



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I692525 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：104112751

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 04 月 21 日

(51)Int. Cl. : C12N1/21 (2006.01)

C12N15/31 (2006.01)

(30)優先權：2014/04/24 美國

61/983,732

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

美國

(72)發明人：瓦勒巧 亞努 WALLECHA, ANU (US)；派提特 羅柏特 PETIT, ROBERT (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2012125551A1

Robert Petit and Partha Basu, "ADXS11-001 IMMUNOTHERAPY: 12 MONTH SURVIVAL AND SAFETY DATA FROM A PHASE 2 STUDY IN RECURRENT CERVICAL CANCER" ASCO INDIA POSTER Draft1.5 05/29/2013 (<http://content.equisolve.net/advaxis/media/e0e1d38f7024f8f0e534eb6fcb9acb82.pdf>)

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：22 共 124 頁

(54)名稱

重組李斯特菌疫苗菌株及產製該菌株之方法

(57)摘要

本發明提供了針對腫瘤或癌症的治療、預防及誘導免疫反應的方法，其包括投與一重組李斯特菌菌株至一個體之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一編碼可部分修補 PrfA 功能之突變型 PrfA 蛋白質的核酸。

The present invention provides methods of treating, protecting against, and inducing an immune response against a tumor or cancer, comprising the step of administering to a subject a recombinant Listeria strain comprising a nucleic acid encoding a mutant PrfA protein that partially restores PrfA function.

指定代表圖：

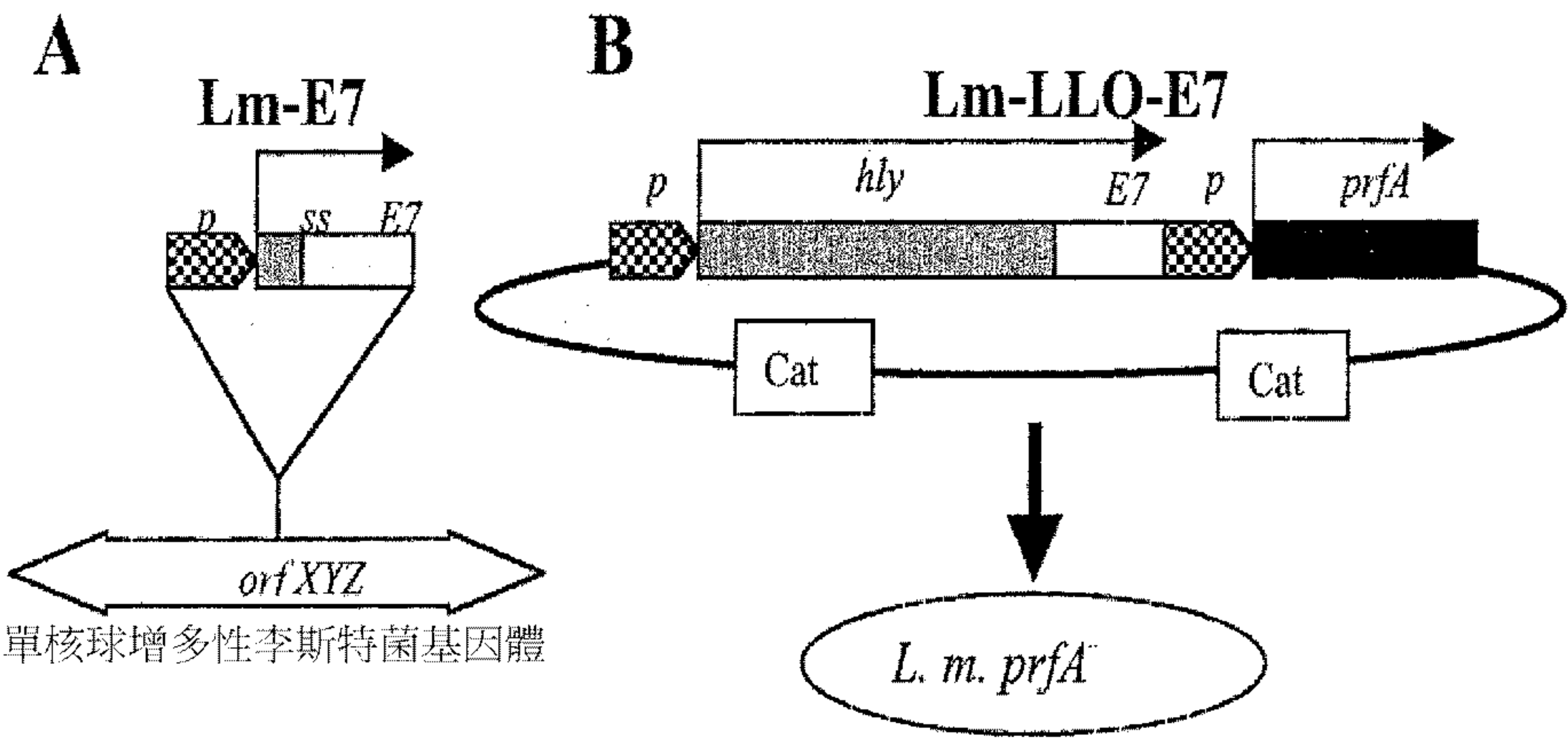


圖 1

發明摘要

I692525

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】 重組李斯特菌疫苗菌株及產製該菌株之方法

RECOMBINANT LISTERIA VACCINE STRAINS AND
METHODS OF PRODUCING THE SAME

【中文】

本發明提供了針對腫瘤或癌症的治療、預防及誘導免疫反應的方法，其包括投與一重組李斯特菌菌株至一個體之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一編碼可部分修補 PrfA 功能之突變型 PrfA 蛋白質的核酸。

【英文】

The present invention provides methods of treating, protecting against, and inducing an immune response against a tumor or cancer, comprising the step of administering to a subject a recombinant *Listeria* strain comprising a nucleic acid encoding a mutant PrfA protein that partially restores PrfA function.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

【發明名稱】 重組李斯特菌疫苗菌株及產製該菌株之方法

RECOMBINANT LISTERIA VACCINE STRAINS AND
METHODS OF PRODUCING THE SAME

【技術領域】

【0001】 本發明提供了針對腫瘤或癌症的治療、預防及誘導免疫反應的方法，其包括投與一重組李斯特菌菌株至一個體之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一編碼可部分修補 PrfA 功能之突變型 PrfA 蛋白質的核酸。

【先前技術】

【0002】 跟隨著高致癌風險的人類乳突狀瘤病毒(HR-HPV)型式的持續性感染被認為是必然（但不充分）的子宮頸侵襲性癌(ICC)病因。HPV 16 及 18 為最普遍的惡性病變類型，佔 ICC 的 70%以上，且超過高變質度前期病變的 50%以上。HR-HPV E6 及 E7 蛋白質係在非典型增生及惡性腫瘤中持續表現，分別破壞細胞週期調節蛋白 p53 及 pRb。由非典型增生及侵襲性惡性病變所強制表現的 E6 及 E7，以及這些蛋白質的病毒來源，使其成為極好的 HPV 治療性疫苗的靶標。

【0003】 單核球增多性李斯特菌(*Lm*)係為一種經由食物傳染的革蘭氏陽性細菌，其有時可在人類中造成疾病，特別是老年人、新生兒、孕婦及免疫力低下的個體。除了會強烈活化先天性免疫及誘導細胞素反應以增強抗原表現細胞（APC）功能外，*Lm* 具有在從吞噬溶酶體逃逸後於 APC 的胞質液中複製的能力，這主要係通過李斯特菌溶解素 O (LLO)蛋白質的作用。這種獨特的細胞內生命週期讓由 *Lm* 分泌的抗原在 MHC I 及 II 類分子的範圍下被處理及呈現，導致強力的細胞毒性 CD8⁺及 Th1 型 CD4⁺ T 細胞介導的免疫反應。*Lm* 已在臨床前模式中作為癌症免疫治療的載體被廣泛研究。以 *Lm*-LLO-E7 免疫接種之小鼠誘導了表現 E7 的已建立腫瘤的消退並授予長期的保護。*Lm*-LLO-E7 的治療功效係與其誘導 E7 特異性 CTL 的能力相互關聯，CTL 係滲透於腫瘤位置及成熟樹突狀細胞、降低腫瘤內調節

CD4⁺ CD25⁺ T 細胞的數量並抑制腫瘤血管生成。

【0004】 *Lm* 作為疫苗載體亦具有一些先天的優點。該細菌在體外無特殊要求而可非常有效地生長且其缺少 LPS（在諸如沙門氏菌之革蘭氏陰性細菌中的一種主要毒性因子）。基因性減毒 *Lm* 載體亦提供額外的安全性，因為其可輕易地以抗生素消滅，以防嚴重的不良影響，且不像一些病毒載體，其不會發生遺傳物質整合入宿主基因體的情形。然而，總有關於活細菌疫苗（諸如 *Lm*）的安全性重大考量，特別是關於其減毒的機制。

【0005】 PrfA 蛋白質係控制包括 *Lm* 所需的必要毒力基因之調節子的表現以繁殖於其脊椎動物宿主內；因此 *prfA* 突變強烈地損害了 PrfA 活化 PrfA 依賴型毒力基因的表現之能力。本發明藉由提供一在 pGG55 質體中攜載可修補部分 PrfA 功用的突變型 *prfA* (D133V) 基因之 *prfA* 突變型李斯特菌而解決了這問題。

【發明內容】

【0006】 於一實施例中，本發明係有關一種重組李斯特菌菌株，該重組李斯特菌菌株包括一重組核酸，該重組核酸包括一編碼一重組多肽之第一開放讀碼框架，該重組多肽包括融合至一異源抗原或其片段的一 LLO 蛋白質的 N 端片段，且其中該重組核酸更包括一編碼一突變型 PrfA 蛋白質之第二開放讀碼框架。

【0007】 於一實施例中，本發明係有關一種重組李斯特菌菌株，該重組李斯特菌菌株包括一重組核酸，該重組核酸包括一編碼一重組多肽之第一開放讀碼框架，該重組多肽包括融合至一異源抗原或其片段的一 LLO 蛋白質的 N 端片段，且其中該重組核酸更包括一編碼一突變型 PrfA 蛋白質之第二開放讀碼框架，且其中該李斯特菌包括在 *prfA* 基因中的基因體突變或缺失。於另一實施例中，由該第二開放讀碼框架所編碼的突變型 PrfA 蛋白質補充了在該李斯特菌菌株的 PrfA 蛋白質中之基因體突變或缺失。於另一實施例中，由該第二開放讀碼框架所編碼的突變型 PrfA 蛋白質修補了在該李斯特菌菌株中的部分 PrfA 功能。

【0008】 於一實施例中，本發明係有關一種針對個體腫瘤或癌症誘導免疫反應之方法，該方法包括向該個體投與一包括重組核酸的重組李斯特菌菌株之步驟，該重組核酸包括編碼一重組多肽之第一開放讀碼框架，該重組多肽包括融合至一異源抗原或其片段的一 LLO 蛋白質的 N 端片段，且其中該重組核酸更包括一編碼一突變型 PrfA 蛋白質之第二開放讀碼框架，藉以針對腫瘤或癌症誘導免疫反應。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括在 *prfA* 基因中的基因體突變或缺失。

【0009】 本發明之其他特徵及優點將自以下詳細描述實例及圖式而變得顯而易見。然而，應瞭解在指示本發明之較佳實施例時，詳細描述及特定實例僅以說明的方式給出，此係因為熟習此項技術者根據此詳細描述將易於清楚在本發明之精神及範疇內的各種改變及修改。

【圖式簡單說明】

【0010】 在說明書的結論部分特別指出並明確主張本發明之標的。然而，通過參考以下詳細描述並同時閱讀附圖，可最好地理解本發明的組織和操作方法以及其目的、特徵和優點，其中：

【0011】 圖 1 係顯示 Lm-E7 及 Lm-LLO-E7 使用不同表現系統來表現並分泌 E7。Lm-E7 藉由將基因卡匣引入單核球增多性李斯特菌基因體之 *orfZ* 結構域中而產生(A)。hly 啟動子驅動 hly 信息序列及 LLO 之前五個胺基酸(AA)繼而 HPV-16 E7 之表現。B)，Lm-LLO-E7 藉由用質體 pGG-55 轉型 *prfA*-菌株 XFL-7 而產生。pGG-55 具有驅動 LLO-E7 之非溶血性融合體之表現的 hly 啟動子。pGG-55 亦含有 *prfA* 基因以在活體內選擇由 XFL-7 保留的質體。

【0012】 圖 2 係顯示 Lm-E7 及 Lm-LLO-E7 分泌 E7。Lm-Gag(泳道 1)、Lm-E7(泳道 2)、Lm-LLO-NP(泳道 3)、Lm-LLO-E7(泳道 4)、XFL-7(泳道 5) 及 10403S(泳道 6)在 Luria-Bertoni 培養液中在 37°C 下隔夜生長。使相等數目之細菌(如由 OD 在 600nm 下吸光度測定)沈澱成粒，且使 18ml 各上清液經 TCA 沈澱。E7 表現係利用西方墨點法分析。墨點依序用抗 E7 mAb (單

抗)及 HRP 接合之抗小鼠(Amersham)進行探針探查，且接著使用 ECL 偵測試劑顯影。

【0013】 圖 3 係顯示 LLO-E7 融合體之腫瘤免疫治療功效。其顯示了小鼠中之在腫瘤接種後 7、14、21、28 及 56 天時的腫瘤大小(以毫米為單位)。未處理小鼠：空心圓形；Lm-LLO-E7：實心圓形；Lm-E7：正方形；Lm-Gag：空心菱形；及 Lm-LLO-NP：實心三角形。

【0014】 圖 4 係顯示來自經 Lm-LLO-E7 免疫接種之小鼠之脾細胞在暴露於 TC-1 細胞時增殖。C57BL/6 小鼠用 Lm-LLO-E7、Lm-E7 或對照 rLm 菌株免疫接種並加強。脾細胞在加強後 6 天收集且以所示比率與經輻射照射的 TC-1 細胞一起塗盤。細胞用 ^3H 胸苷脈衝處理並收集。Cpm 係定義為(實驗性 cpm) - (無 TC-1 對照)。

【0015】 圖 5 係顯示：A. 在投與 TC-1 腫瘤細胞且隨後投與 Lm-E7、Lm-LLO-E7、Lm-ActA-E7 或無疫苗(未處理)之小鼠中，脾臟中 E7 特異性之分泌 IFN- γ 之 CD8 $^+$ T 細胞之誘導及滲入腫瘤的數目。 B. 針對 A 所述之小鼠之脾臟及腫瘤中 E7 特異性 CD8 $^+$ 細胞之誘導及滲入。

【0016】 圖 6 係顯示含有 PEST 區之李斯特菌構築體誘導腫瘤內較高百分比之 E7 特異性淋巴細胞。 A. 來自 1 次實驗之代表性資料。 B. 來自所有 3 次實驗之資料之平均值及 SF。

【0017】 圖 7A 係顯示重組李斯特菌疫苗載體在細菌負荷（毒性）上的繼代效果。上圖：Lm-Gag。下圖：Lm-LLO-E7。圖 7B 係顯示重組 Lm-E7 在脾臟中的細菌負荷繼代效果。其描繪了來自 4 隻小鼠的脾臟均質物中每毫升的活細菌平均 CFU。

【0018】 圖 8 係顯示於投與經繼代的 Lm-Gag 後對投與未經繼代的 Lm-Gag 後針對 HIV-Gag 及 LLO 誘導抗原特異性 CD8 $^+$ T 細胞的結果。小鼠係以 10^3 (A、B、E、F)或 10^5 (C、D、G、H) CFU 的經繼代李斯特菌疫苗載體免疫接種，並分析抗原特異性 T 細胞。B、D、F、H：未經繼代的李斯特菌疫苗載體。A-D：對 MHC I 類 HIV-Gag 肽的免疫反應。E-H：對 LLO 肽的免疫反應。I：來自以 10^5 CFU 的經繼代 Lm-Gag 免疫接種之小鼠的脾細

胞經以來自 HPV E7 的對照肽刺激。

【0019】 圖 9A 係顯示在 LB 穩定性研究中的質體分離情形。圖 9B 係顯示在 TB 穩定性研究中的質體分離情形。圖 9C 係顯示 TB 穩定性的定量分析。

【0020】 圖 10 係顯示來自生長在 LB 中的細菌之可耐受氯黴素(CAP)及 CAP 敏感型活細菌的群落形成單位(CFU)數目。深色長條區域：CAP⁺；白色長條區域：CAP⁻。每一時間點的兩個深色長條區域及兩個白色長條區域係表示二重複的樣本。

【0021】 圖 11 係顯示來自在 TB 中生長的細菌之可耐受 CAP 及 CAP 敏感型活細菌之 CFU 數目。深色長條區域：CAP⁺；白色長條區域：CAP⁻。每一時間點的兩個深色長條區域及兩個白色長條區域係表示二重複的樣本。

【0022】 圖 12 係說明顯示 D133V 突變區域(箭頭處)之實際層析圖。混合物比例係顯示於括號中。

【0023】 圖 13 係描述 ADV451、452 與 453 引子的位置以及在反應中 prfA 基因擴增的區段。

【0024】 圖 14 係顯示使用引子 ADV451 及 ADV453 的 PCR 反應的特異性。

【0025】 圖 15 係顯示使用引子 ADV452 及 ADV453 的 PCR 反應的特異性。

【0026】 圖 16 係顯示使用引子 ADV452 及 1 奈克(ng)做為 DNA 起始數量以偵測野生型 prfA 序列之 PCR 反應的靈敏度。

【0027】 圖 17 係顯示使用引子 ADV452 及 5 奈克做為 DNA 起始數量以偵測野生型 prfA 序列之 PCR 反應的靈敏度。

【0028】 圖 18 係顯示描述於圖 16 中的 PCR 之吸光帶平均密度。

【0029】 圖 19 係顯示描述於圖 17 中的 PCR 之吸光帶平均密度。

【0030】 圖 20 係顯示使用引子 ADV452 以偵測野生型 prfA 序列之 PCR 反應核驗。

【0031】 圖 21 係顯示描述於圖 16 中的 PCR 之吸光帶平均密度。

【0032】 圖 22 係顯示 *Lm*-LLO-E7 中的 D133V *prfA* 突變分析結果。

A：用於密度測定的原始影像； B：影像係經數位強化以促使低密度吸光帶的顯像。

【0033】 應理解為了使圖式簡單清晰，圖中顯示的元件不一定是按比例繪製的。例如，為了清晰起見，一些元件的尺寸相對於其他元件被放大。此外，在考慮合適的地方，附圖標記可以在圖中重複使用，以指明對應的或類似的元件。

【實施方式】

【0034】 本發明於一實施例中提供了一種重組李斯特菌菌株，該重組李斯特菌菌株包括一重組核酸，該核酸包括一編碼一重組多肽之第一開放讀碼框架，該重組多肽包括融合至一異源抗原或其片段的一 LLO 蛋白質的 N 端片段，其中該重組核酸更包括一編碼一突變型 PrfA 蛋白質之第二開放讀碼框架，且其中該李斯特菌包括在 *prfA* 基因中的基因體突變或缺失。於另一實施例中，由該第二開放讀碼框架所編碼的突變型 PrfA 蛋白質補充了在該李斯特菌菌株的 PrfA 蛋白質中的基因體突變或缺失。於另一實施例中，由該第二開放讀碼框架所編碼的突變型 PrfA 蛋白質修補了在該李斯特菌菌株中的部分 PrfA 功能。於一實施例中，由該第二開放讀碼框架所編碼的突變型 PrfA 蛋白質係包括在位置 133 的點突變。於另一實施例中，該 PrfA 胺基酸序列在殘基 133 上的突變係由胺基酸 D 或 Asp 或 Aspartate (天冬胺酸鹽，或 Aspartic acid (天冬胺酸))突變為胺基酸 V 或 Val 或 Valine (纈氨酸)。

【0035】 本發明更提供一種包括本文中所提供的重組李斯特菌菌株之免疫原性組合物以及其使用方法，該等方法包含針對一疾病進行治療、預防以及誘導免疫反應，其中在一些實施例中，該疾病為腫瘤或癌症。

【0036】 本發明亦提供用以在一個體中誘導抗疾病的細胞毒性 T 細胞 (CTL)反應，以及治療病症及與該疾病相關的症狀之方法，該等方法包括投與本文中所提供的重組李斯特菌菌株，其中於一些實施例中該疾病為腫瘤

或癌症。

【0037】 於另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌係為經減毒的李斯特菌。「減毒」及「經減毒的」可涵蓋經修飾以減少對宿主之毒性的細菌、病毒、寄生菌、傳染性生物體、普里昂蛋白、腫瘤細胞、該傳染性生物體內的基因及其類似物。宿主可為人類宿主或動物宿主或器官、組織或細胞。列舉一非限定性實例，細菌可經減毒的以減少對宿主細胞的結合、減少自一宿主細胞向另一宿主細胞的傳播、減少細胞外生長或減少於宿主細胞內之細胞內生長。減毒可藉由量測(例如)毒性指標(indicum 或 indicia)、LD₅₀、自器官清除之比率或競爭指數來評定(參見，例如 Auerbuch 等人，(2001) Infect. Immunity 69:5953-5957)。一般而言，減毒導致 LD₅₀ 增加及/或清除比率增加至少 25%，更一般地至少 50%、最一般地至少 100% (2 倍)、普遍地至少 5 倍、更普遍地至少 10 倍、最普遍地至少 50 倍、經常至少 100 倍、更經常至少 500 倍且最經常至少 1000 倍、通常至少 5000 倍、更通常至少 10,000 倍、且最通常至少 50,000 倍、且最經常至少 100,000 倍。

【0038】 熟習此項技術者將充分瞭解術語「經減毒之基因」可涵蓋調節宿主之毒性、病理學或病毒性、在宿主體內之生長或在宿主體內之存活的基因，其中該基因以減輕、降低或消除毒性、病理學或毒力的方式突變。降低或消除可藉由將突變基因調節之毒力或毒性與未突變(或親代)基因調節之毒力或毒性相比較來評定。「突變基因」涵蓋基因之調節區、基因之編碼區、基因之非編碼區或該等區之任何組合內之缺失、點突變及讀框轉移突變。

【0039】 於一實施例中，本文中所提供者為一種用以在一個體中針對腫瘤或癌症誘導免疫反應之方法，該方法包括對該個體投與一包括本文中所提供的重組李斯特菌菌株之組合物的步驟，藉以針對腫瘤或癌症誘導免疫反應。

【0040】 於一實施例中，本發明提供一種在一個體中治療腫瘤或癌症之方法，包括對該個體投與一包括本文中所提供的重組李斯特菌菌株之組合物的步驟。於另一實施例中，本發明提供一種保護一個體預防腫瘤或癌

症之方法，包括對該個體投與本文中所提供的重組李斯特菌菌株。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係表現該重組多肽。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一編碼該重組多肽之質體。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一在 *prfA* 基因中的基因體突變或缺失。

【0041】 於一實施例中，本文中所提供的方法更包括以一包括本發明的重組李斯特菌菌株之組合物增強一個體的步驟。於另一實施例中，該方法更包括以一包括本文中所提供的異源抗原或其片段之免疫原性組合物增強該個體的步驟。於另一實施例中，該方法更包括以一包括引導該個體的細胞表現該異源抗原之免疫原性組合物增強該個體的步驟。於另一實施例中，該細胞為腫瘤細胞。於另一實施例中，該細胞為表現抗原的細胞。於另一實施例中，該方法更包括以一包括本發明的重組李斯特菌菌株之疫苗增強該個體的步驟。

【0042】 於一實施例中，在本文中所提供的 LLO 蛋白質及 ActA 蛋白質的上下文中的片段係指包括該 LLO 或 ActA 蛋白質的至少 5 個相連胺基酸殘基的胺基酸序列之肽或多肽。於另一實施例中，該術語係指包括該胺基酸序列中的至少 10 個相連胺基酸殘基、至少 15 個相連胺基酸殘基、至少 20 個相連胺基酸殘基、至少 25 個相連胺基酸殘基、至少 40 個相連胺基酸殘基、至少 50 個相連胺基酸殘基、至少 60 個相連胺基酸殘基、至少 70 個相連胺基酸殘基、至少 80 個相連胺基酸殘基、至少 90 個相連胺基酸殘基、至少 100 個相連胺基酸殘基、至少 125 個相連胺基酸殘基、至少 150 個相連胺基酸殘基、至少 175 個相連胺基酸殘基、至少 200 個相連胺基酸殘基、至少 250 個相連胺基酸殘基中之至少一者的胺基酸序列之肽或多肽，或 LLO 或 ActA 或多肽中的至少 300 個相連胺基酸殘基、至少 350 個相連胺基酸殘基、至少 400 個相連胺基酸殘基或至少 450 個相連胺基酸殘基的胺基酸序列之肽或多肽。

【0043】 於另一實施例中，「片段」係為一包括生物活性（例如當單獨投藥時或如本文進一步所述的融合蛋白的上下文中投藥時，誘發針對由腫瘤細胞表現的異源抗原的免疫反應，或者當單獨施用或者當在融合蛋白

的上下文中施用如本文進一步所述)之功能性片段。於另一實施例中，該片段在非融合形式中係有功能性的。

【0044】 本發明於某些實施例中提供了與李斯特菌異源的核酸密碼子最佳化，或李斯特菌內源性的核酸密碼子最佳化。單核球增多性李斯特菌對於每一胺基酸所用的最佳密碼子係顯示於美國專利公開案第 2007/0207170 號中，其係以引用方式併入本文中。若核酸中的至少一密碼子係經以單核球增多性李斯特菌對於該胺基酸比在原本序列中的密碼子更為頻繁使用的密碼子替代，該核酸係經密碼子最佳化。

【0045】 本文中所提供的 N 端 LLO 蛋白質片段以及異源性抗原於一實施例中係直接彼此融合。於另一實施例中，編碼該 N 端 LLO 蛋白質片段及該異源抗原之該等基因係直接彼此融合。於另一實施例中，該 N 端 LLO 蛋白質片段及該異源抗原係通過一連接肽而附接。於另一實施例中，該 N 端 LLO 蛋白質片段及該異源抗原係通過一異源肽而附接。於另一實施例中，該 N 端 LLO 蛋白質片段為該異源抗原的 N 端。於另一實施例中，該 N 端 LLO 蛋白質片段為該融合蛋白的最 N 端部分。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0046】 如本文中所提供的，表現 LLO-抗原融合體的重組李斯特菌菌株係誘導抗腫瘤免疫性(實例 1)，誘發抗原特異性 T 細胞增殖(實例 2)，產生抗原特異性及腫瘤浸潤性 T 細胞(實例 3)。

【0047】 於另一實施例中，本發明提供一種在一個體中治療腫瘤或癌症之方法，該方法包括向該個體投與一重組李斯特菌菌株之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一重組多肽，該重組多肽包括 LLO 蛋白質的 N 端片段以及 HPV E7 抗原，以藉該重組李斯特菌菌株針對 E7 抗原誘導免疫反應，藉以在個體中治療腫瘤或癌症。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係表現該重組多肽。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一編碼該重組多肽之質體。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0048】 於一實施例中，術語「重組多肽」及「融合蛋白」在本文中係可互換使用。

【0049】 於另一實施例中，本發明提供一種保護一個體預防腫瘤或癌症之方法，該方法包括向該個體投與一重組李斯特菌菌株之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一重組多肽，該重組多肽包括 LLO 蛋白質的 N 端片段以及 HPV E7 抗原，以藉該重組李斯特菌菌株針對 E7 抗原誘導免疫反應，藉以保護個體預防腫瘤或癌症。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係表現該重組多肽。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一編碼該重組多肽之質體。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0050】 於另一實施例中，本發明提供一種在一個體中針對腫瘤或癌症誘導免疫反應之方法，該方法包括向該個體投與一重組李斯特菌菌株之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一重組多肽，該重組多肽包括 LLO 蛋白質的 N 端片段以及 HPV E7 抗原，藉以在個體中針對腫瘤或癌症誘導免疫反應。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係表現該重組多肽。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一編碼該重組多肽之質體。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0051】 於另一實施例中，本發明提供一種在一個體中治療腫瘤或癌症之方法，該方法包括向該個體投與一重組李斯特菌菌株之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一重組多肽，該重組多肽包括 ActA 蛋白質的 N 端片段以及異源抗原，以藉該李斯特菌菌株針對該異源抗原誘導免疫反應，藉以在個體中治療腫瘤或癌症。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係表現該重組多肽。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一編碼該重組多肽之質體。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0052】 於另一實施例中，本發明提供一種保護一個體預防腫瘤或癌症之方法，該方法包括向該個體投與一重組李斯特菌菌株之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一重組多肽，該重組多肽包括一 ActA 蛋白質的 N 端片段以及一異源抗原，以藉該重組李斯特菌菌株針對該異源抗原誘導免疫反應，藉以保護個體預防腫瘤或癌症。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係表現該重組多肽。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一編碼該重組多肽之質體。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0053】 於另一實施例中，本發明提供一種在一個體中針對腫瘤或癌症誘導免疫反應之方法，該方法包括向該個體投與一重組李斯特菌菌株之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一重組多肽，該重組多肽包括一異源蛋白質的 N 端片段以及一異源抗原，藉以在個體中針對腫瘤或癌症誘導免疫反應。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係表現該重組多肽。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一編碼該重組多肽之質體。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0054】 該 N 端 ActA 蛋白質片段以及該異源性抗原於另一實施例中係直接彼此融合。於另一實施例中，編碼該 N 端 ActA 蛋白質片段及該異源抗原之該等基因係直接彼此融合。於另一實施例中，該 N 端 ActA 蛋白質片段及該異源抗原係通過一連接肽而附接。於另一實施例中，該 N 端 ActA 蛋白質片段及該異源抗原係通過一異源肽而附接。於另一實施例中，該 N 端 ActA 蛋白質片段為該異源抗原的 N 端。於另一實施例中，該 N 端 ActA 蛋白質片段為該融合蛋白的最 N 端部分。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0055】 於另一實施例中，本發明提供一種在一個體中針對腫瘤或癌症誘導免疫反應之方法，該方法包括向該個體投與一重組李斯特菌菌株之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一重組多肽，該重組多肽包括一含有 PEST 胺基酸序列的肽以及一異源抗原，以藉該重組李斯特菌菌株針對該異源抗原誘導免疫反應，藉以在個體中治療腫瘤或癌症。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係表現該重組多肽。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一編碼該重組多肽之質體。於另一實施例中，該方法係保護一個體預防腫瘤或癌症。於另一實施例中，該方法於該個體中治療腫瘤或癌症。

【0056】 該含有 PEST 胺基酸序列的肽以及該異源性抗原於另一實施例中係直接彼此融合。於另一實施例中，編碼該含有 PEST 胺基酸序列的肽及該異源抗原之該等基因係直接彼此融合。於另一實施例中，該含有 PEST 胺基酸序列的肽及該異源抗原係通過一連接肽而附接。於另一實施例中，該含有 PEST 胺基酸序列的肽及該異源抗原係通過一異源肽而附接。於另一

實施例中，該含有 PEST 胺基酸序列的肽為該異源抗原的 N 端。於另一實施例中，該含有 PEST 胺基酸序列的肽為該融合蛋白的最 N 端部分。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0057】 於另一實施例中，本發明提供一種用以針對 HPV 疫苗接種一個體之方法，該方法包括向該個體投與本文中所提供的 *prfA* 變異型重組李斯特菌菌株之步驟，該李斯特菌係表現 HPV 抗原且其中該李斯特菌包括一表現變異型 PrfA 蛋白質之質體。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係表現一包括該 HPV 抗原之重組多肽。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一編碼該重組多肽之質體。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0058】 於另一實施例中，本文中所提供者係為一在個體的脾臟及腫瘤微環境中增加 T 效應細胞對調節性 T 細胞(Tregs)之比例的方法，包括投與本文中所提供的免疫原性組合物。於另一實施例中，在個體中的脾臟及腫瘤微環境中增加 T 效應細胞對調節性 T 細胞(Tregs)之比例係致使在該個體中有更強烈的抗腫瘤反應。

【0059】 於一實施例中，本文中所提供的突變型 PrfA 蛋白質係包括 D133V 胺基酸突變。於另一實施例中，該突變型 PrfA 蛋白質係由 D133V 胺基酸突變組成。於另一實施例中，一包括編碼本文中所提供的突變型 PrfA 蛋白質的開放讀碼框架之核酸係為一在該重組李斯特菌中的質體。於另一實施例中，該包括一編碼本文中所提供的突變型 PrfA 蛋白質的核酸之質體係為一整合性質體。於另一實施例中，該包括一編碼本文中所提供的突變型 PrfA 蛋白質的核酸之質體係為一游離或染色體外質體。

【0060】 於一實施例中，本文中所提供的 *prfA* 突變型重組李斯特菌係包括該染色體 *prfA* 基因上的部分缺失或完全缺失。於另一實施例中，該 *prfA* 突變型李斯特菌係包括該 *prfA* 基因上的功能喪失型突變。

【0061】 於一實施例中，本文中所提供的突變型 PrfA 蛋白質係補充了在一重組李斯特菌中 *prfA* 基因上的基因體缺失、不活化或突變。於另一實施例中，本文中所提供的突變型 PrfA 蛋白質係補充了在本文中所提供的重

組李斯特菌中 *prfA* 基因上的基因體缺失、不活化或突變。於另一實施例中，本文中所提供的突變型 PrfA 蛋白質修補了在一包括 *prfA* 基因的基因體缺失、不活化或突變之重組李斯特菌中的部分 PrfA 功能。於另一實施例中，本文中所提供的突變型 PrfA 蛋白質修補了在一重組李斯特菌中的 PrfA 喪失型功能。

【0062】 於一實施例中，一野生型 PrfA 蛋白質係由陳述於 SEQ ID NO: 31 中的下列野生型核酸序列所編碼：

```
1  atgaacgctc aagcagaaga attcaaaaaa tatttagaaa
   ctaacgggat aaaaccaaaa
      61 caatttcata aaaaagaact tattttttaac caatgggatc
   cacaagaata ttgtattttt
      121 ctatatgatg gtatcacaaa gctcacgagt attagcgaga
   acgggaccat catgaattta
      181 caatactaca aagggggcttt cgttataatg tctggccttta
   ttgatacaga aacatcggtt
      241 ggctattata atttagaagt cattagcgag caggctaccg
   catacgttat caaaataaac
      301 gaactaaaag aactactgag caaaaatctt acgcactttt
   tctatgtttt ccaaacccta
      361 caaaaacaag tttcatacag cctagctaaa tttaatgatt
   tttcgattaa cgpgaagctt
      421 ggctctattt gcggtcaact tttaatcctg acctatgtgt
   atggtaaaga aactcctgat
      481 ggcatcaaga ttacactgga taatttaaca atgcaggagt
   taggatattc aagtggcatc
      541 gcacatagct cagctgtagt cagaattatt tccaaattaa
   agcaagagaa agttatcgtg
      601 tataaaaatt catgctttta tgtacaaaat cttgattatc
   tcaaaagata tgcccctaaa
      661 ttagatgaat ggtttttattt agcatgtcct gctacttggg
   gaaaattaaa ttaa (SEQ ID NO: 31)。
```

【0063】 於一實施例中，一野生型 PrfA 蛋白質係包括陳述於 SEQ ID NO: 32 中的胺基酸序列：

MNAQAEEFKKYLETNGIKPKQFHKKELIFNQWDP
QEYCIFLYDGITKLTSISENGTIMNLQYYKGAFVIM
SGFIDTETSVGYYNLEVISEQATAYVIKINELKELL
SKNLTHFFYVFQTLQKQVSYSLAKFNDFSINGKLG
SICGQLLILTYVYGKETPDGIKITLDNLTMQELGYS
SGIAHSSAVSRIISKLKQEKVIVYKNSCFYVQNLDY
LKRYAPKLDEWFYLACPATWGKLN (SEQ ID NO: 32)。

【0064】 於一實施例中，一編碼突變型 *prfA* 序列之核酸序列係陳述於
SEQ ID NO: 33 中：

1 atgaacgctc aagcagaaga attcaaaaaa tatttagaaa
ctaacgggat aaaaccaaaa
61 caatttcata aaaaagaact tattttttaac caatgggatc
cacaagaata ttgtatTTTT
121 ctatatgatg gtatcacaaa gctcacgagt attagcgaga
acgggaccat catgaattta
181 caatactaca aaggggcttt cgttataatg tctggcttta
ttgatacaga aacatcggtt
241 ggctattata atttagaagt cattagcgag caggctaccg
catacgttat caaaataaac
301 gaactaaaag aactactgag caaaaatctt acgcactttt
tctatgtttt ccaaacccta
361 caaaaacaag tttcatacag cctagctaaa tttaatgttt
tttcgattaa cgggaagctt
421 ggctctatTT gcggtcaact tttaatcctg acctatgtgt
atggtaaaga aactcctgat
481 ggcatcaaga ttacactgga taattttaaca atgcaggagt
taggatattc aagtggcatc
541 gcacatagct cagctgtag cagaattatt tccaaattaa
agcaagagaa agttatcgtg
601 tataaaaatt catgctttta tgtacaaaat cgtgattatc
tcaaagata tgcccctaaa
661 ttagatgaat ggTTTTatTT agcatgtcct gctacttggg
gaaaattaaa ttaa (SEQ ID NO: 33)

【0065】 於一實施例中，本文中所提供的突變型 PrfA 蛋白質序列係包括一陳述於 SEQ ID NO: 34 中之核酸序列：

MNAQAEEFKKYLETNGIKPKQFHKKELIFNQWDPQE
YCIFLYDGITKLTSENGTIMNLQYYKGAFVIMSGFI
DTETSVGYYNLEVISEQATAYVIKINELKELLSKNLT
HFFYVFQTLQKQVSYSLAKFNVFSINGKLGSI CGQLL
ILTYVYGKETPDGIKITLDNLTMQELGYSSGIAHSSA
VSRIISKLLKQEKVIVYKNSCFYVQNRDYLKRYAPKLD
EWFYLA CPATWGKLN (SEQ ID NO: 34).

於另一實施例中，SEQ ID NO: 34 代表一包括 D133V 突變之突變型 PrfA 蛋白質。於另一實施例中，突變型 PrfA 蛋白質係與 SEQ ID NO: 34 同源且包括 D133V 突變。於另一實施例中，突變型 PrfA 蛋白質係至少有 90% 與 SEQ ID NO: 34 同源且包括 D133V 突變。於另一實施例中，突變型 PrfA 蛋白質係至少有 85% 與 SEQ ID NO: 34 同源，並包括 D133V 突變。

【0066】 於另一實施例中，該個體係處於發生 HPV 所介導之癌症發生（例如子宮頸、頭頸或肛門癌）風險中。於另一實施例中，該個體係呈 HPV 陽性。

【0067】 於另一實施例中，該個體係表現了子宮頸上皮內腫瘤。於另一實施例中，該個體係表現了鱗狀上皮內病變。於另一實施例中，該個體係表現了在子宮頸內的非典型增生。

【0068】 HPV 為本發明該等方法之靶標，且於另一實施例中其為 HPV 16。於另一實施例中，該 HPV 為 HPV-18。於另一實施例中，該 HPV 係選自 HPV-16 及 HPV-18。於另一實施例中，該 HPV 為 HPV-31。於另一實施例中，該 HPV 為 HPV-35。於另一實施例中，該 HPV 為 HPV-39。於另一實施例中，該 HPV 為 HPV-45。於另一實施例中，該 HPV 為 HPV-51。於另一實施例中，該 HPV 為 HPV-52。於另一實施例中，該 HPV 為 HPV-58。於另一實施例中，該 HPV 為高危險型的 HPV。於另一實施例中，該 HPV 為黏膜型 HPV。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0069】 於另一實施例中，本發明提供一種針對所關注抗原疫苗接種一個體之方法，該方法包括向該個體以靜脈注射方式投與一免疫原性組合物之步驟，該免疫原性組合物包括免疫原性肽與所關注的抗原之融合體，其中該免疫原性肽係選自(a) LLO 蛋白質的 N 端片段；(b) ActA 蛋白質或其 N 端片段；以及(c)含有 PEST 胺基酸序列的肽，藉以針對所關注抗原疫苗接種個體。

【0070】 於另一實施例中，本發明提供一種針對所關注抗原疫苗接種一個體之方法，該方法包括向該個體以靜脈注射方式投與一重組李斯特菌菌株之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一重組多肽，該重組多肽包括一融合至所關注抗原的免疫原性肽，其中該免疫原性肽係選自(a) LLO 蛋白質的 N 端片段；(b) ActA 蛋白質或其 N 端片段；以及(c)含有 PEST 胺基酸序列的肽，藉以針對所關注抗原疫苗接種個體。

【0071】 於另一實施例中，本發明提供一種在一個體中針對所關注抗原誘導 CTL 反應之方法，該方法包括向該個體投與一包括或表現該所關注抗原之重組李斯特菌菌株之步驟，藉以在個體中針對所關注抗原誘導 CTL 反應。於另一實施例中，該投與步驟為靜脈注射或口服給藥。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0072】 如本文中所提供的，表現 LLO-抗原融合體的重組李斯特菌菌株係誘導抗腫瘤免疫性(實例 1)，誘發抗原特異性 T 細胞增殖(實例 2)，產生抗原特異性及腫瘤浸潤性 T 細胞(實例 3)。因此，本發明之疫苗係有效針對 HPV 抗原 E7 及 E6 誘導免疫反應。

【0073】 於另一實施例中，本發明提供一種用以在一個體中誘導癌症的消退之方法，該方法包括向該個體投與一包括本文中所提供的重組李斯特菌菌株的組合物之步驟。

【0074】 於另一實施例中，本發明提供一種用以在一個體中降低癌症的復發發生率之方法，該方法包括向該個體投與一包括本文中所提供的重組李斯特菌菌株的組合物之步驟。

【0075】 於另一實施例中，本發明提供一種用以在一個體中抑制腫瘤

的形成之方法，該方法包括向該個體投與一包括本文中所提供的重組李斯特菌菌株的組合物之步驟。

【0076】 於另一實施例中，本發明提供一種用以在一個體中誘導癌症的緩解之方法，該方法包括向該個體投與一包括本文中所提供的重組李斯特菌菌株的組合物之步驟。

【0077】 於另一實施例中，本發明提供一種用以在一個體中阻礙腫瘤的生長之方法，該方法包括向該個體投與一包括本文中所提供的重組李斯特菌菌株的組合物之步驟。

【0078】 於另一實施例中，本發明提供一種用以在一個體中減小腫瘤的大小之方法，該方法包括向該個體投與一包括本文中所提供的重組李斯特菌菌株的組合物之步驟。

【0079】 於一實施例中，疾病為傳染性疾病、自體免疫疾病、呼吸系統疾病、癌前期病狀或癌症。

【0080】 熟習此項技術者將充分瞭解術語「癌前期病狀」涵蓋(不限於)非典型增生、腫瘤前節結、大再生節結(MRN)、低度發育不良節結(LG-DN)、高度發育不良節結(HG-DN)、膽上皮發育不良、變異肝細胞之變異區(FAH)、變異肝細胞之節結(NAH)、染色體不平衡、端粒酶之異常活化、端粒酶之催化次單元之再表現、諸如 CD31、CD34 及 BNH9 之內皮細胞標記的表現(參見，例如 Terracciano 及 Tomillo (2003) Pathologica 95:71-82；Su 及 Bannasch (2003) Toxicol. Pathol. 31:126-133；Rocken 及 Carl-McGrath (2001) Dig. Dis. 19:269-278；Kotoula 等人，(2002) Liver 22:57-69；Frachon 等人，(2001) J. Hepatol. 34:850-857；Shimonishi 等人，(2000) J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 7:542-550；Nakanuma 等人，(2003) J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 10:265-281)。用於診斷癌症及非典型增生之方法係已揭露(參見(例如) Riegler (1996) Semin. Gastrointest. Dis. 7:74-87；Benvegnu 等人，(1992) Liver 12:80-83；Giannini 等人，(1987) Hepatogastroenterol. 34:95-97；Anthony (1976) Cancer Res. 36:2579-2583)。

【0081】 於一實施例中，感染性疾病為由(但不限於)以下病原體中之

任一者引起的感染性疾病：BCG/結核病、瘧疾、惡性瘧原蟲(*Plasmodium falciparum*)、三日瘧原蟲(*plasmodium malariae*)、間日瘧原蟲(*plasmodium vivax*)、輪狀病毒、霍亂、白喉-破傷風、百日咳、流感嗜血桿菌、B 型肝炎、人類乳突狀瘤病毒、季節性流感、大流行性 A 型流感(H1N1)、麻疹及風疹、流行性腮腺炎、腦膜炎雙球菌 A+C、單價、二價及三價口服脊髓灰質炎疫苗、肺炎球菌、狂犬病、破傷風類毒素、黃熱病、炭疽桿菌(*Bacillus anthracis*；炭疽)、肉毒桿菌毒素(*Clostridium botulinum toxin*；肉毒中毒)、鼠疫耶爾森氏菌(*Yersinia pestis*；鼠疫)、重型天花(*Variola major*；天花)及其他相關痘瘡病毒、野兔熱弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*；野兔熱)、病毒性出血熱、沙粒病毒(LCM、胡寧病毒(*Junin virus*)、馬秋波病毒(*Machupo virus*)、瓜納里托病毒(*Guanarito virus*)、賴薩熱(Lassa Fever)、布尼亞病毒(*Bunyaviruses*)、漢坦病毒(*Hantaviruses*)、裂谷熱(Rift Valley Fever)、黃病毒(登革熱)、絲狀病毒(埃博拉病毒(*Ebola*)、馬爾堡病毒(*Marburg*))、類鼻疽伯克霍爾德菌(*Burkholderia pseudomallei*)、貝納特氏立克次體(*Coxiella burnetii*；Q 熱)、布氏桿菌種(*Brucella species/brucellosis*)、鼻疽伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia mallei*；鼻疽)、鸚鵡熱衣原體(*Chlamydia psittaci*；鸚鵡熱)、蓖麻毒素(來自蓖麻(*Ricinus communis*))、產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)之 ϵ 毒素(Epsilon toxin)、葡萄球菌腸毒素 B(*Staphylococcus enterotoxin B*)、斑疹傷寒(Typhus fever；普氏立克次氏體(*Rickettsia prowazekii*))、其他立克次氏體(*Rickettsias*)、食物及水媒病原體、細菌(致瀉性大腸桿菌(*Diarrheagenic E.coli*)、病原性弧菌(*Pathogenic Vibrios*)、志賀菌種(*Shigella species*)、沙門氏菌 BCG、空腸彎曲桿菌(*Campylobacter jejuni*)、小腸結腸炎耶爾森氏菌(*Yersinia enterocolitica*))、病毒(杯狀病毒(*Caliciviruses*)、A 型肝炎、西尼羅河病毒(*West Nile Virus*)、拉克羅斯病毒(*LaCrosse*)、加利福尼亞腦炎(*California encephalitis*)、VEE、EEE、WEE、日本腦炎病毒(*Japanese Encephalitis Virus*)、科薩努爾森林病毒(*Kyasanur Forest Virus*)、尼帕病毒(*Nipah virus*)、漢坦病毒(*hantaviruses*)、蜱傳出血熱病毒、切昆貢亞熱病毒(*Chikungunya virus*)、克里米亞-剛果出血熱病毒

(Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus)、蜱傳腦炎病毒、B 型肝炎病毒、C 型肝炎病毒、疱疹單純型病毒(HSV)、人類免疫缺乏病毒(HIV)、人類乳突狀瘤病毒(HPV)、原蟲(小球隱孢子蟲(*Cryptosporidium parvum*)、卡晏環孢子球蟲(*Cyclospora cayatanensis*)、腸蘭伯式鞭毛蟲(*Giardia lamblia*)、痢疾內阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、弓形蟲(*Toxoplasma*)、真菌(小孢子蟲目(*Microsporidia*))、黃熱病、結核病(包括耐藥 TB)、狂犬病、朊病毒、重度急性呼吸性症候群相關之冠狀病毒(SARS-CoV)、*Coccidioides posadasii*、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、細菌性陰道病、沙眼衣原體、細胞巨大病毒、性病性肉芽腫、杜氏嗜血桿菌(*Hemophilus ducreyi*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhea*)、蒼白密螺旋體(*Treponema pallidum*)、陰道毛滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)或本文中未列出之本領域中已知之任何其他感染性疾病。

【0082】 於另一實施例中，該傳染性疾病為家畜傳染性疾病。於另一實施例中，家畜疾病可傳染給人且稱作「人畜共通疾病(zoonotic disease)」。於另一實施例中，此等疾病包括(但不限於)口蹄疫(Foot and mouth disease)、西尼羅河病毒、狂犬病、犬小病毒(canine parvovirus)、貓白血病毒(feline leukemia virus)、馬流感病毒(equine influenza virus)、牛傳染性鼻氣管炎(infectious bovine rhinotracheitis；IBR)、假性狂犬病(pseudorabies)、經典豬瘟(classical swine fever；CSF)、由牛之牛疱疹病毒 1 型(BHV-1)感染引起之 IBR，及豬之假性狂犬病(奧耶斯基氏病(Aujeszky's disease))、弓蟲病、炭疽、水泡性口炎病毒、馬紅球菌(*rhodococcus equi*)、野兔熱、鼠疫(鼠疫耶爾森氏菌)、毛滴蟲。

【0083】 於另一實施例中，本文中所提供的疾病係為呼吸性或發炎性疾病。於另一實施例中，該呼吸性或發炎性疾病係為慢性阻塞性肺臟疾病(COPD)。於另一實施例中，該疾病為哮喘。

【0084】 於一實施例中，活減毒李斯特菌株能夠在不共同投與其他治療劑(諸如抗發炎劑或支氣管擴張劑)之情況下減輕哮喘症狀。於另一實施例中，本文提供之方法另外包含向個體共同投與一活減毒李斯特菌株及一或多種治療劑之步驟。於另一實施例中，治療劑為抗哮喘劑。於另一實施例

中，藥劑為抗發炎劑、非類固醇抗發炎劑、抗生素、抗膽鹼激導性劑、支氣管擴張劑、皮質類固醇、短效 β 促效劑、長效 β 促效劑、組合吸入劑、抗組織胺劑或其組合。

【0085】 於一實施例中，疾病為癌症或腫瘤。於一實施例中，該腫瘤為癌性的。於另一實施例中，利用本發明方法治療之癌症為乳癌。於另一實施例中，癌症為子宮頸癌。於另一實施例中，癌症為含 Her2 之癌症。於另一實施例中，癌症為黑色素瘤。於另一實施例中，癌症為胰臟癌。於另一實施例中，癌症為卵巢癌。於另一實施例中，癌症為胃癌。於另一實施例中，癌症為胰臟之癌性病變。於另一實施例中，癌症為肺腺癌。於另一實施例中，其為多形性膠質母細胞瘤。於另一實施例中，癌症為結腸直腸腺癌。於另一實施例中，癌症為肺鱗腺癌。於另一實施例中，癌症為胃腺癌。於另一實施例中，癌症為卵巢表面上皮贅生物(例如其良性、增生性或惡性變種)。於另一實施例中，癌症為口腔鱗狀細胞癌。於另一實施例中，癌症為非小細胞肺癌。於另一實施例中，癌症為子宮內膜癌。於另一實施例中，癌症為膀胱癌。於另一實施例中，癌症為頭部及頸部癌症。於另一實施例中，癌症為前列腺癌。於另一實施例中，癌症為口咽癌。於另一實施例中，癌症為肺癌。於另一實施例中，癌症為肛門癌。於另一實施例中，癌症為結腸直腸癌。於另一實施例中，所述癌症為食道癌。本發明該等方法所作為標靶的子宮頸瘤於另一實施例中係為鱗狀細胞癌。於另一實施例中，子宮頸瘤為腺癌。於另一實施例中，子宮頸瘤為腺鱗癌。於另一實施例中，子宮頸瘤為小細胞癌。於另一實施例中，子宮頸瘤為在本領域中已知的任何其它類型子宮頸瘤。

【0086】 本發明該等方法所作為標靶的子宮頸瘤於另一實施例中係為鱗狀細胞癌。於另一實施例中，子宮頸瘤為腺癌。於另一實施例中，子宮頸瘤為腺鱗癌。於另一實施例中，子宮頸瘤為小細胞癌。於另一實施例中，子宮頸瘤為在本領域中已知的任何其它類型子宮頸瘤。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0087】 於一實施例中，術語「腫瘤抗原」、「抗原多肽」或「外來抗

原」在本文中係可互換使用，且包含腫瘤抗原、腫瘤相關抗原、血管生成抗原或傳染性疾病抗原。於另一實施例中，本文中所提供的抗原為自體抗原，該自體抗原係存在於宿主內但宿主因免疫耐受性而未對該自體抗原引起免疫反應。

【0088】 於一個實施例中，該抗原為人類乳突狀瘤病毒-E7 (HPV-E7) 抗原，其於一實施例中係選自 HPV16（於一實施例中，GenBank 寄存編號 AAD33253），且於另一實施例中係選自 HPV18（於一實施例中，GenBank 寄存編號 P06788）。於另一實施例中，該抗原多肽為 HPV-E6，其於一實施例中係選自 HPV16（於一實施例中，GenBank 寄存編號 AAD33252、AAM51854、AAM51853 或 AAB67615），且於另一實施例中係選自 HPV18（於一實施例中，GenBank 寄存編號 P06463）。於另一實施例中，該抗原多肽為 Her/2-neu 抗原。於另一實施例中，該抗原多肽為前列腺特異性抗原 (PSA)（於一實施例中，GenBank 寄存編號 CAD30844、CAD54617、AAA58802 或 NP_001639）。於另一實施例中，該抗原多肽為角質層胰蛋白酶(SCCE)抗原（於一實施例中，GenBank 寄存編號 AAK69652、AAK69624、AAG33360、AAF01139 或 AAC37551）。於另一實施例中，該抗原多肽為腎母細胞瘤抗原 1 (Wilms tumor antigen 1)，其於另一實施例中為 WT-1 端粒酶（GenBank 寄存編號 P49952、P22561、NP_659032、CAC39220.2 或 EAW68222.1）。於另一實施例中，該抗原多肽為 hTERT 或端粒酶（GenBank 寄存編號 NM003219（變異型 1）、NM198255（變異型 2）、NM 198253（變異型 3）或 NM 198254（變異型 4））。於另一實施例中，該抗原多肽為蛋白酶 3（於一實施例中，GenBank 寄存編號 M29142、M75154、M96839、X55668、NM 00277、M96628 或 X56606）。於另一實施例中，該抗原多肽為酪胺酸酶相關蛋白 2 (TRP2)（於一實施例中，GenBank 寄存編號 NP_001913、ABI73976、AAP33051 或 Q95119）。於另一實施例中，該抗原多肽為高分子量黑色素瘤相關抗原(HMW-MAA)（於一實施例中，GenBank 寄存編號 NP_001888、AAI28111 或 AAQ62842）。於另一實施例中，該抗原多肽為睪蛋白（於一實施例中，GenBank 寄存編號 AAF79020、

AAF79019、AAG02255、AAK29360、AAD41588 或 NP_659206)。於另一實施例中，該抗原多肽為 NY-ESO-1 抗原（於一實施例中，GenBank 寄存編號 CAA05908、P78358、AAB49693 或 NP_640343）。於另一實施例中，該抗原多肽為 PSCA（於一實施例中，GenBank 寄存編號 AAH65183、NP_005663、NP_082492、O43653 或 CAB97347）。於另一實施例中，該抗原多肽為介白素(IL) 13 受體 α （於一實施例中，GenBank 寄存編號 NP_000631、NP_001551、NP_032382、NP_598751、NP_001003075 或 NP_999506）。於另一實施例中，該抗原多肽為碳酸酐酶 IX (CAIX)（於一實施例中，GenBank 寄存編號 CAI13455、CAI10985、EAW58359、NP_001207、NP_647466 或 NP_001101426）。於另一實施例中，該抗原多肽為癌胚抗原 (CEA)（於一實施例中，GenBank 寄存編號 AAA66186、CAA79884、CAA66955、AAA51966、AAD15250 或 AAA51970）。於另一實施例中，該抗原多肽為 MAGE-A（於一實施例中，GenBank 寄存編號 NP_786885、NP_786884、NP_005352、NP_004979、NP_005358 或 NP_005353）。於另一實施例中，該抗原多肽為細胞凋亡抑制蛋白（於一實施例中，GenBank 寄存編號 AAC51660、AAY15202、ABF60110、NP_001003019 或 NP_001082350）。於另一實施例中，該抗原多肽為 GP100（於一實施例中，GenBank 寄存編號 AAC60634、YP_655861 或 AAB31176）。於另一實施例中，該抗原多肽為本領域中已知的任一其他抗原多肽。於另一實施例中，本發明該等組合物及方法中的抗原多肽係包括該抗原多肽的免疫原性部分。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0089】 於另一實施例中，抗原為端粒酶(TERT)。於另一實施例中，抗原為 LMP-1。於另一實施例中，抗原為 p53。於另一實施例中，抗原為間皮素(mesothelin)。於另一實施例中，抗原為 EGFRVIII。於另一實施例中，抗原為碳酸酐酶 IX (CAIX)。於另一實施例中，抗原為 PSMA。於另一實施例中，抗原為 HMW-MAA。於另一實施例中，抗原為 HIV-1 Gag。於另一實施例中，抗原為酪胺酸酶相關蛋白 2。於另一實施例中，抗原係選自 Her-2、HIV-1 Gag、LMP-1、p53、PSMA、癌胚抗原(CEA)、LMP-1、血管

舒緩素相關肽酶 3 (KLK3)、KLK9、Muc、酪胺酸酶相關蛋白 2、Muc1、FAP、IL-13R α 2、PSA (前列腺特異性抗原)、gp-100、熱休克蛋白質 70 (HSP-70)、 β -HCG、EGFR-III、顆粒白血球群落刺激因子(G-CSF)、血管生成素、血管生成素-1、Del-1、纖維母細胞生長因子：酸性(aFGF)或鹼性(bFGF)、抑濾泡素、顆粒白血球群落刺激因子(G-CSF)、肝細胞生長因子(HGF)/分散因子(SF)、介白素-8 (IL-8)、瘦體素、中期因子(Midkine)、胎盤生長因子、血小板衍生的內皮細胞生長因子(PD-ECGF)、血小板衍生生長因子-BB (PDGF-BB)、多效蛋白(PTN)、前顆粒蛋白(Progranulin)、增生蛋白(Proliferin)、轉型生長因子- α (TGF- α)、轉型生長因子- β (TGF- β)、腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、血管內皮生長因子(VEGF)/血管滲透因子(VPF)、VEGFR、VEGFR2 (KDR/FLK-1)或其片段、FLK-1 或其抗原決定區、FLK-E1、FLK-E2、FLK-I1、內皮糖蛋白或其片段、神經菌毛蛋白 1 (NRP-1)、血管生成素 1 (Ang1)、Tie2、血小板衍生生長因子(PDGF)、血小板衍生生長因子受體(PDGFR)、轉型生長因子- β (TGF- β)、內皮糖蛋白、TGF- β 受體、單核球趨化蛋白-1 (MCP-1)、VE-鈣黏素(VE-cadherin)、CD31、蝶素(ephrin)、TGF- β 受體、單核球趨化蛋白-1 (MCP-1)、VE-cadherin、CD31、ephrin、ICAM-1、V-CAM-1、VAP-1、E-選滯蛋白、血纖維蛋白溶酶原活化因子(plasminogen activators)、血纖維蛋白溶酶原活化抑制因子-1 (plasminogen activators inhibitor-1)、一氧化氮合成酶(NOS)、COX-2、AC133，或 Id1/Id3、血管生成素 3、血管生成素 4、血管生成素 6、CD105、EDG、HHT1、ORW、ORW1 或 TGF- β 輔受體，或其組合。於另一實施例中，抗原為嵌合 Her2/neu 抗原，如在美國專利申請公開案第 2011/0142791 號揭示，其全文係以引用方式併入本文中。本文中所提供的抗原片段的使用係亦為本發明所涵蓋。

【0090】 於另一實施例中，本文提供之腫瘤抗原為腫瘤相關抗原，其於一實施例中為以下腫瘤抗原中之一者：MAGE(黑色素瘤相關抗原 E)蛋白質，例如 MAGE 1、MAGE 2、MAGE 3、MAGE 4、酪胺酸酶；突變體 ras 蛋白質；突變體 p53 蛋白質；p97 黑色素瘤抗原、與晚期癌症相關之 ras 肽或 p53 肽；與頸癌相關之 HPV 16/18 抗原、與乳癌相關之 KLH 抗原、與結

腸直腸癌相關之 CEA (癌胚抗原)、與黑色素瘤相關之 MART1 抗原或與前列腺癌相關之 PSA 抗原。於另一實施例中，用於本文提供之組合物及方法之抗原為黑色素瘤相關抗原，其於一實施例中為 TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、gp-100、酪胺酸酶、HSP-70、 β -HCG 或其組合。應瞭解，熟習此項技術者將能使用本文中未提及但在本領域中已知之任何異源抗原以用於本文提供之方法及組合物。應理解亦本發明提供（但不因此限於）一包括編碼本文所揭示的該等抗原中之至少一者之核酸的減毒李斯特菌。本發明涵蓋了編碼該等已揭示抗原之突變體、突變蛋白質、剪接變異體、片段、截斷之變異體、可溶性變異體、細胞外結構域、細胞內結構域、成熟序列以及其類似物的核酸。提供了編碼該等抗原之抗原決定基、寡肽及多肽之核酸。亦提供了密碼子最優化之實施例，也就是說，最優化在李斯特菌中的表現。所引用之參考文獻、GenBank 寄存編號及本文中所揭示之核酸、肽及多肽全部係以引用方式併入本文中。於另一實施例中，所選定的核酸序列係可編碼一全長基因或一截短的基因、一融合基因或標記基因，並可為一 cDNA、基因體 DNA、DNA 片段（較佳為 cDNA）。其係可經突變或依需要而以其他方式修飾。這些修飾包含密碼子最優化以在選定的宿主細胞或細菌（即李斯特菌）中最優化密碼子的使用。經選定的序列亦可編碼一分泌型、胞質型、細胞核型、細胞膜結合型或細胞表面型多肽。

【0091】 於一實施例中，血管內皮生長因子(VEGF)為一個與血小管生成（胚胎循環系統的重新形成）及血管生成（來自原有血管結構的血管之生長）二者有關之重要信息傳導蛋白質。於一實施例中，VEGF 活性係主要限制於血管內皮細胞，僅管其確實在少數的其他類型細胞（例如，刺激單核白血球細胞/巨噬細胞的遷移）上具有效果。在體外，已顯示 VEGF 可刺激內皮細胞發生有絲分裂及細胞遷移。VEGF 也增強了微血管滲透性且有時被稱為血管滲透因子。

【0092】 於一實施例中，VEGF 家族的所有成員係通過結合到細胞表面上的酪氨酸激酶受體(VEGFRs)來刺激細胞的反應，使其它們二聚化並通過磷酸轉移化而變成活性的。VEGF 受體具有一由 7 個免疫球蛋白樣結構域

組成的胞外部分、單個跨膜的橫跨區域以及一含有分裂酪氨酸激酶結構域的胞內部分。

【0093】 於一實施例中，VEGF-A 為 VEGFR-2 (KDR/Flk-1)配位體以及 VEGFR-1 (Flt-1)配位體。於一實施例中，VEGFR-2 介導幾乎全部已知的對 VEGF 的細胞反應。VEGFR-1 功能尚未明確，儘管其被認為會調節 VEGFR-2 的信息傳導，其於一實施例中通過螯合 VEGF 而防止與 VEGFR-2 的結合，而於一實施例中係在胚胎內的血管生成期間非常重要。於一實施例中，VEGF-C 及 VEGF-D 為 VEGFR-3 的配位體，其於一實施例中介導淋巴血管生成。

【0094】 於一實施例中，本發明之抗原為 VEGF 受體或其片段，而在一實施例中其為 VEGFR-2，且於另一實施例中為 VEGFR-1，並在另一實施例中為 VEGFR-3。

【0095】 於一實施例中，血管內皮生長因子受體 2 (VEGFR2)係在經活化的內皮細胞(ECs)上有高度表現並參與新血管的形成。於一實施例中，VEGFR2 係結合 VEGF 所有的 5 種同型異構物。於一實施例中，在 ECs 上通過 VEGFR2 的 VEGF 信息傳導係誘導了增殖、遷移及最終的分化。於一實施例中，VEGFR2 的小鼠同系物為胎肝激酶基因-1 (Flk-1)，其為一強力的治療靶標，且在腫瘤的生成、入侵及轉移中有重要的角色。於一實施例中，VEGFR2 亦稱為激酶插入區域受體（一種第三型的受體酪氨酸激酶）(KDR)、分化群 309 (CD309)、FLK1、Ly73、Krd-1、VEGFR、VEGFR-2 或 6130401C07。

【0096】 於其他實施例中，該抗原係源自真菌病原體、細菌、寄生蟲、蠕蟲或病毒。於其他實施例中，該抗原係選自破傷風類毒素、來自流感病毒的血凝素分子、白喉類毒素、HIV gp120、HIV gag 蛋白質、IgA 蛋白酶、胰島素肽 B、馬鈴薯粉狀瘡癰病菌(*Spongospora subterranea*)抗原、弧菌抗原、沙門氏菌抗原、肺炎雙球菌抗原、呼吸道融合病毒抗原、流感嗜血桿菌外膜蛋白、幽門螺桿菌脲酶、腦膜炎雙球菌線毛蛋白、淋病雙球菌線毛蛋白、黑色素瘤相關抗原(TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、GP-100、酪氨酸酶、

MART-1、HSP-70、 β -HCG)、來自 HPV-16、-18、-31、-33、-35 或-45 類型之人類乳突狀瘤病毒的人類乳突狀瘤病毒抗原 E1 及 E2、腫瘤抗原 CEA、Ras 蛋白質、突變或以其他方式、p53 蛋白質、突變或以其他方式、Muc1 或 PSA。

【0097】 於其他實施例中，該抗原係與下列疾病中之一者有關：霍亂、白喉、嗜血桿菌屬、A 型肝炎、B 型肝炎、流行性感冒、麻疹、腦膜炎、流行性腮腺炎、百日咳、天花、肺炎球菌性肺炎、脊髓灰質炎、狂犬病、風疹、破傷風、肺結核、傷寒、水痘-帶狀皰疹、百日咳和黃熱病、來自 Addison 氏病的免疫原及抗原、過敏、過敏症、Bruton 氏症候群、癌症，包括實體瘤和血源性腫瘤、濕疹、橋本甲狀腺炎、多肌炎、皮肌炎、第 1 型糖尿病、後天性免疫缺失症候群、移植排斥（諸如腎臟、心臟、胰腺、肺、骨骼、及肝臟移植）、Grave 氏病、多內分泌自體免疫疾病、肝炎、微觀多動脈炎、結節性多動脈炎、天皰瘡、原發性膽汁性肝硬變、惡性貧血、腹部疾病、抗體介導的腎炎、腎小球腎炎、風濕性疾病、系統性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、血清陰性脊柱關節病(seronegative spondylarthritides)、鼻炎、sjogren 氏症候群、全身性硬化症、硬化性膽管炎、Wegener 氏肉芽腫病、皰疹樣皮炎、牛皮癬、白癜風、多發性硬化、腦脊髓炎、Guillain-Barre 二氏症候群、重症肌無力、Lambert-Eaton 二氏症候群、鞏膜、鞏膜外層、眼色素層炎、慢性皮膚粘膜念珠菌病、蕁麻疹、嬰兒期暫時性低丙種球蛋白血症、骨髓瘤、X 性聯遺傳過度 IgM 症候群、Wiskott-Aldrich 二氏綜合症、運動失調性毛細血管擴張症、自身免疫性溶血性貧血、自身免疫性血小板減少症、自體免疫白血球低下症、特發性巨球蛋白血、澱粉樣變性病、慢性淋巴細胞性白血病、非 Hodgkin 氏淋巴瘤、瘧疾環子孢子蛋白、微生物抗原、病毒抗原、自體抗原及李斯特菌。

【0098】 於另一實施例中，HPV E6 抗原在本發明之方法中係用來代替 E7 抗原或除 E7 抗原外針對子宮頸癌進行治療、預防或誘導免疫反應。

【0099】 於另一實施例中，ActA 蛋白質片段在本發明之方法中係用來代替 LLO 片段或除 LLO 片段外針對子宮頸癌進行治療、預防或誘導免疫反

應。

【0100】 於另一實施例中，含有 PEST 胺基酸序列的蛋白質片段在本發明之方法中係用來代替 LLO 片段或除 LLO 片段外針對子宮頸癌進行治療、預防或誘導免疫反應。

【0101】 於另一實施例中，本發明提供一種用以在一個體中誘導一抗 E7 細胞毒性 T 細胞(CTL)反應之方法，該方法包括向該個體投與一重組李斯特菌菌株之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一重組多肽，該重組多肽包括一 LLO 蛋白質的 N 端片段以及一 HPV E7 抗原，藉以在個體中誘導抗 E7 CTL 反應。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株包括一編碼該重組多肽之質體。於另一實施例中，該方法更包括以本發明之重組李斯特菌菌株增強該個體之步驟。於另一實施例中，該方法更包括以一包括 E7 抗原的免疫原性組合物增強該個體之步驟。於另一實施例中，該方法更包括以一引導該個體的細胞表現 E7 抗原之免疫原性組合物增強該個體之步驟。於另一實施例中，該 CTL 反應能夠對 HPV 所介導的疾病、病症或症狀有治療功效。於另一實施例中，該 CTL 反應能夠對 HPV 所介導的疾病、病症或症狀有預防效果。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0102】 於另一實施例中，本發明提供一種在一個體中治療或改善 HPV 所介導的疾病、病症或症狀之方法，該方法包括向該個體投與一重組李斯特菌菌株之步驟，該重組李斯特菌菌株包括一重組多肽，該重組多肽包括一 LLO 蛋白質的 N 端片段以及一 HPV E7 抗原，以藉該重組李斯特菌菌株針對 E7 抗原誘導免疫反應，藉以在個體中治療或改善 HPV 所介導的疾病、病症或症狀。於另一實施例中，該個體為人類個體。於另一實施例中，該個體為非人類個體。於另一實施例中，該個體為本技術領域中已知的任一其他類型個體。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0103】 於另一實施例中，HPV 所介導的疾病、病症或症狀為生殖器疣。於另一實施例中，HPV 所介導的疾病、病症或症狀為非生殖器疣。於另一實施例中，HPV 所介導的疾病、病症或症狀為呼吸道乳頭狀瘤。於另一實施例中，HPV 所介導的疾病、病症或症狀為本領域中已知的任一其他

HPV 所介導的疾病、病症或症狀。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0104】 本發明的該等方法及組合物的抗原於另一實施例中為 HPV E7 抗原。於另一實施例中，該抗原為 HPV E6 蛋白質。於另一實施例中，該抗原為本領域中已知的任一其他 HPV 蛋白質。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0105】 「E7 抗原」於另一實施例中係指 E7 蛋白質。於另一實施例中，該術語係指 E7 片段。於另一實施例中，該術語係指 E7 肽。於另一實施例中，該術語係指本領域中已知的任一其他類型的 E7 抗原。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0106】 本發明的該等方法及組合物的 E7 蛋白質於另一實施例中為 HPV 16 E7 蛋白質。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 HPV-18 E7 蛋白質。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 HPV-31 E7 蛋白質。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 HPV-35 E7 蛋白質。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 HPV-39 E7 蛋白質。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 HPV-45 E7 蛋白質。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 HPV-51 E7 蛋白質。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 HPV-52 E7 蛋白質。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 HPV-58 E7 蛋白質。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為高危險型 HPV E7 蛋白質。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為黏膜型 HPV E7 蛋白質。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0107】 「E6 抗原」於另一實施例中係指 E6 蛋白質。於另一實施例中，該術語係指 E6 片段。於另一實施例中，該術語係指 E6 肽。於另一實施例中，該術語係指本領域中已知的任一其他類型的 E6 抗原。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0108】 本發明的該等方法及組合物的 E6 蛋白質於另一實施例中為 HPV 16 E6 蛋白質。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 HPV-18 E6 蛋白質。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 HPV-31 E6 蛋白質。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 HPV-35 E6 蛋白質。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 HPV-39 E6 蛋白質。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 HPV-45 E6 蛋白質。於另一

實施例中，該 E6 蛋白質為 HPV-51 E6 蛋白質。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 HPV-52 E6 蛋白質。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 HPV-58 E6 蛋白質。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為高危險型 HPV E6 蛋白質。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為黏膜型 HPV E6 蛋白質。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0109】 於一實施例中，E6 和 E7 抗原的組係預期落入本文中所提供的「異源抗原」之範圍內。

【0110】 本發明的該等方法及組合物所誘導的免疫反應於另一實施例中為 T 細胞反應。另一實施例中，該免疫反應包括細胞毒性 T 細胞反應。另一實施例中，該免疫反應包括 T 細胞反應。另一實施例中，該免疫反應為 CD8⁺ T 細胞反應。另一實施例中，該免疫反應包括 CD8⁺ T 細胞反應。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0111】 本發明該等方法及組合物的 N 端 LLO 蛋白質片段於另一實施例中係包括 SEQ ID No: 2。於另一實施例中，該片段包括 LLO 信息肽。於另一實施例中，該片段包括 SEQ ID No: 2。於另一實施例中，該片段大約由 SEQ ID No: 2 組成。於另一實施例中，該片段基本上係由 SEQ ID No: 2 組成。於另一實施例中，該片段係對應 SEQ ID No: 2。於另一實施例中，該片段係與 SEQ ID No: 2 同源。於另一實施例中，該片段係與 SEQ ID No: 2 的一片段同源。於一些實例中所使用的 ΔLLO 長度為 416 個胺基酸（不包括信息序列），而自胺基端包含含有胱胺酸 484 的活化結構域在內的 88 個殘基係經截斷。本領域技術人員將明白任一不具有該活化結構域（特別是不具有胱胺酸 484）的 ΔLLO 係適用於本發明該等方法及組合物中。於另一實施例中，E7 及/或 E6 抗原與任一包含 PEST 胺基酸序列及 SEQ ID NO: 1 的 ΔLLO 之融合體增強了該抗原的細胞介導與抗腫瘤免疫性。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0112】 用以構築本發明該等疫苗之 LLO 蛋白質於另一實施例中係具有以下序列：

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPKTP

IEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPPRKG YKDGNEYIV
VEKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKR
DSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVERWNEKYAQAYP
NVSAKIDYDDEMAYSESQLIAKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQUEE
VISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVA
YGRQVYLKLSTNSHSTKVKA AFDAAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVI
YGGSAKDEVQIIDGNLGD LRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFLKD NEL
AVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGNEI
VQHKNWSENKSKLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKECTGLAWEWWRTV
IDDRNLPLVKNRNISIWGTTLYPKYSNKVDNPIE(GenBank 寄存編號

P13128； SEQ ID NO: 3；核酸序列係陳述於 GenBank 寄存編號 X15127 中)。

對應於此序列的前蛋白的前 25 個胺基酸為信息序列且在其由細菌分泌時自 LLO 裂解。因此，於此實施例中，全長活性 LLO 蛋白質長度為 504 個殘基。於另一實施例中，全長 LLO 蛋白質具有本領域中已知的任一全長野生型 LLO 蛋白質的胺基酸序列。於另一實施例中，係使用 SEQ ID NO: 3 做為併入本發明的疫苗中之 LLO 片段來源。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0113】 於另一實施例中，使用於本發明該等組合物及方法之 LLO 蛋白質 N 端片段係具有以下序列：

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENS ISSVAPPASPPASPKTPI
EKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPPRKG YKDGNEYIVV
EKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDS
LTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVERWNEKYAQAYSN
VSAKIDYDDEMAYSESQLIAKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQUEEVI
SFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYG
RQVYLKLSTNSHSTKVKA AFDAAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYG
GSAKDEVQIIDGNLGD LRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFLKD NELAVI
KNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYD (SEQ ID NO:

2)。

【0114】 於另一實施例中，該 LLO 片段係具有以下序列：
MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISVAPPASPPASPKTPI
EKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPPRKGKDGNEYIVV
EKKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDS
LTLSIDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNNAVNTLVERWNEKYAQAYSN
VSAKIDYDDEMAYSESQLIKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQUEEVI
SFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYG
RQVYLKLSTNSHSTKVKA AFDA AVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYG
GSAKDEVQIIDGNLGDLRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFLKDNE LAVI
KNNSEYIETTSKAYTD (SEQ ID NO: 4)。

【0115】 於另一實施例中，「李斯特菌溶解素 O 蛋白質」或「LLO 蛋白質」係指野生型 LLO 蛋白質，除非已說明其為野生型 LLO 蛋白質的片段。於另一實施例中，「截短的 LLO」或「 Δ LLO」係指包括 PEST 胺基酸結構域的 LLO 的片段。於另一實施例中，該等術語係指一包括 PEST 序列的 LLO 片段。於另一實施例中，該等術語係指一包括推想的 PEST 序列之 LLO 片段。

【0116】 於另一實施例中，該等術語係指在羧基端不含活化結構域且並不包含胱胺酸 484 之 LLO 片段。於另一實施例中，該等術語係指一非為溶血性的 LLO 片段。於另一實施例中，該 LLO 片段係通過該活化結構域的缺失或突變而變為非溶血性。於另一實施例中，該 LLO 片段係通過胱胺酸 484 的缺失或突變而變為非溶血性。於另一實施例中，該 LLO 片段係通過另一位置的缺失或突變而變為非溶血性。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0117】 於另一實施例中，該 LLO 片段係由野生型 LLO 蛋白質的約前 441 個胺基酸組成。於另一實施例中，該 LLO 片段係由 LLO 的約前 420 個胺基酸組成。於另一實施例中，LLO 片段為 LLO 蛋白質之非溶血性形式。

【0118】 於另一實施例中，LLO 片段係包含一對應上述該等胺基酸範圍中之一者的同源 LLO 蛋白質的殘基。殘基數量於一實施例中並不需要完全與上面列舉的殘基數量相符合；例如，若該同源 LLO 蛋白質相對於本文中所用 LLO 蛋白質係具有插入或缺失，那麼殘基數量係可相應地調整。

【0119】 於另一實施例中，LLO 片段係為本領域中已知的任一其他 LLO 片段。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0120】 於另一實施例中，本發明該等方法的重組多肽係由重組李斯特菌菌株所表現。於另一實施例中，其表現係經由該重組李斯特菌菌株攜載的核苷酸分子所介導。

【0121】 於一實施例中，該重組李斯特菌菌株係藉由一編碼該重組多肽之質體而表現該重組多肽。於另一實施例中，該質體包括一編碼細菌轉錄因子之基因。於另一實施例中，該質體係編碼一李斯特菌轉錄因子。於另一實施例中，該轉錄因子為 PrfA。於另一實施例中，該 PrfA 為突變型 PrfA。於另一實施例中，該 PrfA 係含有一 D133V 胺基酸突變。於另一實施例中，該轉錄因子為本領域中已知的任一其他轉錄因子。於另一實施例中，該質體所編碼的突變型 PrfA 係補充了該李斯特菌中的基因體 PrfA 突變、缺失或不活化。於另一實施例中，該質體所編碼的突變型 PrfA 係修復了該具有基因體 PrfA 突變、缺失或不活化之李斯特菌中的部分 PrfA 功能。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0122】 於另一實施例中，由本文中所提供的一重組李斯特菌所包括的質體係包括一編碼代謝酶之開放讀碼框架。於另一實施例中，該質體包括一編碼代謝酶之第三開放讀碼框架。於另一實施例中，該代謝酶為細菌代謝酶。於另一實施例中，該代謝酶為李斯特菌代謝酶。於另一實施例中，該代謝酶為胺基酸代謝酶。於另一實施例中，該胺基酸代謝基因係參與細胞壁合成路徑。於另一實施例中，該代謝酶為 D-胺基酸胺基轉移酶基因(dat)的產物。於另一實施例中，該代謝酶為丙胺酸消旋酶基因(dal)的產物。於另一實施例中，該代謝酶為本領域中已知的任一其他代謝酶。於另一實施例中，該質體攜載一編碼 dal 蛋白質之開放讀碼框架。於另一實施例中，該質

體攜載一編碼 *dat* 蛋白質之開放讀碼框架。於另一實施例中，該質體攜載一編碼 *dal* 及 *dat* 蛋白質之開放讀碼框架。於另一實施例中，於該質體攜載一編碼 *dal* 及/或 *dat* 蛋白質之開放讀碼框架時，其係補充了一重組李斯特菌菌株中的 *dal/dat* 突變。因此，*dal/dat* 重組李斯特菌係亦可設想在本發明中使用。於另一實施例中，除了本文進一步所述的任一其他突變外，本文中所提供的重組李斯特菌係包括一 *dal/dat* 突變。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0123】 於另一實施例中，本文中所提供的李斯特菌菌株係缺乏胺基酸代謝酶。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係缺乏 D-麩胺酸合成酶基因。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係缺乏 *dat* 基因。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係缺乏 *dal* 基因。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係缺乏 *dga* 基因。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係缺乏涉及二胺庚二酸(DAP)的合成之基因。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係缺乏涉及半胱胺酸合成酶 A (*CysK*)的合成之基因。於另一實施例中，該基因係為不依賴維生素 B12 的甲硫胺酸合成酶。於另一實施例中，該基因係為 *trpA*。於另一實施例中，該基因係為 *trpB*。於另一實施例中，該基因係為 *trpE*。於另一實施例中，該基因係為 *asnB*。於另一實施例中，該基因係為 *gltD*。於另一實施例中，該基因係為 *gltB*。於另一實施例中，該基因係為 *leuA*。於另一實施例中，該基因係為 *argG*。於另一實施例中，該基因係為 *thrC*。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係缺乏本文上述該等基因中之一或多者。

【0124】 於另一實施例中，本文中所提供的李斯特菌菌株係缺乏一合成酶。於另一實施例中，該基因係為胺基酸合成基因。於另一實施例中，該基因係為 *folP*。於另一實施例中，該基因係為二氫尿苷合成酶家族蛋白質。於另一實施例中，該基因係為 *ispD*。於另一實施例中，該基因係為 *ispF*。於另一實施例中，該基因係為磷酸烯醇丙酮酸合成酶。於另一實施例中，該基因係為 *hisF*。於另一實施例中，該基因係為 *hisH*。於另一實施例中，該基因係為 *fliI*。於另一實施例中，該基因係為核糖體大次單元假尿苷合成酶。於另一實施例中，該基因係為 *ispD*。於另一實施例中，該基因係為雙

功能性 GMP 合成酶/麩胺酸醯胺轉移酶蛋白質。於另一實施例中，該基因係為 *cobS*。於另一實施例中，該基因係為 *cobB*。於另一實施例中，該基因係為 *cbiD*。於另一實施例中，該基因係為尿紫質-III C-甲基轉移酶/尿紫質-III 合成酶。於另一實施例中，該基因係為 *cobQ*。於另一實施例中，該基因係為 *uppS*。於另一實施例中，該基因係為 *truB*。於另一實施例中，該基因係為 *dxs*。於另一實施例中，該基因係為 *mvaS*。於另一實施例中，該基因係為 *dapA*。於另一實施例中，該基因係為 *ispG*。於另一實施例中，該基因係為 *folC*。於另一實施例中，該基因係為檸檬酸合成酶。於另一實施例中，該基因係為 *argJ*。於另一實施例中，該基因係為 3-去氧-7-phosphoheptulonate 合成酶。於另一實施例中，該基因係為吡啶-3-甘油磷酸酯合成酶。於另一實施例中，該基因係為鄰氨基苯甲酸合成酶/麩胺酸醯胺轉移酶組成物。於另一實施例中，該基因係為 *menB*。於另一實施例中，該基因係為甲萘醌特異性異分支酸合成酶。於另一實施例中，該基因係為磷酸核糖甲醯基甘胺脒(phosphoribosylformylglycinamidine)合成酶 I 或 II。於另一實施例中，該基因係為磷酸核糖胺基咪唑羧酶-琥珀羧胺

(phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide)合成酶。於另一實施例中，該基因係為 *carB*。於另一實施例中，該基因係為 *carA*。於另一實施例中，該基因係為 *thyA*。於另一實施例中，該基因係為 *mgsA*。於另一實施例中，該基因係為 *aroB*。於另一實施例中，該基因係為 *hepB*。於另一實施例中，該基因係為 *rluB*。於另一實施例中，該基因係為 *ilvB*。於另一實施例中，該基因係為 *ilvN*。於另一實施例中，該基因係為 *alsS*。於另一實施例中，該基因係為 *fabF*。於另一實施例中，該基因係為 *fabH*。於另一實施例中，該基因係為假尿苷合成酶。於另一實施例中，該基因係為 *pyrG*。於另一實施例中，該基因係為 *truA*。於另一實施例中，該基因係為 *pabB*。於另一實施例中，該基因係為一 atp 合成酶基因（如 *atpC*、*atpD-2*、*aptG*、*atpA-2* 等）。

【0125】 於另一實施例中，該基因係為 *phoP*。於另一實施例中，該基因係為 *aroA*。於另一實施例中，該基因係為 *aroC*。於另一實施例中，該基因係為 *aroD*。於另一實施例中，該基因係為 *plcB*。

【0126】 於另一實施例中，本文中所提供的李斯特菌菌株係缺乏一肽轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為 ABC 轉運蛋白/ATP-結合/通透酶蛋白質。於另一實施例中，該基因係為寡肽 ABC 轉運蛋白/寡肽-結合蛋白質。於另一實施例中，該基因係為寡肽 ABC 轉運蛋白/通透酶蛋白質。於另一實施例中，該基因係為鋅 ABC 轉運蛋白/鋅-結合蛋白質。於另一實施例中，該基因係為醣 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為磷轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為 ZIP 鋅轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為 *EmrB/QacA* 家族的抗藥性轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為硫轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為質子依賴型寡肽轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為鎂轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為甲酸鹽/亞硝酸鹽轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為亞精胺/腐胺 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為 Na/Pi-共轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為醣磷轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為麩胺酸 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為主要協助家族轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為甘胺酸內鹽/L-脯氨酸 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為鉬 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為磷壁質酸 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為鈷 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為氨轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為胺基酸 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為細胞分化 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為錳 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為鐵化合物 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為麥芽糖/麥芽糊精 ABC 轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為 *Bcr/CflA* 家族的抗藥性轉運蛋白。於另一實施例中，該基因係為上述蛋白質中之一者之次單元。

【0127】 於一實施例中，本文中所提供的為一種用以將李斯特菌轉型以得到一重組李斯特菌之核酸分子。於另一實施例中，本文中所提供用以將李斯特菌轉型之核酸係缺乏毒性基因。於另一實施例中，該核酸分子係整合至該李斯特菌基因體中並攜載一無功能的毒性基因。於另一實施例中，該毒性基因係於該重組李斯特菌中突變。於另一實施例中，該核酸分

子係用以使該李斯特菌基因體中表現的內源性基因不活化。於另一實施例中，該毒性基因係為 *actA* 基因、*inlA* 基因、*inlB* 基因、*inlC* 基因、*inlJ* 基因、*plbC* 基因、*bsh* 基因或 *prfA* 基因。本領域技術人員應理解該毒性基因係可為本領域中已知與該重組李斯特菌中之毒性相關的任一基因。

【0128】 於一實施例中，本文中所提供的活減毒李斯特菌為重組李斯特菌。於另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌包含基因體內化素 C (*inlC*) 基因的突變。於另一實施例中，重組李斯特菌包含基因體 *actA* 基因及基因體內化素 C 基因的突變或缺失。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。於一實施例中，李斯特菌向鄰近細胞之易位係通過與該過程有關的 *actA* 基因及/或 *inlC* 基因之缺失而受到抑制，藉以引起出乎意料的高程度減毒作用以及增加的免疫原性與做為菌株骨架的實用性。

【0129】 熟習此項技術者將充分瞭解術語「減毒」可涵蓋細菌在動物體中造成疾病之能力的減少。換言之，例如該經減毒的李斯特菌菌株的致病特性與野生型李斯特菌相比係已減少，儘管該經減毒的李斯特菌菌株能夠在培養基中生長並維持。以該經減毒的李斯特菌菌株靜脈接種的 Balb/c 小鼠做一實例，50% 的接種動物生存(LD₅₀)之致命劑量係在野生型李斯特菌以上較佳增加至少約 10 倍、更佳至少約 100 倍、更佳至少約 1,000 倍、甚至更佳至少約 10,000 倍以及最佳至少約 100,000 倍。李斯特菌的減毒菌株因而為不會殺死所投與動物之細菌，或於投與的細菌數量遠大於野生型未減毒細菌殺死相同動物的所需數量時才會殺死該動物之細菌。經減毒的細菌也應解釋為一種因為其生長所需的營養物不存在而無法在一般環境中複製之細菌。因此，該細菌僅限於在一提供有所需營養物的受控環境中複製。本發明之減毒菌株由於無法進行未受控的複製，因此對環境係安全的。

【0130】 於另一實施例中，本文中所提供的李斯特菌菌株為 *inlA* 突變體、*inlB* 突變體、*inlC* 突變體、*inlJ* 突變體、*prfA* 突變體、*actA* 突變體、*dal/dat* 突變體、突 *prfA* 變體、*plcB* 缺失突變體或缺少 *plcA* 及 *plcB* 二者之雙重突變體。於另一實施例中，該李斯特菌包括這些基因中個別基因或其基因組合之缺失或突變。於另一實施例中，本文中所提供的李斯特菌係缺少該等

基因中之每一者。於另一實施例中，本文中所提供的李斯特菌係缺少本文所提供之至少一及多達十個任一基因，包含 *actA*、*prfA* 及 *dal/dat* 基因。於另一實施例中，*prfA* 突變體為 D133V PrfA 突變體。

【0131】 於一實施例中，李斯特菌菌株之染色體中係缺少代謝基因、毒力基因等。於另一實施例中，李斯特菌菌株之染色體中及任一游離基因元件中係缺少代謝基因、毒力基因等。於另一實施例中，在毒力菌株之基因體中係缺少代謝基因、毒力基因等。於一實施例中，染色體中之毒力基因係經突變。於另一實施例中，毒力基因係由染色體中刪除。於另一實施例中，李斯特菌菌株之染色體中的代謝基因、毒力基因等係經突變。於另一實施例中，李斯特菌菌株之染色體中及任一游離基因元件中的代謝基因、毒力基因等係經突變。於另一實施例中，在毒力菌株之基因體中的代謝基因、毒力基因等係經突變。於另一實施例中，毒力基因係由染色體中刪除。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0132】 於一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係經減毒。於另一實施例中，該重組李斯特菌係缺少 *actA* 毒力基因。於另一實施例中，該重組李斯特菌係缺少 *prfA* 毒力基因。於另一實施例中，該重組李斯特菌係缺少 *inlB* 基因。於另一實施例中，該重組李斯特菌係缺少 *actA* 及 *inlB* 基因二者。於另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係包括內源性 *actA* 基因的不活化突變。於另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係包括內源性 *inlB* 基因的不活化突變。於另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係包括內源性 *inlC* 基因的不活化突變。於另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係包括內源性 *actA* 及 *inlB* 基因的不活化突變。於另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係包括內源性 *actA* 及 *inlC* 基因的不活化突變。於另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係包括內源性 *actA*、*inlB* 及 *inlC* 基因的不活化突變。於另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係包括內源性 *actA*、*inlB* 及 *inlC* 基因的不活化突變。於另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係包括內源性 *actA*、*inlB* 及 *inlC* 基因的不活化突變。於

另一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係包括下列基因中任一單一基因或其組合中的不活化突變：*actA*、*dal*、*dat*、*inlB*、*inlC*、*prfA*、*plcA*、*plcB*。

【0133】 熟習此項技術者將瞭解術語「突變」及其語法上的同等用語係包含該序列（核酸或胺基酸序列）的任一型式的突變或改變，且包含一缺失突變、截斷、不活化、斷裂或易位。這些型式的突變在本領域中係容易得知。

【0134】 於一實施例中，為了選擇包括一編碼代謝基因或本文中所提供的互補基因之質體的營養缺陷型細菌，經轉型的營養缺陷型細菌係生長於一將針對該胺基酸代謝基因或互補基因之表現篩選的培養基上。於另一實施例中，一對於 D-麩胺酸合成營養缺陷的細菌係以一包含用於 D-麩胺酸合成之基因的質體轉型，且該營養缺陷型細菌將缺乏 D-麩胺酸下生長，而尚未以該質體轉型，或不表現該編碼用於 D-麩胺酸合成之蛋白質之質體的營養缺陷型細菌將不會生長。於另一實施例中，當經轉型並表現本發明的質體(若該質體包括一編碼用於 D-丙胺酸合成之胺基酸代謝酶的分離核酸)，一對於 D-丙胺酸合成營養缺陷的細菌將在缺乏 D-丙胺酸下生長。此類用於製造包括或缺乏必需生長因子、補充劑、胺基酸、維生素、抗生素及其類似物之適當培養基的方法係為本領域中所熟知，且為可購得的(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)。

【0135】 於另一實施例中，一旦該包括本發明之質體的營養缺陷型細菌在適當的培養基上篩選，該等細菌係在一選擇壓力存在下增殖。這樣的增殖包含使細菌在不具有營養缺陷因子培養基中生長。在營養缺陷型細菌中存在表現胺基酸代謝酶之質體會確保該質體將與細菌一起複製，藉此持續篩選出具有該質體的細菌。熟習此項技術者在配備有本文中本發明及方法時將容易能夠藉由調整包括該質體之營養缺陷型細菌所生長之培養基的體積而放大來使李斯特菌疫苗載體的製造規模。

【0136】 熟習此項技術者將瞭解，於另一實施例中係採用其他營養缺陷型菌株及補充系統以用於本發明內。

【0137】 於一實施例中，本文中所提供的重組李斯特菌菌株係表現一重組多肽。於另一實施例中，重組李斯特菌菌株係包括一編碼一重組多肽之質體。於另一實施例中，本文中所提供的重組核酸係在本文中所提供的重組李斯特菌菌株上之質體內。於另一實施例中，該質體為一未整合至該重組李斯特菌菌株的染色體中之游離質體。於另一實施例中，該質體係為一整合至該重組李斯特菌菌株的染色體內的整合性質體。於另一實施例中，該質體為多重複製質體。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係以 1×10^9 - 3.31×10^{10} CFU 之劑量投與至人類個體。於另一實施例中，該劑量為 $5-500 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $7-500 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $10-500 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $20-500 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $30-500 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $50-500 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $70-500 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $100-500 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $150-500 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $5-300 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $5-200 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $5-150 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $5-100 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $5-70 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $5-50 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $5-30 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $5-20 \times 10^8$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $1-30 \times 10^9$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $1-20 \times 10^9$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $2-30 \times 10^9$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $1-10 \times 10^9$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $2-10 \times 10^9$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $3-10 \times 10^9$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $2-7 \times 10^9$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $2-5 \times 10^9$ CFU。於另一實施例中，該劑量為 $3-5 \times 10^9$ CFU。

【0138】 於另一實施例中，該劑量為 1×10^7 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 1×10^8 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 1×10^9 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 1.5×10^9 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 2×10^9 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 3×10^9 個有機體。於

另一實施例中，該劑量為 4×10^9 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 5×10^9 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 6×10^9 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 7×10^9 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 8×10^9 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 10×10^9 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 1.5×10^{10} 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 2×10^{10} 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 2.5×10^{10} 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 3×10^{10} 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 3.3×10^{10} 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 4×10^{10} 個有機體。於另一實施例中，該劑量為 5×10^{10} 個有機體。每一劑量及劑量範圍代表本發明的一獨立實施例。

【0139】 於一實施例中，本發明組合物的重複投與（劑量）可在第一次治療療程後立即或幾天、幾周或幾個月的時間間隔之後著手進行以達到腫瘤消退。於另一實施例中，重複劑量係可在第一次治療療程後立即或幾天、幾周或幾個月的時間間隔後著手進行以達到腫瘤生長的抑制。可通過本領域中任一已知的技術來確定評估，包括諸如成像技術、血清腫瘤標記物分析、檢體分析、或腫瘤相關症狀的存在、不存在或改善分析之診斷方法。

【0140】 熟習此項技術者將瞭解術語「增強」可涵蓋投與一免疫原性組合物或重組李斯特菌菌株劑量至一個體。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。於另一實施例中，本發明該等方法係施與兩次增強（總共接種3次）。於另一實施例中，係施與三次增強。於另一實施例中，係施與四次增強。於另一實施例中，係施與五次增強。於另一實施例中，係施與六次增強。於另一實施例中，係施與超過六次增強。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0141】 於一實施例中，本發明之一方法更包括以本發明的重組李斯特菌菌株增強一人類個體的步驟。於另一實施例中，該使用在增強接種中的重組李斯特菌菌株係與使用在初始的「促發」接種中的菌株相同。於另一實施例中，該增強菌株係與該促發菌株不同。於另一實施例中，係於該促發及增強接種中使用相同的劑量。於另一實施例中，係於增強中使用較

大的劑量。於另一實施例中，係於增強中使用較小的劑量。於另一實施例中，本發明該等方法更包括投與該個體一增強疫苗接種之步驟。於另一實施例中，該增強疫苗接種係於一單一促發疫苗接種後發生。於另一實施例中，一單一增強疫苗接種係於該促發疫苗接種後投與。於另一實施例中，係於該促發疫苗接種後投與兩次增強疫苗接種。於另一實施例中，係於該促發疫苗接種後投與三次增強疫苗接種。於另一實施例中，於促發及增強菌株之間的時間係實驗性地由本領域技術人員所決定。於另一實施例中，於促發及增強菌株之間的時間係自一天並高達一星期，於另一實施例中其係高達兩周，於另一實施例中其係高達三周，於另一實施例中其係高達四周，於另一實施例中其係高達五周，於另一實施例中其係高達 6 至 8 周，且於另一實施例中該增強菌株係於該促發菌株之後投與高達 8 至 12 周。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0142】 於另一實施例中，本發明之一方法更包括以一包括該 E7 抗原的免疫原性組合物對該人類個體進行接種之步驟。於另一實施例中，該免疫原性組合物係包括一重組 E7 蛋白質或其片段。於另一實施例中，該免疫原性組合物係包括一表現重組 E7 蛋白質或其片段之核苷酸分子。於另一實施例中，非李斯特菌的接種係於接種李斯特菌之前施與。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0143】 本發明該等方法及組合物的重組李斯特菌菌株於另一實施例中係為重組單核球增多性李斯特菌菌株。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為重組斯氏李斯特菌(*Listeria seeligeri*)菌株。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為重組格氏李斯特菌(*Listeria grayi*)菌株。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為重組格氏李斯特菌(*Listeria ivanovii*)菌株。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為重組穆氏李斯特菌(*Listeria murrayi*)菌株。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為重組魏氏李斯特菌(*Listeria welshimeri*)菌株。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為本領域中已知的任一其他李斯特菌菌種的重組菌株。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0144】 本發明提供了一些李斯特菌菌種及菌株，用以製造或基因工

程化本發明的減毒李斯特菌。於一實施例中，該李斯特菌菌株係為野生型單核球增多性李斯特菌 10403S（見 Bishop 及 Hinrichs，(1987) *J. Immunol.* 139: 2005–2009；Lauer 等人，(2002) *J. Bact.* 184: 4177–4186）。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為（經噬菌體治癒的）單核球增多性李斯特菌 DP-L4056（見 Lauer 等人，(2002) *J. Bact.* 184: 4177–4186）。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DP-L4027，其係經噬菌體治癒並缺失 *hly* 基因（見 Lauer 等人，(2002) *J. Bact.* 184: 4177–4186；Jones 及 Portnoy，(1994) *Infect. Immunity* 65: 5608–5613）。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DP-L4029，其係經噬菌體治癒，並缺失 *ActA* 基因（見 Lauer 等人，(2002) *J. Bact.* 184: 4177–4186；Skoble 等人，(2000) *J. Cell Biol.* 150: 527–538）。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DP-L4042 (Δ PEST)(見 Brockstedt 等人，(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13832–13837；支援資訊)。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DP-L4097 (LLO-S44A)（見 Brockstedt 等人，(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13832–13837；支援資訊)。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DP-L4364 (Δ *lplA*；硫辛酸蛋白質連接酶)（見 Brockstedt 等人，(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13832–13837；支援資訊)。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DP-L4405 (Δ *inlA*)（見 Brockstedt 等人，(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13832–13837；支援資訊)。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DP-L4406 (Δ *inlB*)（見 Brockstedt 等人，(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13832–13837；支援資訊)。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 CS-L0001 (Δ *ActA*- Δ *inlB*)(見 Brockstedt 等人，(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13832–13837；支援資訊)。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 CS-L0002 (Δ *ActA*- Δ *lplA*)（見 Brockstedt 等人，(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13832–13837；支援資訊)。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌

CS-L0003 (L461T- Δ lplA) (見 Brockstedt 等人, (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 13832–13837; 支援資訊)。於另一實施例中, 該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DP-L4038 (Δ ActA-LLO L461T) (見 Brockstedt 等人, (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 13832–13837; 支援資訊)。於另一實施例中, 該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DP-L4384 (S44A-LLO L461T) (見 Brockstedt 等人, (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 13832–13837; 支援資訊)。於另一實施例中, 該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌; 其疏辛酸蛋白質突變 (見 O'Riordan 等人, (2003) Science 302: 462–464)。於另一實施例中, 該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DP-L4017 (在溶血素基因中 10403S hly (L461T)點突變) (見 2003 年 7 月 24 日申請之美國臨時專利申請案第 60/490,089 號)。於另一實施例中, 該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 EGD (見 GenBank 寄存編號 AL591824)。於另一實施例中, 該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 EGD-e (見 GenBank 寄存編號 NC_003210; 寄存編號 BAA-679)。於另一實施例中, 該李斯特菌菌株係為缺失 uvrAB 之單核球增多性李斯特菌 DP-L4029 (見 2004 年 2 月 2 日申請之美國臨時專利申請案第 60/541,515 號)。於另一實施例中, 該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 ActA-/inlB-雙重突變體 (見 ATCC 寄存編號 PTA-5562)。於另一實施例中, 該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 lplA 突變體或 hly 突變體 (見 Portnoy 等人提出之美國專利申請案第 20040013690 號)。於另一實施例中, 該李斯特菌菌株係為單核球增多性李斯特菌 DAL/DAT 雙重突變體 (見 Frankel 及 Portnoy 提出之美國專利申請案第 20050048081 號)。本發明涵蓋了試劑及方法, 其包含上述李斯特菌菌株及 (例如) 經質體及/或基因體整合修飾以含有編碼以下基因: hly (LLO; 李斯特菌溶素)、iap (p60)、inlA、inlB、inlC、dal (丙胺酸消旋酶)、dat (D-胺基酸轉胺酶)、plcA、plcB、actA 中之一者或任一組合之核酸, 或任何介導生長、傳播、單壁微脂粒之分解、雙壁微脂粒之分解之核酸的這些菌株, 所述菌株結合至宿主細胞, 由宿主細胞吸收。本發明並不受限於以上所揭示之特定菌株。

【0145】 於另一實施例中，本發明之一重組李斯特菌菌株係已通過一動物宿主繼代。於另一實施例中，繼代使菌株作為疫苗載體之功效最大化。於另一實施例中，繼代使李斯特菌菌株之免疫原性穩定。於另一實施例中，繼代使李斯特菌菌株之毒力穩定。於另一實施例中，繼代增加李斯特菌菌株之免疫原性。於另一實施例中，繼代增加李斯特菌菌株之毒力。於另一實施例中，繼代移除了李斯特菌菌株之不穩定子菌株。於另一實施例中，繼代減少了李斯特菌菌株之不穩定子菌株的流行率。於另一實施例中，該李斯特菌菌株係含有一編碼該含有抗原的重組肽之基因的基因體插入。於另一實施例中，李斯特菌菌株攜載了該一包括編碼該含有抗原的重組肽之基因的載體。於另一實施例中，繼代係以本文中所述方式進行。於另一實施例中，繼代係以本領域中已知的任一其他方法來進行。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0146】 於另一實施例中，使用在本發明該等方法中的重組李斯特菌菌株係已儲存在一冷凍細胞庫。於另一實施例中，該重組李斯特菌菌株係已儲存為冷凍乾燥狀態。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0147】 於另一實施例中，本發明該等方法及組合物之細胞庫係為主細胞庫。於另一實施例中，該細胞庫係為一工作細胞庫。於另一實施例中，該細胞庫係為優良製造規範(GMP)細胞庫。於另一實施例中，該細胞庫係意欲用於臨床等級材料的生產。於另一實施例中，該細胞庫係符合供人類使用管制措施的規定。於另一實施例中，該細胞庫為本領域中已知的任一其他類型的資料庫。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0148】 「優良製造規範」於另一實施例中係由美國聯邦法規(United States Code of Federal Regulations)的 21 CFR 210–211 部分所定義。於另一實施例中，「優良製造規範」係由其他用於臨床等級材料的生產或用於人體消耗的標準所定義，例如除美國外的國家之標準。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0149】 於另一實施例中，使用於本發明該等方法中之重組李斯特菌菌株係來自一批次的疫苗劑量。

【0150】 於另一實施例中，使用於本發明該等方法中之重組李斯特菌菌株係來自於美國專利案第 8,114,414 號中所供方法所生產之冷凍或冷凍乾燥儲備料，其係以引用方式併入本文中。

【0151】 於另一實施例中，本發明的肽為一種融合蛋白。於另一實施例中，「融合蛋白」係指一包括二或更多個藉由肽鍵或其他化學鍵而連接一起之蛋白質的肽或多肽。於另一實施例中，該等蛋白質係以一或更多個設於二或更多個蛋白質之間的胺基酸（例如一間隔體）而連接一起。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0152】 於另一實施例中，本發明之疫苗更包括一佐劑。本發明之方法及組合物中所用之佐劑於另一實施例中為顆粒球/巨噬細胞群落刺激因子 (GM-CSF) 蛋白質。於另一實施例中，佐劑包含 GM-CSF 蛋白質。於另一實施例中，佐劑為編碼 GM-CSF 之核苷酸分子。於另一實施例中，佐劑包含編碼 GM-CSF 之核苷酸分子。於另一實施例中，佐劑為皂素 QS21。於另一實施例中，佐劑包含皂素 QS21。於另一實施例中，佐劑為單磷醯基脂質 A。於另一實施例中，佐劑包含單磷醯基脂質 A。於另一實施例中，佐劑為 SBAS2。於另一實施例中，佐劑包含 SBAS2。於另一實施例中，佐劑為含未甲基化 CpG 之寡核苷酸。於另一實施例中，佐劑包含含未甲基化 CpG 之寡核苷酸。於另一實施例中，佐劑為免疫刺激性細胞激素。於另一實施例中，佐劑包含免疫刺激性細胞激素。於另一實施例中，佐劑為編碼免疫刺激性細胞激素之核苷酸分子。於另一實施例中，佐劑包含編碼免疫刺激性細胞激素之核苷酸分子。於另一實施例中，佐劑為或包含羽莖糖苷。於另一實施例中，佐劑為或包含細菌有絲分裂原。於另一實施例中，佐劑為或包含細菌毒素。於另一實施例中，佐劑為或包含本領域中已知之任何其他佐劑。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0153】 於另一實施例中，本發明之核苷酸在運作上係連接一驅動李斯特菌菌株中所編碼的肽之表現的啟動子/調節序列。有利於驅動一基因構成表現之啟動子/調節序列係在本領域中所熟知，且包含但不限於（例如）李斯特菌的 P_{hlyA} 、 P_{ActA} 及 p60 啟動子、鏈球菌 bac 啟動子、鏈黴菌 $sgiA$ 啟

動子及蘇雲金芽孢桿菌 *phaZ* 啟動子。於另一實施例中，編碼本發明的肽的核酸之誘導型及組織特異性表現係藉由在一誘導型或組織特異性啟動子/調節序列的控制下置放編碼該肽的核酸而達成。有利於其目的之組織特異性或誘導型啟動子/調節序列實例包含（但不限於）MMTV LTR 誘導型啟動子，以及 SV40 後強化子/啟動子。於另一實施例中，係使用了一經誘導以對諸如金屬、醣皮質素等誘導劑做出反應之啟動子。因此，應理解本發明包含了任一已知或未知的啟動子/調節序列之使用，且能夠驅動在運作上與其相連的期望蛋白質的表現。

【0154】 本發明之方法及組合物中所用之 ActA 蛋白質之 N 端片段於另一實施例中係具有 SEQ ID NO: 5 中陳述的序列：

MRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEKTEEQPSEVNT
GPRYETAREVSSRDIKELEKSNKVRNTNKADLIAMLKEKAEEKGPNINNN
NSEQTENAAINEEASGADRPAIQVERRHPGLPSDSA AEIKKRRKAIASSDS
ELESITYPKPTKVNNKKKVAKESVADASESDLDSSMQSADESSPQPLKA
NQQPFFPKVFKKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAIVDKSAGLIDQLLTKK
KSEEVNASDFPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSFEPFPPPTDE
ELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSFEPFPPPTDELEIIRETASSLDSSFTR
GDLASLRNAINRHSQNFSDFPPIPTEEELNGRGGRP。

於另一實施例中，ActA 片段包含 SEQ ID NO: 5 中陳述之序列。於另一實施例中，ActA 片段為本領域中已知之任何其他 ActA 片段。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0155】 於另一實施例中，編碼 ActA 蛋白質之片段之重組核苷酸係包括 SEQ ID NO: 6 中陳述之序列：

Atgcgtgcgatgatggtggttttcattactgccattgcattacgattaaccccgacataatatttcagcgacagata
gcgaagattctagtctaaacacagatgaatgggaagaagaaaaacagaagagcaaccaagcgaggtaaatac
gggaccaagatacgaaactgcacgtgaagtaagttcacgtgatattaagaactagaaaaatcgaataaagtgag
aaatacgaacaaagcagacctaatagcaatgttgaaagaaaaagcagaaaaaggtccaaatatcaataatacaa
cagtgaacaaactgagaatgcggctataaatgaagaggcttcaggagccgaccgaccagctatacaagtggagc

gtcgtcatccaggattgccatcggatagcgcagcggaaattaaaaaagaaggaaagccatagcatcatcggata
gtgagcttgaaagccttacttatccggataaaccaacaaaagtaaataagaaaaaagtggcgaaagagtcagttgc
ggatgcttctgaaagtgacttagattctagcatgcagtcagcagatgagtcttcaccacaacctttaaagcaaacca
acaaccattttccctaaagtatttaaaaaataaaagatgcggggaaatgggtacgtgataaaatcgacgaaaatc
ctgaagtaaagaaagcgattgttgataaaagtgcagggtaattgaccaattattaacaaaaagaaaagtgaagag
gtaaatgcttcggacttcccgccaccacctacggatgaagagttaagacttgctttgccagagacaccaatgcttctt
ggttttaatgctcctgctacatcagaaccgagctcattcgaatttccaccaccacctacggatgaagagttaagactt
gctttgccagagacgccaatgcttcttggttttaatgctcctgctacatcggaaccgagctcgttcgaatttccaccgc
ctccaacagaagatgaactagaaatcatccgggaaacagcatcctcgctagattctagttttacaagaggggattta
gctagtttgagaaatgctattaatcgccatagtcaaaatttctctgatttcccaccaatcccaacagaagaagagttga
acgggagaggcggtagacca。

於另一實施例中，重組核苷酸具有 SEQ ID NO: 6 中陳述之序列。於另一實施例中，重組核苷酸包括編碼 ActA 蛋白質的片段之任何其他序列。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0156】 於本發明該等方法及組合物的另一實施例中，PEST 胺基酸序列係融合至 E7 或 E6 抗原。如本文中所提供的，表現 PEST 胺基酸序列-抗原融合體的重組李斯特菌菌株係誘導抗腫瘤免疫性（實例 3），並產生抗原特異性及腫瘤浸潤性 T 細胞（實例 4）。再者，包括抗原及含有 PEST 胺基酸序列 KENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHAEIDK (SEQ ID NO: 1)之融合蛋白顯示了增強的細胞介導的免疫性。

【0157】 因此，抗原與源自其他原核生物體之其他 LM PEST 胺基酸序列及 PEST 胺基酸序列之融合物亦可增強抗原之免疫原性。於另一實施例中，PEST 胺基酸序列具有選自 SEQ ID NO: 7-12 之序列。於另一實施例中，PEST 胺基酸序列係為來自 LM ActA 蛋白質之 PEST 胺基酸序列。於另一實施例中，PEST 胺基酸序列為 KTEEQPSEVNTGPR (SEQ ID NO: 7)、KASVTDTSEGDLDSSMQSADESTPQPLK (SEQ ID NO: 8)、KNEEVNASDFPPPPTDEELR (SEQ ID NO: 9)或 RGGIPTSEEFSSLNSGDFTDDENSETTEEEIDR (SEQ ID NO: 10)。於另一實

施例中，PEST 胺基酸序列係來自鏈球菌屬(*Streptococcus sp*)之鏈球菌溶血素 O 蛋白質。於另一實施例中，PEST 胺基酸序列係來自化膿鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)鏈球菌溶血素 O，例如在胺基酸 35-51 處之 KQNTASTETTTTNEQPK (SEQ ID NO: 11)。於另一實施例中，PEST 胺基酸序列係來自類馬鏈球菌(*Streptococcus equisimilis*)鏈球菌溶血素 O，例如在胺基酸 38-54 處之 KQNTANTETTTTNEQPK (SEQ ID NO: 12)。於另一實施例中，PEST 胺基酸序列為自原核生物體獲得之 PEST 胺基酸序列。於另一實施例中，PEST 胺基酸序列為該項領域中已知的任一其他 PEST 胺基酸序列。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0158】 其他原核生物體之 PEST 胺基酸序列係可根據諸如由(例如)Rechsteiner 及 Rogers (1996, Trends Biochem. Sci. 21:267-271)針對 LM 描述之方法鑑別。或者，來自其他原核生物體之 PEST 胺基酸序列亦可基於此方法鑑別。預期將有 PEST 胺基酸序列之其他原核生物體包括(但不限於)其他李斯特菌種。於另一實施例中，該 PEST 胺基酸序列係嵌入該抗原蛋白質內。因此，於另一實施例中，「融合體」係指一包括該抗原以及連接於該抗原的一端或嵌入該抗原內之 i)一 N 端 LLO 蛋白質(tLLO)、ii)一 N 端 ActA 蛋白質或 iii)一 PEST 胺基酸序列二者之抗原蛋白質。

【0159】 於另一實施例中，PEST 胺基酸序列係使用本領域中已知之任何其他方法或演算法鑑別，例如 CaSPredictor (Garay-Malpartida HM, Occhiucci JM, Alves J, Belizario JE. Bioinformatics. 2005 年 6 月；21 冊，增刊 1：i169-76)。於另一實施例中，係使用下列方法：

【0160】 PEST 指數藉由將值 1 分配給胺基酸 Ser、Thr、Pro、Glu、Asp、Asn 或 Gln 來針對每一 30-35 個胺基酸的序列段(stretch)計算。PEST 殘基中之各者之係數值(CV)為 1 且其他胺基酸(非 PEST)中之各者的係數值為 0。

【0161】 用於鑑別 PEST 胺基酸序列之各方法係代表本發明的一獨立實施例。

【0162】 於另一實施例中，本發明之 LLO 蛋白質、ActA 蛋白質或其

片段不需完全為本文中所陳述該等序列中所陳述者，而可做出保有融合至本文中其他處所陳述抗原的 LLO 或 ActA 蛋白質的功能特性之其他變更、修飾或改變。於另一實施例中，本發明利用了 LLO 蛋白質、ActA 蛋白質或其片段之類似物。類似物於另一實施例中與自然發生的蛋白質或肽不同之處在於保守的胺基酸序列差異或不影響序列的修飾，或其二者。

【0163】 於另一實施例中，完整的 E7 蛋白質或其片段係融合至 LLO 蛋白質、ActA 蛋白質或含有 PEST 胺基酸序列的肽，以產生本發明方法的重組肽。於另一實施例中，所使用的 E7 蛋白質（完整的或做為該等片段的來源）具有下列序列：

【0164】 MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEDEID
GPAGQAE PDRAHYNIVTFCKCDSTLR LCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGI
VCPICSQKP (SEQ ID No: 13)。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 SEQ ID No: 13 之同系物。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 SEQ ID No: 13 之變異體。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 SEQ ID No: 13 之異構體。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 SEQ ID No: 13 之片段。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 SEQ ID No: 13 之同系物片段。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 SEQ ID No: 13 之變異體片段。於另一實施例中，該 E7 蛋白質為 SEQ ID No: 13 之異構體片段。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0165】 於另一實施例中，E7 蛋白質之序列為：

【0166】 MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDE
IDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSADDLRAFQQQL
FLNTLSFVCPWCASQQ (SEQ ID No: 14)。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 14 之同系物。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 14 之變異體。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 14 之異構體。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 14 之片段。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 14 之同系物片段。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 14 之變異體片段。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 14 之異構體片段。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0167】 於另一實施例中，E7 蛋白質具有下列 GenBank 登錄號中之一者所陳述之序列：M24215、NC_004500、V01116、X62843 或 M14119。於另一實施例中，E7 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的同系物。於另一實施例中，E7 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的變異體。於另一實施例中，E7 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的異構體。於另一實施例中，E7 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的片段。於另一實施例中，E7 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的同系物片段。於另一實施例中，E7 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的變異體片段。於另一實施例中，E7 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的異構體片段。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0168】 於另一實施例中，完整的 E6 蛋白質或其片段係融合至 LLO 蛋白質、ActA 蛋白質或含有 PEST 胺基酸序列的肽，以產生本發明方法的重組肽。於另一實施例中，所使用的 E6 蛋白質（完整的或做為該等片段的來源）具有下列序列：

【0169】 MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYC
KQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYS
LYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGR
WTGRCMSCCRSSRTRRETQL (SEQ ID No: 15)。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 15 之同系物。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 15 之變異體。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 15 之異構體。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 15 之片段。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 15 之同系物片段。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 15 之變異體片段。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 15 之異構體片段。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0170】 於另一實施例中，E6 蛋白質之序列為：

【0171】 MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLE

LTEVFEEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYSDSVYGDTLE
KLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLHLNEKRRRFHNIAGHYRGQCHS
CCNRARQERLQRRRETQV (SEQ ID No: 16)。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 16 之同系物。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 16 之變異體。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 16 之異構體。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 16 之片段。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 16 之同系物片段。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 16 之變異體片段。於另一實施例中，該 E6 蛋白質為 SEQ ID No: 16 之異構體片段。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0172】 於另一實施例中，E6 蛋白質具有下列 GenBank 登錄號中之一者所陳述之序列：M24215、M14119、NC_004500、V01116、X62843 或 M14119。於另一實施例中，E6 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的同系物。於另一實施例中，E6 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的變異體。於另一實施例中，E6 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的異構體。於另一實施例中，E6 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的片段。於另一實施例中，E6 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的同系物片段。於另一實施例中，E6 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的變異體片段。於另一實施例中，E6 蛋白質為來自上述 GenBank 登錄號中之一者之序列的異構體片段。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0173】 於另一實施例中，「同源性」係指與 LLO 序列（例如 SEQ ID NO: 2-4 中之一者）之一致性大於 60%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 64%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 68%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 72%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 75%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 78%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於

80%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 82%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 83%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 85%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 87%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 88%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 90%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 92%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 93%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 95%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 96%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 97%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 98%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性大於 99%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 2-4 中之一者之一致性為 100%。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0174】 於另一實施例中，「同源性」係指與 E7 序列(例如 SEQ ID NO: 13-14 中之一者)之一致性大於 60%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 62%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 64%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 68%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 72%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 75%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 78%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 80%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 82%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 83%。於另一實施例中，「同

源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 85%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 87%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 88%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 90%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 92%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 93%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 95%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 96%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 97%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 98%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性大於 99%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 13-14 中之一者之一致性為 100%。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0175】 於另一實施例中，「同源性」係指與 E6 序列(例如 SEQ ID NO: 15-16 中之一者)之一致性大於 60%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 64%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 68%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 72%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 75%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 78%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 80%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 82%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 83%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 85%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 87%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 88%。於

另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 90%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 92%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 93%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 95%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 96%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 97%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 98%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性大於 99%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 15-16 中之一者之一致性為 100%。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0176】 於另一實施例中，「同源性」係指與 PEST 胺基酸序列（例如 SEQ ID NO: 1 及 7-12 中之一者）或與 ActA 序列（例如 SEQ ID NO: 5-6 中之一者）之一致性大於 60%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 60%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 64%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 68%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 72%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 75%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 78%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 80%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 82%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 83%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 85%。於

另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 87%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 88%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 90%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 92%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 93%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 95%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 96%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 97%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 98%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性大於 99%。於另一實施例中，「同源性」係指與 SEQ ID NO: 1 及 7-12 或與 SEQ ID NO: 5-6 中之一者之一致性為 100%。每種可能性代表本發明的一獨立實施例。

【0177】 於一實施例中，利用本領域中已充分描述之方法，包含免疫墨點分析，或利用許多可獲得的套裝軟體中之任一者經由所建立之方法經由電腦演算法分析胺基酸序列，對本文中所列之任何胺基酸序列之蛋白質及/或肽同源性進行測定。舉例而言，此等套裝中的一些包含 FASTA、BLAST、MPsrch 或 Scanps 套裝，且於其他實施例中可採用 Smith 及 Waterman 演算法之用法及/或供分析用之整體/局部或 BLOCKS 比對。判定同源性之各種方法代表本發明的一獨立實施例。

【0178】 於另一實施例中，本發明之 LLO 蛋白質、ActA 蛋白質或其片段係藉由化學共軛作用而附接於該抗原。於另一實施例中，戊二醛係用於該共軛作用上。於另一實施例中，該共軛作用係使用本領域中任一已知的適當方法來進行。每種可能性代表本發明的另一實施例。

【0179】 於另一實施例中，本發明之融合蛋白可藉由任何適宜方法來製備，包含(例如)選殖並限制性分解適宜的序列或藉由下述之方法直接化學合成。於另一實施例中，可選殖子序列且可使用適宜的限制酶切剪適宜的子序列。於另一實施例中可接著連接該等片段以產生期望的 DNA 序列。於另一實施例中，編碼該融合蛋白的 DNA 係使用 DNA 擴增法（例如聚合酶鏈反應(PCR)）產生。首先，分別擴增天然 DNA 任一側新末端上之區段。一個經擴增序列之 5'端編碼肽連接子，而另一經擴增序列之 3'端亦編碼肽連接子。由於第一片段之 5'端與第二片段之 3'端互補，故可將該兩個片段(例如在 LMP 瓊脂糖上部分純化後)用作第三 PCR 反應中之重疊模板。經擴增序列將含有密碼子、開放位點之羧基側上之區段（現形成胺基序列）、連接子及開放位點之胺基側上之序列（現形成羧基序列）。接著將插入子接合至質體。

【0180】 於另一實施例中，LLO 蛋白質、ActA 蛋白質（或其片段）以及該抗原（或其片段）係通過本領域技術人員已知的手段而接合。於另一實施例中，該抗原或其片段係直接或通過一連接子（間隔體）而接合該 ActA 蛋白質或 LLO 蛋白質。於另一實施例中，該嵌合分子係以一單鏈融合蛋白質形式重組表現。

【0181】 於另一實施例中，本發明的融合肽係使用標準的化學肽合成技術而合成。於另一實施例中，該嵌合分子係合成為一單鏈相連多肽。於另一實施例中，LLO 蛋白質、ActA 蛋白質（或其片段），以及該抗原（或其片段）係單獨合成，並接著藉由一分子的胺基末端與另一分子的羧基末端的縮合而融合，藉以形成一肽鍵。於另一實施例中，該 ActA 蛋白質或 LLO 蛋白質以及抗原係各自以一肽間隔體分子的一端而縮合，藉以形成一相連的融合蛋白。

【0182】 於另一實施例中，本發明之多肽及蛋白質係通過固相肽合成 (SPPS)而製備，如 Stewart 等人於 Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版, 1984, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.中所述；或如 Bodanszky 及 Bodanszky (The Practice of Peptide Synthesis, 1984, Springer-Verlag, New York)所述。於

另一實施例中，經適當保護之胺基酸殘基經由其羧基黏附至經衍生化且不溶性之聚合載體上，如交叉鏈結之聚苯乙烯或聚醯胺樹脂。「經適當保護的」指在胺基酸之 α -胺基及任何側鏈官能基上存在有保護基。此側鏈保護基通常對溶劑、試劑及合成中所用的反應條件係穩定的，且在不影響最終肽產物之條件下是可移去的。寡肽逐步的合成係藉由移去最初胺基酸中之 N-保護基而進行，並與所期望的肽的序列中之下一個胺基酸的羧基末端結合。此胺基酸也經過適當的保護。納入之胺基酸之羧基可予以活化，以藉由形成為一反應性基團（諸如形成為碳化二亞胺、對稱酸酐或諸如羥基苯並三唑或五氟苯基酯之「活性酯」基）而可與所支撐結合的胺基酸之 N-末端反應。該含有本發明之疫苗及組合物之醫藥組合物於另一實施例中係藉由熟習此項技術者已知的任何方法（諸如非經腸道、癌旁、經黏膜、經皮、肌肉內、靜脈內、皮內、皮下、腹膜內、心室內、顱內、陰道內或腫瘤內）投與一個體。

【0183】 在本文提供的方法及組合物的另一實施例中，疫苗或組合物係通過口服施用，並因此製成適於口服施用的形式，即以固體或液體製劑形式。適合的固體口服劑型包含錠劑、膠囊、藥丸、顆粒、片粒等等。適合的液體口服劑型包括溶液、懸浮液、分散液、乳劑、油劑等等。於本發明的另一實施例中，活性成分係製成膠囊。根據此實施例，除了活性化合物及插入載體或稀釋劑，本發明的組合物包括硬凝膠膠囊。

【0184】 於另一實施例中，疫苗或組合物係通過靜脈注射、動脈注射或肌肉內注射液體製備物施用。適合的液體製劑包含溶液、懸浮液、分散液、乳劑、油劑等等。於一實施例中，醫藥組合物係通過靜脈注射投與，並因此製成適合用於靜脈注射施用的形式。於另一實施例中，醫藥組合物係通過動脈注射投與，並因此製成適合用於動脈注射投與的形式。於另一實施例中，醫藥組合物係通過肌肉內注射投與，並因此製成適合用於肌肉內注射投與的形式。

【0185】 熟習此項技術者將瞭解術語「治療」可涵蓋治療性治療以及預防性或預防手段，其中其目的係預防或減輕如本文描述之靶向病理性病

狀或病症。因此，於一實施例中，治療可能包含直接影響或治癒疾病、病症或病狀，壓制、抑制、預防、減弱其嚴重程度、延遲其發作、減弱與其相關的症狀，或其組合。因此，於一實施例中，「治療」尤其可涵蓋延遲發展、加速緩解、誘導緩解、放大緩解、加速恢復、提高替代治療的效率或降低其耐受性，或其組合。於一實施例中，「預防」或「阻礙」尤其可涵蓋延遲症狀發作、防止疾病復發、降低復發發病的次數或頻率、提高症狀發病之間的潛伏期，或其組合。於一實施例中，「壓制」或「抑制」尤其可涵蓋降低症狀嚴重程度、降低急性發病的嚴重程度、降低症狀的數量、降低與疾病相關的症狀的發生率、降低症狀的潛伏期、改善症狀、減少繼發症狀、減少繼發性感染、延長患者存活時間，或其組合。

【0186】 於一實施例中，症狀為原發性的，而於另一實施例中，症狀為繼發性的。於一實施例中，「原發性」係指症狀為特定疾病或病症的直接結果，而於一實施例中，「繼發」係指症狀源自原發性原因或由其引起。於一實施例中，本發明所用的的組合物可治療原發性或繼發性症狀或繼發性併發症。於另一實施例中，「症狀」可為任何疾病或病理狀況的表現。

於另一實施例中，本發明提供了一包括本發明疫苗、施用器以及描述本發明該等方法的使用的教學材料之試劑組。儘管典型的試劑組係在下文中描述，鑒於本發明揭示內容其他有用試劑組的內容物對於熟習此項技術者而言將變得顯而易見。這些試劑組中之每一者代表本發明的一獨立實施例。

【0187】 於一實施例中，單數形式的詞語（諸如「一」、「一個」及「該」）係包含其對應的複數形式，除非上下文中另有明確規定。

【0188】 在整個本申請中，本發明的各種實施例可以以範圍的形式呈現。應理解，範圍形式的描述僅僅是為方便和簡潔起見，不應被看作是對本發明的範圍的固定的限制。因此，範圍的描述應當被認為具體公開了所有可能的子範圍以及該範圍內的單個數值。例如，從 1 到 6 的範圍的描述應當被認為具體公開了子範圍，如 1 到 3、1 到 4、1 到 5、2 到 4、2 到 6、3 到 6，等等，以及該範圍內的單個數值，例如，1、2、3、4、5 和 6。這

對於任何範圍廣度均適用。

【0189】 無論何時在本文中標示數值範圍，其是指包含該指定範圍內的任何例舉數字(分數或整數)。該等用語「範圍在」一第一標示數值及一第二標示數值「之間」，以及「範圍從」一第一標示數值「至」一第二標示數值，在本文中係可互換使用，且其係指包含該第一及第二標示數值以及其之間的所有分數和整數的數字。

【0190】 熟習此項技術者應充分瞭解術語「約」在用於修改一個數字定義的參數時，可涵蓋在數量上加上或減去該參數表示數值的 5%，或於另一實施例中加上或減去該參數表示數值的 10%，或於另一實施例中加上或減去該參數表示數值的 15%，或於另一實施例中加上或減去該參數表示數值的 20%之參數變化。

【0191】 熟習此項技術者應瞭解術語「個體」可涵蓋需要針對病況或其後遺症之療法或易罹患該病況或其後遺症之哺乳動物（包含成人或人類幼兒、青少年或青年人），且亦可包含非人類哺乳動物（諸如狗、貓、豬、牛、綿羊、山羊、馬、大鼠及小鼠）。亦應充分瞭解該術語可涵蓋牲畜。術語「個體」並不排除在各方面正常之個體。

【0192】 熟習此項技術者將瞭解用於治療目的之術語「哺乳動物」是指歸類為哺乳動物的任何動物，包含（但不限於）人類、家畜及農畜，以及動物園動物、參與運動項目的動物或寵物動物，諸如犬科動物（包含狗）及馬、貓、牛、豬、羊等。

【0193】 在下面的實例中係描述了多個特定細節，以提供對本發明的徹底理解。然而，熟習此項技術者將會理解可以在不具有這些特定細節的情況下實施本發明。在其他例子中，為避免使本發明不夠清晰，未對公知的方法、程序及元件進行詳細描述。因此這些實例不應以任何方式解釋為限制本發明範圍的廣度。

實驗細節部分

實例 1：LLO-抗原融合體誘導抗腫瘤免疫性

材料及實驗方法（實例 1-2）

細胞株

【0194】 C57BL/6 同基因 TC-1 腫瘤係以 HPV-16 E6 及 E7 永生化並以 c-Ha-ras 致癌基因轉型。TC-1(由 T.C.Wu (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD)提供)為一種表現較低含量 HPV-16 E6 及 E7 且經 c-Ha-ras 致癌基因轉型之高度致瘤性肺上皮細胞。TC-1 在 37°C、10% CO₂ 下生長於含有 10% FCS、2mM L-麩醯胺酸、100 U/ml 青黴素、100μg/ml 鏈黴素、100μM 非必需胺基酸、1 mM 丙酮酸鈉、50 微莫耳(mcM) 2-ME、400 微克(mcg)/毫升 G418 及 10%國家標準菌種保存中心-109 培養基(National Collection Type Culture-109 medium)的 RPMI 1640 中。C3 為來自經 HPV 16 之完整基因體永生化且經 pEJ-ras 轉型之 C57BL/6 小鼠的小鼠胚胎細胞。EL-4/E7 為經 E7 以反轉錄病毒方式轉導之胸腺瘤 EL-4。

單核球增多性李斯特菌菌株及增殖

【0195】 所用李斯特菌菌株為 Lm-LLO-E7 (游離型表現系統中之 hly-E7 融合基因；圖 1A)、Lm-E7 (整合於李斯特菌基因體中之單複本 E7 基因卡匣)、Lm-LLO-NP (「DP-L2028」；游離型表現系統中之 hly-NP 融合基因)及 Lm-Gag (「ZY-18」；整合於染色體中之單複本 HIV-1 Gag 基因卡匣)。E7 藉由 PCR 使用引子 5'-GGCTCGAGCATGGAGATACACC-3'(SEQ ID No: 17；XhoI 位點加下劃線)及 5'-GGGGACTAGTTTATGGTTTCTGAGAACAA-3' (SEQ ID No: 18；SpeI 位點加下劃線)擴增且接合至 pCR2.1 (Invitrogen, San Diego, CA)。E7 藉由 XhoI/SpeI 分解而由 pCR2.1 切除並接合至 pGG-55。將 hly-E7 融合基因及多潛能轉錄因子 prfA 選殖至 pAM401 (一種多複本穿梭質體(Wirth R 等人, J Bacteriol, 165: 831, 1986))中, 產生 pGG-55。hly 啟動子驅動 hly 基因產物的前 441 個胺基酸之表現, (其缺乏溶血性 C 端, 下文稱為「△LLO」, 且具有在 SEQ ID No: 25 中所陳述的序列), 且利用 XhoI 位點連接至 E7 基因, 產生以 LLO-E7 形式轉錄及分泌之 hly-E7 融合基因。李斯特菌之 prfA 陰性菌株 XFL-7 (由 Dr. Hao Shen, University of Pennsylvania 所提供)經 pGG-55

轉型，針對在活體內質體之保留進行選擇(圖 1A-B)。hly 啟動子及基因片段係使用引子 5'-GGGGGCTAGCCCTCCTTTGATTAGTATATTC-3' (SEQ ID No：19；NheI 位點加下劃線) 及 5'-CTCCCTCGAGATCATAATTTACTTCATC-3' (SEQ ID No：20；XhoI 位點加下劃線) 產生。prfA 基因係使用引子 5'-GACTACAAGGACGATGACCGACAAGTGATAACCCGGGATCTAAATAAATCCGTTT-3' (SEQ ID No：27；XbaI 位點加下劃線) 及 5'-CCCGTCGACCAGCTCTTCTTGGTGAAG-3' (SEQ ID No：21；SalI 位點加下劃線) 進行 PCR 擴增。Lm-E7 藉由將含有驅動 E7 表現及分泌之 hly 啟動子及信息序列之表現卡匣引入 LM 基因體之 orfZ 結構域中而產生。E7 藉由 PCR 使用引子 5'-GCGGATCCCATGGAGATACACCTAC-3' (SEQ ID No：22；BamHI 位點加下劃線) 及 5'-GCTCTAGATTATGGTTTCTGAG-3' (SEQ ID No：23；XbaI 位點加下劃線) 進行擴增。E7 接著接合至 pZY-21 穿梭載體中。LM 菌株 10403S 經所得質體 pZY-21-E7 轉型，該質體包含插入對應於 LM 基因體之 orfX、Y、Z 結構域之 1.6-kb 序列中間的表現卡匣。同源性結構域允許 E7 基因卡匣藉由同源重組插入 orfZ 結構域。篩選 E7 基因卡匣整合至 orfZ 結構域中之殖株。細菌生長於具有 (Lm-LLO-E7 及 Lm-LLO-NP) 或不具有 (Lm-E7 及 ZY-18) 氯黴素(20µg/ml)之腦心浸液培養基中。細菌以等分試樣形式冷凍在-80℃下。表現利用西方墨點法驗證(圖 2)。

西方墨點法

【0196】 李斯特菌菌株在 37℃ 下生長於 Luria-Bertoni 培養基中，且在相同的 600nm 量測光密度下收集。上清液經 TCA 沈澱且再懸浮於補充有 0.1 N NaOH 之 1 倍樣品緩衝液中。將相同量之各細胞沈澱物或各經 TCA 沈澱之上清液裝載於 4-20% Tris-甘胺酸 SDS-PAGE 凝膠(NOVEX, San Diego, CA)上。將凝膠轉移至聚偏二氟乙烯上，且用抗 E7 單株抗體(mAb)(Zymed Laboratories, South San Francisco, CA)進行探針探查，接著與 HRP 接合之抗

小鼠二級抗體 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.)一起培養，用 Amersham ECL 偵測試劑顯影，並曝光於 Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech)上。

量測腫瘤生長

【0197】 腫瘤每隔一天用測徑規跨越最短及最長表面直徑量測。此等兩個量測值之平均值以平均腫瘤直徑(以毫米為單位)對各時間點之形式作圖。小鼠在腫瘤直徑達至 20mm 時犧牲。僅顯示存活小鼠之各時間點之腫瘤量測值。

李斯特菌重組體對所確立之腫瘤生長的作用

【0198】 6 至 8 週大的 C57BL/6 小鼠(Charles River)在左側腹皮下接受 2×10^5 個 TC-1 細胞。腫瘤接種後一週，腫瘤直徑已達至 4-5mm 之可觸知的大小。八隻一組的小鼠接著在第 7 天及第 14 天以 0.1 LD_{50} Lm-LLO-E7 (10^7 個 CFU)、Lm-E7 (10^6 個 CFU)、Lm-LLO-NP (10^7 個 CFU) 或 Lm-Gag (5×10^5 個 CFU)腹膜內處理。

^{51}Cr 釋放分析

【0199】 C57BL/6 小鼠(6-8 週大)係以 0.1 LD_{50} Lm-LLO-E7、Lm-E7、Lm-LLO-NP 或 Lm-Gag 腹膜內免疫接種。免疫接種後十天，收集脾臟。脾細胞與作為飼養細胞之經輻射照射的 TC-1 細胞 (100 : 1，脾細胞 : TC-1) 係建立成培養細胞；活體外刺激 5 天，接著用於標準 ^{51}Cr 釋放分析，使用以下靶標：EL-4、EL-4/E7 或以 E7 H-2b 肽(RAHYNIVTF)脈衝處理之 EL-4。E : T 細胞比率(以三重複進行)為 80 : 1、40 : 1、20 : 1、10 : 1、5 : 1 及 2.5 : 1。在 37°C 下培育 4 小時後，細胞係經沈澱成粒，且自各孔移除 $50\mu\text{l}$ 上清液。樣品係以 Wallac 1450 閃爍計數器(Gaithersburg, MD)分析。特異性溶解百分比係以 $[(\text{實驗性每分鐘計數(cpm)} - \text{自發性 cpm}) / (\text{總 cpm} - \text{自發性 cpm})] \times 100$ 形式測定。

TC-1 特異性增殖

【0200】 C57BL/6 小鼠係以 0.1 LD₅₀ Lm-LLO-E7、Lm-E7、Lm-LLO-NP 或 Lm-Gag 免疫接種且藉由 20 天後以 1 LD₅₀ Lm-LLO-E7、Lm-E7、Lm-LLO-NP 或 Lm-Gag 腹膜內注射來加強。加強後六天，自經免疫接種小鼠及未處理小鼠收集脾臟。在每孔具有 2.5×10^4 、 1.25×10^4 、 6×10^3 或 3×10^3 個經輻射照射的 TC-1 細胞做為 E7 Ag 來源之情況下，或在無 TC-1 細胞情況下或在 10 µg/ml Con A 情況下，脾細胞係在平底 96 孔盤中以每孔 5×10^5 個細胞建立培養細胞。細胞於 45 小時後每孔係以 0.5 µCi [³H]胸苷/孔脈衝處理。孔盤於 18 小時後係使用 Tomtec 收集器 96 (Orange, CT) 收集，且以 Wallac 1450 閃爍計數器評估增殖。cpm 之變化係計算為實驗性 cpm - 無 Ag cpm。

流動細胞計數分析

【0201】 C57BL/6 小鼠係以 0.1 LD₅₀ Lm-LLO-E7 或 Lm-E7 靜脈內(i.v) 免疫接種且 30 天後加強。針對 CD8 (53-6.7，經 PE 接合)、CD62 配位體 (CD62L；MEL-14，經 APC 接合) 及 E7 H-2Db 四聚體之三色流動細胞分析係使用具有 CellQuest®軟體之 FACSCalibur®流式細胞儀(Becton Dickinson, Mountain View, CA)進行。加強 5 天後收集之脾細胞在室溫下用負載有 E7 肽(RAHYNIVTF)或對照(HIV-Gag)肽之 H-2Db 四聚體染色。四聚體以 1/200 稀釋度使用且由 Dr. Larry R. Pease (Mayo Clinic, Rochester, MN) 及由 NIAID Tetramer Core Facility 及 NIH AIDS 研究及參考試劑計劃(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)提供。分析四聚體⁺、CD8⁺、CD62L^低 細胞。

B16F0-Ova 實驗

【0202】 24 隻 C57BL/6 小鼠係以 5×10^5 個 B16F0-Ova 細胞接種。在第 3 天、第 10 天及第 17 天，八隻一組的小鼠係以 0.1 LD₅₀ Lm-OVA(10^6 個 cfu)、Lm-LLO-OVA(10^8 個 cfu)免疫接種，且八隻動物保持未經處理。

統計

【0203】 針對腫瘤直徑之比較，測定各組之腫瘤大小之平均值及 SD，

且利用史都登氏 t 試驗法(Student's t test)確定統計顯著性。 $p \leq 0.05$ 視為顯著。

結果

【0204】 比較 Lm-E7 及 Lm-LLO-E7 影響 TC-1 生長之能力。皮下腫瘤建立在 C57BL/6 小鼠之左側腹。七天後，腫瘤已達至可觸知的大小(4-5mm)。小鼠在第 7 天及第 14 天用 0.1 LD₅₀ Lm-E7、Lm-LLO-E7 或作為對照的 Lm-Gag 及 Lm-LLO-NP 進行疫苗接種。Lm-LLO-E7 誘導 75%所建立之 TC-1 腫瘤之完全消退，同時該組中之另 2 隻小鼠中之腫瘤生長得到控制（圖 3）。相形之下，用 Lm-E7 及 Lm-Gag 免疫接種並不誘導腫瘤消退。此實驗多次重複，結果總是極其相似。另外，在不同免疫接種實驗方案下針對 Lm-LLO-E7 獲得相似結果。在另一實驗中，單次免疫接種能夠治癒小鼠之所建立之 5 mm TC-1 腫瘤。

【0205】 在其他實驗中，在其他 2 種表現 E7 之腫瘤細胞株：C3 及 EL-4/E7 情況下，獲得相似結果。為了證實用 Lm-LLO-E7 疫苗接種之功效，分別在第 60 天或第 40 天用 TC-1 或 EL-4/E7 腫瘤細胞再攻擊腫瘤已消除之動物。用 Lm-LLO-E7 免疫接種之動物保持無腫瘤直至實驗結束（在 TC-1 情況下為第 124 天而對於 EL-4/E7 為第 54 天）。

【0206】 因此，抗原以帶有△LLO 之融合蛋白質形式表現係增強了抗原之免疫原性。

實例 2：LM-LLO-E7 處理誘發 TC-1 特異性脾細胞增殖

【0207】 為了量測 Lm-E7 與 Lm-LLO-E7 對 T 細胞之誘導，在經免疫接種之小鼠中量測 TC-1 特異性增殖反應(一種抗原特異性免疫活性的測量)。來自經 Lm-LLO-E7 免疫接種之小鼠之脾細胞在暴露於做為 E7 來源之經輻射照射 TC-1 細胞時，在 20：1、40：1、80：1 及 160：1 之脾細胞：TC-1 比率下增殖（圖 4）。相反地，來自經 Lm-E7 及 rLm 對照免疫接種之小鼠之脾細胞僅展示出背景程度之增殖。

實例 3：E7 與 LLO、ActA 或 PEST 序列之融合體增強 E7 特異性免疫且產生腫瘤浸潤性 E7 特異性 CD8⁺ 細胞

材料及實驗方法

【0208】 將包括 100 mcl 含 2×10^5 個 TC-1 腫瘤細胞之磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS) 加 400 mcl (微升) MATRIGEL® 之 500 mcl MATRIGEL® (BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J.) 皮下植入 12 隻 C57BL/6 小鼠之左側腹 (n=3)。小鼠在第 7 天、第 14 天及第 21 天腹膜內免疫接種，且在第 28 天收集脾臟及腫瘤。腫瘤 MATRIGEL 自小鼠中移除且在 4°C 下在含有 2 毫升 (ml) RP 10 培養基之試管中在冰上培育隔夜。腫瘤用鑷子切碎，切成 2 mm 塊狀物，且在 37°C 下與 3 ml 酶混合物 (0.2 mg/ml 膠原酶-P、1 mg/ml DNase-1 於 PBS 中) 一起培育 1 小時。組織懸浮液經由耐綸篩過濾且用含 5% 胎牛血清 + 0.05% NaN₃ 之 PBS 洗滌以用於四聚體及 IFN- γ 染色。

【0209】 將脾細胞及腫瘤細胞以 10^7 個細胞/毫升在布雷菲德菌素 A (brefeldin A) 存在下與 1 微莫耳 (mM) E7 肽一起培育 5 小時。細胞經洗滌兩次且在 4°C 下在 50 mcl 抗小鼠 Fc 受體上清液 (2.4 G2) 中培育 1 小時或隔夜。細胞針對表面分子 CD8 及 CD62L 染色、透化、使用透化試劑組 Golgi-stop® 或 Golgi-Plug® (Pharmingen, San Diego, Calif.) 固定，且針對 IFN- γ 染色。使用雙雷射流式細胞儀 FACSCalibur 獲得了 500,000 個事件並使用 Cellquest 軟體 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 分析。計算經活化 (CD62L^低) CD8⁺ T 細胞內分泌 IFN- γ 之細胞之百分比。

【0210】 針對四聚體染色，H-2D^b 四聚體裝載有藻紅素 (PE) 接合之 E7 肽 (RAHYNIVTF，SEQ ID NO：24)，在室溫下染色 1 小時，且在 4°C 下用抗別藻藍蛋白 (APC) 接合之 MEL-14 (CD62L) 及 FITC 接合之 CD8⁺ 染色 30 分鐘。分析細胞，比較脾臟及腫瘤中四聚體⁺ CD8⁺ CD62L^低 細胞。

結果

【0211】 為了分析 Lm-ActA-E7 增強抗原特異性免疫之能力，小鼠用 TC-1 腫瘤細胞植入且用 Lm-LLO-E7 (1×10^7 個 CFU)、Lm-E7 (1×10^6 個 CFU) 或 Lm-ActA-E7 (2×10^8 個 CFU) 免疫接種，或未經處理的 (未處理)。來自 Lm-LLO-E7 及 Lm-ActA-E7 組之小鼠的腫瘤與 Lm-E7 或未處理小鼠中相比

含有較高百分比之分泌 IFN- γ 之 CD8⁺ T 細胞(圖 5A)及四聚體特異性 CD8⁺ 細胞(圖 5B)。

【0212】 在另一實驗中，腫瘤負載小鼠經投與 Lm-LLO-E7、Lm-PEST-E7、Lm- Δ PEST-E7 或 Lm-E7epi，且量測腫瘤內 E7 特異性淋巴細胞之含量。小鼠在第 7 天及第 14 天用 0.1 LD₅₀ 之 4 種疫苗處理。腫瘤在第 21 天收集且用 CD62L、CD8 之抗體及用 E7/Db 四聚體染色。在用 Lm-LLO-E7 及 Lm-PEST-E7 疫苗接種之小鼠中看到腫瘤內四聚體陽性淋巴細胞之百分比增加(圖 6A)。此結果在三次實驗中為可再現的(圖 6B)。

【0213】 因此，Lm-LLO-E7、Lm-ActA-E7 及 Lm-PEST-E7 各自有效誘導腫瘤浸潤性 CD8⁺ T 細胞及腫瘤消退。

實例 4：通過小鼠繼代李斯特菌疫苗載體誘發對異源性及內源性抗原的免疫反應增加

材料及實驗方法

細菌菌株

【0214】 血清型 1 之單核球增多性李斯特菌 10403S (ATCC, Manassas, Va.)為使用在這些研究中的野生型生物體以及以下所述構築體之親代菌株。菌株 10403S 於腹膜內注入 BALB/c 小鼠時係具有約 5 x 10⁴ 個 CFU 的 LD₅₀。「Lm-Gag」為一含有使用經修飾穿梭載體 pKSV7 而穩定整合至李斯特菌基因體中之 HIV-1 菌株 HXB (帶有形成合胞體的表現型之亞型 B 實驗室菌株) gag 基因的重組 LM 菌株。Gag 蛋白質係通過該菌株表現並分泌，如通過西方墨點法所判定。所有的菌株係長在腦心浸液(BHI)培養液或瓊脂盤(Difco Labs, Detroit, Mich)中。

細菌培養

【0215】 來自於表現繼代抗原及/或融合蛋白之單一殖株的細菌係經選殖並隔夜培養在 BHI 培養液中。此培養物的等分試樣係以無任何添加劑的狀態下冷凍在 -70°C 下。由此儲備料，培養物係生長至 O.D. 600 nm 的值

為 0.1 至 0.2，且其等分試樣係再以無任何添加劑的狀態下冷凍在 -70°C 下。上述步驟係為製備經選殖的細菌庫而使用，但在每次繼代之後一些細菌菌株係經選殖並檢查靶標抗原的表現情況，如本文中所述。經確定表現外來抗原的菌株係使用於下次的繼代中。

小鼠中的細菌繼代

【0216】 6 至 8 週大的雌性 BALB/c (H-2d)小鼠係購自 Jackson Laboratories (Bar Harbor, Me)並保持在無病原體的微隔離器環境中。於冷凍儲存於 -70°C 下的儲備培養物之等分試樣中的活菌效價係藉由在使用前解凍並塗在 BHI 瓊脂盤上而判定。總之， 5×10^5 個細菌係以腹膜內注入 BALB/c 小鼠。於 3 天後，脾臟係經收集及均質化，且脾臟均質物的連續稀釋物係隔夜培養在 BHI 培養液並塗在 BHI 瓊脂盤上。為進一步的繼代，係再讓等分試樣生長至 O.D. 600 nm 的值為 0.1 至 0.2，冷凍在 -70°C ，並再通過連續稀釋來判定細菌效價。於初始的繼代(繼代 0)之後，此序列重複總共 4 次。

胞內細胞素 $\text{IFN-}\gamma$ 染色

【0217】 淋巴細胞係於細胞毒性 T 細胞(CTL)對於 HIV-GAG (AMQMLKETI; SEQ ID No: 25)、李斯特菌 LLO (GYKDGNEYI; SEQ ID No: 26)或 HPV 病毒基因 E7 (RAHYNIVTF) (SEQ ID No: 24)的抗原決定區存在或不存在下，以濃度 1 微莫耳培養在含有 50 U/ml 人類重組 IL-2 及 1 $\mu\text{l/ml}$ 布雷菲德菌素 A (brefeldin A (GolgistopTM; PharMingen, San Diego, CA)) 的完全 RPMI-10 中。細胞首先進行表面染色，接著洗滌並使用 Cytofix/Cytoperm 試劑組根據製造商建議(PharMingen, San Diego, CA)接受胞內細胞素染色。對於胞內 $\text{IFN-}\gamma$ 染色，係使用與 FITC 接合的大鼠抗小鼠型 $\text{IFN-}\gamma$ 單株抗體(殖株 XMG 1.2)以及其同型對照抗體(大鼠 IgG1;皆來自 PharMingen)。總之， 10^6 個細胞係在 4°C 下於含有 1%牛血清蛋白及 0.02%疊氮化鈉(FACS 緩衝液)的 PBS 中染色 30 分鐘，隨後在 FACS 緩衝液中洗滌 3 次。樣本資料係於 FACScanTM 流式細胞儀或 FACSCaliburTM 儀器(Becton Dickinson, San Jose, CA)上獲得。針對 CD8 (PERCP 接合，大鼠抗小鼠型，殖株 53-6.7，

Pharmingen, San Diego, Calif.)、CD62L (APC 接合，大鼠抗小鼠型，殖株 MEL-14) 及胞內 IFN- γ 之三色流動細胞分析係使用 FACSCalibur® 流式細胞儀 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 進行，且資料係進一步以 CELLQuest 軟體 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 分析。於針對 CD8⁺ 及胞內 IFN- γ 染色分析之前，細胞係圈選為 CD8 高及 CD62L^低。

結果

在小鼠中的繼代增加了重組單核球增多性李斯特菌的毒力

【0218】 使用三種不同的構築體來判定繼代對重組李斯特菌疫苗載體的衝擊。這些構築體中的二者攜載了該繼代抗原中的基因體插入：第一種係包括 HIV gag 基因 (Lm-Gag)，而第二種係包括 HPV E7 基因 (Lm-E7)。第三種 (Lm-LLO-E7) 係包括針對該與截短型式 LLO 及編碼 prfA (控制李斯特菌毒力因子的正調節因子) 的基因融合之繼代抗原之帶有該融合基因的質體。此質體係用以補充 prfA 陰性突變體，藉以在一活宿主中，選擇壓力會有利於保存該質體，因為沒有該質體細菌是無毒力的。三種構築體全部在體外廣泛地增殖許多細菌世代。

【0219】 如通過脾臟中存活的細菌數量所量測，繼代細菌在前兩次的每次繼代中會造成細菌毒力的增加。對於 Lm-Gag 及 Lm-LLO-E7，每次繼代的毒力增加直到第二次繼代 (圖 7A)。該含有質體的構築體 Lm-LLO-E7 顯示了最急劇的毒力增加。於繼代之前，初始的 Lm-LLO-E7 免疫接種劑量必須增加至 10⁷ 個細菌且脾臟必須在第 2 天收集以回收細菌 (而對於 Lm-Gag 係在第 3 天收集其初始劑量 10⁵ 個細菌)。於初次繼代後，Lm-LLO-E7 的標準劑量係足以在第 3 天收集。對於 Lm-E7，在未經繼代的細菌中毒力係增加 1.5 個數量級 (圖 7B)。

【0220】 因此，通過小鼠繼代會增加李斯特菌疫苗菌株的毒力。

繼代增加了單核球增多性李斯特菌菌株誘導 CD8⁺ T 細胞的能力

【0221】 接著，繼代對於誘導抗原特異性 CD8⁺ T 細胞的能效係藉由具有對 MHC I 類特異的免疫顯性肽之胞內細胞素染色法，使用 HIV-Gag 肽

AMQMLKETI (SEQ ID No: 25)及 LLO 91-99 (GYKDGNEYI; SEQ ID No: 26) 而判定。10³ 個 CFU 的繼代細菌(Lm-Gag)注入小鼠內誘發了顯著數量的 HIV-Gag 特異性 CD8⁺ T 細胞，而相同劑量的未經繼代 Lm-Gag 未誘導出可偵測到的 Gag 特異性 CD8⁺ T 細胞。縱然增加未經繼代的細菌劑量 100 倍，其並未補償其相對的無毒力；事實上，甚至在較高劑量下並未有可偵測到的 Gag 特異性 CD8⁺ T 細胞被誘發。隨著經繼代的細菌之相同劑量增加係增加了 50%的 Gag 特異性 T 細胞誘導（圖 8）。相同的抗原特異性 CD8⁺ T 細胞誘導模式係在 LLO 特異性 CD8⁺ T 細胞上觀察到，顯示這些結果並未由繼代抗原的特性所造成，因為其在 LLO（內源性李斯特菌抗原）上可觀察到。

【0222】 因此，通過小鼠繼代會增加李斯特菌疫苗菌株的免疫原性。

實例 5：在沒有抗生素下含有 PrfA 的質體在具有 PrfA 缺失的 LM 菌株中係穩定的

材料及實驗方法

細菌

【0223】 單核球增多性李斯特菌菌株 XFL7 係在 prfA 基因中含有 300 個鹼基對缺失。XFL7 攜載可部分恢復毒力並授予 CAP 耐受性的 pGG55，且已在美國專利申請公開案第 200500118184 號中描述。

自李斯特菌萃取質體的實驗方案開發

【0224】 1 mL 的單核球增多性李斯特菌 Lm-LLO-E7 研究工作細胞庫小管係接種至 27 mL 含有 34 µg/mL CAP 的 BH1 培養基中並在 37°C 及 200 rpm 下生長 24 小時。

【0225】 七個該培養物的 2.5 mL 樣本係沉澱成粒（以 15000 rpm 進行 5 分鐘），且沉澱物係以 50 µl 溶菌酶溶液在 37°C 下培養不同的時間量（自 0 至 60 分鐘）。

【0226】 溶菌酶溶液：

- 29 μ l 1 M 磷酸氫二鉀
- 21 μ l 1 M 磷酸二氫鉀
- 500 μ l 40%蔗糖（已通過 0.45/ μ m 的濾膜進行過濾滅菌）
- 450 μ l 水
- 60 μ l 溶菌酶(50 mg/mL)

【0227】 於與溶菌酶一起培養之後，其懸浮液係依前述方法離心並丟棄上清液。各沉澱物係接著藉由一改良版 QIAprep Spin Miniprep Kit® (Qiagen, Germantown, Maryland)實驗方案而接受質體萃取。對於該實驗方案的改變如下：

1. 緩衝液 P1、P2 及 N3 的體積係全部增加 3 倍以讓增加的生物體完全裂解。
2. 於加入 P2 之前將 2 mg/mL 溶菌酶加入再懸浮細胞中。裂解溶液係接著於中和之前在 37°C 下培養 15 分鐘。
3. 質體 DNA 係再懸浮成 30 μ L 而非 50 μ L，以增加濃度。

【0228】 於其他實驗中，細胞係在 P1 緩衝液及溶菌酶中培養 15 分鐘，接著在室溫下與 P2（裂解緩衝液）及 P3（中和緩衝液）一起培養。

【0229】 來自於各繼代培養物的等體積分離質體 DNA 係在 0.8%瓊脂糖凝膠上跑膠並以溴化乙菲錠染色及顯影任一結構或分離不穩定性的跡象。

【0230】 這些結果顯示了由單核球增多性李斯特菌 Lm-LLO-E7 所萃取的質體提高了隨溶菌酶培養時間增加的功效，且在約培養 50 分鐘時達至最佳程度。

【0231】 這些結果提供了由李斯特菌疫苗菌株萃取質體的有效方法。

複印培養

【0232】 原培養物的稀釋物係於塗在存有或未存有 34 μ g/mL CAP 之含有 LB 或 TB 瓊脂的培養皿上。選擇性瓊脂或非選擇性瓊脂上的菌落數差異係用以判定該質體是否有任何顯見的分離不穩定性。

結果

【0233】 pGG55 質體於沒有抗生素下在單核球增多性李斯特菌菌株 XFL7 中的基因穩定性（即在缺少選擇壓力下該質體被細菌保留或保持穩定與該細菌相關聯的程度；例如，抗生素選擇壓力）係藉由在 Luria-Bertani 培養基（LB: 5 g/L NaCl、10 g/ml 大豆蛋白胨、5 g/L 酵母菌萃取物）及 Terrific Broth 培養基（TB: 10 g/L 葡萄糖、11.8 g/L 大豆蛋白胨、23.6 g/L 酵母菌萃取物、2.2 g/L KH_2PO_4 、9.4 g/L K_2HPO_4 ）二者中以二重複培養方式的連續繼代培養而評估。裝在 250 mL 擋板搖瓶中的 50 mL 新鮮培養基係以固定數量的細胞(1 OD mL)接種，接著以 24 小時的間隔繼代培養。培養物係在 37°C 下以 200 rpm 於一軌道振盪器中進行接種。於每次繼代培養時係測量其 OD₆₀₀ 值以用於計算經過的細胞倍增時間（或其世代），直至在 LB 培養基中達到 30 個世代或在 TB 培養基中達到 42 個世代。在每一繼代培養階段（約每 4 個世代）中係藉由離心將已知數量的細胞(15 OD mL)沉澱成粒，且質體 DNA 係使用上述 Qiagen QIAprep Spin Miniprep®實驗方案進行萃取。於純化後，質體 DNA 係接受瓊脂糖凝膠電泳，接著進行溴化乙菲錠染色。儘管於該等樣本之間在製備中的質體數量有輕微的變化，關於細菌的世代數量其整體趨勢為一恆定數量的質體（圖 9A-B）。因此，pGG55 表現出在菌株 XFL7 中的穩定性，即使在沒有抗生素的情況下。

【0234】 在瓊脂培養皿上利用複印培養對各階段繼代培養的穩定性研究中亦監測了質體的穩定性。與瓊脂糖凝膠電泳的結果一致，在整個 LB 或 TB 液體培養（分別為圖 10 及 11）的研究中含有質體的細胞數量整體上並沒有變化。

【0235】 這些發現顯示出編碼 prfA 質體在沒有抗生素下表現了其在含有 prfA 突變的李斯特菌菌株中的穩定性。

材料與方法（實例 6-10）

【0236】 PCR 試劑：

【0237】 該等用以擴增 prfA 基因及鑑別 D133V 突變之引子係顯示於

表 1 之中。該等引子 ADV451、452 及 453 之儲備液係藉由稀釋 TE 緩衝液中的引子至 400 μM 而製備。儲備液的等分試樣係進一步以水(PCR 等級)稀釋至 20μM 以製備工作溶液。該等引子係儲存在-20°C 下。使用於 PCR 中的試劑係顯示於表 2 之中。

【0238】 表 1. 引子 ADV451、452 及 453。

引子	方向	序列 (5'→3')	特異性
ADV451	正向	CCTAGCTAAATTTAATGT (SEQ ID NO: 28)	D133V 突變
ADV452	正向	CCTAGCTAAATTTAATGA (SEQ ID NO: 29)	野生型序列
ADV453	反向	TAATTTTCCCCAAGTAGC AGG (SEQ ID NO: 30)	共享序列

【0239】 表 2. PCR 試劑。

	描述	供應商	目錄編號
1	0.2 ml 薄壁 PCR 管: GeneAmp 高壓滅菌反應管及蓋子	Applied Biosystems	N801-0612
2	水 (PCR 試劑)	Sigma	W1754
3	Taq DNA 聚合酶及含有 15 mM MgCl ₂ 之 10 倍反應緩衝液	Sigma	D1806
4	脫氧核苷酸(dNTPs)組，每組 10 mM	Sigma	D7295
5	引子 ADV451、ADV452 及 ADV453	Invitrogen	
6	模板 DNA, 小量製備的 pGG55 質體		
7	熱循環儀 PTC200 (48 孔加熱塊)	MJ Research	

質體 DNA 的製備

【0240】 具有(pGG55 D133V)或不具有(pGG55 WT) *prfA* 突變的 pGG55 質體係使用 PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen, K2100-05) 根據製造商的說明藉由大腸桿菌或單核球增多性李斯特菌的小量製備進行萃取及純化。對於來自李斯特菌的質體純化，攜載 pGG55 D133V

或野生型質體的細菌菌株係由冷凍的儲備料劃線塗在含有氯黴素(25 µg/ml)的 BHI 瓊脂培養皿中。取自各菌株的單一菌落係在 5 ml 選擇性培養基中(具有 25 µg/ml 氯黴素的 BHI 培養液)以劇烈搖晃方式在 37°C 下生長 6 小時，以 1:500 比例下接種於 100 ml 選擇性培養基之中並在近似的條件下隔夜生長。取自隔夜培養物的細菌係藉由在 4,000 x g 下離心 10 分鐘而收集，並再懸浮於含有 2 mg/ml 溶菌酶(Sigma, L7001)的緩衝液 R3 (再懸浮緩衝液)之中。細菌懸浮物於進行常規的實驗方案之前係在 37°C 下培養至少 1 小時。溶出質體之濃度及純度係在分光光度計中以 260nm 及 280nm 量測。為製備模板 DNA，pGG55 D133V 及 WT 質體係由該小量製備儲備液再懸浮於水中，最終濃度為 1 ng/µl。對於 pGG55 WT 質體，係由該 1 ng/µl 溶液製備連續 10 倍稀釋液，其係對應 10^{-1} 至 10^{-7} 的稀釋度。

測試臨床等級材料之 *prfA* 特異性 PCR 實驗方案

【0241】 反應混合物係含有 1 倍 PCR 緩衝液、1.5 mM MgCl₂、0.8 mM dNTPs、各為 0.4 µM 的引子、0.05 U/µl 的 Taq DNA 聚合酶以及 0.04 ng/µl 的 pGG55 D133V 模板質體。每一試驗中，係需要 10 個小管且各管中的 25 µl 反應溶液之關鍵組分係顯示於表 3 之中。在 PCR 反應中，係以足夠用於 11 個反應的試劑製備主要混合液（如在表 4 中所示），且此 PCR 混合液中的 24µl 係加入至各小管內。隨後，總量為 1 µl 的連續稀釋 pGG55 WT 質體係加入至對應的小管中：管 3 中為 1 ng；管 4 中為 100 pg；管 5 中為 10 pg；管 6 中為 1 pg；管 7 中為 100 fg；管 8 中為 10 fg；管 9 中為 1 fg；管 10 中為 0.1 fg。此連續稀釋度係用以計算出標準曲線以判定該方法的靈敏度。此外，0.5 µl 的水及 0.5 µl 的引子 ADV451 (20 µM 儲備液)係加入管 1，且 1 µl 的水係加入管 2 中，而完成 25 µl 的最終體積。每小管中用於 25 µl 的反應的之各試劑數量係顯示於表 5 中。使用在該反應中的 PCR 循環條件係顯示於表 6 中。

【0242】 於 PCR 反應結束後，5 µl 的注膠緩衝液（6 倍，具有溴酚藍）係加入至各樣本中且其 10 µl 係通過在 TBE 緩衝液中的 1.2%瓊脂糖凝膠電

泳分析。凝膠尺寸為 7 公分 x 7 公分且具有 15 個樣本槽(1 毫米 x 2 毫米)梳齒。此凝膠係在 100V 下跑膠~30 分鐘，直至溴酚藍染劑達到凝膠的中間。此凝膠係以溴化乙菲錠(0.5 µg/ml)染色 20 分鐘，在水中去染 10 分鐘。此凝膠係照以 UV 光以顯影及攝像。其影像係使用吸光帶密度測定軟體分析(Quantity One version 4.5.1, BioRad)。

【0243】 表 3. 各別 PCR 反應組用以驗證偵測野生型 prfA 序列存在於 *Lm*-LLO-E7 樣本中之方法。

管	引子 A	引子 B	模板 DNA	功用	期望結果
1	ADV451	ADV453	1 ng 的 pGG55 (D133V)	用於 ADV451 反應的陽性對照組	陽性
2	ADV452	ADV453	1 ng 的 pGG55 (D133V)	用於 ADV452 反應的陰性對照組(特異性)	陰性
3	ADV452	ADV453	1 ng 的 pGG55 (野生型) + 1 ng pGG55 (D133V)	用於 ADV452 反應的陽性對照組	陽性
4	ADV452	ADV453	100 pg 的 pGG55 (野生型) + 1 ng pGG55 (D133V)	測試該反應的靈敏度	陽性
5	ADV452	ADV453	10 pg 的 pGG55 (野生型) + 1 ng pGG55 (D133V)	測試該反應的靈敏度	陽性
6	ADV452	ADV453	1 pg 的 pGG55 (野生型) + 1 ng pGG55 (D133V)	測試該反應的靈敏度	陽性
7	ADV452	ADV453	100 fg 的 pGG55 (野生型) + 1ng pGG55 (D133V)	測試該反應的靈敏度	陽性
8	ADV452	ADV453	10 fg 的 pGG55 (野生型) + pGG55 (D133V)	測試該反應的靈敏度	陽性

9	ADV452	ADV453	1 fg 的 pGG55 (野生型) + pGG55 (D133V)	測試該反應的靈敏度	弱陽性
10	ADV452	ADV453	0.1 fg 的 pGG55 (野生型) + pGG55 (D133V)	測試該反應的靈敏度	待判定

【0244】 表 4. 主要 PCR 混合液的製備。

試劑	份量 (μl)
水	206.25
Taq DNA 聚合酶 10 倍反應緩衝液(含 15 mM MgCl ₂)	27.5
脫氧核苷酸(dNTPs) 10 mM each	5.5
引子 ADV452 (20 μM in water)	5.5
引子 ADV453 (20 μM in water)	5.5
pGG55 D133V (<i>Lm</i> -LLO-E7) 質體 (1 ng/μl)	11
Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μl)	2.75
總共	264

【0245】 表 5. 使用引子 ADV451、452 及 453 以驗證偵測野生型 *prfA* 序列的存在之 PCR 實驗方案。

試劑	PCR
水	18.75 μl
PCR 10 倍緩衝液 + MgCl ₂ 15mM	2.5 μl
脫氧核苷酸混合物(dATP、dCTP、dGTP 及 dTTP) 各 10mM	0.5 μl
引子 ADV452 (20 μM)	0.5 μl
引子 ADV453 (20 μM)	0.5 μl
Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl)	0.25 μl
模板 DNA (1 ng/μl) pGG55 D133V	1 μl
模板 DNA pGG55 WT (管 3 至 10) ^a	1 μl
每管最終體積 ^b	25 μl

- ^a pGG55 WT (管 3 中為 1 ng；管 4 中為 100 pg；管 5 中為 10 pg；管 6 中為 1 pg；管 7 中為 100 fg；管 8 中為 10 fg；管 9 中為 1 fg；管 10 中為 0.1 fg)。
- ^b 在管 1 中加入 0.5 µl 的水及 0.5 µl 的引子 ADV451 (20 µM 儲備液)；在管 2 加入 1 µl 的水。

【0246】 表 6. 使用引子 ADV451、452 及 453 以偵測野生型 prfA 序列存在之 PCR 循環條件。

步 驟	溫度	時間	循環數
1.	94°C	2 分 30 秒	1
2.	94°C	30 秒	1
3.	53°C	30 秒	1
4.	72°C	30 秒	1
5.	重複步驟 2 至 4		12
6.	94°C	30 秒	1
7.	50°C	30 秒	1
8.	72°C	30 秒	1
9.	重複步驟 6 至 8		23
10.	72°C	10 分鐘	1

定序：

【0247】 該等質體的定序係使用雙脫氧定序法而完成。質體 pGG55 D133V 及 pGG55 WT 係以不同比例 (1:1、1:10、1:100、1:1,000 及 1:10,000) 混合。質體於混合物中的總量係維持恆定(500 µg)，且該含有野生型序列的質體係以相對於該 D133V 質體的 10 倍連續稀釋而判定該方法的靈敏度。

結果

實例 6：定序並非是靈敏的 D133V 突變復原偵測方法。

【0248】 為評估定序在偵測野生型 *prfA* 序列時的靈敏度，pGG55 D133V 及 WT 質體係以不同的比例混合並定序。其結果係顯示於圖 12 中，並顯示出定序在鑑別 *prfA* D133V 突變時有高度的特異性（圖 12）。另一方面，其靈敏度低且在序列中具有可偵測的波峰之野生型 *prfA* pGG55 質體最大稀釋度為 1/10（圖 12）。總而言之，儘管定序是非常有特異性的，但該方法的靈敏度低且不適合用來篩選稀有事件的存在，諸如在 *Lm*-LLO-E7 樣本中的 *prfA* D133V 突變之反突變體。

實例 7：偵測 D133V 突變復原之高特異性及靈敏性 PCR 方法之開發。

【0249】 鑒於定序對偵測稀有事件的低靈敏性，有必要開發具有相似特異性之更靈敏方法以偵測 D133V 突變復原成野生型。為達此目標，我們設計了一種基於 PCR 的方法，其特別擴增野生型序列且有足夠的靈敏度在 D133V 突變序列的 10,000,000 個複本中偵測至少一 *prfA* 的野生型複本。我們設計了 3 種引子用於此方法中：ADV451、ADV452 及 ADV453 (表 1)。ADV451 及 ADV452 二者為正向引子且其在 3' 位置的最後一個核苷酸不同，以鑑別在 *prfA* 基因的 398 位置處之 A→T (D133V) 突變。ADV453 引子為位於 ADV451 及 ADV452 引子黏合位置下游約 300 個鹼基處之反向引子（圖 13）。期望以引子 ADV451 或 ADV452 及 ADV453 獲得的 PCR 吸光帶為 326 個鹼基。在嚴格條件下，ADV451 引子應只擴增 pGG55 D133V 質體，而 ADV452 會對野生型 *prfA* 基因有特異性。

實例 8：PCR 方法的特異性。

【0250】 使用引子 ADV451 的反應係非常有特異性且擴增經突變的 D133V *prfA* 序列（泳道 1 至 3），而非該野生型序列（泳道 4 至 6）。然而，當使用 5 ng 的模板 DNA 時，在泳道 4 中可偵測到非常微弱的吸光帶，但以 1 ng 則無法偵測到（圖 14）。

【0251】 如在圖 15 中所示，使用 ADV452 引子的反應只擴增野生型 *prfA* 序列（泳道 4、5、6），且當使用攜載 D133V *prfA* 突變之 pGG55 做為模板時係無法偵測到吸光帶（泳道 1、2、3），甚至在反應中使用 5 ng 的質

體時（圖 16）。總而言之，該等使用引子 ADV451 及 ADV452 的 PCR 反應係非常有特異性且能夠鑑別出 pGG55 質體中在 *prfA* 基因 398 位置處的 A↔T (D133V) 突變。根據這些結果，我們選出 1 ng 的用量做為模板 DNA 在反應中所使用的標準用量。

實例 9：PCR 方法的靈敏度。

【0252】反應的靈敏度係使用 1ng 的模板 DNA 來測試。對於攜載野生型 *prfA* 序列的質體，用量漸少的 DNA（對應 10^{-1} 至 10^{-7} 的 10 倍稀釋度）係包含在反應中以評估靈敏度。於這些反應中僅有引子 ADV452 及 ADV453 被使用。於有 30 個循環的 PCR 反應中（10 個循環使用黏合溫度 53°C ，另外的 20 個循環使用黏合溫度 50°C ），該方法的靈敏度為 1/100,000（資料未顯示）。如圖 5 中所示，對於 D133V 反突變體的偵測將 PCR 的循環數增至 37 個循環會改善該方法的視覺靈敏度至 10^{-6} ，且沒有顯著損害其特異性。當使用 1 ng 的質體做為 DNA 初始用量時，於 10^{-6} 稀釋物中可見到一明顯的吸光帶，其對應了在一百萬個 D133V 突變體中一個野生型序列複本的偵測程度。於長時間曝光後只有在泳道 1 及 9 中見到非常微弱的吸光帶，再度確保該方法穩健的特異性。另一方面，當在一開始使用 5 ng 的 DNA 時，可在 10^{-7} 稀釋物中輕易偵測到吸光帶而增加 PCR 的靈敏度。然而，相似強度的吸光帶亦可使用 pGG55 D133V 質體而偵測到，顯示出該方法的特異性極限（圖 17）。使用 pGG55 D133V 質體所觀察到的吸光帶可能是因使用引子 ADV452 的 D133V 突變的非特異性擴增而產生，其可隨著循環數的增加而顯著累積。這些結果指出此方法在沒有顯著損害特異性下的靈敏度極限係位於 1:1,000,000 至 1:10,000,000 之間。

實例 10：表現具有 LLO 於 E7 上(LM-LLO-E7)之融合蛋白的重組李斯特菌

【0253】此菌株係比野生型親代菌株 10403S 減毒約 4 至 5 logs，並分泌融合蛋白 tLLO-E7。此免疫療法係基於通過毒力基因轉錄活化子 *prfA* 的不可逆缺失而由 10403S 衍生之 XFL7 架構。PrfA 係調節數個毒力基因的轉錄，諸如李斯特菌溶解素 O (LLO)、ActA、PlcA（磷脂酶 A）、PlcB（磷脂

酶 B) 等，該等基因係單核球增多性李斯特菌之體內胞內生長及存活所需。在體外質體 pGG55 係由 Lm-LLO-E7 通過以氯黴素選擇的手段而保留。然而在體內由 Lm-LLO-E7 所保留的質體係攜載經突變的 *prfA* (D133V) 的複本，其在 DNA 的結合與該等毒力基因的轉錄活化上已表現出比野生型 PrfA 的活性較低。我們已觀察到當與野生型菌株 10403S 相比時，使用經突變的 *prfA* 補充會導致由 Lm-LLO-E7 所分泌的 LLO 量降低約 40 倍。這意味著菌株 Lm-LLO-E7 可能表現出由 PrfA 所調節的毒力基因(諸如 *actA*、*inlA*、*inlB*、*inlC*、*plcB* 等) 的表現降低。於 Lm-LLO-E7 中，使用經突變的 *prfA* 複本補充可能造成由 PrfA 所調節的不同毒力基因的表現降低，導致了約 4 至 5 logs 的全面衰減。

【0254】 儘管本發明的某些特徵已經在本文中圖示並描述，本領域技術人員可想到許多修改、替換、改變或等效物。因此，應理解所附申請專利範圍係意欲涵蓋落入本發明真實精神內的所有此類修改及改變。

【符號說明】

無

序列表

<110> 美商艾德凡斯有限公司

<120> 重組李斯特菌疫苗菌株及產製該菌株之方法

<130> P-77775-USP

<140> 104112751

<141> 2015-04-21

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 1

Lys Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala
1 5 10 15

Ser Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys
20 25 30

<210> 2

<211> 441

<212> PRT

<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 2

Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
1 5 10 15

Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
20 25 30

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Val Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
35 40 45

Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr
50 55 60

Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly
65 70 75 80

Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn

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

Ala	Ala	Val	Ser	Gly 325	Lys	Ser	Val	Ser	Gly 330	Asp	Val	Glu	Leu	Thr	Asn 335
Ile	Ile	Lys	Asn 340	Ser	Ser	Phe	Lys	Ala 345	Val	Ile	Tyr	Gly	Gly 350	Ser	Ala
Lys	Asp	Glu 355	Val	Gln	Ile	Ile	Asp 360	Gly	Asn	Leu	Gly	Asp 365	Leu	Arg	Asp
Ile	Leu 370	Lys	Lys	Gly	Ala	Thr 375	Phe	Asn	Arg	Glu	Thr 380	Pro	Gly	Val	Pro
Ile 385	Ala	Tyr	Thr	Thr	Asn 390	Phe	Leu	Lys	Asp	Asn 395	Glu	Leu	Ala	Val	Ile 400
Lys	Asn	Asn	Ser	Glu 405	Tyr	Ile	Glu	Thr	Thr 410	Ser	Lys	Ala	Tyr	Thr 415	Asp
Gly	Lys	Ile	Asn 420	Ile	Asp	His	Ser	Gly 425	Gly	Tyr	Val	Ala	Gln 430	Phe	Asn
Ile	Ser	Trp 435	Asp	Glu	Val	Asn	Tyr 440	Asp							
<210>	3														
<211>	529														
<212>	PRT														
<213>	單核球增多性李斯特菌														
<400>	3														
Met 1	Lys	Lys	Ile	Met 5	Leu	Val	Phe	Ile	Thr 10	Leu	Ile	Leu	Val	Ser 15	Leu
Pro	Ile	Ala	Gln 20	Gln	Thr	Glu	Ala	Lys 25	Asp	Ala	Ser	Ala	Phe 30	Asn	Lys
Glu	Asn	Ser 35	Ile	Ser	Ser	Met	Ala 40	Pro	Pro	Ala	Ser	Pro 45	Pro	Ala	Ser
Pro 50	Lys	Thr	Pro	Ile	Glu	Lys 55	Lys	His	Ala	Asp	Glu 60	Ile	Asp	Lys	Tyr
Ile 65	Gln	Gly	Leu	Asp	Tyr 70	Asn	Lys	Asn	Asn	Val 75	Leu	Val	Tyr	His	Gly 80

Asp	Ala	Val	Thr	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asn	
				85					90					95		
Glu	Tyr	Ile	Val	Val	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Ile	Asn	Gln	Asn	Asn	
			100					105					110			
Ala	Asp	Ile	Gln	Val	Val	Asn	Ala	Ile	Ser	Ser	Leu	Thr	Tyr	Pro	Gly	
		115					120					125				
Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Ser	Glu	Leu	Val	Glu	Asn	Gln	Pro	Asp	Val	
	130					135					140					
Leu	Pro	Val	Lys	Arg	Asp	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Ile	Asp	Leu	Pro	Gly	
145					150					155					160	
Met	Thr	Asn	Gln	Asp	Asn	Lys	Ile	Val	Val	Lys	Asn	Ala	Thr	Lys	Ser	
				165					170					175		
Asn	Val	Asn	Asn	Ala	Val	Asn	Thr	Leu	Val	Glu	Arg	Trp	Asn	Glu	Lys	
			180					185					190			
Tyr	Ala	Gln	Ala	Tyr	Pro	Asn	Val	Ser	Ala	Lys	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	
		195					200					205				
Glu	Met	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ser	Gln	Leu	Ile	Ala	Lys	Phe	Gly	Thr	Ala	
	210					215					220					
Phe	Lys	Ala	Val	Asn	Asn	Ser	Leu	Asn	Val	Asn	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	
225					230					235					240	
Glu	Gly	Lys	Met	Gln	Glu	Glu	Val	Ile	Ser	Phe	Lys	Gln	Ile	Tyr	Tyr	
				245					250					255		
Asn	Val	Asn	Val	Asn	Glu	Pro	Thr	Arg	Pro	Ser	Arg	Phe	Phe	Gly	Lys	
			260					265					270			
Ala	Val	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly	Val	Asn	Ala	Glu	Asn	
		275					280					285				
Pro	Pro	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Gln	Val	Tyr	Leu	
	290					295					300					

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

<210> 4
<211> 416
<212> PRT
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 4

Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
1 5 10 15

Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
20 25 30

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Val Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
35 40 45

Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr
50 55 60

Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly
65 70 75 80

Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn
85 90 95

Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn
100 105 110

Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly
115 120 125

Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val
130 135 140

Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly
145 150 155 160

Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser
165 170 175

Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys
180 185 190

Tyr Ala Gln Ala Tyr Ser Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp

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

<210> 5
<211> 390
<212> PRT

<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 5

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

Asp Glu Asn Pro Glu Val Lys Lys Ala Ile Val Asp Lys Ser Ala Gly
225 230 235 240

Leu Ile Asp Gln Leu Leu Thr Lys Lys Lys Ser Glu Glu Val Asn Ala
245 250 255

Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp Glu Glu Leu Arg Leu Ala Leu
260 265 270

Pro Glu Thr Pro Met Leu Leu Gly Phe Asn Ala Pro Ala Thr Ser Glu
275 280 285

Pro Ser Ser Phe Glu Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp Glu Glu Leu Arg
290 295 300

Leu Ala Leu Pro Glu Thr Pro Met Leu Leu Gly Phe Asn Ala Pro Ala
305 310 315 320

Thr Ser Glu Pro Ser Ser Phe Glu Phe Pro Pro Pro Pro Thr Glu Asp
325 330 335

Glu Leu Glu Ile Ile Arg Glu Thr Ala Ser Ser Leu Asp Ser Ser Phe
340 345 350

Thr Arg Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Asn Ala Ile Asn Arg His Ser
355 360 365

Gln Asn Phe Ser Asp Phe Pro Pro Ile Pro Thr Glu Glu Glu Leu Asn
370 375 380

Gly Arg Gly Gly Arg Pro
385 390

<210> 6
<211> 1170
<212> DNA
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 6
atgcgtgcga tgatggtggt tttcattact gccaatigca ttacgattaa ccccgacata 60
atatttgcag cgacagatag cgaagattct agtctaaaca cagatgaatg ggaagaagaa 120
aaaacagaag agcaaccaag cgaggtaa at acgggaccaa gatacgaaac tgcacgtgaa 180

gtaagtacac gtgatattaa agaactagaa aaatcgaata aagtgagaaa tacgaacaaa 240
gcagacctaa tagcaatgtt gaaagaaaaa gcagaaaaag gtccaaatat caataataac 300
aacagtgaac aaactgagaa tgcggctata aatgaagagg cttcaggagc cgaccgacca 360
gctatacaag tggagcgtcg tcatccagga ttgccatcgg atagcgcagc ggaaattaaa 420
aaaagaagga aagccatagc atcatcggat agtgagcttg aaagccttac ttatccggat 480
aaaccaacaa aagtaaataa gaaaaaagtg gcgaaagagt cagttgcgga tgcttctgaa 540
agtgacttag attctagcat gcagtcagca gatgagtcct caccacaacc tttaaaagca 600
aaccaacaac catTTTTCCC taaagtatTT aaaaaaataa aagatgcggg gaaatgggta 660
cgtgataaaa tcgacgaaaa tcctgaagta aagaaagcga ttgttgataa aagtgcaggg 720
ttaattgacc aattattaac caaaaagaaa agtgaagagg taaatgcttc ggacttcccg 780
ccaccaccta cggatgaaga gttaagactt gctttgccag agacaccaat gcttcttggt 840
tttaatgctc ctgctacatc agaaccgagc tcattcgaat ttccaccacc acctacggat 900
gaagagttaa gacttgcttt gccagagacg ccaatgcttc ttggttttta tgctcctgct 960
acatcggaac cgagctcggt cgaatttcca ccgcctccaa cagaagatga actagaaatc 1020
atccgggaaa cagcatcctc gctagattct agttttacaa gaggggattt agctagtttg 1080
agaaatgcta ttaatcgcca tagtcaaaat ttctctgatt tcccaccaat cccaacagaa 1140
gaagagttga acgggagagg cggtagacca 1170

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 7

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

<210> 8
<211> 28
<212> PRT
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 8

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

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

20

25

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 9

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

Glu Glu Leu Arg
20

<210> 10
<211> 33
<212> PRT
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 10

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

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

Arg

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 鏈球菌屬G148

<400> 11

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

Lys

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 類馬鏈球菌

<400> 12

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

Lys

<210> 13
<211> 98
<212> PRT
<213> 人類乳突狀瘤病毒類型16

<400> 13

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro

<210> 14
<211> 105
<212> PRT
<213> 人類乳突狀瘤病毒類型16

<400> 14

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser
20 25 30

Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His
35 40 45

Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met
50 55 60

Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala
65 70 75 80

Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe
85 90 95

Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
100 105

<210> 15
<211> 158
<212> PRT
<213> 人類乳突狀瘤病毒類型16

<400> 15

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
1 5 10 15

Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
20 25 30

Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
35 40 45

Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
50 55 60

Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
65 70 75 80

Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
85 90 95

Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
100 105 110

Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
115 120 125

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
130 135 140

Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145 150 155

<210> 16
<211> 158
<212> PRT
<213> 人類乳突狀瘤病毒類型16

<400> 16

Met Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys
20 25 30

Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala
35 40 45

Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala Ala
50 55 60

Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg His
65 70 75 80

Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr
85 90 95

Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu
100 105 110

Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His
115 120 125

Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg
130 135 140

Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val
145 150 155

<210> 17

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	17	
ggctcgagca	tggagataca	cc22
<210>	18	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	18	
ggggactagt	ttatggtttc	tgagaaca28
<210>	19	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	19	
gggggctagc	cctcctttga	ttagtatatt c31
<210>	20	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	20	
ctccctcgag	atcataattt	acttcac28
<210>	21	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	21	
cccgtcgacc	agctcttctt	ggtgaag27

<210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 22
gcggatccca tggagataca cctac 25

<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 23
gctctagatt atggtttctg ag 22

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人類乳突狀瘤病毒類型16

<400> 24

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 25

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 26

Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile
1 5

<210>	27	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	27	
	gactacaagg acgatgaccg acaagtgata acccgggatc taaataaatc cgttt	55
<210>	28	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用於擴增prfA基因及鑑別D133V突變之ADV451正向引子	
<400>	28	
	cctagctaaa tttaatgt	18
<210>	29	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用於擴增prfA基因之ADV452正向引子	
<400>	29	
	cctagctaaa tttaatga	18
<210>	30	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用於擴增prfA基因之ADV453正向引子	
<400>	30	
	taattttccc caagtagcag g	21
<210>	31	
<211>	714	
<212>	DNA	
<213>	單核球增多性李斯特菌	
<400>	31	
	atgaacgctc aagcagaaga attcaaaaaa tatttagaaa ctaacgggat aaaaccaaaa	60
	caatttcata aaaaagaact tattttttaac caatgggatc cacaagaata ttgtattttt	120

ctatatgatg gtatcacaaa gctcacgagt attagcgaga acgggaccat catgaattta 180
caatactaca aaggggcttt cgttataatg tctggcttta ttgatacaga aacatcggtt 240
ggctattata atttagaagt cattagcgag caggctaccg catacgttat caaaataaac 300
gaactaaaag aactactgag caaaaatcct acgcactttt tctatgtttt ccaaacccta 360
caaaaacaag tttcatacag cctagctaaa tttaatgatt tttcgattaa cgggaagctt 420
ggctctattt gcggtcaact tttaatcctg acctatgtgt atggtaaaga aactcctgat 480
ggcatcaaga ttacactgga taatttaaca atgcaggagt taggatattc aagtggcatc 540
gcacatagct cagctgttag cagaattatt tccaaattaa agcaagagaa agttatcgtg 600
tataaaaatt catgctttta tgtacaaaat cttgattatc tcaaaagata tgcccctaaa 660
ttagatgaat ggttttattt agcatgtcct gctacttggg gaaaattaaa ttaa 714

<210> 32
<211> 237
<212> PRT
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 32

Met Asn Ala Gln Ala Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Leu Glu Thr Asn Gly
1 5 10 15

Ile Lys Pro Lys Gln Phe His Lys Lys Glu Leu Ile Phe Asn Gln Trp
20 25 30

Asp Pro Gln Glu Tyr Cys Ile Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Thr Lys Leu
35 40 45

Thr Ser Ile Ser Glu Asn Gly Thr Ile Met Asn Leu Gln Tyr Tyr Lys
50 55 60

Gly Ala Phe Val Ile Met Ser Gly Phe Ile Asp Thr Glu Thr Ser Val
65 70 75 80

Gly Tyr Tyr Asn Leu Glu Val Ile Ser Glu Gln Ala Thr Ala Tyr Val
85 90 95

Ile Lys Ile Asn Glu Leu Lys Glu Leu Leu Ser Lys Asn Leu Thr His
100 105 110

Phe Phe Tyr Val Phe Gln Thr Leu Gln Lys Gln Val Ser Tyr Ser Leu
115 120 125

Ala Lys Phe Asn Asp Phe Ser Ile Asn Gly Lys Leu Gly Ser Ile Cys
130 135 140

Gly Gln Leu Leu Ile Leu Thr Tyr Val Tyr Gly Lys Glu Thr Pro Asp
145 150 155 160

Gly Ile Lys Ile Thr Leu Asp Asn Leu Thr Met Gln Glu Leu Gly Tyr
165 170 175

Ser Ser Gly Ile Ala His Ser Ser Ala Val Ser Arg Ile Ile Ser Lys
180 185 190

Leu Lys Gln Glu Lys Val Ile Val Tyr Lys Asn Ser Cys Phe Tyr Val
195 200 205

Gln Asn Leu Asp Tyr Leu Lys Arg Tyr Ala Pro Lys Leu Asp Glu Trp
210 215 220

Phe Tyr Leu Ala Cys Pro Ala Thr Trp Gly Lys Leu Asn
225 230 235

<210> 33
<211> 714
<212> DNA
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 33
atgaacgctc aagcagaaga attcaaaaaa tatttagaaa ctaacgggat aaaaccaaaa 60
caatttcata aaaaagaact tatttttaac caatgggata cacaagaata ttgtatTTTT 120
ctatatgatg gtatcacaaa gctcacgagt attagcgaga acgggaccat catgaattta 180
caatactaca aaggggcttt cgttataatg tctggcttta ttgatacaga aacatcggtt 240
ggctattata atttagaagt cattagcgag caggctaccg catacgttat caaaataaac 300
gaactaaaag aactactgag caaaaatctt acgcactttt tctatgtttt ccaaacccta 360
caaaaacaag ttctatacag cctagctaaa tttaatgttt ttctgattaa cgggaagctt 420
ggctctatTT gcggtcaact tttaatcctg acctatgtgt atggtaaaga aactcctgat 480
ggcatcaaga ttacactgga taatttaaca atgcaggagt taggatattc aagtggcatc 540
gcacatagct cagctgttag cagaattatt tccaaattaa agcaagagaa agttatcgtg 600
tataaaaatt catgctttta tgtacaaaat cgtgattatc tcaaaagata tgcccctaaa 660

ttagatgaat ggttttatitt agcatgtcct gctacttggg gaaaattaaa ttaa714

<210> 34
<211> 237
<212> PRT
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 34

Met Asn Ala Gln Ala Glu Glu Phe Lys Lys Tyr Leu Glu Thr Asn Gly
15

Ile Lys Pro Lys Gln Phe His Lys Lys Glu Leu Ile Phe Asn Gln Trp
202530

Asp Pro Gln Glu Tyr Cys Ile Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Thr Lys Leu
354045

Thr Ser Ile Ser Glu Asn Gly Thr Ile Met Asn Leu Gln Tyr Tyr Lys
505560

Gly Ala Phe Val Ile Met Ser Gly Phe Ile Asp Thr Glu Thr Ser Val
65707580

Gly Tyr Tyr Asn Leu Glu Val Ile Ser Glu Gln Ala Thr Ala Tyr Val
859095

Ile Lys Ile Asn Glu Leu Lys Glu Leu Leu Ser Lys Asn Leu Thr His
100105110

Phe Phe Tyr Val Phe Gln Thr Leu Gln Lys Gln Val Ser Tyr Ser Leu
115120125

Ala Lys Phe Asn Val Phe Ser Ile Asn Gly Lys Leu Gly Ser Ile Cys
130135140

Gly Gln Leu Leu Ile Leu Thr Tyr Val Tyr Gly Lys Glu Thr Pro Asp
145150155160

Gly Ile Lys Ile Thr Leu Asp Asn Leu Thr Met Gln Glu Leu Gly Tyr
165170175

Ser Ser Gly Ile Ala His Ser Ser Ala Val Ser Arg Ile Ile Ser Lys
180185190

Leu Lys Gln Glu Lys Val Ile Val Tyr Lys Asn Ser Cys Phe Tyr Val
195 200 205

Gln Asn Arg Asp Tyr Leu Lys Arg Tyr Ala Pro Lys Leu Asp Glu Trp
210 215 220

Phe Tyr Leu Ala Cys Pro Ala Thr Trp Gly Lys Leu Asn
225 230 235

<210> 35
<211> 364
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Lovaxin_C_pGG55

<400> 35
ccaaacccta caaaaacaag ttccatacag cctagctaaa tttaatgttt tttcgattaa 60
cgggaagctt ggctctatitt gcggtcaact tttaatcctg acctatgtgt atggtaaaga 120
aactcctgat ggcatcaaga ttacactgga taatttaaca atgcaggagt taggatattc 180
aagtggcatc gcacatagct cagctgttag cagaattatt tccaaattaa agcaagagaa 240
agttatcgtg tataaaaatt catgctttta tgtacaaaat cgtgattatc tcaaagata 300
tgcccctaaa ttagatgaat ggttttatitt agcatgtcct gctacttggg gaaaattaaa 360
ttaa 364

<210> 36
<211> 364
<212> DNA
<213> 單核球增多性李斯特菌

<400> 36
ccaaacccta caaaaacaag ttccatacag cctagctaaa tttaatgatt tttcgattaa 60
cgggaagctt ggctctatitt gcggtcaact tttaatcctg acctatgtgt atggtaaaga 120
aactcctgat ggcatcaaga ttacactgga taatttaaca atgcaggagt taggatattc 180
aagtggcatc gcacatagct cagctgttag cagaattatt tccaaattaa agcaagagaa 240
agttatcgtg tataaaaatt catgctttta tgtacaaaat cttgattatc tcaaagata 300
tgcccctaaa ttagatgaat ggttttatitt agcatgtcct gctacttggg gaaaattaaa 360
ttaa 364

申請專利範圍

1. 一種重組李斯特菌菌株，該重組李斯特菌菌株包括游離(episomal)質體，該質體包含重組核酸，該核酸包括編碼重組多肽之第一開放讀碼框架，該重組多肽包括融合至異源抗原或其片段之 LLO 蛋白質的 N 端片段，且其中該重組核酸更包括編碼突變型 PrfA 蛋白質之第二開放讀碼框架，該突變型 PrfA 蛋白質包含 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列。
2. 如請求項 1 之重組李斯特菌菌株，其中該李斯特菌在該 *prfA* 基因中包括缺失、不活化或突變。
3. 如請求項 1 之重組李斯特菌菌株，其中該突變型 PrfA 蛋白質係由 SEQ ID NO: 33 所編碼。
4. 如請求項 2 之重組李斯特菌菌株，其中由該第二開放讀碼框架所編碼之突變型 PrfA 蛋白質補足(complement)於該李斯特菌菌株中的 *prfA* 基因體突變、缺失或不活化，或修補於該李斯特菌菌株中的部分 PrfA 功能。
5. 如請求項 1 之重組李斯特菌菌株，其中該異源抗原係為人類乳突狀瘤病毒-E7 (HPV-E7)或 HPV-E6。
6. 如請求項 5 之重組李斯特菌菌株，其中該 HPV-E7 係來自 HPV16。
7. 如請求項 1 之重組李斯特菌菌株，其中該 LLO 蛋白質之 N 端片段係選自包括 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 之序列，或其中該 LLO 蛋白質之 N 端片段為 SEQ ID NO: 3 之片段。
8. 如請求項 1 之重組李斯特菌菌株，其中該重組李斯特菌菌株係重組單核球增多性李斯特菌菌株。
9. 一種醫藥組合物，其包括如請求項 1 至 8 中任一項之重組李斯特菌菌株。
10. 一種如請求項 1 至 8 中任一項之重組李斯特菌菌株的用途，其係用於製備在人類個體中針對腫瘤或癌症誘導免疫反應的藥物。
11. 如請求項 10 之用途，其中該李斯特菌係通過靜脈注射或口服給藥而投與該個體。

12. 如請求項 11 之用途，其中該藥物中的重組李斯特菌菌株係以 1×10^7 至 3.31×10^{10} 個有機體之劑量投與該人類個體。
13. 如請求項 12 之用途，其中該重組李斯特菌菌株於投與前係儲存於冷凍或冷凍乾燥狀態中。
14. 如請求項 10 之用途，其更包括以該包括重組李斯特菌菌株之藥物增強 (boosting) 該人類個體之步驟。
15. 如請求項 10 之用途，其進一步包括以包括或引導該 E7 抗原表現之免疫原性組合物接種該人類個體之步驟，或進一步包含投與其他治療劑至該個體之步驟。
16. 如請求項 10 之用途，其中該免疫反應係細胞毒性 T 細胞抗腫瘤免疫反應。
17. 如請求項 10 之用途，其中該用途係致使保護個體對抗腫瘤或癌症。
18. 如請求項 10 之用途，其中該用途係致使針對腫瘤或癌症治療個體。
19. 如請求項 17 或 18 之用途，其中該癌症係子宮頸癌、頭頸癌(HNC)或肛門癌。

圖 式

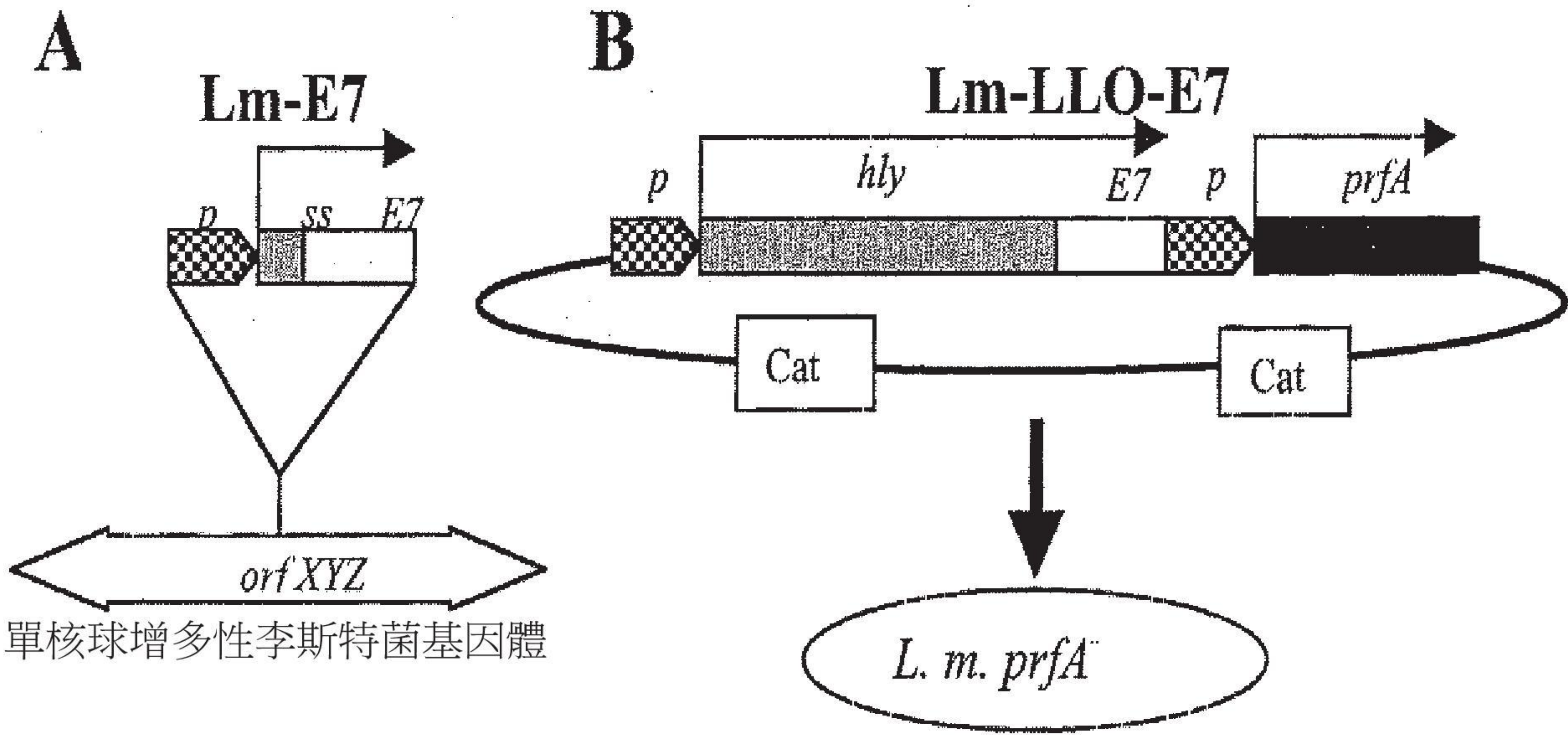


圖 1

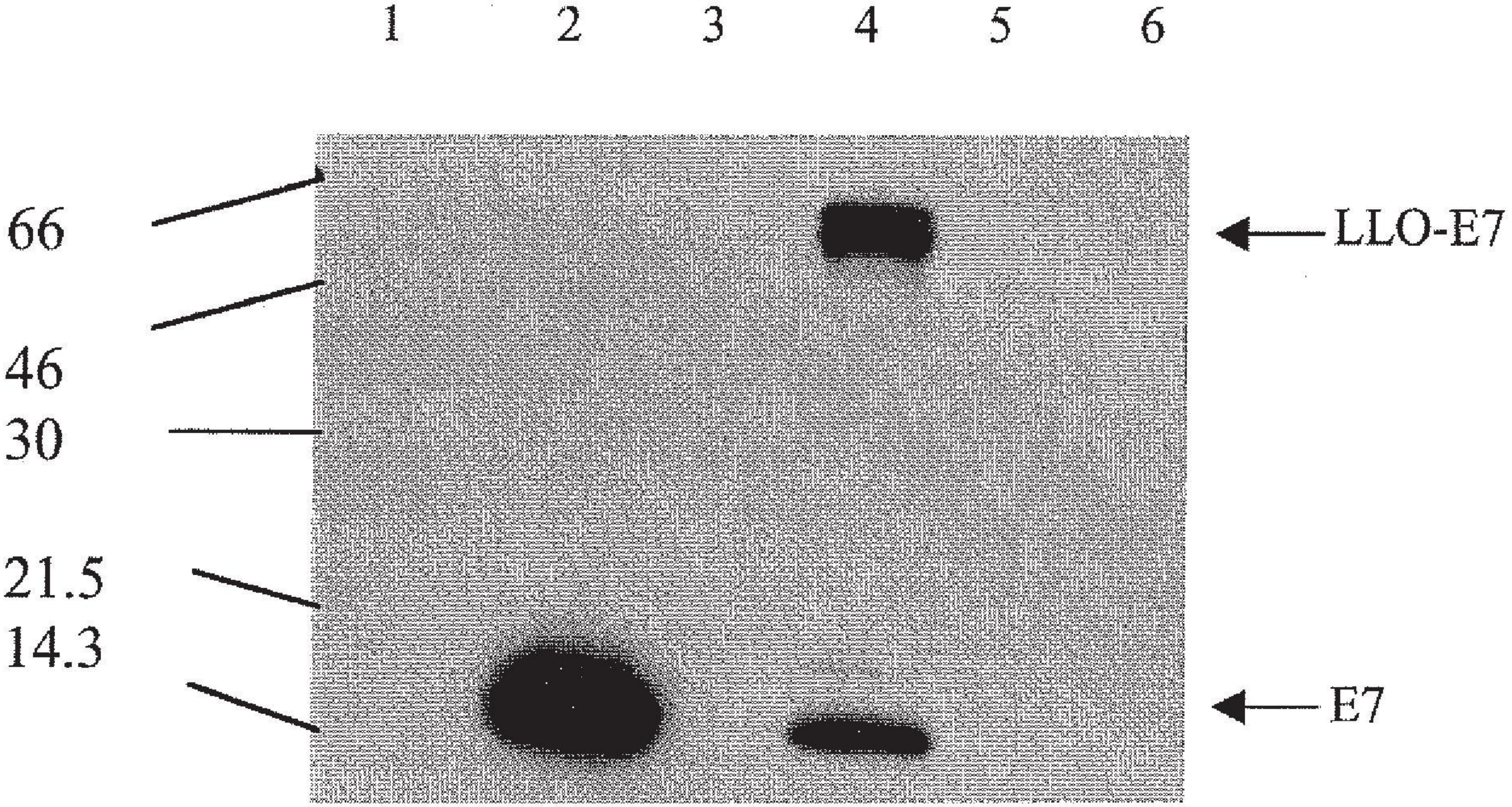


圖 2

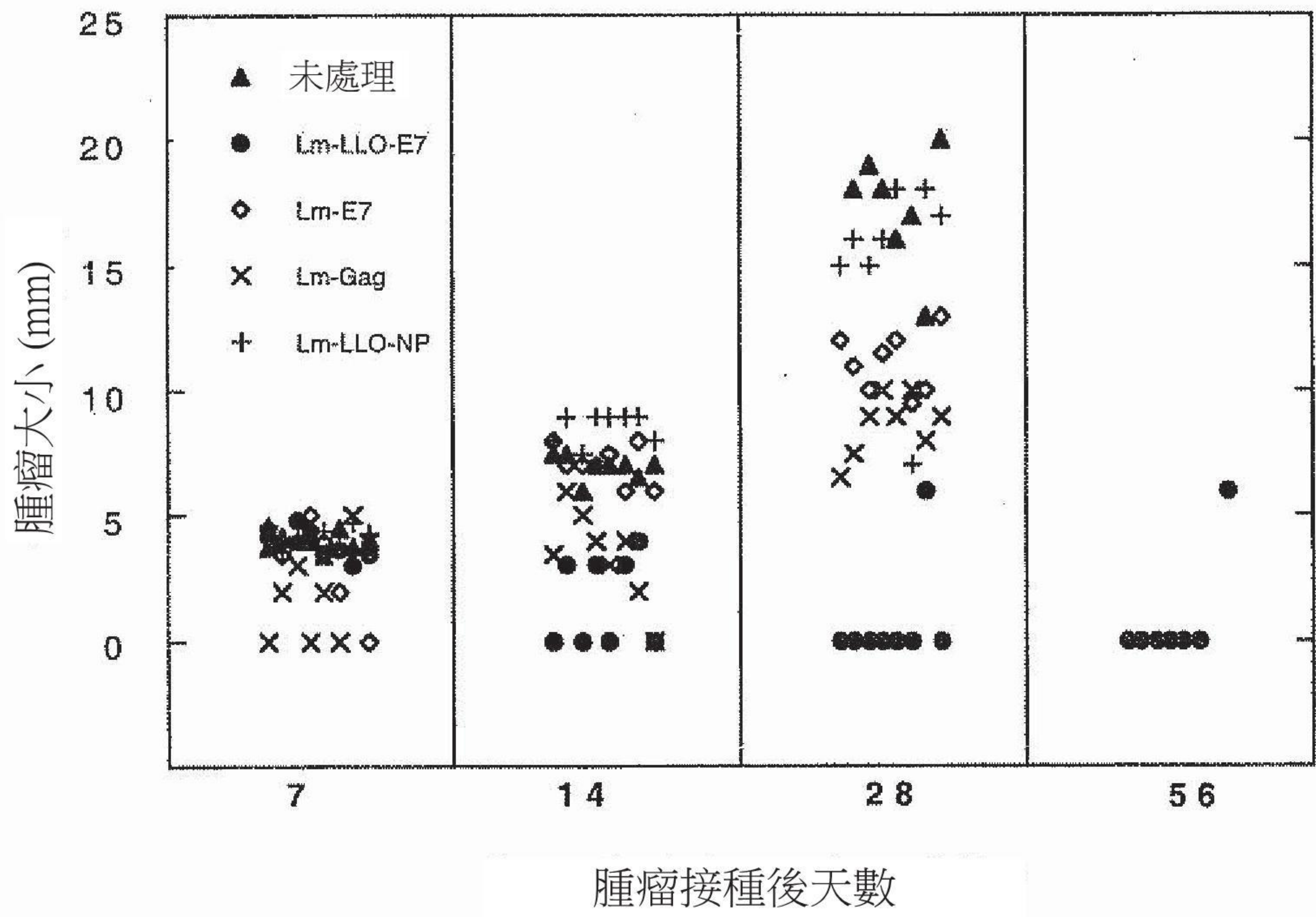


圖 3

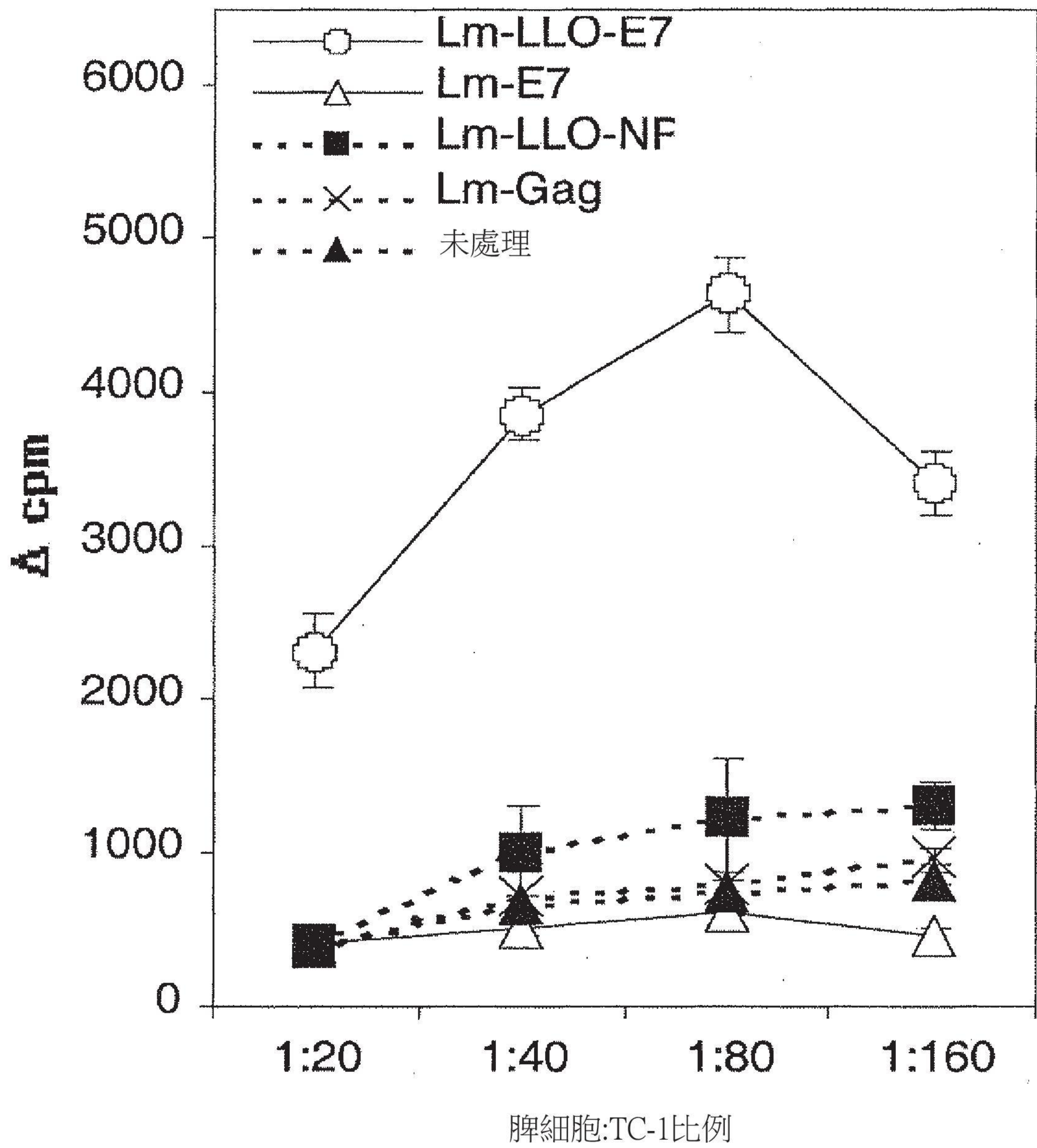


圖 4

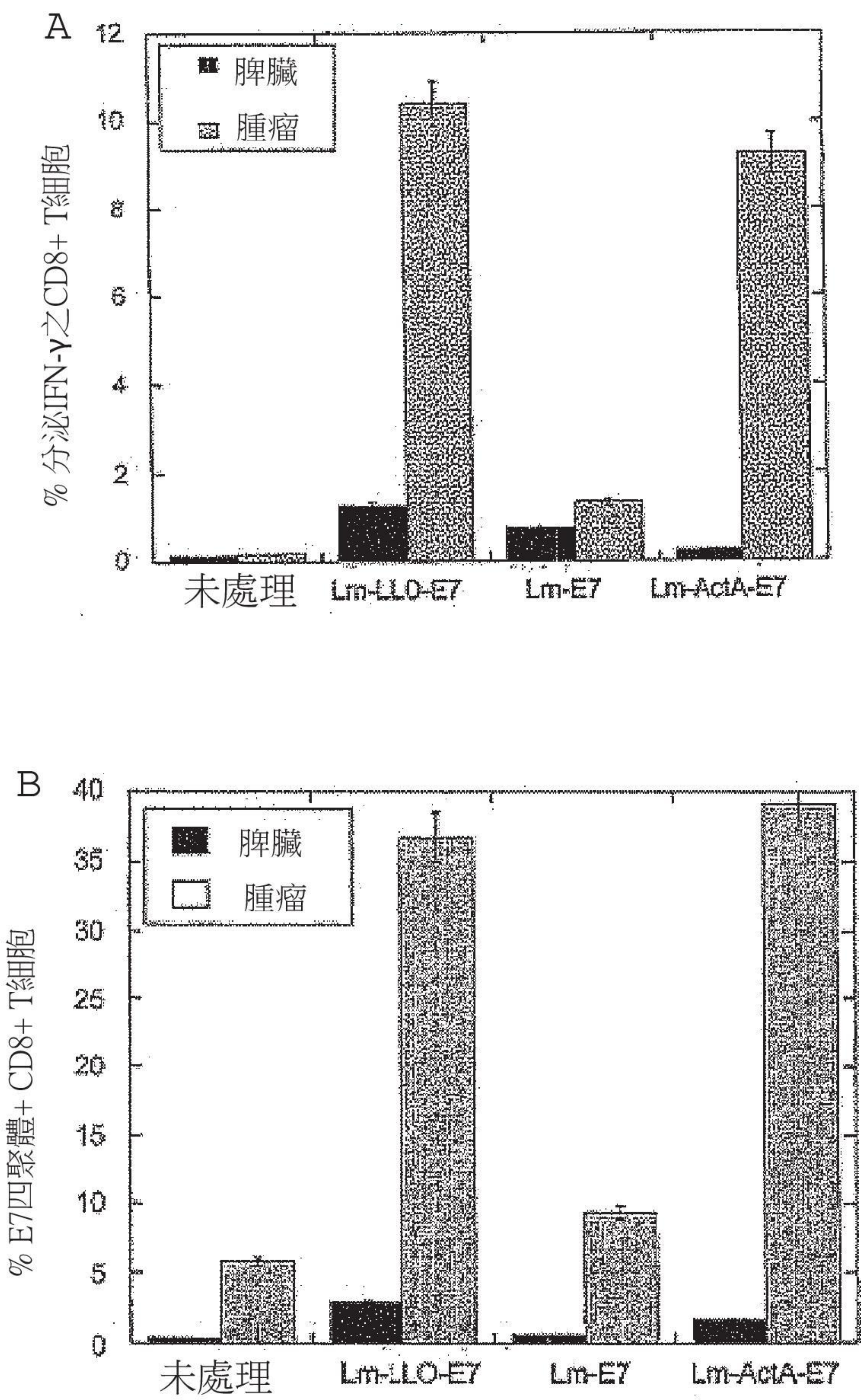


圖 5

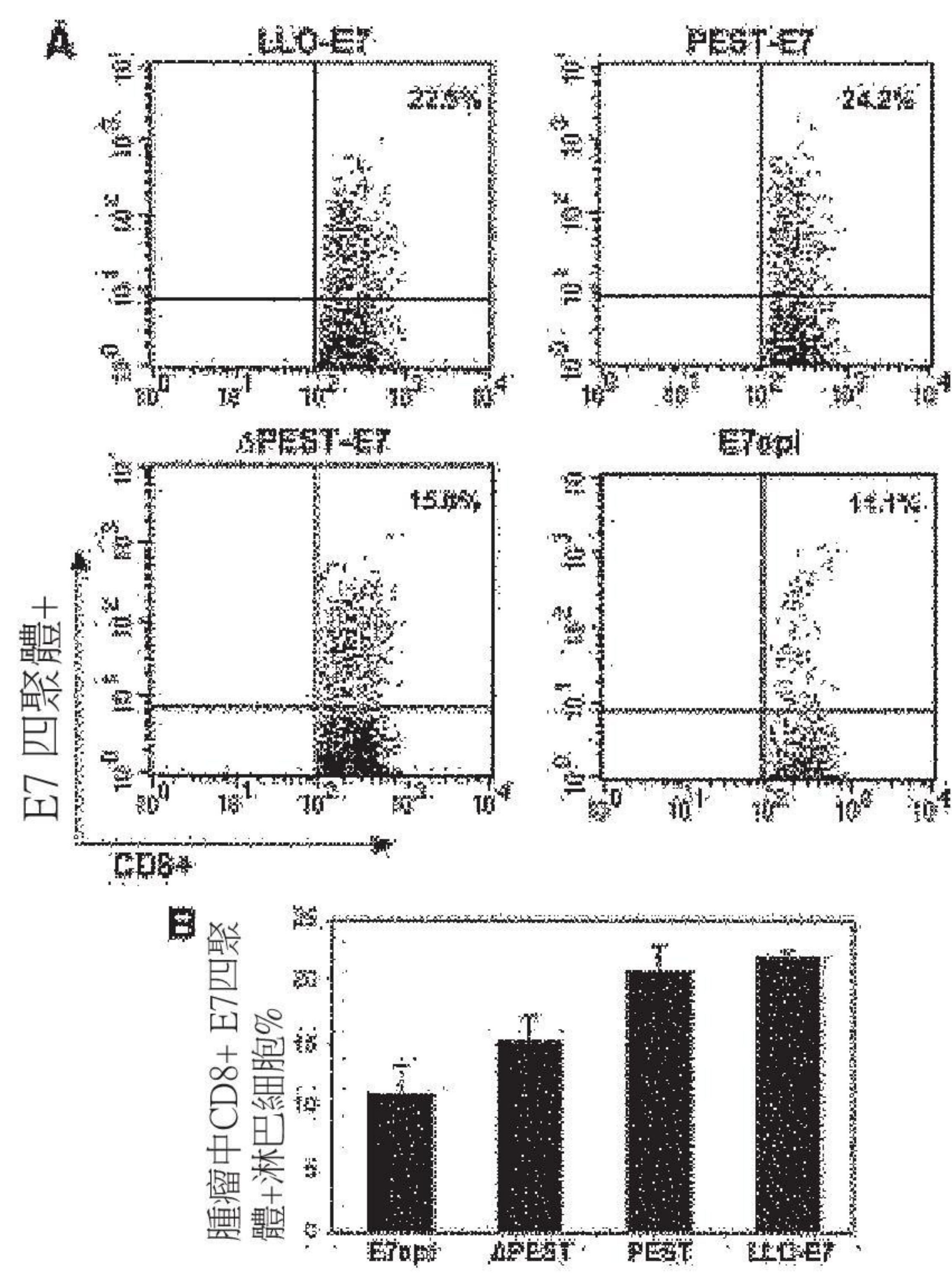


圖 6

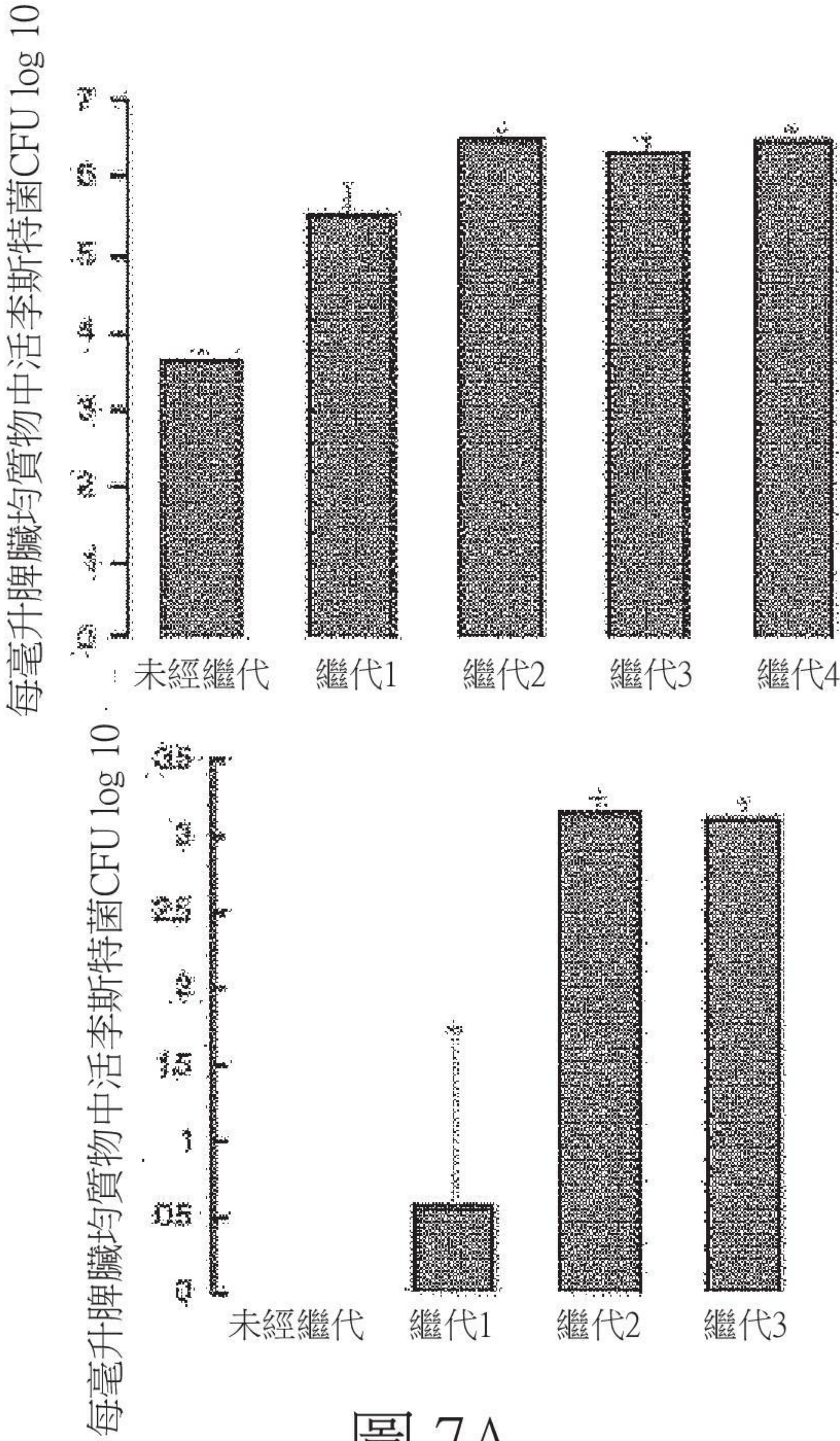


圖 7A

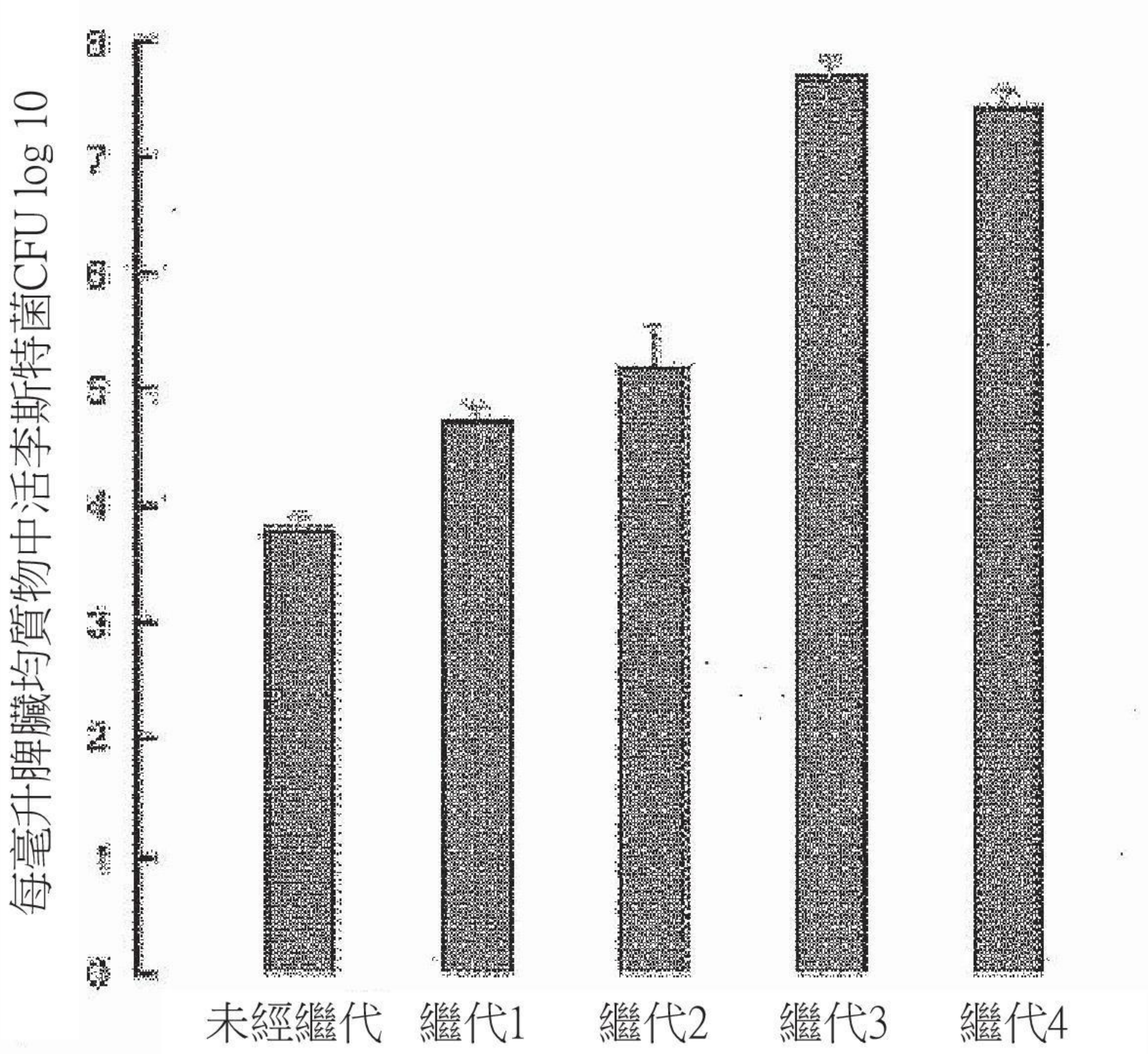


圖 7B

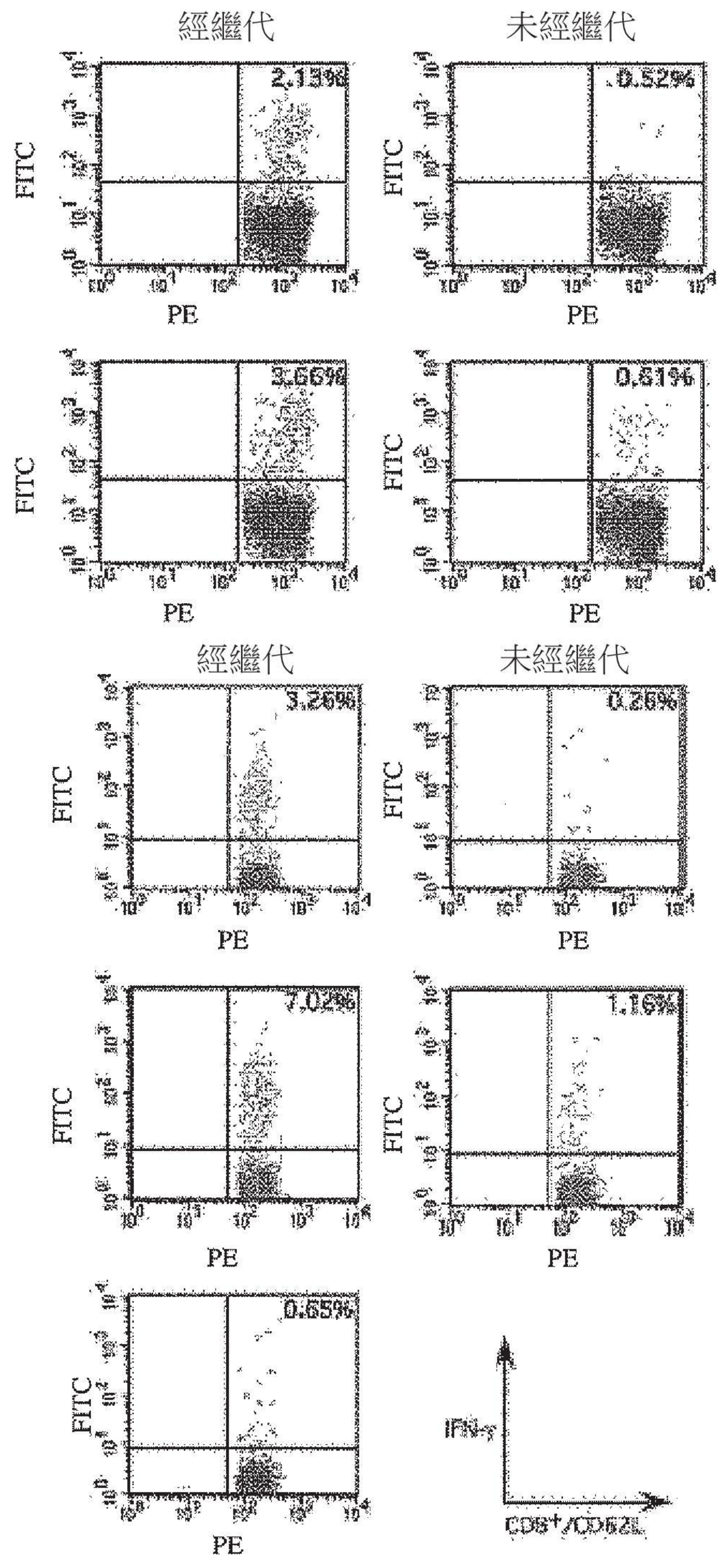


圖 8

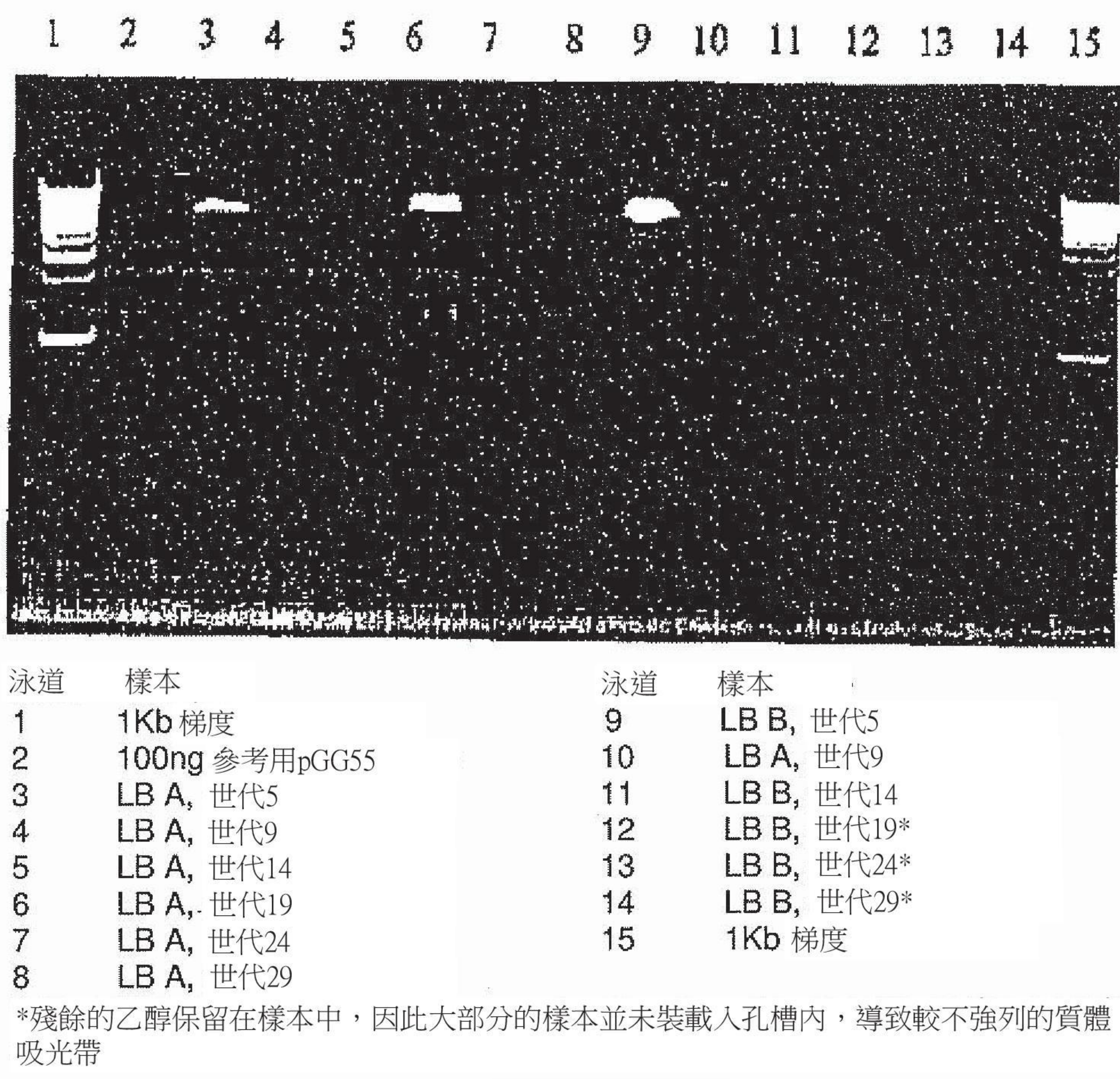


圖 9A

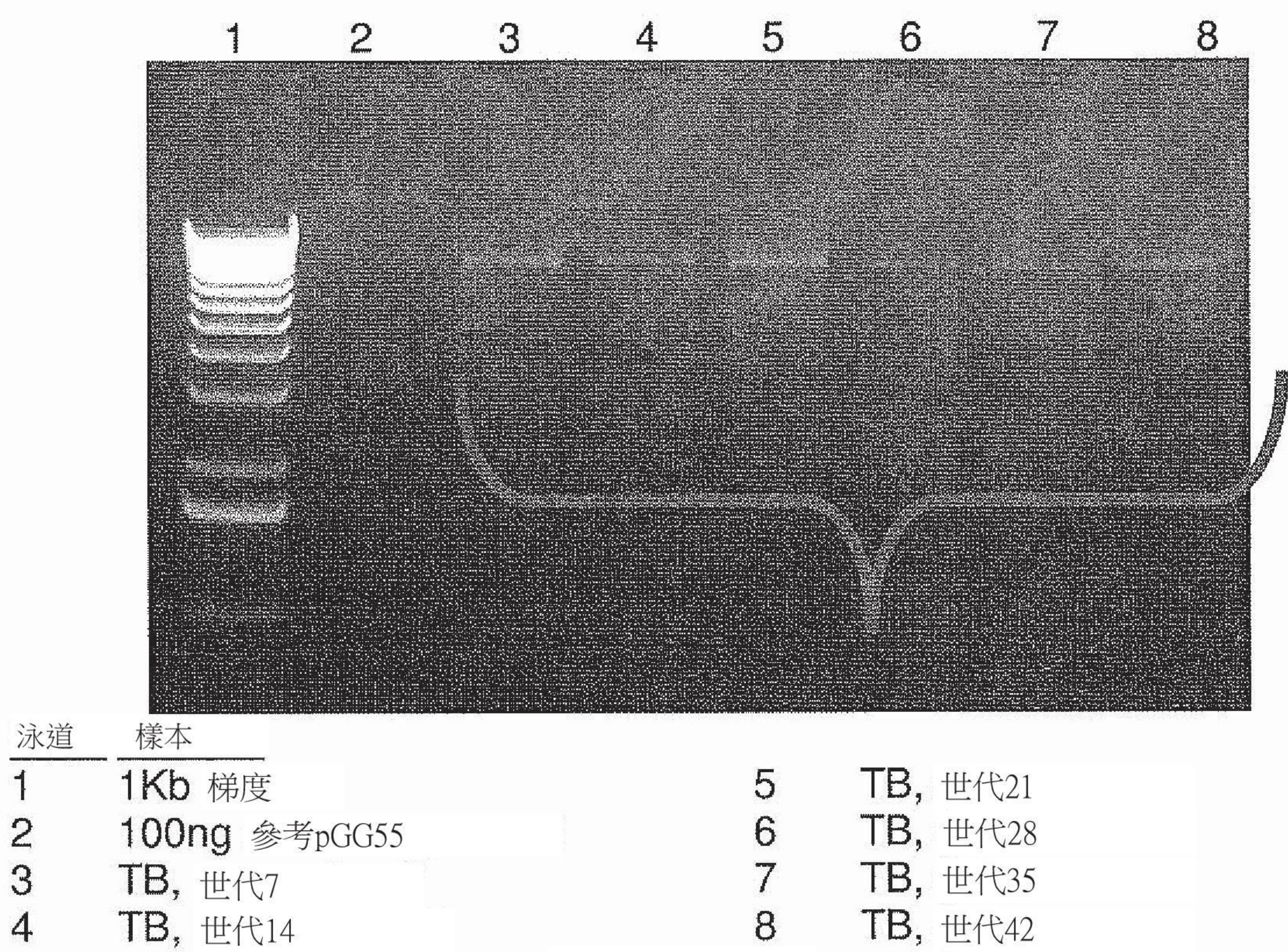


圖 9B

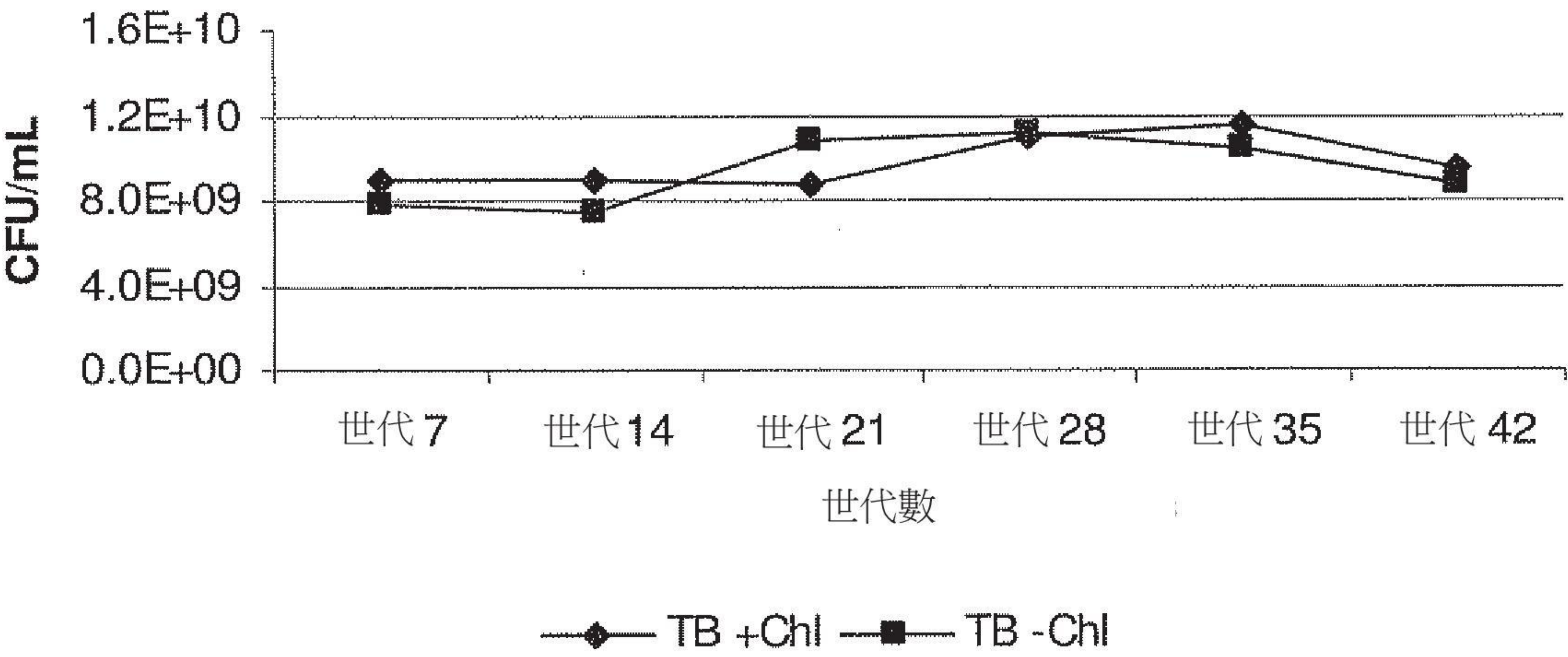


圖 9C

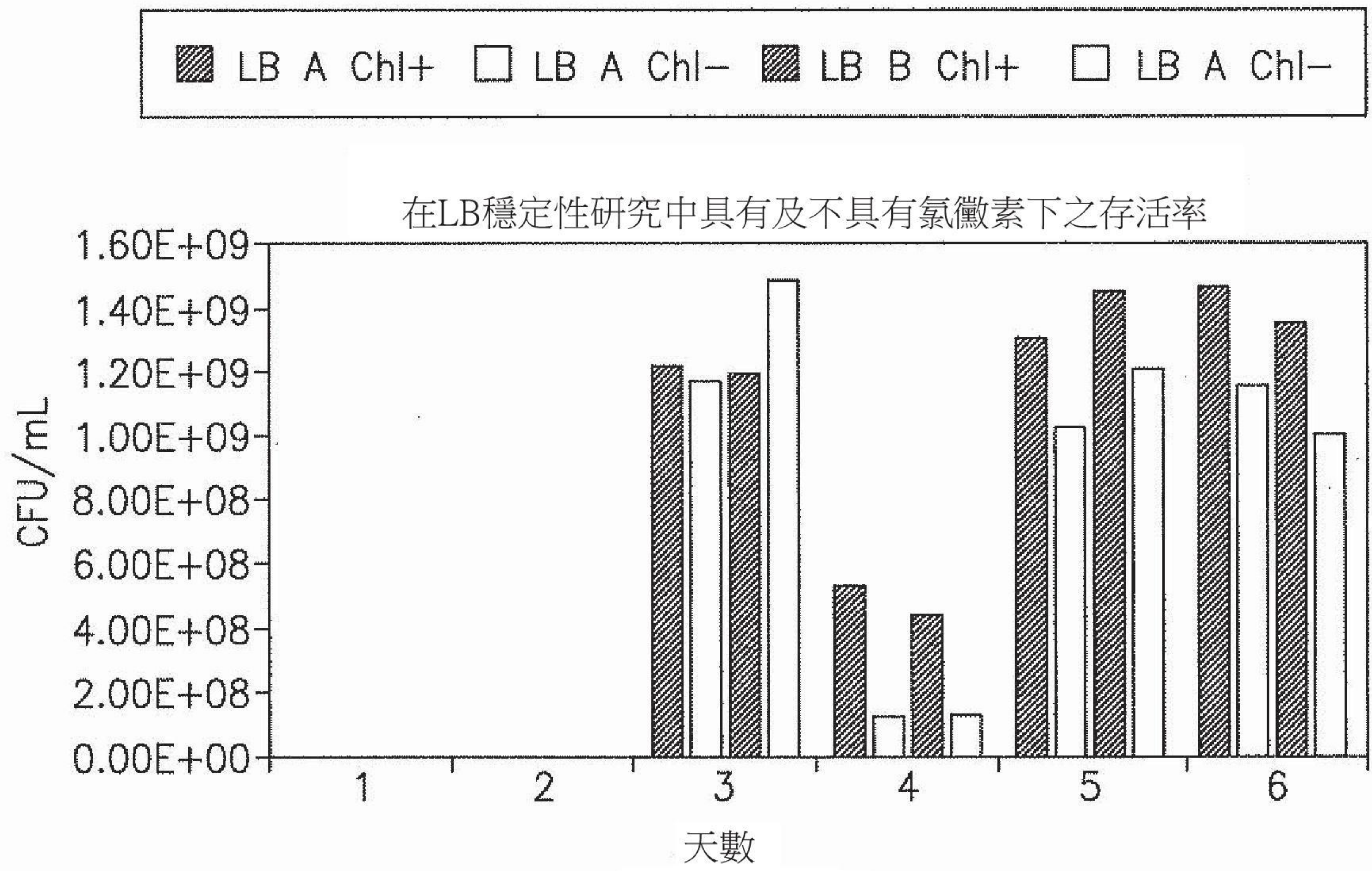


圖 10

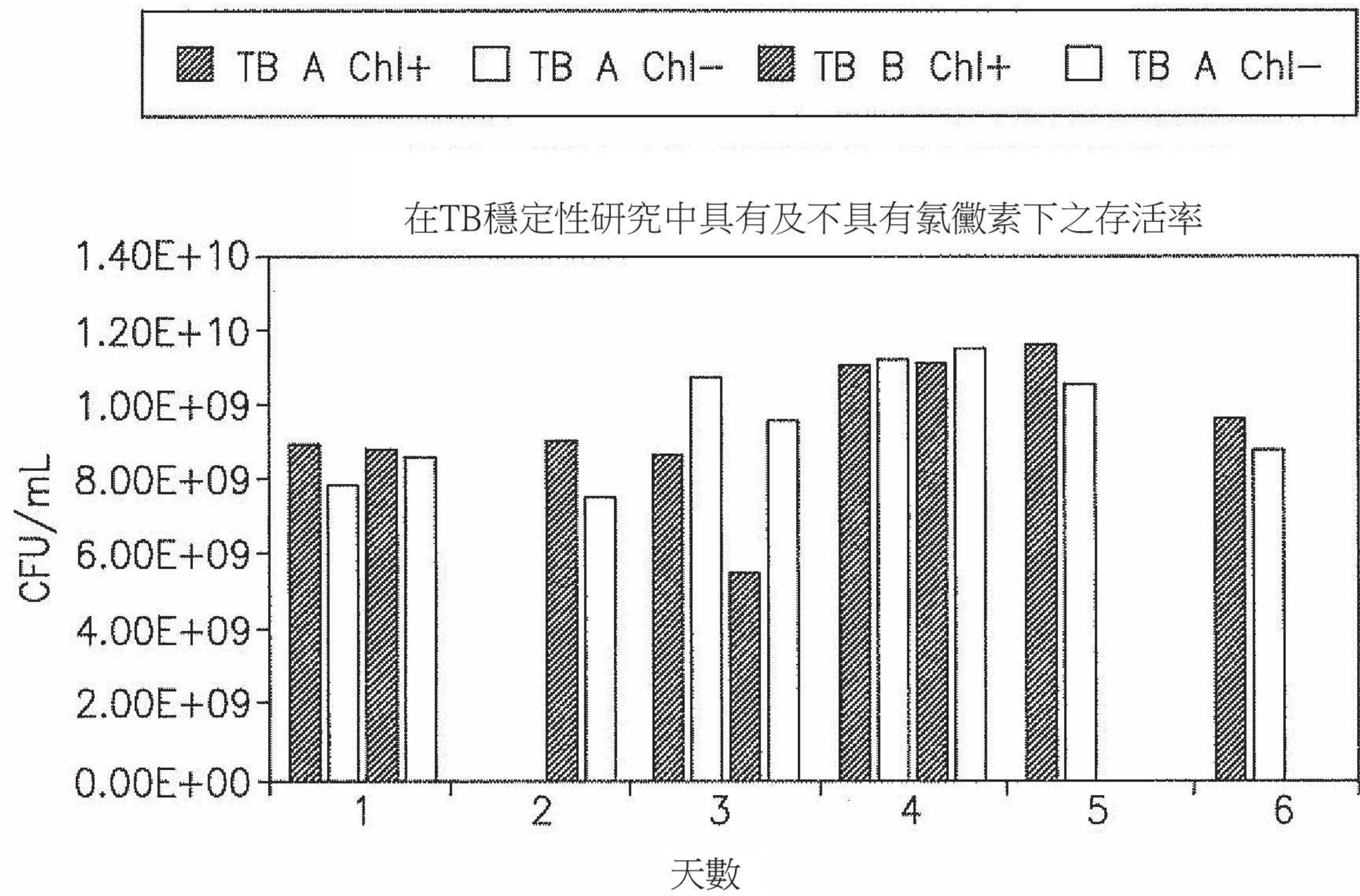
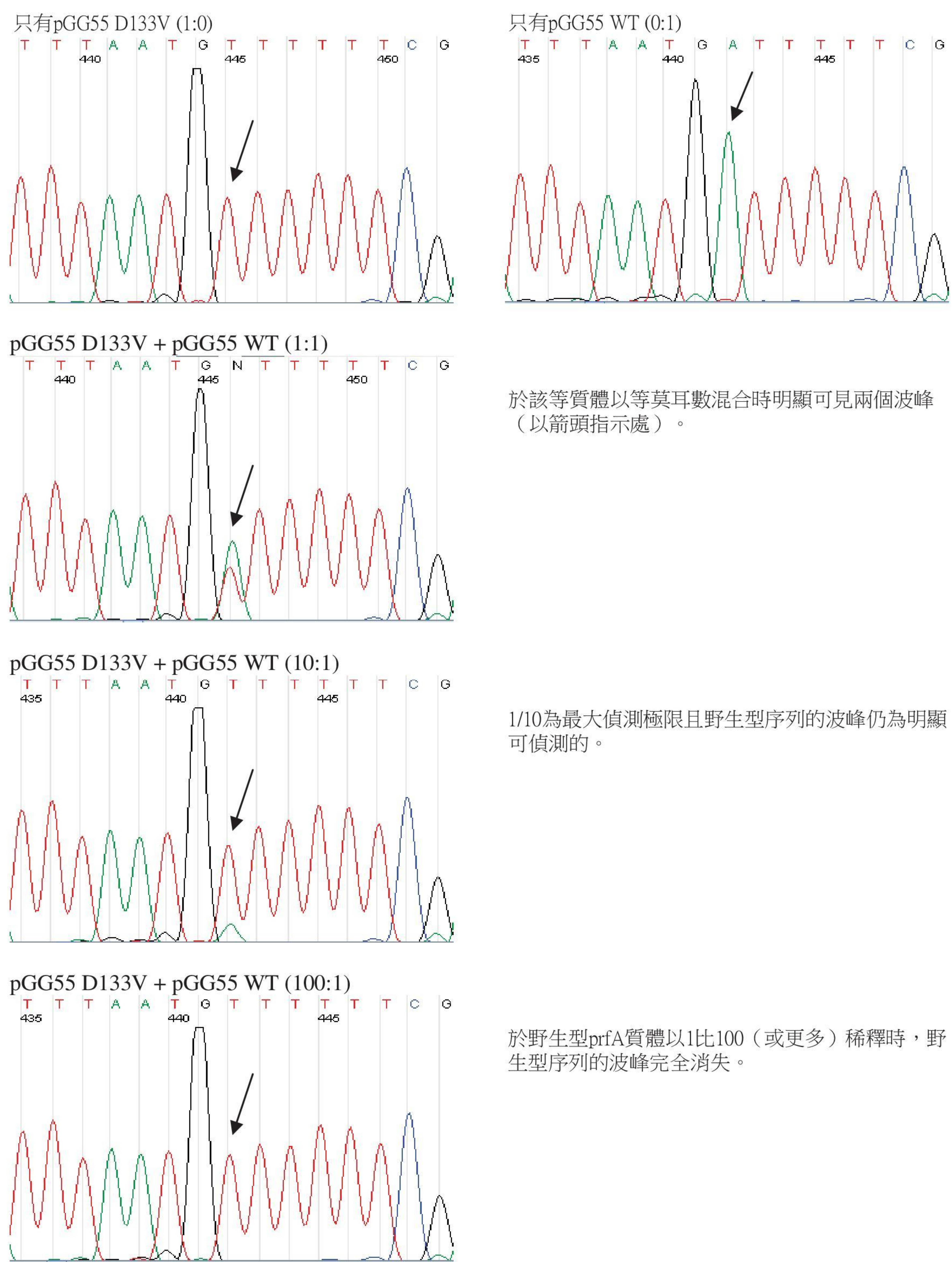


圖 11



於該等質體以等莫耳數混合時明顯可見兩個波峰
(以箭頭指示處)。

1/10為最大偵測極限且野生型序列的波峰仍為明顯
可偵測的。

於野生型prfA質體以1比100（或更多）稀釋時，野
生型序列的波峰完全消失。

圖 12

Lovaxin_C_pGG55	CCAAACCCTACAAAAACAAGTTTCATACAGCCTAGCTAAATTTAATGTTT	ADV451 →
Reference_10403S_prfA	CCAAACCCTACAAAAACAAGTTTCATACAGCCTAGCTAAATTTAATGATT	
		ADV452 →
	*****	**
Lovaxin_C_pGG55	TTTCGATTAAACGGGAAGCTTGGCTCTATTTGCGGTCAACTTTTAATCCTG	
Reference_10403S_prfA	TTTCGATTAAACGGGAAGCTTGGCTCTATTTGCGGTCAACTTTTAATCCTG	

Lovaxin_C_pGG55	ACCTATGTGTATGGTAAAGAAACTCCTGATGGCATCAAGATTACACTGGA	
Reference_10403S_prfA	ACCTATGTGTATGGTAAAGAAACTCCTGATGGCATCAAGATTACACTGGA	

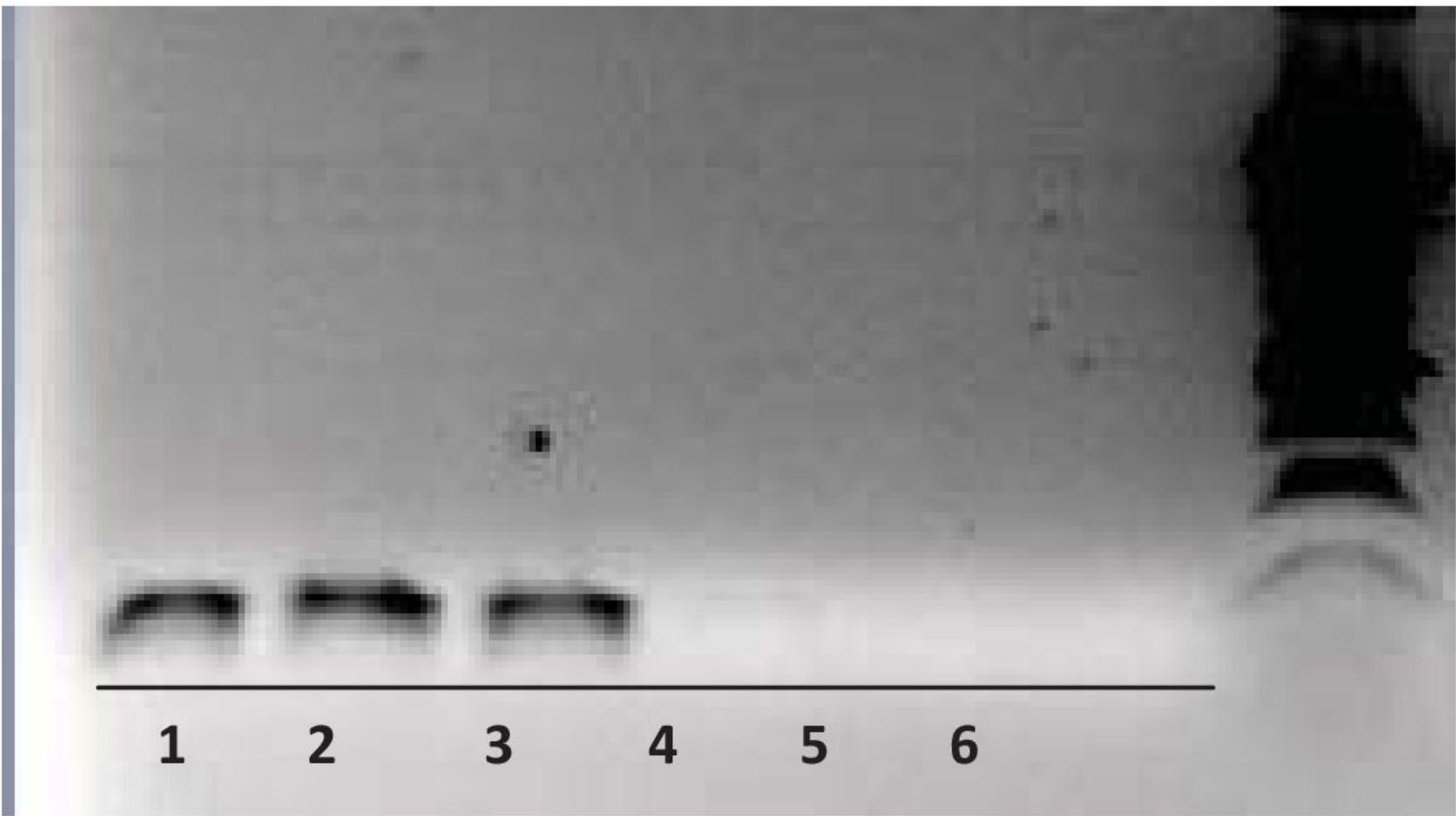
Lovaxin_C_pGG55	TAATTTAACAATGCAGGAGTTAGGATATTCAAGTGGCATCGCACATAGCT	
Reference_10403S_prfA	TAATTTAACAATGCAGGAGTTAGGATATTCAAGTGGCATCGCACATAGCT	

Lovaxin_C_pGG55	CAGCTGTTAGCAGAATTATTTCCAAATTAAAGCAAGAGAAAGTTATCGTG	
Reference_10403S_prfA	CAGCTGTTAGCAGAATTATTTCCAAATTAAAGCAAGAGAAAGTTATCGTG	

Lovaxin_C_pGG55	TATAAAAATTCATGCTTTTATGTACAAAATCGTGATTATCTCAAAAGATA	
Reference_10403S_prfA	TATAAAAATTCATGCTTTTATGTACAAAATCCTTGATTATCTCAAAAGATA	
	*****	*****
Lovaxin_C_pGG55	TGCCCCTAAATTAGATGAATGGTTTTATTTAGCATGTCCTGCTACTTGGG	
Reference_10403S_prfA	TGCCCCTAAATTAGATGAATGGTTTTATTTAGCATGTCCTGCTACTTGGG	
		← ADV453

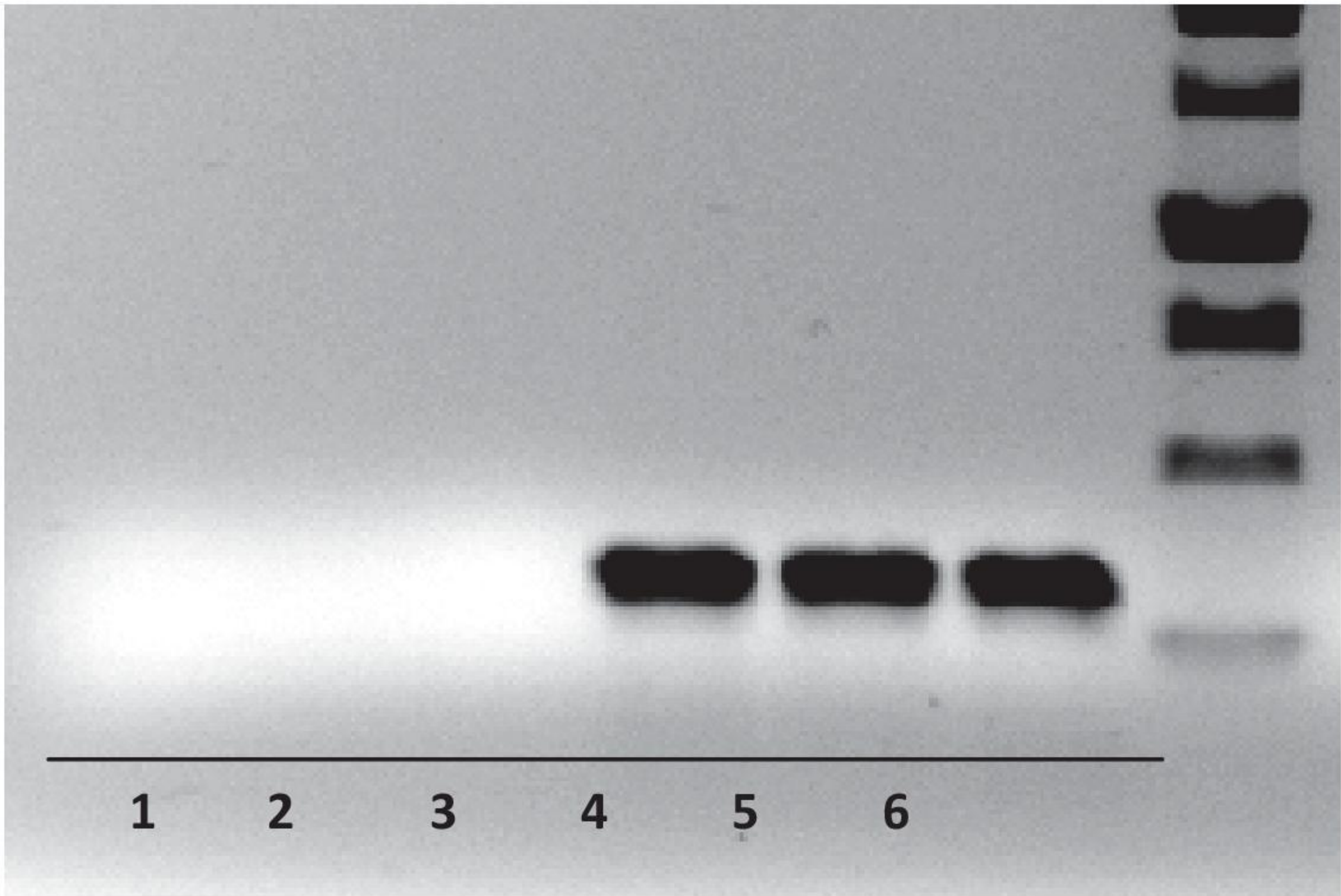
Lovaxin_C_pGG55	GAAAATTAAATTAA	(SEQ ID NO: 35)
Reference_10403S_prfA	GAAAATTAAATTAA	(SEQ ID NO: 36)

圖13



1. 5 ng 的 pGG55 D133V;
2. 1 ng 的 pGG55 D133V;
3. 0.2 ng 的 pGG55 D133V;
4. 5 ng 的 pGG55 野生型 ；
5. 1 ng 的 pGG55 野生型 ；
6. 0.2 ng 的 pGG55 野生型 ；

圖 14



- 1) 5 ng 的 pGG55 D133V;
- 2) 1 ng 的 pGG55 D133V;
- 3) 0.2 ng 的 pGG55 D133V;
- 4) 5 ng 的 pGG55 野生型 ；
- 5) 1 ng 的 pGG55 野生型 ；
- 6) 0.2 ng 的 pGG55 野生型 ；

圖 15

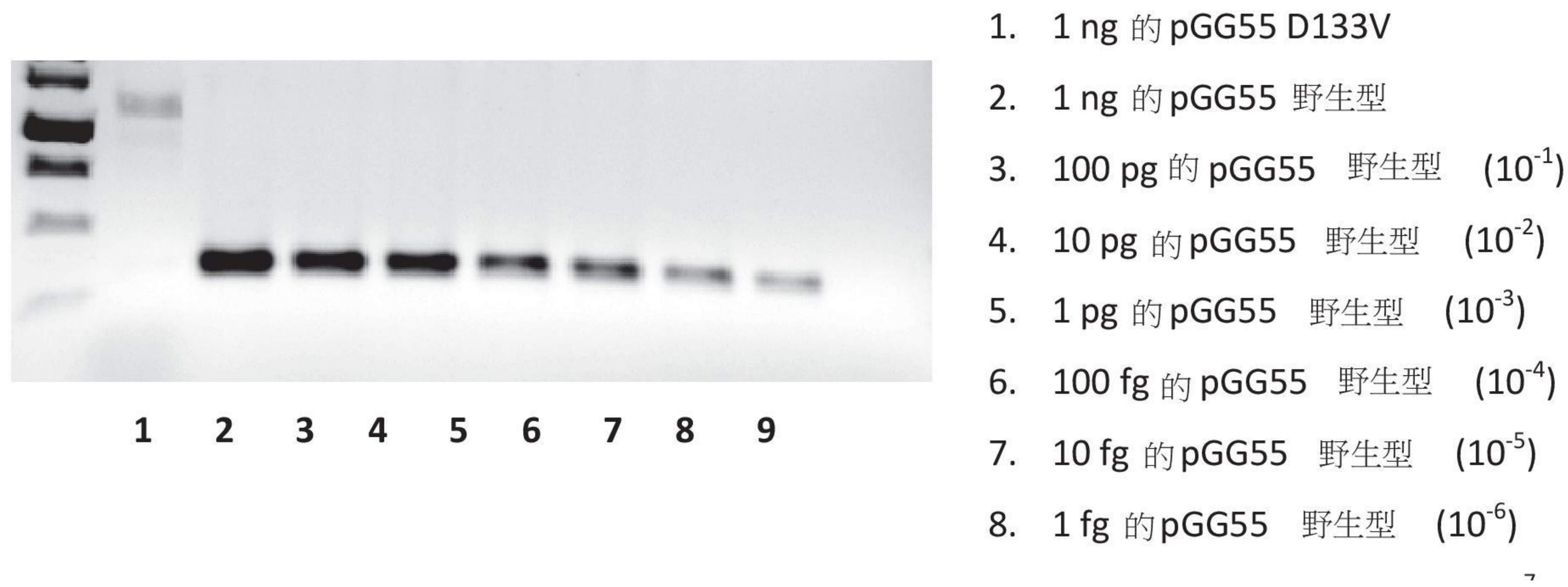


圖 16

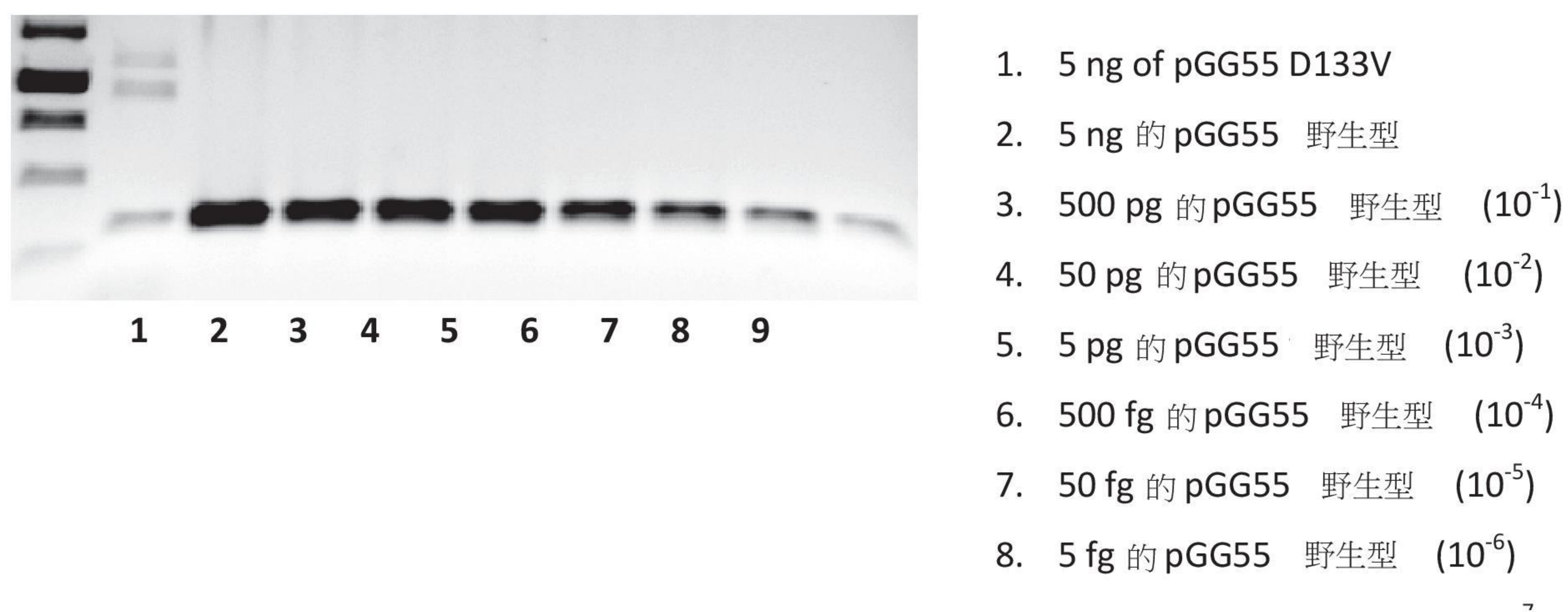


圖 17

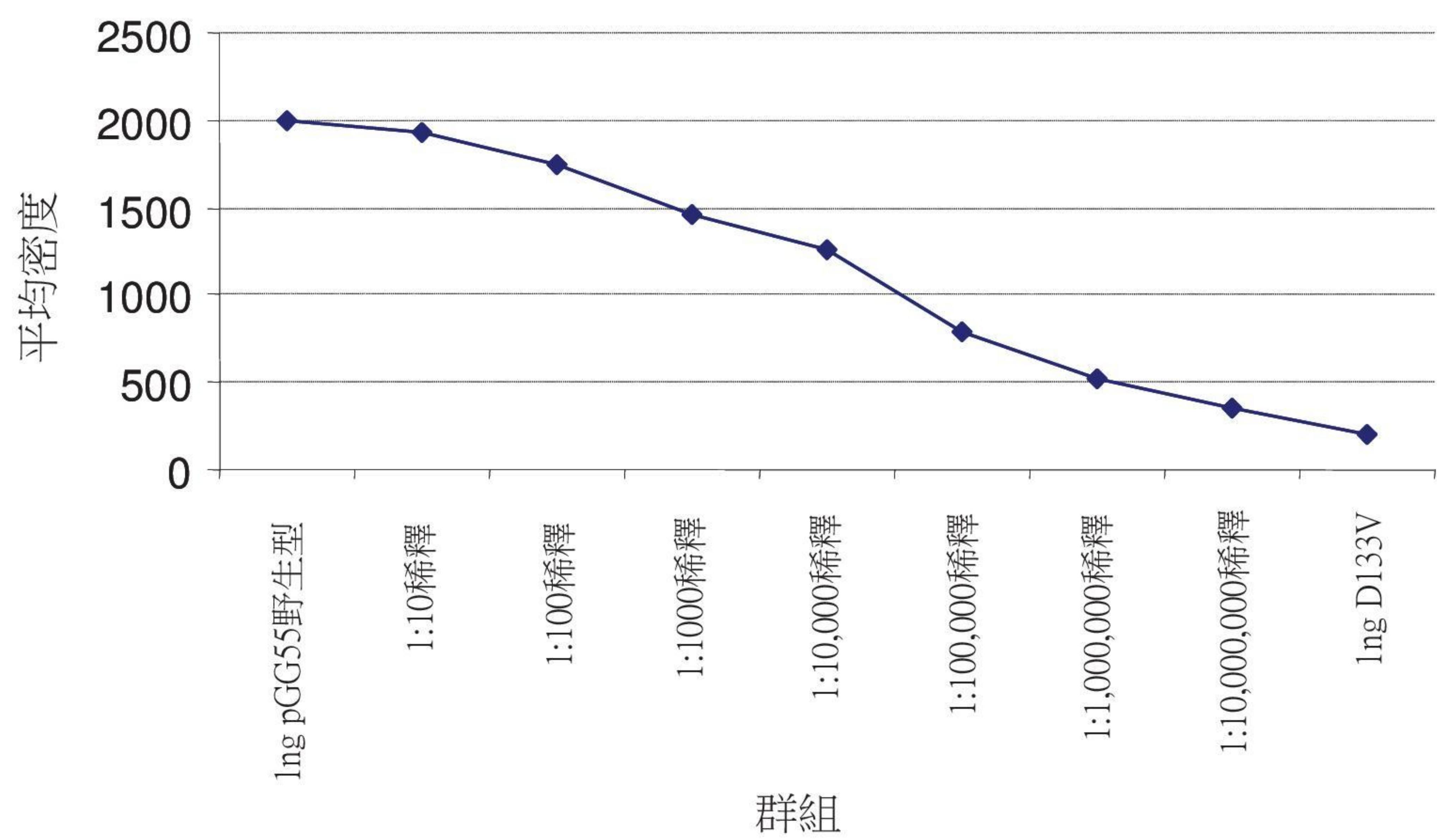


圖 18

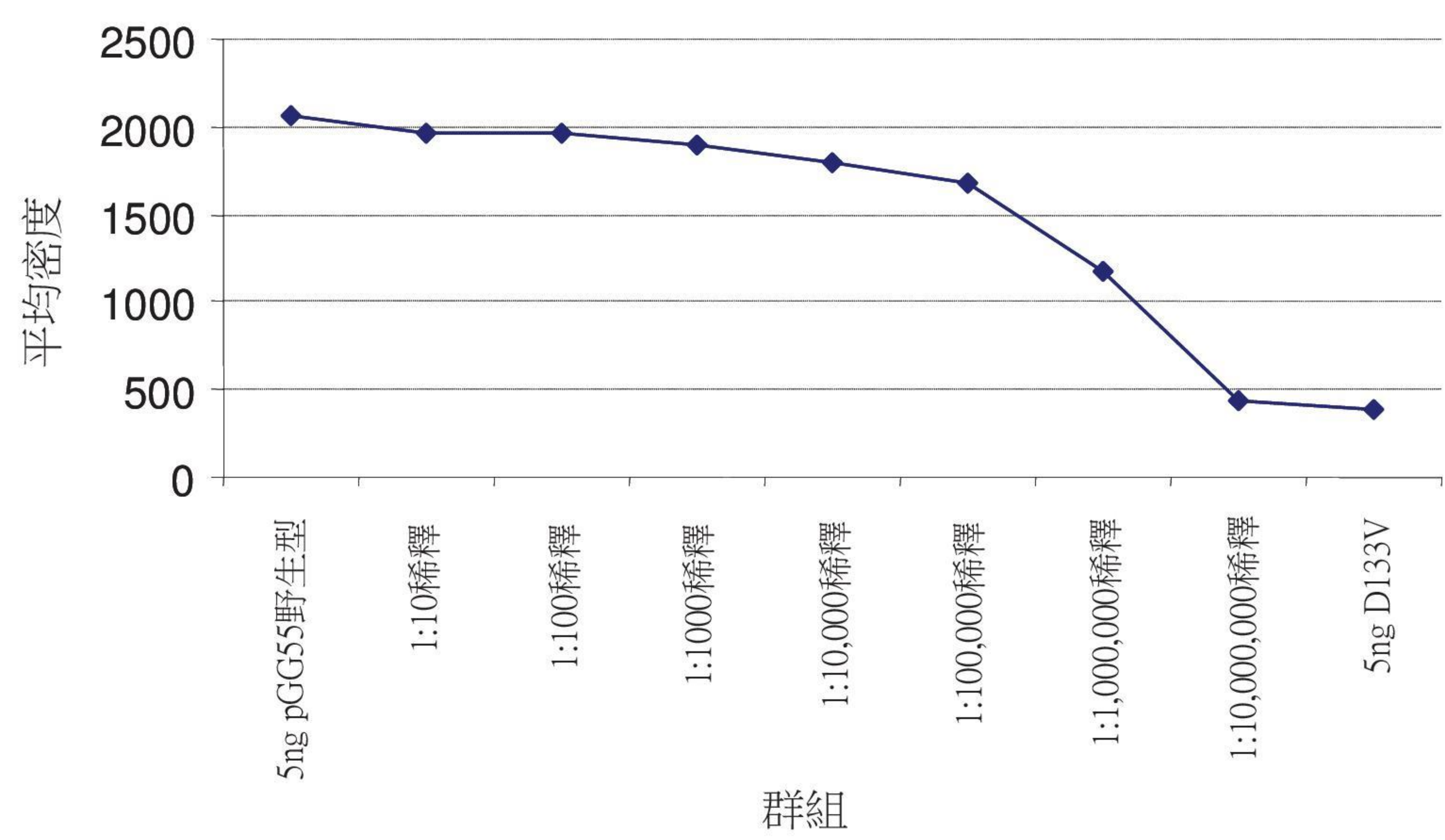


圖 19

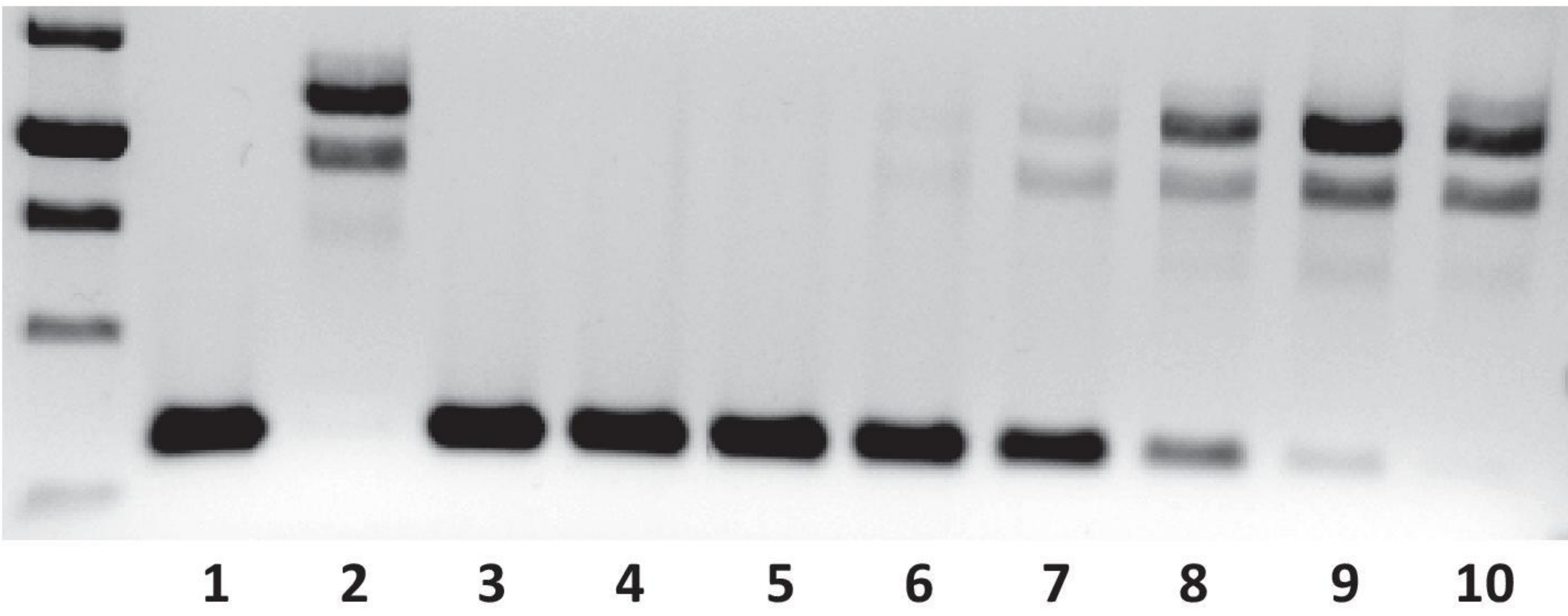


圖 20

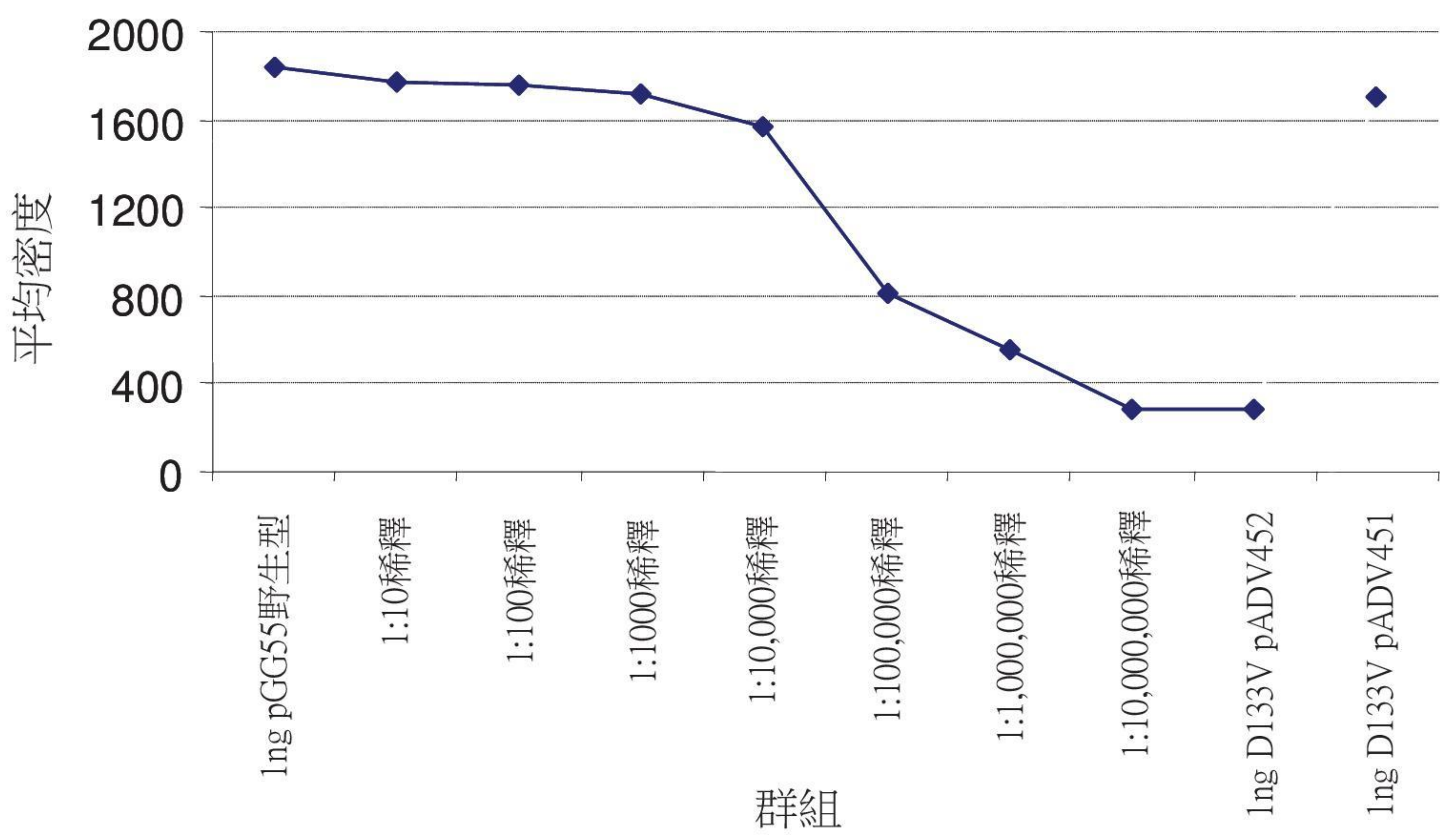
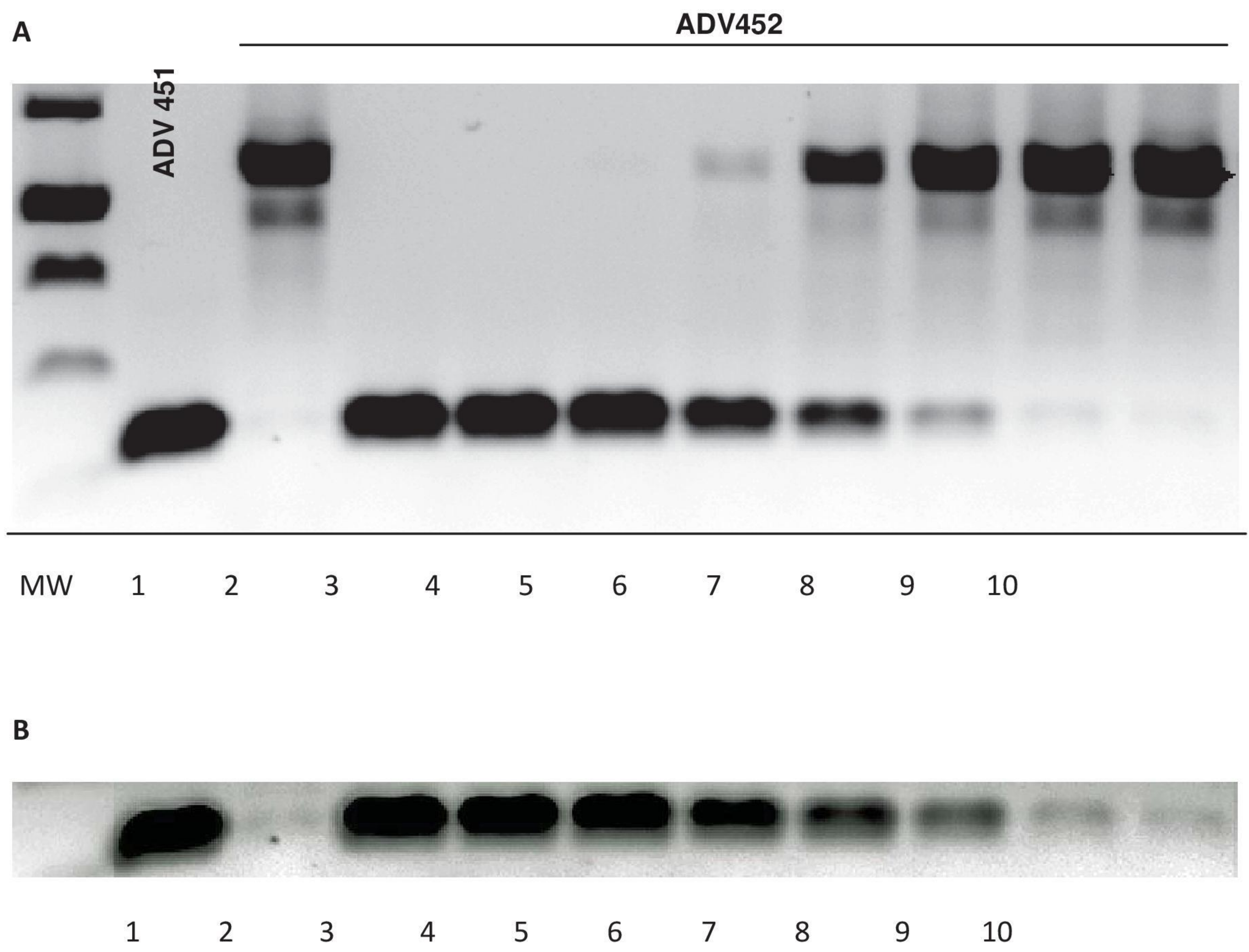


圖 21



- 1) 只有1 ng的pGG55 D133V

2) 只有1 ng的pGG55 D133V

3) 1 ng的pGG55 D133V + 1 ng的pGG55野生型prfA

4) 1 ng的pGG55 D133V + 100 pg的pGG55野生型prfA
- 6) 1 ng的pGG55 D133V + 1 pg的pGG55野生型prfA

7) 1 ng的pGG55 D133V + 100 fg的pGG55野生型prfA

8) 1 ng的pGG55 D133V + 10 fg的pGG55野生型prfA

9) 1 ng的pGG55 D133V + 1 fg的pGG55野生型prfA

圖 22