编码膜型 IL-12 细胞因子佐剂的 mRNA 肿瘤疫苗及其用途

相关申请交叉引用

本申请要求于 2024 年 3 月 4 日提交的中国国家申请号 202410245327.9 的优先权权益，所述申请通过引用整体并入本文。

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体的，涉及一种编码膜型 IL-12 细胞因子佐剂的 mRNA 肿瘤疫苗及其用途。

背景技术

癌症是人类健康的重大威胁疾病，由于细胞增殖或分化异常，导致功能异常、细胞生长不受调控，局部组织侵袭和转移。癌症细胞由于基因突变表达特异的肿瘤新生抗原，可以被免疫 T 淋巴细胞识别和杀伤，是肿瘤免疫治疗的基础。

针对免疫原性肿瘤的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)数量不足是免疫治疗面临的一个重大挑战(Kalbasi 和 Ribas，2020)。传统的疫苗，例如基于蛋白质的疫苗与明矾结合，通常无法产生针对病毒感染或肿瘤的强烈 CTL 反应；而更强的佐剂虽然可以增强 CTL 反应，但往往伴随着严重的毒性(Awate 等人，2013；Coffman 等人，2010)。抗原的产生和佐剂的选择对于疫苗的成功至关重要。近年来开发的 mRNA 疫苗平台为产生更强大的抗原和有效的佐剂提供了一个有前景的策略，用于预防病毒感染和治疗癌症(Barbier 等人，2022；Beck 等人，2021；Chaudhary 等人，2021)。为了增加抗原表达，大多数临床 mRNA 疫苗使用甲基化修饰的碱基以防止先天免疫感应并减少毒性，尽管这可能也会限制 mRNA 的佐剂效应(Andries 等人，2015；Kariko 等人，2005)。用于 mRNA 递送的脂质纳米颗粒(LNPs)可以作为内置佐剂，诱导促炎症细胞因子如 IL-1β 和 IL-6 的产生，从而促进抗原特异性 CD4+滤泡辅助 T 细胞(Tfh)和 B 细胞反应(Alameh 等人，2021；Tahtinen 等人，2022)。然而，细胞因子如 IL-6 可能会抑制幼稚 T 细胞分化为效应细胞，而效应 T 细胞在抗肿瘤免疫反应中是至关重要的(Huseni 等人，2023)。因此，选择合适的 mRNA 癌症疫苗佐剂对于确保其疗效和安全性至关重要。对于诱导肿瘤特异性杀伤性 T 细胞而言，营造一个以 IL-12 和 TNF-α 为主导的 Th1 型免疫微环境非常重要。然而，IL-12 本身是一个毒性很大的细胞因子，直接将 IL-12 蛋白作为佐剂和 RNA 疫苗共注射或者用

mRNA 表达游离 IL-12 都会导致严重的治疗相关副作用；所以如何为 mRNA 疫苗的 T 细胞激活过程营造一个有利于杀伤性 T 细胞分化的免疫微环境，并且降低免疫过程对机体产生的副作用对于提升 mRNA 肿瘤疫苗的疗效至关重要。

最新研究发现肌肉注射的 mRNA-LNP 主要引流到引流淋巴结和脾脏，被巨噬细胞和树突状细胞捕获并表达蛋白(Kimberly，J.H.等 Mol Ther Nucleic Acids. 2023 年 11 月 24 日;35(1):102083.)。引流淋巴结和脾脏是肿瘤疫苗触发适应性免疫反应的重要器官，因此将 IL-12 特异递送到引流淋巴结和脾脏，避免 IL-12 释放到外周组织，可能在提高肿瘤 mRNA 疫苗免疫效果的同时降低 IL-12 引起的外周毒副作用。

发明内容

有鉴于此，本发明的目的在于提供编码膜型 IL-12 细胞因子佐剂的 mRNA 肿瘤疫苗，利用 RNA 技术将 IL-12 和肿瘤抗原同时表达在外周淋巴组织中的抗原递呈细胞上，膜型 IL-12 作为佐剂提高常规 mRNA 肿瘤疫苗的治疗效果；与直接表达游离的 IL-12 蛋白相比，细胞膜锚定形式的 IL-12 蛋白可以将 IL-12 限定在外周淋巴组织的抗原递呈细胞表面，在不影响其佐剂效应的同时避免 IL-12 释放到外周组织引起外周毒性。

为了实现上述发明目的，本发明提供了以下技术方案：

在一个方面，本发明提供了一种编码膜型 IL-12 细胞因子佐剂的 mRNA 肿瘤疫苗，其中，所述 mRNA 包含编码 IL-12 的序列(IL12)、编码膜结构域的序列(MD)以及编码肿瘤抗原的序列(Ag)三部分。

根据本发明的具体实施方式，所述编码 IL-12 的序列(IL12)和所述编码膜结构域的序列(MD)位于一条 mRNA 上，所述编码肿瘤抗原的序列(Ag)位于另一条 mRNA 上；或者所述编码 IL-12 的序列(IL12)、编码膜结构域的序列(MD)以及编码肿瘤抗原的序列(Ag)位于同一条 mRNA 上，且所述三部分的排列顺序为 IL12-L1-MD-L2-Ag，或 Ag-L2-IL12-L1-MD；其中 L1 为甘氨酸/丝氨酸(Glycine/Serine，Gly/Ser)多肽连接子，L2 为 IRES 序列或 Glycine/Serine 或 2A 多肽连接子，L2 优选 2A 多肽连接子。

根据本发明的具体实施方式，所述肿瘤抗原包括突变来源的肿瘤新抗原、病毒来源的肿瘤特异性抗原或肿瘤高表达的相关抗原。

根据本发明的具体实施方式，所述突变来源的肿瘤新抗原包括 KARS G12C、KRASG12D、EGFRvIII 或 $BRAF^{V600E}$；所述病毒来源的肿瘤特异性抗原包括 HPV E6/E7、内源性逆转录病毒抗原 hERT、LMP1 或 LMP2；所述肿瘤高表达的相关抗原包括 WT1、MAGE-A3、GP100、NY-ESO-I、HER2/Neu、Claudin18.2、Mesothelin 或 MUC。

根据本发明的具体实施方式，所述编码 IL-12 细胞因子的序列包含编码 IL-12B 多肽和 IL-12A 多肽的 ORF，其中 IL-12B 和 IL-12A 通过多肽接头(linker)连接，所述 linker 包括 Gly/Ser linker，所述 Gly/Ser linker 包含(GnS)m，其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20 且 m 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20；所述 linker 优选为$(G4S)_3$ linker。

根据本发明的具体实施方式，所述膜结构域可以包含跨膜结构域，优选包含跨膜结构域加胞内域，跨膜结构域包括 CD80 跨膜域、CD86 跨膜域、CD4 跨膜域、CD8 跨膜域、VEGFR 跨膜域、PDGF-RB 跨膜域，优选为 CD80 跨膜域；胞内域包括 CD80 胞内域、CD86 胞内域、CD4 胞内域、CD8 胞内域、VEGFR 胞内域、PDGF-RB 胞内域、PDGF-RB 胞内域截短体，胞内域和跨膜域可以来自同一个基因组合或不同基因组合；优选为 CD80 跨膜域加 CD80 胞内域的组合。

根据本发明的具体实施方式，所述 mRNA 肿瘤疫苗还包含负载 mRNA 的核酸载体，所述核酸载体包括脂质体、LPP 或 LPX，优选为 LNP 纳米脂质体。

在另一方面，本发明还提供了一种药物组合物，其包含本发明的 mRNA 肿瘤疫苗和第二抗癌剂，所述第二抗癌剂包括免疫检查点抑制剂和/或双特异性 T 细胞衔接器(BiTE)。优选地，所述药物组合物还包含药学上可接受的辅料。

在又一方面，本发明还提供了本发明的 mRNA 肿瘤疫苗或药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的应用。在又一方面，本发明还提供了本发明的 mRNA 肿瘤疫苗或药物组合物在用于治疗或预防肿瘤中的应用。在又一方面，本发明还提供了一种治疗或预防受试者的肿瘤的方法，所述方法包括向所述受试者施用本发明的 mRNA 肿瘤疫苗或药物组合物。

根据本发明的具体实施方式，其中，所述肿瘤选自 B 细胞淋巴瘤、支气管癌、前列腺癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌症、外周神经系统癌症、食道癌、头颈癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、口腔癌、喉癌、唾液腺癌、胸腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、脂肪癌、睾丸癌、恶性纤维组织细胞瘤、结肠直肠癌、黑色素瘤、胃癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、胆管癌、小肠癌或阑尾癌、鳞状细胞癌、乳腺癌和卵巢癌。

有益效果

在本发明中，我们通过在 mRNA 中加入一段细胞膜锚定的 IL-12 序列，成功地提升了现有 mRNA 肿瘤疫苗的治疗效果。与直接表达游离的 IL-12 蛋白相比，细胞膜锚定形式的 IL-12 蛋白可以将 IL-12 限定在外周淋巴组织的抗原递呈细胞表面，在不影响 IL-12 佐剂效果的同时大大降低了 IL-12 蛋白释放到外周血中，显著降低了 IL-12 蛋白产生的

系统性毒性。在多种类型的肿瘤疫苗中，膜锚定的 IL-12 序列的加入都可以显著的提升 mRNA 疫苗的治疗效果。因此，我们认为，以膜锚定 IL-12 为基础的 mRNA 肿瘤疫苗有潜力成为新一代的肿瘤治疗性疫苗，并在多种临床肿瘤中实现更好的治疗效果。

附图说明

为了更清楚地说明本申请实施例中的技术方案，下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍。

图 1 显示 IL-12 可以作为佐剂促进 mRNA 疫苗的抗肿瘤效果。(A-E) C57BL/6J 小鼠(n=4-6)皮下接种 4×10^5 B16F10-OVA 细胞，在肿瘤接种后第 8 天和第 12 天通过肌肉注射接受 5μg 编码 OVA 的 mRNA。在接种疫苗后的 6 小时，将 2.5μg IL2-Fc（C）、5μg IL15-Fc（D）或 0.25μg IL12-Fc 蛋白(E)与海藻酸钠混合后肌肉注射到同一部位。(B) 在第一次接种疫苗后的第 9 天，采集外周血，通过流式细胞术分析计算 OVA 特异性 T 细胞的数量。(C-E) 每种治疗的肿瘤生长曲线如图所示。数据以均值±标准误(SEM)表示，来自两次独立实验。P 值通过双向方差分析结合 Bonfferoni 多重比较检验确定(C-E)。**P < 0.01，***P < 0.001，****P < 0.0001。

图 2 显示构建含游离或膜锚定 IL12 佐剂的 RNA 肿瘤疫苗。(A) 游离形式 sIL12-OVA 和膜锚定形式 mtIL12-OVA mRNA 疫苗的结构示意图。(B) DC2.4 细胞转染了 CTRL mRNA (上图)、mtEGFP-OVA RNA (中图) 或 mtIL12-OVA mRNA (下图)。转染后 24 小时，收集细胞并用 IL12p40 和抗 OVA 肽-MHC 复合物抗体染色，通过流式细胞术分析膜 IL12 或 OVA-pMHC 复合物的表达。(C) DC2.4 细胞转染了 mtIL12-OVA mRNA 或 sIL12-OVA mRNA，转染后 24 小时，收集细胞培养液以测量分泌的游离 IL12 浓度。

图 3 显示含膜锚定 IL12 佐剂的 RNA 肿瘤疫苗相较含游离性 IL12 佐剂的疫苗具有相似的抗肿瘤效果，但外周毒性更低。(A，B) C57BL/6J 小鼠(n=6)接种了 4×10^5 B16F10-OVA 细胞，在接种后第 8 天和第 12 天通过肌肉注射 2.5μg 编码 mtEGFP-OVA、mtIL12-OVA 或 sIL12-OVA 的 mRNA-LNP 疫苗。记录肿瘤生长曲线和小鼠生存曲线(A)和体重变化(B)。(C) C57BL/6J 小鼠(n=4)通过肌肉注射 2.5μg 编码 mtIL12-OVA 或 sIL12-OVA 的 mRNA，在注射后 24 小时和 48 小时收集血清，测量促炎细胞因子浓度。

图 4 显示 mtIL12 mRNA 疫苗特异性激活抗原特异性 T 细胞，但不影响旁观者 T 细胞或 NK 细胞。(A) C57/B6J 小鼠(n=4)通过肌肉注射 2.5μg 编码 mtIL12-OVA 或 sIL12-OVA 的 mRNA，在接种疫苗后 24 小时，解剖 dLNs，通过流式细胞术检测表面表达 IL12p40 的细胞亚群。(B) C57BL/6J 小鼠(n=4-5)过继转移 5×10^5 OT1 T 细胞，并在 1 天

后接种了 5μg 编码 mtEGFP-OVA、mtIL12-OVA 或 sIL12-OVA 的 mRNA 疫苗。在免疫后 42 小时，通过腹腔注射 50μL BFA。在免疫后 48 小时解剖并消化引流淋巴结(dLN)，通过流式细胞术检测 IFN-γ^+细胞。(C) C57BL/6J 小鼠通过肌肉注射接受了 5μg mtIL12 mRNA 或 5μg sIL12 mRNA。36 小时后，收集外周血，加入 BFA 溶液阻断 6 小时，然后流式细胞术分析 IFNγ 阳性的细胞亚群比例。

图 5 显示 mtIL12-OVA mRNA 疫苗相较单独的 OVA mRNA 或者 mtIL12 mRNA 具有更好的抗肿瘤效果。C57BL/6J 小鼠(n=6)接种 4×10^5 B16F10-OVA 细胞，携带肿瘤的小鼠在第 8 天和第 12 天通过肌肉注射 2.5μg 编码 mtEGFP-OVA、mtIL12-OVA 或 mtIL12 的 mRNA，记录了肿瘤生长曲线。

图 6 显示含膜锚定 IL12 佐剂的 RNA 肿瘤疫苗抗肿瘤效果依赖于 $CD8^+$ T 细胞。C57BL/6J 小鼠(n=6)接种了 4×10^5 B16F10-OVA 细胞，在接种后第 8 天和第 12 天肌肉注射 2.5μg 编码 mtIL12-OVA 的 mRNA 治疗。在治疗开始前一天，给予抗 NK1.1(200μg)、抗 CD8(200μg)、抗 CD4(200μg)和抗 CSF1R(500μg)抗体，并在接下来的两周内每周两次继续给药。记录肿瘤生长曲线(A)和生存曲线(B)。(C) C57BL/6J 小鼠在第 0 天和第 5 天通过肌肉注射接受了 2.5μg mtEGFP-OVA mRNA 或 2.5μg mtIL12-OVA mRNA。在第一次接种疫苗后的第 8 天测量引流淋巴结中 OVA 特异性 T 细胞，在第一次接种疫苗后的第 13 天测量脾脏中 OVA 特异性 T 细胞。

图 7 显示基于 mtIL12 的疫苗在 OVA 抗原模型中产生了更强的效应性 T 细胞。(A) B6 小鼠在第 0 天和第七天肌肉注射 2.5 ug mtEGFP-OVA 或者 mtIL12-OVA RNA 免疫，第 14 天取血进行流式分析。(B) 流式分析显示 IL12 免疫促进 OVA 特异性 T 细胞从前体表型(Ly108+ CD69-)到效应表型(Ly108- CD69-)分化。(C) 外周血细胞与 OT1 peptide (SIINFEKL)共孵育 3 小时后进行流式染色分析。结果发现 IL12 疫苗免疫产生的小鼠 OVA 特异性 T 细胞表达更高水平的效应分子(GZMB，IFN-gamma)，高表达效应 T 细胞特异性转录因子 T-bet，低表达免疫抑制性分子 PD-1。(D) mtEGFP-OVA 或者 mtIL12-OVA 免疫完的小鼠中分选同等数量的 OVA 特异性 T 细胞，并与不同浓度的 OT1 peptide(SIINFEKL)共孵育，4 小时后测量培养上清中 IFN-gamma 的浓度。

图 8.显示顺式递送 IL12 和抗原可以产生更多的抗原特异性 T 细胞。(A) B6 小鼠在第 0 天和第 7 天静脉注射 2ug mtEGFP-OVA，2ug mtEGFP-OVA+1ug mtIL12 和 1ug mtEGFP-OVA+1ug mtIL12-OVA RNA-LNP，第 14 天取血进行流式分析。(B) 流式分析显示顺式递送 IL12 和抗原疫苗治疗的小鼠(1ug mtEGFP-OVA+1ug mtIL12-OVA)产生了更高数目的外周血抗原特异性 T 细胞。

图 9 显示膜结合型 IL12 佐剂 mRNA 疫苗克服免疫检查点阻断耐药性。(A) C57BL/6J 小鼠(n=6)皮下接种 4×10^5 B16F10-OVA 细胞，在肿瘤接种后第 11 天和第 15 天接受了 2.5μg 编码 mtIL12-OVA 的 mRNA 治疗。在第一次接种疫苗后的第 6 天，给予抗 CTLA4(200μg)和抗 PD1(200μg)，并持续两周，每周两次。记录了肿瘤生长曲线和小鼠存活率。

图 10 显示 mtIL12-E7 疫苗抑制 HPV 相关的 TC-1 肿瘤生长。C57BL/6J 小鼠(n=6)接种了 4×10^5 TC-1 细胞，携带肿瘤的小鼠在第 14 天肌肉注射 1μg 编码 mtEGFP-E7、mtIL12-E7 或 mtIL12 的 mRNA 治疗，并在第 20 天用 2μg 相同 mRNA 疫苗进行加强免疫。记录了肿瘤生长曲线和小鼠存活率(A)，以及体重变化(B)。可以看到在晚期 TC-1 肿瘤携带小鼠中，对照 E7 疫苗或 mtIL12 单独治疗均未能控制肿瘤生长。然而，尽管 TC-1 肿瘤在两次 mtIL12-E7 疫苗接种后继续生长至约 500 mm^3，但肿瘤最终消退，约 80% 的肿瘤成功根除(A)。重要的是，与未治疗组相比，接受 mtIL12-E7 mRNA 疫苗治疗的小鼠没有显著的体重下降(B)。

图 11 显示基于 mtIL12 的疫苗在 E7 抗原模型中产生了更强的效应性 T 细胞。(A). TC-1 荷瘤小鼠在肿瘤种植第 12 天肌肉注射 2.5 ug mtEGFP-E7，第 18 天肌肉注射 2.5 ug mtEGFP-E7 或者 2.5ug mtIL12-E7 免疫，第 22 天取肿瘤进行流式分析。(B). 流式分析展示抗原特异性 T 细胞的圈门和部分表面标志表达。(C). 流式分析显示 IL12 免疫促进 E7 特异性 T 细胞的肿瘤内富集，并且相对于 mtGFP-E7 免疫产生的 T 细胞，mtIL12-E7 免疫产生的 T 细胞更多停留在效应状态(LY108-CD69-)而不是耗竭状态(LY108-CD69+)，并且表达更高的效应分子 GZMB，和更低的抑制性标志 PD1。

图 12 显示 mtIL12 佐剂可以应用到内源性逆转录病毒来源的肿瘤新抗原的 mRNA 疫苗设计。P15E 蛋白，源自 gp70 逆转录病毒基因表达，在许多癌症中被检测到，包括 MC38 结肠腺癌细胞系(Ye 等人，2020)。第 0 天将 $4X10^5$ 的 MC38 肿瘤细胞皮下注射到 C57BL/6J 小鼠中。肿瘤形成后，在第 12 和第 16 天小鼠肌肉注射 2.5μg 的 mtIL12-p15E 或者对照 mtEGFP-p15E mRNA-LNP，每周监测两次肿瘤生长曲线。结果如图 7 所示对照 P15E mRNA 疫苗治疗几乎不能抑制肿瘤生长，而 mtIL12-P15E 治疗诱导了显著的肿瘤消退和完全根除(图 7)。

图 13 显示基于 mtIL12 的疫苗在 p15E 抗原模型中产生了更强的效应性 T 细胞。(A).MC38 荷瘤小鼠在肿瘤接种后第 12 天肌肉注射 2.5 ug mtEGFP-p15E mRNA，第 18 天进行 2.5 ug mtEGFP-p15E 或者 2.5ug mtIL12-p15E mRNA 疫苗再次免疫，第 21 天取外周血进行流式分析。(B). 流式分析显示 mtIL12-p15E 免疫产生了更多的 p15E 抗原特

异性 T 细胞，并且相对于 mtEGFP-p15E 免疫产生的 T 细胞，mtIL12-p15E 免疫产生的 T 细胞表达更高的效应分子 GZMB 和 IFN-gamma，和更低的抑制性标志 PD1。

具体实施方式

本发明提供了一种编码膜型 IL-12 细胞因子佐剂的 mRNA 肿瘤疫苗，其中，所述 mRNA 包含编码 IL-12 的序列(IL12)、编码膜结构域的序列(MD)以及编码肿瘤抗原的序列(Ag)三部分。

根据本发明的具体实施方式，所述编码 IL-12 的序列(IL12)和所述编码膜结构域的序列(MD)位于一条 mRNA 上，所述编码肿瘤抗原的序列(Ag)位于另一条 mRNA 上；或者所述编码 IL-12 的序列(IL12)、编码膜结构域的序列(MD)以及编码肿瘤抗原的序列(Ag)位于同一条 mRNA 上，所述三部分的排列顺序为 IL12-L1-MD-L2-Ag，或 Ag-L2-IL12-L1-MD；其中 L1 为 Glycine/Serine 多肽连接子，L2 为 IRES 序列或 Glycine/Serine 或 2A 多肽连接子。

优选的是，所述编码 IL-12 的序列(IL12)、编码膜结构域的序列(MD)以及编码肿瘤抗原的序列(Ag)位于同一条 mRNA 上。这是因为同一 mRNA 可保证 IL12、MD 和 Ag 在同一细胞内同时表达，避免因两条 mRNA 转染效率差异导致部分细胞仅表达 IL-12-MD 或 Ag，能更精准地实现三者的同步表达，保证它们在量和时间上的协调性，有利于发挥它们之间的协同作用。另外，能够优化生产流程和降低生产成本，单条 mRNA 的合成、纯化及质控成本显著低于两条独立 mRNA 的并行生产，在基因治疗等实际应用中，只需要递送一条 mRNA 进入细胞，相比于递送两条 mRNA，操作更简单，递送效率更高，也降低了因递送多条 mRNA 带来的载体容量限制、细胞摄取差异等问题，提高了治疗的可行性和可操作性。单一分子结构也更容易保证稳定性(如避免两条 mRNA 的降解速率差异)，且批次间一致性更高。

本发明中描述的肿瘤抗原可以包括突变来源的肿瘤新抗原如 KARS G12C、KRAS G12D、EGFRvIII 和 $BRAF^{V600E}$；病毒来源的肿瘤特异性抗原如 HPV E6/E7、内源性逆转录病毒抗原(hERT)、LMP1 和 LMP2；肿瘤高表达的相关抗原如 WT1、MAGE-A3、GP100、NY-ESO-I、HER2/Neu、Claudin18.2、Mesothelin 和 MUC 等。可以根据肿瘤特异性抗原而改变抗原种类。卵清蛋白(OVA)是一种蛋白抗原，广泛用于在癌症免疫治疗中引发细胞和体液免疫反应，在本领域中常用作肿瘤模式抗原。在本发明的实施例中，以 OVA 作为肿瘤特异性抗原的实例。

白细胞介素-12 (IL-12)是由两个独立基因 IL-12A (p35)和 IL-12B (p40)编码的一种多

效能细胞因子，它们以一种活性异源二聚体(p70)或 p40 的同型二聚体(p80)形式存在。在本发明中，IL-12B 和 IL-12A 通过多肽接头(linker)连接，所述 linker 包括 Gly/Ser linker，所述 Gly/Ser linker 包含(GnS)m，其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20 且 m 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20；在本发明的实施例中，IL-12 细胞因子的两个亚基通过$(G4S)_3$ linker 连接。

本发明的膜结构域可以为跨膜结构域加胞内域，跨膜结构域包括 CD80 跨膜域、CD86 跨膜域、CD4 跨膜域、CD8 跨膜域、VEGFR 跨膜域、PDGF-RB 跨膜域，优选为 CD80 跨膜域；胞内域包括 CD80 胞内域、CD86 胞内域、CD4 胞内域、CD8 胞内域、VEGFR 胞内域、PDGF-RB 胞内域、PDGF-RB 胞内域截短体，胞内域和跨膜域可以来自同一个基因组合或不同基因组合。例如，可以使用下述跨膜域序列和胞内域序列相加，但是本发明不限于此：

1. 人 CD8A 跨膜域，IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCY (SEQ ID NO: 85)

2. 人 PDGF-RB 跨膜域，VVISAILALVVLTIISLIILI (SEQ ID NO: 3)

3. 人 CD80 跨膜域，LLPSWAITLISVNGIFVICCL (SEQ ID NO: 5)

4. 人 CD86 跨膜域，WITAVLPTVIICVMVFCLILW (SEQ ID NO: 7)

5. 鼠 CD80 跨膜域，TLVLFGAGAVITVVVIVVII (SEQ ID NO: 9)

6. 人 CD8A 胞内域(ICD)氨基酸序列，LYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV (SEQ ID NO: 11)

7. 人 PDGF-RB 胞内域(ICD)氨基酸序列，

QKKPRYEIRWKVIESVSSDGHEYIYVDPMQLPYDSTWELPRDQLVLGRTLGSGAFGQWEATAHGLSHSQATMKVAVKMLKSTARSSEKQALMSELKIMSHLGPHLNWNLLGACTKGGPIYIITEYCRYGDLVDYLHRNKHTFLQHHSDKRRPPSAELYSNALPVGLPLPSHVSLTGESDGGYMDMSKDESVDYVPMLDMKGDVKYADIESSNYMAPYDNYVPSAPERTCRATLINESPVLSYMDLVGFSYQVANGMEFLASKNCVHRDLAARNVLICEGKLVKICDFGLARDIMRDSNYISKGSTFLPLKWMAPESIFNSLYTTLSDVWSFGILLWEIFTLGGTPYPELPMNEQFYNAIKRGYRMAQPAHASDEIYEIMQKCWEEKFEIRPPFSQLVLLLERLLGEGYKKKYQQVDEEFLRSDHPAILRSQARLPGFHGLRSPLDTSSVLYTAVQPNEGDNDYIIPLPDPKPEVADEGPLEGSPSLASSTLNEVNTSSTISCDSPLEPQDEPEPEPQLELQVEPEPELEQLPDSGCPAPRAEAEDSFL (SEQ ID NO: 13)

8. 截短的人 PDGF-RB 胞内域(ICD)氨基酸序列

QKKPRYEIRWKVIESVSSDGHE (SEQ ID NO: 15)

9. 人 CD80 胞内域(ICD)氨基酸序列

TYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO: 17)

10. 人 CD86 胞内域(ICD)氨基酸序列

KWKKKKRPRNSYKCGTNTMEREESEQTKKREKIHIPERSDEAQRVFKSSKTSSC DKSDTCF (SEQ ID NO: 19)

11. 鼠 CD80 胞内域(ICD)氨基酸序列

KCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQTVFL (SEQ ID NO: 21)

下面结合具体实施例，对本发明作进一步详细的阐述，下述实施例不用于限制本发明，仅用于说明本发明。以下实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，下述实施例中所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

实施例

我们想知道 T 细胞刺激细胞因子是否能够快速扩增抗原启动的 CTLs，并有效增强抗肿瘤免疫反应。尽管 IL-2 对 T 细胞激活至关重要，IL-15 能够高效扩增 T 细胞数量(Guo 等人，2021；Zou 等人，2024)，但在 mRNA 疫苗的背景下，我们观察到这些细胞因子对增强抗肿瘤活性的作用有限。IL-12 能够诱导 Th1 型免疫微环境，促进具有肿瘤杀伤能力的 CD8+ T 细胞分化(Hewitt 等人，2020；Tucker 等人，2020；Tugues 等人，2015；Zou 等人，2024)。值得注意的是，我们观察到 IL-12 是增强 mRNA 癌症疫苗抗肿瘤效果的最有效细胞因子佐剂。为了优化 IL-12 的刺激效应并减少外周毒性，我们设计了一种表达肿瘤抗原和膜结合型 IL-12 佐剂的 mRNA 疫苗。我们的研究结果揭示了 IL-12 诱导并扩增了一种未被充分研究的预效应 T 细胞亚群。我们进一步探讨了 mtIL-12 如何提供强大的抗肿瘤反应，同时将毒性降至最低。

材料和方法

小鼠和细胞系：

C57BL/6J，BALB/c，C57BL/6J-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J (OT1 TCR transgenic)小鼠，6-8 周龄，购自维通利华或者 Jackson Laboratory。小鼠饲养在 SPF 环境，所有动物实验

符合清华大学实验动物管理实施细则。

MC38、B16F10、TC-1 和 DC2.4 细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。Freestyle 293-F(R79007)购自 Invitrogen。B16F10-OVA 细胞系是通过慢病毒表达 OVA 后从单细胞克隆中筛选得到的。所有细胞系均常规检测支原体污染。MC38、B16F10 和 TC-1 细胞在含有 10%热灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中培养，条件为 37°C、5% CO_2。DC2.4 细胞在含有 10%热灭活胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1 mmol/L MEM 非必需氨基酸、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中培养，条件为 37°C、5% CO_2。293-F 细胞在 SMM 293-TI 培养基(M293TI；Sino Biological)中培养。

试剂：

抗 CD4(克隆 GK1.5)、抗 CD8(克隆 53-5.8)、抗 mCSF1R(克隆 AFS98)、抗 NK1.1(克隆 PK136)、抗 PD-L1 抗体(10F.9G2)、抗 mCTLA4(克隆 4F10)和抗 mIL12p75(克隆 JR2-9A5)购自 Bio X Cell。IL2-Fc、IL15-Fc 和 IL12-Fc 为本实验室自行生产。具体方法为：将细胞因子编码序列与人类 IgG1 Fc 片段通过 GGGGS 连接子融合，并克隆到 pEE12.4 载体中。将编码蛋白的质粒转染到 293F 细胞中，上清液通过 Protein-A 亲和层析(GE Healthcare)纯化，按照既定协议进行操作。

小鼠肿瘤模型建立和治疗：

MC38 细胞(4×10^5)、TC-1 细胞(3×10^5)和 B16F10-OVA 细胞($2\text{-}5\times10^5$)细胞接种到小鼠的右侧背部皮下，肿瘤建立后，每周三次测量肿瘤的长(a)，宽(b)，计算肿瘤体积=a*b*b/2。小鼠按肿瘤大小随机分组。小鼠在特定的时间点注射 1-5 μg 不同编码区的 mRNA-纳米脂质体复合物，或者脂质体空载对照。删除不同细胞亚群实验，从 mRNA 疫苗接种前一天开始，每 3 天腹腔注射 200 μg 抗 CD8 抗体、200 μg 抗 CD4 抗体、200 μg 抗 NK1.1 抗体、或 500 μg 抗 CSFIR 抗体。在 mRNA 疫苗接种后 6 小时，将 2 μg IL2-Fc、3.5 μg IL15-Fc 和 0.25 μg IL12-Fc 与海藻酸钠混合后肌肉注射。从首次 mRNA 疫苗接种后第 6 天开始，每 3 天腹腔注射 200 μg 抗 PD-L1 抗体和 200 μg 抗 CTLA4 抗体。

当肿瘤的长、宽或高超过 2cm，或者肿瘤大小超过 1500mm^3，或者荷瘤小鼠体重下降超过 20%时，处死小鼠。

流式细胞术分析

细胞消化离心后制成细胞悬液，先加入 anti-FcgRIII/II (克隆 2.4G2)抗体冰上放置 15min 阻断非特异结合，然后加入相应的荧光偶联抗体 4° C 避光放置 30min 染色。

Fixable viability Dye eFluorTM 506 或者 Dye eFluorTM 780 染色用来排除死细胞。染色后 PBS 洗去游离抗体，进行流式细胞上机实验，数据使用 FlowJo 软件(Treestar)进行分析。

流式微球阵列(Cytometric Bead Array，CBA)和 ELISA 分析血清和组织样本

CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Kit (BD Biosciences)依据说明书操作测量小鼠血清和肿瘤组织匀浆中的细胞因子水平。ELISA 采用 96 孔微孔板(Corning Costar)，2 μg/mL(100 μL/孔)捕获抗体加入到板中 4° C 过夜吸附。PBS 洗板，然后加入封闭液(PBS 含 0.05% TWEEN-20 和 5%脱脂牛奶)封闭后，加入用封闭液稀释的血清或肿瘤匀浆液，37 ° C 放置 1.5 小时。PBST 洗板后加入碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase)标记的 Goat Anti-Human IgG 二抗，37 ° C 放置 50min。PBST 洗板后加入 100 μL p-Nitrophenyl Phosphate 显色后用 SPECTROstar Nano (BMG LABTECH)，在 405nm 波长读板。

T 细胞体外培养和过继细胞转移：

为了在体外生成激活的 OT-I 细胞毒性 T 细胞(CTLs)，从小鼠脾细胞中用 1 mM SIINFEKL 肽(New England Peptide)以 10^8 细胞/mL 的浓度刺激。肽脉冲 2 小时后，洗去肽，将脾细胞以 10^6 细胞/mL 的浓度在 T 细胞培养基中培养，添加 5 ng/mL 小鼠重组 IL-2(mrIL-2)和 10 ng/mL mrIL-12(R&D)，或仅添加 5 ng/mL mrIL-2，并每日补充。在第 4 天，将 2×10^6 Ficoll 分离的活 OT-1 细胞通过静脉注射过继转移到 B16-OVA 肿瘤小鼠中。

对于体内细胞转移实验，将 10^5 个幼稚 OT1 细胞转移到幼稚小鼠中，并在细胞转移后 24 小时用 10 μg mtEGFP-OVA 或 mtIL12-OVA mRNA 疫苗进行免疫。免疫后第 7 天，从小鼠脾脏中分离出激活的 OT-1 细胞，纯化后将 5×10^5 个 OT-1 细胞通过静脉注射转移到 B16-OVA 肿瘤小鼠中。

mRNA 生产

包含 mRNA 完整序列并且携带 poly-A 序列的 DNA 质粒通过酶切法制备体外转录模板，模板通过 HiSynth® T7 Co-transcription RNA Synthesis Kit (C3111)进行共转录加帽。体外转录生产的 mRNA 通过纤维素法去除双链 RNA，并储存于-80 冰箱以待后续实验。

mRNA 纳米脂质体包装：

mRNA 被溶解于 pH=4.0 的 100 毫摩柠檬酸钠缓冲液中。DSPC，胆固醇，DMG-PEG2000，SM102 以 38.5：10：1.5：50 的摩尔比溶解在无水乙醇中。调整 LNP 和 RNA 质量比为 30：1-50：1，然后将溶于柠檬酸钠溶液的 RNA 和溶于无水乙醇的 LNP 混合物以 3：1 体积比用微流控系统混合，制备为 mRNA-LNP 纳米脂质体。将 mRNA 纳米脂质体溶液放入 PBS 缓冲液中透析，透析完成的 mRNA 纳米脂质体可以用于体内外动物实验。

数据分析

荷瘤小鼠治疗前，根据肿瘤体积随机分配到不同组。数据使用 GraphPad Prism 统计软件分析，展示为平均值± SEM。肿瘤曲线用 two-way ANOVA 分析方法计算 P 值，小鼠存活曲线用 Log-rank test 分析计算 P 值，其他数据用 unpaired two-tailed t-tests 检验分析。$p < 0.05$ 代表有显著性差异。

结果示于以下实施例中。

实施例 1. IL-12 增强 mRNA 肿瘤疫苗的疗效以实现优越的肿瘤控制

有效诱导、激活和分化 CD8+ T 细胞需要除了 TCR-pMHC 识别和共刺激信号之外的第三信号(Tugues 等人，2015)。尽管目前的 mRNA-LNP 疫苗能够扩增大量肿瘤特异性 CD8+ T 细胞(图 1 的 A-B，序列 S1 (SEQ ID NO: 69))，但它们仅部分抑制肿瘤生长(图 1 的 C-E)。已知这种 mRNA 疫苗能够诱导高水平的 IL-1β、IL-6 和 I 型干扰素，从而促进免疫激活(Li 等人，2022)。然而，这些细胞因子可能无法有效激活 CD8+ T 细胞以实现最佳的肿瘤控制。为了确定能够与 mRNA 疫苗协同作用的关键细胞因子信号，我们分别筛选了几种 T 淋巴细胞刺激细胞因子，包括 IL2、IL15 和 IL12，以用于肿瘤治疗。这些细胞因子已知可以通过不同的下游转录因子促进 T 细胞增殖、激活或效应分化(Propper 和 Balkwill，2022)。为了将这些细胞因子递送至引流淋巴结(dLN)以协助 T 细胞启动，我们将特定的 Fc 融合细胞因子与 mRNA 疫苗共同肌肉注射到肿瘤携带小鼠的同一部位(图 1 的 A)。尽管 IL-2 和 IL-15 未能进一步增强 mRNA 疫苗的抗肿瘤效果(图 1 的 C-D)，但 IL-12 显著增强了疫苗的疗效，导致明显的肿瘤抑制(图 1 的 E)。这些结果促使我们将 IL-12 作为佐剂纳入 mRNA 疫苗中，以更好地激活抗原特异性 T 细胞并改善肿瘤控制。

实施例 2. 膜结合型 IL-12 基 mRNA 疫苗实现优越的抗肿瘤疗效且毒性有限

为了研究 IL-12 作为 mRNA 疫苗佐剂的潜力，我们构建了一种 IL12-OVA 融合 mRNA 疫苗，用于治疗表达 OVA 的 B16F10-OVA 肿瘤模型。在此构建中，IL-12 的分泌型与 OT1 表位编码序列通过 2A 连接子连接(sIL12-OVA)(图 2 的 A，上图，序列 19，即 SEQ ID NO: 67)。对于对照 mRNA 疫苗，IL-12 编码序列被替换为免疫原性较低的 EGFP (Skelton 等人，2001)。已知 IL12 能够激活 CD4、CD8 和 NK 细胞，并诱导强效的 IFN-γ 分泌(Guo 等人，2012)。我们假设 sIL12-OVA mRNA 疫苗后翻译的 IL-12 蛋白的系统性扩散可能导致观察到的毒性(Hewitt 等人，2020)。为解决这一问题，我们进一步开发

了一种膜结合型 IL12(mtIL12)佐剂 mRNA 疫苗(mtIL12-OVA)，旨在将 IL-12 限制在 dLN 或脾脏中的抗原递呈细胞表面。在此构建中，IL-12 与 CD80 分子的跨膜结构域融合，然后通过 2A 连接子与肿瘤抗原连接(图 2 的 A，下图，序列 10，即 SEQ ID NO: 58)。体外转染 DC2.4 细胞证实 mtIL12-OVA mRNA 转染后可以在细胞表面同时呈递 OT-1 多肽/MHC-I 复合物和 IL-12 细胞因子(图 2 的 B，序列 10，即 SEQ ID NO: 58)。体外转染 sIL12-OVA mRNA 能够诱导 IL-12 分泌到培养上清中(图 2 的 C，序列 19，即 SEQ ID NO: 67)；而 mtIL12-OVA mRNA 转染证实 IL-12 锚定在细胞表面(图 2 的 B，序列 10，即 SEQ ID NO: 58)，几乎没有渗漏到上清液中(图 2 的 B-C)。

在 B16-OVA 肿瘤携带小鼠中，sIL12-OVA 疫苗显著改善了治疗效果并延长了肿瘤控制时间，与对照 mRNA 疫苗相比(图 3 的 A，sIL12-OVA 序列 19 (SEQ ID NO: 67)，对照序列 S1 (SEQ ID NO: 69))。然而，sIL12-OVA mRNA 疫苗导致接种小鼠体重显著下降(图 3 的 B)，表明存在系统性毒性。在体内，mtIL12-OVA 显示出与 sIL12-OVA 相似的肿瘤生长抑制和延长生存的效果(图 3 的 A，mtIL12-OVA 序列 10 (SEQ ID NO: 58)，sIL12-OVA 序列 19 (SEQ ID NO: 67))，值得注意的是，mtIL12-OVA 给药并未加剧与可溶性 IL12 相关的毒性，与对照 OVA mRNA 治疗组小鼠一样，体重短暂下降后快速恢复(图 3 的 B)。与 sIL12-OVA 相比，mtIL12-OVA 诱导的血清 IL-12、IFN-γ 和 MCP-1 水平显著降低(图 2 的 C)。且 IL-12 仅在 dLN 内的单核细胞、树突状细胞和巨噬细胞表面检测到(图 4 的 A)。这些结果表明，膜结合型 IL12 有效地将 IL-12 限制在 APCs 表面，防止其释放到外周组织。

为了进一步阐明为什么 mtIL12 佐剂疫苗能够有效分离毒性副作用与增强的抗肿瘤效果，我们进行了实验，将 1×10^6 OT-1 TCR 转基因 CD8 T 细胞分选并转移到野生型(WT)小鼠中，随后用对照 OVA、sIL12-OVA 或 mtIL12-OVA mRNA 疫苗进行免疫(图 4 的 B 和 4C，序列 S1(SEQ ID NO: 69)，10 (SEQ ID NO: 58)，19 (SEQ ID NO: 67))。与对照 OVA 疫苗相比，sIL12-OVA 和 mtIL12-OVA 疫苗在 dLN 中诱导了相当数量的抗原特异性 IFN-γ 阳性的细胞(图 4 的 B)。然而，sIL12-OVA 疫苗还在 dLN(图 4 的 B)和外周血(图 4 的 C)中诱导了更高数量的 IFN-γ 阳性的旁观者 CD8+ T 细胞、CD4+ T 细胞和 NK 细胞，而 mtIL12-OVA 组中未观察到这种现象。这种差异可能解释了 sIL12-OVA 组中更高的血清 IFN-γ 水平和外周毒性，而 mtIL12-OVA 组中未观察到这些现象。综上所述，这些结果表明，膜结合型 IL-12 细胞因子佐剂的 mRNA 疫苗能够显著增强抗肿瘤效果，同时最小化不良反应。

在体内，mtIL12-OVA mRNA 疫苗治疗效果优于单独使用 OVA-mRNA 或着单独的

mtIL12 mRNA 治疗(图 5，序列 S1 (SEQ ID NO: 69)，序列 19 (SEQ ID NO: 67)，序列 S15 (SEQ ID NO: 83))，表明 IL-12 细胞因子和抗原的同时呈递协同增强了抗肿瘤效果。

实施例 3. 基于 mtIL12 的 mRNA 疫苗依赖 CD8 T 细胞实现肿瘤控制并诱导独特的预效应 CD8 T 细胞亚群

基于 IL-12 的疗法可以作用于多种免疫细胞类型，包括 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、NK 细胞和巨噬细胞，以优化肿瘤控制(Xue 等人，2022)。为了确定哪些细胞亚群对于 mtIL12-OVA mRNA 疫苗介导的肿瘤控制是必需的，我们使用抗体选择性地删除特定免疫细胞亚群。删除 NK 细胞、CD4+ T 细胞或巨噬细胞并未影响疫苗的抗肿瘤效果(图 6 的 A 和 B，序列 19 (SEQ ID NO: 67))。相比之下，CD8+ T 细胞的删除极大地削弱了疫苗介导的肿瘤抑制和小鼠生存获益，表明 CD8+ T 细胞反应对于疫苗的抗肿瘤效果至关重要。

我们进一步探索了 mtIL12-OVA 疫苗增强抗肿瘤效果的细胞和分子机制。与对照 OVA mRNA 疫苗相比，mtIL12-OVA 疫苗免疫后在引流淋巴结和脾脏中诱导了更高比例的抗原特异性 CD8+ T 细胞(图 6 的 C)。

进一步我们通过流式细胞术分析 T 细胞分化阶段，我们采用了一种基于 Ly108 和 CD69 的分群策略，该策略可以区分慢性感染或肿瘤模型中抗原特异性 T 细胞的分化轨迹(Beltra 等人，2020)。C57BL/6J 小鼠在第 0 天和第 7 天肌肉注射 2.5 ug mtEGFP-OVA 或者 mtIL12-OVA RNA，第 14 天取血进行流式分析(图 7 的 A)。对照 OVA mRNA 主要诱导 Ly108+CD69- T 细胞亚群(前体状态)，而 mtIL12-OVA 疫苗主要在外周血中诱导 Ly108-CD69- T 细胞亚群(效应状态)(图 7 的 B)。与对照 OVA mRNA 组相比，mtIL12-OVA 疫苗组的 PBMCs 中 granzyme B 阳性或 IFN-γ 阳性 OVA 特异性 CD8+ T 细胞的比例显著更高(图 7 的 C)。此外，mtIL12-OVA 组中 OVA 特异性 CD8+ T 细胞表达效应 T 细胞转录因子 T-bet 的比例更高，而抑制性分子 PD-1 的水平更低(图 7 的 C)。为了进一步验证这些细胞的功能能力，我们从 mtIL12-OVA 或对照 OVA mRNA 疫苗免疫过的小鼠中分离脾细胞，用不同稀释度的 SIINFEKL 肽刺激，并通过 ELISA 分析 IFN-γ 分泌。两组的基线 IFN-γ 分泌量均较低，但在肽刺激后，两组的脾细胞均以剂量依赖性方式分泌 IFN-γ，且 mtIL12-OVA 组检测到的量显著更高(图 7 的 D)。这些结果表明，mtIL12-OVA 疫苗诱导的外周抗原特异性 T 细胞是具有高度效力的预效应 T 细胞，它们在重新遇到抗原时表现出更高的敏感性和更强的效应反应，从而与传统 OVA mRNA 疫苗相比实现了增强的肿瘤抑制。

接下来我们分析 mtIL12 和 OVA 抗原串联在一起的设计(mtIL12-OVA)是否比两者的简单混合应用(OVA+mtIL12)免疫效果更好。B6 小鼠在第 0 天和第 7 天静脉注射 2ug mtEGFP-OVA，2ug mtEGFP-OVA+1ug mtIL12 或 1ug mtEGFP-OVA+1ug mtIL12-OVA RNA-LNP，第 14 天取血进行流式分析(图 8 的 A)。 流式分析显示顺式递送 IL12 和抗原的小鼠(OVA+ mtIL12-OVA)产生了更高比例和数目的外周血抗原特异性 T 细胞(图 8 的 B，序列 S1 (SEQ ID NO: 69)，序列 19 (SEQ ID NO: 67)，序列 S15 (SEQ ID NO: 83))。

实施例 4. 膜结合型 IL12 佐剂 mRNA 疫苗克服免疫检查点阻断耐药性

免疫检查点阻断(ICB)疗法在临床环境中显示出有希望的治疗结果(Hargadon 等人，2018)，然而，只有少数患者能够有效响应(Sharma 等人，2017)。耐药性的一个机制是“免疫冷”肿瘤中缺乏足够的肿瘤浸润性淋巴细胞(TILs)。我们认为，mtIL12 佐剂 mRNA 癌症疫苗可以通过向免疫冷肿瘤中提供足够的抗原特异性 TIL 来克服 ICB 疗法的耐药性。为了验证，我们在 B16-OVA 肿瘤携带小鼠中用 mtIL12-OVA(图 9 的 A，序列 19，SEQ ID NO: 67)或 ICB 抗体(抗 PD-L1 加抗 CTLA4)进行治疗，这些肿瘤已经充分建立。尽管 ICB 疗法单独对肿瘤生长和生存几乎没有影响，但 mtIL12-OVA 疫苗显著抑制了肿瘤生长。此外，将 mtIL12-OVA 与 ICB 疗法联合使用进一步改善了肿瘤抑制并延长了生存时间(图 9 的 A)。

实施例 5. 膜结合型 IL12 佐剂适用于 HPV 相关肿瘤的 E6/E7 抗原的疫苗设计

我们进一步研究了膜结合型 IL12 佐剂 mRNA 疫苗的设计是否可以扩展到临床上相关的肿瘤特异性抗原。E6 和 E7 癌蛋白直接参与了 HPV 诱导的致癌过程，无论是在临床前还是临床环境中。尽管对 E6/E7 靶向治疗性疫苗的研究广泛，但进展有限(Grunwitz 等人，2019；Peng 等人，2021)。我们在模拟 HPV 相关癌症的 TC-1 肿瘤小鼠模型中比较了对照 E7 mRNA 疫苗与 mtIL12-E7 疫苗的治疗效果(Lin 等人，1996)。在晚期晚期 TC-1 肿瘤携带小鼠中，对照 E7 疫苗或 mtIL12 单独治疗均未能控制肿瘤生长(图 10 的 A，序列 S15(SEQ ID NO: 83)，序列 S4 (SEQ ID NO: 72)，序列 18(SEQ ID NO: 66))。然而，尽管 TC-1 肿瘤在两次 mtIL12-E7 疫苗接种后继续生长至约 500 mm^3，但肿瘤最终消退，约 80%的肿瘤成功根除(图 10 的 A)。重要的是，与未治疗组相比，接受 mtIL12-E7 mRNA 疫苗治疗的小鼠没有显著的体重下降(图 10 的 B)。

TC-1 荷瘤小鼠在肿瘤种植第 12 天被 2.5 ug mtEGFP-E7，第 18 天被 2.5 ug mtEGFP-E7 或者 2.5ug mtIL12-E7 免疫，第 22 天取肿瘤组织进行流式分析(图 11 的 A)。 结果显

示 IL12 免疫促进 E7 特异性 T 细胞的肿瘤内富集，并且相对于 mtGFP-E7 免疫产生的 T 细胞，mtIL12-E7 免疫产生的 T 细胞更多停留在效应状态(LY108-CD69-)而不是耗竭状态(LY108-CD69+)，并且表达更高的效应分子 GZMB，和更低的抑制性标志 PD-1(图 11 的 C).

实施例 6. 膜结合型 IL12 佐剂适用于逆转录病毒来源的肿瘤新抗原的疫苗设计

内源性逆转录病毒(ERVs)基因整合到宿主基因组中，并在健康组织中通常保持沉默，但在癌症等病理条件下其表达被重新激活(Cherkasova 等人，2013；Smith 等人，2018)。这些重新激活的 ERV 蛋白为癌症疫苗开发提供了可行的靶点。P15E 蛋白，源自 gp70 逆转录病毒基因表达，在许多癌症中被检测到，包括 MC38 结肠腺癌细胞系(Ye 等人，2020)。C57BL/6 小鼠皮下接种 $4X10^5$ 的 MC38 肿瘤，小鼠在肿瘤形成后第 12 和第 16 天肌肉注射 2.5 μg 的 mtIL12-p15E 或者对照 mtEGFP-p15E mRNA-LNP，每周监测两次肿瘤生长曲线。结果如图 12 所示对照 P15E mRNA 疫苗治疗对肿瘤生长的影响最小，而 mtIL12-P15E 治疗诱导了显著的肿瘤消退和完全根除(图 12，序列 S5(SEQ ID NO: 73)，序列 S9 (SEQ ID NO: 77))。

MC38 荷瘤小鼠在肿瘤种植第 12 天肌肉注射 2.5 ug mtEGFP-p15E，第 18 天肌肉注射 2.5 ug mtEGFP-p15E 或者 2.5ug mtIL12-p15E 免疫，第 21 天取外周血进行流式分析(图 13 的 A)。结果显示相较于 mtEGFP-P15E mRNA 疫苗，mtIL12-P15E 免疫产生了更多的 p15E 抗原特异性 T 细胞，并且相对于 mtGFP-p15E 免疫产生的 T 细胞，mtIL12-p15E 免疫产生的 T 细胞表达更高的效应分子 IFN-gamma，和更低的免疫抑制性分子 PD-1.

总之，这些实验表明，基于 mtIL12 的疫苗策略适用于针对多种临床上相关的抗原表位进行癌症治疗。

讨论：

细胞因子在 T 细胞激活过程中作为第三信号发挥作用。mRNA-LNP 的自佐剂效应主要诱导产生促炎症细胞因子，包括 IL-1β、IL-6 和 I 型干扰素(Li 等人，2022；Tahtinen 等人，2022)，这些细胞因子可能无法最佳支持抗原特异性 CD8+ T 细胞反应。在筛选了多种 T 细胞刺激细胞因子后，我们发现 IL-12 是增强 mRNA 疫苗抗肿瘤效果的最有效细胞因子。

许多研究都集中在将 IL-12 局部递送至肿瘤微环境(TME)中，以增强抗肿瘤免疫反

应，同时减轻系统性毒性(Nguyen 等人，2020)。目前的临床方法包括通过瘤内转染编码 IL-12 的质粒或 mRNA 来实现(Hewitt 等人，2020；Telli 等人，2021)。然而，这些局部递送方法面临重大挑战，尤其是对于深部实体瘤，且仍存在 IL-12 扩散至循环系统的风险，导致毒性反应和治疗窗口受限。我们的研究表明，局部注射编码可溶性 IL-12 的 mRNA 会导致 IL-12 大量渗漏至血清中，从而引发随后的 IFN-γ反应，而 IFN-γ是与 IL-12 相关毒性密切相关的关键促炎症细胞因子。通过将 IL-12 通过跨膜结构域锚定在转染细胞表面，我们成功地将 IL-12 的治疗益处与系统性毒性分离。

T 细胞功能障碍的特征是肿瘤细胞通过既定机制逃避 T 细胞介导的细胞毒性(Zebley 等人，2024)。有研究表明，幼稚肿瘤特异性 T 细胞在进入 TME 后的数小时内会迅速获得功能障碍表型(Philip 等人，2017；Rudloff 等人，2023)。在我们的研究中，传统 mRNA 疫苗扩增了大量祖细胞样抗原特异性 T 细胞，但这些细胞表现出有限的抗肿瘤活性。我们推测，类似的机制可能阻碍了传统 mRNA 疫苗产生的祖细胞 T 细胞分化为功能性效应细胞。在 mRNA 疫苗的启动阶段引入 IL-12 信号，有助于抗原特异性 T 细胞分化为预效应表型。有趣的是，这些预效应 CD8+ T 细胞在循环中分泌的效应细胞因子很少，但在重新遇到肿瘤抗原时表现出更高的敏感性和更强的效应反应，这可能有助于解释其有限的外周毒性但增强的抗肿瘤效果。这些细胞还表现出较低水平的抑制性 PD-1，并显示出对抑制性 TME 的抵抗力，增强了抗肿瘤能力。

总之，将膜结合型 IL-12 作为佐剂显著增强了 mRNA 肿瘤疫苗的治疗效果，同时最小化了毒性。这种策略适用于多种临床上相关的肿瘤抗原，并具有相当的临床转化潜力。

本发明涉及的序列如下：

序列信息：

序号	名称	序列
跨膜域序列		
1	人CD8A 跨膜域(TM)氨基酸序列	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (SEQ ID NO: 1)
2	人CD8A 跨膜域(TM)cDNA序列	atttatatttgggcgccgctggcgggcacctgcggcgtgctgctgctgagcctggtgattacc (SEQ ID NO: 2)
3	人PDGF-RB跨膜域(TM)氨基酸序列	VVISAILALVVLTIISLIILI (SEQ ID NO: 3)
4	人PDGF-RB跨膜域(TM)cDNA序列	Gtggtgattagcgcgattctggcgctggtggtgctgaccattattagcctgattattctgatt (SEQ ID NO: 4)
5	人CD80 跨膜域(TM)氨基酸序列	LLPSWAITLISVNGIFVICCL (SEQ ID NO: 5)
6	人CD80 跨膜域(TM)cDNA序列	Ctgctgccgagctgggcgattaccctgattagcgtgaacggcatttttgtgatttgctgcctg (SEQ ID NO: 6)
7	人CD86 跨膜域(TM)氨基酸序列	WITAVLPTVIICVMVFCLILW (SEQ ID NO: 7)
8	人CD86 跨膜域(TM)cDNA序列	Tggattaccgcggtgctgccgaccgtgattatttgcgtgatggtgttttgcctgattctgtgg (SEQ ID NO: 8)
9	鼠CD80跨膜域(TM)氨基酸序列	TLVLFGAGAVITVVVIVVII (SEQ ID NO: 9)
10	鼠CD80跨膜域(TM)cDNA序列	Acactggtgctgtttggcgccggcttcggcgccgtgatcacagtggtggtcattgtggtcattatc (SEQ ID NO: 10)
胞内域序列		
1	人CD8A 胞内域(ICD)氨基酸序列	LYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV (SEQ ID NO: 11)
2	人CD8A 胞内域(ICD)cDNA序列	Ctgtactgcaaccaccggaatcggcggagagtgtgcaagtgccctagacctgtggtcaagagcggcgacaagcctagcctgagcgccagatatgtt(SEQ ID NO: 12)
3	人PDGF-RB胞内域(ICD)氨基酸序列	QKKPRYEIRWKVIESVSSDGHEYIYVDPMQLPYDSTWELPRDQLVLGRTLGSGAFGQWEATAHGLSHSQATMKVAVKMLKSTARSSEKQALMSELKIMSHLGPHLNWNLLGACTKGGPIYIITEYCRYGDLVDYLHRNKHTFLQHHSDKRRPPSAELYSNALPVGLPLPSHVSLTGESDGGYMDMSKDESVDYVPMLDMKGDVKYADIESSNYMAPYDNYVPSAPERTCRATLINESPVLSYMDLVGFSYQVANGMEFLASKNCVHRDLAARNVLICEGKLVKICDFGLARDIMRDSNYISKGSTFLPLKWMAPESIFNSLYTTLSDVWSFGILLWEIFTLGGTPYPELPMNEQFYNAIKRGYRMAQPAHASDEIYEIMQKCWEEKFEIRPPFSQLVLLLERLLGEGYKKKYQQVDEEFLRSDHPAILRSQARLPGFHGLRSPLDTSSVLYTAVQPNEGDNDYIIPLPDPKPEVADEGPLEGSPSLASSTLNEVNTSSTISCDSPLEPQDEPEPEPQLELQVEPEPELEQLPDSGCPAPRAEAEDSFL (SEQ ID NO: 13)
4	人PDGF-RB胞内域(ICD)cDNA序列	cagaagaagcccagatacgagatccggtggaaagtgatcgagagcgtgtcctccgatggccacgagtacatctacgtggaccccatgcagctgccctacgatagcacatgggagctgcccagagatcagctggtgctgggaagaacacttggctctggcgcctttggacagtgggaagccacagctcacggactgagccatagccaggccacaatgaaggtggccgtgaagatgctgaagtccaccgccagaagcagcgagaagcaggccctgatgagcgagctgaagatcatgagccacctgggacctcacctgaactggaatctgctgggcgcctgcacaaaaggcggccctatctacatcatcaccgagtactgcagatacggcgacctggtggactacctgcaccggaacaagcacacctttctgcagcaccacagcgacaagagaaggcctcctagcgccgagctgtactctaatgctctgcctgtgggactgcccctgcctagccatgtttctctgaccg

		gcgaatccgacggcggctacatggacatgagcaaggatgagagcgtggactacgtgcccatgctg gacatgaagggcgacgtgaagtacgccgacatcgagagcagcaactacatggcccccttacgacaa ttacgtgccaagcgctcccgagcggacctgtagagccacactgatcaatgagagccccgtgctgtc ctacatggatctcgtggggttcagctaccaggtggccaacggcatggaatttctggccagcaagaac tgcgtgcacagagatctggccgccagaaacgtgctgatctgcgagggcaagctggtcaagatctgc gactttggcctggccagagacatcatgcgggactccaactacatcagcaagggcagcaccttcctg cctctgaagtggatggcccctgagtccatcttcaacagcctgtacacaaccctgagcgacgtgtggt ccttcggcattctgctgtgggagatctttaccctcggcggcaccccttatcctgagctgcctatgaacg agcagttctacaacgccatcaagcggggctacagaatggcccagcctgctcatgccagcgacgag atctacgagatcatgcagaagtgttgggaagagaagttcgagatcaggcctccattcagccagctgg tcctgctgctggaaagactgctcggcgagggctacaagaaaaagtaccagcaggtcgacgaagag ttcctgcggagcgatcaccctgccatcctcagatctcaggccagactgcctggattccacggcctga gaagccctctggatacaagcagcgtgctgtacacagccgtgcagcccaacgagggcgacaacgat tacatcatccctctgcctgatcctaagcctgaggtggccgatgagggacctctggaaggatctccaa gcctggcctctagcaccctgaacgaagtgaacaccagctccaccatcagctgcgacagcccactg gaacctcaggatgagcctgagcctgaacctcagctggaactgcaggtcgagcccgagccagaact ggaacagctgcctgattctggctgccctgctcctagagccgaagccgaggatagctttctg (SEQ ID NO: 14)
5	截短的人PDGF-RB胞内域(ICD)氨基酸序列	QKKPRYEIRWKVIESVSSDGHE (SEQ ID NO: 15)
6	截短的人PDGF-RB胞内域(ICD)cDNA序列	Cagaagaagcccagatacgagatccggtggaaagtgatcgagagcgtgtcctccgatggccacg aa (SEQ ID NO: 16)
7	人CD80 胞内域(ICD)氨基酸序列	TYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO: 17)
8	人CD80 胞内域(ICD)cDNA序列	Acctactgcttcgcccctagatgcagagagcggcggagaaacgaacggctgagaagagaatctgt gcggcccgtt (SEQ ID NO: 18)
9	人CD86 胞内域(ICD)氨基酸序列	KWKKKKRPRNSYKCGTNTMEREESEQTKKREKIHIPERSDEAQ RVFKSSKTSSCDKSDTCF (SEQ ID NO: 19)
10	人CD86 胞内域(ICD)cDNA序列	Aagtggaagaagaagaaaaggccccggaacagctacaagtgcggcaccaacaccatggaacg ggaagagagcgagcagaccaagaagagagagaagattcacatcccgagcggagcgacgaag cccagagagtgtttaagagcagcaagaccagcagctgcgacaagagcgatacctgcttc (SEQ ID NO: 20)
11	鼠CD80 胞内域(ICD)氨基酸序列	KCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQTVFL (SEQ ID NO: 21)
12	鼠CD80 胞内域(ICD)cDNA序列	Aagtgcttctgcaagcacagatcctgtttcaggagaaatgaggccagcagagagacaaacaacag cctgacatttggccctgaggaggccctggccgagcagacagtgtttctg (SEQ ID NO: 22)
1	hIL12B cDNA序列	Atgtgccatcagcagctggtgattagctggtttagcctggtgtttctggcgagcccgctggtggcgat ttgggaactgaaaaaagatgtgtatgtggtggaactggattggtatccggatgcgccgggcgaaatg gtggtgctgacctgcgataccccggaagaagatggcattacctggaccctggatcagagcagcga agtgctgggcagcggcaaaaccctgaccattcaggtgaaagaatttggcgatgcgggccagtatac ctgccataaaggcggcgaagtgctgagccatagcctgctgctgctgcataaaaaagaagatggcat ttggagcaccgatattctgaaagatcagaaagaaccgaaaaacaaaaccttttctgcgctgcgaagcg aaaaactatagcggccgctttacctgctggtggctgaccaccattagcaccgatctgacctttagcgt gaaaagcagccgcggcagcagcgatccgcagggcgtgacctgcggcgcggcgaccctgagcg cggaacgcgtgcgcggcgataacaaagaatatgaatatagcgtggaatgccaggaagatagcgcg tgcccggcggcggaagaaagcctgccgattgaagtgatggtggatgcggtgcataaactgaaatat gaaaactataccagcagctttttttattcgcgatattattaaaccggatccgccgaaaaacctgcagctg aaaccgctgaaaaacagccgccaggtggaagtgagctgggaatatccggatacctggagcacccc gcatagctattttagcctgaccttttgcgtgcaggtgcagggcaaaagcaaacgcgaaaaaaaagat cgcgtgtttaccgataaaaccagcgcgaccgtgatttgccgcaaaaacgcgagcattagcgtgcgc gcgcaggatcgctattatagcagcagctggagcgaatgggcgagcgtgccgtgcagc (SEQ ID NO: 23)

2	mIL12B cDNA序列	Atgtgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgttttgctggtgtctccactcatggccatgt gggagctggagaaagacgtttatgttgtagaggtggactggactcccgatgcccctggagaaacag tgaacctcacctgtgacacgcctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggag tcataggctctggaaagaccctgaccatcactgtcaaagagtttctagatgctggccagtacacctgc cacaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctccacaagaaggaaaatggaatttgg tccactgaaatttttaaaaaatttcaaaaacaagactttcctgaagtgtgaagcaccaaattactccggac ggttcacgtgctcatggctggtgcaaagaaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagtagcag ttcccctgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctgcagagaaggtcacactggac caaagggactatgagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggag accctgcccattgaactggcgttggaagcacggcagcagaataaatatgagaactacagcaccagc ttcttcatcagggacatcatcaaaccagacccgcccaagaacttgcagatgaagcctttgaagaactc acaggtggaggtcagctgggagtaccctgactcctggagcactccccattcctacttctccctcaagt tctttgttcgaatccagcgcaagaaagaaaagatgaaggagacagaggaggggtgtaaccagaaa ggtgcgttcctcgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcgggaatgtctgcgtgcaa gctcaggatcgctattacaattcctcatgcagcaagtgggcatgtgttccctgcagggtccgatcc (SEQ ID NO: 24)
3	hIL12B氨基酸序列	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAP GEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDA GQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDA VHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY PDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR KNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 25)
4	mIL12B氨基酸序列	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCE APNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASL SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQ NKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSW STPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEV QCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRS (SEQ ID NO: 26)
5	hIL12A cDNA序列	Atgtgcccggcgcgcagcctgctgctggtggcgaccctggtgctgctggatcatctgagcctggc gcgcaacctgccggtggcgaccccggatccgggcatgtttccgtgcctgcatcatagccagaacct gctgcgcgcggtgagcaacatgctgcagaaagcgcgccagaccctggaattttatccgtgcaccag cgaagaaattgatcatgaagatattaccaaagataaaaccagcaccgtggaagcgtgcctgccgct ggaactgaccaaaaacgaaagctgcctgaacagccgcgaaaccagctttattaccaacggcagct gcctggcgagccgcaaaaccagctttatgatggcgctgtgcctgagcagcatttatgaagatctgaa aatgtatcaggtggaatttaaaaccatgaacgcgaaactgctgatggatccgaaacgccagatttttct ggatcagaacatgctggcggtgattgatgaactgatgcaggcgctgaactttaacagcgaaaccgtg ccgcagaaaagcagcctggaagaaccggatttttataaaaccaaaattaaactgtgcattctgctgca tgcgtttcgcattcgcgcggtgaccattgatcgcgtgatgagctatctgaacgcgagc (SEQ ID NO: 27)
6	mIL12A cDNA序列	Agggtcattccagtctctggacctgccaggtgtcttagccagtcccgaaacctgctgaagaccaca gatgacatggtgaagacggccagagaaaaactgaaacattattcctgcactgctgaagacatcgatc atgaagacatcacacgggaccaaaccagcacattgaagacctgtttaccactggaactacacaaga acgagagttgcctggctactagagagacttcttccacaacaagagggagctgcctgcccccacaga agacgtctttgatgatgaccctgtgccttggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagt tccaggccatcaacgcagcacttcagaatcacaaccatcagcagatcattctagacaagggcatgct ggtggccatcgatgagctgatgcagtctctgaatcataatggcgagactctgcgccagaaacctcct gtgggagaagcagaccttacagagtgaaaatgaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcaccc gcgtcgtgaccatcaacagggtgatgggctatctgagctccgcc (SEQ ID NO: 28)
7	hIL12A 氨基酸序列	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQN LLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLP LELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLK MYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNS ETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

		(SEQ ID NO: 29)
8	mIL12A 氨基酸序列	MCQSRYLLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA (SEQ ID NO: 30)
9	G4S连接子mRNA序列	Ggcggaggcggatcaggcggcggtggatctgggggtggcggatct (SEQ ID NO: 31)
10	G4S连接子氨基酸序列	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 32)
11	OVA cDNA序列	atgctggagcagctggagtccatcatcaacttcgagaagctgaccgagtggacctcc (SEQ ID NO: 33)
12	OVA氨基酸序列	MLEQLESIINFEKLTEWTS (SEQ ID NO: 34)
突变来源的肿瘤新抗原序列信息：		
1	KRAS G12C	MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO: 35)
2	KRAS G12D	MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO: 36)
3	EGFRvIII	LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPS (SEQ ID NO: 37)
4	BRAFV600E	LTVKIGDFGLATEKSRWSGSHQFEQ (SEQ ID NO: 38)
病毒来源的肿瘤特异性抗原信息：		
1	HPV16 E6	MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQL (SEQ ID NO: 39)
2	HPV 18 E7	MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYSDSVYGDTLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRHLNEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRRRETQV (SEQ ID NO: 40)
3	HPV16 E7	MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 41)
4	HPV18 E7	MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCCKCEARIKLVVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQQ (SEQ ID NO: 42)
5	内源性逆转录病毒抗原(hERT)	TFLGSLTWK, ATFLGSLTWK, TFLGSLTWKR, PATFLGSLTWK (分别为SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45和SEQ ID NO: 46)
6	LMP1(latent membrane protein 1)	MEHDLERGPPGPRRPPRGPPLSSSLGLALLLLLLALLFWLYIVMSDWTGGALLVLYSFALMLIIIILIIFIFRRDLLCPLGALCILLLMITLLLIALWNLHGQALFLGIVLFIFGCLLVLGIWIYLLEMLWRLGATIWQLLAFFLAFFLDLILLIIALYLQQNWWTLLVDLLWLLLFLAILIWMYYHGQRHSDEHHHDDSLPHPQQATDDSGHESDSNSNEGRHHLLVSGAGDGPPLCSQNLGAPGGGPDNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPQDPDNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPHSPSDSAGNDGGPPQLTEEVENKGGDQGPPLMTDGGGGHSHDSGHGGGDPHLPTLLLGSSGSGGDDDDPHGPVQLSYYD (SEQ ID NO: 47)
7	LMP2(latent	MGSLEMVPMGAGPPSPGGDPDGYDGGNNSQYPSASGSSGNTP

	membrane protein 2)	TPPNDEERESNEEPPPPYEDPYWGNGDRHSDYQPLGTQDQSLY LGLQHDGNDGLPPPPYSPRDDSSQHIYEEAGRGSMNPVCLPVIV APYLFWLAAIAASCFTASVSTVVTATGLALSLLLLAAVASSYA AAQRKLLTPVTVLTAVVTFFAICLTWRIEDPPFNSLLFALLAAA GGLQGIYVLVMLVLLILAYRRRWRRLTVCGGIMFLACVLVLIV DAVLQLSPLLGAVTVVSMTLLLLAFVLWLSSPGGLGTLGAALL TLAAALALLASLILGTLNLTTMFLLMLLWTLVVLLICSSCSSCPL SKILLARLFLYALALLLLASALIAGGSILQTNFKSLSSTEFIPNLF CMLLLIVAGILFILAILTEWGSGNRTYGPVFMCLGGLLTMVAG AVWLTVMSNTLLSAWILTAGFLIFLIGFALFGVIRCCRYCCYYC LTLESEERPPTPYRNTV (SEQ ID NO: 48)
肿瘤高表达的相关抗原序列信息：		
1	WT1	MGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGGCALPVSGAAQWAPVLDFAP PGASAYGSLGGPAPPPAPPPPPPPPPHSFIKQEPSWGGAEPHEEQ CLSAFTVHFSGQFTGTAGACRYGPFGPPPPSQASSGQARMFPNA PYLPSCLESQPAIRNQGYSTVTFDGTPSYGHTPSHHAAQFPNHS FKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPPVYGCHTPTDSCTGSQALLLR TPYSSDNLYQMTSQLECMTWNQMNLGATLKGVAAGSSSSVK WTEGQSNHSTGYESDNHTTPILCGAQYRIHTHGVFRGIQDVRR VPGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQMHSR KHTGEKPYQCDFKDCERRFSRSDQLKRHQRRHTGVKPFQCKT CQRKFSRSDHLKTHTRTHTGKTSEKPFSCRWPSCQKKFARSDE LVRHHNMHQRNMTKLQLAL (SEQ ID NO: 49)
2	MAGE-A3	MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSS TLVEVTLGEVPAAESPDPPQSPQGASSLPTTMNYPLWSQSYEDS SNQEEEGPSTFPDLESEFQAALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVT KAEMLGSVVGNWQYFFPVIFSKASSSLQLVFGIELMEVDPIGHL YIFATCLGLSYDGLLGDNQIMPKAGLLIIVLAIIAREGDCAPEEKI WEELSVLEVFEGREDSILGDPKKLLTQHFVQENYLEYRQVPGS DPACYEFLWGPRALVETSYVKVLHHMVKISGGPHISYPPLHEW VLREGEE (SEQ ID NO: 50)
3	GP100(Pmel)	MDLVLKRCLLHLAVIGALLAVGATKVPRNQDWLGVSRQLRTK AWNRQLYPEWTEAQRLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASF SIALNFPGSQKVLPDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQPVYPQETD DACIFPDGGPCPSGSWSQKRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSG LSIGTGRAMLGTHTMEVTVYHRRGSRSYVPLAHSSSAFTITDQ VPFSVSVSQLRALDGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPSGYLAEAD LSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLT SCGSSPVPGTTDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPT AEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMG TTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTAR ELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDC VLYRYGSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGG LPKEACMEISSPGCQPPAQRLCQPVLPSPACQLVLHQILKGGSG TYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPLIVGILLVLM AVVLASLIYRRRLMKQDFSVPQLPHSSSHWLRLPRIFCSCPIGEN SPLLSGQQV (SEQ ID NO: 51)
4	NY-ESO-I	MQAEGRGTGGSTGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGEAGATGG RGPRGAGAARASGPGGGAPRGPHGGAASGLNGCCRCGARGPE SRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPLPVPGVLLKEFTV SGNILTIRLTAADHRQLQLSISSCLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQ PPSGQRR (SEQ ID NO: 52)

5	HER2/Neu	MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHL DMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLI AHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTP VTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDI FHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSL TRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLH FNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPY NYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCY GLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPAS NTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIR GRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCF VHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARG HCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHC LPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSG VKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQ RASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLL QETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTV YKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGV GSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQ DLLNWCMQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKIT DFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDV WSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTI DVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNE DLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDP APGAGGMVHHRHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSE GAGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPSPLQRYSEDPTVPLPS ETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGAT LERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHP PPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDV PV (SEQ ID NO: 53)
6	MUC1	MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSS VPSSTEKNAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVTLAPATEPAS GSAATWGQDVTSVPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAPGST APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPD TRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA PGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPD TRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA PGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPD TRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA PGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPD TRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALGSTAPPVHNVTSASGSASG SASTLVHNGTSARATTTPASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKT DASSTHHSSVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSL EDPSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQ LTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPF PFSAQSGAGVPGWGIALLVLVCVLVALAIVYLIALAVCQCRRK NYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVS AGNGGSSLSYTNPAVAATSANL (SEQ ID NO: 54)

7	mIL12A-(G4S)3-IL12B cDNA序列	atgtgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgttttgctggtgtctccactcatggccatgtg ggagctggagaaagacgtttatgttgtagaggtggactggactcccgatgcccctggagaaacagt gaacctcacctgtgacacgcctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagt cataggctctggaaagaccctgaccatcactgtcaaagagtttctagatgctggccagtacacctgcc acaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctccacaagaaggaaaatggaatttggt ccactgaaatttaaaaaatttcaaaaacaagactttcctgaagtgtgaagcaccaaattactccggac ggttcacgtgctcatggctggtgcaaagaaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagtagcag ttcccctgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctgcagagaaggtcacactggac caaagggactatgagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggag accctgcccattgaactggcgttggaagcacggcagcagaataaatatgagaactacagcaccagc ttcttcatcagggacatcatcaaaccagacccgcccaagaacttgcagatgaagcctttgaagaactc acaggtggaggtcagctgggagtaccctgactcctggagcactccccattcctacttctccctcaagt tctttgttcgaatccagcgcaagaaagaaaagatgaaggagacagaggaggggtgtaaccagaaa ggtgcgttcctcgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcgggaatgtctgcgtgcaa gctcaggatcgctattacaattcctcatgcagcaagtgggcatgtgttccctgcagggtccgatccgg cggaggcggatcaggcggcggtggatctgggggtggcggatcttcgcgaagggtcattccagtct ctggacctgccaggtgtcttagccagtcccgaaacctgctgaagaccacagatgacatggtgaaga cggccagagaaaaactgaaacattattcctgcactgctgaagacatcgatcatgaagacatcacacg ggaccaaaccagcacattgaagacctgtttaccactggaactacacaagaacgagagttgcctggct actagagagacttcttccacaacaagagggagctgcctgcccccacagaagacgtctttgatgatga ccctgtgccttggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagttccaggccatcaacgc agcacttcagaatcacaaccatcagcagatcattctagacaagggcatgctggtggccatcgatgag ctgatgcagtctctgaatcataatggcgagactctgcgccagaaacctcctgtgggagaagcagacc cttacagagtgaaaatgaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcacccgcgtcgtgaccatcaac agggtgatgggctatctgagctccgcc (SEQ ID NO: 55)
8	mIL12A-(G4S)3-IL12B 氨基酸序列	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCE APNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASL SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQ NKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSW STPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEV QCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGG SGGGGSSRRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTT RGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHN HQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVK MKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA (SEQ ID NO: 56)
9	mIL12-mCD80TM-T2A-OVA cDNA序列	atgtgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgttttgctggtgtctccactcatggccatgtg ggagctggagaaagacgtttatgttgtagaggtggactggactcccgatgcccctggagaaacagt gaacctcacctgtgacacgcctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagt cataggctctggaaagaccctgaccatcactgtcaaagagtttctagatgctggccagtacacctgcc acaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctccacaagaaggaaaatggaatttggt ccactgaaatttaaaaaatttcaaaaacaagactttcctgaagtgtgaagcaccaaattactccggac ggttcacgtgctcatggctggtgcaaagaaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagtagcag ttcccctgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctgcagagaaggtcacactggac caaagggactatgagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggag accctgcccattgaactggcgttggaagcacggcagcagaataaatatgagaactacagcaccagc ttcttcatcagggacatcatcaaaccagacccgcccaagaacttgcagatgaagcctttgaagaactc acaggtggaggtcagctgggagtaccctgactcctggagcactccccattcctacttctccctcaagt tctttgttcgaatccagcgcaagaaagaaaagatgaaggagacagaggaggggtgtaaccagaaa ggtgcgttcctcgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcgggaatgtctgcgtgcaa gctcaggatcgctattacaattcctcatgcagcaagtgggcatgtgttccctgcagggtccgatccgg cggaggcggatcaggcggcggtggatctgggggtggcggatcttcgcgaagggtcattccagtct ctggacctgccaggtgtcttagccagtcccgaaacctgctgaagaccacagatgacatggtgaaga cggccagagaaaaactgaaacattattcctgcactgctgaagacatcgatcatgaagacatcacacg ggaccaaaccagcacattgaagacctgtttaccactggaactacacaagaacgagagttgcctggct actagagagacttcttccacaacaagagggagctgcctgcccccacagaagacgtctttgatgatga ccctgtgccttggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagttccaggccatcaacgc

		agcacttcagaatcacaaccatcagcagatcattctagacaagggcatgctggtggccatcgatgag ctgatgcagtctctgaatcataatggcgagactctgcgccagaaacctcctgtgggagaagcagacc cttacagagtgaaaatgaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcacccgcgtcgtgaccatcaac agggtgatgggctatctgagctccgcctccggaggaggctccggaggaggaggcagcggagga ggaggatccggcggaggaggctctggcggaggaagcggcgatgcccacgtgagcgaggatttc acatgggagaagccccccgaggaccctcccgacagcaagaacacactggtgctgtttggcgccg gcttcggcgccgtgatcacagtggtggtcattgtggtcattatcaagtgcttctgcaagcacagatcct gtttcaggagaaatgaggccagcagagagacaaacaacagcctgacatttggccctgaggaggcc ctggccgagcagacagtgtttctggagggcaggggcagcctgctgacctgcggagacgtggagg agaaccctggccccatgctggagcagctggagtccatcatcaacttcgagaagctgaccgagtgga cctcctga (SEQ ID NO: 57)
10	mIL12-mCD80TM-T2A-OVA氨基酸序列	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCE APNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASL SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQ NKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSW STPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEV QCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGG SGGGGSSRRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTT RGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHN HQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVK MKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSASGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGSGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFGAGFGA VITVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQ TVFLEGRGSLLTCGDVEENPGPMLEQLESIINFEKLTEWTS (SEQ ID NO: 58)
11	mIL12-mCD80TM-T2A-HPV16 E6 cDNA序列	atgtgcccgcagaaactgaccattagctggtttgcgattgtgctgctggtgagcccgctgatggcgat gtgggaactggaaaaagatgtgtatgtggtggaagtggattggaccccggatgcgccgggcgaaa ccgtgaacctgacctgcgataccccggaagaagatgatattacctggaccagcgatcagcgccatg gcgtgattggcagcggcaaaaccctgaccattaccgtgaaagaatttctggatgcgggccagtatac ctgccataaaggcggcgaaaccctgagccatagccatctgctgctgcataaaaaagaaaacggcat ttggagcaccgaaattctgaaaaactttaaaaacaaaaccttttctgaaatgcgaagcgccgaactata gcggccgctttacctgcagctggctggtgcagcgcaacatggatctgaaatttaacattaaaagcag cagcagcagcccggatagccgcgcggtgacctgcggcatggcgagcctgagcgcggaaaaagt gaccctggatcagcgcgattatgaaaaatatagcgtgagctgccaggaagatgtgacctgcccgac cgcggaagaaaccctgccgattgaactggcgctggaagcgcgccagcagaacaaatatgaaaact atagcaccagctttttattcgcgatattattaaaccggatccgccgaaaaacctgcagatgaaaccgc tgaaaaacagccaggtggaagtgagctgggaatatccggatagctggagcaccccgcatagctatt ttagcctgaaatttttgtgcgcattcagcgcaaaaaagaaaaaatgaaagaaaccgaagaaggctg caaccagaaaggcgcgtttctggtggaaaaaaccagcaccgaagtgcagtgcaaaggcggcaac gtgtgcgtgcaggcgcaggatcgctattataacagcagctgcagcaaatgggcgtgcgtgccgtgc cgcgtgcgcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcagc cgccgcgtgattccggtgagcggcccggcgcgctgcctgagccagagccgcaacctgctgaaaa ccaccgatgatatggtgaaaaccgcgcgcgaaaaactgaaacattatagctgcaccgcggaagata ttgatcatgaagatattacccgcgatcagaccagcaccctgaaaacctgcctgccgctggaactgca taaaaacgaaagctgcctggcgacccgcgaaaccagcagcaccacccgcggcagctgcctgccg ccgcagaaaaccagcctgatgatgaccctgtgcctgggcagcatttatgaagatctgaaaatgtatca gaccgaatttcaggcgattaacgcggcgctgcagaaccataaccatcagcagattattctggataaa ggcatgctggtggcgattgatgaactgatgcagagcctgaaccataacggcgaaaccctgcgcca gaaaccgccggtgggcgaagcggatccgtatcgcgtgaaaatgaaactgtgcattctgctgcatgc gtttagcacccgcgtggtgaccattaaccgcgtgatgggctatctgagcagcgcgagcggcggcg gcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggca gcggcgatgcgcatgtgagcgaagattttacctgggaaaaaccgccggaagatccgccggatagc aaaaacaccctggtgctgtttggcgcgggctttggcgcggtgattaccgtggtggtgattgtggtgatt attaaatgcttttgcaaacatcgcagctgctttcgccgcaacgaagcgagccgcgaaaccaacaaca gcctgaccttggcccggaagaagcgctggcggaacagaccgtgtttctggaaggccgcggcagc ctgctgacctgcggcgatgtggaagaaaacccgggcccgatgcatcagaaacgcaccgcgatgttt

		caggatccgcaggaacgcccgcgcaaactgccgcagctgtgcaccgaactgcagaccaccattca tgatattattctggaatgcgtgtattgcaaacagcagctgctgcgccgcgaagtgtatgattttgcgtttc gcgatctgtgcattgtgtatcgcgatggcaacccgtatgcggtgtgcgataaatgcctgaaattttata gcaaaattagcgaatatcgccattattgctatagcctgtatggcaccaccctggaacagcagtataac aaaccgctgtgcgatctgctgattcgctgcattaactgccagaaaccgctgtgcccggaagaaaaac agcgccatctggataaaaaacagcgctttcataacattcgcggccgctggaccggccgctgcatga gctgctgccgcagcagccgcacccgccgcgaaacccagctg (SEQ ID NO: 59)
12	mIL12-mCD80TM-T2A-HPV16 E6氨基酸序列	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCE APNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASL SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQ NKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSW STPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEV QCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGG SGGGGSSRRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTT RGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHN HQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVK MKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSASGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGSGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFGAGFGA VITVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQ TVFLEGRGSLLTCGDVEENPGPMHQKRTAMFQDPQERPRKLPQ LCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGN PYAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIR CINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRT RRETQL (SEQ ID NO: 60)
13	mIL12-mCD80TM-T2A-HPV18 E6 cDNA序列	atgtgcccgcagaaactgaccattagctggtttgcgattgtgctgctggtgagcccgctgatggcgat gtgggaactggaaaaagatgtgtatgtggtggaagtggattggaccccggatgcgccgggcgaaa ccgtgaacctgacctgcgataccccggaagaagatgatattacctggaccagcgatcagcgccatg gcgtgattggcagcggcaaaaccctgaccattaccgtgaaagaatttctggatgcgggccagtatac ctgccataaaggcggcgaaaccctgagccatagccatctgctgctgcataaaaaagaaaacggcat ttggagcaccgaaattctgaaaaactttaaaaacaaaaccttttctgaaatgcgaagcgccgaactata gcggccgctttacctgcagctggctggtgcagcgcaacatggatctgaaatttaacattaaaagcag cagcagcagcccggatagccgcgcggtgacctgcggcatggcgagcctgagcgcggaaaaagt gaccctggatcagcgcgattatgaaaaatatagcgtgagctgccaggaagatgtgacctgcccgac cgcggaagaaaccctgccgattgaactggcgctggaagcgcgccagcagaacaaatatgaaaact atagcaccagctttttattcgcgatattattaaaccggatccgccgaaaaacctgcagatgaaaccgc tgaaaaacagccaggtggaagtgagctgggaatatccggatagctggagcaccccgcatagctatt ttagcctgaaatttttgtgcgcattcagcgcaaaaaagaaaaaatgaaagaaaccgaagaaggctg caaccagaaaggcgcgtttctggtggaaaaaaccagcaccgaagtgcagtgcaaaggcggcaac gtgtgcgtgcaggcgcaggatcgctattataacagcagctgcagcaaatgggcgtgcgtgccgtgc cgcgtgcgcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcagc cgccgcgtgattccggtgagcggcccggcgcgctgcctgagccagagccgcaacctgctgaaaa ccaccgatgatatggtgaaaaccgcgcgcgaaaaactgaaacattatagctgcaccgcggaagata ttgatcatgaagatattacccgcgatcagaccagcaccctgaaaacctgcctgccgctggaactgca taaaaacgaaagctgcctggcgacccgcgaaaccagcagcaccacccgcggcagctgcctgccg ccgcagaaaaccagcctgatgatgaccctgtgcctgggcagcatttatgaagatctgaaaatgtatca gaccgaatttcaggcgattaacgcggcgctgcagaaccataaccatcagcagattattctggataaa ggcatgctggtggcgattgatgaactgatgcagagcctgaaccataacggcgaaaccctgcgcca gaaaccgccggtgggcgaagcggatccgtatcgcgtgaaaatgaaactgtgcattctgctgcatgc gtttagcacccgcgtggtgaccattaaccgcgtgatgggctatctgagcagcgcgagcggcggcg gcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggca gcggcgatgcgcatgtgagcgaagattttacctgggaaaaaccgccggaagatccgccggatagc aaaaacaccctggtgctgtttggcgcgggctttggcgcggtgattaccgtggtggtgattgtggtgatt attaaatgcttttgcaaacatcgcagctgctttcgccgcaacgaagcgagccgcgaaaccaacaaca gcctgaccttggcccggaagaagcgctggcggaacagaccgtgtttctggaaggccgcggcagc ctgctgacctgcggcgatgtggaagaaaacccgggcccgatggcgcgctttgaagatccgacccg ccgcccgtataaactgccggatctgtgcaccgaactgaacaccagcctgcaggatattgaaattacc

		tgcgtgtattgcaaaaccgtgctggaactgaccgaagtgtttgaatttgcgtttaaagatctgtttgtggt gtatcgcgatagcattccgcatgcggcgtgccataaatgcattgatttttatagccgcattcgcgaact gcgccattatagcgatagcgtgtatggcgataccctggaaaaactgaccaacaccggcctgtataac ctgctgattcgctgcctgcgctgccagaaaccgctgaacccggcggaaaaactgcgccatctgaac gaaaaacgccgctttcataacattgcgggccattatcgcggccagtgccatagctgctgcaaccgcg cgcgccaggaacgcctgcagcgccgccgcgaaacccaggtg (SEQ ID NO: 61)
14	mIL12-mCD80TM-T2A-HPV18 E6 氨基酸序列	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCE APNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASL SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQ NKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSW STPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEV QCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGG SGGGGSSRRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTT RGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHN HQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVK MKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSASGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGSGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFGAGFGA VITVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQ TVFLEGRGSLLTCGDVEENPGPMARFEDPTRRPYKLPDLCTELN TSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHK CIDFYSRIRELRHYSDSVYGDTLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPL NPAEKLRHLNEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRRR ETQV (SEQ ID NO: 62)
15	mIL12-mCD80TM-T2A-HPV16 E7 cDNA序列	atgtgcccgcagaaactgaccattagctggtttgcgattgtgctgctggtgagcccgctgatggcgat gtgggaactggaaaaagatgtgtatgtggtggaagtggattggaccccggatgcgccgggcgaaa ccgtgaacctgacctgcgataccccggaagaagatgatattacctggaccagcgatcagcgccatg gcgtgattggcagcggcaaaaccctgaccattaccgtgaaagaatttctggatgcgggccagtatac ctgccataaaggcggcgaaaccctgagccatagccatctgctgctgcataaaaaagaaaacggcat ttggagcaccgaaattctgaaaaactttaaaaacaaaaccttttctgaaatgcgaagcgccgaactata gcggccgctttacctgcagctggctggtgcagcgcaacatggatctgaaatttaacattaaaagcag cagcagcagcccggatagccgcgcggtgacctgcggcatggcgagcctgagcgcggaaaaagt gaccctggatcagcgcgattatgaaaaatatagcgtgagctgccaggaagatgtgacctgcccgac cgcggaagaaaccctgccgattgaactggcgctggaagcgcgccagcagaacaaatatgaaaact atagcaccagctttttattcgcgatattattaaaccggatccgccgaaaaacctgcagatgaaaccgc tgaaaaacagccaggtggaagtgagctgggaatatccggatagctggagcaccccgcatagctatt tttagcctgaaatttttgtgcgcattcagcgcaaaaaagaaaaaatgaaagaaaccgaagaaggctg caaccagaaaggcgcgtttctggtggaaaaaaccagcaccgaagtgcagtgcaaaggcggcaac gtgtgcgtgcaggcgcaggatcgctattataacagcagctgcagcaaatgggcgtgcgtgccgtgc cgcgtgcgcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcagc cgccgcgtgattccggtgagcggcccggcgcgctgcctgagccagagccgcaacctgctgaaaa ccaccgatgatatggtgaaaaccgcgcgcgaaaaactgaaacattatagctgcaccgcggaagata ttgatcatgaagatattacccgcgatcagaccagcaccctgaaaacctgcctgccgctggaactgca taaaaacgaaagctgcctggcgacccgcgaaaccagcagcaccacccgcggcagctgcctgccg ccgcagaaaaccagcctgatgatgaccctgtgcctgggcagcatttatgaagatctgaaaatgtatca gaccgaatttcaggcgattaacgcggcgctgcagaaccataaccatcagcagattattctggataaa ggcatgctggtggcgattgatgaactgatgcagagcctgaaccataacggcgaaaccctgcgcca gaaaccgccggtgggcgaagcggatccgtatcgcgtgaaaatgaaactgtgcattctgctgcatgc gtttagcacccgcgtggtgaccattaaccgcgtgatgggctatctgagcagcgcgagcggcggcg gcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcagca gcggcgatgcgcatgtgagcgaagattttacctgggaaaaaccgccggaagatccgccggatagc aaaaacaccctggtgctgtttggcgcgggctttggcgcggtgattaccgtggtggtgattgtggtgatt attaaatgcttttgcaaacatcgcagctgctttcgccgcaacgaagcgagccgcgaaaccaacaaca gcctgaccttggcccggaagaagcgctggcggaacagaccgtgtttctggaaggccgcggcagc ctgctgacctgcggcgatgtggaagaaaacccgggcccgatgcatggcgataccccgaccctgca tgaatatatgctggatctgcagccggaaaccaccgatctgtattgctatgaacagctgaacgatagca gcgaagaagaagatgaaattgatggcccggcgggccaggcggaaccggatcgcgcgcattataa

		cattgtgacctttgctgcaaatgcgatagcaccctgcgcctgtgcgtgcagagcacccatgtggata ttcgcaccctggaagatctgctgatgggcaccctgggcattgtgtgcccgatttgcagccagaaacc g (SEQ ID NO: 63)
16	mIL12-mCD80TM-T2A-HPV16 E7 氨基酸序列	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCE APNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASL SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQ NKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSW STPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEV QCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGG SGGGGSSRRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTT RGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHN HQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVK MKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSASGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGSGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFGAGFGA VITVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQ TVFLEGRGSLLTCGDVEENPGPMHGDTPTLHEYMLDLQPETTD LYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCKCDSTL RLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 64)
17	mIL12-mCD80TM-T2A-HPV18 E7 cDNA序列	atgtgcccgcagaaactgaccattagctggtttgcgattgtgctgctggtgagcccgctgatggcgat gtgggaactggaaaaagatgtgtatgtggtggaagtggattggaccccggatgcgccgggcgaaa ccgtgaacctgacctgcgataccccggaagaagatgatattacctggaccagcgatcagcgccatg gcgtgattggcagcggcaaaaccctgaccattaccgtgaaagaatttctggatgcgggccagtatac ctgccataaaggcggcgaaaccctgagccatagccatctgctgctgcataaaaaagaaaacggcat ttggagcaccgaaattctgaaaaactttaaaaacaaaaccttttctgaaatgcgaagcgccgaactata gcggccgctttacctgcagctggctggtgcagcgcaacatggatctgaaatttaacattaaaagcag cagcagcagcccggatagccgcgcggtgacctgcggcatggcgagcctgagcgcggaaaaagt gaccctggatcagcgcgattatgaaaaatatagcgtgagctgccaggaagatgtgacctgcccgac cgcggaagaaaccctgccgattgaactggcgctggaagcgcgccagcagaacaaatatgaaaact atagcaccagctttttattcgcgatattattaaaccggatccgccgaaaaacctgcagatgaaaccgc tgaaaaacagccaggtggaagtgagctgggaatatccggatagctggagcaccccgcatagctatt tttagcctgaaatttttgtgcgcattcagcgcaaaaaagaaaaaatgaaagaaaccgaagaaggctg caaccagaaaggcgcgtttctggtggaaaaaaccagcaccgaagtgcagtgcaaaggcggcaac gtgtgcgtgcaggcgcaggatcgctattataacagcagctgcagcaaatgggcgtgcgtgccgtgc cgcgtgcgcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcagc cgccgcgtgattccggtgagcggcccggcgcgctgcctgagccagagccgcaacctgctgaaaa ccaccgatgatatggtgaaaaccgcgcgcgaaaaactgaaacattatagctgcaccgcggaagata ttgatcatgaagatattacccgcgatcagaccagcaccctgaaaacctgcctgccgctggaactgca taaaaacgaaagctgcctggcgacccgcgaaaccagcagcaccacccgcggcagctgcctgccg ccgcagaaaaccagcctgatgatgaccctgtgcctgggcagcatttatgaagatctgaaaatgtatca gaccgaatttcaggcgattaacgcggcgctgcagaaccataaccatcagcagattattctggataaa ggcatgctggtggcgattgatgaactgatgcagagcctgaaccataacggcgaaaccctgcgcca gaaaccgccggtgggcgaagcggatccgtatcgcgtgaaaatgaaactgtgcattctgctgcatgc gtttagcacccgcgtggtgaccattaaccgcgtgatgggctatctgagcagcgcgagcggcggcg gcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcgca gcggcgatgcgcatgtgagcgaagattttacctgggaaaaaccgccggaagatccgccggatagc aaaaacaccctggtgctgtttggcgcgggctttggcgcggtgattaccgtggtggtgattgtggtgatt attaaatgcttttgcaaacatcgcagctgctttcgccgcaacgaagcgagccgcgaaaccaacaaca gcctgaccttggcccggaagaagcgctggcggaacagaccgtgtttctggaaggccgcggcagc ctgctgacctgcggcgatgtggaagaaaacccgggcccgatgcatggcccgaaagcgaccctgc aggatattgtgctgcatctggaaccgcagaacgaaattccggtggatctgctgtgccatgaacagct gagcgatagcgaagaagaaaacgatgaaattgatggcgtgaaccatcagcatctgccggcgcgcc gcgcggaaccgcagcgccataccatgctgtgcatgtgctgcaaatgcgaagcgcgcattaaactgg tggtggaaagcagcgcggatgatctgcgcgcgtttcagcagctgtttctgaacaccctgagctttgtg tgcccgtggtgcgcgagccagcag (SEQ ID NO: 65)

18	mIL12-mCD80TM-T2A-HPV18 E7 氨基酸序列	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCE APNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASL SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQ NKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSW STPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEV QCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGG SGGGGSSRRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTT RGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHN HQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVK MKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSASGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGSGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFGAGFGA VITVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQ TVFLEGRGSLLTCGDVEENPGPMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIP VDLLCHEQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCM CCKCEARIKLVVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQQ (SEQ ID NO: 66)
19	mIL12-T2A-OVA cDNA序列	atgtgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgttttgctggtgtctccactcatggccatgtg ggagctggagaaagacgtttatgttgtagaggtggactggactcccgatgccccctggagaaacagt gaacctcacctgtgacacgcctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagt cataggctctggaaagaccctgaccatcactgtcaaagagtttctagatgctggccagtacacctgcc acaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctccacaagaaggaaaatggaatttggt ccactgaaattttaaaaaatttcaaaaacaagactttcctgaagtgtgaagcaccaaattactccggac ggttcacgtgctcatggctggtgcaaagaaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagtagcag ttcccctgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctgcagagaaggtcacactggac caaagggactatgagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggag accctgcccattgaactggcgttggaagcacggcagcagaataaatatgagaactacagcaccagc ttcttcatcagggacatcatcaaaccagacccgcccaagaacttgcagatgaagcctttgaagaactc acaggtggaggtcagctgggagtaccctgactcctggagcactccccattcctacttctccctcaagt tctttgttcgaatccagcgcaagaaagaaaagatgaaggagacagaggaggggtgtaaccagaaa ggtgcgttcctcgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcgggaatgtctgcgtgcaa gctcaggatcgctattacaattcctcatgcagcaagtgggcatgtgttccctgcagggtccgatccgg cggaggcggatcaggcggcggtggatctgggggtggcggatcttcgcgaagggtcattccagtct ctggacctgccaggtgtcttagccagtcccgaaacctgctgaagaccacagatgacatggtgaaga cggccagagaaaaactgaaacattattcctgcactgctgaagacatcgatcatgaagacatcacacg ggaccaaaccagcacattgaagacctgtttaccactggaactacacaagaacgagagttgcctggct actagagagacttcttccacaacaagagggagctgcctgcccccacagaagacgtctttgatgatga ccctgtgccttggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagttccaggccatcaacgc agcacttcagaatcacaaccatcagcagatcattctagacaagggcatgctggtggccatcgatgag ctgatgcagtctctgaatcataatggcgagactctgcgccagaaacctcctgtgggagaagcagacc cttacagagtgaaaatgaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcacccgcgtcgtgaccatcaac agggtgatgggctatctgagctccgccgagggcaggggcagcctgctgacctgcggagacgtgg aggagaaccctggccccatgctggagcagctggagtccatcatcaacttcgagaagctgaccgagt ggacctcctga (SEQ ID NO: 67)
20	mIL12-T2A-OVA 氨基酸序列	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCE APNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASL SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQ NKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSW STPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEV QCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGG SGGGGSSRRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTT RGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHN HQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVK MKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAEGRGSLLTCGDVEENP

		GPMLEQLESIINFEKLTEWTS (SEQ ID NO: 68)
S1	mtGFP-T2A-OVA cDNA序列	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGG GTTCCAGGTTCCACTGGTTCGCGAatggtgagcaagggcgaggagctgttca ccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtcc ggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggca agctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgct accccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggag cgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcga caccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggc acaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggc atcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccacta ccagcagaacaccccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacc cagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgac cgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagTCCGGAGGAGGCTCCG GAGGAGGAGGCAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGG CTCTGGCGGAGGAAGCGGCGATGCCCACGTGAGCGAGGATT TCACATGGGAGAAGCCCCCCGAGGACCCTCCCGACAGCAAG AACACACTGGTGCTGTTTGGCGCCGGCTTCGGCGCCGTGATC ACAGTGGTGGTCATTGTGGTCATTATCAAGTGCTTCTGCAAG CACAGATCCTGTTTCAGGAGAAATGAGGCCAGCAGAGAGAC AAACAACAGCCTGACATTTGGCCCTGAGGAGGCCCTGGCCG AGCAGACAGTGTTTCTGGAGGGCAGGGGCAGCCTGCTGACC TGCGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGCCCCATGCTGGAGCA GCTGGAGTCCATCATCAACTTCGAGAAGCTGACCGAGTGGAC CTCCTGA (SEQ ID NO: 69)
S2	mtGFP-T2A-OVA 氨基酸序列	METDTLLLWVLLLWVPGSTGSRMVSKGEELFTGVVPILVELDG DVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL TYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGP VLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDE LYKSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGDAHVSEDFTWEKPP EDPPDSKNTLVLFGAGFGAVITVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEA SRETNNSLTFGPEEALAEQTVFLEGRGSLLTCGDVEENPGPMLE QLESIINFEKLTEWTS* (SEQ ID NO: 70)
S3	mtGFP-T2A-E7 cDNA序列	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGG GTTCCAGGTTCCACTGGTTCGCGAatggtgagcaagggcgaggagctgttca ccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtcc ggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggca agctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgct accccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggag cgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcga caccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggc acaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggc atcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccacta ccagcagaacaccccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacc cagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgac cgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagTCCGGAGGAGGCTCCG GAGGAGGAGGCAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGG CTCTGGCGGAGGAAGCGGCGATGCCCACGTGAGCGAGGATT TCACATGGGAGAAGCCCCCCGAGGACCCTCCCGACAGCAAG AACACACTGGTGCTGTTTGGCGCCGGCTTCGGCGCCGTGATC ACAGTGGTGGTCATTGTGGTCATTATCAAGTGCTTCTGCAAG CACAGATCCTGTTTCAGGAGAAATGAGGCCAGCAGAGAGAC AAACAACAGCCTGACATTTGGCCCTGAGGAGGCCCTGGCCG

		AGCAGACAGTGTTTCTGGAGGGCAGGGGCAGCCTGCTGACC TGCGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGCCCCATGCTGGAGCA GCTGGAGCGGGCCCACTATAACATCGTCACTTTTACCGAGTG GACCTCC (SEQ ID NO: 71)
S4	mtGFP-T2A-E7 氨基酸序列	METDTLLLWVLLLWVPGSTGSRMVSKGEELFTGVVPILVELDG DVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL TYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGP VLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDE LYKSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGDAHVSEDFTWEKPP EDPPDSKNTLVLFGAGFGAVITVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEA SRETNNSLTFGPEEALAEQTVFLEGRGSLLTCGDVEENPGPMLE QLERAHYNIVTFTEWTS (SEQ ID NO: 72)
S5	mtGFP-T2A-p15E 碱基序列	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGG GTTCCAGGTTCCACTGGTTCGCGAatggtgagcaagggcgaggagctgttca ccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtcc ggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggca agctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgct accccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggag cgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcga caccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggc acaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggc atcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccacta ccagcagaacaccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacc cagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgac cgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagTCCGGAGGAGGCTCCG GAGGAGGAGGCAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGG CTCTGGCGGAGGAAGCGGCGATGCCCACGTGAGCGAGGATT TCACATGGGAGAAGCCCCCCGAGGACCCTCCCGACAGCAAG AACACACTGGTGCTGTTTGGCGCCGGCTTCGGCGCCGTGATC ACAGTGGTGGTCATTGTGGTCATTATCAAGTGCTTCTGCAAG CACAGATCCTGTTTCAGGAGAAATGAGGCCAGCAGAGAGAC AAACAACAGCCTGACATTTGGCCCTGAGGAGGCCCTGGCCG AGCAGACAGTGTTTCTGGAGGGCAGGGGCAGCCTGCTGACC TGCGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGCCCCATGCTGGAGCA GCTGGAGaaaagcccgtggtttaccaccctgACCGAGTGGACCTCCTGA (SEQ ID NO: 73)
S6	mtGFP-T2A-p15E 氨基酸序列	METDTLLLWVLLLWVPGSTGSRMVSKGEELFTGVVPILVELDG DVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL TYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGP VLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDE LYKSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGDAHVSEDFTWEKPP EDPPDSKNTLVLFGAGFGAVITVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEA SRETNNSLTFGPEEALAEQTVFLEGRGSLLTCGDVEENPGPMLE QLEKSPWFTTLTEWTS (SEQ ID NO: 74)
S7	Human IL12B-(G4S)3-IL12A 碱基序列	ATGTGTCATCAACAGCTTGTTATTTCATGGTTTTCACTCGTATT CCTCGCTTCCCCTCTCGTAGCTATTTGGGAACTCAAAAAAGAT GTGTATGTTGTAGAATTAGACTGGTATCCTGACGCCCCCGGAG AAATGGTGGTATTGACCTGCGACACACCAGAAGAAGATGGA ATTACCTGGACTCTGGACCAAAGTTCAGAAGTATTAGGTTCT GGAAAGACTCTAACCATACAGGTTAAAGAGTTCGGGGATGCG GGACAGTACACCTGTCATAAAGGGGGCGAAGTGTTAAGTCA CTCCCTGCTCCTGCTTCACAAGAAGGAGGACGGCATCTGGTC GACCGATATTCTGAAAGATCAGAAGGAACCTAAAAATAAGAC

		GTTTCTGAGATGTGAAGCTAAGAATTATTCAGGACGGTTTAC ATGCTGGTGGCTTACAACAATTAGCACAGATCTTACGTTCTCG GTGAAGAGTTCTAGGGGGTCTTCAGATCCCCAGGGCGTGACT TGCGGTGCCGCAACCCTCAGCGCTGAAAGGGTTCGTGGGGA TAACAAAGAATATGAATACAGCGTGGAATGCCAAGAGGATTC TGCATGTCCTGCAGCTGAAGAGTCCCTACCGATTGAGGTCAT GGTCGATGCAGTGCATAAGCTAAAATATGAGAATTACACTTCC TCGTTCTTTATACGCGACATCATCAAACCAGACCCTCCTAAGA ATTTGCAGCTCAAGCCACTAAAGAACTCGCGGCAGGTCGAA GTTTCATGGGAGTACCCTGACACTTGGAGCACTCCGCACTCA TATTTCTCACTGACTTTTTGTGTCCAAGTTCAGGGAAAGAGTA AGCGGGAGAAAAAAGATCGCGTCTTCACTGACAAAACGAGT GCCACAGTAATTTGTAGGAAAAATGCCTCCATCTCAGTGCGT GCGCAGGACCGCTACTATAGCAGTTCCTGGAGCGAGTGGGCC TCTGTGCCCTGCTCAGGTGGTGGGGGTAGCGGCGGTGGCGG CAGCGGAGGAGGAGGCAGTCGAAACCTGCCCGTGGCTACCC CAGATCCTGGCATGTTCCCATGCCTTCATCACTCCCAGAACCT CCTTCGAGCAGTATCTAACATGCTCCAGAAAGCTAGACAGAC GTTGGAGTTTTACCCCTGTACCAGTGAGGAGATCGATCATGA GGACATCACTAAGGATAAGACATCTACAGTGGAGGCGTGTCT GCCTCTGGAGCTGACAAAAAACGAGAGCTGTCTCAATAGCA GAGAGACCAGCTTCATTACTAATGGGTCCTGTCTTGCCAGTA GAAAGACCTCCTTCATGATGGCCTTATGCTTGTCCTCAATTTA TGAAGACCTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTTAAAACAATGA ACGCTAAGTTGCTTATGGACCCAAAAAGGCAGATCTTTTTGG ACCAAAACATGCTGGCTGTCATAGACGAGCTGATGCAGGCCC TAAACTTTAATTCTGAAACAGTTCCCCAAAAATCTAGCCTCG AAGAACCCGATTTCTACAAGACAAAAATTAAATTATGCATCCT ATTACACGCCTTTCGTATCCGAGCAGTAACAATCGACAGAGT AATGAGTTATCTAAACGCCAGCTAA (SEQ ID NO: 75)
S8	Human IL12B-(G4S)3-IL12A 氨基酸序列	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAG QYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFL RCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAV HKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRK NASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS GGGGS GGGGS GGGGS RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCT SEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCIL LHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 76)
S9	murineIL12-TM-T2A-P15E 碱基序列	atgtgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgttttgctggtgtctccactcatggccatgtg ggagctggagaaagacgtttatgttgtagaggtggactggactcccgatgcccctggagaaacagt gaacctcacctgtgacacgcctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagt cataggctctggaaagaccctgaccatcactgtcaaagagtttctagatgctggccagtacacctgcc acaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctccacaagaaggaaaatggaatttggt ccactgaaatttaaaaaatttcaaaaacaagactttcctgaagtgtgaagcaccaaattactccggac ggttcacgtgctcatggctggtgcaaagaaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagtagcag ttcccctgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctgcagagaaggtcacactggac caaagggactatgagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggag accctgcccattgaactggcgttggaagcacggcagcagaataaatatgagaactacagcaccagc ttcttcatcagggacatcatcaaaccagacccgcccaagaacttgcagatgaagcctttgaagaactc acaggtggaggtcagctgggagtaccctgactcctggagcactccccattcctacttctccctcaagt tctttgttcgaatccagcgcaagaaagaaaagatgaaggagacagaggaggggtgtaaccagaaa ggtgcgttcctcgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcgggaatgtctgcgtgcaa gctcaggatcgctattacaattcctcatgcagcaagtgggcatgtgttccctgcagggtccgatccgg cggaggcggatcaggcggcggtggatctgggggtggcggatcttcgcgaagggtcattccagtct

		ctggacctgccaggtgtcttagccagtcccgaaacctgctgaagaccacagatgacatggtgaaga cggccagagaaaaactgaaacattattcctgcactgctgaagacatcgatcatgaagacatcacacg ggaccaaaccagcacattgaagacctgtttaccactggaactacacaagaacgagagttgcctggct actagagagacttcttccacaacaagagggagctgcctgccccacagaagacgtctttgatgatga ccctgtgccttggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagttccaggccatcaacgc agcacttcagaatcacaaccatcagcagatcattctagacaagggcatgctggtggccatcgatgag ctgatgcagtctctgaatcataatggcgagactctgcgccagaaacctcctgtgggagaagcagacc cttacagagtgaaaatgaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcacccgcgtcgtgaccatcaac agggtgatgggctatctgagctccgccTCCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGA GGCAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGGCG GAGGAAGCGGCGATGCCCACGTGAGCGAGGATTTCACATGG GAGAAGCCCCCCGAGGACCCTCCCGACAGCAAGAACACACT GGTGCTGTTTGGCGCCGGCTTCGGCGCCGTGATCACAGTGGT GGTCATTGTGGTCATTATCAAGTGCTTCTGCAAGCACAGATCC TGTTTCAGGAGAAATGAGGCCAGCAGAGAGACAAACAACAG CCTGACATTTGGCCCTGAGGAGGCCCTGGCCGAGCAGACAG TGTTTCTGGAGGGCAGGGGCAGCCTGCTGACCTGCGGAGAC GTGGAGGAGAACCCTGGCCCCATGCTGGAGCAGCTGGAGaaa agcccgtggtttaccaccctgACCGAGTGGACCTCCTGA (SEQ ID NO: 77)
S10	murineIL12-TM-T2A-P15E 氨基酸序列	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCE APNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLS AEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQN KYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWS TPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQ CKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGGS GGGGSSRRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHY SCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTR GSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNH QQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKM KLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSASGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGSGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFGAGFGAVI TVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQTV FLEGRGSLLTCGDVEENPGPMLEQLEKSPWFTTLTEWTS (SEQ ID NO: 78)
S11	E6E7-PEST 碱基序列	ATGCACGGCGATACGCCTACCCTGCACGAGTACATGCTCGAC CTGCAGCCAGAGACCACGGACCTCTACTGCTATGAGCAGTTG AATGACAGCAGCGAAGAGGAGGATGAGATAGATGGGCCCGC CGGTCAGGCTGAGCCTGACCGGGCCCACTATAACATCGTCAC TTTTTGCTGCAAGTGTGATTCAACGCTCAGGCTGTGCGTGCA GAGCACGCACGTGGACATACGAACCCTAGAGGATCTCCTGAT GGGGACCCTAGGGATCGTATGTCCAATATGTAGTCAGAAGCC CATGCACCAGAAGCGGACAGCTATGTTCCAGGACCCGCAGG AGCGGCCCCGGAAGCTGCCGCAGCTGTGCACGGAGCTTCAG ACTACAATACACGACATCATCCTTGAGTGCGTGTATTGTAAGC AGCAGCTCCTGAGACGCGAAGTCTATGACTTCGCGTTTCGGG ACCTCTGCATCGTATACCGCGACGGTAATCCGTACGCGGTATG CGATAAGTGTTTGAAGTTCTATTCAAAGATCAGCGAGTACAG GCACTACTGTTACTCGCTGTATGGTACAACGTTGGAGCAGCA GTACAACAAGCCGTTGTGCGACCTGCTCATACGTTGTATCAAT TGCCAGAAGCCGCTGTGTCCTGAGGAGAAGCAGCGGCATCT GGACAAAAAGCAGAGGTTCCACAACATCCGTGGTCGCTGGA CAGGTCGATGCATGTCTTGTTGCAGGAGTAGCCGTACTCGCC GTGAGACTCAGTTAAAGCTTAGCCATGGCTTCCCGCCGGAGG TGGAGGAGCAGGATGATGGCACGCTGCCCATGTCTTGTGCCC AGGAGAGCGGGATGGACCGTCACCCTGCAGCCTGTGCTTCT GCTAGGATCAATGTGTGA (SEQ ID NO: 79)

S12	E6E7-PEST 氨基酸序列	MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAG QAEPDRAHYNIVTFCCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTL GIVCPICSQKPMHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDII LECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFY SKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEK QRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQLKLSHGFP PEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINV* (SEQ ID NO: 80)
S13	Human IL12-TM-T2A-E6/E7-PEST 碱基序列	ATGTGTCATCAACAGCTTGTTATTTCATGGTTTTCACTCGTATT CCTCGCTTCCCCTCTCGTAGCTATTTGGGAACTCAAAAAAGAT GTGTATGTTGTAGAATTAGACTGGTATCCTGACGCCCCCGGAG AAATGGTGGTATTGACCTGCGACACACCAGAAGAAGATGGA ATTACCTGGACTCTGGACCAAAGTTCAGAAGTATTAGGTTCT GGAAAGACTCTAACCATACAGGTTAAAGAGTTCGGGGATGCG GGACAGTACACCTGTCATAAAGGGGGCGAAGTGTTAAGTCA CTCCCTGCTCCTGCTTCACAAGAAGGAGGACGGCATCTGGTC GACCGATATTCTGAAAGATCAGAAGGAACCTAAAAATAAGAC GTTTCTGAGATGTGAAGCTAAGAATTATTCAGGACGGTTTAC ATGCTGGTGGCTTACAACAATTAGCACAGATCTTACGTTCTCG GTGAAGAGTTCTAGGGGGTCTTCAGATCCCCAGGGCGTGACT TGCGGTGCCGCAACCCTCAGCGCTGAAAGGGTTCGTGGGGA TAACAAAGAATATGAATACAGCGTGGAATGCCAAGAGGATTC TGCATGTCCTGCAGCTGAAGAGTCCCTACCGATTGAGGTCAT GGTCGATGCAGTGCATAAGCTAAAATATGAGAATTACACTTCC TCGTTCTTTATACGCGACATCATCAAACCAGACCCTCCTAAGA ATTTGCAGCTCAAGCCACTAAAGAACTCGCGGCAGGTCGAA GTTTCATGGGAGTACCCTGACACTTGGAGCACTCCGCACTCA TATTTCTCACTGACTTTTTGTGTCCAAGTTCAGGGAAAGAGTA AGCGGGAGAAAAAAGATCGCGTCTTCACTGACAAAACGAGT GCCACAGTAATTTGTAGGAAAAATGCCTCCATCTCAGTGCGT GCGCAGGACCGCTACTATAGCAGTTCCTGGAGCGAGTGGGCC TCTGTGCCCTGCTCAGGTGGTGGGGGTAGCGGCGGTGGCGG CAGCGGAGGAGGAGGCAGTCGAAACCTGCCCGTGGCTACCC CAGATCCTGGCATGTTCCCATGCCTTCATCACTCCCAGAACCT CCTTCGAGCAGTATCTAACATGCTCCAGAAAGCTAGACAGAC GTTGGAGTTTTACCCCTGTACCAGTGAGGAGATCGATCATGA GGACATCACTAAGGATAAGACATCTACAGTGGAGGCGTGTCT GCCTCTGGAGCTGACAAAAAACGAGAGCTGTCTCAATAGCA GAGAGACCAGCTTCATTACTAATGGGTCCTGTCTTGCCAGTA GAAAGACCTCCTTCATGATGGCCTTATGCTTGTCCTCAATTTA TGAAGACCTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTTAAAACAATGA ACGCTAAGTTGCTTATGGACCCAAAAAGGCAGATCTTTTTGG ACCAAAACATGCTGGCTGTCATAGACGAGCTGATGCAGGCCC TAAACTTTAATTCTGAAACAGTTCCCCAAAAATCTAGCCTCG AAGAACCCGATTTCTACAAGACAAAAATTAAATTATGCATCCT ATTACACGCCTTTCGTATCCGAGCAGTAACAATCGACAGAGT AATGAGTTATCTAAACGCCAGCTCCGGAGGAGGCTCCGGAGG AGGAGGCAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGGCTCT GGCGGAGGAAGCGGCGATGCCCACGTGAGCGAGGATTTCAC ATGGGAGAAGCCCCCCGAGGACCCTCCCGACAGCAAGAACA CACTGGTGCTGTTTGGCGCCGGCTTCGGCGCCGTGATCACAG TGGTGGTCATTGTGGTCATTATCAAGTGCTTCTGCAAGCACA GATCCTGTTTCAGGAGAAATGAGGCCAGCAGAGAGACAAAC AACAGCCTGACATTTGGCCCTGAGGAGGCCCTGGCCGAGCA GACAGTGTTTCTGGAGGGCAGGGGCAGCCTGCTGACCTGCG GAGACGTGGAGGAGAACCCTGGCCCCATGCACGGCGATACG CCTACCCTGCACGAGTACATGCTCGACCTGCAGCCAGAGACC ACGGACCTCTACTGCTATGAGCAGTTGAATGACAGCAGCGAA GAGGAGGATGAGATAGATGGGCCCGCCGGTCAGGCTGAGCC

		TGACCGGGCCCACTATAACATCGTCACTTTTTGCTGCAAGTGT GATTCAACGCTCAGGCTGTGCGTGCAGAGCACGCACGTGGA CATACGAACCCTAGAGGATCTCCTGATGGGGACCCTAGGGAT CGTATGTCCAATATGTAGTCAGAAGCCCATGCACCAGAAGCG GACAGCTATGTTCCAGGACCCGCAGGAGCGGCCCCGGAAGC TGCCGCAGCTGTGCACGGAGCTTCAGACTACAATACACGACA TCATCCTTGAGTGCGTGTATTGTAAGCAGCAGCTCCTGAGAC GCGAAGTCTATGACTTCGCGTTTCGGGACCTCTGCATCGTATA CCGCGACGGTAATCCGTACGCGGTATGCGATAAGTGTTTGAA GTTCTATTCAAAGATCAGCGAGTACAGGCACTACTGTTACTCG CTGTATGGTACAACGTTGGAGCAGCAGTACAACAAGCCGTTG TGCGACCTGCTCATACGTTGTATCAATTGCCAGAAGCCGCTGT GTCCTGAGGAGAAGCAGCGGCATCTGGACAAAAAGCAGAGG TTCCACAACATCCGTGGTCGCTGGACAGGTCGATGCATGTCT TGTTGCAGGAGTAGCCGTACTCGCCGTGAGACTCAGTTAAAG CTTAGCCATGGCTTCCCGCCGGAGGTGGAGGAGCAGGATGAT GGCACGCTGCCCATGTCTTGTGCCCAGGAGAGCGGGATGGA CCGTCACCCTGCAGCCTGTGCTTCTGCTAGGATCAATGTGTG A (SEQ ID NO: 81)
S14	Human IL12-TM-T2A-E6/E7-PEST 氨基酸序列	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAG QYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFL RCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAV HKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRK NASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRN LPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASR KTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLD QNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLH AFRIRAVTIDRVMSYLNASSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGS GDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFGAGFGAVITVVVIVVII KCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQTVFLEGRGSL LTCGDVEENPGPMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDS SEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCKCDSTLRLCVQSTHVD IRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPMHQKRTAMFQDPQERPRKLPQ LCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGNP YAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRC INCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTR RETQLKLSHGFPPEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASA RINV (SEQ ID NO: 82)
S15	mIL12-CD80TM 碱基序列	atgtgtcctcagaagctaaccatctcctggtttgccatcgttttgctggtgtctccactcatggccatgtg ggagctggagaaagacgtttatgttgtagaggtggactggactcccgatgcccctggagaaacagt gaacctcacctgtgacacgcctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagt cataggctctggaaagaccctgaccatcactgtcaaagagtttctagatgctggccagtacacctgcc acaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctccacaagaaggaaaatggaatttggt ccactgaaatttaaaaaatttcaaaaacaagactttcctgaagtgtgaagcaccaaattactccggac ggttcacgtgctcatggctggtgcaaagaaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagtagcag ttcccctgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctgcagagaaggtcacactggac caaagggactatgagaagtattcagtgtcctgccaggaggatgtcacctgcccaactgccgaggag accctgcccattgaactggcgttggaagcacggcagcagaataaatatgagaactacagcaccagc ttcttcatcagggacatcatcaaaccagacccgcccaagaacttgcagatgaagcctttgaagaactc acaggtggaggtcagctgggagtaccctgactcctggagcactccccattcctacttctccctcaagt tctttgttcgaatccagcgcaagaaagaaaagatgaaggagacagaggaggggtgtaaccagaaa ggtgcgttcctcgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcgggaatgtctgcgtgcaa gctcaggatcgctattacaattcctcatgcagcaagtgggcatgtgttccctgcagggtccgatccgg cggaggcggatcaggcggcggtggatctgggggtggcggatcttcgcgaagggtcattccagtct ctggacctgccaggtgtcttagccagtcccgaaacctgctgaagaccacagatgacatggtgaaga

		cggccagagaaaaactgaaacattattcctgcactgctgaagacatcgatcatgaagacatcacacg ggaccaaaccagcacattgaagacctgtttaccactggaactacacaagaacgagagttgcctggct actagagagacttcttccacaacaagagggagctgcctgccccacagaagacgtctttgatgatga ccctgtgccttggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagttccaggccatcaacgc agcacttcagaatcacaaccatcagcagatcattctagacaagggcatgctggtggccatcgatgag ctgatgcagtctctgaatcataatggcgagactctgcgccagaaacctcctgtgggagaagcagacc cttacagagtgaaaatgaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcacccgcgtcgtgaccatcaac agggtgatgggctatctgagctccgccTCCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGA GGCAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGGCG GAGGAAGCGGCGATGCCCACGTGAGCGAGGATTTCACATGG GAGAAGCCCCCCGAGGACCCTCCCGACAGCAAGAACACACT GGTGCTGTTTGGCGCCGGCTTCGGCGCCGTGATCACAGTGGT GGTCATTGTGGTCATTATCAAGTGCTTCTGCAAGCACAGATCC TGTTTCAGGAGAAATGAGGCCAGCAGAGAGACAAACAACAG CCTGACATTTGGCCCTGAGGAGGCCCTGGCCGAGCAGACAG TGTTTCTGTGA (SEQ ID NO: 83)
S16	mIL12-CD80TM 氨基酸序列	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAP GETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAG QYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCE APNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLS AEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQN KYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWS TPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQ CKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGGGGSGGGGS GGGGSSRRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHY SCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTR GSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNH QQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKM KLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSASGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGSGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFGAGFGAVI TVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPEEALAEQTV FL* (SEQ ID NO: 84)
	人CD8A跨膜域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCY (SEQ ID NO: 85)

权利要求书

1. 一种编码膜型 IL-12 细胞因子佐剂的 mRNA 肿瘤疫苗，其中，所述 mRNA 包含编码 IL-12 的序列(IL12)、编码膜结构域的序列(MD)以及编码肿瘤抗原的序列(Ag)三部分。

2. 如权利要求 1 所述的 mRNA 肿瘤疫苗，其中，

所述编码 IL-12 的序列(IL12)和所述编码膜结构域的序列(MD)位于一条 mRNA 上，所述编码肿瘤抗原的序列(Ag)位于另一条 mRNA 上；或者

所述编码 IL-12 的序列(IL12)、编码膜结构域的序列(MD)以及编码肿瘤抗原的序列(Ag)位于同一条 mRNA 上，所述三部分的排列顺序为 IL12-L1-MD-L2-Ag；或 Ag-L2-IL12-L1-MD；

其中 L1 为 Glycine/Serine 多肽连接子，L2 为 IRES 序列或 Glycine/Serine 多肽连接子或 2A 多肽连接子，L2 优选 2A 多肽连接子。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 mRNA 肿瘤疫苗，其中，所述肿瘤抗原 Ag 包括突变来源的肿瘤新抗原、病毒来源的肿瘤特异性抗原或肿瘤高表达的相关抗原。

4. 如权利要求 3 所述的 mRNA 肿瘤疫苗，其中，所述突变来源的肿瘤新抗原包括 KARS G12C、KRASG12D、EGFRvIII 或 $BRAF^{V600E}$；所述病毒来源的肿瘤特异性抗原包括 HPV E6/E7、内源性逆转录病毒抗原 hERT、LMP1 或 LMP2；所述肿瘤高表达的相关抗原包括 WT1、MAGE-A3、GP100、NY-ESO-I、HER2/Neu、Claudin18.2 、Mesothelin 或 MUC。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的 mRNA 肿瘤疫苗，其中，所述编码 IL-12 细胞因子的序列包含编码 IL-12B 多肽和 IL-12A 多肽的 ORF，其中 IL-12B 和 IL-12A 通过多肽接头(linker)连接，所述 linker 包括 Gly/Ser linker，所述 Gly/Ser linker 包含$(GnS)_m$，其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20 且 m 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20；所述 linker 优选为$(G4S)_3$ linker。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的 mRNA 肿瘤疫苗，其中，所述膜结构域包含跨膜结构域，优选包含跨膜结构域加胞内域，所述跨膜结构域包括 CD80 跨膜域、CD86 跨膜域、CD4 跨膜域、CD8 跨膜域、VEGFR 跨膜域、PDGF-RB 跨膜域，优选为 CD80 跨膜域；所述胞内域包括 CD80 胞内域、CD86 胞内域、CD4 胞内域、CD8 胞内域、VEGFR 胞内域、PDGF-RB 胞内域、PDGF-RB 胞内域截短体，其中，所述膜结构域优选为 CD80 跨膜域加 CD80 胞内域的组合。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的 mRNA 肿瘤疫苗，其中，所述 mRNA 肿瘤疫苗还包含负载 mRNA 的核酸载体，所述核酸载体包括脂质体、LPP 或 LPX，优选为 LNP 纳米脂质体。

8. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 7 中任一项所述的 mRNA 肿瘤疫苗和第二抗癌剂，所述第二抗癌剂包括免疫检查点抑制剂和/或双特异性 T 细胞衔接器(BiTE)。

9. 权利要求 1 至 7 中任一项所述的 mRNA 肿瘤疫苗或权利要求 8 所述的药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的应用。

10. 如权利要求 9 所述的应用，其中，所述肿瘤包括 B 细胞淋巴瘤、支气管癌、前列腺癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌症、外周神经系统癌症、食道癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、头颈癌、口腔癌、喉癌、唾液腺癌、胸腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、脂肪癌、睾丸癌、恶性纤维组织细胞瘤、结肠直肠癌、黑色素瘤、胃癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、胆管癌、小肠癌或阑尾癌、鳞状细胞癌、乳腺癌和卵巢癌。