沙粒病毒颗粒来源于LCMV且是包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒,且其中在两个S区段之一中,编码GP的ORF在沙粒病毒3’UTR的控制下,且两个S区段的每一个包含编码新抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0082] 在某些实施方案中,本文所述方法包括给予有需要的对象与免疫检查点抑制剂组合的编码黑素瘤抗原的沙粒病毒颗粒。在一些实施方案中,黑素瘤抗原是糖蛋白100(“GP 100”)、酪氨酸酶相关蛋白1(“TRP1”)或酪氨酸酶相关蛋白2(“TRP2”)。在一些实施方案中,对象患有黑素瘤。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是结合或抑制PD1的活性的抗体。因此,在一个实施方案中,本文公开了用于治疗对象的黑素瘤的方法,所述方法包括给予有需要的对象沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂,其中沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的沙粒病毒基因组区段:(i)编码黑素瘤抗原或其抗原片段的核苷酸序列;和(ii)在ORF野生型位置以外位置处的至少一种沙粒病毒ORF,其中ORF编码沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白,其中黑素瘤抗原选自GP 100、TRP1和TRP2,免疫检查点抑制剂是结合或抑制PD1的抗体,沙粒病毒颗粒来源于LCMV且是包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒,且其中在两个S区段之一中,编码GP的ORF在沙粒病毒3’UTR的控制下,且两个S区段的每一个包含编码黑素瘤抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0083] 在某些实施方案中,本文提供本文所述沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂在本文所述治疗对象的肿瘤病的方法中的用途。

[0084] 3.4药物组合物和药盒

[0085] 在某些实施方案中,本文提供包含本文提供的沙粒病毒颗粒(包括三区段沙粒病毒颗粒)、本文提供的免疫检查点抑制剂和药学上可接受的载体的组合物,例如药物、免疫原性或疫苗组合物。因此,在一些实施方案中,本文提供包含本文提供的沙粒病毒颗粒、本文提供的免疫检查点抑制剂和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0086] 在某些实施方案中,组合物中所含的沙粒病毒颗粒是本文提供的感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒。在某些实施方案中,组合物中所含的沙粒病毒颗粒是本文提供的三区段沙粒病毒颗粒,包括感染性复制缺陷型三区段沙粒病毒颗粒或可复制型三区段沙粒病毒颗粒。因此,在某些实施方案中,本文提供的组合物(包括药物、免疫原性或疫苗组合物)包含是复制缺陷型的沙粒病毒颗粒,包括三区段沙粒病毒颗粒,其中沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组:(1)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;和(2)在感染细胞中扩增和表达其遗传信息但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的能力。此外,在某些实施方案中,本文提供的组合物(包括药物、免疫原性或疫苗组合物)包含是复制缺陷型的三区段沙粒病毒颗粒,其中三区段沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组:(1)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;(2)在感染细胞中

扩增和表达其遗传信息的能力;和(3)在正常的非遗传改造的细胞中产生进一步的感染性子代颗粒的能力。在某些实施方案中,免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。

[0087] 因此,在一些实施方案中,本文提供包含本文提供的二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒、本文提供的免疫检查点抑制剂和药学上可接受的载体的药物组合物。在具体的某些实施方案中,沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组:(1)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;和(2)在感染细胞中扩增和表达其遗传信息但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的能力。在更进一步的实施方案中,免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。

[0088] 在某些实施方案中,由本文提供的沙粒病毒颗粒内包括的核苷酸序列编码的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原可以是选自以下的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的一种或多种:致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原、癌胚抗原、组织分化抗原、突变蛋白抗原、新抗原、亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1AI、BCLX(L)、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKKI、ENAH(hMcna)、Ga733(EpCAM)、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IDO1、IGF2B3、IL13Ralpha2、肠羧酸酯酶、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53(非突变型)、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1(前列腺6次跨膜上皮抗原1)、存活蛋白、端粒酶、VEGF、WT1、EGF-R、CEA、CD20、CD33、CD52、糖蛋白100(GP 100或gp 100蛋白)、MELANA/MART1、MART2、NY-ESO-1、p53、MAGE A1、MAGE A3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CDK4、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL、BCR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-RAF、CASP-5、CASP-8、β-联蛋白、Cdc27、CDK4、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、H-ras、K-ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SSX、SSX2、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、ormdm-2、LMP2、HPV E6/E7、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、独特型GD2神经节苷脂G2)、Ras-突变型、p53(突变型)、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、PSA、hTERT、肉瘤易位断裂点、EphA2、前列腺酸磷酸酶PAP、neo-PAP、ML-IAP、AFP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN、TRP2、TRP2-Int2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、sLe(a)、cyp1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、SART3、STn、碳酸酐酶IX、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA)、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-beta、MAD-CT-2、For相关抗原1、TRP1、CA-125、CA19-9、钙网膜蛋白、上皮膜抗原(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、CD19、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、Myo-D1、肌特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶M2型同功酶的二聚形式(肿瘤M2-PK)、BAGE BAGE-1、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-SAR-35、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1、TPTE、糖/神经节苷脂GM2(癌胚抗原-免疫原性-1 OFA-I-1)、GM3、CA 15-3(CA

27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA 50、CAM 43、CEA、EBNA、EF2、Epstein-Barr病毒抗原、HLA-A2、HLA-A11、HSP70-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白I类、GnTV、Herv-K-mel、LAGE-1、LAGE-2、(精子蛋白)SP17、SCP-1、P15(58)、Hom/Mel-40、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、TSP-180、P185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、TAG-72-4、CA-72-4、CAM 17.1、NuMa、13-联蛋白、P16、TAGE、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、HTgp-175、M344、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TLP、TPS、CD22、CD27、CD30、CD70、prostein、TARP(T细胞受体γ另起读框)、Trp-p8、整联蛋白αvβ3(CD61)、泌乳激素或Ral-B、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138和ROR1。在某些实施方案中,核苷酸序列编码2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。在某些实施方案中,本文提供的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的抗原片段由沙粒病毒内所包括的核苷酸序列编码。

[0089] 在某些实施方案中,本文提供的组合物(包括药物、免疫原性或疫苗组合物)包括抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性的免疫检查点抑制剂。在某些实施方案中,负检查点调节剂选自细胞毒性T-淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、CD80、CD86、程序性细胞死亡1(PD-1)、程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、程序性细胞死亡配体2(PD-L2)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3;亦称为CD223)、半乳凝素-3、B和T淋巴细胞弱化子(BTLA)、T细胞膜蛋白3(TIM3)、半乳凝素-9(GAL9)、B7-H1、B7-H3、B7-H4、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9)、T细胞活化的V-结构域Ig抑制剂(VISTA)、糖皮质素诱导的肿瘤坏死因子受体相关(GITR)蛋白、疱疹病毒侵入介体(HVEM)、OX40、CD27、CD28、CD137、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15027、CGEN-15049、CGEN-15052和CGEN-15092。

[0090] 在某些实施方案中,本文提供的组合物、药物、免疫原性或疫苗组合物可用于本文所述方法。因此,在某些实施方案中,组合物可用于治疗肿瘤病。在具体的某些实施方案中,本文提供的组合物可用于治疗选自以下的肿瘤病:急性成淋巴细胞白血病;急性成淋巴细胞淋巴瘤;急性淋巴细胞白血病;急性髓细胞性白血病;急性髓细胞性白血病(成人/儿童);肾上腺皮质癌;AIDS相关癌症;AIDS相关淋巴瘤;肛门癌;阑尾癌;星形细胞瘤;非典型畸胎样/横纹肌样瘤;基底细胞癌;肝外胆管癌(肝胆管型肝癌);膀胱癌;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑癌(成人/儿童);脑瘤,小脑星形细胞瘤(成人/儿童);脑瘤,大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤脑瘤;脑瘤,室管膜瘤;脑瘤,成神经管细胞瘤;脑瘤,幕上原始神经外胚层瘤;脑瘤,视通路和下丘脑神经胶质瘤;脑干神经胶质瘤;乳腺癌;支气管腺瘤/类癌;支气管瘤;伯基特淋巴瘤;儿童癌症;胃肠类癌瘤;类癌瘤;成人癌,原发部位不明;原发部位不明癌;中枢神经系统胚胎性瘤;中枢神经系统淋巴瘤,原发;宫颈癌;儿童肾上腺皮质癌;儿童癌症;儿童大脑星形细胞瘤;脊索瘤,儿童;慢性淋巴细胞白血病;慢性髓细胞性白血病;慢性髓细胞样白血病;慢性骨髓增殖性疾病;结肠癌;结肠直肠癌;颅咽管瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤;肺气肿;子宫内膜癌;室管膜母细胞瘤;室管膜瘤;食管癌;肿瘤尤因家族中的尤因肉瘤;颅外生殖细胞瘤;性腺外生殖细胞瘤;肝外胆管癌;胆囊癌;胃(gastric/stomach)癌;胃类癌;胃肠类癌瘤;胃肠基质瘤;生殖细胞瘤:颅外,性腺外或妊娠滋养细胞肿瘤;妊娠滋养细胞肿瘤,原发部位不明;神经胶质瘤;脑干妊娠滋养细胞肿瘤;神经胶质瘤,儿童视通路和下丘脑;毛细胞白血病;头颈癌;心脏癌;肝细胞(肝)癌;霍奇金淋巴瘤;咽下部癌;下丘脑和视通路神经胶质瘤;眼内黑素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波

西肉瘤;肾癌(肾细胞癌);朗格汉斯细胞组织细胞增多症;喉癌;口唇口腔癌;脂肉瘤;肝癌(原发性);肺癌,非小细胞;肺癌,小细胞;淋巴瘤,原发性中枢神经系统;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;男性乳腺癌;骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤;成神经管细胞瘤;髓质口皮瘤;黑素瘤;黑素瘤,眼内(眼);默克尔细胞癌;默克尔细胞皮肤癌;间皮瘤;间皮瘤,成人恶性;隐匿原发转移性鳞状颈癌;口癌;多发性内分泌肿瘤综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;蕈样肉芽肿病,骨髓增生异常综合征;骨髓增生异常/骨髓增生性疾病;髓细胞性白血病,慢性;髓细胞样白血病,成人急性;髓细胞样白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性(骨髓癌);骨髓增生性病症,慢性;鼻腔和鼻旁窦癌;鼻咽癌;成神经细胞瘤,非小细胞肺癌;非霍奇金淋巴瘤;少突神经胶质瘤;口癌;口腔癌;口咽癌;骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;卵巢上皮癌症(表面上皮-基质瘤);卵巢生殖细胞瘤;卵巢低恶性潜能肿瘤;胰腺癌;胰腺癌,胰岛细胞;乳头状瘤病;鼻旁窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;咽癌;嗜铬细胞瘤;松果体星形细胞瘤;松果体生殖细胞瘤;中度分化的松果体实质肿瘤;成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层瘤;垂体瘤;垂体腺瘤;浆细胞瘤形成/多发性骨髓瘤;胸膜肺胚细胞瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;前列腺癌;直肠癌;肾细胞癌(肾癌);肾盂和输尿管,移行细胞癌;涉及染色体15上的NUT基因的呼吸道癌;成视网膜细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童;涎腺癌;肉瘤,尤因肿瘤家族;塞扎里综合征;皮肤癌(黑素瘤);皮肤癌(非黑素瘤);小细胞肺癌;小肠癌软组织肉瘤;软组织肉瘤;脊髓肿瘤;鳞状细胞癌;隐匿原发转移性鳞状颈癌;胃(stomach/gastric)癌;幕上原发性外胚层肿瘤;T细胞淋巴瘤,皮肤(蕈样肉芽肿病和塞扎里综合征);睾丸癌;喉癌;胸腺瘤;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;甲状腺癌,儿童;肾盂和输尿管移行细胞癌;尿道癌;子宫癌,子宫内膜;子宫肉瘤;阴道癌;外阴癌和肾母细胞瘤。

[0091] 本文还提供可用于实施本文所述方法的药盒。因此,在某些实施方案中,本文提供的药盒包括一个或多个容器和使用说明书,其中一个或多个容器包含本文提供的组合物(例如药物、免疫原性或疫苗组合物)。在其它某些实施方案中,本文提供的药盒包括各自含有用于实施本文所述方法的活性成分的容器。因此,在某些实施方案中,本文提供的药盒包括两个或更多个容器和使用说明书,其中一个容器包含本文提供的沙粒病毒颗粒(包括三区段沙粒病毒颗粒),另一个容器包含本文提供的免疫检查点抑制剂。在一个具体实施方案中,本文提供的药盒包括两个或更多个容器和使用说明书,其中一个容器包含本文提供的沙粒病毒颗粒(包括三区段沙粒病毒颗粒),另一个容器包含本文提供的免疫检查点抑制剂,其中沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组:编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;和在感染细胞中扩增和表达其遗传信息但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的能力。此外,在某些实施方案中,一个容器包含经改造含有包含以下基因组的三区段沙粒病毒颗粒:编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;在感染细胞中扩增和表达其遗传信息的能力;和在正常的非遗传改造的细胞中产生进一步的感染性子代颗粒的能力。在某些实施方案中,本文提供的药盒包括两个或更多个容器和使用说明书,其中一个容器包含本文提供的二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒,另一个容器包含本文提供的免疫检查点抑制剂。在一个具体实施方案中,本文提供的药盒包括两个或更多个容器和使用说明书,其中一个容器包含本文提供的二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒,另一个容器包含本文提供的免疫检查点抑制剂,其中沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组:编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列;

和在感染细胞中扩增和表达其遗传信息但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的能力。在某些实施方案中，免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。

[0092] 3.5惯例和缩略语

[0093]

缩略语	惯例
APC	抗原呈递细胞
C 细胞	补足细胞系
CD4	分化簇 4
CD8	分化簇 8
CMI	细胞介导免疫
GP	糖蛋白
GS-质粒	质粒表达基因组区段

[0094]

缩略语	惯例
IGR	基因间区
JUNV	Junin 病毒
L 蛋白	依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶
L 区段	长区段
LCMV	淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒
MHC	主要组织相容性复合体
NP	核蛋白
ORF	开放阅读框
S 区段	短区段
TF-质粒	质粒表达反式作用因子
UTR	非翻译区
Z 蛋白	基质蛋白 Z

[0095] 4.附图简述

[0096] 图1:二区段和三区段LCMV的基因组结构的示意图。野生型LCMV的二区段基因组由编码GP和NP的1个S区段和编码Z蛋白和L蛋白的1个L区段组成(i)。两个区段的两侧是各自的5'和3'UTR。重组三区段LCMV的基因组(r3LCMV)由1个L区段和其中具有将目标基因(在此为GFP,其可备选为本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段)插入各S区段每一个中的一个位置的两个S区段。r3LCMV-GFP^{天然}(nat)在其天然位置具有全部病毒基因(ii),而r3LCMV-GFP^{人工}(art)中的GP ORF被人为并置并在3'UTR的控制下表达(iii)。

[0097] 图2:野生型沙粒病毒的基因组由短(1;～3.4kb)和大(2;～7.2kb)RNA区段组成。短区段编码编码核蛋白(3)和糖蛋白(4)的开放阅读框。大区段编码依赖于RNA的RNA聚合酶L(5)和基质蛋白Z(6)。野生型沙粒病毒可通过缺失糖蛋白基因并插入针对其诱导免疫应答的本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段(7)代替糖蛋白基因提供复制缺陷型疫苗载体。

[0098] 图3A-3B表示用编码OV抗原的三区段可复制型沙粒病毒载体(r3LCMV-OVA)和抗

PD1抗体(aPD1)治疗的MC-38OVA小鼠癌症模型(C57BL/6小鼠,植入MC-38 OVADim肿瘤细胞)肿瘤生长的作用(图3A)和百分比成活率(图3B)的示例性结果。符号表示每组5只(未治疗)或6只(其它组)小鼠的均值±SEM。

[0099] 图4A-4C表示用编码Adpgk^{mut}抗原(Adpgk^{mut})的三区段可复制型(r3LCMV)或二区段复制缺陷型(r2LCMV)沙粒病毒载体和抗PD1抗体(α-PD-1或PD1)治疗的MC-38小鼠癌症模型(C57BL/6小鼠,植入MC-38肿瘤细胞)对诱导AdpgK^{mut}抗原特异性CD8+细胞毒性T细胞(图4A)、肿瘤生长(图4B)和百分比成活率(图4C)的示例性结果。

[0100] 图5A通过图表表示黑素瘤小鼠模型的示例性方案。

[0101] 图5B-5D表示采用图5A的治疗方案用编码黑素瘤抗原的三区段可复制型(r3LCMV)或二区段复制缺陷型(rLCMV)沙粒病毒载体和抗PD1抗体(α-PD-1)治疗的黑素瘤小鼠模型(注射B16F10黑素瘤细胞的C57BL/6小鼠)对肿瘤生长(图5B)、动物存活率百分比(图5C)和存活天数(图5D)的示例性结果。第1组表示用r3LCMV和α-PD-1治疗的组。第2组表示用rLCMV和α-PD-1治疗的组。第3组表示用缓冲液和α-PD-1治疗的组。第4组表示仅用r3LCMV治疗的组。第5组表示仅用rLCMV治疗的组。第6组表示仅用缓冲液治疗。符号表示每组5只小鼠的均值±SEM。

[0102] 5.发明详述

[0103] 本文提供治疗肿瘤病(例如癌症)的免疫疗法。术语“肿瘤性”或“赘生物”是指细胞或组织的异常新生长。这种异常的新生长可形成肿块,亦称为肿瘤或瘤形成。赘生物包括良性赘生物、原位赘生物、恶性赘生物和情况不确定或不明的赘生物。在某些实施方案中,使用本文所述方法和组合物治疗的肿瘤病是癌症。

[0104] 本文提供的免疫疗法包括不同的方法和组合物。更具体地说,本文提供包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒或病毒载体。可将这些遗传修饰的病毒给予对象用于治疗肿瘤病,例如癌症。本文提供的沙粒病毒,包括编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的详细描述可见于第5.1、5.2、5.3和5.4节。此外,产生用于本文所述方法和组合物的沙粒病毒颗粒或病毒载体的方法更详细地描述于第5.5和5.6节。

[0105] 除了将沙粒病毒颗粒或病毒载体给予对象以外,治疗本文提供的肿瘤病的免疫疗法可包括免疫检查点调谐剂。术语“免疫检查点调谐剂”(亦称为“限点调谐剂”或“检查点调节剂”)是指调节(例如完全或部分降低、抑制、干扰、激活、刺激、增加、增强或支持)一种或多种检查点分子的功能的分子或化合物。因此,免疫检查点调谐剂可以是免疫检查点抑制剂或免疫检查点激活剂。

[0106] “免疫检查点抑制剂”是指抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性的分子。在某些实施方案中,与本文公开的方法和组合物一起使用的免疫检查点抑制剂可直接抑制负检查点调节剂的活性,或降低负检查点调节剂的表达,或干扰负检查点调节剂和结合配偶体(例如配体)的相互作用。与本文公开的方法和组合物一起使用的免疫检查点抑制剂包括靶向负检查点调节剂的表达的蛋白质、多肽、肽、反义寡核苷酸、抗体、抗体片段或抑制性RNA分子。

[0107] “负检查点调节剂”是指通过在T细胞被配体或反受体占用后将负信号递送给T细胞来减量调节免疫应答(例如T细胞活化)的分子。负检查点调节剂的示例性功能是防止不

成比例的免疫活化，将附带的损害降到最低，和/或保持外周自体耐受性。在某些实施方案中，负检查点调节剂是由抗原呈递细胞表达的配体或受体。在某些实施方案中，负检查点调节剂是由T细胞表达的配体或受体。在某些实施方案中，负检查点调节剂是由抗原呈递细胞和T细胞表达的配体或受体。

[0108] 因此，在某些实施方案中，本文提供使用包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒或病毒载体和免疫检查点抑制剂治疗肿瘤病的方法和组合物。这类免疫检查点抑制剂可抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。因此，在某些实施方案中，本文提供使用包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒或病毒载体和抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性的免疫检查点抑制剂治疗肿瘤病的方法。此外，在某些实施方案中，本文提供含有包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒或病毒载体和抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性的免疫检查点抑制剂的组合物。在某些实施方案中，本文提供的沙粒病毒颗粒或病毒载体经改造含有具有编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒基因组区段和在ORF野生型位置以外位置处的至少一种沙粒病毒开放阅读框(“ORF”)。在某些实施方案中，本文提供的沙粒病毒颗粒或病毒载体是感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒或病毒载体。在其它实施方案中，本文提供的沙粒病毒颗粒是三区段沙粒病毒颗粒或病毒载体，其可以是复制缺陷型或可复制型的。在另外其它的实施方案中，本文提供的三区段沙粒病毒颗粒或病毒载体在增殖时不产生可复制型二区段病毒颗粒。使用本文提供的沙粒病毒颗粒或病毒载体和免疫检查点抑制剂的方法和组合物更详细地描述于第5.8和5.9节。

[0109] 5.1非天然位置中具有开放阅读框的沙粒病毒

[0110] 本文提供其ORF具有重排和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒。在某些实施方案中，这类沙粒病毒是可复制型和感染性的。因此，在某些实施方案中，本文提供沙粒病毒基因组区段，其中沙粒病毒基因组区段经改造在其中各个基因存在于自野生型分离的病毒的位置处以外的位置携带沙粒病毒ORF，例如ORF的LCMV-MP(本文称为“野生型位置”)(即非天然位置)和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0111] 野生型沙粒病毒基因组区段和ORF是本领域已知的。具体地说，沙粒病毒基因组由S区段和L区段组成。S区段携带编码GP和NP的ORF。L区段编码L蛋白和Z蛋白。两个区段的两侧是各自的5’和3’UTR。

[0112] 在某些实施方案中，沙粒病毒基因组区段可经改造在野生型位置以外的位置中携带两种或更多种沙粒病毒ORF。在其它实施方案中，沙粒病毒基因组区段可经改造野生型位置以外的位置中携带2种沙粒病毒ORF，或3种沙粒病毒ORF，或或4种沙粒病毒ORF。

[0113] 在某些实施方案中，本文提供的沙粒病毒基因组区段可以是：

[0114] (i)沙粒病毒S区段，其中编码NP的ORF在沙粒病毒5’UTR的控制下；

[0115] (ii)沙粒病毒S区段，其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒5’UTR的控制下；

[0116] (iii)沙粒病毒S区段，其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒5’UTR的控制下；

[0117] (iv)沙粒病毒S区段，其中编码GP的ORF在沙粒病毒3’UTR的控制下；

[0118] (v)沙粒病毒S区段，其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒3’UTR的控制下；

[0119] (vi)沙粒病毒S区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;

[0120] (vii)沙粒病毒L区段,其中编码GP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0121] (viii)沙粒病毒L区段,其中编码NP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0122] (ix)沙粒病毒L区段,其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下;

[0123] (x)沙粒病毒L区段,其中编码GP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;

[0124] (xi)沙粒病毒L区段,其中编码NP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下;和

[0125] (xii)沙粒病毒L区段,其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下。

[0126] 在某些实施方案中,本文所述沙粒病毒基因组区段的非天然位置中的ORF可在沙粒病毒3'UTR或沙粒病毒5'UTR的控制下。在更具体的实施方案中,沙粒病毒3'UTR是沙粒病毒S区段的3'UTR。在另一个具体的实施方案中,沙粒病毒3'UTR是沙粒病毒L区段的3'UTR。在更具体的实施方案中,沙粒病毒5'UTR是沙粒病毒S区段的5'UTR。在其它的具体实施方案中,5'UTR是L区段的5'UTR。

[0127] 在其它实施方案中,本文所述沙粒病毒基因组区段的非天然位置中的ORF可在沙粒病毒保守末端序列元件(5'-和3'-端19-20-nt区)控制下(参见例如Perez&de la Torre,2003,J Virol.77(2):1184-1194)。

[0128] 在某些实施方案中,在沙粒病毒基因组区段的非天然位置中的ORF可在5'UTR的启动子元件控制下(参见例如Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在另一个实施方案中,在沙粒病毒基因组区段的非天然位置中的ORF可在3'UTR的启动子元件控制下(参见例如Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在更具体的实施方案中,5'UTR的启动子元件是S区段或L区段的5'UTR启动子元件。在另一个具体的实施方案中,3'UTR的启动子元件是S区段或L区段的3'UTR启动子元件。

[0129] 在某些实施方案中,在沙粒病毒基因组区段的非天然位置中的ORF可在截短沙粒病毒3'UTR或截短沙粒病毒5'UTR的控制下(参见例如Perez&de la Torre,2003,J Virol.77(2):1184-1194;Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在更具体的实施方案中,截短的3'UTR是沙粒病毒S区段或L区段的3'UTR。在更具体的实施方案中,截短的5'UTR是沙粒病毒S区段或L区段的5'UTR。

[0130] 本文还提供包含经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的第一基因组区段和第二沙粒病毒基因组区段使得沙粒病毒颗粒包含S区段和L区段的沙粒病毒颗粒。在具体实施方案中,在ORF的野生型位置以外位置的ORF是沙粒病毒ORF之一。

[0131] 在某些具体实施方案中,沙粒病毒颗粒可包含所有4种沙粒病毒ORF的完全互补序列。在具体实施方案中,第二沙粒病毒基因组区段经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF。在另一个具体的实施方案中,第二沙粒病毒基因组区段可以是野生型基因组区段(即在野生型位置中的区段包含ORF)。

[0132] 在某些实施方案中,第一沙粒病毒基因组区段是L区段,第二沙粒病毒基因组区段是S区段。在其它实施方案中,第一沙粒病毒基因组区段是S区段,第二沙粒病毒基因组区段是L区段。

[0133] 表1说明包含在ORF的野生型位置以外位置具有ORF的基因组区段和第二基因组区段的沙粒病毒颗粒的非限制性实例。

[0134] 表1

[0135] 沙粒病毒颗粒

[0136] *位置1在沙粒病毒S区段5'UTR的控制下;位置2在沙粒病毒S区段3'UTR的控制下;位置3在沙粒病毒L区段5'UTR的控制下;位置4在沙粒病毒L区段3'UTR的控制下。

[0137]

位置1	位置2	位置3	位置4
GP	NP	L	Z
GP	Z	L	NP
GP	Z	NP	L
GP	L	NP	Z
GP	L	Z	NP
NP	GP	L	Z
NP	GP	Z	L
NP	L	GP	Z
NP	L	Z	GP
NP	Z	GP	L
NP	Z	L	GP
Z	GP	L	NP
Z	GP	NP	L
Z	NP	GP	L
Z	NP	L	GP
Z	L	NP	GP
Z	L	GP	NP
L	NP	GP	Z
L	NP	Z	GP
L	GP	Z	NP
L	GP	NP	Z
L	Z	NP	GP
L	Z	GP	NP

[0138] 本文还提供经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒基因组区段的cDNA和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在更具体的实施方案中,本文提供表1所示沙粒病毒基因组的cDNA或一组cDNA。

[0139] 在某些实施方案中,经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒基因组区段的cDNA是DNA表达载体的一部分或掺入到其中。在一个具体实施方案中,经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒基因组区段的cDNA是促进本文所述沙粒病毒基因组区段产生的DNA表达载体的一部分或掺入其中。在另一个实施方案中,本文所述cDNA可掺入质粒中。第5.7节提供cDNA或核酸和表达系统的更详细的描述。产生cDNA的技术是分子生物学和DNA操作和生产的惯用和常规技术。可采用技术人员已知的任何克隆技术。例如技术是众所周知的,技术人员可在例如以下实验室手册中获得:Sambrook and Russell,Molecular Cloning:A laboratory Manual,3rd edition,Cold Spring Harbor Laboratory N.Y.(2001)。

[0140] 在某些实施方案中，将经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒基因组区段的cDNA和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列导入(例如转染)宿主细胞。因此，在一些实施方案中，本文提供包含经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒基因组区段的cDNA(即基因组区段的cDNA)和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的宿主细胞。在其它实施方案中，本文所述cDNA是DNA表达载体的一部分或可掺入DNA表达载体中并导入宿主细胞。因此，在一些实施方案中，本文提供包含掺入载体的本文所述cDNA的宿主细胞。在其它实施方案中，将本文所述沙粒病毒基因组区段导入宿主细胞中。

[0141] 在某些实施方案中，本文描述了产生包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒基因组区段的方法，其中所述方法包括转录沙粒病毒基因组区段的cDNA。在某些实施方案中，在沙粒病毒基因组区段体外或体内转录期间可能存在病毒聚合酶蛋白。

[0142] 在某些实施方案中，沙粒病毒基因组区段的转录使用双向启动子进行。在其它实施方案中，沙粒病毒基因组区段的转录使用双向表达盒进行(参见例如Ortiz-Riaño et al.,2013,J Gen Virol.,94(Pt 6):1175-1188)。在更具体的实施方案中，双向表达盒包含分别自相对侧向所插入的沙粒病毒基因组区段两端读取的聚合酶I和聚合酶II启动子两者。在甚至更具体的实施方案中，含pol-I和pol-II启动子的双向表达盒自相对侧向L区段和S区段读取。

[0143] 在其它实施方案中，本文所述沙粒病毒基因组区段的cDNA的转录包含启动子。启动子的具体实例包括RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T7启动子、SP6启动子或T3启动子。

[0144] 在某些实施方案中，产生沙粒病毒基因组区段的方法可进一步包括将包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒基因组区段的cDNA导入宿主细胞。在某些实施方案中，产生沙粒病毒基因组区段的方法可进一步包括将包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒基因组区段的cDNA导入宿主细胞，其中宿主细胞表达用于产生沙粒病毒基因组区段的所有其它组分；并从宿主细胞的上清液中纯化沙粒病毒基因组区段。这类方法为本领域技术人员熟知。

[0145] 本文提供培养用本文提供的核酸、载体和组合物感染的细胞的细胞系、培养物和方法。第5.7节提供本文所述核酸、载体系统和细胞系的更详细的描述。

[0146] 在某些实施方案中，本文所述沙粒病毒颗粒产生感染性和可复制型沙粒病毒颗粒。在具体实施方案中，本文所述沙粒病毒颗粒是减毒的。在一个具体的实施方案中，沙粒病毒颗粒经减毒使得病毒保持、至少部分能够增殖且可体内复制，但只可产生低病毒载量，导致是不致病的亚临床感染水平。这类减毒病毒可用作免疫原性组合物。本文提供在第5.9节中所述包含在非天然位置具有ORF的沙粒病毒的免疫原性组合物。

[0147] 5.1.1在非天然位置具有开放阅读框的复制缺陷型沙粒病毒颗粒

[0148] 在某些实施方案中，本文提供沙粒病毒颗粒，其中(i)ORF位于ORF野生型位置以外的位置；和(ii)编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF被去除或功能失活，使得所得病毒无法产生进一步的感染性子代病毒颗粒。包含其中一种或多种ORF缺失或功能失活的遗传修饰的基

因组的沙粒病毒颗粒可在补足细胞(即表达已缺失或功能失活的沙粒病毒ORF的细胞)中产生。所得沙粒病毒颗粒的遗传物质可在宿主细胞感染时转移至宿主细胞中,其中遗传物质可表达和扩增。另外,本文所述遗传修饰的沙粒病毒颗粒的基因组可编码来自沙粒病毒颗粒以外的生物的异源ORF。

[0149] 在某些实施方案中,沙粒病毒的ORF缺失或功能失活并用编码本文所述肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的核苷酸序列置换。在一个具体实施方案中,编码沙粒病毒的糖蛋白GP的ORF缺失或功能失活。在某些实施方案中,基因的功能失活消除任何翻译产物。在某些实施方案中,功能失活是指允许部分翻译,然而翻译产物不再有功能且不能代替野生型蛋白质的遗传变化。

[0150] 在某些实施方案中,编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的4种ORF的至少一种被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在另一个实施方案中,编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的至少1种ORF、至少2种ORF、至少3种ORF或至少4种ORF可被去除并用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在具体实施方案中,编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的4种ORF中仅1种被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在更具体的实施方案中,沙粒病毒基因组区段的GP的ORF被去除。在另一个具体的实施方案中,沙粒病毒基因组区段的NP的ORF被去除。在更具体的实施方案中,沙粒病毒基因组区段的Z蛋白的ORF被去除。在又一个具体实施方案中,编码L蛋白的ORF被去除。

[0151] 因此,在某些实施方案中,本文提供的沙粒病毒颗粒包含以下的基因组区段:(i)经改造在非天然位置携带ORF;(ii)编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF被去除;(iii)被去除的ORF用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。

[0152] 在某些实施方案中,肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的片段是这样的抗原,它能够(i)在宿主(例如小鼠、兔、山羊、驴或人)中诱导抗体免疫应答,其中所得抗体与在肿瘤细胞(例如癌细胞)中或其上表达的免疫原性蛋白质特异性结合;和/或(ii)诱导特异性T细胞免疫应答。

[0153] 在某些实施方案中,编码本文提供的抗原片段的核苷酸序列为8-100个核苷酸长度、15-100个核苷酸长度、25-100个核苷酸长度、50-200个核苷酸长度、50-400个核苷酸长度、200-500个核苷酸长度或400-600个核苷酸长度、500-800个核苷酸长度。在其它实施方案中,编码本文提供的抗原片段的核苷酸序列为750-900个核苷酸长度、800-100个核苷酸长度、850-1000个核苷酸长度、900-1200个核苷酸长度、1000-1200个核苷酸长度、1000-1500核苷酸或10-1500个核苷酸长度、1500-2000个核苷酸长度、1700-2000个核苷酸长度、2000-2300个核苷酸长度、2200-2500个核苷酸长度、2500-3000个核苷酸长度、3000-3200个核苷酸长度、3000-3500个核苷酸长度、3200-3600个核苷酸长度、3300-3800个核苷酸长度、4000个核苷酸-4400个核苷酸长度、4200-4700个核苷酸长度、4800-5000个核苷酸长度、5000-5200个核苷酸长度、5200-5500个核苷酸长度、5500-5800个核苷酸长度、5800-6000个核苷酸长度、6000-6400个核苷酸长度、6200-6800个核苷酸长度、6600-7000个核苷酸长度、7000-7200个核苷酸长度、7200-7500个核苷酸长度或7500个核苷酸长度。在一些实施方案中,核苷酸序列编码肽或多肽,其为5-10个氨基酸长度、10-25个氨基酸长度、25-50个氨基酸长度、50-100个氨基酸长度、100-150个氨基酸长度、150-200个氨基酸长度、200-250个氨

基酸长度、250-300个氨基酸长度、300-400个氨基酸长度、400-500个氨基酸长度、500-750个氨基酸长度、750-1000个氨基酸长度、1000-1250个氨基酸长度、1250-1500个氨基酸长度、1500-1750个氨基酸长度、1750-2000个氨基酸长度、2000-2500个氨基酸长度或大于2500或更多个氨基酸长度。在一些实施方案中，核苷酸序列编码不超过2500个氨基酸长度的多肽。在具体实施方案中，核苷酸序列不含终止密码子。在某些实施方案中，核苷酸序列是密码子优化的。在某些实施方案中，核苷酸组成、核苷酸对组成或两者可被优化。这类优化的技术是本领域已知的，可用来使编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列最优化。

[0154] 在某些实施方案中，沙粒病毒颗粒的生长和感染性不受编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列影响。

[0155] 可采用本领域技术人员已知技术产生包含经改造在野生型位置以外的位置携带沙粒病毒ORF的沙粒病毒基因组区段和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒。例如，可采用反求遗传学技术产生这类沙粒病毒颗粒。在其它实施方案中，复制缺陷型沙粒病毒颗粒(即经改造在野生型位置以外的位置携带沙粒病毒ORF的沙粒病毒基因组区段，其中编码GP、NP、Z蛋白、L蛋白的ORF已缺失)可在补足细胞中产生。

[0156] 在某些实施方案中，包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的本文提供的沙粒病毒颗粒或沙粒病毒基因组区段另包含编码至少一种免疫调节肽、多肽或蛋白质的至少一个核苷酸序列。在某些实施方案中，免疫调节肽、多肽或蛋白质是钙网蛋白(CRT)或其片段；泛素或其片段；粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或其片段；不变链(CD74)或其抗原片段；结核杆菌热激蛋白70或其抗原片段；单纯疱疹病毒1蛋白VP22或其抗原片段；CD40配体或其抗原片段；或Fms相关酪氨酸激酶3(Flt3)配体或其抗原片段。

[0157] 在某些实施方案中，按照本申请使用的沙粒病毒基因组区段或沙粒病毒颗粒可以是旧世界病毒，例如Lassa病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、Mobal病毒、Mopei病毒或Ippy病毒，或新世界病毒，例如Amapari病毒、Flexal病毒、Guanarito病毒、Junin病毒、Latino病毒、Machupo病毒、Oliveros病毒、Paran病毒、Pichinde病毒、Pirital病毒、Sabi病毒、Tacaribe病毒、Tamiami病毒、Bear Canyon病毒或Whitewater Arroyo病毒。

[0158] 在某些实施方案中，本文所述沙粒病毒颗粒适于用作疫苗，并提供在肿瘤病(例如癌症)的接种和治疗中使用所述沙粒病毒颗粒的方法。在第5.8节中提供使用本文所述沙粒病毒颗粒的方法的更详细的描述。

[0159] 在某些实施方案中，本文所述沙粒病毒颗粒适于用作药物组合物，并提供在肿瘤病(例如癌症)的接种和治疗中使用所述沙粒病毒颗粒的方法。在第5.9节中提供使用本文所述沙粒病毒颗粒的方法的更详细的描述。

[0160] 5.2三区段沙粒病毒颗粒

[0161] 本文提供其ORF具有重排和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的三区段沙粒病毒颗粒。一方面，本文提供包含一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒。在某些实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒不重组成为可复制型二区段沙粒病毒颗粒。更具体地说，在某些实施方案中，两个基因组区

段(例如分别为两个S区段或两个L区段)不能以产生可置换两个亲本区段的单一病毒区段的方式重组。在具体实施方案中,三区段沙粒病毒颗粒包含ORF野生型位置以外位置处的ORF和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在又一个具体实施方案中,三区段沙粒病毒颗粒包含所有4种沙粒病毒ORF。因此,在某些实施方案中,三区段沙粒病毒颗粒是可复制型和感染性的。在其它实施方案中,三区段沙粒病毒颗粒缺乏4种沙粒病毒ORF中的一种。因此,在某些实施方案中,三区段沙粒病毒颗粒是感染性但不能够在非补足细胞中产生进一步的感染性子代。

[0162] 在某些实施方案中,编码本文所述三区段沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF可在沙粒病毒3'UTR或沙粒病毒5'UTR的控制下。在更具体的实施方案中,三区段沙粒病毒3'UTR是沙粒病毒S区段的3'UTR。在另一个具体的实施方案中,三区段沙粒病毒3'UTR是三区段沙粒病毒L区段的3'UTR。在更具体的实施方案中,三区段沙粒病毒5'UTR是沙粒病毒S区段的5'UTR。在其它的具体实施方案中,5'UTR是L区段的5'UTR。

[0163] 在其它实施方案中,编码本文所述三区段沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF可在沙粒病毒保守末端序列元件(5'-和3'-端19-20-nt区)控制下(参见例如Perez&de la Torre,2003,J Virol.77(2):1184-1194)。

[0164] 在某些实施方案中,编码三区段沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF可在5'UTR的启动子元件控制下(参见例如Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在另一个实施方案中,编码三区段沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF可在3'UTR的启动子元件控制下(参见例如Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在更具体的实施方案中,5'UTR的启动子元件是S区段或L区段的5'UTR启动子元件。在另一个具体的实施方案中,3'UTR的启动子元件是启动子元件S区段或L区段的3'UTR。

[0165] 在某些实施方案中,编码三区段沙粒病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF可在截短沙粒病毒3'UTR或截短沙粒病毒5'UTR的控制下(参见例如Perez&de la Torre,2003,J Virol.77(2):1184-1194;Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在更具体的实施方案中,截短的3'UTR是沙粒病毒S区段或L区段的3'UTR。在更具体的实施方案中,截短的5'UTR是沙粒病毒S区段或L区段的5'UTR。

[0166] 本文还提供包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的三区段沙粒病毒颗粒的cDNA。在更具体的实施方案中,本文提供编码表2或表3所列三区段沙粒病毒颗粒的DNA核苷酸序列或一组DNA核苷酸序列。

[0167] 在某些实施方案中,编码三区段沙粒病毒基因组的核酸是一个或多个DNA表达载体的一部分或掺入其中。在一个具体实施方案中,编码三区段沙粒病毒颗粒的基因组的核酸是促进本文所述三区段沙粒病毒颗粒产生的一个或多个DNA表达载体的一部分或掺入其中。在另一个实施方案中,本文所述cDNA可掺入质粒中。第5.7节提供cDNA和表达系统的更详细的描述。产生cDNA的技术是分子生物学和DNA操作和生产的惯用和常规技术。可采用技术人员已知的任何克隆技术。这类技术是众所周知的,技术人员可在例如以下实验室手册中获得:Sambrook and Russell,Molecular Cloning:A laboratory Manual,3rd edition,Cold Spring Harbor Laboratory N.Y.(2001)。

[0168] 在某些实施方案中,将包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的三区段沙粒病毒的cDNA导入(例如转染至)宿主细胞。因此,在一些实施

方案中，本文提供包含三区段沙粒病毒颗粒的cDNA(即三区段沙粒病毒颗粒的基因组区段的cDNA)和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的宿主细胞。在其它实施方案中，本文所述cDNA是DNA表达载体的一部分或可掺入DNA表达载体中并导入宿主细胞。因此，在一些实施方案中，本文提供包含掺入载体的本文所述cDNA的宿主细胞。在其它实施方案中，将本文所述三区段沙粒病毒基因组区段(即L区段和/或S区段或区段)导入宿主细胞。

[0169] 在某些实施方案中，本文描述了产生三区段沙粒病毒颗粒的方法，其中所述方法包括转录包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的三区段沙粒病毒颗粒的cDNA。在某些实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒体外或体内转录期间可能存在病毒聚合酶蛋白。在某些实施方案中，沙粒病毒基因组区段的转录使用双向启动子进行。

[0170] 在其它实施方案中，沙粒病毒基因组区段的转录使用双向表达盒进行(参见例如Ortiz-Riañoet al.,2013,J Gen Virol.,94(Pt 6):1175-1188)。在更具体的实施方案中，双向表达盒包含分别自相对侧向所插入的沙粒病毒基因组区段两端读取的聚合酶I和聚合酶II启动子两者。

[0171] 在其它实施方案中，本文所述沙粒病毒基因组区段的cDNA的转录包含启动子。启动子的具体实例包括RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T7启动子、SP6启动子或T3启动子。

[0172] 在某些实施方案中，产生三区段沙粒病毒颗粒的方法可进一步包括将包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的三区段沙粒病毒颗粒的cDNA导入宿主细胞。在某些实施方案中，产生三区段沙粒病毒颗粒的方法可进一步包括将包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的三区段沙粒病毒颗粒的cDNA导入宿主细胞，其中宿主细胞表达用于三区段沙粒病毒颗粒产生的所有其它组分；并从宿主细胞的上清液纯化三区段沙粒病毒颗粒。这类方法为本领域技术人员熟知。

[0173] 本文提供培养用本文提供的核酸、载体和组合物感染的细胞的细胞系、培养物和方法。第5.7节提供本文所述核酸、载体系统和细胞系的更详细的描述。

[0174] 在某些实施方案中，本文所述三区段沙粒病毒颗粒产生感染性和可复制型沙粒病毒颗粒。在具体实施方案中，本文所述沙粒病毒颗粒是减毒的。在一个具体的实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒经减毒使得病毒至少部分保持可复制型且可体内复制，但只可产生低病毒载量，导致是不致病的亚临床感染水平。这类减毒病毒可用作免疫原性组合物。

[0175] 在某些实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒具有与二区段沙粒病毒颗粒相同的向性。

[0176] 本文还提供包含第5.8和5.9节所述三区段沙粒病毒颗粒的组合物。

[0177] 5.2.1包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒

[0178] 一方面，本文提供包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒。在某些实施方案中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。在具体实施方案中，在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组激活基因(RAG1)并用10^4PFU三区段沙粒病毒颗粒感染的小鼠中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的增殖在持续感染至少10天、至少20天、至少30天、至少40天、至少50天、至

少60天、至少70天、至少80天、至少90天或至少100天之后，不产生可复制型二区段病毒颗粒(参见第5.10.14节)。在其它实施方案中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的增殖在至少10代、至少20代、至少30代、至少40代或至少50代之后不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0179] 在其相应的野生型位置处具有所有病毒基因的三区段沙粒病毒颗粒是本领域已知的(例如Emonet et al.,2011 J.Virol.,85(4):1473;Popkin et al.,2011,J.Virol,85(15):7928)。具体地讲，三区段沙粒病毒基因组由一个L区段和两个S区段组成，其中将编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列插入每个S区段的一个位置。更具体地说，一个S区段分别编码GP和肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。另一个S区段分别编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段和NP。L区段编码L蛋白和Z蛋白。所有区段两侧都是各自的5'和3'UTR。

[0180] 在某些实施方案中，将两种沙粒病毒ORF整合到一个区段而非两个分隔的区段的本文提供的三区段沙粒病毒颗粒的两个S区段的区段间重组导致非功能性启动子(即以下结构的基因组区段：5'UTR----------5'UTR或3'UTR----------3'UTR)，其中形成基因组一端的每个UTR是同一基因组另一端的反转重复序列。

[0181] 在某些实施方案中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒经改造在ORF野生型位置以外的位置携带沙粒病毒ORF和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在其它实施方案中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒经改造在野生型位置以外的位置携带2个沙粒病毒ORF，或3个沙粒病毒ORF，或4个沙粒病毒ORF，或5个沙粒病毒ORF，或6个沙粒病毒ORF。在具体实施方案中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒包含所有4种沙粒病毒ORF的完全互补序列。因此，在一些实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒是感染性和可复制型三区段沙粒病毒颗粒。在具体实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒的两个S区段在野生型位置以外的位置携带其ORF之一。在更具体的实施方案中，两个S区段包含S区段ORF的完全互补序列。在某些具体实施方案中，L区段经改造在野生型位置以外的位置携带ORF或L区段可以是野生型基因组区段。

[0182] 在某些实施方案中，两个S区段之一可以是：

[0183] (i)沙粒病毒S区段，其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下；

[0184] (ii)沙粒病毒S区段，其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下；

[0185] (iii)沙粒病毒S区段，其中编码NP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下；

[0186] (iv)沙粒病毒S区段，其中编码GP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下；

[0187] (v)沙粒病毒S区段，其中编码L的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下；和

[0188] (vi)沙粒病毒S区段，其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下。

[0189] 在某些实施方案中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒可包含双重ORF(duplicate ORF)(即两个野生型S区段ORF，例如GP或NP)。在具体实施方案中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒可包含一个双重ORF(例如(GP,GP))或两个双重ORF(例如(GP,GP)和(NP,NP))。

[0190] 下表2A是包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的基因组结构的实例，其中三区段沙粒病毒基因组中两个S区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即所得重组S区段由2个3'UTR而非3'UTR和5'UTR构成)。

[0191] 表2A

[0192] 包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒

[0193] 位置1在沙粒病毒S区段5'UTR的控制下;位置2在沙粒病毒S区段3'UTR的控制下;位置3在沙粒病毒S区段5'UTR的控制下;位置4在沙粒病毒S区段3'UTR的控制下;位置5在沙粒病毒L区段5'UTR的控制下;位置6在沙粒病毒L区段3'UTR的控制下。

[0194] *ORF表示已插入编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0195]

位置 1	位置 2	位置 3	位置 4	位置 5	位置 6

[0196]

位置 1	位置 2	位置 3	位置 4	位置 5	位置 6
*ORF	GP	*ORF	NP	Z	L
*ORF	NP	*ORF	GP	Z	L
*ORF	NP	*ORF	GP	L	Z
*ORF	NP	*ORF	Z	L	GP
*ORF	NP	Z	GP	*ORF	Z
*ORF	NP	Z	GP	Z	*ORF
*ORF	NP	*ORF	L	Z	GP
*ORF	L	*ORF	NP	Z	GP
*ORF	L	Z	NP	*ORF	GP
*ORF	L	*ORF	GP	Z	NP
*ORF	L	Z	GP	*ORF	NP
*ORF	Z	L	NP	*ORF	GP
*ORF	Z	*ORF	GP	L	NP
*ORF	Z	L	GP	*ORF	NP
L	GP	*ORF	NP	*ORF	Z
L	GP	*ORF	*ORF	Z	NP
L	GP	*ORF	Z	*ORF	NP
L	*ORF	Z	GP	*ORF	NP
L	GP	*ORF	NP	*ORF	Z
L	GP	*ORF	Z	*ORF	NP
L	GP	Z	NP	*ORF	*ORF
L	GP	Z	NP	*ORF	*ORF
L	*ORF	Z	NP	*ORF	GP
L	NP	*ORF	Z	*ORF	GP
L	NP	Z	*ORF	GP	*ORF
L	*ORF	Z	*ORF	GP	NP
L	NP	Z	GP	*ORF	*ORF
L	NP	*ORF	Z	*ORF	GP
L	*ORF	Z	NP	*ORF	GP
L	Z	*ORF	GP	*ORF	NP
L	Z	*ORF	NP	*ORF	GP
Z	GP	*ORF	NP	*ORF	L
Z	GP	*ORF	*ORF	L	NP
Z	GP	*ORF	L	*ORF	NP
Z	*ORF	L	GP	*ORF	NP
Z	GP	*ORF	NP	*ORF	L
Z	GP	*ORF	L	*ORF	NP
Z	GP	L	NP	*ORF	*ORF
Z	GP	L	NP	*ORF	*ORF
Z	*ORF	L	NP	*ORF	GP
Z	NP	*ORF	*ORF	L	GP
Z	NP	*ORF	GP	*ORF	L
Z	NP	*ORF	*ORF	L	GP
Z	NP	*ORF	L	*ORF	GP
Z	NP	L	GP	*ORF	*ORF
Z	*ORF	L	GP	*ORF	NP
Z	NP	*ORF	GP	*ORF	L

[0197]

位置1	位置2	位置3	位置4	位置5	位置6
Z	NP	*ORF	L	*ORF	GP
Z	*ORF	L	NP	*ORF	GP
Z	L	*ORF	GP	*ORF	NP

[0198] 在某些实施方案中，位置1和位置2之间的IGR可以是沙粒病毒S区段或L区段IGR；位置2和3之间的IGR可以是沙粒病毒S区段或L区段IGR；和位置5和6之间的IGR可以是沙粒病毒L区段IGR。在一个具体实施方案中，位置1和位置2之间的IGR可以是沙粒病毒S区段IGR；位置2和3之间的IGR可以是沙粒病毒S区段IGR；位置5和6之间的IGR可以是沙粒病毒L区段IGR。在某些实施方案中，其它组合也是可能的。例如，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒，其中三区段沙粒病毒基因组中两个S区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即所得重组S区段由2个5’UTR而非3’UTR和5’UTR构成)。

[0199] 在某些实施方案中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒中S区段和L区段的区段间重组恢复了功能性区段，其中两个病毒基因在唯一一个区段而非两个分隔的区段上。在其它实施方案中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒中S区段和L区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0200] 下表2B是包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的基因组结构的实例，其中三区段沙粒病毒基因组中S区段和L区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即所得重组S区段由2个3’UTR而非3’UTR和5’UTR构成)。

[0201] 表2B

[0202] 包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒

[0203] 位置1在沙粒病毒S区段5’UTR的控制下；位置2在沙粒病毒S区段3’UTR的控制下；位置3在沙粒病毒S区段5’UTR的控制下；位置4在沙粒病毒S区段3’UTR的控制下；位置5在沙粒病毒L区段5’UTR的控制下；位置6在沙粒病毒L区段3’UTR的控制下。

[0204] *ORF表示已插入编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0205]

位置1	位置2	位置3	位置4	位置5	位置6
L	GP	*ORF	NP	Z	*ORF
L	GP	Z	*ORF	*ORF	NP
L	GP	*ORF	NP	Z	*ORF
L	GP	Z	*ORF	*ORF	NP

[0206]

位置1	位置2	位置3	位置4	位置5	位置6
L	NP	*ORF	GP	Z	*ORF
L	NP	Z	*ORF	*ORF	GP
L	NP	*ORF	GP	Z	*ORF
L	NP	Z	*ORF	*ORF	GP
Z	GP	*ORF	NP	L	*ORF
Z	GP	L	*ORF	*ORF	NP
Z	GP	*ORF	NP	L	*ORF
Z	NP	L	*ORF	*ORF	GP
Z	NP	*ORF	GP	L	*ORF
Z	NP	L	*ORF	*ORF	GP

[0207] 在某些实施方案中，位置1和位置2之间的IGR可以是沙粒病毒S区段或L区段IGR；位置2和3之间的IGR可以是沙粒病毒S区段或L区段IGR；位置5和6之间的IGR可以是沙粒病毒L区段IGR。在一个具体实施方案中，位置1和位置2之间的IGR可以是沙粒病毒S区段IGR；位置2和3之间的IGR可以是沙粒病毒S区段IGR；位置5和6之间的IGR可以是沙粒病毒L区段IGR。在某些实施方案中，其它组合也是可能的。例如，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒，其中三区段沙粒病毒基因组中两个S区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即所得重组S区段由2个5’UTR而非3’UTR和5’UTR构成)。

[0208] 在某些实施方案中，本领域技术人员可构建具有表2A或2B列出和本文供述的沙粒病毒基因组，然后采用描述于第5.10节Error!Reference source not found.的测定法确定三区段沙粒病毒颗粒是否是遗传稳定的，即，如本文所述不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0209] 5.2.2包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒

[0210] 一方面，本文提供包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒。在某些实施方案中，包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。在具体实施方案中，在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组激活基因(RAG1)和用10^4PFU三区段沙粒病毒颗粒感染的小鼠中，包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的增殖在持续至少10天、至少20天、至少30天、至少40天或至少50天、至少60天、至少70天、至少80天、至少90天、至少100天后不产生可复制型二区段病毒颗粒(参见第5.10.14节)。在其它实施方案中，包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的增殖在至少10代、20代、30代、40代或50代后不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0211] 在某些实施方案中，使两个沙粒病毒ORF在一个而非两个分隔的区段上整合的本文提供的三区段沙粒病毒颗粒的两个L区段的区段间重组产生非功能性启动子(即以下结构的基因组区段：5’UTR----------5’UTR或3’UTR----------3’UTR)，其中形成基因组一端的每个UTR是同一基因组另一端的反转重复序列。

[0212] 在某些实施方案中，包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒经改造在ORF野生型位置以外的位置携带沙粒病毒ORF和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在其它实施方案中，包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒经改造在野生型位置以外的位置携带2个沙粒病毒ORF，或3个沙粒病毒ORF，或4个沙粒病毒ORF，或5个沙粒病毒ORF或6个沙粒病毒ORF。在具体实施方案中，包含两个L区段和

一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒包含所有4种沙粒病毒ORF的完全互补序列。因此，在一些实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒是感染性和可复制型三区段沙粒病毒颗粒。在具体实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒的两个L区段在野生型位置以外的位置携带其ORF之一。在更具体的实施方案中，两个L区段包含L区段ORF的完全互补序列。在某些具体实施方案中，S区段经改造在野生型位置以外的位置携带其ORF之一或S区段可以是野生型基因组区段。

[0213] 在某些实施方案中，两个L区段之一可以是：

[0214] (i)L区段，其中编码GP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下；

[0215] (ii)L区段，其中编码NP的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下；

[0216] (iii)L区段，其中编码L蛋白的ORF在沙粒病毒5'UTR的控制下；

[0217] (iv)L区段，其中编码GP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下；

[0218] (v)L区段，其中编码NP的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下；和

[0219] (vi)L区段，其中编码Z蛋白的ORF在沙粒病毒3'UTR的控制下。

[0220] 在某些实施方案中，包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒可包含双重ORF(即两个野生型L区段ORF，例如Z蛋白或L蛋白)。在具体实施方案中，包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒可包含一个双重ORF(例如(Z蛋白，Z蛋白))或两个双重ORF(例如(Z蛋白，Z蛋白)和(L蛋白，L蛋白))。

[0221] 下表3是包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的基因组结构的实例，其中三区段沙粒病毒基因组中两个L区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即S区段由两个3'UTR而非3'UTR和5'UTR构成)。根据表3，可预测类似组合以产生由两个5'UTR而非3'UTR和5'UTR构成的沙粒病毒颗粒。

[0222] 表3

[0223] 包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒

[0224] *位置1在沙粒病毒L区段5'UTR的控制下；位置2在沙粒病毒L区段3'UTR的控制下；位置3在沙粒病毒L区段5'UTR的控制下；位置4在沙粒病毒L区段3'UTR的控制下；位置5在沙粒病毒S区段5'UTR的控制下；位置6在沙粒病毒S区段3'UTR的控制下。

[0225] *ORF表示已插入编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0226]

位置 1	位置 2	位置 3	位置 4	位置 5	位置 6
ORF*	Z	ORF*	L	NP	GP
ORF*	Z	ORF*	L	GP	NP
ORF*	Z	GP	L	ORF*	NP
ORF*	Z	ORF*	GP	NP	L
ORF*	Z	GP	ORF*	NP	L
ORF*	Z	NP	ORF*	GP	L
ORF*	ORF*	NP	Z	GP	L
ORF*	Z	GP	NP	ORF*	L
ORF*	Z	NP	GP	ORF*	L
ORF*	L	ORF*	Z	NP	GP
ORF*	L	ORF*	Z	GP	NP
ORF*	L	ORF*	GP	NP	Z
ORF*	L	GP	Z	ORF*	NP
ORF*	L	ORF*	GP	NP	Z
ORF*	L	NP	Z	ORF*	GP
ORF*	L	GP	NP	ORF*	Z
ORF*	L	NP	GP	ORF*	Z
ORF*	GP	ORF*	L	NP	Z
ORF*	GP	NP	L	ORF*	Z
ORF*	GP	ORF*	Z	NP	L
ORF*	GP	NP	Z	ORF*	L
ORF*	NP	ORF*	L	GP	Z
ORF*	NP	GP	L	ORF*	Z
ORF*	NP	GP	Z	ORF*	L
ORF*	NP	ORF*	Z	GP	L
ORF*	L	ORF*	Z	NP	GP
ORF*	L	ORF*	Z	GP	NP
ORF*	L	ORF*	NP	GP	Z
ORF*	L	ORF*	GP	NP	Z
ORF*	L	NP	Z	ORF*	GP
ORF*	Z	ORF*	GP	NP	L
ORF*	Z	GP	L	ORF*	NP
ORF*	Z	NP	GP	ORF*	L
ORF*	Z	GP	NP	ORF*	L

[0227]

位置1	位置2	位置3	位置4	位置5	位置6
ORF*	GP	ORF*	L	NP	Z
ORF*	GP	ORF*	L	Z	NP
ORF*	GP	ORF*	Z	GP	L
ORF*	GP	NP	L	ORF*	Z
GP	L	ORF*	Z	ORF*	NP
GP	L	ORF*	NP	ORF*	Z
GP	Z	ORF*	L	ORF*	NP
GP	Z	ORF*	L	ORF*	NP
GP	Z	ORF*	NP	ORF*	L
GP	NP	ORF*	Z	ORF*	L
NP	L	ORF*	Z	ORF*	GP
NP	L	ORF*	GP	ORF*	Z
NP	L	ORF*	Z	ORF*	GP

[0228] 在某些实施方案中，位置1和位置2之间的IGR可以是沙粒病毒S区段或L区段IGR；位置2和3之间的IGR可以是沙粒病毒S区段或L区段IGR；位置5和6之间的IGR可以是沙粒病毒L区段IGR。在一个具体实施方案中，位置1和位置2之间的IGR可以是沙粒病毒L区段IGR；位置2和3之间的IGR可以是沙粒病毒L区段IGR；位置5和6之间的IGR可以是沙粒病毒S区段IGR。在某些实施方案中，其它组合也是可能的。

[0229] 在某些实施方案中，来自含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的L区段和S区段的区段间重组恢复功能性区段，其中两个病毒基因在唯一一个区段而非两个分隔的区段上。在其它实施方案中，包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒中L区段和S区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒。。

[0230] 下表3B是包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒的基因组结构的实例，其中三区段沙粒病毒基因组中L区段和S区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即所得重组S区段由两个3’UTR而非3’UTR和5’UTR构成)。

[0231] 表3B

[0232] 包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒

[0233] *位置1在沙粒病毒L区段5’UTR的控制下；位置2在沙粒病毒L区段3’UTR的控制下；位置3在沙粒病毒L区段5’UTR的控制下；位置4在沙粒病毒L区段3’UTR的控制下；位置5在沙粒病毒S区段5’UTR的控制下；位置6在沙粒病毒S区段3’UTR的控制下。

[0234] *ORF表示已插入编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0235]

位置1	位置2	位置3	位置4	位置5	位置6
NP	Z	*ORF	GP	L	*ORF
NP	Z	GP	*ORF	*ORF	L
NP	Z	*ORF	GP	L	*ORF
NP	Z	GP	*ORF	*ORF	L
NP	L	*ORF	GP	Z	*ORF
NP	L	GP	*ORF	*ORF	Z
NP	L	*ORF	GP	Z	*ORF
NP	L	GP	*ORF	*ORF	Z
GP	Z	*ORF	NP	L	*ORF
GP	Z	NP	*ORF	*ORF	L
GP	Z	*ORF	NP	L	*ORF
GP	L	NP	*ORF	*ORF	Z
GP	L	*ORF	NP	Z	*ORF
GP	L	NP	*ORF	*ORF	Z

[0236] 在某些实施方案中，位置1和位置2之间的IGR可以是沙粒病毒S区段或L区段IGR；位置2和3之间的IGR可以是沙粒病毒S区段或L区段IGR；位置5和6之间的IGR可以是沙粒病毒L区段IGR。在一个具体实施方案中，位置1和位置2之间的IGR可以是沙粒病毒L区段IGR；位置2和3之间的IGR可以是沙粒病毒L区段IGR；位置5和6之间的IGR可以是沙粒病毒S区段IGR。在某些实施方案中，其它组合也是可能的。

[0237] 在某些实施方案中，本领域技术人员可构建具有表3A或3B列出和本文描述的结构的沙粒病毒基因组，然后采用描述于第5.10节的测定法确定三区段沙粒病毒颗粒是否是遗传稳定的，即，如本文所述不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0238] 5.2.3复制缺陷型三区段沙粒病毒颗粒

[0239] 在某些实施方案中，本文提供三区段沙粒病毒颗粒，其中(i)ORF位于ORF野生型位置以外的位置；和(ii)编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF被去除或功能失活，使得所得病毒无法产生进一步的感染性子代病毒颗粒(即是复制缺陷型的)。在某些实施方案中，第三沙粒病毒区段可以是S区段。在其它实施方案中，第三沙粒病毒区段可以是L区段。在更具体的实施方案中，第三沙粒病毒区段可经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF或第三沙粒病毒区段可以是野生型沙粒病毒基因组区段。在甚至更具体的实施方案中，第三沙粒病毒区段缺乏编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的沙粒病毒ORF。

[0240] 在某些实施方案中，三区段基因组区段可以是S或L区段杂合体(即可以是S区段和L区段的组合的基因组区段)。在其它实施方案中，杂合区段是包含L区段IGR的S区段。在另一个实施方案中，杂合区段是包含S区段IGR的L区段。在其它实施方案中，杂合区段是具有L区段IGR的S区段UTR。在另一个实施方案中，杂合区段是具有S区段IGR的L区段UTR。在具体实施方案中，杂合区段是具有L区段IGR的S区段5’UTR或具有L区段IGR的S区段3’UTR。在其它的具体实施方案中，杂合区段是具有S区段IGR的L区段5’UTR或具有S区段IGR的L区段3’UTR。

[0241] 包含其中一种或多种ORF缺失或功能失活的遗传修饰的基因组的三区段沙粒病毒颗粒可在补足细胞(即表达已缺失或功能失活的沙粒病毒ORF的细胞)中产生。所得沙粒病毒颗粒的遗传物质可在宿主细胞感染时转移至宿主细胞中，其中遗传物质可表达和扩增。

另外，本文所述遗传修饰的沙粒病毒颗粒的基因组可包括编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0242] 在某些实施方案中，编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的4种ORF的至少一种被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在另一个实施方案中，编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的至少1种ORF、至少2种ORF、至少3种ORF或至少4种ORF可被去除并用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在具体实施方案中，编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的4种ORF中仅1种被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在更具体的实施方案中，沙粒病毒基因组区段的GP的ORF被去除。在另一个具体的实施方案中，沙粒病毒基因组区段的NP的ORF被去除。在更具体的实施方案中，沙粒病毒基因组区段的Z蛋白的ORF被去除。在又一个具体实施方案中，编码L蛋白的ORF被去除。

[0243] 在某些实施方案中，本文提供包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒颗粒，其中(i)ORF位于ORF野生型位置以外的位置；和(ii)编码GP或NP的ORF被去除或功能失活，使得所得病毒是复制缺陷型的且非感染性的。在一个具体实施方案中，一种ORF被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在另一个具体的实施方案中，两种ORF被去除并用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在其它的具体实施方案中，3种ORF被去除并用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在具体实施方案中，编码GP的ORF被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在其它的具体实施方案中，编码NP的ORF被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在甚至更具体的实施方案中，编码NP的ORF和编码GP的ORF被去除并用编码本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个或两个核苷酸序列置换。因此，在某些实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒包含(i)一个L区段和两个S区段；(ii)在ORF野生型位置以外位置处的ORF；(iii)编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个或多个核苷酸序列。

[0244] 在某些实施方案中，本文提供包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒颗粒，其中(i)ORF位于ORF野生型位置以外的位置；和(ii)编码Z蛋白和/或L蛋白的ORF被去除或功能失活，使得所得病毒是复制缺陷型且非感染性的。在一个具体实施方案中，一种ORF被去除或用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在另一个具体的实施方案中，两种ORF被去除并用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在具体实施方案中，编码Z蛋白的ORF被去除并用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在其它的具体实施方案中，编码L蛋白的ORF被去除并用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。在甚至更具体的实施方案中，编码Z蛋白的ORF和编码L蛋白的ORF被去除并用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。因此，在某些实施方案中，三区段沙粒病毒颗粒包含(i)两个L区段和一个S区段；(ii)在ORF野生型位置以外位置处的ORF；(iii)编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0245] 因此，在某些实施方案中，本文提供的三区段沙粒病毒颗粒包含这样的三区段沙

粒病毒颗粒(即一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段)：i)经改造在非天然位置携带ORF；ii)编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF被去除)；iii)被去除的ORF用编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个或多个核苷酸序列置换。

[0246] 在某些实施方案中，编码本文提供的抗原片段的核苷酸序列为8-100个核苷酸长度、15-100个核苷酸长度、25-100个核苷酸长度、50-200个核苷酸长度、50-400个核苷酸长度、200-500个核苷酸长度或400-600个核苷酸长度、500-800个核苷酸长度。在其它实施方案中，编码本文提供的抗原片段的核苷酸序列为750-900个核苷酸长度、800-100个核苷酸长度、850-1000个核苷酸长度、900-1200个核苷酸长度、1000-1200个核苷酸长度、1000-1500核苷酸或10-1500个核苷酸长度、1500-2000个核苷酸长度、1700-2000个核苷酸长度、2000-2300个核苷酸长度、2200-2500个核苷酸长度、2500-3000个核苷酸长度、3000-3200个核苷酸长度、3000-3500个核苷酸长度、3200-3600个核苷酸长度、3300-3800个核苷酸长度、4000个核苷酸-4400个核苷酸长度、4200-4700个核苷酸长度、4800-5000个核苷酸长度、5000-5200个核苷酸长度、5200-5500个核苷酸长度、5500-5800个核苷酸长度、5800-6000个核苷酸长度、6000-6400个核苷酸长度、6200-6800个核苷酸长度、6600-7000个核苷酸长度、7000-7200个核苷酸长度、7200-7500个核苷酸长度或7500个核苷酸长度。在一些实施方案中，核苷酸序列编码肽或多肽，其为5-10个氨基酸长度、10-25个氨基酸长度、25-50个氨基酸长度、50-100个氨基酸长度、100-150个氨基酸长度、150-200个氨基酸长度、200-250个氨基酸长度、250-300个氨基酸长度、300-400个氨基酸长度、400-500个氨基酸长度、500-750个氨基酸长度、750-1000个氨基酸长度、1000-1250个氨基酸长度、1250-1500个氨基酸长度、1500-1750个氨基酸长度、1750-2000个氨基酸长度、2000-2500个氨基酸长度或大于2500或更多个氨基酸长度。在一些实施方案中，核苷酸序列编码不超过2500个氨基酸长度的多肽。在具体实施方案中，核苷酸序列不含终止密码子。在某些实施方案中，核苷酸序列是密码子优化的。在某些实施方案中，核苷酸组成、核苷酸对组成或两者可被优化。这类优化的技术是本领域已知的，可用来使编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列最优化。

[0247] 编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的任何核苷酸序列可包括在三区段沙粒病毒颗粒中。在一个实施方案中，编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列能够诱导免疫应答。

[0248] 在某些实施方案中，沙粒病毒颗粒的生长和感染性不受编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列影响。

[0249] 可采用本领域技术人员已知技术产生包含经改造在野生型位置以外的位置携带沙粒病毒ORF的沙粒病毒基因组区段和编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒。例如，可采用反求遗传学技术产生这类沙粒病毒颗粒。在其它实施方案中，复制缺陷型沙粒病毒颗粒(即经改造在野生型位置以外的位置携带沙粒病毒ORF的沙粒病毒基因组区段，其中编码GP、NP、Z蛋白、L蛋白的ORF已缺失)可在补足细胞中产生。

[0250] 在某些实施方案中，包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的本文提供的三区段沙粒病毒颗粒另包含编码至少一种免疫调节肽、多肽或蛋白质的至少一个核苷酸序列。在某些实施方案中，免疫调节肽、多肽或蛋白质是钙网蛋白

(CRT)或其片段;泛素或其片段;粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或其片段;不变链(CD74)或其抗原片段;结核杆菌热激蛋白70或其抗原片段;单纯疱疹病毒1蛋白VP22或其抗原片段;CD40配体或其抗原片段;或Fms相关酪氨酸激酶3(Flt3)配体或其抗原片段。

[0251] 与本文提供的方法和组合物一起使用的沙粒病毒可以是旧世界病毒,例如Lassa病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、Mobal病毒、Mopei病毒或Ippy病毒,或新世界病毒,例如Amapari病毒、Flexal病毒、Guanarito病毒、Junin病毒、Latino病毒、Machupo病毒、Oliveros病毒、Paran病毒、Pichinde病毒、Pirital病毒、Sabi病毒、Tacaribe病毒、Tamiami病毒、Bear Canyon病毒或Whitewater Arroyo病毒。

[0252] 在某些实施方案中,本文所述三区段沙粒病毒颗粒适于用作疫苗,并提供在肿瘤病(例如癌症)的接种和治疗中使用所述沙粒病毒颗粒的方法。在第5.8节中提供使用本文所述沙粒病毒颗粒的方法的更详细的描述。

[0253] 在某些实施方案中,本文所述三区段沙粒病毒颗粒适于用作药物组合物,并提供在肿瘤病(例如癌症)的接种和治疗中使用所述沙粒病毒颗粒的方法。在第5.9节中提供使用本文所述沙粒病毒颗粒的方法的更详细的描述。

[0254] 5.3感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒

[0255] 本文提供的遗传修饰的沙粒病毒包括以下沙粒病毒:

[0256] ●是感染性的;

[0257] ●在非补足细胞(即不表达在复制缺陷型沙粒病毒缺失的功能性并使之成为复制缺陷型的细胞)中形成感染性子代病毒;

[0258] ●能够复制其基因组和表达其遗传信息;和

[0259] ●编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。

[0260] 本文所述遗传修饰的沙粒病毒是感染性的,即,它可附着于宿主细胞,并将其遗传物质释放到宿主细胞中。本文所述遗传修饰的沙粒病毒是复制缺陷型的,即,沙粒病毒不能够在非补足细胞中产生进一步的感染性子代颗粒。具体地讲,沙粒病毒的基因组被修饰(例如通过ORF的去除或功能失活),使得携带修饰基因组的病毒不能再产生感染性子代病毒。非补足细胞是不提供通过修饰基因组已从复制缺陷型沙粒病毒中消除的功能的细胞(例如如果编码GP的ORF蛋白被去除或功能失活,则非补足细胞不提供GP蛋白)。然而,本文提供的遗传修饰的沙粒病毒能够在补足细胞中产生感染性子代病毒。补足细胞是提供(外在(in trans))通过修饰病毒基因组已从复制缺陷型沙粒病毒中消除的功能的细胞(例如如果编码GP的ORF蛋白被去除或功能失活,则补足细胞便提供GP蛋白)。补给功能(例如GP蛋白)的表达可通过本领域技术人员已知的任何方法(例如外在或稳定的表达)进行。本文所述遗传修饰的沙粒病毒可通过病毒感染在细胞中扩增和表达其遗传信息。本文提供的遗传修饰的沙粒病毒可包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段,例如但不限于描述于第5.4节的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列5.4。

[0261] 在某些实施方案中,本文提供遗传修饰的沙粒病毒,其中沙粒病毒的ORF基因组被去除或功能失活,使得所得病毒无法在非补足细胞中产生进一步的感染性子代病毒颗粒。包含其中ORF被去除或功能失活的遗传修饰的基因组的沙粒病毒颗粒可在补足细胞(即表达被去除或功能失活的沙粒病毒ORF的细胞)中产生。所得沙粒病毒颗粒的遗传物质可在宿主细胞感染时转移至宿主细胞中,其中遗传物质可表达和扩增。另外,本文提供的遗传修饰

的沙粒病毒颗粒的基因组编码可在宿主细胞中表达的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。

[0262] 在某些实施方案中，沙粒病毒的ORF缺失或功能失活并用编码本文所述肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的核苷酸置换。在一个具体实施方案中，编码沙粒病毒的糖蛋白GP的ORF缺失或功能失活。在某些实施方案中，基因的功能失活消除了任何翻译产物。在某些实施方案中，功能失活是指允许部分翻译，然而翻译产物不再有功能且不能代替野生型蛋白质的遗传变化。

[0263] 在某些实施方案中，编码沙粒病毒的糖蛋白(GP)的ORF缺失以产生用于本文提供的方法和组合物的复制缺陷型沙粒病毒。在一个具体实施方案中，复制缺陷型沙粒病毒包含含有编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的基因组区段。因此，在某些实施方案中，本文提供的遗传修饰的沙粒病毒颗粒包含以下的基因组区段：a)以基因组区段的野生型形式存在的ORF具有缺失或功能失活；和b)编码(有义或反义)肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。

[0264] 在某些实施方案中，由插入复制缺陷型沙粒病毒的基因组的核苷酸编码的抗原可编码例如肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段或者肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的组合，包括但不限于致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原、癌胚抗原、组织分化抗原、突变蛋白抗原、新抗原、亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1AI、BCLX(L)、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKKI、ENAH(hMcna)、Ga733(EpCAM)、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IDO1、IGF2B3、IL13Ralpha2、肠羧酸酯酶、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53(非突变型)、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1(前列腺6次跨膜上皮抗原1)、存活蛋白、端粒酶、VEGF、WT1、EGF-R、CEA、CD20、CD33、CD52、糖蛋白100(GP 100或gp 100蛋白)、MELANA/MART1、MART2、NY-ESO-1、p53、MAGE A1、MAGE A3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CDK4、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL、BCR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-RAF、CASP-5、CASP-8、β-联蛋白、Cdc27、CDK4、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、H-ras、K-ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SSX、SSX2、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、ormdm-2、LMP2、HPV E6/E7、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、独特型GD2神经节苷脂G2)、Ras-突变型、p53(突变型)、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、PSA、hTERT、肉瘤易位断裂点、EphA2、前列腺酸磷酸酶PAP、neo-PAP、ML-IAP、AFP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN、TRP2、TRP2-Int2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、sLe(a)、cyp1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、SART3、STn、碳酸酐酶IX、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA)、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-beta、MAD-CT-2、For相关抗原1、TRP1、CA-125、CA19-9、钙网膜蛋白、上皮膜抗原(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、CD19、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、Myo-D1、肌特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘

碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶M2型同功酶的二聚形式(肿瘤M2-PK)、BAGE BAGE-1、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-SAR-35、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1、TPTE、糖/神经节苷脂GM2(癌胚抗原-免疫原性-1 OFA-I-1)、GM3、CA 15-3(CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA 50、CAM 43、CEA、EBNA、EF2、Epstein-Barr病毒抗原、HLA-A2、HLA-A11、HSP70-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白I类、GnTV、Herv-K-mel、LAGE-1、LAGE-2、(精子蛋白)SP17、SCP-1、P15(58)、Hom/Mel-40、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、TSP-180、P185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、TAG-72-4、CA-72-4、CAM 17.1、NuMa、13-联蛋白、P16、TAGE、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、HTgp-175、M344、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TLP、TPS、CD22、CD27、CD30、CD70、prostein、TARP(T细胞受体γ另起读框)、Trp-p8、整联蛋白αvβ3(CD61)、泌乳激素或Ral-B、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138和ROR1。第5.4节5.4提供本文所述抗原的详细描述。

[0265] 与本文提供的方法和组合物一起使用的沙粒病毒可以是旧世界病毒,例如Lassa病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、Mobal病毒、Mopei病毒或Ippy病毒,或新世界病毒,例如Amapari病毒、Flexal病毒、Guanarito病毒、Junin病毒、Latino病毒、Machupo病毒、Oliveros病毒、Paran病毒、Pichinde病毒、Pirital病毒、Sabi病毒、Tacaribe病毒、Tamiami病毒、Bear Canyon病毒或Whitewater Arroyo病毒。

[0266] 野生型沙粒病毒基因组由短(～3.4kb)和大(～7.2kb)RNA区段组成。短区段携带编码核蛋白NP和糖蛋白GP基因的ORF。大区段包含依赖于RNA的RNA聚合酶L和基质蛋白Z基因。野生型沙粒病毒可通过用糖蛋白基因置换成一个或多个肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段(针对其诱导免疫应答)提供复制缺陷型以产生疫苗载体。

[0267] 表达本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段或者肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的组合的感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒可用于治疗(以免疫治疗的方式)患有本文所述肿瘤病的对象。

[0268] 已知野生型沙粒病毒感染的沙粒病毒病和免疫抑制产生于不受控制的病毒复制。通过破坏复制,即通过从其基因组缺失例如颗粒释放需要的Z基因或靶细胞感染需要的GP基因来产生沙粒病毒颗粒的感染性子代病毒颗粒的能力,可通过例如给予疫苗接受者,或意外传染参与医学或生物技术应用的人员,或给予动物的接种物,限制感染细胞的总数。因此,破坏沙粒病毒颗粒的复制防止因载体颗粒的特意或意外传播所致的发病机制。在本发明中,一个重要方面在于开发以为了表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的有益方式消除复制的上述必要性。在某些实施方案中,沙粒病毒颗粒通过其基因组的遗传修饰提供复制缺陷型。对基因组的这类修饰可包括:

[0269] ●ORF(例如编码GP、NP、L或Z蛋白的ORF)的缺失;

[0270] ●ORF(例如编码GP、NP、L或Z蛋白的ORF)的功能失活。例如,这可通过引入错义或无义突变实现;

[0271] ●ORF序列改变(例如S1P切割位点与另一种蛋白酶的切割位点交换);

[0272] ●基因组区段之一5'或3'端之一的诱变;

[0273] ●基因间区(即L或S基因组区段)的诱变。

[0274] 在某些实施方案中，本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒是淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)，其中病毒的S区段通过编码GP的ORF蛋白用ORF编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段置换来修饰。

[0275] 在某些实施方案中，野生型沙粒病毒载体基因组可经设计以至少保留两个区段的5’和3’非翻译区(UTR)和/或同样基因间区(IGR)的必要调节元件。虽不受理论束缚，但感染细胞中基因表达的最小反式作用因子作为可以表达的，但可不同地置于基因组中且可置于不同于天然的启动子的控制下，或可自内部核糖体进入位点表达的ORF保留在载体基因组。在某些实施方案中，编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核酸自内源沙粒病毒启动子之一(即S区段的5’UTR，3’UTR，L区段的5’UTR，3’UTR)转录。在其它实施方案中，编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核酸自异源导入的启动子序列表达，后者可通过病毒依赖于RNA的RNA聚合酶、通过细胞RNA聚合酶I、RNA聚合酶II或RNA聚合酶III读取，例如分别为天然存在于病毒UTR的病毒启动子序列、28S核糖体RNA启动子、β-肌动蛋白启动子或5S核糖体RNA启动子的复制。在某些实施方案中，编码的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核糖核酸通过其自身或作为通过与沙粒病毒蛋白ORF的通读转录并翻译，可通过在病毒转录物序列的适当位置引入一个或多个(例如2、3或4个)内部核糖体进入位点，增强宿主细胞中蛋白质的表达。

[0276] 在某些实施方案中，所产生的编码一个或多个肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的载体可基于LCMV的特定毒株。LCMV的毒株包括Clone 13、MP病毒毒株、Arm CA 1371、Arm E-250、WE、UBC、Traub、Pasteur、810885、CH-5692、Marseille#12、HP65-2009、200501927、810362、811316、810316、810366、20112714、Douglas、GR01、SN05、CABN及其衍生物。在某些实施方案中，所产生的编码一个或多个肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的载体可基于LCMV Clone 13。在其它实施方案中，所产生的编码一个或多个肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的载体可基于LCMV MP病毒毒株。

[0277] 在某些实施方案中，所产生的编码一个或多个肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的载体可基于Junin病毒的特定毒株。Junin病毒的毒株包括疫苗株XJ13、XJ#44和Candid#1以及IV4454、人分离毒株。在某些实施方案中，所产生的编码一个或多个肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的载体基于Junin病毒Candid#1病毒毒株。

[0278] 5.4肿瘤抗原、肿瘤相关抗原和抗原片段

[0279] 在某些实施方案中，与本文所述方法和组合物一起使用的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原是在肿瘤细胞或肿瘤(例如癌细胞或恶性肿瘤)中或其上表达的免疫原性蛋白质。在某些实施方案中，与本文所述方法和组合物一起使用的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原是非特异性、突变型、过量表达或异常表达的蛋白质，其可存在于肿瘤细胞或肿瘤和正常细胞或组织两者中。在某些实施方案中，与本文所述方法和组合物一起使用的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原是局限于肿瘤细胞的肿瘤特异性抗原。在某些实施方案中，与本文所述方法和组合物一起使用的肿瘤抗原是局限于癌细胞的癌症特异性抗原。

[0280] 在某些实施方案中，肿瘤抗原或肿瘤相关抗原可显示1、2、3或更多个、包括以下全部特征：过量表达/蓄积(即在正常和肿瘤组织两者中表达，但在瘤形成中高表达)、癌胚(即通常只在胚胎组织和癌性体细胞中表达)、肿瘤病毒或致癌病毒(即由致瘤转化病毒编码)、癌症-睾丸(即只由癌细胞和成人生殖组织例如睾丸表达)、谱系限制性的(即大多由单一癌

症组织型表达)、突变的(即因转录的遗传突变或改变只在肿瘤组织表达)、翻译后改变(例如糖基化的肿瘤相关改变)或独特型的(即自B或T淋巴细胞恶性克隆扩增发生)。

[0281] 在某些实施方案中,与本文所述方法和组合物一起使用的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原包括来自包括以下肿瘤病的抗原:急性成淋巴细胞白血病;急性成淋巴细胞淋巴瘤;急性淋巴细胞白血病;急性髓细胞性白血病;急性髓细胞性白血病(成人/儿童);肾上腺皮质癌;AIDS相关癌症;AIDS相关淋巴瘤;肛门癌;阑尾癌;星形细胞瘤;非典型畸胎样/横纹肌样瘤;基底细胞癌;肝外胆管癌(肝胆管型肝癌);膀胱癌;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑癌(成人/儿童);脑瘤,小脑星形细胞瘤(成人/儿童);脑瘤,大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤脑瘤;脑瘤,室管膜瘤;脑瘤,成神经管细胞瘤;脑瘤,幕上原始神经外胚层瘤;脑瘤,视通路和下丘脑神经胶质瘤;脑干神经胶质瘤;乳腺癌;支气管腺瘤/类癌;支气管瘤;伯基特淋巴瘤;儿童癌症;胃肠类癌瘤;类癌瘤;成人癌,原发部位不明;原发部位不明癌;中枢神经系统胚胎性瘤;中枢神经系统淋巴瘤,原发;宫颈癌;儿童肾上腺皮质癌;儿童癌症;儿童大脑星形细胞瘤;脊索瘤,儿童;慢性淋巴细胞白血病;慢性髓细胞性白血病;慢性髓细胞样白血病;慢性骨髓增殖性疾病;结肠癌;结肠直肠癌;颅咽管瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤;肺气肿;子宫内膜癌;室管膜母细胞瘤;室管膜瘤;食管癌;肿瘤尤因家族中的尤因肉瘤;颅外生殖细胞瘤;性腺外生殖细胞瘤;肝外胆管癌;胆囊癌;胃(gastric/stomach)癌;胃类癌;胃肠类癌瘤;胃肠基质瘤;生殖细胞瘤:颅外,性腺外或妊娠滋养细胞肿瘤;妊娠滋养细胞肿瘤,原发部位不明;神经胶质瘤;脑干妊娠滋养细胞肿瘤;神经胶质瘤,儿童视通路和下丘脑;毛细胞白血病;头颈癌;心脏癌;肝细胞(肝)癌;霍奇金淋巴瘤;咽下部癌;下丘脑和视通路神经胶质瘤;眼内黑素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西肉瘤;肾癌(肾细胞癌);朗格汉斯细胞组织细胞增多症;喉癌;口唇口腔癌;脂肉瘤;肝癌(原发性);肺癌,非小细胞;肺癌,小细胞;淋巴瘤,原发性中枢神经系统;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;男性乳腺癌;骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤;成神经管细胞瘤;髓质口皮瘤;黑素瘤;黑素瘤,眼内(眼);默克尔细胞癌;默克尔细胞皮肤癌;间皮瘤;间皮瘤,成人恶性;隐匿原发转移性鳞状颈癌;口癌;多发性内分泌肿瘤综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;蕈样肉芽肿病,骨髓增生异常综合征;骨髓增生异常/骨髓增生性疾病;髓细胞性白血病,慢性;髓细胞样白血病,成人急性;髓细胞样白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性(骨髓癌);骨髓增生性病症,慢性;鼻腔和鼻旁窦癌;鼻咽癌;成神经细胞瘤,非小细胞肺癌;非霍奇金淋巴瘤;少突神经胶质瘤;口癌;口腔癌;口咽癌;骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;卵巢上皮癌症(表面上皮-基质瘤);卵巢生殖细胞瘤;卵巢低恶性潜能肿瘤;胰腺癌;胰腺癌,胰岛细胞;乳头状瘤病;鼻旁窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;咽癌;嗜铬细胞瘤;松果体星形细胞瘤;松果体生殖细胞瘤;中度分化的松果体实质肿瘤;成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层瘤;垂体瘤;垂体腺瘤;浆细胞瘤形成/多发性骨髓瘤;胸膜肺胚细胞瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;前列腺癌;直肠癌;肾细胞癌(肾癌);肾盂和输尿管,移行细胞癌;涉及染色体15上的NUT基因的呼吸道癌;成视网膜细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童;涎腺癌;肉瘤,尤因肿瘤家族;塞扎里综合征;皮肤癌(黑素瘤);皮肤癌(非黑素瘤);小细胞肺癌;小肠癌软组织肉瘤;软组织肉瘤;脊髓肿瘤;鳞状细胞癌;隐匿原发转移性鳞状颈癌;胃(stomach/gastric)癌;幕上原发性外胚层肿瘤;T细胞淋巴瘤,皮肤(蕈样肉芽肿病和塞扎里综合征);睾丸癌;喉癌;胸腺瘤;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;甲状腺癌,儿童;肾盂和输尿管移行细胞癌;尿道癌;子宫

癌,子宫内膜;子宫肉瘤;阴道癌;外阴癌和肾母细胞瘤。

[0282] 在某些实施方案中,与本文所述方法和组合物一起使用的肿瘤抗原或肿瘤相关抗原包括致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原、癌胚抗原、组织分化抗原、突变蛋白抗原、新抗原、亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1AI、BCLX(L)、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKKI、ENAH(hMcna)、Ga733(EpCAM)、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IDO1、IGF2B3、IL13Ralpha2、肠羧酸酯酶、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53(非突变型)、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1(前列腺6次跨膜上皮抗原1)、存活蛋白、端粒酶、VEGF、WT1、EGF-R、CEA、CD20、CD33、CD52、糖蛋白100(GP 100或gp100蛋白)、MELANA/MART1、MART2、NY-ESO-1、p53、MAGE A1、MAGE A3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CDK4、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL、BCR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-RAF、CASP-5、CASP-8、β-联蛋白、Cdc27、CDK4、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、H-ras、K-ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SSX、SSX2、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、ormdm-2、LMP2、HPV E6/E7、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、独特型GD2神经节苷脂G2)、Ras-突变型、p53(突变型)、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、PSA、hTERT、肉瘤易位断裂点、EphA2、前列腺酸磷酸酶PAP、neo-PAP、ML-IAP、AFP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN、TRP2、TRP2-Int2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、sLe(a)、cyp1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、SART3、STn、碳酸酐酶IX、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA)、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-beta、MAD-CT-2、For相关抗原1、TRP1、CA-125、CA19-9、钙网膜蛋白、上皮膜抗原(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、CD19、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、Myo-D1、肌特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶M2型同功酶的二聚形式(肿瘤M2-PK)、BAGE BAGE-1、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-SAR-35、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1、TPTE、糖/神经节苷脂GM2(癌胚抗原-免疫原性-1 OFA-I-1)、GM3、CA 15-3(CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA 50、CAM 43、CEA、EBNA、EF2、Epstein-Barr病毒抗原、HLA-A2、HLA-A11、HSP70-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白I类、GnTV、Herv-K-mel、LAGE-1、LAGE-2、(精子蛋白)SP17、SCP-1、P15(58)、Hom/Mel-40、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、TSP-180、P185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、TAG-72-4、CA-72-4、CAM 17.1、NuMa、13-联蛋白、P16、TAGE、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、HTgp-175、M344、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TLP、TPS、CD22、CD27、CD30、CD70、prostein、TARP(T细胞受体γ另起读框)、Trp-p8、整联蛋白αvβ3(CD61)、泌乳激素或Ral-B、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138和ROR1。

[0283] 在某些实施方案中,与本文所述方法和组合物一起使用的肿瘤抗原或肿瘤相关抗

原包括致癌病毒抗原，其中致癌病毒抗原是人乳头瘤病毒(HPV)的抗原；卡波西肉瘤相关疱疹病毒的抗原，例如潜伏期相关核抗原；Epstein-Barr病毒的抗原，例如EBV-EA、EBV-MA或EBV-VCA；默克尔细胞多瘤病毒的抗原，例如MCV T抗原，或人嗜T淋巴细胞病毒的抗原，例如HTLV-1 Tax抗原。

[0284] 在某些实施方案中，肿瘤抗原或肿瘤相关抗原是新抗原。本文所用“新抗原”意指通过肿瘤细胞中的突变出现的抗原，这类抗原一般不在正常细胞或组织表达。虽不受理论束缚，但因健康组织一般不具有这些抗原，所以新抗原表示优选的靶标。此外，虽不受理论束缚，但在本发明的情况下，因为识别新抗原的T细胞可能未进行胸腺阴性选择，这类细胞可对抗原具有高的亲合力，并发动针对肿瘤的强免疫应答，同时缺乏诱导正常组织破坏和自身免疫损害的风险。在某些实施方案中，新抗原是MHC I类限制性新抗原。在某些实施方案中，新抗原是MHC II类限制性新抗原。在某些实施方案中，患者肿瘤细胞的突变引起产生新抗原的新蛋白质。

[0285] 在某些实施方案中，肿瘤抗原或肿瘤相关抗原可以是人肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的抗原直向同源物，例如哺乳动物(即非人灵长类动物、猪、狗、猫或马)。

[0286] 在某些实施方案中，本文所述肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的抗原片段由沙粒病毒内所包括的核苷酸序列编码。在某些实施方案中，当片段能够(i)在宿主(例如小鼠、兔、山羊、驴或人)中诱导抗体免疫应答，其中所得抗体与在肿瘤细胞(例如癌细胞)中或其上表达的免疫原性蛋白质特异性结合；和/或(ii)诱导特异性T细胞免疫应答时，该片段是抗原。

[0287] 在某些实施方案中，编码肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的抗原片段的核苷酸序列为8-100个核苷酸长度、15-100个核苷酸长度、25-100个核苷酸长度、50-200个核苷酸长度、50-400个核苷酸长度、200-500个核苷酸长度或400-600个核苷酸长度、500-800个核苷酸长度。在其它实施方案中，核苷酸序列为750-900个核苷酸长度、800-100个核苷酸长度、850-1000个核苷酸长度、900-1200个核苷酸长度、1000-1200个核苷酸长度、1000-1500核苷酸或10-1500个核苷酸长度、1500-2000个核苷酸长度、1700-2000个核苷酸长度、2000-2300个核苷酸长度、2200-2500个核苷酸长度、2500-3000个核苷酸长度、3000-3200个核苷酸长度、3000-3500个核苷酸长度、3200-3600个核苷酸长度、3300-3800个核苷酸长度、4000个核苷酸-4400个核苷酸长度、4200-4700个核苷酸长度、4800-5000个核苷酸长度、5000-5200个核苷酸长度、5200-5500个核苷酸长度、5500-5800个核苷酸长度、5800-6000个核苷酸长度、6000-6400个核苷酸长度、6200-6800个核苷酸长度、6600-7000个核苷酸长度、7000-7200个核苷酸长度、7200-7500个核苷酸长度或7500个核苷酸长度。在一些实施方案中，核苷酸序列编码以下的肽或多肽：5-10个氨基酸长度、10-25个氨基酸长度、25-50个氨基酸长度、50-100个氨基酸长度、100-150个氨基酸长度、150-200个氨基酸长度、200-250个氨基酸长度、250-300个氨基酸长度、300-400个氨基酸长度、400-500个氨基酸长度、500-750个氨基酸长度、750-1000个氨基酸长度、1000-1250个氨基酸长度、1250-1500个氨基酸长度、1500-1750个氨基酸长度、1750-2000个氨基酸长度、2000-2500个氨基酸长度或大于2500或更多个氨基酸长度。在一些实施方案中，核苷酸序列编码不超过2500个氨基酸长度的多肽。在具体实施方案中，核苷酸序列不含终止密码子。在某些实施方案中，核苷酸序列是密码子优化的。在某些实施方案中，核苷酸组成、核苷酸对组成或两者可被优化。这类优化的技术是本领域已知的和可适用于使肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的核苷酸序列优化。

[0288] 在某些实施方案中，沙粒病毒基因组区段、沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒可包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个或多个核苷酸序列。在其它实施方案中，沙粒病毒基因组区段、沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒可包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的至少一个核苷酸序列；编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的至少2个核苷酸序列；编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的至少3个核苷酸序列；或编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的更多个核苷酸序列。

[0289] 可通过取代糖蛋白GP、基质蛋白Z、核蛋白NP或聚合酶L蛋白的ORF的核酸序列将编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核酸序列引入二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒的基因组。在其它实施方案中，使编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核酸序列与糖蛋白GP、基质蛋白Z、核蛋白NP或聚合酶L蛋白的ORF融合。编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列，一旦插入二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒的基因组中，可在4种沙粒病毒启动子(S区段的5'UTR和3'UTR，和L区段的5'UTR和3'UTR)控制下转录和/或表达，以及可插入调节元件的核糖核酸可通过病毒依赖于RNA的RNA聚合酶、细胞RNA聚合酶I、RNA聚合酶II或RNA聚合酶III读取，例如分别为天然存在于病毒UTR的病毒启动子序列、28S核糖体RNA启动子、β-肌动蛋白启动子或5S核糖体RNA启动子的复制。编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核酸可通过其自身或作为通过分别与沙粒病毒ORF和基因融合，和/或与一个或多个(例如2、3或4个)内部核糖体进入位点组合转录和/或表达。

[0290] 在某些实施方案中，包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒另包含编码至少一种免疫调节肽、多肽或蛋白质的至少一个核苷酸序列。在某些实施方案中，免疫调节肽、多肽或蛋白质是钙网蛋白(CRT)或其片段；泛素或其片段；粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或其片段；不变链(CD74)或其抗原片段；结核杆菌热激蛋白70或其抗原片段；单纯疱疹病毒1蛋白VP22或其抗原片段；CD40配体或其抗原片段；或Fms相关酪氨酸激酶3(Flt3)配体或其抗原片段。

[0291] 在某些实施方案中，本文提供的沙粒病毒颗粒包含以下的基因组区段：a)以基因组区段的野生型形式存在的ORF被去除或功能失活；和b)编码(有义或反义)：(i)本文提供的一个或多个肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段，和(ii)本文提供的一种或多种免疫调节肽、多肽或蛋白质。

[0292] 在某些实施方案中，编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列和编码本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质的核苷酸序列在病毒基因组的相同位置上。在某些实施方案中，编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列和编码本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质的核苷酸序列在病毒基因组的不同位置上。

[0293] 在某些实施方案中，编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列和编码本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质的核苷酸序列通过间隔序列分隔开来。在某些实施方案中，编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的序列和编码本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质的核苷酸序列被内部核糖体进入位点或编码蛋白酶切割位点的序列分隔开来。在某些实施方案中，编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列和编码本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质的核苷酸序列被编码接头或自切割肽的核苷酸序列分隔开来。技术人员已知的任何接头肽或自切割肽可与

本文提供的组合物和方法一起使用。肽接头的非限制性实例是GSG。自切割肽的非限制性实例是猪捷申病毒-1 2A肽、Thoseaasign病毒2A肽或口蹄疫病毒2A肽。

[0294] 在某些实施方案中，本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段和本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质直接融合在一起。在某些实施方案中，本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段和本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质通过肽接头融合在一起。在某些实施方案中，本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段和本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质通过肽接头彼此分开。肽接头的的非限制性实例是GSG。自切割肽的的非限制性实例是猪捷申病毒-1 2A肽、Thoseaasign病毒2A肽或口蹄疫病毒2A肽。

[0295] 在某些实施方案中，本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段和本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质表达在同一沙粒病毒颗粒中。在某些实施方案中，本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段和本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质表达在不同的沙粒病毒颗粒中。在某些实施方案中，本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段和本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质表达在相同毒株的不同病毒中。在某些实施方案中，本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段和本文提供的免疫调节肽、多肽或蛋白质表达在不同毒株的不同病毒中。

[0296] 在某些实施方案中，所产生的编码一个或多个肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒包含编码本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一个或多个核苷酸序列。在具体实施方案中，本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段不同的一个或多个本文所述接头、间隔基或切割位点分隔开来。

[0297] 5.5沙粒病毒颗粒和三区段沙粒病毒颗粒的产生

[0298] 一般而言，沙粒病毒颗粒可通过针对LCMV所述的标准反求遗传技术重组产生(参见Flatz et al.,2006,Proc Natl Acad Sci USA 103:4663-4668;Sanchez et al.,2006,Virology 350:370;Ortiz-Riano et al.,2013,J Gen Virol.94:1175-88,其通过引用并入本文)。为了产生本文提供的沙粒病毒颗粒，可按以下描述应用这些技术。可按本文所述修饰病毒的基因组。

[0299] 5.5.1非天然位置开放阅读框

[0300] 包含经改造在ORF野生型位置以外的位置携带病毒ORF的基因组区段和编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒颗粒的产生可通过本领域技术人员已知的任何反求遗传技术重组产生。

[0301] (i)感染性和可复制型沙粒病毒颗粒

[0302] 在某些实施方案中，产生沙粒病毒颗粒的方法包括(i)将第一沙粒病毒基因组区段的cDNA转染至宿主细胞;(ii)将第二沙粒病毒基因组区段的cDNA转染至宿主细胞;(iii)将表达沙粒病毒的最小反式作用因子NP和L的质粒转染至宿主细胞;(iv)保持宿主细胞在适于病毒形成的条件下;和(v)收获沙粒病毒颗粒。在某些更具体的实施方案中，所述cDNA包含在质粒中。

[0303] 一旦自cDNA产生，沙粒病毒颗粒(例如感染性和可复制型)可增殖。在某些实施方案中，沙粒病毒颗粒可在容许病毒生长至允许本文所述病毒使用的滴度的任何宿主细胞中增殖。在一个实施方案中，宿主细胞容许沙粒病毒颗粒生长至与针对相应的野生型所测滴度相当的滴度。

[0304] 在某些实施方案中，沙粒病毒颗粒可在宿主细胞中增殖。可使用的宿主细胞的具体实例包括BHK-21、HEK 293、VERO等。在一个具体实施方案中，沙粒病毒颗粒可在细胞系中增殖。

[0305] 在某些实施方案中，将宿主细胞保持在培养中并用一个或多个质粒转染。质粒表达将在适于在哺乳动物细胞中表达的一个或多个表达盒(例如包含聚合酶I启动子和终止子)控制下产生的沙粒病毒基因组区段。

[0306] 可用于产生沙粒病毒颗粒的质粒可包括：i)编码S基因组区段的质粒，例如pol-I S，ii)编码L基因组区段的质粒，如pol-I L。在某些实施方案中，可将编码指导病毒L和S区段胞内合成的沙粒病毒聚合酶的质粒掺入转染混合物中。例如，编码L蛋白的质粒和/或编码NP的质粒(分别为pC-L和pC-NP)可以存在。L蛋白和NP是病毒RNA转录和复制所需的最小反式作用因子。或者，病毒L和S区段连同NP和L蛋白的胞内合成可使用具有从相对侧分别向两个独立质粒的L和S区段cDNA读取的pol-I和pol-II启动的表达盒进行。

[0307] 在某些实施方案中，沙粒病毒基因组区段在启动子的控制下。通常，可使用RNA聚合酶I驱动的表达盒、RNA聚合酶II驱动的表达盒或T7噬菌体RNA聚合酶驱动的表达盒。在某些实施方案中，编码沙粒病毒基因组区段的质粒可相同，即，基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的启动子转录。启动子的具体实例包括RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T7启动子、SP6启动子或T3启动子。

[0308] 另外，质粒的特征可为哺乳动物选择标记，例如适于在哺乳动物细胞中的基因表达的表达盒(例如上述聚合酶II表达盒)控制下的嘌罗霉素抗性，或病毒基因转录物后面是内部核糖体进入位点(例如脑心肌炎病毒之一)，接着是哺乳动物抗性标记。对于在大肠杆菌(E.coli)中生产，质粒的特征还在于细菌选择标记，例如氨苄西林抗性表达盒。

[0309] 宿主细胞质粒的转染可采用常用策略的任一种进行，例如磷酸钙，基于脂质体的方案或电穿孔。几天后，以滴定的浓度加入合适的选择剂，例如嘌罗霉素。按照标准规程分离存活的克隆并亚克隆，采用蛋白质印迹或流式细胞术规程，用针对目标病毒蛋白质的抗体鉴定高表达克隆。

[0310] 对于回收本文所述沙粒病毒颗粒，预期下列方法。第1天：将通常在M6孔板中80％汇合的细胞用上述质粒的混合物转染。为此，可采用任何常用的策略，例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。

[0311] 3-5天后：收获培养上清液(沙粒病毒载体制备物)，等分，并根据沙粒病毒载体在用前将保存多久而保存在4℃、-20℃或-80℃下。通过免疫聚焦测定法，评价沙粒病毒载体制备物的感染滴度。或者，在转染后第3-5天，可将转染细胞和上清液传代至较大的容器(例如T75组织培养瓶)中，在传代后至多5天收获培养上清液。

[0312] 本申请此外涉及异源ORF的表达，其中编码基因组区段的质粒被修饰成掺入的异源ORF。可使用限制性内切酶将异源ORF掺入质粒中。

[0313] (ii)感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒

[0314] 可如上所述拯救感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒。然而，一旦自cDNA产生，本文提供的感染性复制缺陷型沙粒病毒便可在补足细胞中增殖。补足细胞是提供通过修饰其基因组已从复制缺陷型沙粒病毒中消除的功能的细胞(例如如果编码GP的ORF蛋白缺失或功能失活，则补足细胞便提供GP蛋白)。

[0315] 由于沙粒病毒载体中一种或多种ORF去除或功能失活(此处糖蛋白GP的缺失可作为实例),沙粒病毒载体可在外在提供缺失病毒基因(例如本例中的GP)的细胞中产生并增殖。这类补足细胞系,此后称为C细胞,通过用表达目标病毒基因的一种或多种质粒(补足质粒,称为C质粒)转染细胞系(例如BHK-21、HEK 293、VERO等)来产生。C质粒表达在适于在哺乳动物细胞中表达的一种或多种表达盒(例如哺乳动物聚合酶II启动子例如具有多腺苷酸化信号的EF1α启动子)的控制下产生的沙粒病毒载体中缺失的病毒基因。另外,补足质粒的特征在于哺乳动物选择标记,例如适于在哺乳动物细胞中的基因表达的表达盒(例如上述聚合酶II表达盒)控制下的嘌罗霉素抗性,或病毒基因转录物后面是内部核糖体进入位点(例如脑心肌炎病毒之一),接着是哺乳动物抗性标记。对于在大肠杆菌中生产,质粒的特征还在于细菌选择标记,例如氨苄西林抗性表达盒。

[0316] 将可使用的细胞(例如BHK-21、HEK 293、MC57G等)保持在培养中,并采用任一种策略(例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔),用补足质粒转染。几天后,以滴定的浓度加入合适的选择剂,例如嘌罗霉素。按照标准规程分离存活的克隆并亚克隆,采用蛋白质印迹或流式细胞术规程,用针对目标病毒蛋白质的抗体鉴定高表达的C细胞克隆。作为稳定转染的C细胞使用的备选方法,正常细胞的瞬时转染可补充下面将使用C细胞的各步骤中的遗失的病毒基因。另外,可使用辅助病毒外在提供遗失的功能性。

[0317] 质粒可具有两种类型:i)二质粒,称为TF-质粒,用于在C细胞中胞内表达沙粒病毒的最小反式作用因子,来源于例如本实例中的LCMV的NP和L蛋白;和ii)质粒,称为GS-质粒,用于在C细胞中胞内表达沙粒病毒载体基因组区段,例如含规定修饰的区段。TF-质粒在适于在哺乳动物细胞中进行蛋白质表达的表达盒的控制下表达各个沙粒病毒载体的NP和L蛋白,所述表达盒通常例如哺乳动物聚合酶II启动子,例如CMV或EF1α启动子,其任一个优先与多腺苷酸化信号组合。GS-质粒表达载体的小(S)和大(L)基因组区段。通常,可使用聚合酶I驱动的表达盒或T7噬菌体RNA聚合酶(T7-)驱动表达盒,后者优先与3'端核酶一起用于加工初级转录物以产生正确的末端。在使用基于T7的系统的情况下,C细胞中T7的表达必须如下提供:通过在回收过程中包括类似于TF-质粒构建的额外表达质粒,提供T7,或构建以稳定方式额外表达T7的C细胞。在某些实施方案中,TF和GS质粒可相同,即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polII启动子转录。

[0318] 为了回收沙粒病毒载体,可采用下列程序。第1天:将通常在M6孔板中80%汇合的C细胞用两种TF-质粒加两种GS-质粒的混合物转染。在某些实施方案中,TF和GS质粒可相同,即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polII启动子转录。为此,可采用任一种常用策略,例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。

[0319] 3-5天后:收获培养上清液(沙粒病毒载体制备物),等分,并根据沙粒病毒载体在用前将保存多久而保存在4℃、-20℃或-80℃下。然后通过对C细胞的免疫聚焦测定法,评价沙粒病毒载体制备物的感染滴度。或者,在转染后第3-5天,可将转染细胞和上清液传代至较大的容器(例如T75组织培养瓶)中,在传代后至多5天收获培养上清液。

[0320] 本发明此外涉及细胞培养物中抗原的表达,其中细胞培养物用表达抗原的感染性复制缺陷型沙粒病毒感染。当抗原在培养的细胞中表达时,可采用下列两种方法:

[0321] i)将本文所述沙粒病毒载体制备物以1或更大(例如2、3或4)的感染复数(MOI)感染目标细胞类型,导致在感染后来不久在全部细胞中产生抗原。

[0322] ii)或者,可使用更低的MOI,并且可针对其病毒驱动的抗原表达水平,选择各细胞克隆。随后各克隆可因沙粒病毒载体的非细胞溶解性质而无限扩增。不论方法,随后可从培养上清液或从细胞本身收集(并纯化)抗原,这取决于所产生的抗原的性质。然而,本发明不限于这两种策略,可考虑使用感染性复制缺陷型沙粒病毒作为载体驱动抗原表达的其它方式。

[0323] 5.5.2三区段沙粒病毒颗粒的产生

[0324] 可通过本领域已知反求遗传技术,例如如Emonet et al.,2008,PNAS,106(9):3473-3478;Popkin et al.,2011,J.Virol.,85(15):7928-7932(其通过引用并入本文)所述,重组产生包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的三区段沙粒病毒颗粒。本文提供的三区段沙粒病毒颗粒的产生可按第5.2节中所述修饰5.2。

[0325] (i)感染性和可复制型三区段沙粒病毒颗粒

[0326] 在某些实施方案中,产生三区段沙粒病毒颗粒的方法包括:(i)将一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段的cDNA转染至宿主细胞;(ii)将表达沙粒病毒的最小反式作用因子NP和L的质粒转染至宿主细胞;(iii)保持宿主细胞在适于病毒形成的条件下;和(iv)收获沙粒病毒颗粒。

[0327] 一旦自cDNA产生,三区段沙粒病毒颗粒(即感染性和可复制型)便可增殖。在某些实施方案中,三区段沙粒病毒颗粒可在容许病毒生长至允许本文所述病毒使用的滴度的任何宿主细胞中增殖。在一个实施方案中,宿主细胞容许沙粒病毒颗粒生长至与针对相应的野生型所测滴度相当的滴度。

[0328] 在某些实施方案中,三区段沙粒病毒颗粒可在宿主细胞中增殖。可使用的宿主细胞的具体实例包括BHK-21、HEK 293、VERO等。在一个具体实施方案中,三区段沙粒病毒颗粒可在细胞系中增殖。

[0329] 在某些实施方案中,将宿主细胞保持在培养中并用一种或多种质粒转染。质粒表达将在适于在哺乳动物细胞中表达的一个或多个表达盒(例如包含聚合酶I启动子和终止子)控制下产生的沙粒病毒基因组区段。

[0330] 在具体实施方案中,将宿主细胞保持在培养中并用一种或多种质粒转染。质粒表达将在适于在哺乳动物细胞中表达的一个或多个表达盒(例如包含聚合酶I启动子和终止子)控制下产生的病毒基因。

[0331] 可用于产生包含一个L区段和两个S区段的三区段沙粒病毒的质粒可包括:i)各自编码S基因组区段的二质粒,例如pol-I S,ii)编码L基因组区段的质粒,例如pol-I L。包含两个L区段和一个S区段的三区段沙粒病毒所需的质粒为:i)各自编码L基因组区段的二质粒,例如pol-L,ii)编码S基因组区段的质粒,例如pol-I S。

[0332] 在某些实施方案中,可将编码指导病毒L和S区段胞内合成的沙粒病毒聚合酶的质粒掺入转染混合物中。例如,编码L蛋白的质粒和编码NP的质粒(分别为pC-L和pC-NP)。L蛋白和NP是病毒RNA转录和复制所需的最小反式作用因子。或者,病毒L和S区段连同NP和L蛋白的胞内合成可使用具有从相对侧分别向两个独立质粒的L和S区段cDNA读取的pol-I和pol-II启动的表达盒进行。

[0333] 另外,质粒的特征在于哺乳动物选择标记,例如适于在哺乳动物细胞中的基因表达的表达盒(例如上述聚合酶II表达盒)控制下的嘌罗霉素抗性,或病毒基因转录物后面是

内部核糖体进入位点(例如脑心肌炎病毒之一),接着是哺乳动物抗性标记。对于在大肠杆菌中产生,质粒的特征还在于细菌选择标记,例如氨苄西林抗性表达盒。

[0334] BHK-21细胞用质粒的转染可采用常用策略的任一种进行,例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。几天后,以滴定的浓度加入合适的选择剂,例如嘌罗霉素。按照标准规程分离存活的克隆并亚克隆,采用蛋白质印迹或流式细胞术规程,用针对目标病毒蛋白质的抗体鉴定高表达克隆。

[0335] 通常,可使用RNA聚合酶I驱动的表达盒、RNA聚合酶II驱动的表达盒或T7噬菌体RNA聚合酶驱动表达盒,后者优先与3'端核酶一起用于加工初级转录物以产生正确的末端。在某些实施方案中,编码沙粒病毒基因组区段的质粒可相同,即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polII启动子转录。

[0336] 对于回收沙粒病毒三区段沙粒病毒载体,预期下列方法。第1天:将通常在M6孔板中80%汇合的细胞用上述质粒的混合物转染。为此,可采用任何常用的策略,例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。

[0337] 3-5天后:收获培养上清液(沙粒病毒载体制备物),等分,并根据沙粒病毒载体在用前将保存多久而保存在4℃、-20℃或-80℃下。通过免疫聚焦测定法,评价沙粒病毒载体制备物的感染滴度。或者,在转染后第3-5天,可将转染细胞和上清液传代至较大的容器(例如T75组织培养瓶)中,在传代后至多5天收获培养上清液。

[0338] 在某些实施方案中,提供编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的表达,其中编码基因组区段的质粒经修饰以掺入编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列可使用限制性内切酶掺入质粒中。

[0339] (ii)感染性复制缺陷型三区段沙粒病毒颗粒

[0340] 可如上所述拯救感染性复制缺陷型三区段沙粒病毒颗粒。然而,一旦自cDNA产生,本文提供的感染性复制缺陷型沙粒病毒便可在补足细胞中增殖。补足细胞是提供通过修饰其基因组已从复制缺陷型沙粒病毒中消除的功能的细胞(例如如果编码GP的ORF蛋白缺失或功能失活,则补足细胞便提供GP蛋白)。

[0341] 由于沙粒病毒载体中一种或多种ORF去除或功能失活(此处糖蛋白GP的缺失可作为实例),沙粒病毒载体可在外在提供缺失病毒基因(例如本例中的GP)的细胞中产生并增殖。这类补足细胞系,此后称为C细胞通过用表达目标病毒基因的一种或多种质粒(补足质粒,称为C质粒)转染哺乳动物细胞系例如BHK-21、HEK 293、VERO等(此处BHK-21可作为实例)产生。C质粒表达在适于在哺乳动物细胞中表达的一个或多个表达盒(例如哺乳动物聚合酶II启动子,例如具有多腺苷酸化信号的CMV或EF1α启动子)控制下产生的沙粒病毒载体中缺失的病毒基因。另外,补足质粒的特征在于哺乳动物选择标记,例如适于在哺乳动物细胞中的基因表达的表达盒(例如上述聚合酶II表达盒)控制下的嘌罗霉素抗性,或病毒基因转录物后面是内部核糖体进入位点(例如脑心肌炎病毒之一),接着是哺乳动物抗性标记。对于在大肠杆菌中生产,质粒的特征还在于细菌选择标记,例如氨苄西林抗性表达盒。

[0342] 将可使用的细胞(例如BHK-21、HEK 293、MC57G等)保持在培养中,并采用任一种策略(例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔),用补足质粒转染。几天后,以滴定的浓度加入合适的选择剂,例如嘌罗霉素。按照标准规程分离存活的克隆并亚克隆,采用蛋白质印迹

或流式细胞术规程，用针对目标病毒蛋白质的抗体鉴定高表达的C细胞克隆。作为稳定转染的C细胞使用的备选方法，正常细胞的瞬时转染可补充下面将使用C细胞的各步骤中的遗失的病毒基因。另外，可使用辅助病毒外在提供遗失的功能性。

[0343] 可使用两种类型的质粒：i)二质粒，称为TF-质粒，用于在C细胞中胞内表达沙粒病毒的最小反式作用因子，来源于例如本实例中的LCMV的NP和L蛋白；和ii)质粒，称为GS-质粒，用于在C细胞中胞内表达沙粒病毒载体基因组区段，例如含规定修饰的区段。TF-质粒在适于在哺乳动物细胞中进行蛋白质表达的表达盒的控制下表达各个沙粒病毒载体的NP和L蛋白，所述表达盒通常例如哺乳动物聚合酶II启动子，例如CMV或EF1α启动子，其任一个优先与多腺苷酸化信号组合。GS-质粒表达载体的小(S)和大(L)基因组区段。通常，可使用聚合酶I驱动的表达盒或T7噬菌体RNA聚合酶(T7-)驱动表达盒，后者优先与3'端核酶一起用于加工初级转录物以产生正确的末端。在使用基于T7的系统的情况下，C细胞中T7的表达必须如下提供：通过在回收过程中包括类似于TF-质粒构建的额外表达质粒，提供T7，或构建以稳定方式额外表达T7的C细胞。在某些实施方案中，TF和GS质粒可相同，即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polII启动子转录。

[0344] 为了回收沙粒病毒载体，可采用下列程序。第1天：将通常在M6孔板中80％汇合的C细胞用两种TF-质粒加两种GS-质粒的混合物转染。在某些实施方案中，TF和GS质粒可相同，即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polII启动子转录。为此，可采用任一种常用策略，例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。

[0345] 3-5天后：收获培养上清液(沙粒病毒载体制备物)，等分，并根据沙粒病毒载体在用前将保存多久而保存在4℃、-20℃或-80℃下。然后通过对C细胞的免疫聚焦测定法，评价沙粒病毒载体制备物的感染滴度。或者，在转染后第3-5天，可将转染细胞和上清液传代至较大的容器(例如T75组织培养瓶)中，在传代后至多5天收获培养上清液。

[0346] 本发明此外涉及细胞培养物中抗原的表达，其中细胞培养物用表达抗原的感染性复制缺陷型三区段沙粒病毒感染。当用于CMV抗原在培养的细胞中表达时，可采用下列两种方法：

[0347] i)将本文所述沙粒病毒载体制备物以1或更大(例如2、3或4)的感染复数(MOI)感染目标细胞类型，导致感染后不久已在全部细胞中产生肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。

[0348] ii)或者，可使用更低的MOI，并且可针对其病毒驱动的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段表达水平，选择各细胞克隆。随后各克隆可因沙粒病毒载体的非细胞溶解性质而无限扩增。不论方法，随后可从培养上清液或从细胞本身收集(并纯化)肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段，这取决于所产生的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的性质。然而，本发明不限于这两种策略，可考虑使用感染性复制缺陷型沙粒病毒作为载体驱动肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段表达的其它方式。

[0349] 5.6表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的感染性复制缺陷型沙粒病毒的产生

[0350] 一般而言，沙粒病毒颗粒可通过针对LCMV所述的标准反求遗传技术重组产生(L.Flatz,A.Bergthaler,J.C.de la Torre,and D.D.Pinschewer,Proc Natl Acad Sci USA 103:4663-4668,2006;A.B.Sanchez and J.C.de la Torre,Virology 350:370,2006;

E.Ortiz-Riano,B.Y.Cheng,J.C.de la Torre,L.Martinez-Sobrido.J Gen Virol.94:1175-88,2013)。为了产生与本发明一起使用的感染性复制缺陷型沙粒病毒,可采用这些技术,然而,按本文所述修饰所拯救病毒的基因组。这些修饰可以是:i)4种沙粒病毒ORF(糖蛋白(GP)、核蛋白(NP)、基质蛋白Z、依赖于RNA的RNA聚合酶L)的一种或多种(例如2、3或4种)被去除或功能失活以防止正常细胞中形成感染性颗粒,尽管仍允许在沙粒病毒载体感染的宿主细胞中表达基因;和ii)可导入编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸。本文所述感染性复制缺陷型病毒可按国际专利申请公布号WO 2009/083210(申请号PCT/EP2008/010994)和国际专利申请公布号WO 2014/140301(申请号PCT/EP2014/055144)(其每一个通过引用以其整体并入本文)所述产生。

[0351] 一旦自cDNA产生,本文提供的感染性复制缺陷型沙粒病毒便可在补足细胞中增殖。补足细胞是提供通过修饰其基因组已从复制缺陷型沙粒病毒中消除的功能的细胞(例如如果编码GP的ORF蛋白缺失或功能失活,则补足细胞便提供GP蛋白)。

[0352] 由于沙粒病毒载体中病毒基因的一个或多个的去除或功能性失活(此处糖蛋白GP的缺失可作为实例),沙粒病毒载体可在外在提供缺失病毒基因(例如本例中的GP)的细胞中产生并增殖。这类补足细胞系,此后称为C细胞,通过用表达目标病毒基因的一种或多种质粒(补足质粒,称为C质粒)转染哺乳动物细胞系例如BHK-21、HEK 293、VERO等(此处BHK-21可作为实例)产生。C质粒表达在适于在哺乳动物细胞中表达的一个或多个表达盒(例如哺乳动物聚合酶II启动子,例如具有多腺苷酸化信号的CMV或EF1α启动子)控制下产生的沙粒病毒载体中缺失的病毒基因。另外,补足质粒的特征在于哺乳动物选择标记,例如适于在哺乳动物细胞中的基因表达的表达盒(例如上述聚合酶II表达盒)控制下的嘌罗霉素抗性,或病毒基因转录物后面是内部核糖体进入位点(例如脑心肌炎病毒之一),接着是哺乳动物抗性标记。对于在大肠杆菌中生产,质粒的特征还在于细菌选择标记,例如氨苄西林抗性表达盒。

[0353] 将可使用的细胞(例如BHK-21、HEK 293、MC57G等)保持在培养中,并采用任一种策略(例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔),用补足质粒转染。几天后,以滴定的浓度加入合适的选择剂,例如嘌罗霉素。按照标准规程分离存活的克隆并亚克隆,采用蛋白质印迹或流式细胞术规程,用针对目标病毒蛋白质的抗体鉴定高表达的C细胞克隆。作为稳定转染的C细胞使用的备选方法,正常细胞的瞬时转染可补充下面将使用C细胞的各步骤中的遗失的病毒基因。另外,可使用辅助病毒外在提供遗失的功能性。

[0354] 可使用的质粒可具有两种类型:i)二质粒,称为TF-质粒,用于在C细胞中胞内表达沙粒病毒的最小反式作用因子,来源于例如本实例中的LCMV的NP和L蛋白;和ii)质粒,称为GS-质粒,用于在C细胞中胞内表达沙粒病毒载体基因组区段,例如含规定修饰的区段。TF-质粒在适于在哺乳动物细胞中进行蛋白质表达的表达盒的控制下表达各个沙粒病毒载体的NP和L蛋白,所述表达盒通常例如哺乳动物聚合酶II启动子,例如CMV或EF1α启动子,其任一个优先与多腺苷酸化信号组合。GS-质粒表达载体的小(S)和大(L)基因组区段。通常,可使用聚合酶I驱动的表达盒或T7噬菌体RNA聚合酶(T7-)驱动表达盒,后者优先与3'端核酶一起用于加工初级转录物以产生正确的末端。在使用基于T7的系统的情况下,C细胞中T7的表达必须如下提供:通过在回收过程中包括类似于TF-质粒构建的额外表达质粒,提供T7,或构建以稳定方式额外表达T7的C细胞。在某些实施方案中,TF和GS质粒可相同,即基因组

序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polII启动子转录。

[0355] 为了回收沙粒病毒载体，可采用下列程序。第1天：将通常在M6孔板中80％汇合的C细胞用两种TF-质粒加两种GS-质粒的混合物转染。在某些实施方案中，TF和GS质粒可相同，即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polII启动子转录。为此，可采用任一种常用策略，例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。

[0356] 3-5天后：收获培养上清液(沙粒病毒载体制备物)，等分，并根据沙粒病毒载体在用前将保存多久而保存在4℃、-20℃或-80℃下。然后通过对C细胞的免疫聚焦测定法，评价沙粒病毒载体制备物的感染滴度。

[0357] 本发明此外涉及细胞培养物中肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的表达，其中将细胞培养物用表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒感染。当肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段在培养的细胞中表达时，可采用下列两种方法：

[0358] i)将本文所述沙粒病毒载体制备物以1或更大(例如2、3或4)的感染复数(MOI)感染目标细胞类型，导致感染后不久已在全部细胞中产生肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。

[0359] ii)或者，可使用更低的MOI，并且可针对其病毒驱动的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段表达水平，选择各细胞克隆。随后各克隆可因沙粒病毒载体的非细胞溶解性质而无限扩增。不论方法，随后可从培养上清液或从细胞本身收集(并纯化)肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段，这取决于所产生的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的性质。然而，本发明不限于这两种策略，可考虑使用感染性复制缺陷型沙粒病毒作为载体驱动肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段表达的其它方式。

[0360] 或者，可使用由3种质粒组成的拯救系统：(1)第1种质粒通过在转染细胞中经由聚合酶II的转录和随后的翻译表达NP蛋白；(2)第2种质粒经由聚合酶I的转录产生LCMV基因组的(负链)L-区段以及通过在聚合酶I启动子的相反方向自同一模板经由聚合酶II的转录产生L蛋白；(3)第3种质粒通过经由聚合酶I的转录产生LCMV基因组的S-区段(编码抗原编码序列而非LCMV糖蛋白)。将3μg各质粒用于C细胞的电穿孔，接着将细胞接种于6孔板中，在37℃下温育。在温育后，将来自转染的细胞和上清液与新接种的C细胞混合，在感染后的规定时间点收获载体，从细胞和碎片中澄清。一旦载体产生，便可通过技术人员已知任何技术将编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核酸插入从中转录感染性复制缺陷型载体的基因组区段的质粒中。

[0361] 由于沙粒病毒载体中病毒基因的一个或多个的去除或功能性失活(此处糖蛋白GP的缺失可作为实例)，沙粒病毒载体可在外在提供缺失的或功能失活的病毒基因(例如GP)的细胞中产生并扩增。所得病毒本身是感染性的，但由于缺失的或功能失活的病毒基因(例如GP)的缺乏，因此不能够在非补足细胞中产生进一步的感染性子代颗粒。补足细胞可通过稳定转染、瞬时转染或用表达缺失功能的辅助病毒感染来提供缺失的功能。

[0362] 在某些实施方案中，补足细胞提供已从沙粒病毒载体基因组中缺失或功能失活的病毒基因。在一个具体实施方案中，补足细胞提供来自与用于产生沙粒病毒载体的基因组的病毒毒株相同的病毒毒株的病毒基因。在另一个实施方案中，补足细胞提供来自与用于产生沙粒病毒载体的基因组的病毒毒株不同的病毒毒株的病毒基因。例如，补足细胞中提

供的病毒基因获自LCMV的MP病毒毒株。在另一个实例中，补足细胞中提供的病毒基因获自LCMV的Clone 13毒株。在另一个实例中，补足细胞中提供的病毒基因获自LCMV的WE病毒毒株。

[0363] 在一个具体实施方案中，补足细胞提供LCMV的MP病毒毒株的GP，且沙粒病毒载体包含本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF代替编码GP的ORF蛋白。在一个甚至更具体的实施方案中，补足细胞提供LCMV的MP病毒毒株的GP，沙粒病毒载体获自LCMV Clone 13且包含本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF代替编码GP的ORF蛋白。

[0364] 在一个具体实施方案中，补足细胞提供LCMV的Clone 13毒株的GP，且沙粒病毒载体包含本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF代替编码GP的ORF蛋白。在一个甚至更具体的实施方案中，补足细胞提供LCMV的Clone 13毒株的GP，沙粒病毒载体获自LCMVMP病毒毒株且包含本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF代替编码GP的ORF蛋白。

[0365] 在一个具体实施方案中，补足细胞提供LCMV的WE病毒毒株的GP，且沙粒病毒载体包含本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF代替编码GP的ORF蛋白。在一个甚至更具体的实施方案中，补足细胞提供LCMV的WE病毒毒株的GP，沙粒病毒载体获自LCMV Clone 13且包含本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF代替编码GP的ORF蛋白。

[0366] 在一个具体实施方案中，补足细胞提供LCMV的WE病毒毒株的GP，且沙粒病毒载体包含本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF代替编码GP的ORF蛋白。在一个甚至更具体的实施方案中，补足细胞提供LCMV的WE病毒毒株的GP和沙粒病毒载体获自LCMV MP病毒毒株和包含本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的ORF代替编码GP的ORF蛋白。

[0367] 5.7核酸、载体系统和细胞系

[0368] 在某些实施方案中，本文提供包含本文所述沙粒病毒基因组区段或三区段沙粒病毒颗粒或由其组成的cDNA。

[0369] 5.7.1非天然位置开放阅读框

[0370] 在一个实施方案中，本文提供编码第5.1节所述沙粒病毒基因组区段的核酸5.1。在更具体的实施方案中，本文提供表1列出的DNA核苷酸序列或一组DNA核苷酸序列。第5.1节还提供包含所述核酸的宿主细胞。

[0371] 在具体实施方案中，本文提供经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒基因组区段的cDNA和编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列，其中沙粒病毒基因组区段编码第5.1节所述异源ORF。

[0372] 在一个实施方案中，本文提供编码经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒基因组区段和编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的DNA表达载体系统。准确在讲，本文提供DNA表达载体系统，其中一个或多个载体编码本文所述沙粒病毒颗粒的两个沙粒病毒基因组区段，即L区段和S区段。这类载体系统可编码编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0373] 在另一个实施方案中，本文提供是DNA表达系统的部分或掺入DNA表达系统中的经

改造在野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒S区段的cDNA和编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在其它实施方案中，本文提供是DNA表达系统的部分或掺入DNA表达系统中的经改造在野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒L区段的cDNA和编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在某些实施方案中，是经改造携带以下的沙粒病毒基因组区段的cDNA：(i)在ORF野生型位置以外位置处的ORF；和(ii)编码GP的ORF、NP、Z蛋白或L蛋白被去除并用编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。

[0374] 在某些实施方案中，本文提供的cDNA可来源于LCMV的特定毒株。LCMV的毒株包括Clone 13、MP病毒毒株、Arm CA 1371、Arm E-250、WE、UBC、Traub、Pasteur、810885、CH-5692、Marseille#12、HP65-2009、200501927、810362、811316、810316、810366、20112714、Douglas、GR01、SN05、CABN及其衍生物。在具体实施方案中，cDNA来源于LCMV Clone 13。在其它的具体实施方案中，cDNA来源于LCMV MP病毒毒株。

[0375] 在某些实施方案中，所产生的编码本文所述沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒的载体可基于LCMV的特定毒株。LCMV的毒株包括Clone 13、MP病毒毒株、Arm CA 1371、Arm E-250、WE、UBC、Traub、Pasteur、810885、CH-5692、Marseille#12、HP65-2009、200501927、810362、811316、810316、810366、20112714、Douglas、GR01、SN05、CABN及其衍生物。在某些实施方案中，本文所述沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒可基于LCMV Clone 13。在其它实施方案中，所产生的编码本文所述沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒的载体基于LCMV MP病毒毒株。

[0376] 在另一个实施方案中，本文提供细胞，其中细胞包含本节上述的cDNA或载体系统。本文还提供来源于所述细胞的细胞系、包含所述细胞的培养物、培养所述感染细胞的方法。在某些实施方案中，本文提供细胞，其中细胞包含经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒基因组区段的cDNA和编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在一些实施方案中，细胞包含S区段和/或L区段。

[0377] 5.7.2三区段沙粒病毒颗粒

[0378] 在一个实施方案中，本文提供编码第5.2节中所述三区段沙粒病毒颗粒的核酸。在更具体的实施方案中，本文提供例如表2或表3列出的DNA核苷酸序列或一组DNA核苷酸序列。第5.2节还提供包含所述核酸的宿主细胞。

[0379] 在具体实施方案中，本文提供由经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的三区段沙粒病毒颗粒的cDNA组成的cDNA。在其它实施方案中，是经改造成以下的三区段沙粒病毒颗粒的cDNA：(i)在ORF野生型位置以外的位置携带沙粒病毒ORF；和(ii)其中三区段沙粒病毒颗粒编码第5.2节所述异源ORF。

[0380] 在一个实施方案中，本文提供共同编码包含编码本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的三区段沙粒病毒颗粒的DNA表达载体系统。准确在讲，本文提供DNA表达载体系统，其中一个或多个载体编码三个沙粒病毒基因组区段，即本文所述三区段沙粒病毒颗粒一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段。这类载体系统可编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。

[0381] 在另一个实施方案中，本文提供是DNA表达系统的部分或掺入DNA表达系统中的经改造在野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒S区段的cDNA和编码肿瘤抗原、肿瘤相关

抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在其它实施方案中，提供是DNA表达系统的部分或掺入DNA表达系统中的经改造在野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒L区段的cDNA和编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在某些实施方案中，是经改造携带以下三区段沙粒病毒颗粒的cDNA：(i)在ORF野生型位置以外位置处的ORF；和(ii)编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF被去除并用编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。

[0382] 在某些实施方案中，本文提供的cDNA可来源于LCMV的特定毒株。LCMV的毒株包括Clone 13、MP病毒毒株、Arm CA 1371、Arm E-250、WE、UBC、Traub、Pasteur、810885、CH-5692、Marseille#12、HP65-2009、200501927、810362、811316、810316、810366、20112714、Douglas、GR01、SN05、CABN及其衍生物。在具体实施方案中，cDNA来源于LCMV Clone 13。在其它的具体实施方案中，cDNA来源于LCMV MP病毒毒株。

[0383] 在某些实施方案中，所产生的编码本文所述沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒的载体可基于LCMV的特定毒株。LCMV的毒株包括Clone 13、MP病毒毒株、Arm CA 1371、Arm E-250、WE、UBC、Traub、Pasteur、810885、CH-5692、Marseille#12、HP65-2009、200501927、810362、811316、810316、810366、20112714、Douglas、GR01、SN05、CABN及其衍生物。在某些实施方案中，本文所述沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒可基于LCMV Clone 13。在其它实施方案中，所产生的编码本文所述沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒的载体基于LCMV MP病毒毒株。

[0384] 在另一个实施方案中，本文提供细胞，其中细胞包含本节上述的cDNA或载体系统。本文还提供来源于所述细胞的细胞系、包含所述细胞的培养物、培养所述感染细胞的方法。在某些实施方案中，本文提供细胞，其中细胞包含三区段沙粒病毒颗粒的cDNA。在一些实施方案中，细胞包含S区段和/或L区段。

[0385] 5.7.3复制缺陷型沙粒病毒

[0386] 在一个实施方案中，本文描述了是本文所述二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒的大基因组区段(L区段)的cDNA的核酸序列，其中基因组区段的一种ORF缺失或功能失活，且基因组区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0387] 在一个实施方案中，本文描述了编码本文所述二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒的短基因组区段(S区段)的核酸序列，其中基因组区段的一种ORF缺失或功能失活，且其中短基因组区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在另一个实施方案中，本文描述了编码本文所述二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒的短基因组区段(S区段)的核酸序列，其中糖蛋白基因的ORF缺失或功能失活，且其中短基因组区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。在某些更具体的实施方案中，肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段是描述于第5.4节的抗原。

[0388] 在某些实施方案中，本文提供的核酸序列可来源于LCMV的特定毒株。LCMV的毒株包括Clone 13、MP病毒毒株、Arm CA 1371、Arm E-250、WE、UBC、Traub、Pasteur、810885、CH-5692、Marseille#12、HP65-2009、200501927、810362、811316、810316、810366、20112714、Douglas、GR01、SN05、CABN及其衍生物。在具体实施方案中，核酸来源于LCMV Clone 13。在其它的具体实施方案中，核酸来源于LCMV MP病毒毒株。

[0389] 在一个更具体的实施方案中，本文提供核酸，其包含沙粒病毒基因组区段；和(ii)

编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0390] 在一个实施方案中，本文描述了载体系统包含同时包含本文所述二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒的基因组颗粒的一个或多个载体。准确在讲，本文提供载体系统其中一个或多个载体包含两个沙粒病毒基因组区段，即本文所述二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒的L区段和S区段。这类载体系统可包含(在一个或多个单独的DNA分子中)：

[0391] ●经过修饰使得携带该修饰的S基因组区段的沙粒病毒颗粒无法产生感染性子代病毒颗粒的沙粒病毒S基因组区段和包含编码(有义或反义)肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒L基因组区段；

[0392] ●经过修饰使得携带该修饰的L基因组区段的沙粒病毒颗粒无法产生感染性子代病毒颗粒沙粒病毒L基因组区段和包含编码(有义或反义)肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列的沙粒病毒S基因组区段；

[0393] ●经过修饰使得携带该修饰的S基因组区段的沙粒病毒颗粒无法产生感染性子代病毒颗粒且其中沙粒病毒S基因组区段包含编码(有义或反义)肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段和包含野生型沙粒病毒L基因组区段的核苷酸序列的沙粒病毒S基因组区段；或

[0394] ●经过修饰使得携带该修饰的L基因组区段的沙粒病毒颗粒无法产生感染性子代病毒颗粒且其中沙粒病毒L基因组区段包含编码(有义或反义)肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段和包含野生型沙粒病毒S基因组区段的核苷酸序列的沙粒病毒L基因组区段。

[0395] 在某些实施方案中，本文描述了包含沙粒病毒(例如LCMV)基因组区段的核酸序列，其中编码S基因组区段的GP的ORF用编码选自以下的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换：致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原、癌胚抗原、组织分化抗原、突变蛋白抗原、新抗原、亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1AI、BCLX(L)、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKKI、ENAH(hMcna)、Ga733(EpCAM)、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IDO1、IGF2B3、IL13Ralpha2、肠羧酸酯酶、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53(非突变型)、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE、RAGE-1、RGS5、Rh℃、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1(前列腺6次跨膜上皮抗原1)、存活蛋白、端粒酶、VEGF、WT1、EGF-R、CEA、CD20、CD33、CD52、糖蛋白100(GP 100或gp 100蛋白)、MELANA/MART1、MART2、NY-ESO-1、p53、MAGE A1、MAGE A3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CDK4、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL、BCR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-RAF、CASP-5、CASP-8、β-联蛋白、Cdc27、CDK4、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、H-ras、K-ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SSX、SSX2、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、ormdm-2、LMP2、HPV E6/E7、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、独特型GD2神经节苷脂G2)、Ras-突变型、p53(突变型)、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、PSA、hTERT、肉瘤易位断裂点、EphA2、前列腺酸磷酸酶PAP、neo-PAP、ML-IAP、AFP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN、TRP2、TRP2-Int2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、sLe(a)、cyp1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、SART3、STn、碳酸酐酶IX、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA)、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、Legumain、Tie 2、

Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-beta、MAD-CT-2、For相关抗原1、TRP1、CA-125、CA19-9、钙网膜蛋白、上皮膜抗原(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、CD19、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、Myo-D1、肌特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶M2型同功酶的二聚形式(肿瘤M2-PK)、BAGE BAGE-1、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-SAR-35、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1、TPTE、糖/神经节苷脂GM2(癌胚抗原-免疫原性-1 OFA-I-1)、GM3、CA 15-3(CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA 50、CAM 43、CEA、EBNA、EF2、Epstein-Barr病毒抗原、HLA-A2、HLA-A11、HSP70-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白I类、GnTV、Herv-K-mel、LAGE-1、LAGE-2、(精子蛋白)SP17、SCP-1、P15(58)、Hom/Mel-40、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、TSP-180、P185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、TAG-72-4、CA-72-4、CAM 17.1、NuMa、13-联蛋白、P16、TAGE、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、CO-029、HTgp-175、M344、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TLP、TPS、CD22、CD27、CD30、CD70、prostein、TARP(T细胞受体γ另起读框)、Trp-p8、整联蛋白αvβ3(CD61)、泌乳激素或Ral-B、CD123、CLL-1、CD38、CS-1、CD138和ROR1。

[0396] 在某些实施方案中,本文描述了包含沙粒病毒(例如LCMV)基因组区段的核酸序列,其中编码S基因组区段的GP的ORF用核苷酸序列编码一个或多个肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段(例如前段列出的一个或多个)置换。

[0397] 在另一个实施方案中,本文提供细胞,其中细胞包含本节中上面所述的核酸或载体系统。本文还提供来源于所述细胞的细胞系、包含所述细胞的培养物和培养用核酸或载体系统感染的所述细胞的方法。在某些实施方案中,本文提供细胞,其中细胞包含含有本文所述二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒的大基因组区段(L区段)的核酸,其中基因组区段的一种ORF缺失或功能失活,且基因组区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0398] 在其它实施方案中,本文提供细胞,其中细胞包含含有本文所述二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒的短基因组区段(S区段)的核酸序列,其中基因组区段的一种ORF缺失或功能失活且其中短基因组区段包含编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列。

[0399] 在另一个实施方案中,本文提供细胞,其中细胞包含本文所述两种核酸或载体系统。本文还提供来源于所述细胞的细胞系、包含所述细胞的培养物和培养用核酸或载体系统感染的所述细胞的方法。

[0400] 5.8使用方法

[0401] 疫苗已成功用于预防和/或治疗感染性疾病,例如用于脊髓灰质炎病毒和麻疹的疫苗。然而,在已确定的慢性病(包括癌症)的背景下治疗性免疫不太成功。产生与免疫检查点抑制剂组合使用的沙粒病毒颗粒的能力代表了新的疫苗策略。

[0402] 在某些实施方案中,本文提供治疗对象的肿瘤病的方法。这类方法可包括给予有需要的对象本文提供的沙粒病毒颗粒和本文提供的免疫检查点抑制剂。在某些实施方案

中，所述方法使用的沙粒病毒颗粒是本文提供的感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒。在某些实施方案中，所述方法使用的沙粒病毒颗粒是本文提供的三区段沙粒病毒颗粒，包括感染性复制缺陷型三区段沙粒病毒颗粒或可复制型三区段沙粒病毒颗粒。因此，在某些实施方案中，所述方法使用的沙粒病毒颗粒(包括三区段沙粒病毒颗粒)是复制缺陷型的，其中沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组：(1)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列；和(2)在感染细胞中扩增和表达其遗传信息但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的能力。此外，在某些实施方案中，所述方法使用的三区段沙粒病毒颗粒是复制缺陷型的，其中三区段沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组：(1)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列；(2)在感染细胞中扩增和表达其遗传信息的能力；和(3)在正常的非遗传改造的细胞中产生进一步的感染性子代颗粒的能力。在某些实施方案中，所述方法使用的沙粒病毒颗粒是二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒。因此，在某些实施方案中，所述方法使用的感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒经改造含有包含以下的基因组：(1)编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的核苷酸序列；和(2)在感染细胞中扩增和表达其遗传信息但在非补足细胞中不能产生进一步的感染性子代颗粒的能力。在某些实施方案中，免疫检查点抑制剂抑制、降低或干扰负检查点调节剂的活性。

[0403] 在一个实施方案中，本文提供治疗对象的肿瘤病的方法，所述方法包括给予对象表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一种或多种沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂。在一个具体实施方案中，治疗本文所述肿瘤病的方法包括给予有需要的对象治疗有效量的表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一种或多种沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂。对象可以是哺乳动物，例如但不限于人、小鼠、大鼠、豚鼠、驯养动物，例如但不限于牛、马、绵羊、猪、山羊、猫、狗、仓鼠、驴。在一个具体实施方案中，对象是人。

[0404] 在另一个实施方案中，本文提供诱导针对对象的肿瘤细胞或组织(例如癌细胞或肿瘤)的免疫应答的方法，所述方法包括给予对象表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂。

[0405] 在另一个实施方案中，向其给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂的对象患有、易患肿瘤或有肿瘤病的风险。

[0406] 在另一个实施方案中，向其给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂的对象患有、易患肿瘤病(例如癌症)或有肿瘤病(例如癌症)的风险，或显示癌前组织病变。在另一个具体的实施方案中，向其给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂的对象诊断为肿瘤病(例如癌症)，或显示癌前组织病变。

[0407] 在另一个实施方案中，向其给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂的对象患有、易患选自以下的肿瘤病或有罹患该肿瘤病的风险：急性成淋巴细胞白血病；急性成淋巴细胞淋巴瘤；急性淋巴细胞白血病；急性髓细胞性白血病；急性髓细胞性白血病(成人/儿童)；肾上腺皮质癌；AIDS相关癌症；AIDS相关淋巴瘤；肛门癌；阑尾癌；星形细胞瘤；非典型畸胎样/横纹肌

样瘤;基底细胞癌;肝外胆管癌(肝胆管型肝癌);膀胱癌;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑癌(成人/儿童);脑瘤,小脑星形细胞瘤(成人/儿童);脑瘤,大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤脑瘤;脑瘤,室管膜瘤;脑瘤,成神经管细胞瘤;脑瘤,幕上原始神经外胚层瘤;脑瘤,视通路和下丘脑神经胶质瘤;脑干神经胶质瘤;乳腺癌;支气管腺瘤/类癌;支气管瘤;伯基特淋巴瘤;儿童癌症;胃肠类癌瘤;类癌瘤;成人癌,原发部位不明;原发部位不明癌;中枢神经系统胚胎性瘤;中枢神经系统淋巴瘤,原发;宫颈癌;儿童肾上腺皮质癌;儿童癌症;儿童大脑星形细胞瘤;脊索瘤,儿童;慢性淋巴细胞白血病;慢性髓细胞性白血病;慢性髓细胞样白血病;慢性骨髓增殖性疾病;结肠癌;结肠直肠癌;颅咽管瘤;皮肤T细胞淋巴瘤;促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤;肺气肿;子宫内膜癌;室管膜母细胞瘤;室管膜瘤;食管癌;肿瘤尤因家族中的尤因肉瘤;颅外生殖细胞瘤;性腺外生殖细胞瘤;肝外胆管癌;胆囊癌;胃(gastric/stomach)癌;胃类癌;胃肠类癌瘤;胃肠基质瘤;生殖细胞瘤:颅外,性腺外或妊娠滋养细胞肿瘤;妊娠滋养细胞肿瘤,原发部位不明;神经胶质瘤;脑干妊娠滋养细胞肿瘤;神经胶质瘤,儿童视通路和下丘脑;毛细胞白血病;头颈癌;心脏癌;肝细胞(肝)癌;霍奇金淋巴瘤;咽下部癌;下丘脑和视通路神经胶质瘤;眼内黑素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西肉瘤;肾癌(肾细胞癌);朗格汉斯细胞组织细胞增多症;喉癌;口唇口腔癌;脂肉瘤;肝癌(原发性);肺癌,非小细胞;肺癌,小细胞;淋巴瘤,原发性中枢神经系统;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;男性乳腺癌;骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤;成神经管细胞瘤;髓质口皮瘤;黑素瘤;黑素瘤,眼内(眼);默克尔细胞癌;默克尔细胞皮肤癌;间皮瘤;间皮瘤,成人恶性;隐匿原发转移性鳞状颈癌;口癌;多发性内分泌肿瘤综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;蕈样肉芽肿病,骨髓增生异常综合征;骨髓增生异常/骨髓增生性疾病;髓细胞性白血病,慢性;髓细胞样白血病,成人急性;髓细胞样白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性(骨髓癌);骨髓增生性病症,慢性;鼻腔和鼻旁窦癌;鼻咽癌;成神经细胞瘤,非小细胞肺癌;非霍奇金淋巴瘤;少突神经胶质瘤;口癌;口腔癌;口咽癌;骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;卵巢上皮癌症(表面上皮-基质瘤);卵巢生殖细胞瘤;卵巢低恶性潜能肿瘤;胰腺癌;胰腺癌,胰岛细胞;乳头状瘤病;鼻旁窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;咽癌;嗜铬细胞瘤;松果体星形细胞瘤;松果体生殖细胞瘤;中度分化的松果体实质肿瘤;成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层瘤;垂体瘤;垂体腺瘤;浆细胞瘤形成/多发性骨髓瘤;胸膜肺胚细胞瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;前列腺癌;直肠癌;肾细胞癌(肾癌);肾盂和输尿管,移行细胞癌;涉及染色体15上的NUT基因的呼吸道癌;成视网膜细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童;涎腺癌;肉瘤,尤因肿瘤家族;塞扎里综合征;皮肤癌(黑素瘤);皮肤癌(非黑素瘤);小细胞肺癌;小肠癌软组织肉瘤;软组织肉瘤;脊髓肿瘤;鳞状细胞癌;隐匿原发转移性鳞状颈癌;胃(stomach/gastric)癌;幕上原发性外胚层肿瘤;T细胞淋巴瘤,皮肤(蕈样肉芽肿病和塞扎里综合征);睾丸癌;喉癌;胸腺瘤;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;甲状腺癌,儿童;肾盂和输尿管移行细胞癌;尿道癌;子宫癌,子宫内膜;子宫肉瘤;阴道癌;外阴癌和肾母细胞瘤。

[0408] 在另一个实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予患有、易患肿瘤病或有肿瘤病风险的任何年龄组的对象。在一个具体实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予患有免疫系统受损的对象;妊娠对象;进行器官或骨髓移植的对象;服用免疫抑制药的对

象;进行血液透析的对象;患有癌症的对象或患有、易患肿瘤病或有肿瘤病风险的对象。在一个更具体的实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予对象,所述对象为患有、易患肿瘤病或有肿瘤病风险年龄为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17岁的儿童。在又一个具体实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予是患有、易患肿瘤病或有肿瘤病风险的婴儿的对象。在又一个具体实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予对象,其是患有、易患肿瘤病或有肿瘤病风险月龄为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月的婴儿。在又一个具体实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予是患有、易患肿瘤病或有肿瘤病风险的年长对象。在一个更具体的实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予对象,其是年龄为65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89或90岁的年长对象。

[0409] 在另一个实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予癌症转移风险增高的对象。在一个具体实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予处于新生儿期具有新生儿免疫系统故具有不成熟免疫系统的对象。

[0410] 在另一个实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予具有0级(即原位赘生物)、1级、2级、3级或4级癌症或其亚类(例如3A级、3B级或3C级)或其等同分级的对象。

[0411] 在另一个实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予患有处于选自肿瘤T1、T2、T3和T4及结节N0、N1、N2或N3及转移M0和M1的任何组合的肿瘤、结节、转移(TNM)期的癌症的对象。

[0412] 癌症患者的成功治疗可评价为预期生存期的延长、抗肿瘤免疫应答的诱导或癌症特定性质的改善。可改善的癌症性质的实例包括肿瘤大小(例如T为T0或T1-4)、转移状况(例如M0、M1)、可观察的肿瘤数、结节受累情况(例如N0、N1-4、Nx)、等级(即1、2、3或4级)、期(例如0、I、II、III或IV)、细胞上或体液中某些标记的存在或浓度(例如AFP、B2M、β-HCG、BTA、CA 15-3、CA 27.29、CA 125、CA 72.4、CA 19-9、降钙素、CEA、嗜铬粒蛋白A、EGFR、激素受体、HER2、HCG、免疫球蛋白、NSE、NMP22、PSA、PAP、PSMA、S-100、TA-90和甲状腺球蛋白)和/或相关病理(例如腹水或水肿)或症状(例如恶病质、发热、厌食症或疼痛)。改善如果可通过百分比测量,则可以是至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80或90%(例如生存期,或肿瘤的体积或线性尺寸)。

[0413] 在另一个实施方案中,将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予患有潜伏癌症的对象(例如对象处于缓解中)。因此,本文提供防止癌症再活化的方法。

[0414] 在另一个实施方案中，将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予患有复发性癌症的对象。

[0415] 在另一个实施方案中，将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予有癌症遗传倾向性的对象。在另一个实施方案中，将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予有风险因子的对象。示例性风险因子包括衰老、烟草、日光暴露、辐射暴露、化学品暴露、家族史、酒精、不良饮食、缺乏身体活动或体重超重。

[0416] 在另一个实施方案中，将表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂给予患有一种或多种癌症类型的对象。在其它实施方案中，可靶向对用本文所述组合物治疗敏感的肿瘤病(例如癌症)的任何类型。

[0417] 在另一个实施方案中，向对象给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒赋予针对肿瘤细胞或肿瘤(例如癌细胞或肿瘤)的细胞介导免疫(CMI)。虽不受理论束缚，但在另一个实施方案中，表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物在宿主的抗原呈递细胞(APC)(例如巨噬细胞)中感染并表达目标抗原用于在主要组织相容性复合体(MHC)I和II类上的抗原直接呈递。在另一个实施方案中，向对象给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物诱导共同产生大量的多功能IFN-γ和TNF-α的癌症特异性CD4+和CD8+T细胞应答(IFN-γ由CD4+和CD8+T细胞产生，TNF-α由CD4+T细胞产生)以治疗肿瘤病。

[0418] 在另一个实施方案中，给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂提高或改进癌症治疗的一个或多个临床结果。这类结果的非限制性实例为总体生存、无进展生存期、进展时间、治疗失败时间、无事件生存期、下次治疗时间、总体反应率和反应持续时间。与这类治疗不存在时患有相同肿瘤病的患者或患者群相比，一个或多个临床结果的提高或改进可达至少约10％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％或更高。

[0419] 对象中通过给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物诱导的针对肿瘤细胞或肿瘤(包括癌细胞或肿瘤)的细胞介导免疫(CMI)反应功能的变化可通过技术人员已知的任何测定法测量，包括但不限于流式细胞术(参见例如Perfetto S.P.et al.,Nat Rev Immun.2004;4(8):648-55)；淋巴细胞增殖测定法(参见例如Bonilla F.A.et al.,Ann Allergy Asthma Immunol.2008;101:101-4;和Hicks M.J.et al.,Am J Clin Pathol.1983;80:159-63)；测量淋巴细胞活化的测定法，包括在激活T淋巴细胞的细胞因子测量后测定表面标志物表达的变化(参见例如Caruso A.et al.,Cytometry.1997;27:71-6)；ELISPOT测定法(参见例如Czerkinsky C.C.et al.,J Immunol Methods.1983;65:109-121;和Hutchings P.R.Et al.,J Immunol Methods.1989;120:1-8)或天然杀伤细胞细胞毒性测定法(参见例如Bonilla F.A.et al.,Ann Allergy Asthma Immunol.2005May;94(5Suppl 1):S1-63)。

[0420] 可与本文所述方法和组合物一起使用的免疫检查点抑制剂可靶向任何负检查点

调节剂。在某些实施方案中，这类负检查点调节剂是参与T细胞活化的蛋白质。在某些更具体的实施方案中，这类负检查点调节剂是细胞毒性T-淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、CD80、CD86、程序性细胞死亡1(PD-1)、程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、程序性细胞死亡配体2(PD-L2)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3；亦称为CD223)、半乳凝素-3、B和T淋巴细胞弱化子(BTLA)、T细胞膜蛋白3(TIM3)、半乳凝素-9(GAL9)、B7-H1、B7-H3、B7-H4、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9)、T细胞活化的V-结构域Ig抑制剂(VISTA)、糖皮质素诱导的肿瘤坏死因子受体相关(GITR)蛋白、疱疹病毒侵入介体(HVEM)、OX40、CD27、CD28、CD137、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15027、CGEN-15049、CGEN-15052或CGEN-15092。表4中列出靶向它们的这类检查点调节剂和药物的综述。

[0421] 表4

[0422]

免疫疗法的靶标	作用方式	商品名称	FDA 核准	适应症(人)	临床前评价
PD1/ PD1-L(1,2) (程序性细胞死亡蛋白质-1)	与 PD1 结合的抗体(阻断受体)	Nivolumab (Opdivo-Bristol Myers Squibb)	是	转移性黑素瘤，非小细胞肺癌	是。在 7 种不同的小鼠模型中系统评价了仅 PD1 Ab 和与 CTLA4 的组合。(Barnes et al, AACR Annual Meeting Poster # 3362 (2015)) 还评价了
		Pembrolizumab (Keytruda, MK-3475 Merck)	是	转移性黑素瘤 (肺癌，淋巴瘤，间皮瘤的临床试验)	
		Pidilizumab (CT-011, Cure Tech)	否	临床试验 - 多种癌症	

[0423]

免疫疗法的靶标	作用方式	商品名称	FDA 核准	适应症(人)	临床前评价
	抗体结合 PD-L1 (抑制受体结合)	BMS936559 (Bristol Myers-Squibb)	否	黑素瘤，非小细胞肺癌，卵巢癌 I 期：HIV	P815-B7-H1 修饰的(肥大细胞瘤)。(参见 Hirano et al., Cancer Res., 65(3), 1089-96 (2005))
		MPDL3280A (Roche)	否	NSCLC 和黑素瘤(局部晚期或转移性肿瘤)	
CTLA4 (细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4)	通过与 CTLA4 结合，化合物提高 T 细胞活化并阻断 B7-1 和 B7-2 T 细胞共刺激途径	伊匹木单抗 (MDX010, Yervoy ; Bristol Myers-Squibb)	是	黑素瘤	是。 参见 Simpson et al. J. Exp. Med. 2013: 210(9):1695-710 将可变性能分派给不同的 Ab 克隆。
		Tremelimumab (CP-675,206, Pfizer)	否	临床试验 - 多种癌症	
TIM-3 (T 细胞免疫球蛋白和含粘蛋白的蛋白质 3)	抗 TIM-3 IgG 抑制 TIM-3 结合其受体和/或配体(或许半乳凝素-9)	n.a.	否	n.a.	是。 (参见 Sakuishi et al., J Exp. Med., 207(10), 2187-94 (2010)) 在其各自的背景下测试了 CT26、4T1 和 B16。
LAG-3/ 半乳凝素-3 (淋巴细胞激化基因-3)	抗 LAG-3 抗体/半乳凝素-3 的耗减	n.a.	否	n.a.	是。 Kouo et al., Cancer Immunol Res. 3(4):412-23 (2015) 中报告的 NT2.5 (神经鞘-表达性肿瘤细胞系)。 Woo et al., Cancer Res 72(4)_917-27 (.2012) 中报告的 B16 和 MC38。

[0424]

免疫疗法的靶标	作用方式	商品名称	FDA 核准	适应症(人)	临床前评价
TIGIT (具有 Ig 和 ITIM 结构域的 T 细胞免疫受体)	针对TIGIT的抗体抑制结合 PVR (受体)扰乱抑制性信号转导。此外 CD226 可相反地结合 PVR 并展开其T细胞激活功能/还可能参与NK细胞抑制	研究中 (Genentech)	否	n.a.	是。 (参见Johnston et al., Cancer Cell. 26(6):923–37 (2014))。
BTLA (B 和 T 淋巴细胞弱化子)					
VISTA (T 细胞活化的 V-结构域 Ig 抑制剂)					

[0425] 在某些实施方案中,优选以多次注射(例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、40、45或50次注射)或通过在多个部位(例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12或14个部位)连续输注(例如使用泵)给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和本文提供的免疫检查点抑制剂。在某些实施方案中,在6个月期间、12个月期间、24个月期间或48个月期间两次或分开更多次注射给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物。在某些实施方案中,在所选日期以第1剂、在第1剂之后至少2个月以第2剂和在第1剂之后6个月以第3剂给予表达本文提供的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物。

[0426] 在一个实例中,皮肤注射在多个身体部位进行以减轻局部皮肤反应的程度。在规定的接种日,患者接受以总剂量的3-5次单独的皮内注射(例如至少0.4ml、0.2ml或0.1ml),各自在肢体上在针进入距最近的相邻注射相隔至少约5cm(例如至少4.5、5、6、7、8、9或cm)从一支注射器中给予的指定的总剂量。在随后的接种日,注射部位以顺时针或反时针方式旋转至四肢。

[0427] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括共同给予本文提供的沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂。在某些实施方案中,共同给予是同时的。在另一个实施方案中,沙粒病毒颗粒在给予免疫检查点抑制剂之前给予。在其它实施方案中,沙粒病毒颗粒在给予免疫检查点抑制剂之后给予。在某些实施方案中,给予沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂之间的间隔为约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时或约12小时。在某些实施方案中,给予沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂之间的间隔为约1天、约2天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约8天、约9

天、约10天、约11天、约12天、约13天、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、约9周、约10周、约11周、约12周。在某些实施方案中，给予沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂之间的间隔为约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月或约6个月。在一些实施方案中，所述方法进一步包括给予至少一种另外的疗法。

[0428] 在某些实施方案中，本文提供治疗对象的肿瘤病的方法，所述方法包括给予对象本文提供的一种或多种沙粒病毒颗粒和吲哚胺-2,3加双氧酶(“IDO”)抑制剂。治疗对象的肿瘤病的方法可包括给予对象表达本文提供肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的一种或多种沙粒病毒颗粒或其组合物和IDO抑制剂。在某些实施方案中，本文提供诱导针对对象的肿瘤细胞或组织(例如癌细胞或肿瘤)的免疫应答的方法，所述方法包括给予对象表达本文提供肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的沙粒病毒颗粒或其组合物和IDO抑制剂。在某些实施方案中，所述方法包括给予共同给予本文提供的沙粒病毒颗粒和IDO抑制剂。在某些实施方案中，所述方法包括给予共同给予本文提供的沙粒病毒颗粒、本文提供的免疫检查点抑制剂和IDO抑制剂。

[0429] 在另一个实施方案中，在治疗方案中以约1:1-1:1000的范围摩尔比率，特别包括：1:1比率、1:2比率、1:5比率、1:10比率、1:20比率、1:50比率、1:100比率、1:200比率、1:300比率、1:400比率、1:500比率、1:600比率、1:700比率、1:800比率、1:900比率、1:1000比率给予两种沙粒病毒颗粒。

[0430] 在某些实施方案中，本文提供治疗肿瘤病的方法，其中首先给予第一种沙粒病毒颗粒作为“初免”，并给予第二种沙粒病毒颗粒“加强免疫”。第一种和第二种沙粒病毒颗粒可表达相同或不同的肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段。备选或此外，在某些实施方案中，“初免”和“加强免疫”给予用来源于不同毒株的沙粒病毒颗粒进行。在某些具体实施方案中，“初免”给予用来源于LCMV的沙粒病毒颗粒进行，“加强免疫”用来源于Junin病毒的沙粒病毒颗粒进行。在某些具体实施方案中，“初免”给予用来源于Junin病毒的沙粒病毒颗粒进行，“加强免疫”用来源于LCMV的沙粒病毒颗粒进行。

[0431] 在某些实施方案中，与给予表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的单一沙粒病毒颗粒相比，给予表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的第一种沙粒病毒颗粒，接着给予表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的第二种沙粒病毒颗粒导致更大的抗原特异性CD8+T细胞应答。在某些实施方案中，与第一次给予相比，在第二次给予后，抗原特异性CD8+T细胞计数增加达50％、100％、150％或200％。在某些实施方案中，与相继给予表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的两种沙粒病毒颗粒相比，给予表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的第三种沙粒病毒颗粒导致更大的抗原特异性CD8+T细胞应答。在某些实施方案中，与第一次给予相比，在第三次给予后，抗原特异性CD8+T细胞计数增加达约50％、约100％、约150％、约200％或约250％。

[0432] 在某些实施方案中，本文提供治疗肿瘤病的方法，所述方法包括给予两种或更多种沙粒病毒颗粒，其中两种或更多种沙粒病毒颗粒是同源的，且其中每次给予的时间间隔为约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月、约12个月、约18个月或约24个月。

[0433] 在某些实施方案中，与给予表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的第一种沙粒病毒颗粒和表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的第二种同源沙粒病毒颗粒相

比，给予表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的第一种沙粒病毒颗粒和表达肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的第二种异源沙粒病毒颗粒诱导更大的CD8+T细胞应答。

[0434] 5.9组合物、给药和剂量

[0435] 本文还提供疫苗、免疫原性组合物(例如疫苗制剂)和包含本文提供的沙粒病毒颗粒的药物组合物，以及在某些实施方案中本文提供的免疫检查点抑制剂。这类疫苗、免疫原性组合物和药物组合物可按照本领域标准规程配制。

[0436] 在另一个实施方案中，本文提供包含本文所述感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒的组合物，和在某些实施方案中本文提供的免疫检查点抑制剂。这类组合物可用于治疗肿瘤病的方法。在另一个具体的实施方案中，本文提供的免疫原性组合物可用于在向其给予组合物的宿主中诱导免疫应答。本文所述免疫原性组合物可用作疫苗，因此可配制成作为药物组合物。在一个具体实施方案中，本文所述免疫原性组合物用于治疗对象(例如人类对象)的肿瘤病。在其它实施方案中，疫苗、免疫原性组合物或药物组合物适于兽药和/或人类给予。

[0437] 在某些实施方案中，本文提供包含本文所述沙粒病毒颗粒(或不同沙粒病毒颗粒的组合)的免疫原性组合物。在某些实施方案中，这类免疫原性组合物另包含药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中，这类免疫原性组合物另包含佐剂。可在给予所述组合物之前、同时或之后给予用于与本文所述组合物组合给予的佐剂。在一些实施方案中，术语“佐剂”是指与本文所述组合物联合或作为本文所述组合物的部分给予时增加、提高和/或加强对感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒的免疫应答的化合物，但当该化合物单独给予时不产生对感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒的免疫应答。在一些实施方案中，佐剂产生对感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒的免疫应答，并且不产生变态反应或其它不良反应。佐剂可通过若干机制(包括例如淋巴细胞募集、B和/或T细胞刺激和巨噬细胞刺激)提高免疫应答。当本发明的疫苗或免疫原性组合物包含佐剂或与一种或多种佐剂一起给予时，可使用的佐剂包括但不限于天然盐佐剂或天然盐凝胶佐剂、粒子佐剂、微粒佐剂、粘膜佐剂和免疫刺激佐剂。佐剂的实例包括但不限于铝盐(明矾)(例如氢氧化铝、磷酸铝和硫酸铝)、3脱-O-酰化单磷酰脂质A(MPL)(参见GB 2220211)、MF59(Novartis)、AS03(GlaxoSmithKline)、AS04(GlaxoSmithKline)、聚山梨醇酯80(Tween 80;ICL Americas、Inc.)、咪唑并吡啶化合物(参见以国际公布号WO2007/109812公开的国际申请号PCT/US2007/064857)、咪唑并喹喔啉化合物(参见以国际公布号WO2007/109813公开的国际申请号PCT/US2007/064858)和皂苷，例如QS21(参见Kensil等，载于Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach(eds.Powell&Newman,Plenum Press,NY,1995)；美国专利号5,057,540)。在一些实施方案中，佐剂是弗氏佐剂(完全或不完全)。其它佐剂是任选与免疫刺激剂(例如单磷酰脂质A)组合的水包油乳液(例如角鲨烯或花生油)(参见Stoute et al.,N.Engl.J.Med.336,86-91(1997))。

[0438] 组合物包含单独的本文所述感染性复制缺陷型沙粒病毒或连同药学上可接受的载体和/或免疫检查点抑制剂。可以使用遗传改造的沙粒病毒的混悬液或分散体，尤其是等渗水性混悬液或分散体。药物组合物可被灭菌和/或可包含赋形剂，例如防腐剂、稳定剂、润湿剂和/或乳化剂、稳定剂、调节渗透压的盐和/或缓冲剂，并且按本身已知的方式制备，例如通过常规分散和悬浮方法。在某些实施方案中，这类分散体或混悬液可包含粘度调节剂。

将混悬液或分散体保持在2-8℃左右的温度下或优先可冷冻以用于较长期的储存，然后在用前不久融化。对于注射，可在水性溶液中，优选在生理上相容的缓冲液(例如Hanks溶液、林格氏液或生理盐水缓冲液)中配制疫苗或免疫原制备物。溶液中可含有调配剂(formulatory agent)，例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0439] 在某些实施方案中，本文所述组合物另外包含防腐剂，例如汞衍生物硫柳汞。在一个具体的实施方案中，本文所述药物组合物包含0.001％-0.01％硫柳汞。在其它实施方案中，本文所述药物组合物不含防腐剂。

[0440] 药物组合物包含约10^3-约10^{11}病灶形成单位的遗传改造的沙粒病毒颗粒。胃肠外给药的单位剂型为例如安瓿或小瓶，例如小瓶含有约10^3-10^{10}病灶形成单位或10^5-10^{15}个物理颗粒的遗传改造的沙粒病毒颗粒。

[0441] 在另一个实施方案中，通过包括但不限于口服、皮内、肌内、腹膜内、静脉内、局部、皮下、经皮、鼻内和吸入途径，以及通过划痕(例如使用分叉针通过皮肤顶层刻痕)，将本文提供的疫苗或免疫原性组合物给予对象。具体地讲，可使用皮下、肌内或静脉内途径。

[0442] 对于鼻内或通过吸入给药，可适宜地在使用合适的抛射剂(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体)的同时以从喷雾器(pressurized pack)或雾化器提供的喷雾剂的形式递送按照本发明使用的制剂。在压缩气雾剂的情况下，可通过提供递送计量的阀确定剂量单位。可配制含有化合物和合适的粉末基料(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物的例如用于吸入器或吹入器的明胶的药囊和药盒。

[0443] 活性成分的剂量取决于疫苗接种的类型和对象及其年龄、体重、个体条件、各药代动力学数据和给药方式。

[0444] 在某些实施方案中，可以包含治疗有效量的沙粒病毒颗粒和/或治疗有效量的免疫检查点抑制剂的单剂量将组合物给予患者。在一些实施方案中，可以包含各自为治疗有效量的沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂的单剂量将沙粒病毒颗粒给予患者。

[0445] 在某些实施方案中，将组合物作为单剂量给予患者接着3-6周后的第2剂。按照这些实施方案，可在第2次接种后6-12个月的间隔将加强免疫接种给予对象。在某些实施方案中，加强免疫接种可使用不同的沙粒病毒颗粒或其组合物。在一些实施方案中，可重复给予相同的本文所述组合物，并相隔至少1天、2天、3天、4天、5天、10天、15天、30天、45天、2个月、75天、3个月或至少6个月。

[0446] 在某些实施方案中，包含沙粒病毒颗粒的疫苗、免疫原性组合物或药物组合物可用作活的接种。活的沙粒病毒颗粒的示例性剂量可自每剂10-100或更高PFU的活病毒变化。在一些实施方案中，沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒的合适剂量为10^2、5×10^2、10^3、5×10^3、10^4、5×10^4、10^5、5×10^5、10^6、5×10^6、10^7、5×10^7、10^8、5×10^8、1×10^9、5×10^9、1×10^{10}、5×10^{10}、1×10^{11}、5×10^{11}或10^{12}pfu，可按需以通常的间隔给予对象一次、两次、三次或更多次。在另一个实施方案中，配制活的沙粒病毒，使得0.2-mL剂量含有$10^{6.5}$-$10^{7.5}$荧光病灶单位的活沙粒病毒颗粒。在另一个实施方案中，配制灭活疫苗，使得它含有约15μg-约100μg、约15μg-约75μg、约15μg-约50μg或约15μg-约30μg的沙粒病毒。

[0447] 本文还提供沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂用于制备药物制剂形式的疫苗的方法和用途，所述药物制剂包含沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂作为活性成分。还进一步提供本文提供的沙粒病毒颗粒和本文提供的免疫检查点抑制剂的组合用于治疗本文所

述肿瘤病。在某些实施方案中，组合是在同一药物组合物中。在某些实施方案中，组合不在同一药物组合物中，例如当沙粒病毒颗粒和免疫检查点抑制剂分别给予时。本申请的药物组合物以本身已知的方式制备，例如通过常规混合和/或分散过程。

[0448] 在某些实施方案中，本文提供的方法和组合物与个性化药物联用。通过利用来自患者的独特遗传和/或外遗传特征以预测患者对不同疗法的反应并鉴定哪一种疗法更可能是有效的信息，个性化药物试图为患者提供益处。可与本文提供的方法和组合物联用以获得患者的独特遗传和/或外遗传特征的技术包括但不限于基因组测序、RNA测序、基因表达分析和鉴定肿瘤抗原(例如新抗原)、肿瘤相关抗原或其抗原片段。在某些实施方案中，用于本文提供的方法和组合物的沙粒病毒肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的选择根据患者的遗传特征进行。在某些实施方案中，用于本文提供的方法和组合物的沙粒病毒肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的选择根据肿瘤或肿瘤细胞的遗传特征进行。

[0449] 本文还提供可用于实施本文所述方法的药盒。在某些实施方案中，本文提供的药盒可包括一个或多个容器。这些容器可容纳存储本文提供的组合物(例如药物、免疫原性或疫苗组合物)。药盒中还包括使用说明书。这些使用说明足够详细地描述了使用所含组合物的治疗方案。例如，使用说明可包括本文提供的剂量和给药说明用于治疗肿瘤病的方法。

[0450] 在某些实施方案中，本文提供的药盒包括各自含有用于实施本文所述方法的活性成分的容器。因此，在某些实施方案中，本文提供的药盒包括两个或更多个容器和使用说明书，其中一个容器包含本文提供的感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒，另一个容器包含本文提供的免疫检查点抑制剂。

[0451] 5.10测定法

[0452] 5.10.1沙粒病毒检测测定法

[0453] 技术人员可采用本领域已知技术检测本文所述沙粒病毒基因组区段或三区段沙粒病毒颗粒。例如，RT-PCR可与对沙粒病毒有特异性的引物一起使用以检测和定量测定经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的沙粒病毒基因组区段或三区段沙粒病毒颗粒。可采用蛋白质印迹、ELISA、放射免疫测定法、免疫沉淀、免疫细胞化学或与FACS联合的免疫细胞化学定量测定沙粒病毒基因组区段或三区段沙粒病毒颗粒的基因产物。

[0454] 5.10.2测量感染性的测定法

[0455] 可采用技术人员已知的任何测定法测量沙粒病毒载体制备物的感染性。病毒/载体滴度的测定可通过“病灶形成单位测定法”(FFU测定法)进行。简单地说，将补足细胞(例如任选表达LCMV GP蛋白的HEK 293细胞)铺板，并接种不同稀释度的病毒/载体样品。在温育期后，允许细胞形成单层，并允许病毒与细胞附着，将单层用甲基纤维素覆盖。当将板进一步温育时，原始感染细胞释放病毒子代。由于甲基纤维素覆盖物，新病毒的扩散局限于邻近的细胞。因此，各感染性颗粒产生感染细胞的圆形区，称为病灶。可使这类病灶可见，并籍此使用针对LCMV-NP或由沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒表达的另一种蛋白质的抗体和基于HRP的颜色反应使之可数。病毒/载体的滴度可以每毫升病灶形成单位(FFU/mL)计算。

[0456] 5.10.3沙粒病毒颗粒的生长

[0457] 本文所述沙粒病毒颗粒的生长可通过本领域已知的或本文描述的任何方法评价(例如细胞培养物)。病毒生长可通过将连续稀释的本文所述沙粒病毒颗粒接种在细胞培养

物(例如Vero细胞或BHK-21细胞)中来测定。在温育病毒规定的时间后,采用标准方法分离病毒。

[0458] 5.10.4血清ELISA

[0459] 动物(例如小鼠、豚鼠)疫苗接种时体液免疫应答的测定可通过抗原特异性血清ELISA(酶联免疫吸附测定法)进行。简单地说,将板用抗原(例如重组蛋白质)包被、封闭以避免抗体的非特异性结合,并与连续稀释的血清一起温育。在温育后,例如使用酶偶联的抗物种(例如小鼠、豚鼠)特异性抗体(检测总的IgG或IgG亚类)和随后的颜色反应,可检测结合的血清-抗体。抗体滴度可测定为例如终点几何平均滴度。

[0460] 还可进行免疫捕获ELISA(IC-ELISA)(参见Shanmugham et al.,2010,Clin.Vaccine Immunol.17(8):1252-1260),其中捕获剂与珠粒交联。

[0461] 5.10.5测量诱导抗体的中和活性的测定法

[0462] 使用来自ATCC的ARPE-19细胞和GFP标记的病毒,用下列细胞测定法进行血清中中和抗体的测定。另外使用补充的豚鼠血清作为外源补体的来源。该测定始于用于中和前1或2天在384孔板中接种$6.5x10^3$个细胞/孔(50μl/孔)。中和在96孔无菌组织培养板中在无细胞时在37℃下进行1小时。在中和温育步骤后,将混合物加入细胞中,再温育4天用于用读板仪进行GFP检测。阳性中和人血清用作各板上的测定阳性对照以检查所有结果的可靠性。滴度(EC50)采用4参数逻辑斯谛曲线拟合测定。作为另外的测试,用荧光显微镜检查各孔。

[0463] 5.10.6噬斑减少测定法

[0464] 简单地说,通过使用用绿色荧光蛋白标记的可复制型或缺陷型LCMV进行用于LCMV的噬斑减少(中和)测定法,使用5%兔血清作为外源补体的来源,并通过荧光显微镜清点噬斑。中和滴度可定义为与对照(免疫前)血清样品的相比,导致噬斑50%、75%、90%或95%减少的血清的最高稀释度。

[0465] qPCR:按照生产商提供的方案,使用QIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN),分离LCMV RNA基因组。通过用SuperScript®IIIPlatinum®One-Step qRT-PCR Kit(Invitrogen)和对LCMV NP编码区或沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒的另一个基因组序列段的部分有特异性的引物和探针(FAM报道分子和NFQ-MGB Quencher)在StepOnePlus Real Time PCR System(Applied Biosystems)中进行的定量PCR,检测LCMV RNA基因组当量。反应的温度概况为:在60℃下30分钟,在95℃下2分钟,接着在95℃下15秒钟45个循环,在56℃下30秒钟。通过将样品结果与标准曲线进行比较,来定量测定RNA,所述标准曲线从分光光度定量的体外转录的RNA片段(相当于含有引物和探针结合位点的LCMV NP编码序列或沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒的另一个基因组序列段的片段)的log10稀释系列制备。

[0466] 5.10.7豚鼠肺成纤维细胞(GPL)细胞中的中和测定法

[0467] 简单地说,在以补充兔血清(1%)作为外源补体来源的GPL完全培养基中制备连续稀释的试验血清和对照(接种前)血清。稀释系列跨越1:40-1:5120。使血清稀释液与eGFP标记的病毒(100-200pfu/孔)在37℃下温育30分钟,然后转移到含有汇合的GPL细胞的12孔板中。一式三份对样品进行加工。在37℃下温育2小时后,将细胞用PBS洗涤,重新供给GPL完全培养基,并在37℃/5%CO_2下温育5天。噬斑通过荧光显微镜进行观察,计数,并与对照孔进行比较。导致与对照相比噬斑数减少50%的血清稀释度指定为中和滴度。

[0468] 5.10.8蛋白质印迹法

[0469] 使用RIPA缓冲液(Thermo Scientific),使生长在组织培养瓶或悬液中的受感染细胞在感染后的规定时间点裂解,或直接使用受感染细胞而无需细胞裂解。将样品与还原剂和NuPage LDS样品缓冲液(NOVEX)一起加热至99℃10分钟,冷却到室温后,加载到4-12%SDS-凝胶中用于电泳。使用Invitrogens iBlot Gel转移装置将蛋白质印在膜上,并通过Ponceau染色观察。最后,将制备物用针对目标蛋白质的第一抗体和碱性磷酸酶缀合的第二抗体探测,接着用1-Step NBT/BCIP溶液(INVITROGEN)染色。

[0470] 5.10.9检测抗原特异性CD8+T细胞增殖的MHC-肽多聚体染色测定法

[0471] 可采用技术人员已知的任何测定法检测抗原特异性CD8+T细胞应答。例如,可采用MHC-肽四聚体染色测定法(参见例如Altman J.D.et al.,Science.1996;274:94-96和Murali-Krishna K.et al.,Immunity.1998;8:177-187)。简单地说,该测定法包括下列步骤,采用四聚体测定法检测抗原特异性T细胞的存在。为了T细胞检测对之有特异性的肽,必须同时识别该肽和针对规定的抗原特异性T细胞和T细胞的MHC单元型定制的MHC分子的四聚体(通常荧光标记的)。然后经由荧光标记通过流式细胞术,检测四聚体。

[0472] 5.10.10检测抗原特异性CD4+T细胞增殖的ELISPOT测定法。

[0473] 可采用技术人员已知的任何测定法测试抗原特异性CD4+T细胞应答。例如,可采用ELISPOT测定法(参见例如Czerkinsky C.C.et al.,J Immunol Methods.1983;65:109-121和Hutchings P.R.et al.,J Immunol Methods.1989;120:1-8)。简单地说,该测定法包括下列步骤:将免疫斑点板(immunospot plate)用抗细胞因子抗体包被。将细胞在免疫斑点板上温育。细胞分泌细胞因子,然后洗出细胞。然后将板用第二生物素化抗细胞因子抗体包被,并用抗生物素蛋白-HRP系统观察。

[0474] 5.10.11检测CD8+和CD4+T细胞应答的功能性的胞内细胞因子测定法。

[0475] 可采用技术人员已知的任何测定法测试CD8+和CD4+T细胞应答的功能性。例如,可采用与流式细胞术联合的胞内细胞因子测定法(参见例如Suni M.A.et al.,J Immunol Methods.1998;212:89-98;Nomura L.E.et al.,Cytometry.2000;40:60-68;及Ghanekar S.A.et al.,Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.2001;8:628-63)。简单地说,该测定法包括下列步骤:通过抑制蛋白质转运的特殊肽或蛋白质(例如布雷菲德菌素A)激活细胞,加入所述肽以使细胞因子保留在细胞内。在温育规定的一段时间(通常5小时)后,接着洗涤步骤,可将抗其它细胞标志物的抗体加入细胞中。然后将细胞固定并透化。加入荧光染料缀合的抗细胞因子抗体,可通过流式细胞术分析细胞。

[0476] 5.10.12证实病毒载体的复制缺陷的测定法

[0477] 还可采用技术人员已知的测定感染性可复制病毒颗粒的浓度的任何测定法测量样品中的复制缺陷型病毒颗粒。例如,带有非补足细胞的FFU测定法可用于此目的。

[0478] 此外,基于噬斑的测定法是用来测定病毒样品中以噬斑形成单位(PFU)为单位的病毒浓度的标准方法。具体地讲,非补足宿主细胞的汇合单层用不同稀释度的病毒感染,并用半固体培养基(例如琼脂)覆盖以防止病毒感染无差别地扩散。当病毒成功感染并且在固定细胞单层内的细胞中自我复制,并扩散到周围细胞时,形成病毒噬斑(参见例如Kaufmann,S.H.;Kabelitz,D.(2002).Methods in Microbiology Vol.32:Immunology of Infection.Academic Press.ISBN 0-12-521532-0)。噬斑形成可耗时2-14天,这取决于所分析的病毒。一般对噬斑进行手工计数,结果以及用于制备板的稀释因子用来计算每样品

单位体积噬斑形成单位的数目(PFU/mL)。PFU/mL结果表示样品内感染性可复制颗粒的数目。当使用C细胞时,可采用相同测定法滴定复制缺陷型沙粒病毒颗粒或三区段沙粒病毒颗粒。

[0479] 5.10.13病毒抗原表达的测定法

[0480] 可采用技术人员已知的任何测定法测量病毒抗原的表达。例如,可进行FFU测定法。对于检测,使用针对各病毒抗原的单克隆或多克隆抗体制备物(转基因特异性FFU)。

[0481] 5.10.14动物模型

[0482] 为了体内研究本文所述沙粒病毒颗粒的重组和感染性,可使用动物模型。在某些实施方案中,可用来研究三区段沙粒病毒颗粒的重组和感染性的动物模型包括小鼠、豚鼠、兔和猴。在一个优选的实施方案中,可用研究沙粒病毒的重组和感染性的动物模型包括小鼠。在一个更具体的实施方案中,可用来研究沙粒病毒的重组和感染性的小鼠是I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组激活基因1(RAG1)三重缺陷型的。

[0483] 在某些实施方案中,动物模型可用来测定沙粒病毒感染性和转基因稳定性。在一些实施方案中,病毒RNA可分离自动物模型的血清。技术容易为本领域技术人员所知。病毒RNA可被反转录,携带沙粒病毒ORF的cDNA可用基因特异性引物PCR扩增。还可采用流式细胞术研究沙粒病毒感染性和转基因稳定性。

[0484] 可在动物模型中测试包含表达本文所述肿瘤抗原、肿瘤相关抗原或其抗原片段的二区段感染性复制缺陷型沙粒病毒或其组合物的疫苗的安全性、耐受性和免疫原性有效性。在某些实施方案中,可用于测试本文所述疫苗和其组合物的安全性、耐受性和免疫原性有效性的动物模型包括小鼠、豚鼠、大鼠、猴和黑猩猩。在一个优选的实施方案中,可用于测试本文所述疫苗和其组合物的安全性、耐受性和免疫原性有效性的动物模型包括小鼠。

[0485] 5.10.15免疫检查点抑制剂测定法

[0486] 已设计出多种测定法以评价例如描述于Lechner et al.,J.Immunother.36(9),477-89(2013)的所给出的检查点抑制剂的性质。可用于检测本文所述方法和组合物的肿瘤模型包括Colon26(CT26)、MC38(小鼠结肠腺癌)、B16F10(B16)、Lewis Lung(LLC)、Madison109(Mad 109)、EMT-6(鼠乳腺癌)、4T1(4T1)(鼠乳腺癌)和(RENCA)(鼠肾癌)。

[0487] 在某些实施方案中,在这些模型系统中,“可移植肿瘤”可通过将肿瘤细胞系通过皮下(例如CT26、4T1、MAD109、RENCA、LLC或B16)或大脑内(例如GL261、ONC26M4)接种至啮齿动物(例如成年雌性小鼠)中来产生。肿瘤可在预先确定的时间间隔(例如几天)内发生。这些肿瘤在同基因的免疫活性啮齿动物(例如小鼠品系)中生长。例如CT26、4T1、MAD109和RENCA可在BALB/c小鼠、LLC、B16中生长,GL261可在C57BL/6小鼠中生长,ONC26M4可在FVBN小鼠中生长。“自发性肿瘤”可通过将编码多个(例如1、2、3或更多个)癌基因和编码一个或多个报道分子(例如萤火虫萤光素酶报道分子)的DNA质粒大脑内注射入新生C57BL/6或FVBN小鼠以转化内源脑细胞来产生。神经胶质瘤的生长可通过本领域已知技术(例如生物发光成像)监测。皮下肿瘤的生长可通过本领域已知技术(例如在规定的时间间隔内三维的测径器测量)监测。

[0488] 6.等同内容

[0489] 本文公开的病毒、核酸、方法、宿主细胞和组合物不限于本文所述具体实施方案的范围。实际上,从前面的描述和附图来看,除所描述的以外,所述病毒、核酸、方法、宿主细胞

和组合物的不同修改对本领域技术人员将是显而易见的。这类修改欲落入随附权利要求书的范围内。

[0490] 本文引用了不同的出版物、专利和专利申请，其公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0491] 本文引用了不同的出版物、专利和专利申请，其公开内容通过引用以其整体并入本文。

7.实施例

[0492] 本节的实施例通过实例提供而非限制。

[0493] 7.1结肠腺癌肿瘤模型中用三区段沙粒病毒载体和免疫检查点抑制剂治疗

[0494] 本实施例证实用编码示例性肿瘤特异性抗原(卵清蛋白(OVA))的沙粒病毒载体和免疫检查点抑制剂(抗PD1抗体)治疗对肿瘤生长和百分比成活率产生协同效应。

[0495] 为了测定用编码卵清蛋白(OVA)的三区段可复制型LCMV载体(r3LCMV-OVA)和抗PD1检查点抑制剂(抗PD1抗体)治疗的效果，使用皮下MC38-OVA小鼠模型。在第0天，将MC38-OVA^{dim}结肠癌肿瘤细胞(5 x 10^5)皮下植入C57BL/6小鼠的胁腹。当肿瘤变得可触摸时(在第7天)，小鼠或未治疗(第1组)；在第13、17、20和24天用12.5mg/kg抗PD1抗体(clone RMP1-14，BioXCell)治疗(腹膜内给予)(第2组)；在第7天静脉内注射10^5PFU r3LCMV-OVA(第3组)，或采用相同治疗方案用r3LCMV-OVA和抗PD1抗体的组合治疗(第4组)。5只小鼠未治疗，而所有其它组每组包括6只小鼠。监测随时间推移的肿瘤生长以及动物存活期。

[0496] 上述实验显示自表达OVA的MC38结肠腺癌细胞建立的肿瘤显示对仅抗PD1抗体或r3LCMV-OVA治疗的有限反应，而抗PD1抗体和r3LCMV-OVA免疫疗法的组合产生导致肿瘤生长显著减缓(图3A)以及百分比成活率提高(图3B)的协同效应。

[0497] 7.2.结肠腺癌肿瘤模型中用编码肿瘤新抗原的三区段或二区段沙粒病毒载体和免疫检查点抑制剂治疗

[0498] 本实施例证实用编码新抗原(MC-38Adpgk^{mut})的沙粒病毒载体和免疫检查点抑制剂(抗PD1抗体)治疗产生对诱导抗原特异性CD8+T细胞、肿瘤生长和百分比成活率的协同效应。

[0499] 为了测定编码肿瘤新抗原(例如MC-38Adpgk^{mut}(ADP依赖性葡糖激酶(Adpgk)中的R204M突变)；Yadav et al.,2014,Nature 515:572-576)的基于可复制型和复制缺陷型沙粒病毒的载体治疗的免疫原性和效果，在用编码Adpgk^{mut}的三区段可复制型(r3LCMV-Adpgk^{mut})或复制缺陷型二区段(r2LCMV-Adpgk^{mut})沙粒病毒载体和PD1检查点抑制(抗PD1抗体)治疗后，对植入MC-38肿瘤细胞的小鼠进行评价。

[0500] 在实验的第7天，将MC-38肿瘤细胞(1x106)皮下植入C57BL/6小鼠的胁腹。7天后，在实验的第0天，再次通过静脉内注射5.5x10^5PFU的r2LCMV-Adpgk^{mut}(第1和2组)或5.5x10^4PFU的r3LCMV-Adpgk^{mut}相当于共5.5x10^5个病毒颗粒(第3和4组)或缓冲液(第5和6组)对小鼠免疫。在第0、3、6和9天，通过腹膜内注射6.8mg/kg抗PD1抗体clone RMP1-14再次对第1、3和5组中的动物进行治疗。随后在接种后第7和14天，用MC-38Adpgk^{mut}特异性五聚体(F4B-E-H-2Db-ASMTNMELM，ProImmune)在外周血样品中分析Adpgk^{mut}特异性$CD8^+$T细胞的减少。

[0501] 上述实验显示在用表达Adpgk^{mut}的LCMV载体(第1-4组)治疗的一些动物中诱导相当幅度的新抗原特异性CD8^{+}T细胞应答(图4A)。然而,与二区段复制缺陷型载体(第1和2组)相比,在用三区段复制载体(第3和4组)治疗的动物中观察到显著较高的CD8^{+}T细胞频率(图4A)。在用表达Adpgk^{mut}的可复制型LCMV载体和抗PD1抗体(第3组)治疗小鼠中诱导最高的新抗原特异性CD8^{+}T细胞应答,表明组合治疗对新抗原的免疫原性的协同效应(图4A)。在用r3LCMV-Adpgk^{mut}和抗PD1抗体的组合治疗的动物中观察到肿瘤控制的最高水平和最大存活率(图4B和4C)。

[0502] 7.3.黑素瘤模型中用三区段或二区段沙粒病毒载体和免疫检查点抑制剂治疗

[0503] 本实施例证实用编码黑素瘤抗原(糖蛋白100(“GP 100”)、酪氨酸酶相关蛋白1(“TRP1”)和酪氨酸酶相关蛋白2(“TRP2”))的三区段沙粒病毒载体的混合物在联合或不联合免疫检查点抑制剂(抗PD1抗体)时治疗导致肿瘤大小缩小和动物存活提高(百分比成活率和总存活天数)。

[0504] 为了测定用编码黑素瘤抗原的基于可复制型和复制缺陷型沙粒病毒的载体和PD1检查点抑制治疗的效果,使用小鼠B16F10黑素瘤模型。

[0505] 在实验的第0天,将B16F10黑素瘤细胞(1x10^{5})皮下植入C57BL/6小鼠的胁腹(图5A)。在实验的第7天,在第7天给小鼠静脉内注射:1.2x10^{5}RCV PFU(总计)的可复制型三区段沙粒病毒载体的混合物(r3LCMV-GP 100、r3LCMV-Trp1和r3LCMV-Trp2各4x10^{4}PFU)(第1和4组);在第7天1.2x10^{6}PFU(总计)的复制缺陷型二区段沙粒病毒载体的混合物(rLCMV-GP 100、rLCMV-Trp1和rLCMV-Trp2各4x10^{5}PFU)(第2和5组)或仅缓冲液(第3和6组)。在实验的第10、13、16、19和22天,第1、2和3组中的小鼠另外用200μg抗PD1抗体(clone 29F.1A12,BioXCell)治疗,腹膜内给予。监测随时间推移的肿瘤生长以及动物存活百分比和存活天数。每组有5只小鼠。

[0506] 上述实验显示与对照动物(第6组)相比,已建立的黑素瘤肿瘤对表达黑素瘤抗原GP 100、TRP1和TRp2的三区段可复制型LCMV载体的混合物单次治疗起反应(第4组),如肿瘤体积缩小所示(图5B)和存活率提高所示(图5C和5D)。相比之下,用表达相同黑素瘤抗原的二区段复制缺陷型LCMV载体的混合物、不管检查点抑制存在与否的治疗没有反应(第2和5组)(图5B-5D)。仅抗PD1阻断对动物的肿瘤生长或存活也没有作用(第3组)(图5B-5D)。然而,与仅三区段可复制型LCMV载体的混合物治疗的动物相比,在用三区段可复制型表达黑素瘤抗原的LCMV载体与抗PD1抗体组合治疗的小鼠(第1组)中,观察到与肿瘤体积缩小有关的存活率提高,表明这些治疗方式的协同效应(图5B-5D)。

[0507] 8.序列

[0508] 表5的序列是可与本文所述方法和组合物一起使用的说明性氨基酸序列和核苷酸序列。在某些情况下,DNA序列用来描述病毒基因组区段的RNA序列。RNA序列可容易地从DNA序列中推导。

[0509] 表5

[0510]

SEQ ID NO.	描述	序列
1	淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 clone 13 区段 L，完	GCGCACCGGGGATCCTAGGCGTTTAGTTGCGCTGTTTGGTT GCACAACTTTCTTCGTGAGGCTGTCAGAAGTGGACCTGGCT GATAGCGATGGGTCAAGGCAAGTCCAGAGAGGAGAAAGG

[0511]

	整序列(GenBank：DQ361066.1)(基因组区段是RNA，SEQ ID NO: 1中的序列针对DNA显示；然而，用尿苷(“U”)替换SEQ ID NO: 1中的全部胸苷(“T”)提供RNA序列)。	CACCAATAGTACAAACAGGGCCGAAATCCTACCAGATACC ACCTATCTTGGCCCTTTAAGCTGCAAATCTTGCTGGCAGAA ATTTGACAGCTTGGTAAGATGCCATGACCACTACCTTTGCA GGCACTGTTTAAACCTTCTGCTGTCAGTATCCGACAGGTGT CCTCTTTGTAAATATCCATTACCAACCAGATTGAAGATATC AACAGCCCCAAGCTCTCCACCTCCCTACGAAGAGTAACAC CGTCCGGCCCCGGCCCCGACAAACAGCCCAGCACAAGGGA ACCGCACGTCaCCCAACGCACACAGACACAGCACCCAACA CAGAACACGCACACACACACACACACACACCCACACGCAC GCGCCCCCACCACCGGGGGGCGCCCCCCCCCGGGGGGCGG CCCCCCGGGAGCCCGGGCGGAGCCCCACGGAGATGCCCAT CAGTCGATGTCCTCGGCCACCGACCCGCCcAGCCAATCGTC GCAGGACCTCCCCTTGAGTCTAAACCTGCCCCCCACTgTTT CATACATCAAAGTGCTCCTAGATTTGCTAAAACAAAGTCTG CAATCCTTAAAGGCGAACCAGTCTGGCAAAAGCGACAGTG GAATCAGCAGAATAGATCTGTCTATACATAGTTCCTGGAG GATTACACTTATCTCTGAACCCAACAAATGTTCACCAGTTC TGAATCGATGCAGGAAGAGGTTCCCAAGGACATCACTAAT CTTTTCATAGCCCTCAAGTCCTGCTAGAAAGACTTTCATGT CCTTGGTCTCCAGCTTCACAATGATATTTTGGACAAGGTTT CTTCCTTCAAAAAGGGCACCCATCTTTACAGTCAGTGGCAC AGGCTCCCACTCAGGTCCAACTCTCTCAAAGTCAATAGATC TAATCCCATCCAGTATTCTTTTGGAGCCCAACAACTCAAGC TCAAGAGAATCACCAAGTATCAAGGGATCTTCCATGTAAT CCTCAAACTCTTCAGATCTGATATCAAAGACACCATCGTTC ACCTTGAAGACAGAGTCTGTCCTCAGTAAGTGGAGGCATT CATCCAACATTCTTCTATCTATCTCACCCTTAAAGAGGTGA GAGCATGATAAAAGTTCAGCCACACCTGGATTCTGTAATT GGCACCTAACCAAGAATATCAATGAAAATTTCCTTAAACA GTCAGTATTATTCTGATTGTGCGTAAAGTCCACTGAAATTG AAAACTCCAATACCCCTTTTGTGTAGTTGAGCATGTAGTCC CACAGATCCTTTAAGGATTTAAATGCCTTTGGGTTTGTCAG GCCCTGCCTAATCAACATGGCAGCATTACACACAACATCTC CCATTCGGTAAGAGAACCACCCAAAACCAAACTGCAAATC ATTCCTAAACATAGGCCTCTCCACATTTTTGTTCACCACCTT TGAGACAAATGATTGAAAGGGGCCCAGTGCCTCAGCACCA TCTTCAGATGGCATCATTTCTTTATGAGGGAACCATGAAAA ATTGCCTAATGTCCTGGTTGTTGCAACAAATTCTCGAACAA ATGATTCAAAATACACCTGTTTTAAGAAGTTCTTGCAGACA TCCCTCGTGCTAACAACAAATTCATCAACCAGACTGGAGTC AGATCGCTGATGAGAATTGGCAAGGTCAGAAAACAGAACA GTGTAATGTTCATCCCTTTTCCACTTAACAACATGAGAAAT GAGTGACAAGGATTCTGAGTTAATATCAATTAAAACACAG AGGTCAAGGAATTTAATTCTGGGACTCCACCTCATGTTTTT TGAGCTCATGTCAGACATAAATGGAAGAAGCTGATCCTCA AAGATCTTGGGATATAGCCGCCTCACAGATTGAATCACTTG GTTCAAATTCACTTTGTCCTCCAGTAGCCTTGAGCTCTCAG GCTTTCTTGCTACATAATCACATGGGTTTAAGTGCTTAAGA GTTAGGTTCTCACTGTTATTCTTCCCTTTGGTCGGTTCTGCT AGGACCCAAACACCCAACTCAAAAGAGTTGCTCAATGAAA TACAAATGTAGTCCCAAAGAAGAGGCCTTAAAAGGCATAT ATGATCACGGTGGGCTTCTGGATGAGACTGTTTGTCACAAA TGTACAGCGTTATACCATCCCGATTGCAAACTCTTGTCACA TGATCATCTGTGGTTAGATCCTCAAGCAGCTTTTTGATATA CAGATTTTCCCTATTTTTGTTTCTCACACACCTGCTTCCTAG AGTTTTGCAAAGGCCTATAAAGCCAGATGAGATACAACTC TGGAAAGCTGACTTGTTGATTGCTTCTGACAGCAGCTTCTG

[0512]

		TGCACCCCTTGTGAATTTACTACAAAGTTTGTTCTGGAGTG TCTTGATCAATGATGGGATTCTTTCCTCTTGGAAAGTCATC ACTGATGGATAAACCACCTTTTGTCTTAAAACCATCCTTAA TGGGAACATTTCATTCAAATTCAACCAGTTAACATCTGCTA ACTGATTCAGATCTTCTTCAAGACCGAGGAGGTCTCCCAAT TGAAGAATGGCCTCCtTTTTATCTCTGTTAAATAGGTCTAAG AAAAATTCTTCATTAAATTCACCATTTTTGAGCTTATGATG CAGTTTCCTTACAAGCTTTCTTACAACCTTTGTTTCATTAGG ACACAGTTCCTCAATGAGTCTTTGTATTCTGTAACCTCTAG AACCATCCAGCCAATCTTTCACATCAGTGTTGGTATTCAGT AGAAATGGATCCAAAGGGAAATTGGCATACTTTAGGAGGT CCAGTGTTCTCCTTTGGATACTATTAACTAGGGAGACTGGG ACGCCATTTGCGATGGCTTGATCTGCAATTGTATCTATTGT TTCACAAAGTTGATGTGGCTCTTTACACTTGACATTGTGTA GCGCTGCAGATACAAACTTTGTGAGAAGAGGGACTTCCTC CCCCCATACATAGAATCTAGATTTAAATTCTGCAGCGAACC TCCCAGCCACACTTTTTGGGCTGATAAATTTGTTTAACAAG CCGCTCAGATGAGATTGGAATTCCAACAGGACAAGGACTT CCTCCGGATCACTTACAACCAGGTCACTCAGCCTCCTATCA AATAAAGTGATCTGATCATCACTTGATGTGTAAGCCTCTGG TCTTTCGCCAAAGATAACACCAATGCAGTAGTTGATGAAC CTCTCGCTAAGCAAACCATAGAAGTCAGAAGCATTATGCA AGATTCCCTGCCCCATATCAATAAGGCTGGATATATGGGAT GGCACTATCCCCATTTCAAAATATTGTCTGAAAATTCTCTC AGTAACAGTTGTTTCTGAACCCCTGAGAAGTTTTAGCTTCG ACTTGACATATGATTTCATCATTGCATTCACAACAGGAAAG GGGACCTCGACAAGCTTATGCATGTGCCAAGTTAACAAAG TGCTAACATGATCTTTCCCGGAACGCACATACTGGTCATCA CCTAGTTTGAGATTTTGTAGAAACATTAAGAACAAAAATG GGCACATCATTGGTCCCCATTTGCTGTGATCCATACTATAG TTTAAGAACCCTTCCCGCACATTGATAGTCATTGACAAGAT TGCATTTTCAAATTCCTTATCATTGTTTAAACAGGAGCCTG AAAAGAAACTTGAAAAAGACTCAAAATAATCTTCTATTAA CCTTGTGAACATTTTTGTCCTCAAATCTCCAATATAGAGTT CTCTATTTCCCCCAACCTGCTCTTTATAAGATAGTGCAAAT TTCAGCCTTCCAGAGTCAGGACCTACTGAGGTGTATGATGT TGGTGATTCTTCTGAGTAGAAGCACAGATTTTTCAAAGCAG CACTCATACATTgTGTCAACGACAGAGCTTTACTAAGGGAC TCAGAATTACTTTCCCTCTCACTGATTCTCACGTCTTCTTCC AGTTTGTCCCAGTCAAATTTGAAATTCAAGCCTTGCCTTTG CATATGCCTGTATTTCCCTGAGTACGCATTTGCATTCATTTG CAACAGAATCATCTTCATGCAAGAAAACCAATCATTCTCA GAAAAGAACTTTCTACAAAGGTTTTTTGCCATCTCATCGAG GCCACACTGATCTTTAATGACTGAGGTGAAATACAAAGGT GACAGCTCTGTGGAACCCTCAACAGCCTCACAGATAAATT TCATGTCATCATTGGTTAGACATGATGGGTCAAAGTCTTCT ACTAAATGGAAAGATATTTCTGACAAGATAACTTTTCTTAA GTGAGCCATCTTCCCTGTTAGAATAAGCTGTAAATGATGTA GTCCTTTTGTATTTGTAAGTTTTTCTCCATCTCCTTTGTCATT GGCCCTCCTACCTCTTCTGTACCGTGCTATTGTGGTGTTGA CCTTTTCTTCGAGACTTTTGAAGAAGCTTGTCTCTTCTTCTC CATCAAAACATATTTCTGCCAGGTTGTCTTCCGATCTCCCT GTCTCTTCTCCCTTGGAACCGATGACCAATCTAGAGACTAA CTTGGAAACTTTATATTCATAGTCTGAGTGGCTCAACTTAT ACTTTTGTTTTCTTACGAAACTCTCCGTAATTTGACTCACAG CACTAACAAGCAATTTGTTAAAGTCATATTCCAGAAGTCGT TCTCCATTTAGATGCTTATTAACCACCACACTTTTGTTACTA

[0513]

		GCAAGATCTAATGCTGTCGCACATCCAGAGTTAGTCATGG GATCTAGGCTGTTTAGCTTCTTCTCTCCTTTGAAAATTAAA GTGCCGTTGTTAAATGAAGACACCATTAGGCTAAAGGCTT CCAGATTAACACCTGGAGTTGTATGCTGACAGTCAATTTCT TTACTAGTGAATCTCTTCATTTGCTCATAGAACACACATTC TTCCTCAGGAGTGATTGCTTCCTTGGGGTTGACAAAAAAAC CAAATTGACTTTTGGGCTCAAAGAACTTTTCAAAACATTTT ATCTGATCTGTTAGCCTGTCAGGGGTCTCCTTTGTGATCAA ATGACACAGGTATGACACATTCAACATAAATTTAAATTTTG CACTCAACAACACCTTCTCACCAGTACCAAAAATAGTTTTT ATTAGGAATCTAAGCAGCTTATACACCACCTTCTCAGCAGG TGTGATCAGATCCTCCCTCAACTTATCCATTAATGATGTAG ATGAAAAATCTGACACTATTGCCATCACCAAATATCTGAC ACTCTGTACCTGCTTTTGATTTCTCTTTGTTGGGTTGGTGAG CATTAGCAACAATAGGGTCCTCAGTGCAACCTCAATGTCG GTGAGACAGTCTTTCAAATCAGGACATGATCTAATCCATG AAATCATGATGTCTATCATATTGTATAAGACCTCATCTGAA AAAATTGGTAAAAAGAACCTTTTAGGATCTGCATAGAAGG AAATTAAATGACCATCCGGGCCTTGTATGGAGTAGCACCTT GAAGATTCTCCAGTCTTCTGGTATAATAGGTGGTATTCTTC AGAGTCCAGTTTTATTACTTGGCAAAACACTTCTTTGCATT CTACCACTTGATATCTCACAGACCCTATTTGATTTTGCCTTA GTCTAGCAACTGAGCTAGTTTTCATACTGTTTGTTAAGGCC AGACAAACAGATGATAATCTTCTCAGGCTCTGTATGTTCTT CAGCTGCTCTGTGCTGGGTTGGAAATTGTAATCTTCAAACT TCGTATAATACATTATCGGGTGAGCTCCAATTTTCATAAAG TTCTCAAATTCAGTGAATGGTATGTGGCATTCTTGCTCAAG GTGTTCAGACAGTCCGTAATGCTCGAAACTCAGTCCCACCA CTAACAGGCATTTTTGAATTTTTGCAATGAACTCACTAATA GAtGCCCTAAACAATTCCTCAAAAGACACCTTTCTAAACAC CTTTGACTTTTTTCTATTCCTCAAAAGTCTAATGAACTCCTC TTTAGTGCTGTGAAAGCTTACCAGCCTATCATTCACACTAC TATAGCAACAACCCACCCAGTGTTTATCATTTTTTAACCCT TTGAATTTCGACTGTTTTATCAATGAGGAAAGACACAAAA CATCCAGATTTAACAACTGTCTCCTTCTAGTATTCAACAGT TTCAAACTCTTGACTTTGTTTAACATAGAGAGGAGCCTCTC ATATTCAGTGCTAGTCTCACTTCCCCTTTCGTGCCCATGGG TCTCTGCAGTTATGAATCTCATCAAAGGACAGGATTCGACT GCCTCCCTGCTTAATGTTAAGATATCATCACTATCAGCAAG GTTTTCATAGAGCTCAGAGAATTCCTTGATCAAGCCTTCAG GGTTTACTTTCTGAAAGTTTCTCTTTAATTTCCCACTTTCTA AATCTCTTCTAAACCTGCTGAAAAGAGAGTTTATTCCAAAA ACCACATCATCACAGCTCATGTTGGGGTTGATGCCTTCGTG GCACATCCTCATAATTTCATCATTGTGAGTTGACCTCGCAT CTTTCAGAATTTTCATAGAGTCCATACCGGAGCGCTTGTCG ATAGTAGTCTTCAGGGACTCACAGAGTCTAAAATATTCAG ACTCTTCAAAGACTTTCTCATTTTGGTTAGAATACTCCAAA AGTTTGAATAAAAGGTCTCTAAATTTGAAGTTTGCCCACTC TGGCATAAAACTATTATCATAATCACAACGACCATCTACTA TTGGAACTAATGTGACACCCGCAACAGCAAGGTCTTCCCT GATGCATGCCAATTTGTTAGTGTCCTCTATAAATTTCTTCTC AAAACTGGCTGGaGtGCTCCTAACAAAACACTCAAGAAGAA TGAGAGAATTGTCTATCAGCTTGTAACCATCAGGAATGAT AAGTGGTAGTCCTGGGCATACAATTCCAGACTCCACCAAA ATTGTTTCCACAGACTTATCGTCGTGGTTGTGTGTGCAGCC ACTCTTGTCTGCACTGTCTATTTCAATGCAGCGTGACAGCA ACTTGAGTCCCTCAATCAGAACCATTCTGGGTTCCCTTTGT

[0514]

		CCCAGAAAGTTGAGTTTCTGCCTTGACAACCTCTCATCCTG TTCTATATAGTTTAAACATAACTCTCTCAATTCTGAGATGA TTTCATCCATTGCGCATCAAAAAGCCTAGGATCCTCGGTGC G
2	淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒区段S，完整序列(基因组区段是 RNA，SEQ ID NO: 2 中的序列针对DNA显示；然而，用尿苷(“U”)替换SEQ ID NO: 2 中的全部胸苷(“T”)提供 RNA 序列)。	CGCACCGGGGATCCTAGGCTTTTTGGATTGCGCTTTCCTC TAGATCAACTGGGTGTCAGGCCCTATCCTACAGAAGGATG GGTCAGATTGTGACAATGTTTGAGGCTCTGCCTCACATCA TCGATGAGGTGATCAACATTGTCATTATTGTGCTTATCGT GATCACGGGTATCAAGGCTGTCTACAATTTTGCCACCTGT GGGATATTCGCATTGATCAGTTTCCTACTTCTGGCTGGCA GGTCCTGTGGCATGTACGGTCTTAAGGGACCCGACATTTA CAAAGGAGTTTACCAATTTAAGTCAGTGGAGTTTGATATG TCACATCTGAACCTGACCATGCCCAACGCATGTTCAGCCA ACAACTCCCACCATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGACT AGAATTGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCACAAC TTTTGCAATCTGACCTCTGCCTTCAACAAAAAGACCTTTG ACCACACACTCATGAGTATAGTTTCGAGCCTACACCTCAG TATCAGAGGGAACTCCAACTATAAGGCAGTATCCTGCGAC TTCAACAATGGCATAACCATCCAATACAACTTGACATTCT CAGATCGACAAAGTGCTCAGAGCCAGTGTAGAACCTTCAG AGGTAGAGTCCTAGATATGTTTAGAACTGCCTTCGGGGGG AAATACATGAGGAGTGGCTGGGGCTGGACAGGCTCAGATG GCAAGACCACCTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATACCT GATTATACAAAATAGAACCTGGGAAAACCACTGCACATAT GCAGGTCCTTTTGGGATGTCCAGGATTCTCCTTTCCCAAG AGAAGACTAAGTTCTTCACTAGGAGACTAGCGGGCACATT CACCTGGACTTTGTCAGACTCTTCAGGGGTGGAGAATCCA GGTGGTTATTGCCTGACCAAATGGATGATTCTTGCTGCAG AGCTTAAGTGTTTCGGGAACACAGCAGTTGCGAAATGCAA TGTAAATCATGATGCCGAATTCTGTGACATGCTGCGACTA ATTGACTACAACAAGGCTGCTTTGAGTAAGTTCAAAGAGG ACGTAGAATCTGCCTTGCACTTATTCAAAACAACAGTGAA TTCTTTGATTTCAGATCAACTACTGATGAGGAACCACTTG AGAGATCTGATGGGGGTGCCATATTGCAATTACTCAAAGT TTTGGTACCTAGAACATGCAAAGACCGGCGAAACTAGTGT CCCCAAGTGCTGGCTTGTCACCAATGGTTCTTACTTAAAT GAGACCCACTTCAGTGATCAAATCGAACAGGAAGCCGATA ACATGATTACAGAGATGTTGAGGAAGGATTACATAAAGAG GCAGGGGAGTACCCCCCTAGCATTGATGGACCTTCTGATG TTTTCCACATCTGCATATCTAGTCAGCATCTTCCTGCACC TTGTCAAAATACCAACACACAGGCACATAAAAGGTGGCTC ATGTCCAAAGCCACACCGATTAACCAACAAAGGAATTTGT AGTTGTGGTGCATTTAAGGTGCCTGGTGTAAAAACCGTCT GGAAAAGACGCTGAAGAACAGCGCCTCCCTGACTCTCCAC CTCGAAAGAGGTGGAGAGTCAGGGAGGCCCAGAGGGTCTT AGAGTGTCACAACATTTGGGCCTCTAAAAATTAGGTCATG TGGCAGAATGTTGTGAACAGTTTTCAGATCTGGGAGCCTT GCTTTGGAGGCGCTTTCAAAAATGATGCAGTCCATGAGTG CACAGTGCGGGGTGATCTCTTTCTTCTTTTTGTCCCTTAC TATTCCAGTATGCATCTTACACAACCAGCCATATTTGTCC CACACTTTGTCTTCATACTCCCTCGAAGCTTCCCTGGTCA TTTCAACATCGATAAGCTTAATGTCCTTCCTATTCTGTGA GTCCAGAAGCTTTCTGATGTCATCGGAGCCTTGACAGCTT AGAACCATCCCCTGCGGAAGAGCACCTATAACTGACGAGG TCAACCCGGGTTGCGCATTGAAGAGGTCGGCAAGATCCAT GCCGTGTGAGTACTTGGAATCTTGCTTGAATTGTTTTTGA TCAACGGGTTCCCTGTAAAAGTGTATGAACTGCCCGTTCT

[0515]

		GTGGTTGGAAAATTGCTATTTCCACTGGATCATTAAATCT ACCCTCAATGTCAATCCATGTAGGAGCGTTGGGGTCAATT CCTCCCATGAGGTCTTTTAAAAGCATTGTCTGGCTGTAGC TTAAGCCCACCTGAGGTGGACCTGCTGCTCCAGGCGCTGG CCTGGGTGAATTGACTGCAGGTTTCTCGCTTGTGAGATCA ATTGTTGTGTTTTCCCATGCTCTCCCCACAATCGATGTTC TACAAGCTATGTATGGCCATCCTTCACCTGAAAGGCAAAC TTTATAGAGGATGTTTTCATAAGGGTTCCTGTCCCCAACT TGGTCTGAAACAAACATGTTGAGTTTTCTCTTGGCCCCGA GAACTGCCTTCAAGAGGTCCTCGCTGTTGCTTGGCTTGAT CAAAATTGACTCTAACATGTTACCCCCATCCAACAGGGCT GCCCCTGCCTTCACGGCAGCACCAAGACTAAAGTTATAGC CAGAAATGTTGATGCTGGACTGCTGTTCAGTGATGACCCC CAGAACTGGGTGCTTGTCTTTCAGCCTTTCAAGATCATTA AGATTTGGATACTTGACTGTGTAAAGCAAGCCAAGGTCTG TGAGCGCTTGTACAACGTCATTGAGCGGAGTCTGTGACTG TTTGGCCATACAAGCCATAGTTAGACTTGGCATTGTGCCA AATTGATTGTTCAAAAGTGATGAGTCTTTCACATCCCAAA CTCTTACCACACCACTTGCACCCTGCTGAGGCTTTCTCAT CCCAACTATCTGTAGGATCTGAGATCTTTGGTCTAGTTGC TGTGTTGTTAAGTTCCCCATATATACCCCTGAAGCCTGGG GCCTTTCAGACCTCATGATCTTGGCCTTCAGCTTCTCAAG GTCAGCCGCAAGAGACATCAGTTCTTCTGCACTGAGCCTC CCCACTTTCAAAACATTCTTCTTTGATGTTGACTTTAAAT CCACAAGAGAATGTACAGTCTGGTTGAGACTTCTGAGTCT CTGTAGGTCTTTGTCATCTCTCTTTTCCTTCCTCATGATC CTCTGAACATTGCTGACCTCAGAGAAGTCCAACCCATTCA GAAGGTTGGTTGCATCCTTAATGACAGCAGCCTTCACATC TGATGTGAAGCTCTGCAATTCTCTTCTCAATGCTTGCGTC CATTGGAAGCTCTTAACTTCCTTAGACAAGGACATCTTGT TGCTCAATGGTTTCTCAAGACAAATGCGCAATCAAATGCC TAGGATCCACTGTGCG
3	淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 clone 13 区段 S，完整序列 (GenBank：DQ361065.2) (基因组区段是 RNA，SEQ ID NO: 3 中的序列针对 DNA 显示；然而，用尿苷(“U”)替换 SEQ ID NO: 3 中的全部胸苷(“T”)提供 RNA 序列)。	GCGCACCGGGGATCCTAGGCTTTTTGGATTGCGCTTTCCT CTAGATCAACTGGGTGTCAGGCCCTATCCTACAGAAGGAT GGGTCAGATTGTGACAATGTTTGAGGCTCTGCCTCACATC ATCGATGAGGTGATCAACATTGTCATTATTGTGCTTATCG TGATCACGGGTATCAAGGCTGTCTACAATTTTGCCACCTG TGGGATATTCGCATTGATCAGTTTCCTACTTCTGGCTGGC AGGTCCTGTGGCATGTACGGTCTTAAGGGACCCGACATTT ACAAAGGAGTTTACCAATTTAAGTCAGTGGAGTTTGATAT GTCACATCTGAACCTGACCATGCCCAACGCATGTTCAGCC AACAACTCCCACCATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGAC TAGAATTGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCACAA CTTTTGCAATCTGACCTCTGCCTTCAACAAAAAGACCTTT GACCACACACTCATGAGTATAGTTTCGAGCCTACACCTCA GTATCAGAGGGAACTCCAACTATAAGGCAGTATCCTGCGA CTTCAACAATGGCATAACCATCCAATACAACTTGACATTC TCAGATGCACAAAGTGCTCAGAGCCAGTGTAGAACCTTCA GAGGTAGAGTCCTAGATATGTTTAGAACTGCCTTCGGGGG GAAATACATGAGGAGTGGCTGGGGCTGGACAGGCTCAGAT GGCAAGACCACCTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATACC TGATTATACAAAATAGAACCTGGGAAAACCACTGCACATA TGCAGGTCCTTTTGGGATGTCCAGGATTCTCCTTTCCCAA GAGAAGACTAAGTTCCTCACTAGGAGACTAGCGGGCACAT TCACCTGGACTTTGTCAGACTCTTCAGGGGTGGAGAATCC AGGTGGTTATTGCCTGACCAAATGGATGATTCTTGCTGCA GAGCTTAAGTGTTTCGGGAACACAGCAGTTGCGAAATGCA

[0516]

		ATGTAAATCATGATGAAGAATTCTGTGACATGCTGCGACT AATTGACTACAACAAGGCTGCTTTGAGTAAGTTCAAAGAG GACGTAGAATCTGCCTTGCACTTATTCAAAACAACAGTGA ATTCTTTGATTTCAGATCAACTACTGATGAGGAACCACTT GAGAGATCTGATGGGGGTGCCATATTGCAATTACTCAAAG TTTTGGTACCTAGAACATGCAAAGACCGGCGAAACTAGTG TCCCCAAGTGCTGGCTTGTCACCAATGGTTCTTACTTAAA TGAGACCCACTTCAGTGACCAAATCGAACAGGAAGCCGAT AACATGATTACAGAGATGTTGAGGAAGGATTACATAAAGA GGCAGGGGAGTACCCCCCTAGCATTGATGGACCTTCTGAT GTTTTCCACATCTGCATATCTAGTCAGCATCTTCCTGCAC CTTGTCAAAATACCAACACACAGGCACATAAAAGGTGGCT CATGTCCAAAGCCACACCGATTAACCAACAAAGGAATTTG TAGTTGTGGTGCATTTAAGGTGCCTGGTGTAAAAACCGTC TGGAAAAGACGCTGAAGAACAGCGCCTCCCTGACTCTCCA CCTCGAAAGAGGTGGAGAGTCAGGGAGGCCCAGAGGGTCT TAGAGTGTCACAACATTTGGGCCTCTAAAAATTAGGTCAT GTGGCAGAATGTTGTGAACAGTTTTCAGATCTGGGAGCCT TGCTTTGGAGGCGCTTTCAAAAATGATGCAGTCCATGAGT GCACAGTGCGGGGTGATCTCTTTCTTCTTTTTGTCCCTTA CTATTCCAGTATGCATCTTACACAACCAGCCATATTTGTC CCACACTTTGTCTTCATACTCCCTCGAAGCTTCCCTGGTC ATTTCAACATCGATAAGCTTAATGTCCTTCCTATTCTGTG AGTCCAGAAGCTTTCTGATGTCATCGGAGCCTTGACAGCT TAGAACCATCCCCTGCGGAAGAGCACCTATAACTGACGAG GTCAACCCGGGTTGCGCATTGAAGAGGTCGGCAAGATCCA TGCCGTGTGAGTACTTGGAATCTTGCTTGAATTGTTTTTG ATCAACGGGTTCCCTGTAAAAGTGTATGAACTGCCCGTTC TGTGGTTGGAAAATTGCTATTTCCACTGGATCATTAAATC TACCCTCAATGTCAATCCATGTAGGAGCGTTGGGGTCAAT TCCTCCCATGAGGTCTTTTAAAAGCATTGTCTGGCTGTAG CTTAAGCCCACCTGAGGTGGACCTGCTGCTCCAGGCGCTG GCCTGGGTGAATTGACTGCAGGTTTCTCGCTTGTGAGATC AATTGTTGTGTTTTCCCATGCTCTCCCCACAATCGATGTT CTACAAGCTATGTATGGCCATCCTTCACCTGAAAGGCAAA CTTTATAGAGGATGTTTTCATAAGGGTTCCTGTCCCCAAC TTGGTCTGAAACAAACATGTTGAGTTTTCTCTTGGCCCCG AGAACTGCCTTCAAGAGGTCCTCGCTGTTGCTTGGCTTGA TCAAAATTGACTCTAACATGTTACCCCCATCCAACAGGGC TGCCCCTGCCTTCACGGCAGCACCAAGACTAAAGTTATAG CCAGAAATGTTGATGCTGGACTGCTGTTCAGTGATGACCC CCAGAACTGGGTGCTTGTCTTTCAGCCTTTCAAGATCATT AAGATTTGGATACTTGACTGTGTAAAGCAAGCCAAGGTCT GTGAGCGCTTGTACAACGTCATTGAGCGGAGTCTGTGACT GTTTGGCCATACAAGCCATAGTTAGACTTGGCATTGTGCC AAATTGATTGTTCAAAAGTGATGAGTCTTTCACATCCCAA ACTCTTACCACACCACTTGCACCCTGCTGAGGCTTTCTCA TCCCAACTATCTGTAGGATCTGAGATCTTTGGTCTAGTTG CTGTGTTGTTAAGTTCCCCATATATACCCCTGAAGCCTGG GGCCTTTCAGACCTCATGATCTTGGCCTTCAGCTTCTCAA GGTCAGCCGCAAGAGACATCAGTTCTTCTGCACTGAGCCT CCCCACTTTCAAAACATTCTTCTTTGATGTTGACTTTAAA TCCACAAGAGAATGTACAGTCTGGTTGAGACTTCTGAGTC TCTGTAGGTCTTTGTCATCTCTCTTTTCCTTCCTCATGAT CCTCTGAACATTGCTGACCTCAGAGAAGTCCAACCCATTC AGAAGGTTGGTTGCATCCTTAATGACAGCAGCCTTCACAT CTGATGTGAAGCTCTGCAATTCTCTTCTCAATGCTTGCGT

[0517]

		CCATTGGAAGCTCTTAACTTCCTTAGACAAGGACATCTTG TTGCTCAATGGTTTCTCAAGACAAATGCGCAATCAAATGC CTAGGATCCACTGTGCG
4	淋巴细胞脉络丛脑膜炎毒株 MP 区段 L，完整序列 (基因组区段是 RNA，SEQ ID NO:4 中的序列针对 DNA 显示；然而，用尿苷(“U”)替换 SEQ ID NO:4 中的全部胸苷(“T”)提供 RNA 序列)。	GCGCACCGGGGATCCTAGGCATTTTTGTTGCGCATTTTGT TGTGTTATTTGTTGCACAGCCCTTCATCGTGGGACCTTCA CAAACAAACCAAACCACCAGCCATGGGCCAAGGCAAGTCC AAAGAGGGAAGGGATGCCAGCAATACGAGCAGAGCTGAAA TTCTGCCAGACACCACCTATCTCGGACCTCTGAACTGCAA GTCATGCTGGCAGAGATTTGACAGTTTAGTCAGATGCCAT GACCACTATCTCTGCAGACACTGCCTGAACCTCCTGCTGT CAGTCTCCGACAGGTGCCCTCTCTGCAAACATCCATTGCC AACCAAACTGAAAATATCCACGGCCCCAAGCTCTCCACCC CCTTACGAGGAGTGACGCCCCGAGCCCCAACACCGACACA AGGAGGCCACCAACACAACGCCCAACACGGAACACACAC A CACACACCCACACACACATCCACACACACGCGCCCCCACA ACGGGGGCGCCCCCCCGGGGGTGGCCCCCCGGGTGCTCGG GCGGAGCCCCACGGAGAGGCCAATTAGTCGATCTCCTCGA CCACCGACTTGGTCAGCCAGTCATCACAGGACTTGCCCTT AAGTCTGTACTTGCCCACAACTGTTTCATACATCACCGTG TTCTTTGACTTACTGAAACATAGCCTACAGTCTTTGAAAG TGAACCAGTCAGGCACAAGTGACAGCGGTACCAGTAGAAT GGATCTATCTATACACAACTCTTGGAGAATTGTGCTAATT TCCGACCCCTGTAGATGCTCACCAGTTCTGAATCGATGTA GAAGAAGGCTCCCAAGGACGTCATCAAAATTTCCATAACC CTCGAGCTCTGCCAAGAAAACTCTCATATCCTTGGTCTCC AGTTTCACAACGATGTTCTGAACAAGGCTTCTTCCCTCAA AAAGAGCACCCATTCTCACAGTCAAGGGCACAGGCTCCCA TTCAGGCCCAATCCTCTCAAAATCAAGGGATCTGATCCCG TCCAGTATTTTCCTTGAGCCTATCAGCTCAAGCTCAAGAG AGTCACCGAGTATCAGGGGGTCCTCCATATAGTCCTCAAA CTCTTCAGACCTAATGTCAAAAACACCATCGTTCACCTTG AAGATAGAGTCTGATCTCAACAGGTGGAGGCATTCGTCCA AGAACCTTCTGTCCACCTCACCTTTAAAGAGGTGAGAGCA TGATAGGAACTCAGCTACACCTGGACCTTGTAACTGGCAC TTCACTAAAAAGATCAATGAAAACTTCCTCAAACAATCAG TGTTATTCTGGTTGTGAGTGAAATCTACTGTAATTGAGAA CTCTAGCACTCCCTCTGTATTATTTATCATGTAATCCCAC AAGTTTCTCAAAGACTTGAATGCCTTTGGATTTGTCAAGC CTTGTTTGATTAGCATGGCAGCATTGCACACAATATCTCC CAATCGGTAAGAGAACCATCCAAATCCAAATTGCAAGTCA TTCCTAAACATGGGCCTCTCCATATTTTTGTTCACTACTT TTAAGATGAATGATTGGAAAGGCCCCAATGCTTCAGCGCC ATCTTCAGATGGCATCATGTCTTTATGAGGGAACCATGAA AAACTTCCTAGAGTTCTGCTTGTTGCTACAAATTCTCGTA CAAATGACTCAAAATACACTTGTTTTAAAAAGTTTTTGCA GACATCCCTTGTACTAACGACAAATTCATCAACAAGGCTT GAGTCAGAGCGCTGATGGGAATTTACAAGATCAGAAAATA GAACAGTGTAGTGTTCGTCCCTCTTCCACTTAACTACATG AGAAATGAGCGATAAAGATTCTGAATTGATATCGATCAAT ACGCAAAGGTCAAGGAATTTGATTCTGGGACTCCATCTCA TGTTTTTTGAGCTCATATCAGACATGAAGGGAAGCAGCTG ATCTTCATAGATTTTAGGGTACAATCGCCTCACAGATTGG ATTACATGGTTTAAACTTATCTTGTCCTCCAGTAGCCTTG AACTCTCAGGCTTCCTTGCTACATAATCACATGGGTTCAA GTGCTTGAGGCTTGAGCTTCCCTCATTCTTCCCTTTCACA

[0518]

		GGTTCAGCTAAGACCCAAACACCCAACTCAAAGGAATTAC TCAGTGAGATGCAAATATAGTCCCAAAGGAGGGGCCTCAA GAGACTGATGTGGTCGCAGTGAGCTTCTGGATGACTTTGC CTGTCACAAATGTACAACATTATGCCATCATGTCTGTGGA TTGCTGTCACATGCGCATCCATAGCTAGATCCTCAAGCAC TTTTCTAATGTATAGATTGTCCCTATTTTTATTTCTCACA CATCTACTTCCCAAAGTTTTGCAAAGACCTATAAAGCCTG ATGAGATGCAACTTTGAAAGGCTGACTTATTGATTGCTTC TGACAGCAACTTCTGTGCACCTCTTGTGAACTTACTGCAG AGCTTGTTCTGGAGTGTCTTGATTAATGATGGGATTCTTT CCTCTTGGAAAGTCATTACTGATGGATAAACCACTTTCTG CCTCAAGACCATTCTTAATGGGAACAACTCATTCAAATTC AGCCAATTTATGTTTGCCAATTGACTTAGATCCTCTTCGA GGCCAAGGATGTTTCCCAACTGAAGAATGGCTTCCTTTTT ATCCCTATTGAAGAGGTCTAAGAAGAATTCTTCATTGAAC TCACCATTCTTGAGCTTATGATGTAGTCTCCTTACAAGCC TTCTCATGACCTTCGTTTCACTAGGACACAATTCTTCAAT AAGCCTTTGGATTCTGTAACCTCTAGAGCCATCCAACCAA TCCTTGACATCAGTATTAGTGTTAAGCAAAAATGGGTCCA AGGGAAAGTTGGCATATTTTAAGAGGTCTAATGTTCTCTT CTGGATGCAGTTTACCAATGAAACTGGAACACCATTTGCA ACAGCTTGATCGGCAATTGTATCTATTGTTTCACAGAGTT GGTGTGGCTCTTTACACTTAACGTTGTGTAATGCTGCTGA CACAAATTTTGTTAAAAGTGGGACCTCTTCCCCCCACACA TAAAATCTGGATTTAAATTCTGCAGCAAATCGCCCCACCA CACTTTTCGGACTGATGAACTTGTTAAGCAAGCCACTCAA ATGAGAATGAAATTCCAGCAATACAAGGACTTCCTCAGGG TCACTATCAACCAGTTCACTCAATCTCCTATCAAATAAGG TGATCTGATCATCACTTGATGTGTAAGATTCTGGTCTCTC ACCAAAAATGACACCGATACAATAATTAATGAATCTCTCA CTGATTAAGCCGTAAAAGTCAGAGGCATTATGTAAGATTC CCTGTCCCATGTCAATGAGACTGCTTATATGGGAAGGCAC TATTCCTAATTCAAAATATTCTCGAAAGATTCTTTCAGTC ACAGTTGTCTCTGAACCCCTAAGAAGTTTCAGCTTTGATT TGATATATGATTTCATCATTGCATTCACAACAGGAAAAGG GACCTCAACAAGTTTGTGCATGTGCCAAGTTAATAAGGTG CTGATATGATCCTTTCCGGAACGCACATACTGGTCATCAC CCAGTTTGAGATTTTGAAGGAGCATTAAAAACAAAAATGG GCACATCATTGGCCCCCATTTGCTATGATCCATACTGTAG TTCAACAACCCCTCTCGCACATTGATGGTCATTGATAGAA TTGCATTTTCAAATTCTTTGTCATTGTTTAAGCATGAACC TGAGAAGAAGCTAGAAAAAGACTCAAAATAATCCTCTATC AATCTTGTAAACATTTTTGTTCTCAAATCCCCAATATAAA GTTCTCTGTTTCCTCCAACCTGCTCTTTGTATGATAACGC AAACTTCAACCTTCCGGAATCAGGACCAACTGAAGTGTAT GACGTTGGTGACTCCTCTGAGTAAAAACATAAATTCTTTA AAGCAGCACTCATGCATTTTGTCAATGATAGAGCCTTACT TAGAGACTCAGAATTACTTTCCCTTTCACTAATTCTAACA TCTTCTTCTAGTTTGTCCCAGTCAAACTTGAAATTCAGAC CTTGTCTTTGCATGTGCCTGTATTTCCCTGAGTATGCATT TGCATTCATTTGCAGTAGAATCATTTTCATACACGAAAAC CAATCACCCTCTGAAAAAAACTTCCTGCAGAGGTTTTTTG CCATTTCATCCAGACCACATTGTTCTTTGACAGCTGAAGT GAAATACAATGGTGACAGTTCTGTAGAAGTTTCAATAGCC TCACAGATAAATTTCATGTCATCATTGGTGAGACAAGATG GGTCAAAATCTTCCACAAGATGAAAAGAAATTTCTGATAA GATGACCTTCCTTAAATATGCCATTTTACCTGACAATATA

[0519]

		GTCTGAAGGTGATGCAATCCTTTTGTATTTTCAAACCCCA CCTCATTTTCCCCTTCATTGGTCTTCTTGCTTCTTTCATA CCGCTTTATTGTGGAGTTGACCTTATCTTCTAAATTCTTG AAGAAACTTGTCTCTTCTTCCCCATCAAAGCATATGTCTG CTGAGTCACCTTCTAGTTTCCCAGCTTCTGTTTCTTTAGA GCCGATAACCAATCTAGAGACCAACTTTGAAACCTTGTAC TCGTAATCTGAGTGGTTCAATTTGTACTTCTGCTTTCTCA TGAAGCTCTCTGTGATCTGACTCACAGCACTAACAAGCAA TTTGTTAAAATCATACTCTAGGAGCCGTTCCCCATTTAAA TGTTTGTTAACAACCACACTTTTGTTGCTGGCAAGGTCTA ATGCTGTTGCACACCCAGAGTTAGTCATGGGATCCAAGCT ATTGAGCCTCTTCTCCCCTTTGAAAATCAAAGTGCCATTG TTGAATGAGGACACCATCATGCTAAAGGCCTCCAGATTGA CACCTGGGGTTGTGCGCTGACAGTCAACTTCTTTCCCAGT GAACTTCTTCATTTGGTCATAAAAAACACACTCTTCCTCA GGGGTGATTGACTCTTTAGGGTTAACAAAGAAGCCAAACT CACTTTTAGGCTCAAAGAATTTCTCAAAGCATTTAATTTG ATCTGTCAGCCTATCAGGGGTTTCCTTTGTGATTAAATGA CACAGGTATGACACATTCAACATGAACTTGAACTTTGCGC TCAACAGTACCTTTTCACCAGTCCCAAAAACAGTTTTGAT CAAAAATCTGAGCAATTTGTACACTACTTTCTCAGCAGGT GTGATCAAATCCTCCTTCAACTTGTCCATCAATGATGTGG ATGAGAAGTCTGAGACAATGGCCATCACTAAATACCTAAT GTTTTGAACCTGTTTTTGATTCCTCTTTGTTGGGTTGGTG AGCATGAGTAATAATAGGGTTCTCAATGCAATCTCAACAT CATCAATGCTGTCCTTCAAGTCAGGACATGATCTGATCCA TGAGATCATGGTGTCAATCATGTTGTGCAACACTTCATCT GAGAAGATTGGTAAAAAGAACCTTTTTGGGTCTGCATAAA AAGAGATTAGATGGCCATTGGGACCTTGTATAGAATAACA CCTTGAGGATTCTCCAGTCTTTTGATACAGCAGGTGATAT TCCTCAGAGTCCAATTTTATCACTTGGCAAAATACCTCTT TACATTCCACCACTTGATACCTTACAGAGCCCAATTGGTT TTGTCTTAATCTAGCAACTGAACTTGTTTTCATACTGTTT GTCAAAGCTAGACAGACAGATGACAATCTTTTCAAACTAT GCATGTTCCTTAATTGTTCCGTATTAGGCTGGAAATCATA ATCTTCAAACTTTGTATAATACATTATAGGATGAGTTCCG GACCTCATGAAATTCTCAAACTCAATAAATGGTATGTGGC ACTCATGCTCAAGATGTTCAGACAGACCATAGTGCCCAAA ACTAAGTCCCACCACTGACAAGCACCTTTGAACTTTTAAA ATGAACTCATTTATGGATGTTCTAAACAAATCCTCAAGAG ATACCTTTCTATACGCCTTTGACTTTCTCCTGTTCCTTAG AAGTCTGATGAACTCTTCCTTGGTGCTATGAAAGCTCACC AACCTATCATTCACACTCCCATAGCAACAACCAACCCAGT GCTTATCATTTTTTGACCCTTTGAGTTTAGACTGTTTGAT CAACGAAGAGAGACACAAGACATCCAAATTCAGTAACTGT CTCCTTCTGGTGTTCAATAATTTTAAACTTTTAACTTTGT TCAACATAGAGAGGAGCCTCTCATACTCAGTGCTAGTCTC ACTTCCTCTCTCATAACCATGGGTATCTGCTGTGATAAAT CTCATCAAAGGACAGGATTCAACTGCCTCCTTGCTTAGTG CTGAAATGTCATCACTGTCAGCAAGAGTCTCATAAAGCTC AGAGAATTCCTTAATTAAATTTCCGGGGTTGATTTTCTGA AAACTCCTCTTGAGCTTCCCAGTTTCCAAGTCTCTTCTAA ACCTGCTGTAAAGGGAGTTTATGCCAAGAACCACATCATC GCAGTTCATGTTTGGGTTGACACCATCATGGCACATTTTC ATAATTTCATCATTGTGAAATGATCTTGCATCTTTCAAGA TTTTCATAGAGTCTATACCGGAACGCTTATCAACAGTGGT CTTGAGAGATTCGCAAAGTCTGAAGTACTCAGATTCCTCA

[0520]

		AAGACTTTCTCATCTTGGCTAGAATACTCTAAAAGTTTAA ACAGAAGGTCTCTGAACTTGAAATTCACCCACTCTGGCAT AAAGCTGTTATCATAATCACACCGACCATCCACTATTGGG ACCAATGTGATACCCGCAATGGCAAGGTCTTCTTTGATAC AGGCTAGTTTATTGGTGTCCTCTATAAATTTCTTCTCAAA ACTAGCTGGTGTGCTTCTAACGAAGCACTCAAGAAGAATG AGGGAATTGTCAATCAGTTTATAACCATCAGGAATGATCA AAGGCAGTCCCGGGCACACAATCCCAGACTCTATTAGAAT TGCCTCAACAGATTTATCATCATGGTTGTGTATGCAGCCG CTCTTGTCAGCACTGTCTATCTCTATACAACGCGACAAAA GTTTGAGTCCCTCTATCAATACCATTCTGGGTTCTCTTTG CCCTAAAAAGTTGAGCTTCTGCCTTGACAACCTCTCATCT TGTTCTATGTGGTTTAAGCACAACTCTCTCAACTCCGAAA TAGCCTCATCCATTGCGCATCAAAAAGCCTAGGATCCTCG GTGCG
	5	淋巴细胞脉络丛脑膜炎毒株 MP 区段 S，完整序列 (基因组区段是 RNA，SEQ ID NO: 5 中的序列针对 DNA 显示；然而，用尿苷(“U”)替换 SEQ ID NO: 5 中的全部胸苷(“T”)提供 RNA 序列)。	CGCACCGGGGATCCTAGGCTTTTTGGATTGCGCTTTCCTC AGCTCCGTCTTGTGGGAGAATGGGTCAAATTGTGACGATG TTTGAGGCTCTGCCTCACATCATTGATGAGGTCATTAACA TTGTCATTATCGTGCTTATTATCATCACGAGCATCAAAGC TGTGTACAATTTCGCCACCTGCGGGATACTTGCATTGATC AGCTTTCTTTTTCTGGCTGGCAGGTCCTGTGGAATGTATG GTCTTGATGGGCCTGACATTTACAAAGGGGTTTACCGATT CAAGTCAGTGGAGTTTGACATGTCTTACCTTAACCTGACG ATGCCCAATGCATGTTCGGCAAACAACTCCCATCATTATA TAAGTATGGGGACTTCTGGATTGGAGTTAACCTTCACAAA TGACTCCATCATCACCCACAACTTTTGTAATCTGACTTCC GCCCTCAACAAGAGGACTTTTGACCACACACTTATGAGTA TAGTCTCAAGTCTGCACCTCAGCATTAGAGGGGTCCCCAG CTACAAAGCAGTGTCCTGTGATTTTAACAATGGCATCACT ATTCAATACAACCTGTCATTTTCTAATGCACAGAGCGCTC TGAGTCAATGTAAGACCTTCAGGGGGAGAGTCCTGGATAT GTTCAGAACTGCTTTTGGAGGAAAGTACATGAGGAGTGGC TGGGGCTGGACAGGTTCAGATGGCAAGACTACTTGGTGCA GCCAGACAAACTACCAATATCTGATTATACAAAACAGGAC TTGGGAAAACCACTGCAGGTACGCAGGCCCTTTCGGAATG TCTAGAATTCTCTTCGCTCAAGAAAAGACAAGGTTTCTAA CTAGAAGGCTTGCAGGCACATTCACTTGGACTTTATCAGA CTCATCAGGAGTGGAGAATCCAGGTGGTTACTGCTTGACC AAGTGGATGATCCTCGCTGCAGAGCTCAAGTGTTTTGGGA ACACAGCTGTTGCAAAGTGCAATGTAAATCATGATGAAGA GTTCTGTGATATGCTACGACTGATTGATTACAACAAGGCT GCTTTGAGTAAATTCAAAGAAGATGTAGAATCCGCTCTAC ATCTGTTCAAGACAACAGTGAATTCTTTGATTTCTGATCA GCTTTTGATGAGAAATCACCTAAGAGACTTGATGGGAGTG CCATACTGCAATTACTCGAAATTCTGGTATCTAGAGCATG CAAAGACTGGTGAGACTAGTGTCCCCAAGTGCTGGCTTGT CAGCAATGGTTCTTATTTGAATGAAACCCATTTCAGCGAC CAAATTGAGCAGGAAGCAGATAATATGATCACAGAAATGC TGAGAAAGGACTACATAAAAAGGCAAGGGAGTACCCCTCT AGCCTTGATGGATCTATTGATGTTTTCTACATCAGCATAT TTGATCAGCATCTTTCTGCATCTTGTGAGGATACCAACAC ACAGACACATAAAGGGCGGCTCATGCCCAAAACCACATCG GTTAACCAGCAAGGGAATCTGTAGTTGTGGTGCATTTAAA GTACCAGGTGTGGAAACCACCTGGAAAAGACGCTGAACAG CAGCGCCTCCCTGACTCACCACCTCGAAAGAGGTGGTGAG TCAGGGAGGCCCAGAGGGTCTTAGAGTGTTACGACATTTG GACCTCTGAAGATTAGGTCATGTGGTAGGATATTGTGGAC

[0521]

		AGTTTTCAGGTCGGGGAGCCTTGCCTTGGAGGCGCTTTCA AAGATGATACAGTCCATGAGTGCACAGTGTGGGGTGACCT CTTTCTTTTTCTTGTCCCTCACTATTCCAGTGTGCATCTT GCATAGCCAGCCATATTTGTCCCAGACTTTGTCCTCATAT TCTCTTGAAGCTTCTTTAGTCATCTCAACATCGATGAGCT TAATGTCTCTTCTGTTTTGTGAATCTAGGAGTTTCCTGAT GTCATCAGATCCCTGACAACTTAGGACCATTCCCTGTGGA AGAGCACCTATTACTGAAGATGTCAGCCCAGGTTGTGCAT TGAAGAGGTCAGCAAGGTCCATGCCATGTGAGTATTTGGA GTCCTGCTTGAATTGTTTTTGATCAGTGGGTTCTCTATAG AAATGTATGTACTGCCCATTCTGTGGCTGAAATATTGCTA TTTCTACCGGGTCATTAAATCTGCCCTCAATGTCAATCCA TGTAGGAGCGTTAGGGTCAATACCTCCCATGAGGTCCTTC AGCAACATTGTTTGGCTGTAGCTTAAGCCCACCTGAGGTG GGCCCGCTGCCCCAGGCGCTGGTTTGGGTGAGTTGGCCAT AGGCCTCTCATTTGTCAGATCAATTGTTGTGTTCTCCCAT GCTCTCCCTACAACTGATGTTCTACAAGCTATGTATGGCC ACCCCTCCCCTGAAAGACAGACTTTGTAGAGGATGTTCTC GTAAGGATTCCTGTCTCCAACCTGATCAGAAACAAACATG TTGAGTTTCTTCTTGGCCCCAAGAACTGCTTTCAGGAGAT CCTCACTGTTGCTTGGCTTAATTAAGATGGATTCCAACAT GTTACCCCCATCTAACAAGGCTGCCCCTGCTTTCACAGCA GCACCGAGACTGAAATTGTAGCCAGATATGTTGATGCTAG ACTGCTGCTCAGTGATGACTCCCAAGACTGGGTGCTTGTC TTTCAGCCTTTCAAGGTCACTTAGGTTCGGGTACTTGACT GTGTAAAGCAGCCCAAGGTCTGTGAGTGCTTGCACAACGT CATTGAGTGAGGTTTGTGATTGTTTGGCCATACAAGCCAT TGTTAAGCTTGGCATTGTGCCGAATTGATTGTTCAGAAGT GATGAGTCCTTCACATCCCAGACCCTCACCACACCATTTG CACTCTGCTGAGGTCTCCTCATTCCAACCATTTGCAGAAT CTGAGATCTTTGGTCAAGCTGTTGTGCTGTTAAGTTCCCC ATGTAGACTCCAGAAGTTAGAGGCCTTTCAGACCTCATGA TTTTAGCCTTCAGTTTTTCAAGGTCAGCTGCAAGGGACAT CAGTTCTTCTGCACTAAGCCTCCCTACTTTTAGAACATTC TTTTTTGATGTTGACTTTAGGTCCACAAGGGAATACACAG TTTGGTTGAGGCTTCTGAGTCTCTGTAAATCTTTGTCATC CCTCTTCTCTTTCCTCATGATCCTCTGAACATTGCTCACC TCAGAGAAGTCTAATCCATTCAGAAGGCTGGTGGCATCCT TGATCACAGCAGCTTTCACATCTGATGTGAAGCCTTGAAG CTCTCTCCTCAATGCCTGGGTCCATTGAAAGCTTTTAACT TCTTTGGACAGAGACATTTTGTCACTCAGTGGATTTCCAA GTCAAATGCGCAATCAAAATGCCTAGGATCCACTGTGCG
6	LCMV 的 MP 病毒毒株 NP 蛋白的氨基酸序列	MSLSKEVKSFQWTQALRRELQGFTSDVKAAVIKDATSLLN GLDFSEVSNVQRIMRKEKRDDKDLQRLRSLNQTVYSLVDL KSTSKKNVLKVGRLSAEELMSLAADLEKLKAKIMRSERPL TSGVYMGNLTAQQLDQRSQILQMVGMRRPQQSANGVVRVW DVKDSSLLNNQFGTMPSLTMACMAKQSQTSLNDVVQALTD LGLLYTVKYPNLSDLERLKDKHPVLGVITEQQSSINISGY NFSLGAAVKAGAALLDGGNMLESILIKPSNSEDLLKAVLG AKKKLNMFVSDQVGDRNPYENILYKVCLSGEGWPYIACRT SVVGRAWENTTIDLTNERPMANSPKPAPGAAGPPQVGLSY SQTMLLKDLMGGIDPNAPTWIDIEGRFNDPVEIAIFQPQN GQYIHFYREPTDQKQFKQDSKYSHGMDLADLFNAQPGLTS SVIGALPQGMVLSCQGSDDIRKLLDSQNRRDIKLIDVEMT KEASREYEDKVWDKYGWLCKMHTGIVRDKKKKEVTPHCAL MDCIIFESASKARLPDLKTVHNILPHDLIFRGPNVVTL

[0522]

7	LCMV 的 MP 病毒毒株 GP 蛋白的氨基酸序列	MGQIVTMFEALPHIIDEVINIVIIVLIIITSIKAVYNFAT CGILALISFLFLAGRSCGMYGLDGPDIYKGVYRFKSVEFD MSYLNLTMPNACSANNSHHYISMGTSGLELTFTNDSIITH NFCNLTSALNKRTFDHTLMSIVSSLHLSIRGVPSYKAVSC DFNNGITIQYNLSFSNAQSALSQCKTFRGRVLDMFRTAFG GKYMRSGWGWTGSDGKTTWCSQTNYQYLIIQNRTWENHCR YAGPFGMSRILFAQEKTRFLTRRLAGTFTWTLSDSSGVEN PGGYCLTKWMILAAELKCFGNTAVAKCNVNHDEEFCDMLR LIDYNKAALSKFKEDVESALHLFKTTVNSLISDQLLMRNH LRDLMGVPYCNYSKFWYLEHAKTGETSVPKCWLVSNGSYL NETHFSDQIEQEADNMITEMLRKDYIKRQGSTPLALMDLL MFSTSAYLISIFLHLVRIPTHRHIKGGSCPKPHRLTSKGI CSCGAFKVPGVETTWKRR
8	LCMV 的 MP 病毒毒株 L 蛋白的氨基酸序列	MDEAISELRELCLNHIEQDERLSRQKLNFLGQREPRMVLI EGLKLLSRCIEIDSADKSGCIHNHDDKSVEAILIESGIVC PGLPLIIPDGYKLIDNSLILLECFVRSTPASFEKKFIEDT NKLACIKEDLAIAGITLVPIVDGRCDYDNSFMPEWVNFKF RDLLFKLLEYSSQDEKVFEESEYFRLCESLKTTVDKRSGI DSMKILKDARSFHNDEIMKMCHDGVNPNMNCDDVVLGINS LYSRFRRDLETGKLKRSFQKINPGNLIKEFSELYETLADS DDISALSKEAVESCPLMRFITADTHGYERGSETSTEYERL LSMLNKVKSLKLLNTRRRQLLNLDVLCLSSLIKQSKLKGS KNDKHWVGCCYGSVNDRLVSFHSTKEEFIRLLRNRRKSKA YRKVSLEDLFRTSINEFILKVQRCLSVVGLSFGHYGLSEH LEHECHIPFIEFENFMRSGTHPIMYYTKFEDYDFQPNTEQ LRNMHSLKRLSSVCLALTNSMKTSSVARLRQNQLGSVRYQ VVECKEVFCQVIKLDSEEYHLLYQKTGESSRCYSIQGPNG HLISFYADPKRFFLPIFSDEVLHNMIDTMISWIRSCPDLK DSIDDVEIALRTLLLLMLTNPTKRNQKQVQNIRYLVMAIV SDFSSTSLMDKLKEDLITPAEKVVYKLLRFLIKTVFGTGE KVLLSAKFKFMLNVSYLCHLITKETPDRLTDQIKCFEKFF EPKSEFGFFVNPKESITPEEECVFYDQMKKFTGKEVDCQR TTPGVNLEAFSMMVSSFNNGTLIFKGEKRLNSLDPMTNSG CATALDLASNKSVVVNKHLNGERLLEYDFNKLLVSAVSQI TESFMRKQKYKLNHSDYEYKVSKLVSRLVIGSKETEAGKL EGDSADICFDGEEETSFFKNLEDKVNSTIKRYERSKKTNE GENEVGFENTKGLHHLQTILSGKMAYLRKVILSEISFHLV EDFDPSCLTNDDMKFICEAIETSTELSPLYFTSAVKEQCG LDEMAKNLCRKFFSEGDWFSCMKMILLQMNANAYSGKYRH MQRQGLNFKFDWDKLEEDVRISERESNSESLSKALSLTKC MSAALKNLCFYSEESPTSYTSVGPDSGRLKFALSYKEQVG GNRELYIGDLRTKMFTRLIEDYFESFSSFFSGSCLNNDKE FENAILSMTINVREGLLNYSMDHSKWGPMMCPFLFLMLLQ NLKLGDDQYVRSGKDHISTLLTWHMHKLVEVPFPVVNAMM KSYIKSKLKLLRGSETTVTERIFREYFELGIVPSHISSLI DMGQGILHNASDFYGLISERFINYCIGVIFGERPESYTSS DDQITLFDRRLSELVDSDPEEVLVLLEFHSHLSGLLNKFI SPKSVVGRFAAEFKSRFYVWGEEVPLLTKFVSAALHNVKC KEPHQLCETIDTIADQAVANGVPVSLVNCIQKRTLDLLKY ANFPLDPFLLNTNTDVKDWLDGSRGYRIQRLIEELCPSET KVMRRLVRRLHHKLKNGEFNEEFFLDLFNRDKKEAILQLG NILGLEEDLSQLANINWLNLNELFPLRMVLRQKVVYPSVM TFQEERIPSLIKTLQNKLCSKFTRGAQKLLSEAINKSAFQ SCISSGFIGLCKTLGSRCVRNKNRDNLYIRKVLEDLAMDA HVTAIHRHDGIMLYICDRQSHPEAHCDHISLLRPLLWDYI CISLSNSFELGVWVLAEPVKGKNEGSSSLKHLNPCDYVAR KPESSRLLEDKISLNHVIQSVRRLYPKIYEDQLLPFMSDM

[0523]

		SSKNMRWSPRIKFLDLCVLIDINSESLSLISHVVKWKRDE HYTVLFSDLVNSHQRSDSSLVDEFVVSTRDVCKNFLKQVY FESFVREFVATSRTLGSFSWFPHKDMMPSEDGAEALGPFQ SFILKVVNKNMERPMFRNDLQFGFGWFSYRLGDIVCNAAM LIKQGLTNPKAFKSLRNLWDYMINNTEGVLEFSITVDFTH NQNNTDCLRKFSLIFLVKCQLQGPGVAEFLSCSHLFKGEV DRRFLDECLHLLRSDSIFKVNDGVFDIRSEEFEDYMEDPL ILGDSLELELIGSRKILDGIRSLDFERIGPEWEPVPLTVR MGALFEGRSLVQNIVVKLETKDMRVFLAELEGYGNFDDVL GSLLLHRFRTGEHLQGSEISTILQELCIDRSILLVPLSLV PDWFTFKDCRLCFSKSKNTVMYETVVGKYRLKGKSCDDWL TKSVVEEID
9	LCMV 的 MP 病毒毒株 Z 蛋白的氨基酸序列	MGQGKSKEGRDASNTSRAEILPDTTYLGPLNCKSCWQRFD SLVRCHDHYLCRHCLNLLLSVSDRCPLCKHPLPTKLKIST APSSPPPYEE
10	Junin 病毒 Candid#1 L 区段	GCGCACCGGGGATCCTAGGCGTAACTTCATCATTAAAATCTC AGATTCTGCTCTGAGTGTGACTTACTGCGAAGAGGCAGACA AATGGGCAACTGCAACGGGGCATCCAAGTCTAACCAGCCA GACTCCTCAAGAGCCACACAGCCAGCCGCAGAATTTAGGA GGGTAGCTCACAGCAGTCTATATGGTAGATATAACTGTAAGT GCTGCTGGTTTGCTGATACCAATTTGATAACCTGTAATGATC ACTACCTTTGTTTAAGGTGCCATCAGGGTATGTTAAGGAATT CAGATCTCTGCAATATCTGCTGGAAGCCCCTGCCCACCACA ATCACAGTACCGGTGGAGCCAACAGCACCACCACCATAGG CAGACTGCACAGGGTCAGACCCGACCCCCCGGGGGGCCCC CATGGGGACCCCCCGTGGGGGAACCCCGGGGGTGATGCGC CATTAGTCAATGTCTTTGATCTCGACTTTGTGCTTCAGTGGC CTGCATGTCACCCCTTTCAATCTGAACTGCCCTTGGGGATCT GATATCAGCAGGTCATTTAAAGATCTGCTGAATGCCACCTTG AAATTTGAGAATTCCAACCAGTCACCAAATTTATCAAGTGA ACGGATCAACTGCTCTTTGTGTAGATCATAAACGAGGACAA AGTCCTCTTGCTGAAATAATATTGTTTGTGATGTTGTTTTTAG ATAAGGCCATAGTTGGCTTAATAAGGTTTCCACACTATCAAT GTCCTCTAGTGCTCCAATTGCCTTGACTATGACATCCCCAGA CAACTCAACTCTATATGTTGACAACCTTTCATTACCTCTGTA AAAGATACCCTCTTTCAAGACAAGAGGTTCTCCTGGGTTAT CTGGCCCAATGAGGTCATATGCATACTTGTTACTTAGTTCAG AATAAAAGTCACCAAAGTTGAACTTAACATGGCTCAGAATA TTGTCATCATTTGTCGCAGCGTAGCCTGCATCAATAAACAAG CCAGCTAGGTCAAAGCTCTCATGGCCTGTGAACAATGGTAG GCTAGCGATAACCAGTGCACCATCCAACAATGAGTGGCTTC CCTCAGACCCAGAAACACATTGACTCATTGCATCCACATTC AGCTCTAATTCAGGGGTACCGACATCATCCACTCCTAGTGA ACTGACAATGGTGTAACTGTACACCATCTTTCTTCTAAGTTT AAATTTTGTCGAAACTCGTGTGTGTTCTACTTGAATGATCAA TTTTAGTTTCACAGCTTCTTGGCAAGCAACATTGCGCAACA CAGTGTGCAGGTCCATCATGTCTTCCTGAGGCAACAAGGAG ATGTTGTCAACAGAGACACCCTCAAGGAAAACCTTGATATT ATCAAAGCTAGAAACTACATAACCCATTGCAATGTCTTCAAC AAACATTGCTCTTGATACTTTATTATTCCTAACTGACAAGGT AAAATCTGTGAGTTCAGCTAGATCTACTTGACTGTCATCTTC TAGATCTAGAACTTCATTGAACCAAAAGAAGGATTTGAGAC ACGATGTTGACATGACTAGTGGGTTTATCATCGAAGATAAGA CAACTTGCACCATGAAGTTCCTGCAAACTTGCTGTGGGCTG ATGCCAACTTCCCAATTTGTATACTCTGACTGTCTAACATGG GCTGAAGCGCAATCACTCTGTTTCACAATATAAACATTATTA

[0524]

		TCTCTTACTTTCAATAAGTGACTTATAATCCCTAAGTTTTCAT TCATCATGTCTAGAGCCACACAGACATCTAGAAACTTGAGT CTTCCACTATCCAAAGATCTGTTCACTTGAAGATCATTCATA AAGGGTGCCAAATGTTCTTCAAATAGTTTGGGGTAATTTCTT CGTATAGAATGCAATACATGGTTCATGCCTAATTGGTCTTCTA TCTGTCGTACTGCTTTGGGTTTAACAGCCCAGAAGAAATTC TTATTACATAAGACCAGAGGGGCCTGTGGACTCTTAATAGC AGAAAACACCCACTCCCCTAACTCACAGGCATTTGTCAGCA CCAAAGAGAAGTAATCCCACAAAATTGGTTTAGAAAATTGG TTAACTTCTTTAAGTGATTTTTGACAGTAAATAACTTTAGGC TTTCTCTCACAAATTCCACAAAGACATGGCATTATTCGAGTA AATATGTCCTTTATATACAGAAATCCGCCTTTACCATCCCTAA CACACTTACTCCCCATACTCTTACAAAACCCAATGAAGCCT GAGGCAACAGAAGACTGAAATGCAGATTTGTTGATTGACTC TGCCAAGATCTTCTTCACGCCTTTTGTGAAATTTCTTGACAG CCTGGACTGTATTGTCCTTATCAATGTTGGCATCTCTTCTTTC TCTAACACTCTTCGACTTGTCATGAGTTTGGTCCTCAAGACC AACCTCAAGTCCCCAAAGCTCGCTAAATTGACCCATCTGTA GTCTAGAGTTTGTCTGATTTCATCTTCACTACACCCGGCATA TTGCAGGAATCCGGATAAAGCCTCATCCCCTCCCCTGCTTAT CAAGTTGATAAGGTTTTCCTCAAAGATTTTGCCTCTCTTAAT GTCATTGAACACTTTCCTCGCGCAGTTCCTTATAAACATTGT CTCCTTATCATCAGAAAAAATAGCTTCAATTTTCCTCTGTAG ACGGTACCCTCTAGACCCATCAACCCAGTCTTTGACATCTTG TTCTTCAATAGCTCCAAACGGAGTCTCTCTGTATCCAGAGTA TCTAATCAATTGGTTGACTCTAATGGAAATCTTTGACACTATA TGAGTGCTAACCCCATTAGCAATACATTGATCACAAATTGTG TCTATGGTCTCTGACAGTTGTGTTGGAGTTTTACACTTAACG TTGTGTAGAGCAGCAGACACAAACTTGGTGAGTAAAGGAG TCTCTTCACCCATGACAAAAAATCTTGACTTAAACTCAGCA ACAAAAGTTCCTATCACACTCTTTGGGCTGATAAACTTGTTT AATTTAGAAGATAAGAATTCATGGAAGCACACCATTTCCAG CAGTTCTGTCCTGTCTTGAAACTTTTCATCACTAAGGCAAG GAATTTTTATAAGGCTAACCTGGTCATCGCTGGAGGTATAAG TGACAGGTATCACATCATACAATAAGTCAAGTGCATAACAC AGAAATTGTTCAGTAATTAGCCCATATAAATCTGATGTGTTG TGCAAGATTCCCTGGCCCATGTCCAAGACAGACATTATATGG CTGGGGACCTGGTCCCTTGACTGCAGATACTGGTGAAAAAA CTCTTCACCAACACTAGTACAGTCACAACCCATTAAACCTA AAGATCTCTTCAATTTCCCTACACAGTAGGCTTCTGCAACAT TAATTGGAACTTCAACGACCTTATGAAGATGCCATTTGAGAA TGTTCATTACTGGTTCAAGATTCACCTTTGTTCTATCTCTGG GATTCTTCAATTCTAATGTGTACAAAAAAGAAAGGAAAAGT GCTGGGCTCATAGTTGGTCCCCATTTGGAGTGGTCATATGAA CAGGACAAGTCACCATTGTTAACAGCCATTTTCATATCACAG ATTGCACGTTCGAATTCCTTTTCTGAATTCAAGCATGTGTAT TTCATTGAACTACCCACAGCTTCTGAGAAGTCTTCAACTAA CCTGGTCATCAGCTTAGTGTTGAGGTCTCCCACATACAGTTC TCTATTTGAGCCAACCTGCTCCTTATAACTTAGTCCAAATTT CAAGTTCCCTGTATTTGAGCTGATGCTTGTGAACTCTGTAGG AGAGTCGTCTGAATAGAAACATAAATTCCGTAGGGCTGCAT TTGTAAAATAACTTTTGTCTAGCTTATCAGCAATGGCTTCAG AATTGCTTTCCCTGGTACTAAGCCGAACCTCATCCTTTAGTC TCAGAACTTCACTGGAAAAGCCCAATCTAGATCTACTTCTAT GCTCATAACTACCCAATTTCTGATCATAATGTCCTTGAATTAA AAGATACTTGAAGCATTCAAAGAATTCATCTTCTTGGTAGGC TATTGTTGTCAAATTTTTTAATAACAAACCCAAAGGGCAGAT

[0525]

		GTCCTGCGGTGCTTCAAGAAAATAAGTCAATTTAAATGGAG ATAGATAAACAGCATCACATAACTCTTTATACACATCAGACC TGAGCACATCTGGATCAAAATCCTTCACCTCATGCATTGACA CCTCTGCTTTAATCTCTCTCAACACTCCAAAAGGGGCCCAC AATGACTCAAGAGACTCTCGCTCATCAACAGATGGATTTTT TGATTTCAACTTGGTGATCTCAACTTTTGTCCCCTCACTATT AGCCATCTTGGCTAGTGTCATTTGTACGTCATTTCTAATACCC TCAAAGGCCCTTACTTGATCCTCTGTTAAACTCTCATACATC ACTGATAATTCTTCTTGATTGGTTCTGGTTCTTGAACCGGTG CTCACAAGACCTGTTAGATTTTTTAATATTAAGTAGTCCATG GAATCAGGATCAAGATTATACCTGCCTTTTGTTTTAAACCTC TCAGCCATAGTAGAAACGCATGTTGAAACAAGTTTCTCCTTA TCATAAACAGAAAGAATATTTCCAAGTTCGTCGAGCTTGGG GATTACCACACTTTTATTGCTTGACAGATCCAGAGCTGTGCT AGTGATGTTAGGCCTGTAGGGATTGCTTTTCAGTTCACCTGT AACTTTAAGTCTTCCTCTATTGAAGAGAGAAATGCAGAAGG ACAAAATCTCTTTACACACTCCTGGAATTTGAGTATCTGAGG AAGTCTTAGCCTCTTTGGAAAAGAATCTGTCCAATCCTCTTA TCATGGTGTCCTCTTGTTCCAGTGTTAGACTCCCACTTAGAG GGGGGTTTACAACAACACAATCAAACTTGACTTTGGGCTCA ATAAACTTCTCAAAACACTTTATTTGATCTGTCAGGCGATCA GGTGTCTCTTTGGTTACCAAGTGACACAGATAACTAACATTT AATAGATATTTAAACCTTCTTGCAAAGTAAAGATCTGCATCT TCCCCTTCACCCAAAATTGTCTGGAAAAGTTCCACAGCCAT CCTCTGAATCAGCACCTCTGATCCAGACATGCAGTCGACCC TTAACTTTGACATCAAATCCACATGATGGATTTGATTTGCATA TGCCATCAAGAAATATCTTAGACCTTGTAAAAATGTCTGGTT CCTTTTGGAAGGGGAACAGAGTACAGCTAACACTAACAATC TTAATATTGGCCTTGTCATTGTCATGAGTTCGTGGCTAAAAT CCAACCAGCTGGTCATTTCCTCACACATTTCAATTAACACAT CCTCCGAAAATATAGGCAGGAAAAATCTCTTTGGATCACAG TAAAAAGAGCCTTGTTCTTCCAATACCCCATTGATGGATAGA TAGATAGAATAGCACCTTGACTTCTCACCTGTTTTTTGGTAA AACAAGAGACCAAATGTATTCTTTGTCAGATGAAATCTTTGT ACATAACACTCTCTTAGTCTAACATTCCCAAAATATCTAGAA TACTCTCTTTCATTGATTAACAATCGGGAGGAAAATGATGTC TTCATCGAGTTGACCAATGCAAGGGAAATGGAGGACAAAA TCCTAAATAATTTCTTCTGCTCACCTTCCACTAAGCTGCTGA ATGGCTGATGTCTACAGATTTTCTCAAATTCCTTGTTAATAGT ATATCTCATCACTGGTCTGTCAGAAACAAGTGCCTGAGCTA AAATCATCAAGCTATCCATATCAGGGTGTTTTATTAGTTTTTC CAGCTGTGACCAGAGATCTTGATGAGAGTTCTTCAATGTTC TGGAACACGCTTGAACCCACTTGGGGCTGGTCATCAATTTC TTCCTTATTAGTTTAATCGCCTCCAGAATATCTAGAAGTCTGT CATTGACTAACATTAACATTTGTCCAACAACTATTCCCGCAT TTCTTAACCTTACAATTGCATCATCATGCGTTTTGAAAAGAT CACAAAGTAAATTGAGTAAAACTAAGTCCAGAAACAGTAA AGTGTTTCTCCTGGTGTTGAAAACTTTTAGACCTTTCACTTT GTTACACACGGAAAGGGCTTGAAGATAACACCTCTCTACAG CATCAATAGATATAGAATTCTCATCTGACTGGCTTTCCATGTT GACTTCATCTATTGGATGCAATGCGATAGAGTAGACTACATC CATCAACTTGTTTGCACAAAAAGGGCAGCTGGGCACATCAC TGTCTTTGTGGCTTCCTAATAAGATCAAGTCATTTATAAGCTT AGACTTTTGTGAAAATTTGAATTTCCCCAACTGCTTGTCAA AAATCTCCTTCTTAAACCAAAACCTTAACTTTATGAGTTCTT CTCTTATGACAGATTCTCTAATGTCTCCTCTAACCCCAACAA AGAGGGATTCATTTAACCTCTCATCATAACCCAAAGAATTCT

[0526]

		TTTTCAAGCATTCGATGTTTTCTAATCCCAAGCTCTGGTTTTT TGTGTTGGACAAACTATGGATCAATCGCTGGTATTCTTGTTC TTCAATATTAATCTCTTGCATAAATTTTGATTTCTTTAGGATG TCGATCAGCAACCACCGAACTCTTTCAACAACCCAATCAGC AAGGAATCTATTGCTGTAGCTAGATCTGCCATCAACCACAG GAACCAACGTAATCCCTGCCCTTAGTAGGTCGGACTTTAGG TTTAAGAGCTTTGACATGTCACTCTTCCATTTTCTCTCAAAC TCATCAGGATTGACCCTAACAAAGGTTTCCAATAGGATGAG TGTTTTCCCTGTGAGTTTGAAGCCATCCGGAATGACTTTTGG AAGGGTGGGACATAGTATGCCATAGTCAGACAGGATCACAT CAACAAACTTCTGATCTGAATTGATCTGACAGGCGTGTGCC TCACAGGACTCAAGCTCTACTAAACTTGACAGAAGTTTGAA CCCTTCCAACAACAGAGAGCTGGGGTGATGTTGAGATAAA AAGATGTCCCTTTGGTATGCTAGCTCCTGTCTTTCTGGAAAA TGCTTTCTAATAAGGCTTTTTATTTCATTTACTGATTCCTCCA TGCTCAAGTGCCGCCTAGGATCCTCGGTGCG
11	Junin 病毒 Candid#1 S 区段	GCGCACCGGGGATCCTAGGCGATTTTGGTTACGCTATAATTG TAACTGTTTTCTGTTTGGACAACATCAAAAACATCCATTGCA CAATGGGGCAGTTCATTAGCTTCATGCAAGAAATACCAACC TTTTTGCAGGAGGCTCTGAACATTGCTCTTGTTGCAGTCAG TCTCATTGCCATCATTAAGGGTATAGTGAACTTGTACAAAAG TGGTTTATTCCAATTCTTTGTATTCCTAGCGCTTGCAGGAAG ATCCTGCACAGAAGAAGCTTTCAAAATCGGACTGCACACTG AGTTCCAGACTGTGTCCTTCTCAATGGTGGGTCTCTTTTCCA ACAATCCACATGACCTACCTTTGTTGTGTACCTTAAACAAGA GCCATCTTTACATTAAGGGGGGCAATGCTTCATTTCAGATCA GCTTTGATGATATTGCAGTATTGTTGCCACAGTATGATGTTAT AATACAACATCCAGCAGATATGAGCTGGTGTTCCAAAAGTG ATGATCAAATTTGGTTGTCTCAGTGGTTCATGAATGCTGTGG GACATGATTGGCATCTAGACCCACCATTTCTGTGTAGGAACC GTGCAAAGACAGAAGGCTTCATCTTTCAAGTCAACACCTCC AAGACTGGTGTCAATGGAAATTATGCTAAGAAGTTTAAGAC TGGCATGCATCATTTATATAGAGAATATCCTGACCCTTGCTTG AATGGCAAACTGTGCTTAATGAAGGCACAACCTACCAGTTG GCCTCTCCAATGTCCACTCGACCACGTTAACACATTACACTT CCTTACAAGAGGTAAAAACATTCAACTTCCAAGGAGGTCCT TGAAAGCATTCTTCTCCTGGTCTTTGACAGACTCATCCGGC AAGGATACCCCTGGAGGCTATTGTCTAGAAGAGTGGATGCT CGTAGCAGCCAAAATGAAGTGTTTTGGCAATACTGCTGTAG CAAAATGCAATTTGAATCATGACTCTGAATTCTGTGACATGT TGAGGCTCTTTGATTACAACAAAAATGCTATCAAAACCCTA AATGATGAAACTAAGAAACAAGTAAATCTGATGGGGCAGA CAATCAATGCCCTGATATCTGACAATTTATTGATGAAAAACA AAATTAGGGAACTGATGAGTGTCCCTTACTGCAATTACACA AAATTTTGGTATGTCAACCACACACTTTCAGGACAACACTC ATTACCAAGGTGCTGGTTAATAAAAAACAACAGCTATTTGA ACATCTCTGACTTCCGTAATGACTGGATATTAGAAAGTGACT TCTTAATTTCTGAAATGCTAAGCAAAGAGTATTCGGACAGG CAGGGTAAAACTCCTTTGACTTTAGTTGACATCTGTATTTGG AGCACAGTATTCTTCACAGCGTCACTCTTCCTTCACTTGGTG GGTATACCCTCCCACAGACACATCAGGGGCGAAGCATGCCC TTTGCCACACAGGTTGAACAGCTTGGGTGGTTGCAGATGTG GTAAGTACCCCAATCTAAAGAAACCAACAGTTTGGCGTAGA GGACACTAAGACCTCCTGAGGGTCCCCACCAGCCCGGGCA CTGCCCGGGCTGGTGTGGCCCCCCAGTCCGCGGCCTGGCC GCGGACTGGGGAGGCACTGCTTACAGTGCATAGGCTGCCTT CGGGAGGAACAGCAAGCTCGGTGGTAATAGAGGTGTAGGT

[0527]

		TCCTCCTCATAGAGCTTCCCATCTAGCACTGACTGAAACATT ATGCAGTCTAGCAGAGCACAGTGTGGTTCACTGGAGGCCA ACTTGAAGGGAGTATCCTTTTCCCTCTTTTTCTTATTGACAA CCACTCCATTGTGATATTTGCATAAGTGACCATATTTCTCCCA GACCTGTTGATCAAACTGCCTGGCTTGTTCAGATGTGAGCT TAACATCAACCAGTTTAAGATCTCTTCTTCCATGGAGGTCAA ACAACTTCCTGATGTCATCGGATCCTTGAGTAGTCACAACCA TGTCTGGAGGCAGCAAGCCGATCACGTAACTAAGAACTCCT GGCATTGCATCTTCTATGTCCTTCATTAAGATGCCGTGAGAG TGTCTGCTACCATTTTTAAACCCTTTCTCATCATGTGGTTTTC TGAAGCAGTGAATGTACTGCTTACCTGCAGGTTGGAATAAT GCCATCTCAACAGGGTCAGTGGCTGGTCCTTCAATGTCGAG CCAAAGGGTGTTGGTGGGGTCGAGTTTCCCCACTGCCTCTC TGATGACAGCTTCTTGTATCTCTGTCAAGTTAGCCAATCTCA AATTCTGACCGTTTTTTTCCGGCTGTCTAGGACCAGCAACT GGTTTCCTTGTCAGATCAATACTTGTGTTGTCCCATGACCTG CCTGTGATTTGTGATCTAGAACCAATATAAGGCCAACCATCG CCAGAAAGACAAAGTTTGTACAAAAGGTTTTCATAAGGATT TCTATTGCCTGGTTTCTCATCAATAAACATGCCTTCTCTTCGT TTAACCTGAATGGTTGATTTTATGAGGGAAGAGAAGTTTTCT GGGGTGACTCTGATTGTTTCCAACATGTTTCCACCATCAAG AATAGATGCTCCAGCCTTTACTGCAGCTGAAAGACTGAAGT TGTAACCAGAAATATTGATGGAGCTTTCATCTTTAGTCACAA TCTGAAGGCAGTCATGTTCCTGAGTCAGTCTGTCAAGGTCA CTTAAGTTTGGATACTTCACAGTGTATAGAAGCCCAAGTGA GGTTAAAGCTTGTATGACACTGTTCATTGTCTCACCTCCTTG AACAGTCATGCATGCAATTGTCAATGCAGGAACAGAGCCAA ACTGATTGTTTAGCTTTGAAGGGTCTTTAACATCCCATATCC TCACCACACCATTTCCCCCAGTCCCTTGCTGTTGAAATCCCA GTGTTCTCAATATCTCTGATCTTTTAGCAAGTTGTGACTGGG ACAAGTTACCCATGTAAACCCCCTGAGAGCCTGTCTCTGCT CTTCTTATCTTGTTTTTTAATTTCTCAAGGTCAGACGCCAAC TCCATCAGTTCATCCCTCCCCAGATCTCCCACCTTGAAAACT GTGTTTCGTTGAACACTCCTCATGGACATGAGTCTGTCAAC CTCTTTATTCAGGTCCCTCAACTTGTTGAGGTCTTCTTCCCC CTTTTTAGTCTTTCTGAGTGCCCGCTGCACCTGTGCCACTTG GTTGAAGTCGATGCTGTCAGCAATTAGCTTGGCGTCCTTCA AAACATCTGACTTGACAGTCTGAGTGAATTGGCTCAAACCT CTCCTTAAGGACTGAGTCCATCTAAAGCTTGGAACCTCCTT GGAGTGTGCCATGCCAGAAGTTCTGGTGATTTTGATCTAGA ATAGAGTTGCTCAGTGAAAGTGTTAGACACTATGCCTAGGA TCCACTGTGCG
12	LCMV 的 Clone 13 毒株 NP 蛋白的氨基酸序列 (GenBank 登记号. ABC96002.1 ; GI:86440166)	MSLSKEVKSFQWTQALRRELQSFTSDVKAAVIKDATNLLNGL DFSEVSNVQRIMRKEKRDDKDLQRLRSLNQTVHSLVDLKSTS KKNVLKVGRLSAEELMSLAADLEKLKAKIMRSERPQASGVY MGNLTTQQLDQRSQILQIVGMRKPQQGASGVVRVWDVKDSS LLNNQFGTMPSLTMACMAKQSQTPLNDVVQALTDLGLLYTV KYPNLNDLERLKDKHPVLGVITEQQSSINISGYNFSLGAAVKA GAALLDGGNMLESILIKPSNSEDLLKAVLGAKRKLNMFVSDQ VGDRNPYENILYKVCLSGEGWPYIACRTSIVGRAWENTTIDLT SEKPAVNSPRPAPGAAGPPQVGLSYSQTMLLKDLMGGIDPNA PTWIDIEGRFNDPVEIAIFQPQNGQFIHFYREPVDQKQFKQDSK YSHGMDLADLFNAQPGLTSSVIGALPQGMVLSCQGSDDIRKL LDSQNRKDIKLIDVEMTREASREYEDKVWDKYGWLCKMHT GIVRDKKKKEITPHCALMDCIIFESASKARLPDLKTVHNILPHD LIFRGPNVVTL

[0528]

13	LCMV 的 Clone 13 毒株 GP 蛋白的氨基酸序列 (GenBank 登记号。ABC96001.2 ; GI:116563462)	MGQIVTMFEALPHIIDEVINIVIIVLIVITGIKAVYNFATCGIFALI SFLLLAGRSCGMYGLKGPDIYKGVYQFKSVEFDMSHLNLTMP NACSANNSHHYISMGTSGLELTFTNDSIISHNFCNLTSAFNKKT FDHTLMSIVSSLHLSIRGNSNYKAVSCDFNNGITIQYNLTFSDA QSAQSQCRTFRGRVLDMFRTAFGGKYMRSGWGWTGSDGKT TWCSQTSYQYLIIQNRTWENHCTYAGPFGMSRILLSQEKTKFL TRRLAGTFTWTLSDSSGVENPGGYCLTKWMILAAELKCFGNT AVAKCNVNHDEEFCDMLRLIDYNKAALSKFKEDVESALHLFK TTVNSLISDQLLMRNHLRDLMGVPYCNYSKFWYLEHAKTGE TSVPKCWLVTNGSYLNETHFSDQIEQEADNMITEMLRKDYIK RQGSTPLALMDLLMFSTSAYLVSIFLHLVKIPTHRHIKGGSCPK PHRLTNKGICSCGAFKVPGVKTVWKRR
14	LCMV 的 Clone 13 毒株 L 蛋白的氨基酸序列 (GenBank 登记号。ABC96004.1 ; GI:86440169)	MDEIISELRELCLNYIEQDERLSRQKLNFLGQREPRMVLIEGLK LLSRCIEIDSADKSGCTHNHDDKSVETILVESGIVCPGLPLIIPD GYKLIDNSLILLECFVRSTPASFEKKFIEDTNKLACIREDLAVAG VTLVPIVDGRCDYDNSFMPEWANFKFRDLLFKLLEYSNQNEK VFEESEYFRLCESLKTTIDKRSGMDSMKILKDARSTHNDEIMR MCHEGINPNMSCDDVVFGINSLFSRFRRDLESGKLKRNFQKV NPEGLIKEFSELYENLADSDDILTLSREAVESCPLMRFITAETHG HERGSETSTEYERLLSMLNKVKSLKLLNTRRRQLLNLDVLCL SSLIKQSKFKGLKNDKHWVGCCYSSVNDRLVSFHSTKEEFIRL LRNRKKSKVFRKVSFEELFRASISEFIAKIQKCLLVVGLSFEHY GLSEHLEQECHIPFTEFENFMKIGAHPIMYYTKFEDYNFQPSTE QLKNIQSLRRLSSVCLALTNSMKTSSVARLRQNQIGSVRYQVV ECKEVFCQVIKLDSEEYHLLYQKTGESSRCYSIQGPDGHLISFY ADPKRFFLPIFSDEVLYNMIDIMISWIRSCPDLKDCLTDIEVALR TLLLLMLTNPTKRNQKQVQSVRYLVMAIVSDFSSTSLMDKLR EDLITPAEKVVYKLLRFLIKTIFGTGEKVLLSAKFKFMLNVSYL CHLITKETPDRLTDQIKCFEKFFEPKSQFGFFVNPKEAITPEEEC VFYEQMKRFTSKEIDCQHTTPGVNLEAFSLMVSSFNNGTLIFK GEKKLNSLDPMTNSGCATALDLASNKSVVVNKHLNGERLLE YDFNKLLVSAVSQITESFVRKQKYKLSHSDYEYKVSKLVSRLV IGSKGEETGRSEDNLAEICFDGEEETSFFKSLEEKVNTTIARYR RGRRANDKGDGEKLTNTKGLHHLQLILTGKMAHLRKVILSEI SFHLVEDFDPSCLTNDDMKFICEAVEGSTELSPLYFTSVIKDQC GLDEMAKNLCRKFFSENDWFSCMKMILLQMNANAYSGKYR HMQRQGLNFKFDWDKLEEDVRISERESNSESLSKALSLTQCM SAALKNLCFYSEESPTSYTSVGPDSGRLKFALSYKEQVGGNRE LYIGDLRTKMFTRLIEDYFESFSSFFSGSCLNNDKEFENAILSM TINVREGFLNYSMDHSKWGPMMCPFLFLMFLQNLKLGDDQY VRSGKDHVSTLLTWHMHKLVEVPFPVVNAMMKSYVKSKLK LLRGSETTVTERIFRQYFEMGIVPSHISSLIDMGQGILHNASDF YGLLSERFINYCIGVIFGERPEAYTSSDDQITLFDRRLSDLVVSD PEEVLVLLEFQSHLSGLLNKFISPKSVAGRFAAEFKSRFYVWG EEVPLLTKFVSAALHNVKCKEPHQLCETIDTIADQAIANGVPV SLVNSIQRRTLDLLKYANFPLDPFLLNTNTDVKDWLDGSRGY RIQRLIEELCPNETKVVRKLVRKLHHKLKNGEFNEEFFLDLFN RDKKEAILQLGDLLGLEEDLNQLADVNWLNLNEMFPLRMVL RQKVVYPSVMTFQEERIPSLIKTLQNKLCSKFTRGAQKLLSEA INKSAFQSCISSGFIGLCKTLGSRCVRNKNRENLYIKKLLEDLT TDDHVTRVCNRDGITLYICDKQSHPEAHRDHICLLRPLLWDYI CISLSNSFELGVWVLAEPTKGKNNSENLTLKHLNPCDYVARK PESSRLLEDKVNLNQVIQSVRRLYPKIFEDQLLPFMSDMSSKN MRWSPRIKFLDLCVLIDINSESLSLISHVVKWKRDEHYTVLFS DLANSHQRSDSSLVDEFVVSTRDVCKNFLKQVYFESFVREFVA TTRTLGNFSWFPHKEMMPSEDGAEALGPFQSFVSKVVNKNV ERPMFRNDLQFGFGWFSYRMGDVVCNAAMLIRQGLTNPKAF

[0529]

		KSLKDLWDYMLNYTKGVLEFSISVDFTHNQNNTDCLRKFSLI FLVRCQLQNPGVAELLSCSHLFKGEIDRRMLDECLHLLRTDSV FKVNDGVFDIRSEEFEDYMEDPLILGDSLELELLGSKRILDGIR SIDFERVGPEWEPVPLTVKMGALFEGRNLVQNIIVKLETKDMK VFLAGLEGYEKISDVLGNLFLHRFRTGEHLLGSEISVILQELCI DRSILLIPLSLLPDWFAFKDCRLCFSKSRSTLMYETVGGRFRLK GRSCDDWLGGSVAEDID
15	LCMV 的 Clone 13 毒株 Z 蛋白的氨基酸序列 (GenBank 登记号。ABC96003.1 ; GI:86440168)	MGQGKSREEKGTNSTNRAEILPDTTYLGPLSCKSCWQKFDSL VRCHDHYLCRHCLNLLLSVSDRCPLCKYPLPTRLKISTAPSSPP PYEE
16	LCMV 的 WE 病毒毒株 GP 蛋白的氨基酸序列	MGQIVTMFEALPHIIDEVINIVIIVLIIITSIKAVYNFATCGILALV SFLFLAGRSCGMYGLNGPDIYKGVYQFKSVEFDMSHLNLTMP NACSANNSHHYISMGSSGLELTFTNDSILNHNFCNLTSAFNKK TFDHTLMSIVSSLHLSIRGNSNHKAVSCDFNNGITIQYNLSFSD PQSAISQCRTFRGRVLDMFRTAFGGKYMRSGWGWAGSDGKT TWCSQTSYQYLIIQNRTWENHCRYAGPFGMSRILFAQEKTKFL TRRLAGTFTWTLSDSSGVENPGGYCLTKWMILAAELKCFGNT AVAKCNVNHDEEFCDMLRLIDYNKAALSKFKQDVESALHVF KTTVNSLISDQLLMRNHLRDLMGVPYCNYSKFWYLEHAKTG ETSVPKCWLVTNGSYLNETHFSDQIEQEADNMITEMLRKDYI KRQGSTPLALMDLLMFSTSAYLISIFLHLVKIPTHRHIKGGSCP KPHRLTNKGICSCGAFKVPGVKTIWKRR
17	WE 特异性引物	5’AATCGTCTCTAAGGATGGGTCAGATTGTGACAATG-3’
18	携带与 WET 特异性引物互补的突出端的 WE 特异性融合引物	5’AATCGTCTCTAAGGATGGGTCAGATTGTGACAATG-3’
19	WE 特异性引物	5’CTCGGTGATCATGTTATCTGCTTCTTGTTCGATTTGA-3’
20	与 WE 序列互补的 WE 特异性融合引物	5’AATCGTCTCTTTCTTTATCTCCTCTTCCAGATGG-3’
21	对 LCMV NP 有特异性的引物	5’-GGCTCCCAGATCTGAAAACTGTT-3’
22	NP 特异性引物和 GP 特异性引物；NP 特异性：与在 RT 反应中的相同，GP 特异性：5’	5’-GCTGGCTTGTCACTAATGGCTC-3’

[0001] 序列表

[0002] <110> 霍欧奇帕生物科技股份公司

[0003] <120> 作为癌症疫苗的沙粒病毒颗粒

[0004] <130> 13194-017-228

[0005] <140> TBA

[0006] <141> On even date herewith

[0007] <150> 62/254,654

[0008] <151> 2015-11-12

[0009] <150> 62/254,651

[0010] <151> 2015-11-12

[0011] <160> 22

[0012] <170> PatentIn version 3.5

[0013] <210> 1

[0014] <211> 7229

[0015] <212> DNA

[0016] <213> 人工序列

[0017] <220>

[0018] <223> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV) clone 13 区段 L

[0019] (GenBank: DQ361066.1)

[0020] <400> 1

[0021] gcgcaccggg gatcctaggc gtttagttgc gctgtttggt tgcacaactt tcttcgtgag 60

[0022] gctgtcagaa gtggacctgg ctgatagcga tgggtcaagg caagtccaga gaggagaaag 120

[0023] gcaccaatag tacaaacagg gccgaaatcc taccagatac cacctatctt ggccctttaa 180

[0024] gctgcaaatc ttgctggcag aaatttgaca gcttggtaag atgccatgac cactaccttt 240

[0025] gcaggcactg tttaaacctt ctgctgtcag tatccgacag gtgtcctctt tgtaaatatc 300

[0026] cattaccaac cagattgaag atatcaacag ccccaagctc tccacctccc tacgaagagt 360

[0027] aacaccgtcc ggccccggcc ccgacaaaca gcccagcaca agggaaccgc acgtcaccca 420

[0028] acgcacacag acacagcacc caacacagaa cacgcacaca cacacacaca cacacccaca 480

[0029] cgcacgcgcc cccaccaccg gggggcgccc ccccccgggg ggcggccccc cgggagcccg 540

[0030] ggcggagccc cacggagatg cccatcagtc gatgtcctcg gccaccgacc cgcccagcca 600

[0031] atcgtcgcag gacctcccct tgagtctaaa cctgcccccc actgtttcat acatcaaagt 660

[0032] gctcctagat ttgctaaaac aaagtctgca atccttaaag gcgaaccagt ctggcaaaag 720

[0033] cgacagtgga atcagcagaa tagatctgtc tatacatagt tcctggagga ttacacttat 780

[0034] ctctgaaccc aacaaatgtt caccagttct gaatcgatgc aggaagaggt tcccaaggac 840

[0035] atcactaatc ttttcatagc cctcaagtcc tgctagaaag actttcatgt ccttggtctc 900

[0036] cagcttcaca atgatatttt ggacaaggtt tcttccttca aaaagggcac ccatctttac 960

[0037] agtcagtggc acaggctccc actcaggtcc aactctctca aagtcaatag atctaatccc 1020

[0038] atccagtatt cttttggagc ccaacaactc aagctcaaga gaatcaccaa gtatcaaggg 1080

[0039] atcttccatg taatcctcaa actcttcaga tctgatatca aagacaccat cgttcacctt 1140

[0040] gaagacagag tctgtcctca gtaagtggag gcattcatcc aacattcttc tatctatctc 1200

[0041] acccttaaag aggtgagagc atgataaaag ttcagccaca cctggattct gtaattggca 1260

[0042] cctaaccaag aatatcaatg aaaatttcct taaacagtca gtattattct gattgtgcgt 1320

[0043] aaagtccact gaaattgaaa actccaatac ccctttgtg tagttgagca tgtagtccca 1380

[0044] cagatccttt aaggatttaa atgcctttgg gtttgtcagg ccctgcctaa tcaacatggc 1440

[0045] agcattacac acaacatctc ccattcggta agagaaccac ccaaaaccaa actgcaaatc 1500

[0046] attcctaaac ataggcctct ccacattttt gttcaccacc tttgagacaa atgattgaaa 1560

[0047] ggggcccagt gcctcagcac catcttcaga tggcatcatt tctttatgag ggaaccatga 1620

[0048] aaaattgcct aatgtcctgg ttgttgcaac aaattctcga acaaatgatt caaaatacac 1680

[0049] ctgttttaag aagttcttgc agacatccct cgtgctaaca acaaattcat caaccagact 1740

[0050] ggagtcagat cgctgatgag aattggcaag gtcagaaaac agaacagtgt aatgttcatc 1800

[0051] ccttttccac ttaacaacat gagaaatgag tgacaaggat tctgagttaa tatcaattaa 1860

[0052] aacacagagg tcaaggaatt taattctggg actccacctc atgtttttg agctcatgtc 1920

[0053] agacataaat ggaagaagct gatcctcaaa gatcttggga tatagccgcc tcacagattg 1980

[0054] aatcacttgg ttcaaattca ctttgtcctc cagtagcctt gagctctcag gctttcttgc 2040

[0055] tacataatca catgggttta agtgcttaag agttaggttc tcactgttat tcttcccttt 2100

[0056] ggtcggttct gctaggaccc aaacacccaa ctcaaaagag ttgctcaatg aaatacaaat 2160

[0057] gtagtcccaa agaagaggcc ttaaaaggca tatatgatca cggtgggctt ctggatgaga 2220

[0058] ctgtttgtca caaatgtaca gcgttatacc atcccgattg caaactcttg tcacatgatc 2280

[0059] atctgtggtt agatcctcaa gcagcttttt gatatacaga ttttccctat ttttgtttct 2340

[0060] cacacacctg cttcctagag ttttgcaaag gcctataaag ccagatgaga tacaactctg 2400

[0061] gaaagctgac ttgttgattg cttctgacag cagcttctgt gcacccctg tgaatttact 2460

[0062] acaaagtttg ttctggagtg tcttgatcaa tgatgggatt ctttcctctt ggaaagtcat 2520

[0063] cactgatgga taaaccacct tttgtcttaa aaccatcctt aatgggaaca tttcattcaa 2580

[0064] attcaaccag ttaacatctg ctaactgatt cagatcttct tcaagaccga ggaggtctcc 2640

[0065] caattgaaga atggcctcct ttttatctct gttaaatagg tctaagaaaa attcttcatt 2700

[0066] aaattcacca tttttgagct tatgatgcag tttccttaca agctttctta caacctttgt 2760

[0067] ttcattagga cacagttcct caatgagtct ttgtattctg taacctctag aaccatccag 2820

[0068] ccaatctttc acatcagtgt tggtattcag tagaaatgga tccaaaggga aattggcata 2880

[0069] ctttaggagg tccagtgttc tcctttggat actattaact agggagactg ggacgccatt 2940

[0070] tgcgatggct tgatctgcaa ttgtatctat tgtttcacaa agttgatgtg gctctttaca 3000

[0071] cttgacattg tgtagcgctg cagatacaaa ctttgtgaga agagggactt cctcccccca 3060

[0072] tacatagaat ctagatttaa attctgcagc gaacctccca gccacacttt ttgggctgat 3120

[0073] aaatttgttt aacaagccgc tcagatgaga ttggaattcc aacaggacaa ggacttcctc 3180

[0074] cggatcactt acaaccaggt cactcagcct cctatcaaat aaagtgatct gatcatcact 3240

[0075] tgatgtgtaa gcctctggtc tttcgccaaa gataacacca atgcagtagt tgatgaacct 3300

[0076] ctcgctaagc aaaccataga agtcagaagc attatgcaag attccctgcc ccatatcaat 3360

[0077] aaggctggat atatgggatg gcactatccc catttcaaaa tattgtctga aaattctctc 3420

[0078] agtaacagtt gtttctgaac ccctgagaag ttttagcttc gacttgacat atgatttcat 3480

[0079] cattgcattc acaacaggaa aggggacctc gacaagctta tgcatgtgcc aagttaacaa 3540

[0080] agtgctaaca tgatctttcc cggaacgcac atactggtca tcacctagtt tgagattttg 3600

[0081] tagaaacatt aagaacaaaa atgggcacat cattggtccc catttgctgt gatccatact 3660

[0082] atagtttaag aacccttccc gcacattgat agtcattgac aagattgcat tttcaaattc 3720

[0083] cttatcattg tttaaacagg agcctgaaaa gaaacttgaa aaagactcaa aataatcttc 3780

[0084] tattaacctt gtgaacattt ttgtcctcaa atctccaata tagagttctc tatttccccc 3840

[0085] aacctgctct ttataagata gtgcaaattt cagccttcca gagtcaggac ctactgaggt 3900

[0086] gtatgatgtt ggtgattctt ctgagtagaa gcacagattt ttcaaagcag cactcataca 3960

[0087] ttgtgtcaac gacagagctt tactaaggga ctcagaatta ctttccctct cactgattct 4020

[0088] cacgtcttct tccagtttgt cccagtcaaa tttgaaattc aagccttgcc tttgcatatg 4080

[0089] cctgtatttc cctgagtacg catttgcatt catttgcaac agaatcatct tcatgcaaga 4140

[0090] aaaccaatca ttctcagaaa agaactttct acaaaggttt tttgccatct catcgaggcc 4200

[0091] acactgatct ttaatgactg aggtgaaata caaaggtgac agctctgtgg aaccctcaac 4260

[0092] agcctcacag ataaatttca tgtcatcatt ggttagacat gatgggtcaa agtcttctac 4320

[0093] taaatggaaa gatatttctg acaagataac ttttcttaag tgagccatct tccctgttag 4380

[0094] aataagctgt aaatgatgta gtccttttgt atttgtaagt ttttctccat ctcctttgtc 4440

[0095] attggccctc ctacctcttc tgtaccgtgc tattgtggtg ttgacctttt cttcgagact 4500

[0096] tttgaagaag cttgtctctt cttctccatc aaaacatatt tctgccaggt tgtcttccga 4560

[0097] tctccctgtc tcttctccct tggaaccgat gaccaatcta gagactaact tggaaacttt 4620

[0098] atattcatag tctgagtggc tcaacttata cttttgtttt cttacgaaac tctccgtaat 4680

[0099] ttgactcaca gcactaacaa gcaatttgtt aaagtcatat tccagaagtc gttctccatt 4740

[0100] tagatgctta ttaaccacca cacttttgtt actagcaaga tctaatgctg tcgcacatcc 4800

[0101] agagttagtc atgggatcta ggctgtttag cttcttctct cctttgaaaa ttaaagtgcc 4860

[0102] gttgttaaat gaagacacca ttaggctaaa ggcttccaga ttaacacctg gagttgtatg 4920

[0103] ctgacagtca atttctttac tagtgaatct cttcatttgc tcatagaaca cacattcttc 4980

[0104] ctcaggagtg attgcttcct tggggttgac aaaaaaacca aattgacttt tgggctcaaa 5040

[0105] gaacttttca aaacatttta tctgatctgt tagcctgtca ggggtctcct ttgtgatcaa 5100

[0106] atgacacagg tatgacacat tcaacataaa tttaaatttt gcactcaaca acaccttctc 5160

[0107] accagtacca aaaatagttt ttattaggaa tctaagcagc ttatacacca ccttctcagc 5220

[0108] aggtgtgatc agatcctccc tcaacttatc cattaatgat gtagatgaaa aatctgacac 5280

[0109] tattgccatc accaaatatc tgacactctg tacctgcttt tgatttctct ttgttgggtt 5340

[0110] ggtgagcatt agcaacaata gggtcctcag tgcaacctca atgtcggtga gacagtcttt 5400

[0111] caaatcagga catgatctaa tccatgaaat catgatgtct atcatattgt ataagacctc 5460

[0112] atctgaaaaa attggtaaaa agaacctttt aggatctgca tagaaggaaa ttaaatgacc 5520

[0113] atccgggcct tgtatggagt agcaccttga agattctcca gtcttctggt ataataggtg 5580

[0114] gtattcttca gagtccagtt ttattacttg gcaaaacact tctttgcatt ctaccacttg 5640

[0115] atatctcaca gaccctattt gattttgcct tagtctagca actgagctag ttttcatact 5700

[0116] gtttgttaag gccagacaaa cagatgataa tcttctcagg ctctgtatgt tcttcagctg 5760

[0117] ctctgtgctg ggttggaaat tgtaatcttc aaacttcgta taatacatta tcgggtgagc 5820

[0118] tccaattttc ataaagttct caaattcagt gaatggtatg tggcattctt gctcaaggtg 5880

[0119] ttcagacagt ccgtaatgct cgaaactcag tcccaccact aacaggcatt tttgaatttt 5940

[0120] tgcaatgaac tcactaatag atgccctaaa caattcctca aaagacacct ttctaaacac 6000

[0121] ctttgacttt tttctattcc tcaaaagtct aatgaactcc tctttagtgc tgtgaaagct 6060

[0122] taccagccta tcattcacac tactatagca acaacccacc cagtgtttat catttttaa 6120

[0123] ccctttgaat ttcgactgtt ttatcaatga ggaaagacac aaaacatcca gatttaacaa 6180

[0124] ctgtctcctt ctagtattca acagtttcaa actcttgact ttgtttaaca tagagaggag 6240

[0125] cctctcatat tcagtgctag tctcacttcc cctttcgtgc ccatgggtct ctgcagttat 6300

[0126] gaatctcatc aaaggacagg attcgactgc ctccctgctt aatgttaaga tatcatcact 6360

[0127] atcagcaagg ttttcataga gctcagagaa ttccttgatc aagccttcag ggtttacttt 6420

[0128] ctgaaagttt ctctttaatt tcccactttc taaatctctt ctaaacctgc tgaaaagaga 6480

[0129] gtttattcca aaaaccacat catcacagct catgttgggg ttgatgcctt cgtggcacat 6540

[0130] cctcataatt tcatcattgt gagttgacct cgcatctttc agaattttca tagagtccat 6600

[0131] accggagcgc ttgtcgatag tagtcttcag ggactcacag agtctaaaat attcagactc 6660

[0132] ttcaaagact ttctcatttt ggttagaata ctccaaaagt ttgaataaaa ggtctctaaa 6720

[0133] tttgaagttt gcccactctg gcataaaact attatcataa tcacaacgac catctactat 6780

[0134] tggaactaat gtgacacccg caacagcaag gtcttccctg atgcatgcca atttgttagt 6840

[0135] gtcctctata aatttcttct caaaactggc tggagtgctc ctaacaaaac actcaagaag 6900

[0136] aatgagagaa ttgtctatca gcttgtaacc atcaggaatg ataagtggta gtcctgggca 6960

[0137] tacaattcca gactccacca aaattgtttc cacagactta tcgtcgtggt tgtgtgtgca 7020

[0138] gccactcttg tctgcactgt ctatttcaat gcagcgtgac agcaacttga gtccctcaat 7080

[0139] cagaaccatt ctgggttccc tttgtcccag aaagttgagt ttctgccttg acaacctctc 7140

[0140] atcctgttct atatagttta aacataactc tctcaattct gagatgattt catccattgc 7200

[0141] gcatcaaaaa gcctaggatc ctcggtgcg 7229

[0142] <210> 2

[0143] <211> 3376

[0144] <212> DNA

[0145] <213> 人工序列

[0146] <220>

[0147] <223> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV) 区段 S

[0148] <400> 2

[0149] cgcaccgggg atcctaggct ttttggattg cgctttcctc tagatcaact gggtgtcagg 60

[0150] ccctatccta cagaaggatg ggtcagattg tgacaatgtt tgaggctctg cctcacatca 120

[0151] tcgatgaggt gatcaacatt gtcattattg tgcttatcgt gatcacgggt atcaaggctg 180

[0152] tctacaattt tgccacctgt gggatattcg cattgatcag tttcctactt ctggctggca 240

[0153] ggtcctgtgg catgtacggt cttaagggac ccgacattta caaaggagtt taccaattta 300

[0154] agtcagtgga gtttgatatg tcacatctga acctgaccat gcccaacgca tgttcagcca 360

[0155] acaactccca ccattacatc agtatgggga cttctggact agaattgacc ttcaccaatg 420

[0156] attccatcat cagtcacaac ttttgcaatc tgacctctgc cttcaacaaa aagacctttg 480

[0157] accacacact catgagtata gtttcgagcc tacacctcag tatcagaggg aactccaact 540

[0158] ataaggcagt atcctgcgac ttcaacaatg gcataaccat ccaatacaac ttgacattct 600

[0159] cagatcgaca aagtgctcag agccagtgta gaaccttcag aggtagagtc ctagatatgt 660

[0160] ttagaactgc cttcgggggg aaatacatga ggagtggctg gggctggaca ggctcagatg 720

[0161] gcaagaccac ctggtgtagc cagacgagtt accaatacct gattatacaa aatagaacct 780

[0162] gggaaaacca ctgcacatat gcaggtcctt ttgggatgtc caggattctc ctttcccaag 840

[0163] agaagactaa gttcttcact aggagactag cgggcacatt cacctggact ttgtcagact 900

[0164] cttcaggggt ggagaatcca ggtggttatt gcctgaccaa atggatgatt cttgctgcag 960

[0165] agcttaagtg tttcgggaac acagcagttg cgaaatgcaa tgtaaatcat gatgccgaat 1020

[0166] tctgtgacat gctgcgacta attgactaca acaaggctgc tttgagtaag ttcaaagagg 1080

[0167] acgtagaatc tgccttgcac ttattcaaaa caacagtgaa ttctttgatt tcagatcaac 1140

[0168] tactgatgag gaaccacttg agagatctga tgggggtgcc atattgcaat tactcaaagt 1200

[0169] tttggtacct agaacatgca aagaccggcg aaactagtgt ccccaagtgc tggcttgtca 1260

[0170] ccaatggttc ttacttaaat gagacccact tcagtgatca aatcgaacag gaagccgata 1320

[0171] acatgattac agagatgttg aggaaggatt acataaagag gcaggggagt acccccctag 1380

[0172] cattgatgga ccttctgatg ttttccacat ctgcatatct agtcagcatc ttcctgcacc 1440

[0173] ttgtcaaaat accaacacac aggcacataa aaggtggctc atgtccaaag ccacaccgat 1500

[0174] taaccaacaa aggaatttgt agttgtggtg catttaaggt gcctggtgta aaaaccgtct 1560

[0175] ggaaaagacg ctgaagaaca gcgcctccct gactctccac ctcgaaagag gtggagagtc 1620

[0176] agggaggccc agagggtctt agagtgtcac aacatttggg cctctaaaaa ttaggtcatg 1680

[0177] tggcagaatg ttgtgaacag ttttcagatc tgggagcctt gctttggagg cgctttcaaa 1740

[0178] aatgatgcag tccatgagtg cacagtgcgg ggtgatctct ttcttctttt tgtcccttac 1800

[0179] tattccagta tgcatcttac acaaccagcc atatttgtcc cacactttgt cttcatactc 1860

[0180] cctcgaagct tccctggtca tttcaacatc gataagctta atgtccttcc tattctgtga 1920

[0181] gtccagaagc tttctgatgt catcggagcc ttgacagctt agaaccatcc cctgcggaag 1980

[0182] agcacctata actgacgagg tcaacccggg ttgcgcattg aagaggtcgg caagatccat 2040

[0183] gccgtgtgag tacttggaat cttgcttgaa ttgtttttga tcaacgggtt ccctgtaaaa 2100

[0184] gtgtatgaac tgcccgttct gtggttggaa aattgctatt tccactggat cattaaatct 2160

[0185] accctcaatg tcaatccatg taggagcgtt ggggtcaatt cctcccatga ggtcttttaa 2220

[0186] aagcattgtc tggctgtagc ttaagcccac ctgaggtgga cctgctgctc caggcgctgg 2280

[0187] cctgggtgaa ttgactgcag gtttctcgct tgtgagatca attgttgtgt tttcccatgc 2340

[0188] tctccccaca atcgatgttc tacaagctat gtatggccat ccttcacctg aaaggcaaac 2400

[0189] tttatagagg atgttttcat aagggttcct gtccccaact tggtctgaaa caaacatgtt 2460

[0190] gagttttctc ttggccccga gaactgcctt caagaggtcc tcgctgttgc ttggcttgat 2520

[0191] caaaattgac tctaacatgt tacccccatc caacagggct gcccctgcct tcacggcagc 2580

[0192] accaagacta aagttatagc cagaaatgtt gatgctggac tgctgttcag tgatgacccc 2640

[0193] cagaactggg tgcttgtctt tcagcctttc aagatcatta agatttggat acttgactgt 2700

[0194] gtaaagcaag ccaaggtctg tgagcgcttg tacaacgtca ttgagcggag tctgtgactg 2760

[0195] tttggccata caagccatag ttagacttgg cattgtgcca aattgattgt tcaaaagtga 2820

[0196] tgagtctttc acatcccaaa ctcttaccac accacttgca ccctgctgag gctttctcat 2880

[0197] cccaactatc tgtaggatct gagatctttg gtctagttgc tgtgttgtta agttccccat 2940

[0198] atataccccт gaagcctggg gcctttcaga cctcatgatc ttggccttca gcttctcaag 3000

[0199] gtcagccgca agagacatca gttcttctgc actgagcctc cccactttca aaacattctt 3060

[0200] ctttgatgtt gactttaaat ccacaagaga atgtacagtc tggttgagac ttctgagtct 3120

[0201] ctgtaggtct ttgtcatctc tcttttcctt cctcatgatc ctctgaacat tgctgacctc 3180

[0202] agagaagtcc aacccattca gaaggttggt tgcatcctta atgacagcag ccttcacatc 3240

[0203] tgatgtgaag ctctgcaatt ctcttctcaa tgcttgcgtc cattggaagc tcttaacttc 3300

[0204] cttagacaag gacatcttgt tgctcaatgg tttctcaaga caaatgcgca atcaaatgcc 3360

[0205] taggatccac tgtgcg 3376

[0206] <210> 3

[0207] <211> 3377

[0208] <212> DNA

[0209] <213> 人工序列

[0210] <220>

[0211] <223> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV) clone 13 区段 S

[0212] (GenBank: DQ361065.2)

[0213] <400> 3

[0214] gcgcaccggg gatcctaggc tttttggatt gcgctttcct ctagatcaac tgggtgtcag 60

[0215] gccctatcct acagaaggat gggtcagatt gtgacaatgt ttgaggctct gcctcacatc 120

[0216] atcgatgagg tgatcaacat tgtcattatt gtgcttatcg tgatcacggg tatcaaggct 180

[0217] gtctacaatt ttgccacctg tgggatattc gcattgatca gtttcctact tctggctggc 240

[0218] aggtcctgtg gcatgtacgg tcttaaggga cccgacattt acaaaggagt ttaccaattt 300

[0219] aagtcagtgg agtttgatat gtcacatctg aacctgacca tgcccaacgc atgttcagcc 360

[0220] aacaactccc accattacat cagtatgggg acttctggac tagaattgac cttcaccaat 420

[0221] gattccatca tcagtcacaa cttttgcaat ctgacctctg ccttcaacaa aaagaccttt 480

[0222] gaccacacac tcatgagtat agtttcgagc ctacacctca gtatcagagg gaactccaac 540

[0223] tataaggcag tatcctgcga cttcaacaat ggcataacca tccaatacaa cttgacattc 600

[0224] tcagatgcac aaagtgctca gagccagtgt agaaccttca gaggtagagt cctagatatg 660

[0225] tttagaactg ccttcggggg gaaatacatg aggagtggct ggggctggac aggctcagat 720

[0226] ggcaagacca cctggtgtag ccagacgagt taccaatacc tgattataca aaatagaacc 780

[0227] tgggaaaacc actgcacata tgcaggtcct tttgggatgt ccaggattct cctttcccaa 840

[0228] gagaagacta agttcctcac taggagacta gcgggcacat tcacctggac tttgtcagac 900

[0229] tcttcagggg tggagaatcc aggtggttat tgcctgacca aatggatgat tcttgctgca 960

[0230] gagcttaagt gtttcgggaa cacagcagtt gcgaaatgca atgtaaatca tgatgaagaa 1020

[0231] ttctgtgaca tgctgcgact aattgactac aacaaggctg ctttgagtaa gttcaaagag 1080

[0232] gacgtagaat ctgccttgca cttattcaaa acaacagtga attctttgat ttcagatcaa 1140

[0233] ctactgatga ggaaccactt gagagatctg atgggggtgc catattgcaa ttactcaaag 1200

[0234] ttttggtacc tagaacatgc aaagaccggc gaaactagtg tccccaagtg ctggcttgtc 1260

[0235] accaatggtt cttacttaaa tgagacccac ttcagtgacc aaatcgaaca ggaagccgat 1320

[0236] aacatgatta cagagatgtt gaggaaggat tacataaaga ggcaggggag taccccccta 1380

[0237] gcattgatgg accttctgat gttttccaca tctgcatatc tagtcagcat cttcctgcac 1440

[0238] cttgtcaaaa taccaacaca caggcacata aaaggtggct catgtccaaa gccacaccga 1500

[0239] ttaaccaaca aaggaatttg tagttgtggt gcatttaagg tgcctggtgt aaaaaccgtc 1560

[0240] tggaaaagac gctgaagaac agcgcctccc tgactctcca cctcgaaaga ggtggagagt 1620

[0241] cagggaggcc cagagggtct tagagtgtca caacatttgg gcctctaaaa attaggtcat 1680

[0242] gtggcagaat gttgtgaaca gttttcagat ctgggagcct tgctttggag gcgctttcaa 1740

[0243] aaatgatgca gtccatgagt gcacagtgcg gggtgatctc tttcttcttt ttgtccctta 1800

[0244] ctattccagt atgcatctta cacaaccagc catatttgtc ccacactttg tcttcatact 1860

[0245] ccctcgaagc ttccctggtc atttcaacat cgataagctt aatgtccttc ctattctgtg 1920

[0246] agtccagaag ctttctgatg tcatcggagc cttgacagct tagaaccatc ccctgcggaa 1980

[0247] gagcacctat aactgacgag gtcaacccgg gttgcgcatt gaagaggtcg gcaagatcca 2040

[0248] tgccgtgtga gtacttggaa tcttgcttga attgtttttg atcaacgggt tccctgtaaa 2100

[0249] agtgtatgaa ctgcccgttc tgtggttgga aaattgctat ttccactgga tcattaaatc 2160

[0250] taccctcaat gtcaatccat gtaggagcgt tggggtcaat tcctcccatg aggtctttta 2220

[0251] aaagcattgt ctggctgtag cttaagccca cctgaggtgg acctgctgct ccaggcgctg 2280

[0252] gcctgggtga attgactgca ggtttctcgc ttgtgagatc aattgttgtg ttttcccatg 2340

[0253] ctctccccac aatcgatgtt ctacaagcta tgtatggcca tccttcacct gaaaggcaaa 2400

[0254] ctttatagag gatgttttca taagggttcc tgtccccaac ttggtctgaa acaaacatgt 2460

[0255] tgagttttct cttggccccg agaactgcct tcaagaggtc ctcgctgttg cttggcttga 2520

[0256] tcaaaattga ctctaacatg ttacccccat ccaacagggc tgcccctgcc ttcacggcag 2580

[0257] caccaagact aaagttatag ccagaaatgt tgatgctgga ctgctgttca gtgatgaccc 2640

[0258] ccagaactgg gtgcttgtct ttcagccttt caagatcatt aagatttgga tacttgactg 2700

[0259] tgtaaagcaa gccaaggtct gtgagcgctt gtacaacgtc attgagcgga gtctgtgact 2760

[0260] gtttggccat acaagccata gttagacttg gcattgtgcc aaattgattg ttcaaaagtg 2820

[0261] atgagtcttt cacatcccaa actcttacca caccacttgc accctgctga ggctttctca 2880

[0262] tcccaactat ctgtaggatc tgagatcttt ggtctagttg ctgtgttgtt aagttcccca 2940

[0263] tatatacccc tgaagcctgg ggcctttcag acctcatgat cttggccttc agcttctcaa 3000

[0264] ggtcagccgc aagagacatc agttcttctg cactgagcct ccccactttc aaaacattct 3060

[0265] tctttgatgt tgactttaaa tccacaagag aatgtacagt ctggttgaga cttctgagtc 3120

[0266] tctgtaggtc tttgtcatct ctcttttcct tcctcatgat cctctgaaca ttgctgacct 3180

[0267] cagagaagtc caacccattc agaaggttgg ttgcatcctt aatgacagca gccttcacat 3240

[0268] ctgatgtgaa gctctgcaat tctcttctca atgcttgcgt ccattggaag ctcttaactt 3300

[0269] ccttagacaa ggacatcttg ttgctcaatg gtttctcaag acaaatgcgc aatcaaatgc 3360

[0270] ctaggatcca ctgtgcg 3377

[0271] <210> 4

[0272] <211> 7205

[0273] <212> DNA

[0274] <213> 人工序列

[0275] <220>

[0276] <223> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎毒株MP 区段 L

[0277] <400> 4

[0278] gcgcaccggg gatcctaggc atttttgttg cgcattttgt tgtgttattt gttgcacagc 60

[0279] ccttcatcgt gggaccttca caaacaaacc aaaccaccag ccatgggcca aggcaagtcc 120

[0280] aaagagggaa gggatgccag caatacgagc agagctgaaa ttctgccaga caccacctat 180

[0281] ctcggacctc tgaactgcaa gtcatgctgg cagagatttg acagtttagt cagatgccat 240

[0282] gaccactatc tctgcagaca ctgcctgaac ctcctgctgt cagtctccga caggtgccct 300

[0283] ctctgcaaac atccattgcc aaccaaactg aaaatatcca cggccccaag ctctccaccc 360

[0284] ccttacgagg agtgacgccc cgagccccaa caccgacaca aggaggccac caacacaacg 420

[0285] cccaacacgg aacacacaca cacacaccca cacacacatc cacacacacg cgcccccaca 480

[0286] acgggggcgc ccccccgggg gtggcccccc gggtgctcgg gcggagcccc acggagaggc 540

[0287] caattagtcg atctcctcga ccaccgactt ggtcagccag tcatcacagg acttgccctt 600

[0288] aagtctgtac ttgcccacaa ctgtttcata catcaccgtg ttctttgact tactgaaaca 660

[0289] tagcctacag tctttgaaag tgaaccagtc aggcacaagt gacagcggta ccagtagaat 720

[0290] ggatctatct atacacaact cttggagaat tgtgctaatt tccgacccct gtagatgctc 780

[0291] accagttctg aatcgatgta gaagaaggct cccaaggacg tcatcaaaat ttccataacc 840

[0292] ctcgagctct gccaagaaaa ctctcatatc cttggtctcc agtttcacaa cgatgttctg 900

[0293] aacaaggctt cttccctcaa aaagagcacc cattctcaca gtcaagggca caggctccca 960

[0294] ttcaggccca atcctctcaa aatcaaggga tctgatcccg tccagtattt tccttgagcc 1020

[0295] tatcagctca agctcaagag agtcaccgag tatcaggggg tcctccatat agtcctcaaa 1080

[0296] ctcttcagac ctaatgtcaa aaacaccatc gttcaccttg aagatagagt ctgatctcaa 1140

[0297] caggtggagg cattcgtcca agaaccttct gtccacctca cctttaaaga ggtgagagca 1200

[0298] tgataggaac tcagctacac ctggaccttg taactggcac ttcactaaaa agatcaatga 1260

[0299] aaacttcctc aaacaatcag tgttattctg gttgtgagtg aaatctactg taattgagaa 1320

[0300] ctctagcact ccctctgtat tatttatcat gtaatcccac aagtttctca aagacttgaa 1380

[0301] tgcctttgga tttgtcaagc cttgtttgat tagcatggca gcattgcaca caatatctcc 1440

[0302] caatcggtaa gagaaccatc caaatccaaa ttgcaagtca ttcctaaaca tgggcctctc 1500

[0303] catatttttg ttcactactt ttaagatgaa tgattggaaa ggccccaatg cttcagcgcc 1560

[0304] atcttcagat ggcatcatgt ctttatgagg gaaccatgaa aaacttccta gagttctgct 1620

[0305] tgttgctaca aattctcgta caaatgactc aaaatacact tgttttaaaa agtttttgca 1680

[0306] gacatccctt gtactaacga caaattcatc aacaaggctt gagtcagagc gctgatggga 1740

[0307] atttacaaga tcagaaaata gaacagtgta gtgttcgtcc ctcttccact taactacatg 1800

[0308] agaaatgagc gataaagatt ctgaattgat atcgatcaat acgcaaaggt caaggaattt 1860

[0309] gattctggga ctccatctca tgtttttga gctcatatca gacatgaagg gaagcagctg 1920

[0310] atcttcatag attttagggt acaatcgcct cacagattgg attacatggt ttaaacttat 1980

[0311] cttgtcctcc agtagccttg aactctcagg cttccttgct acataatcac atgggttcaa 2040

[0312] gtgcttgagg cttgagcttc cctcattctt ccctttcaca ggttcagcta agacccaaac 2100

[0313] acccaactca aaggaattac tcagtgagat gcaaatatag tcccaaagga ggggcctcaa 2160

[0314] gagactgatg tggtcgcagt gagcttctgg atgactttgc ctgtcacaaa tgtacaacat 2220

[0315] tatgccatca tgtctgtgga ttgctgtcac atgcgcatcc atagctagat cctcaagcac 2280

[0316] ttttctaatg tatagattgt ccctattttt atttctcaca catctacttc ccaaagtttt 2340

[0317] gcaaagacct ataaagcctg atgagatgca actttgaaag gctgacttat tgattgcttc 2400

[0318] tgacagcaac ttctgtgcac ctcttgtgaa cttactgcag agcttgttct ggagtgtctt 2460

[0319] gattaatgat gggattcttt cctcttggaa agtcattact gatggataaa ccactttctg 2520

[0320] cctcaagacc attcttaatg ggaacaactc attcaaattc agccaattta tgtttgccaa 2580

[0321] ttgacttaga tcctcttcga ggccaaggat gtttcccaac tgaagaatgg cttccttttt 2640

[0322] atccctattg aagaggtcta agaagaattc ttcattgaac tcaccattct tgagcttatg 2700

[0323] atgtagtctc cttacaagcc ttctcatgac cttcgtttca ctaggacaca attcttcaat 2760

[0324] aagcctttgg attctgtaac ctctagagcc atccaaccaa tccttgacat cagtattagt 2820

[0325] gttaagcaaa aatgggtcca agggaaagtt ggcatatttt aagaggtcta atgttctctt 2880

[0326] ctggatgcag tttaccaatg aaactggaac accatttgca acagcttgat cggcaattgt 2940

[0327] atctattgtt tcacagagtt ggtgtggctc tttacactta acgttgtgta atgctgctga 3000

[0328] cacaaatttt gttaaaagtg ggacctcttc cccccacaca taaaatctgg atttaaattc 3060

[0329] tgcagcaaat cgccccacca cacttttcgg actgatgaac ttgttaagca agccactcaa 3120

[0330] atgagaatga aattccagca atacaaggac ttcctcaggg tcactatcaa ccagttcact 3180

[0331] caatctccta tcaaataagg tgatctgatc atcacttgat gtgtaagatt ctggtctctc 3240

[0332] accaaaaatg acaccgatac aataattaat gaatctctca ctgattaagc cgtaaaagtc 3300

[0333] agaggcatta tgtaagattc cctgtcccat gtcaatgaga ctgcttatat gggaaggcac 3360

[0334] tattcctaat tcaaaatatt ctcgaaagat tctttcagtc acagttgtct ctgaacccct 3420

[0335] aagaagtttc agctttgatt tgatatatga tttcatcatt gcattcacaa caggaaaagg 3480

[0336] gacctcaaca agtttgtgca tgtgccaagt taataaggtg ctgatatgat cctttccgga 3540
[0337] acgcacatac tggtcatcac ccagtttgag attttgaagg agcattaaaa acaaaaatgg 3600
[0338] gcacatcatt ggccccccatt tgctatgatc catactgtag ttcaacaacc cctctcgcac 3660
[0339] attgatggtc attgatagaa ttgcattttc aaattctttg tcattgttta agcatgaacc 3720
[0340] tgagaagaag ctagaaaaag actcaaaata atcctctatc aatcttgtaa acatttttgt 3780
[0341] tctcaaatcc ccaatataaa gttctctgtt tcctccaacc tgctctttgt atgataacgc 3840
[0342] aaacttcaac cttccggaat caggaccaac tgaagtgtat gacgttggtg actcctctga 3900
[0343] gtaaaaacat aaattcttta aagcagcact catgcatttt gtcaatgata gagccttact 3960
[0344] tagagactca gaattacttt ccctttcact aattctaaca tcttcttcta gtttgtccca 4020
[0345] gtcaaacttg aaattcagac cttgtctttg catgtgcctg tatttccctg agtatgcatt 4080
[0346] tgcattcatt tgcagtagaa tcattttcat acacgaaaac caatcaccct ctgaaaaaaa 4140
[0347] cttcctgcag aggtttttg ccatttcatc cagaccacat tgttctttga cagctgaagt 4200
[0348] gaaatacaat ggtgacagtt ctgtagaagt ttcaatagcc tcacagataa atttcatgtc 4260
[0349] atcattggtg agacaagatg ggtcaaaatc ttccacaaga tgaaaagaaa tttctgataa 4320
[0350] gatgaccttc cttaaatatg ccatttacc tgacaatata gtctgaaggt gatgcaatcc 4380
[0351] ttttgtattt tcaaacccca cctcattttc cccttcattg gtcttcttgc ttctttcata 4440
[0352] ccgctttatt gtggagttga ccttatcttc taaattcttg aagaaacttg tctcttcttc 4500
[0353] cccatcaaag catatgtctg ctgagtcacc ttctagtttc ccagcttctg tttctttaga 4560
[0354] gccgataacc aatctagaga ccaactttga aaccttgtac tcgtaatctg agtggttcaa 4620
[0355] tttgtacttc tgctttctca tgaagctctc tgtgatctga ctcacagcac taacaagcaa 4680
[0356] tttgttaaaa tcatactcta ggagccgttc cccatttaaa tgtttgttaa caaccacact 4740
[0357] tttgttgctg gcaaggtcta atgctgttgc acacccagag ttagtcatgg gatccaagct 4800
[0358] attgagcctc ttctcccctt tgaaaatcaa agtgccattg ttgaatgagg acaccatcat 4860
[0359] gctaaaggcc tccagattga cacctggggt tgtgcgctga cagtcaactt ctttcccagt 4920
[0360] gaacttcttc atttggtcat aaaaaacaca ctcttcctca ggggtgattg actctttagg 4980
[0361] gttaacaaag aagccaaact cacttttagg ctcaaagaat ttctcaaagc atttaatttg 5040
[0362] atctgtcagc ctatcagggg tttcctttgt gattaaatga cacaggtatg acacattcaa 5100
[0363] catgaacttg aactttgcgc tcaacagtac cttttcacca gtcccaaaaa cagttttgat 5160
[0364] caaaaatctg agcaatttgt acactacttt ctcagcaggt gtgatcaaat cctccttcaa 5220
[0365] cttgtccatc aatgatgtgg atgagaagtc tgagacaatg gccatcacta aatacctaat 5280
[0366] gttttgaacc tgtttttgat tcctctttgt tgggttggtg agcatgagta ataatagggt 5340
[0367] tctcaatgca atctcaacat catcaatgct gtccttcaag tcaggacatg atctgatcca 5400
[0368] tgagatcatg gtgtcaatca tgttgtgcaa cacttcatct gagaagattg gtaaaaagaa 5460
[0369] ccttttttggg tctgcataaa aagagattag atggccattg ggaccttgta tagaataaca 5520
[0370] ccttgaggat tctccagtct tttgatacag caggtgatat tcctcagagt ccaattttat 5580
[0371] cacttggcaa aatacctctt tacattccac cacttgatac cttacagagc ccaattggtt 5640
[0372] ttgtcttaat ctagcaactg aacttgtttt catactgttt gtcaaagcta gacagacaga 5700
[0373] tgacaatctt ttcaaactat gcatgttcct taattgttcc gtattaggct ggaaatcata 5760
[0374] atcttcaaac tttgtataat acattatagg atgagttccg gacctcatga aattctcaaa 5820
[0375] ctcaataaat ggtatgtggc actcatgctc aagatgttca gacagaccat agtgcccaaa 5880
[0376] actaagtccc accactgaca agcacctttg aacttttaaa atgaactcat ttatggatgt 5940
[0377] tctaaacaaa tcctcaagag ataccttttct atacgccttt gactttctcc tgttccttag 6000

[0378] aagtctgatg aactcttcct tggtgctatg aaagctcacc aacctatcat tcacactccc 6060

[0379] atagcaacaa ccaacccagt gcttatcatt ttttgaccct ttgagtttag actgtttgat 6120

[0380] caacgaagag agacacaaga catccaaatt cagtaactgt ctccttctgg tgttcaataa 6180

[0381] ttttaaactt ttaactttgt tcaacataga gaggagcctc tcatactcag tgctagtctc 6240

[0382] acttcctctc tcataaccat gggtatctgc tgtgataaat ctcatcaaag gacaggattc 6300

[0383] aactgcctcc ttgcttagtg ctgaaatgtc atcactgtca gcaagagtct cataaagctc 6360

[0384] agagaattcc ttaattaaat ttccggggtt gattttctga aaactcctct tgagcttccc 6420

[0385] agtttccaag tctcttctaa acctgctgta aagggagttt atgccaagaa ccacatcatc 6480

[0386] gcagttcatg tttgggttga caccatcatg gcacattttc ataatttcat cattgtgaaa 6540

[0387] tgatcttgca tctttcaaga ttttcataga gtctataccg gaacgcttat caacagtggt 6600

[0388] cttgagagat tcgcaaagtc tgaagtactc agattcctca aagactttct catcttggct 6660

[0389] agaatactct aaaagtttaa acagaaggtc tctgaacttg aaattcaccc actctggcat 6720

[0390] aaagctgtta tcataatcac accgaccatc cactattggg accaatgtga tacccgcaat 6780

[0391] ggcaaggtct tctttgatac aggctagttt attggtgtcc tctataaatt tcttctcaaa 6840

[0392] actagctggt gtgcttctaa cgaagcactc aagaagaatg agggaattgt caatcagttt 6900

[0393] ataaccatca ggaatgatca aaggcagtcc cgggcacaca atcccagact ctattagaat 6960

[0394] tgcctcaaca gatttatcat catggttgtg tatgcagccg ctcttgtcag cactgtctat 7020

[0395] ctctatacaa cgcgacaaaa gtttgagtcc ctctatcaat accattctgg gttctctttg 7080

[0396] ccctaaaaag ttgagcttct gccttgacaa cctctcatct tgttctatgt ggtttaagca 7140

[0397] caactctctc aactccgaaa tagcctcatc cattgcgcat caaaaagcct aggatcctcg 7200

[0398] gtgcg 7205

[0399] <210> 5

[0400] <211> 3359

[0401] <212> DNA

[0402] <213> 人工序列

[0403] <220>

[0404] <223> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎毒株MP 区段 S

[0405] <400> 5

[0406] cgcaccgggg atcctaggct ttttggattg cgctttcctc agctccgtct tgtgggagaa 60

[0407] tgggtcaaat tgtgacgatg tttgaggctc tgcctcacat cattgatgag gtcattaaca 120

[0408] ttgtcattat cgtgcttatt atcatcacga gcatcaaagc tgtgtacaat ttcgccacct 180

[0409] gcgggatact tgcattgatc agctttcttt ttctggctgg caggtcctgt ggaatgtatg 240

[0410] gtcttgatgg gcctgacatt tacaaagggg tttaccgatt caagtcagtg gagtttgaca 300

[0411] tgtcttacct taacctgacg atgcccaatg catgttcggc aaacaactcc catcattata 360

[0412] taagtatggg gacttctgga ttggagttaa ccttcacaaa tgactccatc atcacccaca 420

[0413] acttttgtaa tctgacttcc gccctcaaca agaggacttt tgaccacaca cttatgagta 480

[0414] tagtctcaag tctgcacctc agcattagag gggtccccag ctacaaagca gtgtcctgtg 540

[0415] attttaacaa tggcatcact attcaataca acctgtcatt ttctaatgca cagagcgctc 600

[0416] tgagtcaatg taagaccttc agggggagag tcctggatat gttcagaact gcttttggag 660

[0417] gaaagtacat gaggagtggc tggggctgga caggttcaga tggcaagact acttggtgca 720

[0418] gccagacaaa ctaccaatat ctgattatac aaaacaggac ttgggaaaac cactgcaggt 780

[0419] acgcaggccc tttcggaatg tctagaattc tcttcgctca agaaaagaca aggtttctaa 840

[0420] ctagaaggct tgcaggcaca ttcacttgga ctttatcaga ctcatcagga gtggagaatc 900

[0421] caggtggtta ctgcttgacc aagtggatga tcctcgctgc agagctcaag tgttttggga 960

[0422] acacagctgt tgcaaagtgc aatgtaaatc atgatgaaga gttctgtgat atgctacgac 1020

[0423] tgattgatta caacaaggct gctttgagta aattcaaaga agatgtagaa tccgctctac 1080

[0424] atctgttcaa gacaacagtg aattctttga tttctgatca gcttttgatg agaaatcacc 1140

[0425] taagagactt gatgggagtg ccatactgca attactcgaa attctggtat ctagagcatg 1200

[0426] caaagactgg tgagactagt gtccccaagt gctggcttgt cagcaatggt tcttatttga 1260

[0427] atgaaaccca tttcagcgac caaattgagc aggaagcaga taatatgatc acagaaatgc 1320

[0428] tgagaaagga ctacataaaa aggcaaggga gtacccctct agccttgatg gatctattga 1380

[0429] tgttttctac atcagcatat ttgatcagca tctttctgca tcttgtgagg ataccaacac 1440

[0430] acagacacat aaagggcggc tcatgcccaa aaccacatcg gttaaccagc aagggaatct 1500

[0431] gtagttgtgg tgcatttaaa gtaccaggtg tggaaaccac ctggaaaaga cgctgaacag 1560

[0432] cagcgcctcc ctgactcacc acctcgaaag aggtggtgag tcagggaggc ccagagggtc 1620

[0433] ttagagtgtt acgacatttg gacctctgaa gattaggtca tgtggtagga tattgtggac 1680

[0434] agttttcagg tcggggagcc ttgccttgga ggcgctttca aagatgatac agtccatgag 1740

[0435] tgcacagtgt ggggtgacct ctttcttttt cttgtccctc actattccag tgtgcatctt 1800

[0436] gcatagccag ccatatttgt cccagacttt gtcctcatat tctcttgaag cttctttagt 1860

[0437] catctcaaca tcgatgagct taatgtctct tctgttttgt gaatctagga gtttcctgat 1920

[0438] gtcatcagat ccctgacaac ttaggaccat tccctgtgga agagcaccta ttactgaaga 1980

[0439] tgtcagccca ggttgtgcat tgaagaggtc agcaaggtcc atgccatgtg agtatttgga 2040

[0440] gtcctgcttg aattgttttt gatcagtggg ttctctatag aaatgtatgt actgcccatt 2100

[0441] ctgtggctga aatattgcta tttctaccgg gtcattaaat ctgccctcaa tgtcaatcca 2160

[0442] tgtaggagcg ttagggtcaa tacctcccat gaggtccttc agcaacattg tttggctgta 2220

[0443] gcttaagccc acctgaggtg ggcccgctgc cccaggcgct ggtttgggtg agttggccat 2280

[0444] aggcctctca tttgtcagat caattgttgt gttctcccat gctctcccta caactgatgt 2340

[0445] tctacaagct atgtatggcc acccctcccc tgaaagacag actttgtaga ggatgttctc 2400

[0446] gtaaggattc ctgtctccaa cctgatcaga aacaaacatg ttgagtttct tcttggcccc 2460

[0447] aagaactgct ttcaggagat cctcactgtt gcttggctta attaagatgg attccaacat 2520

[0448] gttaccccca tctaacaagg ctgcccctgc tttcacagca gcaccgagac tgaaattgta 2580

[0449] gccagatatg ttgatgctag actgctgctc agtgatgact cccaagactg ggtgcttgtc 2640

[0450] tttcagcctt tcaaggtcac ttaggttcgg gtacttgact gtgtaaagca gcccaaggtc 2700

[0451] tgtgagtgct tgcacaacgt cattgagtga ggtttgtgat tgtttggcca tacaagccat 2760

[0452] tgttaagctt ggcattgtgc cgaattgatt gttcagaagt gatgagtcct tcacatccca 2820

[0453] gaccctcacc acaccatttg cactctgctg aggtctcctc attccaacca tttgcagaat 2880

[0454] ctgagatctt tggtcaagct gttgtgctgt taagttcccc atgtagactc cagaagttag 2940

[0455] aggcctttca gacctcatga ttttagcctt cagtttttca aggtcagctg caagggacat 3000

[0456] cagttcttct gcactaagcc tccctacttt tagaacattc ttttttgatg ttgactttag 3060

[0457] gtccacaagg gaatacacag tttggttgag gcttctgagt ctctgtaaat ctttgtcatc 3120

[0458] cctcttctct ttcctcatga tcctctgaac attgctcacc tcagagaagt ctaatccatt 3180

[0459] cagaaggctg gtggcatcct tgatcacagc agctttcaca tctgatgtga agccttgaag 3240

[0460] ctctctcctc aatgcctggg tccattgaaa gcttttaact tctttggaca gagacatttt 3300

[0461] gtcactcagt ggatttccaa gtcaaatgcg caatcaaaat gcctaggatc cactgtgcg 3359

[0462] <210> 6

[0463] <211> 558

[0464] <212> PRT

[0465] <213> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒

[0466] <220>

[0467] <223> LCMV的MP病毒毒株NP蛋白

[0468] <400> 6

[0469] Met Ser Leu Ser Lys Glu Val Lys Ser Phe Gln Trp Thr Gln Ala Leu

[0470] 1 5 10 15

[0471] Arg Arg Glu Leu Gln Gly Phe Thr Ser Asp Val Lys Ala Ala Val Ile

[0472] 20 25 30

[0473] Lys Asp Ala Thr Ser Leu Leu Asn Gly Leu Asp Phe Ser Glu Val Ser

[0474] 35 40 45

[0475] Asn Val Gln Arg Ile Met Arg Lys Glu Lys Arg Asp Asp Lys Asp Leu

[0476] 50 55 60

[0477] Gln Arg Leu Arg Ser Leu Asn Gln Thr Val Tyr Ser Leu Val Asp Leu

[0478] 65 70 75 80

[0479] Lys Ser Thr Ser Lys Lys Asn Val Leu Lys Val Gly Arg Leu Ser Ala

[0480] 85 90 95

[0481] Glu Glu Leu Met Ser Leu Ala Ala Asp Leu Glu Lys Leu Lys Ala Lys

[0482] 100 105 110

[0483] Ile Met Arg Ser Glu Arg Pro Leu Thr Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn

[0484] 115 120 125

[0485] Leu Thr Ala Gln Gln Leu Asp Gln Arg Ser Gln Ile Leu Gln Met Val

[0486] 130 135 140

[0487] Gly Met Arg Arg Pro Gln Gln Ser Ala Asn Gly Val Val Arg Val Trp

[0488] 145 150 155 160

[0489] Asp Val Lys Asp Ser Ser Leu Leu Asn Asn Gln Phe Gly Thr Met Pro

[0490] 165 170 175

[0491] Ser Leu Thr Met Ala Cys Met Ala Lys Gln Ser Gln Thr Ser Leu Asn

[0492] 180 185 190

[0493] Asp Val Val Gln Ala Leu Thr Asp Leu Gly Leu Leu Tyr Thr Val Lys

[0494] 195 200 205

[0495] Tyr Pro Asn Leu Ser Asp Leu Glu Arg Leu Lys Asp Lys His Pro Val

[0496] 210 215 220

[0497] Leu Gly Val Ile Thr Glu Gln Gln Ser Ser Ile Asn Ile Ser Gly Tyr

[0498] 225 230 235 240

[0499] Asn Phe Ser Leu Gly Ala Ala Val Lys Ala Gly Ala Ala Leu Leu Asp

[0500] 245 250 255

[0501] Gly Gly Asn Met Leu Glu Ser Ile Leu Ile Lys Pro Ser Asn Ser Glu

[0502] 260 265 270

[0503] Asp Leu Leu Lys Ala Val Leu Gly Ala Lys Lys Lys Leu Asn Met Phe

[0504] 275 280 285

[0505] Val Ser Asp Gln Val Gly Asp Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Ile Leu Tyr

[0506] 290 295 300

[0507] Lys Val Cys Leu Ser Gly Glu Gly Trp Pro Tyr Ile Ala Cys Arg Thr

[0508] 305 310 315 320

[0509] Ser Val Val Gly Arg Ala Trp Glu Asn Thr Thr Ile Asp Leu Thr Asn

[0510] 325 330 335

[0511] Glu Arg Pro Met Ala Asn Ser Pro Lys Pro Ala Pro Gly Ala Ala Gly

[0512] 340 345 350

[0513] Pro Pro Gln Val Gly Leu Ser Tyr Ser Gln Thr Met Leu Leu Lys Asp

[0514] 355 360 365

[0515] Leu Met Gly Gly Ile Asp Pro Asn Ala Pro Thr Trp Ile Asp Ile Glu

[0516] 370 375 380

[0517] Gly Arg Phe Asn Asp Pro Val Glu Ile Ala Ile Phe Gln Pro Gln Asn

[0518] 385 390 395 400

[0519] Gly Gln Tyr Ile His Phe Tyr Arg Glu Pro Thr Asp Gln Lys Gln Phe

[0520] 405 410 415

[0521] Lys Gln Asp Ser Lys Tyr Ser His Gly Met Asp Leu Ala Asp Leu Phe

[0522] 420 425 430

[0523] Asn Ala Gln Pro Gly Leu Thr Ser Ser Val Ile Gly Ala Leu Pro Gln

[0524] 435 440 445

[0525] Gly Met Val Leu Ser Cys Gln Gly Ser Asp Asp Ile Arg Lys Leu Leu

[0526] 450 455 460

[0527] Asp Ser Gln Asn Arg Arg Asp Ile Lys Leu Ile Asp Val Glu Met Thr

[0528] 465 470 475 480

[0529] Lys Glu Ala Ser Arg Glu Tyr Glu Asp Lys Val Trp Asp Lys Tyr Gly

[0530] 485 490 495

[0531] Trp Leu Cys Lys Met His Thr Gly Ile Val Arg Asp Lys Lys Lys Lys

[0532] 500 505 510

[0533] Glu Val Thr Pro His Cys Ala Leu Met Asp Cys Ile Ile Phe Glu Ser

[0534] 515 520 525

[0535] Ala Ser Lys Ala Arg Leu Pro Asp Leu Lys Thr Val His Asn Ile Leu

[0536] 530 535 540

[0537] Pro His Asp Leu Ile Phe Arg Gly Pro Asn Val Val Thr Leu

[0538] 545 550 555

[0539] <210> 7

[0540] <211> 498

[0541] <212> PRT

[0542] <213> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒

[0543] <220>

[0544] <223> LCMV的MP病毒毒株GP蛋白

[0545] <400> 7

[0546] Met Gly Gln Ile Val Thr Met Phe Glu Ala Leu Pro His Ile Ile Asp
[0547] 1 5 10 15
[0548] Glu Val Ile Asn Ile Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Ile Thr Ser Ile
[0549] 20 25 30
[0550] Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Ile Leu Ala Leu Ile Ser
[0551] 35 40 45
[0552] Phe Leu Phe Leu Ala Gly Arg Ser Cys Gly Met Tyr Gly Leu Asp Gly
[0553] 50 55 60
[0554] Pro Asp Ile Tyr Lys Gly Val Tyr Arg Phe Lys Ser Val Glu Phe Asp
[0555] 65 70 75 80
[0556] Met Ser Tyr Leu Asn Leu Thr Met Pro Asn Ala Cys Ser Ala Asn Asn
[0557] 85 90 95
[0558] Ser His His Tyr Ile Ser Met Gly Thr Ser Gly Leu Glu Leu Thr Phe
[0559] 100 105 110
[0560] Thr Asn Asp Ser Ile Ile Thr His Asn Phe Cys Asn Leu Thr Ser Ala
[0561] 115 120 125
[0562] Leu Asn Lys Arg Thr Phe Asp His Thr Leu Met Ser Ile Val Ser Ser
[0563] 130 135 140
[0564] Leu His Leu Ser Ile Arg Gly Val Pro Ser Tyr Lys Ala Val Ser Cys
[0565] 145 150 155 160
[0566] Asp Phe Asn Asn Gly Ile Thr Ile Gln Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Asn
[0567] 165 170 175
[0568] Ala Gln Ser Ala Leu Ser Gln Cys Lys Thr Phe Arg Gly Arg Val Leu
[0569] 180 185 190
[0570] Asp Met Phe Arg Thr Ala Phe Gly Gly Lys Tyr Met Arg Ser Gly Trp
[0571] 195 200 205
[0572] Gly Trp Thr Gly Ser Asp Gly Lys Thr Thr Trp Cys Ser Gln Thr Asn
[0573] 210 215 220
[0574] Tyr Gln Tyr Leu Ile Ile Gln Asn Arg Thr Trp Glu Asn His Cys Arg
[0575] 225 230 235 240
[0576] Tyr Ala Gly Pro Phe Gly Met Ser Arg Ile Leu Phe Ala Gln Glu Lys
[0577] 245 250 255
[0578] Thr Arg Phe Leu Thr Arg Arg Leu Ala Gly Thr Phe Thr Trp Thr Leu
[0579] 260 265 270
[0580] Ser Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Thr Lys
[0581] 275 280 285
[0582] Trp Met Ile Leu Ala Ala Glu Leu Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Val
[0583] 290 295 300
[0584] Ala Lys Cys Asn Val Asn His Asp Glu Glu Phe Cys Asp Met Leu Arg
[0585] 305 310 315 320
[0586] Leu Ile Asp Tyr Asn Lys Ala Ala Leu Ser Lys Phe Lys Glu Asp Val
[0587] 325 330 335

[0588] Glu Ser Ala Leu His Leu Phe Lys Thr Thr Val Asn Ser Leu Ile Ser
[0589] 340 345 350
[0590] Asp Gln Leu Leu Met Arg Asn His Leu Arg Asp Leu Met Gly Val Pro
[0591] 355 360 365
[0592] Tyr Cys Asn Tyr Ser Lys Phe Trp Tyr Leu Glu His Ala Lys Thr Gly
[0593] 370 375 380
[0594] Glu Thr Ser Val Pro Lys Cys Trp Leu Val Ser Asn Gly Ser Tyr Leu
[0595] 385 390 395 400
[0596] Asn Glu Thr His Phe Ser Asp Gln Ile Glu Gln Glu Ala Asp Asn Met
[0597] 405 410 415
[0598] Ile Thr Glu Met Leu Arg Lys Asp Tyr Ile Lys Arg Gln Gly Ser Thr
[0599] 420 425 430
[0600] Pro Leu Ala Leu Met Asp Leu Leu Met Phe Ser Thr Ser Ala Tyr Leu
[0601] 435 440 445
[0602] Ile Ser Ile Phe Leu His Leu Val Arg Ile Pro Thr His Arg His Ile
[0603] 450 455 460
[0604] Lys Gly Gly Ser Cys Pro Lys Pro His Arg Leu Thr Ser Lys Gly Ile
[0605] 465 470 475 480
[0606] Cys Ser Cys Gly Ala Phe Lys Val Pro Gly Val Glu Thr Thr Trp Lys
[0607] 485 490 495
[0608] Arg Arg
[0609] <210> 8
[0610] <211> 2209
[0611] <212> PRT
[0612] <213> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒
[0613] <220>
[0614] <223> LCMV的MP病毒毒株L蛋白
[0615] <400> 8
[0616] Met Asp Glu Ala Ile Ser Glu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Asn His Ile
[0617] 1 5 10 15
[0618] Glu Gln Asp Glu Arg Leu Ser Arg Gln Lys Leu Asn Phe Leu Gly Gln
[0619] 20 25 30
[0620] Arg Glu Pro Arg Met Val Leu Ile Glu Gly Leu Lys Leu Leu Ser Arg
[0621] 35 40 45
[0622] Cys Ile Glu Ile Asp Ser Ala Asp Lys Ser Gly Cys Ile His Asn His
[0623] 50 55 60
[0624] Asp Asp Lys Ser Val Glu Ala Ile Leu Ile Glu Ser Gly Ile Val Cys
[0625] 65 70 75 80
[0626] Pro Gly Leu Pro Leu Ile Ile Pro Asp Gly Tyr Lys Leu Ile Asp Asn
[0627] 85 90 95
[0628] Ser Leu Ile Leu Leu Glu Cys Phe Val Arg Ser Thr Pro Ala Ser Phe
[0629] 100 105 110

[0630] Glu Lys Lys Phe Ile Glu Asp Thr Asn Lys Leu Ala Cys Ile Lys Glu
[0631] 115 120 125
[0632] Asp Leu Ala Ile Ala Gly Ile Thr Leu Val Pro Ile Val Asp Gly Arg
[0633] 130 135 140
[0634] Cys Asp Tyr Asp Asn Ser Phe Met Pro Glu Trp Val Asn Phe Lys Phe
[0635] 145 150 155 160
[0636] Arg Asp Leu Leu Phe Lys Leu Leu Glu Tyr Ser Ser Gln Asp Glu Lys
[0637] 165 170 175
[0638] Val Phe Glu Glu Ser Glu Tyr Phe Arg Leu Cys Glu Ser Leu Lys Thr
[0639] 180 185 190
[0640] Thr Val Asp Lys Arg Ser Gly Ile Asp Ser Met Lys Ile Leu Lys Asp
[0641] 195 200 205
[0642] Ala Arg Ser Phe His Asn Asp Glu Ile Met Lys Met Cys His Asp Gly
[0643] 210 215 220
[0644] Val Asn Pro Asn Met Asn Cys Asp Asp Val Val Leu Gly Ile Asn Ser
[0645] 225 230 235 240
[0646] Leu Tyr Ser Arg Phe Arg Arg Asp Leu Glu Thr Gly Lys Leu Lys Arg
[0647] 245 250 255
[0648] Ser Phe Gln Lys Ile Asn Pro Gly Asn Leu Ile Lys Glu Phe Ser Glu
[0649] 260 265 270
[0650] Leu Tyr Glu Thr Leu Ala Asp Ser Asp Asp Ile Ser Ala Leu Ser Lys
[0651] 275 280 285
[0652] Glu Ala Val Glu Ser Cys Pro Leu Met Arg Phe Ile Thr Ala Asp Thr
[0653] 290 295 300
[0654] His Gly Tyr Glu Arg Gly Ser Glu Thr Ser Thr Glu Tyr Glu Arg Leu
[0655] 305 310 315 320
[0656] Leu Ser Met Leu Asn Lys Val Lys Ser Leu Lys Leu Leu Asn Thr Arg
[0657] 325 330 335
[0658] Arg Arg Gln Leu Leu Asn Leu Asp Val Leu Cys Leu Ser Ser Leu Ile
[0659] 340 345 350
[0660] Lys Gln Ser Lys Leu Lys Gly Ser Lys Asn Asp Lys His Trp Val Gly
[0661] 355 360 365
[0662] Cys Cys Tyr Gly Ser Val Asn Asp Arg Leu Val Ser Phe His Ser Thr
[0663] 370 375 380
[0664] Lys Glu Glu Phe Ile Arg Leu Leu Arg Asn Arg Arg Lys Ser Lys Ala
[0665] 385 390 395 400
[0666] Tyr Arg Lys Val Ser Leu Glu Asp Leu Phe Arg Thr Ser Ile Asn Glu
[0667] 405 410 415
[0668] Phe Ile Leu Lys Val Gln Arg Cys Leu Ser Val Val Gly Leu Ser Phe
[0669] 420 425 430
[0670] Gly His Tyr Gly Leu Ser Glu His Leu Glu His Glu Cys His Ile Pro
[0671] 435 440 445

[0672] Phe Ile Glu Phe Glu Asn Phe Met Arg Ser Gly Thr His Pro Ile Met
[0673] 450 455 460
[0674] Tyr Tyr Thr Lys Phe Glu Asp Tyr Asp Phe Gln Pro Asn Thr Glu Gln
[0675] 465 470 475 480
[0676] Leu Arg Asn Met His Ser Leu Lys Arg Leu Ser Ser Val Cys Leu Ala
[0677] 485 490 495
[0678] Leu Thr Asn Ser Met Lys Thr Ser Ser Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn
[0679] 500 505 510
[0680] Gln Leu Gly Ser Val Arg Tyr Gln Val Val Glu Cys Lys Glu Val Phe
[0681] 515 520 525
[0682] Cys Gln Val Ile Lys Leu Asp Ser Glu Glu Tyr His Leu Leu Tyr Gln
[0683] 530 535 540
[0684] Lys Thr Gly Glu Ser Ser Arg Cys Tyr Ser Ile Gln Gly Pro Asn Gly
[0685] 545 550 555 560
[0686] His Leu Ile Ser Phe Tyr Ala Asp Pro Lys Arg Phe Phe Leu Pro Ile
[0687] 565 570 575
[0688] Phe Ser Asp Glu Val Leu His Asn Met Ile Asp Thr Met Ile Ser Trp
[0689] 580 585 590
[0690] Ile Arg Ser Cys Pro Asp Leu Lys Asp Ser Ile Asp Asp Val Glu Ile
[0691] 595 600 605
[0692] Ala Leu Arg Thr Leu Leu Leu Leu Met Leu Thr Asn Pro Thr Lys Arg
[0693] 610 615 620
[0694] Asn Gln Lys Gln Val Gln Asn Ile Arg Tyr Leu Val Met Ala Ile Val
[0695] 625 630 635 640
[0696] Ser Asp Phe Ser Ser Thr Ser Leu Met Asp Lys Leu Lys Glu Asp Leu
[0697] 645 650 655
[0698] Ile Thr Pro Ala Glu Lys Val Val Tyr Lys Leu Leu Arg Phe Leu Ile
[0699] 660 665 670
[0700] Lys Thr Val Phe Gly Thr Gly Glu Lys Val Leu Leu Ser Ala Lys Phe
[0701] 675 680 685
[0702] Lys Phe Met Leu Asn Val Ser Tyr Leu Cys His Leu Ile Thr Lys Glu
[0703] 690 695 700
[0704] Thr Pro Asp Arg Leu Thr Asp Gln Ile Lys Cys Phe Glu Lys Phe Phe
[0705] 705 710 715 720
[0706] Glu Pro Lys Ser Glu Phe Gly Phe Phe Val Asn Pro Lys Glu Ser Ile
[0707] 725 730 735
[0708] Thr Pro Glu Glu Glu Cys Val Phe Tyr Asp Gln Met Lys Lys Phe Thr
[0709] 740 745 750
[0710] Gly Lys Glu Val Asp Cys Gln Arg Thr Thr Pro Gly Val Asn Leu Glu
[0711] 755 760 765
[0712] Ala Phe Ser Met Met Val Ser Ser Phe Asn Asn Gly Thr Leu Ile Phe
[0713] 770 775 780

[0714] Lys Gly Glu Lys Arg Leu Asn Ser Leu Asp Pro Met Thr Asn Ser Gly
[0715] 785 790 795 800
[0716] Cys Ala Thr Ala Leu Asp Leu Ala Ser Asn Lys Ser Val Val Val Asn
[0717] 805 810 815
[0718] Lys His Leu Asn Gly Glu Arg Leu Leu Glu Tyr Asp Phe Asn Lys Leu
[0719] 820 825 830
[0720] Leu Val Ser Ala Val Ser Gln Ile Thr Glu Ser Phe Met Arg Lys Gln
[0721] 835 840 845
[0722] Lys Tyr Lys Leu Asn His Ser Asp Tyr Glu Tyr Lys Val Ser Lys Leu
[0723] 850 855 860
[0724] Val Ser Arg Leu Val Ile Gly Ser Lys Glu Thr Glu Ala Gly Lys Leu
[0725] 865 870 875 880
[0726] Glu Gly Asp Ser Ala Asp Ile Cys Phe Asp Gly Glu Glu Glu Thr Ser
[0727] 885 890 895
[0728] Phe Phe Lys Asn Leu Glu Asp Lys Val Asn Ser Thr Ile Lys Arg Tyr
[0729] 900 905 910
[0730] Glu Arg Ser Lys Lys Thr Asn Glu Gly Glu Asn Glu Val Gly Phe Glu
[0731] 915 920 925
[0732] Asn Thr Lys Gly Leu His His Leu Gln Thr Ile Leu Ser Gly Lys Met
[0733] 930 935 940
[0734] Ala Tyr Leu Arg Lys Val Ile Leu Ser Glu Ile Ser Phe His Leu Val
[0735] 945 950 955 960
[0736] Glu Asp Phe Asp Pro Ser Cys Leu Thr Asn Asp Asp Met Lys Phe Ile
[0737] 965 970 975
[0738] Cys Glu Ala Ile Glu Thr Ser Thr Glu Leu Ser Pro Leu Tyr Phe Thr
[0739] 980 985 990
[0740] Ser Ala Val Lys Glu Gln Cys Gly Leu Asp Glu Met Ala Lys Asn Leu
[0741] 995 1000 1005
[0742] Cys Arg Lys Phe Phe Ser Glu Gly Asp Trp Phe Ser Cys Met Lys
[0743] 1010 1015 1020
[0744] Met Ile Leu Leu Gln Met Asn Ala Asn Ala Tyr Ser Gly Lys Tyr
[0745] 1025 1030 1035
[0746] Arg His Met Gln Arg Gln Gly Leu Asn Phe Lys Phe Asp Trp Asp
[0747] 1040 1045 1050
[0748] Lys Leu Glu Glu Asp Val Arg Ile Ser Glu Arg Glu Ser Asn Ser
[0749] 1055 1060 1065
[0750] Glu Ser Leu Ser Lys Ala Leu Ser Leu Thr Lys Cys Met Ser Ala
[0751] 1070 1075 1080
[0752] Ala Leu Lys Asn Leu Cys Phe Tyr Ser Glu Glu Ser Pro Thr Ser
[0753] 1085 1090 1095
[0754] Tyr Thr Ser Val Gly Pro Asp Ser Gly Arg Leu Lys Phe Ala Leu
[0755] 1100 1105 1110

[0756] Ser Tyr Lys Glu Gln Val Gly Gly Asn Arg Glu Leu Tyr Ile Gly
[0757] 1115 1120 1125
[0758] Asp Leu Arg Thr Lys Met Phe Thr Arg Leu Ile Glu Asp Tyr Phe
[0759] 1130 1135 1140
[0760] Glu Ser Phe Ser Ser Phe Phe Ser Gly Ser Cys Leu Asn Asn Asp
[0761] 1145 1150 1155
[0762] Lys Glu Phe Glu Asn Ala Ile Leu Ser Met Thr Ile Asn Val Arg
[0763] 1160 1165 1170
[0764] Glu Gly Leu Leu Asn Tyr Ser Met Asp His Ser Lys Trp Gly Pro
[0765] 1175 1180 1185
[0766] Met Met Cys Pro Phe Leu Phe Leu Met Leu Leu Gln Asn Leu Lys
[0767] 1190 1195 1200
[0768] Leu Gly Asp Asp Gln Tyr Val Arg Ser Gly Lys Asp His Ile Ser
[0769] 1205 1210 1215
[0770] Thr Leu Leu Thr Trp His Met His Lys Leu Val Glu Val Pro Phe
[0771] 1220 1225 1230
[0772] Pro Val Val Asn Ala Met Met Lys Ser Tyr Ile Lys Ser Lys Leu
[0773] 1235 1240 1245
[0774] Lys Leu Leu Arg Gly Ser Glu Thr Thr Val Thr Glu Arg Ile Phe
[0775] 1250 1255 1260
[0776] Arg Glu Tyr Phe Glu Leu Gly Ile Val Pro Ser His Ile Ser Ser
[0777] 1265 1270 1275
[0778] Leu Ile Asp Met Gly Gln Gly Ile Leu His Asn Ala Ser Asp Phe
[0779] 1280 1285 1290
[0780] Tyr Gly Leu Ile Ser Glu Arg Phe Ile Asn Tyr Cys Ile Gly Val
[0781] 1295 1300 1305
[0782] Ile Phe Gly Glu Arg Pro Glu Ser Tyr Thr Ser Ser Asp Asp Gln
[0783] 1310 1315 1320
[0784] Ile Thr Leu Phe Asp Arg Arg Leu Ser Glu Leu Val Asp Ser Asp
[0785] 1325 1330 1335
[0786] Pro Glu Glu Val Leu Val Leu Leu Glu Phe His Ser His Leu Ser
[0787] 1340 1345 1350
[0788] Gly Leu Leu Asn Lys Phe Ile Ser Pro Lys Ser Val Val Gly Arg
[0789] 1355 1360 1365
[0790] Phe Ala Ala Glu Phe Lys Ser Arg Phe Tyr Val Trp Gly Glu Glu
[0791] 1370 1375 1380
[0792] Val Pro Leu Leu Thr Lys Phe Val Ser Ala Ala Leu His Asn Val
[0793] 1385 1390 1395
[0794] Lys Cys Lys Glu Pro His Gln Leu Cys Glu Thr Ile Asp Thr Ile
[0795] 1400 1405 1410
[0796] Ala Asp Gln Ala Val Ala Asn Gly Val Pro Val Ser Leu Val Asn
[0797] 1415 1420 1425

[0798] Cys Ile Gln Lys Arg Thr Leu Asp Leu Leu Lys Tyr Ala Asn Phe
[0799] 1430 1435 1440
[0800] Pro Leu Asp Pro Phe Leu Leu Asn Thr Asn Thr Asp Val Lys Asp
[0801] 1445 1450 1455
[0802] Trp Leu Asp Gly Ser Arg Gly Tyr Arg Ile Gln Arg Leu Ile Glu
[0803] 1460 1465 1470
[0804] Glu Leu Cys Pro Ser Glu Thr Lys Val Met Arg Arg Leu Val Arg
[0805] 1475 1480 1485
[0806] Arg Leu His His Lys Leu Lys Asn Gly Glu Phe Asn Glu Glu Phe
[0807] 1490 1495 1500
[0808] Phe Leu Asp Leu Phe Asn Arg Asp Lys Lys Glu Ala Ile Leu Gln
[0809] 1505 1510 1515
[0810] Leu Gly Asn Ile Leu Gly Leu Glu Glu Asp Leu Ser Gln Leu Ala
[0811] 1520 1525 1530
[0812] Asn Ile Asn Trp Leu Asn Leu Asn Glu Leu Phe Pro Leu Arg Met
[0813] 1535 1540 1545
[0814] Val Leu Arg Gln Lys Val Val Tyr Pro Ser Val Met Thr Phe Gln
[0815] 1550 1555 1560
[0816] Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Ile Lys Thr Leu Gln Asn Lys Leu
[0817] 1565 1570 1575
[0818] Cys Ser Lys Phe Thr Arg Gly Ala Gln Lys Leu Leu Ser Glu Ala
[0819] 1580 1585 1590
[0820] Ile Asn Lys Ser Ala Phe Gln Ser Cys Ile Ser Ser Gly Phe Ile
[0821] 1595 1600 1605
[0822] Gly Leu Cys Lys Thr Leu Gly Ser Arg Cys Val Arg Asn Lys Asn
[0823] 1610 1615 1620
[0824] Arg Asp Asn Leu Tyr Ile Arg Lys Val Leu Glu Asp Leu Ala Met
[0825] 1625 1630 1635
[0826] Asp Ala His Val Thr Ala Ile His Arg His Asp Gly Ile Met Leu
[0827] 1640 1645 1650
[0828] Tyr Ile Cys Asp Arg Gln Ser His Pro Glu Ala His Cys Asp His
[0829] 1655 1660 1665
[0830] Ile Ser Leu Leu Arg Pro Leu Leu Trp Asp Tyr Ile Cys Ile Ser
[0831] 1670 1675 1680
[0832] Leu Ser Asn Ser Phe Glu Leu Gly Val Trp Val Leu Ala Glu Pro
[0833] 1685 1690 1695
[0834] Val Lys Gly Lys Asn Glu Gly Ser Ser Ser Leu Lys His Leu Asn
[0835] 1700 1705 1710
[0836] Pro Cys Asp Tyr Val Ala Arg Lys Pro Glu Ser Ser Arg Leu Leu
[0837] 1715 1720 1725
[0838] Glu Asp Lys Ile Ser Leu Asn His Val Ile Gln Ser Val Arg Arg
[0839] 1730 1735 1740

[0840] Leu Tyr Pro Lys Ile Tyr Glu Asp Gln Leu Leu Pro Phe Met Ser
[0841] 1745 1750 1755
[0842] Asp Met Ser Ser Lys Asn Met Arg Trp Ser Pro Arg Ile Lys Phe
[0843] 1760 1765 1770
[0844] Leu Asp Leu Cys Val Leu Ile Asp Ile Asn Ser Glu Ser Leu Ser
[0845] 1775 1780 1785
[0846] Leu Ile Ser His Val Val Lys Trp Lys Arg Asp Glu His Tyr Thr
[0847] 1790 1795 1800
[0848] Val Leu Phe Ser Asp Leu Val Asn Ser His Gln Arg Ser Asp Ser
[0849] 1805 1810 1815
[0850] Ser Leu Val Asp Glu Phe Val Val Ser Thr Arg Asp Val Cys Lys
[0851] 1820 1825 1830
[0852] Asn Phe Leu Lys Gln Val Tyr Phe Glu Ser Phe Val Arg Glu Phe
[0853] 1835 1840 1845
[0854] Val Ala Thr Ser Arg Thr Leu Gly Ser Phe Ser Trp Phe Pro His
[0855] 1850 1855 1860
[0856] Lys Asp Met Met Pro Ser Glu Asp Gly Ala Glu Ala Leu Gly Pro
[0857] 1865 1870 1875
[0858] Phe Gln Ser Phe Ile Leu Lys Val Val Asn Lys Asn Met Glu Arg
[0859] 1880 1885 1890
[0860] Pro Met Phe Arg Asn Asp Leu Gln Phe Gly Phe Gly Trp Phe Ser
[0861] 1895 1900 1905
[0862] Tyr Arg Leu Gly Asp Ile Val Cys Asn Ala Ala Met Leu Ile Lys
[0863] 1910 1915 1920
[0864] Gln Gly Leu Thr Asn Pro Lys Ala Phe Lys Ser Leu Arg Asn Leu
[0865] 1925 1930 1935
[0866] Trp Asp Tyr Met Ile Asn Asn Thr Glu Gly Val Leu Glu Phe Ser
[0867] 1940 1945 1950
[0868] Ile Thr Val Asp Phe Thr His Asn Gln Asn Asn Thr Asp Cys Leu
[0869] 1955 1960 1965
[0870] Arg Lys Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Lys Cys Gln Leu Gln Gly
[0871] 1970 1975 1980
[0872] Pro Gly Val Ala Glu Phe Leu Ser Cys Ser His Leu Phe Lys Gly
[0873] 1985 1990 1995
[0874] Glu Val Asp Arg Arg Phe Leu Asp Glu Cys Leu His Leu Leu Arg
[0875] 2000 2005 2010
[0876] Ser Asp Ser Ile Phe Lys Val Asn Asp Gly Val Phe Asp Ile Arg
[0877] 2015 2020 2025
[0878] Ser Glu Glu Phe Glu Asp Tyr Met Glu Asp Pro Leu Ile Leu Gly
[0879] 2030 2035 2040
[0880] Asp Ser Leu Glu Leu Glu Leu Ile Gly Ser Arg Lys Ile Leu Asp
[0881] 2045 2050 2055

[0882] Gly Ile Arg Ser Leu Asp Phe Glu Arg Ile Gly Pro Glu Trp Glu
[0883] 2060 2065 2070
[0884] Pro Val Pro Leu Thr Val Arg Met Gly Ala Leu Phe Glu Gly Arg
[0885] 2075 2080 2085
[0886] Ser Leu Val Gln Asn Ile Val Val Lys Leu Glu Thr Lys Asp Met
[0887] 2090 2095 2100
[0888] Arg Val Phe Leu Ala Glu Leu Glu Gly Tyr Gly Asn Phe Asp Asp
[0889] 2105 2110 2115
[0890] Val Leu Gly Ser Leu Leu Leu His Arg Phe Arg Thr Gly Glu His
[0891] 2120 2125 2130
[0892] Leu Gln Gly Ser Glu Ile Ser Thr Ile Leu Gln Glu Leu Cys Ile
[0893] 2135 2140 2145
[0894] Asp Arg Ser Ile Leu Leu Val Pro Leu Ser Leu Val Pro Asp Trp
[0895] 2150 2155 2160
[0896] Phe Thr Phe Lys Asp Cys Arg Leu Cys Phe Ser Lys Ser Lys Asn
[0897] 2165 2170 2175
[0898] Thr Val Met Tyr Glu Thr Val Val Gly Lys Tyr Arg Leu Lys Gly
[0899] 2180 2185 2190
[0900] Lys Ser Cys Asp Asp Trp Leu Thr Lys Ser Val Val Glu Glu Ile
[0901] 2195 2200 2205
[0902] Asp
[0903] <210> 9
[0904] <211> 90
[0905] <212> PRT
[0906] <213> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒
[0907] <220>
[0908] <223> LCMV的MP病毒毒株Z蛋白
[0909] <400> 9
[0910] Met Gly Gln Gly Lys Ser Lys Glu Gly Arg Asp Ala Ser Asn Thr Ser
[0911] 1 5 10 15
[0912] Arg Ala Glu Ile Leu Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Gly Pro Leu Asn Cys
[0913] 20 25 30
[0914] Lys Ser Cys Trp Gln Arg Phe Asp Ser Leu Val Arg Cys His Asp His
[0915] 35 40 45
[0916] Tyr Leu Cys Arg His Cys Leu Asn Leu Leu Leu Ser Val Ser Asp Arg
[0917] 50 55 60
[0918] Cys Pro Leu Cys Lys His Pro Leu Pro Thr Lys Leu Lys Ile Ser Thr
[0919] 65 70 75 80
[0920] Ala Pro Ser Ser Pro Pro Pro Tyr Glu Glu
[0921] 85 90
[0922] <210> 10
[0923] <211> 7115

[0924] <212> DNA

[0925] <213> 人工序列

[0926] <220>

[0927] <223> Junin病毒Candid#1 L区段

[0928] <400> 10

[0929] gcgcaccggg gatcctaggc gtaacttcat cattaaaatc tcagattctg ctctgagtgt 60

[0930] gacttactgc gaagaggcag acaaatgggc aactgcaacg gggcatccaa gtctaaccag 120

[0931] ccagactcct caagagccac acagccagcc gcagaattta ggagggtagc tcacagcagt 180

[0932] ctatatggta gatataactg taagtgctgc tggtttgctg ataccaattt gataacctgt 240

[0933] aatgatcact acctttgttt aaggtgccat cagggtatgt taaggaattc agatctctgc 300

[0934] aatatctgct ggaagcccct gcccaccaca atcacagtac cggtggagcc aacagcacca 360

[0935] ccaccatagg cagactgcac agggtcagac ccgacccccc ggggggcccc catggggacc 420

[0936] ccccgtgggg gaaccccggg ggtgatgcgc cattagtcaa tgtctttgat ctcgactttg 480

[0937] tgcttcagtg gcctgcatgt cacccctttc aatctgaact gcccttgggg atctgatatc 540

[0938] agcaggtcat ttaaagatct gctgaatgcc accttgaaat ttgagaattc caaccagtca 600

[0939] ccaaatttat caagtgaacg gatcaactgc tctttgtgta gatcataaac gaggacaaag 660

[0940] tcctcttgct gaaataatat tgtttgtgat gttgttttta gataaggcca tagttggctt 720

[0941] aataaggttt ccacactatc aatgtcctct agtgctccaa ttgccttgac tatgacatcc 780

[0942] ccagacaact caactctata tgttgacaac ctttcattac ctctgtaaaa gataccctct 840

[0943] ttcaagacaa gaggttctcc tgggttatct ggcccaatga ggtcatatgc atacttgtta 900

[0944] cttagttcag aataaaagtc accaaagttg aacttaacat ggctcagaat attgtcatca 960

[0945] tttgtcgcag cgtagcctgc atcaataaac aagccagcta ggtcaaagct ctcatggcct 1020

[0946] gtgaacaatg gtaggctagc gataaccagt gcaccatcca acaatgagtg gcttccctca 1080

[0947] gacccagaaa cacattgact cattgcatcc acattcagct ctaattcagg ggtaccgaca 1140

[0948] tcatccactc ctagtgaact gacaatggtg taactgtaca ccatctttct tctaagttta 1200

[0949] aattttgtcg aaactcgtgt gtgttctact tgaatgatca attttagttt cacagcttct 1260

[0950] tggcaagcaa cattgcgcaa cacagtgtgc aggtccatca tgtcttcctg aggcaacaag 1320

[0951] gagatgttgt caacagagac accctcaagg aaaaccttga tattatcaaa gctagaaact 1380

[0952] acataaccca ttgcaatgtc ttcaacaaac attgctcttg atactttatt attcctaact 1440

[0953] gacaaggtaa aatctgtgag ttcagctaga tctacttgac tgtcatcttc tagatctaga 1500

[0954] acttcattga accaaaagaa ggatttgaga cacgatgttg acatgactag tgggtttatc 1560

[0955] atcgaagata agacaacttg caccatgaag ttcctgcaaa cttgctgtgg gctgatgcca 1620

[0956] acttcccaat ttgtatactc tgactgtcta acatgggctg aagcgcaatc actctgtttc 1680

[0957] acaatataaa cattattatc tcttactttc aataagtgac ttataatccc taagttttca 1740

[0958] ttcatcatgt ctagagccac acagacatct agaaacttga gtcttccact atccaaagat 1800

[0959] ctgttcactt gaagatcatt cataaagggt gccaaatgtt cttcaaatag tttggggtaa 1860

[0960] tttcttcgta tagaatgcaa tacatggttc atgcctaatt ggtcttctat ctgtcgtact 1920

[0961] gctttgggtt taacagccca gaagaaattc ttattacata agaccagagg ggcctgtgga 1980

[0962] ctcttaatag cagaaaacac ccactcccct aactcacagg catttgtcag caccaaagag 2040

[0963] aagtaatccc acaaaattgg tttagaaaat tggttaactt ctttaagtga tttttgacag 2100

[0964] taaataactt taggctttct ctcacaaatt ccacaaagac atggcattat tcgagtaaat 2160

[0965] atgtccttta tatacagaaa tccgccttta ccatccctaa cacacttact ccccatactc 2220

[0966] ttacaaaacc caatgaagcc tgaggcaaca gaagactgaa atgcagattt gttgattgac 2280
[0967] tctgccaaga tcttcttcac gccttttgtg aaatttcttg acagcctgga ctgtattgtc 2340
[0968] cttatcaatg ttggcatctc ttctttctct aacactcttc gacttgtcat gagtttggtc 2400
[0969] ctcaagacca acctcaagtc cccaaagctc gctaaattga cccatctgta gtctagagtt 2460
[0970] tgtctgattt catcttcact acacccggca tattgcagga atccggataa agcctcatcc 2520
[0971] cctcccctgc ttatcaagtt gataaggttt tcctcaaaga ttttgcctct cttaatgtca 2580
[0972] ttgaacactt tcctcgcgca gttccttata aacattgtct ccttatcatc agaaaaaata 2640
[0973] gcttcaattt tcctctgtag acggtaccct ctagacccat caacccagtc tttgacatct 2700
[0974] tgttcttcaa tagctccaaa cggagtctct ctgtatccag agtatctaat caattggttg 2760
[0975] actctaatgg aaatctttga cactatatga gtgctaaccc cattagcaat acattgatca 2820
[0976] caaattgtgt ctatggtctc tgacagttgt gttggagttt tacacttaac gttgtgtaga 2880
[0977] gcagcagaca caaacttggt gagtaaagga gtctcttcac ccatgacaaa aaatcttgac 2940
[0978] ttaaactcag caacaaaagt tcctatcaca ctctttgggc tgataaactt gtttaattta 3000
[0979] gaagataaga attcatggaa gcacaccatt tccagcagtt ctgtcctgtc ttgaaacttt 3060
[0980] tcatcactaa ggcaaggaat ttttataagg ctaacctggt catcgctgga ggtataagtg 3120
[0981] acaggtatca catcatacaa taagtcaagt gcataacaca gaaattgttc agtaattagc 3180
[0982] ccatataaat ctgatgtgtt gtgcaagatt ccctggccca tgtccaagac agacattata 3240
[0983] tggctgggga cctggtccct tgactgcaga tactggtgaa aaaactcttc accaacacta 3300
[0984] gtacagtcac aacccattaa acctaaagat ctcttcaatt tccctacaca gtaggcttct 3360
[0985] gcaacattaa ttggaacttc aacgacctta tgaagatgcc atttgagaat gttcattact 3420
[0986] ggttcaagat tcacctttgt tctatctctg ggattcttca attctaatgt gtacaaaaaa 3480
[0987] gaaaggaaaa gtgctgggct catagttggt ccccatttgg agtggtcata tgaacaggac 3540
[0988] aagtcaccat tgttaacagc cattttcata tcacagattg cacgttcgaa ttccttttct 3600
[0989] gaattcaagc atgtgtattt cattgaacta cccacagctt ctgagaagtc ttcaactaac 3660
[0990] ctggtcatca gcttagtgtt gaggtctccc acatacagtt ctctatttga gccaacctgc 3720
[0991] tccttataac ttagtccaaa tttcaagttc cctgtatttg agctgatgct tgtgaactct 3780
[0992] gtaggagagt cgtctgaata gaaacataaa ttccgtaggg ctgcatttgt aaaataactt 3840
[0993] ttgtctagct tatcagcaat ggcttcagaa ttgctttccc tggtactaag ccgaacctca 3900
[0994] tcctttagtc tcagaacttc actggaaaag cccaatctag atctacttct atgctcataa 3960
[0995] ctacccaatt tctgatcata atgtccttga attaaaagat acttgaagca ttcaaagaat 4020
[0996] tcatcttctt ggtaggctat tgttgtcaaa ttttttaata acaaacccaa agggcagatg 4080
[0997] tcctgcggtg cttcaagaaa ataagtcaat ttaaatggag atagataaac agcatcacat 4140
[0998] aactctttat acacatcaga cctgagcaca tctggatcaa aatccttcac ctcatgcatt 4200
[0999] gacacctctg ctttaatctc tctcaacact ccaaaagggg cccacaatga ctcaagagac 4260
[1000] tctcgctcat caacagatgg atttttttgat ttcaacttgg tgatctcaac ttttgtcccc 4320
[1001] tcactattag ccatcttggc tagtgtcatt tgtacgtcat ttctaatacc ctcaaaggcc 4380
[1002] cttacttgat cctctgttaa actctcatac atcactgata attcttcttg attggttctg 4440
[1003] gttcttgaac cggtgctcac aagacctgtt agatttttta atattaagta gtccatggaa 4500
[1004] tcaggatcaa gattatacct gccttttgtt ttaaacctct cagccatagt agaaacgcat 4560
[1005] gttgaaacaa gtttctcctt atcataaaca gaaagaatat ttccaagttc gtcgagcttg 4620
[1006] gggattacca cacttttatt gcttgacaga tccagagctg tgctagtgat gttaggcctg 4680
[1007] tagggattgc ttttcagttc acctgtaact ttaagtcttc ctctattgaa gagagaaatg 4740

[1008] cagaaggaca aaatctcttt acacactcct ggaatttgag tatctgagga agtcttagcc 4800
[1009] tctttggaaa agaatctgtc caatcctctt atcatggtgt cctcttgttc cagtgttaga 4860
[1010] ctcccactta gagggggttt tacaacaaca caatcaaact tgactttggg ctcaataaac 4920
[1011] ttctcaaaac actttatttg atctgtcagg cgatcaggtg tctctttggt taccaagtga 4980
[1012] cacagataac taacatttaa tagatattta aaccttcttg caaagtaaag atctgcatct 5040
[1013] tccccttcac ccaaaattgt ctggaaaagt tccacagcca tcctctgaat cagcacctct 5100
[1014] gatccagaca tgcagtcgac ccttaacttt gacatcaaat ccacatgatg gatttgattt 5160
[1015] gcatatgcca tcaagaaata tcttagacct tgtaaaaatg tctggttcct tttggaaggg 5220
[1016] gaacagagta cagctaacac taacaatctt aatattggcc ttgtcattgt catgagttcg 5280
[1017] tggctaaaat ccaaccagct ggtcatttcc tcacacattt caattaacac atcctccgaa 5340
[1018] aatataggca ggaaaaatct ctttggatca cagtaaaaag agccttgttc ttccaatacc 5400
[1019] ccattgatgg atagatagat agaatagcac cttgacttct cacctgtttt ttggtaaaac 5460
[1020] aagagaccaa atgtattctt tgtcagatga aatctttgta cataacactc tcttagtcta 5520
[1021] acattcccaa aatatctaga atactctctt tcattgatta acaatcggga ggaaaatgat 5580
[1022] gtcttcatcg agttgaccaa tgcaagggaa atggaggaca aaatcctaaa taatttcttc 5640
[1023] tgctcacctt ccactaagct gctgaatggc tgatgtctac agattttctc aaattccttg 5700
[1024] ttaatagtat atctcatcac tggtctgtca gaaacaagtg cctgagctaa aatcatcaag 5760
[1025] ctatccatat cagggtgttt tattagtttt tccagctgtg accagagatc ttgatgagag 5820
[1026] ttcttcaatg ttctggaaca cgcttgaacc cacttggggc tggtcatcaa tttcttcctt 5880
[1027] attagtttaa tcgcctccag aatatctaga agtctgtcat tgactaacat taacatttgt 5940
[1028] ccaacaacta ttcccgcatt tcttaacctt acaattgcat catcatgcgt tttgaaaaga 6000
[1029] tcacaaagta aattgagtaa aactaagtcc agaaacagta aagtgtttct cctggtgttg 6060
[1030] aaaactttta gacctttcac tttgttacac acggaaaggg cttgaagata acacctctct 6120
[1031] acagcatcaa tagatataga attctcatct gactggcttt ccatgttgac ttcatctatt 6180
[1032] ggatgcaatg cgatagagta gactacatcc atcaacttgt ttgcacaaaa agggcagctg 6240
[1033] ggcacatcac tgtctttgtg gcttcctaat aagatcaagt catttataag cttagacttt 6300
[1034] tgtgaaaatt tgaatttccc caactgcttg tcaaaaatct ccttcttaaa ccaaaacctt 6360
[1035] aactttatga gttcttctct tatgacagat tctctaatgt ctcctctaac cccaacaaag 6420
[1036] agggattcat ttaacctctc atcataaccc aaagaattct ttttcaagca ttcgatgttt 6480
[1037] tctaatccca agctctggtt ttttgtgttg gacaaactat ggatcaatcg ctggtattct 6540
[1038] tgttcttcaa tattaatctc ttgcataaat tttgatttct ttaggatgtc gatcagcaac 6600
[1039] caccgaactc tttcaacaac ccaatcagca aggaatctat tgctgtagct agatctgcca 6660
[1040] tcaaccacag gaaccaacgt aatccctgcc cttagtaggt cggactttag gtttaagagc 6720
[1041] tttgacatgt cactcttcca ttttctctca aactcatcag gattgaccct aacaaaggtt 6780
[1042] tccaatagga tgagtgtttt ccctgtgagt ttgaagccat ccggaatgac ttttggaagg 6840
[1043] gtgggacata gtatgccata gtcagacagg atcacatcaa caaacttctg atctgaattg 6900
[1044] atctgacagg cgtgtgcctc acaggactca agctctacta aacttgacag aagtttgaac 6960
[1045] ccttccaaca acagagagct ggggtgatgt tgagataaaa agatgtccct ttggtatgct 7020
[1046] agctcctgtc tttctggaaa atgctttcta ataaggcttt ttatttcatt tactgattcc 7080
[1047] tccatgctca agtgccgcct aggatcctcg gtgcg 7115
[1048] <210> 11
[1049] <211> 3411

[1050] <212> DNA

[1051] <213> 人工序列

[1052] <220>

[1053] <223> Junin病毒Candid#1 S 区段

[1054] <400> 11

[1055] gcgcaccggg gatcctaggc gattttggtt acgctataat tgtaactgtt ttctgtttgg 60

[1056] acaacatcaa aaacatccat tgcacaatgg ggcagttcat tagcttcatg caagaaatac 120

[1057] caacctttt gcaggaggct ctgaacattg ctcttgttgc agtcagtctc attgccatca 180

[1058] ttaagggtat agtgaacttg tacaaaagtg gtttattcca attctttgta ttcctagcgc 240

[1059] ttgcaggaag atcctgcaca gaagaagctt tcaaaatcgg actgcacact gagttccaga 300

[1060] ctgtgtcctt ctcaatggtg ggtctctttt ccaacaatcc acatgaccta cctttgttgt 360

[1061] gtaccttaaa caagagccat ctttacatta agggggggcaa tgcttcattt cagatcagct 420

[1062] ttgatgatat tgcagtattg ttgccacagt atgatgttat aatacaacat ccagcagata 480

[1063] tgagctggtg ttccaaaagt gatgatcaaa tttggttgtc tcagtggttc atgaatgctg 540

[1064] tgggacatga ttggcatcta gacccaccat ttctgtgtag gaaccgtgca aagacagaag 600

[1065] gcttcatctt tcaagtcaac acctccaaga ctggtgtcaa tggaaattat gctaagaagt 660

[1066] ttaagactgg catgcatcat ttatatagag aatatcctga cccttgcttg aatggcaaac 720

[1067] tgtgcttaat gaaggcacaa cctaccagtt ggcctctcca atgtccactc gaccacgtta 780

[1068] acacattaca cttccttaca agaggtaaaa acattcaact tccaaggagg tccttgaaag 840

[1069] cattcttctc ctggtctttg acagactcat ccggcaagga taccccctgga ggctattgtc 900

[1070] tagaagagtg gatgctcgta gcagccaaaa tgaagtgttt tggcaatact gctgtagcaa 960

[1071] aatgcaattt gaatcatgac tctgaattct gtgacatgtt gaggctcttt gattacaaca 1020

[1072] aaaatgctat caaaacccta aatgatgaaa ctaagaaaca agtaaatctg atggggcaga 1080

[1073] caatcaatgc cctgatatct gacaatttat tgatgaaaaa caaaattagg gaactgatga 1140

[1074] gtgtccctta ctgcaattac acaaaatttt ggtatgtcaa ccacacactt tcaggacaac 1200

[1075] actcattacc aaggtgctgg ttaataaaaa acaacagcta tttgaacatc tctgacttcc 1260

[1076] gtaatgactg gatattagaa agtgacttct taatttctga aatgctaagc aaagagtatt 1320

[1077] cggacaggca gggtaaaact cctttgactt tagttgacat ctgtatttgg agcacagtat 1380

[1078] tcttcacagc gtcactcttc cttcacttgg tgggtatacc ctcccacaga cacatcaggg 1440

[1079] gcgaagcatg ccctttgcca cacaggttga acagcttggg tggttgcaga tgtggtaagt 1500

[1080] accccaatct aaagaaacca acagtttggc gtagaggaca ctaagacctc ctgagggtcc 1560

[1081] ccaccagccc gggcactgcc cgggctggtg tggcccccca gtccgcggcc tggccgcgga 1620

[1082] ctggggaggc actgcttaca gtgcataggc tgccttcggg aggaacagca agctcggtgg 1680

[1083] taatagaggt gtaggttcct cctcatagag cttcccatct agcactgact gaaacattat 1740

[1084] gcagtctagc agagcacagt gtggttcact ggaggccaac ttgaagggag tatccttttc 1800

[1085] cctctttttc ttattgacaa ccactccatt gtgatatttg cataagtgac catatttctc 1860

[1086] ccagacctgt tgatcaaact gcctggcttg ttcagatgtg agcttaacat caaccagttt 1920

[1087] aagatctctt cttccatgga ggtcaaacaa cttcctgatg tcatcggatc cttgagtagt 1980

[1088] cacaaccatg tctggaggca gcaagccgat cacgtaacta agaactcctg gcattgcatc 2040

[1089] ttctatgtcc ttcattaaga tgccgtgaga gtgtctgcta ccatttttaa acccctttctc 2100

[1090] atcatgtggt tttctgaagc agtgaatgta ctgcttacct gcaggttgga ataatgccat 2160

[1091] ctcaacaggg tcagtggctg gtccttcaat gtcgagccaa agggtgttgg tggggtcgag 2220

[1092] tttccccact gcctctctga tgacagcttc ttgtatctct gtcaagttag ccaatctcaa 2280
[1093] attctgaccg ttttttttccg gctgtctagg accagcaact ggtttccttg tcagatcaat 2340
[1094] acttgtgttg tcccatgacc tgcctgtgat ttgtgatcta gaaccaatat aaggccaacc 2400
[1095] atcgccagaa agacaaagtt tgtacaaaag gttttcataa ggatttctat tgcctggttt 2460
[1096] ctcatcaata aacatgcctt ctcttcgttt aacctgaatg gttgatttta tgagggaaga 2520
[1097] gaagttttct ggggtgactc tgattgtttc caacatgttt ccaccatcaa gaatagatgc 2580
[1098] tccagccttt actgcagctg aaagactgaa gttgtaacca gaaatattga tggagctttc 2640
[1099] atctttagtc acaatctgaa ggcagtcatg ttcctgagtc agtctgtcaa ggtcacttaa 2700
[1100] gtttggatac ttcacagtgt atagaagccc aagtgaggtt aaagcttgta tgacactgtt 2760
[1101] cattgtctca cctccttgaa cagtcatgca tgcaattgtc aatgcaggaa cagagccaaa 2820
[1102] ctgattgttt agctttgaag ggtctttaac atcccatatc ctcaccacac catttccccc 2880
[1103] agtcccttgc tgttgaaatc ccagtgttct caatatctct gatcttttag caagttgtga 2940
[1104] ctgggacaag ttacccatgt aaaccccctg agagcctgtc tctgctcttc ttatcttgtt 3000
[1105] ttttaatttc tcaaggtcag acgccaactc catcagttca tccctcccca gatctcccac 3060
[1106] cttgaaaact gtgtttcgtt gaacactcct catggacatg agtctgtcaa cctctttatt 3120
[1107] caggtccctc aacttgttga ggtcttcttc ccccttttta gtctttctga gtgcccgctg 3180
[1108] cacctgtgcc acttggttga agtcgatgct gtcagcaatt agcttggcgt ccttcaaaac 3240
[1109] atctgacttg acagtctgag tgaattggct caaacctctc cttaaggact gagtccatct 3300
[1110] aaagcttgga acctccttgg agtgtgccat gccagaagtt ctggtgattt tgatctagaa 3360
[1111] tagagttgct cagtgaaagt gttagacact atgcctagga tccactgtgc g 3411
[1112] <210> 12
[1113] <211> 558
[1114] <212> PRT
[1115] <213> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒
[1116] <220>
[1117] <223> LCMV的Clone 13毒株NP蛋白
[1118] (GenBank登记号ABC96002.1; GI:86440166)
[1119] <400> 12
[1120] Met Ser Leu Ser Lys Glu Val Lys Ser Phe Gln Trp Thr Gln Ala Leu
[1121] 1 5 10 15
[1122] Arg Arg Glu Leu Gln Ser Phe Thr Ser Asp Val Lys Ala Ala Val Ile
[1123] 20 25 30
[1124] Lys Asp Ala Thr Asn Leu Leu Asn Gly Leu Asp Phe Ser Glu Val Ser
[1125] 35 40 45
[1126] Asn Val Gln Arg Ile Met Arg Lys Glu Lys Arg Asp Asp Lys Asp Leu
[1127] 50 55 60
[1128] Gln Arg Leu Arg Ser Leu Asn Gln Thr Val His Ser Leu Val Asp Leu
[1129] 65 70 75 80
[1130] Lys Ser Thr Ser Lys Lys Asn Val Leu Lys Val Gly Arg Leu Ser Ala
[1131] 85 90 95
[1132] Glu Glu Leu Met Ser Leu Ala Ala Asp Leu Glu Lys Leu Lys Ala Lys
[1133] 100 105 110

[1134] Ile Met Arg Ser Glu Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn
[1135] 115 120 125
[1136] Leu Thr Thr Gln Gln Leu Asp Gln Arg Ser Gln Ile Leu Gln Ile Val
[1137] 130 135 140
[1138] Gly Met Arg Lys Pro Gln Gln Gly Ala Ser Gly Val Val Arg Val Trp
[1139] 145 150 155 160
[1140] Asp Val Lys Asp Ser Ser Leu Leu Asn Asn Gln Phe Gly Thr Met Pro
[1141] 165 170 175
[1142] Ser Leu Thr Met Ala Cys Met Ala Lys Gln Ser Gln Thr Pro Leu Asn
[1143] 180 185 190
[1144] Asp Val Val Gln Ala Leu Thr Asp Leu Gly Leu Leu Tyr Thr Val Lys
[1145] 195 200 205
[1146] Tyr Pro Asn Leu Asn Asp Leu Glu Arg Leu Lys Asp Lys His Pro Val
[1147] 210 215 220
[1148] Leu Gly Val Ile Thr Glu Gln Gln Ser Ser Ile Asn Ile Ser Gly Tyr
[1149] 225 230 235 240
[1150] Asn Phe Ser Leu Gly Ala Ala Val Lys Ala Gly Ala Ala Leu Leu Asp
[1151] 245 250 255
[1152] Gly Gly Asn Met Leu Glu Ser Ile Leu Ile Lys Pro Ser Asn Ser Glu
[1153] 260 265 270
[1154] Asp Leu Leu Lys Ala Val Leu Gly Ala Lys Arg Lys Leu Asn Met Phe
[1155] 275 280 285
[1156] Val Ser Asp Gln Val Gly Asp Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Ile Leu Tyr
[1157] 290 295 300
[1158] Lys Val Cys Leu Ser Gly Glu Gly Trp Pro Tyr Ile Ala Cys Arg Thr
[1159] 305 310 315 320
[1160] Ser Ile Val Gly Arg Ala Trp Glu Asn Thr Thr Ile Asp Leu Thr Ser
[1161] 325 330 335
[1162] Glu Lys Pro Ala Val Asn Ser Pro Arg Pro Ala Pro Gly Ala Ala Gly
[1163] 340 345 350
[1164] Pro Pro Gln Val Gly Leu Ser Tyr Ser Gln Thr Met Leu Leu Lys Asp
[1165] 355 360 365
[1166] Leu Met Gly Gly Ile Asp Pro Asn Ala Pro Thr Trp Ile Asp Ile Glu
[1167] 370 375 380
[1168] Gly Arg Phe Asn Asp Pro Val Glu Ile Ala Ile Phe Gln Pro Gln Asn
[1169] 385 390 395 400
[1170] Gly Gln Phe Ile His Phe Tyr Arg Glu Pro Val Asp Gln Lys Gln Phe
[1171] 405 410 415
[1172] Lys Gln Asp Ser Lys Tyr Ser His Gly Met Asp Leu Ala Asp Leu Phe
[1173] 420 425 430
[1174] Asn Ala Gln Pro Gly Leu Thr Ser Ser Val Ile Gly Ala Leu Pro Gln
[1175] 435 440 445

[1176] Gly Met Val Leu Ser Cys Gln Gly Ser Asp Asp Ile Arg Lys Leu Leu
[1177] 450 455 460
[1178] Asp Ser Gln Asn Arg Lys Asp Ile Lys Leu Ile Asp Val Glu Met Thr
[1179] 465 470 475 480
[1180] Arg Glu Ala Ser Arg Glu Tyr Glu Asp Lys Val Trp Asp Lys Tyr Gly
[1181] 485 490 495
[1182] Trp Leu Cys Lys Met His Thr Gly Ile Val Arg Asp Lys Lys Lys Lys
[1183] 500 505 510
[1184] Glu Ile Thr Pro His Cys Ala Leu Met Asp Cys Ile Ile Phe Glu Ser
[1185] 515 520 525
[1186] Ala Ser Lys Ala Arg Leu Pro Asp Leu Lys Thr Val His Asn Ile Leu
[1187] 530 535 540
[1188] Pro His Asp Leu Ile Phe Arg Gly Pro Asn Val Val Thr Leu
[1189] 545 550 555
[1190] <210> 13
[1191] <211> 498
[1192] <212> PRT
[1193] <213> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒
[1194] <220>
[1195] <223> LCMV的Clone 13毒株GP蛋白
[1196] (GenBank登记号ABC96001.2; GI:116563462)
[1197] <400> 13
[1198] Met Gly Gln Ile Val Thr Met Phe Glu Ala Leu Pro His Ile Ile Asp
[1199] 1 5 10 15
[1200] Glu Val Ile Asn Ile Val Ile Ile Val Leu Ile Val Ile Thr Gly Ile
[1201] 20 25 30
[1202] Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ser
[1203] 35 40 45
[1204] Phe Leu Leu Leu Ala Gly Arg Ser Cys Gly Met Tyr Gly Leu Lys Gly
[1205] 50 55 60
[1206] Pro Asp Ile Tyr Lys Gly Val Tyr Gln Phe Lys Ser Val Glu Phe Asp
[1207] 65 70 75 80
[1208] Met Ser His Leu Asn Leu Thr Met Pro Asn Ala Cys Ser Ala Asn Asn
[1209] 85 90 95
[1210] Ser His His Tyr Ile Ser Met Gly Thr Ser Gly Leu Glu Leu Thr Phe
[1211] 100 105 110
[1212] Thr Asn Asp Ser Ile Ile Ser His Asn Phe Cys Asn Leu Thr Ser Ala
[1213] 115 120 125
[1214] Phe Asn Lys Lys Thr Phe Asp His Thr Leu Met Ser Ile Val Ser Ser
[1215] 130 135 140
[1216] Leu His Leu Ser Ile Arg Gly Asn Ser Asn Tyr Lys Ala Val Ser Cys
[1217] 145 150 155 160

[1218] Asp Phe Asn Asn Gly Ile Thr Ile Gln Tyr Asn Leu Thr Phe Ser Asp
[1219] 165 170 175
[1220] Ala Gln Ser Ala Gln Ser Gln Cys Arg Thr Phe Arg Gly Arg Val Leu
[1221] 180 185 190
[1222] Asp Met Phe Arg Thr Ala Phe Gly Gly Lys Tyr Met Arg Ser Gly Trp
[1223] 195 200 205
[1224] Gly Trp Thr Gly Ser Asp Gly Lys Thr Thr Trp Cys Ser Gln Thr Ser
[1225] 210 215 220
[1226] Tyr Gln Tyr Leu Ile Ile Gln Asn Arg Thr Trp Glu Asn His Cys Thr
[1227] 225 230 235 240
[1228] Tyr Ala Gly Pro Phe Gly Met Ser Arg Ile Leu Leu Ser Gln Glu Lys
[1229] 245 250 255
[1230] Thr Lys Phe Leu Thr Arg Arg Leu Ala Gly Thr Phe Thr Trp Thr Leu
[1231] 260 265 270
[1232] Ser Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Thr Lys
[1233] 275 280 285
[1234] Trp Met Ile Leu Ala Ala Glu Leu Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Val
[1235] 290 295 300
[1236] Ala Lys Cys Asn Val Asn His Asp Glu Glu Phe Cys Asp Met Leu Arg
[1237] 305 310 315 320
[1238] Leu Ile Asp Tyr Asn Lys Ala Ala Leu Ser Lys Phe Lys Glu Asp Val
[1239] 325 330 335
[1240] Glu Ser Ala Leu His Leu Phe Lys Thr Thr Val Asn Ser Leu Ile Ser
[1241] 340 345 350
[1242] Asp Gln Leu Leu Met Arg Asn His Leu Arg Asp Leu Met Gly Val Pro
[1243] 355 360 365
[1244] Tyr Cys Asn Tyr Ser Lys Phe Trp Tyr Leu Glu His Ala Lys Thr Gly
[1245] 370 375 380
[1246] Glu Thr Ser Val Pro Lys Cys Trp Leu Val Thr Asn Gly Ser Tyr Leu
[1247] 385 390 395 400
[1248] Asn Glu Thr His Phe Ser Asp Gln Ile Glu Gln Glu Ala Asp Asn Met
[1249] 405 410 415
[1250] Ile Thr Glu Met Leu Arg Lys Asp Tyr Ile Lys Arg Gln Gly Ser Thr
[1251] 420 425 430
[1252] Pro Leu Ala Leu Met Asp Leu Leu Met Phe Ser Thr Ser Ala Tyr Leu
[1253] 435 440 445
[1254] Val Ser Ile Phe Leu His Leu Val Lys Ile Pro Thr His Arg His Ile
[1255] 450 455 460
[1256] Lys Gly Gly Ser Cys Pro Lys Pro His Arg Leu Thr Asn Lys Gly Ile
[1257] 465 470 475 480
[1258] Cys Ser Cys Gly Ala Phe Lys Val Pro Gly Val Lys Thr Val Trp Lys
[1259] 485 490 495

[1260] Arg Arg

[1261] <210> 14

[1262] <211> 2210

[1263] <212> PRT

[1264] <213> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒

[1265] <220>

[1266] <223> LCMV的Clone 13毒株L蛋白

[1267] (GenBank登记号ABC96004.1; GI:86440169)

[1268] <400> 14

[1269] Met Asp Glu Ile Ile Ser Glu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Asn Tyr Ile

[1270] 1 5 10 15

[1271] Glu Gln Asp Glu Arg Leu Ser Arg Gln Lys Leu Asn Phe Leu Gly Gln

[1272] 20 25 30

[1273] Arg Glu Pro Arg Met Val Leu Ile Glu Gly Leu Lys Leu Leu Ser Arg

[1274] 35 40 45

[1275] Cys Ile Glu Ile Asp Ser Ala Asp Lys Ser Gly Cys Thr His Asn His

[1276] 50 55 60

[1277] Asp Asp Lys Ser Val Glu Thr Ile Leu Val Glu Ser Gly Ile Val Cys

[1278] 65 70 75 80

[1279] Pro Gly Leu Pro Leu Ile Ile Pro Asp Gly Tyr Lys Leu Ile Asp Asn

[1280] 85 90 95

[1281] Ser Leu Ile Leu Leu Glu Cys Phe Val Arg Ser Thr Pro Ala Ser Phe

[1282] 100 105 110

[1283] Glu Lys Lys Phe Ile Glu Asp Thr Asn Lys Leu Ala Cys Ile Arg Glu

[1284] 115 120 125

[1285] Asp Leu Ala Val Ala Gly Val Thr Leu Val Pro Ile Val Asp Gly Arg

[1286] 130 135 140

[1287] Cys Asp Tyr Asp Asn Ser Phe Met Pro Glu Trp Ala Asn Phe Lys Phe

[1288] 145 150 155 160

[1289] Arg Asp Leu Leu Phe Lys Leu Leu Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Glu Lys

[1290] 165 170 175

[1291] Val Phe Glu Glu Ser Glu Tyr Phe Arg Leu Cys Glu Ser Leu Lys Thr

[1292] 180 185 190

[1293] Thr Ile Asp Lys Arg Ser Gly Met Asp Ser Met Lys Ile Leu Lys Asp

[1294] 195 200 205

[1295] Ala Arg Ser Thr His Asn Asp Glu Ile Met Arg Met Cys His Glu Gly

[1296] 210 215 220

[1297] Ile Asn Pro Asn Met Ser Cys Asp Asp Val Val Phe Gly Ile Asn Ser

[1298] 225 230 235 240

[1299] Leu Phe Ser Arg Phe Arg Arg Asp Leu Glu Ser Gly Lys Leu Lys Arg

[1300] 245 250 255

[1301] Asn Phe Gln Lys Val Asn Pro Glu Gly Leu Ile Lys Glu Phe Ser Glu

[1302] 260 265 270
[1303] Leu Tyr Glu Asn Leu Ala Asp Ser Asp Asp Ile Leu Thr Leu Ser Arg
[1304] 275 280 285
[1305] Glu Ala Val Glu Ser Cys Pro Leu Met Arg Phe Ile Thr Ala Glu Thr
[1306] 290 295 300
[1307] His Gly His Glu Arg Gly Ser Glu Thr Ser Thr Glu Tyr Glu Arg Leu
[1308] 305 310 315 320
[1309] Leu Ser Met Leu Asn Lys Val Lys Ser Leu Lys Leu Leu Asn Thr Arg
[1310] 325 330 335
[1311] Arg Arg Gln Leu Leu Asn Leu Asp Val Leu Cys Leu Ser Ser Leu Ile
[1312] 340 345 350
[1313] Lys Gln Ser Lys Phe Lys Gly Leu Lys Asn Asp Lys His Trp Val Gly
[1314] 355 360 365
[1315] Cys Cys Tyr Ser Ser Val Asn Asp Arg Leu Val Ser Phe His Ser Thr
[1316] 370 375 380
[1317] Lys Glu Glu Phe Ile Arg Leu Leu Arg Asn Arg Lys Lys Ser Lys Val
[1318] 385 390 395 400
[1319] Phe Arg Lys Val Ser Phe Glu Glu Leu Phe Arg Ala Ser Ile Ser Glu
[1320] 405 410 415
[1321] Phe Ile Ala Lys Ile Gln Lys Cys Leu Leu Val Val Gly Leu Ser Phe
[1322] 420 425 430
[1323] Glu His Tyr Gly Leu Ser Glu His Leu Glu Gln Glu Cys His Ile Pro
[1324] 435 440 445
[1325] Phe Thr Glu Phe Glu Asn Phe Met Lys Ile Gly Ala His Pro Ile Met
[1326] 450 455 460
[1327] Tyr Tyr Thr Lys Phe Glu Asp Tyr Asn Phe Gln Pro Ser Thr Glu Gln
[1328] 465 470 475 480
[1329] Leu Lys Asn Ile Gln Ser Leu Arg Arg Leu Ser Ser Val Cys Leu Ala
[1330] 485 490 495
[1331] Leu Thr Asn Ser Met Lys Thr Ser Ser Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn
[1332] 500 505 510
[1333] Gln Ile Gly Ser Val Arg Tyr Gln Val Val Glu Cys Lys Glu Val Phe
[1334] 515 520 525
[1335] Cys Gln Val Ile Lys Leu Asp Ser Glu Glu Tyr His Leu Leu Tyr Gln
[1336] 530 535 540
[1337] Lys Thr Gly Glu Ser Ser Arg Cys Tyr Ser Ile Gln Gly Pro Asp Gly
[1338] 545 550 555 560
[1339] His Leu Ile Ser Phe Tyr Ala Asp Pro Lys Arg Phe Phe Leu Pro Ile
[1340] 565 570 575
[1341] Phe Ser Asp Glu Val Leu Tyr Asn Met Ile Asp Ile Met Ile Ser Trp
[1342] 580 585 590
[1343] Ile Arg Ser Cys Pro Asp Leu Lys Asp Cys Leu Thr Asp Ile Glu Val

[1344] 595 600 605
[1345] Ala Leu Arg Thr Leu Leu Leu Leu Met Leu Thr Asn Pro Thr Lys Arg
[1346] 610 615 620
[1347] Asn Gln Lys Gln Val Gln Ser Val Arg Tyr Leu Val Met Ala Ile Val
[1348] 625 630 635 640
[1349] Ser Asp Phe Ser Ser Thr Ser Leu Met Asp Lys Leu Arg Glu Asp Leu
[1350] 645 650 655
[1351] Ile Thr Pro Ala Glu Lys Val Val Tyr Lys Leu Leu Arg Phe Leu Ile
[1352] 660 665 670
[1353] Lys Thr Ile Phe Gly Thr Gly Glu Lys Val Leu Leu Ser Ala Lys Phe
[1354] 675 680 685
[1355] Lys Phe Met Leu Asn Val Ser Tyr Leu Cys His Leu Ile Thr Lys Glu
[1356] 690 695 700
[1357] Thr Pro Asp Arg Leu Thr Asp Gln Ile Lys Cys Phe Glu Lys Phe Phe
[1358] 705 710 715 720
[1359] Glu Pro Lys Ser Gln Phe Gly Phe Phe Val Asn Pro Lys Glu Ala Ile
[1360] 725 730 735
[1361] Thr Pro Glu Glu Glu Cys Val Phe Tyr Glu Gln Met Lys Arg Phe Thr
[1362] 740 745 750
[1363] Ser Lys Glu Ile Asp Cys Gln His Thr Thr Pro Gly Val Asn Leu Glu
[1364] 755 760 765
[1365] Ala Phe Ser Leu Met Val Ser Ser Phe Asn Asn Gly Thr Leu Ile Phe
[1366] 770 775 780
[1367] Lys Gly Glu Lys Lys Leu Asn Ser Leu Asp Pro Met Thr Asn Ser Gly
[1368] 785 790 795 800
[1369] Cys Ala Thr Ala Leu Asp Leu Ala Ser Asn Lys Ser Val Val Val Asn
[1370] 805 810 815
[1371] Lys His Leu Asn Gly Glu Arg Leu Leu Glu Tyr Asp Phe Asn Lys Leu
[1372] 820 825 830
[1373] Leu Val Ser Ala Val Ser Gln Ile Thr Glu Ser Phe Val Arg Lys Gln
[1374] 835 840 845
[1375] Lys Tyr Lys Leu Ser His Ser Asp Tyr Glu Tyr Lys Val Ser Lys Leu
[1376] 850 855 860
[1377] Val Ser Arg Leu Val Ile Gly Ser Lys Gly Glu Glu Thr Gly Arg Ser
[1378] 865 870 875 880
[1379] Glu Asp Asn Leu Ala Glu Ile Cys Phe Asp Gly Glu Glu Glu Thr Ser
[1380] 885 890 895
[1381] Phe Phe Lys Ser Leu Glu Glu Lys Val Asn Thr Thr Ile Ala Arg Tyr
[1382] 900 905 910
[1383] Arg Arg Gly Arg Arg Ala Asn Asp Lys Gly Asp Gly Glu Lys Leu Thr
[1384] 915 920 925
[1385] Asn Thr Lys Gly Leu His His Leu Gln Leu Ile Leu Thr Gly Lys Met

[1386] 930 935 940

[1387] Ala His Leu Arg Lys Val Ile Leu Ser Glu Ile Ser Phe His Leu Val

[1388] 945 950 955 960

[1389] Glu Asp Phe Asp Pro Ser Cys Leu Thr Asn Asp Asp Met Lys Phe Ile

[1390] 965 970 975

[1391] Cys Glu Ala Val Glu Gly Ser Thr Glu Leu Ser Pro Leu Tyr Phe Thr

[1392] 980 985 990

[1393] Ser Val Ile Lys Asp Gln Cys Gly Leu Asp Glu Met Ala Lys Asn Leu

[1394] 995 1000 1005

[1395] Cys Arg Lys Phe Phe Ser Glu Asn Asp Trp Phe Ser Cys Met Lys

[1396] 1010 1015 1020

[1397] Met Ile Leu Leu Gln Met Asn Ala Asn Ala Tyr Ser Gly Lys Tyr

[1398] 1025 1030 1035

[1399] Arg His Met Gln Arg Gln Gly Leu Asn Phe Lys Phe Asp Trp Asp

[1400] 1040 1045 1050

[1401] Lys Leu Glu Glu Asp Val Arg Ile Ser Glu Arg Glu Ser Asn Ser

[1402] 1055 1060 1065

[1403] Glu Ser Leu Ser Lys Ala Leu Ser Leu Thr Gln Cys Met Ser Ala

[1404] 1070 1075 1080

[1405] Ala Leu Lys Asn Leu Cys Phe Tyr Ser Glu Glu Ser Pro Thr Ser

[1406] 1085 1090 1095

[1407] Tyr Thr Ser Val Gly Pro Asp Ser Gly Arg Leu Lys Phe Ala Leu

[1408] 1100 1105 1110

[1409] Ser Tyr Lys Glu Gln Val Gly Gly Asn Arg Glu Leu Tyr Ile Gly

[1410] 1115 1120 1125

[1411] Asp Leu Arg Thr Lys Met Phe Thr Arg Leu Ile Glu Asp Tyr Phe

[1412] 1130 1135 1140

[1413] Glu Ser Phe Ser Ser Phe Phe Ser Gly Ser Cys Leu Asn Asn Asp

[1414] 1145 1150 1155

[1415] Lys Glu Phe Glu Asn Ala Ile Leu Ser Met Thr Ile Asn Val Arg

[1416] 1160 1165 1170

[1417] Glu Gly Phe Leu Asn Tyr Ser Met Asp His Ser Lys Trp Gly Pro

[1418] 1175 1180 1185

[1419] Met Met Cys Pro Phe Leu Phe Leu Met Phe Leu Gln Asn Leu Lys

[1420] 1190 1195 1200

[1421] Leu Gly Asp Asp Gln Tyr Val Arg Ser Gly Lys Asp His Val Ser

[1422] 1205 1210 1215

[1423] Thr Leu Leu Thr Trp His Met His Lys Leu Val Glu Val Pro Phe

[1424] 1220 1225 1230

[1425] Pro Val Val Asn Ala Met Met Lys Ser Tyr Val Lys Ser Lys Leu

[1426] 1235 1240 1245

[1427] Lys Leu Leu Arg Gly Ser Glu Thr Thr Val Thr Glu Arg Ile Phe

[1428] 1250 1255 1260

[1429] Arg Gln Tyr Phe Glu Met Gly Ile Val Pro Ser His Ile Ser Ser

[1430] 1265 1270 1275

[1431] Leu Ile Asp Met Gly Gln Gly Ile Leu His Asn Ala Ser Asp Phe

[1432] 1280 1285 1290

[1433] Tyr Gly Leu Leu Ser Glu Arg Phe Ile Asn Tyr Cys Ile Gly Val

[1434] 1295 1300 1305

[1435] Ile Phe Gly Glu Arg Pro Glu Ala Tyr Thr Ser Ser Asp Asp Gln

[1436] 1310 1315 1320

[1437] Ile Thr Leu Phe Asp Arg Arg Leu Ser Asp Leu Val Val Ser Asp

[1438] 1325 1330 1335

[1439] Pro Glu Glu Val Leu Val Leu Leu Glu Phe Gln Ser His Leu Ser

[1440] 1340 1345 1350

[1441] Gly Leu Leu Asn Lys Phe Ile Ser Pro Lys Ser Val Ala Gly Arg

[1442] 1355 1360 1365

[1443] Phe Ala Ala Glu Phe Lys Ser Arg Phe Tyr Val Trp Gly Glu Glu

[1444] 1370 1375 1380

[1445] Val Pro Leu Leu Thr Lys Phe Val Ser Ala Ala Leu His Asn Val

[1446] 1385 1390 1395

[1447] Lys Cys Lys Glu Pro His Gln Leu Cys Glu Thr Ile Asp Thr Ile

[1448] 1400 1405 1410

[1449] Ala Asp Gln Ala Ile Ala Asn Gly Val Pro Val Ser Leu Val Asn

[1450] 1415 1420 1425

[1451] Ser Ile Gln Arg Arg Thr Leu Asp Leu Leu Lys Tyr Ala Asn Phe

[1452] 1430 1435 1440

[1453] Pro Leu Asp Pro Phe Leu Leu Asn Thr Asn Thr Asp Val Lys Asp

[1454] 1445 1450 1455

[1455] Trp Leu Asp Gly Ser Arg Gly Tyr Arg Ile Gln Arg Leu Ile Glu

[1456] 1460 1465 1470

[1457] Glu Leu Cys Pro Asn Glu Thr Lys Val Val Arg Lys Leu Val Arg

[1458] 1475 1480 1485

[1459] Lys Leu His His Lys Leu Lys Asn Gly Glu Phe Asn Glu Glu Phe

[1460] 1490 1495 1500

[1461] Phe Leu Asp Leu Phe Asn Arg Asp Lys Lys Glu Ala Ile Leu Gln

[1462] 1505 1510 1515

[1463] Leu Gly Asp Leu Leu Gly Leu Glu Glu Asp Leu Asn Gln Leu Ala

[1464] 1520 1525 1530

[1465] Asp Val Asn Trp Leu Asn Leu Asn Glu Met Phe Pro Leu Arg Met

[1466] 1535 1540 1545

[1467] Val Leu Arg Gln Lys Val Val Tyr Pro Ser Val Met Thr Phe Gln

[1468] 1550 1555 1560

[1469] Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Ile Lys Thr Leu Gln Asn Lys Leu

[1470] 1565 1570 1575

[1471] Cys Ser Lys Phe Thr Arg Gly Ala Gln Lys Leu Leu Ser Glu Ala

[1472] 1580 1585 1590

[1473] Ile Asn Lys Ser Ala Phe Gln Ser Cys Ile Ser Ser Gly Phe Ile

[1474] 1595 1600 1605

[1475] Gly Leu Cys Lys Thr Leu Gly Ser Arg Cys Val Arg Asn Lys Asn

[1476] 1610 1615 1620

[1477] Arg Glu Asn Leu Tyr Ile Lys Lys Leu Leu Glu Asp Leu Thr Thr

[1478] 1625 1630 1635

[1479] Asp Asp His Val Thr Arg Val Cys Asn Arg Asp Gly Ile Thr Leu

[1480] 1640 1645 1650

[1481] Tyr Ile Cys Asp Lys Gln Ser His Pro Glu Ala His Arg Asp His

[1482] 1655 1660 1665

[1483] Ile Cys Leu Leu Arg Pro Leu Leu Trp Asp Tyr Ile Cys Ile Ser

[1484] 1670 1675 1680

[1485] Leu Ser Asn Ser Phe Glu Leu Gly Val Trp Val Leu Ala Glu Pro

[1486] 1685 1690 1695

[1487] Thr Lys Gly Lys Asn Asn Ser Glu Asn Leu Thr Leu Lys His Leu

[1488] 1700 1705 1710

[1489] Asn Pro Cys Asp Tyr Val Ala Arg Lys Pro Glu Ser Ser Arg Leu

[1490] 1715 1720 1725

[1491] Leu Glu Asp Lys Val Asn Leu Asn Gln Val Ile Gln Ser Val Arg

[1492] 1730 1735 1740

[1493] Arg Leu Tyr Pro Lys Ile Phe Glu Asp Gln Leu Leu Pro Phe Met

[1494] 1745 1750 1755

[1495] Ser Asp Met Ser Ser Lys Asn Met Arg Trp Ser Pro Arg Ile Lys

[1496] 1760 1765 1770

[1497] Phe Leu Asp Leu Cys Val Leu Ile Asp Ile Asn Ser Glu Ser Leu

[1498] 1775 1780 1785

[1499] Ser Leu Ile Ser His Val Val Lys Trp Lys Arg Asp Glu His Tyr

[1500] 1790 1795 1800

[1501] Thr Val Leu Phe Ser Asp Leu Ala Asn Ser His Gln Arg Ser Asp

[1502] 1805 1810 1815

[1503] Ser Ser Leu Val Asp Glu Phe Val Val Ser Thr Arg Asp Val Cys

[1504] 1820 1825 1830

[1505] Lys Asn Phe Leu Lys Gln Val Tyr Phe Glu Ser Phe Val Arg Glu

[1506] 1835 1840 1845

[1507] Phe Val Ala Thr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Phe Ser Trp Phe Pro

[1508] 1850 1855 1860

[1509] His Lys Glu Met Met Pro Ser Glu Asp Gly Ala Glu Ala Leu Gly

[1510] 1865 1870 1875

[1511] Pro Phe Gln Ser Phe Val Ser Lys Val Val Asn Lys Asn Val Glu

[1512] 1880 1885 1890
[1513] Arg Pro Met Phe Arg Asn Asp Leu Gln Phe Gly Phe Gly Trp Phe
[1514] 1895 1900 1905
[1515] Ser Tyr Arg Met Gly Asp Val Val Cys Asn Ala Ala Met Leu Ile
[1516] 1910 1915 1920
[1517] Arg Gln Gly Leu Thr Asn Pro Lys Ala Phe Lys Ser Leu Lys Asp
[1518] 1925 1930 1935
[1519] Leu Trp Asp Tyr Met Leu Asn Tyr Thr Lys Gly Val Leu Glu Phe
[1520] 1940 1945 1950
[1521] Ser Ile Ser Val Asp Phe Thr His Asn Gln Asn Asn Thr Asp Cys
[1522] 1955 1960 1965
[1523] Leu Arg Lys Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Arg Cys Gln Leu Gln
[1524] 1970 1975 1980
[1525] Asn Pro Gly Val Ala Glu Leu Leu Ser Cys Ser His Leu Phe Lys
[1526] 1985 1990 1995
[1527] Gly Glu Ile Asp Arg Arg Met Leu Asp Glu Cys Leu His Leu Leu
[1528] 2000 2005 2010
[1529] Arg Thr Asp Ser Val Phe Lys Val Asn Asp Gly Val Phe Asp Ile
[1530] 2015 2020 2025
[1531] Arg Ser Glu Glu Phe Glu Asp Tyr Met Glu Asp Pro Leu Ile Leu
[1532] 2030 2035 2040
[1533] Gly Asp Ser Leu Glu Leu Glu Leu Leu Gly Ser Lys Arg Ile Leu
[1534] 2045 2050 2055
[1535] Asp Gly Ile Arg Ser Ile Asp Phe Glu Arg Val Gly Pro Glu Trp
[1536] 2060 2065 2070
[1537] Glu Pro Val Pro Leu Thr Val Lys Met Gly Ala Leu Phe Glu Gly
[1538] 2075 2080 2085
[1539] Arg Asn Leu Val Gln Asn Ile Ile Val Lys Leu Glu Thr Lys Asp
[1540] 2090 2095 2100
[1541] Met Lys Val Phe Leu Ala Gly Leu Glu Gly Tyr Glu Lys Ile Ser
[1542] 2105 2110 2115
[1543] Asp Val Leu Gly Asn Leu Phe Leu His Arg Phe Arg Thr Gly Glu
[1544] 2120 2125 2130
[1545] His Leu Leu Gly Ser Glu Ile Ser Val Ile Leu Gln Glu Leu Cys
[1546] 2135 2140 2145
[1547] Ile Asp Arg Ser Ile Leu Leu Ile Pro Leu Ser Leu Leu Pro Asp
[1548] 2150 2155 2160
[1549] Trp Phe Ala Phe Lys Asp Cys Arg Leu Cys Phe Ser Lys Ser Arg
[1550] 2165 2170 2175
[1551] Ser Thr Leu Met Tyr Glu Thr Val Gly Gly Arg Phe Arg Leu Lys
[1552] 2180 2185 2190
[1553] Gly Arg Ser Cys Asp Asp Trp Leu Gly Gly Ser Val Ala Glu Asp

[1554] 2195 2200 2205
[1555] Ile Asp
[1556] 2210
[1557] <210> 15
[1558] <211> 90
[1559] <212> PRT
[1560] <213> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒
[1561] <220>
[1562] <223> LCMV的Clone 13毒株Z蛋白
[1563] (GenBank登记号ABC96003.1; GI:86440168)
[1564] <400> 15
[1565] Met Gly Gln Gly Lys Ser Arg Glu Glu Lys Gly Thr Asn Ser Thr Asn
[1566] 1 5 10 15
[1567] Arg Ala Glu Ile Leu Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Gly Pro Leu Ser Cys
[1568] 20 25 30
[1569] Lys Ser Cys Trp Gln Lys Phe Asp Ser Leu Val Arg Cys His Asp His
[1570] 35 40 45
[1571] Tyr Leu Cys Arg His Cys Leu Asn Leu Leu Leu Ser Val Ser Asp Arg
[1572] 50 55 60
[1573] Cys Pro Leu Cys Lys Tyr Pro Leu Pro Thr Arg Leu Lys Ile Ser Thr
[1574] 65 70 75 80
[1575] Ala Pro Ser Ser Pro Pro Pro Tyr Glu Glu
[1576] 85 90
[1577] <210> 16
[1578] <211> 498
[1579] <212> PRT
[1580] <213> 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒
[1581] <220>
[1582] <223> LCMV的WE病毒毒株GP蛋白
[1583] <400> 16
[1584] Met Gly Gln Ile Val Thr Met Phe Glu Ala Leu Pro His Ile Ile Asp
[1585] 1 5 10 15
[1586] Glu Val Ile Asn Ile Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Ile Thr Ser Ile
[1587] 20 25 30
[1588] Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Ile Leu Ala Leu Val Ser
[1589] 35 40 45
[1590] Phe Leu Phe Leu Ala Gly Arg Ser Cys Gly Met Tyr Gly Leu Asn Gly
[1591] 50 55 60
[1592] Pro Asp Ile Tyr Lys Gly Val Tyr Gln Phe Lys Ser Val Glu Phe Asp
[1593] 65 70 75 80
[1594] Met Ser His Leu Asn Leu Thr Met Pro Asn Ala Cys Ser Ala Asn Asn
[1595] 85 90 95

[1596] Ser His His Tyr Ile Ser Met Gly Ser Ser Gly Leu Glu Leu Thr Phe
[1597] 100 105 110
[1598] Thr Asn Asp Ser Ile Leu Asn His Asn Phe Cys Asn Leu Thr Ser Ala
[1599] 115 120 125
[1600] Phe Asn Lys Lys Thr Phe Asp His Thr Leu Met Ser Ile Val Ser Ser
[1601] 130 135 140
[1602] Leu His Leu Ser Ile Arg Gly Asn Ser Asn His Lys Ala Val Ser Cys
[1603] 145 150 155 160
[1604] Asp Phe Asn Asn Gly Ile Thr Ile Gln Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Asp
[1605] 165 170 175
[1606] Pro Gln Ser Ala Ile Ser Gln Cys Arg Thr Phe Arg Gly Arg Val Leu
[1607] 180 185 190
[1608] Asp Met Phe Arg Thr Ala Phe Gly Gly Lys Tyr Met Arg Ser Gly Trp
[1609] 195 200 205
[1610] Gly Trp Ala Gly Ser Asp Gly Lys Thr Thr Trp Cys Ser Gln Thr Ser
[1611] 210 215 220
[1612] Tyr Gln Tyr Leu Ile Ile Gln Asn Arg Thr Trp Glu Asn His Cys Arg
[1613] 225 230 235 240
[1614] Tyr Ala Gly Pro Phe Gly Met Ser Arg Ile Leu Phe Ala Gln Glu Lys
[1615] 245 250 255
[1616] Thr Lys Phe Leu Thr Arg Arg Leu Ala Gly Thr Phe Thr Trp Thr Leu
[1617] 260 265 270
[1618] Ser Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Thr Lys
[1619] 275 280 285
[1620] Trp Met Ile Leu Ala Ala Glu Leu Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Val
[1621] 290 295 300
[1622] Ala Lys Cys Asn Val Asn His Asp Glu Glu Phe Cys Asp Met Leu Arg
[1623] 305 310 315 320
[1624] Leu Ile Asp Tyr Asn Lys Ala Ala Leu Ser Lys Phe Lys Gln Asp Val
[1625] 325 330 335
[1626] Glu Ser Ala Leu His Val Phe Lys Thr Thr Val Asn Ser Leu Ile Ser
[1627] 340 345 350
[1628] Asp Gln Leu Leu Met Arg Asn His Leu Arg Asp Leu Met Gly Val Pro
[1629] 355 360 365
[1630] Tyr Cys Asn Tyr Ser Lys Phe Trp Tyr Leu Glu His Ala Lys Thr Gly
[1631] 370 375 380
[1632] Glu Thr Ser Val Pro Lys Cys Trp Leu Val Thr Asn Gly Ser Tyr Leu
[1633] 385 390 395 400
[1634] Asn Glu Thr His Phe Ser Asp Gln Ile Glu Gln Glu Ala Asp Asn Met
[1635] 405 410 415
[1636] Ile Thr Glu Met Leu Arg Lys Asp Tyr Ile Lys Arg Gln Gly Ser Thr
[1637] 420 425 430

[1638] Pro Leu Ala Leu Met Asp Leu Leu Met Phe Ser Thr Ser Ala Tyr Leu
[1639] 435 440 445
[1640] Ile Ser Ile Phe Leu His Leu Val Lys Ile Pro Thr His Arg His Ile
[1641] 450 455 460
[1642] Lys Gly Gly Ser Cys Pro Lys Pro His Arg Leu Thr Asn Lys Gly Ile
[1643] 465 470 475 480
[1644] Cys Ser Cys Gly Ala Phe Lys Val Pro Gly Val Lys Thr Ile Trp Lys
[1645] 485 490 495
[1646] Arg Arg
[1647] <210> 17
[1648] <211> 35
[1649] <212> DNA
[1650] <213> 人工序列
[1651] <220>
[1652] <223> WE特异性引物
[1653] <400> 17
[1654] aatcgtctct aaggatgggt cagattgtga caatg 35
[1655] <210> 18
[1656] <211> 35
[1657] <212> DNA
[1658] <213> 人工序列
[1659] <220>
[1660] <223> 携带与WET特异性引物互补的突出端的WE特异性融合引物
[1661] <400> 18
[1662] aatcgtctct aaggatgggt cagattgtga caatg 35
[1663] <210> 19
[1664] <211> 37
[1665] <212> DNA
[1666] <213> 人工序列
[1667] <220>
[1668] <223> WE特异性引物
[1669] <400> 19
[1670] ctcggtgatc atgttatctg cttcttgttc gatttga 37
[1671] <210> 20
[1672] <211> 34
[1673] <212> DNA
[1674] <213> 人工序列
[1675] <220>
[1676] <223> 与WE序列互补的WE特异性融合引物
[1677] <400> 20
[1678] aatcgtctct ttctttatct cctcttccag atgg 34
[1679] <210> 21

[1680] <211> 23

[1681] <212> DNA

[1682] <213> 人工序列

[1683] <220>

[1684] <223> 对LCMV NP有特异性的引物

[1685] <400> 21

[1686] ggctcccaga tctgaaaact gtt 23

[1687] <210> 22

[1688] <211> 22

[1689] <212> DNA

[1690] <213> 人工序列

[1691] <220>

[1692] <223> NP特异性引物和GP特异性引物;NP特异性:与在RT反应中的相同,GP特异性:5'引物末端

[1693] <400> 22

[1694] gctggcttgt cactaatggc tc 22

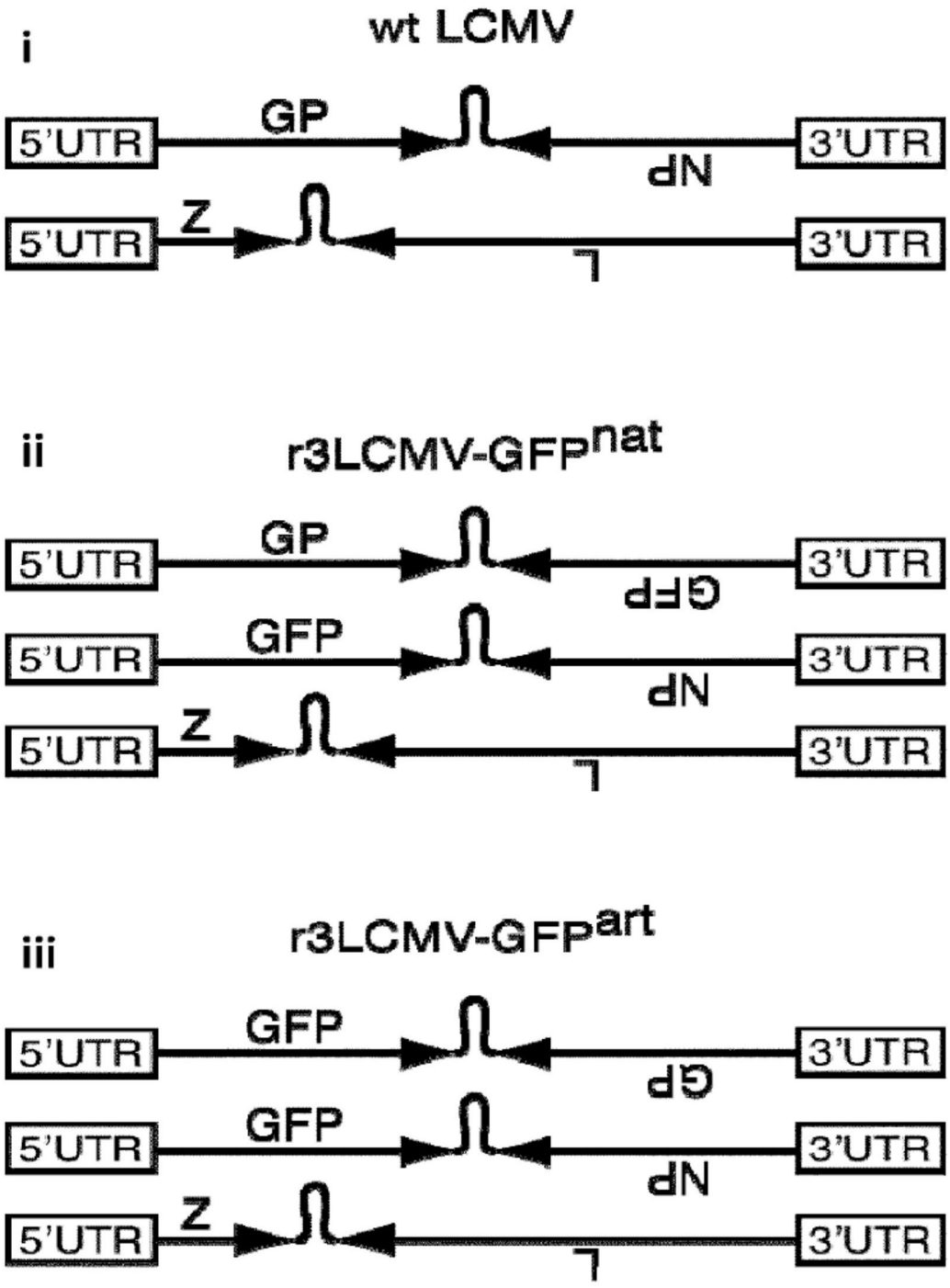

i
wt LCMV
5'UTR
GP
3'UTR
NP
5'UTR
Z
3'UTR
L
ii
r3LCMV-GFPnat
5'UTR
GP
3'UTR
GFP
5'UTR
GFP
3'UTR
NP
5'UTR
Z
3'UTR
L
iii
r3LCMV-GFPart
5'UTR
GFP
3'UTR
GP
5'UTR
GFP
3'UTR
NP
5'UTR
Z
3'UTR
L

图1

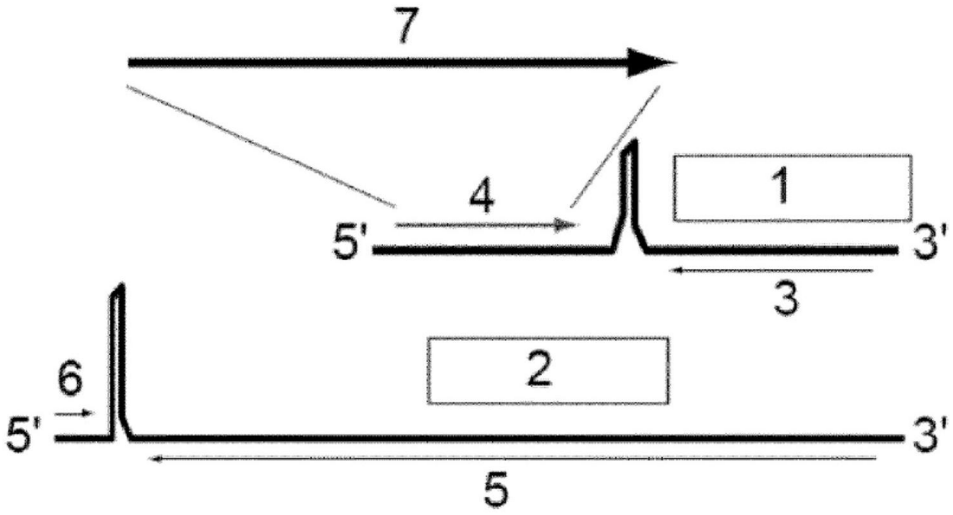

7
4
1
5'
3'
3
6
2
5'
3'
5

图2

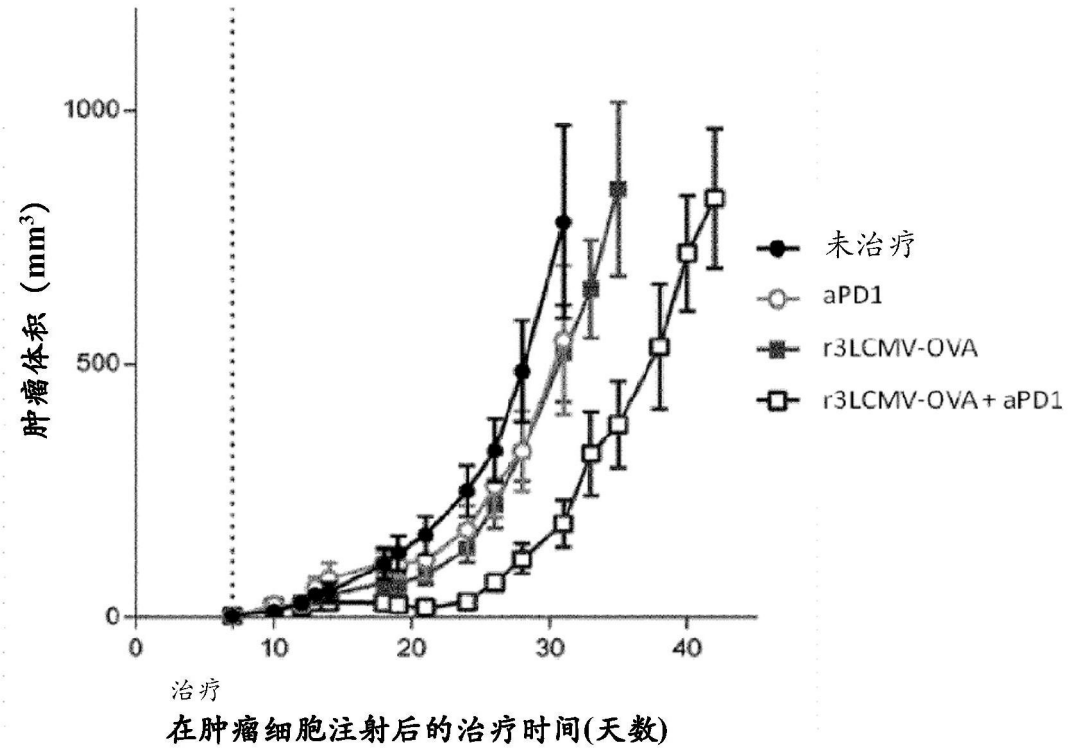

1000
500
0
肿瘤体积（mm³）
0
10
20
30
40
治疗
在肿瘤细胞注射后的治疗时间(天数)
未治疗
aPD1
r3LCMV-OVA
r3LCMV-OVA+aPD1

图3A

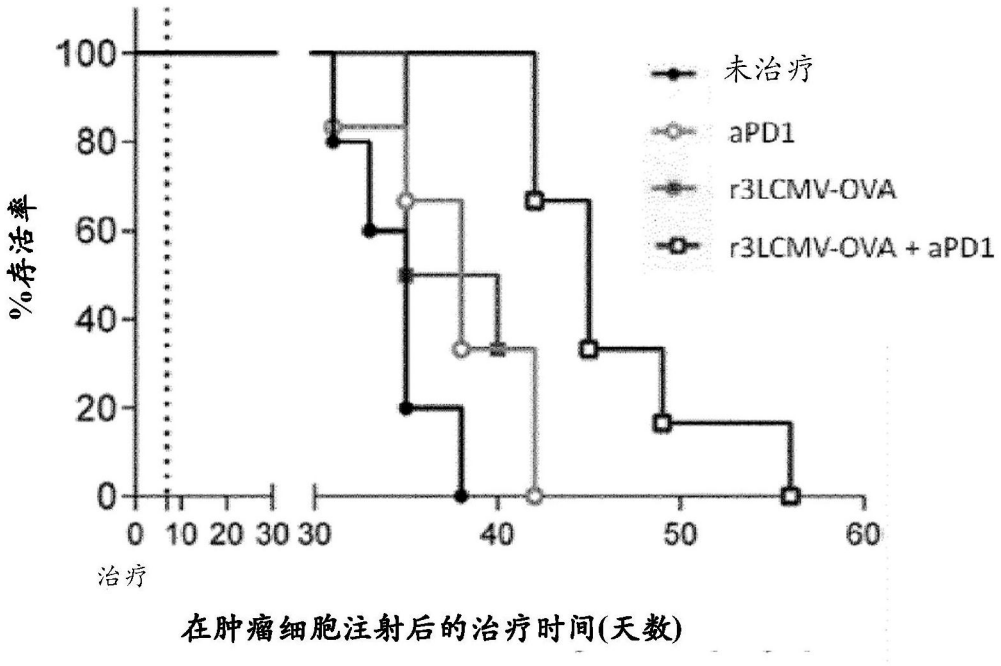

100
80
60
40
20
0
%存活率
0 10 20 30 30 40 50 60
治疗
在肿瘤细胞注射后的治疗时间(天数)
未治疗
aPD1
r3LCMV-OVA
r3LCMV-OVA + aPD1

图3B

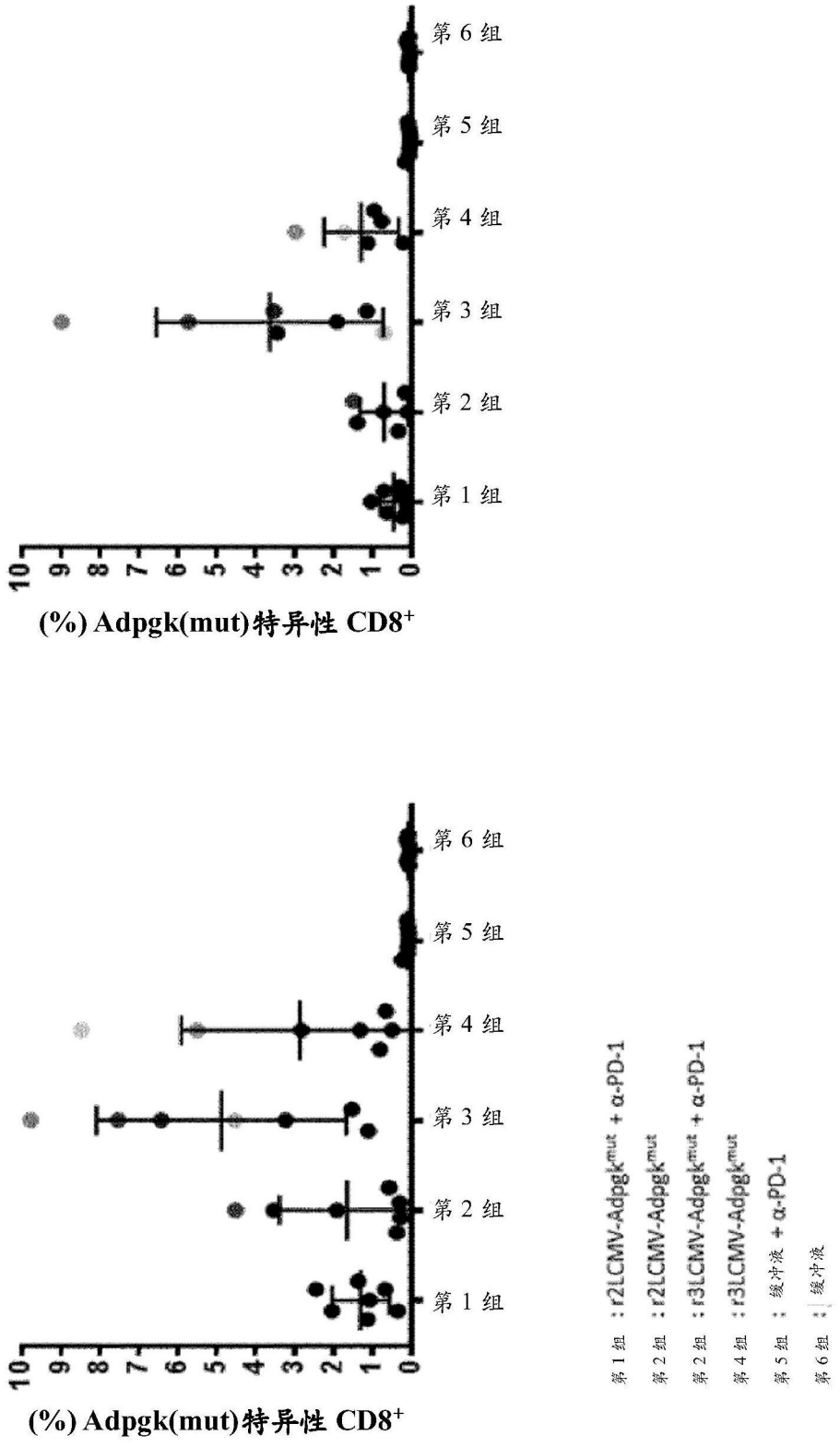
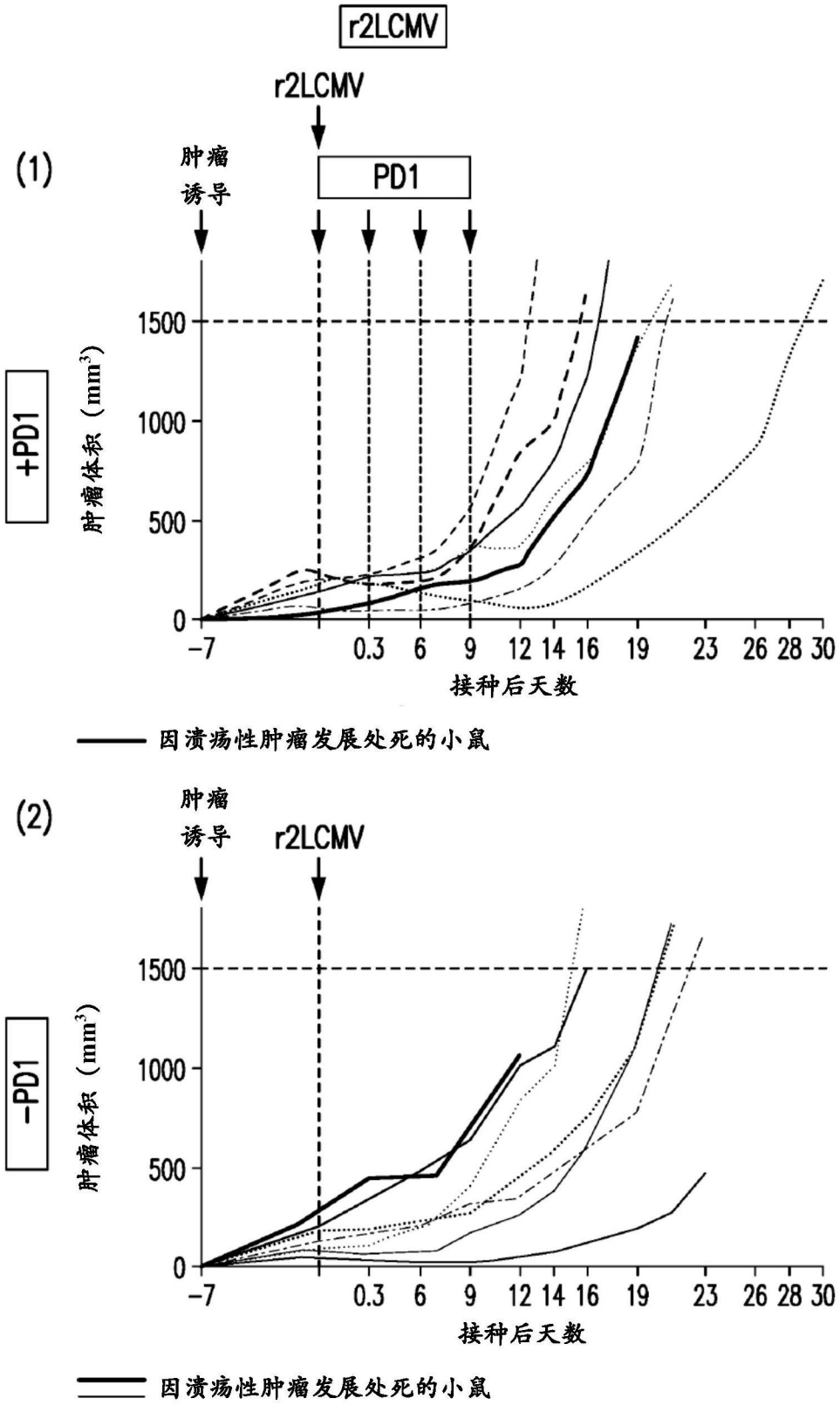
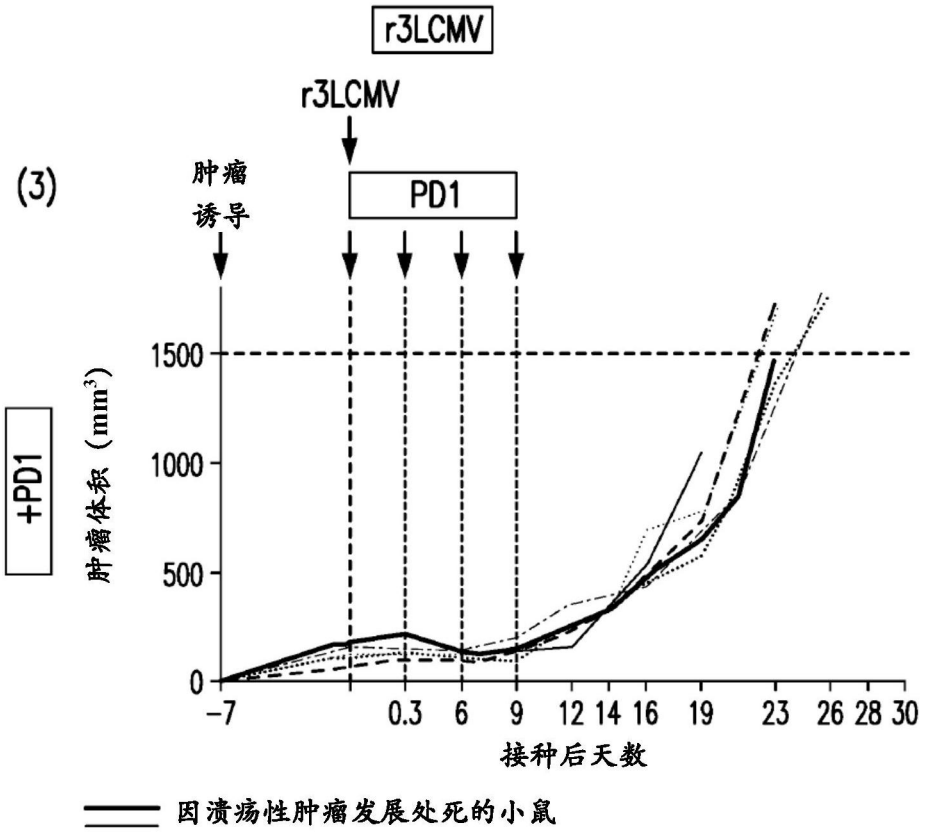

第 6 组
第 5 组
第 4 组
第 3 组
第 2 组
第 1 组
10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
(%) Adpgk(mut)特异性 CD8+
第 6 组
第 5 组
第 4 组
第 3 组
第 2 组
第 1 组
10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
(%) Adpgk(mut)特异性 CD8+
第 1 组 : r2LCMV-Adpgk^mut + α-PD-1
第 2 组 : r2LCMV-Adpgk^mut
第 2 组 : r3LCMV-Adpgk^mut + α-PD-1
第 4 组 : r3LCMV-Adpgk^mut
第 5 组 : 缓冲液 + α-PD-1
第 6 组 : 缓冲液

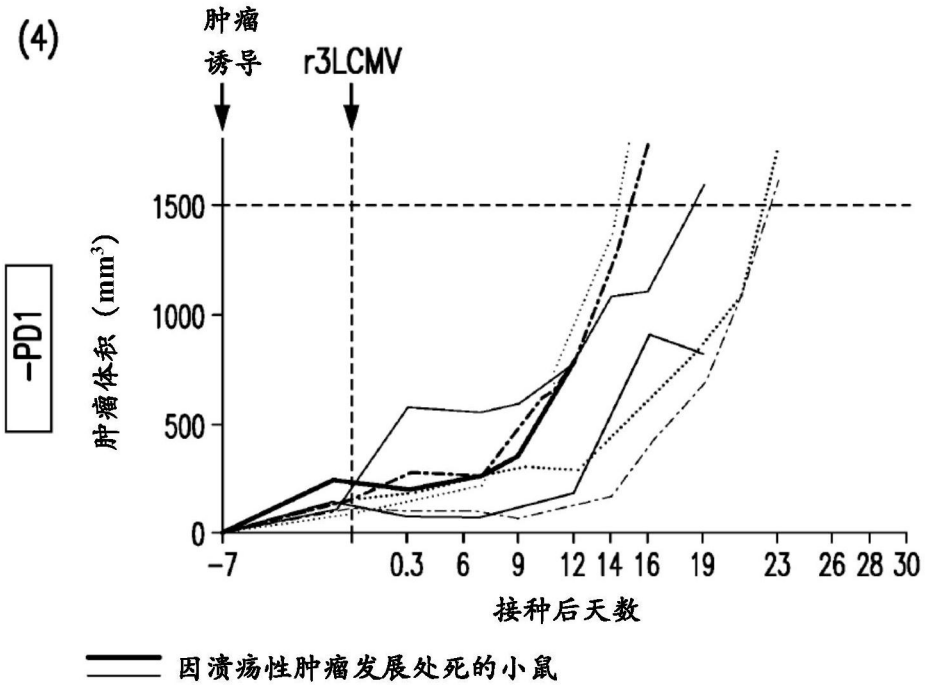
图4A



如果肿瘤达到>1500 mm^3 的体积或者如果它使小鼠皮肤形成溃疡则处死小鼠(1)-(6)小鼠组

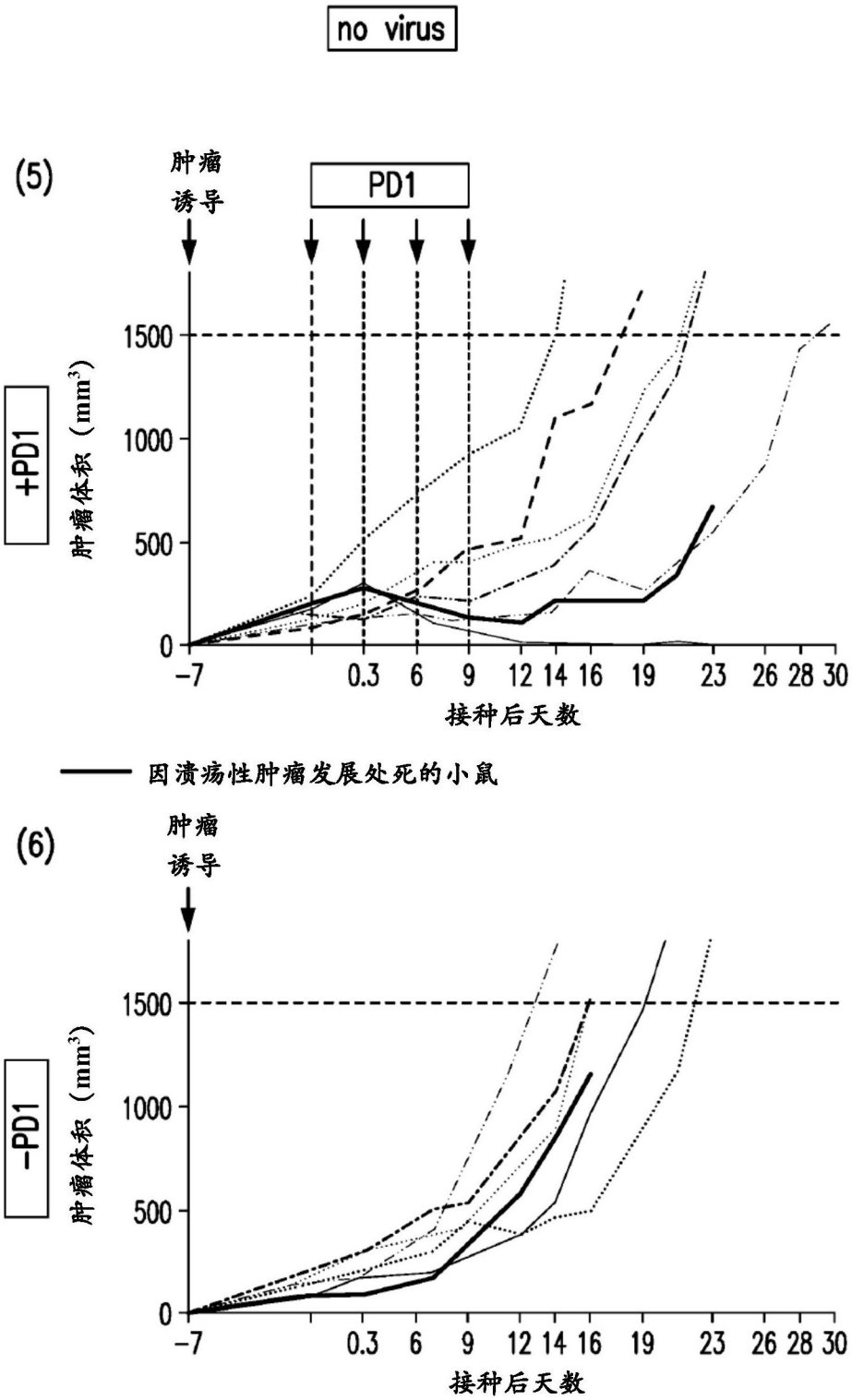
图4B





如果肿瘤达到>1500 mm^3 的体积或者如果它使小鼠皮肤形成溃疡则处死小鼠(1)-(6)小鼠组

图4B续



如果肿瘤达到>1500 mm^3 的体积或者如果它使小鼠皮肤形成溃疡则处死小鼠(1)-(6)小鼠组

图4B续

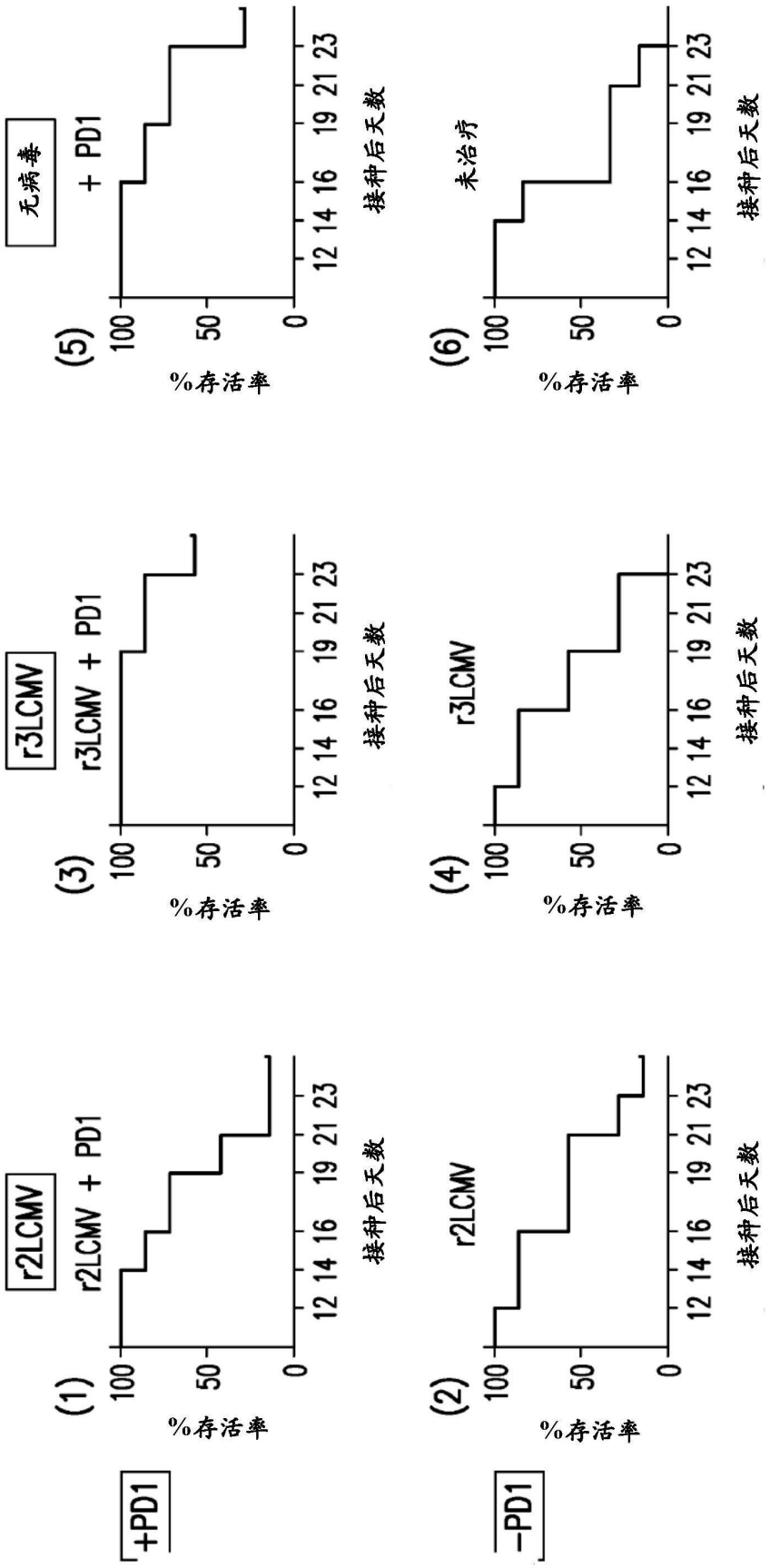

+PD1
-PD1
r2LCMV + PD1
r2LCMV
r3LCMV + PD1
r3LCMV
无病毒 + PD1
未治疗
(1)
(2)
(3)
(4)
(5)
(6)
%存活率
100
50
0
12 14 16 19 21 23
接种后天数

图4C

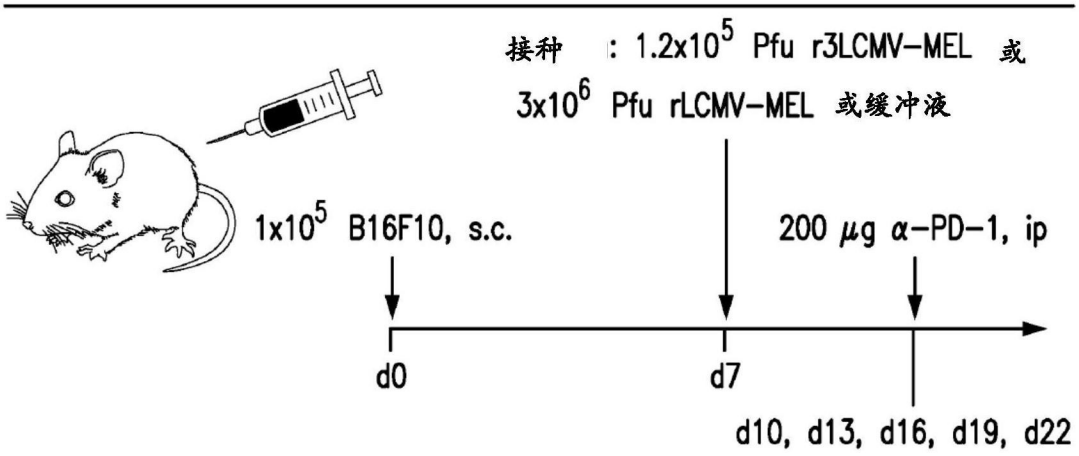

接种 : 1.2x10^5 Pfu r3LCMV-MEL 或
3x10^6 Pfu rLCMV-MEL 或缓冲液
1x10^5 B16F10, s.c.
200 μg α-PD-1, ip
d0
d7
d10, d13, d16, d19, d22

图5A

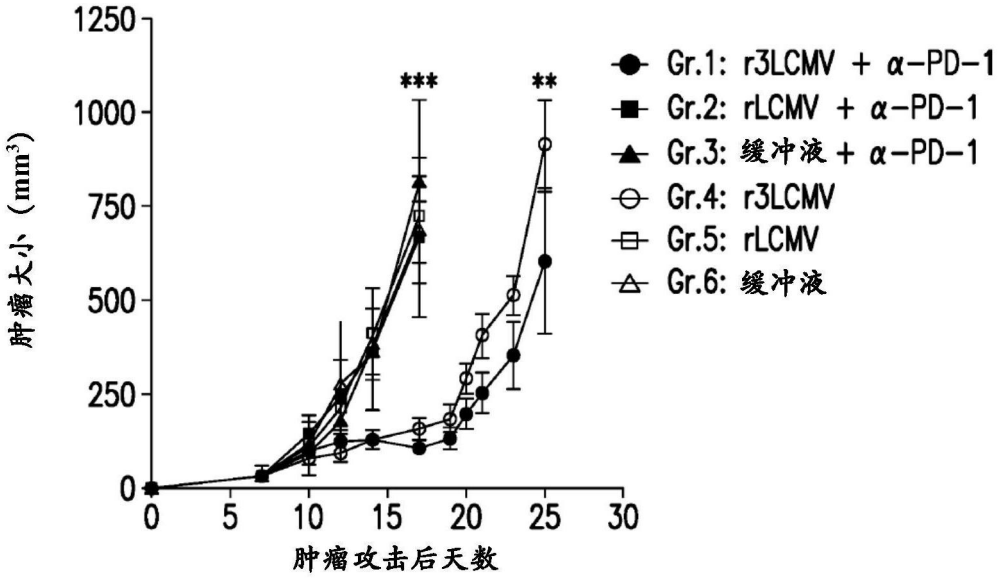

肿瘤大小（mm^3）
肿瘤攻击后天数
***
**
Gr.1: r3LCMV + α-PD-1
Gr.2: rLCMV + α-PD-1
Gr.3: 缓冲液 + α-PD-1
Gr.4: r3LCMV
Gr.5: rLCMV
Gr.6: 缓冲液

图5B

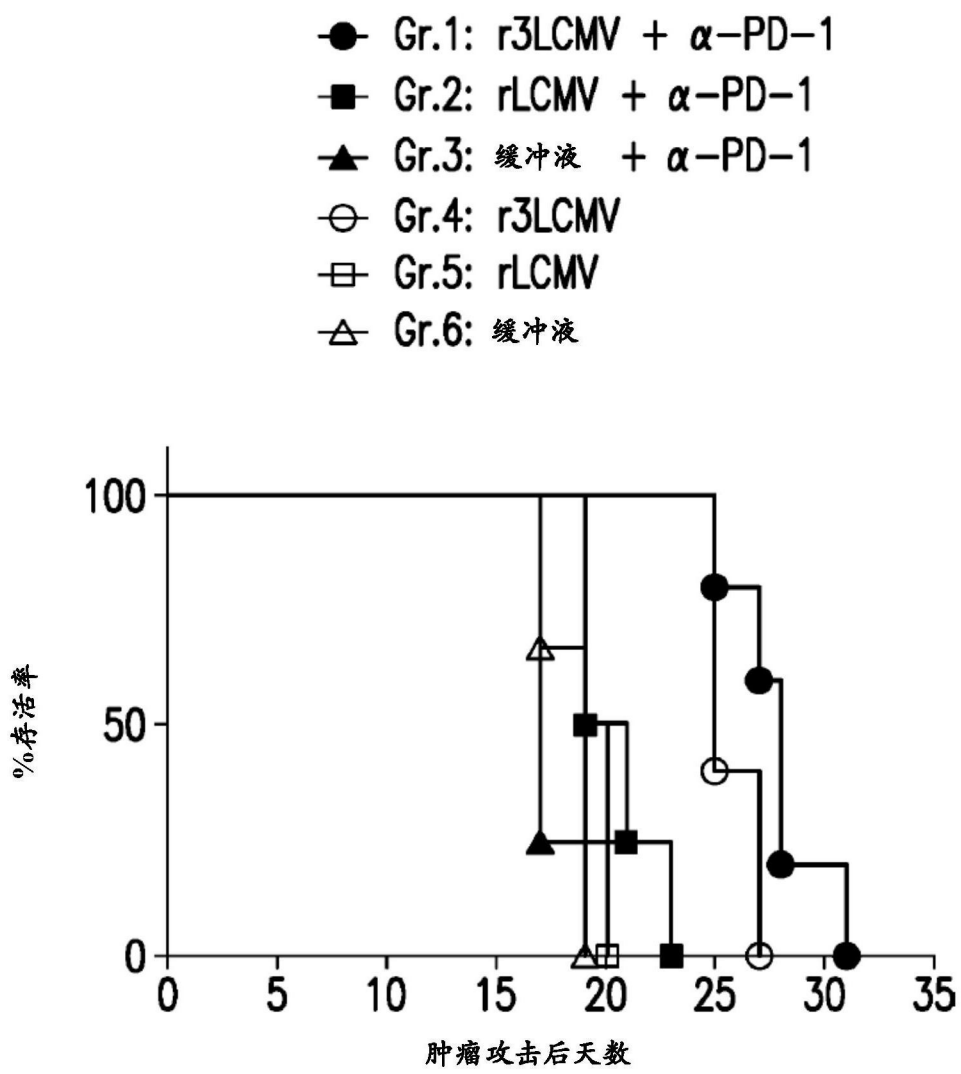

Gr.1: r3LCMV + α-PD-1
Gr.2: rLCMV + α-PD-1
Gr.3: 缓冲液 + α-PD-1
Gr.4: r3LCMV
Gr.5: rLCMV
Gr.6: 缓冲液
100
50
0
%存活率
0
5
10
15
20
25
30
35
肿瘤攻击后天数

图5C

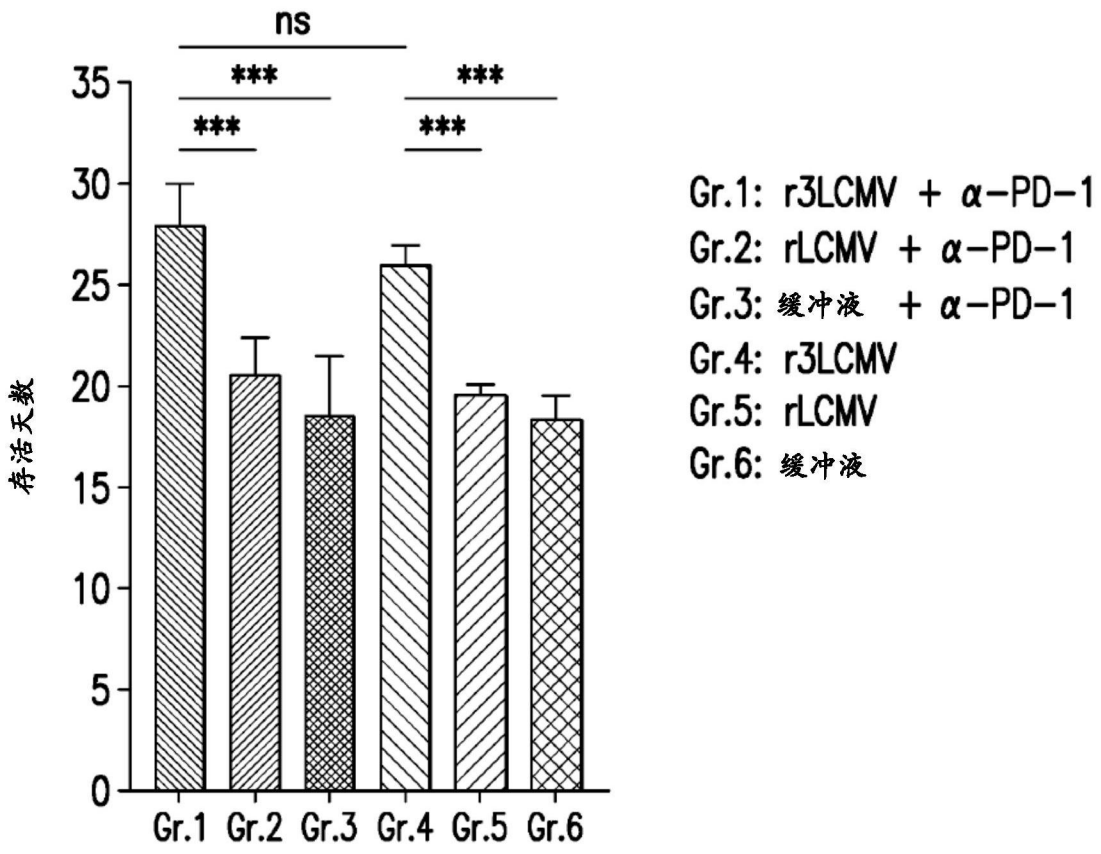

ns
***
***
***
***
35
30
25
20
15
10
5
0
存活天数
Gr.1
Gr.2
Gr.3
Gr.4
Gr.5
Gr.6
Gr.1: r3LCMV + α-PD-1
Gr.2: rLCMV + α-PD-1
Gr.3: 缓冲液 + α-PD-1
Gr.4: r3LCMV
Gr.5: rLCMV
Gr.6: 缓冲液

图5D