



# (12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110913892 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201880029699.0

(22)申请日 2018.05.02

(30)优先权数据

62/500,053 2017.05.02 US

62/561,760 2017.09.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/030725 2018.05.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/204534 EN 2018.11.08

(71)申请人 免疫治疗有限公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 特瑞·海兰

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219

代理人 金海霞 刘慧

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书104页 附图60页

(54)发明名称

包含癌抗原的LAMP(溶酶体相关膜蛋白)构  
建物

(57)摘要

本发明提供了包含LAMP腔内结构域的特定片段的LAMP构建物,以将癌抗原递送到免疫细胞,用于增强加工。这些LAMP构建物可用于治疗疾病,特别是过度增殖性障碍和/或癌症。所述LAMP构建物在施用于对象时允许呈递正确配置的三维表位,用于产生免疫应答。所述LAMP构建物可以是多价分子,和/或可以被提供为含有两种或更多种LAMP构建物的多价疫苗的一部分。本文中所描述的LAMP构建物也可用于在施用于非人类脊椎动物时产生抗体。

1. 一种改良LAMP构建物,其包含:
  - a. LAMP蛋白的半胱氨酸保守片段;和
  - b. 至少一种癌抗原。
2. 权利要求1的改良LAMP构建物,其中:
  - a. 所述抗原被放置在所述半胱氨酸保守片段的N-端处;
  - b. 所述抗原被放置在单个半胱氨酸保守片段的C-端处;或
  - c. 所述抗原被放置在两个半胱氨酸保守片段之间。
3. 权利要求1或权利要求2的改良LAMP构建物,其中所述改良LAMP构建物包含表1的第1列或第4列中所述的至少一种片段/表位,并且优选地如ILC-1、ILC-2、ILC-3、ILC-4、ILC-5或ILC-6中所示来构建。
4. 权利要求3的改良LAMP构建物,其中每个抗原被连接物隔开。
5. 权利要求4的改良LAMP构建物,其中所述连接物选自氨基酸序列GPGPG或PMGLP。
6. 前述权利要求任一项的改良LAMP构建物,其中所述改良LAMP构建物包含超过一个半胱氨酸保守片段。
7. 权利要求1-6任一项的改良LAMP构建物,其中所述半胱氨酸保守片段包含LAMP蛋白的同源结构域。
8. 权利要求1-7任一项的改良LAMP构建物,其中所述改良LAMP构建物还包含LAMP蛋白的跨膜结构域。
9. 权利要求1-8任一项的改良LAMP构建物,其中所述改良LAMP构建物还包含信号序列。
10. 权利要求9的改良LAMP构建物,其中所述信号序列源自于LAMP蛋白。
11. 权利要求1-10任一项的改良LAMP构建物,其中所述LAMP蛋白选自LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、LIMP 2、Macrosailin、Endolyn、LAMP5或LIMBIC。
12. 权利要求11的改良LAMP构建物,其中所述LAMP蛋白选自SEQ ID NO:1-113中的任一者,和/或所述癌抗原选自SEQ ID NO:114-197中的任一者。
13. 权利要求12的改良LAMP构建物,其中所述LAMP蛋白与SEQ ID NO:1-113具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%同一性,和/或所述癌抗原与SEQ ID NO:114-197具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%同一性。
14. 一种多核苷酸,其编码权利要求1-13任一项的改良LAMP构建物。
15. 一种宿主细胞,其包含权利要求14的多核苷酸。
16. 一种组合物,其包含权利要求1-13任一项的改良LAMP构建物、权利要求14的多核苷酸或权利要求15的宿主细胞。
17. 一种治疗患有疾病或障碍的对象的方法,其中所述方法包括以足以减轻或治疗所述疾病或障碍的量向需要的对象施用权利要求1-13任一项的改良LAMP构建物、权利要求14的多核苷酸、权利要求15的宿主细胞或权利要求16的组合物。
18. 权利要求17的方法,其中所述方法包括初免步骤和至少一个加强步骤。
19. 权利要求18的方法,其中权利要求1-13任一项的改良LAMP构建物、权利要求14的多核苷酸、权利要求15的宿主细胞或权利要求16的组合物被用于所述初免步骤中。
20. 权利要求18或19的方法,其中所述加强步骤包括施用抗原、改良LAMP构建物、由改

良LAMP构建物编码的多肽或包含所述改良LAMP构建物的细胞。

21. 权利要求17-20任一项的方法,其中用于初免的抗原与用于加强的抗原相同。

22. 权利要求17-21任一项的方法,其中用于初免的抗原与用于加强的第二抗原源自于同一蛋白。

23. 权利要求17-22任一项的方法,其中超过一种抗原被用于初免和/或加强。

## 包含癌抗原的LAMP (溶酶体相关膜蛋白) 构建物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及包含癌抗原的改良LAMP构建物以及它们在治疗患有过度增殖性障碍和/或癌症的对象中的用途。还描述了利用本文描述的改良LAMP构建物的初免-加强 (prime boost) 方案。

### 背景技术

[0002] 在下面的讨论中,出于背景和介绍的目的将描述某些文章和方法。本文包含的任何内容都不应被解释为对现有技术的“承认”。申请人明确保留在适当情况下证明本文参考的文章和方法在适用的法律规定下不构成现有技术的权力。

[0003] DNA疫苗是用于开发预防性和治疗性疫苗两者的新的且有希望的候选物。它们被证明是安全的,并且如果需要重复的疫苗接种循环以获得临床益处,则缺少对载体骨架的免疫应答可能是明确的优势。然而,常规DNA疫苗的一种察觉到的缺点是它们在人类中的低免疫原性。基于表位的DNA疫苗的免疫原性中的关键限制步骤可能是表位进入MHC II呈递途径到达T细胞,这在不使用靶向技术的疫苗的情况下可能是随机的过程。

[0004] 美国专利号5,633,234描述了包含修饰的流感血凝素 (HA) 的抗原性结构域和胞质胞内体/溶酶体靶向信号的嵌合蛋白,所述靶向信号有效地将抗原靶向该区室。所述抗原性结构域被加工,并且来自于它的肽与主要组织相容性 (MHC) II类分子联合呈递在细胞表面上。LAMP-1的胞质尾区被用于形成所述嵌合蛋白的胞内体/溶酶体靶向结构域。

[0005] 美国专利号8,318,173扩展了这些初始的观察,描述了包含插入在LAMP-1的完整腔内结构域与跨膜结构域之间的HIV-1Gag蛋白的嵌合蛋白 (以及编码这些蛋白的相应DNA)。将这种构建物引入到树突状细胞中,所述细胞随后被报道为靶向MHC II途径。

[0006] 这种方法已被证明可用于提高针对几种病毒抗原的细胞和体液应答,所述病毒抗原是人类乳头瘤病毒E7、登革病毒膜蛋白、HIV-1gp160膜蛋白、HIV-1p55 Gag、西尼罗病毒膜蛋白、丙型肝炎病毒NS3蛋白和巨细胞病毒pp65 (参见例如Bonini等, J. Immunol. 166: 5250-5257, 2001)。所述增强的免疫应答可以归因于LAMP与MHC II的共定位以及抗原性肽的更高效的加工和递送。此外, LAMP靶向据报道引起数目增加的免疫原性表位的呈递,因此与非靶向抗原相比诱导在定性水平上拓宽的免疫应答。例如, Fernandes等, 2000, Eur. J. Immunol. 30 (8): 2333-43证实了在痘苗病毒载体中编码的LAMP转运的OVA抗原的被呈递的肽的数目增加。在从外源供应的OVA产生的12种肽中, 9种被OVA/LAMP嵌合体呈递, 相比较而言只有2种被不含LAMP的构建物呈递。

[0007] 尽管已确定LAMP的胞质结构域是必需的 (与信号序列和跨膜结构域相结合), 但它对所有抗原的胞内体/溶酶体转运来说不总是足够的。相反, 已显示LAMP的完整腔内结构域对于蛋白质向溶酶体囊泡途径的转运来说也是需要的。

[0008] 然而, 即使存在LAMP的完整腔内结构域和完整跨膜/胞质尾区 (“完全LAMP构建物”), 但仍越来越多地发现, 特定抗原引起免疫应答的效能高度依赖于在这些构建物中使用的具体序列。事实上已发现, 当被插入到完全LAMP构建物中时, 同一蛋白的不同抗原性片



段不引发相同的免疫应答。所述抗原片段有时产生免疫应答,其他时候则不产生。这些观察使得在使用完全LAMP构建物时,事先预测来自于感兴趣的蛋白质的哪个特定抗原性序列将引起免疫应答的能力变得困难。

[0009] 此外,在产生完全LAMP构建物中,已反复地观察到为了正确地表达和加工抗原,需要完整腔内结构域。例如,在Godinho等,PLoS ONE 9 (6) :e99887.doi:10.1371/journal.pone.0099887中,作者报道了所述完全和完整的腔内结构域是将抗原靶向溶酶体所需的最小必需区域,并且所述腔内结构域的片段不起作用。参见同上,第6页。

[0010] 具体来说,作者Godinho显示,通过完全去除第一腔内结构域和一部分第二腔内结构域(即T1-Lum/gag构建物),蛋白质表达和抗体应答两者降低。同样地,去除25%的第一腔内结构域单具有完整的第二腔内结构域(即T2-lum/gag),蛋白质表达和抗体应答两者相对提高,但仍低于使用完全LAMP构建物获得的结果。

[0011] 此外,所述作者承认引起免疫应答的能力取决于具体抗原和在这些完全LAMP构建物中使用的表位。例如,在第9页第2栏中,作者陈述道“因此,以前的研究证实,产生作为VLP分泌或采取可溶形式的Gag的DNA疫苗诱导不同水平的T和B细胞活化,其也不同于由胞质Gag诱导的应答”。此外,正如文献中已经描述的抗原性序列在LAMP的完整腔内结构域与LAMP的完整跨膜/胞质结构域之间的插入可以产生如此大的多核苷酸序列,使得在商业化水平上生产可能变得过于昂贵或者从科学观点来看不现实。

[0012] 因此,对设计可用作疫苗以有效治疗例如过度增殖性障碍和/或癌症的新的改良LAMP构建物,存在着需求。此外,在改进后,这些新的LAMP构建物可用于产生抗体。

## 发明内容

[0013] 提供该发明内容是为了以简化形式介绍所选的概念,所述概念在下文的详细描述中被进一步描述。该发明内容不打算鉴定要求保护的主体内容的关键或基本特征,也不打算用于限制所述要求保护的主体内容的范围。根据下面书写的详细描述(包括在附图中图示和在随附的权利要求书中定义的那些方面),所述要求保护的主体内容的其他特征、细节、用途和优点将显而易见。

[0014] 本发明的一个目的是提供包含LAMP结构域的特定片段和/或变体的新的构建物(“改良LAMP构建物”),将其将本文所述的癌抗原有效地呈递到免疫系统,以产生增强的免疫应答。这些改良LAMP构建物有效地将所述抗原导向溶酶体/胞内体区室,在那里它们被加工并呈递到II类主要组织相容性复合物(MHC)分子,使得辅助性T细胞被优先刺激和/或产生抗体。

[0015] 本文描述的改良LAMP构建物和方法可以在对象中引发免疫应答。所述免疫应答可以是针对所述改良LAMP构建物(例如疫苗)中的抗原的表位的免疫应答。疫苗武装所述对象的免疫系统,使得所述免疫系统可以检测并破坏所述对象中含有所述疫苗的抗原的物质。本文描述的改良LAMP构建物和方法可以在所述对象中引发Th1免疫应答。Th1免疫应答可以包括免疫细胞的亚类(例如抗原特异性T-细胞)分泌炎性细胞因子(例如IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ )。在某些情况下,所述炎性细胞因子活化另一种亚型的免疫细胞(例如细胞毒性T-细胞),所述另一种亚型的免疫细胞可以破坏所述对象中含有所述抗原的物质。

[0016] 在某些情况下,在本文中描述的改良LAMP构建物和方法中使用的表位和/或抗原

可以被对象的免疫系统识别,以引发Th1免疫应答并释放I型细胞因子。所述Th1应答可能是由所述表位与所述T-细胞、更具体来说所述T-细胞表达的主要组织相容性复合物(MHC)之间的相互作用启动的。例如,表位与MHC受体的高亲和性结合可以刺激Th1应答。MHC受体可以是多种类型的MHC受体中的至少一种。接合在T-细胞上的MHC受体在群体中的个体之间可以不同。

[0017] 在某些情况下,所述免疫应答是I型免疫应答。在某些情况下,所述免疫应答的特征在于I型细胞因子生产与II型细胞因子生产之比大于1。在某些情况下,所述免疫应答的特征在于I型细胞因子生产与II型细胞因子生产之比小于1。在某些情况下,所述免疫应答的特征在于IFN $\gamma$ 生产与IL-10生产之比大于1。在某些情况下,所述免疫应答的特征在于IFN $\gamma$ 生产与IL-10生产之比小于1。

[0018] 也设想了初免-加强方案。例如,本发明还提供了一种在对象中产生针对癌抗原的免疫应答的方法,所述方法包括用本文中描述的包含癌抗原的改良LAMP构建物初免所述对象,然后用所述抗原或相关抗原(例如源自于相同或高度相似的蛋白质序列的第二抗原)对所述对象进行至少一次加强。在所述初免和加强步骤的任一者或两者中,可以使用抗原的混合物。已显示,将改良LAMP构建物用于初免步骤然后用于抗原加强步骤显著产生了更高的滴度,表明了LAMP在增强抗体应答中的能力。

[0019] 本发明的另一个目的是通过经辅助性T细胞的刺激引发抗肿瘤免疫应答,提供治疗癌症和/或过度增殖性障碍的改进的方法。

[0020] 本发明还提供了编码本文中描述的任何包含癌抗原的改良LAMP构建物的核酸分子。本发明还提供了包含抗原的改良LAMP构建物,以产生抗体。所述改良LAMP构建物可以包含其中所述核酸分子被可操作地连接到表达控制序列的核酸。在一种优选情况下,所述改良LAMP构建物是适合于对患者进行疫苗接种的疫苗载体。另一方面,本发明提供了包含所述改良LAMP构建物的递送媒介,以便于将编码所述抗原的核酸分子引入到细胞中。所述递送媒介可以是基于脂质的(例如脂质体制剂)、基于病毒的(例如包含包封所述核酸分子的病毒蛋白)或基于细胞的。

[0021] 在优选实施方式中,本发明提供了一种可注射组合物,其包含含有感兴趣的癌抗原的改良LAMP构建物,用于在哺乳动物中引发针对所述癌抗原的免疫应答(例如抗体的产生)。在优选实施方式中,相对于Th2应答,这种疫苗优先产生Th1应答。所述改良LAMP构建物包含本文中描述的癌抗原的至少一个表位。

[0022] 本发明还提供了包含本文中描述的任何改良LAMP构建物的细胞。在一种情况下,所述细胞是抗原呈递细胞。所述抗原呈递细胞可以是专业抗原呈递细胞(例如树突状细胞、巨噬细胞、B细胞等)或工程化改造的抗原呈递细胞(例如被工程化改造成表达抗原呈递所需的分子例如II类MHC分子的非专业抗原呈递细胞)。所述抗原呈递所需的分子可以源自于其他细胞例如天然存在的细胞,或者它们本身可以被工程化改造(例如突变或修饰以表现出所需性质,例如对抗原性表位更高或更低的亲和性)。在一种情况下,所述抗原呈递细胞不表达任何辅助刺激信号,并且所述抗原是自身抗原。

[0023] 本发明还提供了一种试剂盒,其包含含有本文中描述的任何改良LAMP构建物的多种细胞。至少两种所述细胞表达不同的II类MHC分子,并且每种细胞包含相同的LAMP构建物。在一种情况下,提供了一种试剂盒,其包含改良LAMP构建物和用于接受所述载体的细

胞。

[0024] 本发明还提供了一种转基因动物,其包含本文中描述的至少一种细胞和/或至少一种改良LAMP构建物。本发明还提供了一种转基因动物,其包含至少一种本文中描述的细胞。

[0025] 本发明还提供了一种在动物(例如人类或非人类脊椎动物)中产生针对抗原的免疫应答的方法,所述方法包括:向所述动物施用如上所述的细胞,其中所述细胞在所述动物中表达或可以被诱导表达所述改良LAMP构建物。在一种情况下,所述细胞包含与所述动物的MHC蛋白相容的II类MHC分子,使得所述动物不产生针对所述II类MHC分子的免疫应答。在一种优选情况下,所述动物是人类。

[0026] 另一方面,本发明提供了一种引发针对癌抗原的免疫应答的方法,所述方法包括向动物例如人类或非人类脊椎动物施用本文中描述的任何改良LAMP构建物。优选地,所述改良LAMP构建物对于所述动物的细胞来说是感染性的。例如,所述改良LAMP构建物可以是病毒载体,例如痘苗病毒的改良LAMP构建物。

[0027] 例如,本发明还提供了一种在动物中产生针对癌抗原的免疫应答的方法,所述方法包括用本文中描述的包含抗原的改良LAMP构建物初免所述动物,然后是所述动物的至少一次加强。已显示,将改良LAMP构建物用于初免步骤然后用于抗原加强步骤显著产生了更高的滴度,表明了LAMP在增强抗体应答中的能力。

[0028] 在另一种情况下,从患者获得细胞,将本文中描述的改良LAMP构建物引入到所述细胞中,并将所述细胞或所述细胞的后代重新引入到所述患者中。在一种情况下,所述细胞是能够分化成抗原呈递细胞的干细胞。具体来说设想了人类患者的治疗以及兽医应用。

[0029] 本发明还包括在非人类脊椎动物中产生抗体的方法,其中将所述非人类脊椎动物用本文中描述的包含感兴趣的抗原的改良LAMP构建物注射。然后,在所述非人类脊椎动物中,所述感兴趣的癌抗原在LAMP的帮助下被高效呈递到免疫系统,产生针对所述抗原的抗体。

[0030] 具体来说,通过所述感兴趣的抗原与LAMP的组合呈递,所述抗原随后被有效地运输到胞质胞内体/溶酶体区室,在那里所述抗原可以被加工,并且来自于所述抗原的肽与II类主要组织相容性(MHC)分子相结合被呈递在细胞表面上。

[0031] 这些产生的抗体可以从所述脊椎动物的血液分离(作为多克隆),然后使用标准技术进一步分离以产生单克隆抗体。

[0032] 在优选实施方式中,所述非人类脊椎动物的基因组包含引入的部分人类免疫球蛋白区,所述引入的区域包含人类免疫球蛋白可变区基因座的编码序列和基于所述非人类脊椎动物的内源性免疫球蛋白可变区基因座的非编码序列。优选地,非人类脊椎动物的基因组被移除了至少一部分或所有的内源性免疫球蛋白区。

[0033] 在其他优选实施方式中,在非人类脊椎动物中生产人类单克隆抗体,要求所述宿主具有至少一个表达人类重链免疫球蛋白的基因座和至少一个表达人类轻链免疫球蛋白的基因座。

[0034] 在某些情况下,所述部分人类免疫球蛋白可变区基因座包含人类V<sub>H</sub>编码序列和基于所述非人类脊椎动物的内源性V<sub>H</sub>区的非编码V<sub>H</sub>序列。在这些情况下,所述部分人类免疫球蛋白可变区基因座还包含人类D和J基因编码序列和基于所述非人类脊椎动物宿主的内源

性基因组的非编码D和J基因序列。

[0035] 在其他情况下,所述免疫球蛋白区包含引入的区域,所述引入的区域含有人类V<sub>L</sub>编码序列和基于所述非人类脊椎动物的内源性V<sub>L</sub>区的非编码V<sub>L</sub>序列。更优选地,所引入的包含人类V<sub>L</sub>编码序列的部分人类免疫球蛋白区还包含人类J基因编码序列和基于所述非人类脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码J基因序列。

[0036] 在某些情况下,所述脊椎动物是哺乳动物,并且优选地所述哺乳动物是啮齿动物例如小鼠或大鼠。在其他情况下,所述脊椎动物是禽类,例如鸡。其他非人类脊椎动物包括兔、美洲驼、骆驼、奶牛、豚鼠、仓鼠、狗、猫、马、非人类灵长动物、猿猴(例如猴或猿)、猴(例如狨猴、狒狒、恒河猴)或猿(例如大猩猩、黑猩猩、猩猩、长臂猿)。

[0037] 在其他实施方式中,所述部分人类免疫球蛋白区包含人类V<sub>H</sub>基因编码区,并且还包含i) 人类D和J基因编码序列,和ii) 基于所述非人类脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码D和J基因和pre-DJ序列。在其他情况下,所述V<sub>H</sub>基因编码区源自于(至少部分源自于)其他来源,例如它们可以是合理设计或以其他方式设计的序列,作为人类序列和其他设计序列的組合的序列,或来自于其他物种例如非人类灵长动物的序列。

[0038] 在另一种特定情况下,所述部分人类免疫球蛋白区包含人类V<sub>L</sub>基因编码区,并且还包含i) 人类J基因编码序列,和ii) 基于所述非人类脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码J基因序列。在特定情况下,所述部分人类免疫球蛋白区包含人类V<sub>H</sub>编码区、人类D和J基因编码序列以及基于所述非人类脊椎动物宿主的内源性基因组的非编码D和J基因和pre-DJ序列。

[0039] 本文中描述的方法可用于诊断和治疗用途的抗体(包括完全人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体)的生产和/或优化。生产这些抗体的杂交瘤也是本发明的另一个目的。

[0040] 下文中更详细地描述了这些以及其他的方面、目的和特征。

## 附图说明

[0041] 参考下面的详细描述和附图,可以更好地理解本发明的目的和特征。

[0042] 图1示出了可以如本文中所述使用的不同类型的改良LAMP构建物(被鉴定为ILC-1、ILC-2、ILC-3、ILC-4、ILC-5和ILC-6)的总体方案。

[0043] 图2B示出了本文中定义的LAMP蛋白的结构域,而图2A定义了这些结构域的具体氨基酸边界,所述LAMP蛋白是人类LAMP-1 (SEQ ID NO:1)、人类LAMP-2 (SEQ ID NO:2)、人类LAMP-3 (SEQ ID NO:3)、人类LAMP-4 (SEQ ID NO:4)、人类Endolyn (SEQ ID NO:5)、人类Macrosailin (SEQ ID NO:80)、人类LAMP-5 (SEQ ID NO:93) 和人类LIMBIC (SEQ ID NO:67)。正如本文中描述的,所述LAMP腔内结构域、同源结构域、跨膜结构域、胞质尾区和所述信号序列可用于产生本文中所描述的改良LAMP构建物ILC-1、ILC-2、ILC-3、ILC-4、ILC-5和ILC-6。

[0044] 图3提供了在其他物种中发现的LAMP-1蛋白与人类LAMP-1 (SEQ ID NO:1) 相比的比对。这些其他物种的对等结构域可用于产生本文中描述的改良LAMP构建物,并且通过将图2和图3中为人类LAMP-1鉴定的结构域与图3中示出的比对进行比较可以容易地鉴定。

[0045] 图4提供了在其他物种中发现的LAMP-2蛋白与人类LAMP-2 (SEQ ID NO:2) 相比的比对。这些其他物种的对等结构域可用于产生本文中描述的改良LAMP构建物,并且通过将

图2和图4中为人类LAMP-2鉴定的结构域与图4中示出的比对进行比较可以容易地鉴定。

[0046] 图5提供了在其他物种中发现的LAMP-3蛋白与人类LAMP-3 (SEQ ID NO:3) 相比的比对。这些其他物种的对等结构域可用于产生本文中描述的改良LAMP构建物,并且通过将图2和图5中为人类LAMP-3鉴定的结构域与图5中示出的比对进行比较可以容易地鉴定。

[0047] 图6提供了在其他物种中发现的LIMP-2蛋白与人类LIMP-2 (SEQ ID NO:4) 相比的比对。这些其他物种的对等结构域可用于产生本文中描述的改良LAMP构建物,并且通过将图2和图6中为人类LIMP-2鉴定的结构域与图6中示出的比对进行比较可以容易地鉴定。

[0048] 图7提供了在其他物种中发现的LIMBIC蛋白与人类LIMBIC (SEQ ID NO:67) 相比的比对。这些其他物种的对等结构域可用于产生本文中描述的改良LAMP构建物,并且通过将图2和图7中为人类LIMBIC鉴定的结构域与图7中示出的比对进行比较可以容易地鉴定。

[0049] 图8提供了在其他物种中发现的Endolyn蛋白与人类Endolyn (SEQ ID NO:5) 相比的比对。这些其他物种的对等结构域可用于产生本文中描述的改良LAMP构建物,并且通过将图2和图8中为人类Endolyn鉴定的结构域与图8中示出的比对进行比较可以容易地鉴定。

[0050] 图9提供了在其他物种中发现的Macrosailin蛋白与人类Macrosailin (SEQ ID NO:80) 相比的比对。这些其他物种的对等结构域可用于产生本文中描述的改良LAMP构建物,并且通过将图2和图9中为人类Macrosailin鉴定的结构域与图9中示出的比对进行比较可以容易地鉴定。

[0051] 图10提供了在其他物种中发现的LAMP-5蛋白与人类LAMP-5 (SEQ ID NO:93) 相比的比对。这些其他物种的对等结构域可用于产生本文中描述的改良LAMP构建物,并且通过将图2和图10中为人类LAMP-5鉴定的结构域与图10中示出的比对进行比较可以容易地鉴定。

[0052] 图11示出了当将小鼠在第0、7和14天用HVEM-LAMP、HVEM或LAMP免疫接种时获得的结果。在第28天,对小鼠采血并分离血清样品。通过ELISA检查HVEM特异性IgG。数据表示抗体滴度的几何平均值 $\pm$ 几何SD,  $n=6$ 。\*\*\* $p$ 值 $<0.01$ 。

[0053] 图12示出了当将小鼠在第0、7和14天用HVEM-LAMP、HVEM或LAMP免疫接种时获得的结果。在第35天,将小鼠在铝佐剂存在下用 $5\mu\text{g}$  HVEM蛋白加强。在第49天对小鼠采血并分离血清样品。通过ELISA检查HVEM特异性IgG。数据表示抗体滴度的几何平均值 $\pm$ 几何SD,  $n=6$ 。\*\*\* $p$ 值 $<0.001$ ;\*\*\*\* $p$ 值 $<0.0001$ 。

[0054] 图13显示LAMP改变了HVEM的CRD3/4中的表位的结合亲和性。

[0055] 图14证实了所试验的改良LAMP构建物的蛋白质表达。在图14-28每一者中,标注“完全LAMP构建物”、ILC-1、ILC-2、ILC-3和ILC-4对应于图1中所描绘的构建物。

[0056] 图15显示所述改良LAMP构建物诱导产生 $\text{INF } \gamma$  的Th1效应T细胞。

[0057] 图16示出了针对所有存活蛋白肽合并物引发显著更高的T细胞应答的特定的改良LAMP构建物(例如图1中所示的ILC-4)。

[0058] 图17显示CD4<sup>+</sup> T细胞是 $\text{INF } \gamma$  产生细胞的主要来源,并且所述改良LAMP构建物与完全LAMP构建物相比表现出CD4效应记忆细胞群体的增加。

[0059] 图18显示出所述改良LAMP构建物在BALB/c小鼠中产生更强的存活蛋白特异性总IgG应答。

[0060] 图19和20提供了可以如表1和段落[150]中所述单个或组合地克隆到本文和图1-

10中描述的LAMP构建物中的癌抗原的氨基酸序列。此外,图19提供了实施例中所试验的存活蛋白-LAMP构建物的氨基酸序列。每种构建物的信号序列用小写且带下划线的字母描述;存活蛋白序列用具有黑色阴影的大写白色字母描述;腔内结构域用斜体大写字母描述,并且跨膜/胞质结构域用具有灰色阴影的大写字母表示,并且在ILC-4中,第二同源结构域被加粗。可以包括其他氨基酸(LE和EF)作为克隆连接物的一部分。

[0061] 图21示出了IGFBP2 (39-328)-ILC-1构建物在10 $\mu$ g IM/EP免疫接种的剂量下诱导显著更高的产生IFN $\gamma$ 的效应T细胞。

[0062] 图22示出了IGFBP2 (39-328)-ILC-1构建物在10 $\mu$ g IM/EP免疫接种的剂量下诱导产生IFN $\gamma$ 和/或TNF $\alpha$ 的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>效应记忆T细胞。

[0063] 图23示出了通过IM/EP免疫接种用IGFBP2 (39-328)-ILC-1构建物免疫接种的C57BL/6白化病小鼠中IGFBP-2-特异性IgG的产生。

[0064] 图24示出了用pp65和gB肽两者进行的IFN $\gamma$ 诱导。

[0065] 图25示出了免疫接种小鼠血清中针对CMV转染的细胞裂解物的总IgG(左)和IgG2a(右)抗体滴度。

[0066] 图26示出了PSMA-ILC-1LAMP构建物在20 $\mu$ g ID/EP免疫接种的剂量下诱导显著更高的产生IFN $\gamma$ 的效应T细胞。

[0067] 图27示出了PSMA-ILC-1LAMP构建物在20 $\mu$ g ID/EP免疫接种的剂量下诱导产生IFN $\gamma$ 的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>效应记忆T细胞。

[0068] 图28示出了通过ID/EP免疫接种用PSMA-ILC-1LAMP构建物免疫接种的C57BL/6小鼠中的总IgG和IgG2A产生。

## 具体实施方式

[0069] 本发明提供了可用于产生疫苗和/或用于产生抗体的改良LAMP构建物。所述改良LAMP构建物可用于调节或增强免疫应答。在一种优选情况下,本发明提供了一种通过提供包含本文中描述的一种或多种癌抗原的改良LAMP构建物来治疗患有癌症或过度增殖性障碍的患者的方法。所述改良LAMP构建物也可用于在非人类脊椎动物中、优选为非人类哺乳动物中产生抗体。

### [0070] 定义

[0071] 为下面书面描述中使用的特定术语,提供了下述定义。

[0072] 当在本说明书和权利要求书中使用时,没有具体数目的指称包括复数指称物,除非上下文明确指示不是如此。例如,术语“细胞”包括多个细胞,包括其混合物。术语“核酸分子”包括多个核酸分子。

[0073] 当在本文中使用时,术语“包含”旨在意味着所述改良LAMP构建物和方法包括所叙述的要素,但不排除其他要素。当用于定义改良LAMP构建物和方法时,“基本上由……构成”意味着排除对所述组合具有任何重要意义的其他要素。因此,基本上由本文中所定义的要素构成的改良LAMP构建物将不排除来自于分离和纯化方法的痕量污染物和可药用载体,例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等。“由……构成”意味着排除超过痕量的其他成分要素和用于施用本发明的改良LAMP构建物的实质性方法步骤。由每个这些过渡性术语定义的实施方式都在本发明的范围之内。

[0074] 术语“约”或“大约”对于特定值来说意味着在由本领域普通技术人员所确定的可接受的范围之内,所述范围部分依赖于测量或确定所述值的方法,例如测量系统的限制。例如,“约”可以意味着给定值的最高20%、优选地最高10%、更优选地最高5%、更优选地最高1%的范围。可选地,特别是对于生物系统或方法来说,所述术语可以意味着在值的一定数量级之内,优选地5倍之内,更优选地2倍之内。除非另有陈述,否则术语“约”对特定值来说意味着在可接受的误差范围例如 $\pm 1-20\%$ 、优选地 $\pm 1-10\%$ 、更优选地 $\pm 1-5\%$ 之内。

[0075] 在提供值的范围的情况下,应该理解在该范围的上限与下限之间的每个居间值和在该陈述的范围中的任何其他陈述的或居间值,被涵盖在本发明之内。这些较小范围的上限和下限可以被独立地包括在所述较小范围中,并且也被涵盖在本发明之内,除了在所述陈述的范围中任何具体排除的限值之外。在所述陈述的范围包括所述限值中的一者或两者的情况下,排除了那些被包括的限值中的任一者或两者的范围,也被包括在本发明中。

[0076] 当在本文中使用时,“溶酶体/胞内体区室”是指膜结合的酸性液泡,其含有在膜中的LAMP分子、在抗原加工中发挥作用的水解酶和用于抗原识别和呈递的II类MHC分子。该区室充当通过各种不同机制(包括胞吞、吞噬和胞饮)中的任一者从细胞表面内化的外来物质和通过特化的自溶现象递送到该区室的细胞内物质的降解位点(de Duve, Eur.J.Biochem.137:391,1983)。当在本文和权利要求书中使用时,术语“胞内体”涵盖溶酶体。

[0077] 当在本文中使用时,“溶酶体相关细胞器”是指包含溶菌酶的任何细胞器,并且包括但不限于MIIC、CIIV、黑素小体、分泌颗粒、裂解性颗粒、血小板致密颗粒、嗜碱粒、Birbeck颗粒、吞噬溶酶体、分泌溶酶体等。优选地,这种细胞器缺少甘露糖6-磷酸受体并包含LAMP,但可以包含或不包含II类MHC分子。对于综述,参见例如Blott和Griffiths, Nature Reviews, Molecular Cell Biology, 2002; Dell’Angelica等, The FASEB Journal 14:1265-1278, 2000。

[0078] 当在本文中使用时,术语“多核苷酸”和“核酸分子”可互换地用于指称任何长度的核苷酸的聚合形式。多核苷酸可以含有脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和/或它们的类似物。核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行任何已知或未知的功能。术语“多核苷酸”包括例如单链、双链和三螺旋分子、基因或基因片段、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、反义分子、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、适体、质粒、载体、分离的任何序列的DNA、分离的任何序列的RNA、核酸探针和引物。核酸分子也可以包含修饰的核酸分子(例如包含修饰的碱基、糖和/或核苷酸间连接物)。

[0079] 当在本文中使用时,术语“肽”是指两个或更多个亚单位氨基酸、氨基酸类似物或肽模拟物的化合物。所述亚单位可以通过肽键或通过其他键(例如酯、醚等)连接。

[0080] 当在本文中使用时,术语“氨基酸”是指天然和/或非天然的或合成的氨基酸,包括甘氨酸和D或L光学异构体两者,以及氨基酸类似物和肽模拟物。如果肽链短,三个或更多个氨基酸的肽通常被称为寡肽。如果肽链长(例如大于约10个氨基酸),所述肽通常被称为多肽或蛋白质。尽管术语“蛋白质”涵盖术语“多肽”,但“多肽”可以小于全长蛋白质。

[0081] 当在本文中使用时,“LAMP多肽”是指本文中所描述的哺乳动物溶酶体相关膜蛋白人类LAMP-1、人类LAMP-2、人类LAMP-3、人类LIMP-2、人类Endolyn、人类LIMBIC、人类LAMP-5或人类Macrosailin,以及直系同源物(例如在图3-10中示出的LAMP蛋白)和等位基因变体。

[0082] 当在本文中使用时,“表达”是指多核苷酸被转录成mRNA和/或翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果所述多核苷酸源自于基因组DNA,表达可以包括从基因组DNA转录的mRNA的剪接。

[0083] 当在本文中使用时,“在转录控制下”或“可操作地连接”是指由表达控制元件和编码序列的适合的并置所控制的多核苷酸序列的表达(例如转录或翻译)。在一种情况下,当表达控制序列控制并调节DNA序列的转录时,该DNA序列“可操作地连接”到所述表达控制序列。

[0084] 当在本文中使用时,“编码序列”是当置于适合的表达控制序列的控制之下时被转录并翻译成多肽的序列。编码序列的边界由5’(氨基)端的起始密码子和3’(羧基)端的翻译终止密码子确定。编码序列可以包括但不限于原核序列、来自于真核mRNA的cDNA、来自于真核(例如哺乳动物)DNA的基因组DNA序列和甚至合成的DNA序列。多腺苷化信号和转录终止序列通常位于所述编码序列的3’。

[0085] 当在本文中使用时,如果两个编码序列或它们的互补序列编码相同的氨基酸序列,则所述两个编码序列彼此“对应”。

[0086] 当在本文中使用时,“信号序列”是指内质网易位序列。该序列编码与细胞通讯的信号肽,以将它连接(例如通过化学键)的多肽导向内质网囊泡区室,进入胞吐/胞吞细胞器,递送到细胞囊泡区室、细胞表面,或分泌所述多肽。该信号序列有时在蛋白质成熟中被细胞切掉。可以发现与原核生物和真核生物本源的各种不同蛋白质缔合的信号序列。

[0087] 当在本文中使用时,“转运”是指改良LAMP构建物所编码的多肽的移动或进展,其通过从粗面内质网到发生抗原加工和与MHC II结合的胞内体/溶酶体区室或相关细胞器的途径中的细胞器或区室来进行。

[0088] 当在本文中使用时,“改良LAMP构建物”和“包含抗原的改良LAMP构建物”和“包含感兴趣的抗原的改良LAMP构建物”可互换使用。所述改良LAMP构建物的不同排列在图1中作为ILC1-ILC6示出。此外,“改良LAMP构建物”的使用涵盖了所述改良LAMP构建物的多核苷酸序列以及由所述改良LAMP构建物的多核苷酸序列编码的蛋白质两者。

[0089] 当在本文中使用时,“改良LAMP构建物递送媒介”被定义为可以将改良LAMP构建物携带到宿主细胞中并且与本文中所描述的改良LAMP构建物缔合出现的任何分子或成组分子或大分子(例如基因或基因片段、反义分子、核酶、适体等)。

[0090] 当在本文中使用时,“改良LAMP构建物递送”或“改良LAMP构建物转移”是指将所述改良LAMP构建物引入到宿主细胞中,不论用于引入的方法如何。引入的改良LAMP构建物可以稳定地或暂时地维持在所述宿主细胞中。稳定维持通常要求引入的改良LAMP构建物含有与所述宿主细胞相容的复制起点,或整合到宿主细胞的复制子例如染色体外复制子(例如质粒)或核或线粒体染色体中。

[0091] 当在本文中使用时,“改良的LAMP病毒构建物”是指包含待体内、离体或体外递送到宿主细胞中的所述改良LAMP构建物的病毒或病毒粒子。改良的LAMP病毒构建物的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、反转录病毒载体等。在基因转移由腺病毒载体介导的情况下,改良LAMP构建物包括腺病毒基因组或其一部分,以及所选择的与腺病毒衣壳蛋白相结合的非腺病毒基因。

[0092] 当在本文中使用时,“腺病毒介导的基因转移”或“腺病毒转导”是指利用进入细胞



的腺病毒将改良LAMP构建物转移到宿主细胞中的过程。优选地,所述改良LAMP构建物能够在所述细胞内复制和/或整合并被转录。

[0093] 当在本文中使用时,“腺病毒粒子”是指包含外部衣壳和改良LAMP构建物的单个腺病毒毒粒,其中所述衣壳进一步包含腺病毒包膜蛋白。所述腺病毒包膜蛋白可以被修饰以包含融合多肽,所述融合多肽含有共价附连到所述病毒蛋白质的多肽配体,例如用于将所述腺病毒粒子靶向到特定细胞和/或组织类型。

[0094] 当在本文中使用时,术语“施用”或“免疫接种”或“注射”改良LAMP构建物是指用所述改良LAMP构建物转导、转染、微注射、电穿孔或射击所述细胞。在某些情况下,通过将靶细胞与递送细胞相接触(例如通过细胞融合或通过所述递送细胞邻近所述靶细胞时将递送细胞裂解),将改良LAMP构建物引入到所述靶细胞中。

[0095] 当在本文中使用时,短语“初免-加强”描述了使用本文中描述的改良LAMP构建物来引发T-细胞应答,随后使用第二种包含抗原的改良LAMP构建物、包含抗原或重组抗原的DNA疫苗来加强所述应答(或反之亦然)。这些异源初免-加强免疫接种引发与通过用相同载体初免和加强所能实现的相比高度和广度更大的免疫应答。使用包含抗原的改良LAMP构建物的初免启动了记忆细胞;所述加强步骤扩大了所述记忆应答。优选地,使用不引起针对彼此的应答的两种不同药剂,并且因此不干扰彼此的活性。在初免和/或加强步骤中特别考虑到了抗原的混合物。加强可以进行一次或多次。

[0096] 当在本文中使用时,“杂交”是指其中一个或多个多核苷酸进行反应以形成通过核苷酸残基的碱基之间的氢键键合稳定化的复合体的反应。所述氢键键合可以通过Watson-Crick碱基配对、Hoogsteen结合或以任何其他序列特异性方式进行。所述复合体可以包含形成双链体结构的两条链、形成多链复合体的三条或更多条链、自我杂交的单链或它们的任何组合。杂交反应可以构成更加广泛的过程例如PCR反应的引发或核酶对多核苷酸的酶切割中的步骤。

[0097] 当在本文中使用时,与另一个序列具有一定百分比(例如至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%)的“序列同一性”的多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域),意味着在比较所述两个序列时,在使用本领域中常用的软件程序最大对齐时,相同的碱基(或氨基酸)的百分比。

[0098] 当在DNA序列的确定长度内至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、优选地至少约80%、且最优选地至少约90或95%的核苷酸匹配时,两个序列是“基本上同源的”或“基本上相似的”。同样地,当在多肽序列的确定长度内所述多肽的至少约50%、至少约60%、至少约66%、至少约70%、至少约75%、优选地至少约80%、且最优选地至少约90或95%的氨基酸残基匹配时,两个多肽序列是“基本上同源的”或“基本上相似的”。基本上同源的序列可以通过使用序列数据库中可用的标准软件比较所述序列来鉴定。基本上同源的核酸序列也可以在Southern杂交实验中,在例如为该特定系统定义的严紧条件下鉴定。确定适合的杂交条件在本领域的技术范围之内。例如,严紧条件可以是:在5xSSC和50%甲酰胺和42℃下杂交,并在0.1xSSC和0.1%十二烷基硫酸钠和60℃下洗涤。严紧杂交条件的其他实例包括:约25℃至约37℃的温育温度;约6xSSC至约10xSSC的杂交缓冲液浓度;约0%至约25%的甲酰胺浓度;和约6xSSC的洗涤溶液。温和杂交条件的实例包括:约40℃至约50℃的温育温度;约9xSSC至约2xSSC的缓冲液浓度;约30%至约50%的甲酰胺浓度;和约5xSSC

至约2xSSC的洗涤溶液。高严谨条件的实例包括：约55℃至约68℃的温育温度；约1xSSC至约0.1xSSC的缓冲液浓度；约55%至约75%的甲酰胺浓度；和约1xSSC、0.1xSSC或去离子水的洗涤溶液。一般来说，杂交温育时间为5分钟至24小时，使用1、2或更多个洗涤步骤，并且洗涤温育时间为约1、2或15分钟。SSC是0.15M NaCl和15mM柠檬酸盐缓冲液。应该理解，可以利用使用其他缓冲体系的SSC的等效物。相似性可以通过测序来验证，但优选地，也或可选地使用适合于所考虑的特定结构域的测定法，通过功能（例如转运到胞内体区室的能力等）来验证。

[0099] 术语“百分比(%)序列相似性”、“百分比(%)序列同一性”等，通常是指可以具有或不具有共同进化起源的核酸分子的不同核苷酸序列或多肽的氨基酸序列之间的同一性或对应性程度（参见Reeck等，同上）。序列同一性可以使用大量可公开获得的序列比较算法例如BLAST、FASTA、DNA Strider、GCG (Genetics Computer Group,《GCG软件包程序手册》(Program Manual for the GCG Package),第7版, Madison, Wisconsin)等中的任一者来确定。

[0100] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸分子之间的百分比同一性，出于最佳比较的目的将所述序列对齐。所述两个序列之间的百分比同一性是所述序列共有的一致位置的数目的函数（即百分比同一性=一致位置的数目/位置（例如交叠的位置）的总数 $\times$  100）。在一个实施方式中，所述两个序列是相同长度或近似相同长度的。两个序列之间的百分比同一性可以使用与下面描述的相似的技术，在允许或不允许存在间隙的情况下来确定。在计算百分比序列同一性中，通常对完全匹配进行计数。

[0101] 两个序列之间的百分比同一性的确定，可以使用数学算法来实现。用于两个序列的比較的数学算法的非限制性实例是Karlin和Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87:2264的算法，如在Karlin和Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90:5873-5877中改良的。这种算法被并入到Altschul等, J. Mol. Biol. 1990; 215:403的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸搜索可以使用NBLAST程序，计分=100，字长=12来进行，以获得与本发明的序列同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以使用XBLAST程序，计分=50，字长=3来进行，以获得与本发明的蛋白质序列同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带间隙的比对，可以利用如Altschul等, Nucleic Acids Res. 1997, 25:3389中所描述的Gapped BLAST。或者，可以使用PSI-Blast来进行检测分子之间的远缘关系的迭代搜索。参见Altschul等, (1997)，同上。当利用BLAST、Gapped BLAST和PSI-Blast程序时，可以使用相应程序（例如XBLAST和NBLAST）的缺省参数。参见万维网上的ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/。

[0102] 用于序列比較的数学算法的另一个非限制性实例是Myers和Miller, CABIOS 1988; 4:11-17的算法。这种算法被并入到ALIGN程序(2.0版)中，所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序来比较氨基酸序列时，可以使用PAM120权重残基表、12的间隙长度罚分和4的间隙罚分。

[0103] 在优选实施方式中，两个氨基酸序列之间的百分比同一性使用Needleman和Wunsch的算法(J. Mol. Biol. 1970, 48:444-453)来确定，所述算法已被并入到GCG软件包中的GAP程序内(Accelrys, Burlington, MA; 可以在万维网上的accelrys.com处获得)，使用Blossum62矩阵或PAM250矩阵，16、14、12、10、8、6或4的间隙权重和1、2、3、4、5或6的长度权重。在另一个优选实施方式中，两个核苷酸序列之间的百分比同一性使用GCG软件包中的

GAP程序来确定,使用NWSgapdna.CMP矩阵,40、50、60、70或80的间隙权重和1、2、3、4、5或6的长度权重。特别优选的一套参数(并且如果从业人员不确定应该使用什么参数来确定分子是否在本发明的序列同一性或同源性限度内的话,可以使用的一套参数)是使用Blossum 62计分矩阵,并且间隙开放罚分为12,间隙扩展罚分为4,移码间隙罚分为5。

[0104] 可以确定百分比同一性的另一个非限制性实例是通过使用软件程序,例如在《现代分子生物学方法》(Current Protocols In Molecular Biology) (F.M.Ausubel等主编,1987)附录30,第7.7.18节,表7.7.1中描述的软件程序。优选地,将缺省参数用于比对。优选的比对程序是使用缺省参数的BLAST。具体来说,优选的程序是BLASTN和BLASTP,使用下述缺省参数:Genetic code=standard;filter=none;strand=both;cutoff=60;expect=10;Matrix=BLOSUM62;Descriptions=50sequences;sort by=HIGH SCORE;Databases=non-redundant,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详情可以在下述英特网网址处找到:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>。

[0105] 本文中描述的性质的统计分析可以通过标准检验例如t-检验、ANOVA或卡方检验来进行。通常,统计学显著性被计算到 $p=0.05$  (5%)、更优选地 $p=0.01$ 、 $p=0.001$ 、 $p=0.0001$ 、 $p=0.000001$ 的水平。

[0106] 也可以提供结构域序列的“保守修饰的变体”。对于特定核酸序列来说,保守修饰的变体是指编码一致或基本上一致的氨基酸序列的核酸,或者在所述核酸不编码氨基酸序列的情况下,是指基本上一致的序列。具体来说,简并密码子替换可以通过产生其中一个或多个所选择的(或所有)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基替换的序列来实现(Batzer等,1991,Nucleic Acids Res.19:5081;Ohtsuka等,1985,J.Biol.Chem.260:2605-2608;Rossolini等,1994,Mol.Cell.Probes 8:91-98)。

[0107] 术语野生型蛋白的“生物活性片段”、“生物活性形式”、“生物活性等同物”和“功能性衍生物”,具有当使用适合于检测野生型蛋白的生物活性的测定法测量时至少基本上等于(例如不显著不同于)所述活性的生物活性。

[0108] 当在本文中使用时,“体内”核酸递送、核酸转移、核酸疗法等,是指将改良LAMP构建物直接引入到生物体例如人类或非人类哺乳动物的身体中,由此将所述改良LAMP构建物引入到这种生物体体内的细胞中。

[0109] 当在本文中使用时,术语“原位”是指一种类型的体内核酸递送,其中将所述改良LAMP构建物带到靶细胞附近(例如所述核酸不被全身性施用)。例如,原位递送方法包括但不限于将改良LAMP构建物直接注射在位点处(例如到组织例如肿瘤或心肌中),通过开放手术部位将所述改良LAMP构建物与细胞或组织接触,或使用医疗接入装置例如导管将所述改良LAMP构建物递送到位点。

[0110] 当在本文中使用时,术语“分离的”或“纯化的”意味着与通常与所述多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段天然缔合的细胞组分或其他组分分开(或基本上不含所述组分)。例如,对于改良LAMP构建物来说,分离的多核苷酸是与通常在染色体中与其缔合的5'和3'序列分离的多核苷酸。正如对本领域技术人员来说显而易见的,非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”以将它与它的天然存在的对应物区分开。基本上不含或基本上纯化的,意味着至少50%、优选地至少70%、更优选地至少80%、甚至

更优选地至少90%的所述群体不含天然与其缔合的组分。

[0111] 当在本文中使用时,“靶细胞”或“受体细胞”是指期望成为或已经成为本文中描述的改良LAMP构建物的受体的个体细胞或细胞。该术语旨在也包括单个细胞的后代,并且所述后代由于天然、偶然或故意的突变,可以不必定与原始亲代细胞完全一致(在形态上或在基因组或总DNA互补上)。靶细胞可以与其他细胞相接触(例如在组织中),或者可能被发现生物体的身体内循环。

[0112] 当在本文中使用时,“对象”是脊椎动物,优选为哺乳动物,更优选为人类。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿猴类、人类、家畜、运动动物(sport animal)和宠物。在其他优选实施方式中,所述“对象”是啮齿动物(例如大鼠、小鼠、兔、美洲驼、骆驼、奶牛、豚鼠、仓鼠、狗、猫、马、非人类灵长动物、猿猴(例如猴或猿)、猴(例如狨猴、狒狒、恒河猴)或猿(例如大猩猩、黑猩猩、猩猩、长臂猿)。在其他实施方式中,可以使用非人类哺乳动物,特别是常规作为模型用于证实在人类中的治疗效能的哺乳动物(例如鼠科动物、灵长动物、猪科动物、犬科动物或兔类动物)。

[0113] 术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”可以互换并以单数或复数形式使用,是指已经历恶性转化,使得它们对于宿主生物体来说成为病理性的细胞。原代癌细胞(即从恶性转化的位点附近获得的细胞)可以通过已确立的技术、特别是组织学检查,与非癌性细胞容易地区分开。当在本文中使用时,癌细胞的定义不仅包括原代癌细胞,还包括源自于癌细胞祖先的任何细胞。这包括转移的癌细胞和源自于癌细胞的体外培养物和细胞系。当指称通常表现为实体肿瘤的癌症类型时,“临床可检测的”肿瘤是在肿瘤块的基础上可以例如通过诸如CAT扫描、MR成像、X-射线、超声或触诊的程序检测,和/或由于在可以从患者获得的样品中一种或多种癌症特异性抗原的表达而可以检测的肿瘤。

[0114] 在优选实施方式中,所述癌症(包括所有发展阶段,包括增生)是腺癌、肉瘤、皮肤癌、黑素瘤、膀胱癌、脑癌(包括多形性胶质母细胞瘤)、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌(包括但不限于NSCLC、SCLC、鳞状细胞癌)、结肠直肠癌、肛门癌、直肠癌、宫颈癌、肝癌、头颈癌、口腔癌、唾液腺癌、食管癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌(PDA)、肾细胞癌、胃癌、肾癌、多发性骨髓瘤或脑癌。此外,用本文中描述的LAMP构建物治疗的优选疾病包括那些由巨细胞病毒(CMV)引起的过度增殖性障碍或癌症。

[0115] 当在本文中使用时,术语“可药用载体”涵盖了任何标准制药载体,例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水和乳液例如油/水或水/油乳液,和各种不同类型的润湿剂。包含所述改良LAMP构建物的组合物还可以包括稳定剂和防腐剂。对于载体、稳定剂和佐剂的实例,参见《马丁雷明顿药物科学》(Martin Remington's Pharm.Sci.)第15版(Mack Publ.Co., Easton(1975))。

[0116] 当所述改良LAMP构建物已被引入到细胞内部时,所述细胞已被这些核酸“转化”、“转导”或“转染”。转化DNA可以与或不与构成细胞基因组的染色体DNA整合(共价连接)。例如,在原核生物、酵母和哺乳动物细胞中,所述改良LAMP构建物可以维持在游离体元件例如质粒上。在真核细胞中,稳定转化的细胞是其中所述改良LAMP构建物已整合在染色体中使得它通过染色体复制被子细胞继承的细胞。这种稳定性由所述真核细胞建立包含有所述改良LAMP构建物的子细胞群体的细胞系或克隆的能力所证实。“克隆”是通过有丝分裂从单一细胞或共同祖先产生的细胞群体。“细胞系”是能够在体外稳定生长许多代(例如至少约

10代)的原代细胞的克隆。

[0117] 当在本文中使用时,“有效量”是足以实现有益或所需结果的量,例如所述改良LAMP构建物转化和/或表达和/或达到所需治疗终点的有效量。有效量可以在一次或多次施用、应用或给药中施用。在一种情况下,改良LAMP构建物的有效量是足以在包含至少两个细胞的细胞群体中转化/转导/转染至少一个细胞的量。

[0118] 当在本文中使用时,“治疗有效量”在本文中用于表示足以防止、校正异常的生理响应和/或使异常的生理响应正常化的量。在一种情况下,“治疗有效量”是足以将疾病的临床显著特征例如肿瘤块尺寸、抗体产生、细胞因子产生、发热或白细胞计数等降低至少约30%、更优选地至少50%、最优选地至少90%的量。

[0119] “抗体”是结合特定抗原的任何免疫球蛋白,包括抗体及其片段。所述术语涵盖了多克隆、单克隆和嵌合抗体(例如双特异性抗体)。“抗体结合部位”是抗体分子的包含特异性结合抗原的重链和轻链可变区和高变区的结构部分。示例性的抗体分子是完整免疫球蛋白分子、基本上完整的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的含有补位的那些部分,包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和F(v)部分,所述部分优选用于本文描述的治疗方法中。因此,术语抗体不仅涵盖了全抗体分子,而且涵盖了抗体片段以及抗体和抗体片段的变体(包括衍生物例如融合蛋白)。在本申请中用术语“抗体”描述的分子的实例包括但不限于:单链Fv(scFv), Fab片段, Fab'片段, F(ab')<sub>2</sub>, 二硫键连接的Fv(sdFv), Fv, 以及包含VL或VH任一结构域或由其构成的片段。当在本文中使用时,术语“单链Fv”或“scFv”是指包含与抗体的VH结构域相连的抗体的VL结构域的多肽。参见Carter(2006) Nature Rev. Immunol. 6:243。

[0120] 此外,本发明的抗体包括但不限于单克隆、多特异性、双特异性、人类、人源化、小鼠或嵌合抗体,单链抗体,骆驼抗体, Fab片段, F(ab')片段, 抗独特型(抗Id)抗体(包括例如针对本发明的抗体的抗Id抗体), 结构域抗体和任何上述抗体的表位结合片段。本发明的免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类的免疫球蛋白分子。

[0121] 最优选地,所述抗体是人类抗体。当在本文中使用时,“人类”抗体包括具有人类免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并包括从人类免疫球蛋白文库和已被遗传工程改造成生产人类抗体的异种移植小鼠或其他生物体分离的抗体。本文中描述的改良LAMP构建物可以与在示例性流程中所描述的用于产生人类抗体和人类单克隆抗体的已知技术相组合使用,参见例如PCT公布W0 98/24893、W0 92/01047、W096/34096、W0 96/33735、欧洲专利号0 598 877、美国专利号5,413,923、5,625,126、5,633,425、5,569,825、5,661,016、5,545,806、5,814,318、5,885,793、5,916,771和5,939,598,以及Lonberg和Huszar, Int.Rev.Immunol.13:65-93(1995)。

[0122] 人类抗体或“人源化”嵌合单克隆抗体可以使用所述改良LAMP构建物与本文中描述的或本领域中另外已知的技术相组合来生产。例如,用于生产嵌合抗体的标准方法在本领域中是已知的。对于综述,参见下述参考文献:Morrison, Science 229:1202(1985); Oi等, BioTechniques 4:214(1986); Cabilly等, 美国专利号4,816,567; Taniguchi等, EP 171496; Morrison等, EP 173494; Neuberger等, W0 8601533; Robinson等, W0 8702671; Boulianne等, Nature 312:643(1984); Neuberger等, Nature 314:268(1985)。

[0123] 本发明的抗体可以是单价、二价、三价或多价的。例如,单价scFv可以通过化学方

法或通过与另一种蛋白质或物质缔合被多聚体化。融合到六聚组氨酸标签或Flag标签的scFv可以使用Ni-NTA琼脂糖(Qiagen)或使用抗Flag抗体(Stratagene, Inc.)被多聚体化。此外,所述改良LAMP构建物可用于产生针对所述改良LAMP构建物中含有的编码的抗原的单特异性、双特异性、三特异性或更高的多特异性。参见例如PCT公布WO 93/17715、WO 92/08802、WO 91/00360、WO92/05793;Tutt等,J.Immunol.147:60-69(1991);美国专利号4,474,893、4,714,681、4,925,648、5,573,920、5,601,819;Kostelny等,J.Immunol.148:1547-1553(1992)。

[0124] “表位”是通常由短的肽序列或寡糖构成,被免疫系统的组分特异性识别或特异性结合的结构。通常已显示T-细胞表位是直链寡肽。如果两个表位可以被同一抗体特异性结合,则它们彼此对应。如果两个表位都能结合到相同的B细胞受体或相同的T细胞受体,并且一个抗体与其表位的结合基本上阻止了被另一个表位结合(例如低于约30%、优选地低于约20%、更优选地低于约10%、5%、1%或约0.1%的另一个表位结合),则两个表位彼此对应。在本发明中,多个表位可以组成抗原。

[0125] 当在本文中使用时,术语“抗原”或“感兴趣的抗原”覆盖了由克隆到所述改良LAMP构建物中的多核苷酸序列编码的被用于引发先天性或适应性免疫应答的任何多肽序列,如表1所示。“抗原”涵盖了克隆在所述改良LAMP构建物中的单个抗原以及多个抗原性序列(源自于相同或不同蛋白)两者。

[0126] 当在本文中使用时,术语“抗原呈递细胞”包括在表面上呈递与主要组织相容性复合物分子或其部分或一种或多种非经典MHC分子或其部分相结合的抗原的任何细胞。适合的APC的实例在下文中详细讨论,并且包括但不限于完整细胞例如巨噬细胞、树突状细胞、B细胞、杂交APC和培养的抗原呈递细胞。

[0127] 当在本文中使用时,“工程化改造的抗原呈递细胞”是指在其表面上具有非天然分子组成部分的抗原呈递细胞。例如,这种细胞可以在其表面上不天然具有辅助刺激分子,或者在其表面上除了天然辅助刺激分子之外可以还具有另外的人工辅助刺激分子,或者可能在其表面上表达非天然的II类分子。在优选实施方式中,所述工程化改造的抗原呈递细胞在其表面上具有从所述改良LAMP构建物表达的抗原。

[0128] 当在本文中使用时,“免疫效应细胞”是指能够结合抗原并介导免疫应答的细胞。这些细胞包括但不限于T细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL),例如CTL细胞系、CTL克隆和来自于肿瘤、炎性或其他浸润物的CTL。

[0129] 当在本文中使用时,“部分人类”是指具有来自于人类和非人类脊椎动物两者的序列的核酸。在部分人类序列的情形中,所述部分人类核酸具有人类免疫球蛋白编码区的序列和基于所述非人类脊椎动物的内源性免疫球蛋白区的非编码序列的序列。当指称来自于非人类脊椎动物的内源性非编码序列时,术语“基于”是指对应于所述非编码序列,并与所述宿主脊椎动物例如所述ES细胞所源自的非人类脊椎动物的内源性基因座的非编码序列具有相对高的同源性程度的序列。优选地,所述非编码序列与包含所述非编码序列的部分人类分子已被引入到其中的非人类脊椎动物宿主细胞的内源性基因座中存在的相应非编码序列具有至少80%、更优选地90%的同源性。

[0130] 当在本文中使用时,术语“免疫球蛋白可变区”是指编码抗体分子的全部或一部分可变区的核苷酸序列或控制抗体分子的表达的全部或一部分调控核苷酸序列。用于重链的

免疫球蛋白区可以包括但不限于V、D、J和转换区的全部或一部分,包括内含子。用于轻链的免疫球蛋白区可以包括但不限于与轻链恒定区基因相关或相邻的V和J区、它们的上游侧翼序列、内含子。

[0131] “转基因动物”意味着具有作为染色体外元件存在于其部分细胞中或稳定整合在其种系DNA中(即在其大多数或所有细胞的基因组序列中)的外源核酸序列的非人类动物,通常为哺乳动物。在产生包含人类序列的转基因动物中,按照本领域中公知的方法,通过例如所述宿主动物的胚胎或胚胎干细胞的遗传操作,将部分人类核酸引入到这些转基因动物的种系中。

[0132] “载体”包括不论是否自我复制,可用于转化或转染细胞的质粒和病毒和任何DNA或RNA分子。

[0133] “分离的”或“纯化的”细胞群基本上不含天然与其缔合的细胞和材料。基本上不含的或基本上纯化的APC意味着至少50%的群体是APC,优选至少70%,更优选至少80%,甚至更优选至少90%的群体不含天然与其缔合的非APC细胞。

[0134] 当在本文中使用时,“遗传修饰”是指对细胞的正常核苷酸的任何添加、缺失或破坏。可以实现APC的遗传修饰的任何方法都在本发明的精神和范围内。本领域公认的方法包括病毒介导的基因转移、脂质体介导的转移、转化、转染和转导,例如病毒介导的基因转移如使用基于DNA病毒例如腺病毒、腺相关病毒和疱疹病毒的改良LAMP构建物以及基于反转录病毒的载体。

[0135] 除非另有指明,否则本发明的实践利用在本领域技术范围之内的常规分子生物学、微生物学和重组DNA技术。这些技术在文献中充分解释。参见例如Maniatis,Fritsch& Sambrook,《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual) (1982);《DNA克隆实用方法》(DNA Cloning:A Practical Approach),第I和II卷(D.N.Glover主编,1985);《寡核苷酸合成》(Oligonucleotide Synthesis) (M.J.Gait主编,1984);《核酸杂交》(Nucleic Acid Hybridization) (B.D.Hames&S.J.Higgins主编,1985);《转录和翻译》(Transcription and Translation) (B.D.Hames&S.I.Higgins主编,1984);《动物细胞培养》(Animal Cell Culture) (R.I.Freshney主编,1986);《固定化细胞和酶》(Immobilized Cells and Enzymes) (IRL Press,1986);B.Perbal,《分子克隆实用指南》(A Practical Guide to Molecular Cloning) (1984)。

[0136] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的相同的意义。出于描述和公开可以与目前描述的发明相结合使用的装置、制剂和方法的目的,本文中提到的所有出版物通过引用并入本文。

[0137] LAMP构建物

[0138] 正如从cDNA克隆所推演的(Chen等,J.Biol.Chem.263:8754,1988),LAMP-1由约382个氨基酸的多肽核心构成,具有大的(346个残基)腔内氨基端结构域,然后是24个残基的疏水性跨膜区和短的(12个残基)羧基端胞质尾区。参见图2A和2B。所述腔内结构域被高度糖基化,被约20个天冬酰胺连接的复合体类型的寡糖取代,并由被富含脯氨酸/丝氨酸的铰链区分隔开的两个大约160个残基的“同源结构域”构成。每个这些同源结构域含有4个均匀间隔的半胱氨酸残基,二硫键合形成4个36-38个残基的环,其对称地位于腔内结构域的两半之内(Arterburn等,J.Biol.Chem.265:7419,1990;也参见Chen等,J.Biol.Chem.25:



263 (18):8754-8,1988)。图2A示意性示出了LAMP-1、LAMP-2、LAMP-3、Endolyn、LIMBIC、LAMP5或Macrosailin之间的保守结构域。

[0139] 以前报道的LAMP构建物包含采取下面这种特定排列方式的下述元件：(a) LAMP-1蛋白的完整腔内结构域，所述抗原，然后是LAMP-1蛋白的完整跨膜/胞质尾区；或(b) 所述抗原和LAMP-1蛋白的完整跨膜/胞质尾区。在实例(a)中，所述抗原性序列被插入到LAMP-1蛋白的完整腔内结构域与LAMP-1的完整跨膜结构域/胞质尾区之间。已显示两种构建物成功地将抗原性序列靶向到溶酶体/胞内体，如图1中所示将被称为“完全LAMP构建物”，相比于本文中描述的改良LAMP构建物ILC1-ILC6。本文中描述的改良LAMP构建物不包括所述在现有技术中描述的完全LAMP构建物。

[0140] 尽管在文献中已广泛报道了比LAMP-1的完整腔内结构域更小的片段在产生稳健的免疫应答中不是有效的(参见例如Godinho等)。相比之下，本发明人出人意料地发现，采取某些排列方式的特定片段事实上确实有效地将抗原呈递到免疫系统，在许多情况下产生更稳健的免疫应答，包括产生不同的抗体谱。例如，本发明人已鉴定到，对产生稳健的免疫应答有效的最小LAMP腔内结构域片段不是所述完整腔内结构域(正如在文献中广泛报道的)，而是LAMP蛋白的腔内结构域的单个同源结构域。

[0141] 例如，构建物可以不包含所述完整腔内结构域，而是代之以包含LAMP蛋白的腔内结构域的单个同源结构域。当在本文中使用，所述“同源结构域”如图3-10中所示包含至少4个均匀间隔的半胱氨酸残基。如图3-10中所示，在每个同源结构域中这些半胱氨酸残基被标注为1、2、3和4(并且在LAMP-2和Macrosailin中鉴定到5个半胱氨酸，在LIMBIC中鉴定到6个半胱氨酸，在Endolyn中鉴定到8个半胱氨酸)，并在本文中被定义为“半胱氨酸保守片段”。另外的氨基酸可以被包括到所述半胱氨酸保守片段的N-末端和/或C-末端，以产生多达并包括LAMP蛋白的完整同源结构域。这些另外添加的氨基酸可以源自于所述半胱氨酸保守片段所源自的同源结构域或其他LAMP蛋白同源结构域。因此，当在本文中使用，LAMP同源结构域包含一个半胱氨酸保守片段和/或由一个半胱氨酸保守片段构成。至少两个LAMP同源结构域组成了LAMP-1、LAMP-2、LAMP-3或Endolyn的腔内结构域。

[0142] 具体来说，在一个优选实施方式中，所述改良LAMP构建物包含表1中描述的至少一种癌抗原(优选表1的第4列中描述的序列/片段/表位)和/或段落[150]中描述的组，其被融合到LAMP蛋白的腔内结构域、LAMP蛋白的至少一个同源结构域或LAMP蛋白的至少一个半胱氨酸保守片段的N-端。参见例如图1的ILC-2和ILC-6。在优选实施方式中，这些构建物还包含LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞浆尾区。在其他优选实施方式中，当抗原含有跨膜结构域时，所述LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞浆尾区是非必需的。在优选实施方式中，在所述改良LAMP构建物中包括两个同源结构域(例如图1的ILC-1)。在其他优选实施方式中，所述两个同源结构域源自于LAMP-1、LAMP-2、LAMP-3或Endolyn蛋白。或者，所述两个同源结构域源自于不同的LAMP蛋白。在这些包含两个同源结构域的构建物中，也可以包括LAMP铰链结构域。本段中描述的改良LAMP构建物相对于现有技术来说是出人意料的，因为所述抗原总是被放置在所述完整腔内LAMP-1结构域与完整LAMP-1跨膜/胞质尾区之间，因为尚未报道所述腔内结构域的片段在产生稳健的免疫应答中有效。

[0143] 在另一个优选实施方式中，所述改良LAMP构建物包含表1中描述的至少一种癌抗原(优选表1的第4列中描述的序列/片段/表位)和/或段落[150]中描述的组，其被融合到



LAMP蛋白的单个同源结构域或LAMP蛋白的单个半胱氨酸保守片段的C-端(例如,图1的ILC-5)。在优选实施方式中,这些构建物还包含LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞质尾区(例如图1的ILC-3)。在其他优选实施方式中,当抗原含有跨膜结构域时,LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞质尾区是非必需的。如图1所示,也可以将表1中描述的癌抗原插入到完全LAMP构建物中。或者,可以使用来自两个不同的LAMP蛋白的两个同源结构域。本段中描述的改良LAMP构建物相对于现有技术来说是出人意料的,因为抗原总是被放置在所述完整腔内LAMP-1结构域和完整LAMP-1跨膜/胞质尾区之间,因为尚未报道所述腔内结构域的片段在产生稳健的免疫应答中有效。

[0144] 因此,所述改良LAMP构建物包含表1中描述的至少一种癌抗原(优选表1的第4列中描述的序列/片段/表位)和/或段落[150]中描述的组,其被融合到LAMP蛋白的单个同源结构域或LAMP蛋白的单个半胱氨酸保守片段的C-端。参见例如图1的ILC-3和ILC-5。在优选实施方式中,这些构建物还包含LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞浆尾区。在其他优选实施方式中,当抗原含有跨膜结构域时,所述LAMP蛋白的跨膜结构域和/或LAMP蛋白的胞浆尾区是非必需的。如上所述,本段中描述的改良LAMP构建物相对于现有技术来说是出人意料的。

[0145] 在另一个优选实施方式中,所述改良LAMP构建物包含融合在LAMP蛋白的第一同源结构域与LAMP蛋白的第二同源结构域之间(或至少在两个半胱氨酸保守片段之间)的至少一个感兴趣的抗原。参见例如图1的ILC-4。在优选实施方式中,所述两个同源结构域源自于LAMP-1、LAMP-2、LAMP-3或Endolyn蛋白。在这些构建物中,所述抗原可以被放置在LAMP铰链区中。或者,可以使用来自于两种不同LAMP蛋白的两个同源结构域。如上所述,这种融合在两个LAMP同源结构域(包括半胱氨酸保守片段)之间的表1中描述的至少一种癌抗原(优选表1的第4列中描述的序列/片段/表位)和/或段落[150]中描述的组的方式相对于现有技术来说是出人意料的。

[0146] 上文定义的每种改良LAMP构建物可以使用图中定义的结构域来产生。例如,具体设想了例如包括在图1中示出的改良LAMP构建物中的结构域可以起源于从直系同源序列衍生的序列。参见例如图3-10。明确设想了对于直系同源系列来说,在图2A和2B中定义的对等结构域可用于产生图1中示出的改良LAMP构建物。此外,图3-10中示出的直系同源序列是可用于产生所述结构域的序列的代表。鉴定其他直系同源序列和/或同种型并将它们与图3-10中示出的比对进行比较,完全在本领域的技术范围之内。因此,通过使用图3-10中示出的比对为人类LAMP蛋白鉴定图2A和2B中定义的对等边界,人们可以产生图1中示出的改良LAMP构建物。

[0147] 正如专业技术人员充分理解的,每个结构域的边界是近似值,并且在克隆考虑和限制性酶放置的基础上可以调整至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。因此,当特定结构域(例如LAMP同源结构域)被包括在所述改良LAMP构建物中时,所述结构域的起点和终点可以参照图2A中定义的边界调整至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。

[0148] 上文描述的每个所述改良LAMP构建物可以另外包含信号序列和/或出于克隆目的在每个结构域之间包含另外的氨基酸,正如本领域中公知的。此外,所述LAMP同源结构域、LAMP腔内结构域、LAMP跨膜结构域和/或LAMP胞浆尾区结构域可以起源于相同的LAMP蛋白(例如人类LAMP-1)或不同的LAMP蛋白(例如腔内结构域来自于人类LAMP-1并且跨膜结构域

来自于人类LAMP-2,和/或同一基因家族(例如LAMP-1)或不同基因家族(LAMP-1和LAMP-2)中的直系同源结构域的混合)。

[0149] 设想了所描述的LAMP构建物的多肽变体。例如,与本文中描述的任何改良LAMP构建物具有至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%同一性的多肽,以及编码这些变体的多核苷酸。所述改良LAMP构建物的变体保留了通过将所述抗原性序列靶向溶酶体而起作用的能力。例如,修饰的腔内序列必须保留以与原始的结构域序列相比至少约50%、至少约60%、至少70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%的效能,即使包含所述嵌合序列的细胞产生足够的抗原呈递以使其增强免疫应答的效能,将膜和非膜抗原性材料两者转运到胞内体区室的能力。在一种情况下,通过构建含有卵清蛋白的良好表征的抗原性结构域、含有推测的溶酶体/胞内体靶向信号的蛋白的跨膜结构域和胞质结构域的改良LAMP构建物,可以鉴定含有适合的转运信号的序列。靶向的效率可以通过确定表达所述改良LAMP构建物的抗原呈递细胞刺激HA表位特异性II类MHC限制性T-细胞的能力来测量(参见例如美国专利号5,633,234的实施例5)。

[0150] 编码任何所描述的改良LAMP构建物的多核苷酸,以及与本文中描述的任何改良LAMP构建物的多核苷酸具有至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%同一性的多核苷酸,是本发明的优选实施方式。所述改良LAMP构建物的变体保留了通过将所述抗原性序列靶向到溶酶体而起作用的能力。例如,修饰的腔内序列必须保留以与原始的结构域序列相比至少约50%、至少约60%、至少70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%的效能,即使包含所述嵌合序列的细胞产生足够的抗原呈递以使其增强免疫应答的效能,将膜和非膜抗原性材料两者转运到胞内体区室的能力。在一种情况下,通过构建含有卵清蛋白的良好表征的抗原性结构域、含有推测的溶酶体/胞内体靶向信号的蛋白的跨膜结构域和胞质结构域的改良LAMP构建物,可以鉴定含有适合的转运信号的序列。靶向的效率可以通过确定表达所述改良LAMP构建物的抗原呈递细胞刺激HA表位特异性II类MHC限制性T-细胞的能力来测量(参见例如美国专利号5,633,234的实施例5)。

#### [0151] 癌抗原

[0152] 可以使用技术人员公知的技术将表1中所示的以下抗原克隆到本文所述的每种LAMP构建物中。也可以将第四列中描述的序列/片段/表位克隆到本文所述的改良LAMP构建物中。此外,具体设想了,表1中所列的任一种癌抗原可以与表1中所列的任何其他抗原(包括第四列中所述的序列/片段/表位)组合并插入到本文所述的改良LAMP构建物中。

[0153]

SEQ ID NO:	每种抗原的蛋白质名称	登记号/来源于	可以被克隆到本文所述的 LAMP 构建物中的优选表位/片段, 至少包含.....
114	pp65	ABQ23593	图 20 中突出显示的表位, 其包括 LLQTGIHVRVVSQPSL 和/或 ALPLKMLNIPSINVH 和/或 DQYVKVYLESFCEDV 和/或 IIKPGKISHIMLDVAFTSH 和/或 PQYSEHPFTTSQYRIQGLK 和/或 PPWQAGILARNLVPMV 和/或 KYQEFFWDANDIYRIFA, 其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式来组合, 并克隆到本文所述的 LAMP 构建物中, 其中每个表位优选被连接物例如 GPGPG 或 PMGLP 隔开。代表性构建物插入序列如 SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:116 所示。
117 和 118	gB	P06473	图 20 中突出显示的表位, 其包括 TTSAQTRSVYSQHVHT 和/或 QLIPDDYSNTHSTRYV 和/或 VSVFETSGGLVFWQ 和/或 NSAYEYVDYLFKRMIDLS, 其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式来组合, 并克隆到本文所述的 LAMP 构建物中, 其中每个表位优选被连接物例如 GPGPG 或 PMGLP 隔开。代表性构建物插入序列如 SEQ ID NO:119 和 SEQ ID NO:120 所示。
121	IE1	P13202	图 20 中突出显示的表位, 其包括 VLAELVKQIKVRVDMVRHRIKEHMLKKYTQ 和/或 IVPEDKREMWMACIKELH 和/或 KDELRRKMMYMCYRNIEFTKNSAFPKTT 和/或 SVMKRRRIEICMKVFAQYI 和/或 AIAEEDDEEEAIVAY 和/或 VKSEPVSIEIEVAPEEEEEDG, 其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式来组合, 并克隆到本文所述的 LAMP 构建物中, 其中每个表位优选被连接物例如 GPGPG 或 PMGLP 隔开。代表性构建物插入序列如 SEQ ID NO:122 和 SEQ ID NO:123 所示。
124	形态转化区 II (“MTRII”)	AAA66543	SEQ ID NO:125
126	US28	AMJ53524	SEQ ID NO:127
128	IGFBP2	NP_000588	(a) 大致为 SEQ ID NO:128 的氨基酸 39-328; (b) 大致为 SEQ ID NO:128 的氨基酸 40-328; (c) 大致为 SEQ ID NO:128 的氨基酸 43-135; (d) 大致为 SEQ ID NO:128 的氨基酸 1-163; (e) 大致为 SEQ ID NO:128 的氨基酸 2-163; (f) 大致为 SEQ ID NO:128 的氨基酸 39-163; (g) 大致为 SEQ ID NO:128 的氨基酸 40-163; (h) 大致为 SEQ ID NO:128 的氨基酸 229-309; (i) SEQ ID NO:128 的氨基酸 2-328; 和/或 (j) 大致为 SEQ ID NO:128 的氨基酸 1-328
129	HCMVA 病毒白介素-10	P17150	SEQ ID NO:130

[0154]

131	HCMVM 膜糖蛋白 UL144 (“UL144”)	F5HAM0	SEQ ID NO:132
133	HCMVM 蛋白 UL141 (“UL141”)	Q6RQJ3	SEQ ID NO:134
135	HCMVA 独特短 US11 糖蛋白 (“US11”)	P09727	SEQ ID NO:136
137 和 138	HCMV 包膜糖蛋白 H OS (“HOS”)	A0A0G2TM81	图 20 中突出显示的表位, 其包括 TYNSSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPR 和/或 DLTETLERYQQRLNTYALVSKDLASYRSFS 和/或 SHTTSGLHRPHFNQTCILFD 和/或 QLNRHSYALKDPDFLDAALDF, 其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式来组合, 并克 隆到本文所述的 LAMP 构建物中, 其中每个表位优选被连接物例如 GPGPG 或 PMGLP 隔开。代表 性构建物插入序列如 SEQ ID NO:139 和 SEQ ID NO:140 所示。
141	HCMVT 病毒转录 因子 IE2 (“IE2”)	Q6SWP7	图 20 中突出显示的表位, 其包括 RRGRVKIDEVSRMFR 和/或 GIQIYTRNHEVKSE 和/或 LSTPFLMEHTMPVTHPPEVA, 其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式来组合, 并克 隆到本文所述的 LAMP 构建物中, 其中每个表位优选被连接物例如 GPGPG 或 PMGLP 隔开。代表 性构建物插入序列如 SEQ ID NO:142 和 SEQ ID NO:143 所示。
144	TERT 同种型 1 (“TERT”)	NP_937983.2	SEQ ID NO:145 SEQ ID NO:146
147	存活蛋白	NP_001125727	SEQ ID NO:147; 代表性构建物包括 SEQ ID NO:193-197。
148	破伤风	1AF9_A	图 20 中突出显示的表位, 其包括 PGINGKAIHLVNNESE 和/或 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGT 和/或 YVSIDKFRIFCKALNPKIEKLYTSYLS 和/或 ILRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLK, 其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式来组 合, 并克隆到本文所述的 LAMP 构建物中, 其中每个表位优选被连接物例如 GPGPG 或 PMGLP 隔 开。代表性构建物插入序列如 SEQ ID NO:149 和 SEQ ID NO:150 所示。

[0155]

151	瘤 瘰 丸 抗 原 NY-ESO-1 ("NY-ESO-1")	NP-001318.1 (SEQ ID NO:151)	SEQ ID NO:151 的氨基酸 1-155 SEQ ID NO:151 的氨基酸 80-155
152	HER2	AAA75493.1 (SEQ ID NO:152)	包含以下至少一者的构建物: SEQ ID NO:152 的氨基酸 23-652 和/或 690-1255, 其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式来组合, 并克隆到本文所述的 LAMP 构建物中, 其中每个表位优选地被连接物例如 GPGPG 或 PMGLP 隔开。代表性构建物插入序列如 SEQ ID NO:153 和 SEQ ID NO:154 所示。
155	HER3	NP_001973.2 (SEQ ID NO:155)	包含以下至少一者的构建物: SEQ ID NO:155 的氨基酸 20-643、665-1201 和/或 1209-1342, 其中每个表位可以以任何顺序和/或以任何组合方式来组合, 并克隆到本文所述的 LAMP 构建物中, 其中每个表位优选地被连接物例如 GPGPG 或 PMGLP 隔开。代表性构建物插入序列如 SEQ ID NO:156 和 SEQ ID NO:157 所示。
158	HVEM	NP_003811.2 (SEQ ID NO:158)	氨基酸 39-202 (SEQ ID NO:159)
160-163	HPV 构建物		用于产生构建物的序列: (a) HPV 16 E6 (SEQ ID NO:160); (b) HPV 18 E6 (SEQ ID NO:161); (c) HPV 16 E7 (SEQ ID NO:162); (d) HPV 18 E7 (SEQ ID NO:163) 代表性构建物: SEQ ID NO:164 (代表性 HPV 16 E6-E7 构建物) SEQ ID NO:165 (代表性 HPV 18 E6-E7 构建物) SEQ ID NO:166 (HPV 16 E6 - 连接物 - HPV 18 E6 - 连接物 - HPV 16 E7 - 连接物 - HPV 18 E7)
169-172	EBV 构建物		以下任何序列的任何组合都可以用于形成构建物 (a) EBV EBNA1 (SEQ ID NO:169); (b) EBV 截短的 EBNA-1 (SEQ ID NO:170); (c) EBV gp350 (SEQ ID NO:171); (d) EBV LMP2 (SEQ ID NO:172)。例如, 代表性构建物可以包含截短的 EBNA-1 和 LMP2。
174-175	HBV 构建物		可以使用以下任何序列 (以任一方向) 来形成构建物: HBV 中间 S 蛋白 (SEQ ID NO:174) 和 HBV X 蛋白 (SEQ ID NO:175)。例如, 代表性构建物可以包含中间 S 蛋白-X 蛋白。

[0156]

176	TIGIT		SEQ ID NO:176
177	TEM8		SEQ ID NO:177
178	TEM1		SEQ ID NO:178
179	HER2 ECD+TM		SEQ ID NO:179
180	CEA		SEQ ID NO:180
181	TARP		SEQ ID NO:181
182	PROSTEIN		SEQ ID NO:182
183	PSMA		SEQ ID NO:183
184	BIRC4		SEQ ID NO:184
185	Mucin-1		SEQ ID NO:185
186	Mucin-1 同种型		SEQ ID NO:186
187	CD40 配位体		SEQ ID NO:187
188	WT-1		SEQ ID NO:188
189	WT-1 截短		SEQ ID NO:189
190	PRAME		SEQ ID NO:190
191	LAGE-1		SEQ ID NO:191
192	MAGE A3		SEQ ID NO:192
198	1A01_HLA-A/m	UniProtKB: P30443	SEQ ID NO:198
199	1A02	UniProtKB: P01892	SEQ ID NO:199
200	5T4	UniProtKB: Q13641	SEQ ID NO:200
201	ACRBP	UniProtKB: Q8NEB7	SEQ ID NO:201
202	AFP	UniProtKB:	SEQ ID NO:202

[0157]

		P02771		
203	AKAP4	UniProtKB: Q5JQC9	SEQ ID NO:203	
204	$\alpha$ -辅肌动蛋白 - 4/m	UniProtKB: B4DSX0	SEQ ID NO:204	
205	$\alpha$ -辅肌动蛋白 - 4/m	UniProtKB: B4E337	SEQ ID NO:205	
206	$\alpha$ -辅肌动蛋白 - 4/m	UniProtKB: O43707	SEQ ID NO:206	
207	$\alpha$ -甲基酰基-辅酶 A_消旋酶	UniProtKB: A0A024RE16	SEQ ID NO:207	
208	$\alpha$ -甲基酰基-辅酶 A_消旋酶	UniProtKB: A8KAC3	SEQ ID NO:208	
209	ANDR	UniProtKB: P10275	SEQ ID NO:209	
210	ART-4	UniProtKB: Q9ULX3	SEQ ID NO:210	
211	ARTC1/m	UniProtKB: P52961	SEQ ID NO:211	
212	AURKB	UniProtKB: Q96GD4	SEQ ID NO:212	
213	B2MG	UniProtKB: P61769	SEQ ID NO:213	
214	B3GN5	UniProtKB: Q9BYG0	SEQ ID NO:214	
215	B4GNI	UniProtKB:	SEQ ID NO:215	

[0158]

		Q00973	
216	B7H4	UniProtKB; Q7Z7D3	SEQ ID NO:216
217	BAGE-1	UniProtKB; Q13072	SEQ ID NO:217
218	BASI	UniProtKB; P35613	SEQ ID NO:218
219	BCL-2	UniProtKB; A9QXG9	SEQ ID NO:219
220	bcr/abl	UniProtKB; A9UEZ4	SEQ ID NO:220
221	bcr/abl	UniProtKB; A9UEZ7	SEQ ID NO:221
222	bcr/abl	UniProtKB; A9UEZ8	SEQ ID NO:222
223	bcr/abl	UniProtKB; A9UEZ9	SEQ ID NO:223
224	bcr/abl	UniProtKB; A9UF00	SEQ ID NO:224
225	bcr/abl	UniProtKB; A9UF01	SEQ ID NO:225
226	bcr/abl	UniProtKB; A9UF03	SEQ ID NO:226
227	bcr/abl	UniProtKB; A9UF04	SEQ ID NO:227
228	bcr/abl	UniProtKB;	SEQ ID NO:228



[0159]

		A9UF05		
229	bcr/abl	UniProtKB: A9UF06	SEQ ID NO:229	
230	bcr/abl	UniProtKB: A9UF08	SEQ ID NO:230	
231	$\beta$ -连环蛋白/m	UniProtKB: P35222	SEQ ID NO:231	
232	$\beta$ -连环蛋白/m	UniProtKB: Q8WYA6	SEQ ID NO:232	
233	BING-4	UniProtKB: O15213	SEQ ID NO:233	
234	BIRC7	UniProtKB: Q96CA5	SEQ ID NO:234	
235	BRCA1/m	UniProtKB: A0A024R1V0	SEQ ID NO:235	
236	BRCA1/m	UniProtKB: A0A024R1V7	SEQ ID NO:236	
237	BRCA1/m	UniProtKB: A0A024R1Z8	SEQ ID NO:237	
238	BRCA1/m	UniProtKB: A0A068BFX7	SEQ ID NO:238	
239	BRCA1/m	UniProtKB: C6YB45	SEQ ID NO:239	
240	BRCA1/m	UniProtKB: C6YB47	SEQ ID NO:240	
241	BRCA1/m	UniProtKB:	SEQ ID NO:241	

[0160]

		G3XAC3	
242	BY55	UniProtKB: O95971	SEQ ID NO:242
243	CAMEL	UniProtKB: O95987	SEQ ID NO:243
244	CASPA	UniProtKB: Q92851-4	SEQ ID NO:244
245	组织蛋白酶_B	UniProtKB: A0A024R374	SEQ ID NO:245
246	组织蛋白酶_B	UniProtKB: P07858	SEQ ID NO:246
247	组织蛋白酶_L	UniProtKB: A0A024R276	SEQ ID NO:247
248	组织蛋白酶_L	UniProtKB: P07711	SEQ ID NO:248
249	组织蛋白酶_L	UniProtKB: Q9HBQ7	SEQ ID NO:249
250	CD1A	UniProtKB: P06126	SEQ ID NO:250
251	CD1B	UniProtKB: P29016	SEQ ID NO:251
252	CD1C	UniProtKB: P29017	SEQ ID NO:252
253	CD1D	UniProtKB: P15813	SEQ ID NO:253
254	CD1E	UniProtKB:	SEQ ID NO:254

[0161]

		P15812		
255	CD20	UniProtKB: P11836	SEQ ID NO:255	
256	CD22	UniProtKB: O60926	SEQ ID NO:256	
257	CD22	UniProtKB: P20273	SEQ ID NO:257	
258	CD22	UniProtKB: Q0EAF5	SEQ ID NO:258	
259	CD276	UniProtKB: Q5ZPR3	SEQ ID NO:259	
260	CD33	UniProtKB: B4DF51	SEQ ID NO:260	
261	CD33	UniProtKB: P20138	SEQ ID NO:261	
262	CD33	UniProtKB: Q546G0	SEQ ID NO:262	
263	CD3E	UniProtKB: P07766	SEQ ID NO:263	
264	CD3Z	UniProtKB: P20963	SEQ ID NO:264	
265	CD44_同种型_1	UniProtKB: P16070	SEQ ID NO:265	
266	CD44_同种型_6	UniProtKB: P16070-6	SEQ ID NO:266	
267	CD4	UniProtKB:	SEQ ID NO:267	

[0162]

		P01730		
268	CD52	UniProtKB: P31358	SEQ ID NO:268	
269	CD52	UniProtKB: Q6IBD0	SEQ ID NO:269	
270	CD52	UniProtKB: V9HWN9	SEQ ID NO:270	
271	CD55	UniProtKB: B1API5	SEQ ID NO:271	
272	CD55	UniProtKB: D3DT85	SEQ ID NO:272	
273	CD55	UniProtKB: D3DT86	SEQ ID NO:273	
274	CD55	UniProtKB: P08174	SEQ ID NO:274	
275	CD56	UniProtKB: P13591	SEQ ID NO:275	
276	CD80	UniProtKB: A0N0P2	SEQ ID NO:276	
277	CD80	UniProtKB: P33681	SEQ ID NO:277	
278	CD86	UniProtKB: P42081	SEQ ID NO:278	
279	CD8A	UniProtKB: P01732	SEQ ID NO:279	
280	CDC27/m	UniProtKB:	SEQ ID NO:280	

[0163]

		G5EA36		
281	CDC27/m	UniProtKB: P30260	SEQ ID NO:281	
282	CDE30	UniProtKB: P28908	SEQ ID NO:282	
283	CDK4/m	UniProtKB: A0A024RBB6	SEQ ID NO:283	
284	CDK4/m	UniProtKB: P11802	SEQ ID NO:284	
285	CDK4/m	UniProtKB: Q6LC83	SEQ ID NO:285	
286	CDK4/m	UniProtKB: Q96BE9	SEQ ID NO:286	
287	CDKN2A/m	UniProtKB: D1LYX3	SEQ ID NO:287	
288	CDKN2A/m	UniProtKB: G3XAG3	SEQ ID NO:288	
289	CDKN2A/m	UniProtKB: K7PML8	SEQ ID NO:289	
290	CDKN2A/m	UniProtKB: L8E941	SEQ ID NO:290	
291	CDKN2A/m	UniProtKB: Q8N726	SEQ ID NO:291	
292	CEA	RefSeq: NP_004354	SEQ ID NO:292	
293	CEAM6	UniProtKB:	SEQ ID NO:293	

[0164]

		P40199		
294	CH3L2	UniProtKB: Q15782	SEQ ID NO:294	
295	CLCA2	UniProtKB: Q9UQC9	SEQ ID NO:295	
296	CML28	UniProtKB: Q9NQT4	SEQ ID NO:296	
297	CML66	UniProtKB: Q96RS6	SEQ ID NO:297	
298	COA-1/m	UniProtKB: Q5T124	SEQ ID NO:298	
299	毛状蛋白样蛋白	UniProtKB: Q14019	SEQ ID NO:299	
300	胶原蛋白_XXIII	UniProtKB: L8EAS4	SEQ ID NO:300	
301	胶原蛋白_XXIII	UniProtKB: Q86Y22	SEQ ID NO:301	
302	COX-2	UniProtKB: Q6ZYK7	SEQ ID NO:302	
303	CP1B1	UniProtKB: Q16678	SEQ ID NO:303	
304	CSAG2	UniProtKB: Q9Y5P2-2	SEQ ID NO:304	
305	CSAG2	UniProtKB: Q9Y5P2	SEQ ID NO:305	
306	CT45A1	UniProtKB:	SEQ ID NO:306	

[0165]

		Q5HYN5	
307	CT55	UniProtKB: Q8WUE5	SEQ ID NO:307
308	CT- 9/BRD6	UniProtKB: Q58F21	SEQ ID NO:308
309	CTAG2_同种型 _LAGE-1A	UniProtKB: O75638-2	SEQ ID NO:309
310	CTAG2_同种型 _LAGE-1B	UniProtKB: O75638	SEQ ID NO:310
311	CTCFL	UniProtKB: Q8NI51	SEQ ID NO:311
312	Cten	UniProtKB: Q8IZW8	SEQ ID NO:312
313	细胞周期素_B1	UniProtKB: P14635	SEQ ID NO:313
314	细胞周期素_D1	UniProtKB: P24385	SEQ ID NO:314
315	cyp-B	UniProtKB: P23284	SEQ ID NO:315
316	DAM-10	UniProtKB: P43366	SEQ ID NO:316
317	DEPIA	UniProtKB: Q5TB30	SEQ ID NO:317
318	E7	UniProtKB: P03129	SEQ ID NO:318
319	E7	UniProtKB:	SEQ ID NO:319

[0166]

		P06788		
320	E7	UniProtKB: P17387		SEQ ID NO:320
321	E7	UniProtKB: P06429		SEQ ID NO:321
322	E7	UniProtKB: P27230		SEQ ID NO:322
323	E7	UniProtKB: P24837		SEQ ID NO:323
324	E7	UniProtKB: P21736		SEQ ID NO:324
325	E7	UniProtKB: P26558		SEQ ID NO:325
326	E7	UniProtKB: P36831		SEQ ID NO:326
327	E7	UniProtKB: P36833		SEQ ID NO:327
328	E7	UniProtKB: Q9QCZ1		SEQ ID NO:328
329	E7	UniProtKB: Q81965		SEQ ID NO:329
330	E7	UniProtKB: Q80956		SEQ ID NO:330
331	EF1A2	UniProtKB: Q05639		SEQ ID NO:331
332	EFTUD2/m	UniProtKB:		SEQ ID NO:332



[0167]

		Q15029		
333	EGFR	UniProtKB: A0A0B4JIY5	SEQ ID NO:333	
334	EGFR	UniProtKB: E7BSV0	SEQ ID NO:334	
335	EGFR	UniProtKB: L0R6G1	SEQ ID NO:335	
336	EGFR	UniProtKB: P00533-2	SEQ ID NO:336	
337	EGFR	UniProtKB: P00533	SEQ ID NO:337	
338	EGFR	UniProtKB: Q147T7	SEQ ID NO:338	
339	EGFR	UniProtKB: Q504U8	SEQ ID NO:339	
340	EGFR	UniProtKB: Q8NDU8	SEQ ID NO:340	
341	EGLN3	UniProtKB: Q9H6Z9	SEQ ID NO:341	
342	ELF2/m	UniProtKB: B7Z720	SEQ ID NO:342	
343	EMMPRIN	UniProtKB: Q54A51	SEQ ID NO:343	
344	EpCam	UniProtKB: P16422	SEQ ID NO:344	
345	EphA2	UniProtKB:	SEQ ID NO:345	

[0168]

		P29317		
346	EphA3	UniProtKB: P29320	SEQ ID NO:346	
347	EphA3	UniProtKB: Q6P4R6	SEQ ID NO:347	
348	ErbB3	UniProtKB: B3K WG5	SEQ ID NO:348	
349	ErbB3	UniProtKB: B4D GQ7	SEQ ID NO:349	
350	ERBB4	UniProtKB: Q15303	SEQ ID NO:350	
351	ERG	UniProtKB: P11308	SEQ ID NO:351	
352	ETV6	UniProtKB: P41212	SEQ ID NO:352	
353	EWS	UniProtKB: Q01844	SEQ ID NO:353	
354	EZH2	UniProtKB: F2YMM1	SEQ ID NO:354	
355	EZH2	UniProtKB: G3XAL2	SEQ ID NO:355	
356	EZH2	UniProtKB: L0R855	SEQ ID NO:356	
357	EZH2	UniProtKB: Q15910	SEQ ID NO:357	
358	EZH2	UniProtKB:	SEQ ID NO:358	

[0169]

		S4S3R8		
359	FABP7	UniProtKB: O15540	SEQ ID NO:359	
360	FCGR3A_1 型	UniProtKB: P08637	SEQ ID NO:360	
361	FCGR3A_2 型	CCDS: CCDS1232.1	SEQ ID NO:361	
362	FGF5	UniProtKB: P12034	SEQ ID NO:362	
363	FGF5	UniProtKB: Q60518	SEQ ID NO:363	
364	FGFR2	UniProtKB: P21802	SEQ ID NO:364	
365	纤连蛋白	UniProtKB: A0A024R5I6	SEQ ID NO:365	
366	纤连蛋白	UniProtKB: A0A024RB01	SEQ ID NO:366	
367	纤连蛋白	UniProtKB: A0A024RDT9	SEQ ID NO:367	
368	纤连蛋白	UniProtKB: A0A024RDV5	SEQ ID NO:368	
369	纤连蛋白	UniProtKB: A6NH44	SEQ ID NO:369	
370	纤连蛋白	UniProtKB: A8K6A5	SEQ ID NO:370	
371	纤连蛋白	UniProtKB:	SEQ ID NO:371	

[0170]

		B2R627		
372	纤连蛋白	UniProtKB: B3KXM5	SEQ ID NO:372	
373	纤连蛋白	UniProtKB: B4DIC5	SEQ ID NO:373	
374	纤连蛋白	UniProtKB: B4DN21	SEQ ID NO:374	
375	纤连蛋白	UniProtKB: B4DS98	SEQ ID NO:375	
376	纤连蛋白	UniProtKB: B4DTH2	SEQ ID NO:376	
377	纤连蛋白	UniProtKB: B4DTK1	SEQ ID NO:377	
378	纤连蛋白	UniProtKB: B4DU16	SEQ ID NO:378	
379	纤连蛋白	UniProtKB: B7Z3W5	SEQ ID NO:379	
380	纤连蛋白	UniProtKB: B7Z939	SEQ ID NO:380	
381	纤连蛋白	UniProtKB: G5E9X3	SEQ ID NO:381	
382	纤连蛋白	UniProtKB: Q9H382	SEQ ID NO:382	
383	FOS	UniProtKB: P01100	SEQ ID NO:383	
384	FOXP3	UniProtKB:	SEQ ID NO:384	

[0171]

385	FUT1	Q9BZS1 UniProtKB: P19526	SEQ ID NO:385	
386	G250	UniProtKB: Q16790	SEQ ID NO:386	
387	GAGE-1	Genbank: AAA82744	SEQ ID NO:387	
388	GAGE-2	UniProtKB: Q6NT46	SEQ ID NO:388	
389	GAGE-3	UniProtKB: Q13067	SEQ ID NO:389	
390	GAGE-4	UniProtKB: Q13068	SEQ ID NO:390	
391	GAGE-5	UniProtKB: Q13069	SEQ ID NO:391	
392	GAGE-6	UniProtKB: Q13070	SEQ ID NO:392	
393	GAGE7b	UniProtKB: O76087	SEQ ID NO:393	
394	GAGE-8_(GAGE-2 D)	UniProtKB: Q9UEU5	SEQ ID NO:394	
395	GASR	UniProtKB: P32239	SEQ ID NO:395	
396	GnT-V	UniProtKB: Q09328	SEQ ID NO:396	
397	GPC3	UniProtKB:	SEQ ID NO:397	

[0172]

		I6QJG3		
398	GPC3	UniProtKB: P51654	SEQ ID NO:398	
399	GPC3	UniProtKB: Q8IYG2	SEQ ID NO:399	
400	GPNNMB/m	UniProtKB: A0A024RA55	SEQ ID NO:400	
401	GPNNMB/m	UniProtKB: Q14956	SEQ ID NO:401	
402	GPNNMB/m	UniProtKB: Q8IXJ5	SEQ ID NO:402	
403	GPNNMB/m	UniProtKB: Q96F58	SEQ ID NO:403	
404	GRM3	UniProtKB: Q14832	SEQ ID NO:404	
405	HAGE	UniProtKB: Q9NXZ2	SEQ ID NO:405	
406	hepsin	UniProtKB: B2ZDQ2	SEQ ID NO:406	
407	hepsin	UniProtKB: P05981	SEQ ID NO:407	
408	Her2/neu	UniProtKB: B4DTR1	SEQ ID NO:408	
409	Her2/neu	UniProtKB: L8ESG2	SEQ ID NO:409	
410	Her2/neu	UniProtKB:	SEQ ID NO:410	

[0173]

		P04626		
411	Her2/neu	UniProtKB: Q9UK79	SEQ ID NO:411	
412	HLA-A2/m	UniProtKB: Q95387	SEQ ID NO:412	
413	HLA-A2/m	UniProtKB: Q9MYF8	SEQ ID NO:413	
414	同源框_NKX3.1	UniProtKB: Q99801	SEQ ID NO:414	
415	HOM-TES-85	UniProtKB: B2RBQ6	SEQ ID NO:415	
416	HOM-TES-85	UniProtKB: Q9P127	SEQ ID NO:416	
417	HPG1	Pubmed: 12543784	SEQ ID NO:417	
418	HS71A	UniProtKB: P0DMV8	SEQ ID NO:418	
419	HS71B	UniProtKB: P0DMV9	SEQ ID NO:419	
420	HST-2	UniProtKB: P10767	SEQ ID NO:420	
421	hTERT	UniProtKB: O94807	SEQ ID NO:421	
422	iCE	UniProtKB: O00748	SEQ ID NO:422	
423	IF2B3	UniProtKB:	SEQ ID NO:423	

[0174]

		O00425		
424	IL-13Ra2	UniProtKB: Q14627	SEQ ID NO:424	
425	IL2-RA	UniProtKB: P01589	SEQ ID NO:425	
426	IL2-RB	UniProtKB: P14784	SEQ ID NO:426	
427	IL2-RG	UniProtKB: P31785	SEQ ID NO:427	
428	IMP3	UniProtKB: Q9NV31	SEQ ID NO:428	
429	ITA5	UniProtKB: P08648	SEQ ID NO:429	
430	ITB1	UniProtKB: P05556	SEQ ID NO:430	
431	ITB6	UniProtKB: P18564	SEQ ID NO:431	
432	血管舒缓素-2	UniProtKB: A0A024R4J4	SEQ ID NO:432	
433	血管舒缓素-2	UniProtKB: A0A024R4N3	SEQ ID NO:433	
434	血管舒缓素-2	UniProtKB: B0AZU9	SEQ ID NO:434	
435	血管舒缓素-2	UniProtKB: B4DU77	SEQ ID NO:435	
436	血管舒缓素-2	UniProtKB:	SEQ ID NO:436	



[0175]

		P20151		
437	血管舒缓素-2	UniProtKB: Q6T774	SEQ ID NO:437	
438	血管舒缓素-2	UniProtKB: Q6T775	SEQ ID NO:438	
439	血管舒缓素-4	UniProtKB: A0A0C4DFQ5	SEQ ID NO:439	
440	血管舒缓素-4	UniProtKB: Q5BQA0	SEQ ID NO:440	
441	血管舒缓素-4	UniProtKB: Q96PT0	SEQ ID NO:441	
442	血管舒缓素-4	UniProtKB: Q96PT1	SEQ ID NO:442	
443	血管舒缓素-4	UniProtKB: Q9Y5K2	SEQ ID NO:443	
444	KI20A	UniProtKB: O95235	SEQ ID NO:444	
445	KIAA0205	UniProtKB: Q92604	SEQ ID NO:445	
446	KIF2C	UniProtKB: Q99661	SEQ ID NO:446	
447	KK-LC-1	UniProtKB: Q5H943	SEQ ID NO:447	
448	LDLR	UniProtKB: P01130	SEQ ID NO:448	
449	LGMN	UniProtKB:	SEQ ID NO:449	

[0176]

		Q99538	
450	LIRB2	UniProtKB: Q8N423	SEQ ID NO:450
451	LY6K	UniProtKB: Q17RY6	SEQ ID NO:451
452	MAGA5	UniProtKB: P43359	SEQ ID NO:452
453	MAGA8	UniProtKB: P43361	SEQ ID NO:453
454	MAGAB	UniProtKB: P43364	SEQ ID NO:454
455	MAGE-A10	UniProtKB: A0A024RC14	SEQ ID NO:455
456	MAGE-A12	UniProtKB: P43365	SEQ ID NO:456
457	MAGE-A1	UniProtKB: P43355	SEQ ID NO:457
458	MAGE-A2	UniProtKB: P43356	SEQ ID NO:458
459	MAGE-A3	UniProtKB: P43357	SEQ ID NO:459
460	MAGE-A4	UniProtKB: A0A024RC12	SEQ ID NO:460
461	MAGE-A4	UniProtKB: P43358	SEQ ID NO:461
462	MAGE-A4	UniProtKB:	SEQ ID NO:462

[0177]

		QIRN33	
463	MAGE-A6	UniProtKB: A8K072	SEQ ID NO:463
464	MAGE-A6	UniProtKB: P43360	SEQ ID NO:464
465	MAGE-A6	UniProtKB: Q6FHI5	SEQ ID NO:465
466	MAGE-A9	UniProtKB: P43362	SEQ ID NO:466
467	MAGE-B10	UniProtKB: Q96LZ2	SEQ ID NO:467
468	MAGE-B16	UniProtKB: A2A368	SEQ ID NO:468
469	MAGE-B17	UniProtKB: A8MXT2	SEQ ID NO:469
470	MAGE-_B1	UniProtKB: Q96TGI	SEQ ID NO:470
471	MAGE-B2	UniProtKB: O15479	SEQ ID NO:471
472	MAGE-B3	UniProtKB: O15480	SEQ ID NO:472
473	MAGE-B4	UniProtKB: O15481	SEQ ID NO:473
474	MAGE-B5	UniProtKB: Q9BZ81	SEQ ID NO:474
475	MAGE-B6	UniProtKB:	SEQ ID NO:475

[0178]

		Q8N7X4	
476	MAGE-C1	UniProtKB: O60732	SEQ ID NO:476
477	MAGE-C2	UniProtKB: Q9UBF1	SEQ ID NO:477
478	MAGE-C3	UniProtKB: Q8TD91	SEQ ID NO:478
479	MAGE-D1	UniProtKB: Q9Y5V3	SEQ ID NO:479
480	MAGE-D2	UniProtKB: Q9UNF1	SEQ ID NO:480
481	MAGE-D4	UniProtKB: Q96JG8	SEQ ID NO:481
482	MAGE- E1	UniProtKB: Q6IAI7	SEQ ID NO:482
483	MAGE-E1_ (MAGE 1)	UniProtKB: Q9HCI5	SEQ ID NO:483
484	MAGE-E2	UniProtKB: Q8TD90	SEQ ID NO:484
485	MAGE-F1	UniProtKB: Q9HAY2	SEQ ID NO:485
486	MAGE-H1	UniProtKB: Q9H213	SEQ ID NO:486
487	MAGEL2	UniProtKB: Q9UJ55	SEQ ID NO:487
488	乳腺珠蛋白_A	UniProtKB:	SEQ ID NO:488

[0179]

		Q13296	
489	乳腺珠蛋白_A	UniProtKB: Q6NX70	SEQ ID NO:489
490	MART-1/melan-A	UniProtKB: Q16655	SEQ ID NO:490
491	MART-2	UniProtKB: Q5VTY9	SEQ ID NO:491
492	MC1_R	UniProtKB: Q01726	SEQ ID NO:492
493	MC1_R	UniProtKB: Q1JUL4	SEQ ID NO:493
494	MC1_R	UniProtKB: Q1JUL6	SEQ ID NO:494
495	MC1_R	UniProtKB: Q1JUL8	SEQ ID NO:495
496	MC1_R	UniProtKB: Q1JUL9	SEQ ID NO:496
497	MC1_R	UniProtKB: Q1JUM0	SEQ ID NO:497
498	MC1_R	UniProtKB: Q1JUM2	SEQ ID NO:498
499	MC1_R	UniProtKB: Q1JUM3	SEQ ID NO:499
500	MC1_R	UniProtKB: Q1JUM4	SEQ ID NO:500
501	MC1_R	UniProtKB:	SEQ ID NO:501

[0180]

		Q1JUM5	
502	MC1_R	UniProtKB: Q6UR92	SEQ ID NO:502
503	MC1_R	UniProtKB: Q6UR94	SEQ ID NO:503
504	MC1_R	UniProtKB: Q6UR95	SEQ ID NO:504
505	MC1_R	UniProtKB: Q6UR96	SEQ ID NO:505
506	MC1_R	UniProtKB: Q6UR97	SEQ ID NO:506
507	MC1_R	UniProtKB: Q6UR98	SEQ ID NO:507
508	MC1_R	UniProtKB: Q6UR99	SEQ ID NO:508
509	MC1_R	UniProtKB: Q6URA0	SEQ ID NO:509
510	MC1_R	UniProtKB: Q86YW1	SEQ ID NO:510
511	MC1_R	UniProtKB: V9Q5S2	SEQ ID NO:511
512	MC1_R	UniProtKB: V9Q671	SEQ ID NO:512
513	MC1_R	UniProtKB: V9Q783	SEQ ID NO:513
514	MC1_R	UniProtKB:	SEQ ID NO:514

[0181]

		V9Q7F1		
515	MCI_R	UniProtKB: V9Q8N1	SEQ ID NO:515	
516	MCI_R	UniProtKB: V9Q977	SEQ ID NO:516	
517	MCI_R	UniProtKB: V9Q9P5	SEQ ID NO:517	
518	MCI_R	UniProtKB: V9Q9R8	SEQ ID NO:518	
519	MCI_R	UniProtKB: V9QAE0	SEQ ID NO:519	
520	MCI_R	UniProtKB: V9QAR2	SEQ ID NO:520	
521	MCI_R	UniProtKB: V9QAW3	SEQ ID NO:521	
522	MCI_R	UniProtKB: V9QB02	SEQ ID NO:522	
523	MCI_R	UniProtKB: V9QB58	SEQ ID NO:523	
524	MCI_R	UniProtKB: V9QBY6	SEQ ID NO:524	
525	MCI_R	UniProtKB: V9QC17	SEQ ID NO:525	
526	MCI_R	UniProtKB: V9QC66	SEQ ID NO:526	
527	MCI_R	UniProtKB:	SEQ ID NO:527	

[0182]

		V9QCQ4	
528	MC1_R	UniProtKB: V9QDF4	SEQ ID NO:528
529	MC1_R	UniProtKB: V9QDN7	SEQ ID NO:529
530	MC1_R	UniProtKB: V9QDQ6	SEQ ID NO:530
531	间皮素	UniProtKB: Q13421	SEQ ID NO:531
532	MITF	UniProtKB: O75030-8	SEQ ID NO:532
533	MITF	UniProtKB: O75030-9	SEQ ID NO:533
534	MITF	UniProtKB: O75030	SEQ ID NO:534
535	MMP1_1	UniProtKB: B3KQS8	SEQ ID NO:535
536	MMP7	UniProtKB: P09237	SEQ ID NO:536
537	MUC-1	Genbank: AAA60019	SEQ ID NO:537
538	MUM-1/m	RefSeq: NP_116242	SEQ ID NO:538
539	MUM-2/m	UniProtKB: Q9Y5R8	SEQ ID NO:539
540	MYO1A	UniProtKB:	SEQ ID NO:540



[0183]

		Q9UBC5	
541	MYO1B	UniProtKB: O43795	SEQ ID NO:541
542	MYO1C	UniProtKB: O00159	SEQ ID NO:542
543	MYO1D	UniProtKB: O94832	SEQ ID NO:543
544	MYO1E	UniProtKB: Q12965	SEQ ID NO:544
545	MYO1F	UniProtKB: O00160	SEQ ID NO:545
546	MYO1G	UniProtKB: B011T2	SEQ ID NO:546
547	MYO1H	RefSeq: NP_001094891	SEQ ID NO:547
548	NA17	UniProtKB: Q3V5L5	SEQ ID NO:548
549	NA88-A	Pubmed: 10790436	SEQ ID NO:549
550	Neo-PAP	UniProtKB: Q9BWT3	SEQ ID NO:550
551	NFYC/m	UniProtKB: Q13952	SEQ ID NO:551
552	NGEP	UniProtKB: Q61WH7	SEQ ID NO:552
553	NPM	UniProtKB:	SEQ ID NO:553

[0184]

		P06748		
554	NRCAM	UniProtKB: Q92823		SEQ ID NO:554
555	NSE	UniProtKB: P09104		SEQ ID NO:555
556	NUF2	UniProtKB: Q9BZD4		SEQ ID NO:556
557	NY-ESO-1	UniProtKB: P78358		SEQ ID NO:557
558	OA1	UniProtKB: P51810		SEQ ID NO:558
559	OGT	UniProtKB: O15294		SEQ ID NO:559
560	OS-9	UniProtKB: B4DH11		SEQ ID NO:560
561	OS-9	UniProtKB: B4E321		SEQ ID NO:561
562	OS-9	UniProtKB: B7Z8E7		SEQ ID NO:562
563	OS-9	UniProtKB: Q13438		SEQ ID NO:563
564	骨钙蛋白	UniProtKB: P02818		SEQ ID NO:564
565	骨桥蛋白	UniProtKB: A0A024RDE2		SEQ ID NO:565
566	骨桥蛋白	UniProtKB:		SEQ ID NO:566

[0185]

		A0A024RDE6		
567	骨桥蛋白	UniProtKB: A0A024RDJ0	SEQ ID NO:567	
568	骨桥蛋白	UniProtKB: B7Z351	SEQ ID NO:568	
569	骨桥蛋白	UniProtKB: F2YQ21	SEQ ID NO:569	
570	骨桥蛋白	UniProtKB: P10451	SEQ ID NO:570	
571	p53	UniProtKB: P04637	SEQ ID NO:571	
572	PAGE-4	UniProtKB: O60829	SEQ ID NO:572	
573	PAI-1	UniProtKB: P05121	SEQ ID NO:573	
574	PAI-2	UniProtKB: P05120	SEQ ID NO:574	
575	PAP	UniProtKB: Q06141	SEQ ID NO:575	
576	PAP	UniProtKB: Q53S56	SEQ ID NO:576	
577	PATE	UniProtKB: Q8WXA2	SEQ ID NO:577	
578	PAX3	UniProtKB: P23760	SEQ ID NO:578	
579	PAX5	UniProtKB:	SEQ ID NO:579	

[0186]

		Q02548		
580	PD1L1	UniProtKB: Q9NZQ7	SEQ ID NO:580	
581	PDCD1	UniProtKB: Q15116	SEQ ID NO:581	
582	PDEF	UniProtKB: O95238	SEQ ID NO:582	
583	PECA1	UniProtKB: P16284	SEQ ID NO:583	
584	PGCB	UniProtKB: Q96GW7	SEQ ID NO:584	
585	PGFRB	UniProtKB: P09619	SEQ ID NO:585	
586	Pim-1_激酶	UniProtKB: A0A024RD25	SEQ ID NO:586	
587	Pin-1	UniProtKB: O15428	SEQ ID NO:587	
588	Pin-1	UniProtKB: Q13526	SEQ ID NO:588	
589	Pin-1	UniProtKB: Q49AR7	SEQ ID NO:589	
590	PLAC1	UniProtKB: Q9HBJ0	SEQ ID NO:590	
591	PMEL	UniProtKB: P40967	SEQ ID NO:591	
592	PML	UniProtKB:	SEQ ID NO:592	

[0187]

		P29590		
593	POTEF	UniProtKB: A5A3E0	SEQ ID NO:593	
594	POTE	UniProtKB: Q86YR6	SEQ ID NO:594	
595	PRAME	UniProtKB: A0A024R1E6	SEQ ID NO:595	
596	PRAME	UniProtKB: P78395	SEQ ID NO:596	
597	PRDX5/m	UniProtKB: P30044	SEQ ID NO:597	
598	PRM2	UniProtKB: P04554	SEQ ID NO:598	
599	prostein	UniProtKB: Q96JT2	SEQ ID NO:599	
600	蛋白酶-3	UniProtKB: D6CHE9	SEQ ID NO:600	
601	蛋白酶-3	UniProtKB: P24158	SEQ ID NO:601	
602	PSA	UniProtKB: P55786	SEQ ID NO:602	
603	PSB9	UniProtKB: P28065	SEQ ID NO:603	
604	PSCA	UniProtKB: D3DWI6	SEQ ID NO:604	
605	PSCA	UniProtKB:	SEQ ID NO:605	

[0188]

		O43653		
606	PSGR	UniProtKB: Q9H255		SEQ ID NO:606
607	PSM	UniProtKB: Q04609		SEQ ID NO:607
608	PTPRC	RefSeq: NP_002829		SEQ ID NO:608
609	RAB8A	UniProtKB: P61006		SEQ ID NO:609
610	RAGE-1	UniProtKB: Q9UQ07		SEQ ID NO:610
611	RARA	UniProtKB: P10276		SEQ ID NO:611
612	RASH	UniProtKB: P01112		SEQ ID NO:612
613	RASK	UniProtKB: P01116		SEQ ID NO:613
614	RASN	UniProtKB: P01111		SEQ ID NO:614
615	RGS5	UniProtKB: O15539		SEQ ID NO:615
616	RHAMM/CD168	UniProtKB: O75330		SEQ ID NO:616
617	RHOC	UniProtKB: P08134		SEQ ID NO:617
618	RSSA	UniProtKB:		SEQ ID NO:618

[0189]

		P08865		
619	RU1	UniProtKB: Q9UHH3	SEQ ID NO:619	
620	RU2	UniProtKB: Q9UHG0	SEQ ID NO:620	
621	RUNX1	UniProtKB: Q01196	SEQ ID NO:621	
622	S-100	UniProtKB: V9HW39	SEQ ID NO:622	
623	SAGE	UniProtKB: Q9NXZ1	SEQ ID NO:623	
624	SART-1	UniProtKB: O43290	SEQ ID NO:624	
625	SART-2	UniProtKB: Q9UL01	SEQ ID NO:625	
626	SART-3	UniProtKB: Q15020	SEQ ID NO:626	
627	SEPR	UniProtKB: Q12884	SEQ ID NO:627	
628	SIA7F	UniProtKB: Q969X2	SEQ ID NO:628	
629	SIA8A	UniProtKB: Q92185	SEQ ID NO:629	
630	SIAT9	UniProtKB: Q9UNP4	SEQ ID NO:630	
631	SIRT2/m	UniProtKB:	SEQ ID NO:631	

[0190]

		A0A024R0G8	
632	SIRT2/m	UniProtKB: Q8IXJ6	SEQ ID NO:632
633	SOX10	UniProtKB: P56693	SEQ ID NO:633
634	SP17	UniProtKB: Q15506	SEQ ID NO:634
635	SPNXA	UniProtKB: Q9NS26	SEQ ID NO:635
636	SPXN3	UniProtKB: Q5MJ09	SEQ ID NO:636
637	SSX-1	UniProtKB: Q16384	SEQ ID NO:637
638	SSX-2	UniProtKB: Q16385	SEQ ID NO:638
639	SSX3	UniProtKB: Q99909	SEQ ID NO:639
640	SSX-4	UniProtKB: O60224	SEQ ID NO:640
641	ST1A1	UniProtKB: P50225	SEQ ID NO:641
642	STAG2	UniProtKB: Q8N3U4-2	SEQ ID NO:642
643	STAMP-1	UniProtKB: Q8NFT2	SEQ ID NO:643
644	STEAP-1	UniProtKB:	SEQ ID NO:644



[0191]

		A0A024RA63	
645	STEAP-1	UniProtKB: Q9UHE8	SEQ ID NO:645
646	存活蛋白-2B	UniProtKB: O15392-2	SEQ ID NO:646
647	存活蛋白	UniProtKB: O15392	SEQ ID NO:647
648	SYCP1	UniProtKB: A0A024R0I2	SEQ ID NO:648
649	SYCP1	UniProtKB: B7ZLS9	SEQ ID NO:649
650	SYCP1	UniProtKB: Q15431	SEQ ID NO:650
651	SYCP1	UniProtKB: Q3MHC4	SEQ ID NO:651
652	SYT-SSX-1	UniProtKB: A4PIV7	SEQ ID NO:652
653	SYT-SSX-1	UniProtKB: A4PIV8	SEQ ID NO:653
654	SYT-SSX-2	UniProtKB: A4PIV9	SEQ ID NO:654
655	SYT-SSX-2	UniProtKB: A4PIW0	SEQ ID NO:655
656	TARP	UniProtKB: Q0VGM3	SEQ ID NO:656
657	TCRg	UniProtKB:	SEQ ID NO:657

[0192]

		A2JGV3		
658	TF2AA	UniProtKB: P52655	SEQ ID NO:658	
659	TGFR2	UniProtKB: P37173	SEQ ID NO:659	
660	TGM-4	UniProtKB: B2R7D1	SEQ ID NO:660	
661	TIE2	UniProtKB: Q02763	SEQ ID NO:661	
662	TKTL1	UniProtKB: P51854	SEQ ID NO:662	
663	TPI/m	UniProtKB: P60174	SEQ ID NO:663	
664	TRGV11	UniProtKB: Q99601	SEQ ID NO:664	
665	TRGV9	UniProtKB: A4D1X2	SEQ ID NO:665	
666	TRGV9	UniProtKB: Q99603	SEQ ID NO:666	
667	TRGV9	UniProtKB: Q99604	SEQ ID NO:667	
668	TRPC1	UniProtKB: P48995	SEQ ID NO:668	
669	TRP-p8	UniProtKB: Q7Z2W7	SEQ ID NO:669	
670	TSG10	UniProtKB:	SEQ ID NO:670	

[0193]

		Q9BZW7	
671	TSPY1	UniProtKB: Q01534	SEQ ID NO:671
672	TVC_(TRGV3)	Genbank: M13231.1	SEQ ID NO:672
673	TX101	UniProtKB: Q9BY14-2	SEQ ID NO:673
674	酪氨酸酶	UniProtKB: A0A024DBG7	SEQ ID NO:674
675	酪氨酸酶	UniProtKB: L8B082	SEQ ID NO:675
676	酪氨酸酶	UniProtKB: L8B086	SEQ ID NO:676
677	酪氨酸酶	UniProtKB: L8B0B9	SEQ ID NO:677
678	酪氨酸酶	UniProtKB: O75767	SEQ ID NO:678
679	酪氨酸酶	UniProtKB: P14679	SEQ ID NO:679
680	酪氨酸酶	UniProtKB: U3M8N0	SEQ ID NO:680
681	酪氨酸酶	UniProtKB: U3M9D5	SEQ ID NO:681
682	酪氨酸酶	UniProtKB: U3M9J2	SEQ ID NO:682
683	TYRP1	UniProtKB:	SEQ ID NO:683

[0194]

		P17643		
684	TYRP2	UniProtKB: P40126	SEQ ID NO:684	
685	UPA	UniProtKB: Q96NZ9	SEQ ID NO:685	
686	VEGFR1	UniProtKB: B5A924	SEQ ID NO:686	
687	WT1	UniProtKB: A0A0H5AUY0	SEQ ID NO:687	
688	WT1	UniProtKB: P19544	SEQ ID NO:688	
689	WT1	UniProtKB: Q06250	SEQ ID NO:689	
690	XAGE1	UniProtKB: Q9HD64	SEQ ID NO:690	
691	IL-10	UniProtKB: P22301	SEQ ID NO:691	
692	IL-5	UniProtKB: P05113	SEQ ID NO:692	
693	M-CSF	UniProtKB: P09603	SEQ ID NO:693	
694	TGFβ1	UniProtKB: P01137	SEQ ID NO:694	
695	半胱天冬蛋白酶 _8	UniProtKB: Q14790	SEQ ID NO:695	
696	SERPINB5	UniProtKB:	SEQ ID NO:696	

[0195]

		P36952		
697	钙网蛋白	UniProtKB: B4DHR1	SEQ ID NO:697	
698	钙网蛋白	UniProtKB: B4E2Y9	SEQ ID NO:698	
699	钙网蛋白	UniProtKB: P27797	SEQ ID NO:699	
700	钙网蛋白	UniProtKB: Q96L12	SEQ ID NO:700	
701	N-myc	UniProtKB: P04198	SEQ ID NO:701	

[0196] 另外,可以将表1中描述的抗原(包括第4列中所示的序列/片段/表位)单独地或彼此组合地克隆到本文所述的LAMP构建物中。例如,名称pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、

IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3指表1中描述的蛋白,并且明确地旨在不仅泛指表1第1列中所示的全长序列,而且优选是图19和20以及表1第4列中所述的序列/片段/表位。因此,表1第1列中所示的每个序列,包括表1第4列中描述的表位/片段,可以用于产生LAMP构建物。为了说明不同的可能组合,但不以任何方式限制本公开,可以如下将抗原的组合(包括表1第1列中所示的序列和/或表1第4列中所述的序列/片段/表位)克隆到LAMP构建物中:(a) pp65和以下中的至少一个:gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3;(b) gB和以下中的至少一个:pp65、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3;(c) IE1和以下中的至少一个:pp65、gB、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3;(d) MTRII和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3;(e) US28和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3;(f) IGFBP2和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3;(g) IL10和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3;(h) UL144和以下中的至少一个:

pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(i) UL141和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(j) US11和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(k) IE2和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(l) TERT和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(m) 存活蛋白和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(n) 破伤风和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(o) NY-ESO-1和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(p) HER2和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(q) HER3和以下中的至少一个：

pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(r) HVEM和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(s) HOS和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(t) HPV16E6和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(u) HPV18E6和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(v) HPV16E7和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(w) HPV18E7和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(x) EBNA1和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(y) EBNA1截短和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(z) gp350和以下中的至少一个：



pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(aa) LMP2和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(ab) GCP3和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(ac) 中间S和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(ad) X蛋白和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(ae) TIGIT和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(af) TEM8和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(ag) TEM1和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(ah) HER2 ECD+TM和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(ai) CEA和以下中的至少一

个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3; (aj) TARP和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3; (ak) PROSTEIN和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3; (al) PSMA和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3; (am) BIRC4和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3; (an) MUCIN-1和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3; (ao) MUCIN-1同种型和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3; (ap) CD40-L和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、WT-1、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3; (aq) WT-1和以下中的至少一个:pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1截短、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3; (ar) WT-1截短和以下中的至少一个:

pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、PRAME、LAGE-1和/或MAGE A3；(as) PRAME和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、LAGE-1和/或MAGE A3；(at) LAGE-1和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME和/或MAGE A3；和/或 (au) MAGE A3和以下中的至少一个：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、存活蛋白、破伤风、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA截短、gp350、LMP2、GCP3、中间S、X蛋白、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、MUCIN-1、MUCIN-1同种型、CD40-L、WT-1、WT-1截短、PRAME和/或LAGE-1。特定LAMP构建物中如上所述的抗原组合的顺序可以变化，因为所述列表描述了LAMP构建物所包含的内容，而并非必需描述特定构建物中抗原的排列。此外，特别设想了，这些抗原可以组合在单个LAMP构建物中，或者可以在包含多个LAMP构建物的组合物中递送。

**[0197] 编码改良LAMP构建物的序列的组装**

**[0198]** 用于构建包含所述感兴趣的抗原的改良LAMP构建物的程序在本领域中是公知的(参见例如Williams等, J. Cell Biol. 111:955, 1990)。编码所需区段的DNA序列可以从容易获得的重组DNA材料例如可以从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852, U.S.A.) 或从含有所需DNA的DNA文库获得的重组DNA材料来获得。

**[0199]** 例如，使用重组DNA方法的常规程序，可以将对应于所需结构域序列的DNA区段与适合的控制和信号序列组装。参见例如在美国专利号4,593,002和Langford等, Molec. Cell. Biol. 6:3191, 1986中所描述的。

**[0200]** 编码蛋白质或多肽的DNA序列可以被化学合成或通过几种方法之一被分离。待合成的DNA序列可以被设计成具有对所需氨基酸序列适合的密码子。通常，人们将选择对在表中表达所述序列的目标宿主来说优选的密码子。完整序列可以从通过标准方法制备并组装成完整编码序列的交叠的寡核苷酸组装。参见例如Edge, Nature 292:756, 1981; Nambair等, Science 223:1299, 1984; Jay等, J. Biol. Chem. 259:6311, 1984。

**[0201]** 在一种情况下，使用聚合酶链反应单个地分离编码所述改良LAMP构建物的结构域序列的一种或多种核酸(M. A. Innis等, 《PCR方案：方法和应用指南》(PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications), Academic Press, 1990)。所述结构域优选地从已知含有它们的可公开获得的克隆分离，但是它们也可以从基因组DNA或cDNA文库分离。优选地，分离的片段在边缘具有相容的限制性内切核酸酶位点，其允许构建编码所述癌抗原序

列的改良LAMP构建物。这种技术对于本领域技术人员来说是公知的。结构域序列可以彼此直接融合(例如没有居间序列)或插入到彼此之中(例如其中结构域序列是不连续的),或者可以被居间序列(例如连接物序列)分隔开。

[0202] 用于制备寡核苷酸引物、探针和DNA文库以及通过核酸杂交对它们进行筛选的基本策略,对于本领域技术人员来说是公知的。参见例如Sambrook等,1989,同上;Perbal, 1984,同上。适合的基因组DNA或cDNA文库的构建在本领域的技术范围之内。参见例如Perbal, 1984,同上。或者,适合的DNA文库或可公开获得的克隆可以从生物研究材料的供应商例如Clonetech和Stratagene获得,以及从公共保藏处例如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)获得。

[0203] 选择可以通过从DNA的表达文库表达序列并通过免疫学方法检测表达的肽来实现。选择表达结合到MHC II分子并结合到所需抗体/T细胞受体的肽的克隆。这些选择程序对于本领域普通技术人员来说是公知的(参见例如Sambrook等,1989,同上)。

[0204] 在含有所需多肽序列的编码序列的克隆被制备或分离后,可以将所述序列克隆到任何适合的载体中,所述载体优选地包含用于在宿主细胞中维持所述序列的复制起点。

#### [0205] 核酸递送媒介

[0206] 在一种情况下,将包含改良LAMP构建物的疫苗组合物引入到细胞中。所述细胞可以是用于复制所述核酸或用于表达所述改良LAMP构建物的宿主细胞。优选地,用于表达所述改良LAMP构建物的宿主细胞是抗原呈递细胞(在下文进一步描述)。

[0207] 在优选实施方式中,所述改良LAMP构建物还包含用于插入到靶细胞中的多核苷酸序列和可操作地连接到所述多核苷酸序列以控制它在所述细胞中的表达(例如转录和/或翻译)的表达控制序列。实例包括质粒、噬菌体、自主复制序列(ARS)、着丝粒和能够在体外或在宿主细胞(例如细菌、酵母或昆虫细胞)和/或靶细胞(例如哺乳动物细胞、优选为抗原呈递细胞)中复制或被复制和/或将所述编码改良LAMP构建物的序列传送到靶细胞内的所需位置的其他序列。

[0208] 重组表达载体可以源自于容易感染动物(包括人、马、奶牛、猪、美洲驼、长颈鹿、狗、猫或鸡)的微生物。优选的载体包括已被用作活疫苗的载体,例如痘苗。这些重组体可以被直接接种到宿主中,不仅提供针对所述微生物载体的免疫力,而且表达外来抗原。本文中设想作为活重组疫苗的优选载体包括RNA病毒、腺病毒、疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、以及痘苗和其他痘病毒,正如在例如Flexner, Adv. Pharmacol. 21:51, 1990中教导的。

[0209] 表达控制序列包括但不限于结合RNA聚合酶的启动子序列、分别结合到转录激活子和阻遏物的增强子序列或负调控元件和/或用于核糖体结合的翻译起始序列。例如,细菌表达载体可以包括启动子例如lac启动子和用于转录起始的序列、Shine-Dalgarno序列和起始密码子AUG (Sambrook等,1989,同上)。同样地,真核表达载体优选地包括用于RNA聚合酶II的异源、同源或嵌合启动子、下游多腺苷化信号、起始密码子AUG和用于核糖体脱离的终止密码子。

[0210] 表达控制序列可以从天然存在的基因获得,或者可以被设计。设计的表达控制序列包括但不限于突变的和/或嵌合的表达控制序列或者合成或克隆的共有序列。含有启动子和多核苷酸被可操作地连接到其中的克隆位点的载体,在本领域中是公知的。这些载体能够在体外或体内转录RNA,并且可以从诸如Stratagene (La Jolla, Calif.) 和Promega

Biotech (Madison, Wis.) 的来源商购。

[0211] 为了优化表达和/或转录,可能必需去除、添加或改变所述载体的5'和/或3'非翻译部分,以消除额外的或可替选的翻译起始密码子或可能在转录或翻译水平上干扰或降低表达的其他序列。或者,可以将共有核糖体结合位点插入到紧邻起始密码子的5'以增强表达。广范围的各种不同表达控制序列——控制可操作地连接到它的DNA序列的表达的序列——可用于这些载体中,以表达本发明的DNA序列。这些有用的表达控制序列包括例如SV40、CMV、痘苗病毒、多瘤病毒、腺病毒、疱疹病毒的早期或晚期启动子和已知控制哺乳动物细胞的基因表达的其他序列,及其各种不同组合。

[0212] 在一种情况下,所述改良LAMP构建物包含用于复制所述载体的复制起点。优选地,所述起点在至少一种类型的宿主细胞中起作用,所述宿主细胞可用于产生足够拷贝数的序列用于递送到靶细胞。因此,适合的起点包括但不限于在细菌细胞(例如埃希氏杆菌(*Escherichia* sp.)、沙门氏菌(*Salmonella* sp.)、变形杆菌(*Proteus* sp.)、梭菌(*Clostridium* sp.)、克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、链霉菌(*Streptomyces* sp.)和假单胞菌(*Pseudomonas* sp.))、酵母(例如酿酒酵母(*Saccharomyces* sp.)或毕赤酵母(*Pichia* sp.))、昆虫细胞和哺乳动物细胞中起作用的起点。在一种优选情况下,提供了在所述核酸递送媒介被引入到其中的靶细胞(例如哺乳动物细胞如人类细胞)中起作用的复制起点。在另一种情况下,提供了至少两个复制起点,一个在宿主细胞中起作用,一个在靶细胞中起作用。

[0213] 所述改良LAMP构建物可以可替选地或附加性地包含促进所述核酸递送载体的至少一部分整合到靶细胞染色体中的序列。例如,所述改良LAMP构建物可以包含与靶细胞的染色体DNA同源的区域。在一种情况下,所述递送载体包含与编码所述改良LAMP构建物的核酸序列侧接的两个或更多个重组位点。

[0214] 所述载体可以另外包含可检测和/或可选择的标记物,以确认所述载体已被成功地引入到靶细胞中和/或可以被所述靶细胞表达。这些标记物可以编码活性例如但不限于RNA、肽或蛋白质的产生,或者可以提供用于RNA、肽、蛋白质、无机和有机化合物或组合物等的结合位点。

[0215] 可检测/可选择标记物基因的实例包括但不限于:编码提供针对原本有毒的化合物(例如抗生素)的抗性的产物的DNA区段;编码在受体细胞中原本缺少的产物的DNA区段(例如tRNA基因、营养缺陷标记物);编码抑制基因产物的活性的产物的DNA区段;编码可以被容易地鉴定的产物(例如表型标记物例如 $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光蛋白(GFP、CFP、YFP、BFP、RFP、EGFP、EYFP、EBFP、dsRed、其突变、修饰或增强的形式等)和细胞表面蛋白)的DNA区段;结合原本对细胞存活和/或功能有害的产物的DNA区段;原本抑制其他核酸区段的活性的DNA区段(例如反义寡核苷酸);结合修饰底物的产物(例如限制性内切核酸酶)的DNA区段;可用于分离或鉴定所需分子的DNA区段(例如编码特异性蛋白结合位点的区段);引物序列;在不存在时直接或间接提供对特定化合物的抗性或敏感性的DNA区段;和/或编码在受体细胞中有毒的产物的DNA区段。

[0216] 所述标记物基因可作为标记物,用于证实成功的基因转移和/或用于分离表达被转移的基因的细胞和/或从细胞回收被转移的基因。例如,在一种情况下,所述标记物基因被用于分离和纯化表达所述改良LAMP构建物的抗原呈递细胞。

[0217] 可以提供基本上相似的基因,例如与已知基因具有高于约50%、高于约70%、高于80%、高于约90%并且优选地高于约95%的同一性的基因。基本上相似的结构域序列可以首先通过选择在严紧杂交条件下特异性杂交到感兴趣的结构域序列的序列来鉴定。执行测定法以确定同源、变体或修饰的结构域序列的适合性仅仅是对表达适合活性的序列进行筛选的问题。这些筛选在本领域中是常规的。

[0218] 所述改良LAMP构建物可以被提供为裸露核酸,或与用于促进核酸进入到细胞中的一种或多种分子相结合提供在递送媒介中。适合的递送媒介包括但不限于:脂质体制剂,多肽,多糖,脂多糖,病毒制剂(例如包括病毒、病毒粒子、人工病毒包膜等),细胞递送媒介等。

[0219] 基于脂质的制剂

[0220] 被设计用于促进改良LAMP构建物的细胞内递送的递送媒介,必须与非极性和极性环境两者相互作用(在例如质膜、组织液、细胞内的区室等中或其上)。因此,优选地,递送媒介被设计成含有极性和非极性结构域两者或用于将改良LAMP构建物易位到细胞内的易位序列。

[0221] 具有极性和非极性结构域的化合物被称为两亲物。阳离子型两亲物具有能够在生理pH下或附近带正电荷的极性基团,用于与带负电荷的多核苷酸例如DNA相互作用。

[0222] 本文描述的改良LAMP构建物可以被提供在包含脂质单层或双层的制剂中,以促进所述载体进行跨细胞膜转移。可以使用脂质体或任何形式的脂质膜例如平面脂质膜或完整细胞例如红细胞的细胞膜。脂质体制剂可以通过任何手段来施用,包括静脉内或口服施用。

[0223] 脂质体和脂质体制剂可以按照标准方法来制备,并且在本领域中是公知的,参见例如Remington's;Akimaru,1995,Cytokines Mol.Ther.1:197-210;Alving,1995,Immunol.Rev.145:5-31;Szoka,1980,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467;美国专利号4,235,871;美国专利号4,501,728;和美国专利号4,837,028。在一种情况下,所述脂质体包含靶向分子,用于将脂质体:改良LAMP构建物复合物靶向到特定细胞类型。在特别优选的情况下,靶向分子包含用于靶组织中存在的血管或细胞表面上的生物分子(例如受体或配体)的结合配偶体(例如配体或受体)。

[0224] 脂质体电荷是脂质体从血液清除的重要决定因素,其中带负电荷的脂质体被网状内皮系统更快地摄取(Juliano,1975,Biochem.Biophys.Res.Commun.63:651)并因此在血流中具有更短的半衰期。并入磷脂酰乙醇胺衍生物通过阻止脂质体聚集增加了循环时间。例如,将N-( $\omega$ -羧基)酰基酰胺基磷脂酰乙醇胺并入到L- $\alpha$ -二硬脂酰基磷脂酰胆碱的大的单层囊泡,急剧提高了体内脂质体循环寿命(参见例如Ahl,1997,Biochim.Biophys.Acta 1329:370-382)。具有延长的循环半衰期的脂质体对于治疗和诊断用途来说通常是合乎需要的。关于药代动力学的一般性讨论,参见例如Remington's,第37-39章, Lee等,在《药代动力学分析实用方法》(Pharmacokinetic Analysis:A Practical Approach) (Technomic Publishing AG,Basel,Switzerland 1996)中。

[0225] 通常,使用约5至15摩尔%的带负电荷的磷脂例如磷脂酰甘油、磷酸酰丝氨酸或磷脂酰肌醇来制备脂质体。添加的带负电荷的磷脂例如磷脂酰甘油也起到阻止脂质体的自发聚集的作用,从而使尺寸较小的脂质体聚集体形成的风险最小化。浓度为至少约50摩尔%的膜硬化剂例如神经鞘磷脂或饱和的中性磷脂和5至15摩尔%的单唾液酸化神经节苷脂,也可以合乎需要地提供脂质体性质例如刚性(参见例如美国专利号4,837,028)。

[0226] 此外,脂质体悬液可以包括脂质保护剂,其在储存时保护脂质以防自由基和脂质过氧化损伤。亲脂性自由基淬灭剂例如 $\alpha$ -生育酚和水溶性铁特异性螯合剂例如 ferrioxianine 是优选的。

[0227] 本发明的改良LAMP构建物可以包括尺寸不均一的多层囊泡。例如,可以将形成囊泡的脂质溶解在适合的有机溶剂或溶剂系统中,并在真空或惰性气体下干燥,以形成脂质薄膜。如果需要,可以将所述薄膜重新溶解在适合的溶剂例如叔丁醇中,然后冷冻干燥以形成采取更容易水合的粉末状形式的更均匀的脂质混合物。将这种薄膜用肽或多肽复合物的水溶液覆盖,并允许在搅拌下通常在15至60分钟的时间段内水合。通过在更剧烈的搅拌条件下水合所述脂质或通过添加增溶性去污剂例如脱氧胆酸盐,可以使得到的多层囊泡的尺寸分布向较小的尺寸转变。水合介质优选地包含浓度为最终脂质体悬液中脂质体的内部体积中所需的浓度的核酸。

[0228] 在脂质体制备后,可以将所述脂质体按尺寸筛分,以获得所需的尺寸范围和相对窄的脂质体尺寸分布。一个优选的尺寸范围是约0.2至0.4微米,其允许所述脂质体悬液通过常规滤器、通常为0.22微米滤器过滤来除菌。如果所述脂质体已按尺寸筛分到约0.2至0.4微米,则过滤除菌可以在高通量的基础上进行。几种技术可用于将脂质体按尺寸筛分到所需尺寸(参见例如美国专利号4,737,323)。

[0229] 适合的脂质包括但不限于DOTMA (Felgner等,1987,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7413-7417)、DOGS或Transfectain<sup>TM</sup> (Behr等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:6982-6986)、DNERIE或DORIE (Felgner等,Methods 5:67-75)、DC-CHOL (Gao和Huang,1991,BBRC 179:280-285)、DOTAP<sup>TM</sup> (McLachlan等,1995,Gene Therapy 2:674-622)、Lipofectamine<sup>RTM</sup>和甘油脂质化合物(参见例如EP901463和W098/37916)。

[0230] 适合于与所述改良LAMP构建物复合的其他分子包括阳离子型分子例如聚酰胺-胺(Haensler和Szoka,1993,Bioconjugate Chem.4:372-379)、树枝状聚赖氨酸(WO 95/24221)、聚乙烯亚胺(polyethylene irinine)或聚丙烯亚胺(polypropylene h-nine)(WO 96/02655)、聚赖氨酸(美国专利号5,595,897;FR 2 719 316)、壳聚糖(美国专利号5,744,166)、DNA-明胶团聚体(参见例如美国专利号6,207,195;美国专利号6,025,337;美国专利号5,972,707)或DEAE葡聚糖(Lopata等,1984,Nucleic Acid Res.12:5707-5717)。

[0231] 基于病毒的基因递送媒介

[0232] 在一种情况下,所述改良LAMP构建物递送媒介包含病毒或病毒粒子。在这种情况下,优选地,所述改良LAMP构建物包含病毒载体。病毒载体例如反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒和疱疹病毒,通常由两种组分构成,修饰的病毒基因组和包围它的外壳结构(参见例如Smith等,1995,Ann.Rev.Microbiol.49:807-838),尽管有时病毒载体以裸露形式引入或用病毒蛋白之外的蛋白包被。大多数当前的载体具有与野生型病毒相似的外壳结构。这种结构包装并保护病毒核酸,并提供结合和进入靶细胞的手段。

[0233] 优选地,包含本文中描述的改良LAMP构建物的病毒载体与野生型病毒基因组相比被修饰,以失去所述病毒在靶细胞中生长的能力,同时使所述病毒能够在用于制备感染性粒子的宿主细胞(例如包装或辅助细胞)中生长。载体核酸通常必需包含用于在辅助细胞系中复制和包装的顺式作用的病毒序列和用于调控被递送到靶细胞的多核苷酸的表达的表达控制序列。其他病毒功能在特定包装或辅助细胞系中反式表达,正如在本领域中已知的。

[0234] 优选的改良LAMP构建物是从选自疱疹病毒、巨细胞病毒、泡沫病毒、慢病毒、Semliki森林病毒、AAV(腺相关病毒)、痘病毒、腺病毒和反转录病毒的病毒衍生的病毒载体。这些病毒载体在本领域中是公知的。

[0235] 在一种优选情况下,使用的病毒载体是腺病毒载体。腺病毒基因组由约36kb的线性双链DNA分子构成,带有超过约30个完成病毒复制周期所必需的基因。早期基因分为4个区(E1至E4),它们对于病毒复制来说是必需的,除了据信调节抗病毒宿主免疫应答的E3区之外。E1区(E1A和E1B)编码负责病毒基因组的转录调控的蛋白质。E2区基因(E2A和E2B)的表达导致病毒复制所需的多肽的合成。由E3区编码的蛋白质阻止由细胞毒性T细胞和肿瘤坏死因子造成的细胞溶解(Wold和Gooding,1991,Virology 184:1-8)。由E4区编码的蛋白质参与DNA复制、晚期基因表达和剪接以及宿主细胞关闭(Halbert等,1985,J.Virol.56:250-257)。晚期基因通常编码对病毒衣壳有贡献的结构蛋白。此外,腺病毒基因组带有顺式作用的5'和3' ITR(末端反向重复序列)和DNA复制所必需的包装序列。所述ITR带有DNA复制起点,而衣壳化区对于腺病毒DNA包装到感染性粒子中而言是必需的。

[0236] 腺病毒载体可以被工程化改造成条件复制型(CRA载体),以便在特定细胞(例如增殖性细胞)中选择性复制,正如在Heise和Kim(2000,J.Clin.Invest.105:847-851)中所描述的。在另一种情况下,腺病毒载体对于E1功能来说是复制缺陷的(例如通过E1的完全或部分缺失或突变)。所述载体的腺病毒骨架可以包含其他修饰(一个或多个病毒基因中的缺失、插入或突变)。E2修饰的一个实例通过位于DBP(DNA结合蛋白)编码基因上的热敏突变来说明(Ensinger等,1972,J.Virol.10:328-339)。所述腺病毒序列也可以缺失全部或一部分E4区(参见例如EP 974 668;Christ等,2000,Human Gene Ther.11:415-427;Lusky等,1999,J.Virol.73:8308-8319)。非必需的E3区内的其他缺失可以允许被递送的多核苷酸的尺寸增加(Yeh等,1997,FASEB Journal 11:615-623)。然而,保留编码允许病毒避开免疫系统(Gooding等,1990,Critical Review of Immunology 10:53-71)或炎症反应(EP 00440267.3)的多肽(例如gp19k)的全部或一部分E3序列,可以是有利的。

[0237] 也可使用保留ITR和包装序列并包含实质性遗传修饰以废除病毒抗原的残留合成的第二代载体,以便提高所表达的基因在被转导细胞中的长期表达(参见例如WO 94/28152;Lusky等,1998,J.Virol 72:2022-2032)。

[0238] 被引入到细胞中的所述改良LAMP构建物可以插入到病毒基因组的除了顺式作用序列之外的任何位置中。优选地,它被插入以代替缺失区(E1、E3和/或E4),优选地在缺失的E1区内。

[0239] 腺病毒可以源自于任何人类或动物来源,特别是犬类(例如CAV-1或CAV-2,Genbank参考号分别为CAVIGENOM和CAV77082)、禽类(Genbank参考号AAVEDSDNA)、牛类(例如BAV3;Reddy等,1998,J.Virol.72:1394-1402)、鼠类(Genbank参考号ADRMUSMAVI)、绵羊、猫科动物、猪或猿猴来源,或者可以是杂交病毒。可以使用任何血清型。然而,C亚类的人类腺病毒是优选的,特别是腺病毒2(Ad2)和5(Ad5)。这些病毒可以例如从ATCC获得。

[0240] 腺病毒粒子或空的腺病毒衣壳也可用于通过病毒介导的辅助内化过程来转移改良LAMP构建物,如在美国专利号5,928,944中所述。这一过程可以在阳离子试剂例如聚碳烯或包含一个或多个脂质层的脂质囊泡存在下实现。

[0241] 腺病毒粒子可以按照本领域中任何常规的技术(例如WO96/17070),使用互补细胞



系或辅助病毒来制备和繁殖,所述互补细胞系或辅助病毒反式供应丢失的对于病毒复制而言必需的病毒基因。细胞系293 (Graham等,1977,J.Gen.Virol.36:59-72) 和PERC6 (Fallaux等,1998,Human Gene Therapy 9:1909-1917) 常用于补足E1缺失。其他细胞系已被工程化改造成补足缺陷的载体 (Yeh等,1996,J.Virol.70:559-565;Kroughak和Graham,1995,Human Gene Ther.6:1575-1586;Wang等,1995,Gene Ther.2:775-783;Lusky等,1998,J.Virol.72:2022-203;EP 919627和WO 97/04119)。腺病毒粒子可以从培养上清液回收,但是也可以在裂解后从细胞回收,并任选地按照标准技术 (例如层析、超离心,如在WO 96/27677、WO 98/00524、WO 98/26048和WO 00/50573中所描述) 进一步纯化。

[0242] 细胞类型特异性靶向可以使用通过修饰病毒表面蛋白从具有广宿主范围的腺病毒衍生的载体来实现。例如,腺病毒感染的特异性由与允许细胞的表面处存在的细胞受体的附连来决定。就此而言,在腺病毒衣壳表面处存在的纤维和五邻体,在细胞附连中发挥关键作用 (Defer等,1990,J.Virol.64:3661-3673)。因此,腺病毒的细胞靶向可以通过编码纤维和/或五邻体的病毒基因的遗传修饰以产生能够与独特的细胞表面受体特异性相互作用的修饰的纤维和/或五邻体来进行。这些修饰的实例描述在Wickarn等,1997,J.Virol.71:8221-8229;Arriberg等,1997,Virol.Chem 268:6866-6869;Roux等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:9079-9083;Miller和Vile,1995,FASEB J.9:190-199;WO 93/09221和WO 95/28494中。

[0243] 在特别优选的情况下,使用腺相关病毒序列作为载体。源自于人类细小病毒AAV-2 (腺相关病毒2型) 的载体是目前正在开发的最有前景的基因递送媒介之一。这种用于包装单链DNA的系统的几个特征表明它是用于递送的裸露DNA的可能的替选物。与其他病毒载体例如痘苗或腺病毒形成对比,主要的吸引人的特征在于AAV载体不表达任何病毒基因。疫苗构建物中包括的唯一病毒DNA序列是145bp的末端反向重复序列 (ITR)。因此,与在使用裸露DNA的免疫接种中相同,表达的唯一基因是抗原或抗原嵌合体的基因。此外,已知AAV载体转导分裂和非分裂细胞两者,例如人类外周血单核细胞衍生的树突状细胞,具有持久的转基因表达,并具有口服和鼻内递送以产生粘膜免疫的可能性。此外,所需的DNA的量似乎大大减少几个数量级,最大应答在 $10^{10}$ 至 $10^{11}$ 个粒子或DNA拷贝的剂量下,形成对比的是裸露DNA的剂量为50ug或约 $10^{15}$ 个拷贝。

[0244] 在一种情况下,通过用编码AAV ITR嵌合蛋白的构建物中包含的DNA和含有AAV编码区 (AAV rep和cap基因) 而没有ITR的AAV辅助质粒ACG2共转染适合的细胞系 (例如人类293细胞) 来包装AAV载体。随后将所述细胞用腺病毒Ad5感染。载体可以使用本领域中已知的方法 (例如氯化铯密度梯度超离心) 从细胞裂解物纯化,并验证以确保它们不含可检测的能够复制的AAV或腺病毒 (例如通过细胞病变效应生物测定法)。可以使用在用蛋白酶K消化后制备的病毒DNA样品,通过定量PCR来确定AAV滴度。优选地,通过这种方法产生的载体滴度为每ml约 $5 \times 10^{12}$ 至 $1 \times 10^{13}$ 个DNase抗性粒子。

[0245] 在其他情况下,使用反转录病毒载体。反转录病毒是一类整合型病毒,其使用病毒编码的反转录酶进行复制,以将病毒的RNA基因组复制成双链DNA,所述双链DNA被整合到感染细胞 (例如靶细胞) 的染色体DNA中。这些载体包括源自于鼠白血病病毒、特别是Moloney (Gilboa等,1988,Adv.Exp.Med.Biol.241:29) 或Friend's FB29株 (WO 95/01447) 的载体。通常,反转录病毒载体缺失病毒基因gag、pol和env的全部或一部分,并保留5'和3'LTR和衣

壳化序列。这些元件可以被修饰以提高反转录病毒载体的表达水平或稳定性。这些修饰包括用反转录转座子之一例如VL30替换反转录病毒的衣壳化序列(参见例如美国专利号5,747,323)。优选地,所述改良LAMP构建物被插入到所述衣壳化序列下游,优选地以相对于反转录病毒基因组相反的方向。细胞特异性靶向可以通过抗体或抗体片段与反转录病毒的包膜蛋白的偶联来实现,正如本领域中已知的。

[0246] 反转录病毒粒子在辅助病毒存在下或在适合的互补(包装)细胞系中制备,所述细胞系含有整合在其基因组中的对于所述反转录病毒载体来说有缺陷的反转录病毒基因(例如gag/pol和env)。这些细胞系描述在现有技术中(Miller和Rosman,1989,BioTechniques 7:980;Danos和Mulligan,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:6460;Markowitz等,1988,Virol.167:400)。所述env基因的产物负责病毒粒子与靶细胞表面上存在的病毒受体的结合,并因此决定所述反转录病毒粒子的宿主范围。在本发明的情形中,使用含有兼嗜性包膜蛋白的包装细胞系例如PA317细胞(ATCC CRL 9078)或293EI6(W097/35996)以允许感染人类和其他物种的靶细胞,是有利的。所述反转录病毒粒子优选地从培养上清液回收,并且可以任选地按照标准技术(例如层析、超离心)进一步纯化。

[0247] 其他适合的病毒包括痘病毒。痘病毒科的几个成员的基因组已被作图并测序。痘病毒载体可以从痘病毒科的任何成员(特别是金丝雀痘、鸡痘和痘苗病毒)获得。适合的痘苗病毒包括但不限于Copenhagen株(Goebel等,1990,Virol.179:247-266;Johnson等,1993,Virol.196:381-401)、Wyeth株和修饰的Ankara(MVA)株(Antoine等,1998,Virol.244:365-396)。用于构建痘苗病毒载体的一般性条件在本领域中是已知的(参见例如EP 83 286和EP 206 920;Mayr等,1975,Infection3:6-14;Sutter和Moss,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10847-10851)。优选地,将感兴趣的多核苷酸插入到非必需基因座中,例如非编码基因间区或其失活或缺失不显著损害病毒生长和复制的任何基因。

[0248] 痘病毒粒子如本领域中所述来制备(Piccini等,1987,Methods of Enzymology 153:545-563;美国专利号4,769,330;美国专利号4,772,848;美国专利号4,603,112;美国专利号5,100,587和美国专利号5,179,993)。通常,构建供体质粒,通过在大肠埃希氏杆菌(E.coli)中生长进行扩增,并通过常规程序进行分离。然后,将它与痘病毒基因组一起引入到适合的细胞培养物(例如鸡胚成纤维细胞)中,以通过同源重组产生痘病毒粒子。它们可以从培养上清液或在裂解步骤(例如化学裂解、冷冻/融化、渗透压冲击、超声处理等)后从培养的细胞回收。可以使用连续的多轮噬斑纯化来去除污染性的野生型病毒。然后可以使用本领域中已知的技术(例如层析方法或在氯化铯或蔗糖梯度上超离心)来纯化病毒粒子。

[0249] 在全球根除天花的战役中痘苗作为活病毒疫苗的使用,使得痘苗成为开发作为活重组疫苗载体的明显选择。已经报道了表达接近100种不同外来蛋白质的活重组痘苗病毒,它们中的许多是有效的实验性疫苗(由Moss和Flexner,1987综述)。由于它的基因组尺寸大,能够接受至少25,000个碱基对的外来DNA,以及它感染大多数真核细胞类型(包括昆虫细胞)的能力(出处同上),痘苗作为表达载体是特别通用的。不同于其他DNA病毒,痘病毒专门在感染的细胞的细胞质内复制,降低了重组病毒DNA与宿主染色体进行遗传交换的可能性。已显示重组痘苗载体正确加工和表达来自于各种不同来源(包括人、其他哺乳动物、寄生虫、RNA和DNA病毒、细菌和噬菌体)的蛋白质。

[0250] 编码外来蛋白质的DNA的表达受到宿主病毒调控元件,包括上游启动子序列和必

要时RNA加工信号的控制。已通过同源重组进行了外来DNA在痘苗病毒基因组的非必需区中的插入(Panicali等,Proc.Nat'l.Acad.Sci,USA,79:4927,1982;Mackett等,Proc.Nat'l.Acad.Sci,USA,79:7415,1982)。

[0251] 由于在插入位点处或其附近的转录调控元件,或通过更精确的遗传工程,可以发生所述改良LAMP构建物的癌抗原表达。已构建了极大地促进了外来基因的插入和表达的质粒载体(Mackett等,J.Virol,49:857,1982)。这些载体含有表达位点,其由痘苗转录启动子和用于插入侧接有来自于痘苗基因组的非必需区的DNA的外来编码序列的一个或多个独特的限制性内切核酸酶位点构成。启动子的选择决定了表达的时间(例如早期或晚期)和水平,而侧接的DNA序列决定了同源重组的位点。

[0252] 通过这种程序产生的病毒粒子仅仅约千分之一是重组的。尽管重组病毒噬斑可以通过DNA杂交来鉴定,但已开发了高效的选择程序。通过使用非必需的痘苗病毒胸苷激酶(TK)基因的区段作为侧接序列,外来基因重组到TK基因座中并通过插入而使所述TK基因失活。TK病毒的选择通过在5-溴脱氧尿苷存在下在TK细胞中进行病毒噬斑测定法来实现。所述核苷类似物的磷酸化和随后致死性掺入到病毒DNA中,只发生在被TK+亲代病毒感染的细胞中。取决于转染和重组的效率,高达80%的噬斑是所需重组体,其余的是自发TK突变体。

[0253] 含有大肠埃希氏杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶基因以及用于第二个基因的表达位点的质粒载体,允许将重组体与亲代病毒区分开的可替代方法(Chakrabarti等,Mol.Cell.Biol.,5:3403,1985)。由这些重组体形成的噬斑可以通过在添加适合的指示剂后形成的蓝色来正向鉴定。通过将TK选择和 $\beta$ -半乳糖苷酶表达两者组合,重组病毒被容易且快速地分离。然后通过适合的细胞系中繁殖来扩增所述重组体,并通过适合的酶学、免疫学或物理程序检查插入基因的表达。

[0254] 可以添加到痘苗病毒基因组的遗传信息的量的上限尚不知道。然而,接近25,000个碱基对的外来DNA的添加对病毒产量没有明显的有害效应(Smith等,Gene,25:21,1983)。在必要时,可以缺失痘苗病毒基因组的大的区段以提供额外的容量(Moss等,J.Virol.40:387,1981)。

[0255] 病毒的衣壳分子可以包括靶向组成部分以促进靶向和/或进入到细胞中。适合的靶向分子包括但不限于:化学缀合物,脂质,糖脂,激素,糖,聚合物(例如PEG、聚赖氨酸、PEI等),肽,多肽(参见例如WO 94/40958),维生素,抗原,凝集素,抗体及其片段。优选地,这些靶向分子识别并结合到细胞特异性标记物、组织特异性标记物、细胞受体、病毒抗原、抗原性表位或肿瘤相关标记物。

[0256] 包含基于病毒粒子的改良LAMP构建物的组合物可以配制成 $10$ 至 $10^{14}$ i.u.(感染单位)之间、优选地 $10$ 至 $10^{11}$ i.u.之间的药剂的形式。所述滴度可以通过常规技术确定。LAMP构建物的剂量优选地在 $0.01$ 至 $10\text{mg/kg}$ 之间,更特别地在 $0.1$ 至 $2\text{mg/kg}$ 之间。

[0257] 自我复制RNA

[0258] 自我复制RNA病毒载体也可使用本文中所描述的改良LAMP构建物来构建。例如,甲病毒、黄病毒、麻疹病毒和弹状病毒可用于产生自我复制RNA病毒疫苗。优选的自我复制RNA病毒株包括但不限于狂犬病病毒(RABV)、水泡性口炎病毒(VSV)、西尼罗病毒、昆津病毒、塞姆利基森林病毒(SFV)、辛德毕斯病毒(SIN)和/或委内瑞拉马脑炎病毒(VEE)。

[0259] 自我复制RNA病毒在递送到组织中之后表达本源抗原,因此模拟活的减毒疫苗而

没有回归致病性的风险。它们也刺激先天性免疫系统,因此增强应答。参见例如Ljungberg, K.,“自我复制的甲病毒RNA疫苗”(Self-replicating alphavirus RNA vaccines),*Expert Rev Vaccines* (2):177-94 (2015);Lundstrom, K.,“癌症免疫疗法中的溶瘤甲病毒”(Oncolytic Alphaviruses in Cancer Immunotherapy),*Vaccines* 5:9 (2017);Lundstrom, K.,“作为疫苗的复制子RNA病毒载体”(Replicon RNA Viral Vectors as Vaccines),*Vaccines* 4:39 (2016) (整体通过引用并入本文)。包含本文中描述的改良LAMP构建物的自我复制疫苗的使用,也可用于初免-加强方案中。

[0260] 此外,自我复制RNA病毒也可以如本文中所述用脂质体包封,以改进递送和靶向。使用包含本文中描述的改良LAMP构建物的自我复制RNA病毒的免疫接种可以提供抗原的更高的瞬时表达水平,导致产生中和抗体应答和在安全条件下针对致命激惹的保护作用。

#### [0261] 基于细胞的递送媒介

[0262] 本发明的改良LAMP构建物可以利用包含所述构建物的其它细胞(“递送细胞”)递送到靶细胞。将构建物引入到细胞中的方法在本领域中是已知的,并包括将DNA微注射到细胞的核中(Capechi等,1980,*Cell* 22:479-488),用CaPO<sub>4</sub>转染(Chen和Okayama,1987,*Mol.Cell Biol.* 7:2745-2752),电穿孔(Chu等,1987,*Nucleic Acid Res.* 15:1311-1326),脂转染/脂质体融合(Feigner等,1987,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:7413-7417)和粒子轰击(Yang等,1990,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:9568-9572)。适合的细胞包括自体和非自体细胞,并且可以包括异种细胞。递送细胞可以被诱导成通过诱导它们的死亡(例如通过向这些细胞提供可诱导的自杀基因)来将它们的内含物递送到靶细胞。

#### [0263] 辅助分子

[0264] 本发明的包含改良LAMP构建物的组合物可以包含用于促进将改良LAMP构建物引入到细胞中和/或用于增强特定治疗效果和/或增加抗体生产的一种或多种辅助分子。

[0265] 此外,本发明的包含改良LAMP构建物的组合物可以包括一种或多种稳定化物质例如脂质、核酸酶抑制剂、水凝胶、透明质酸酶(W098/53853)、胶原酶、聚合物、螯合剂(EP 890362),以便抑制在动物/人体内的降解和/或改善所述载体在靶细胞中的转染/感染。这些物质可以单独或组合(例如阳离子型和中性脂质)使用。

[0266] 也已显示,腺病毒蛋白能够使胞内体失稳并增强DNA被摄入到细胞内。腺病毒与含有脂质复合的DNA载体的溶液的混合物或将DNA结合到使用蛋白质交联剂共价附连到腺病毒的聚赖氨酸,可以显著提高改良LAMP构建物的摄入和表达(参见例如Curiel等,1992,*Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.* 6:247-252)。

#### [0267] 宿主细胞

[0268] 本发明的改良LAMP构建物可以在各种不同的宿主细胞中表达,包括但不限于:原核细胞(例如大肠埃希氏杆菌、葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)),酵母细胞(例如酿酒酵母(*Saccharomyces* sp.)),昆虫细胞,线虫细胞,植物细胞,两栖类细胞(例如爪蟾),禽类细胞,和哺乳动物细胞(例如人类细胞、小鼠细胞、哺乳动物细胞系、原代培养的哺乳动物细胞例如来自于解剖组织的)。

[0269] 所述分子可以在从生物体分离的宿主细胞、作为生物体的一部分的宿主细胞或被引入到生物体中的宿主细胞中表达。在一种情况下,改良LAMP构建物在体外例如在培养物中在宿主细胞中表达。在另一种情况下,改良LAMP构建物在转基因生物体(例如转基因小

鼠、大鼠、兔、猪、灵长动物等)中表达,所述生物体包括含有编码所述改良LAMP构建物的核酸的体细胞和/或生殖系细胞。用于构建转基因动物的方法在本领域中是已知的并且是常规的。

[0270] 改良LAMP构建物也可以在体外被引入到细胞中,并且可以将所述细胞(例如干细胞、造血细胞、淋巴细胞等)引入到宿主生物体中。所述细胞对于宿主生物体来说可以是异源或自体的。例如,可以从所述宿主生物体获得细胞,将改良LAMP构建物在体外引入到所述细胞中,然后将所述细胞重新引入到宿主生物体中。

#### [0271] 抗原呈递细胞

[0272] 在本发明的优选情况下,将本文所述的改良LAMP构建物引入到天然或工程化的抗原呈递细胞中。

[0273] 当在本文中使用时,术语“抗原呈递细胞”(APC)意指在其表面上呈递与主要组织相容性复合物分子、优选为II类分子或其部分结合的抗原的任何细胞。适合的APC的实例在下文中详细讨论,并且包括但不限于完整细胞例如巨噬细胞、树突状细胞、B细胞、杂交APC和培养的抗原呈递细胞。制造杂交APC的方法在本领域中已被描述并且已知。

[0274] 树突状细胞(DC)是强效抗原呈递细胞。已显示DC提供T细胞活化和增殖所需的所有信号。这些信号可以被分为两种类型。为免疫应答提供特异性的第一种类型通过T-细胞受体/CD3(“TCR/CD3”)复合物与APC表面上由I或II类主要组织相容性复合物(上文定义的“MHC”)蛋白呈递的抗原性肽之间的相互作用介导。这种相互作用对于发生T细胞活化来说是必要的但不是充分的。事实上,在没有第二种类型的信号时,所述第一种类型的信号可以导致T细胞无反应性。被称为辅助刺激信号的第二种类型的信号既不是抗原特异性的也不是MHC限制的,并且在第一种类型的信号存在下可以引起T细胞的完全增殖应答和T细胞效应功能的诱导。

[0275] 几种分子已显示出增强辅助刺激活性。它们包括但不限于热稳定抗原(HSA)、硫酸软骨素修饰的MHC恒定链(Ii-CS)、细胞内粘附分子I(ICAM-1)和APC表面上的B7辅助刺激分子及其在T细胞上的对应受体CD 28或CTLA-4。

[0276] 其他重要的辅助刺激分子是CD40、CD54、CD80、CD86。当在本文中使用时,术语“辅助刺激分子”涵盖了当与T细胞表面上的TCR所结合的肽/MHC复合物一起作用时,提供了实现结合所述肽的T细胞的活化的辅助刺激效果的任何单一分子或分子的组合。因此,所述术语涵盖了APC上的B7或其他辅助刺激分子及其片段(单独地,与另外的分子复合地或作为融合蛋白的一部分),它们与肽/MHC复合物一起结合到同族配体,并在T细胞表面上的TCR特异性结合所述肽时引起所述T细胞的活化。辅助刺激分子可以从各种不同的来源(包括例如Beckman Coulter)商购。

[0277] 在本发明的一种情况下,使用在Romani等,J.Immunol.Methods196:135-151,1996和Bender等,J.Immunol.Methods 196:121-135,1996中描述的方法,从哺乳动物例如鼠、猿猴或人类的外周血单核细胞(PBMC)产生不成熟和成熟的树突状细胞两者。简单来说,利用免疫磁性技术将分离的PBMC预处理以清除T-和B-细胞。然后将清除淋巴细胞的PBMC在增补有人类血浆(优选为自体血浆)和GM-CSF/IL-4的RPMI培养基9中培养例如约7天,以产生树突状细胞。与它们的单核细胞祖先相比,树突状细胞是非贴壁的。因此,在大约第7天,将非贴壁细胞收获以进一步处理。

[0278] 在GM-CSF和IL-4存在下从PBMC衍生的所述树突状细胞是不成熟的,因为如果从培养物中去除细胞因子刺激物,它们可以失去非贴壁性质并逆转回到巨噬细胞的细胞命运。所述处于不成熟状态下的树突状细胞,在加工本源蛋白质抗原用于II类MHC限制的途径中非常有效(Romani等,J.Exp.Med.169:1169,1989)。培养的树突状细胞的进一步成熟通过在含有必需的成熟因子的巨噬细胞调制的培养基(CM)中培养3天来完成。成熟的树突状细胞不太能够捕获新的蛋白质用于呈递,但是在刺激静息T细胞(CD4和CD8两者)以生长和分化方面好得多。

[0279] 成熟的树突状细胞可以通过它们的形态变化来鉴定,例如通过更加能动的细胞质过程的形成,通过它们的非贴壁性,通过存在下述标记物中的至少一者:CD83,CD68,HLA-DR或CD86,或通过Fc受体例如CD 115的丧失来鉴定(综述在Steinman,Annu.Rev.Immunol.9:271,1991中)。成熟的树突状细胞可以被收集,并使用典型的细胞荧光显影术和细胞分选技术和装置例如FACScan和FACStar来分析。用于流式细胞术的第一抗体是特异性针对成熟树突状细胞的细胞表面抗原的第一抗体,并且是可商购的。第二抗体可以是生物素化的Ig,随后是FITC-或PE-偶联的链亲和素。

[0280] 可替代地,其他人报道了用于上调(活化)树突状细胞和将单核细胞转化成活化的树突状细胞表型的方法。这种方法包括向培养基添加钙离子载体,以将单核细胞转变成活化的树突状细胞。例如在24-48小时的培养周期的开始时添加钙21离子载体A23187,引起合并的“单核细胞加上DC”级分的均匀的活化和树突状细胞表型转化:特征性地,所述活化的群体均匀地变成CD 14 (Leu M3) 阴性,并且上调HLA-DR、HLA-DQ、ICAM-1,137.1和137.2。此外,这种活化的大量群体在进一步纯化时在少量的基础上也发挥作用。已将特定的细胞因子组合成功地用于扩增(或部分取代)使用钙离子载体实现的活化/转化:这些细胞因子包括但不限于G-CSF、GM-CSF、IL-2和IL-4。每种细胞因子在单独提供时不足以用于最佳的上调。

[0281] 用于分离APC的第二种方法是收集相对大量的已经在血液中循环的前定向APC。以前用于从人类外周血分离定向APC的技术包括物理程序的组合,例如甲泛葡胺梯度和粘附/非粘附步骤(Freudenthal等,PNAS 87:7698-7702,1990),Percoll梯度分离(Mehta-Damani等,J.Immunol.153:996-1003,1994),和荧光活化细胞分选技术(Thomas等,J.Immunol.151:6840-52,1993)。

[0282] 存在许多在本领域中常规用于分离专业抗原呈递细胞(或它们的前体)的其它方法,并且这些方法和可能开发的其他方法是非限制性的,并涵盖在本发明的范围之内。

[0283] 在一个实施方式中,所述APC和因此呈递一种或多种抗原的细胞是自体的。在另一个实施方式中,所述呈递抗原的APC是同种异体的,即源自于不同对象。

[0284] 正如本文讨论的,可以使用上述方法或本领域中已知的其他方法将改良LAMP构建物引入到APC中,所述方法包括但不限于转染、电穿孔、融合、微注射、基于病毒的递送或基于细胞的递送.Arthur等,Cancer Gene Therapy 4(1):17-25,1997报道了在人类树突状细胞中基因转移方法的比较。

[0285] 已知的、部分的和推测的人类白细胞抗原(HLA)、人类MHC的基因指定、氨基酸和核苷酸序列(包括共有序列),已被发表(参见例如Zemmour和Parham,Immunogenetics 33:310-320,1991),并且表达HLA变体的细胞系是已知的并且通常也可以获得,许多来自于美

国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection) (“ATCC”)。因此,使用PCR,可以容易地将编码II类MHC的核苷酸序列操作性连接到本发明的表达载体,然后将其用于转化适合的细胞,以在其中表达。

[0286] 可以使用专业APC,例如巨噬细胞、B细胞、单核细胞、树突状细胞和朗格汉斯细胞。使用标准程序从下述供体的血液或组织收集这些细胞:1) 自体供体;2) 具有与待治疗的宿主不同的HLA特异性的异源供体;或3) 不同物种的异种供体(Coligan等,《免疫学现代方法》(Current Protocols in Immunology),第3和14节,1994)。所述细胞可以从正常宿主或具有感染性疾病、癌症、自体免疫疾病或过敏症的患者分离。

[0287] 可以使用白细胞去除术和“FICOLL/HYPAQUE”密度梯度离心(通过Ficoll和不连续Percoll密度梯度逐步离心),从外周血获得专业APC。使用的程序避免了将所述APC暴露于可以被所述APC内化的抗原,引起不特异性针对感兴趣的抗原的T细胞的活化。

[0288] 不天然呈递抗原的细胞可以通过引入编码适合分子的序列,被工程化改造成抗原呈递细胞。例如,编码II类MHC分子、辅助分子、辅助刺激分子和抗原加工辅助分子的核酸序列,可以在直接合成、克隆、从含有这些基因的细胞纯化DNA等之后被引入。获得在本文描述的改良LAMP构建物和方法中使用的分子的编码基因的一种方便的手段,是使用选定的寡核苷酸引物对,在选定的核酸模板上进行聚合酶链反应(PCR)扩增。例如,可以使用上皮细胞、内皮细胞、肿瘤细胞、成纤维细胞、活化的T细胞、嗜曙红细胞、角化细胞、星形细胞、小胶质细胞、胸腺皮质上皮细胞、施旺细胞、视网膜色素上皮细胞、成肌细胞、血管平滑肌细胞、软骨细胞、肠上皮细胞、甲状腺细胞和肾小管细胞。它们可以是最近从宿主外植并且没有在细胞培养物中广泛传代以形成确立细胞系的原代细胞,或者相对均质并且能够增殖许多代或无限增殖的确立细胞系。

[0289] 不是专业APC的细胞从它们所位于的自体供体、异源供体或异种供体的任何组织,使用各种不同的已知分离方法来分离(Darling,《动物细胞:培养和培养基》(Animal Cells:Culture and Media),J.Wiley,New York,1994;Freshney,《动物细胞的培养》(Culture of Animal Cells),Alan R.Liss,Inc.,New York,1987)。非自体细胞例如异源或异种细胞,可以被离体工程化改造以表达匹配已知人类HLA特异性的I类和II类HLA分子。然后将这些细胞引入到匹配所述工程化细胞的HLA特异性的人类对象中。将所述细胞进一步离体工程化改造以表达本发明的一种或多种LAMP构建物。

[0290] 将所述工程化改造的细胞通过标准的细胞培养方法维持在细胞培养物中(Darling,《动物细胞:培养和培养基》(Animal Cells:Culture and Media),J.Wiley,New York,1994;Freshney,《动物细胞的培养》(Culture of Animal Cells),Alan R.Liss,Inc.,New York,1987)。在本发明中使用的细胞系从各种不同的来源获得(例如《ATCC细胞系和杂交瘤目录》(ATCC Catalogue of Cell Lines&Hybridomas),American Type Culture Collection,第8版,1995),或者使用标准方法生产(Freshney,《永生化细胞的培养》(Culture of Immortalized Cells),Wiley-Liss,New York,1996)。对于在人类对象中使用来说,非转化的细胞系是优选的。

[0291] 在一种情况下,在GM-CSF的影响下分化成树突状细胞的CD34+前体从对象的身体获得,并将编码本发明的LAMP构建物的核酸引入到所述细胞中,然后将所述细胞注射到所述对象中。利用本文中所描述的改良LAMP构建物,将增强源自于特定抗原的肽与转导的抗



原呈递细胞上的II类MHC分子的结合,产生显著更加强力的全身性T细胞依赖性免疫应答和/或抗体生产。尽管在这种策略中转染的抗原呈递细胞优选为自体细胞,但如上所述,可以使用在所述宿主中有效呈递抗原的任何II类MHC细胞。

#### [0292] 肽疫苗

[0293] 在本发明的范围之内还包括由所述改良LAMP构建物编码的肽疫苗。优选地,所述抗原在所述区室/细胞器(或它被递送到的后续区室/细胞器)内被加工,以产生能够调节免疫应答的结合到II类MHC分子的表位。

[0294] 由所述改良LAMP构建物编码的肽疫苗也可以被结合在膜结构中,以便于将它施用于生物体的身体。例如,由所述改良LAMP构建物编码的肽疫苗可以被并入到脂质体中,如美国专利号4,448,765中所述。

[0295] 当蛋白质或多肽要被用作免疫原时,它可以通过在重组细胞中表达本文中描述的任一个或多个改良LAMP构建物来生产,或者它可以通过化学合成来制备。例如,可以使用Merrifield技术(Journal of American Chemical Society, vol.85, pp.2149-2154, 1968)。

#### [0296] 使用LAMP构建物生产抗体的方法

[0297] 作为多核苷酸的所述改良LAMP构建物、所述改良LAMP构建物的编码蛋白质和/或细胞(例如表达本文中描述的改良LAMP构建物的抗原呈递细胞)可用于通过专业技术人员公知的方法例如本领域中描述的方法来产生抗体。参见例如Sutcliffe等,同上;Wilson等,同上;Chow等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:910-914(1985);和Bittle等,J.Gen.Virol.66:2347-2354(1985)。如果使用体内免疫接种,则可以用由所述改良LAMP构建物编码的蛋白质和/或包含本文中所描述的含有抗原的改良LAMP构建物的多核苷酸对动物进行免疫接种。使用作为多核苷酸的改良LAMP构建物、所述改良LAMP构建物的编码蛋白质和/或细胞(例如表达本文中描述的改良LAMP构建物的抗原呈递细胞)进行初免,然后用抗原进行加强,是本发明的优选实施方式。在其他优选实施方式中,具体设想了用本文中所描述的改良LAMP构建物进行初免,然后用抗原进行加强,并且这种方式可用于产生甚至更稳健的免疫应答,特别是从抗体谱多样性和滴度的观点来看。

[0298] 可以将包含所述抗原的改良LAMP构建物注射到所述非人类脊椎动物中以产生抗体。LAMP构建物的制备及其在非人类脊椎动物中的注射,可以按照本领域技术人员公知的动物免疫接种的原则来完成。

[0299] 使用改良LAMP构建物有效地呈递所述抗原,在一种情况下涉及所述抗原在胞吞后被抗原呈递细胞中的LAMP加工以及所述胞内体与溶酶体的融合。然后所述胞内体与来自于高尔基体的含有II类MHC分子的胞吐小泡融合,得到的肽结合到所述II类MHC分子。所述MHC-肽复合物然后转运到细胞质膜,在那里所述抗原可用于展示到CD4<sup>+</sup>T细胞。

[0300] 动物例如兔、大鼠、小鼠、美洲驼、骆驼和/或奶牛,可以用所述包含抗原的改良LAMP构建物和/或编码所述包含抗原的改良LAMP构建物的多核苷酸免疫接种。适合于免疫接种的其他动物包括非人类哺乳动物,例如啮齿动物(例如豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠)、鼠科动物(例如小鼠)、犬科动物(例如狗)、猫科动物(例如猫)、马科动物(例如马)、灵长动物、猿猴(例如猴或猿)、猴(例如狨猴、狒狒、恒河猴)或猿(例如大猩猩、黑猩猩、猩猩、长臂猿)。

[0301] 例如,可以使用含有约100微克包含抗原或载体蛋白的改良LAMP构建物和弗氏佐



剂或已知用于刺激免疫应答的任何其他佐剂的乳液的腹膜内和/或真皮内注射。可能需要例如以约2周的间隔进行几次加强注射(例如使用重组抗原蛋白),以提供可以例如使用直接或间接地(例如通过生物素化的AviTag)吸附到固相表面的游离抗原通过ELISA测定法检测的抗抗原抗体的有用滴度。来自于被免疫接种的动物的血清中抗抗原抗体的滴度可以通过抗抗体的选择来提高,例如按照本领域中公知的方法通过吸附到固相支持物上的抗原并洗脱所选择的抗体。

[0302] 或者,也可以将编码所述包含抗原的改良LAMP构建物的多核苷酸直接引入到动物中。参见例如美国专利号5,676,954、6,875,748、5,661,133;Sahin等,Nat Rev Drug Discov,2014Oct;13(10):759-80;Kariko等,Mol Ther,2008Nov;16(11):1833-40;Kariko等,Nucleic Acid Res,2011,Nov;39(21):e142;美国专利号6,511,832。在一个实例中,将包含抗原的改良LAMP构建物直接注射到非人类脊椎动物中。在所述动物中的注射可以通过肌肉内、真皮内、鼻内、皮下、静脉内、气管内和鞘内递送来进行。使用重组抗原的后续加强,也可以被包括在所述抗体的产生中。

[0303] 此外,通过本公开的方法产生的抗体可以使用展示技术例如噬菌体展示、酵母展示或核糖体展示进行亲和力成熟。在一个实例中,筛选展示在噬菌体粒子表面上的单链抗体分子(“scFv”),以鉴定免疫特异性地结合到所述抗原和/或初始蛋白质的scFv。本发明涵盖了scFv及其被鉴定为免疫特异性地结合到所述抗原和/或初始蛋白质的部分两者。这些scFv可以通过将例如编码所述scFv的VH和/或VL结构域的核苷酸序列插入到含有恒定结构域序列的表达载体中,被常规地“转变”成免疫球蛋白分子,所述表达载体被工程化改造成指导所述免疫球蛋白分子的表达。

[0304] 使用本发明的包含抗原的改良LAMP构建物和编码所述包含抗原的改良LAMP构建物的多核苷酸产生的抗体(包括scFv、以及包含抗体片段或其变体或由抗体片段或其变体构成的其他分子(例如本发明的抗体的重链或轻链或其一部分或本发明的单链抗体))的重组表达,需要构建含有编码所述抗体或其片段或变体的多核苷酸的表达载体。一旦获得本发明的编码抗体分子(例如完全抗体、抗体的重链或轻链或其变体或一部分(优选但不必定含有所述重链或轻链可变结构域))的多核苷酸之后,用于生产所述抗体分子的载体可以使用本领域中公知的技术,通过重组DNA技术来生产。因此,在本文中描述了通过表达含有编码抗体的核苷酸序列的多核苷酸来制备抗体的方法。可以使用本领域技术人员公知的方法来构建含有抗体编码序列和适合的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组,并且在本文中描述。因此,本发明提供了可复制的载体,其包含可操作地连接到启动子的编码如本文中所述获得并分离的抗抗原抗体(例如完全抗体、抗体的重链或轻链、抗体的重链或轻链可变结构域或其一部分或重链或轻链CDR、单链Fv或其片段或变体)的核苷酸序列。这些载体可以包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见例如PCT公布W0 86/05807、PCT公布W089/01036和美国专利号5,122,464),并且可以将所述抗体的可变结构域克隆到这种载体中,用于表达完整重链、完整轻链或完整重链和轻链两者。

[0305] 可以通过常规技术将所述表达载体转移到宿主细胞,然后将所述转染的细胞通过常规技术进行培养,以生产任一种所述抗抗原抗体。因此,本发明包括宿主细胞,其含有可操作地连接到异源启动子的编码所述抗抗原抗体(例如完全抗体、其重链或轻链或其部分,

或本发明的单链抗体或其片段或变体)的多核苷酸。在优选实施方式中,为了表达完整抗体分子,可以将编码重链和轻链两者的载体在所述宿主细胞中共表达,用于表达所述完整免疫球蛋白分子,正如下文详细描述。

[0306] 可以利用各种不同的宿主-表达载体系统来表达抗抗原抗体。这些宿主-表达系统代表了可以用于生产并随后纯化感兴趣的编码序列的媒介,但是也代表了当用适合的核苷酸编码序列转化或转染时可以表达所述抗抗原抗体的细胞。它们包括但不限于用含有序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的微生物例如细菌(例如大肠埃希氏杆菌、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*));用含有编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如酿酒酵母、毕赤酵母);用含有编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用含有编码序列的重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒CaMV、烟草花叶病毒TMV)感染或用含有编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统;或带有重组表达构建物的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、3T3细胞),所述构建物含有源自于哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自于哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒晚期启动子、痘苗病毒7.5K启动子)。优选地,将细菌细胞例如大肠埃希氏杆菌、更优选地真核细胞用于所述抗抗原抗体的表达。例如,与载体例如来自于人类巨细胞病毒的主要立即早期基因启动子元件联合的哺乳动物细胞例如中华仓鼠卵巢细胞(CHO),是一种有效的表达系统(Foecking等, *Gene* 45:101 (1986); Cockett等, *Bio/Technology* 8:2 (1990))。

[0307] 在细菌系统中,大量表达载体可以有利地根据预定用途来选择。例如,当将要生产大量蛋白(用于抗体生产或所述改良LAMP构建物的编码多肽)时,指导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体可能是合乎需要的。这样的载体包括但不限于大肠埃希氏杆菌表达载体pUR278(Ruther等, *EMBO* 1.2:1791 (1983)),其中所述编码序列可以被单个地连接到所述载体中,与lac Z编码区同框,以便产生融合蛋白;pIN载体(Inouye&Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985); Van Heeke&Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989))等。pGEX载体也可用于将外来多肽表达为与谷胱甘肽S-转移酶(GST)的融合蛋白。通常,这些融合蛋白是可溶的,并且可以通过吸附并结合到基质谷胱甘肽琼脂糖珠,然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱,从裂解的细胞容易地纯化。所述pGEX载体被设计成包括凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,以便可以将所述克隆的靶基因产物从GST组成部分释放。

[0308] 在昆虫系统中,可以使用苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒(AcNPV)作为载体来表达抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码蛋白。所述病毒在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。编码序列可以被单个地克隆在所述病毒的非必需区(例如多角体蛋白基因)中并置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制之下。

[0309] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用大量基于病毒的表达系统来表达抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码蛋白。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,可以将感兴趣的编码序列连接到腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动子和三联前导序列。然后将这个嵌合基因通过体外或体内重组插入到腺病毒基因组中。

[0310] 在病毒基因组的非必需区(例如E1或E3区)中的插入将产生在被感染的宿主中存活并且能够表达所述抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码多肽的重组病毒(例如参见

Logan&Shenk,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:355-359(1984))。

[0311] 插入的编码序列的高效翻译也可能需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,所述起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同相,以确保整个插入序列的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是各种不同起源的,包括天然和合成的两者。表达的效率可以通过包含适合的转录增强子元件、转录终止子等来提高(参见例如Bittner等,Methods in Enzymol.153:51-544(1987))。

[0312] 此外,可以选择以所需的特定方式调节所述插入序列的表达或修饰和加工所述基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这些修饰(例如糖基化)和加工(例如切割)对所述蛋白质的功能来说可能是重要的。不同宿主细胞具有特征性和特异性的机制用于蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰。可以选择适合的细胞系或宿主系统以确保表达的外来蛋白质的正确修饰和加工,为此,可以使用具有用于原始转录本的正确加工、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。这些哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERY、BHK、Hela、COS、NSO、MDCK、293、3T3、W138,以及特别是乳腺癌细胞系例如BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D和正常乳腺细胞系例如CRL7030和HsS78Bst。

[0313] 对于重组蛋白的长期、高得率生产来说,稳定的表达是优选的。例如,可以工程化改造稳定地表达抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码多肽的细胞系。代替使用含有病毒复制起点的表达载体,可以将宿主细胞用受到适合的表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷化位点等)控制的多核苷酸和选择标记物进行转化。在引入所述外来多核苷酸之后,可以允许工程化细胞在富集培养基中生长1-2天,然后切换到选择培养基。所述重组质粒中的选择标记物提供对所述选择的抗性,并允许细胞将所述质粒稳定地整合到它们的染色体中并生长以形成灶点,所述灶点进而可以被克隆并扩增成细胞系。这种方法可以被有利地用于工程化改造表达所述抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码多肽的细胞系。

[0314] 可以使用大量选择体系,包括但不限于可以分别用于tk-、hgprt-或aprt-细胞的单纯性疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等,Cell 11:223(1977))、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska&Szybalski,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:202(1992))和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy等,Cell 22:817(1980))基因。此外,可以使用抗代谢物抗性作为下述基因的选择基础:dhfr,其提供对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等,Natl.Acad.Sci.USA 77:357(1980); O'Hare等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527(1981));gpt,其提供对霉酚酸的抗性(Mulligan&Berg,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072(1981));neo,其提供对氨基糖苷G-418的抗性(Goldspiel等,Clinical Pharmacy,12:488-505(1993);Wu和Wu,Biotherapy 3:87-95(1991);Tolstoshev,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596(1993);Mulligan,Science 260:926-932(1993);以及Morgan和Anderson,Ann.Rev.Biochem.62:191-217(1993);TIB TECH 11(5):155-215(May;1993));和hygro,其提供对潮霉素的抗性(Santerre等,Gene 30:147(1984))。重组DNA技术领域中公知的方法可以被常规应用于选择所需的重组克隆,并且这些方法被描述在例如Ausubel等(主编),《现代分子生物学方法》(Current Protocols in Molecular Biology),John Wiley&Sons,NY(1993);Kriegler,《基因转移和表达实验指南》(Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual),Stockton Press,NY(1990);以及Dracopoli等(主编),《人类遗传学现代方法》(Current

Protocols in Human Genetics), John Wiley&Sons, NY (1994) 的第12和13章; Colberre-Garapin等, J.Mol.Biol.150:1 (1981) 中。

[0315] 抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码多肽的表达水平可以通过载体扩增来提高(对于综述, 参见Bebbington和Hentschel, 在DNA克隆中基于基因扩增的载体用于在哺乳动物细胞中克隆基因的表达的用途(The Use Of Vectors Based On Gene Amplification For The Expression Of Cloned Genes In Mammalian Cells In DNA Cloning), Vol.3. (Academic Press, New York, 1987))。当表达抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码多肽的载体系统中的标记物可扩增时, 宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的提高将增加所述标记物的拷贝数。由于所述被扩增区与所述编码序列相连, 因此所述抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码多肽的生产也提高(Crouse等, Mol.Cell.Biol.3: 257 (1983))。

[0316] 可以包括在载体序列中的其他元件包括异源信号肽(分泌信号)、膜锚定序列、内含子、可选剪接位点、翻译起始和终止信号、蛋白质内含子、生物素化位点和促进翻译后修饰的其他位点、纯化标签、编码与其他蛋白质或肽的融合蛋白的序列、被内部核糖体进入位点隔开的分隔编码区、编码例如提供可选择性(例如抗生素抗性)或可分拣性(例如荧光)的“标记物”蛋白的序列、修饰的核苷酸和其他已知的多核苷酸顺式作用零件, 但不限于这些实例。

[0317] 所述宿主细胞可以用本发明的两种表达载体共转染, 例如, 编码重链来源的多肽的第一载体和编码轻链来源的多肽的第二载体。所述两个载体可能含有一致的选择标记物, 能够使重链和轻链多肽相等地表达。或者, 可以使用编码并且能够表达重链和轻链多肽两者的单一载体。在这种情况下, 所述轻链优选被放置在重链之前, 以避免有毒的游离重链的过量(Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:2 197 (1980))。所述重链和轻链的编码序列可以包含cDNA或基因组DNA或合成的DNA序列。

[0318] 一旦已通过重组表达生产了抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码多肽后, 它可以通过本领域中已知的用于蛋白质纯化的任何方法进行纯化, 例如通过层析(例如离子交换、亲和(特别是通过蛋白A亲和以及用于特定抗原的免疫亲和)和尺寸分离柱层析)、离心、差异溶解度或通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。此外, 可以将抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码多肽融合到本文中描述的或本领域中原本已知的异源多肽序列, 以便于纯化。

[0319] 在一个实例中, 所述抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码多肽可以与免疫球蛋白(IgA、IgE、IgG、IgM)的恒定结构域或其部分(CH1、CH2、CH3或其任何组合及其部分)或白蛋白(包括但不限于重组人类白蛋白或其片段或变体(参见例如1999年3月2日授权的美国专利号5,876,969、欧洲专利0 413 622和1998年6月16日授权的美国专利号5,766,883)融合, 产生嵌合多肽。这些融合蛋白可以便于纯化, 并且可以增加体内半衰期。这一点已被由人类CD4-多肽的前两个结构域和哺乳动物免疫球蛋白的重链或轻链的恒定区的各种不同结构域构成的嵌合蛋白显示。参见例如EP 394,827; Traunecker等, Nature, 331:84-86 (1988)。抗原跨过上皮屏障向免疫系统的递送的增加, 已用偶联到FcRn结合配偶体例如IgG或Fe片段的抗原(例如胰岛素)得以证实(参见例如PCT公布WO 96/22024和WO 99/04813)。也已发现, 由于IgG部分的二硫键而具有二硫键连接的二聚体结构的IgG融合蛋白, 与单独

的单体多肽或其片段相比在结合和中和其他分子中更加高效。参见例如Fountoulakis等, J.Biochem., 270:3958-3964 (1995)。编码本文中描述的抗抗原抗体或所述改良LAMP构建物的编码多肽的核酸也可以与作为表位标签(例如血凝素(“HA”)标签或flag标签)的感兴趣的基因重组,以帮助所表达的多肽的检测和纯化。例如,由Janknecht等人描述的系统允许容易地纯化在人类细胞系中表达的非变性融合蛋白(Janknecht等, 1991, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8972-897)。在这个系统中,将感兴趣的基因亚克隆在痘苗病毒重组质粒中,使得所述基因的开放阅读框在翻译上被融合到由6个组氨酸残基构成的氨基端标签。所述标签充当所述融合蛋白的基质结合结构域。将来自于用所述重组痘苗病毒感染的细胞的提取物装载到Ni<sup>2+</sup>次氨基乙酸-琼脂糖柱上,并且带有组氨酸标签的蛋白可以用含有咪唑的缓冲液选择性洗脱。

#### [0320] 施用

[0321] 本发明的疫苗材料可以含有本文中描述的免疫刺激性改良LAMP构建物,或者可以是表达所述免疫刺激性改良LAMP构建物的重组微生物或抗原呈递细胞。本发明的含有改良LAMP构建物的疫苗材料的制备和这些改良LAMP构建物用于个体免疫接种的施用,按照本领域技术人员公知的免疫接种原则来完成。

[0322] 大量的这些材料可以通过培养含有表达本文中描述的改良LAMP构建物的复制子的重组体或转化的细胞来获得。培养方法对于本领域技术人员来说是公知的,并且在上文引用的一个或多个文献中教导。所述改良LAMP构建物疫苗通常通过重组体或转化的细胞的培养来生产,并配制在通常是生理相容的水性溶液的可药用溶液或悬液中,或配制在包衣片剂、片剂、胶囊、栓剂或安瓿瓶中,如本领域中所述,例如通过引用并入本文的美国专利号4,446,128中所述。施用可以是任何适合的途径,包括口服、直肠、鼻内或通过注射施用,其中注射可以是例如透皮、皮下、肌肉内或静脉内注射。

[0323] 所述改良LAMP构建物以足以在哺乳动物中诱导免疫应答的量施用于所述哺乳动物。施用的最低优选量是引发抗体形成到至少4倍于施用前存在的浓度所需的量。典型的初始施用剂量,在静脉内、肌肉内或皮下施用时为10-5000微克或者10<sup>5</sup>至10<sup>11</sup>噬斑形成单位的重组载体,尽管这个量可以由进行所述施用的临床医生调整,正如在疫苗或诱导免疫应答的其他药剂的施用中通常发生的。单次施用通常可以足以诱导免疫,但可以进行多次施用以确保或加强所述应答。

[0324] 所述改良LAMP构建物疫苗一开始可以在非人类哺乳动物(例如小鼠或灵长动物)中试验。例如可以使用接种小鼠的免疫应答的测定来证实与野生型抗原相比更多的抗体、T细胞增殖和对所述改良LAMP构建物的细胞毒性T细胞应答。可以在恒河猴中评估改良LAMP构建物,以确定在小鼠中高度有效的疫苗制剂是否也引发适合的猴免疫应答。在一种情况下,每只猴每次免疫接种接受总共5mg DNA, IM递送并分为2个位点,其中免疫接种在第0天和第4、8和20周进行,任选额外的药剂。可以测量抗体应答、ADCC、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T-细胞的细胞因子产生、CD4<sup>+</sup>和CD 8<sup>+</sup>T-细胞的抗原特异性细胞因子染色,以监测对所述疫苗的免疫应答。

[0325] 本发明的制剂和施用的适合方法的进一步描述,可以在美国专利号4,454,116(构建物)、美国专利号4,681,762(重组细菌)以及美国专利号4,592,002和4,920,209(重组病毒)中找到。

[0326] 癌症免疫疗法：预防和治疗的候选者

[0327] 本文中描述的包含表1中所述的至少一种癌抗原的改良LAMP构建物可用于治疗患有癌症和/或过度增殖性障碍的患者。实例包括具有明确的Epstein-Barr病毒相关淋巴瘤的患者、具有HPV相关宫颈癌的患者、具有慢性HCV的患者或具有癌基因或肿瘤抑制基因的确定重排或突变的患者。进一步优选的实施方式包括患有由CMV感染引起的过度增殖性障碍(包括癌症)的患者。

[0328] 在优选实施方式中,可以使用本文描述的改良LAMP构建物治疗的癌症包括但不限于下述癌症的所有发展阶段,包括增生:腺癌,肉瘤,皮肤癌,黑素瘤,膀胱癌,脑癌(包括多形性胶质母细胞瘤),乳腺癌,子宫癌,卵巢癌,前列腺癌,肺癌(包括但不限于NSCLC、SCLC、鳞状细胞癌),结肠直肠癌,肛门癌,直肠癌,宫颈癌,肝癌,头颈癌,口腔癌,唾液腺癌,食管癌,胰腺癌,胰腺导管腺癌(PDA),肾细胞癌,胃癌,肾癌,多发性骨髓瘤或脑癌。

[0329] 设想了一旦个体的癌症被鉴定后,可以在所述癌症进程期间的任何时期使用改良LAMP构建物的疗法,例如在包含所述改良LAMP构建物的疫苗组合物的情形下。在高风险患者中也可以进行疫苗接种,以便预防随后癌症的出现。还设想了基于蛋白质的LAMP构建物疫苗以及细胞疗法(例如,包含LAMP构建物的树突状细胞疗法)。

[0330] 用于疗法的程序

[0331] 在一个实施方式中,可以在患者恶性肿瘤的过程中的任何适合的时间点将所述改良LAMP构建物注入到所述患者中。例如,包含表1中所述的至少一种癌抗原的改良LAMP构建物可以在肿瘤负荷低的阶段时注射。在将所述改良LAMP构建物引入到个体的抗原呈递细胞(例如树突状细胞)中的可选实施方式中,从所述个体的骨髓或通过静脉穿刺从外周血抽取所述抗原呈递细胞的前体或成熟的抗原呈递细胞。将这些细胞建立培养物,然后用所述改良LAMP构建物转导。一旦转导发生后,将这些抗原呈递细胞注回所述患者中。

[0332] 在特别优选实施方式中,本发明提供了一种用于具有低肿瘤负荷的癌症患者的治疗方法,例如在疾病的早期、在赘生性肿瘤切除后或在以其他方式降低肿瘤细胞负荷时。在这种方法中,从所述患者获得含有能够分化成表达II类MHC分子的抗原呈递细胞的自体干细胞的细胞群体。将这些细胞培养并通过引入改良LAMP构建物进行转化,以将所述待与II类MHC分子缔合的癌抗原递送到所述区室/细胞器内或所述抗原被递送到的另一个区室/细胞器内。

[0333] 然后将所述转染的干细胞群体重新引入到所述患者中,在那里所述干细胞分化成抗原呈递细胞,其表达与来自于所述抗原的 $T_H$ 表位复合的II类MHC分子。通过增强所述辅助性T细胞群体的刺激,针对所述抗原的免疫应答将被增强。

[0334] 更通常地,在一个实施方式中,本发明提供了一种包含所述改良LAMP构建物的疫苗组合物,用于在哺乳动物中调节针对抗原的免疫应答(即刺激、增强或降低这种应答)。

[0335] 试剂盒

[0336] 本发明还包括便于执行本文中描述的方法的试剂盒。在一种情况下,试剂盒包含本文中所述的改良LAMP构建物和用于接受所述改良LAMP构建物的细胞。所述试剂盒可以另外包含用于将所述细胞工程化改造成专业APC的一种或多种核酸。然而,在一种情况下,所述细胞是专业APC。所述细胞可以表达或不表达辅助刺激分子。在优选情况下,当所述细胞不表达辅助刺激分子时,由所述改良LAMP构建物编码的抗原是自体抗原。在另一种情

况下,提供了表达不同MHC分子(例如已知在人类中表达的MHC分子)的一组细胞。在另一种情况下,所述试剂盒包含促进所述改良LAMP构建物进入到细胞中的试剂(例如基于脂质的制剂、病毒包装材料、细胞等)。在另一种情况下,提供了对所述改良LAMP构建物所编码的抗原特异的一种或多种T细胞系,以验证所述改良LAMP构建物引发、调节或增强免疫应答的能力。

#### [0337] 实施例

[0338] 现在将参考下面的实施例进一步说明本发明。应该认识到,下述内容仅仅是示例性的,并且可以对细节作出修改并仍落于本发明的范围之内。

#### [0339] 实施例1-LAMP构建物的构建

[0340] 图1中示出的改良LAMP构建物可以使用专业技术人员公知的标准分子生物学技术来构建。例如,可以设计包含所述多核苷酸的质粒,以产生图1中示出的不同结构ILC-1至ILC-6。图1中示出的LAMP结构域可以源自于图3-10中示出的氨基酸序列。优选地,所述LAMP结构域源自于图3-10中示出的人类LAMP蛋白。每个结构域的边界可以从图2A和图2B中得出。设想了所述相应结构域也可以通过在与人类序列相比时鉴定对等的结构域,从直系同源序列克隆。可以如表1中所述将癌抗原单个地或组合地克隆到所描述的LAMP构建物中。

#### [0341] 实施例2-小鼠对LAMP构建物的免疫应答的评估

[0342] 可以测试如实施例1中所描述的改良LAMP构建物调节免疫应答的能力。例如,雌性BALB/c小鼠可以在第0、14和28天,使用nanopass针头用100 $\mu$ l PBS中的50 $\mu$ g所述改良LAMP构建物和5 $\mu$ g GM-CSF进行i.d免疫接种。随后,实验将在最后一次给药后4周结束。

[0343] 用抗原性蛋白(10 $\mu$ g/ml)在T细胞培养基(含有10%热失活FBS、1%青霉素/链霉素和1X 2-ME的RPMI)中刺激脾细胞( $3 \times 10^5$ /孔),72h后收集上清液。将上清液稀释(400 $\mu$ l上清液+200 $\mu$ l T细胞培养基),并通过ELISA评估细胞因子。IL-10或IL-4的生产可以通过ELISPOT测定法来测量。

#### [0344] 实施例3-使用LAMP构建物改进抗原呈递

[0345] 存活蛋白是凋亡抑制剂(IAP)蛋白家族的最小成员,参与凋亡的抑制和细胞周期的调控。这些功能属性使得存活蛋白成为表现出相异的功能即调控细胞增殖和细胞死亡的独特蛋白。肿瘤中存活蛋白的表达不仅与凋亡的抑制和细胞死亡率降低相关,而且与对化疗的抗性和肿瘤的侵袭性相关[1-6]。因此,存活蛋白是癌症疫苗和治疗剂的重要靶点[7-9]。也已发现,存活蛋白显著表达在人类胚胎干细胞和许多身体干细胞类型两者上,表明它在干细胞产生和维持中具有尚未探测过的作用。

[0346] 癌症是一组混杂的疾病,其中具有侵入其他身体部位的潜力的异常细胞生长控制着正常的内稳态,并且如果不及时且正确治疗,将变得致命。免疫疗法特异性靶向肿瘤细胞,从而避免了对非肿瘤细胞的附带损伤并诱导抗肿瘤应答。这种抗肿瘤应答也具有根除身体中远处的也许不可能通过手术切除的肿瘤的潜力。抗肿瘤免疫应答的诱导或增强在癌症中是艰巨的挑战,因为肿瘤细胞使用多种逃避策略并避免被免疫细胞检测或消除。

[0347] 本项目的目的是评估通过I.D.注射到BALB/c小鼠中的全新一代LAMP构建物的体内免疫应答。具体来说,通过真皮内注射将小鼠用50 $\mu$ g在图1的图例中定义的试验构建物进行免疫接种。在这个试验中未添加佐剂。在一个月內,每组6只小鼠每7天用疫苗施用,总共三剂。在最后一次免疫接种后14天监测免疫应答。



[0348] 所述试验LAMP构建物如本文中所述来产生,并且每个试验构建物的序列示出在图19中。存活蛋白购自MyBiosource (San Diego, CA)。存活蛋白的肽来自于GenScript (Piscataway, NJ)。抗存活蛋白抗体和m-IgGk-BP-HRP购自Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX),并且小鼠抗LAMP-1/CD107a单克隆抗体来自于OriGene Technologies (Rockville, MD)。用于IFN  $\gamma$  的ELISPOT抗体对来自于Biolegend。荧光偶联的CD3、CD4、CD8、CD44、CD62L、IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、颗粒酶B、CD69单克隆抗体和Zombie aqua可固定存活率试剂盒购自BioLegend (San Diego, CA)。山羊抗小鼠IgG2a-HRP和山羊抗小鼠IgG-HRP购自Southern Biotechnologies (Birmingham, AL)。链亲和素-HRP购自Thermo Fisher (Waltham, MA)。SureBlue TMB微孔过氧化物酶底物和TMB终止溶液购自KPL (Gaithersburg, MD)。

[0349] 对于Pharmajet来说,每只小鼠每剂使用100 $\mu$ l总体积中的50 $\mu$ g每种构建物。在第0、7和14天,通过i.d.递送将小鼠用疫苗免疫接种。在第28天将小鼠取血,用于血清收集。收集血清并储存在-30 $^{\circ}$ C。在第28天实验结束时收集脾脏并处理,用于ELISPOT和FACS,以评估存活蛋白特异性T细胞应答。

[0350] 通过ELISA测量血浆存活蛋白特异性总IgG。针对存活蛋白的鼠类抗体应答通过间接ELISA来评估。将ELISA板 (MaxiSorp) 用碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的2 $\mu$ g/ml存活蛋白 (1-142) 包被过夜,然后用PBS中的2%BSA阻断。将血浆样品在阻断缓冲液中1:100稀释。用山羊抗小鼠IgG-HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL) 检测样品。反应用SureBlue TMB底物进行显色并用来自于KPL (Gaithersburg, MD) 的TMB终止溶液终止。使用Epoch ELISA读板器 (BioTek, Winooski, VT) 读板 (OD450)。

[0351] 抗原特异性T细胞应答的评估。为了在疫苗接种过的小鼠中评估抗原特异性T细胞应答,通过酶联免疫斑点 (ELISPOT) 来评估来自于疫苗接种过的小鼠的脾细胞的抗原特异性IFN  $\gamma$  生产。对于ELISPOT测定来说,将96孔硝酸纤维素板 (Millipore) 用100 $\mu$ l/孔的在PBS中的捕获单克隆抗体在4 $^{\circ}$ C包被过夜。将板用200 $\mu$ l/孔的PBS洗涤三次,并用200 $\mu$ l/孔的T细胞培养基在室温阻断至少2hr。将脾细胞以3 $\times 10^5$ 个细胞/孔铺板,并与2 $\mu$ g/ml的存活蛋白的合并肽(表2)或刀豆蛋白A (0.125 $\mu$ g/ml) 或单独的培养基,在总体积为200 $\mu$ l/孔的T细胞培养基(含有L-谷氨酰胺和HEPES (ATCC)、1%青霉素、1%链霉素和5 $\times 10^{-5}$ M $\beta$ -ME的RPMI-1640)中,以3 $\times 10^5$ 个细胞/孔的密度在37 $^{\circ}$ C下和5%CO $_2$ 中共培养48h。将板用200 $\mu$ l/孔的PBS洗涤两次,并用200 $\mu$ l/孔的PBS-T (0.05%Tween/PBS) 洗涤两次。添加稀释的检测抗体 (50 $\mu$ l/孔,在PBS-T/0.5%BSA中),并将板在室温下振摇温育2hr。将板用PBS洗涤四次。添加在PBS中稀释的链亲和素-碱性磷酸酶 (50 $\mu$ l/孔) 并温育2h。将板用PBS洗涤四次,并用50 $\mu$ l/孔的3-氨基-9-乙基咔唑 (AEC, BD Bioscience) 底物显色10min。通过在流动自来水下洗涤来终止显色。在室温下在暗处干燥72h后,使用AID ELISPOT高分辨率读板器系统和AID ELISPOT软件3.5版 (Autoimmun Diagnostika GmbH) 对着色的斑点进行计数。

[0352] 表2. 来自于Genscript的合并的肽



[0353]	合并的 P1	Sur1-15, Sur11-25, Sur 21-35, Sur31-45, sur 41-55
	合并的 P2	Sur51-65, sur61-75, sur71-85, sur81-95
	合并的 P3	Sur91-105, sur 101-115, sur111-125, sur121-135, sur131-142
	合并的 P4	Sur31-45, sur41-55 和 sur51-65

[0354] Western印迹。使用lipofectamine 2000试剂(Invitrogen)将293T细胞用所述试验构建物转染。将转染的细胞用PBS洗涤并悬浮在200μl含有停止蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液(Thermo Scientific,Waltham,MA)中。将裂解物离心(4℃下700g 15分钟),然后使用Pierce BCA蛋白质测定试剂盒(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)测量澄清的上清液中的蛋白质浓度。将10μg蛋白质在预制(4-20%)SDS-PAGE凝胶(BioRad,Hercules,California)中电泳,转移到硝酸纤维素膜(BioRad)上,并用针对hLAMP的mAb进行免疫印迹。将膜用Detection™阻断缓冲液(KPL)阻断,用兔抗人LAMP抗体(Sino Biological Inc., Beijing,China)或抗存活蛋白抗体和山羊抗兔HRP抗体探测,然后用TMB(KPL)显色。

[0355] 流式细胞术。将细胞首先用PBS中的Zombie aqua可固定存活性染料(1:500稀释)标记,然后用染色缓冲液(含有4%FBS、2%兔血清、2%小鼠血清的PBS)中的表面抗体(1:100稀释)标记。对于细胞内染色来说,将细胞用Zombie aqua染色,然后进行表面染色,用4%聚甲醛固定,并用通透化缓冲液(含有1%FCS和0.1%皂苷的PBS)中的细胞内抗体染色。样品在CytoFlex流式细胞仪(Beckman Coulter)上进行分析,并使用Kaluza软件(Beckman Coulter)进行分析。

[0356] 统计学。使用GraphPad Prism 6.0软件或R文件来进行双向ANOVA检验,以评估统计学显著性。从抗原活化的结果推导出每只小鼠的RPMI结果。

[0357] 疫苗和免疫接种。对照、存活蛋白+完全LAMP、存活蛋白-ILC-1构建物、存活蛋白-ILC-2、存活蛋白-ILC-3和存活蛋白-ILC-4构建物疫苗以每只小鼠每次给药25μl的总体积使用。在第0天、第7天和第14天,通过ID递送用疫苗对小鼠进行免疫接种。在第-13天和第28天对小鼠取血以收集血清。收集血清并将其储存在-30℃。在第28天收集脾脏并处理以用于ELISPOT/ELISA测定。

[0358] 图14:质粒的验证:将293T细胞用所述质粒转染3天。将转染的细胞裂解,然后在预制SDS-PAGE凝胶中电泳。将蛋白质转移到硝酸纤维素膜并用针对人类LAMP(OriGene,#TA337108)或存活蛋白(Santa Cruz#17779)的mAb进行免疫印迹。LAMP的分子量=100KD,存活蛋白的分子量=16KD。图13显示所有试验的LAMP构建物产生尺寸适合的蛋白质。

[0359] 图15和16:试验的LAMP构建物诱导产生IFN $\gamma$ 的Th1效应T细胞。在第0、7和14天,将雌性BALB/c小鼠通过Pharmajet装置用100μl PBS中的50μg指定构建物i.d免疫接种。实验在最后一次给药后14天结束。用存活蛋白的合并肽(4μg/ml)在T细胞培养基(含有10%热失活FBS、1%青霉素/链霉素和1X $\beta$ -ME的RPMI)中刺激脾细胞( $3 \times 10^5$ /孔)48h。A.通过斑点测量的IFN $\gamma$ 生产。B.由所有合并肽诱导的IFN $\gamma$ 生产(来自于A的条形图)。n=每组6只。将双向ANOVA(R文件)用于统计分析。图14显示所有试验的LAMP构建物诱导稳健的T细胞应答,正如由IFN $\gamma$ 生产所示。

[0360] 我们出人意料地发现,在所述改良LAMP构建物的3次给药(相隔一周)之后,稳健的Th1型应答被试验的LAMP构建物引发,特别是其中铰链序列被存活蛋白基因代替的ILC-4。更有趣的是,改良LAMP构建物ILC-4显得识别从N-端到C-端的存活蛋白表位,并诱导针对与小鼠具有100%同一性的人类存活蛋白肽序列的T细胞应答。我们也发现,将冻融的脾细胞用存活蛋白肽刺激更长时间(72hr),ILC-4与第一代LAMP-存活蛋白相比显示出显著更高的IFN $\gamma$ 生产(参见图19)。具体来说,图16显示试验的所有改良LAMP构建物都显示出较高T细胞应答,其中ILC-4具有最好的活性,因为这种构建物针对所有存活蛋白肽合并物引发显著更高的T细胞应答。此外,与本领域中已知的相反,去除腔内结构域的第二同源结构域产生的改良LAMP构建物与完全LAMP构建物相比引发更稳健的免疫应答(参见ILC-2和ILC-3的结果)。用合并肽4(4 $\mu$ g/ml)在T细胞培养基(含有10%热失活FBS、1%青霉素/链霉素和1 $\times$  $\beta$ -ME的RPMI)中刺激冷冻的脾细胞(4 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔)48h。 $n$ =每组6只。将双向ANOVA用于统计分析。 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ , $***p<0.005$ , $****p<0.0001$ 。

[0361] 图17.CD4 T细胞是IFN $\gamma$ 生产细胞的主要来源。在第0、7和14天,将雌性BALB/c小鼠通过Pharmajet装置用100 $\mu$ l PBS中的50 $\mu$ g指定构建物进行i.d免疫接种。实验在最后一次给药后14天结束。用合并肽1(4 $\mu$ g/ml)在T细胞培养基(含有10%热失活FBS、1%青霉素/链霉素和1 $\times$  $\beta$ -ME的RPMI)中刺激脾细胞(1 $\times$ 10<sup>6</sup>/孔)过夜,然后添加莫能霉素和布雷菲德菌素A并继续培养5h。收获细胞并按照ITI染色方案用Zombie、表面标记物和细胞内染色进行染色。将细胞对记忆性CD4 T细胞(CD4+CD44+CD62L-)或CD8 T细胞(CD8+CD44+CD62L-)进行门选。数据代表了每个组中的一只小鼠。尽管在用各种不同构建物疫苗接种的小鼠中存在CD8效应记忆细胞的增加,但在CD4 T细胞群体中IFN $\gamma$ 生产更加显著。

[0362] 图18:在BALB/c小鼠中改良LAMP构建物产生更强的存活蛋白特异性总IgG应答。在第0、7和14天,将雌性BALB/c小鼠通过Pharmajet装置用100 $\mu$ l PBS中的50 $\mu$ g指定疫苗进行i.d免疫接种。实验在最后一次给药后14天结束。在第28天对小鼠取血。分离血清并储存在-30 $^{\circ}$ C下。通过ELISA确定血清中的总IgG和IgG2a。简单来说,将ELISA板用2 $\mu$ g/ml存活蛋白(1-142aa)包被,用PBS/2%BSA阻断,血清(在阻断缓冲液中1:100稀释)通过HRP偶联的山羊抗小鼠IgG(1:6000)和IgG2a(1:11000)抗体进行评估。 $n$ =每组6只小鼠。 $**p<0.01$ , $***p<0.005$ , $****p<0.0001$ 。重要的并且与本领域中已知的相反的是,图18显示腔内结构域的片段比使用完整腔内结构域效果更好(即将完全LAMP构建物与构建物ILC-2和IL-3相比)。出人意料地,在腔内结构域的两个同源结构域之间插入抗原产生了最强的抗体应答(参见ILC-4)。

[0363] 本节中所引用的参考文献

[0364] 1.Kami K,Doi R,Koizumi M,Toyoda E,Mori T,Ito D等,在胰腺癌患者中存活蛋白表达是一种预后标记物(Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients),Surgery.2004;136(2):443-8.doi:10.1016/j.surg.2004.05.023.PubMed PMID:15300213。

[0365] 2.Zhang SQ,Qiang SY,Yang WB,Jiang JT,Ji ZZ,在乳腺癌的癌发生和发展的不同阶段中存活蛋白的表达(Expression of survivin in different stages of carcinogenesis and progression of breast cancer),Ai Zheng.2004;23(6):697-700.PubMed PMID:15191674。

- [0366] 3.Zhang X,Zhong L,Hu K,Li Q,非小细胞肺癌中存活蛋白的表达及其与凋亡的相关性(Expression of survivin and its correlation with apoptosis in non-small cell lung cancer),Zhongguo Fei Ai Za Zhi.2004;7(2):138-41.doi:10.3779/j.jissn.1009-3419.2004.02.14.PubMed PMID:21215009。
- [0367] 4.Kishi H,Igawa M,Kikuno N,Yoshino T,Urakami S,Shiina H,前列腺癌中存活蛋白基因的表达式:与临床病理学特征、增殖活性和凋亡的相关性(Expression of the survivin gene in prostate cancer:correlation with clinicopathological characteristics,proliferative activity and apoptosis),J Urol.2004;171(5):1855-60.doi:10.1097/01.ju.0000120317.88372.03.PubMed PMID:15076293。
- [0368] 5.Asanuma K,Tsuji N,Endoh T,Yagihashi A,Watanabe N,在结肠癌细胞中存活蛋白通过特异性蛋白1介导的基因转录的上调增强Fas配体表达(Survivin enhances Fas ligand expression via up-regulation of specificity protein 1-mediated gene transcription in colon cancer cells),J Immunol.2004;172(6):3922-9.PubMed PMID:15004200。
- [0369] 6.Miyachi K,Sasaki K,Onodera S,Taguchi T,Nagamachi M,Kaneko H等,胃癌中存活蛋白mRNA表达与淋巴结转移之间的相关性(Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer),Gastric Cancer 2003;6(4):217-24.doi:10.1007/s10120-003-0255-2.PubMed PMID:14716515。
- [0370] 7.Badana AK,Chintala M,Gavara MM,Naik S,Kumari S,Kappala VR等,在三阴性乳腺癌中脂筏破坏通过减弱LRP6和存活蛋白的表达来诱导凋亡(Lipid rafts disruption induces apoptosis by attenuating expression of LRP6 and survivin in triple negative breast cancer),Biomed Pharmacother.2017;97:359-68.doi:10.1016/j.biopha.2017.10.045.PubMed PMID:29091885。
- [0371] 8.Cai JP,Wang YD,Zhang X,Xue HZ,肝癌中P16和存活蛋白的表达以及它们的临床重要性(Expression of P16 and survivin in liver cancer and their clinical significance),Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.2017;25(10):778-80..doi:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.10.013.PubMed PMID:29108210。
- [0372] 9.Cho HJ,Kim HR,Park YS,Kim YH,Kim DK,Park SI,在用基于铂的疗法治的III期非小细胞肺癌患者中存活蛋白表达的预后价值(Prognostic value of survivin expression in stage III non-small cell lungcancer patients treated with platinum-based therapy),Surg Oncol.2015;24(4):329-34.doi:10.1016/j.suronc.2015.09.001.PubMed PMID:26690822。
- [0373] 10.Godinho RM,Matassoli FL,Lucas CG,Rigato PO,Goncalves JL,Sato MN等,由溶酶体相关膜蛋白(LAMP-1)的腔内结构域进行的HIV-Gag表达的调控和向内溶酶体/分泌途径的靶向增强Gag特异性免疫应答(Regulation of HIV-Gag expression and targeting to the endolysosomal/secretory pathway by the luminal domain of lysosomal-associated membrane protein(LAMP-1)enhance Gag-specific immune response),PLoS One.2014;9(6):e99887.doi:10.1371/journal.pone.0099887.PubMed PMID:24932692;PubMed Central PMCID:PMC4059647。

[0374] 实施例4:LAMP构建物的治疗性治疗

[0375] 雌性BALB/c小鼠可以在第0天用7000个同基因4T1乳腺癌细胞s.c接种。在肿瘤可触知后,使用nanopass针头i.d给予100u1 PBS中的50ug疫苗和5ug GMCSF。使用卡尺测量原发肿瘤,并使用公式 $p/6 \times (\text{长度} \times \text{宽度})^{3/2}$ 来计算肿瘤体积。可以测量平均肿瘤体积随肿瘤接种后的天数的变化。可以使用Kaplan-Meier图来显示结束点时的总存活率。

[0376] 实施例5-初免/加强方案

[0377] 疱疹病毒进入介导体(HVEM),也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员14(TNFRSF14)或CD270,是一种TNF受体超家族的人类细胞表面受体。近年中,已发现HVEM在造血细胞和各种不同的实质细胞例如乳腺癌、黑素瘤、结肠直肠癌和卵巢癌细胞以及肠上皮上高表达。HVEM是一种双向作用蛋白,通过结合到BTLA或LIGHT(TNFSF14)抑制或刺激T细胞。

[0378] 我们产生了编码HVEM-LAMP的DNA疫苗,以产生用于肿瘤治疗性应用的能够阻断HVEM的抑制性功能的抗体。我们假设LAMP将通过提高HVEM特异性抗体的亲和性和/或扩展HVEM蛋白中的B细胞表位谱来促进抗体应答。在本研究中,我们比较了含有和不含LAMP的HVEM编码质粒(SEQ ID NO:158和SEQ ID NO:159)的免疫原性。如本文所述设计编码HVEM-LAMP和HVEM以及重组HVEM蛋白的质粒。

[0379] 山羊抗小鼠IgG-HRP购自Southern Biotechnologies(Birmingham,AL)。SureBlue TMB微孔过氧化物酶底物和TMB终止溶液购自KPL(Gaithersburg,MD)。ELISPOT板从EMD Millipore(Billerica,MA,Cat.No.MAIPS4510)订购。在ELISPOT中使用的IFN- $\gamma$ 抗体对购自BioLegend(San Diego,CA),并将克隆AN18和R46A2分别用作包被和检测抗体。链亲和素-HRP和AEC底物购自BD Biosciences(San Jose,CA)。

[0380] 6至8周龄雌性Balb/c小鼠购自Harlan Laboratories(Frederick,MA),并维持在Immunomic Therapeutics,Inc.(Rockville,MA)的动物房中。在第0、7和14天,通过电穿孔IM递送将小鼠(n=6)用10 $\mu$ g/剂的HVEM-LAMP、HVEM或LAMP载体对照进行处理。在第35天,将小鼠在铝佐剂存在下用5 $\mu$ g HVEM蛋白通过i.p.注射进行加强。在第28和49天,将小鼠取血并分离血清用于抗体检测。在第56天将小鼠处死,并通过ELISPOT试验脾细胞的IFN- $\gamma$ 生产。

[0381] ELISA程序遵照Su等,J of Immunol Res;(10):1-15(2016)。将板用5 $\mu$ g/ml HVEM蛋白包被。数据使用Microsoft Excel和Prism 6软件进行分析。

[0382] 本研究的主要目的是在HVEM-LAMP和HVEM之间比较抗体特性。在第28天,HVEM-LAMP疫苗接种的小鼠与HVEM组相比产生显著更高水平的HVEM特异性IgG抗体(图11)。在蛋白质加强后,在HVEM免疫接种的小鼠中HVEM特异性抗体增加约1000倍,平均滴度从100变成108000。这个结果表明免疫记忆被HVEM DNA质粒诱导。尽管单独的HVEM DNA仅诱导极低的抗体应答,但蛋白质加强快速唤醒免疫记忆。另一方面,HVEM-LAMP组再一次表现出比HVEM和LAMP组显著更高的滴度,平均滴度为HVEM组的5倍,指示了LAMP在增强抗体应答中的作用(图12)。

[0383] 此外,将来自于HVEM+LAMP或单独的HVEM免疫接种/HVEM蛋白加强的小鼠的血清样品(第49天)合并并进行肽作图试验。发现12种肽结合到所述合并的血清(小鼠IgG反应),并且所述12种肽中的7种显示出强的结合亲和性。如图13中所示,与单独的HVEM相比HVEM+

LAMP改变了肽17、24、25和28的结合亲和性。这些变化在保护肿瘤生长中可能具有生理效应。

[0384] 总而言之,来自于本研究的数据表明两种构建物在体内表达,并且LAMP显著提高体液免疫应答。

[0385] 实施例6:从多肽生产抗体

[0386] 抗抗原抗体可以使用动物注射,通过各种不同的产生抗体的标准方法来制备(参见《现代方法》(Current Protocols),第2章)。例如,将表达本文中描述的包含癌抗原的改良LAMP构建物的细胞施用于非人类脊椎动物,以诱导含有单克隆抗体的血清的生产。在优选方法中,制备并纯化所述LAMP/抗原蛋白的制备物,以使它基本上不含天然污染物。然后将这种制备物引入到非人类脊椎动物中,以产生具有更高特异性活性的多克隆抗血清。

[0387] 在最优选的方法中,本发明的抗抗原抗体是单克隆抗体(或其蛋白结合片段)。这种单克隆抗体可以使用杂交瘤技术来制备(Kohler等,Nature 256:495(1975);Kohler等,Eur.J.Immunol.6:511(1976);Kohler等,Eur.J.Immunol.6:292(1976);Hammerling等,《单克隆抗体和T-细胞杂交瘤》(Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas),Elsevier,N.Y.,pp.563-681(1981))。一般来说,这些程序包括用包含抗原的改良LAMP构建物、包含抗原的改良LAMP构建物的编码蛋白或更优选地用表达改良LAMP构建物的细胞对非人类脊椎动物(优选为兔、小鼠、奶牛、骆驼、美洲驼)进行免疫接种。这些细胞可以在任何适合的组织培养基中培养;然而,优选地在增补有10%胎牛血清(在约56℃下失活)并增补有约10g/l的非必需氨基酸、约1,000U/ml的青霉素和约100ug/ml的链霉素的Earle's改良的Eagle's培养基中培养细胞。

[0388] 提取这些非人类脊椎动物宿主(例如小鼠)的脾细胞,并将其与适合的骨髓瘤细胞系融合。根据本发明,可以使用任何适合的骨髓瘤细胞系;然而,优选地使用可以从ATCC™获得的亲本骨髓瘤细胞系(SP20)。在融合后,将得到的杂交瘤细胞选择性维持在HAT培养基中,然后如Wands等人所述(Gastroenterology 80:225-232(1981))通过有限稀释法进行克隆。然后测定通过这种选择获得的杂交瘤细胞,以鉴定分泌能够结合所述抗原的抗体的克隆。

[0389] 应该认识到,根据本文公开的方法,可以使用所述抗抗原抗体的Fab和F(ab')<sub>2</sub>以及其他片段。通常通过蛋白水解切割,使用酶例如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胃蛋白酶(以产生F(ab')<sub>2</sub>片段)产生这些片段。或者,可以通过使用重组DNA技术或通过合成化学来生产分泌的蛋白结合片段。

[0390] 对于抗体在人类中的体内使用来说,使用“人源化”嵌合单克隆抗体可能是优选的。这些抗体可以使用源自于上述产生所述单克隆抗体的杂交瘤细胞的遗传构建物来生产。用于生产嵌合抗体的方法在本领域中是已知的(对于综述,参见Morrison,Science 229:1202(1985);Oi等,BioTechniques 4:214(1986);Cabilly等,美国专利号4,816,567;Taniguchi等,EP 171496;Morrison等,EP 173494;Neuberger等,WO 8601533;Robinson等,WO 8702671;Boulianne等,Nature 312:643(1984);Neuberger等,Nature 314:268(1985))。

[0391] 实施例7:使用多核苷酸产生多克隆和单克隆抗体

[0392] 将多核苷酸直接注射到动物中的方法在本领域中已充分描述。参见例如美国专利

号5,676,954、6,875,748、5,661,133。例如,可以将编码包含抗原的改良LAMP构建物的多核苷酸注射到受约束的清醒小鼠(雌性6-12周龄BALB/c或裸小鼠nu/nu,来自于Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, Ind.)的四头肌中。在一个实施方式中,使用一次性无菌塑料胰岛素注射器和装配有从微量移液器头切下的塑料套环的28G1/2针头(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, N.J., 目录号329430), 50 $\mu$ l溶液中的50 $\mu$ g多核苷酸可用于注射小鼠,如Hartikka, J.等, Hum. Gene Ther. 7:1205-1217 (1996) 中所述。

[0393] 或者,在注射前24小时开始,可以向6周龄Sprague Dawley雌性小鼠(体重20-25克)在饮用水中提供5000ppm ZnSO<sub>4</sub>。已显示该锌量能够激活金属硫蛋白启动子。然后使用25号针头通过微静脉穿刺,用30 $\mu$ l总体积中的与150 $\mu$ g脂质体(Lipofection™)复合的30 $\mu$ g编码含有抗原的改良LAMP构建物的多核苷酸静脉内注射每只小鼠。动物看护应该在整个研究期间维持,并且应该遵照“实验室动物使用和护理指南”(Guide for the Use and Care of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press)来进行。

[0394] 在所述注射的编码包含抗原的改良LAMP构建物的多核苷酸被递送到动物中的细胞内之后,所述抗原被递送到胞内体/溶酶体,加工并递送到免疫系统。然后所述包含抗原的改良LAMP构建物可以刺激特异性针对所述抗原的抗体的产生。这些抗体可以被分离并用作多克隆混合物,或者被进一步分离成单一物类或单克隆。免疫应答的过程和针对外来抗原的抗体的体内生产,在本领域中是公知的。

[0395] 在第三种动物模型中,将Balb/c 3T3 A31细胞通过电穿孔用编码包含抗原的改良LAMP构建物的多核苷酸转染。表达包含抗原的LAMP构建物的G418抗性克隆通过它们结合人类RBC的能力来鉴定。为了产生多克隆抗体,将Balb/c小鼠以14天的时间间隔,用10<sup>7</sup>个包含所述含有抗原的改良LAMP构建物的细胞进行两次腹膜内免疫接种。在最后一次加强后,收集免疫血清,将IgG通过蛋白G Sepharose纯化,并在通过将1.0mg纯化的抗原偶联到溴化氰活化的Sepharose CL-4B而制备的抗原柱上通过。结合的IgG可以用0.1M pH 2.5的甘氨酸缓冲液洗脱,并用0.1体积的pH 8.0的0.1M Tris中和。为了产生单克隆抗体(mAb),将Balb/c小鼠用包含抗原的LAMP构建物免疫接种,并按照标准方法(28)通过将免疫脾细胞与SP2骨髓瘤融合来产生杂交瘤。可以通过如本领域中所述的酶联免疫吸附测定法来鉴定特异性与抗原反应的阳性孔。将所述杂交瘤通过有限稀释法克隆三次,以产生抗体。

[0396] 实施例8:包含抗原的改良LAMP构建物的免疫接种

[0397] 在哺乳动物中产生抗体的方法在本领域中是公知的。在一个实例中,通过在两个月的时间段内用总共500 $\mu$ g包含抗原的改良LAMP构建物免疫接种无病原体的兔,产生针对包含抗原的LAMP构建物的多克隆抗血清。例如,可以将所述包含抗原的改良LAMP构建物溶解在PBS中,并用等体积的弗氏佐剂乳化。在最后一次加强后,可以分离所述兔的血清以确定多克隆抗血清的滴度。

[0398] 在另一个动物模型中,可以将5只小鼠(C57BL/6J; Jackson Labs)的组用在铝佐剂中乳化的5 $\mu$ g无内毒素的包含抗原的LAMP构建物皮下免疫接种。三周后,对小鼠取血,并且可以通过ELISA通过滴定所述血清来确定抗抗原特异性抗体的存在(血清中的抗体直接结合到直接或间接地(通过生物素化标签和链亲和素)包被在孔上的野生型BPTI或APP-KI)。

[0399] 为了获得单克隆抗体,可以将4-6周龄Balb/c小鼠用包含抗原的改良LAMP构建物免疫接种(例如以2周的时间间隔用10-100 $\mu$ g/注射来免疫接种四次,第一次注射时溶解在弗氏完全佐剂中,随后的免疫接种时溶解在弗氏不完全佐剂中)。分离脾细胞并与融合细胞系例如Sp2/0骨髓瘤细胞融合,然后进行有限稀释。生长的克隆使用例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)来筛选。将96孔板用包含抗原的改良LAMP构建物或用对照蛋白包被。添加培养上清液,然后洗涤并添加用于检测的标记的抗小鼠抗体。在有限稀释后,获得产生所述抗抗原抗体的稳定杂交瘤的克隆。从每种细胞收集上清液,并且通过使用蛋白A琼脂糖柱的亲亲和层析,可以纯化单克隆抗体。

#### [0400] 实施例9-具有IGFBP-2的LAMP构建物

[0401] 癌症疫苗的开发已经进行了超过40年。然而,尽管对多种不同的癌症疫苗制剂进行了大量的临床研究,但是治疗性癌症疫苗接种的总体临床获益为约20%<sup>1,2,3,4,5</sup>。提高效能的障碍包括:a)作为癌症相关抗原的自身蛋白的免疫原性差,b)诱导调节性T细胞<sup>6</sup>,以及c)通过疫苗接种获得的免疫应答低。最近的报道表明,疫苗诱导的Th1免疫浸润在肿瘤微环境中与许多肿瘤的临床反应改善有关<sup>7,8,9,10,11</sup>。

[0402] 胰岛素样生长因子结合蛋白2(IGFBP-2)是一种在许多人类肿瘤进展过程中升高的自身蛋白。IGFBP-2的过表达与预后不良的高级别神经胶质瘤相关<sup>12</sup>,并且是乳腺癌患者恶性肿瘤的独立指标<sup>13</sup>。IGFBP2与肺癌患者的转移和生存不良有关<sup>14</sup>。IGFBP2过表达还与肾上腺癌<sup>15</sup>、膀胱癌<sup>16</sup>、胃癌<sup>17</sup>、卵巢癌<sup>18,19</sup>和前列腺癌<sup>20,21</sup>中的晚期疾病相关。

#### [0403] 材料和方法

[0404] 小鼠.6至8周龄雌性C57BL/6白化病小鼠购自Envigo,并维持在Immunomic Therapeutics, Inc. (Rockville, MA)的动物房中。

[0405] 试剂和抗体.对照载体对照、IGFBP2(1-328)-无LAMP和IGFBP2(39-328)-ILC-1构建物如本文所述使用标准方案来制备。抗小鼠兔IGFBP2 PoAb来自于MyBiosource (San Diego, CA),山羊抗兔IgG-FITC来自于e-biosciences (San Diego, CA),兔抗人类LAMP来自于Sino Biological (中国北京)。山羊抗兔HRP、山羊抗小鼠IgG1-HRP和山羊抗小鼠IgG2a-HRP购自Southern Biotechnologies (Birmingham, AL)。链亲和素-HRP购自Thermo Fisher (Waltham, MA)。SureBlue TMB微孔过氧化物酶底物和TMB终止溶液购自KPL (Gaithersburg, MD)。用于IFN $\gamma$ 和IL-10的ELISPOT抗体对来自于BioLegend。细胞因子ELISA试剂盒来自于R&D系统。

[0406] 疫苗和免疫接种.对照、IGFBP2(39-328)-ILC-1构建物和IGFBP2(1-328)-无LAMP疫苗以每只小鼠每次给药20 $\mu$ l的总体积使用。在第0天、第7天和第14天,通过电穿孔经IM递送疫苗对小鼠进行免疫接种。在第-13天和第28天对小鼠取血以收集血清。收集血清并将其储存在-30 $^{\circ}$ C。在第28天收集脾脏并处理以用于ELISPOT/ELISA测定。

[0407] 通过ELISA测量血清IGFBP-2特异性IgG。针对IGFBP-2的鼠类抗体应答通过间接ELISA来评估。将ELISA板(MaxiSorp)用碳酸盐碳酸氢盐缓冲液中的5 $\mu$ g/ml IGFBP2(39-328)蛋白包被过夜,然后用PBS中的2%BSA阻断。将血清样品在PBS-T中稀释(1:100、1:300、1:900、1:2700、1:8100、1:24300、1:72900、1:218700)。用1:6000山羊抗小鼠IgG-HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL),然后用链亲和素-HRP (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)检测样品。反应用SureBlue TMB底物进行显色并用来自于KPL

(Gaithersburg, MD) 的TMB终止溶液终止。使用Epoch ELISA读板器 (BioTek, Winooski, VT) 读板 (OD450)。计算平均背景 (仅PBS), OD450值大于 $2 \times$ 平均背景样品被认为是阳性的。此类样品的稀释度被确定为终点滴度。

[0408] 抗原特异性T细胞应答的评估。为了在疫苗接种过的小鼠中评估抗原特异性T细胞应答, 通过酶联免疫斑点 (ELISPOT) 来评估来自于疫苗接种过的小鼠的脾细胞的抗原特异性IFN  $\gamma$  和IL-10。

[0409] 去除脾细胞中的红细胞, 并在平底96孔板中在200 $\mu$ l/孔的T细胞培养基 (含L-谷氨酰胺和HEPES (ATCC)、1%青霉素、1%链霉素和 $5 \times 10^{-5}$ M 2-ME的RPMI-1640) 中以 $4 \times 10^5$ 个细胞/孔与10 $\mu$ g/ml IGFBP2 (39-328) 蛋白或刀豆蛋白A (0.25 $\mu$ g/ml) 或单独的培养基在37 $^{\circ}$ C下和5%CO<sub>2</sub>中共培养72h。将板以1600rpm离心6分钟, 收集上清液, 并储存在-30 $^{\circ}$ C下。

[0410] 对于ELISPOT测定来说, 如本文所述来进行。简单来说, 将96孔硝酸纤维素板 (Millipore) 用30 $\mu$ l 35%乙醇活化1分钟, 用PBS洗涤两次, 并用50 $\mu$ l/孔的在PBS中的捕获单克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。将板用200 $\mu$ l/孔的PBS洗涤三次, 并用200 $\mu$ l/孔的T细胞培养基在室温阻断至少2hr。将脾细胞以 $4 \times 10^5$ 个细胞/孔铺板, 并与10 $\mu$ g/ml IGFBP2 (39-328) 蛋白或10 $\mu$ g/ml肽合并物或刀豆蛋白A (0.25 $\mu$ g/ml) 或单独的培养基, 在总体积为200 $\mu$ l/孔的T细胞培养基中在37 $^{\circ}$ C下和5%CO<sub>2</sub>中共培养48h。洗涤板, 添加稀释的检测抗体 (50 $\mu$ l/孔), 并将板在室温下在振荡器上温育2hr。将板用PBS洗涤四次。添加在PBS中稀释的链亲和素-HRP (50 $\mu$ l/孔) 并温育1h。将板用PBS洗涤, 并用50 $\mu$ l/孔的AEC显色液显色长达30min。通过在流动自来水下洗涤来终止显色。在室温下在暗处干燥24-72h后, 使用AID ELISPOT高分辨率读板器系统和AID ELISPOT软件3.5版 (Autoimmun Diagnostika GmbH) 对着色的斑点进行计数。

[0411] 评估细胞内细胞因子。为了确定负责产生细胞因子的细胞, 进行了细胞内染色。去除脾细胞中的RBC, 在冰箱中储存24小时。第二天, 将脾细胞在平底96孔板中在200 $\mu$ l/孔T细胞培养基 (含有L-谷氨酰胺和HEPES (ATCC)、1%青霉素、1%链霉素和 $5 \times 10^{-5}$ M 2-ME的RPMI-1640) 中以 $3 \times 10^6$ 个细胞/孔与20 $\mu$ g/ml IGFBP2 (39-328) 蛋白或肽合并物或单独的培养基进行共培养。一小时后, 将布雷菲德菌素A和莫能霉素的混合物 ( $\times 1000$ ) 以20 $\mu$ l的体积添加到每个孔中 (对于20 $\mu$ l的体积, 每孔0.22 $\mu$ l; 为所有孔制备储备液)。将PMA/离子霉素活化混合物与BFA和莫能霉素一起添加到阳性对照孔中 (设置了两个孔; 一个用于IgG对照, 另一个用于细胞因子染色)。将细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下温育6小时。

[0412] 用200 $\mu$ l PBS洗涤细胞。用50 $\mu$ l稀释的Zombie aqua染料 (Zombie aqua在PBS中1:500的稀释液) 对细胞进行染色, 并在室温下避光温育20分钟。用含2%血清的PBS洗涤细胞一次。将20 $\mu$ l纯化的抗小鼠CD16/32mAb (克隆2.4G2; 1 $\mu$ g/20 $\mu$ l) 添加到细胞中, 并将细胞在4 $^{\circ}$ C下温育10分钟。将细胞进行离心 (2000rpm, 6分钟), 倾析上清液, 并在补充有2%血清的PBS中添加细胞外抗体。抗体为每孔各0.3 $\mu$ l。抗体以50 $\mu$ l/孔的体积进行添加, 在4 $^{\circ}$ C中温育30分钟 (CD3克隆17A2可以活化T细胞, 因此4 $^{\circ}$ C温度是重要的)。

[0413] 用PBS+蛋白 (2%FCS) 洗涤细胞, 固定并用100 $\mu$ l CytoFix/CytoPerm溶液在4 $^{\circ}$ C下透化30分钟 (在加入固定缓冲液时用多通道充分混合以减少聚集和双峰形成)。用200 $\mu$ l透化/洗涤缓冲液 (1 $\times$ ) 洗涤细胞两次 (2000rpm, 6分钟)。在透化缓冲液中, 用0.5 $\mu$ l抗体/孔的细胞内染色抗体对细胞进行染色。用同种型对照对PMA/离子霉素孔之一进行染色。温育1小



时(或过夜)后,用透化缓冲液洗涤细胞两次,并通过流式细胞仪采集细胞。采集时,每秒事件数小于8000。每个样品采集 $>10^6$ 个细胞。使用Kaluzza分析软件分析所获取的数据。排除死细胞和双峰。

[0414] 统计学.使用Prism 6软件(GraphPad Software,La Jolla,CA)进行统计分析。数据通过单向ANOVA进行分析,然后通过Tukey检验进行多重比较。低于0.05的p值被认为指示统计学显著性差异。

[0415] 结果.图21:IGFBP2 (39-328)-ILC-1构建物在10 $\mu$ g IM/EP免疫接种的剂量下诱导显著更高的产生IFN  $\gamma$  的效应T细胞。肽合并物1诱导的IFN  $\gamma$  应答类似于IGFBP-2全长蛋白,表明在肽合并物1中具有优势表位。用IGFBP-2蛋白(10 $\mu$ g/ml)或肽合并物(10 $\mu$ g/ml)在T细胞培养基(含10%热灭活的FBS、1%青霉素/链霉素和1 $\times$ 2-ME的RPMI)中刺激脾细胞( $4 \times 10^5$ 个/孔)48小时。点图中的值是每只小鼠的实验性中值。N=7只小鼠/组。图21A.点图显示了使用全长IGFBP2 (10 $\mu$ g/ml)的唤回率。图21B.点图显示使用肽合并物1 (10 $\mu$ g/ml)的唤回率。\*表示 $p < 0.05$ 。

[0416] 图22.IGFBP2 (39-328)-ILC-1构建物在10 $\mu$ g IM/EP免疫接种的剂量下诱导产生IFN  $\gamma$  和/或TNF $\alpha$ 的CD4 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ 效应记忆T细胞。在T细胞培养基(含10%热灭活的FBS、1%青霉素/链霉素和1 $\times$ 2-ME的RPMI)中,用IGFBP-2蛋白(10 $\mu$ g/ml)或肽合并物1 (5 $\mu$ g/ml)刺激脾细胞( $4 \times 10^5$ 个/孔)6小时。如本文中所述对细胞进行细胞内细胞因子染色,并如下所示进行分析。每个组的代表性数据。

[0417] 图23:通过IM/EP用IGFBP2 (39-328)-ILC-1构建物免疫接种的C57BL/6白化病小鼠中IGFBP-2-特异性IgG的产生。在第0天、第7天和第14天,用20 $\mu$ g PBS中的10 $\mu$ g所示疫苗对雌性C57BL/6白化病小鼠进行IM/EP免疫接种。在第-6天、第28天对小鼠进行取血。分离血清并将储存在-30 $^{\circ}$ C下。通过ELISA测定血浆中的IgG。简单来说,将ELISA板用碳酸盐碳酸氢盐缓冲液中的5 $\mu$ g/ml IGFBP-2 (39-328)包被,用2%BSA阻断,通过HRP偶联的山羊抗小鼠IgG (1:6000)评估血清(在PBS-T中1:100稀释)。计算平均背景(仅PBS),OD450值大于2 $\times$ 平均背景的背景样品被认为是阳性的。此类样品的稀释度被确定为终点滴度。

[0418] 该实施例中引用的参考文献。

[0419] 1.Melero,I.等,癌症治疗性疫苗:临床试验概述(Therapeutic vaccines for cancer:an overview of clinical trials),Nat Rev Clin Oncol 11,509-524(2014)。

[0420] 2.Obeid,J.,Hu,Y.&Slingluff,C.L.,Jr.疫苗、佐剂和树突状细胞活化剂-现状和未来挑战(Vaccines,Adjuvants,and Dendritic Cell Activators--Current Status and Future Challenges),Semin Oncol 42,549-561(2015)。

[0421] 3.Pol,J.等,试验观察:基于肽的抗癌疫苗(Trial Watch:Peptide-based anticancer vaccines),Oncoimmunology 4,e974411(2015)。

[0422] 4.Speiser,D.E.&Romero,P.用于癌症免疫疗法和保护性T细胞免疫的分子疫苗(Molecularly defined vaccines for cancer immunotherapy,and protective T cell immunity),Semin Immunol 22,144-154(2010)。

[0423] 5.Thomas,A.&Giaccone,G.为什么主动免疫疗法在肺癌中不起作用?(Why has active immunotherapy not worked in lung cancer?),Ann Oncol 26,2213-2220(2015)。

- [0424] 6.Ebert,L.M.等,癌症疫苗在晚期黑素瘤患者中诱导NY-ESO-1特异性调节性T细胞扩增(A cancer vaccine induces expansion of NY-ESO-1-specific regulatory T cells in patients with advanced melanoma),PloS One 7,e48424(2012)。
- [0425] 7.Galon,J.等,人类结直肠肿瘤内免疫细胞的类型、密度和定位可预测临床结果(Type,density,and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome),Science 313,1960-1964(2006)。
- [0426] 8.Fridman,W.H.,Pages,F.,Sautes-Fridman,C.&Galon,J.人体肿瘤的免疫状况:对临床结果的影响(The immune contexture in human tumours:impact on clinical outcome),Nat Rev Cancer 12,298-306(2012)。
- [0427] 9.Kenter,G.G.等,针对外阴上皮内瘤变的HPV-16癌蛋白的疫苗接种(Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia),N Engl J Med 361,1838-1847(2009)。
- [0428] 10.Madan,R.A.,Bilusic,M.,Heery,C.,Schlom,J.&Gulley,J.L.TRICOM载体治疗性癌症疫苗的临床评估(Clinical evaluation of TRICOM vector therapeutic cancer vaccines),Semin Oncol 39,296-304(2012)。
- [0429] 11.Disis,M.L.等,转移性乳腺癌患者同时接受曲妥珠单抗和HER2/neu特异性疫苗接种(Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer),J Clin Oncol 27,4685-4692(2009)。
- [0430] 12.Moore,L.M.等,IGFBP2是Ink4a-Arf状态的候选生物标记物,也是高级别神经胶质瘤的治疗靶标(IGFBP2 is a candidate biomarker for Ink4a-Arf status and a therapeutic target for high-grade gliomas),Proc Natl Acad Sci U S A 106,16675-16679(2009)。
- [0431] 13.Busund,L.T.等,与良性病变相比,IGFBP2在乳腺癌中的显著表达(Significant expression of IGFBP2 in breast cancer compared with benign lesions),J Clin Pathol 58,361-366(2005)。
- [0432] 14.Hu,Q.等,胰岛素样生长因子结合蛋白2与肺癌转移相关吗?(Is insulin-like growth factor binding protein 2 associated with metastasis in lung cancer?),Clin Exp Metastasis 31,535-541(2014)。
- [0433] 15.Boulle,N.,Logie,A.,Gicquel,C.,Perin,L.&Le Bouc,Y.胰岛素样生长因子II(IGF-II)和IGF结合蛋白2水平的升高与散发性肾上腺皮质肿瘤的恶性肿瘤相关(Increased levels of insulin-like growth factor II(IGF-II)and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors),J Clin Endocrinol Metab 83,1713-1720(1998)。
- [0434] 16.Miyake,H.,Hara,I.,Yamanaka,K.,Muramaki,M.&Eto,H.胰岛素样生长因子(IGF)结合蛋白-2与IGF结合蛋白-3的比率在经受膀胱浸润性移行细胞癌的根治术的患者中的预后意义(Prognostic significance of insulin-like growth factor(IGF) binding protein-2 to IGF-binding protein-3 ratio in patients undergoing radical cystectomy for invasive transitional cell carcinoma of the bladder)BJU Int 95,987-991(2005)。

[0435] 17. Shi, L.H., Zhu, X.Q., Zhao, G.H., Xia, Y.B. & Zhang, Y.S. 胰岛素样生长因子结合蛋白2在胃癌中的表达及其与细胞增殖的关系 (Expression of insulin-like growth factor binding protein-2 in gastric carcinoma and its relationship with cell proliferation) *World J Gastroenterol* 12, 6285-6289 (2006)。

[0436] 18. Lee, E.J. 等, 胰岛素样生长因子结合蛋白2促进卵巢癌细胞侵袭 (Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes ovarian cancer cell invasion), *Mol Cancer* 4, 7 (2005)。

[0437] 19. Lukanova, A. 等, 与C肽、胰岛素样生长因子结合蛋白-1和-2的预诊断水平相关的卵巢癌风险 (美国, 瑞典, 意大利) (Risk of ovarian cancer in relation to prediagnostic levels of C-peptide, insulin-like growth factor binding proteins-1 and -2 (USA, Sweden, Italy)) *Cancer Causes Control* 14, 285-292 (2003)。

[0438] 20. Degraff, D.J., Aguiar, A.A. & Sikes, R.A. IGFBP-2在前列腺癌进展和骨硬化性病发展起关键作用的疾病证据 (Disease evidence for IGFBP-2 as a key player in prostate cancer progression and development of osteosclerotic lesions), *Am J Transl Res* 1, 115-130 (2009)。

[0439] 21. Shariat, S.F. 等, 血浆胰岛素样生长因子I和胰岛素样生长因子结合蛋白2和-3的术前血浆水平与前列腺癌的侵袭、进展和转移的关系 (Association of preoperative plasma levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 with prostate cancer invasion, progression, and metastasis), *J Clin Oncol* 20, 833-841 (2002)。

[0440] 实施例10: 包含CMVpp65和gB的LAMP构建物

[0441] 多形性胶质母细胞瘤 (GBM) 脑癌是一种侵略性人类脑癌, 5年生存率低于10% (Schuessler A等, 2014)。当前的治疗包括手术切除肿瘤和放疗, 但是成功的治疗只是将中位生存期延长到约15个月。目前正在评估GBM的一些临床试验, 包括免疫疗法。有趣的是, 最近发现GBM肿瘤表达CMV抗原, 包括抗原pp65。CMV在GBM中的作用尚不清楚, 因为CMV不是致癌病毒, 但是, 从治疗的角度来看, CMV抗原的存在提供了利用已有的抗病毒免疫性进行基于免疫的GBM治疗的独特机会。最近的一份报告显示, 以独特的方案使用转染有LAMP-pp65 mRNA的DC进行的自体免疫疗法显著提高了GBM患者的生存率。具体而言, 佛罗里达大学的Duane A. Mitchell博士表明, 离体产生的转染有LAMP-pp65 mRNA并注回GBM患者内的自体DC显著提高了GBM患者的生存率。pp65转染的DC的方案还要求在DC注射前24h通过注射破伤风/白喉疫苗来对注射部位进行预处理 (Mitchell DA等, 2015)。

[0442] 在这里, 我们使用PharmaJet和ID/EP将pp65+ILC-1LAMP构建物与gB+ILC-1LAMP疫苗进行比较。

[0443] 材料和方法

[0444] 试剂. 质粒构建物对照、pp65+ILC-1LAMP构建物和gB+ILC-1LAMP如本文所述进行构建。用于ELISPOT的pp65和gB肽购自JPT (70%纯度)。RBC裂解缓冲液购自TonboBio, 并通过0.22μm过滤器过滤。ConA (Sigma) 以2.5μg/ml进行使用。IFN γ ELISPOT的抗体购自eBioscience或Biolegend。IL-10 ELISPOT试剂SA-ALP和BCIP/NBT plus购自MabTech。使用来自Southern Biotech的HRP抗小鼠抗体评估抗体滴度。CMV感染的细胞的裂解物购自

Virusys.生产公司确认所述裂解物无感染性。

[0445] 免疫接种和血浆收集.6至8周龄的雄性BALB/C小鼠在Immunomic Therapeutics, Inc的动物房中饲养并维持。在第0天、第7天和第14天通过ID (Pharmajet) 或ID通过电穿孔用疫苗对小鼠进行免疫接种。在第26天处死小鼠。

[0446] ELISPOT.如本文中所述进行ELISPOT,区别在于细胞数目:将细胞以 $2 \times 10^5$ 个脾细胞/孔进行接种。用培养基冲洗来自处死小鼠的脾脏,裂解红细胞,然后使用细胞仪对细胞进行计数。每个ELISPOT孔中接种 $2 \times 10^5$ 个脾细胞,并用培养基(含HEPES+10%HI等胎+NaP+ME+P/S的RPMI)、PP65和gB肽的平行样(每种肽 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )或ConA ( $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 进行温育。在对每只小鼠的平行实验取平均值并从RPMI孔值减去所述值后显示结果。

[0447] 抗体滴度.使用CMV感染的细胞的裂解物评估抗体滴度。评估了总IgG和IgG2a。仅计算总IgG的结果,并且仅比较1:1000D的结果。

[0448] 结果.图24显示,pp65和gB肽两者诱导了IFN  $\gamma$ 。另外,从最后一次采血测试血清抗体。当使用CMV转染细胞的裂解物时,两种免疫接种观察到相似的IgG滴度。具体地,图25显示了免疫接种小鼠血清中针对CMV转染细胞裂解物的总IgG(左)和IgG2a(右)抗体滴度。使用Mann Whitney检验在GraphPad prim中进行统计分析。IgG2a CMV裂解物Ag-P=0.041

[0449] 实施例11.包含PSMA的LAMP构建物

[0450] 前列腺癌是男性中最常被诊断出的癌症,也是美国男性中第二大最常见的癌症死亡原因<sup>1</sup>。对于局部疾病,手术和放疗仍然是根治性疗法,但具有副作用,例如泌尿症状和性功能障碍,这会对生活质量产生负面影响。对于转移性疾病,与单独的雄激素剥夺疗法(ADT)<sup>2</sup>相比,化学疗法作为初始治疗现在似乎可以延长生存期。ADT伴有:a)骨矿物质密度降低和骨质疏松性脆性骨折的风险增加,b)发展成去势抵抗性前列腺癌(CRPC)。正在开发利用免疫系统识别并杀死前列腺癌细胞的方法。一种这样的尝试产生了Sipuleucel-T,这是FDA批准的自体细胞免疫疗法,其靶向前列腺酸性磷酸酶(PAP),用于治疗无症状或症状轻微的转移性CRPC(mCRPC)<sup>3</sup>。正在开发针对前列腺癌的其他免疫疗法,包括多种候选疫苗,以及使用靶向单克隆抗体的方法4,5。

[0451]

[0452] 已经鉴定到几种肿瘤相关抗原(TAA),它们代表了基于T细胞或抗体的免疫疗法的有希望的靶标。在正常和恶性前列腺组织中优先表达的分子组包括前列腺特异性膜抗原(PSMA)、prostein、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、T细胞受体 $\gamma$ 交替阅读框蛋白(TARP)、瞬时受体电位(trp)-p8和前列腺六跨膜上皮抗原1(STEAP1)。

[0453] 人类前列腺特异性膜抗原(PSMA),也称为叶酸水解酶I(FOLH1),是一种750个氨基酸的II型膜糖蛋白,主要在正常人类前列腺上皮中表达,并在包括转移性疾病的前列腺癌中上调。PSMA(Folh1)的小鼠同源物不在小鼠前列腺中表达,但主要在脑和肾中表达。小鼠Folh1编码752个氨基酸的蛋白质,与人类PSMA氨基酸序列具有86%同一性和91%相似性。PSMA被认为是前列腺的重要临床生物标记物,因为它在前列腺细胞上的表达要比其他组织的细胞高许多倍<sup>7,8,9</sup>。已经表明PSMA表达增加与前列腺癌进展之间存在着很强的相关性<sup>10</sup>。PSMA表达升高也与其他恶性肿瘤有关,包括肾癌和膀胱癌<sup>11</sup>。在肿瘤新脉管系统上观察到PSMA表达升高,但正常脉管系统未提示PSMA在血管生成中的作用<sup>12</sup>。PSMA作为一种膜蛋白,

是开发针对它的抗体以用于诊断和治疗目的的有吸引力的靶标<sup>13</sup>。已经开发了几种治疗性抗PSMA单克隆抗体,其中许多已用于放射免疫疗法,以靶向细胞毒性放射性核苷酸,特别是针对表达PSMA的细胞<sup>14</sup>。已证明某些抗PSMA单克隆抗体可通过促进杀死前列腺癌细胞的抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)来介导治疗作用<sup>4,14,15</sup>。

[0454] 材料和方法

[0455] 小鼠.6至8周龄雌性C57BL/6白化病小鼠购自Envigo,并维持在Immunomic Therapeutics, Inc. (Rockville, MA)的动物房中。

[0456] 试剂和抗体.如本文所述制备对照和PSMA-ILC-1LAMP构建物。人类PSMA PepMix (185个肽,具有11个氨基酸重叠的15聚体)来自于JPT (Acton, MA)。小鼠抗人类PSMA Alexa Flour 488、山羊 (Fab) 2抗小鼠IgG-Fc PE来自于abcam (Cambridge, MA),兔抗人类LAMP来自于Sino Biological (中国北京)。山羊抗兔HRP、山羊抗小鼠IgG1-HRP和山羊抗小鼠IgG2a-HRP购自Southern Biotechnologies (Birmingham, AL)。链亲和素-HRP购自Thermo Fisher (Waltham, MA)。SureBlue TMB微孔过氧化物酶底物和TMB终止溶液购自KPL (Gaithersburg, MD)。用于IFN $\gamma$ 的ELISPOT抗体对来自BioLegend。

[0457] 疫苗和免疫接种.对照载体PSMA-ILC-1LAMP构建物以每只小鼠每次给药20 $\mu$ l的总体积使用。在第0天和第21天通过电穿孔经ID用疫苗对小鼠进行免疫接种。收集血清并将其储存在-30 $^{\circ}$ C。在第34天收集脾用于ELISPOT/ELISA测定。

[0458] 抗原特异性T细胞应答的评估。为了在疫苗接种过的小鼠中评估抗原特异性T细胞应答,通过酶联免疫斑点 (ELISPOT) 来评估来自于疫苗接种过的小鼠的脾细胞的抗原特异性IFN  $\gamma$  和IL-10。去除脾细胞中的红细胞,并在平底96孔板中在200 $\mu$ l/孔的T细胞培养基(含L-谷氨酰胺和HEPES (ATCC)、1%青霉素、1%链霉素和 $5 \times 10^{-5}$ M 2-ME的RPMI-1640)中以 $4 \times 10^5$ 个细胞/孔与10 $\mu$ g/ml IGFBP2 (39-328) 蛋白或刀豆蛋白A (0.25 $\mu$ g/ml) 或单独的培养基在37 $^{\circ}$ C下和5%CO<sub>2</sub>中共培养72h。将板以1600rpm离心6分钟,收集上清液,并储存在-30 $^{\circ}$ C下。

[0459] 对于ELISPOT测定来说,如本文所述来进行。简单来说,将96孔硝酸纤维素板 (Millipore) 用30 $\mu$ l 35%乙醇活化1分钟,用PBS洗涤两次,并用50 $\mu$ l/孔的在PBS中的捕获单克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。将板用200 $\mu$ l/孔的PBS洗涤三次,并用200 $\mu$ l/孔的T细胞培养基在室温阻断至少2hr。将脾细胞以 $3 \times 10^5$ 个细胞/孔铺板,并与用于PSMA的10、5、2、1、0.1、0.01 $\mu$ g/ml PSMA JPT肽混合物或刀豆蛋白A (0.25 $\mu$ g/ml) 或单独的培养基,在总体积为200 $\mu$ l/孔的T细胞培养基中在37 $^{\circ}$ C下和5%CO<sub>2</sub>中共培养48h。洗涤板,添加稀释的检测抗体 (50 $\mu$ l/孔),并将板在室温下在振荡器上温育2hr。将板用PBS洗涤四次。添加在PBS中稀释的链亲和素-HRP (50 $\mu$ l/孔) 并温育1h。将板用PBS洗涤,并用50 $\mu$ l/孔的AEC显色液显色长达30min。通过在流动自来水下洗涤来终止显色。在室温下在暗处干燥24-72h后,使用AID ELISPOT高分辨率读板器系统和AID ELISPOT软件3.5版 (Autoimmun Diagnostika GmbH) 对着色的斑点进行计数。

[0460] 通过ELISA测量血清PSMA特异性IgG/IgG2a和Prostein特异性IgG/IgG2a。针对PSMA的鼠类抗体应答通过间接ELISA来评估。将ELISA板 (MaxiSorp) 用碳酸盐碳酸氢盐缓冲液中的5 $\mu$ g/ml PSMA蛋白包被过夜,然后用PBS中的2%BSA阻断。将血清样品在PBS-T中稀释 (1:100、1:300、1:900、1:2700、1:8100、1:24300、1:72900、1:218700)。用1:6000山羊抗小鼠

IgG-HRP或1:11000山羊抗小鼠IgG2a-HRP (Southern Biotech,Birmingham,Al),然后用链亲和素-HRP (Thermo Fisher Scientific,Rockford,IL) 检测样品。反应用SureBlue TMB底物进行显色并用来自于KPL (Gaithersburg,MD) 的TMB终止溶液终止。使用Epoch ELISA读板器 (BioTek,Winooski,VT) 读板 (OD450)。计算平均背景 (仅PBS),OD450值大于2×平均背景的样品被认为是阳性的。此类样品的稀释度被确定为终点滴度。

[0461] 评估细胞内细胞因子.为了确定负责产生细胞因子的细胞,进行了细胞内染色。去除脾细胞中的RBC,在冰箱中储存24小时。第二天,将脾细胞在平底96孔板中在200μl/孔T细胞培养基 (含有L-谷氨酰胺和HEPES (ATCC)、1%青霉素、1%链霉素和 $5 \times 10^{-5}$ M 2-ME的RPMI-1640) 中以 $3 \times 10^6$ 个细胞/孔与2μg/ml PSMA (JPT肽混合物) 或单独的培养基进行共培养。一小时后,将布雷菲德菌素A和莫能霉素的混合物 (×1000) 以20μl的体积添加到每个孔中 (对于20μl的体积,每孔0.22μl;为所有孔制备储备液)。将PMA/离子霉素活化混合物与BFA和莫能霉素一起添加到阳性对照孔中 (设置了两个孔;一个用于IgG对照,另一个用于细胞因子染色)。将细胞在37℃和5%CO<sub>2</sub>下温育6小时。

[0462] 活/死染色 (此步骤中无蛋白):用200μl PBS洗涤细胞 (此洗涤中无蛋白)。用50μl 稀释的Zombie aqua染料 (Zombie aqua在PBS中1:500的稀释液) 对细胞进行染色,并在室温下避光温育20分钟 (此步骤中无蛋白)。用含2%血清的PBS洗涤细胞一次。

[0463] Fc阻断:将20μl纯化的抗小鼠CD16/32mAb (克隆2.4G2;1μg/20μl) 添加到细胞中,并将细胞在4℃下温育10分钟。

[0464] 表面染色:将细胞进行离心 (2000rpm,6分钟),倾析上清液,并在补充有2%血清的PBS中添加细胞外抗体。抗体为每孔各0.3μl。抗体以50μl/孔的体积进行添加,在4℃中温育30分钟 (CD3克隆17A2可以活化T细胞,因此4℃温度是重要的)。

[0465] 固定和透化:用PBS+蛋白 (2%FCS) 洗涤细胞,固定并用100μl CytoFix/CytoPerm溶液在4℃下透化30分钟 (在加入固定缓冲液时用多通道充分混合以减少聚集和双峰形成)。用200μl透化/洗涤缓冲液 (1×) 洗涤细胞两次 (2000rpm,6分钟)。

[0466] 细胞内染色:在透化缓冲液中,用0.5μl抗体/孔的细胞内染色抗体对细胞进行染色。用同种型对照对PMA/离子霉素孔之一进行染色。温育1小时 (或过夜) 后,用透化缓冲液洗涤细胞两次,并通过流式细胞仪采集细胞。采集时,每秒事件数小于8000。每个样品采集 $> 10^6$ 个细胞。

[0467] 使用Kaluza分析软件分析所获取的数据。排除死细胞和双峰。

[0468] 统计学.使用Prism 6软件 (GraphPad Software,La Jolla,CA) 进行统计分析。数据通过单向ANOVA进行分析,然后通过Tukey检验进行多重比较。低于0.05的p值被认为指示统计学显著性差异。

[0469] 图26显示PSMA-ILC-1LAMP构建物在20μg ID/EP免疫接种的剂量下诱导显著更高的产生IFN $\gamma$ 的效应T细胞。用来自JPT的PSMA肽混合物 (2、1、0.1、0.01、0.001μg/ml) 在T细胞培养基 (含10%热灭活的FBS、1%青霉素/链霉素和1×2-ME的RPMI) 中刺激脾细胞 ( $3 \times 10^5$ 个/孔) 48小时。点图中的值是每只小鼠的实验性中值。N=7只小鼠/组。点图显示了使用PSMA的唤回率。

[0470] 图27显示PSMA-ILC-1LAMP构建物在20μg ID/EP免疫接种的剂量下诱导产生IFN $\gamma$ 的CD4+和CD8+效应记忆T细胞。在T细胞培养基 (含10%热灭活的FBS、1%青霉素/链霉素和1

×2-ME的RPMI)中,用PSMA肽(JPT;2μg/ml)刺激脾细胞( $3 \times 10^5$ 个/孔)6小时。如本文中所述对细胞进行细胞内细胞因子染色,并如下所示进行分析。显示了来自单只小鼠的数据。

[0471] 图28显示通过ID/EP免疫接种用PSMA-ILC-1LAMP构建物免疫接种的C57BL/6小鼠中的总IgG和IgG2A产生。通过ELISA测定血浆中的IgG。简单来说,将ELISA板用碳酸盐碳酸氢盐缓冲液中的5μg/ml PSMA包被,用2%BSA阻断,通过HRP偶联的山羊抗小鼠IgG(1:6000)评估血清(在PBS-T中1:100稀释)。

[0472] 对于本领域普通技术人员来说,可以对本文中描述的内容进行改变、修改和其他操作,而不背离本发明和权利要求书的精神和范围。指明的所有专利、专利申请、国际申请和参考文献明确地以其整体通过引用并入本文。

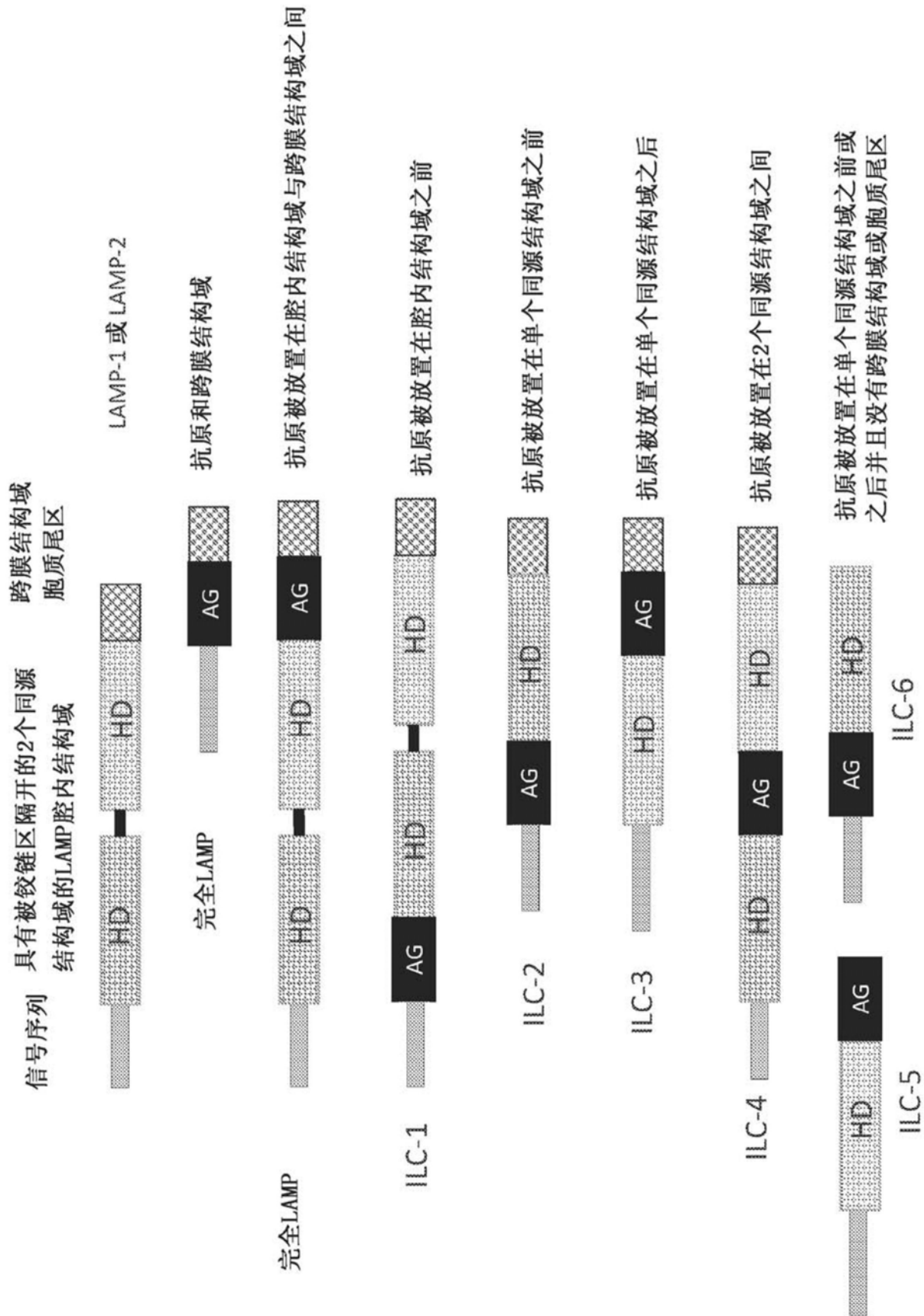


图1



基因名称 登记号	替代名称	SEQ ID NO.	直系同源物	信号 序列	腔内结构域			跨膜结构域	胞质尾区
					第一同源 结构域	铰链区	第二同源 结构域		
h. LAMP-1 NP_005552.3	CD107a; LAMPA; LGP120	1	SEQ ID NO: 6-24	1-28	29-194	195-227	228至381 或382	382或383 至405	406-417
h. LAMP-2 NP_002285.1	CD107b; LAMPB; LGP110	2	SEQ ID NO:25-43	1-28	29-192	193-228	229-375	376-399	400-410
h. LAMP-3 NP_055213.2	CD208; DC LAMP; DC- LAMP; DCLAMP; TSC403	3	SEQ ID NO:44-55	1-27	28-219	220-234	235-381	382-402	403-416
LIMP-2 Q14108	AMRF; EPM4; LGP85; CD36L2; HLGP85; LIMP1I; SR-BII; SCARB2	4	SEQ ID NO:56-66	*5-27 跨膜 *不可 切割的	28-433			434-459	460-478
h. Endolyn NP_006007.2	唾液黏蛋白 CD164 MUC-24	5	SEQ ID NO:73-79	1-23	24-162			163-183	184-197
Macrosialin NP_001242.2	CD68	80	SEQ ID NO: 81-92	1-21	22-319			320-344	345-354

图2A

LAMP5 NP 036393	BD-LAMP	93	SEQ ID NO: 94-101	1-29	30-235	236-256	257-280
h. LIMBIC NP_002329.2	LSAMP IGLON3	67	SEQ ID NO: 68-72 和 102-113	1-28	29-315	316-338	无尾区

图2A续

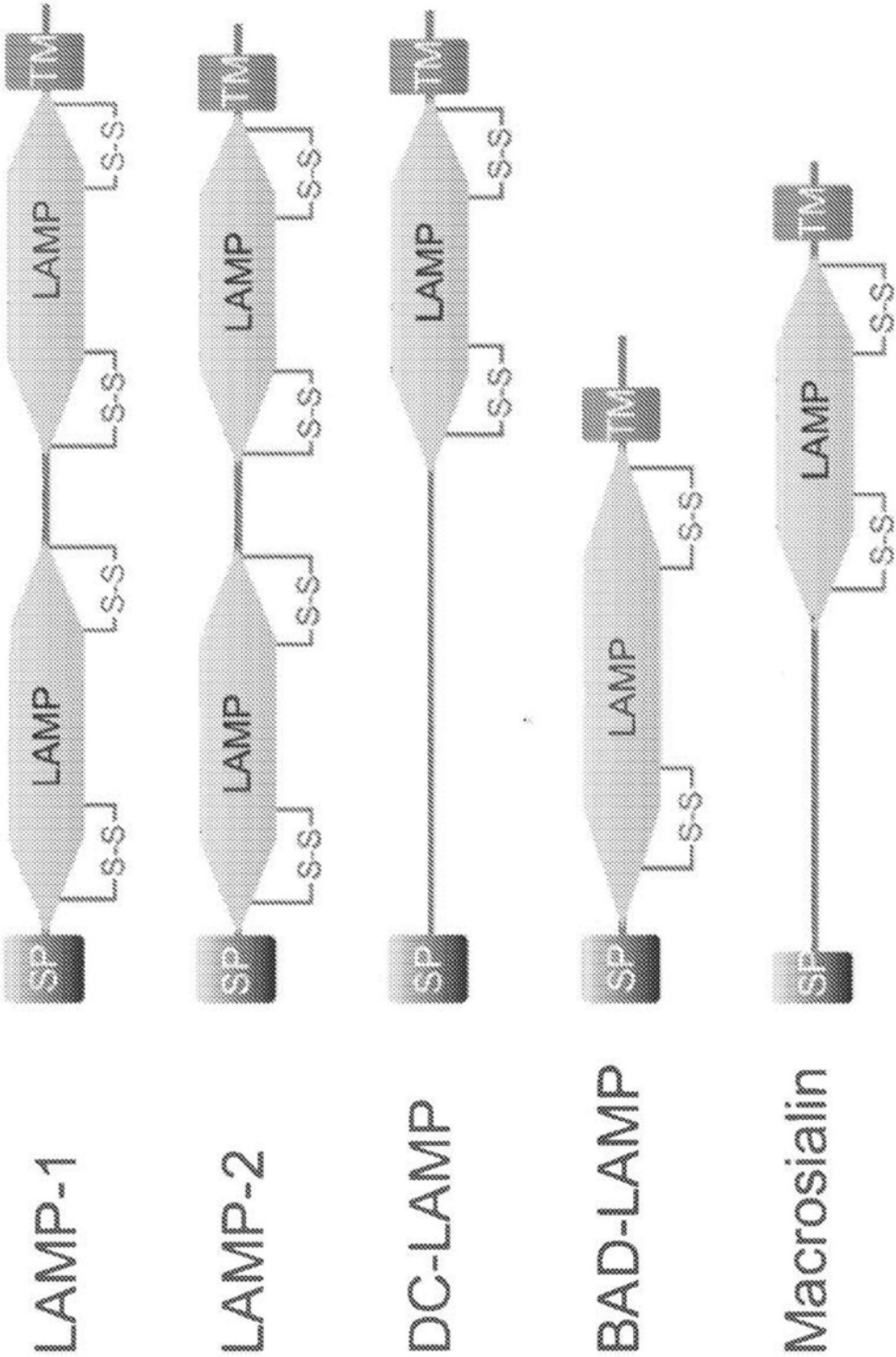


图2B

## 人类LAMP-1与直系同源序列的比对

信号序列		LAMP同源结构域1	
		1	
SEQIDNO:1	MAAPGSARRPLLLLLLLLLLGLIMH-CASAAMFMVKNGN-GTACIMANFSAAFSVNYDTKS	58	
SEQIDNO:6	MAAPGAR-RPLL---LLLLAGLAH--GASALFEVK--NN-GTTCIMASFSASFLTYYETAN	52	
SEQIDNO:7	-----MARAAG-VCWTLMLGCVFA-AHAVTFEVTDGN--STCIKGELNASFSISYNTTN	50	
SEQIDNO:8	-MSWRQVKMPVYWMAMVLLIGVVQ-VATAVQFEVKDGKTNITCILADLSINFSVSYNVSS	58	
SEQIDNO:9	MAAPGSARRPLLLLLLLLLLGLVH-CASAAMFMVKNGN-GTACIMANFSAAFSVNYDTKS	58	
SEQIDNO:10	MAAPGSARRSLLL-LLLLLLGLIH-CASAAMFIVKNGN-GTACIMANFSAAFSVNYDTKS	57	
SEQIDNO:11	MAAFGGARRRPL--LLLLLAGLVH--GAAAVFVVKDAN-GTACIMANFSAAFSLASYETRS	55	
SEQIDNO:12	MEAPGGARRRPLLL--LLLGLVH--GASAVFVVRNSN-GTACIMANFSAFVSVIYESKS	54	
SEQIDNO:13	MAAPGGARRRPLLL--LLFAGLVH--GASAVFVVKNGN-GTACIMADFSATFLTSYDTRS	55	
SEQIDNO:14	MAAPGAR-RPLL---LLLLAGLAH--SAPALFEVKDNN-GTACIMASFSASFLTYYDAGH	53	
SEQIDNO:15	-----MGGAA--RAVLLGFL--QASSSFDVRDST-GKVCIIANLTVAFSVEYKSSG	46	
SEQIDNO:16	MAAPGGAWRRPLLLL-LLLLGLAR--GASAVFVSDGN-GTACIMADFAAAFEISYDSRS	56	
SEQIDNO:17	MAEPGGARTPQRL--LLLGLIH--VASSIFVVKNGT-GTACIMANFSATFSSNYDTKS	55	
SEQIDNO:18	-----MARALL--AAVLLGFL--QASSSFDVRDST-GKVCIIANLTVAFSVEYKSNG	47	
SEQIDNO:19	-----MARGLLA--AAALLGFL--QASSSFEVKDSS-GKVCIIADLTVAFSVEYKTNV	48	
SEQIDNO:20	MVSSSSCRRLLL--AAVLLGFL--QASSTFEVRDST-GKICILANFSAEFTVDYSTKA	54	
SEQIDNO:21	MKSFPSPVALFI-VCSAVLADT---QAVVTLEVKEGN--STCIKAESAVFSITYNTTN	53	
SEQIDNO:22	MKRSHALVVL-I-IAWFSLSGC----IQAVSLEVKEGN--STCIKANLSAYFSITYNTSS	52	
SEQIDNO:23	MTRTCPFVVG-I-AC-FAILGCVTVVQSQVTLLEVTEGN--STCIKAELSASFSITYDTAN	55	
SEQIDNO:24	-----	0	

## LAMP同源结构域1

		2	
SEQIDNO:1	GPKNMTFDLPDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGH--TLTLNFTRNATRYSVQIM	116	
SEQIDNO:6	GSQIVNISLPASAEVLKNGSSCGKENVSDPSLTITFGRGY--LLTLNFTKNTRYSVQHM	110	
SEQIDNO:7	GTSVSVFALPASASVSE-RSSCGS-AAVPPELALVFGDTHHTLSLLFSRDQRLRYVSN	108	
SEQIDNO:8	KMELATFVLPSEAVTNINKSSCGVENTTAPVLAIQFGSNH--SLSIHFARNNTRYEVAEL	116	
SEQIDNO:9	GPKNMTFDLPDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGH--TLTLNFTRNATRYSVQIM	116	
SEQIDNO:10	GPKNMTFDLPDAKVVNLSSSCGKENTSDPSLVIAFGRGQ--TLTLNFTRNATRYSVQIM	115	
SEQIDNO:11	GPKNMTFDLPDA--VVLNSSSCGKENTSDPSLMIAFGKGH--GLTLNFTRNATRYSVQIM	112	
SEQIDNO:12	GYKNASFELPATA-EVQNTSSCGRENTSNPSLQIAFGRGH--VLALNFTRNATLYSVPLL	111	
SEQIDNO:13	GPQNKSFELPAGA-EVSNSSSCGKENASDSSLVITFGRGH--TLTLNFTRNATRYEVQIM	112	
SEQIDNO:14	VSKVSNMTLPASAEVLKNSSSCGEKNASEPTLAITFGEY--LLKLTFTKNTRYSVQHM	111	
SEQIDNO:15	QKQFAHFFLPQNATSQ-SHSSCGEGNTSHPILALSFGAGH--LISLNFSTLDKYQVEEL	103	
SEQIDNO:16	GAKNTTFLPASA-QVLNSSSCGKENTSDSSLVIAFGRGH--TLTLNFTRNATRYSVQIM	113	
SEQIDNO:17	GLESTTFRLPQNA-SVMNSSSCGKENTSNPILEIGFGGGH--TLTMNFSSTTQSYQVELL	112	
SEQIDNO:18	QKQFAHFFLPQNATSQ-SHSSCGEGNTSHPILALSFGAGH--LISLNFSTLDKYQVEEL	104	
SEQIDNO:19	QKEFVHFFLPQNASVD-SQSSCGKDNASHPILVLDFGGGH--SLSLNFSEADKYQVEEL	105	
SEQIDNO:20	KVERKTFQLPSSAHINKESSCGKEKETSQVLVVEFGTGN--SLTFTFEKSNDFYHVSNL	112	
SEQIDNO:21	DTRTVSVFLPNSTTVDSANSSCGS-NGSTPGLMAKFGPGH--YFGMNFSTNGSLYSVDTL	110	
SEQIDNO:22	STRTAQFILPDSATVPDPSSTCGG-NGSSPWLVAVFAGH--ALGLGFSTNGSFYSVANL	109	
SEQIDNO:23	GTRTMVPLPGSAVVG-ASSCGG-DGRSPWLVALFGDGH--ALGLGFSSNDSLYSVAKL	111	
SEQIDNO:24	-----	0	

图3

## LAMP同源结构域1

	3	
SEQIDNO:1	SFVYNLSDETHLFPNASSK-EIKT-VESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNN-VTVTLHDA	173
SEQIDNO:6	YFTYNLSDTEHFFNAISK-EIYT-MDSTTDIKADINKAYRCVSDIRVYMKN-VTVVLRLDA	167
SEQIDNO:7	SLQYNLSDGDIFFQSSSAGVQSVMASVSELSARLNSTYRCVSSSSI SLSAAVNLTLSGV	168
SEQIDNO:8	VMSYNLSDKIIFFNASENGTKTV-STNKTAVLAENDTVYKCMNPHLIRMDN-ANATFHD	174
SEQIDNO:9	SFVYNLSDTHLFPNASSK-EIKT-VESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNN-VTVTLHDA	173
SEQIDNO:10	SFVYNLSDTHLFPNASSK-EIKT-VESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNN-VTVTLHDA	172
SEQIDNO:11	SFIYNLSDTQIFPNASSK-ETKT-VESATDIRADINKKYRCVSNITQIHMHN-VTVTFHDV	169
SEQIDNO:12	SFVYNLSDSDLPNASSK-DIKT-VGSTTDIKADIDKRYRCVSDSKVPMGN-VTVTLQDA	168
SEQIDNO:13	RFAYNLSDTDTFPNSSST-GVKT-VESATDIKADINKTYRCVSETQVNMDN-VTVTLRDA	169
SEQIDNO:14	YFTYNLSDTQFFPNASSK-GPDT-VDSTTDIKADINKTYRCVSDIRVYMKN-VTVLWDA	168
SEQIDNO:15	TFHYNLSDETLFPNATEG-KVMV-ATQKSVIQAIRIGTEYRCINSKYVRMKH-VNITFSNV	160
SEQIDNO:16	TLVYNLSDAEFFPSASSK-GTKT-VAASDIRADLNTKYRCVSNQVHLLN-VTVTLGNA	170
SEQIDNO:17	SFSYNLSDATLFPNASKGSEESS-VKSKTDIQADIHKKYRCVSSNRITMSN-VTVLSDV	170
SEQIDNO:18	TFHYNLSDETLFPNASEG-KVME-VTQKSVIQAIRIGTEYRCINSKYIYIRH-VNITFSNV	161
SEQIDNO:19	VFHYNLSDATLFPNSSTG-GMKT-VSHKSIIQAHMGTQYRCINSKHINMKH-VNITFSNV	162
SEQIDNO:20	TFSYNLSDSSFFPNSSG--GQRE-VSRAGDIQANINTTYRCRSNHRVNMN-VTVLFSNV	168
SEQIDNO:21	FLRYNLSDASLFPANSSGPVDFELASVGIWAPTNTTYRCLSPPTITITR-PSVTFSEM	169
SEQIDNO:22	TLQYNLSDASVFPDANSSGVVTV-VSSSVGIWAAVNTTYRCLSSVLFQVGG-ATVTFSDM	167
SEQIDNO:23	TLQYNLSDVSNFPEANSTDVVTVE-TTSSVGMVARVNTTYRCISASPVIVGG-ATVTFSDV	169
SEQIDNO:24	-----	0

## LAMP同源结构域1

## 铰链区

	4	
SEQIDNO:1	TIQAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSPPTAPPAP-----PSP-SP---SPVPKSPS	218
SEQIDNO:6	TIQAYLSSGNFSKEETHCTQDGPSTTGP-----PSP-SP---PLVPTNPT	209
SEQIDNO:7	QMEAYMSSANLSADESVCSADQPSTTVAPPPSTT-----TSPPPIPPVPE	213
SEQIDNO:8	RLEAYLKQSNFSQKVSTCSEDTPTSAFA-PV--T-----T-----TAPVPAP-VPDPP	219
SEQIDNO:9	TIQAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSPPTAPPAP-----PSP-SP---SPVPESPS	218
SEQIDNO:10	TIQAYLSNSSFSREETRCEQDRPSPPTAPPAP-----PSP-SP---SPVPESPS	217
SEQIDNO:11	TIQAYLANSNFSKEETRCEQDGFPTTAPPPP-----PHP-SP---SPAPESPS	214
SEQIDNO:12	TIQAYLWNNFSQAESRCRQDMPSTTAPPAPFVP-----PSPSP-SP---PPKPESPS	219
SEQIDNO:13	AIQAYLSSSNFSREETRCEQDLPT-----P-----TTPPQP-AP---TPAPASPA	210
SEQIDNO:14	TIQAYLPSSNFSKEETRCPPQDQPSPTTGP-----PSP-SP---PLVPTNPS	210
SEQIDNO:15	TLEAYPTNDTFSANKTECREDMVSTTTVAPTTPKH-----ATSQVPTTSPAPTAAPSSPA	215
SEQIDNO:16	TIQAYLANNSFSQQETRCEQDKPSP-----PTP-----TAPPTP-TP---TPAPTSVP	214
SEQIDNO:17	TIQAYLSNNTFSKEETRCSDTPSPSPVPTTHPTT-----IPVPTP-TPTRPPTPAEIPP	224
SEQIDNO:18	TLEAYPTNGTFTSNKTECEDMVSTTTVAPTTPKH-----ITSQVPATSPAPTAAPSNA	216
SEQIDNO:19	TLEAYLTNGTSLVNKTECAEDRVSTTMVPTTPKQ-----TTSQSPTTGPAPTS-PPNPT	216
SEQIDNO:20	TLEAYLPNNAFSKNDVCAEDKTSTVA--PPITTH-----IPTTSLAPPT-PPPTDTPK	220
SEQIDNO:21	KLEAYMPGNDFSPAERVCAADQTTGAPTTH-----SAATP-TT-PSPTPAGTPE	218
SEQIDNO:22	RLEAYMPGNDLSPRESFCAADQTTTAPPTTTAAP----TTTAATTM-AP-PAPTTPPGTPV	221
SEQIDNO:23	TMEAFMTGEDLSPNESVCTADQSFTTAPPPPPS-----TTTAA-PA-PVPTPPGTPS	219
SEQIDNO:24	-----MVQICRVQSWFVGVTPLLI FATVLHQGFATVAP-PTPAPHKEPGRPE	46

\* ; \*

图3续

## 铰链

## LAMP同源结构域2

	1	2	
SEQIDNO:1	VDKYNVSGTNGT-CLLASMGQLNLITYE-RKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTL		276
SEQIDNO:6	VSKYNVTGNNGT-CLLASMGQLNLITYL-KKDNKTVTRAFNISPNDT-SSGSCGINLVTL		266
SEQIDNO:7	RGNYSVTDGNGTVCVLALMGQLNITHY- TTQNSVSELMNLQPNQTTVSGSCGVTESSL		272
SEQIDNO:8	VVQYSVNRSEF-CLLAKVGLQMNITYT-TKDGNKGSYVFNIESKGVTVDGNCTNTTAYL		277
SEQIDNO:9	VDKYNVSGTNGT-CLLASMGQLNLITYE-RKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTL		276
SEQIDNO:10	VDKYNVSGTNGT-CLLASMGQLNLITYE-RKDNTTVTRLLNINPNKTLASGSCGAHLVTL		275
SEQIDNO:11	VHKYNVSGANGT-CLLASMGQLNLITYK-KKDNTTVVKVVSINPNKTTAGGSCGAQLVTL		272
SEQIDNO:12	VSRYNVSDGNAT-CLLASMGQLNLITYV-HRDNATVTRVFNINPNKTKPSGHCGAQQVTL		277
SEQIDNO:13	VFRYNVSGSNGT-CLLASMGQLNLITYR-RVDNKTVTREFNVNPNKTTFGGNCSTLTL		268
SEQIDNO:14	VSKYNVTGDNNGT-CLLASMGQLNITYM-KKDNTTVTRAFNINPSDK-YSGTCSGAQLVTL		267
SEQIDNO:15	VGKYNVTGANGT-CVLASMGQLNITYV-KKDEKMGDLNLFPHNTSASGMCESTSAFL		273
SEQIDNO:16	VSRYNVSGANGT-CLLASMGQLNLITYR-TKDNTTVTRGLNINPNKTTFGGSCSAQLVTL		272
SEQIDNO:17	IFKYNVSDANGT-CLLASMGQLNLITYA-KKDNSSARIWNINPNKTVAGGSCSPQVAIL		282
SEQIDNO:18	VGKYNVTGANGT-CVLASMGQLNITYL-KKDGTGLDLLNFVPHNTNASGTCENTSAFL		274
SEQIDNO:19	VGKYNVTGPNGT-CVLAYMGQLNITYQ-QKDEKMGDLNLFVPHNTTSSGRCDNTSALL		274
SEQIDNO:20	IGRYNVTGLHGI-CLLATMGQLQNVNITYS-TKNKTSKSELNLPPTAEVSGTCENSITL		277
SEQIDNO:21	QGSYSVKNASGTVCCLMAKMGVQLNVSYFSQSQNKTQVELNLTNLTSSSGLCGGTNATL		278
SEQIDNO:22	RGTYSVVNGNDTCLLAQMGQLNVSYFSRSQNKTQSLVNLTNLTNLTSSGCEKGSATL		281
SEQIDNO:23	QGSYSVSNSNGTVCCLLARMALQNLISHFSASQNKTIQEVNLLPNQTTSSGSCDPTSATL		279
SEQIDNO:24	RGYYNVTNHNGTICLMAYMGQLNISYNSTSQKKVVQDVMNLQPNLTKHSGLCDSDIASL		106
	*,*           *::* :::*::*::*           :	..           * *           *	

## LAMP同源结构域2

SEQIDNO:1	ELHS-EGTTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTILP-DARDPAFKAANGSLRALQATVGN	334
SEQIDNO:6	KVEN-K-NRALELQFGMNASSSLFFLQGVRLNMTLP-DALVPTFSISNHSKALQATVGN	323
SEQIDNO:7	RLSD--ETTNTLTFSTMTNSTQKYLSAVSVSALWP-DMS-VVFEAGNTSLSALQCSVGR	328
SEQIDNO:8	SLST-GS-IDLRFNFTLNSSLEVFLDGVSLSTGLPADANDTHFEAANSSLNMQTNVHK	335
SEQIDNO:9	ELHS-EGSTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTTLP-DARDPAFKAANGSLRALQATVGN	334
SEQIDNO:10	ELHS-EGSTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTTLP-DARDPAFKAANSSLRALQATVGN	333
SEQIDNO:11	ELRS-ESVTLLAFQFGMNASTSRFFLQGIQLNMTLP-DARDPTFKAGNNSLRALQATIGN	330
SEQIDNO:12	ELQS-ERSTVLVFQFGMNASSGQYFLQGVLLNTTLP-DAREPAFSASNSSLRALQATLGN	335
SEQIDNO:13	ELHS-ENLLLLALQFVMNESSSRVFLQGVQLNLTLP-DAKEGSFTATNSSLRALQATAGN	326
SEQIDNO:14	KVGN-K-SRVLELQFGMNATSSSLFFLQGVQLNMTLP-DAIEPTFSTSNYSKALQASVGN	324
SEQIDNO:15	NLAF-EK-TKITFHFVLNASSEKFFLQGVNVSTTLPSEAKAPTFEASNDMSSESRAVGN	331
SEQIDNO:16	ELQG-ESLRLALQFALNTSSSRVFLQGVQLNMTLP-DARDPSFSAANSSLRALQATAGN	330
SEQIDNO:17	ELQT-EN-STLAFSFGMNATTSKFFLREIRFHKFFP-DAKDPAFGAVNSSKELQATVGN	339
SEQIDNO:18	NLAF-EK-TKITFHFVLNASSEKFFLQGVNVSTTLPSEAKAPMFEASNDMSSELRAVGN	332
SEQIDNO:19	NLTF-EK-TRVIFQFALNATAEKFFLQGVSVSTTLPSEAKNPKFEATNNSMSELRAVGN	332
SEQIDNO:20	NLTS-ES-TSLSFQFSQNTSTEKYFLQGIIVTANLPPEATEKNISYSNHTLNALKTSVGK	335
SEQIDNO:21	VLAQ-EETTVLSFLFTVNSTSNKYHLSGITLQANWT-DMM-SPFSASNTSLDYLRSSLGH	335
SEQIDNO:22	ILTQ-Q-TTILIFTFSLNSTSSKYHLSGLSLQANWS-DMA-AAFSASNASLSYLRSTFGH	337
SEQIDNO:23	VLTQ-ANATNLSFLFTLNSTSNRYHLTGLSVVAWS-DMT-APFNTSNSSLDYQRGSLGR	336
SEQIDNO:24	NLTVDVAKTNLTFVFTMNSTSNKYHLSVTVSAAWP-EMK-EPVSVHNSSLDYLRGTVG	164
	:	: : * * : , * : , : , * : : :

图3续

## LAMP同源结构域2

## 跨膜结构域

	3	4	
SEQIDNO:1	SYKCNAAEEHVRVTKAFSVNIFKVVVQAFKVEGGQFGSVVEECLLDENSMLIPIAVGGALAG		394
SEQIDNO:6	SYKCNTEEHIFVSKMLSLNVFSVQVQAFKVDSDRFGSVVEECVQDGNMMLIPIAVGGALAG		383
SEQIDNO:7	SYVCSAQQMLSVTPVFSINTFRLQLQFPFNITANRFSTAEECRVDQENMLIPIIIVGAALAG		388
SEQIDNO:8	SFKCNSKQTLQITDPFTVNTYHLQVQAFNSD-NTFASAVECSLDENGMLVPIVVGALAG		394
SEQIDNO:9	SYKCNAAEEHVRVTKAFSVNIFKVVVQAFKVEGGQFGSVVEECVLDENNMLIPIAVGGALAG		394
SEQIDNO:10	SYKCNAAEEHVRVTKAFSVNIFKVVVQAFKVEGGQFGSVVEECLLDENNMLIPIAVGGALAG		393
SEQIDNO:11	SYKCNAGEHVQVTEAFSVNIIKVVVQAFQVQGDKFGSVVEECQLDENSMMLIPIAVGGALAG		390
SEQIDNO:12	SYKCNSEEHVRVTPAFSLSIKVVVQAFQVKGDKFGSVVEECLLDQDSMLIPIAVGGALAG		395
SEQIDNO:13	SYKCNAEQRLRVTSFSLNMFVWLQAFRVGDGDKFGPVEECQLDENSMMLIPIAVGGALAG		386
SEQIDNO:14	SYKCNSEEHIFVSKALALNVFSVQVQAFRVESDRFGSVVEECVQDGNMMLIPIAVGGALAG		384
SEQIDNO:15	SYKCSAEENFQVTDKALVNVFNQVQAFKVDGDKFGAMEECQLDENNMLIPIIIVGAALAG		391
SEQIDNO:16	SYKCRSEQRLQVTEAFALNVFQVRVQAFRVGDGDKFGPAEECQLDENSMMLIPIAVGGALAG		390
SEQIDNO:17	SYKCNAEENVHVTDFGSVNI FRVRVQAFKVEGDKFGSVVEECLLDENNMLIPIAVGGALAG		399
SEQIDNO:18	SYKCSAEENLQVTDKALVNVFNQVQAFKVDGDKFGAVEECQLDENNMLIPIIIVGAALAG		392
SEQIDNO:19	SYKCSSEENLQVTDQALVNVFNQVQVQIFKIDGDKFGPVEECQLDENNMLIPIIIVGAALAG		392
SEQIDNO:20	SYKCAEESIWI SGKAAVNIFNIQLQAFKIPGDKFGAVEECQLDENNMLIPIIIVGAALAG		395
SEQIDNO:21	SYMCNAEQTLFVVSTF SINMFELQVQFFGVTSTQFASA EVCQIDQDQMLIPIIIVGAALAG		395
SEQIDNO:22	SYMCNAEQILAVTPVFS LNTFSLQIQFFGVT TNQFAAAEECQMDQDQMLIPIIIVGASLAG		397
SEQIDNO:23	SYMCISEQTLVVDQNFSLNTFQLQVQFFGITRGQFAQAEECQLDQDNMLIPIVVGALAG		396
SEQIDNO:24	SYFCRDEQTLNVAQNLSINTFQLQVQFFAVKGDQFGAAEECQLDEDDMLIPIVVGALAG		224
	*: * : . : : . : : * * * . * * : ** : ** : **		

## 胞质尾区

SEQIDNO:1	LVLIVLIAYLIVGRKRSHAGYQTI	417
SEQIDNO:6	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	406
SEQIDNO:7	LVLIVLVAYLIGRKRTHAGYQTI	411
SEQIDNO:8	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	417
SEQIDNO:9	LVLIVLIAYLIVGRKRSHAGYQTI	417
SEQIDNO:10	LVLIVLIAYLIVGRKRSHAGYQT-	415
SEQIDNO:11	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	413
SEQIDNO:12	LVLVVLIAYLIGRKRSHAGYQT-	417
SEQIDNO:13	LVLIVLLAYLIGRKRSHAGYQTI	409
SEQIDNO:14	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	407
SEQIDNO:15	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	414
SEQIDNO:16	LVLVVLMAYLIVGRKRSHAGYQTI	413
SEQIDNO:17	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	422
SEQIDNO:18	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	415
SEQIDNO:19	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	415
SEQIDNO:20	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	418
SEQIDNO:21	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	418
SEQIDNO:22	LVLIVLIAYLIGRKKSHAGYQTI	420
SEQIDNO:23	LVLIVLIAYLIGRKRSHAGYQTI	419
SEQIDNO:24	LVVIVLLAYLIGRKRSHAGYQSI	247
	** : ** : ** : ** : ** : ** :	

图3续



LAMP-1					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_005552.3	智人 ( <i>H. sapiens</i> )	1	NP_990614.1	原鸡 ( <i>G. gallus</i> )	15
NP_034814.2	小鼠 ( <i>M. musculus</i> )	6	NP_001011507.1	野猪 ( <i>S. scrofa</i> )	16
NP_955996.1	斑马鱼 ( <i>D. rerio</i> )	7	XP_001374132.1	短尾负鼠 ( <i>M. domestica</i> )	17
NP_001087042.1	非洲爪蟾 ( <i>X. laevis</i> )	8	XP_003203252.1	火鸡 ( <i>M. gallopavo</i> )	18
NP_001233491.1	黑猩猩 ( <i>P. troglodytes</i> )	9	XP_002191607.2	斑胸草雀 ( <i>T. guttate</i> )	19
XP_001087801.1	猕猴 ( <i>M. mulatta</i> )	10	XP_003218797.1	变色蜥 ( <i>A. carolinensis</i> )	20
XP_534193.2	家犬 ( <i>C. lupus familiaris</i> )	11	XP_004067118.1	青鳉 ( <i>O. latipes</i> )	21
XP_002723509.1	家兔 ( <i>O. cuniculus</i> )	12	XP_003969941.1	红鳍东方鲀 ( <i>T. rubripes</i> )	22
NP_001068592.1	家牛 ( <i>B. taurus</i> )	13	NP_001158846.1	安大略鲑 ( <i>S. salar</i> )	23
NP_036989.1	褐家鼠 ( <i>R. norvegicus</i> )	14	XP_003452974.1	罗非鱼 ( <i>O. niloticus</i> )	24

图3续



## 人类LAMP-2与直系同源序列的比对

SEQIDNO: 2	-----	0
SEQIDNO: 25	-----	0
SEQIDNO: 26	-----	0
SEQIDNO: 27	-----	0
SEQIDNO: 28	-----	0
SEQIDNO: 29	-----	0
SEQIDNO: 30	-----	0
SEQIDNO: 31	-----	0
SEQIDNO: 32	-----	0
SEQIDNO: 33	-----	0
SEQIDNO: 34	-----	0
SEQIDNO: 35	-----	0
SEQIDNO: 36	-----	0
SEQIDNO: 37	MAMKNFTLQQERDTSVALIIRTYVRAFLKVYTKVPKPQRCHNQW---QSLNIEGIEGIEI	57
SEQIDNO: 38	-----	0
SEQIDNO: 39	-----MECREGEVTRCKQKNNLFSGIN-DDISGAKQ	30
SEQIDNO: 40	-----	0
SEQIDNO: 41	-----	0
SEQIDNO: 42	-----	0
SEQIDNO: 43	-----	0

SEQIDNO: 2	-----	0
SEQIDNO: 25	-----	0
SEQIDNO: 26	-----	0
SEQIDNO: 27	-----	0
SEQIDNO: 28	-----	0
SEQIDNO: 29	-----	0
SEQIDNO: 30	-----	0
SEQIDNO: 31	-----	0
SEQIDNO: 32	-----	0
SEQIDNO: 33	-----	0
SEQIDNO: 34	-----	0
SEQIDNO: 35	-----	0
SEQIDNO: 36	-----	0
SEQIDNO: 37	VKGSKWR--SALETIITIIVKVRK-----SQVQKYHPFSLHSECQKTNQE	99
SEQIDNO: 38	-----	0
SEQIDNO: 39	AKQRQCTPQKPPKRATATLPLQRPPRGIPGPAPAAVAAVAADRITPSGSHQTRPPEAR	90
SEQIDNO: 40	-----	0
SEQIDNO: 41	-----	0
SEQIDNO: 42	-----	0
SEQIDNO: 43	-----	0

图4

SEQIDNO:2	-----MVCF	4
SEQIDNO:25	-----M	1
SEQIDNO:26	-----MGDT	4
SEQIDNO:27	-----	0
SEQIDNO:28	-----MVCF	4
SEQIDNO:29	-----MVCF	4
SEQIDNO:30	-----MVCF	4
SEQIDNO:31	-----MVCF	4
SEQIDNO:32	-----MVCF	4
SEQIDNO:33	-----MVCF	4
SEQIDNO:34	-----MVCF	4
SEQIDNO:35	-----MVCF	4
SEQIDNO:36	-----MR	2
SEQIDNO:37	G---TGGVATVIADECLLWPSIPFSTLAQKVNLSCEAFSIIIGYSVFALFIYLPKNMLDF	156
SEQIDNO:38	-----	0
SEQIDNO:39	DERPVRDPRNRAAAPSGHWRRAGGPQFHR-----HHR-----HRRHGPAPLRR	133
SEQIDNO:40	-----	0
SEQIDNO:41	-----	0
SEQIDNO:42	-----	0
SEQIDNO:43	-----	0

## 信号序列

## LAMP同源结构域1

1

SEQIDNO:2	-RL---FPVPGSGLVLVCLVLGAVR--SYALELNLTDSSENATCLYAKWQMNFTVRYETT	57
SEQIDNO:25	-CL---SPVKGAKLILIFLFLGAVQ--SNALIVNLTDS-KGTCLYAEWEMNFTITYETT	53
SEQIDNO:26	GAM--ERCACPAAVLLLSLVL---MG--ATAFEVEIKDDKNATCIYAKLSVNITVQYETD	57
SEQIDNO:27	-----MAVRGFLPLLFIILLSGIVHADDMMTSPLPS-----TAEIK	35
SEQIDNO:28	-RL---FPVPGSGLVLVCLVLGAVQ--SYALELNLTDSGKATCLYAKWQMNFTVRYETT	57
SEQIDNO:29	-RL---FPVPGSGLVLVCLVLGAVQ--SYALELNLTDSGKATCLYAKWQMNFTVRYETT	57
SEQIDNO:30	-RL---FPVPGSGLVLVCLVLGAVR--SHALELNLEADSAIN-----	39
SEQIDNO:31	-RL---SPAPGSGLVLLCLVLGAVS--SYALEVNVTDSSEKATCLYAKWQMNFTIQYNTT	57
SEQIDNO:32	-RL---SPVPGSGLVLLCLVLGAVS--SYALELNLTDSSEKALCLYAKWQMNFTIPYETT	57
SEQIDNO:33	-RL---APVPGSGFLLLCVLGAVS--SYALELNLTDSSEKATCLYAKWQMNFTIRYETT	57
SEQIDNO:34	-RL---SPVPGSGLLMLCLVLGAVS--SYALELNLTNSEKATCLYAKWQMNFTIRYETT	57
SEQIDNO:35	-RL---APVPGCGFLLFCLVLGTVS--SYALELNLTDSSEKATCLYAKWQMNFTIRYETT	57
SEQIDNO:36	-LL---SPVTGSKLVLLFLFLGAVR--SDALKLNLTDS-KGTCLYAEWEMNFTITYEAL	54
SEQIDNO:37	IELAELMLSTETQLLEPTRVCCGICQ--SYALELNLTDSKNATCLYSKWQMTFTINYETT	214
SEQIDNO:38	--MAPPRCPAGLALLLLLLGACGFFQ--SYAVEVDVKDASNFTCLYAKWQMMKFLIKYETN	56
SEQIDNO:39	LLLRPPP-PAA-----AAARFLGFFQ--SYAVEVDIKDASNATCLYADWMMRFLIKYESN	185
SEQIDNO:40	--M--ERCACPAALLLSLVL---MG--AMAFDVEIKDDKNATCIYAKLSVNITVQYETN	51
SEQIDNO:41	-----MF-RCAFLILFLALGNEHLHSHGTEVSVNNTENKLCYANLMVNFVSVTYEVG	51
SEQIDNO:42	-----MKVSHATAGLVVWFVVLGCIDAVT----L-EVKESNTTCIKADLSASFIIYNTT	50
SEQIDNO:43	-----	0

图4续

## LAMP同源结构域1

	2	
SEQIDNO: 2	NKTYKTVTISDH GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS WIANFTKAA STYSI	111
SEQIDNO: 25	NQTNKTITIAVP--DKATHDGSSCGDDRNSAKIMI QFGFAVS-WAVNFTKEA---SHYSI	107
SEQIDNO: 26	TSSSKNITFPVP--SDVTYNGSSCGSDGKAPLLVINFGNSQS-WSLNFTTRNN---STYSG	111
SEQIDNO: 27	---T---ANLP--LVIQTTSSTTSTTT-SRP--SSTSTHSTLTTEPAA-----	73
SEQIDNO: 28	NKTYKTVTISDR--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFSKAA---STYSI	111
SEQIDNO: 29	NKTYKTVTISDR--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFSKAA---STYSI	111
SEQIDNO: 30	CSKCKTVTISDH--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFTKAA---STYSI	93
SEQIDNO: 31	SKNFKTATISDF--STATYNGSVCNDQNNPKIVVQFGSGFS-WIVNFTKKE---SAYLI	111
SEQIDNO: 32	SKSYKTVTISNF--GTPTYNGSICGDNQNGSRIAVQFGSGFS-WIVNFTKSV---SVYSI	111
SEQIDNO: 33	DKHNKTVPISDL--GAATYNGSFCGDDQNGPKIAVQFGSGFS-WIVNFTKEAASPSTYLV	114
SEQIDNO: 34	NNSHKTVSISDF--GAATYNGSFCGDDHNDPQIVMQFGSGFS-WIVNFAKES---SSYLI	111
SEQIDNO: 35	DKHNKTVTISDF--DAAAYNGSVCGDDQNGPKIAVQFGSGFS-WIVNFTKEASSTSTYLV	114
SEQIDNO: 36	K-VNETVTITVP--DKVTYNGSSCGDDKNGAKIMI QYGSTLS-WAVNFTKEA---SQYFI	107
SEQIDNO: 37	GNETKNVTITVP--ENVTYDSSCGDNQTVPQIAVQFGLGYS-WHLNFTKKEN--NSYSF	269
SEQIDNO: 38	SSDYKNASLDLT--STVTHNGSICGSDTQAALLAVQFGDGHS-WSINFTKNN---ETYRA	110
SEQIDNO: 39	SGDYKTTTLNLS--SSVTHNGSVCNDTQAALVAVQFGEHGS-WSINITKNN---ETYQG	239
SEQIDNO: 40	TSSTKNVTFSVP--SEVTYNGSSCGSNGKAPILVINFGNGHS-WSLNFTTRND---SMYSG	105
SEQIDNO: 41	VNKNETVIFVLP--ENVTTTGSTCDNTTSTLKL--SFGHGHS-WTVEFTKKN---KTYQV	103
SEQIDNO: 42	HAER-TVQVLLPNSTTVDTANSTCGKDGSSPRLVAVFGSGY-TLGLNFSTNG---TLYQV	105
SEQIDNO: 43	-----	0

## LAMP同源结构域1

	3	
SEQIDNO: 2	DSVSFSYNTGDNTTFPDAEDKGI-LTVDELLAIRIPLNDFRCNSLSTLEKNDVVQHYWD	170
SEQIDNO: 25	HDIVLSYNTSDSTVFPGAVAKGV-HTVKNPENFKVPLDVIFKCNVLTYNLTPVQKYWG	166
SEQIDNO: 26	SALIFTYNTNDTILFPDALRKLIS-STAMFLGPVPLNSTYKICISREVVSENVQI IYD	170
SEQIDNO: 27	-----KTTTARTTVTTSA---PTSTQSTSSSSTSATVTTLAP	107
SEQIDNO: 28	DSISFSYNTGDNTTFPDAEDKGI-ITVDELLAIKIPLNDFRCNSLSTLEKNDVVQNYWD	170
SEQIDNO: 29	DSISFSYNTGDNTTFPDAEDKGI-ITVDELLAIKIPLNDFRCNSLSTLEKNDVVQNYWD	170
SEQIDNO: 30	DSISFSYNTGDNTTFPDAEDKGI-LTVDELLAIKIPLNDFRCNSLSTLEKNDVVQHYWD	152
SEQIDNO: 31	DSISFSYNLSDNATFPDAKEKGI-LTVHDLVGFRIPLNNIFRCNSLSTLEKNGVVQYYWD	170
SEQIDNO: 32	DSISFSYNTGDNTTFPDAKDKGI-LTVNESVAFKIPLNDFRCNSLSSLVKNGVVQNYWD	170
SEQIDNO: 33	DTISFSYNTDNKTFPDAKEKEV-FTVNNRVALKIPLNDFRCNSLSTLENRDVVQHYWD	173
SEQIDNO: 34	NSISFSYNTSDTTTFPDAKKGV-LTVNDSVGFQVPLNDFRCNSLSTLEKNDVVQHYWD	170
SEQIDNO: 35	DSISFSYNTDNATFPDAKEKGV-FTVNNRVALKIPLNDFRCNSLSTLEKSDVVQHYWD	173
SEQIDNO: 36	NNITLSYNTNDTKTFPGAVPKGI-LTVIIPVGSQPLPLGVIFKCSSVLTFNLSPPVQHYWG	166
SEQIDNO: 37	DTIVFTYNTSDNETFPPEAKEKGQVLSVFEFYRIPLNKIFRCHSEESLIGDKATHHYWE	329
SEQIDNO: 38	EFITFTYNTNDTAVFPDARRQGPVITVVKDAMHPIQLNNVFVCHHTTSLEAENVQTQIFWN	170
SEQIDNO: 39	DFITLTNTNDTAVFPDAKRKGPITVLVRDPSRPIQLNTVFVCHNSFVIEAENTTQIFWN	299
SEQIDNO: 40	GALIFTYNTNDSTLFPDALKEGLIS-STAAFLGPIPLNSTYKICISSEVVVSENVQTQIISD	164
SEQIDNO: 41	DTIVFSYNLNDSSVFPNSTSKETKFVTVKSIITNVSDTYYSCKSENVLTVESVIQTLVD	163
SEQIDNO: 42	SSLTLQYNLSDTSVFPNATISGVVTLVSASVGIEANVNNTYKASPTVIDVATAKVNFTD	165
SEQIDNO: 43	-----MTQIGGVQPVFLA	13

图4续

LAMP同源结构域1		4	铰链区
SEQIDNO:2	VLVQAFVQNGTVSTNEFLCDK	KTS---TVAPTIHTTVPS-----PTTTPT--PKEKPE	219
SEQIDNO:25	IHLQAFVQNGTVSKNEQVCEEDQTF	--TTVAPIIHTTAPSTTTTLTPTSTPTPTPTPTPT	224
SEQIDNO:26	VKLEAFMANGTLGK-EIICDADKPS	--PVPSPTQPST-----TASTAIPAPTSKPLDKPT	222
SEQIDNO:27	TTTGHNTTNSTTEPPTTGHNTTNS	--TTDAPTTHHTNAT----VAPTPPPTTPSVPKPT	161
SEQIDNO:28	VLVQAFVQNGTVSTNEFLCDEDKTS	---TVAPTIHTTVPS-----PTTTPT--PKEKPE	219
SEQIDNO:29	VLVQAFVQNGTVSTNEFLCDEDKTS	---TVAPTIHTTVPS-----PTTTPT--PKEKPE	219
SEQIDNO:30	VLVQAFVQNGTVSTNEFLCDKDKTS	---TVAPTIVHTTVPS-----PTTTPT--RIP---	198
SEQIDNO:31	VHVQAFVQNGTVSTKEFLCEKDKTS	--TTVVPTISTTTTPS-----PTTTPT--PKEKPE	220
SEQIDNO:32	VHVQAFVQNGTVSTNEYLCEDNTT	--TTVAPIVPTTVPSPTTTSSPTTTTPS--PKEKPD	226
SEQIDNO:33	VHVQAFVQNGTVSTTEFLCDKDKTV	--TTAVFIVPTTLPS-----PT-----KPV	216
SEQIDNO:34	VHVQAFVQNGTVSTKEFLCDKDKTL	--TTTVFVIPTSVPS-----PTTTPT--PKEKPE	220
SEQIDNO:35	VHVQAFVQNGTVSTTEFLCDKDKTV	--TTAMFIVPTTAPS-----PT-----KPV	216
SEQIDNO:36	IHLQAFVQNGTVSKHEQVCKEDKTA	--TTVAPIIHTTVPSPTTTTLTPTSI----PVPTPT	220
SEQIDNO:37	TVVQAFIQNGTISKKEFICSKDRAS	--TTVAPVTTQVPS-----TTATVPQDKPY	379
SEQIDNO:38	VTMQPFVQNGTISKKESRCYADTPTAAPT	VLFTVANVTAS--TTISPAPTTAPKPAENPV	229
SEQIDNO:39	VTMQAFVQNGTVSKKESRCPADTPTSEPT	VPPTIANVTASTTTLSPAPTTAPKPVENPV	359
SEQIDNO:40	VKLEAFMQNGTLGK-EVSCDADKPS	--PTPT-TNPST-----TASTTTTPTTSKPLDNPT	215
SEQIDNO:41	VALQAFVINGSKSDTDVCSADMTS	--TTVAPTT---TV---TSTAAPTSTPTLPTPT	213
SEQIDNO:42	MRLEAYMPGNELSPNETVCFADQTS	--TTPSPTTVSTTAV----PTQT----P--PGTPQ	213
SEQIDNO:43	VTVHLIL-----ATV--LHQTF--AT--	VTPFVTTA----VPHK----E--PGRPD	48

铰链	LAMP同源结构域2	
	1	2
SEQIDNO:2	AGTYSVNNG--NDTCLLATMGLQLNITQ-----DKVASVININPNTTHSTGSCRSHTAL	271
SEQIDNO:25	VGNYSIRNG--NTTCLLATMGLQLNITE-----EKVPFIFNINPATNFTGSCQPQSAQ	276
SEQIDNO:26	MGNYSVSDA--SGICLLASMLQINTSLL--SEGKNIWRPFNIDPLGIKNGTCTNQTGT	278
SEQIDNO:27	VGNYSVKTD--NVSDCLLAKMGLQFSFKIS----GNASLQTVNLDPNVTKVNGTCGSGGSD	216
SEQIDNO:28	AGTYSVNNG--NDTCLLATMGLQLNITQ-----DKVASVININPNTTHSTGSCRSHTAL	271
SEQIDNO:29	AGTYSVNNG--NETCLLATMGLQLNITQ-----DKVASVININPNTTHSTGSCRSHTAL	271
SEQIDNO:30	-----PXVASVININPNTTHSTGSCRSHTAL	224
SEQIDNO:31	VGSYSVNNS--NGTCLLATMGLQLNITH-----NKVASVININPNTTDTGSCQPQTAL	272
SEQIDNO:32	VGSYLVKNG--SDTCLLATMGLQLNVTH-----DKVASVININPNVTGYSGSCHPQTAL	278
SEQIDNO:33	VGSYSVNNS--NGTCLLATMGLQLNITH-----DKVASVININPNTTNATGSCQPQTAL	268
SEQIDNO:34	TGSYSVTSS--NGTCLLANMGLQLNITQ-----DKVASVININPNTTNATGNCHSKTAL	272
SEQIDNO:35	VGSYSVNNS--NGTCLLATMGLQLNITH-----DKVASVININPNTTNATGSCQPQTAL	268
SEQIDNO:36	VGNYSISNG--NATCLLATMGLQLNITE-----EKVPFIFNINPATNFTGSCQPQTAQ	272
SEQIDNO:37	PGKYAVKNG--NDTCLLATMGLQLNVTQ-----NKVNSVININPNVTDTGSCSNETAE	431
SEQIDNO:38	TGNYSLKTG--NKTCLLATVGLQLNISQ-----DK-PLLINIDPKTTHADGTCGNTSAT	280
SEQIDNO:39	TGNYSLKSG--NKTCLLATVGLQLNVSQ-----EK-PLLININPKTTVADGACGNTTAT	410
SEQIDNO:40	TGNYSVSDV--NGTCLLASMLQINTSLL--SEGKNIWTFNIDPTAMSKNGTCSNQGT	271
SEQIDNO:41	TGKYSIAPDVNSTACLMATFGLIGYKQG----D--KEETINLVPNITEVGGACGANSS-	266
SEQIDNO:42	QGNYTVKDA--NDTICLLAKMGLQLNVSYT--SQNKTVQDVLNLPNVTNSTGSCGASSAT	270
SEQIDNO:43	QGDYQVTSS--NGTVCFLASMLQLNITFNSTSQNKTLQEVINIQPNRTKSSGSCDTSSAL	107

. \*: \* \* \*

图4续

## LAMP同源结构域2

SEQIDNO:2	LRLNS-STIKYLDVFVAVKNE----NRFYLKEVNVSMY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP	324
SEQIDNO:25	LRLNN-SQIKYLDVFVAVKNE----KRFYLKEVNVVYMY-LANGSA-FNISKNLSFWDAP	329
SEQIDNO:26	LILTE--NRTIEFTFALKNK----NHFYLEEENITLI---NGSAFSSRQNLSTWEAS	329
SEQIDNO:27	SSLFLTS--KDITVHFVFTNDS---QKFLHALTLTVD-LGNG-NIFNDSNTNLSLWEAS	269
SEQIDNO:28	LRLNS-STIKYLDVFVAVKNE----NRFYLKEVNVSMY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP	324
SEQIDNO:29	LRLNS-STIKYLDVFVAVKNE----NRFYLKEVNVSMY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP	324
SEQIDNO:30	LRLNS-STIKYLDVFVAVKNE----NRFYLKEVNVSMY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP	277
SEQIDNO:31	LRLNS-SNIKYLDVFVAVKNE----NRFYLKEVNVSMY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP	325
SEQIDNO:32	LRLNS-SNIKYLDVFVAVKNE----NRFYLKEVNVSMY-LANGSV-FSFANNNLSYWDAP	331
SEQIDNO:33	LRLSS-SNIKYLDVFVAVKNE----NRFYLKEVNVSMI-LVNGSV-YSISNTNLSYWDAP	321
SEQIDNO:34	LRLSG-SNIKYLDVFVAVKND----NRFYLKEVNVSVY-LVNGSV-FSIANNNLSYWDAP	325
SEQIDNO:35	LRLSS-SNIKYLDVFVAVKNE----NRFYLKEVNVSMI-LVNGSV-YSISNTNLSYWDAP	321
SEQIDNO:36	LRLNN-SQIKYLDVFVAVKNE----KRFYLKEVNVNMY-LANGSA-FHVSNNNLSFWDAP	325
SEQIDNO:37	LRLSG-SNVKYIDVFVAVKNG----NRFYLKEVNVVIS-FVNASD-LNVANNNLSYWDAP	484
SEQIDNO:38	LKLND-GNRTLIDFTFIV-NASASVQKFYLREVNVTLLNYQNGSVILSADNNNLSKWDAS	338
SEQIDNO:39	LKLND-GNSTLIGFTFAVKNTSASVQKFYLREVNVTLLNRLNGSVISSADNSNLSKWDAS	469
SEQIDNO:40	LILTD--NSTVIEFTLALKNK----NHFYLEEENITLI---NGSASSTRQNLSTWEAS	322
SEQIDNO:41	-DLILTS--DTITIMFTFSNDG---KKFHLHALKVTVK-PATG-DPVIANNNLSIWAAA	318
SEQIDNO:42	LVLTLQ-TQSTILTFNFTLNSTT---NKYHLSGVTLIAN-WFDS-AHFSMSNNLSNLYLRST	324
SEQIDNO:43	LTLTDAEKTNLTFVFALNTTS---NKYHLSEVSLSAA-LSDMKETFVAQNHSLDYLRGT	163
	* : . : . . : : : * : : : * . . . .	

## LAMP同源结构域2

## 跨膜结构域

SEQIDNO:2	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVVTQGKYSTAQDCSADD-LN <sup>3</sup> FLVPIAVGA <sup>4</sup>	383
SEQIDNO:25	LGSSYMCNKEQVLSVSRAFAQINTFNLKVQPFNVTKGQYSTAQECSLDDD-TILIP <sup>3</sup> IVGA <sup>4</sup>	388
SEQIDNO:26	VDSSYMCHKEQIKVSEDLFINAFDVRVQPFVGNNGTFATAEDCFAD-Q-NFIVPIVGA	387
SEQIDNO:27	VGSSYMCNKEQSYNISDKLTNTFELQVQPFVDVKKNSFSTAHECSLDDT-SLLIP <sup>3</sup> IVGA <sup>4</sup>	328
SEQIDNO:28	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVVTQGKYSTAEECSADSDLNFLIP <sup>3</sup> AVGV <sup>4</sup>	384
SEQIDNO:29	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVVTQGKYSTAQDCSADD-DN <sup>3</sup> FLVPIAVGA <sup>4</sup>	383
SEQIDNO:30	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVVTQGKYSTAEECSADSDLNFLIP <sup>3</sup> AVGV <sup>4</sup>	337
SEQIDNO:31	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVMEGKYSTAQECSLDDD-TILIP <sup>3</sup> IVGA <sup>4</sup>	384
SEQIDNO:32	LGSSYMCNKEQTVSVSGEFQINTFDLRVQPFNVKDGKYSTAQDCRADD-DN <sup>3</sup> FLVPIAVGA <sup>4</sup>	390
SEQIDNO:33	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFVTEGKYSTAQECSLDDD-TILIP <sup>3</sup> IVGA <sup>4</sup>	380
SEQIDNO:34	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLVQPFVMEGKYSTAQDCSADD-DN <sup>3</sup> FIVPIAVGA <sup>4</sup>	384
SEQIDNO:35	LGSSYMCNKEQTVSVSGALQINTFDLRVQPFVTEGKYSTAEECSADSDLNFLIP <sup>3</sup> AVGV <sup>4</sup>	381
SEQIDNO:36	LGSSYMCNKEQVSVSRTFAQINTFNLKVQPFNVTKGEYSTAQDCSADDED-NFLVPIAVGA	384
SEQIDNO:37	LGSSYMCNKEQTLALADSLQINTFNLVQPFVSVAGKYSTAEDCSADDD-NFIVPIAVGA	543
SEQIDNO:38	LGNSYMCNKEQTLINENLQVHTFNLVQPFVVKENKFSIAEECFADSDLNFLIP <sup>3</sup> AVGM <sup>4</sup>	398
SEQIDNO:39	LGSSYMCNKEQTLQINENVQVHTFNLVQPFVLEANKFATAEECIADSDLNFLIP <sup>3</sup> AVGV <sup>4</sup>	529
SEQIDNO:40	VGSSYMCNKEQIKVSEDLVINSFDVRVQPFVKNETFATAQQCSLDDD-SIVIP <sup>3</sup> IVGA <sup>4</sup>	381
SEQIDNO:41	VGSSYMCNKEQTLNVTDTLTLYTFELRVQPFVKNKGEFATAHECSLDDT-SILIP <sup>3</sup> IVGA <sup>4</sup>	377
SEQIDNO:42	LGSSYMCNKEQTLFVTPSFSLNTFDLQVQPFVKSGRFATAEECQMDQN-QMIIP <sup>3</sup> IVGA <sup>4</sup>	383
SEQIDNO:43	LGSSYMCNKEQTLGVTPDFAINTFQVQVQPFVTKGQFAAAEECQLDKD-DMLIP <sup>3</sup> IVGA <sup>4</sup>	222
	: . * * * . . * : . : : : : * * * : : * : * * : : : * : *	

图4续

## 胞质尾区

```

SEQIDNO:2      ALAGVLILVLLAYFIGLKHHH-AGYEQF  410
SEQIDNO:25     GLSGLIIVIVIAIYLIIGRRKTY-AGYQTL  415
SEQIDNO:26     ALGVLVVLVMVAYFIGRRKQSSAGYEQM  415
SEQIDNO:27     ALAGLIFIVVIAIYVIGRRRTY-VGYQTL  355
SEQIDNO:28     ALGFLIIVVFISYMIIGRRKSR-TGYQSV  411
SEQIDNO:29     ALAGVLILVLLAYFIGLKRRH-AGYEQF  410
SEQIDNO:30     ALGFLIIVVFISYMIIGRRKSR-TGYQSV  364
SEQIDNO:31     GLSGLIIVIVIAIYLIIGRRKSY-AGYQTL  411
SEQIDNO:32     ALAGVLILVLLAYFIGLKRRH-AGYEQF  417
SEQIDNO:33     GLSGLIIVIVIAIYLIIGRRKSY-AGYQTL  407
SEQIDNO:34     ALAGVLILVLLAYFIGLKRRH-AGYEQF  411
SEQIDNO:35     ALGFLIIVVFISYMIIGRRKSR-TGYQSV  408
SEQIDNO:36     ALGGVLILVLLAYFIGLKRRH-AGYEQF  411
SEQIDNO:37     ALGGLVILVLMAYFVGRKRR-AGYEQF  570
SEQIDNO:38     ALGFLIILVFISYIIIGRRKSR-TGYQSV  425
SEQIDNO:39     ALGFLIILVFISYIIIGRRKSR-TGYQSV  556
SEQIDNO:40     ALAGLIVIVIAIYLIIGRRKGY-AGYQTL  408
SEQIDNO:41     ALAGLILIVVIAIYVIGRRKTY-VGYQTL  404
SEQIDNO:42     ALAGLVLTITLIAYLIIGRRSH-AGYQAI  410
SEQIDNO:43     ALAALVLIVLSAYLIIGRRSH-AGYQSI  249
.*. :.:. . :*:* : : ** : .

```

LAMP-2					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_002285.1	智人 (H. sapiens)	2	NP_001231184.1	野猪 (S. scrofa)	34
NP_034815.2	小鼠 (M. musculus)	25	XP_004022401.1	绵羊 (O. aries)	35
NP_001087881.1	非洲爪蟾 (X. laevis)	26	NP_058764.2	褐家鼠 (R. norvegicus)	36
NP_001013551.1	斑马鱼 (D. rerio)	27	XP_001510101.2	鸭嘴兽 (O. anatinus)	37
XP_003918270.1	东非狒狒 (P. Anubis)	28	NP_001001749.1	原鸡 (G. gallus)	38
XP_001084005.2	猕猴 (M. mulatta)	29	XP_002191794.1	斑胸草雀 (T. guttata)	39
XP_003317709.1	黑猩猩 (P. troglodytes)	30	NP_001116192.2	热带爪蟾 (X. tropicalis)	40
XP_005641822.1	家犬 (C. lupus familiaris)	31	NP_001133282.1	安大略鲑 (S. salar)	41
XP_001493687.3	家马 (E. caballus)	32	XP_003445830.1	罗非鱼 (O. niloticus)	42
NP_001029742.1	家牛 (B. taurus)	33	XP_003961835.1	红鳍东方鲀 (T. rubripes)	43

图4续



## 人类LAMP-3与直系同源序列的比对

信号序列	LAMP同源结构域1	
SEQIDN0:3	MPRQLSAAAAFASLAVILHD----GSQMRKAKAFPETRDYSQPTAAATVQDIKKPV-QQP	55
SEQIDN0:44	MPRQLSAAAAFASLAVILHD----GSQMRKAKAFPETRDYSQPSAAATVQDIKKPV-QQP	55
SEQIDN0:45	MPRQLSAAAVLFASLAVILHD----GSQMRKAKAFPKTRDYSQPTAAATGQDIKPV-QQP	55
SEQIDN0:46	MPRQLSAAAVLFASLAVILHD----GSQMRKAKAFPKTRDYSQPTAAATGQDIKPV-QQP	55
SEQIDN0:47	MSWQLSAAVALFVSLALILHY----GSQIRAKMFPETVDFQ-PTTAATVRATAKPF-LHL	54
SEQIDN0:48	MSWRLSAVLVSFVSLAVFLHY----GHHMKAKVFPEITDSSSPTTAATVQATAEPSLWKP	56
SEQIDN0:49	-----	0
SEQIDN0:50	MAWQLSAVVLFVSLAVILYY----GSHVRANVFPEITDYSQPTTAATIQTTRAQPSLSQP	56
SEQIDN0:51	MSWQIPAVVMSEFALVAIWYYDSHYNSHMQAKVFPEITGYSSPTTG---QATVKPSLLQP	57
SEQIDN0:52	MSWQISAVVLFVSLAVIYYDS---HMKANVFPEITGYSSPTTG---QATVKPSLLQP	53
SEQIDN0:53	MPGQTSAAVL-LCLAVILH----GYQIREKEFPEARGYLQYTATTTEQITAKPPL-PL	53
SEQIDN0:54	MPGQISAAVLFLSLTVILH----GYQIREKEFPKARGYLQYTATSAEQITTKPLL-QL	54
SEQIDN0:55	-----	0

## LAMP同源结构域1

SEQIDN0:3	AKQAPHQTLAAREMDGHITFQTAATVKIP-----TTPATTKNATTSPIITY	102
SEQIDN0:44	AKQAPHQTLAAREMDGHITFQTAATVKIP-----TTPATTKNATTSPIITY	102
SEQIDN0:45	ANQAPHQTLAARLMDGHITFQTAATIKTP-----TTPVTTKNTPTTSPIIY	102
SEQIDN0:46	ANQAPHQTLAARLMDGHITFQTAATIKTP-----TTPVTTKNTPTTSPIIY	102
SEQIDN0:47	TNQVPSQTLAARSMDGHIASQRAATSSSEPPTHTTVKTLVTTSLVTANSTPSSSPIIY	114
SEQIDN0:48	TNHTPHKTLAAKSTDGHVTSQIATTVTDSETLTTHTTTITTLAATSLAATNSTPSTSPTH	116
SEQIDN0:49	-----	0
SEQIDN0:50	TNQVPHKTLATRSMDGQVTSQTAATVNPETPVTHTTIKTAAATSLVTNSTLSTSPITN	116
SEQIDN0:51	TNYVPHKTAAARSTDGHVTSQTVAKTSSSETLTTNTTIDVLATTSPTTKSTLPTPTTH	117
SEQIDN0:52	TNHVPCNTAAAKSTDGHVTSQTVAKTSSPETLTTNTTIEVLVTTSPVTTQSTLPTPTTH	113
SEQIDN0:53	TNQTSATLASRSKDDYIQTAETS---TFE---DTAHITMKTAPVTTKSLPISSTSY	107
SEQIDN0:54	INQRSHITLASRFKDDYIQMAETS---AIE---NTAHITMKTVPVTTKSLPPISSASY	108
SEQIDN0:55	-----MDRVSLSTILLY	14

## LAMP同源结构域1

SEQIDN0:3	TLVT-----TQATPNNSHTAPPVTEVTGPGSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	152
SEQIDN0:44	TLVT-----TQATPNNSHTAPPVTEVTGPGSLVPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	152
SEQIDN0:45	TLVT-----TQATSNNSHHTAPPLTKVTGPGSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	152
SEQIDN0:46	TLVT-----TQATSNNSHHTAPPLTKVTGPGSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	152
SEQIDN0:47	TLVT-----TIVTPNNSNTAAPVTEATIGPSADPGSLPTTS--TPLAHTTRTNPSTL	164
SEQIDN0:48	TLFT-----TLATPNTSHMAAPVTEAAISPSAGLSLLPPTI--IPPAHTTGTRSTL	166
SEQIDN0:49	-----	0
SEQIDN0:50	TLT-----TLATPDNTHTTTPVTEATIGPSAGPGSPPTTITTTSSAYTTGTRSTV	168
SEQIDN0:51	TLVT-----TLATPNKSHVTFPVTEAKVGLSVGPSSPPVTV--NPTAHTTGTRPSTA	167
SEQIDN0:52	TLVT-----TLATPSKSHVTFPVTEAKAGLSIGPSSPPVTI--NPTAHTTGTRPSTA	163
SEQIDN0:53	TFV-----RTNNSHMTASSTEDTIGSGSITHL-----PFPTTRASLAIV	146
SEQIDN0:54	TFV-----RSNNAHMTASSTDDTIGSGSIAHL-----PVPTTRASLAIV	147
SEQIDN0:55	GLLYINDAYSENTFAQPSNTTTPAPNTTTHVTSNTTTLAP-----NTTT	59

图5

## LAMP同源结构域1

SEQIDNO:3	SHTTGNTTQPSNQTTLPATLSIALHKSTTGQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTRTAAPAS	209
SEQIDNO:44	SHTTGNTTQPSNQTTLPATLSIALHKSTTGQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTRTAAPAS	209
SEQIDNO:45	NHTTGNTTQPSNQTTLPATLSIALHKSTTGQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTRTAAPAS	209
SEQIDNO:46	NHTTGNTTQPSNQTTLPATLSIALHKSTTGQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTRTAAPAS	209
SEQIDNO:47	SHKTRKTTTHFGNQTTLPATLSTSTHKSTSSHKSAQS---THAPGTTAAAHNTTQTASPAT	221
SEQIDNO:48	SPTAGKTTQPSNQTTLPATLSTSPHNSTASQKPTHF---NHTPGPTTGAHNTTQTASPAT	223
SEQIDNO:49	-----MTQSSRSVLLMLSSSLHCLGSSLESNPKDPSVLAEAPGQN-----KRDSDSL	48
SEQIDNO:50	SHTTGKTTQLSNQTTLPATLSTSPHNSTTSQNPAS---THTPGPTTGTCTNTTQTASPAT	225
SEQIDNO:51	SHTTGKTTQLSNQTTLPATLSTSPHNITTSQKPTQP---THTPGPTTATYNTTQTASPAT	224
SEQIDNO:52	SHTTGKTTQLSNQTTLPATLSTSPHNITTSQKPTQP---THTPGPTTAAANTTHTASPAT	220
SEQIDNO:53	NHITGRSTQLGGQTTLPKALFTPSHESSTTQRPTLS---TI-VSELTPTGKDRSTTSSVP	202
SEQIDNO:54	NYITGRATQLGGQTTLPKFTFTASHKSTTNQRPTLS---TNVLGTSTPTHKDRSTTSPVP	204
SEQIDNO:55	THVTSNTTTLA-----PNTTTTHITSNTTTLAPNTT---TTLAPNTTTTHSVTTTKTAST	111
	* . :	

## LAMP同源结构域2

## 铰链

SEQIDNO:3	TVPGPTLAPQPSSVKTGIYQVLN-GSRLCIKAEMGIQLIVQDKESVFSPPRYFNLDPNAT	268
SEQIDNO:44	TVPGPTLAPQPSSVKTGIYQVLN-GSRLCIKAEMGIQLIVQDKESVSWGHRTITLSS--K	266
SEQIDNO:45	TVPGSTLAPQPSSVKTGIYQVLN-GSRLCIKAEMGIQLIVQDKESVFSPPRYFNLDPNAT	268
SEQIDNO:46	TVPGSTLAPQPSSIKTGIYQVLN-GSRLCIKAEMGIQLIVQDKESVFSPPRYFNLDPNAT	268
SEQIDNO:47	PASGPTLAPQPSSPKTGIYQVLN-GSRLCIKAEMGIELMVQDTKSVFSPQRYFNLDPNAT	280
SEQIDNO:48	IAPGPTLAPQPSSAKTGIYQVLN-GSKLCIKAEMGIELTVQDTQSVFSPQRYFNLDPNAT	282
SEQIDNO:49	VPQMPVLQPKETAAPPLVTYTIIRNPQKVCVRASFGVEFVVREN----KKKYYFNLTNSA	104
SEQIDNO:50	TAPGPTLAPQPSSAKTGMQILN-GSKLCIKAEMGIQLTVQDTKSASPPQGYFNLDPNAT	284
SEQIDNO:51	IAPRPTLAPQPLSPKTGIYQVHN-GSKLCIKAEMGIQLTVQDSVSVFSPQKYFNLDPNAT	283
SEQIDNO:52	IAPRPTLAPQPLSPKTGLYQVLN-GSKLCIKAEMGIQLTVQDSVSVFSPQKYFNLDPNAT	279
SEQIDNO:53	LVPRPTFVTWSSPAKIGTYEVLN-GSRLCIKAEMGIALIVQEKGLDSATQRHFNLDPSLT	261
SEQIDNO:54	LVPRPTLVTWSSPAKIGTYEVLN-GSRLCIKAEMGIALIVQEKGLDSATQRHFNLDPSLT	263
SEQIDNO:55	TTPTPTLEPKPSPPETGNYTVKI-KNEFCIEALMGLELELTNS---TKTQQYFNIVPSQI	167
	.: * : ...*:.* :*: : : : : : : : : : :	

## LAMP同源结构域2

SEQIDNO:3	QASGNCGRK----SNLLLNFGGGFVNLTFTKDEESYIYSEVGAYLTVS-----DPETIY	319
SEQIDNO:44	SLSGGCLARNEHSPHPLFLFFFEKGPSPVQAEDDEESYIYSEVGAYLTVS-----DPETIY	321
SEQIDNO:45	QASGNCGRN----SNLLLNFGGGFVNLTFTKDEGSYIYSEVGACLTVS-----DPETIY	319
SEQIDNO:46	QASGNCGRN----SNLLLNFGGGFVNLTFTKDEGSYIYSEVGACLTVS-----DPETIY	319
SEQIDNO:47	QTSNGCGSQK----SNLLLNFGGGFVNLTFLKDENSYYINEVGAYLTVS-----NPEKIY	331
SEQIDNO:48	QASGNCGRK----SKLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYVSGVGAYLTVS-----NPEKVI	333
SEQIDNO:49	RATGYCANQK----TVLSLEFSGGNLEFTFIKDGDSYVKTVKGSLRAAPPCKNCPSKIY	160
SEQIDNO:50	QVSGICGRK----SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYIYSEVGAYLTVS-----NPEKTY	335
SEQIDNO:51	QASGNCGRK----SNLLLNFGGGFVNLTFTKGEKSYIYSEVEAYLTVS-----NPAKVI	334
SEQIDNO:52	QASGNCGRK----SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYIYSEVEAYLTVS-----NPAKVI	330
SEQIDNO:53	HASGKCGSQN----SNLFLNFGGGSVNVTFTKEENLYYVSEVGAYLTIS-----NTEKTY	312
SEQIDNO:54	HASGKCDSQK----SNLFLNFGGGSVNITFTKEENLYYVSEVGAYLTIS-----NTEKTY	314
SEQIDNO:55	NSNGTCEKSK----ANLNLTFANSYINFVFAQDDNSYYLDNVTYVFNLTV-----RSESWY	218
	.* * : * * * . . . : * : * : : : . *	

图5续



		LAMP同源结构域2	
		3	4
SEQIDN0:3	QGIKHAVVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQVKTDDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	379	
SEQIDN0:44	QGIKHAVVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQVKTDDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	381	
SEQIDN0:45	QGMKHAVVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQVKTDDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	379	
SEQIDN0:46	QGMKHAVVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQVKTDDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	379	
SEQIDN0:47	QGMKSSVVMFETGVGHSFKCVSEQSLQLSTHLQVKTDDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	391	
SEQIDN0:48	QGMKNNAVVMFETMIGHSFKCVSEQSLQLSPHLQVKTDDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	393	
SEQIDN0:49	VGLVDNEKLFKAKNGLSFNCKSETMLILADYFRLKLVLPLQIQAFDLVNGAFGKEVECWAD	220	
SEQIDN0:50	QGMKSPVVMFETVIGHSFKCVSEQSLQLSTHLQVKTDDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	395	
SEQIDN0:51	QGLKHAMMMFETVVGHSFKCVSEQSLQLSTYLQVKTDDVQLQAFDFEDDHFGNADECISD	394	
SEQIDN0:52	QGMKYAMMMFETVVGHSFKCVSEQSLQLSNHLQVKTDDVQLQAFDFEDDHFGNADECISD	390	
SEQIDN0:53	QGKS-TMMMFETVVGHSFKCVSEQSLQLSAQLQMKTMNIHLQAFDFEGDSFGIVDECLSD	371	
SEQIDN0:54	QGKNTLMMFETVVGHSFKCVSEQSLQLSAQLQMKTMNIHLQAFDFEGDSFGVNECLSD	374	
SEQIDN0:55	GNAT-NQKLLKTENGYSVKCKNTPKIQLGDTMNLVMTNVKLQVFNFKDNSFGKETTCKYD	277	
		. : : : * * : * . : * . : : : : * * : : . * * * * *	

## 跨膜

## 胞质尾区

SEQIDN0:3	YIV-LPV-IGAIVVGLCLMGMGVYKIRLRCQSSGYQRI	416
SEQIDN0:44	YTIV-LPV-IGAIVVGLCLMGMGVYKIRLRCQSSGYQRI	418
SEQIDN0:45	YTIV-LPV-IGAIVVGLCLVIGGVYKIRLRCQSSGYQRI	416
SEQIDN0:46	YTIV-LPV-IGAIVVGLCLVGMGVYKIRLRCQSSGYQRI	416
SEQIDN0:47	YTVV-LPV-IGAIVLGLCAVGLIVYGIHLRRESSGYQRI	428
SEQIDN0:48	YTIV-LPV-IGAIVLGLCAVGLIVYGIHLRRESSGYQRI	430
SEQIDN0:49	YNKRMIPIILGAVAAACILIAILTYVLVREHRNQGYEQL	259
SEQIDN0:50	YTVV-LPV-IGAIVLGLFAVGLIVYGVVRREASGYQRI	432
SEQIDN0:51	RNRREIPVAVGLSIAVLLAVLLTACLVTTRKRPSSRGYERM	433
SEQIDN0:52	RNRREIPVAVGLSIAVLLAVLLTACLVTTRKRPSSRGYERM	429
SEQIDN0:53	YTVV-LPV-VGIIVVVLGVGLGIYKIRQRQSSAYQRI	408
SEQIDN0:54	YTVV-LPM-VAIIVVVICVVGSLSVYKIRQRHQSAYQRI	411
SEQIDN0:55	HNFG-LMI-AGIVIVVIVVLGVIIYFIWHKRKSSGYQRI	314
		. : : . : : : . * : :

LAMP-3					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_055213.2	智人 (H. sapiens)	3	XP_001496333.1	家马 (E. caballus)	50
XP_001155195.3	黑猩猩 (P. troglodytes)	44	NP_001095605.1	家牛 (B. Taurus)	51
XP_003894825.1	东非狒狒 (P. Anubis)	45	XP_004003158.1	绵羊 (O. aries)	52
NP_001028044.1	猕猴 (M. mulatta)	46	NP_001012015.1	褐家鼠 (R. norvegicus)	53
XP_848889.2	家犬 (C. lupus familiaris)	47	NP_796330.2	小鼠 (M. musculus)	54
XP_003358746.1	野猪 (S. scrofa)	48	XP_002936919.2	热带爪蟾 (X. tropicalis)	55
XP_001342688.2	斑马鱼 (D. rerio)	49			

图5续

## 人类LIMP-2与直系同源序列的比对

## 信号序列

```

SEQIDNO:4      -----MGRCCFYTAGTLS 13
SEQIDNO:56     -----MGRCCFYTAGTLS 13
SEQIDNO:57     -----MGRCCFYTAGTLS 13
SEQIDNO:58     -----MGRCCFYTVGTLS 13
SEQIDNO:59     -----MGRCCFYAVGTLS 13
SEQIDNO:60     -----MGRCCFYTAGTLS 13
SEQIDNO:61     -----MTRRSCTIYATGIVC 15
SEQIDNO:62     -----MARCCFYTAGTLS 13
SEQIDNO:63     -----MRSCLCLVTGVL 13
SEQIDNO:64     -----MVKWAVFGTA 13
SEQIDNO:65     MQLDDILHINNCKADCSSLSTPNPKTDLVNMNGPKHKFCTKLSSTYLKRWITIV--VA 58
SEQIDNO:66     -----MYGRSNRLCAKLSSAFLRKWWFVIA--FA 27

```

## LAMP同源结构域

```

SEQIDNO:4      LLLLVTSVTLVAVFQKAVDQSIIEKKIVLRNGTEAFDSWEKPPLPVYTQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:56     LLLLVTSVTLVAVFQKAVDQSIIEKKIVLRNGTEAFDSWEKPPLPVYTQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:57     LLLLVTSVTLVAVFQKAVDQSIIEKKIVLRNGTEAFDSWEKPPLPVYTQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:58     LLLLVTSIALLVAVFQKAVDQTIIEKNIVLRNGSETFDSWKKPPLPVYAQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:59     LLLLVTSITLLVAVFQKAVDQTIIEKNIVLRNGSETFDSWKKPPLPVYTQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:60     LLLLVTSVTLVAVFQKAVDQTIIEKNMVLQNGTKVENSWEKPPLPVYIQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:61     AHLILGIALLLAQVFQTMIEKRIKKEITLAENSRVLDGWINPPPPVYMQFYFFNVTNPD 75
SEQIDNO:62     LLLLVTSVTLVAVFQKAVDQTIIEKNMVLQNGTKVFDSEKPPLPVYIQFYFFNVTNPE 73
SEQIDNO:63     LTLIASISLLVAHVFTVVDLQVKQGTVLKNGTETFEAWEDPPPPVYMQFYFFNVTNPL 73
SEQIDNO:64     VTLLIVSIVLLLTHTFMDIVEGQVKQAIVLKNESEVFEDWANPPPPVYMQFYFFNVTNPL 73
SEQIDNO:65     AALIIG--GIVVACEFTVLIDAVVDRMVALRPGAKTFGWAKPPVEPRISLYIYNVTNAD 116
SEQIDNO:66     LSLLVL--GALVTFGFTAIFRTIIDHQVALRVGGQSFGWWSRPPVEPIIRIFVYNVTNAD 85

```

\*: :        : : :    \*    :       : : :    . \*       . :    \*    \* \*       : : : \* \* \*

## LAMP同源结构域

```

SEQIDNO:4      EILRGE-TPRVEEVGPYTYRELRNKANIQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:56     EILRGE-TPRVEEVGPYTYRELRNKANIQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:57     EILRGE-TPRVEEVGPYTYRELRNKANVQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:58     EILRGE-IPRLEEVPYTYRELRNKAQIIFQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:59     EILNGE-TPRLEEVPYTYRELRNKDDIIFQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:60     EILQGE-IPLLEEVPYTYRELRNKANIQFGENGTTISAVTNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:61     EFLAGKEKAKVTQMGPYTYREYRPRENVTYLENGTKIFATNPKSFVFLRNMSAGDPEVDR 135
SEQIDNO:62     EILQGE-IPLLEEVPYTYRELRNKANVQFGENGTTISAVTNKAYIFERNQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO:63     EVLQGA-TPLVEEKGPYTYREYRPRVHVQFLDNGTKVSALNPKTYVFEPEKSVGNPEVDL 132
SEQIDNO:64     EVLSGE-KPFVDEIGPYTYREYRPRENITFSVNGTEVSAVTPKTYVFEPEKSVGDPKVDL 132
SEQIDNO:65     DFLSNGSKAIVDEVGPYVYSETWEKVNIVENDNGTL-SYNLRKIYSFREDLSVG-PEDDV 174
SEQIDNO:66     EFLNNGTKPILDELGPYVYVQTEWEKVNIVENPNGTI-SYNQKRVYIFNEDLSGG-LEDDV 143

```

: . \*        : : : \* \* \* :       : :       \* \*       : : \*       : \*       \*

图6

## LAMP同源结构域

```

SEQIDNO:4      IRTLNIPLVLTVIEWSQ-V-HFLREIEAMLKAYQQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO:56     IRTLNIPLVLTVIEWSQ-V-RFLREIEAMLKAYQQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO:57     IRTLNIPLVLTVIEWSQ-V-HFLREIEAMLKAYQQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO:58     IRTLNIPLVLTVIEWSQ-V-HFLREIEAMLKAYQQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO:59     LRTLNIPLVLTVIEWSQ-V-HFLREIEAMLKAYQQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO:60     IRTINIPLLTVVDLAQ-L-TLLREIEAMLKAYQQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO:61     VTTVNIPMIAMNENLSYSFFVTRAVSMYMGSMGLFMNRTVHEILWGFCDPLTKLHA 195
SEQIDNO:62     IRTINIPLLTVVEMAQ-Q-PFLREIEAMLKAYQQKLFVTHTVDELLWGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO:63     IRTINIPAVTAMEWTR-A-TSLQFATEVLLLLYQESLFTVTRVHELLWGYKDKLLSTIHV 190
SEQIDNO:64     IRTVNIPLVLTILEMTK-DSSLLRPFIIAALKTYKEGMFVTRTVDELLWGYKDAVLSILHP 191
SEQIDNO:65     VIVFNIPLSATSQS KHAARFLRLAMASIMDILKIKPFVQVSVGQLLWGYEDPLKLAKD 234
SEQIDNO:66     VIVFNIPLSATSQS KHAARFLRLAMASIMDILKIKPFVEVSVGQLLWGYEDPLKLAKD 203
                : . * : : . . . : : * : * : * : * : * :

```

## LAMP同源结构域

```

SEQIDNO:4      FRPDI----SPYFGLFYERKNGTNDGDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDKCN 246
SEQIDNO:56     FRPDI----SPYFGLFYERKNGTNDGDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDKCN 246
SEQIDNO:57     FRPDI----SPYFGLFYERKNGTNDGDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDKCN 246
SEQIDNO:58     FKPEI----SPYFGLFYERKNGTNDGDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDKCN 246
SEQIDNO:59     FKHDV----SPYFGLFYERKNGTNDGDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDKCN 246
SEQIDNO:60     FKPDV----SPNFGFLFYERKNGTNDGEYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDKCN 246
SEQIDNO:61     MRPEV----DEHFGMLYKNGTNGHEGEFVFTGKKNYMNKYGKIDTWNGISQMNWSSNQSN 251
SEQIDNO:62     FRPDV----SPNFGFLFYERKNGTNDGEYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDKCN 246
SEQIDNO:63     LHPEI----DPVFGFFNKMNGTDDGEYVFLSGEMNYLNFSRIVEWKGKESLNWWTDKCN 246
SEQIDNO:64     FKKNI----SDTFGLFYKMNNTDDGEYIFLSGKDYLEFTQIAEWKGKALNWWTDKCN 247
SEQIDNO:65     VVPKEQKLPYEEFGLLYGKNGTSSDRVTVNTGVDDIRRYGIIDNFNGRTHLPHWTTDACN 294
SEQIDNO:66     VVPKEQKLPYEEFGLMYGKNSTSKDVTVTGVDITQYGIIDKYNRSHQTHWLSEQCN 263
                . . ** : * * . . : * . : * : * * * : * . . *

```

## LAMP同源结构域

```

SEQIDNO:4      MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSEDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVP AEILANT 305
SEQIDNO:56     MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSEDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVP AEILANT 305
SEQIDNO:57     MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSEDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVP AEILANT 305
SEQIDNO:58     MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSEDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVP AEILANT 305
SEQIDNO:59     MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSEDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVP AEILANT 305
SEQIDNO:60     MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSEDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVP AEILANT 305
SEQIDNO:61     MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSEDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVP AEILANT 305
SEQIDNO:62     MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSEDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVP AEILANT 305
SEQIDNO:63     MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSEDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVP AEILANT 305
SEQIDNO:64     MINGTDGDSFHPLITKDEVLYVFPSEDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVP AEILANT 305
SEQIDNO:65     TLAGTDGSIFFPHIDHDRIHLYVDKDLRLLPLVFEKEVMTSNEVPGYRFTPEWVFADV 354
SEQIDNO:66     RLNGTDGSIFFPHITKNSTLHVYKDLRLLPLVFEKEVMTSNEVPGYRFTPEWVFADV 323
                : * * * * * : : . : : : : : : : : : : : : : : : :

```

图6续

## LAMP同源结构域

```

          3       4       5
SEQIDNO:4  ---SDNAGFCIPE-GNCLGSGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYQADERFVSAIEGMHP-NQ 360
SEQIDNO:56 ----SDNAGFCIPE-GNCLGSGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYQADERFVSAIEGMHP-NK 360
SEQIDNO:57 ---SDNAGFCIPE-GNCLGSGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYQADERFVSAIEGMHP-NK 360
SEQIDNO:58 ---SDNAGFCVPE-GNCLGSGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYEADKKFVSAIDGMRP-NK 360
SEQIDNO:59 ---SDNAGFCIPK-GNCLGSGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYQADEKFVSAIIGMHP-NK 360
SEQIDNO:60 ----SENAGFCIPE-GNCMDSGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYQADEKFVSAIKGMHP-NK 360
SEQIDNO:61 DENPANAGFCVPA-GDCLGKGVLSVCRQGAPIVVSFPHFYQADERYNAIEGMNP-NE 368
SEQIDNO:62 ---SENAGFCIPE-GNCMDAGVLNVSICKNGAPIIMSFPHFYQADEKFVSAIKGMRP-NK 360
SEQIDNO:63 TVNPDNAGFCVPP-GNCPGAGVLNVSICKQGAPIFLSAPHFYQADQKFVSDIEGMHP-TK 363
SEQIDNO:64 SVNPNKKGFCVPE-GNCLPSGLNVSICKEGAPIVLSSPHFYQADENVINSIRGMKP-VK 364
SEQIDNO:65 DSHPDNMCFCPAGKPCSNGLENVSLCQYDSPIMLSFPHFYLADES LRTQVEGISPPMK 414
SEQIDNO:66 DKNPNMCMCYCPAG-PPCAHGLENVSLCQYDSPILLSFPHFYMAQT LRTAVEGISPPEK 382
          * : *      * *::*: * :*: * * * * * : . : * : * :

```

## LAMP同源结构域

```

SEQIDNO:4  EDHETFDINPLTGIILKAAKRFQINIYVKKLDDFVETGDIRTMVFPVMYLNESVHIDKE 420
SEQIDNO:56 EDHETFDINPLTGIILKAAKRFQINIYVKKLDDFVETGDIRTMVFPVMYLNESVHIDKE 420
SEQIDNO:57 EDHETFDINPLTGIILKAAKRFQINIYVKKLDDFVETGDIRTMVFPVMYLNESVHIDKE 420
SEQIDNO:58 DYHETFDINPLTGIILRAAKRFQINIVYVKKLDDFIETGNIRTMVFPVMYLNESVHIDKE 420
SEQIDNO:59 EYHETFDINPLTGIILRAAKRFQINIVYVKKLDDFVETGNIQTLVFPVMYLNESVHIDKE 420
SEQIDNO:60 EEHESFVDINPLTGIILRGAKRFQINTYVKKLDDFVETGDIRTMVFPVMYLNESVHIDKE 420
SEQIDNO:61 EEHETFDINPTTGVPIRACKRAQLNIILKRVGRFPNTKFLNETIFPIMYVNETATIDDE 428
SEQIDNO:62 EEHESFVDINPLTGIILRGAKRFQINTYVKKLDDFVETGNIRTMVFPVMYLNESVHIDKE 420
SEQIDNO:63 EYHETFDINPLTGLVLQAARKMQINIHVRKLPEFFETGNIRTLIFPVMYLNESVHIDKE 423
SEQIDNO:64 EHHMTFLDLNPLTGTLIQAARKQVNVYVKKLDDFVETGDIQTLFFPVMYLNESVHIDKE 424
SEQIDNO:65 EKHQFFFDVQPKMGTTLVRARIQINLAVSQVFDIKQVANFPDIIFPILWFEEGIDNLPD 474
SEQIDNO:66 DKHQLFIDVQFDMGTALRARARIQINLAVSQVVDIKQVANFPDIVFPILWFEEGIDSLPD 442
: * :*: * : : * * * : : : . : .*: : *

```

## 跨膜结构域

## 胞质尾区

```

SEQIDNO:4  TASRLKSMINTTIIITNI----PYIIMALGVFFGLVFTWLACKGQGSMDDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:56 TASRLKSMINTTIIITNI----PYIIMALGVFFGLVFTWLACKGQGSMDDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:57 TASRLKSVINTTIIITNI----PYIIMALGVFFGLVFTWLACKGQGSMDDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:58 TASRLKSVINTTIIITNI----PYIIMALGVFFGLVFTWLACRGQGSMDDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:59 TASRLKSVINTTIIITNI----PYIIMALGVFFGLVFTWLACRGQGSMDDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:60 TANQLKSVINTTIIITNI----PYIIMALGVFFGLVFTWLACRGQGSMDDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:61 SAAQMRMLLIIVTVSNF----PYIIMALGVFFGLVFTWLACRGQGSMDDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:62 TASQLKSVINTTIIITNI----PYIIMALGVFFGLVFTWLACRGQGSMDDEGTADERAPLI 476
SEQIDNO:63 SANKLKHVLEASVVTGI----PFVIMAIGIVFGIVFSVLVCRAQGAREESTEEERSPLI 479
SEQIDNO:64 SAGRLRSILFQGRVVANI----PFIIMGLGIIILAFLETTLSCLQKRSRDEGTEEERGPLI 480
SEQIDNO:65 EVTDL--MRFAEQVPPKIRVALIVGLCALGVILLSTF--CLIRNSHRQSTLHLEGSNY 530
SEQIDNO:66 EILD--MKVATNIPRAKFILTIALFGLGGFLFVAVI--CLVRKSHRQSTLHLEGSNY 498
          : : : : : * : : :

```

图6续

```

SEQIDNO:4      RT----- 478
SEQIDNO:56     RT----- 478
SEQIDNO:57     RT----- 478
SEQIDNO:58     RT----- 478
SEQIDNO:59     RT----- 478
SEQIDNO:60     RT----- 478
SEQIDNO:61     HSFATTKDETAYTQVSNQAEDSPENRNNQPLRNGSYIAMSPVEAQKC 531
SEQIDNO:62     RT----- 478
SEQIDNO:63     RT----- 481
SEQIDNO:64     RAS----- 483
SEQIDNO:65     LATA-----QVDMNKKQNKDNQPARY----- 551
SEQIDNO:66     LATA-----SVDQAKKKAKMDNGMSSKSN----- 522
:

```

LIMP-2					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_005497.1	智人 (H. sapiens)	4	NP_775366.1	斑马鱼 (D. rerio)	61
XP_517214.2	黑猩猩 (P. troglodytes)	56	NP_446453.1	褐家鼠 (R. norvegicus)	62
XP_001096458.1	猕猴 (M. mulatta)	57	XP_420593.1	原鸡 (G. gallus)	63
XP_005639134.1	家犬 (C. lupus familiaris)	58	NP_001016557.1	热带爪蟾 (X. tropicalis)	64
NP_001095623.1	家牛 (B. Taurus)	59	NP_726504.2	黑腹果蝇 (D. Melanogaster)	65
NP_031670.1	小鼠 (M. musculus)	60	XP_314345.2	冈比亚按蚊 (A. gambiae)	66

图6续

## 人类LIMBIC/SLAMP与直系同源序列的比对

## 信号序列

## LAMP同源结构域

		1	
SEQIDNO:67	-MVRVQPDRLQLPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRSDFNRTDNIIVRQGDTAILRCVVED	57	
SEQIDNO:68	-MVRVQPDRLQLPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRSDFNRTDNIIVRQGDTAILRCVVED	57	
SEQIDNO:69	-MGARVQPDRLQLPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRSDFNRTDNIIVRQGDTAILRCVVED	57	
SEQIDNO:70	-MVGRVQPDRLQLPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRSDFNRTDNIIVRQGDTAILRCVVED	57	
SEQIDNO:71	-MVGRSQSDRLQLPLF-LLRLLCL-LPTGLPVRSGDFNRSTDNIIVRQGDTAILRCFVED	57	
SEQIDNO:72	----MSCLWIHSVFIPGFF--LLF-GFEGFPVISVESQRSTDNIIVRQGDITVIRCYVDD	53	
SEQIDNO:102	-MVGRVQPDRLQLPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRSDFNRTDNIIVRQGDTAILRCVVED	57	
SEQIDNO:103	-MVGRVQPDRLQLPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRSDFNRTDNIIVRQGDTAILRCVVED	57	
SEQIDNO:104	-MVARVQPDRLQLPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRSDFNRTDNIIVRQGDTAILRCVVED	57	
SEQIDNO:105	-MVARVQPDRLQLPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRSDFNRTDNIIVRQGDTAILRCVVED	57	
SEQIDNO:106	-----MSFAGEAA-----SQILNKAEPFISRSEAFKFAVGDTITLPCVAS	42	
SEQIDNO:107	-----MRPCLLHSIWMLGFVLCCLSLQGLPVRSGDFNRSTDNIIVRQGDTAILRCFVED	54	
SEQIDNO:108	-MLGARPPRSQPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRSDFNRTDNIIVRQGDTAILRCVVED	57	
SEQIDNO:109	-MVGRVHPDRKQLPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRGVDFTRTDNIIVRQGDTAILRCYVED	57	
SEQIDNO:110	-MVARQPDRLQLPLV-LLRLLCL-LPTGLPVRSDFTRTDNIIVRQGDTAILRCFVED	57	
SEQIDNO:111	---MRTYW-LHSIWVL-GFFLSLF-SLQGLPVRSDFTRTDNIIVRQGDTAILRCYVED	54	
SEQIDNO:112	-----MRPCLLHSIWMLGFVLCCLSLQGLPVRSGDFNRSTDNIIVRQGDTAILRCFVED	54	
SEQIDNO:113	MQVGRKSCWRQ--LQASFFRLCL-IFTGFPVRSDMQRATDNIIVRQGDITVIRCYVDD	57	
	:	:: :.. *** : * * .	

## LAMP同源结构域

		2	
SEQIDNO:67	KN-SKVAWLNRSGIIFAGHDKWSLDPVELEKRHSLEYSRLIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:68	KN-SKVAWLNRSGIIFAGHDKWSLDPVELEKRHSLEYSRLIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:69	KN-SKVAWLNRSGIIFAGHDKWSLDPVELEKRHSLEYSRLIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:70	KN-SKVAWLNRSGIIFAGHDKWSLDPVELEKRHALEYSLRIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:71	KS-SKVAWLNRSGIIFAVDDKWSLDPVELEKRSPFEYSRLIQKVDVSDGFPYICSVQTN	116	
SEQIDNO:72	KV-SKVAWLNRSGIIFAGEDKWSLDPVELVTQGLQLEYSLRIQKVDVFDEGPYTCIQTK	112	
SEQIDNO:102	KN-SKVAWLNRSGIIFAGHDKWSLDPVELEKRHALEYSLRIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:103	KN-SKVAWLNRSGIIFAGHDKWSLDPVELEKRHSLEYSRLIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:104	KN-SKVAWLNRSGIIFAGHDKWSLDPVELEKRHSLEYSRLIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:105	KN-SKVAWLNRSGIIFAGHDKWSLDPVELEKRHSLEYSRLIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:106	PGTYVLAWKRGIAILTAGSVKVTDPVRVLVN---GYSLQIRDAVPQDAGDYICQIAML	98	
SEQIDNO:107	RS-SRVAWLNRSGIIFAGDDKWSLDPVELEKRSLLEYSLRIQKVDVSDGFPYTCVQTK	113	
SEQIDNO:108	KN-SKVAWLNRSGIIFAGHDKWSLDPVELEKRHSLEYSRLIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:109	KS-SKVAWLNRSGIIFAGHDKWSLDPVELEKRTALEYSRLIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:110	RS-SKVAWLNRSGIIFAGEDKWSLDPVELEKRSPLEYSLRIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:111	RS-SKVAWLNRSGIIFAGEDKWSLDPVELEKRNPLEYSRLIQKVDVYDEGSYTCVQTQ	113	
SEQIDNO:112	RS-SRVAWLNRSGIIFAGDDKWSLDPVELEKRSLLEYSLRIQKVDVSDGFPYTCVQTK	113	
SEQIDNO:113	KV-SKVAWLNRSGIIFAGQDKWSLDPVDLVTKGQLEYSLRIQKVDVYDEGSYTCIQTK	116	
	: * * . * : * * : * * * * . * * * : * : . * * * * . :		

图7



## LAMP同源结构域

3

```

SEQIDNO:67 HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---T 171
SEQIDNO:68 HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---T 171
SEQIDNO:69 HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---T 171
SEQIDNO:70 HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---L 171
SEQIDNO:71 QHTKTMQVYLIVQVPPKISNISA--DITVNEGSNVTLMCIAYGRPEPMITWRHLTP---T 171
SEQIDNO:72 QQSKTSQVYLIVQVPAIIYKVSE--DITVNEGSNVALTCLANGRPDPAITWRLNLP---S 167
SEQIDNO:102 HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---L 171
SEQIDNO:103 HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---T 171
SEQIDNO:104 HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---T 171
SEQIDNO:105 HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---T 171
SEQIDNO:106 DPR-EITHSVEILVPPKITHVTSGGHLQVRKGSFVRLECSATGNPMPNITWTRKNNLLPN 157
SEQIDNO:107 QHTKTTQVYLIVQVPPKISNISA--DITVNEGSNVTLMCIAYGRPEPMITWRHLTP---T 168
SEQIDNO:108 HEPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---T 171
SEQIDNO:109 HQPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DVTVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---T 171
SEQIDNO:110 HHPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DITVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---T 171
SEQIDNO:111 HHPKTSQVYLIVQVPPKISNISS--DITVNEGSNVTLCMANGRPEPVITWRHLTP---T 168
SEQIDNO:112 QHTKTTQVYLIVQVPPKISNISA--DITVNEGSNVTLMCIAYGRPEPMITWRHLTP---T 168
SEQIDNO:113 QQPKTSQVYLIVQVPASIVQVSN--DITVNEGSNVTLSCLANGRPDPAITWRLNLP---S 171
. : : * * * : : : . : : * * * * * * * * * * * * * * * * .

```

## LAMP同源结构域

4

```

SEQIDNO:67 GREFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVQVKVTVNYPPTITESKS 230
SEQIDNO:68 GREFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT 230
SEQIDNO:69 GREFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT 230
SEQIDNO:70 GREFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT 230
SEQIDNO:71 ARDFEGEEFLEIQGITREQSGRYECKAANEVASADVQVRVTVNYPPIITESNS-NEAT 230
SEQIDNO:72 AEALDV-GEYLEISGVVRSQAGRYECKASNDVSTPDVKYVNVVNYPPYIKDVRS-SETA 225
SEQIDNO:102 GREFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT 230
SEQIDNO:103 GREFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT 230
SEQIDNO:104 GRELEGEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT 230
SEQIDNO:105 GREFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT 230
SEQIDNO:106 GEEQFT-NPVYVIENMDRHKGGTYICTANNGVGQVATSQIILHVLYPEISVENPTVYSG 216
SEQIDNO:107 ARDFEGEEFLEIQGITREQSGRYECKAANEVASADVQVRVTVNYPPIITESKS-NEAT 227
SEQIDNO:108 GREFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT 230
SEQIDNO:109 GREFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVSSADVQVKVTVNYPPTITESKS-NEAT 230
SEQIDNO:110 GKEFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVASADVQVRVTVNYPPTITESKS-NEAA 230
SEQIDNO:111 GKEFEGEEYLEILGITREQSGKYECKAANEVASADVQVRVTVNYPPTITESKS-NEAA 227
SEQIDNO:112 ARDFEGEEFLEIQGITREQSGRYECKAANEVASADVQVRVTVNYPPIITESKS-NEAT 227
SEQIDNO:113 AEPLDG-EEYLDIIGIMRTQAGRYECKASNDVATPDVKYVNVIVNYPPTIKKTQS-SETP 229
.. * : : * : * * * * * * * * * * * * * * * * : : * * * * * * * * :

```

图7续

## 6

跨膜：

SEQIDNO:67	VAANKLGVTNASIVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCCLL-SKC-----	338
SEQIDNO:68	VAANKLGVTNASIVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCCLL-SKC-----	338
SEQIDNO:69	VAANKLGVTNASIVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCCLL-SKC-----	338
SEQIDNO:70	VAANKLGVTNASIVLFSKYAKTEPDSMQVIE-FLHIDLKSIRHPL-KVNPIQK-----	34
SEQIDNO:71	VAANKLGITNTSLYLYI-GPGTPIDNATSLAASLWLMANILCLF-CTC-----	337
SEQIDNO:72	VATNRLGVHNASVFLYKPGMGRDINSAGCICQSLWLLLLCVSSAL-LQC-----	333
SEQIDNO:102	VAANKLGVTNASIVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLFCCLL-SKC-----	338
SEQIDNO:103	VAANNLGVTNASIVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCCLL-SKC-----	338
SEQIDNO:104	VAANNLGVTNASIVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCCLL-SKC-----	338
SEQIDNO:105	VAANNLGMTNASIVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCCLL-SKC-----	338
SEQIDNO:106	IADNQLGKTRKTVTLTGPKPTAVF---RSVPNSQWKDKYNISWIVDSHSPIEEFKLYYRQ	333
SEQIDNO:107	VAANKLGITNTSLYLYI-GPGTPIDSATSLAASLWLMANLLFCLF-CTC-----	334
SEQIDNO:108	VAANNLGVTNASIVLFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCCLL-SKC-----	338
SEQIDNO:109	VAANKLGVTNASLILFRPGSVRGINGSISLAVPLWLLAASLFCCLL-SKC-----	338
SEQIDNO:110	VAANKLGVTNASLYLYRPGTGRVDNGSVSLAVPLWLLAASLLCCLL-SKC-----	338
SEQIDNO:111	VAANKLGVTNASLYLYRPGTGRVDNGSMSLAVPLWLLAASLLCCLL-SKC-----	335
SEQIDNO:112	VAANKLGITNTSLYLYI-GPGTPIDSATSLAASLWLMANLLFCLF-CTC-----	334
SEQIDNO:113	VASNRLGVQNASLFLYRPGTGRDINGSACVSQSLWLLLLASFACLF-LKC-----	337

图7续



```

SEQIDNO:67 ----- 338
SEQIDNO:68 ----- 338
SEQIDNO:69 ----- 338
SEQIDNO:70 ----- 341
SEQIDNO:71 ----- 337
SEQIDNO:72 ----- 333
SEQIDNO:102 ----- 338
SEQIDNO:103 ----- 338
SEQIDNO:104 ----- 338
SEQIDNO:105 ----- 338
SEQIDNO:106 MTFSIGQLQLQTDWRDIVLPAPFPYSHHYTQGMSYLRGLEPDQQYEARVQSRNRYGWSD 393
SEQIDNO:107 ----- 334
SEQIDNO:108 ----- 338
SEQIDNO:109 ----- 338
SEQIDNO:110 ----- 338
SEQIDNO:111 ----- 335
SEQIDNO:112 ----- 334
SEQIDNO:113 ----- 337

```

```

SEQIDNO:67 ----- 338
SEQIDNO:68 ----- 338
SEQIDNO:69 ----- 338
SEQIDNO:70 ----- 341
SEQIDNO:71 ----- 337
SEQIDNO:72 ----- 333
SEQIDNO:102 ----- 338
SEQIDNO:103 ----- 338
SEQIDNO:104 ----- 338
SEQIDNO:105 ----- 338
SEQIDNO:106 FSESFLFTTSNTGKWMGQCCTNPG 417
SEQIDNO:107 ----- 334
SEQIDNO:108 ----- 338
SEQIDNO:109 ----- 338
SEQIDNO:110 ----- 338
SEQIDNO:111 ----- 335
SEQIDNO:112 ----- 334
SEQIDNO:113 ----- 337

```

LIMBIC/LSAMP					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_002329.2	智人 ( <i>H. sapiens</i> )	67	NP_001192297.1	家牛 ( <i>B. Taurus</i> )	105
XP_516662.2	黑猩猩 ( <i>P. troglodytes</i> )	68	XP_312298.5	冈比亚按蚊 ( <i>A. gambiae</i> )	106
XP_002716722.1	家兔 ( <i>O. cuniculus</i> )	69	NP_001096385.1	热带爪蟾 ( <i>X. tropicalis</i> )	107
NP_780757.1	小鼠 ( <i>M. musculus</i> )	70	XP_003434117.1	家犬 ( <i>C. lupus familiaris</i> )	108
NP_001086181.1	非洲爪蟾 ( <i>X. laevis</i> )	71	XP_001362972.1	短尾负鼠 ( <i>M. domestica</i> )	109
NP_001034921.1	斑马鱼 ( <i>D. rerio</i> )	72	NP_990205.1	原鸡 ( <i>G. gallus</i> )	110
NP_058938.1	褐家鼠 ( <i>R. norvegicus</i> )	102	XP_002190582.1	斑胸草雀 ( <i>T. guttate</i> )	111
XP_001502710.1	家马 ( <i>E. caballus</i> )	103	NP_001096385.1	热带爪蟾 ( <i>X. tropicalis</i> )	112
NP_001231626.1	野猪 ( <i>S. scrofa</i> )	104	XP_003449349.1	罗非鱼 ( <i>O. niloticus</i> )	113

图7续

## 人类ENDOLYN与直系同源序列的比对

## 信号序列

## LAMP同源结构域

```

SEQIDNO:5      MSRLSRSLWAATCLGVLCVLSADKNTQH-PNVTTLAPISNVTSAP-----V-TSLPLV 53
SEQIDNO:73     MSGSSRRLWAATCLAVLCVSAAPNITTLAPNVTEVPT-----TT-----TKVVPPTQM 50
SEQIDNO:74     MSRLSRSLWAVTCLAVLCVLSAEENPTPH-TNVTSLAPTSNITSAP-----V-TSLPLV 53
SEQIDNO:75     MLGLSRQLLWAVGCLAALCVLTAANKSTIL-PPSTTPWLSPTTQT-----TSAPPKTL 54
SEQIDNO:76     MSGLSRPLLLAVGCLAALCVITAAGNTTTLA-PNVTTASS-PPPTTTTVPVSPTTSLPLPV 58
SEQIDNO:77     MSGLSRPLLLAVGYLAALCVITAARNTTVT-PNVTPSS-PPPTTATVPVSPTTTLTPPV 58
SEQIDNO:78     MSGLSRQLCWAAACLAALCALTAQAQSFSSD-PNGTTTTTQATTTAAT-----TRVTTAAPA 55
SEQIDNO:79     MSGASRGLFWAATCLAAALCLSAQAQSNS-SASPNVTDPT-----TT-----SKVVPPTLT 49
*   * * * . * . * . * : * . * :

```

## LAMP同源结构域

```

          1       2 3           4       5       6       7       8
SEQIDNO:5      TTPAPETCEGRNSCVSCFNVSVV-NTTCFWIECKD--ESYCSHNSTVSDCQVGNNTDFCS 110
SEQIDNO:73     PTVLPETCASFNSCVSCVNATFTNNITCFWLHCQEANKTYCAN-EPLSNCSQVNRTDLCS 109
SEQIDNO:74     TTPAPETCEGRNSCVSCFNASTV-NTTCFWIECKD--ESYCSHNSTVSDCQVGNNTDFCS 110
SEQIDNO:75     PTPAPEICENRNSCISCFDA----NNTCFWIECKG--KSYCSDNSTVSDCHVNGTDFCS 108
SEQIDNO:76     TTPAPDICGRNSCVSCVDG----NATCFWIECKG--KSYCSDNSTAGDCKVNTTGFC 112
SEQIDNO:77     TTPAPDICGRNSCISVDG----NATCFWIECKG--KSYCSDNSTVSDCKVNTTGFC 112
SEQIDNO:78     TTPAPDPCDNRNSCVSCVNTSVD-ATACSWIECKE--KSYCSHNSTVSDCQVNSTQLCS 112
SEQIDNO:79     TTKPPETCESFNSCVSCVNATLTNNITCVWLDCEANKTYCSS-ELVSNCTQKTSTDSCS 108
*   * : * . * . * . * . * : * * . * : * : * : * : * : * : * :

```

## LAMP同源结构域

```

SEQIDNO:5      VST-ATPVPTANSTAKPTVQSPSTT-SKTVTTS GTTNTVTPTSQPVKRSTFDAASFIG 168
SEQIDNO:73     VIPPTPVPT-NSTAKPTTRPSSPTPTPSVTSAGTNTTLTPTSQPERKSTFDAASFIG 168
SEQIDNO:74     VPT-ATLVPTANSTAKPTVQSPSTT-SKTVTTS GTTNTVTPTSQPVKRSTFDAASFIG 168
SEQIDNO:75     GPT-VTPLPT-NSTAKTTTTLPSPSSA-STTATTSGTNTTLAPTTPMRKSTFDAASFIG 165
SEQIDNO:76     VPT-TTPTPT-NSTAKTTTTLPSTTTT-STTATTSGTNTTLSPTIQPTRKSTFDAASFIG 169
SEQIDNO:77     VPT-TTPTPT-NSTAKTTTTLPSTTTT-STTATTSGTANTTLTPTIQPMRKSTFDAASFIG 169
SEQIDNO:78     APE-PTMMPT-NSTAKTTTQPSSSTA-TTTATTSGTNTLSPTSQPRKSTFDAASFIG 169
SEQIDNO:79     VIP-TTPVPT-NSTAKPTTRPSSPTPTPSVTSAGATNTTVTPTSQPERKSTFDAASFIG 166
*   * * * * * * . * * : . . . * : * : * : * : * : * * * * * * * *

```

## 跨膜

## 胞质尾区

```

SEQIDNO:5      GIVLVLGVAIVFFLYKFCKSKERNYHTL 197
SEQIDNO:73     GIVLVLGVAIVFFLYKFCKSKERNYHTL 197
SEQIDNO:74     GIVLVLGVAIVFFLYKFCKSKERNYHTL 197
SEQIDNO:75     GIVLVLGVAIVFFLYKFCKSKERNYHTL 194
SEQIDNO:76     GIVLVLGVAIVFFLYKFCKSKERNYHTL 198
SEQIDNO:77     GIVLVLGVAIVFFLYKFCKSKERNYHTL 198
SEQIDNO:78     GIVLILGVQAVIFFLYKFCKSKERNYHTL 198
SEQIDNO:79     GIVLVLGVAIVFFLYKFCKSKERNYHTL 195
*****

```

图8

Endolyn					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_006007.2	智人 (H. sapiens)	5	NP_001039506.1	家牛 (B. taurus)	76
NP_058594.1	小鼠 (M. musculus)	73	XP_004011265.1	绵羊 (O. aries)	77
XP_001091286.1	猕猴 (M. mulatta)	74	XP_532256.2	家犬 (C. lupus familiaris)	78
XP_001924661.2	野猪 (S. scrofa)	75	NP_114000.1	褐家鼠 (R. norvegicus)	79

图8续

## 人类MACROSAILIN与直系同源序列的比对

信号序列	1	LAMP同源结构域1
SEQIDNO:80	MRLAVLFSGALLGL-LAAQGTGND	CPHKKSATLLPSFTVPTVTEST----GTTSHRTTK 55
SEQIDNO:81	MRLAVLFSGALLGL-LAAQGTGND	CPHKKSATLLPSFTVPTVTEST----GTTSHRTTK 55
SEQIDNO:82	MRLAVFFSGALLGL-LAAQGTGND	CPHKKSATLLPSFTVPTTATESTPS-PGTTSHRTTK 58
SEQIDNO:83	MRLPVCL--ILLGP-LIAQGTED	CPHKKAVTLLPSFTMTPTATESTAS-PTTSHRPTTT 56
SEQIDNO:84	MRLAVLFLGALLGL-LAAQGTGND	CPHKKSATLLPSFTVPTTATEST----GTTSHRTTK 55
SEQIDNO:85	MRFPVCL--TLLVL-LVAQGTGK	DCPHKKAATLLPSFTETPTTTGSTAS-PTTTHRPTTT 56
SEQIDNO:86	MRPAVFFLGALVGL-LAAQGT	RSDCPHKKSATLLPSFTVPTTATESTGS-PGTTSHSTTT 58
SEQIDNO:87	MRLAVLFSGALLGL-LAAQETG	NDCPHKKSATLLPSFTVPTTATESTAS-PGTTSHQTTQ 58
SEQIDNO:88	MRLFVLFLA-LLGL-HAA-----	-----S-SGTTSHRTTK 27
SEQIDNO:89	MTLAVLFLGALLGL-LAESTTSH-----	-----22
SEQIDNO:90	MRLAVLFSGALLGL-LAAQGTGND	CPHKKSATLLPSFTVPTTATEST----GTTSHRTTK 55
SEQIDNO:91	MRLSLLSGILLGL-LAEQAGD	KCPQEKSVTLVPSFTVTIATERSTTSPETTTSSGS- 58
SEQIDNO:92	-----MGLTLPLPAQGSQCRAN	CPHKKSATLVPSFTVPTTATSG----PTTTAHQTTT 49

## LAMP同源结构域1

SEQIDNO:80	SHKTTTHRTTT-----TGTTSHGPTTATHNP	TTTSHGNVTVHPTSNNSTATSQGPSTAT 108
SEQIDNO:81	SHKTTTHRTTT-----TGTTSHGPTTATHNP	TTTSHGNVTVHPTSNNSTATSQGPSTAT 108
SEQIDNO:82	SHRTTWRISTTTHTNTITGTTSESPTATHSPA-----	-----92
SEQIDNO:83	SHGNVTVH-----T-----SSGPTTVTHNPA-----	-----77
SEQIDNO:84	SHKTTTHRTTT-----TGTTSHRPTTATHNP	TTTSHRNATVHPTSNNSTATSQGPSTAT 108
SEQIDNO:85	SHRPTTTS-----HRPTTSHRPTTSHRPT-----	-----TTS 85
SEQIDNO:86	AETT-----SHAPNTTTHQ-----	-----72
SEQIDNO:87	SHRTTTT-----GTTSDHPTTATHNP-----	-----79
SEQIDNO:88	NPHTT-----SHSTATPGTTSHRPTTAT-----	-----50
SEQIDNO:89	--RTTTPR-----TTTTGTTSHGPTTVTHNPA-----	-----47
SEQIDNO:90	SHKTTTHRTTT-----TGTTSHRPTTATHNP	TTTSHRNATVHPTSNNSTATSQGPSTAT 108
SEQIDNO:91	--TATTYRTS-----TAATTPHS-----	-----NSTATS-----80
SEQIDNO:92	DHGTTTSHETTTSQGTSTHGTSTPHTTTTGHGTT-TGHQN-----	-----TSH-----91

## LAMP同源结构域1

SEQIDNO:80	HSPATTSHGNATVHPT-SNSTATSPG-----	F-T--SSAHPEPPPPSPSPSPTSK 154
SEQIDNO:81	HSPATTSHGNATVHPT-SNSTATSPG-----	F-T--SSAHPEPPPPSPSPSPTSK 154
SEQIDNO:82	---TTTSHQNTTVHPT-SNITATSPG-----	PST--RSPHPEP-PPSPSPSPGSK 135
SEQIDNO:83	---TTTSHGNATISHATVSPPT-----	NG-TATSPRSST--VGPHPGPPPPSP--SPRSK 124
SEQIDNO:84	HRPATTSHGNATVHPT-SNSTATSPG-----	L-T--SSAHPGPPPPSPSPSPASK 154
SEQIDNO:85	HRPTTSHGNATV-----SP-----	TTNSPGFST--VGPHPGPPPPSPSPSPSST 128
SEQIDNO:86	-APTTPGHRNTTIHPTTSTNTTGTG	TGKPHSTSY--TQPGPGPRPPPPSPGPGPQ 129
SEQIDNO:87	---TTTSHGNTTVHPTTSTNTVTSPG-----	SAS--SSPHRPPPPSPSPSPGSK 124
SEQIDNO:88	---PTTGHGNVTVHPTTSTNTTTTGTG	TS--PGFST--STPHPGPPPPSPSPSPGSR 102
SEQIDNO:89	---TTTSHGNATVHPT-SSSTATSPG-----	SST--RPPHGGPPPPSPSPSPGSK 91
SEQIDNO:90	HRPATTSHGNATVHPT-SNSTATSPG-----	L-T--SSAHPGPPPPSPSPSPASK 154
SEQIDNO:91	--YSTTSEGTAVTHGTTTSPRN-----	TSTT--STSQSVVPVPPSPQPTSSPS 123
SEQIDNO:92	--STTTSHGTSTPHKTTTRHPTTSHGTTT	SHGTSTGHWTARPTIRPGPPPPPP--SPG 145

图9



## 跨膜结构域

## 胞质尾区

```

SEQIDNO:80      -SILLPLIIGLILLGLLLALVLIAFCIIRRRPSAYQAL 354
SEQIDNO:81      -SILLPLIIGLILLGLLLALVLIAFCIIRRRPSAYQAL 354
SEQIDNO:82      -SILLPLIIGLILLGLLLTLVLVTFCIIRRRPPTYQPL 335
SEQIDNO:83      -SILLPLIIGLVLLGLLLTLVLIAFCITRRRQSTYQPL 335
SEQIDNO:84      -SILLPLIIGLVLLGLLLALVLIAFCIIRRRPSAYQAL 354
SEQIDNO:85      -SILLPLIIGLVLLGLLLTLVLIAFCVTRRRQSTYQPL 330
SEQIDNO:86      -FNLLPLIVGVISLGLLLALVLTFCIIRRRPPTYQPL 329
SEQIDNO:87      -SILLPLIIGLILLGLFALVLITFCVIRRRPPTYQAL 322
SEQIDNO:88      PSILVPLIIGLILVGLLLALVLAFCIARRRPSAYQAL 305
SEQIDNO:89      -TILLPLIIGLIFLGLLLTLVLVTFCIIRRRPPAYQPL 291
SEQIDNO:90      -SILLPLIIGLVLLGLLLALVLIAFCIIRRRPSAYQAL 354
SEQIDNO:91      -NILVPLVVLVLLTLLILVLSAFCISRRRPPAYQPL 323
SEQIDNO:92      ----- 263

```

Macrosailin					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_001242.2	智人 (H. sapiens)	80	XP_849733.1	家犬 (C. lupus familiaris)	86
XP_003315403.1	黑猩猩 (P. troglodytes)	81	NP_001093232.1	家马 (E. caballus)	87
NP_001039367.1	家牛 (B. taurus)	82	XP_002719034.1	绵羊 (O. aries)	88
BAA23738.1	小鼠 (M. musculus)	83	XP_003131995.1	野猪 (S. scrofa)	89
XP_014974003.1	猕猴 (M. mulatta)	84	XP_003912313.1	东非狒狒 (P. anubis)	90
NP_001026808.1	褐家鼠 (R. norvegicus)	85	XP_001369761.1	短尾负鼠 (M. domestica)	91
			XP_001517723.2	鸭嘴兽 (O. anatinus)	92

图9续

## 人类LAMP5与直系同源序列的比对

信号序列	LAMP同源结构域
	1
SEQIDNO:93	MDLQGRGVPSIDRLRVLLMLFHTMAQIMAEQEEVENLSGLSTNPEKDI FVVRENGTTCIMA 60
SEQIDNO:94	MDLRGRAVPSIDRLRVLLMLFHTMAQIMAEQEEVENLSGLSTNPEKDI FVVRENGTTCIMA 60
SEQIDNO:95	MDLQGRAVPSVDRRLRVLLMLFHTMAQIMAEQEEVENLSGLSTNPEKDI FVVRENGTTCIMA 60
SEQIDNO:96	MDLRGRAVPSVYRLRVLLMLFHTMAQIMAEQEEVENLSGLSTNPEKDI FVVRENGTTCIMA 60
SEQIDNO:97	MDLRRRALLGVDGLRVLLMLFHTVTRIMAEQEEVENLSGLSTNPEKDI FVVRENGTTCIMA 60
SEQIDNO:98	MDLRVRTLLGGDRRLRILLMFFHVMVQTVAEQEEVENLSGLSTNPEKDI FVVRENGTTCIMA 60
SEQIDNO:99	MDLRGRALLGGDRRLRILLMFFHAMAQTVAEQEEVENLSGLSTNPEKDI FVVRENGTTCIMA 60
SEQIDNO:100	-----MAAGRLPGLLFLHAAARLAAEQEEVENLSGLSPNPEKDI FVVRENRTTCIMA 52
SEQIDNO:101	--MDYRACTSALRMPVLLLLLCTFSCNLAEQEEVENLSGLSSNPDKNIFAIRENGTTCIMA 58
	. : *::: . ***** *:*:*: *::: *::: *

## LAMP同源结构域

	2
SEQIDNO:93	EFAAKFIVPYDVWASNYVDLITEQADIALTRGAEVKGRCGHSESELQVFWVDRAAYALKML 120
SEQIDNO:94	EFAAKFIVPYDVWASNYVDLITEQADIALTRGAEVKGRCGHSESELQVFWVDRAAYALKML 120
SEQIDNO:95	EFAAKFIVPYDVWASNYVDLITEQADIALTRGAEVKGRCGHSESELQVFWVDRAAYALKML 120
SEQIDNO:96	EFAAKFIVPYDVWASNYVDLITEQADISLTRGAEVKGHCCHNESELQVFWVDRAAYALKML 120
SEQIDNO:97	EFAAKFIVPYDVWASNYVDLITEQADISLTRGAEVKGHCCHNESELQVFWVDRAAYALKML 120
SEQIDNO:98	EFAAKFIVPYDVWASNYVDLITEQAEISLTRGAEVKGHCCHNESELEVFVVDHAYTLRML 120
SEQIDNO:99	EFAAKFIVPYDVWASNYVDLITEQAEISLTRGAEVKGRCGHNESELQVFWVDRAAYTLKML 120
SEQIDNO:100	EFAAKFVVPYDVWASNYVDLITEQADIPLSRGAEMKGCCTNESELEISWLERAYTLKLF 112
SEQIDNO:101	EFSARILVPYEVPSNEVDWDLEEASIQLPRTTEIRGKCWNNESELHLSWLDKAYTLKLF 118
	**:::***: *:: ** *: * * *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *

## LAMP同源结构域

SEQIDNO:93	FVK-----ESHNMSKGPEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF 153
SEQIDNO:94	FVK-----ESHNMSKGPEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF 153
SEQIDNO:95	FVK-----ESHNTSKGPEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF 153
SEQIDNO:96	FVK-----ESRNASKGPEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF 153
SEQIDNO:97	FLK-----ESHNTPKGPEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF 153
SEQIDNO:98	FVK-----ESHNTSKGPEATWNLNKHVFVYDSSEKTHF 153
SEQIDNO:99	FVK-----ESHNTSKGLEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF 153
SEQIDNO:100	FLKVRGCPRLGRGRCAALRGPDPQCPPEEGHNTSRGPEAFWRLSRIQFSYDTSERTYF 172
SEQIDNO:101	FSK-----EGQDA--SKSRSWKMSKIQFLYDPSEHTIF 149
	* * *: *: * . . *: *: *: * * *: * *

图10



## LAMP同源结构域

3

```

SEQIDNO:93 KDAVSAGKHTANSHHLSALVTPAGKSYECQAQQTISLASSDPQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:94 KDAVSAGKHTANSHHLSALVTPAGKSYECQAQQTISLASSDLQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:95 KDAVSAGKHTANSHHLSALVTPAGKSYECQAQQTISLASSDPQKMTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:96 KDAVSAGKHTANSHRLSALVTPAGKSYECQAQQTISLASSDPQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:97 KDAVSAGKHTANSHHLSALVTPAGKSYECQAQQTISLASSDPQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:98 KAPVKVNKYIASSHLSALVTPAGMSYECQAQQTISLASSDPQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:99 KDAVSAGKHTANSHHLSALVTPAGMSYECQAQQTISLASSDPQKTVTMILSAVHIQPFDI 213
SEQIDNO:100 KDAVSPGKHTASSHLSALVTPAGKSYECQAQQTISLISSDHQKSVQQLLSEVRIQPFDI 232
SEQIDNO:101 KSGARPGRHTANSHHLSLMVTPAGMSYECEATQRISLTSTDHQQKIVVLYLSEVHLQPFDI 209
* . .::*.**:** :***** ***:** * ** * : ** *::*****

```

## 跨膜结构域

## 胞质尾区

4

```

SEQIDNO:93 ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIMVTLAIYHVHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:94 ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIMVTLAIYHVHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:95 ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIVVTLTIYHVHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:96 ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIVVTLAIYHIHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:97 ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIVVTLVIYHIHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:98 ISDFVFSEEHKCPVDEQEQLLEETLPLILGLILGLVIVITLVIYHIHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:99 ISDFVFSEEHKCPVDEREQLEETLPLILGLILGLVIVITLVIYHIHHKMTANQVQIPRDR 273
SEQIDNO:100 TADVFVFSEEHKCPVDQREQLLEETLPLILGLILGLVIVITLCVYHIHHKMTANQVQIPRDR 292
SEQIDNO:101 KSDFVYSEYKCPDQQRKQLEETLPLILGLTLGVAILIIVAVYHIHHKMTANQVQIPRDR 269
:***:***:***.***:***** ***:***: : ***:***:*****

```

```

SEQIDNO:93 SQYKHM 280
SEQIDNO:94 SQYKHM 280
SEQIDNO:95 SQYKHM 280
SEQIDNO:96 SQYKHM 280
SEQIDNO:97 SQYKHM 280
SEQIDNO:98 SQYKHM 280
SEQIDNO:99 SQYKHM 280
SEQIDNO:100 SQYKHM 299
SEQIDNO:101 SLYKHM 276
* *****

```

LAMP5					
登记号	物种	SEQ ID NO:	登记号	物种	SEQ ID NO:
NP_036393.1	智人 (H. sapiens)	93	NP_001076887.1	家牛 (B. taurus)	97
XP_514512.3	黑猩猩 (P. troglodytes)	94	NP_083806.2	小鼠 (M. musculus)	98
NP_001181627.1	猕猴 (M. mulatta)	95	NP_001014205.1	褐家鼠 (R. norvegicus)	99
XP_850634.1	家犬 (C. lupus familiaris)	96	XP_004935300.1	原鸡 (G. gallus)	100
			NP_001090781.1	热带爪蟾 (X. tropicalis)	101

图10续



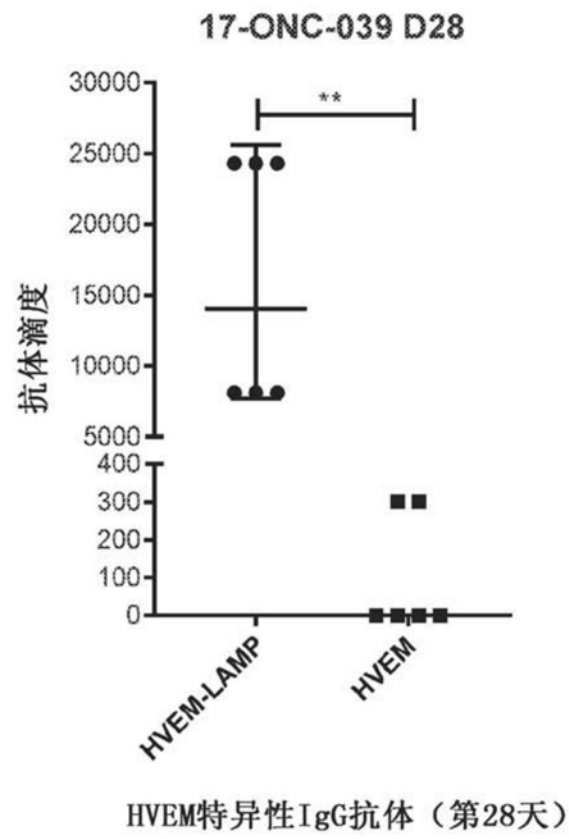


图11

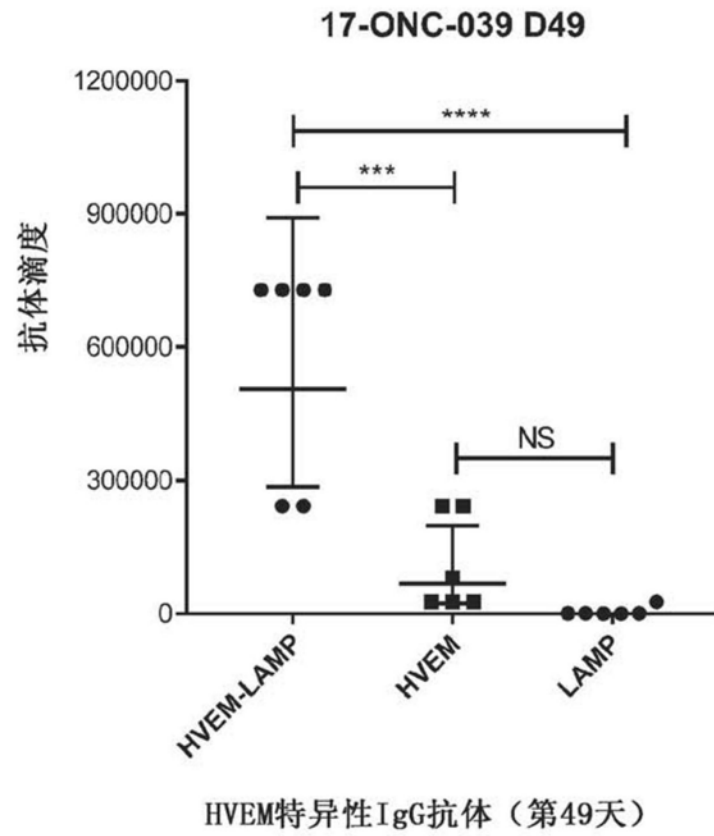


图12

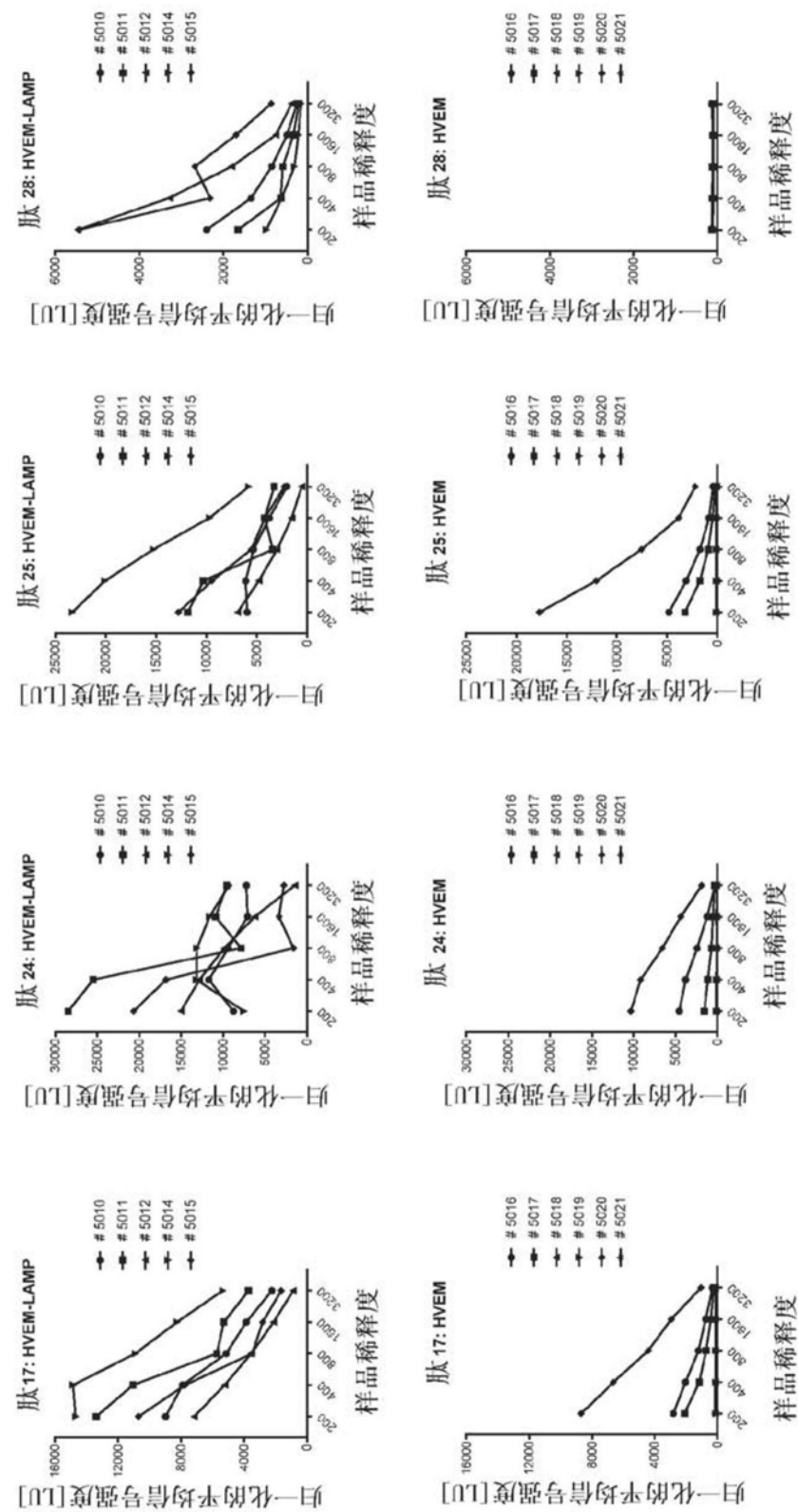


图13

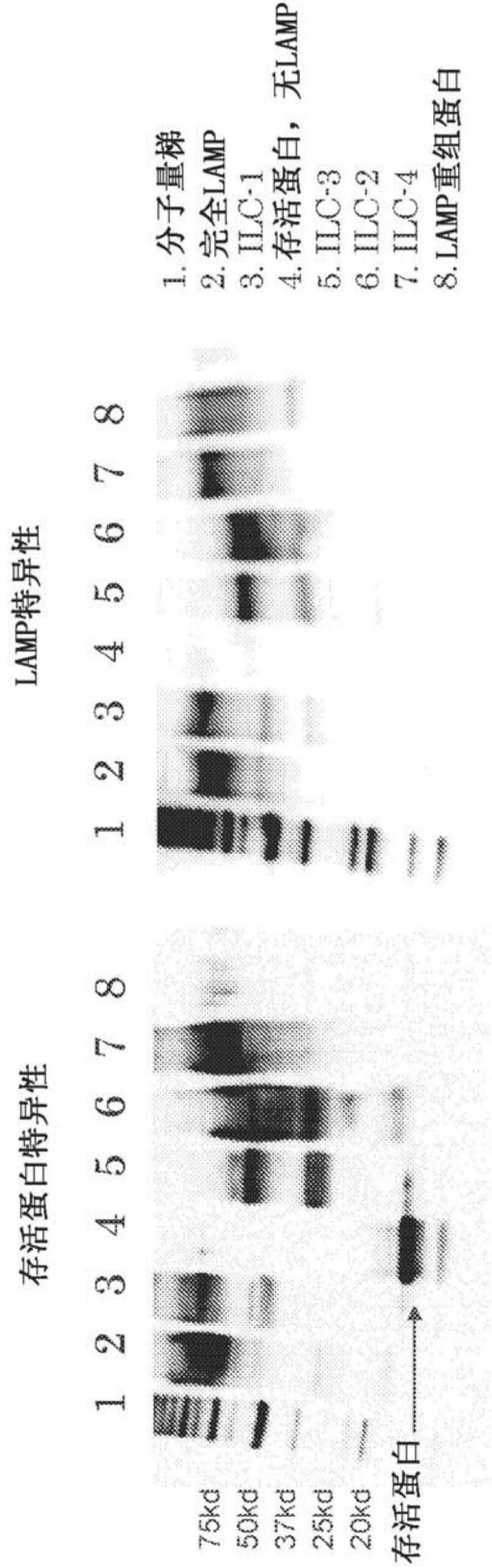


图14

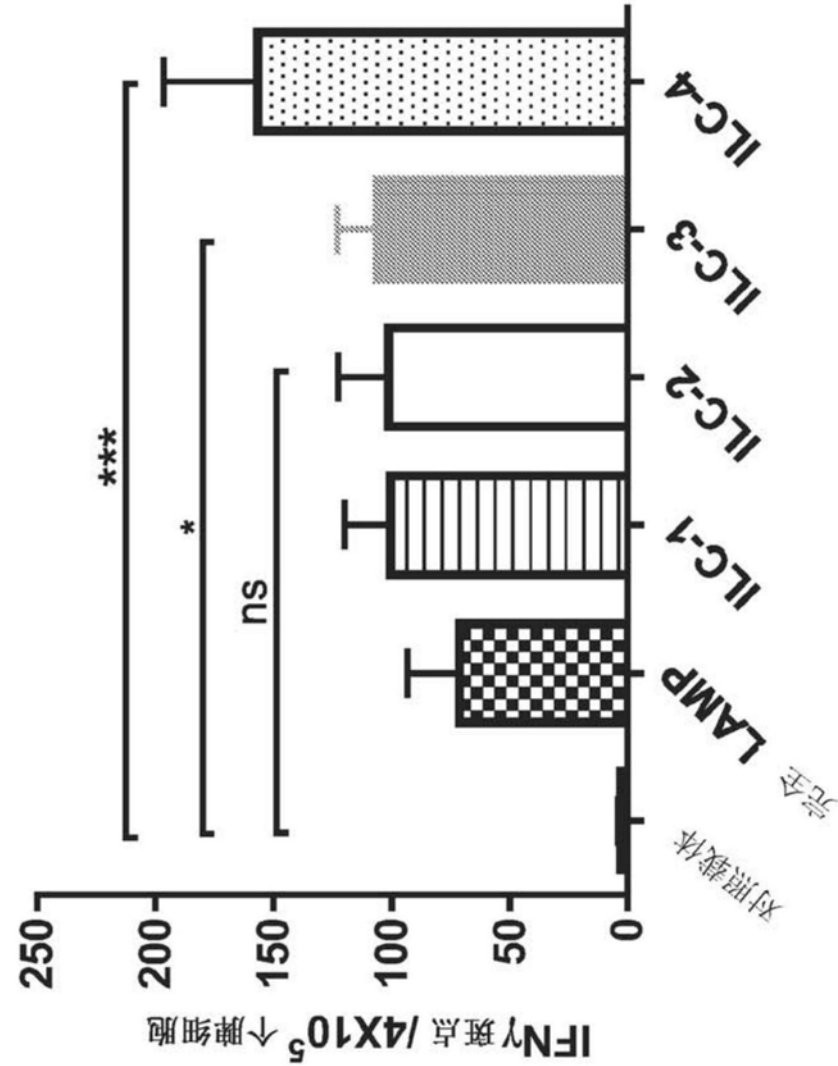


图15

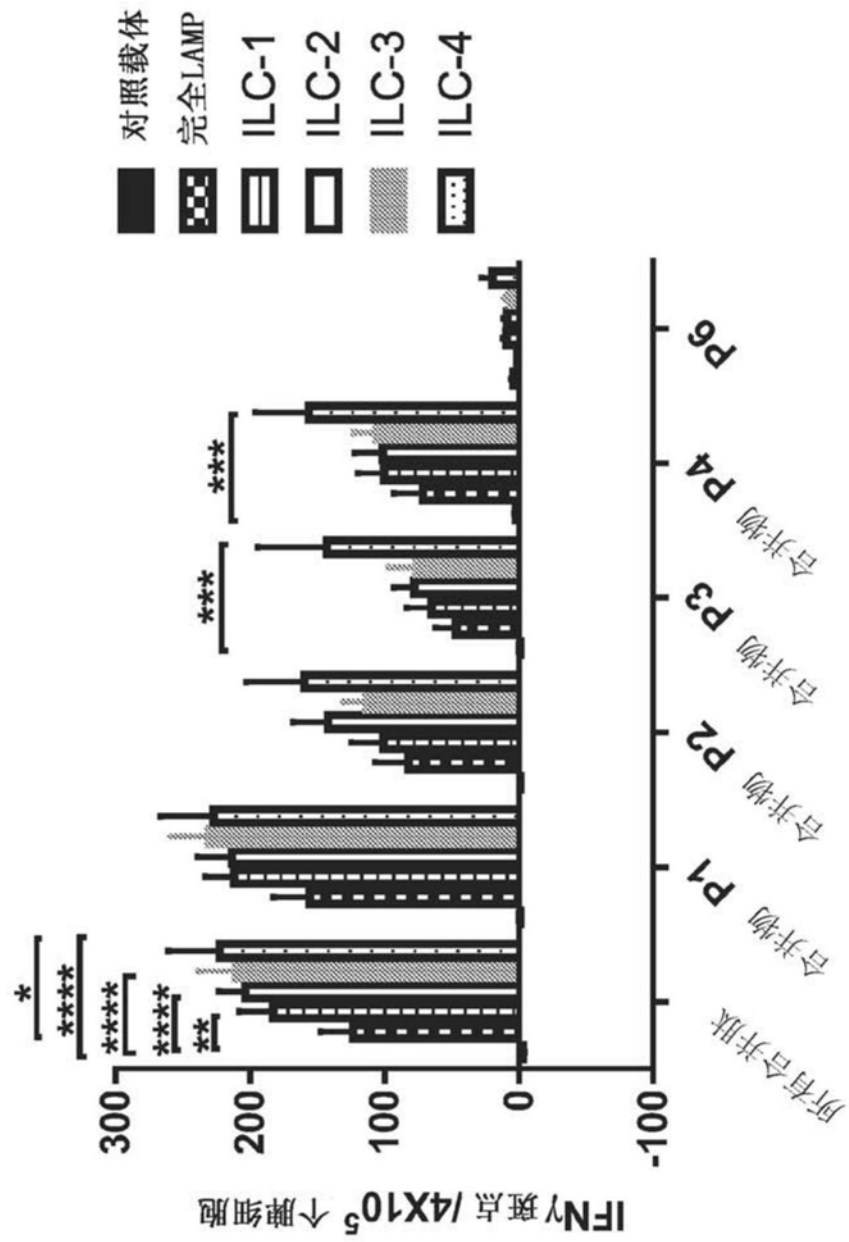


图16



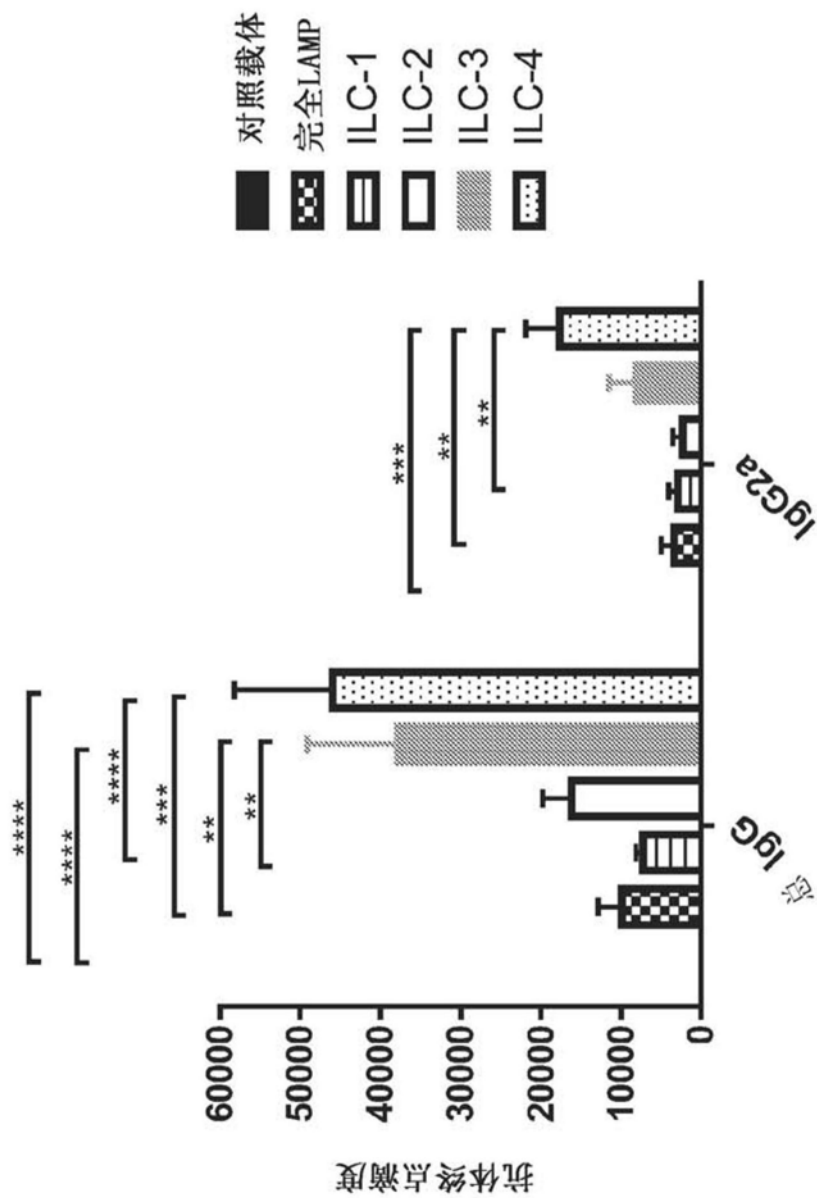


图18



## 存活蛋白--完全LAMP构建物的实例 (SEQ ID NO: 193)

maprsarrpIIIIIIIIIIglmhcasaaMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPDATVVLNRSSCGKENTSDP  
SLVIAFGRGHTLTNFRNATRYSVQLMSFVYNLSDTLHFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLH  
DATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSTTAPPAPSPSPSPVPKSPSVDKYNVSGTNGTCLLASMGLQLNLTYERKDNTTVTR  
LLNINPNKTSASGSCGAHLVTLELHSEGTTVLLFQFGMNASSRFFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYK  
CNAEEHVRVTKAFSVNIFKVVWQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSEM**MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACT**  
**TPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFCKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIA**  
**KETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD**EFTLIPIAVGGALAGLVLIYLVGRKRSHAGYQTI

## 存活蛋白--ILC-1构建物的实例 (SEQ ID NO: 194)

maprsarrpIIIIIIIIIIglmhcasaa**MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFCK**  
**FKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAM**  
**D**AMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTNFRN  
ATRYSVQLMSFVYNLSDTLHFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLHDTIQAYLSNSSFSRGETR  
CEQDRPSTTAPPAPSPSPSPVPKSPSVDKYNVSGTNGTCLLASMGLQLNLTYERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAH  
LVTLELHSEGTTVLLFQFGMNASSRFFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKNAEEHVRVTKAFSVNIF  
KVVWQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSEM**LIPIAVGGALAGLVLIYLVGRKRSHAGYQTI**

## 存活蛋白--ILC-2构建物的实例 (SEQ ID NO: 195)

maprsarrpIIIIIIIIIIglmhcasaa**MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFCK**  
**KELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD**A  
MFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTNFRNAT  
RYSVQLMSFVYNLSDTLHFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLHDTIQAYLSNSSFSRGETRCE  
QD**LIPIAVGGALAGLVLIYLVGRKRSHAGYQTI**

## 存活蛋白--ILC-3构建物的实例 (SEQ ID NO: 196)

maprsarrpIIIIIIIIIIglmhcasaaMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPDATVVLNRSSCGKENTSDP  
SLVIAFGRGHTLTNFRNATRYSVQLMSFVYNLSDTLHFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLH  
DATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDLE**MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQ**  
**CFCKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAA**  
**MD**EFTLIPIAVGGALAGLVLIYLVGRKRSHAGYQTI

## 存活蛋白--ILC-4构建物的实例 (SEQ ID NO: 197)

maprsarrpIIIIIIIIIIglmhcasaaMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPDATVVLNRSSCGKENTSDP  
SLVIAFGRGHTLTNFRNATRYSVQLMSFVYNLSDTLHFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLH  
DATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDLE**MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLA**  
**QCFFCKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQ**  
**LAAMD**EFTCLLASMGLQLNLTYERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLELHSEGTTVLLFQFGMNASSRFFLQ  
IQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKNAEEHVRVTKAFSVNIFKVVWQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSEM  
**LIPIAVGGALAGLVLIYLVGRKRSHAGYQTI**

图19

**> SEQIDNO:114; pp65; 登记号: ABQ23593; 氨基酸1-561**

MESRRRCPEMISVLGPISGHVVKAVFSRGDTPVLPHETRL**LLQTGIHVRVVSQPSL**ILVSQYTPDSTPCHRGDNQLQ  
VQHTYFTGSEVENSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVY**ALPLKMLNIPSINVH**HYPSSAAERKRRHLPVADAVIHAS  
GKQMWQARLTVSGLAWTRQQNQWKEPDVYYTSAFVFPTKDVALRHVVCAHELVCSEMENTRATKMQVIG**DQYVKVYL**  
**ESFCEDV**PSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTNRNPQPFMRPHERNGFTVLCPKNM**IKPGKISHIMLDVAF**TSH**EHFGL**  
LCPKSIPGLSISGNLLMNGQQIFLEVQAIRETVELRQYDPVAALFFFDIDLLLRG**PQYSEHPTFTSQYRIQGKLE**  
YRHTWDRHDEGAAGQDDDVWTSGSDSDEELVTTERKTTPRVTTGGGAMAGASTSAGRKRSASSATACTSGVMTRGRL  
KAESTVAPEEDTDESDNEIHNPAVFTW**PPWQAGILARNLVP**VMVATVQGQNL**KYQEFFWDANDIYRIFA**ELEGVWQ  
PAAQPKRRRRHQDALPGPCIASTPKKHRG

代表性pp65 LAMP构建物插入序列: 被GPGPG连接物隔开的

pp65表位(上面突出显示)(SEQ ID NO:115)

**LLQTGIHVRVVSQPSL**GPGPGALPLKMLNIPSINVH**GPGPGDQYVKVYLE**SFCEDV**GPGPGI**IKPGKISHIMLDVAF  
TSH**GPGPGPQYSEHPTFTSQYRIQGKLE**GPGPG**PPWQAGILARNLVP**VMV**GPGPGKYQEFFWDANDIYRIFA**

代表性pp65 LAMP构建物插入序列: 被PMGLP连接物隔开的

pp65表位(上面突出显示)(SEQ ID NO:116)

**LLQTGIHVRVVSQPSL**PMGLPALPLKMLNIPSINVH**PMGLPDQYVKVYLE**SFCEDV**PMGLPI**IKPGKISHIMLDVAF  
TSH**PMGLPPQYSEHPTFTSQYRIQGKLE**PMGL**PPWQAGILARNLVP**VMV**PMGLPKYQEFFWDANDIYRIFA**

**> SEQIDNO:117; gB; 登记号P06473人类疱疹病毒5 AD169株的氨基酸1-906**

MESRIWCLVVCVNLICIVCLGAAVSSSSTSHATSSSTHNGSHTSRTTSAQTRSVYSQHVTSSSEAVSHRANETIYNTTL  
KYGDVVGVTNTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIICTSMKPINEDLDEGIMVYKRNIVAHFTKVRVYQKVLTFRRS  
YAYIYTTYLLGSNTEYVAPPMEIHHINKFAQCYSSYSRVIGGTVFVAYHRDSYENKTMQLIPDDYSNTHSTRYVT  
VKDQWHSRGSTWLYRETCNLNCLMTITTARSKYPYHFFATSTGDVVYISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYT  
IVSDFGRPNAAPEHRLVAFLEADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQ  
EVNMSDSALDCVRDEAINKLQQIFNTSYNQTYEKYGNVSFVETSGGLVVFQGIKQKSLVELERLANRSSLNITHR  
TRRSTSDNNTTHLSSMESVHNLVYAQLQFTYDTRLGYINRALAQIAEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAILSAIY  
NKPIAARFMGDVGLGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVFIFNFANSSYVQYQGLGEDNEILLGNHRTE  
ECQLPSLKIFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSISTVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEEIMR  
EFNSYKQVRKYVEDKVVDPLPPYLKGLDDLMSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPFGAFTIILVA  
IAVVIITYLIYTRQRLCTQPLQNLFPYLVADGTTVTSGSTKDTSLQAPPSYEESSVYNSGRKGPSPSSDASTAA  
PPYTNEQAYQMLLALARLDAEQRAQQNGTDSLGGQTGTQDKGQKPNLLDRLRHRKNGYRHLKDSDEEENV

**> SEQIDNO:118; 登记号P06473人类疱疹病毒5 AD169株的gB片段**

VSSSSTSHATSSSTHNGSHTS**RTTSAQTRSVYSQHVT**SSSEAVSHRANETIYNTTLKYGDVVGVTNTTKYPYRVCSMAQ  
GTDLIRFERNIICTSMKPINEDLDEGIMVYKRNIVAHFTKVRVYQKVLTFRRSYAYIYTTYLLGSNTEYVAPPMW  
EIHINKFAQCYSSYSRVIGGTVFVAYHRDSYENKTM**QLIPDDYSNTHSTRYV**TVKDQWHSRGSTWLYRETCNLNCL  
MLTITTARSKYPYHFFATSTGDVVYISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYTIVSDFGRPNAAPEHRLVAFLE  
RADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQQ  
IFNTSYNQTYEKYGN**VSVFETSGGLVVFQ**GIKQKSLVELERLANRSSLNITHRTRRSTSDNNTTHLSSMESVHNL  
VYAQLQFTYDTRLGYINRALAQIAEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAILSAIYNKPIAARFMGDVGLGLASCVTIN  
QTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVFIFNFANSSYVQYQGLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIFIA**GN**SAYEYVDY  
**LFKRMIDLS**SISTVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEEIMREFNSYKQVRKYVEDKVVDPLPP  
YLKGLDDLMSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNP**TRQRLCTQPLQNLFPYLV**ADGTTVTSGSTK  
DTSLQAPPSYEESSVYNSGRKGPSPSSDASTAAPPYTNEQAYQMLLALARLDAEQRAQQNGTDSLGGQTGTQDKGQ  
KPNLLDRLRHRKNGYRHLKDSDEEENV

图20

SEQ ID NO:119: 代表性gB LAMP构建物插入序列:

被GPGPG连接物隔开的gB表位 (上面突出显示)

TTSAQTRSVYSQHVTGPGPGQLIPDDYSNTHSTRYVGP<sup>GP</sup>GVSVFETSGGLVVF<sup>WQ</sup>GP<sup>GP</sup>GN<sup>SAYEYVDYLF</sup>KRMIDLS

SEQ ID NO:120: 代表性gB LAMP构建物插入序列:

被PMGLP连接物隔开的gB表位 (上面突出显示)

TTSAQTRSVYSQHVT<sup>PMGLP</sup>QLIPDDYSNTHSTRYV<sup>PMGLP</sup>VS<sup>VF</sup>ETSGGLVVF<sup>WQ</sup><sup>PMGLP</sup>NS<sup>AYEYVDYLF</sup>KRMIDLS

> SEQ ID NO:121; IE1; 登记号P13202人类疱疹病毒5 AD169株的氨基酸1-491

MESSAKRKMDPDNPDEGPSSKVPRPETPVTKATTF<sup>LQ</sup>TMLRKEVNSQLSLGDPLFPELAEESLKT<sup>FE</sup>QVTEDCNEN  
PEKD<sup>VLAELVKQIKVRVDMVRHRIKEHMLK<sup>KY</sup>TQ</sup>TEEKFTGAFNMMGGCLQNALDILD<sup>KV</sup>HEPF<sup>EEMK</sup>CIGLTMQS  
MYENY<sup>IVP</sup>EDKREMW<sup>MACIKELH</sup>DVSKGAANKLGGALQAKARAK<sup>KDELRRKMMYMCYRNIEFF</sup>TKNSA<sup>FP</sup>KTTNGC  
SQAMAALQNL<sup>PQ</sup>CSPDEIMAYA<sup>QKIF</sup>KILDEERDKVLTHIDHIFMDIL<sup>TC</sup>VETMCNEYKVTSDACMM<sup>TM</sup>YGGISL  
LSEFCRVLCCYVLEETSVMLAKRPLITKPEVI<sup>SVMKRRIEEICMKVFAQYIL</sup>LGADPLRVCSPSVDDLR<sup>IAIEESDE</sup>  
<sup>EEAIVAY</sup>TLATAGVSSDSLVSPPESPVPATIP<sup>LSSVIVAENS</sup>DQEESEQSDEEEEAIVAY<sup>GP</sup>GPVKSEPVSEIEEVAPEE  
EEDG

SEQ ID NO:122: 代表性IE1 LAMP构建物插入序列:

被GPGPG连接物隔开的IE1表位 (上方突出显示)

VLAELVKQIKVRVDMVRHRIKEHMLK<sup>KY</sup>TQ<sup>GP</sup>GP<sup>GIV</sup>PE<sup>DK</sup>REMW<sup>MACIKELH</sup>GP<sup>GP</sup>GKDELRRKMMYMCYRNIEF  
FTKNSA<sup>FP</sup>KTT<sup>GP</sup>GP<sup>GS</sup>V<sup>MKRRIEEICMKVFAQYIG</sup>PG<sup>GAIAEESDEEEAIVAY</sup>GP<sup>GP</sup>VKSEPVSEIEEVAPEE  
EEDG

SEQ ID NO:123: 代表性IE1 LAMP构建物插入序列:

被PMGLP连接物隔开的IE1表位 (上方突出显示)

VLAELVKQIKVRVDMVRHRIKEHMLK<sup>KY</sup>TQ<sup>PMGLP</sup>I<sup>VP</sup>EDKREMW<sup>MACIKELH</sup>PMGLPKDELRRKMMYMCYRNIEF  
FTKNSA<sup>FP</sup>KTT<sup>PMGLP</sup>S<sup>VKRRIEEICMKVFAQYIP</sup>MGLPAIAEESDEEEAIVAY<sup>PMGLP</sup>VKSEPVSEIEEVAPEE  
EEDG

> SEQIDNO:124; 形态转化区II; AAA66543人类β疱疹病毒5的氨基酸1-79

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKPTLVGHVGT<sup>VY</sup>CDGLSFP  
RVG

> SEQIDNO:125; 代表性形态转化区II LAMP构建物插入序列

ATTTTIKNTKPQCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKPTLVGHVGT<sup>VY</sup>CDGLSFP<sup>RVG</sup>

> SEQIDNO:126; US28; AMJ53524人类β疱疹病毒5的氨基酸1-364

MTPTTTTAELTTEFDYDEDATPCVFTDVLNQSKPVT<sup>LF</sup>LYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLA  
AADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYPVKQACLF<sup>SIF</sup>FWW  
IFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCM<sup>TDY</sup>DY<sup>LEV</sup>SYPIILNVELMLGAFVIPLSVISYCYRISRIVAVSQSRHKGRIVR  
VLI<sup>AV</sup>VLVFIIIFWLPYHLTLFVDTLKLLKWISSCE<sup>FE</sup>RS<sup>LKRALIL</sup>TESLAFCHCCLNPLLYVFGTK<sup>FR</sup>QELHC  
LLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP

> SEQIDNO:127; 代表性US28 LAMP构建物插入序列

图20续

MTPTTTTAAELTTEFDYDEDATPCVFTDVLNQSKPVTTWRRRIQCSGDDHNSLEIALDRYYAIVMYRYPVKQTKKD  
 NQCMTDYDYLEVSYPRISRIVAVSQSRHKGRIVRDTLKLKWISSSCEFRSLKRGTKFRQELHCLLAEFRQRLFS  
 RDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSIIP

>SEQIDNO:128 NP\_000588.2胰岛素样生长因子结合蛋白2同种型前体[智人]

MLPRVGC PALPLPPP LLLPL LLLLLLGASGGGGGARA EVLFRCPCTPERLAACGPPPVAPPAVA AVAGGARM  
 PCAELVREPGCGCCSV CARLEGEACGVYTPRCGQGLRCYPHPGSELPLQALVMGE GTCEKRRDAEY GASPEQVADN  
 GDDHSEGLVENHVDSTMNMLGGGGSAGRKPLKSGMKELAVFREKVTEQHRQMGKGKHHLGLEEPKKLRPPPART  
 PCQQELDQVLERISTMRLPDERGPLEHLYSLHIPNCDKHGLYNLQCKMSLNQRGECWCVPNTGKLIQGAPTIRG  
 DPECHLFYNEQQEARGVHTQRMQ

>SEQIDNO:129 sp |P17150| IL10H\_HCMVA病毒白介素-10同

源物OS =人类巨细胞病毒 (AD169株) GN = UL111A PE = 1 SV = 2

MLSVMVSSSLVLIVFFLGASEEAKPATTTIKNTKPCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKPTLQREDDYSVWLDGTVVK  
 GCWGCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDHVYPGLKTELHSMRSTLESYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNG  
 TRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK

>SEQ ID NO:130-代表性HCMVA病毒白介素-10 LAMP构建物插入序列

ATTTIKNTKPCRPEDYATRLQDLRVTFHRVKPTLQREDDYSVWLDGTVVKGCWGCSVMDWLLRRYLEIVFPAGDH  
 VYPGLKTELHSMRSTLESYKDMRQCPLLGCGDKSVISRLSQEAERKSDNGTRKGLSELDTLFSRLEEYLHSRK

>SEQ ID NO:131; sp |F5HAM0| UL144\_HCMVM膜糖蛋白

UL144 OS =人类巨细胞病毒 (Merlin株) GN = UL144 PE = 3 SV = 1  
 MKPLVMLICFGVILLQLGVTKVCQHNEVQLGNECCPPCGLGQRVTKVCTERTSVTCTPCPNGTIVVSGLYNCTDCTQ  
 CNVTQVMIRNCTSTNNTVCA PKNHTYFSTPGVQHHKQRRQNHTAHITVKQKGKSGRHTLAWLSLFI FLVGIILLILY  
 LIAAYRSERCQQCCSIGKIFYRTL

>SEQIDNO:132: 代表性HCMVM膜糖蛋白UL144 LAMP构建物插入序列

KVCQHNEVQLGNECCPPCGLGQRVTKVCTERTSVTCTPCPNGTIVVSGLYNCTDCTQCNVTQVMIRNCTSTNNTVCA  
 PKNHTYFSTPGVQHHKQRRQNHTAHITVKQKGKSGRHTAAYRSERCQQCCSIGKIFYRTL

>SEQ ID NO:133; sp |Q6RJQ3| UL141\_HCMVM蛋白UL141

OS =人类巨细胞病毒 (Merlin株) GN = UL141 PE = 1 SV = 1  
 MCRRESLRTLPLWLFVLLSCLPRLLYSSSSFPFATADIAEKMWAENYETTSPAPVLVAEGEQVTIPCTVMTHSWPM  
 VSIRARFCRSHDGSDELILD AVKGHRLMNGLYRLPYATWNFSQLHLGQIFSLTFNVSTDTAGMYECVLRNYSHGL  
 IMQRFVILTQLETLSRPDEPCCTPALGRYSLGDQIWSPTPWRLRNHDCGMYRGFQRNYFYI GRADAEDCWKPACPD  
 EEPDRCWTVIQRYRLPGDCYRSQPHPPKFLPVT PAPPADIDTGMSPWATR GIAAFLGFWSIFTVCFLCYLCYLQCC  
 GRWCPTPGRGRRGEGYRRLPTYDSYPGVKKMKR

>SEQ ID NO:134: 代表性HCMVM蛋白UL141 LAMP构建物插入序列

DIAEKMWAENYETTSPAPVLVAEGEQVTIPCTVMTHSWPMVSIRARFCRSHDGSDELILD AVKGHRLMNGLYRLP  
 YATWNFSQLHLGQIFSLTFNVSTDTAGMYECVLRNYSHGLIMQRFVILTQLETLSRPDEPCCTPALGRYSLGDQIW  
 SPTPWRLRNHDCGMYRGFQRNYFYI GRADAEDCWKPACPD EEPDRCWTVIQRYRLPGDCYRSQPHPPKFLPVT PAP  
 PADIDTGMSPWATRYLQCCGRWCPTPGRGRRGEGYRRLPTYDSYPGVKKMKR

>SEQIDNO:135: sp |P09727| US11\_HCMVA独特的短US11糖蛋白

OS =人类巨细胞病毒 (AD169株) GN = US11 PE = 1 SV = 1

图20续



MNLVMLILALWAPVAGSMPELSLTLEFDEPPPLVETEPPLPSDVSEYRVEYSEARCVLRSGGRLEALWTLRGNLSV  
PTPTPRVYYQTLEGYADRVPTPVEDVSESLVAKRYWLRDYRVPQRTKLVLFFYFSPCHQCQTYTVECEPRCLVPWVP  
LWSSLEDIERLLFEDRRIMAYYALTIKSAQYTLMMVAVIQVFWGLYVKGLHRHFPWMFSDQW

> SEQIDNO:136: 代表性HCMVA独特的短US11糖蛋白LAMP构建物插入序列

MPELSLTLEFDEPPPLVETEPPLPSDVSEYRVEYSEARCVLRSGGRLEALWTLRGNLSVPTPTPRVYYQTLEGYAD  
RVPTPVEDVSESLVAKRYWLRDYRVPQRTKLVLFFYFSPCHQCQTYTVECEPRCLVPWVPLWSSLEDIERLLFEDRR  
LMAYYALTIKSAQYHRHFPWMFSDQW

> SEQIDNO:137: tr | A0A0G2TM81 | A0A0G2TM81\_HCMV包膜糖蛋白H  
OS =人类巨细胞病毒GN = UL75 PE = 3 SV = 1

MRPGLPSYLVIVLAVCLLSHLLSPRYGAEAVSEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENATQCTYNSSLRNSTVVRENAI  
SFNFFQSYNQYYVFHMPRCCLFAGPLAEQFLNQV~~DLTETLERYQQR~~LNNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQP  
TTVPPPIDLSIPHVWMPPTTPHGWTE~~SHTTSGLHRPHFNQTCILFD~~GHDLLFSTVTPCLHQGFYLIDELRYVKIT  
LTEDFFVVTVSIDDDTPMLLIFGHLPRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKD~~QLNRHSYLKDPDFLDAALDF~~  
NYLDLSALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFM  
ITCLSQTTPRTTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKTHLA  
SFLSAFARQELYLMGSLVHSMVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSDLTPCSSSGRRDHS  
ERLTRLFPDATVPTTPTALSILSTMQPSLTETFPDLFCPLGESFSALTVEHVSYYVTNQYLIKGISYPVSTTV  
VGQSLIITQDSQSKCELTRNMHTTHSITAALNISLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNE  
VVVSSPRTHYLMMLKNGTVLEVTDVVVDATDSRLLMMSVYALSAIIGIYLLYRMLKTC

> SEQIDNO:138 HCMV包膜糖蛋白H片段

VSEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENATQCTYNSSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPRCCLFAGPLAEQF  
LNQV~~DLTETLERYQQR~~LNNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPPTVPPPIDLSIPHVWMPPTTPHGWTE  
TSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIDELRYVKITLTEDFFVVTVSIDDDTPMLLIFGHLPRV  
LFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYLKDPDFLDAALDFNYLDLSALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQML  
DRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLSQTTPRTTLLLYPTAVDLAKRALW  
TPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGSLVHSMVHTTERR  
EIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSDLTPCSSSGRRDHSLERLTRLFPDATVPTTPTALSILSTMQPS  
LTETFPDLFCPLGESFSALTVEHVSYYVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIITQDSQSKCELTRNMHTTHSIT  
AALNISLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTHYLMMLKNGTVLEVTDVVVDA  
TDSRMLKTC

> SEQIDNO:139被GPGPG连接物隔开的代表性HCMV包膜糖

蛋白表位(上方突出显示) LAMP构建物插入序列

TYNSSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPRGPGPGDLTETLERYQQR~~LNNTYALVSKDLASYRSFS~~GPGPGS  
HTTSGLHRPHFNQTCILFDGPGPGQLNRHSYLKDPDFLDAALDF

> SEQIDNO:140被PMGLP连接物隔开的代表性HCMV包膜糖蛋白

表位(上方突出显示) LAMP构建物插入序列

TYNSSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPRPMGLPDLTETLERYQQR~~LNNTYALVSKDLASYRSFS~~PMGLPS  
HTTSGLHRPHFNQTCILFDPMGLPQLNRHSYLKDPDFLDAALDF

> SEQIDNO:141: sp | Q6SWP7 | VIE2\_HCMVT病毒转录因子IE2 OS =

人类巨细胞病毒(Towne株) GN = UL122 PE = 1 SV = 1

MESSAKRKMDPNPDEGPSSKVPRPETPVTKATTFLQTMLRKEVNSQLSLGDPFLPELAEESLKTFFERVTEDCNEN  
PEKDVLAELGDILAQAVNHAGIDSSSTGPTLTTHSCSVSSAPLNKPTPTSVAVTNTPLPGASATPELSPRKKPRKT  
TRPFKVI~~IKPPV~~PAPIMPLIKQEDIKPEP~~FTI~~QYRNKI~~IDTAGCIVISDSEEEQGE~~EVETRGATASSPSTGSG  
TPRVTSPTHPLSQMNHPLPDP~~LGRP~~DESSSSSSSSSSASDSESESEEMKCSSGGGASVTSSHGRGGFGGAASS  
SLLSCGHQSSGGASTGPRKKKSKRISELDNEKVRNIMKDKNTPFCTPNVQT~~RRGRVKIDEVSRMFR~~NTNRSLEYKN

图20续

LPFTIPSMHQVLDEAIKACKTMQVNNKGIQIIYTRNHEVKSEVDAVRCRLGTMCNLA LSTPFLMEHTMPVTHPPEV  
AQR TADACNEG VKAAWSL KELHTHQLCPRSSDYRNMI IHAATPVDDL GALNLCLPLMQKFPKQVMVRIFSTNQGGF  
MLPIYETA AKAYAVGQFEQPTETPTPEDLDL TSLAIEAAIQDLRNKSQ

> SEQIDNO:142: 代表性病毒转录因子IE2 LAMP构建物插入序列,  
具有被GPGPG连接物隔开的IE2表位 (上方突出显示)

RRGRVKIDEVSRMFRGPGGGGIQIIYTRNHEVKSEGPGGLSTPFLMEHTMPVTHPPEVA

> SEQIDNO:143: 代表性病毒转录因子IE2 LAMP构建物插入序列,  
具有被PMGLP连接物隔开的IE2表位 (上方突出显示)

RRGRVKIDEVSRMFRPMGLPGIQIIYTRNHEVKSEPMGLPLSTPFLMEHTMPVTHPPEVA

> SEQIDNO:144 NP\_937983.2端粒酶逆转录酶同种型1 [智人]

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRRQVSC  
L KELVARVLQRLCERGAKNVLA FG FALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHL  
LARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGS  
SRSLPLPKRPRRGAAPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHH  
AGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLP  
RLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPEEEDTDPRLVQLLRQHS  
SPWQVYGFVRACLRLRPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPA  
EHLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSSFFVYTETTFQKNRLFFYRKS VWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQ  
HREARPALTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLD  
DIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFK  
SHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSI  
LSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFPEDE  
ALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSLFLD  
LQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGP  
LPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLP GTTTLTALEAAANPALPSDFKTILD

> SEQIDNO:145: 端粒酶逆转录酶短片段1 168-1132氨基酸, 其可  
被插入到本文所述的改良的完全LAMP构建物中

YQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGA  
PEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWD  
PCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLE  
LLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPEEEDTDPRLVQLLRQHS SPWQVYGFVRACLRR  
LVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAEHLREEILAKFLHW  
LMSVYVVELLRSSFFVYTETTFQKNRLFFYRKS VWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALTSRLRF  
IPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDI HRAWRTFVLRVRA  
QDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQ  
FVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSI LSTLLCSLCYGD MEN  
KLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFPEDEALGGTAFVQMPAHGL  
FPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYK  
ILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAF  
LKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLP GTTTLTALEAAANPALPSDFKTILD

> SEQIDNO:146: 端粒酶逆转录酶片段2, 其可被插入到  
本文所述的改良的完全LAMP构建物中

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRRQVSC  
L KELVARVLQRLCERGAKNVLA FG FALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDGPPLY

图20续

QLGAATQARPPPHASGPRRRGCGERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVG  
 QGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAET  
 KHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCP  
 YGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPPEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRLVPPGLWGS  
 RHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWMMSVYVVEL  
 LRSFFYVTETTFQKNRLFFYRKSWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP  
 IVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVSVLYERARRPGLLGASVGLDDIHRWRTFVLRVRAQDPPPELYF  
 VKVAITGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLPYMRQFVAHLQETS  
 PLRDAVVEIQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTFPHLTHAKT  
 FLRTLVRGVPEYGCVVNLKTVVNFVEDEALDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFRNGFKAGRNMRRKLFVGLR  
 LKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMS  
 LGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGLSLRTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAANPALPSDFKTL  
 D

> SEQIDNO:147 存活蛋白；登记号NP\_001125727的氨基酸1-142；  
 含有杆状病毒IAP重复序列的蛋白5

MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCCTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFFCFKELEGWEPDDDPFEE  
 HKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKLDREKAKNIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD

> SEQIDNO:148 1AF9\_A链A，破伤风神经毒素C片段

MKNLDCWVDNEEDIDVILKKSTILNLDINNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGKAIHLVNNESSSEVIVHKAM  
 DIEYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTNEYSIISSMKHSLSIGSGWSVSLKGNLIWTLKDSAGEVRQIT  
 FRDLDPKFNAYLANKWVFIITNDRLLSSANLYINGVLMGSAEITGLGAIREDDNNITLKLDRCNNNNQYVSIDKFRI  
 FCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASSSKDVQLKNITDYMYLTNAPSYTNGKLNYYR  
 RLYNGLKFIIKRYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNAFNLDRIILRVGYNAPGIPLYKKMEAV  
 KLRDLKITYSVQLKLYDDKNASLGLVGTHNGQIGNDPNRDILIASNWFNHLKDKILGCDWYFVPTDEGWTND

>代表性破伤风神经毒素C LAMP构建物插入序列：被GPGPG连接物隔  
 开的破伤风神经毒素C表位（上方突出显示）（SEQ ID NO:149）

PGINGKAIHLVNNESSSEGPGPGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTGPGPGYVSIDKFRI FCKALNPKEIEKLYT  
 SYLSGPGGILRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLK

> 代表性破伤风神经毒素C LAMP构建物插入序列：被PMGLP连接物隔  
 开的破伤风神经毒素C表位（上方突出显示）（SEQ ID NO:150）

PGINGKAIHLVNNESSSEPMGLPFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTGPMGLPYVSIDKFRI FCKALNPKEIEKLYT  
 SYLSPMGLPILRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLK

> NP\_001318.1癌/睾丸抗原1 [智人]（SEQ ID NO:151）

MQAEGRTGGSTGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGEAGATGGRGPRGAGAARASGPGGGAPRGP HGGAAASGLNGCC  
 RCGARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPLVPVGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSISSC  
 LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR

NY-ESO-1 SEQ ID NO:151的1-155（SEQ ID NO:167）

MQAEGRTGGSTGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGEAGATGGRGPRGAGAARASGPGGGAPRGP HGGAAASGLNGCC  
 RCGARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPLVPVGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSISSC  
 LQQQRR

图20续

**NY-ESO-1 SEQ ID NO:151的80-155 (SEQ ID NO:168)**

ARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPLPVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSISSCLQQ  
QRR

**> AAA75493.1 HER2受体[智人] (SEQ ID NO:152)**

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLR LPA SPETHLDMRLRHLYQG CQV VQGNLELTYLPTNASLSFLQD  
IQEVQGYVLI AHNQVRQVPLQRLRIVRG TQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGG  
VLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALT LIDTNRSRACHPCSPMCKGSR CWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARCK  
GPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYL  
STDVGSCTLVCP LHNQEVT AEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVR AVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPES  
FDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL PDL SVFQNLQVIRGRILHNGAYS LTLQGLGISWLGLR  
SLRELGSGLALIHNNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED ECVGEG LACHQLCARGHCWGP GPTQCVNCS  
QFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVARCP SGVKPDL  
SYMPIWKFPDEEGACQPCP INC THSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIVSAVVGILLVVLGVVFGILIKRRQKIRK  
YTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGT VYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLENTS  
PKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRL LGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVREN RGR LGSQDLLNWC MQIAKGMSYL  
EDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVP IKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTV  
WELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFREL VSEFSRMARDPQR FVV  
IQNEDLG PASPLDSTFYRS LLEDDDMGDLVDAE EYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRSSSTRSGGDLTLGLE  
PSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLP THDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYV  
NQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKT LSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLT PQGGAAPQPHPPPAFSPA  
FDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLG LDVPV

**代表性HER2构建物 (SEQ ID NO:153)，其包含SEQ ID****NO:152的氨基酸23-652和690-1255**

TQVCTGTDMKLR LPA SPETHLDMRLRHLYQG CQV VQGNLELTYLPTNASLSFLQD IQEVQGYVLI AHNQVRQVPLQRL  
RIVRG TQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFH  
KNNQLALT LIDTNRSRACHPCSPMCKGSR CWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHS  
DCLACLFHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCP LHNQEVT AED  
GTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVR AVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFET  
LEEITGYLYISAWPDSL PDL SVFQNLQVIRGRILHNGAYS LTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNTHLCFVH  
TVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED ECVGEG LACHQLCARGHCWGP GPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREY  
VNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVARCP SGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQPCP INC  
THSCVDLDDKGCPAEQRASPLTLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGT VYKGIWIPDG  
ENVKIPVAIAVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRL LGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVREN RGR LGS  
QDLLNWC MQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVP IKWMALESIL  
RRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRE  
LVSEFSRMARDPQR FVVIQNEDLG PASPLDSTFYRS LLEDDDMGDLVDAE EYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRH  
RSSSTRSGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLP THDPSPLQRYSEDPTVPLPSE  
TDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKT LSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLT P  
QGGAAPQPHPPPAFSPA FDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLG LDVPV

**第二代表性HER2构建物 (SEQ ID NO:154)，其包含SEQ ID NO:152  
的氨基酸23-632。**

TQVCTGTDMKLR LPA SPETHLDMRLRHLYQG CQV VQGNLELTYLPTNASLSFLQD IQEVQGYVLI AHNQVRQVPLQRL  
RIVRG TQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFH

图20续



KNNQLALTLLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRTVACAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHS  
DCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLNQEVTAED  
GTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFET  
LEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLLTQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVH  
TVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREY  
VNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVARCPSGVKPDLSPYIWKFPDEEGACQPCPINC  
TH

**>NP\_001973.2受体酪氨酸蛋白激酶erbB-3同种型1前体[智人] (SEQ ID NO:155)**

MRANDALQVLGLLFLARGSEVGNQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLTKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSF  
LQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHARQLRLTQLTEILSGGVYIEKN  
DKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCTLTITCAPQCNGHCFGPNPNQCCH  
DECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQLVYNKLTFTQLEPNPHTKYQYGGVCVASCNHFVVDQTSVRA  
CPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALD  
PEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVSFNLTTIGGRSLYNRGSLLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYI  
SANRQLCYHHSNLNWTKVLRGPTTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCDPLCSSGGCWGPQGLSCRNYSRGGVCVTH  
CNFLNGEPREFAEAECSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVLAGKPIYKYPDVQN  
ECRPFCHENCTQGCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLTALTIVAGLVVIFMMLGGTFLYWRGRRIQNKRAMRRYLERG  
ESIEPLDPSEKANKVLARIFKETELRKLKVLGSGVFGTVHKGWVIEGESIKIPVCIKVIDEDKSGRQSFQAVTDHM  
LAIGSLDHAHIVRLGLCPGSSLQVLTQYLPGLSLLDHVRQHRGALGPQLLLNWGVQIAKGMYYLEEHGMVHRNLA  
ARNVLLKSPSQVQVADFGVADLLPPDDKQLLYSEAKTIKWMALSIHFGKYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAEPY  
AGLRLAEVDPDLLEKGERLAQPQICTIDVYVMVMVKCWMIDENIRPTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAP  
GPEPHGLTNKKLEEVELEPELDDLDLEAEEDNLATTTLGSAISLPVGTNLNRPRGSQSLLSPSSGYMPMNQCNLGE  
SCQESAVSGSSERCPRVSLHPMPRGCLASESSEGHVTGSEAELEKQVSMCRSRSRSPRPRGDSAYHSQRHSL  
TPVTPLSPGLEEDVNGYVMPDTHLKGTPSSREGTLSSVGLSSVLGTEEEDEDEEYEMNRRRRHSPPHPPRPSS  
LEELGYEYMDVGSLSASLGSTQSCPLHPVPIMPTAGTTPDEDEYEMNRQRDGGGPGDYAAMGACPAEQGYEEM  
RAFQGPQHQAAPHVHYARLKTLSLEATDSAFDNPDYWHSRLFPKANAQRT

**代表性HER3构建物 (SEQ ID NO:156) , 包含SEQ ID NO:155的氨基酸20-643、  
665-1201和1209-1342**

SEVGNQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLTKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFS  
TLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHARQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRD  
AEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCTLTITCAPQCNGHCFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTCFACR  
HFNDSGACVPRCPQLVYNKLTFTQLEPNPHTKYQYGGVCVASCNHFVVDQTSVRAACPPDKMEVDKNGLKMCEPC  
GGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNI  
QSWPPHMHNFVSFNLTTIGGRSLYNRGSLLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSNLNWTKVL  
RGPTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCDPLCSSGGCWGPQGLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAEAECS  
CHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVLAGKPIYKYPDVQNECRPFCHENCTQGCKGPELQ  
DCLGQTLVLIGKTHLTIVWRGRRIQNKRAMRRYLERGESIEPLDPSEKANKVLARIFKETELRKLKVLGSGVFGTVH  
KGVWVIEGESIKIPVCIKVIDEDKSGRQSFQAVTDHMLAIGSLDHAHIVRLGLCPGSSLQVLTQYLPGLSLLDHVR  
QHRGALGPQLLLNWGVQIAKGMYYLEEHGMVHRNLAARNVLLKSPSQVQVADFGVADLLPPDDKQLLESEAKTIK  
WMALSIHFGKYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAEPYAGLRLAEVDPDLLEKGERLAQPQICTIDVYVMVMVKCWMID  
ENIRPTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAPGPEPHGLTNKKLEEVELEPELDDLDLEAEEDNLATTTLG  
SALSIPVGTNLNRPRGSQSLLSPSSGYMPMNQCNLGESESAVSGSSERCPRVSLHPMPRGCLASESSEGHVTGS  
EAELEKQVSMCRSRSRSPRPRGDSAYHSQRHSLTPVTPLSPGLEEDVNGYVMPDTHLKGTPSSREGTLSSV  
GLSSVLGTEEEDEDEEYEMNPHPPRPSSLEELGYEYMDVGSLSASLGSTQSCPLHPVPIMPTAGTTPDEDEYEM  
NRQRDGGGPGDYAAMGACPAEQGYEEMRAFQGPQHQAAPHVHYARLKTLSLEATDSAFDNPDYWHSRLFPKANA  
QRT

图20续

**第二代表性HER3构建物 (SEQ ID NO:157)，其包含SEQ ID NO:****155的氨基酸20-643。**

SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGAENQYQTLTKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFS  
 TLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRD  
 AEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGEEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCCHDECAGGCSGPQDTCFACR  
 HFND SGACVPRCPQLVYNKLTFTQLEPNHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPC  
 GGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNI  
 QSWFPHMHNFVSFSLNTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSNLNWKVLR  
 GPTEERLDIKHNRPRDCVAEGKVCDPLCSSGGCWGP GPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAEAECS  
 CHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPFCVSSCPHGVLAGKGP IYKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGPELQ  
 DCLGQTLVLIGKTHLT

**> NP\_003811. 2肿瘤坏死因子受体超家族成员14同种型1前体[智人] (SEQ ID NO:158)**

MEPPGDWGGPPWRSTPKTDVLRVLVLYLTFLGAPCYAPALPSCKEDEYFVGSECCPKCSPGYRVKEACGELTGTVCE  
 PCPPGTYYIAHLNGLSKCLQCQMCDPAMGLRASRNCSTENAVCGCSPGHFCIVQDGDHCAACRAYATSSPGQRVQK  
 GGTESQDTLCQNCPPGTFTSPNGTLEECQHQTCSWLVTKAGAGTSSSHVWVWFLSGSLVIVIVCSTVGLIICVKRR  
 KPRGDDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSTGRSPNH

**代表性HVEM构建物 (SEQ ID NO:159)，其包含SEQ ID NO:158的氨基酸39-202**

LPSCKEDEYFVGSECCPKCSPGYRVKEACGELTGTVCEPCPPGTYYIAHLNGLSKCLQCQMCDPAMGLRASRNCST  
 ENAVCGCSPGHFCIVQDGDHCAACRAYATSSPGQRVQKGGTESQDTLCQNCPPGTFTSPNGTLEECQHQTCSWLVT  
 KAGAGTSSSHVW

**HPV构建物****被GPGPG连接物隔开的代表性HPV 16 E6-E7构建物 (SEQ ID****NO:164)**

MHQKRTAMFQDPQESGRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSK  
 ISEYRHYCYSLYGTTLTQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLQRHLDDKKQRFHNIIRGRWTGRCMSSCRSSRTRETQ**LGPG**  
**GPGMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYGYGQLNDSSEEDEIDGPAGQAEPRDAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTH**  
**VDIRTELDLLMGTLGIVCPICSQKP**

**被GPGPG连接物隔开的代表性HPV 18 E6-E7构建物 (SEQ ID****NO:165)**

MARFEDPTRSGYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIREL  
 HYSDSVYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLLRHLNEKRRFHNIAAGHYRGQCHSCCNRRARQERLQRRRETQ**VGPG**  
**GPGMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLGHGQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIE**  
**LVVLESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQQ**

**代表性HPV 16 E6-连接物-HPV 18 E6-连接物-HPV 16 E7-连接物-HPV 18 E7构建物 (SEQ ID NO:166)**

MHQKRTAMFQDPQESGRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSK  
 ISEYRHYCYSLYGTTLTQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLQRHLDDKKQRFHNIIRGRWTGRCMSSCRSSRTRETQ**LGPG**  
**GPGMARFEDPTRSGYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRI**  
**ELRHYSDSVYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLLRHLNEKRRFHNIAAGHYRGQCHSCCNRRARQERLQRRRETQ**  
**VGPGPG**

图20续

**GP**GPGMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLGHGQLSDSEEENDEIDG  
VNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSADDLRAFQQFLNTLSFVCPWCASQQ

### 用于形成上述构建物的序列

#### HPV 16 E6 (SEQ ID NO:160) 人类乳头瘤病毒16型

MHQKRTAMFQDPQESGRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREYVDRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSK  
ISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSSCRSSRTRRETQL

#### HPV 18 E6 (SEQ ID NO:161) 人类乳头瘤病毒18型

MARFEDPTRSGYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTFEVDLFFVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELR  
HYSDSVYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLLRHLNEKRRFHNIAAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRRRETQV

#### HPV 16 E7 (SEQ ID NO:162) 人类乳头瘤病毒16型

MHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYGYGQLNDSSEEDEIDGPAGQAEPPRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDI  
RTLEDLLMGTGLGIVCPICSQKP

#### HPV 18 E7 (SEQ ID NO:163) 人类乳头瘤病毒18型

MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLGHGQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVV  
ESSADDLRAFQQFLNTLSFVCPWCASQQ

### EBV抗原

#### EBV EBNA1全长核抗原EBNA-1 [人类γ疱疹病毒4] (SEQ ID NO:169)

MSDEGPGTGPGNGLGEKGDTSPEGS SGGSGPQRRGGDNHGRGRGRGRGRGGGRPGAPGSGSGSPRHRDGVRRPQKR  
PSCIGCKGTHGGTGAGAGAGGAGAGAGAGGGAGAGGGAGGAGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGG  
GAGGAGAGGGAGGAGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGG  
GAGAGGAGAGGAGAGGAGAGGAGAGGAGAGGAGAGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAGAGG  
AGGAGGAGAGGGAGAGGAGAGGGGRGRGGSGGRGRGGSGGRGRGGSGGRRGRGRERARGGSRERARGRGRGRGEKR  
PRSPSSQSSSSGSPRRPPPPGRPPFFHPVGEADYFEYHQEGGPDGEPDVPPGAIEQGPADDPGEGPSTGPRGQGDG  
GRRKKGGWFGKHRGQGGSNPKFENIAEGLRALLARSHVERTTDEGTWVAGVFVYGGSKTSLYNLRRGTALAIPQCR  
LTPLSRLPFGMAPGPGPQPGPLRESIVCYFMVFLQTHIFAENVLKDAIKDLVMTKPAPTCNIRVTVCSEDDGVDLPP  
WFPPMVEGAAAEGDDGDDGDEGGDGEDEEGQE

#### EBV EBNA1截短核抗原EBNA-1 [人类γ疱疹病毒4] (SEQ ID NO: 170)

MSDEGPGTGPGNGLGEKGDTSPEGS SGGSGPQRRGGDNHGRGRGRGRGRGGGRPGAPGSGSGSPRHRDGVRRPQKR  
PSCIGCKGTHRGRGGSGGRGRGGSGGRRGRGRERARGGSRERARGRGRGRGEKPRSPSSQSSSSGSPRRPPPPGR  
RPPFFHPVGEADYFEYHQEGGPDGEPDVPPGAIEQGPADDPGEGPSTGPRGQGDGGRKKGGWFGKHRGQGGSNPKF  
ENIAEGLRALLARSHVERTTDEGTWVAGVFVYGGSKTSLYNLRRGTALAIPQCRLTPLSRLPFGMAPGPGPQPGPL  
RESIVCYFMVFLQTHIFAENVLKDAIKDLVMTKPAPTCNIRVTVCSEDDGVDLPPWFPPMVEGAAAEGDDGDDGDEG  
GDGDEGEEGQE

#### EBV gp350 ECD糖蛋白350 [人类γ疱疹病毒4] (SEQ ID NO:171)

MEAALLVCQYTIQSLIHLTGEDPGFFNVEIPEFFPYPTCNVCTADVNTINFDVGGKKHQLDLDFGQLTPHTKAVY  
QPRGAFGGSENATNLFLELLGAGELALTMRSKKLPINVTTGEEQQVSLSVDVYFQDVFGTMWCHHAEMQNPVYL  
IPETVPYIKWDNCNSTNITAVVRAQGLDVTPLSLPTSAQDSNFSVKTEMLGNEIDIECIMEDGEISQVLPDGNKF

图20续

NITCSGYESHVPSGGILTSTSPVATPIPGTGYAYSLRLTPRPVSRFLGNNISILYVFYSGNGPKASGGDYCIQSNIV  
FSDEIPASQDMPNTNTDITYVGDNATYSVPMVTSEDANSPNVTVTAFWAWPNNTETDFKCKWLTSTGTPSGCENIS  
GAFASNRTFDITVSGLTAPKTLIITRTATNATTTTHKVIFSKAPESTTTSTPLNTTGFADPNTTTGLPSSSTHVPT  
NLTAPASTGPTVSTADVTSTPTAGTTSASPVTSPSPWDNGTESKAPDMISSTSPVTTTPNATSPTPAVTTPTP  
NATSPTPAVTTTPNATSPTLGKTSPTS AVTTTPNATSPTLGKTSPTS AVTTTPNATSPTLGKTSPTS AVTTPT  
PNATGPTVGETSPQANATNHTLGGTSTPTPVVTSQPKNATS AVTTGQHNTSSSTSSMSLRPSSNPETLSPSTSDNS  
TSHMPLLTSAHPTGGENITQVTPASISTHHVSTSSPAPRPGTTSQASGPGNSSTSTKPGEVNVTGTPPQNATSPQ  
APSGQKTAVFTVTSTGGKANSTTGKHTTGHGARTSTEPTTDYGGDSTTPRPRYNATTYLPSTSSKLPRWTFTS  
PPVTTAQATVPVPPTSQPRFSNLS

#### EBV LMP2膜蛋白LMP-2A [人类 γ 疱疹病毒4] (SEQ ID NO:172)

MGSLEMPMAGAGPPSPGGDPDGYDGGNNSQYPSASGSSGNTPTPPNDEERESNEEPPPPYEDPYWNGDRHSDYQP  
LGTQDQSLYLGLQHDGNDGLPPPPYSPRDDSSQHIYEEAGRGSMNPVCLPVIVAPYLFWLAAIAASCFTASVSTVV  
TATGLALSLLLLAAVASSYAAAQRKLLTPVTVLTAVVTFFAICLTWRIEDPPFNSLLFALLAAAGGLQGIYVLVML  
VLLILAYRRRWRLTVCGGIMFLACVLVLIVDAVLQLSPLLGA VTTVVSMTLLLLAFVLWLSSP GGLGLTGAALLTL  
AAALALLASLILGLTNLTMMFLMLLWTLVLVLLICSSSCSCLSKILLARLFYALALLLLASALIAGGSILQTNF  
KSLSTEFIPNLFMCLLLIVAGILFILAILTEWGSNRTYGPVFMCLGGLLTMVAGAVWLTVMSTLLSAWILTAG  
FLIFLIGFALFGVIRCCRYCCYCLTLESEERPPTPYRNTV

#### GCP3磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3同种型2前体[智人] (SEQ ID NO:173)

AQPPPPPPDATCHQVRSFFQRLQPLKWPETVPVPGSDLQVCLPKGPTCCSRKMEEKYQLTARLNMEQLQSASME  
LKFLIIQNAAVFQEAFAEIVVRHAKNYTNAMFKNYPSLTPQAFEFVGEFFTDVSLYILGSDINVDDMVNELEFDSLF  
PVIYTQLMNPGLPDSALDINECLRGARRDLKVFGNFKLIMTQVSKSLQVTRIFLQALNLGIEVINTDHLKFSKD  
CGRMLTRMWYCSYCQGLMMVKPCGGYCNVVMQGCMAVVEIDKYWREYILSLEELVNGMYRIYDMENVLLGLFSTI  
HDSIQYVQKNAGKLTTTIGKLCAHSQQRQYRSAYYPEDLFDKVKLVKVAHVEHEETLSSRRRELQKLKSFISFYS  
ALPGYICSHSPVAENDTLCWNGQELVERYSQKAARNGMKNQFNLHELKMKGPEPVVSQIIDKLKHINQLLR TMSMP  
KGRVLDKNLDEEGFESGDCGDEDECIGSGDGMIVKNQLRFLAELAYDLVDVDDAPGNSQQATPKDNEISTFHNL  
GNVHSPLK

#### 中间S蛋白 (HBV) 中间包膜蛋白[乙型肝炎病毒] (SEQ ID NO:174)

MQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVLTTASPLSSIFSRIGDPALNMENITSGTIPQSLDSWWTSLN  
FLGGTTVCLGQNSQSPTS NHSTSCPTCPGYRWMCLRRDYQGMPLVCP LIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYP  
SCCCTKPSDGNCCTCIPSSWAFGKFLWEWASARYWGPSX

#### X蛋白 (HBV) X蛋白[乙型肝炎病毒] (SEQ ID NO:175)

MAARLCCQLDPARDVLCLRPVGAESRGRPLSGPLGALPSPSPSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSA  
RRMETTVNAHQILPKVLHKRTFGLSAMSTTDLEAYFKDCVFKDW

#### TIGIT假设蛋白, 部分[智人]与TIGIT同种型6有99%同源性, 部分[苏门答腊猩猩] (SEQ ID NO:176)

MMTGTIETTGNISAEKGSIIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLTLQSL  
LTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP

#### TEM8炭疽毒素受体1同种型1前体[智人] (SEQ ID NO:177)

EDGGPACYGGFDLYFILDKSGSVLHHWNEIYYFVEQLAHKFISPQLRMSFIVFSTRGTTLMKLTEDREQIRQGLEE  
LQKVLPGGDTYMHEGFERASEQIYYENRQGYRTASVIIALTDGELHEDLFFYSEREANRSRDLGAIVYCVGVKDFN  
ETQLARIADSKDHVFPVNDGFQALQGIHLSILKKSCIEILAAEPSTICAGESFQVVVRGNGFRHARNVDRVLCSEK  
INDSVTLNEKPFVSDTYLLCPAPILKEVGMKAALQVSMNDGLSFISSSVIIITTHCSDGS

图20续



**TEM1** 内皮唾液酸蛋白前体[智人] (SEQ ID NO:178)

QDPWAAEPRAACGPSSCYALFPRRTTFLEAWRACRELGGDLATPRTPEEAQRVDSL VGAGPASRLWIGLQRQARQ  
CQLQRPLRGFTTWTGDDTAFTNWAQPASGGPCPAQRCVALEASGEHRWLEGSCTLAVDGYLCQFGFEGACPALQD  
EAGQAGPAVYTTFFHLVSTEFEWLPFGSVAAVQCQAGRGASLLCVKQPEGGVGWSRAGPLCLGTGCSPDNGGCEHE  
CVEEVDGHVSCRCTEGFRLAADGRSCEDPCAQAPCEQQCEPGGPQGYSCHRLGFRPAEDDPHRCVDTDECQIAGV  
CQQMCVNYVGGFECYCSEGEHEADGISCSPAGAMGAQASQDLGDELDDGEDEDEDEAWKAFNGGWTEMPGILW  
MEPTQPPDFALAYRPSFPEDREPQIPYEPTWPPPLSAPRVPHYSSVLSVTRPVVVSATHPTLPSAHQPPVIPATH  
PALSRDHQIPVIAANYPDLP SAYQPGILSVSHAQPPAHQPPMISTKYPELFPAHQSPMFPDTRVAGTQTTHLPG  
IPPNHAPLVTTLGAQLPPQAPDALVLRQTATQLPIIPTAQPSLTTSRSPVSPA HQISVPAATQPAALPTLLPSQS  
PTNQTSPISTPHPSKAPQIPREDGPSKALALWLPSPAPTAAPTALGEAGLAHSQRDDRWLYCTRCPHAPNKRI  
TDCYRWVIHAGSKSPTEPMPPRGSLTGVQTCRTSV

**HER2 ECD+TM v-erb-b2**成红细胞性白血病病毒癌基因同源物2，神经/胶质母  
细胞瘤来源的癌基因同源物，部分[合成构建物] (SEQ ID NO:179)

TQVCTGTDMKRLRLPASPETHLDMRLHLYQGCQVVGQNL ELYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLI AHNQVRQVPLQR  
LRIVRGTLQFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFH  
KNNQLALTLLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSDCQSLTRTV CAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHS  
DCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCP LHNQEVTAED  
GTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFET  
LEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRILHNGAYS LTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIH HNTHLCFVH  
TVPWDQLFRNP HQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREY  
VNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDP PFCVARCPSGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQPCP INC  
THSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIVSAVVGILLVVVLGVVFGILI

**CEA** 癌胚抗原相关细胞粘附分子5同种型1前原蛋白[智人] (SEQ ID NO:180)

KLTIIESTPFNVAEGKEVLLLLVHNLPQH LFGYSWKGERVDGNRQIIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQ  
NIIQNDTGFTYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATY LWWVNNQSLP  
VSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNL SCHAA  
SNPPAQYSWFVNGTFQQTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDE  
DAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTL SVTRNDVGVPYECGIQNKLSVDHSDPVILNVLYG  
PDDPTISPSYTYRPGVNL SLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTT  
VKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDA  
RAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPII SPDPSSYLSGANLNL SCHASNPSPQYSWRINGIPQHTQVLF I  
AKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSA

**TARF** TCR  $\gamma$  交替阅读框蛋白同种型2 [智人] (SEQ ID NO:181)

MKTNDTYMKFSWLTVPKSLDK EHRCAIVRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMDPKDNCSKDANDTLLLQLNTSA

**PROSTEIN** 溶质载体家族45成员3 [智人] (SEQ ID NO:182)

MVQRLWVSRLLRHRKAQLPPLLLLEVGVEEKSASDHWGRGRYGRRRPLAGLLCPDPRPTPLEALLSDLFRDPDHCRQA  
DWDTSALAPYLGTQEECEE AALGPTEPAEGLSAPSLSPHCCPCRARLA FRNLGALLPRLHQLCCRMFRTLRLVGE  
GLYQGVFRAEPGTEARRHYDEGVRLVQRF GTRASVAVVTASYHREKQVFLPKYRGDTGGASSED SLMTSFLPGPK  
PGAPFPNGHV GAGGSGLLPPPALCGASACDVSVRVVVGEPTEARVVPGRGICLDLAILDSAFLLSQVAPSLFMGS  
IVQLSQSVTFDKS DLA K YSA

**PSMA** 前列腺特异性膜抗原[智人] (SEQ ID NO:183)

图20续

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQ  
SQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPFPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGD  
LVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVARYGKVFGRGNKVNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLP  
GGGVQQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYDDAQKLEKMGGSAPPDSSWRGSLKV  
PYNVGPFGFTGNFSTQVKVMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRS  
FGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNL  
TKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYH  
SVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTSVSVF  
DSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLEAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESF  
PGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVQRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA

#### **BIRC4 存活蛋白-β [智人] (SEQ ID NO:184)**

MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCCTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFFCFKELEGWEPDDDDPIGP  
GTVAYACNTSTLGGRRGRITREEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKLDREKAKNKIAKETNNKKKEFEETAK  
KVRRAIEQLAAMD

#### **MUCIN-1 粘蛋白[智人] (SEQ ID NO:185)**

TGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMITSSVLSSHSPGSGSSTTQGGQDVT LAPATEPASGSAATWGQD  
VTSVPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAP  
PAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPG  
STAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTR  
PAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SA  
PDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHG  
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAP  
PAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPG  
STAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTR  
PAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SA  
PDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHG  
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAP  
PAHGVT SAPDNRPALGSTAPPVHNVT SASGSASGSASTLVHNGTSARATTPASKSTPFSIPSHSDPTTLASHS  
TKTDASSTHHSSVPLTSSNHSTSPQLSTGVSFHISNLQFNSSLEDPSTDYYQELQORDISEMFLQIYKQGG  
FLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPPSAQSGAGVPG

#### **MUCIN-1 同种型粘蛋白-1同种型11前体[智人] (SEQ ID NO:186)**

TGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNALSTGVSFHISNLQFNSSLEDPSTDYYQELQORDISEMFLQ  
IYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPPSAQSGAG  
VPGWGIALLVLCVLVALAIVYLIALAVCQCRKNGYQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEK  
VSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

#### **CD40 配体[智人] (SEQ ID NO:187)**

MKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRDLKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVK  
DIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY  
AQVTFCNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVS  
HGTGFTSFGLLKL

#### **WT-1 Wilms肿瘤蛋白同种型D [智人] (SEQ ID NO:188)**

MGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGGALPVSGAAQWAPVLDFAPPGASAYGSLGGFPAPPPAPPPPPPPHFSFIKQEP  
SWGGAEPHEEQCLSAFTVHFSGQFTGTAGACRYGPFPPPPSQASSGQARMFPNAPYLPSCLSQPAIRNQGYSTV  
TFDGTSPSYGHTPSHAAQFPNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPPVYGCHTPTDSTGSAQLLLRTPYSSDNLYQ  
MTSQLECMTNQMNLGATLKGVAAGSSSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNHTTFLCGAQYRIHTHGVRGIQDVRVVP

图20续

GVAPTLVRSASETSEKRPFCAYPGCNKRYFKLSHLQMHRSKHTGEKPYQCDFKDCERRFSRSDQLKRHQRRHTGV  
KPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRTHTGKTSEKPFSCRWPSCQKKFARSDDELVRHHNMHQNRNMTKLQLAL

### **WT-1 截短Wilms肿瘤蛋白同种型D [智人] (SEQ ID NO:189)**

MGSDVRDLNALPAVPSLGGGGGCGALPVSGAAQWAPVLDFAAPPASAYGSLGGPAPPPAPPPPPPPPHSFIKQEP  
SWGGAEPHEEQCLSAFTVHFSGQFTGTAGACRYGPFPPPPSQASSGQARMFPNAPYLPSCLESQFAIRNQGYSTV  
TFDGTSPSYGHTPSHAAQFPNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPPVYGCHTPTDSTGTSQALLLRTPYSSDNLYQ  
MTSQLECMTNQMNLGATLKGVAAGSSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNHTTPILCGAQYRIHTHGVRFGIQDVRVVP  
GVAPTLVRSASETSEKRP

### **PRAME 优先表达的黑素瘤抗原[智人] (SEQ ID NO: 190)**

MERRRLWGSIQSRYISMSVWTSPPRLVELAGQSLLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAW  
PFTCLPLGLVMKGQHLHLETFKAVLDGLDVLQAQEVRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTWVSGNRASLYSFPEPEAA  
QPMTKKRKVDGLSTEAEQPFIPVEVLVDLFLKEGACDELF SYLIEKVKRKKNVRLRLCCKKLKIFAMPMDIKMILK  
MVQLDSIEDLEVCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRLLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQLQALYVD  
SLFFLRGRDLQLLRHVMNPLETLSITNCRLESGDVMHLSQSPSVSLSVLSLGSVMLTDVSPPEPLQALLERASATL  
QDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSTFYGNSISISALQSLQLHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLH  
LERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRFTFYDPEPILCPCFMPN

### **LAGE-1 癌/睾丸抗原2, 同种型CRA\_a [智人] (SEQ ID NO: 191)**

MQAEGQGTGGSTGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGEAGATGGRGPRGAGAAASGPRGGAPRGP HGGAAASAQDGRG  
PCGARRPDSRLLQLHITMPFSSPMEAEVRRILSRDAAPLPRPGAVLKDFTVSGNLLFMSVRDQDREGAGRMVVG  
WGLGSASPEGQKARDLRTPKHKVSEQRPGTGP PPPPEGAQGDGCRGVAFNVMFSAPHI

### **MAGE A3 黑素瘤相关抗原3 [智人] (SEQ ID NO: 192)**

MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSSTLVEVTLGEVPAAESPDPPQSPQGASSLPTTMN  
YPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEFQAALSARKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFFPVIFS  
KASSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLDGNQIMPKAGLLIIVLAI IAREGDCAPEEKIWEELSVL  
EVFEGREDSILGDPKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALVETSYVKVLHHMVKISGGPHISYPPL  
HEWVLREGEE

图20续

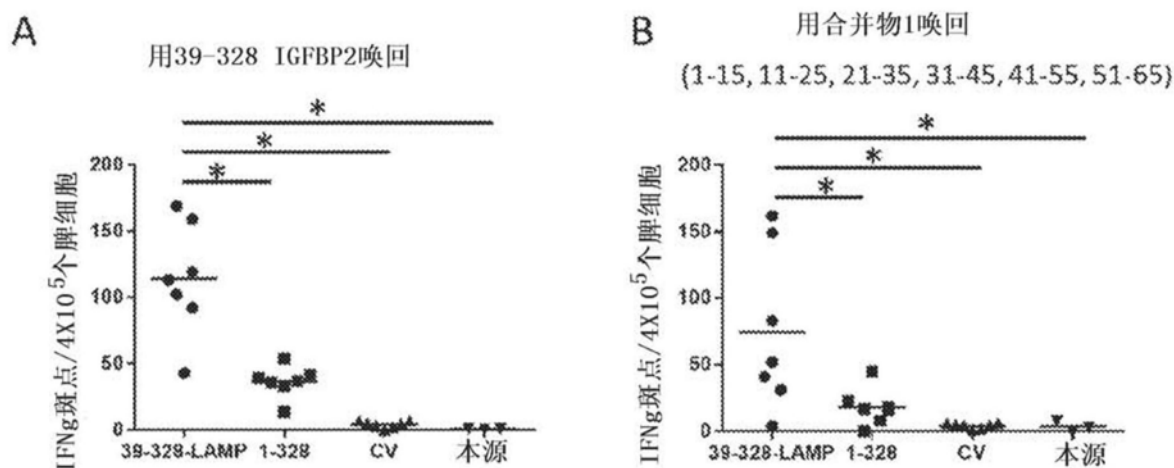


图21

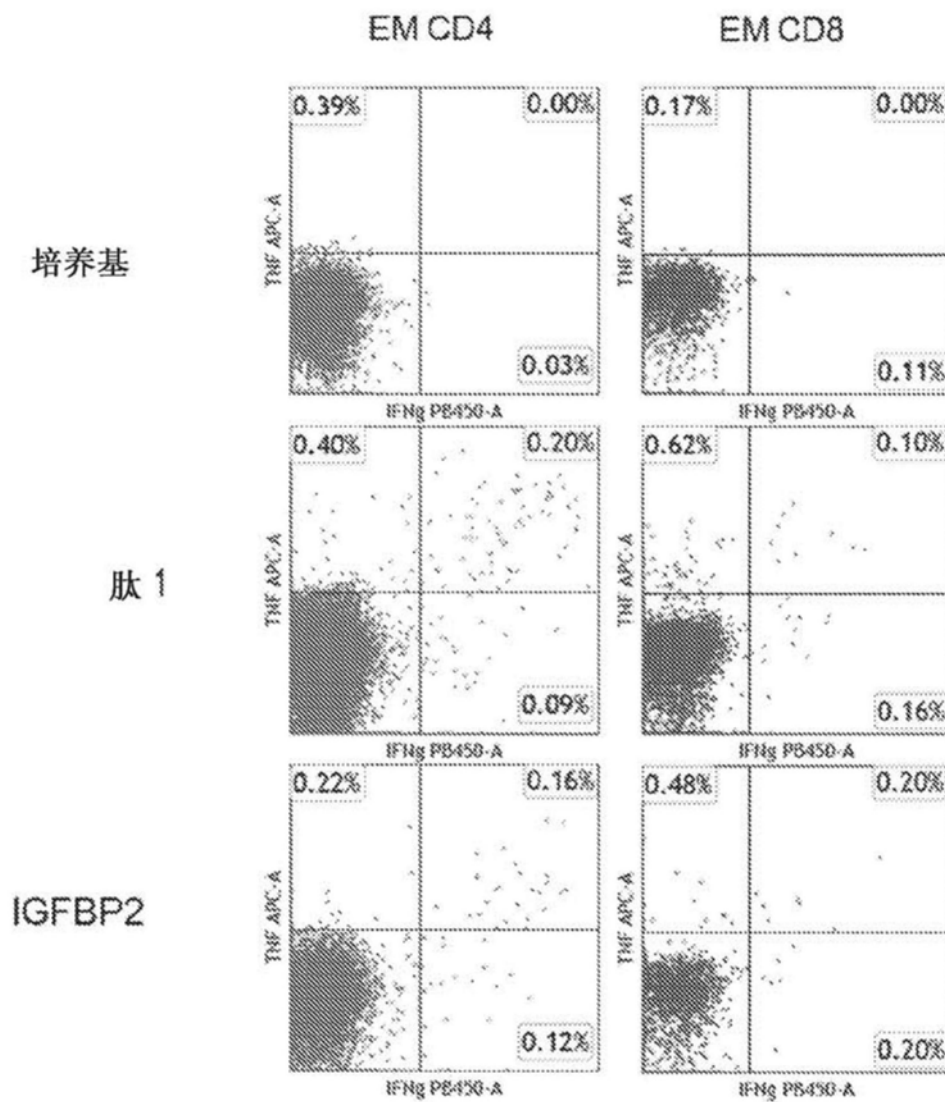


图22



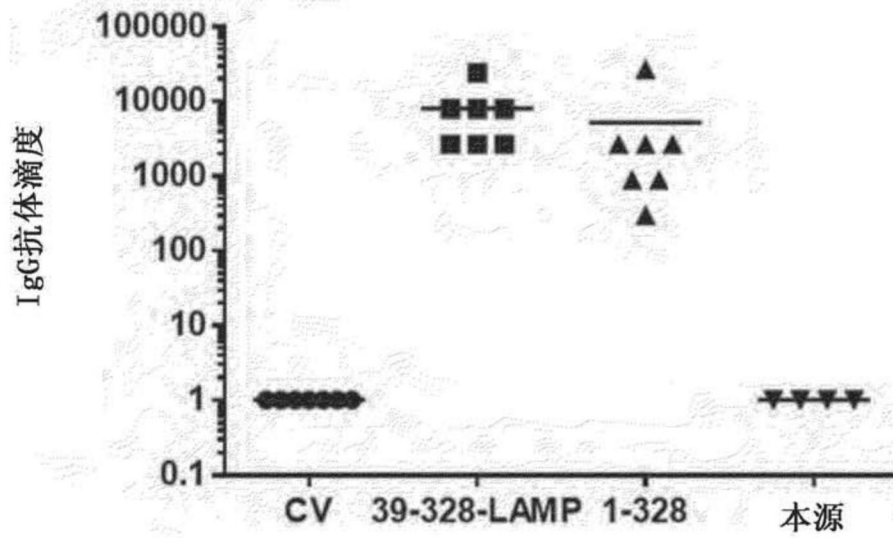


图23

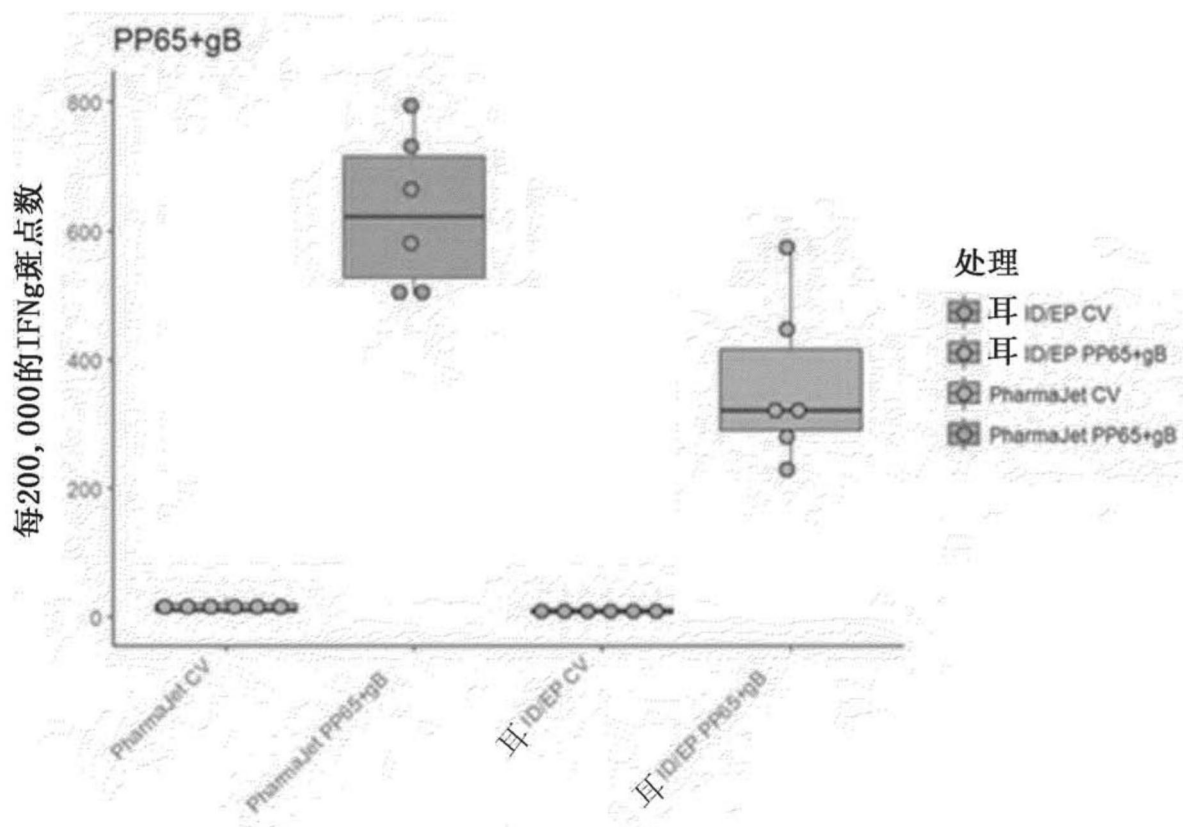


图24

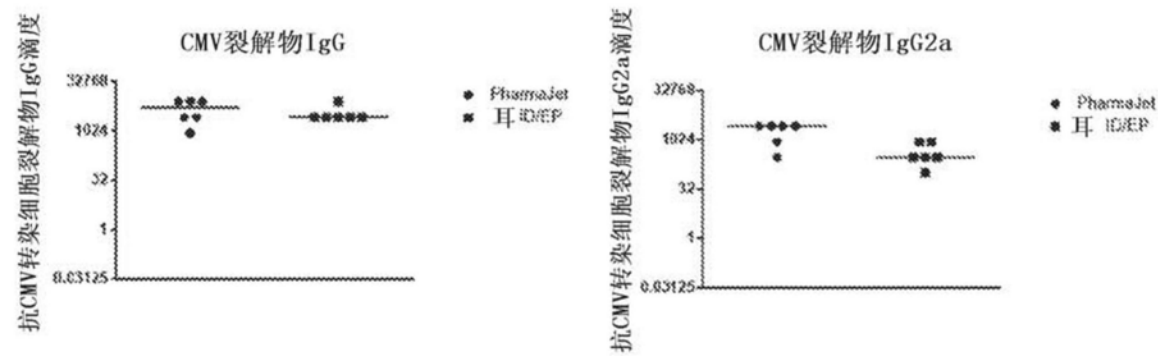


图25

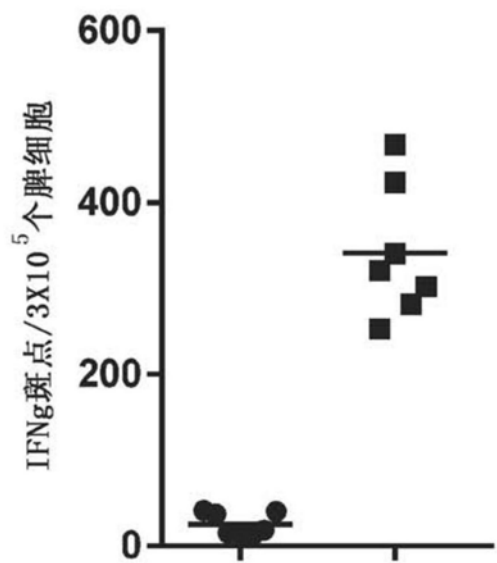


图26

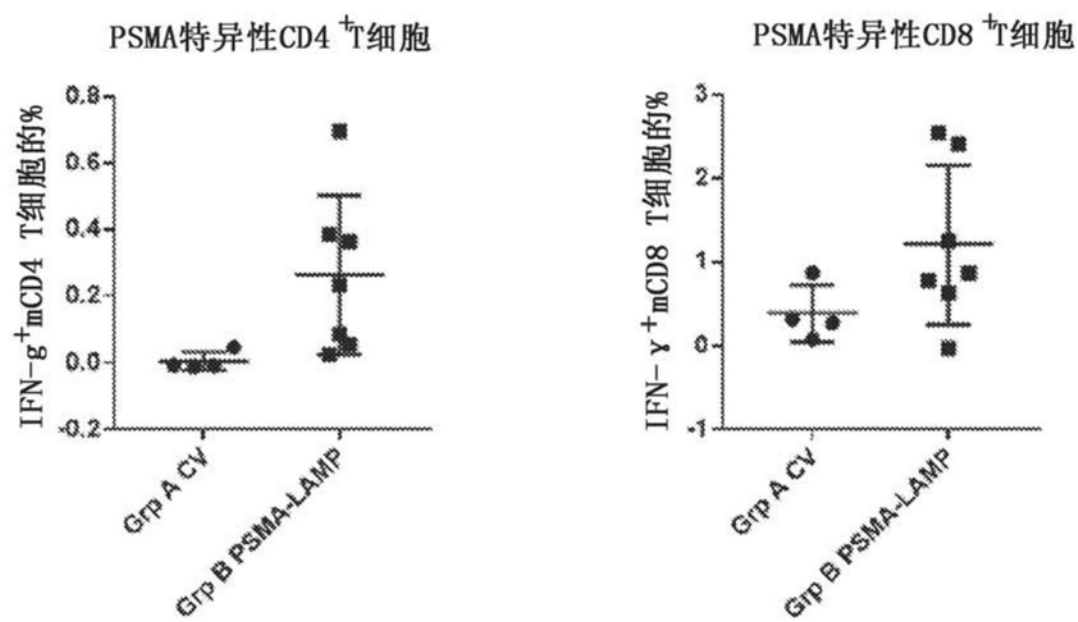


图27

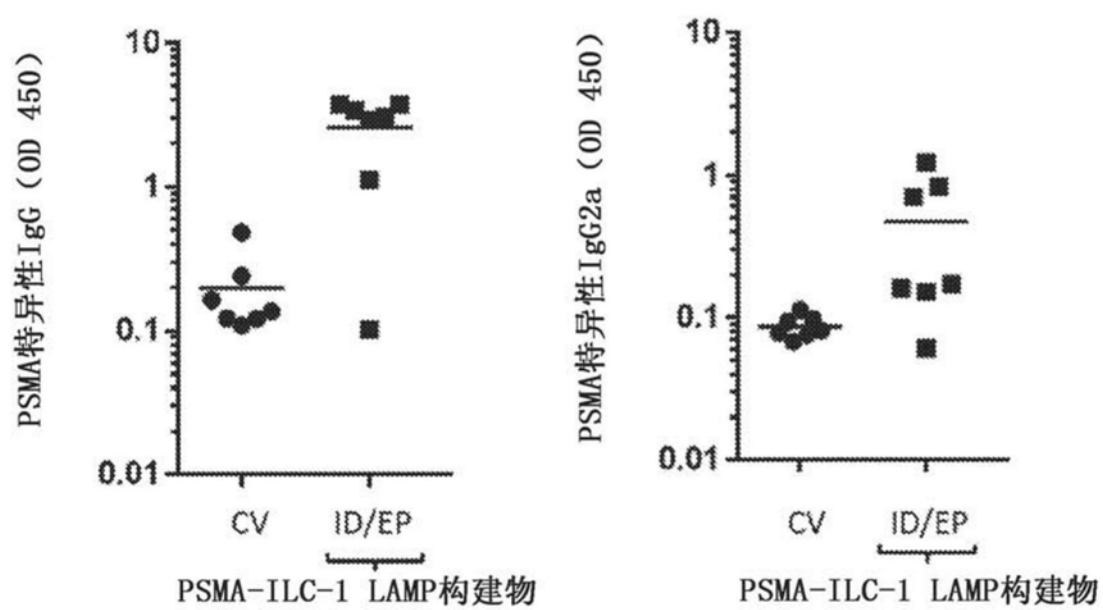


图28