



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109071592 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 19

(21) 申请号 201780016086.9
(22) 申请日 2017.01.09
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109071592 A

(43) 申请公布日 2018.12.21
(30) 优先权数据
62/276479 2016.01.08 US
62/301885 2016.03.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.07
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/012704 2017.01.09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/120577 EN 2017.07.13
(73) 专利权人 吉奥瓦斯科公司
地址 美国佐治亚州
(72) 发明人 H. 罗宾逊 A. 多米 M. 赫勒斯泰因
F. 圭拉库 N.P. 麦柯利

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
专利代理师 梁谋 万雪松

(51) Int.Cl.
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/285 (2006.01)

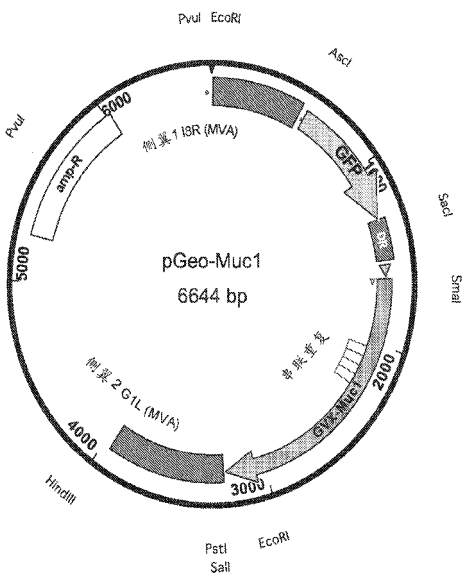
(56) 对比文件
WO 2015175340 A1,2015.11.19
CN 101831411 A,2010.09.15
CN 102844663 A,2012.12.26
US 2009069367 A1,2009.03.12
CN 102844663 A,2012.12.26
CN 1554764 A,2004.12.15
Emmanuel Adu-Gyamfi等.The Ebola Virus Matrix Protein Penetrates into the Plasma Membrane.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2014,第288卷(第8期),
Eva Mittler等.The Cytoplasmic Domain of Marburg Virus GP Modulates Early Steps of Viral Infection.《JOURNAL OF VIROLOGY》.2011,第85卷(第16期), (续)

审查员 王鹏

权利要求书2页 说明书49页
序列表35页 附图5页

(54) 发明名称
用于产生对肿瘤相关抗原的免疫应答的组合物和方法

(57) 摘要
描述了用于产生对肿瘤相关抗原(诸如MUC1)的免疫应答的组合物和方法。本文描述的组合物和方法涉及编码一种或多种病毒抗原的经修饰的牛痘Ankara (MVA) 载体,其用于在施用所述载体的受试者中产生对表达肿瘤相关抗原的肿瘤的保护性免疫应答。本发明的组合物和方法在预防上和治疗上是有用的,并且可以用于预防和/或治疗肿瘤和有关的疾病。



[接上页]

(56) 对比文件

Sharmila Pejawar-Gaddy等.Generation of a tumor vaccine candidate based on conjugation of a MUC1 peptide to polyionic papillomavirus virus-like particles.《Cancer Immunol Immunother》.2010,第59卷

Toritse Orubu等.Expression and Cellular Immunogenicity of a Transgenic Antigen Driven by Endogenous Poxviral Early Promoters at Their Authentic Loci

in MVA.《PLOS ONE》.2012,第7卷(第6期),

Laetitia Fend等.Intravenous Injection of MVA Virus Targets CD8⁺Lymphocytes to Tumors to Control Tumor Growth upon Combinatorial Treatment with a TLR9 Agonist.《Cancer Immunology Research 》.2014,第2卷(第12期),

Naif Khalaf Alharbi等.Enhancing cellular immunogenicity of MVA-vectored vaccines by utilizing the F11L endogenous promoter.《Vaccine》.2015,第34卷

1. 一种重组改良牛痘ankara (MVA) 病毒载体, 其包含:

(i) 以5' 至3' 方向编码包含 (a) 肿瘤相关抗原 (TAA) 的细胞外片段, (b) 马尔堡病毒的糖蛋白 (GP) 的跨膜结构域, 和 (c) 肿瘤相关抗原 (TAA) 的细胞内片段的嵌合氨基酸序列的第一核酸序列; 和

(ii) 编码马尔堡病毒VP40基质蛋白的第二核酸序列;

其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列两者都是与痘病毒表达系统相容的启动子的控制下; 且其中在表达时, 所述嵌合氨基酸序列和VP40基质蛋白能够组装在一起以形成病毒样颗粒 (VLPs)。

2. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中将所述第一核酸序列和所述第二核酸序列插入选自I、II、III、IV、V或VI的MVA的一个或多个缺失位点中。

3. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中将所述第一核酸序列和所述第二核酸序列插入所述MVA中在天然缺失位点、经修饰的天然缺失位点中或在必需或非必需MVA基因之间。

4. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中将所述第一核酸序列和所述第二核酸序列插入相同天然缺失位点、经修饰的天然缺失位点中或在相同的必需或非必需MVA基因之间。

5. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中将所述第一核酸序列和所述第二核酸序列插入不同的天然缺失位点、不同的经修饰的缺失位点中或在不同的必需或非必需MVA基因之间。

6. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中将所述第一核酸序列插入在两个必需的且高度保守的MVA基因之间; 并将所述第二核酸序列插入重构的且经修饰的缺失III中; 其中所述缺失III位点被重构和修饰以除去非必须侧翼序列。

7. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中将所述第一核酸序列插入在MVA基因I8R和G1L之间, 且将所述第二核酸序列插入A50R和B1R之间的缺失III区域中。

8. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中所述启动子选自Pm2H5启动子、Psyn II启动子或mH5启动子或它们的组合。

9. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中通过一种或多种选自以下的方法优化所述第一核酸序列: 将选择的密码子改变成对于MVA的蛋白表达而言最佳的其它同义密码子, 使用沉默突变中断同聚物段, 或使用沉默突变中断转录终止子基序。

10. 权利要求1的重组载体, 其中所述第一核酸序列包含粘蛋白-1 (MUC-1) 的细胞外片段和MUC-1的细胞内片段。

11. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中所述细胞外片段选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与其至少95%相同的氨基酸序列。

12. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中所述第一核酸序列编码包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或与其至少95%相同的氨基酸序列。

13. 权利要求10的重组MVA病毒载体, 其中所述MUC-1的细胞内片段包含SEQ ID NO:6的氨基酸407-475或与其至少95%相同的氨基酸序列。

14. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中所述第一核酸序列包含选自SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:29的核酸序列。

15. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中所述第一核酸序列包含SEQ ID NO:29的核酸序列。

16. 权利要求1的重组MVA病毒载体, 其中所述马尔堡病毒的糖蛋白 (GP) 的跨膜结构域

包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

17. 权利要求1的重组载体,其中所述重组MVA病毒载体表达选自癌胚胎抗原/未成熟的层粘连蛋白受体蛋白 (OFA/iLRP)、甲胎蛋白 (AFP)、癌胚抗原 (CEA)、CA-125、上皮肿瘤抗原 (ETA)、酪氨酸酶、黑素瘤相关抗原 (MAGE)、ras的异常产物或p53的异常产物的TAA。

18. 重组MVA病毒载体,其包含:

(i) 编码包含SEQ ID NO:15的嵌合氨基酸序列的第一核酸序列;和

(ii) 编码马尔堡病毒VP40基质蛋白序列的第二核酸序列;

其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列两者都是在与痘病毒表达系统相容的启动子的控制下;且其中在表达时,所述嵌合氨基酸序列和VP40基质蛋白能够组装在一起以形成VLPs。

19. 权利要求18的重组MVA病毒载体,其中所述第一核酸序列选自SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:29。

20. 权利要求18的重组MVA病毒载体,其中所述第一核酸序列包含SEQ ID NO:29。

21. 权利要求18的重组MVA病毒载体,其中将所述第一核酸序列插入在MVA基因I8R和G1L之间,且将所述第二核酸序列插入A50R和B1R之间的缺失III区域中。

22. 权利要求18的重组MVA病毒载体,其中所述启动子选自Pm2H5启动子、Psyn II启动子或mH5启动子或它们的组合。

23. 权利要求1-22中任一项的重组MVA在制备在有此需要的受试者中诱导对TAA的免疫应答的药物中的用途,包括以足以诱导对TAA的免疫应答的量给所述受试者施用所述重组MVA载体。

24. 权利要求1-22中任一项的重组MVA在制备在有此需要的受试者中治疗表达TAA的癌症的药物中的用途,包括以足以诱导对由癌症表达的TAA的免疫应答的量给所述受试者施用所述重组MVA载体。

用于产生对肿瘤相关抗原的免疫应答的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年1月8日提交的美国临时专利申请US 62/276,479和2016年3月1日提交的美国临时专利申请US 62/301,885的权益,它们的公开内容特此通过引用整体并入。

技术领域

[0003] 本文描述的组合物和方法涉及用于产生对肿瘤相关抗原(TAA)的免疫应答的组合物,包括疫苗组合物;制备方法;和其使用方法。本发明的组合物和方法在预防上和在治疗上是有用的。

[0004] 发明背景

[0005] 在2016年,据估计在美国将诊断出1,685,210个新癌症病例和595,690例癌症死亡(Cancer Facts & Figures 2016, American Cancer Society 2016)。与标准疗法组合地或在此之后,已经在具有晚期或复发性癌症的患者中测试了基于人肿瘤相关抗原(TAA)的癌症疫苗。由于肿瘤微环境的多重高抑制效应和标准疗法对患者的免疫系统的作用,已经难以适当地评价癌症疫苗的免疫原性和治疗效果。在人癌症的动物模型中,在预防性场合中施用的疫苗是最免疫原性的,并有效地阻止癌症发生和进展。

[0006] 基于人TAA的疫苗是免疫原性的和安全的,且能够引起对于癌症预防而言重要的长期记忆。

[0007] 一种具体TAA是MUC-1,它是粘蛋白家族的一个成员且编码膜结合的糖基化磷蛋白。MUC1具有120-225 kDa的核心蛋白质量,其通过糖基化增加至250-500 kDa。它从细胞的表面向外伸出200-500 nm (Brayman M, Thathiah A, Carson DD, 2004, Reprod Biol Endocrinol. 2: 4)。所述蛋白通过跨膜结构域锚定至许多上皮细胞的顶表面。这些重复富含允许重度 α -糖基化的丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸残基(Brayman M, Thathiah A, Carson DD, 2004, Reprod Biol Endocrinol. 2: 4)。已经报道了多种交替剪接的转录物变体,它们编码该基因的不同异形体。

[0008] MUC-1的细胞质尾巴是72个氨基酸长,且含有几个磷酸化位点(Singh PK, Hollingsworth MA (2006年8月), Trends Cell Biol. 16 (9): 467-476)。所述蛋白通过结合病原体发挥保护功能,并且也在细胞信号传递能力中起作用(Lindén SK等人.2009, PLoS Pathog. 5 (10): e1000617)。

[0009] 该蛋白的过表达、异常细胞内定位和糖基化的变化已经与癌关联。具体地,MUC-1过表达经常与结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌和胰腺癌有关(Gendler SJ (2001年7月), J. Mammary Gland Biol Neoplasia. 6 (3): 339-353)。

[0010] 目前不存在美国批准的针对癌症的人用疫苗。需要免疫原性疫苗组合物和使用方法来预防和治疗由肿瘤造成的癌症。

[0011] 发明概述

[0012] 本文描述的本发明的组合物和方法可用于在有此需要的受试者中产生对肿瘤相

关抗原 (TAA) 的免疫应答。有利地,所述组合物和方法可以预防性地用于针对癌症相关抗原免疫受试者,或治疗性地用于治疗或改善有此需要的受试者中的疾病的发作和严重程度。

[0013] 在第一方面,本发明是一种包含肿瘤相关抗原 (TAA) 编码序列 (TAA序列) 和基质蛋白编码序列 (基质蛋白序列) 的重组改良牛痘Ankara (MVA) 载体,其中所述TAA序列和基质蛋白序列是在与痘病毒表达系统相容的启动子的控制下。

[0014] 在一个实施方案中,将所述TAA序列和所述基质蛋白序列插入所述MVA载体的一个或多个缺失位点中。

[0015] 在一个实施方案中,所述TAA选自癌胚胎抗原/未成熟的层粘连蛋白受体蛋白 (OFA/iLRP)、甲胎蛋白 (AFP)、癌胚抗原 (CEA)、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原 (ETA)、酪氨酸酶、黑素瘤相关抗原 (MAGE)、ras的异常产物、p53的异常产物或其免疫原性片段。

[0016] 在一个实施方案中,所述TAA是MUC-1。

[0017] 在一个实施方案中,所述TAA是OFA/iLRP。

[0018] 在一个实施方案中,所述TAA是CEA。

[0019] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是马尔堡病毒基质蛋白。

[0020] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是马尔堡病毒VP40基质蛋白。

[0021] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是埃博拉病毒基质蛋白。

[0022] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是埃博拉病毒VP40基质蛋白。

[0023] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是苏丹病毒基质蛋白。

[0024] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是苏丹病毒VP40基质蛋白。

[0025] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是人免疫缺陷病毒1型 (HIV-1) 基质蛋白。

[0026] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是由gag基因编码的人免疫缺陷病毒1型 (HIV-1) 基质蛋白。

[0027] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是拉沙病毒基质蛋白。

[0028] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是拉沙病毒Z蛋白。

[0029] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是拉沙病毒Z蛋白的片段。

[0030] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是丝状病毒科 (*Filoviridae*) 病毒科中的病毒的基质蛋白。

[0031] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是逆转录病毒科 (*Retroviridae*) 病毒科中的病毒的基质蛋白。

[0032] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是沙粒病毒科 (*Arenaviridae*) 病毒科中的病毒的基质蛋白。

[0033] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是黄病毒科 (*Flaviviridae*) 病毒科中的病毒的基质蛋白。

[0034] 在一个实施方案中,将所述TAA序列和所述基质蛋白序列在天然缺失位点、经修饰的天然缺失位点中或在必需或非必需MVA基因之间插入所述MVA载体中。

[0035] 在另一个实施方案中,将所述TAA序列和所述基质蛋白序列插入相同天然缺失位点、经修饰的天然缺失位点中或在相同的必需或非必需MVA基因之间。

[0036] 在另一个实施方案中,将所述TAA序列插入选自I、II、III、IV、V或VI的缺失位点,并将所述基质蛋白序列插入选自I、II、III、IV、V或VI的缺失位点。

[0037] 在另一个实施方案中,将所述TAA序列和所述基质蛋白序列插入不同的天然缺失位点、不同的经修饰的缺失位点中或在不同的必需或非必需MVA基因之间。

[0038] 在另一个实施方案中,将所述TAA序列插入在第一缺失位点中,并将基质蛋白序列插入在第二缺失位点中。

[0039] 在一个特定实施方案中,将所述TAA序列插入在两个必需的且高度保守的MVA基因之间;并将所述基质蛋白序列插入重构的且经修饰的缺失III中。

[0040] 在一个实施方案中,将所述缺失III修饰以除去非必需序列和将所述基质蛋白序列插入在必需基因之间。

[0041] 在一个特定实施方案中,将所述基质蛋白序列插入在MVA基因I8R和G1L之间。

[0042] 在一个特定实施方案中,将所述TAA序列插入在两个必需的且高度保守的MVA基因之间以限制可存活的缺失突变体的形成。

[0043] 在一个特定实施方案中,将所述TAA蛋白序列插入在MVA基因I8R和G1L之间。

[0044] 在一个实施方案中,所述启动子选自Pm2H5、Psyn II和mH5启动子或它们的组合。

[0045] 在一个实施方案中,将所述TAA序列优化。在一个特定实施方案中,如下优化所述TAA序列:将选择的密码子改变成对于MVA的蛋白表达而言最佳的其它同义密码子,使用沉默突变中断同聚物段,使用沉默突变中断转录终止子基序,或导致TAA的跨膜(而不是分泌)形式的表达,和它们的组合。

[0046] 在一个实施方案中,所述重组MVA病毒载体表达组装成VLP的TAA和基质蛋白。

[0047] 在第二方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本发明的重组MVA载体和药学上可接受的载体。

[0048] 在一个实施方案中,将所述重组MVA载体配制成用于腹膜内、肌肉内、真皮内、表皮、粘膜或静脉内施用。

[0049] 在第三方面,本发明提供了包含两种重组MVA载体的药物组合物,其中每种重组MVA载体包含TAA序列,其中(i)第一种重组MVA载体的TAA序列不同于第二种重组MVA载体的TAA序列。

[0050] 在一个实施方案中,将所述TAA序列和所述基质蛋白序列插入所述MVA载体的一个或多个缺失位点中。

[0051] 在一个实施方案中,所述TAA选自癌胚胎抗原/未成熟的层粘连蛋白受体蛋白(OFA/iLRP)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原(ETA)、酪氨酸酶、黑素瘤相关抗原(MAGE)以及ras和p53的异常产物或其免疫原性片段。

[0052] 在一个实施方案中,所述TAA是MUC-1。

[0053] 在一个实施方案中,所述TAA是癌胚胎抗原/未成熟的层粘连蛋白受体蛋白(OFA/iLRP)。

[0054] 在一个实施方案中,所述TAA是癌胚抗原(CEA)。

[0055] 在一个实施方案中,所述第一种重组MVA载体的TAA是MUC-1,且所述第二种重组MVA载体的TAA是癌胚胎抗原/未成熟的层粘连蛋白受体蛋白(OFA/iLRP)。

[0056] 在一个实施方案中,所述第一种重组MVA载体的TAA是MUC-1,且所述第二种重组MVA载体的TAA是癌胚抗原(CEA)。

[0057] 在一个实施方案中,所述第一种重组MVA载体的TAA是癌胚胎抗原/未成熟的层粘

连蛋白受体蛋白 (OFA/iLRP), 且所述第二种重组MVA载体的TAA是癌胚抗原 (CEA)。

[0058] 在一个实施方案中, 将所述TAA序列和所述基质蛋白序列插入所述MVA载体中在天然缺失位点、经修饰的天然缺失位点中或在必需或非必需MVA基因之间。

[0059] 在另一个实施方案中, 将所述TAA序列和所述基质蛋白序列插入相同天然缺失位点、相同的经修饰的天然缺失位点中或在相同的必需或非必需MVA基因之间。

[0060] 在另一个实施方案中, 将所述TAA序列插入选自I、II、III、IV、V或VI的缺失位点, 并将所述基质蛋白序列插入选自I、II、III、IV、V或VI的缺失位点。

[0061] 在另一个实施方案中, 将所述TAA序列和所述基质蛋白序列插入不同的天然缺失位点、不同的经修饰的缺失位点中或在不同的必需或非必需MVA基因之间。

[0062] 在另一个实施方案中, 将所述TAA序列插入在第一缺失位点中, 并将基质蛋白序列插入在第二缺失位点中。

[0063] 在一个特定实施方案中, 将所述TAA序列插入在两个必需的且高度保守的MVA基因之间; 并将所述基质蛋白序列插入重构的且经修饰的缺失III中。

[0064] 在一个实施方案中, 将所述缺失III修饰以除去非必需序列和将所述基质蛋白序列插入在必需基因之间。

[0065] 在一个特定实施方案中, 将所述基质蛋白序列插入在MVA基因I8R和G1L之间。

[0066] 在一个特定实施方案中, 将所述TAA序列插入在两个必需的且高度保守的MVA基因之间以限制可存活的缺失突变体的形成。

[0067] 在一个特定实施方案中, 将所述TAA蛋白序列插入在MVA基因I8R和G1L之间。

[0068] 在一个实施方案中, 所述启动子选自Pm2H5、Psyn II和mH5启动子或它们的组合。

[0069] 在一个实施方案中, 将所述TAA序列优化。在一个特定实施方案中, 如下优化所述TAA序列: 将选择的密码子改变成对于MVA的蛋白表达而言最佳的其它同义密码子, 使用沉默突变中断同聚物段, 使用沉默突变中断转录终止子基序, 或导致TAA的跨膜 (而不是分泌) 形式的表达, 和它们的组合。

[0070] 在一个实施方案中, 所述重组MVA病毒载体表达组装成VLP的TAA和基质蛋白。

[0071] 在第二方面, 本发明提供了一种药物组合物, 其包含本发明的重组MVA载体和药学上可接受的载体。

[0072] 在一个实施方案中, 将所述重组MVA载体配制成用于腹膜内、肌肉内、真皮内、表皮、粘膜或静脉内施用。

[0073] 在一个特定实施方案中, 所述第一种重组MVA载体的TAA序列来自与第二种重组MVA载体的TAA序列不同的物种。

[0074] 在第四方面, 本发明提供了包含三种或更多种重组MVA载体的药物组合物, 其中每种重组MVA载体包含TAA序列, 其中 (i) 所述三种或更多种重组MVA载体含有不同的TAA序列。

[0075] 在一个实施方案中, 所述TAA序列是MUC-1、癌胚胎抗原/未成熟的层粘连蛋白受体蛋白 (OFA/iLRP) 和癌胚抗原 (CEA)。

[0076] 在一个特定实施方案中, 所述TAA序列来自相同物种。

[0077] 在一个特定实施方案中, 所述TAA序列来自不同物种。

[0078] 在第五方面, 本发明提供了一种在有此需要的受试者中诱导对肿瘤的免疫应答的方法, 所述方法包括以足以诱导免疫应答的量将包含本文描述的免疫原性载体的组合物施

用给所述受试者。

[0079] 在一个实施方案中,所述免疫应答是体液免疫应答、细胞免疫应答或它们的组合。

[0080] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的结合抗体的产生。

[0081] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的中和抗体的产生。

[0082] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的非中和抗体的产生。

[0083] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的细胞介导的免疫应答的产生。

[0084] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的中和抗体和非中和抗体的产生。

[0085] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的中和抗体和细胞介导的免疫的产生。

[0086] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的非中和抗体和细胞介导的免疫的产生。

[0087] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的中和抗体、非中和抗体和细胞介导的免疫的产生。

[0088] 在一个实施方案中,所述肿瘤选自白血病(例如成髓细胞、前髓细胞、粒单核细胞、单核细胞、红白血病、慢性髓细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病)、淋巴瘤(例如霍奇金病和非霍奇金病)、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、尤因瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、威尔曼瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、发育异常和增生。

[0089] 在另一个实施方案中,所述TAA是MUC-1,且所述肿瘤选自腺癌(乳房、结肠直肠、胰腺、其它)、类癌瘤、脊索瘤、绒毛膜癌、结缔组织增生性小圆细胞肿瘤(DSRCT)、上皮样肉瘤、滤泡树突细胞肉瘤、交错树突细胞/网状细胞肉瘤、肺: II型肺泡壁细胞病变(II型细胞增生、发育异常的II型细胞、顶端肺泡增生)、间变性大细胞淋巴瘤、弥散性大B细胞淋巴瘤(可变的)、浆母细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、上皮样间皮瘤、骨髓瘤、浆细胞瘤、神经束膜瘤、肾细胞癌、滑膜肉瘤(上皮区域)、胸腺癌(经常)、脑膜瘤或佩吉特病。

[0090] 在第六方面,本发明提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括将本发明的重组MVA载体以治疗癌症的有效量施用给有此需要的受试者。

[0091] 在第七方面,本发明提供了一种减少受试者中的肿瘤生长的方法,所述方法包括将本发明的重组MVA载体以减少肿瘤生长的有效量施用给所述受试者。

[0092] 在第八方面,本发明提供了一种阻止受试者中的肿瘤生长的方法,所述方法包括将本发明的重组MVA载体以预防有效量施用给所述受试者。

[0093] 在一个实施方案中,所述受试者表达肿瘤细胞标志物,但是尚未呈现症状。在一个特定实施方案中,治疗导致有症状的疾病的阻止。

[0094] 在另一个实施方案中,所述受试者表达肿瘤细胞标志物,但是表现出癌症的微小症状。

[0095] 在另一个实施方案中,所述方法导致癌症的至少一种症状的改善。

[0096] 在第九方面,本发明提供了一种制备重组改良牛痘Ankara (MVA) 病毒载体的方法,所述方法包括将至少一个TAA序列插入所述MVA载体中,其中所述至少一个TAA序列可操作地连接至与痘病毒表达系统相容的启动子。

[0097] 在一个实施方案中,所述方法包括将至少一个基质蛋白序列插入所述MVA载体中,其中所述至少一个TAA序列可操作地连接至与痘病毒表达系统相容的启动子。

[0098] 附图简述

[0099] 图1是MUC1的穿梭载体 (pGeo-Muc1) 的示意图。

[0100] 图2是解释MVA载体的设计的简笔画。

[0101] 图3的蛋白质印迹证实,用MVA-Muc1VP40疫苗感染的细胞 (1) 表达Muc1蛋白,和 (2) 表达低糖基化的Muc1。

[0102] 图4是细胞的图像,所述细胞已经针对 (1) Muc1蛋白和 (2) 低糖基化的Muc1蛋白的存在进行了免疫染色。如此染色的细胞样品包括阴性对照细胞 (MCF10A)、阳性对照细胞 (MCF7)、已经用MVA-Muc1VP40疫苗感染的HEK-293T细胞、和没有用MVA-Muc1VP40疫苗感染的HEK-293T细胞。

[0103] 图5的电子显微照片显示了用MVA-Muc1VP40 (编码Muc1 TAA蛋白的MVA疫苗) 感染的细胞的病毒样颗粒 (VLP) 产生。

[0104] 图6提供了Muc1的O-连接的糖基化的靶向减少的最初修饰路径的示意图。

[0105] 图7提供了Muc1的O-连接的糖基化的靶向减少的另一个最初修饰路径的示意图。

[0106] 发明详述

[0107] 提供了组合物和方法以在有此需要的受试者中产生对肿瘤相关抗原 (TAA) 的免疫应答。本发明的组合物和方法可以用于在有此需要的受试者中阻止或延迟肿瘤的形成或治疗肿瘤或与其有关的疾病 (诸如癌症)。在一个实施方案中,治疗会限制肿瘤发生、生长和/或肿瘤相关疾病 (诸如癌症) 的严重程度。

[0108] 理想的免疫原性组合物或疫苗具有安全性、效力、保护范围和存活力的特征,但是,具有少于所有这些特征的组合物仍然可以用于在暴露的受试者中阻止肿瘤生长或限制症状或疾病进展,所述受试者在症状发生之前治疗过。在一个实施方案中,本发明提供了一种疫苗,其允许在单次免疫接种以后至少部分的 (如果不是完全的) 保护。

[0109] 在一个实施方案中,所述组合物是重组疫苗或免疫原性载体,其包含一个或多个编码肿瘤相关抗原 (TAA) 或其免疫原性片段的核酸序列。

[0110] 在一个实施方案中,所述组合物是重组疫苗或免疫原性载体,其包含MUC-1的细胞外片段。

[0111] 在一个实施方案中,所述组合物是重组疫苗或免疫原性载体,其包含MUC-1的细胞内片段。

[0112] 在一个实施方案中,所述组合物是重组疫苗或免疫原性载体,其包含MUC-1的细胞外和细胞内片段。

[0113] 在一个实施方案中,所述组合物是重组疫苗或免疫原性载体,其包含MUC-1的细胞外片段、MUC-1的细胞内片段和马尔堡病毒的糖蛋白 (GP) 的跨膜结构域。

[0114] 在一个实施方案中,所述组合物是重组疫苗或免疫原性载体,其包含TAA的细胞外片段、TAA的细胞内片段和丝状病毒科病毒科中的病毒的GP的跨膜结构域。

[0115] 在一个实施方案中,所述载体表达形成VLP的蛋白并产生对TAA或其免疫原性片段的免疫应答。

[0116] 在示例性实施方案中,所述免疫应答是长效的和持久的,以致于不需要重复强化,但是在一个实施方案中,提供本文提供的组合物的一次或多次施用以强化最初的引发的免疫应答。

[0117] I. 定义

[0118] 在以单数提供术语的情况下,发明人也预见到由该术语的复数描述的本发明的方面。如在本说明书中和在所附权利要求书中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数形式,除非上下文另外清楚地指明,例如,“一个/种肽”包括多个/种肽。因而,例如,对“一种方法”的提及包括一种或多种方法,和/或本文描述的和/或本领域技术人员在阅读本公开内容后会明白的类型的步骤。

[0119] 术语“抗原”表示能够诱导免疫应答的物质或分子,诸如蛋白或其片段。

[0120] 术语“结合抗体”或“bAb”表示这样的抗体:其从体液(例如,血清或粘膜分泌物)中纯化或存在于体液(例如,血清或粘膜分泌物)中,且其识别特定抗原。本文中使用的抗体可以是单个抗体或多个抗体。结合抗体包含中和抗体和非中和抗体。

[0121] 术语“癌症”表示这样的恶性肿瘤:其已经经历具有分化损失的特征性间变、增加的生长速率、周围组织的侵入,且能够转移。

[0122] 术语“细胞介导的免疫应答”表示由淋巴细胞提供的免疫防御,诸如当敏化的T细胞淋巴细胞直接裂解表达外来抗原的细胞并分泌细胞因子(例如,IFN- γ)时由所述敏化的T细胞淋巴细胞提供的防御,所述细胞因子可以调节巨噬细胞和天然杀伤(NK)细胞效应子功能并增进T细胞繁殖和分化。所述细胞免疫应答是适应性免疫应答的第2个分支。

[0123] 术语“保守氨基酸置换”表示用非天然残基置换天然氨基酸残基,使得对在该位置处的氨基酸残基的大小、极性、电荷、疏水性或亲水性几乎没有或没有影响,且不会导致实质上改变的免疫原性。例如,这些可以是在以下组内的置换:缬氨酸、甘氨酸;甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸;天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。对多肽序列的保守氨基酸修饰(和对编码核苷酸的对应修饰)可以产生这样的多肽:其具有与亲本多肽类似的功能和化学特征。

[0124] 术语“缺失”在多肽或蛋白的背景下表示从所述多肽或蛋白序列除去一个或多个氨基酸残基的密码子,其中在任一侧上的区域连接在一起。术语缺失在核酸的背景下表示从核酸序列除去一个或多个碱基,其中在任一侧上的区域连接在一起。

[0125] 术语“埃博拉病毒”表示扎伊尔埃博拉病毒(*Zaire ebolavirus*)种的病毒,且具有由国际病毒分类学委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses)赋予它的含义,如在(Kuhn, J.H. 等人. 2010 Arch Virol 155:2083-2103)中记录的。

[0126] 术语“片段”在蛋白性试剂的背景下表示这样的肽或多肽:其包含肽、多肽或蛋白的氨基酸序列的至少2个连续氨基酸残基、至少5个连续氨基酸残基、至少10个连续氨基酸残基、至少15个连续氨基酸残基、至少20个连续氨基酸残基、至少25个连续氨基酸残基、至少40个连续氨基酸残基、至少50个连续氨基酸残基、至少60个连续氨基酸残基、至少70个连续氨基酸残基、至少80个连续氨基酸残基、至少90个连续氨基酸残基、至少100个连续氨基酸残基、至少125个连续氨基酸残基、至少150个连续氨基酸残基、至少175个连续氨基酸残

基、至少200个连续氨基酸残基或至少250个连续氨基酸残基的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述片段占参照多肽的整个长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一个实施方案中,全长蛋白的片段保留所述全长蛋白的活性。在另一个实施方案中,所述全长蛋白的片段不保留所述全长蛋白的活性。

[0127] 术语“片段”在核酸的背景下表示这样的核酸:其包含编码肽、多肽或蛋白的核酸序列的至少2个连续核苷酸、至少5个连续核苷酸、至少10个连续核苷酸、至少15个连续核苷酸、至少20个连续核苷酸、至少25个连续核苷酸、至少30个连续核苷酸、至少35个连续核苷酸、至少40个连续核苷酸、至少50个连续核苷酸、至少60个连续核苷酸、至少70个连续核苷酸、至少80个连续核苷酸、至少90个连续核苷酸、至少100个连续核苷酸、至少125个连续核苷酸、至少150个连续核苷酸、至少175个连续核苷酸、至少200个连续核苷酸、至少250个连续核苷酸、至少300个连续核苷酸、至少350个连续核苷酸或至少380个连续核苷酸的核酸序列。在一个实施方案中,所述片段占参照核酸序列的整个长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一个优选的实施方案中,核酸的片段编码保留所述全长蛋白的活性的肽或多肽。在另一个实施方案中,所述片段编码所述全长蛋白的肽或多肽,其不保留所述全长蛋白的活性。

[0128] 本文中使用的术语“生长抑制量”表示在体外或在体内抑制靶细胞(诸如肿瘤细胞)的生长或增殖的量,不论抑制细胞生长的机制(例如,通过细胞生长抑制特性、细胞毒性特性等)。在一个优选的实施方案中,所述生长抑制量使在体内或在细胞培养物中的靶细胞的增殖或生长抑制(即,在某种程度上减慢和优选地停止)大于约20%,优选地大于约50%,最优选地大于约75%(例如,约75%至约100%)。

[0129] 本文中使用的短语“异源序列”表示通常在自然界中没有与另一个目标核酸或蛋白、多肽或肽序列关联的任何核酸、蛋白、多肽或肽序列。

[0130] 本文中使用的短语“异源基因插入物”表示已经或要插入本文描述的重组载体中的任何核酸序列。所述异源基因插入物可以仅表示基因产物编码序列,或可以表示包含启动子、基因产物编码序列(诸如GP、VP或Z)和与其关联或可操作地连接的任何调节序列的序列。

[0131] 术语“同聚物段”表示包含至少四个未被任意其它核苷酸中断的相同核苷酸的序列,例如,GGGG或TTTTTTT。

[0132] 术语“体液免疫应答”表示Ab产生的刺激。体液免疫应答也表示伴随抗体产生的辅助蛋白和事件,包括T辅助细胞活化和细胞因子产生、亲和力成熟和记忆细胞产生。所述体液免疫应答是适应性免疫应答的两个分支之一。

[0133] 术语“体液免疫”表示由抗体提供的免疫防御,所述抗体是诸如可以直接结合肿瘤的中和Ab;或者,结合Ab,其鉴别赘生性细胞用于通过诸如补体(C')介导的裂解、吞噬作用和天然杀伤细胞等先天性免疫应答杀死。

[0134] 术语“免疫原性组合物”是包含抗原分子的组合物,在将所述组合物施用给受试者的情况下,所述抗原分子导致针对所述目标抗原分子的体液和/或细胞免疫应答在所述受试者中的产生。

[0135] 术语“免疫应答”表示由受试者(例如,人)的免疫系统对抗原或抗原决定簇的任何应答。示例性的免疫应答包括体液免疫应答(例如,抗原特异性抗体的产生)和细胞介导的

免疫应答(例如,抗原特异性的T细胞的产生)。用于评估免疫应答的测定是本领域已知的,且可以包含体内测定,诸如测量抗体应答和迟发型超敏反应应答的测定。在一个实施方案中,测量抗体应答的测定主要可以测量B-细胞功能以及B-细胞/T-细胞相互作用。对于抗体应答测定,可以在抗原攻击以后对比血液中的抗体滴度。本文中使用的“抗体滴度”可以定义为这样的免疫后血清的最高稀释度:其产生大于每位受试者的免疫前样品的值。所述体外测定可以包括确定细胞的以下能力:分裂,或为其它细胞的分裂提供帮助,或释放淋巴因子和其它因子,表达活化的标志物,和裂解靶细胞。可以在体外测定中对比小鼠和人的淋巴细胞。在一个实施方案中,对比来自类似来源(诸如周围血细胞、脾细胞或淋巴结细胞)的淋巴细胞。但是,可能对比来自不同来源的淋巴细胞,如在人类的周围血细胞和小鼠的脾细胞的非限制性例子中。对于体外测定,可以将细胞纯化(例如,B-细胞、T-细胞和巨噬细胞)或保持它们的天然状态(例如,脾细胞或淋巴结细胞)。纯化可以通过产生期望的结果的任意方法。使用促分裂原或特异性抗原,可以针对它们的增殖能力在体外测试所述细胞。使用混合的淋巴细胞反应(MLR)测定可以确定细胞在有特定抗原存在下分裂的能力。可以测试来自培养的细胞的上清液以定量所述细胞的分泌特定淋巴因子的能力。可以将所述细胞从培养物除去并测试它们的表达活化抗原的能力。这可以通过任意方法完成,所述方法是合适的,如在使用结合活化抗原的抗体或配体以及结合编码活化抗原的RNA的探针的非限制性例子中。

[0136] 与被诊断为具有肿瘤或癌症的受试者有关的术语“改善的治疗结果”表示肿瘤的生长或可检测的与肿瘤生长有关的症状的减慢或减少。

[0137] 术语“诱导免疫应答”是指在已经给其施用所述组合物(例如,疫苗)的受试者中引起针对TAA的体液应答(例如,抗体的产生)或细胞应答(例如,T细胞的活化)。

[0138] 术语“插入”在多肽或蛋白的背景下表示一个或多个非天然的氨基酸残基在所述多肽或蛋白序列中的添加。通常,将不超过约1-6个残基(例如1-4个残基)插入在所述多肽或蛋白分子内的任何一个位点处。

[0139] 术语“马尔堡病毒”表示马尔堡病毒(*Marburg marburgvirus*)种的病毒,且具有由国际病毒分类学委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses)赋予它的含义,如在(Kuhn, J.H. 等人. 2010 Arch Virol 155:2083-2103)中记录的。

[0140] 术语“标志物”意指具有与疾病或障碍有关的表达水平或活性的改变的任何蛋白或多核苷酸。

[0141] 术语“经修饰的牛痘Ankara”、“经修饰的牛痘ankara”、“经修饰的牛痘Ankara”或“MVA”表示由Anton Mayr博士通过在鸡胚胎成纤维细胞上连续传代而开发的痘苗病毒的高减毒株;或其变体或衍生物。在(Mayr, A. 等人. 1975 Infection 3:6-14;瑞士专利号568,392)中综述了MVA。

[0142] 本文中使用的术语“肿瘤”是指在身体的某个部分中的组织的新的或异常的生长,特别是作为癌症的特征。

[0143] 术语“中和抗体”或“NAb”表示这样的抗体:其从体液(例如,血清或粘膜分泌物)中纯化或者存在于体液(例如,血清或粘膜分泌物)中,并且其识别特定抗原和抑制所述抗原在受试者(例如,人)中的作用。本文中使用的抗体可以是单个抗体或多个抗体。

[0144] 术语“非中和抗体”或“nnAb”表示不是中和抗体的结合抗体。

[0145] “可操作地连接.”当将第一个核酸序列置于与第二个核酸序列的功能关联中时,所述第一个核酸序列与所述第二个核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,那么所述启动子与所述编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接的DNA序列在相同读码框中是连续的,且在必要时连接两个蛋白编码区。

[0146] 术语“预防”和“阻止”表示抑制病症(例如,肿瘤或与其有关的病症)的发生或发作,或阻止受试者中由治疗的施用或治疗组合的施用引起的病症的一种或多种症状的复发、发作或发生。

[0147] 术语“启动子”表示足以指导转录的多核苷酸。

[0148] 术语“预防有效量”表示组合物(例如,重组MVA载体或药物组合物)的量,该量足以导致病症或其症状(例如,肿瘤或病症或与其有关的症状)的发生、复发或发作的预防,或增强或改善另一种疗法的预防作用。

[0149] 术语“重组的”是指半合成的或合成的起源的多核苷酸,其在自然界中不存在,或以在自然界中未发现的排列与另一个多核苷酸连接。

[0150] 关于病毒载体的术语“重组的”是指这样的载体(例如,病毒基因组):其已经例如使用重组核酸技术进行了体外操作以表达异源病毒核酸序列。

[0151] 术语“一个调节序列”、“多个调节序列”共同地表示启动子序列、多腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节结构域、复制起点、内核糖体进入位点(“IRES”)、增强子等,它们共同地提供编码序列的转录和翻译。并非需要所有这些控制序列总是存在,只要选择的基因能够被转录和翻译即可。

[0152] 术语“穿梭载体”表示可用于将遗传物质从一个宿主系统转移进另一个宿主系统中的遗传载体(例如,DNA质粒)。穿梭载体可以在至少一种宿主(例如,大肠杆菌)中单独地复制(没有任意其它载体的存在)。在MVA载体构建的背景下,穿梭载体经常是这样的DNA质粒:其可以在大肠杆菌中操作,并然后引入培养的被MVA载体感染的细胞中,从而导致新重组MVA载体的产生。

[0153] 术语“沉默突变”是指核苷酸序列中的变化,该变化不会造成由所述核苷酸序列编码的蛋白的一级结构的变化,例如,从AAA(编码赖氨酸)至AAG(也编码赖氨酸)的变化。

[0154] 术语“受试者”意指任何哺乳动物,包括、但不限于,人类、家养动物、耕作动物、动物园动物、体育运动动物或宠物动物,诸如狗、马、猫、牛、大鼠、小鼠、豚鼠等。“处于风险中”的那些受试者的确定可以根据受试者或保健提供者的诊断测试或意见(例如,基因测试、酶或蛋白标志物、标志物历史等)通过任何客观或主观确定做出。

[0155] 术语“苏丹病毒”表示苏丹埃博拉病毒(*Sudan ebolavirus*)种的病毒,且具有由国际病毒分类学委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses)赋予它的含义,如在(Kuhn, J.H. 等人. 2010 Arch Virol 155:2083-2103)中记录的。

[0156] 术语“替代端点”是指除了临床益处的测量以外的临床测量,其用作临床益处的测量的替代。

[0157] 术语“替代标志物”是指这样的实验室测量或物理符号:其在临床或动物试验中用作临床上有意义的端点的替代,所述端点是受试者如何感觉、发挥功能或存活是直接量度,并且预期会预示治疗的作用(Katz, R., NeuroRx 1:189-195 (2004); New drug, antibiotic, and biological drug product regulations; accelerated approval—

FDA. Final rule. Fed Regist 57: 58942-58960, 1992)。

[0158] 术语“保护的替代标志物”是指这样的替代标志物：其在临床或动物试验中用作肿瘤生长的减少或阻止的临床上有意义的端点的替代。

[0159] 术语“同义密码子”表示具有编码相同氨基酸的不同核酸序列的密码子的应用，例如，AAA和AAG（它们二者编码赖氨酸）。密码子优化会将蛋白的密码子改变成载体或宿主细胞最频繁地使用的同义密码子。

[0160] 术语“治疗有效量”是指所述组合物（例如，重组MVA载体或药物组合物）的量，当施用给哺乳动物用于治疗肿瘤时，该量足以实现所述肿瘤的这样的治疗。

[0161] 术语“治疗”表示由一种或多种疗法的施用引起的肿瘤的根除或控制，由肿瘤造成的状况或一种或多种症状的进展、严重程度和/或持续时间的减轻或改善。

[0162] 术语“疫苗”是指这样的物质：在将所述物质施用给受试者以后，其用于引起免疫应答和赋予免疫。这样的免疫可以包括在疫苗施用以后当将受试者暴露于免疫原时发生的细胞或体液免疫应答。

[0163] 术语“疫苗插入物”表示这样的核酸序列：其编码与启动子可操作地连接的异源序列用于当插入重组载体中时表达。所述异源序列可以编码这里描述的糖蛋白或基质蛋白。

[0164] 术语“病毒样颗粒”或“VLP”表示在抗原上和形态学上类似于天然病毒的结构。

[0165] II. 肿瘤相关抗原

[0166] 本发明的组合物可用于诱导对肿瘤相关抗原的免疫应答。

[0167] 在一个特定实施方案中，所述载体表达MUC-1。在一个实施方案中，所述载体表达MUC-1的低糖基化形式。MUC1存在于几乎所有的上皮细胞上，但是它在癌细胞中过表达，且它的有关聚糖比非肿瘤相关的MUC1的那些更短 (Gaidzik N等人. 2013, Chem Soc Rev. 42 (10): 4421-42)。

[0168] 跨膜糖蛋白粘蛋白1 (MUC1) 在多种上皮癌中被异常地糖基化和过表达，并且在所述疾病的进展中起重要作用。肿瘤相关的MUC1就它的生化特征、细胞分布和功能而言不同于在正常细胞中表达的MUC1。在癌细胞中，MUC1参与细胞内信号转导途径并在转录和转录后水平调节它的靶基因的表达 (Nath, S., Trends in Mol Med., 第20卷，第6期，第332-342页，2014年6月)。

[0169] A. TAA的免疫原性片段

[0170] 在不同的实施方案中，TAA的免疫原性片段可以由本文描述的MVA载体表达。

[0171] 在某些实施方案中，免疫原性片段诸如在表1中列举的那些，可以由本文描述的MVA载体表达。

[0172] 表1：肿瘤相关抗原的免疫原性片段

[0173]

抗原	蛋白登录号	片段	位置(氨基酸)
MUC1	NP_001191214	细胞外结构域	20-376
MUC1	NP_001191214	细胞内结构域	407-475
OFA/iLRP	NP_001291217	层粘连蛋白-结合结构域	166-300
5T4	NP_001159864	细胞外结构域	61-345
5T4	NP_001159864	细胞内结构域	377-420
CEA	NP_001278413	Ig结构域	36-659

[0174] 在一个实施方案中,所述载体表达MUC1的免疫原性细胞外结构域片段。

[0175] 在一个实施方案中,所述载体表达由序列AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP (SEQ ID NO:1)组成的MUC1的细胞外结构域片段。

[0176] 在一个实施方案中,所述载体表达由序列AHGVTSAPDNRPALGSTAPP (SEQ ID NO:2)组成的MUC1的细胞外结构域片段。

[0177] 在一个实施方案中,所述载体表达由序列AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALGSTAPP (SEQ ID NO:3)组成的MUC1的细胞外结构域片段。

[0178] 在一个实施方案中,所述载体表达由序列AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALGSTAPP (SEQ ID NO:4)组成的MUC1的细胞外结构域片段。

[0179] 在一个实施方案中,所述载体表达MUC1的细胞内结构域片段。

[0180] 在一个实施方案中,载体表达MUC-1的细胞外片段、MUC-1的细胞内片段和马尔堡病毒的糖蛋白(GP)的跨膜结构域。

[0181] 在一个实施方案中,载体表达TAA的细胞外片段、TAA的细胞内片段和马尔堡病毒的糖蛋白(GP)的跨膜结构域。

[0182] III. 重组病毒载体

[0183] 在一个方面,本发明是一种重组病毒载体,其包含一个或多个编码肿瘤相关抗原或其免疫原性片段的核酸序列。在某些实施方案中,所述重组病毒载体是牛痘病毒载体,和更具体地,MVA载体,所述载体包含一个或多个编码肿瘤相关抗原或其免疫原性片段的核酸序列。

[0184] 还已经使用痘苗病毒来工程改造病毒载体用于重组基因表达和用于作为重组活疫苗的潜在应用(Mackett, M. 等人1982 PNAS USA 79:7415-7419; Smith, G. L. 等人. 1984 Biotech Genet Engin Rev 2:383-407)。这需要借助于DNA重组技术将编码外来抗原的DNA序列(基因)引入痘苗病毒的基因组中。如果将所述基因掺入在所述病毒的生命周期非必需的病毒DNA中的位点处,新产生的重组痘苗病毒可能是传染性的,也就是说能够感染外来细胞,且因而表达掺入的DNA序列(欧洲专利申请No. 83,286和No. 110,385)。以此方式制备的重组痘苗病毒一方面可以用于预防感染性疾病的活疫苗,另一方面用于在真核细胞中制备异源蛋白。

[0185] 已经开发了痘苗病毒的几种这样的毒株以避免天花疫苗接种的不希望的副作用。因而,通过将痘苗病毒(CVA)的Ankara株在鸡胚胎成纤维细胞上长期连续传代,已经制备了经修饰的牛痘Ankara (MVA) (关于综述,参见Mayr, A. 等人. 1975 Infection 3:6-14; 瑞士专利号568,392)。所述MVA病毒可作为ATCC No.: VR-1508从美国典型培养物保藏中心公开得到。通过它的显著减毒来区分MVA,如通过在维持良好免疫原性的同时减少的毒力和减小的在灵长类动物细胞中复制的能力所证实的。已经分析了MVA病毒以确定基因组相对于亲本CVA株的改变。已经鉴别出6个重大基因组DNA缺失(缺失I、II、III、IV、V和VI),共计31,000个碱基对(Meyer, H. 等人. 1991 J Gen Virol 72:1031-1038)。得到的MVA病毒变成宿主细胞严格限于禽细胞。

[0186] 此外,通过它的极度减毒来表征MVA。当在多种动物模型中测试时,证实了MVA甚至在免疫抑制的动物中是无毒性的。更重要的是,已经在广泛的临床试验中证实了MVA株的优

良性质 (Mayr A. 等人. 1978 Zentralbl Bakteriologie [B] 167:375-390; Stickl等人. 1974 Dtsch Med Wschr 99:2386-2392)。在超过120,000人(包括高危患者)的这些研究中,没有副作用与MVA疫苗的使用有关。

[0187] 发现在人细胞中的MVA复制在感染晚期被阻断,从而阻止组装成成熟的传染性病毒粒子。尽管如此,MVA甚至在非允许的细胞中能够在高水平表达病毒和重组基因,并被提出充当有效的和特别安全的基因表达载体 (Sutter, G.和Moss, B. 1992 PNAS USA 89: 10847-10851)。另外,基于具有外源DNA序列的MVA建立了新颖的牛痘载体疫苗,所述外源DNA序列插入在MVA基因组内的缺失III的位点处 (Sutter, G. 等人. 1994 Vaccine 12: 1032-1040)。

[0188] 可以如在下文中所述制备重组MVA痘苗病毒。将DNA-构建体引入被MVA感染的细胞中以允许同源重组,所述DNA-构建体含有编码外来多肽的DNA-序列,其侧接邻近预定的插入位点的MVA DNA序列(例如在两个保守的必需的MVA基因诸如I8R/G1L之间;在重构的且经修饰的缺失III中;或在MVA基因组内的其它非必需位点处)。一旦已经将所述DNA-构建体引入真核细胞中且已经将外源DNA与病毒DNA重组,可能以本身已知的方式分离期望的重组痘苗病毒,优选地借助于标志物。要插入的DNA-构建体可以是直链的或环形的。质粒或聚合酶链式反应产物是优选的。这样的制备重组MVA载体的方法描述在PCT公开W0/2006/026667(通过引用并入本文)中。所述DNA-构建体含有侧接天然存在的缺失的左侧和右侧的序列。将所述外源DNA序列插入在侧接天然存在的缺失的序列之间。对于DNA序列或基因的表达,必须使所述基因的转录所必需的调节序列存在于所述DNA上。这样的调节序列(称作启动子)是本领域技术人员已知的,且包括例如牛痘11 kDa基因的那些,如在EP-A-198,328中所描述的,和7.5 kDa基因的那些 (EP-A-110,385)。通过转染,例如借助于磷酸钙沉淀 (Graham 等人. 1973 Virology 52:456-467; Wigler等人. 1979 Cell 16:777-785),借助于电穿孔 (Neumann等人. 1982 EMBO J. 1:841-845),通过显微注射 (Graessmann等人. 1983 Meth Enzymol 101:482-492),借助于脂质体 (Straubinger等人. 1983 Meth Enzymol 101:512-527),借助于原生质球 (Schaffner 1980 PNAS USA 77:2163-2167)或通过本领域技术人员已知的其它方法,可以将所述DNA-构建体引入MVA感染的细胞中。

[0189] 意外地发现在本文中描述和测试的MVA载体在单次激发或同源激发/强化方案以后是有效的。其它MVA载体设计需要异源激发/强化方案,而其它公开的研究已经不能用MVA载体诱导有效的免疫应答。相反,本发明的MVA载体设计和制备方法可用于生产有效的MVA疫苗载体以引起有效的T-细胞和抗体免疫应答。此外,在单次同源激发强化以后能够引起有效的免疫应答和抗体产生的MVA疫苗载体的应用对于诸如使用、商品化和特别地将物质运输至受影响的第三世界地方等考虑是重要的。

[0190] 在一个实施方案中,本发明是一种重组病毒载体(例如,MVA载体),其包含一个或多个编码肿瘤相关抗原或其免疫原性片段的核酸序列。使用本领域技术人员已知的常规技术,可以构建病毒载体(例如,MVA载体)。所述一种或多种异源基因插入物编码具有期望的免疫原性的多肽,即,通过其施用可以在体内诱导免疫反应(细胞免疫和/或体液免疫)的多肽。在其中引入编码具有免疫原性的多肽的基因的病毒载体(例如,MVA载体)的基因区域侧接必不可少的区域。在编码具有免疫原性的多肽的基因的引入中,适当的启动子可以可操作地连接在编码具有期望的免疫原性的多肽的基因的上游。

[0191] 所述一个或多个编码肿瘤相关抗原或其免疫原性片段的核酸序列可以选自任何TAA。在一个实施方案中,所述一个或多个TAA或其免疫原性片段选自:MUC1,MUC1的细胞外片段,MUC1的细胞内片段,癌胚胎抗原/未成熟的层粘连蛋白受体蛋白(OFA/iLRP),OFA/iLRP的细胞外片段,OFA/iLRP的细胞内片段,癌胚抗原(CEA),CEA的细胞外片段,CEA的细胞内片段,或它们的组合。在示例性实施方案中,所述基因编码这样的多肽或蛋白:其能够在施用它的受试者中诱导免疫应答,和更具体地,能够给所述受试者提供保护和/或治疗益处的免疫应答。

[0192] 在一个实施方案中,所述核酸序列编码MUC1。将所述异源基因插入物插入在与痘病毒表达系统相容的启动子的控制下的载体的一个或多个缺失位点中。

[0193] 在另一个实施方案中,所述核酸序列编码MUC1的免疫原性片段。

[0194] 在一个实施方案中,所述载体表达MUC1的免疫原性细胞外结构域片段。

[0195] 在一个实施方案中,所述载体表达由序列AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP (SEQ ID NO:1)组成的MUC1的细胞外结构域片段。

[0196] 在一个实施方案中,所述载体表达由序列AHGVTSAPDNRPALGSTAPP (SEQ ID NO:2)组成的MUC1的细胞外结构域片段。

[0197] 在一个实施方案中,所述载体表达由序列AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALGSTAPP (SEQ ID NO:3)组成的MUC1的细胞外结构域片段。

[0198] 在一个实施方案中,所述载体表达由序列AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALGSTAPP (SEQ ID NO:4)组成的MUC1的细胞外结构域片段。

[0199] 在一个实施方案中,所述载体表达MUC1的细胞内结构域片段。

[0200] 在一个实施方案中,所述核酸序列编码MUC1的细胞外片段和MUC1的细胞内片段。

[0201] 在一个实施方案中,所述核酸序列编码马尔堡病毒的糖蛋白(GP)的跨膜结构域。

[0202] 在一个实施方案中,所述核酸序列编码MUC1的免疫原性细胞外结构域序列和马尔堡病毒的糖蛋白(GP)的跨膜结构域。

[0203] 在一个实施方案中,所述核酸序列编码MUC1的免疫原性细胞外结构域序列和马尔堡病毒的糖蛋白(GP)的跨膜结构域和MUC1的细胞内结构域序列。

[0204] 在一个实施方案中,所述核酸序列编码MUC1的免疫原性细胞外结构域序列和马尔堡病毒的糖蛋白(GP)的跨膜结构域和MUC1的细胞内结构域序列,所述MUC1的免疫原性细胞外结构域序列包含具有序列AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALGSTAPP (SEQ ID NO:4)的MUC1的片段。

[0205] 在一个实施方案中,将所述缺失III位点重构和修饰以除去非必需的侧翼序列。

[0206] 在示例性实施方案中,将所述疫苗构建成:表达TAA例如MUC1,其使用穿梭载体pGeo-MUC1插入在两个保守的必需的MVA基因(I8R和G1L)之间;和表达MUC1,其使用穿梭载体pGeo-MUC1插入缺失III中。将所述pGeo-MUC1构建成:具有氨苄西林抗性标志物,从而允许所述载体在细菌中复制;具有两个侧翼序列,从而允许所述载体与MVA基因组中的特定位置重组;具有绿色荧光蛋白(GFP)选择标志物,从而允许重组MVA的选择;具有与MVA序列的Flank 1的部分同源的序列,从而使得能够在将MUC1插入MVA基因组中以后从MVA载体除去GFP序列;具有经修饰的H5 (mH5)启动子,其使得能够转录插入的异源基因插入物;和具有

TAA序列。

[0207] 在某些实施方案中,所述多肽或编码所述多肽的核酸序列可以具有突变或缺失(例如,内部缺失、氨基-或羧基-端的截短或点突变)。

[0208] 引入重组病毒载体中的一个或多个基因是在指导其在细胞中的表达的调节序列的控制下。

[0209] 可以将病毒载体的核酸物质包囊例如在脂质膜中或用结构蛋白(例如,衣壳蛋白)包囊,所述结构蛋白可能包括一种或多种病毒多肽。

[0210] 在示例性实施方案中,本发明是一种重组病毒载体(例如,重组MVA载体),其包含来自TAA的一个或多个基因、或由所述一个或多个基因编码的一种或多种多肽。

[0211] 许多TAA的核酸序列是公开的且可得自多种来源,包括、例如,GenBank和PubMed。示例性的GenBank索引(包括MUC1)包括与登录号NM_001204285对应的那些。

[0212] 在某些实施方案中,所述一个或多个基因编码多肽或其片段,所述多肽或其片段在选择TAA或其保留免疫原性活性的免疫原性片段的至少20、25、30、35、40、45、50、55、60、65或70个连续残基上与选择的TAA是基本上相同的(例如,至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或甚至100%同一性)。

[0213] 在一个实施方案中,将所述编码TAA或其免疫原性片段的序列插入MVA载体的缺失位点I、II、III、IV、V或VI中。

[0214] 在一个实施方案中,将所述编码TAA或其免疫原性片段的序列插入在MVA载体的I8R和G1L之间,或插入在MVA载体的重构的且经修饰的缺失III中;和将编码TAA或其免疫原性片段的第二序列插入在MVA载体的I8R和G1L之间,或插入MVA载体的重构的且经修饰的缺失位点III中。

[0215] 在一个实施方案中,所述重组载体包含:在第一缺失位点中,编码TAA或其免疫原性片段的核酸序列,其可操作地连接至与痘病毒表达系统相容的启动子;和在第二缺失位点中,编码VLP形成蛋白的核酸序列,其可操作地连接至与痘病毒表达系统相容的启动子。

[0216] 在示例性实施方案中,本发明是一种重组MVA载体,其包含至少一个编码TAA或其免疫原性片段的异源核酸序列(例如,一个或多个序列),所述异源核酸序列是在指导其在细胞中的表达的调节序列的控制下。所述序列可以例如在选自Pm2H5、Psyn II或mH5启动子的启动子的控制下。

[0217] 本发明的重组病毒载体可以用于感染受试者的细胞,这又会促进所述病毒载体的一个或多个异源序列翻译成蛋白产物(例如,TAA或其免疫原性片段)。如本文中进一步讨论的,可以将所述重组病毒载体施用给受试者,使得它感染所述受试者的一个或多个细胞,其然后促进所述病毒载体的一个或多个病毒基因的表达和刺激针对肿瘤的治疗性或保护性免疫应答。

[0218] 在一个实施方案中,所述重组MVA疫苗表达蛋白,所述蛋白组装成包含TAA或其免疫原性片段的病毒样颗粒(VLP)。尽管不希望受任何特定理论约束,据信,提供TAA以引起保护性免疫应答,并提供基质蛋白以实现VLP的组装和作为T细胞免疫应答的靶标,由此增强保护性免疫应答和提供交叉保护。

[0219] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是马尔堡病毒基质蛋白。

[0220] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是埃博拉病毒基质蛋白。

- [0221] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是苏丹病毒基质蛋白。
- [0222] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是人免疫缺陷病毒1型(HIV-1)基质蛋白。
- [0223] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是由gag基因编码的人免疫缺陷病毒1型(HIV-1)基质蛋白。
- [0224] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是拉沙病毒基质蛋白。
- [0225] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是拉沙病毒Z蛋白。
- [0226] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是拉沙病毒Z蛋白的片段。
- [0227] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是丝状病毒科病毒科中的病毒的基质蛋白。
- [0228] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是逆转录病毒科病毒科中的病毒的基质蛋白。
- [0229] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是沙粒病毒科病毒科中的病毒的基质蛋白。
- [0230] 在一个实施方案中,所述基质蛋白是黄病毒科病毒科中的病毒的基质蛋白。
- [0231] 可以为了在MVA载体中的应用而优化一个或多个核酸序列。优化包括密码子优化,其采用沉默突变以将来自天然序列的选择的密码子改变成被宿主-载体系统最佳地表达的同义密码子。其它类型的优化包括使用沉默突变来中断同聚物段或转录终止子基序。这些优化策略中的每一种可以提高基因的稳定性、提高转录物的稳定性、或提高来自所述序列的蛋白表达的水平。在示例性实施方案中,将减小在TAA序列中的同聚物段的数目以稳定所述构建体。可以为类似于牛痘终止信号的任何对象提供沉默突变。可以添加一个额外核苷酸以便表达任何TAA的跨膜(而不是分泌)形式。
- [0232] 在示例性实施方案中,将所述序列为了在MVA中的表达而密码子优化;将具有 ≥ 5 个脱氧鸟苷、 ≥ 5 个脱氧胞苷、 ≥ 5 个脱氧腺苷和 ≥ 5 个脱氧胸苷的运行的序列通过沉默突变中断以使移码突变引起的表达损失最小化;和通过添加一个额外核苷酸将GP序列修饰成表达所述蛋白的跨膜(而不是分泌)形式。
- [0233] 在一个实施方案中,本发明提供了一种单价的疫苗载体组合物。本文中使用的术语单价表示含有来自一种TAA的序列的疫苗载体组合物。
- [0234] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种二价疫苗。本文中使用的术语二价表示含有两种载体的疫苗载体组合物,所述载体具有来自不同TAA的序列。
- [0235] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种三价疫苗。本文中使用的术语三价表示含有三种载体的疫苗载体组合物,所述载体具有来自不同TAA的序列。
- [0236] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种四价疫苗。本文中使用的术语四价表示含有四种载体的疫苗载体组合物,所述载体具有来自不同TAA的序列。本文中使用的术语四价的和四价是同义的。
- [0237] 本发明也延伸至包含上述重组病毒载体的宿主细胞、以及从被所述重组病毒载体感染的宿主细胞制备的分离的病毒粒子。
- [0238] 在一个实施方案中,用针对核心1 β 3半乳糖基转移酶(T合酶)或COSMC的siRNA过表达所述TAA。COSMC是被认为有活性的T-合酶的表达所需的分子伴侣,所述T-合酶是在粘蛋白型O-聚糖生物合成过程中将Tn抗原(GalNAc α 1-Ser/Thr-R)半乳糖基化以形成核心1 Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr (T抗原)的唯一酶(Wang等人. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010年5月18日; 107(20): 9228-9233)。
- [0239] 在另一个实施方案中,用唾液酸转移酶1过表达所述TAA。唾液酸转移酶是调节含

有唾液酸的分子的细胞水平的关键酶。

[0240] 在特定实施方案中,所述唾液酸转移酶是ST6GALNAC1。

[0241] 在另一个实施方案中,用唾液酸转移酶1和针对核心1 β 3半乳糖基转移酶(T合酶)或COSMC(T合酶特异性的伴侣蛋白; C1GALT1C1)的siRNA过表达所述TAA。

[0242] IV. 药物组合物

[0243] 容易地将本发明的重组病毒载体单独地或组合地配制为用于兽用或人用的药物组合物。所述药物组合物可以包含药学上可接受的稀释剂、赋形剂、载体或佐剂。

[0244] 在一个实施方案中,本发明是一种有效地保护和/或治疗肿瘤的疫苗,所述疫苗包含表达至少一种TAA多肽(例如,TAA)或其免疫原性片段的重组MVA载体。所述疫苗组合物可以包含一种或多种另外的治疗剂。

[0245] 所述药物组合物可以包含1、2、3、4种或超过4种不同的重组MVA载体。

[0246] 在一个实施方案中,本发明提供了一种单价的疫苗载体组合物。本文中使用的术语单价表示含有一种TAA序列的疫苗载体组合物。

[0247] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种二价疫苗。本文中使用的术语二价表示含有两种载体的疫苗载体组合物,所述载体具有来自不同TAA的序列。

[0248] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种三价疫苗。本文中使用的术语三价表示含有三种载体的疫苗载体组合物,所述载体具有来自不同TAA的序列。

[0249] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种四价疫苗。本文中使用的术语四价表示含有四种载体的疫苗载体组合物,所述载体具有来自不同TAA的序列。本文中使用的术语四价的和四价是同义的。

[0250] 本文中使用的短语“药学上可接受的载体”包括标准药用载体中的任一种,诸如适合于胃肠外施用的那些,例如,通过肌肉内、关节内(在关节中)、静脉内、真皮内、腹膜内和皮下途径。这样的制剂的例子包括:水性的和非水性的、等渗的无菌注射溶液,其含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,所述溶质使得所述制剂与预期接受者的血液等渗;和水性的和非水性的无菌混悬液,其可以包括助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。一种示例性的药学上可接受的载体是生理盐水。

[0251] 其它生理上可接受的稀释剂、赋形剂、载体或佐剂和它们的制剂是本领域技术人员已知的。

[0252] 在一个实施方案中,将佐剂用作免疫应答增强剂。在不同的实施方案中,所述免疫应答增强剂选自基于明矾的佐剂、基于油的佐剂、Specol、RIBI、TiterMax、Montanide ISA50或Montanide ISA 720、GM-CSF、基于非离子嵌段共聚物的佐剂、基于二甲基双十八烷基溴化铵(DDA)的佐剂AS-1、AS-2、基于Ribi佐剂系统的佐剂、QS21、Quil A、SAF(处于其微流态化形式(SAF-m)的Syntex佐剂)、二甲基-二十八烷基溴化铵(DDA),基于人补体的佐剂m. vaccae、ISCOMS、MF-59、SBAS-2、SBAS-4、Enhancyn[®]、RC-529、AGP、MPL-SE、QS7、七叶素;洋地黄皂苷;和丝石竹(Gypsophila)、昆诺阿藜(Chenopodium quinoa)皂苷。

[0253] 通过选自例如胃肠外、肌肉内、动脉内、血管内、静脉内、腹膜内、皮下、真皮、透皮、眼、吸入、含服、舌下、舌周、鼻、局部施用和口服施用的途径,可以施用在本文所述的方法中利用的组合物。优选的施用方法可以随多种因素(例如,正在施用的组合物的组分和正在治疗的病症的严重程度)变化。适合用于口服施用的制剂可以由液体溶液诸如溶解在稀释剂

(例如,水、盐水或PEG-400)中的有效量的所述组合物、胶囊剂、药囊剂或片剂组成,各自含有预定量的疫苗。所述药物组合物也可以是用于吸入例如至支气管通路的气雾剂制剂。可以将气雾剂制剂与增压的、药学上可接受的推进剂(例如,二氯二氟甲烷、丙烷或氮气)混合。

[0254] 为了本发明的目的,适合用于递送治疗剂或生物活性剂的药物组合物可以包括,例如,片剂、囊形片、胶囊剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、混悬液、乳剂、溶液、凝胶、水凝胶、口服凝胶、糊剂、滴眼剂、软膏剂、乳膏剂、硬膏剂、灌服药、递送装置、栓剂、灌肠剂、注射剂、植入物、喷雾剂或气雾剂。这些制剂中的任一种可以通过众所周知的和公认的现有方法制备。参见,例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy (第21版), A. R. Gennaro编, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, 和Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, J. Swarbrick编, Informa Healthcare, 2006,它们中的每一篇特此通过引用并入。

[0255] 如果本发明的组合物与免疫刺激剂或佐剂一起共同施用,可以显著地提高所述组合物(例如,疫苗)的免疫原性。本领域技术人员众所周知的合适佐剂包括,例如,磷酸铝、氢氧化铝、QS21、Quil A (及其衍生物和组分)、磷酸钙、氢氧化钙、氢氧化锌、糖脂类似物、氨基酸的八癸基酯、胞壁酰基二肽、聚磷腈、脂蛋白、ISCOM-Matrix、DC-Chol、DDA、细胞因子和其它佐剂及其衍生物。

[0256] 可以将根据本文描述的发明的药物组合物配制成在施用(例如,靶向递送)后立即或在使用控释或延长释放制剂施用以后的任何预定时间段释放所述组合物。在以下情况下,在控释或延长释放制剂中的药物组合物的施用是有用的:所述组合物单独地或组合地具有(i)狭窄的治疗指数(例如,导致有害副作用或毒性反应的血浆浓度和导致治疗效果的血浆浓度之间的差异较小;通常,将治疗指数TI定义为半数致死剂量(LD₅₀)与半数有效剂量(ED₅₀)的比率);(ii)在胃肠道中的狭窄吸收窗;或(iii)短生物半衰期,使得为了维持治疗水平需要在一天中频繁给药。

[0257] 可以遵循许多策略来得到控释或延长释放,其中释放速率超过药物组合物的代谢速率。例如,可以如下得到控释:适当地选择制剂参数和成分,包括、例如,适当的控释组合物和包衣。合适的制剂是本领域技术人员已知的。例子包括单个或多个单位片剂或胶囊组合物、油溶液、混悬液、乳剂、微胶囊、微球、纳米颗粒、贴剂和脂质体。

[0258] 适合用于口服施用的制剂可以由以下制剂组成:(a)液体溶液,诸如溶解在稀释剂(诸如水、盐水或PEG 400)中的有效量的疫苗;(b)胶囊剂、药囊或片剂,各自含有预定量的疫苗,作为液体、固体、颗粒或明胶;(c)在适当的液体中的混悬液;(d)合适的乳剂;和(e)多糖聚合物诸如甲壳质。也可以将疫苗(单独地或与其它合适组分组合地)制成要通过吸入施用(例如,至支气管通路)的气雾剂制剂。可以将气雾剂制剂放在增压的可接受的推进剂(诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等)中。

[0259] 用于直肠施用的合适制剂包括,例如,栓剂,其由疫苗与栓剂基质组成。合适的栓剂基质包括天然的或合成的甘油三酯或石蜡烃。另外,也可能使用明胶直肠胶囊剂,其由疫苗与基质的组合组成,所述基质包括例如液体甘油三酯、聚乙二醇和石蜡烃。

[0260] 本发明的疫苗也可以与细胞因子共同施用以进一步增强免疫原性。所述细胞因子可以通过本领域技术人员已知的方法施用,例如,作为质粒形式的核酸分子或作为蛋白或

融合蛋白。

[0261] 本发明也提供了包含本发明的疫苗的试剂盒。例如，包含疫苗和使用说明书的试剂盒是在本发明的范围内。

[0262] V. 检验点抑制剂和化学疗法的组合

[0263] 在一个实施方案中，以上方法可以进一步包括给所述受试者施用护理标准疗法。在实施方案中，所述护理标准疗法是外科手术、辐射、射频、低温、超声消融、全身化学疗法或它们的组合。

[0264] 可以将本文描述的载体组合物与其它活性成分组合地提供为药物组合物。所述活性剂可以是，非限制性地，包括、但不限于放射性核素、免疫调节剂、抗血管生成剂、细胞因子、趋化因子、生长因子、激素、药物、前药、酶、寡核苷酸、siRNA、促细胞凋亡剂、光活性治疗剂、细胞毒性剂、化学治疗剂、毒素、其它抗体或其抗原结合片段。

[0265] 在另一个实施方案中，所述药物组合物包括本文描述的表达TAA的载体和检验点抑制剂以活化CD4⁺、CD8⁺ 效应T-细胞从而增加肿瘤清除。

[0266] 在不同的实施方案中，所述检验点抑制剂是抗体。

[0267] 抗体是适应性免疫应答的关键组分，在识别外来抗原和刺激免疫应答中起重要作用。许多免疫治疗方案涉及抗体。有许多FDA批准的可用作联合治疗的抗体。这些抗体可以选自阿仑珠单抗、阿特殊单抗、伊匹木单抗、纳武单抗、奥法木单抗、派姆单抗或利妥昔单抗。

[0268] 靶向PD-1或PD-L1的单克隆抗体可以强化针对癌细胞的免疫应答，且已经被证实治疗某些癌症中的许多前途。靶向PD-1的抗体的例子包括派姆单抗和纳武单抗。靶向PD-L1的抗体的一个例子是阿特殊单抗。

[0269] CTLA-4是在某些T细胞上的另一种蛋白，其充当一类“关闭开关”以保持免疫系统在检查中。伊匹木单抗是连接至CTLA-4以阻断活性和强化对肿瘤的免疫应答的单克隆抗体。

[0270] 在另一个实施方案中，将所述免疫原性载体组合物与辅助化学疗法一起施用以增加树突细胞的诱导T细胞增殖的能力。

[0271] 在不同的实施方案中，将所述载体组合物在化学疗法之前、之后或与其同时施用。

[0272] 在某些实施方案中，本发明的组合物能够减小具有肿瘤或癌症的受试者接受化疗或辐射治疗的需要。在其它实施方案中，所述组合物能够减小具有肿瘤或癌症的受试者中与辐射或化学疗法有关的副作用的严重程度。

[0273] 可以单独地或与其它类型的癌症治疗策略（例如，如本文中所述的辐射疗法、化学疗法、激素疗法、免疫疗法和抗肿瘤剂）组合地施用本发明的药物组合物。

[0274] 可与这些方法一起使用的合适化学治疗剂包括索拉非尼、瑞戈非尼、伊马替尼、艾立布林、吉西他滨、卡培他滨、帕唑帕尼、拉帕替尼、达拉菲尼、苹果酸舒尼替尼、克唑替尼、依维莫司、torisirolimus、西罗莫司、阿昔替尼、吉非替尼、阿那曲唑(anastrole)、比卡鲁胺、氟维司群、雷替曲塞、培美曲塞、醋酸戈舍瑞林、厄洛替尼、威罗菲尼、visiodegib、柠檬酸他莫昔芬、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、奥沙利铂、阿柏西普、贝伐珠单抗、曲妥珠单抗、培妥珠单抗、帕木单抗、紫杉烷、博来霉素、美法仑、矾松素、Camptosar、丝裂霉素-C、米托蒽醌、净司他丁酯、多柔比星、聚乙二醇化的多柔比星、Folfori、5-氟尿嘧啶、替莫唑胺、帕瑞

肽、替加氟、吉美拉西、oteraci、伊曲康唑、硼替佐米、来那度胺、伊立替康、表柔比星和罗米地新。优选的化学治疗剂是卡铂、氟尿嘧啶、长春碱、吉西他滨、环磷酰胺、多柔比星、甲氨蝶呤、紫杉醇、托泊替康、依托泊苷、甲氨蝶呤、索拉非尼、伊立替康和特罗凯。

[0275] 通常已经用在癌症患者中的癌症化疗药物的通用名包括：多柔比星、表柔比星、5-氟尿嘧啶、紫杉醇、多西他赛、顺铂、博来霉素、美法仑、矾松素、伊立替康、丝裂霉素-C和米托蒽醌。作为例子，可能使用且可能在临床试验阶段中的一些其它癌症化疗药物包括：resminostat、他喹莫德、refametinib、拉帕替尼、Tyverb、Arenegyr、帕瑞肽、Signifor、替西木单抗、曲美木单抗、兰索拉唑、PrevOnco、ABT-869、linifanib、tivantinib、特罗凯、厄洛替尼、Stivarga、瑞戈非尼、氟-索拉非尼、布立尼布、脂质体多柔比星、乐伐替尼、雷莫芦单抗、培维A酸、Ruchiko、muparfostat、Teysono、替加氟、吉美拉西、奥替拉西和orantinib。

[0276] 可以用在本发明中的一些癌症药物的生产商商标名称包括：多吉美（索拉非尼）、STIVARGA（瑞戈非尼）、AFFINITOR（依维莫司）、格列卫（伊马替尼）、HALAVEN（艾立布林）、力比泰（培美曲塞）、健择（吉西他滨）、VOTRIENT（帕唑帕尼）、TYKERB（拉帕替尼）、TAFINIAR（达拉菲尼）、索坦（苹果酸舒尼替尼）、XALKORI（克唑替尼）、TORISEL（torisirolimus）、INLYTA（阿昔替尼）、易瑞沙（吉非替尼）、ARIMEDEX（阿那曲唑（anastrole））、康士得（比卡鲁胺）、FASLODEX（氟维司群）、拓优得（雷替曲塞）、诺雷德（醋酸戈舍瑞林）、特罗凯（厄洛替尼）、希罗达（卡培他滨）、ZELBROF（威罗菲尼）、ERIVEDGE（visiodegib）、PERJETA（培妥珠单抗）、赫赛汀（曲妥珠单抗）、泰索帝（多西他赛）、JEVTANA（卡巴他赛）、乐沙定（奥沙利铂）、ZALTRAP（阿柏西普）、阿伐他汀（贝伐珠单抗）诺瓦得士、Istubal和VALODEX（柠檬酸他莫昔芬）、TEMODAR（替莫唑胺）、SIGNIFOR（帕瑞肽）、VECTIBIX（帕木单抗）、阿霉素（多柔比星）、DOXIL（聚乙二醇化的多柔比星）、注射用紫杉醇（紫杉醇）、TEYSUNO（替加氟、吉美拉西、奥替拉西）、硼替佐米（万珂）和来那度胺、ISTODAX（罗米地新）。

[0277] 据信，多柔比星（阿霉素）和DOXIL（在脂质体中的聚乙二醇化的多柔比星）可以起作用以杀死癌细胞的一种方式是通过插入DNA中。还有人认为，多柔比星可以变成氧化亚氮自由基和/或由此增加癌细胞中的自由基的细胞水平和由此触发细胞的损伤和程序性死亡。多柔比星具有限制它的应用的潜在严重不利全身效应，诸如心脏损伤。

[0278] 5-氟尿嘧啶（5-FU, Efudex）是一种用于治疗癌症的嘧啶类似物。它是一种自杀抑制剂并通过胸苷酸合酶的不可逆抑制而起作用。象许多抗癌药物一样，5-FU的作用被系统广泛感觉到，但是最严重地落在更频繁地使用它们的核苷酸合成机制的快速分裂的细胞（诸如癌细胞）上。5-FU会杀死身体部分中的快速分裂中的非癌细胞，例如，衬在消化道上的细胞。Folfori是使用5-FU、Camptosar和伊立替康（甲酰四氢叶酸）的治疗。5-FU掺入DNA分子中并停止合成，且Camptosar是阻止DNA解螺旋和复制的拓扑异构酶抑制剂。伊立替康（亚叶酸，甲酰四氢叶酸）是用作高剂量的药物甲氨蝶呤的“挽救”药物的维生素B衍生物，且其调节/增强/减少5-FU（氟尿嘧啶）的副作用。丝裂霉素C是有效的DNA交联剂。长期使用可能导致持久的骨髓损伤。它也可能造成肺纤维化和肾损伤。

[0279] 紫杉烷试剂包括紫杉醇（泰素）和多西他赛（泰索帝）。紫杉烷会破坏细胞微管功能。微管是细胞分裂所必需的。紫杉烷会稳定微管中的GDP-结合的微管蛋白，由此抑制细胞分裂的过程。癌细胞不再可以分裂。但是，紫杉烷同样可能抑制非癌细胞的细胞分裂。

[0280] 顺铂(其包括卡铂和奥沙利铂)是有机铂复合物,其在体内反应从而结合DNA并造成DNA的交联。交联的DNA触发癌细胞的细胞凋亡(程序性细胞死亡)。但是,顺铂还可以触发非癌细胞的细胞凋亡。

[0281] 博来霉素诱导DNA链断裂。一些研究提示,博来霉素也会抑制胸苷向DNA链中的掺入。博来霉素还将杀死非癌细胞。美法仑(爱克兰)是向DNA的鸟嘌呤碱基添加烷基的氮芥烷化剂。美法仑的主要不良作用包括呕吐、口腔溃疡和骨髓抑制。

[0282] 已经证实矾松素会在众多癌细胞系中诱导细胞周期停滞和细胞凋亡。它通过Akt/mTOR途径的抑制而触发自噬。它通过JNK依赖性的p53 Ser15磷酸化而诱导G2/M细胞周期停滞和细胞凋亡。它促进自噬性细胞死亡。它抑制Akt/mTOR信号传递。它以PI 3-激酶依赖性的方式诱导细胞内ROS产生。对于非癌细胞,矾松素是毒素、生殖毒素和诱变剂。

[0283] 可以基于它的特异性和患者中的癌细胞可能对其敏感的细胞途径靶标的抑制效能来选择化学治疗剂。在实践本发明时,可以通过它的抑制细胞途径靶标的能力来选择化学治疗剂,所述细胞途径靶标选自mTORC、RAF激酶、MEK激酶、磷酸肌醇激酶3、成纤维细胞生长因子受体、多重酪氨酸激酶、人表皮生长因子受体、血管内皮生长因子、其它血管生成、热激蛋白; Smo (平滑)受体、FMS-样酪氨酸激酶3受体、细胞凋亡蛋白抑制剂、细胞周期蛋白依赖性激酶、脱乙酰基酶、ALK酪氨酸激酶受体、丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶Pim-1、豪猪酰基转移酶、hedgehog途径、蛋白激酶C、mDM2、Glypiciin3、ChK1、肝细胞生长因子MET受体、表皮生长因子结构域-样7、Notch途径、Src-家族激酶、DNA甲基转移酶、DNA嵌入剂、胸苷合酶、微管功能干扰剂、DNA交联剂、DNA链断裂剂、DNA烷化剂、JNK依赖性的p53 Ser15磷酸化诱导物、DNA拓扑异构酶抑制剂、Bcl-2和自由基产生物。

[0284] 在一个实施方案中,在表现遗传调节剂之前、之后或与其同时施用所述载体组合物。

[0285] 在一个实施方案中,在表现遗传调节剂之前、之后或与其同时施用所述载体组合物,所述表现遗传调节剂选自DNA甲基转移酶的抑制剂、组蛋白甲基转移酶的抑制剂、组蛋白乙酰基转移酶的抑制剂、组蛋白脱乙酰基酶的抑制剂和赖氨酸脱甲基酶的抑制剂。

[0286] 在一个实施方案中,在DNA甲基转移酶的抑制剂之前、之后或与其同时施用所述载体组合物。

[0287] 在一个实施方案中,在组蛋白脱乙酰基酶的抑制剂之前、之后或与其同时施用所述载体组合物。

[0288] VI. 使用方法

[0289] 本发明的组合物可以用作疫苗用于诱导对TAA的免疫应答。

[0290] 在示例性实施方案中,本发明提供了一种在有此需要的受试者中诱导对TAA的免疫应答的方法,所述方法包括给所述受试者以有效量施用编码至少一种TAA或其免疫原性片段的重组病毒载体以产生对TAA的免疫应答。所述方法的结果是,所述受试者被部分地或完全地针对所述TAA免疫。

[0291] 在一个实施方案中,本发明提供了使用本文描述的组合物活化受试者中的免疫应答的方法。在某些实施方案中,本发明提供了使用本文描述的组合物促进受试者中的免疫应答的方法。在某些实施方案中,本发明提供了使用本文描述的组合物增加受试者中的免疫应答的方法。在某些实施方案中,本发明提供了使用本文描述的组合物增强受试者中的

免疫应答的方法。

[0292] 在示例性实施方案中,本发明提供了一种在有此需要的受试者中治疗、减小、预防或延迟肿瘤的生长方法,所述方法包括将本发明的组合物以治疗有效量施用给所述受试者。治疗的结果是,受试者具有改善的与肿瘤有关的疾病的治疗概况。

[0293] 在示例性实施方案中,本发明提供了一种在有此需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括将本发明的组合物以治疗有效量施用给所述受试者。治疗的结果是,受试者具有改善的癌症治疗概况。

[0294] 在一个实施方案中,所述方法可以减少一种或多种肿瘤的生长,使一种或多种肿瘤收缩,或根除一种或多种肿瘤。例如,肿瘤质量不会增加。在某些实施方案中,所述肿瘤与它的原始质量相比收缩了10%、25%、50%、75%、85%、90%、95%或99%或更多(或之间的任何数字)。在某些实施方案中,所述收缩使得,不能手术的肿瘤足以允许切除术,如果需要的话。实质收缩的概念也可以被称作“消退”,其表示身体生长(诸如肿瘤)的减少。这样的减少可以通过测量的参数(例如,但不限于,直径、质量(即,重量)或体积)的减小来确定。该减少决不指示大小被完全减小,仅指示测量的参数定量地小于先前的测定。

[0295] 在一个实施方案中,所述方法可以阻止肿瘤转移。

[0296] 在示例性实施方案中,本发明提供了一种在有此需要的受试者中治疗增殖性障碍的方法,所述方法包括将本发明的组合物以治疗有效量施用给所述受试者。本文中使用的术语“增殖性障碍”表示这样的障碍:其中细胞群体的生长超过周围细胞的生长,且与周围细胞的生长不协调。在某些情况下,增殖性障碍导致肿瘤的形成。在某些实施方案中,所述肿瘤是良性的、恶化前的或恶性的。在其它实施方案中,所述增殖性障碍是自身免疫疾病、血管闭塞、再狭窄、动脉粥样硬化或炎症肠病。在一个实施方案中,要治疗的自身免疫疾病可以选自I型自身免疫疾病或II型自身免疫疾病或III型自身免疫疾病或IV型自身免疫疾病,例如,多发性硬化(MS)、类风湿性关节炎、糖尿病、I型糖尿病(糖尿病)、系统性红斑狼疮(SLE)、慢性多关节炎、巴塞多氏病、慢性肝炎的自身免疫形式、溃疡性结肠炎、变态反应I型疾病、变态反应II型疾病、变态反应III型疾病、变态反应IV型疾病、纤维肌痛、脱发、别赫捷列夫氏病、克罗恩氏病、重症肌无力、神经性皮炎、风湿性多肌痛、进行性系统性硬化症(PSS)、银屑病、莱特尔综合症、风湿性关节炎、银屑病、血管炎等或II型糖尿病。

[0297] 在一个实施方案中,所述免疫应答是体液免疫应答、细胞免疫应答或它们的组合。

[0298] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的结合抗体的产生。

[0299] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的中和抗体的产生。

[0300] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的非中和抗体的产生。

[0301] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的细胞介导的免疫应答的产生。

[0302] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的中和抗体和非中和抗体的产生。

[0303] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的中和抗体和细胞介导的免疫的产生。

[0304] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的非中和抗体和细胞介导的免疫的产生。

[0305] 在一个特定实施方案中,所述免疫应答包含针对所述TAA的中和抗体、非中和抗体和细胞介导的免疫的产生。

[0306] 在某些实施方案中,本发明的组合物可以用作疫苗用于治疗处于发生肿瘤的风险中的受试者或已经具有肿瘤的受试者。所述重组病毒载体包含编码TAA、病毒蛋白(以促进病毒样颗粒(VLP)的组装)或另外酶(以促进TAA的表达和糖基化)的基因或序列。

[0307] 通常,所述疫苗将是在混合物中并同时施用,但是也可以单独施用。

[0308] 要根据本文所述的方法治疗的受试者可以是已经被医学从业人员诊断为具有这样的病症的受试者(例如具有肿瘤的受试者)。可以通过任意合适的方式执行诊断。本领域技术人员会理解,要根据本发明治疗的受试者可能已经使用标准测试鉴别为,或可能已经在没有检查下鉴别为,由于一种或多种风险因素的存在而处于高危中的受试者。

[0309] 可以将预防性处理施用给例如这样的受试者:其尚未具有肿瘤,但是其易于发生肿瘤或以其它方式处于发生肿瘤的风险中。

[0310] 可以将治疗性处理施用给例如已经具有肿瘤的受试者,以便改善或稳定所述受试者的状况。结果是改善的治疗概况。在某些情况下,与等同的未经处理的对照相比,处理可以使障碍或其症状改善例如5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%,如通过任何标准技术测量的。

[0311] 例如,取决于癌症的类型,改善的治疗概况可以选自癌症的一种或多种症状的减轻、疾病的程度的减小、疾病的稳定化(即,未恶化)状态、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或减轻、可检测的或不可检测的缓解(无论部分的还是完全的)、肿瘤消退、肿瘤生长的抑制、肿瘤转移的抑制、癌细胞数目的减少、向周围器官中的癌细胞浸润的抑制、改善的至疾病进展的时间(TTP)、改善的应答率(RR)、延长的总存活(OS)、延长的至下一次治疗的时间(TNTT)、或延长的从第一次进展至下一次治疗的时间、或前述两项或更多项的组合。

[0312] 在其它实施方案中,治疗可能导致与肿瘤(例如癌症)有关的疾病的一种或多种症状的改善。根据该实施方案,通过检测症状的改善或缺失可以评估治疗的证实。

[0313] 在一个实施方案中,本发明是通过给受试者施用编码至少一种TAA或其免疫原性片段的重组病毒载体在受试者(例如,人)中诱导免疫应答的方法。所述免疫应答可以是细胞免疫应答或体液免疫应答或它们的组合。

[0314] 例如,通过注射(例如,肌肉内、动脉内、血管内、静脉内、腹膜内或皮下),可以施用所述组合物。

[0315] 应当理解,可以同时或依次(例如,强化)采用超过一种施用本发明的疫苗的途径。另外,可以与传统的免疫接种方案(诸如采用蛋白抗原、痘苗病毒和灭活病毒作为疫苗)组合地采用本发明的疫苗。因而,在一个实施方案中,将本发明的疫苗施用给受试者(用本发明的疫苗“激发”所述受试者),并然后施用传统疫苗(用传统疫苗“强化”所述受试者)。在另一个实施方案中,首先将传统疫苗施用给受试者,随后施用本发明的疫苗。在另一个实施方案中,共同施用传统疫苗和本发明的疫苗。

[0316] 尽管不受任何特定机理约束,据信,在接种如本文中所述的药物组合物后,宿主的免疫系统如下对所述疫苗做出应答:产生分泌的和血清的抗体,所述抗体是对一种或多种TAA或其免疫原性片段特异性的;和产生对一种或多种TAA或其免疫原性片段特异性的、细胞介导的免疫应答。作为疫苗接种的结果,所述宿主变成至少部分地或完全地对一种或多

种TAA或其免疫原性片段具有免疫力,或免于发生由肿瘤造成的中等或严重疾病。

[0317] 在一个方面,提供了减轻与肿瘤有关的一种或多种症状、减轻所述症状的严重程度或减少所述症状的发生的方法,所述方法包括施用有效量的包含重组MVA病毒载体的药物组合物,所述重组MVA病毒载体包含TAA和基质蛋白序列,任选地共表达促进TAA的表达和期望糖基化的序列。

[0318] 在另一个方面,本发明提供了提供抗-TAA免疫的方法,所述方法包括施用有效量的包含重组MVA疫苗的药物组合物,所述重组MVA疫苗表达TAA和病毒基质蛋白以允许VLP的形成。

[0319] 还应当理解,可以进行本发明的疫苗组合物的单次或多次施用。例如,处于特别高的发生肿瘤的风险中的受试者可能需要多次免疫接种以建立和/或维持保护性免疫应答。通过测量结合和中和分泌和血清抗体的量以及T细胞的水平,可以监测诱导的免疫的水平,并在必要时调节剂量或重复疫苗接种以维持期望的保护水平。

[0320] 在一个实施方案中,将施用重复至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次或超过8次。

[0321] 在一个实施方案中,将施用重复2次。

[0322] 在一个实施方案中,提供约2-8次、约4-8次或约6-8次施用。

[0323] 在一个实施方案中,在施用之间提供约1-4-周、2-4周、3-4周、1周、2周、3周、4周或超过4周间隔。

[0324] 在一个具体实施方案中,在2次施用之间使用4-周间隔。

[0325] 在一个实施方案中,本发明提供了一种监测治疗进程的方法。在示例性实施方案中,所述监测聚焦于生物活性、免疫应答和/或临床应答。

[0326] 在一个实施方案中,所述生物活性是T-细胞免疫应答、调节性T-细胞活性、分子应答(MRD)、细胞产生应答或常规肿瘤应答,例如,在佐剂或晚期病场合中。

[0327] 在一个实施方案中,监测免疫应答,例如,通过免疫测定诸如细胞毒性测定、细胞内细胞因子测定、四聚体测定或ELISPOT测定。

[0328] 在一个实施方案中,监测临床应答,例如通过使用确定的定义诸如应答(肿瘤消退)、无进展、无复发或总存活的结果。

[0329] 在一个实施方案中,所述方法包括在受试者中确定诊断标志物(例如,受本文化合物调节的本文所述的任何靶标,蛋白或其指标,等)或诊断测量(例如,筛选、测定)的水平的步骤,所述受试者已经接受治疗量的本文化合物,其足以治疗所述疾病或其症状。可以将所述方法中确定的标志物的水平与在健康的正常对照中或在其它受折磨的患者中的已知标志物水平进行对比以确立所述受试者的疾病状态。在优选的实施方案中,在晚于第一水平的确定的时间点确定受试者中的标志物的第二水平,并对比所述两个水平以监测疾病的进程或治疗的效力。在某些优选的实施方案中,在开始根据本发明的治疗之前,确定受试者中的治疗前标志物水平;然后可以将该治疗前标志物水平与治疗开始以后所述受试者中的标志物水平进行对比,以确定所述治疗的效力。

[0330] 在一个实施方案中,在受试者的状况改善(例如,受试者的疾病水平的改变(例如,减小))后,如果必要的话,可以施用维持剂量的本发明的化合物、组合物或组合。随后,可以减小施用的剂量或频率或二者(作为症状的函数)至保持改善的状况的水平。但是,患者可

以在疾病症状的任何复发后要求在长期基础上的间歇治疗。

[0331] A. 剂量

[0332] 以与剂量制剂相容的方式,和以将是治疗上有效的、免疫原性的和保护性的量,施用所述疫苗。要施用的量取决于要治疗的受试者,包括、例如,个体的免疫系统合成抗体的能力,和,如果需要的话,产生细胞介导的免疫应答的能力。施用需要的活性成分的精确量取决于从业人员的判断,且可以在逐个患者的基础上监测。但是,合适的剂量范围可容易地由本领域技术人员确定,且通常在约 5.0×10^6 TCID₅₀至约 5.0×10^9 TCID₅₀的范围内。所述剂量也可能取决于,但不限于,施用途径、患者的健康状态和重量以及制剂的性质。

[0333] 以将是治疗上有效的、免疫原性的和/或保护免于表达TAA的肿瘤的量,施用本发明的药物组合物。施用的剂量取决于要治疗的受试者(例如,施用方式,和正在治疗的受试者的年龄、体重、免疫系统的能力和一般健康)。以提供足够表达水平的量施用所述组合物,所述表达水平会引起免疫应答,而没有不适当的不利生理效应。优选地,本发明的组合物是包括一种或多种TAA或其免疫原性片段和大基质蛋白的异源病毒载体;且以以下剂量施用:例如, 1.0×10^4 至 9.9×10^{12} TCID₅₀的病毒载体,优选地 1.0×10^5 TCID₅₀至 1.0×10^{11} TCID₅₀ pfu,更优选地 1.0×10^6 至 1.0×10^{10} TCID₅₀ pfu,或最优选地 5.0×10^6 至 5.0×10^9 TCID₅₀。所述组合物可以包括,例如,至少 5.0×10^6 TCID₅₀的病毒载体(例如, 1.0×10^8 TCID₅₀的病毒载体)。医师或研究人员可以决定适当的量和剂量方案。

[0334] 所述方法的组合物可以包括,例如, 1.0×10^4 至 9.9×10^{12} TCID₅₀的病毒载体,优选地 1.0×10^5 TCID₅₀至 1.0×10^{11} TCID₅₀ pfu,更优选地 1.0×10^6 至 1.0×10^{10} TCID₅₀ pfu,或最优选地 5.0×10^6 至 5.0×10^9 TCID₅₀。所述组合物可以包括,例如,至少 5.0×10^6 TCID₅₀的病毒载体(例如, 1.0×10^8 TCID₅₀的病毒载体)。所述方法可以包括,例如,将所述组合物施用给所述受试者2次或更多次。

[0335] 术语“有效量”是指施用的组合物的量,其以临床上有关的方式改善、抑制或改进受试者的情况或障碍的症状(例如,改善、抑制或改进与肿瘤(例如癌症)有关的疾病,或提供对肿瘤的有效免疫应答)。认为所述受试者中的任何改善足以实现治疗。优选地,足以治疗的量是阻止与肿瘤有关的疾病的发生或其一种或多种症状的量,或是减轻与肿瘤有关的疾病的一种或多种症状的严重程度、或受试者遭受与肿瘤有关的疾病的一种或多种症状的时间长度的量(例如,相对于没有用本发明的组合物治疗的对照受试者,减轻至少10%、20%或30%,更优选地减轻至少50%、60%或70%,和最优选地减轻至少80%、90%、95%、99%或更多)。用于实践本文所述的方法(例如,与肿瘤有关的疾病的治疗)的药物组合物的足够量随施用方式和正在治疗的受试者的年龄、体重和一般健康而变化。

[0336] 重要的是,注意到,本发明的价值可能从未以实际临床益处的方式证实。相反,本发明的价值可能将以针对保护的替代标志物的成功的方式来证实。对于适应症诸如与肿瘤有关的疾病(其中尝试测量干预的临床益处是不实用的或不道德的),FDA的加速批准(FDA's Accelerated Approval)程序允许基于针对替代端点的效力批准新疫苗。因此,本发明的价值可能在于它的诱导免疫应答的能力,所述免疫应答构成保护的替代标志物。

[0337] 类似地,FDA可能允许基于它的动物规则(Animal Rule)批准针对TAA的疫苗。在该情况下,基于在动物中的效力而获得批准。

[0338] 所述方法的组合物可能包括,例如, 1.0×10^4 至 9.9×10^{12} TCID₅₀的病毒载体,优选

地 1.0×10^5 TCID₅₀至 1.0×10^{11} TCID₅₀ pfu,更优选地 1.0×10^6 至 1.0×10^{10} TCID₅₀ pfu,或最优选地 5.0×10^6 至 5.0×10^9 TCID₅₀。所述组合物可以包括,例如,至少 5.0×10^6 TCID₅₀的病毒载体(例如, 1.0×10^8 TCID₅₀的病毒载体)。所述方法可以包括,例如,施用所述组合物2次或更多次。

[0339] 在某些情况下,可能合乎需要的是,将本发明的TAA疫苗与诱导针对其它试剂、特别是其它TAA的保护性应答的疫苗组合。例如,可以与其它基因免疫接种疫苗诸如针对流感(Ulmer, J. B. 等人, Science 259:1745-1749 (1993); Raz, E. 等人, PNAS (USA) 91: 9519-9523 (1994))、疟疾(Doolan, D. L. 等人, J. Exp. Med. 183:1739-1746 (1996); Sedegah, M. 等人, PNAS (USA) 91:9866-9870 (1994))和结核病(Tascon, R. C. 等人, Nat. Med. 2:888-892 (1996))的那些同时、单独地或依次地施用本发明的疫苗组合物。

[0340] B. 适应症

[0341] 在具体实施方案中,可以将在本发明的方法中有用的免疫原性载体施用给具有肿瘤的受试者或诊断出具有以下病症的受试者:前列腺癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、子宫内膜癌、膀胱癌、结肠癌或宫颈癌;腺癌;黑素瘤;淋巴瘤;神经胶质瘤;或肉瘤诸如软组织肉瘤和骨肉瘤。

[0342] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于治疗或预防癌症的本发明的载体,所述癌症包括、但不限于,赘生物(neoplasms)、肿瘤、转移灶或以失控的细胞生长为特征的任何疾病或障碍,和特别是其多药抗性形式。所述癌症可以是多病灶肿瘤。要用本发明的治疗剂治疗的癌症和增殖性障碍的类型的例子包括、但不限于:白血病(例如骨髓细胞、前髓细胞、粒单核细胞、单核细胞、红白血病、慢性髓细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病)、淋巴瘤(例如霍奇金病和非霍奇金病)、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、尤因瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、肾细胞癌、肝细胞癌、威尔曼瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、发育异常和增生。在一个特定实施方案中,将本发明的治疗化合物施用给具有前列腺癌(例如,前列腺炎、良性前列腺肥大、良性前列腺增生(BPH)、前列腺副神经节瘤、前列腺腺癌、前列腺上皮内瘤形成、前列腺-直肠瘘管和非典型前列腺间质损伤)的患者。在一个特别优选的实施方案中,将本发明的药物用于治疗癌症、神经胶质瘤、肝癌和/或结肠癌。癌症的治疗和/或预防包括、但不限于:减轻与癌症有关的症状,癌症的进展的抑制,癌症的消退的促进,和免疫应答的促进。

[0343] 本文中使用的术语肿瘤表示组织的异常生长。肿瘤可以是良性的或恶性的。通常,恶性肿瘤被称作癌症。癌症与良性肿瘤的差别在于恶性细胞的如下侵入其它组织的能力:通过侵入直接生长进邻近组织中,或通过转移植入远位点中(即,穿过血液或淋巴系统的运输)。本发明的方法适合用于治疗良性和恶性肿瘤(癌症)。

[0344] 如本文中定义的,浅表肿瘤是位于身体的外表面上的肿瘤,其已经限制自身且没有传播至周围组织或身体的其它部分。内部肿瘤位于内部器官或身体的其它内部部分上。一种侵袭性肿瘤是已经开始突破正常组织屏障并侵入周围区域的肿瘤,例如,已经传播超出导管和小叶的侵袭性乳腺癌。

[0345] 预见到通过本文中公开的方法治疗的肿瘤的类型非排它列表包括以下种类:
(a) 腹部肿瘤,包括腹膜肿瘤和腹膜后肿瘤; (b) 骨肿瘤,包括股骨肿瘤、颅骨肿瘤、颌肿瘤、

下颌肿瘤、上颌肿瘤、腭肿瘤、鼻肿瘤、眶肿瘤、颅底肿瘤和脊椎肿瘤；c) 乳腺肿瘤，包括男性乳腺肿瘤、乳房导管癌和叶状瘤；(d) 消化系统肿瘤，包括胆道肿瘤、胆管肿瘤、胆总管肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠肿瘤、食管肿瘤、肠肿瘤、盲肠肿瘤、阑尾肿瘤、结肠直肠肿瘤、结肠直肠腺瘤性结肠息肉病、结肠直肠加德纳综合征、结肠肿瘤、结肠腺瘤性结肠息肉病、结肠加德纳综合征、乙状结肠肿瘤、遗传性非息肉性结肠直肠肿瘤、直肠肿瘤、肛门肿瘤、十二指肠肿瘤、回肠肿瘤、空肠肿瘤、胃肿瘤、肝肿瘤、肝细胞腺瘤、肝细胞癌、胰腺肿瘤、胰岛细胞腺瘤、胰岛素瘤、胰岛细胞癌、胃泌素瘤、胰高血糖素瘤、生长抑素瘤、胰腺瘤、胰腺导管癌和腹膜肿瘤；(e) 内分泌腺肿瘤，包括肾上腺肿瘤、肾上腺皮质肿瘤、肾上腺皮质腺瘤、肾上腺皮质癌、多发性内分泌瘤病、多发性内分泌瘤病1型、多发性内分泌瘤病2a型、多发性内分泌瘤病2b型、卵巢肿瘤、粒层细胞肿瘤、黄体瘤、Meigs氏综合征、卵巢塞尔托利-莱迪希细胞肿瘤、泡膜细胞瘤、胰腺肿瘤、副肿瘤内分泌综合征、甲状旁腺肿瘤、垂体瘤、纳尔逊综合征、睾丸肿瘤、睾丸塞尔托利-莱迪希细胞肿瘤和甲状腺肿瘤；(f) 眼肿瘤，包括结膜肿瘤、眶肿瘤、视网膜肿瘤、视网膜母细胞瘤、葡萄膜肿瘤、脉络膜肿瘤和虹膜肿瘤；(g) 脑、头和颈肿瘤，包括食管肿瘤、面部肿瘤、眼睑肿瘤、口腔肿瘤、牙龈肿瘤、口腔白斑、毛状白斑、唇肿瘤、腭肿瘤、唾液腺肿瘤、腮腺肿瘤、舌下腺肿瘤、颌下腺肿瘤、舌肿瘤、耳鼻咽喉肿瘤、耳肿瘤、咽肿瘤、鼻肿瘤、鼻旁窦肿瘤、上颌窦肿瘤、咽肿瘤、下咽肿瘤、鼻咽肿瘤、鼻咽肿瘤、口咽肿瘤、扁桃体肿瘤、甲状旁腺肿瘤、甲状腺肿瘤和气管肿瘤；(h) 血液学肿瘤，包括骨髓肿瘤；(i) 神经系统肿瘤，包括中枢神经系统肿瘤、脑肿瘤、脑室肿瘤、脉络丛肿瘤、脉络丛乳头状瘤、幕下肿瘤、脑干肿瘤、小脑肿瘤、神经细胞瘤、松果体瘤、幕上肿瘤、下丘脑肿瘤、垂体肿瘤、纳尔逊综合征、颅神经肿瘤、视神经肿瘤、视神经胶质瘤、听神经瘤、神经纤维瘤病2、神经系统副肿瘤综合征、Lambert-Eaton肌无力综合征、边缘叶脑炎、横贯性脊髓炎、副肿瘤性小脑变性、副肿瘤性多发性神经病、周围神经系统肿瘤、颅神经肿瘤、听神经瘤和视神经肿瘤；(j) 盆腔肿瘤；(k) 皮肤肿瘤，包括棘皮瘤、皮脂腺肿瘤、汗腺肿瘤和基底细胞癌；(l) 软组织肿瘤，包括肌肉肿瘤和血管肿瘤；(m) 脾肿瘤；(n) 胸部肿瘤，包括心脏肿瘤、纵隔肿瘤、呼吸道肿瘤、支气管肿瘤、肺肿瘤、支气管原癌、非小细胞肺癌、肺硬变病、潘科斯特综合征、肺胚细胞瘤、肺硬化性血管瘤、胸膜肿瘤、恶性胸腔积液、气管肿瘤、胸腺肿瘤和胸腺瘤；(o) 泌尿生殖器肿瘤，包括女性生殖器肿瘤、输卵管肿瘤、子宫肿瘤、子宫颈肿瘤、子宫内膜肿瘤、子宫内膜样癌、子宫内膜间质瘤、子宫内膜间质肉瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤、男性生殖器肿瘤、阴茎肿瘤、前列腺肿瘤、睾丸肿瘤、泌尿系肿瘤、膀胱肿瘤、肾肿瘤、肾细胞癌、肾母细胞瘤、Denys-Drash综合征、WAGR综合征、中胚叶肾瘤、输尿管肿瘤和尿道肿瘤；和(p) 另外的癌症，包括肾癌、肺癌、黑素瘤、白血病、巴雷特食管、组织转化初癌细胞。

[0346] 在一个实施方案中，本文描述的刺激免疫应答的载体表达MUC1或其免疫原性片段，且对于治疗以下病症是特别有用的：腺癌（乳房、结肠直肠、胰腺、其它）、类癌瘤、脊索瘤、绒毛膜癌、结缔组织增生性小圆细胞肿瘤（DSRCT）、上皮样肉瘤、滤泡树突细胞肉瘤、交错树突细胞/网状细胞肉瘤、肺：II型肺泡壁细胞病变（II型细胞增生、发育异常的II型细胞、顶端肺泡增生）、间变性大细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤（可变的）、浆母细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、上皮样间皮瘤、骨髓瘤、浆细胞瘤、神经束膜瘤、肾细胞癌、滑膜肉瘤（上皮区域）、胸腺癌（经常）、脑膜瘤或佩吉特病。

[0347] C. 施用

[0348] 本文中使用的术语“施用”表示将一定剂量的本发明的药物组合物提供给受试者的方法。通过选自例如胃肠外、真皮、透皮、眼、吸入、含服、舌下、舌周、鼻、直肠、局部施用和口服施用的途径，可以施用在本文所述的方法中利用的组合物。胃肠外施用包括静脉内、腹膜内、皮下、动脉内、血管内和肌肉内施用。优选的施用方法可以随多种因素（例如，正在施用的组合物的组分和正在治疗的病症的严重程度）变化。

[0349] 本发明的药物组合物（例如，疫苗）的施用可以是通过本领域技术人员已知的任何途径。施用可以是通过例如肌肉内注射。还可以通过选自例如胃肠外、真皮、透皮、眼、吸入、含服、舌下、舌周、鼻、直肠、局部施用和口服施用的途径施用在本文所述的方法中利用的组合物。胃肠外施用包括静脉内、腹膜内、皮下和肌肉内施用。优选的施用方法可以随多种因素（例如，正在施用的组合物的组分和正在治疗的病症的严重程度）变化。

[0350] 另外，可以将本发明的组合物的单次或多次施用提供给受试者。例如，特别易于发生肿瘤的受试者可能需要多次治疗以建立和/或维持针对肿瘤的保护。可以监测由本文描述的药物组合物提供的诱导的免疫水平，例如，测量中和分泌和血清抗体的量。然后可以在必要时调节或重复所述剂量以维持免于肿瘤发生的期望保护水平或减少肿瘤生长。

[0351] 通过定时施用所述载体，可以得到增加的疫苗接种效力。上述的激发和强化组合物中的任一种适合与本文所述的方法一起使用。

[0352] 在一个实施方案中，将MVA载体用于激发和强化目的。这样的方案包括、但不限于MM、MMM和MMMM。

[0353] 在某些实施方案中，施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10次或超过10次MVA强化。

[0354] 可以单独地施用载体（即，可以在一个或几个时机施用质粒，用或不用替代类型的疫苗制剂（例如，用或不用蛋白或另一类载体诸如病毒载体的施用）），且任选地，与佐剂一起或与替代强化免疫接种（例如，活载体疫苗诸如重组改良牛痘Ankara载体（MVA））结合地（例如，在其之前），所述替代强化免疫接种包含插入物，所述插入物可能不同于免疫接种的“激发”部分的插入物或可能是有关的疫苗插入物。例如，GM-CSF或本领域技术人员已知的其它佐剂。所述佐剂可以是“遗传佐剂”（即，通过DNA序列递送的蛋白）。

[0355] 在示例性实施方案中，本发明是一种免疫接种方法，其包括：(i) 施用包含DNA质粒的激发组合物，所述DNA质粒包含一个或多个编码TAA或其免疫原性片段的序列；(ii) 施用第一剂包含经修饰的牛痘Ankara病毒载体的强化组合物，所述牛痘Ankara病毒载体包含一个或多个编码TAA或其免疫原性片段的基因；和(iii) 在所述第一剂以后约12至20周之间，更具体地在所述第一剂以后约14至约18周之间，甚至更具体地在所述第一剂以后约16周，施用第二剂强化组合物。

[0356] 在一个特定实施方案中，所述TAA与在步骤(i) - (iii) 中相同。任选地，所述方法还包括一个或多个另外的步骤，包括、例如，一个或多个另外剂量的激发组合物或不同的激发组合物（即，第二激发组合物）和/或一个或多个另外剂量的强化组合物或不同的强化组合物（即，第二强化组合物）的施用。

[0357] 通过下述非限制性实施例进一步描述了要求保护的发明。考虑到以上公开内容和以下实验例证（作为举例说明而包括，且非限制），并参考附图，本领域普通技术人员将会明白本发明的其它方面和实施方案。

实施例

[0358] 实施例1. MVA疫苗载体

[0359] 本实施例提供了关于示例性的MVA疫苗载体的信息。使用MVA株1974/NIH构建MVA疫苗,所述MVA株1974/NIH已经被遗传修饰成表达两个其它基因:马尔堡病毒的VP40蛋白,和由人MUC1蛋白的部分和马尔堡病毒糖蛋白(GP)的部分组成的嵌合蛋白。所述嵌合的MUC1/GP基因具有编码跨膜蛋白的更具体结构,所述跨膜蛋白具有从人MUC1基因衍生出的细胞外结构域、从马尔堡病毒的糖蛋白衍生出的跨膜结构域、和人MUC1基因的细胞内结构域。在下面实施例2中详细地给出了用于制备MUC1/GP嵌合蛋白的方法。在下面实施例3中详细地给出了用于制备被遗传修饰成表达MUC1/GP和VP40蛋白的MVA疫苗的方法和由其编码的MUC1的低糖基化状态的表征。

[0360] 表2列出了用于设计本发明的MVA疫苗载体的GenBank序列的登录号

表 2. 本发明的 MVA 疫苗载体, 序列的来源	
设计元件	来源序列的 GenBank 登录号
MUC1	NM_001204285
马尔堡病毒 GP	JX458834
马尔堡病毒 VP40	JX458834

[0362] 实施例2. 序列优化

[0363] 实施例2解释了用于用在MVA疫苗载体中的MUC1序列的优化方法。本实施例显示了在GEO-MUC1中包括的MUC1序列的优化。针对其它株的疫苗所遵循的方法是非常类似的,包括相同的操作集合。

[0364] Muc1/4TR基因优化

[0365] 1. 从天然序列开始

[0366] ● 智人粘蛋白1: NCBI参照序列: NM_001204285.1

[0367] ● 复制/粘贴来自GenBank的序列并保存为SeqBuiler文件: Muc1-1TR_001204285

[0368] 含有仅1个串联重复(1428个核苷酸)的Muc1序列(SEQ ID NO:5)

[0369] ATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCCTCACAGTGCTTACAGTTGTTACGGGTCTGGTCA
TGCAAGCTCTACCCAGGTGGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCAGCTCTACTGAGAAGA
ATGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCAGTACAGGGACAGGAT
GTCACCTCTGGCCCCGGCCACGGAACAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGT
CACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAGCCACGATGTCACCTCAGCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGG
GCTCCACCGCCCCCAAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCA
GCCCATGGTGTACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCCTCCAGTCCACAATGTACCTC
GGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGACAAACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCAG
CCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTCACGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCTTGCCAGCCATAGCACCAAG
ACTGATGCCAGTAGCACTACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCCAGTTGTC
TACTGGGGTCTCTTTCTTTTCTTCTGTCTTTTACATTTCAAACCTCCAGTTTAATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCA
CCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGAAATGTTTTGCAGATTTATAAACAAGGGGTTTTCTGGGC
CTCTCCAATATTAAGTTTCAGGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGT
CCACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAGCAGCCTCTCGATATAACCTGACGATCTCAGACGTCA
GCGTGAGTGATGTGCCATTTCTCTGCCAGCTCTGGGGCTGGGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTG
CTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCATTGTCTATCTCATTGCTTGGCTGTGCTGTCAGTGCCGCCGAAAGAACTA
CGGGCAGCTGGACATCTTTCCAGCCCGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCCATGGGC
GCTATGTGCCCTTAGCAGTACCGATCGTAGCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAGGTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCT
TACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAAGTTGTAG

[0370] Muc1/1TR蛋白 (475个氨基酸) (SEQ ID NO:6)

MTPTGTSPPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMSSSVLSSHSPGSGSSTTQGD
VT LAPATEPASGSAATWGQDVTSPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP
 AHGVTSAPDNRPALGSTAPPVHNVTASGSASGSASTLVHNGTSARATTTASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTK
 [0371] TDASSTHHSTVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLG
 LSNIKFRPGSVVQTLTAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLV
LVCVLVALAIVYLIALAVCQCRRKNYQQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSSTRSPYEKVSAGNGGSSLS
YTNPAVAATSANL

[0372] 序列符号:

[0373] 框: 信号肽

[0374] 斜体框: 串联重复

[0375] 粗体: 跨膜结构域

[0376] 下划线: 细胞质尾巴

[0377] 2. 决定将GeoVax与含有4个串联重复的Muc1基因配合

[0378] ● 在Muc1-1TR_001204285上添加额外串联重复.

[0379] ● 将新序列命名为: GVX-Muc1/4TR.01

[0380] GeoVax Muc1/4TR序列 (1608个核苷酸) (SEQ ID NO:7)

ATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCTGCTGCTGCTCCTCACAGTGCTTACAGTTGTTACGGGTTCTGGTC
 ATGCAAGCTCTACCCAGGTGGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCACAGCTCTACTGAGAA
 GAATGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAG
 GATGTCACTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGGATGTACCTCGGTCC
 CAGTCACCAAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAGCCACAGATGTACCTCAGCCCCGGACAACAAGCCAGC
 CCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCGGACACCAAGCCGGCCCCGGCTCCACCGCC
CCCCACGGTGTACCTCGGCCCGGACACCAAGCCGGCCCCGGCTCCACCGCCCCCAGCCACGGTG
TCACCTCGGCCCGGACACCAAGCCGGCCCCGGCTCCACCGCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCGGGA
CACCAAGCCGGCCCCGGCTCCACCGCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCGGGA
GCCATCGGTGTACCTCGGCCCGGACACCAAGCCGGCCCCGGCTCCACCGCCCCCAGCCACGGTG
 GGCTCCACCGCCCTCCAGTCCACAATGTACCTCGGCCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTCTACTCTGGTGC
 ACAACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCAACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATCCAGCCACCACTC
 TGATACTCCTACCACCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCAGTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCT
 CTCACCTCCTCAATCACAGCACTTCTCCCAAGTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCTGCTTTTTCACATTT
 CAAACCTCCAGTTTAATTCCTCTCTGGAAGATCCCAAGAGCTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGA
 AATGTTTTTGCAGATTTATAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTTCAGGCCAGGATCTGTGGTG
 GTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCCAGCAGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAA
 CGGAAGCAGCTCTCGATATAACCTGACGATCTCAGAGCTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCCA
 GTCTGGGGCTGGGGTGCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCATTGTC
TATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGGACATCTTTCCAGCCCGGGATA
CCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCCATGGGCGCTATGTCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAG
CCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAGGTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCT
GCCAACTTGTAG

[0382] Muc1/4TR蛋白 (535个氨基酸) (SEQ ID NO:8)

MTPTGTSPPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMSSSVLSSHSPGSGSSTTQGD
DVLAPATEPASGSAATWGQDVTSPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTA
PPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPAL
 [0383] GSTAPPVHNVTASGSASGSASTLVHNGTSARATTTASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSTVPP
LTSSNHSTSPQLSTGVSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVV
VQLTAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLVCVLVALAIV
YLIALAVCQCRRKNYQQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSSTRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATS
ANL

[0384] 序列符号:

[0385] 框: 信号肽

[0386] 斜体框 粗体框: 连续串联重复

[0387] 粗体: 跨膜结构域

[0388] 下划线: 细胞质尾巴

[0389] ● 将Muc1-1TR_001204285序列与GVX-Muc1/4TR.01比对

[0390] CLUSTAL 2.1多序列比对 序列形式是Pearson

[0391] 序列: Muc1/1TR 1428个氨基酸 (Muc1-1TR_001204285) (SEQ ID NO:5)

[0392] 序列: Muc1/4TR 1608个氨基酸 (GVX-Muc1/4TR.01) (SEQ ID NO:7)

```
*****
Muc1/1TR      ATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCCTCACAGTGCTTACAGTT
Muc1/4TR      ATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCCTCACAGTGCTTACAGTT
*****

Muc1/1TR      GTTACGGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCAGGTGGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACC
Muc1/4TR      GTTACGGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCAGGTGGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACC
*****

Muc1/1TR      CAGAGAAGTTTCAGTGCCAGCTCTACTGAGAAGAATGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTA
Muc1/4TR      CAGAGAAGTTTCAGTGCCAGCTCTACTGAGAAGAATGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTA
*****

Muc1/1TR      CTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCTG
Muc1/4TR      CTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCTG
*****

Muc1/1TR      GCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGGATGTCACTCG
Muc1/4TR      GCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGGATGTCACTCG
*****

Muc1/1TR      GTCCCACTCACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAGCCACGATGTCACTCA
Muc1/4TR      GTCCCACTCACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAGCCACGATGTCACTCA
*****

Muc1/1TR      GCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTCACTCG
Muc1/4TR      GCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTCACTCG
*****

Muc1/1TR      GCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGG-----
Muc1/4TR      GCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTCACTCG
*****

[0393] Muc1/1TR      -----
Muc1/4TR      GCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTCACTCG

Muc1/1TR      -----
Muc1/4TR      GCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTCACTCG

Muc1/1TR      -----GCTCCACCGCCCCCCCAGCCCATGGTGTCACTCG
Muc1/4TR      GCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCCATGGTGTCACTCG
*****

Muc1/1TR      GCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCCTCCAGTCCACAATGTCACTCG
Muc1/4TR      GCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCCTCCAGTCCACAATGTCACTCG
*****

Muc1/1TR      GCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACAACGGCACCTCTGCCAGG
Muc1/4TR      GCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACAACGGCACCTCTGCCAGG
*****

Muc1/1TR      GCTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTCCCAGCCACCACTCTGAT
Muc1/4TR      GCTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTCCCAGCCACCACTCTGAT
*****

Muc1/1TR      ACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCAGTAGCACTCACCATAGC
Muc1/4TR      ACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCAGTAGCACTCACCATAGC
*****

Muc1/1TR      ACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCCAGTTGTCTACTGGGGTC
Muc1/4TR      ACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCCAGTTGTCTACTGGGGTC
*****

Muc1/1TR      TCTTTCTTTTTCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTTAATTCTCTCTGGAAGAT
Muc1/4TR      TCTTTCTTTTTCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTTAATTCTCTCTGGAAGAT
*****
```

```
Muc1/1TR      CCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGAAATGTTTTGAGATT
Muc1/4TR      CCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGAAATGTTTTGAGATT
*****

Muc1/1TR      TATAAACAGGGGGTTTTCTGGGCTCTCCAATATTAAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTG
Muc1/4TR      TATAAACAGGGGGTTTTCTGGGCTCTCCAATATTAAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTG
*****

Muc1/1TR      GTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCCACGACGTGGAGACACAG
Muc1/4TR      GTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCCACGACGTGGAGACACAG
*****

Muc1/1TR      TTCAATCAGTATAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGACGATCTCAGACGTCAGC
Muc1/4TR      TTCAATCAGTATAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGACGATCTCAGACGTCAGC
*****

Muc1/1TR      GTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCAGTCTGGGGCTGGGGTGCCAGGCTGGGGC
Muc1/4TR      GTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCAGTCTGGGGCTGGGGTGCCAGGCTGGGGC
*****

[0394] Muc1/1TR      ATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCATTGTCTATCTCATTGCC
Muc1/4TR      ATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCATTGTCTATCTCATTGCC
*****

Muc1/1TR      TTGGCTGTCTGTGAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGGACATCTTTCCAGCCCGG
Muc1/4TR      TTGGCTGTCTGTGAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGGACATCTTTCCAGCCCGG
*****

Muc1/1TR      GATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCATGGGCGCTATGTGCC
Muc1/4TR      GATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCATGGGCGCTATGTGCC
*****

Muc1/1TR      CCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCTATGAGAAGGTTCTGCAGGTAATGGTGGCAGCAGC
Muc1/4TR      CCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCTATGAGAAGGTTCTGCAGGTAATGGTGGCAGCAGC
*****

Muc1/1TR      CTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACTTGTAG
Muc1/4TR      CTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACTTGTAG
*****
*****
```

[0395] CLUSTAL 2.1多序列比对 序列形式是Pearson

[0396] 序列: Muc1/1TR 475个氨基酸 (Muc1-1TR_001204285) (SEQ ID NO:6)

[0397] 序列: Muc1/4TR 535个氨基酸 (GVX-Muc1/4TR.01) (SEQ ID NO:8)

[0398] 比对评分2859

[0400] 为了增加Muc1向基于马尔堡病毒VP40的VLP中的掺入的效率,将Muc1的跨膜结构域用马尔堡病毒糖蛋白的跨膜结构域替代。

[0401] 马尔堡病毒糖蛋白序列(在马尔堡病毒GP上的TM序列位置1930-2019)

(SEQ ID NO:9)

[0402] ATGTGGACTACATGCTTCTTTATCAGTCTCATCTTGATCCAAGGGATAAAAACTCTCCCTATTTTGGAGATAGCCAG
TAACGATCAACCCCAAAATGTGGATTGGGTATGCTCCGGAACTCTCCAGAAAACAGAAGACGTCCATCTGATGGGAT
TTACACTGAGCGGGCAGAAAGTTGCTGATTCCCCTTTGGAGGCATCCAAGCGATGGGCTTTCAGGACAGGTGTACCT
CCTAAGAATGTTGAGTATACGGAAGGGGAGGAAGCCAAAACATGCTACAATATAAGTGTAACGGATCCCTCTGGAAA
ATCCTTGCTGTTAGATCCTCCCAACACGTCCGAGACTATCCTAAATGCAAACTATCCATCACATTCAGGTCAAA
ACCCTCATGCGCAGGGGATCGCCCTCCATTTGTGGGGAGCATTTTTCTATATGATCGCATTGCCTCCACAACAATG
TACCGAGGCAAAGTCTTCACTGAAGGGAACATAGCAGCCATGATTGTCAATAAGACAGTGCACAAAATGATTTTCTC
GAGGCAAGGACAAGGGTACCGTCACATGAATCTGACTTCTACTAATAAATATTGGACAAGTAGCAACGGAACGCAAA
CAAATGACACTGGATGCTTTGGTACTCTTCAAGAATACAATTCTACGAAGAACCAACATGTGCTCCGTCTAAAACA
CCCCACCACCGCCACAGCCCATCCGGAGATCAACCCACAAGCACCCCAACCGATGCCACTAGACTCAACACCAC
AAACCCAAACAGTGATGATGAGGATCTCACAACATCCGGCTCAGGGTCTGGGGAACAGGAACCCCTATACGACTTCTG
ATGCGGTCACTAAGCAAGGGCTTTTCATCAACAATGCCACCCACTCTCTCACCGCAACCAGGCACGCCACAGCAAGGA
GGAAACAACACAAACCACTCCCAAGACGCTGCAACTGAACTTGACAACACCAATACAACCTGCACAACCGCCCATGCC
CTCCCAACACACCACCAATCTCCACCAACAACACCTCCAAACACAACTCAGCACCCCTCTCCGAACCAACCAAAA
ACACCACCAATCCCAACACACAAAGCATGGCCACTGAAAATGAGAAAACAGTGCCCCCCCCGAAAACAACCTGCCT
CCAACAGAAAGTCTTACCACAGAAAAGAGCACCAACAATACAAAAGCCCCACCACAATGGAACCAATAACAACAA
CGGACATTTCACTAGTCCCTCCTCCACCCCAACTCGACTACTCAACATCTTATATATTTAGGAGGAAACGAAGTA
TCCTCTGGAGGGAAGGCGACATGTTCCCTTTTCTAGATGGGTAAATAAATGCTCCAATTGATTTTGATCCAGTTCCTA
AATACAAAGACAATCTTTGATGAATCTTCTAGTCTGGTGCTCAGCCGAGGAAGATCAACATGCATCCTCCAATAT
CAGTTTAACTTTATCTTATCTTCTCATACAAGTGAACCACTGCCTACTCTGGAGAAAATGAAAATGATTGTGATG
CAGAGCTAAGAATTTGGAGCGTTCAGGAGGACGACCTGGCAGCAGGGCTCAGTTGGATACCATTTTTTGGCCCTGGA
ATCGAAGGACTTTATACCGCTGGTTTAATTAATAAATCAAAACAATTTGGTCTGCAGGTTGAGGCGTCTAGCCAATCA
AACTGCAAAATCTTTGGAATCTTACTAAGGGTCACAACCGAGGAAAGAACATTTTCTTAAATCAATAGACATGCTA
TTGACTTTCTACTCACAAGGTGGGGAGGAACATGCAAAGTGCTTGGACCCGATTGTTGCATAGGAATAGAGGACTTG
TCCAGAAATATTTCAGAACAGATTGACCAATCAAGAAGGACGAACAAAAAGAGGGGACTGGTTGGGGTCTGGGTGG
TAAATGGGTGGACATCCGACTGGGGTGGTCTTACTAACTTGGGCATCTTACTACTATTGTCCATAGCTGTCTTGATTG
CTCTATCCTGTATTTGTCTGATCTTTACTAATATATTGGATAG

[0403] 马尔堡病毒糖蛋白（在马尔堡病毒GP上的TM序列位置644-673）

(SEQ ID NO:10)

[0404] MWTTCCFFISLILIQGIKTLPILEIASNDQPQNVDVSCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPLEASKRWAFTGVF
PKNVEYTEGEEAKTCYNISVTDPSGKSLLLDPPTNVRDYPKCKTIHHIQGQNPHAQGIALLHWGAFFLYDRIASTTM
YRGKVFTEGNIAAMIVNKTVMKMI FSRQGGYRHMNLTSTNKYWTSSNGTQTNDTGCFGLQEYNSTKNQTCAPSKT
PPPPPTAHPEIKPTSTPTDTRLNNTNPNSSDDEDLTSSGSGSGEQEPYTTSDAVTKQGLSSTMPPTLSPQPGTPQQG
GNNTNHSQDAATELDNTNTTAQPPMPSHNTTITSTNNTSKHNLSTLSEPPQNTTNPNTQSMATENEKTSAPPKTTLF
PTESPTTEKSTNNTKSPTTMEPNNTNGHFTSPSSSTPNSTQHLYFRKRKRSILWREGDMFPFLDGLINAPIDFDPVP
NTKTI FDESSSSGASAEEDQHASSNISLTLSYLPHTSENTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPG
IEGLYTAGLIKQNNLVCRLRLRLANQTAKSLELLLRVTTEERTFSLINRHAI DFLLRWGGTCKVLGPDCCIGIEDL
SRNISEQIDQIKKDEQKEGTGWGLGGKWWTS DWGVLTNLGILLLSIAVLIALSCICRI FTKYIG

[0405] GeoVax Muc1/4TR序列（跨膜结构域序列：在Muc1/1TR上的位置1129-1218）
(SEQ ID NO:11)

[0406]

ATGACACCGGGCAGCCAGTCTCCTTTCTCCTGCTGCTGCTCCTCACAGTGCTTACAGTTGTTACGGGTTCTGGTCA
TGCAAGCTCTACCCAGGTGGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTTCAAGTCCCAGCTCTACTGAGAAGA
ATGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGAT
GTCACCTCTGGCCCCGGCCACGGAACAGCTTCAGGTTTCAAGTGCACCTGGGGACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGT
CACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCGCCAGCCACGATGTCACCTCAGCCCCGGGACAACAAGCCAGCCCCGG
GCTCCACCGCCCCCAAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCA
GCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAAGCCACGGTGTACCTC
GGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGC
CGGCCCGGGCTCCACCGCCCCCAAGCCATGGTGTACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACC
GCCCCCTCCAGTCCACAATGTACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGACAACGGCAC
CTCTGCCAGGGTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTCCAGCCACCACTCTGATACTCCTA
CCACCCTTGCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCAGTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTACCTCCTCC
AATCACAGCACTTCTCCCAAGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCTGTCTTTTACATTTCAAACCTCCAGTT
TAATTCCTCTCTGGAAGATCCAGCACCAGTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGAAATGTTTTTGAGA
TTTATAACAAGGGGTTTTCTGGGCTCTCCAATATTAAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTG
GCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCCAGCAGCTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCTCTCG
ATATAACCTGACGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCAGTCTGGGGCTGGGGTGC
CAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGTGGTCTGTGTCTGGTTGCGCTGGCCATTGTCTATCTCATTGCCTTGGCT
GTCTGTAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGGACATCTTTCCAGCCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGA
GTACCCACCTACCACCCCATGGGCGCTATGTGCCCTTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCCTATGAGAAGGTTTCTG
CAGGTAATGGTGGCAGCAGCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAATTGTAG

[0407] (跨膜结构域序列：在Muc1/1TR上的位置157-186) (SEQ ID NO:12)

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMSSVLSSHPSPGSGSSTTQGD
VTLAPATEPASGSAATWQDVTVPVTRPALGSTTTPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAGHVTSAPDTRPAPGSTAPP
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAGHVTSAPDTRPAPGSTAPPAGHVTSAPDTRPAPGSTAPPAGHVTSAPDNRPALGST
APPVHNVTASGSGASGASTLVHNGTSARATTTTASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDAASSTHHSTVPPLTSS
NHSTSPQLSTGVSFLLSFHISNLQFNSSLEDPSDYYQELQDISFEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTL
AFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLISDVSVDVFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLLIALA
VCQCRKNYQQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

[0409] ● 用马尔堡病毒GP的TM序列替换GVX-Muc1/4TR.01上的TM序列：
WWTSDWGLTNLGIILLLSIAVLIALSCIC (SEQ ID NO:13)

[0410] ● 将新序列命名为：GVX-Muc1_4TRMTm.02 (SEQ ID NO:14)

[0411]

ATGACACCGGGCAGCCAGTCTCCTTTCTCCTGCTGCTGCTCCTCACAGTGCTTACAGTTGTTACGGGTTCTGGTCA
TGCAAGCTCTACCCAGGTGGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTTCAAGTCCCAGCTCTACTGAGAAGA
ATGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGAT
GTCACCTCTGGCCCCGGCCACGGAACAGCTTCAGGTTTCAAGTGCACCTGGGGACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGT
CACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCGCCAGCCACGATGTCACCTCAGCCCCGGGACAACAAGCCAGCCCCGG
GCTCCACCGCCCCCAAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCA
GCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAAGCCACGGTGTACCTC
GGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGC
CGGCCCGGGCTCCACCGCCCCCAAGCCATGGTGTACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACC
GCCCCCTCCAGTCCACAATGTACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGACAACGGCAC
CTCTGCCAGGGTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTCCAGCCACCACTCTGATACTCCTA
CCACCCTTGCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCAGTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTACCTCCTCC
AATCACAGCACTTCTCCCAAGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCTGTCTTTTACATTTCAAACCTCCAGTT
TAATTCCTCTCTGGAAGATCCAGCACCAGTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGAAATGTTTTTGAGA
TTTATAACAAGGGGTTTTCTGGGCTCTCCAATATTAAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTG
GCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCCAGCAGCTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCTCTCG
ATATAACCTGACGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCAGTCTGGGGCTGGGGTGT
GGTGGACATCCGACTGGGGTGTCTTACTAAGTGGGCATCTTACTACTATTGTCCATAGCTGTCTTGATTGCTCTA
TCCTGTATTTGTGCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGGACATCTTTCCAGCCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGA
GTACCCACCTACCACCCCATGGGCGCTATGTGCCCTTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCCTATGAGAAGGTTTCTG
CAGGTAATGGTGGCAGCAGCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAATTGTAG

[0412] 对应的蛋白序列 (SEQ ID NO:15)

- [0413] MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQD
VT LAPATEPASGSAATWGQDVT SVPVTRPALGSTTPP AHDVTSAPDNKPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP
APPVHNVTASGSASGSASTLVHNGTSARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSTVPPLTSS
NHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYYQELQORDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTL
AFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGV **WWTSDWGVLTNLGILLLLLSIAVLIAL**
SCICRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSSTRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL
- [0414] 序列符号:
- [0415] 框: 信号肽
- [0416] 斜体框 **粗体框**: 连续串联重复
- [0417] 粗体: 跨膜结构域
- [0418] 下划线: 细胞质尾巴
- [0419] ● 将Muc1-1TR_001204285序列与GVX-Muc1/4TR.01和GVX-Muc1_4TRMTm.02比对
- [0420] CLUSTAL 2.1多序列比对 序列形式是Pearson
- [0421] 序列: 1TR 475个氨基酸 (SEQ ID NO:10)
- [0422] 序列: 4TR 535个氨基酸 (SEQ ID NO:12)
- [0423] 序列: 4TRMTm 535个氨基酸 (SEQ ID NO:14)

```

1TR      MTPGTQSPFFLLLLLLTVLTVVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSV
4TR      MTPGTQSPFFLLLLLLTVLTVVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSV
4TRMtm   MTPGTQSPFFLLLLLLTVLTVVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSV
*****

1TR      LSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQDVT SVPVTRPALGSTTPPAHDVTS
4TR      LSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQDVT SVPVTRPALGSTTPPAHDVTS
4TRMtm   LSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQDVT SVPVTRPALGSTTPPAHDVTS
*****

1TR      APDNKPAPGSTAPPAGHVT SAPDTRPAP-----
4TR      APDNKPAPGSTAPPAGHVT SAPDTRPAPGSTAPPAGHVT SAPDTRPAPGSTAPPAGHVT
4TRMtm   APDNKPAPGSTAPPAGHVT SAPDTRPAPGSTAPPAGHVT SAPDTRPAPGSTAPPAGHVT
*****

1TR      -----GSTAPPAGHVT SAPDNRPALGSTAPPVHNVT
4TR      APDTRPAPGSTAPPAGHVT SAPDTRPAPGSTAPPAGHVT SAPDNRPALGSTAPPVHNVT
4TRMtm   APDTRPAPGSTAPPAGHVT SAPDTRPAPGSTAPPAGHVT SAPDNRPALGSTAPPVHNVT
*****

[0424] 1TR      ASGSASGSASTLVHNGTSARATTPASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHS
4TR      ASGSASGSASTLVHNGTSARATTPASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHS
4TRMtm   ASGSASGSASTLVHNGTSARATTPASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHS
*****

1TR      TVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSTFVFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQORDISEMFLQI
4TR      TVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSTFVFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQORDISEMFLQI
4TRMtm   TVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSTFVFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQORDISEMFLQI
*****

1TR      YKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVS
4TR      YKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVS
4TRMtm   YKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVS
*****

1TR      VSDVFPFFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLIALAVCQCRKKNYGQLDIFPAR
4TR      VSDVFPFFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLIALAVCQCRKKNYGQLDIFPAR
4TRMtm   VSDVFPFFSAQSGAGVWWTSDWGVLTNLGILLLLSIAVLIALSCICRKNYGQLDIFPAR
*****
          .   ::   :: *   :   :   * *****

1TR      DTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSDTRS PYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL
4TR      DTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSDTRS PYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL
4TRMtm   DTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSDTRS PYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL
*****

```

[0425] 3. 密码子优化痘苗病毒的DNA序列

[0426] ● 2.1. 在LifeTechnology网站获得GeneArt Gene Synthesis工具,

[0427] ● 输入G0序列并遵循说明书。

[0428] ● 优化痘苗病毒的序列。

[0429] ● 复制经优化的序列并粘贴进新的SeqBuilber文件中。

[0430] 2.2. 保存经优化的序列以及报告。

[0431] ● 将经优化的序列命名为: GVX-Muc1_4TRMTmVVop.03

[0432] (SEQ ID NO:16)

[0433]

ATGACACCTGGAACACAATCTCCATTTTTTCTACTACTACTATTGACAGTACTAACAGTAGTAACAGGATCTGGACA
TGCGTCTAGTACACCAGGTGGAGAAAAAGAAACATCTGCGACTCAAAGATCTTCTGTACCATCTTCTACAGAAAAA
ATGCGGTATCTATGACATCTAGTGTACTATCTTCTCATTCTCCTGGATCTGGATCTTCTACTACACAAGGACAAGAT
GTAACACTAGCGCCAGCTACAGAACCAGCTTCTGGATCTGCTGCTACTTGGGGTCAAGATGTTACTTCTGTTCCAGT
AACAAGACCAGCGCTAGGATCTACAACACCACCAGCGCATGATGTAACAAGTGGCCAGATAATAAACAGCGCCTG
GTTCTACTGCTCCACCAGCTCATGGTGTACTTCAGCGCCTGATACAAGACCTGCACCTGGATCTACAGCTCCTCCT
GCACATGGTGTAAACATCTGCTCCAGATACAAGACCAGCTCCAGGTTCAACAGCACCTCCAGCGCATGGTGTACTAG
TGCTCCAGATACAAGACCTGCGCCTGGAAGTACTGCCACCACCAGCATGGTGTAACTAGTGGCCTGATACAAGAC
CAGCGCCAGGATCAACTGCTCCTCCTGCTCATGGTGTACAAGTGCACCTGATAATAGACCTGCGTTGGGATCTACT
GCGCCTCCAGTTTATAATGTAACATCAGCGTCTGGAAGTGGCTCTGGTTCTGCGTCTACATTGGTTCATAATGGTAC
ATCTGCGAGAGCGACAACAACCTCCAGCGTCTAAATCTACACCATTTTCTATTCCATCTCATCATTCTGATACACCAA
CAACATTGGCGAGTCATTCTACAAAAACAGATGCGAGTTCTACACATCATTCTACTGTACCACCACTAACATCTTCT
AATCATAGTACATCTCCAACTATCTACTGGTGTATCTTTTTTTTTTCTATCTTTTCATATTTCTAATCTACAGTT
TAATTCTAGTTTGAAGATCCATCTACAGATTATTATCAAGAACTACAAAGAGATATTTCTGAAATGTTTCTACAAA
TATATAACAAGGAGGATTCTAGGACTATCTAATATTAAGTTTAGACCAGGATCTGTAGTAGTTCAACTAACTCTA
GCGTTTAGAGAAGGTACTATTAATGTACATGATGTTGAAACACAGTTTAAATCAATATAAAACAGAAGCGGCGTCTAG
ATATAATCTAACAATTTCTGATGTATCTGTATCTGATGTTCCATTTCCATTTTCTGCGCAATCTGGTGCTGGTGTAT
GGTGGACATCTGATTGGGGAGTACTAATACTAGGAATTCTACTATTGCTATCTATTGCGGTACTAATTGCGCTA
TCTTGTATATGTAGAAGAAAAATTATGGACAACCTAGATATTTTCCAGCGAGAGATACTTATCATCCAATGTCTGA
ATATCCAACATATCATACACATGGAAGATATGTACCACCTTCTTCAACAGATAGATCTCCATATGAAAAAGTATCTG
CGGGAATGGTGGTTCTTCTCTATCTTATACAAATCCAGCGGTAGCGGCGACTTCTGCGAATCTATAA

[0434] 2.3. 翻译经优化的序列

[0435] (SEQ ID NO:17)

[0436]

MTPGTQSPFFLLLLLVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGGQD
VTLAPATEPASGSAATWGQDVTSPVTRPALGSTTTPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHGVTSPAPDTRPAPGSTAPP
AHGVTSPAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSPAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSPAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSPAPDNRPALGST
APPVHNVTSASGSASGSASTLVHNGTSARATTTASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSTVPPLTSS
NHSTSPQLSTGVSTFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTL
AFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGAGVWWTSDWGVLTNLGILLLSIAVLIAL
SCICRRKNYQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSSTRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

[0437] 4. 通过沉默突变中断同聚物序列(富含G/C或T/A的区域)

[0438] ● 针对 ≥ 4 个G/C区域检索序列:

[0439] ○ 没有发现多个G或C。

[0440] ● 针对 ≥ 5 个A/T区域检索序列:

[0441] ○ 已经发现7个富含A/T的区域:

[0442] ○ 都已经被单个沉默突变中断。

[0443] ○ 表2总结了在Muc1上做出的所有突变。

表2: Muc1突变

序列核苷酸	沉默突变核苷酸	在GP基因中的突变位置
TTT	TTC	27
TTT	TTC	30
GAA	GAG	102
AAA	AAG	105
GAA	GAG	150
AAA	AAG	153
AAA	AAG	375
AAA	AAG	804
TTT	TTC	816
AAA	AAG	873
TTT	TTC	966
TTT	TTC	969
TTT	TTC	972
TCT	TCC	978
TTT	TTC	1002
AAA	AAG	1215
TTT	TTC	1284
AAA	AAG	1407
TTT	TTC	1431
GAA	GAG	1530
AAA	AAG	1633

[0444] 将序列保存为GVX-Muc1_4TRMTmVVop.04 (SeqBuilber文件)。
(SEQ ID NO:18)

ATGACACCTGGAACACAATCTCCATTcTTcCTACTACTACTATTGACAGTACTAACAGTAGTAACAGGATCTGGACATGCGTCTAG
TACACAGGTGGAGAgAAgGAAACATCTGCGACTCAAAGATCTTCTGTACCATCTTCTACAGAgAAgAATGCGGTATCTATGACAT
CTAGTGTACTATCTTCTCATTCTCCTGGATCTGGATCTTCTACTACACAAGGACAAGATGTAACACTAGCGCCAGCTACAGAACCA
GCTTCTGGATCTGCTGCTACTTGGGGTCAAGATGTTACTTCTGTTCCAGTAACAAGACCAGCGCTAGGATCTACACACCACCAGC
GCATGATGTAACAAGTGCGCCAGATAATAAgCCAGCGCCTGGTTCTACTGCTCCACCAGCTCATGGTGTACTTTCAGCGCCTGATA
CAAGACCTGCACCTGGATCTACAGCTCCTCCTGCACATGGTGTAAACATCTGCTCCAGATACAAGACCAGCTCCAGGTTCACACGA
CCTCCAGCGCATGGTGTACTAGTGTCTCCAGATACAAGACCTGCGCCTGGAAAGTACTGCACCACCAGCACATGGTGTAACTAGTGC
GCCTGATACAGACCAGCGCCAGGATCAACTGCTCCTCCTGCTCATGGTGTACAGTGACCTGATAATAGACCTGCGTTGGGAT
CTACTGCGCCTCCAGTTTATAATGTAACATCAGCGTCTGGAAGTGCGTCTGGTTCTGCGTCTACATTGGTTTATAATGGTACATCT
GCGAGAGCGACAACAACCTCCAGCGTCTAAgTCTACACCATTCCTATTCCATCTCATCTTCTGATACACCAACAACATTGGCGAG
TCATTCTACAAAgACAGATGCGAGTTCTACACATCATTCTACTGTACCACCACCTAACATCTTCTAATCATAGTACATCTCCACAAC
TATCTACTGGTGTATCTTTcTTcTTcCTATCCTTTCATATTTCTAATCTACAGTTcAATTCTAGTTTGGAGATCCATCTACAGAT
TATTATCAAGAACTACAAAGAGATATTTCTGAAATGTTTCTACAAATATATAACAAGGAGGATTTCTAGGACTATCTAATATTAA
GTTTAGACCAGGATCTGTAGTAGTTCAACTAACTCTAGCGTTTAGAGAAGGTACTATTAATGTACATGATGTTGAAACACAGTTTA
ATCAATATAAgACAGAAGCGGCGTCTAGATATAATCTAACAATTTCTGATGTATCTGTATCTGATGTTCCATTTCCATTTTCTGCG
CAATCTGGTGTGTTGATGGTGGACATCTGATTGGGGAGTACTAACTAATCTAGGAATTCTACTATTGCTATCTATTGCGGTACT
AATTGCGCTATCTTGATATGTAGAAGAAgAATTATGGACAACCTAGATATTTcCCAGCGAGAGATCTTATCATCCAATGTCTG
AATATCCAACATATCATACATGGAAGATATGTACCACCTTCTTCAACAGATAGATCTCCATATGAgAAgGTATCTGCGGGAAT
GGTGGTTCTTCTCTATCTTATACAAATCCAGCGGTAGCGGCGACTTCTGCGAATCTATAA

[0446] ● 翻译GVX-Muc1_4TRMTmVVop.04:
(SEQ ID NO:19)

MTPGTQSPFFLLLLLVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMSSVLSSHSPGSGSSTTQGGQDVTLPATEP
ASGSAATWGGQDVTVPVTRPALGSTTPPAHDVTSAFDNKPAPGSTAPPAHGVTSAFDTRPAPGSTAPPAHGVTSAFDTRPAPGSTA
PPAHGVTSAFDTRPAPGSTAPPAHGVTSAFDTRPAPGSTAPPAHGVTSAFDNRPALGSTAPVHNVTSASGSASGSASTLVHNGTS
ARATTFPASKSTPFSIPSHSDTPTTLASHSTKTDASTHSTVPLTSSNHSTSPQLSTGVSTFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTD
YYQELQRDISMFLLQYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTIISDVSVSDVPFFPSA
QSGAGVWWTSDWGLTNLGLILLLSIAVLIALSCLCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVFPSSSTDRSPYEKVSAGN
GGSSLSYTNPAVAATSANL

[0447] 5. 针对痘苗病毒转录终止子检索GP序列

- [0450] ● 没有发现T₅NT基序。
- [0451] 6. 添加第二个终止密码子
- [0452] ● 将经优化的序列命名为: GVX-Muc1_4TRMTmVVop.05。
- [0453] 通过沉默突变(在可能时)修饰串联重复的序列,以减少重组和增加插入物稳定性。
- [0454] 第一串联重复
- (SEQ ID NO:20)
- GCT CAT GGT GTT ACT TCA GCG CCT GAT ACA AGA CCT GCA CCT GGA TCT ACA GCT CCT CCT
- [0455]
- (SEQ ID NO:21)
- A H G V T S A P D T R P A P G S T A P P
- [0456] 第二串联重复
- (SEQ ID NO:22)
- GCA CAT GGT GTA ACA TCT GCT CCA GAT ACA AGA CCA GCT CCA GGT TCA ACA GCA CCT CCA
- [0458] 第三串联重复
- (SEQ ID NO:23)
- GCG CAT GGT GTT ACT AGT GCT CCA GAT ACA AGA CCT GCG CCT GGA AGT ACT GCA CCA CCA
- [0459]
- [0460] 第四串联重复
- (SEQ ID NO:24)
- GCA CAT GGT GTA ACT AGT GCG CCT GAT ACA AGA CCA GCG CCA GGA TCA ACT GCT CCT CCT
- (SEQ ID NO:25)
- GCT CAT GGT GTT ACT TCA GCG CCT GAT ACA AGA CCc GCA CCc GGA TCT ACc GCT CCg CCT
- (SEQ ID NO:26)
- GCA CAc GGc GTc ACA TCT GCT CCc GAc Act cgt CCA GCT CCT GGT agc ACA GCA CCT CCA
- [0461]
- (SEQ ID NO:27)
- GCG CAT GGa GTa ACc AGT GCa CCA GAT ACc cga CCT GCG CCg GGc AGT ACT GCc CCA CCg
- (SEQ ID NO:28)
- GCc CAc GGg GTg ACg AGc GCc CCg GAc ACg cgc CCA Gct CCA GGg TCA ACg GCg CCc CCT
- (SEQ ID NO:21)
- A H G V T S A P D T R P A P G S T A P P
- [0462] ● 将经优化的序列命名为: GVX-Muc1_4TRMTmVVop.06。
- [0463] 7. 添加限制位点用于将Muc1克隆进MVA-穿梭质粒pLW-73中。
- [0464] ● 针对SmaI、SalI和PstI位点检索GVX-Muc1_4TRMTmVVop.06序列
- [0465] ○ 所述位点都不存在于Muc基因上,所以任一个可以用于克隆。
- [0466] ● 分别在Muc1基因的3`和5`添加Sma I和Sal I限制位点。
- [0467] ○ Sma I序列: cccggg
- [0468] ○ Sal I序列: gtcgac
- [0469] ○ 在SmaI上游添加5个核苷酸和在SalI下游添加5个核苷酸以促进消化和克隆: gcgct。
- [0470] ● 将具有克隆位点的序列保存为GVX-Muc1_4TRMTmVVop.05 (SeqBuilber文件)。
- [0471] ● Genscript的最终序列(SeqBuiler文件): GVX-Muc4TRMTM

(SEQ ID NO:29)

[0472] ggcgtcccgaggATGACACCTGGAACACAATCTCCATTcTTcCTACTACTACTATTGACAGTACTAACAGTA
GTAAACAGGATCTGGACATGCGTCTAGTACACCAGGTGGAGAgAAGAAACATCTGCGACTCAAAGA
TCTTCTGTACCATCTTCTACAGAgAAGAATGCGGTATCTATGACATCTAGTGTACTATCTTCTCATTCT
CCTGGATCTGGATCTTCTACTACACAAGGACAAGATGTAACACTAGCGCCAGCTACAGAACCAGCT
TCTGGATCTGCTGCTACTTGGGGTCAAGATGTTACTTCTGTTCCAGTAACAAGACCAGCGCTAGGAT
CTACAACACCACCAGCGCATGATGTAACAAGTGCGCCAGATAATAAgCCAGCGCCTGGTTCTACTG
CTCCACCAGCTCATGGTGTACTTTCAGCGCCTGATACAAGACCTGCACCTGGATCTACAGCTCCTC
CTGCACATGGTGTAAACATCTGCTCCAGATACAAGACCAGCTCCAGGTTCAACAGCACCTCCAGCGC
ATGGTGTACTAGTGCTCCAGATACAAGACCTGCGCCTGGAAGTACTGCACCACCAGCACATGGTG
TAACTAGTGCGCCTGATACAAGACCAGCGCCAGGATCAACTGCTCCTCCTGCTCATGGTGTACAA
GTGCACCTGATAATAGACCTGCGTTGGGATCTACTGCGCCTCCAGTTCATAATGTAACATCAGCGTC
TGGAAGTGCCTCTGGTTCTGCGTCTACATTGGTTCATAATGGTACATCTGCGAGAGCGACAACAAC
TCCAGCGTCTAAgTCTACACCATTcTCTATTCCATCTCATCTTCTGATACACCAACAACATTGGCGA
GTCTATTCTACAAAgACAGATGCGAGTTCTACACATCATTCTACTGTACCACCACCTAACATCTTCTAAT
CATAGTACATCTCCACAACATCTACTGGTGTATCTTTCCTTcTTcCTATCCTTTCATATTTCTAATCTACA
GTTcAATTCTAGTTTGGAGATCCATCTACAGATTATTATCAAGAACTACAAAGAGATATTTCTGAAAT
GTTTCTACAAATATATAAACAAGGAGGATTTCTAGGACTATCTAATATTAAGTTTAGACCAGGATCTG
TAGTAGTTCAACTAACTCTAGCGTTTAGAGAAGGTACTATTAATGTACATGATGTTGAAACACAGTTT
AATCAATATAAgACAGAAGCGGCGTCTAGATATAATCTAACAATTTCTGATGTATCTGTATCTGATGT
TCCATTTCCATTcTCTGCGCAATCTGGTGCTGGTGTATGGTGGACATCTGATTGGGGAGTACTAACT
AATCTAGGAATCTACTATTGCTATCTATTGCGGTACTAATTGCGCTATCTTGATATGTAGAAGAAA
gAATTATGGACAACCTAGATATTTTCCAGCGAGAGATACTTATCATCCAATGTCTGAATATCCAACATA
TCATACACATGGAAGATATGTACCACCTTCTTCAACAGATAGATCTCCATATGAgAAGGTATCTGCGG
GAAATGGTGGTCTTCTCTATCTTATACAAATCCAGCGGTAGCGGCGACTTCTGCGAATCTATAATA
Agtcgacgcgt

[0473] 对应的蛋白序列

(SEQ ID NO:30)

[0474] MTPGTQSPFFLLLLLVLTVVVGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSVLSSHSPGSGS
STTQGQDVTLPATEPASGSAATWGQDVTSVPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPP[AHGV]
TSAPDTRPAPGSTAPP[AHGV]TSAPDTRPAPGSTAPP[AHGV]TSAPDTRPAPGSTAPP[AHGV]TSAPDTRP
APGSTAPP[AHGV]TSAPDNRPALGSTAPPVHNVTASGSASGSASTLVHNGTSARATTTASKSTPFSIP
SHHSDPTTLASHSTKTDASSTHHSTVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSFLLSFHISNLQFNSSLEDPTDYY
QELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTIS
DVSVDVFPFSAQSGAGVWWTSDWGVLTNLGILLLLSIAVLIALSCICRRKNYGQLDIFPARDTYHPMS
EYPTYHTHGRYVPPSSDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

[0475] ● 将最终的GVX-Muc4TRMTM序列与Muc1-1TR_001204285比对

[0476] CLUSTAL 2.1多序列比对

[0477] 序列形式是Pearson

[0478] 序列: GVX-Muc4TRMTM 535个氨基酸 (SEQ ID NO:30)

[0479] 序列: Muc1-1TR_001204285 475个氨基酸 (SEQ ID NO:10)

[0480]

```

GVX-Muc4TRMTM      MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSV
Muc1-1TR_001204285 MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSV
*****

GVX-Muc4TRMTM      LSSHSPGSGSSTTQGGDVT LAPATEPASGSAATWGQDVTVPVTRPALGSTTPPAHDVTS
Muc1-1TR_001204285 LSSHSPGSGSSTTQGGDVT LAPATEPASGSAATWGQDVTVPVTRPALGSTTPPAHDVTS
*****

GVX-Muc4TRMTM      APDNKPAPGSTAPPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPPAHGVTS
Muc1-1TR_001204285 APDNKPAPGSTAPPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPPAHGVTS
*****

GVX-Muc4TRMTM      APDTRPAPGSTAPPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPPAHGVTS
Muc1-1TR_001204285 -----GSTAPPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPPAHGVTS
*****

GVX-Muc4TRMTM      ASGSASGSASTLVHNGTSARATTTTFAKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDA SSTHHS
Muc1-1TR_001204285 ASGSASGSASTLVHNGTSARATTTTFAKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDA SSTHHS
*****

GVX-Muc4TRMTM      TVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQRDI SEMFLQI
Muc1-1TR_001204285 TVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQRDI SEMFLQI
*****

GVX-Muc4TRMTM      YKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVS
Muc1-1TR_001204285 YKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVS
*****

GVX-Muc4TRMTM      VSDVPFFFSAQSGAGVWWTSDWGVLTNLGILLLSIAVLIALSCICRRKNYGQLDIFPAR
Muc1-1TR_001204285 VSDVPFFFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLIALAVCQCRKNYGQLDIFPAR
*****
.      ::      ::      *      :      :      *      *****

GVX-Muc4TRMTM      DTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL
Muc1-1TR_001204285 DTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL
*****

```

[0481] ● 将最终的GVX-Muc4TRMTM序列与GVX-Muc1_4TRMTm.01比对

[0482] CLUSTAL 2.1多序列比对

[0483] 序列形式是Pearson

[0484] 序列: GVX-Muc4TRMTM 535个氨基酸 (SEQ ID NO:30)

[0485] 序列: GVX-Muc1/4TR.01 535个氨基酸 (SEQ ID NO:12)

[0486]

```

GVX-Muc4TRMTM      MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSV
GVX-Muc1/4TR.01    MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSV
*****

GVX-Muc4TRMTM      LSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQDVTSVPVTRPALGSTTTPAHDVTS
GVX-Muc1/4TR.01    LSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQDVTSVPVTRPALGSTTTPAHDVTS
*****

GVX-Muc4TRMTM      APDNKPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP AHGVTS
GVX-Muc1/4TR.01    APDNKPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP AHGVTS
*****

GVX-Muc4TRMTM      APDTRPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP AHGVTSAPDNRPALGSTAPPVHNVT
GVX-Muc1/4TR.01    APDTRPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP AHGVTSAPDNRPALGSTAPPVHNVT
*****

GVX-Muc4TRMTM      ASGSASGSASTLVHNGTSARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHS
GVX-Muc1/4TR.01    ASGSASGSASTLVHNGTSARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHS
*****

GVX-Muc4TRMTM      TVPPLTSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDYQELQRDISEMFLQI
GVX-Muc1/4TR.01    TVPPLTSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDYQELQRDISEMFLQI
*****

GVX-Muc4TRMTM      YKQGGFLGLSNIKFRPGSVV VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNL TISDVS
GVX-Muc1/4TR.01    YKQGGFLGLSNIKFRPGSVV VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNL TISDVS
*****

GVX-Muc4TRMTM      VSDVPFFFS AQSGAGVWWTSDWGVLTNLGILLLSIAVLIALSCICRRKNY GQLDIFPAR
GVX-Muc1/4TR.01    VSDVPFFFS AQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLI ALAVCQRRKNY GQLDIFPAR
***** .  ::  :: *  :  ::  * *****

GVX-Muc4TRMTM      DTYHPMSEYPTYHTHGRYV PPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL
GVX-Muc1/4TR.01    DTYHPMSEYPTYHTHGRYV PPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL
*****

```

[0487] ● 将最终的GVX-Muc4TRMTM序列与GVX-Muc1_4TRMTm.02比对

[0488] CLUSTAL 2.1多序列比对

[0489] 序列形式是Pearson

[0490] 序列1: GVX-Muc4TRMTM 535个氨基酸 (SEQ ID NO:30)

[0491] 序列2: GVX-Muc1_4TRMTm.02 535个氨基酸 (SEQ ID NO:15)

GVX-Muc4TRMTM	MTPTGTSPPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSSATQRSSVPSSTEKNAVSMSTSSV
GVX-Muc1_4TRMTm.02	MTPTGTSPPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSSATQRSSVPSSTEKNAVSMSTSSV
GVX-Muc4TRMTM	LSSHSPGSGSSTTQGGDVTLPATEPASGSAATWGQDVTVPVTRPALGSTTPPAHDVTS
GVX-Muc1_4TRMTm.02	LSSHSPGSGSSTTQGGDVTLPATEPASGSAATWGQDVTVPVTRPALGSTTPPAHDVTS
GVX-Muc4TRMTM	APDNKPAPGSTAPPFAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPFAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPFAHGVTSA
GVX-Muc1_4TRMTm.02	APDNKPAPGSTAPPFAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPFAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPFAHGVTSA
GVX-Muc4TRMTM	APDTRPAPGSTAPPFAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPFAHGVTSA PDNRPALGSTAPPVHNVT
GVX-Muc1_4TRMTm.02	APDTRPAPGSTAPPFAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPFAHGVTSA PDNRPALGSTAPPVHNVT
[0492] GVX-Muc4TRMTM	ASGSASGSASTLVHNGTSARATTTT PASKSTPFSPSHHSDTPTTLASHSTKT DASSTHHS
GVX-Muc1_4TRMTm.02	ASGSASGSASTLVHNGTSARATTTT PASKSTPFSPSHHSDTPTTLASHSTKT DASSTHHS
GVX-Muc4TRMTM	TVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQRDI SEMFLQI
GVX-Muc1_4TRMTm.02	TVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQRDI SEMFLQI
GVX-Muc4TRMTM	YKQGGFLGLSNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVS
GVX-Muc1_4TRMTm.02	YKQGGFLGLSNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVS
GVX-Muc4TRMTM	VSDVPPFFSAQSGAGVWWTSDWGVLTNLGILLLLLSIAVLIALSCICRRKNYGQLDIFPAR
GVX-Muc1_4TRMTm.02	VSDVPPFFSAQSGAGVWWTSDWGVLTNLGILLLLLSIAVLIALSCICRRKNYGQLDIFPAR
GVX-Muc4TRMTM	DTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL
GVX-Muc1_4TRMTm.02	DTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

[0493] 将GVX-Muc4TRMTM的名称简化为“GVX-Muc1”。

[0494] ● 订购含有GVX-Muc4TRMTM DNA序列的合成基因。

[0495] ● 将GVX-Muc4TRMTM DNA序列克隆进pLW-73穿梭质粒中并将新质粒pGeo-Muc1重新命名(参见图1)。

[0496] 实施例3: MVA疫苗构建和MUC1的低糖基化形式的体外评价。

[0497] 重组MVA疫苗由具有2个抗原表达盒的MVA载体(MVA-Muc1VP40)组成。一个表达盒编码人Muc1的嵌合形式,其构建描述在上面实施例2中(在下文中该构建被称作GVX-Muc1),且其为了MVA疫苗构建的目的已经将它的DNA序列克隆进标题为pGeo-Muc1的穿梭质粒中(质粒的图像见上面)。一个表达盒编码马尔堡病毒的VP40蛋白。GVX-Muc1和VP40的表达足以产生分泌的病毒样颗粒(VLP)。将GVX-Muc1蛋白表达为由人Muc1的细胞外结构域、马尔堡病毒GP的跨膜结构域和人Muc1的细胞内结构域组成的嵌合蛋白。使马尔堡病毒VP40蛋白在细胞的细胞质中表达,在此处它与GVX-Muc1的细胞内结构域和跨膜结构域结合,从而造成VLP的细胞表面芽殖,所述VLP具有在它们的表面上的GVX-Muc1和被包封在它们的内部(腔)空间中的VP40。载体平台和天然抗原构象的这种新颖组合会产生这样的疫苗:其预期会引起强烈的、宽的且持久的免疫应答。

[0498] 使用在Bernard Moss博士的实验室中开发的穿梭载体构建MVA-Muc1VP40疫苗候选物,并正在被NIAID许可给GeoVax用于用在疫苗开发中。已经证实这些穿梭载体会产生稳定的疫苗插入物,其在使用HIV和出血热病毒疫苗的工作中具有高的、但是无毒的表达水平。将Muc1序列放在MVA的两个必需基因(I8R和G1L)之间,并将VP40插入在重构的且经修饰的缺失III中在A50R和B1R基因之间,如下图(图2)所示,其中数字表示在MVA基因组中

的坐标:

[0499] 将GVX-Muc1和VP40基因针对MVA进行密码子优化。已经将沉默突变引入以中断同聚物序列(>4G/C和>4A/T)从而减少可能导致移码的RNA聚合酶误差。已经为牛痘特异性的终止子编辑插入的序列以除去可能导致过早终止的基序。将所有疫苗插入物置于如前所述的经修饰的H5早/晚牛痘启动子下。使用无牛海绵状脑病/传染性海绵状脑病(BSE/TSE)的原料,在GeoVax在专用房间中在“GLP-样条件”下制备载体,具有完全可追溯性和所有步骤的完整记录。

[0500] 使用Muc1特异性抗体通过蛋白质印迹法评估在细胞中表达的GVX-Muc1蛋白的全长和天然构象的表达。在37℃使用MVA-Muc1VP40疫苗以1.0的感染复数感染DF1细胞1小时,该时间以后将培养基换为新鲜的预温热的培养基。在37℃温育48小时以后,将细胞的上清液收获并通过在500xg离心10分钟进行澄清。一旦从细胞除去上清液,将细胞本身从平板收获,用冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤1次,并然后在PBS + 1%Triton X-100去污剂的溶液在冰上裂解15分钟。该温育以后,如下制备核后(post-nuclear)上清液:将裂解物在1000xg离心10分钟,并收获顶部的液体层,其在下文中被称作“细胞裂解物”。将细胞裂解物应用于10%SDS-PAGE凝胶,并通过电泳分离,然后转移至硝酸纤维素膜,用Odyssey封闭缓冲液封闭,然后与第一抗体一起温育,所述第一抗体识别(1)存在于样品中的Muc1的总量,或(2)样品中的低糖基化的Muc1的总量。作为对照,将来自DF1细胞的上清液和细胞裂解物用亲本MVA感染(不含有抗原表达盒的载体对照)。该分析的结果显示在以下蛋白质印迹图像(图3)中:

[0501] 这证实,MVA-Muc1VP40疫苗会感染DF1细胞和表达Muc1蛋白,且此外证实,表达的Muc1的一些部分处于低糖基化形式。

[0502] 如这里所述,通过免疫染色被所述疫苗感染的细胞,或同时染色已知表达正常糖基化的或低糖基化的Muc1的对照细胞,看到由MVA-Muc1VP40疫苗编码的Muc1的低糖基化形式的证据:

[0503] - 对照细胞系MCF7和MCF10A都表达Muc1。293T细胞不表达。

[0504] - MCF7细胞表达低糖基化的Muc1,其被低糖基化的Muc1特异性的Ab (4H5) 识别。

[0505] - MCF10A表达正常Muc1。使用pan-Muc1 Ab (HMPV) 检测总Muc1。

[0506] - 用MVA-Muc1VP40或MV对照病毒(亲本MVA)感染293T细胞。

[0507] - 将所有样品用指示的Ab染色。

[0508] - 在以下图像(图4)中注意到在染色阴性对照和MV对照条件下的负信号(黄色背景);正信号是黄色背景以上的赤褐色:

[0509] 使用DF1细胞(HMPV)通过免疫电子显微术(EM)证实VLP形成,所述DF1细胞用MVA-Muc1VP40疫苗感染并用识别Muc1的单克隆抗体染色。在下面的EM图像(图5)中,清楚地说明了两件事情:(1)所述VLP是丝状,即将VP40蛋白用作基质蛋白的事实现象衍生物,所述基质蛋白驱动从细胞表面的VLP芽殖;和(2) VLP被针对Muc1的抗体正染色,从而证实该蛋白被掺入芽殖VLP中。

[0510] 实施例4:Muc1的O-连接的糖基化的靶向减少

[0511] 简介

[0512] 粘蛋白-型O-糖基化开始于通过添加核心1 O-聚糖Gal β 3-GalNAc α 1-Ser/Thr对蛋

白的修饰。这发生在两个步骤中：(1) GalNAc共价地连接至氨基酸主链的丝氨酸或苏氨酸；(2) 然后将Gal添加至GalNAc。通过其它糖向核心1结构的添加，从该核心结构建立极大种类的其它糖型。该初步修饰途径的示意图如在图6中所示：

[0513] 这导致在蛋白主链的Ser或Thr残基上的T抗原碳水化合物的形成。重要的是，功能性T合酶(也被称作核心1 β 3-半乳糖基转移酶，基因符号C1GALT1)是负责来自Tn抗原的T抗原的形成的唯一已知酶。核心1碳水化合物结构的随后进一步修饰完全依赖于T抗原的形成。因此，在没有T合酶存在下，依赖于核心1结构的O-连接的糖基化随着Tn抗原的形成而停止(参见Aryal, R. P., Ju, T. & Cummings, R. D., J Biol Chem 289, 11630-11641 (2014))。作为限制，低糖基化的另一个机制涉及 α -2,6-唾液酸转移酶I(基因符号ST6GALNAC1)向Tn上添加唾液酸，从而产生末端(不可延长的)唾液酸基-Tn结构(Sia α 2-6GalNAc α 1-Ser/Thr)，如在图7中所示。

[0514] 目的是确保低糖基化的Muc1的内源性体内产生。尽管Muc1在细胞中的过表达可能压倒许多细胞的糖基化机制，它可能适合我们的目的以通过擅改糖基化机制向Muc1的低糖基化额外推动生物合成途径。用Tn抗原和唾液酸基-Tn终止O-连接的糖基化的Muc1结构是与许多癌有关的已知低糖基化形式中的优势物质。鉴于关于O-连接的糖基化合成途径已知的知识，可以预见到两个容易地识别的机制用于驱动Muc1的内源性低糖基化：

[0515] (1) 通过击倒功能性T合酶的表达来阻止T抗原的形成和促进Tn抗原的丰度。这可以如下完成：

[0516] a. 通过siRNA方法直接靶向T合酶基因的转录物；或者

[0517] 通过siRNA方法靶向COSMC(基因符号C1GALT1C1)的转录物，因为已知COSMC是T合酶在ER中的折叠和功能所必需的和特异性的，并且在该X-连接的基因中的突变已经在人类中与Tn综合征相关联。

[0518] (2) 过表达 α -2,6-唾液酸转移酶I(基因符号ST6GALNAC1，在本文中缩写为‘ST1’)以用唾液酸基-Tn终止O-连接的糖基化。

[0519] 方法

[0520] 关于三个目标基因的总结数据如下提供：

[0521] T合酶(C1GALT1)

[0522] C1GALT1基因是66,104个核苷酸长，由6个外显子组成，且位于人染色体7p21.3处。将其转录和剪接以产生6244个核苷酸长mRNA(NM_020156)。起始密码子位于mRNA的核苷酸224处，且CDS跨224..1315的1092个核苷酸，产生具有42kD的计算分子量的363氨基酸蛋白(NP_064541)。预测氨基酸残基7..29编码跨膜结构域，且已知该蛋白的胞外结构域停留在ER的腔中，从而指示T合酶是单次穿过II型膜蛋白。

[0523] COSMC(T合酶特异性的伴侣蛋白；C1GALT1C1)

[0524] C1GALT1C1基因是4476个核苷酸长，由3个外显子组成，且位于人X染色体上在Xq24处。将其转录和剪接以产生1915个核苷酸长mRNA(NM_152692)。起始密码子位于mRNA的核苷酸412处，且CDS跨412..1368的957个核苷酸，产生具有36kD的计算分子量的318氨基酸蛋白(NP_689905)。预测氨基酸残基7..26编码跨膜结构域，且已知该蛋白的胞外结构域停留在ER的腔中，从而指示COSMC是单次穿过II型膜蛋白。

[0525] ST1(α -2,6-唾液酸转移酶I；ST6GALNAC1)

[0526] ST6GALNAC1基因是26,064个核苷酸长,由12个外显子组成,且位于人17号染色体q25.1处。将其转录和剪接以产生2593个核苷酸长mRNA (NM_018414)。起始密码子位于mRNA的核苷酸201处,且CDS跨201..2003的1803个核苷酸,产生具有68kD的计算分子量的600氨基酸蛋白(NP_060884)。预测氨基酸残基15..35编码跨膜结构域,且已知该蛋白的胞外结构域在易位后暴露于ER的腔,从而指示ST1是单次穿过II型膜蛋白。

[0527] 要应用于人T合酶和COSMC基因的、确立的siRNA设计方法如下:

[0528] 1. 在靶mRNA中找到以AA二核苷酸开始的21核苷酸序列。

[0529] 2. 用下述参数选择2-4个靶序列:

[0530] 具有30-50%GC含量的siRNA比具有更高G/C含量的那些更有活性。

[0531] 由于4-6核苷酸聚胸苷酸段充当RNA pol III的终止信号,当设计要从RNA pol III启动子表达的序列时,避免了靶序列中> 4个T或A的段。

[0532] 由于mRNA的某些区域可能是高度结构化的或被调节蛋白结合,沿着基因序列的长度选择在不同位置处的siRNA靶位点。没有观察到靶位点在mRNA上的位置与siRNA效能之间的关联。

[0533] 将潜在靶位点与适当的基因组数据库(人、小鼠、大鼠等)对比并从考虑中消除与其它编码序列具有超过16-17个连续碱基对的同源性的任何靶序列。

[0534] 3. 设计适当对照。

[0535] 阴性对照siRNA具有与siRNA相同的核苷酸组成,但是其缺少与基因组的显著序列同源性。混杂基因特异性的siRNA的核苷酸序列并进行检索以确保它缺少与任意其它基因的同源性。

[0536] 另外的siRNA序列靶向相同的mRNA。一次使用单一siRNA执行实验,两种或更多种不同的siRNA靶向相同的基因。

[0537] MVA驱动的ST1表达应当是直率的,因为该基因产物的CDS是仅约1800个核苷酸长度。

[0538] 细胞系

[0539] 已知HEK-293T细胞是Muc1表达阴性的(参见Mehanta, 等人, PLoS ONE, 2008)。T47D细胞(源自人乳腺癌)内源性地表达Muc1,其在标准培养基(RPMI)中生长,且是可转染的。这些细胞已经用于上述出版物中的Muc1击倒(KD)研究,且可能适合我们的研究/Muc1低糖基化的早期表征研究。T47D细胞可用431美元得自ATCC(目录号HTB-133)。Olja Finn提到,存在一系列可用于癌研究的基于MCF-7系的细胞系。具体地,她推荐在该系列中的MCF-10A,因为已知它表达高水平的完全糖基化的Muc1(也参见Olja的论文: Cascio, 等人, J Biol Chem, 2011)。MCF-10A是一种转化的、非致瘤性的附着上皮细胞系,其源自具有纤维囊性疾病的36-岁高加索女性的乳腺。根据ATCC,所述细胞系适合作为转染宿主,其中所述细胞系可用431美元得到(目录号CRL-10317)。该细胞系使用得自Lonza的哺乳动物上皮细胞生长培养基(MEGM),补充了Lonza MEGM Bullet Kit(没有庆大霉素/两性霉素-B补充物)和100 ng/ml霍乱毒素(Sigma)。

[0540] 瞬时表达构建体

[0541] 在从Origene (www.origene.com)寻找可用于基因操作的产品时,发现它们提供处于现成即可使用的形式的诊疗RNAi试剂以及在现成即可使用的质粒中的诊疗ORF。对于

RNAi方法,对于我们的目的而言两种最适当的试剂将是合成的siRNA双链体或可以从质粒表达的shRNA构建体。由于以任何成功,我们的目标是从MVA载体本身表达RNAi产品,最合适的是使这些末端与shRNA一起工作,这将容易地转移至MVA表达系统。Origene提供了许多不同形式的shRNA产品,但是我们需要可为制备质粒(提供Kan(r)和Cam(r))选择的和可报告的(提供GFP和RFP)简单表达载体。因而,我们将订购靶向C1GALT1(在质粒pGFP-V-RS中,具有GFP报告物:目录号TG306064)和C1GALT1C1(在质粒pRFP-C-RS中,具有RFP报告物:目录号TF317130)的shRNA构建体。两种质粒用U6启动子驱动shRNA转录。这些质粒的图显示在下面。

[0542] 给上述的shRNA产品各提供了4种shRNA。每种shRNA将针对KD独立地测试。它们具有如下靶序列和mRNA坐标。

[0543] 靶向C1GALT1(T合酶)的Origene shRNA产品以及mRNA坐标(NM_020156):

[0544]	产品	SEQ ID NO:	序列	坐标 (mRNA)
	TG306064A	31	TATGAATGTAGAAGCAGGAGATTCCAGAG	970-998
	TG306064B	32	TGGTACTGGAATTACAACCTATTATCCTCC	1076-1104
	TG306064C	33	CCAAAGAAGGCAGAGATCAACTATACTGG	630-658
	TG306064D	34	ACACATAGTTCCTCCATTGAAGACTTAGC	920-948

[0545] 靶向C1GALT1C1(COSMC)的Origene shRNA产品以及mRNA坐标(NM_152692):

[0546]	产品	SEQ ID NO:	序列	坐标 (mRNA)
	TF317130A	35	TAGGATTGGTCATGGAAATAGAATGCACC	495-523
	TF317130B	36	AAGGAGACTTGGACCAAACTGTGACAA	670-698
	TF317130C	37	GCAGTTTGCCTGAAATATGCTGGAGTATT	1081-1109
	TF317130D	38	CTTACCTCCAAATGGTTCTGACAATGACT	1338-1366

[0547] 通过RT-PCR或WB可以评估这些基因产品的KD。

[0548] 为了驱动ST1的表达,可从Origene容易得到构建体。目标产品(目录号RC216697)含有全长ST6GALNAC1基因,其用CMV启动子驱动,且在C-端用Myc和DDK(FLAG)标记做标记,都在Origene pCMV6-Entry载体中(参见下面RC216687)。

[0549] 实验计划

[0550] 1. 初步实验

[0551] 制备HEK293T或HeLa细胞的全细胞裂解物(WCL)。使用WCL来优化用于检测T-合酶(用rb pAb)和COSMC(用ms mAb)的WB方法。使用抗-ms IR700染料和抗-rb IR800染料作为第二物(secondaries),以允许在相同WB上对两种抗原的随后同时检测,并且当测定转录物的shRNA KD的效应时这样的同时检测将是重要的。

[0552] 建立和储存MCF10A细胞。

- [0553] 用无害的编码GFP的质粒转染MCF10A细胞以确定转染效率的基础水平。
- [0554] 制备MCF10A WCL。测试WB对T-合酶和COSMC的表达水平。
- [0555] 使用MCF10A细胞针对WB和流式细胞计量术测试抗-Muc1 Ab。
- [0556] 2. 关键实验
- [0557] 在MCF10A细胞中的T-合酶的shRNA KD
- [0558] 用4种靶向T-合酶的shRNA质粒中的每一种单独地转染MCF10A细胞。
- [0559] 在预定的时间点制备每个转染群体的WCL。针对T-合酶、COSMC、Muc1和低糖基化的Muc1 (hgMuc1)的表达分析WCL。
- [0560] 选择产生最佳KD应答的shRNA。
- [0561] 用最佳shRNA转染MCF10A细胞。使用流式细胞计量术针对Muc1和hgMuc1的表面表达来分析细胞。
- [0562] 在MCF10A细胞中的COSMC的shRNA KD
- [0563] 用4种靶向COSMC的shRNA质粒中的每一种单独地转染MCF10A细胞。
- [0564] 在预定的时间点制备每个转染群体的WCL。针对T-合酶、COSMC、Muc1和低糖基化的Muc1 (hgMuc1)的表达分析WCL。
- [0565] 选择产生最佳KD应答的shRNA。
- [0566] 用最佳shRNA转染MCF10A细胞。使用流式细胞计量术针对Muc1和hgMuc1的表面表达来分析细胞。
- [0567] 2. 关键实验 (续)
- [0568] ST1 (ST6GALNAC1唾液酸转移酶)在MCF10A细胞中的异位表达
- [0569] 用编码在CMV启动子后面的ST1的RC216697质粒转染MCF10A细胞。
- [0570] 在预定的时间点评估生存力和制备转染的细胞的WCL。针对ST1 (通过抗-DDK抗体检测)、Muc1和低糖基化的Muc1 (hgMuc1)的表达,分析WCL。
- [0571] 用RC216697质粒转染MCF10A细胞。使用流式细胞计量术针对Muc1和hgMuc1的表面表达来分析细胞。
- [0572] 考虑到来自以上关键实验的结果,确定是否继续进行研究的单个方案之一,或尝试组合方案。例如,人们可以构思尝试通过shRNA对T-合酶和COSMC的双-KD(如果单独地都没有产生足够的结果),或与驱动ST1的表达的RC216697质粒一起共转染任一种shRNA。
- [0573] 如果将使用ST1,继续以牛痘密码子优化的形式合成该基因。
- [0574] 前述讨论仅仅公开了和描述了本发明的示例性实施方案。本领域技术人员从这样的讨论以及从附图和权利要求书会容易地认识到,可以在其中做出不同的变化、修改和变动,而不脱离在下述权利要求书中限定的本发明的精神和范围。
- [0575] 本文中引用的所有参考文献都以它们整体通过引用并入。

序列表

<110> GeoVax, Inc

<120> 用于产生对肿瘤相关抗原的免疫应答的组合物和方法

<130> GEO-0502W0

<150> US62/276,479

<151> 2016-01-08

<150> US62/301,885

<151> 2016-03-01

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	

[0001]

Thr	Ala	Pro	Pro
			20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Asn	Arg	Pro	Ala	Leu	Gly	Ser
1				5					10					15	

Thr	Ala	Pro	Pro
			20

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1	5	10	15
	Thr Ala Pro	Pro Ala His Gly Val	Thr Ser Ala Pro Asp	Asn Arg Pro
		20	25	30
	Ala Leu Gly	Ser Thr Ala Pro	Pro	
		35	40	
<210>	4			
<211>	100			
<212>	PRT			
<213>	智人			
<400>	4			
	Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser			
	1	5	10	15
	Thr Ala Pro	Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro		
		20	25	30
[0002]	Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro	Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro		
		35	40	45
	Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro	Pro Ala His Gly Val		
		50	55	60
	Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro	Pro		
	65	70	75	80
	Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp	Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser		
		85	90	95
	Thr Ala Pro	Pro		
		100		
<210>	5			
<211>	1428			
<212>	DNA			
<213>	智人			
<400>	5			
	atgacaccgg gcaccacgtc tcctttcttc ctgctgctgc tcctcacagt gtttacagtt			60
	gttacgggtt ctggatcatgc aagctctacc ccaggtggag aaaaggagac ttcggctacc			120

	cagagaagtt cagtgccag ctctactgag aagaatgctg tgagtatgac cagcagcgta	180
	ctctccagcc acagccccgg ttccaggtcc tccaccactc agggacagga tgtcactctg	240
	gccccggcca cggaaccagc ttccaggttca gctgccacct ggggacagga tgtcacctcg	300
	gtcccagtc caggccagc cctgggtcc accaccccg cagcccacga tgtcacctca	360
	gccccggaca acaagccagc cccgggtcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg	420
	gccccggaca ccaggccggc cccgggtcc accgcccccc cagcccattg tgtcacctcg	480
	gccccggaca acaggcccg cttgggtcc accgcccctc cagtccacaa tgtcacctcg	540
	gcctcaggct ctgcatcagg ctccagcttct actctggtgc acaacggcac ctctgccagg	600
	gtaccacaa cccagccag caagagcact ccatttctaa ttcccagcca ccactctgat	660
	actctacca cccttgccag ccatagcacc aagactgatg ccagtagcac tcaccatagc	720
	acggtacctc ctctcacctc ctccaatcac agcacttctc cccagttgtc tactggggtc	780
	tctttctttt tctgtcttt tcacatttca aacctccagt ttaattctc tctggaagat	840
	cccagcaccg actactacca agagctgcag agagacattt ctgaaatgtt ttgacagatt	900
[0003]	tataaacaag ggggttttct gggcctctcc aatattaagt tcaggccagg atctgtggtg	960
	gtacaattga ctctggcctt ccgagaaggt accatcaatg tccacgacgt ggagacacag	1020
	ttcaatcagt ataaaacgga agcagcctct cgatataacc tgacgatctc agacgtcagc	1080
	gtgagtgatg tgccatttcc ttctctgcc cagtctgggg ctgggggtgcc aggtctggggc	1140
	atcgcgctgc tgggtctggt ctgtgttctg gttgcgctgg ccattgtcta tctcattgcc	1200
	ttggctgtct gtcagtgccg ccgaaagaac tacgggcagc tggacatctt tccagcccgg	1260
	gatacctacc atcctatgag cgagtacccc acctaccaca cccatgggag ctatgtgccc	1320
	cctagcagta ccgatcgtag cccctatgag aaggtttctg caggtaatgg tggcagcagc	1380
	ctctcttaca caaaccagc agtggcagcc acttctgcca acttgtag	1428

<210> 6
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
50 55 60

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65 70 75 80

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
85 90 95

Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
100 105 110

Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115 120 125

[0004]

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
130 135 140

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
145 150 155 160

Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His
165 170 175

Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu
180 185 190

Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys
195 200 205

Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr
210 215 220

Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser
225 230 235 240

Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu
245 250 255

Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu
260 265 270

Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu
275 280 285

Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly
290 295 300

Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val
305 310 315 320

Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp
325 330 335

Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr
340 345 350

[0005]

Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe
355 360 365

Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu
370 375 380

Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala
385 390 395 400

Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile
405 410 415

Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr
420 425 430

His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro
435 440 445

Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr
450 455 460

Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
465 470 475

<210> 7
<211> 1608
<212> DNA
<213> 智人

<400> 7

[0006]

```

atgacaccgg gcacccagtc tcctttcttc ctgctgctgc tcttcacagt gtttacagtt      60
gttacggggt ctggtcatgc aagctctacc ccaggtggag aaaaggagac ttcggctacc      120
cagagaagtt cagtgccag ctctactgag aagaatgctg tgagtatgac cagcagcgta      180
ctctccagcc acagccccgg ttcaggctcc tccaccactc agggacagga tgtcactctg      240
gccccggcca cggaaccagc ttcagggtca gctgccacct ggggacagga tgtcacctcg      300
gtcccagtc caggccagc cctgggctcc accaccccgc cagcccacga tgtcacctca      360
gccccggaca acaagccagc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg      420
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg      480
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg      540
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg      600
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg      660
gccccggaca acaggccgc cttgggctcc accgcccctc cagtccacaa tgtcacctcg      720
gcctcaggct ctgcatcagg ctcagcttct actctgggtg acaacggcac ctctgccagg      780
gtaccacaa cccagccag caagagcact ccattctcaa ttcccagcca ccactctgat      840
actctacca cccttgccag ccatagcacc aagactgatg ccagtagcac tcaccatagc      900
acggtacctc ctctcacctc ctccaatcac agcaattctc cccagttgtc tactggggtc      960
tctttctttt tcctgtcttt tcacatttca aacctccagt ttaattctc tctggaagat     1020
cccagcaccg actactacca agagctgcag agagacattt ctgaaatgtt ttgcagatt     1080
tataaacaag ggggttttct gggcctctcc aatattaagt tcaggccagg atctgtggtg     1140
gtacaattga ctctggcctt ccgagaaggt accatcaatg tccacgacgt ggagacacag     1200
ttcaatcagt ataaaacgga agcagcctct cgatataacc tgacgatctc agacgtcagc     1260
gtgagtgatg tgccatttcc tttctctgcc cagtctgggg ctgggggtgcc aggtgggggc     1320
atcgcgctgc tgggtgctgt ctgtgttctg gttgcgctgg ccattgtcta tctcattgcc     1380

```

```

ttggctgtct gtcagtgccg ccgaaagaac tacgggcagc tggacatctt tccagcccgg      1440
gatacctacc atcctatgag cgagtacccc acctaccaca cccatggggcg ctatgtgccc      1500
cctagcagta ccgatcgtag cccctatgag aaggtttctg caggtaatgg tggcagcagc      1560
ctctcttaca caaaccagc agtggcagcc acttctgcc aattgtag      1608

```

<210> 8
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8

```

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr
1          5          10          15

```

```

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
          20          25          30

```

```

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
          35          40          45

```

[0007]

```

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
50          55          60

```

```

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65          70          75          80

```

```

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
          85          90          95

```

```

Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
100          105          110

```

```

Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115          120          125

```

```

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
130          135          140

```

```

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
145          150          155          160

```


Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
165 170 175

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
180 185 190

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
195 200 205

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn
210 215 220

Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser
225 230 235 240

Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly
245 250 255

Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe
260 265 270

[0008]

Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His
275 280 285

Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Thr Val Pro Pro
290 295 300

Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val
305 310 315 320

Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser
325 330 335

Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp
340 345 350

Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly
355 360 365

Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr
370 375 380

Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln
385 390 395 400

Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile
405 410 415

Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser
420 425 430

Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys
435 440 445

Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys
450 455 460

Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg
465 470 475 480

Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly
485 490 495

[0009]

Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val
500 505 510

Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val
515 520 525

Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
530 535

<210> 9

<211> 2046

<212> DNA

<213> 马尔堡病毒

<400> 9

atgtggacta catgcttctt tatcagtcctc atcttgatcc aagggataaa aactctccct 60

atcttgagaa tagccagtaa cgatcaaccc caaaatgtgg attcggtatg ctccggaact 120

ctccagaaaa cagaagacgt ccatctgatg ggatttacac tgagcgggca gaaagttgct 180

gattcccctt tggaggcatc caagcgatgg gctttcagga caggtgtacc tcctaagaat 240

gttgagtata cggaagggga ggaagccaaa acatgctaca atataagtgt aacggatccc 300

[0010]	tctggaaaat ccttgctgtt agatcctccc accaacgtcc gagactatcc taaatgcaaa	360
	actatccatc acattcaagg tcaaaaccct catgcgcagg ggatcgccct ccatttgtgg	420
	ggagcatttt tcctatatga tcgcattgcc tccacaacaa tgtaccgagg caaagtcttc	480
	actgaaggga acatagcagc catgattgtc aataagacag tgcacaaaat gattttctcg	540
	aggcaaggac aagggtaccg tcacatgaat ctgacttcta ctaataaata ttggacaagt	600
	agcaacggaa cgcaaacaaa tgacactgga tgctttggta ctcttcaaga atacaattct	660
	acgaagaacc aaacatgtgc tccgtctaaa acacccccac caccgcccac agcccatccg	720
	gagatcaaac ccacaagcac cccaaccgat gccactagac tcaacaccac aaacccaaac	780
	agtgatgatg aggatctcac aacatccggc tcagggtctg gggaacagga accctatacg	840
	acttctgatg cggtcactaa gcaagggtt tcatacaaa tgccaccac tctctcaccg	900
	caaccaggca cgccacagca aggaggaaac aacacaaacc actcccaaga cgctgcaact	960
	gaacttgaca acaccaatac aactgcacaa cgcgccatgc cctcccacaa caccaccaca	1020
	atctccacca acaacacctc caaacacaa ctcagcacc tctccgaacc accacaaaac	1080
	accaccaatc ccaacacaca aagcatggcc actgaaaatg agaaaaccag tgcccccccg	1140
	aaaacaacc tgctccaac agaaagtct accacagaaa agagcaccaa caatacaaaa	1200
	agccccacca caatggaacc aaatacaaca aacggacatt tcactagtcc ctctccacc	1260
	cccaactcga ctactcaaca tcttatatat ttcaggagga aacgaagtat cctctggagg	1320
	gaaggcgaca tgttcccttt tctagatggg ttaataaatg ctccaattga ttttgatcca	1380
	gttccaaata caaagacaat ctttgatgaa tcttctagtt ctggtgcttc agccgaggaa	1440
	gatcaacatg catcctccaa tatcagttta actttatctt atcttctca tacaagtgaa	1500
	aacactgcct actctggaga aatgaaaat gatttgtatg cagagctaag aatttgagc	1560
	gttcaggagg acgacctggc agcagggtc agttggatac catttttttg ccctggaatc	1620
	gaaggacttt ataccgctgg tttaattaaa aatcaaaaca atttggctg caggttgagg	1680
	cgtctagcca atcaaactgc aaaatctttg gaactcttac taagggtcac aaccgaggaa	1740
	agaacatttt cttaaatcaa tagacatgct attgactttc tactcacaag gtggggagga	1800
	acatgcaaag tgcttgacc cgattgttgc ataggaatag aggacttgct cagaaatatt	1860
	tcagaacaga ttgaccaaata caagaaggac gaacaaaaag aggggactgg ttgggtctg	1920
	ggtggtaaat ggtggacatc cgactgggt gttcttacta acttgggcat cttactacta	1980

ttgtccatag ctgtcttgat tgctctatcc tgtatttgtc gtatctttac taaatatatt 2040
ggatag 2046

<210> 10
<211> 681
<212> PRT
<213> 马尔堡病毒

<400> 10

Met Trp Thr Thr Cys Phe Phe Ile Ser Leu Ile Leu Ile Gln Gly Ile
1 5 10 15

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

Val Asp Ser Val Cys Ser Gly Thr Leu Gln Lys Thr Glu Asp Val His
35 40 45

Leu Met Gly Phe Thr Leu Ser Gly Gln Lys Val Ala Asp Ser Pro Leu
50 55 60

[0011]

Glu Ala Ser Lys Arg Trp Ala Phe Arg Thr Gly Val Pro Pro Lys Asn
65 70 75 80

Val Glu Tyr Thr Glu Gly Glu Glu Ala Lys Thr Cys Tyr Asn Ile Ser
85 90 95

Val Thr Asp Pro Ser Gly Lys Ser Leu Leu Leu Asp Pro Pro Thr Asn
100 105 110

Val Arg Asp Tyr Pro Lys Cys Lys Thr Ile His His Ile Gln Gly Gln
115 120 125

Asn Pro His Ala Gln Gly Ile Ala Leu His Leu Trp Gly Ala Phe Phe
130 135 140

Leu Tyr Asp Arg Ile Ala Ser Thr Thr Met Tyr Arg Gly Lys Val Phe
145 150 155 160

Thr Glu Gly Asn Ile Ala Ala Met Ile Val Asn Lys Thr Val His Lys
165 170 175

Met Ile Phe Ser Arg Gln Gly Gln Gly Tyr Arg His Met Asn Leu Thr
180 185 190

Ser Thr Asn Lys Tyr Trp Thr Ser Ser Asn Gly Thr Gln Thr Asn Asp
195 200 205

Thr Gly Cys Phe Gly Thr Leu Gln Glu Tyr Asn Ser Thr Lys Asn Gln
210 215 220

Thr Cys Ala Pro Ser Lys Thr Pro Pro Pro Pro Pro Thr Ala His Pro
225 230 235 240

Glu Ile Lys Pro Thr Ser Thr Pro Thr Asp Ala Thr Arg Leu Asn Thr
245 250 255

Thr Asn Pro Asn Ser Asp Asp Glu Asp Leu Thr Thr Ser Gly Ser Gly
260 265 270

Ser Gly Glu Gln Glu Pro Tyr Thr Thr Ser Asp Ala Val Thr Lys Gln
275 280 285

[0012]

Gly Leu Ser Ser Thr Met Pro Pro Thr Leu Ser Pro Gln Pro Gly Thr
290 295 300

Pro Gln Gln Gly Gly Asn Asn Thr Asn His Ser Gln Asp Ala Ala Thr
305 310 315 320

Glu Leu Asp Asn Thr Asn Thr Thr Ala Gln Pro Pro Met Pro Ser His
325 330 335

Asn Thr Thr Thr Ile Ser Thr Asn Asn Thr Ser Lys His Asn Leu Ser
340 345 350

Thr Leu Ser Glu Pro Pro Gln Asn Thr Thr Asn Pro Asn Thr Gln Ser
355 360 365

Met Ala Thr Glu Asn Glu Lys Thr Ser Ala Pro Pro Lys Thr Thr Leu
370 375 380

Pro Pro Thr Glu Ser Pro Thr Thr Glu Lys Ser Thr Asn Asn Thr Lys
385 390 395 400

Ser Pro Thr Thr Met Glu Pro Asn Thr Thr Asn Gly His Phe Thr Ser
405 410 415

Pro Ser Ser Thr Pro Asn Ser Thr Thr Gln His Leu Ile Tyr Phe Arg
420 425 430

Arg Lys Arg Ser Ile Leu Trp Arg Glu Gly Asp Met Phe Pro Phe Leu
435 440 445

Asp Gly Leu Ile Asn Ala Pro Ile Asp Phe Asp Pro Val Pro Asn Thr
450 455 460

Lys Thr Ile Phe Asp Glu Ser Ser Ser Ser Gly Ala Ser Ala Glu Glu
465 470 475 480

Asp Gln His Ala Ser Ser Asn Ile Ser Leu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro
485 490 495

His Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr Ser Gly Glu Asn Glu Asn Asp Cys
500 505 510

[0013]

Asp Ala Glu Leu Arg Ile Trp Ser Val Gln Glu Asp Asp Leu Ala Ala
515 520 525

Gly Leu Ser Trp Ile Pro Phe Phe Gly Pro Gly Ile Glu Gly Leu Tyr
530 535 540

Thr Ala Gly Leu Ile Lys Asn Gln Asn Asn Leu Val Cys Arg Leu Arg
545 550 555 560

Arg Leu Ala Asn Gln Thr Ala Lys Ser Leu Glu Leu Leu Leu Arg Val
565 570 575

Thr Thr Glu Glu Arg Thr Phe Ser Leu Ile Asn Arg His Ala Ile Asp
580 585 590

Phe Leu Leu Thr Arg Trp Gly Gly Thr Cys Lys Val Leu Gly Pro Asp
595 600 605

Cys Cys Ile Gly Ile Glu Asp Leu Ser Arg Asn Ile Ser Glu Gln Ile
610 615 620

Asp Gln Ile Lys Lys Asp Glu Gln Lys Glu Gly Thr Gly Trp Gly Leu
625 630 635 640

Gly Gly Lys Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu Gly
645 650 655

Ile Leu Leu Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys Ile
660 665 670

Cys Arg Ile Phe Thr Lys Tyr Ile Gly
675 680

<210> 11
<211> 1608
<212> DNA
<213> 智人

[0014] <400> 11
atgacaccgg gcaccagtc tcctttcttc ctgctgctgc tcctcacagt gttacagtt 60
gttacgggtt ctggatcatgc aagctctacc ccaggtggag aaaaggagac ttcggctacc 120
cagagaagtt cagtgccag ctctactgag aagaatgctg tgagtatgac cagcagcgta 180
ctctccagcc acagccccgg ttcaggctcc tccaccactc agggacagga tgtcactctg 240
gccccggcca cggaaccagc ttcagggtca gctgccacct ggggacagga tgtcacctcg 300
gtcccagtc caggccagc cctgggctcc accaccccg cagcccacga tgtcacctca 360
gccccggaca acaagccagc cccgggctcc accgcccc cagcccacgg tgtcacctcg 420
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccc cagcccacgg tgtcacctcg 480
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccc cagcccacgg tgtcacctcg 540
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccc cagcccacgg tgtcacctcg 600
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccc cagcccacgg tgtcacctcg 660
gccccggaca acaggcccg cttgggctcc accgcccc cagtccacaa tgtcacctcg 720
gcctcaggt ctgcatcagg ctgagcttct actctggtgc acaacggcac ctctgccagg 780
gctaccacaa cccagccag caagagcact ccattctcaa tcccagcca ccactctgat 840
actctacca cccttgccag ccatagcacc aagactgatg ccagtagcac tcaccatagc 900
acggtacctc ctctcacctc ctccaatcac agcaattctc cccagttgtc tactggggtc 960
tctttctttt tcctgtcttt tcacatttca aacctccagt ttaattctc tctggaagat 1020

```

cccagcacccg actactacca agagctgcag agagacattt ctgaaatggt tttgcagatt      1080
tataaacaag ggggttttct gggcctctcc aatattaagt tcaggccagg atctgtggtg      1140
gtacaattga ctctggcctt ccgagaaggt accatcaatg tccacgacgt ggagacacag      1200
ttcaatcagt ataaaacgga agcagcctct cgatataacc tgacgatctc agacgtcagc      1260
gtgagtgatg tgccatttcc tttctctgcc cagtctgggg ctgggggtgcc aggctggggc      1320
atcgcgctgc tgggtctggt ctgtgttctg gttgcgctgg ccattgtcta tctcattgcc      1380
ttggctgtct gtcagtgccg ccgaaagaac tacgggcagc tggacatctt tccagcccgg      1440
gatacctacc atcctatgag cgagtacccc acctaccaca cccatgggcg ctatgtgccc      1500
cctagcagta ccgatcgtag cccctatgag aaggtttctg caggtaatgg tggcagcagc      1560
ctctcttaca caaaccagc agtggcagcc acttctgcca acttgtag      1608

```

<210> 12
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> 智人

[0015] <400> 12

```

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr
1           5           10           15

```

```

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
20           25           30

```

```

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
35           40           45

```

```

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
50           55           60

```

```

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65           70           75           80

```

```

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
85           90           95

```

```

Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
100          105          110

```


Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115 120 125

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
130 135 140

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
145 150 155 160

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
165 170 175

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
180 185 190

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
195 200 205

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn
210 215 220

[0016]

Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser
225 230 235 240

Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly
245 250 255

Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe
260 265 270

Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His
275 280 285

Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Thr Val Pro Pro
290 295 300

Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val
305 310 315 320

Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser
325 330 335

Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp
340 345 350

Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly
355 360 365

Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr
370 375 380

Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln
385 390 395 400

Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile
405 410 415

Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser
420 425 430

Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys
435 440 445

[0017]

Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys
450 455 460

Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg
465 470 475 480

Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly
485 490 495

Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val
500 505 510

Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val
515 520 525

Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
530 535

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> 马尔堡病毒

<400> 13

Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu Gly Ile Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys Ile Cys
 20 25 30

<210> 14

<211> 1608

<212> DNA

<213> 智人

<400> 14

[0018]

```

atgacaccgg gcaccagtc tcctttcttc ctgctgctgc tcctcacagt gtttacagtt      60
gttacgggtt ctggtcatgc aagctctacc ccaggtggag aaaaggagac ttcggtacc      120
cagagaagtt cagtgccag ctctactgag aagaatgtg tgagtatgac cagcagcgta      180
ctctccagcc acagccccgg ttcaggctcc tccaccactc agggacagga tgtcactctg      240
gccccggcca cggaaccagc ttcaggttca gctgccacct ggggacagga tgtcacctcg      300
gtcccagtca ccaggccagc cctgggctcc accaccccgc cagcccacga tgtcacctca      360
gccccggaca acaagccagc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg      420
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg      480
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg      540
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg      600
gccccggaca ccaggccggc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctcg      660
gccccggaca acaggccgc cttgggctcc accgcccctc cagtccacaa tgtcacctcg      720
gcctcagget ctgcatcagg ctcagcttct actctggtgc acaacggcac ctctgccagg      780
gctaccacaa cccagccag caagagcact ccattctcaa ttcccagcca cactctgat      840
actctacca cccttgccag ccatagcacc aagactgatg ccagtagcac tcaccatagc      900
acggtacctc ctctcacctc ctccaatcac agcaattctc ccagttgtc tactggggtc      960
tctttctttt tctgtcttt tcacatttca aacctccagt ttaattctc tctggaagat     1020
cccagcaccg actactacca agagctgcag agagacattt ctgaaatggt tttgcagatt     1080
tataaacaag ggggttttct gggcctctcc aatattaagt tcaggccagg atctgtggtg     1140
gtacaattga ctctggcctt ccgagaaggt accatcaatg tccacgacgt ggagacacag     1200

```

```

ttcaatcagt ataaaacgga agcagcctct cgatataacc tgacgatctc agacgtcagc      1260
gtgagtgatg tgccatttcc tttctctgcc cagtctgggg ctgggggtgtg gtggacatcc      1320
gactgggggtg ttcttactaa cttgggcata ttactactat tgtccatagc tgtcttgatt      1380
gctctatcct gtatttgtcg ccgaaagaac tacgggcagc tggacatctt tccagcccg      1440
gataacctacc atcctatgag cgagtacccc acctaccaca cccatgggcg ctatgtgccc      1500
cctagcagta ccgatcgtag ccctatgag aaggtttctg caggtaatgg tggcagcagc      1560
ctctcttaca caaaccagc agtggcagcc acttctgcca acttgtag      1608

```

<210> 15
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15

```

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr
1          5          10          15

```

[0019] Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
 20 25 30

```

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
35          40          45

```

```

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
50          55          60

```

```

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65          70          75          80

```

```

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
85          90          95

```

```

Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
100          105          110

```

```

Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115          120          125

```

```

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr

```

73

	355	360	365	
	Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr 370 375 380			
	Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln 385 390 395 400			
	Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile 405 410 415			
	Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser 420 425 430			
	Gly Ala Gly Val Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu 435 440 445			
	Gly Ile Leu Leu Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys 450 455 460			
[0021]	Ile Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg 465 470 475 480			
	Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly 485 490 495			
	Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val 500 505 510			
	Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val 515 520 525			
	Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu 530 535			
	<210> 16			
	<211> 1608			
	<212> DNA			
	<213> 智人			
	<400> 16			
	atgacacctg gaacacaatc tccatttttt ctactactac tattgacagt actaacagta 60			
	gtaacaggat ctggacatgc gtctagtaca ccaggtggag aaaaagaaac atctgcgact 120			

	caaagatctt ctgtaccatc ttctacagaa aaaaatgcgg tatctatgac atctagtgtgta	180
	ctatctttctc attctcctgg atctggatct tctactacac aaggacaaga tgtaacacta	240
	gcgccagcta cagaaccagc ttctggatct gctgctactt ggggtcaaga tggttacttct	300
	gttccagtaa caagaccagc gctaggatct acaacaccac cagcgcataga tgtaacaagt	360
	gcgccagata ataaaccagc gcctggttct actgctccac cagctcatgg tggttacttca	420
	gcgcctgata caagacctgc acctggatct acagctcttc ctgcacatgg tgtaacatct	480
	gctccagata caagaccagc tccagggtca acagcacctc cagcgcataga tggttactagt	540
	gctccagata caagacctgc gcctggaagt actgcaccac cagcacatgg tgtaactagt	600
	gcgcctgata caagaccagc gccaggatca actgctcttc ctgctcatgg tggttacaagt	660
	gcacctgata atagacctgc gttgggatct actgcgcctc cagttcataa tgtaacatca	720
	gcgtctggaa gtgcgtctgg ttctgcgtct acattgggtc ataattgtac atctgcgaga	780
	gcgacaacaa ctccagcgtc taaatctaca ccattttcta ttccatctca tcattctgat	840
	acaccaacaa cattggcgag tcattctaca aaaacagatg cgagttctac acatcattct	900
[0022]	actgtaccac cactaacatc ttctaatacat agtacatctc cacaactatc tactggtgta	960
	tctttttttt ttctatcttt tcataattct aatctacagt ttaattctag ttggaagat	1020
	ccatctacag attattatca agaactacaa agagatattt ctgaaatgtt tctacaaaata	1080
	tataaacaag gaggatttct aggactatct aatattaagt ttagaccagg atctgtagta	1140
	gttcaactaa ctctagcgtt tagagaaggt actattaatg tacatgatgt tgaaacacag	1200
	tttaataaat ataaaacaga agcggcgtct agatataatc taacaatttc tgatgtatct	1260
	gtatctgatg ttccatttcc attttctgcg caatctggtg ctggtgtatg gtggacatct	1320
	gattggggag tactaactaa tctaggaatt ctactattgc tatctattgc ggtactaatt	1380
	gcgctatctt gtatatgtag aagaaaaaat tatggacaac tagatatattt tccagcgaga	1440
	gatacttate atccaatgtc tgaatatcca acatatcata cacatggaag atatgtacca	1500
	cctttttcaa cagatagatc tccatatgaa aaagtatctg cgggaaatgg tggttcttct	1560
	ctatcttata caaatccagc ggtagcggcg acttctgcga atctataa	1608
	<210> 17	
	<211> 535	
	<212> PRT	
	<213> 智人	

<400> 17

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
1 5 10 15

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
50 55 60

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65 70 75 80

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
85 90 95

[0023] Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
100 105 110

Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115 120 125

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
130 135 140

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
145 150 155 160

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
165 170 175

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
180 185 190

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
195 200 205

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn

	210	215	220	
	Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser 225 230 235 240			
	Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly 245 250 255			
	Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe 260 265 270			
	Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His 275 280 285			
	Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Thr Val Pro Pro 290 295 300			
	Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val 305 310 315 320			
[0024]	Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser 325 330 335			
	Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp 340 345 350			
	Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly 355 360 365			
	Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr 370 375 380			
	Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln 385 390 395 400			
	Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile 405 410 415			
	Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser 420 425 430			
	Gly Ala Gly Val Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu			

435	440	445
Gly Ile Leu Leu Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys		
450	455	460
Ile Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg		
465	470	475
Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly		
485	490	495
Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val		
500	505	510
Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val		
515	520	525
Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu		
530	535	

[0025]

<210> 18
 <211> 1608
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 18
 atgacacctg gaacacaatc tccattcttc ctactactac tattgacagt actaacagta 60
 gtaacaggat ctggacatgc gtctagtaca ccaggtggag agaaggaaac atctgcgact 120
 caaagatctt ctgtaccatc ttctacagag aagaatgcgg tatctatgac atctagtgtgta 180
 ctatctttctc attctcctgg atctggatct tctactacac aaggacaaga tgtaacacta 240
 gcgccagcta cagaaccagc ttctggatct gctgctactt ggggtcaaga tgttacttct 300
 gttccagtaa caagaccagc gctaggatct acaacaccac cagcgcgatga tgtaacaagt 360
 gcgccagata ataagccagc gcctgggttct actgctccac cagctcatgg tgttacttca 420
 gcgcctgata caagacctgc acctggatct acagctcctc ctgcacatgg tgtaacatct 480
 gctccagata caagaccagc tccaggttca acagcacctc cagcgcgatgg tgttactagt 540
 gctccagata caagacctgc gcctggaagt actgcaccac cagcacatgg tgtaactagt 600
 gcgcctgata caagaccagc gccaggatca actgctcctc ctgctcatgg tgttacaagt 660
 gcacctgata atagacctgc gttgggatct actgcgcctc cagttcataa tgtaacatca 720

	gcgtctggaa gtgcgtctgg ttctgcgtct acattggttc ataatggtac atctgcgaga	780
	gcgacaacaa ctccagcgtc taagtctaca ccattctcta ttccatctca tcattctgat	840
	acaccaacaa cattggcgag tcattctaca aagacagatg cgagttctac acatcattct	900
	actgtaccac cactaacatc ttctaatacat agtacatctc cacaactatc tactgggtgta	960
	tctttcttct tcctatcctt tcataattct aatctacagt tcaattctag ttggaagat	1020
	ccatctacag attattatca agaactacaa agagatattt ctgaaatgtt tctacaaata	1080
	tataaacaag gaggatttct aggactatct aatattaagt ttagaccagg atctgtagta	1140
	gttcaactaa ctctagcggt tagagaaggt actattaatg tacatgatgt tgaaacacag	1200
	tttaatacat ataagacaga agcggcgtct agatataatc taacaatttc tgatgtatct	1260
	gtatctgatg ttccatttcc attttctgcg caatctggtg ctggtgtatg gtggacatct	1320
	gattggggag tactaactaa tctaggaatt ctactattgc tatctattgc ggtactaatt	1380
	gcgctatctt gtatatgtag aagaaagaat tatggacaac tagatatattt cccagcgaga	1440
	gatacttate atccaatgtc tgaatatcca acatatcata cacatggaag atatgtacca	1500
[0026]	ccttcttcaa cagatagatc tccatatgag aaggtatctg cgggaaatgg tggttcttct	1560
	ctatcttata caaatccagc ggtagcggcg acttctgcga atctataa	1608

<210> 19
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 19

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
 20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
 35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
 50 55 60

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu

	65				70					75					80	
	Ala	Pro	Ala	Thr	Glu	Pro	Ala	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Thr	Trp	Gly	Gln
					85					90					95	
	Asp	Val	Thr	Ser	Val	Pro	Val	Thr	Arg	Pro	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Thr
				100					105					110		
	Pro	Pro	Ala	His	Asp	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Asn	Lys	Pro	Ala	Pro
			115					120					125			
	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr
		130					135					140				
	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser
	145					150					155					160
	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His
					165					170					175	
[0027]	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala
				180					185					190		
	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro
			195					200					205			
	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Asn
		210					215					220				
	Arg	Pro	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Val	His	Asn	Val	Thr	Ser
	225					230					235					240
	Ala	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Thr	Leu	Val	His	Asn	Gly
					245					250					255	
	Thr	Ser	Ala	Arg	Ala	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Ser	Lys	Ser	Thr	Pro	Phe
				260					265					270		
	Ser	Ile	Pro	Ser	His	His	Ser	Asp	Thr	Pro	Thr	Thr	Leu	Ala	Ser	His
			275					280					285			
	Ser	Thr	Lys	Thr	Asp	Ala	Ser	Ser	Thr	His	His	Ser	Thr	Val	Pro	Pro

	290		295		300											
	Leu 305	Thr	Ser	Ser	Asn	His 310	Ser	Thr	Ser	Pro	Gln 315	Leu	Ser	Thr	Gly	Val 320
	Ser	Phe	Phe	Phe	Leu 325	Ser	Phe	His	Ile	Ser 330	Asn	Leu	Gln	Phe	Asn 335	Ser
	Ser	Leu	Glu	Asp 340	Pro	Ser	Thr	Asp	Tyr 345	Tyr	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg	Asp
	Ile	Ser	Glu 355	Met	Phe	Leu	Gln	Ile 360	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gly 365	Phe	Leu	Gly
	Leu	Ser 370	Asn	Ile	Lys	Phe	Arg 375	Pro	Gly	Ser	Val	Val 380	Val	Gln	Leu	Thr
	Leu 385	Ala	Phe	Arg	Glu	Gly 390	Thr	Ile	Asn	Val	His 395	Asp	Val	Glu	Thr	Gln 400
[0028]	Phe	Asn	Gln	Tyr	Lys 405	Thr	Glu	Ala	Ala	Ser 410	Arg	Tyr	Asn	Leu	Thr 415	Ile
	Ser	Asp	Val	Ser 420	Val	Ser	Asp	Val	Pro 425	Phe	Pro	Phe	Ser	Ala 430	Gln	Ser
	Gly	Ala	Gly 435	Val	Trp	Trp	Thr	Ser 440	Asp	Trp	Gly	Val	Leu 445	Thr	Asn	Leu
	Gly	Ile 450	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser 455	Ile	Ala	Val	Leu	Ile 460	Ala	Leu	Ser	Cys
	Ile 465	Cys	Arg	Arg	Lys	Asn 470	Tyr	Gly	Gln	Leu	Asp 475	Ile	Phe	Pro	Ala	Arg 480
	Asp	Thr	Tyr	His	Pro 485	Met	Ser	Glu	Tyr	Pro 490	Thr	Tyr	His	Thr	His 495	Gly
	Arg	Tyr	Val	Pro 500	Pro	Ser	Ser	Thr	Asp 505	Arg	Ser	Pro	Tyr	Glu 510	Lys	Val
	Ser	Ala	Gly	Asn	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Tyr	Thr	Asn	Pro	Ala	Val

	515	520	525	
	Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu 530	535		
	<210> 20			
	<211> 60			
	<212> DNA			
	<213> 智人			
	<400> 20			
	gctcatggtg ttacttcagc gcctgataca agacctgcac ctggatctac agctcctcct			60
	<210> 21			
	<211> 20			
	<212> PRT			
	<213> 智人			
	<400> 21			
	Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser 1 5 10 15			
[0029]	Thr Ala Pro Pro 20			
	<210> 22			
	<211> 60			
	<212> DNA			
	<213> 智人			
	<400> 22			
	gcacatggtg taacatctgc tccagataca agaccagctc caggttcaac agcacctcca			60
	<210> 23			
	<211> 60			
	<212> DNA			
	<213> 智人			
	<400> 23			
	gcgcatggtg ttactagtgc tccagataca agacctgcgc ctggaagtac tgcaccacca			60
	<210> 24			
	<211> 60			
	<212> DNA			
	<213> 智人			
	<400> 24			
	gcacatggtg taactagtgc gcctgataca agaccagcgc caggatcaac tgctcctcct			60

<210>	25		
<211>	60		
<212>	DNA		
<213>	智人		
<400>	25		
	gctcatgggtg ttacttcagc gcctgataca agacccgcac ccggatctac cgctccgcct	60	
<210>	26		
<211>	60		
<212>	DNA		
<213>	智人		
<400>	26		
	gcacacggcg tcacatctgc tcccgacact cgtccagctc ctggtagcac agcacctcca	60	
<210>	27		
<211>	60		
<212>	DNA		
<213>	智人		
<400>	27		
	gcgcatggag taaccagtgc accagatacc cgacctgcgc cgggcagtac tgccccaccg	60	
[0030]			
<210>	28		
<211>	60		
<212>	DNA		
<213>	智人		
<400>	28		
	gcccacgggg tgacgagcgc cccggacacg cgcccagctc cagggtcaac ggcgccccct	60	
<210>	29		
<211>	1633		
<212>	DNA		
<213>	智人		
<400>	29		
	gcgctcccgg gatgacacct ggaacacaat ctccattctt cctactacta ctattgacag	60	
	tactaacagt agtaacagga tctggacatg cgtctagtac accaggtgga gagaaggaaa	120	
	catctgcgac tcaaagatct tctgtaccat cttctacaga gaagaatgcg gtatctatga	180	
	catctagtgt actatcttct cattctcctg gatctggatc ttctactaca caaggacaag	240	
	atgtaacact agcgccagct acagaaccag cttctggatc tgctgctact tggggtcaag	300	
	atgttacttc tgttccagta acaagaccag cgctaggatc tacaacacca ccagcgcgtg	360	

	atgtaacaag tgcgccagat aataagccag cgcctgggtc tactgctcca ccagctcatg	420
	gtgttacttc agcgctgat acaagacctg cacctggatc tacagctcct cctgcacatg	480
	gtgtaacatc tgctccagat acaagaccag ctccaggttc aacagcacct ccagcgcacg	540
	gtgttactag tgctccagat acaagacctg cgcctggaag tactgcacca ccagcacatg	600
	gtgtaactag tgcgcctgat acaagaccag cgccaggatc aactgctcct cctgctcatg	660
	gtgttacaag tgcacctgat aatagacctg cgttgggacg tactgcgcct ccagttcata	720
	atgtaacatc agcgtctgga agtgcgtctg gttctgcgtc tacattgggt cataatggta	780
	catctgcgag agcgacaaca actccagcgt ctaagtctac accattctct attccatctc	840
	atcattctga tacaccaaca acattggcga gtcattctac aaagacagat gcgagttcta	900
	cacatcattc tactgtacca ccactaacat cttctaata tagtacatct ccacaactat	960
	ctactggtgt atctttcttc ttctatcct ttcatatttc taatctacag ttcaattcta	1020
	gtttggaaga tccatctaca gattattatc aagaactaca aagagatatt tctgaaatgt	1080
	ttctacaaat atataaaca ggaggatttc taggactatc taatattaag tttagaccag	1140
[0031]	gatctgtagt agttcaacta actctagcgt ttagagaagg tactattaat gtacatgatg	1200
	ttgaaacaca gtttaataca tataagacag aagcggcgtc tagatataat ctaacaattt	1260
	ctgatgtatc tgtatctgat gttccatttc cattctctgc gcaatctggt gctggtgtat	1320
	ggtggacatc tgattgggga gtactaacta atctaggaat tctactattg ctatctattg	1380
	cgggtactaat tgcgctatct tgtatatgta gaagaaagaa ttatggacaa ctagatattt	1440
	tcccagcgag agatacttat catccaatgt ctgaatatcc aacatatcat acacatggaa	1500
	gatatgtacc accttcttca acagatagat ctccatatga gaaggatatc gcgggaaatg	1560
	gtggttcttc tctatcttat acaaatccag cggtagcggc gacttctgcg aatctataat	1620
	aagtcgacgc gct	1633

<210> 30
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 30

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
50 55 60

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65 70 75 80

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
85 90 95

Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
100 105 110

Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115 120 125

[0032]

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
130 135 140

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
145 150 155 160

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
165 170 175

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
180 185 190

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
195 200 205

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn
210 215 220

Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser
225 230 235 240

Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly
245 250 255

Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe
260 265 270

Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His
275 280 285

Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Thr Val Pro Pro
290 295 300

Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val
305 310 315 320

Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser
325 330 335

Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp
340 345 350

[0033]

Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly
355 360 365

Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr
370 375 380

Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln
385 390 395 400

Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile
405 410 415

Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser
420 425 430

Gly Ala Gly Val Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu
435 440 445

Gly Ile Leu Leu Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys
450 455 460

Ile Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg
465 470 475 480

Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly
485 490 495

Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val
500 505 510

Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val
515 520 525

Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
530 535

<210> 31
<211> 29
<212> DNA
<213> 智人

<400> 31
tatgaatgta gaagcaggag attccagag

29

[0034]

<210> 32
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

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

Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys
20 25

<210> 33
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

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

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

	20	25	
	<210> 34		
	<211> 29		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 34		
	acacatagtt cctccattga agacttagc		29
	<210> 35		
	<211> 29		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 35		
	taggattggc catggaaata gaatgcacc		29
[0035]	<210> 36		
	<211> 29		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 36		
	aaggagactt ggaccaaaca ctgtgacaa		29
	<210> 37		
	<211> 29		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 37		
	gcagtttgcc tgaaatatgc tggagtatt		29
	<210> 38		
	<211> 29		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 38		
	cttacctcca aatggttctg acaatgact		29

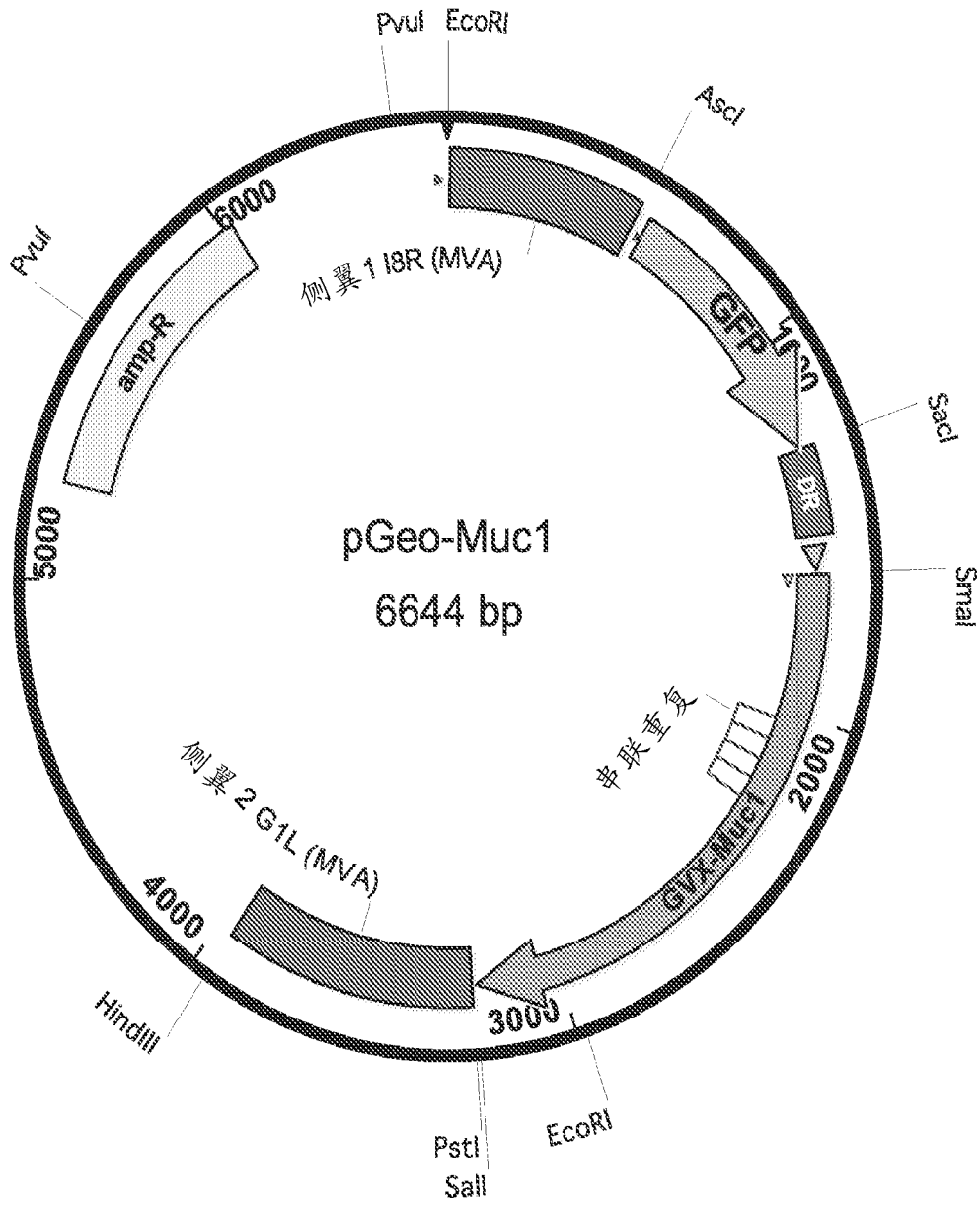


图 1

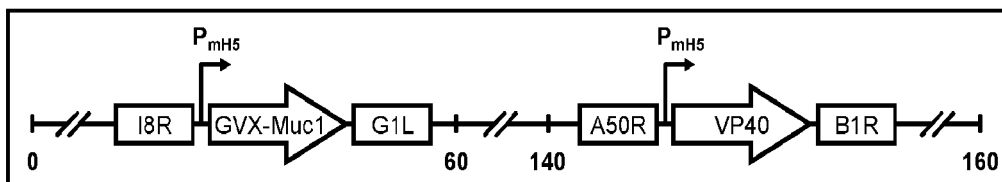


图 2

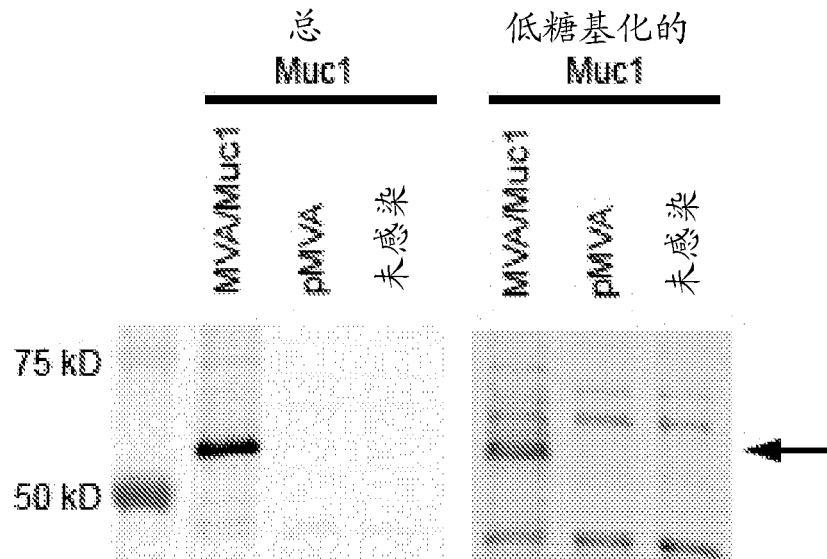


图 3

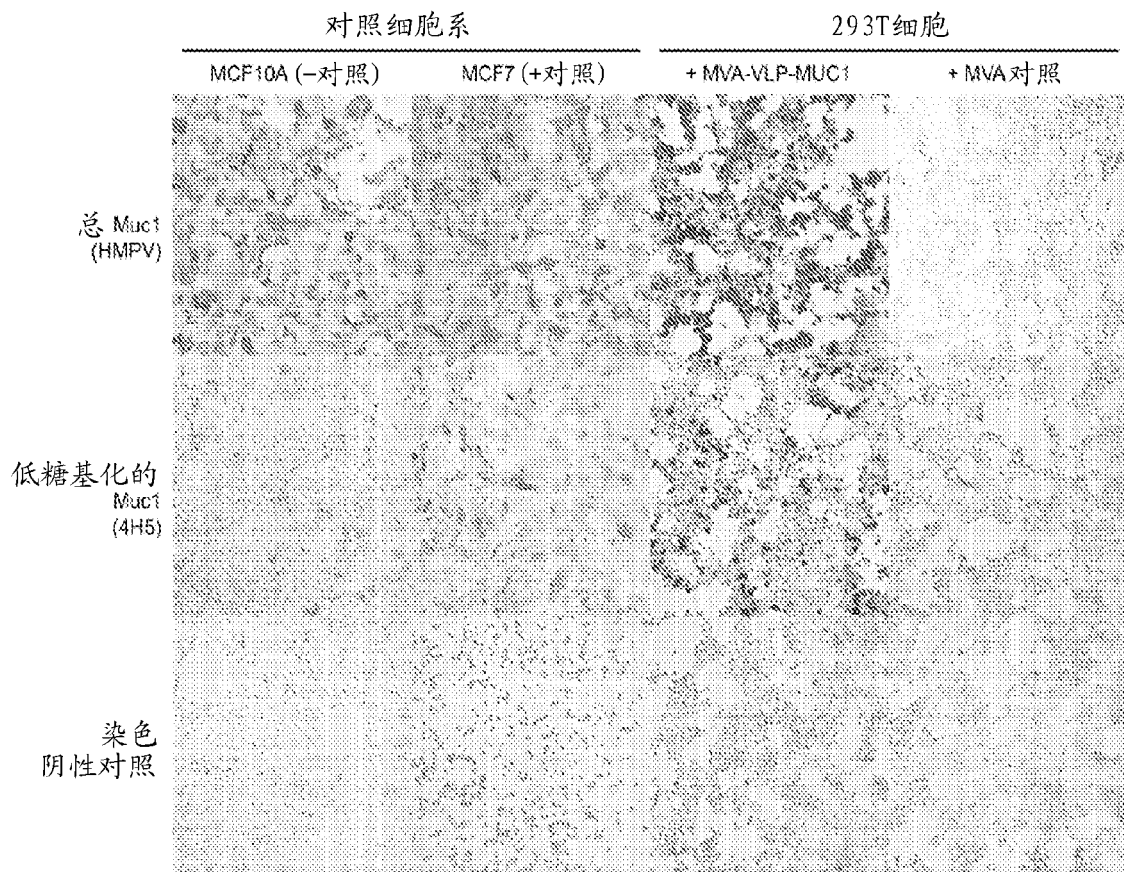


图 4

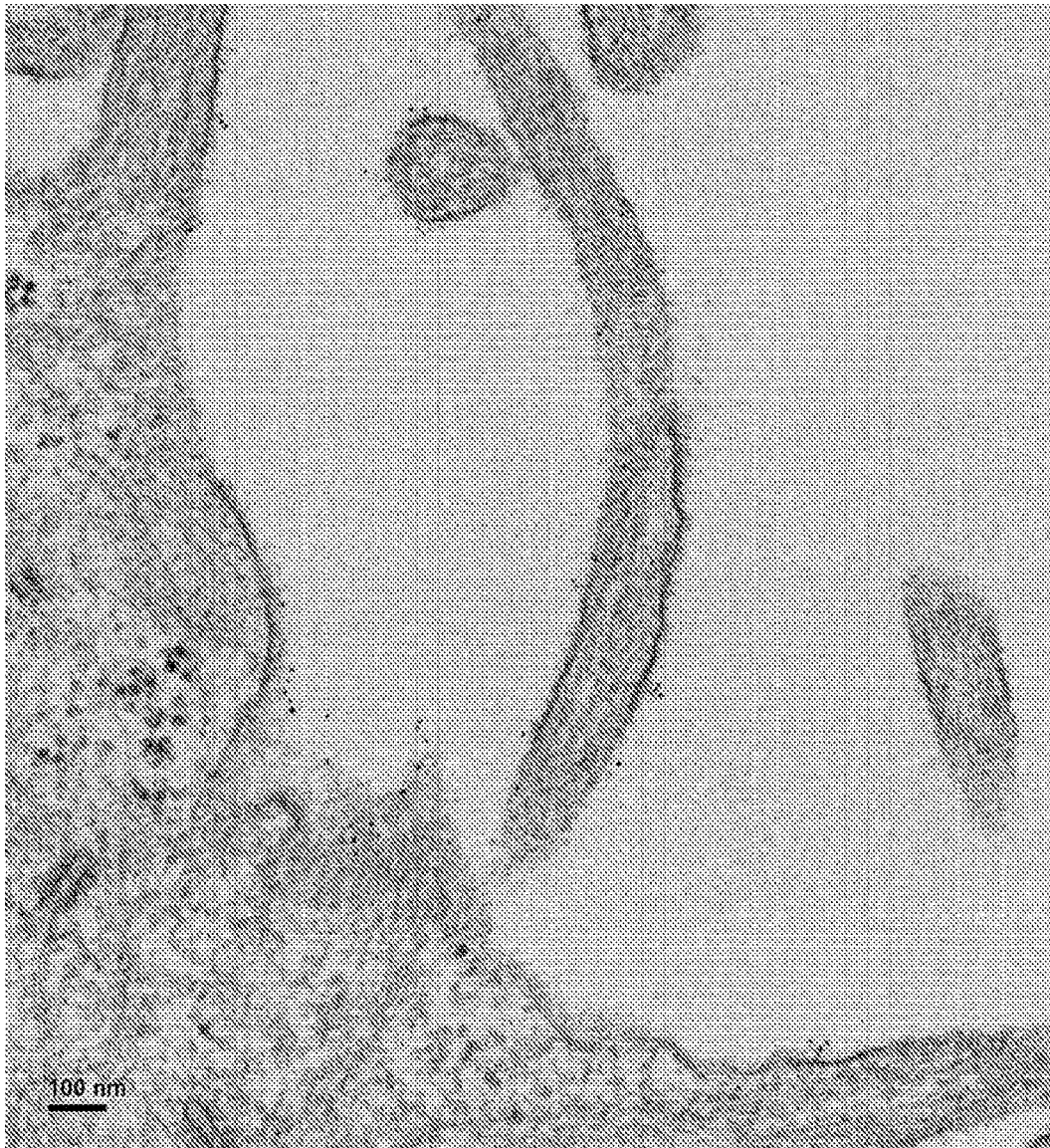


图 5

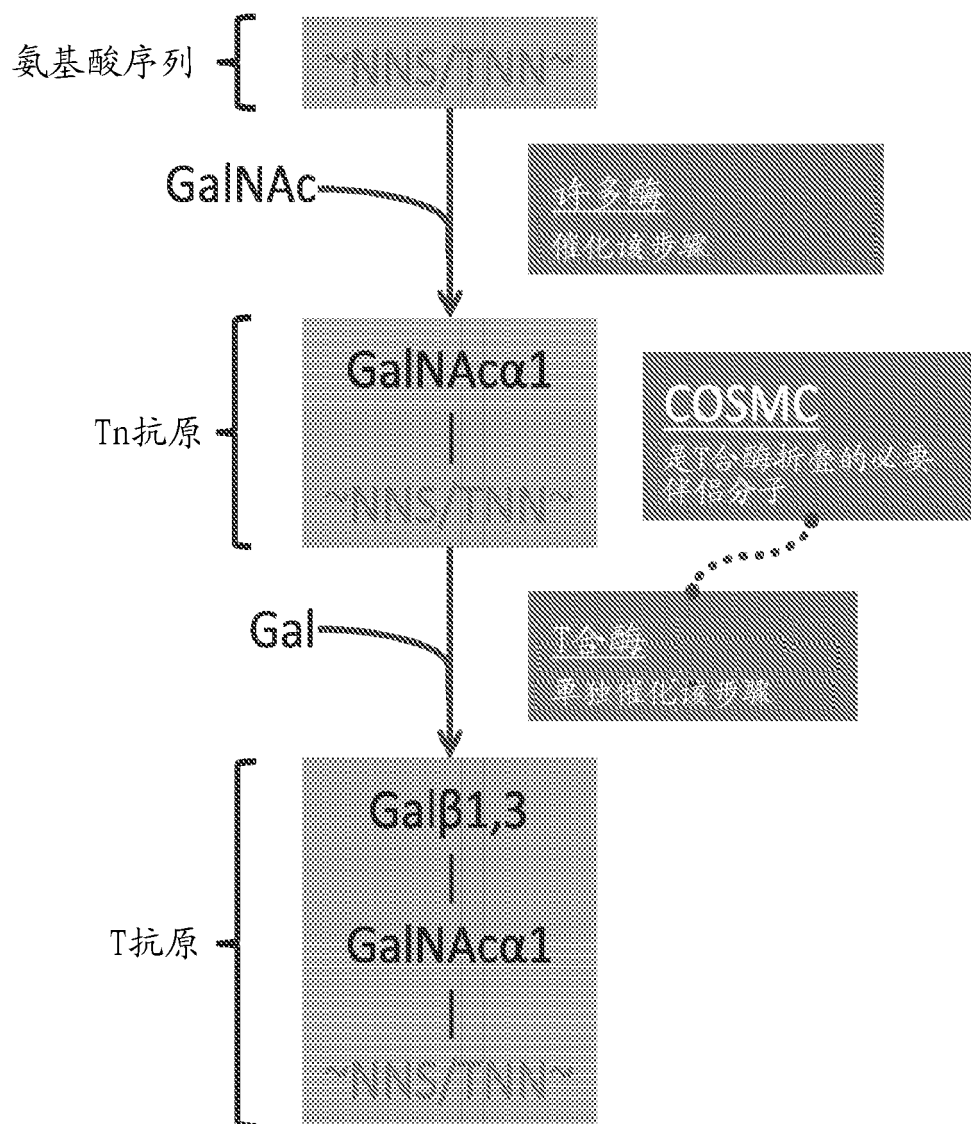


图 6

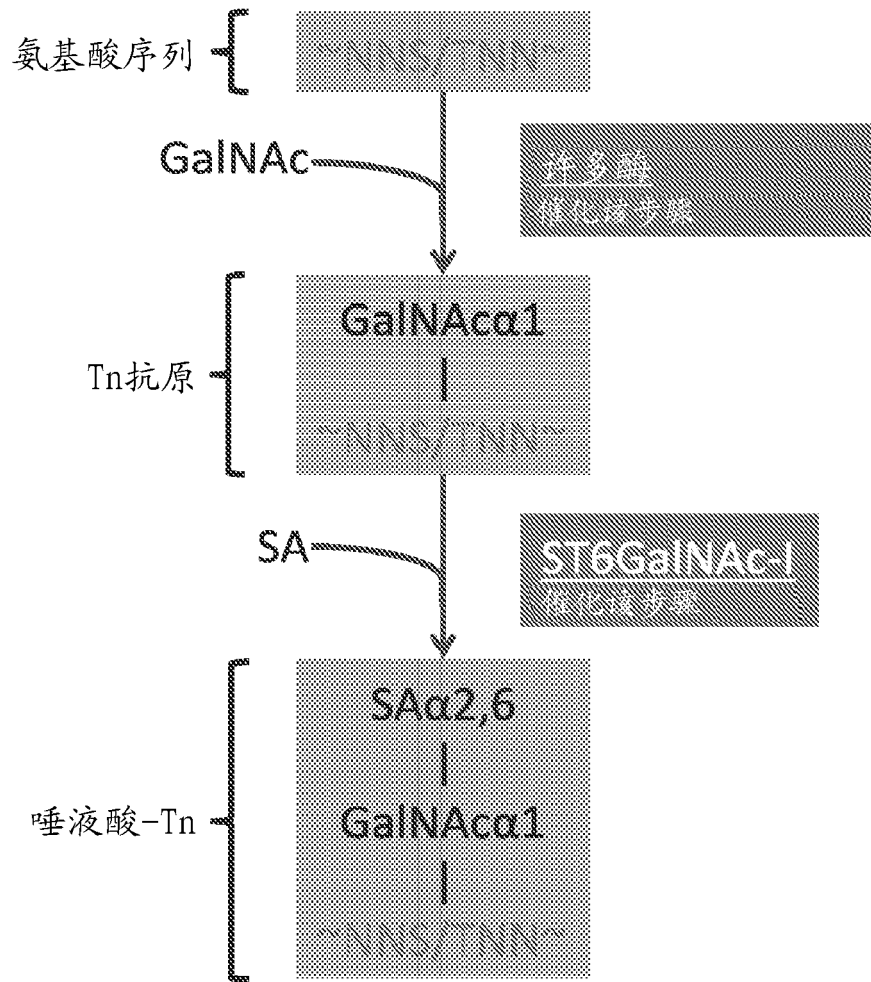


图 7