(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119233982 A
(43)申请公布日 2024.12.31

(21)申请号 202380032755.7
(22)申请日 2023.04.10
(30)优先权数据
63/329,463 2022.04.10 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/065588 2023.04.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/201201 EN 2023.10.19
(71)申请人 免疫治疗有限公司
地址 美国
(72)发明人 特瑞·海兰 沈伟 高筠婷 徐人欢
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
专利代理师 金海霞 刘慧
(51)Int.Cl.
C07K 14/54(2006.01)
A61K 38/16(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61K 39/215(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 14/165(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 14/71(2006.01)
C07K 14/82(2006.01)
C12N 9/12(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)

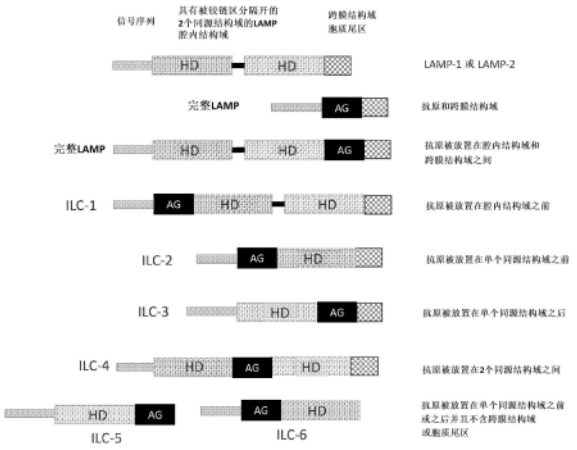
权利要求书4页 说明书179页
序列表（电子公布） 附图93页

(54)发明名称

包含免疫应答增强基因的双顺反子LAMP构建体及其使用方法

(57)摘要

本公开提供了核酸分子(例如质粒或载体)，其包含:编码双顺反子或多顺反子LAMP构建体的核酸序列,所述构建体包含LAMP腔内结构域的特定片段和与所述LAMP蛋白异源的抗原结构域以提供至少一个用于引发免疫应答的抗原,其中由所述构建体表达的抗原任选地被加工并呈递给II类MHC分子;以及编码免疫应答增强多肽的核酸序列,所述免疫应答增强多肽任选地从宿主细胞分泌。所述核酸分子可以例如用于治疗疾病，特别是过敏、感染性疾病、糖尿病、过度增殖性病症和/或癌症。



CN 119233982 A

1.一种分离的核酸分子,其包含:

a.第一多核苷酸序列,其编码包含LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域和与所述LAMP蛋白异源的抗原结构域的多肽(合称为“LAMP-抗原构建体”),其中所述抗原结构域被放置在所述两个同源结构域之间;和

b.第二多肽序列,其编码至少一种包含免疫应答增强基因多肽(IREG)或IREG的包含分泌信号序列的胞外结构域的第二多肽。

2.根据权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、溶酶体整合膜蛋白-2(“LIMP 2”)、Macrosailin、Endolyn、LAMP5或边缘系统相关膜蛋白(“LIMBIC”)。

3.根据权利要求2所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自SEQ ID NO:1-113中的任一者。

4.根据权利要求1或2所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白与SEQ ID NO:1-113具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性。

5.根据权利要求2所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白是LAMP-1,并且其中所述LAMP-抗原构建体的两个同源结构域包括LAMP-1同源结构域1和LAMP-1同源结构域2。

6.根据权利要求5所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域1包含SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列。

7.根据权利要求5或6所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域2包含SEQ ID NO:1的第228-381位残基的氨基酸序列。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体在所述两个同源结构域中的至少一者与所述抗原结构域之间包含接头。

9.根据权利要求8所述的分离的核酸分子,其中所述接头包含GPGPG或PMGLP的氨基酸序列。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体进一步包含LAMP蛋白的跨膜结构域。

11.根据权利要求10所述的分离的核酸分子,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:1的第383-405位残基。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体进一步包含信号序列。

13.根据权利要求12所述的分离的核酸分子,其中所述信号序列源自LAMP蛋白,例如包含SEQ ID NO:1的第1-28位残基或SEQ ID NO:198的第1-28位残基的信号序列。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体进一步包含LAMP蛋白的胞质结构域。

15.根据权利要求14所述的分离的核酸分子,其中所述胞质结构域包含SEQ ID NO:1的第406-417位残基。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述IREG包含CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33或

其胞外结构域中的一者或多者,任选地其中所述CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23或IL-15与免疫球蛋白的Fc结构域融合。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列与所述IREG异源。

18.根据权利要求17所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列源自IgKVIII、Ig-κ、四连接素或IL-2,和/或其中所述第二多肽进一步包含肺表面活性物质相关蛋白D(SPD)。

19.根据权利要求18所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽在EF-1α核心启动子例如SEQ ID NO:124的启动子的控制下表达。

20.一种组合物,其包含根据权利要求1-18中任一项所述的分离的核酸分子。

21.一种宿主细胞,其包含根据权利要求1-18中任一项所述的分离的核酸。

22.一种组合物,其包含根据权利要求20所述的宿主细胞。

23.一种治疗患有疾病或病症的受试者或在患有疾病或病症或具有发生疾病或病症的风险的受试者中诱导免疫应答的方法,其中所述方法包括以足以在所述受试者中治疗所述疾病或病症或诱导免疫应答的量向所述受试者施用根据权利要求1-18中任一项所述的分离的核酸分子、根据权利要求19所述的组合物或根据权利要求20所述的宿主细胞。

24.根据权利要求22所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用至少一种第二治疗剂。

25.一种分离的核酸分子,其包含:

a.第一多核苷酸序列,其编码包含LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域和包含HER2胞外结构域的抗原结构域的多肽(合称为"HER2-LAMP"),其中所述抗原结构域被放置在所述两个LAMP同源结构域之间;和

b.第二多肽序列,其编码至少一种包含免疫应答增强基因多肽(IREG)或IREG的包含分泌信号序列的胞外结构域的第二多肽。

26.根据权利要求25所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、溶酶体整合膜蛋白-2("LIMP 2")、Macrosailin、Endolyn、LAMP5或边缘系统相关膜蛋白("LIMBIC")。

27.根据权利要求26所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自SEQ ID NO:1-113中的任一者。

28.根据权利要求25或26所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白与SEQ ID NO:1-113具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性。

29.根据权利要求26所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白是LAMP-1,并且其中所述HER2-LAMP的两个同源结构域包括LAMP-1同源结构域1和LAMP-1同源结构域2。

30.根据权利要求29所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域1包含SEQ ID NO:1的第29-194位残基或SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列。

31.根据权利要求29或30所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域2包含SEQ ID NO:1的第228-381位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列。

32.根据权利要求25-31中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述HER2-LAMP在所述两个同源结构域中的至少一者与所述抗原结构域之间包含接头。

33.根据权利要求32所述的分离的核酸分子,其中所述接头包含GPGPG或PMGLP的氨基酸序列。

34.根据权利要求25-33中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述HER2-LAMP进一步包含LAMP蛋白的跨膜结构域。

35.根据权利要求34所述的分离的核酸分子,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:1的第383-405位残基。

36.根据权利要求25-35中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述HER2-LAMP进一步包含信号序列。

37.根据权利要求36所述的分离的核酸分子,其中所述信号序列源自LAMP蛋白,例如包含SEQ ID NO:1的第1-28位氨基酸残基或SEQ ID NO:198的第1-28位残基的信号序列。

38.根据权利要求25-37中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述HER2-LAMP进一步包含LAMP蛋白的胞质结构域。

39.根据权利要求38所述的分离的核酸分子,其中所述胞质结构域包含SEQ ID NO:1的第406-417位残基。

40.根据权利要求25-39中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述抗原结构域包含SEQ ID NO:200的氨基酸序列或由SEQ ID NO:200的氨基酸序列组成。

41.根据权利要求25-40中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述HER2-LAMP包含SEQ ID NO:1的第1-194位残基或SEQ ID NO:198的氨基酸序列,随后是SEQ ID NO:200的氨基酸序列,随后是SEQ ID NO:1的第228-381位残基或SEQ ID NO:202的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

42.根据权利要求25-41中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述IREG包含CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33或其胞外结构域中的一者或多者,任选地其中所述CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23或IL-15与免疫球蛋白的Fc结构域融合。

43.根据权利要求25-42中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列与所述IREG异源。

44.根据权利要求43所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列源自IgKVIII、Ig-κ、四连接素或IL-2。

45.根据权利要求25-44中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽包括SPD和可溶性CD40L(sCD40L)的融合体、SPD和Flt3L的融合体、IL-12、IL-21、与Fc结构域融合的OX40L、与Fc结构域融合的CD80、或IL-15。

46.根据权利要求45所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽在EF-1α核心启动子例如SEQ ID NO:124的启动子的控制下表达。

47.一种组合物,其包含根据权利要求25-46中任一项所述的分离的核酸分子。

48.一种宿主细胞,其包含根据权利要求25-46中任一项所述的分离的核酸。

49.一种组合物,其包含根据权利要求48所述的宿主细胞。

50.一种治疗患有癌症的受试者的方法,其中所述方法包括以足以在所述受试者中治疗所述癌症或诱导针对所述癌症的免疫应答的量向所述受试者施用根据权利要求25-46中任一项所述的分离的核酸分子、根据权利要求47所述的组合物或根据权利要求48所述的宿

主细胞。

51.根据权利要求50所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用至少一种第二治疗剂。

52.根据权利要求1-19或25-46中任一项所述的分离的核酸,其中所述分离的核酸包括DNA、mRNA或自扩增RNA。

包含免疫应答增强基因的双顺反子LAMP构建体及其使用方法

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年4月10日提交的美国临时专利申请第63/329,463号的优先权,所述临时专利申请的内容整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包括ST26格式的序列表,其整体通过引用并入本文(文件名:2023-04-10_01305-0023-00PCTST26;文件大小:1,417,543字节)。

技术领域

[0005] 本公开涉及分离的核酸分子(例如质粒或载体),其编码双顺反子或多顺反子LAMP(溶酶体相关膜蛋白)构建体,所述构建体包含LAMP融合蛋白,和第二任选分泌的蛋白质例如来自免疫应答增强基因(IREG)的蛋白质,以及它们在治疗患有感染性疾病、糖尿病、过敏、过度增殖性病症和/或癌症,特别是COVID-19的受试者中的用途。此外,本文描述的双顺反子LAMP构建体可用于在非人脊椎动物中产生抗体,优选地其中所述非人脊椎动物的基因组至少包含部分人免疫球蛋白区域和/或人源化免疫球蛋白区域。

背景技术

[0006] 在下面的讨论中,出于背景和介绍的目的,将描述某些文章和方法。本文包含的任何内容均不应被解释为对现有技术的“承认”。申请人明确保留在适当情况下证明本文引用的文章和方法不构成适用法律规定下的现有技术的权利。

[0007] 疫苗是开发预防性和治疗性疫苗的新的、有前景的候选者。它们被证明是安全的,并且如果需要重复的疫苗接种周期来实现临床益处,那么对载体骨架缺乏免疫应答可能是一个决定性的优势。然而,传统疫苗的一个明显缺点是它们在人类中的免疫原性低。基于表位的疫苗的免疫原性中的一个关键限制步骤可能是表位进入T细胞的II类主要组织相容性(MHC)呈递途径的过程,这在没有靶向技术的疫苗的情况下可能是一个随机过程。

[0008] 各种设计的LAMP-抗原构建体以前已被描述在例如美国专利第11,203,629号中(参见其中的图1)。美国专利第11,203,629号中描述的一种被命名为ILC-4的构建体(描绘在本文的图1中)包含融合在LAMP蛋白的第一同源结构域和LAMP蛋白的第二同源结构域之间(或至少在两个半胱氨酸保守片段之间)的至少一种感兴趣的抗原,例如,所述至少一种感兴趣的抗原可以被放置在LAMP铰链区中。在一些实施方式中,该构建体还包含LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞质尾区。所述两个同源结构域可以源自例如LAMP-1、LAMP-2、LAMP-3或Endolyn蛋白。或者,可以使用来自两种不同LAMP蛋白的两个同源结构域。发明人出人意料地发现,改进的LAMP构建体例如ILC-4可以例如引发针对所述感兴趣的抗原的强烈T细胞和抗体应答,使其成为用作疫苗的可行候选者。

[0009] 尽管如此,还需要设计新的和进一步改进的LAMP构建体以及编码它们的核酸分子,其可以用作疫苗来有效地治疗例如过敏、感染性疾病、糖尿病、过度增殖性病症和/或癌症,和/或用于产生有用的抗体。

发明内容

[0010] 正如本文中进一步描述的,发明人现已发现,可以设计分离的核酸分子,其不仅表达LAMP构建体(例如在本文图1中所描述的),而且表达特定类型的第二多肽,通常是分泌多肽,其编码已被发现在体内增强针对肿瘤或感染性疾病的免疫应答的基因例如CD40L、CD80、OX40、IL-12、IL-21、IL-15或Flt3L等;并且从所述分离的核酸分子表达这两种多肽,不仅与较早的LAMP构建体相比,而且与包含某些分泌抗原例如第二疾病抗原的双顺反子LAMP构建体相比,都出人意料地增强了免疫应答。

[0011] 提供该发明内容是为了以简化形式介绍一系列概念,这些概念将在下面的具体实施方式中进一步描述。该发明内容无意鉴定所要求保护的主题内容的关键或必要特征,也无意用于限制所要求保护的主题内容的范围。从下面的书面具体实施方式(包括在附图中说明的和在权利要求书中定义的那些方面),所要求保护的主题内容的其他特征、细节、实用性和优点将显而易见。

[0012] 本公开的一个目的是提供新的核酸分子,其编码构建体(“双顺反子LAMP构建体”),所述构建体包含将感兴趣的抗原有效呈递给免疫系统以产生增强的免疫应答的LAMP结构域的特定片段和/或变体。这些双顺反子LAMP构建体有效地将所述抗原引导到溶酶体/内体区室,在那里它们被加工并呈递给II类主要组织相容性复合体(MHC)分子,以便优先刺激辅助T细胞和/或产生抗体,同时具有增强免疫应答的能力。

[0013] 本文描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子和方法可以在受试者中引发免疫应答。所述免疫应答可以是针对所述双顺反子LAMP构建体(例如疫苗)中编码的抗原的表位的免疫应答。疫苗武装受试者的免疫系统,使免疫系统可以检测并破坏所述受试者中含有所述疫苗的抗原的物质。本文描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子和方法可以在所述受试者中引发Th1免疫应答。Th1免疫应答可以包括由免疫细胞的亚群(例如抗原特异性T细胞)分泌炎性细胞因子(例如IFNγ、TNFa)。在某些情况下,所述炎性细胞因子激活另一种亚型的免疫细胞(例如细胞毒性T细胞),其可以破坏所述受试者中含有所述抗原的物质。

[0014] 在某些情况下,在本文描述的双顺反子LAMP构建体和方法中使用的抗原可以被受试者的免疫系统识别,从而引发Th1免疫应答并释放I型细胞因子。所述Th1应答可以由所述表位与T细胞(更具体而言是由所述T细胞表达的主要组织相容性复合体(MHC))之间的相互作用引发。例如,表位与MHC受体的高亲和力结合可以刺激Th1应答。MHC受体可以是多种类型的MHC受体中的至少一种。接合在T细胞上的MHC受体可能因群体中的个体而异。

[0015] 在某些情况下,所述免疫应答是1型免疫应答。在某些情况下,所述免疫应答的特征在于I型细胞因子产生与II型细胞因子产生的比率大于1。在某些情况下,所述免疫应答的特征在于I型细胞因子产生与II型细胞因子产生的比率小于1。在某些情况下,所述免疫应答的特征在于IFNγ产生与IL-10产生的比率大于1。在某些情况下,所述免疫应答的特征在于IFNγ产生与IL-10产生的比率小于1。

[0016] 本文描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子也可以以提供免疫调控元件(IRE)或免疫应答增强基因(IREG)的表达,从而在受试者中引发增强的免疫应答(例如包含显著更高的抗体滴度的免疫应答)的方式使用。例如,核酸分子(例如质粒或载体)可以提供包含LAMP-抗原多肽的双顺反子LAMP构建体的表达,所述多肽被加工并呈递给II类MHC分

子,从而优先刺激辅助T细胞,启动记忆细胞和/或产生抗体;并且提供另一种IREG或IRE多肽的表达,所述多肽可以被分泌到所述受试者的循环中,并且可以例如进一步增强针对所述LAMP抗原的体液和细胞免疫应答。

[0017] 在一个方面,所述编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子是适合于对受试者进行疫苗接种的疫苗载体。在另一个方面,本公开提供了一种递送媒介,其用于促进将所述编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子(其包含编码表位和/或抗原的多核苷酸)引入到细胞中。所述递送媒介可以是基于脂质的(例如脂质体制剂)、基于病毒的(例如包含包封所述核酸分子的病毒蛋白)或基于细胞的。

[0018] 在一些实施方式中,本公开提供了一种可注射组合物,其包含本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子,用于在受试者中引发针对抗原的免疫应答(例如抗体的产生)。在一些实施方式中,这种疫苗产生相对于Th2应答优先的Th1应答。

[0019] 本公开还提供了一种细胞,其包含本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子,可用于产生免疫应答。在一个方面,所述细胞是抗原呈递细胞。所述抗原呈递细胞可以是专业抗原呈递细胞(例如树突状细胞、巨噬细胞、B细胞等)或工程化抗原呈递细胞(例如被工程化改造以表达抗原呈递所需的分子例如II类MHC分子的非专业抗原呈递细胞)。所述抗原呈递所需的分子可以源自其他细胞,例如是天然存在的,或者它们本身可以被工程化改造(例如突变或修饰以表现出所需的特性,例如对抗原表位更高或更低的亲和力)。

[0020] 本公开还提供了一种试剂盒,其包含多种细胞,所述细胞包含本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子。至少两种所述细胞可以表达不同的II类MHC分子,并且每种细胞可以包含相同的LAMP构建体。在一个方面,提供了一种试剂盒,其包含编码双顺反子LAMP构建体的病毒载体。

[0021] 本公开还提供了一种转基因动物,其包含至少一种所述细胞和/或至少一种本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子。本公开还提供了一种转基因动物,其包含至少一种本文描述的细胞。

[0022] 本公开还提供了一种用于在受试者(例如人或非人脊椎动物)中产生针对抗原的增强的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用如上所述的细胞,其中所述细胞在所述受试者中表达或可以被诱导以表达所述双顺反子LAMP构建体。在一个方面,所述细胞包含与所述受试者的MHC蛋白相容的II类MHC分子,使得所述受试者不产生针对所述II类MHC分子的免疫应答。

[0023] 在另一个方面,本公开提供了一种引发针对抗原的增强的免疫应答的方法,所述方法包括向受试者例如人或非人脊椎动物施用本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子。优选地,所述核酸分子对所述受试者的细胞具有感染性。例如,所述编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子可以是病毒载体,例如痘苗病毒载体。

[0024] 本公开还包括在非人脊椎动物中产生抗体的方法,其中用本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子注射所述非人脊椎动物。产生的抗体可以从所述脊椎动物的血液中分离出来(作为多克隆),然后使用标准技术进一步分离以产生单克隆抗体。

[0025] 本文描述的方法可用于生产和/或优化抗体,包括全人抗体、人源化抗体、嵌合抗体,用于诊断和治疗用途。产生此类抗体的杂交瘤也是本公开的另一个目的。

[0026] 本公开的具体实施方式包括下述实施方式:

[0027] 1.一种分离的核酸分子,其包含:

[0028] a.第一多核苷酸序列,其编码包含LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域和与所述LAMP蛋白异源的抗原结构域的多肽(合称为“LAMP-抗原构建体”),其中所述抗原结构域被放置在所述两个同源结构域之间;和

[0029] b.第二多肽序列,其编码至少一种包含免疫应答增强基因多肽(IREG)或IREG的包含分泌信号序列的胞外结构域的第二多肽。

[0030] 2.根据实施方式1所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、溶酶体整合膜蛋白-2(“LIMP 2”)、Macrosailin、Endolyn、LAMP5或边缘系统相关膜蛋白(“LIMBIC”)。

[0031] 3.根据实施方式2所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自SEQ ID NO:1-113中的任一者。

[0032] 4.根据实施方式1或2所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白与SEQ ID NO:1-113具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性。

[0033] 5.根据实施方式2所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白是LAMP-1,并且其中所述LAMP-抗原构建体的两个同源结构域包括LAMP-1同源结构域1和LAMP-1同源结构域2。

[0034] 6.根据实施方式5所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域1包含SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:199的核苷酸序列或与SEQ ID NO:199的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0035] 7.根据实施方式5或6所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域2包含SEQ ID NO:1的第228-381位残基或SEQ ID NO:1的第228-382位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第228-381位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:202的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:203的核苷酸序列或与SEQ ID NO:203的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0036] 8.根据实施方式1-7中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体在所述两个同源结构域中的至少一者与所述抗原结构域之间包含接头。

[0037] 9.根据实施方式8所述的分离的核酸分子,其中所述接头包含GPGPG或PMGLP的氨基酸序列。

[0038] 10.根据实施方式1-9中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体进一步包含LAMP蛋白的跨膜结构域。

[0039] 11.根据实施方式10所述的分离的核酸分子,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:1的第383-405位残基。

[0040] 12.根据实施方式1-11中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建

体进一步包含信号序列。

[0041] 13.根据实施方式12所述的分离的核酸分子,其中所述信号序列源自LAMP蛋白。

[0042] 14.根据实施方式1-13中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体进一步包含LAMP蛋白的胞质结构域。

[0043] 15.根据实施方式14所述的分离的核酸分子,其中所述胞质结构域包含SEQ ID NO:1的第406-417位残基。

[0044] 16.根据实施方式1-15中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述IREG包含CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33(或包含与SEQ ID NO:133、145、147、149、151、155、159、165、169、173、177、181、189、191、204、238、242、243、252或253中的任一者的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性的氨基酸序列)或其胞外结构域中的一者或多者,任选地其中所述CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23或IL-15与免疫球蛋白的Fc结构域融合,或者其中所述分离的核酸分子包含编码任选地与Fc结构域融合的CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列与SEQ ID NO:134、146、148、150、152、160、166、170、174、178、182、190、192、205、239、244或881中的任一者的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性。

[0045] 17.根据实施方式1-16中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列与所述IREG异源。

[0046] 18.根据实施方式17所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列源自IgKVIII(例如SEQ ID NO:122)、Ig-κ(例如SEQ ID NO:120)、四连接素或IL-2,和/或其中所述第二多肽进一步包含肺表面活性物质相关蛋白D(SPD)(例如SEQ ID NO:131)。

[0047] 19.根据实施方式18所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽在EF-1α核心启动子例如SEQ ID NO:124的启动子的控制下表达。

[0048] 20.一种组合物,其包含根据实施方式1-18中任一者所述的分离的核酸分子。

[0049] 21.一种宿主细胞,其包含根据实施方式1-18中任一者所述的分离的核酸。

[0050] 22.一种组合物,其包含根据实施方式20所述的宿主细胞。

[0051] 23.一种治疗患有疾病或病症的受试者或在患有疾病或病症或具有发生疾病或病症的风险的受试者中诱导免疫应答的方法,其中所述方法包括以足以在所述受试者中治疗所述疾病或病症或诱导免疫应答的量向所述受试者施用根据实施方式1-18中任一者所述的分离的核酸分子、根据实施方式19所述的组合物或根据实施方式20所述的宿主细胞。

[0052] 24.根据实施方式23所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用至少一种第二治疗剂。

[0053] 25.一种分离的核酸分子,其包含:

[0054] a.第一多核苷酸序列,其编码包含LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域和包含HER2胞外结构域的抗原结构域的多肽(合称为“HER2-LAMP”),其中所述抗原结构域被放置在所述两个LAMP同源结构域之间;和

[0055] b.第二多肽序列,其编码至少一种包含免疫应答增强基因多肽(IREG)或IREG的包含分泌信号序列的胞外结构域的第二多肽。

[0056] 26.根据实施方式25所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、溶酶体整合膜蛋白-2(“LIMP 2”)、Macrosailin、Endolyn、LAMP5或边缘系统相关膜蛋白(“LIMBIC”)。

[0057] 27.根据实施方式26所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自SEQ ID NO:1-113中的任一者。

[0058] 28.根据实施方式25或26所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白与SEQ ID NO:1-113具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性。

[0059] 29.根据实施方式26所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白是LAMP-1,并且其中所述HER2-LAMP的两个同源结构域包括LAMP-1同源结构域1和LAMP-1同源结构域2。

[0060] 30.根据实施方式29所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域1包含SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:199的核苷酸序列或与SEQ ID NO:199的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0061] 31.根据实施方式29或30所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域2包含SEQ ID NO:1的第228-381位残基或第228-382位残基或SEQ ID NO:1的第228-382位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第228-381位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:202的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:203的核苷酸序列或与SEQ ID NO:203的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0062] 32.根据实施方式25-31中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述HER2-LAMP在所述两个同源结构域中的至少一者与所述抗原结构域之间包含接头。

[0063] 33.根据实施方式32所述的分离的核酸分子,其中所述接头包含GPGPG或PMGLP的氨基酸序列。

[0064] 34.根据实施方式25-33中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述HER2-LAMP进一步包含LAMP蛋白的跨膜结构域。

[0065] 35.根据实施方式34所述的分离的核酸分子,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:1的第383-405位残基。

[0066] 36.根据实施方式25-35中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述HER2-LAMP进一步包含信号序列。

[0067] 37.根据实施方式36所述的分离的核酸分子,其中所述信号序列源自LAMP蛋白。

[0068] 38.根据实施方式25-37中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述HER2-LAMP进一步包含LAMP蛋白的胞质结构域。

[0069] 39.根据实施方式38所述的分离的核酸分子,其中所述胞质结构域包含SEQ ID

NO:1的第406-417位残基。

[0070] 40.根据实施方式25-39中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述抗原结构域包含SEQ ID NO:200的氨基酸序列或由SEQ ID NO:200的氨基酸序列组成。

[0071] 41.根据实施方式25-40中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述HER2-LAMP包含SEQ ID NO:1的第1-194位残基或SEQ ID NO:198的氨基酸序列,随后是SEQ ID NO:200的氨基酸序列,随后是SEQ ID NO:1的第228-381位残基或SEQ ID NO:202的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

[0072] 42.根据实施方式25-41中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述IREG包含CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33(或包含与SEQ ID NO:133、145、147、149、151、155、159、165、169、173、177、181、189、191、193、204、238、242、243、252或253中的任一者的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性的氨基酸序列)或其胞外结构域中的一者或多者,任选地其中所述CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23或IL-15与免疫球蛋白的Fc结构域融合,或者其中所述分离的核酸分子包含编码任选地与Fc结构域融合的CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列与SEQ ID NO:134、146、148、150、152、160、166、170、174、178、182、190、192、194、205、239、244或881中的任一者的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性。

[0073] 43.根据实施方式25-42中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列与所述IREG异源。

[0074] 44.根据实施方式43所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列源自IgKVIII(例如SEQ ID NO:122)、Ig-κ(例如SEQ ID NO:120)、四连接素或IL-2。

[0075] 45.根据实施方式25-44中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽包括SPD和可溶性CD40L(sCD40L)的融合体、SPD和Flt3L的融合体、IL-12、IL-21、与Fc结构域融合的OX40L、与Fc结构域融合的CD80、或IL-15(例如包含与SEQ ID NO:233、238、242或252具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性的氨基酸序列,或包含与下述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:131的氨基酸序列,然后是SEQ ID NO:204、151、145、147、149、193、181、155、159、169、252或253之一的氨基酸序列),或者其中所述核酸包含编码SPD和可溶性CD40L(sCD40L)的融合体、SPD和Flt3L的融合体、IL-12、IL-21、与Fc结构域融合的OX40L、与Fc结构域融合的CD80、或IL-15的核苷酸序列(例如包含与下述序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性的核苷酸序列:SEQ ID NO:132,然后是SEQ ID NO:205、152、146、148、150、194、182、156、170或881之一)。

[0076] 46.根据实施方式45所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽在EF-1α核心启动子例如SEQ ID NO:124的启动子的控制下表达。

[0077] 47.一种组合物,其包含根据实施方式25-46中任一者所述的分离的核酸分子。

[0078] 48.一种宿主细胞,其包含根据实施方式25-46中任一者所述的分离的核酸。

[0079] 49.一种组合物,其包含根据实施方式48所述的宿主细胞。

[0080] 50.一种治疗患有癌症的受试者的方法,其中所述方法包括以足以在所述受试者中治疗所述癌症或诱导针对所述癌症的免疫应答的量向所述受试者施用根据实施方式25-46中任一者所述的分离的核酸分子、根据实施方式47所述的组合物或根据实施方式48所述的宿主细胞。

[0081] 51.根据实施方式50所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用至少一种第二治疗剂。

[0082] 52.一种分离的核酸分子,其包含:

[0083] a.第一多核苷酸序列,其编码包含LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域和包含冠状病毒刺突蛋白抗原的抗原结构域的多肽(合称为“刺突-LAMP”),其中所述抗原结构域被放置在所述两个LAMP同源结构域之间;和

[0084] b.第二多肽序列,其编码至少一种包含免疫应答增强基因多肽(IREG)或IREG的包含分泌信号序列的胞外结构域的第二多肽。

[0085] 53.根据实施方式52所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、溶酶体整合膜蛋白-2(“LIMP 2”)、Macrosailin、Endolyn、LAMP5或边缘系统相关膜蛋白(“LIMBIC”)。

[0086] 54.根据实施方式53所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自SEQ ID NO:1-113中的任一者。

[0087] 55.根据实施方式52或53所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白与SEQ ID NO:1-113具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性。

[0088] 56.根据实施方式53所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白是LAMP-1,并且其中所述刺突-LAMP的两个同源结构域包括LAMP-1同源结构域1和LAMP-1同源结构域2。

[0089] 57.根据实施方式56所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域1包含SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:199的核苷酸序列或与SEQ ID NO:199的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0090] 58.根据实施方式56或57所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域2包含SEQ ID NO:1的第228-381位残基或第228-382位残基或SEQ ID NO:1的第228-382位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第228-381位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:202的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:203的核苷酸序列或与SEQ ID NO:203的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0091] 59.根据实施方式52-58中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述刺突-LAMP在

所述两个同源结构域中的至少一者与所述抗原结构域之间包含接头。

[0092] 60.根据实施方式59所述的分离的核酸分子,其中所述接头包含GPGPG或PMGLP的氨基酸序列。

[0093] 61.根据实施方式52-60中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述刺突-LAMP进一步包含LAMP蛋白的跨膜结构域。

[0094] 62.根据实施方式61所述的分离的核酸分子,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:1的第383-405位残基。

[0095] 63.根据实施方式52-62中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述刺突-LAMP进一步包含信号序列。

[0096] 64.根据实施方式63所述的分离的核酸分子,其中所述信号序列源自LAMP蛋白。

[0097] 65.根据实施方式52-64中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述刺突-LAMP进一步包含LAMP蛋白的胞质结构域。

[0098] 66.根据实施方式65所述的分离的核酸分子,其中所述胞质结构域包含SEQ ID NO:1的第406-417位残基。

[0099] 67.根据实施方式52-66中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述抗原结构域包含刺突S1和/或S2或包含SEQ ID NO:118或119的序列的氨基酸序列。

[0100] 68.根据实施方式52-67中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述刺突-LAMP包含SEQ ID NO:1的第1-194位残基或SEQ ID NO:198的氨基酸序列,然后是SEQ ID NO:231的氨基酸序列,然后是SEQ ID NO:1的第228-381位残基或SEQ ID NO:202的氨基酸序列,或者由所述氨基酸序列组成。

[0101] 69.根据实施方式52-68中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述IREG包含CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33(或包含与SEQ ID NO:133、145、147、149、151、155、159、165、169、173、177、181、189、191、204、238、242、243、252或253中的任一者的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性的氨基酸序列)或其胞外结构域中的一者或多者,任选地其中所述CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23或IL-15与免疫球蛋白的Fc结构域融合,或者其中所述分离的核酸分子包含编码任选地与Fc结构域融合的CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列与SEQ ID NO:134、146、148、150、152、160、166、170、174、178、182、190、192、205、239、244或881中的任一者的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性。

[0102] 70.根据实施方式52-68中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽包含SPD-sCD40L融合多肽。

[0103] 71.根据实施方式52-70中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列与所述IREG异源。

[0104] 72.根据实施方式71所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列源自SPD。

[0105] 73.根据实施方式52-72中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽在EF-1α核心启动子例如SEQ ID NO:124的启动子的控制下表达。

[0106] 74.一种组合物,其包含根据实施方式52-73中任一者所述的分离的核酸分子。

[0107] 75.一种宿主细胞,其包含根据实施方式52-73中任一者所述的分离的核酸。

[0108] 76.一种组合物,其包含根据实施方式75所述的宿主细胞。

[0109] 77.一种治疗患有冠状病毒感染(例如来自COVID-19)或具有发生冠状病毒感染(例如来自COVID-19)的风险的受试者的方法,其中所述方法包括以足以治疗所述冠状病毒感染(例如COVID-19)或预防其发作或降低其症状的严重程度的量向所述受试者施用根据实施方式52-73中任一者所述的分离的核酸分子、根据实施方式74所述的组合物或根据实施方式75所述的宿主细胞。

[0110] 78.一种在受试者中诱导针对冠状病毒例如SARS Co-V2的免疫应答的方法,其中所述方法包括以足以在所述受试者中诱导针对所述冠状病毒例如SARS Co-V2的免疫应答的量向所述受试者施用根据实施方式52-73中任一者所述的分离的核酸分子、根据实施方式74所述的组合物或根据实施方式75所述的宿主细胞。

[0111] 79.一种分离的核酸分子,其包含:

[0112] a.第一多核苷酸序列,其编码包含LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域和包含NY-ESO1或CD161蛋白抗原的抗原结构域的多肽(“NY-ESO1-LAMP”或“CD161-LAMP”LAMP-抗原构建体),其中所述抗原结构域被放置在所述两个LAMP同源结构域之间;和

[0113] b.第二多肽序列,其编码至少一种包含免疫应答增强基因多肽(IREG)或IREG的包含分泌信号序列的胞外结构域的第二多肽。

[0114] 80.根据实施方式79所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、溶酶体整合膜蛋白-2(“LIMP 2”)、Macrosailin、Endolyn、LAMP5或边缘系统相关膜蛋白(“LIMBIC”)。

[0115] 81.根据实施方式80所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自SEQ ID NO:1-113中的任一者。

[0116] 82.根据实施方式79或80所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白与SEQ ID NO:1-113具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性。

[0117] 83.根据实施方式79所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白是LAMP-1,并且其中所述NY-ESO1-LAMP或CD161-LAMP的两个同源结构域包括LAMP-1同源结构域1和LAMP-1同源结构域2。

[0118] 84.根据实施方式83所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域1包含SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:199的核苷酸序列或与SEQ ID NO:199的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0119] 85.根据实施方式83或84所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域2包含SEQ ID NO:1的第228-381位残基或第228-382位残基或SEQ ID NO:1的第228-382位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第228-381位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:202的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、

至少97％、至少98％或至少99％同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:203的核苷酸序列或与SEQ ID NO:203的核苷酸序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0120] 86.根据实施方式79-85中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体在所述两个同源结构域中的至少一者与所述抗原结构域之间包含接头。

[0121] 87.根据实施方式86所述的分离的核酸分子,其中所述接头包含GPGPG或PMGLP的氨基酸序列。

[0122] 88.根据实施方式79-87中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体进一步包含LAMP蛋白的跨膜结构域。

[0123] 89.根据实施方式88所述的分离的核酸分子,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:1的第383-405位残基。

[0124] 90.根据实施方式79-89中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体进一步包含信号序列。

[0125] 91.根据实施方式90所述的分离的核酸分子,其中所述信号序列源自LAMP蛋白。

[0126] 92.根据实施方式79-91中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体进一步包含LAMP蛋白的胞质结构域。

[0127] 93.根据实施方式92所述的分离的核酸分子,其中所述胞质结构域包含SEQ ID NO:1的第406-417位残基。

[0128] 94.根据实施方式79-93中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体包含下述氨基酸序列或由下述氨基酸序列组成:SEQ ID NO:1的第1-194位残基或SEQ ID NO:198的氨基酸序列,然后是SEQ ID NO:223的氨基酸序列,然后是SEQ ID NO:1的第228-381位残基或SEQ ID NO:202的氨基酸序列,或SEQ ID NO:1的第1-194位残基或SEQ ID NO:198的氨基酸序列,然后是SEQ ID NO:236的氨基酸序列,然后是SEQ ID NO:1的第228-381位残基或SEQ ID NO:202的氨基酸序列。

[0129] 95.根据实施方式79-94中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述IREG包含CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33(或包含与SEQ ID NO:133、145、147、149、151、155、159、165、169、173、177、181、189、191、204、238、242、243、252或253中的任一者的氨基酸序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性或100％同一性的氨基酸序列)或其胞外结构域中的一者或多者,任选地其中所述CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23或IL-15与免疫球蛋白的Fc结构域融合,或者其中所述分离的核酸分子包含编码任选地与Fc结构域融合的CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列与SEQ ID NO:134、146、148、150、152、160、166、170、174、178、182、190、192、205、239、244或881中的任一者的核苷酸序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性或100％同一性。

[0130] 96.根据实施方式79-95中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽包含SPD-sCD40L融合多肽或IL-15多肽(例如SEQ ID NO:233或169或225)。

[0131] 97.根据实施方式79-96中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列

与所述IREG异源。

[0132] 98.根据实施方式97所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列源自SPD或包含SEQ ID NO:120或122。

[0133] 99.根据实施方式79-98中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽在EF-1α核心启动子例如SEQ ID NO:124的启动子的控制下表达。

[0134] 100.一种组合物,其包含根据实施方式79-99中任一者所述的分离的核酸分子。

[0135] 101.一种宿主细胞,其包含根据实施方式79-99中任一者所述的分离的核酸。

[0136] 102.一种组合物,其包含根据实施方式101所述的宿主细胞。

[0137] 103.一种在有需要的受试者中诱导免疫应答的方法,所述方法包括以足以在所述受试者中诱导免疫应答的量向所述受试者施用根据实施方式79-99中任一者所述的分离的核酸分子、根据实施方式100所述的组合物或根据实施方式101所述的宿主细胞。

[0138] 104.一种分离的核酸分子,其包含:

[0139] a.第一多核苷酸序列,其编码包含LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域和抗原结构域的多肽,所述抗原结构域包含pp65抗原(例如包含SEQ ID NO:291、292或293),并任选地进一步包含gB抗原(例如包含SEQ ID NO:294、295、296或297)和1E1抗原(例如包含SEQ ID NO:298、299或300)中的一者或两者,任选地在所述pp65与所述gB和/或1E1抗原序列之间包含接头肽(合称为“pp65-LAMP”),其中所述抗原结构域被放置在所述两个LAMP同源结构域之间;和

[0140] b.第二多肽序列,其编码至少一种包含免疫应答增强基因多肽(IREG)或IREG的包含分泌信号序列的胞外结构域的第二多肽。

[0141] 105.根据实施方式104所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、溶酶体整合膜蛋白-2(“LIMP 2”)、Macrosailin、Endolyn、LAMP5或边缘系统相关膜蛋白(“LIMBIC”)。

[0142] 106.根据实施方式105所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自SEQ ID NO:1-113中的任一者。

[0143] 107.根据实施方式104或105所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白与SEQ ID NO:1-113具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性。

[0144] 108.根据实施方式105所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白是LAMP-1,并且其中所述HER2-LAMP的两个同源结构域包括LAMP-1同源结构域1和LAMP-1同源结构域2。

[0145] 109.根据实施方式108所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域1包含SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:199的核苷酸序列或与SEQ ID NO:199的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0146] 110.根据实施方式108或109所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域2包含SEQ ID NO:1的第228-381位残基或第228-382位残基或SEQ ID NO:1的第228-382

位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第228-381位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:202的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:203的核苷酸序列或与SEQ ID NO:203的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0147] 111.根据实施方式104-110中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述pp65-LAMP在所述两个同源结构域中的至少一者与所述抗原结构域之间包含接头。

[0148] 112.根据实施方式111所述的分离的核酸分子,其中所述接头包含GPGPG或PMGLP的氨基酸序列。

[0149] 113.根据实施方式104-112中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述pp65-LAMP进一步包含LAMP蛋白的跨膜结构域。

[0150] 114.根据实施方式113所述的分离的核酸分子,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:1的第383-405位残基。

[0151] 115.根据实施方式104-114中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述pp65-LAMP进一步包含信号序列。

[0152] 116.根据实施方式115所述的分离的核酸分子,其中所述信号序列源自LAMP蛋白。

[0153] 117.根据实施方式104-116中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述pp65-LAMP进一步包含LAMP蛋白的胞质结构域。

[0154] 118.根据实施方式117所述的分离的核酸分子,其中所述胞质结构域包含SEQ ID NO:1的第406-417位残基。

[0155] 119.根据实施方式104-118中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述IREG包含CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33(或包含与SEQ ID NO:133、145、147、149、151、155、159、165、169、173、177、181、189、191、204、238、242、243、252或253中的任一者的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性的氨基酸序列)或其胞外结构域中的一者或多者,任选地其中所述CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23或IL-15与免疫球蛋白的Fc结构域融合,或者其中所述分离的核酸分子包含编码任选地与Fc结构域融合的CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列与SEQ ID NO:134、146、148、150、152、160、166、170、174、178、182、190、192、205、239、244或881中的任一者的核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或100%同一性。

[0156] 120.根据实施方式104-119中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列与所述IREG异源。

[0157] 121.根据实施方式120所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列源自IgKVIII(例如SEQ ID NO:122)、Ig-κ(例如SEQ ID NO:120)、四连接素或IL-2。

[0158] 122.根据实施方式104-121中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽包括SPD和可溶性CD40L(sCD40L)的融合体、SPD和Flt3L的融合体、IL-12、IL-21、与Fc结构域融合的OX40L、与Fc结构域融合的CD80、或IL-15(例如包含与SEQ ID NO:233、238、242或

252具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性或100％同一性的氨基酸序列,或包含与下述氨基酸序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性或100％同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:131的氨基酸序列,然后是SEQ ID NO:204、151、145、147、149、193、181、155、159、169、252或253之一的氨基酸序列),或者其中所述核酸包含编码SPD和可溶性CD40L(sCD40L)的融合体、SPD和Flt3L的融合体、IL-12、IL-21、与Fc结构域融合的OX40L、与Fc结构域融合的CD80、或IL-15的核苷酸序列(例如包含与下述序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性或100％同一性的核苷酸序列:SEQ ID NO:132,然后是SEQ ID NO:205、152、146、148、150、194、182、156、170或881之一)。

[0159] 123.根据实施方式122所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽在EF-1α核心启动子例如SEQ ID NO:124的启动子的控制下表达。

[0160] 124.一种组合物,其包含根据实施方式104-123中任一者所述的分离的核酸分子。

[0161] 125.一种宿主细胞,其包含根据实施方式104-123中任一者所述的分离的核酸。

[0162] 126.一种组合物,其包含根据实施方式125所述的宿主细胞。

[0163] 127.一种治疗患有癌症的受试者的方法,其中所述方法包括以足以在所述受试者中治疗所述癌症或诱导针对所述癌症的免疫应答的量向所述受试者施用根据实施方式104-123中任一者所述的分离的核酸分子、根据实施方式124所述的组合物或根据实施方式125所述的宿主细胞。

[0164] 128.根据实施方式127所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用至少一种第二治疗剂。

[0165] 129.根据实施方式127或128所述的方法,其中所述癌症选自成胶质细胞瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌和头颈癌。

[0166] 130.一种分离的核酸分子,其包含:

[0167] a.第一多核苷酸序列,其编码包含LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域和包含大T抗原(例如包含SEQ ID NO:254、255或256的氨基酸序列)的抗原结构域的多肽(“大T-LAMP”),其中所述抗原结构域被放置在所述两个LAMP同源结构域之间;和

[0168] b.第二多肽序列,其编码至少一种包含免疫应答增强基因多肽(IREG)或IREG的包含分泌信号序列的胞外结构域的第二多肽。

[0169] 131.根据实施方式130所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、溶酶体整合膜蛋白-2(“LIMP 2”)、Macrosailin、Endolyn、LAMP5或边缘系统相关膜蛋白(“LIMBIC”)。

[0170] 132.根据实施方式131所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自SEQ ID NO:1-113中的任一者。

[0171] 133.根据实施方式130或131所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白与SEQ ID NO:1-113具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的同一性。

[0172] 134.根据实施方式131所述的分离的核酸分子,其中所述LAMP蛋白是LAMP-1,并且其中所述HER2-LAMP的两个同源结构域包括LAMP-1同源结构域1和LAMP-1同源结构域2。

[0173] 135.根据实施方式134所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域1包

含SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第29-194位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:198的第29-195位残基的氨基酸序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:199的核苷酸序列或与SEQ ID NO:199的核苷酸序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0174] 136.根据实施方式134或135所述的分离的核酸分子,其中所述人LAMP-1同源结构域2包含SEQ ID NO:1的第228-381位残基或第228-382位残基或SEQ ID NO:1的第228-382位残基的氨基酸序列,或包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的第228-381位残基的氨基酸序列或SEQ ID NO:202的氨基酸序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性的氨基酸序列,或者其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:203的核苷酸序列或与SEQ ID NO:203的核苷酸序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性的核苷酸序列(其中如果所述核苷酸序列是RNA,则T被U代替)。

[0175] 137.根据实施方式130-136中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述大T-LAMP在所述两个同源结构域中的至少一者与所述抗原结构域之间包含接头。

[0176] 138.根据实施方式137所述的分离的核酸分子,其中所述接头包含GPGPG或PMGLP的氨基酸序列。

[0177] 139.根据实施方式130-138中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述大T-LAMP进一步包含LAMP蛋白的跨膜结构域。

[0178] 140.根据实施方式140所述的分离的核酸分子,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:1的第383-405位残基。

[0179] 141.根据实施方式130-140中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述pp65-LAMP进一步包含信号序列。

[0180] 142.根据实施方式141所述的分离的核酸分子,其中所述信号序列源自LAMP蛋白。

[0181] 143.根据实施方式130-142中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述大T-LAMP进一步包含LAMP蛋白的胞质结构域。

[0182] 144.根据实施方式143所述的分离的核酸分子,其中所述胞质结构域包含SEQ ID NO:1的第406-417位残基。

[0183] 145.根据实施方式130-144中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述IREG包含CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33(或包含与SEQ ID NO:133、145、147、149、151、155、159、165、169、173、177、181、189、191、204、238、242、243、252或253中的任一者的氨基酸序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性或100％同一性的氨基酸序列)或其胞外结构域中的一者或多者,任选地其中所述CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23或IL-15与免疫球蛋白的Fc结构域融合,或者其中所述分离的核酸分子包含编码任选地与Fc结构域融合的CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列与SEQ ID NO:134、146、148、150、152、160、166、170、174、178、182、190、192、205、239、244或881中的任一者的核苷酸序列具

有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性或100％同一性。

[0184] 146.根据实施方式130-145中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列与所述IREG异源。

[0185] 147.根据实施方式146所述的分离的核酸分子,其中所述分泌信号序列源自IgKVIII(例如SEQ ID NO:122)、Ig-κ(例如SEQ ID NO:120)、四连接素或IL-2。

[0186] 148.根据实施方式130-147中任一者所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽包括SPD和可溶性CD40L(sCD40L)的融合体、SPD和Flt3L的融合体、IL-12、IL-21、与Fc结构域融合的OX40L、与Fc结构域融合的CD80、或IL-15(例如包含与SEQ ID NO:233、238、242或252具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性或100％同一性的氨基酸序列,或包含与下述氨基酸序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性或100％同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:131的氨基酸序列,然后是SEQ ID NO:204、151、145、147、149、193、181、155、159、169、252或253之一的氨基酸序列),或者其中所述核酸包含编码SPD和可溶性CD40L(sCD40L)的融合体、SPD和Flt3L的融合体、IL-12、IL-21、与Fc结构域融合的OX40L、与Fc结构域融合的CD80、或IL-15的核苷酸序列(例如包含与下述序列具有至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性或100％同一性的核苷酸序列:SEQ ID NO:132,然后是SEQ ID NO:205、152、146、148、150、194、182、156、170或881之一)。

[0187] 149.根据实施方式148所述的分离的核酸分子,其中所述第二多肽在EF-1α核心启动子例如SEQ ID NO:124的启动子的控制下表达。

[0188] 150.一种组合物,其包含根据实施方式130-149中任一者所述的分离的核酸分子。

[0189] 151.一种宿主细胞,其包含根据实施方式130-149中任一者所述的分离的核酸。

[0190] 152.一种组合物,其包含根据实施方式151所述的宿主细胞。

[0191] 153.一种治疗患有癌症的受试者的方法,其中所述方法包括以足以在所述受试者中治疗所述癌症或诱导针对所述癌症的免疫应答的量向所述受试者施用根据实施方式130-149中任一者所述的分离的核酸分子、根据实施方式150所述的组合物或根据实施方式151所述的宿主细胞。

[0192] 154.根据实施方式153所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用至少一种第二治疗剂。

[0193] 155.根据实施方式153或154所述的方法,其中所述癌症是皮肤癌,例如梅克尔细胞癌。

[0194] 156.根据实施方式1-19、25-46、52-73、79-99、104-123或130-149中任一者所述的分离的核酸,其中所述分离的核酸包括DNA、mRNA或自扩增RNA。

[0195] 157.一组多肽,其由根据实施方式1-19、25-46、52-73或79-99、104-123或130-149中任一者所述的分离的核酸编码。

[0196] 其他目的和优点将在下面的描述中部分阐述,并且将部分从所述描述中理解,或者可以通过实践学会。所述目的和优点将利用在权利要求书中特别指出的要素和组合来实现和获得。

[0197] 应当理解,上面的一般性描述和下面的详细描述仅仅是示例性和解释性的,并不限制权利要求书。

[0198] 并入本说明书并构成本说明书一部分的附图说明了一个(几个)实施方式,并与所述描述一起用于解释本文描述的原理。

附图说明

[0199] 参考下面的详细描述和附图,可以更好地理解本公开的目的和特征。

[0200] 图1示出了可以如本文中所述使用的不同类型的改进的LAMP-抗原构建体(被鉴定为ILC-1、ILC-2、ILC-3、ILC-4、ILC-5和ILC-6)的总体方案。某些骨架构建体被进一步描述在整体通过引用并入本文的在美国专利第11,203,629号中。

[0201] 图2B示出了本文中定义的LAMP蛋白的结构域,而图2A定义了人LAMP-1(SEQ ID NO:1)、人LAMP-2(SEQ ID NO:2)、人LAMP-3(SEQ ID NO:3)、人LIMP-2(SEQ ID NO:4)、人Endolyn(SEQ ID NO:5)、人Macrosialin(SEQ ID NO:80)、人LAMP-5(SEQ ID NO:93)和人LIMBIC(SEQ ID NO:67)的这些结构域的具体氨基酸边界。正如本文中所述,所述LAMP腔内结构域、同源结构域、跨膜结构域、胞质尾区和信号序列可用于产生本文所描述的双顺反子LAMP构建体。

[0202] 图3提供了在其他物种中发现的LAMP-1蛋白与人LAMP-1(SEQ ID NO:1)相比的比对。这些其他物种的等效结构域可用于产生本文描述的双顺反子LAMP构建体,并且可以通过将图2和图3中为人LAMP-1鉴定的结构域与图3中示出的比对进行比较,容易地鉴定出来。

[0203] 图4提供了在其他物种中发现的LAMP-2蛋白与人LAMP-2(SEQ ID NO:2)相比的比对。这些其他物种的等效结构域可用于产生本文描述的双顺反子LAMP构建体,并且可以通过将图2和图4中为人LAMP-2鉴定的结构域与图4中示出的比对进行比较,容易地鉴定出来。

[0204] 图5提供了在其他物种中发现的LAMP-3蛋白与人LAMP-3(SEQ ID NO:3)相比的比对。这些其他物种的等效结构域可用于产生本文描述的双顺反子LAMP构建体,并且可以通过将图2和图5中为人LAMP-3鉴定的结构域与图5中示出的比对进行比较,容易地鉴定出来。

[0205] 图6提供了在其他物种中发现的LIMP-2蛋白与人LIMP-2(SEQ ID NO:4)相比的比对。这些其他物种的等效结构域可用于产生本文描述的双顺反子LAMP构建体,并且可以通过将图2和图6中为人LIMP-2鉴定的结构域与图6中示出的比对进行比较,容易地鉴定出来。

[0206] 图7提供了在其他物种中发现的LIMBIC蛋白与人LIMBIC(SEQ ID NO:67)相比的比对。这些其他物种的等效结构域可用于产生本文描述的双顺反子LAMP构建体,并且可以通过将图2和图7中为人LIMBIC鉴定的结构域与图7中示出的比对进行比较,容易地鉴定出来。

[0207] 图8提供了在其他物种中发现的Endolyn蛋白与人Endolyn(SEQ ID NO:5)相比的比对。这些其他物种的等效结构域可用于产生本文描述的双顺反子LAMP构建体,并且可以通过将图2和图8中为人Endolyn鉴定的结构域与图8中示出的比对进行比较,容易地鉴定出来。

[0208] 图9提供了在其他物种中发现的Macrosialin蛋白与人Macrosialin(SEQ ID NO:80)相比的比对。这些其他物种的等效结构域可用于产生本文描述的双顺反子LAMP构建体,并且可以通过将图2和图9中为人Macrosialin鉴定的结构域与图9中示出的比对进行比较,容易地鉴定出来。

[0209] 图10提供了在其他物种中发现的LAMP-5蛋白与人LAMP-5(SEQ ID NO:93)相比的比对。这些其他物种的等效结构域可用于产生本文描述的双顺反子LAMP构建体,并且可以

通过将图2和图10中为人LAMP-5鉴定的结构域与图10中示出的比对进行比较,容易地鉴定出来。

[0210] 图11示出了示例性双顺反子构建体HER2-LAMP-sCD40L的设计。

[0211] 图12示出了用双顺反子HER2-LAMP-sCD40L疫苗转染的293T细胞的上清液中sCD40L的检测。星号表示指示了sCD40L存在的蛋白质条带。使用生物素化抗CD40L抗体的免疫沉淀实验被用于检测对照293T细胞、用双顺反子HER2-LAMP-sCD40L转染的293T细胞或用表达GFP的对照载体转染的293T细胞中的sCD40L。细胞培养上清液被用作输入(I)。穿流物(FT)表示未与生物素化抗CD40L抗体结合的蛋白质,而结合的(B)表示与生物素化抗CD40L抗体结合的蛋白质。

[0212] 图13A-D示出了在用ITI-双顺反子疫苗或2-V COVID疫苗免疫接种一次(图13A-B)或免疫接种两次(图13C-D)后小鼠中的刺突特异性T细胞应答的检测。图13A和13C:ELISPOT。图13B和13D:斑点计数。CV=对照载体(单独的质粒)。SFC=斑点形成细胞。使用Student T检验来确定显著性。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。

[0213] 图14示出了通过流式细胞术检测刺突特异性CD4和CD8 T细胞。在用2-V疫苗进行疫苗接种后,CD4+和CD8+T细胞应答均增强。

[0214] 图15示出了CD4+和CD8+T细胞中IFNγ、TNFα和IL-2的细胞内细胞因子染色(ICS)。

[0215] 图16A-F示出了在用ITI-双顺反子疫苗或2-V疫苗免疫接种一次(图16A、16C和16E)相比于免疫接种两次(图16B、16D和16F)后S1特异性抗体的测量值。使用Student T检验来确定显著性。

[0216] 图17A-B示出了在转染的293T细胞的上清液中HER2-LAMP-sCD40L的检测。图17A示出了用于ELISA的sCD40L标准曲线。图17B示出了上清液中sCD40L的检测。对照细胞=未用双顺反子构建体转染的细胞。

[0217] 图18A-F示出了双顺反子疫苗能够引发强烈的T细胞和抗体应答。图18A示出了示例性疫苗接种计划,其中小鼠通过真皮内(ID)注射20μg对照载体、HER2-LAMP或双顺反子HER2-LAMP-sCD40L进行免疫接种。图18B示出了IFNγ斑点形成细胞(ELISPOT)。图18C示出了IFNγ斑点形成细胞平均值±SEM。图18D-F示出了通过ELISA检测的HER2特异性总IgG(图18D)、IgG1(图18E)和IgG2a(图18F);N=7。单向ANOVA被用于统计分析。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

[0218] 图19A-B示出了在CD4和CD8 T细胞中细胞因子IFNγ(IFNg)、TNFα(TNFa)和IL-2的细胞内染色。图19A示出了染色细胞的%的平均值±SEM。图19B示出了代表性FACS图。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。

[0219] 图20示出了通过ELISA确定的HER2特异性抗体应答。

[0220] 图21A-B示出了HER2-LAMP-sCD40L保护小鼠免于表达HER2的乳腺肿瘤。图21A示出了ELISPOT的结果。图21B示出了使用卡尺测量的肿瘤尺寸。

[0221] 图22A-B示出了HER2-LAMP-sCD40L在小鼠中提高存活率。图22A示出了实验设计的示意图。图22B示出了在单个实验中在肿瘤激惹后的小鼠存活率。N=10。

[0222] 图23示出了具有免疫应答增强基因(IREG)的HER2-LAMP疫苗(HER2-LAMP-IREG)对肿瘤体积的影响。IREG=CD40L、Flt3L、IL-21、IL-12和OX40L。**p<0.01;****p<0.0001。

[0223] 图24示出了HER2-LAMP-IREG对小鼠存活率的影响。

[0224] 图25示出了HER2-LAMP-IL-15诱导强烈的抗原特异性抗体应答,正如通过ELISA所确定的。每组N＝5。T-检验被用于统计分析。*p<0.05,**p<0.01。

[0225] 图26示出了HER2-LAMP-IL-15引发强烈的T细胞应答,正如通过ELISPOT所确定的。数据表示IFNγ斑点形成细胞平均值±SEM。N＝5。T-检验被用于统计分析。*p<0.05,**p<0.01。

[0226] 图27A-B示出了两剂HER2-LAMP-IL-15引发强烈的T细胞应答,正如通过ELISPOT所确定的。数据表示原始斑点(图27A)和IFNγ斑点形成细胞平均值±SEM(图27B)。N＝5。T-检验被用于统计分析。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

[0227] 图28A-C涉及包含SARS CoV-2S1刺突蛋白的第一代双顺反子LAMP构建体。图28A示出了编码第一代双顺反子LAMP构建体(基于ILC-4)的载体(双顺反子-S1-LAMP-EF1 IgK-S2P;7427bp)的总体方案,所述构建体包含SARS CoV-2S1刺突蛋白的片段作为靶抗原,并包含用于表达可操作地连接到Ig-κ前导序列(分泌信号)的SARS CoV-2S2刺突蛋白(作为用于分泌的第二抗原)的表达盒。图28B是第一代ITI-COVID双顺反子构建体的另一种表示(作为环状质粒),示出了编码序列的多核苷酸的排布的代表性、但优选的实例。图28C示出了所述第一代ITI-COVID双顺反子构建体的完整多核苷酸和编码的多肽结构域。

[0228] 图29A-D示出了在鼠类TSA乳腺癌模型中,与对照(CV)和非双顺反子HER2-LAMP载体相比,作为DNA载体施用的双顺反子HER2-LAMP-sCD40L(可溶性CD40配体)对肿瘤生长的抑制。图29A示出了实验方案。图29B示出了每只小鼠的肿瘤生长变化,而图29C示出了每个组(对照、HER2-LAMP和HER2-LAMP-sCD40L)中的7只小鼠的肿瘤生长变化。对照(CV;最上方的曲线)用实心圆圈描绘;HER2-LAMP(图29C中的中间曲线)用实心正方形描绘;HER2-LAMP-sCD40L(图29C中的底部曲线)用实心三角形描绘。图29D示出了在实验终止时测量的肿瘤重量(*表示p<0.05,而**表示p<0.01)。

[0229] 图30示出了与对照载体相比,HER2-LAMP-sCD40L诱导CD3+记忆T细胞的产生。

[0230] 图31A-C示出了与HER2-LAMP和对照载体相比,HER2-LAMP-sCD40L促进T细胞在肿瘤微环境中的浸润。图31A示出了在获取、清洁和解离肿瘤后,肿瘤中CD3+T细胞的数量。图31B示出了CD4+T细胞的数量。图31C示出了CD8+T细胞的数量。*表示p<0.05,而**表示p<0.01。

[0231] 图32A-C示出了由HER2-LAMP-sCD40L载体产生的可溶性CD40配体(sCD40L)在引流淋巴结中增强产生IL-12的1型树突状细胞(DC1)的活化。图32A示出了在所述实验中使用的门选方案,而图32B示出了表达CD8的DC1细胞,图32C示出了产生IL-12的DC1细胞。*表示p<0.05。

[0232] 图33A-B示出了双顺反子HER2-LAMP-sCD40L在肿瘤微环境中激活炎性信号。具体而言,图33A示出了在获取、清洁和解离肿瘤后,肿瘤中CD4+CD69+细胞的数量,并且图33B示出了肿瘤中CD8+CD69+细胞的数量。*表示p<0.05。

[0233] 图34A-B示出了双顺反子HER2-LAMP-sCD40L在肿瘤微环境中促进产生PD-1的T细胞。具体而言,图33A示出了在获取、清洁和解离肿瘤后,肿瘤中CD4+PD-1+细胞的数量,并且图33B示出了肿瘤中CD8+PD-1+细胞的数量。*表示p<0.05,而**表示p<0.01。

[0234] 图35示出了在将脾细胞与HER2胞外结构域的几种不同合并肽温育后,遵照图29A中描述的方案对来自小鼠的脾细胞进行的ELISPOT分析的结果。结果显示与对照或HER2-

LAMP构建体相比,双顺反子HER2-LAMP-sCD40L针对某些合并的HER2肽诱导更强的应答。

[0235] 图36示出了来自图29A-C中描述的实验的平行实验的结果,每个对照、HER2-LAMP和HER2-LAMP-sCD40L组使用5只小鼠,证实了双顺反子构建体与另外两个组相比更多地抑制肿瘤生长,$p<0.05$。

[0236] 图37A-D示出了来自图36中示出的实验的脾细胞的FACS分析的结果(遵照图29A的方案),并示出了HER2-LAMP-sCD40L在脾脏中诱导多功能CD4效应记忆T细胞("TEM"细胞)。图37A示出了CD4 TEM细胞的百分率;图37B示出了CD8 TEM细胞的百分率。在条形图中指示了表达IFNg、TNFa或IFNg和TNFa两者的CD4或CD8 TEM细胞的量。其余的图示出了表达IFNg和TNFa两者的CD4TEM细胞(图37C)或CD8 TEM细胞(图37D)对合并的HER2肽的响应。*$P<0.05$,**$p<0.01$,****$p<0.0001$。

[0237] 图38A-B示出了在图29A的鼠类TSA模型中,从HER2-LAMP-sCD40L构建体表达的可溶性CD40L增强脾脏中DC1树突状细胞的活化。FACS门选策略示出在图38A中,而DC1树突状细胞的百分率示出在图38B中。*表示$p<0.05$,而**表示$p<0.01$。

[0238] 图39A-B示出了细胞染色实验的结果,表明在图29A的鼠类TSA模型中,从HER2-LAMP-sCD40L构建体表达的可溶性CD40L增加肿瘤中CD4+(图39A)和CD8+T细胞(图39B)的存在。

[0239] 图40A-B示出了其中将小鼠用对照载体(CV)、Her2-LAMP(即HER2-铰链-LAMP)、Her2-LAMP-sCD40L、Her2-LAMP-mFlt3L或Her2-LAMP-sCD40L与Her2-LAMP-mFlt3L两者的组合注射(每组7只小鼠),然后对脾细胞进行ELISPOT分析的实验的结果。图40A示出了每个组的IFNg形成细胞平均值+/-SEM,而图40B示出了来自所述5个组中的每个组的识别各种HER2肽合并物的细胞的数量。

[0240] 图41示出了图40A的每个组通过ELISA确定的抗体滴度。

[0241] 图42A-D示出了在图40A的实验后,识别各种HER2胞外结构域肽合并物的各种CD4和CD8 TEM细胞的百分率,具体而言是CD8IFNg TNFa细胞(图42A)、CD8 IFNg细胞(图42B)、CD4 IFNg TNFa细胞(图42C)和CD4 IFNg细胞(图42D)。

[0242] 图43示出了通过ELISA所测量的两种双顺反子构建体HER2-LAMP-IL-12和HER2-LAMP-mFlt3L的组合施用对血清抗体滴度的影响。

具体实施方式

[0243] 本公开涵盖了例如编码双顺反子或多顺反子LAMP构建体的核酸分子,其可用于产生疫苗和/或用于产生抗体和/或体液免疫应答。所述核酸分子可用于诱导免疫应答。在一个方面,本公开提供了通过提供本文描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子(例如质粒或载体)来治疗患有过敏、感染性疾病例如冠状病毒或Covid-19、糖尿病、癌症或过度增殖性病症的受试者。所述编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子也可用于在非人脊椎动物、优选为非人哺乳动物中产生抗体。

[0244] A.定义

[0245] 为在下面的书面描述中使用的特定术语提供了下述定义。

[0246] 除非上下文另有明确规定,否则在本说明书和权利要求书中使用的没有具体数目的指称包括复数指称物。例如,术语"细胞"包括多种细胞,包括其混合物。术语"核酸分子"

包括多个核酸分子。

[0247] 本文所使用的术语“包含”意指核酸分子或双顺反子LAMP构建体和方法包括所叙述的要素,但不排除其他要素。在氨基酸或核苷酸序列的情况下,这意味着可以向所述序列的任一末端添加其他序列元件。当用于定义核酸分子、双顺反子LAMP构建体和方法时,“基本上由……组成”意味着排除对所述组合或其功能具有任何本质重要性的其他要素。因此,基本上由本文所定义的元件组成的双顺反子LAMP构建体不排除来自分离和纯化方法的痕量污染物以及药学上可接受的载体例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等。“由……组成”意味着排除其他成分的超过痕量的要素和用于施用本文描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子的实质性方法步骤。在氨基酸或核苷酸序列的情况下,“由……组成”表示不向所述序列的任一末端添加其他序列元件,但所叙述的序列允许并入生理上发生的氨基酸或核苷酸的修饰,例如DNA甲基化或糖基化等。由这些过渡性术语中的每一者定义的实施方式都在本公开的范围之内。

[0248] 术语“约”或“大约”意指在本领域普通技术人员所确定的特定值的可接受范围之内,所述范围将部分取决于所述值如何测量或确定,例如测量系统的限制。例如,“约”可以表示给定值的至多20%、优选地至多10%、更优选地至多5%、更优选地至多1%的范围。或者,特别是对于生物系统或过程而言,所述术语可以意指在值的一个数量级以内,优选地在5倍以内,更优选地在2倍以内。除非另有说明,否则术语“约”意指在特定值的可接受误差范围之内,例如±1-20%、优选地±1-10%、更优选地±1-5%之内。

[0249] 在提供值的范围的情况下,应当理解的是,在该范围的上限和下限之间的每个居间值以及该陈述范围内的任何其他陈述的或居间的值都被涵盖在本公开之内。这些较小的范围的上限和下限可以被独立地包括在所述较小范围内,并且也涵盖在在本公开之内,前提是排除所陈述的范围内任何具体排除的限值。在所陈述的范围包括一个或两个限值的情况下,排除这两个所包括的限值的范围也包括在本公开中。

[0250] 本文所使用的“溶酶体/内体区室”是指膜结合的酸性液泡,其含有在膜中的LAMP分子、在抗原加工中起作用的水解酶和用于抗原识别和呈递的II类MHC分子。该区室充当通过各种机制(包括内吞、吞噬和胞饮)中的任一者从细胞表面内化的外来物质以及通过专门的自溶现象递送到该区室的细胞内物质的降解位点(de Duve,Eur.J.Biochem.137:391,1983)。本文所使用的术语“内体”涵盖溶酶体。

[0251] 本文所使用的“溶酶体相关细胞器”是指包含溶酶体的任何细胞器,包括但不限于MIIC、CIIV、黑色素体、分泌颗粒、裂解颗粒、血小板致密颗粒、嗜碱性粒细胞颗粒、Birbeck颗粒、吞噬溶酶体、分泌溶酶体等。优选地,此类细胞器缺乏甘露糖6-磷酸受体并包含LAMP,但可以包含或可以不包含II类MHC分子。关于综述,参见例如Blott和Griffiths,Nature Reviews,Molecular Cell Biology,2002;Dell’Angelica等,The FASEB Journal 14:1265-1278,2000。

[0252] 本文所使用的术语“多核苷酸”和“核酸分子”可互换地用于指称任何长度的核苷酸的聚合物形式。多核苷酸可以含有脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和/或其类似物。因此,在某些情况下,本文中的双顺反子LAMP构建体核酸分子可以是DNA分子例如DNA载体,如DNA病毒载体,并且在其他情况下,它可以是RNA分子,包括自扩增RNA载体(也被称为自复制RNA载体)。

[0253] 核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行任何已知或未知的功能。取决于上下文,术语“多核苷酸”还包括例如单链、双链和三螺旋分子、基因或基因片段、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、反义分子、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、适体、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。核酸分子还可以包括修饰的核酸分子(例如包含修饰的碱基、糖和/或核苷酸间接头)。

[0254] 本文所使用的术语“肽”是指两个或更多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或肽模拟物的化合物。所述亚基可以通过肽键或其他键(例如酯、醚等)连接。

[0255] 本文所使用的术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括甘氨酸和D或L光学异构体,以及氨基酸类似物和肽模拟物。三个或更多个氨基酸的肽通常被称为寡肽(如果所述肽链短)。如果所述肽链长(例如大于约10个氨基酸),则所述肽通常被称为多肽或蛋白质。尽管术语“蛋白质”涵盖术语“多肽”,但“多肽”可以是小于全长的蛋白质。

[0256] 本文所使用的“LAMP蛋白”或“LAMP多肽”是指本文所描述的哺乳动物溶酶体相关膜蛋白人LAMP-1、人LAMP-2、人LAMP-3、人LIMP-2、人Endolyn、人LIMBIC、人LAMP-5或人Macrosialin中的任一者,以及直系同源物(例如图3-10中示出的LAMP蛋白)及其等位基因变体。除非另有明确说明,否则本文所使用的LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、LIMP 2、Macrosialin、Endolyn、LAMP5或LIMBIC是指图3-10中所注明的人类蛋白质及其等位基因变体。

[0257] 本文所使用的LAMP“同源结构域”至少包含图3-10中示出的4个均匀间隔的半胱氨酸残基。如图3-10中所示,这些半胱氨酸残基在每个同源结构域中被标记为1、2、3和4(并且在LIMP-2和Macrosialin中鉴定到五个半胱氨酸,在LIMBIC中鉴定到六个半胱氨酸,并且在Endolyn中鉴定到八个半胱氨酸),并在本文中被定义为“半胱氨酸保守片段”。在所述半胱氨酸保守片段的N-端末端和/或C-端末端可以包含额外的氨基酸,以产生直至并包括LAMP蛋白的完整同源结构域。这些额外添加的氨基酸可以源自所述半胱氨酸保守片段所源自的同源结构域或其他LAMP蛋白同源结构域。因此,本文所使用的LAMP同源结构域包含一个半胱氨酸保守片段和/或由一个半胱氨酸保守片段组成。至少两个LAMP同源结构域构成LAMP-1、LAMP-2、LAMP-3或Endolyn的腔内结构域。

[0258] 本文所使用的“表达”是指多核苷酸转录成mRNA和/或翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果所述多核苷酸源自基因组DNA,则表达可以包括从所述基因组DNA转录的mRNA的剪接。

[0259] 本文所使用的“在转录控制下”或“可操作地连接”是指由表达控制元件和编码序列的适当并置控制的多核苷酸序列的表达(例如转录或翻译)。在一个方面,当表达控制序列控制和调节核酸序列的转录时,该序列“可操作地连接”到所述表达控制序列。在另一种情况下,术语“可操作地连接”是指肽、多肽或蛋白质(例如表位或抗原)与信号序列(例如分泌信号序列)的连接,以使所述肽、多肽或者蛋白质从宿主细胞分泌。

[0260] 本文所使用的“信号序列”或“信号肽”表示内质网易位序列。该序列编码一种信号肽,其与细胞通信,以将与其连接(例如通过化学键)的多肽引导到内质网泡状区室,进入胞吐/内吞细胞器,递送到细胞泡状区室、细胞表面或分泌所述多肽。在多肽的成熟中,这种信号序列有时被细胞剪掉。可以发现信号序列与原核生物和真核生物天然的各种蛋白质相伴。“分泌信号序列”是指导致与其附连的多肽被细胞分泌的信号序列。

[0261] 本文所使用的“编码序列”是指当置于适合的表达控制序列的控制下时,被转录并

翻译成肽、多肽或蛋白质的序列。编码序列的边界由5'(氨基)端处的起始密码子和3'(羧基)端处的翻译终止密码子决定。编码序列可以包括但不限于原核序列、来自真核mRNA的cDNA、来自真核(例如哺乳动物)DNA的基因组DNA序列以及甚至合成的DNA序列。多聚腺苷酸化信号和转录终止序列通常位于编码序列的3'。

[0262] 当在本文中使用时,如果两个编码序列或其互补序列编码相同的氨基酸序列,则它们彼此"对应"。

[0263] 如本文所用,"转运"表示由双顺反子LAMP构建体编码的多肽以从粗面型内质网到内体/溶酶体区室或其中发生抗原加工和与MHC II的结合的相关细胞器的途径,通过细胞器或区室的运动或前进。

[0264] 本文所使用的术语"抗原"或"感兴趣的抗原"涵盖了由克隆到编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子中的多核苷酸序列编码的任何多肽序列,其被用于引发先天性或适应性免疫应答。"抗原"涵盖单个抗原以及多个抗原性序列(源自相同或不同蛋白质)两者。在某些情况下,"抗原"提供特定的"表位"或抗体识别位点。在某些情况下,"抗原"是"靶抗原",这意味着它代表了由患病细胞表达的特定蛋白质,例如由肿瘤细胞表达的肿瘤抗原,或来自感染性疾病的特定外来抗原,例如来自冠状病毒或其他类型病毒的刺突蛋白。在某些情况下,所述抗原在LAMP融合蛋白内表达,产生"LAMP-抗原构建体"。可以在本文中使用的LAMP-抗原构建体的不同排布在图1中作为ILC-1-ILC-6说明。

[0265] 本文所使用的"双顺反子LAMP构建体"、"包含抗原的双顺反子LAMP构建体"、"包含靶抗原的双顺反子LAMP构建体"、"包含感兴趣的抗原的双顺反子LAMP构建体"和"双顺反子LAMP-抗原构建体"可以互换使用,并且是指编码或表达两种多肽(即,包含LAMP-抗原构建体的第一多肽和第二多肽)的核酸构建体,所述第二多肽在某些实施方式中可以编码IREG多肽或第二抗原。在某些情况下,本文中的双顺反子LAMP构建体核酸分子可以是DNA分子例如DNA载体例如DNA病毒载体,并且在其他情况下它可以是RNA分子,包括自扩增RNA载体(也被称为自复制RNA载体)。在其他情况下,根据上下文,"双顺反子LAMP构建体"是指从核酸构建体中共同表达的多肽。

[0266] 本文所使用的"免疫应答元件"或"免疫应答增强基因"或"IREG"广义上是指编码可以在受试者中增强免疫应答例如体液和/或细胞免疫应答的蛋白质的基因。在某些情况下,缩写IREG也可用于指称此类基因的编码的多肽或此类蛋白质的胞外结构域,或包含此类蛋白质或胞外结构域的融合分子。IREG的实例包括某些细胞因子或免疫蛋白,例如CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33。

[0267] 本文所使用的"双顺反子LAMP构建体递送媒介"被定义为可以将编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子携带到宿主细胞中的任何分子或成组分子或大分子。

[0268] 本文所使用的"双顺反子LAMP构建体递送"或"双顺反子LAMP构建体转移"是指将编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子引入到宿主细胞中,而不管用于引入的方法如何。所述引入的核酸分子可以在所述宿主细胞中稳定或短暂地维持。稳定的维持通常要求引入的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子要么含有与所述宿主细胞相容的复制原点,要么整合到所述宿主细胞的复制子例如染色体外复制子(例如质粒)或核染色体或线粒体染色体中。

[0269] 本文所使用的"病毒双顺反子LAMP构建体"是指包含核酸分子的病毒或病毒粒子,

所述核酸分子包含待在体内、离体或体外递送到宿主细胞中的双顺反子LAMP构建体。病毒双顺反子LAMP构建体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、反转录病毒载体等。在基因转移由腺病毒载体介导的方面中,病毒双顺反子LAMP构建体包括腺病毒基因组或其部分,以及与腺病毒衣壳蛋白结合的选定的非腺病毒基因。

[0270] 本文所使用的“腺病毒介导的基因转移”或“腺病毒转导”是指利用进入宿主细胞的腺病毒将编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子转移到所述宿主细胞中的过程。优选地,所述核酸分子能够在所述细胞内复制和/或整合并转录。

[0271] 本文所使用的“腺病毒粒子”是由外部衣壳和编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子组成的单个腺病毒病毒粒子,其中所述衣壳进一步由腺病毒包膜蛋白组成。所述腺病毒包膜蛋白可以被修饰以包含融合多肽,所述融合多肽含有共价附连到到病毒蛋白的多肽配体,例如用于将所述腺病毒粒子靶向特定细胞和/或组织类型。

[0272] 本文所使用的术语“施用”或“免疫接种”或“注射”编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子是指用所述核酸分子转导、转染、显微注射、电穿孔或射击细胞。在一些方面中,通过使靶细胞与递送细胞接触(例如通过细胞融合或通过在递送细胞接近靶细胞时裂解递送细胞),将编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子引入到靶细胞中。

[0273] 本文所使用的术语“治疗”等广义上是指受试者中疾病或病症的改进或改善,例如与疾病或病症相关的至少一种症状或标志物的改进或改善,例如在肿瘤的情况下,例如肿瘤尺寸的减小或与肿瘤相关的生化标志物的变化或疾病症状的减轻。在疾病例如癌症或感染性疾病的情况下,治疗也指所述疾病或病症的至少一种症状的减轻。例如,治疗也指预防疾病或病症的发作或减缓其发作,或在发作后预防或减轻一种或多种症状(例如包括无症状疾病相比于有症状疾病的发展)。治疗也指在免疫接种或疫苗接种中的使用,例如在受试者中诱导免疫应答,其可以例如在受试者中预防症状的发作、减轻症状的严重程度或改善疾病或病症的至少一种现有症状。

[0274] 本文所使用的短语免疫应答的“靶增强”或简称“增强”描述了编码“LAMP-抗原构建体”的核酸分子的用途,所述构建体包含:(1)在LAMP融合多肽中的与待治疗的疾病或病症相关的靶抗原,以及(2)编码旨在增强免疫应答的蛋白质(即IREG蛋白)的另一种分泌多肽。一般来说,此类靶增强允许同时递送靶抗原和分泌的IREG。在一些实施方式中,这种方法可以改善体液和细胞免疫应答两者。

[0275] 本文所使用的术语“分泌”是指细胞内的过程和途径,其导致肽、多肽或蛋白质通过细胞壁转运,从而将所述肽、多肽或蛋白质释放到细胞外环境中,并可能例如进入受试者的循环。去往细胞外环境(即待分泌)的肽、多肽或蛋白质通常被提供有通常位于N-端处的分泌信号序列,其将翻译所述肽、多肽或者蛋白质的核糖体引导到粗面型内质网(粗面型ER),从那里新制造的肽、多肽或蛋白质可以并入到小的转运或分泌囊泡中,所述囊泡将所述肽、多肽和蛋白质转运到细胞表面进行释放。

[0276] 本文所使用的“杂交”是指一种反应,其中一个或多个多核苷酸反应形成通过核苷酸残基的碱基之间的氢键键合而稳定的复合物。所述氢键键合可以通过Watson-Crick碱基配对、Hoogstein结合或以任何其他序列特异性方式发生。所述复合物可以包括形成双链体结构的两条链、形成多链复合物的三条或更多条链、单条自杂交链或这些情况的任何组合。杂交反应可以构成更广泛的过程例如PCR反应的启动或核酶对多核苷酸的酶切中的一个步

骤。

[0277] 当在本文中使用时,与另一序列具有一定百分率(例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%)的“序列同一性”的多核苷酸或多核苷酸区(或多肽或多肽区)意味着在比较所述两个序列中,当使用本领域中常规的软件程序进行最大比对时,该百分率的碱基(或氨基酸)是相同的。

[0278] 当在DNA序列的规定长度内至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%的核苷酸匹配时,两个序列是“基本上同源的”或“基本上相似的”。类似地,当在多肽序列的规定长度内所述多肽的至少50%、至少60%、至少66%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90或至少95%的氨基酸残基匹配时,两个多肽序列是“基本上同源的”或“基本上相似的”。通过使用序列数据库中可用的标准软件比较序列,可以鉴定出基本上同源的序列。在Southern杂交实验中,在例如为该特定系统所定义的严格条件下,也可以鉴定出基本上同源的核酸序列。定义适合的杂交条件在本领域技术人员的能力范围之内。例如,严格条件可以是:在42℃下在5xSSC和50%甲酰胺下杂交,并在60℃下在0.1xSSC和0.1%十二烷基硫酸钠下洗涤。严格杂交条件的其他实例包括:约25℃至约37℃的温育温度;约6xSSC至约10xSSC的杂交缓冲液浓度;约0%至约25%的甲酰胺浓度;以及约6xSSC的洗涤溶液。中等杂交条件的实例包括:约40℃至约50℃的温育温度;约9xSSC至约2xSSC的缓冲液浓度;约30%至约50%的甲酰胺浓度;以及约5xSSC至约2xSSC的洗涤溶液。高严格条件的实例包括:约55℃至约68℃的温育温度;约1xSSC至约0.1xSSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约1xSSC、0.1xSSC或去离子水的洗涤溶液。一般来说,杂交温育时间为5分钟至24小时,使用1、2或更多个洗涤步骤,并且洗涤温育时间为约1、2或15分钟。SSC是0.15M NaCl和15mM柠檬酸盐缓冲液。应当理解,可以采用使用其他缓冲系统的SSC的等效物。相似性可以通过测序来验证,但优选地也可以使用适合于所讨论的特定结构域的测定法,通过功能(例如转运到内体区室的能力等)来验证。

[0279] 术语“序列相似性百分数(%)”、“序列同一性百分数(%)”等通常是指核酸分子的不同核苷酸序列或多肽的氨基酸序列之间的同一性或对应性程度,所述序列可以具有或不具有共同的进化起源(参见Reeck等,同上)。序列同一性可以使用多种公开可用的序列比较算法中的任一者来确定,例如BLAST、FASTA、DNA Strider、GCG(遗传学计算机组,GCG软件包程序手册,第7版,Madison,Wisconsin)等。

[0280] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸分子之间的同一性百分数,出于最佳比较的目的将所述序列进行比对。所述两个序列之间的同一性百分数是所述序列共享的相同位置数量的函数(即同一性百分数=相同位置的数量/位置(例如重叠的位置)的总数x 100)。在一个实施方式中,所述两个序列具有或大约具有相同的长度。两个序列之间的同一性百分数可以使用与下文所述类似的技术来确定,允许或不允许空位。在计算序列同一性百分数时,通常对精确匹配进行计数。

[0281] 可以使用数学算法来实现两个序列之间的同一性百分数的确定。用于比较两个序列的数学算法的非限制性实例是Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1990,87:2264的算法,并如Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1993,90:5873-5877中所述修改。这种算法被并入到Altschul等,J.Mol.Biol.1990;215:403的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸搜索可以使用NBLAST程序,评分=100,字长=12进行,以获得与本公开的

序列同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以使用XBLAST程序,评分＝50,字长＝3进行,以获得与本公开的蛋白质序列同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带空位的比对,可以使用如Altschul等,Nucleic Acids Res.1997,25:3389中所述的带空位BLAST。或者,可以使用PSI-Blast来执行迭代搜索,以检测分子之间的距离关系。参见Altschul等,(1997),同上。当使用BLAST、带空位BLAST和PSI-Blast程序时,可以使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见万维网上的ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/。

[0282] 用于序列比较的数学算法的另一个非限制性实例是Myers和Miller,CABIOS1988;4:11-17的算法。这种算法被并入到作为GCG序列比对软件包的一部分的ALIGN程序(2.0版)中。当使用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分。

[0283] 在一个实施方式中,使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.1970,48:444-453)的算法确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数,所述算法已被并入到GCG软件包(Accelrys,Burlington,MA;可在万维网上的accelrys.com上获得)中的GAP程序中,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。在又一个实施方式中,使用GCG软件包中的GAP程序确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数,使用NWSgapdna.CMP矩阵,空位权重为40、50、60、70或80,长度权重为1、2、3、4、5或6。特定的一组参数(并且如果从业者不确定应该应用哪些参数来确定分子是否是本公开的序列同一性或同源性限制,则可以使用的一组参数)是使用Blossum 62评分矩阵,并且空位开放罚分为12,空位扩展罚分为4,移码空位罚分为5。

[0284] 可以如何确定同一性百分数的另一个非限制性实例是通过使用软件程序,例如在《分子生物学现代方法》(Current Protocols In Molecular Biology)(F.M.Ausubel等主编,1987),增补30,第7.7.18节,表7.7.1中所描述的程序。优选地,使用默认参数进行比对。比对程序是BLAST,使用默认参数。具体而言,程序是BLASTN和BLASTP,使用下述默认参数:遗传密码＝标准;过滤器＝无;链＝两条;截止值＝60;预期＝10;矩阵＝BLOSUM62;描述＝50个序列;排序方式＝高评分;数据库＝非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详细信息可以在下述互联网地址处找到:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0285] 本文描述的性质的统计分析可以通过标准检验例如t-检验、ANOVA或卡方检验来进行。通常,统计显著性将被测量到p＝0.05(5%)的水平,更优选地p＝0.01、p＝0.001、p＝0.0001、p＝0.000001。

[0286] 还可以提供结构域序列的“保守修饰的变体”。对于特定核酸序列而言,保守修饰的变体是指那些编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸,或者在所述核酸不编码氨基酸序列的情况下,是指基本上相同的序列。具体而言,简并密码子替换可以通过产生其中一个或多个选定(或所有)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基替换的序列来实现(Batzer等,1991,Nucleic Acid Res.19:5081;Ohtsuka等,1985,J.Biol.Chem.260:2605-2608;Rossolini等,1994,Mol.Cell.Probes 8:91-98)。

[0287] 术语野生型蛋白质的“生物活性片段”、“生物活性形式”、“生物活性等效物”和“功能衍生物”具有与野生型蛋白质的生物活性至少基本上相等(例如无显著差异)的生物活性,正如使用适合于检测所述活性的测定法所测量的。

[0288] 本文所使用的“体内核酸递送、核酸转移、核酸疗法”等是指将本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子直接引入到受试者(例如人或非人哺乳动物)的体内,从而将所述核酸分子体内引入到此类生物体的细胞中。

[0289] 本文所使用的术语“原位”是指一种类型的体内核酸递送,其中将所述编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子带到靶细胞附近(例如所述核酸未被全身性施用)。例如,原位递送方法包括但不限于将编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子直接注射到某个部位(例如组织如肿瘤或心肌中),通过开放的手术区域将所述核酸分子与细胞或组织接触,或使用医疗进入装置如导管将所述核酸分子递送到某个部位。

[0290] 本文所使用的术语“分离的”或“纯化的”是指与其中所述多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段在自然界中通常相伴的细胞和其他组分分离开(或基本上不含所述组分)。例如,对于本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的分离的核酸分子而言,分离的多核苷酸是与染色体中通常与其相伴的5’和3’序列分离开的多核苷酸。正如对本领域技术人员而言显而易见的,非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”来将它与其天然存在的对应物区分开。基本上不含或基本上纯化的意味着至少50%、优选地至少70%、更优选地至少80%、甚至更优选地至少90%的群体不含它们在自然界中与其相伴的组分。

[0291] 本文所使用的“靶细胞”或“受体细胞”是指希望作为或已经成为本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子的受体的个体细胞或细胞。所述术语还旨在包括单个细胞的后代,并且所述后代由于自然、意外或故意突变而可能不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态方面或在基因组或总DNA互补方面)。靶细胞可以与其他细胞接触(例如在组织中),或者可以在生物体的身体内循环。

[0292] 除非另有特别说明,否则本文所使用的“受试者”是人。在此类其他情况下,受试者可以是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿猴、人类、农场动物、运动动物和宠物。在某些情况下,所述“受试者”是啮齿动物(例如大鼠、小鼠或兔)、美洲驼、骆驼、奶牛、豚鼠、仓鼠、狗、猫、马、非人灵长类动物、猿猴(例如猴或猿)、猴(例如狨猴、狒狒、恒河猴)或猿(例如大猩猩、黑猩猩、猩猩、长臂猿)。在一些实施方式中,可以使用非人哺乳动物,特别是通常作为模型用于证明在人类中的治疗功效的哺乳动物(例如鼠类、灵长类动物、猪、犬或兔)。

[0293] 术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”可互换并以单数或复数形式使用,是指已经历恶性转化使其对宿主生物体而言具有病理性的细胞。原发性癌细胞转化使其对宿主生物体而言具有病理性。原发性癌细胞(即从恶性转化部位附近获得的细胞)可以通过公认的技术,特别是组织学检查,容易地与非癌细胞区分开来。本文所使用的癌细胞的定义不仅包括原发性癌细胞,还包括源自癌细胞祖先的任何细胞。这包括转移的癌细胞,以及源自癌细胞的体外培养物和细胞系。当指称通常表现为实体瘤的癌症类型时,“临床上可检测的”肿瘤是在肿瘤团块的基础上可以例如通过诸如CAT扫描、MR成像、X射线、超声或触诊的程序检测的肿瘤,和/或由于可从患者获得的样品中一种或多种癌症特异性抗原的表达而可检测的肿瘤。

[0294] 在一些实施方式中,癌症(包括所有进展阶段,包括增生)是腺癌、肉瘤、皮肤癌、黑色素瘤、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌(包括但不限于NSCLC、SCLC、鳞状细胞癌)、结肠直肠癌、肛门癌、直肠癌、宫颈癌、肝癌、头颈癌、口腔癌、唾液腺癌、食管

癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌(PDA)、肾癌、胃癌、肾癌、多发性骨髓瘤或脑癌。

[0295] 本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子也可用于治疗过敏,例如食物过敏(例如花生过敏原,例如Ara H1、H2和/或H3)或环境过敏原例如花粉(树花粉,例如CRY J1或CRY J2)、狗皮屑、猫唾液或尘螨。

[0296] 在某些情况下,双顺反子LAMP构建体可以包括可用于治疗感染性疾病例如病毒性或细菌性疾病的抗原。在一个实例中,双顺反子LAMP构建体可用于治疗冠状病毒感染,例如来自Covid-19的感染。

[0297] 可以用本文描述的双顺反子LAMP构建体治疗的其他疾病和/或病症包括例如感染性疾病和糖尿病。

[0298] 本文所使用的术语“药学上可接受的载体”涵盖任何标准的药物载体,例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水和乳液例如油/水或水/油乳液,以及各种类型的润湿剂。包含编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子的组合物还可以包括稳定剂和防腐剂。关于载体、稳定剂和佐剂的实例,参见Martin Remington's Pharm.Sci.,第15版(Mack Publ.Co.,Easton(1975))。

[0299] 当编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子已被引入到细胞内时,所述细胞已被这种核酸分子“转化”、“转导”或“转染”。转化DNA可以与构成细胞基因组的染色体DNA整合(共价连接),也可以不整合。例如,在原核生物、酵母和哺乳动物细胞中,所述编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子可以保持在游离体元件例如质粒上。在真核细胞中,稳定转化的细胞是其中所述编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子已整合到染色体中,使得它通过染色体复制而被子细胞遗传的细胞。这种稳定性通过所述真核细胞建立由含有所述核酸分子的子细胞群体组成的细胞系或克隆的能力得到证明。“克隆”是从单个细胞或共同祖先通过有丝分裂衍生的细胞的群体。“细胞系”是能够在体外稳定生长许多代(例如至少10代)的原代细胞的克隆。

[0300] 本文所使用的“有效量”或“治疗有效量”是足以影响有益或预期结果,例如治疗受试者或在受试者中诱导免疫应答的量。

[0301] “抗体”是结合特定抗原的任何免疫球蛋白,包括抗体及其片段。所述术语涵盖多克隆、单克隆和嵌合抗体(例如双特异性抗体)。“抗体结合部位”是抗体分子的结构部分,由特异性结合抗原的重链和轻链可变区和高变区组成。示例性的抗体分子是完整的免疫球蛋白分子、基本上完整的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的那些含有补位的部分,包括Fab、Fab'、F(ab')$_2$和F(v)部分。因此,术语抗体不仅包括整个抗体分子,还包括抗体片段以及抗体和抗体片段的变体(包括衍生物例如融合蛋白)。本申请中用术语“抗体”描述的分子的实例包括但不限于:单链Fv(scF)、Fab片段、Fab'片段、F(ab')$_2$、二硫键连接的Fv(sdFv)、Fv,以及包含VL或VH结构域或由VL或VH结构域组成的片段。本文所使用的术语“单链Fv”或“scFv”是指包含与抗体的VH结构域连接的抗体的VL结构域的多肽。参见Carter(2006)Nature Rev.Immunol.6:243。

[0302] 此外,可以使用本文描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子产生的抗体包括但不限于单克隆、多特异性、双特异性、人、人源化、小鼠或嵌合抗体、单链抗体、骆驼抗体、Fab片段、F(ab')片段、抗独特型(抗Id)抗体(包括例如针对本公开的抗体的抗Id抗体)、结构域抗体和上述任一者的表位结合片段。所述免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类的免疫球

蛋白分子。

[0303] 本文所使用的“人”抗体包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并包括从人免疫球蛋白文库和已被遗传工程改造以产生人抗体的异种小鼠或其他生物体分离的抗体。本文所述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子可以与示例性方案中所述的用于产生人抗体和人单克隆抗体的已知技术组合使用,参见例如PCT公开WO 98/24893、WO 92/01047、WO 96/34096、WO 96/33735,欧洲专利第0 598 877号,美国专利第5,413,923、5,625,126、5,633,425、5,569,825、5,661,016、5,545,806、5,814,318、5,885,793、5,916,771和5,939,598号,以及Lonberg和Huszar,Int.Rev.Immunol.13:65-93(1995)。

[0304] 人抗体或“人源化”嵌合单克隆抗体可以使用所述编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子与本文描述的或本领域中原本已知的技术的组合来产生。例如,产生嵌合抗体的标准方法在本领域中是已知的。关于综述,参见下述参考文献:Morrison,Science 229:1202(1985);Oi等,BioTechniques 4:214(1986);Cabilly等,美国专利第4,816,567号;Taniguchi等,EP 171496;Morrison等,EP 173494;Neuberger等,WO 8601533;Robinson等,WO 8702671;Boulianne等,Nature 312:643(1984);Neuberger等,Nature 314:268(1985)。

[0305] 可以使用本文描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子产生的抗体可以是单价、二价、三价或多价的。例如,单价scFv可以通过化学方法或通过与另一种蛋白质或物质结合进行多聚化。与六组氨酸标签或Flag标签融合的scFv可以使用Ni-NTA琼脂糖(Qiagen)或使用抗Flag抗体(Stratagene,Inc.)进行多聚化。此外,所述编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子可用于为所述双顺反子LAMP构建体中包含的编码抗原产生单特异性、双特异性、三特异性或更大的多特异性。参见例如PCT公开WO 93/17715、WO 92/08802、WO 91/00360、WO 92/05793;Tutt等,J.Immunol.147:60-69(1991);美国专利第4,474,893、4,714,681、4,925,648、5,573,920、5,601,819号;Kostelny等,J.Immunol.148:1547-1553(1992)。

[0306] “表位”是一种被免疫系统的组分特异性识别或特异性结合的结构,通常由短肽序列或寡糖组成。T细胞表位通常被证明是线性寡肽。如果两个表位可以被同一抗体特异性结合,则它们彼此对应。如果两个表位都能够与相同的B细胞受体或相同的T细胞受体结合,并且一种抗体与其表位的结合基本上阻止了另一个表位的结合(例如另一个表位的结合小于约30%,优选地小于约20%,更优选地小于约10%、5%、1%或约0.1%),则两个表位彼此对应。本领域普通技术人员将会理解,多个表位可以构成抗原。

[0307] 本文所使用的术语“抗原呈递细胞”包括在表面上呈递与主要组织相容性复合物分子或其部分或一种或多种非经典MHC分子或其部分结合的抗原的任何细胞。适合的APC的实例在下文中详细讨论,并包括但不限于完整细胞例如巨噬细胞、树突状细胞、B细胞、混合APC和寄养抗原呈递细胞。

[0308] 本文所使用的“工程化抗原呈递细胞”是指在其表面上具有非天然分子部分的抗原呈递细胞。例如,这种细胞可以在其表面上不天然具有共刺激物,或者在其表面上除了天然共刺激物之外还可以具有额外的人工共刺激物,或者可以在其表面上表达非天然II类分子。在一些实施方式中,所述工程化抗原呈递细胞在其表面上具有从所述双顺反子LAMP构建体表达的抗原。

[0309] 本文所使用的“免疫效应细胞”是指能够结合抗原并介导免疫应答的细胞。这些细胞包括但不限于T细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)例

如CTL系、CTL克隆和来自肿瘤、炎性或其他浸润物的CTL。

[0310] 本文所使用的“部分人类”是指具有来自人类和非人脊椎动物两者的序列的核酸。在部分人类序列的背景下,所述部分人类核酸具有人免疫球蛋白编码区的序列和基于所述非人脊椎动物的内源免疫球蛋白区的非编码序列的序列。当用于指称来自非人脊椎动物的内源非编码序列时,术语“基于”是指与所述非编码序列相对应,并且与所述宿主脊椎动物(例如ES细胞源自的非人脊椎动物)内源基因座的非编码序列具有相对高程度的同源性的序列。优选地,所述非编码序列与引入了包含所述非编码序列的部分人类分子的非人脊椎动物宿主细胞的内源基因座中发现的相应非编码序列具有至少80%、更优选地90%的同源性。

[0311] 本文所使用的术语“免疫球蛋白可变区”是指编码抗体分子的全部或一部分可变区或控制抗体分子表达的调控核苷酸序列的全部或一部分的核苷酸序列。免疫球蛋白的重链区域可以包括但不限于V、D、J和开关区域的全部或一部分,包括内含子。免疫球蛋白的轻链区域可以包括但不限于与轻链恒定区基因相关或邻近的V和J区域、其上游侧翼序列、内含子。

[0312] “转基因动物”是指非人类动物,通常是哺乳动物,其具有在其部分细胞中作为染色体外元件存在的或稳定地整合到其生殖细胞系DNA中(即在其大部分或全部细胞的基因组序列中)的外源核酸序列。在产生包含人类序列的转基因动物时,根据本领域中公知的方法,通过对例如宿主动物的胚胎或胚胎干细胞进行遗传操作,将部分人类核酸引入到此类转基因动物的生殖细胞系中。

[0313] “载体”包括质粒和病毒以及可用于转化或转染细胞的任何DNA或RNA分子,无论是否自我复制。

[0314] 本文所使用的“遗传修饰”是指对细胞正常核苷酸的任何添加、缺失或破坏。本领域公认的方法包括病毒介导的基因转移、脂质体介导的转移、转化、转染和转导,例如病毒介导的基因转移,例如使用基于DNA病毒(例如腺病毒、腺相关病毒和疱疹病毒)以及基于反转录病毒的载体的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子。

[0315] 在某些方面中,除非另有说明,否则本公开的实践采用了本领域技术范围内的常规分子生物学、微生物学和重组DNA技术。此类技术在文献中得到了充分解释。参见例如Maniatis、Fritsch和Sambrook,《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(1982);《DNA克隆实用方法》(DNA Cloning:A Practical Approach),第I和II卷(D.N.Glover主编,1985);《寡核苷酸合成》(Oligonucleotide Synthesis)(M.J.Gait主编,1984);《核酸杂交》(Nucleic Acid Hybridization)(B.D.Hames和S.J.Higgins主编,1985);《转录和翻译》(Transcription and Translation)(B.D.Hames和S.I.Higgins主编,1984);《动物细胞培养》(Animal Cell Culture)(R.I.Freshney主编,1986);《固定化细胞和酶》(Immobilized Cells and Enzymes)(IRL Press,1986);B.Perbal,《分子克隆实践指南》(A Practical Guide to Molecular Cloning)(1984)。

[0316] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本文提到的所有出版物均通过引用并入本文,目的是描述和公开可以与本文描述的公开内容相结合使用的装置、制剂和方法。

[0317] B.示例性LAMP-抗原融合多肽

[0318] 下面是代表性实施方式:

[0319] 一种分离的核酸,其编码双顺反子LAMP构建体,即编码LAMP-抗原融合蛋白(LAMP构建体)和免疫增强蛋白,使得两者均在宿主细胞或受试者中表达。在某些情况下,例如如果还表达第三多肽,则本文中的核酸可以编码多顺反子构建体。

[0320] 在某些情况下,所述抗原是特定疾病或病症的靶抗原。在某些情况下,所述免疫增强蛋白是来自IREG的多肽或多肽结构域例如胞外结构域,任选地与另一个分子例如免疫球蛋白的Fc结构域融合。在某些情况下,所述免疫增强蛋白可以被分泌,因此可操作地连接到分泌信号序列。在某些情况下,所述LAMP-抗原融合蛋白可以具有本文图1的ILC-1、ILC-2、ILC-3、ILC-4、ILC-5或ILC-6中的任一者的骨架结构。在某些情况下,它具有ILC-4的骨架结构。在某些情况下,所述LAMP-抗原构建体包含被放置在LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域之间的抗原。在其他情况下,所述抗原被放置在LAMP同源结构域的N-端之前,或LAMP同源结构域的C-端之后但在LAMP跨膜结构域之前。当在本文中使用时,所述LAMP蛋白可以选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、LIMP 2、Macrosialin、Endolyn、LAMP5或LIMBIC。在其他实施方式中,所述LAMP蛋白选自与氨基酸SEQ ID NO:1-113中的任一者具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些情况下,所述LAMP蛋白是LAMP-1。

[0321] 在某些情况下,除了LAMP的至少两个同源结构域之外,所述LAMP组分还包括LAMP或异源蛋白质的跨膜结构域,以及任选的LAMP或异源蛋白质的信号序列,并且在某些情况中还包括LAMB的胞质结构域。在某些此类情况下,所述LAMP蛋白是LAMP-1。

[0322] 具体而言,从cDNA克隆推导出的LAMP-1(Chen等,J.Biol.Chem.263:8754,1988)由约382个氨基酸的多肽核心组成,其具有大的(346个残基)腔内氨基端结构域,随后是24个残基的疏水跨膜区和短的(12个残基)羧基端胞质尾区。参见图2A和图2B。所述腔内结构域被高度糖基化,被约20个天冬酰胺连接的复合型寡糖取代,并由两个约160个残基的“同源结构域”组成,所述同源结构域被富含脯氨酸/丝氨酸的22个残基的“铰链”区隔开。这些“同源结构域”中的每一者都含有4个均匀间隔的半胱氨酸残基,被二硫键键合以形成四个36-38个残基的环,对称地放置在所述腔内结构域的两半内(Arterburn等,J.Biol.Chem.265:7419,1990;也参见Chen等,J.Biol.Chem.25:263(18):8754-8,1988)。图2A示意性示出了LAMP-1、LAMP-2、LAMP-3、Endolyn、LIMBIC、LAMP5或Macrosialin之间的保守结构域。

[0323] 以前报道的LAMP构建体以这种特定排列方式包含下述元件:(a)LAMP-1蛋白的完整腔内结构域,抗原,然后是LAMP-1蛋白的完整跨膜/胞质尾区;或(b)抗原和LAMP-1蛋白的完整跨膜/胞质尾区。

[0324] 在实例(a)中,所述抗原性序列被插入到LAMP-1蛋白的完整腔内结构域与LAMP-1的完整跨膜结构域/胞质尾区之间。两种构建体已被证明成功地将抗原性序列靶向溶酶体/内体,并且当与本文描述的改进的LAMP构建体ILC-1-ILC-6相比时,将被称为“完整LAMP构建体”,如图1中所示。本文所述的双顺反子LAMP构建体不包括所述完整LAMP构建体。相反,本文所述的双顺反子LAMP构建体可以包含融合到LAMP蛋白的腔内结构域的N-端、LAMP蛋白的至少一个同源结构域的N-或C-端、或LAMP蛋白的至少一个半胱氨酸保守片段的N-或C-端的至少一个抗原(参见例如图1的ILC-1-ILC-6)。然而,一些双顺反子LAMP构建体包含被融合在LAMP蛋白的第一同源结构域与LAMP蛋白的第二同源结构域之间(或至少在两个半胱氨

酸保守片段之间)的至少一个抗原(参见例如图1的ILC-4)。例如,所述至少一个抗原可以被放置在LAMP铰链区中或者可以代替LAMP铰链区。在一些实施方式中,该构建体还包含LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞质尾区。

[0325] 具体而言,在一些实施方式中,所述双顺反子LAMP构建体包含两个同源结构域(例如图1的ILC-4)。在一些实施方式中,这些构建体还包含LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞质尾区。在其他实施方式中,当抗原含有跨膜结构域时,LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞质尾区是非必需的。在其他实施方式中,所述两个同源结构域源自LAMP-1、LAMP-2、LAMP-3或Endolyn蛋白。或者,所述两个同源结构域源自不同的LAMP蛋白。在这些包含两个同源结构域的构建体中,还可以包含LAMP铰链结构域。

[0326] 在所述双顺反子LAMP构建体的LAMP-抗原部分包含ILC-4结构(如图1中所示),例如其中所述LAMP构建体的第一多核苷酸序列包含或编码包含LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域和与所述LAMP蛋白异源的抗原结构域的多肽,其中所述抗原结构域被放置在所述两个同源结构域之间的情况下,所述两个LAMP蛋白同源结构域可以选自如图3中所示的同源结构域1和同源结构域2的氨基酸序列,其源自SEQ ID NO:1-113或与那些序列具有例如至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。因此,例如,在这种构建体中的LAMP是LAMP-1的情况下,天然人LAMP-1同源结构域1和同源结构域2可以围绕所述LAMP-抗原构建体的抗原结构域。在某些情况下,所述同源结构域可以例如包含SEQ ID NO:1的第29-194位和第228-381位氨基酸残基,或与那些序列具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或图2A和3中描绘的此类结构域的序列之一,或SEQ ID NO:198和202的第29-195位残基。在所述构建体是多核苷酸的情况下,所述构建体可以在LAMP同源结构域1编码序列的起点之前进一步编码信号序列,例如SEQ ID NO:1的第1-28位残基或图2A和图3中另外描绘的信号序列或例如SEQ ID NO:198的第1-28位残基。在某些情况下,也可以使用异源(即非LAMP)信号序列。因此,在一些实施方式中,所述LAMP的第一同源结构域包含与SEQ ID NO:198的第29位残基至C-端或SEQ ID NO:1的第29-194位残基具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽序列。在某些情况下,也可以包括LAMP信号序列,例如SEQ ID NO:198或SEQ ID NO:1的第1-28位残基。在某些情况下,所述LAMP的第二同源结构域包含与SEQ ID NO:202或SEQ ID NO:1的第228-381位残基具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽序列。在某些情况下,可以包括例如图2A和3中描绘的LAMP跨膜结构域,即包含SEQ ID NO:1的第383-405位残基或包含另一个天然LAMP跨膜结构域序列。在某些情况下,还可以包括LAMP的胞质尾区,例如包含SEQ ID NO:1的第406-417位残基,或如图2A和3中所描绘的,或包含天然LAMP胞质尾区序列。

[0327] 在一些其他实施方式中,所述双顺反子LAMP构建体包含与LAMP蛋白的单个同源结构域的C-端或LAMP蛋白的单个半胱氨酸保守片段融合的至少一个抗原。参见例如图1的ILC-3和ILC-5。在一些实施方式中,这些构建体还包含LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞质尾区。在其他实施方式中,当抗原含有跨膜结构域时,所述LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞质尾区是非必需的。

[0328] 上述双顺反子LAMP构建体可以使用图中定义的结构域产生。例如,具体设想了例

如包含在图1中所示的双顺反子LAMP构建体中的结构域可以来源于从直系同源序列衍生的序列。参见例如图3-10。明确设想了图2A和图2B中定义的等效结构域可用于使用图1中所示的载体骨架产生直系同源序列的所述双顺反子LAMP构建体。此外,图3-10中示出的直系同源序列代表了可用于产生所述结构域的序列。本领域技术人员完全有能力鉴定其他直系同源序列和/或同种型,并将它们与图3-10中示出的比对进行比较。因此,通过用图3-10中示出的比对鉴定图2A和图2B中定义的人LAMP蛋白的等效边界,人们可以产生本文描述的双顺反子LAMP构建体。

[0329] 正如专业技术人员会很好地理解的,每个结构域的边界是近似值,可以根据克隆考虑和限制性内切酶放置调整至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。因此,当特定结构域(例如LAMP同源结构域)被包含在双顺反子LAMP构建体中时,所述结构域的起始和终止氨基酸可以调整至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸,如图2A中定义的那些边界。

[0330] 正如本领域中公知的,出于克隆目的,本文描述的双顺反子LAMP构建体中的每一者可以在每个结构域之间另外包含信号序列和/或额外的氨基酸。此外,所述LAMP同源结构域、LAMP腔内结构域、LAMP跨膜结构域和/或LAMP胞质尾区结构域可以来源于同一LAMP蛋白(例如人LAMP-1)或不同的LAMP蛋白(例如来自人LAMP-1的腔内结构域和来自人LAMP-2的跨膜结构域,和/或同一基因家族(例如LAMP-1)或不同基因家族(LAMP-1和LAMP-2)中的直系同源结构域的混合。

[0331] 设想了所描述的LAMP构建体的多肽变体。例如,与本文描述的任何双顺反子LAMP构建体具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的多肽以及编码这些变体的多核苷酸。所述双顺反子LAMP构建体的变体保留了通过将抗原性序列靶向溶酶体来发挥作用的能力。例如,修饰的腔内序列必须保留将膜和非膜抗原性物质两者转运到内体区室的能力,与原始结构域序列相比,其功效为至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%,所述功效即导致包含它的嵌合序列的细胞充分地呈递抗原以产生免疫应答的功效。在一个方面,可以通过构建含有卵清蛋白的明确表征的抗原结构域、跨膜结构域和含有推定的溶酶体/内体靶向信号的蛋白质的胞质结构域的双顺反子LAMP构建体,来鉴定含有适合的转运信号的序列。靶向效率可以通过确定表达所述双顺反子LAMP构建体的抗原呈递细胞刺激HA表位特异性II类MHC限制性T细胞的能力来测量(参见例如美国专利第5,633,234号的实施例5)。

[0332] 本公开的一些实施方式包括编码所描述的双顺反子LAMP构建体中的任一者的多核苷酸,以及与本文描述的双顺反子LAMP构建体多核苷酸中的任一者具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的多核苷酸。所述双顺反子LAMP构建体的变体保留了通过将抗原性序列靶向溶酶体来发挥作用的能力。例如,修饰的腔内序列必须保留将膜和非膜抗原性物质两者转运到内体区室的能力,与原始结构域序列相比,其功效为至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%,所述功效即导致包含它的嵌合序列的细胞充分地呈递抗原以产生免疫应答的功效。在一个方面,可以通过构建含有卵清蛋白的明确表征的抗原结构域、跨膜结构域和含有推定的溶酶体/内体靶向信号的蛋白质的胞质结构域的双顺反子LAMP构建体,来鉴定含有适合的转运信号的序列。靶向效率可以通过确定表达所述双顺反子LAMP构建体的抗原呈递细胞刺激HA表位特异性II类MHC限制性T细胞的能力来测量(参见例如美国专利第5,

633,234号的实施例5)。

[0333] C.示例性双顺反子LAMP构建体的构建

[0334] 本文中的双顺反子LAMP构建体可以例如从分离的核苷酸序列构建,其中在所述核酸中LAMP-抗原构建体的启动子/增强子和编码序列的后面或前面是第二多肽的第二启动子/增强子和编码序列。在某些情况下,所述第二多肽可以是旨在增强免疫应答的多肽,即从免疫应答增强基因(IREG)表达的蛋白质或蛋白质的胞外结构域。在某些情况下,所述第二多肽可以被分泌,因此所述核苷酸可以包括所述第二多肽的适合的分泌信号序列,其可以已经包含在所述多肽的编码序列中,或者可以来自不同的蛋白质。在某些情况下,所述第二多肽是融合蛋白,例如与另一个多肽序列例如免疫球蛋白的Fc结构域、另一种抗原等融合的胞外结构域或完整IREG多肽。

[0335] 如下所述,所述在双顺反子LAMP构建体中使用的LAMP-抗原构建体中的抗原可以是感染性疾病的靶抗原,例如病毒刺突蛋白,或者它也可以是癌抗原,例如在某些肿瘤或肿瘤细胞中过表达的多肽。

[0336] 例如,正如在下面的实施例中所述,某些双顺反子LAMP蛋白使用来自SARS-Co-V2病毒的刺突蛋白或刺突蛋白亚基以及使用癌抗原例如HER2胞外结构域或使用NY-ESO1或CD161来制造。因此,在一些实施方式中,所述LAMP-抗原构建体包含与癌抗原或病毒刺突蛋白抗原融合的LAMP。在某些情况下,此类抗原的编码区可以与IREG编码区组合。IREG的实例包括某些细胞因子或免疫蛋白,例如CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33。在一些实施方式中,所述IREG包含同源或异源分泌信号序列编码区,使得所述第二多肽在表达时被分泌。

[0337] 正如在下面的实施例中所述,构建了下述双顺反子LAMP构建体:(1)HER2-LAMP-sCD40L(图11;SEQ ID NO:197),(2)HER2-LAMP-mFLT3L(SEQ ID NO:208),(3)HER2-LAMP-IL-12(SEQ ID NO:212),(4)HER2-LAMP-IL-21(SEQ ID NO:216),(5)HER2-LAMP-OX40L(SEQ ID NO:241),(6)HER2-LAMP-CD80(SEQ ID NO:251),(7)NY-ESO1-LAMP-IL-15(SEQ ID NO:222),(8)CD161-LAMP-sCD40L(SEQ ID NO:235),(9)刺突-LAMP-sCD40L(2-V Covid疫苗;SEQ ID NO:230)和(10)ITI-COVID-19双顺反子疫苗(ITI-双顺反子-S1-LAMP-RBG pA-EF2-S2P BHG pA;第一代COVID-19疫苗;SEQ ID NO:228)。下面的表中提供了这些构建体及其组分的序列。

[0338] 例如,可以构建包含第一多核苷酸序列的病毒载体,以产生图1中示出的ILC-1至ILC-6的不同结构,包括在一些实施方式中存在的ILC-4的结构,或在LAMP蛋白的第一和第二同源结构域之间(或至少在两个半胱氨酸保守片段之间)的LAMP铰链区中包含第一感兴趣的抗原(初免抗原)或用第一感兴趣的抗原替换所述LAMP铰链区的类似结构。图1中示出的LAMP结构域源自图3-10中示出的氨基酸序列。通过鉴定与人类序列相比等效的结构域,也可以从直系同源序列中克隆相应的结构域。感兴趣的抗原(包括一种或多种感兴趣的抗原)可以单独地或组合克隆到所述LAMP构建体中。还可以构建病毒载体以编码表达盒,所述表达盒包含编码IREG或第二抗原的第二多核苷酸序列,其可以与分泌信号序列可操作地连接。

[0339] ILC-4LAMP构建体的相对“紧凑的”尺寸在一些实施方式中是有利的,因为它可以减少与包含第二多核苷酸序列相关的尺寸限制。此外,正如在上述美国专利第11,203,629

号中所述,已发现ILC-4LAMP构建体与测试的其他LAMP构建体相比提供更强的免疫应答(例如更强的T细胞和/或抗体应答)。因此,在一些实施方式中,所述双顺反子LAMP构建体使用ILC-4设计,即包含ILC-4LAMP-抗原构建体的总体结构。

[0340] 在一些实施方式中,包含编码双顺反子LAMP构建体的表达盒的分离的核酸例如载体或疫苗是DNA载体,而在其他情况下,它是RNA载体,包括自扩增RNA载体。

[0341] D.用于双顺反子LAMP构建体的抗原

[0342] 1.SARS-CoV-2病毒抗原和双顺反子构建体

[0343] 在一些实施方式中,LAMP-抗原构建体中的抗原可以包括来自SARS CoV2或其他病毒感染因子的抗原,例如病毒刺突蛋白。在某些情况下,双顺反子构建体也可以表达来自同一感染因子的第二抗原以供分泌。在其他情况下,所述双顺反子构建体可以表达IREG多肽作为第二多肽。

[0344] 在一个特定实例中,构建了第一代载体,用作针对严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV-2病毒,也被称为COVID-19)的疫苗。除了通过有效疫苗产生中和抗体之外,T细胞是针对许多感染性疾病的自然获得的保护性免疫的重要组分,许多针对病毒感染的疫苗和正在开发的疫苗通常是为了引发病毒特异性T细胞应答,所述应答具有激活先天免疫的潜力,具有直接效应物功能,并有助于抗体应答,这可以用作预防和治疗的建议。

[0345] 为了诱导T细胞和抗体应答两者以预防SARS-Cov-2感染或减轻与感染相关的症状,设计了一种载体,其中分别表达了两种病毒蛋白。由LAMP和病毒刺突S1亚基蛋白组成的第一种融合蛋白旨在引发快速和强烈的S1特异性CD4+T细胞应答。第二种蛋白质是具有两个脯氨酸替换的全长刺突蛋白,其由独立的启动子人延伸因子-1α(EF1)驱动,并且在其N-端上也具有序列肽(IgK SP)。54nub设计使预融合稳定化的刺突蛋白能够产生并分泌,以将所述抗原呈递给B细胞。由第一启动子引发的强烈的S1特异性CD4 T细胞不仅有助于CD8 T细胞的功能,而且增强了针对SARS-Cov-2的中和抗体。(载体的描述参见图28A-C。)

[0346] 所述第一代ITI-COVID-19双顺反子疫苗编码病毒表面锚定的刺突糖蛋白的S1和S2亚基的表达。刺突的S1和S2亚基介导SARS-CoV-2病毒进入宿主细胞。使用ILC-4LAMP构建体的核酸分子,所述S1编码序列(GenBank MN908974)位于编码两个LAMP同源结构域(N-Lamp和腔内结构域2)的多核苷酸序列之间。所述S1编码序列在CMV增强子序列的影响下与CMV启动子可操作地连接,因此在宿主细胞中的表达产生包含所述S1抗原的ILC-4LAMP构建体,所述S1抗原用于加工和呈递给II类MHC分子(即提供“初免抗原”)。所述S2编码序列被提供在所述载体上的其他地方,并与编码Ig-κ分泌信号的多核苷酸序列(前导序列)和EF1启动子序列可操作地连接,使得在宿主细胞中的表达产生S2抗原用于分泌(即提供“加强抗原”)。因此,所述载体提供了一种用于引入到适合的宿主或靶细胞中的单一核酸分子,其能够提供初免和加强抗原两者,以引发增强的免疫应答。因此,这与使用仅编码双顺反子LAMP构建体的载体相比可以提供显著优势,因为加强由LAMP构建体引发的免疫应答的任何需要或要求都需要施用以一个或多个时间间隔单独施用的加强疫苗(例如包含所述抗原)。

[0347] 如下面的实施例1和2中所述,随后设计并测试了第二代COVID-19载体:刺突-LAMP-sCD40L,并发现其与第一代载体相比具有出乎意料的甚至更高的免疫应答。该第二代载体以ILC-4格式编码SEQ ID NO:229中提供的LAMP-抗原序列,其中所述特定刺突源自B1.351变体。应当理解,随着COVID-19的进一步演化,可以使用其他变体刺突抗原来代替用

于该载体的刺突抗原。并且,代替作为第二多肽的第二COVID-19抗原,该第二代载体编码SEQ ID NO:233中所提供的肺表面活性物质结合蛋白D(SPD)和CD40L胞外结构域的融合蛋白。

[0348] 应当理解,本文中涵盖了此类分离的核酸的变体,其中所述LAMP-抗原构建体包含COVID-19刺突蛋白或类似的病毒抗原蛋白和IREG多肽,例如SPD-CD40L或另一种IREG(例如CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33)的胞外结构域或完整蛋白质序列,其在某些情况下可以任选地进一步与结构域例如免疫球蛋白Fc结构域融合。在一些实施方式中,在所述第一或第二多肽的结构域之间也可以存在接头。并且在一些实施方式中,所述第二多肽可以被分泌,因此与分泌信号序列可操作地连接。

[0349] a)示例性刺突蛋白序列

[0350] 在一些实施方式中,LAMP-抗原构建体可以包含感染性疾病抗原,例如细菌或病毒抗原。在一些实施方式中,所述病毒抗原是刺突蛋白或刺突蛋白的结构域。在某些情况下,所述病毒抗原源自冠状病毒,例如SARS病毒,例如SARS-CoV-2(COVID-19)病毒。在一些实施方式中,在本文的双顺反子构建体中使用的抗原选自由SARS-CoV-2病毒编码的抗原,例如S1刺突亚基或S2刺突亚基。这种S1刺突亚基的实例包括但不限于与SEQ ID NO:118具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:119或SEQ ID NO:231具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含编码与SEQ ID NO:229具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸。在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:232具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的多核苷酸。

[0351] 在某些情况下,由所述双顺反子构建体表达的相应第二多肽是IREG多肽,例如SPD-CD40L或另一种IREG(例如CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33)的胞外结构域或完整蛋白质序列,其在某些情况下可以任选地进一步与结构域例如免疫球蛋白Fc结构域融合。

[0352] 2.癌症相关抗原

[0353] 在其他实施方式中,所述LAMP-抗原构建体可以包含癌抗原。使用包含本文所述的双顺反子LAMP构建体的疫苗的癌症免疫疗法的候选者将是任何癌症患者,例如文献记载的Epstein-Barr病毒相关淋巴瘤患者、HPV相关宫颈癌患者、慢性HCV患者或在癌基因或肿瘤抑制基因中具有限定的重排或突变的患者。

[0354] 在一些实施方式中,可以使用包含本文所述的双顺反子LAMP构建体的疫苗治疗的癌症包括但不限于下述癌症的所有进展阶段,包括增生:腺癌、肉瘤、皮肤癌、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌(包括但不限于NSCLC、SCLC、鳞状细胞癌)、结肠直肠癌、肛门癌、直肠癌、宫颈癌、肝癌、头颈癌、口腔癌、唾液腺癌、食管癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌(PDA)、肾癌、胃癌、肾癌、多发性骨髓瘤或脑癌。

[0355] 可以设想,一旦鉴定出个体癌症,则可以在其过程中的任何时期使用包含本文所述的核酸分子的疫苗组合物的疗法。也可以在高危患者中进行疫苗接种,以防止随后出现癌症。

[0356] 此类癌抗原的实例包括HER2、CD161和NY-ESO1或其胞外结构域。

[0357] a)HER2

[0358] 在一些实施方式中,LAMP-抗原构建体包含HER2抗原。在某些情况下,所述HER2抗原包含HER2的胞外结构域(ECD)部分。在某些情况下,所述抗原选自与SEQ ID NO:200具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述HER2抗原的编码核苷酸序列与SEQ ID NO:201具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0359] 在一些实施方式中,HER2-LAMP-抗原构建体编码与SEQ ID NO:195具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,LAMP-抗原构建体编码HER2-LAMP,并包含与SEQ ID NO:196具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方式中,所述HER2-LAMP抗原构建体具有与以下序列具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的核苷酸编码序列:SEQ ID NO:199、然后是SEQ ID NO:201、然后是SEQ ID NO:203。在一些实施方式中,所述HER2-LAMP抗原构建体具有与以下序列具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽序列:SEQ ID NO:198、然后是SEQ ID NO:200、然后是SEQ ID NO:202,任选地在这些区段之间具有一个或两个接头序列。

[0360] 在某些情况下,由所述双顺反子构建体表达的相应的第二多肽是IREG多肽,例如SPD-CD40L或另一种IREG(例如CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33)的胞外结构域或完整蛋白质序列,其在某些情况下可以任选地进一步与结构域例如免疫球蛋白Fc结构域融合。

[0361] b)NY-ESO1

[0362] 在一些实施方式中,所述LAMP-抗原构建体包含NY-ESO1的抗原。此类NY-ESO1抗原序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:223具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述NY-ESO1核苷酸编码序列与SEQ ID NO:224具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0363] 在一些实施方式中,所述LAMP-抗原构建体包含:(a)编码与SEQ ID NO:221具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸。在一些实施方式中,所述LAMP-抗原构建体的编码序列与以下序列具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至

少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性:SEQ ID NO:199、然后是SEQ ID NO:224、然后是SEQ ID NO:203。

[0364] 在某些情况下,由所述双顺反子构建体表达的相应的第二多肽是IREG多肽,例如IL-15或另一种IREG(例如CD40、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33)的胞外结构域或完整蛋白质序列,其在某些情况下可以任选地进一步与结构域例如免疫球蛋白Fc结构域融合。

[0365] c)CD161

[0366] 在一些实施方式中,所述LAMP-抗原构建体包括CD161的抗原,例如CD161的ECD。此类CD161序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:236具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,CD161 ECD核苷酸编码序列与SEQ ID NO:237具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性。

[0367] 在一些实施方式中,所述LAMP-抗原构建体包含:(a)编码与SEQ ID NO:234具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸。在一些实施方式中,所述LAMP-抗原构建体编码序列与以下序列具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性:SEQ ID NO:199、然后是SEQ ID NO:237、然后是SEQ ID NO:203。

[0368] 在某些情况下,由所述双顺反子构建体表达的相应的第二多肽是IREG多肽,例如SPD-CD40L或另一种IREG(例如CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33)的胞外结构域或完整蛋白质序列,其在某些情况下可以任选地进一步与结构域例如免疫球蛋白Fc结构域融合。

[0369] d)其他癌抗原

[0370] 下面表A中示出的抗原也可以使用专业技术人员已知的技术克隆到本文描述的每个双顺反子LAMP-抗原构建体中。例如,第四列中描述的序列/片段/表位也可以克隆到本文所述的LAMP-抗原构建体中。此外,表A中列出的癌抗原中的任一者可以与表A中列出的任何其他抗原(包括第四列中描述的序列/片段/表位)组合,并插入到本文所述的LAMP-抗原构建体中。或者,表A的癌抗原中的任一者可以与本公开中描述的任何其他癌抗原组合,并插入到本文的LAMP-抗原构建体中。

[0371] 在某些情况下,由包括来自表A的癌抗原的双顺反子构建体表达的相应的第二多肽是IREG多肽,例如SPD-CD40L或另一种IREG(例如CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18或IL-33)的胞外结构域或完整蛋白质序列,其在某些情况下可以任选地进一步与结构域例如免疫球蛋白Fc结构域融合。

[0372]

SEQ ID NO：	抗原的蛋白质名称	登记号/源自	可以克隆到本文描述的 LAMP 构建体中的示例性表位/片段至少包含：
254	大 T 抗原	YP_009111421	SEQ ID NO：254 的第 1-327 位氨基酸，在第 220 位氨基酸处含有或不含突变，其中野生型丝氨酸优选地被丙氨酸（或其他失活性氨基酸）代替（例如 SEQ ID NO：255-256），使得 Rb 结合基序的磷酸化被抑制，正如在 Sharma 等，38, 1153-1162（IJC 2016）中所述。也设想了 SEQ ID NO：254 的第 1-327 位氨基酸的片段，例如被示例为 SEQ ID NO：255-256 的那些片段，只要这些片段保留产生针对梅克尔细胞多瘤病毒（MCPγV）的大 T 抗原的抗体应答的能力即可。 可以与本文中的双顺反子构建体一起使用的大 T 抗原 LAMP 构建体的一个实例是 SEQ ID NO：879 或 880 的构建体。
255	大 T 抗原	YP_009111421	SEQ ID NO：254 的第 1-327 位氨基酸，其中 S220 是任何氨基酸（X）。
256	大 T 抗原	YP_009111421	SEQ ID NO：254 的第 1-327 位氨基酸，其中 S220 是丙氨酸（A）。
257	小 T 抗原	YP_009111422	MCPγVgp4 小 T 抗原，全长和片段。
258	MAGE-A10	UniProtKB：A0A024RC14	
259	MAGE-A12	UniProtKB：P43365	
260	MAGE-A1	UniProtKB：P43355	
261	MAGE-A2	UniProtKB：P43356	
262	MAGE-A3	UniProtKB：P43357	
263	MAGE-A4	UniProtKB：A0A024RC12	
264	MAGE-A4	UniProtKB：P43358	
265	MAGE-A4	UniProtKB：Q1RN33	
266	MAGE-A6	UniProtKB：A8K072	

[0373]

267	MAGE-A6	UniProtKB：P43360	
268	MAGE-A6	UniProtKB：Q6FHI5	
269	MAGE-A9	UniProtKB：P43362	
270	MAGE-B10	UniProtKB：Q96LZ2	
271	MAGE-B16	UniProtKB：A2A368	
272	MAGE-B17	UniProtKB：A8MXT2	
273	MAGE-_B1	UniProtKB：Q96TG1	
274	MAGE-B2	UniProtKB：O15479	
275	MAGE-B3	UniProtKB：O15480	
276	MAGE-B4	UniProtKB：O15481	
277	MAGE-B5	UniProtKB：Q9BZ81	
278	MAGE-B6	UniProtKB：Q8N7X4	
279	MAGE-C1	UniProtKB：O60732	
280	MAGE-C2	UniProtKB：Q9UBF1	
281	MAGE-C3	UniProtKB：Q8TD91	
282	MAGE-D1	UniProtKB：Q9Y5V3	
283	MAGE-D2	UniProtKB：Q9UNF1	
284	MAGE-D4	UniProtKB：Q96JG8	
285	MAGE-_E1	UniProtKB：Q6IAI7	
286	MAGE-E1（MAGE1）	UniProtKB：Q9HCI5	
287	MAGE-E2	UniProtKB：Q8TD90	

[0374]

288	MAGE-F1	UniProtKB：Q9HAY2	
289	MAGE-H1	UniProtKB：Q9H213	
290	MAGEL2	UniProtKB：Q9UJ55	
291-293	pp65	ABQ23593	在本文中的 pp65-LAMP 构建体中有用的示例性 pp65 抗原序列还包括包含 LLQTGIHVRVSQPSL（SEQ ID NO：291，第 41-55 位）和/或 ALPLKMLNIPSINVH（SEQ ID NO：291，第 115-129 位）和/或 DQYVKVYLESFCEDV（SEQ ID NO：291，第 221-235 位）和/或 IIKPGKISHIMLDVAFTSH（SEQ ID NO：291，第 281-299 位）和/或 PQYSEHPTFTSQYRIQGKL（SEQ ID NO：291，第 361-379 位）和/或 PPWQAGILARNLVPMV（SEQ ID NO：291，第 485-500 位）和/或 KYQEFFWDANDIYRIFA（SEQ ID NO：291，第 509-525 位）的序列，其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式组合，并克隆到本文描述的 LAMP 构建体中，其中每个表位任选地被接头例如 GPGPG（SEQ ID NO：292，第 36-40 位）或 PMGLP（SEQ ID NO：293，第 36-40 位）分隔开。代表性的构建体插入片段被示出为 SEQ ID NO：292 和 SEQ ID NO：293。
294-297	gB	P06473	本文中的示例性 gB 抗原序列还包括包含 TTSAQTRSVYSQHVT（SEQ ID NO：294，第 44-58 位）和/或 QLIPDDYSNTHSTRYV（SEQ ID NO：294，第 212-227 位）和/或 VSVFETSGGLVVFWQ（SEQ ID NO：294，第 418-432 位）和/或 NSAYEYVDYLFKRMIDLS（SEQ ID NO：294，第 622-639 位）的序列，其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式组合，并克隆到本文描述的 LAMP 构建体中，其中每个表位优选地被接头例如 GPGPG（SEQ ID NO：296，第 16-20 位）或 PMGLP（SEQ ID NO：297，第 16-20 位）分隔开。代表性的构建体插入片段被示出为 SEQ ID NO：296 和 SEQ ID NO：297。
298-300	IE1	P13202	示例性 1E1 抗原序列还包括包含

[0375]

			VLAELVKQIKVRVDMVRHRIKEHMLKKYTQ（SEQ ID NO：298，第 81-110 位）和/或 IVPEDKREMWMACIKELH（SEQ ID NO：298，第 158-175 位）和/或 KDELRRKMMYMCYRNIEFFTKNSAFPKTT（SEQ ID NO：298，第 197-225 位）和/或 SVMKRRIEEICMKVFAQYI（SEQ ID NO：298，第 337-355 位）和/或 AIAEESDEEEAIVAY（SEQ ID NO：298，第 373-387 位）和/或 VKSEPVSEIEEVAPEEEEDG（SEQ ID NO：298，第 449-468 位）的序列，其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式组合，并克隆到本文描述的 LAMP 构建体中，其中每个表位优选地被接头例如 GPGPG（SEQ ID NO：299，第 31-35 位）或 PMGLP（SEQ ID NO：300，第 31-35 位）分隔开。代表性的构建体插入片段被示出为 SEQ ID NO：299 和 SEQ ID NO：300。
301	形态转化区 II（“MTRII”），人 β 疱疹病毒	AAA66543	
302	代表性 MTRII LAMP 构建体插入片段		
303	人 β 疱疹病毒 5	AMJ53524	
304	US28		
305	IGFBP2	NP_000588	示例性 IGFBP2 抗原序列还包含 SEQ ID NO：128 的第 39-328 位氨基酸；（b） SEQ ID NO：128 的第 40-328 位氨基酸；（c） SEQ ID NO：128 的第 43-135 位氨基酸；（d） SEQ ID NO：128 的第 1-163 位氨基酸；（e） SEQ ID NO：128 的第 2-163 位氨基酸；（f） SEQ ID NO：128 的第 39-163 位氨基酸；（g） SEQ ID NO：128 的第 40-163 位氨基酸；（h） SEQ ID NO：128 的第 229-309 位氨基酸；（i） SEQ ID NO：128 的第 2-328 位氨基酸；和/或（j） SEQ ID NO：

[0376]

				128 的第 1-328 位氨基酸。
306	HCMVA 病毒白介素-10（“IL10”）	P17150		
307	代表性 HCMVA 病毒 IL-10 LAMP 构建体插入片段			
308	HCMVM 膜糖蛋白 UL144（“UL144”）	F5HAM0		
309	代表性 HCMV 膜糖蛋白 UL144 LAMP 构建体插入片段			
310	HCMVM 蛋白 UL141（“UL141”）	Q6RJQ3		
311	代表性 HCMV 蛋白 UL141 LAMP 构建体插入片段			
312	HCMVA 独特短 US11 糖蛋白（“US11”）	P09727		
313	代表性 HCMVA 独特短 US11 糖			

[0377]

	蛋白LAMP构建体插入片段		
314-317	HCMV包膜糖蛋白HOS（“HOS”）	A0A0G2TM81	示例性HCMV包膜糖蛋白HOS抗原序列还包括包含TYNSSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPR（SEQ ID NO：314，第60-94位）和/或DLTETLERYQQRLNTYALVSKDLASYRSFS（SEQ ID NO：314，第110-139位）和/或SHTTSGLHRPHFNQTCILFD（SEQ ID NO：314，第180-199位）和/或QLNRHSYLKDPDFLDAALDF（SEQ ID NO：314，第285-304位）的序列，其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式组合，并克隆到本文描述的LAMP构建体中，其中每个表位优选地被接头例如GPGPG（SEQ ID NO：316，第36-40位）或PMGLP（SEQ ID NO：317，第36-40位）分隔开。参见例如SEQ ID NO：315-317。
318-320	HCMVT病毒转录因子IE2（“IE2”）	Q6SWP7	示例性IE2抗原序列还包括包含RRGRVKIDEVSRMFR（SEQ ID NO：318，第356-370位）和/或GIQIIYTRNHEVKSE（SEQ ID NO：318，第408-422位）和/或LSTPFLMEHTMPVTHPPEVA（SEQ ID NO：318，第438-457位）的序列，其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式组合，并克隆到本文描述的LAMP构建体中，其中每个表位优选地被接头例如GPGPG（SEQ ID NO：319，第16-20位）或PMGLP（SEQ ID NO：320，第16-20位）分隔开。参见例如SEQ ID NO：319-320。
321-323	TERT剪接形式1（“TERT”）	NP_937983.2	
324	存活蛋白	NP_001125727	
325-327	破伤风	1AF9_A	示例性破伤风抗原序列还包括包含PGINGKAIHLVNNESSE（SEQ ID NO：325，第53-69位）和/或FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGT（SEQ ID NO：325，第

[0378]

			84-108 位）和/或 YVSIDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLS（SEQ ID NO：325，第 220-247 位）和/或 ILRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLK（SEQ ID NO：325，第 361-386 位）的序列，其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式组合，并克隆到本文描述的 LAMP 构建体中，其中每个表位优选地被接头例如 GPGPG（SEQ ID NO：326，第 18-22 位）或 PMGLP（SEQ ID NO：327，第 18-22 位）分隔开。代表性构建体插入片段被示出为 SEQ ID NO：326 和 SEQ ID NO：327。
328	睾丸癌抗原 NY-ESO-1（“NY-ESO-1”）	NP-001318.1	
329-331	HER2	AAA75493.1	另一个示例性 HER2 抗原序列包含 SEQ ID NO：198，并且由 SEQ ID NO：199 编码。
332-334	HER3	NP_001973.2	构建体包含 SEQ ID NO:332 的第 20-643、665-1201 和/或 1209-1342 位氨基酸中的至少一者，其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式组合，并克隆到本文描述的 LAMP 构建体中，其中每个表位优选地被接头例如 GPGPG 或 PMGLP 分隔开。代表性构建体插入片段被示出为 SEQ ID NO：333 和 SEQ ID NO：334。
335 336	HVEM	NP_003811.2	一个实例是包含 SEQ ID NO：335 的第 39-202 位氨基酸的序列。
337-340	HPV 构建体		实例包括用于产生所述构建体的序列：(a)HPV 16 E6(SEQ ID NO：337）；（b）HPV 18 E6（SEQ ID NO：338）；（c）HPV 16 E7（SEQ ID NO：339）；（d）HPV 18 E7（SEQ ID NO：340） 代表性构建体： SEQ ID NO：341（代表性 HPV 16 E6-E7 构建体） SEQ ID NO：342（代表性 HPV 18 E6-E7 构建体） SEQ ID NO：343（HPV 16 E6–接头–HPV 18 E6–接头–HPV 16 E7–接头–HPV 18 E7）

[0379]

346-349	EBV 构建体	采取任何组合的任何下述序列可用于产生构建体（a）EBV EBNA1（SEQ ID NO：346）；（b）EBV 截短的 EBNA-1（SEQ ID NO：347）；（c）EBV gp350（SEQ ID NO：348）；（d）EBV LMP2（SEQ ID NO：349）。例如，代表性构建体可以包含截短的 EBNA-1 和 LMP2。
351-352	HBV 构建体	任何下述序列可用于（以任一取向）产生所述构建体：HBV 中间 S 蛋白（SEQ ID NO：351）和 HBV X 蛋白（SEQ ID NO：352）。例如，代表性构建体可以包含中间 S 蛋白 –X 蛋白。
353	TIGIT	
354	TEM8	
355	TEM1	
356	HER2 ECD+TM	
357	CEA	
358	TARP	
359	PROSTEIN	
360	PSMA	
361	BIRC4	
362	黏蛋白-1	
363	黏蛋白-1 剪接形式	
364	CD40 配体	
352	WT-1	
366	截短的 WT-1	
367	PRAME	

[0380]

368	LAGE-1	
369	MAGE A3	
370-374	存活蛋白	NP_001125727 代表性构建体包括包含 SEQ ID NO：370-374 中的任一者的构建体
375	1A01_HLA-A/m	UniProtKB：P30443
376	1A02	UniProtKB：P01892
377	5T4	UniProtKB：Q13641
378	ACRBP	UniProtKB：Q8NEB7
379	AFP	UniProtKB：P02771
380	AKAP4	UniProtKB：Q5JQC9
381	α-辅肌动蛋白-4/m	UniProtKB：B4DSX0
382	α-辅肌动蛋白-4/m	UniProtKB：B4E337
383	α-辅肌动蛋白-4/m	UniProtKB：O43707
384	α-甲基酰基辅酶A消旋酶	UniProtKB：A0A024RE16
385	α-甲基酰基辅酶A消旋酶	UniProtKB：A8KAC3
386	ANDR	UniProtKB：P10275
387	ART-4	UniProtKB：Q9ULX3
388	ARTC1/m	UniProtKB：P52961
389	AURKB	UniProtKB：Q96GD4
390	B2MG	UniProtKB：P61769

[0381]

391	B3GN5	UniProtKB：Q9BYG0	
392	B4GN1	UniProtKB：Q00973	
393	B7H4	UniProtKB：Q7Z7D3	
394	BAGE-1	UniProtKB：Q13072	
395	BASI	UniProtKB：P35613	
396	BCL-2	UniProtKB：A9QXG9	
397	bcr/abl	UniProtKB：A9UEZ4	
398	bcr/abl	UniProtKB：A9UEZ7	
399	bcr/abl	UniProtKB：A9UEZ8	
400	bcr/abl	UniProtKB：A9UEZ9	
401	bcr/abl	UniProtKB：A9UF00	
402	bcr/abl	UniProtKB：A9UF01	
403	bcr/abl	UniProtKB：A9UF03	
404	bcr/abl	UniProtKB：A9UF04	
405	bcr/abl	UniProtKB：A9UF05	
406	bcr/abl	UniProtKB：A9UF06	
407	bcr/abl	UniProtKB：A9UF08	
408	β-连环蛋白/m	UniProtKB：P35222	
409	β-连环蛋白/m	UniProtKB：Q8WYA6	
410	BING-4	UniProtKB：O15213	
411	BIRC7	UniProtKB：Q96CA5	

[0382]

412	BRCA1/m	UniProtKB：A0A024R1V0
413	BRCA1/m	UniProtKB：A0A024R1V7
414	BRCA1/m	UniProtKB：A0A024R1Z8
415	BRCA1/m	UniProtKB：A0A068BFX7
416	BRCA1/m	UniProtKB：C6YB45
417	BRCA1/m	UniProtKB：C6YB47
418	BRCA1/m	UniProtKB：G3XAC3
419	BY55	UniProtKB：O95971
420	CAMEL	UniProtKB：O95987
421	CASPA	UniProtKB：Q92851-4
422	组织蛋白酶_B	UniProtKB：A0A024R374
423	组织蛋白酶_B	UniProtKB：P07858
424	组织蛋白酶_L	UniProtKB：A0A024R276
425	组织蛋白酶_L	UniProtKB：P07711
426	组织蛋白酶_L	UniProtKB：Q9HBQ7
427	CD1A	UniProtKB：P06126
428	CD1B	UniProtKB：P29016
429	CD1C	UniProtKB：P29017
430	CD1D	UniProtKB：P15813
431	CD1E	UniProtKB：P15812
432	CD20	UniProtKB：P11836

[0383]

433	CD22	UniProtKB：O60926	
434	CD22	UniProtKB：P20273	
435	CD22	UniProtKB：Q0EAF5	
436	CD276	UniProtKB：Q5ZPR3	
437	CD33	UniProtKB：B4DF51	
438	CD33	UniProtKB：P20138	
439	CD33	UniProtKB：Q546G0	
440	CD3E	UniProtKB：P07766	
441	CD3Z	UniProtKB：P20963	
442	CD44_剪接形式1	UniProtKB：P16070	
443	CD44_剪接形式6	UniProtKB：P16070-6	
444	CD4	UniProtKB：P01730	
445	CD52	UniProtKB：P31358	
446	CD52	UniProtKB：Q6IBD0	
447	CD52	UniProtKB：V9HWN9	
448	CD55	UniProtKB：B1AP15	
449	CD55	UniProtKB：D3DT85	
450	CD55	UniProtKB：D3DT86	
451	CD55	UniProtKB：P08174	
452	CD56	UniProtKB：P13591	

[0384]

453	CD80	UniProtKB：A0N0P2	
454	CD80	UniProtKB：P33681	
455	CD86	UniProtKB：P42081	
456	CD8A	UniProtKB：P01732	
457	CDC27/m	UniProtKB：G5EA36	
458	CDC27/m	UniProtKB：P30260	
459	CDE30	UniProtKB：P28908	
460	CDK4/m	UniProtKB：A0A024RBB6	
461	CDK4/m	UniProtKB：P11802	
462	CDK4/m	UniProtKB：Q6LC83	
463	CDK4/m	UniProtKB：Q96BE9	
464	CDKN2A/m	UniProtKB：D1LYX3	
465	CDKN2A/m	UniProtKB：G3XAG3	
466	CDKN2A/m	UniProtKB：K7PML8	
467	CDKN2A/m	UniProtKB：L8E941	
468	CDKN2A/m	UniProtKB：Q8N726	
469	CEA	RefSeq：NP_004354	
470	CEAM6	UniProtKB：P40199	
471	CH3L2	UniProtKB：Q15782	
472	CLCA2	UniProtKB：Q9UQC9	
473	CML28	UniProtKB：Q9NQT4	

[0385]

474	CML66	UniProtKB：Q96RS6
475	COA-1/m	UniProtKB：Q5T124
476	毛状蛋白样蛋白	UniProtKB：Q14019
477	胶原蛋白 XXIII	UniProtKB：L8EAS4
478	胶原蛋白 XXIII	UniProtKB：Q86Y22
479	COX-2	UniProtKB：Q6ZYK7
480	CP1B1	UniProtKB：Q16678
481	CSAG2	UniProtKB：Q9Y5P2-2
482	CSAG2	UniProtKB：Q9Y5P2
483	CT45A1	UniProtKB：Q5HYN5
484	CT55	UniProtKB：Q8WUE5
485	CT-_9/BRD6	UniProtKB：Q58F21
48	CTAG2_剪接形式_LAGE-1A	UniProtKB：O75638-2
487	CTAG2_剪接形式_LAGE-1B	UniProtKB：O75638
488	CTCFL	UniProtKB：Q8NI51
489	Cten	UniProtKB：Q8IZW8
490	cyclin_B1	UniProtKB：P14635
491	cyclin_D1	UniProtKB：P24385
492	cyp-B	UniProtKB：P23284
493	DAM-10	UniProtKB：P43366

[0386]

494	DEP1A	UniProtKB：Q5TB30	
495	E7	UniProtKB：P03129	
496	E7	UniProtKB：P06788	
497	E7	UniProtKB：P17387	
498	E7	UniProtKB：P06429	
499	E7	UniProtKB：P27230	
500	E7	UniProtKB：P24837	
501	E7	UniProtKB：P21736	
502	E7	UniProtKB：P26558	
503	E7	UniProtKB：P36831	
504	E7	UniProtKB：P36833	
505	E7	UniProtKB：Q9QCZ1	
506	E7	UniProtKB：Q81965	
507	E7	UniProtKB：Q80956	
508	EF1A2	UniProtKB：Q05639	
509	EFTUD2/m	UniProtKB：Q15029	
510	EGFR	UniProtKB：A0A0B4J1Y5	
511	EGFR	UniProtKB：E7BSV0	
512	EGFR	UniProtKB：L0R6G1	
513	EGFR	UniProtKB：P00533-2	
514	EGFR	UniProtKB：P00533	

[0387]

515	EGFR	UniProtKB：Q147T7
516	EGFR	UniProtKB：Q504U8
517	EGFR	UniProtKB：Q8NDU8
518	EGLN3	UniProtKB：Q9H6Z9
519	ELF2/m	UniProtKB：B7Z720
520	EMMPRIN	UniProtKB：Q54A51
521	EpCam	UniProtKB：P16422
522	EphA2	UniProtKB：P29317
523	EphA3	UniProtKB：P29320
524	EphA3	UniProtKB：Q6P4R6
525	ErbB3	UniProtKB：B3KWG5
526	ErbB3	UniProtKB：B4DGQ7
527	ERBB4	UniProtKB：Q15303
528	ERG	UniProtKB：P11308
529	ETV6	UniProtKB：P41212
530	EWS	UniProtKB：Q01844
531	EZH2	UniProtKB：F2YMM1
532	EZH2	UniProtKB：G3XAL2
533	EZH2	UniProtKB：L0R855
534	EZH2	UniProtKB：Q15910
535	EZH2	UniProtKB：S4S3R8

[0388]

536	FABP7	UniProtKB：O15540
537	FCGR3A_版本1	UniProtKB：P08637
538	FCGR3A_版本2	CCDS: CCDS1232.1
539	FGF5	UniProtKB：P12034
540	FGF5	UniProtKB：Q60518
541	FGFR2	UniProtKB：P21802
542	纤连蛋白	UniProtKB：A0A024R5I6
543	纤连蛋白	UniProtKB：A0A024RB01
544	纤连蛋白	UniProtKB：A0A024RDT9
545	纤连蛋白	UniProtKB：A0A024RDV5
546	纤连蛋白	UniProtKB：A6NH44
547	纤连蛋白	UniProtKB：A8K6A5
548	纤连蛋白	UniProtKB：B2R627
549	纤连蛋白	UniProtKB：B3KXM5
550	纤连蛋白	UniProtKB：B4DIC5
551	纤连蛋白	UniProtKB：B4DN21
552	纤连蛋白	UniProtKB：B4DS98
553	纤连蛋白	UniProtKB：B4DTH2
554	纤连蛋白	UniProtKB：B4DTK1
555	纤连蛋白	UniProtKB：B4DU16

[0389]

556	纤连蛋白	UniProtKB：B7Z3W5
557	纤连蛋白	UniProtKB：B7Z939
558	纤连蛋白	UniProtKB：G5E9X3
559	纤连蛋白	UniProtKB：Q9H382
560	FOS	UniProtKB：P01100
561	FOXP3	UniProtKB：Q9BZS1
562	FUT1	UniProtKB：P19526
563	G250	UniProtKB：Q16790
564	GAGE-1	Genbank：AAA82744
565	GAGE-2	UniProtKB：Q6NT46
566	GAGE-3	UniProtKB：Q13067
567	GAGE-4	UniProtKB：Q13068
568	GAGE-5	UniProtKB：Q13069
569	GAGE-6	UniProtKB：Q13070
570	GAGE7b	UniProtKB：O76087
571	GAGE-8（GAGE-2D）	UniProtKB：Q9UEU5
572	GASR	UniProtKB：P32239
573	GnT-V	UniProtKB：Q09328
574	GPC3	UniProtKB：I6QJG3
575	GPC3	UniProtKB：P51654
576	GPC3	UniProtKB：Q8IYG2

[0390]

577	GPNMB/m	UniProtKB：A0A024RA55
578	GPNMB/m	UniProtKB：Q14956
579	GPNMB/m	UniProtKB：Q8IXJ5
580	GPNMB/m	UniProtKB：Q96F58
581	GRM3	UniProtKB：Q14832
582	HAGE	UniProtKB：Q9NXZ2
583	hepsin	UniProtKB：B2ZDQ2
584	hepsin	UniProtKB：P05981
585	Her2/neu	UniProtKB：B4DTR1
586	Her2/neu	UniProtKB：L8E8G2
587	Her2/neu	UniProtKB：P04626
588	Her2/neu	UniProtKB：Q9UK79
589	HLA-A2/m	UniProtKB：Q95387
590	HLA-A2/m	UniProtKB：Q9MYF8
591	同源框_NKX3.1	UniProtKB：Q99801
592	HOM-TES-85	UniProtKB：B2RBQ6
593	HOM-TES-85	UniProtKB：Q9P127
594	HPG1	Pubmed：12543784
595	HS71A	UniProtKB：P0DMV8
596	HS71B	UniProtKB：P0DMV9
597	HST-2	UniProtKB：P10767

[0391]

598	hTERT	UniProtKB：O94807
599	iCE	UniProtKB：O00748
600	IF2B3	UniProtKB：O00425
601	IL-13Ra2	UniProtKB：Q14627
602	IL2-RA	UniProtKB：P01589
603	IL2-RB	UniProtKB：P14784
604	IL2-RG	UniProtKB：P31785
605	IMP3	UniProtKB：Q9NV31
606	ITA5	UniProtKB：P08648
607	ITB1	UniProtKB：P05556
608	ITB6	UniProtKB：P18564
609	激肽释放酶-2	UniProtKB：A0A024R4J4
610	激肽释放酶-2	UniProtKB：A0A024R4N3
611	激肽释放酶-2	UniProtKB：B0AZU9
612	激肽释放酶-2	UniProtKB：B4DU77
613	激肽释放酶-2	UniProtKB：P20151
614	激肽释放酶-2	UniProtKB：Q6T774
615	激肽释放酶-2	UniProtKB：Q6T775
616	激肽释放酶-4	UniProtKB：A0A0C4DFQ5
617	激肽释放酶-4	UniProtKB：Q5BQA0
618	激肽释放酶-4	UniProtKB：Q96PT0

[0392]

619	激肽释放酶-4	UniProtKB：Q96PT1	
620	激肽释放酶-4	UniProtKB：Q9Y5K2	
621	KI20A	UniProtKB：O95235	
622	KIAA0205	UniProtKB：Q92604	
623	KIF2C	UniProtKB：Q99661	
624	KK-LC-1	UniProtKB：Q5H943	
625	LDLR	UniProtKB：P01130	
626	LGMN	UniProtKB：Q99538	
627	LIRB2	UniProtKB：Q8N423	
628	LY6K	UniProtKB：Q17RY6	
629	MAGA5	UniProtKB：P43359	
630	MAGA8	UniProtKB：P43361	
631	MAGAB	UniProtKB：P43364	
632	MAGE-A10	UniProtKB：A0A024RC14	
633	MAGE-A12	UniProtKB：P43365	
634	MAGE-A1	UniProtKB：P43355	
635	MAGE-A2	UniProtKB：P43356	
636	MAGE-A3	UniProtKB：P43357	
637	MAGE-A4	UniProtKB：A0A024RC12	
638	MAGE-A4	UniProtKB：P43358	
639	MAGE-A4	UniProtKB：Q1RN33	

[0393]

640	MAGE-A6	UniProtKB：A8K072
641	MAGE-A6	UniProtKB：P43360
642	MAGE-A6	UniProtKB：Q6FHI5
643	MAGE-A9	UniProtKB：P43362
644	MAGE-B10	UniProtKB：Q96LZ2
645	MAGE-B16	UniProtKB：A2A368
646	MAGE-B17	UniProtKB：A8MXT2
647	MAGE-_B1	UniProtKB：Q96TG1
648	MAGE-B2	UniProtKB：O15479
649	MAGE-B3	UniProtKB：O15480
650	MAGE-B4	UniProtKB：O15481
651	MAGE-B5	UniProtKB：Q9BZ81
652	MAGE-B6	UniProtKB：Q8N7X4
653	MAGE-C1	UniProtKB：O60732
654	MAGE-C2	UniProtKB：Q9UBF1
655	MAGE-C3	UniProtKB：Q8TD91
656	MAGE-D1	UniProtKB：Q9Y5V3
657	MAGE-D2	UniProtKB：Q9UNF1
658	MAGE-D4	UniProtKB：Q96JG8
659	MAGE-_E1	UniProtKB：Q6IAI7
660	MAGE-E1（MAGE1）	UniProtKB：Q9HCI5

[0394]

661	MAGE-E2	UniProtKB：Q8TD90	
662	MAGE-F1	UniProtKB：Q9HAY2	
663	MAGE-H1	UniProtKB：Q9H213	
664	MAGEL2	UniProtKB：Q9UJ55	
665	乳腺珠蛋白_A	UniProtKB：Q13296	
666	乳腺珠蛋白_A	UniProtKB：Q6NX70	
667	MART-1/melan-A	UniProtKB：Q16655	
668	MART-2	UniProtKB：Q5VTY9	
669	MC1_R	UniProtKB：Q01726	
670	MC1_R	UniProtKB：Q1JUL4	
671	MC1_R	UniProtKB：Q1JUL6	
672	MC1_R	UniProtKB：Q1JUL8	
673	MC1_R	UniProtKB：Q1JUL9	
674	MC1_R	UniProtKB：Q1JUM0	
675	MC1_R	UniProtKB：Q1JUM2	
676	MC1_R	UniProtKB：Q1JUM3	
677	MC1_R	UniProtKB：Q1JUM4	
678	MC1_R	UniProtKB：Q1JUM5	
679	MC1_R	UniProtKB：Q6UR92	
680	MC1_R	UniProtKB：Q6UR94	
681	MC1_R	UniProtKB：Q6UR95	

[0395]

682	MC1_R	UniProtKB：Q6UR96	
683	MC1_R	UniProtKB：Q6UR97	
684	MC1_R	UniProtKB：Q6UR98	
685	MC1_R	UniProtKB：Q6UR99	
686	MC1_R	UniProtKB：Q6URA0	
687	MC1_R	UniProtKB：Q86YW1	
688	MC1_R	UniProtKB：V9Q5S2	
689	MC1_R	UniProtKB：V9Q671	
690	MC1_R	UniProtKB：V9Q783	
691	MC1_R	UniProtKB：V9Q7F1	
692	MC1_R	UniProtKB：V9Q8N1	
693	MC1_R	UniProtKB：V9Q977	
694	MC1_R	UniProtKB：V9Q9P5	
695	MC1_R	UniProtKB：V9Q9R8	
696	MC1_R	UniProtKB：V9QAE0	
697	MC1_R	UniProtKB：V9QAR2	
698	MC1_R	UniProtKB：V9QAW3	
699	MC1_R	UniProtKB：V9QB02	
700	MC1_R	UniProtKB：V9QB58	
701	MC1_R	UniProtKB：V9QBY6	
702	MC1_R	UniProtKB：V9QC17	

[0396]

703	MC1_R	UniProtKB：V9QC66
704	MC1_R	UniProtKB：V9QCQ4
705	MC1_R	UniProtKB：V9QDF4
706	MC1_R	UniProtKB：V9QDN7
707	MC1_R	UniProtKB：V9QDQ6
708	间皮素	UniProtKB：Q13421
709	MITF	UniProtKB：O75030-8
710	MITF	UniProtKB：O75030-9
711	MITF	UniProtKB：O75030
712	MMP1_1	UniProtKB：B3KQS8
713	MMP7	UniProtKB：P09237
714	MUC-1	Genbank：AAA60019
715	MUM-1/m	RefSeq：NP_116242
716	MUM-2/m	UniProtKB：Q9Y5R8
717	MYO1A	UniProtKB：Q9UBC5
718	MYO1B	UniProtKB：O43795
719	MYO1C	UniProtKB：O00159
720	MYO1D	UniProtKB：O94832
721	MYO1E	UniProtKB：Q12965
722	MYO1F	UniProtKB：O00160
723	MYO1G	UniProtKB：B0I1T2

[0397]

724	MYO1H	RefSeq：NP_001094891
725	NA17	UniProtKB：Q3V5L5
726	NA88-A	Pubmed：10790436
727	Neo-PAP	UniProtKB：Q9BWT3
728	NFYC/m	UniProtKB：Q13952
729	NGEP	UniProtKB：Q6IWH7
730	NPM	UniProtKB：P06748
731	NRCAM	UniProtKB：Q92823
732	NSE	UniProtKB：P09104
733	NUF2	UniProtKB：Q9BZD4
734	NY-ESO-1	UniProtKB：P78358
735	OA1	UniProtKB：P51810
736	OGT	UniProtKB：O15294
737	OS-9	UniProtKB：B4DH11
738	OS-9	UniProtKB：B4E321
739	OS-9	UniProtKB：B7Z8E7
740	OS-9	UniProtKB：Q13438
741	骨钙蛋白	UniProtKB：P02818
742	骨桥蛋白	UniProtKB：A0A024RDE2
743	骨桥蛋白	UniProtKB：A0A024RDE6
744	骨桥蛋白	UniProtKB：A0A024RDJ0

[0398]

745	骨桥蛋白	UniProtKB：B7Z351
746	骨桥蛋白	UniProtKB：F2YQ21
747	骨桥蛋白	UniProtKB：P10451
748	p53	UniProtKB：P04637
749	PAGE-4	UniProtKB：O60829
750	PAI-1	UniProtKB：P05121
751	PAI-2	UniProtKB：P05120
752	PAP	UniProtKB：Q06141
753	PAP	UniProtKB：Q53S56
754	PATE	UniProtKB：Q8WXA2
755	PAX3	UniProtKB：P23760
756	PAX5	UniProtKB：Q02548
757	PD1L1	UniProtKB：Q9NZQ7
758	PDCD1	UniProtKB：Q15116
759	PDEF	UniProtKB：O95238
760	PECA1	UniProtKB：P16284
761	PGCB	UniProtKB：Q96GW7
762	PGFRB	UniProtKB：P09619
763	Pim-1_-激酶	UniProtKB：A0A024RD25
764	Pin-1	UniProtKB：O15428
765	Pin-1	UniProtKB：Q13526

[0399]

766	Pin-1	UniProtKB：Q49AR7
767	PLAC1	UniProtKB：Q9HBJ0
768	PMEL	UniProtKB：P40967
769	PML	UniProtKB：P29590
770	POTEF	UniProtKB：A5A3E0
771	POTE	UniProtKB：Q86YR6
772	PRAME	UniProtKB：A0A024R1E6
773	PRAME	UniProtKB：P78395
774	PRDX5/m	UniProtKB：P30044
775	PRM2	UniProtKB：P04554
776	prostein	UniProtKB：Q96JT2
777	蛋白酶-3	UniProtKB：D6CHE9
778	蛋白酶-3	UniProtKB：P24158
779	PSA	UniProtKB：P55786
780	PSB9	UniProtKB：P28065
781	PSCA	UniProtKB：D3DWI6
782	PSCA	UniProtKB：O43653
783	PSGR	UniProtKB：Q9H255
784	PSM	UniProtKB：Q04609
785	PTPRC	RefSeq：NP_002829
786	RAB8A	UniProtKB：P61006

[0400]

787	RAGE-1	UniProtKB：Q9UQ07
788	RARA	UniProtKB：P10276
789	RASH	UniProtKB：P01112
790	RASK	UniProtKB：P01116
791	RASN	UniProtKB：P01111
792	RGS5	UniProtKB：O15539
793	RHAMM/CD168	UniProtKB：O75330
794	RHOC	UniProtKB：P08134
795	RSSA	UniProtKB：P08865
796	RU1	UniProtKB：Q9UHJ3
797	RU2	UniProtKB：Q9UHG0
798	RUNX1	UniProtKB：Q01196
799	S-100	UniProtKB：V9HW39
800	SAGE	UniProtKB：Q9NXZ1
801	SART-_1	UniProtKB：O43290
802	SART-2	UniProtKB：Q9UL01
803	SART-3	UniProtKB：Q15020
804	SEPR	UniProtKB：Q12884
805	SIA7F	UniProtKB：Q969X2
806	SIA8A	UniProtKB：Q92185
807	SIAT9	UniProtKB：Q9UNP4

[0401]

808	SIRT2/m	UniProtKB：A0A024R0G8
809	SIRT2/m	UniProtKB：Q8IXJ6
810	SOX10	UniProtKB：P56693
811	SP17	UniProtKB：Q15506
812	SPNXA	UniProtKB：Q9NS26
813	SPXN3	UniProtKB：Q5MJ09
814	SSX-1	UniProtKB：Q16384
815	SSX-2	UniProtKB：Q16385
816	SSX3	UniProtKB：Q99909
817	SSX-4	UniProtKB：O60224
818	ST1A1	UniProtKB：P50225
819	STAG2	UniProtKB：Q8N3U4-2
820	STAMP-1	UniProtKB：Q8NFT2
821	STEAP-1	UniProtKB：A0A024RA63
822	STEAP-1	UniProtKB：Q9UHE8
823	存活蛋白-2B	UniProtKB：O15392-2
824	存活蛋白	UniProtKB：O15392
825	SYCP1	UniProtKB：A0A024R0I2
826	SYCP1	UniProtKB：B7ZLS9
827	SYCP1	UniProtKB：Q15431
828	SYCP1	UniProtKB：Q3MHC4

[0402]

829	SYT-SSX-1	UniProtKB：A4PIV7
830	SYT-SSX-1	UniProtKB：A4PIV8
831	SYT-SSX-2	UniProtKB：A4PIV9
832	SYT-SSX-2	UniProtKB：A4PIW0
833	TARP	UniProtKB：Q0VGM3
834	TCRg	UniProtKB：A2JGV3
835	TF2AA	UniProtKB：P52655
836	TGFR2	UniProtKB：P37173
837	TGM-4	UniProtKB：B2R7D1
838	TIE2	UniProtKB：Q02763
839	TKTL1	UniProtKB：P51854
840	TPI/m	UniProtKB：P60174
841	TRGV11	UniProtKB：Q99601
842	TRGV9	UniProtKB：A4D1X2
843	TRGV9	UniProtKB：Q99603
844	TRGV9	UniProtKB：Q99604
845	TRPC1	UniProtKB：P48995
846	TRP-p8	UniProtKB：Q7Z2W7
847	TSG10	UniProtKB：Q9BZW7
848	TSPY1	UniProtKB：Q01534
849	TVC（TRGV3）	Genbank：M13231.1

[0403]

850	TX101	UniProtKB：Q9BY14-2
851	酪氨酸酶	UniProtKB：A0A024DBG7
853	酪氨酸酶	UniProtKB：L8B082
853	酪氨酸酶	UniProtKB：L8B086
854	酪氨酸酶	UniProtKB：L8B0B9
855	酪氨酸酶	UniProtKB：O75767
856	酪氨酸酶	UniProtKB：P14679
857	酪氨酸酶	UniProtKB：U3M8N0
858	酪氨酸酶	UniProtKB：U3M9D5
859	酪氨酸酶	UniProtKB：U3M9J2
860	TYRP1	UniProtKB：P17643
861	TYRP2	UniProtKB：P40126
862	UPA	UniProtKB：Q96NZ9
863	VEGFR1	UniProtKB：B5A924
864	WT1	UniProtKB：A0A0H5AUY0
865	WT1	UniProtKB：P19544
866	WT1	UniProtKB：Q06250
867	XAGE1	UniProtKB：Q9HD64
868	IL-10	UniProtKB：P22301
869	IL-5	UniProtKB：P05113
870	M-CSF	UniProtKB：P09603

[0404]

871	TGFβ1	UniProtKB：P01137
872	脱天蛋白酶_8	UniProtKB：Q14790
873	SERPINB5	UniProtKB：P36952
874	钙网蛋白	UniProtKB：B4DHR1
875	钙网蛋白	UniProtKB：B4E2Y9
876	钙网蛋白	UniProtKB：P27797
877	钙网蛋白	UniProtKB：Q96L12
878	N-myc	UniProtKB：P04198

[0405] 此外,表A中描述的抗原(包括第4列中所示的序列/片段/表位)可以单独或相互组合地克隆到本文描述的LAMP-抗原构建体中。因此,表A第1列中所示的每一个序列,包括表1

第4列中所述的表位/片段,可用于与另一个也选自表A的第1列或第4列的序列组合以产生LAMP-抗原构建体。例如,在核酸构建体或携带这种核酸构建体的细胞的情况下,所述构建体可以编码表A中或本文中别处列出的一种或多种抗原。此外,IREG序列也可以作为第二多肽(或者在核酸载体或携带这种载体的细胞的情况下,IREG的编码序列)包含在内,以便产生双顺反子LAMP构建体。

[0406] 特定LAMP-抗原构建体中抗原组合的顺序也可以不同。例如,名称pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3指的是表1中描述的蛋白质,并且明确表示不仅泛指表A第1列中所示的全长序列,而且泛指表A的第4列中所述的序列/片段/表位。因此,表A的第1列中示出的每一个序列,包括表1的第4列中描述的表位/片段,都可用于产生LAMP构建体,然后可以将其与例如IREG序列合并,以产生双顺反子LAMP构建体。

[0407] 为了说明不同的、额外的可能抗原组合,但绝不限制本公开,可以将如下所述的抗原(包括表A第1列中所示的序列和/或表A第4列中所述的序列/片段/表位)的组合克隆到所述LAMP构建体中:(a)pp65与gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(b)gB与pp65、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(c)IE1与pp65、gB、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(d)MTRII与pp65、gB、IE1、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(e)US28与pp65、gB、IE1、MTRII、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(f)IGFBP2与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-

1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(g)IL10与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(h)UL144与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(i)UL141与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(j)US11与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(k)IE2与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(l)TERT与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(m)存活蛋白与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(n)破伤风与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(o)NY-ESO-1与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、HER2、HER3、HVEM、

HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(p)HER2与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(q)HER3与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(r)HVEM与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(s)HOS与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(t)HPV16E6与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(u)HPV18E6与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(v)HPV16E7与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(w)HPV18E7与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(x)EBNA1与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、

HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(y)EBNA1 trunc与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(z)gp350与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(aa)LMP2与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ab)GCP3与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ac)中间S与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ad)X蛋白与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ae)TIGIT与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(af)TEM8与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ag)TEM1与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、

HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ah)HER2 ECD+TM与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ai)CEA与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(aj)TARP与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ak)PROSTEIN与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(al)PSMA与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(am)BIRC4与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(an)黏蛋白-1与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ao)黏蛋白-1iso与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ap)CD40-L与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、

EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、WT-1、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(aq)WT-1与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1trunc.、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(ar)WT-1trunc与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(as)PRAME与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、LAGE-1和/或MAGE A3中的至少一者;(at)LAGE-1与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME和/或MAGE A3中的至少一者;和/或(au)MAGE A3与pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、黏蛋白-1、黏蛋白-1iso、CD40-L、WT-1、WT-1trunc.、PRAME和/或LAGE-1中的至少一者。特定LAMP构建体中如上所述的抗原组合的顺序可以变化,因为该列表描述了LAMP构建体包含的抗原,而不一定描述了特定构建体内抗原的排列。此外,具体设想了这些抗原可以在单个LAMP构建体内组合,或者可以在包含多个LAMP构建体的组合物中递送。

[0408] 可以在本文的双顺反子LAMP构建体中使用的抗原的其他实例包括例如在国际公开WO 2018/204534中(例如该公开的表1和图19-20中)或国际公开WO 2021/077051中(例如该公开的表1和图11A中)公开的抗原。这两篇出版物整体通过引用并入本文。

[0409] 在某些情况下,在所述双顺反子LAMP构建体中使用的抗原包括pp65抗原,例如包含SEQ ID NO:291、292或293,或表A的第4列中所示的SEQ ID NO:291的一个或多个部分。在某些情况下,所述抗原包含SEQ ID NO:292或293。在某些情况下,在所述双顺反子LAMP构建体中使用的抗原包括gB抗原,例如包含SEQ ID NO:294、295、296或297,或表A的第4列中所示的SEQ ID NO:294中的一个或多个抗原片段。在某些情况下,所述抗原包含SEQ ID NO:296或297。在某些情况下,在所述双顺反子LAMP构建体中使用的抗原包括1E1抗原,例如包含SEQ ID NO:298、299或300,或表A的第4列中所示的1E1多肽序列中的一者或多者。在某些情况下,所述抗原包含SEQ ID NO:299或300。在某些情况下,所述抗原包含pp65、gB和1E1抗原序列中的超过一者,例如通过一个或多个接头肽序列联结,如表A的第4列中所示。在某些

情况下,所述抗原包含pp65、gB和1E1抗原序列中的每一者,例如选自一组抗原序列(a)包含SEQ ID NO:292或293,(b)包含SEQ ID NO:296或297,和(c)包含SEQ ID NO:299或300的序列。例如,此类pp65、gB和1E1抗原的多核苷酸编码序列可以与IREG蛋白编码序列一起用于双顺反子LAMP构建体中。例如,采取多肽、多核苷酸(即DNA载体或自复制RNA载体)或细胞形式的此类构建体可用于治疗各种癌症,例如上文列出的癌症,包括例如其中所述癌症(包括所有进展阶段,包括增生)是腺癌、肉瘤、皮肤癌、黑色素瘤、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌(包括但不限于NSCLC、SCLC、鳞状细胞癌)、结肠直肠癌、肛门癌、直肠癌、宫颈癌、肝癌、头颈癌、口腔癌、唾液腺癌、食管癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌(PDA)、肾癌、胃癌、肾癌、多发性骨髓瘤或脑癌的情形。在某些情况下,所述癌症是多形性成胶质细胞瘤。在某些情况下,所述癌症是乳腺癌。在某些情况下,所述癌症是前列腺癌。在某些情况下,所述癌症是头颈癌。在某些情况下,所述癌症是结肠直肠癌。

[0410] 在其他情况下,所述抗原包含大T抗原,例如包含SEQ ID NO:254、255或256的氨基酸序列。在某些情况下,所述抗原包含SEQ ID NO:255或SEQ ID NO:256的氨基酸序列。在某些情况下,所述双顺反子LAMP构建体内的LAMP-抗原构建体包含SEQ ID NO:879或SEQ ID NO:880的氨基酸序列,两者均包含侧翼为LAMP1的同源结构域的SEQ ID NO:256的氨基酸序列,并包含信号序列。SEQ ID NO:879进一步包含LAMP跨膜结构域和胞质区。在本文的双顺反子LAMP构建体中,所述构建体可以进一步包含或编码IREG蛋白。例如,其中抗原是大T抗原的构建体可用于治疗癌症,例如皮肤癌,例如梅克尔细胞癌。此类抗原可以与作为第二多肽的IREG组合,其实例在下文和本公开中别处提供。

[0411] E.用于双顺反子LAMP构建体的示例性免疫应答增强基因(IREG)

[0412] 在一些实施方式中,所述第二多肽可以包括由免疫应答增强基因(IREG)编码的结构域或抗原,其可以增加对所述双顺反子LAMP-抗原构建体的T细胞应答和/或抗体应答。IREG多肽的实例包括例如CD40L、CD80、OX40、Flt3L、GM-CSF、IL-12、IL-21、IL-23、IL-15、CD70、CD86、IL-7、IL-18、IL-33、GM-CSF、4-1BB、4-1BBL、IL-27或CCL20。

[0413] 1.CD40配体(CD40L)

[0414] 在一些实施方式中,所述IREG是CD40L。CD40L是一种在活化的T细胞,特别是CD4 T细胞的表面上表达的跨膜蛋白。CD40L刺激抗原呈递细胞(APC)例如树突状细胞(DC)和巨噬细胞以及B细胞的CD40依赖性活化,以增强T细胞和抗体应答。在一些实施方式中,所述CD40L是CD40L的可溶性版本(sCD40L)。在一些实施方式中,所述sCD40L是4-三聚体,即包含CD40L三聚体的四聚体的蛋白质复合物。在一些实施方式中,所述sCD40L比天然CD40L更易溶解和/或具有更好的分泌。此类CD40L序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:204具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0415] 在某些情况下,所述sCD40L与另一种多肽例如SPD融合。在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含第二多核苷酸,其编码与以下序列具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:196、233或238,或者SEQ ID NO:131或133、然后是SEQ ID NO:204的组合。在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含第二多核苷酸,其编码与以下序列具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、

至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:196、233或238,或者SEQ ID NO:131或133、然后是SEQ ID NO:204的组合。在某些情况下,所述第二多肽的编码序列包含与SEQ ID NO:239或237或205具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％或100％序列同一性的核苷酸序列。

[0416] 2.FLT3L

[0417] 在一些实施方式中,所述IREG是FLT3L。此类FLT3L序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:151或209具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

[0418] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体编码第二多肽,其包括前面带有SPD多肽的人Flt3L多肽,从而产生融合蛋白。在某些此类情况下,所述双顺反子构建体编码第二多肽,其氨基酸序列与SEQ ID NO:207具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％或100％的序列同一性。

[0419] 3.IL-12

[0420] 在一些实施方式中,所述IREG是IL-12。此类IL-12序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:137、139、143、145、147、149、187、189、193或213具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

[0421] 在一些实施方式中,所述IL-12的核苷酸编码序列包含与SEQ ID NO:138、140、144、146、148、150、188、190、194或214具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0422] 4.IL-21

[0423] 在一些实施方式中,所述IREG是IL-21。此类IL-21序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:179、181或217具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

[0424] 在一些实施方式中,所述IL-21的核苷酸编码序列包含与SEQ ID NO:180、182或218具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0425] 5.OX40配体(OX40L)

[0426] 在一些实施方式中,所述IREG是OX40L。此类OX40L序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:153、155或243具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列。在某些情况下,所述OX40L与异源信号肽例如来自IL-2的信号肽融合。在某些情况下,所述OX40L序列是胞外结构域序列。在某些情况下,所述OX40L胞外结构域还与免疫球蛋白的Fc结构域融合。在某些情况下,所述双顺反子构建体包含第二多核苷酸,其编码与以下序列具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％或100％序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:242,或者SEQ

ID NO:246或248、然后是SEQ ID NO:243的组合。

[0427] 6.IL-15

[0428] 在一些实施方式中,所述IREG是IL-15。此类IL-15序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:167或169具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述IL-15的核苷酸编码序列包含与SEQ ID NO:168或170具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列。

[0429] 在某些情况下,所述IL-15被表达在异源信号序列例如IgKVIII或Ig-κ的后面。此类IL-15序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:225具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述IL-15的核苷酸编码序列包含与SEQ ID NO:226具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列。

[0430] 7.CD80

[0431] 在一些实施方式中,所述IREG是CD80。此类CD80序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:157、159或253具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述CD80的核苷酸编码序列包含与SEQ ID NO:158或160或254具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列。

[0432] 在某些情况下,所述CD80被表达在异源信号序列例如IL-2信号序列的后面。在某些情况下,所述CD80是CD80的胞外结构域。在某些情况下,所述CD80的胞外结构域进一步与免疫球蛋白的Fc结构域融合。此类序列的实例包括但不限于与SEQ ID NO:252或253具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0433] F.示例性双顺反子LAMP构建体序列

[0434] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含编码LAMP-抗原多肽的多核苷酸序列,所述多肽包含LAMP蛋白的腔内结构域的两个同源结构域和与所述LAMP蛋白异源的抗原结构域,其中所述抗原结构域被放置在所述两个同源结构域之间。在某些情况下,所述LAMP的第一同源结构域包含与SEQ ID NO:198的第29位残基到C-端或SEQ ID NO:1的第29-194位残基具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽序列。在某些情况下,所述LAMP的第二同源结构域包含与SEQ ID NO:202或SEQ ID NO:1的第228-381位残基具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽序列。

[0435] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:230具有至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列。

[0436] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:228具有至少60%、至

少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0437] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:197具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0438] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:208具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0439] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:212具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0440] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:216具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0441] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:222具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0442] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:241具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0443] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:251具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0444] 在一些实施方式中,所述双顺反子构建体包含与SEQ ID NO:235具有至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0445] G.编码双顺反子LAMP构建体的序列的组装

[0446] 构建包含感兴趣抗原的双顺反子LAMP构建体的方法在本领域中是众所周知的(参见例如Williams等,J.Cell Biol.111:955,1990)。编码所需区段的DNA序列可以从容易获得的重组DNA材料获得,例如可以从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,12301Parklawn Drive,Rockville,Md.20852,U.S.A.)或含有所需DNA的DNA文库获得的那些材料。

[0447] 例如,可以使用重组DNA方法的常规程序,将与所需结构域序列相对应的DNA片段与适合的控制和信号序列组装在一起。参见例如在美国专利第4,593,002号和Langford等,Molec.Cell.Biol.6:3191,1986中所述。

[0448] 编码蛋白质或多肽的DNA序列可以通过化学方法合成或通过几种方法之一分离。所述待合成的DNA序列可以被设计成具有适用于所需氨基酸序列的密码子。一般来说,人们会为所述序列将在其中用于表达的预期宿主选择优选的密码子。完整序列可以从通过标准方法制备的交叠寡核苷酸组装,并组装成完整的编码序列。参见例如Edge,Nature 292:

756,1981;Nambair等,Science 223:1299,1984;Jay等,J.Biol.Chem.259:6311,1984。

[0449] 在一个方面,使用聚合酶链反应单个地分离编码双顺反子LAMP构建体的结构域序列的一个或多个多核苷酸(M.A.Innis等,在《PCR方案:方法和应用指南》(PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications),Academic Press,1990中)。所述结构域优选地从已知含有它们的公开可用的克隆中分离,但它们也可以从基因组DNA或cDNA文库中分离。优选地,分离的片段以相容的限制性内切酶位点为边界,其允许构建编码所述抗原序列的双顺反子LAMP构建体。这种技术是本领域技术人员公知的。结构域序列可以直接相互融合(例如没有居间序列),或相互插入(例如其中结构域序列不连续),或者可以被居间序列(例如接头序列)分隔开。

[0450] 制备寡核苷酸引物、探针和DNA文库,以及通过核酸杂交对其进行筛选的基本策略,对于本领域普通技术人员来说是公知的。参见Sambrook等,1989,同上;Perbal,1984,同上。适合的基因组DNA或cDNA文库的构建在本领域的技术范围之内。参见例如Perbal,1984,同上。或者,适合的DNA文库或公开可用的克隆可以从生物研究材料的供应商处例如Clonetech和Stratagene获得,也可以从公共保藏处例如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)获得。

[0451] 选择可以通过从DNA表达文库表达序列并免疫检测所表达的肽来实现。选择表达与MHC II分子和所需抗体/T细胞受体结合的肽的克隆。这些选择程序对于本领域普通技术人员来说是公知的(参见例如Sambrook等,1989,同上)。

[0452] 一旦制备或分离出含有所需多肽序列的编码序列的克隆,就可以将所述序列克隆到任何适合的载体中,所述载体优选地包含用于在宿主细胞中维持所述序列的复制原点。

[0453] H.核酸递送媒介

[0454] 在一个方面,本公开提供了一种核酸分子(例如质粒或载体),其包含:(i)第一多核苷酸序列,其编码融合在LAMP蛋白的第一同源结构域与LAMP蛋白的第二同源结构域之间(或至少在两个半胱氨酸保守片段之间)的本文所描述的抗原,例如所述至少一种感兴趣的抗原可以被放置在所述LAMP铰链区中,或者可以代替所述LAMP铰链区;和(ii)第二多核苷酸序列,其编码与分泌信号序列可操作地连接的至少一种IREG或其他抗原,其中所述IREG或其他抗原被分泌到所述受试者的循环中。其他示例性核酸实施方式被描述在发明内容和权利要求书部分以及整个本文的公开内容中。

[0455] 所述核酸分子可以作为疫苗组合物提供并引入到细胞中。所述细胞可以是用于复制所述核酸分子或用于表达所述双顺反子LAMP构建体(提供所述LAMP-抗原构建体)和所述与分泌信号序列可操作地连接的IREG或第二抗原(使得包含所述IREG或第二抗原的第二多肽从细胞分泌出来)的宿主细胞。优选地,所述宿主细胞是抗原呈递细胞(在下文进一步描述)。在一些实施方式中,所述疫苗包含DNA、mRNA或自扩增RNA。

[0456] 在一些实施方式中,所述编码LAMP-抗原构建体的第一多核苷酸序列进一步包含用于插入到靶细胞中的多核苷酸序列和与其可操作地连接的表达控制序列,以控制所述第一多核苷酸序列在所述细胞中的表达(例如转录和/或翻译)。同样地,在一些实施方式中,所述编码包含IREG或其他抗原的第二多肽的第二多核苷酸序列进一步包含用于插入到靶细胞中的多核苷酸序列和与其可操作地连接的表达控制序列,以控制所述第二多核苷酸序列在所述细胞中的表达(例如转录和/或翻译)。包含所述第一和第二多核苷酸序列的核酸

分子可以提供为例如质粒、噬菌体、自主复制序列(ARS)、着丝粒和能够在体外或宿主细胞(例如细菌、酵母或昆虫细胞)和/或靶细胞(例如哺乳动物细胞,优选为抗原呈递细胞)中复制或被复制和/或将所述表达的序列输送到所述靶细胞内的所需位置的其他序列。

[0457] 重组表达载体可以源自容易感染动物(包括人、马、奶牛、猪、美洲驼、长颈鹿、狗、猫或鸡)的微生物。本文中的某些载体包括已被用作活疫苗的载体,例如痘苗。这些重组体可以直接接种到宿主中,不仅为微生物载体提供免疫力,而且表达外来抗原。正如在例如Flexner,Adv.Pharmacol.21:51,1990中教导的,本文中设想的作为活重组疫苗的一些载体包括RNA病毒、腺病毒、疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒以及痘苗和其他痘病毒。

[0458] 表达控制序列包括但不限于结合RNA聚合酶的启动子序列、分别与转录激活子和阻遏物结合的增强子序列或负调控元件,和/或用于核糖体结合的翻译起始序列。例如,细菌表达载体可以包含启动子例如lac启动子,以及用于转录起始的Shine-Dalgarno序列和起始密码子AUG(Sambrook等,1989,同上)。类似地,真核表达载体优选地包含用于RNA聚合酶II的异源、同源或嵌合启动子,下游多聚腺苷酸化信号,起始密码子AUG和用于核糖体脱离的终止密码子。

[0459] 表达控制序列可以从天然存在的基因获得,也可以被设计。设计的表达控制序列包括但不限于突变和/或嵌合的表达控制序列或合成或克隆的共有序列。含有启动子和多核苷酸可以在其中可操作地连接的克隆位点的载体在本领域中是公知的。此类载体能够在体外或体内转录RNA,并且可以从诸如Stratagene(La Jolla,Calif.)和Promega Biotech(Madison,Wis.)的来源商购。

[0460] 为了优化表达和/或转录,可能需要移除、添加或改变所述载体的5'和/或3'非翻译部分,以消除额外的或可选的翻译起始密码子或可能在转录或翻译水平上干扰或减少表达的其他序列。或者,可以紧靠起始密码子的5'处插入共有核糖体结合位点以增强表达。多种表达控制序列(控制与其可操作地连接的多核苷酸序列的表达的序列)可用于这些载体中,以表达本公开的多核苷酸序列。此类有用的表达控制序列包括例如SV40、CMV、痘苗、多瘤病毒、腺病毒、疱疹病毒的早期或晚期启动子和已知控制哺乳动物细胞基因表达的其他序列,以及它们的各种组合。

[0461] 所述第一和第二多核苷酸序列(编码所述LAMP-抗原构建体和第二多肽)可以从相同或不同的表达控制序列表达。例如,单个启动子可用于编码两种多肽的双顺反子mRNA分子的转录,或者可以使用不同的启动子来控制所述两种不同多肽的表达。本领域技术人员将会意识到,"第二"编码蛋白的翻译可以通过包含翻译增强元件例如内部核糖体进入位点(IRES)(Wiley Interdiscip.Rev.RNA 3:195-212,2012)或非结构化连接序列以实现翻译的终止后重新启动(Onishi等,G3(Bethesda)6(12):4115-4125,2016)来实现。然而,在一些实施方式中,编码所述两种多肽的多核苷酸序列从不同的表达控制序列(例如不同的启动子)表达。

[0462] 为了实现所述第二多核苷酸的分泌,其编码序列可以包括编码长度通常为16-30个氨基酸的分泌信号序列(也被称为前导序列)的多核苷酸序列,以便表达与分泌信号序列可操作地连接的第二多核苷酸序列。本领域技术人员熟知适合的分泌信号序列,其包括例如白介素-2、CD5、免疫球蛋白κ轻链(在后文中被称为Ig-κ前导序列)、胰蛋白酶原、血清白蛋白和催乳素的信号序列(Stern等,Trends Cell Mol.Biol.2:1-17,2007;Kober等,

Biotechnol.Bioengin.110:1164-1173,2013)。在某些情况下,所述分泌信号序列可以是对所述IREG或第二多肽抗原而言“本源的”分泌信号序列。

[0463] 在一个方面,所述核酸分子包含用于复制的复制原点。优选地,所述原点在至少一种类型的宿主细胞中起作用,所述宿主细胞可用于产生足够数量的序列拷贝,以用于递送到靶细胞。因此,适合的原点包括但不限于在细菌细胞(例如埃希氏杆菌属菌种(Escherichia sp.)、沙门氏菌属菌种(Salmonella sp.)、变形杆菌属菌种(Proteus sp.)、梭菌属菌种(Clostridium sp.)、克雷伯氏菌属菌种(Klebsiella sp.)、芽孢杆菌属菌种(Bacillus sp.)、链霉菌属菌种(Streptomyces sp.)和假单胞菌属菌种(Pseudomonas sp.))、酵母(例如酵母属菌种(Saccharamyces sp.)或毕赤酵母属菌种(Pichia sp.))、昆虫细胞和哺乳动物细胞中起作用的那些原点。在一个方面,提供了在引入核酸递送媒介的靶细胞(例如哺乳动物细胞,例如人类细胞)中起作用的复制原点。在另一个方面,提供了至少两个复制原点,一个在宿主细胞中起作用,另一个在靶细胞中起作用。

[0464] 所述核酸分子可以可选地或另外地包含一种多核苷酸序列,以促进所述核酸分子(例如递送载体)的至少一部分整合到靶细胞的染色体中。例如,所述核酸分子可以包含与靶细胞染色体DNA同源的区域。在一个方面,所述核酸分子被提供为递送载体,其包含两个或更多个重组位点,所述重组位点在编码所述LAMP-抗原构建体和第二多肽的核酸序列和/或所述双顺反子LAMP构建体本身的侧翼。

[0465] 所述载体可以另外包含可检测和/或可选择标记,以验证所述载体已被成功地引入到靶细胞中和/或可以被所述靶细胞表达。这些标记可以编码活性,例如但不限于RNA、肽或蛋白质的产生,或者可以为RNA、肽、蛋白质、无机和有机化合物或组合物等提供结合位点。

[0466] 可检测/可选择标记基因的实例包括但不限于:编码提供对原本有毒的化合物(例如抗生素)的抗性的产物的DNA区段;编码在受体细胞中原本缺乏的产物的DNA区段(例如tRNA基因、营养缺陷型标记);编码抑制基因产物的活性的产物的DNA区段;编码易于鉴定的产物(例如表型标记如β-半乳糖苷酶、荧光蛋白(GFP、CFP、YFG、BFP、RFP、EGFP、EYFP、EBFP、dsRed、其突变、修饰或增强的形式等)和细胞表面蛋白)的DNA区段;结合原本对细胞存活和/或功能有害的产物的DNA区段;以其他方式抑制其他核酸区段的活性的DNA区段(例如反义寡核苷酸);结合修饰底物的产物(例如限制性内切酶)的DNA区段;可用于分离或鉴定所需分子的DNA区段(例如编码特定蛋白质结合位点的片段);引物序列;当缺乏时直接或间接地赋予对特定化合物的抗性或敏感性的DNA区段;和/或编码在受体细胞中有毒的产物的DNA区段。

[0467] 所述标记基因可用作成功基因转移的构象的标记,和/或用于分离表达被转移的基因的细胞和/或从细胞中回收被转移的基因。例如,在一个方面,所述标记基因用于分离和纯化表达本文描述的双顺反子LAMP构建体的抗原呈递细胞。

[0468] 可以提供基本上相似的基因,例如与已知基因具有大于约50%、大于约70%、大于80%、大于约90%、优选地大于约95%同一性的基因。基本上相似的结构域序列最初可以通过选择在严格杂交条件下与感兴趣的结构域序列特异性杂交的序列来鉴定。进行测定以确定同源、变异或修饰的结构域序列的适合性只是筛选表达适合活性的序列的问题。这种筛选在本领域中是常规的。

[0469] 编码所述LAMP-抗原构建体和第二多肽的双顺反子LAMP构建体可以被提供为裸核酸分子,或者与一个或多个分子相结合提供在递送媒介中,以促进核酸进入细胞。适合的递送媒介包括但不限于:脂质体制剂、多肽、多糖、脂多糖、病毒制剂(例如包括病毒、病毒粒子、人工病毒包膜等)、细胞递送媒介等。

[0470] I.基于脂质的制剂

[0471] 被设计用于促进编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子的细胞内递送的递送媒介必须与非极性和极性环境两者(例如在质膜、组织液、细胞内的隔室等中或上)相互作用。因此,优选地,递送媒介被设计成含有极性和非极性结构域两者或用于将编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子易位到细胞中的易位序列。

[0472] 具有极性和非极性结构域的化合物称为两亲物。阳离子两亲物具有极性基团,能够在生理pH下或其附近带正电荷,与带负电荷的多核苷酸例如DNA相互作用。

[0473] 包含所述双顺反子LAMP构建体的核酸分子可以以包含脂质单层或双层的制剂的形式提供,以促进所述载体跨过细胞膜转移。可以使用脂质体或任何形式的脂质膜,例如平面脂质膜或完整细胞(如红细胞)的细胞膜。脂质体制剂可以通过任何手段施用,包括静脉内或口服施用。

[0474] 脂质体和脂质体制剂可以根据标准方法制备,并且在本领域中是公知的,参见例如Remington's;Akimaru,1995,Cytokines Mol.Ther.1:197-210;Alving,1995,Immunol.Rev.145:5-31;Szoka,1980,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467;美国专利第4,235,871号;美国专利第4,501,728号;以及美国专利第4,837,028号。在一个方面,所述脂质体包含靶向分子,用于将脂质体:核酸分子(本文中的双顺反子LAMP构建体)复合物靶向到特定细胞类型。在一个特定方面,靶向分子包括靶组织中发现的血管或细胞的表面上的生物分子(例如受体或配体)的结合配偶体(例如配体或受体)。

[0475] 脂质体电荷是脂质体从血液中清除的重要决定因素,带负电荷的脂质体更快地被网状内皮系统吸收(Juliano,1975,Biochem.Biophys.Res.Commun.63:651),因此在血流中的半衰期更短。掺入磷脂酰乙醇胺衍生物通过防止脂质体聚集来延长循环时间。例如,将N-(ω-羧基)酰氨基磷脂酰乙醇胺掺入到L-α-二硬脂酰磷脂酰胆碱的大型单层囊泡中,显著延长了体内脂质体循环寿命(参见例如Ahl,1997,Biochim.Biophys.Acta 1329:370-382)。具有延长的循环半衰期的脂质体通常适合用于治疗和诊断用途。关于药代动力学的一般性讨论,参见例如Remington's,第37-39章;Lee等,在《药代动力学分析:实用方法》(Pharmacokinetic Analysis:A Practical Approach)(Technomic Publishing AG,Basel,Switzerland 1996)中。

[0476] 通常,脂质体使用约5至15摩尔%的带负电荷的磷脂例如磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸或磷脂酰肌醇来制备。添加带负电荷的磷脂例如磷脂酰甘油,也用于防止脂质体自发聚集,从而使不想要的脂质体聚集物形成的风险最小化。浓度为至少50摩尔%的膜硬化剂例如鞘磷脂或饱和中性磷脂,以及5至15摩尔%的单唾液酸基神经节苷脂,也可以赋予理想的脂质体特性例如刚性(参见例如美国专利第4,837,028号)。

[0477] 此外,所述脂质体悬液可以包括脂质保护剂,其在储存过程中保护脂质免受自由基和脂质过氧化损伤。可以使用亲脂性自由基淬灭剂例如α-生育酚和水溶性铁特异性螯合剂例如ferrioxianine。

[0478] 本文所述的双顺反子LAMP构建体也可以掺入到尺寸各异的多层囊泡中。例如,可以将形成囊泡的脂质溶解在适合的有机溶剂或溶剂体系中,并在真空或惰性气体下干燥以形成薄脂质膜。如果需要,可以将所述膜重新溶解在适合的溶剂例如叔丁醇中,然后冻干以形成更均匀的脂质混合物,所述混合物采取更容易水合的粉末状形式。将这种膜用肽或多肽复合物的水溶液覆盖,并允许其在搅拌下水合通常15至60分钟的时间段。通过在更剧烈的搅拌条件下水合所述脂质或通过添加增溶去污剂例如脱氧胆酸盐,可以使得到的多层囊泡的尺寸分布向更小的尺寸方向迁移。水合介质优选地包含在最终的脂质体悬液中脂质体内部体积中所需的浓度的核酸。

[0479] 在脂质体制备后,可以调整所述脂质体的尺寸,以达到所需的尺寸范围和相对窄的脂质体尺寸分布。一个示例性的尺寸范围是约0.2至0.4微米,这允许将所述脂质体悬液通过常规滤器(通常是0.22微米滤器)过滤进行除菌。如果脂质体的尺寸已经减小到约0.2至0.4微米,则可以在高通量的基础上进行过滤器除菌。有几种技术可用于将脂质体调整到所需尺寸(参见例如美国专利第4,737,323号)。

[0480] 适合的脂质包括但不限于DOTMA(Felgner等,1987,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7413-7417)、DOGS或Transfectain™(Behr等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:6982-6986)、DNERIE或DORIE(Felgner等,Methods 5:67-75)、DC-CHOL(Gao和Huang,1991,BBRC 179:280-285)、DOTAP™(McLachlan等,1995,Gene Therapy2:674-622)、Lipofectamine™和甘油脂质化合物(参见例如EP901463和WO98/37916)。

[0481] 适合与所述双顺反子LAMP构建体络合的其他分子可以包括阳离子分子,例如聚酰胺胺(Haensler和Szoka,1993,Bioconjugate Chem.4:372-379)、树枝状聚赖氨酸(WO 95/24221)、聚乙烯亚胺或聚丙烯亚胺(WO 96/02655)、聚赖氨酸(美国专利第5,595,897号;FR 2 719316)、壳聚糖(美国专利第5,744,166号)、DNA-明胶凝聚体(参见例如美国专利第6,207,195号;美国专利第6,025,337号;美国专利第5,972,707号)或DEAE葡聚糖(Lopata等,1984,Nucleic Acid Res.12:5707-5717)。

[0482] J.基于病毒的基因递送媒介

[0483] 在一个方面,包含所述双顺反子LAMP构建体的核酸分子被提供为包含病毒或病毒粒子的递送媒介。在这一方面,优选地,所述核酸分子包含病毒载体。病毒载体如反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒和疱疹病毒,通常由两个组分组成,即修饰的病毒基因组和围绕它的外壳结构(参见例如Smith等,1995,Ann.Rev.Microbiol.49:807-838),尽管有时病毒载体以裸露形式引入或被病毒蛋白以外的蛋白包被。目前,大多数载体的外壳结构与野生型病毒相似。这种结构包装和保护病毒核酸,并提供结合和进入靶细胞的手段。

[0484] 优选地,包含本文描述的双顺反子LAMP构建体的病毒载体从野生型病毒基因组修饰而成,以使所述病毒不能在靶细胞中生长,同时使所述病毒能够在用于制备感染性粒子的宿主细胞(例如包装或辅助细胞)中生长。载体核酸通常包含用于在辅助细胞系中复制和包装的必需顺式作用病毒序列,以及用于调节被递送至靶细胞的多核苷酸的表达的表达控制序列。正如本领域中已知的,其他病毒功能在特定包装或辅助细胞系中以反式表达。

[0485] 病毒载体可以衍生自选自疱疹病毒、巨细胞病毒、泡沫病毒、慢病毒、塞姆利基森林病毒、AAV(腺相关病毒)、痘病毒、腺病毒和反转录病毒的病毒。此类病毒载体在本领域中是众所周知的。

[0486] 在一个方面,使用的病毒载体是腺病毒载体。腺病毒基因组由约36kb的线性双链DNA分子组成,携带完成病毒复制周期所需的超过约30个基因。早期基因分为4个区域(E1至E4),除E3区域之外,其余区域对病毒复制至关重要,E3区域被认为调节抗病毒宿主免疫应答。E1区(EIA和EIB)编码负责调节病毒基因组转录的蛋白质。E2区基因(E2A和E2B)的表达导致病毒复制所需的多肽的合成。由E3区编码的蛋白质防止细胞毒性T细胞和肿瘤坏死因子的细胞溶解(Wold和Gooding,1991,Virology 184:1-8)。由E4区编码的蛋白质参与DNA复制、晚期基因表达和剪接以及宿主细胞关闭(Halbert等,1985,J.Virol.56:250-257)。所述晚期基因通常编码对病毒衣壳有贡献的结构蛋白。此外,腺病毒基因组携带顺式作用的5'和3'ITR(反向末端重复序列)和DNA复制所必需的包装序列。所述ITR带有DNA复制原点,而衣壳化区域是腺病毒DNA包装成感染性粒子所需要的。

[0487] 如Heise和Kim(2000,J.Clin.Invest.105:847-851)中所述,腺病毒载体可以被工程化改造成条件复制型(CRAd载体),以便在特定细胞(例如增殖性细胞)中选择性复制。在另一个方面,腺病毒载体对E1功能来说是复制缺陷的(例如通过E1的完全或部分缺失或突变)。所述载体的腺病毒骨架可以包含额外的修饰(一个或多个病毒基因中的缺失、插入或突变)。E2修饰的实例通过位于DBP(DNA结合蛋白)编码基因上的热敏突变来说明(Ensinger等,1972,J.Virol.10:328-339)。腺病毒序列也可以缺失掉E4区的全部或部分(参见例如EP 974 668;Christ等,2000,Human Gene Ther.11:415-427;Lusky等,1999,J.Virol.73:8308-8319)。非必需E3区内的额外缺失可以允许被递送的多核苷酸的尺寸增加(Yeh等,1997,FASEB Journal 11:615 623)。然而,保留编码多肽(例如gp19k)的E3序列的全部或部分可能是有利的,其允许病毒逃避免疫系统(Gooding等,1990,Critical Review of Immunology 10:53-71)或炎症反应(EP 00440267.3)。

[0488] 保留了ITR和包装序列并包含大量遗传修饰以废除病毒抗原的残留合成的第二代载体,也可用于改善所表达的基因在被转导的细胞中的长期表达(参见例如WO 94/28152;Lusky等,1998,J.Virol 72:2022-2032)。

[0489] 被引入到细胞中的本公开的核酸分子可以插入到病毒基因组的任何位置中,例外的是顺式作用序列。优选地,它被插入以代替被缺失的区域(E1、E3和/或E4),优选地在缺失的E1区内。

[0490] 腺病毒可以源自任何人类或动物来源,特别是犬(例如CAV-1或CAV-2,Genbank参考号分别为CAVIGENOM和CAV77082)、禽(Genbank参考号AAVEDSDNA)、牛(例如BAV3;Reddy等,1998,J.Virol.72:1394 1402)、鼠(Genbank参考号ADRMUSMAVI)、绵羊、猫、猪或猿猴来源,或者可以是杂合病毒。可以使用任何血清型。在某些情况下,使用C亚组的人腺病毒,特别是腺病毒2(Ad2)和5(Ad5)。此类病毒可以例如从ATCC获得。

[0491] 正如美国专利第5,928,944号中所述,腺病毒粒子或空腺病毒衣壳也可用于通过病毒介导的共内化过程来转移编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子。该过程可以在阳离子试剂如聚卡宾或包含一个或多个脂质层的脂质囊泡的存在下完成。

[0492] 腺病毒粒子可以根据本领域中的任何常规技术(例如WO 96/17070),使用以反式方式提供病毒复制所需的缺失病毒基因的互补细胞系或辅助病毒来制备和繁殖。细胞系293(Graham等,1977,J.Gen.Virol.36:59-72)和PERC6(Fallaux等,1998,Human Gene Therapy 9:1909-1917)通常用于补充E1缺失。其他细胞系已被工程化改造以补充缺陷的载

体(Yeh等,1996,J.Virol.70:559-565;Kroughak和Graham,1995,Human Gene Ther.6:1575-1586;Wang等,1995,Gene Ther.2:775-783;Lusky等,1998,J.Virol.72:2022-203;EP 919627和WO 97/04119)。腺病毒粒子可以从培养上清液中回收,也可以在裂解后从细胞中回收,并任选地根据标准技术进一步纯化(例如色谱法、超速离心,如WO 96/27677、WO 98/00524、WO 98/26048和WO 00/50573中所述)。

[0493] 使用源自具有广泛宿主范围的腺病毒的载体,通过修饰病毒表面蛋白,可以实现细胞类型特异性靶向。例如,腺病毒的感染特异性由与受纳细胞表面处存在的细胞受体的附着决定。在这方面,腺病毒衣壳表面处存在的纤突和五邻体在细胞附着中起着关键作用(Defer等,1990,J.Virol.64:3661-3673)。因此,腺病毒的细胞靶向可以通过对编码纤突和/或五邻体的病毒基因进行遗传修饰,以产生能够与独特的细胞表面受体特异性相互作用的修饰的纤突和/或五邻体来进行。此类修饰的实例被描述在Wickarn等,1997,J.Virol.71:8221-8229;Arriberg等,1997,Virol.Chem 268:6866-6869;Roux等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:9079-9083;Miller和Vile,1995,FASEB J.9:190-199;WO 93/09221和WO 95/28494中。

[0494] 在一个特定方面,腺相关病毒序列被用作载体。源自人细小病毒AAV-2(腺相关病毒2型)的载体是目前正在开发的最有前景的基因递送媒介之一。这种系统包装单链DNA的几个特征表明它是裸DNA递送的可能替代品。与其他病毒载体如痘苗或腺病毒相比,一个主要的吸引人的特征是AAV载体不表达任何病毒基因。疫苗构建体中包含的唯一病毒DNA序列是145bp的反向末端重复序列(ITR)。因此,与使用裸DNA的免疫接种中一样,唯一表达的基因是抗原或抗原嵌合体的基因。此外,已知AAV载体转导分裂和非分裂细胞两者,例如人外周血单核细胞衍生的树突状细胞,具有持续的转入基因表达,并有可能进行口腔和鼻内递送,以产生黏膜免疫。此外,所需的DNA量似乎少得多,减少了几个数量级,最大响应发生在10^{10}至10^{11}个DNA粒子或拷贝的剂量下,与此相比裸DNA剂量为50ug或约10^{15}个拷贝。

[0495] 在一个方面,通过以下步骤来包装AAV载体:用包含在编码AAV ITR嵌合蛋白的构建体和含有AAV编码区(AAV rep和cap基因)但不含所述ITR的AAV辅助质粒ACG2中的DNA共转染适合的细胞系(例如人293细胞)。随后用腺病毒Ad5感染所述细胞。载体可以使用本领域中已知的方法(例如氯化铯密度梯度超速离心)从细胞裂解物中纯化,并经过验证以确保它们不含可检测的具有复制能力的AAV或腺病毒(例如通过细胞病变效应生物测定法)。AAV滴度可以使用在用蛋白酶K消化后制备的病毒DNA样品,通过定量PCR来确定。优选地,通过这种方法产生的载体滴度为约$5x10^{12}$至$1x10^{13}$个DNA酶抗性粒子/ml。

[0496] 在其他方面,使用反转录病毒载体。反转录病毒是一类整合型病毒,它使用病毒编码的反转录酶进行复制,将病毒RNA基因组复制成双链DNA,其被整合到被感染细胞(例如靶细胞)的染色体DNA中。此类载体包括源自鼠白血病病毒,特别是Moloney(Gilboa等,1988,Adv.Exp.Med.Biol.241:29)或Friend's FB29毒株(WO 95/01447)的载体。通常,反转录病毒载体会缺失掉病毒基因gag、pol和env的全部或部分,并保留5'和3'LTR和衣壳化序列。这些元件可以被修饰以提高反转录病毒载体的表达水平或稳定性。此类修饰包括用反转录转座子之一例如VL30代替反转录病毒衣壳化序列(参见例如美国专利第5,747,323号)。优选地,本公开的核酸分子被插入到衣壳化序列的下游,优选地以相对于反转录病毒基因组相反的方向。正如本领域中已知的,细胞特异性靶向可以通过将抗体或抗体片段与反转录病

毒包膜蛋白偶联来实现。

[0497] 反转录病毒粒子在辅助病毒存在下或在适合的互补(包装)细胞系中制备,所述细胞系含有整合在其基因组中的所述反转录病毒载体所缺陷的反转录病毒基因(例如gag/pol和env)。此类细胞系在现有技术中已有描述(Miller和Rosman,1989,BioTechniques 7:980;Danos和Mulligan,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:6460;Markowitz等,1988,Virol.167:400)。env基因的产物负责病毒粒子与靶细胞表面上存在的病毒受体的结合,因此决定了所述反转录病毒粒子的宿主范围。在本公开的背景下,有利的是使用包装细胞系,例如含有兼嗜性包膜蛋白的PA317细胞(ATCC CRL 9078)或293EI6(WO97/35996),以允许感染人类和其他物种的靶细胞。所述反转录病毒粒子优选地从培养上清液中回收,并且可以任选地根据标准技术(例如色谱法、超速离心)进一步纯化。

[0498] 其他适合的病毒包括痘病毒。已绘制并测序了痘病毒科的几个成员的基因组。痘病毒载体可以从痘病毒科的任何成员获得,特别是金丝雀痘、鸡痘和痘苗病毒。适合的痘苗病毒包括但不限于哥本哈根毒株(Goebel等,1990,Virol.179:247-266;Johnson等,1993,Virol.196:381-401)、惠氏毒株和修饰的安卡拉(MVA)毒株(Antoine等,1998,Virol.244:365-396)。构建痘苗病毒载体的一般条件在本领域中是已知的(参见例如EP 83 286和EP 206 920;Mayr等,1975,Infection 3:6-14;Sutter和Moss,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10847-10851)。优选地,将感兴趣的多核苷酸插入到非必需基因座例如非编码基因间区或者失活或缺失不显著损害病毒生长和复制的任何基因内。

[0499] 痘病毒粒子如本领域中所述来制备(Piccini等,1987,Methods of Enzymology 153:545-563;美国专利第4,769,330号;美国专利第4,772,848号;美国专利第4,603,112号;美国专利第5,100,587号和美国专利第5,179,993号)。通常,构建供体质粒,通过在大肠埃希氏杆菌(E.coli)中生长进行扩增,并通过常规程序进行分离。然后,将其与痘病毒基因组一起引入到适合的细胞培养物(例如鸡胚成纤维细胞)中,以通过同源重组产生痘病毒粒子。这些粒子可以从培养上清液或裂解步骤(例如化学裂解、冻融、渗透压冲击、超声处理等)后的培养细胞中回收。可以使用连续几轮的噬斑纯化来去除污染的野生型病毒。然后可以使用本领域已知的技术(例如色谱法或在氯化铯或蔗糖梯度上超速离心)纯化病毒粒子。

[0500] 在全球根除天花的运动中使用痘苗病毒作为活病毒疫苗,使痘苗病毒成为开发活重组疫苗载体的明显选择。已报道了表达近100种不同外来蛋白的活重组痘苗病毒,其中许多是有效的实验性疫苗(由Moss和Flexner,1987综述)。痘苗病毒作为表达载体特别通用,因为它的基因组尺寸大,能够接受至少25,000个碱基对的外来DNA,并且能够感染大多数真核细胞类型,包括昆虫细胞(同上)。与其他DNA病毒不同,痘病毒仅在被感染细胞的细胞质中复制,降低了重组病毒DNA与宿主染色体进行遗传交换的可能性。重组痘苗载体已被证明能够正确加工和表达来自各种来源的蛋白质,包括人、其他哺乳动物、寄生虫、RNA和DNA病毒、细菌和噬菌体。

[0501] 编码外来蛋白的DNA的表达受宿主病毒调控元件(包括上游启动子序列,必要时还包括RNA加工信号)的控制。将外来DNA插入到痘苗病毒基因组的非必需区域中通过同源重组来进行(Panicali等,Proc.Nat'l.Acad.Sci,USA,79:4927,1982;Mackett等,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,79:7415,1982)。

[0502] 由于插入位点处或其附近的转录调控元件或通过更精确的遗传工程,本公开的核

酸分子可以表达多肽。已经构建了极大促进外来基因的插入和表达的质粒载体(Mackett等,J.Virol,49:857,1982)。这些载体含有由痘苗病毒转录启动子和用于插入外来编码序列的一个或多个独特的限制性内切酶位点组成的表达位点,侧翼是来自痘苗病毒基因组的非必需区域的DNA。启动子的选择决定了表达的时间(例如早期或晚期)和水平,而侧翼DNA序列决定了同源重组的位点。

[0503] 通过这种程序产生的病毒粒子中只有约千分之一是重组的。尽管重组病毒噬斑可以通过DNA杂交鉴定,但已开发出高效的选择程序。通过使用非必需的痘苗病毒胸苷激酶(TK)基因的区段作为侧翼序列,外来基因重组到TK基因座,并通过插入使TK基因失活。TK病毒的选择通过在5-溴脱氧尿苷存在下在TK细胞中进行病毒噬斑测定来实现。所述核苷类似物的磷酸化和随后在病毒DNA中的致命掺入仅发生在用TK+亲本病毒感染的细胞中。取决于转染和重组的效率,多达80个噬斑是所需的重组体,其余的是自发TK突变体。

[0504] 含有大肠埃希氏杆菌β-半乳糖苷酶基因以及第二基因的表达位点的质粒载体允许一种区分重组体和亲本病毒的替代方法(Chakrabarti等,Mol.Cell.Biol.,5:3403,1985)。由此类重组体形成的噬斑可以通过在添加适合的指示剂后形成的蓝色进行阳性鉴定。通过将TK选择和β-半乳糖苷酶表达两者结合,重组病毒被容易且快速地分离。然后通过在适合的细胞系中繁殖来扩增所述重组体,并通过适当的酶学、免疫学或物理学程序来检查插入基因的表达。

[0505] 可以添加到痘苗病毒基因组中的遗传信息的量的上限尚不清楚。然而,添加近25,000个碱基对的外来DNA对病毒产量没有明显的有害影响(Smith等,Gene,25:21,1983)。如有必要,可以缺失痘苗病毒基因组的大区段以提供额外的容量(Moss等,J.Virol.40:387,1981)。

[0506] 病毒衣壳分子可以包括靶向部分,以促进靶向和/或进入细胞。适合的靶向分子包括但不限于化学偶联物、脂质、糖脂、激素、糖、聚合物(例如PEG、聚赖氨酸、PEI等)、肽、多肽(参见例如WO 94/40958)、维生素、抗原、凝集素、抗体及其片段。优选地,此类靶向分子识别并结合细胞特异性标志物、组织特异性标志物、细胞受体、病毒抗原、抗原性表位或肿瘤相关标志物。

[0507] 基于病毒粒子的包含双顺反子LAMP构建体的组合物可以以10至10^{14}i.u(感染单位)之间、优选地10至10^{11}i.u之间的剂量形式配制。所述滴度可以通过常规技术测定。双顺反子LAMP构建体的剂量优选地在0.01至10mg/kg之间,更特别地在0.1至2mg/kg之间。

[0508] K.自复制RNA

[0509] 自复制RNA病毒载体(也被称为自扩增RNA病毒载体)也可以使用本文描述的双顺反子LAMP构建体构建。例如,甲病毒、黄病毒、麻疹病毒和弹状病毒可用于产生自复制RNA病毒疫苗。自复制RNA病毒的示例性毒株包括但不限于狂犬病病毒(RABV)、水疱性口炎病毒(VSV)、西尼罗病毒、昆津病毒、塞姆利基森林病毒(SFV)、辛德比斯病毒(SIN)和/或委内瑞拉马脑炎病毒(VEE)。

[0510] 自复制RNA病毒在递送到组织中后表达天然抗原,从而模拟减毒活疫苗,而没有恢复致病性的风险。它们还刺激先天免疫系统,从而增强应答。参见例如Ljungberg,K.,自复制甲病毒RNA疫苗(Self-replicating alphavirus RNA vaccines),Expert Rev Vaccines(2):177-94(2015);Lundstrom,K.,癌症免疫疗法中的溶瘤甲病毒(Oncolytic

Alphaviruses in Cancer Immunotherapy),Vaccines 5:9(2017);Lundstrom,K.,作为疫苗的复制子RNA病毒载体(Replicon RNA Viral Vectors as Vaccines),Vaccines 4:39(2016)(整体通过引用并入本文)。包含本文描述的双顺反子LAMP构建体的自复制疫苗的使用也可用于初免-加强方案。

[0511] 此外,如本文中所述,自复制RNA病毒也可以被脂质体包裹,以改善递送和靶向。用包含本文描述的核酸分子的自复制RNA病毒进行免疫接种可以提供更高的抗原瞬时表达水平,导致产生中和抗体应答并在安全条件下针对致命激惹提供保护。

[0512] L.基于细胞的递送媒介

[0513] 根据本公开的核酸分子可以通过包含所述构建体的其他细胞(“递送细胞”)递送到靶细胞。将核酸分子引入细胞的方法在本领域中是已知的,并包括将DNA显微注射到细胞核中(Capechi等,1980,Cell 22:479-488),用$CaPO_4$转染(Chen和Okayama,1987,Mol.Cell Biol.7:2745 2752),电穿孔(Chu等,1987,Nucleic Acid Res.15:1311-1326),脂染/脂质体融合(Feigner等,1987,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7413-7417)和粒子轰击(Yang等,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:9568-9572)。适合的细胞包括自体和非自体细胞,并且可以包括异种细胞。可以通过诱导递送细胞的死亡(例如通过向这些细胞提供可诱导自杀基因)来诱导所述递送细胞将其内容物递送到靶细胞。

[0514] M.辅助分子

[0515] 包含根据本公开的核酸分子的组合物可以包含一种或多种辅助分子,用于促进所述核酸分子引入到细胞中和/或增强特定治疗效果和/或提高抗体生产。

[0516] 此外,所述组合物可以包括一种或多种稳定化物质,例如脂质、核酸酶抑制剂、水凝胶、透明质酸酶(WO 98/53853)、胶原酶、聚合物、螯合剂(EP 890362),以便抑制动物/人体内的降解和/或改善载体在靶细胞中的转染/感染。此类物质可以单独或组合使用(例如阳离子和中性脂质)。

[0517] 还已显示,腺病毒蛋白能够破坏内体的稳定,并增强DNA在细胞中的摄取。腺病毒与含有脂质复合的DNA载体的溶液的混合物,或DNA与使用蛋白质交联剂共价连接到腺病毒的聚赖氨酸的结合,可以显著提高包含核酸分子的双顺反子LAMP构建体的摄取和表达(参见例如Curiel等,1992,Am.I.Respir.Cell.Mol.Biol.6:247-252)。

[0518] N.宿主细胞

[0519] 根据本公开的核酸分子可以在各种宿主细胞中表达,包括但不限于:原核细胞(例如大肠埃希氏杆菌、葡萄球菌属菌种(Staphylococcussp.)、芽孢杆菌属菌种);酵母细胞(例如酵母属菌种);昆虫细胞;线虫细胞;植物细胞;两栖动物细胞(例如爪蟾);禽类细胞;以及哺乳动物细胞(例如人类细胞、小鼠细胞、哺乳动物细胞系、原代培养的哺乳动物细胞例如来自被解剖组织的细胞)。

[0520] 所述分子可以在从生物体分离的宿主细胞、作为生物体一部分的宿主细胞或引入到生物体中的宿主细胞中表达。在一个方面,所述核酸分子在体外,例如在培养物中的宿主细胞中表达。在另一个方面,所述核酸分子在转基因生物体(例如转基因小鼠、大鼠、兔、猪、灵长类动物等)中表达,所述生物体包含体细胞和/或生殖系细胞,所述细胞包含编码本文的双顺反子LAMP构建体的核酸。构建转基因动物的方法在本领域中是公知的,并且是常规的。

[0521] 本文所描述的核酸分子也可以在体外引入到细胞中,并且可以将所述细胞(例如干细胞、造血细胞、淋巴细胞等)引入到宿主生物体中。所述细胞相对于所述宿主生物体可以是异源的或自体的。例如,可以从所述宿主生物体获得细胞,将核酸分子在体外引入到所述细胞中,然后重新引入到所述宿主生物体中。

[0522] O.抗原呈递细胞

[0523] 在本发明的一个方面,将本文所述的核酸分子引入到天然或工程化的抗原呈递细胞中。

[0524] 本文所使用的术语“抗原呈递细胞”(APC)意指在其表面上呈递与主要组织相容性复合物分子(优选为II类MHC分子)或其部分结合的抗原的任何细胞。下文详细讨论了适合的APC的实例,包括但不限于完整细胞例如巨噬细胞、树突状细胞、B细胞、混合APC和寄养抗原呈递细胞。制造混合APC的方法在本领域中被描述和已知。

[0525] 树突状细胞(DC)是强效的抗原呈递细胞。已显示,DC提供T细胞活化和增殖所需的所有信号。这些信号可分为两种类型。第一种类型为免疫应答提供特异性,通过T细胞受体/CD3(“TCR/CD3”)复合物与被APC表面上的主要组织相容性复合物(“MHC”,定义如上)I类或II类蛋白呈递的抗原性肽之间的相互作用介导。这种相互作用对于发生T细胞活化来说是必要的,但不是充分的。事实上,在没有第二种类型的信号的情况下,第一种类型的信号可以导致T细胞无能。第二种类型的信号被称为共刺激信号,既不是抗原特异性也不是MHC限制性的,其在第一种类型的信号存在下,可以导致T细胞的完全增殖响应和T细胞效应器功能的诱导。

[0526] 几种分子已被显示增强共刺激活性。这些分子包括但不限于热稳定抗原(HSA)、硫酸软骨素修饰的MHC不变链(Ii-CS)、细胞内黏附分子I(ICAM-1)和APC表面上的B7共刺激分子及其在T细胞上的反受体CD28或CTLA-4。

[0527] 其他重要的共刺激分子是CD40、CD54、CD80、CD86。本文所使用的术语“共刺激分子”涵盖了任何单个分子或分子组合,其在与T细胞表面上的TCR结合的肽/MHC复合物一起作用时,提供共刺激效应,实现结合所述肽的T细胞的活化。因此,所述术语涵盖B7或APC上的其他共刺激分子、其片段(单独地、与另一个分子复合或作为融合蛋白的一部分),所述片段与肽/MHC复合物一起结合同源配体,并在T细胞表面上的TCR特异性结合所述肽时导致T细胞活化。共刺激分子可从各种来源商购,包括例如Beckman Coulter。

[0528] 在本公开的一个方面,使用在Romani等,J.Immunol.Methods 196:135-151,1996和Bender等,J.Immunol.Methods 196:121-135,1996中描述的方法从哺乳动物(例如鼠类、猿猴或人类)的外周血单核细胞(PBMC)产生未成熟和成熟的树突状细胞。简而言之,利用免疫磁性技术对分离的PBMC进行预处理,以耗竭T细胞和B细胞。然后将淋巴细胞耗竭的PBMC在增补有人血浆(优选为自体血浆)和GM-CSF/IL-4的RPMI培养基中培养(例如约7天),以产生树突状细胞。树突状细胞与其单核细胞祖先相比是非黏附的。因此,在大约第7天,收获非黏附细胞以用于进一步加工。

[0529] 在GM-CSF和IL-4存在下从PBMC衍生的树突状细胞是未成熟的,因为如果从培养物中去除细胞因子刺激,它们可以失去非黏附特性并恢复到巨噬细胞的细胞命运。处于未成熟状态的树突状细胞在加工MHC II类限制性途径的天然蛋白质抗原方面非常有效(Romani等,J.Exp.Med.169:1169,1989)。培养的树突状细胞的进一步成熟通过在含有必要成熟因

子的巨噬细胞条件培养基(CM)中培养3天来实现。成熟的树突细胞捕获新蛋白质进行呈递的能力较低,但在刺激静息T细胞(CD4和CD8两者)生长和分化方面要好得多。

[0530] 成熟的树突状细胞可以通过以下来鉴定:其形态的变化,例如形成更具运动性的细胞质突起;其非黏附性;下述标志物中的至少一者的存在:CD83、CD68、HLA-DR或CD86;或Fc受体例如CD 115的丧失(在Steinman,Annu.Rev.Immunol.9:271,1991中综述)。可以使用典型的细胞荧光成像和细胞分选技术和装置(例如FACScan和FACStar)来收集和分析成熟的树突状细胞。用于流式细胞术的第一抗体是那些对成熟树突状细胞的细胞表面抗原具有特异性的抗体,并且是可商购的。第二抗体可以是生物素化的Ig,然后是FITC或PE偶联的链霉亲和素。

[0531] 或者,其他人报道了一种上调(激活)树突状细胞并将单核细胞转变成活化的树突状细胞表型的方法。这种方法包括向培养基添加钙离子载体,以将单核细胞转变成活化的树突状细胞。例如,在24-48小时的培养期开始时添加钙21离子载体A23187,导致合并的“单核细胞加DC”级分的均匀活化和树突状细胞表型转变:特征性地,所述活化的群体均匀地变成CD 14(Leu M3)阴性,并上调HLA-DR、HLA-DQ、ICAM-1、137.1和137.2。此外,这种活化的混合群体也在小数量的基础上起到进一步纯化的群体的作用。细胞因子的特定组合已被成功地用于扩大(或部分替代)使用钙离子载体实现的活化/转变:这些细胞因子包括但不限于G-CSF、GM-CSF、IL-2和IL-4。单独给予的每种细胞因子不足以实现最佳的上调。

[0532] 用于分离APC的第二种方法是收集已经在血液中循环的相对大量的预定型APC。用于从人类外周血分离定型APC的先前技术涉及多种物理程序的组合,例如甲泛葡胺梯度和黏附/非黏附步骤(Freudenthal等,PNAS 87:7698-7702,1990)、Percoll梯度分离(Mehta-Damani等,J.Immunol.153:996-1003,1994)以及荧光激活细胞分选技术(Thomas等,J.Immunol.151:6840-52,1993)。

[0533] 本领域中有许多其他常规方法用于分离专业抗原呈递细胞(或其前体),并且此类方法和可能开发的其他方法是非限制性的,并且涵盖在本公开的范围之内。

[0534] 在一个实施方式中,所述APC以及因此呈递一种或多种抗原的细胞是自体的。在另一个实施方式中,所述呈递抗原的APC是同种异体的,即源自不同的受试者。

[0535] 正如本文中所讨论的,本文所述的核酸分子可以使用上述方法或本领域中已知的其他方法引入到APC中,包括但不限于转染、电穿孔、融合、显微注射、基于病毒的递送或基于细胞的递送。Arthur等,Cancer Gene Therapy 4(1):17-25,1997报道了在人树突状细胞中基因转移方法的比较。

[0536] 已知的、部分的和推定的人白细胞抗原(HLA)(人MHC的遗传名称)的氨基酸和核苷酸序列(包括共有序列)已被发表(参见例如Zemmour和Parham,Immunogenetics 33:310-320,1991),并且表达HLA变体的细胞系是已知的,通常也是可获得的,许多来自美国典型培养物保藏中心(“ATCC”)。因此,使用PCR,可以容易地将编码II类MHC的核苷酸序列与本公开的表达载体可操作地连接,然后将其用于转化适合的细胞以在其中进行表达。

[0537] 可以使用专业APC,例如巨噬细胞、B细胞、单核细胞、树突状细胞和朗格汉斯细胞。这些细胞使用标准程序从1)自体供体,2)具有与待治疗的宿主不同的HLA特异性的异源供体,或3)不同物种的异种供体的血液或组织中收集(Coligan等,《免疫学现代方法》(Current Protocols in Immunology),第3和14节,1994)。所述细胞可以从正常宿主或患

有感染性疾病、癌症、自身免疫性疾病或过敏的患者中分离。

[0538] 可使用白细胞去除术和“FICOLL/HYPAQUE”密度梯度离心(通过FICOLL和不连续的Percoll密度梯度逐步离心)从外周血中获得专业APC。所采用的程序避免了APC向可能被APC内化的抗原的暴露,从而导致对感兴趣的抗原不特异的T细胞的活化。

[0539] 通过引入编码适合分子的序列,可以将非天然抗原呈递细胞工程化改造成抗原呈递细胞。例如,编码II类MHC分子、辅助分子、共刺激分子和抗原加工辅助分子的核酸序列可以在直接合成、克隆、从含有此类基因的细胞中纯化DNA等之后引入。获得用于编码在本文中描述的双顺反子LAMP构建体和方法中使用的分子的基因的一种权宜手段是通过在选定的核酸模板上用选定的寡核苷酸引物对进行聚合酶链反应(PCR)扩增。例如,可以使用上皮细胞、内皮细胞、肿瘤细胞、成纤维细胞、活化的T细胞、嗜酸性粒细胞、角质形成细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞、胸腺皮质上皮细胞、施旺细胞、视网膜色素上皮细胞、成肌细胞、血管平滑肌细胞、软骨细胞、肠上皮细胞、甲状腺细胞和肾小管细胞。这些细胞可以是最近从宿主中外植并且没有在细胞培养中广泛传代以形成已建立的细胞系的原代细胞,也可以是相对均质且能够增殖许多代或无限增殖的已建立的细胞系。

[0540] 作为非专业APC的细胞,使用各种已知的分离方法,从它们在其中驻留的自体供体、异源供体或异种供体的任何组织中分离(Darling,《动物细胞:培养和培养基》(Animal Cells:Culture and Media),J.Wiley,New York,1994;Freshney,《动物细胞的培养》(Culture of Animal Cells),Alan R.Liss,Inc.,New York,1987)。非自体细胞例如异源或异种细胞,可以离体进行工程化改造,以表达与已知的人HLA特异性相匹配的I类和II类HLA分子。然后,可以将这些细胞引入与所述工程化细胞的HLA特异性相匹配的人类受试者中。进一步对所述细胞进行离体工程化改造,以表达根据本公开的一种或多种LAMP构建体。

[0541] 通过标准细胞培养方法将所述工程化细胞维持在细胞培养中(Darling,《动物细胞:培养和培养基》(Animal Cells:Culture and Media),J.Wiley,New York,1994;Freshney,《动物细胞的培养》(Culture of Animal Cells),Alan R.Liss,Inc.,New York,1987)。用于本公开的细胞系从各种来源获得(例如《ATCC细胞系和杂交瘤目录》(ATCC Catalogue of Cell Lines&Hybidomas),美国典型培养物保藏中心,第8版,1995年),或使用标准方法生产(Freshney,《永生化细胞的培养》(Culture of Immortalized Cells),Wiley-Liss,New York,1996)。非转化细胞系优选地用于人类受试者。

[0542] 在一个方面,从受试者身体获得在GM-CSF影响下分化成树突状细胞的CD34+前体,并将编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子引入到所述细胞中,然后将其注射到所述受试者中。使用本文所描述的核酸分子将增强源自特定抗原的肽与转导的抗原呈递细胞上的II类MHC分子的结合,导致显著更强的全身性T细胞依赖性免疫应答和/或抗体产生。尽管以这种策略转染的抗原呈递细胞优选为自体细胞,但如上所述,可以使用在所述宿主中有效呈递抗原的任何MHC II类细胞。

[0543] P.施用

[0544] 根据本公开的疫苗材料可以含有本文描述的编码免疫刺激性双顺反子LAMP构建体的核酸分子,或者可以是表达所述免疫刺激性双顺反子LAMP构建体的重组微生物或抗原呈递细胞。用于个体免疫接种的此类核酸分子的制备和施用根据本领域技术人员公知的免疫接种原则来完成。

[0545] 通过培养含有所述核酸分子的重组或转化细胞,可以获得大量的这些材料。培养方法对于本领域技术人员而言是公知的,并且在上文引用的一个或多个文件中教导。包含本文所述的核酸分子的疫苗通常通过培养重组或转化的细胞来生产,并配制成药理学上可接受的溶液或悬液,通常是生理相容的水溶液,或配制成包衣片剂、片剂、胶囊、栓剂或安瓿,正如本领域中,例如在通过引用并入本文的美国专利第4,446,128号中所述。施用可以是任何适合的途径,包括口服、直肠、鼻内或注射,其中注射可以是例如透皮、皮下、肌肉内或静脉内。

[0546] 本文所描述的核酸分子可以以足以在哺乳动物中诱导免疫应答的量施用到所述哺乳动物。在一些实施方式中,施用的最小量是引发抗体形成至施用前存在的浓度的至少4倍浓度所需的量。施用的典型初始剂量为10^5至10^{11}个噬斑形成单位的重组载体,尽管这个量可以由进行所述施用的临床医生进行调整,正如在施用疫苗和其他诱导免疫应答的药剂时通常发生的那样。单次施用通常可以足以诱导免疫力。

[0547] 包含本文所描述的核酸分子的疫苗最初可以在非人哺乳动物(例如小鼠或灵长类动物)中进行测试。例如,接种小鼠的免疫应答测定可用于证明所述双顺反子LAMP构建体与野生型抗原相比具有更多的抗体、T细胞增殖和细胞毒性T细胞应答。疫苗可以在恒河猴中进行评估,以确定在小鼠中高度有效的疫苗制剂是否也将引发适当的猴免疫应答。在一个方面,每只猴每次免疫接种共接受5mg核酸分子,IM递送并分为2个部位,在第0天和第4、8和20周进行免疫接种,并任选地进行额外的给药。可以测量抗体应答、ADCC、CD4+和CD8+T细胞的细胞因子产生、CD4+和CD8+T细胞的抗原特异性细胞因子染色,以监测针对所述疫苗的免疫反应。

[0548] 根据本公开的制剂和施用的适合方法的进一步描述可以在美国专利第4,454,116号(构建体)、美国专利第4,681,762号(重组细菌)和美国专利第4,592,002和第4,920,209号(重组病毒)中找到。

[0549] Q.治疗程序

[0550] 在一个实施方式中,可以在患者恶性肿瘤过程中的任何合适时间将本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子注射到所述患者中。例如,在肿瘤负荷低的阶段注射本文所描述的核酸分子。在将所述核酸分子引入到个体的抗原呈递细胞中的可选实施方式中,通过静脉穿刺从所述个体的骨髓或外周血抽取抗原呈递细胞的前体或成熟的抗原呈递细胞。这些细胞在培养中建立,然后用所述核酸分子转导。一旦发生转导,就将这些抗原呈递细胞注射回所述患者中。

[0551] 在一个特定实施方式中,本公开提供了一种治疗具有低肿瘤负荷的癌症患者的方法,例如在疾病早期、在切除赘生肿瘤后或在以其他方式降低肿瘤细胞负荷时。在这种方法中,从所述患者获得含有能够分化成表达II类MHC分子的抗原呈递细胞的自体干细胞的细胞群体。将这些细胞培养,并通过引入本文描述的双顺反子LAMP构建体进行转化,以将所述与II类MHC分子相关的抗原递送到所述区室/细胞器内或所述抗原被递送到的另一个区室/细胞器内,并将第二抗原或IREG分泌到循环中。

[0552] 然后将所述转染的干细胞群体重新引入到所述患者中,在那里所述干细胞分化成抗原呈递细胞,其表达与来自所述抗原的T_h表位复合的II类MHC分子。通过辅助T细胞群体的增强刺激,针对所述抗原的免疫应答将被增强。所述分泌的抗原或IREG通过例如扩大记

忆应答来增强所述免疫应答。

[0553] 更一般而言,在一个实施方式中,本公开提供了一种疫苗组合物,其包含编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子,用于在哺乳动物中调节针对抗原的免疫应答(即刺激、增强或减少这种应答)。

[0554] R.试剂盒

[0555] 本公开还包括便于执行本文描述的方法的试剂盒。在一个方面,试剂盒包含如本文所描述的编码双顺反子LAMP构建体的核酸分子和用于接受所述核酸分子的细胞。在一个方面,所述细胞是专业APC。细胞可以表达也可以不表达共刺激分子。在一个方面,当所述细胞不表达共刺激分子时,由所述双顺反子LAMP构建体编码的抗原是自身抗原。在另一个方面,提供了一组表达不同MHC分子(例如已知在人类中表达的MHC分子)的细胞。在另一个方面,所述试剂盒包含促进所述核酸分子进入细胞的试剂(例如基于脂质的制剂、病毒包装材料、细胞等)。在另一个方面,提供了一种或多种对由所述核酸分子编码的抗原特异的T细胞系,以验证所述双顺反子LAMP构建体引发、调节或增强免疫应答的能力。

[0556] S.附加实施方式

[0557] 本文的附加实施方式包括下述实施方式:

[0558] 1.一种核酸分子,其包含:

[0559] a.第一多核苷酸序列,其编码包含抗原和LAMP蛋白的半胱氨酸保守片段的LAMP-抗原构建体;和

[0560] b.第二多核苷酸序列,其编码至少一种与分泌信号序列可操作地连接的IREG多肽;

[0561] c.其中所述第一和第二多核苷酸序列与用于在宿主或靶细胞中表达所述LAMP-抗原构建体和IREG的表达控制序列可操作地连接。

[0562] 2.根据实施方式1所述的核酸分子,其中:

[0563] a.所述抗原被放置在所述半胱氨酸保守片段的N-端处;

[0564] b.所述抗原被放置在所述半胱氨酸保守片段的C-端处;或

[0565] c.所述抗原被放置在两个半胱氨酸保守片段之间。

[0566] 3.一种核酸分子,其包含:

[0567] a.第一多核苷酸序列,其编码包含被放置在两个半胱氨酸保守片段之间的抗原的LAMP-抗原构建体;和

[0568] b.第二多核苷酸序列,其编码至少一种与分泌信号序列可操作地连接的IREG多肽;

[0569] c.其中所述第一和第二多核苷酸序列与用于在宿主或靶细胞中表达所述LAMP-抗原构建体和IREG多肽的表达控制序列可操作地连接。

[0570] 4.根据前述实施方式中任一者所述的核酸分子,其中所述改进的LAMP构建体包含图1中示出的ILC-1、ILC-2、ILC-3、ILC-4、ILC-5或ILC-6的结构(即其中所述第一多核苷酸序列编码的多肽包含图1中示出的ILC-1、ILC-2、ILC-3、ILC-4、ILC-5或ILC-6的结构)。

[0571] 5.根据前述实施方式中任一者所述的核酸分子,其中所述半胱氨酸保守片段包含LAMP蛋白的同源结构域。

[0572] 6.根据前述实施方式中任一者所述的核酸分子,其中所述改进的LAMP构建体进一

步包含LAMP蛋白的跨膜结构域。

[0573] 7.根据前述实施方式中任一者所述的核酸分子,其中所述改进的LAMP构建体进一步包含信号序列。

[0574] 8.根据实施方式7所述的核酸分子,其中所述信号序列源自LAMP蛋白。

[0575] 9.根据前述实施方式中任一者所述的核酸分子,其中包含在所述LAMP-抗原构建体中的抗原被放置在LAMP铰链区中或代替LAMP铰链区。

[0576] 10.根据前述实施方式中任一者所述的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、LIMP 2、Macrosailin、Endolyn、LAMP5或LIMBIC。

[0577] 11.根据实施方式10所述的核酸分子,其中所述LAMP蛋白选自SEQ ID NO:1-113中的任一者。

[0578] 12.根据实施方式10所述的核酸分子,其中所述LAMP蛋白与SEQ ID NO:1-113具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、96％、97％、98％或99％同一性。

[0579] 13.根据前述实施方式中任一者所述的核酸分子,其中所述LAMP-抗原构建体在宿主或靶细胞中的表达导致所述抗原的加工并呈递给II类MHC途径,以引发免疫应答。

[0580] 14.根据前述实施方式中任一者所述的核酸分子,其中所述IREG在宿主或靶细胞中的表达导致所述IREG的分泌。

[0581] 15.根据实施方式14所述的核酸分子,其中所述IREG的分泌可以加强由所述抗原引发的免疫应答。

[0582] 16.根据实施方式1-15中任一者所述的核酸分子,其中所述抗原是与感染性疾病例如Covid-19相关的抗原,与癌症相关的抗原,SARS-CoV-2病毒S1刺突亚基、HER2、NY-ESO1或CD161,或者SARS-CoV-2病毒S1刺突亚基、HER2、NY-ESO1或CD161的结构域。

[0583] 17.根据前述实施方式中任一者所述的核酸分子,其中所述核酸分子是质粒或载体。

[0584] 18.根据实施方式17所述的核酸分子,其中所述核酸分子是病毒载体。

[0585] 19.一种宿主细胞,其包含根据实施方式1至18中任一者所述的核酸分子。

[0586] 20.一种组合物,其包含根据实施方式1至18中任一者所述的核酸分子或根据实施方式19所述的宿主细胞。

[0587] 21.一种治疗患有疾病或病症的受试者的方法,其中所述方法包括以足以减轻或治疗所述疾病或病症的量向有需要的受试者施用根据实施方式1-18中任一者所述的核酸分子或根据实施方式19所述的宿主细胞或根据实施方式20所述的组合物。

[0588] 实施例

[0589] 现在将参考下述实施例进一步说明本公开。应当理解,以下内容仅仅作为示例,并且可以对细节进行修改,同时仍落于本公开的范围之内。

[0590] 实施例1.编码双顺反子LAMP构建体的载体的构建

[0591] 设计了第一代COVID-19疫苗候选物,其编码作为LAMP融合蛋白的一种COVID-19抗原和作为分泌蛋白的第二种COVID-19抗原。所述构建体被命名为ITI-COVID-19双顺反子构建体(ITI-双顺反子-S1-LAMP-RBG pA-EF1-S2P BGH pA;SEQ ID NO:228,图28C),并被证明诱导SARS-Cov-2特异性抗体和T细胞应答两者。为了获得最佳的抗体和T细胞应答,研究了

疫苗的剂量(20μg)和初免与加强之间的时间长度(例如14天)。在用20μg ITI-COVID-19双顺反子疫苗进行两次免疫接种后,诱导了强烈的SARS-Cov-2刺突特异性T细胞和抗体。重要的是,所述ITI-COVID-19双顺反子疫苗引发中和SARS-Cov-2的抗体应答。

[0592] 刺突的S1和S2亚基介导SARS-CoV-2病毒进入宿主细胞。使用用于ILC-4LAMP构建体的核酸分子,所述S1编码序列(GenBank MN908974)位于编码两个LAMP同源结构域(N-LAMP和腔内结构域2)的多核苷酸序列之间。所述S1编码序列在CMV增强子序列的影响下与CMV启动子可操作地连接,因此在宿主细胞中的表达产生包含所述S1抗原的ILC-4LAMP构建体,所述S1抗原用于加工和呈递给II类MHC分子(即提供"初免抗原")。所述S2编码序列被提供在所述载体上的其他地方,并与编码Ig-κ分泌信号的多核苷酸序列(前导序列)和EF1启动子序列可操作地连接,使得在宿主细胞中的表达产生S2抗原用于分泌(即提供"加强抗原")。因此,所述载体提供了一种用于引入到适合的宿主或靶细胞中的单一核酸分子,其能够提供初免和加强抗原两者,以引发增强的免疫应答。因此,这与使用仅编码双顺反子LAMP构建体的载体相比可以提供显著优势,因为加强由LAMP构建体引发的免疫应答的任何需要或要求都需要施用以一个或多个时间间隔单独施用的加强疫苗(例如包含所述抗原)。

[0593] 所述第一代ITI-COVID-19双顺反子疫苗表达病毒表面锚定的刺突糖蛋白的S1和S2亚基。刺突的S1和S2亚基介导SARS-CoV-2病毒进入宿主细胞。使用用于ILC-4LAMP构建体的核酸分子,所述S1编码序列(GenBank MN908974)位于编码两个LAMP同源结构域(N-Lamp和腔内结构域2)的多核苷酸序列之间。所述S1编码序列在CMV增强子序列的影响下与CMV启动子可操作地连接,因此在宿主细胞中的表达产生包含所述S1抗原的ILC-4LAMP构建体,所述S1抗原用于加工和呈递给II类MHC分子(即提供"初免抗原")。所述S2编码序列被提供在所述载体上的其他地方,并与编码Ig-κ分泌信号的多核苷酸序列(前导序列)和EF1启动子序列可操作地连接,使得在宿主细胞中的表达产生S2抗原用于分泌(即提供"加强抗原")。因此,所述载体提供了一种用于引入到适合的宿主或靶细胞中的单一核酸分子,其能够提供靶和加强抗原两者,以引发增强的免疫应答。因此,这与使用仅编码双顺反子LAMP构建体的载体相比可以提供显著优势,因为加强由LAMP构建体引发的免疫应答的任何需要或要求都需要施用以一个或多个时间间隔单独施用的加强疫苗(例如包含所述抗原)。

[0594] 该第一代COVID-19双顺反子构建体的多核苷酸序列示出在图28C中。S1和S2的DNA序列从例如Genbank获得(ncbi.nlm.nih.gov/genbank/sars-cov-2-seqs/#nucleotide-sequences)。在图28A示出的载体中,所述S2多核苷酸序列编码包括两个脯氨酸(P)替换的S2变体。具体而言,所述ITI-COVID-19双顺反子疫苗(第一代疫苗)表达如下文更详细描述的S1-LAMP序列(图28C中示出的SEQ ID NO:227的第950-2004位残基)和具有Ig-κ前导序列的刺突蛋白(第16-1273位残基)(参见图28C;SEQ ID NO:227的第2145-3423位残基)。

[0595] 下面的表1提供了上述双顺反子LAMP构建体的示例性DNA和蛋白质序列,以及可用于构建本文描述的双顺反子LAMP构建体的各种示例性启动子/增强子序列和多肽序列。

[0596] 使用本领域技术人员公知的标准分子生物学技术构建了下述额外的双顺反子LAMP构建体:(1)HER2-LAMP-sCD40L(图11;SEQ ID NO:197),(2)HER2-LAMP-mFLT3L(SEQ ID NO:208),(3)HER2-LAMP-IL-12(SEQ ID NO:212),(4)HER2-LAMP-IL-21(SEQ ID NO:216),(5)HER2-LAMP-OX40L(SEQ ID NO:241),(6)HER2-LAMP-CD80(SEQ ID NO:251),(7)NY-ESO1-LAMP-IL-15(SEQ ID NO:222),(8)CD161-LAMP-sCD40L(SEQ ID NO:235),和第二代

Covid-19构建体(9)刺突-LAMP-sCD40L(2-V Covid疫苗;SEQ ID NO:230)。这些构建体及其部件的序列提供在下面的表中。

[0597] HER2-LAMP-sCD40L表达HER2-LAMP多肽SEQ ID NO:195和mSPD-sCD40L融合蛋白SEQ ID NO:196。HER2-LAMP-mFLT3L表达HER2-LAMP多肽(SEQ ID NO:195)和SPD-mFLT3L多肽SEQ ID NO:207。HER2-LAMP-IL-12表达HER2-LAMP多肽(SEQ ID NO:195)和鼠类IL-12p36-P2A-IL-12p40多肽SEQ ID NO:213。HER2-LAMP-IL-21表达HER2-LAMP多肽(SEQ ID NO:195)和鼠类IL-21多肽SEQ ID NO:217。HER2-LAMP-OX40L表达HER2-LAMP多肽(SEQ ID NO:195)和带有鼠类IL-2信号肽(SP)的OX40L胞外结构域(ECD)Fc融合蛋白SEQ ID NO:242。HER2-LAMP-CD80表达HER2-LAMP多肽(SEQ ID NO:195)和带有鼠类IL-2SP的CD80ECD SEQ ID NO:252。刺突-LAMP-sCD40L表达刺突-LAMP多肽SEQ ID NO:229和SPD-sCD40L多肽SEQ ID NO:233。下面是说明了这些和其他序列的表格。与美国临时优先权申请相比,SEQ ID NO:195已被更新,以反映HER2-LAMP多肽序列包含SEQ ID NO:198,然后是SEQ ID NO:200,然后是SEQ ID NO:202,并且包括在所述临时优先权申请中的重复HER2-LAMP序列已被缺失,而不改变周围序列的总体编号。SEQ ID NO:221和229被类似地更新,以反映NY-ESO1-LAMP和刺突-LAMP多肽序列包含SEQ ID NO:198,然后是NY-ESO1抗原或刺突抗原,然后是SEQ ID NO:202。

[0598]

表 1. 双顺反子构建体中的 DNA 和蛋白质序列

蛋白质	SEQ ID NO:	序列
智人（*H. sapiens*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 NP_005552.3	1	参见图 3
智人（*H. sapiens*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_002285.1	2	参见图 4
智人（*H. sapiens*）LAMP-3 蛋白质序列；登记号 NP_055213.2	3	参见图 5
智人（*H. sapiens*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_005497.1	4	参见图 6
智人（*H. sapiens*）Endolyn 蛋白质序列；登记号 NP_006007.2	5	参见图 8
小鼠(*M. musculus*)LAMP-1 蛋白质序列；登记号 NP_034814.2	6	参见图 3
斑马鱼（*D. rerio*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 NP_955996.1	7	参见图 3
非洲爪蟾（*X. laevis*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 NP_001087042.1	8	参见图 3

[0599]

黑猩猩（*P. troglodytes*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 NP_001233491.1	9	参见图 3
猕猴（*M. mulatta*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 XP_001087801.1	10	参见图 3
家犬（*C. lupus familiaris*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 XP_534193.2	11	参见图 3
欧洲兔（*O. cuniculus*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 XP_002723509.1	12	参见图 3
家牛（*B. taurus*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 NP_001068592.1	13	参见图 3
褐家鼠（*R. novegicus*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 NP_036989.1	14	参见图 3
原鸡（*G. gallus*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 NP_990614.1	15	参见图 3
野猪（*S. scrofa*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 NP_001011507.1	16	参见图 3
家蝇（*M. domestica*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 XP_001374132.1	17	参见图 3
火鸡（*M. gallopavo*）	18	参见图 3

[0600]

LAMP-1 蛋白质序列；登记号 XP_003203252.1		
珍珠鸟(*T. guttate*)LAMP-1 蛋白质序列；登记号 XP_002191607.2	19	参见图 3
安乐蜥（*A. carolinensis*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 XP_003218797.1	20	参见图 3
青鳉（*O. latipes*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 XP_004067118.1	21	参见图 3
红鳍东方鲀（*T. rubripes*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 XP_003969941.1	22	参见图 3
大西洋鲑(*S. salar*)LAMP-1 蛋白质序列；登记号 NP_001158846.1	23	参见图 3
罗非鱼（*O. niloticus*）LAMP-1 蛋白质序列；登记号 XP_003452974.1	24	参见图 3
小鼠(*M. musculus*)LAMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_034815.2	25	参见图 4
非洲爪蟾（*X. laevis*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_001087881.1	26	参见图 4
斑马鱼（*D. rerio*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号	27	参见图 4

[0601]

NP_001013551.1		
142nubisbis LAMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_003918270.1	28	参见图 4
猕猴（*M. mulatta*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_001084005.2	29	参见图 4
黑猩猩（*P. troglodytes*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_003317709.1	30	参见图 4
家犬（*C. lupus familiaris*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_005641822.1	31	参见图 4
家马（*E. caballus*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_001493687.3	32	参见图 4
家牛（*B. taurus*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_001029742.1	33	参见图 4
野猪（*S. scrofa*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_001231184.1	34	参见图 4
绵羊（*O. aries*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_004022401.1	35	参见图 4
褐家鼠（*R. norvegicus*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_058764.2	36	参见图 4

[0602]

鸭嘴兽（*O. anatinus*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_001510101.2	37	参见图 4
原鸡（*G. gallus*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_001001749.1	38	参见图 4
珍珠鸟(*T. guttata*)LAMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_002191794.1	39	参见图 4
热带爪蟾（*X. tropicalis*）LAMP-蛋白质序列 2；登记号 NP_001116192.2	40	参见图 4
大西洋鲑(*S. salar*)LAMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_001133282.1	41	参见图 4
罗非鱼（*O. niloticus*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_003445830.1	42	参见图 4
红鳍东方鲀（*T. rubripes*）LAMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_003961835.1	43	参见图 4
黑猩猩（*P. troglodytes*）LAMP-3 蛋白质序列；登记号 XP_001155195.3	44	参见图 5
143nubisbis LAMP-3 蛋白质序列；登记号 XP_003894825.1	45	参见图 5
猕猴（*M. mulatta*）LAMP-3	46	参见图 5

[0603]

蛋白质序列；登记号 NP_001028044.1		
家犬（*C. lupus familiaris*）LAMP-3 蛋白质序列；登记号 XP_848889.2	47	参见图 5
野猪（*S. scrofa*）LAMP-3 蛋白质序列；登记号 XP_003358746.1	48	参见图 5
斑马鱼（*D. rerio*）LAMP-3 蛋白质序列；登记号 XP_001342688.2	49	参见图 5
家马（*E. caballus*）LAMP-3 蛋白质序列；登记号 XP_001496333.1	50	参见图 5
家牛（*B. taurus*）LAMP-3 蛋白质序列；登记号 NP_001095605.1	51	参见图 5
绵羊（*O. aries*）LAMP-3 蛋白质序列；登记号 XP_004003158.1	52	参见图 5
褐家鼠（*R. norvegicus*）LAMP-3 蛋白质序列；登记号 NP_001012015.1	53	参见图 5
小鼠(*M. musculus*)LAMP-3 蛋白质序列；登记号 NP_796330.2	54	参见图 5
热带爪蟾（*X. tropicalis*）LAMP-3 蛋白质序列；登	55	参见图 5

[0604]

记号 XP_002936919.2		
黑猩猩（*P. troglodytes*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_517214.2	56	参见图 6
猕猴（*M. mulatta*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_001096458.1	57	参见图 6
家犬（*C. lupus familiaris*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_005639134.1	58	参见图 6
家牛（*B. taurus*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_001095623.1	59	参见图 6
小鼠（*M. musculus*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_031670.1	60	参见图 6
斑马鱼（*D. rerio*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_775366.1	61	参见图 6
褐家鼠（*R. norvegicus*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_446453.1	62	参见图 6
原鸡（*G. gallus*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_420593.1	63	参见图 6
热带爪蟾（*X. tropicalis*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_001016557.1	64	参见图 6

[0605]

黑腹果蝇(*D. melanogaster*)LIMP-2 蛋白质序列；登记号 NP_726504.2	65	参见图 6
冈比亚按蚊（*A. gambiae*）LIMP-2 蛋白质序列；登记号 XP_314345.2	66	参见图 6
智人（*H. sapiens*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 NP_002329.2	67	参见图 7
黑猩猩（*P. troglodytes*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 XP_516662.2	68	参见图 7
欧洲兔（*O. cuniculus*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 XP_002716722.1	69	参见图 7
小鼠（*M. musculus*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 NP_780757.1	70	参见图 7
非洲爪蟾（*X. laevis*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 NP_001086181.1	71	参见图 7
斑马鱼（*D. rerio*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 NP_001034942l.1	72	参见图 7
小鼠(*M. musculus*)Endolyn	73	参见图 8

[0606]

蛋白质序列；登记号NP_058594.1		
猕猴（*M. mulatta*）Endolyn蛋白质序列；登记号XP_001091286.1	74	参见图 8
野猪（*S. scrofa*）Endolyn蛋白质序列；登记号XP_001924661.2	75	参见图 8
家牛（*B. taurus*）Endolyn蛋白质序列；登记号NP_001039506.1	76	参见图 8
绵羊（*O. aries*）Endolyn蛋白质序列、；登记号XP_004011265.1	77	参见图 8
家犬（*C. lupus familiaris*）Endolyn蛋白质序列；登记号XP_532256.2	78	参见图 8
褐家鼠（*R. norvegicus*）Endolyn蛋白质序列；登记号NP_114000.1	79	参见图 8
智人（*H. sapiens*）Macrosialin蛋白质序列；登记号NP_001242.2	80	参见图 9
黑猩猩（*P. troglodytes*）Macrosialin蛋白质序列；登记号XP_003315403.1	81	参见图 9
家牛（*B. taurus*）Macrosialin蛋白质序列；登记号	82	参见图 9

[0607]

NP_001039367.1		
小鼠（*M. musculus*）Macrosialin 蛋白质序列；登记号 BAA23738.1	83	参见图 9
猕猴（*M. mulatta*）Macrosialin 蛋白质序列；登记号 XP_014974003.1	84	参见图 9
褐家鼠（*R. norvegicus*）Macrosialin 蛋白质序列；登记号 NP_001026808.1	85	参见图 9
家犬（*C. lupus familiaris*）Macrosialin 蛋白质序列；登记号 XP_849733.1	86	参见图 9
家马（*E. caballus*）Macrosialin 蛋白质序列；登记号 NP_001093232.1	87	参见图 9
绵羊（*O. aries*）Macrosialin 蛋白质序列；登记号 XP_002719034.1	88	参见图 9
野猪（*S. scrofa*）Macrosialin 蛋白质序列；登记号 XP_003131995.1	89	参见图 9
147nubisbis Macrosialin 蛋白质序列；登记号 XP_039123313.1	90	参见图 9
家蝇（*M. domestica*）Macrosialin 蛋白质序列；登记号 XP_001369761.1	91	参见图 9

[0608]

鸭嘴兽（*O. anatinus*）Macrosialin 蛋白质序列；登记号 XP_001517723.2	92	参见图 9
智人（*H. sapiens*）LAMP5 蛋白质序列；登记号 NP_036393.1	93	参见图 10
黑猩猩（*P. troglodytes*）LAMP5 蛋白质序列；登记号 NP_036393.1	94	参见图 10
猕猴（*M. mulatta*）LAMP5 蛋白质序列；登记号 NP_001181627.1	95	参见图 10
家犬（*C. lupus familiaris*）LAMP5 蛋白质序列；登记号 XP_850634.1	96	参见图 10
家牛（*B. taurus*）LAMP5 蛋白质序列；登记号 NP_001076887.1	97	参见图 10
小鼠（*M. musculus*）LAMP5 蛋白质序列；登记号 NP_083806.2	98	参见图 10
褐家鼠（*R. norvegicus*）LAMP5 蛋白质序列；登记号 NP_001014205.1	99	参见图 10
原鸡（*G. gallus*）LAMP5 蛋白质序列；登记号 XP_004935300.1	100	参见图 10
热带爪蟾（*X. tropicalis*）	101	参见图 10

[0609]

LAMP5 蛋白质序列；登记号 NP_001090781.1		
褐家鼠（*R. norvegicus*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 NP_058938.1	102	参见图 7
家马（*E. caballus*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 XP_001502710.1	103	参见图 7
野猪（*S. scrofa*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 NP_001231626.1	104	参见图 7
家牛（*B. taurus*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 NP_001192297.1	105	参见图 7
冈比亚按蚊（*A. gambiae*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 XP_312298.5	106	参见图 7
热带爪蟾（*X. tropicalis*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 NP_001096385.1	107	参见图 7
家犬（*C. lupus familiaris*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 XP_003434117.1	108	参见图 7

[0610]

家蝇（*M. domestica*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 XP_001362972.1	109	参见图 7
原鸡（*G. gallus*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 NP_990205.1	110	参见图 7
珍珠鸟（*T. guttate*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 XP_002190582.1	111	参见图 7
热带爪蟾（*X. tropicalis*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 NP_001096385.1	112	参见图 7
罗非鱼（*O. niloticus*）LIMBIC/SLAMP 蛋白质序列；登记号 XP_003449349.1	113	参见图 7
示例性 LAMP 信号序列；蛋白质序列	114	MAPRSARRPLLLLLLLLLGLMHCASA
N-LAMP 蛋白质序列	115	AMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRS SCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLNFTRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPN ASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLHDATIQAYLSNS SFSRGETRCEQD
C-LAMP 蛋白质序列	116	ADPHRCGWCPGGAGPHRPHRLPRRQEEESRRLPDYL
TM Cyto LAMP 蛋白质序列	117	LIPIAVGGALAGLVLIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI

[0611]

SARS CoV-2 S1 刺突蛋白质序列	118	VNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA IHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIV NNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEY VSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSA LEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTF LLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVR FPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCY GVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC VIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVE GFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVK NKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDI TPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYST GSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRAR
示例性 SARS CoV-2 刺突蛋白质序列（16-1273）	119	VNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA IHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIV NNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEY VSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSA LEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTF LLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVR FPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCY GVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC VIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVE GFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVK NKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDI TPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYST GSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQS IIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGD STECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDF GGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLIC AQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQM AYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQ

[0612]

		NAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTY VTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPH GVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNF YEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSP DVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPW YIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLK GVKLHYT
鼠 Ig-κ 前导序列；蛋白质序列	120	METDTLLLWVLLLWVPGSTGD
鼠 Ig-κ 前导序列； DNA 序列	121	atggaaaccgatacactgctgctgtgggtgctgttgctctgggttccaggatctacaggcgac
人 IgKVIII 前导序列；蛋白质序列	122	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC
人 IgKVIII 前导序列；DNA 序列	123	atggacatgcgtgtgccggcccaactgcttggtttgctgctcctctggcttcgggggcgcaagatgc
人 EF-1α 核心启动子；DNA 序列	124	gggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggagggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaa ggtggcgcgggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtata taagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttgccgccagaacacag
人四连接素；蛋白质序列	125	EPPTQKPKKIVNAKKDVVNTKMFEELKSRLDTLAQEVALLKEQQALQTV
人四连接素；DNA 序列	126	gagccaccaacccagaagcccaagaagattgtaaatgccaagaaagatgttgtgaacacaaagatgtttgaggagct caagagccgtctggacaccctgggcccaggaggtgggccctgctgaaggagcagcaggcccctgcagacggtc
鼠四连接素；蛋白质序列	127	ESPTPKAKKAANAKKDLVSSKMFEELKNRMDVLAQEVALLKEKQALQTV
鼠四连接素；DNA 序列	128	gagtcacccactcccaaggccaagaaggctgcaaatgccaagaaagatttggtgagctcaaagatgttcgaggagct caagaacaggatggatgtcctggcccaggaggtggccctgctgaaggagaagcaggccttacagactgtg
鼠肺表面活性物质相关蛋白 D（SPD）；蛋白质序列	129	MLPFLSMLVLLVQPLGNLGAEMKSLSQRSVPNTCTLVMCSPTENGLPGRDG RDGREGPRGEKGDPGLPGPMGLSGLQGPTGPVGPKGENGSAGEPGPKGERG LSGPPGLPGIPGPAGKEGPSGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQGS TGAKGSTGPKGERGAPGVQGAPGNAGAAGPAGPAGPQGAPGSRGPPGLKG DRGVPGDRGIKGESGLPDSAALRQQMEALKGKLQRLEVAFSHYQKAALFPD G

[0613]

鼠肺表面活性物质相关蛋白 D（SPD）：DNA 序列	130	atgctgccctttctctccatgcttgcttgtacagccccctgggaaatctgggagcagaaatgaagagcctctgca gagatcagtacccaacacctgcaccctagtcatgtgtagcccacagagaatggcctgcctggtcgtgatggacggg atgggagagaaggtccacgggtgagaaggtgatccaggtttgccaggacctatgggctctcagggttgcaggg ccctacaggtccagttggacccaaaggagagaatggctctgctggcgaacctggaccaaagggagaacgtggacta agtggacctccaggacttccaggtattcctggtccagctgggaaagaaggtccctctgggaagcagggaacatagg acctcaaggcaaaccaggtcctaaaggagaggctgggcccaaaggagaagtaggtgctcctggcatgcaaggatct acagggggcaaaaggctccacaggcccccaagggagaaagaggtgcccctggtgtgcaaggagcccccagggaatgc tggagcagcaggacctgccggacctgccggtccacagggagctccaggttccagggggcccccaggactcaaggg ggacagaggtgttcctggagacagaggaatcaaaggtgaaagcgggcttccagacagtgctgctctgaggcagcag atggaggccttaaaggaaaactacagcgtctagaggttgccttctcccactatcagaaagctgcattgttccctgatgg c
人肺表面活性物质相关蛋白 D（SPD）：蛋白质序列	131	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLVMCSSVESGLPGRD GRDGREGPRGEKGDPGLPGAAGQAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKG DTGPSGPPGPPGVPGPAGREGPLGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPG MQGSAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGAAGSAGAMGPQGSPGARGP PGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKK VELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAAENAALQQ LVVAKNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGSEDCVE IFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF
人肺表面活性物质相关蛋白 D（SPD）：DNA 序列	132	atgctgctcttcctctctctgcactggtcctgctcacacagcccctgggctacctggaagcagaaatgaagacctactc ccacagaacaatgcccagtgcttgcaccctggtcatgtgtagctcagtggagagtggcctgcctggtcgcgatggacg ggatgggagagagggccctcgggcgagaagggggacccaggtttgccaggagctgcagggcaagcagggatg cctggacaagctggcccagttgggcccaaagggacaatggctctgttggagaacctggaccaaagggagacactg ggccaagtggacctccaggacctcccggtgtgcctggtccagctggaagagaaggtcccctgggggaagcagggga acataggacctcagggcaagccaggcccaaaaggagaagctgggcccaaaggagaagtaggtgcccccaggcatg cagggctcggcagggggcaagaggcctcgcaggccctaagggagagcgaggtgtccctggtgagcgtggagtccct ggaaacacagggggcagcagggtctgctggagccatgggtcccccagggaagtccaggtgccagggggaccccccggg attgaagggggacaaaggcattcctggagacaaaggagcaaagggagaaagtgggcttccagatgttgcttctctga ggcagcaggttgaggccttacagggacaagtacagcacctccaggctgctttctctcagtataagaaagttgagctctt cccaaatggccaaagtgtcgggggagaagatttttcaagacagcaggctttgtaaaaccatttacggaggcacagctgct gtgcacacaggctggtggacagttggcctctccacggctctgccgctgagaatgccgccttgcaacagctggtcgtagc

[0614]

		taagaacgaggctgcttttcctgagcatgactgattccaagacagagggcaagttcacctacccacaggagagtccct ggtctattccaactgggcccccagggggagcccaacgatgatggcgggtcagaggactgtgtggagatcttcaccaatg gcaagtggaatgacagggcttgtggagaaaagcgtcttgtggtctgcgagttc
人可溶性 CD70；蛋白质序列	133	QRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHG PELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISL LRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
人可溶性 CD70；DNA 序列	134	cagcgcttcgcacaggctcagcagctgccgctcgagtcacttgggtgggacgtagctgagctgcagctgaatca cacaggacctcagcaggaccccaggctatactgcagggggcccacgcactgggccgctccttcctgcatggacca gagctggacaagggggcagctacgtatccatcgtgatggcatctacatggtacacatccaggtgacgctggccatctgtt cctccacgacggcctccaggcaccacccacccacctggccgtgggaatctgctctcccgcctcccgtagcatcagc ctgctgcgtctcagcttccaccaaggttgtaccattgcctcccagcgcctgacgccccctggcccgaggggacacactc tgcaccaacctcactgggacactttgccttcccgaaacactgatgagaccttctttggagtgcagtgggtgcgcccc
鼠可溶性 CD70；蛋白质序列	135	SKQQQRLLEHPEPHTAELQLNLTVPRKDPTLRWGAGPALGRSFTHGPELEEG HLRIHQDGLYRLHIQVTLANCSSPGSTLQHRATLAVGICSPAAHGISLLRGRF GQDCTVALQRLTYLVHGDVLCTNLTLPLLPSRNADETFFGVQWICP
鼠可溶性 CD70；DNA 序列	136	agtaagcagcaacagaggctgctggagcaccctgagccgcacacagctgagttacagctgaatctcacagttcctcg gaaggacccacactgcgctgggggagcaggcccagcctgggaaggtccttcacacacggaccagagctggagga gggccatctgcgtatccatcaagatggcctctacaggctgcatatccaggtgacactggccaactgctcttcccaggc agcaccctgcagcacagggccaccctggctgtgggcatctgctcccccgctgcgcacggcatcagcttgctgcgtgg gcgctttggacaggactgtacagtggcattacagccgcctgacatacctggtccacggagatgtcctctgtaccaacctc accctgcctctgctgccgtcccgcaacgctgatgagaccttctttggagttcagtggatatgccct
鼠 IL-12p35-P2A-IL-12p40 ；蛋白质序列	137	MVSVPTASPSASSSSSQCRSSMCQSRYLLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPAR CLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPL ELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQA INAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRV KMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAAAAGSGATNFSLLKQAGDVEENP GPGSCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNL TCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHS HLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKF NIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEET LPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYP

[0615]

		DSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKG GNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRS
鼠 IL-12p35-P2A-IL-12p40 ； DNA 序列	138	atggtcagcgttccaacagcctcacccctcggcatccagcagctcctctcagtgccggtccagcatgtgtcaatcacgct acctcctcttttggccaccctgccctcctaaaccacctcagtttggccagggtcattccagtctctggacctgccaggt gtcttagccagtcccgaaaacctgctgaagaccacagatgacatggtgaagacggccagagaaaaactgaaacattatt cctgcactgctgaagacatcgatcatgaagacatcacacgggaccaaaccagcacattgaagacctgtttaccactgg aactacacaagaacgagagttgcctggctactagagagacttcttccacaacaagagggagctgcctgcccccacag aagacgtctttgatgatgaccctgtgcctggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagttccaggccat caacgcagcacttcagaatcacaaccatcagcagatcattcttgacaaggcatgctggtggccatcgatgagctgat gcagtctctgaatcataatggcgagactctgcgccagaaacctcctgtgggagaagcagaccccttacagagtgaaaat gaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcacccgcgtcgtgaccatcaacagggtgatggctatctgagctccgcc gcggccgcaggatctgggccaccaactttcattgctcaagcaggcgggcgatgtggaggaaaaccctggccccg gatcctgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgttttgctggtgtctccactcatggccatgtggagctgg agaaagacgtttatgttgtagaggtggactggactcccgatgccctggagaaaacagtgaacctcacctgtgacacgc ctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagtcataggctctggaaagaccctgaccatcact gtcaaagagtttcttgatgctggccagtacacctgccacaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctcc acaagaaggaaaatggaatttggtccactgaaatttaaagaatttcaagaacaaagacttcctgaagtgtgaagcacca aattactccggacggttcacgtgctcatggctggtgcaaagaaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagtagca gttcccctgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctgcagagaaggtcacactggaccaaagggact atgagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggagaccctgcccattgaactggcgt tggaagcacggcagcagaataaatatgagaactacagcaccaggcttcttcatcagggacatcatcaaaccagacccg cccaagaacttgcagatgaagcctttgaagaactcacaggtggaggtcagctgggagtaccctgactcctggagcact ccccattcctacttctcctcaagttctttgttcgaatccagcgcaagaaagaaaagatgaaggagacagaggagggt gtaaccagaaaggtgcgttcctctgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcgggaatgtctgcgtgcaa gctcaggatcgctattacaattcctcatgcagcaagtgggcatgttccctgcagggtccgatcctag
鼠 IL-12p35 蛋白质序列	139	MVSVPTASPSASSSSSQCRSSMCQSRYLLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPAR CLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPL ELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQA INAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRV KMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAAAA
鼠 IL-12p35 DNA 序列	140	atggtcagcgttccaacagcctcacccctcggcatccagcagctcctctcagtgccggtccagcatgtgtcaatcacgct

[0616]

		acctcctcttttggccaccctgccctcctaaaccacctcagtttggccagggtcattccagtctctggacctgccaggt gtcttagccagtcccgaaacctgctgaagaccacagatgacatggtgaagacggccagagaaaaactgaaacattatt cctgcactgctgaagacatcgatcatgaagacatcacacgggaccaaaccagcacattgaagacctgtttaccactgg aactacacaagaacgagagttgcctggctactagagagacttcttccacacaacaagagggagctgcctgccccacag aagacgtctttgatgatgacccctgtgccttggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagttccaggccat caacgcagcacttcagaatcacaaccatcagcagatcattcttgacaaggcatgctggtggccatcgatgagctgat gcagtctctgaatcataatggcgagactctgcgccagaaacctcctgtgggagaagcagaccctacagagtgaaaat gaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcacccgcgtcgtgaccatcaacagggtgatgggctatctgagctccgcc gcggccgca
示例性 P2A 蛋白质序列	141	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPG
示例性 P2A DNA 序列	142	ggatctgggggccaccaactttcattgctcaagcagggcgatgtggaggaaaaccctggccccgga
IL-12p40 蛋白质序列	143	SCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCD TPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLL LHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKS SSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIE LALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSW STPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNV CVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRS
IL-12p40 DNA 序列	144	atcctgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgttttgctgtgtctccactcatggccatgtgggagctgga gaaagacgtttatgttgtagaggtggactgggactcccgatgcccctggagaaacagtgaacctcacctgtgacacgcc tgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagtcataggctctggaaagaccctgaccatcactgt caaagagtttcttgatgctggccagtacacctgccacaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctccac aagaaggaaaatggaatttggtccactgaaatttaaagaatttcaagaacaaagacttcctgaagtgtgaagcaccaaa ttactccggacggttcacgtgctcatggctgtgcaaagaaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagtagcagt tcccctgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctgcagagaaggtcacactggaccaaagggactat gagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggagaccctgcccattgaactggcgttg gaagcacggcagcagaataaatatgagaactacagcaccagcttcttcatcagggacatcatcaaaccagacccgcc caagaacttgcagatgaagcctttgaagaactcacaggtggaggtcagctgggagtaccctgactcctggagcactcc ccattcctacttctccctcaagttcttgttcgaatccagcgcaaagaaagaaaagatgaaggagacagaggagggtgt aaccagaaaggtgcgttcctgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcgggaatgtctgcgtgcaagc tcaggatcgctattacaattcctcatgcagcaagtgggcatgtgttccctgcagggtccgatcctag

[0617]

人 IL-12p35-P2A-IL-12p40 蛋白质序列	145	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFI TNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNASATNFSLLKQAGDVEENPGPGMCHQQLVISWFSLVFLASPLV AIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATL SAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS FFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQG KSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
人 IL-12p35-P2A-IL-12p40 DNA 序列	146	atgtgcccggcgcgcagcctgctgtggtggcgacctggtgctggatcatctgagcctggcgcgcaacctgcc ggtggcgacccccggatccgggcatgtttccgtgcctgcatcatagccagaacctgctgcgcgcggtgagcaacatgc tgcagaaagcgcgccagaccctggaatttatccgtgcaccagcgaagaaattgatcatgaagatattaccaaagataa aaccagcaccgtggaagcgtgcctgccgctggaactgaccaaaaacgaaagctgcctgaacagccgcgaaaccag ctttattaccaacggcagctgcctggcgagccgcaaaaccagctttatgatggcgctgtgcctgagcagcatttatgaa gatctgaaaatgtatcaggtggaatttaaaccatgaacgcgaaactgctgatggatccgaaacgccagatttttctgga tcagaacatgctggcggtgattgatgaactgatgcaggcgctgaacttttaacagcgaaaccgtgccgcagaaaagca gcctggaagaaccggatttttataaaaccaaaattaaactgtgcattctgctgcatgcgtttcgcattcgcgcggtgacca ttgatcgcgtgatgagctatctgaacgcgagcgcgaccaacttttagcctgctgctgaaacaggcgggcgatgtggaagaa aacccgggcccgggcatgtgccatcagcagctggtgattagctggtttagcctgtgttctggcgagcccgctggtg gcgatttgggaactgaaaaaagatgtgtatgtggtggaactggattggtatccggatgcgccgggcgaaatggtggtg ctgacctgcgatacccgggaagaagatggcattacctggaccctggatcagagcagcgaagtgctgggcagcggca aaaccctgaccattcaggtgaaagaatttggcgatgcggcgccagtatacctgccataaaggcggcgaagtgctgagc catagcctgctgctgctgcataaaaaaagaagatggcatttggagcaccgatattctgaaagatcagaaagaaccgaaa aacaaaaccttctgcgctgcgaagcgaaaaactatagcggccgctttacctgctggtggctgaccaccattagcaccg atctgaccttagcgtgaaaagcagccgcggcagcagcgatccgcagggcgtgacctgcggcgcggcgaccctga gcgcggaacgcgtgcgcggcgataacaaagaatatgaatatagcgtggaatgccaggaagatagcgcgtgcccgg cggcggaagaaagcctgccgattgaagtgatggtggatgcggtgcataaactgaaatatgaaaactataccagcagct ttttattcgcgatattattaaaccggatccgccgcgaaaaacctgcagctgaaaccgctgaaaaacagccgccaggtgga agtgagctgggaaatatccggatacctggagcaccccgcatagctatttaagcctgacctttgcgtgcaggtgcagggc

[0618]

		aaaagcaaacgcgaaaaaaaagatcgcgtgtttaccgataaaaccagcgcgaccgtgatttgccgcaaaaacgcga gcattagcgtgcgcgcgcaggatcgctattatagcagctggagcgaatgggcgagcgtgccgtgcagc
人 IL-12p35 蛋白质序列	147	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFI TNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTI DRVMSYLNAS
人 IL-12p35 DNA 序列	148	atgtgcccggcgcgcagcctgctgctggtggcgacctgtgctgctggatcatctgagcctggcgcgcaacctgcc ggtggcgacccccggatccgggcatgtttccgtgcctgcatcatagccagaacctgctgcgcggtgagcaacatgc tgcagaaagcgccgccagaccctggaatttatccgtgcaccagcgaagaaattgatcatgaagatattaccaaagataa aaccagcaccgtggaagcgtgcctgccgctggaactgaccaaaaacgaaagctgcctgaacagccgcgaaaccag ctttattaccaacgggcagctgcctggcgagccgcaaaaccagctttatgatggcgctgtgcctgagcagcatttatgaa gatctgaaaatgtatcaggtggaatttaaaaccatgaacgcgaaactgctgatggatccgaaaacgcccagattttctgga tcagaacatgctggcggtgattgatgaactgatgcaggcgctgaacttaacagcgaaaccgtgccgcagaaaagca gcctggaagaaccggatttttataaaaccaaaattaaactgtgcattctgctgcattcgcgcggtgacca ttgatcgcgtgatgagctatctgaacgcgagc
人 IL-12p40 蛋白质序列	149	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
人 IL-12p40 DNA 序列	150	atgtgccatcagcagctggtgattagctggtttagcctggtgtttctggcgagcccgctggtggcgatttgggaactgaa aaaagatgtgtatgtggtggaactggattggtatccggatgcgccgggcgaaatggtggtgctgacctgcgatacccc ggaagaagatggcattacctggaccctggatcagagcagcgaagtgctgggcagcgggcaaaaccctgaccattcag gtgaaagaatttggcgatgcgggccagtatacctgccataaaggcgggcgaagtgctgagccatagcctgctgctgctg cataaaaaagaagatggcatttggagcaccgatattctgaaagatcagaaagaaccgaaaaacaaaaccttctgcgct gcgaagcgaaaaactatagcggccgcttacctgctggtggctgaccaccattagcaccgatctgaccttagcgtgaa aagcagccgcggcagcagcgatccgcagggcgtgacctgcggcgcggcgaccctgagcgcggaacgcgtgcgc ggcgataacaaagaatatgaatatagcgtggaatgccaggaagatagcgcgtgcccgggcgggcggaagaaagcctg

[0619]

		ccgattgaagtgatggtggatgcggtgcataaactgaaatatgaaaactataccagcagctttttattcgcgatattatta aaccggatccgccgaaaaacctgcagctgaaaccgctgaaaaacagcccgccaggtggaagtgagctgggaatatcc ggatacctggagcacccccgcatagctatttagcctgacctttgcgtgcaggtgcagggcaaaagcaaacgcgaaaa aaaagatcgcgtgtttaccgataaaaccagcgcgaccgtgatttgccgcaaaaacgcgagcattagcgtgcgcgcgc aggatcgctattatagcagcagctggagcgaatgggcgagcgtgccgtgcagc
人 FLT3L 蛋白质序列	151	TQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVL AQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISR LLQETSEQLVALKPWITRQNFSRCLELQCQPDSSTLPPPWSPRPLEATAPTAP QP
人 FLT3L DNA 序列	152	atgacagtgctggcgcccagcctggagcccaacaacctatctcctcctgctgctgagctcgggactcagtggg acccaggactgctcctttccaacacagccccatctcctccgacttcgctgtcaaaatccgtgagctgtctgactacctgctt caagattacccagtcaccgtggcctccaacctgcaggacgaggagctctgcgggggcctctgtggcggctggtcctggc acagcgctggatggagcggctcaagactgtcgctgggtccaagatgcaaggcttgctggagcgcgtgaacacggag atacactttgtcaccaaatgtgcctttcagccc
鼠 OX40L 蛋白质序列	153	SSSPAKDPPIQRLRGAVTRCEDGQLFISSYKNEYQTMEVQNNSVVIKCDGLY IIYLKGSFFQEVKIDLHFREDHNPISIPMLNDGRRIVFTVVASLAFKDKVYLTV NAPDTLCEHLQINDGELIVVQLTPGYCAPEGSYHSTVNQVPL
鼠 OX40L DNA 序列	154	agcagcagccctgccaaggaccctcctattcagaggctgaggggcgccgtgacaagggtgcgaggacggacaggctg ttcatcagcagctacaagaacgagtatcagaccatggaggtgcagaacaacagcgtggtgatcaagtgcgacggcct gtacatcatctacctgaagggcagcttcttccaagaggtgaagatcgacctgcacttttagggaggaccacaaccctatc agcatccctatgctgaacgacggaaggaggatcgtgttcaccgtggtggctagcctggccttcaaggacaaggtgtac ctgaccgtgaacgcccctgacaccctgtgcgagcacctgcagatcaacgacggcgagctgatcgtggtgcagctgac ccctggctactgcgcccctgagggcagctaccacagcaccgtgaaccaagtgcctctg
人 OX40L 蛋白质序列	155	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLIS LKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTT DNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
人 OX40L DNA 序列	156	caggtatcacatcggtatcctcgaattcaaagtatcaaagtacaatttaccgaatataagaaggagaaaggtttcatcctc acttcccaaaaggaggatgaaatcatgaaggtgcagaacaactcagtcatcatcaactgtgatgggtttttatctcatctcc ctgaagggctacttctcccaggaagtcaacattagccttcattaccagaaggatgaggagcccctcttccaactgaaga aggtcaggtctgtcaactccttgatggtggcctctgacttacaaagacaaagtctacttgaatgtgaccactgacaata cctccctggatgacttccatgtgaatggcggaggagaactgattcttatccatcaaaatcctggtgaattctgtgtcctt

[0620]

鼠 CD80 蛋白质序列	157	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVVLSVIAGKLKV WPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSCVVQKKERGTYEVKHLALVK LSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTIS QDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKN
鼠 CD80 DNA 序列	158	Gtggacgagcagctgagcaagagcgtgaaggacaaggtgctgctgccttgtaggtacaacagccctcacgaggac gagagcgaggataggatctactggcagaagcacgacaaggtagtgctgagtgatgtgatagccggcaagctgaaggtgt ggcctgagtacaagaataggacccctgtacgacaacaccacctacagcctgatcatcctgggcctggtgctgagcgata gggtacctacagctgcgtggtgcagaagaaggaggagcacctacgaggtgaagcacctggccctggtgaagc tgagcatcaaggccgacttcagcaccctaacatcaccgagagcggcaacccctagcgccgacaccaagaggatcac ctgcttcgctagcggcggcttcctaagcctagattcagctggctggagaacggaagggagctgcctggcataaaca cgaccatatctcaagaccctgagagcgagctgtacaccatcagctctcagctggacttcaacaccacccgcaatcaca ccatcaagtgcctgatcaagtacggcgacgcccacgtgagcgaggacttcacctgtgggagaagcctcctgaggaccct cctgacagcaagaac
人 CD80 蛋白质序列	159	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIW PEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLS VKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQD PETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDN
人 CD80 DNA 序列	160	gttatccacgtgaccaaggaagtgaaagaagtggcaacgctgtcctgtggtcacaatgtttctgttgaagagctggcac aaactcgcatctactactggcaaaaggagaagaaaatggtgctgactatgatgtctgggggacatgaatatatggcccgagt acaagaaccggaccatctttgatatcactaataacctctccattgtgatcctggctctgcgcccatctgacgagggcaca tacgagtgtgttgttctgaagtatgaaaaagacgctttcaagcgggaacacctggctgaagtgacgttatcagtcaaag ctgacttccctacacctagtatatctgacttgaaattccaacttctaatattagaaggataatttgctcaacctctggaggtt ttccagagcctcacctctcctggttggaaaatggagaagaattaaatgccatcaacacaacagtttcccaagatcctgaa actgagctctatgctgttagcagcaaactggatttcaatatgacaaccaacaccacagcttcatgtgtctcatcaagtatgga catttaagagtgaatcagaccttcaactggaatacaaccaagcaagagcatttcctgataac
鼠 CD86 蛋白质序列	161	MDPRCTMGLAILIFVTVLLISDAVSVETQAYFNGTAYLPCPFTKAQNISLSEL VVFWQDQQKLVLYEHYLGTEKLDSVNAKYLGRTSFDRNNWTLRLHNVQIK DMGSYDCFIQKKPPTGSIILQQTLTELSVIANFSEPEIKLAQNVTGNSGINLTC TSKQGHPKPKKMYFLITNSTNEYGDNMQISQDNVTELFSISNSLSLSFPDGV WHMTVVCVLETESMKISSKPLNFTQEFPSPQTYWK
鼠 CD86 DNA 序列	162	atggatccgcgctgcaccatgggcctggcgattctgatttttgtgaccgtgctgctgattagcgatgcggtgagcgtgg

[0621]

		aaacccaggcgtatttaacggcaccgcgtatctgccgtgcccgtttaccaaagcgcagaacattagcctgagcgaact ggtggtgttttggcaggatcagcagaaactggtgctgtatgaacattatctgggcaccgaaaaactggatagcgtgaac gcgaaatatctgggccgcaccagctttgatcgcaacaactggaccctgcgcctgcataacgtgcagattaaagatatg ggcagctatgattgctttattcagaaaaaaccgcccgaccggcagcattattctgcagcagaccctgaccgaactgagc gtgattgcgaacttlagcgaaccggaaattaaactggcgcagaacgtgaccggcaacagcggcattaacctgacctg caccagcaaacagggccatccgaaaccgaaaaaaatgtatttctgattaccaacagcaccaacgaatatggcgataa catgcagattagccaggataacgtgaccgaactgtttagcattagcaacagcctgagcctgagcttccggatggcgtg tggcatatgaccgtggtgtgcgtgctggaaaccgaaagcatgaaaattagcagcaaaccgctgaacttlacccaggaa tttccgagcccgcagacctattggaaag
鼠 IL-18 蛋白质序列	163	NFGRLHCTTAVIRNINDQVLFVDKRQPVFEDMTDIDQSASEPQTRLIIYMYK DSEVRGLAVTLSVKDSKMSTLSCKNKIISFEEMDPPENIDDIQSDLIFFQKRVP GHNKMEFESSLYEGHFLACQKEDDAFKLILKKKDENGDKSVMFTLTNLHQS
鼠 IL-18 DNA 序列	164	atggctgccatgtcagaagactcttgcgtcaacttcaaggaaatgatgtttattgacacaacacgctttacttatacctgaag aaaatggagacctggaatcagacaacttggccgacttcactgtacaaccgcagtaatacggaatataaatgaccaagt tctcttcgttgacaaaagacagcctgtgttcgaggatatgactgatattgatcaaagtgccagtgaacccagaccagac tgataatatacatgtacaaagacagtgaagtaaggaggactggctgtgaccctctctgtgaaggatagtaaaatgtctacc ctctcctgtaagaacaagatcatttccttgaggaaatggatccacctgaaaatattgatgatatacaaagtgatctcatatt ctttcagaaacgtgttccaggacacacaacaagatggagtttgaatcttcactgtatgaaggacacttcttgcttgccaaaa ggaagatgatgctttcaaactcattctgaaaaaaaaggatgaaaatgggataaatctgtaatgttcactctcactaactt acatcaaagttag
分泌的人 IL-18 蛋白质序列	165	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYK DSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVP GHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED
分泌的人 IL-18 DNA 序列	166	aactttggccgacttcactgtacaaccgcagtaatacggaatataaatgaccaagttcttcttcgttgacaaaagacagcc tgtgttcgaggatatgactgatattgatcaaagtgccagtgaacccagaccagactgatataatacatgtacaaagaca gtgaagtaagaggactggctgtgaccctctctgtgaaggatagtaaaatgtctaccctctcctcctgtaagaacaagatcattt ccttgaggaaatggatccacctgaaaatattgatgatatacaaagtgatctcatattcttcagaaacgtgttccaggaca caacaagatggagtttgaatcttcactgtatgaaggacactttcttgcttgccaaaaggaagatgatgctttcaaactcatt ctgaaaaaaaaggatgaaaatgggataaatctgtaatgttcactctcactaacttacatcaaagttag
鼠 IL-15 蛋白质序列	167	NWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLLELQVILHE YSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI

[0622]

		VQMFINTS
鼠 IL-15 DNA 序列	168	aactggatagatgtaagatatgacctggagaaaattgaaagccttattcaatctattcatattgacaccacctttatacactg acagtgacttcatcccagttgcaaagttactgcaatgaactgctttctcctggaattgcaggttatttacatgagtacagt aacatgactcttaatgaaacagtaagaaacgtgctctaccttgcaaacagcactctgtcttctaacaagaatgtagcaga atctggctgcaaggaatgtgaggagctggaggagaaaaccttcacagagtttttgcaaagctttatacgcattgtccaaa tgttcatcaacacgtcc
人 IL-15 蛋白质序列	169	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISL ESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHI VQMFINTS
人 IL-15 DNA 序列	170	aactgggtgaatgtaataagtgatttgaaaaaaattgaagatcttattcaatctatgcatattgatgctactttatatacggaa agtgatgttcaccccagttgcaaagtaacagcaatgaagtgctttcttggagttacaagttatttcacttgagtccggag atgcaagtattcatgatacagtagaaaatctgatcatcctagcaaacaacagtttgtcttctaatgggaatgtaacagaatc tggatgcaaagaatgtgaggaactggaggaaaaaaatattaaagaatttttgcagagttttgtacatattgtccaaatgttc atcaacacttct
鼠 IL-7 蛋白质序列	171	ECHIKDKEGKAYESVLMISIDELDKMTGTDSNCPNNEPNFFRKHVCDDTKE AAFLNRAARKLKQFLKMNISEEFNVHLLTVSQGTQTLVNCTSKEEKNVKEQ KKNDACFLKRLLREIKTCWNKILKGSI
鼠 IL-7 DNA 序列	172	gagtgccacattaaagacaaagaaggtaaagcatatgagagtgtactgatgatcagcatcgatgaattggacaaaatg acaggaactgatagtaattgcccgaataatgaaccaaacttttttagaaaacatgtatgtgatgatacaaaggaagctgct tttctaaatcgtgctgctcgcaagttgaagcaatttcttaaaatgaatatcagtgaagaattcaatgtccacttactaacagt atcacaaggcacacaaacactgtgaactgcacaagtaaggaagaaaaaaacgtaaaggaacagaaaaaagaatgat gcatgtttcctaaagagactactgagagaaataaaaactttgtggaataaaatttttgaagggcagtatataa
人 IL-7 蛋白质序列	173	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKE GMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAA LGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH
人 IL-7 DNA 序列	174	gattgtgatattgaaggtaaagatggcaaacaatatgagagtgttctaatggtcagcatcgatcaattattggacagcatg aaagaaattggtagcaattgcctgaataatgaatttaacttttttaaaagacatatctgtgatgctaataaggaaggtatgtt tttattccgtgctgctcgcaagttgaggcaatttcttaaaatgaatagcactggtgatttgatctccacttattaaaagtttca gaaggcacaacaatactgttgaactgcactggccaggttaaaggaagaaaaccagctgccctgggtgaagcccaacc aacaaagagtttggaagaaataaatctttaaaggaacagaaaaaactgaatgacttgtgtttcctaaagagactattac aagagataaaaacttgttggaataaaatttgatgggcactaaagaacactga

[0623]

鼠 IL-33 蛋白质序列	175	AASVDTLSIQGTSLLTQSPASLSTYNDQSVSFVLENGCYVINVDDSGKDQEQ DQVLLRYYESPCPASQSGDGVDGKKLMVNMSPIKDTDIWLHANDKDYSVE LQRGDVSPPEQAFFVLHKKSSDFVSFECKNLPGTYIGVKDNQLALVEEKDES CNNIMFKLSKI
鼠 IL-33 DNA 序列	176	gctgcgtctgttgacacattgagcatccaaggaacttcactttaacacagtctcctgcctccctgagtacatacaatgac caatctgttagtttgtttggagaatggatgttatgtgatcaatgttgacgactctggaaaagaccaagagcaagaccag gtgctactacgctactatgagtctccctgtcctgcaagtcaatcaggcgacggtgtggatgggaagaagctgatggtga acatgagttccatcaaagacacagacatctggctgcatgccaacgacaaggactactccgtggagcttcaaagggtg acgtctcgcctccggaacaggccttcttcgtcctttcacaaaaagtcctcggactttgtttcatttgaatgcaagaatcttcct ggcacttacataggagtgaaggacaaccagctggctctagtggaggaaaaagatgagagctgcaacaatattatgttt aagctctcgaaaatctaa
人 IL-33 蛋白质序列	177	AFGISGVQKYTRALHDSSITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVED LKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNESGDGVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNK EHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCVSFECKTDPGVFIGVKDNHLALIK VDSSENLCTENILFKLSET
人 IL-33 DNA 序列	178	gcctttggtatatcagggtccagaaatatactagagcacttcatgattcaagtatcacaggaatttcacctattacagagt atcttgcttctctaagcacatacaatgatcaatccattactttgcttgtggaggatgaaagttatgagatatatgttgaagact tgaaaaaagatgaaaagaaagataaggtgttactgagttactatgagtctcaacaccctcaaatgaatcaggtgacgg tgttgatggtaagatgttaatggtaaccctgagtcctacaaaagacttctggttgcatgccaacaacaaggaacactctgt ggagctccataagtgtgaaaaaccactgccagaccaggcctcttttgtccttcataatatgcactccaactgtgtttcattt gaatgcaagactgatcctggagtgtttataggtgtaaaggataaatcatcttgctctgattaaagtagactcttctgagaattt gtgtactgaaaatatcttgtttaagctctctgaaact
鼠 IL-21 蛋白质序列	179	HKSSPQGPDRLLIRLRHLIDIVEQLKIYENDLDPELLSAPQDVKGHCEHAAFA CFQKAKLKPSNPGNNKTFIIDLVAQLRRRLPARRGGKKQKHIAKCPSCDSYE KRTPKEFLERLKWLLQKMIHQHLS
鼠 IL-21 DNA 序列	180	cataaatcaagccccccaagggccagatcgcctcctgattagacttcgtcaccttattgacattgttgaacagctgaaaat ctatgaaaatgacttggatcctgaacttctatcagctccacaagatgtaaagggcactgtgagcatgcagctttgcctg tttcagaaggccaaactcaagccatcaaaccctggaaacaataagacattcatcattgacctcgtggcccagctcagg aggaggctgcctgccaggaggggaggaaagaaacagaagcacatagctaaatgcccttcctgtgattcgtatgagaa aaggacacccaaagaattcctagaaagactaaaatggctccttcaaaagatgattcatcagcatctctcc
人 IL-21 蛋白质序列	181	HKSSSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSA

[0624]

		FSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDS YEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS
人 IL-21 DNA 序列	182	cacaaatcaagctcccaaggtcaagatcgccacatgattagaatgcgtcaacttatagatattgttgatcagctgaaaaa ttatgtgaatgacttggtccctgaatttctgccagctccagcttcagaagatgtagagacaaactgtgagtggtcagctttttcctgtt ttcagaaggcccaactaaagtcagcaaatacaggaaacaatgaaaggataatcaatgtatcaattaaaaagctgaaga ggaaaccacctccacaaatgcagggagaagacagaaacacagactaacatgcccttcatgtgattcttatgagaaaa aaccacccaaagaattcctagaaaagattcaaatcacttctccaaaagatgattcatcagcatctgtcctctagaacacac ggaagtgaagattcc
鼠 IL-23a p19-P2A-IL-12 p40 蛋白质序列	183	MLDCRAVIMLWLLPWVTQGLAVPRSSSPDWAQCQQLSRNLCMLAWNAHA PAGHMNLLREEEDEETKNNVPRIQCEDGCDPQGLKDNSQFCLQRIRQGLAF YKHLLDSDIFKGEPALLPDSPMEQLHTSLLGLSQLLQPEDHPRETQQMPSLSS SQQWQRPLLRSKILRSLQAFLAIAARVFAHGAATLTEPLVPTAATNFSLLKQ AGDVEENPGPCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDA PGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKG GETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQR NMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGTASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTC PTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVE VSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGALLVEKTST EVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRS
鼠 IL-23a p19-P2A-IL-12 p40 DNA 序列	184	atgctggattgcagagcagtaataatgctatggctgttgccctgggtcactcagggcctggctgtgcctaggagtagca gtcctgactgggctcagtgccagcagctctctcggaatctctgcatgctagcctggaacgcacatgcaccagcgggac atatgaatctactaagagaagaagaggatgaagagactaaaaataatgtgccccgtatccagtgtgaagatggttgtga cccacaaggactcaaggacaacagccagttctgcttgcaaaggatccgccaaggtctggcttttataagcacctgctt gactctgacatcttcaaagggggagcctgctctactcctgatagcccccatggagcaacttcacacctccctactaggact cagccaactcctccagccagaggatcacccccgggagacccaacagatgcccagcctgagttctagtcagcagtgg cagcgccccctttctccgttccaagatccttcgaagcctccaggccttttggccatagctgcccgggtctttgccccacgg agcagcaactctgactgagcccttagtgccaacagctgccaccaacttttcattgctcaagcaggcgggcgatgtgga ggaaaaccctggcccccggatcctgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgtttgctggtgtctccactcat ggccatgtgggagctggagaaaagacgtttatgttgtagaggtggactggactcccgatgcccctggagaaacagtga acctcacctgtgacacgcctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagtcataggctctgga aagaccctgaccatcactgtcaaagagtttctagatgctggccagtacacctgccacaaaggaggcgagactctgagc

[0625]

		cactcacatctgctgctccacaagaaggaaaatggaatttggtccactgaaatttaaaaaatttcaaaaacaagactttc ctgaagtgtgaagcaccaaattactccggacggttcacgtgctcatggctggtgcaaagaaacatggacttgaagttca acatcaagagcagtagcagttcccctgactctcgggcagtgacatgtggaacggcgtctctgtctgcagagaaggtca cactggaccaaaggagactatgagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggagacc ctgcccattgaactggcgttggaagcacggcagcagaataaatatgagaactacagcaccagcttcttcatcagggac atcatcaaaccagacccgcccaagaacttgcagatgaagccttgaagaactcacaggtggaggtcagctgggagta ccctgactcctggagcactcccccattcctactcttccctcaagttctttgttcgaatccagcgcaagaaagaaaagatgaa ggagacagaggaggggtgtaaccagaaaggtgcgctcctgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggc gggaatgtctgcgtgcaagctcaggatcgctattacaattcctctgtgcagcaagtgggcatgtgttccctgcagggtcc gatcctag
鼠 IL-23a p19 蛋白质序列	185	MLDCRAVIMLWLLPWVTQGLAVPRSSSPDWAQCQQLSRNLCMLAWNAHA PAGHMNLLREEDEETKNNVPRIQCEDGCDPQGLKDNSQFCLQRIRQGLAF YKHLLDSDIFKGEPALLPDSPMEQLHTSLLGLSQLLQPEDHPRETQQMPSLSS SQQWQRPLLRSKILRSLQAFLAIAARVFAHGAATLTEPLVPTA
鼠 IL-23a p19 DNA 序列	186	gccaccatgctgggagcagagctgtaatgctgctgttgctgctgccctggacagctcaggcagagctgtgcctgg gggcagcagccctgcctggactcagtgccagcagcttcacagaagctctgcacactggcctggagtgcacatccac tagtgggacacatggatctaagagaagagggagatgaagagactacaaatgatgttcccatatccagtgtggagatg gctgtgaccccaaggactcagggacaacagtcagttctgcttgcaaaggatccaccagggtctgatttttatgagaa gctgctaggatcggatatatttcacagggggagccttctctgctccctgatagcccctgtgggccagcttcatgcctccctact gggcctcagccaactctcctgcagcctgagggtcaccactgggagactcagcagattccaagcctcagtcccagccagc catggcagcgtctcctcttctccgcttcaaaatccttcgcagcctccaggcctttgtggctgtagccgcccgggtctttgccc atggagcagcaaccctgagtccc
鼠 IL-12 p40 蛋白质序列	187	CPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCD TPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLL LHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKS SSSSPDSRAVTCGTASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIEL ALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWS TPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGALLVEKTSTEVQCKGGNVC VQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRS
鼠 IL-12 p40 DNA 序列	188	ggatccatgtgtcaccagcagttggtcatctcttggttttccctggtttttctggcatctcccctcgtggccatatgggaact gaagaaagatgtttatgtcgtagaattggattggtatccggatgcccctggagaaaatggtggtcctcacctgtgacaccc

[0626]

		ctgaagaagatggtatcacctggaccttggaccagagcagtgaggtcttaggctctggcaaaaccctgaccatccaag tcaaagagtttggagatgctggccagtacacctgtcacaaaggaggcgaggttctaagccattcgctcctgctgcttca caaaaaggaagatggaatttggtccactgatatttaaaggaccagaaagaacccaaaaataagacctttctaagatgc gaggccaagaattattctggacgtttcacctgctggtggctgacgacaatcagtactgatttgacattcagtgtcaaaag cagcagaggctcttctgaccccaaggggtgacgtgcggagctgctacactctctgcagagagagtcagaggggac aacaaggagtatgagtactcagtggagtgccaggaggacagtgcctgcccagctgctgaggagagtctgcccattga ggtcatggtggatgccgttcacaagctcaagtatgaaaactacaccagcagcttcttcatcagggacatcatcaaacct gacccacccaagaacttgcagctgaagccattaaagaattctcggcaggtggaggtcagctgggagtaccctgacac ctggagtactccacattcctacttctccctgacattctgcgttcaggtccagggcaagagcaagagagaaaagaaagat agagtcttcacggacaagacctcagccacggtcatctgccgcaaaaatgccagcattagcgtgcgggcccaggacc gctactatagctcatcttggagcgaatgggcatctgtgccctgcagttag
人 IL-23a p19-P2A-IL-12 p40 蛋白质序列	189	MLGSRAVMLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPL VGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYE KLLGSDIFTGEPSLLPDSPVGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQP WQRLLLRFKILRSLQAFVAVAARVFAHGAATLSPATNFSLLKQAGDVEENP GPMCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL TCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHS LLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAE ESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSW EYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISV RAQDRYYSSSWSEWASVPCS
人 IL-23a p19-P2A-IL-12 p40 DNA 序列	190	gccaccatgctgggagcagagctgtaatgctgctgttgctgctgccctggacagctcaggcagagctgtgcctgg gggcagcagccctgcctggactcagtgccagcagctttcacagaagctctgcacactggcctggagtgcacatccac tagtgggacacatggatctaagagaagagggagatgaagagactacaaatgatgttcccatatccagtgtggagatg gctgtgaccccaaggactcagggacaacagtcagttctgcttgcaaaggatccaccagggtctgatttttatgaaa gctgctaggatcggatatttcacagggggagccttctctgctccctgatagcccctgtgggccagcttcatgcctccctact gggcctcagccaactcctgcagcctgagggtcaccactgggagactcagcagattccaagcctcagtcccagccagc catggcagcgtctccttctccgcttcaaaatccttcgcagcctccaggccttggctgtagccgcccgggtctttgccc atggagcagcaaccctgagtcccgccaccaactttcattgctcaagcaggcgggcgatgtggaggaaaaccctggc cccggatccatgtgtcaccagcagttggtcatctctggtttccctggtttttctggcatctcccctcgtggccatatggga

[0627]

		actgaagaaaagatgtttatgtcgtagaattggattggtatccggatgcccctggagaaatggtggtcctcacctgtgaca ccctgaagaagatggtatcacctggaccttggaccagagcagtgaggtcttaggctctggcaaaaccctgaccatcc aagtcaaagagttggagatgctggccagtacacctgtcacaaaggaggcgaggttctaagccattcgctcctgctgct tcacaaaaaggaagatggaatttggtccactgatattttaaaggaccagaaagaacccaaaaataagacctttctaagat gcgaggccaagaattattctggacgtttcacctgctggtggctgacgacaatcagtactgatttgacattcagtgtcaaa agcagcagaggctcttctgacccccaagggtgacgtgcggagctgctacactctctgcagagagagtcagaggggg acaacaaggagtatgagtactcagtggagtggccaggaggacagtgcctgcccagctgctgaggagagtctgcccatt gaggtcatggtggatgccgttcacaagctcaagtatgaaaactacaccagcagcttcttcatcagggacatcatcaaac ctgacccacccaagaacttgcagctgaagccattaaagaattctcggcaggtggaggtcagctgggagtaccctgac acctggagtactccacattcctacttctccctgacattctgcgttcaggtccagggcaagagcaagagagaaaagaaag atagagtcttcacggacaagacctcagccacggtcatctgccgcaaaaatgccagcattagcgtgcgggcccaggac cgctactatagctcatcttggagcgaatgggcatctgtgccctgcagttag
人 IL-23a p19 蛋白质序列	191	MLGSRAVMLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPL VGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYE KLLGSDIFTGEPSLLPDSPVGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQP WQRLLLRFKILRSLQAFVAVAARVFAHGAATLSP
人 IL-23a p19 DNA 序列	192	gccaccatgctgggagcagagctgtaatgctgctgttgctgccctggacagctcaggcagagctgtgcctgg gggcagcagccctgcctggactcagtgccagcagcttcacagaagctctgcacactggcctggagtgcacatccac tagtgggacacatggatctaagagaagagggagatgaagagactacaaaatgatgttcccatatccagtgtggagatg gctgtgaccccaaggactcagggacaacagtcagttctgcttgcaaaggatccaccaggggtctgatttttatgagaa gctgctaggatcggatatttttcacagggggagccttctctgctccctgatagccctgtgggccagcttcatgcctccctact gggcctcagccaacttcctgcagcctgagggtcaccactgggagactcagcagattccaagcctcagtcccagccagc catggcagcgtctcctcttctccgcttcaaaatccttcgcagcctccaggccttttgtggctgtagccgcccgggtctttgccc atggagcagcaaccctgagtccc
人 IL-12 p40 蛋白质序列	193	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS

[0628]

人 IL-12 p40 DNA 序列	194	ggatccatgtgtcaccagcagttggtcatctcttggtttttccctggtttttctggcatctccctcctgtggccatatgggaact gaagaaagatgtttatgtcgtagaattggattggtatccggatgcccctggagaaaatggtggtcctcacctgtgacaccc ctgaagaagatggtatcacctggaccttggaccaggagcagtgaggtcttaggctctggcaaaaccctgaccatccaag tcaaagagtttggagatgctggccagtacacctgtcacaaaggaggcgaggttctaagccattcgctcctgctgcttca caaaaaggaagatggaatttggtccactgatatttaaaggaccagaaagaacccaaaaataagacctttctaagatgc gaggccaagaattattctggacgtttcacctgctggtggctgacgacaatcagtactgatttgacattcagtgtcaaag cagcagaggctcttctgaccccaaggggtgacgtgcggagctgctacactctctgcagagagagtcagagaggggac aacaaggagtatgagtactcagtggagtgccaggaggacagtgcctgcccagctgctgaggagagtctgcccattga ggtcatggtggatgccgttcacaagctcaagtatgaaaactacaccagcagcttcttcatcagggacatcatcaaacct gacccacccaagaacttgcagctgaaggccattaaagaattctcggcaggtggaggtcagctgggagtaccctgacac ctggagtactccacattcctacttctccctgacattctgcgttcaggtccagggcaagagcaagagagaaaagaaagat agagtcttcacggacaagacctcagccacggtcatctgccgcaaaaatgccagcattagcgtgcgggcccaggacc gctactatagctcatcttggagcgaatgggcatctgtgccctgcagttag
HER2-LAMP 蛋白质序列_	195	MAPRSARRPLLLLLLLLLGLMHCASAAMFMVKNGNGTACIMANFSAAFS VNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLN FTRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCV SGTQVHMNNVTVTLHDATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDLETQVCTGTDMKL RLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYV LIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPG GLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNR SRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQ CAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTF GASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVC YGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQP EQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQG LGISWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTAN RPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQ GLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVAR CPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHEFTCLLASMGLQLNLTYER KDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLELHSEGTTVLLFQFGMNASSSR FFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCNAEEHVRVTKA

[0629]

mSPD + sCD40L 蛋白质序列	196	FSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSM MLPFLSMLVLLVQPLGNLGAEMKSLSQRSVPNTCTLVMCSPTENGLPGRDG RDGREGPRGEKGDPGLPGPMGLSGLQGPTGPVGPKGENGSAGEPGPKGERG LSGPPGLPGIPGPAGKEGPSGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQGS TGAKGSTGPKGERGAPGVQGAPGNAGAAGPAGPAGPQGAPGSRGPPGLKG DRGVPGDRGIKGESGLPDSAALRQQMEALKGKLQRLEVAFSHYQKAALFPD GHRRLDKVEEEVNLHEDFVFIKKLKRCNKGEGSLSLLLNCEEMRRQFEDLVK DITLNKEEKKENSFEMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYYT MKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPS SGSERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFELQAGASVFVNVTEASQVIHR VGFSSFGLLKL
HER2-LAMP-sCD40L ；HER2（胞外结构域）+LAMP +EF-1α +SPD +sCD40L；DNA 序列	197	atggtgaaaaatggcaacgggaccgcgtgcataatggccaacttctctgcctttctcagtgaactacgacaccaag agtggccctaagaacatgaccttgacctgccatcagatgccacagtggtgctcaaccgcagctcctgtggaaaagag aacacttctgaccccagtctcgtgattgctttggaagaggacatacactcactctcaatttcacgagaaatgcaacacgt tacagcgtccagctcatgagtttgtttataacttgtcagacacacacctttcccaatgcgagctccaaagaaatcaag actgtggaatctataactgacatcagggcagatatagataaaaaatacagatgtgttagtggcacccaggtccacatga acaacgtgaccgtaacgctccatgatgccaccatccaggcgtacctttccaacagcagcttcagccgggagagaca cgctgtgaacaagacctcgagacacaagtctgcaccggcaccgacatgaagctgagactgcccgccagcccccgaaa cccatctggacatgctgcggcatctgtaccaaggctgtcaagtggtgcaaggcaatctggaactgacatatctgcctac caacgcctctctgagctttctgcaagacatccaagaagtgcaaggctacgtcctcattgcccacacaaccaagtccgacaa gtgccactgcagcggctgagaatcgtgcgggcacccagctgttcgaggacaactatgctctggccgtgctggacaa cggcgacccctctgaacaacaccacccagtgactggcgcctctcccggcggactgagagaactgcagctgcgctctc tgaccgagattctgaaggcggcgtgctgatccagcggaaccctcagctgtgctaccaagacaccattctgtggaag gacatcttccacaagaacaaccagctggctctgaccctcatcgacaccaacagaagccgggcttgccaccccttgcag ccccatgtgcaagggcagcagatgttgggggcgagagcagcgaggactgccagtctctgaccagaaccgtgtgtgcc ggcggatgcgccagatgcaagggcccctctgccaaccgattgctgccacgaacagtgcgccgctggctgtaccggcc ccaagcacagcgattgtctggcttgtctgcacttcaaccactccggcatctgcgagctgcactgcccagccctctgtgac atacaacaccgacacattcgagagcatgcccaaccccgagggcagatacacattcggcgccagctgtgtgaccgctt gcccctacaactatctgagcaccgacgtgggcagctgcaccctcgtgtgccctctgcacaatcaagaagtgaccgcc gaggacggcacccagagatgcgagaagtgctccaagccttgcgccagagtgtgctacggactgggcatggaacatc tgcggggaagtgcgggccgtgaccagcgccaatatccaagaatttgccggctgcaagaagatttttcggcagtctggcct

[0630]

ttctgcccgagagcttcgatggcgacccccgcctctaacacagccccctctgcagccagagcagctccaagtgttcgaga cactggaagagatcaccggctatctgtacatcagcggcttggccccgactctctgcccgatctgagcgtgttccagaatct gcaagtcatcagaggccggattctgcacaacggcgcctattctctgacactgcaaggactggaatcagctggctgg gactgcggagtctgagagagctgggcagcggactggcactgatccaccacacaacacccatctgtgcttcgtgcacacc gtgccttgggatcagctgttccggaatcccccaccaagctctgctgcacaccgccaacagacccgaggatgagtgtgtg ggcgagggggctggcttgccatcagctctgtgccagaggacactgttgggaccggccctacccagtgcgtgaactg ctcccagtttctgcgggggccaagaatgcgtggaagagtgcagagtgctccaaggactgccccgcgagtacgtgaacg ccagacactgtctgccatgccacccccgagtgccagcctcagaatggcagcgtgacatgcttcggcccgaggccgat cagtgtgtggcttgcgctcactacaaggaccctcccttctgcgtgggcccggtgtccttctggcgtgaaacccgatctgtc ctacatgcctatctggaagttcccccgacgaggaaggcgcttgtcagccttgcccatcaactgcacccacgaattcacc tgcctgctggccagcatgggctgcagctgaacctcacctatgagaggaaggacaacacgacggtgacaaggcttct caacatcaacccccaacaagacctcggccagcgggagctgcggcgcccacctggtgactctggagctgcacagcga gggccaccaccgtcctgctcttccagttccgggatgaatgcaagttctagccggttttcctacaaggaatccagttgaatac aattcttcctgacgccagagaccctgcctttaaagctgccaacggctcccctgcgagcgctgcagggccacagtcggcaa ttcctacaagtgcaacgcggaggagcacgtccgtgtcacgaaggcgttttcagtcaatatattcaaagtgtgggtccag gctttcaaggtggaaggtggccagtttggctctgtggaggagtgtctgctggacgagaacacgcatgctgatccccatc gctgtgggtggtgccctggcgggggctggtcctcatcgcctacctcgtcggcaggaagaggagtcacgc aggctaccagactatctagtaaagatcttttcccctctgccaaaaaattatgggacatcatgaagccccttgagcatctga cttctggctaataaaggaaatttatttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctctcactcggaaggacataagggc ggccgcggtacccgtgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcccgagaagttgg ggggagggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcgggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactg gctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggt ttgccgccagaacacagtctagaggatccgccgccaccatggaaaccgatacactgctgctgtgggtgctgttgctct gggttccaggatctacaggcgacatgctgccctttctctccatgcttgtctgtacagccccctgggaaatctgggag cagaaatgaagagcctctcgcagagatcagtacccaacacctgcacacctagtcatgtgtagcccaacagagaatggc ctgcctggtcgtgatggacgggatgggagagaaggtccacgggggtgagaagggtgatccaggtttgccaggacctat ggggctctcagggttgcagggccctacaggtccagttggacccaaaggagagaatggctctgctggcgaacctgga ccaaagggagaacgtggactaagtggacctccaggacttccaggtattcctggtccagctgggaaagaaggtccctct gggaagcagggggaacataggacctcaaggcaaaccaggtcctaaaggagaggctgggcccaaaggagaagtagg tgctcctggcatgcaaggatctacagggggcaaaaggctccacaggcccaagggagaaagaggtgcccctgtgtg caaggagccccagggaatgctggagcagcaggacctgccggaccctgccggtccacagggagctccaggttccagg		

[0631]

		gggccccccaggactcaaggggacagaggttcctggagacagaggaatcaaaggtgaaagcgggcttccagac agtgctgctctgaggcagcagatggaggccttaaaaggaaaactacagcgtctagaggttgccttctcccactatcaga aagctgcattgttccctgatggccatagaagattggataaggtcgaagaggaagtaaaccttcatgaagatttgtattca taaaaaagctaaagagatgcaacaaaggagaaggaagatctttatccttgctgaactgtgaggagatgagaaggcaatttga agaccttgtcaaggatataacgttaaacaaagaagagaaaaaagaaaacagctttgaaatgcaaagaggtgatgagg atcctcaaattgcagcacacgttgtaagcgaagccaacagtaatgcagcatccgttctacagtgggccaagaaaggat attataccatgaaaagcaacttgtgataatgcttgaaaatgggaaacagctgacggttaaaagagaaggactctattatgtc tacactcaagtcaccttctgctctaatcgggagccttcgagtcaacgcccattcatcgtcggcctctggctgaaggcccag cagtggatctgagagaatcttactcaaggcgggcaaaatacccacagttcctcccagctttgcgagcagcagtctgttcact tgggcggagtgtttgaattacaagctggtgcttctgtgtttgtcaacgtgactgaagcaagccaagtgatccacagagtt ggcttctcatctttggcttactcaaactctgaacgcgtttcctgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgccctccc ccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttcctataaaaatgaggaaattgcatcgcattgtctga gtaggtgtcattctattctggggggtgtgggtgggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggca tgctgggatgcggtgggctctatggcccggg
LAMP 信号序列（第 1-28 位残基）和腔内结构域 1	198	MAPRSARRPLLLLLLLLLGLMHCASAAMFMVKNGNGTACIMANFSAAFS VNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLN FTRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCV SGTQVHMNNVTVTLHDATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDLE
LAMP 信号序列和腔内结构域 1	199	atggcgcccccgcagcgcccggcgaccctgctgctactgctgttgctgctcggcctcatgcattgtgcgtcag cagcaatgtttatggtgaaaaatggcaacgggaccgcgtgcataatggccaacttctctgctgccttctcagtgaactac gacaccaagagtggccctaagaacatgaccttgacctgccatcagatgccacagtggtgctcaaccgcagctcctgt ggaaaagagaacacttctgacccccagtctcgtgattgctttggaagaggacatacactcactctcaatttcacgagaaa tgcaacacgttacagcgtccagctcatgagtttgtttataacttgtcagacacacacctttcccccaatgcgagctccaaa gaaatcaagactgtggaatctataactgacatcagggcagatatagataaaaaatacagatgtgttagtggcacccagg tccacatgaacaacgtgaccgtaacgctccatgatgccaccatccaggcgtaccttccaacagcagcttcagccgggg gagagacacgctgtgaacaagacctcgag
HER2（胞外结构域）蛋白质序列	200	TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSF LQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLN NTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKN NQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARC KGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTF

[0632]

		ESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQR CEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFD GDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRI LHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFR NPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRG QECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACA HYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHEF
	HER2（胞外结构域）DNA序列	201	acccaggtgtgcaccggcaccgatatgaaactgcgcctgccggcgagcccggaaacccatctggatatgctgcgcc atctgtatcagggctgccaggtggtgcagggcaacctggaactgacctatctgccgaccaacgcgagcctgagctttc tgcaggatattcaggaagtgcagggctatgtgctgattgctgcataaccaggtgccgctgcagcgcctg cgcattgtgcgcggcacccagctgtttgaagataactatgcgctggcggtgctggataacggcgatccgctgaacaac accacccggtgaccggcgcgagcccgggcggcctgcgcgaactgcagctgcgcagcctgaccgaaattctgaaa ggcggcgtgctgattcagcgcaacccgcagctgtgctatcaggatacccattctgtggaaagatattttcataaaaacaa ccagctggcgctgaccctgattgataccaaccgcagccgcgcgtgccatccgtgcagcccgatgtgcaaaggcagc cgctgctgggggcgaaagcagcgaagattgccagagcctgacccgcaccgtgtgcgcgggcggctgcgcggctgc aaaggcccgctgccgaccgattgctgccatgaacagtgcgcgggcgggctgcaccggcccgaaacatagcgattgcc tggcgtgcctgcatttaaccatagcggcatttgcgaactgcattgcccggcgctggtgacctataacaccgatacctttt gaaagcatgccgaacccggaaggccgctatacctttggcgcgagctgcgtgaccgcgtgcccgtataactatctgag caccgatgtgggcagctgcaccctggtgtgcccgctgcataaccaggaagtgaccgcggaagatggcacccagcgc tgcgaaaaatgcagcaaaccgtgcgcgcgcgctgtgctatgggcctgcggaacatctgcgcgaagtgcgcggg tgaccagcgcgaacattcaggaatttgcgggctgcaaaaaaatttttggcagcctggcgtttctgccggaaagctttgat ggcgatccggcgagcaacaccgcgccgctgcagccggaacagctgcaggtgtttgaaaccctggaagaaattaccg gctatctgtatattagcgcgtggccggatagcctgccggatctgagcgtgtttcagaacctgcaggtgattcgcggccg cattctgcataacggcgcgtatagccctgaccctgcagggcctgggcattagctggctgggcctgcgcagcctgcgcg aactgggcagcggcctggcgctgattcatcataacacccatctgtgctttgtgcataccgtgccgtgggatcagctgttt cgcaacccgcatcaggcgctgctgcataccgcgaaccgcccggaaagatgaatgcgtgggcgaaggcctggcgtgc catcagctgtgcgcgcggcggccattgctgggggcccgggccccgacccagtgcgtgaactgcagcccagtttctgcgcg gccaggaatgcgtggaagaatgccgcgtgctgcagggcctgccgcgcgaatatgtgaacgcggccgccattgcctgcc gtgccatccggaatgccagccgcagaacggcagcgtgacctgcttggcccggaagcggatcagtgcgtggcgtgc gcgcattataaagatccgccgtttgcgtggcgcctgcccgagcggcgtgaaaccggatctgagctatatgccgattt ggaaatttccggatgaagaaggcggtgccagccgtgcccgattaactgcacccatgaatttt

[0633]

LAMP 的腔内结构域 2 蛋白质序列	202	TCLLASMGLQLNLTYERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLELHSE GTTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVG NSYKCNAEEHVRVVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSM
LAMP 的腔内结构域 2 DNA 序列	203	acctgcctgctggccagcatgggctgcagctgaacctcacctatgagaggaaggacaacacgacggtgacaaggc ttctcaacatcaacccccaacaagacctcggccagcgggagctgcggcgcccacctgctggtgactctggagctgcacagc gagggcaccaccgtcctgctcttccagttcgggatgaatgcaagttctagccggttttcctacaaggaatccagttgaa tacaattcttcctgacgccagagaccctgcctttaaagctgccaacggctccctgcgagcgctgcaggcccacagtcgg caattcctacaagtgcaacgcggaggagcacgtccgtgtcacgaaggcgttttcagtcaatatattcaaagtgtgggtc caggctttcaaggtggaaggtggccagtttggctctgtggaggagtgtctgctggacgagaacagcatg
sCD40L 蛋白质序列	204	HRRLDKVEEEVNLHEDFVFIKKLKRCNKGEGSLSLLNCEEMRRQFEDLVKDI TLNKEEKKENSFEMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYYTMK SNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPSSGS ERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFELQAGASVFVNVTEASQVIHRVGF SSFGLLKL
sCD40L DNA 序列	205	catcgccgcctggataaagtggaagaagaagtgaacctgcatgaagatttgtgtttattaaaaaactgaaacgctgcaa caaaggcgaaggcagcctgagcctgctgaactgcgaagaaatgccgccgccagtttgaagatctggtgaaagatatta ccctgaacaaagaagaaaaaaaagaaaacagctttgaaatgcagcgcggcgatgaagatccgcagattgcggcgca tgtggtgagcgaagcgaacagcaacgcggcgagcgtgctgcagtgggcgaaaaaaggctattataccatgaaaagc aacctggtgatgctggaaaacggcaaacagctgaccgtgaaacgcgaaggcctgtattatgtgtatacccaggtgacc ttttgcagcaaccgcgaaccgagcagccgcgccgtttattgtgggcctgtggctgaaaccgagcagcggcagcga acgcattctgctgaaagcggcgaacacccatagcagccagctgtgcgaacagcagagcgtgcatctgggcggc gtgtttgaactgcaggcgggcgcgagcgtgtttgtgaaccgaagcgagccaggtgattcatcgcgtgggcttt agcagctttggcctgctgaaactgtaa
	206	
SPD + mFLT3L 蛋白质序列	207	MLPFLSMLVLLVQPLGNLGAEMKSLSQRSVPNTCTLVMCSPTENGLPGRDG RDGREGPRGEKGDPGLPGPMGLSGLQGPTGPVGPKGENGSAGEPGPKGERG LSGPPGLPGIPGPAGKEGPSGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQGS TGAKGSTGPKGERGAPGVQGAPGNAGAAGPAGPAGPQGAPGSRGPPGLKG DRGVPGDRGIKGESGLPDSAALRQQMEALKGKLQRLEVAFSHYQKAALFPD GPCLRGTPDCYFSHSPISSNFKVKFRELTDHLLKDYPVTVAVNLQDEKHCKA LWSLFLAQRWIEQLKTVAGSKMQTLLEDVNTEIHFVTSCTFQPLPECLRFVQ

[0634]

HER2-LAMP-mFLT3L ；HER2（胞外结构域）+LAMP +EF-1α +SPD +mFLT3L；DNA序列	208	TNISHLLKDTCTQLLALKPCIGKACQNFSRCLEVQCQPDSSTLLPPRSPIALEA TELPEPRPRQ atggcgccccgcagcgcccggcgaccctgctgctgctactgctgttgctgctcggcctcatgcattgtgcgtcag cagcaatgtttatggtgaaaaatggcaacgggaccgcgtgcataatggccaacttctctgctgccttctcagtgaactac gacaccaagagtggccctaagaacatgaccctgacctgccatcagatgccacagtggtgctcaaccgcagctcctgt ggaaaagagaacacttctgaccccagtctcgtgattgctttggaagaggacatacactcactctcaatttcacgagaaa tgcaacacgttacagcgtccagctcatgagttttgtttataacttgtcagacacacacctttcccaatgcgagctccaaa gaaatcaagactgtggaatctataactgacatcagggcagatatagataaaaaatacagatgtgttagtggcacccagg tccacatgaacaacgtgaccgtaacgctccatgatgccaccatccaggcgtacctttccaacagcagcttcagccggg gagagacacgctgtgaacaagacctcgagacacaagtctgcaccggcaccgacatgaagctgagactgcccgcca gccccgaaacccatctggacatgctgcggcatctgtaccaaggctgtcaagtggtgcaaggcaatctggaactgacat atctgcctaccaacgcctctctgagctttctgcaagacatccaagaagtgcaaggctacgtcctcattgcccacaaccaa gtccgacaagtgccactgcagcggctgagaatcgtgcgggggcacccagctgttcgaggacaactatgctctggccgt gctggacaacggcgacccctctgaacaacaccacaccagtgactggcgcctctcccggcggactgagagaactgcag ctgcgctctctgaccgagattctgaagggcggcgtgctgatccagcggaaccctcagctgtgctaccaagacaccatt ctgtggaaggacatcttccacaagaacaaccagctggctctgaccctcatcgacaccaacagaagccgggcttgcca cccttgcagccccatgtgcaaggggcagcagatgttgggggcgagagcagcgaggactgccagtctctgaccagaacc gtgtgtgccggcggatgcgccagatgcaaggggccctctgccaaccgattgctgccacgaacagtgcgccgctggct gtaccggccccaagcacagcgattgtctggcttgtctgcacttcaaccactccggcatctgcgagctgcactgcccag ccctcgtgacatacaacaccgacacatttcgagagcatgcccaacccccgagggcagatacacattcggcgccagctgt gtgaccgcttgccctacaactatctgagcaccgacgtgggcagctgcaccctcgtgtgccctctgcacaatcaagaa gtgaccgccgaggacggcacccagagatgcgagaagtgctccaagcctgcgccagagtgtgctacggactgggc atggaacatctgcgggaagtgcgggccgtgaccagcgccaatatccaagaatttgccggctgcaagaagatttttcgg cagtctggccttctgcccgagagcttcgatggcgaccccgcctctaacacagcccctctgcagccagagcagctcca agtgttcgagacactggaagagatcaccggctatctgtacatcagcgcttgggcccgactctctgcccgatctgagcgtg ttccagaatctgcaagtcatcagaggccggattctgcacaacgggcgcctattctctgacactgcaaggactgggaatca gctggctgggactgcggagtctgagagagctgtgggcagcggactggcactgatccaccacacaacacccatctgcttc gtgcacaccgtgccttgggatcagctgttccggaatcccccaccaagctctgctgcacaccgccaacagacccgagga tgagtgtgtgggcgagggggctggcttgccatcagctctgtgccagaggacactgttgggaccgggccctacccagt gcgtgaactgctcccagtttctgcgggggccaagaatgcgtggaagagtgcagagtgctccaaggactgccccgcga gtacgtgaacgccagacactgtctgccatgccaccccgagtgccagcctcagaatggcagcggtgacatgcttcgggcc

[0635]

ccgaggccgatcagtgtgtggcttgcgctcactacaaggaccctccttcttctgcgtggcccggtgtccttctggcgtgaa acccgatctgtcctacatgcctatctggaagttcccccgacgaggaaggcgcttgtcagccttgcccccatcaactgcacc cacgaattcacctgcctgctggccagcatgcggctgcagctgaacctcacctatgagaggaaggacaacacgacggt gacaaggcttctcaacatcaacccccaacaagacctcggccagcgggagctgcggcgcccacctggtgactctggag ctgcacagcgcgaggcgcaccaccgtcctgctcttccagttcgcggatgaatgcaagttctagccggttttctacaaggaat ccagttgaatacaattcttcctgacgccagagaccctgccttaaagctgccaacggctccctgcgagcgctgcaggcc acagtcggcaattcctacaagtgcaacgcggaggagcacgtccgtgtcacgaaggcgttttcagtcaatatattcaaag tgtgggtccaggctttcaaggtggaaggtggccagtttggctctgtggaggagtgtctgctggacgagaacagcatgc tgatccccatcgctgtgggtggtgccctggcgggctggtcctcatcgtcctacctcgtcggcaggaaga ggagtcacgcaggctaccagactatctagtaaagatctttttccctctgccaaaaaattatgggacatcatgaagccccctt gagcatctgacttctggctaataaaggaaatttatttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctctcactcggaaggg acataagggcggccgcggtaccccgtgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcccc gagaagttgggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaaggtggcgcgggtaaactgggaaagtgat gtcgtgtactggctccgccttttccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttt cgcaacgggtttgccgccagaacacagtctagaggatcccgccgccaccatggaaaccgatacactgctgctgtgggt gctgttgctctgggttccaggatctacaggcgcatgctgccctttctctccatgcttgtctgcttgctacagcccctggga aatctgggagcagaaatgaagagcctctcgcagagatcagtacccaacacctgcaccctagtcatgtgtagcccaaca gagaatggcctgcctggtcgtgatggacgggatgggagagaaggtccacgggggtgagaaggtgatccaggtttgc caggacctatgggctctcagggttgcagggccctacaggtccagttggacccaaaggagagaatggctctgctggc gaacctggaccaaaggggagaacgtggactaagtggacctccaggacttccaggtattcctggtccagctgggaaaga aggtccctctgggaagcagggggaacataggacctcaaggcaaaccaggtcctaaaggagaggctgggcccaaagg agaagtaggtgctcctggcatgcaaggatctacagggggcaaaaggctccacaggcccccaagggagaaaagaggtgc ccctggtgtgcaaggagcccccagggaatgctggagcagcaggacctgccggtccacagggagctcc aggttccagggggcccccaggactcaaggggggacagaggtgttcctggagacagaggaatcaaaggtgaaagcgg gcttccagacagtgctgctctgaggcagcagatggaggccttaaaaggaaaaactacagcgtctagaggttgccttctc ccactatcagaaagctgcattgttccctgatggcccctgcctgagaggcacccctgattgctactctctcacagcccca tcagcagcaacttcaaagtgaagttcagagagctgaccgaccatctgctgaaggactaccctgtgaccgtggccgtga acctgcaggatgagaagcactgcaaagccctgtggtccctgtttctggcccagagatggatcgagcagctgaaaaca gtggccggcagcaagatgcagaccctgctggaagatgtgaacaccgagatccacttcgtgaccagctgcaccttcca gcctctgcctgagtgcctgagattcgtgcagaccaacatcagccatctgctcaaagacacatgcacccagctgctggc cctgaagccttgtatcgggcaaagcctgccagaacttcagccggtgcctggaagttcagtggccagcctgatagcagcac		

[0636]

		actgctgcctccaagaagccctatcgctctggaagccacagagctgcctgagcctagacctcggcag
mFLT3L；蛋白质序列	209	PCLRGTPDCYFSHSPISSNFKVKFRELTDHLLKDYPVTVAVNLQDEKHCKAL WSLFLAQRWIEQLKTVAGSKMQTLLEDVNTEIHFVTSCTFQPLPECLRFVQT NISHLLKDTCTQLLALKPCIGKACQNFSRCLEVQCQPDSSTLLPPRSPIALEAT ELPEPRPRQ
mFLT3L；DNA 序列	210	ccgtgcctgcgcggcacccccggattgctatttagccatagcccgattagcagcaactttaaagtgaaatttcgcgaact gaccgatcatctgctgaaagattatccggtgaccgtggcggtgaacctgcaggatgaaaaacattgcaaagcgctgtg gagcctgtttctggcgcagcgctggattgaacagctgaaaaccgtggcgggcagcaaaatgcagaccctgctggaag atgtgaacaccgaaattcatttgtgaccagctgcaccttcagccgctgccggaatgcctgcgctttgtgcagaccaac attagccatctgctgaaagatacctgcacccagctgctggcgctgaaaccgtgcattggcaaagcgtgccagaacttta gccgctgcctggaagtgcagtgccagccggatagcagcaccctgctgccgccgcgcagcccgattgcgctggaag cgaccgaactgccggaaccgcgcccgccgccag
	211	
HER2-LAMP-IL-12；HER2（胞外结构域）+LAMP+EF-1α+IL-12；DNA 序列	212	atggcgcccccgcagcgcccgggcgaccccctgctgctgctactgctgttgctgctcggcctcatgcattgtgcgtcag cagcaatgtttatggtgaaaaatggcaacgggaccgcgtgcataatggccaacttctctgctgccttctcagtgaactac gacaccaagagtggccctaagaacatgaccctgacctgccatcagatggccacagtggtgctcaaccgcagctcctgt ggaaaagagaacacttctgaccccagtctcgtgattgctttggaagaggacatacactcactctcaatttcacgagaaa tgcaacacgtttacagcgtccagctcatgagttttgtttataacttgtcagacacacacctttcccaatgcgagctccaaa gaaatcaagactgtggaatctataactgacatcagggcagatatagataaaaaaatacagatgtgttagtggcacccagg tccacatgaacaacgtgaccgtaacgctccatgatgccaccatccaggcgtacctttccaacagcagcttcagccggg gagagacacgctgtgaacaagacctcgagacacaagtctgcaccggcaccgacatgaagctgagactgcccgcca gccccgaaacccatctggacatgctgcggcatctgtaccaaggctgtcaagtggtgcaaggcaatctggaactgacat atctgcctaccaacgcctctctgagctttctgcaagacatccaagaagtgcaaggctacgtcctcattgcccacaaccaa gtccgacaagtgccactgcagcggctgagaatcgtgcgggggcacccagctgttcgaggacaactatgctctggccgt gctggacaacggcgacccctctgaacaacaccacccaccagtgactggcgcctctcccgggcggactgagagaactgcag ctgcgctctctgaccgagattctgaagggcggcgtgctgatccagcggaaccctcagctgtgctaccaagacaccatt ctgtggaaggacatcttccacaagaacaacgctggctctgaccctcatcgacaccaacagaagcgcgggcttgcca ccctttgcagccccatgtgcaaggggcagcagatgttgggggcgagagcgcggaggactgccagtctctgaccagaacc gtgtgtgccggcggatgcgccagatgcaagggccctctgccaaccgattgctgccacgaacagtgcgccgctggct gtaccggccccaagcacagcgattgtctggcttgtctgcacttcaaccactccggcatctgcgagctgcactgcccag ccctcgtgacatacaacaccgacacattcgagagcatgcccaaccccgagggcagatacacattcgggcgccagctgt

[0637]

gtgaccgcttgcccctacaactatctgagcaccgacgtgggcagctgcacccctcgtgtgccctctgcacaatcaagaa		
gtgaccgccgaggacggcacccagagatgcgagaagtgctccaagccttgcgccagagtgtgctacggactgggc		
atggaacatctgcgggaagtgcgggccgtgaccagcgccaatatccaagaatttgccggctgcaagaaagatttctcgg		
cagtctggcctttctgcccgagagcttcgatggcgacccgcctctaacacagcccctctgcagccagagcagctcca		
agtgttcgagacactggaagagatcaccggctatctgtacatcagcgcttggcccgactctctgcccgatctgagcgtg		
ttccagaatctgcaagtcatcagaggccggattctgcacaacggcgcctattctctgacactgcaaggactgggaatca		
gctggctgggactgcggagtctgagagagctgtggcagcggactggcactgatccaccacacaacacccatctgtgcttc		
gtgcacaccgtgccttgggatcagctgttccggaatcccccaccaagctctgctgcacaccgccaacagacccgagga		
tgagtgtgtgggcgagggggctggcttgccatcagctctgtgccagaggacactgttgggggacccggccctacccagt		
gcgtgaactgctcccagtttctgcgggcccaagaatgcgtggaagagtgcagagtgctccaaggactgccccgcga		
gtacgtgaacgccagacactgtctgccatgccacccccgagtgccagcctcagaatggcagcgtgacatgcttcggcc		
ccgaggccgatcagtgtgtggcttgcgctcactacaaggacccctcccttctgcgtggcccggtgtcctctggcgtgaa		
acccgatctgtcctacatgcctatctggaagttcccccgacgaggaagggcgcttgtcagccttgccccatcaactgcacc		
cacgaattcacctgcctgctggccagcatgggggctgcagctgaacctcacctatgagaggaaggacaacacgacggt		
gacaaggcttctcaacatcaacccccaacaagacctcggccagcgggagctgcgggcgcccacctggtgactctggag		
ctgcacagcgaggcaccaccgtcctgctcttccagttcgggatgaatgcaagttctagccggttttctacaaggaat		
ccagttgaatacaattcttcctgacgccagagaccctgccttaaagctgccaacggctccctgcgagcgctgcaggcc		
acagtcggcaattcctacaagtgcaacgcggaggagcacgtccgtgtcacgaaggcgttttcagtcaatatattcaaag		
tgtgggtccaggctttcaaggtggaaggtggccagtttggctctgtggaggagtgtctgctggacgagaacagcatgc		
tgatccccatcgctgtgggtggtgccctggcgggggctggtcctcatcgtcctcatcgctacctcgtcggcaggaaga		
ggagtcacgcaggctaccagactatctagtaaagatcttttccctctgccaaaaattatgggacatcatgaagccccctt		
gagcatctgacttctggctaataaaggaaatttatttcattgcaatagtgtgttggaatttttttgtgtctctcactcggaagg		
acataagggcggccgcggtaccctgtgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcccc		
gagaagttgggggaggagggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaagtggcgcgggtaaactgggaaagtgat		
gtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttt		
cgcaacgggtttgccgccagaacacagtctagaggatcccgccgccaccatggagaggaccctggtgtgcctggtggt		
gatcttcctgggcaccgtggcccacaagagcagccctcaaggccctgatagggctgctgattaggctgaggcacctgat		
cgacatcgtggagcagctgaagatctacgagaacgacctggaccctgagctgctgagcgcccctcaagacgtgaag		
ggccactgcgagcacgccgccttcgcctgcttcagaaggccaagctgaagcctagcaaccctggcaacacaaga		
ccttcatcatcgacctggtggctcagctgaggaggaggctgcctgctagaggagggcggcaagaagcagaagcacat		
cgccaagtgccctagctgcgacagctacgagaagaggaccccctaaggagttcctggagaggctgaagtggctgctg		

[0638]

		cagaagatgatccatcagcacctgagctgaac
鼠 IL-12（IL-12 p36-P2A-IL-12p40）蛋白质序列	213	MVSVPTASPSASSSSSQCRSSMCQSRYLLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPAR CLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPL ELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQA INAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRV KMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAAAAGSGATNFSLLKQAGDVEENP GPGSCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNL TCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHS HLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKF NIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEET LPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYP DSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKG GNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRS
鼠 IL-12（IL-12 p36-P2A-IL-12p40）DNA 序列	214	atggtcagcgttccaacagcctcaccctcggcatccagcagctcctctcagtgccggtccagcatgtgtcaatcacgct acctcctcttttggccaccctgccctcctaaccacctcagtttggccagggtcattccagtctctggacctgccaggt gtcttagccagtcccgaaacctgctgaagaccacagatgacatggtgaagacggccagagaaaaactgaaacattatt cctgcactgctgaagacatcgatcatgaagacatcacacgggaccaaaccagcacattgaagacctgtttaccactgg aactacacaagaacgaagagttgcctggctactagagagacttcttccacaacaaagaggagctgcctgcccccacag aagacgtctttgatgatgaccctgtgcttggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagttccaggccat caacgcagcacttcagaatcacaaccatcagcagatcattcttgacaaggcatgctggtggccatcgatgagctgat gcagtctctgaatcataatggcgagactctgcgccagaaacctcctgtgggagaagcagaccttacagagtgaaaat gaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcacccgcgtcgtgaccatcaacagggtgatgggctatctgagctccgcc gcggccgcaggatctgggccaccaactttcattgctcaagcaggcgggcgatgtggaggaaaaccctggccccg gatcctgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgttttgctggtgtctccactcatggccatgtgggagctgg agaaagacgtttatgttgtagaggtggactggactcccgatgcccctggagaaacagtgaacctcacctgtgacacgc ctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagtcatataggctctggaaagaccctgaccatcact gtcaaagagtttcttgatgctggccagtacacctgccacaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctcc acaagaaggaaaatggaatttggtccactgaaatttaaagaatttcaagaacaagacttcctgaagtgtgaagcacca aattactccggacggttcacgtgctcatggctggtgcaaagaaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagtagca gttcccctgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctgcagagaaggtcacactggaccaaagggact atgagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggagaccctgcccattgaactggcgt

[0639]

		tggaagcacggcagcagaataaaatatgagaactacagcaccagcttcttcatcagggacatcatcaaaccagacccg
		cccaagaacttgcagatgaagccttgaagaactcacaggtggaggtcagctgggagtaccctgactcctggagcact
		ccccattcctacttctccctcaagttctttgttcgaatccagcgcaagaaagaaaagatgaaggagacagaggagggt
		gtaaccagaaaggtgcgttcctgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcgggaatgtctgcgtgcaa
		gctcaggatcgctattacaattcctcatgcagcaagtgggcatgtgttccctgcagggtccgatcctag
	215	
HER2-LAMP-IL-21；HER2（胞外结构域）+LAMP+EF-1α+IL-21；DNA 序列	216	atggcgccccgcagcgcccggcgaccctgctgctgctactgctgttgctgctcggcctcatgcattgtgcgtcag
		cagcaatgtttatggtgaaaaatggcaacgggaccgcgtgcataatggccaacttctctgctgccttctcagtgaactac
		gacaccaagagtggccctaagaacatgaccctgacctgccatcagatgccacagtggtgctcaaccgcagctcctgt
		ggaaaagagaacacttctgaccccagtctcgtgattgctttggaagaggacatacactcactctcaatttcacgagaaa
		tgcaacacgttacagcgtccagctcatgagttttgtttataacttgtcagacacacacctttcccaatgcgagctccaaa
		gaaatcaagactgtggaatctataactgacatcagggcagatatagataaaaaatacagatgtgttagtggcacccagg
		tccacatgaacaacgtgaccgtaacgctccatgatgccaccatccaggcgtacctttccaacagcagcttcagccgggg
		gagagacacgctgtgaacaagacctcgagacacaagtctgcaccggcaccgacatgaagctgagactgcccgcca
		gccccgaaacccatctggacatgctgcggcatctgtaccaaggctgtcaagtggtgcaaggcaatctggaactgacat
		atctgcctaccaacgcctctctgagctttctgcaagacatccaagaagtgcaaggctacgtcctcattgcccacaaccaa
		gtccgacaagtgccactgcagcggctgagaatcgtgcgggcacccagctgttcgaggacaactatgctctggccgt
		gctggacaacggcgaccctctgaacaacaccacaccagtgactggcgcctctcccggcggactgagagaactgcag
		ctgcgctctctgaccgagattctgaagggcggcgtgctgatccagcggaaccctcagctgtgctaccaagacaccatt
		ctgtggaaggacatcttccacaagaacaacgctggctctgacccctcatcgacaccaacagaagccgggcttgcca
		ccctgcagccccatgtgcaagggcagcagatgttgggggcgagagcagcgaggactgccagtctctgaccagaacc
		gtgtgtgccggcggatgcgccagatgcaagggcccctctgccaaccgattgctgccacgaacagtgcgccgctggct
		gtaccggccccaagcacagcgattgtctggcttgtctgcacttcaaccactccggcatctgcgagctgcactgcccag
		ccctcgtgacatacaacaccgacacattcgagagcatgcccaaccccgagggcagatacacattcggccgccagctgt
		gtgaccgcttgccctacaactatctgagcaccgacgtgggcagctgcaccctgtgtgccctctgcacaatcaagaa
		gtgaccgccgaggacggcacccagagatgcgagaagtgctccaagccttgcgccagagtgtgctacggactgggc
		atggaacatctgcgggaagtgcgggccgtgaccagcgccaatatccaagaatttgccggctgcaagaagatttcgg
		cagtctggccttctgcccgagagcttcgatggcgaccccgcctctaacacagcccctctgcagccagagcagctcca
		agtgttcgagacactggaagagatcaccggctatctgtacatcagcgcttgggcccgactctctgcccgatctgagcgtg
		ttccagaatctgcaagtcatcagaggccggattctgcacaacggcgcctattctctgacactgcaaggactgggaatca
		gctggctgggactgcggagtctgagagagctgggcagcggactggcactgatccaccacacaacacccatctgtgcttc

[0640]

		gtgcacaccgtgccttgggatcagctgttccggaatcccccaccaagctctgctgcacaccgccaacagacccgagga tgagtgtgtgggcgagggggctggcttgccatcagctctgtgccagaggacactgttgggggacccggccctacccagt gcgtgaactgctcccagtttctgcgggggccaagaatgcgtggaagagtgcagagtgctccaaggactgccccgcga gtacgtgaacgccagacactgtctgccatgccaccccgagtgccagcctcagaatggcagcgtgacatgcttcggcc ccgaggccgatcagtgtgtggcttgcgctcactacaaggaccctcccttctgcgtggcccggtgtccttctggcgtgaa acccgatctgtcctacatgcctatctggaagttcccgacgaggaaggcgcttgtcagccttgcccccatcaactgcacc cacgaattcacctgcctgctggccagcatgtgggctgcagctgaacctcacctatgagaggaaggacaacacgacggt gacaaggcttctcaacatcaacccccaacaagacctcggccagcgggagctgcggcgcccacctgctggactctggag ctgcacagcgaggggccaccaccgtcctgctcttccagttcgtgggatgaatgcaagttctagccggttttttcctacaaggaat ccagttgaatacaattcttcctgacgccagagaccctgcctttaaagctgccaacggctccctgcgagcgctgcaggcc acagtcggcaattcctacaagtgcaacgcggaggagcacgtccgtgtcacgaaggcgttttcagtcaatatattcaaag tgtgggtccaggctttcaaggtggaaggtggccagtttggctctgtggaggagtgtctgctggacgagaacagcatgc tgatccccatcgctgtgggtggtgccctggcgggggctggtcctcatcgtcctacctcgtcggcaggaaga ggagtcacgcaggctaccagactatctagtaaagatctttttccctctgccaaaaattatgggacatcatgaagccccttt gagcatctgacttctggctaataaaggaaatttattttcattgcaatagtgtgttggaatttttttgtgtctctcactcggaaagg acataagggcggccgcggtaccctgtgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcccc gagaagttgggggaggagggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcgggtaaactgggaaagtgat gtcgtgtactggctccgccttttccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttt cgcaacgggtttgccgccagaacacagtctagaggatcccgccgccaccatggagaggaccctggtgtgcctggtggt gatcttcctgggcaccgtggcccacaagagcagccctcaaggccctgatagggctgctgcttaggctgaggcacctgat cgacatcgtggagcagctgaagatctacgagaacgacctggaccctgagctgctgagcgccctcaagacgtgaag ggccactgcgagcacgccgccttcgcctgctttcagaaggccaagctgaagcctagcaaccctggcaacacaaga ccttcatcatcgacctggtggctcagctgaggaggaggctgcctgctaggagggcggcaagaagcagaagcacat cgccaagtgccctagctgcgacagctacgagaagaggaccctaaggagttcctggagaggctgaagtggctgctg cagaagatgatccatcagcacctgagctgaac
示例性鼠 IL-21 蛋白质序列	217	MERTLVCLVVIFLGTVAHKSSPQGPDRLLIRLRHLIDIVEQLKIYENDLDPEL LSAPQDVKGHCEHAAFACFQKAKLKPSNPGNNKTFIIDLVAQLRRRLPARR GGKKQKHIAKCPSCDSYEKRTPKEFLERLKWLLQKMIHQHLS
示例性鼠 IL-21 DNA 序列	218	atggagaggaccctgtgtgcctggtggtgatcttcctgggcaccgtggcccacaagagcagccctcaaggccctga taggctgctgattaggctgaggcacctgatcgacatcgtggagcagctgaagatctacgagaacgacctggaccctg agctgctgagcggccctcaagacgtgaaggccactgcgagcacgccgccttcgcctgcttcagaaggccaagctg

[0641]

		aagcctagcaaccctggcaacaacaagacgacttcatcatcgacctggtggctcagctgaggaggaggctgcctgctag gaggggcggcaagaagcagaagcacatcgcccaagtgccctagctgcgacagctacgagaagaggaccccctaagg agttcctggagaggctgaagtggctgctgcagaagatgatccatcagcacctgagctga
CD80（胞外结构域+Fc 结构域）蛋白质序列	219	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVVLSVIAGKLKV WPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSCVVQKKERGTYEVKHLALVK LSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTIS QDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKN DIGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLEGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPI VTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKAFACAVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTK KQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKL RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
CD80（胞外结构域+Fc 结构域）DNA 序列	220	gtggacgagcagctgagcaagagcgtgaaggacaaggtgctgcctgcttgtaggtacaacacagccctcacgaggacg agagcgaggataggatctactgtggcagaagcacgacaaggtagtgctgagtgtgatagccggcaagctgaaggtgtg gcctgagtacaagaataggaccctgtacgacaacaccacctacagcctgatcatcctgggcctgtgctgagcgatag gggtacctacagctgcgtggtgcagaagaaggagggcgcacctacgaggtgaagcacctggccctggtgaagct gagcatcaaggccgacttcagcaccctaacatcaccgagagcggcaacccctagcgccgacaccaagaggatcac ctgcttcgctagcggcggcttccctaagcctaggttcagctggctggagaacggaagggagctgcctggcataaaca cgaccatatctcaagaccctgagagcgagctgtacaccatcagctctcagctggacttcaacacaccacccgcaatcaca ccatcaagtgcctgatcaagtacggcgacgcccaccagtgagcgaggacttcacctgtggagaagcctcctgaggaccct cctgacagcaagaacgatatcggaggcggaggaagcggaggcggaggaagcccccagaggggcccacaatcaagc cctgtcctccatgcaaatgcccagcacctaacctcgaggtggaccatccgtcttcatcttcccctccaaagatcaaggat gtactcatgatctccctgagcccatagtcacatgtgtggtggatgtgagcgaggatgacccagatgtccagatca gctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagacacaaaacccatagaggaggattacaacagtactctccgggg tggtcagtgccctcccatccagcaccaggactggatgagtggcaaggcgttcgcatgcgcggtcaacaacaaagac ctcccagcgcccatcgagagaaccatctcaaaacccaaagggtcagtaagagctccacaggtatatgtcttgcctcca ccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacctgcatggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtg gagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaagaacactgaaccagtcctggactctgatggttcttacttc atgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactgggtggaaagaaatagctactcctgttcagtggtccacgaggg tctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccggactccgggtaaa
NY-ESO1-LAMP 蛋白质序	221	MAPRSARRPLLLLLLLLLLGLMHCASAAMFMVKNGNGTACIMANFSAAFS

[0642]

列		
NY-ESO1-LAMP-IL-15 ；NY-ESO1 +LAMP +EF-1α +Ig-κ+IL-15； DNA 序列	222	VNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLN FTRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCV SGTQVHMNNVTVTLHDATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDLEMQAEGRGTGGS TGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGEAGATGGRGPRGAGAARASGPGGGAP RGPHGGAASGLNGCCRCGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQD APPLPVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSISSCLQQQRRTCLLASM GLQLNLTYERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLELHSEGTTVLLF QFGMNASSSRFFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCN AEEHVRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSM
		atggcgcccccgcagcgcccggcgacccctgctgctactgctgttgctgctcggcctcatgcattgtgcgtcag cagcaatgtttatggtgaaaaatggcaacgggaccgcgtgcataatggccaacttctctgctgccttctcagtgaactac gacaccaagagtggccctaagaacatgaccctgaccctgccatcagatgccacagtggtgctcaaccgcagctcctgt ggaaaagagaacacttctgacccccagtctcgtgattgctttggaagaggacatacactcactcactcaatttcacgagaaa tgcaacacgttacagcgtccagctcatgagtttgtttataacttgtcagacacacacctttcccaatgcgagctccaaa gaaatcaagactgtggaatctataactgacatcagggcagatatagataaaaaatacagatgtgttagtggcacccagg tccacatgaacaacgtgaccgtaacgctccatgatgccaccatccaggcgtacctttccaacagcagcttcagccggg gagagacacgctgtgaacaagacctcgagatgcaagccgaaggcagaggaaccggtggatctactgggggatgctg atggtcccggtggacccggtattccagatggacccgggcggaaaatgctggcggtcccggcgaagctggtgctactggt ggaagaggaccaagaggcgctggtgccgctagagcttctggccccggtggcggagccccctagaggaccacatggc ggagctgcatctggactgaatggctgctgtagatgcggcgccagaggaccagaaaagccggctgcttgagttctatctg gccatgccttttgccacaccaatggaagccgagctggctagacgcagtctggcccaagatgctcctccacttccagttc cgggcgtgctgctgaaagagtttaccgtcagcggcaacaattctgaccatccggctgacagccgccgaccatagacag ctgcaactgagcatctccagctgcctccagcagcagagaagagaattcacctgcctgctggccagcatgggctgtca gctgaacctcacctatgagaggaaggacaacacgacggtgacaaggcttctcaacatcaacccaacaagacctcgg ccagcgggagctgcgggcgcccacctggtgactctggagctgcacagcgagggcaccaccgtcctgctcttccagttc gggatgaatgcaagttctagccggttttcctacaaggaatccagttgaatacaattcttcctgacgccagagaccctgc ctttaaagctgccaacggctccctgcgagcgctgcaggccacagtcggcaattcctacaagtgcaacgcggaggagc acgtccgtgtcacgaaggcgtttcagtcaatatattcaaagtgtgggtccaggctttcaaggtggaaggtggccagttt ggctctgtggaggagtgtctgctggacgagaacagcatgctgatcccccatcgctgtgggtgtgccctggccgggct ggtcctcatcgtcctcatcgcctacctcgtcggcaggaagaggagtcacgcaggctaccagactctagtaaagatct ttttccctctgccaaaaattatggggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaatttatttca

[0643]

		ttgcaatagtgttggaatttttgtgtctctcactcggaaggacataagggcggccgcggtacccgtgaggctccggt gcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcccccgagaagttgggggaggggtcggcaattgaaccggt gcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggggg agaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttgccgccagaacacagtctagaggat ccgccgccaccatggaaaccgatacactgctgctgtgggtgctgttgctctctgggttccaggatctacaggcgacaact ggatcgacgtccgctacgacctggaaaagatcgagagcctgatccagagcatccacatcgacaccacactgtacacc gacagcgactttcaccccagctgcaaagtgaccgccatgaactgctttctgctggaactgcaagtgatcctgcacgagt acagcaacatgaccctgaacgagacagtgcggaacgtgctgtacctggccaatagcaccctgagcagcaacaagaa cgtggccgagagcggctgcaaagagtgcgaggaactggaagagaaaaccttcaccgagtttctgcagagcttcatcc ggatcgtgcagatgttcatcaacaccagc
NY-ESO1 蛋白质序列	223	MQAEGRGTGGSTGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGEAGATGGRGPRGAGA ARASGPGGGAPRGPHGGAASGLNGCCRCGARGPESRLLEFYLAMPFATPME AELARRSLAQDAPPLPVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSISSCLQ QQRR
NY-ESO1（-tm）DNA 序列	224	atgcaagccgaaggcagaggaaccggtggatctactgggatgctgatggtcccggtggaccccggtattccagatgg acccggcggaaatgctggcggtcccggcgaagctggtgctactggtggaagaggaccaagaggcgctggtgccgc tagagcttctggccccggtggcggagcccctagaggaccacatggcggagctgcatctggactgaatggctgctgta gatgcggcgccagaggaccagaaagccggctgcttgagttctatctggccatgccttcgccacaccaatggaagcc gagctggctagacgcagtctggcccaagatgctcctccacttccagttccgggcgtgctgctgaaagagtttaccgtca gcggcaacattctgaccatccggctgacagccgccgaccatagacagctgcaactgagcatctccagctgcctccag cagcagagaaga
Ig-κ 和 IL-15 蛋白质序列	225	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDF HPSCKVTAMNCFLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAE SGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS
Ig-κ 和 IL-15 DNA 序列	226	
ITI-COVID-19 双顺反子疫苗（ITI- 双顺反子-S1-LAMP-RBG pA-EF2-S2P BHG pA；第一代 COVID-19 疫苗）；蛋白	227	参见图 28C

[0644]

质序列		
ITI-COVID-19 双顺反子疫苗（ITI-双顺反子-S1-LAMP-RBG pA-EF2-S2P BHG pA；第一代 COVID-19 疫苗）；DNA 序列	228	参见图 28C
用于刺突-LAMP-sCD40L 的刺突-LAMP 多肽序列；SARS-CoV-2 B.1.351 刺突（南非变体，无 SP 和 TM）+LAMP +EF-1α +SPD +sCD40L	229	MAPRSARRPLLLLLLLLLLGLMHCASAAMFMVKNGNGTACIMANFSAAFS VNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLN FTRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCV SGTQVHMNNVTVTLHDATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDLEVNFTTRTQLPPA YTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRF ANPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCE FQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGK QGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRGLPQGFSALEPLVDLPIGINIT RFQTLHISYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVD CALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNA TRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNV YADSFVIRGDEVRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG GNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQ PTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGT GVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTN TSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAE HVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGVENSVAY SNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCT QLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSK RSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTD EMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYE NQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNF GAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANL AATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKN

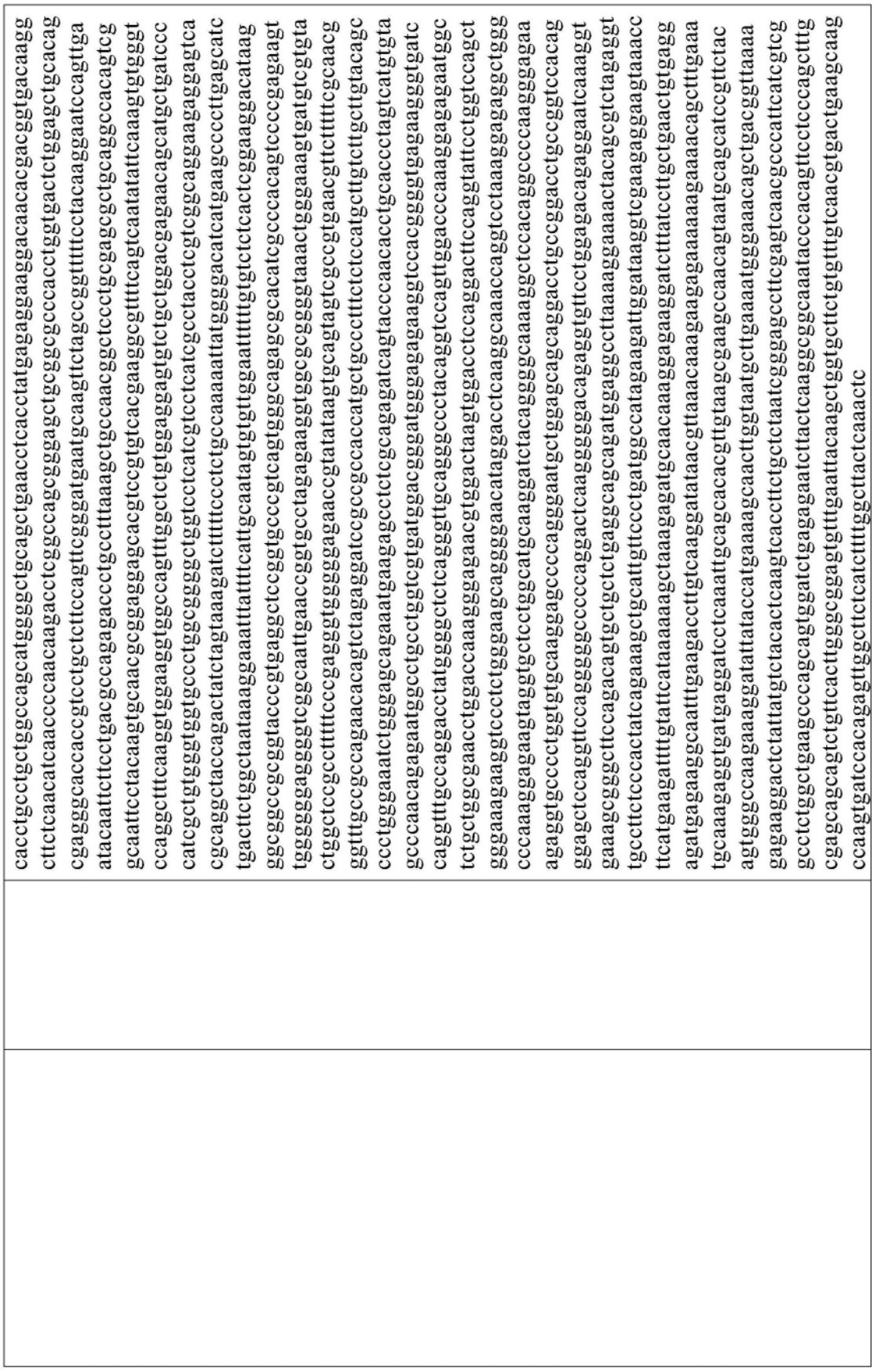
[0645]

		FTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNC DVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNI QKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYCMTSCCSCLKGCCSC GSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYTTCLLASMGLQLNLTYERKDNTTVTRLLN INPNKTSASGSCGAHLVTLELHSEGTTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTIL PDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCNAEEHVRVTKAFSVNIFKVWVQ AFKVEGGQFGSVEECLLDENSM
刺突 -LAMP-sCD40L；SARS-CoV-2 B.1.351 刺突（南非变体，无 SP 和 TM）+LAMP +EF-1α +SPD +sCD40L；DNA 序列	230	atggcgcccccgcagcgccggccgaccctgctgctactgctgttgctgctcggcctcatgcattgtgcgtcag cagcaatgtttatggtgaaaaatggcaacgggaccgcgtgcataatggccaacttctctgctgccttctcagtgaactac gacaccaagagtggccctaagaacatgaccttgacctgccatcagatgccacagtggtgctcaaccgcagctcctgt ggaaaagagaacacttctgacccccagtctcgtgattgctttggaagaggacatacactcactctcaatttcacgagaaa tgcaacacgttacagcgtccagctcatgagtttgtttataacttgtcagacacacacctttcccaatgcgagctccaaa gaaatcaagactgtggaatctatataactgacatcagggcagatatagataaaaaatacagatgtgttagtggcacccagg tccacatgaacaacgtgaccgtaacgctccatgatgccaccatccaggcgtacctttccaacagcagcttcagccggg gagagacacgctgtgaacaagacctcgaggtcaacttcaccaccagaacacagctgcctccagcctacaccaacag cttcaccagaggcgtgtactacccccgacaaggtgttcagatccagcgtgctgcactctacccaggacctgttcctgcctt tcttcagcaacgtgacctggttccacgccatccacgtgtccggcaccaatggcaccaagagattcgcccaatcctgtgct gcccttcaacgacggggtgtactttgccagcaccgagaagtccaacatcatcagaggctggatcttcggcaccacact ggacagcaagacccagagcctgctgatcgtgaacaacgccaccaacgtggtcatcaaagtgtgcgagttccagttct gcaacgacccccttcctgggcgtctactaccacaagaacaacaagagctggatggaaagcgagttccgggtgtacagc agcgccaacaactgcacctttcgagtacgtgtcccagcctttcctgatggacctggaaggcaagcagggcaacttcaag aacctgcgcgagttcgtgttcaagaacatcgacggctacttcaaaatctacagcaagcacacccctatcaacctcgtgc ggggactgcctcaggggcttttctgctctggaaccccctggtggatctgcccatcggcatcaacatcacccggtttcagac cctgcacatcagctacctgacacctggcgatagcagctctggatggacagctggcgccgctgcctactatgtgggata cctgcagcctcggaccttcctgctgaagtacaacgagaacggcaccatcaccgacgccgtggattgtgctctggatcc tctgagcgagacaaagtgcaccctgaagtccttcaccgtggaaaagggcatctaccagaccagcaacttcgggtgc agcccaccgaatccatcgtgcggttcccaatatcaccaatctgtgcccctteggcgaggtgttcaatgccaccagattc gcctctgtgtacgcctggaaccggaagcggatcagcaattgcgtggccgactactccgtgctgtacaactccgccagc ttcagcaccttcaagtgctacggcgtgtccctaccaagctgaacgacctgtgcttcacaaacgtgtacgccgacagct tcgtgatccgggggagatgaagtgcggcagattgcccctggacagaccggcaatatcgccgactacaactacaagctg cccgacgacttcaccggctgtgttgattgcctggaacagcaacaacctggactccaaagtcggcggcaactacaattac

[0646]

ctgtaccggctgttccggaagtccaatctgaagcccttcgagcgggacatcagcaccgaaatctatcaggccggcag		
cacccttgcaatggcgtgaagggcttaactgctacttcccactgcagtcctacggcttccagccaacatacggcgtg		
ggctaccagccttacagagtggtggtgctgagcttcgagctgctgcatgctcctgccacagtgtgcggccctaagaaa		
agcaccaatctcgtgaagaacaaatgcgtgaacttcaacttcaacggcctgaccggcaccggcgtgctgacagagag		
caacaagaagttcctgccattccagcagttcggccgggacattgccgatacccacagatgctgtcagagatccccagac		
actggaaatccctggacatcacccccatgcagcttcggcggagtgtctgtgatcacccctggcacccaacaccagcaatca		
ggtggcagtgctgtaccagggcgtgaactgtacagaggtgccagtggccattcacgccgatcagctgaccctacttg		
gcgggtgtactccacaggcagcaatgttccagaccagagccggctgtctgatcggagccgagcacgtgaacaata		
gctacgagtgcgacatcccccatcggcgctggcatctgtgccagctatcagacccagacaaacagcccccagacgggct		
agaagtgtggccagccagagcatcattgcctacacaatgtctctgggcgtcgagaacagcgtggcctactccaacaac		
tctatcgctatcccccaccaatttcaccatcagcgtgaccaccggagatcctgcctgtgtccatgaccaagaccagcgtgg		
actgcaccatgtacatctgcggcgattccaccgagtgctccaacctgctgctgcagtacggcagcttctgcacccagct		
gaatagagcccctgacagggatcgccgtggaacaggacaaggaacacccaagaggtgttcgcccaagtgaagcaaatc		
tacaagacccctcctatcaaggacttcggcggcttcaatttcagccagattctgcccgatcctagcaagcccagcaagc		
ggagcttcatcgaggacctgctgttcaacaaagtgacactggccgacgccggcttcatcaagcagtatggcgattgtct		
gggcgacattgcagcccggatctgatttgcgcccagaagtttaacggactgaccgtgctgcctcctctgctgaccgat		
gagatgatcgcccagtacacatctgcctgctggccggcacaatcacaagcggctggacatttggagctggcgctgc		
cctgcagatccccctttgctatgcagatggcctaccggttcaacggcatcggagtgacccagaatgtgctgtacgagaac		
cagaagctgatcgccaaccagttcaacagcgccatcggcaagatccaggacagcctgagcagcacagccagcgctc		
tgggaaagctgcaggacgtggtcaaccagaatgcccaggcactgaacaccctggtcaagcagctgtctagcaacttc		
ggcgccatcagctctgtgctgaacgatatcctgagcagactggacaaggtggaagccgaggtgcagatcgacagact		
gatcaccggaaggctgcagtccctgcagacctacgttacccagcagctgatcagagccgccgagattagagcctctg		
ccaatctggccgccaccaagatgtctgagtgtgtctgggccagagcaagagagtggactttttgcggcaagggctac		
cacctgatgagcttccctcagtctgcaccacacggcgtggtgtttctgcacgtgacatacgtgcccgctcaagagaaga		
acttcacaacagcccctgccatctgccacgacggcaaagcccacttcctagagaaggcgttcgtgtccaacggca		
cccattggttcgtgacccagcggaacttctacgagcccccagatcatcaccaccgacaacaccttcgtgtctggcaactg		
cgacgtcgtgatcggcattgtgaacaataccgtgtacgaccctctgcagcccgagctggacagcttcaaagaggaact		
ggataagtacttttaagaaccacacaagcccccgacgtggacctgggcgatatcagcggaatcaatgccagcgtcgtga		
acatccagaaagagatcgaccggctgaacgaggtggccaagaatctgaacgagagcctgatcgacctgcaagaact		
ggggaagtacgagcagtacatcaagtggccttggtactgcatgaccagctgctgtagctgcctgaaggctgttgcag		
ctgtggctcctgctgcaagttcgacgaggacgattctgagcccgtgctgaaaggcgtgaagctgcactacacagaatt		

[0647]


cacctgcctgctggccagcatgggctgcagctgaacctcacctatgagaggaaggacaacacgacggtgacaagg
cttctcaacatcaacccacacaagacctcggccagcgggagctgcggcgcccacctggtgactctggagctgcacag
cgagggcaccaccgtcctgctcttccagttcgggatgaatgcaagttctagccggttttcctacaaggaatccagttga
atacaattcttcctgacgccagagaccctgcctttaaagctgccaacggctccctgcgagcgctgcaggccacagtcg
gcaattcctacaagtgcaacgcggaggagcacgtccgtgtcacgaaggcgttttcagtcaatatattcaaagtgtgggt
ccaggctttcaaggtggaaggtggccagtttggctctgtggaggagtgtctgctggacgagaacagcatgctgatccc
catcgctgtgtggtgtggtgcctggcgggctggtcctcatcgtcctcatcgcctacctcgtcggcaggaagaggagtca
cgcaggctaccagactatctagtaaagatcttttcctctgccaaaaattatgggacatcatgaagccccttgagcatc
tgacttctggctaataaaggaaatttatttttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctctcactcggaaggacataag
ggcggccgcggtacccgtgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcccgcgagaagt
tgggggggagggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaaggtggcgcgggtaaactgggaaagtgatgtcgtgta
ctggctccgcctttttcccgaggtgtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttttcgcaacg
ggtttgccgccagaacacagtctagaggatccgccgccaccatgctgccctttctctccatgcttgtctttgctacagc
ccctgggaaatctgggagcagaaatgaagagctctcgcagagatcagtacccaacacctgcaccctagtcatgtgta
gcccaacagagaatggcctgcctggtcgtgatggacgggatgggagaaggtccacgggggtgagaaggtgatc
caggtttgccaggacctatgggctctcaggttgcaggccctacaggtccagttggacccaaaggagagaatggc
tctgctggcgaacctggaccaaagggagaacgtggactaagtggacctccaggacttccaggtattcctggtccagct
gggaaagaaggtccctctgggaagcaggggaacataggacctcaaggcaaaccaggtcctaaaggagaggctggg
cccaaaggagaagtaggtgctcctggcatgcaaggatctacagggggcaaaaggctccacaggccccaagggagaa
agaggtgcccctggtgtgcaaggagccccagggaatgctggagcagcaggaccctgccggtccacag
ggagctccaggttccaggggggcccccaggactcaaggggacagaggtgttcctggagacagaggaatcaaaggt
gaaagcgggcttccagacagtgctgctctgaggcagcagatggaggccttaaaaggaaaaactacagcgtctagaggt
tgccttctcccactatcagaaagctgcattgttccctgatggccatagaagattggataaggtcgaagaggaagtaaacc
ttcatgaagatttgtattcataaaaaagctaaagagatgcaacaaaggagaaggatctttatccttgctgaactgtgagg
agatgagaaggcaatttgaagaccttgtcaaggatataacgttaaacaaagaagagaaaaaagaaaacagctttgaaa
tgcaaagaggtgatgaggatcctcaaattgcagcacacgttgtaagcgaagccaacagtaatgcagcatccgttctac
agtgggccaagaaaggatattataccatgaaaagcaacttggtaatgcttgaaaatgggaaacagctgacggttaaaa
gagaaggactctattatgtctacactcaagtcaccttctgctctaatcgggagccttcgagtcaacgcccattcatcgtcg
gcctctggctgaagcccagcagtggatctgagagaatcttactcaaggcggcaaatacccacagttcctcccagctttg
cgagcagcagtctgttcacttgggcggagtgtttgaattacaagctggtgcttctgtgtttgtcaacgtgactgaagcaag
ccaagtgatccacagagttggcttctcatcttttggcttactcaaactc

[0648]

SARS-COV-2 B.1.351 刺突（南非变体(无 SP 和 TM)；蛋白质序列	231	VNFTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA IHVSGTNGTKRFANPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIV NNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEY VSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRGLPQGFSA LEPLVDLPIGINITRFQTLHISYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLK YNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNI TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIA WNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGF NCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNK CVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPC SFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSN VFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIA YTMSLGVENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDST ECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGG FNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQ KFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAY RFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNA QALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVT QQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGV VFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYE PQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDV DLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYC MTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT
SARS-COV-2 B.1.351 刺突（南非变体(无 SP 和 TM)；DNA 序列	232	gtgaactttaccacccgcacccagctgccgcggcgtataccaacagctttacccgcggcgtgtattatccggataaag tgtttcgcagcagcgtgctgcatagcacccaggatctgtttctgccgttttttagcaacgtgacctggtttcatgcgattcat gtgagcggcaccaacggcaccaaaacgctttgcgaacccggtgctgccgtttaacgatggcgtgtatttttgcgagcacc gaaaaaagcaacattattcgcggctggatttttggcaccacccctggatagcaaaacccagagcctgctgattgtgaaca acgcgaccaacgtggtgattaaagtgtgcgaatttcagtttgcaacgatccgtttctgggcgtgtattatcataaaaaca acaaaagctggatggaaagcgaatttcgcgtgtatagcagcgcgaacaactgcaccttgaatatgtgagccagccgtt tctgatggatctggaaggcaaacagggcaacttaaaaacctgcgcgaatttgtgtttaaaaacattgatggctatttaa

[0649]

aatttatagcaaacatacccgattaacctggtgcgcggcctgccgcagggctttagcgcgctggaaccgctggtgga		
tctgccgattggcattaacattacccgctttcagacccctgcatattagctatctgaccccgggcgatagcagcggct		
ggaccgcgcgggcgcggcggcgtattatgtgggctatctgcagccgcgcgcaccttctgctgaaatataacgaaaacggc		
accattaccgatgcggtggattgcgcgctggatccgctgagcgaaaccaatgcaccctgaaaagctttaccgtggaa		
aaaggcatttatcagaccagcaacttttcgcgtgcagccgaccgaaagcattgtgcgctttccgaacattaccaacctgt		
gcccgtttggcgaagtgtttaacgcgacccgctttgcgagcgtgtatgcgtggaaccgcaaacgcattagcaactgcgt		
ggcggattatagcgtgctgtataacagcgcgagctttagcaccttaaatgctatggcgtgagcccgaccaaactgaac		
gatctgtgctttaccaacgtgtatgcggatagcttgtgattcgcggcgatgaagtgccgccagattgcgccgggccaga		
ccggcaacattgcggattataactatataaactgccggatgatttaccggctgcgtgattgcgtggtggaacagcaacaacct		
ggatagcaaagtgggcggcaactatactatctgtatcgcctgtttcgcaaaagcaacctgaaaccgtttgaacgcgat		
attagcaccgaaatttatcaggcgggcagcacccgtgcaacggcgtgaaaggctttaactgctatttccgctgcaga		
gctatggctttcagccgacctatggcgtgggctatcagccgtatcgcgtgtggtgctgagctttgaactgctgcatgcg		
ccggcgaccgtgtgcggcccgaaaaaaagcaccaacctggtgaaaaacaaatgcgtgaacttaactttaacggcct		
gaccggcaccggcgtgctgaccgaaagcaacaaaaaatttctgccgtttcagcagtttggccgcgatattgcggatac		
caccgatgcggtgcgcgatccgcagaccctggaaattctggatattaccccgtgcagctttggcgggcgtgagcgtgat		
taccccgggcaccaacaccagcaaccaggtggcggtgctgtatcagggcgtgaactgcaccgaagtgccggtggc		
gattcatgcggatcagctgaccccgacctggcgcgtgtatagcaccggcagcaacgtgtttcagacccgcgcgggct		
gcctgattgggcgcgggaacatgtgaacaacagctatgaaatgcgatattccgattggcgcgggcatttgcgcgagctatca		
gacccagaccaacagcccgccgcgcgcgcagcgtggcgagccagagcattattgcgtataccatgagcctggg		
cgtggaaaacagcgtggcgtatagcaacaacagcattgcgattccgaccaactttaccattagcgtgaccaccgaaatt		
ctgccggtgagcatgaccaaaaccagcgtggattgcaccatgtatatttgcggcgatagcaccgaatgcagcaacctg		
ctgctgcagtatggcagctttgcacccagctgaaccgcgcgctgaccggcattgcggtggaacaggataaaaacac		
ccaggaagtgtttgcgcaggtgaaacagatttataaaacccgccgattaaagatttggcggctttaactttagccagat		
tctgccggatccgagcaaaccgagcaaacgcagctttattgaagatctgctgtttaacaaagtgaccctggcggatgcg		
ggctttattaaacagtatggcgattgcctgggcgatattgcgggcgcgcgatctgatttgcgcgcagaaatttaacggcct		
gaccgtgctgccgccgctgctgaccgatgaaatgattgcgcagtataccagcgcgctgctggcgggccaccattacca		
gcggctggaccttggcgcgggcgcggcgctgcagattccgtttgcgatgcagatggcgtatcgctttaacggcattg		
gcgtgacccagaacgtgctgtatgaaaaccagaaactgattgcgaaccagtttaacagcgcgattggcaaaattcagg		
atagcctgagcagcaccgcgagcgcgctgggcaaactgcaggatgtggtgaaccagaacgcgcaggcgctgaaca		
ccctggtgaaacagctgagcagcaactttggcgcgattagcagcgtgctgaacgatattctgagccgcctggataaag		
tggaagcggaagtgcagattgatcgcctgattaccggcgccctgcagagcctgcagacctatgtgacccagcagctg		

[0650]

		attcgcgcggcggaaattcgcgcgagcgcgaacctggcggcgaccaaaatgagcgaatgcgtgctgggccagagc aaacgcgtggattttgcggcaaaggctatcatctgatgagctttccgcagagcgccgccgcatggcgtggtgtttctgc atgtgacctatgtgccggcgcaggaaaaaaacttaccaccgcgccggcgatttgccatgatggcaaagcgcatttcc gcgcgaaggcgtgtttgtgagcaacggcacacccattggtttgtgacccagcgcaacttttatgaaccgcagattattacca ccgataacacctttgtgagcggcaactgcgatgtggtgattggcattgtgaacaacaccgtgtatgatccgctgcagcc ggaactggatagctttaaagaagaactggataaatatttaaaaaccataccagcccggatgtggatctgggcgatatta gcggcattaacgcgagcgtggtgaacattcagaaagaaattgatcgcctgaacgaagtggcgaaaaacctgaacgaa agcctgattgatctgcaggaactgggcaaatatgaacagtatattaaatggccgtggtattgcatgaccagctgctgca gctgcctgaaaggctgctgcagctgcggcagctgctgcaaatttgatgaagatgatagcgaaccggtgctgaaaggc gtgaaactgcattatacc
SPD-xCD40L 蛋白质序列	233	MLPFLSMLVLLVQPLGNLGAEMKSLSQRSVPNTCTLVMCSPTENGLPGRDG RDGREGPRGEKGDPGLPGPMGLSGLQGPTGPVGPKGENGSAGEPGPKGERG LSGPPGLPGIPGPAGKEGPSGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQGS TGAKGSTGPKGERGAPGVQGAPGNAGAAGPAGPAGPQGAPGSRGPPGLKG DRGVPGDRGIKGESGLPDSAALRQQMEALKGKLQRLEVAFSHYQKAALFPD GHRRLDKVEEEVNLHEDFVFIKKLKRCNKGEGSLSLLNCEEMRRQFEDLVK DITLNKEEKKENSFEMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYYT MKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPS SGSERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFELQAGASVFVNVTEASQVIHR VGFSSFGLLKL
CD161-LAMP 蛋白质序列	234	MAPRSARRPLLLLLLLLLGLMHCASAAMFMVKNGNGTACIMANFSAAFS VNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLN FTRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCV SGTQVHMNNVTVTLHDATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDLEQKSSIEKCSVDI QQSRNKTTERPGLLNCPIYWQQLREKCLLFSHTVNPWNNSLADCSTKESSLL LIRDKDELIHTQNLIRDKAILFWIGLNFSLSEKNWKWINGSFLNSNDLEIRGD AKENSCISISQTSVYSEYCSTEIRWICQKELTPVRNKVYPDSTCLLASMGLQL NLTYERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLELHSEGTTVLLFQFGM NASSSRFFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCNAEEHV RVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSM

[0651]

CD161-LAMP-sCD45L；CD161（胞外结构域）+LAMP +EF-1α +SPD +sCD40L；DNA 序列	235	atggcgccccgcagcgccggcgacccctgctgctactgctgttgctgctcggcctcatgcattgtgcgtcag cagcaatgtttatggtgaaaaatggcaacgggaccgcgtgcataatggccaacttctctgctgccttctcagtgaactac gacaccaagagtggccctaagaacatgaccttgacctgccatcagatgccacagtggtgctcaaccgcagctcctgt ggaaaagagaacacttctgaccccagtctcgtgattgctttggaagaggacatacactcactctcaatttcacgagaaa tgcaacacgttacagcgtccagctcatgagtttgtttataacttgtcagacacacacctttcccaatgcgagctccaaa gaaatcaagactgtggaatctataactgacatcagggcagatatagataaaaaatacagatgtgttagtggcacccagg tccacatgaacaacgtgaccgtaacgctccatgatgccaccatccaggcgtaccttccaacagcagcttcagccgggg gagagacacgctgtgaacaagacctcgagcagaagtccagcatcgagaagtgcagcgtggacatccagcagagcc ggaacaagaccaccgaaagacccggcctgctgaactgccctatctactggcagcagctgagagagaagtgcctgct gttcagccacaccgtgaatcctggaacaacagcctggccgactgcagcacaaaagagagcagcctgctgctgatca gagacaaggacgagctgatccacacacagaacctgatccgcgacaaggccatcctgttctggatcggcctgaacttc agcctgagcgagaagaagaactggaagtggatcaacggcagcttcctgaactccaacgacctggaaatccgggcgacg ccaaagagaacacgctgcatcagcatcagccagaccacgcgtgtacagcgagtactgctccaccgagatcagatggatc tgccagaaagaactgaccctgtgcggaacaaggtgtaccccgattctgaattcacctgcctgctggccagcatgggg ctgcagctgaacctcacctatgagaggaaggacaacacgacggtgacaaggcttctcaacatcaaccccaacaagac ctcggccagcgggagctgcggcgcccacctggtgactctggagctgcacacgcgaggcaccaccgtcctgctcttc cagttcgggatgaatgcaagttctagccggttttctacaaggaatccagttgaatacaattcttcctgacgcccagagac cctgcctttaaagctgccaacgggctccctgcgagcgctgcagggccacagtcggcaattcctacaagtgcaacgcgga ggagcacgtccgtgtcacgaaggcgttttcagtcaatatattcaaagtgtgggtccaggctttcaaggtggaaggtggc cagtttggctctgtggaggagtgtctgctggacgagaacagcatgctgatcccccatcgctgtgggtggtgccctggcg gggctggtcctcatcgtcctctcatcgcctacctctgtcggcaggaagaggagtcacgcaggctaccagactatctagtaa agatcttttccctctgccaaaaattatgggggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaattt attttcattgcaatagtgtgttggaatttttttgtgtctctcactcggaaggacataagggcggccgcggtaccgtgaggc tccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggagggtcggcaattga accggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggt gggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctcta gaggatccgccgccaccatggaaaccgatacactgctgctgtgggtgctgttgctctgggttccaggatctacaggcg acatgctgccctttctctccatgcttgtcttgtacagccccctgggaaatctgggagcagaaatgaagagcctctcgc agagatcagtacccaacacctgcacctagtcatgtgtagcccaacagagaatggcctgctgtctgtgatggacgg gatgggagagaaggttccacgggggtgagaaggtgatccagtttgccaggacctatgggctctcaggttgcagg gccctacaggtccagttggacccaaaggagagaatggctctgctggcgaacctggaccaaaggggagaacgtggact

[0652]

		aagtggacctccaggacttccaggtattcctggtccagctgggaaagaaggtccctctgggaagcagggaacatag gacctcaaggcaaaccaggtcctaaaggagaggctgggcccaaaggagaagtaggtgctcctggcatgcaaggatc tacaggggcaaaaggctccacaggccccaaggagaaagaggtgcccctggtgtgcaaggagccccagggaatg ctggagcagcaggacctgccggacctgccggtccacagggagctccaggttccaggggggccccccaggactcaagg gggacagaggttcctggagacagaggaatcaaaggtgaaagcgggcttccagacagtgctgctctgaggcagca gatggaggccttaaaaggaaaactacagcgtctagaggttgccttctcccactatcagaaagctgcattgttccctgatg gccatagaagattggataaggtcgaagaggaagtaaacctcatgaagatttttgtattcataaaaaagctaaagagatgc aacaaaggagaaggatctttatcctgctgaactgtgaggagatgagaaggcaatttgaagacctgtcaaggatataa cgttaaacaaagaagaggaaaaaagaaaacagctttgaaatgcaaagaggtgatgaggatcctcaaattgcagcacac gttgtaagcgaagccaacagtaatgcagcatccgttctacagtgggccaagaaaggatattataccatgaaaagcaact tggtaatgcttgaaaatgggaaacagctgacggttaaaagagaaggactctattatgtctacactcaagtcaccttctgct ctaatcgggagccttcgagtcaacgcccattcatcgtcggcctctggctgaagcccagcagtggatctgagagaatctt actcaaggcggcaaatacccacagttcctcccagctttgcgagcagcagtctgttcacttgggcggagtgtttgaattac aagctggtgcttctgtgtttgtcaacgtgactgaagcaagccaagtgatccacagagttggcttctcatctttggcttact caaactc
CD161（胞外结构域）蛋白质序列	236	QKSSIEKCSVDIQQSRNKTTERPGLLNCPIYWQQLREKCLLFSHTVNPWNNS LADCSTKESSLLLIRDKDELIHTQNLIRDKAILFWIGLNFSLSEKNWKWINGS FLNSNDLEIRGDAKENSCISISQTSVYSEYCSTEIRWICQKELTPVRNKVYPDS
CD161（胞外结构域）DNA序列	237	cagaagtccagcatcgagaagtgcagcgtggacatccagcagagccggaacaagaccaccgaaagacccggcctg ctgaactgccctatctactggcagcagctgagagagaagtgcctgctgttcagccacacccgtgaatccctggaacaac agcctggccgactgcagcacaaaagagagcagcctgctgctgatcagagacaaggacgagctgatccacacacag aacctgatccgcgacaaggccatcctgttctggatcgggctgaacttcagcctgagcgagcgagaagaactggaagtggatc aacggcagcttcctgaactccaacgacctggaaatccgggggcgacgccaaagagaacagctgcatcagcatcagcc agaccagcgtgtacagcgagtactgctccaccgagatcagatggatctgccagaaagaactgacccctgtgcggaac aaggtgtacccccgattct
SPD-sCD40L 蛋白质序列	238	MLPFLSMLVLLVQPLGNLGAEMKSLSQRSVPNTCTLVMCSPTENGLPGRDG RDGREGPRGEKGDPGLPGPMGLSGLQGPTGPVGPKGENGSAGEPGPKGERG LSGPPGLPGIPGPAGKEGPSGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQGS TGAKGSTGPKGERGAPGVQGAPGNAGAAGPAGPAGPQGAPGSRGPPGLKG DRGVPGDRGIKGESGLPDSAALRQQMEALKGKLQRLEVAFSHYQKAALFPD GHRRLDKVEEEVNLHEDFVFIKKLKRCNKGEGSLSLLNCEEMRRQFEDLVK

[0653]

		DITLNKEEKKENSFEMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYYT MKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYVYTQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPS SGSERILLKAANTHSSSQLCEQQSVHLGGVFELQAGASVFVNVTEASQVIHR VGFSSFGLLKL
SPD-sCD40L DNA 序列	239	atgctgcccttctctccatgcttgcttgtacagccccctgggaaatctgggagcagaaatgaagagcctctcgca gagatcagtacccaacacctgcaccctagtcatgtagcccaacagagaatggcctgcctgtcgatggacggg atgggagagaaggtccacgggggtgagaaggtgatccaggtttgccaggacctatgggctctcagggttgcaggg ccctacaggtccagttggacccaaaggagagaatggctctgctggcgaacctggaccaaagggagaacgtggacta agtggacctccaggacttccaggtattcctggtccagctgggaaagaaggtccctctgggaaggcagggggaacatagg acctcaaggcaaaccaggtcctaaaggagaggctgggcccaaaggagaagtaggtgctcctggcatgcaaggatct acagggggcaaaaggctccacaggccccaagggagaaagaggtgccctgtgtgtgcaaggagcccccagggaatgc tggagcagcaggacctgccggacctgccggtccacagggagctccaggttccaggtttcccaggaggggccccccaggactcaaggg ggacagaggtgttcctggagacagaggaatcaaaggtgaaagcgggcttccagacagtgctgctctgaggcagcag atggaggccttaaaaggaaaactacagcgtctagaggttgccttctcccactatcagaaagctgcattgttccctgatgg ccatagaagattggataaggtcgaagaggaagtaaaccttcatgaagatttgtattcataaaaaagctaaagagatgca acaaaggagaaggatctttatccttgctgaactgtgaggagatgagaaggcaatttgaagaccttgtcaaggatataac gttaaacaaagaagagaaaaaagaaaacagctttgaaatgcaaagaggtgatgaggatcctcaaattgcagcacacg ttgtaagcgaagccaacagtaatgcagcatccgttctacagtgggccaagaaaggatattataccatgaaaagcaactt ggtaatgcttgaaaatgggaaacagctgacggttaaaagagaaggactctattatgtctacactcaagtcaccttctgct ctaatcgggagccttcgagtcaacgcccattcatcgtcgggcctctggctgaagcccagcagtggatctgagagaatctt actcaaggcggcaaatacccacagttcctcccagctttgcgagcagcagtctgttcacttgggcggagtgtttgaattac aagctggtgcttctgtgtttgtcaacgtgactgaagcaaggccaagtgatccacagagttggcttctcatctttttggcttact caaactctga
	240	
HER2-LAMP-OX40L ；HER2（胞外结构域）+LAMP +EF-1α +IL-2 SP +OX40L（胞外结构域+Fc结构域）；DNA 序列	241	atggcgcccccgcagcgcccggcgaccctgctgctgctactgctgttgctgctcggcctcatgcattgtgcgtcag cagcaatgtttatggtgaaaaatggcaacgggaccgcgtgcataatggccaacttctctgtgccttctcagtgaactac gacaccaagagtggccctaagaacatgaccctgacctgccatcagatgccacagtggtgctcaaccgcagctcctgt ggaaaagagaacacttctgaccccagtctcgtgattgcttttggaagaggacatacactcactctcaatttcacgagaaa tgcaacacgttacagcgtccagctcatgagtttttgtttataacttgtcagacacacacctttccccaatgcgagctccaaa gaaatcaagactgtggaatctataactgacatcagggcagatatagataaaaaatacagatgtgttagtggcacccagg tccacatgaacaacgtgaccgtaacgctccatgatgccaccatccaggcgtacctttccaacagcagcttcagccgggg

[0654]

gagagacacgctgtgaacaagacctcgagacacaagtctgcaccggcaccgacatgaagctgagactgcccgccca		
gccccgaaacccatctggacatgctgcggcatctgtaccaaggctgtcaagtggtgcaaggcaatctggaactgacat		
atctgcctaccaacgcctctctgagctttctgcaagacatccaagaagtgcaaggctacgtcctcattgcccacaaccaa		
gtccgacaagtgccactgcagcggctgagaatcgtgcgggcacccagctgttcgaggacaactatgctctggccgt		
gctggacaacggcgacgaccctctgaacaacaccacaccagtgactggcgcctctcccggcgggactgagagaactgcag		
ctgcgctctctgaccgagattctgaagggcggcgtgctgatccagcggaaccctcagctgtgctaccaagacaccatt		
ctgtggaaggacatcttccacaagaacaaccagctggctctgaccctcatcgacaccaacagaagccgggcttgcca		
ccctgcagcccatgtgcaaggcagcagatgttgggcgagagcagcgaggactgccagtctctgaccagaacc		
gtgtgtgccggcggatgcgccagatgcaagggcccctgccaaccgattgctgcccacgaacagtgcgccgctggct		
gtaccggccccaagcacagcgattgtctggcttgtctgcacttcaaccactccgcgatctgcgagctgcactgcccag		
ccctcgtgacatacaacaccgacacattcgagagcatgcccaacccccgagggcagatacacattcggccagctgt		
gtgaccgcttgccctacaactatctgagcaccgacgtgggcagctgcacctcgtgtgccctctgcacaatcaagaa		
gtgaccgccgaggacggcacccagagatgcgagaagtgctccaagccttgcgccagagtgtgctacggactgggc		
atggaacatctgcgggaagtgcgggccgtgaccagcgccaatatccaagaatttgccggctgcaagaagatttcgg		
cagtctggccttctgcccgagagcttcgatggcgacccgcctctaacacagcccctctgcagccagagcagctcca		
agtgttcgagacactggaagagatcaccggctatctgtacatcagcgcttgggcccgactctctgcccgatctgagcgtg		
ttccagaatctgcaagtcatcagaggccggattctgcacaacggcgcctattctctgacactgcaaggactgggaatca		
gctggctgggactgcgggagtctgagagagagctgggcagcgggactggcactgatccaccacacaacacccatctgtgcttc		
gtgcacaccgtgccttgggatcagctgttccggaatcccccaccaagctctgctgcacaccgccaacagacccgagga		
tgagtgtgtgggcgaggggctggcttgccatcagctctgtgccagaggacactgttgggggacccggccctacccagt		
gcgtgaactgctcccagtttctgcgggccaagaatgcgtggaagagtgcagagtgctccaaggactgcccgcgga		
gtacgtgaacgccagacactgtctgccatgccacccccgagtgccagcctcagaatggcagcgtgacatgcttcggcc		
ccgaggccgatcagtgtgtggcttgcgctcactacaaggacccctcccttctgcgtggcccggtgtccttctggcgtgaa		
acccgatctgtcctacatgcctatctggaagttccccgacgaggaaggcgcttgtcagccttgccccatcaactgcacc		
cacgaattcacctgcctgctggccagcatgggctgcagctgaacctcacctatgagaggaaggacaacacgacggt		
gacaaggcttctcaacatcaacccaacaagacctcggccagcgcgggagctgcggcgcccacctggtgactctggag		
ctgcacagcgaggcaccaccgtcctgctcttccagttcgggatgaatgcaagttctagccggttttttcctacaaggaat		
ccagttgaatacaattcttcctgacgccagagaccctgccttttaaagctgccaacggctccctgcgagcgctgcaggcc		
acagtcggcaattcctacaagtgcaacgcggaggagcacgtccgtgtcacgaaggcgttttcagtcaatatattcaaag		
tgtgggtccaggctttcaaggtggaaggtggccagtttggctctgtggaggagtgtctgctggacgagaacagcatgc		
tgatcccccatcggctgtgggtggtgccctgggcgggggctggtcctcatcgtcctcatcggctacctcgtcgggcaggaaga		

[0655]

		ggagtcacgcaggctaccagactatctagtaaagatctttttccctctgccaaaaattatgggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaatttatttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctctcactcggaaggacataaggcggcggctaccgtgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcgggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcctttttcccgaggtgtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaaacacagtctagaggatccgccgccaccatgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcactaagtcttgcacttgtcacgaattcgataagcagcagccctgccaaggacccctcctattcagaggctgaggggccgccgtgacaaggtgcgaggacgacggacagctgttcatcagcagctacaagaacgagtatcagaccatggaggtgcagaacaacagcgtggtgatcaagtgcgacggcctgtacatcatctacctgaaggcgcagcttcttccaagaggtgaagatcgacctgcacttaggaggaccacaacccctatcagcatccctatgctgaacgacggaaggaggatcgtgttcaccgtggtggctagcctggccttcaaggacaaggtgtacctgaccgtgaacgccccctgacaccctgtgcgagcacctgcagatcaacgacggcgagctgatcgtggtgcagctgaccctggctactgctgcgccctgaggcagctaccacagcaccgtgaaccaagtgccctctggatatcggaggcggaggaagcggaggcggaggaagccccagagggcccacaatcaagcccctgtcctccatgcaaatgcccagcacctaacctcgaggtggaccatccgtcttcatcttcctccaaagatcaagatgtactcatgatctccctgagcccccatagtcacatgtgtggtgtggatgtgagcgaggatgacccagatgtccagatcagctggttttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagacacaaacccatagaggattacaacagtactctccgggtggtcagtgccctcccatccagcaccaggactggatgagtggcaaggcgttcgcatgcgcggtcaacaacaaagacctcccagcgcccatcgagagaaccatctcaaaacccaaagggtcagtaagagctccacaggtatatgtcttgcctccaccagaagaagatgactaagaaacaggtcactctgacctgcatggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtggatacagcaagctgagagtggaaaagaagaactgggtggaaagaaatagctactcctgttcagtggtccacgagggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccggactccgggtaaa	
IL-2 SP-OX40L 胞外结构域－Fc 蛋白质序列	242	MYRMQLLSCIALSLALVTNSSSPAKDPPIQRLRGAVTRCEDGQLFISSYKNEYQTMEVQNNSVVIKCDGLYIIYLKGSFFQEVKIDLHFREDHNPISIPMLNDGRRIVFTVVASLAFKDKVYLTVNAPDTLCEHLQINDGELIVVQLTPGYCAPEGSYHSTVNQVPLDIGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLEGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKAFACAVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVVVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
OX40L（胞外结构域+Fc 结	243	SSSPAKDPPIQRLRGAVTRCEDGQLFISSYKNEYQTMEVQNNSVVIKCDGLY

[0656]

构域）蛋白质序列		IIYLKGSFFQEVKIDLHFREDHNPISIPMLNDGRRIVFTVVASLAFKDKVYLTV NAPDTLCEHLQINDGELIVVQLTPGYCAPEGSYHSTVNQVPLDIGGGGSGGG GSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLEGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSE DDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKA FACAVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
OX40L（胞外结构域+Fc 结构域）DNA 序列	244	agcagcagccctgccaaggaccctctattcagaggctgagggcgccgtgacaaggtgcgaggacgacagctg ttcatcagcagctacaagaacgagtatcagaccatggaggtgcagaacaacagcgtggtgatcaagtgcgacggcct gtacatcatctacctgaagggcagcttctccaagaggtgaagatcgacctgcacttttagggaggaccacaaccctatc agcatccctatgctgaacgacggaaggaggatcgtgttcaccgtggtggctagcctggccttcaaggacaaggtgtac ctgaccgtgaacgccccctgacacccctgtgcgagcacctgcagatcaacgacggcgagctgatcgtggtgcagctgac ccctggctactgcgcccctgagggcagctaccacagcaccgtgaaccaagtgcctctggatatcggaggcggagga agcggaggcggaggaagccccagagggcccacaatcaagccctgtcctccatgcaaatgcccagcacctaacctc gaggtggaccatccgtcttcatcttccctccaaagatcaaggatgtactcatgatctccctgagccccatagtcacatgt gtggtggtggatgtgagcgaggatgacccagatgtccagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagct cagacacaaacccatagaggattacaacagtactctccgggtggtcagtgccctcccccatccagcaccaggactg gatgagtggcaaggcgttcgcatgcgcggtcaacacaaagacctcccagcgcccatcgagagaaccatctcaaaa cccaaagggtcagtaagagctccacaggtatatgtcttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggtcact ctgacctgcatggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaac tacaagaacactgaaccagtcctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaact gggtggaaagaaatagctactcctgttcagtggtccacgagggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctccc ggactccgggtaaa
EF-1α 核心启动子	245	gggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggagggtcggcaattgaaccggtgcctagagaa ggtggcgcgggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtata taagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttgccgccagaacacag
鼠 IL-2 信号肽（SP）氨基酸序列	246	MYRMQLLSCIALSLALVTNS
鼠 IL-2 SP 核苷酸序列	247	atgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcactaagtcttgcacttgtcacgaattcg
人 IL-2 SP 氨基酸序列	248	MYRMQLLSCIALSLALVTNS

[0657]

人 IL-2 SP 核苷酸序列	249	atgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcactaagtcttgcacttgtcacaaacagt
	250	
HER2-LAMP-CD80；HER2（胞外结构域）+LAMP +EF-1α +IL-2 SP +CD80（胞外结构域+Fc结构域）；DNA 序列	251	atggcgcccccgcagcgcccggcgaccctgctgctgctactgctgttgctgctcggcctcatgcattgtgcgtcag cagcaatgtttatggtgaaaaatggcaacgggaccgcgtgcataatggccaacttctctgtgccttctcagtgaactac gacaccaagagtggccctaagaacatgaccctgccatcagatgccacagtggtgctcaaccgcagctcctgt ggaaaagagaacacttctgaccccagtctcgtgattgctttggaagaggacatacactcactctcaatttcacgagaaa tgcaacacgtttacagcgtccagctcatgagtttgtttataacttgtcagacacacacctttcccaatgcgagctccaaa gaaatcaagactgtggaatctataactgacatcagggcagatatagataaaaaatacagatgtgttagtggcacccagg tccacatgaacaacgtgaccgtaacgctccatgatgccaccatccaggcgtacctttccaacagcagcttcagccggg gagagacacgctgtgaacaagacctcgagacacaagtctgcaccggcaccgacatgaagctgagactgcccgcca gccccgaaacccatctggacatgctgcggcatctgtaccaaggctgtcaagtggtgcaaggcaatctggaactgacat atctgcctaccaacgcctctctgagctttctgcaagacatccaagaagtgcaaggctacgtcctcattgcccacaaccaa gtccgacaagtgccactgcagcggctgagaatcgtgcgggggcacccagctgttcgaggacaactatgctctggccgt gctggacaacggcgaccctctgaacaacaccacaccagtgactggcgcctctcccggcggactgagagaactgcag ctgcgctctgaccgagattctgaagggcggcgtgctgatccagcggaaccctcagctgtgctaccaagacaccatt ctgtggaaggacatcttccacaagaacaaccagctggctctgaccctcatcgacaccaacagaagccgggcttgcca ccctgcagccccatgtgcaagggcagcagatgttgggggcgagagcagcgaggactgccagtctctgaccagaacc gtgtgtgccggcggatgcgccagatgcaagggcccctctgccaaccgattgctgccacgaacagtgccgctggct gtaccggccccaagcacagcgattgtctggcttgtctgcacttcaaccactccggcatctgcgagctgcactgcccag ccctcgtgacatacaacaccgacacacattcgagagcatgcccaacccccgagggcagatacacattcggcgccagctgt gtgaccgcttgccctacaactatctgagcaccgacgtgggcagctgcaccctgtgtgccctctgcacaatcaagaa gtgaccgccgaggacggcacccagagatgcgagaagtgctccaagccttgcgccagagtgtgctacggactgggc atggaacatctgcgggaagtgcgggccgtgaccagcgccaatatccaagaatttgccggctgcaagaagatttcgg cagtctggccttctgcccgagagcttcgatggcgaccccgcctctaacacagccctctgcagccagagcagctcca agtgttcgagacactggaagagatcaccggctatctgtacatcagcgcttgggcccgactctctgcccgatctgagcgtg ttccagaatctgcaagtcatcagaggccggattctgcacaacggcgcctattctctgacactgcaaggactgggaatca gctggctgggactgcggagtctgagagagctgggcagcggactggcactgatccaccacaacacccatctgcttc gtgcacaccgtgccttgggatcagctgttccggaatcccccaccaagctctgctgcacaccgccaacagacccgagga tgagtgtgtgggcgaggggctggcttgccatcagctctgtgccagaggacactgttgggggacccggccctacccagt

[0658]

gcgtgaactgctcccagtttctgcgggccaagaatgcgtggaagagtgcagagtgctccaaggactgccccgcga		
gtacgtgaacgccagacactgtctgccatgccaccccgagtgccagcctcagaatggcagcgtgacatgcttcggcc		
ccgaggccgatcagtgtgtggcttgcgctcactacaaggacccctcccttctgcgtggcccggtgtccttctggcgtgaa		
acccgatctgtcctacatgcctatctggaagttccccgacgaggaaggcgcttgtcagccttgccccatcaactgcacc		
cacgaattcacctgcctgctggccagcatgggggctgcagctgaacctcacctatgagaggaaggacaacacgacggt		
gacaaggcttctcaacatcaaccccaacaagacctcggccagcgggagctgcggcgcccacctggtgactctggag		
ctgcacagcgagggcaccaccgtcctgcttccagttcgggatgaatgcaagttctagccggttttctacaaggaat		
ccagttgaatacaattcttcctgacgccagagaccctgcctttaaagctgccaacggctccctgcgagcgctgcaggcc		
acagtcggcaattcctacaagtgcaacgcggaggagcacgtccgtgtcacgaaggcgttttcagtcaatatattcaaag		
tgtgggtccaggctttcaaggtggaaggtggccagtttggctctgtggaggagtgtctgctggacgagaacagcatgc		
tgatcccatcgctgtgggtggtgccctggcgggctggtcctcatcgtcctcatcgctcctacctcgtcgcaggaaga		
ggagtcacgcaggctaccagactatctagtaaagatcttttccctctgccaaaaattatgggacatcatgaagcccctt		
gagcatctgacttctggctaataaaggaaatttatttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctctcactcggaagg		
acataagggcggccgcggtaccgtgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcccc		
gagaagttgggggaggagggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaaggtggcgcgggtaaactgggaaagtgat		
gtcgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttt		
cgcaacgggtttgccgccagaacacagtctagaggatccgccgccaccatgtacaggatgcaactcctgtcttgcatt		
gcactaagtcttgcacttgtcacgaattcgatagtggacgagcagctgagcaagagcgtgaaggacaaggtgctgctg		
ccttgtaggtacaacagccctcacgaggacgagagcgaggataggatctactggcagaagcacgacaaggtagtgc		
tgagtgtgatagccggcaagctgaagggtgtggcctgagtacaagaataggaccctgtacgacaacacccacctacagc		
ctgatcatcctgggcctggctgctgagcgatagggtacctacagctgcgtggtgcagaagaggagagggcgcaccta		
cgaggtgaagcacctgggccctggtgaagctgagcatcaaggccgacttcagcaccctaacatcaccgagagcggc		
aaccctagcgccgacaccaagaggatcacctgcttcgctagcggcggctccctaagcctaggttcagctggctgga		
gaacggaagggagctgcctggcataaaacacgaccatatctcaagaccctgagagcgagctgtacaccatcagctctc		
agctggacttcaacaccaccgcaatcacaccatcaagtgcctgatcaagtacggcgacgcccacgtgagcgagga		
cttcacctgggagaagcctcctgaggaccctcctgacagcaagaacgatatcggagggcggaggaagcggaggcgg		
aggaagcccagagggcccacaatcaagccctgtcctccatgcaaatgcccagcacctaaccctcgagggtggacca		
tccgtcttcatcttcctccaaagatcaaggatgtactcatgatctccctgagcccccatagtcacatgtgtggtggtggat		
gtgagcgaggatgacccagatgtccagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagacacaaac		
ccatagaggattacaacagtactctccgggtggtcagtgccctccccatccagcaccaggactggatgagtggca		
aggcgttcgcatgcgcggtcaacaacaaagacctcccagcgcccatcgagagaaacccatctcaaaaccccaaagggtc		

[0659]

		agtaagagctccacaggtatatgtcttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacctgcatg gtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaagaacact gaaccagtcctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactgggtggaaaga aatagctactcctgttcagtggtccacgagggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccggactccgggta aa
IL-2 SP + CD80 胞外结构域+ FC	252	MYRMQLLSCIALSLALVTNSVDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIY WQKHDKVVLSVIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSCV VQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPK PRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAH VSEDFTWEKPPEDPPDSKNDIGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLEG GPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKAFACAVNNKDLPAPIERTISKPK GSVRAPQVYVVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKS FSRTPGK
CD80(胞外结构域+Fc 结构域）蛋白质序列	253	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVVLSVIAGKLKV WPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSCVVQKKERGTYEVKHLALVK LSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTIS QDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKN DIGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLEGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPI VTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKAFACAVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVVLPPPEEEMTK KQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKL RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
CD80(胞外结构域+Fc 结构域）DNA 序列	881	gtggacgagcagctgagcaagagcgtgaaggacaaggtgctgcctgtaggtacaacagccctcacgaggacg agagcgaggataggatctactggcagaagcacgacaaggtagtgctgagtggtatagccggcaagctgaaggtgtg gcctgagtacaagaataggaccctgtacgacaacaccacctacagcctgatcatcctggccctggtgctgagcgatag gggtacctacagctgcgtggtgcagaagaaggagagggcgcacctacgaggtgaagcacctggccctggtgaagct gagcatcaaggccgacttcagcaccctaacatcaccgagagcggcaaccctagcgccgacaccaagaggatcac ctgcttcgctagcggcggcttccctaagcctagattcagctggctggagaacggaagggagctgcctggcataaaca cgaccatatctcaagaccctgagagcgagctgtacaccatcagctctcagctggacttcaacaccacccgcaatcaca

[0660]

	879	ccatcaagtgcctgatcaagtacggcgacgcccacgtgagcgaggacttcacctgtggagaagcctcctgaggaccct cctgacagcaagaacgatatcggaggcggaggaagcggaggcggaaggccccagaggggcccacaatcaagc cctgtcctccatgcaaatgcccagcacctaacctcgagggtggaccatccgtcttcatcttccctccaaagatcaaggat gtactcatgatctccctgagcccatagtcacatgtggtggtggatgtgagcgaggatgacccagatgtccagatca gctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagacacaaacccatagaggaggattacaacagtactctccgggg tggtcagtgccctcccccatccagcaccaggactggatgagtggcaaggcgttcgcatgcgcggtcaacacaaagac ctcccagcgcccatcgagagaaccatctcaaaacccaaagggtcagtaagagctccacaggtatatgtcttgcctcca ccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacctgcatggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtg gagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaagaacactgaaccagtcctggactctgatggttcttacttc atgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactggtggaaagaaatagctactcctgttcagtggtccacgaggg tctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccggactccgggtaaa
示例性人LAMP1-大T抗原片段序列，包括LAMP1跨膜和胞质区和LAMP1信号序列		
示例性人LAMP1-大T抗原片段序列，包括LAMP1信号序列，并排除LAMP1跨膜和胞质区	880	
ITI-COVID-19双顺反子疫苗（ITI-双顺反子-S1-LAMP-RBG pA-EF2-S2P BHG pA；第一代COVID-19疫苗）的互补序列；DNA序列（SEQ ID NO：228）	882	参见图28C

[0661] 实施例2.第二代双顺反子COVID疫苗(2-V-Covid)在小鼠中引发T细胞和抗体应答

[0662] 产生足够的抗原特异性T细胞和抗体应答的主要挑战是DNA疫苗的低免疫原性。为

了提高针对DNA疫苗的T细胞应答,设计了一种新的双顺反子DNA疫苗。本实施例讨论了第二代COVID-19DNA疫苗,即刺突-LAMP-sCD40L(2-V-Covid疫苗;SARS-CoV-2B.1.351刺突(南非变体,无SP和TM)+LAMP+EF-1α+SPD+sCD40L;SEQ ID NO:242-243),其包含(1)与LAMP融合的全长SARS-CoV-2刺突蛋白,和(2)可溶性CD40L(sCD40L),两者均单独表达。这种双顺反子DNA疫苗被设计用于以相对低的水平诱导sCD40L的局部表达,从而为使用全身性重组CD40L或激动性抗CD40抗体提供一种安全的方法(van Mierlo等,2002)。

[0663] CD40配体(CD40L;CD154)通过刺激树突状细胞和B细胞来增强适应性免疫应答。包含CD40L基因的DNA疫苗已被显示在体内增强T细胞和抗体应答(未示出)。为了生产具有改善的免疫原性的COVID疫苗,设计了一种第二代疫苗以在两个单独的表达盒中表达SARS-CoV-2全长刺突蛋白和可溶性CD40L。在BALB/c小鼠中评估了这种2-V COVID疫苗的免疫原性。在两次免疫接种后,与实施例1中描述的第一代COVID-19DNA疫苗相比,所述新疫苗诱导更强的刺突特异性T细胞应答和更高水平的刺突特异性抗体应答。下面的实施例中讨论的数据表明,所述新疫苗具有更高的免疫原性,并具有提高针对COVID 19和未来新出现的感染性疾病的保护的潜力。

[0664] CD40L是一种在活化的T细胞,特别是CD4 T细胞的表面上表达的跨膜蛋白。CD40L刺激抗原呈递细胞(APC)例如树突状细胞(DC)和巨噬细胞以及B细胞的CD40依赖性活化,以增强T细胞和抗体应答(Grewal和Flavell,1998;Schoenberger等,1998)。重组的可溶性CD40L或激动性抗体已用于临床,并在各种癌症中显示出有希望的结果(Beatty等,2011,2017;Vonderheide等,2001)。因此,CD40L的这些免疫刺激功能使其成为对抗感染性疾病和癌症的有前景的疫苗佐剂。如本文和下面的实施例中所讨论的,sCD40L增强刺突特异性T细胞和抗体应答。本文中讨论的数据支持使用双顺反子DNA疫苗对抗感染性疾病。

[0665] A.材料和方法

[0666] 1.疫苗构建体

[0667] ITI-COVID-19双顺反子疫苗(ITI-双顺反子-S1-LAMP-RBG pA-EF2-S2P BHG pA;第一代COVID-19DNA疫苗,“ITI-双顺反子疫苗”;示出在图28C中,SEQ ID NO:228)先前如上面的实施例1中所述构建。

[0668] 第二代刺突-LAMP-sCD40L构建体“2-V COVID疫苗”(SEQ ID NO:228)也根据上文实施例1中描述的方法构建。所述2-V COVID疫苗具有两个独立的表达盒,独立地由CMV启动子和EF1启动子驱动。第一表达盒表达SARS-CoV-2南非变体(B.1.351)感染性克隆的全长刺突基因(SEQ ID NO:227)。第二表达盒表达与小鼠肺表面活性物质相关蛋白D(SPD)蛋白融合的可溶性鼠CD40L胞外结构域(SEQ ID NO:233)。

[0669] 使用的对照载体(CV)是没有任何基因插入片段的载体。

[0670] 2.试剂

[0671] 用于流式细胞术和酶联免疫斑点(ELISPOT)的抗体购自Biolegend,SA-HRP和AEC试剂盒购自BD。针对刺突蛋白的抗体和重组刺突(S1)(目录号40591-V08H)和RBD(目录号405092-V08B)蛋白购自Sino Biologics。兔多克隆抗S1抗体购自Sino Biologics。抗体滴度使用来自Southern Biotech的HRP抗小鼠抗体来评估。海肾萤光素酶报告物测定体系购自Promega(目录号E2710)。Epivax肽由GenScript合成。

[0672] 用于人ACE2过表达的预先制备的慢病毒粒子从GenTarget Inc订购(目录号

LvP1310)。

[0673] JPT PepMix™ SARS-CoV-2重叠肽合并物购自JPT(目录号PM-WCPV-S)。所述肽合并物含有总共315个肽(在158和157个肽的两个子合并物中递送),这些肽衍生自通过刺突的肽扫描(具有11个氨基酸重叠的15mer区段)(UniProt:P0DTC2)。

[0674] 假型萤光素酶rSARS-Cov-2刺突病毒购自Creative Diagnostics(编号Cov-PS01,批号CL-114A)。

[0675] 3.构建体的瞬时转染

[0676] 使用lipofectamine 2000(Invitrogen),将293T细胞用对照载体(CV)或双顺反子疫苗构建体瞬时转染。在转染后48小时,收集上清液,离心并过滤。分析所述上清液中可溶性CD40L的表达。

[0677] 在一些实施方式中,可以用人ACE2转导293T细胞。通过用表达人ACE2(血管紧张素I转化酶2,NM_021804)的慢病毒转导293T细胞来制备293T-ACE2细胞系,所述慢病毒由GeneTarget Inc制备,其含有RFP和杀稻瘟菌素双重选择标记。在感染后,使用15ug/ml的杀稻瘟菌素来分离表达RFP和ACE两者的单细胞克隆。正如所示,通过用抗人ACE2抗体(Sino Biological,兔Pab,目录号10108-T60)染色来检测人ACE2的表达。293T-ACE3克隆2和克隆5具有较高的hACE2表达,克隆5被用于本研究中的中和试验。

[0678] 4.Western印迹和免疫沉淀方法

[0679] 将生物素化的抗CD40L抗体(克隆MR1 BioLegend目录号106503)结合到链霉亲和素包被的磁珠上,用于分离CD40L。将珠子装载到凝胶上用于Western印迹成像。下述抗体也被用于Western印迹:(1)抗CD40L/CD154第一抗体(Invitrogen PA5-78983)和山羊抗兔IgG-HRP第二抗体(Southern Biotech 4030-05)。

[0680] 5.免疫接种和血清收集

[0681] 将6至8周龄雌性BALB/c小鼠在有执照的动物设施中繁殖和饲养。

[0682] 用于ITI-双顺反子疫苗和2-V COVID疫苗的免疫接种时间表如表2中所示。通过ID注射到耳部,然后电穿孔,将小鼠用DNA疫苗进行免疫接种。在免疫接种前和第二次免疫接种后14天收集血液样品。在第28天,按计划处死小鼠,收集脾脏和血清,用于测量T细胞和抗体应答。

[0683]

表 2. 免疫接种时间表

组	处理	浓度（mg/mL）	剂量（μg）	途径	小鼠数量	体积（μL）	小鼠ID	第0天	第14天	第14天	第28天
A	对照载体（CV）	3.3	20	ID（耳）	10	20	001-010	第一次免疫接种	每组终止5只小鼠，用于ELISA和	第二次免疫接种	终止，用于ELISA和ELISPOT
B	ITI-双顺反子疫苗	2.0	20	ID（耳）	10	20	011-020				
C	刺突-LAMP-sCD40L（2-V COVID疫苗）	2.0	20	IM（耳）	10	20	021-030				

[0684] 6.通过ELISPOT评估抗原特异性T细胞应答

[0685] 为了评估接种疫苗的小鼠中的抗原特异性T细胞应答,通过酶联免疫斑点(ELISPOT)评估了来自接种疫苗的小鼠的脾细胞的抗原特异性IFNγ。ELISPOT测定如本文中所述进行。简而言之,将脾细胞以$3x10^5$个细胞/孔的密度铺板,与1μg/ml的JPT重叠刺突肽、0.25μg/mL的伴刀豆球蛋白A或单独的培养基在总体积为200μl/孔的T细胞培养基中,在37℃和5% CO_2下共培养48h。用50μl/孔的AEC显色溶液对板进行长达30min的显色。通过在流动的自来水下洗涤来停止显色。在空气干燥后,使用AID ELISPOT高分辨率读板器系统和AID ELISPOT软件3.5版(Autoimmun Diagnostika GmbH)对着色斑点进行计数。使用Student T检验确定用ITI-双顺反子疫苗和2-V COVID疫苗转染的细胞之间的显著差异。

[0686] 7.ELISA

[0687] 通过间接ELISA评估鼠对疫苗的抗体应答。将ELISA板(MaxiSorp)用1μg/ml重组SARS-Cov-2刺突S1或RBD蛋白包被过夜,然后用PBS中的2% BSA封闭。将血清样品在PBS-T中稀释(1:2)。样品用1:6000的山羊抗小鼠IgG-HRP(Southern Biotech,Birmingham,Al)检测。反应用SureBlue TMB底物显色,并用来自KPL(Gaithersburg,MD)的TMB终止溶液终止。使用Epoch ELISA读板器(BioTek,Winooski,VT)读板(OD450)。

[0688] 8.SARS-Cov-2假病毒中和试验(pVNT)

[0689] 在一些实施方式中,使用了SARS-CoV-2假病毒中和试验。假型萤光素酶rSARS-CoV-2刺突购自Creative Diagnostics Inc.,这种基于慢病毒的SARS-CoV-2S假型病毒是一种复制受限的重组假型慢病毒粒子,含有SARS-CoV-2刺突蛋白。由于假型萤光素酶rSARS-CoV-2的感染性仅限于单轮复制,因此它在慢病毒载体基因组中编码海肾萤光素酶。当其基因组在进入细胞后整合时,萤光素酶的表达和活性与转导的细胞数量成正比。

[0690] 为了测定pVNT,可以将20μL SARS-CoV-2刺突假型病毒(10^5RLU)与两倍系列稀释的试验血清样品(起始稀释度为1:10)在50μL的终体积中,在37℃下预温育1小时,然后加入体积为50μL的$5x\ 10^4$个HEK293T-ACE2细胞。在感染后48-72小时,加入等体积的海肾萤光素

酶底物(Promega,目录号2710),并使用带有Gen5软件的微孔板读板器(BioTek)测量发光信号。测量可以对CV合并血清样品进行一式两份,对B组合并血清样品进行一式三份。中和的%和pVNT的IC50如前所述进行计算(Le Bert等,2020)。

[0691] 9.流式细胞术和细胞内细胞因子染色(ICS)

[0692] 用浓度为2ug/mL的刺突肽刺激脾细胞6小时。在温育6小时后,用Zombie aqua对细胞进行染色,然后进行表面染色,用Perm/固定溶液(BD Biosciences)固定,并在1x Perm/洗涤缓冲液中用细胞内抗体染色。样品在CytoFlex流式细胞仪(Beckman Coulter)上分析,并使用Kaluza软件(Beckman Coulter)进行分析。

[0693] 对细胞进行细胞内细胞因子IFNγ、TNFα和IL-2的染色。CD4 T细胞(效应记忆CD4)在CD3+CD4+CD8-CD44+CD62L-淋巴细胞上门选。CD8 T细胞(效应记忆CD4)在CD3+CD4-CD8+CD44+CD62L-淋巴细胞上门选。

[0694] B.结果

[0695] 1.2-V COVID疫苗表达可溶性CD40配体(sCD40L)

[0696] 将293T细胞用2-V COVID疫苗转染,并分析sCD40L的表达。使用免疫沉淀和Western印迹方法,证实了从2-V COVID疫苗表达sCD40L(图12;加框的条带指示sCD40L)。

[0697] 2.2-V COVID疫苗引发T细胞应答

[0698] 在第一次免疫接种后14天和第二次免疫接种后14天测定2-VCOVID疫苗的免疫原性(表2)。数据显示,与第一代COVID-19疫苗相比,2-V COVID疫苗诱导显著增强的T细胞应答(图13A-D)。所述数据表明,sCD40L的存在通过引发更大的T细胞应答来改善2-VCOVID疫苗。

[0699] 3.2-V COVID疫苗在体内刺激刺突特异性CD4和CD8 T细胞

[0700] 与ITI-双顺反子疫苗相比,在接种2-V疫苗的小鼠的脾细胞中观察到更大数量的CD4+和CD8+T细胞(图14)。数据表明,sCD40L的存在提供了所述增强。也对CD4+和CD8+T细胞进行了细胞内细胞因子染色,并且与ITI-双顺反子疫苗相比,接种2-V疫苗的小鼠中IFNγ、TNFα和IL-2的百分率更大(图15)。

[0701] 4.2-V COVID疫苗在体内引发刺突特异性抗体应答

[0702] 通过ELISA分析了在一次或两次免疫接种后,来自免疫接种小鼠的血清中的S1特异性抗体。图16A-B示出了S1结合性抗体的总IgG。图16C-D示出了IgG2a抗体。图16E-F示出了IgG1抗体。数据表明,与ITI-双顺反子疫苗相比,2-V COVID疫苗引发了优异的S1特异性抗体应答。单剂2-V COVID疫苗后,IgG1应答尤为明显(图16E)。

[0703] 5.总结

[0704] 与第一代疫苗相比,所述2-V疫苗显著增强了刺突特异性T细胞应答,包括CD4+和CD8+T细胞应答两者。在单次免疫接种后,所述2-V疫苗还增强了S1特异性抗体应答,特别是IgG1水平。

[0705] 实施例3.从HER2-LAMP-sCD40L双顺反子疫苗表达可溶性CD40L(sCD40L)

[0706] 本实施例讨论了HER2-LAMP-sCD40L(图11;SEQ ID NO:197),一种编码HER2-LAMP和4-三聚体版本的sCD40L的双顺反子DNA疫苗。本文讨论的数据支持了使用双顺反子DNA疫苗对抗癌症。

[0707] CD40配体(CD40L)是一种在活化的T细胞,特别是CD4 T细胞的表面上表达的跨膜

蛋白,其刺激抗原呈递细胞(APC)的CD40依赖性活化,导致T细胞和抗体应答的增强。CD40L的可溶性多聚体形式(sCD40L)可以充当佐剂以增强疫苗的免疫原性。正如在本实施例中所述,针对表达HER2-LAMP但不表达任何第二多肽(例如sCD40L)的构建体测试了HER2-LAMP-sCD40L双顺反子构建体。与用对照HER2-LAMP DNA免疫接种的小鼠相比,HER2-LAMP-sCD40L在小鼠中引发显著增强的HER2特异性T细胞和抗体应答。细胞内染色显示,在疫苗中包含sCD40L诱导了强效抗原特异性T细胞(IFNγ)的产生,主要是在CD4 T细胞中。此外,在小鼠TSA乳腺癌模型中,在治疗性疫苗的背景中HER2-LAMP-sCD40L显著抑制肿瘤生长并延长存活时间,表明所述HER2-LAMP-sCD40L疫苗是促进体内抗肿瘤功效的有效策略。

[0708] A.材料和方法

[0709] 总的来说,本实施例中使用的材料和方法如上文实施例1-2中所述,但有以下修改。

[0710] 1.疫苗构建体

[0711] 在这些实施例中讨论的HER2-LAMP-sCD40L双顺反子构建体(图11;SEQ ID NO:197)包含两个表达盒。第一表达盒由CMV启动子驱动,以表达LAMP-HER2/ErBB2融合蛋白(SEQ ID NO:195;或SEQ ID NO:198,然后是SEQ ID NO:200,然后是SEQ ID NO:202)。第二表达盒由EF1启动子驱动,以表达可溶性鼠CD40配体(sCD40L;GenBank登记号X65453.2),其编码与表面活性物质蛋白D(SPD)的主体融合的4-三聚体可溶性CD40L(Gómez等,2009;Stone等,2006)(SEQ ID NO:196)。在SPD与sCD40L之间存在三个氨基酸HRR。所述构建体被设计用于将HER2抗原递送到MHC II区室,这可以增强抗体产生和CD4 T细胞应答两者,同时分泌所述sCD40L多肽构建体。

[0712] 使用不含sCD40L的HER2-LAMP构建体作为对照疫苗。

[0713] 使用编码刺突的双顺反子DNA疫苗(刺突-LAMP)作为对照载体(即阴性对照)。

[0714] 2.免疫接种和血清收集

[0715] 6至8周龄的雌性C57BL/6小鼠在有执照的动物设施中繁殖和饲养。用于HER2-LAMP-sCD40L疫苗的免疫接种时间表示出在图13A和表3中。通过真皮内(ID)注射到耳部用20μg对照载体或疫苗对小鼠进行免疫接种。实验在第二次给药后一周、即第22天终止。将脾细胞用1μg/mL HER2合并肽处理48小时。

[0716]

表 3. 免疫接种时间表

组	处理	浓度（mg/mL）	剂量（μg）	途径	小鼠数量	体积（μL）	小鼠ID	第0天	第14天	第22天
A	对照载体刺突-LAMP	3.1	20	ID（耳）	5	20	001-005	第一次免疫接种	第二次免疫接种	终止以确定T细胞和抗体应答
B	LAMP-铰链-HER2	3.0	20	ID（耳）	7	20	006-012			
C	LAMP-HER2-sCD40L	2.0	20	IM（耳）	7	20	013-019			

[0717] 3.构建体的瞬时转染和ELISA

[0718] 分析用HER2-LAMP-sCD40L转染的293T细胞的sCD40L表达。编码刺突的双顺反子DNA疫苗(刺突-LAMP)作为阴性对照。在转染后5天,收集这些细胞的上清液,并用ELISA检测sCD40L。

[0719] 4.通过ELISPOT评估抗原特异性T细胞应答

[0720] 材料和方法如上文实施例2中所述,不同之处在于使用重叠的HER2肽(购自Genscript或JPT)代替重叠的刺突肽。

[0721] 5.流式细胞术和细胞内细胞因子染色(ICS)

[0722] 将来自免疫接种小鼠的脾细胞(图18A)与布雷菲德菌素A和莫能菌素在含有或不含HER2肽合并物的情况下温育5小时。

[0723] 6.ELISA

[0724] 通过间接ELISA评估鼠对HER2的抗体应答。将ELISA板(MaxiSorp)用1μg/ml HER2蛋白包被过夜。

[0725] 7.统计学

[0726] 使用Prism软件进行统计分析。采用单向ANOVA对各组进行比较。

[0727] 8.鼠乳腺肿瘤模型

[0728] 将小鼠用两剂HER2-LAMP-sCD40L或HER2-LAMP进行免疫接种,然后注射$2x10^5$个表达HER2的TSA(鼠乳腺癌)细胞。用1μg/mL的HER2肽合并物刺激血细胞,并通过ELISPOT进行分析。使用卡尺测量肿瘤。

[0729] B.结果

[0730] 1.HER2-LAMP-SCD40L表达可溶性CD40配体(SCD40L)

[0731] 将293T细胞用HER2-LAMP-sCD40L转染,并分析sCD40L的表达。使用ELISA,证实了从HER2-LAMP-sCD40表达sCD40L(图17A-B)。例如,在所述293T细胞的上清液中检测到sCD40L。

[0732] 2.HER2-LAMP-sCD40L引发HER2特异性细胞和体液应答

[0733] 在第22天,即第二次免疫接种后一周,测定了HER2-LAMP-sCD40L的免疫原性(图18A和表3)。数据显示,与用HER2-LAMP(即不含sCD40L的疫苗构建体)疫苗接种的小鼠相比,用HER2-LAMP-sCD40L疫苗接种的小鼠具有显著的T细胞应答(图18B-C)。数据还显示,与用HER2-LAMP对照疫苗接种的小鼠相比,用HER2-LAMP-sCD40L疫苗接种的小鼠的总IgG(图18D)、IgG1(图18D)和IgG2a(图16D)抗体增加。合在一起,这些数据表明sCD40L的存在促进了体内T细胞和抗体应答的改善。

[0734] 3.HER2-LAMP-sCD401比CD8 T细胞更高效地刺激CD4 T细胞

[0735] 在布雷菲德菌素A和莫能菌素存在下(参见方法第5部分),将来自免疫接种小鼠的脾细胞在存在或不存在HER2肽合并物的情况下温育5小时。然后对细胞进行细胞内染色,并通过流式细胞术进行分析。效应记忆CD4或CD8 T细胞在CD3+CD44+CD62L-CD4+或CD8%淋巴细胞上门选。图19A-B中的数据在图19A中表示为平均值+/-SEM,在图19B中表示为代表性FACS图。如图19A-B中所示,HER2-LAMP-sCD40L比CD8 T细胞更高效地刺激CD4 T细胞。数据还表明,sCD40L的存在提供了CD4和CD8 T细胞两者的增强的刺激(图19A-B)。

[0736] 4.HER2-LAMP-sCD40L在体内引发HER2特异性抗体应答

[0737] 在HER2-LAMP-sCD40L或HER2-LAMP或载体对照(CV)的两次免疫接种后,通过ELISA分析来自免疫接种小鼠的血清中的HER2特异性IgG抗体。图20显示了HER2结合性抗体的总IgG。数据表明,与HER2-LAMP相比,sCD40L的存在引发了提高的抗体应答。

[0738] 5.总结

[0739] 所述HER2-LAMP-sCD40L疫苗在体内引发强烈的HER2特异性T细胞和抗体应答。与CD8 T细胞相比,所述疫苗还增强CD4 T细胞,表明sCD40L在体内优先作用于CD4 T细胞。下面的实施例4讨论了HER2-LAMP-sCD40L在鼠乳腺肿瘤模型中的作用。

[0740] 在单独的工作(未示出)中,还制备了HER2-LAMP-sCD40L自扩增RNA构建体,并将其用于转染BHK-21细胞,通过Western印迹证实了所述转染的细胞分泌sCD40L。

[0741] 实施例4.表达双顺反子HER2-LAMP IREG的DNA疫苗在TSA乳腺癌模型中的抗肿瘤作用

[0742] 通过免疫反应增强基因(IREG)的表达,可以增强疫苗诱导的免疫应答,所述IREG可以放大免疫应答、改变免疫应答的质量和/或创造有利于免疫细胞浸润的肿瘤微环境。前述实施例讨论了向DNA疫苗添加CD40L在体内引发增强的T细胞和抗体应答。本实施例讨论了具有IREG Flt3L、IL-21、IL-21或OX40L的HER2-LAMP疫苗。数据表明,HER2-LAMP-IREG疫苗增强免疫原性并具有抗肿瘤特性。

[0743] A.材料和方法

[0744] 总的来说,本实施例中使用的材料和方法如上面的实施例1-3中所述,但具有下述修改。

[0745] 1.疫苗构建体

[0746] HER2-LAMP-sCD40L(SEQ ID NO:197)和HER2-LAMP对照如上面的实施例1和3中所讨论。

[0747] HER2-LAMP-mFLT3L(SEQ ID NO:208)、HER2-LAMP-IL-12(SEQ ID NO:212)、HER2-LAMP-IL-21(SEQ ID NO:216)和HER2-LAMP-OX40L(SEQ ID NO:241)如实施例1中所述构建。

[0748] 对照载体(CV)使用不含任何基因插入片段的载体。

[0749] 2.免疫接种

[0750] 6至8周龄雌性BALB/c小鼠购自Jackson Laboratory(Maine,USA)。在皮下(sc)注射2x10^{5}个TSA-HER肿瘤细胞后两天,将所述小鼠在耳部通过ID用DNA疫苗进行免疫接种。如表4中所示,将小鼠再免疫接种三次。

[0751]

表 4. 免疫接种时间表

组	疫苗	剂量（μg）	小鼠数量	体积（μL）	小鼠 ID	第0天	第2天	第9天	第16天	第23天	第45天
A	对照载体（CV）	20	10	20	41-50	Sc 注射 2x10^5 个 TSA-HER2 细胞	第一次免疫接种（ID 耳）	第二次免疫接种（ID 耳）	第三次免疫接种（ID 耳）	第四次免疫接种（ID 耳）	监测肿瘤生长和小鼠存活率的最后一天
B	HER2-LAMP-CD40L	20	10	20	51-60						
C	HER2-LAMP-Flt3L	20	10	20	61-70						
D	HER2-LAMP-IL-21	20	10	20	71-80						
E	HER2-LAMP-IL-12	20	10	20	81-90						
F	HER2-LAMP-OX40L	20	10	20	91-100						

[0752] 3.肿瘤监测

[0753] 在第一次免疫接种前2天,将2x10^{5}个TSA-HER2肿瘤细胞注射到乳腺脂肪垫中。肿瘤每周测量两次或一次。肿瘤直径被计算为长度x宽度的平方根,肿瘤体积使用公式$4/3\pi r^3$计算。当肿瘤体积达到2000mm^{3}或濒临死亡时,对小鼠实施安乐死。

[0754] 4.统计学

[0755] 结果被显示为平均值±标准偏差。使用GraphPad Prism软件9.0.2版进行统计分析。使用了双尾student's T检验。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。

[0756] B.结果

[0757] 1.HER2-LAMP-sCD40L在体内表现出针对HER2的抗肿瘤作用

[0758] 测试了HER2-LAMP-sCD40L在鼠乳腺肿瘤模型中的效果。在用表达HER2的TSA细胞激惹之前,将小鼠用两剂HER2-LAMP-sCD40L或HER2-LAMP进行免疫接种。来自用HER2-LAMP-sCD40L治疗的小鼠的血细胞有更多的IFNγ斑点(图21A)。HER2-LAMP-sCD40L或HER2-LAMP均具有抗肿瘤作用,因为用任一疫苗治疗的小鼠在17天内都没有肿瘤生长(图21B)。还观察了小鼠45天,以确定疫苗是否对小鼠存活率有影响。图22B中示出了被治疗小鼠的存活概率。尽管HER2-LAMP-sCD40L和HER2-LAMP都提高小鼠存活率,但HER2-LAMP-sCD40L似乎对表达HER2的细胞更具保护性。

[0759] 2.具有免疫应答增强基因(IREG)的双顺反子疫苗在体内表现出抗肿瘤作用

[0760] 测试了与其他IREG组合的HER2-LAMP的效果。除了HER2-LAMP-CD40L之外,还测试

了下述疫苗:(1)HER2-LAMP-Flt3L(SEQ ID NO:208),(2)HER2-LAMP-IL-21(SEQ ID NO:216),(3)HER2-LAMP-IL-12(SEQ ID NO:212),和(4)HER2-LAMP-OX40L(SEQ ID NO:241)。在所有情况下,接种疫苗的小鼠中的肿瘤的生长速度都比CV治疗的小鼠中的肿瘤慢(图23)。在测试的五种HER2-LAMP疫苗中,HER2-LAMP-IL-21显示出最低的肿瘤抑制水平,而HER2-LAMP-CD40L和HER2-LAMP-Flt3L显示出最高的肿瘤抑制水平(图23)。

[0761] 3.具有免疫应答增强基因(IREG)的双顺反子疫苗提高小鼠存活率

[0762] 测试了所有五种HER2-LAMP-IREG疫苗——(1)HER2-LAMP-CD40L、(2)HER2-LAMP-Flt3L、(3)HER2-LAMP-IL-21、(4)HER2-LAMP-IL-12和(5)HER2-LAMP-OX40L对小鼠存活率的影响。小鼠首先用TSA-HER2细胞皮下注射,然后在注射TSA-HER2细胞后2、9、16和23天施用四次独立的免疫接种。在45天的过程中,监测小鼠的存活率。数据显示,与用对照载体(CV)治疗的小鼠相比,所有免疫接种小鼠都具有提高的存活率(图24)。接受HER2-LAMP-CD40L的小鼠显示出最高的存活概率(图24)。

[0763] 4.总结

[0764] 所有测试的HER2-LAMP-IREG疫苗均抑制肿瘤生长。CD40L提供了最大的抗肿瘤保护作用,其次是Flt3L和IL-12。此外,所有HER2-LAMP-IREG疫苗都提高小鼠存活率。小鼠存活率的提高与疫苗对肿瘤生长的抑制相对应。

[0765] 实施例5.双顺反子HER2-LAMP-IL-15疫苗在小鼠中引发抗原特异性T细胞应答

[0766] IL-15是一种1型T辅助细胞细胞因子(Chen等,2014),已被证明具有显著的抗肿瘤免疫应答,并且在某些临床前试验中可以逆转宿主对肿瘤抗原的耐受性。IL-15是一种14-15kDa的4α-螺旋束家族细胞因子家族成员,其刺激自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、γδT细胞、ILC1细胞、上皮内淋巴细胞(IEL)、表达CD103+CD56+CD44+的先天细胞和记忆CD8 T细胞的产生(Motegi等,2008;Wu和Xu,2010)。与IL-2一样,IL-15刺激T细胞的增殖,诱导细胞毒性淋巴细胞和记忆表型CD8 T细胞的产生,并刺激NK细胞的增殖和维持。与IL-2相反,IL-15不介导活化诱导的细胞死亡(AICD),不始终如一地激活Treg,并可以导致较少的毛细血管渗漏综合征。在多个鼠免疫疗法试验中观察到IL-15的效力,包括使用同基因转基因腺癌小鼠前列腺癌细胞(TRAMP-C2)、Pmel-1小鼠、B16黑色素瘤细胞、Mc38细胞和CT26结肠癌细胞的试验。这些研究表明,在癌症疗法中,IL-15可能比IL-2更有效(Guo等,2021;Heon等,2015;Klebanoff等,2004;Morris等,2014;Rauch等,2014)。

[0767] 本实施例讨论了IL-15对双顺反子HER2 DNA疫苗诱导的小鼠免疫应答的影响。比较了由HER2-LAMP、HER2-LAMP-CD40L和HER2-LAMP-IL-15诱导的免疫应答。

[0768] A.材料和方法

[0769] 总的来说,本实施例中使用的材料和方法如上面实施例1-4中所述,但具有下述修改。

[0770] 1.疫苗构建体

[0771] 在本实施例中讨论的疫苗是LAMP-铰链-HER2(表达不含IREG多肽的单独的HER2-LAMP)、HER2-LAMP-IL-15构建体(表达多肽HER2-LAMP(参见例如SEQ ID NO:195)和分泌的IL-15例如带有Ig-κ信号序列的IL-15(SEQ ID NO:225))、LAMP-HER2-CD40L(SEQ ID NO:197)和对照载体(CV,即不含任何基因插入片段的载体)。这些疫苗如前面的实施例中所述来制备。

[0772] 2.免疫接种

[0773] 6至8周龄的雌性BALB/c小鼠在有执照的动物设施中繁殖和饲养。通过在耳部真皮内(ID)注射,将小鼠用下面的表5中所示的疫苗治疗。在第0天和第16天将小鼠用疫苗进行免疫接种。在第36天对小鼠采血。收集血清并在-30℃下储存。在第14天和第36天收集脾脏并进行处理,用于ELISPOT以评估HER2特异性T细胞应答。

[0774]

表 5. 免疫接种时间表

组	疫苗	浓度(mg/mL)	剂量(μg)	小鼠数量	体积(μL)	小鼠ID	第-1天	第0天	第14天	第15-17天	第29天	第36天
A	对照载体(CV)	3.3	20	10	20	2095-2104	预采血	第一次	每组终止5只小鼠	第二次	采集血清	终止小鼠
B	LAMP-铰链-HER2	3.0	20	10	20	2105-2114						
C	HER2-LAMP CD40L	2.0	20	10	20	2115-2124						
D	HER2-LAMP IL-15	1	20	10	50	2125-2134						

[0775] 3.抗原特异性T细胞应答的评估

[0776] 从脾细胞中耗竭红细胞(RBC),并在U形底96孔板中,在200μl/孔的T细胞培养基(RPMI-1640,含有L-谷氨酰胺和HEPES(ATCC)、1%青霉素、1%链霉素和5x10^{-5} Mβ-巯基乙醇(βME))中,在1x10^{6}个细胞/孔和1μg/mL HER2肽混合物或单独培养基下,在布雷菲德菌素A下,在37℃、5% CO_2下共培养5小时。将板以1200rpm离心6分钟,收集细胞沉淀物用于细胞内染色。

[0777] 4.ELISPOT

[0778] 尽管与T细胞应答的ELISPOT分析相关的总体材料和方法如上面的实施例2-3中所述,但在这里提供了与本实施例相关的修改和具体细节。将96孔硝酸纤维素板(Millipore)用100μL/孔的含有捕获单克隆抗体的PBS在4℃下包被过夜。将板在200μL/孔的T细胞培养基中洗涤三次,并在室温下用200μL/孔的T细胞培养基封闭至少2小时。将脾细胞以3x10^{5}个细胞/孔的密度铺板,并与1μg/孔的T细胞培养基(RPMI-1640,含有L-谷氨酰胺和HEPES(ATCC)、1%青霉素、1%链霉素和5x10^{-5} Mβ-巯基乙醇(βME))在37℃和5% CO_2下共培养48小时。将板用200μL/孔PBS洗涤两次,并用200μL/孔PBS-T(PBS中0.05%吐温)洗涤两次。加入稀释的检测抗体(50μL/孔,在PBS-T/0.5% BSA中),并将板在室温下振摇温育2小时。将板用PBS洗涤四次。加入在PBS中稀释的链霉亲和素-碱性磷酸酶(50μL/孔),并温育2小时。

将板用PBS洗涤四次,用50μL/孔的3-氨基-9-乙基咔唑(AEC,BD Bioscience)底物显色10分钟。通过在流动的自来水下洗涤来停止显色。在室温下和暗处干燥72小时后,使用AID ELISPOT高分辨率读板器系统和AID ELISPOT软件3.5版(Autoimmun Diagnostika GmbH)对着色的斑点进行计数。

[0779] 5.流式细胞术

[0780] 尽管与T细胞应答的ELISPOT分析相关的总体材料和方法如上面的实施例中所述,但在这里提供了与本实施例相关的修改和具体细节。首先将细胞用PBS中的Zombie aqua固定活性染料(1:500稀释)标记,然后用染色缓冲液(在PBS中的4% FBS、2%大鼠血清、2%小鼠血清)中的表面抗体(1:100稀释)标记。对于细胞内染色来说,将细胞用Zombie aqua染色,然后进行表面染色,用4%多聚甲醛固定,并用通透化缓冲液(含1% FCS、0.1%皂苷的PBS)中的细胞内抗体染色。

[0781] 6.统计学

[0782] 使用GraphPad Prism 6.0软件进行T检验,以评估统计显著性。从抗原激活的结果中扣除每只小鼠的RPMI结果。

[0783] B.结果

[0784] 1.HER2-LAMP-IL-5引发强烈的T细胞应答

[0785] 与不含IREG的HER2疫苗(LAMP-铰链-HER2)相比,两种含有IREG的双顺反子疫苗HER2-LAMP-IL-15和HER2-LAMP-CD40L诱导更强的抗原特异性抗体应答,正如通过ELISA所测量的(图25)。所述双顺反子疫苗也引发了强烈的T细胞应答。尽管一剂任一双顺反子疫苗均足以引发所述应答(图26),但两剂HER2-LAMP-IL-15比两剂LAMP-铰链-HER2或HER2-LAMP-CD40L引发的应答更强烈(图27A-B)。

[0786] 2.总结

[0787] 比较了由铰链-LAMP-HER2、HER2-LAMP-IL-15和HER2-LAMP-CD40L诱导的免疫应答。与铰链-LAMP-HER2相比,HER2-LAMP-IL-15和HER2-LAMP-CD40L这两种双顺反子疫苗都诱导了强烈的T细胞应答,尤其是在每种疫苗施用两剂时。与CD8 T细胞相比,两种双顺反子疫苗都增强CD4 T细胞以产生IFNγ。然而,在HER2-CD40L和HER2-IL-15治疗之间没有显著差异。目前正在进行研究以确定HER2-LAMP-IL-15的抗肿瘤活性。

[0788] 在不脱离本公开和权利要求的精神和范围的情况下,本领域普通技术人员会想到本文所述内容的变化、修改和其他实施方案。所有已确定的专利、专利申请、国际申请和参考文献均明确地整体通过引用并入本文。

[0789] 实施例6.双顺反子HER2-LAMP-可溶性CD40L的体内抗肿瘤活性A.简介

[0790] 在乳腺肿瘤模型中比较了通过DNA载体递送的非双顺反子HER2-LAMP和双顺反子HER2-LAMP-sCD40L的抗肿瘤功效,并探讨了肿瘤微环境中的细胞因子谱。施用和分析时间表示出在图29A中。集合示出在图29-39中的总体结果显示,双顺反子HER2-LAMP-sCD40L通过显著抑制肿瘤生长来增强抗肿瘤作用(图29和36);双顺反子HER2-LAMP-sCD40L系统地影响记忆T细胞和T细胞在肿瘤微环境(TME)中的浸润(图30-31);双顺反子HER2-LAMP-sCD40L通过激活引流淋巴结中的DC1树突状细胞来诱导抗原呈递细胞产生IL-12(图32);双顺反子HER2-LAMP-sCD40L激活TME中的炎性应答,使肿瘤从“冷”变为“热”(图33);双顺反子HER2-LAMP-sCD40L在TME中促进CD4 T细胞产生PD-1(图34);与Her2-LAMP DNA疫苗相比,双顺反

子Her2-LAMP-sCD40L在脾脏中诱导更强的IFNg产生(图37);由所述构建体表达的可溶性CD40L在脾脏中诱导抗原呈递细胞增强DC1的活化(图38);并且双顺反子Her2-LAMP-sCD40L增加肿瘤周和肿瘤内组织中的CD4和CD8T细胞(图39)。

[0791] B总结和结果

[0792] 为了在乳腺肿瘤模型中测试非双顺反子HER2-LAMP和双顺反子HER2-LAMP-sCD40L在体内抑制肿瘤生长的能力,将雌性BALB/c小鼠在第0天用$1x10^5$个表达Her2的TSA细胞接种(注射到乳腺脂肪垫中),然后在第2天和第9天用20μl PBS中的20μg对照载体、Her2-LAMP或双顺反子Her2-LAMP-sCD40L进行免疫接种。每个治疗组中有7只小鼠。用卡尺监测肿瘤尺寸。肿瘤直径被计算为长度x宽度的平方根,并且肿瘤体积使用公式$4/3\pi r^3$计算。在最后一次给药后5天(或第14天)收集血清。在最后一次给药后6天(或第15天)终止实验,并在终止时对肿瘤称重。图29A示出了研究设计的示意图。

[0793] 图29B-C示出了使用每个组中的七只小鼠运行该实验的结果。这些图示出了各个动物和每个动物组在肿瘤移植后4至13天的肿瘤尺寸变化(单位为mm^3)。正如可以在图29B-C中看到的,所述双顺反子构建体比HER2-LAMP或对照更有效地抑制肿瘤生长。图29D示出了肿瘤重量的变化(单位为g)。正如可以在所述图中看到的,所述双顺反子构建体与对照相比存在肿瘤重量的统计学显著的降低(**$p<0.01$),并且在HER2-LAMP与双顺反子构建体组之间存在肿瘤重量的统计学显著的差异(*$p<0.05$)。

[0794] 对于后续实验而言,用剪刀将肿瘤切成2至4mm的碎片,置于含有2.5ml解离培养基(含有100ul酶D、50ul酶R和12.5μl酶A的2.35ml RPMI)的gentleMACS™ C管中。将肿瘤在gentleMACS™解离器上处理,然后在37℃下温育。将细胞通过70mm网眼过滤器过滤,并用10ml RPMI洗涤两次(300g,7min),然后重悬浮在PBS/1%FBS染色缓冲液中,与荧光抗体温育,并如下所述进行流式细胞术。荧光偶联的CD3、CD45、CD11c、CD11b、CD103、PD-1、PD-L1、NK1.1、CD25、FoxP3、CD24、IL-12、IL-2、CD4、CD8、CD44、CD62L、IFNγ、TNFα单克隆抗体和Zombie aqua固定活性试剂盒购自BioLegend(San Diego,CA)。如下所述使用GraphPad Prism®6.0软件进行单向ANOVA,以评估统计显著性。从抗原激活的结果中扣除每只小鼠的RPMI结果。

[0795] 图30示出了在每个治疗组中,在终止时脾细胞中CD3+记忆T细胞的百分率。将脾细胞用Zombie(一种细胞表面标志物)染色,并根据内部染色方案进行细胞内染色。细胞在Zombie-CD44+CD62L-CD3+记忆T细胞上门选。图30中的数据代表平均值±SEM(每组7只小鼠)。如所述图中所示,基于该实验,与对照相比,在双顺反子HER2-LAMP-sCD40L治疗组中存在CD3+记忆T细胞的统计学显著的增加(*$p<0.05$)。

[0796] 图31A-C显示双顺反子HER2-LAMP-sCD40L构建体促进T细胞在肿瘤微环境(TME)中的浸润。在终止后一天,将肿瘤清洗、称重、使用Miltenyi®肿瘤解离试剂盒和gentleMACS™解离器消化,并用荧光抗体染色。将细胞在CD45+CD3+Zombie-群体上门选CD4和CD8,并在CD45+CD3+Zombie-CD44+CD62L-上门选效应记忆T细胞(TEM细胞)。结果示出在图31A-C中,并且数据代表平均值±SEM。如数据所示,与对照组或HER2-LAMP构建体相比,在施用所述双顺反子构建体的小鼠中T细胞在肿瘤微环境中的浸润在统计学上更高。

[0797] 图32A-C显示在小鼠中可溶性CD40L从所述双顺反子构建体表达,并且它在引流淋巴结中增强产生IL-12的1型树突状细胞(DC1细胞)的活化。在终止后,制备淋巴细胞并将其

用Zombie表面标志物染色,并根据内部染色方案进行细胞内染色。如图32A中所示,DC1细胞在Zombie-CD45+MHCII+CD11c+CD24+CD103+细胞上门选。DC细胞被定义为MHCII+CD11C+,而DC1细胞被定义为MHCII+CD11C+CD24+CD103+CD11b-,DC2细胞被定义为MHCII+CD11C+CD24+CD11b+。图32B示出了表达CD8的DC1细胞的百分率,而图32C示出了表达IL-12的DC1细胞的百分率。单向ANOVA统计分析显示,与对照和HER2-LAMP实验两者相比,所述双顺反子构建体导致这种表达IL-12的DC1细胞的统计学显著的增加。

[0798] 图33A-B显示了双顺反子HER2-LAMP-sCD40L构建体在肿瘤微环境中激活炎性信号。在实验终止后一天,将肿瘤清洗、称重、使用Miltenyi®肿瘤解离试剂盒和gentleMACS™解离器消化,并用荧光抗体染色。将细胞在Zombie-CD45+CD69CD4+/CD8+细胞上门选。数据代表平均值±SEM。如所述图中所示,与对照相比,在用所述双顺反子构建体治疗后,肿瘤中CD4+CD69+和CD8+CD69+细胞存在统计学显著的增加(*表示p<0.5)。

[0799] 图34A-B中示出的进一步数据表明,所述双顺反子构建体还在肿瘤微环境中促进T细胞产生PD-1。在实验终止后一天,将肿瘤清洗、称重、使用Miltenyi®肿瘤解离试剂盒和gentleMACS™解离器消化,并用荧光抗体染色。将细胞在CD45+CD3+PD1+CD4+Zombie-群体上门选CD4,并在CD45+CD3+PD1+CD8+Zombie-群体上门选CD8。如所述图中所示,与对照和HER2-LAMP构建体两者相比,所述双顺反子构建体显示出CD4 PD-1+细胞数量的统计学显著的增加。

[0800] 图36中提供了进一步的数据,显示了遵照图29A中阐述的方案,与HER2-LAMP和对照相比,双顺反子HER2-LAMP-sCD40L以统计学显著的方式抑制肿瘤生长,其中使用每组5只小鼠重复所述实验。在该使用每组5只小鼠的实验运行后,收集了额外的数据。图35显示,所述双顺反子构建体还诱导针对HER2胞外结构域(ECD)的特定合并肽的更强的T细胞应答。在实验结束时,将来自所述小鼠的脾细胞与1μg/ml的Her2合并肽(个体肽由GenScript合成,并合并在被称为P1-P6的六个不同的合并物中)温育48小时。数据表示原始斑点(顶部)和平均FNγ斑点形成细胞±SEM(底部,n=5)。双向ANOVA被用于统计分析。*p<0.05,***p<0.001,****p<0.0001。具体而言,通过酶联免疫斑点(ELISPOT)评估来自疫苗接种小鼠的脾细胞的抗原特异性IFNγ产生,并使用AID ELISPOT高分辨率读板器系统和AID ELISPOT软件3.5版(Autoimmun Diagnostika GmbH)对添加检测抗体后的着色斑点进行计数。对于流式细胞术而言,将细胞首先用PBS中的Zombie aqua固定活性染料(1:500稀释)标记,然后用染色缓冲液(在PBS中的4% FBS、2%大鼠血清、2%小鼠血清)中的表面抗体(1:100稀释)标记。对于细胞内染色而言,将细胞用Zombie aqua染色,然后进行表面染色,用4%多聚甲醛固定,并用通透化缓冲液(含1% FCS、0.1%皂苷的PBS)中的细胞内抗体染色。样品在CytoFlex®流式细胞仪(Beckman Coulter)上分析,并使用Kaluza®软件(Beckman Coulter)进行分析。图37A-D中提供的来自FACS分析的柱状图显示,双顺反子HER2-LAMP-sCD40L构建体在脾脏中诱导多功能CD4效应记忆T细胞。为了进行该分析,将脾细胞在布雷菲德菌素A和莫能菌素存在下与Her2合并肽(个体肽由GenScript合成)温育6小时。收获细胞,将其用Zombie(一种表面标志物)染色,并进行细胞内染色,然后在记忆T细胞上门选。图37A-D显示了来自所述FACS的柱状图。数据代表平均值±SEM。双向ANOVA被用于统计分析,其中*P<0.05,**P<0.01,****P<0.0001。

[0801] 还分析了来自该使用每组5只小鼠的第二次实验运行的树突状细胞。如图38A-B中

所示,收集脾细胞并将其用Zombie染色,在Zombie-CD45+MHCII+CD11c+CD24+CD103+上门选,并确定此类CD24+CD11b-CD103+树突状细胞的百分率。如图38B中所示,与对照和HER2-LAMP构建体相比,接受所述双顺反子构建体的小鼠的脾脏中存在统计学上更多的此类细胞(*p<0.05,**p<0.01;每组n=5)。

[0802] 最后,图39进一步示出了细胞染色数据的结果,表明与对照和HER2-LAMP构建体相比,从所述双顺反子构建体表达的sCD40L以统计学显著的方式增加肿瘤中的CD4+和CD8+T细胞。具体而言,在体内实验终止后,收集肿瘤并在10%福尔马林中固定。由Ultivue(Cambridge,MA,USA)将所述组织切割并安装在载玻片上,用DAPI、抗CD4或抗CD8抗体和抗FoxP3抗体染色。图39A-B示出了从原始成像数据分析的条形图。数据代表平均值±SEM。对于CV和HER2-LAMP而言n=3,对于HER2-LAMP-sCD40L而言n=4。单向ANOVA被用于统计分析。**p<0.01,***p<0.001。

[0803] 实施例7.使用双顺反子HER2-LAMP-MFLT3L和HER2-LAMP-SCD40L的体内研究

[0804] 本研究的目的是确定通过用作为DNA载体提供的双顺反子HER2-LAMP-sCD40L与HER2-LAMP-mFlt3L构建体两者免疫接种是否会增强免疫应答。6至8周龄的Balb/c小鼠购自Jackson Laboratory(Maine,USA)。每只小鼠每剂真皮内注射20μg对照载体、HER2-LAMP(也被称为HER2-铰链-LAMP)、双顺反子HER2-LAMP-sCD40L、双顺反子HER2-LAMP-mFlt3L、或者HER2-LAMP-sCD40L与HER2-LAMP-mFlt3L疫苗两者,总体积为20μl。每组包括7只小鼠。在第0天和第14天对小鼠进行免疫接种,并在第二剂后10天终止。通过ELISPOT和FACS测定来评估Her2特异性T细胞应答。实验在最后一剂后十天终止。将脾细胞与Her2合并肽(GenScript)温育48小时。数据示出在图40A-B中,并表示原始斑点(顶部)和平均IFNγ斑点形成细胞±SEM。单向ANOVA被用于统计分析(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。正如可以在图40A-B中看到的,Her2-LAMP-mFlt3L诱导由Her2合并肽1、2、3、4和5唤起的显著更强的T细胞应答,而Her2-LAMP和Her2-LAMP-sCD40L仅引发针对合并肽1和2的T细胞应答。此外,当单独施用时,每种双顺反子构建体都导致特定合并Her2 ECD肽的脾细胞识别,但就这种识别而言没有观察到协同效应。

[0805] 如图41中所示,与单顺反子DNA相比,双顺反子Her2-LAMP-sCD40L、Her2-LAMP-mFlt3L和组合疫苗也诱导更高的抗体应答,其中Her2-LAMP-mFlt3L疫苗显示出最高的抗体应答。具体而言,在实验终止时,收集血清样品,并通过间接ELISA测量HER2特异性IgG。数据示出在图41中,并表示抗体滴度的平均值±SEM。每组n=6。T-检验被用于统计分析。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。

[0806] 所述研究进一步证实,与Her2-LAMP DNA疫苗相比,Her2-LAMP-sCD40L增加多功能CD4 T细胞,而Her2-LAMP-mFlt3L增强多功能CD8 T细胞,如图42A-D中所示。为了进行此分析,在含有莫能菌素和布雷菲德菌素A的T细胞培养基(含有10%热失活FBS、1%青霉素/链霉素和1Xβ-ME的RPMI)中,将脾细胞($1x10^6$/孔)用Her2合并肽(1μg/ml,GenScript)刺激5小时。收获细胞,并按照内部染色方案将其用Zombie(一种表面标志物)和细胞内染色进行染色。对于FACS而言,将细胞在记忆T细胞上进行门选。图42A-D示出了从原始FACS分析的条形图。数据代表平均值±SEM。单向ANOVA被用于统计分析。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

[0807] 实施例8.使用双顺反子HER2-LAMP-MFLT3L与HER2-LAMP-IL-12的体内研究

[0808] 在进一步的实验中,在第0天和第14天对雌性Balb/c小鼠真皮内注射20μg编码Her2-LAMP或Her2-LAMP-IL-12或Her2-LAMP-mFlt3L的DNA载体或20μg对照载体或Her2-LAMP-IL-12与Her2-LAMP-mFlt3L的混合物。在第22天收集血清样品。通过间接ELISA测量Her2特异性IgG。结果示出在图43中,表明Her2-LAMP-mFlt3L构建体与Her2-LAMP-IL-12构建体相比提供了更高的抗体应答。

[0809] 参考文献

[0810] Beatty,G.L.,Chiorean,E.G.,Fishman,M.P.,Saboury,B.,Teitelbaum,U.R.,Sun,W.,Huhn,R.D.,Song,W.,Li,D.,Sharp,L.L.,Torigian,D.A.,O'Dwyer,P.J.和Vonderheide,R.H.(2011),在小鼠和人类中CD40激动剂改变肿瘤基质并对胰腺癌显示出疗效(CD40agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans),Science(New York,N.Y.),331(6024),1612-1616.https://doi.org/10.1126/science.1198443

[0811] Beatty,G.L.,Li,Y.和Long,K.B.(2017),癌症免疫疗法:通过CD40激动剂激活先天性和适应性免疫(Cancer immunotherapy:Activating innate and adaptive immunity through CD40 agonists),Expert Review of Anticancer Therapy,17(2),175-186.https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1270208

[0812] Chen,X.,Ni,J.,Meng,H.,Li,D.,Wei,Y.,Luo,Y.和Wu,Y.(2014),白细胞介素-15:一种增强自体全细胞肿瘤疫苗对Lewis肺癌的疗效的强效佐剂(Interleukin-15:A potent adjuvant enhancing the efficacy of an autologous whole-cell tumor vaccine against Lewis lung carcinoma.Molecular Medicine Reports,10(4),1828-1834.https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2474

[0813] Gómez,C.E.,Nájera,J.L.,Sánchez,R.,Jiménez,V.和Esteban,M.(2009),在用表达HIV抗原的减毒痘病毒载体MVA和NYVAC进行DNA初免和加强期间多聚体可溶性CD40配体(sCD40L)高效增强HIV特异性细胞免疫应答(Multimeric soluble CD40 ligand(sCD40L) efficiently enhances HIV specific cellular immune responses during DNA prime and boost with attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC expressing HIV antigens),Vaccine,27(24),3165-3174.https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.049

[0814] Grewal,I.S.和Flavell,R.A.(1998),细胞介导的免疫中的CD40和CD154(CD40 and CD154 in cell-mediated immunity),Annual Reviewof Immunology,16,111-135.https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.111

[0815] Guo,J.,Liang,Y.,Xue,D.,Shen,J.,Cai,Y.,Zhu,J.,Fu,Y.-X.和Peng,H.(2021),肿瘤条件IL-15前细胞因子以有限的毒性重新激活抗肿瘤免疫(Tumor-conditional IL-15 pro-cytokine reactivates anti-tumorimmunity with limited toxicity),Cell Research,31(11),1190-1198.https://doi.org/10.1038/s41422-021-00543-4

[0816] Heon,E.K.,Wulan,H.,Macdonald,L.P.,Malek,A.O.,Braunstein,G.H.,Eaves,C.G.,Schattner,M.D.,Allen,P.M.,Alexander,M.O.,Hawkins,C.A.,McGovern,D.W.,Freeman,R.L.,Amir,E.P.,Huse,J.D.,Zaltzman,J.S.,Kauff,N.P.,Meyers,P.G.,Gleason,M.H.,Overholtzer,M.G.,…Press,O.A.(2015),在乳腺癌中IL-15通过调节Tim-3

诱导强烈但短暂的肿瘤浸润性CD8 T细胞应答(IL-15 inducesstrong but short-lived tumor-infiltrating CD8 T cell responses through theregulation of Tim-3 in breast cancer),Biochemical and BiophysicalResearch Communications,464(1),360-366.https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.162

[0817] Klebanoff,C.A.,Finkelstein,S.E.,Surman,D.R.,Lichtman,M.K.,Gattinoni,L.,Theoret,M.R.,Grewal,N.,Spiess,P.J.,Antony,P.A.,Palmer,D.C.,Tagaya,Y.,Rosenberg,S.A.,Waldmann,T.A.和Restifo,N.P.(2004),IL-15增强肿瘤反应性CD8+T细胞的体内抗肿瘤活性(IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+Tcells),Proceedings of the National Academy of Sciences of the UnitedStates of America,101(7),1969-1974.https://doi.org/10.1073/pnas.0307298101

[0818] Le Bert,N.,Tan,A.T.,Kunasegaran,K.,Tham,C.Y.L.,Hafezi,M.,Chia,A.,Chng,M.H.Y.,Lin,M.,Tan,N.,Linster,M.,Chia,W.N.,Chen,M.I.-C.,Wang,L.-F.,Ooi,E.E.,Kalimuddin,S.,Tambyah,P.A.,Low,J.G.-H.,Tan,Y.-J.和Bertoletti,A.(2020),在COVID-19和SARS病例和未感染的对照中的SARS-CoV-2特异性T细胞免疫(SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS,and uninfected controls),Nature,584(7821),457-462.https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z

[0819] Morris,J.C.,Ramlogan-Steel,C.A.,Yu,P.,Black,B.A.,Mannan,P.,Allison,J.P.,Waldmann,T.A.和Steel,J.C.(2014),用表达IL-15和IL-15Rα的肿瘤细胞疫苗接种抑制了鼠乳腺癌和前列腺癌(Vaccination with tumor cells expressing IL-15 and IL-15Rαinhibitsmurine breast and prostate cancer),Gene Therapy,21(4),393-401.https://doi.org/10.1038/gt.2014.10

[0820] Motegi,A.,Kinoshita,M.,Inatsu,A.,Habu,Y.,Saitoh,D.和Seki,S.(2008),IL-15诱导的CD8+CD122+T细胞提高抗细菌和抗肿瘤免疫应答:对老年小鼠中免疫功能的影响(IL-15-induced CD8+CD122+Tcells increase antibacterial and anti-tumor immune responses:Implicationsfor immune function in aged mice),Journal of Leukocyte Biology,84(4),1047-1056.https://doi.org/10.1189/jlb.0807530

[0821] Rauch,D.A.,Harding,J.C.和Ratner,L.(2014),IL-15缺陷型tax小鼠揭示了IL-1α在肿瘤免疫中的作用(IL-15 deficient tax mice reveal arole for IL-1αin tumor immunity),PloS One,9(1),e85028.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085028

[0822] Schoenberger,S.P.,Toes,R.E.,van der Voort,E.I.,Offringa,R.和Melief,C.J.(1998),T细胞对细胞毒性T淋巴细胞的辅助由CD40-CD40L相互作用介导(T-cell help for cytotoxic T lymphocytes ismediated by CD40-CD40L interactions),Nature,393(6684),480-483.https://doi.org/10.1038/31002

[0823] Stone,G.W.,Barzee,S.,Snarsky,V.,Kee,K.,Spina,C.A.,Yu,X.-F.和Kornbluth,R.S.(2006),多聚体可溶性CD40配体和GITR配体作为人免疫缺陷病毒DNA疫苗的佐剂(Multimeric soluble CD40 ligandand GITR ligand as adjuvants for human immunodeficiency virus DNAvaccines),Journal of Virology,80(4),1762-1772.https://doi.org/10.1128/JVI.80.4.1762-1772.2006

[0824] van Mierlo,G.J.D.,den Boer,A.T.,Medema,J.P.,van der Voort,E.I.H.,Fransen,M.F.,Offringa,R.,Melief,C.J.M.和Toes,R.E.M.(2002),CD40刺激通过诱导强烈的全身细胞毒性T淋巴细胞免疫而导致CD40(-)肿瘤的有效治疗(CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-)tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity),Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,99(8),5561-5566.https://doi.org/10.1073/pnas.082107699

[0825] Vonderheide,R.H.,Dutcher,J.P.,Anderson,J.E.,Eckhardt,S.G.,Stephans,K.F.,Razvillas,B.,Garl,S.,Butine,M.D.,Perry,V.P.,Armitage,R.J.,Ghalie,R.,Caron,D.A.和Gribben,J.G.(2001),在癌症患者中重组人CD40配体的I期研究(Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients),Journal of Clinical Oncology:Official Journal of the American Society of Clinical Oncology,19(13),3280-3287.https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.13.3280

[0826] Wu,Z.和Xu,Y.(2010),IL-15Rα-IgG1-Fc通过NK和CD8+T细胞增殖和活化增强IL-2和IL-15的抗肿瘤作用(IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances IL-2and IL-15anti-tumor action through NK and CD8+T cells proliferation and activation),Journal of Molecular Cell Biology,2(4),217-222.https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq012

[0827] 等效性

[0828] 上述书面说明书被认为足以使本领域技术人员实践所述实施方式。上述描述和实施例详细说明了某些实施方式,并描述了发明人设想的最佳模式。然而应当理解,无论上述内容在文本中显得有多么详细,所述实施方式都可以以多种方式实践,并且应当根据权利要求书及其任何等效物进行解释。

[0829] 无论是否明确指出,本文所使用的术语约均指称数值,包括例如整数、分数和百分率。术语约通常是指本领域普通技术人员认为与所叙述的值等效(例如具有相同的功能或结果)的数值范围(例如所叙述的范围的+/-5-10%)。当术语例如至少和约位于数值或范围的名单之前时,所述术语修饰所述名单中提供的所有值或范围。在某些情况下,术语约可以包括四舍五入到最接近的有效数字的数值。

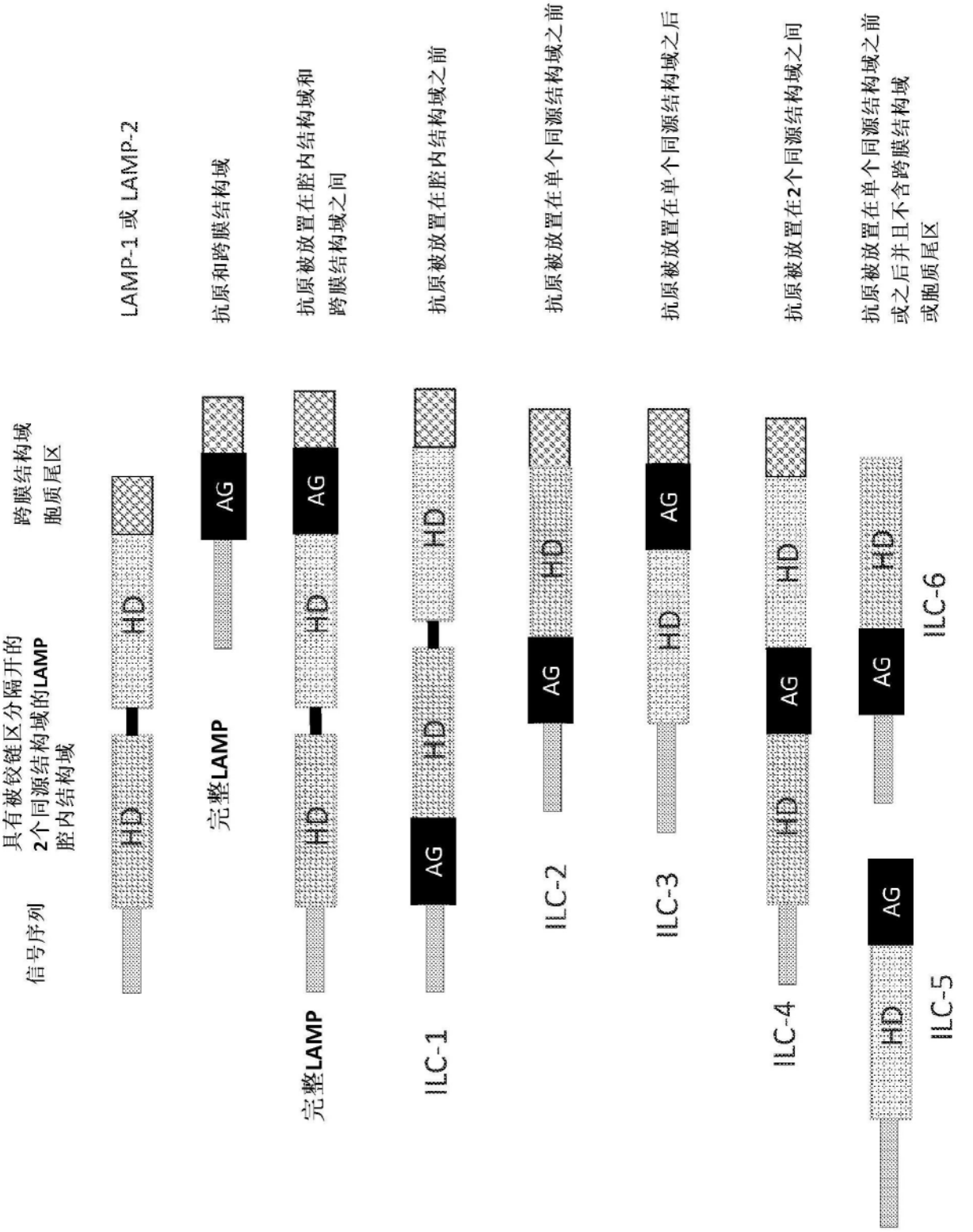
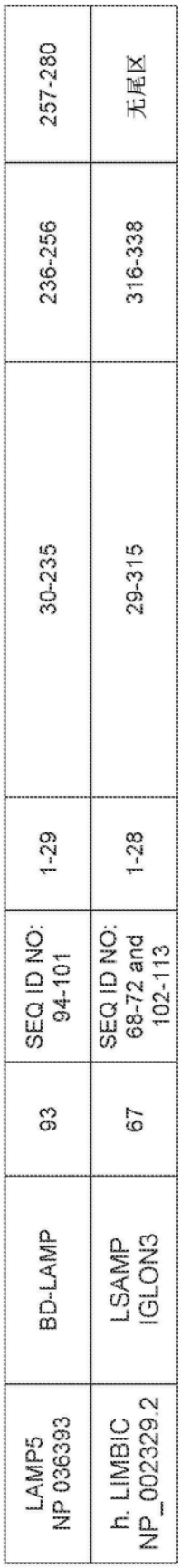

信号序列
具有被铰链区分隔开的
2个同源结构域的LAMP
腔内结构域
跨膜结构域
胞质尾区
HD
AG
LAMP-1 或 LAMP-2
抗原和跨膜结构域
完整LAMP
抗原被放置在腔内结构域和
跨膜结构域之间
完整LAMP
抗原被放置在腔内结构域之前
ILC-1
抗原被放置在单个同源结构域之前
ILC-2
抗原被放置在单个同源结构域之后
ILC-3
抗原被放置在2个同源结构域之间
ILC-4
抗原被放置在单个同源结构域之前
或之后并且不含跨膜结构域
或胞质尾区
ILC-5
ILC-6

图1

					腔内结构域			跨膜结构域	胞质尾区
基因名称 登记号	替代名称	SEQ ID NO.	直系同源物	信号序列	第一同源结构域	铰链区	第二同源结构域		
h. LAMP-1 NP_005552.3	CD107a; LAMPA; LGP120	1	SEQ ID NO: 6-24	1-28	29-194	195-227	228 to 381 or 382	382 or 383 to 405	406-417
h. LAMP-2 NP_002285.1	CD107b; LAMPB; LGP110	2	SEQ ID NO:25-43	1-28	29-192	193-228	229-375	376-399	400-410
h. LAMP-3 NP_055213.2	CD208; DC LAMP; DC-LAMP; DCLAMP; TSC403	3	SEQ ID NO:44-55	1-27	28-219	220-234	235-381	382-402	403-416
LIMP-2 Q14108	AMRF; EPM4; LGP85; CD36L2; HLGP85; LIMPII; SR-BII; SCARB2	4	SEQ ID NO:56-66	*5-27 跨膜 *不可切割的	28-433			434-459	460-478
h. Endolyn NP_006007.2	唾液酸黏蛋白 CD164 MUC-24	5	SEQ ID NO:73-79	1-23		24-162		163-183	184-197
Macrosailin NP_001242.2	CD68	80	SEQ ID NO: 81-92	1-21		22-319		320-344	345-354

图2A



LAMP5 NP 036393	BD-LAMP	93	SEQ ID NO: 94-101	1-29	30-235	236-256	257-280
h. LIMBIC NP_002329.2	LSAMP IGLON3	67	SEQ ID NO: 68-72 and 102-113	1-28	29-315	316-338	无尾区

图2A续

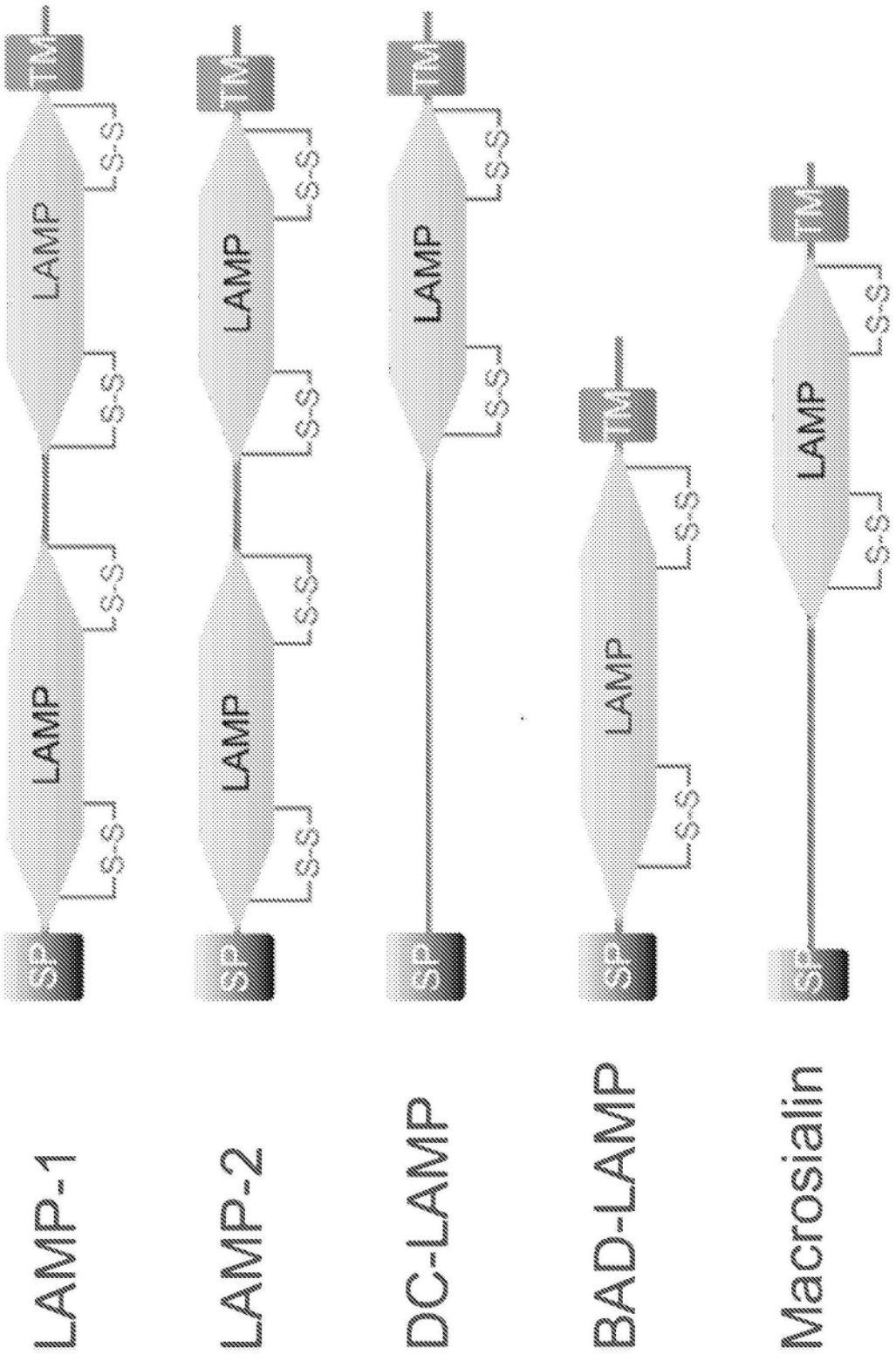


图2B

人LAMP-1与直系同源序列的比对

信号序列 LAMP同源结构域1

1

```
SEQIDNO:1    MAAPGSAPRPLLLLLLLLLLGLMH-CASAAMFMVKNGN-GTACIMANFSAAFSVNYDTKS  58
SEQIDNO:6    MAAPGAR-RPLL----LLLLAGLAH--GASALFEVK-NN-GTTCIMASFSASFLTTYETAN  52
SEQIDNO:7    ------MARAAG-VCWTLLMGCVFA-AHAVTFEVTDGN--STCIKGELNASFSISYNTTN  50
SEQIDNO:8    -MSWRQVKMPVYWMAVMLLIGVVQ-VATAVQFEVKDGKTNITCILADLSINFSVSYNVSS  58
SEQIDNO:9    MAAPGSARRPLLLLLLLLLLGLVH-CASAAMFMVKNGN-GTACIMANFSASFSVNYDTKS  58
SEQIDNO:10   MAAPGSARRSLLL-LLLLLLGLTH-CASAAMFIVKNGN-GTACIMANFSAAFSVNYDTKS  57
SEQIDNO:11   MAAFGGARPRPL--LLLLLAGLVH--GAAAVFVVKDAN-GTACIMANFSAAFLASYETRS  55
SEQIDNO:12   MEAPGGARRPLLLL----LLLGLVH--GASAVFVVRNSN-GTACIMANFSAVFSVIYESKS  54
SEQIDNO:13   MAAPGGARRRPLLL--LLFAGLVH--GASAVFVVKNGN-GTACIMADFSATFLTSYDTRS  55
SEQIDNO:14   MAAPGAR-RPLL----LLLLAGLAH--SAPALFEVKDNN-GTACIMASFSASFLTTYDAGH  53
SEQIDNO:15   --------MGGAA--RAVLLGFL---QASSSFDVRDST-GKVCIIANLTVAFSVEYKSSG  46
SEQIDNO:16   MAAPGGAWRRPLLLL-LLLLGLAR--GASAVFVVSDGN-GTACIMADFAAAFEISYDSRS  56
SEQIDNO:17   MAEPGGARTPQRLL--LLLLGLIH--VASSIFVVKNGT-GTACIMANFSATFSMNYTTKS  55
SEQIDNO:18   --------MARALL--AAVLLGFL---QASSSFDVRDST-GKVCIIANLTVAFSVEYKSNG  47
SEQIDNO:19   ------MARGLLA--AAALLGFL---QASSSFEVKDSS-GKVCILADLTVAFSVEYKTNV  48
SEQIDNO:20   MVSSSSCRRGLLL--AAVLLGFL---QASSTFEVRDKT-GKICILANFSAEFTVDYSTKA  54
SEQIDNO:21   MKSFPSFVALFI-VCSAVLADT----QAVVTLEVKEGN--STCIKAEFSAVFSITYNTTN  53
SEQIDNO:22   MKRSHALVVL-I-IAWFSLSGC----IQAVSLEVKEGN--STCIKANLSAYFSITYNTSS  52
SEQIDNO:23   MTRTCPFVVG-I-AC-FAILGCVTVVQSQVTLEVTEGN--STCIKAELSASFSITYDTAN  55
SEQIDNO:24   ------------------------------------------------------------  0
```

LAMP同源结构域1

2

```
SEQIDNO:1    GPKNMTFDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGH--TLTLNFTRNATRYSVQLM  116
SEQIDNO:6    GSQIVNISLPASAEVLKNGSSCGKENVSDPSLTITFGRGY--LLTLNFTKNTTRYSVQHM  110
SEQIDNO:7    GTSVSVFALPASASVSE-RSSCGS-AAVPPELALVFGDTHTHTLSLLFSRDQRLYRVSNI  108
SEQIDNO:8    KMELATFVLPSEAVTNINKSSCGVENTTAPVLAIQFGSNH--SLSIHFARNNTRYEVAEL  116
SEQIDNO:9    GPKNMTFDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGH--TLTLNFTRNATRYSVQLM  116
SEQIDNO:10   GPKNMTFDLPSDAKVVLNSSSCGKENTSDPSLVIAFGRGQ--TLTLNFTRNATRYSVQLM  115
SEQIDNO:11   GPKNVTFDLPSDA-VVLNSSSCGKENTSDPSLMIAFGKGH--GLTLNFTRNATRYSVQLM  112
SEQIDNO:12   GYKNASFELPATA-EVQNTSSCGRENTSNPSLQIAFGRGH--VLALNFTRNATLYSVPLL  111
SEQIDNO:13   GPQNKSFELPAGA-EVSNSSSCGKENASDSSLVITFGRGH--TLTLIFTRNATRYEVQLM  112
SEQIDNO:14   VSKVSNMTLPASAEVLKNSSSCGEKNASEPTLAITFGEGY--LLKLTFTKNTTRYSVQHM  111
SEQIDNO:15   QKQFAHFFLPQNATSQ-SHSSCGEGNTSHPILALSFGAGH--LISLNFSKTLDKYQVEEL  103
SEQIDNO:16   GAKNTTFSLPASA-QVLNSSSCGKENTSDSSLVIAFGRGH--TLTLSFTRNATRYSVQLM  113
SEQIDNO:17   GLESTTFRLPQNA-SVMNSSSCGKENTSNPILEIGFGGGH--TLTMNFSSTTQSYQVELL  112
SEQIDNO:18   QKQFAHFFLPQNATSQ-SHSSCGEGNTSHPILALSFGAGH--LLSLNFSKTLDKYQVEEL  104
SEQIDNO:19   QKEFVHFFLPQNASVD-SQSSCGKDNASHPILVLDFGGGH--SLSLNFSESADKYQVEEL  105
SEQIDNO:20   KVERKTFQLPSSAHINKESSSCGKEKETSQVLVVEFGTGN--SLTFTFEKSNDFYHVSNL  112
SEQIDNO:21   DTRTVSVFLPNSTTVDSANSSCGS-NGSTPGLMAKFGPGH--YFGMNFSTNGSLYSVDTL  110
SEQIDNO:22   STRTAQFILPDSATVDPDSSTCGG-NGSSPWLVAVFGAGH--ALGLGFSTNGSFYSVANL  109
SEQIDNO:23   GTRTVMVPLPGSAVVGV-ASSCGG-DGRSPWLVALFGDGH--ALGLGFSSNDSLYSVAKL  111
SEQIDNO:24   ------------------------------------------------------------  0
```

图3

LAMP同源结构域1

```
                                                                3
SEQIDNO:1       SFVYNLSDTHLFPNASSK-EIKT-VESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNN-VTVTLHDA  173
SEQIDNO:6       YFTYNLSDTEHFPNAISK-EIYT-MDSTTDIKADINKAYRCVSDIRVYMKN-VTVVLRDA  167
SEQIDNO:7       SLQYNLSDGDIFPQSSSAGVQSVMASVSELMSARLNSTYRCVSSSSISLSAAVNLTLSGV  168
SEQIDNO:8       VMSYNLSDKIIFPNASENGTKTV-STNKTAVLAENDTVYKCMNPHLIRMDN-ANATFHDI  174
SEQIDNO:9       SFVYNLSDTHLFPNASSK-EIKT-VESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNN-VTVTLHDA  173
SEQIDNO:10      SFVYNLSDTHLFPNASSK-EIKT-VESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNN-VTVTLHDA  172
SEQIDNO:11      SFIYNLSDTQIFPNASSK-ETKT-VESATDIRADINKKYRCVSNTQIHMHN-VTVTFHDV  169
SEQIDNO:12      SFVYNLSDSDLFPNASSK-DIKT-VGSTTDIKADIDKRYRCVSDSKVPMGN-VTVTLQDA  168
SEQIDNO:13      RFAYNLSDTDTFPNSSST-GVKT-VESATDIKADINKTYRCVSETQVNMDN-VTVTLRDA  169
SEQIDNO:14      YFTYNLSDTQFFPNASSK-GPDT-VDSTTDIKADINKTYRCVSDIRVYMKN-VTIVLWDA  168
SEQIDNO:15      TFHYNLSDETLFPNATEG-KVMV-ATQKSVIQARIGTEYRCINSKYVPRMKH-VNITFSNV  160
SEQIDNO:16      TLVYNLSDAEFFPSASSK-GTKT-VAASTDIRADLNTKYRCVSNSQVHLLN-VTVTLGNA  170
SEQIDNO:17      SFSYNLSDATLFPNASKGSEESS-VKSKTDIQADIHKKYRCVSSNRITMSN-VTIVLSDV  170
SEQIDNO:18      TFHYNLSDETLFPNASEG-KVME-VTQKSVIQARIGTEYRCINSKYIYIRH-VNITFSNV  161
SEQIDNO:19      VFHYNLSDATLFPNSSTG-GMKT-VSHKSIIQAHMGTQYRCINSKHINMKN-VNVTFSNV  162
SEQIDNO:20      TFSYNLSDSSFFPNSSG--GQRE-VSRAGDIQANINTTYRCRSNHRVNMTN-VTVLFSNV  168
SEQIDNO:21      FLRYNLSDASLFPEANSSGPVDFELSASVGIWAPTNTTYRCLSPTTITITR-PSVTFSEM  169
SEQIDNO:22      TLQYNLSDASVFPDANSSGVVTV-VSSSVGIWAAVNTTYRCLSSVLFQVGG-ATVTFSDM  167
SEQIDNO:23      TLQYNLSDVSNFPEANSTDVVTVE-TTSVGMVARVNTTYRCISASPVIVGG-ATVTFSNV  169
SEQIDNO:24      ------------------------------------------------------------  0
```

LAMP同源结构域1 铰链区

```
                                4
SEQIDNO:1       TIQAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSPTTAPPAP----------PSP-SP---SPVPKSPS  218
SEQIDNO:6       TIQAYLSSGNFSKEETHCTQDGPSPTTGP--------------PSP-SP---PLVPTNPT  209
SEQIDNO:7       QMEAYMSSANLSADESVCSADQPSTTVAPPPSTT--------------TSPPPIPPVPE  213
SEQIDNO:8       RLEAYLKQSNFSQKVSTCSEDITPTSAPA-PV--T------T-------TAPVPAP-VPDPP  219
SEQIDNO:9       TIQAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSPTTAPPAP----------PSP-SP---SPVPESPS  218
SEQIDNO:10      TIQAYLSNSSFSREETRCEQDRPSPTTAPPAP----------PSP-SP---SPVPESPS  217
SEQIDNO:11      TIQAYLANSNFSKEETRCEQDGPFPTTAPPPP----------PHP-SP---SPAPESPS  214
SEQIDNO:12      TIQAYLWNNSFSQAESRCRQDMPSPTTAPPAPPVP------PSPPSP-SP---PPKPESPS  219
SEQIDNO:13      AIQAYLSSSNFSREETRCEQDLPT----------P-----TTPPQP-AP---TPAPASPA  210
SEQIDNO:14      TIQAYLPSSNFSKEETRCPQDQPSPTTGP--------------PSP-SP---PLVPTNPS  210
SEQIDNO:15      TLEAYPTNDTFSANKTECREDMVSTTTVAPTTPKH-----ATSQVPTTSPAPTAAPSSPA  215
SEQIDNO:16      TIQAYLANNSFSQQETRCEQDKPSP--------PTP------TAPPTP-TP---TPAPTSPV  214
SEQIDNO:17      TIQAYLSNNTFSKEETRCSQDTPSPSPVPTTHPTT-----IPVPTP-TPTRPPTPAEIPP  224
SEQIDNO:18      TLEAYPTNGTFSTNKTECSEDMVSTTTVAPTTPKH-----ITSQVPATSPAPTAAPSNPA  216
SEQIDNO:19      TLEAYLTNGTLSVNKTECAEDRVSTTTMVPTTPKQ------TTSQSPTTGPAPTS-PPNPT  216
SEQIDNO:20      TLEAYLPNNAFSKNDSVCAEDKTSTVA--PPITTH-----IPTTTSLAPPT-PPPTDTPK  220
SEQIDNO:21      KLEAYMPGNDFSPAERVCAADQTTTGAPTTTT----------SAATP-TT-PSPTPAGTPE  218
SEQIDNO:22      RLEAYMPGNDLSPRESFCAADQTTTAPPTTTAAP----TTTAATTM-AP-PAPTPPGTPV  221
SEQIDNO:23      TMEAFMTGEDLSPNESVCTADQSFTTAPPPPPS---------TTTAA-PA-PVPTPPGTPS  219
SEQIDNO:24      -------------MVQICRVQSWFVGVTPLLIFATVLHQGFATVAP-PTPAPHKEPGRPE  46
                             *  :                                        *
```

图3续


铰链
LAMP同源结构域2
1
2
SEQIDNO:1 VDKYNVSGTNGT-CLLASMGLQLNLTYE-RKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTL 276
SEQIDNO:6 VSKYNVTGNNGT-CLLASMALQLNITYL-KKDNKTVTRAFNISPNDT-SSGSCGINLVTL 266
SEQIDNO:7 RGNYSVTDGNGTVCVLALMGLQLNITHT-TTQNQSVSELMNLQPNQTTVSGSCGVTESSL 272
SEQIDNO:8 VVQYSVNRSSEP-CLLAKVGLQMNITYT-TKDGKNGSYVFNIESKGVTVDGNCTNTTAYL 277
SEQIDNO:9 VDKYNVSGTNGT-CLLASMGLQLNLTYE-RKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTL 276
SEQIDNO:10 VDKYNVSGTNGT-CLLASMGLQLNLTYE-RKDNTTVTRLLNINPNKTLASGSCGAHLVTL 275
SEQIDNO:11 VHKYNVSGANGT-CLLASMGLQLNVTYK-KKDNTTVVKVVSINPNKTTAGGSCGAQLVTL 272
SEQIDNO:12 VSRYNVSDGNAT-CLLASMGLQLNLTYV-HRDNATVTRVFNINPNKTKPSGHCGAQQVTL 277
SEQIDNO:13 VFRYNVSGSNGT-CLLASMGLQLNVTYR-RVDNKTVTREFNVNPNKTTFGGNCSATLATL 268
SEQIDNO:14 VSKYNVTGDNGT-CLLASMALQLNITYM-KKDNTTVTRAFNINPSDK-YSGTCGAQLVTL 267
SEQIDNO:15 VGKYNVTGANGT-CVLASMGLQLNITYV-KKDEKMGLDLLNFIPHNTSASGMCESTSAFL 273
SEQIDNO:16 VSRYNVSGANGT-CLLASMGLQLNVTYR-TKDNTTVTRGLNINPNKTTFGGSCSAQLVTL 272
SEQIDNO:17 IFKYNVSDANGT-CLLASMGLQLNITYA-KKDNSSARIIWNINPNKTVAGGSCSPQVAIL 282
SEQIDNO:18 VGKYNVTGANGT-CVLASMGLQLNITYL-KKDGKTGLDLLNFVPHNTNASGTCENTSAFL 274
SEQIDNO:19 VGKYNVTGPNGT-CVLAYMGLQLNITYQ-QKDEKMGLDLLNFVPHNTTSSGRCDNTSALL 274
SEQIDNO:20 IGRYNVTGLHGI-CLLATMGLQVNVTYS-TKNKTSKSELLNLPP-TAEVSGTCENSSITL 277
SEQIDNO:21 QGSYSVKNASGTVCLMAKMGVQLNVSYFSQSQNKTVQELLNLTPNLTSSSGLCGGTNATL 278
SEQIDNO:22 RGTYSVVNGNDTTCLLAQMGLQLNVSYFSRSQNKTVQSLVNLTPNLTNSTGSCEKGSATL 281
SEQIDNO:23 QGSYSVSNSNGTVCLLARMALQLNISHFSASQNKTIQEVVNLLPNQTTSSGSCDPTSATL 279
SEQIDNO:24 RGYYNVTNHNGTICLMAYMGLQLNISYNSTSQKKVVQDVMNLQPNLTKHSGLCDSDIASL 106
LAMP同源结构域2
SEQIDNO:1 ELHS-EGTTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTTLP-DARDPAFKAANGSLRALQATVGN 334
SEQIDNO:6 KVEN-K-NRALELQFGMNASSSLFFLQGVRLNMTLP-DALVPTFSISNHSLKALQATVGN 323
SEQIDNO:7 RLSD--ETTNLTFSFTMNSTTQKYYLSAVSVSALWP-DMS-VVFEAGNTSLSALQCSVGR 328
SEQIDNO:8 SLST-GS-IDLRFNFTLNSSLEVFYLDGVSLSTGLPADANDTHFEAANSSLNYMQTNVHK 335
SEQIDNO:9 ELHS-EGSTVLLFLFGMNASSSRFFLQGIQLNTTLP-DARDPAFKAANGSLRALQATVGN 334
SEQIDNO:10 ELHS-EGSTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTTLP-DARDPAFKAANSSLRALQATVGN 333
SEQIDNO:11 ELRS-ESVTLLAFQFGMNASTSRFFLQGIQLNMTLP-DARDPTFKAGNNSLRALQATIGN 330
SEQIDNO:12 ELQS-ERSTVLVFQFGMNASSGQYFLQGVLLNTTLP-DAREPAFSASNSSLRALQATLGN 335
SEQIDNO:13 ELHS-ENLLLLALQFVMNESSSRVFLQGVQLNLTLP-DAKEGSFTATNSSLRALQATAGN 326
SEQIDNO:14 KVGN-K-SRVLELQFGMNATSSLFFLQGVQLNMTLP-DAIEPTFSTSNYSLKALQASVGN 324
SEQIDNO:15 NLAF-EK-TKITFHFVLNASSEKFFLQGVNVSTTLPSEAKAPTFEASNDSMSESRATVGN 331
SEQIDNO:16 ELQG-ESLRLLALQFALNTSSSRVFLQGVQLNMTLP-DARDPSFSAANSSLRALQATAGN 330
SEQIDNO:17 ELQT-EN-STLAFSFGMNATTSKFFLREIRFHKFFP-DAKDPAFGAVNSSLKELQATVGN 339
SEQIDNO:18 NLAF-EK-TKITFHFVLNASSEKFFLQGVNVSTTLPSEAKAPMFEASNDSMSELRATVGN 332
SEQIDNO:19 NLTF-EK-TRVIFQFALNATAEKFFLQGVSVSTTLPSEAKNPKFEATNNSMSELRASVGN 332
SEQIDNO:20 NLTS-ES-TSLSFQFSQNTSTEKYFLQGIIVTANLPPEATEKNISYSNHTLNALKTSVGK 335
SEQIDNO:21 VLAQ-EETTVLSFLFTVNSTSNKYHLSGITLQANWT-DMM-SPFSASNTSLDYLRSSLGH 335
SEQIDNO:22 ILTQ-Q-TTILIFTFSLNSTSSKYHLSGLSLQANWS-DMA-AAFSASNASLSYLRSTFGH 337
SEQIDNO:23 VLTQ-ANATNLSFLFTLNSTSNRYHLTGLSVVAAWS-DMT-APFNTSNSSLDYQRGSLGR 336
SEQIDNO:24 NLTVDAVKTNLTFVFTMNSTSNKYHLSEVTVSAAWP-EMK-EPVSVHNSSLDYLRGTVGY 164

图3续

LAMP同源结构域2 跨膜结构域

3 4

```
SEQIDNO:1    SYKCNAEEHVRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSMLIPIAVGGALAG  394
SEQIDNO:6    SYKCNTEEHIFVSKMLSLNVFSVQVQAFKVDSDRFGSVEECVQDGNNMLIPIAVGGALAG  383
SEQIDNO:7    SYVCSAQQMLSVTPVFSINTFRLQLQPFNITANRFSTAEECRVDQENMLIPIIVGAALAG  388
SEQIDNO:8    SFKCNSKQTLQITDPFTVNTYHLQVQAFNSD--NTFASAVECSLDENGMLVPIVVGAALAG  394
SEQIDNO:9    SYKCNAEEHVRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECVLDENNMLIPIAVGGALAG  394
SEQIDNO:10   SYKCNAEEHVRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENNMLIPIAVGGALAG  393
SEQIDNO:11   SYKCNAGEHVQVTEAFSVNIIKVWVQAFQVQGDKFGSVEECQLDENSMLIPIAVGGALAG  390
SEQIDNO:12   SYKCNSEEHVRVTPAFSLSIFKVWVQAFQVKGDKFGSVEECLLDQDSMLIPIAVGGALAG  395
SEQIDNO:13   SYKCNAEQRLRVTSSFSLNMFRVWLQAFRVDGDKFGPVEECQLDENSMLIPIAVGGALAG  386
SEQIDNO:14   SYKCNSEEHIFVSKALALNVFSVQVQAFRVESDRFGSVEECVQDGNNMLIPIAVGGALAG  384
SEQIDNO:15   SYKCSAEENFQVTDKALVNVFNVQVQAFKVDGDKFGAMEECQLDENNMLIPIIVGAALAG  391
SEQIDNO:16   SYKCRSEQRLQVTEAFALNVFQVRVQAFRVDGDKFGPAEECQLDENSMLIPIAVGGALAG  390
SEQIDNO:17   SYKCNAEENVHVTDGFSVNIFRVRVQAFKVEGDKFGSVEECLLDENNMLIPIAVGGALAG  399
SEQIDNO:18   SYKCSAEENLQVTDKALVNVFNVQVQAFKVDGDKFGAVEECQLDENNMLIPIIVGAALAG  392
SEQIDNO:19   SYKCSSEENLQVTDQALVNVFNVQVQIFKIDGDKFGPVEECQLDENNMLIPIIVGAALAG  392
SEQIDNO:20   SYKCIAEESIWISGKAAVNIFNIQLQAFKIPGDKFGAVEECQLDENNMLIPIIVGAALAG  395
SEQIDNO:21   SYMCNAEQTLFVVSTFSINMFELQVQPFGVTSTQFASAEVCQIDQDQMLIPIIVGAALAG  395
SEQIDNO:22   SYMCNAEQILAVTPVFSLNTFSLQIQPFGVTTNQFAAAEECQMDQDQMLIPIIVGASLAG  397
SEQIDNO:23   SYMCISEQTLVVDQNFSLNTFQLQVQPFGITRGQFAQAEECQLDQDNMLIPIVVGAALAG  396
SEQIDNO:24   SYFCRDEQTLNVAQNLSINTFQLQVQPFAVKGDQFGAAEECQLDEDDMLIPIVVGAALAG  224
             *: *   : . :     :.   : :* *      *.    *  * : **:** **.:***
```

胞质尾区

```
SEQIDNO:1    LVLIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI   417
SEQIDNO:6    LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   406
SEQIDNO:7    LVLIVLVAYLIGRKRTHAGYQTI   411
SEQIDNO:8    LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   417
SEQIDNO:9    LVLIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI   417
SEQIDNO:10   LVLIVLIAYLVGRKRSHAGYQT-   415
SEQIDNO:11   LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   413
SEQIDNO:12   LVLVVLIAYLIGRKRSHAGYQT-   417
SEQIDNO:13   LVLIVLLAYLIGRKRSHAGYQTI   409
SEQIDNO:14   LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   407
SEQIDNO:15   LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   414
SEQIDNO:16   LVLVVLMAYLVGRKRSHAGYQTI   413
SEQIDNO:17   LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   422
SEQIDNO:18   LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   415
SEQIDNO:19   LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   415
SEQIDNO:20   LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   418
SEQIDNO:21   LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   418
SEQIDNO:22   LVLIVLIAYLIGRKKSHAGYQTI   420
SEQIDNO:23   LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI   419
SEQIDNO:24   LVVIVLLAYLIGRKRSHAGYQSI   247
             **::**:***:***::*****:
```

图3续

LAMP-1					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_005552.3	智人	1	NP_990614.1	原鸡	15
NP_034814.2	小鼠	6	NP_001011507.1	野猪	16
NP_955996.1	斑马鱼	7	XP_001374132.1	家蝇	17
NP_001087042.1	非洲爪蟾	8	XP_003203252.1	火鸡	18
NP_001233491.1	黑猩猩	9	XP_002191607.2	珍珠鸟	19
XP_001087801.1	猕猴	10	XP_003218797.1	安乐蜥	20
XP_534193.2	家犬	11	XP_004067118.1	青鳉	21
XP_002723509.1	欧洲兔	12	XP_003969941.1	红鳍东方鲀	22
NP_001068592.1	家牛	13	NP_001158846.1	大西洋鲑	23
NP_036989.1	褐家鼠	14	XP_003452974.1	罗非鱼	24

图3续

人LAMP-2与直系同源序列的比对

```
SEQIDNO:2       ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:25      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:26      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:27      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:28      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:29      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:30      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:31      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDN0:32      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:33      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:34      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:35      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:36      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:37      MAMKNFTLQQERDTSVALIIRTYVRAFLKVYTKVPKPQRCHNQW---QSLNIEGIEGIEI  57
SEQIDNO:38      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:39      ----------------------------MECREGEVTRCKQKNNLFSGIN-DDISGAKQ  30
SEQIDNO:40      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:41      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:42      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:43      ------------------------------------------------------------  0

SEQIDNO:2       ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:25      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:26      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:27      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:28      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:29      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:30      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:31      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDN0:32      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:33      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:34      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:35      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:36      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:37      VKGSKWR----SALETIITIQVKRK----------------SQVQKYHPFSLHSECQKTNQE  99
SEQIDNO:38      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:39      AKQRQCTPQKPPKRATATLPLQRPPRGIPGPAPAAVAAAVAADRITPSGSHQTRPPEAAR  90
SEQIDNO:40      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:41      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:42      ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:43      ------------------------------------------------------------  0
```

图4

```
SEQIDNO:2     ------------------------------------------------------------MVCF  4
SEQIDNO:25    ------------------------------------------------------------M  1
SEQIDNO:26    ------------------------------------------------------------MGDT  4
SEQIDNO:27    ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:28    ------------------------------------------------------------MVCF  4
SEQIDNO:29    ------------------------------------------------------------MVCF  4
SEQIDNO:30    ------------------------------------------------------------MVCF  4
SEQIDNO:31    ------------------------------------------------------------MVCF  4
SEQIDNO:32    ------------------------------------------------------------MVCF  4
SEQIDNO:33    ------------------------------------------------------------MVCF  4
SEQIDNO:34    ------------------------------------------------------------MVCF  4
SEQIDNO:35    ------------------------------------------------------------MVCF  4
SEQIDNO:36    ------------------------------------------------------------MR  2
SEQIDNO:37    G---TGGVATVIADECLLWPSIPFSTLAQKVNLGSCEAFSIIGYSVFALFIYLKPNMLDF  156
SEQIDNO:38    ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:39    DERPVRDPRNRAAAPSGHWRRAGGPQRHR------HHR----------HRRHGPAPLRR  133
SEQIDNO:40    ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:41    ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:42    ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:43    ------------------------------------------------------------  0
```

信号序列　　LAMP同源结构域1

```
                                                                1
SEQIDNO:2     -RL----FPVPGSGLVLVCLVLGAVR--SYALELNLTDSENATCLYAKWQMNFTVRYETT  57
SEQIDNO:25    -CL----SPVKGAKLILIFLFLGAVQ--SNALIVNLTDS-KGTCLYAEWEMNFTITYETT  53
SEQIDNO:26    GAM--ERCACPAAVLLLSLVL---MG--ATAFEVEIKDDKNATCIYAKLSVNITVQYETD  57
SEQIDNO:27    ---------MAVRGFLPLLFILLSGIVHADDMMTSPLPS-----------------TAELK  35
SEQIDNO:28    -RL----FPVPGSGLVLVCLVLGAVQ--SYALELNLTDSGKATCLYAKWQMNFTVRYETT  57
SEQIDNO:29    -RL----FPVPGSGLVLVCLVLGAVQ--SYALELNLTDSGKATCLYAKWQMNFTVRYETT  57
SEQIDNO:30    -RL----FPVPGSGLVLVCLVLGAVR--SHALELNEADSAIN-----------------  39
SEQIDNO:31    -RL----SPAPGSGLVLLCLVLGAVS--SYALEVNVTDSEKATCLYAKWQMNFTIQYNTT  57
SEQIDNO:32    -RL-----SPVPGSGLVLLCLVLGAVS--SYALELNLTDSEKALCLYAKWQMNFTIPYETT  57
SEQIDNO:33    -RL----APVPGSGFLLLCLVLGAVS--SYALELNLTDSSNATCLYAKWQMNFTIRYETT  57
SEQIDNO:34    -RL----SPVPGSGLLMLCLVLGAVS--SYALELNLTNSEKATCLYAKWQMNFTIRYETT  57
SEQIDNO:35    -RL-----APVPGCGFLLFCLVLGTVS--SYALELNLTDSSKATCLYAKWQMNFTIRYETT  57
SEQIDNO:36    -LL----SPVTGSKLVLLFLFLGAVR--SDALKLNLTDS-KGTCLYAEWEMNFTITYEAL  54
SEQIDNO:37    IELAELMLSTETQLLEPTRVCCGICQ--SYALEINLTDSKNATCLYSKWQMTFTINYETT  214
SEQIDNO:38    --MAPPRCPAGLALLLLLLGACGFFQ--SYAVEVDVKDASNFTCLYAQWMMKFLIKYETN  56
SEQIDNO:39    LLLRPPP-PAA-----AAARFLGFFQ--SYAVEVDIKDASNATCLYADWMMRFLIKYESN  185
SEQIDNO:40    ---M---ERCACPAALLLLSLVL----MG---AMAFDVEIKDDKNATCIYAKLSVNVTVQYETN  51
SEQIDNO:41    ---------MF-RCAFLILFLALGNELHLSHGTEVSVNNTENKLCLYANLMVNFSVTYEVG  51
SEQIDNO:42    ------MKVSHATAGLVVWFVVLGCIDAVT-----L-EVKESNTTCIKADLSASFSIIYNTT  50
SEQIDNO:43    ------------------------------------------------------------  0
```

图4续

LAMP同源结构域1

```
                                    2
SEQIDNO:2       NKTYKTVTISDH--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFTKAA---STYSI  111
SEQIDNO:25      NQTNKTITIAVP--DKATHDGSSCGDDRNSAKIMIQFGFAVS-WAVNFTKEA---SHYSI  107
SEQIDNO:26      TSSSKNITFPVP--SDVTTNGSSCGSDGKAPLLVINFGNSQS-WSLNFTRNN---STYSG  111
SEQIDNO:27      ----T-----ANLP--LVIQTTSSTTSTTTT-SRP--SSTSTHSTLTTEPAA---------  73
SEQIDNO:28      NKTYKTVTISDR--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFSKAA---STYSI  111
SEQIDNO:29      NKTYKTVTISDR--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFSKAA---STYSI  111
SEQIDNO:30      CSKCKTVTISDH--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFTKAA---STYSI  93
SEQIDNO:31      SKNFKTATISDF--STATYNGSVCGNDQNNPKIVVQFGSGFS-WIVNFTKKE---SAYLI  111
SEQIDN0:32      SKSYKTVTISNF--GTPTYNGSICGDNQNGSRIAVQFGSGFS-WIVNFTKSV---SVYSI  111
SEQIDNO:33      DKHNKTVPISDL--GAATYNGSFCGDDQNGPKIAVQFGSGFS-WIVNFTKEAASPSTYLV  114
SEQIDNO:34      NNSHKTVSISDF--GAATYNGSFCGDDHNDPQIVMQFGSGFS-WIVNFAKES---SSYLI  111
SEQIDNO:35      DKHNKTVTISDF--DAAAYNGSVCGDDQNGPKIAVQFGSGFS-WIVNFTKEASSTSTYLV  114
SEQIDNO:36      K-VNETVTITVP--DKVTYNGSSCGDDKNGAKIMIQYGSTLS-WAVNFTKEA---SQYFI  107
SEQIDNO:37      GNETKNVTVTVP--ENVTYDGSSCGDNQTVPQIAVQFGLGYS-WHLNFTKKEN--NSYSF  269
SEQIDNO:38      SSDYKNASLDLT--STVTHNGSICGSDTQAALLAVQFGDGHS-WSINFTKNN---ETYRA  110
SEQIDNO:39      SGDYKTTTLNLS--SSVTHNGSVCGNDTQAALVAVQFGEGHS-WSINITKNN---ETYQG  239
SEQIDNO:40      TSSTKNVTFSVP--SEVTTNGSSCGSNGKAPILVINFGNGHS-WSLNFTRND---SMYSG  105
SEQIDNO:41      VNKNETVIFVLP--ENVTTEGSTCDNTTSTLKL--SFGHGHS-WTVEFTKKN---KTYQV  103
SEQIDNO:42      HAER-TVQVLLPNSTTVDTANSTCGKDGSSPRLVAVFGSGY-TLGLNFSTNG---TLYQV  105
SEQIDNO:43      ----------------------------------------------------------  0
```

LAMP同源结构域1

```
                                                                3
SEQIDNO:2       DSVSFSYNTGDNTTFPDAEDKGI-ITVDELLAIRIPLNDLFRCNSLSTLEKNDVVQHYWD  170
SEQIDNO:25      HDIVLSYNTSDSTVFPGAVAKGV-HTVKNPENFKVPLDVIFKCNSVLTYNLTPVVQKYWG  166
SEQIDNO:26      SALIFTYNTNDTILFPDALRKGLIS-STAMFLGPVPLNSTYKCISREVVVSENVTQIIYD  170
SEQIDNO:27      ----------------------KTTTARTTVTTSA---PTSTQSTSSSSTSATVTTLAP  107
SEQIDNO:28      DSISFSYNTGDNTTFPDAEDKGI-ITVDELLAIKIPLNDLFRCNSLSTLEKNDVVQNYWD  170
SEQIDNO:29      DSISFSYNTGDNTTFPDAEDKGI-ITVDELLAIKIPLNDLFRCNSLSTLEKNDVVQNYWD  170
SEQIDNO:30      DSISFSYNTGDNTTFPDAEDKGI-LTVDELLAIKIPLNDLFRCNSLSTLEKNDVVQHYWD  152
SEQIDNO:31      DSISFSYNLSDNATFPDAKEKGI-LTVHDLVGFRIPLNNIFRCNSLSTLEKNGVVQYYWD  170
SEQIDN0:32      DSISFSYNTGDNTTFPDAKDKGI-LTVNESVAFKIPLNDIFRCNSLSSLVKNGVVQNYWD  170
SEQIDNO:33      DTISFSYNTNDNKTFPDAKEKEV-FTVNNRVALKIPLNDIFRCNSLSTLENRDVVQHYWD  173
SEQIDNO:34      NSISFSYNTSDTTTFPDAKKKGV-LTVNDSVGFQVPLNDIFRCNSLSTLEKDNVVQHYWD  170
SEQIDNO:35      DSISFSYNTNDNATFPDAKEKGV-FTVNNRVALKIPLNDIFRCNSLSTLEKSDVVQHYWD  173
SEQIDNO:36      NNITLSYNTNDTKTFPGAVPKGI-LTVIIPVGSQLPLGVIFKCSSVLTFNLSPVVQHYWG  166
SEQIDNO:37      DTIVFTYNTSDNETFPEAKEKGQVLSVFEFRYARIPLNKIFRCHSEESLIGDKATHHYWE  329
SEQIDNO:38      EFITFTYNTNDTAVFPDARRQGPVTIVVKDAMHPIQLNNVFVCHHTTSLEAAENVTQIFWN  170
SEQIDNO:39      DFITLTYNTNDTAVFPDAKRKGPITVLVRDPSRPIQLNTVFVCHNSFVIEAENTTQIFWN  299
SEQIDNO:40      GALIFTYNTNDSTLFPDALKEGLIS-STAAFLGPIPLNSTYKCISSEVVVSENVTQIISD  164
SEQIDNO:41      DTIVFSYNLNDSSVFPNSTSKETKFVTVKSIITNVSVDTYYSCKSENVLTVESVIQTLYD  163
SEQIDNO:42      SSLTLQYNLSDTSVFPNATISGVVTLVSASVGIEANVNTTYKCASPTVIDVATAKVNFTD  165
SEQIDNO:43      ----------------------------------------------MTQIGGVQPVFLA  13
```

图4续


LAMP同源结构域1
铰链区
4
SEQIDNO:2 VLVQAFVQNGTVSTNEFLCDKDKTS---TVAPTIHTTVPS------PTTTPT--PKEKPE 219
SEQIDNO:25 IHLQAFVQNGTVSKNEQVCEEDQTP--TTVAPIIHTTAPSTTTTLTPTSTPTPTPTPTPT 224
SEQIDNO:26 VKLEAFMANGTLGK-EIICDADKPS--PVPSPTQPST------TASTAIPAPTSKPLDKPT 222
SEQIDNO:27 TTTGHNTTNSTTEPPTTTGHNTTNS--TTDAPTTTHTNAT-----VAPTPPPTTPSVPKPT 161
SEQIDNO:28 VLVQAFVQNGTVSTNEFLCDEDKTS---TVAPTIHTTVPS-------PTTTPT--PKEKPE 219
SEQIDNO:29 VLVQAFVQNGTVSTNEFLCDEDKTS---TVAPTIHTTVPS-------PTTTPT--PKEKPE 219
SEQIDNO:30 VLVQAFVQNGTVSTNEFLCDKDKTS---TVAPTVHTTVPS------PTTTPT--RIP--- 198
SEQIDNO:31 VHVQAFVQNGTVSTKEFLCEKDKTS--TTVVPTISTTTPS------PTTTPT--PKEKPE 220
SEQIDN0:32 VHVQAFVQNGTVSTNEYLCEKDNTT--TTVAPIVPTTVPSPTTTSSPTTTPS--PKEKPD 226
SEQIDNO:33 VHVQAFVQNGTVSTTEFLCDKDKTV--TTAVPIVPTTLPS------PT---------KPV 216
SEQIDNO:34 VHVQAFVQNGTVSTKEFLCDKDKTL--TTTVPVIPTSVPS-------PTTTPT--PKEKPE 220
SEQIDNO:35 VHVQAFVQNGTVSTTEFLCDKDKTV--TTAMPIVPTTAPS------PT---------KPV 216
SEQIDNO:36 IHLQAFVQNGTVSKHEQVCKEDKTA--TTVAPIIHTTVPSPTTTLTPTSI-----PVPTPT 220
SEQIDNO:37 TVVQAFIQNGTISKEEFICSKDRAS--TTVAPVTTQVVPS---------TTATPVPQDKPY 379
SEQIDNO:38 VTMQPFVQNGTISKKESRCYADTPTAAPTVLPTVANVTTAS-TTISPAPTTAPKPAENPV 229
SEQIDNO:39 VTMQAFVQNGTVSKKESRCPADTPTSEPTVPPTIANVTTASTTTLSPAPTTAPKPVENPV 359
SEQIDNO:40 VKLEAFMQNGTLGK-EVSCDADKPS--PTPT-TNPST-----TASTTTPTPTSKPLDNPT 215
SEQIDNO:41 VALQAFVINGSKSDTDTVCSADMTS--TTVAPTT-----TV-----TSTAAPTSTPTLPTPT 213
SEQIDNO:42 MRLEAYMPGNELSPNETVCFADQTS--TTPSPTTVSTTAV-----PTQT-----P--PGTPQ 213
SEQIDNO:43 VTVHLIL--------ATV--LHQTF--AT---VTPPVTTA----VPHK----E--PGRPD 48
铰链
LAMP同源结构域2
1
2
SEQIDNO:2 AGTYSVNNG--NDTCLLATMGLQLNITQ------DKVASVININPNTTHSTGSCRSHTAL 271
SEQIDNO:25 VGNYSIRNG--NTTCLLATMGLQLNITE-------EKVPFIFNININPATTNFTGSCQPQSAQ 276
SEQIDNO:26 MGNYTVSDA--SGICLLASMGLQINTSLL--SEGKNIWRPFNIDPLGIKTNGTCTNQTGT 278
SEQIDNO:27 VGNYSVKTD-NVSDCLLAKMGLQFSFKIS----GNASLQTVNLDPNVTKVNGTCGSGGSD 216
SEQIDNO:28 AGTYSVNNG--NDTCLLATMGLQLNITQ------DKVASVININPNTTHSTGSCRSHTAL 271
SEQIDNO:29 AGTYSVNNG--NETCLLATMGLQLNITQ------DKVASVININPNTTHSTGSCRSHTAL 271
SEQIDNO:30 ----------PKVASVININPNTTHSTGSCRSHTAL 224
SEQIDNO:31 VGSYSVNNS--NGTCLLATMGLQLNITH------NKVASVININPNTTDFTGSCQPQTAL 272
SEQIDN0:32 VGSYLVKNG--SDTCLLATMGLQLNVTH------DKVASVININPNVTGYSGSCHPQTAL 278
SEQIDNO:33 VGSYSVVNS--NGTCLLATMGLQLNITH------DKVASVFNININPNTTNATGSCQPQTAL 268
SEQIDNO:34 TGSYSVTSS--NGTCLLANMGLQLNITQ------DKVASVININPNTTNATGNCHSKTAL 272
SEQIDNO:35 VGSYSVVNS--NGTCLLATMGLQLNITH-------DKVASVFNININPNTTNATGSCQPQTAL 268
SEQIDNO:36 VGNYTISNG--NATCLLATMGLQLNITE-------EKVPFIFNININPATTNFTGSCQPQTAQ 272
SEQIDNO:37 PGKYAVKNG--NDTCLLATMGLQLNVTQ------NKVNSVININPNVTDFTGSCSNETAE 431
SEQIDNO:38 TGNYSLKTG--NKTCLLATVGLQLNISQ------DK-PLLININDPKTTHADGTCGNTSAT 280
SEQIDNO:39 TGNYSLKSG--NKTCFLATVGLQLNVSQ------EK-PLLININPKTTVADGACGNTTAT 410
SEQIDNO:40 TGNYSVSDV--NGTCLLASMGLQINTSLL--SEGKNIWTAFNIDPTAMSKNGTCSNQTGT 271
SEQIDNO:41 TGKYSIAPDVNSTACLMATFGLQIGYKQG-----D--KEETINLVPNITEVGGACGANSS- 266
SEQIDNO:42 QGNYTVKDA-NDTICLLAKMGLQLNVSYT--SQNKTVQDVLNLNPNVTNSTGSCGASSAT 270
SEQIDNO:43 QGDYQVTSS-NGTVCFLASMGLQLNITFNSTSQNKTLQEVINIQPNRTKSSGSCDTSSAL 107

图4续

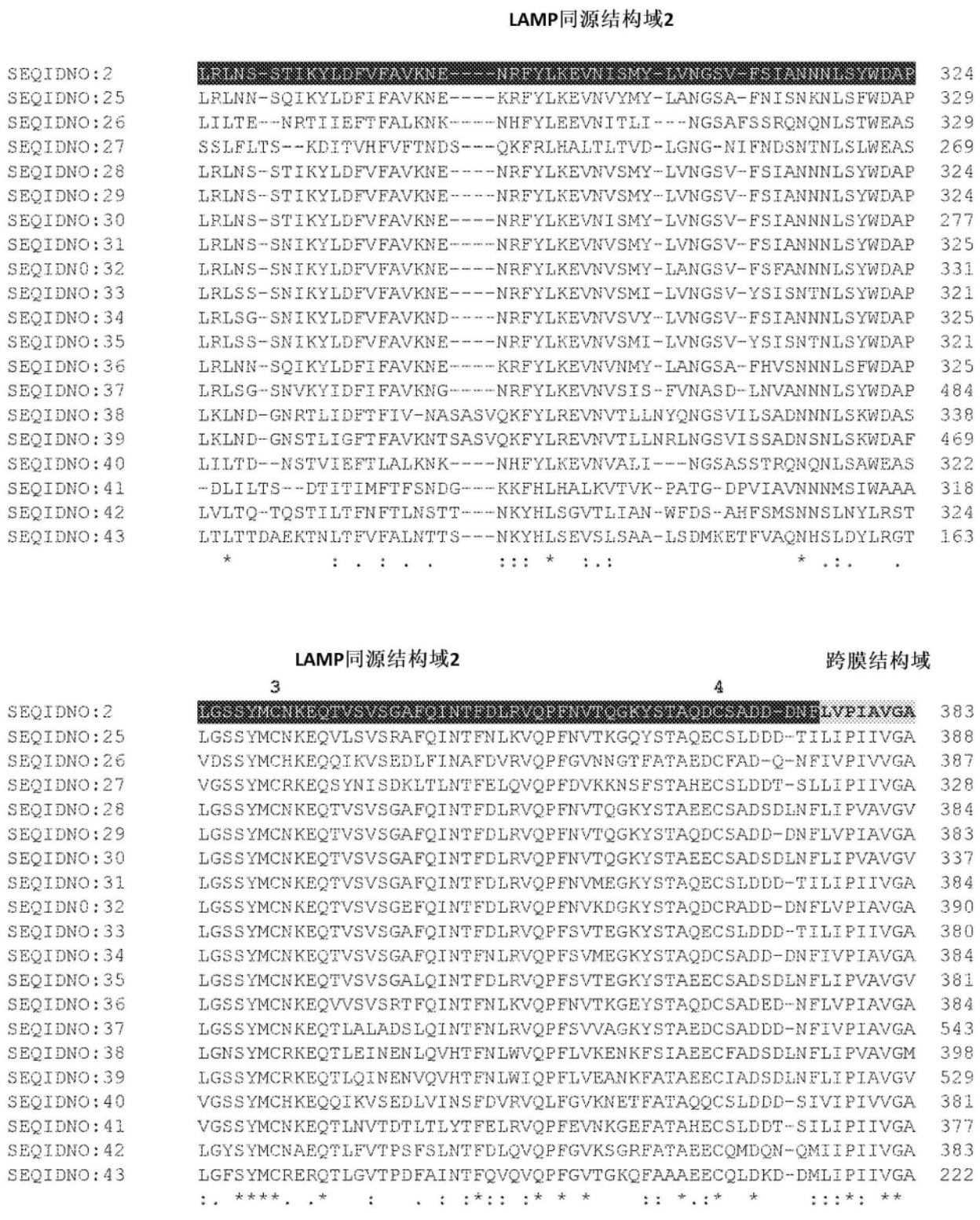

LAMP同源结构域2
SEQIDNO:2 LRLNS-STIKYLDFVFAVKNE----NRFYLKEVNISMY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP 324
SEQIDNO:25 LRLNN-SQIKYLDFIFAVKNE----KRFYLKEVNVYMY-LANGSA-FNISNKNLSFWDAP 329
SEQIDNO:26 LILTE--NRTIIEFTFALKNK----NHFYLEEVNITLI---NGSAFSSRQNQNLSTWEAS 329
SEQIDNO:27 SSLFLTS--KDITVHFVFTNDS---QKFRLHALTLTVD-LGNG-NIFNDSNTNLSLWEAS 269
SEQIDNO:28 LRLNS-STIKYLDFVFAVKNE----NRFYLKEVNVSMY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP 324
SEQIDNO:29 LRLNS-STIKYLDFVFAVKNE----NRFYLKEVNVSMY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP 324
SEQIDNO:30 LRLNS-STIKYLDFVFAVKNE----NRFYLKEVNISMY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP 277
SEQIDNO:31 LRLNS-SNIKYLDFVFAVKNE----NRFYLKEVNVSMY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP 325
SEQIDN0:32 LRLNS-SNIKYLDFVFAVKNE----NRFYLKEVNVSMY-LANGSV-FSFANNNLSYWDAP 331
SEQIDNO:33 LRLSS-SNIKYLDFVFAVKNE----NRFYLKEVNVSMI-LVNGSV-YSISNTNLSYWDAP 321
SEQIDNO:34 LRLSG-SNIKYLDFVFAVKND----NRFYLKEVNVSVY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP 325
SEQIDNO:35 LRLSS-SNIKYLDFVFAVKNE----NRFYLKEVNVSMI-LVNGSV-YSISNTNLSYWDAP 321
SEQIDNO:36 LRLNN-SQIKYLDFIFAVKNE----KRFYLKEVNVNMY-LANGSA-FHVSNNNLSFWDAP 325
SEQIDNO:37 LRLSG-SNVKYIDFIFAVKNG----NRFYLKEVNVSIS-FVNASD-LNVANNNLSYWDAP 484
SEQIDNO:38 LKLND-GNRTLIDFTFIV-NASASVQKFYLREVNVTLLNYQNGSVILSADNNNLSKWDAS 338
SEQIDNO:39 LKLND-GNSTLIGFTFAVKNTSASVQKFYLREVNVTLLNRLNGSVISSADNSNLSKWDAF 469
SEQIDNO:40 LILTD--NSTVIEFTLALKNK----NHFYLKEVNVALI---NGSASSTRQNQNLSAWEAS 322
SEQIDNO:41 -DLILTS--DTITIMFTFSNDG---KKFHLHALKVTVK-PATG-DPVIAVNNNMSIWAAA 318
SEQIDNO:42 LVLTQ-TQSTILTFNFTLNSTT---NKYHLSGVTLIAN-WFDS-AHFSMSNNSLNYLRST 324
SEQIDNO:43 LTLTTDAEKTNLTFVFALNTTS---NKYHLSEVSLSAA-LSDMKETFVAQNHSLDYLRGT 163
LAMP同源结构域2
跨膜结构域
3
4
SEQIDNO:2 LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVTQGKYSTAQDCSADD-DNFLVPIAVGA 383
SEQIDNO:25 LGSSYMCNKEQVLSVSRAFQINTFNLKVQPFNVTKGQYSTAQECSLDDD-TILIPIIVGA 388
SEQIDNO:26 VDSSYMCHKEQQIKVSEDLFINAFDVRVQPFGVNNGTFATAEDCFAD-Q-NFIVPIVVGA 387
SEQIDNO:27 VGSSYMCRKEQSYNISDKLTLNTFELQVQPFDVKKNSFSTAHECSLDDT-SLLIPIIVGA 328
SEQIDNO:28 LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVTQGKYSTAEECSADSDLNFLIPVAVGV 384
SEQIDNO:29 LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVTQGKYSTAQDCSADD-DNFLVPIAVGA 383
SEQIDNO:30 LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVTQGKYSTAEECSADSDLNFLIPVAVGV 337
SEQIDNO:31 LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVMEGKYSTAQECSLDDD-TILIPIIVGA 384
SEQIDN0:32 LGSSYMCNKEQTVSVSGEFQINTFDLRVQPFNVKDGKYSTAQDCRADD-DNFLVPIAVGA 390
SEQIDNO:33 LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFSVTEGKYSTAQECSLDDD-TILIPIIVGA 380
SEQIDNO:34 LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLRVQPFSVMEGKYSTAQDCSADD-DNFIVPIAVGA 384
SEQIDNO:35 LGSSYMCNKEQTVSVSGALQINTFDLRVQPFSVTEGKYSTAEECSADSDLNFLIPVAVGV 381
SEQIDNO:36 LGSSYMCNKEQVVSVSRTFQINTFNLKVQPFNVTKGEYSTAQDCSADED-NFLVPIAVGA 384
SEQIDNO:37 LGSSYMCNKEQTLALADSLQINTFNLRVQPFSVVAGKYSTAEDCSADDD-NFIVPIAVGA 543
SEQIDNO:38 LGNSYMCRKEQTLEINENLQVHTFNLWVQPFLVKENKFSIAEECFADSDLNFLIPVAVGM 398
SEQIDNO:39 LGSSYMCRKEQTLQINENVQVHTFNLWIQPFLVEANKFATAEECIADSDLNFLIPIAVGV 529
SEQIDNO:40 VGSSYMCHKEQQIKVSEDLVINSFDVRVQLFGVKNETFATAQQCSLDDD-SIVIPIVVGA 381
SEQIDNO:41 VGSSYMCNKEQTLNVTDTLTLYTFELRVQPFEVNKGEFATAHECSLDDT-SILIPIIVGA 377
SEQIDNO:42 LGYSYMCNAEQTLFVTPSFSLNTFDLQVQPFGVKSGRFATAEECQMDQN-QMIIPIIVGA 383
SEQIDNO:43 LGFSYMCRERQTLGVTPDFAINTFQVQVQPFGVTGKQFAAAEECQLDKD-DMLIPIIVGA 222

图4续

胞质尾区

```
SEQIDNO:2       ALAGVLILVLLAYFIGLKHHH-AGYEQF    410
SEQIDNO:25      GLSGLIIVIVIAYLIGRRKTY-AGYQTL    415
SEQIDNO:26      ALGVLVVLVMVAYFIGRRKQSSAGYEQM    415
SEQIDNO:27      ALAGLIFIVVIAYVIGRRRTY-VGYQTL    355
SEQIDNO:28      ALGFLIIVVFISYMIGRRKSR-TGYQSV    411
SEQIDNO:29      ALAGVLILVLLAYFIGLKRHH-AGYEQF    410
SEQIDNO:30      ALGFLIIVVFISYMIGRRKSR-TGYQSV    364
SEQIDNO:31      GLSGLIIVIVIAYLIGRRKSY-AGYQTL    411
SEQIDN0:32      ALAGVLILVLLAYFIGLKRHH-AGYEQF    417
SEQIDNO:33      GLSGLIIVIVIAYLIGRRKSY-AGYQTL    407
SEQIDNO:34      ALAGVLILVLLAYFIGLKRHH-AGYEQF    411
SEQIDNO:35      ALGFLIIVVFISYMIGRRKSR-TGYQSV    408
SEQIDNO:36      ALGGVLILVLLAYFIGLKRHH-TGYEQF    411
SEQIDNO:37      ALGGLVILVLMAYFVGRKRRA-TGYEQF    570
SEQIDNO:38      ALGFLIILVFISYIIGRRKSR-TGYQSV    425
SEQIDNO:39      ALGFLIILVFISYIIGRRKSR-TGYQSV    556
SEQIDNO:40      ALAGLIVIIVIAYLIGRRKGY-SGYQTL    408
SEQIDNO:41      ALAGLILIVVIAYVIGRRKTY-VGYQTL    404
SEQIDNO:42      ALAGLVLITLIAYLIGKRRSH-AGYQAI    410
SEQIDNO:43      ALAALVLIVLSAYLIGRKRSH-AGYQSI    249
                .*. ::.: . :*.:* ::    **: .
```

	LAMP-2				
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_002285.1	智人	2	NP_001231184.1	野猪	34
NP_034815.2	小鼠	25	XP_004022401.1	绵羊	35
NP_001087881.1	非洲爪蟾	26	NP_058764.2	褐家鼠	36
NP_001013551.1	斑马鱼	27	XP_001510101.2	鸭嘴兽	37
XP_003918270.1	东非狒狒	28	NP_001001749.1	原鸡	38
XP_001084005.2	猕猴	29	XP_002191794.1	珍珠鸟	39
XP_003317709.1	黑猩猩	30	NP_001116192.2	热带爪蟾	40
XP_005641822.1	家犬	31	NP_001133282.1	大西洋鲑	41
XP_001493687.3	家马	32	XP_003445830.1	罗非鱼	42
NP_001029742.1	家牛	33	XP_003961835.1	红鳍东方鲀	43

图4续

人LAMP-3与直系同源序列的比对

信号序列 LAMP同源结构域1

```
SEQIDNO:3     MPRQLSAAAALFASLAVILHD----GSQMRAKAFPETRDYSQPTAAATVQDIKKPV-QQP  55
SEQIDNO:44    MPRQLSAAAALFASLAVILHD----GSQMRAKAFPETRDYSQPSAAATVQDIKKPV-QQP  55
SEQIDNO:45    MPRQLSAAAVLFASLAVILHD-----GSQMRAKAFPKTRDYSQPTAAATGQDIAKPV-QQP  55
SEQIDNO:46    MPRQLSAAAVLFASLAVILHD----GSQMRAKAFPKTRDYSQPTAAATGQDIAKPV-QQP  55
SEQIDNO:47    MSWQLSAAVALFVSLALILHY----GSQIRAKMFPETVDFQ-PTTAATVRATAKPFL-HL  54
SEQIDNO:48    MSWRLSAVLVSFVSLAVFLHY-----GHHMKAKVFPEITDSSSPTTAATVQATAEPSLWKP  56
SEQIDNO:49    ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:50    MAWQLSAVVVLFVSLAVILYY-----GSHVRANVFPEITDYSQPTTAATIQTRAQPSLSQP  56
SEQIDNO:51    MSWQIPAVVMSFMALVAIWYYDSHYNSHMQAKVFPEITGYSSPTTG---QATVKPSLLQP  57
SEQIDNO:52    MSWQISAVVLFFVSLAVIWYYDS-----HMKANVFPEITGYSSPTTG----QATVKPSLLQP  53
SEQIDNO:53    MPGQTSAVAVL-LCLAVILH-----GYQIREKEFPEARGYLQYTATTTEQITAKPPL-PL  53
SEQIDNO:54    MPGQISAVAVLFLSLTVILH------GYQIREKEFPKARGYLQYTATSAEQITTKPLL-QL  54
SEQIDNO:55    ------------------------------------------------------------  0
```

LAMP同源结构域1

```
SEQIDNO:3     AKQAPHQTLAARFMDGHITFQTAATVKIP------------TTTPATTKNTATTSPITY  102
SEQIDNO:44    AKQAPHQTLAARFMDGHITFQTAATVKTP------------TTTPATTKNTATTSPITY  102
SEQIDNO:45    ANQAPHQTLAARLMDGHITFQTAATIKTP-------------TTTPVTTKNTPTTSPIIY  102
SEQIDNO:46    ANQAPHQTLAARLMDGHITFQTAATIKTP------------TTTPVTTKNTPTTSPIIY  102
SEQIDNO:47    TNQVPSQTLAARSMDGHIASQRAATTSSSEPPTTHTTVKTLVTTSLVTANSTPSSSPIIY  114
SEQIDNO:48    TNHTPHKTLAAKSTDGHVTSQIATTVTDSETLTTHTTITTLAATSLAATNSTPSTSPTTH  116
SEQIDNO:49    ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:50    TNQVPHKTLATRSMDGQVTSQTAATTVNPETPVTHTTIKTAAATSLVTTNSTLSTSPITN  116
SEQIDNO:51    TNYVPHKTAAARSTDGHVTSQTVAKTSSSETLTTNTTIDVLATTSPVTTKSTLPTTPTTH  117
SEQIDNO:52    TNHVPCNTAAAKSTDGHVTSQTVAKTSSPETLTTNTTIEVLVTTSPVTTQSTLPTTPTTH  113
SEQIDNO:53    TNQTSHATLASRSKDDYIQTAAETS--TFE-----DTAHITMKTAIPVTTKSLLPISSTSY  107
SEQIDNO:54    INQRSHITLASRFKDDYIQMAAETS--AIE----NTAHITMKTVTPVTTKSLPPISSASY  108
SEQIDNO:55    ----------------------------------------MDRVSLLSTILLLY  14
```

LAMP同源结构域1

```
SEQIDNO:3     TLVT--------TQATPNNSHTAPPVTEVTVGPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSSTV  152
SEQIDNO:44    TLVT---------TQATPNNSHTAPPVTEVTVGPSLVPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSSTV  152
SEQIDNO:45    TLVT---------TQATSNNSHTAPPLTKVTVGPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSSTV  152
SEQIDNO:46    TLVT---------TQATSNNSHTAPPLTKVTVGPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSSTV  152
SEQIDNO:47    TLVT---------TIVTPNNSNTAAPVTEATIGPSADPGSLPTTS--TPLAHTTRTNPSTL  164
SEQIDNO:48    TLFT---------TLATPNTSHMAAPVTEAAISPSAGLSSLLPTI--IPPAHTTGTRSSTL  166
SEQIDNO:49    ------------------------------------------------------------  0
SEQIDNO:50    TLLT---------TLATPDNTHTTTPVTEATIGPSAGPGSPPTTITTTSSAYTTGTRSSTV  168
SEQIDNO:51    TLVT---------TLATPNKSHVTFPVTEAKVGLSVGPSSPPVTV--NPTAHTTGNRPSTA  167
SEQIDNO:52    TLVT---------TLATPSKSHVTFPVTEAKAGLSIGPSSPPVTI--NPAAHTTGNRPSTA  163
SEQIDNO:53    TFV-------------RTNNSHMTASSTEDTIGSGSITHL----------PFPTTRASLAAV  146
SEQIDNO:54    TFV------------RSNNAHMTASSTDDTIGSGSIAHL---------PVPTTRASLAIV  147
SEQIDNO:55    GLLYINDAYSENTFAQPSNTTTPAPNTTTTHVTSNTTTLAP----------------NTTT  59
```

图5

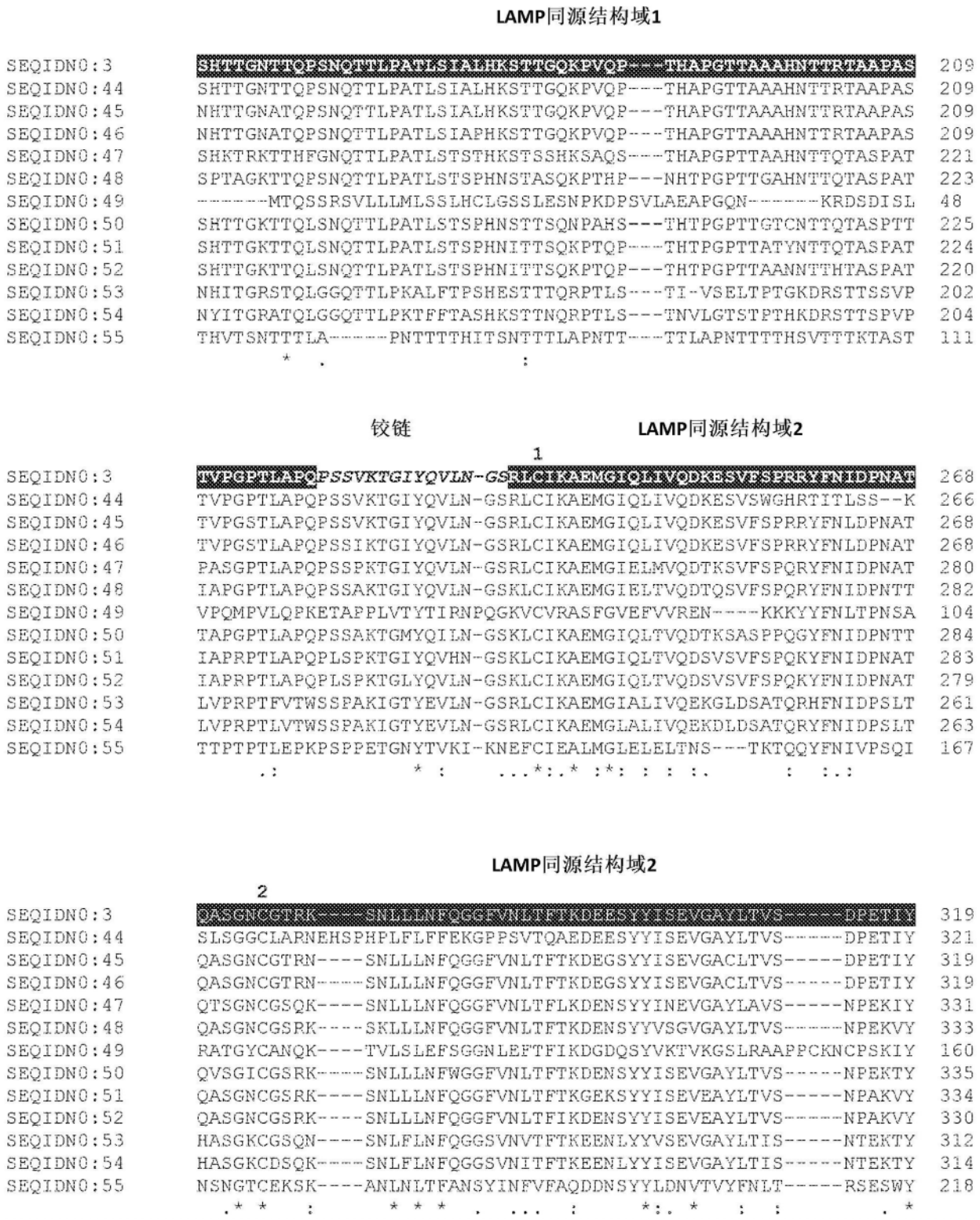
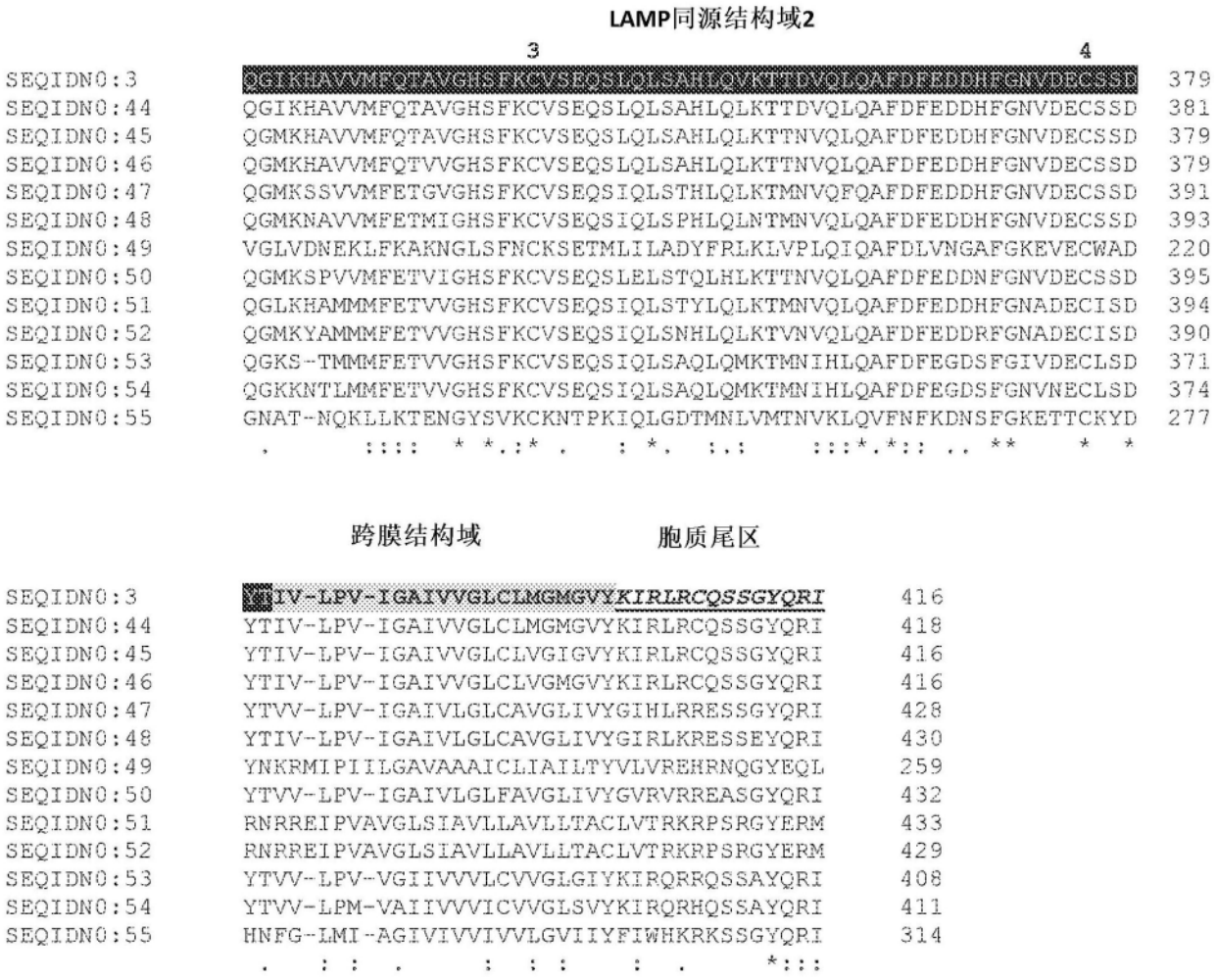

LAMP同源结构域1
SEQIDNO:3 SHTTGNTTQPSNQTTLPATLSIALHKSTTGQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTRTAAPAS 209
SEQIDNO:44 SHTTGNTTQPSNQTTLPATLSIALHKSTTGQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTRTAAPAS 209
SEQIDNO:45 NHTTGNATQPSNQTTLPATLSIALHKSTTGQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTRTAAPAS 209
SEQIDNO:46 NHTTGNATQPSNQTTLPATLSIAPHKSTTGQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTRTAAPAS 209
SEQIDNO:47 SHKTRKTTHFGNQTTLPATLSTSTHKSTSSHKSAQS---THAPGPTTAAHNTTQTASPAT 221
SEQIDNO:48 SPTAGKTTQPSNQTTLPATLSTSPHNSTASQKPTHP---NHTPGPTTGAHNTTQTASPAT 223
SEQIDNO:49 -------MTQSSRSVLLLMLSSLHCLGSSLESNPKDPSVLAEAPGQN-------KRDSDISL 48
SEQIDNO:50 SHTTGKTTQLSNQTTLPATLSTSPHNSTTSQNPAHS---THTPGPTTGTCNTTQTASPTT 225
SEQIDNO:51 SHTTGKTTQLSNQTTLPATLSTSPHNITTSQKPTQP---THTPGPTTATYNTTQTASPAT 224
SEQIDNO:52 SHTTGKTTQLSNQTTLPATLSTSPHNITTSQKPTQP---THTPGPTTAANNTTHTASPAT 220
SEQIDNO:53 NHITGRSTQLGGQTTLPKALFTPSHESTTTQRPTLS---TI-VSELTPTGKDRSTTSSVP 202
SEQIDNO:54 NYITGRATQLGGQTTLPKTFFTASHKSTTNQRPTLS---TNVLGTSTPTHKDRSTTSPVP 204
SEQIDNO:55 THVTSNTTTLA------PNTTTTHITSNTTTLAPNTT---TTLAPNTTTTHSVTTTKTAST 111
铰链
LAMP同源结构域2
1
SEQIDNO:3 TVPGPTLAPQPSSVKTGIYQVLN-GSRLCIKAEMGIQLIVQDKESVFSPRRYFNIDPNAT 268
SEQIDNO:44 TVPGPTLAPQPSSVKTGIYQVLN-GSRLCIKAEMGIQLIVQDKESVSWGHRTITLSS--K 266
SEQIDNO:45 TVPGSTLAPQPSSVKTGIYQVLN-GSRLCIKAEMGIQLIVQDKESVFSPRRYFNLDPNAT 268
SEQIDNO:46 TVPGSTLAPQPSSIKTGIYQVLN-GSRLCIKAEMGIQLIVQDKESVFSPRRYFNLDPNAT 268
SEQIDNO:47 PASGPTLAPQPSSPKTGIYQVLN-GSRLCIKAEMGIELMVQDTKSVFSPQRYFNIDPNAT 280
SEQIDNO:48 IAPGPTLAPQPSSAKTGIYQVLN-GSKLCIKAEMGIELTVQDTQSVFSPQRYFNIDPNTT 282
SEQIDNO:49 VPQMPVLQPKETAPPLVTYTIRNPQGKVCVRASFGVEFVVREN-----KKKYYFNLTPNSA 104
SEQIDNO:50 TAPGPTLAPQPSSAKTGMYQILN-GSKLCIKAEMGIQLTVQDTKSASPPQGYFNIDPNTT 284
SEQIDNO:51 IAPRPTLAPQPLSPKTGIYQVHN-GSKLCIKAEMGIQLTVQDSVSVFSPQKYFNIDPNAT 283
SEQIDNO:52 IAPRPTLAPQPLSPKTGLYQVLN-GSKLCIKAEMGIQLTVQDSVSVFSPQKYFNIDPNAT 279
SEQIDNO:53 LVPRPTFVTWSSPAKIGTYEVLN-GSRLCIKAEMGIALIVQEKGLDSATQRHFNIDPSLT 261
SEQIDNO:54 LVPRPTLVTWSSPAKIGTYEVLN-GSRLCIKAEMGLALIVQEKDLDSATQRYFNIDPSLT 263
SEQIDNO:55 TTPTPTLEPKPSPPETGNYTVKI-KNEFCIEALMGLELELTNS---TKTQQYFNIVPSQI 167
LAMP同源结构域2
2
SEQIDNO:3 QASGNCGTRK---SNLLLNFQGGFVNLTFTKDEESYYISEVGAYLTVS-------DPETIY 319
SEQIDNO:44 SLSGGCLARNEHSPHPLFLFFEKGPPSVTQAEDEESYYISEVGAYLTVS-------DPETIY 321
SEQIDNO:45 QASGNCGTRN----SNLLLNFQGGFVNLTFTKDEGSYYISEVGACLTVS------DPETIY 319
SEQIDNO:46 QASGNCGTRN-----SNLLLNFQGGFVNLTFTKDEGSYYISEVGACLTVS------DPETIY 319
SEQIDNO:47 QTSGNCGSQK----SNLLLNFQGGFVNLTFLKDENSYYINEVGAYLAVS-----NPEKIY 331
SEQIDNO:48 QASGNCGSRK----SKLLLNFQGGFVNLTFTKDENSYYVSGVGAYLTVS-------NPEKVY 333
SEQIDNO:49 RATGYCANQK----TVLSLEFSGGNLEFTFIKDGDQSYVKTVKGSLRAAPPCKNCPSKIY 160
SEQIDNO:50 QVSGICGSRK-----SNLLLNFWGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS------NPEKTY 335
SEQIDNO:51 QASGNCGSRK----SNLLLNFQGGFVNLTFTKGEKSYYISEVEAYLTVS------NPAKVY 334
SEQIDNO:52 QASGNCGSRK----SNLLLNFQGGFVNLTFIKDENSYYISEVEAYLTVS-------NPAKVY 330
SEQIDNO:53 HASGKCGSQN----SNLFLNFQGGSVNVTFTKEENLYYVSEVGAYLTIS------NTEKTY 312
SEQIDNO:54 HASGKCDSQK-----SNLFLNFQGGSVNITFTKEENLYYISEVGAYLTIS------NTEKTY 314
SEQIDNO:55 NSNGTCEKSK----ANLNLTFANSYINFVFAQDDNSYYLDNVTVYFNLT------RSESWY 218

图5续




```
                                    LAMP同源结构域2
                                    3                                                4
SEQIDN0:3       QGIKHAVVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQVKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD  379
SEQIDN0:44      QGIKHAVVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD  381
SEQIDN0:45      QGMKHAVVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTNVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD  379
SEQIDN0:46      QGMKHAVVMFQTVVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTNVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD  379
SEQIDN0:47      QGMKSSVVMFETGVGHSFKCVSEQSIQLSTHLQLKTMNVQFQAFDFEDDHFGNVDECSSD  391
SEQIDN0:48      QGMKNAVVMFETMIGHSFKCVSEQSIQLSPHLQLNTMNVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD  393
SEQIDN0:49      VGLVDNEKLFKAKNGLSFNCKSETMLILADYFRLKLVPLQIQAFDLVNGAFGKEVECWAD  220
SEQIDN0:50      QGMKSPVVMFETVIGHSFKCVSEQSLELSTQLHLKTTNVQLQAFDFEDDNFGNVDECSSD  395
SEQIDN0:51      QGLKHAMMMFETVVGHSFKCVSEQSIQLSTYLQLKTMNVQLQAFDFEDDHFGNADECISD  394
SEQIDN0:52      QGMKYAMMMFETVVGHSFKCVSEQSIQLSNHLQLKTVNVQLQAFDFEDDRFGNADECISD  390
SEQIDN0:53      QGKS-TMMMFETVVGHSFKCVSEQSIQLSAQLQMKTMNIHLQAFDFEGDSFGIVDECLSD  371
SEQIDN0:54      QGKKNTLMMFETVVGHSFKCVSEQSIQLSAQLQMKTMNIHLQAFDFEGDSFGNVNECLSD  374
SEQIDN0:55      GNAT-NQKLLKTENGYSVKCKNTPKIQLGDTMNLVMTNVKLQVFNFKDNSFGKETTCKYD  277
                  .      ::::  * *.:* .   : *.  :.:    :::*.*:: .. **    *  *

                                跨膜结构域                胞质尾区

SEQIDN0:3       YTIV-LPV-IGAIVVGLCLMGMGVYKIRLRCQSSGYQRI                      416
SEQIDN0:44      YTIV-LPV-IGAIVVGLCLMGMGVYKIRLRCQSSGYQRI                      418
SEQIDN0:45      YTIV-LPV-IGAIVVGLCLVGIGVYKIRLRCQSSGYQRI                      416
SEQIDN0:46      YTIV-LPV-IGAIVVGLCLVGMGVYKIRLRCQSSGYQRI                      416
SEQIDN0:47      YTVV-LPV-IGAIVLGLCAVGLIVYGIHLRRESSGYQRI                      428
SEQIDN0:48      YTIV-LPV-IGAIVLGLCAVGLIVYGIRLKRESSEYQRI                      430
SEQIDN0:49      YNKRMIPIILGAVAAAICLIAILTYVLVREHRNQGYEQL                      259
SEQIDN0:50      YTVV-LPV-IGAIVLGLFAVGLIVYGVRVRREASGYQRI                      432
SEQIDN0:51      RNRREIPVAVGLSIAVLLAVLLTACLVTRKRPSRGYERM                      433
SEQIDN0:52      RNRREIPVAVGLSIAVLLAVLLTACLVTRKRPSRGYERM                      429
SEQIDN0:53      YTVV-LPV-VGIIVVVLCVVGLGIYKIRQRRQSSAYQRI                      408
SEQIDN0:54      YTVV-LPM-VAIIVVVICVVGLSVYKIRQRHQSSAYQRI                      411
SEQIDN0:55      HNFG-LMI-AGIVIVVIVVLGVIIYFIWHKRKSSGYQRI                      314
                  .   : :  .     :  : :    :  .     *:::
```

	LAMP-3				
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_055213.2	智人	3	XP_001496333.1	家马	50
XP_001155195.3	黑猩猩	44	NP_001095605.1	家牛	51
XP_003894825.1	东非狒狒	45	XP_004003158.1	绵羊	52
NP_001028044.1	猕猴	46	NP_001012015.1	褐家鼠	53
XP_848889.2	家犬	47	NP_796330.2	小鼠	54
XP_003358746.1	野猪	48	XP_002936919.2	热带爪蟾	55
XP_001342688.2	斑马鱼	49			

图5续

人LIMP-2与直系同源序列的比对

信号序列

```
SEQIDNO:4   ----------MGRCCFYTAGTLS 13
SEQIDNO:56  ----------MGRCCFYTAGTLS 13
SEQIDNO:57  ----------MGRCCFYTAGTLS 13
SEQIDNO:58  ----------MGRCCFYTVGTLS 13
SEQIDNO:59  ----------MGRCCFYAVGTLS 13
SEQIDNO:60  ----------MGRCCFYTAGTLS 13
SEQIDNO:61  ----------MTRRSCTIYATGIVC 15
SEQIDNO:62  ----------MARCCFYTAGTLS 13
SEQIDNO:63  ----------MRSLCLVTVGVLA 13
SEQIDNO:64  ----------MVKWAVFGTAAVS 13
SEQIDNO:65  MQLDDILHINNCKADCSSLSTTPNPKTDLVNMNGPKHKFCTKLSSTYLRKWWITIV--VA 58
SEQIDNO:66  ----------MYGRSNRLCAKLSSAFLRKWWFVIA--FA 27
                                                  .  .  ..
```

LAMP同源结构域

```
SEQIDNO:4   LLLLVTSVTLLVARVTQKAVDQSIEKKIVLRNGTEAFDSWEKPPLPVYTQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:56  LLLLVTSVTLLVARVFQKAVDQSIEKKIVLRNGTEAFDSWEKPPLPVYTQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:57  LLLLVTSVTLLVARVFQKAVDQSIEKKIVLRNGTEAFDSWEKPPLPVYTQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:58  LLLLVTSIALLVARVFQKAVDQTIEKNIVLRNGSETFDSWKKPPLPVYAQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:59  LLLLVTSITLLVARVFQKAVDQTIEKNIVLRNGSETFDSWKKPPLPVYTQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:60  LLLLVTSVTLLVARVFQKAVDQTIEKNMVLQNGTKVFNSWEKPPLPVYIQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:61  AHLLILGIALLLAQVFQTMIQERIKKEITLAENSRVLDGWINPPPPVYMQYFFFNVTNPD 75
SEQIDNO:62  LLLLVTSVTLLVARVFQKAVDQTIEKNMVLQNGTKVFDSWEKPPLPVYIQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:63  LTLLIASISLLVAHVFQTVVDLQVKQGTVLKNGTETFEAWEDPPPPVYMQFYFFNVTNPL 73
SEQIDNO:64  VTLLIVSIVLLLTHTFMDIVEGQVKQAIVLKNESEVFEDWANPPPPVYMQFYFFNVTNPL 73
SEQIDNO:65  AALIIG--GIVVACEFTVLIDAVVDRMVALRPGAKTFGWWAKPPVEPRISLYIYNVTNAD 116
SEQIDNO:66  LSLLVL--GALVTFGFTAFIRTIIDHQVALRVGGQSFGWWSRPPVEPIIRIFVYNVTNAD 85
              *::     :::  *   :   :.:  .*    . :  *  **       :.:****
```

LAMP同源结构域

```
SEQIDNO:4   EILRGE-TPRVEEVGPYTYRELRNKANIQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:56  EILRGE-TPRVEEVGPYTYRELRNKANIQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:57  EILRGE-TPRVEEVGPYTYRELRNKANVQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:58  EILRGE-IPRLEEVGPYTYRELRDKADIQFGDNGTTISAVSNKAYVFERNQSVGDPKTDL 132
SEQIDNO:59  EILNGE-TPRLEEVGPYTYRELRNKDDIQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDKSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:60  EILQGE-IPLLEEVGPYTYRELRNKANIQFGENGTTISAVTNKAYVFERNQSVGDPNVDL 132
SEQIDNO:61  EFLAGKEKAKVTQMGPYTYREYRPRENVTYLENGTKIFATNPKSFVFLRNMSAGDPEVDR 135
SEQIDNO:62  EILQGE-IPLLEEVGPYTYRELRNKANVQFGENGTTISAVTNKAYIFERNQSVGDPTVDL 132
SEQIDNO:63  EVLQGA-TPLVEEKGPYTYREYRPRVHVQFLDNGTKVSALNPKTYVFEPEKSVGNPEVDL 132
SEQIDNO:64  EVLSGE-KPFVDEIGPYTYREYRPRENITFSVNGTEVSAVTPKTYVFEPEKSIGDPKVDL 132
SEQIDNO:65  DFLSNGSKAIVDEVGPYVYSETWEKVNIVENDNGTL--SYNLRKIYSFREDLSVG--PEDDV 174
SEQIDNO:66  EFLNNGTKPILDELGPYVYVQTWEKVNIKENPNGTI-SYNQKRVYIFNEDLSGG-LEDDV 143
            :.* .     : : ***.* :   : .:    ***       : : *  : * *    *
```

图6

LAMP同源结构域

```
SEQIDNO:4     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-HFLREIIEAMLKAYQQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO:56    IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO:57    IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-HFLREIIEAMLKAYQQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO:58    IRTLNIPAVTAMEWAH-L-HFFRELIEALLKAYQQTLFVTHTVDELLWGYKDEILSLINV 190
SEQIDNO:59    LRTLNIPALTAMEWTQ-L-PLLRDIIEALLKAYRQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLINT 190
SEQIDNO:60    IRTINIPLLTVVDLAQ-L-TLLRELIEAMLKAYQQKLFVIHTVHELLWGYKDEILSLVHI 190
SEQIDNO:61    VTTVNIPMIAVMNELNSYSFFVRTAVSMYMGSMGMGLFMNRTVHEILWGFKDPLLTKLHA 195
SEQIDNO:62    IRTINIPLLTVVEMAQ-Q-PFLREIIEAMLKAYQQTLFVTHTVHELLWGYKDEVLSLVHI 190
SEQIDNO:63    IRTINVPAVTAMEWTR-A-TSLQFATEVLLLLYQESLFTVRTVHELLWGYKDKLLSTIHV 190
SEQIDNO:64    IRTVNIPLVTILEMTK-DSSLLRPFIIAALKTYKEGMFVTRTVDELLWGYKDAVLSILHP 191
SEQIDNO:65    VIVPNIPMLSATSQSKHAARFLRLAMASIMDILKIKPFVQVSVGQLLWGYEDPLLKLAKD 234
SEQIDNO:66    VIVPNIPMLSATSQSKHAARFLRLAMASIMDILKIKPFVEVSVGQLLWGYEDPLLKLAKD 203
              : . *:* ::  .  .    .:     :      *   :* ::***::* :*.  :
```

LAMP同源结构域

```
                                                                      1
SEQIDNO:4     FRPDI----SPYFGLFYEKNGTNDGDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWITDKCN 246
SEQIDNO:56    FRPDI-----SPYFGLFYEKNGTNDGDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWITDKCN 246
SEQIDNO:57    FRPDI-----SPYFGLFYEKNGTNDGDYVFLTGEDNYLNFTKIVEWNGKTSLDWWITDKCN 246
SEQIDNO:58    FKPEI-----SPYFGLYYGKNGTNDGDYVFLTGEDNYLNFSKIVEWNGKTSLDWWTTDKCN 246
SEQIDNO:59    FKHDV-----SPYFGLFYGKNGTNDGDYVFLTGEDNYLNFSKIVEWNGKTSLDWWTADECN 246
SEQIDNO:60    FKPDV-----SPNFGLFYERNGTNDGEYVFLTGEDNYLNFSKIVEWNGKTSLDWWTTDTCN 246
SEQIDNO:61    MRPEV-----DEHFGLMYNKNGTHEGEFVFHTGEKNYMNYGKIDTWNGISQMNWWSSNQSN 251
SEQIDNO:62    FRPDV-----SPNFGLFYERNGTNDGEYVFLTGEDNYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTTDTCN 246
SEQIDNO:63    LHPEI-----DPVFGFFNKMNGTDDGEYVFLSGEMNYLNFSRIVEWKGKESLNWWTTKTCN 246
SEQIDNO:64    FKKNI-----SDTFGLFYKMNTTDDGEYIFLSGEKDYLEFTQIAEWKGQKALNWWTTETCN 247
SEQIDNO:65    VVPKEQKLPYEEFGLLYGKNGTSSDRVTVNTGVDDIRRYGIIDNFNGRTHLPHWTTDACN 294
SEQIDNO:66    VVPKEQKLPYEEFGLMYGKNSTSKDTVTVWTGVDDITQYGIIDKYNGRSHQTHWLSEQCN 263
              .  .        **:    * * ..   . :*  .  .:  *  ::*      * :. .*
```

LAMP同源结构域

```
                                                    2
SEQIDNO:4     MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPAEILANT 305
SEQIDNO:56    MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPAEILANT 305
SEQIDNO:57    MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPAEILANT 305
SEQIDNO:58    MINGTDGDSFHPLIDKDEILYVFPSEFCRSVYITFSDFKS-VQGLPAFRYKVPGEVLANT 305
SEQIDNO:59    MINGTDGDTFHPLITRDEVLYVFPSDFCRSVYITFSDFES-VQGLPALRYKVPAEILANT 305
SEQIDNO:60    MINGTDGDSFHPLISKDEVLYLFPSDLCRSVHITFSSFEN-VEGLPAFRYKVPAEILANT 305
SEQIDNO:61    MINGTDGSVFHTFLSRKELLYIFAADLCRSIHLGYVRDME-VKGIPAFRFAPPSDVLAPP 310
SEQIDNO:62    MINGTDGDSFHPLISKDETLYIFPSDFCRSVYITFSSFEN-VEGLPAFRYKVPAEILANS 305
SEQIDNO:63    MINGTDGTSFHPLISKDENIYIFSSDFCRSLYLVYDSSGS-VAGVPTYRFVPSPMVFANT 305
SEQIDNO:64    MINGTDGTSFHPLLNKDDTIYMFSSDLCRSIYAVYESSEN-IKDISVFRFSPPASVFANV 306
SEQIDNO:65    TLAGTDGSIFPPHIDHDRILHVYDKDLCRLLPLVFEKEVMTSNEVPGYRFTPPEWVFADV 354
SEQIDNO:66    RLNGTDGSIFPPRITKNSTLHVYEKDLCRLLPLSFEKEVTVRGGVKGYRFTPSPDVFASV 323
               : **** *   : :.  :::: ::** :   :         :   *:     ::*
```

图6续

LAMP同源结构域

```
                        3       4               5
SEQIDNO:4       ---SDNAGFCIPE-GNCLGSGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYQADERFVSAIEGMHP-NQ 360
SEQIDNO:56      ---SDNAGFCIPE-GNCLGSGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYQADERFVSAIEGMHP-NK 360
SEQIDNO:57      ---SDNAGFCIPE-GNCLGSGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYQADERFVSAIEGMHP-NK 360
SEQIDNO:58      ---SDNAGFCVPK-GNCLGSGVLNISICKNGAPIIISFPHFYEADKKFVSAIDGMRP-NK 360
SEQIDNO:59      ---SDNAGFCIPK-GNCLGSGVLNVSVCKNGAPIIMSFPHFYQADEKFVSAIGGMHP-NK 360
SEQIDNO:60      ---SENAGFCIPE-GNCMDSGVLNISICKNGAPIIMSFPHFYQADEKFVSAIKGMHP-NK 360
SEQIDNO:61      DENPANAGFCVPA-GDCLGKGVLKVSVCRQGAPIVVSFPHFYQADERYINAIEGMNP-NE 368
SEQIDNO:62      ---SENAGFCIPE-GNCMDAGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYQADEKFVSAIKGMRP-NK 360
SEQIDNO:63      TVNPDNAGFCVPP-GNCPGAGVLNVSICKQGAPIFLSAPHFYQADQKFVSDIEGMHP-TK 363
SEQIDNO:64      SVNPQNKGFCVPE-GNCLPSGLLNVSICKEGAPIVLSSPHFYQADENVINSIRGMKP-VK 364
SEQIDNO:65      DSHPDNMCFCPAGKPSCSPNGLFNVSLCQYDSPIMLSFPHFYLADESLRTQVEGISPPMK 414
SEQIDNO:66      DKNPNNMCYCPAG-PPCAPHGLFNVSLCQYDSPILLSFPHFYMADQTLRTAVEGISPPEK 382
                      *  :*      *   *::::*:*: .:**.:* **** **:   . : *: *  :
```

LAMP同源结构域

```
SEQIDNO:4       EDHETFVDINPLTGIILKAAKRFQINIYVKKLDDFVETGDIRTMVFPVMYLNESVHIDKE 420
SEQIDNO:56      EDHETFVDINPLTGIILKAAKRFQINIYVKKLDDFVETGDIRTMVFPVMYLNESVHIDKE 420
SEQIDNO:57      EDHETFVDINPLTGIILKAAKRFQINIYVKKLDDFVETGDIRTMVFPVMYLNESVLIDKE 420
SEQIDNO:58      DYHETFVDINPLTGIILRAAKRFQINVYVKKLDDFIETGNIRTMVFPVMYINESVLIDKD 420
SEQIDNO:59      EYHETFVDINPLTGIILRAAKRFQINVYVRKLDDFVETGNIQTLVFPVMYINESVLIDKE 420
SEQIDNO:60      EEHESFVDINPLTGIILRGAKRFQINTYVRKLDDFVETGDIRTMVFPVMYLNESVLIDKE 420
SEQIDNO:61      EEHETYLDINPTTGVPIRACKRAQLNIILKRVRGFPNTKFLNETIFPIMYVNETATIDDE 428
SEQIDNO:62      EEHESFVDINPLTGIILRGAKRFQINTYVKKLDDFVETGNIRTMVFPVMYLNESVLIDKE 420
SEQIDNO:63      EYHETFVDINPLTGLVLQAAKRMQINIHVRKLPEFFETGNIRTLIFPVMYINESVLIDEA 423
SEQIDNO:64      EHHMTFLDLNPLTGTLIQAAKRIQVNVYVRKINVYLITQDIQTLFFPVMHLNESVLIDDK 424
SEQIDNO:65      EKHQFFFDVQPKMGTTLRVRARIQINLAVSQVFDIKQVANFPDIIFPILWFEEGIDNLPD 474
SEQIDNO:66      DKHQLFIDVQPDMGTALRARARIQINLAVSQVVDIKQVANFPDIVFPILWFEEGIDSLPD 442
                : *  :.*::*  *  ::   * *:*  : ::     .  :   .**:: .:*
```

跨膜结构域 胞质尾区

```
SEQIDNO:4       TASRLKSMINTTTIITNI----PYIIMALGVFFGLVFTWLACKGQGSMDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:56      TASRLKSMINTTLIITNI----PYIIMALGVFFGLVFTWLACKGQGSMDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:57      TASRLKSVINTTLIITNI----PYIIMALGVFFGFVFTWLACKGQGSMDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:58      TASRLKSVINTTLIITNI----PYIVMALGVFFGLIFTWLACRGQGSMDEGTPDERAPLI 476
SEQIDNO:59      TASRLKSVINTTLIVTNI----PYIIMALGVFFGLIFTWLACRGQGSTDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:60      TANQLKSVINTTLVVTNI----PYIIMALGVFFGLVFTWLACRGQGSMDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:61      SAAQMRMLLLIVTVVSNF----PVIILALGVILLVVLIFLVCRNRQRKNEVKRIDFTEAF 484
SEQIDNO:62      TASQLKSVINTTLIVTNI----PYIIMALGVFFGLIFTWLACRGQGSTDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:63      SANKLKHVLLEASVVTGI----PFVIMAIGIVFGIVFSVLVCRAQGAREESTEEERSPLI 479
SEQIDNO:64      SAGRLRSILFQGRVVANI----PFIIMGLGIILAFLFTTLSCLQKRSRDEGTEEERGPLI 480
SEQIDNO:65      EVTDL--MRFAEQVPPKIRVALIVGLCALGVILLLLSTF--CLIRNSHRQSTLHLEGSNY 530
SEQIDNO:66      EILDL--MKVATNIPPRAKFILTIALFGLGGFLFVVAVI--CLVRKSHRQSTLHLEGSNY 498
                    :  :     :           : .:* .: .:     *  :    : .
```

图6续

```
SEQIDNO:4       RT-------------------------------------------------  478
SEQIDNO:56      RT-------------------------------------------------  478
SEQIDNO:57      RT-------------------------------------------------  478
SEQIDNO:58      RT-------------------------------------------------  478
SEQIDNO:59      RT-------------------------------------------------  478
SEQIDNO:60      RT-------------------------------------------------  478
SEQIDNO:61      HSFATTKDETAYTQVSNQAEDSPENRNNQPLRNGSYIAMSPVEAQKC     531
SEQIDNO:62      RT-------------------------------------------------  478
SEQIDNO:63      RT-------------------------------------------------  481
SEQIDNO:64      RAS------------------------------------------------  483
SEQIDNO:65      LATA-------------QVDMNKKQNKDNQPARY----------------  551
SEQIDNO:66      LATA-------------SVDQAKKKAKMDNGMSSKSN-------------  522
                 :
```

LIMP-2					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_005497.1	智人	4	NP_775366.1	斑马鱼	61
XP_517214.2	黑猩猩	56	NP_446453.1	褐家鼠	62
XP_001096458.1	猕猴	57	XP_420593.1	原鸡	63
XP_005639134.1	家犬	58	NP_001016557.1	热带爪蟾	64
NP_001095623.1	家牛	59	NP_726504.2	黑腹果蝇	65
NP_031670.1	小鼠	60	XP_314345.2	冈比亚按蚊	66

图6续

人LIMBIC/SLAMP与直系同源序列的比对

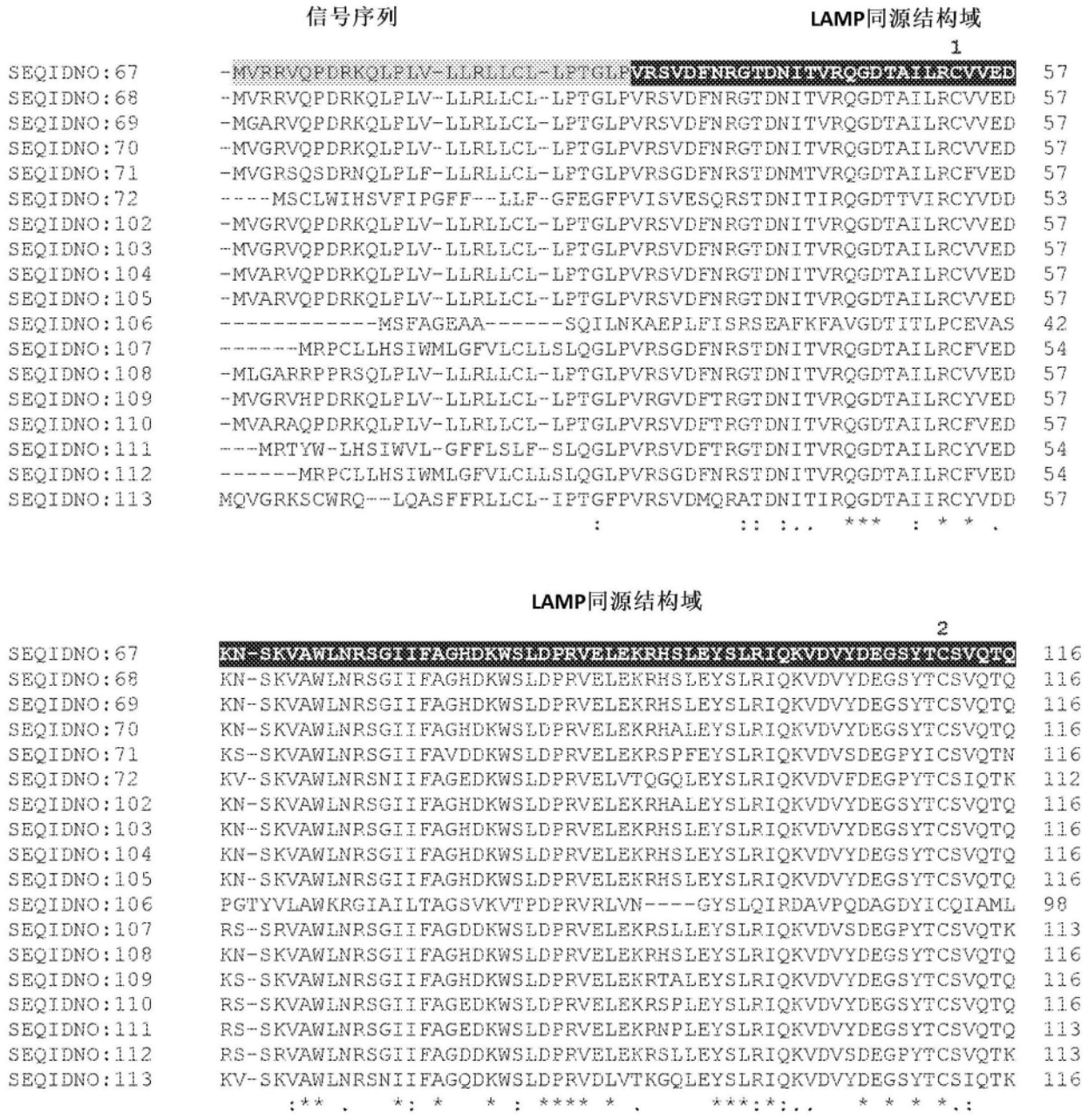


图7

LAMP同源结构域

3

```
SEQIDNO:67    HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---T  171
SEQIDNO:68    HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---T  171
SEQIDNO:69    HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---T  171
SEQIDNO:70    HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---L  171
SEQIDNO:71    QHTKTMQVYLIVQVPPKISNISA--DITVNEGSNVTLMCIAYGRPEPMITWRHLTP---T  171
SEQIDNO:72    QQSKTSQVYLIVQVPAIIYKVSE--DITVNEGSNVALTCLANGRPDPAITWRLLNP---S  167
SEQIDNO:102   HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---L  171
SEQIDNO:103   HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---T  171
SEQIDNO:104   HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---T  171
SEQIDNO:105   HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---T  171
SEQIDNO:106   DPR-EITHSVEILVPPKITHVTSGGHLQVRKGSPVRLECSATGNPMPNITWTRKNNLLPN  157
SEQIDNO:107   QHTKTTQVYLIVQVPPKISNISA--DITVNEGSNVTLMCIAYGRPEPMITWRHLTP---T  168
SEQIDNO:108   HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---T  171
SEQIDNO:109   HQPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---T  171
SEQIDNO:110   HHPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DITVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---T  171
SEQIDNO:111   HHPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DITVNEGSNVTLVCMANGRPEPVITWRHLTP---T  168
SEQIDNO:112   QHTKTTQVYLIVQVPPKISNISA--DITVNEGSNVTLMCIAYGRPEPMITWRHLTP---T  168
SEQIDNO:113   QQPKTSQVYLIVQVPASIYQVSN--DITVNEGSNVTLSCLANGRPDPAITWRLLNP---S  171
              .        : : **  * :::   .: *.:** * * * * *.* * ***   .
```

LAMP同源结构域

4

```
SEQIDNO:67    GREFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVKQVKVTVNYPPTITESKS        230
SEQIDNO:68    GREFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVKQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT  230
SEQIDNO:69    GREFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVKQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT  230
SEQIDNO:70    GREFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVKQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT  230
SEQIDNO:71    ARDFEGEEEFLEIQGITREQSGRYECKAANEVASADVKQVRVTVNYPPIITESNS-NEAT  230
SEQIDNO:72    AEALDV-GEYLEISGVVRSQAGRYECKASNDVSTPDVKYVNVVVNYPPYIKDVRS-SETA  225
SEQIDNO:102   GREFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVKQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT  230
SEQIDNO:103   GREFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVKQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT  230
SEQIDNO:104   GRELEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVKQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT  230
SEQIDNO:105   GREFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVKQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT  230
SEQIDNO:106   GEEQFT-NPVYVIENMDRHKGGTYICTANNGVGQVATSQIILHVLYPPEISVENPTVYSG  216
SEQIDNO:107   ARDFEGEEEFLEIQGITREQSGRYECKAANEVASADVKQVRVTVNYPPIITESKS-NEAT  227
SEQIDNO:108   GREFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVRQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT  230
SEQIDNO:109   GREFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVKQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT  230
SEQIDNO:110   GKEFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVASADVKQVRVTVNYPPTITESKS-NEAA  230
SEQIDNO:111   GKEFEGEEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVASADVKQVRVTVNYPPTITESKS-NEAA  227
SEQIDNO:112   ARDFEGEEEFLEIQGITREQSGRYECKAANEVASADVKQVRVTVNYPPIITESKS-NEAT  227
SEQIDNO:113   AEPLDG-EEYLDIIGIMRTQAGRYECKASNDVATPDVKYVNVIVNYPPTIKKTQS-SETP  229
              ..          * .: * :.* * *.* * *.   .  : : * *** *.  .    :
```

图7续

LAMP同源结构域

```
                    5                                                                  6
SEQIDNO:67      TGRQASLKCEASAVPAPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSLTVTNVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:68      TGRQASLKCEASAVPAPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSLTVTNVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:69      TGRQASLKCEASAVPAPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSLTVTNVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:70      TGRQASLKCEASAVPAPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSLTVTNVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:71      TGKQAILRCEASAVPAPDFEWYKDDTRINSAQGLEIRNTGSRSVLMVANVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:72      VGQAGVLHCEASAVPQPEFEWYRDERRLSSSQSLTIQVSGSRTVLVVANVTEEDYGNYTC  285
SEQIDNO:102     TGRQASLKCEASAVPAPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSLTVTNVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:103     TGRQASLKCEASAVPAPDFEWYRDDTRITSANGLEIKSTEGQSSLTVANVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:104     TGRKASLKCEASAVPAPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSLTVTNVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:105     TGRKASLKCEASAVPAPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSLTVTNVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:106     EGQEAMLVCIVHGESQPEVLWHKDTMQIDQTERHVIENRGARHTLIIRKVHPQDFGNYSC  276
SEQIDNO:107     TGKQAILRCEASAVPAPDFEWYKDDTRINSAQGLEIRNTGSRSVLMVANVTEEHYGNYTC  287
SEQIDNO:108     TGRKASLKCEASAVPAPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSLTVTNVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:109     TGRQASLKCEASAVPAPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSIEGQSLLMVTNVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:110     TGRQALLRCEASAVPTPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTGSQSLLMVANVTEEHYGNYTC  290
SEQIDNO:111     TGRQALLRCEASAVPTPDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTGSQSLLMVANVTEEHYGNYTC  287
SEQIDNO:112     TGKQAILRCEASAVPAPDFEWYKDDTRINSAQGLEIRNTGSRSVLMVANVTEEHYGNYTC  287
SEQIDNO:113     VGRNGTLRCEVTAVPTPEFEWYRDDKRLANTQSITIQTSGTTTSLTIANITEEDYGNYTC  289
                 *: . * * . .   *:. *::*  :: .::   *.       * : ::  :.:***:*
```

跨膜结构域

```
SEQIDNO:67      VAANKLGVTNASLVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCLL-SKC----------  338
SEQIDNO:68      VAANKLGVTNASLVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCLL-SKC----------  338
SEQIDNO:69      VAANKLGVTNASLVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCLL-SKC----------  338
SEQIDNO:70      VAANKLGVTNASLVLFSKYAKTEPDSMQVIE-FLHIDLKSIRHPL-KVNPIQK-------  341
SEQIDNO:71      VAANKLGITNTSLYLYI-GPGTPIDNATSLAASLWLMANILLCLF-CTC----------  337
SEQIDNO:72      VATNRLGVHNASVFLYKPGMGRDINSAGCICQSLWLLLLCVSSAL-LQC----------  333
SEQIDNO:102     VAANKLGVTNASLVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLFCLL-SKC----------  338
SEQIDNO:103     VAANNLGVTNASLVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCLL-SKC----------  338
SEQIDNO:104     VAANNLGVTNASLVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCLL-SKC----------  338
SEQIDNO:105     VAANNLGMTNASLVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCLL-SKC----------  338
SEQIDNO:106     IADNQLGKTRKTVTLTGKPKTAVF---RSVPNSQWKDKYNISWIVDSHSPIEEFKLYYRQ  333
SEQIDNO:107     VAANKLGITNTSLYLYI-GPGTPIDSATSLAASLWLMANLLFCLF-CTC----------  334
SEQIDNO:108     VAANNLGVTNASLVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCLL-SKC----------  338
SEQIDNO:109     VAANKLGVTNASLILFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLFCLL-SKC----------  338
SEQIDNO:110     VAANKLGVTNASLYLYRPGTGRVDNGSVSLAVPLWLLAASLLCLL-SKC----------  338
SEQIDNO:111     VAANKLGVTNASLYLYRPGTGRVDNGSMSLAVPLWLLAASLLCLL-SKC----------  335
SEQIDNO:112     VAANKLGITNTSLYLYI-GPGTPIDSATSLAASLWLMANLLFCLF-CTC----------  334
SEQIDNO:113     VASNRLGVQNASLFLYRPGTGRDINGSACVSQSLWLLLASFACLF-LKC----------  337
                :* *.**  . :: *              :          .   .
```

图7续

```
SEQIDNO:67      ------------------------------------------------------------  338
SEQIDNO:68      ------------------------------------------------------------  338
SEQIDNO:69      ------------------------------------------------------------  338
SEQIDNO:70      ------------------------------------------------------------  341
SEQIDNO:71      ------------------------------------------------------------  337
SEQIDNO:72      ------------------------------------------------------------  333
SEQIDNO:102     ------------------------------------------------------------  338
SEQIDNO:103     ------------------------------------------------------------  338
SEQIDNO:104     ------------------------------------------------------------  338
SEQIDNO:105     ------------------------------------------------------------  338
SEQIDNO:106     MTFSIGQLQPLQTDWRDIVLPAFPYSHHYTQGMSYLIRGLEPDQQYEARVQSRNRYGWSD  393
SEQIDNO:107     ------------------------------------------------------------  334
SEQIDNO:108     ------------------------------------------------------------  338
SEQIDNO:109     ------------------------------------------------------------  338
SEQIDNO:110     ------------------------------------------------------------  338
SEQIDNO:111     ------------------------------------------------------------  335
SEQIDNO:112     ------------------------------------------------------------  334
SEQIDNO:113     ------------------------------------------------------------  337

SEQIDNO:67      ------------------------  338
SEQIDNO:68      ------------------------  338
SEQIDNO:69      ------------------------  338
SEQIDNO:70      ------------------------  341
SEQIDNO:71      ------------------------  337
SEQIDNO:72      ------------------------  333
SEQIDNO:102     ------------------------  338
SEQIDNO:103     ------------------------  338
SEQIDNO:104     ------------------------  338
SEQIDNO:105     ------------------------  338
SEQIDNO:106     FSESFLFTTSNTGKWMGQCCTNPG  417
SEQIDNO:107     ------------------------  334
SEQIDNO:108     ------------------------  338
SEQIDNO:109     ------------------------  338
SEQIDNO:110     ------------------------  338
SEQIDNO:111     ------------------------  335
SEQIDNO:112     ------------------------  334
SEQIDNO:113     ------------------------  337
```

LIMBIC/LSAMP					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_002329.2	智人	67	NP_001192297.1	家牛	105
XP_516662.2	黑猩猩	68	XP_312298.5	冈比亚按蚊	106
XP_002716722.1	欧洲兔	69	NP_001096385.1	热带爪蟾	107
NP_780757.1	小鼠	70	XP_003434117.1	家犬	108
NP_001086181.1	非洲爪蟾	71	XP_001362972.1	家蝇	109
NP_001034921.1	斑马鱼	72	NP_990205.1	原鸡	110
NP_058938.1	褐家鼠	102	XP_002190582.1	珍珠鸟	111
XP_001502710.1	家马	103	NP_001096385.1	热带爪蟾	112
NP_001231626.1	野猪	104	XP_003449349.1	罗非鱼	113

图7续

人ENDOLYN与直系同源序列的比对

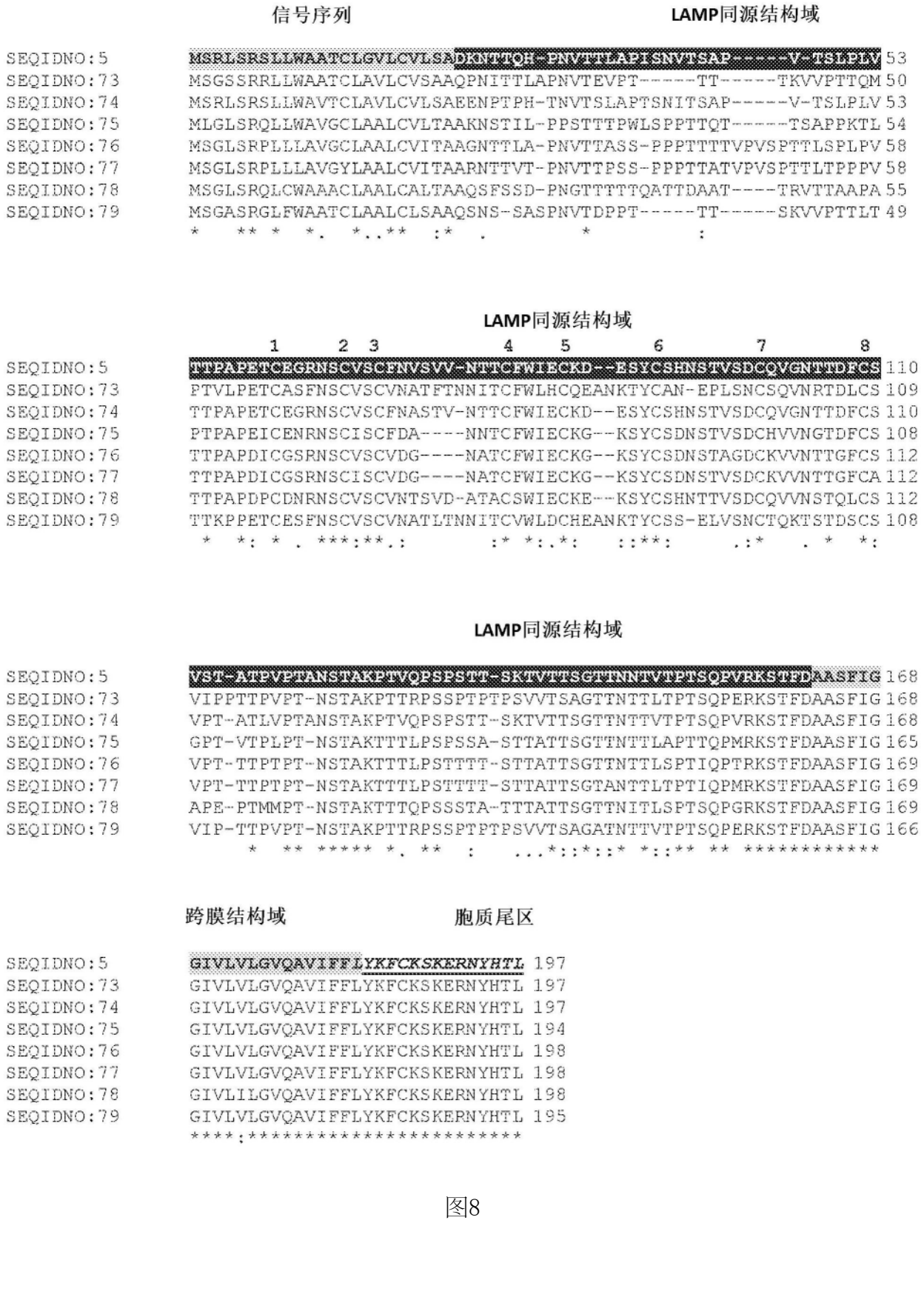


图8

	Endolyn				
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_006007.2	智人	5	NP_001039506.1	家牛	76
NP_058594.1	小鼠	73	XP_004011265.1	绵羊	77
XP_001091286.1	猕猴	74	XP_532256.2	家犬	78
XP_001924661.2	野猪	75	NP_114000.1	褐家鼠	79

图8续

人MACROSAILIN与直系同源序列的比对



图9

LAMP同源结构域

```
                                  2
SEQIDNO:80      ETIGDYTWTNGSQPCVHLQAQIQIRVMYTTQGGG---------EAWGISVLNPNK-TKVQ 204
SEQIDNO:81      ETIGDYTWTNGSQPCVHLQAQIQIRVMYTTQGGG---------EAWGISVLNPNK-TKVQ 204
SEQIDNO:82      EAIGDYTWSNGSQPCVRLQAQIQIRVLYPTQGGG---------EAWGISVLNPNR-TKAQ 185
SEQIDNO:83      GALGNYTWANGSQPCVQLQAQIQIRILYPIQGGRKVKLKWGLKRAWGISVLNPNK-TKVQ 183
SEQIDNO:84      ETIGDYMWTNGSQPCVHLQAQIQIRVMYTTQGGG---------EAWGISVLNPNK-TKVQ 204
SEQIDNO:85      GALGNYTWTNGSQPCVQLQAQIQIRILYLTQGGK---------KAWGLSVLNPNK-TKVQ 178
SEQIDNO:86      DAIGDYTWTTGSQPCARLQARIQIGVVYPTQAGG---------QAWGISVLNPNS-TKPW 179
SEQIDNO:87      EAIGDYIWTNGSQPCVRLQAQIQIRVLYPTLGGG---------KAWGISVLNPNK-TKAQ 174
SEQIDNO:88      EAVGNYTWTNGSQPCVQLQAQIQIRVLYPTQGGG---------QAWGMSVLNPNR-TKAQ 152
SEQIDNO:89      EAIGDYTWTNGSQPCVQLQAQIQIRVLYPTQGGG---------EAWGISVLNPNK-TKAL 141
SEQIDNO:90      ETIGDYMWTNGSQPCVHLQAQIQIRVMYTTQGGG---------EAWGISVLNPNK-TKVQ 204
SEQIDNO:91      GAVGDYIGANGSQLCVHLRAQIQMRVLYQASGGG---------KLWGIFVLNPNR-TMAQ 173
SEQIDNO:92      KAVGNYTVFNGSQPCLRLRAEIRLWVLYQAQEEGEAPPVSG-------AASFPPPRPRPVA 199
                 ::*:*   .*** * :*:*.*:: ::*                    : *
```

LAMP同源结构域

```
                3
SEQIDNO:80      GSCEGAHPHLLLSF----PYGHLSFGFMQDLQQ--KVVYLSYMAVEYNVSFPHAAQWTFS 258
SEQIDNO:81      GSCEGAHPHLLLSF----PYGHLSFGFMQDLQQ--KAVYLSYMAVEYNVSFPHAAQWTFS 258
SEQIDNO:82      GGCEGTHSHLLLSF-----PSGQLSFGFKQDPLQ--SAVYLNYMAVEYNVSFPQAVQWTFS 239
SEQIDNO:83      GGCDGTHPHLSLSF----PYGQLTFGFKQDLHQSPSTVYLDYMAVEYNVSFPQAAQWTFM 239
SEQIDNO:84      GSCEGAHPHLLLSF----PYGHLSFGFMQDLQQ--RVVYLSYMAVEYNVSFPHAAQWTFS 258
SEQIDNO:85      GGCDSAHPHLALSF----PYGQLTFGFKQDRHQSHSTVYLNYMAVEYNVSFPQAAQWTFS 234
SEQIDNO:86      GDCDGARPHLLLSF-----PFGQLSFGFTQEPQQ--GSVYLDYLALQYNVSFPQAAQWTFS 233
SEQIDNO:87      GGCA--HPHLLLSF----PYGQLSFGFKQEPLQ--STVYLNYIAVEYNVSFPQAAQWTFL 226
SEQIDNO:88      GGCEGPRPHLLLSF-----PYGQLSFGFKQDPGQGQSAVYLSYLAVEYNVSFPQAARWTFS 208
SEQIDNO:89      GGCEGAHPHVRLSF-----PYGQLTFGFKQQPQE--STVYLNYMAVEYNVSFPRAAQWTFS 195
SEQIDNO:90      GSCEGAHPHLLLSF----PYGHLSFGFMQDLQQ--RVVYLSYMAVEYNVSFPHAAQWTFS 258
SEQIDNO:91      GNCEANHSSLILSF-----PNGKLIFGFKQDSIK--KIVYLSHLATEFNVSFPSATRWIFS 227
SEQIDNO:92      GEGDGERSRVTPVASAMTVEGGSRAGFAM------------------------------- 228
                *     :  :          *    **
```

LAMP同源结构域

```
                                  4                                  5
SEQIDNO:80      AQNASLRDLQAPLGQSFSCSNSSIILSPAVHLDLLSLRLQAAQLPHTGVFGQSFSCPSDR 318
SEQIDNO:81      AQNASLRDLQAPLGRSFSCSNSSIILSPAVHLDLLSLRLQAAQLPHTGVFGQSFSCPSDR 318
SEQIDNO:82      VQNSSLRDLQTPLGHSFSCRNASIIVSPALHLDLLSLKLQAAQLSPSGAFGPSFSCPNDK 299
SEQIDNO:83      AQNSSLRELQAPLGQSFCCGNASIVLSPAVHLDLLSLRLQAAQLPDKGHFGPCFSCNRDQ 299
SEQIDNO:84      AQNASLRDLQAPLGQSFSCSNSSIILSPAVHLDLLSLRLQAAQLPHTGVFGQSFSCPSDR 318
SEQIDNO:85      AQNSSLQELQAPLGQSFCCGNTSIVLSPAIHLDLLSLRLQAAQLPDKGHFGPCFSCASDQ 294
SEQIDNO:86      GQNASLRALQAPLGQSFSCRNASILLTPALRLDLLHLKLQAAQLPPSGAFGPSFSCPSEH 293
SEQIDNO:87      VQNSSLRDLQAPLGQRFSCRNASIALSPAFHLDLLSLKLQAAQLTPTGAFGPSFSCPSDQ 286
SEQIDNO:88      AQNASLRDLQAPLGQSFSCRNASIAVSPALHLDLLSLRVQAAQLPRTGIFGPSFSCPADH 268
SEQIDNO:89      VQNSSLRDLQTPVGRSYSCRNASIILSTAFHLDLLSLKLQAAQLPPTGNFGPSFSCPSDQ 255
SEQIDNO:90      AQNASLRDLQAPLGQSFSCSNSSIILSPAVHLDLLSLRLQAAQLPHTGVFGQSFSCPSDR 318
SEQIDNO:91      VENSSLQDLQTPLGHSFSCRNRSIALSPDIHLDLLSLQLQAAQLSSSGAFGAAFSCSADL 287
SEQIDNO:92      -LGAEVRSRAPSLGRAGKTRL--RIHQPVVVLQ-------HTYYV--------------- 263
                  .:.::     :*:              . *:        :
```

图9续



	Macrosailin				
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_001242.2	智人	80	XP_849733.1	家犬	86
XP_003315403.1	黑猩猩	81	NP_001093232.1	家马	87
NP_001039367.1	家牛	82	XP_002719034.1	绵羊	88
BAA23738.1	小鼠	83	XP_003131995.1	野猪	89
XP_014974003.1	猕猴	84	XP_003912313.1	东非狒狒	90
NP_001026808.1	褐家鼠	85	XP_001369761.1	家蝇	91
			XP_001517723.2	鸭嘴兽	92

图9续

人LAMP5与直系同源序列的比对

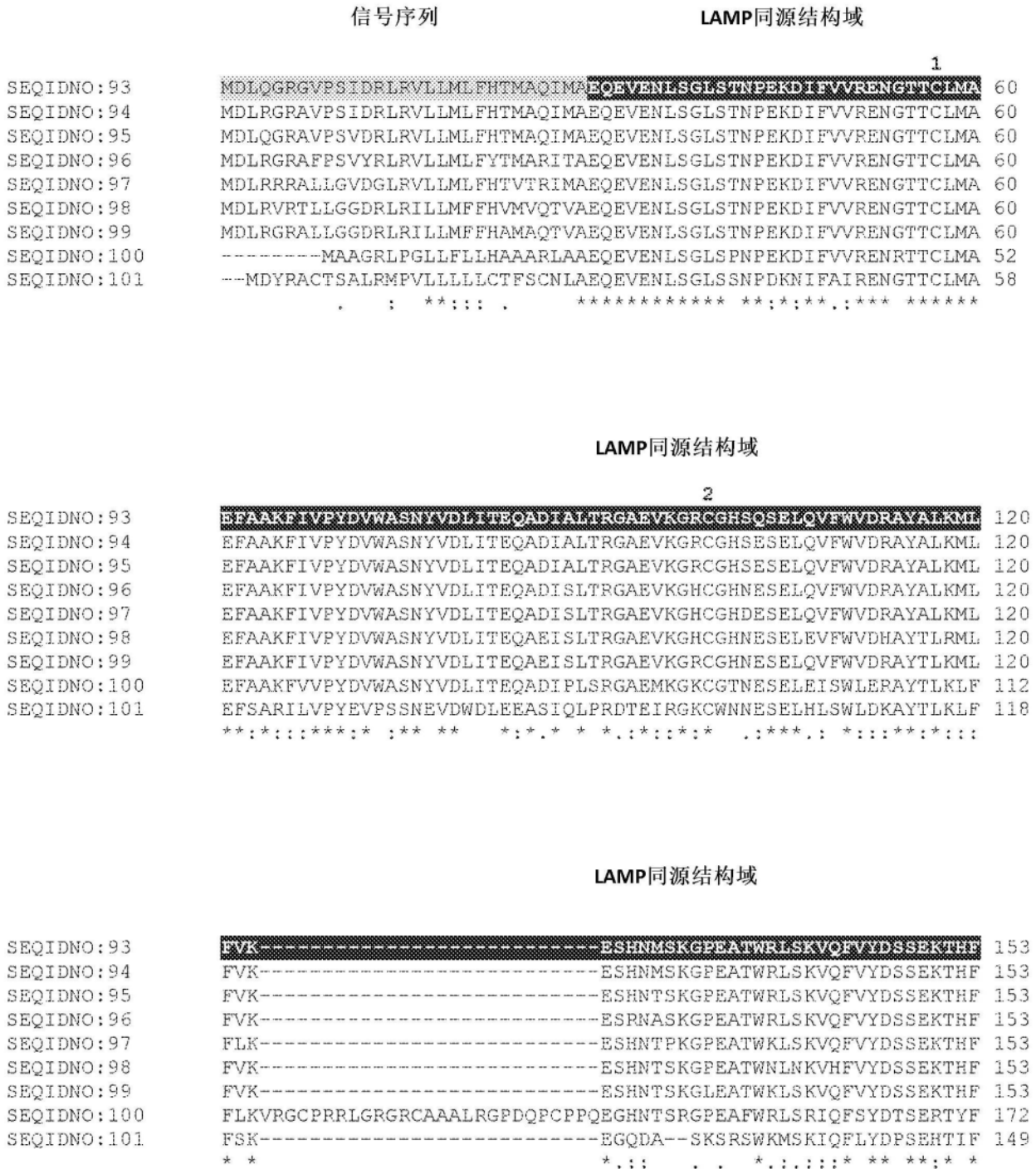
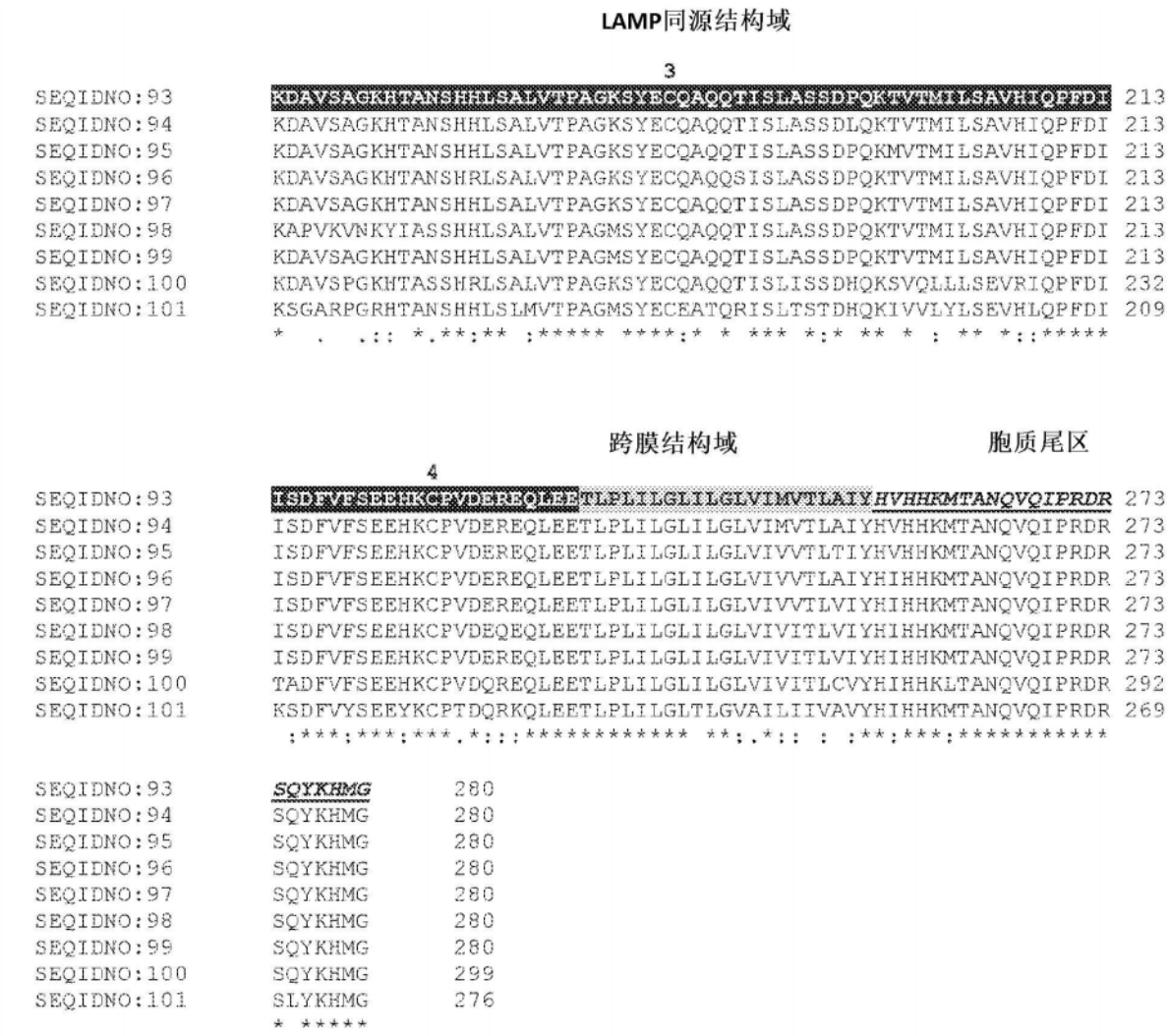


图10




```
                                                3
SEQIDNO:93      KDAVSAGKHTANSHHLSALVTPAGKSYECQAQQTISLASSDPQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:94      KDAVSAGKHTANSHHLSALVTPAGKSYECQAQQTISLASSDLQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:95      KDAVSAGKHTANSHHLSALVTPAGKSYECQAQQTISLASSDPQKMVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:96      KDAVSAGKHTANSHRLSALVTPAGKSYECQAQQSISLASSDPQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:97      KDAVSAGKHTANSHHLSALVTPAGKSYECQAQQTISLASSDPQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:98      KAPVKVNKYIASSHHLSALVTPAGMSYECQAQQTISLASSDPQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:99      KDAVSAGKHTANSHHLSALVTPAGMSYECQAQQTISLASSDPQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:100     KDAVSPGKHTASSHRLSALVTPAGKSYECQAQQTISLISSDHQKSVQLLLSEVRIQPFDI 232
SEQIDNO:101     KSGARPGRHTANSHHLSLMVTPAGMSYECEATQRISLTSTDHQKIVVLYLSEVHLQPFDI 209
                *  .  .:: *.**:** :***** ****:* * *** *:* ** * : ** *::*****

                                                4
SEQIDNO:93      ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIMVTLAIYHVHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:94      ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIMVTLAIYHVHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:95      ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIVVTLTIYHVHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:96      ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIVVTLAIYHIHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:97      ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIVVTLVIYHIHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:98      ISDFVFSEEHKCPVDEQEQLEETLPLILGLILGLVIVITLVIYHIHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:99      ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIVITLVIYHIHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:100     TADFVFSEEHKCPVDQREQLEETLPLILGLILGLVIVITLCVYHIHHKLTANQVQIPRDR 292
SEQIDNO:101     KSDFVYSEEYKCPTDQRKQLEETLPLILGLTLGVAILIIVAVYHIHHKMTANQVQIPRDR 269
                 :***:***:***.*:::************ **:.*:: : :**:***:************

SEQIDNO:93      SQYKHMG      280
SEQIDNO:94      SQYKHMG      280
SEQIDNO:95      SQYKHMG      280
SEQIDNO:96      SQYKHMG      280
SEQIDNO:97      SQYKHMG      280
SEQIDNO:98      SQYKHMG      280
SEQIDNO:99      SQYKHMG      280
SEQIDNO:100     SQYKHMG      299
SEQIDNO:101     SLYKHMG      276
                * *****
```

LAMP5					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_036393.1	智人	93	NP_001076887.1	家牛	97
XP_514512.3	黑猩猩	94	NP_083806.2	小鼠	98
NP_001181627.1	猕猴	95	NP_001014205.1	褐家鼠	99
XP_850634.1	家犬	96	XP_004935300.1	原鸡	100
			NP_001090781.1	热带爪蟾	101

图10续

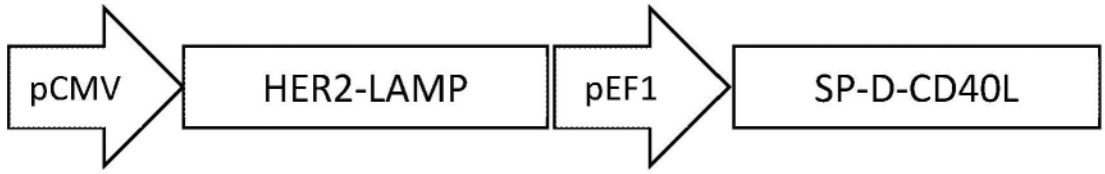

pCMV
HER2-LAMP
pEF1
SP-D-CD40L

图11

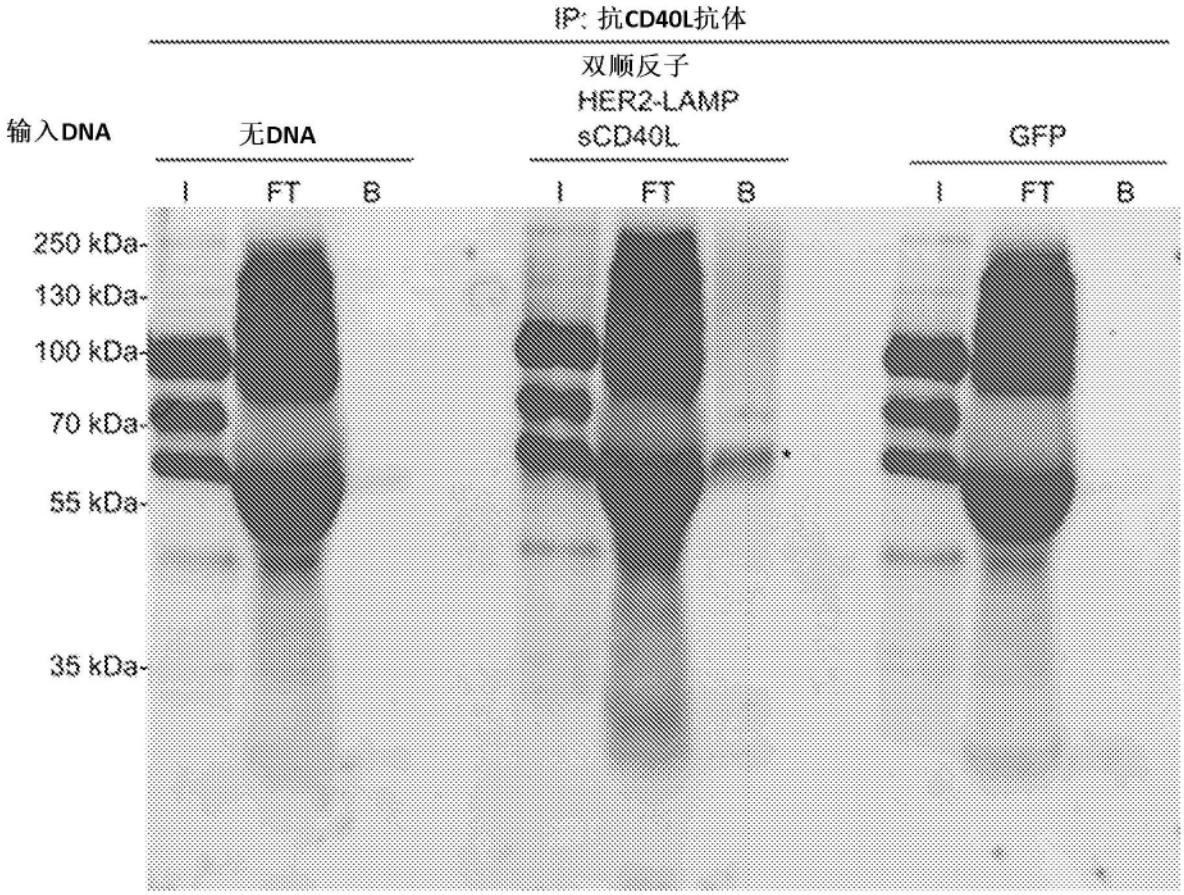

IP: 抗CD40L抗体
双顺反子
HER2-LAMP
sCD40L
输入DNA
无DNA
GFP
I
FT
B
I
FT
B
I
FT
B
250 kDa-
130 kDa-
100 kDa-
70 kDa-
55 kDa-
35 kDa-

图12

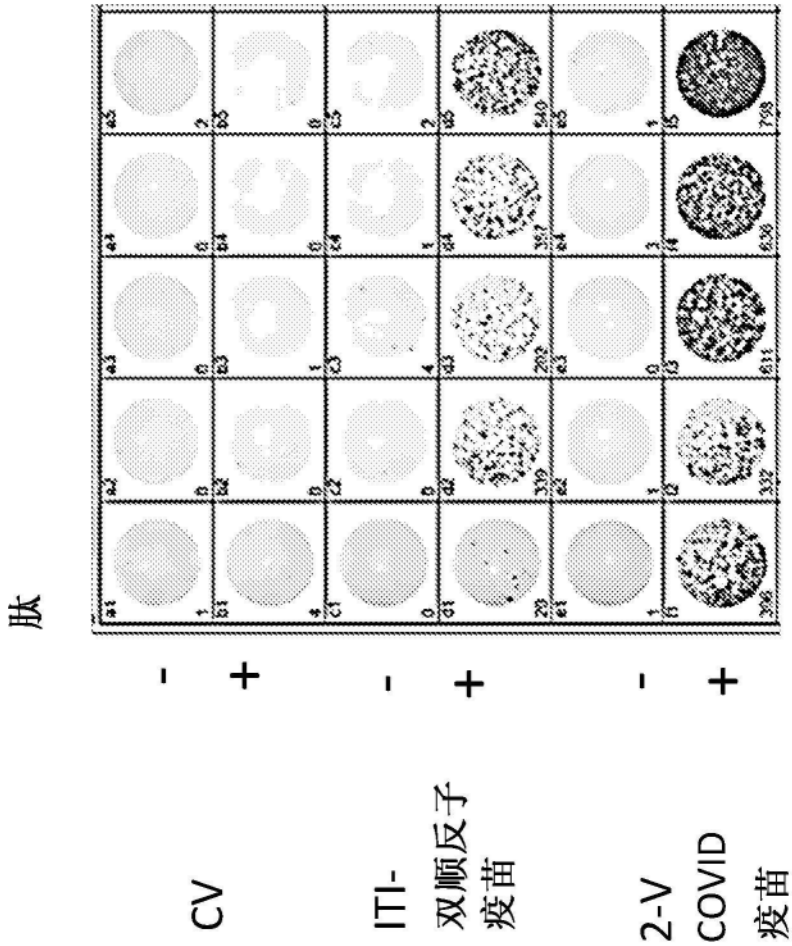


图13A

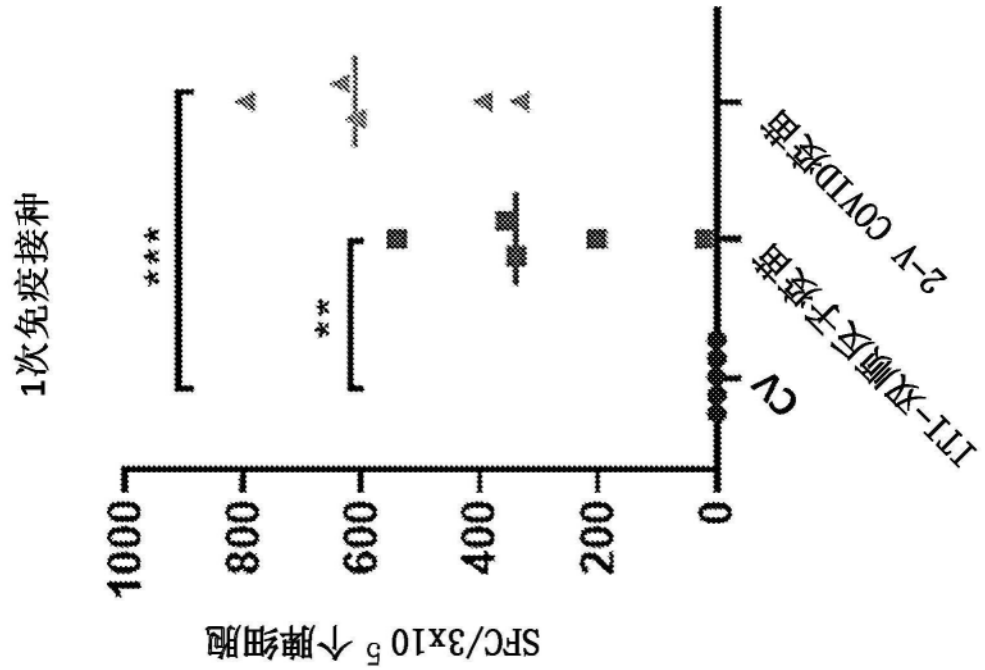

1次免疫接种
SFC/3x10⁵ 个脾细胞
1000
800
600
400
200
0
CV
1TI-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗
***
**

图13B

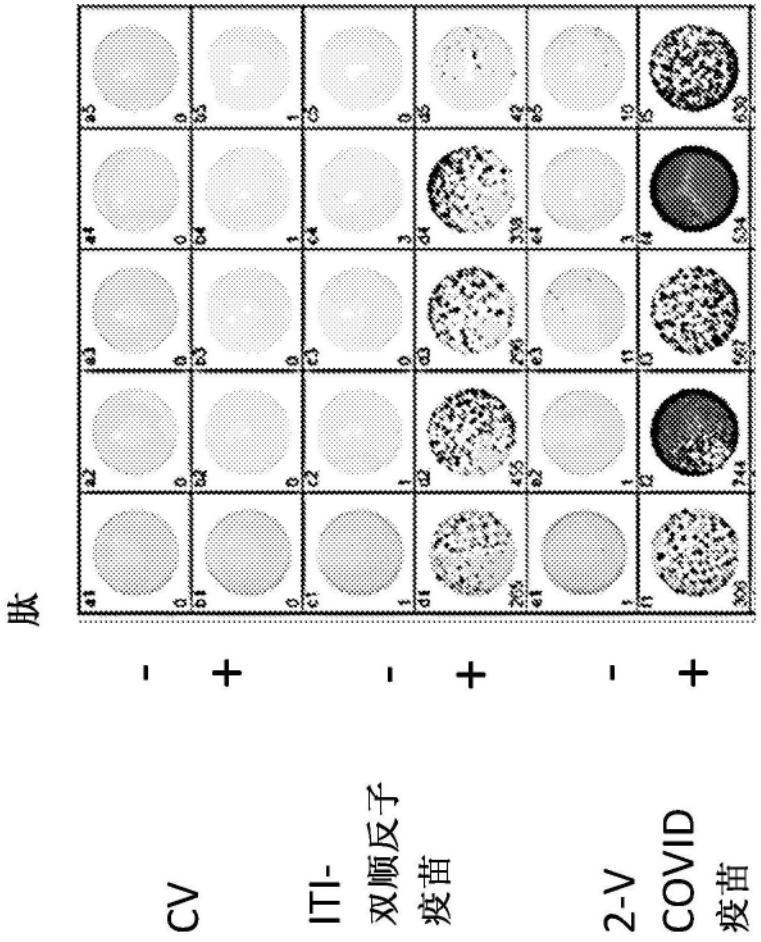

肽
- + - + - +
CV
ITI-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗

图13C

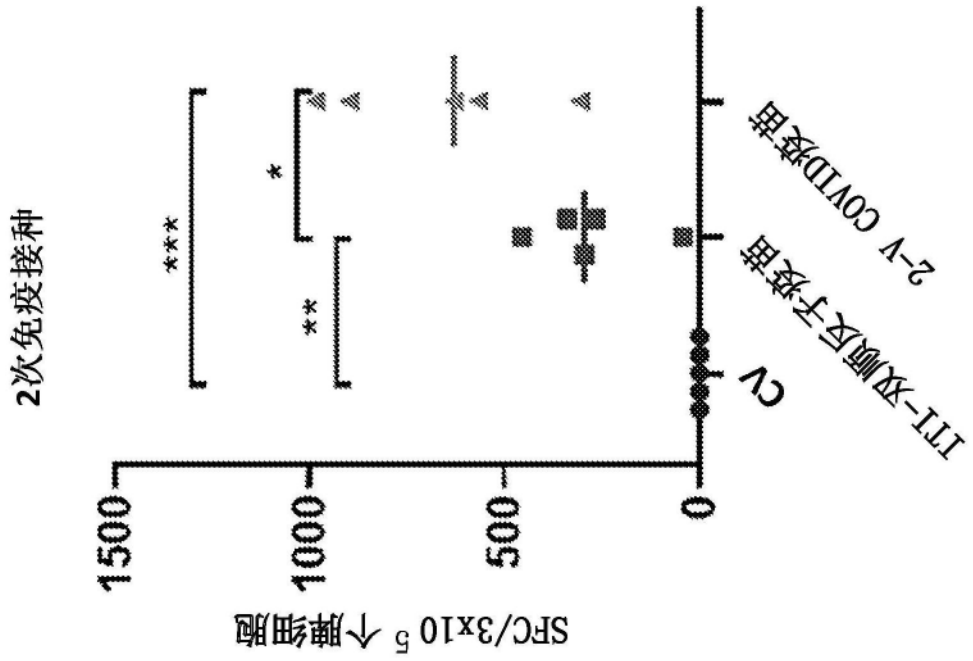

2次免疫接种
SFC/3x10 5 个脾细胞
1500
1000
500
0
***
**
*
CV
ITI-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗

图13D

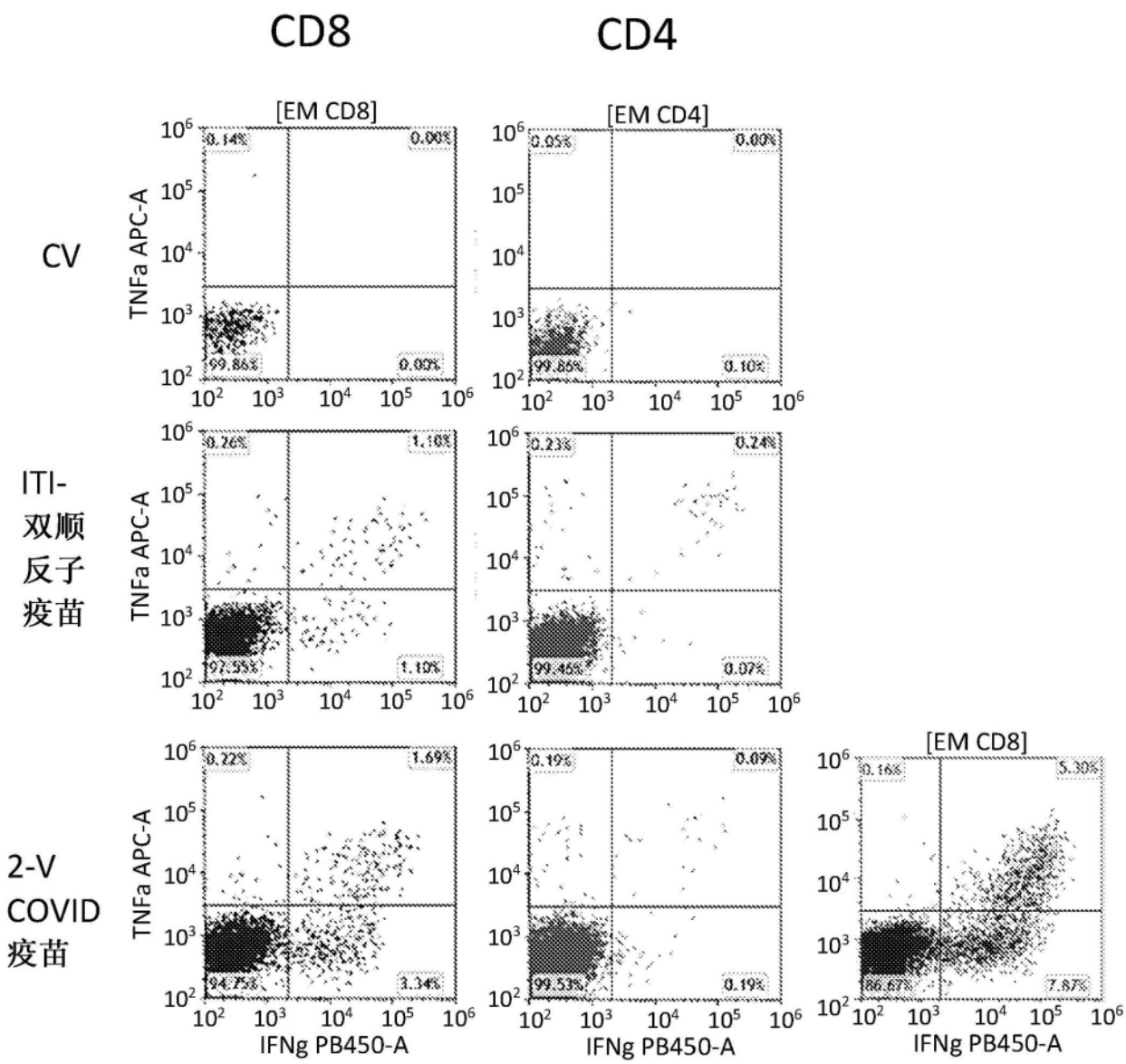

CD8
CD4
[EM CD8]
[EM CD4]
[EM CD8]
CV
ITI-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗
TNFa APC-A
IFNg PB450-A
0.14%
0.00%
99.86%
0.00%
0.05%
0.00%
99.85%
0.10%
0.26%
1.10%
97.55%
1.10%
0.23%
0.24%
99.46%
0.07%
0.22%
1.69%
94.75%
3.34%
0.19%
0.09%
99.53%
0.19%
0.16%
5.30%
86.67%
7.87%

图14

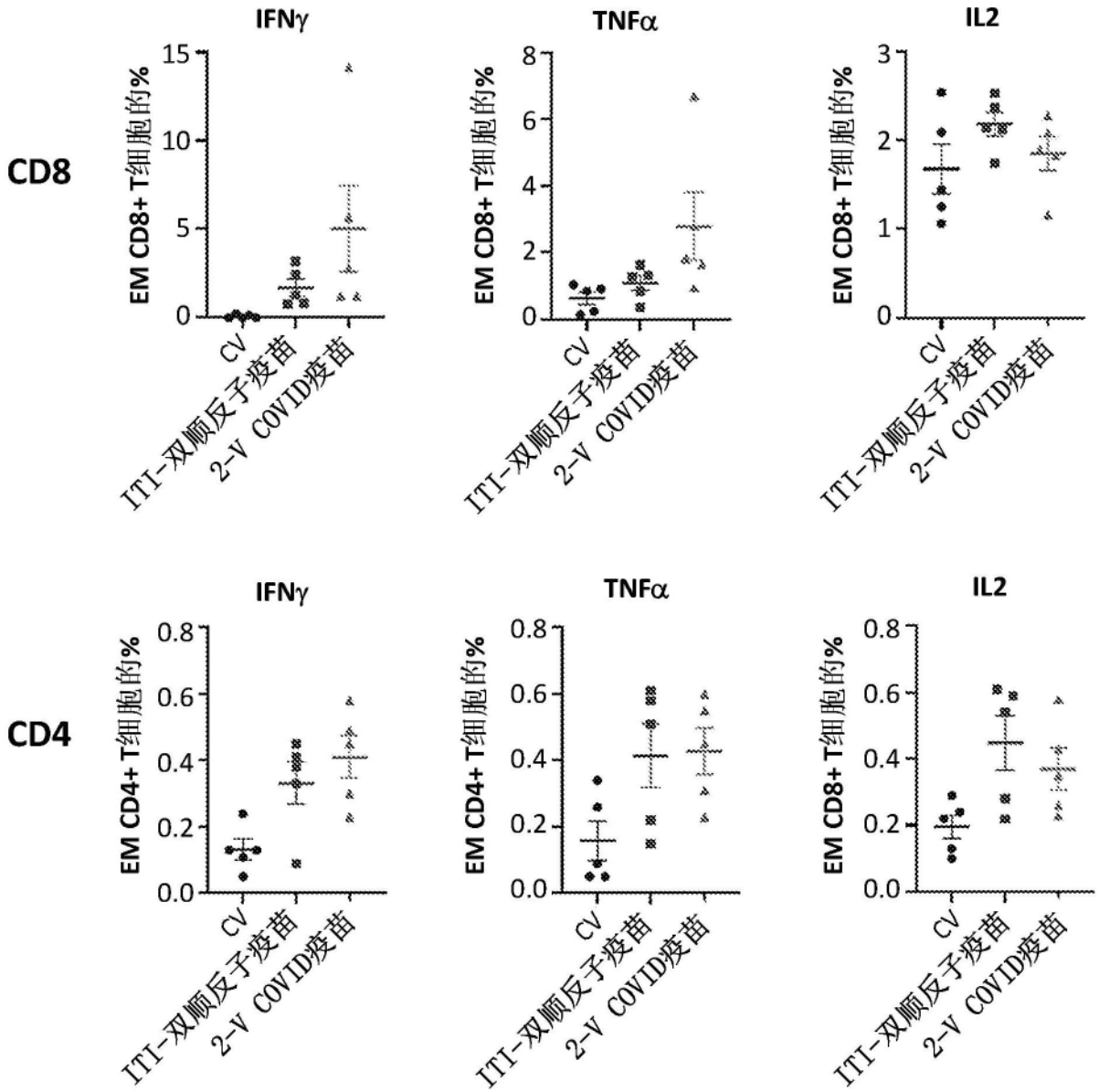

CD8
CD4
IFNγ
TNFα
IL2
EM CD8+ T细胞的%
EM CD4+ T细胞的%
CV
ITI-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗

图15

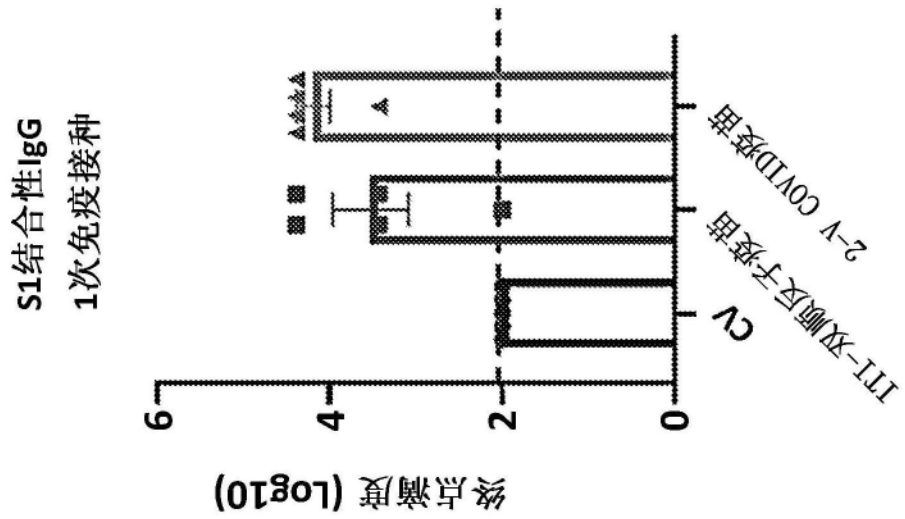

S1结合性IgG
1次免疫接种
终点滴度 (Log10)
0
2
4
6
CV
ITT-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗

图16A

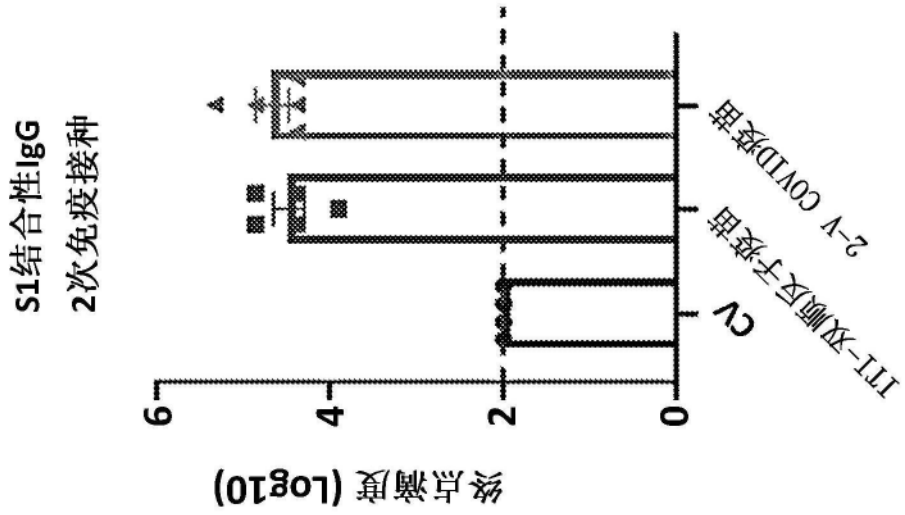

S1结合性IgG
2次免疫接种
终点滴度 (Log10)
0
2
4
6
CV
ITT-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗

图16B

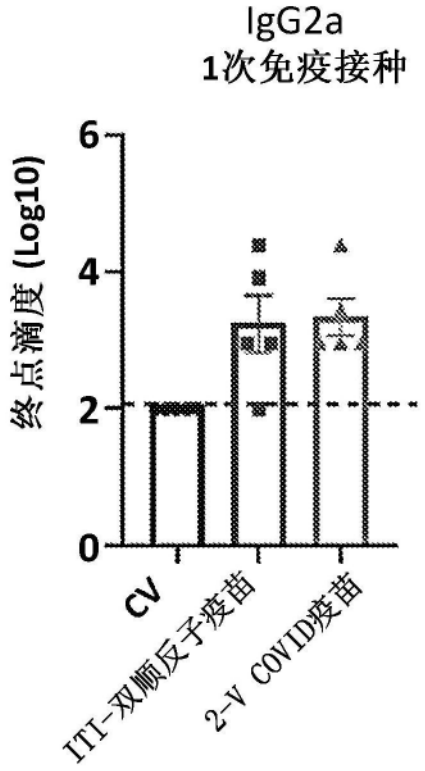

IgG2a
1次免疫接种
终点滴度 (Log10)
6
4
2
0
CV
ITI-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗

图16C

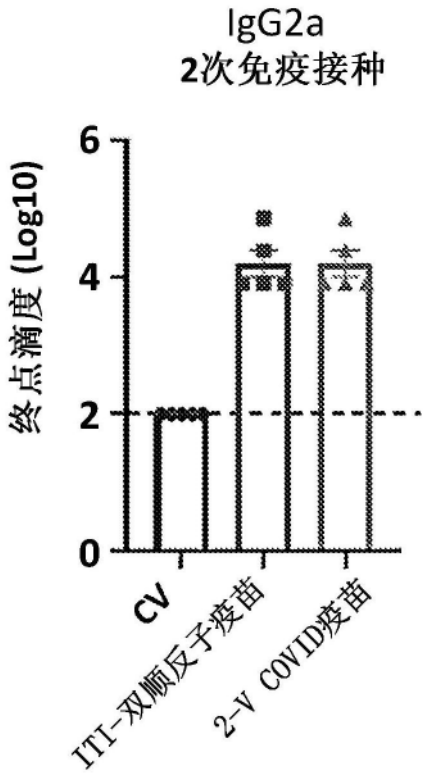

IgG2a
2次免疫接种
终点滴度 (Log10)
6
4
2
0
CV
ITI-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗

图16D

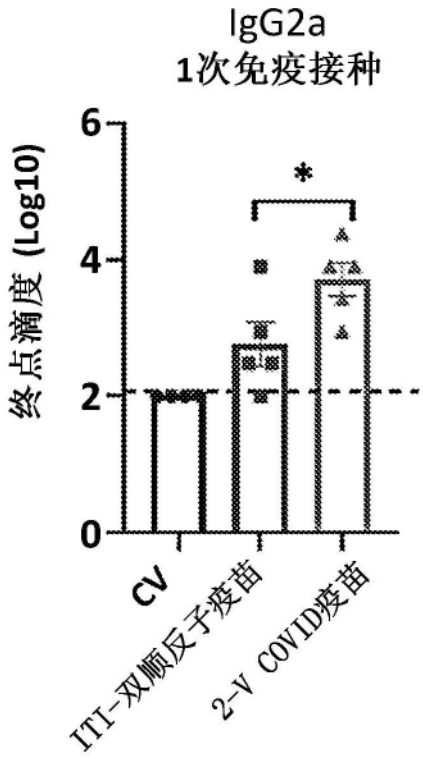

IgG2a
1次免疫接种
终点滴度 (Log10)
6
4
2
0
*
CV
ITI-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗

图16E

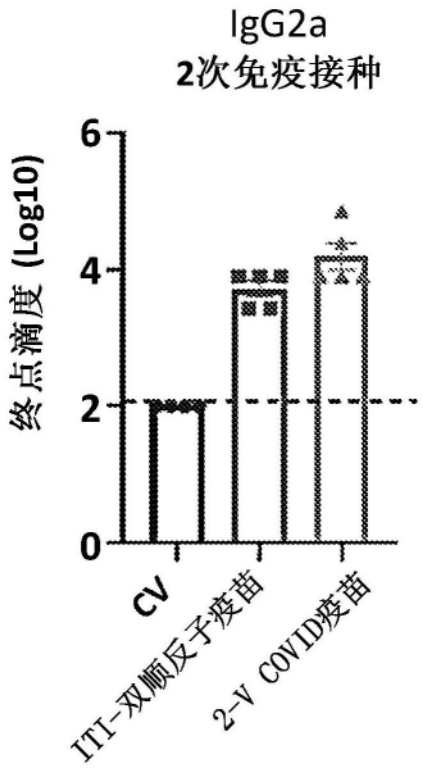

IgG2a
2次免疫接种
终点滴度 (Log10)
6
4
2
0
CV
ITI-双顺反子疫苗
2-V COVID疫苗

图16F

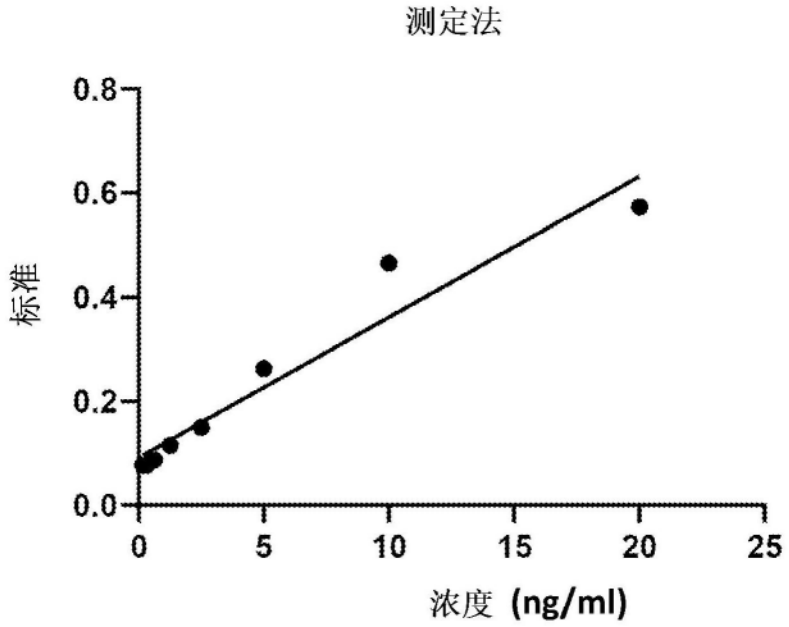

测定法
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
标准
0
5
10
15
20
25
浓度 (ng/ml)

图17A

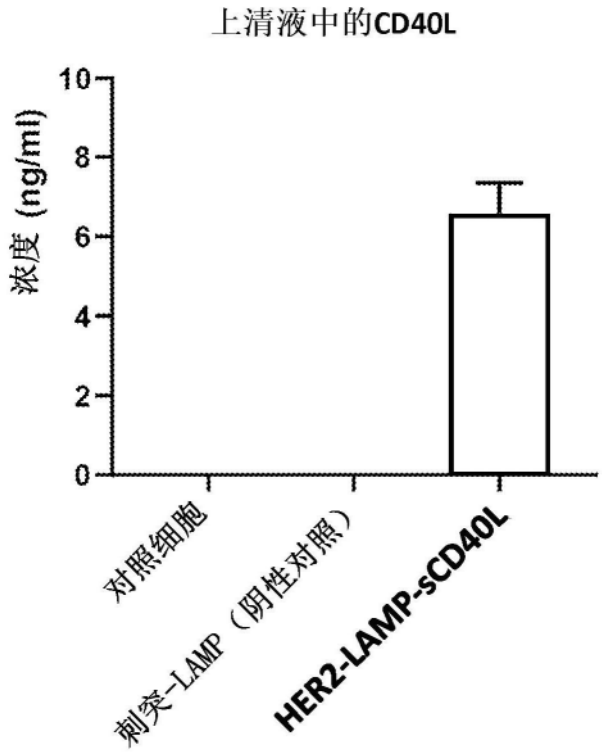

上清液中的CD40L
10
8
6
4
2
0
浓度 (ng/ml)
对照细胞
刺突-LAMP（阴性对照）
HER2-LAMP-sCD40L

图17B

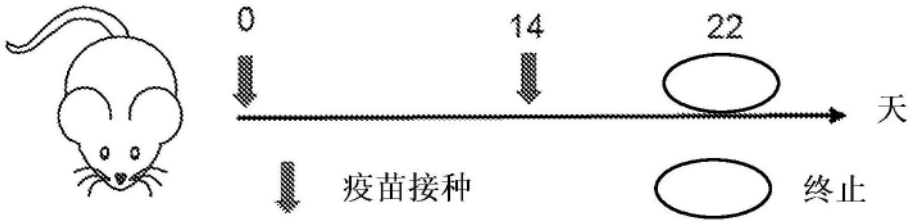

0
14
22
天
疫苗接种
终止

图18A

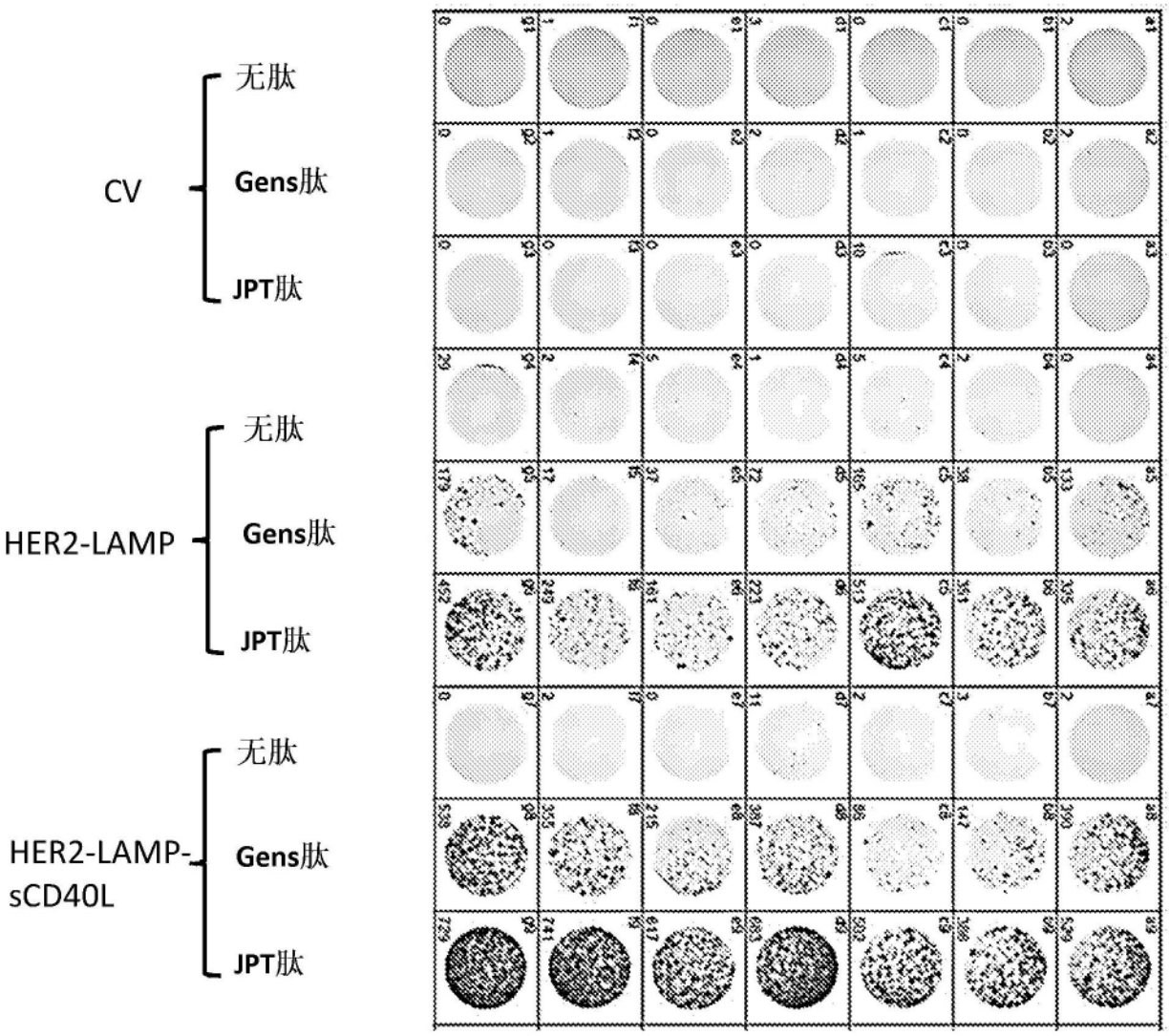

CV
无肽
Gens肽
JPT肽
HER2-LAMP
无肽
Gens肽
JPT肽
HER2-LAMP-sCD40L
无肽
Gens肽
JPT肽

图18B

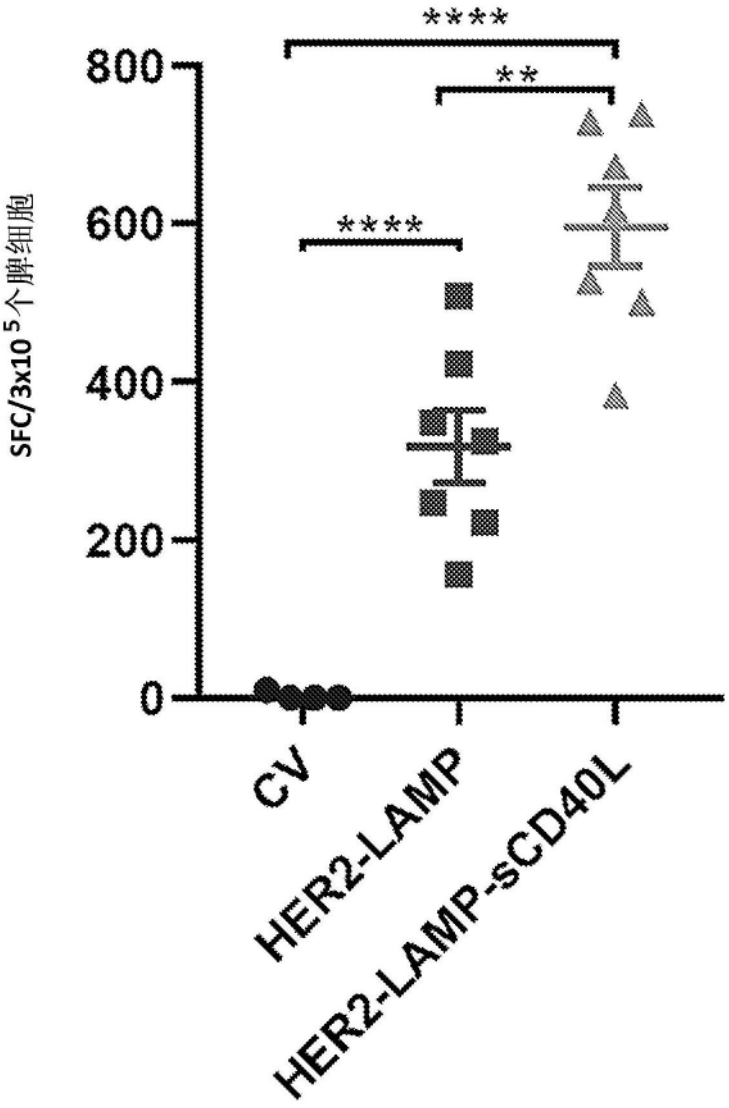


图18C

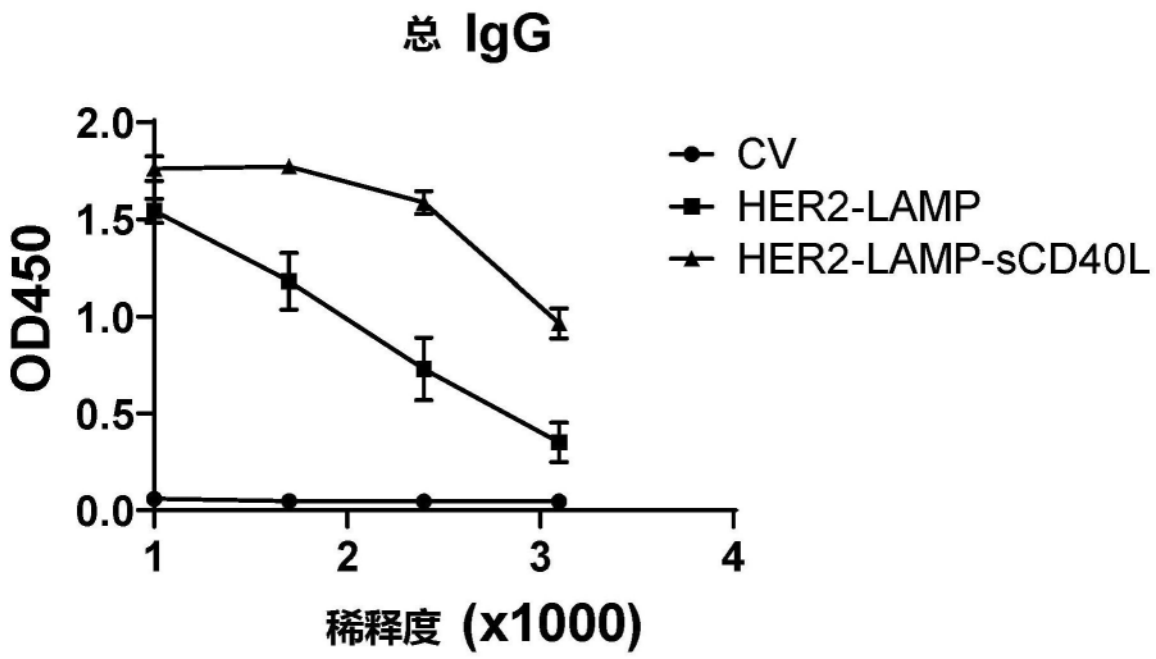

总 IgG
OD450
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3
4
稀释度 (x1000)
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图18D

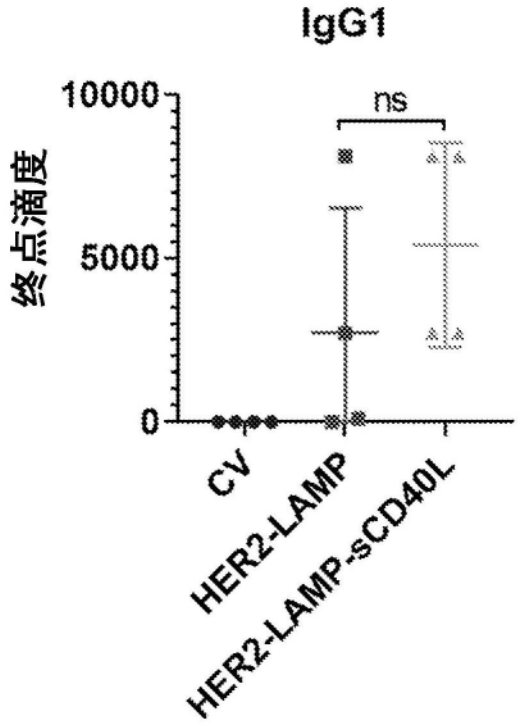

IgG1
终点滴度
10000
5000
0
ns
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图18E

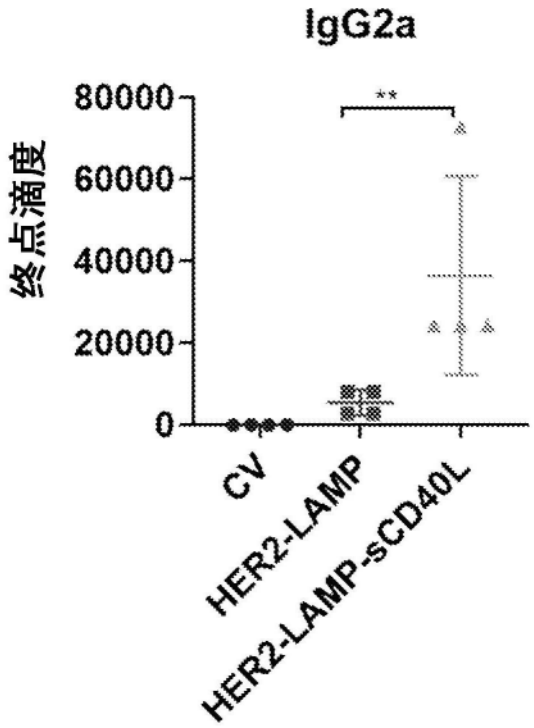

IgG2a
终点滴度
80000
60000
40000
20000
0
**
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图18F

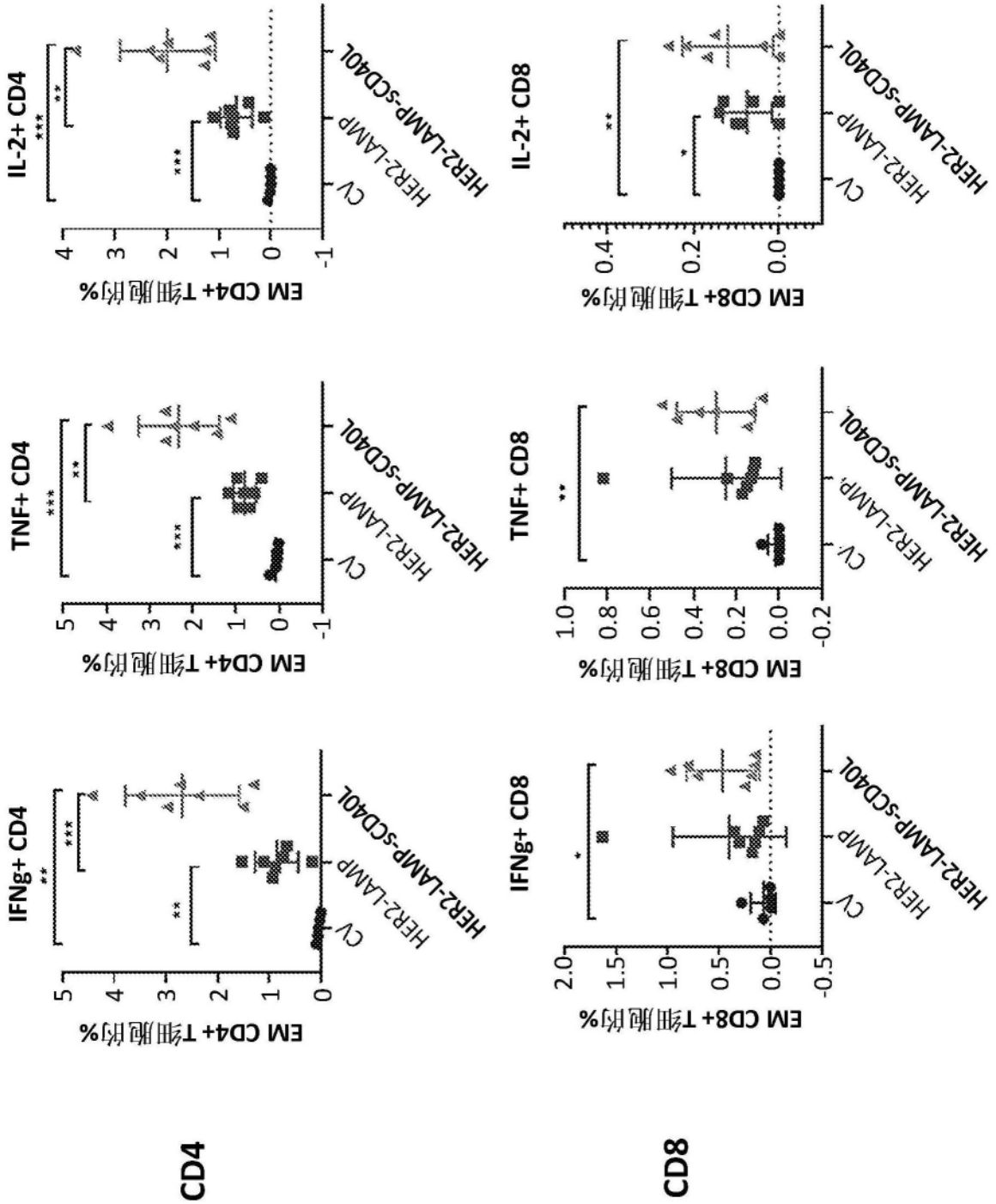

CD4
CD8
IFNg+ CD4
TNF+ CD4
IL-2+ CD4
IFNg+ CD8
TNF+ CD8
IL-2+ CD8
EM CD4+ T细胞的%
EM CD8+ T细胞的%
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图19A

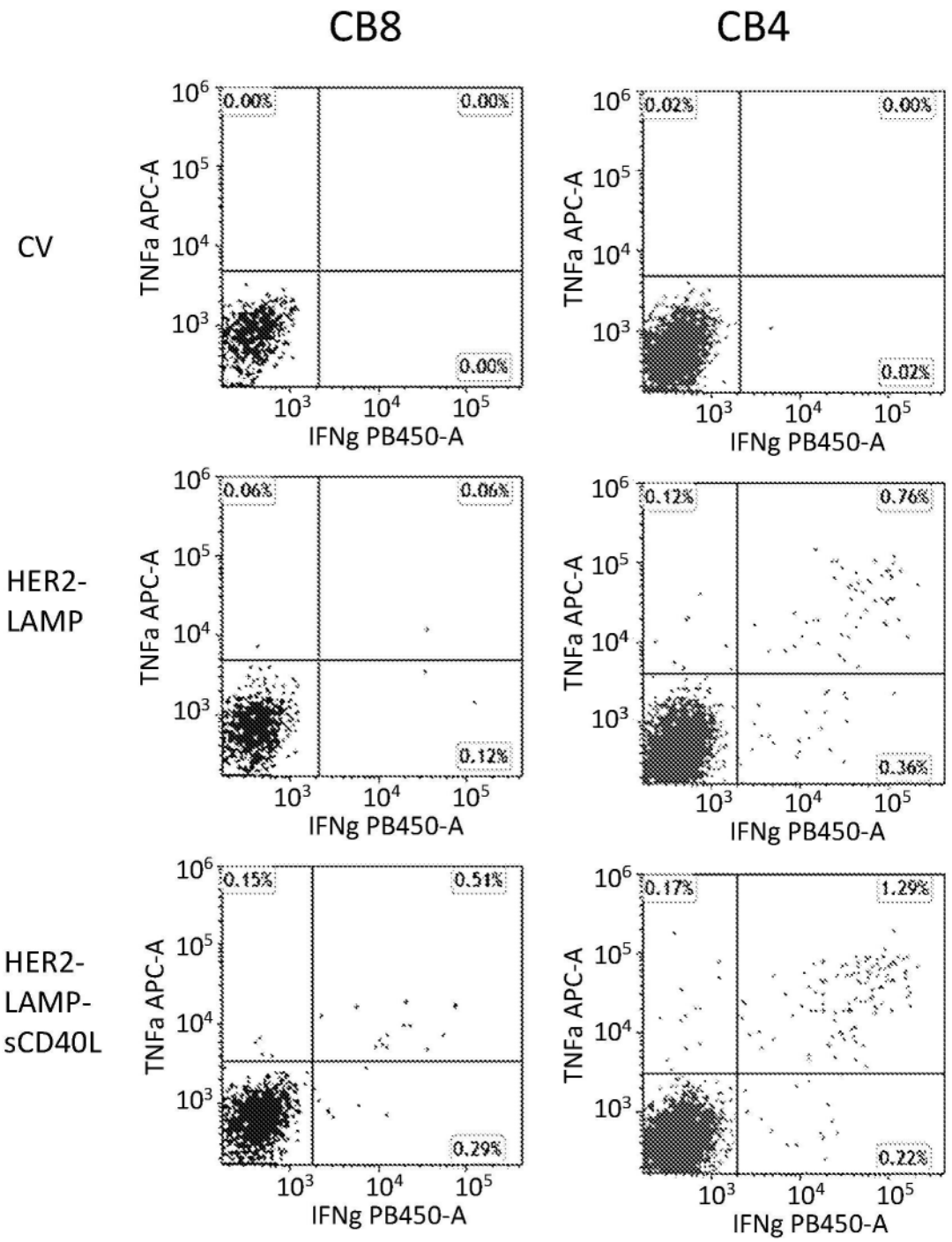

CB8
CB4
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
TNFa APC-A
IFNg PB450-A
0.00%
0.00%
0.00%
0.00%
0.02%
0.00%
0.02%
0.06%
0.06%
0.12%
0.12%
0.76%
0.36%
0.15%
0.51%
0.29%
0.17%
1.29%
0.22%

图19B

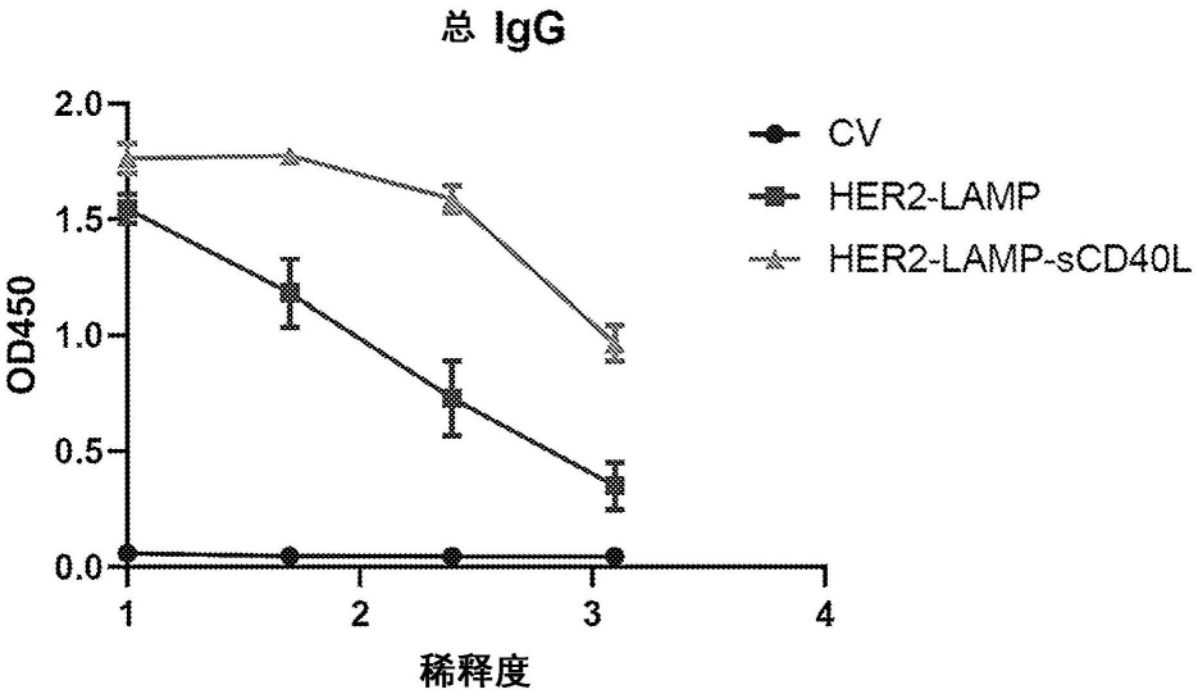

总 IgG
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD450
1
2
3
4
稀释度
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图20

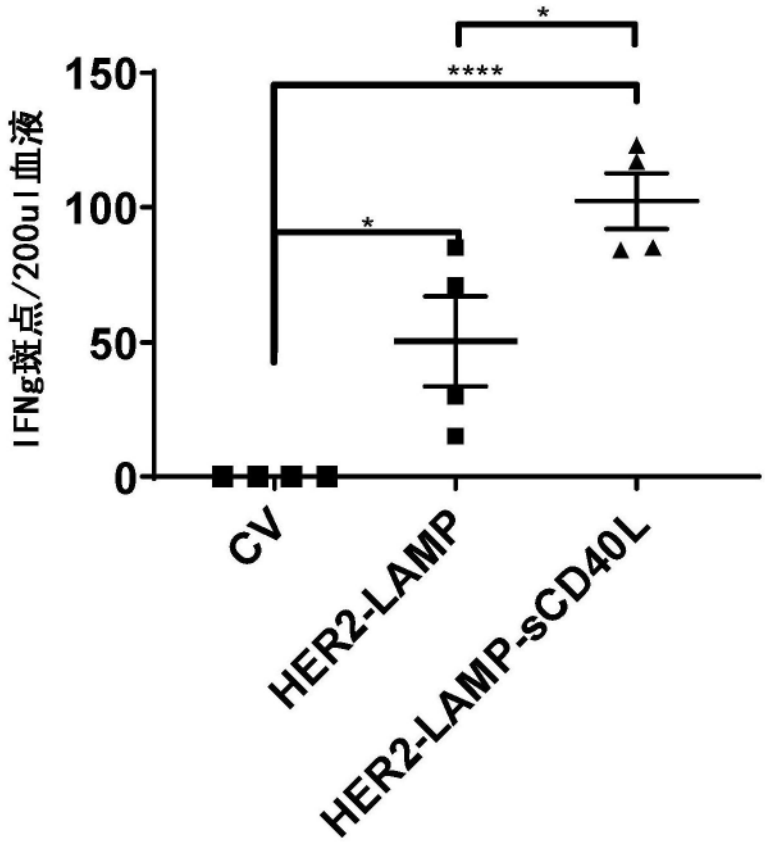

*
****
*
150
100
50
0
IFNg斑点/200ul血液
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图21A

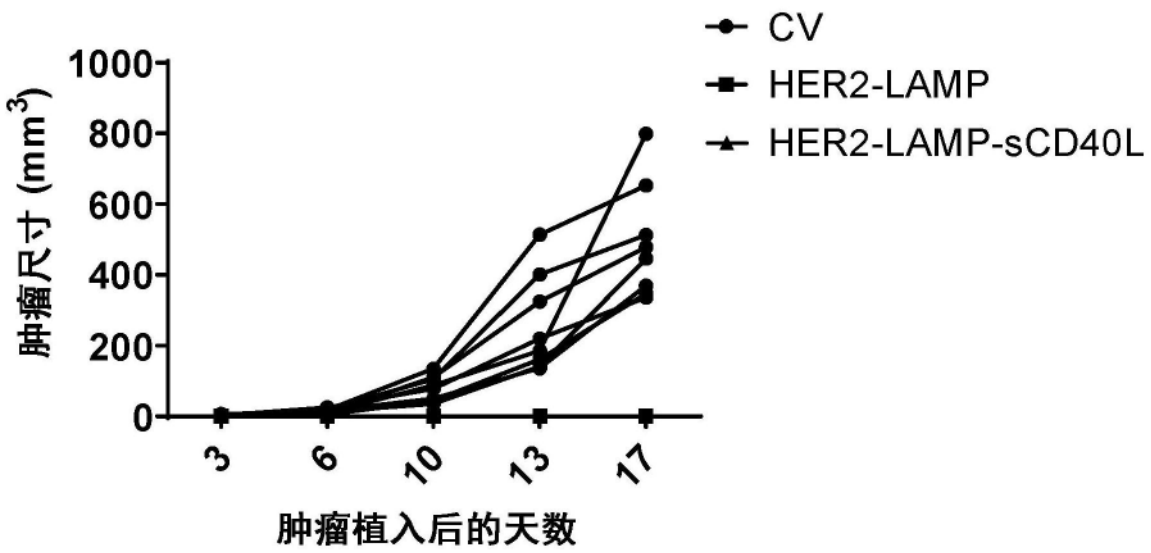

CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
肿瘤尺寸 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
3
6
10
13
17
肿瘤植入后的天数

图21B

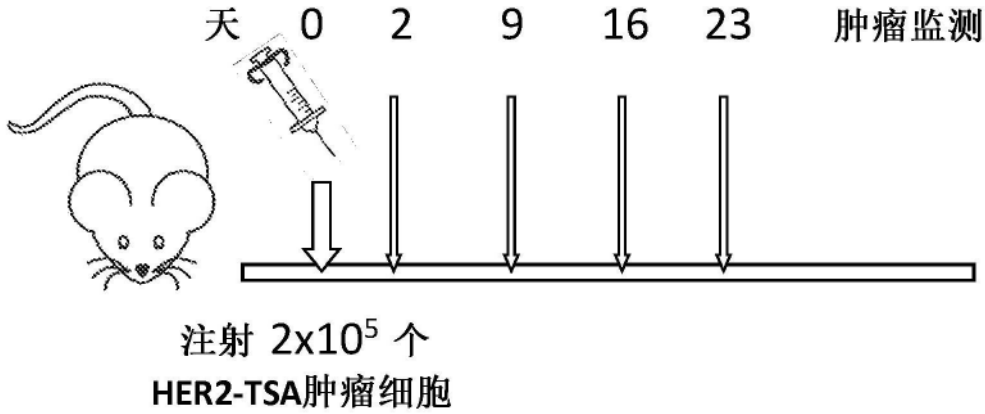

天 0 2 9 16 23 肿瘤监测
注射 2x10^5 个
HER2-TSA肿瘤细胞

图22A

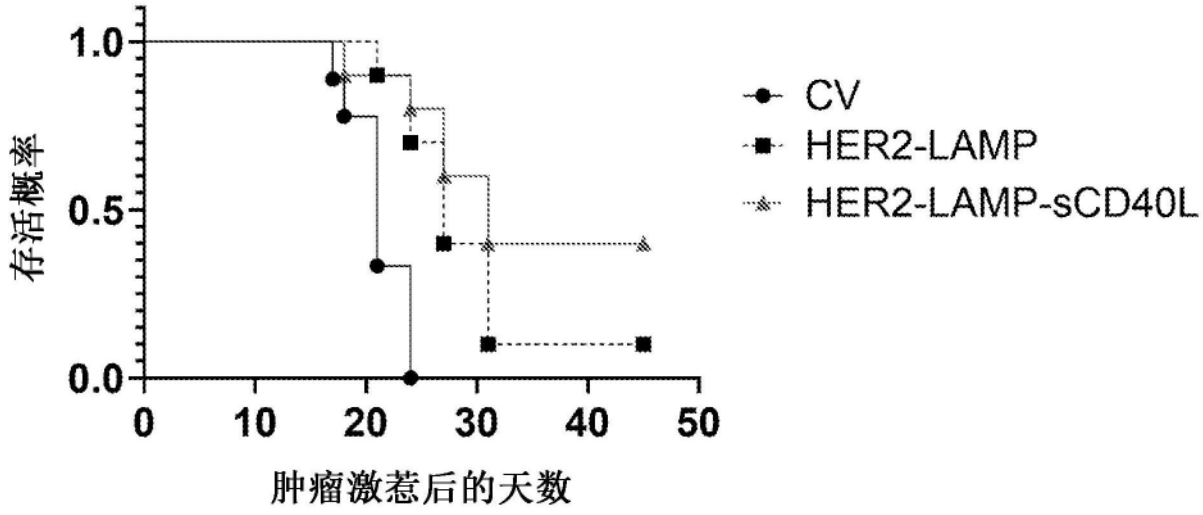

1.0
0.5
0.0
存活概率
0
10
20
30
40
50
肿瘤激惹后的天数
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图22B

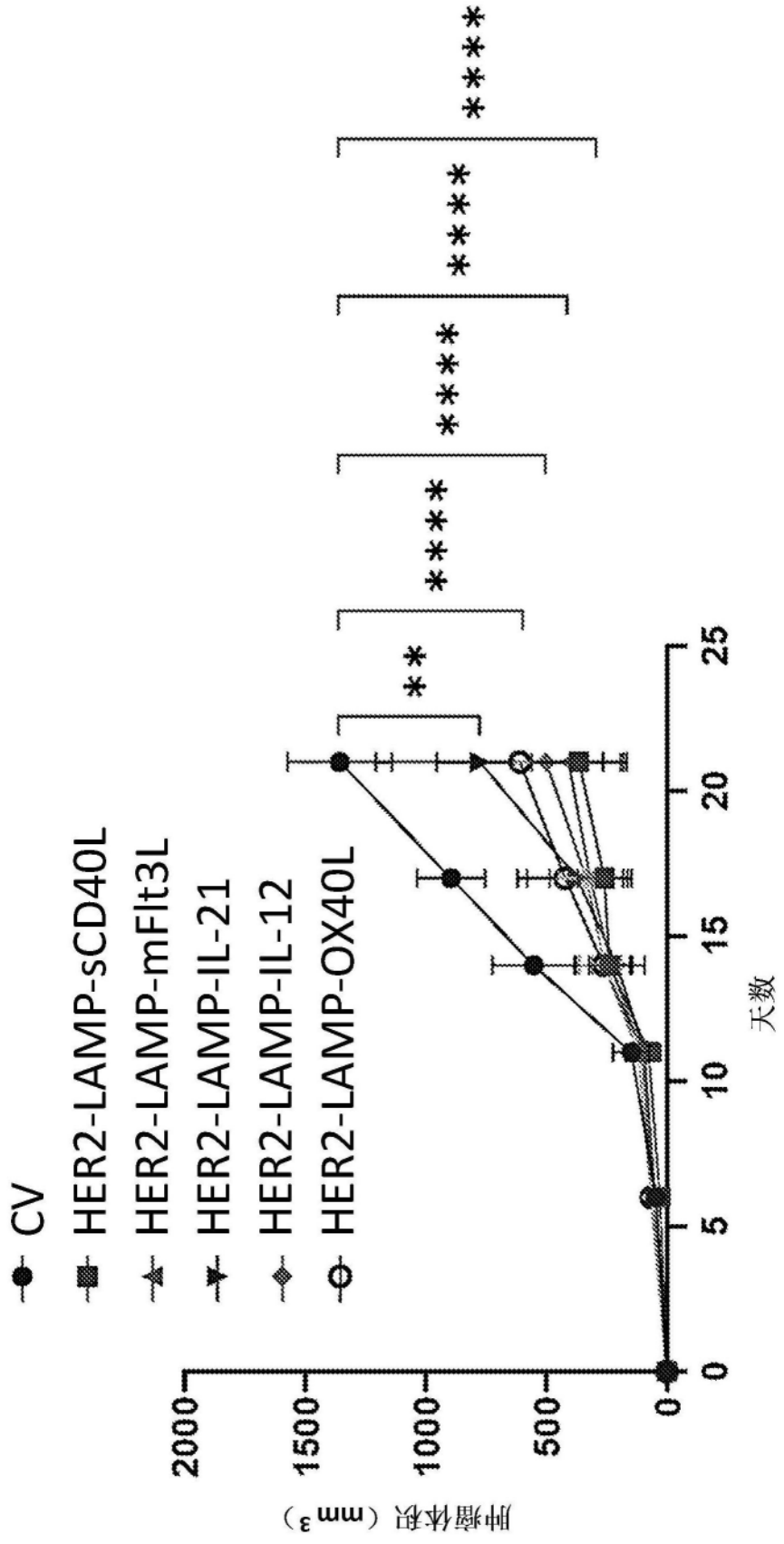

CV
HER2-LAMP-sCD40L
HER2-LAMP-mFlt3L
HER2-LAMP-IL-21
HER2-LAMP-IL-12
HER2-LAMP-OX40L
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
天数

图23

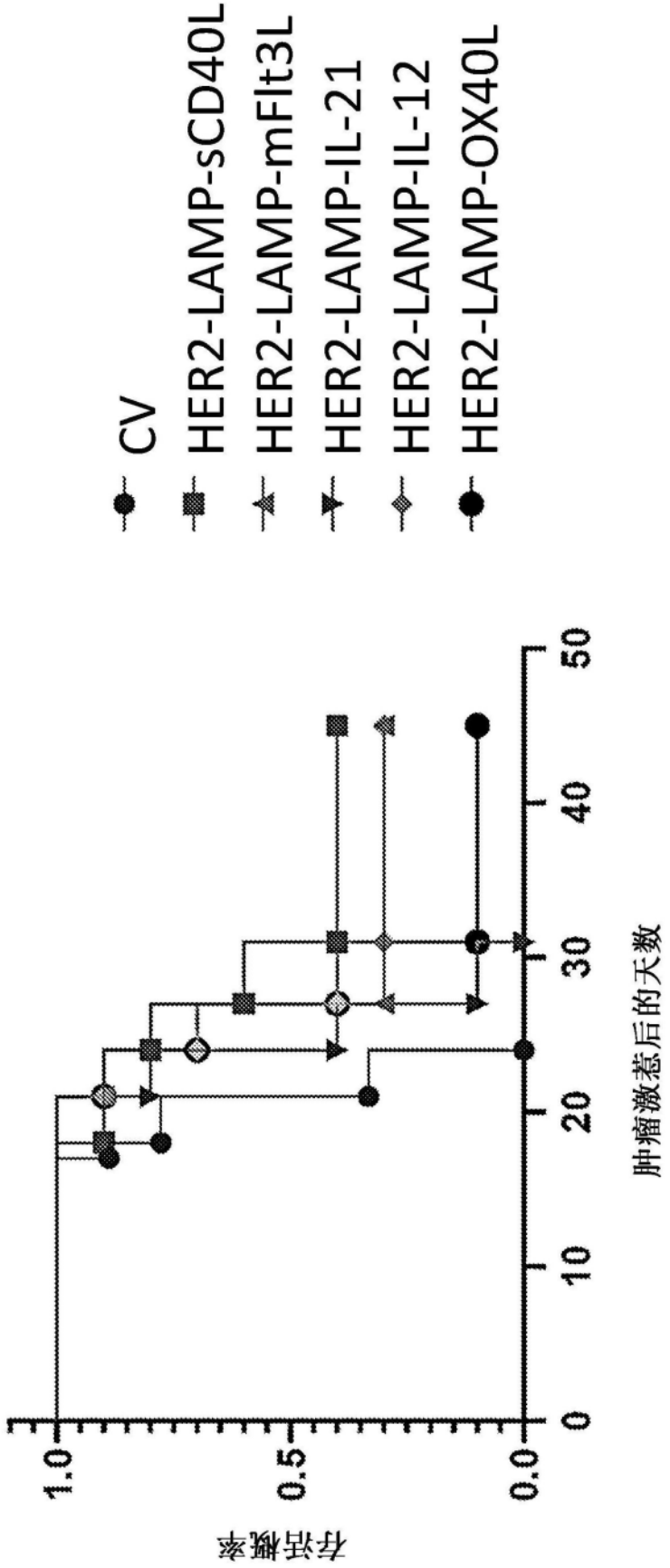

CV
HER2-LAMP-sCD40L
HER2-LAMP-mFlt3L
HER2-LAMP-IL-21
HER2-LAMP-IL-12
HER2-LAMP-OX40L
存活概率
1.0
0.5
0.0
0
10
20
30
40
50
肿瘤激惹后的天数

图24

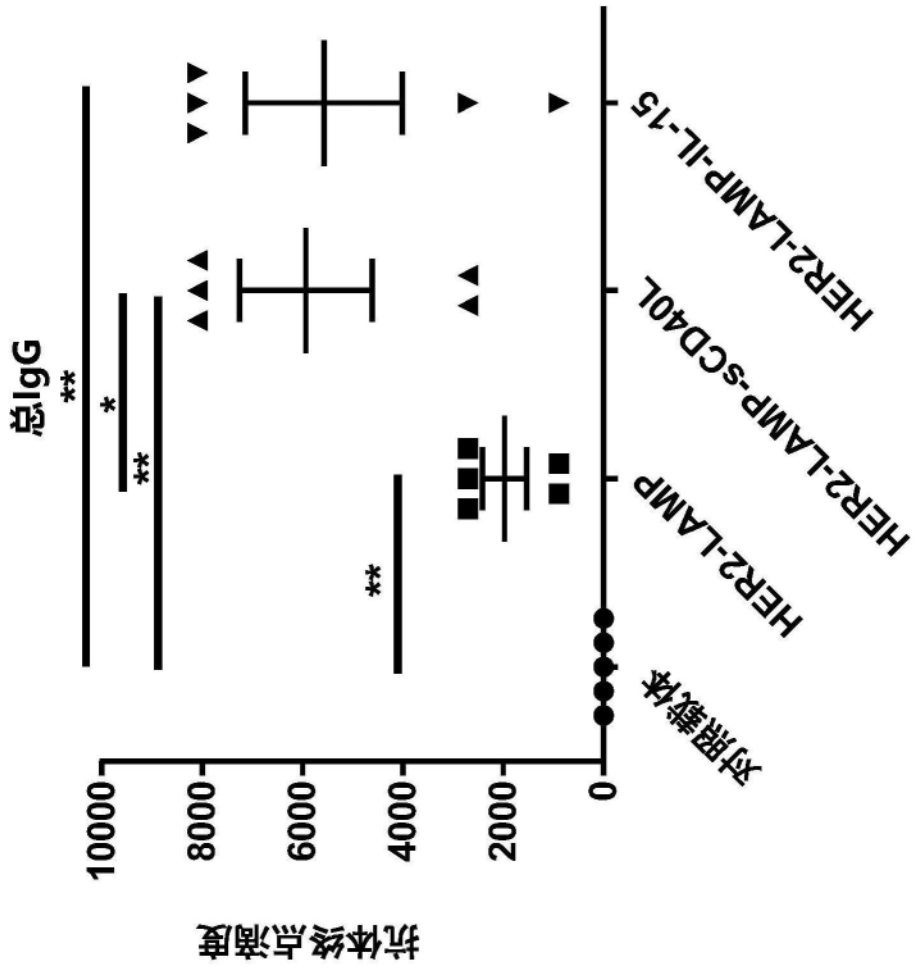

抗体终点滴度
10000
8000
6000
4000
2000
0
对照载体
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
HER2-LAMP-IL-15
总IgG
**
*
**
**

图25

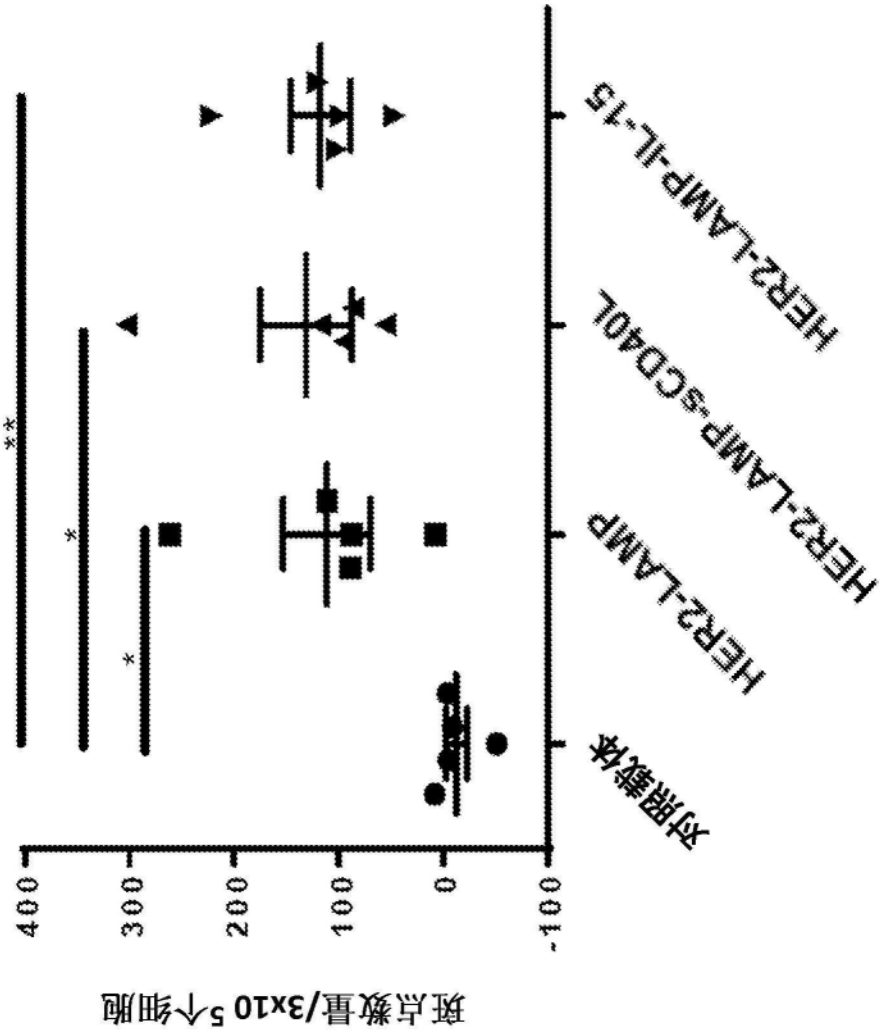

斑点数量/3x10 5个细胞
400
300
200
100
0
-100
对照载体
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
HER2-LAMP-IL-15
*
*
**

图26

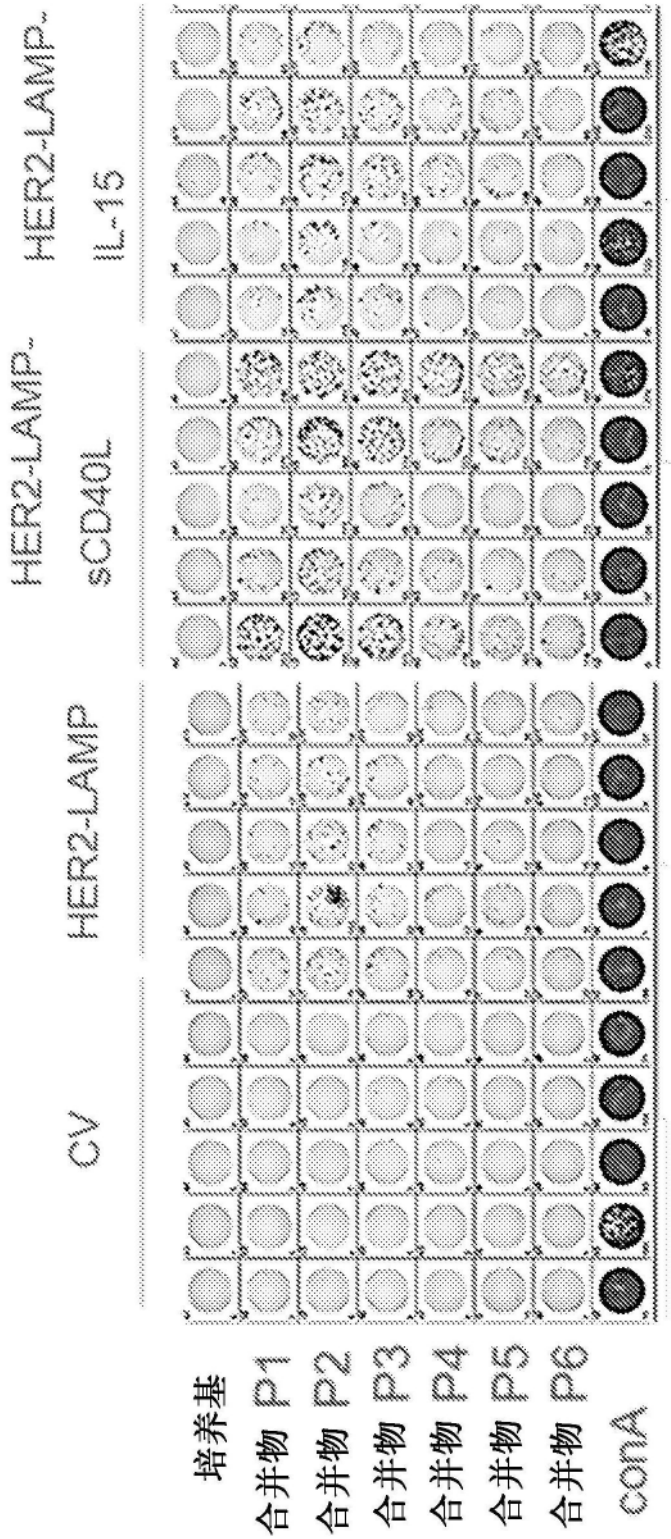

CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-
sCD40L
HER2-LAMP-
IL-15
培养基
合并物 P1
合并物 P2
合并物 P3
合并物 P4
合并物 P5
合并物 P6
conA

图27A

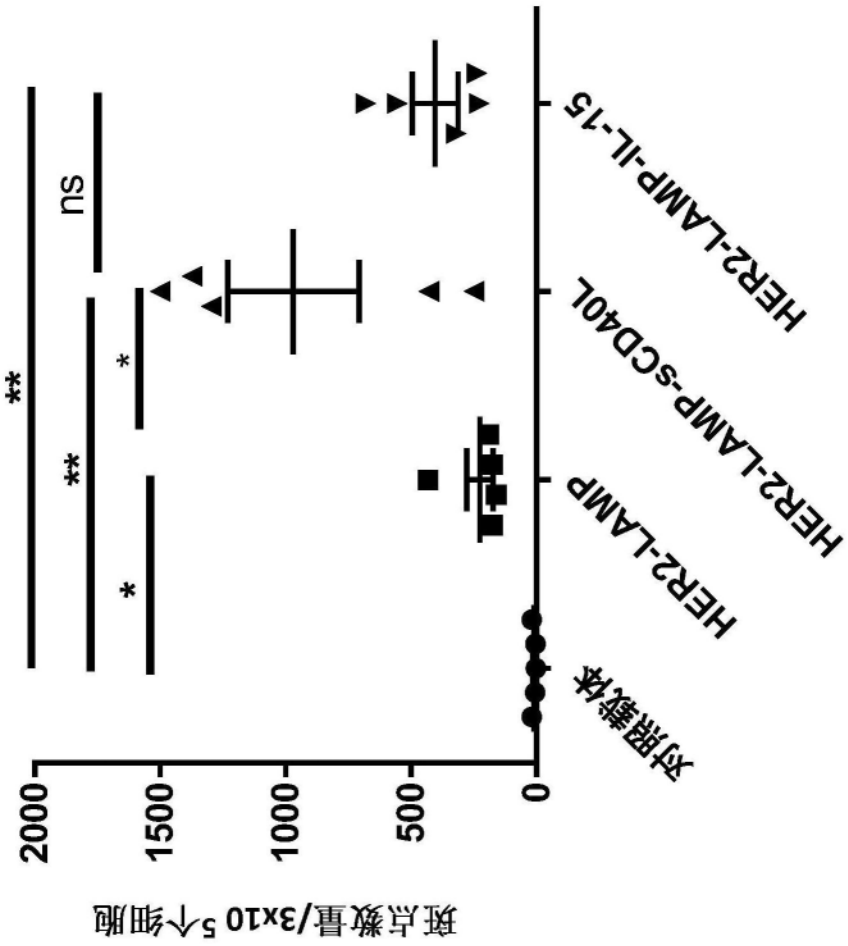

斑点数量/3x10 5个细胞
2000
1500
1000
500
0
对照载体
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
HER2-LAMP-IL-15
ns
**
**
*
*

图27B

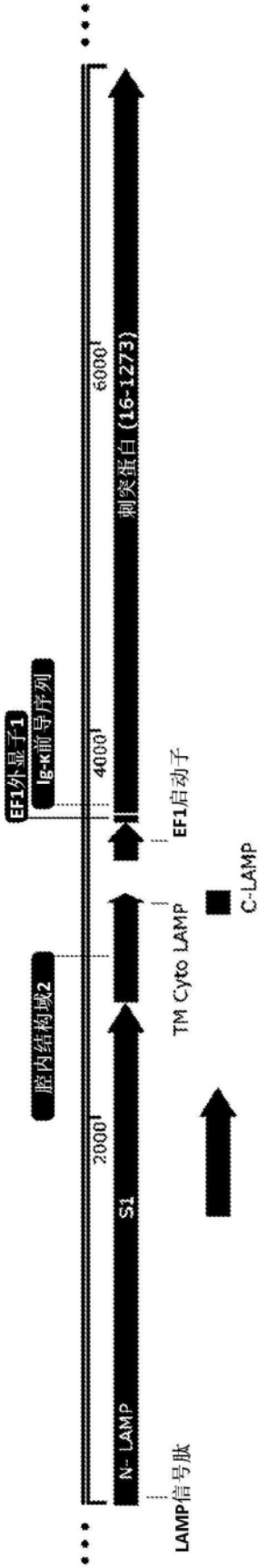

LAMP信号肽
N- LAMP
S1
2000
腔内结构域2
TM Cyto LAMP
C-LAMP
EF1启动子
4000
Ig-κ前导序列
EF1外显子1
6000
刺突蛋白 (16-1273)

图28A

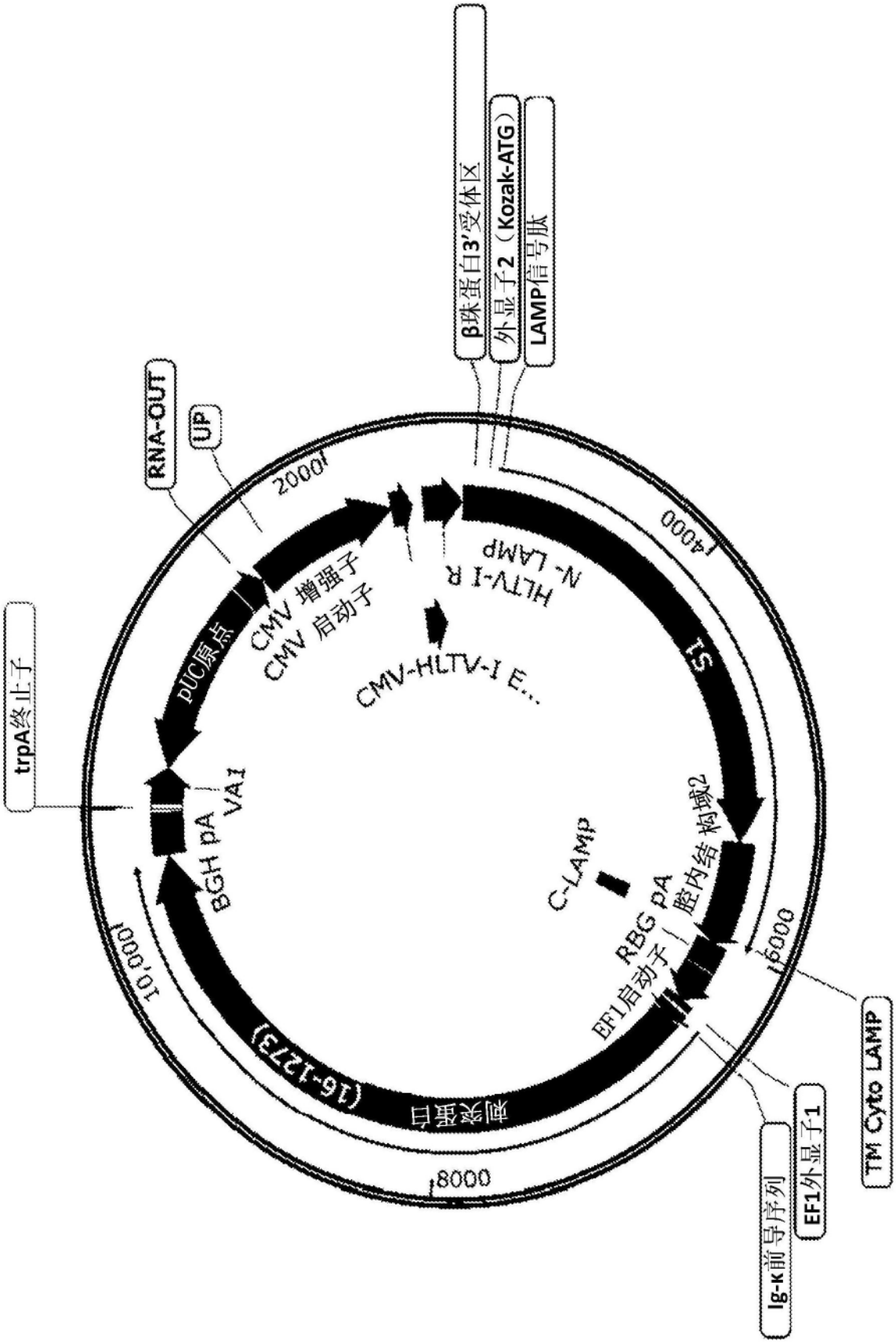

β珠蛋白3'受体区
外显子2（Kozak-ATG）
LAMP信号肽
RNA-OUT
UP
2000
4000
pUC原点
CMV 增强子
CMV 启动子
HLTV-I R
N- LAMP
CMV-HLTV-I E...
S1
trpA终止子
VA1
BGH pA
C-LAMP
RBG pA
腔内结 构域2
EF1启动子
6000
10,000
(16-1273)
刺突蛋白
8000
Ig-κ前导序列
EF1外显子1
TM Cyto LAMP

图28B

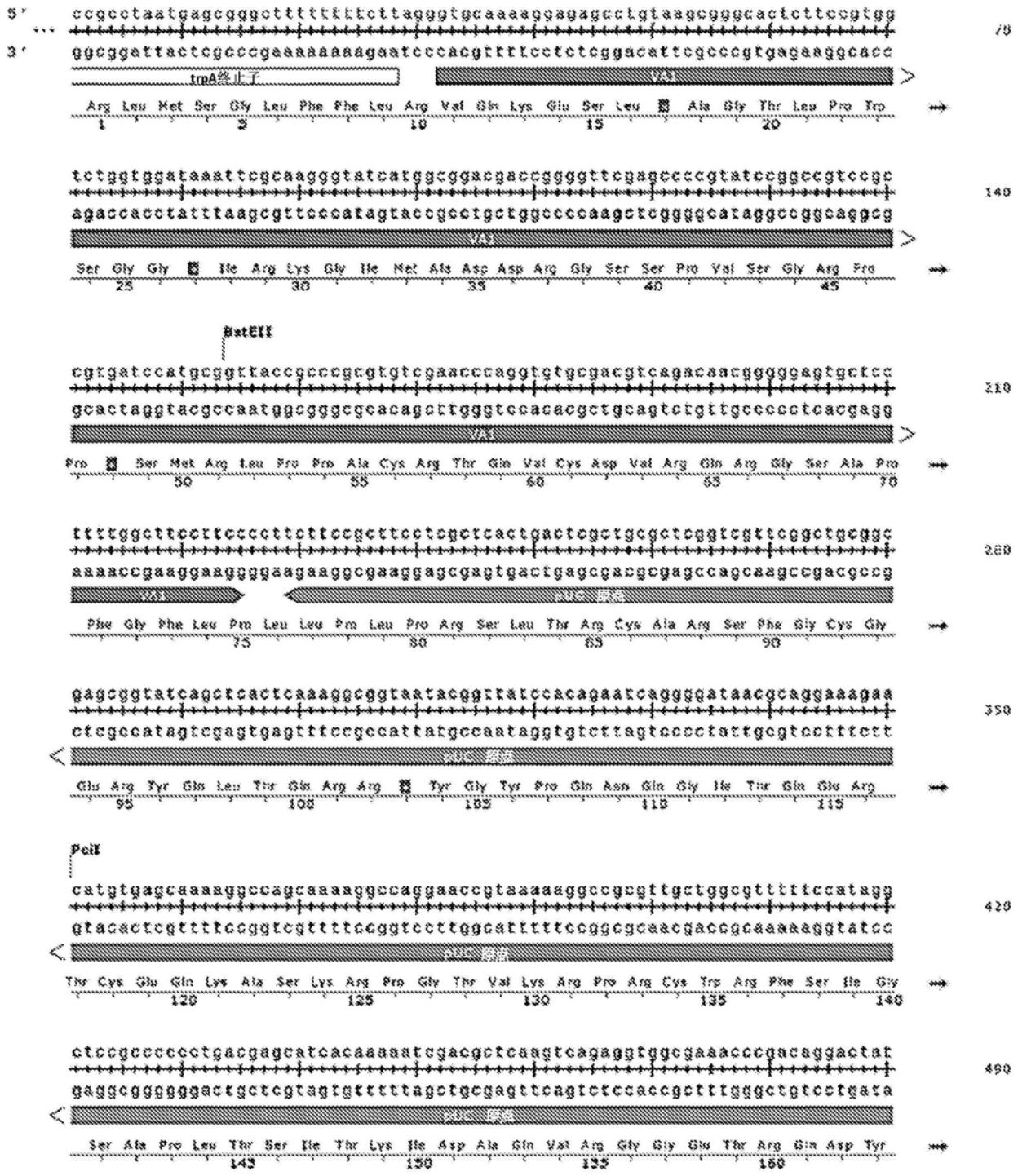


图28C

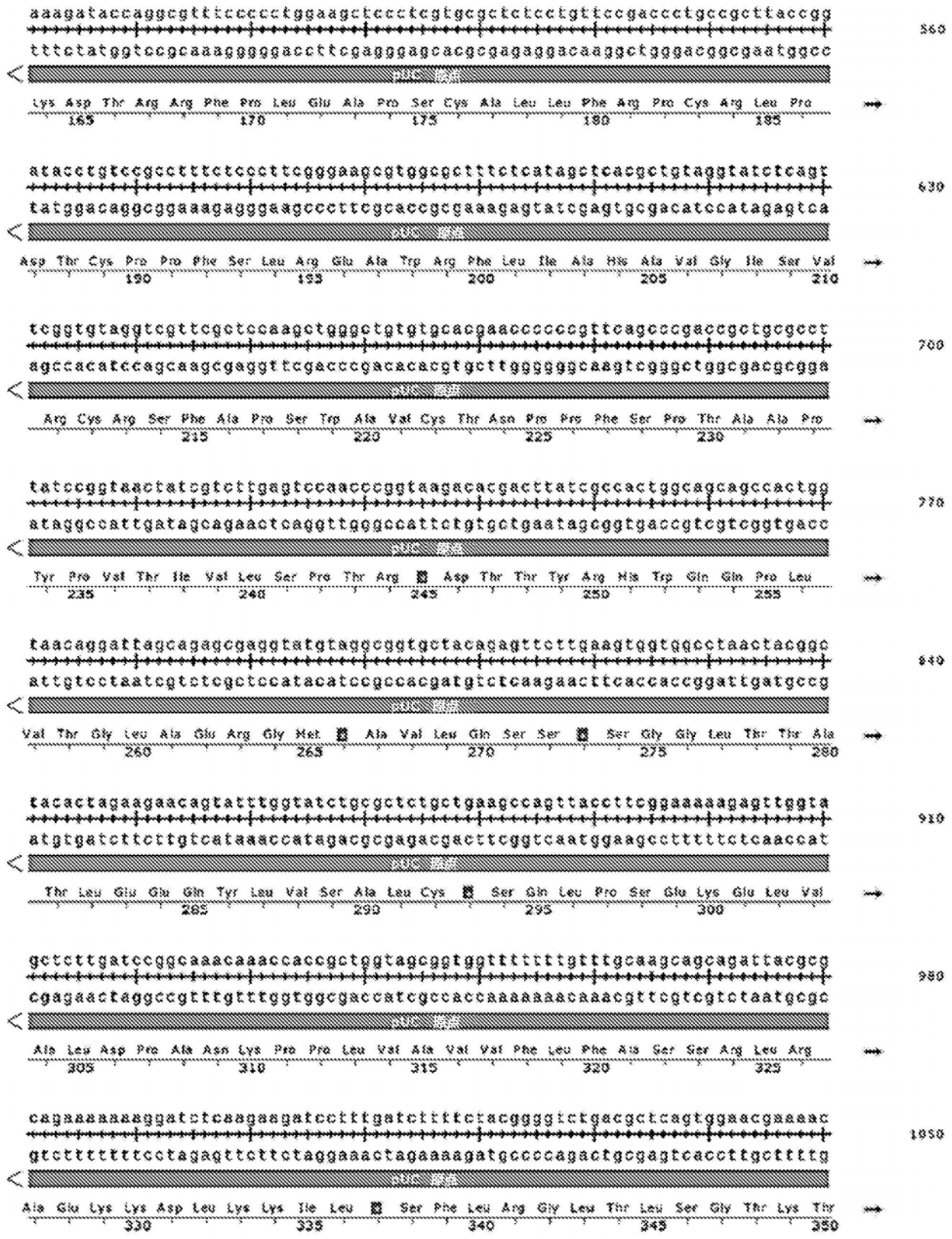

aaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccgg
560
tttctatggtccgcaaaggggaccttcgagggagcacgcgagaggacaaggctgggacggcgaatggcc
pUC 启动
Lys Asp Thr Arg Arg Phe Pro Leu Glu Ala Pro Ser Cys Ala Leu Leu Phe Arg Pro Cys Arg Leu Pro
165 170 175 180 185
atacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagt
630
tatggacaggcggaaagagggaagccctttcgcaccgcgaaagagtatcgagtgcgacatccatagagtca
pUC 启动
Asp Thr Cys Pro Pro Phe Ser Leu Arg Glu Ala Trp Arg Phe Leu Ile Ala His Ala Val Gly Ile Ser Val
190 195 200 205 210
tcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgcct
700
agccacatccagcaagcgaggttcgacccgacacacgtgcttgggggggcaagtcgggctggcgacgcgga
pUC 启动
Arg Cys Arg Ser Phe Ala Pro Ser Trp Ala Val Cys Thr Asn Pro Pro Phe Ser Pro Thr Ala Ala Pro
215 220 225 230
tatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactgg
770
ataggccattgatagcagaactcaggttgggccattctgtgctgaatagcggtgaccgtcgtcggtgacc
pUC 启动
Tyr Pro Val Thr Ile Val Leu Ser Pro Thr Arg X Asp Thr Thr Tyr Arg His Trp Gln Gln Pro Leu
235 240 245 250 255
taacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggc
840
attgtcctaatcgtctcgctccatacatccgccacgatgtctcaagaacttcaccaccggattgatgccg
pUC 启动
Val Thr Gly Leu Ala Glu Arg Gly Met X Ala Val Leu Gln Ser Ser X Ser Gly Gly Leu Thr Thr Ala
260 265 270 275 280
tacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggta
910
atgtgatcttcttgtcataaaccatagacgcgagacgaacttcggtcaatggaagccttttttctcaaccat
pUC 启动
Thr Leu Glu Glu Gln Tyr Leu Val Ser Ala Leu Cys X Ser Gln Leu Pro Ser Glu Lys Glu Leu Val
285 290 295 300
gctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttttgtttgcaagcagcagattacgcg
980
cgagaactaggccgtttgtttggtggcgaccatcgccaccaaaaaaaacaaacgttcgtcgtctaatgcgc
pUC 启动
Ala Leu Asp Pro Ala Asn Lys Pro Pro Leu Val Ala Val Val Phe Leu Phe Ala Ser Ser Arg Leu Arg
305 310 315 320 325
cagaaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaac
1050
gtcttttttttcctagagttcttctaggaaactagaaaaagatgccccagactgcgagtcaccttgcttttg
pUC 启动
Ala Glu Lys Lys Asp Leu Lys Lys Ile Leu X Ser Phe Leu Arg Gly Leu Thr Leu Ser Gly Thr Lys Thr
330 335 340 345 350

图28C(续)

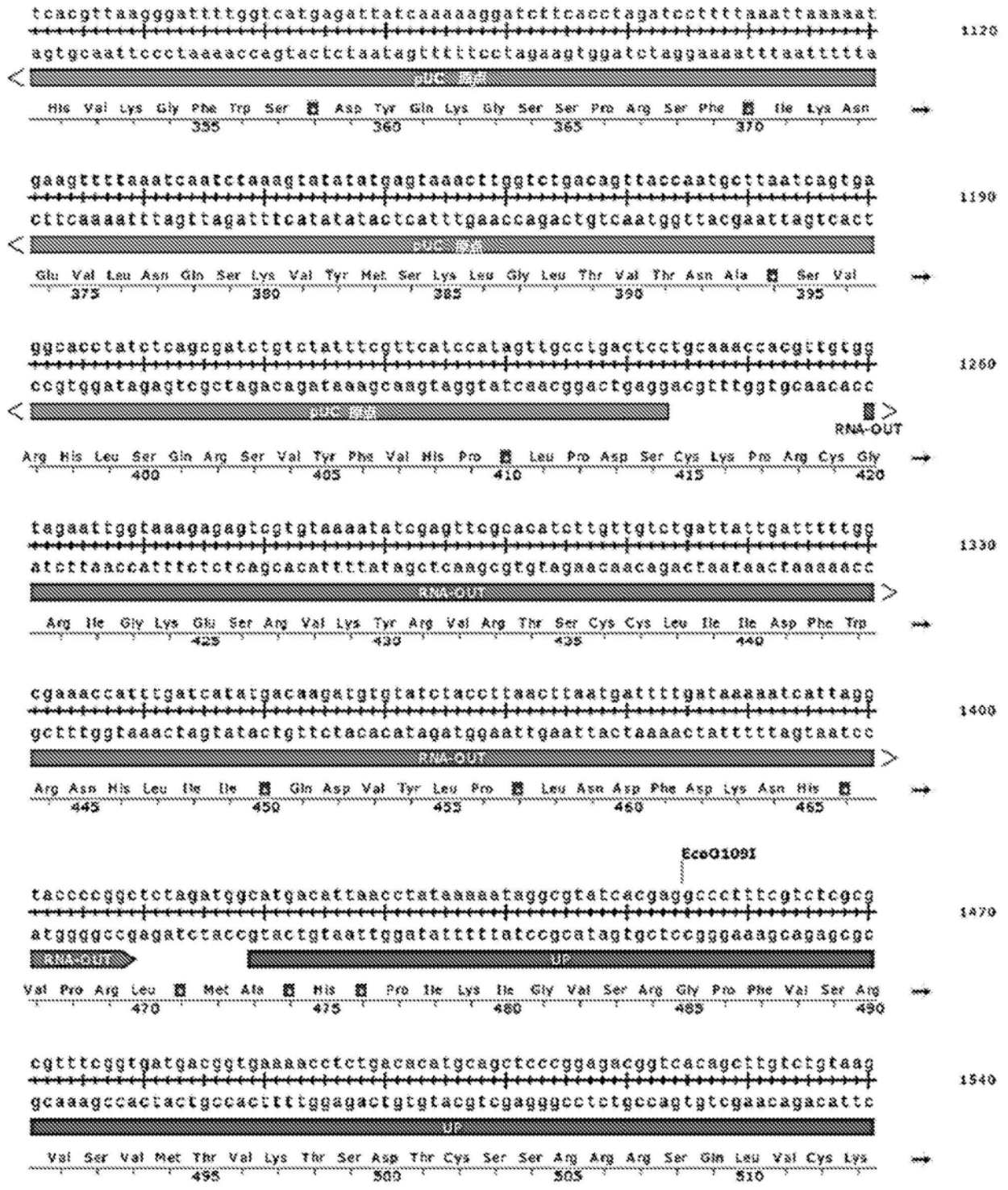


图28C(续)

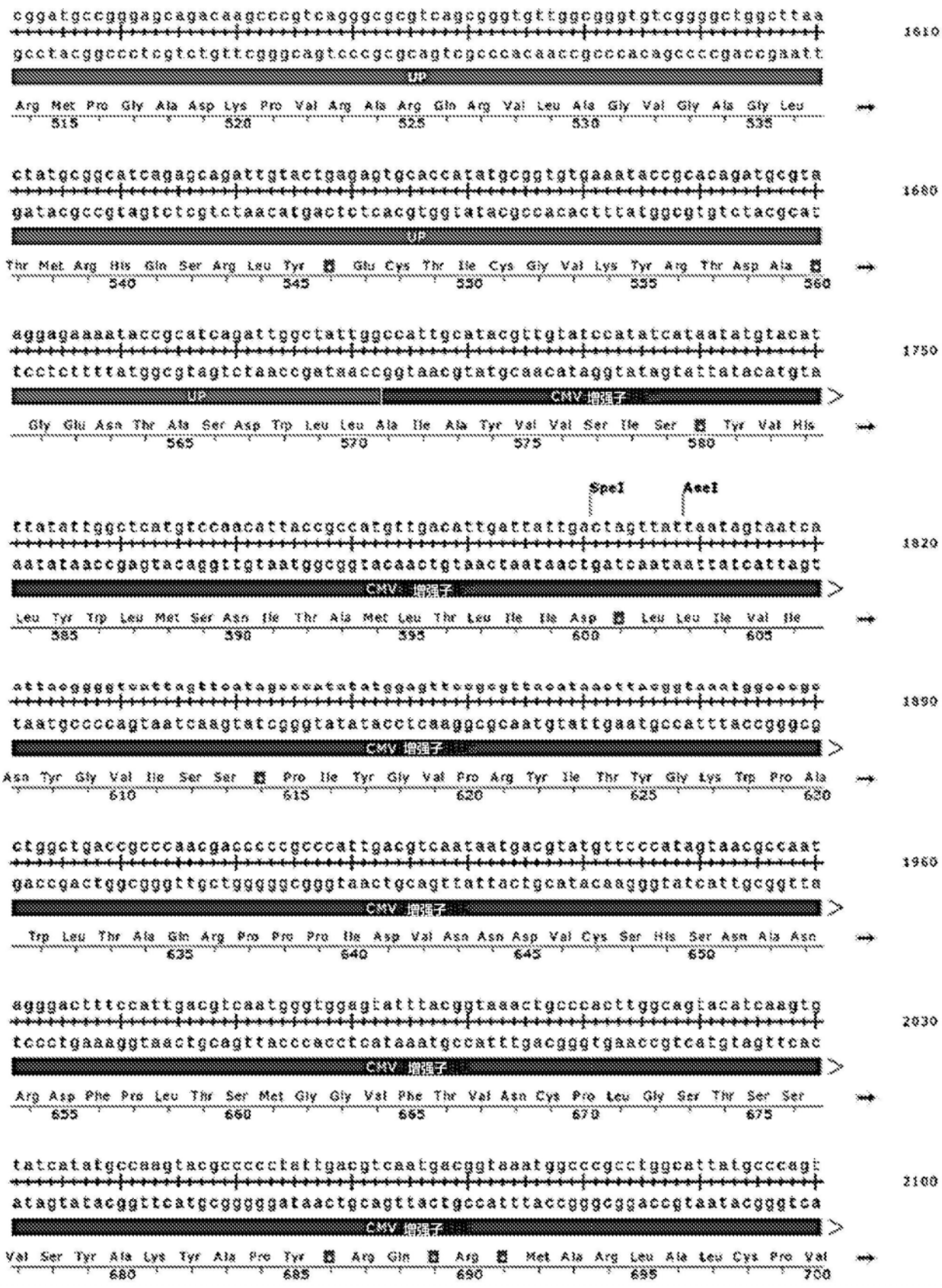


图28C(续)

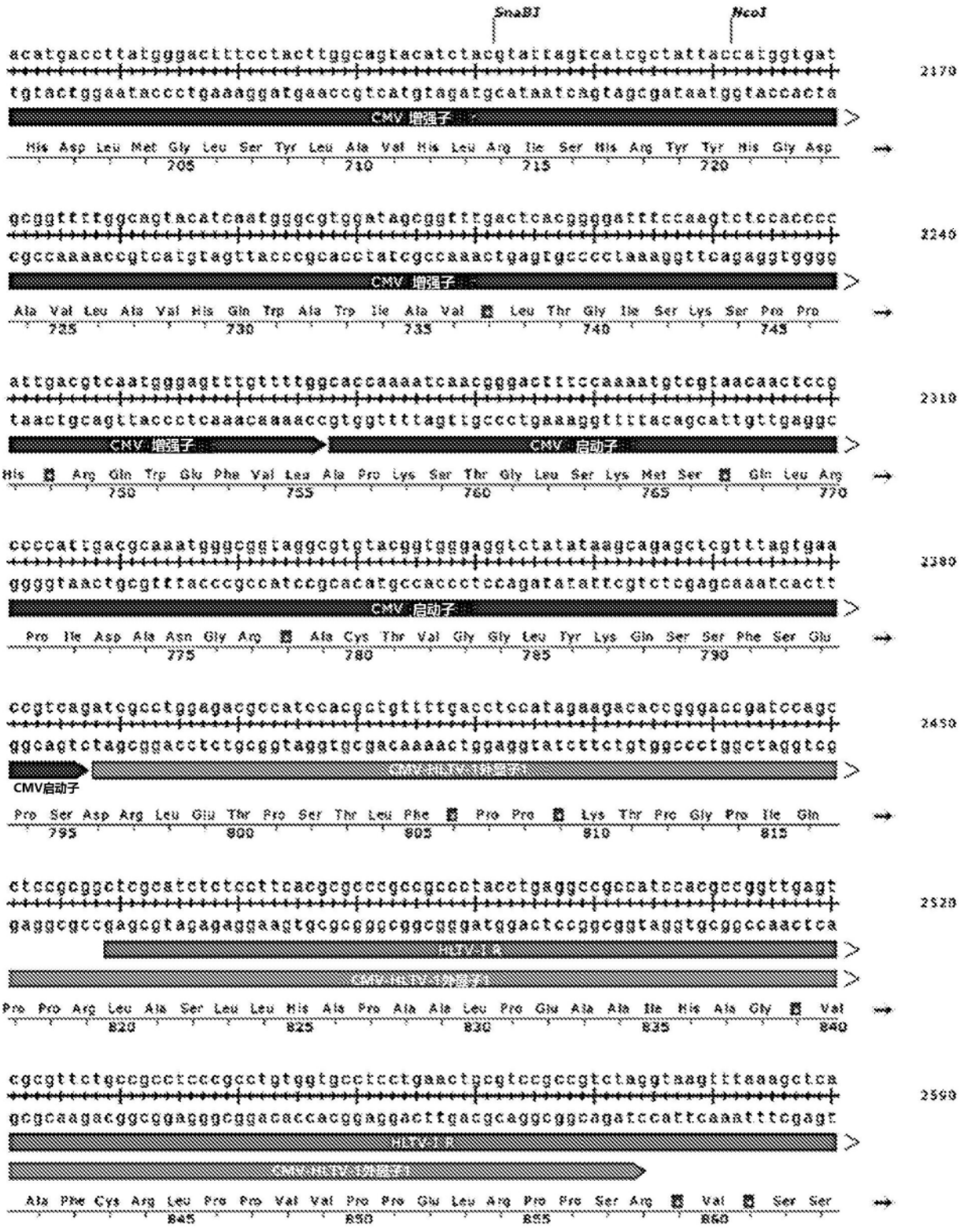

SnaBI
NcoI
CMV 增强子
CMV 启动子
CMV启动子
CMV-HLTV-1R重复序列
HLTV-1R
CMV-HLTV-1R融合序列

图28C(续)

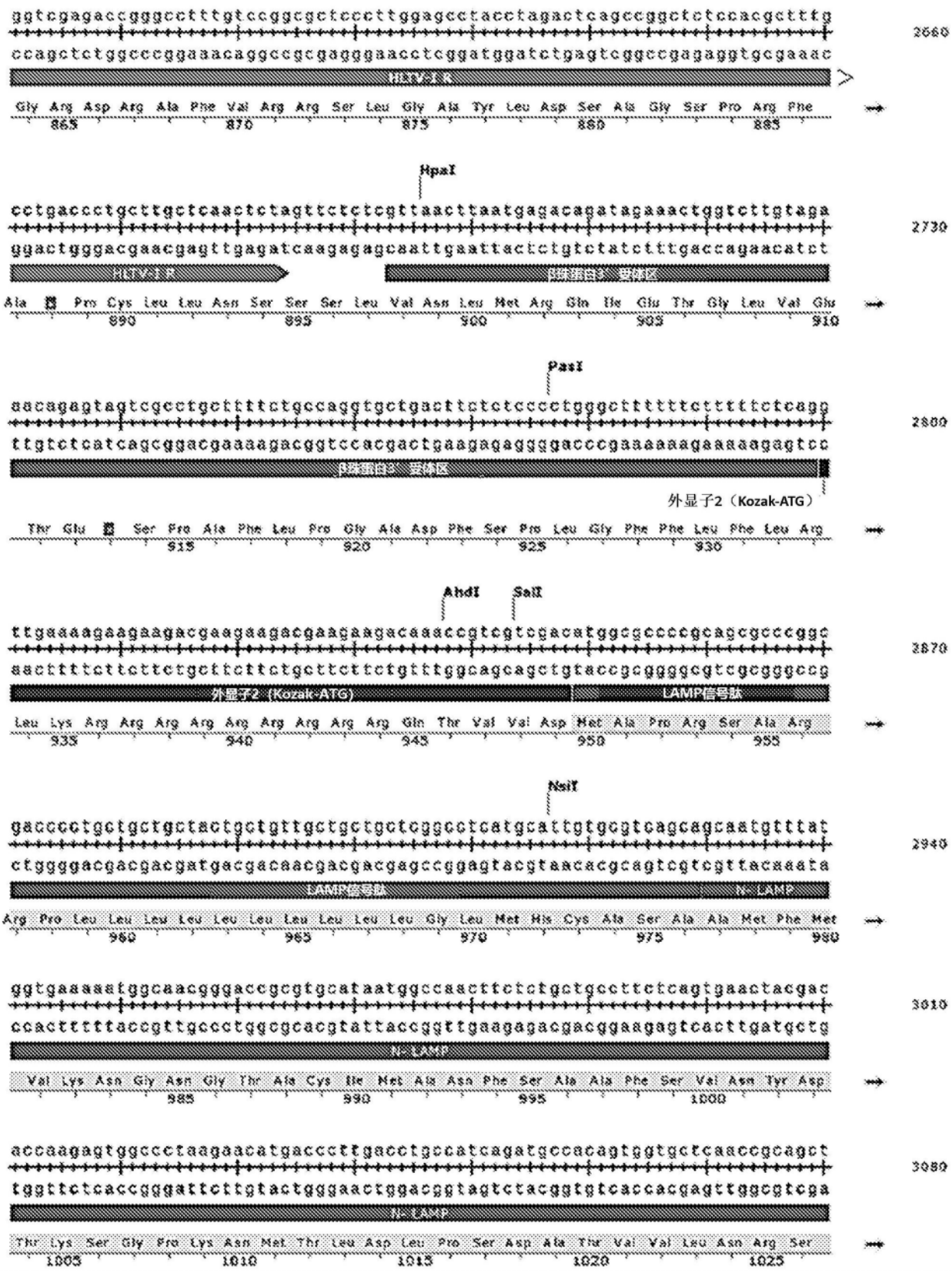

HpaI
PasI
外显子2（Kozak-ATG）
AhdI
SalI
NsiI
2660
2730
2800
2870
2940
3010
3080

图28C(续)

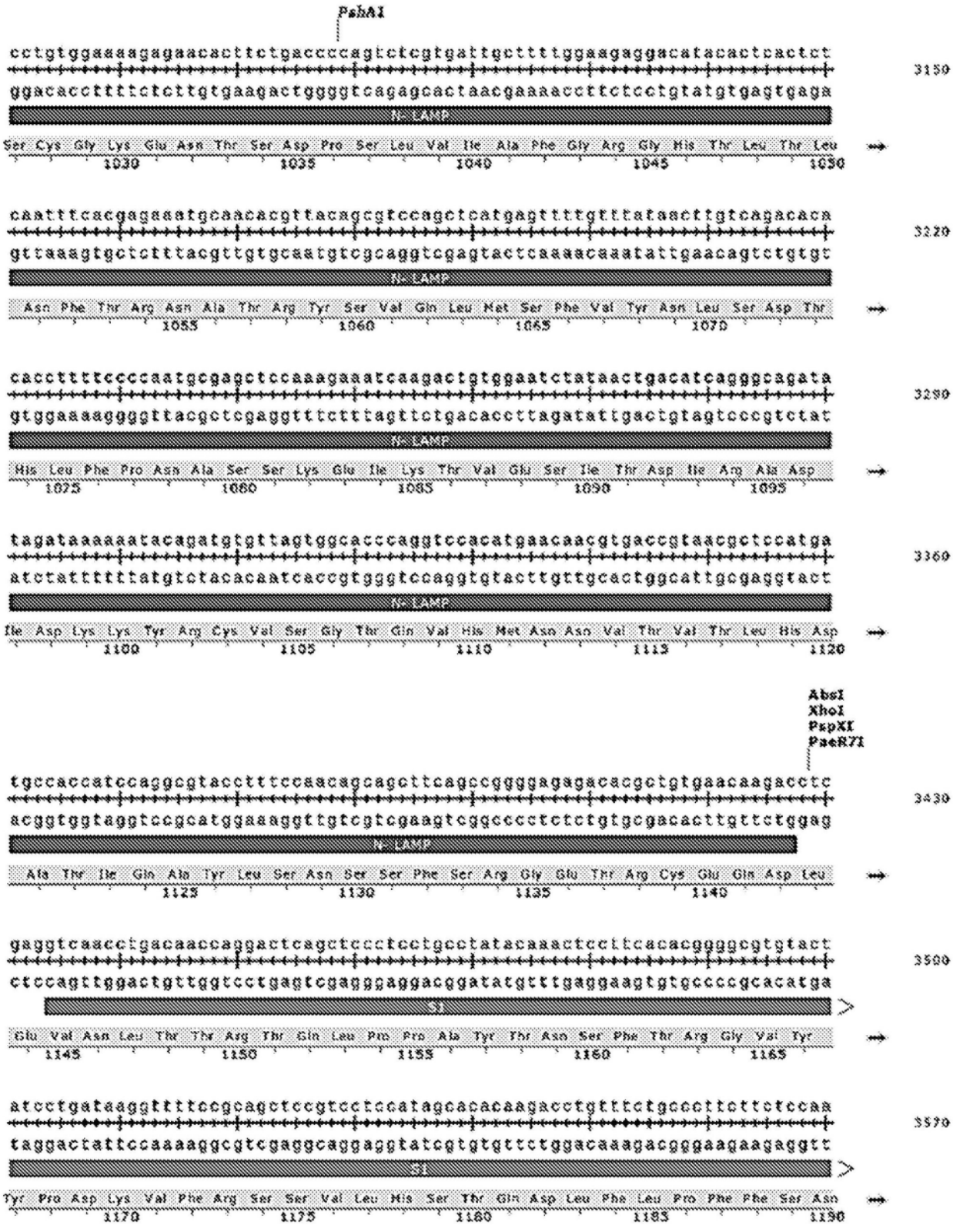

PshAI
cctgtggaaaagagaacacttctgaccccagtctcgtgattgcttttggaagaggacatacactcactct
ggacacctttctctttgtgaagactggggtcagagcactaacgaaaaccttctcctgtatgtgagtgaga
N- LAMP
Ser Cys Gly Lys Glu Asn Thr Ser Asp Pro Ser Leu Val Ile Ala Phe Gly Arg Gly His Thr Leu Thr Leu
1030 1035 1040 1045 1050
3150
caatttcacgagaaatgcaacacgttacagcgtccagctcatgagttttgtttataacttgtcagacaca
gttaaagtgctctttacgttgtgcaatgtcgcaggtcgagtactcaaaacaaatattgaacagtctgtgt
N- LAMP
Asn Phe Thr Arg Asn Ala Thr Arg Tyr Ser Val Gln Leu Met Ser Phe Val Tyr Asn Leu Ser Asp Thr
1055 1060 1065 1070
3220
caccttttccccaatgcgagctccaaagaaatcaagactgtggaatctataactgacatcagggcagata
gtggaaaaggggttacgctcgaggttttctttagttctgacaccttagatattgactgtagtcccgtctat
N- LAMP
His Leu Phe Pro Asn Ala Ser Ser Lys Glu Ile Lys Thr Val Glu Ser Ile Thr Asp Ile Arg Ala Asp
1075 1080 1085 1090 1095
3290
tagataaaaaatacagatgtgttagtggcacccaggtccacatgaacaacgtgaccgtaacgctccatga
atctatttttatgtctacacaatcaccgtgggtccaggtgtacttgttgcactggcattgcgaggtact
N- LAMP
Ile Asp Lys Lys Tyr Arg Cys Val Ser Gly Thr Gln Val His Met Asn Asn Val Thr Val Thr Leu His Asp
1100 1105 1110 1115 1120
3360
AbsI
XhoI
PspXI
PsaR7I
tgccaccatccaggcgtacctttccaacagcagcttcagccggggagagacacgctgtgaacaagacctc
acggtggtaggtccgcatggaaaggttgtcgtcgaagtcggcccctctctgtgcgacacttgttctggag
N- LAMP
Ala Thr Ile Gln Ala Tyr Leu Ser Asn Ser Ser Phe Ser Arg Gly Glu Thr Arg Cys Glu Gln Asp Leu
1125 1130 1135 1140
3430
gaggtcaacctgacaaccaggactcagctcccttcctgcctatacaaactccttcacacgggggcgtgtact
ctccagttggactgttggtcctgagtcgagggaggacggatatgtttgaggaagtgtgccccgcacatga
S1
Glu Val Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe Thr Arg Gly Val Tyr
1145 1150 1155 1160 1165
3500
atcctgataaggttttccgcagctccgtcctccatagcacacaagacctgtttctgccccttcttctccaa
taggactattccaaaaggcgtcgaggcaggaggtatcgtgtgttctggacaaagacgggaagaagaggtt
S1
Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn
1170 1175 1180 1185 1190
3570

图28C(续)

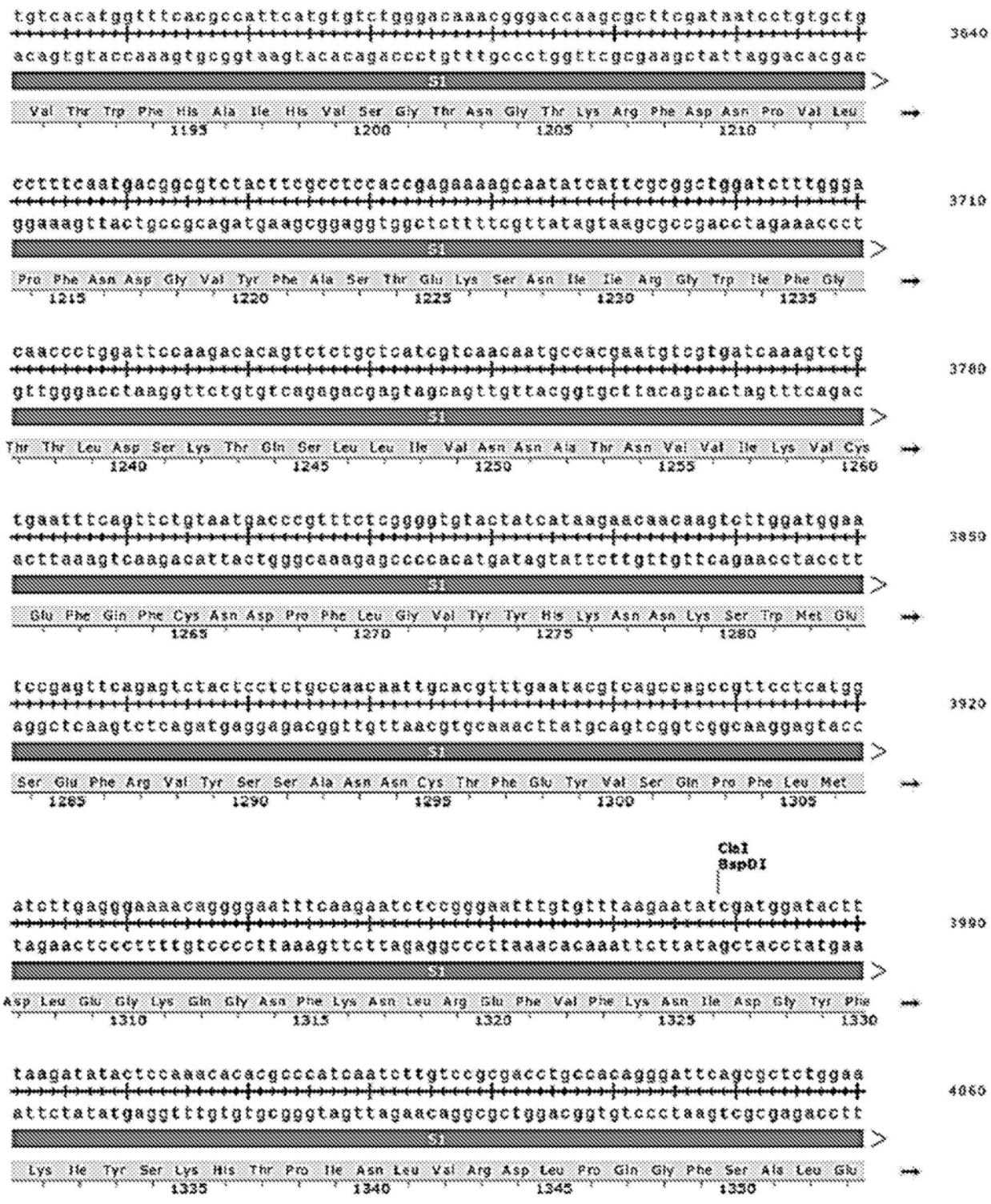


图28C(续)



图29A

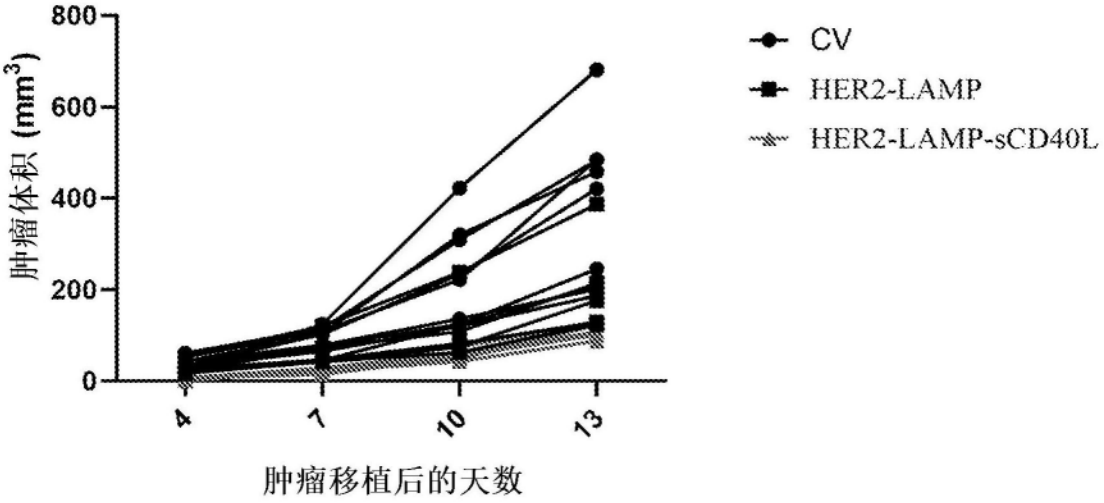


图29B

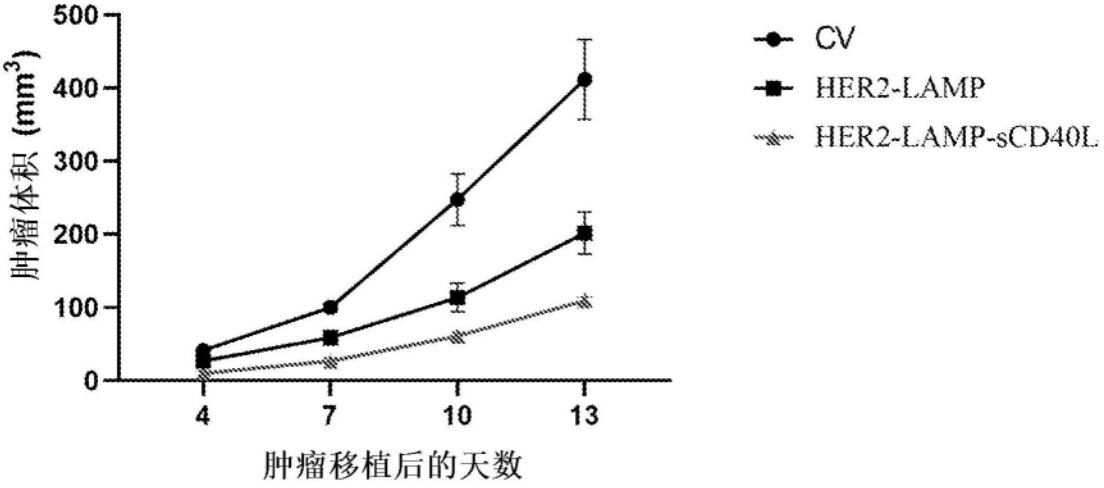


图29C

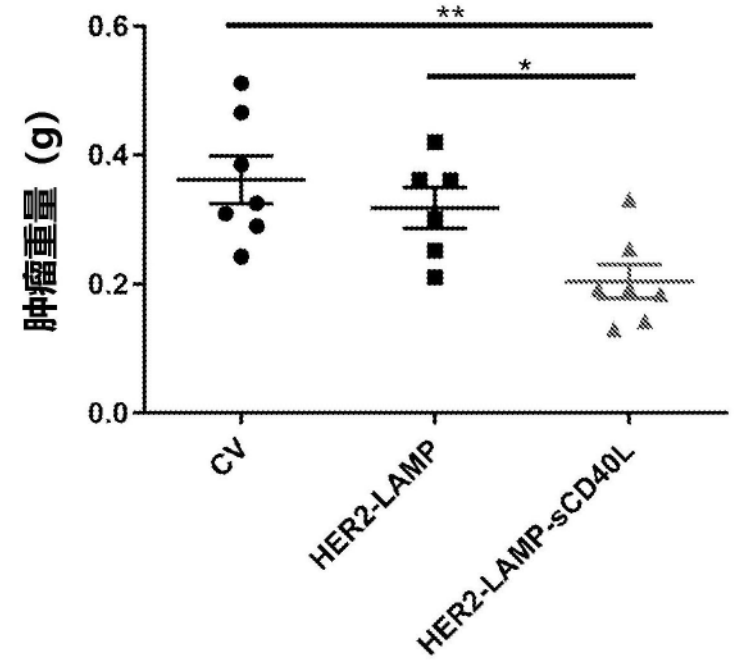

**
*
0.6
0.4
0.2
0.0
肿瘤重量（g）
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图29D

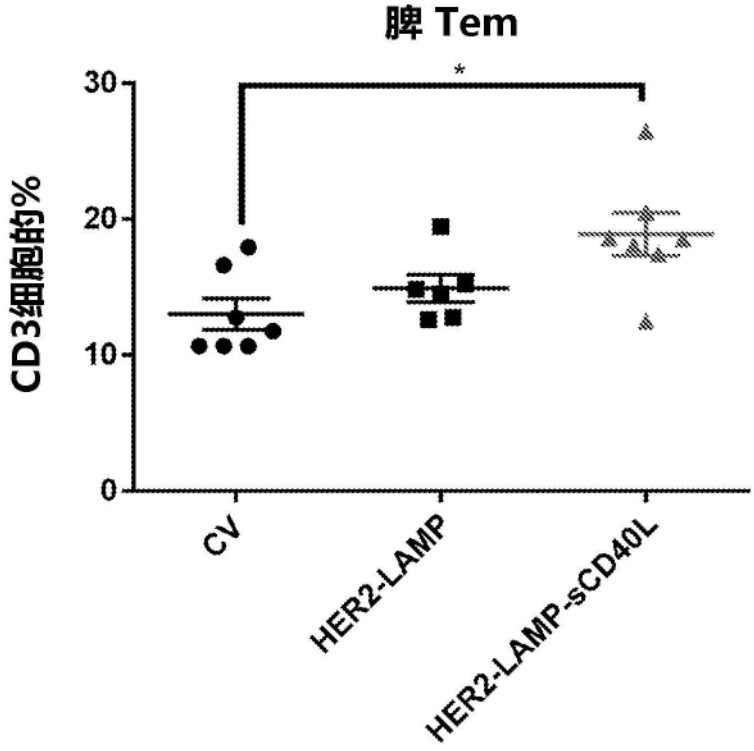

脾 Tem
*
30
20
10
0
CD3细胞的%
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图30

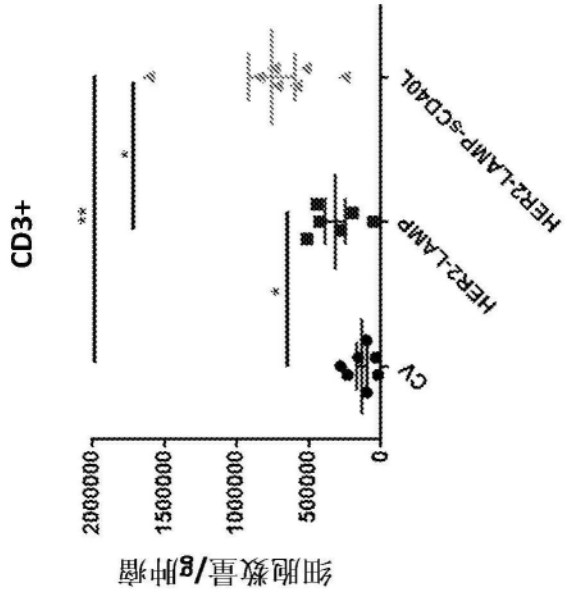

CD3+
细胞数量/g肿瘤
2000000
1500000
1000000
500000
0
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
**
*
*

图31A

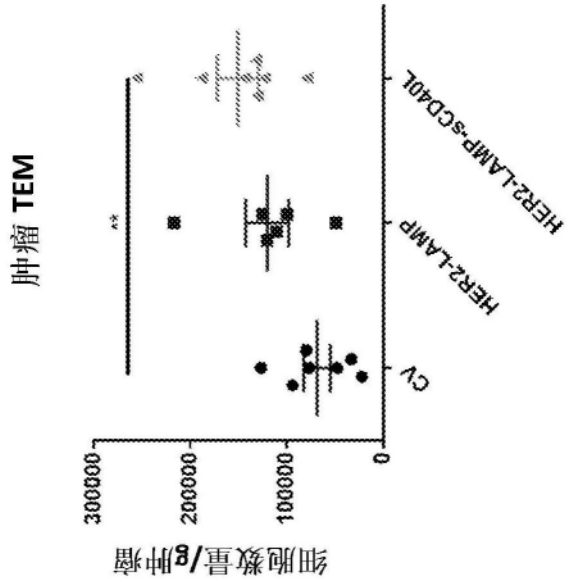

肿瘤 TEM
细胞数量/g肿瘤
300000
200000
100000
0
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
**

图31B

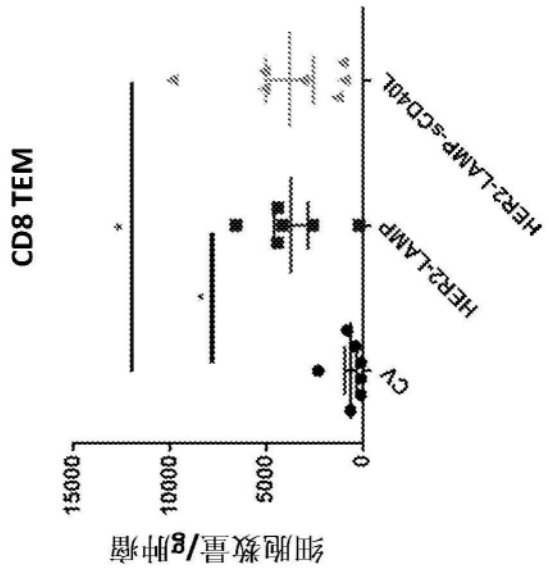

CD8 TEM
细胞数量/g肿瘤
15000
10000
5000
0
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图31V

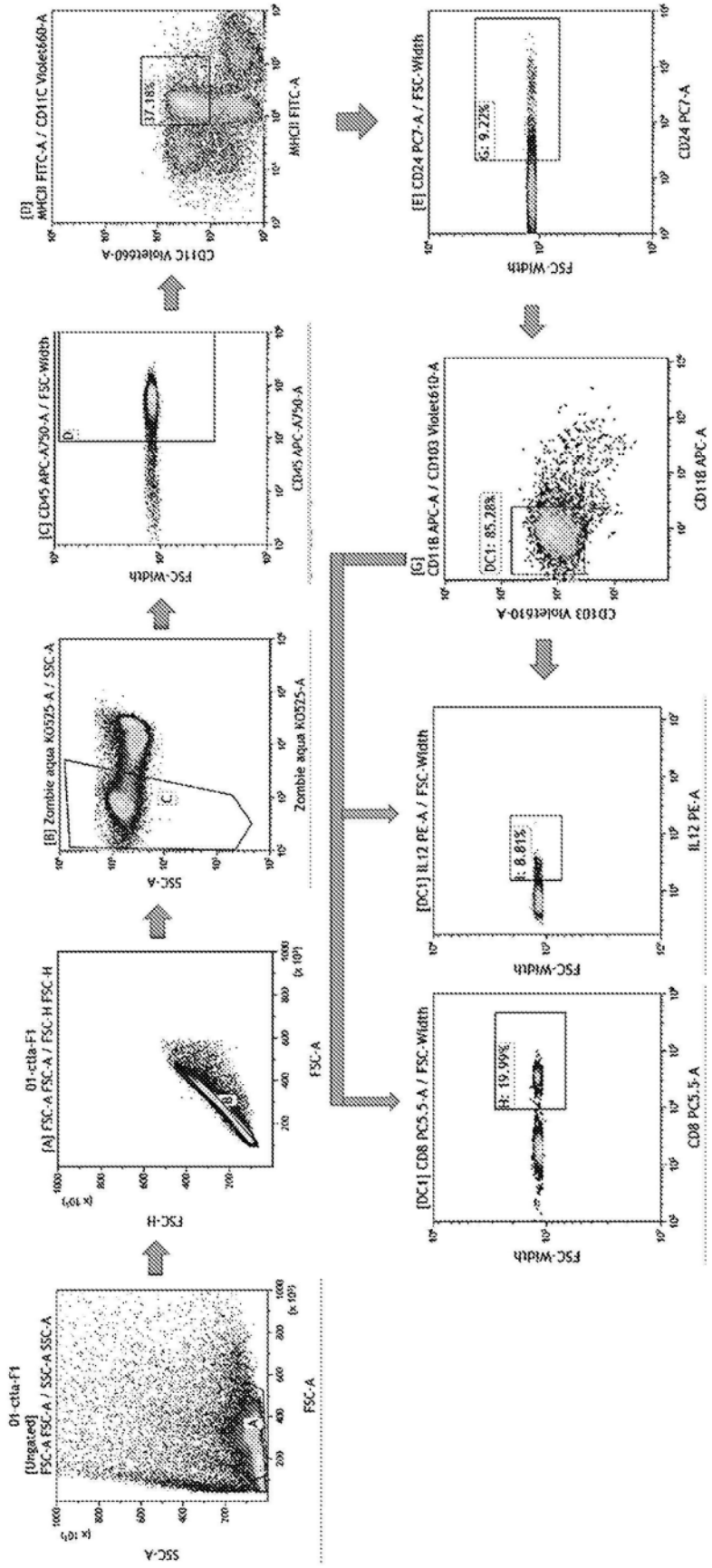

01-ctla-F1
[Ungated]
FSC-A FSC-A / SSC-A SSC-A
SSC-A
FSC-A
[A] FSC-A FSC-A / FSC-H FSC-H
FSC-H
FSC-A
[B] Zombie aqua KO525-A / SSC-A
SSC-A
Zombie aqua KO525-A
[C] CD45 APC-A750-A / FSC-Width
FSC-Width
CD45 APC-A750-A
[D] MHCII FITC-A / CD11C Violet660-A
37.18%
CD11C Violet660-A
MHCII FITC-A
[E] CD24 PC7-A / FSC-Width
6: 9.22%
FSC-Width
CD24 PC7-A
[G] CD118 APC-A / CD103 Violet610-A
DC1: 85.28%
CD103 Violet610-A
CD118 APC-A
[DC1] IL12 PE-A / FSC-Width
8: 8.81%
FSC-Width
IL12 PE-A
[DC1] CD8 PC5.5-A / FSC-Width
8: 19.99%
FSC-Width
CD8 PC5.5-A

图32A

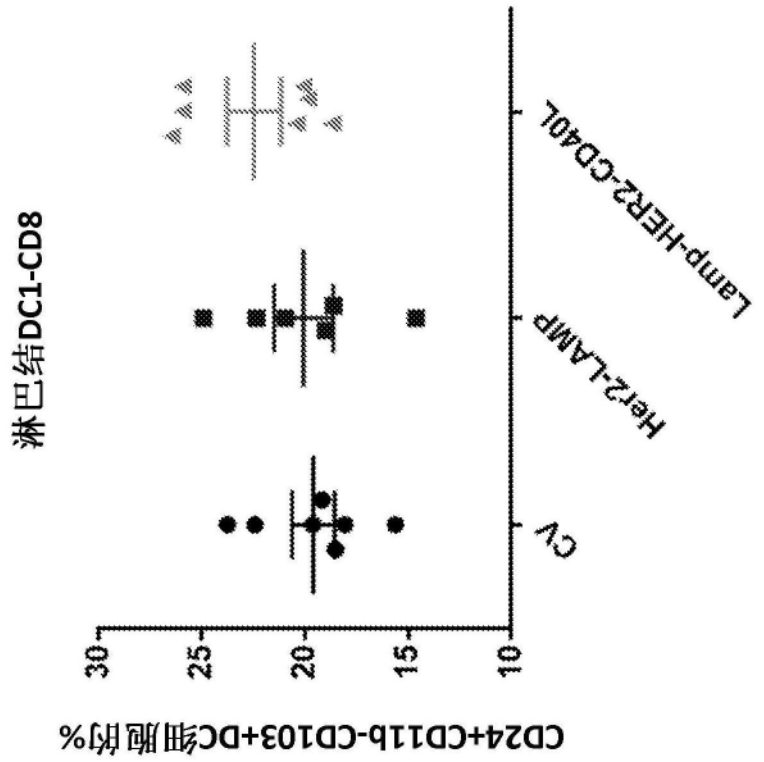

淋巴结DC1-CD8
CD24+CD11b-CD103+DC细胞的%
30
25
20
15
10
CV
Her2-LAMP
Lamp-HER2-CD40L

图32B

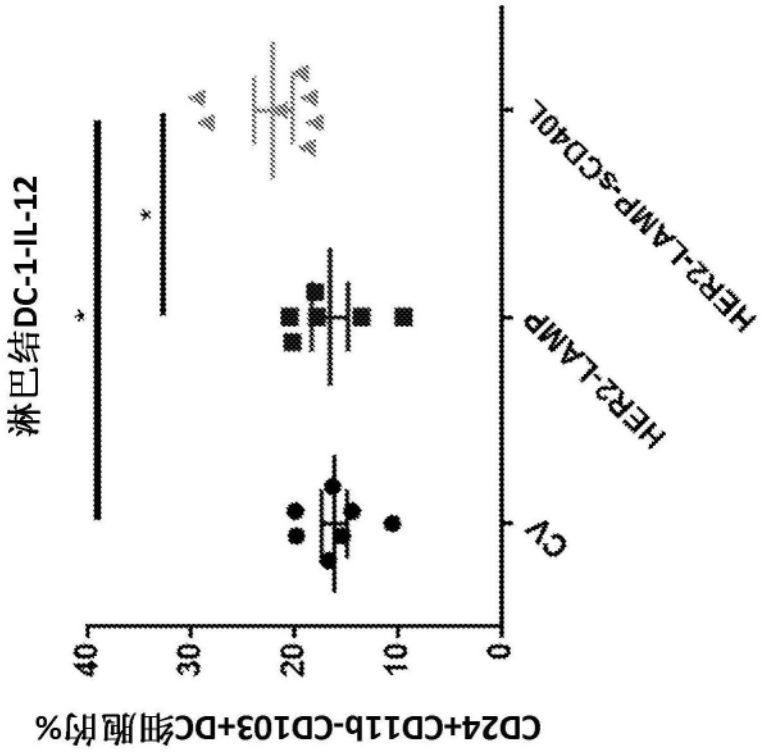

淋巴结DC-1-IL-12
CD24+CD11b-CD103+DC细胞的%
40
30
20
10
0
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图32C

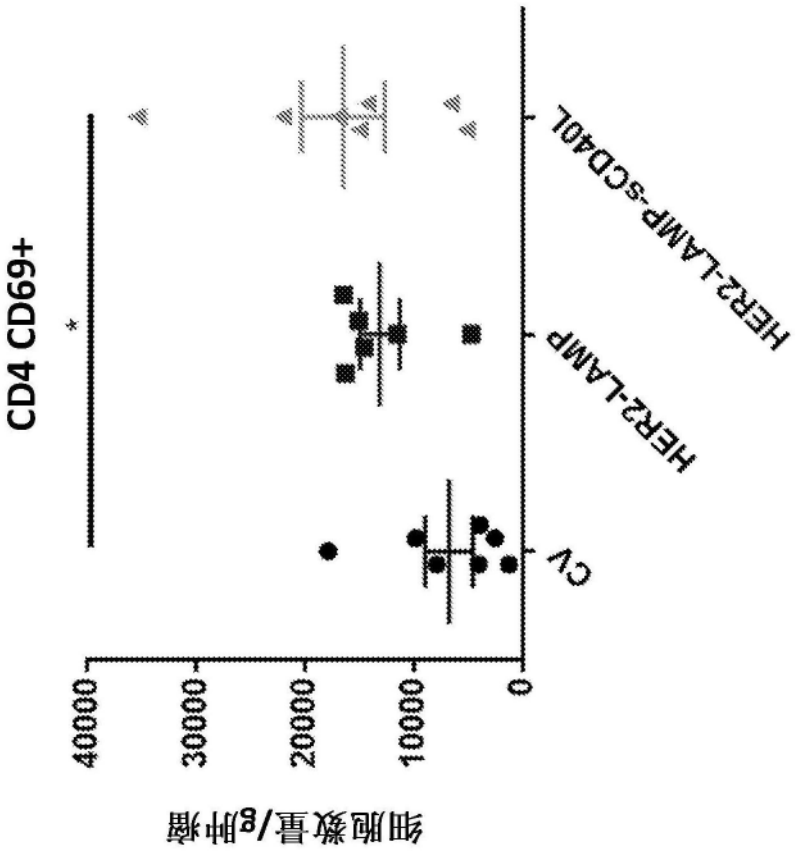

CD4 CD69+
细胞数量/g肿瘤
40000
30000
20000
10000
0
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图33A

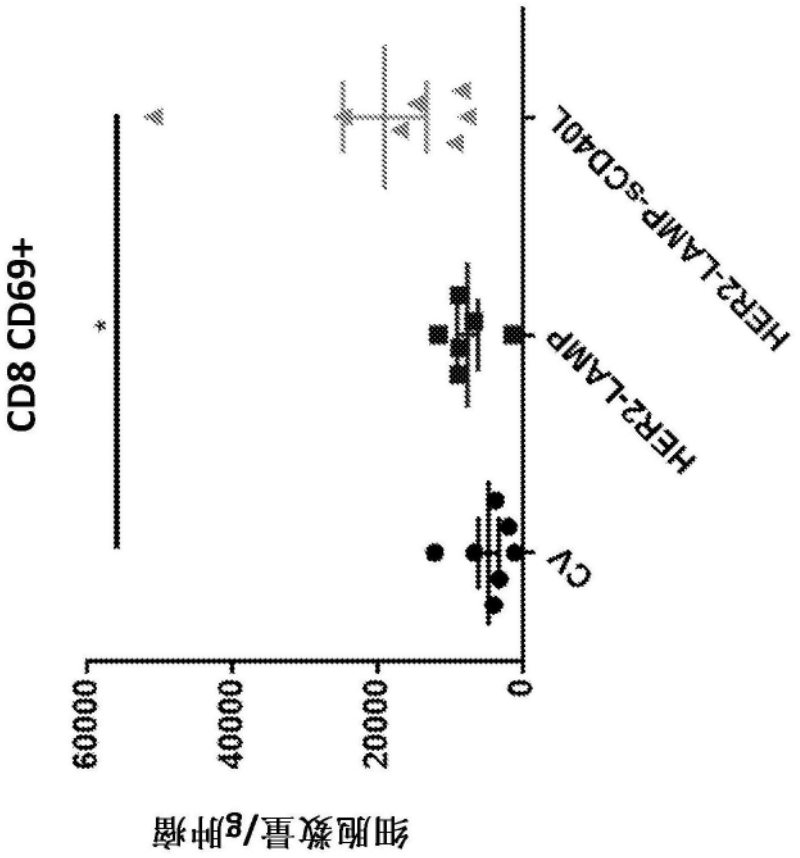

细胞数量/g肿瘤
60000
40000
20000
0
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
CD8 CD69+
*

图33B

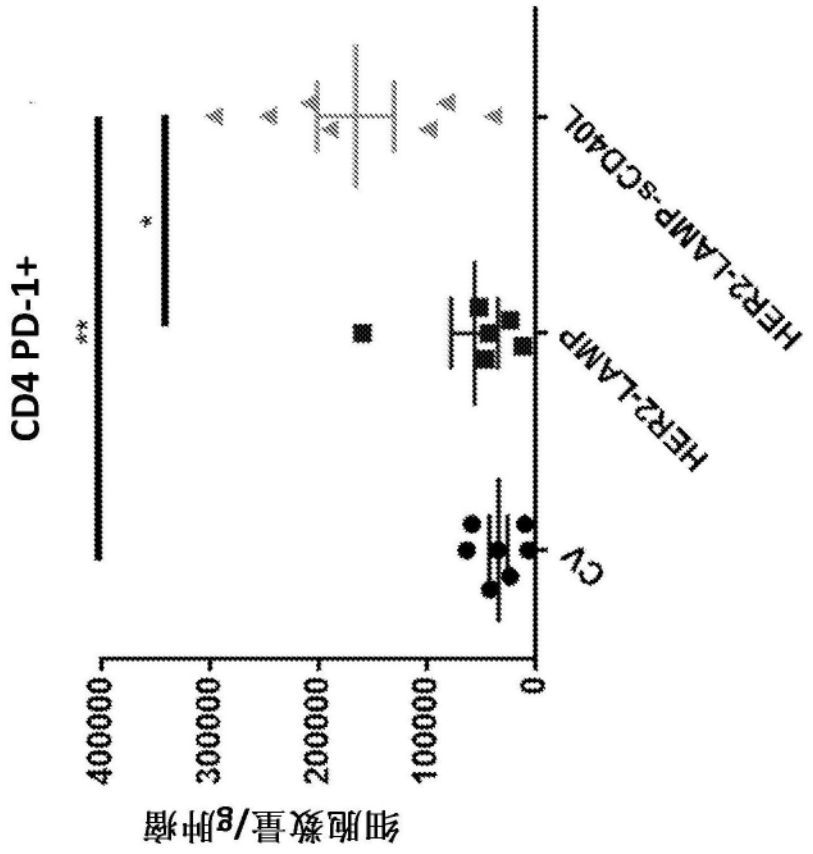

CD4 PD-1+
细胞数量/g肿瘤
400000
300000
200000
100000
0
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
**
*

图34A

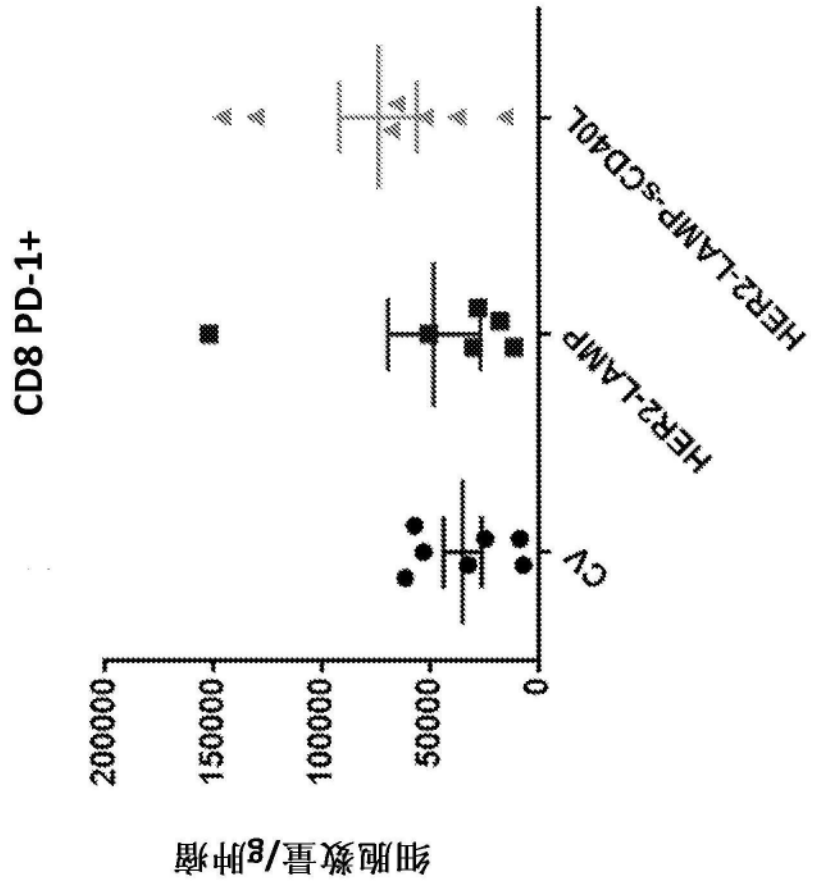

CD8 PD-1+
细胞数量/g肿瘤
200000
150000
100000
50000
0
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图34B

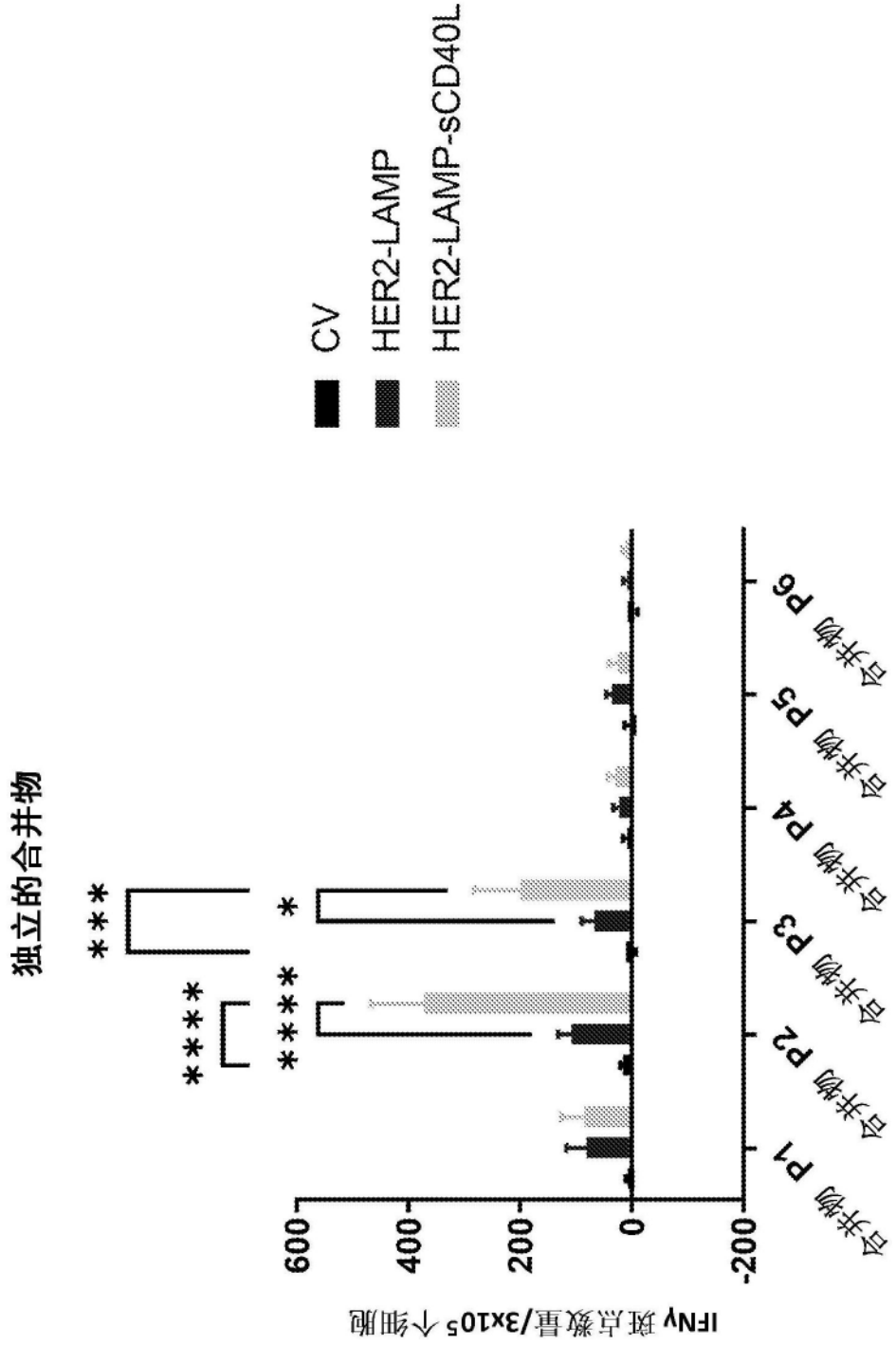

CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
IFNγ 斑点数量/3x10⁵ 个细胞
600
400
200
0
-200
合并物 P1
合并物 P2
合并物 P3
合并物 P4
合并物 P5
合并物 P6
独立的合并物
****
*****
*****
*

图35

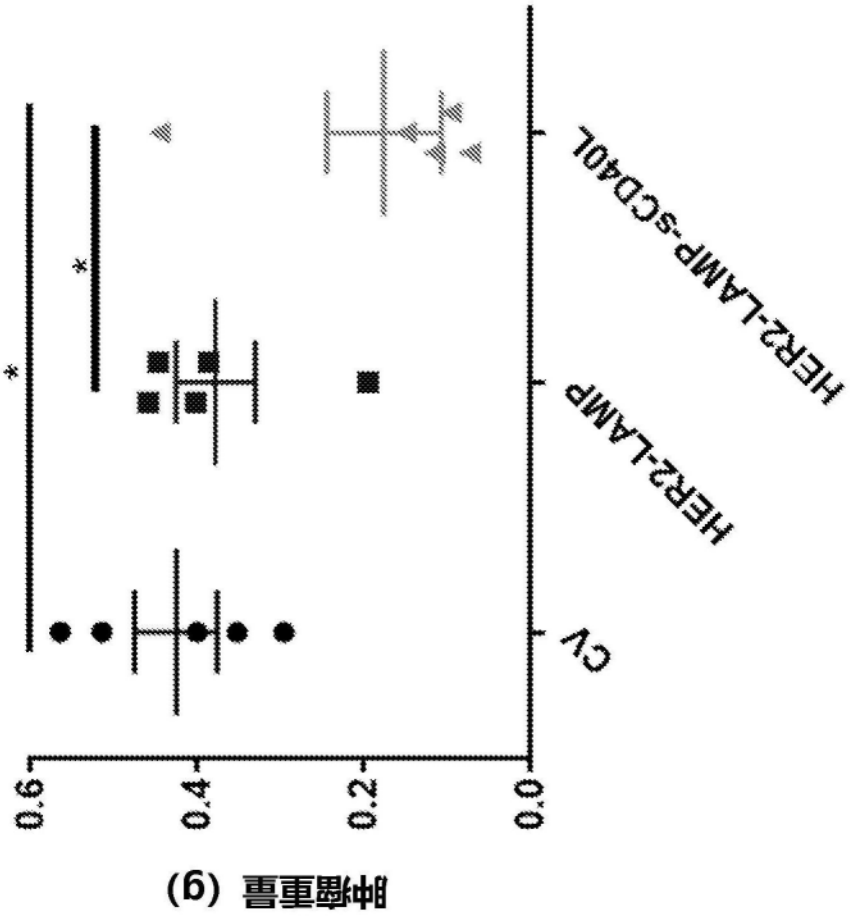

肿瘤重量 (g)
0.0
0.2
0.4
0.6
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
*
*
*

图36

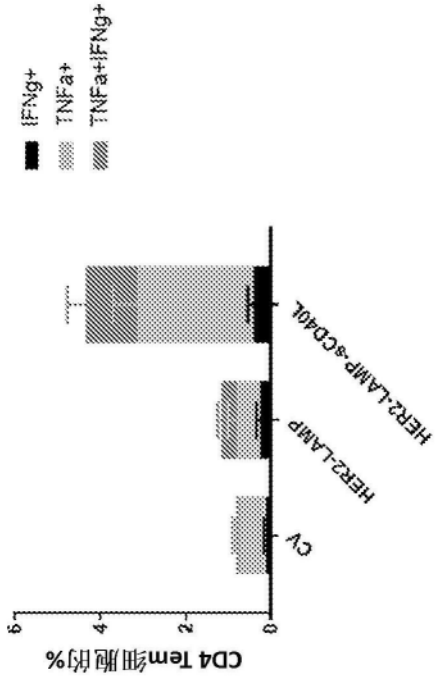

CD4 Tem细胞的%
0
2
4
6
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
IFNg+
TNFa+
TNFa+IFNg+

图37A

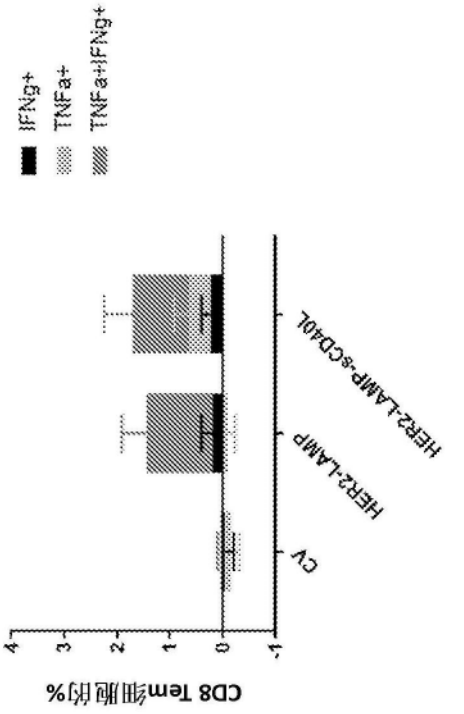

IFNg+
TNFa+
TNFa+IFNg+
CD8 Tem细胞的%
4
3
2
1
0
-1
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L

图37B

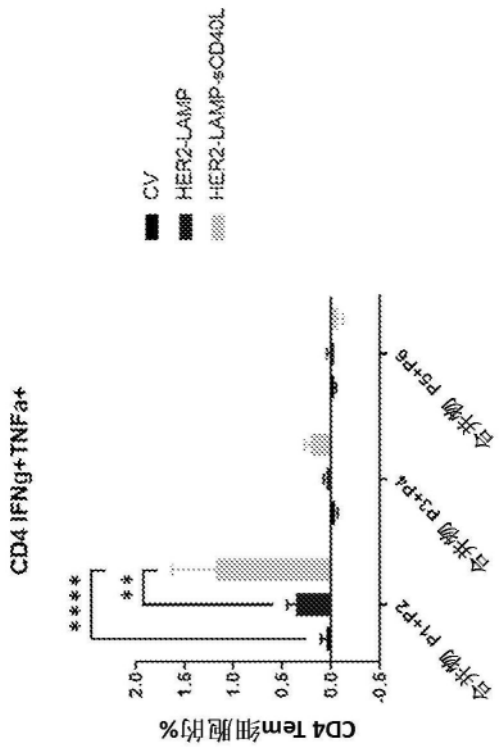

CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
CD4 IFNg+TNFa+
CD4 Tem细胞的%
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
****
**
合并肽 P1+P2
合并肽 P3+P4
合并肽 P5+P6

图37C

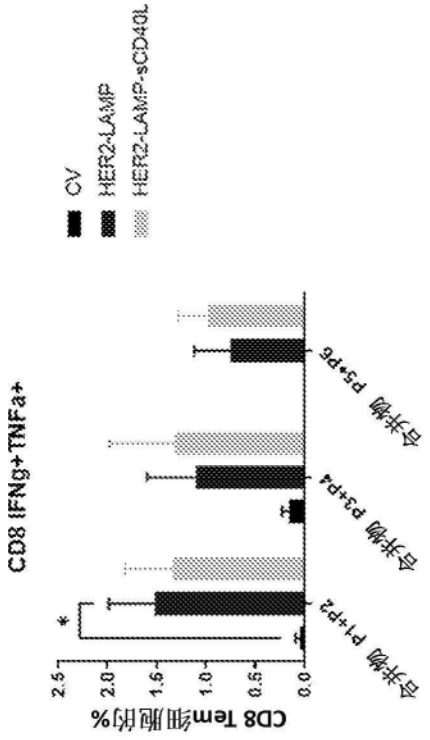

CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
CD8 IFNg+TNFa+
CD8 Tem细胞的%
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
P1+P2
P3+P4
P5+P6
未刺激

图37D

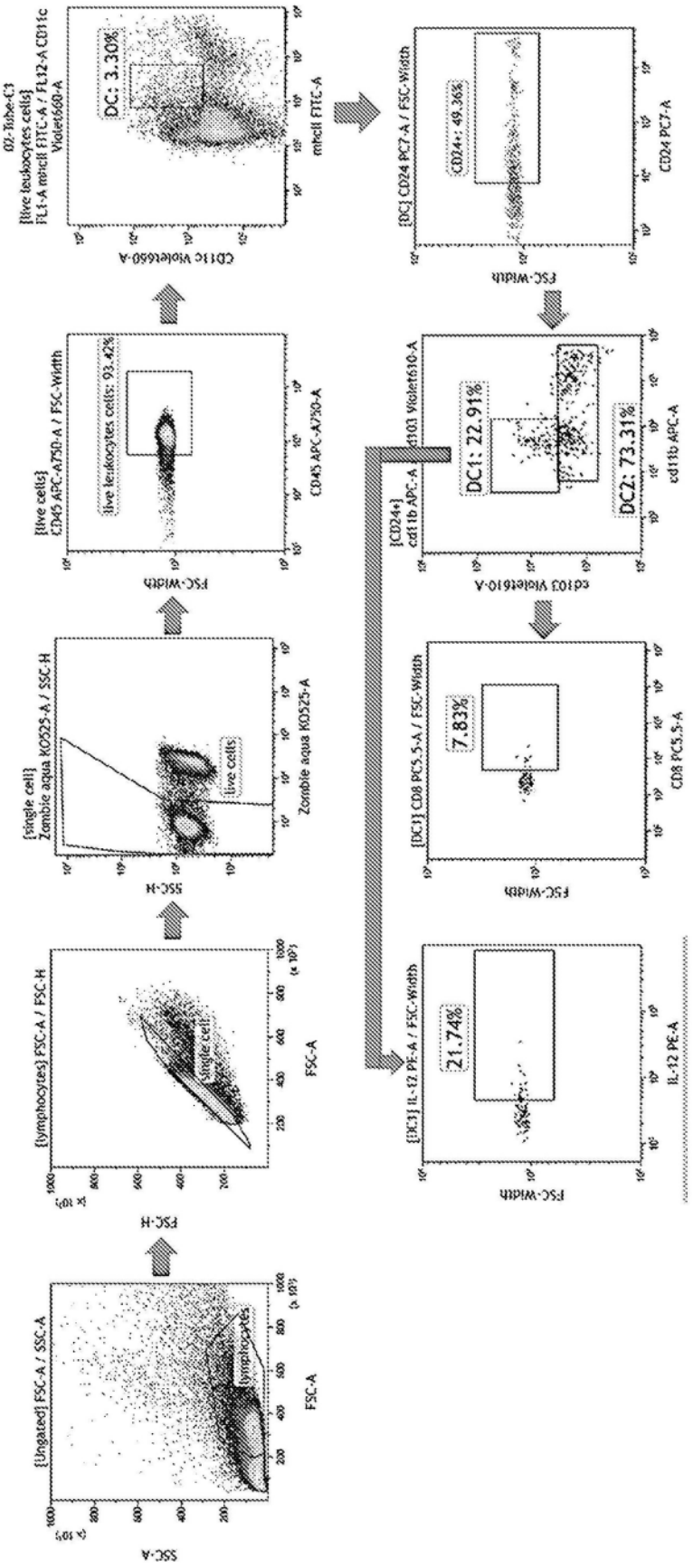

{Ungated} FSC-A / SSC-A
lymphocytes
FSC-A
SSC-A
{lymphocytes} FSC-A / FSC-H
single cell
FSC-H
FSC-A
{single cell}
Zombie aqua KO525-A / SSC-H
live cells
SSC-H
Zombie aqua KO525-A
{live cells}
CD45 APC-A750-A / FSC-Width
live leukocytes cells: 93.42%
FSC-Width
CD45 APC-A750-A
02-Tube-C3
{live leukocytes cells}
FL3-A mtcll FITC-A / FL12-A CD11c Violet660-A
DC: 3.30%
CD11c Violet660-A
mtcll FITC-A
{DC} CD24 PC7-A / FSC-Width
CD24+: 49.36%
FSC-Width
CD24 PC7-A
{DC1} CD8 PC5.5-A / FSC-Width
7.83%
FSC-Width
CD8 PC5.5-A
{DC2}
cd11b APC-A / cd103 Violet610-A
DC1: 22.91%
DC2: 73.31%
cd103 Violet610-A
cd11b APC-A
{DC3} IL-12 PE-A / FSC-Width
21.74%
FSC-Width
IL-12 PE-A

图38A

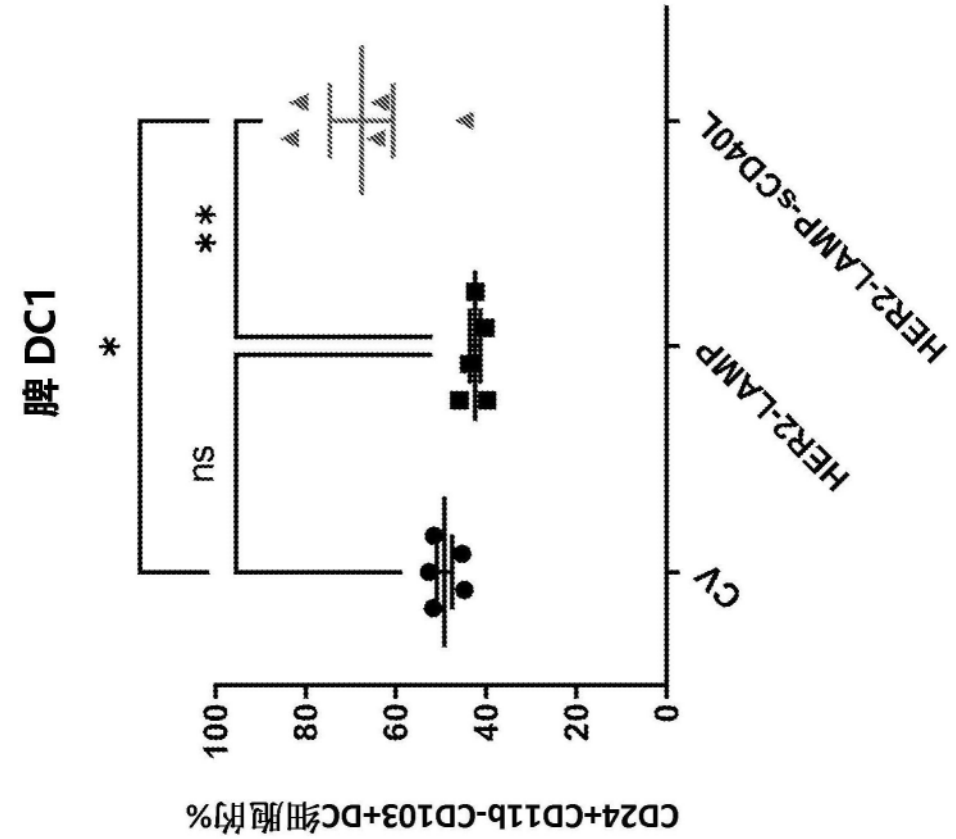

脾 DC1
CD24+CD11b-CD103+DC细胞的%
100
80
60
40
20
0
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
ns
*
**

图38B

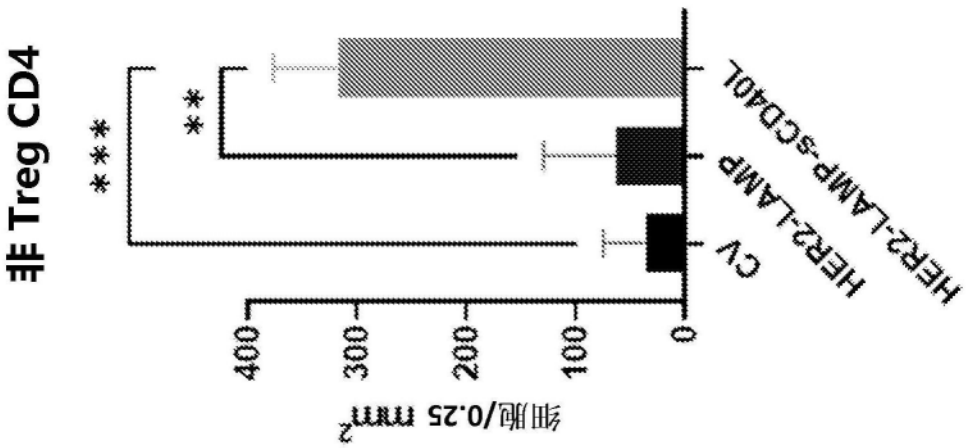

非 Treg CD4
细胞/0.25 mm²
400
300
200
100
0
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-sCD40L
***
**

图39A

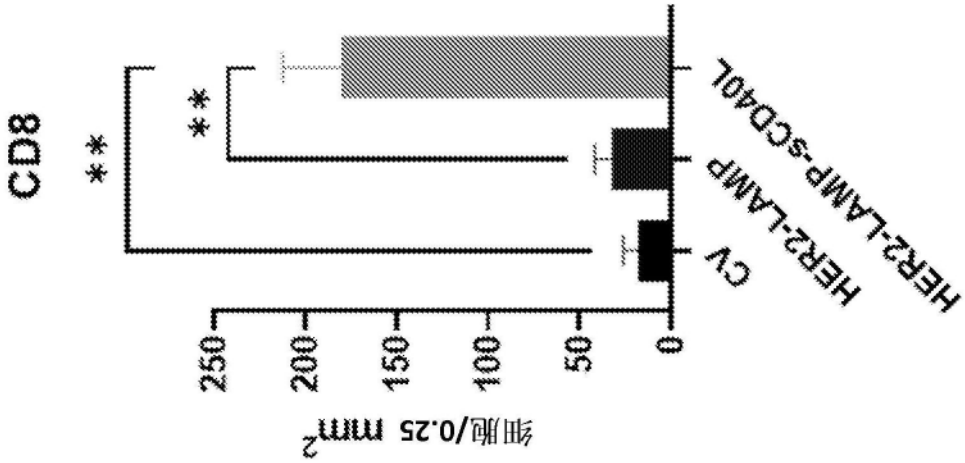

CD8
**
**
HER2-LAMP-sCD40L
HER2-LAMP
CV
0
50
100
150
200
250
细胞/0.25 mm²

图39B

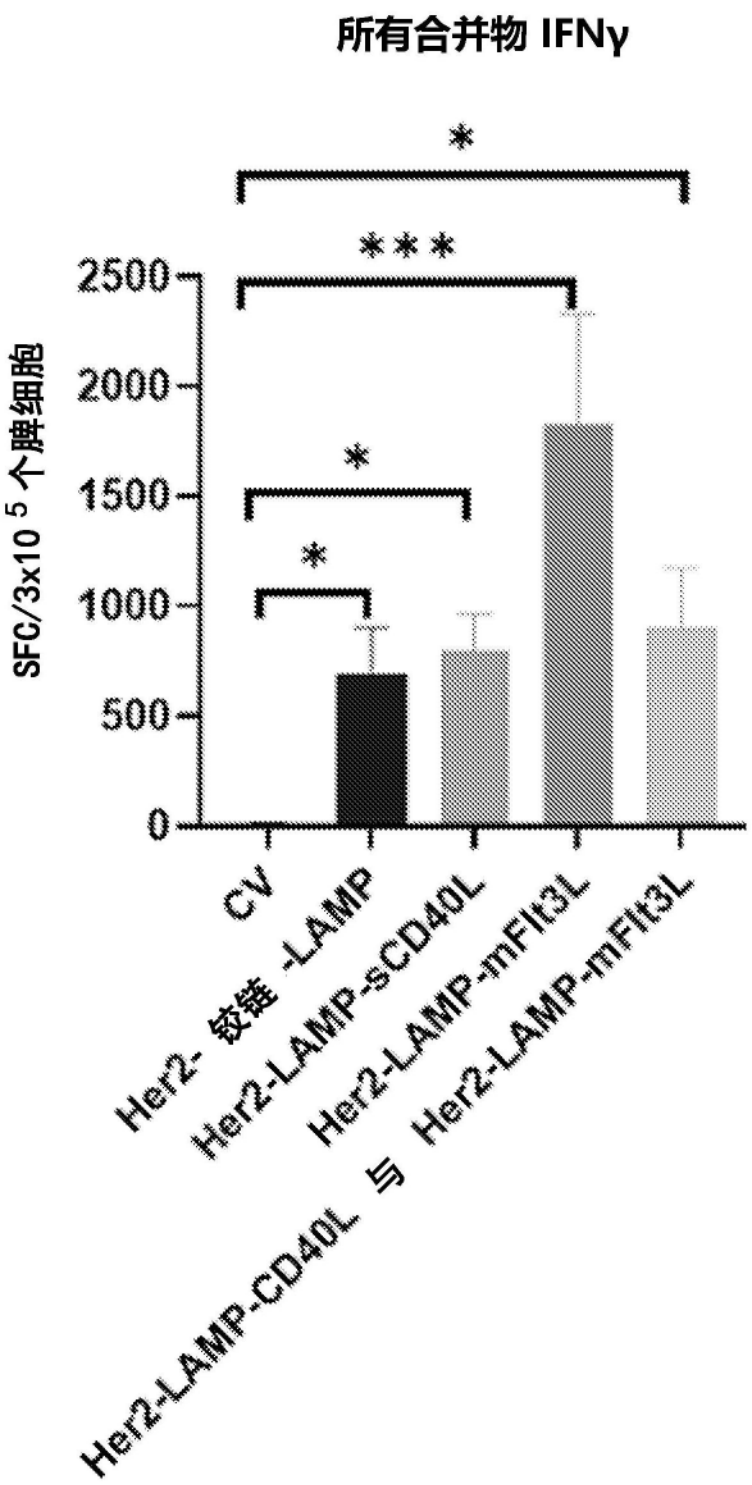

所有合并物 IFNγ
SFC/3x10 5 个脾细胞
2500
2000
1500
1000
500
0
*
***
*
*
CV
Her2- 铰链 -LAMP
Her2-LAMP-sCD40L
Her2-LAMP-mFlt3L
Her2-LAMP-CD40L 与 Her2-LAMP-mFlt3L

图40A

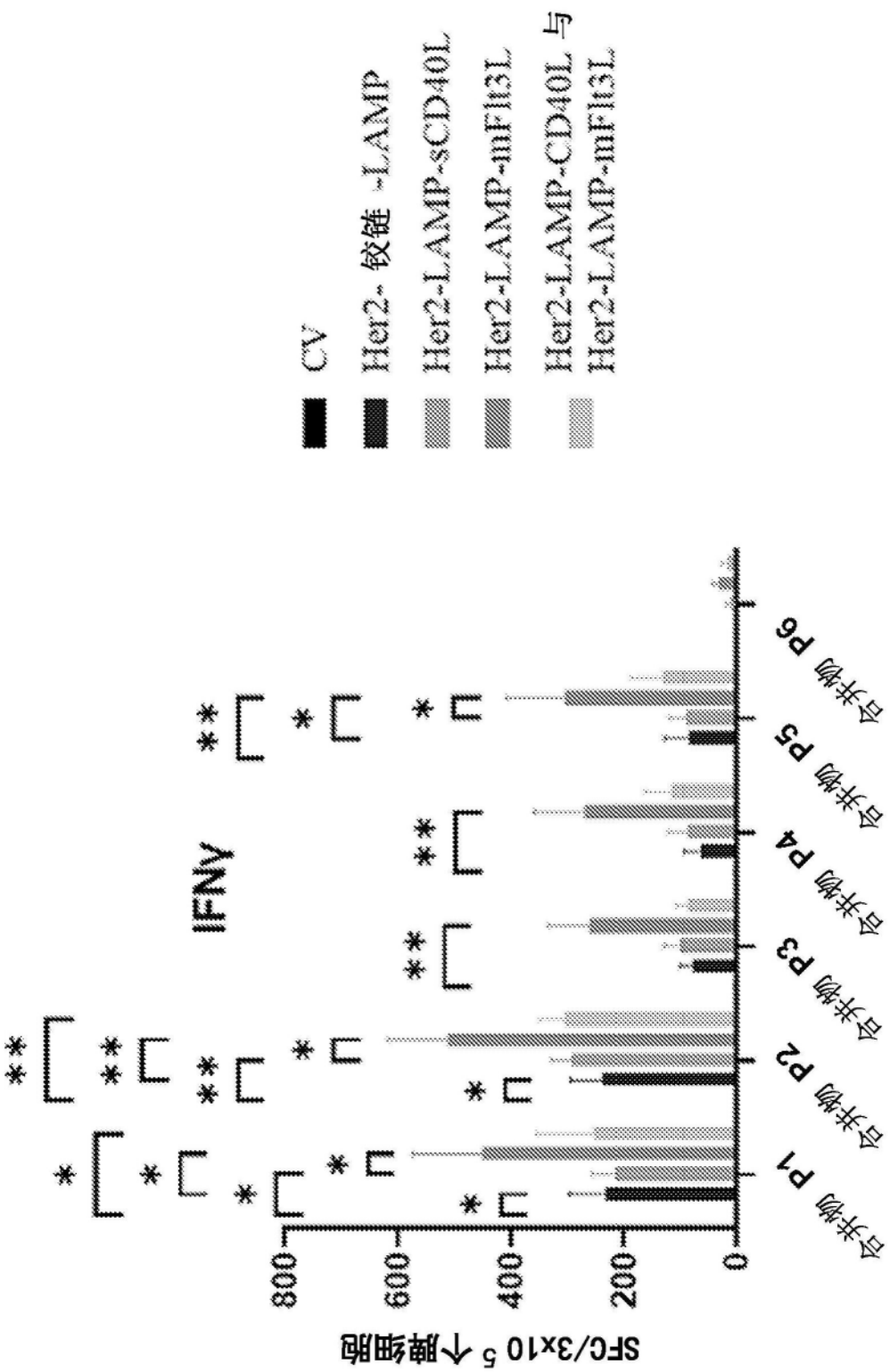

CV
Her2- 铰链 -LAMP
Her2-LAMP-sCD40L
Her2-LAMP-mFlt3L
Her2-LAMP-CD40L 与
Her2-LAMP-mFlt3L
IFNγ
SFC/3x10 5 个脾细胞
800
600
400
200
0
合并物 P1
合并物 P2
合并物 P3
合并物 P4
合并物 P5
合并物 P6

图40B

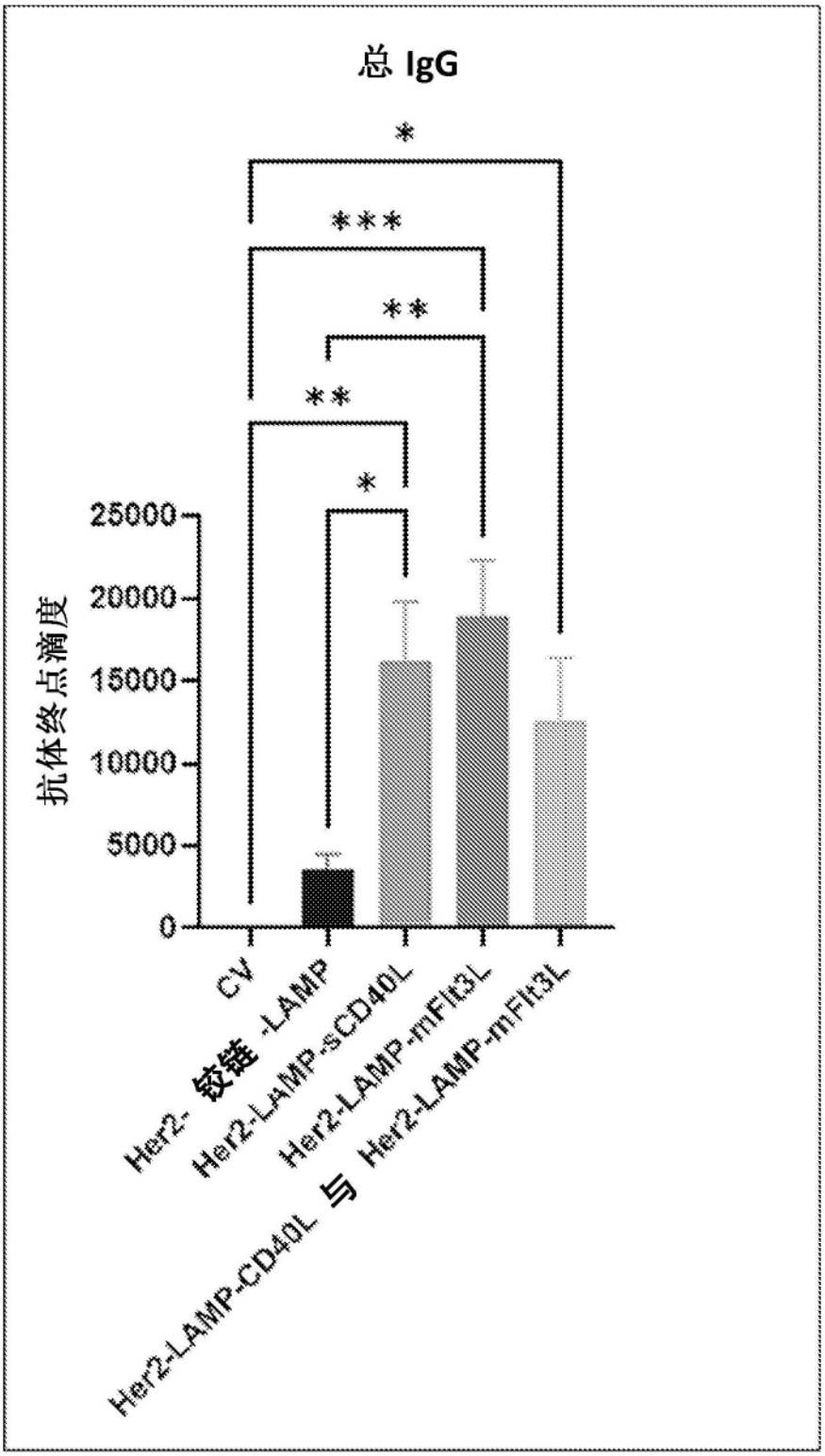

总 IgG
抗体终点滴度
25000
20000
15000
10000
5000
0
*
***
**
**
*
CV
Her2-铰链-LAMP
Her2-LAMP-sCD40L
Her2-LAMP-mFlt3L
Her2-LAMP-CD40L 与 Her2-LAMP-mFlt3L

图41

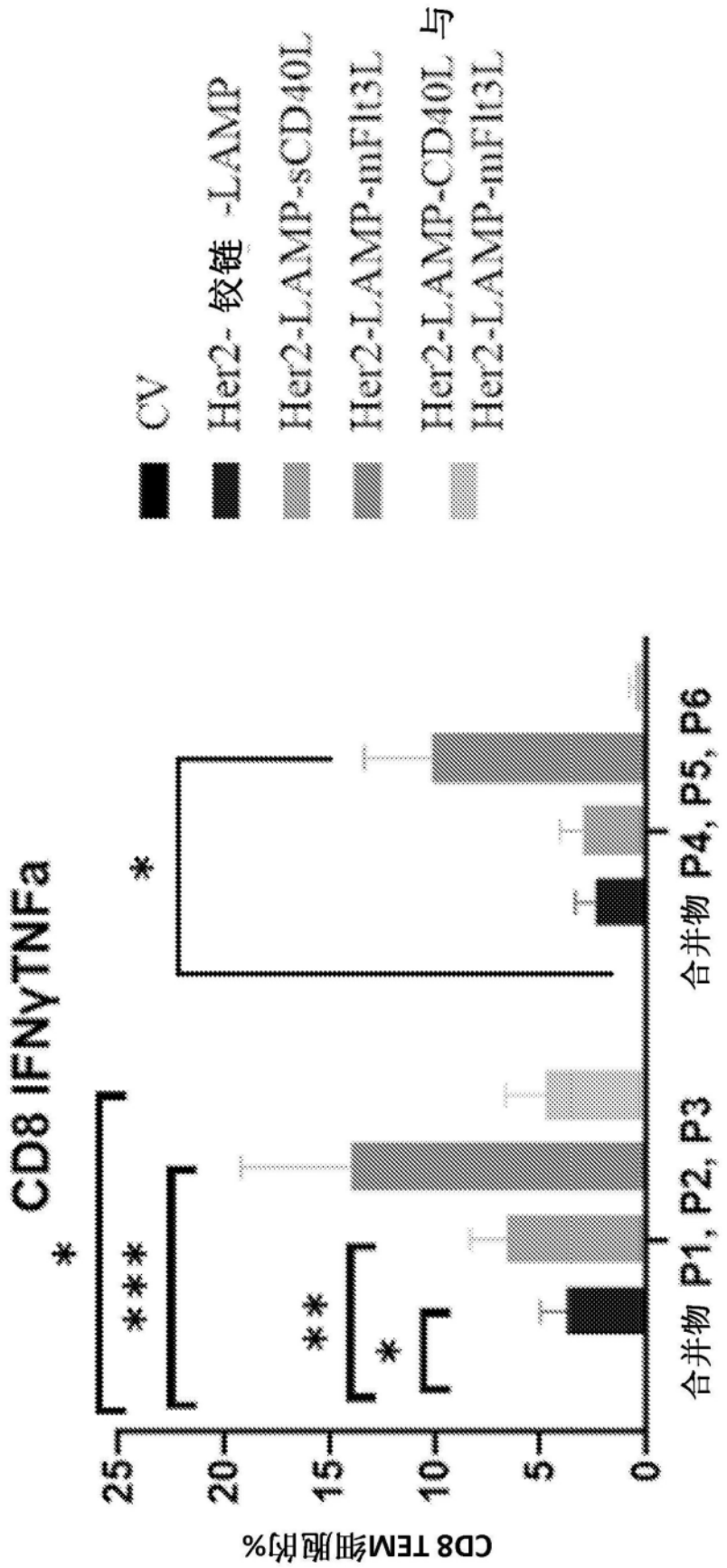

CV
Her2- 铰链 -LAMP
Her2-LAMP-sCD40L
Her2-LAMP-mFlt3L
Her2-LAMP-CD40L 与
Her2-LAMP-mFlt3L
CD8 IFNγTNFa
CD8 TEM细胞的%
25
20
15
10
5
0
*
***
**
*
*
合并物 P1, P2, P3
合并物 P4, P5, P6

图42A

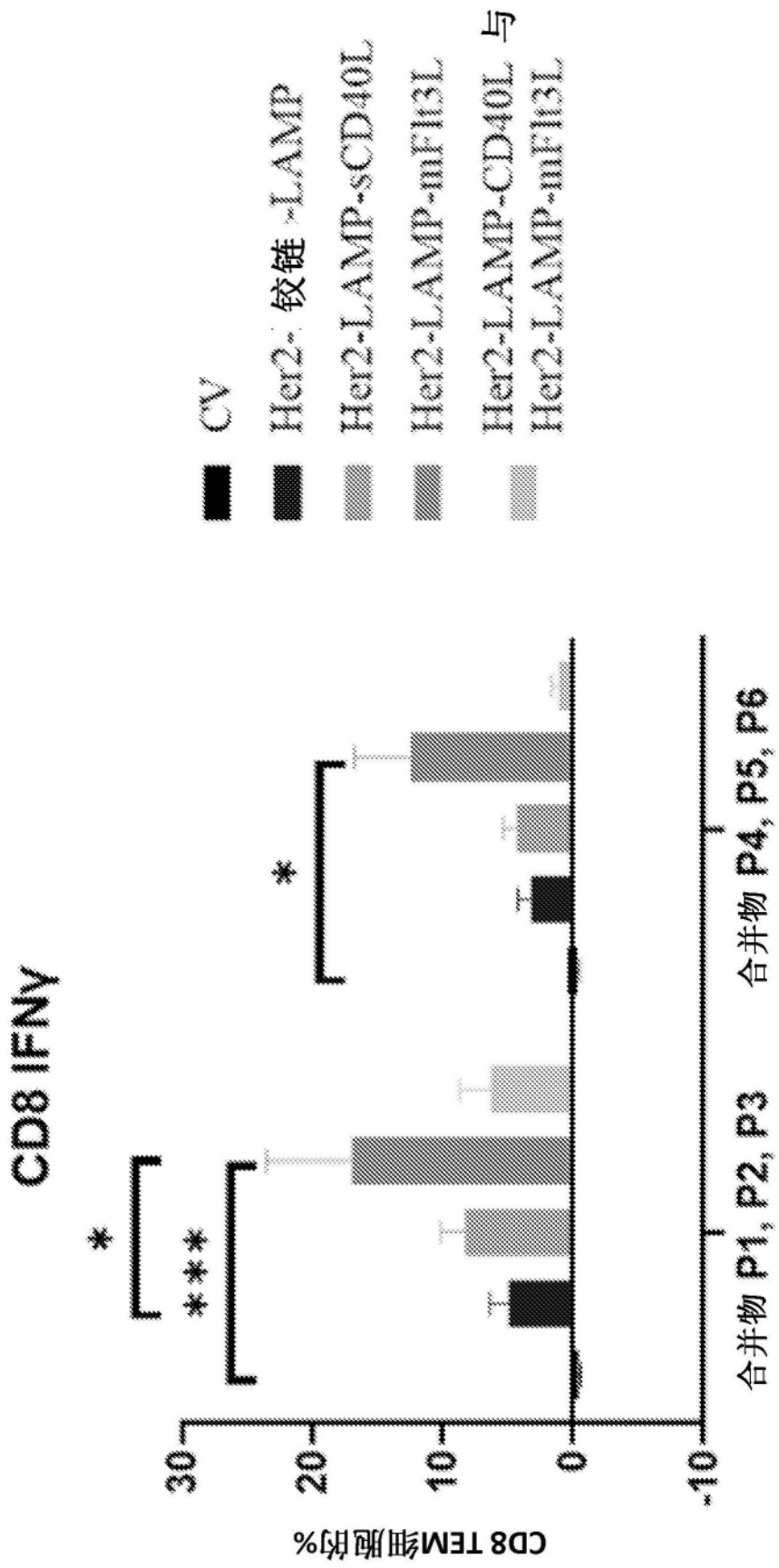

CD8 IFNγ
CD8 TEM细胞的%
30
20
10
0
-10
*
***
*
合并物 P1, P2, P3
合并物 P4, P5, P6
CV
Her2-铰链-LAMP
Her2-LAMP-sCD40L
Her2-LAMP-mFlt3L
Her2-LAMP-CD40L 与
Her2-LAMP-mFlt3L

图42B

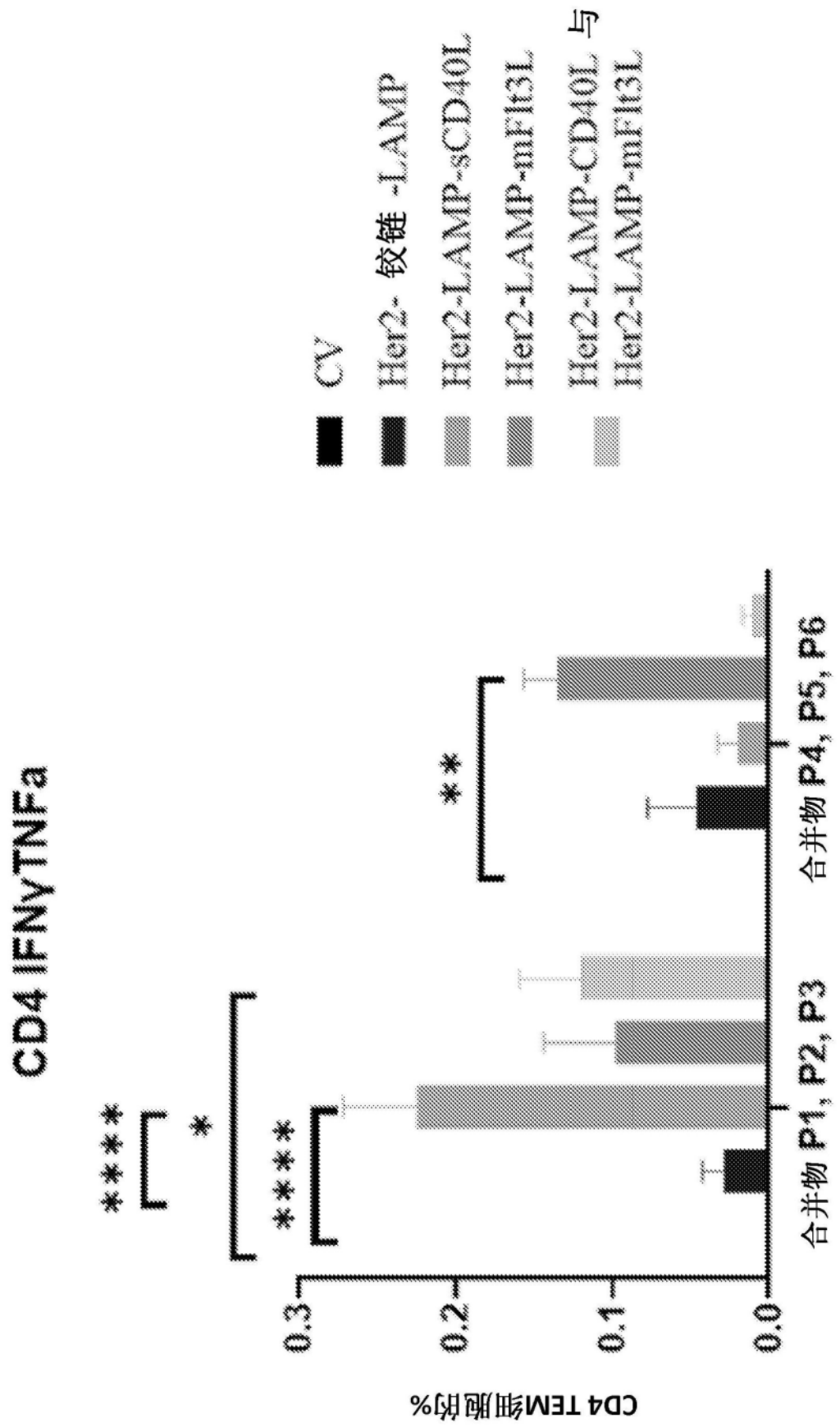

CV
Her2- 铰链 -LAMP
Her2-LAMP-sCD40L
Her2-LAMP-mFlt3L
Her2-LAMP-CD40L 与
Her2-LAMP-mFlt3L
CD4 IFNγTNFa
CD4 TEM细胞的%
0.0
0.1
0.2
0.3
****
*
****
**
合并物 P1, P2, P3
合并物 P4, P5, P6

图42C

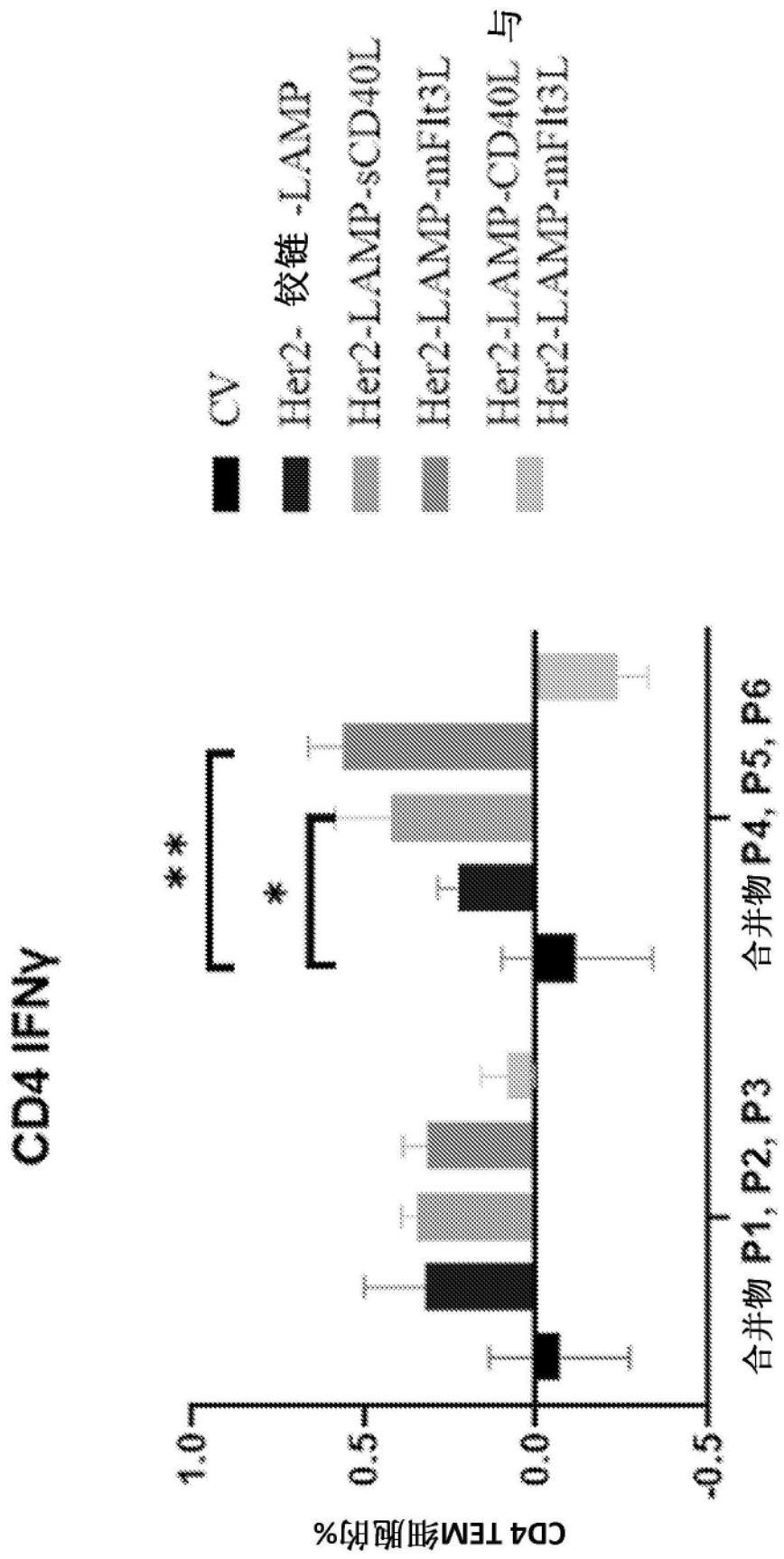

CD4 IFNγ
CV
Her2- 铰链 -LAMP
Her2-LAMP-sCD40L
Her2-LAMP-mFlt3L
Her2-LAMP-CD40L 与
Her2-LAMP-mFlt3L
**
*
1.0
0.5
0.0
-0.5
CD4 TEM细胞的%
合并物 P1, P2, P3
合并物 P4, P5, P6

图42D

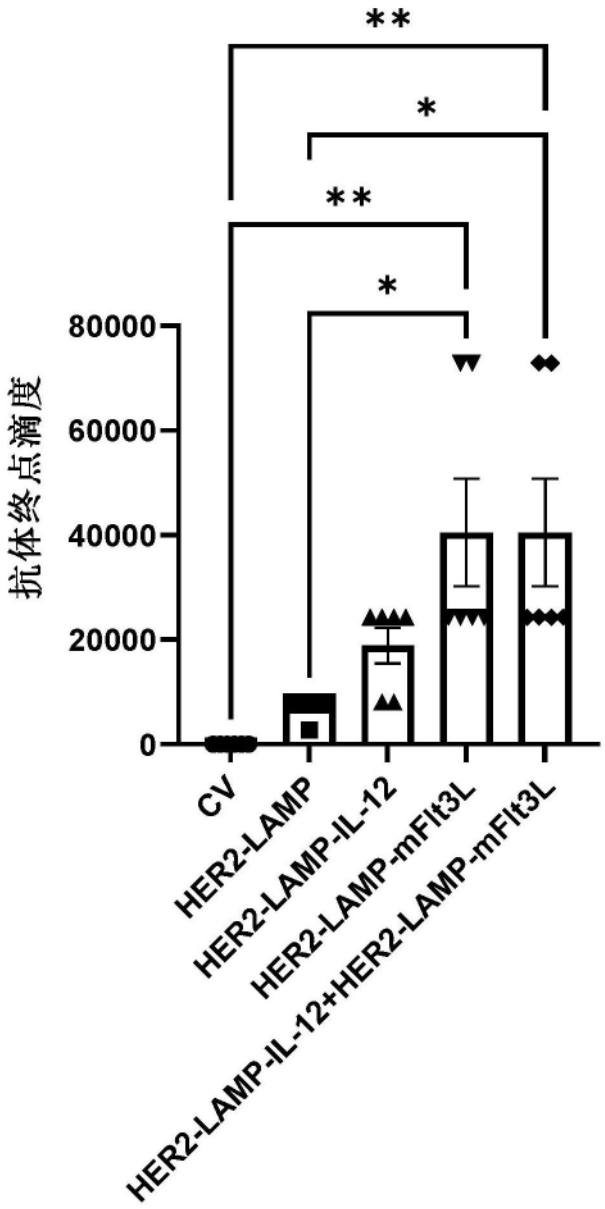

**
*
**
*
80000
60000
40000
20000
0
抗体终点滴度
CV
HER2-LAMP
HER2-LAMP-IL-12
HER2-LAMP-mFlt3L
HER2-LAMP-IL-12+HER2-LAMP-mFlt3L

图43