



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107286245 B

(45) 授权公告日 2021.10.08

(21) 申请号 201610222458.0

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2016.04.11

A61K 35/15 (2015.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 48/00 (2006.01)

申请公布号 CN 107286245 A

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.10.24

A61P 31/20 (2006.01)

(73) 专利权人 北京普纳生物科技有限公司

A61P 31/18 (2006.01)

地址 101102 北京市北京经济技术开发区

A61P 31/22 (2006.01)

科创六街88号院6号楼1单元601室

(72) 发明人 黄雪芬 陈思毅

(56) 对比文件

CN 101002937 A, 2007.07.25

CN 1318105 A, 2001.10.17

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

CN 103768604 A, 2014.05.07

务所(普通合伙) 11201

郑秀惠等. 分子佐剂在 DNA 疫苗中的应用. 《国际生殖健康/计划生育杂志》. 2009, 第28卷 (第3期),

代理人 李志东

彭晓谋等. 外源辅助T淋巴细胞表位影响HBV S基因. 《中华医学杂志》. 2003, 第83卷 (第3期),

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

Boyer J D et al.. SIV DNA vaccine co-administered with IL-12 expression plasmid enhances CD8 SIV cellular immune responses in cynomolgus macaques. 《Journal of medical primatology》. 2005, 第34卷 (第5-6期),

审查员 杨大鹏

权利要求书2页 说明书23页

序列表31页 附图3页

(54) 发明名称

PD-L1和PD-L2重组蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明提出了一种重组蛋白及其用途, 该重组蛋白包括: 免疫检查点分子片段; 辅助T细胞抗原决定基片段; 以及免疫刺激分子片段. 该重组蛋白在体内刺激产生抗免疫检查点抗体, 调动体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL, 并且刺激产生抗免疫检查点的CTL, 进而特异性杀伤肿瘤细胞. 本发明实施例所提出的重组蛋白引起的对肿瘤细胞的主动免疫杀伤效果显著.

1. 一种重组蛋白,其特征在于,由以下片段组成:
免疫检查点分子片段;
辅助T细胞抗原决定基片段;以及
免疫刺激分子片段;
其中,所述免疫检查点分子片段为PD-L1和PD-L2的至少之一的去除跨膜区的细胞外分子片段,
所述辅助T细胞抗原决定基片段为广谱PADRE辅助T细胞抗原决定基片段,
所述免疫刺激分子片段为粒细胞集落刺激生物因子片段,
所述辅助T细胞抗原决定基片段的N端与所述免疫检查点分子片段的C端相连,所述辅助T细胞抗原决定基片段的C端与所述免疫刺激分子片段的N端相连。
2. 一种重组蛋白,其特征在于,所述重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1、4、7所示。
3. 一种核酸,其特征在于,所述核酸编码权利要求1~2任一项所述的重组蛋白,并且所述核酸的核苷酸序列如SEQ ID NO:10、13、16所示。
4. 一种构建体,其特征在于,所述构建体携带权利要求3所述的核酸。
5. 根据权利要求4所述的构建体,其特征在于,所述构建体的载体为pET系列载体、pGEX系列载体、pPIC系列载体、BacPAK、pSV系列载体或pCMV系列载体。
6. 一种构建体,其特征在于,所述构建体携带下列核酸分子:
 - (1) 编码免疫检查点分子片段的核酸分子,所述免疫检查点分子片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:19~21所示,所述编码免疫检查点分子片段的核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:22~24所示;
 - (2) 编码辅助T细胞抗原决定基片段的核酸分子,所述辅助T细胞抗原决定基片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述编码辅助T细胞抗原决定基片段的核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:26所示;以及
 - (3) 编码免疫刺激分子片段的核酸分子,所述免疫刺激分子片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示,所述编码免疫刺激分子片段的核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:30所示。
7. 一种转基因细胞,其特征在于,所述转基因细胞携带权利要求4~6任一项所述的构建体。
8. 根据权利要求7所述的转基因细胞,其特征在于,所述转基因细胞为BL21, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, DH10B, XL1- Blue, Pichia pastors, Kluyveromyces lactis, Sf9, Sf21, High-Five T, CHO细胞系, HEK细胞系, HeLa细胞系或COS细胞系。
9. 根据权利要求7所述的转基因细胞,其特征在于,所述转基因细胞为抗原呈递细胞。
10. 根据权利要求9所述的转基因细胞,其特征在于,所述转基因细胞为树突状细胞。
11. 权利要求1~2任一项所述的重组蛋白在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗肺癌。
12. 权利要求1~2任一项所述的重组蛋白在制备疫苗中的用途,所述疫苗用于预防或治疗肺癌。
13. 一种药物组合物,其特征在于,包括:
权利要求1~2任一项所述的重组蛋白;以及

药学上可接受的佐剂。

14. 一种树突状细胞,其特征在于,所述树突状细胞负载权利要求1~2任一项所述的重组蛋白。

15. 一种靶向性免疫细胞群,其特征在于,所述靶向性免疫细胞群是通过将权利要求14所述的树突状细胞与淋巴细胞进行共培养获得的。

16. 一种疫苗,其特征在于,包含权利要求1~2任一项所述的重组蛋白、权利要求14所述的树突状细胞或权利要求15所述的靶向性免疫细胞群。

17. 一种制备抗体的方法,其特征在于,包括:

利用权利要求1~2任一项所述的重组蛋白对动物进行免疫接种;

采集经过免疫接种的动物的血清;以及

从所述血清中纯化出目的抗体。

18. 一种治疗组合物,其特征在于,包括:

权利要求1~2任一项所述的重组蛋白、权利要求3所述的核酸、权利要求4~6任一项所述的构建体、权利要求7~10任一项所述的转基因细胞、权利要求13所述的药物组合物、权利要求14所述的树突状细胞、权利要求15所述的靶向性免疫细胞群、或权利要求16所述的疫苗。

PD-L1和PD-L2重组蛋白及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域,具体地,本发明涉及重组蛋白及其用途。

背景技术

[0002] 癌症,由于细胞内基因突变导致细胞增殖失控的一种疾病。目前已成为人类健康的重大威胁,是导致人类死亡的主要原因之一。世界卫生组织(WHO)在发表的《全球癌症报告2014》中指出,2012年全球癌症患者和死亡病例都在迅速增加,而新增癌症病例有近一半出现在亚洲,其中大部分在中国,中国新增癌症病例高居第一位。《2012年中国肿瘤登记年报》数据显示,中国每年新增癌症病例约350万,约有250万人因此死亡。因此,寻找高效特异的癌症治疗方法具有重大的临床价值。

[0003] 传统的肿瘤治疗方法主要包括手术、放疗和化疗,但这几种方法都具有较大的局限性,比如由于癌细胞的近端入侵或远端转移,手术切除后的肿瘤转移复发率较高,而放疗和化疗对于机体自身的正常细胞尤其是造血系统和免疫系统会造成严重的损害,因此对于已发生肿瘤转移的患者也很难达到较好的远期疗效。随着肿瘤分子机制的深入研究和生物技术的进一步发展,靶向药物治疗和免疫治疗在肿瘤的综合治疗中发挥着愈来愈大的作用。靶向疗法主要包括单克隆抗体(有时归为被动胞回输和肿瘤疫苗等。免疫疗法通过调动机体的免疫系统,增强肿瘤微环境抗肿瘤免疫疗法)和小分子靶向药物,而免疫疗法主要包括细胞因子疗法、免疫检查点单抗、过继免疫疗法,从而控制和杀伤肿瘤细胞,因此有效率高,特异性强,耐受性好的优点,在肿瘤治疗中具有广阔的前景。

[0004] 肿瘤免疫治疗疫苗主要包括肿瘤细胞疫苗、树突状细胞(DC细胞)疫苗、蛋白&多肽疫苗、核酸疫苗、基因工程疫苗和抗独特型肿瘤疫苗。这些疫苗能够杀伤肿瘤的主要机制即是通过引起患者针对于肿瘤特异性抗原免疫反应,包括抗体反应和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)特异性杀伤等。

[0005] 然而,这些肿瘤疫苗针对肿瘤相关抗原,临床疗效弱,仍有待进一步深入研究和开发.来增强临床疗效。

发明内容

[0006] 本发明是发明人基于以下问题和事实的发现而提出的:

[0007] 肿瘤细胞高表达免疫检查点分子PD-L1或PD-L2,与活化的细胞毒性T淋巴细胞上表达的PD-1相结合,进而抑制肿瘤的T淋巴细胞反应,来逃避细胞毒性T淋巴细胞的免疫杀伤。目前,通过体外生产抗PD-L1/PD抗体,再注射病人体内的被动免疫疗法,虽可短暂激活病人体内已经存在自发诱导产生的免疫细胞-细胞毒性T淋巴细胞(CTL),来杀伤肿瘤细胞,但临床效果持续时间短,需不断重复注射抗PD-L1/PD抗体,来维持体内抗体浓度。

[0008] 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提出了一种具有引起肿瘤特异性抗原免疫反应的重组PD-L1蛋白,该蛋白通过主动免疫,在病人体内持续刺激产生抗PD-L1抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导

产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生新的抗PD-L1CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。本发明所提出的重组蛋白引起的对肿瘤细胞的主动免疫杀伤效果显著。

[0009] 在本发明的第一方面,本发明提出了一种重组蛋白。根据本发明的实施例,所述重组蛋白包括:免疫检查点分子片段;辅助T细胞抗原决定基片段;以及免疫刺激分子片段。本发明实施例所提出的重组蛋白可在体内持续刺激产生抗免疫检查点抗体,调动体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点的CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。本发明实施例所提出的重组蛋白引起的对肿瘤细胞的主动免疫杀伤效果显著。

[0010] 根据本发明的实施例,所述重组蛋白还可以及进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0011] 根据本发明的实施例,所述免疫检查点分子为PD-L1或PD-L2。PD-L1或PD-L2在肿瘤细胞中特异性表达,进而本发明实施例所提出的重组蛋白可引起的肿瘤抗原免疫反应的特异性更强。

[0012] 根据本发明的实施例,所述免疫检查点分子片段为所述PD-L1或PD-L2的去除跨膜区的细胞外分子片段。PD-L1或PD-L2的去除跨膜区的细胞外分子片段仅具有肿瘤抗原性,不具有肿瘤免疫抑制功能,进而PD-L1或PD-L2的去除跨膜区的细胞外分子片段可更为有效地引起肿瘤抗原免疫反应,且特异性进一步提高。

[0013] 根据本发明的实施例,所述辅助T细胞抗原决定基为广谱PADRE辅助T细胞抗原决定基。广谱PADRE辅助T细胞抗原决定基可有效激活辅助T细胞,进而进一步增强重组蛋白所引起的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的特异性杀伤。

[0014] 根据本发明的实施例,所述免疫刺激分子为粒细胞集落刺激生物因子、白细胞介素-12或趋化因子。上述免疫刺激分子具有生物活性,可显著增强树突状细胞(DC细胞)的抗原呈递功能和增强细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和B淋巴细胞的活性,进而本发明实施例的重组蛋白可更为有效地引起肿瘤抗原免疫反应。

[0015] 根据本发明的实施例,所述辅助T细胞抗原决定基片段N端与所述免疫检查点分子片段的C端相连,所述辅助T细胞抗原决定基片段C端与所述免疫刺激分子片段的N端相连。本发明实施例的重组蛋白中的相关分子片段在上述连接状态下,有利于肿瘤抗原PD-L1或PD-L2片段在DC细胞中的呈递,有利于辅助T细胞抗原决定基和免疫刺激分子发挥相应的激活免疫细胞的功能,进而本发明实施例的重组蛋白可更为有效地引起肿瘤抗原免疫反应。

[0016] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种重组蛋白。根据本发明的实施例,所述重组蛋白具有SEQ ID NO:1~9所示的氨基酸序列。

[0017] MFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEE DLK VQHSSYRQRA RLLKDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKNINQRILVDPVTSEHELTCQAEAKF VAAWTLKAAASGSGMWLQSLLLLGTVACISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISE MFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGS LTKLKGPLTMMASHYKQHC PPTPETSCATQIITFESFKENLKD FLLVIPFDC WEPVQELEHHHHH (SEQ ID NO:1)。

[0018] MFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEE DLK VQHSSYRQRA RLLKDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKNINQRILVDPVTSEHELTCQAEAKF VAAWTLKAAASGSGMKVSAARLAVILIATALCAPASAPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTS GKCSNPAV VFVTRKNRQVCANPEKKWREYINSLEMSLEHHHHH (SEQ ID NO:2)。

[0019] MFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEE DLKVQHSSYRQRA
 RLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKNINQRILVDPVTSEHELTCQAEAKF
 VAAWTLKAAAVDSGSGMCPARSLLLVATLVLLDHL SLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTL E
 FYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKT SFMMALCLSSIYEDLKMYQV
 EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPPQSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRV
 MSYLNASGGGGSGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLT
 IQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDL
 TFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFF
 IRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR KNA
 SISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSLEHHHHHH (SEQ ID NO:3)。

[0020] MLFTVTVPKELYIIIEHGSNTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKAS
 FHIPQVQVRDEGQYQCII IYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSAKF
 VAAWTLKAAAVDSGSGMWLQSLLLLGTVACSI SAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRD TAAEMNETVEVI
 SEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLSTKLKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPF
 DCWEPVQELEHHHHHH (SEQ ID NO:4)。

[0021] MLFTVTVPKELYIIIEHGSNTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKAS
 FHIPQVQVRDEGQYQCII IYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSAKF
 VAAWTLKAAAVDSGSGMKVSAARLAVILIATALCAPASAPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTS GKCSNP
 AVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEMSLEHHHHHH (SEQ ID NO:5)。

[0022] MLFTVTVPKELYIIIEHGSNTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKAS
 FHIPQVQVRDEGQYQCII IYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSAKF
 VAAWTLKAAAVDSGSGMCPARSLLLVATLVLLDHL SLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTL E
 FYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKT SFMMALCLSSIYEDLKMYQV
 EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPPQSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRV
 MSYLNASGGGGSGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLT
 IQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDL
 TFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFF
 IRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR KNA
 SISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSLEHHHHHH (SEQ ID NO:6)。

[0023] MFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEE DLKVQHSSYRQRA
 RLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKNINQRILVDPVTSEHELTCQAE LFT
 VTPKELYIIIEHGSNTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKASFH IPQVQVRDEG
 QYQCII IYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSAKFVAAWTLKAAAVD
 SSGMWLQSLLLLGTVACSI SAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRD TAAEMNETVEVI SEMFDLQEPTCL
 QTRLELYKQGLRGLSTKLKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQELEHH
 HHH (SEQ ID NO:7)。

[0024] MFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEE DLKVQHSSYRQRA
 RLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKNINQRILVDPVTSEHELTCQAE LFT
 VTPKELYIIIEHGSNTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKASFH IPQVQVRDEG

QYQCII IYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSAKFVAAWTLKAAAVD
SGSGMKVSAARLAVILIATALCAPASAPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSKGCSNPAVVVTRKNRQV
CANPEKKWREYINSLEMSLEHHHHHH (SEQ ID NO:8)。

[0025] MFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEE DLKVQHSSYRQRA
RLLDKQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEFLT
VTVPKELYIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAIASLQKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKASFHIPQVQVRDEG
QYQCII IYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSAKFVAAWTLKAAAVD
SGSGMCPARSLLLVATLVLLDHL SLARNLPVATPDPGMFPC LHHSQNL LRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHE
DITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD
PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGS
GGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYDPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQY
TCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWT TISTDLTFSVKSSRGSSD
PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYENYSSFFIRDI IKPDPKKN
LQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS
SSWSEWASVPCSLEHHHHHH (SEQ ID NO:9)。

[0026] 本发明实施例所述提出的重组蛋白可引起肿瘤特异性抗原免疫反应,该蛋白通过主动免疫,在病人体内刺激产生抗PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗PD-L1或PD-L2CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。本发明所提出的重组蛋白引起的对肿瘤细胞的主动免疫杀伤效果显著。

[0027] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种核酸。根据本发明的实施例,所述核酸编码前面所述的重组蛋白,并且所述核酸具有SEQ ID NO:10~18所示的核苷酸序列。

[0028] ATGTTTACTGTCACGGTTC CCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATG
CAAATTTCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCTACTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATT
CAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTT CAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGGCTGTTGAAGGACC
AGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGAT
CAGCTATGGTGGTGCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCCCCATAACA AAAATCAACCAAAGAATT
TTGGTTGTGGATCCAGTCACTCTGAACATGAACTGACATGTGAGGCTGAGGCGAAATTTGTGGCGGCGTGGACCC
TGAAAGCGGCGGCGAGCGGCAGCGCATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTC
TGCACCCGCCGCTCGCCAGCCCCAGCACACAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGCGTCTC
CTGAACCTGAGTAGAGACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGG
AGCCGACCTGCCTACAGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGG CAGCCTACCAAGCTCAAGGGCCC
CTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAACAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAAACTTCTGTGCAACCCAGATTATC
ACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTTCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGG
AGCTCGAGCACCACCACCACCAC (SEQ ID NO:10)。

[0029] ATGTTTACTGTCACGGTTC CCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATG
CAAATTTCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCTACTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATT
CAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTT CAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGGCTGTTGAAGGACC
AGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGAT
CAGCTATGGTGGTGCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCCCCATAACA AAAATCAACCAAAGAATT

TTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACTGACATGTCAGGCTGAGGCGAAATTTGTGGCGGCGTGGACCC
TGAAAGCGGCGGCGAGCGGCAGCGGCATGAAGGTCTCCGCGGCACGCCTCGCTGTCATCCTCATTGCTACTGCCCT
CTGCGCTCCTGCATCTGCCTCCCCATATTCCTCGACACCACACCCTGCTGCTTTGCCTACATTGCCCGCCCACTG
CCCCGTGCCACATCAAGGAGTATTTCTACACCAGTGGCAAGTGTCTCCAACCCAGCAGTCGTCTTTGTCACCCGAA
AGAACCGCCAAGTGTGTGCCAACCCAGAGAAGAAATGGGTTCCGGGAGTACATCAACTCTTTGGAGATGAGCCTCGA
GCACCACCACCACCACCAC (SEQ ID NO:11)。

[0030] ATGTTTACTGTCACGGTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATG
CAAATTTCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCACTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATT
CAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTCCAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGGCTGTTGAAGGACC
AGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGAT
CAGCTATGGTGGTCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCCCCATAACAACAAAATCAACCAAAGAATT
TTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACTGACATGTCAGGCTGAGGCGAAATTTGTGGCGGCGTGGACCC
TGAAAGCGGCGGCGGTCGACAGCGGCAGCGGCATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCTCT
CCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTCCCATGCCTTACCAC
TCCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAAATCTAGAATTTTACCCTTGCACTT
CTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAAC
CAAGAATGAGAGTTGCCTAAATTCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACC
TCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGA
ATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGAT
GCAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCCTTGAAGAACCGGATTTTATAAACTAAA
ATCAAGCTCTGCATACTTCTCATGCTTTCAGAATTCGGGCAGTACTATTGATAGAGTATGAGCTATCTGAATG
CTTCCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGTTCGGGTGGCGGCGGATCTATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTA
TGTCGTAGAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCCTGGAGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGAT
GGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGGAGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGT
TTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTCGCTCCTGCTGCTTACAAAAA
GGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCACAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCGAG
GCCAAGAATTATTCTGGACGTTTACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAA
GCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGA
CAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATT
GAGGTCATGGTGGATGCCGTTACAAGCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCA
AACCTGACCCACCAAGAACTTGACAGCTGAAGCCATTAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCC
TGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAA
AAGAAAGATAGAGTCTTACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGG
CCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTCTCGAGCACCACCACCACCA
CCAC (SEQ ID NO:12)。

[0031] ATGTTATTACAGTGACAGTCCCTAAGGAACTGTACATAATAGAGCATGGCAGCAATGTGACCCTGGA
ATGCAACTTTGACACTGGAAGTCATGTGAACCTTGGAGCAATAACAGCCAGTTTGCAAAGGTGGAAAATGATACA
TCCCCACACCGTGAAAGAGCCACTTGTCTGGAGGAGCAGCTGCCCTAGGGAAGGCCTCGTTCCACATACCTCAAG
TCCAAGTGAGGGACGAAGGACAGTACCAATGCATAATCATCTATGGGGTCGCTGGGACTACAAGTACCTGACTCT

GAAAGTCAAAGCTTCCTACAGGAAAATAAACACTCACATCCTAAAGGTTCCAGAAAACAGATGAGGTAGAGCTCACC
TGCCAGGCTACAGGTTATCCTCTGGCAGAAGTATCCTGGCCAAACGTCAGCGCGAAATTTGTGGCGGCGTGGACCC
TGAAAGCGGCGGCGGTCGACAGCGGCAGCGGCATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAG
CATCTCTGCACCCGCCGCTCGCCAGCCCCAGCACACAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGG
CGTCTCTGAACCTGAGTAGAGACTGCTGCTGAGATGAATGAAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACC
TCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCACCAAGCTCAA
GGGCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAACAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAAACTTCCTGTGCAACCCAG
ATTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTTCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAG
TCCAGGAGCTCGAGCACCACCACCACCAC (SEQ ID NO:13)。

[0032] ATGTTATTCACAGTGACAGTCCCTAAGGAACTGTACATAATAGAGCATGGCAGCAATGTGACCCTGGA
ATGCAACTTTGACTGGAAGTCATGTGAACCTTGGAGCAATAACAGCCAGTTTGCAAAGGTGAAAATGATACA
TCCCCACACCGTGAAAGAGCCACTTTGCTGGAGGAGCAGCTGCCCTAGGGAAGGCCTCGTTCCACATACCTCAAG
TCCAAGTGAGGGACGAAGGACAGTACCAATGCATAATCATCTATGGGGTCGCTGGGACTACAAGTACCTGACTCT
GAAAGTCAAAGCTTCCTACAGGAAAATAAACACTCACATCCTAAAGGTTCCAGAAAACAGATGAGGTAGAGCTCACC
TGCCAGGCTACAGGTTATCCTCTGGCAGAAGTATCCTGGCCAAACGTCAGCGCGAAATTTGTGGCGGCGTGGACCC
TGAAAGCGGCGGCGGTCGACAGCGGCAGCGGCATGAAGGTCTCCGCGGCACGCCTCGCTGTCATCCTCATTGCTAC
TGCCCTCTGCGCTCCTGCATCTGCCTCCCCATATTCCTCGACACCACACCCTGCTGCTTTGCCTACATTGCCCGC
CCACTGCCCCGTGCCACATCAAGGAGTATTTCTACACCAGTGGCAAGTGCTCCAACCCAGCAGTCGTCTTTGTCA
CCCGAAAGAACCGCAAGTGTGTGCCAACCCAGAGAAGAAATGGGTTCCGGGAGTACATCAACTCTTTGGAGATGAG
CCTCGAGCACCACCACCACCAC (SEQ ID NO:14)。

[0033] ATGTTATTCACAGTGACAGTCCCTAAGGAACTGTACATAATAGAGCATGGCAGCAATGTGACCCTGGA
ATGCAACTTTGACTGGAAGTCATGTGAACCTTGGAGCAATAACAGCCAGTTTGCAAAGGTGAAAATGATACA
TCCCCACACCGTGAAAGAGCCACTTTGCTGGAGGAGCAGCTGCCCTAGGGAAGGCCTCGTTCCACATACCTCAAG
TCCAAGTGAGGGACGAAGGACAGTACCAATGCATAATCATCTATGGGGTCGCTGGGACTACAAGTACCTGACTCT
GAAAGTCAAAGCTTCCTACAGGAAAATAAACACTCACATCCTAAAGGTTCCAGAAAACAGATGAGGTAGAGCTCACC
TGCCAGGCTACAGGTTATCCTCTGGCAGAAGTATCCTGGCCAAACGTCAGCGCGAAATTTGTGGCGGCGTGGACCC
TGAAAGCGGCGGCGGTCGACAGCGGCAGCGGCATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCCT
CCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTACCAC
TCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTT
CTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAAC
CAAGAATGAGAGTTGCCTAAATTCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACC
TCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGA
ATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGAT
GCAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCCTGAAGAACCGGATTTTTATAAACTAAA
ATCAAGCTCTGCATACTTCTCATGCTTTCAGAATTCGGGCAGTACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAATG
CTTCCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGTGGGTCGGTGGCGGCGGATCTATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTA
TGTCGTAGAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCTGGAGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGAT
GGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAAGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATCCAAGTCAAAGAGT
TTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTCGCTCCTGCTGCTTACAAAAA

GGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCGAG
GCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAA
GCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGA
CAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATT
GAGGTCATGGTGGATGCCGTTTACAAGCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCA
AACCTGACCCACCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCC
TGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAA
AAGAAAGATAGAGTCTTACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGG
CCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTCTCGAGCACCACCACCACCA
CCAC (SEQ ID NO:15)。

[0034] ATGTTTACTGTCACGGTTCCTCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATG
CAAATTTCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGACTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATT
CAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTTACAGATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGGCTGTTGAAGGACC
AGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGAT
CAGCTATGGTGGTGGCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCCCCATAACAACAAAATCAACCAAGAATT
TTGTTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACTGACATGTCAGGCTGAGTTATTCACAGTGACAGTCCCTAAGG
AACTGTACATAATAGAGCATGGCAGCAATGTGACCCTGGAATGCAACTTTGACACTGGAAGTCATGTGAACCTTGG
AGCAATAACAGCCAGTTTGCAAAGGTGGAAAATGATACATCCCCACACCGTGAAAGAGCCACTTTGCTGGAGGAG
CAGCTGCCCTAGGGAAGGCCTCGTTCACATACCTCAAGTCCAAGTGAGGGACGAAGGACAGTACCAATGCATAA
TCATCTATGGGGTCGCCTGGGACTACAAGTACCTGACTCTGAAAGTCAAAGCTTCCTACAGGAAAATAAACACTCA
CATCTAAAGGTTCCAGAAACAGATGAGGTAGAGCTCACCTGCCAGGCTACAGGTTATCCTCTGGCAGAAGTATCC
TGGCCAAACGTCAGCGCAAATTTGTGGCGCGTGGACCCTGAAAGCGGCGGCGTGCACAGCGGCAGCGGCATGT
GGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCTGCACCCGCCCCTCGCCCAGCCCCAGCAC
ACAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACTGCTGCTGAG
ATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGC
TGTACAAGCAGGGCTGCGGGGAGCCTACCAAGCTCAAGGGCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAACA
GCACTGCCCTCCAACCCGGAACTTCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAG
GACTTTCTGCTTGTGCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAGCTCGAGCACCACCACCACCAC (SEQ
ID NO:16)。

[0035] ATGTTTACTGTCACGGTTCCTCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATG
CAAATTTCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGACTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATT
CAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTTACAGATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGGCTGTTGAAGGACC
AGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGAT
CAGCTATGGTGGTGGCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCCCCATAACAACAAAATCAACCAAGAATT
TTGTTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACTGACATGTCAGGCTGAGTTATTCACAGTGACAGTCCCTAAGG
AACTGTACATAATAGAGCATGGCAGCAATGTGACCCTGGAATGCAACTTTGACACTGGAAGTCATGTGAACCTTGG
AGCAATAACAGCCAGTTTGCAAAGGTGGAAAATGATACATCCCCACACCGTGAAAGAGCCACTTTGCTGGAGGAG
CAGCTGCCCTAGGGAAGGCCTCGTTCACATACCTCAAGTCCAAGTGAGGGACGAAGGACAGTACCAATGCATAA
TCATCTATGGGGTCGCCTGGGACTACAAGTACCTGACTCTGAAAGTCAAAGCTTCCTACAGGAAAATAAACACTCA

CATCCTAAAGGTTCCAGAAACAGATGAGGTAGAGCTCACCTGCCAGGCTACAGGTTATCCTCTGGCAGAAGTATCC
TGGCCAAACGTCAGCGCGAAAATTTGTGGCGGCGTGGACCCTGAAAGCGGCGGCGGTGACAGCGGCAGCGGCATGA
AGGTCTCCGCGGCACGCCTCGCTGTCATCCTCATTGCTACTGCCCTCTGCGCTCCTGCATCTGCCTCCCCATATTC
CTCGGACACCACACCCTGCTGCTTTGCCTACATTGCCCCGCCACTGCCCCGTGCCACATCAAGGAGTATTTCTAC
ACCAGTGGCAAGTGTCCAACCCAGCAGTCGTCTTTGTACCCGAAAAGAACCGCCAAGTGTGTGCCAACCCAGAGA
AGAAATGGGTTCTGGGAGTACATCAACTCTTTGGAGATGAGCCTCGAGCACCACCACCACCACCAC (SEQ ID NO:
17)。

[0036] ATGTTTACTGTCACGGTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATG
CAAATTTCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGACTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATT
CAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTTCAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGGCTGTTGAAGGACC
AGCTCTCCCTGGGAAATGCTGACTTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGAT
CAGCTATGGTGGTCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCCCCATACAACAAAATCAACCAAAGAATT
TTGGTTGTGGATCCAGTCACTCTGAACATGAACTGACATGTCAGGCTGAGTTATTCACAGTGACAGTCCCTAAGG
AACTGTACATAATAGAGCATGGCAGCAATGTGACCCTGGAATGCAACTTTGACACTGGAAGTCATGTGAACCTTGG
AGCAATAACAGCCAGTTTGCAAAAGGTGAAAATGATACATCCCCACACCGTGAAAGAGCCACTTTGCTGGAGGAG
CAGCTGCCCTAGGGAAGGCCTCGTTCACATACCTCAAGTCCAAGTGAGGGACGAAGGACAGTACCAATGCATAA
TCATCTATGGGGTCGCTGGGACTACAAGTACCTGACTCTGAAAGTCAAAGCTTCCTACAGGAAAATAAACACTCA
CATCCTAAAGGTTCCAGAAACAGATGAGGTAGAGCTCACCTGCCAGGCTACAGGTTATCCTCTGGCAGAAGTATCC
TGGCCAAACGTCAGCGCGAAAATTTGTGGCGGCGTGGACCCTGAAAGCGGCGGCGGTGACAGCGGCAGCGGCATGT
GTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCTCCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCTCCCCGT
GGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCACCACTCCCCAAACCTGCTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTC
CAGAAGGCCAGACAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATA
AAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCTAAATTCAGAGAGACCTC
TTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTAT
GAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCT
TTCTAGATCAAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACA
AAAATCCTCCCTTGAAGAACCGGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCAGAATT
CGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAATGCTTCCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGG
GTGGCGGCGGATCTATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTATGTGCTAGAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCTGG
AGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTC
TTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGAG
GCGAGGTTCTAAGCCATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGA
CCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGGTGG
CTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGT
GCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGA
GGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATTGAGGTGATGGTGGATGCCGTTACAAGCTCAAGTAT
GAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCAT
TAAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTGAGTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCT
GACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACGGACAAGACCTCAGCC

ACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGGCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC (SEQ ID NO:18)。

[0037] 本发明实施例所述提出的核酸编码的重组蛋白通过主动免疫,在病人体内刺激产生抗PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗PD-L1或PD-L2CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。本发明所提出的重组蛋白引起的对肿瘤细胞的主动免疫杀伤效果显著。

[0038] 在本发明的第四方面,本发明提出了一种构建体。根据本发明的实施例,所述构建体携带前面所述的核酸。本发明实施例所提出的构建体导入受体细胞,可实现前面所述的核酸的高效表达,进而在受体细胞中高效表达前面所述的重组蛋白。

[0039] 根据本发明的实施例,所述的构建体还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0040] 根据本发明的实施例,所述构建体的载体为pET系列载体、pPIC系列载体、BacPAK、pSV系列载体或pCMV系列载体。本发明实施例的上述载体可实现在原核细胞或真核细胞中进一步高效表达上述重组蛋白。

[0041] 在本发明的第五方面,本发明提出了一种构建体。根据本发明的实施例,所述构建体携带下列核酸分子:(1)编码免疫检查点分子片段的核酸分子,所述免疫检查点分子片段具有SEQ ID NO:19~21所示的氨基酸序列,所述编码免疫检查点分子片段的核酸分子具有SEQ ID NO:22~24所示的核苷酸序列;(2)编码辅助T细胞抗原决定基片段的核酸分子,所述辅助T细胞抗原决定基片段具有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,所述编码辅助T细胞抗原决定基片段的核酸分子具有SEQ ID NO:26所示的核苷酸序列;以及(3)编码免疫刺激分子片段的核酸分子,所述免疫刺激分子片段具有SEQ ID NO:27~29所示的氨基酸序列,所述编码免疫刺激分子片段的核酸分子具有SEQ ID NO:30~32所示的核苷酸序列。任选地,所述构建体的载体为pET系列载体、pPIC系列载体、BacPAK、pSV系列载体或pCMV系列载体。

[0042] MFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEEDLKVQHSSYRQRA RLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKNINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYP KAEVIWTSDDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEE (SEQ ID NO:19)。

[0043] MLFTVTVPKELYIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKAS FHIPQVQVRDEGQYQCI I IYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVS (SEQ ID NO:20)。

[0044] MFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEEDLKVQHSSYRQRA RLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKNINQRILVVDVPTSEHELTCQAELFT VTVPKELYIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKASFHIPQVQVRDEG QYQCI I IYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVS (SEQ ID NO:21)。

[0045] atgtttactgtcacggttcccaaggacctatatgttgtagagtagtgtagcaatatgacaattgaatg caaattcccagtagaaaaacaattagacctggctgcactaattgtctattgggaaatggaggataagaacattatt caattttgtgcatggagaggaagacctgaaggttcagcatagtagctacagacagagggcccggtgttgaaggacc agctctccctgggaaatgctgcacttcagatcacagatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgctgcatgat cagctatggtggtgccgactacaagcgaattactgtgaaagtcaatgccccatacaaaaaatcaaccaaagaatt ttggttgtggatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggctgagggctacccaaggccgaagtcatt

ggacaagcagtgaccatcaagtcctgagtggttaagaccaccaccaccaattccaagagagaggagaagcttttcaa
tgtgaccagcacactgagaatcaacacaacaactaatgagatttttctactgcacttttaggagattagatcctgag
gaa (SEQ ID NO:22)。

[0046] atgttattcacagtgacagtccttaaggaactgtacataatagagcatggcagcaatgtgaccctgga
atgcaactttgacactggaagtcattgtgaaccttgagcaataacagccagtttgcaaaaggtggaaaatgataca
tccccacaccgtgaaagagccactttgctggaggagcagctgcccctaggggaaggcctcgttccacatacctcaag
tccaagtgaggacgaaggacagtaccaatgcataatcatctatggggtcgctgggactacaagtacctgactct
gaaagtcaaagcttctacaggaaaataaacactcacatcctaaaggttcagaaacagatgaggtagagctcacc
tgccaggctacaggttatcctctggcagaagtatcctggccaaacgtcagc (SEQ ID NO:23)。

[0047] atgtttactgtcacggtcccaaggacctatatgtggtagagtatggtagcaatatgacaattgaatg
caaattcccagtagaaaaacaattagacctggctgcactaattgtctattgggaaatggaggataagaacattatt
caatttgtgcatggagaggaagacctgaaggtcagcatagtagctacagacagagggcccggctgttgaaggacc
agctctccctgggaaatgtgcacttcagatcacagatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgctgcatgat
cagctatggtgggtgccgactacaagcaattactgtgaaagtcaatgccccatacaaaaaatcaaccaagaatt
ttggttggatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggctgagttattcacagtgacagtccttaagg
aactgtacataatagagcatggcagcaatgtgacctggaatgcaactttgacactggaagtcattgtgaaccttg
agcaataacagccagtttgcaaaaggtggaaaatgatacatccccacaccgtgaaagagccactttgctggaggag
cagctgcccctaggggaaggcctcgttccacatacctcaagtccaagtgaggacgaaggacagtaccaatgcataa
tcatctatggggtcgctgggactacaagtacctgactctgaaagtcagagcttctacaggaaaataaacactca
catcctaaaggttcagaaacagatgaggtagagctcaccctgccaggctacaggttatcctctggcagaagtatcc
tgccaaacgtcagc (SEQ ID NO:24)。

[0048] AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:25)。

[0049] Gcgaaatttgtggcggtggacctgaaagcgcgcg (SEQ ID NO:26)。

[0050] MWLQSLLLLGTVACSIAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDAAEMNETVEVISEMFDLQE
PTCLQTRLELYKQGLRGLTKLKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE
(SEQ ID NO:27)。

[0051] MKVSAARLAVILIATALCAPASAPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSKGKCSNPAVVFVTRK
NRQVCANPEKKWVREYINSLEMS (SEQ ID NO:28)。

[0052] MCPARSLLLVATLVLLDHLNLRNLVATPDPGMFCLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEE
IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAK
LLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASG
GGGSGGGSGGGSIWELKKDVYVVELDWYDPAGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGD
AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWTIISTDLTFSVKSSR
GSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPD
PPKNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD
RYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO:29)。

[0053] atgtggctgcagagcctgctgctcttgggactgtggcctgcagcatctctgcacccgcccgtcggc
cagccccagcacacagccctgggagcatgtgaatgccatccaggagggcccggctctcctgaacctgagtagagac
actgctgctgagatgaaacagtagaagtcattctcagaaatgtttgacctcaggagccgacctgcctacaga

cccgctggagctgtacaagcagggcctgcggggcagcctcaccaagctcaagggccccttgaccatgatggccag
ccactacaacagcactgccctccaacccccgaaacttctgtgcaaccagattatcaccttgaagtttcaa
gagaacctgaaggactttctgcttgcaccccccttgactgctgggagccagtcaggag (SEQ ID NO:30)。

[0054] atgaaggtctccgcgccacgcctcgtgtcatcctcattgctactgccctctgcgctcctgcatctgc
ctccccatattctcggacaccacacctgctgctttgcctacattgcccgccactgccctgcccacatcaag
gagtattttctacaccagtggaagtgtccaaccagcagtcgtctttgtcaccgaaagaaccgccaagtgtgtg
ccaaccagagaagaaatgggttcgggagtacatcaactctttggagatgagc (SEQ ID NO:31)。

[0055] atgtgtccagcgcgcagcctcctccttgggtaccctggctcctcctggaccacctcagttggccag
aaacctccccgtggccactccagaccaggaatgttccatgccttcaccactcccaaacctgctgagggccgtc
agcaacatgctccagaaggccagacaaactctagaatttacccttgacttctgaagagattgatcatgaagata
tcacaaaagataaaaccagcacagtgaggcctgtttaccattggaattaaccaagaatgagagttgcctaaatc
cagagagacctctttcataactaatgggagttgcctggcctccagaaagacctctttatgatggcctgtgcctt
agtagtattttatgaagacttgaagatgtaccaggtggagttcaagaccatgaatgcaaagcttctgatggatccta
agaggcagatctttctagatcaaacatgctggcagttattgatgagctgatgcaggccctgaatttcaacagtga
gactgtgccacaaaaatcctccttgaagaaccggatttttataaaactaaaatcaagctctgcatacttcttcat
gctttcagaattcgggcagtgactattgatagagtgatgagctatctgaatgcttccggtggcgggtggctcgggcg
gtggtgggtcgggtggcggcgatctatatgggaactgaagaaagatgtttatgtcgtagaattggattggtatcc
ggatgccccctggagaaatggtggtcctcacctgtgacacccctgaagaagatggtatcacctggacctggaccag
agcagtgaggtcttaggctctggcaaacctgacctccaagtcaaagagtttgagatgctggccagtcacct
gtcacaaaggaggcgaggttctaagccattcgctcctgctgcttcacaaaaaggaagatggaatttggtccactga
tattttaaaggaccagaaagaacccaaaaataagaccttcttaagatgcgaggccaagaattattctggacgttcc
acctgctggtggctgacgacaatcagtactgatttgacattcagtgctaaaagcagcagaggtcttctgaccccc
aaggggtgacgtgaggagctgctacactctctgcagagagagtcagaggggacaacaaggagatagagtactcagt
ggagtgccaggaggacagtgctgcccagctgctgaggagagcttgcctattgaggtcatggtggatgccgttcac
aagctcaagatgaaaactacaccagcagcttcttcatcaggacatcatcaaacctgaccaccaagaacttgc
agctgaagccattaaagaattctcggcaggtggaggtcagctgggagtagcctgacacctggagtactccacattc
ctacttctccctgacattctgcttccaggtccaggcaagagcaagagagaaaagaaagatagagtcttcacggac
aagacctcagccacggtcatctgccgcaaaaatgccagcattagcgtgcgggcccaggaccgctactatagctcat
cttgagcgaatgggcatctgtgccctgacgt (SEQ ID NO:32)。

[0056] 本发明实施例所述提出的构建体在受体细胞中高效表达含有免疫检查点分子片段、辅助T细胞抗原决定基片段和免疫刺激分子片段的重组蛋白,该重组蛋白通过主动免疫,在病人体内刺激产生抗PD-L1抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗PD-L1CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。

[0057] 在本发明的第六方面,本发明提出了一种转基因细胞。根据本发明的实施例,所述转基因细胞携带前面所述的构建体。本发明实施例所提出的转基因细胞可高表达前面所述的重组蛋白,所获得的重组蛋白通过主动免疫,在病人体内刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2的抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2的CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。

[0058] 根据本发明的实施例,所述转基因细胞还可以进一步包括如下附加技术特征至少

之一：

[0059] 根据本发明的实施例,所述转基因细胞为BL21, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, DH10B, XL1-Blue, Pichia pastors, Kluyveromyceslactis, Sf9, Sf21, High-Five T, CHO细胞系, HEK细胞系, HeLa细胞系或COS细胞系。根据本发明的实施例,上述的转基因细胞可高效表达前面所述的重组蛋白,进而通过蛋白纯化,获得的重组蛋白给予患者,可在患者体内通过主动免疫,在病人体内进一步有效刺激产生抗PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗PD-L1或PD-L2CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。

[0060] 根据本发明的实施例,所述转基因细胞为抗原呈递细胞。根据本发明的实施例,所述抗原呈递细胞来源于病人,进而携带前面所述构建体的抗原呈递细胞可进一步回输入病人体内,进而在病人体内实现前面所述重组蛋白的持续表达,进而可在患者体内通过主动免疫,在体内进一步有效刺激产生抗PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗PD-L1或PD-L2CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。

[0061] 根据本发明的实施例,所述转基因细胞为DC细胞。DC细胞具有抗原递呈功能,来源于病人自身的DC细胞携带前面所述的构建体,回输入病人体内,可实现前面所述重组蛋白在并病人体内的高效表达并将肿瘤抗原PD-L1或PD-L2高效呈递在DC细胞的表面,进而进一步有效刺激产生抗PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗PD-L1或PD-L2CTL,进而进一步有效地特异性杀伤肿瘤细胞。

[0062] 在本发明的第七方面,本发明提出了前面所述的重组蛋白在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗肿瘤。本发明实施例所提出的重组蛋白在肿瘤患者体内可引起显著的肿瘤特异性抗原免疫反应,有效刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2CTL,进而有效地特异性杀伤肿瘤细胞。进而发明人进一步经过实验验证发现,本发明实施例所提出的重组蛋白具有在制备有效用于预防或治疗肿瘤的药物中的用途。

[0063] 在本发明的第八方面,本发明提出了前面所述的重组蛋白在制备疫苗中的用途,所述疫苗用于预防或治疗肿瘤。本发明实施例所提出的重组蛋白在肿瘤患者体内可引起显著的肿瘤特异性抗原免疫反应,有效刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2CTL,进而有效地特异性杀伤肿瘤细胞。进而发明人进一步经过实验验证发现,本发明实施例所提出的重组蛋白具有在制备有效用于预防或治疗肿瘤的疫苗中的用途。

[0064] 在本发明的第九方面,本发明提出了前面所述的重组蛋白在制备疫苗中的用途,所述疫苗用于治疗病毒感染。根据本发明的实施例,发明人发现,HBV、HCV、HIV、EBV病毒感染的细胞表达PD-L1,本发明实施例所提出的重组蛋白所制备的疫苗可在病人体内刺激产生抗PD-L1抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1CTL,进而有效地特异性杀伤被上述病毒感染的细胞。

[0065] 在本发明的第十方面,本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例,所述药物组合物包括:前面所述的重组蛋白;以及药学上可接受的佐剂。本发明实施例所提出的药物组合物中的重组蛋白可引起显著的特异性抗原免疫反应,加之佐剂的增强免疫应答的功能。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的药物组合物在病人体内有效刺激产生

抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2CTL,进而有效地特异性杀伤肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞。

[0066] 在本发明的第十一方面,本发明提出了一种DC细胞。根据本发明的实施例,所述DC细胞负载前面所述的重组蛋白。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的DC细胞可将重组蛋白中的抗原(如前面所述的免疫检查点分子片段)、辅助T细胞抗原决定基片段以及免疫刺激分子片段分别呈递到细胞表面,进而有效刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2CTL,进而有效地特异性杀伤肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞。

[0067] 在本发明的第十二方面,本发明提出了一种靶向性免疫细胞群。根据本发明的实施例,所述靶向性免疫细胞群是通过前面所述的DC细胞与淋巴细胞进行共培养获得的。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的靶向性免疫细胞群可特异性杀伤肿瘤细胞,分泌特异性结合肿瘤抗原的抗体,实现对肿瘤细胞的特异性清除。

[0068] 在本发明的第十三方面,本发明提出了一种疫苗。根据本发明的实施例,所述疫苗包含前面所述的重组蛋白、前面所述的DC细胞或前面所述的靶向性免疫细胞群。如前所述,本发明实施例所提出的重组蛋白、DC细胞以及靶向性免疫细胞群在患者体内可引起显著的特异性抗原免疫反应。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的疫苗可有效刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2CTL,进而有效地特异性杀伤肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞。

[0069] 在本发明的第十四方面,本发明提出了一种抗体。根据本发明的实施例,所述抗体特异性识别前面所述的重组蛋白,进而本发明实施例所提出的抗体可特异性识别肿瘤抗原。根据本发明的实施例,发明发现,所述抗体可特异性识别抗原,与肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞特异性结合,进而使得肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞被吞噬细胞吞噬,实现对肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞的特异性清除。

[0070] 在本发明的第十五方面,本发明提出了一种制备抗体的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括:利用前面所述的重组蛋白对动物进行免疫接种;采集经过免疫接种的动物的血清;以及从所述血清中纯化出目的抗体。本发明实施例所提出的制备抗体的方法,操作简便,抗体可特异性识别所述重组蛋白。

[0071] 在本发明的第十六方面,本发明提出了一种治疗组合物。根据本发明的实施例,所述治疗组合物包括:前面所述的重组蛋白、前面所述的核酸、前面所述的构建体、前面所述的转基因细胞、前面所述的药物组合物、前面所述的DC细胞、前面所述的靶向性免疫细胞群、前面所述的疫苗或者前面所述的抗体。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的治疗组合物可直接或间接引起特异性抗原免疫反应,实现对肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞的特异性杀伤和清除。

[0072] 在本发明的第十七方面,本发明提出了一种在患者体内刺激抗PD-L1抗体生成或细胞毒性T淋巴细胞反应的方法。根据本发明的实施例,所述方法是通过下列方式的至少之

一实现的:1)前面所述的重组蛋白与取自患者的DC细胞共培养,将负载了前面所述的重组蛋白的DC细胞回输到患者体内;2)给患者给予前面所述的药物组合物;3)将前面所述的构建体导入取自患者的DC细胞,将导入所述构建体的DC细胞回输到患者体内;以及4)给患者给予前面所述的构建体。本发明实施例所提出的方式可在患者体内显著刺激抗PD-L1抗体生成或细胞毒性T淋巴细胞反应。

附图说明

[0073] 图1是根据本发明实施例的融合蛋白结构示意图;

[0074] 图2是根据本发明实施例的负载了融合蛋白(PD-L1 Δ -PADRE Th-GM-CSF)的DC疫苗能够显著诱导抗-PD-L1抗体反应;

[0075] 图3是根据本发明实施例的负载了融合蛋白(PD-L1 Δ -PADRE Th-GM-CSF)的DC疫苗能够显著诱导抗-PD-L1CTL反应;以及

[0076] 图4是根据本发明实施例的负载了融合蛋白(PD-L1 Δ -PADRE Th-GM-CSF)的DC疫苗能够显著控制PD-L1+肺癌的生长。

具体实施方式

[0077] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例在附图中示出,其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0078] 需要说明的是,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地,在本发明的描述中,除非另有说明,“多个”的含义是两个或两个以上。

[0079] 重组蛋白及其用途

[0080] 一方面,本发明提出了一种重组蛋白。根据本发明的实施例,该重组蛋白包括:免疫检查点分子片段;辅助T细胞抗原决定基片段;以及免疫刺激分子片段。本发明实施例所提出的重组蛋白在患者体内刺激产生抗免疫检查点抗体,调动体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点的CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。本发明实施例所提出的重组蛋白引起的对肿瘤细胞的主动免疫杀伤效果显著。

[0081] 具体地,根据本发明的实施例,免疫检查点分子可选自但不限于PD-L1和PD-L2的至少之一。PD-L1或PD-L2在肿瘤细胞中特异性表达,进而本发明实施例所提出的重组蛋白可引起的肿瘤抗原免疫反应的特异性更强。

[0082] 更具体地,根据本发明的实施例,免疫检查点分子片段为所述PD-L1或PD-L2的去除跨膜区的细胞外分子片段(PD-L1 Δ /PD-L2 Δ)。PD-L1或PD-L2的去除跨膜区的细胞外分子片段仅具有肿瘤抗原性,不具有肿瘤免疫抑制功能,进而PD-L1或PD-L2的去除跨膜区的细胞外分子片段被抗原呈递细胞如DC细胞呈递在细胞的表面,可有效地引起肿瘤抗原免疫反应,且特异性进一步提高。

[0083] 另外,根据本发明的实施例,辅助T细胞抗原决定基可为广谱PADRE辅助T细胞抗原决定基(PADRETh)。广谱PADRE辅助T细胞抗原决定基是一种与广谱人类白细胞抗原DR(HLA-

DR)结合的抗原决定基肽段,这种肽段以高亲和力或中间亲和力与16种最普遍的HLA-DR类型中的15种相结合。由于它有普遍的结合力,进而PADRE需要克服HLA-DR分子在人群中的多样性带来的问题。PADRE作为辅助T细胞抗原决定基与抗原结合,结合后高效、长时间激活Ag-特异性抗原反应。PADRE肽段被特别加工成在人体中可以免疫性激活辅助T淋巴细胞1(Th1)以协助杀伤性免疫T细胞的激活以及激活辅助T淋巴细胞2(Th2)以协助B淋巴细胞分泌抗体,进而进一步增强重组蛋白所引起的抗原免疫反应。

[0084] 根据本发明的具体实施例,免疫刺激分子可选自粒细胞集落刺激生物因子(GM-CSF)、白细胞介素-12(IL-12)或趋化因子(RANTES)。上述免疫刺激分子具有生物活性。

[0085] 其中,GM-CSF在动物模型和临床试验中用来增强免疫反应。在免疫治疗中,GM-CSF也被广泛的用作佐剂以增强免疫反应。在多种啮齿类动物肿瘤模型中,均被免疫接种经辐射造成的肿瘤细胞,这种肿瘤细胞分泌GM-CSF,以此来刺激强有力的、特异性的和长时间的抗肿瘤免疫反应。这种免疫接种在晚期黑色素瘤的转移性病变中会诱导CD4+和CD8+T淋巴细胞和浆细胞的渗入,进而引起大量肿瘤细胞的坏死。除了黑色素瘤,使用GM-CSF-分泌肿瘤细胞的临床试验已经被报道用在非小细胞肺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌的治疗中。GM-CSF-分泌肿瘤细胞的免疫增强作用与GM-CSF能够征集DC细胞并使DC细胞成熟和活化,进而激活免疫杀伤T淋巴细胞和B淋巴细胞的作用相关。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的重组蛋白中的GM-CSF可显著增强树突状细胞(DC细胞)的抗原呈递功能和增强细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和B淋巴细胞的活性,进而本发明实施例的重组蛋白可更为有效地引起肿瘤抗原免疫反应。

[0086] 趋化因子在免疫反应、造血过程和常规免疫监视中控制着特定白细胞种群的迁移。RANTES(regulated upon activation normal T-cell expressed,CCL5)是一种免疫趋化因子。它与表达在T淋巴细胞、单核细胞、成熟免疫杀伤细胞和DC细胞上的CCR1和CCR5有亲和力。趋化因子,如RANTES在不同的疫苗中,通过大量征集相关免疫细胞,以此来进行肿瘤细胞识别、免疫致敏和杀伤肿瘤细胞。

[0087] IL-12是一种多效细胞因子,IL-12激活能够引起自身免疫的和适应性免疫的相互关联。基于它的反应,IL-12被认为是“细胞毒性淋巴细胞成熟因子”和“自然杀伤细胞刺激因子”。由于IL-12可建立起自身免疫和适应性免疫的相互关联,进而它能够强有力地刺激IFN- γ —a的生成,进而协调人体自身的抗癌机制。IL-12已经在人体中被用于肿瘤的免疫治疗。IL-12在多种免疫细胞中发挥作用,包括T淋巴细胞和B淋巴细胞。IL-12在促进Th1细胞的抗肿瘤免疫反应中发挥着关键作用。

[0088] 辅助T细胞抗原决定基片段以及免疫刺激分子片段的连接顺序如下所述:辅助T细胞抗原决定基片段N端与免疫检查点分子片段的C端相连,辅助T细胞抗原决定基片段C端与所述免疫刺激分子片段的N端相连。本发明实施例的重组蛋白中的相关分子片段在上述连接状态下,重组蛋白中相应分子片段可分别呈递在DC细胞的表面。DC细胞,主要的抗原呈递细胞(APCs),通过产生前免疫细胞因子和呈递抗原给T淋巴细胞来调节自身和适应性免疫反应以此来抵抗病毒感染。本发明实施例所提出的重组蛋白允许DC细胞呈递细胞内抗原到细胞表面上,其中通过内吞途径呈递到MHC class II,通过交叉启动途径呈递到MHC class I,进而导致产生抗原特异性Th细胞和CTL细胞反应。本发明实施例所提出的重组蛋白呈递在DC细胞的表面引起强有力的抗体反应。一直以来认为,DC细胞激活体液反应,是通过CD4+

Th细胞引发T淋巴细胞和B淋巴细胞的相互作用而实现的。然而,现有的体外和体内实验证实,DC细胞激活体液反应是一种直接的作用方式。特别地,DC细胞被证实可强有力地促进细胞分化和CD40-激活的B淋巴细胞的抗体的产生。接种负载有抗原的DC细胞能够诱导保护性体液免疫反应。本发明实施例的重组蛋白可更为有效地引起肿瘤抗原免疫反应。

[0089] 根据本发明的实施例,上述重组蛋白具有SEQ ID NO:1~9所示的氨基酸序列。其中SEQ ID NO:1是人类PD-L1 Δ -PADRETh-人类GM-CSF重组蛋白的氨基酸序列,SEQ ID NO:2是人类PD-L1 Δ -PADRETh-人类RANTES重组蛋白的氨基酸序列,SEQ ID NO:3是人类PD-L1 Δ -PADRETh-IL-12重组蛋白的氨基酸序列,SEQ ID NO:4是人类PD-L2 Δ -PADRETh-人类GM-CSF重组蛋白的氨基酸序列,SEQ ID NO:5是人类PD-L2 Δ -PADRETh-人类RANTES重组蛋白的氨基酸序列,SEQ ID NO:6是人类PD-L2 Δ -PADRETh-人类IL-12重组蛋白的氨基酸序列,SEQ ID NO:7是人类PD-L1-PD-L2 Δ -PADRETh-人类GM-CSF重组蛋白的氨基酸序列,SEQ ID NO:8是人类PD-L1-PD-L2 Δ -PADRETh-人类RANTES重组蛋白的氨基酸序列,SEQ ID NO:9是人类PD-L1-PD-L2 Δ -PADRETh-人类IL-12重组蛋白的氨基酸序列。本发明实施例所述提出的重组蛋白可引起肿瘤特异性抗原免疫反应,可引起细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的特异性杀伤和B细胞分泌特异性抗体,实现对肿瘤细胞的特异性杀伤。

[0090] 同时,本发明提出了一种编码前面所述的重组蛋白的核酸,根据本发明的实施例,编码前面所述的重组蛋白的核酸具有SEQ ID NO:10~18所示的核苷酸序列。其中SEQ ID NO:10是编码人类PD-L1 Δ -PADRETh-人类GM-CSF重组蛋白的核酸的核苷酸序列,SEQ ID NO:11是编码人类PD-L1 Δ -PADRETh-人类RANTES重组蛋白的核酸的核苷酸序列,SEQ ID NO:12是编码人类PD-L1 Δ -PADRETh-IL-12重组蛋白的核酸的核苷酸序列,SEQ ID NO:13是编码人类PD-L2 Δ -PADRETh-人类GM-CSF重组蛋白的核酸的核苷酸序列,SEQ ID NO:14是编码人类PD-L2 Δ -PADRETh-人类RANTES重组蛋白的核酸的核苷酸序列,SEQ ID NO:15是编码人类PD-L2 Δ -PADRETh-人类IL-12重组蛋白的核酸的核苷酸序列,SEQ ID NO:16是编码人类PD-L1-PD-L2 Δ -PADRETh-人类GM-CSF重组蛋白的核酸的核苷酸序列,SEQ ID NO:17是编码人类PD-L1-PD-L2 Δ -PADRETh-人类RANTES重组蛋白的核酸的核苷酸序列,SEQ ID NO:18是编码人类PD-L1-PD-L2 Δ -PADRETh-人类IL-12重组蛋白的核酸的核苷酸序列。本发明实施例所述提出的核酸编码的重组蛋白可引起肿瘤特异性抗原免疫反应,引起细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的特异性杀伤和B细胞分泌特异性抗体,实现对肿瘤细胞的特异性杀伤。

[0091] 同时,本发明提出了一种携带前面所述的核酸的构建体。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的构建体导入受体细胞,可实现前面所述的核酸的高效表达,进而在受体细胞中高效表达前面所述的重组蛋白。根据本发明的具体实施例,该构建体的载体为pET系列载体、pGEX系列载体、pPIC系列载体、BacPAK、pSV系列载体或pCMV系列载体,其中,pET系列载体在E.coli中在T7启动子下调控表达重组蛋白,pGEX系列载体用于在E.coli中在tac启动子下调控表达重组蛋白,pPIC系列载体用于在酵母菌中在AOX1启动子下调控表达重组蛋白,BacPAK载体用于在杆状病毒中在pPolh启动子的调控下表达重组蛋白,pSV系列载体或pCMV系列载体用于在哺乳动物细胞中在CMV、SV40和(EF)-1启动子的调控下表达重组蛋白。本发明实施例的上述载体可实现在原核细胞或真核细胞中进一步高效表达上述重组蛋白。

[0092] 具体地,根据本发明的实施例,上述构建体携带下列核酸分子:(1) 编码免疫检查点分子片段的核酸分子,该免疫检查点分子片段具有SEQ ID NO:19~21所示的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:19是人类PD-L1 Δ 的氨基酸序列,SEQ ID NO:20是人类PD-L2 Δ 的氨基酸序列,SEQ ID NO:21是人类PD-L1-PD-L2 Δ 的氨基酸序列,所述编码免疫检查点分子片段的核酸分子具有SEQ ID NO:22~24所示的核苷酸序列,其中SEQ ID NO:22是编码人类PD-L1 Δ 的核酸分子的核苷酸序列,SEQ ID NO:23是编码人类PD-L2 Δ 的核酸分子的核苷酸序列,SEQ ID NO:24是编码人类PD-L1-PD-L2 Δ 的核酸分子的核苷酸序列;(2) 编码辅助T细胞抗原决定基片段的核酸分子,辅助T细胞抗原决定基片段具有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,编码辅助T细胞抗原决定基片段的核酸分子具有SEQ ID NO:26所示的核苷酸序列;以及(3) 编码免疫刺激分子片段的核酸分子,免疫刺激分子片段具有SEQ ID NO:27~29所示的氨基酸序列,其中,SEQ ID NO:27是人类GM-CSF片段的氨基酸序列,SEQ ID NO:28是人类RANTES片段的氨基酸序列,SEQ ID NO:29是人类IL-12片段的氨基酸序列,所述编码免疫刺激分子片段的核酸分子具有SEQ ID NO:30~32所示的核苷酸序列,其中,SEQ ID NO:30是编码人类GM-CSF片段的核酸分子的核苷酸序列,SEQ ID NO:31是编码人类RANTES片段的核酸分子的核苷酸序列,SEQ ID NO:32是编码人类IL-12片段的核酸分子的核苷酸序列。

[0093] 任选地,所述构建体的载体为原核或真核细胞蛋白表达载体。本发明实施例所述提出的构建体在受体细胞中高效表达含有免疫检查点分子片段、辅助T细胞抗原决定基片段和免疫刺激分子片段的重组蛋白,该重组蛋白在肿瘤患者体内可显著引起肿瘤特异性抗原免疫反应,进而引起细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的特异性杀伤和B淋巴细胞分泌特异性抗体,实现对肿瘤细胞的特异性杀伤。

[0094] 另外,本发明还提出了一种转基因细胞。根据本发明的实施例,所述转基因细胞携带前面所述的构建体,进而本发明实施例所提出的转基因细胞可高表达前面所述的重组蛋白通过主动免疫,在病人体内刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2的抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2的CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。

[0095] 根据本发明的具体实施例,所述转基因细胞为BL21,BL21 (DE3),BL21 (DE3) pLysS,DH10B,XL1-Blue,Pichia pastors,Kluyveromyces lactis,Sf9,Sf21,High-Five T,CHO细胞系,HEK细胞系,HeLa细胞系或COS细胞系。其中,BL21,BL21 (DE3),BL21 (DE3) pLysS,DH10B和XL1-Blue是E.coli细胞,Pichiapastors和Kluyveromyces lactis是酵母细胞,Sf9,Sf21,和High-Five T用于杆状病毒的表达,CHO细胞系,HEK细胞系,HeLa细胞系或COS细胞系是哺乳动物细胞系。根据本发明的实施例,上述的转基因细胞可高效表达前面所述的重组蛋白,进而通过蛋白纯化,获得的重组蛋白给予患者,可在患者体内通过主动免疫,在病人体内进一步有效刺激产生抗PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗PD-L1或PD-L2CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。

[0096] 根据本发明的具体实施例,所述转基因细胞可为抗原呈递细胞,所述转基因细胞为DC细胞。根据本发明的实施例,所述抗原呈递细胞来源于病人,进而携带前面所述构建体的抗原呈递细胞可进一步回输入病人体内,进而在病人体内实现前面所述重组蛋白的持续表达,进而可在患者体内通过主动免疫,在体内进一步有效刺激产生抗PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗PD-L1或PD-

L2CTL,进而特异性杀伤肿瘤细胞。

[0097] 另一方面,在应用方面,发明人提出了前面所述的重组蛋白在制备药物、疫苗中的用途,所述药物或疫苗用于预防或治疗肿瘤。本发明实施例所提出的重组蛋白在肿瘤患者体内可引起显著的肿瘤特异性抗原免疫反应,有效刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2CTL,进而有效地特异性杀伤肿瘤细胞。进而发明人进一步经过实验验证发现,本发明实施例所提出的重组蛋白具有在制备有效用于预防或治疗肿瘤的药物或疫苗中的用途。

[0098] 另外,本发明还提出了前面所述的重组蛋白在制备疫苗中的用途,所述疫苗用于治疗病毒感染。根据本发明的实施例,发明人发现,HBV、HCV、HIV、EBV病毒感染的细胞表达PD-L1,本发明实施例所提出的重组蛋白所制备的疫苗可在病人体内刺激产生抗PD-L1抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1CTL,进而有效地特异性杀伤被上述病毒感染的细胞。

[0099] 治疗组合物

[0100] 一方面,本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例,所述药物组合物包括:前面所述的重组蛋白;以及药学上可接受的佐剂。本发明实施例所提出的药物组合物中的重组蛋白可引起显著的特异性抗原免疫反应,加之佐剂的增强免疫应答的功能。根据本发明的实施例,根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的药物组合物在肿瘤病人体内有效刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2CTL,进而有效地特异性杀伤肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞。

[0101] 另一方面,本发明提出了一种DC细胞。根据本发明的实施例,所述DC细胞负载前面所述的重组蛋白。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的DC细胞可将重组蛋白中的肿瘤抗原(如前面所述的免疫检查点分子片段)、辅助T细胞抗原决定基片段以及免疫刺激分子片段分别呈递到细胞表面,进而有效刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2CTL,进而有效地特异性杀伤肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞。。

[0102] 再一方面,本发明提出了一种靶向性免疫细胞群。根据本发明的实施例,所述靶向性免疫细胞群是通过前面所述的DC细胞与淋巴细胞进行共培养获得的。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的靶向性免疫细胞群可特异性杀伤肿瘤细胞,分泌特异性结合肿瘤抗原的抗体,实现对肿瘤细胞的特异性清除。

[0103] 再一方面,本发明提出了一种疫苗。根据本发明的实施例,所述疫苗包含前面所述的重组蛋白、前面所述的DC细胞或前面所述的靶向性免疫细胞群。如前所述,本发明实施例所提出的重组蛋白、DC细胞以及靶向性免疫细胞群在患者体内可引起显著的特异性抗原免疫反应。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的疫苗可有效刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2抗体,调动病人体内已经存在的自发诱导产生的免疫细胞CTL,并且刺激产生抗免疫检查点,如PD-L1或PD-L2CTL,进而有效地特异性杀伤肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞。

[0104] 再一方面,本发明提出了一种抗体。根据本发明的实施例,所述抗体特异性识别前面所述的重组蛋白,进而本发明实施例所提出的抗体可特异性识别肿瘤抗原。根据本发明的实施例,发明发现,所述抗体可特异性识别抗原,与肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞特异性结合,进而使得肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞被吞噬细胞吞噬,实现对肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞的特异性清除。同时,本发明提出了一种制备抗体的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括:利用前面所述的重组蛋白对动物进行免疫接种;采集经过免疫接种的动物的血清;以及从所述血清中纯化出目的抗体。本发明实施例所提出的制备抗体的方法,操作简便,抗体可特异性识别所述重组蛋白。

[0105] 根据本发明的实施例,本发明提出的治疗组合物可包括前面所述的重组蛋白、前面所述的核酸、前面所述的构建体、前面所述的转基因细胞、前面所述的药物组合物、前面所述的DC细胞、前面所述的靶向性免疫细胞群、前面所述的疫苗或者前面所述的抗体的任意一种。根据本发明的实施例,本发明实施例所提出的治疗组合物可直接或间接引起特异性抗原免疫反应,实现对肿瘤细胞或被病毒(HBV、HCV、HIV、EBV)感染的细胞的特异性杀伤和清除。

[0106] 相应地,对患者给予治疗有效量的前面所述的重组蛋白、前面所述的药物组合物、前面所述的DC细胞、前面所述的靶向性免疫细胞群、前面所述的疫苗或者前面所述的抗体均可有效治疗或预防表达PD-L1或PD-L2的肿瘤。

[0107] 在本文中所使用的术语“给予”指将预定量的物质通过某种适合的方式引入病人。本发明实施例中的重组蛋白、药物组合物、DC细胞、靶向性免疫细胞群、疫苗或抗体可以通过任何常见的途径给药,只要它可以到达预期的组织。给药的各种方式是可以预期的,包括腹膜,静脉,肌肉,皮下,皮层,口服,局部,鼻腔,肺部和直肠,但是本发明不限于这些已举例的给药方式。然而,由于口服给药时,口服给药的组合物的活性成分应该被包被或被配制以防止其在胃部被降解。优选地,本发明的组合物可以注射制剂被给药。此外,本发明的药物组合物可以使用将活性成分传送到靶细胞的特定器械来给药。

[0108] 本发明实施例中的重组蛋白、药物组合物、DC细胞、靶向性免疫细胞群、疫苗或抗体的给药频率和剂量可以通过多个相关因素被确定,该因素包括要被治疗的疾病类型,给药途径,病人年龄,性别,体重和疾病的严重程度以及作为活性成分的药物类型。根据本发明的一些实施例,日剂量可分为适宜形式的1剂、2剂或多剂,以在整个时间段内以1次、2次或多次给药,只要达到治疗有效量即可。

[0109] 术语“治疗有效量”是指足以显著改善某些与疾病或病症相关的症状的量,也即为给定病症和给药方案提供治疗效果的量。术语“治疗”用于指获得期望的药理学和/或生理学效果。本文使用的“治疗”涵盖将本发明实施例中的重组蛋白、药物组合物、DC细胞、靶向性免疫细胞群、疫苗或抗体给予个体以治疗,包括但不限于将含本文所述的给予有需要的个体。

[0110] 需要说明的是,根据本发明实施例的重组蛋白及其用途、药物组合物、DC细胞、靶向性免疫细胞群、疫苗、抗体、治疗和诊断癌症的方法和系统是本申请的发明人经过艰苦的创造性劳动和优化工作才发现和完成的。

[0111] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的

实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0112] 实施例1

[0113] 在以下实施例中,所用的材料和方法如下所述:

[0114] 制备树突状(DC)细胞

[0115] 从鼠骨髓分离DC细胞的方法如下所述:从小鼠的四肢中冲出骨髓,并将骨髓过尼龙网,并用氯化铵去除红细胞。然后用RPMI-1640培养基充分润洗细胞,之后培养在2.5ml RPMI-1640培养基中,培养基中含有10%FBS,20ng/ml重组小鼠GM-CSF (rmGM-CSF) 和20ng/ml重组小鼠IL-4 (rmIL-4) (购自PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ)。在培养过程的第2天和第4天,去除细胞上清并更换新鲜培养基,新鲜培养基中含有20ng/ml的rmGM-CSF和20ng/ml的rmIL-4。细胞培养在37°C、5%CO₂的培养箱中。在培养过程的第48小时,去除非粘连粒细胞并更换新鲜培养基。细胞培养7天后,通过FACS分析,约80%以上的细胞表达DC细胞特有标记物。

[0116] DC细胞免疫和肿瘤模型

[0117] 向骨髓来源的DC细胞(骨髓细胞培养5-7天后获得)中加入重组蛋白,用来激活DC细胞,8小时后用PBS润洗细胞3次,并继续培养136小时后,将DC细胞用作免疫模型。在一些实验中,抗原激活的DC细胞用100ng/ml LPS (Sigma, St. Louis, MO) 刺激24小时后PBS润洗细胞并将DC细胞通过小鼠的脚掌注入小鼠(C57BL/6, Jackson Laboratory)体内。在肿瘤模型中,啮齿类动物肺癌细胞CMT167 (C57BL) (购自European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECAC))通过皮下注射被导入同系C57BL/6小鼠的右侧腹腔。肿瘤接种后,小鼠被随机分组并且在不同天数,不同的组分别注射抗原激活的DC细胞或PBS。利用测径器每周2或3次测量肿瘤体积。

[0118] 免疫杀伤细胞(CTL)分析

[0119] CD8+CTL反应是通过标准铬释放实验评估的。标准铬释放评估实验是通过测量体外再激活脾细胞溶解靶细胞的能力实现的。取自免疫小鼠的脾细胞体外用包含多肽的RPMI再刺激4~6天。靶细胞和对照组细胞用⁵¹Cr铬酸钠盐溶液标记90min。不同数目的效应细胞与一定数目(1X10⁴/孔)的靶细胞在37°C下在96-孔板v-底板(每孔加有200微升培养基)中共培养3小时。从每3个孔中收集100微升上清。溶解率通过以下公式计算:(实验铬释放量-自发铬释放量)/(最大铬释放量-自发铬释放量)X100。其中,铬释放量是通过如下操作实现的:共培养后,将孔板放到离心机上离心,通过γ计数器(购自Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA)计算上清液中的辐射活性(铬释放量)。

[0120] 实施例2构建融合蛋白表达载体

[0121] 合成融合基因一:包含部分人PD-L1序列或PD-L2序列(Accession number GenBank:AF177937.1),完整的PADRE辅助T细胞抗原决定基序列和完整的GM-CSF、IL-12或RANTES序列(Accession number GenBank:M11734.1)以及侧翼克隆位点序列(融合基因一结构如图1所示)(由GENEWIZ, South Plainfield, NJ, USA合成)。合成融合基因二:包含部分人PD-L1序列或PD-L2序列(GenBank:AF177937.1)和完整的辅助T细胞PADRE抗原决定基序

列。这些合成基因被NdeI和XhoI(购自Boehringer Mannheim)限制性内切酶消化后克隆到pET21a(+)表达载体上(购自Novagen),通过酶切和测序鉴定,连接正确且无突变的目标重组质粒。

[0122] 实施例3制备和纯化包含人PD-L1的融合蛋白

[0123] 为了制备和纯化重组蛋白,目标重组质粒电转入Escherichia coli BL21(DE3)(Novagen)感受态细胞,之后Escherichia coli BL21(DE3)接种在LB琼脂培养板(包含50微克/ml的氨苄西林)上进行扩增培养。以下所描述的重组蛋白表达的方法是一系列在不同实验条件下的实验中的一个。

[0124] 为了表达重组蛋白,包含氨苄西林的4YT培养基(包含32g Bacto胰蛋白胨,20g酵母提取物和5g NaCl/L,pH 7.2)与一个克隆共同孵育,孵育条件是:在180rpm和37°C下震荡培养24h。之后加入IPTG(购自Sigma)至终浓度为1mM,再继续培养4~5小时以便表达重组蛋白。最后在4°C,15,900×g的条件下离心收集细胞。

[0125] 为了从包涵体中纯化重组蛋白,冰冻的细胞小块用裂解液(50mMTris,pH 8.0,1mMEDTA和1mM PMSF)重悬,细胞小块与裂解液的质量体积比是1:10。包含重组蛋白的包涵体在French压力(Constant Systems LTD)137.9MPa的条件下恢复活性。在离心之前,加入等体积的裂解液稀释以减少粘滞度,从而更有利于获得包涵体。裂解后的溶液在48,000×g的条件下离心30min,以致使包涵体沉淀。弃上清,然后对沉淀清洗三次以去除宿主细胞中的内毒素、蛋白和DNA。第一遍清洗所用溶液包含50mMTris,pH 8.0,5mMEDTA和2%TritonX-100。第二遍清洗所用溶液包含50mMTris,pH 8.0,5mMEDTA,1%脱氧胆酸钠。第三遍清洗所用溶液包含50mMTris,pH 8.0,5mMEDTA,and 1M NaCl。清洗之后,沉淀用专门的裂解液在室温下重悬(质量体积比为1:40),搅拌30min并在离心条件下重沉淀。包涵体中重组蛋白的溶解和变性需要利用一种溶解剂(8M尿素)。室温下,沉淀溶解后,蛋白的浓度为2mg/ml,并继续搅拌30min。加入醋酸调pH到8.0。通过两步透析法(MWCO 6,000-8,000Da)在12-16小时内浓缩190mL的溶解蛋白。第一步透析在50mMTrisHCl pH 8.0的溶液中进行,第二步透析在pH 4.5的25mM醋酸钠溶液中进行。溶解的蛋白进一步通过Ni-NTA Fast Start Kit(Qiagen)进行纯化。洗脱出的蛋白通过12%SDS-PAGE凝胶电泳分析,并且蛋白浓度通过Bradford et al.(Bio-Rad Laboratories)测定。纯度大于90%的重组蛋白保存到-20°C,以备后续研究。

[0126] 实施例4负载了包含人PD-L1的融合蛋白的DC细胞在小鼠体内可有效诱导抗PD-L1抗体的产生和CTL反应

[0127] 在本实施例中,一系列的实验是为了验证负载了PD-L1融合蛋白的DC细胞是否能够在小鼠中诱导抗PD-L1抗体的产生和CTL反应。负载了PD-L1融合蛋白的DC细胞在小鼠体内能够引起PD-L1-特异性反应的能力是通过利用DC细胞免疫小鼠验证的。

[0128] 将雌性B6小鼠(the Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME,USA)(n=4)用骨髓来源的DC细胞进行免疫,此DC细胞分别负载了重组蛋白(PD-L1 Δ -PADRETh-GM-CSF)(iPD-L1-Vax),蛋白(PD-L1 Δ),免疫刺激因子(重组GM-CSF,Genzyme,Tarzana,CA)或PBS。每只小鼠接种1×10⁶个DC细胞,通过每周间隔两次的脚板注射50 μ g/ml的细胞溶液实现。两周后,每组鼠取脾和血清。每组鼠血清中的PD-L1-特异性IgG的水平通过ELISA测定,ELISA板每3个孔中铺有重组PD-L1蛋白(Abcam,Cambridge,MA,USA),ELISA数值是通过血清(1:100倍稀

释)的OD450nm值的平均值±SD获得的。

[0129] 结果如图2所示,图2显示了负载了iPD-L1-Vax DC细胞能够诱导显著的抗-PD-L1抗体反应,然而负载了PD-L1 Δ 蛋白DC细胞只能诱导微弱的抗-PD-L1抗体反应。

[0130] 为了评估CTL反应,从接种免疫小鼠的肿瘤细胞悬液中分离脾细胞。分离出的T细胞利用PD-L1重组蛋白激活的DC细胞(10微克/ml)再刺激,进而进行体外⁵¹Cr释放试验,⁵¹Cr释放试验按照指定的T/E(靶细胞:效应细胞)比进行。靶细胞是PD-L1+鼠肺癌细胞系CMT167(C57BL)(购自European Collection of Authenticated Cell Cultures(ECACC))。

[0131] 结果如图3所示,图3显示了负载了iPD-L1-Vax DC细胞能够诱导显著的抗-PD-L1CTL反应,然而负载了PD-L1 Δ 蛋白的DC细胞仅诱导微弱的抗-PD-L1CTL反应。

[0132] 实施例5在同系小鼠中,负载了包含人PD-L1的融合蛋白的DC免疫接种控制PD-L1+肺癌的生长

[0133] 为了评估验证负载了PD-L1融合蛋白的DC细胞诱导抗肿瘤免疫反应,C57BL/6小鼠(n=6只/组)皮下接种CMT167肿瘤细胞(1x10⁵),3d后,免疫接种1.5x10⁶骨髓来源的DC细胞,DC细胞分别负载了重组蛋白(PD-L1 Δ -PADRE Th-GM-CSF)(iPD-L1-Vax),蛋白PD-L1 Δ ,免疫刺激因子(GMCSF),或PBS,并且DC细胞预先体外利用LPS一周间隔两次刺激成熟。免疫接种后,每隔3~4天测量肿瘤生长。

[0134] 结果如图4所示,图4显示了利用负载了iPD-L1-Vax DC免疫接种小鼠后,能够显著抑制PD-L1+肺癌的生长,然而利用负载了蛋白PD-L1 Δ 或PBS的DC免疫接种小鼠,却不能抑制PD-L1+肺癌的生长。

[0135] 实施例6

[0136] 在本实施例中,发明人考察了负载了重组蛋白(PD-L1 Δ -PADRE Th-IL-12或PD-L1 Δ -PADRE Th-RANTES或PD-L2 Δ -PADRE Th-GM-CSF或PD-L2 Δ -PADRE Th-IL-12或PD-L1 Δ -PADRE Th-RANTES或PD-L1/L2 Δ -PADRE Th-GM-CSF或PD-L1/L2 Δ -PADRE Th-IL-12或PD-L1/L2 Δ -PADRE Th-RANTES)的DC细胞在小鼠体内诱导抗PD-L1或抗PD-L2抗体的产生和CTL反应的情况以及免疫接种控制PD-L1+或PD-L2+肺癌的生长的情况,实验方法如实施例4和实施例5所描述的,结果显示,负载了重组蛋白(PD-L1 Δ -PADRE Th-IL-12或PD-L1 Δ -PADRE Th-RANTES或PD-L2 Δ -PADRE Th-GM-CSF或PD-L2 Δ -PADRE Th-IL-12或PD-L1 Δ -PADRE Th-RANTES或PD-L1/L2 Δ -PADRE Th-GM-CSF或PD-L1/L2 Δ -PADRE Th-IL-12或PD-L1/L2 Δ -PADRE Th-RANTES)DC细胞能够诱导显著的抗PD-L1或抗PD-L2抗体反应和诱导显著的抗PD-L1或抗PD-L2CTL反应,利用负载了重组蛋白(PD-L1 Δ -PADRE Th-IL-12或PD-L1 Δ -PADRE Th-RANTES或PD-L2 Δ -PADRE Th-GM-CSF或PD-L2 Δ -PADRE Th-IL-12或PD-L1 Δ -PADRE Th-RANTES或PD-L1/L2 Δ -PADRE Th-GM-CSF或PD-L1/L2 Δ -PADRE Th-IL-12或PD-L1/L2 Δ -PADRE Th-RANTES)DC细胞免疫接种小鼠后,能够显著抑制PD-L1+或PD-L2+肺癌的生长。

[0137] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结

合和组合。

[0138] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

SEQUENCE LISTING

<110> LifeSeq Limited Corporation
 <120> PD-L1和PD-L2重组蛋白及其用途
 <130> PIDC1161471
 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 人类 PD-L1 Δ -PADRE Th-人类GM-CSF 重组蛋白的氨基酸序列
 <400> 1
 Met Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly
 1 5 10 15
 Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp
 20 25 30
 Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile
 35 40 45
 Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr
 50 55 60
 [0001] Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala
 65 70 75 80
 Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg
 85 90 95
 Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys
 100 105 110
 Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp
 115 120 125
 Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Ala Lys Phe
 130 135 140
 Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Ser Gly Ser Gly Met Trp
 145 150 155 160
 Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile Ser Ala
 165 170 175
 Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val Asn
 180 185 190
 Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr Ala
 195 200 205
 Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp Leu
 210 215 220

Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln Gly
 225 230 235 240

Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met Ala
 245 250 255

Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala
 260 265 270

Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe
 275 280 285

Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu Leu Glu
 290 295 300

His His His His His His
 305 310

<210> 2
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 人类 PD-L1 Δ - PADRE Th -人类 RANTES重组蛋白的氨基酸序列

<400> 2

Met Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly
 1 5 10 15

Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp
 20 25 30

Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile
 35 40 45

Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr
 50 55 60

Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala
 65 70 75 80

Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg
 85 90 95

Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys
 100 105 110

Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp
 115 120 125

Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Ala Lys Phe
 130 135 140

Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Ser Gly Ser Gly Met Lys
 145 150 155 160

[0002]

Val Ser Ala Ala Arg Leu Ala Val Ile Leu Ile Ala Thr Ala Leu Cys
 165 170 175
 Ala Pro Ala Ser Ala Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro Cys Cys
 180 185 190
 Phe Ala Tyr Ile Ala Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys Glu Tyr
 195 200 205
 Phe Tyr Thr Ser Gly Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe Val Thr
 210 215 220
 Arg Lys Asn Arg Gln Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp Val Arg
 225 230 235 240
 Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Glu Met Ser Leu Glu His His His His His
 245 250 255

His

<210> 3
 <211> 708
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 人类PD-L1Δ- PADRE Th -IL-12重组蛋白的氨基酸序列

<400> 3

[0003]

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

Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu
165 170 175

Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro
180 185 190

Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val
195 200 205

Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys
210 215 220

Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser
225 230 235 240

Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys
245 250 255

Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala
260 265 270

Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr
275 280 285

Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys
290 295 300

[0004] Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu
305 310 315 320

Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr
325 330 335

Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys
340 345 350

Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr
355 360 365

Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys
385 390 395 400

Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu
405 410 415

Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp
420 425 430

Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr
435 440 445

Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys
450 455 460

Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu
 465 470 475 480
 Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys
 485 490 495
 Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe
 500 505 510
 Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val
 515 520 525
 Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala
 530 535 540
 Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu
 545 550 555 560
 Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu
 565 570 575
 Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr
 580 585 590
 Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp
 595 600 605
 [0005] Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val
 610 615 620
 Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr
 625 630 635 640
 Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu
 645 650 655
 Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys
 660 665 670
 Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser
 675 680 685
 Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser Leu Glu His His
 690 695 700
 His His His His
 705
 <210> 4
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 人类PD-L2 Δ - PADRE Th -人类 GM-CSF重组蛋白的氨基酸序列
 <400> 4

Met Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His
1 5 10 15

Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val
20 25 30

Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr
35 40 45

Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu
50 55 60

Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly
65 70 75 80

Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr
85 90 95

Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile
100 105 110

Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr
115 120 125

Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Ala Lys Phe
130 135 140

[0006] Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Ser Gly Ser Gly
145 150 155 160

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
165 170 175

Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
180 185 190

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
195 200 205

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
210 215 220

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
225 230 235 240

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
245 250 255

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
260 265 270

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
275 280 285

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
290 295 300

Leu Glu His His His His His His
305 310

<210> 5
<211> 259
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 人类PD-L2 Δ- PADRE Th -人类 RANTES重组蛋白的氨基酸序列

<400> 5

Met Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His
1 5 10 15

Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val
20 25 30

Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr
35 40 45

Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu
50 55 60

Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly
65 70 75 80

Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr
85 90 95

[0007]

Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile
100 105 110

Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr
115 120 125

Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Ala Lys Phe
130 135 140

Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Ser Gly Ser Gly
145 150 155 160

Met Lys Val Ser Ala Ala Arg Leu Ala Val Ile Leu Ile Ala Thr Ala
165 170 175

Leu Cys Ala Pro Ala Ser Ala Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro
180 185 190

Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys
195 200 205

Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe
210 215 220

Val Thr Arg Lys Asn Arg Gln Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp
225 230 235 240

Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Glu Met Ser Leu Glu His His His
245 250 255

His His His

<210> 6

<211> 708

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 人类PD-L2 Δ -PADRE Th -人类IL-12重组蛋白的氨基酸序列

<400> 6

Met Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His
1 5 10 15Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val
20 25 30Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr
35 40 45Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu
50 55 60Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly
65 70 75 80Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr
85 90 95

[0008]

Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile
100 105 110Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr
115 120 125Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Ala Lys Phe
130 135 140Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Ser Gly Ser Gly
145 150 155 160Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu
165 170 175Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro
180 185 190Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val
195 200 205Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys
210 215 220Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser
225 230 235 240

Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys
 245 250 255
 Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala
 260 265 270
 Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr
 275 280 285
 Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys
 290 295 300
 Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu
 305 310 315 320
 Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr
 325 330 335
 Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys
 340 345 350
 Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr
 355 360 365
 Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Gly Gly Gly Ser
 370 375 380
 [0009] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys
 385 390 395 400
 Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu
 405 410 415
 Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp
 420 425 430
 Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr
 435 440 445
 Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys
 450 455 460
 Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu
 465 470 475 480
 Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys
 485 490 495
 Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe
 500 505 510
 Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val
 515 520 525
 Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala
 530 535 540

Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu
545 550 555 560

Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu
565 570 575

Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr
580 585 590

Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp
595 600 605

Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val
610 615 620

Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr
625 630 635 640

Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu
645 650 655

Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys
660 665 670

Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser
675 680 685

Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser Leu Glu His His
690 695 700

His His His His
705

<210> 7
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 人类PD-L1-PD-L2Δ - PADRE Th -人类GM-CSF重组蛋白的氨基酸序列

<400> 7

Met Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly
1 5 10 15

Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp
20 25 30

Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile
35 40 45

Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr
50 55 60

Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala
65 70 75 80

Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg
85 90 95

[0010]

Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys
 100 105 110

Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp
 115 120 125

Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Leu Phe Thr
 130 135 140

Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly Ser Asn Val
 145 150 155 160

Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn Leu Gly Ala
 165 170 175

Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser Pro His Arg
 180 185 190

Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys Ala Ser
 195 200 205

Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln Tyr Gln Cys
 210 215 220

Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu Thr Leu Lys
 225 230 235 240

[0011] Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu Lys Val Pro
 245 250 255

Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly Tyr Pro Leu
 260 265 270

Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp
 275 280 285

Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Ser Gly Ser Gly Met Trp Leu Gln
 290 295 300

Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile Ser Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val Asn Ala Ile
 325 330 335

Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu
 340 345 350

Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp Leu Gln Glu
 355 360 365

Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg
 370 375 380

Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met Ala Ser His
 385 390 395 400

Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln
 405 410 415

Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu
 420 425 430

Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu Leu Glu His His
 435 440 445

His His His His
 450

<210> 8
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 人类PD-L1-PD-L2 Δ - PADRE Th-人类 RANTES重组蛋白的氨基酸序列

<400> 8

Met Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly
 1 5 10 15

Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp
 20 25 30

Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile
 35 40 45

Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr
 50 55 60

Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala
 65 70 75 80

Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg
 85 90 95

Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys
 100 105 110

Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp
 115 120 125

Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Leu Phe Thr
 130 135 140

Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly Ser Asn Val
 145 150 155 160

Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn Leu Gly Ala
 165 170 175

Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser Pro His Arg
 180 185 190

[0012]

Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys Ala Ser
 195 200 205

Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln Tyr Gln Cys
 210 215 220

Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu Thr Leu Lys
 225 230 235 240

Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu Lys Val Pro
 245 250 255

Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly Tyr Pro Leu
 260 265 270

Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp
 275 280 285

Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Ser Gly Ser Gly Met Lys Val Ser
 290 295 300

Ala Ala Arg Leu Ala Val Ile Leu Ile Ala Thr Ala Leu Cys Ala Pro
 305 310 315 320

Ala Ser Ala Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro Cys Cys Phe Ala
 325 330 335

Tyr Ile Ala Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys Glu Tyr Phe Tyr
 340 345 350

Thr Ser Gly Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe Val Thr Arg Lys
 355 360 365

Asn Arg Gln Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp Val Arg Glu Tyr
 370 375 380

Ile Asn Ser Leu Glu Met Ser Leu Glu His His His His His His
 385 390 395

<210> 9
 <211> 848
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 人类PD-L1-PD-L2 Δ - PADRE Th-人类IL-12重组蛋白的氨基酸序列

<400> 9

Met Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly
 1 5 10 15

Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp
 20 25 30

Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile
 35 40 45

Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr
 50 55 60

[0013]

Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala
 65 70 75 80
 Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg
 85 90 95
 Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys
 100 105 110
 Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp
 115 120 125
 Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Leu Phe Thr
 130 135 140
 Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly Ser Asn Val
 145 150 155 160
 Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn Leu Gly Ala
 165 170 175
 Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser Pro His Arg
 180 185 190
 Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys Ala Ser
 195 200 205
 [0014] Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln Tyr Gln Cys
 210 215 220
 Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu Thr Leu Lys
 225 230 235 240
 Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu Lys Val Pro
 245 250 255
 Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly Tyr Pro Leu
 260 265 270
 Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp
 275 280 285
 Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Ser Gly Ser Gly Met Cys Pro Ala
 290 295 300
 Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu Asp His Leu Ser
 305 310 315 320
 Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro
 325 330 335
 Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu
 340 345 350
 Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu
 355 360 365

Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala
 370 375 380

Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg
 385 390 395 400

Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr
 405 410 415

Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys
 420 425 430

Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp
 435 440 445

Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp
 450 455 460

Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys
 465 470 475 480

Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys
 485 490 495

Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val
 500 505 510

[0015] Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 515 520 525

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
 530 535 540

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
 545 550 555 560

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
 565 570 575

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
 580 585 590

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
 595 600 605

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
 610 615 620

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
 625 630 635 640

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
 645 650 655

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
 660 665 670

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
675 680 685

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
690 695 700

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
705 710 715 720

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
725 730 735

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
740 745 750

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
755 760 765

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
770 775 780

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
785 790 795 800

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
805 810 815

[0016] Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
820 825 830

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser Leu Glu His His His His His His
835 840 845

<210> 10
 <211> 930
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码人类PD-L1 Δ- PADRE Th-人类GM-CSF重组蛋白的核酸的核苷酸序列

<400> 10
 atgtttactg tcacggttcc caaggaccta tatgtgtag agtatgtag caatatgaca 60
 attgaatgca aattccagc agaaaaaca ttagacctgg ctgcactaat tgtctattgg 120
 gaaatggagg ataagaacat tattcaattt gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag 180
 catagtagct acagacagag ggcccggctg ttgaaggacc agctctcct gggaaatgct 240
 gcacttcaga tcacagatgt gaaattgcag gatgcagggg tgtaccgctg catgatcagc 300
 tatggtggtg ccgactacaa gcgaattact gtgaaagtca atgcccata caacaaaatc 360
 aaccaaagaa ttttggttgt ggatccagtc acctctgaac atgaactgac atgtcaggct 420
 gaggcgaaat ttgtggcggc gtggaccctg aaagcggcgg cgagcggcag cggcatgtgg 480
 ctgcagagcc tgctgctctt gggcactgtg gcctgcagca tctctgcacc cgcccgctcg 540
 cccagcccca gcacacagcc ctgggagcat gtgaatgcca tccaggagc cggcgctctc 600
 ctgaacctga gtagagacac tgctgctgag atgaatgaaa cagtagaagt catctcagaa 660

atgtttgacc tccaggagcc gacctgccta cagacccgcc tggagctgta caagcagggc 720
 ctgcggggca gcctcaccaa gctcaagggc cccttgacca tgatggccag ccaactacaa 780
 cagcactgcc ctccaacccc gaaacttcc tgtgcaacc agattatcac ctttgaaagt 840
 ttcaaagaga acctgaagga ctttctgctt gtcatcccct ttgactgctg ggagccagtc 900
 caggagctcg agcaccacca ccaccaccac 930

<210> 11
 <211> 771
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码人类PD-L1 Δ - PADRE Th-人类 RANTES重组蛋白的核酸的核苷酸序列

<400> 11
 atgtttactg tcacgggtcc caaggaccta tatgtggtag agtatggtag caatatgaca 60
 attgaatgca aattcccagt agaaaaacaa ttagacctgg ctgcactaat tgtctattgg 120
 gaaatggagg ataagaacat tattcaattt gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag 180
 catagtagct acagacagag ggcccggctg ttgaaggacc agctctccct gggaaatgct 240
 gcacttcaga tcacagatgt gaaattgcag gatgcagggg tgtaccgctg catgatcagc 300
 tatggtggtg cgcactacaa gcgaattact gtgaaagtca atgccccata caacaaaatc 360
 aaccaaagaa ttttggttgt ggatccagtc acctctgaac atgaactgac atgtcaggct 420
 gaggcgaaat ttgtggcggc gtggaccctg aaagcggcgg cgagcggcag cggcatgaag 480
 gtctccgctg cagcctcgc tgtcatcctc attgctactg ccctctgcgc tcctgcatct 540
 gcctcccatt attcctcgga caccacacc tgctgctttg cctacattgc ccgccactg 600
 ccccgctccc acatcaagga gtatttttac accagtggca agtgctccaa cccagcagtc 660
 gtctttgtca cccgaaagaa ccgccaagtg tgtccaacc cagagaagaa atgggttcgg 720
 gagtacatca actcttttga gatgagcctc gagcaccacc accaccacca c 771

[0017]

<210> 12
 <211> 2124
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码人类PD-L1 Δ - PADRE Th-IL-12 重组蛋白的核酸的核苷酸序列

<400> 12
 atgtttactg tcacgggtcc caaggaccta tatgtggtag agtatggtag caatatgaca 60
 attgaatgca aattcccagt agaaaaacaa ttagacctgg ctgcactaat tgtctattgg 120
 gaaatggagg ataagaacat tattcaattt gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag 180
 catagtagct acagacagag ggcccggctg ttgaaggacc agctctccct gggaaatgct 240
 gcacttcaga tcacagatgt gaaattgcag gatgcagggg tgtaccgctg catgatcagc 300
 tatggtggtg cgcactacaa gcgaattact gtgaaagtca atgccccata caacaaaatc 360
 aaccaaagaa ttttggttgt ggatccagtc acctctgaac atgaactgac atgtcaggct 420
 gaggcgaaat ttgtggcggc gtggaccctg aaagcggcgg cggtcgacag cggcagcggc 480
 atgtgtccag cgcgcagcct cctccttctg gctaccctgg tcctcctgga ccacctcagt 540
 ttggccagaa acctccccgt ggccactcca gaccaggaa tgttcccatg ccttcaccac 600

	teccaaaacc tgctgagggc cgtcagcaac atgctccaga aggccagaca aactctagaa	660
	ttttaccctt gcactttctga agagattgat catgaagata tcacaaaaga taaaaccagc	720
	acagtggagg cctgtttacc attggaatta accaagaatg agagttgcct aaattccaga	780
	gagacctctt tcataactaa tgggagttgc ctggcctcca gaaagacctc ttttatgatg	840
	gccctgtgcc ttagtagtat ttatgaagac ttgaagatgt accaggtgga gttcaagacc	900
	atgaatgcaa agcttctgat ggatcctaag aggcagatct ttctagatca aaacatgctg	960
	gcagttattg atgagctgat gcaggccctg aatttcaaca gtgagactgt gccacaaaaa	1020
	tcctcccttg aagaaccgga tttttataaa actaaaatca agctctgcat acttcttcat	1080
	gctttcagaa ttcgggcagt gactattgat agagtgatga gctatctgaa tgcttccggt	1140
	ggcggttgct cgggcggtgg tgggtcgggt ggccggcgat ctatatggga actgaagaaa	1200
	gatgtttatg tcgtagaatt ggattggtat ccggatgccc ctggagaaat ggtggtcctc	1260
	acctgtgaca ccctgaaga agatggtatc acctggacct tggaccagag cagtgaggtc	1320
	ttaggctctg gcaaaacct gaccatccaa gtcaaagagt ttggagatgc tggccagtac	1380
	acctgtcaca aaggaggcga ggttctaagc cattcgtcc tgctgcttca caaaaaggaa	1440
	gatggaattt ggtccactga tattttaag gaccagaaag aacccaaaaa taagacctt	1500
	ctaagatgag aggccaagaa ttattctgga cgtttcacct gctggtggtc gacgacaatc	1560
	agtactgatt tgacattcag tgtcaaaagc agcagaggct cttctgacct ccaaggggtg	1620
	acgtgcggag ctgtacact ctctgcagag agagtcaag gggacaacaa ggagtatgag	1680
	tactcagtgg agtgccagga ggacagtgcc tgcccagctg ctgaggagag tctgcccatt	1740
[0018]	gaggtcatgg tggatgccgt tcacaagctc aagtatgaaa actacaccag cagcttctc	1800
	atcagggaca tcatacaacc tgacceacce aagaacttgc agctgaagcc attaaagaat	1860
	tctcggcagg tggaggctag ctgggagtac cctgacacct ggagtactcc acattcctac	1920
	ttctccctga cattctcgct tcaggtccag ggcaagagca agagagaaaa gaaagataga	1980
	gtcttcacgg acaagacctc agccacggtc atctgccga aaaatgccag cattagcgtg	2040
	cgggcccagg accgctacta tagctcatct tggagcgaat gggcatctgt gccctgcagt	2100
	ctcagcacc accaccacca ccac	2124

<210> 13

<211> 936

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 编码人类PD-L2 Δ -PADRE Th-人类 GM-CSF重组蛋白的核酸的核苷酸序列

<400> 13

	atgttattca cagtacagt ccctaaggaa ctgtacataa tagagcatgg cagcaatgtg	60
	accctggaat gcaactttga cactggaagt catgtgaacc ttggagcaat aacagccagt	120
	ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa gagccacttt gctggaggag	180
	cagctgcccc taggaaagc ctcgttccac atacctcaag tccaagtgag ggacgaagga	240
	cagtaccaat gcataatcat ctatggggtc gcctgggact acaagtacct gactctgaaa	300
	gtcaaaagctt cctacaggaa aataaacact cacatectaa aggttccaga aacagatgag	360
	gtagagctca cctgccagc tacaggttat cctctggcag aagtatctg gccaaacgtc	420

agcgcgaaat ttgtggcggc gtggaccctg aaagcggcgg cggtcgacag cggcagcggc 480
 atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc 540
 cgctcgccca gcccagcac acagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccgg 600
 cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcatc 660
 tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag 720
 cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggccctt tgaccatgat ggccagccac 780
 tacaaacage actgcccctcc aaccccggaa acttctctgt caaccagat taccaccttt 840
 gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgta tcccctttga ctgctgggag 900
 ccagtccagg agctcgagca ccaccaccac caccac 936

<210> 14
 <211> 777
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码人类PD-L2 Δ- PADRE Th-人类 RANTES重组蛋白的核酸的核苷酸序列

<400> 14
 atgttattca cagtgcagct ccctaaggaa ctgtacataa tagagcatgg cagcaatgtg 60
 accctggaat gcaactttga cactggaagt catgtgaacc ttggagcaat aacagccagt 120
 ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa gagccacttt gctggaggag 180
 cagctgcccc tagggaaggc ctcgttcac atacctcaag tccaagtgag ggacgaagga 240
 cagtaccaat gcataatcat ctatggggtc gcctgggact acaagtacct gactctgaaa 300
 gtcaaagctt cctacaggaa aataaacact cacatcctaa aggttccaga aacagatgag 360
 gtagagetca cctgccagge tacaggttat cctctggcag aagtatcctg gccaaacgtc 420
 agcgcgaaat ttgtggcggc gtggaccctg aaagcggcgg cggtcgacag cggcagcggc 480
 atgaaggtct ccgcggaagc cctcgtctgc atcctcattg ctactgccct ctgcgtctct 540
 gcatctgect ccccatatc ctcggacacc acaccctgct gctttgccta cattgccgc 600
 ccaactgccc gtgcccacat caaggagtat ttctacacca gtggcaagtg ctccaacca 660
 gcagtcgtct ttgtcaccgc aaagaaccgc caagtgtgtg ccaaccaga gaagaaatgg 720
 gttcgggagt acatcaacte tttggagatg agcctcgagc accaccacca ccaccac 777

[0019]

<210> 15
 <211> 2124
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码人类PD-L2 Δ- PADRE Th-人类IL-12重组蛋白的核酸的核苷酸序列

<400> 15
 atgttattca cagtgcagct ccctaaggaa ctgtacataa tagagcatgg cagcaatgtg 60
 accctggaat gcaactttga cactggaagt catgtgaacc ttggagcaat aacagccagt 120
 ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa gagccacttt gctggaggag 180
 cagctgcccc tagggaaggc ctcgttcac atacctcaag tccaagtgag ggacgaagga 240
 cagtaccaat gcataatcat ctatggggtc gcctgggact acaagtacct gactctgaaa 300
 gtcaaagctt cctacaggaa aataaacact cacatcctaa aggttccaga aacagatgag 360

gtagagctca cctgccaggc tacaggttat cctctggcag aagtatcctg gccaaacgtc	420
agcgcgaaat ttgtggcggc gtggaccctg aaagcggcgg cggtcgacag cggcagcggc	480
atgtgtccag cgcgcagcct cctccttgtg gctaccctgg tcctcctgga ccacctcagt	540
ttggccagaa acctccccgt ggccactcca gaccaggaa tgttcccatg ccttcaccac	600
teccaaaace tgctgagggc cgtcagcaac atgctccaga aggccagaca aactctagaa	660
ttttaccctt gcacttctga agagattgat catgaagata tcacaaaaga taaaaccagc	720
acagtggagg cctgtttacc attggaatta accaagaatg agagttgctt aaattccaga	780
gagacctctt tcataactaa tgggagttgc ctggcctcca gaaagacctc ttttatgatg	840
gcctctgtcc ttagtagtat ttatgaagac ttgaagatgt accagtgga gttcaagacc	900
atgaatgcaa agcttctgat ggatcctaag aggcagatct ttctagatca aaacatgctg	960
gcagttattg atgagctgat gcaggccctg aatttcaaca gtgagactgt gccacaaaaa	1020
tcctcccttg aagaaccgga tttttataaa actaaaatca agctctgcat acttcttcat	1080
gctttcagaa ttcgggcagt gactattgat agagtatga gctatctgaa tgcttccggt	1140
ggcgggtgct cgggcgggtg tgggtcgggt ggcggcggat ctatatggga actgaagaaa	1200
gatgtttiat tcgtagaatt ggattggtat ccggatgccc ctggagaaat ggtggcctc	1260
acctgtgaca cccctgaaga agatggtatc acctggacct tggaccagag cagtgaggtc	1320
ttaggctctg gcaaaacct gaccatcaa gtcaaagat ttggagatgc tggccagtac	1380
acctgtcaca aaggaggcga gtttctaagc cattcgctcc tgctgcttca caaaaaggaa	1440
[0020] gatggaattt ggtccactga tattttaaag gaccagaaag aacccaaaaa taagaccttt	1500
ctaagatggg aggccaagaa ttattctgga cgtttcacct gctggtggct gacgacaatc	1560
agtactgatt tgacattcag tgtcaaaagc agcagaggct ctctgacct ccaaggggtg	1620
acgtgaggag ctgtactact ctctgcagag agagtcagag gggacaacaa ggagtatgag	1680
tactcagtgg agtgccagga ggacagtgcc tgcccagctg ctgaggagag tctgeccatt	1740
gaggtcatgg tggatgccgt tcacaagctc aagtatgaaa actacaccag cagcttcttc	1800
atcagggaca tcatcaaacc tgaccaccc aagaacttgc agctgaagcc attaaagaat	1860
tctcggcagg tggaggtcag ctgggagtac cctgacacct ggagtactcc acattcctac	1920
ttctccctga cattctcgct tcaggtccag ggcaagagca agagagaaaa gaaagataga	1980
gttttcacgg acaagacctc agccacggtc atctgccgca aaaatgccag cattagcgtg	2040
cgggcccagg accgctacta tagctcatct tggagcgaat gggcatctgt gcctgcagt	2100
ctcgagcacc accaccacca ccac	2124
<210> 16	
<211> 1356	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 编码人类PD-L1-PD-L2 Δ - PADRE Th-人类GM-CSF重组蛋白的核酸的核苷酸序列	
<400> 16	
atgtttactg tcacggttcc caaggaccta tatgtgtag agtatgtag caatatgaca	60
attgaatgca aattcccagt agaaaaaca ttagacctgg ctgcactaat tgtctattgg	120

gaaatggagg ataagaacat tattcaattt gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag	180
catagtagct acagacagag ggccccggctg ttgaaggacc agctctccct gggaaatgct	240
gcacttcaga tcacagatgt gaaattgcag gatgcagggg tgtaccgctg catgatcagc	300
tatggtggtg ccgactacaa gcgaattact gtgaaagtca atgccccata caacaaaatc	360
aaccaaagaa ttttggttgt ggatccagtc acctctgaac atgaaactgac atgtcaggct	420
gagttattca cagtgcagct ccctaaggaa ctgtacataa tagagcatgg cagcaatgtg	480
accctggaat gcaactttga cactggaagt catgtgaacc ttggagcaat aacagccagt	540
ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa gagccacttt gctggaggag	600
cagctgcccc tagggaagc ctcgttccac atacctcaag tccaagtgag ggacgaagga	660
cagtaccaat gcataatcat ctatggggtc gcctgggact acaagtacct gactctgaaa	720
gtcaaagctt cctacaggaa aataaacact cacatcctaa aggttccaga aacagatgag	780
gtagagctca cctgccagc tacagttat cctctggcag aagtatcctg gccaaacgtc	840
agcgcgaaat ttgtggcggc gtggaccctg aaagcggcgg cggtcgacag cggcagcggc	900
atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc	960
cgctcgccca gccccagcac acagccctgg gagcatgtga atgecatcca ggaggccccg	1020
cgctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcac	1080
tcagaaatgt ttgacctca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag	1140
cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggccct tgaccatgat ggccagccac	1200
tacaaacagc actgcccctc aacccccgaa acttctgtg caaccagat taccacttt	1260
[0021] gaaagttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgc tcccccttga ctgctgggag	1320
ccagtcagg agctcgagca ccaccaccac caccac	1356
<210> 17	
<211> 1197	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 编码人类PD-L1-PD-L2 Δ - PADRE Th-人类 RANTES重组蛋白的核酸的核苷酸序列	
<400> 17	
atgtttactg tcacggttcc caaggaccta tatgtgtag agtatgtag caatatgaca	60
attgaatgca aattcccagt agaaaaaca ttagacctgg ctgcactaat tgtctattgg	120
gaaatggagg ataagaacat tattcaattt gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag	180
catagtagct acagacagag ggccccggctg ttgaaggacc agctctccct gggaaatgct	240
gcacttcaga tcacagatgt gaaattgcag gatgcagggg tgtaccgctg catgatcagc	300
tatggtggtg ccgactacaa gcgaattact gtgaaagtca atgccccata caacaaaatc	360
aaccaaagaa ttttggttgt ggatccagtc acctctgaac atgaaactgac atgtcaggct	420
gagttattca cagtgcagct ccctaaggaa ctgtacataa tagagcatgg cagcaatgtg	480
accctggaat gcaactttga cactggaagt catgtgaacc ttggagcaat aacagccagt	540
ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa gagccacttt gctggaggag	600
cagctgcccc tagggaagc ctcgttccac atacctcaag tccaagtgag ggacgaagga	660
cagtaccaat gcataatcat ctatggggtc gcctgggact acaagtacct gactctgaaa	720

gtcaaagctt cctacagaa aataaacact cacatcctaa aggttccaga aacagatgag 780
 gtagagetca cctgccagc tacaggttat cctctggcag aagtatcctg gccaaacgtc 840
 agcgcgaaat ttgtggcggc gtggaccctg aaagcggcgg cggtcgacag cggcagcggc 900
 atgaaggtct ccgcggcagc cctcgtctgc atcctcattg ctactgcect ctgcctcct 960
 gcatctgctt ccccatatc ctcggacacc acaccctgct getttgcta cattgcccgc 1020
 ccaactgccc gtgcccacat caaggagtat ttctacacca gtggcaagtg ctccaacca 1080
 gcagtcgtct ttgtcaccgg aaagaaccgc caagtgtgtg ccaaccaga gaagaaatgg 1140
 gttcgggagt acatcaactc tttggagatg agcctcgagc accaccacca ccaccac 1197

<210> 18
 <211> 2544
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码人类PD-L1-PD-L2 Δ - PADRE
 Th-人类IL-12重组蛋白的核酸的核苷酸序列

<400> 18
 atgtttactg tcacggttcc caaggaccta tatgtgtag agtatgtag caatatgaca 60
 attgaatgca aattcccagt agaaaaaca ttagacctgg ctgcactaat tgtctattgg 120
 gaaatggagg ataagaacat tattcaattt gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag 180
 catagtagct acagacagag ggcccggctg ttgaaggacc agctctcctt gggaaatgct 240
 gcacttcaga tcacagatgt gaaattgcag gatgcagggg tgtaccgctg catgatcagc 300
 tatggtggtg ccgactacaa gcgaattact gtgaaagtca atgcccata caacaaaatc 360
 aaccaaagaa ttttggttgt ggatccagtc acctctgaac atgaactgac atgtcaggct 420
 gaggttattca cagtgcagct ccctaaggaa ctgtacataa tagagcatgg cagcaatgtg 480
 acctggaat gcaactttga cactggaagt catgtgaacc ttggagcaat aacagccagt 540
 ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa gageccactt gctggaggag 600
 cagctgcccc tagggaagc ctcgttcac atacctcaag tccaagtgag ggacgaagga 660
 cagtaccaat gcataatcat ctatggggtc gcctgggact acaagtacct gactctgaaa 720
 gtcaaagctt cctacagaa aataaacact cacatcctaa aggttccaga aacagatgag 780
 gtagagetca cctgccagc tacaggttat cctctggcag aagtatcctg gccaaacgtc 840
 agcgcgaaat ttgtggcggc gtggaccctg aaagcggcgg cggtcgacag cggcagcggc 900
 atgtgtccag cgcgcagcct cctccttgtg gctaccctgg tcctcctgga ccacctcagt 960
 ttggccagaa acctccccgt ggccactcca gaccaggaa tgttccatg cttcaccac 1020
 tccaaaacc tgctgagggc cgtcagcaac atgtccaga aggccagaca aactctagaa 1080
 tttaccctt gcacttctga agagattgat catgaagata tcacaaaaga taaaccagc 1140
 acagtggagg cctgtttacc attggaatta accaagaatg agagttgcct aaattccaga 1200
 gagacctctt tcataactaa tgggagttgc ctggcctcca gaaagacctc ttttatgatg 1260
 gcctctgtcc ttagtagtat ttatgaagac ttgaagatgt accaggtgga gttcaagacc 1320
 atgaatgcaa agcttctgat ggatcctaag aggcagatct ttctagatca aaacatgctg 1380
 gcagttattg atgagctgat gcaggccctg aattcaaca gtgagactgt gccacaaaa 1440

[0022]

```

tcctcccttg aagaaccgga tttttataaa actaaaatca agctctgcat acttcttcat 1500
gctttcagaa ttcgggcagt gactattgat agagtgatga gctatctgaa tgcttccggt 1560
ggcgggtggct cgggcgggtgg tgggtcgggt ggccggcgat ctatatggga actgaagaaa 1620
gatgtttatg tcgtagaatt ggattggtat ccggatgcc ctggagaaat ggtggtcctc 1680
acctgtgaca cccctgaaga agatggtatc acctggacct tggaccagag cagtgaggtc 1740
ttaggctctg gcaaaacct gaccatccaa gtcaaagagt ttggagatgc tggccagtac 1800
acctgtcaca aaggaggcga gtttctaagc cattcgtcc tgctgcttca caaaaaggaa 1860
gatggaatth ggtccactga tattttaaag gaccagaaag aacccaaaaa taagaccttt 1920
ctaagatgcg aggccaagaa ttattctgga cgtttcacct gctggtggct gacgacaatc 1980
agtactgatt tgacattcag tgtcaaaagc agcagaggct cttctgacct ccaaggggtg 2040
acgtgcgagg ctgtacact ctctgcagag agagtgcagag gggacaacaa ggagtatgag 2100
tactcagtgg agtgccagga ggacagtgcc tgcccagctg ctgaggagag tctgcccatt 2160
gaggtcatgg tggatgccgt tcacaagctc aagtatgaaa actacaccag cagcttcttc 2220
atcagggaca tcatcaaacc tgaccaccc aagaacttgc agctgaagcc attaaagaat 2280
tctcggcagg tggaggtcag ctgggagtac cctgacacct ggagtactcc acattcctac 2340
ttctccctga cattctgctg tcaggtccag ggcaagagca agagagaaaa gaaagataga 2400
gtcttcacgg acaagacctc agccacggtc atctgccgca aaaatgccag cattagcgtg 2460
cgggcccgagg accgctacta tagctcatct tggagcgaat gggcatctgt gccctgcagt 2520
ctcgagcacc accaccacca ccac 2544
    
```

[0023]

```

<210> 19
<211> 201
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 人类PD-L1 Δ 的氨基酸序列

<400> 19

Met Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly
1           5           10          15

Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp
          20           25           30

Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile
          35           40           45

Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr
          50           55           60

Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala
65           70           75           80

Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg
          85           90           95

Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys
          100          105          110
    
```

Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp
115 120 125

Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
130 135 140

Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly
145 150 155 160

Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val
165 170 175

Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys
180 185 190

Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu
195 200

<210> 20
<211> 141
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 人类PD-L2 Δ 的氨基酸序列

<400> 20

[0024]

Met Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His
1 5 10 15

Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val
20 25 30

Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr
35 40 45

Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu
50 55 60

Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly
65 70 75 80

Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr
85 90 95

Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile
100 105 110

Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr
115 120 125

Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser
130 135 140

<210> 21
<211> 281
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> 人类PD-L1-PD-L2 Δ 的氨基酸序列

<400> 21

Met Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly
 1 5 10 15

Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp
 20 25 30

Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile
 35 40 45

Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr
 50 55 60

Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala
 65 70 75 80

Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg
 85 90 95

Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys
 100 105 110

Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp
 115 120 125

[0025]

Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Leu Phe Thr
 130 135 140

Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly Ser Asn Val
 145 150 155 160

Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn Leu Gly Ala
 165 170 175

Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser Pro His Arg
 180 185 190

Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys Ala Ser
 195 200 205

Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln Tyr Gln Cys
 210 215 220

Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu Thr Leu Lys
 225 230 235 240

Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu Lys Val Pro
 245 250 255

Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly Tyr Pro Leu
 260 265 270

Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser
 275 280

<210> 22
 <211> 603
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码人类PD-L1 Δ 的核酸分子的核苷酸序列

<400> 22
 atgtttactg tcacggttcc caaggaccta tatgtggtag agtatggtag caatatgaca 60
 attgaatgca aattcccagt agaaaaacaa ttagacctgg ctgcactaat tgtctattgg 120
 gaaatggagg ataagaacat tattcaattt gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag 180
 catagtagct acagacagag ggcccggctg ttgaaggacc agctctccct gggaaatgct 240
 gcacttcaga tcacagatgt gaaattgcag gatgcagggg tgtaccgctg catgatcagc 300
 tatggtgggt ccgactacaa gcgaattact gtgaaagtca atgcccata caacaaaatc 360
 aaccaaagaa ttttggttgt ggatccagtc acctctgaac atgaaactgac atgtcaggct 420
 gagggtacc ccaaggccga agtcatctgg acaagcagtg accatcaagt cctgagtgg 480
 aagaccacca ccaccaattc caagagagag gagaagcttt tcaatgtgac cagcacactg 540
 agaatcaaca caacaactaa tgagattttc tactgcactt ttaggagatt agatcctgag 600
 gaa 603

<210> 23
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> Artificial

[0026]

<220>
 <223> 编码人类PD-L2 Δ 的核酸分子的核苷酸序列

<400> 23
 atgttattca cagtgcagtc ccctaaggaa ctgtacataa tagagcatgg cagcaatgtg 60
 acctggaat gcaactttga cactggaagt catgtgaacc ttggagcaat aacagccagt 120
 ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa gagecacttt gctggaggag 180
 cagctgcccc tagggaagtc ctctgtccac atacctcaag tccaagtgag ggacgaagga 240
 cagtaccaat gcataatcat ctatggggtc gcctgggact acaagtacct gactctgaaa 300
 gtcaaagctt cctacaggaa aataaacact cacatcctaa aggttccaga aacagatgag 360
 gtagagetca cctgccagtc tacaggttat cctctggcag aagtatctct gccaaacgtc 420
 agc 423

<210> 24
 <211> 843
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码人类PD-L1-PD-L2 Δ 的核酸分子的核苷酸序列

<400> 24
 atgtttactg tcacggttcc caaggaccta tatgtggtag agtatggtag caatatgaca 60
 attgaatgca aattcccagt agaaaaacaa ttagacctgg ctgcactaat tgtctattgg 120
 gaaatggagg ataagaacat tattcaattt gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag 180
 catagtagct acagacagag ggcccggctg ttgaaggacc agctctccct gggaaatgct 240

gcacttcaga tcacagatgt gaaattgcag gatgcagggg tgtaccgctg catgatcagc 300
 tatgggtggtg ccgactacaa gcgaattact gtgaaagtca atgccccata caacaaaatc 360
 aaccaaagaa ttttggttgt ggatccagtc acctctgaac atgaactgac atgtcaggct 420
 gagttattca cagtgcagct ccctaaggaa ctgtacataa tagagcatgg cagcaatgtg 480
 accctggaat gcaactttga cactggaagt catgtgaacc ttggagcaat aacagccagt 540
 ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa gagccacttt gctggaggag 600
 cagctgcccc tagggaagcg ctcgttcac atacctcaag tccaagtgag ggacgaagga 660
 cagtaccaat gcataatcat ctatggggtc gcctgggact acaagtacct gactctgaaa 720
 gtcaaagctt cctacagaa aataaacact cacatcctaa aggttccaga aacagatgag 780
 gtagagctca cctgccagcg tacaggttat cctctggcag aagtatcctg gccaaacgtc 840
 agc 843

<210> 25
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 辅助T细胞抗原决定基片段的氨基酸序列

<400> 25

Ala Lys Phe Val Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10

[0027]

<210> 26
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码辅助T细胞抗原决定基片段的核酸分子的核苷酸序列

<400> 26

gcgaaatttg tggcggcgtg gaccctgaaa gcggcggcg 39

<210> 27
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 人类GM-CSF片段的氨基酸序列

<400> 27

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

Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
 20 25 30

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
 35 40 45

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
 50 55 60

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys

65		70		75		80	
Gln Gly Leu Arg	Gly Ser Leu Thr Lys	Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met					
	85			90		95	
Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser							
	100			105		110	
Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys							
	115			120		125	
Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu							
	130			135		140	
<210> 28							
<211> 91							
<212> PRT							
<213> Artificial							
<220>							
<223> 人类RANTES片段的氨基酸序列							
<400> 28							
Met Lys Val Ser Ala Ala Arg Leu Ala Val Ile Leu Ile Ala Thr Ala							
1	5			10		15	
Leu Cys Ala Pro Ala Ser Ala Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro							
	20			25		30	
[0028] Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys							
	35			40		45	
Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe							
	50			55		60	
Val Thr Arg Lys Asn Arg Gln Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp							
65	70			75		80	
Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser Leu Glu Met Ser							
	85			90			
<210> 29							
<211> 540							
<212> PRT							
<213> Artificial							
<220>							
<223> 人类IL-12片段的氨基酸序列							
<400> 29							
Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu							
1	5			10		15	
Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro							
	20			25		30	
Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val							
	35			40		45	
Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys							

50	55	60
Thr Ser Glu Glu Ile 65	Asp His Glu Asp Ile 70	Thr Lys Asp Lys Thr Ser 75 80
Thr Val Glu Ala Cys 85	Leu Pro Leu Glu Leu 90	Thr Lys Asn Glu Ser Cys 95
Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala 100 105 110		
Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr 115 120 125		
Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys 130 135 140		
Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu 145 150 155 160		
Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr 165 170 175		
Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys 180 185 190		
Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr 195 200 205		
Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser 210 215 220		
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys 225 230 235 240		
Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu 245 250 255		
Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp 260 265 270		
Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr 275 280 285		
Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys 290 295 300		
Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu 305 310 315 320		
Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys 325 330 335		
Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe 340 345 350		
Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val		

[0029]

355	360	365
Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala		
370	375	380
Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu		
385	390	395
Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu		
405	410	415
Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr		
420	425	430
Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp		
435	440	445
Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val		
450	455	460
Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr		
465	470	475
Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu		
485	490	495
Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys		
500	505	510
Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser		
515	520	525
Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser		
530	535	540

[0030]

<210> 30
 <211> 432
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码人类GM-CSF片段的核酸分子的核苷酸序列

<400> 30
 atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc 60
 cgctcgccca gccccagcac acagccctgg gagcatgtga atgcatcca ggaggcccg 120
 cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcac 180
 tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgctacaga cccgcctgga gctgtacaag 240
 cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggccct tgaccatgat ggccagccac 300
 tacaacagc actgccctcc aacccggaa acttctgtg caaccagat taccacctt 360
 gaaagtcca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgta tccccttga ctgctgggag 420
 ccagtccagg ag 432

<210> 31
 <211> 273
 <212> DNA

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 编码人类RANTES片段的核酸分子的核苷酸序列	
	<400> 31	
	atgaaggtct cgcggcagc cctcgtgtc atcctcattg ctactgcct ctgcgtcct	60
	gcactgcct cccatattc ctcggacacc acacctgtc gctttgccta cattgccgc	120
	ccactgccc gtgccacat caaggagtat ttctacacca gtggcaagt ctccaacca	180
	gcagtgtct ttgtcaccg aaagaaccg caagtgtgtg ccaaccaga gaagaaatgg	240
	gttcggagt acatcaactc tttggagatg agc	273
	<210> 32	
	<211> 1620	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 编码人类IL-12片段的核酸分子的核苷酸序列	
	<400> 32	
	atgtgtccag cgcgcagcct cctccttgtg gctaccctgg tctcctgga ccacctcagt	60
	ttggccagaa acctccccgt ggccactcca gaccaggaa tgttccatg ccttaccac	120
	tccaaaacc tgcctgagggc cgtcagcaac atgtccaga aggccagaca aactctagaa	180
	ttttaccctt gcacttctga agagattgat catgaagata tcacaaaaga taaaaccagc	240
	acagtggagg cctgtttacc attggaatta accaagaatg agagttcct aaattccaga	300
[0031]	gagacctctt tcataactaa tgggagttgc ctggcctcca gaaagacctc ttttatgatg	360
	gcctctgtcc ttagtagtat ttatgaagac ttgaagatgt accaggtgga gttcaagacc	420
	atgaatgcaa agcttctgat ggatcctaag aggcagatct ttctagatca aaacatgctg	480
	gcagttattg atgagctgat gcaggecctg aatttcaaca gtgagactgt gccacaaaa	540
	tctcctctg aagaaccgga tttttataaa actaaaatca agctctgeat acttcttcat	600
	gctttcagaa ttcgggcagt gactattgat agagtatga gctatctgaa tgcttccggt	660
	ggcgggtgct cgggcggtg tgggtcgggt ggcggcggat ctatatggga actgaagaaa	720
	gatgtttatg tcgtagaatt ggattggtat ccgatgccc ctggagaaat ggtggtcctc	780
	acctgtgaca ccctgaaga agatggtatc acctggacct tggaccagag cagtgaggtc	840
	ttagctctg gcaaacctc gaccatcaa gtcaaagagt ttggagatgc tggccagtac	900
	acctgtcaca aaggaggcga gtttctaagc cattcgtcc tgctgcttca caaaaaggaa	960
	gatggaattt ggtcactga tattttaaag gaccagaaag aacccaaaa taagacctt	1020
	ctaagatgag aggccaagaa ttattctgga cgtttcacct gctggtggt gacgacaatc	1080
	agtactgatt tgacattcag tgtcaaaagc agcagaggct cttctgacct ccaaggggtg	1140
	acgtgaggag ctgctacct ctctgcagag agagtcagag gggacaacaa ggagtatgag	1200
	tactcagtgg agtgccagga ggacagtgc tggccagctg ctgaggagag tctgccatt	1260
	gaggtcatgg tggatgccgt tcacaagctc aagtatgaaa actacaccag cagcttctc	1320
	atcagggaca tcatcaaac tgaccaccc aagaactgc agctgaagcc attaaagaat	1380
	tctcggcagg tggaggctag ctgggagtac cctgacacct ggagtactcc acattcctac	1440
	tttccctga cattctgctg tcaggtccag ggcaagagca agagagaaaa gaaagataga	1500
[0032]	gtcttcacgg acaagacct agccacggct atctgccgca aaaatgccag cattagcgtg	1560
	cgggcccagg accgctacta tagctcatct tggagcgaat gggcatctgt gccctgcagt	1620

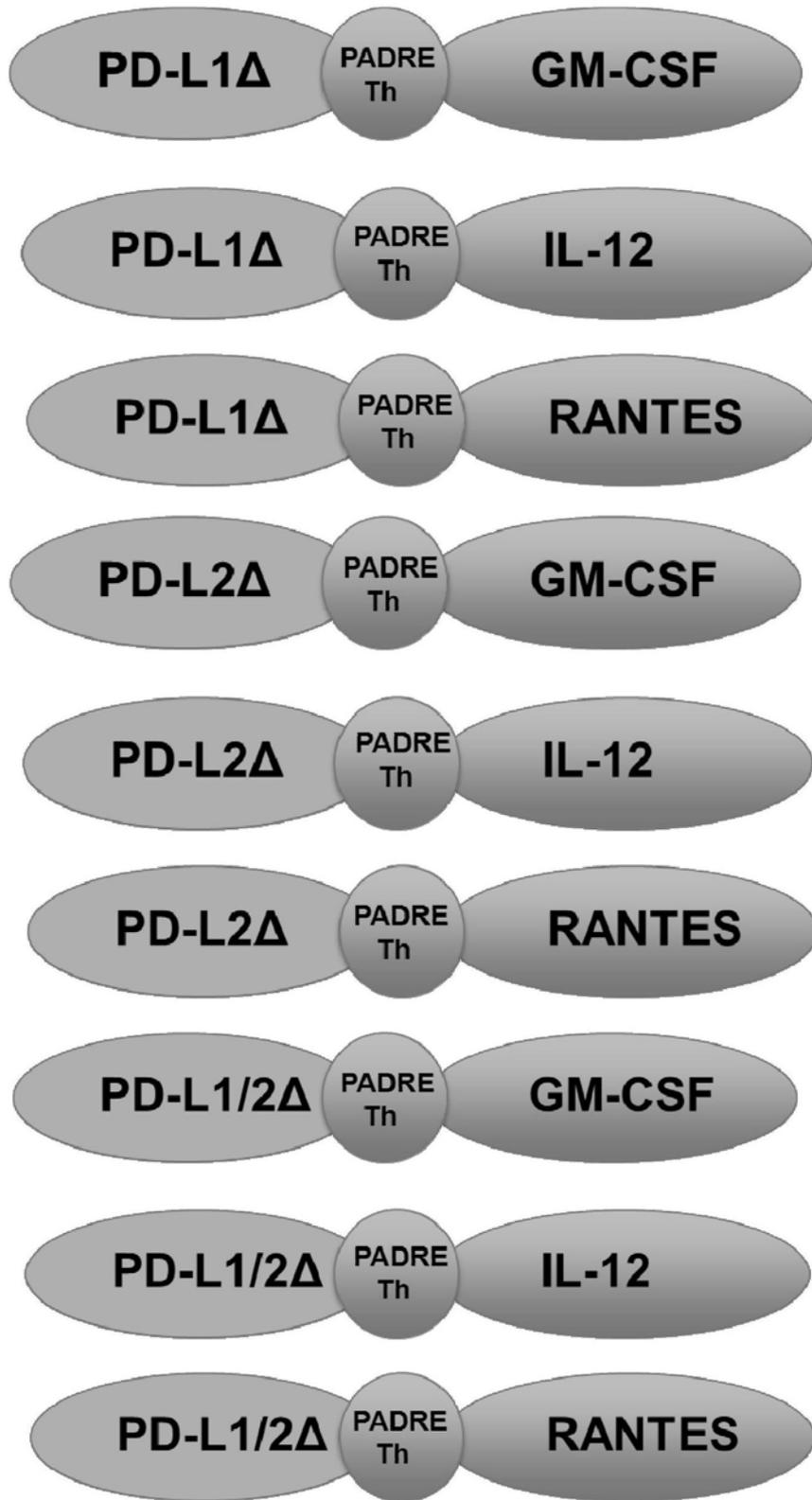


图1

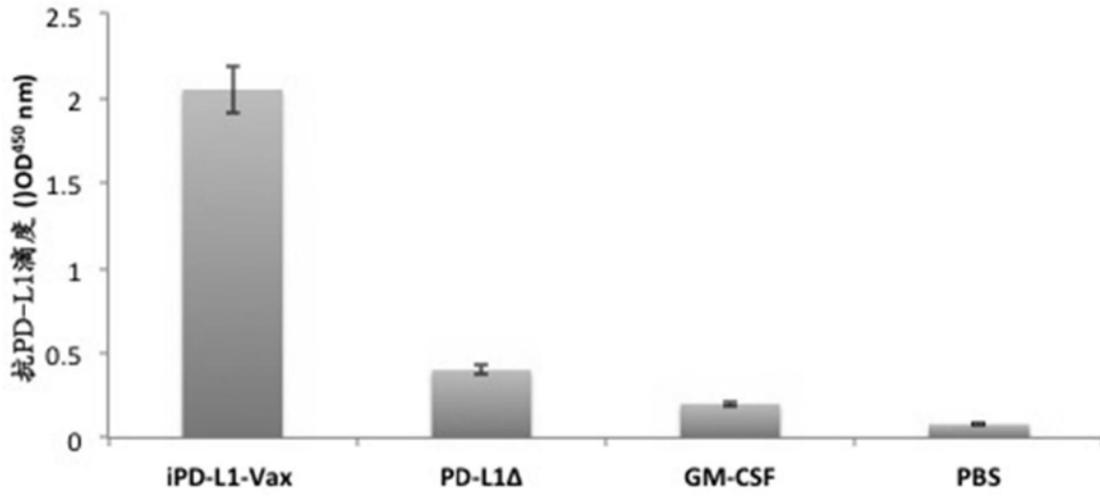


图2

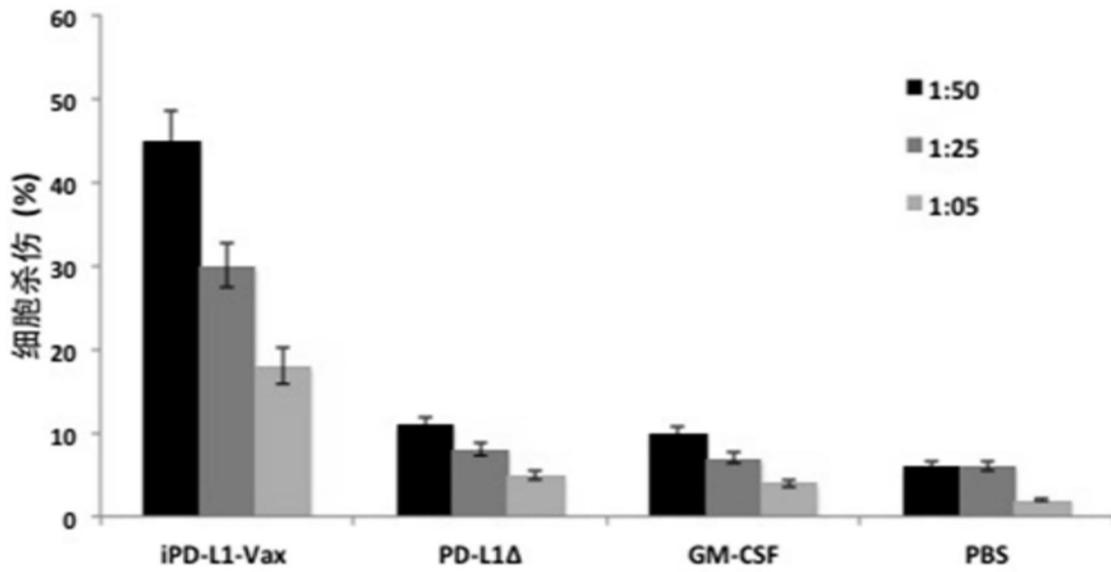


图3

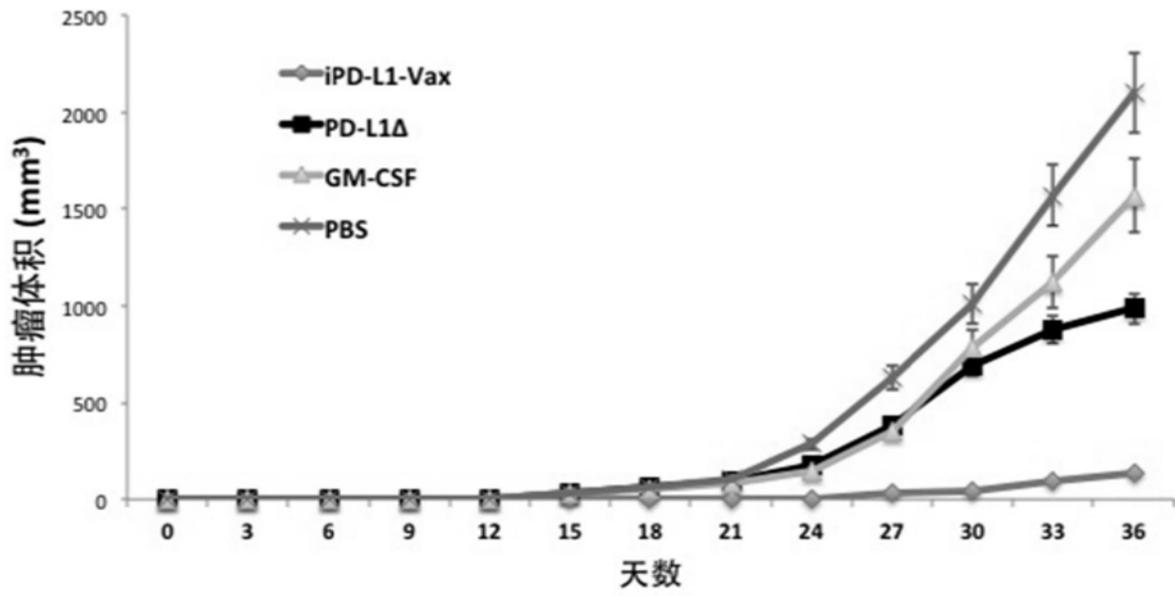


图4