

發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

A61K 39/385

(2006.01)

A61P 35/00

(2006.01)

※申請案號：96142857

※申請日期：96年11月13日

※IPC分類：

一、發明名稱：

(中) 作為編碼抗原和蛋白質毒素之核苷酸序列的載體之微生物、製造彼之方法及彼之用途

(英) Microorganisms as carriers of nucleotide sequences coding for antigens and protein toxins, process of manufacturing and uses thereof

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓 名：(中) 艾特納辛塔瑞斯有限公司

(英) AETERNA ZENTARIS GMBH

代表人：(中) 1.岡特 諾沃德 2.琳達 米貝克

(英) 1.NAUWALD, GUNTER 2.MISSBACH, LINDA

地 址：(中) 德國法蘭克福威思幕勒街五十號

(英) Weismuellerstrasse 50, 60314 Frankfurt, Germany

國籍：(中英) 德國 GERMANY

三、發明人：(共 4 人)

1. 姓 名：(中) 艾微洛 尖奇夫

(英) GENTSHEV, IVAYLO

國 籍：(中) 德國

(英) GERMANY

2. 姓 名：(中) 喬琴 芬斯特爾

(英) FENSTERLE, JOACHIM

國 籍：(中) 德國

(英) GERMANY

3. 姓 名：(中) 伍爾夫 瑞普

(英) RAPP, ULF R.

國 籍：(中) 德國

(英) GERMANY

4.姓 名：(中) 華納 高貝爾
(英) GOEBEL, WERNER
國 籍：(中) 德國
(英) GERMANY

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 歐洲 ; 2006/11/13 ; 06123974.5 ☒ 有主張優先權
2. 美國 ; 2006/11/13 ; 60/865,484 ☒ 有主張優先權
3. 美國 ; 2007/05/21 ; 60/939,140 ☒ 有主張優先權

4.姓 名：(中) 華納 高貝爾
(英) GOEBEL, WERNER
國 籍：(中) 德國
(英) GERMANY

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 歐洲 ; 2006/11/13 ; 06123974.5 ☒ 有主張優先權
2. 美國 ; 2006/11/13 ; 60/865,484 ☒ 有主張優先權
3. 美國 ; 2007/05/21 ; 60/939,140 ☒ 有主張優先權

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明關於作為編碼抗原和蛋白質毒素之異源核苷酸序列的載體之微生物，製造彼之方法以及對應之質體或表現載體。這些微生物可作為藥物，尤其是作為用於治療不同腫瘤之腫瘤疫苗。

【先前技術】

癌症之免疫療法代表一種腫瘤治療法的可能選項。利用不同方法之多樣臨床試驗係集中於其在患者體內之效力。原則上，被動及主動免疫療法間係有所區別。

主動免疫療法係針對誘導與疫苗相關之腫瘤特異性免疫反應。後者目前在臨床上係利用數種不同之方法探查。例如：有類稱為全細胞疫苗者，其原料為直接自患者取得（自體）或自適當之細胞株衍生（異源）之腫瘤細胞。然後，通常係將這些細胞去活化，差異處理後再重新施予於患者身上。

相反地，抗原特異性疫苗含有一（或更多）腫瘤特異性抗原、部分該抗原或編碼該特異性抗原之 DNA 以及抗獨特型疫苗。通常，這些疫苗並非單獨隔離而係與適當之載體一起注射。因此，一方面係使用不同之典型佐劑，但亦可與生物免疫刺激劑（諸如細胞活素）組合。

為了進行免疫刺激可應用含有與免疫刺激劑（諸如破傷風毒素）聯結之抗原的方法。再者，有些嘗試係將抗原

與樹突細胞一起組合施予。最後，有些嘗試係使用具有病毒或細菌載體之重組活疫苗。

很長一段時間係使用由作為佐劑之細菌毒素（諸如破傷風毒素、志賀毒素、致死毒素或霍亂毒素）與抗原所組成之融合蛋白質來作為疫苗，尤其是可用來對抗感染者（Freytag 及 Clements，1999）。另外，亦可使用天然毒素（其通常與標靶細胞特異性分子（諸如腫瘤細胞之細胞表面分子）融合）以破壞標靶細胞。

在此方面，具天然毒素之融合蛋白質（其通常包含酶性單位及蛋白質-結合結構區）在作為佐劑時可發展其理想之作用（Freytag 及 Clements，1999）。藉由這些疫苗可取得令人滿意之免疫反應，即使是在黏膜（尤其是口腔）免疫後亦是。使用這些融合蛋白質之麻煩為天然毒素具高度毒性，因此無法在人體中設立（Holmgren，等人，2005）。

因此，一連串之研究全部係關於將毒素去毒性並同時保存佐劑之效果。然而，由於在大部分情況中，佐劑之效果與造成毒性效果之酶促活性相一致（Lycke，等人，1992），去毒性無法直接執行，即使某些毒素顯示出未損失其酶促、佐劑活性（Hormozi，等人，1999；Lycke，等人，1992）。

在霍亂毒素（CT）之案例中有數種去毒性之嘗試（Agren et al., 1999；Byun et al., 2001；Eriksson et al., 2004；Kweon et al., 2002；Sanchez et al., 2002），然而

，霍亂毒素作為黏膜佐劑很普遍（Freytag 及 Clements）。因此，總結上述，可有效誘導抗體反應（主要為黏膜 IgA），使抗體反應中與毒素相關之受第 II 類 MHC 限制的 T 細胞支援增加為該用於疫苗（其由蛋白質-抗原及經融合或共同投服之毒素所組成）之黏膜佐劑的主要先決條件（Freytag 及 Clements）。

在霍亂毒素（尤其是其 B-次單位（CtxB））方面係以作為佐劑之形式進行測試，因其負責結合 GM-1 受體且當單獨分離時並不顯示毒性效果（Holmgren，等人）。具 CtxB 之蛋白質融合物的特徵為主要誘導 Th2 免疫反應。這些為 T 細胞反應，其主要由細胞活素（諸如 IL-4 或 IL-6）決定其特徵，且其主要誘出抗體，但其幾乎不或最多有限地起始一細胞免疫反應，尤其是細胞毒性 T 細胞反應（CTL）（Holmgren，等人）。

另外，CtxB 作為黏膜佐劑可引起蛋白質-抗原系統性耐受性。系統性耐受性一詞係描述抗原特異性淋巴球（尤其是 T 細胞或 B 細胞）之竭盡或去活化。因此，此種方法不能用來誘導系統性免疫反應（Holmgren，等人）。

相對於黏膜施予，腹膜內或皮下施予毒素-抗原融合蛋白質可引起系統性以及低細胞毒性反應。確實，此已用於模型系統中之腫瘤疫苗接種（參考，如（Becerra，等人，2003））。然而，這類反應亦可以純化之抗原本身取得且主要係取決於所使用之佐劑。除了在模型中所測得之 CTL 反應非常弱外，甚至並無證據顯示該保護作用係倚賴

這些效果。再者，該抗原並不經由口服施予而僅能經由直接注射（s.c.、i.d.、i.m.、i.p.）抗原來施予。

融合至去毒性之毒素的抗原蛋白質若以口服腫瘤疫苗之形式施予時通常為無效。主要的原因為（若有）其僅能誘導出低水準之系統性免疫反應或者，在 CtxB 之情況中，甚至誘導出系統性耐受性及誘導出黏膜限制之抗體及 Th2 型免疫反應。

例如：McSorley，等人證明以 CtxB-抗原融合蛋白質（對腫瘤疫苗而言，其代表引起系統性反應之較佳方式）進行鼻部免疫化時宜容耐 Th1 細胞並將其去活化，然而，Th2 細胞則不受影響（McSorley，等人 1998）。Th2 反應之特徵在於主要為製造 IL-4 或 IL-6 之 T-輔助者細胞。尤其是，這些細胞活素負責啟動 B 細胞製造抗體，這些抗體可在大部分之習知疫苗中提供保護作用。相反的，Th1 T 細胞大部分分泌 IL-2 及 IFN- γ 這類細胞活素而藉此參與細胞性免疫反應。根據免疫策略之目的來啟動以抗體為主之 Th2 免疫反應（稱為 Th2 偏移）或以細胞為主之 Th1 反應（稱為 Th1 偏移）非常地重要。

相對地，系統性誘導具有製造 IFN- γ 之 T 輔助細胞的 Th1 為主之細胞性免疫反應及誘導細胞毒性 T 細胞（CTL）對腫瘤免疫療法而言是必要的。

習知技藝顯示出毒素可作為佐劑。尤其是，霍亂毒素（CT）顯示強烈之佐劑效果。然而，此作用在毒素被去毒性時很快地明顯減弱。在其次單位 CtxB 方面，口服施予

甚至可誘導系統性耐受性。此問題可經由鼻部施予來部分避免。然而，若應用鼻部投服則出現其他問題，尤其是，諸如：關於 GM-1 受體在腦中之表現的與 CtxB 次單位相關的問題（van Ginkel，等人，2000），這些問題反應在特別嚴重之副作用的風險將增加（Mutsch，等人，2004）。

爲了克服這些問題，可製造共同表現毒素及（異源）抗原的重組活疫苗。此選擇在感染疫苗（即，針對特殊病原，如：結核病病原，且意圖誘導對抗該病原之免疫力的疫苗）方面已在努力。

在發展這類感染疫苗之過程中曾利用數種重組細菌株來產生爲存活或去活化疫苗形式之經口投服的與適當（異源）抗原融合之重組毒素。在大部分情況中，產生之菌株僅表現重組毒素。因此，這些方法主要僅針對毒素本身（誘導抗體反應）及，必然地，表現毒素之菌株（病原）產生免疫性。這類疫苗並不適合作爲腫瘤療法中可能使用之腫瘤疫苗，因而，不令人意外地，相關試驗中並未提及任何這類可能之應用（Reveneau et al., 2002）（Vertiev et al., 2001）（Freytag and Clements, 1999；Jackson et al., 1996）。

關於這類感染疫苗，在誘導抗體反應之過程中，毒素並不作爲佐劑而是誘導較佔上風之黏膜抗體免疫反應。這些感染疫苗試驗不包括或僅有非常微弱之系統性免疫反應。相對於腫瘤疫苗，這類疫苗並不尋求誘導細胞性免疫反

應，尤其是細胞毒性 T 細胞。正常情況下，表現毒素之細菌病原顯示胞外存活形態，因此，並不會造成 CTL 活化，即：由這類感染疫苗提供之保護作用為 CTL 獨立性。

下列細菌菌株已用於上述之感染疫苗試驗中：重組之乳桿菌（Reveneau et al., 2002）、李斯特氏菌（Vertiev et al., 2001）、炭疽桿菌（Mendelson et al., 2005；Mesnage et al., 1999）、志賀氏菌（Anderson et al., 2000；Tzschaschel et al., 1996b）、大腸桿菌（Walker et al., 1992）、弧菌（Butterton et al., 1995；Chen et al., 1998；Thungapathra et al., 1999）及沙門氏菌（Jackson et al., 1996）。

另外，亦嘗試藉由表面遞呈來增強黏膜免疫反應（Konieczny et al., 2000）或以異源抗原（沙門氏菌、志賀氏菌：（Garmory et al., 2003；Orr et al., 1999；Su et al., 1991；Tzschaschel et al., 1996a；Tzschaschel et al., 1996b）、耶爾森氏菌：（Sory and Cornelis, 1990）、弧菌（Ryan et al., 1997a）、大腸桿菌：（Zhu et al., 2006））之形式分泌毒素。然而，在這些額外案例中，毒素本身代表該免疫反應所針對之抗原。

因此，需注意：毒素並非作為佐劑，所描述之研究亦不企圖將毒素與另外之分別（異源）抗原一起以融合蛋白質之形式表現。再者，具 CT 或 CtxB 之融合蛋白質並非以這些系統產生且亦不建議如此。

因此，上述文件中所提及之融合蛋白質為肽分泌訊號

（諸如 HlyA）與毒素蛋白質之融合蛋白質，而非由毒素與（異源）抗原所組成之融合蛋白質。

這些研究之主要目的僅為取得理想之黏膜免疫反應（Tzschaschel et al., 1996a）。誘導系統性免疫反應並非尋求之目標。若最後進行測量，則由於這類模型中之保護作用僅由抗體傳介（比較，如：[31]），因此，系統性免疫反應之分析僅限於抗體（尤其是系統性 IgA）。這些研究對於系統性細胞性免疫反應（尤其是細胞毒性 T 細胞反應）之誘導作用並無描述。與分泌訊號融合原係分別用來增加毒素之溶解度及增強其穩定性，因為強烈、單純之胞質性表現通常會產生不溶性聚集物（Gentschev et al., 2002a）。

於此觀點，某些作者觀察到具分泌訊號之融合蛋白質可造成快速之胞質性降解（Tzschaschel et al., 1996a），然而，其他人則觀察到安定作用（Orr et al., 1999）。因此，習知技藝在此處是有些矛盾的。目前為止，先前以分泌之毒素（毒素+分泌訊號）進行的實驗係針對增加穩定性，而此點顯然並未在所有案例中達到。

當然，其中一種理由在於表現強度及質體穩定性不同。Tzschaschel，等人描述所使用之質體系統非常不穩定，且無選擇的，僅可在一些細菌中找列。該作者經由迷你轉位子（transposon）利用染色體整合來作為可能之解決方法（Tzschaschel et al., 1996a；Tzschaschel et al., 1996b）。

然而，這類系統擁有數種不利之處。一方面，整合點並未限定，此可導致宿主株有令人不滿意的表型轉變（如：增加/減少鄰接基因之表現）。另一方面，使用單一基因組複本的預期表現水準低，此對致免疫力具負面效果。畢竟，染色體轉位子整合相當不穩定，因其造成重複成分處之經常性的自發性切除。

如上述，習知技藝在分泌之異源毒素的穩定性方面有些矛盾。

Garmory，等人甚至假設分泌異源抗原在致免疫性方面並無任何特殊益處（Garmony，等人，2002；Roland，等人，2005）。在其他案例中，靜脈內投服後確實觀察到對分泌之毒素的系統性抗體反應增加，但口服施予後則不。完全相反地，口服施予甚至間接地產生問題（Roland，等人，2005）。

最終，以製造破傷風毒素之革蘭氏陽性菌株（植物乳桿菌）進行之研究顯示出與分泌毒素之菌株（毒素之呈現方式為結合在細菌之細胞膜或包含在細胞質內）相較下，其在誘導系統性抗體反應上並無顯著差異（Reveneau，等人，2002）。

先前研究中並未研究亦未描述系統性細胞性免疫反應（尤其是細胞毒性 T 細胞）及所產生之保護作用。

因此，若分泌作為佐劑之毒素代表一種優點，則上述以毒素為基礎之感染疫苗的習知技藝便不能表示對誘導系統性（細胞性）免疫反應的顧慮。完全相反地，更確切地

說，上述研究偏重於指出穩定性之問題並提出分泌之異源毒素之遺漏的優點。習知技藝中完全未描述或提出由分泌訊號、毒素及異源抗原所組成之融合蛋白質。

在上述章節中提出描述細菌載體之習知技藝，該細菌載體異源地表現毒素且可作為感染疫苗。在其列舉之實例中主要係進行關於毒素之表現或穩定性以及其溶解度之改良，例如：插入強表現啟動因子或將毒素與分泌訊號融合。

其他作者亦研究活疫苗中之毒素與異源抗原的融合物。在這些案例中，毒素大部分係作為佐劑。在某些案例中（如（Brossier，等人，2000）），異源抗原係作為佐劑而毒素係作為適當之抗原。

然而，需注意：在所提及之案例中，毒素-抗原基因融合構造物僅表現於細胞質或周質中。毒素-抗原構造物既不融合至額外之分泌訊號（此可使其完全分泌）亦不直接分泌。

在這些構成毒素-抗原基因融合構造物之過程中係使用重組之大腸桿菌（Clemens et al., 2004）、炭疽桿菌（Brossier et al., 2000）、志賀氏菌（Koprowski et al., 2000；Ranallo et al., 2005；Zheng et al., 2005）及弧菌（Silva et al., 2003）。在沙門氏菌（摘要於（Garmory et al., 2002））方面，亦有CT變種與抗原（Hajishengallis et al., 1996；Huang et al., 2000）或其他毒素與抗原（Barry et al., 1996；Cardenas and Clements, 1993；

Chabalgoity et al., 1997 ; Chabalgoity et al., 1996 ; Chabalgoity et al., 2000 ; Chabalgoity et al., 1995 ; Chacon et al., 1996 ; Jagusztyn-Krynicka et al., 1993 ; Khan et al., 1994a ; Khan et al., 1994b ; Lee et al., 2000 ; Pogonka et al., 2003 ; Schodel et al., 1990 ; Smerdou et al., 1996 ; Ward et al., 1999 ; Wu et al., 2000) 之融合物的描述。

在大部分之這些案例中，主要之焦點係在誘導黏膜（抗體）免疫反應而在誘導系統性免疫反應方面僅選擇皮下施予而不選擇口服施予[36]。

一些以沙門氏菌作為援助菌株之工作僅限於用來決定菌株之特徵（Gomez-Duarte et al., 1995 ; Jagusztyn-Krynicka et al., 1993），其他僅分析黏膜及/或系統性抗體反應及/或保護作用（Barry et al., 1996 ; Cardenas and Clements, 1993 ; Dunstan et al., 2003 ; Hajishengallis et al., 1996 ; Harokopakis et al., 1997 ; Khan et al., 1994a ; Khan et al., 1994b ; Pogonka et al., 2003 ; Smerdou et al., 1996 ; Somner et al., 1999）。在所有這些其中僅偶然使用抗原與破傷風毒素之融合物且只作為感染疫苗之案例中並無系統性細胞性免疫反應，尤其是細胞毒性 T 細胞反應之研究。

因此，從免疫學觀點來看，從那些研究中無法取得關於作為腫瘤疫苗之可能用途的結論，因其焦點係設定在由抗體傳介之作為感染疫苗的效果。

包含對研究過之免疫反應的同型 (isotype) 分析的研究調查顯示出更具相關性。事實上，在這些案例中並不直接測量細胞性免疫反應，僅有抗體反應之同型變化形廓提供免疫反應之 Th1/Th2 偏移的結論。如 IgG1 之抗體同型與 Th2 反應有關而如 IgG2a 之抗體同型則與 Th1 反應有關。如已提及者，Th1 反應為以細胞為主之免疫反應，而 Th2 反應主要係代表由體液抗體驅動之反應。再者，那些研究並未描述腫瘤疫苗亦未提出任何作為抗腫瘤劑之用途。

一種以作為載體之沙門氏菌（其表現破傷風毒素-抗原融合蛋白質）為基礎之感染疫苗研究已在狗體內進行。在狗體內誘導之低抗體反應在抗體變化形廓方面顯示出 Th1 偏移，因此，其為與細胞型免疫反應較有關之反應（Chabalgoity et al., 2000）。無可否認地，狗之免疫學的研究很少，因此，狗之抗體的變化形廓可以提供之關於 Th1 偏移的資訊有多少並不清楚。

然而，由相同團體利用可相比擬之構造物在小鼠中進行之研究顯示出 IgG1 及 IgG2a 具相同水準之抗體變化形廓，此暗示一種混合之 Th1/Th2 反應。

有趣的是，現存之抗破傷風毒素的免疫力（由於先前進行之免疫處理，其可在大部分人類中找到）可另外強烈地誘導出 IgG1，而 IgG2a 則很難誘導出。此清楚地指出明確的 Th2 偏移（Chabalgoity et al., 1995）。因此，人類使用以破傷風毒素為基礎之活疫苗作為腫瘤疫苗時頗具傷

害性。因可預期的是，在大部分這些顯示破傷風毒素特異性反應的患者中可誘導出強烈之以 Th2 抗體為主的反應。

僅很少數之研究亦分析細胞性免疫反應且對具有及不具有毒素融合物之基因構造物進行比較。例如：在一種案例中係在沙門氏菌中比較具有及不具有破傷風毒素之抗原融合物（Lee，等人）。其中，破傷風毒素抗原融合構造物主要係增加總體抗體水準，然而，Th1/Th2 變化形廓幾乎沒有改變。即使是該抗原特異性 CD4⁺ T 細胞在典型 Th1 細胞活素（諸如：分別為 IFN- γ 及 IL-2）的分泌情形亦僅顯示些微之分岐性。由相同團體稍早進行之研究亦測量細胞性 IFN- γ 之水準。然而，並未與不具破傷風毒素之構造物（Chabalgoity，等人）進行比較。其他以不同之革蘭氏陰性細菌載體（如，志賀氏菌）（Koprowski et al., ; Ranallo et al., ; Zheng et al.）或弧菌（Campos et al., ; Ryan et al.）進行之研究亦未分別分析同型及細胞性免疫反應。

總之，可確定的是，所提出之研究清楚聚焦在誘導由抗體驅動之體液免疫反應。確實，其使用基因毒素抗原構造物，但這些構造物並不帶有分泌訊號且亦不被直接分泌。然而，絕無系統性細胞免疫反應之分析，尤其是細胞毒性 T 細胞反應。再者，這類細胞性細胞毒性 T 細胞反應無法自體液抗體反應推定且若抗體反應係由 Th1/Th2 組成，則無法偵測。

不過，這些細胞性細胞毒性 T 細胞免疫反應對腫瘤疫

苗接種療法確實非常重要。

因此，就僅限於黏膜感染疫苗之毒素-抗原融合物而言，發展中之技藝的現況並不允許任何關於任何這類構造物於作為腫瘤疫苗上的可能用途的聲明。

如上述，基因融合構造物表現時可不需分泌系統之協助。毒素及毒素抗原構造物通常分別位於細胞質及周質（即，介於二種膜之間）。為了誘導有效之細胞性免疫反應，毒素必須可讓抗原-遞呈細胞（APC）自由接近。通常，天然毒素係在革蘭氏陰性細菌之周質中製造。此對單純之黏膜免疫反應而言已是足夠，因周質毒素可自結腸中之周質流出，因此亦為可接近者（Hunt and Hardy, 1991）。然而，若載體瞄準結腸外之抗原-遞呈細胞（諸如集合淋巴結（Peyer's Patch）或淋巴器官，如：淋巴結或脾臟），則此並無意義。

原則上，二種因子對腫瘤疫苗之效力具關鍵性：Th1-型細胞性免疫反應之誘導及固有免疫系統之組成分（諸如NK細胞、NKT-細胞及 γ - δ T細胞，其對腫瘤療法之效力而言很重要）的參與（Dunn et al., 2004）。

這些固有免疫系統之組成分的重要性落在多種層級。經適當活化之NK-及 γ - δ T細胞可局部製造大量IFN- γ 。此干擾素（其亦由特異性Th1偏極之T細胞製造）在腫瘤療法中有多種功能。其中心功能之一為抑制血管生成，其中斷腫瘤之氧及營養供應，使腫瘤飢餓。再者，NK細胞擁有辨識第I類MHC分子的受體。若這些分子呈現在

細胞上則 NK 細胞將受到抑制。

在誘導特異性細胞毒性 T 細胞之疫苗方面，這些 CTLs 可殺死腫瘤細胞。若腫瘤細胞失去其表現第 I 類 MHC 分子的能力（此在腫瘤中經常發生）則特異性細胞毒性 T 細胞失效。因此，在此案例中，對 NK 細胞之抑制作用終止，NK 細胞即可直接排除腫瘤細胞。

因此，若腫瘤疫苗能有效地誘導出二種組成分即為理想情況。關於融合之毒素佐劑的 Th1-Th2 偏移方面有些矛盾之數據。如稍早所討論者，以分離方式施予之毒素抗原融合構造物可明顯誘導出強烈之 Th2 偏極的免疫反應。某些作者對活疫苗載體之描述仍為低度之 Th2 偏移；其他作者則見到輕微之 Th1 偏移。

然而，這些數據亦完全以非分泌之構造物為基礎。藉由這類感染疫苗誘導固有之免疫力從未曾經過比較或考慮。

如同已提出者，主要理由為現存之疫苗為黏膜感染疫苗，而非腫瘤疫苗。因此，對 Th1 免疫反應、CTL 免疫反應及固有之免疫系統反應之誘導並非焦點。相反的，考慮腫瘤疫苗時，誘導這些免疫反應是不可少的。

有趣的是，在細胞生物學中通常係使用天然毒素作為傳信通路之抑制劑。因此，在各毒素中，天然百日咳毒素顯示出可抑制 NK 細胞之特殊細胞凋亡樣式，但霍亂毒素則不。一種不同研究顯示出霍亂毒素（但其 B-次單位則不）阻斷特殊之 NK 細胞功能（Poggi，等人，1996）。天然

百日咳毒素係用來抑制淋巴球之趨化作用（Spangrude，等人，1985）。即便這些研究與腫瘤疫苗接種無關，本技藝之技術熟習人士亦可歸結出使用毒素作為腫瘤疫苗有害之結論，因對腫瘤療法具關鍵性之固有免疫系統之反應係受到抑制而非受誘導。

其他研究證實天然百日咳毒素（但非去活化之百日咳毒素）之類的毒素能有效地誘導固有免疫系統之組成分。若真考慮對抗腫瘤之免疫療法時，此表示需使用天然毒素。然而，由於毒性原因，這類投藥是不可行的。再者，這類誘導將不可避免地引致由 Th2 指導之次級免疫反應，此將對腫瘤療法有害（Boyd，等人，2005）。因此，在誘導固有免疫反應方面，習知技藝既未描述亦不曾考慮接種腫瘤疫苗。相反地，文獻中之評論分析甚至不利於在腫瘤療法中使用毒素。

然而，有趣的為一種毒素或其次單位與其他刺激劑之協同作用的分析（諸如以低甲基化之 CpG 再現單位（CpG ODN）（Holmgren，等人，2005）或脂多醣（LPS）免疫刺激 DNA 寡核苷酸）。在 LPS 之案例中顯示出原先主要係透過毒素之 B-次單位而增加對單核細胞之誘導，然而，整體來說，其係被整個毒素（全毒素（holotoxin））抑制（Hajishengallis et al., 2004）。然而，這些研究完全倚賴使用純化之毒素-抗原-融合構造物（其中係加入 LPS 或 CpG 之類的物質作為佐劑）。再者，僅對可誘導適合之免疫反應但不直接攻擊腫瘤之巨噬細胞進行分析。因此，這

些研究在誘導固有免疫系統之組成分（尤其是可直接攻擊腫瘤之 NK 細胞）方面並無重要性。

然而，其他研究顯示 NK 細胞可被活化並被毒素（像銅綠假單胞菌外毒素 A）以趨化方式攻擊（Muhlen，等人，2004）。根據該實驗系統，Th1 反應亦可被誘導，雖然，NK 細胞及 Th1 反應很可能因此受到抑制（Michalkiewicz et al., 1999）。然而，這些分析主要係瞄準腸毒素 A 之肝毒性的分析且與接種腫瘤疫苗無關。有趣的是，該效果為高度之劑量倚賴性，只要稍微改變劑量即可使效果逆轉。再者，作者無法揭露何種反應可在活體內有效發生。因此，從該數據無法預測若使用毒素或甚至是去毒性之毒素作為佐劑時可能發生何種效果。

總之，免疫反應強烈倚賴所應用之特殊系統。在大部分案例中，黏膜抗感染疫苗係瞄準黏膜處之免疫系統局部運作，以誘導有效之黏膜免疫反應（Lycke，2005）。然而，這些研究並不包括研發腫瘤疫苗。另外，這些研究缺乏關於誘導系統性細胞性免疫反應（尤其是腫瘤疫苗接種所必要之細胞毒性 T 細胞反應）之資訊。

分泌異源抗原已經證明可提供有利於系統性免疫反應之益處（Hess，等人，1996）。然而，所描述之經分泌的抗原並非經分泌之毒素-抗原構造物；其中並未使用毒素或其次單位。在基因轉殖腫瘤模型中藉此取得之免疫反應亦高度受限（Gentschev，等人，2005）。確實，此案例中可誘導微弱之抗體及細胞毒性 T 細胞反應，以藉此部分

防止腫瘤惡化。然而，不僅是免疫反應本身受限，還有保護作用本身亦受限。同樣地，這些腫瘤疫苗接種研究缺乏與非分泌形之構造物的比較。再者，腫瘤疫苗接種並未進行比較性研究（Hess，等人，1996）且相對於進一步之研究，其未見關於分泌之任何益處（Garmory，等人，2002；Roland，等人，2005）。

總之，如前述，習知技藝對分泌之看法相當矛盾且對腫瘤療法中分泌形毒素-抗原構造物並無任何關於潛在利益的建議。完全相反的，現有文獻之評論分析較不贊同這類用途。

細菌毒素（Todar，2002）：在一種化學水準下有二種類型之細菌毒素，脂多醣類（其與革蘭氏陰性細菌之細胞壁結合）及蛋白質類（其自細菌細胞釋出且可在遠離細菌生長部位之組織部位作用）。與細胞結合之脂多醣（LPS）毒素係稱為內毒素而胞外擴散性毒素則稱為外毒素。

外毒素為存活細菌在指數生長期間所分泌之典型的可溶性蛋白質，但在某些案例中其係經由細菌細胞溶解而釋出。毒素通常係由引起該與毒素相關之疾病的特殊菌株所特別製造（如：僅破傷風桿菌製造破傷風毒素；僅白喉桿菌製造白喉毒素）。革蘭氏陽性細菌及革蘭氏陰性細菌均製造可溶性蛋白質毒素。

一般而言，現存之蛋白質（外-）毒素有三種類別：
（i）第 I 型毒素（超抗原），其結合至宿主細胞表面並調

節免疫反應，但不轉位入細胞內，（ii）第Ⅱ型毒素（打洞毒素（pore-forming toxins）），其作用在宿主細胞膜並使宿主細胞滲漏及死亡，（iii）第Ⅲ型毒素（A-B 毒素），其經由一特異性受體結合至宿主細胞並轉位入細胞內，在其中變成活性並修飾宿主細胞之蛋白質或其他組成分。

如上述指出，在宿主細胞內於胞內作用之第Ⅲ型毒素係由二種組成分組成：一種組成分（次單位 A）造成毒素之酶活性；另一種組成分（次單位 B）與結合至宿主細胞膜上之特殊受體有關並可將酶轉移通過細胞膜。酶組成分需待其自天然（A+B）毒素釋出後才具有活性。分離之 A 次單位具有酶活性但缺乏結合及進入細胞之能力。分離之 B 次單位可結合靶的細胞（甚至阻斷天然毒素之結合），但其不具毒性。

毒素次單位可有多種不同之合成及排列方式：A+B 表示該毒素係以在靶的細胞表面交互作用之二種分別的蛋白質次單位形式合成及分泌；A-B 或 A-5B 或 AB5 表示 A 及 B 次單位係分別合成，但在分泌期間藉由非共價鍵聯結並結合至其靶的；5B 或 B5 表示該蛋白質之結合結構區係由 5 個相同之次單位所組成。AB 或 A/B 代表毒素以單肽形式合成，分成可藉由蛋白質水解裂解而分開之 A 及 B 結構區的毒素。AB 或 A/B 毒素之實例為白喉毒素、外毒素 A、肉毒桿菌毒素及破傷風毒素。A-5B 或 AB5 毒素之實例為霍亂毒素及志賀毒素，而炭疽毒素 LF 及炭疽毒素 EF 為

A-B 毒素之實例。

習知技藝之其他相關文件包含下列：

Michl，等人描述細菌及細菌毒素於作為實體腫瘤治療劑之用途。其中揭示毒素-抗原融合構造物及這類構造物之細菌靶向，研究白喉毒素（DT）、假單胞菌外毒素 A（PE）及產氣莢膜桿菌腸毒素（CPE）之用途。然而，作者並未提及霍亂毒素，亦未證明或明示由細菌遞送之毒素-抗原融合構造物分泌（Michl 及 Gress，2004）。

Lahiri 提出關於不同細菌毒素之概述，並討論其種種用途。雖然作者提及毒素-抗原融合構造物，但其並未談及霍亂毒素及分泌之毒素-抗原融合構造物的細菌靶向（Lahiri，2000）。

Lavelle，等人揭示作為免疫調節藥物之感染劑分子。該作者亦提及霍亂毒素-抗原融合蛋白質，但這類構造物僅直接以蛋白質之形式施予，並不藉由經遺傳修改之活疫苗施予。（Lavelle，等人，2004）。

WO 01/74383 係針對嵌合形抗原-腸毒素黏膜免疫原亦提及霍亂毒素次單位 A2 及 B 之用途。然而，這類嵌合形免疫原總是同時包含 A2 及 B 次單位，且企圖用於黏膜免疫，而非用於腫瘤治療中。

WO 02/077249 描述用於將異源蛋白質遞送至特異突變之靶的細胞的非致命性小腸結腸炎耶爾森氏菌突變株。其中亦提及霍亂毒素次單位 A1 之用途，但該專利文件並未提及分泌且僅提及感染病及感染狀態之治療。

WO 2004/018630 揭示編碼雙股真核細胞表現盒之重組雙股 RNA 噬菌體。其中雖然提及霍亂毒素次單位 A，但該文件並無進一步之相關內容。

Holmgren，等人概述黏膜免疫及佐劑之領域。尤其是，其討論霍亂毒素作為黏膜佐劑之效果，但未揭示關於遺傳表現系統或活疫苗之資訊，亦未提及腫瘤療法（Holmgren，等人，2003）。

Holmgren 及 Czerkinsky 亦概述黏膜免疫性及疫苗。然而，此文章亦僅限於抗感染，並未討論腫瘤療法或明示於此領域之可能用途（Holmgren 及 Czerkinsky，2005）。

Freytag 及 Clements 之另一評論討論黏膜佐劑在抗感染免疫療法中之應用。雖然提及霍亂毒素作為黏膜佐劑，但作者並未提及分泌之毒素-抗原構造物及腫瘤療法為可能之投藥領域（Freytag 及 Clements，2005）。

Shaw 及 Starnbach 描述使用改良之細菌毒素遞送疫苗抗原。然而，該文章並未提及霍亂毒素，且為了疫苗接種之原因而受限於直接施予毒素-抗原融合蛋白質（Shaw 及 Starnbach，2003）。

WO 03/072789 針對作為編碼用於治療腫瘤之細胞抗原之核苷酸序列的載體之微生物。雖然該專利文件提及分泌及於腫瘤治療領域中之用途，但其完全未提及細菌毒素及融合蛋白質。

Gentschev、Dietrich 和 Goebel 以及 Gentschev，等人描述細菌靶向及其於腫瘤疫苗研發中之用途。然而，此二

篇文章並未提及細菌毒素及融合蛋白質於腫瘤療法中之用途（Gentshev，等人，2002a；Gentshev，等人，2002b）。

WO 98/23763 揭示表現大腸桿菌溶血素 B 及 D 次單位以及包含融合至 hlyA 之異源抗原的融合多肽之霍亂弧菌細胞。其進一步描述表現霍亂毒素次單位 B 及分泌訊號序列之融合多肽、異源抗原和霍亂毒素 A2 次單位之霍亂弧菌疫苗株。最後，其揭示一種包含融合至困難梭菌毒素 A 或毒素 B 次單位之抗原部分的霍亂毒素 B 次單位。然而，該專利申請案並未提及蛋白質毒素加上異源性非-蛋白質毒素抗原之融合蛋白質於腫瘤療法中之用途。

Dietrich 與同事們討論二種疫苗遞送工具-溶血素 A 及李斯特菌素-其可用於細胞介導之免疫性。然而，其並未提及蛋白質毒素-異源抗原融合蛋白質或共同-表現（Dietrich，等人，2003）。

Gentshev，等人描述大腸桿菌之 α -溶血素分泌系統於傷寒沙門氏菌 Ty21a 疫苗株中遞送抗原之用途。然而，該作者並未提及細菌毒素及融合蛋白質於腫瘤療法中之用途（Gentshev，等人，2004）。

WO 02/47727 係針對包含蛋白質毒素之 B 次單位的治療劑。該文件僅揭示 CtxB 及 EtxB 與病毒抗原之融合蛋白質。其中未提及細菌疫苗或細菌疫苗遞送。

Cheng-hua S 與同事們描述霍亂毒素 B 次單位與 HBV PreS2 抗原決定部位之基因融合物以及該融合蛋白質在直

接免疫研究中之抗原性。然而，其中未提及細菌疫苗或細菌疫苗遞送（Cheng-hua，等人，1995）。

Sanchez，等人揭示當與 DNA 疫苗經由皮下共同投服時，霍亂毒素 B 次單位基因可增強黏膜免疫球蛋白 A、Th1 型及 CD8⁺細胞毒性反應（Sanchez，等人，2004）。然而，此方法中，作者使用 DNA 作為載體，其本身可作為 Th1 促進佐劑。另外，蛋白質係由宿主細胞製造且非直接或經由細菌載體遞送，因此，可被真核細胞直接利用。

WO 01/29233 係針對嵌合型致免疫組成物及編碼彼之核酸。然而，其中未提及細菌疫苗或細菌疫苗遞送。

WO 2007/044406 係關於利用以 SopE 攜帶型 III 分泌訊號為根據之細菌抗原遞送系統來刺激免疫反應的方法。然而，該專利申請案中未提及細菌毒素及融合蛋白質於腫瘤療法中之用途。

總之，從習知技藝中可歸結出：天然毒素因為其毒性強因此不能用於人類。再者，將其應用於腫瘤療法中是有害的，因固有之免疫系統（尤其是 NK 細胞）的反應將受到抑制。然而，本免疫反應為成功之腫瘤療法的關鍵組成分，因腫瘤細胞經常失去其表現第 I 類 MHC 分子的能力，因此，對於 CTL 之辨識及攻擊具抗性。

另一方面，使用單獨之去毒性毒素次單位或融合至（異源）抗原蛋白質之去毒性毒素次單位可造成被強烈減弱之佐劑效果及/或甚至引起免疫系統的系統性耐受性以及黏膜限制性抗體和 Th2 型免疫反應。

再者，分泌（異源）抗原-毒素融合蛋白質（其僅在抗感染疫苗（即，瞄準抗原或甚至是毒素本身）之過程中才被提及）不僅顯示出對細胞質表現無助益且一般而言並不適合。

總之，未曾提出腫瘤治療方法，亦未描述或達成以製造 IFN- γ 之 T-輔助細胞來系統性誘導以 Th1 為主之細胞免疫反應（誘導 CTL）或活化固有免疫反應，而這些均為腫瘤療法所必需。

【發明內容】

本發明之目的係提供新穎之腫瘤疫苗，藉由此疫苗可誘導強烈之系統性細胞性免疫系統反應並可取得有效之腫瘤療法。

令人驚訝地，於一觀點中，本發明之目的可藉由提供包含下列組成分之作爲編碼抗原和蛋白質毒素之核苷酸序列的載體之微生物來解決：

（I）至少一種編碼至少一種野生型或突變之蛋白質的至少一種完全或部分抗原之核苷酸序列；及

（II）至少一種編碼至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位之核苷酸序列；及

（III）a）至少一種編碼至少一種轉運系統（其可使組成分（I）及組成分（II）之表現產物表現在該微生物之外表面上及/或可使組成分（I）及組成分（II）之表現產物分泌）；及/或至少一種訊號序列（其可使組成分（I

) 及組成分 (II) 之表現產物分泌) 之核苷酸序列 ; 及 / 或

b) 選擇性地 , 至少一種編碼至少一種用於於哺乳動物細胞之細胞溶質中溶解微生物及用於胞內釋出質體或表現載體 (其包含在該溶解之微生物內) 之蛋白質的核苷酸序列 ; 及

(IV) 至少一種編碼至少一種用於表現一或多種組成分 (I) 至 (III) 之活化序列的核苷酸序列 , 其中該活化序列可在該微生物中被活化及 / 或為組織細胞特異性、腫瘤細胞特異性、巨噬細胞特異性、樹突細胞特異性、淋巴細胞特異性、功能特異性或非細胞特異性 ;

其中該組成分 (I) 至 (IV) 中之任一可出現一次或數次且若組成分 (I) 至 (IV) 中之一種組成分出現數次 , 則其可彼此各自獨立地為相同或相異。

於一較佳體系中係提供包含上述組成分 (I) 至 (IV) 之微生物 , 其中組成分 (I) 及組成分 (II) 並不相同 , 亦即組成分 (I) 並不編碼至少一種編碼至少一種蛋白質毒素及 / 或至少一種蛋白質毒素次單位之核苷酸序列。

在本發明之過程中 , 與組成分 (IV) 相關之 “組織細胞 - 特異性” 一詞係指在靶的組織細胞中被特異活化之活化序列 , 諸如激素倚賴性啟動子 (如 : 在前列腺組織中者) 。

在本發明之過程中 , 與組成分 (IV) 相關之 “腫瘤細胞 - 特異性” 一詞係指在腫瘤細胞中被特異活化之活化序

列，諸如被腫瘤特異性致癌基因之作用活化的啓動因子成分。

在本發明之過程中，與組成分（IV）相關之“巨噬細胞-特異性”一詞係指在巨噬細胞中被特異活化之活化序列，諸如編碼巨噬細胞-特異性基因之啓動子成分（如：編碼 F4/80 之基因）。

在本發明之過程中，與組成分（IV）相關之“樹突細胞-特異性”一詞係指在樹突細胞中被特異活化之活化序列，諸如控制 B7.1 之表現的啓動子成分。“樹突細胞-特異性”一詞等同“樹突型-細胞-特異性”一詞，即，其具相同意義且均指樹突細胞。

在本發明之過程中，與組成分（IV）相關之“淋巴細胞-特異性”一詞係指在淋巴系之細胞中被特異活化之成分，如：調節 T 細胞中 CD3 分子之表現的啓動子成分或調節成熟 B 細胞中 CD20 之表現的啓動子成分。

在本發明之過程中，與組成分（IV）相關之“功能-特異性”一詞係指在細胞（如：已喪失 p53 表現之腫瘤細胞）中被特異活化之活化序列，或在細菌中根據，如：細胞定位或氧之壓力而被活化之活化序列。

在本發明之過程中，與組成分（IV）相關之“非細胞-特異性”一詞係指到處活躍之活化序列，諸如組成上活性之細菌啓動子。

在本發明之過程中，“核苷酸序列”一詞係指 dsDNA、ssDNA、dsRNA、ssRNA 或 dsDNA/RNA 雜交體。宜爲

dsDNA。

在本發明之過程中，“抗原”一詞係指與抗體反應之分子，即，可產生抗體者。一些抗原本身不會誘出抗體之製造；僅那些可誘導抗體製造者稱為免疫原。在本發明之目的中係欲包含所有種類之已知抗原。藉由資料庫及/或在不造成過度負擔下進行實驗審查來取得關於可能之抗原的必要資訊為本技藝之技術熟習人士所知之學問。抗原之實例為：（尤其是）細胞抗原、組織細胞特異性抗原（如：腫瘤衍生來源之組織細胞）、細胞蛋白質抗原、病毒抗原、病毒蛋白質抗原，等。宜為蛋白質抗原。更宜為異源抗原或外來抗原，即，非本發明之各別微生物的內生性抗原，或非本發明之各別微生物所天然表現，但藉由標準分子生物法引入其中的抗原。

在本發明之過程中，“完全抗原”一詞係指與根據上述定義之抗體反應之完全分子。完全抗原之實例為，如：全長蛋白質，其亦為較佳者。

在本發明之過程中，“部分抗原”一詞係指與根據上述定義之抗體反應之分子的特殊部分。部分抗原可為，如：蛋白質再現單位（motives），諸如在蛋白質內之胺基酸環、蛋白質激酶結構區、抗原決定部位，等。宜為蛋白質激酶結構區及抗原決定部位，後者為抗體所能辨識之抗原的特殊位置（亦稱為抗原決定簇）。

在本發明之過程中，與蛋白質相關之“野生型”及“經突變”等詞係分別指由其“天然”支配性胺基酸序列（

由各別之核苷酸序列編碼)所組成之蛋白質及與該野生型序列相較下，在其胺基酸序列(由各別之核苷酸序列編碼)中具有一或多種突變之蛋白質。較佳地，野生型及/或突變之蛋白質係衍生自腫瘤細胞。在部分抗原方面，更佳者為包含突變之序列，即，宜選擇包含一或多種突變之抗原決定部位(如：B-Raf V600E 抗原決定部位)。

在本發明之意義中，微生物係指細菌、革蘭氏陽性細菌、革蘭氏陰性細菌及真核細胞，後者包含單細胞寄生蟲、酵母菌、腫瘤細胞及細胞株細胞，諸如啤酒酵母、利什曼屬、自患者自體衍生之腫瘤細胞及腫瘤細胞株。這類微生物通常係作為載體，以轉移對微生物而言為外來(異源或異質)之核苷酸序列。較佳地，使用毒性減弱之細菌，例如：攜帶被刪除或去活化之 *aroA*、*aro*、*asd*、*gal*、*pur*、*cya*、*crp*、*phoP/Q*、*omp* 基因之細菌或溫度敏感突變體或抗生素倚賴性突變體(Cardenas 及 Clements, 1992)。更適合作為包含上述組成分(I)至(IV)之微生物為那些一可克服小腸黏膜，作為載體之革蘭氏陰性、減毒、兼性細胞內細菌(如：沙門氏菌屬或志賀氏菌屬)。

於一較佳體系中係提供包含上述組成分(I)至(IV)之微生物，其中該微生物係選自“細菌、革蘭氏陽性細菌、革蘭氏陰性細菌及真核細胞”且宜選自“埃希氏菌屬、大腸桿菌、沙門氏菌屬、傷寒沙門氏菌、鼠傷寒沙門氏菌、耶爾森氏菌屬、小腸結腸炎耶爾森氏菌、弧菌屬、霍亂弧菌、李斯特菌屬、單核球增多性李斯特菌、志賀氏菌

屬、福氏志賀氏菌 (*Shigella flexneri*) ”，較佳地，其中該微生物之毒性被減弱。更佳地，上述定義之微生物中係排除霍亂弧菌。

在本發明之目的中，與微生物相關之“屬”一詞係欲包含指定菌屬中之所有成員（包括種、亞種，等）。例如：“沙門氏菌屬”一詞係欲包含沙門氏菌屬中之所有成員，諸如：傷寒沙門氏菌及鼠傷寒沙門氏菌。

於另一較佳體系中係提供根據上述定義之微生物，其中該組成分（I）之至少一種野生型或突變之蛋白質的至少一種完全或部分抗原係選自下列野生型蛋白質及彼之已知突變體：“受體；受體之胞外、跨膜或胞內部分；黏著分子；黏著分子之胞外、跨膜或胞內部分；訊號轉導蛋白質；細胞週期蛋白質；轉錄因子；分化蛋白質；胚胎蛋白質；病毒蛋白質；過敏原；微生物致病原之蛋白質；真核生物致病原之蛋白質；睪丸癌抗原蛋白質；腫瘤抗原蛋白質；及/或組織-細胞特異性蛋白質”，其中該組織細胞係選自“甲狀腺、乳腺、唾液腺、淋巴結、乳腺、胃黏膜、腎臟、卵巢、前列腺、子宮頸、膀胱黏膜及神經”。

在突變之蛋白質方面，突變可為致癌性且可能造成其原始細胞功能之損失或取得。

這類抗原在細胞中控制細胞生長及細胞分裂，並出現在正常細胞之細胞膜上（例如：第 I 類 MHC 分子）。在腫瘤細胞中，這些抗原常過度表現或特異突變。這類突變可具有致癌基因遏制子之功能限制或因此將原癌基因活化

成致癌基因並可單獨涉入腫瘤生長或，通常在腫瘤生長中過度表現。這類細胞抗原出現在腫瘤細胞膜上，因此代表在腫瘤細胞上之抗原，然而，其不會引起影響患者之腫瘤疾病的免疫反應。Rapp (US 5,156,841) 已描述致癌蛋白質（即，致癌基因之表現產物）於作為腫瘤疫苗之免疫原的用途。

根據本發明之抗原及其（致癌性）突變的實例為：i）受體，諸如“Her-2/neu、雄激素受體、雌激素受體、乳鐵蛋白受體、中期因子（midkine）受體、EGF 受體、ERBB2、ERBB4、TRAIL 受體、FAS、TNF α 受體、TGF- β 受體；ii）訊號轉導蛋白質，諸如 c-Raf (Raf-1)、A-Raf、B-Raf、B-Raf V599E、B-Raf V600E、B-Raf KD、B-Raf V600E 激酶結構區、B-Raf V600E KD、B-Raf V600E 激酶結構區 KD、B-Raf 激酶結構區、B-Raf 激酶結構區 KD、Ras、Bcl-2、Bcl-X、Bcl-W、Bfl-1、Brag-1、Mcl-1、A1、Bax、BAD、Bak、Bcl-Xs、Bid、Bik、Hrk、Bcr/abl、Myb、C-Met、IAP1、IAO2、XIAP、ML-IAP、LIVIN、存活素、APAF-1；iii）細胞週期控制之蛋白質，諸如細胞週期素 D (1-3)、細胞週期素 E、細胞週期素 A、細胞週期素 B、細胞週期素 H、Cdk-1、Cdk-2、Cdk-4、Cdk-6、Cdk-7、Cdc25C、p16、p15、p21、p27、p18、pRb、p107、p130、E2F (1-5)、GAAD45、MDM2、PCNA、ARF、PTEN、APC、BRCA、p53 及同源物；iv）轉錄因子，諸如 C-Myc、NFkB、c-Jun、ATF-2、Sp1；v）

胚胎蛋白質，諸如癌胚抗原、 α -胎兒蛋白、MAGE、MAGE-1、MAGE-3、NY-ESO-1、PSCA；vi) 分化抗原，諸如 MART、Gp100、酪胺酸酶、GRP、TCF-4、髓鞘鹼性蛋白 (basic myelin)、 α -乳白蛋白、GFAP、前列腺特異性抗原 (PSA)、纖維酸性蛋白質、酪胺酸酶、EGR-1、MUC1；vii) 病毒性抗原，諸如下列病毒之抗原：HIV、HPV、HCV、HPV、EBV、CMV、HSV、流感病毒、A 型流感病毒、A 型流感病毒 (H5N1) 及 (H3N2)、B 型流感病毒、C 型流感病毒；紅血球凝集素 (hemagglutinins)、紅血球凝集素 H1、紅血球凝集素 H5、紅血球凝集素 H7、紅血球凝集素 HA1 (宜來自 A 型流感病毒 (A/泰國/1 (KAN-1) 2004 (H5N1)、紅血球凝集素 HA12 (宜來自 A 型流感病毒 (A/泰國/1 (KAN-1) 2004 (H5N1)、紅血球凝集素 HA12C (宜來自 A 型流感病毒 (A/泰國/1 (KAN-1) 2004 (H5N1)、神經胺基酸酶、微生物抗原：p60、LLO、尿素酶，等。真核細胞病原之抗原：CSP (瘧疾)、calflagin (錐蟲屬)、CPB (碩大利什曼蟲)，等。

於另一較佳體系中係提供根據上述定義之微生物，其中該組成分 (I) 之至少一種野生型或突變之蛋白質的至少一種完全或部分抗原係選自下列野生型蛋白質及彼之已知突變體：“Her-2/neu、雄激素受體、雌激素受體、中期因子 (midkine) 受體、EGF 受體、ERBB2、ERBB4、TRAIL 受體、FAS、TNF α 受體、TGF- β 受體、乳鐵蛋白受體、髓鞘鹼性蛋白、 α -乳白蛋白、GFAP、纖維酸性蛋

白質、酪胺酸酶、EGR-1、MUC1、c-Raf (Raf-1)、A-Raf、B-Raf、B-Raf V599E、B-Raf V600E、B-Raf KD、B-Raf V600E 激酶結構區、B-Raf V600E KD、B-Raf V600E 激酶結構區 KD、B-Raf 激酶結構區、B-Raf 激酶結構區 KD、N-Ras、K-Ras、H-Ras、Bcl-2、Bcl-X、Bcl-W、Bfl-1、Brag-1、Mcl-1、A1、Bax、BAD、Bak、Bcl-Xs、Bid、Bik、Hrk、Bcr/abl、Myb、C-Met、IAP1、IAO2、XIAP、ML-IAP LIVIN、存活素、APAF-1、細胞週期素 D (1-3)、細胞週期素 E、細胞週期素 A、細胞週期素 B、細胞週期素 H、Cdk-1、Cdk-2、Cdk-4、Cdk-6、Cdk-7、Cdc25C、p16、p15、p21、p27、p18、pRb_[r1]、p107、p130、E2F (1-5)、GAAD45、MDM2、PCNA、ARF、PTEN、APC、BRCA、Akt、PI3K、mTOR、p53 及同源物、C-Myc、NFkB、c-Jun、ATF-2、Sp1、前列腺特異性抗原 (PSA)、癌胚抗原、 α -胎兒蛋白、PAP；PSMA；STEAP；MAGE、MAGE-1、MAGE-3、NY-ESO-1、PSCA、MART、Gp100、酪胺酸酶、GRP、TCF-4、HIV 病毒、HPV 病毒、HCV 病毒、HPV 病毒、EBV 病毒、CMV 病毒、HSV 病毒、流感病毒、A 型流感病毒、A 型流感病毒 (H5N1) 及 (H3N2)、B 型流感病毒、C 型流感病毒之病毒抗原；紅血球凝集素、紅血球凝集素 H1、紅血球凝集素 H5、紅血球凝集素 H7、紅血球凝集素 HA1 (宜來自 A 型流感病毒 (A/泰國/1 (KAN-1) 2004 (H5N1))、紅血球凝集素 HA12 (宜來自 A 型流感病毒 (A/泰國/1 (KAN-1

) 2004 (H5N1) 、紅血球凝集素 HA12C (宜來自 A 型流感病毒 (A/泰國 /1 (KAN-1) 2004 (H5N1) 、神經胺基酸酶、_[r2]p60、LLO、尿素酶、CSP、calflagin 及 / 或 CPB ”

。

於另一較佳體系中係提供根據上述定義之微生物，其中該組成分 (I) 之至少一種野生型或突變之蛋白質的至少一種完全或部分抗原係選自下列由野生型蛋白質及彼之已知突變體 (括號中之編號) 所組成之激酶：

AAK1 (NM 014911), AATK (NM 004920), ABL1 (NM 005157), ABL2 (NM 005158), ACK1 (NM 005781), ACVR1 (NM 001105), ACVR1B (NM 020328), ACVR2 (NM 001616), ACVR2B (NM 001106), ACVRL1 (NM 000020), ADCK1 (NM 020421), ADCK2 (NM 052853), ADCK4 (NM 024876), ADCK5 (NM 174922), ADRBK1 (NM 001619), ADRBK2 (NM 005160), AKT1 (NM 005163), AKT2 (NM 001626), AKT3 (NM 005465), ALK (NM 004304), ALK7 (NM 145259), ALS2CR2 (NM 018571), ALS2CR7 (NM 139158), AMHR2 (NM 020547), ANKK1 (NM 178510), ANKRD3 (NM 020639), APEG1 (NM 005876), ARAF (NM 001654), ARK5 (NM 014840), ATM (NM 000051), ATR (NM 001184), AURKA (NM 003600), AURKB (NM 004217), AURKC (NM 003160), AXL (NM 001699), BCKDK (NM 005881), BCR (NM 004327), BIKE (NM 017593), BLK (NM 001715), BMPR1A (NM 004329), BMPR1B (NM 001203), BMPR2 (NM 001204), BMX (NM 001721), BRAF (NM 004333), BRD2 (NM 005104), BRD3 (NM 007371), BRD4 (NM 014299), BRDT (NM 001726), BRSK1 (NM 032430), BRSK2 (NM 003957), BTK (NM 000061), BUB1 (NM 004336), BUB1B (NM 001211), CABC1 (NM 020247), CAMK1 (NM 003656), CaMK1b (NM 198452), CAMK1D (NM 020397), CAMK1G (NM 020439), CAMK2A (NM 015981), CAMK2B (NM 001220), CAMK2D (NM 001221), CAMK2G (NM 001222), CAMK4 (NM 001744), CAMKK1 (NM 032294), CAMKK2 (NM 006549), CASK (NM 003688), CCRK (NM 012119), CDC2 (NM 001786), CDC2L1 (NM 001787), CDC2L5 (NM 003718), CDC42BPA (NM 014826), CDC42BPB (NM 006035), CDC7L1 (NM 003503), CDK10 (NM 003674), CDK11 (NM 015076), CDK2 (NM 001798), CDK3 (NM 001258), CDK4 (NM 000075), CDK5 (NM 004935), CDK6 (NM 001259), CDK7 (NM 001799), CDK8 (NM 001260), CDK9 (NM 001261), CDKL1 (NM 004196), CDKL2 (NM 003948), CDKL3 (NM 016508), CDKL4 (NM 001009565), CDKL5 (NM 003159), CHEK1 (NM

001274), CHUK (NM 001278), CIT (NM 007174), CLK1 (NM 004071), CLK2 (NM 003993), CLK3 (NM 003992), CLK4 (NM 020666), CRK7 (NM 016507), CSF1R (NM 005211), CSK (NM 004383), CSNK1A1 (NM 001892), CSNK1D (NM 001893), CSNK1E (NM 001894), CSNK1G1 (NM 022048), CSNK1G2 (NM 001319), CSNK1G3 (NM 004384), CSNK2A1 (NM 001895), CSNK2A2 (NM 001896), DAPK1 (NM 004938), DAPK2 (NM 014326), DAPK3 (NM 001348), DCAMKL1 (NM 004734), DCAMKL2 (NM 152619), DCAMKL3 (XM 047355), DDR1 (NM 013993), DDR2 (NM 006182), DMPK (NM 004409), DMPK2 (NM 017525.1), DYRK1A (NM 001396), DYRK1B (NM 006484), DYRK2 (NM 006482), DYRK3 (NM 003582), DYRK4 (NM 003845), EEF2K (NM 013302), EGFR (NM 005228), EIF2AK3 (NM 004836), EIF2AK4 (NM_001013703), EPHA1 (NM 005232), EPHA10 (NM 001004338), EPHA2 (NM 004431), EPHA3 (NM 005233), EPHA4 (NM 004438), EPHA5 (NM 004439), EPHA6 (XM 114973), EPHA7 (NM 004440), EPHA8 (NM 020526), EPHB1 (NM 004441), EPHB2 (NM 017449), EPHB3 (NM 004443), EPHB4 (NM 004444), EPHB6 (NM 004445), ERBB2 (NM 004448), ERBB3 (NM 001982), ERBB4 (NM 005235), ERK8 (NM 139021), ERN1 (NM 001433), ERN2 (NM 033266), FASTK (NM 025096), FER (NM 005246), FES (NM 002005), FGFR1 (NM 000604), FGFR2 (NM 022970), FGFR3 (NM 000142), FGFR4 (NM 022963), FGR (NM 005248), FLJ23074 (NM 025052), FLJ23119 (NM 024652), FLJ23356 (NM 032237), FLT1 (NM 002019), FLT3 (NM 004119), FLT4 (NM 002020), FRAP1 (NM 004958), FRK (NM 002031), FYN (NM 002037), GAK (NM 005255), GPRK5 (NM 005308), GPRK6 (NM 002082), GPRK7 (NM 139209), GRK4 (NM 005307), GSG2 (NM 031965), GSK3A (NM 019884), GSK3B (NM 002093), GUCY2C (NM 004963), GUCY2D (NM 000180), GUCY2F (NM 001522), H11 (NM 014365), HAK (NM 052947), HCK (NM 002110), HIPK1 (NM 152696), HIPK2 (NM 022740), HIPK3 (NM 005734), HIPK4 (NM 144685), HRI (NM 014413), HUNK (NM 014586), ICK (NM 016513), IGF1R (NM 000875), IKBKB (NM 001556), IKBKE (NM 014002), ILK (NM 004517), INSR (NM 000208), INSRR (NM 014215), IRAK1 (NM 001569), IRAK2 (NM 001570), IRAK3 (NM 007199), IRAK4 (NM 016123), ITK (NM 005546), JAK1 (NM 002227), JAK2 (NM 004972), JAK3 (NM 000215), KDR (NM 002253), KIS (NM 144624), KIT (NM 000222), KSR (XM 290793), KSR2 (NM 173598), LAK (NM 025144), LATS1 (NM 004690), LATS2 (NM 014572), LCK (NM 005356), LIMK1 (NM 016735), LIMK2 (NM 005569), LMR3 (XM 055866), LMTK2 (NM 014916), LOC149420 (NM 152835), LOC51086 (NM 015978), LRRK2 (XM 058513), LTK (NM 002344), LYN (NM 002350), MAK (NM 005906), MAP2K1 (NM 002755), MAP2K2 (NM 030662), MAP2K3 (NM 002756), MAP2K4 (NM 003010), MAP2K5 (NM 002757), MAP2K6 (NM 002758), MAP2K7 (NM 005043), MAP3K1 (XM 042066), MAP3K10 (NM 002446),

MAP3K11 (NM 002419), MAP3K12 (NM 006301), MAP3K13 (NM 004721), MAP3K14 (NM 003954), MAP3K2 (NM 006609), MAP3K3 (NM 002401), MAP3K4 (NM 005922), MAP3K5 (NM 005923), MAP3K6 (NM 004672), MAP3K7 (NM 003188), MAP3K8 (NM 005204), MAP3K9 (NM 033141), MAP4K1 (NM 007181), MAP4K2 (NM 004579), MAP4K3 (NM 003618), MAP4K4 (NM 145686), MAP4K5 (NM 006575), MAPK1 (NM 002745), MAPK10 (NM 002753), MAPK11 (NM 002751), MAPK12 (NM 002969), MAPK13 (NM 002754), MAPK14 (NM 001315), MAPK3 (NM 002746), MAPK4 (NM 002747), MAPK6 (NM 002748), MAPK7 (NM 002749), MAPK8 (NM 002750), MAPK9 (NM 002752), MAPKAPK2 (NM 032960), MAPKAPK3 (NM 004635), MAPKAPK5 (NM 003668), MARK (NM 018650), MARK2 (NM 017490), MARK3 (NM 002376), MARK4 (NM 031417), MAST1 (NM 014975), MAST205 (NM 015112), MAST3 (XM 038150), MAST4 (XM 291141), MASTL (NM 032844), MATK (NM 139355), MELK (NM 014791), MERTK (NM 006343), MET (NM 000245), MGC33182 (NM 145203), MGC42105 (NM 153361), MGC43306 (C9orf96), MGC8407 (NM 024046), MIDORI (NM 020778), MINK (NM 015716), MKNK1 (NM 003684), MKNK2 (NM 017572), MLCK (NM 182493), MLK4 (NM 032435), MLKL (NM 152649), MOS (NM 005372), MST1R (NM 002447), MST4 (NM 016542), MUSK (NM 005592), MYLK (NM 053025), MYLK2 (NM 033118), MYO3A (NM 017433), MYO3B (NM 138995), NEK1 (NM 012224), NEK10 (NM 152534), NEK11 (NM 024800), NEK2 (NM 002497), NEK3 (NM 002498), NEK4 (NM 003157), NEK5 (MGC75495), NEK6 (NM 014397), NEK7 (NM 133494), NEK8 (NM 178170), NEK9 (NM 033116), NLK (NM 016231), NPR1 (NM 000906), NPR2 (NM 003995), NRBP (NM 013392), NRBP2 (NM 178564), NRK (NM 198465), NTRK1 (NM 002529), NTRK2 (NM 006180), NTRK3 (NM 002530), OBSCN (NM 052843), OSR1 (NM 005109), PACE-1 (NM 020423), PAK1 (NM 002576), PAK2 (NM 002577), PAK3 (NM 002578), PAK4 (NM 005884), PAK6 (NM 020168), PAK7 (NM 020341), PASK (NM 015148), PCTK1 (NM 006201), PCTK2 (NM 002595), PCTK3 (NM 212503), PDGFRA (NM 006206), PDGFRB (NM 002609), PDK1 (NM 002610), PDK2 (NM 002611), PDK3 (NM 005391), PDK4 (NM 002612), PDPK1 (NM 002613), PFTK1 (NM 012395), PHKG1 (NM 006213), PHKG2 (NM 000294), PIK3R4 (NM 014602), PIM1 (NM 002648), PIM2 (NM 006875), PIM3 (NM 001001852), PINK1 (NM 032409), PKE (NM 173575), PKMYT1 (NM 004203), pknbeta (NM 013355), PLK (NM 005030), PLK3 (NM 004073), PRKAA1 (NM 006251), PRKAA2 (NM 006252), PRKACA (NM 002730), PRKACB (NM 002731), PRKACG (NM 002732), PRKCA (NM 002737), PRKCB1 (NM 002738), PRKCD (NM 006254), PRKCE (NM 005400), PRKCG (NM 002739), PRKCH (NM 006255), PRKCI (NM 002740), PRKCL1 (NM 002741), PRKCL2 (NM 006256), PRKCM (NM 002742), PRKCN (NM 005813), PRKCQ (NM 006257), PRKCZ (NM 002744), PRKD2 (NM 016457), PRKDC (NM 006904), PRKG1 (NM 006258), PRKG2

(NM 006259), PRKR (NM 002759), PRKWNK1 (NM 018979), PRKWNK2 (NM 006648), PRKWNK3 (NM 020922), PRKWNK4 (NM 032387), PRKX (NM 005044), PRKY (NM 002760), PRPF4B (NM 003913), PSKH1 (NM 006742), PSKH2 (NM 033126), PTK2 (NM 005607), PTK2B (NM 004103), PTK6 (NM 005975), PTK7 (NM 002821), PTK9 (NM 002822), PTK9L (NM 007284), PXK (NM 017771), QSK (NM 025164), RAD53 (NM 007194), RAF1 (NM 002880), RAGE (NM 014226), RET (NM 020975), RHOK (NM 002929), RIOK1 (NM 031480), RIOK2 (NM 018343), RIPK1 (NM 003804), RIPK2 (NM 003821), RIPK3 (NM 006871), RIPK5 (NM 015375), RNASEL (NM 021133), ROCK1 (NM 005406), ROCK2 (NM 004850), ROR1 (NM 005012), ROR2 (NM 004560), ROS1 (NM 002944), RPS6KA1 (NM 002953), RPS6KA2 (NM 021135), RPS6KA3 (NM 004586), RPS6KA4 (NM 003942), RPS6KA5 (NM 004755), RPS6KA6 (NM 014496), RPS6KB1 (NM 003161), RPS6KB2 (NM 003952), RPS6KC1 (NM 012424), RPS6KL1 (NM 031464), RYK (NM 002958), SBK (XM 370948), SCYL1 (NM 020680), SCYL2 (NM 017988), SGK (NM 005627), SgK069 (SU SgK069), SgK085 (XM 373109), SgK110 (SU SgK110), SGK2 (NM 016276), SgK223 (XM 291277), SgK269 (XM 370878), SgK424 (CGP SgK424), SgK493 (SU_SgK493), SgK494 (NM 144610), SgK495 (NM 032017), SGK1 (NM 013257), SK681 (NM 001001671), SLK (NM 014720), SMG1 (NM 015092), SNARK (NM 030952), SNF1LK (NM 173354), SNF1LK2 (NM 015191), SNK (NM 006622), SNRK (NM 017719), SRC (NM 005417), SRMS (NM 080823), SRPK1 (NM 003137), SRPK2 (NM 003138), SSTK (NM 032037), STK10 (NM 005990), STK11 (NM 000455), STK16 (NM 003691), STK17A (NM 004760), STK17B (NM 004226), STK18 (NM 014264), STK19 (NM 032454), STK22B (NM 053006), STK22C (NM 052841), STK22D (NM 032028), STK23 (NM 014370), STK24 (NM 003576), STK25 (NM 006374), STK3 (NM 006281), STK31 (NM 031414), STK32B (NM 018401), STK33 (NM 030906), STK35 (NM 080836), STK36 (NM 015690), STK38 (NM 007271), STK38L (NM 015000), STK39 (NM 013233), STK4 (NM 006282), STK5 (NM 001003787), STYK1 (NM 018423), SUDD (NM 003831), SYK (NM 003177), TAF1 (NM 138923), TAF1L (NM 153809), TAO1 (NM 004783), TAOK1 (NM 020791), TAOK3 (NM 016281), TBCK (NM 033115), TBK1 (NM 013254), TEC (NM 003215), TEK (NM 000459), TESK1 (NM 006285), TESK2 (NM 007170), TEX14 (NM 031272), TGFBR1 (NM 004612), TGFBR2 (NM 003242), TIE (NM 005424), TIF1 (NM 003852), TLK1 (NM 012290), TLK2 (NM 006852), TNIK (NM 015028), TNK1 (NM 003985), TOPK (NM 018492), TP53RK (NM 033550), TRAD (NM 007064), TRIB1 (NM 025195), TRIB2 (NM 021643), TRIB3 (NM 021158), TRIM28 (NM 005762), TRIM33 (NM 015906), TRIO (NM 007118), TRPM6 (NM 017662), TRPM7 (NM 017672), TRRAP (NM 003496), TSSK4 (NM 174944), TTBK1 (NM 032538), TTBK2 (NM 173500), TTK (NM 003318), TTN (NM 003319),

TXK (NM 003328), TYK2 (NM 003331), TYRO3 (NM 006293), ULK1 (NM 003565), ULK2 (NM 014683), ULK3 (NM 015518), ULK4 (NM 017886), VRK1 (NM 003384), VRK2 (NM 006296), VRK3 (NM 016440), WEE1 (NM 003390), Wee1B (NM 173677), YANK1 (NM 145001), YES1 (NM 005433), ZAK (NM 016653), and/or ZAP70 (NM 001079)".

本發明之過程中，“過敏原”一詞係指如此文所定義之引出過敏性及/或過敏反應之完全或部分抗原。實例有：Der p 5（蝨）、Bet v 1（花粉）、Phl p 1（草粉）、Asp f 1/a（曲黴）、PLA 2（蜜蜂）、Hev b（乳膠）（Schmid-Grendelmeier and Cramer, 2001）。

微生物及真核病原之抗原及睪丸癌抗原列於上表中。

本發明之過程中，根據組成分（II）之蛋白質毒素及/或其次單位宜為細菌蛋白質毒素，更宜為外毒素。細菌外毒素之實例為第I型毒素（超抗原）、第II型毒素（孔洞形成毒素）及第III型毒素（A-B毒素）。

於一較佳體系中係提供根據上述定義之微生物，其中組成分（II）係選自下列：“細菌毒素、腸毒素、外毒素、第I型毒素、第II型毒素、第III型毒素、第IV型毒素、第V型毒素、RTX毒素、AB毒素、A-B毒素、A/B毒素、A+B毒素、A-5B毒素及/或AB5毒素”。

於另一較佳體系中係提供根據上述定義之微生物，其中組成分（II）係選自下列：“腺苷酸環化酶毒素、炭疽病毒毒素、炭疽病毒毒素（EF）、炭疽病毒毒素（LF）、肉毒桿菌毒素、霍亂毒素（CT、Ctx）、霍亂毒素次單位B（CTB、CtxB）、白喉毒素（DT、Dtx）、大腸桿菌LT毒素

、大腸桿菌熱不穩定性腸毒素（LT）、大腸桿菌熱不穩定性腸毒素次單位B（LTB）、大腸桿菌ST毒素、大腸桿菌熱穩定性腸毒素（ST）、紅斑毒素、剝脫素毒素、外毒素A、產氣莢膜腸毒素、百日咳毒素（PT、Ptx）、志賀毒素（ST、Stx）、志賀毒素次單位B（STB、StxB）、志賀樣毒素、葡萄球菌腸毒素、破傷風毒素（TT）、中毒休克症候群毒素（TSST-1）、Vero毒素（VT）、困難梭菌（*Clostridium difficile*）之毒素A（TA）及毒素B（TB）、索氏梭菌（*Clostridium sordellii*）之致死毒素（LT）及出血性毒素（HT）、諾維梭菌（*Clostridium novyi*）之 α 毒素（AT）”。

然而，若使用霍亂毒素或其次單位CtxB作為根據本發明之組成分（II）的毒素，則宜不使用霍亂弧菌作為載體（微生物）。

於一較佳體系中係提供根據上述定義之微生物，其中組成分（I）及組成分（II）係連接在一起以使由此二種組成分編碼之融合蛋白質表現及/或分泌。較合適的為，此融合蛋白質係選自下列：“CtxB-PSA、CtxB-B-Raf V600E KD（激酶失效）、CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區、CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區 KD（激酶失效）、CtxB-B-Raf、CtxB-B-Raf KD（激酶失效）、CtxB-B-Raf 激酶結構區 KD（激酶失效）、CtxB-HA1（流感病毒之紅血球凝集素的次單位1）、CtxB-HA12C”。

分泌作用為一種分離、合成製作及自細胞或分泌之化

學物質或一些物質中釋出化學物的過程。分泌作用並非真核細胞所獨有者；其亦出現在細菌及古菌中。ATP 結合盒（ABC）型轉運子為生物之所有三種結構區所共有。Sec 系統亦為另一保留之分泌系統，其與真核細胞內質網中之易位子（translocon）（包含酵母菌之 Sec61 易位子複合體及細菌中之 Sec Y-E-G 複合體）同源。革蘭氏陰性菌具有二種膜，這使得其分泌作用在局部解剖學上較複雜。因此，在革蘭氏陰性細菌中至少有五種專門之分泌系統：

（1）第 I 型分泌系統：其與上述之 ATP 結合盒轉運子相同。

（2）第 II 型分泌系統：蛋白質穿越內膜係倚賴 Sec 系統而穿越外膜係倚賴另一特別系統。菌毛（bacterial pili）使用修改之 Sec 系統，但與第 I 型系統不同。

（3）第 III 型分泌系統（T3SS）：其與細菌鞭毛基體同源。其類似於一種分子注射器，透過此分子注射器，細菌（如：志賀菌或耶爾森氏菌）可將蛋白質注射入真核細胞中。細胞溶質中之低 Ca^{2+} 濃度開啓調節 T3SS 之閘門。植物病原中之 Hrp 系統透過類似機制將生物髮夾（hairpin）注射入植物中。

（4）第 IV 型分泌系統，其與細菌之結合機制（及古菌鞭毛）同源。其可轉運 DNA 及蛋白質。其係在農桿菌（*Agrobacterium tumefaciens*）中發現，該菌使用此系統來將 Ti 質體及蛋白質引入發展出冠繆病（腫瘤）之宿主中。幽門螺桿菌使用第 IV 型分泌系統將 CagA 注射入胃上

皮細胞中。百日咳桿菌（其為引起百日咳之媒介）係部分透過第Ⅳ型分泌系統來分泌百日咳毒素。

（5）第Ⅴ型分泌系統（亦稱為自動轉運子系統）：其使用 Sec 系統跨越內膜。使用此通路之蛋白質具有在其C端形成 β 屏障及插入外膜以將剩餘之肽運出之能力。最後， β 屏障可能分裂並留在外膜中。某些人相信這些自動轉運子之剩餘部分將產生類似 β 屏障之膜孔蛋白（porins）。

細菌以及粒腺體和葉綠體亦使用許多其他特殊轉運系統，諸如雙-精胺酸轉位（Tat）通路，相對於Sec-倚賴性輸出，其運輸經完全摺疊之蛋白質通過膜。系統之名稱來自對瞄準此系統所需之訊號序列中二個連續精胺酸之需求。革蘭氏陰性菌中之分泌涉及藉由合適之分泌系統克服內及外膜，如：Hly 第Ⅰ型或第Ⅲ型分泌系統或AIDA自動轉運子。革蘭氏陽性菌中，分泌系統必須克服內膜及細胞壁，而此點在大部分菌株中可經由與合適之分泌訊號融合來達成。

組成分（Ⅲ）a）為至少一種編碼至少一種轉運系統（其可使組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物表現在微生物之外表面上及/或使組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物被分泌）。各別組成分可選擇被分泌或表現在微生物之膜上（即，與膜結合）。這類轉運系統為，例如：
i）第Ⅰ型分泌系統、第Ⅱ型分泌系統、第Ⅲ型分泌系統、第Ⅳ型分泌系統、第Ⅴ型分泌系統，ii）大腸桿菌之溶

血素轉運系統（訊號）（含有受 hly-特異性啓動因子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列）；下列爲欲使用之轉運訊號：在分泌方面-於 HlyB 及 HlyD 蛋白質之存在下，C-端 HlyA 轉運訊號；在膜結合型表現方面-於 HlyB 蛋白質之存在下，C-端 HlyA 轉運訊號，iii) 大腸桿菌之溶血素轉運系統（訊號）（含有受非 hly-特異性細菌啓動因子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 的核苷酸序列），iv) 新月柄桿菌（*Caulobacter crescentus*）之 S 層（Rsa A）蛋白質之轉運訊號；下列爲欲使用之轉運訊號：在分泌及膜結合型表現方面-C-端 RsaA 轉運訊號，v) 大腸桿菌之 TolC 蛋白質爲轉運訊號 TolC；下列爲欲使用之轉運訊號：在膜結合型表現方面-TolC（大腸桿菌之完整膜蛋白質 TolC）之 N-端轉運訊號爲一種大腸桿菌外膜之多功能孔道形成蛋白質，除了諸如接受大腸桿菌素 E1（Morona，等人，1983）及分泌大腸桿菌素 V（Fath，等人，1991）之功能外，其亦作爲 U3 噬菌體之受體（Austin，等人，1990）；此蛋白質不僅可在大腸桿菌中找到；亦可在許多革蘭氏陰性細菌中找到（Wiener，2000）；TolC 在外膜之定位及廣泛出現使其爲呈現異源抗原之理想候選者，以，如：引起免疫反應。

革蘭氏陽性菌不包含外膜。在這些案例中之分泌作用較簡單且通常不需要提供分泌機制以供通過細胞膜及細胞壁運輸。在革蘭氏陽性菌之案例中，與異源蛋白質在 N-端融合之分泌訊號對於分泌作用通常爲必要且足夠的。蛋

白質（用於這些蛋白質之訊號序列已有描述）主要包含所有分泌之細菌蛋白質。李斯特菌方面之實例為衍生自李斯特菌素之分泌訊號，p60 或 ActA。一般而言，類似之方法可應用在真核細胞上，在此真核細胞中，當無滯留訊號存在時，將蛋白質瞄準內質網之訊號序列（例如泛分泌訊號 Vtgss）對分泌作用而言為必要且足夠的。

選擇性之組成分（Ⅲ）b）為編碼至少一種用於溶解哺乳動物細胞之細胞溶質中的微生物及用於胞內釋出質體或表現載體（其包含在溶解之微生物中）之蛋白質的至少一種核苷酸序列。這類溶菌蛋白質（細胞內溶素）為，如：李斯特菌特異性溶菌蛋白質，諸如 PLY551（Loessner，等人，1995）及/或受李斯特菌啟動子控制之李斯特菌特異性 holin 蛋白。本發明之一較佳體系係不同組成分（Ⅲ）b）之組合，例如：溶菌蛋白質與 holin 之組合。

組成分（Ⅲ）a）及/或（Ⅲ）b）二者可彼此各自獨立地為組成上活性。

於一較佳體系中係提供根據上述定義之微生物，其中組成分（Ⅲ）a）係選自：“第 I 型分泌系統、第 II 型分泌系統、第 III 型分泌系統、第 IV 型分泌系統、第 V 型分泌系統、大腸桿菌之溶血素轉運系統（訊號）（含有受 hly-特異性啟動子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列）、大腸桿菌之溶血素轉運系統（訊號）（含有受非 hly-特異性細菌啟動因子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列）、新月柄桿菌之 S 層（Rsa A）蛋白質之轉運訊

號、大腸桿菌之 TolC 蛋白質之轉運訊號、分泌訊號 Vtgss 及/或衍生自李斯特菌素之分泌訊號，p60 及/或 ActA”且其中組成分（Ⅲ）b）係選自：“細胞內溶素、革蘭氏陽性細菌之溶菌蛋白質、單核細胞增生李斯特菌之溶菌蛋白質、單核細胞增生李斯特菌之 PLY551 及/或單核細胞增生李斯特菌之 holin 蛋白”。

於另一較佳體系中，該相同組成分（Ⅲ）a）可使組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物表現在微生物之外表面上及/或使組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物分泌。於此較佳體系中，組成分（Ⅲ）a）為僅編碼一種轉運系統之至少一種核苷酸序列，其可使組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物伴隨表現在微生物之外表面上及/或使組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物伴隨分泌，其中這類較佳組成分（Ⅲ）a）為至少一種編碼大腸桿菌之溶血素轉運系統（訊號）（含有受 hly-特異性啟動因子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列）或編碼大腸桿菌之溶血素轉運系統（訊號）的至少一種核苷酸序列（含有受非 hly-特異性細菌啟動因子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列）。

於另一較佳體系中係提供根據上述定義之微生物，其中根據組成分（Ⅲ）a），組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物係被分泌。更合適的，組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）係連接在一起，一起表現並以由二種組成分編碼之融合蛋白質的形式分泌。最佳地，此融合蛋白質係選自下列

： “ CtxB-PSA、CtxB-B-Raf V600E KD（激酶失效）、CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區、CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區 KD（激酶失效）、CtxB-B-Raf、CtxB-B-Raf KD（激酶失效）、CtxB-B-Raf 激酶結構區 KD（激酶失效）、CtxB-HA1（流感病毒之紅血球凝集素的次單位 1）、CtxB-HA12C”。

在本發明之過程中，“分泌”一詞係指藉由適當之分泌系統（諸如上述說明者）分泌蛋白質抗原、蛋白質毒素及/或毒素-抗原融合蛋白質通過革蘭氏陰性細菌之二種膜或革蘭氏陽性細菌之內膜及細胞壁進入鄰近環境之作用。

如吾人所知：利用分泌系統（諸如來自大腸桿菌之溶血素第 I 型分泌系統），分泌產物通常在所有細胞部分中找到：細胞膜性、膜結合型，位於自體膜囊泡中及完全分泌入鄰近環境中（Balsalobre，等人，2006），在本發明之過程中分泌作用不需完全。然而完全或幾乎完全之分泌作用（即，完全分泌之分泌產物佔絕大部分）為所需或較佳者。

組成分（IV）代表編碼至少一種用於表現一或多種組成分（I）至（III）之活化序列之至少一種核苷酸序列，其中該活化序列可在微生物中被活化及/或為組織細胞特異性、腫瘤細胞特異性、巨噬細胞特異性、樹突細胞特異性、淋巴球特異性、功能特異性或非細胞特異性。

若表現係以膜結合方式結合在微生物外表面上，則宜選擇可在微生物中被活化之活化序列。這類活化序列為，

如：i) 組成上活性之啓動子區，諸如具大腸桿菌之 β -內醯胺酶基因或大腸桿菌 hly 基因位之內生性啓動子，tetA 基因（Busby 及 Ebright，1994）之“核糖體結合部位”（RBS）的啓動子區，ii) 可被誘導之啓動子，宜爲被細胞接受後變成活性之啓動子。單核球增多性李斯特菌之 actA 啓動子（Dietrich，等人，1998）或鼠傷寒沙門氏菌之 pcgC 啓動子（Bumann，2001）均屬於此類。

若質體係在微生物溶解入哺乳動物之細胞溶質後釋出，則該活化序列並非細胞特異性，而爲組織細胞特異性、細胞週期特異性或功能特異性。較宜爲，這類活化序列係經過選擇而可特定於巨噬細胞、樹突細胞及淋巴球中活化。

於另一較佳體系中係提供根據上述定義之微生物，其中

組成分（I）係選自下列：B-Raf V600E、B-Raf V600E 激酶結構區、B-Raf V600E KD（激酶失效）、B-Raf V600E 激酶結構區 KD（激酶失效）、B-Raf KD（激酶失效）、B-Raf 激酶結構區、B-Raf 激酶結構區 KD（激酶失效）、前列腺特異性抗原（PSA）、紅血球凝集素 HA1（宜來自 A 型流感病毒（A/泰國/1（KAN-1）2004（H5N1））、紅血球凝集素 HA12（宜來自 A 型流感病毒（A/泰國/1（KAN-1）2004（H5N1））、紅血球凝集素 HA12C（宜來自 A 型流感病毒（A/泰國/1（KAN-1）2004（H5N1））”；

組成分（Ⅱ）係選自下列：“霍亂毒素次單位 B（CTB、CtxB）、大腸桿菌熱不穩定性腸毒素次單位 B（LTB）、破傷風毒素（TT）”；

組成分（Ⅲ）a）係選自：“大腸桿菌之 HlyA 溶血素轉運訊號與 Hly 分泌系統之組成分（含有受 hly-特異性啟動因子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列）”；
[r3]

組成分（Ⅳ）係選自“大腸桿菌 hly 基因位之內生性啟動因子”；

其中組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）係連接在一起以使得由此二種組成分編碼之融合蛋白質表現且其中該融合蛋白質係經分泌。

上述說明之根據組成分（Ⅰ）至（Ⅳ）及較佳體系之微生物在下文中稱為本發明之微生物。

本發明之微生物非常適合作為腫瘤瞄準過程中之活疫苗而用於腫瘤療法中。此係藉由本發明之微生物進行，其作為遺傳資訊之載體將異源抗原與蛋白質毒素遞送入腫瘤部位，以融合蛋白質之形式表現並於原位被分泌。

本發明之微生物可透過該經遞送、編碼和表現之毒素-抗原融合蛋白質之有效且優越的表現和分泌（即，無胞質性及/或週質性聚集出現）而令人驚異且方便地決定其特徵。

再者，與口服之蛋白質疫苗（其相對地係誘導免疫系統之系統性耐受性）相較下，經由投服本發明之微生物可

出人意料地引出強系統性細胞性免疫系統反應。

最值得注意的是，除了誘導 Th1 型之系統性細胞性免疫系統反應外，本發明之微生物引起第 I 類 MHC 限制性 CD8⁺細胞毒性 T 細胞（CTL）活化並強烈增強此 CTL 免疫反應。

再者，除了誘導及/或增加強烈之細胞性系統性 Th1 及 CTL 免疫系統反應外，固有之免疫系統（如：NK 細胞、NKT 細胞及/或 γ - δ T 細胞）亦意外地可被本發明之微生物以協同方式活化。

若使用霍亂毒素作為毒素組成分，本發明之微生物的利處在於人體內無預存之對抗該正常存在之毒素的免疫力（相對於破傷風毒素而言，例如：由兒童期之抗破傷風疫苗接種取得之免疫力）。因此，使用霍亂毒素及/或其單位（尤其是 CtxB）較佳。

本發明之微生物特別適合用於以活疫苗為基礎之標靶腫瘤（免疫）療法的口服投藥。藉此可改良患者之適應性。

然而，本發明之微生物並不僅限於用於腫瘤療法中。原則上，本發明之微生物亦適合治療及/或預防所有那些需要在療法中強制誘導系統性細胞性 Th1 免疫系統反應的疾病。這類感染性疾病之實例包括，但不限於：HIV、流感、HCV 及其他病毒性疾病、結核桿菌病、單核球增多性李斯特菌及其他細菌性疾病。

本發明之微生物極適合用於治療像流感之類的疾病，

此類疾病需藉由組合黏膜免疫系統反應及系統性細胞性免疫反應來提供理想保護。另外，其可用於在過敏性疾病（如：過敏性鼻炎）中特異誘導似 Th1 免疫性。在這類情況中，該抗原為一種融合至蛋白質毒素組成分之過敏原，且各別疫苗之作用原則為將過敏反應（疾病）中對抗過敏原之以 Th2 為主的免疫反應轉向 Th1 免疫反應的免疫反應轉移。

較佳之施予模式為口服。於一較佳體系中，將根據本發明之沙門氏菌株在合適之介質中發酵、收成，然後藉由離心清洗，接著，利用合適之物質調配及穩定，再凍乾之。將凍乾之物質填入抗胃酸之膠囊中，其中含有之存活細胞數宜介於 10^9 至 10^{10} 之細菌間。膠囊係藉由液體口服攝入。

或者，將如上述之凍乾細菌與含有緩衝劑（其可中和胃酸）之藥囊一起分發（藥學套組）。於一較佳體系中，此緩衝劑為碳酸鹽緩衝劑。在使用前，以水製備緩衝劑並提取後立即與水混合攝入凍乾細菌。

另一替換法係使用冷凍細菌。在此情況中，清洗後，經由安定劑（宜為蔗糖或甘油）來穩定細菌再將其冷凍並貯存在 -80°C ，每一劑量之濃度宜介於 10^9 至 10^{10} 個細菌。此製劑宜用於如上述之加有碳酸鹽緩衝劑的藥學套組中。

於一較佳體系中係提供包含至少一種本發明微生物（宜為至少一種凍乾之本發明微生物）及藥學上可接受之載體的藥學組成物。

根據本發明之組成分（I）至（IV）係藉由本技藝之技術熟習人士所熟知之方法引入本發明之微生物中。若該微生物代表細菌則將組成分插入質體或表現載體中，再將質體或表現載體轉移入細菌中。適合用於製造質體、表現載體及本發明微生物之分子生物選殖及轉形技術為本技藝之技術熟習人士所熟知且代表例行之實驗工作。

本發明之另一主題係投服含有本發明微生物之藥物製劑。投服係經由局部或系統性途徑，例如：口服、經由口、直腸途徑進入表皮、進入皮下組織、進入肌肉組織、進入體腔、進入器官、進入腫瘤或進入血液循環中。

這類藥物製劑為，例如：在藥師所熟悉之適合用於注射的溶液中的本發明微生物之懸浮液。

本發明之特殊主題為經口或直腸投服根據本發明之藥物，以治療及/或預防疾病。投藥可為一次或數次。在各次投藥中係投服約 10 至 10^{11} 之本發明微生物。若投服此數目之本發明微生物不會引起足夠之免疫反應則必須增加注射之數目。

在投服本發明之微生物後，該遞呈組成分（I）的細胞（例如：為腫瘤起源之腫瘤細胞或組織細胞）之耐受性瓦解而觸發針對該腫瘤及/或其組織細胞之強烈系統性免疫反應。根據選擇之組成分（I），此細胞性免疫反應係完全針對該腫瘤或亦針對腫瘤細胞，包括該腫瘤細胞源起之組織細胞。

於另一觀點中，本發明之目的已藉由提供包含至少一

種本發明微生物的藥物來解決，該本發明之微生物包含上述之遺傳組成分（I）至（IV）或至少一種如此文所定義之藥學組成物。

於一較佳體系中，本發明之微生物可用於製備用於治療及/或預防選自下列之生理學及/或病理生理學之病況的藥物：“不受控制之細胞分裂、惡性腫瘤、良性腫瘤、實體腫瘤、肉瘤、癌、過度增生病、類癌、尤文氏肉瘤、卡波西氏肉瘤、腦瘤、源自腦及/或神經系統及/或腦脊膜之腫瘤、神經膠質瘤、神經母細胞瘤、胃癌、腎臟癌、腎細胞癌、前列腺癌（prostate cancer）、前列腺癌（prostate carcinomas）、結締組織腫瘤、軟組織肉瘤、胰臟腫瘤、肝腫瘤、頭腫瘤、頸瘤、食道癌、甲狀腺癌、骨肉瘤、腎母細胞腫瘤、胸腺瘤、睪丸癌、肺癌、支氣管癌、乳癌（breast cancer）、乳癌（mamma carcinomas）、小腸癌、結腸直腸腫瘤、結腸癌、直腸癌、婦科腫瘤、卵巢腫瘤（ovary tumors）/卵巢腫瘤（ovarian tumors）、子宮癌、子宮頸癌（cervical cancer）、子宮頸癌（cervix carcinomas）、子宮體癌（cancer of body of uterus）、子宮體癌（corpus carcinomas）、子宮內膜癌、尿膀胱癌、膀胱癌、皮膚癌、基底細胞癌、脊椎瘤（spinalioma）、黑色素瘤、眼內黑色素瘤、白血病、慢性白血病、急性白血病、淋巴瘤、感染、病毒或細菌感染、流行感冒、慢性發炎、器官排斥及/或自體免疫疾病”。

細菌感染包含，但不限於：炭疽熱、細菌性腦膜炎、

肉毒桿菌症、布氏桿菌症、彎曲菌病、貓抓病、霍亂、白喉、流行性斑疹傷寒、膿疱瘡、退伍軍人病、麻瘋病（韓森氏病）、鉤端螺旋體病、李斯特氏菌症、萊姆病、類鼻疽、MRSA 感染、諾卡菌症、百日咳（whooping cough）、黑死病、肺炎球菌性肺炎、鸚鵡熱、Q 熱、洛磯山斑點熱（RMSF）、沙門氏菌症、猩紅熱、志賀氏菌症、梅毒、破傷風、沙眼、結核病、兔熱病、傷寒、斑疹傷寒、尿道感染、細菌引起之心臟病。

病毒感染包含，但不限於：AIDS、與 AIDS 相關之併發症（ARC）、水痘（varicella）、一般感冒、巨細胞感染、柯羅拉多壁蝨熱、登革熱、埃博拉出血熱、手足口病、肝炎、單純性疱疹、帶狀疱疹、HPV、流行感冒（flu）、拉薩熱、麻疹、馬爾堡出血熱、感染性單核球過多症、腮腺炎、小兒麻痺症、進行性多病竈白質腦病變（progressive multifocal leukencephalopathy）、鼠疫、德國麻疹、SARS、天花（variola）、病毒性腦炎、病毒性腸胃炎、病毒性腦膜炎、病毒性肺炎、西尼羅河病、黃熱病。

慢性發炎或慢性發炎性疾病包含，但不限於：慢性膽囊炎、支氣管擴張症、類風濕性關節炎、橋本甲狀腺炎、發炎性腸病（潰瘍性結腸炎及克隆氏症）、矽肺症及其他肺塵症。

自體免疫病包含，但不限於：系統性症候群（諸如 SLE、修格蓮氏（Sjögren's）症候群）、硬皮症、類風濕

性關節炎和多發性肌炎以及局部症候群（諸如 IDDM）、橋本甲狀腺炎、艾迪生氏病、尋常性天疱瘡、牛皮癬、異位性皮膚炎、異位性症候群、氣喘、自體免疫溶血型貧血、多發性硬化症。

包含根據所有此文所描述之用於治療及/或預防如此文所描述和定義之生理學及/或病理生理學病況的較佳體系所定義之至少一種微生物及至少一種藥學組成物的對應藥物亦包括在本發明內。

於另一觀點中，本發明之目的係藉由提供包含如此文所說明之組成分（I）至（IV）的質體或表現載體來解決。攜帶至少一種包含如此文所說明之組成分（I）至（IV）的質體或表現載體的本發明微生物為較佳者。

於另一觀點中，本發明之目的係藉由提供用於製造本發明微生物之方法來解決，其中係製造如此文所說明之質體或表現載體，再以此質體或表現載體將微生物轉形。

於另一觀點中，本發明之目的係藉由提供包含至少一種本發明微生物或如上述之藥學組成物或如上述之藥物以及藥學上可接受之緩衝劑（宜為碳酸鹽緩衝劑）的藥學套組來解決。

所有列舉之參考資料及專利的全部內容在此併為參考資料。本發明藉由下列實例（但不限於此）更詳細地解釋。

【實施方式】

實例 1：在不同細菌載體株中建構、表現及分泌 PSA-CtxB 融合蛋白質

爲了證明大腸桿菌第 I 型溶血素分泌系統分泌腫瘤抗原（此處爲前列腺素特異性抗原（PSA））與作爲佐劑之蛋白質毒素組成分（此處爲 CtxB）之融合蛋白質的可行性及證明其效力，依此文之描述建構 PSA-CtxB 融合蛋白質。在不同革蘭氏陰性菌株（其可能作爲腫瘤療法中之活疫苗株）中測試表現及分泌。分子生物學選殖係以質體 / 表現載體 pMOhly1（此先前已描述）爲基礎（Gentschev et al., 2005；Gentschev et al., 1996, WO 03/072789）。

1A 抗卡納黴素 pMOhly1-表現載體衍生物之建構方法

依（Datsenko and Wanner, 2000）中之描述進行 pMOhly1 之安苳青黴素抗性盒的取代。

簡單地說，使用同義引物（sense primer）P1（5'-GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTG GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'）和反義引物 P2（5'-GCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC CATATGAATATCCTCCTTA-3'）及作爲模版之質體 pKD4，進行 PCR 以製造攜帶卡納黴素抗性基因（Kan^R）之片段，此片段鄰接與安苳青黴素抗性基因同源之區（下方劃線處）。

將底有 pKD46 質體及靶的質體 pMOhly 之大腸桿菌株

BW25114 在補充以 0.2% L- (+) -阿拉伯糖之 LB 介質 (狄夫可 (Difco)) 中，在 37℃ 下生長 3-4 小時，再以 PCR 片段轉形。

轉形後，將細菌細胞分佈在含有 25 微克/毫升卡納黴素之 LB 瓊脂盤中並在 37℃ 培育一整夜。

第二天，撿出 Kan^R 選殖株並在含有 50 微克/毫升卡納黴素之 LB 介質中再培育 48 小時，以去除所有提供安苳青黴素抗性之質體。

最後，選擇具 Kan^R 及安苳青黴素-敏感表型之選殖株。藉由 PCR 及定序來確認 Ap^R 基因被 Kan^R 盒取代。所產生之質體稱為 pMKhly1。

1B pMKhly-PSA 質體之選殖方法

使用同義引物 PSA-Nsi1 (5'-GATTGGTGATGCATCCCC TCAT-3';Nsi1 限制位為下方劃線處) 和反義引物 PSA-Nsi12 (5'-GGTGCTCATGCATTGGCCACG-3') 藉由 PCR 將編碼 PSA 之 DNA 片段增數。在 Thermal Cycler 60 (Biometra, Göttingen, 德國) 中進行 30 個循環之 PCR：在 94℃ 下 1 分鐘、54℃ 下 1 分鐘及 72℃ 下 2 分鐘。

以 Nsi1 限制酶分解後將攜帶 psa 基因之 DNA 片段插入輸出載體 pMKhly1 之單一 Nsi1 部位中。自大腸桿菌 DH5α (Invitrogene, 德國) 中分離出所產生之質體 pMKhly-PSA，藉由限制分析進行分析並定序。

1C pMKhly-PSA/CtxB 質體之選殖方法

使用同義引物 Ptac-Sa II (5'-AAAAAAGTCGACGGCTGTGCAGGTCGTAAATCACTGC-3') 和反義引物 Ptac-NotI (5'-AAAAAAGCGGCCGCGGAAATTGTTATCCGCTCA CAATTCC-3') 藉由 PCR 將編碼來自 pGEX-6p-1-質體 (Amersham Bioscience, 德國) 之 Ptac-啓動子之 201 bpDNA 片段增數。在 T3 熱循環儀 (Biometra, 德國) 中進行 30 個循環之 PCR：在 95℃ 下 30 秒、55℃ 下 30 秒及 72℃ 下 90 秒。使用同義引物 Rbs-NotI-前向 (5'-AAAAAAGCGGCCGCTAAGGATGAATTATGATTAAATTAAA ATTTGG-3') 和反義引物 ctb-Sa II -逆向 (5'-TTTATAGTCGACTTAATTTGCCATACTAATTGCGGCAATCGC-3') 藉由 PCR 將編碼來自霍亂弧菌 EI tor 之核糖體結合部位及 CtxB 的全部編碼序列之 413 bpDNA 片段增數。在 T3 熱循環儀 (Biometra, 德國) 中進行 PCR：步驟 1：30 個循環，在 95℃ 下 30 秒、50℃ 下 30 秒及 72℃ 下 2 分鐘。以 Qiaquick PCR 純化套組 (Qiagen, 德國) 純化及以 NotI 限制酶分解此二種片段後，再將此二片段連接，以產生 594 bp 之 Ptac-ctxB-片段。亦將所產生之片段純化後，再以 Sa II 限制酶分解之，然後，將 Ptac-ctxB-片段插入輸出載體 pMKhly-PSA 之單一 Sa II 部位中。自大腸桿菌 DH5 α (Invitrogene, 德國) 中分離出質體 pMKhly-PSA/CtxB，再加以分析並定序。

1D PSA-CtxB-HlyAs 融合構造物之選殖方法

使用同義引物 5'ctxB NsiI (5'-GCATATGCACATGCATCACCTCAAAATATTACTGAT-3') 和反義引物 3'ctxB SrfI NsiI (5'-GGCTTTTTTTATATCTTATGCATGCCCGGGCATTGCGGCAATCGC-3') (SrfI 部位為粗體) 藉由 PCR 將之代表來自霍亂弧菌 El tor 之 ctxB 基因的 ~300 bp DNA 片段增數。以 QIAquick PCR 純化套組 (Qiagen, 德國) 純化後, 以 NsiI 限制酶分解之, 將攜帶全 ctxB 基因但無 N-端訊號序列之 DNA 片段插入輸出載體 pMKhly1 之單一 NsiI 部位中。自大腸桿菌 DH5 α (Life Technologies) 中分離出所產生之質體 pMKhly-CtxB, 再分析並定序之。以引物 5-PSA-鈍端 (5'-GTGGGAGGCTGGGAGTGC-3') 和 3-PSA-鈍端 (5'-GGGGTTGGCCACGATGGT-3') , 藉由 PCR 將來自質體 pCDNA3PSA 之人類 psa 基因增數。在 Thermal Cycler 60 (Biometra, Göttingen, 德國) 中進行 30 個循環之 PCR: 在 94°C 下 1 分鐘、56°C 下 1 分鐘及 72°C 下 2 分鐘。接著, 將 0.7kb DNA 產物選殖入 pMKhly-CtxB 之 SrfI 部位中。藉由限制分析及定序來證明所產生之質體 pMKhly-CtxB-PSA。

1E 融合蛋白質在不同菌種中之表現和分泌

利用標準之電穿孔程序將質體 pMKhly-CtxB-PSA 轉形入不同之電勝任 (electro-competent) 菌株中。檢出抗卡納黴素之單一株落並令其生長在 BHI 介質 (Beckton

Dickinson, 美國：小牛腦，從 200 克泡製，6.0 克/升；牛心，從 250 克泡製，9.8 克/升；蛋白腴 10.0 克/升；氯化鈉 5.0 克/升；右旋糖 2.0 克/升；磷酸二鈉 2.5 克/升）中，密度為每毫升 1×10^9 細胞。生長後，將 20 毫升培養在 Heraeus 離心機中於 4°C ，4000rpm (3000g) 離心 30 分鐘。將 18 毫升上清液轉移入新管中。接著，加入 1.8 毫升 TCA (三氯醋酸, Applichem, 德國)，將液體混合並在冰上培育至少 1 小時。培育後，將上清液在 Heraeus 離心機中於 4°C ，4000rpm (3000g) 離心 30 分鐘。倒乾上清液並以 1 毫升丙酮 p.a. (Aplichem, 德國) 清洗沈澱小丸。將沈澱物在 Hereaus 離心機中於 4°C ，4000rpm (3000g) 離心 10 分鐘。將沈澱小丸風乾，在 150 微升之帶有或不帶有 β -巰基乙醇之 5x 蘭里 (Laemmli) 緩衝劑 (70 mM Tris-HCl, pH6.8、40% (體積/體積) 甘油、3% (體積/體積) 十二烷基硫酸鈉、5% (體積/體積) 2-巰基乙醇及 0.05% (重量/體積) 溴酚藍) 中提取 (Laemmli, 1970)。

在 SDS PAGE 之各道中使用 20 微升溶液。將分開之蛋白質電泳轉移 (西方點墨) 至 Hybond ECL 硝基纖維素膜 (Amer-sham-Pharmacia, Little Chalfont, UK) 上，並以含 1%BSA 之 PBS (氯化鉀 0.20 克/升、磷酸二氫鉀 0.20 克/升、氯化鈉 8.00 克/升、無水磷酸二氫二鈉 1.15 克/升) 阻斷一整夜。在 PBS-吐溫 (Tween) 0.05% 中清洗膜，與多株兔子抗 PSA 抗體 (1:750, DAKO, 丹麥)、CtxB 抗體 (1:1000, Zytomed, 德國, 柏林) 或 HlyAs 抗體 (

Gentshev, 等人, 1996) 一起培育, 接著, 與 HRP-偶合之抗兔子 IgG (1/2,000; Dianova, 德國, 漢堡) 培育 1 小時。以增強之化學發光套組 (GE 健康照護生命科學 (GE Healthcare Life Science, 德國) 發展西方點墨。

第 11 圖描述 PSA-CtxB 融合蛋白質在不同細菌株 (包括: 大腸桿菌屬、都柏林沙門氏菌、檸檬酸桿菌屬、傷寒沙門氏菌 Ty21a、鼠傷寒沙門氏菌屬、尤文氏菌屬 (*Erwinia* spp.) 及福氏志賀氏菌屬) 中的功能表現及分泌。

表現及分泌 PSA-CtxB 融合蛋白質之傷寒沙門氏菌 Ty21a 係存放於德國微生物及細胞培養收集處 (DSMZ), 編號 DSM 19244。

實例 2: 以分泌腫瘤抗原與 CtxB 之融合蛋白質或單獨之 CtxB 的沙門氏菌株免疫化之小鼠對腫瘤細胞挑戰的免疫反應及保護作用

在動物腫瘤模型中, 藉由下列實驗證明分泌之融合蛋白質 (含有腫瘤抗原與蛋白質毒素) 的優異保護效果。在此模型中係將表現及分泌 CtxB-PSA 融合蛋白質之鼠傷寒沙門氏菌 aroA (SL7207) pMKhly-CtxB-PSA 與其他對照菌株相比較。

2A 免疫程序

在 3 週之期間內將 DBA/2 小鼠進行免疫處置三次。以

細菌進行免疫時，經由胃內施予 50 微升之 7%NaHCO₃ 來預先處置動物，以增加胃內之 pH。預先處置後 5-10 分鐘，經由胃內途徑施予於體積為 100 微升之 PBS 中的 5×10^8 存活之卡納黴素不敏感性細菌。在對照組方面，依（Fensterle，等人，2005）中之描述，以編碼 PSA（pCDNA-PSA）之裸出的質體 DNA 經由肌肉內途徑將小鼠免疫化。

2B T-細胞反應

最後一次免疫後 7 天，依先前發表（Fensterle，等人，1999）中之內容，將小鼠之脾臟通過網篩，再溶解紅血球，以製備免疫化小鼠之脾臟細胞。根據（Fensterle，等人，1999）中所發表之實驗計劃進行 ELISPOT 分析，以偵測 PSA 特異性 CD⁸⁺ T 細胞。

簡單地說，在 PSA 特異性 CD⁸⁺ T 細胞之活體外分析方面，以在 100 微升碳酸鹽緩衝劑（Fensterle，等人，1999），pH9.6 中之 5 微克/毫升抗老鼠 IFN- γ 單株抗體（mAb）R4（PharMingen）塗覆 96 槽硝基纖維素盤（Millititer HA；Millipore，麻省貝德福市）。在 4°C 培育一整夜並以在 PBS 中之 1%BSA 阻斷之，在每槽 100 微升 RP10（Fensterle，等人，1999）中加入 1×10^5 個來自經免疫接種之小鼠的脾臟細胞。

在 CD⁸⁺ T 細胞反應之分析方面，使用表現 PSA 之 P815 細胞株 PPSA 24；簡單地說，此細胞株經由 CMV 啟動子（由質體 pCDNA3 編碼）表現全長 PSA（Fensterle，

等人，2005）。於 30 U/毫升 IL-2 之存在下，在 37°C，5%CO₂ 中培育 20-22 小時後，清洗培養盤，再與 100 微升生物素化之抗老鼠 IFN- γ mAbXMB1.2（0.25 微克/毫升，PharMingen）一起培育 2 小時。清洗培養盤，於 100 微升之鹼性磷酸酶-偶合的抗生蛋白鏈菌素（PharMingen）1/20,000 稀釋液之存在下，在 37°C 培育 1 小時。加入 50 微升溶於水中之即時可用的受質 BCIP/NBT（Sigma，密蘇里州聖路易市）來目視檢查斑點。在放大 3 倍之解剖顯微鏡下計算斑點。

肽-特異性 T 細胞（CTL）之頻率係以 IFN- γ -分泌細胞/10⁵ 脾臟細胞之數目表示。爲了分析再次刺激後之 T 細胞反應，於 60 U/毫升重組之 IL-2 的存在下，以在 RP10 介質（Fensterle，等人，1999）中的 2x10⁶ 經放射處理之表現 PSA 之 P815 細胞（Fensterle，等人，2005）再度刺激 2.5x10⁷ 個脾臟細胞 5 天。依上述，利用與 4x10⁵ 飼養細胞（=來自未經處理過之 DBA/2 小鼠的新鮮製備的脾臟細胞）和 10⁵PPSA24 細胞混合之不同量之經再次刺激的細胞（每槽 10⁵、3x10⁴、10⁴ 或 3x10³）進行 ELISPOT 分析。

誘導細胞性免疫反應（尤其是 CD⁸⁺細胞毒性 T 細胞）在腫瘤療法之效率中扮演重要角色（Boon et al., 2006；Rosenberg, 2001）。因此，首先測試攜帶 pMKhly-CtxB-PSA 表現載體之重組菌株鼠傷寒沙門氏菌（SL7207）誘導 PSA 特異性 CD⁸⁺ T 細胞免疫反應之效率。

爲達此目的，依此文之描述，以重組之 SL7207/pMKhly-CtxB (n=10)、SL7207/pMKhly-CtxB-PSA (n=10)、SL7207/pMKhly-PSA (n=10)、SL7207/pMKhly-PSA/CtxB (n=10)、SL7207/pMKhly (n=7) 經 p.o. 將 64 隻 10-14 週大之雌 DBA-2 小鼠免疫化，並以裸出的 pcDNA3-PSA (n=10) 作爲陽性對照組。

第 12 圖顯示 ELISPOT 數據，其揭露經 DNA 免疫之小鼠顯示強 CD^{8+} T 細胞反應。再度刺激後，在以可分泌融合至 CtxB 之 PSA 蛋白質的沙門氏菌進行免疫接種的動物中可偵測到顯著之免疫反應，但以分泌單獨之 PSA 或分別之 PSA 和 CtxB 的沙門氏菌進行免疫接種的動物則不。有趣的是，以分泌單獨之 CtxB 毒素的沙門氏菌進行免疫接種的動物亦在再度刺激後顯示顯著之免疫反應。這些反應最可能係由於那些非特異辨識靶的細胞株之固有免疫系統的 NK 細胞或其他細胞。因此，從分泌之單獨的 CtxB 之數據可歸結出在分泌之 CtxB-PSA 融合蛋白質（分泌 IFN- γ 之脾臟細胞）方面所觀察到的免疫反應係由 CD^{8+} T 細胞反應及深遠之固有免疫系統（最可能爲 NK 細胞）反應所組成。

2C 對腫瘤細胞挑戰之保護作用

爲了分析免疫作用之保護能力，根據上述計劃將每組 6-7 隻小鼠進行免疫處置。在小鼠第三次免疫化後二週，藉由二次 s.c. 注射 1×10^6 細胞入剔毛之腹部皮膚的每一側

，以 PPSA 24（見上述）進行挑戰。在 14 天之期間內監控小鼠之腫瘤外觀並經由測量最大及最小之腫瘤直徑來評估腫瘤直徑。利用下式以旋轉橢球體（rotation ellipsoid）形式計算腫瘤體積：

$$V = \frac{\pi}{6} * a * b^2, a > b.$$

藉由單向 ANOVA 及 Dunnett 氏多向比較後檢測進行結果之顯著性分析（使用 Graph Pad Prism 軟體）。後檢測僅在 ANOVA 結果為顯著時才進行。

第 13 圖顯示之結果係以平均值 $\pm$ SD 表示。在第 6、9、12 及 14 天觀察到顯著之保護效果。如所預期者，所包含之以裸出之 DNA 進行的疫苗接種可作為完全保護小鼠免於腫瘤生長之對照組。然而，以裸出之 DNA 進行之疫苗接種在人體中最多僅顯示出中等效力。考慮細菌構造物時，疫苗株 SL7207/pMKhly-CtxB-PSA（表現及分泌 CtxB-PSA 融合蛋白質）證明為最有效者。其在腫瘤挑戰後第 9、12 及 14 天顯著減少腫瘤體積。注意，與第 14 天之 SL7207/pMKhly-CtxB-PSA 的數值相較下，SL7207/pMKhly-CtxB 株亦減少腫瘤生長。雖然並不顯著，此遞延效果與 ELISPOT 分析中所測得之細胞反應非常配合。再者，SL7207/pMKhly-PSA 株亦在第 14 天取得顯著之保護效果，此表示本疫苗株亦可誘導低於偵測門檻之 T 細胞反應。相反地，SL7207/pMKhly-PSA/CtxB 疫苗株並不誘導相關效果，且係維持在與單獨之 SL7207/pMKhly1 相同之範圍

內。

實例 3：致癌基因-毒素融合蛋白質在傷寒沙門氏菌 Ty21a 中之表現及分泌

依類似於實例 1 之程序進行，但使用另一種腫瘤抗原，在激酶結構區具有 10aa 缺失之致癌基因 B-Raf V600E (B-Raf V600E 激酶結構區激酶失效 (KD)，或簡單地記為 Braf*KD、更簡單地記為 BKD)。依此文之描述建構由此致癌基因及作為佐劑之蛋白質毒素組成分（此處為 CtxB）所組成之 BKD-CtxB 融合蛋白質。在人類疫苗株傷寒沙門氏菌 Ty21a 中證明其表現及分泌。分子選殖係以先前描述之質體/表現載體 pMOhly1 為基礎 (Gentschev et al., 2005; Gentschev et al., 1996) 且選殖程序係類似於本申請案之實例 1。所產生之載體稱為 pMBKDC。該融合蛋白質之序列列於第 10 圖中。

第 17 圖描述利用載體 pMBKDC 電穿孔入傷寒沙門氏菌 Ty21a 及其他菌株中之融合蛋白質的表現及分泌情形。

表現及分泌 BKD-CtxB 融合蛋白質之傷寒沙門氏菌 Ty21a 菌株係存放於德國微生物及細胞培養收集處 (DSMZ)，編號 DSM 19245。

實例 4：具不同之遺傳編碼的免疫佐劑之 OVA-CtxB 融合構造物的比較

為了比較活疫苗分泌之毒素-抗原融合蛋白質的免疫

效力，建構一包含廣泛用於免疫研究之抗原（雞卵白蛋白（OVA））和 CtxB 之融合蛋白質。

使用同義引物 Nsil-OVA-前向 5'-CAT GTA TGC ATT AGC CAT GGT ATA CCTGG-3' 和反義引物 Nsil-OVA-反向 5'-TTT TTT ATG CAT AAG GG AAA CAC CAC ATC TGC C-3'，藉由 PCR 將代表 *ova* 基因（NM205152）之 1033bp DNA 片段增數。以 QIAquick PCR 純化套組（Qiagen，德國）純化後，以 *Nsil* 限制酶分解之，將攜帶全 *ova* 基因，無 N-端訊號序列之 DNA 片段插入輸出載體 pMKhly1 之單一 *Nsil* 部位中。自大腸桿菌 DH5 α （生命科技（Life Technologies））中分離出所產生之質體 pMKhly-Ova，再加以分析並定序。

使用同義引物 5' *ctxB* Nsil (5'-GCATATGCACATGCA TCACCTCAAAATATTACTGAT-3') 和反義引物 3' *ctxB* Srf1 Nsil (5'-GGCTTTTTTTATATCTTATGCATGCCCGGGC ATTGCGGCAATCGC-3')（*Srf1* 部位為粗體），藉由 PCR 將代表來自霍亂弧菌 EI tor 之 *ctxB* 基因的 ~300bp DNA 片段增數。以 QIAquick PCR 純化套組（Qiagen，德國）純化後，以 *Nsil* 限制酶分解之，將攜帶全 *ctxB* 基因，無 N-端訊號序列之 DNA 片段插入輸出載體 pMKhly1 之單一 *Nsil* 部位中。自大腸桿菌 DH5 α （生命科技）中分離出所產生之質體 pMKhly-CtxB，再加以分析並定序。使用 5-OVA-Sfr1 GCC ATC ATG TCA GCT CTA 和 3-OVA-Sfr1 AGG GGA AAC ACA TCT GCC 引物，藉由 PCR 將來自

pCI-OVA 質體之 ova 基因增數。PCR 係在 Thermal Cycler 60 (Biometra, Göttingen, 德國) 中進行 30 個循環：在 94℃ 下 1 分鐘、49℃ 下 1 分鐘及 72℃ 下 2 分鐘 30 秒。接著，將 1.1-kb DNA 產物選殖入質體 pMKhly-CtxB 之 *SrfI* 部位。藉由限制分析檢查所產生之質體 pMKhly-CtxB-OVA 並定序。

將此融合蛋白質引出 Th1 免疫反應之能力與由 pMKhly 載體編碼之單獨分泌的 OVA 加上編碼干擾素 (IFN- γ)、介白素 (IL-12) 及趨化素 (IP-10) 的 DNA 遞送質體 (其編碼受真核細胞啟動子控制的蛋白質) 之引出反應的能力相比較。

依上述進行免疫程序及 ELISPOT 分析。簡單地說，以不同菌株經口將 C57BL/6 小鼠進行免疫處置三次。最後一次免疫處置後 7 天，移出脾臟，再刺激 5 天並在 ELISPOT 分析中分析。爲了再刺激脾臟細胞，使用以 SIINFEKL 肽 (字母代表胺基酸) 脈衝處理之細胞、卵白蛋白之 H-2^b-限制 MHC-I 抗原決定部位。

第 14 圖顯示與共同遞送 IFN- γ 或 IP-10 之構造物相較下，包含雞卵白蛋白 (OVA) 與 CtxB 之融合蛋白質於誘導 OVA 特異性 CD⁸⁺ T 細胞反應及可能之固有免疫系統反應上的優越效力。當菌株具有經共同遞送之 IL-12 構造物時，其顯示出類似之效力。

實例 5：病毒抗原之表現及分泌

本發明微生物於表現及分泌任何（非腫瘤）抗原之適合性係透過禽疫苗株，鼠傷寒沙門氏菌 VacT 中該融合至 CtxB 之禽流感病毒 H5N1 的溶血素 H1 蛋白質之表現來證明。

在 PCR 中使用同義引物 5'-HA-G：5'-ATC TGT CAA ATG GAG AAA-3' 和反義引物 3-HA12C：5'-TAC TCC ACT TAT TTC CTC TCT-3'，以將編碼 H5，不帶有 C-端膜結構區（H12C）之 DNA 片段增數。接著，將 PCR 產物選殖入 pMKhly-CtxB 之 Srf1 部位。藉由限制分析及定序檢查所產生之 pMKhly-CtxB-H12C 質體。由抗 CtxB 及 HlyA 之多株抗體所進行之免疫點墨法顯示出鼠傷寒沙門氏菌 VacT/pMKhly-CtxB-H12C 菌株可有效地表現及分泌雜交種 H5-蛋白質（第 2 圖）。在實驗條件下經分泌之 H5 的量為 2-3 微克蛋白質/毫升上清液。

令細菌生長在 BHI 介質中使密度達到每毫升 1×10^9 細胞。將 20 毫升培養在 Heraeus 離心機中於 4°C ，4000rpm（3000g）離心 30 分鐘。將 18 毫升上清液轉移入新管中。接著，加入 1.8 毫升 TCA（三氯醋酸，Applichem，德國），將液體混合並在冰上培育至少 1 小時。培育後，將懸浮液在 Heraeus 離心機中於 4°C ，4000rpm（3000g）離心 30 分鐘。倒乾上清液並以 1 毫升丙酮 p.a.（Applichem，德國）清洗沈澱小丸；將沈澱物在 Heraeus 離心機中於 4°C ，4000rpm（3000g）離心 10 分鐘。將沈澱小丸風乾，在 150 微升之 5x 蘭里（Laemmli）緩衝劑中

提取。在 SDS PAGE 之各道中使用 20 微升溶液。將分開之蛋白質電泳轉移（西方點墨）至 Hybond ECL 硝基纖維素膜（Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, U.K.）上，並以含 1%BSA 之 PBS 阻斷一整夜。在 PBS-吐溫 0.05% 中清洗膜，與多株兔子抗 CtxB 抗體（1:1000, Zytomed, 德國柏林）或 HlyAs 抗體（Gentschev, 等人, 1996）一起培育，接著，與 HRP-偶合之抗兔子 IgG（1/2,000; Dianova, 德國, 漢堡）一起培育 1 小時。使用增強之化學發光套組（GE Healthcare Life Science, 德國）進行西方點墨。

第 15 圖描述在畜禽疫苗株，鼠傷寒沙門氏菌 VacT 中，HA12C-CtxB 融合蛋白質之有效表現及功能性分泌作用。

實例 6：經由第 III 型分泌系統表現及分泌毒素佐劑與腫瘤抗原之融合蛋白質

數種革蘭氏陰性細菌均攜帶可用於分泌抗原之第 III 型分泌系統。通常，這些系統可用於直接將異源抗原注射入細胞中。在此實例中，作為分泌訊號（YopE）之耶爾森氏菌毒素組成分係遺傳上融合至作為佐劑之熱不穩定性腸毒素次單位 B（LT-B）片段與腫瘤抗原，PSA 上。此構造物係欲在合適（宜為減毒）之耶爾森氏菌株中表現，以經由 YopE 訊號序列，藉由內生性第 III 型分泌機制分泌出融合蛋白質。

在此實例中，將基因融合物 YopE18-LT-B-PSA 選殖入質體 paCYC184 之 EcoRI 部位以將構造物與所使用之 cat 基因同向使用而產生由該質體編碼之 cat 啟動因子表現的產物（<http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappacyc184.htm>）。爲了增強表現，可使用任何啟動因子。

下文中示範一種選殖程序。在 PCR 反應中，利用下列引物將來自大腸桿菌包含熱不穩定性腸毒素次單位 B 之染色體 DNA 或包含此序列（GenBank 編號 AF242418）之載體增數：

Eco-yopel8-f（包含 EcoRI 部位+YopE18 訊號序列）

:

5'-CTGAATTCATGAAAATATCATCATTTATTTCTACATCAC
TGCCCCCTGCCGGCATCAGTGTCAAATAAAGTAAAATGTTATG
TTTTAT3'

（5'區 黑：EcoRI 部位+3 鹼基 5'，紅：編碼 YopE 蛋白質第Ⅲ型分泌系統之訊號序列（aa1-18）之序列，GenBank 編號 M92066；italic 區：LT-B 基因之同源區（GB 編號 AF242418），鹼基 4-28）。

磷酸化之反向引物 LT-B-r：

5'-GTTTTCCATACTGATTGCCGCAATTGAATTGG-3'

（GB AF242418 之逆向股 372-341）。

同時，利用下列引物將如本申請案中所描述之來自載體 pMK-CtxB-PSA 的 PSA 序列增數：

磷酸化之前向引物 psa-f :

5'-GTGGGAGGCTGGGAGTGCGAG-3'

反向引物 psa-eco-r :

5' CCTGAATTCTTAGACGTGATACCTTGAAGCAC

(5' 黑 : EcoRI 部位 +3 鹼基 5' , 藍 : 終止密碼子 , 黑 : PSA 序列之 3'區 , 本申請案) 。

接著 , 在適當條件下 , 以 DNA 連接酶將二種片段連接在一起。連接後 , 在第二次 PCR 反應中利用上述之 Eco-yope18-f 及 PSA-Eco-R 引物將新片段增數。

利用合適之 PCR 純化套組將所產生之片段純化 , 以去除緩衝劑和寡核苷酸 , 接著 , 在適當反應條件下以 EcoRI 酶分解之。利用瓊脂糖凝膠電泳法將所產生之 1040 bp 片段純化 , 連接入經 EcoRI 分解之載體 paCYC184。將具四環黴素抗性、cm 敏感性株落定序後 , 選出具有與 cm 基因同向整合之正確序列的株落並利用電穿孔法將其轉形入合適之耶爾森氏菌株內。此疫苗株將經由其內生性第Ⅲ型分泌系統分泌 LT-B-PSA 融合物。

實例 7 毒素-抗原融合物於革蘭氏陽性細菌中之表現及分泌

革蘭氏陽性及陰性細菌具有不同之分泌必要條件。革蘭氏陰性細菌擁有二層膜 , 因此 , 除了分泌訊號外之分泌機制對完全分泌而言是必須的。在革蘭氏陽性細菌方面 , 分泌訊號序列已足夠。

在此實例中係描述利用 p60 分泌訊號在李斯特菌中分泌破傷風類毒素 PSA 融合物的系統。

首先，利用 NsiI 分解載體 pUC18 (PS) actAOVATinIA (Loeffler, 等人, 2006)，接著，在適當條件下以 3'-5'核酸外切酶處理之。最後，藉瓊脂糖凝膠電泳法將片段純化。

同時，利用下列磷酸化引物將來自合適來源（如：*Clostridium tetanii* 菌株之基因組 DNA）之破傷風類毒素片段 C (GenBank 編號 M12739) 增數：

tetc for : 5'-TAAAAATCTGGATTGTTGGGTTG-3'，而下方劃線之額外鹼基係為了確保融合物之正確框構。

tetc rev : 5'-ATCATTTGTCCATCCTTCATCTG-3'。

利用下列磷酸化引物將來自本申請案所描述之質體 pMO BKDC 的 BRAF KD 片段增數：

br for : 5'-GATTGGGAGATTCCTGATG-3'

br rev : 5'-CCCGTGGACAGGAAACGCACC-3'。

利用合適之 PCR 純化套組將二種片段純化，接著，在合適條件下，以 DNA 連接酶將其連接在一起。連接後，利用合適之 PCR 純化套組將片段再度純化並利用 tetc for 及 br rev 引物增數。增數後，藉由瓊脂糖凝膠電泳法將所產生之 2280 bp 片段純化並連接入 pUC18 (PS) actAOVATinIA 之純化的 NsiI-3'-5'核酸外切酶片段中。連接並轉形入大腸桿菌後，選出帶有在框構內之片段的株落。接著，利用 PstI 及 SacI 切質體，利用凝膠電泳法將

2837 bp 片段純化並連接入經 PstI 和 SacI 適當分解且純化之載體 pSP118 中 (Loeffler, 等人, 2006)。將所產生之載體 pSP118-act-TetC-Braf*KD 轉形入帶有 trpS 缺失之李斯特菌株 (如：單核球增多性李斯特菌 $\delta trpS \delta aroA/B$) 中 (Loeffler, 等人, 2006)。在此設定中，該質體係經由以質體為基礎之 trpS (“平衡之致命系結”) 穩定而該質體係編碼噬菌體賴胺酸 (其導致該菌株之胞內溶解)。act-TetC-Braf*KD 盒主要在真核宿主細胞中在 actA 啟動子 (其有些胞內滲漏) 之控制下表現 (Loeffler, 等人, 2006)。表現盒之 actA 訊號序列導致 TetC-Braf*KD 融合蛋白質分泌。

實例 8 分泌毒素-抗原融合物之真核細胞

此實例中係建構一種分泌 CtxB-PSA 融合蛋白質之真核細胞株 (如：腫瘤細胞株)。為了達到此目的，使用全分泌訊號 (US 6,733,997)，原則上，此全分泌訊號可令對應之表現盒在不同來源之細胞 (包括哺乳動物細胞、酵母菌及原核細胞) 中分泌。

首先，利用下列引物將來自質體 pMO BKDC (本申請案) 之 CtxB-Braf*KD 融合物增數：

CB-for : 5'-

atcGGATCCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGC-3' (小寫字母：間隔子，下方劃線：BamHI 部位，大寫字母：CtxB5')

CB-rev : 5'-

tag GGATCC *TTAGTGGACAGGAAACGCACCATATCC*-3' (小寫字母：間隔子，下方劃線：BamHI 部位，*italic*：終止密碼子，大寫字母：BRaf*KD3')。

接著，利用合適之 PCR 純化套組將 PCR 產物純化，再接著以 BamHI 部分分解之（片段含有內 BamHI 部位）。經由瓊脂糖凝膠電泳法將部分分解之 1231 bp 片段分離出再接著連接入經 BamHI 分解及凝膠純化之質體 pVtgEGFP（美國專利申請案 6733997）中。接著，選出帶有框構內與 Vtgss 同向之株落，命名為 pVtgCtxBRAf。此質體可經由電穿孔法轉形入真核細胞株（此可經由 kan/neo 選擇盒選擇）。該細胞株可為已建立之細胞株（如：作為異源癌症疫苗之癌症細胞株）或自患者衍生之作為自體癌症疫苗的腫瘤細胞。

在任何情況中，由遺傳上融合至 CtxB-Braf*KD 之載體 pVtgEGFP 編碼的分泌訊號 Vtgss 將可使該融合蛋白質分泌出。

利用類似方法亦可在酵母菌中表現融合蛋白質。例如：證明 US 6,733,997 之第 11 圖中所描述之一種修改的選擇策略。首先，藉 EagI 及 Eco47III 切出如上述之來自質體 pVtgCtxBRAf 之含有 Vtgss-CtxB-Braf*KD 融合物的盒並插入載體 pBSPGK 中（US 6,733,997，第 11 圖）。接著，以 SacI 及 HindIII 分解所產生之載體並依類似於 US 6,733,997（第 11 圖）中所描述之方法將包含 PGK 成分及

Vtgss-CtxB-Braf*KD 融合物之片段整合入載體 pYEX-S1 的對應區中。所產生之質體可藉由電穿孔法轉形入酵母菌株（如：啤酒酵母）中。該酵母菌將表現及分泌該融合蛋白質且其可用於疫苗接種之目的中。

縮寫

ABC	ATP 結合盒
AIDA	涉及瀰漫性黏附之黏著素
APC	抗原-遞呈細胞
aroA	aroA 基因
AT	α 毒素
ATP	三磷酸腺苷
B-Raf KD	B-Raf 激酶結構區
BSA	牛血清白蛋白
CagA	幽門螺桿菌之主要疾病相關之毒性蛋白質

質

CPE	產氣莢膜芽胞梭菌腸毒
CpG	含有低甲基化之免疫刺激性 DNA 序列 (其包含 CpG 再現單位) 的 DNA 序列
CT/Ctx	霍亂毒素
CTB/CtxB	霍亂毒素次單位 B
CTL	細胞毒性 CD8 ⁺ T 細胞 (T 殺手細胞)
CMV	巨細胞病毒
DNA	去氧核糖核酸

ds	雙 股
DT/Dtx	白 喉 毒 素
E.coli	大 腸 桿 菌
EBV	伊 普 斯 坦 - 巴 爾 病 毒 (Ebstein Barr
virus)	
GM-1 受 體	單 唾 液 酸 神 經 節 甘 酯 受 體 1
HA	凝 血 素
HCV	C 型 肝 炎 病 毒
HIV	人 類 免 疫 缺 乏 症 病 毒
Hly	溶 血 素
HPV	人 類 乳 突 瘤 病 毒
HT	出 血 性 毒 素
i.d.	皮 內
i.m.	肌 肉 內
i.p.	腹 膜 內
IFN	干 擾 素
IgA	免 疫 球 蛋 白 同 型 A
IgG	免 疫 球 蛋 白 同 型 G
IL	介 白 素
KD	激 酶 失 效
LPS	脂 多 醣
LT	大 腸 桿 菌 熱 不 穩 定 性 腸 毒 素
LT	致 死 毒 素
LTB	大 腸 桿 菌 熱 不 穩 定 性 腸 毒 素 次 單 位 B

mAb	單株抗體
MHC	主要組織適應性複合體
NK細胞	天然殺手細胞
NKT細胞	天然殺手T細胞
PAGE	聚丙烯醯胺凝膠電泳法
PBS	磷酸鹽緩衝液
PCR	聚合酶鏈反應
PE	假單胞菌外毒素A
PSA	前列腺素特異性抗原
PT/Ptx	百日咳毒素
RNA	核糖核酸
s.c.	皮下
SDS	十二烷基硫酸鈉
Sec	一般分泌 (Sec) 途徑
ss	單股
ST	大腸桿菌熱穩定性腸毒素
ST/Stx	志賀毒素
STB/StxB	志賀毒素次單位B
T3SS	第Ⅲ型分泌系統
Tat	雙精胺酸轉位
TCA	三氯醋酸
Th1 (細胞)	發炎性CD4 ⁺ T細胞
Th2 (細胞)	輔助者CD4 ⁺ T細胞
TSST-1	中毒性休克症候羣毒素

TT	破傷風毒素
VT	佛羅 (Vero) 毒素

【圖式簡單說明】

第 1 圖描述大腸桿菌溶血素 A (hlyA) 分泌訊號之核苷酸序列 (5'→3')。NsiI 部位處下方劃線。

第 2 圖描述大腸桿菌溶血素第 I 型轉運系統之大腸桿菌溶血素 B (hlyB) 的核苷酸序列 (5'→3')。

第 3 圖描述大腸桿菌溶血素第 I 型轉運系統之大腸桿菌溶血素 D (hlyD) 的核苷酸序列 (5'→3')。

第 4 圖描述不帶有訊號肽之人類前列腺特異性抗原 (PSA)，編號 M26663 (現代人前列腺-特異性抗原 mRNA，完整 cds)，100-807 區 (對應肽：AA26-261) 的核苷酸序列 (5'→3')。

第 5 圖描述不帶有訊號肽，包含 204-494 區之霍亂毒素次單位 B (CtxB)，編號 K01170 (霍亂腸毒素次單位 A2 (γ) 之霍亂弧菌 toxA 及 toxB 基因) 的核苷酸序列 (5'→3')。

第 6 圖描述含有 V600E 突變之人類 B-raf 蛋白質 (BRAF) (編號 M95712 (B-raf 蛋白質 (BRAF) mRNA，完整編號序列)) 的 B-Raf 激酶結構區 (B-Raf KD) 之 1403-2359 區 (不含 1448-1477 區 (對應肽：AA448-766，不含 AA463-472)) 的核苷酸序列 (5'→3')。

第 7 圖描述人類 HLA B27 限制之 B-Raf V600E 抗原

決定部位的核苷酸序列 (5'→3')。

第 8 圖描述 CtxB-PSA-HlyA 之基因融合構造物的核苷酸序列 (5'→3')。

第 9 圖描述 CtxB-B-Raf V600E-HlyA 之基因融合構造物的核苷酸序列 (5'→3')。

第 10 圖描述 CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區 KD-HlyA 之基因融合構造物的核苷酸序列 (5'→3')。

第 11 圖描述在 pMKhly-PSA -CtxB 之不同菌種重組株中之 PSA-CtxB 融合蛋白質的功能表現及分泌。

第 12 圖描述在以不同之活疫苗載體免疫的小鼠中，用於測量 CD8⁺T-細胞及固有免疫系統 (NK 細胞) 反應之分泌 IFN- γ 的脾臟細胞。

第 13 圖描述以不同活疫苗載體進行免疫後反應之腫瘤體積減小情形。

第 14 圖描述在以不同之活疫苗 (其攜帶不同之免疫佐劑與 CtxB-OVA 融合構造物) 免疫化的小鼠中，用於測量 CD8⁺T-細胞及固有免疫系統 (NK 細胞) 反應之分泌 IFN- γ 的脾臟細胞。

第 15 圖描述在畜禽疫苗株中，禽流感紅血球凝集素 H1-CtxB 融合蛋白質之有效表現及功能性分泌作用，該獸醫疫苗株中包含 H5N1 紅血球凝集素 (HA1+HA2，稱為 HA12)，無跨膜區 (HA12c) 之完整序列。活減毒鼠傷寒血清型腸沙門氏菌 vacT (gyrA D87G) 及活減毒腸炎血清型腸沙門氏菌 vacE (菌株 Sm24/Rif12/Ssq) 二者均來自

LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO KG。

第 16 圖描述編碼 CtxB-HA12c-HlyA 融合蛋白質的核苷酸序列。

第 17 圖描述利用載體 pMBKDC 電穿孔入傷寒沙門氏菌 Ty21a 及其他菌株之融合蛋白質的表現及分泌情形：

A) 第 A1-A3 道：利用用於偵測之抗 B-Raf 抗體，根據 TP StMoBKDC 分析上清液。第 A1 道：傷寒沙門氏菌 Ty21a pMoBKDC，第 A2 道：傷寒沙門氏菌 Ty21a，第 A3 道：鼠傷寒沙門氏菌 aroA。Braf-V600E KD-CtxB 融合蛋白質係以上方箭頭標記且具有約 48kDa 之預期大小。蛋白質標記：Invitrogen BenchMark 預染蛋白梯 (Pre-Stained protein ladder)，#10748-010。

B) 如 A 中之同等分析，利用新製造之抗-HlyA 抗體作為偵測抗體。第 1、2 道：StMoPc 構造物，第 3 道：傷寒沙門氏菌 Ty21a MoBKDC，第 4 道：大腸桿菌 MoBKDC，第 5 道：傷寒沙門氏菌 Ty21a，第 6 道：鼠傷寒沙門氏菌 aroA。蛋白質標記：Invitrogen BenchMark 預染蛋白梯，#10748-010，目錄編號 1315592。

第 18 圖描述空載體 pMKhly1 之完整核苷酸序列 (5' → 3')。

文 獻

- Agren, L. C., Ekman, L., Lowenadler, B., Nedrud, J. G., and Lycke, N. Y. (1999). Adjuvanticity of the cholera toxin A1-based gene fusion protein, CTA1-DD, is critically dependent on the ADP-ribosyltransferase and Ig-binding activity. *J Immunol* 162, 2432-2440.
- Anderson, R. J., Pasetti, M. F., Sztein, M. B., Levine, M. M., and Noriega, F. R. (2000). DeltaguaBA attenuated *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1204 as a *Shigella* vaccine and as a live mucosal delivery system for fragment C of tetanus toxin. *Vaccine* 18, 2193-2202.
- 10 Austin, E. A., Graves, J. F., Hite, L. A., Parker, C. T., and Schnaitman, C. A. (1990). Genetic analysis of lipopolysaccharide core biosynthesis by *Escherichia coli* K-12: insertion mutagenesis of the *rfa* locus. *J Bacteriol* 172, 5312-5325.
- Balsalobre, C., Silvan, J. M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E., and Wai, S. N. (2006). Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 59, 99-112.
- 15 Barry, E. M., Gomez-Duarte, O., Chatfield, S., Rappuoli, R., Pizza, M., Losonsky, G., Galen, J., and Levine, M. M. (1996). Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908. *Infect Immun* 64, 4172-4181.
- 20 Becerra, J. C., Arthur, J. F., Landucci, G. R., Forthal, D. N., and Theuer, C. P. (2003). CD8+ T-cell mediated tumor protection by *Pseudomonas* exotoxin fused to ovalbumin in C57BL/6 mice. *Surgery* 133, 404-410.
- Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24, 175-208.
- 25 Boyd, A. P., Ross, P. J., Conroy, H., Mahon, N., Lavelle, E. C., and Mills, K. H. (2005). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death. *J Immunol* 175, 730-738.
- Brossier, F., Weber-Levy, M., Mock, M., and Sirard, J. C. (2000). Protective antigen-mediated antibody response against a heterologous protein produced in vivo by *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 68, 5731-5734.
- 30

- Bumann, D. (2001). Regulated antigen expression in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strongly affects colonization capabilities and specific CD4(+)-T-cell responses. *Infect Immun* 69, 7493-7500.
- Busby, S., and Ebright, R. H. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and
5 transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79, 743-746.
- Butterton, J. R., Beattie, D. T., Gardel, C. L., Carroll, P. A., Hyman, T., Killeen, K. P., Mekalanos, J. J., and Calderwood, S. B. (1995). Heterologous antigen expression in *Vibrio cholerae* vector strains. *Infect Immun* 63, 2689-2696.
- Byun, Y., Ohmura, M., Fujihashi, K., Yamamoto, S., McGhee, J. R., Udaka, S., Kiyono,
10 H., Takeda, Y., Kohsaka, T., and Yuki, Y. (2001). Nasal immunization with *E. coli* verotoxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. *Vaccine* 19, 2061-2070.
- Campos, J., Martinez, E., Marrero, K., Silva, Y., Rodriguez, B. L., Suzarte, E., Ledon, T., and Fando, R. (2003). Novel type of specialized transduction for CTX phi or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ phi in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*
15 185, 7231-7240.
- Cardenas, L., and Clements, J. D. (1992). Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. *Clin Microbiol Rev* 5, 328-342.
- Cardenas, L., and Clements, J. D. (1993). Development of mucosal protection against
20 the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector. *Infect Immun* 61, 4629-4636.
- Chabalgoity, J. A., Harrison, J. A., Esteves, A., Demarco de Hormaeche, R., Ehrlich, R., Khan, C. M., and Hormaeche, C. E. (1997). Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun* 65, 2402-2412.
25
- Chabalgoity, J. A., Khan, C. M., Nash, A. A., and Hormaeche, C. E. (1996). A *Salmonella typhimurium* htrA live vaccine expressing multiple copies of a peptide comprising amino acids 8-23 of herpes simplex virus glycoprotein D as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C protects mice from herpes simplex virus infection. *Mol Microbiol* 19,
30 791-801.

- Chabalgoity, J. A., Moreno, M., Carol, H., Dougan, G., and Hormaeche, C. E. (2000). *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine* 19, 460-469.
- 5 Chabalgoity, J. A., Villareal-Ramos, B., Khan, C. M., Chatfield, S. N., de Hormaeche, R. D., and Hormaeche, C. E. (1995). Influence of preimmunization with tetanus toxoid on immune responses to tetanus toxin fragment C-guest antigen fusions in a *Salmonella* vaccine carrier. *Infect Immun* 63, 2564-2569.
- 10 Chacon, M. R., Londono, P., Dougan, G., and Selkirk, M. E. (1996). Heterologous expression of the cuticular-glutathione peroxidase of lymphatic filariae in an attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* abrogates H-2 restriction of specific antibody responses. *Parasite Immunol* 18, 307-316.
- Chen, I., Finn, T. M., Yanqing, L., Guoming, Q., Rappuoli, R., and Pizza, M. (1998). A recombinant live attenuated strain of *Vibrio cholerae* induces immunity against tetanus toxin and *Bordetella pertussis* tracheal colonization factor. *Infect Immun* 66, 1648-1653.
- 15 Cheng-hua, S., Cheng, C., Jing-sheng, Z., Jiezhi, L., and Qing-jun, M. (1995). Gene fusion of cholera toxin B subunit and HBV PreS2 epitope and the antigenicity of fusion protein. *Vaccine* 13, 933-937.
- 20 Clemens, J., Savarino, S., Abu-Elyazeed, R., Safwat, M., Rao, M., Wierzba, T., Svennerholm, A. M., Holmgren, J., Frenck, R., Park, E., and Naficy, A. (2004). Development of pathogenicity-driven definitions of outcomes for a field trial of a killed oral vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli* in Egypt: application of an evidence-based method. *J Infect Dis* 189, 2299-2307.
- 25 Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6640-6645.
- Dietrich, G., Bubert, A., Gentschev, I., Sokolovic, Z., Simm, A., Catic, A., Kaufmann, S. H., Hess, J., Szalay, A. A., and Goebel, W. (1998). Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol* 16, 181-185.
- 30 Dietrich, G., Viret, JF, and Gentschev, I. (2003). Haemolysin A and listeriolysin - two vaccine delivery tools for the induction of cell-mediated immunity. *Int. J. Parasitol* 33, 495-505

- Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.
- Dunstan, S. J., Simmons, C. P., and Strugnell, R. A. (2003). In vitro and in vivo stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol* 37, 111-119.
- 5 Eriksson, A. M., Schon, K. M., and Lycke, N. Y. (2004). The cholera toxin-derived CTA1-DD vaccine adjuvant administered intranasally does not cause inflammation or accumulate in the nervous tissues. *J Immunol* 173, 3310-3319.
- Fath, M. J., Skvirsky, R. C., and Kolter, R. (1991). Functional complementation between bacterial MDR-like export systems: colicin V, alpha-hemolysin, and *Erwinia* protease. *J Bacteriol* 173, 7549-7556.
- 10 Fensterle, J., Grode, L., Hess, J., and Kaufmann, S. H. E. (1999). Effective DNA vaccination against listeriosis by prime/boost inoculation with the gene gun. *J Immunol* 163, 4510-4518.
- 15 Fensterle, J., Schwartz, V., Riedmiller, H., and Rapp, U. R. (2005). Animal models for DNA vaccination against prostate cancer using PSA encoding plasmids. *Onkologie* 28 (suppl 2), 52.
- Freytag, L. C., and Clements, J. D. (1999). Bacterial toxins as mucosal adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol* 236, 215-236.
- 20 Freytag, L. C., and Clements, J. D. (2005). Mucosal adjuvants. *Vaccine* 23, 1804-1813.
- Garmory, H. S., Brown, K. A., and Titball, R. W. (2002). *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 26, 339-353.
- Garmory, H. S., Titball, R. W., Griffin, K. F., Hahn, U., Bohm, R., and Beyer, W. (2003). *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. *Infect Immun* 71, 3831-3836.
- 25 Gentschev, I., Dietrich, G., and Goebel, W. (2002a). The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* 10, 39-45.
- Gentschev, I., Dietrich, G., Spreng, S., Pilgrim, S., Stritzker, J., Kolb-Maurer, A., and Goebel, W. (2002b). Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. *Int J Med Microbiol* 291, 577-582.
- 30

- Gentschev, I., Fensterle, J., Schmidt, A., Potapenko, T., Troppmair, J., Goebel, W., and Rapp, U. R. (2005). Use of a recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice. *BMC Cancer* 5, 15.
- 5 Gentschev, I., Mollenkopf, H., Sokolovic, Z., Hess, J., Kaufmann, S. H., and Goebel, W. (1996). Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. *Gene* 179, 133-140.
- Gentschev, I., Dietrich, G., Spreng, S., Neuhaus, B., Maier, E., Benz, R., Goebel, W., Fensterle, J., and Rapp, UR. (2004). Use of the alpha-hemolysin secretion system of
- 10 *Escherichia coli* for antigen delivery in the *Salmonella typhi* Ty21a vaccine strain. *Int J Med Microbiol* 294, 363-371.
- Gomez-Duarte, O. G., Galen, J., Chatfield, S. N., Rappuoli, R., Eidels, L., and Levine, M. M. (1995). Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain. *Vaccine* 13,
- 15 1596-1602.
- Hajishengallis, G., Harokopakis, E., Hollingshead, S. K., Russell, M. W., and Michalek, S. M. (1996). Construction and oral immunogenicity of a *Salmonella typhimurium* strain expressing a streptococcal adhesin linked to the A2/B subunits of cholera toxin. *Vaccine* 14, 1545-1548.
- 20 Hajishengallis, G., Nawar, H., Tapping, R. I., Russell, M. W., and Connell, T. D. (2004). The Type II heat-labile enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and their respective B pentamers differentially induce and regulate cytokine production in human monocytic cells. *Infect Immun* 72, 6351-6358.
- Harokopakis, E., Hajishengallis, G., Greenway, T. E., Russell, M. W., and Michalek, S. M. (1997). Mucosal immunogenicity of a recombinant *Salmonella typhimurium*-cloned heterologous antigen in the absence or presence of coexpressed cholera toxin A2 and B subunits. *Infect Immun* 65, 1445-1454.
- Hess, J., Gentschev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W., and Kaufmann, S. H. (1996). Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant
- 30 *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1458-1463.
- Holmgren, J., Adamsson, J., Anjuere, F., Clemens, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., Flach, C. F., George-Chandy, A., Harandi, A. M., Lebens, M., et al. (2005). Mucosal

- adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett* 97, 181-188.
- Holmgren, J., and Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11, S45-53.
- 5 Holmgren, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., and Mharandi, A. (2003). Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 21 Suppl 2, S89-95.
- Hormozi, K., Parton, R., and Coote, J. (1999). Adjuvant and protective properties of native and recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin preparations in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 23, 273-282.
- 10 Huang, Y., Hajishengallis, G., and Michalek, S. M. (2000). Construction and characterization of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus mutans* under control of the anaerobically inducible *nirB* promoter. *Infect Immun* 68, 1549-1556.
- 15 Hunt, P. D., and Hardy, S. J. (1991). Heat-labile enterotoxin can be released from *Escherichia coli* cells by host intestinal factors. *Infect Immun* 59, 168-171.
- Jackson, R. J., Marinaro, M., VanCott, J. L., Yamamoto, M., Okahashi, N., Fujihashi, K., Kiyono, H., Chatfield, S. N., and McGhee, J. R. (1996). Mucosal immunity: regulation by helper T cells and a novel method for detection. *J Biotechnol* 44, 209-216.
- 20 Jagusztyn-Krynicka, E. K., Clark-Curtiss, J. E., and Curtiss, R., 3rd (1993). *Escherichia coli* heat-labile toxin subunit B fusions with *Streptococcus sobrinus* antigens expressed by *Salmonella typhimurium* oral vaccine strains: importance of the linker for antigenicity and biological activities of the hybrid proteins. *Infect Immun* 61, 1004-1015.
- Khan, C. M., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R. J., Demarco de Hormaeche, R., McNeill, H., Ali, T., Chatfield, S., Capron, A., Dougan, G., and Hormaeche, C. E. (1994a). Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the *Schistosoma mansoni* peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in a live *aro*-attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *J Immunol* 153, 5634-5642.
- 25 Khan, C. M., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R. J., Riveau, G., Demarco de Hormaeche, R., McNeill, H., Ali, T., Fairweather, N., Chatfield, S., Capron, A., and et al. (1994b). Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glu-
- 30

- tathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of Salmonella. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11261-11265.
- Konieczny, M. P., Suhr, M., Noll, A., Autenrieth, I. B., and Alexander Schmidt, M. (2000). Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27, 321-332.
- Koprowski, H., 2nd, Levine, M. M., Anderson, R. J., Losonsky, G., Pizza, M., and Barry, E. M. (2000). Attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain CVD 1204 expressing colonization factor antigen I and mutant heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 68, 4884-4892.
- Kweon, M. N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., Van Ginkel, F. W., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., et al. (2002). A nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE antibodies. *J Infect Dis* 186, 1261-1269.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lahiri, S. S. (2000). Bacterial toxins--an overview. *J Nat Toxins* 9, 381-408.
- Lavelle, E. C., McGuirk, P., and Mills, K. H. (2004). Molecules of infectious agents as immunomodulatory drugs. *Curr Top Med Chem* 4, 499-508.
- Lee, J. J., Sinha, K. A., Harrison, J. A., de Hormaeche, R. D., Riveau, G., Pierce, R. J., Capron, A., Wilson, R. A., and Khan, C. M. (2000). Tetanus toxin fragment C expressed in live *Salmonella* vaccines enhances antibody responses to its fusion partner *Schistosoma haematobium* glutathione S-transferase. *Infect Immun* 68, 2503-2512.
- Loeffler, D. I., Schoen, C. U., Goebel, W., and Pilgrim, S. (2006). Comparison of different live vaccine strategies in vivo for delivery of protein antigen or antigen-encoding DNA and mRNA by virulence-attenuated *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 74, 3946-3957.
- Loessner, M. J., Wendlinger, G., and Scherer, S. (1995). Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol Microbiol* 16, 1231-1241.

- Lycke, N. (2005). From toxin to adjuvant: basic mechanisms for the control of mucosal IgA immunity and tolerance. *Immunol Lett* 97, 193-198.
- Lycke, N., Tsuji, T., and Holmgren, J. (1992). The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur J Immunol* 22, 2277-2281.
- McSorley, S. J., Rask, C., Pichot, R., Julia, V., Czerkinsky, C., and Glaichenhaus, N. (1998). Selective tolerization of Th1-like cells after nasal administration of a cholera toxoid-LACK conjugate. *Eur J Immunol* 28, 424-432.
- Mendelson, I., Gat, O., Aloni-Grinstein, R., Altboum, Z., Inbar, I., Kronman, C., Bar-Haim, E., Cohen, S., Velan, B., and Shafferman, A. (2005). Efficacious, nontoxigenic *Bacillus anthracis* spore vaccines based on strains expressing mutant variants of lethal toxin components. *Vaccine* 23, 5688-5697.
- Mesnage, S., Weber-Levy, M., Haustant, M., Mock, M., and Fouet, A. (1999). Cell surface-exposed tetanus toxin fragment C produced by recombinant *Bacillus anthracis* protects against tetanus toxin. *Infect Immun* 67, 4847-4850.
- Michalkiewicz, J., Stachowski, J., Barth, C., Patzer, J., Dzierzanowska, D., and Madalinski, K. (1999). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on IFN-gamma synthesis: expression of costimulatory molecules on monocytes and activity of NK cells. *Immunol Lett* 69, 359-366.
- Michl, P., and Gress, T. M. (2004). Bacteria and bacterial toxins as therapeutic agents for solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 689-702.
- Morona, R., Manning, P. A., and Reeves, P. (1983). Identification and characterization of the TolC protein, an outer membrane protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 153, 693-699.
- Muhlen, K. A., Schumann, J., Wittke, F., Stenger, S., Van Rooijen, N., Van Kaer, L., and Tiegs, G. (2004). NK cells, but not NKT cells, are involved in *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced hepatotoxicity in mice. *J Immunol* 172, 3034-3041.
- Mutsch, M., Zhou, W., Rhodes, P., Bopp, M., Chen, R. T., Linder, T., Spyr, C., and Steffen, R. (2004). Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 350, 896-903.

- Orr, N., Galen, J. E., and Levine, M. M. (1999). Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM(197), and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-htrA. *Infect Immun* 67, 4290-4294.
- 5 Poggi, A., Spada, F., Costa, P., Tomasello, E., Revello, V., Pella, N., Zocchi, M. R., and Moretta, L. (1996). Dissection of lymphocyte function-associated antigen 1-dependent adhesion and signal transduction in human natural killer cells shown by the use of cholera or pertussis toxin. *Eur J Immunol* 26, 967-975.
- Pogonka, T., Klotz, C., Kovacs, F., and Lucius, R. (2003). A single dose of recombinant *Salmonella typhimurium* induces specific humoral immune responses against heterologous *Eimeria tenella* antigens in chicken. *Int J Parasitol* 33, 81-88.
- 10 Ramirez, R., Carracedo, J., Zamzami, N., Castedo, M., and Kroemer, G. (1994). Pertussis toxin inhibits activation-induced cell death of human thymocytes, pre-B leukemia cells and monocytes. *J Exp Med* 180, 1147-1152.
- Ranallo, R. T., Fonseka, C. P., Cassels, F., Srinivasan, J., and Venkatesan, M. M. (2005). Construction and characterization of bivalent *Shigella flexneri* 2a vaccine strains SC608(pCFAI) and SC608(pCFAI/LTB) that express antigens from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 73, 258-267.
- 15 Reveneau, N., Geoffroy, M. C., Loch, C., Chagnaud, P., and Mercenier, A. (2002). Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* 20, 1769-1777.
- 20 Roland, K. L., Tinge, S. A., Killeen, K. P., and Kochi, S. K. (2005). Recent advances in the development of live, attenuated bacterial vectors. *Curr Opin Mol Ther* 7, 62-72.
- Rosenberg, S. A. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-384.
- 25 Ryan, E. T., Butterton, J. R., Smith, R. N., Carroll, P. A., Crean, T. I., and Calderwood, S. B. (1997a). Protective immunity against *Clostridium difficile* toxin A induced by oral immunization with a live, attenuated *Vibrio cholerae* vector strain. *Infect Immun* 65, 2941-2949.
- 30 Ryan, E. T., Butterton, J. R., Zhang, T., Baker, M. A., Stanley, S. L., Jr., and Calderwood, S. B. (1997b). Oral immunization with attenuated vaccine strains of *Vibrio cholerae* expressing a dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamoeba histolytica* pro-

- tein fused to the cholera toxin B subunit induces systemic and mucosal antiamebic and anti-V. cholerae antibody responses in mice. *Infect Immun* 65, 3118-3125.
- Sanchez, J., Wallerstrom, G., Fredriksson, M., Angstrom, J., and Holmgren, J. (2002). Detoxification of cholera toxin without removal of its immunoadjuvanticity by the addition of (STa-related) peptides to the catalytic subunit. A potential new strategy to generate immunostimulants for vaccination. *J Biol Chem* 277, 33369-33377.
- 5 Sanchez, AE., Aquino, G., Ostoa-Saloma, P., Laclette, JP., and Rocha-Zavaleta, L. (2004). Cholera toxin B-subunit gene enhances mucosal Immunoglobulin A, Th1-type and CD8+ cytotoxic responses when co-administered intradermally with a DNA vaccine. *Clinic Diagnost Laborat Immun* 11, 711-719.
- 10 Schmid-Grendelmeier, P., and Cramer, R. (2001). Recombinant allergens for skin testing. *Int Arch Allergy Immunol* 125, 96-111.
- Schodel, F., Enders, G., Jung, M. C., and Will, H. (1990). Recognition of a hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope expressed as a fusion protein with the subunit B of Escherichia coli heat labile enterotoxin in attenuated salmonellae. *Vaccine* 8, 569-572.
- 15 Shaw, C. A., and Starnbach, M. N. (2003). Using Modified Bacterial Toxins to Deliver Vaccine Antigens. *ASM News* 69, 384-389.
- Silva, A. J., Mohan, A., and Benitez, J. A. (2003). Cholera vaccine candidate 638: intranasal immunogenicity and expression of a foreign antigen from the pulmonary pathogen Coccidioides immitis. *Vaccine* 21, 4715-4721.
- 20 Smerdou, C., Anton, I. M., Plana, J., Curtiss, R., 3rd, and Enjuanes, L. (1996). A continuous epitope from transmissible gastroenteritis virus S protein fused to E. coli heat-labile toxin B subunit expressed by attenuated Salmonella induces serum and secretory immunity. *Virus Res* 41, 1-9.
- 25 Somner, E. A., Ogun, S. A., Sinha, K. A., Spencer Valero, L. M., Lee, J. J., Harrison, J. A., Holder, A. A., Hormaeche, C. E., and Khan, C. M. (1999). Expression of disulphide-bridge-dependent conformational epitopes and immunogenicity of the carboxy-terminal 19 kDa domain of Plasmodium yoelii merozoite surface protein-1 in live attenuated Salmonella vaccine strains. *Microbiology* 145 (Pt 1), 221-229.
- 30 Sory, M. P., and Cornelis, G. R. (1990). Delivery of the cholera toxin B subunit by using a recombinant Yersinia enterocolitica strain as a live oral carrier. *Res Microbiol* 141, 921-929.

- Spangrude, G. J., Sacchi, F., Hill, H. R., Van Epps, D. E., and Daynes, R. A. (1985). Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol* 135, 4135-4143.
- Su, G. F., Brahmbhatt, H. N., de Lorenzo, V., Wehland, J., and Timmis, K. N. (1992).
5 Extracellular export of Shiga toxin B-subunit/haemolysin A (C-terminus) fusion protein expressed in *Salmonella typhimurium* aroA-mutant and stimulation of B-subunit specific antibody responses in mice. *Microb Pathog* 13, 465-476.
- Thungapathra, M., Sharma, C., Gupta, N., Ghosh, R. K., Mukhopadhyay, A., Koley, H., Nair, G. B., and Ghosh, A. (1999). Construction of a recombinant live oral vaccine from
10 a non-toxigenic strain of *Vibrio cholerae* O1 serotype inaba biotype E1 Tor and assessment of its reactogenicity and immunogenicity in the rabbit model. *Immunol Lett* 68, 219-227.
- Todar, K. (2002). Mechanism of bacterial pathogenicity: protein toxins. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*.: <http://textbookofbacteriology.net/proteintoxins.html>.
- 15 Tzschaschel, B. D., Guzman, C. A., Timmis, K. N., and de Lorenzo, V. (1996a). An *Escherichia coli* hemolysin transport system-based vector for the export of polypeptides: export of Shiga-like toxin IIeB subunit by *Salmonella typhimurium* aroA. *Nat Biotechnol* 14, 765-769.
- Tzschaschel, B. D., Klee, S. R., de Lorenzo, V., Timmis, K. N., and Guzman, C. A.
20 (1996b). Towards a vaccine candidate against *Shigella dysenteriae* 1: expression of the Shiga toxin B-subunit in an attenuated *Shigella flexneri* aroD carrier strain. *Microb Pathog* 21, 277-288.
- van Ginkel, F. W., Jackson, R. J., Yuki, Y., and McGhee, J. R. (2000). Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J*
25 *Immunol* 165, 4778-4782.
- Vertiev, Y. V., Zdanovsky, A. G., Shevelev, A. B., Borinskaya, S. A., Gening, E. L., Martin, T., Ivanov, P. A., and Yankovsky, N. K. (2001). Recombinant *Listeria* strains producing the nontoxic L-chain of botulinum neurotoxin A in a soluble form. *Res Microbiol* 152, 563-567.
- 30 Walker, M. J., Rohde, M., Timmis, K. N., and Guzman, C. A. (1992). Specific lung mucosal and systemic immune responses after oral immunization of mice with *Salmonella typhimurium* aroA, *Salmonella typhi* Ty21a, and invasive *Escherichia coli* expressing recombinant pertussis toxin S1 subunit. *Infect Immun* 60, 4260-4268.

- Ward, S. J., Douce, G., Figueiredo, D., Dougan, G., and Wren, B. W. (1999). Immunogenicity of a *Salmonella typhimurium* aroA aroD vaccine expressing a nontoxic domain of *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun* 67, 2145-2152.
- Wiener, M. C. (2000). Bacterial export takes its Tol. *Structure* 8, R171-175.
- 5 Wu, S., Beier, M., Sztein, M. B., Galen, J., Pickett, T., Holder, A. A., Gomez-Duarte, O. G., and Levine, M. M. (2000). Construction and immunogenicity in mice of attenuated *Salmonella typhi* expressing *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1) fused to tetanus toxin fragment C. *J Biotechnol* 83, 125-135.
- Zheng, J. P., Zhang, Z. S., Li, S. Q., Liu, X. X., Yuan, S. L., Wang, P., Zhan, D. W.,
10 Wang, L. C., and Huang, C. F. (2005). Construction of a novel *Shigella* live-vector strain co-expressing CS3 and LTB/STm of enterotoxigenic *E. coli*. *World J Gastroenterol* 11, 3411-3418.
- Zhu, C., Ruiz-Perez, F., Yang, Z., Mao, Y., Hackethal, V. L., Greco, K. M., Choy, W., Davis, K., Butters, J. R., and Boedeker, E. C. (2006). Delivery of heterologous protein
15 antigens via hemolysin or autotransporter systems by an attenuated *ler* mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vaccine* 24, 3821-3831.

序列表

<110> Zentaris GmbH

<120> 作為編碼抗原和蛋白質毒素之核苷酸序列的
5 載體之微生物,製造彼之方法及彼之用途

<130> 06/02 Z

<160> 40

<170> PatentIn 第 3.3 版

10

<210> 1

<211> 61

<212> DNA

<213> 人工

15 <220>

<223> 人工 DNA 序列

<400> 1

gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt ggtgtaggct ggagctgctt 60

c 61

20

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工

25 <220>

<223> 人工 DNA 序列

<400> 2

gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccatatgaat atcctcctta 60

	<210>	3	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
5	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	3	
		gattggtgat gcatccctca t	21
10	<210>	4	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
15	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	4	
		ggtgctcatg cattggccac g	21
	<210>	5	
20	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
25	<400>	5	
		aaaaaagtcg acggctgtgc aggtcgtaaa tcactgc	37

	<210>	6	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
5	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	6	
	aaaaaagcgg ccgcgaaatt gttatccgct cacaattcc		39
10	<210>	7	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
15	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	7	
	aaaaaagcgg ccgctaagga tgaattatga ttaaattaaa atttgg		46
20	<210>	8	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
25	<400>	8	
	tttatagtcg acttaatttg ccataactaat tgcggcaatc gc		42

	<210>	9	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
5	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	9	
		gcatatgcac atgcatcacc tcaaaatatt actgat	36
10	<210>	10	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
15	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	10	
		ggcttttttta tatcttatgc atgcccgggc attgcggcaa tcgc	44
	<210>	11	
20	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
25	<400>	11	
		gtgggaggct gggagtgc	18

	<210>	12	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
5	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	12	
	ggggttggcc	acgatggt	18
10	<210>	13	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
15	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	13	
	catgtatgca	ttagccatgg	tatacctgg
			29
	<210>	14	
20	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
25	<400>	14	
	ttttttatgc	ataaggga	aa caccacatct gcc
			33

	<210>	15	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
5	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	15	
	gccatcatgt	cagctcta	18
10	<210>	16	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
15	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	16	
	aggggaaaca	catctgcc	18
20	<210>	17	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
25	<400>	17	
	atctgtcaaa	tggagaaa	18

	<210>	18	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
5	<220>		
	<223>	人工DNA 序列	
	<400>	18	
	tactccactt atttcctctc t		21
10	<210>	19	
	<211>	87	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
15	<223>	人工DNA 序列	
	<400>	19	
	ctgaattcat gaaaatatca tcattttattt ctacatcact gcccctgccg gcatcagtgt		60
	caaataaagt aaaatgttat gttttat		87
20	<210>	20	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
25	<223>	人工DNA 序列	
	<400>	20	
	gttttccata ctgattgccg caattgaatt gg		32

	<210>	21	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
5	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	21	
		gtgggaggct gggagtgcga g	21
10	<210>	22	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
15	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	22	
		cctgaattct tagacgtgat accttgaagc ac	32
	<210>	23	
20	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
25	<400>	23	
		taaaaatctg gattgttggg ttg	23

	<210>	24	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
5	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	24	
	atcatttgtc catccttcat ctg		23
10	<210>	25	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
15	<223>	人工 DNA 序列	
	<400>	25	
	gattgggaga ttctgatg		19
20	<210>	26	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工 DNA 序列	
25	<400>	26	
	cccgtggaca ggaaacgcac c		21

	<210>	27	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
5	<220>		
	<223>	人工DNA序列	
	<400>	27	
	atcggatcct caaaatatta ctgatttggtg tgc		33
10	<210>	28	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
15	<223>	人工DNA序列	
	<400>	28	
	tagggatcct tagtggacag gaaacgcacc atatcc		36
	<210>	29	
20	<211>	285	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工DNA序列	
25	<400>	29	
	atgccaaaca taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct		60
	gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg cattagccta tggaagtcag		120
	ggtgatctta atccattaat taatgaaatc agcaaaatca tttcagctgc aggtagcttc		180
	gatgttaaag aggaaagaac tgcagcttct ttattgcagt tgtccggtaa tgccagtgat		240

ttttcatatg gacggaactc aataaccctg accacatcag cataa 285

<210> 30

<211> 2124

5 <212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工DNA 序列

<400> 30

10 atggattcctt gtcataaaat tgattatggg ttatacgccc tggagatttt agcccaatac 60
cataacgtct ctgttaaccc ggaagaaatt aaacatagat ttgatacaga cgggacaggt 120
ctgggattaa cgtcatgggt gcttgctgcg aaatcttttag aactaaaggt aaaacaggta 180
aaaaaaacaa ttgatcgatt aaactttatt tttctgcccg cattagtctg gagagaggat 240
ggacgtcatt ttattctgac taaaatcagc aaagaagtaa acagatatct tatttttgat 300
15 ttggagcagc gaaatccccg tgttctcgaa cagtctgagt ttgaggcggt atatcagggg 360
catattattc ttattacttc ccgttcttct gttaccggga aactggcaaa atttgacttt 420
acctggttta ttctgccat tataaaatac aggagaatat ttattgaaac ccttggtgta 480
tctgtttttt tacaattatt tgcattaata accccccttt tttttcaggt ggttatggac 540
aaagtattag tgcacagggg gttttcaacc cttaatgtta ttactgttgc cttatctggt 600
20 gtagtggtgt ttgagattat actcagcggg ttaagaactt acatttttgc acatagtaca 660
agtcggattg atgttgagtt gggtgccaaa ctcttcgggc atttactggc gctaccgatac 720
tcttattttg agagtcgctg tggttggtgat actgttgcca gggtaagaga attagaccag 780
atccgtaatt ttctgacagg acaggcatta acatctgttt tggacttatt attttcactc 840
atattttttg cggtaatgtg gtattacagc ccaaagctta ctctgggtgat cttatttttcg 900
25 ctgccttggt atgctgcatg gtctgttttt attagcccca ttttgcgacg tcgccttgat 960
gataagtttt cacggaatgc ggataatcaa tctttcctgg tggaatcagt aacggcgatt 1020
aacactataa aagctatggc agtctcacct cagatgacga acatatggga caaacaattg 1080
gcaggatatg ttgctgcagg ctttaaagtg acagtattag caaccattgg tcaacaagga 1140
atacagttaa taaaaagac tgttatgatc atcaacctat ggttgggagc acacctgggt 1200

atttccgggg atttaagtat tggtcagtta attgctttta atatgcttgc tggtcagatt 1260
gttgaccggt ttattcgctt tgcacaaatc tggcaggatt tccagcaggt tggatatatca 1320
gttaccgccc ttggtgatgt gcttaactct ccaactgaaa gttatcatgg gaaactgaca 1380
ttgccggaaa ttaatggtga tatcactttt cgtaatatcc ggtttcgcta taaacctgat 1440
5 tctccgggta ttttggacaa tatcaatctt agtattaagc agggggaggt tattggtatt 1500
gtcggacgtt ctggttcagg aaaaagcaca ttaactaaat taattcaacg tttttatatt 1560
cctgaaaatg gccaggtatt aattgatgga catgatcttg cgttggccga tcctaactgg 1620
ttacgtcgtc aggtgggggt tgtgttgagc gacaatgtgc tgcttaatcg cagtattatt 1680
gataatattt cactggctaa tcctggcatg tccgtcgaaa aagttattta tgcagcgaaa 1740
10 ttagcaggtg ctcattgattt ttttctgaa ttgcgtgagg ggtataacac cattgtcggg 1800
gaacaggggg caggattatc cggaggtcaa cgtcaacgca tcgcaattgc aagggcgctg 1860
gtgaacaacc ctaaaatact catttttgat gaagcaacca gtgctctgga ttatgagtcg 1920
gagcatgtca tcatgcgcaa tatgcacaaa atatgtaagg gcagaacggt tataatcatt 1980
gctcatcgtc tgtctacagt aaaaaatgca gaccgcatta ttgtcatgga aaaagggaaa 2040
15 attggtgaac agggtaaaca taaggagctg ctttctgaac cggaaagttt atacagttac 2100
ttatatcagt tacagtcaga ctaa 2124

<210> 31
<211> 1437
20 <212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 人工DNA序列
<400> 31

25 atgaaaacat ggttaatggg gttcagcgag ttctgttgc gctataaact tgtctggagt 60
gaaacatgga aaatccggaa gcaattagat actccgttac gtgaaaagga cgaaaatgaa 120
ttcttaccog ctcattctgga attaatgaa acgccagtat ccagacggcc gcgtctgggt 180
gcttatttta ttatgggggt tctgggtatt gcttttattt tatctgtttt aggccaagtg 240
gaaattgttg cactgcaaa tgggaaatta acacacagtg ggcgtagtaa agaaattaaa 300

```

cctattgaaa actcaatagt taaagaaatt atcgtaaaag aaggagagtc agtccggaaa 360
ggggatgtgt tattaaagct tacagcactg ggagctgaag ctgatacggt aaaaacacag 420
tcacactgtg tacaggccag gctggaacaa actcggtatc aaattctgag cagggtcaatt 480
gaattaaata aactacctga actaaagctt cctgatgagc cttattttca gaatgtatct 540
5 gaagaggaag tactgcgttt aacttctttg ataaaaagaac agttttccac atggcaaaat 600
cagaagtatc aaaaagaact gaatttggat aagaaaagag cagagcgatt aacagtactt 660
gcccgataaa accgttatga aaattttatca aggggtgaaa aaagccgtct ggatgatttc 720
agtagtttat tgcataaaca ggcaattgca aaacatgctg tacttgagca ggagaataaa 780
tatgtcgaag cagtaaatga attacgagtt tataaatcac aactggagca aattgagagt 840
10 gagatattgt ctgcaaaaga agaatatcag cttgttacgc agctttttta aaatgaaatt 900
ttagataagc taagacaaac cacagacaac attgggttat taactctgga attagcgaaa 960
aatgaagagc gtcaacaggc ttcagtaatc agggccccag tttcggtaaa agttcagcaa 1020
ctgaagggtc atactgaagg tggggttggt acaacagcgg aaacactgat ggatcatcgt 1080
ccggaagatg acacgctgga ggttactgct ctggtacaaa ataaagatat tggttttatt 1140
15 aacgtcgggc agaatgccat cattaaagtg gaggcatttc cttatacacg atatgggttat 1200
ctggtgggta aggtgaaaaa tataaattta gatgcaatag aagaccagag actgggactt 1260
gtttttaatg ttattatttc tattgaagag aattgtttgt caaccggaaa taaaaacatt 1320
ccattaagct cgggtatggc agtcactgca gaaataaaga caggatatgcg aagtgtaatc 1380
agttatcttc ttagtccttt agaagagtca gtaacagaaa gtttacgtga gcgttaa 1437

```

20

<210> 32

<211> 708

<212> DNA

<213> 人工

25 <220>

<223> 人工DNA序列

<400> 32

```

gtgggaggct gggagtgcga gaagcattcc caaccctggc aggtgcttgt ggcctctcgt 60
ggcagggcag tctgcggcgg tggtctggtg caccgccagt gggctctcac agctgccac 120

```

tgcatcagga acaaaagcgt gatcttgctg ggtcggcaca gcctgtttca tcctgaagac 180
acaggccagg tatttcaggt cagccacagc ttcccacacc cgctctacga tatgagcctc 240
ctgaagaatc gattcctcag gccaggtgat gactccagcc acgacctcat gctgctccgc 300
ctgtcagagc ctgccgagct cacggatgct gtgaagggtca tggacctgcc caccaggag 360
5 ccagcactgg ggaccacctg ctacgcctca ggctggggca gcattgaacc agaggagttc 420
ttgaccccaa agaaacttca gtgtgtggac ctccatgtta tttccaatga cgtgtgtgcg 480
caagttcacc ctcagaaggt gaccaagtgc atgctgtgtg ctggacgctg gacagggggc 540
aaaagcacct gctcgggtga ttctgggggc ccacttgtct gtaatgggtg gcttcaaggt 600
atcacgtcat ggggcagtga accatgtgcc ctgccgaaa ggccctccct gtacaccaag 660
10 gtggtgcatt accggaagtg gatcaaggac accatcgtgg ccaacccc 708

<210> 33
<211> 291
<212> DNA
15 <213> 人工
<220>
<223> 人工DNA 序列
<400> 33

cctcaaaata ttactgattt gtgtgcagaa taccacaaca cacaaatata tacgctaaat 60
20 gataagatat ttctgtatac agaatctcta gctggaaaaa gagagatggc tatcattact 120
tttaagaatg gtgcaatddd tcaagtagaa gtaccaggta gtcaacatat agattcacia 180
aaaaaagcga ttgaaaggat gaaggatacc ctgaggattg catatcttac tgaagctaaa 240
gtcgaaaagt tatgtgtatg gaataataaa acgcctcatg cgattgccgc a 291

25 <210> 34
<211> 927
<212> DNA
<213> 人工
<220>

<223> 人工 DNA 序列

<400> 34

gatgattggg agattcctga tgggcagatt acagtgggac aaagaaaggg aaagtggcat 60
 ggtgatgtgg cagtgaaaat gttgaatgtg acagcaccta cacctcagca gttacaagcc 120
 5 ttcaaaaatg aagtaggagt actcaggaaa acacgacatg tgaatatcct actcttcatg 180
 ggctattcca caaagccaca actggctatt gttaccaggt ggtgtgaggg ctccagcttg 240
 tatcaccatc tccatatcat tgagacaaaa tttgagatga tcaaacttat agatattgca 300
 cgacagactg cacagggcat ggattactta cacgccaagt caatcatcca cagagacctc 360
 aagagtaata atatatttct tcatgaagac ctcacagtaa aaataggtga ttttggctca 420
 10 gctacagaga aatctcgatg gagtgggtcc catcagtttg aacagttgtc tggatccatt 480
 ttgtggatgg caccagaagt catcagaatg caagataaaa atccatacag ctttcagtca 540
 gatgtatatg catttgggat tgttctgtat gaattgatga ctggacagtt accttattca 600
 aacatcaaca acagggacca gataattttt atgggtgggac gaggatacct gtctccagat 660
 ctcagtaagg tacggagtaa ctgtccaaaa gccatgaaga gattaatggc agagtgcctc 720
 15 aaaaagaaaa gagatgagag accactcttt ccccaaattc tcgcctctat tgagctgctg 780
 gcccgctcat tgccaaaaat tcaccgcagt gcatcagaac cctccttgaa tcgggctggt 840
 ttccaaacag aggattttag tctatatgct tgtgcttctc caaaaacacc catccaggca 900
 gggggatatg gtgcgtttcc tgtccac 927

20 <210> 35

<211> 92

<212> DNA

<213> 人工

<220>

25 <223> 人工 DNA 序列

<400> 35

cgatttttggc ctggcgaccg aaaaagcggg cgatttttggc ctggcgaccg aaaaagcggg 60
 cgatttttggc ctggcgaccg aaaaagcggg gc 92

```

<210> 36
<211> 1302
<212> DNA
<213> 人工
5 <220>
<223> 人工 DNA 序列
<400> 36

atgccaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct 60
gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact 120
10 gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atatatacgc taaatgataa gatatttttcg 180
tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatggtgca 240
atttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa 300
aggatgaagg ataccctgag gattgcatat cttactgaag ctaaagtcga aaagtatatgt 360
gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc ccgtgggagg ctgggagtg 420
15 gagaagcatt cccaaccctg gcaggtgctt gtggcctctc gtggcagggc agtctgcggc 480
ggtgttctgg tgcaccccca gtgggtcctc acagctgcc actgcatcag gaacaaaagc 540
gtgatcttgc tgggtcggca cagcctgttt catcctgaag acacaggcca ggtatttcag 600
gtcagccaca gcttcccaca cccgctctac gatatgagcc tcctgaagaa tcgattcctc 660
aggccagggtg atgactccag ccacgacctc atgctgctcc gcctgtcaga gcctgccgag 720
20 ctacaggatg ctgtgaaggt catggacctg cccaccagg agccagcact ggggaccacc 780
tgctacgcct caggctgggg cagcattgaa ccagaggagt tcttgacccc aaagaaactt 840
cagtgtgtgg acctccatgt tatttccaat gacgtgtgtg cgcaagttca ccctcagaag 900
gtgaccaagt tcatgctgtg tgctggacgc tggacagggg gcaaaagcac ctgctcgggt 960
gattctgggg gccacttgt ctgtaatggt gtgcttcaag gtatcacgtc atggggcagt 1020
25 gaaccatgtg ccctgcccga aaggccttcc ctgtacacca aggtggtgca ttaccggaag 1080
tggatcaagg acaccatcgt ggccaacccc gggcatgcat tagcctatgg aagtcagggt 1140
gatcttaatc cattaattaa tgaaatcagc aaaatcattt cagctgcagg tagcttcgat 1200
gttaaagagg aaagaactgc agcttcttta ttgcagttgt ccggtaatgc cagtgat 1260
tcatatggac ggaactcaat aacctgacc acatcagcat aa 1302

```

<210> 37

<211> 684

<212> DNA

5 <213> 人工

<220>

<223> 人工 DNA 序列

<400> 37

atgacaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct 60
10 gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact 120
gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atacatacgc taaatgataa gatatttttcg 180
tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatggtgca 240
acttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa 300
aggatgaagg atacctgag gattgcatat cttactgaag ctaaagtcga aaagttatgt 360
15 gtatggaata ataaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc ccggcgattt tggcctggcg 420
accgaaaaag cgggcgattt tggcctggcg accgaaaaag cgggcgattt tggcctggcg 480
accgaaaaag cgggcgcatgc attagcctat ggaagtcagg gtgatcttaa tccattaatt 540
aatgaaatca gcaaatcat ttcagctgca ggtagcttcg atgttaaaga ggaaagaact 600
gcagcttctt tattgcagtt gtccggtaat gccagtgatt tttcatatgg acggaactca 660
20 ataaccctga ccacatcagc ataa 684

<210> 38

<211> 1521

<212> DNA

25 <213> 人工

<220>

<223> 人工 DNA 序列

<400> 38

atgccaaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct 60

gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact 120
gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atatatacgc taaatgataa gatatttttcg 180
tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatgggtgca 240
atttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa 300
5 aggatgaagg ataccctgag gattgcatat cttactgaag ctaaagtcga aaagttatgt 360
gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc ccgatgattg ggagattcct 420
gatgggcaga ttacagtggg acaaagaaag ggaaagtggc atgggtgatgt ggcagtgaaa 480
atgttgaatg tgacagcacc tacacctcag cagttacaag ccttcaaaaa tgaagtagga 540
gtactcagga aaacacgaca tgtgaatatc ctactcttca tgggctattc cacaaagcca 600
10 caactggcta ttgttaccca gtgggtgtgag ggctccagct tgtatcacca tctccatatc 660
attgagacca aatttgagat gatcaaactt atagatattg cacgacagac tgcacagggc 720
atggattact tacacgcaa gtcaatcatc cacagagacc tcaagagtaa taatatatct 780
cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc tagctacaga gaaatctcga 840
tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca ttttgtggat ggcaccagaa 900
15 gtcacagaaa tgcaagataa aaatccatac agctttcagt cagatgtata tgcatttggg 960
attgttctgt atgaattgat gactggacag ttaccttatt caaacatcaa caacagggac 1020
cagataatct ttatgggtggg acgaggatac ctgtctccag atctcagtaa ggtacggagt 1080
aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc tcaaaaagaa aagagatgag 1140
agaccactct tccccaaat tctcgctct attgagctgc tggcccgcctc attgccaaaa 1200
20 attcaccgca gtgcatcaga accctccttg aatcgggctg gtttccaaac agaggatttt 1260
agtctatatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccatccagg cagggggata tgggtgcgttt 1320
cctgtccacg ggcatgcatt agcctatgga agtcaggggtg atcttaatcc attaattaat 1380
gaaatcagca aaatcatttc agctgcaggt agcttcgatg ttaaagagga aagaactgca 1440
gcttctttat tgcagttgtc cggtaatgcc agtgattttt catatggacg gaactcaata 1500
25 accctgacca catcagcata a 1521

<210> 39

<211> 2169

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工 DNA 序列

<400> 39

```

5  atgacaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct   60
   gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact   120
   gatttggtgtg cagaatacca caacacacaa atacatacgc taaatgataa gatatttttcg   180
   tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatgggtgca   240
   acttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa   300
10  aggatgaagg ataccctgag gattgcatat cttactgaag ctaaagtcga aaagttatgt   360
   gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc ccatctgtca aatggagaaa   420
   atagtgcctt tttttgcaat agtcagtctt gttaaaagtg atcagatttg cattgggttac   480
   catgcaaaca actcgacaga gcaggttgac acaataatgg aaaagaacgt tactgttaca   540
   catgcccaag acatactgga aaagacacac aacgggaagc tctgcgatct agatggagtg   600
15  aagcctctaa ttttgagaga ttgtagtgta gctggatggc tcctcggaaa ccaatgtgt   660
   gacgaattca tcaatgtgcc ggaatgggtcc tacatagtgg agaaggccaa tccagtcaat   720
   gacctctgtt acccagggga tttcaatgac tatgaagaat tgaaacacct attgagcaga   780
   ataaaccatt ttgagaaaat tcagatcatc cccaaaagtt cttggtccag tcatgaagcc   840
   tcattagggg tgagctcagc atgtccatac cagagaaagt cctccttttt cagaaatgtg   900
20  gtatggctta tcaaaaagaa cagtacatac ccaacaataa agaggagcta caataatacc   960
   aaccaagaag atcttttggg actgtggggg attcaccatc ctaatgatgc ggacagagcag 1020
   acaaagctct atcaaaaccc aaccacctat atttcggttg ggacatcaac actaaaccag 1080
   agattggtac caagaatagc tactagatcc aaagtaaacg ggcaaagtgg aaggatggag 1140
   ttcttctgga caattttaaa accgaatgat gcaatcaact tcgagagtaa tggaaatttc 1200
25  attgctccag aatatgcata caaaattgtc aagaaagggg actcaacaat tatgaaaagt 1260
   gaattggaat atggtaactg caacaccaag tgtcaaaactc caatgggggc gataaactct 1320
   agtatgccat tccacaatat acaccctctc accatcgggg aatgccccaa atatgtgaaa 1380
   tcaaacagat tagtccttgc gactgggctc agaaatagcc ctcaaagaga gagaagaaga 1440
   aaaaagagag gattatttgg agctatagca ggtttttatag agggaggatg gcagggaatg 1500

```

gtagatgggtt ggtatgggta ccaccatagc aatgagcagg ggagtgggta cgctgcagac 1560
aaagaatcca ctcaaaaggc aatagatgga gtcaccaata aggtcaactc gatcattgac 1620
aaaatgaaca ctcaagtttga ggccggttga aggggaattta acaacttaga aaggagaata 1680
gagaatttaa acaagaagat ggaagacggg ttcctagatg tctggactta taatgctgaa 1740
5 cttctgggttc tcatggaaaa tgagagaact ctagactttc atgactcaaa tgtcaagaac 1800
ctttacgaca aggtccgact acagcttagg gataatgcaa aggaactggg taacggttgt 1860
ttcgagttct atcataaatg tgataatgaa tgtatggaaa gtgtaagaaa cggaacgtat 1920
gactacccgc agtattcaga agaagcaaga ctaaaaagag aggaaataag tggagtaggg 1980
catgcattag cctatggaag tcaggggtgat cttaatccat taattaatga aatcagcaaa 2040
10 atcatttcag ctgcaggtag cttcgatggt aaagaggaaa gaactgcagc ttctttattg 2100
cagttgtccg gtaatgccag tgatttttca tatggacgga actcaataac cctgaccaca 2160
tcagcataa 2169

<210> 40

15 <211> 12672

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人工DNA序列

20 <400> 40

gaattccaag cgaagtccat cccctccct cttgattaca agggtgataa ttattattcg 60
catttggtgtg gtaatgggat agaaaggaat ggatagaaaa agaacaaaat tagtatagca 120
atagatatgc cactgcatt gaatacttac agggcattat tttattatgt ttaaattgaa 180
gtgggtctctg gtttgattta ttgttattc aagggggctg tttggagatc ggaaaattct 240
25 gtacgttaag tgtattattt aaccagtttc gatgcgtaac agattgattt tgcgtcagcg 300
gttatcgctt ttaagttggt gctcttgcgc tatcgcgttt aggttatccg attaaagtca 360
aatttcctga aaatgctgta tagcgcgga gtgcacctta tagctgtagg taagtatggt 420
caaaaaatag tcttgccgta caataatttt ccatatccaa actcactcct tcaagattct 480
ggccccgggtt tacgggtagt ttccggaagg gcggtagcat gctgattcaa actgcaagat 540

gaaacattgt cggagttgga tggaattaag tcatggctat agcatttggg cgtgcataac 600
 aaaattggtc ctcatatttt agagtatgat tgcataattca ctaatatattt tacttttctga 660
 tgcgtggtgg catcatgctt tatgagataa acaatcctgg tagactagcc ccctgaatct 720
 ccagacaacc aatatcactt atttaagtga tagtcttaat actagttttt agactagtca 780
 5 ttggagaaca gatgattgat gtcttaggat cggagaaacg cagacggcgt actacacagg 840
 aaaagatcgc tatcgttcag cagagctttg aaccgggaat gacggctctcc cttgttgccc 900
 ggcaacatgg tgtggcagcc agccagctat ttctctggcg caagcaatac caggagggaa 960
 gtcttactgc tgtggctgcc ggagaacagg tcgttctgc ctctgaactt gctgccgcca 1020
 tgaagcagat taaagagctc cagcgctgc tcggcaaaaa aacgatggaa aatgaactcc 1080
 10 ttaaagaagc cgttgaatat gggcgagcaa aaaagtggat agcgcacgcg cccttattgc 1140
 ccggggatgg ggagtaagct tcgtcagccg ttgtctccgg gtgtcgcgtg cgcagttgca 1200
 cgtcattctc agacgaaccg atgactggaa ggacggccgc cgcagccgtc acacggatga 1260
 tacggatgtg cttcgccgta tacatcatgt tatcgagag ctgcccacat atggttatcg 1320
 tcgggtatgg gcgctgcttc gcagacaaac agaacttgat ggtatgcctg cgatcaatgc 1380
 15 caaatgtgtt taccggatca tgtgccagaa tgcgctgttg cttgagcgaa aaccgctgt 1440
 accgccatcg aaacgggcac ataccggcag agtggctgtg aaagaaagta atcagcgatg 1500
 gtgctctgac gggtttgagt tccgctgtga taacggagaa aaactgcggg tcacgttcgc 1560
 gctggactgc tgtgatcgtg aggcactgca ctgggcggtc acaacgggtg gcttcaacag 1620
 tgaaacagta caggacgtca tgctgggagc agtggaaacgc cgctttggca gcgagcttcc 1680
 20 ggcgtctcca gtggagtggc tgacggataa tggttcatgc taccgggcga atgaaacacg 1740
 tcagttcgcc aggatgttgg gacttgaacc gaagaacacg gcagtgcgga gtccggagag 1800
 taacggaata acagagagct tcgtgaaaac gataaagcgt gattacataa gtatcatgcc 1860
 caaaccagac gggttaacgg cagcaaagaa ccttgcagag gcgttcgagc attataacga 1920
 atggcatccg catagtgcgc tgggttatcg ctgccacgg gaatatctgc ggcagcgggc 1980
 25 cagtaatggg ttaagtgata acaggtatct ggaaatatag gggcaaattc acctggtcat 2040
 tatctggaat ttgacgaagt gtgataactg gtatagccag attaattctaa acctttgtct 2100
 gacaaaatca gataaagaag agtagttcaa aagacaactc gtggactctc attcagagag 2160
 ataggcggtta ccaaaatttg tttggaactg aacaagaaaa ttgtatttgt gtaactataa 2220
 tcttaatgta aaataaaaga caccagttct gtagaatatg cttattgaag agagtgtaat 2280

aataatttta tatagatgtt gtacaaagaa caggaatgag taattattta tgcttgatgt 2340
 tttttgactc ttgcttttta tagttattat ttttaagtta gtcagcgcaa taaaaacttg 2400
 cttttaatat taatgcgagt tatgacatta aacggaagaa acataaaggc atattttttgc 2460
 cacaatattt aatcatataa tttaagttgt agtgagttha ttatgaatat aaacaaacca 2520
 5 ttagagattc ttgggcatgt atcctggcta tgggccagtt ctccactaca cagaaactgg 2580
 ccagtatctt tgtttgcaat aaatgtatta cccgcaatac aggctaacca atatgtttta 2640
 ttaaccggg atgattaccc tgtcgctat thtagttggg ctaatttaag tttagaaaat 2700
 gaaattaaat atcttaatga tgttacctca ttagttgcag aagactggac ttcaggtgat 2760
 cgtaaattgg tcatgactg gattgctcct ttcggggata acggtgccct gtacaaatat 2820
 10 atgcgaaaaa aattccctga tgaactattc agagccatca gggatggatcc caaaactcat 2880
 gttggtaaag tatcagaatt tcatggaggt aaaattgata aacagttagc gaataaaatt 2940
 tttaaacaat atcaccacga gtttaataact gaagtaaaaa gaaagtcaga ttttaatttt 3000
 tcattaactg gtttaagaggt aattaaatgc caacaataac cactgcacaa attaaaagca 3060
 cactgcagtc tgcaaagcaa tccgctgcaa ataaattgca ctgagcagga caaagcacga 3120
 15 aagatgcatt agcctatgga agtcaggggt atcttaatcc attaatatga gaaatcagca 3180
 aaatcatttc agctgcaggt agcttcgatg ttaaagagga aagaactgca gcttctttat 3240
 tgcagttgtc cggtaatgcc agtgattttt catatggacg gaactcaata accctgacca 3300
 catcagcata atatattaat ttaaatgata gcaatcttac tgggctgtgc cacataagat 3360
 tgctattttt tttggagtca taatggattc ttgtcataaa attgattatg ggttatacgc 3420
 20 cctggagatt ttagcccaat accataacgt ctctgttaac ccggaagaaa ttaaacatag 3480
 atttgataca gacgggacag gtctgggatt aacgtcatgg ttgcttgctg cgaaatcttt 3540
 agaactaaag gtaaaacagg taaaaaaaaa aattgatcga ttaaaacttta tttttctgcc 3600
 cgcattagtc tggagagagg atggacgtca ttttattctg actaaaatca gcaaagaagt 3660
 aaacagatat cttatttttg atttgagca gcaaatccc cgtgttctcg aacagtctga 3720
 25 gtttgaggcg ttatatcagg ggcatattat tcttattact tcccgttctt ctgttaccgg 3780
 gaaactggca aaatttgact ttacctggtt tattcctgcc attataaaat acaggagaat 3840
 atttattgaa acccttggtg tatctgtttt tttacaatta tttgcattaa taacccccct 3900
 ttttttccag gtggttatgg acaaagtatt agtgcacagg gggttttcaa cccttaatgt 3960
 tattactggt gcattatctg ttgtagtggg gtttgagatt atactcagcg gtttaagaac 4020

ttacattttt gcacatagta caagtcggat tgatgttgag ttgggtgcca aactcttccg 4080
 gcatttactg gcgctaccga tctcttattt tgagagtcgt cgtgttggtg atactgttgc 4140
 gagggtaaga gaattagacc agatccgtaa ttttctgaca ggacaggcat taacatctgt 4200
 tttggactta ttattttcac tcatattttt tgcggtaatg tggattaca gcccaaagct 4260
 5 tactctgggtg atcttatttt cgctgccttg ttatgctgca tggctctgtt ttattagccc 4320
 cattttgcga cgctgccttg atgataagtt ttcacggaat gcggataatc aatctttcct 4380
 ggtggaatca gtaacggcga ttaacactat aaaagctatg gcagtctcac ctcatgatgac 4440
 gaacatatgg gacaaacaat tggcaggata tggtgctgca ggctttaaag tgacagtatt 4500
 agcaaccatt ggtcaacaag gaatacagtt aatacaaaaag actgttatga tcatcaacct 4560
 10 atggttggga gcacacctgg ttatttccgg ggatttaagt attggtcagt taattgcttt 4620
 taatatgctt gctggtcaga ttgttgacc gggtattcgc cttgcacaaa tctggcagga 4680
 tttccagcag gttggtatat cagttaccg ccttggtgat gtgcttaact ctccaactga 4740
 aagttatcat gggaaactga cattgccgga aattaatggg gatatacctt ttcgtaatat 4800
 ccggtttcgc tataaacctg attctccggg tattttggac aatatcaatc ttagtattaa 4860
 15 gcaggggggag gttattggta ttgtcggacg ttctggttca ggaaaaagca cattaactaa 4920
 attaatcaa cgtttttata ttctgaaaa tggccaggta ttaattgatg gacatgatct 4980
 tgcgttggct gatcctaact gggtacgtcg tcaggtgggg gttgtgttgc aggacaatgt 5040
 gctgcttaat cgcagtatta ttgataatat ttcactggct aatcctggca tgtccgtcga 5100
 aaaagttatt tatgcagcga aattagcagg cgctcatgat tttatttctg atttgctga 5160
 20 ggggtataac accattgtcg gggaacaggg ggcaggatta tccggaggtc aacgtcaacg 5220
 catcgcaatt gcaagggcgc tggatgaaca ccctaaaata ctcatTTTTTg atgaagcaac 5280
 cagtgtctctg gattatgagt cggagcatgt catcatgcgc aatatgcaca aaatatgtaa 5340
 gggcagaacg gttataatca ttgctcatcg tctgtctaca gtaaaaaatg cagaccgcat 5400
 tattgtcatg gaaaaaggga aaattgttga acagggtaaa cataaggagc tgctttctga 5460
 25 accggaaagt ttatacagtt acttatatca gttacagtca gactaacaga aagaacagaa 5520
 gaatatgaaa acatgggttaa tgggggttcag cgagttcctg ttgcgtata aacttgtctg 5580
 gagtgaaaca tggaaaatcc ggaagcaatt agatactccg gtacgtgaaa aggacgaaaa 5640
 tgaattctta ccgctcatc tggaaatta tgaaacgcc gatatccagac ggccgcgtct 5700
 ggttgcttat tttattatgg ggtttctggg tattgctttt atttatctg ttttaggcca 5760

agtggaatt gttgccactg caaatgggaa attaacacac agtgggcgta gtaaagaaat 5820
 taaacctatt gaaaactcaa tagttaaaga aattatcgta aaagaaggag agtcagtccg 5880
 gaaaggggat gtgttattaa agcttacagc actgggagct gaagctgata cgttaaaaac 5940
 acagtcacat ctgttacagg ccaggctgga acaaactcgg tatcaaattc tgagcaggtc 6000
 5 aattgaatta aataaactac ctgaactaaa gcttctgat gagccttatt ttcagaatgt 6060
 atctgaagag gaagtactgc gtttaacttc tttgataaaa gaacagtttt ccacatggca 6120
 aaatcagaag tatcaaaaag aactgaattt ggataagaaa agagcagagc gattaacagt 6180
 acttgcccgt ataaaccgtt atgaaaattt atcaagggtt gaaaaaagcc gtctggatga 6240
 tttcagtagt ttattgcata aacaggcaat tgcaaaacat gctgtacttg agcaggagaa 6300
 10 taaatatgtc gaagcagtaa atgaattacg agtttataaa tcacaactgg agcaaattga 6360
 gagtgagata ttgtctgcaa aagaagaata tcagcttggt acgcagcttt ttaaaaatga 6420
 aattttagat aagctaagac aaacaacaga caacattggg ttattaactc tggaattagc 6480
 gaaaaatgaa gagcgtcaac aggtctcagt aatcagggcc ccagtttcgg gaaaagttca 6540
 gcaactgaag gttcactactg aaggtggggt tggtacaaca gcggaaacac tgatggatcat 6600
 15 cgttccggaa gatgacacgc tggagggttac tgctctggta caaaataaag atattggttt 6660
 tattaacgtc gggcagaatg ccatcattaa agtggaggca tttccttata cacgatatgg 6720
 ttatctggtg ggtaaggtga aaaatataaa tttagatgca atagaagacc agagactggg 6780
 acttgttttt aatgttatta tttctattga agagaattgt ttgtcaaccg ggaataaaaa 6840
 cattccatta agctcgggta tggcagtcac tgcagaaata aagacaggta tgcgaagtgt 6900
 20 aatcagttat cttcttagtc ctttagaaga gtcagtaaca gaaagttagt gtgagcggtta 6960
 agtttcagaa gtccagtatt tgctgctata cgtgctgctg ggcacttgcc gtctgaacgg 7020
 cattgatccg gaagccaagt caaacaacag cgtgatgagc gtcagggcaa aacaccaagg 7080
 ctctctcgat gacaccagaa caaattgaaa tacgtgagct gaggaaaaag ctaccgagtt 7140
 cttgatgttg gactccctga acagttctct gtaatcggga aactcaggac gcgttatcct 7200
 25 gtgggtcacac tctgcatgt gtttaggggt catcacagca gctacagata ctggtaaaac 7260
 cgctctgaaa aaccagacgg cagacgggct gtattacgta gtcagggtact tgagctacat 7320
 ggcacagtc acggtttggc cggagcaaga cgtatcacca caatggcaac ccggagaggt 7380
 gtcagcgcca gtgatataag acggttaacg gttaaaaatc gtggcggtga caacatccca 7440
 gtggactgag gtcacacagg cctggcagca ttctcttccc ggccggatga cccgatttc 7500

acggggaaaag tacgccgata acagtttacg ggctgaagat tggcgtaggg aggatagcag 7560
acgttttgcc gccccattg tctggagttg ggtgagaagg catcatttca ccaacaccaa 7620
catttcacag ttacacccca cagctacatg aagcgcttcc atgaattatc gctttgattt 7680
atcatgttaa aatagctcta cacggttggt tcaggattgc gcaccgaaac cctctaaaat 7740
5 ccaactgacgc gcctgcgaat tatccagcac cgcgcctttc gagatcctct acgccggacg 7800
catcgtggcc ggcatcaccg gcgccacagg tgcggttgct ggcgctata tcgccgacat 7860
caccgatggg gaagatcggg ctgccactt cgggctcatg agcgcttggt tcggcggtggg 7920
tatggtggca ggccccgtgg cggggggact gttgggcgcc atctccttgc atgcaccatt 7980
ccttgccggc gcggtgctca acggcctcaa cctactactg ggctgcttcc taatgcagga 8040
10 gtcgcataag ggagagcgtc gaccgatgcc cttgagagcc ttcaaccag tcagctcctt 8100
ccggtgggcg cggggcatga ctatcgtcgc cgcacttatg actgtcttct ttatcatgca 8160
actcgtagga caggtgccgg cagcgctctg ggtcattttc ggcgaggacc gctttcgctg 8220
gagcgcgacg atgatcggcc tgtcgcttgc ggtattcgga atcttgacg ccctcgctca 8280
agccttcgtc actggtcccg ccaccaaagc tttcggcgag aagcaggcca ttatcgccgg 8340
15 catggcggcc gacgcgctgg gctacgtctt gctggcgctt gcgacgcgag gctggatggc 8400
cttccccatt atgattcttc tcgcttcggg cggcatcggg atgcccgctg tgcaggccat 8460
gctgtccagg caggtagatg acgaccatca gggacagctt caaggatcgc tcgcggtct 8520
taccagccta acttcgatca ttggaccgct gatcgtcacg gcgatttatg ccgcctcggc 8580
gagcacatgg aacgggttgg catggattgt aggcgcgcgc ctataccttg tctgcctccc 8640
20 cgcgttgctg cgcggtgcat ggagccgggc cacctcgacc tgaatggaag ccggcggcac 8700
ctcgtaacg gattcaccac tccaagaatt ggagccaatc aattcttgcg gagaactgtg 8760
aatgcgcaaa ccaacccttg gcagaacata tccatcgctg ccgccatctc cagcagccgc 8820
acgcggcgca tctcgggcag cgttgggtcc tggccacggg tgcgcatgat cgtgctcctg 8880
tcgttgagga cccggctagg ctggcggggg tgccttactg gttagcagaa tgaatcaccg 8940
25 atacgcgagc gaacgtgaag cgactgctgc tgcaaacgt ctgcgacctg agcaacaaca 9000
tgaatggtct tcggtttccg tgtttcgtaa agtctggaaa cgcggaagtc agcgccctgc 9060
accattatgt tccggatctg catcgcagga tgctgctggc taccctgtgg aacacctaca 9120
tctgtattaa cgaagcgtg gcattgacct tgagtgattt ttctctggtc ccgcgcgcatc 9180
cataccgcca gttgtttacc ctcaaacgt tccagtaacc gggcatgttc atcatcagta 9240

acccgatatcg tgagcatcct ctctcgtttc atcggatatca ttacccccat gaacagaaat 9300
 ccccccattaca cggaggcatc agtgaccaa caggaaaaaa ccgcccttaa catggcccgc 9360
 tttatcagaa gccagacatt aacgcttctg gagaaactca acgagctgga cgcggatgaa 9420
 caggcagaca tctgtgaatc gcttcacgac cacgctgatg agctttaccg cagctgcctc 9480
 5 gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agtcccggga gacggtcaca 9540
 gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtggt 9600
 ggcgggtgtc ggggagcagc catgaccagc tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc 9660
 ttaactatgc ggcacagag cagattgtac tgagagtgc ccatatgcgg tgtgaaatac 9720
 cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg 9780
 10 actcgtgcg ctcggtcggt cggctgcggc gagcggatc agtcaactca aaggcggtaa 9840
 tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc 9900
 aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgctg tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc 9960
 ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaaccg acaggactat10020
 aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc10080
 15 cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct10140
 cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg10200
 aaccccccggt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc10260
 cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga10320
 ggtatgtagg cgggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa10380
 20 ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac ctccgaaaa agagttggta10440
 gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttggt tgcaagcagc10500
 agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg10560
 acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaaggal10620
 tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagtttta atcaatctaa agtatatatg10680
 25 agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct10740
 gtctatttcg ttcatccata gttgcctgac tccccatatg aatatcctcc ttagttccta10800
 ttccgaagtt cctattctct agaaagtata ggaacttcag agcgcttttg aagctggggt10860
 gggcgaagaa ctccagcatg agatccccgc gctggaggat catccagccg gcgtcccgga10920
 aaacgattcc gaagcccaac ctttcataga aggcggcggt ggaatcgaat tctcgtgatg10980

gcaggttggg cgctcgcttg tgggtcattt cgaaccccag agtcccgtc agaagaactc11040
gtcaagaagg cgatagaagg cgatgcgctg cgaatcgggg gcggcgatac cgtaaagcac11100
gaggaagcgg tcagcccatt cgccgccaag ctcttcagca atatcacggg tagccaacgc11160
tatgtcctga tagcgggtccg ccacaccag cgggccacag tcgatgaatc cagaaaagcg11220
5 gccattttcc accatgatat tcggcaagca ggcatcgcca tgggtcacga cgagatcctc11280
gccgtcgggc atgcgcgcct tgagcctggc gaacagttcg gctggcgca gccctgatg11340
ctcttcgtcc agatcatcct gatcgacaag accggcttcc atccgagtac gtgctcgctc11400
gatgcgatgt ttcgcttggg ggtcgaatgg gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg11460
ccgcattgca tcagccatga tggatacttt ctccggcagga gcaaggtgag atgacaggag11520
10 atcctgcccc ggcacttcgc ccaatagcag ccagtcctt cccgcttcag tgacaacgtc11580
gagcacagct gcgcaaggaa cgcccgctgt ggccagccac gatagcccg ctgcctcgctc11640
ctgcagttca ttcagggcac cggacaggtc ggtcttgaca aaaagaaccg ggcgcccctg11700
cgctgacagc cggaacacgg cggcatcaga gcagccgatt gtctgttgtg ccagtcata11760
gccgaatagc ctctccacce aagcggccgg agaacctgcg tgcaatccat cttgttcaat11820
15 catgcgaaac gatcctcatc ctgtctcttg atcagatctt gatccctgc gccatcagat11880
ccttggcggc aagaaagcca tccagtttac tttgcagggc ttcccaacct taccagagg11940
cgccccagct ggcaattccg gttcgcttgc tgtccataaa accgcccagt ctagctatcg12000
ccatgtaagc cactgcaag ctacctgctt tctctttgcg cttgcgtttt ccctgttcc12060
gatagcccag tagctgacat tcacccggg tcagcacctt ttctgcggac tggctttcta12120
20 cgtgttccgc ttcctttagc agcccttgcg ccctgagtgc ttgcggcagc gtgggggatc12180
ttgaagttcc tattccgaag ttcctattct ctagaaagta taggaacttc gaagcagctc12240
cagcctacac caaaaaagg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc12300
ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt12360
gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc12420
25 cctgacgtct aagaaccat tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg12480
aggccctttc gtcttcaaga attctcatgt ttgacagctt atcatcgatg gacattattt12540
ttgtggagcc ggaggaaaca gaccagacgg ttcagatgag gcgcttacca ccagaaccg12600
tgttggtcca ccattctggc gattcccaaa cgctatttgg ataaaaagta gccttaacgt12660
ggtttatttt cc

12672

五、中文發明摘要

發明之名稱：作為編碼抗原和蛋白質毒素之核苷酸序列的載體之微生物、製造彼之方法及彼之用途

本發明關於包含下列組成分之作為編碼抗原和蛋白質毒素之核苷酸序列的載體之微生物：（Ⅰ）至少一種編碼至少一種野生型或突變之蛋白質的至少一種完全或部分抗原之核苷酸序列；及（Ⅱ）至少一種編碼至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位之核苷酸序列；及（Ⅲ）a）至少一種編碼至少一種轉運系統之核苷酸序列，該轉運系統可使組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物表現在該微生物之外表面上及/或可使組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物分泌；及/或至少一種編碼至少一種信號序列之核苷酸序列，該信號序列可使組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物分泌；及/或（Ⅲ）b）選擇性地，至少一種編碼至少一種用於於哺乳動物細胞之細胞溶質中溶解微生物及用於胞內釋出質體或表現載體（其包含在該溶解之微生物內）之蛋白質的核苷酸序列；及（Ⅳ）至少一種編碼至少一種用於表現一或多種組成分（Ⅰ）至（Ⅲ）之活化序列的核苷酸序列，其中該活化序列可在該微生物中被活化及/或為組織細胞特異性、腫瘤細胞特異性、巨噬細胞特異性、樹突細胞特異性、淋巴細胞特異性、功能特異性或非細胞特異性；其中任一之該組成分（Ⅰ）至（Ⅳ）可出現一次或數次且為相同或相異。本發明亦揭示該微生物之製造方法、對應之質體或表現載體及該微生物作為藥物之用途。

六、英文發明摘要

發明之名稱：

Microorganisms as Carriers of Nucleotide Sequences Coding for Antigens and Protein Toxins, Process of Manufacturing and Uses thereof

The invention relates to a microorganism as a carrier of nucleotide sequences coding for antigens and protein toxins comprising the following components: (I) at least one nucleotide sequence coding for at least one complete or partial antigen of at least one wild-type or mutated protein; and (II) at least one nucleotide sequence coding for at least one protein toxin and/or at least one protein toxin subunit; and (III) a) at least one nucleotide sequence coding for at least one transport system which enables the expression of the expression products of component (I) and component (II) on the outer surface of the microorganism and/or enables the secretion of the expression products of component (I) and component (II); and/or coding for at least one signal sequence which enables the secretion of the expression products of component (I) and component (II); and/or (III) b) optionally, at least one nucleotide sequence coding for at least one protein for lysing the microorganism in the cytosol of mammalian cells and for intracellularly releasing plasmids or expression vectors, which are contained in the lysed microorganism; and (IV) at least one nucleotide sequence for at least one activation sequence for the expression of one or more of components (I) to (III), wherein said activation sequence can be activated in the microorganism and/or is tissue cell-specific, tumor cell-specific, macrophage-specific, dendrite-specific, lymphocyte-specific, function-specific or non-cell-specific"; wherein any of components (I) to (IV) can be present either once or several times and either identical or different. Also disclosed are a process of manufacturing thereof, corresponding plasmids or expression vectors and uses of the microorganism as a medicament.

第2圖

hlyB:

ATGGATTCTTGT CATAAAATTGATTATGGGTTATACGCCCTGGAGATTTTAGCCCAATAC
CATAACGTCTCTGTTAACCCGGAAGAAATTAAACATAGATTTGATACAGACGGGACAGGT
CTGGGATTAACGTCATGGTTGCTTGCTGCGAAATCTTTAGAACTAAAGGTAAAACAGGTA
AAAAAACAATTGATCGATTAACTTTATTTTTCTGCCCGCATTAGTCTGGAGAGAGGAT
GGACGTCATTTTATTCTGACTAAAATCAGCAAAGAACTAAACAGATATCTTATTTTTGAT
TTGGAGCAGCGAAATCCCGTGTTCTCGAACAGTCTGAGTTTGAGGCGTTATATCAGGGG
CATATTATTCTTATTACTTCCCGTTCTTCTGTTACCGGGAACTGGCAAATTTGACTTT
ACCTGGTTTATTCTGCCATTATAAAATACAGGAGAATATTTATTGAAACCCCTGTTGTA
TCTGTTTTTTTACAATTATTTGCATTAATAACCCCCCTTTTTTTTTCAGGTGGTTATGGAC
AAAGTATTAGTGACAGGGGGTTTTCAACCCTTAATGTTATTACTGTTGCCTTATCTGTT
GTAGTGGTGGTTTGAGATTATACTCAGCGGTTTAAGAACTTACATTTTTGCACATAGTACA
AGTCGGATTGATGTTGAGTTGGGTGCCAACTCTTCCGGCATTACTGGCGCTACCGATC
TCTTATTTTGAGAGTCGTCGTGTTGGTGATACTGTTGCGAGGGTAAGAGAATTAGACCAG
ATCCGTAATTTTCTGACAGGACAGGCATTAACATCTGTTTTGGACTTATTATTTTCACTC
ATATTTTTTGCGTAATGTGGTATTACAGCCCCAAAGCTTACTCTGGTGATCTTATTTTCG
CTGCCTTGTTATGCTGCATGGTCTGTTTTTATTAGCCCCATTTTGCGACGTCGCCTTGAT
GATAAGTTTTTCACGGAATGCGGATAATCAATCTTTCCTGGTGGAATCAGTAACGGCGATT
AACACTATAAAAGCTATGGCAGTCTCACCTCAGATGACGAACATATGGGACAAAACAATTG
GCAGGATATGTTGCTGCAGGCTTTAAAGTGACAGTATTAGCAACCATTGGTCAACAAGGA
ATACAGTTAATACAAAAGACTGTTATGATCATCAACCTATGGTTGGGAGCACACCTGGTT
ATTTCCGGGGATTTAAGTATTGGTCAGTTAATTGCTTTTAATATGCTTGCTGGTCAGATT
GTTGCACCGGTTATTTCGCCTTGACAAATCTGGCAGGATTTCCAGCAGGTTGGTATATCA
GTTACCCGCCTTGGTGATGTGCTTAACTCTCCAAGTAAAGTTATCATGGGAACTGACA
TTGCCGGAAATTAATGGTGATATCACTTTTCGTAATATCCGGTTTCGCTATAAACCTGAT
TCTCCGGTTATTTTGGACAATATCAATCTTAGTATTAAGCAGGGGGAGGTTATTGGTATT
GTCGGACGTTCTGGTTCAGGAAAAAGCACATTAATAAATTAATTCAACGTTTTTATATT
CCTGAAATGGCCAGGTATTAATTGATGGACATGATCTTGCGTTGGCCGATCCTAACTGG
TTACGTCGTCAGGTGGGGGTTGTGTTGCAGGACAATGTGCTGCTTAATCGCAGTATTATT
GATAATATTTCACTGGCTAATCCTGGCATGTCCGTCGAAAAAGTTATTTATGCAGCGAAA
TTAGCAGGTGCTCATGATTTTTATTTCTGAATTGCGTGAGGGGTATAACACCATTGTCGGG
GAACAGGGGGCAGGATTATCCGGAGGTCAACGTCAACGCATCGCAATTGCAAGGGCGCTG
GTGAACAACCCTAAAATACTCATTTTTGATGAAGCAACCAGTGCTCTGGATTATGAGTCG
GAGCATGTCATCATGCGCAATATGCACAAAATATGTAAGGGCAGAACGGTTATAATCATT
GCTCATCGTCTGTCTACAGTAAAAATGCAGACCGCATTATTGTCATGAAAAAGGGAAA
ATTGTTGAACAGGGTAAACATAAGGAGCTGCTTTCTGAACCGGAAAGTTTATACAGTTAC
TTATATCAGTTACAGTCAGACTAA

第3圖

hlyD:

ATGAAAACATGGTTAATGGGGTTCAGCGAGTTCCTGTTGCGCTATAAACTTGTCTGGAGT
GAAACATGGAAAATCCGGAAGCAATTAGATACTCCGGTACGTGAAAAGGACGAAAATGAA
TTCTTACCCGCTCATCTGGAATTAATTGAAACGCCAGTATCCAGACGGCCGCTCTGGTT
GCTTATTTTATTATGGGGTTTCTGGTTATTGCTTTTATTTTATCTGTTTTAGGCCAAGTG
GAAATTGTTGCCACTGCAAATGGGAAATTAACACACAGTGGGCGTAGTAAAGAAATTAAA
CCTATTGAAAACCTCAATAGTTAAAGAAATTATCGTAAAAGAAGGAGAGTCAGTCCGGAAA
GGGGATGTGTTATTAAAGCTTACAGCACTGGGAGCTGAAGCTGATACGTTAAAAACACAG
TCATCACTGTTACAGGCCAGGCTGGAACAACTCGGTATCAAATTCAGCAGGTCAATT
GAATTAAATAAACTACCTGAACTAAAGCTTCCTGATGAGCCTTATTTTCAGAATGTATCT
GAAGAGGAAGTACTGCGTTTAACTTCTTTGATAAAAAGAACAGTTTTCCACATGGCAAAT
CAGAAGTATCAAAAAGAACTGAATTTGGATAAGAAAAGAGCAGAGCGATTAAACAGTACTT
GCCCCGTATAAACCGTTATGAAAATTTATCAAGGGTTGAAAAAGCCGTCTGGATGATTTCT
AGTAGTTTATTGCATAAACAGGCAATTGCAAAACATGCTGTACTTGAGCAGGAGAATAAA
TATGTGCAAGCAGTAAATGAATTACGAGTTTATAAATCACAACTGGAGCAAATTGAGAGT
GAGATATTGTCTGCAAAAGAAGAATATCAGCTTGTTACGCAGCTTTTAAAAATGAAATT
TTAGATAAGCTAAGACAAACCACAGACAACATTGGGTATTAACTCTGGAATTAGCGAAA
AATGAAGAGCGTCAACAGGCTTCAGTAATCAGGGCCCCAGTTTCGGTAAAAGTTCAGCAA
CTGAAGGTTCTACTGAAGGTGGGGTTGTTACAACAGCGGAAACACTGATGGTCATCGTT
CCGGAAGATGACACGCTGGAGGTTACTGCTCTGGTACAAAATAAAGATATTGGTTTTATT
AACGTCGGGCAGAATGCCATCATTAAGTGGAGGCATTTCTTTATACACGATATGGTTAT
CTGGTGGGTAAGGTGAAAAATATAAATTTAGATGCAATAGAAGACCAGAGACTGGGACTT
GTTTTTAATGTTATTATTTCTATTGAAGAGAATTGTTTGTCAACCGGAAATAAAAACATT
CCATTAAAGCTCGGGTATGGCAGTCACTGCAGAAATAAAGACAGGTATGCGAAGTGTAAATC
AGTTATCTTCTTAGTCCTTTAGAAGAGTCAGTAACAGAAAGTTTACGTGAGCGTTAA

第4圖

PSA:

GTGGGAGGCTGGGAGTGGGAGAAGCATTCCCAACCCTGGCAGGTGCTTGTGGCCTCTCGT
GGCAGGGCAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGCACCCCCAGTGGGTCCACAGCTGCCCAC
TGCATCAGGAACAAAAGCGTGATCTTGCTGGGTGGGCACAGCCTGTTTCATCCTGAAGAC
ACAGGCCAGGTATTTAGGTCAGCCACAGCTTCCCACACCCGCTCTACGATATGAGCCTC
CTGAAGAATCGATTCTCAGGCCAGGTGATGACTCCAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGC
CTGTGAGAGCCTGCCGAGCTCACGGATGCTGTGAAGGTCATGGACCTGCCCACCCAGGAG
CCAGCACTGGGGACCACCTGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCATTGAACCAGAGGAGTTC
TTGACCCCAAAGAACTTCAGTGTGTGGACCTCCATGTTATTTCCAATGACGTGTGTGCG
CAAGTTCACCCTCAGAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTGTGCTGGACGCTGGACAGGGGGC
AAAAGCACCTGCTCGGGTGATTCTGGGGGCCCACTTGTCTGTAATGGTGTGCTTCAAGGT
ATCACGTCATGGGGCAGTGAACCATGTGCCCTGCCCCGAAAGGCCTTCCCTGTACACCAAG
GTGGTGCATTACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCCC

第5圖

CtxB:

CCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACAAATATATACGCTAAAT
GATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACT
TTTAAGAATGGTGCAATTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAA
AAAAAAGCGATTGAAAGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAA
GTCGAAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAACGCCTCATGCGATTGCCGCA

第6圖

B-Raf KD:

GATGATTGGGAGATTCTGATGGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAAAGGGAAAGTGGCAT
GGTGATGTGGCAGTGAAAATGTTGAATGTGACAGCACCTACACCTCAGCAGTTACAAGCC
TTCAAAAATGAAGTAGGAGTACTCAGGAAAACACGACATGTGAATATCCTACTCTTCATG
GGCTATTCCACAAAGCCACAACCTGGCTATTGTTACCCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCTTG
TATCACCATCTCCATATCATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACCTTATAGATATTGCA
CGACAGACTGCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTC
AAGAGTAATAATATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTA
GCTACAGAGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATT
TTGTGGATGGCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCA
GATGTATATGCATTTGGGATTGTTCTGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATTCA
AACATCAACAACAGGGACCAGATAATTTTTATGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCCAGAT
CTCAGTAAGGTACGGAGTAACTGTCCAAAAGCCATGAAGAGATTAATGGCAGAGTGCCTC
AAAAAGAAAAGAGATGAGAGACCACTCTTCCCCAAATTCTCGCCTCTATTGAGCTGCTG
GCCCCGCTCATTGCCAAAATTCACCGCAGTGCATCAGAACCCTCCTTGAATCGGGCTGGT
TTCCAAACAGAGGATTTTAGTCTATATGCTTGTGCTTCTCCAAAAACACCCATCCAGGCA
GGGGGATATGGTGCGTTTCCTGTCCAC

第7圖

B-Raf V600E:
CGATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGCGATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGC
GATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGGC

第8圖

Ctx - PSA - HlyA:

ATGCCAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATCACCTCAAAATATTACT
GATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACAAATATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG
TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCA
ATTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAGCGATTGAA
AGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT
GTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCGTGGGAGGCTGGGAGTGC
GAGAAGCATTCCCAACCCCTGGCAGGTGCTTGTGGCCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGCGGC
GGTGTCTGGTGCACCCCCAGTGGGTCTCACAGCTGCCCCTGCATCAGGAACAAAAGC
GTGATCTTGCTGGGTGCGGCACAGCCTGTTTCATCCTGAAGACACAGGCCAGGTATTTTCA
GTCAGCCACAGCTTCCACACCCGCTCTACGATATGAGCCTCCTGAAGAATCGATTCTC
AGGCCAGGTGATGACTCCAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGTCAGAGCCTGCCGAG
CTCACGGATGCTGTGAAGGTATGGACCTGCCACCCAGGAGCCAGCACTGGGGACCACC
TGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCATTGAACCAGAGGAGTTCTTGACCCCAAAGAACTT
CAGTGTGTGGACCTCCATGTTATTTCCAATGACGTGTGTGCGCAAGTTCACCCTCAGAAG
GTGACCAAGTTCATGCTGTGTGCTGGACGCTGGACAGGGGGCAAAGCACCTGCTCGGGT
GATTCTGGGGGCCCACTTGTCTGTAATGGTGTGCTTCAAGGTATCACGTATGGGGCAGT
GAACCATGTGCCCTGCCCCGAAAGGCCTTCCCTGTACACCAAGGTGGTGCATTACCGGAAG
TGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCCCGGGCATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGT
GATCTTAATCCATTAATTAATGAAATCAGCAAAATCATTTTCAGCTGCAGGTAGCTTCGAT
GTTAAAGAGGAAAGAACTGCAGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTT
TCATATGGACGGAACCTCAATAACCCTGACCACATCAGCATAA

第9圖

Ctx - B-Raf V600E 抗原決定部位-HlyA:

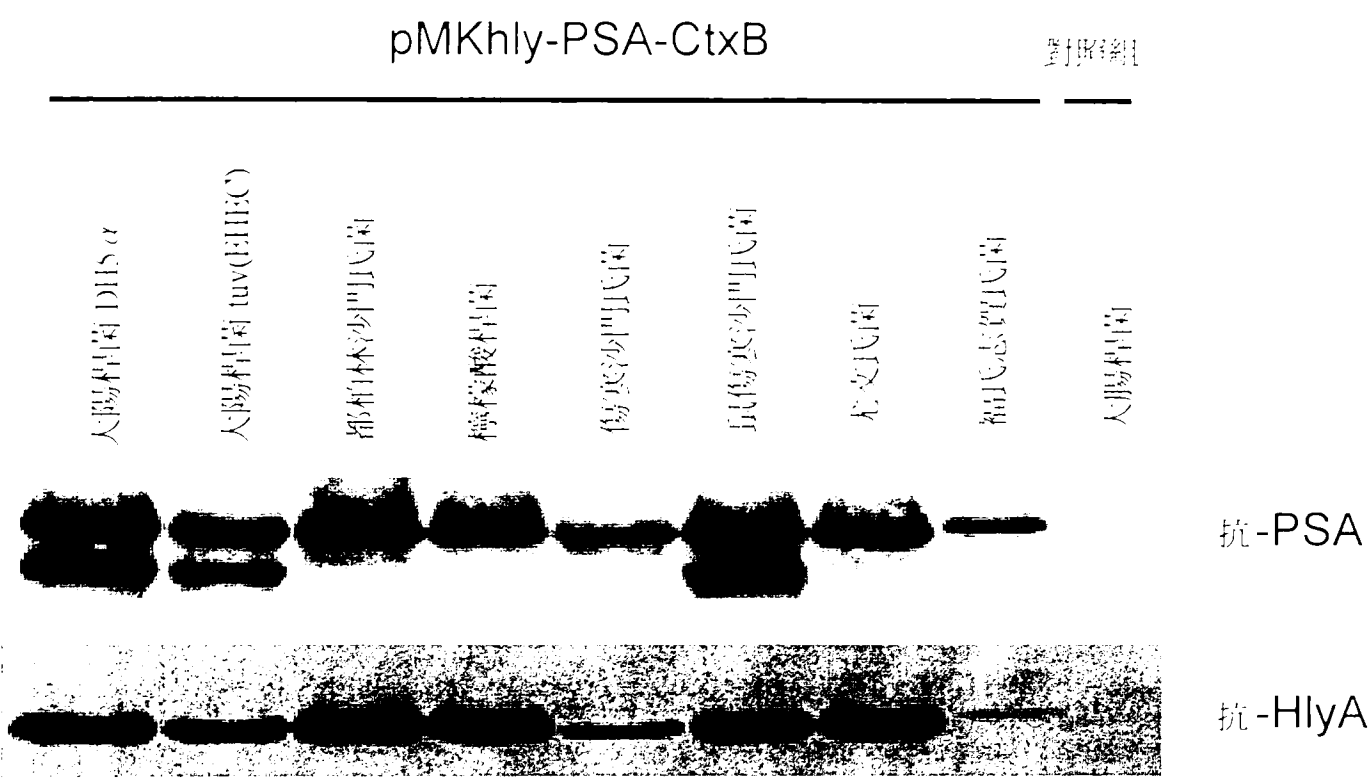
ATGACAACAATAACCACTGCACAAATTTAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATCACCTCAAAATATTACT
GATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACAAATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG
TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCA
ACTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAAAGCGATTGAA
AGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT
GTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCGGCGATTTTGGCCTGGCG
ACCGAAAAAGCGGGCGATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGCGATTTTGGCCTGGCG
ACCGAAAAAGCGGGGCATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGTGATCTTAATCCATTAATT
AATGAAATCAGCAAAATCATTTTCAGCTGCAGGTAGCTTCGATGTTAAAGAGGAAAGAACT
GCAGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAAGTCA
ATAACCCCTGACCACATCAGCATAA

第10圖

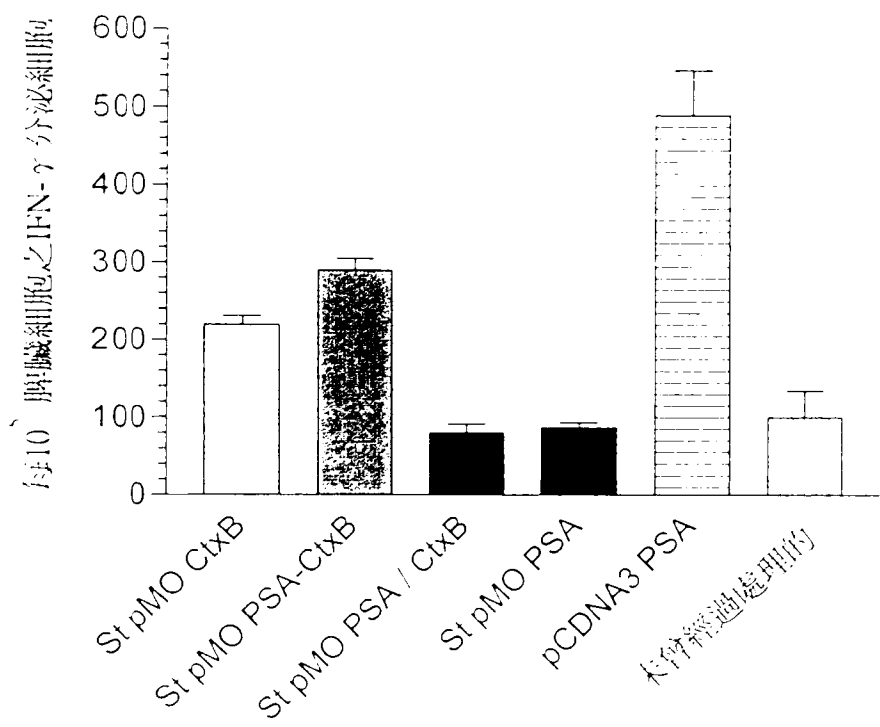
Ctx - BRAF KD - HlyA:

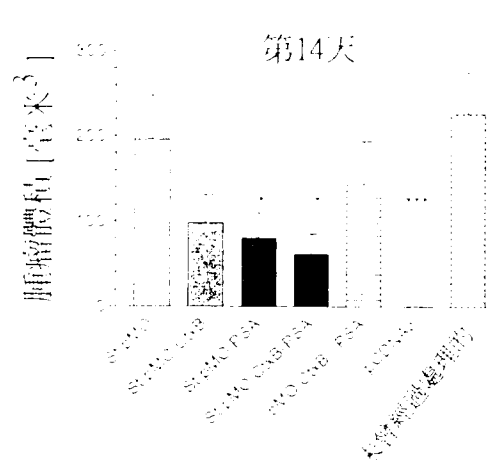
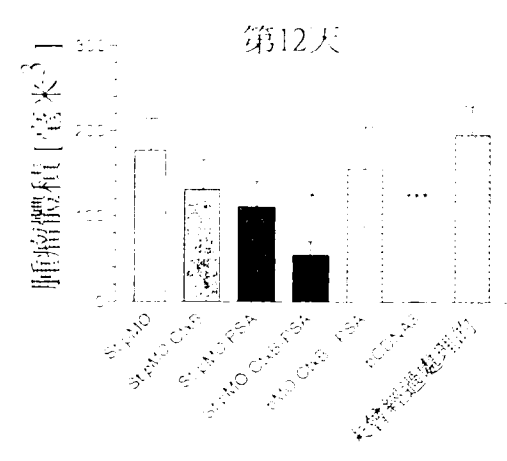
ATGCCAACAATAACCACTGCACAAATTTAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATCACCTCAAAATATTACT
GATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACAAATATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG
TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCA
ATTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAAGCGATTGAA
AGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT
GTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCGATGATTGGGAGATTCTT
GATGGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAAAGGGAAAGTGGCATGGTGTGTGGCAGTGAAA
ATGTTGAATGTGACAGCACCTACACCTCAGCAGTTACAAGCCTTCAAAAATGAAGTAGGA
GTACTCAGGAAAACACGACATGTGAATATCCTACTCTTCATGGGCTATTCCACAAAGCCA
CAACTGGCTATTGTTACCCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCTTGTATCACCATCTCCATATC
ATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACCTTATAGATATTGCACGACAGACTGCACAGGGC
ATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAATAATATATTT
CTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATCTCGA
TGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGCACCAGAA
GTCATCAGAATGCAAGATAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATATGCATTTGGG
ATTGTTCTGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATTCAAACATCAACAACAGGGAC
CAGATAATTTTTATGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCCAGATCTCAGTAAGGTACGGAGT
AACTGTCCAAAAGCCATGAAGAGATTAATGGCAGAGTGCCTCAAAAAGAAAAGAGATGAG
AGACCACTCTTTCCCCAAATTCTCGCCTCTATTGAGCTGCTGGCCCGCTCATTGCCAAAA
ATTACCCGAGTGCATCAGAACCCTCCTTGAATCGGGCTGGTTTCCAAACAGAGGATTTT
AGTCTATATGCTTGTGCTTCTCCAAAAACACCCATCCAGGCAGGGGGATATGGTGC GTTT
CCTGTCCACGGGCATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGTGATCTTAATCCATTAATTAAT
GAAATCAGCAAAATCATTTTCTGCTGCAGGTAGCTTCGATGTTAAAGAGGAAAGAACTGCA
GCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAACCTCAATA
ACCCTGACCACATCAGCATAA

第11圖

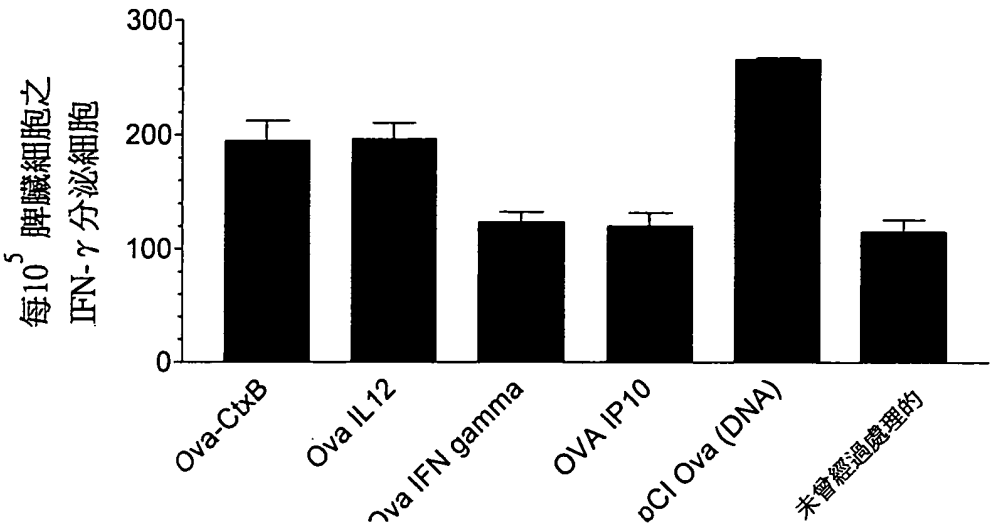


第12圖

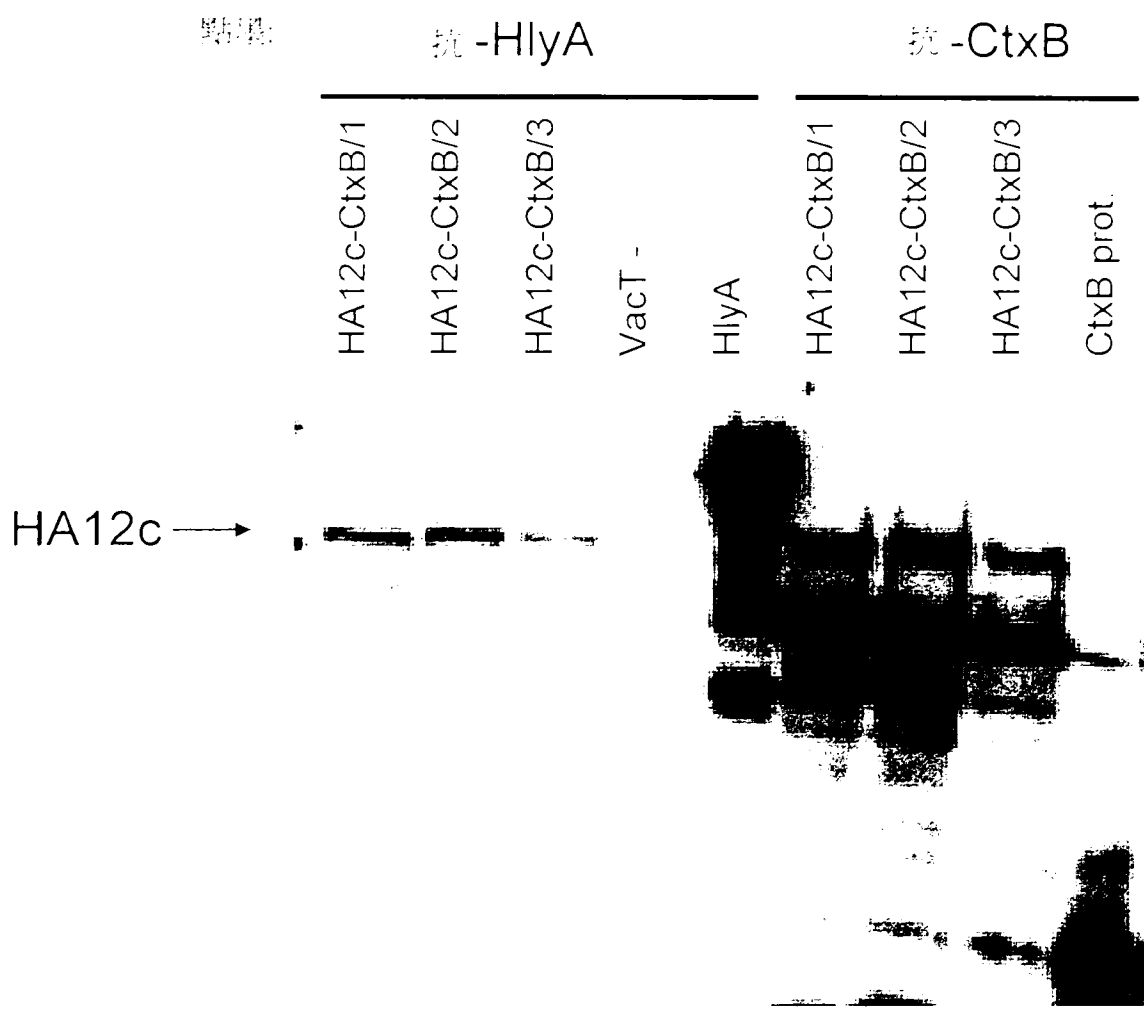




第14圖



第15圖

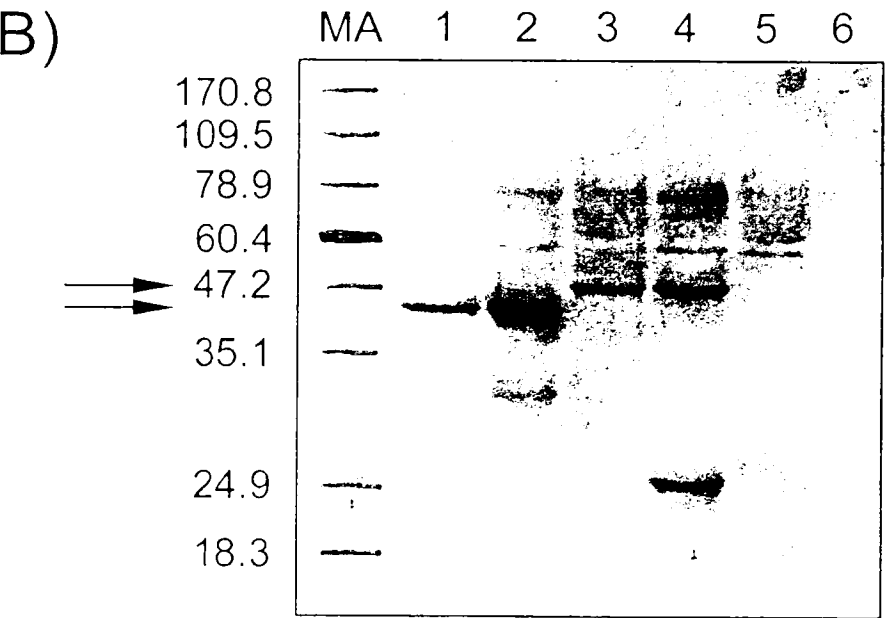
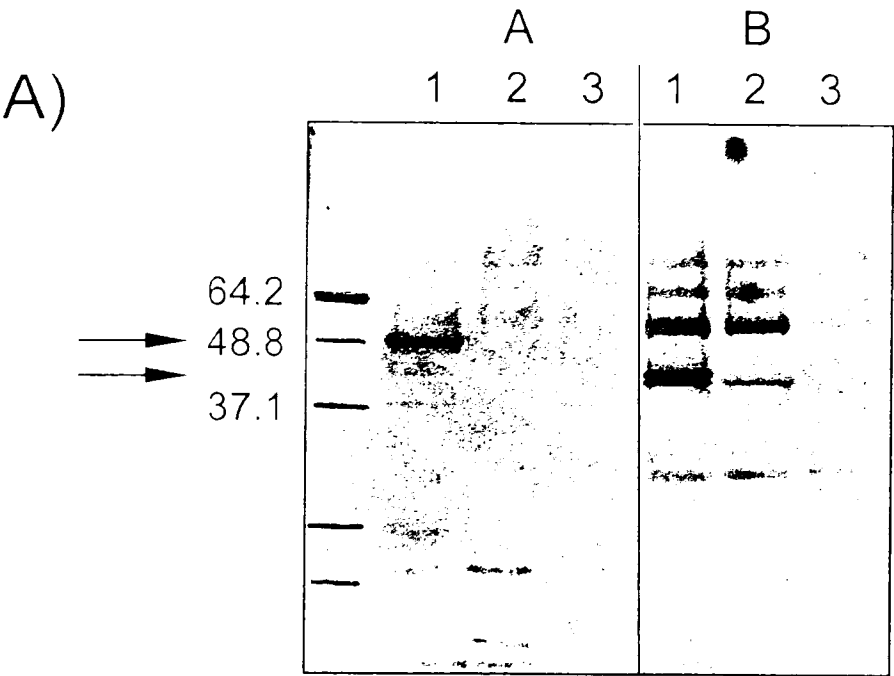


第16圖

CtxB-HA12c-HlyA:

ATGACAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
 GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATCACCTCAAATATTACT
 GATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACAAATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG
 TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCA
 ACTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAAAGCGATTGAA
 AGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT
 GTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCATCTGTCAAATGGAGAAA
 ATAGTGCTTCTTTTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTAC
 CATGCAAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACA
 CATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTG
 AAGCCTCTAATTTTGAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGT
 GACGAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCCTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAAT
 GACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGA
 ATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCC
 TCATTAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGAGAAAGTCCTCCTTTTTCAGAAATGTG
 GTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACC
 AACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAG
 ACAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACCAG
 AGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAG
 TTCTTCTGGACAATTTTAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTC
 ATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGT
 GAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAACTCT
 AGTATGCCATTCCACAATATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAA
 TCAACAGATTAGTCCTTGGGACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGA
 AAAAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATG
 GTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGAC
 AAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTTGAC
 AAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAACCTTAGAAAGGAGAATA
 GAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAA
 CTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAAC
 CTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAACTGGGTAACGGTTGT
 TTCGAGTTCTATCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAGAAACGGAACGTAT
 GACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGCAAGACTAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAGGG
 CATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGTGATCTTAATCCATTAATTAATGAAATCAGCAAA
 ATCATTTTCAGCTGCAGGTAGCTTCGATGTTAAAGAGGAAAGAACTGCAGCTTCTTTATTG
 CAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTTCATATGGACGGAACCTAATAACCCTGACCACA
 TCAGCATAA

第17圖



第18圖

載體 pMKhly 1 (完整序列):

位點	pM0 Kan	12672 bp	DNA	CIRCULAR SYN	13-NOV-2006	
定義	pM0 Kan	分泌載體				
登記關	pM0 Kan					
鍵字	.					
來源	未知					
有機體	未知					
	未分類					
參考	1 (第1至12672個鹼基)					
作者	個人					
期刊	未發表					
特性		位置/限定物				
CDS		2503..3015				
		/基因 ="HlyC"				
CDS		3027..3128				
		/基因 ="5hlyA nter"				
CDS		3129..3311				
		/基因 ="3'hlyA"				
		/產品 ="hlyA'"				
CDS		3383..5506				
		/基因 ="hlyB"				
		/產品 ="hlyB"				
CDS		5525..6961				
		/基因 ="hlyD"				
		/產品 ="hlyD"				
CDS		補體 (11029..11823)				
		/基因 ="KM-Res"				
鹼基計算	3420 a	2832 c	3095 g	3325 t		
開端						
1	GAATTCCAAG	CGAAGTCCAT	CCCCCTCCCT	CTTGATTACA	AGGGTGATAA	TTATTATTTCG
61	CATTTGTGTG	GTAATGGGAT	AGAAAGGAAT	GGATAGAAAA	AGAACAAAAT	TAGTATAGCA
121	ATAGATATGC	CCACTGCATT	GAATACTTAC	AGGGCATTAT	TTTATTATGT	TTAAATTGAA
181	GTGGTCTCTG	GTTTGATTTA	TTTGTTATTTC	AAGGGGGCTG	TTTGGAGATC	GGAAAATTCT
241	GTACGTTAAG	TGTATTATTT	AACCAGTTTC	GATGCGTAAC	AGATTGATTT	TGCGTCAGCG
301	GTTATCGCTT	TTAAGTTGTT	GCTCTTGCGC	TATCGCGTTT	AGGTTATCCG	ATTAAAGTCA
361	AATTTCTCTGA	AAATGCTGTA	TAGCGCGGGA	GTGCACCTTA	TAGCTGTAGG	TAAGTATGTT
421	CAAAAAATAG	TCTTGCCGTA	CAATAATTTT	CCATATCCAA	ACTCACTCCT	TCAAGATTCT
481	GGTCCCGGTT	TACGGGTAGT	TTCCGGAAGG	GCGGTAGCAT	GCTGATTCAA	ACTGCAAGAT
541	GAAACATTGT	CGGAGTTGGA	TGGAATTAAG	TCATGGCTAT	AGCATTTGGG	CGTGCATAAC
601	AAAATTGGTC	CTCATATTTT	AGAGTATGAT	TGCATATTCA	CTAATATTTT	TACTTTCTGA
661	TGCGTGGTGG	CATCATGCTT	TATGAGATAA	ACAATCCTGG	TAGACTAGCC	CCCTGAATCT
721	CCAGACAACC	AATATCACTT	ATTTAAGTGA	TAGTCTTAAT	ACTAGTTTTT	AGACTAGTCA
781	TTGGAGAACA	GATGATTGAT	GTCTTAGGAT	CGGAGAAACG	CAGACGGCGT	ACTACACAGG
841	AAAAGATCGC	TATCGTTCAG	CAGAGCTTTG	AACCGGGAAT	GACGGTCTCC	CTTGTTGCCC
901	GGCAACATGG	TGTGGCAGCC	AGCCAGCTAT	TTCTTGGCG	CAAGCAATAC	CAGGAGGGAA
961	GTCTTACTGC	TGTGGCTGCC	GGAGAACAGG	TCGTTCTGCG	CTCTGAACTT	GCTGCCGCCA
1021	TGAAGCAGAT	TAAAGAGCTC	CAGCGCCTGC	TCGGCAAAAA	AACGATGGAA	AATGAACCTC
1081	TTAAAGAAGC	CGTTGAATAT	GGGCGAGCAA	AAAAGTGGAT	AGCGCACGCG	CCCTTATTGC
1141	CCGGGGATGG	GGAGTAAGCT	TCGTCAGCCG	TTGTCTCCGG	GTGTCGCGTG	CGCAGTTGCA
1201	CGTCATTCTC	AGACGAACCG	ATGACTGGAA	GGACGGCCGC	CGCAGCCGTC	ACACGGATGA
1261	TACGGATGTG	CTTCGCCGTA	TACATCATGT	TATCGGAGAG	CTGCCACAT	ATGGTTATCG
1321	TCGGGTATGG	GCGCTGCTTC	GCAGACAAAC	AGAAGTTGAT	GGTATGCCTG	CGATCAATGC
1381	CAAATGTGTT	TACCGGATCA	TGTGCCAGAA	TGCGCTGTTG	CTTGAGCGAA	AACCCGCTGT
1441	ACCGCCATCG	AAACGGGCAC	ATACCGGCAG	AGTGGCTGTG	AAAGAAAGTA	ATCAGCGATG
1501	GTGCTCTGAC	GGGTTTGAGT	TCCGCTGTGA	TAACGGAGAA	AAACTGCGGG	TCACGTTCCG

第18圖-續

1561	GCTGGACTGC	TGTGATCGTG	AGGCACTGCA	CTGGGCGGTC	ACAACGGGTG	GCTTCAACAG
1621	TGAAACAGTA	CAGGACGTCA	TGCTGGGAGC	AGTGGAACGC	CGCTTTGGCA	GCGAGCTTCC
1681	GGCGTCTCCA	GTGGAGTGGC	TGACGGATAA	TGGTTCATGC	TACCGGGCGA	ATGAAACACG
1741	TCAGTTCGCC	AGGATGTTGG	GACTTGAACC	GAAGAACACG	GCAGTGCGBA	GTCCGGAGAG
1801	TAACGGAATA	ACAGAGAGCT	TCGTGAAAAC	GATAAAGCGT	GATTACATAA	GTATCATGCC
1861	CAAACCAGAC	GGGTTAACGG	CAGCAAAGAA	CCTTGCAGAG	GCGTTCGAGC	ATTATAACGA
1921	ATGGCATCCG	CATAGTGCGC	TGGGTATATC	CTCGCCACGG	GAATATCTGC	GGCAGCGGGC
1981	CAGTAATGGG	TTAAGTGATA	ACAGGTATCT	GGAAATATAG	GGGCAAATCC	ACCTGGTCAT
2041	TATCTGGAAT	TTGACGAAGT	GTGATAACTG	GTATAGCCAG	ATTAATCTAA	ACCTTTGTCT
2101	GACAAAATCA	GATAAAGAAG	AGTAGTTCAA	AAGACAACTC	GTGGACTCTC	ATTCAGAGAG
2161	ATAGGCGTTA	CCAAAATTTG	TTTGGAACTG	AACAAGAAAA	TTGTATTTGT	GTAACATAAA
2221	TCTTAATGTA	AAATAAAGA	CACCAGTTCT	GTAGAATATG	CTTATTGAAG	AGAGTGTAAT
2281	AATAATTTTA	TATAGATGTT	GTACAAAGAA	CAGGAATGAG	TAATTATTTA	TGCTTGATGT
2341	TTTTTGACTC	TTGCTTTTTA	TAGTTATTAT	TTTAAAGTTA	GTCAGCGCAA	TAAAACTTG
2401	CTTTTAATAT	TAATGCGAGT	TATGACATTA	AACGGAAGAA	ACATAAAGGC	ATATTTTTGC
2461	CACAATATTT	AATCATATAA	TTTAAAGTTG	AGTGAGTTTA	TTATGAATAT	AAACAAACCA
2521	TTAGAGATTC	TTGGGCATGT	ATCCTGGCTA	TGGGCCAGTT	CTCCACTACA	CAGAACTGG
2581	CCAGTATCTT	TGTTTGCAAT	AAATGTATTA	CCCGCAATAC	AGGCTAACCA	ATATGTTTTA
2641	TTAACCCGGG	ATGATTACCC	TGTCGCGTAT	TGTAGTTGGG	CTAATTTAAG	TTAGAAAAAT
2701	GAAATTAAAT	ATCTTAATGA	TGTTACCTCA	TTAGTTGCAG	AAGACTGGAC	TTCAGGTGAT
2761	CGTAAATGGT	TCATTGACTG	GATTGCTCCT	TTCGGGGATA	ACGGTGCCCT	GTACAAATAT
2821	ATGCGAAAAA	AATTCCCTGA	TGAACTATTC	AGAGCCATCA	GGGTGGATCC	CAAACTCAT
2881	GTTGGTAAAG	TATCAGAATT	TCATGGAGGT	AAAATTGATA	AACAGTTAGC	GAATAAAATT
2941	TTTAAACAAT	ATCACCACGA	GTTAATAACT	GAAGTAAAAA	GAAAGTCAGA	TTTTAATTTT
3001	TCATTAAGTG	GTTAAGAGGT	AATTAAATGC	CAACAATAAC	CACTGCACAA	ATTTAAAGCA
3061	CACTGCAGTC	TGCAAAGCAA	TCCGCTGCAA	ATAAATTGCA	CTCAGCAGGA	CAAAGCACGA
3121	AAGATGCATT	AGCCTATGGA	AGTCAGGGTG	ATCTTAATCC	ATTAATTAAT	GAAATCAGCA
3181	AAATCATTTT	AGCTGCAGGT	AGCTTCGATG	TTAAAGAGGA	AAGAACTGCA	GCTTCTTTAT
3241	TGCAGTTGTC	CGGTAATGCC	AGTGATTTTT	CATATGGACG	GAACTCAATA	ACCTTGACCA
3301	CATCAGCATA	ATATATTAAT	TTAAATGATA	GCAATCTTAC	TGGGCTGTGC	CACATAAGAT
3361	TGCTATTTTT	TTTGGAGTCA	TAATGGATTG	TTGTCATAAA	ATTGATTATG	GGTTATACGC
3421	CCTGGAGATT	TTAGCCCAAT	ACCATAACGT	CTCTGTAAAC	CCGGAAGAAA	TTAAACATAG
3481	ATTTGATACA	GACGGGACAG	GTCTGGGATT	AACGTCATGG	TTGCTTGCTG	CGAAATCTTT
3541	AGAACTAAAG	GTA AACAGG	TAAAAAACA	AATTGATCGA	TTAAACTTTA	TTTTCTGCC
3601	CGCATTAGTC	TGGAGAGAGG	ATGGACGTCA	TTTTATTCTG	ACTAAAATCA	GCAAAGAAGT
3661	AAACAGATAT	TTATTTTTTG	ATTTGGAGCA	GCGAAATCCC	CGTGTTCTCT	AACAGTCTGA
3721	GTTTGAGGCG	TTATATCAGG	GGCATATTAT	TCTTATTACT	TCCCGTTCTT	CTGTTACCGG
3781	GAAACTGGCA	AAATTTGACT	TTACCTGGTT	TATTCCTGCC	ATTATAAAAT	ACAGGAGAAT
3841	ATTTATTGAA	ACCCTTGTTG	TATCTGTTTT	TTTACAATTA	TTTGCATTAA	TAACCCCCCT
3901	TTTTTTCCAG	GTGGTTATGG	ACAAAGTATT	AGTGACACAG	GGGTTTTCAA	CCCTTAATGT
3961	TATTACTGTT	GCATTATCTG	TTGTAGTGGT	GTTTGAGATT	ATACTCAGCG	GTTTAAAGAC
4021	TTACATTTTT	GCACATAGTA	CAAGTCGGAT	TGATGTTGAG	TTGGGTGCCA	AACTCTCCG
4081	GCATTTACTG	GCGCTACCGA	TCTCTTATTT	TGAGAGTCGT	CGTGTGGTG	ATACTGTTGC
4141	GAGGGTAAGA	GAATTAGACC	AGATCCGTAA	TTTTCTGACA	GGACAGGCAT	TAACATCTGT
4201	TTTGGACTTA	TTATTTTCAC	TCATATTTTT	TGCGGTAATG	TGGTATTACA	GCCCAAAGCT
4261	TACTCTGGTG	ATCTTATTTT	CGCTGCCTTG	TTATGCTGCA	TGGTCTGTTT	TTATTAGCCC
4321	CATTTTGCGA	CGTCGCCTTG	ATGATAAGTT	TTCACGGAAT	GCGGATAATC	AATCTTTCCT
4381	GGTGGAAATCA	GTAACGGCGA	TTAACACTAT	AAAAGCTATG	GCAGTCTCAC	CTCAGATGAC
4441	GAACATATGG	GACAAACAAT	TGGCAGGATA	TGTTGCTGCA	GGCTTTAAAG	TGACAGTATT
4501	AGCAACCATT	GGTCAACAAG	GAATACAGTT	AATACAAAAG	ACTGTTATGA	TCATCAACCT
4561	ATGGTTGGGA	GCACACCTGG	TTATTTCCGG	GGATTTAAGT	ATTGGTCAGT	TAATTGCTTT
4621	TAATATGCTT	GCTGGTCAGA	TTGTTGCACC	GGTTATTTCG	CTTGACACAA	TCTGGCAGGA
4681	TTTCCAGCAG	GTTGGTATAT	CAGTTACCCG	CCTTGGTGAT	GTGCTTAACT	CTCCAACCTGA
4741	AAGTTATCAT	GGGAAACTGA	CATTGCCGGA	AATTAATGGT	GATATCACTT	TTCGTAATAT
4801	CCGGTTTCGC	TATAAACCTG	ATTCTCCGGT	TATTTTGGAC	AATATCAATC	TTAGTATTAA
4861	GCAGGGGGAG	GTTATTGGTA	TTGTCGGACG	TTCTGGTTCA	GGAAAAAGCA	CATTAACATA
4921	ATTAATTCAA	CGTTTTTATA	TTCCTGAAAA	TGGCCAGGTA	TTAATTGATG	GACATGATCT

第18圖-續

```

4981 TCGGTTGGCT GATCCTAACT GGTACGTCG TCAGGTGGGG GTTGTGTTGC AGGACAATGT
5041 GCTGCTTAAT CGCAGTATTA TTGATAATAT TTCACTGGCT AATCCTGGCA TGTCCTGCGA
5101 AAAAGTTATT TATGCAGCGA AATTAGCAGG CGCTCATGAT TTTATTTCTG ATTTGCGTGA
5161 GGGGTATAAC ACCATTGTCG GGAACAGGG GGCAGGATTA TCCGGAGGTC AACGTCAACG
5221 CATCGCAATT GCAAGGGCGC TGGTGAACAA CCCTAAAATA CTCATTTTTG ATGAAGCAAC
5281 CAGTGCTCTG GATTATGAGT CGGAGCATGT CATCATGCGC AATATGCACA AAATATGTAA
5341 GGGCAGAACG GTTATAATCA TTGCTCATCG TCTGTCTACA GTAAAAAATG CAGACCGCAT
5401 TATTGTCATG GAAAAAGGGA AAATTGTTGA ACAGGGTAAA CATAAGGAGC TGCTTTCTGA
5461 ACCGGAAGT TTATACAGTT ACTTATATCA GTTACAGTCA GACTAACAGA AAGAACAGAA
5521 GAATATGAAA ACATGGTTAA TGGGGTTCAG CGAGTTCCTG TTGCGCTATA AACTTGTCTG
5581 GAGTGAAACA TGGAAAATCC GGAAGCAATT AGATACTCCG GTACGTGAAA AGGACGAAAA
5641 TGAATTCTTA CCCGCTCATC TGGAATTAAT TGAAACGCCA GTATCCAGAC GGCCGCGTCT
5701 GGTTGCTTAT TTTATTATGG GGTTCCTGGT TATTGCTTTT ATTTTATCTG TTTTAGGCCA
5761 AGTGGAATTT GTTGCCACTG CAAATGGGAA ATTAACACAC AGTGGGCGTA GTAAAGAAAT
5821 TAAACCTATT GAAAACTCAA TAGTTAAAGA AATTATCGTA AAAGAAGGAG AGTCAGTCCG
5881 GAAAGGGGAT GTGTTATTAA AGCTTACAGC ACTGGGAGCT GAAGCTGATA CGTTAAAAAC
5941 ACAGTCATCA CTGTTACAGG CCAGGCTGGA ACAAACTCGG TATCAAATTC TGAGCAGGTC
6001 AATTGAATTA AATAAACTAC CTGAACATAA GCTTCCTGAT GAGCCTTATT TTCAGAATGT
6061 ATCTGAAGAG GAAGTACTGC GTTTAACTTC TTTGATAAAA GAACAGTTT CCACATGGCA
6121 AAATCAGAAG TATCAAAAAG AACTGAATTT GGATAAGAAA AGAGCAGAGC GATTAACAGT
6181 ACTTGCCCGT ATAAACCGTT ATGAAAATTT ATCAAGGGTT GAAAAAGCC GTCTGGATGA
6241 TTTCAAGTAG TTATTGCATA AACAGGCAAT TGCAAAACAT GCTGTACTTG AGCAGGAGAA
6301 TAAATATGTC GAAGCAGTAA ATGAATTACG AGTTTATAAA TCACAACTGG AGCAAATTGA
6361 GAGTGAGATA TTGTCTGCAA AAGAAGAATA TCAGCTTGTT ACGCAGCTTT TAAAAATGA
6421 AATTTTAGAT AAGCTAAGAC AAACAACAGA CAACATTGGG TTATTAATCT TGGAATTAGC
6481 GAAAAATGAA GAGCGTCAAC AGGCTTCAGT AATCAGGGCC CCAGTTTCGG GAAAAGTTCA
6541 GCAACTGAAG GTTCATACTG AAGGTGGGGT TGTTACAACA GCGGAAACAC TGATGGTCAT
6601 CGTTCCGGAA GATGACACGC TGGAGGTTAC TGCTCTGGTA CAAAATAAAG ATATTGGTTT
6661 TATTAACGTC GGGCAGAATG CCATCATTA AAGTGGAGGCA TTTCTTATA CACGATATGG
6721 TTATCTGGTG GGTAAGGTGA AAAATATAAA TTTAGATGCA ATAGAAGACC AGAGACTGGG
6781 ACTTGTTTTT AATGTTATTA TTTCTATTGA AGAGAATTGT TTGTCAACCG GGAATAAAAA
6841 CATTCCATTA AGCTCGGGTA TGGCAGTCAC TGCAGAAATA AAGACAGGTA TGCGAAGTGT
6901 AATCAGTTAT CTTCTTAGTC CTTTAGAAGA GTCAGTAACA GAAAGTTTAC GTGAGCGTTA
6961 AGTTTTCAGAA GTCCAGTATT TGCTGCTATA CGTGCTGCGT GGCATTGCC GTCTGAACGG
7021 CATTGATCCG GAAGCCAAGT CAAACAACAG CGTGATGAGC GTCAGGGCAA AACACCAAGG
7081 CTCTCTCGAT GACACCAGAA CAAATTGAAA TACGTGAGCT GAGGAAAAAG CTACCGAGTT
7141 CTTGATGTTG GACTCCCTGA ACAGTTCTCT GTAATCGGGA AACTCAGGAC GCTTATCTCT
7201 GTGGTCACAC TCTGCCATGT GTTTAGGGTT CATCACAGCA GCTACAGATA CTGGTAAAAAC
7261 CGTCCTGAAA AACCAGACGG CAGACGGGCT GTATTACGTA GTCAGGTACT TGAGCTACAT
7321 GGCATCAGTC ACGGTTTGGC CGGAGCAAGA CGTATCACC CAATGGCAAC CCGGAGAGGT
7381 GTCAGCGCCA GTGATATAAG ACGGTTAACG GTTAAAAATC GTGGCGTTGA CAACATCCCA
7441 GTGGACTGAG GTCACACAGG CCTGGCAGCA TTCCTCTTCC GGCCGGATGA CCCGGATTTC
7501 ACGGGGAAAG TACGCCGATA ACAGTTTACG GGCTGAAGAT TGGCGTAGGG AGGATAGCAG
7561 ACGTTTTGCC GCCCCATTG TCTGGAGTTG GGTGAGAAGG CATCATTTCA CCAACACCAA
7621 CATTTACAG TTACACCCCA CAGCTACATG AAGCGCTTCC ATGAATTATC GCTTTGATTT
7681 ATCATGTTAA AATAGCTCTA CACGGTTGGT TCAGGATTGC GCACCGAAAC CCTCTAAAAT
7741 CCACTGACGC GCCTGCGAAT TATCCAGCAC CGCGCCTTTC GAGATCCTCT ACGCCGGACG
7801 CATCGTGGCC GGCATCACCG GCGCCACAGG TGCGGTTGCT GGCGCCTATA TCGCCGACAT
7861 CACCGATGGG GAAGATCGGG CTCGCCACTT CGGGCTCATG AGCGCTTGTT TCGGCGTGGG
7921 TATGGTGGCA GGCCCCGTGG CCGGGGACT GTTGGGCGCC ATCTCCTTGC ATGCACCATT
7981 CTTGCGGCG GCGGTGCTCA ACGGCCTCAA CCTACTACTG GGCTGCTTCC TAATGCAGGA
8041 GTCGCATAAG GGAGAGCGTC GACCGATGCC CTTGAGAGCC TTCAACCCAG TCAGCTCCTT
8101 CCGGTGGGCG CGGGGCATGA CTATCGTCGC CGCACTTATG ACTGTCTTCT TTATCATGCA
8161 ACTCGTAGGA CAGGTGCCGG CAGCGCTCTG GGTCATTTTT GCGGAGGACC GCTTTCGCTG
8221 GAGCGCGACG ATGATCGGCC TGTCGCTTGC GGTATTCGGA ATCTTGACAC CCCTCGCTCA
8281 AGCCTTCGTC ACTGGTCCCG TCACCAAACG TTTTCGGCGAG AAGCAGGCCA TTATCGCCCG
8341 CATGGCGGCC GACGCGCTGG GCTACGTCTT GCTGGCGTTC GCGACGCGAG GCTGGATGGC

```

第18圖-續

8401	CTTCCCCATT	ATGATTCTTC	TCGCTTCCGG	CGGCATCGGG	ATGCCCGCGT	TGCAGGCCAT
8461	GCTGTCCAGG	CAGGTAGATG	ACGACCATCA	GGGACAGCTT	CAAGGATCGC	TCGCGGCTCT
8521	TACCAGCCTA	ACTTCGATCA	TTGGACCGCT	GATCGTCACG	GCGATTTATG	CCGCCTCGGC
8581	GAGCACATGG	AACGGGTTGG	CATGGATTGT	AGGCGCCGCC	CTATACCTTG	TCTGCCTCCC
8641	CGCGTTGCGT	CGCGGTGCAT	GGAGCCGGGC	CACCTCGACC	TGAATGGAAG	CCGGCGGCAC
8701	CTCGCTAACG	GATTCAACCAC	TCCAAGAATT	GGAGCCAATC	AATTCTTGCG	GAGAAGTGTG
8761	AATGCGCAAA	CCAACCCTTG	GCAGAACATA	TCCATCGCGT	CCGCCATCTC	CAGCAGCCGC
8821	ACGCGGCGCA	TCTCGGGCAG	CGTTGGGTCC	TGGCCACGGG	TGCGCATGAT	CGTGCTCCTG
8881	TCGTTGAGGA	CCCGGCTAGG	CTGGCGGGGT	TGCCTTACTG	GTTAGCAGAA	TGAATCACCG
8941	ATACGCGAGC	GAACGTGAAG	CGACTGCTGC	TGCAAAACGT	CTGCGACCTG	AGCAACAACA
9001	TGAATGGTCT	TCGGTTTCCG	TGTTTCGTAA	AGTCTGGAAG	CGCGGAAGTC	AGCGCCCTGC
9061	ACCATTATGT	TCCGGATCTG	CATCGCAGGA	TGCTGCTGGC	TACCCTGTGG	AACACCTACA
9121	TCTGTATTAA	CGAAGCGCTG	GCATTGACCC	TGAGTGATTT	TTCTCTGGTC	CCGCCGCATC
9181	CATACCGCCA	GTTGTTTACC	CTCACAACGT	TCCAGTAACC	GGGCATGTTT	ATCATCAGTA
9241	ACCCGTATCG	TGAGCATCCT	CTCTCGTTTC	ATCGGTATCA	TTACCCCAT	GAACAGAAAT
9301	CCCCCTTACA	CGGAGGCATC	AGTGACCAAA	CAGGAAAAAA	CCGCCCTTAA	CATGGCCCCG
9361	TTTATCAGAA	GCCAGACATT	AACGCTTCTG	GAGAAACTCA	ACGAGCTGGA	CGCGGATGAA
9421	CAGGCAGACA	TCTGTGAATC	GCTTCACGAC	CACGCTGATG	AGCTTTACCG	CAGCTGCCTC
9481	GCGCGTTTCG	GTGATGACGG	TGAAAACCTC	TGACACATGC	AGCTCCCGGA	GACGGTCACA
9541	GCTTGTCTGT	AAGCGGATGC	CGGGAGCAGA	CAAGCCCGTC	AGGGCGCGTC	AGCGGGTGTT
9601	GGCGGGTGTC	GGGGCGCAGC	CATGACCCAG	TCACGTAGCG	ATAGCGGAGT	GTATACTGGC
9661	TTAACTATGC	GGCATCAGAG	CAGATTGTAC	TGAGAGTGCA	CCATATGCGG	TGTGAAATAC
9721	CGCACAGATG	CGTAAGGAGA	AAATACCGCA	TCAGGCGCTC	TTCCGCTTCC	TCGCTCACTG
9781	ACTCGCTGCG	CTCGGTCGTT	CGGCTGCGGC	GAGCGGTATC	AGCTCACTCA	AAGGCGGTAA
9841	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	CAGGAAAGAA	CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC
9901	AAAAGGCCAG	GAACCGTAAA	AAGGCCGCGT	TGCTGGCGTT	TTCCATAGG	CTCCGCCCCC
9961	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	GTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT
10021	AAAGATACCA	GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	CCCTCGTGCG	CTCTCTGTT	CCGACCCTGC
10081	CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTTCTCC	CTTCGGGAAG	CGTGGCGCTT	TCTCATAGCT
10141	CACGCTGTAG	GTATCTCAGT	TCGGTGTAGG	TCGTTGCTC	CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG
10201	AACCCCCCGT	TCAGCCCGAC	CGCTGCGCCT	TATCCGGTAA	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC
10261	CGGTAAGACA	CGACTTATCG	CCACTGGCAG	CAGCCACTGG	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA
10321	GGTATGTAGG	CGGTGCTACA	GAGTTCCTGA	AGTGGTGGCC	TAACTACGGC	TACACTAGAA
10381	GGACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	AGCCAGTTAC	CTTCGGAAAA	AGAGTTGGTA
10441	GCTCTTGATC	CGGCAAAACA	ACCACCGCTG	GTAGCGGTGG	TTTTTTTGTT	TGCAAGCAGC
10501	AGATTACGCG	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	AAGATCCCTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG
10561	ACGCTCAGTG	GAACGAAAAC	TCACGTTAAG	GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAGGGA
10621	TCTTCACCTA	GATCCTTTTA	AATTAATAAT	GAAGTTTTAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG
10681	AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGCGATCT
10741	GTCTATTTTC	TTCATCCATA	GTTGCCTGAC	TCCCCATATG	AATATCCTCC	TTAGTTCCTA
10801	TTCCGAAGTT	CCTATTCTCT	AGAAAGTATA	GGAACCTCAG	AGCGCTTTTG	AAGCTGGGGT
10861	GGGCGAAGAA	CTCCAGCATG	AGATCCCCGC	GCTGGAGGAT	CATCCAGCCG	GCGTCCCGGA
10921	AAACGATTCC	GAAGCCCAAC	CTTTCATAGA	AGGCGGCGGT	GGAATCGAAA	TCTCGTGATG
10981	GCAGGTTGGG	CGTCGCTTGG	TCGGTCATTT	CGAACCCAG	AGTCCCGCTC	AGAAGAACTC
11041	GTCAAGAAGG	CGATAGAAGG	CGATGCGCTG	CGAATCGGGA	GCGGCGATAC	CGTAAAGCAC
11101	GAGGAAGCGG	TCAGCCCAT	CGCCGCCAAG	CTCTTCAGCA	ATATCACGGG	TAGCCAACGC
11161	TATGTCCTGA	TAGCGGTCCG	CCACACCCAG	CCGGCCACAG	TCGATGAATC	CAGAAAAGCG
11221	GCCATTTTCC	ACCATGATAT	TCGGCAAGCA	GGCATCGCCA	TGGGTACACG	CGAGATCCTC
11281	GCCGTCGGGC	ATGCGCGCCT	TGAGCCTGGC	GAACAGTTTC	GCTGGCGCGA	GCCCCTGATG
11341	CTCTTCGTCC	AGATCATCCT	GATCGACAAG	ACCGGCTTCC	ATCCGAGTAC	GTGCTCGCTC
11401	GATGCGATGT	TTCGCTTGGT	GGTCGAATGG	GCAGGTAGCC	GGATCAAGCG	TATGCAGCCG
11461	CCGATTGCA	TCAGCCATGA	TGGATACTTT	CTCGGCAGGA	GCAAGGTGAG	ATGACAGGAG
11521	ATCCTGCCCC	GGCACTTCGC	CCAATAGCAG	CCAGTCCCTT	CCCCTTCAG	TGACAACGTC
11581	GAGCACAGCT	GCGCAAGGAA	CGCCCGTCGT	GGCCAGCCAC	GATAGCCGCG	CTGCCTCGTC
11641	TGACAGTTCA	TTCAGGGCAC	CGGACAGGTC	GGTCTTGACA	AAAAGAACCG	GGCGCCCCTG
11701	CGCTGACAGC	CGGAACACGG	CGGCATCAGA	GCAGCCGATT	GTCTGTTGTG	CCCAGTCATA
11761	GCCGAATAGC	CTCTCCACCC	AAGCGGCCGG	AGAACCTGCG	TGCAATCCAT	CTTGTTCAAT

第18圖-續

11821	CATGCGAAAC	GATCCTCATC	CTGTCTCTTG	ATCAGATCTT	GATCCCCTGC	GCCATCAGAT
11881	CCTTGCGCGC	AAGAAAGCCA	TCCAGTTTAC	TTTGCAGGGC	TTCCCAACCT	TACCAGAGGG
11941	CGCCCCAGCT	GGCAATTCCG	GTTGCTTGC	TGTCCATAAA	ACCGCCCAGT	CTAGCTATCG
12001	CCATGTAAGC	CCACTGCAAG	CTACCTGCTT	TCTCTTTGCG	CTTGCGTTTT	CCCTTGTTCA
12061	GATAGCCCAG	TAGCTGACAT	TCATCCGGGG	TCAGCACCGT	TTCTGCGGAC	TGGCTTTCTA
12121	CGTGTTCCGC	TTCCTTTAGC	AGCCCTTGCG	CCCTGAGTGC	TTGCGGCAGC	GTGGGGGATC
12181	TTGAAGTTCC	TATTCCGAAG	TTCTATTCT	CTAGAAAGTA	TAGGAACTTC	GAAGCAGCTC
12241	CAGCCTACAC	CAAAAAAGGG	AATAAGGGCG	ACACGGAAAT	GTTGAATACT	CATACTCTTC
12301	CTTTTCAAT	ATTATTGAAG	CATTTATCAG	GGTTATTGTC	TCATGAGCGG	ATACATATTT
12361	GAATGTATTT	AGAAAAATAA	ACAAATAGGG	GTTCCGCGCA	CATTTCCCCG	AAAAGTGCCA
12421	CCTGACGTCT	AAGAAACCAT	TATTATCATG	ACATTAACCT	ATAAAAATAG	GCGTATCACG
12481	AGGCCCTTTC	GTCTTCAAGA	ATTCTCATGT	TTGACAGCTT	ATCATCGATG	GACATTATTT
12541	TTGTGGAGCC	GGAGGAAACA	GACCAGACGG	TTGAGATGAG	GCGCTTACCA	CCAGAACCGC
12601	TGTTGTCCCA	CCATTCTGGC	GATTCCCAA	CGCTATTTGG	ATAAAAAGTA	GCCTTAACGT
12661	GGTTTATTTT	CC				

//

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：第(11)圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

附件 3A：第096142857號申請專利範圍修正本

民國 101 年 12 月 25 日修正

十、申請專利範圍

1. 一種作為編碼抗原和蛋白質毒素之核苷酸序列的載體之微生物，其包含下列組成分：

(I) 至少一種編碼至少一種野生型或突變之蛋白質的至少一種完全或部分抗原之核苷酸序列；及

(II) 至少一種編碼至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位之核苷酸序列；及

(III) a) 至少一種編碼至少一種轉運系統（其可使組成分（ I ）及組成分（ II ）之表現產物表現在該微生物之外表面上及/或可使組成分（ I ）及組成分（ II ）之表現產物分泌）；及/或編碼至少一種訊號序列（其可使組成分（ I ）及組成分（ II ）之表現產物分泌）之核苷酸序列；及/或

b) 選擇性地，至少一種編碼至少一種用於於哺乳動物細胞之細胞溶質中溶解微生物及用於胞內釋出質體或表現載體（其包含在該溶解之微生物內）之蛋白質的核苷酸序列；及

(IV) 至少一種編碼至少一種用於表現一或多種組成分（ I ）至（ III ）之活化序列的核苷酸序列，其中該活化序列可在該微生物中被活化及/或為組織細胞特異性、腫瘤細胞特異性、巨噬細胞特異性、樹突細胞特異性、淋巴細胞特異性、功能特異性或非細胞特異性；

其中該組成分（Ⅰ）至（Ⅳ）中之任一可出現一次或數次且若組成分（Ⅰ）至（Ⅳ）中之一種組成分出現數次，則其可彼此各自獨立地為相同或相異；

其中組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）並非相同，亦即組成分（Ⅰ）並不編碼至少一種編碼至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位的核苷酸序列；

其中組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）並非相同；且

其中該微生物係選自大腸桿菌、沙門氏菌屬、耶爾森氏菌屬、弧菌屬、李斯特菌屬、志賀氏菌屬及假單胞菌屬。

2.如申請專利範圍第 1 項之微生物，其中排除霍亂弧菌作為微生物。

3.如申請專利範圍第 1 或 2 項之微生物，其中該組成分（Ⅰ）之至少一種野生型或突變之蛋白質的至少一種完全或部分抗原係選自下列之野生型蛋白質及彼之已知突變體：“受體；受體之胞外、跨膜或胞內部分；黏著分子；黏著分子之胞外、跨膜或胞內部分；訊號轉導蛋白質；細胞週期蛋白質；轉錄因子；分化蛋白質；胚胎蛋白質；病毒蛋白質；過敏原；微生物致病原之蛋白質；真核生物致病原之蛋白質；腫瘤睪丸抗原蛋白質；腫瘤抗原蛋白質；及/或組織-細胞特異性蛋白質”，其中該組織細胞係選自“甲狀腺、乳腺、唾液腺、淋巴結、乳腺、胃黏膜、腎臟、卵巢、前列腺、子宮頸、膀胱黏膜及神經”。

4.如申請專利範圍第 3 項之微生物，其中該組成分

(I) 之至少一種野生型或突變之蛋白質的至少一種完全或部分抗原係選自下列之野生型蛋白質及彼之已知之突變體： “ Her-2/neu、雄激素受體、雌激素受體、中期因子 (midkine) 受體、EGF 受體、ERBB2、ERBB4、TRAIL 受體、FAS、TNF α 受體、TGF- β 受體、乳鐵蛋白受體、髓鞘鹼性蛋白 (basic myelin)、 α -乳白蛋白、GFAP、纖維酸性蛋白質、酪胺酸酶、EGR-1、MUC1、c-Raf (Raf-1)、A-Raf、B-Raf、B-Raf V599E、B-Raf V600E、B-Raf KD、B-Raf V600E 激酶結構區、B-Raf V600E KD、B-Raf V600E 激酶結構區 KD、B-Raf 激酶結構區、B-Raf 激酶結構區 KD、N-Ras、K-Ras、H-Ras、Bcl-2、Bcl-X、Bcl-W、Bfl-1、Brag-1、Mcl-1、A1、Bax、BAD、Bak、Bcl-Xs、Bid、Bik、Hrk、Bcr/abl、Myb、C-Met、IAP1、IAO2、XIAP、ML-IAP LIVIN、存活素、APAF-1、細胞週期素 D (1-3)、細胞週期素 E、細胞週期素 A、細胞週期素 B、細胞週期素 H、Cdk-1、Cdk-2、Cdk-4、Cdk-6、Cdk-7、Cdc25C、p16、p15、p21、p27、p18、pRb_[r1]、p107、p130、E2F (1-5)、GAAD45、MDM2、PCNA、ARF、PTEN、APC、BRCA、Akt、PI3K、mTOR、p53 及同源物、C-Myc、NFkB、c-Jun、ATF-2、Sp1、前列腺特異性抗原 (PSA)、癌胚抗原、 α -胎兒蛋白、PAP；PSMA；STEAP；MAGE、MAGE-1、MAGE-3、NY-ESO-1、PSCA、MART、Gp100、酪胺酸酶、GRP、TCF-4、HIV 病毒、HPV 病毒、HCV 病毒、HPV 病毒、EBV 病毒、

CMV 病毒、HSV 病毒、流感病毒、A 型流感病毒、A 型流感病毒 (H5N1) 及 (H3N2)、B 型流感病毒、C 型流感病毒之病毒抗原；紅血球凝集素 (hemagglutinins)、紅血球凝集素 H1、紅血球凝集素 H5、紅血球凝集素 H7、紅血球凝集素 HA1 (宜來自 A 型流感病毒 (A/泰國/1 (KAN-1) 2004 (H5N1)、紅血球凝集素 HA12 (宜來自 A 型流感病毒 (A/泰國/1 (KAN-1) 2004 (H5N1)、紅血球凝集素 HA12C (宜來自 A 型流感病毒 (A/泰國/1 (KAN-1) 2004 (H5N1)、神經胺基酸酶、 $[r_2]p60$ 、LLO、尿素酶、CSP、calflagin 及/或 CPB” 或者，其中該組成分 (I) 之至少一種野生型或突變之蛋白質的至少一種完全或部分抗原係選自下列由野生型蛋白質及彼之已知之突變體 (括號中之編號) 所組成之激酶：

AATK (NM 004920), ABL1 (NM 005157), ABL2 (NM 005158), ACK1 (NM 005781), ACVR1 (NM 001105), ACVR1B (NM 020328), ACVR2 (NM 001616), ACVR2B (NM 001106), ACVRL1 (NM 000020), ADCK1 (NM 020421), ADCK2 (NM 052853), ADCK4 (NM 024876), ADCK5 (NM 174922), ADRBK1 (NM 001619), ADRBK2 (NM 005160), AKT1 (NM 005163), AKT2 (NM 001626), AKT3 (NM 005465), ALK (NM 004304), ALK7 (NM 145259), ALS2CR2 (NM 018571), ALS2CR7 (NM 139158), AMHR2 (NM 020547), ANKK1 (NM 178510), ANKRD3 (NM 020639), APEG1 (NM 005876), ARAF (NM 001654), ARK5 (NM 014840), ATM (NM 000051), ATR (NM 001184), AURKA (NM 003600), AURKB (NM 004217), AURKC (NM 003160), AXL (NM 001699), BCKDK (NM 005881), BCR (NM 004327), BIKE (NM 017593), BLK (NM 001715), BMPR1A (NM 004329), BMPR1B (NM 001203), BMPR2 (NM 001204), BMX (NM 001721), BRAF (NM 004333), BRD2 (NM 005104), BRD3 (NM 007371), BRD4 (NM 014299), BRDT

(NM 001726), BRSK1 (NM 032430), BRSK2 (NM 003957), BTK (NM 000061), BUB1 (NM 004336), BUB1B (NM 001211), CAB31 (NM 020247), CAMK1 (NM 003656), CaMK1b (NM 198452), CAMK1D (NM 020397), CAMK1G (NM 020439), CAMK2A (NM 015981), CAMK2B (NM 001220), CAMK2D (NM 001221), CAMK2G (NM 001222), CAMK4 (NM 001744), CAMKK1 (NM 032294), CAMKK2 (NM 006549), CASK (NM 003688), CCRK (NM 012119), CDC2 (NM 001786), CDC2L1 (NM 001787), CDC2L5 (NM 003718), CDC42BPA (NM 014826), CDC42BPB (NM 006035), CDC7L1 (NM 003503), CDK10 (NM 003674), CDK11 (NM 015076), CDK2 (NM 001798), CDK3 (NM 001258), CDK4 (NM 000075), CDK5 (NM 004935), CDK6 (NM 001259), CDK7 (NM 001799), CDK8 (NM 001260), CDK9 (NM 001261), CDKL1 (NM 004196), CDKL2 (NM 003948), CDKL3 (NM 016508), CDKL4 (NM 001009565), CDKL5 (NM 003159), CHEK1 (NM 001274), CHUK (NM 001278), CIT (NM 007174), CLK1 (NM 004071), CLK2 (NM 003993), CLK3 (NM 003992), CLK4 (NM 020666), CRK7 (NM 016507), CSF1R (NM 005211), CSK (NM 004383), CSNK1A1 (NM 001892), CSNK1D (NM 001893), CSNK1E (NM 001894), CSNK1G1 (NM 022048), CSNK1G2 (NM 001319), CSNK1G3 (NM 004384), CSNK2A1 (NM 001895), CSNK2A2 (NM 001896), DAPK1 (NM 004938), DAPK2 (NM 014326), DAPK3 (NM 001348), DCAMKL1 (NM 004734), DCAMKL2 (NM 152619), DCAMKL3 (XM 047355), DDR1 (NM 013993), DDR2 (NM 006182), DMPK (NM 004409), DMPK2 (NM 017525.1), DYRK1A (NM 001396), DYRK1B (NM 006484), DYRK2 (NM 006482), DYRK3 (NM 003582), DYRK4 (NM 003845), EEF2K (NM 013302), EGFR (NM 005228), EIF2AK3 (NM 004836), EIF2AK4 (NM_001013703), EPHA1 (NM 005232), EPHA10 (NM 001004338), EPHA2 (NM 004431), EPHA3 (NM 005233), EPHA4 (NM 004438), EPHA5 (NM 004439), EPHA6 (XM 114973), EPHA7 (NM 004440), EPHA8 (NM 020526), EPHB1 (NM 004441), EPHB2 (NM 017449), EPHB3 (NM 004443), EPHB4 (NM 004444), EPHB6 (NM 004445), ERBB2 (NM 004448), ERBB3 (NM 001982), ERBB4 (NM 005235), ERK8 (NM 139021), ERN1 (NM 001433), ERN2 (NM 033266), FASTK (NM 025096), FER (NM 005246), FES (NM 002005), FGFR1 (NM 000604), FGFR2 (NM 022970), FGFR3 (NM 000142), FGFR4 (NM 022963), FGR (NM 005248), FLJ23074 (NM 025052), FLJ23119 (NM 024652), FLJ23356 (NM 032237), FLT1 (NM 002019), FLT3 (NM 004119), FLT4 (NM 002020), FRAP1 (NM 004958), FRK (NM 002031), FYN (NM 002037), GAK (NM 005255), GPRK5 (NM 005308), GPRK6 (NM 002082), GPRK7 (NM 139209), GRK4 (NM 005307), GSG2 (NM 031965), GSK3A (NM 019884), GSK3B (NM

002093), GUCY2C (NM 004963), GUCY2D (NM 000180), GUCY2F (NM 001522), H11 (NM 014365), HAK (NM 052947), HCK (NM 002110), HIPK1 (NM 152696), HIPK2 (NM 022740), HIPK3 (NM 005734), HIPK4 (NM 144685), HRI (NM 014413), HUNK (NM 014586), ICK (NM 016513), IGF1R (NM 000875), IKBKB (NM 001556), IKBKE (NM 014002), ILK (NM 004517), INSR (NM 000208), INSRR (NM 014215), IRAK1 (NM 001569), IRAK2 (NM 001570), IRAK3 (NM 007199), IRAK4 (NM 016123), ITK (NM 005546), JAK1 (NM 002227), JAK2 (NM 004972), JAK3 (NM 000215), KDR (NM 002253), KIS (NM 144624), KIT (NM 000222), KSR (XM 290793), KSR2 (NM 173598), LAK (NM 025144), LATS1 (NM 004690), LATS2 (NM 014572), LCK (NM 005356), LIMK1 (NM 016735), LIMK2 (NM 005569), LMR3 (XM 055866), LMTK2 (NM 014916), LOC149420 (NM 152835), LOC51086 (NM 015978), LRRK2 (XM 058513), LTK (NM 002344), LYN (NM 002350), MAK (NM 005906), MAP2K1 (NM 002755), MAP2K2 (NM 030662), MAP2K3 (NM 002756), MAP2K4 (NM 003010), MAP2K5 (NM 002757), MAP2K6 (NM 002758), MAP2K7 (NM 005043), MAP3K1 (XM 042066), MAP3K10 (NM 002446), MAP3K11 (NM 002419), MAP3K12 (NM 006301), MAP3K13 (NM 004721), MAP3K14 (NM 003954), MAP3K2 (NM 006609), MAP3K3 (NM 002401), MAP3K4 (NM 005922), MAP3K5 (NM 005923), MAP3K6 (NM 004672), MAP3K7 (NM 003188), MAP3K8 (NM 005204), MAP3K9 (NM 033141), MAP4K1 (NM 007181), MAP4K2 (NM 004579), MAP4K3 (NM 003618), MAP4K4 (NM 145686), MAP4K5 (NM 006575), MAPK1 (NM 002745), MAPK10 (NM 002753), MAPK11 (NM 002751), MAPK12 (NM 002969), MAPK13 (NM 002754), MAPK14 (NM 001315), MAPK3 (NM 002746), MAPK4 (NM 002747), MAPK6 (NM 002748), MAPK7 (NM 002749), MAPK8 (NM 002750), MAPK9 (NM 002752), MAPKAPK2 (NM 032960), MAPKAPK3 (NM 004635), MAPKAPK5 (NM 003668), MARK (NM 018650), MARK2 (NM 017490), MARK3 (NM 002376), MARK4 (NM 031417), MAST1 (NM 014975), MAST205 (NM 015112), MAST3 (XM 038150), MAST4 (XM 291141), MASTL (NM 032844), MATK (NM 139355), MELK (NM 014791), MERTK (NM 006343), MET (NM 000245), MGC33182 (NM 145203), MGC42105 (NM 153361), MGC43306 (C9orf96), MGC8407 (NM 024046), MIDORI (NM 020778), MINK (NM 015716), MKNK1 (NM 003684), MKNK2 (NM 017572), MLCK (NM 182493), MLK4 (NM 032435), MLKL (NM 152649), MOS (NM 005372), MST1R (NM 002447), MST4 (NM 016542), MUSK (NM 005592), MYLK (NM 053025), MYLK2 (NM 033118), MYO3A (NM 017433), MYO3B (NM 138995), NEK1 (NM 012224), NEK10 (NM 152534), NEK11 (NM 024800), NEK2 (NM 002497), NEK3 (NM

002498), NEK4 (NM 003157), NEK5 (MGC75495), NEK6 (NM 014397), NEK7 (NM 133494), NEK8 (NM 178170), NEK9 (NM 033116), NLK (NM 016231), NPR1 (NM 000906), NPR2 (NM 003995), NRBP (NM 013392), NRBP2 (NM 178564), NRK (NM 198465), NTRK1 (NM 002529), NTRK2 (NM 006180), NTRK3 (NM 002530), OBSCN (NM 052843), OSR1 (NM 005109), PACE-1 (NM 020423), PAK1 (NM 002576), PAK2 (NM 002577), PAK3 (NM 002578), PAK4 (NM 005884), PAK6 (NM 020168), PAK7 (NM 020341), PASK (NM 015148), PCTK1 (NM 006201), PCTK2 (NM 002595), PCTK3 (NM 212503), PDGFRA (NM 006206), PDGFRB (NM 002609), PDK1 (NM 002610), PDK2 (NM 002611), PDK3 (NM 005391), PDK4 (NM 002612), PDKP1 (NM 002613), PFTK1 (NM 012395), PHKG1 (NM 006213), PHKG2 (NM 000294), PIK3R4 (NM 014602), PIM1 (NM 002648), PIM2 (NM 006875), PIM3 (NM 001001852), PINK1 (NM 032409), PKE (NM 173575), PKMYT1 (NM 004203), pknbeta (NM 013355), PLK (NM 005030), PLK3 (NM 004073), PRKAA1 (NM 006251), PRKAA2 (NM 006252), PRKACA (NM 002730), PRKACB (NM 002731), PRKACG (NM 002732), PRKCA (NM 002737), PRKCB1 (NM 002738), PRKCD (NM 006254), PRKCE (NM 005400), PRKCG (NM 002739), PRKCH (NM 006255), PRKCI (NM 002740), PRKCL1 (NM 002741), PRKCL2 (NM 006256), PRKCM (NM 002742), PRKCN (NM 005813), PRKCQ (NM 006257), PRKCZ (NM 002744), PRKD2 (NM 016457), PRKDC (NM 006904), PRKG1 (NM 006258), PRKG2 (NM 006259), PRKR (NM 002759), PRKWINK1 (NM 018979), PRKWINK2 (NM 006648), PRKWINK3 (NM 020922), PRKWINK4 (NM 032387), PRKX (NM 005044), PRKY (NM 002760), PRPF4B (NM 003913), PSKH1 (NM 006742), PSKH2 (NM 033126), PTK2 (NM 005607), PTK2B (NM 004103), PTK6 (NM 005975), PTK7 (NM 002821), PTK9 (NM 002822), PTK9L (NM 007284), PXX (NM 017771), QSK (NM 025164), RAD53 (NM 007194), RAF1 (NM 002880), RAGE (NM 014226), RET (NM 020975), RHOK (NM 002929), RIOK1 (NM 031480), RIOK2 (NM 018343), RIPK1 (NM 003804), RIPK2 (NM 003821), RIPK3 (NM 006871), RIPK5 (NM 015375), RNASEL (NM 021133), ROCK1 (NM 005406), ROCK2 (NM 004850), ROR1 (NM 005012), ROR2 (NM 004560), ROS1 (NM 002944), RPS6KA1 (NM 002953), RPS6KA2 (NM 021135), RPS6KA3 (NM 004586), RPS6KA4 (NM 003942), RPS6KA5 (NM 004755), RPS6KA6 (NM 014496), RPS6KB1 (NM 003161), RPS6KB2 (NM 003952), RPS6KC1 (NM 012424), RPS6KL1 (NM 031464), RYK (NM 002958), SBK (XM 370948), SCYL1 (NM 020680), SCYL2 (NM 017988), SGK (NM 005627), SgK069 (SU SgK069), SgK085 (XM 373109), SgK110 (SU SgK110), SGK2 (NM 016276),

SgK223 (XM 291277), SgK269 (XM 370878), SgK424 (CGP SgK424), SgK493 (SU_SgK493), SgK494 (NM 144610), SgK495 (NM 032017), SGK1 (NM 013257), SK681 (NM 001001671), SLK (NM 014720), SMG1 (NM 015092), SNARK (NM 030952), SNF1LK (NM 173354), SNF1LK2 (NM 015191), SNK (NM 006622), SNRK (NM 017719), SRC (NM 005417), SRMS (NM 080823), SRPK1 (NM 003137), SRPK2 (NM 003138), SSTK (NM 032037), STK10 (NM 005990), STK11 (NM 000455), STK16 (NM 003691), STK17A (NM 004760), STK17B (NM 004226), STK18 (NM 014264), STK19 (NM 032454), STK22B (NM 053006), STK22C (NM 052841), STK22D (NM 032028), STK23 (NM 014370), STK24 (NM 003576), STK25 (NM 006374), STK3 (NM 006281), STK31 (NM 031414), STK32B (NM 018401), STK33 (NM 030906), STK35 (NM 080836), STK36 (NM 015690), STK38 (NM 007271), STK38L (NM 015000), STK39 (NM 013233), STK4 (NM 006282), STK5 (NM 001003787), STYK1 (NM 018423), SUDD (NM 003831), SYK (NM 003177), TAF1 (NM 138923), TAF1L (NM 153809), TAO1 (NM 004783), TAOK1 (NM 020791), TAOK3 (NM 016281), TBCK (NM 033115), TBK1 (NM 013254), TEC (NM 003215), TEK (NM 000459), TESK1 (NM 006285), TESK2 (NM 007170), TEX14 (NM 031272), TGFBR1 (NM 004612), TGFBR2 (NM 003242), TIE (NM 005424), TIF1 (NM 003852), TLK1 (NM 012290), TLK2 (NM 006852), TNIK (NM 015028), TNK1 (NM 003985), TOPK (NM 018492), TP53RK (NM 033550), TRAD (NM 007064), TRIB1 (NM 025195), TRIB2 (NM 021643), TRIB3 (NM 021158), TRIM28 (NM 005762), TRIM33 (NM 015906), TRIO (NM 007118), TRPM6 (NM 017662), TRPM7 (NM 017672), TRRAP (NM 003496), TSSK4 (NM 174944), TTBK1 (NM 032538), TTBK2 (NM 173500), TTK (NM 003318), TTN (NM 003319), TXK (NM 003328), TYK2 (NM 003331), TYRO3 (NM 006293), ULK1 (NM 003565), ULK2 (NM 014683), ULK3 (NM 015518), ULK4 (NM 017886), VRK1 (NM 003384), VRK2 (NM 006296), VRK3 (NM 016440), WEE1 (NM 003390), Wee1B (NM 173677), YANK1 (NM 145001), YES1 (NM 005433), ZAK (NM 016653), 及/或 ZAP70 (NM 001079) 。

5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之微生物，其中組成分 (II) 係選自下列：“細菌毒素、腸毒素、外毒素、第 I 型毒素、第 II 型毒素、第 III 型毒素、第 IV 型毒素、第 V 型毒素、RTX 毒素、AB 毒素、A-B 毒素、A/B 毒素、A+B 毒素、A-5B 毒素及/或 AB5 毒素”。

6. 如申請專利範圍第 5 項之微生物，其中組成分

(II) 係選自下列： “腺苷酸環化酶毒素、炭疽病毒素、炭疽病毒素 (EF)、炭疽病毒素 (LF)、肉毒桿菌毒素、霍亂毒素 (CT、Ctx)、霍亂毒素次單位 B (CTB、CtxB)、白喉毒素 (DT、Dtx)、大腸桿菌 LT 毒素、大腸桿菌熱不穩定性腸毒素 (LT)、大腸桿菌熱不穩定性腸毒素次單位 B (LTB)、大腸桿菌 ST 毒素、大腸桿菌熱穩定性腸毒素 (ST)、紅斑毒素、剝脫素毒素、外毒素 A、產氣莢膜腸毒素、百日咳毒素 (PT、Ptx)、志賀毒素 (ST、Stx)、志賀毒素次單位 B (STB、StxB)、志賀樣毒素、葡萄球菌腸毒素、破傷風毒素 (TT)、中毒休克症候群毒素 (TSST-1)、Vero 毒素 (VT)、困難梭菌 (Clostridium difficile) 之毒素 A (TA) 及毒素 B (TB)、索氏梭菌 (Clostridium sordellii) 之致死毒素 (LT) 及出血性毒素 (HT)、諾維梭菌 (Clostridium novyi) 之 α 毒素 (AT) ”。

7.如申請專利範圍第 1 或 2 項之微生物，其中組成分 (I) 及組成分 (II) 係連接在一起以使由此二種組成分編碼之融合蛋白質表現及/或分泌。

8.如申請專利範圍第 7 項之微生物，其中該融合蛋白質係選自下列： “ CtxB-PSA、CtxB-B-Raf V600E KD、CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區、CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區 KD、CtxB-B-Raf、CtxB-B-Raf KD、CtxB-B-Raf 激酶結構區 KD、CtxB-HA1 及 CtxB-HA12C”。

9.如申請專利範圍第 1 或 2 項之微生物，其中組成分

(Ⅲ) a) 係選自 : “ 第 I 型分泌系統、第 II 型分泌系統、第 III 型分泌系統、第 IV 型分泌系統、第 V 型分泌系統、大腸桿菌之溶血素轉運系統 (訊號) (含有受 hly-特異性啓動子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列) 、大腸桿菌之溶血素轉運系統 (訊號) (含有受非 hly-特異性細菌啓動子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列) 、新月柄桿菌 (*Caulobacter crescentus*) 之 S 層 (Rsa A) 蛋白質之轉運訊號、大腸桿菌之 TolC 蛋白質之轉運訊號、分泌訊號 Vtgss 及 / 或衍生自李斯特菌素之分泌訊號 , p60 及 / 或 ActA ” 且其中組成分 (Ⅲ) b) 係選自 :

“ 細胞內溶素、革蘭氏陽性細菌之溶菌蛋白質、單核細胞增生李斯特菌之溶菌蛋白質、單核細胞增生李斯特菌之 PLY551 及 / 或單核細胞增生李斯特菌之 holin 蛋白 ” 。

10. 如申請專利範圍第 9 項之微生物 , 其中組成分 (Ⅲ) a) 爲至少一種僅編碼一種轉運系統之核苷酸序列 , 該轉運系統可使組成分 (I) 及組成分 (II) 之表現產物伴隨表現在該微生物之外表面上及 / 或可使組成分 (I) 及組成分 (II) 之表現產物伴隨分泌 , 其中該組成分 (Ⅲ) a) 宜爲至少一種編碼大腸桿菌之溶血素轉運系統 (訊號) 的核苷酸序列 (含有受 hly-特異性啓動子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列) 或至少一種編碼大腸桿菌之溶血素轉運系統 (訊號) 的核苷酸序列 (含有受非 hly-特異性細菌啓動子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列) 。

11.如申請專利範圍第 1 或 2 項之微生物，其中依組成分（Ⅲ）a），組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）之表現產物係被分泌。

12.如申請專利範圍第 1 或 2 項之微生物，其中

組成分（Ⅰ）係選自下列：B-Raf V600E、B-Raf V600E 激酶結構區、B-Raf V600E KD、B-Raf V600E 激酶結構區 KD、B-Raf KD、B-Raf 激酶結構區、B-Raf 激酶結構區 KD、前列腺特異性抗原（PSA）、紅血球凝集素 HA1（宜來自 A 型流感病毒（A/泰國/1（KAN-1）2004（H5N1））、紅血球凝集素 HA12（宜來自 A 型流感病毒（A/泰國/1（KAN-1）2004（H5N1））、紅血球凝集素 HA12C（宜來自 A 型流感病毒（A/泰國/1（KAN-1）2004（H5N1））；

組成分（Ⅱ）係選自下列：“霍亂毒素次單位 B（CTB、CtxB）、大腸桿菌熱不穩定性腸毒素次單位 B（LTB）、破傷風毒素（TT）”；

組成分（Ⅲ）a）係選自：“大腸桿菌之 HlyA 溶血素轉運訊號與 Hly 分泌系統之組成分（含有受 hly-特異性啟動子控制之 HlyA、HlyB 及 HlyD 之核苷酸序列）”；[r3]

組成分（Ⅳ）係選自“大腸桿菌 hly 基因位之內生性啟動子”；

其中組成分（Ⅰ）及組成分（Ⅱ）係連接在一起以使得由此二種組成分編碼之融合蛋白質表現且其中該融合蛋白質係被分泌。

13.一種藥學組成物，其包含至少一種申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之微生物（宜為至少一種經凍乾之微生物）及藥學上可接受之載體（宜為膠囊）。

14.一種藥物，其包含至少一種申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之微生物或至少一種申請專利範圍第 13 項之藥學組成物。

15.一種如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之微生物於製造用於治療及/或預防選自下列之生理學及/或病理生理學症狀之藥物上之用途：“不受控制之細胞分裂、惡性腫瘤、良性腫瘤、實體腫瘤、肉瘤、癌、過度增生病、類癌、尤文氏肉瘤、卡波西氏肉瘤、腦瘤、源自腦及/或神經系統及/或腦脊膜之腫瘤、神經膠質瘤、神經母細胞瘤、胃癌、腎臟癌、腎細胞癌、前列腺癌（prostate cancer）、前列腺癌（prostate carcinomas）、結締組織腫瘤、軟組織肉瘤、胰臟腫瘤、肝腫瘤、頭腫瘤、頸瘤、食道癌、甲狀腺癌、骨肉瘤、腎母細胞腫瘤、胸腺瘤、睪丸癌、肺癌、支氣管癌、乳癌（breast cancer）、乳癌（mamma carcinomas）、小腸癌、結腸直腸腫瘤、結腸癌、直腸癌、婦科腫瘤、卵巢腫瘤（ovary tumors）/卵巢腫瘤（ovarian tumors）、子宮癌、子宮頸癌（cervical cancer）、子宮頸癌（cervix carcinomas）、子宮體癌（cancer of body of uterus）、子宮體癌（corpus carcinomas）、子宮內膜癌、尿膀胱癌、膀胱癌、皮膚癌、基底細胞癌、脊椎瘤（spinalioma）、黑色素瘤、眼

內黑色素瘤、白血病、慢性白血病、急性白血病、淋巴瘤、感染、病毒或細菌感染、流行感冒、慢性發炎、器官排斥及/或自體免疫疾病”。

16.一種質體或表現載體，其包含申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之組成分（I）至（IV）。

17.一種用於製造申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之微生物的方法，其中係製造申請專利範圍第 16 項之質體或表現載體且藉此質體或表現載體將微生物轉形。

18.一種藥學套組，其包含至少一種申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之微生物或申請專利範圍第 13 項之藥學組成物或申請專利範圍第 14 項之藥物及藥學上可接受之緩衝劑（宜為碳酸鹽緩衝劑）。

【十一、圖式】

第1圖

hlyA:

ATGCCAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAGCCTATGGAAGTCAG
GGTGATCTTAATCCATTAATTAATGAAATCAGCAAAATCATTTCAGCTGCAGGTAGCTTC
GATGTTAAAGAGGAAAGAACTGCAGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGAT
TTTTCATATGGACGGAACCTCAATAACCCTGACCACATCAGCATAA