



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118108860 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 29

(21) 申请号 202410260364.7

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2024.03.07

A61K 38/17 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00 (2006.01)

申请公布号 CN 118108860 A

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

(43) 申请公布日 2024.05.31

(56) 对比文件

(73) 专利权人 南京澄实生物医药科技有限公司

CN 113429486 A, 2021.09.24

地址 210000 江苏省南京市江北新区探

WO 2021254491 A1, 2021.12.23

路73号树屋十六栋A-4栋2层201室

审查员 杨光

(72) 发明人 韩悌云 徐实 李静 刘桂来

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限

公司 11245

专利代理师 陆惠中

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书2页 说明书14页

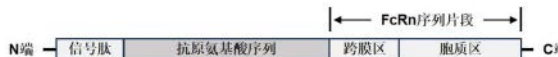
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

一种基于FcRn可提高细胞免疫水平的重组疫苗及应用

(57) 摘要

本发明提供一种基于FcRn可提高细胞免疫水平的融合蛋白构架、重组疫苗等。所述融合蛋白包含至少一种靶标抗原蛋白、FcRn蛋白的跨膜区和胞质区。本发明发现FcRn架构能够将抗原导向到胞内体,胞内体酸化后与溶酶体融合,促使抗原降解为抗原肽。本发明的基于FcRn的融合蛋白分子架构以及重组疫苗等,可有效增强细胞的抗原呈递,具有强细胞免疫原性,且可刺激或活化CD4+或CD8+T细胞,提高细胞免疫水平,为制备高效诱导细胞免疫的免疫药物设计领域提供新技术。



1. 一种融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白选自以下(a) - (d)的任意一种:

(a) 所述融合蛋白从N端到C端依次为:信号肽、靶标抗原BY55、GS linker、靶标抗原SPRY4、GS linker、FcRn蛋白的跨膜区和FcRn蛋白的胞质区;

(b) 所述融合蛋白从N端到C端依次为:信号肽、靶标抗原TCF7、GS linker、靶标抗原WNT6、GS linker、FcRn蛋白的跨膜区和FcRn蛋白的胞质区;

(c) 所述融合蛋白从N端到C端依次为:信号肽、靶标抗原Trp1、GS linker、FcRn蛋白的跨膜区和FcRn蛋白的胞质区;

(d) 所述融合蛋白从N端到C端依次为:信号肽、靶标抗原Trp2、GS linker、FcRn蛋白的跨膜区和FcRn蛋白的胞质区;

其中,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,所述GS linker的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,所述FcRn蛋白的跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述FcRn蛋白的胞质区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,所述靶标抗原BY55的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,所述靶标抗原SPRY4的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,所述靶标抗原TCF7的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,所述靶标抗原WNT6的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示,所述靶标抗原Trp1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,所述靶标抗原Trp2的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。

2. 一种重组核酸分子,其特征在于,编码权利要求1所述融合蛋白。

3. 一种重组基因表达盒,其特征在于,包含权利要求2所述重组核酸分子。

4. 一种重组载体,其特征在于,包含权利要求2所述重组核酸分子、或权利要求3所述重组基因表达盒。

5. 一种重组宿主细胞,其特征在于,包含权利要求2所述重组核酸分子、或权利要求3所述重组基因表达盒、或权利要求4所述重组载体。

6. 一种药物组合物,其特征在于,包含一种或多种权利要求1所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求2所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求3所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求4所述重组载体,和/或一种或多种权利要求5所述重组宿主细胞。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

8. 一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种权利要求1所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求2所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求3所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求4所述重组载体,和/或一种或多种权利要求5所述重组宿主细胞。

9. 一种或多种权利要求1中所述融合蛋白(a)和/或所述融合蛋白(b),和/或一种或多种权利要求2所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求3所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求4所述重组载体,和/或一种或多种权利要求5所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求6或7所述药物组合物,和/或一种或多种权利要求8所述重组疫苗在制备治疗急性骨髓性白血病的药物中的用途。

10. 一种或多种权利要求1中所述融合蛋白(c)和/或所述融合蛋白(d),和/或一种或多种权利要求2所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求3所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求4所述重组载体,和/或一种或多种权利要求5所述重组宿主细胞,和/

或一种或多种权利要求6或7所述药物组合物,和/或一种或多种权利要求8所述重组疫苗在制备治疗黑色素瘤的药物中的用途。

一种基于FcRn可提高细胞免疫水平的重组疫苗及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,特别是免疫药物技术领域,具体涉及一种基于FcRn可提高细胞免疫水平的重组疫苗、制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 细胞免疫,又称细胞介导免疫(Cell-mediated immunity),是清除细胞内寄生微生物最为有效的防御反应,也是抑制肿瘤的有效途径。T细胞是响应细胞免疫反应的主要细胞类群之一,可以被抗原呈递细胞(Antigen-presenting cell,APC)表面的抗原片段活化,转化为效应T细胞。由于T细胞只能识别显示在细胞表面的片段抗原,因此主要组织相容性复合物(Major histocompatibility complex,MHC)作为抗原呈递过程中的关键因子,在诱导宿主对病原体产生有效的适应性免疫的过程中不可或缺。当前许多实验研究表明,MHCII类分子向CD4⁺T细胞呈递抗原肽是激活细胞免疫反应的重要过程,并且在诱导免疫细胞清除肿瘤细胞或病原体方面发挥着关键作用。

[0003] 重组疫苗作为预防和治疗传染病和癌症的药剂和药物,在人类医学和兽医学中具有特别重要的意义。目前,评估重组疫苗有效性的一个关键因素,是检测疫苗对免疫生物体的特异性T细胞的激活程度。然而,基于常规架构的重组疫苗只能对T细胞产生微弱的刺激,甚至不能有效激活T细胞,不能够满足实验或医疗需求。

[0004] 新生儿Fc受体(Neonatal Fc Receptor,FcRn)由FCGRT基因编码,不仅存在于胚胎期,且在成年期的实质细胞(上皮,内皮,肝细胞和角质形成细胞)和造血细胞中广泛存在。研究表明,FcRn主要存在于胞内体(Endosome)和溶酶体(Lysosome)的膜上,其结构上能与β微球蛋白形成非共价结合,参与胞内体、溶酶体与细胞膜之间的循环。

[0005] 对于FcRn的应用,现有技术美国专利文献US6086875A(公开日2000-07-11)公开了一种激活或抑制哺乳动物全身免疫反应的方法,包括向表达FcRn受体的上皮组织的上皮屏障的管腔侧施用有效量的FcRn结合配偶体和选自下组的抗原的缀合物,病原体的抗原特征,自身免疫性疾病的抗原特征,和过敏原的抗原特征,其中FcRn结合配偶体是非特异性IgG或IgG的FcRn结合片段。现有技术中国专利文献CN101316927A(公开日2008-12-03)公开了FcRn受体的用途,具体公开了一种用于在细胞内生成抗体或者其功能性部分、衍生物和/或类似物的方法,包括提供能够利用FcRn受体蛋白生成所述抗体的细胞以及培养所述细胞以实现所述抗体的生成。现有技术中国专利文献CN104232667A(公开日2014-12-24)公开了FcRn介导的抗细粒棘球蚴靶向黏膜疫苗载体的构建方法,描述了抗原与小鼠IgG2的Fc结构域融合表达,可促进抗原被FcRn识别,不涉及FcRn相关的重组疫苗构建或应用。可见,并没有现有技术公开FcRn具有特定的优异性能,可用于构建抗原融合蛋白或重组疫苗。

[0006] 因此,本领域仍然亟需一种更优的融合抗原架构,以及相应构建的重组疫苗,达到更优的促进抗原呈递的能力,提高细胞免疫水平的效果。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种基于FcRn可提高细胞免疫水平的融合蛋白构架、重组疫苗等。本发明的融合蛋白包含至少一种靶标抗原蛋白、FcRn蛋白的跨膜区和胞质区。本发明发现FcRn架构能够将抗原导向到胞内体,胞内体酸化后与溶酶体融合,促使抗原降解为抗原肽,可有效增强细胞的抗原呈递。本发明还提供相应的重组核酸、基因表达盒、载体、宿主细胞、药物组合物、疫苗、制药用途、应用方法等。

[0008] 本发明的一方面提供一种融合蛋白,其特征在于,包含:

[0009] (a) 至少一种靶标抗原蛋白;和

[0010] (b) FcRn蛋白的跨膜区和FcRn蛋白的胞质区。

[0011] 进一步地,其特征在于,所述FcRn蛋白来源于哺乳动物。

[0012] 进一步地,其特征在于,所述FcRn蛋白的跨膜区和胞质区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,FcRn蛋白的跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,FcRn蛋白的胞质区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0013] 进一步地,其特征在于,所述抗原为任意一种肿瘤抗原或肿瘤抗原组合。

[0014] 进一步地,其特征在于,所述肿瘤抗原选自以下组的一种或多种:BY55 (CD160 antigen)、SPRY4 (Protein sprouty homolog 4)、TCF7 (Transcription factor 7)、WNT6 (Protein Wnt-6)、Trp1 (Short transient receptor potential channel 1)、Trp2 (Short transient receptor potential channel 2)。

[0015] 进一步地,其特征在于,所述BY55氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,所述SPRY4氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,所述TCF7氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,所述WNT6氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示,所述Trp1氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,所述Trp2氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。

[0016] 进一步地,其特征在于,所述抗原位于所述FcRn蛋白跨膜区的N-端;所述抗原的N-端任选地包含信号肽;所述融合蛋白的各部分可以任选地通过接头序列(linker)间隔开。

[0017] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白从N端到C端依次包含:信号肽、抗原氨基酸序列、FcRn序列跨膜区、FcRn序列胞质区。

[0018] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白从N端到C端依次包含以下(a)-(d)的任意一种构架:

[0019] (a) 信号肽、靶标抗原BY55、GS linker、靶标抗原SPRY4、GS linker、FcRn蛋白的跨膜区和FcRn蛋白的胞质区;

[0020] (b) 信号肽、靶标抗原TCF7、GS linker、靶标抗原WNT6、GS linker、FcRn蛋白的跨膜区和FcRn蛋白的胞质区;

[0021] (c) 信号肽、靶标抗原Trp1、GS linker、FcRn蛋白的跨膜区和FcRn蛋白的胞质区;

[0022] (d) 信号肽、靶标抗原Trp2、GS linker、FcRn蛋白的跨膜区和FcRn蛋白的胞质区。

[0023] 进一步地,其特征在于,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;所述GS linker的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;所述BY55氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,所述SPRY4氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,所述TCF7氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,所述WNT6氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示,所述Trp1氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,所述Trp2氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,所述FcRn蛋白的跨膜区和FcRn蛋白的胞质区的氨基

酸序列如SEQ ID NO:4所示,所述FcRn蛋白的跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述FcRn蛋白的胞质区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0024] 本发明的另一方面提供一种重组核酸分子,其特征在于,编码本发明任一项所述融合蛋白。

[0025] 本发明的另一方面提供一种重组基因表达盒,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子。

[0026] 进一步地,其特征在于,所述重组基因表达盒从5'端到3'端依次包含:5' UTR、信号肽、抗原核酸序列、GS linker、FcRn序列跨膜区和胞质区、3' UTR。

[0027] 本发明的另一方面提供一种重组载体,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子、或所述重组基因表达盒。

[0028] 本发明的另一方面提供一种重组宿主细胞,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子、或所述重组基因表达盒、或所述重组载体。

[0029] 本发明的另一方面提供一种药物组合物,其特征在于,包含一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞。

[0030] 进一步地,其特征在于,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0031] 本发明的另一方面提供一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞。

[0032] 本发明的另一方面提供本发明一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述药物组合物在以下任一项中的用途:

[0033] (a) 制备用于提高细胞抗原呈递的药物;

[0034] (b) 制备用于在生物中诱导免疫反应的药物;

[0035] (c) 制备用于刺激或激活生物体内CD4⁺或CD8⁺ T细胞的药物;

[0036] (d) 制备用于治疗、接种疫苗或生物免疫的药物。

[0037] 进一步地,其特征在于,所述药物为用于治疗癌症的药物。

[0038] 进一步地,其特征在于,所述癌症为白血病、黑色素瘤、结直肠癌、胃癌、食道癌、头颈癌、膀胱癌、宫颈癌、肉瘤、细胞瘤、肺癌、结肠癌、直肠癌、卵巢癌、肾脏癌、胰脏癌、肝癌、乳腺癌、骨髓瘤、神经胶质瘤或淋巴瘤等。

[0039] 本发明的另一方面提供一种用于提高哺乳动物APC(抗原呈递细胞)中抗原呈递效果的方法,其特征在于,该方法包括向细胞和/或其他免疫生物体施用一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种所述重组核酸分子,和/或一种或多种所述重组基因表达盒,和/或一种或多种所述的宿主细胞,和/或一种或多种所述的重组载体,和/或一种或多种所述药物组合物。优选地,所述方法是非治疗和诊断目的的。

[0040] 本发明的另一方面提供一种用于刺激或活化CD4⁺或CD8⁺ T细胞的方法,其特征在

于,该方法包括向细胞和/或其他免疫生物体施用一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种所述重组核酸分子,和/或一种或多种所述重组基因表达盒,和/或一种或多种所述的宿主细胞,和/或一种或多种所述的重组载体,和/或一种或多种所述药物组合物。优选地,所述方法是非治疗和诊断目的的。

[0041] 本发明的基于FcRn的融合分子架构、可提高细胞免疫水平的重组疫苗等具有如下有益技术效果:

[0042] 1. 本发明的基于FcRn的融合分子架构以及重组疫苗等,可有效增强细胞的抗原呈递,具有强细胞免疫原性,且可刺激或活化CD4⁺或CD8⁺ T细胞,提高细胞免疫水平,为制备高效诱导细胞免疫的免疫药物设计领域提供新技术。

[0043] 2. 本发明实施例4表明,FcRn架构能够将抗原导向到胞内体,胞内体酸化后与溶酶体融合,促使抗原降解为抗原肽,随后与MHC I类或II类分子结合,从而达到促进抗原呈递的目的。

[0044] 3. 本发明实施例5表明,基于本发明的重组核酸疫苗(疫苗B)能够诱导显著的抗原特异性细胞免疫应答,效果远远优于疫苗A和疫苗C,接近于阳性刺激物引起的细胞免疫水平。

[0045] 4. 本发明实施例6表明,基于本发明的重组核酸疫苗I和疫苗II均能够激活荷瘤小鼠的免疫系统,并提供有效免疫保护。在接种第三针疫苗之后,肿瘤体积显著小于阴性对照组,并且持续抑制肿瘤生长。

[0046] 5. 本发明实施例7治疗实验表明,基于本发明的重组核酸疫苗III和疫苗IV均能够起到治疗作用,抑制肿瘤体积的增长;同时施用疫苗III和疫苗IV,效果更佳,可以极大程度抑制肿瘤增殖,几乎达到完全抑制。

[0047] 6. 本发明实施例7预防实验表明,基于本发明的重组核酸疫苗III和疫苗IV能够起到预防作用,抑制肿瘤增殖,并有效提高小鼠存活率。接种基于本发明的重组核酸疫苗III&疫苗IV后,在荷瘤第25天仍旧有80%小鼠存活。

[0048] 7. 基于本发明的细胞免疫抗原呈递架构设计策略,可根据靶动物有针对性的选择特异性或同源性高的FcRn分子构建细胞免疫疫苗。例如,在小鼠免疫实验中,来源于人(Homo sapiens)FcRn的跨膜区和胞质区序列与小鼠高度同源,因此可以显著激活细胞免疫。

[0049] 8. 本发明的基于FcRn的融合分子架构以及重组疫苗等,可用于人和动物的疾病预防和治疗,特别适用于动物免疫药物的生产和研发,能够显著提高免疫个体的抗原呈递和细胞免疫反应,且在诱导细胞免疫应答方面远优于现有技术,例如优于现有常规核酸疫苗分子架构,本发明具有广泛的应用前景。

[0050] 9. 基于本发明的重组核酸疫苗能够应用于多种肿瘤疫苗的开发,其诱导的细胞免疫在预防、治疗和治疗后长期保护方面均表现优异,具有极高的研发及商业价值。

附图说明

[0051] 图1为本发明的融合蛋白分子结构示意图。

[0052] 图2为包含本发明融合蛋白分子的基因表达盒架构示意图。

[0053] 图3为包含本发明基因表达盒架构的重组载体质粒示意图。

[0054] 图4A-图4D为本发明疫苗A、B、C、D的质量控制峰图以及纯度检测结果,其中图4A为疫苗A的质量控制峰图以及纯度检测结果,图4B为疫苗B的质量控制峰图以及纯度检测结果,图4C为疫苗C的质量控制峰图以及纯度检测结果,图4D为疫苗D的质量控制峰图以及纯度检测结果。

[0055] 图5为本发明疫苗D转染DC 2.4细胞后,检测所表达出的蛋白在内质网、内体、溶酶体中的共定位情况的照片。

[0056] 图6为本发明疫苗A、B、C在小鼠体内免疫及取样流程图。

[0057] 图7为基于本发明的重组疫苗B和基于常规分子架构疫苗A、C的ELISPOT结果对比图。

[0058] 图8为基于本发明的重组疫苗B和基于常规分子架构疫苗A、C的ELISPOT原始结果图。

[0059] 图9为基于本发明的疫苗I的架构示意图。

[0060] 图10为基于本发明的疫苗II的架构示意图。

[0061] 图11A-图11B,其中图11A为本发明实施例6的小鼠免疫流程;图11B为本发明实施例6中基于本发明的重组疫苗对C1498急性骨髓性白血病小鼠模型的抑制肿瘤体积免疫治疗效果。

[0062] 图12为基于本发明的疫苗III的架构示意图。

[0063] 图13为基于本发明的疫苗IV的架构示意图。

[0064] 图14A-图14B,其中图14A为实施例7治疗实验的小鼠免疫流程;图14B为本发明实施例7治疗实验中基于本发明的重组疫苗对B16-F10黑色素瘤小鼠模型的肿瘤体积治疗效果。

[0065] 图15A-图15C,其中图15A为实施例7预防实验的小鼠免疫流程;图15B为本发明实施例7预防实验中基于本发明的重组疫苗对B16-F10黑色素瘤小鼠模型的肿瘤体积预防效果;图15C为本发明实施例7预防实验中基于本发明的重组疫苗对B16-F10黑色素瘤小鼠模型的存活率预防效果。

具体实施方式

[0066] 术语“FcRn”指新生儿结晶片段Fc受体(Neonatal fragment crystallizable receptor)或新生儿Fc受体(Neonatal Fc receptor),是人类中由FCGRT基因编码的蛋白质。它是一种IgGFc受体,其结构与 β -2-微球蛋白相关。在啮齿动物中,FcRn最初被确定为通过母乳将母体免疫球蛋白G从母体转运到新生儿后代的受体,因此被称为新生儿Fc受体。

[0067] 术语“FcRn的跨膜区和胞质区”指FcRn蛋白的跨膜结构域和胞质结构域的蛋白序列,一般指FcRn蛋白的C端肽链,从跨膜区的第一个氨基酸开始,到最后一个氨基酸结束。在一些情况下,FcRn的跨膜区和胞质区肽链之间存在linker序列。示例性,编码的FcRn序列跨膜区和胞质区的氨基酸序列可以如SEQ ID NO:4所示,其中FcRn序列跨膜区的氨基酸序列可以如SEQ ID NO:6所示,FcRn序列胞质区的氨基酸序列可以如SEQ ID NO:7所示,以及在保持FcRn的跨膜区和胞质区功能的前提下,与其序列具有80%(例如,80%、85%、90%、95%、98%、99%、100%)以上同源性的序列。

[0068] 术语“肿瘤抗原”或“肿瘤相关抗原”, tumor-associated antigen, TAA, 通常包括本领域已知的含义, 其包括在肿瘤细胞上表达(或与肿瘤细胞发育相关)、已知或被认为对肿瘤细胞的致瘤特性有作用的任何分子。许多肿瘤抗原为本领域已知。一种分子是否为肿瘤抗原还可以根据本领域技术人员熟知的技术和测定法确定, 例如克隆发生测定法(clonogenic assay)、转化试验、体外或体内肿瘤形成测定法、凝胶迁移测定法(gel migration assay)、基因敲除分析等。术语“肿瘤抗原”可以指人跨膜蛋白, 即锚定在细胞脂双层中的细胞膜蛋白。肿瘤抗原分子包括但不限于: EGFR、HER2、HER3、HER4、EpCAM、CEA、TRAIL、TRAIL受体1、TRAIL受体2、淋巴毒素 β 受体、CCR4、CD19、CD20、CD22、CD28、CD33、CD40、CD80、CSF-1R、CTLA-4、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、hepsin、黑素瘤相关的硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、VEGF受体1、VEGF受体2、IGF1-R、TSLP-R、TIE-1、TIE-2、TNF- α 、TNF样凋亡微弱诱导剂(TWEAK)、IL-1R。本文所用TAA为BY55(CD160 antigen)、SPRY4(Protein sprouty homolog 4)、TCF7(Transcription factor 7)、WNT6(Protein Wnt-6)、Trp1(Short transient receptor potential channel 1)或Trp2(Short transient receptor potential channel 2)。

[0069] 术语“给药”或“接种”指, 基于本发明核酸疫苗或疫苗组合物优选地经肌内的或皮下的途径给予, 尽管其他的给药途径也能被使用, 例如, 口服、鼻内(例如气雾剂或其他非针剂给药)、淋巴结内、真皮内、腹膜内、直肠或阴道给药, 或通过联用的途径。在动物的颈部肌内的给药是优选的。可采用加速方案(boosting regimens)将给药方案调节为提供最佳免疫。

[0070] 术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤, 包括但不限于: 转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0071] 术语“重组核酸分子”指具有在自然界中不连接在一起的序列的多核苷酸。重组多核苷酸可包括在合适的载体中, 且该载体可用于转化至合适的宿主细胞。然后多核苷酸在重组宿主细胞中表达以产生例如“重组多肽”“重组蛋白”“融合蛋白”等。

[0072] 术语“重组表达载体”指用于表达例如编码所需多肽的多核苷酸的DNA结构。重组表达载体可包括, 例如包含(1)对基因表达具有调控作用的遗传元素的集合, 例如启动子和增强子; (2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列; 以及(3)适当的转录和翻译起始和终止序列的转录亚单位。重组表达载体以任何合适的方式构建、可以使用任何载体, 包括质粒、病毒、噬菌体和转座子。用于本公开的可能载体包括但不限于染色体、非染色体和合成的DNA序列, 例如病毒质粒、细菌质粒、噬菌体DNA、酵母质粒以及从质粒和噬菌体DNA的组合中衍生的载体, 来自如慢病毒、逆转录病毒、牛痘、腺病毒、鸡痘、杆状病毒、SV40和伪狂犬病等病毒的DNA。包括自复制型载体和非自复制型载体。

[0073] 术语“mRNA”, 指信使RNA、Messenger RNA, 中文译名“信使核糖核酸”, 是由DNA的一条链作为模板转录而来的、携带遗传信息能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。

[0074] 术语“5' -UTR”, 指“5' 非翻译区”或“5' UTR”, 为转录成初级RNA转录本(前体mRNA)并位于编码序列上游的一部分基因。初级转录本是初始RNA产物, 包含内含子和外显子, 由DNA转录产生。许多初级转录本必须经过RNA加工以形成具有生理活性的RNA。形成成熟mRNA的加工过程包括修饰末端、切除内含子、加帽和/或从前体RNA上剪切出各rRNA分子。因此, mRNA的5' UTR是不会被翻译成蛋白质并位于编码序列上游的一部分mRNA。在基因组序列中,

5' UTR通常被定义为位于转录起始点和起始密码子之间的区域。脊椎动物mRNA的5' 非翻译区(5' UTR)长度可以是几十个碱基到几百个碱基。

[0075] 术语“3' -UTR”,指“3' -非翻译区”或“3' UTR”,涉及位于基因的3' 端,在蛋白质编码区的终止密码子下游,并且被转录但不翻译成氨基酸序列的区域,或涉及RNA分子中的对应区域。3' -非翻译区通常从翻译产物的终止密码子延伸至通常在转录过程之后附着的多聚(A)序列。哺乳动物mRNA的3' -非翻译区通常具有已知为AAUAAA六核苷酸序列的同源区。该序列可能是多聚(A)附着信号并且经常位于多聚(A)附着位点上游的10至30个碱基处。3' -非翻译区可以包含一个或更多个反向重复,可以折叠产生茎环结构,所述结构充当核糖核酸外切酶的屏障或与已知提高RNA稳定性的蛋白质(例如,RNA结合蛋白)相互作用。

[0076] 术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生基于本发明的重组疫苗的任何类型的细胞系统,包括真核细胞,例如,哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞;和原核细胞,例如,大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞。

[0077] 术语“个体”、“患者”或者“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于,家养动物(例如,猪、牛、羊、猫、狗和马等),灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴),以及啮齿类动物(例如,兔、小鼠和大鼠等)。

[0078] 术语“转化、转染、转导”具有本领域技术人员普遍理解的意思,即将外源性的DNA、RNA导入宿主的过程。

[0079] 术语“药物组合”或“药物组合物”是指包含在药物生产领域中广泛采用的辅助物料。使用载体的主要目的在于提供一种使用安全、性质稳定和/或具有特定功能性的药物组合物,还在于提供一种方法,以便在为受试者体内得到有效吸收。药学上可接受的载体可以是具有惰性的填充剂,也可以是为药用组合提供某种功能(例如稳定组合物的整体pH值或防止组合物中活性成分的降解)的功效成分。药学上可接受的载体的非限制性实例包括但不限于粘合剂、助悬剂、乳化剂、稀释剂(或填充剂)、成粒剂、粘胶剂、崩解剂、润滑剂、抗粘剂、助流剂、胶凝剂、吸收延迟剂、溶解抑制剂、增强剂、吸附剂、缓冲剂、螯合剂、防腐剂、着色剂、矫味剂和甜味剂等。

[0080] 术语“治疗”是指:在罹患疾病之后,使受试者接触(例如给药)基于本发明的重组疫苗、组合物等,从而与不接触时相比使该疾病的症状减轻,并不意味着必需完全抑制疾病的症状。罹患疾病是指:身体出现了疾病症状。

[0081] 术语“预防”是指:在罹患疾病之前,通过使受试者接触(例如给药)基于本发明的重组疫苗、组合物等,从而与不接触时相比减轻罹患疾病后的症状,并不意味着必需完全抑制患病。

[0082] 除非另外定义或由背景清楚指示,否则在本公开中的全部技术与科学术语具有如本公开所述领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0083] 本发明公开了一种有效提高细胞的抗原呈递效率的融合分子架构、基于该架构的重组疫苗制备方法及应用。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,他们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显

能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0084] 本发明提供的融合蛋白和编码核酸及其元件,制备方法及应用中,所用原料及试剂均可由市售获得。

[0085] 下面结合实施例,进一步阐明本发明。其中,作为一种优选,选用核酸疫苗架构用于制备重组疫苗。

[0086] 实施例1本发明重组核酸疫苗以及对照疫苗的构建

[0087] 为了制备包含本发明融合分子(序列如SEQ ID NO:1所示)的重组核酸疫苗,本发明的融合蛋白分子结构示意图如图1所示,从N端到C端依次包含:信号肽、抗原氨基酸序列、FcRn序列跨膜区、FcRn序列胞质区。首先构建一个基因表达盒,包含本发明融合蛋白分子的基因表达盒架构示意图如图2所示,从5'端到3'端依次包含:5' UTR、信号肽(编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示)、抗原核酸序列(即靶标抗原)、GS linker(编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示)、FcRn序列跨膜区和胞质区(其中,编码的FcRn序列跨膜区和胞质区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,其中FcRn序列跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,FcRn序列胞质区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示)、3' UTR。本实施例采用Fluc表位多肽作为靶标抗原,编码Fluc表位多肽的序列(编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示)被克隆到表达盒中,作为模型抗原。随后,基于密码子简并性对完整的基因表达盒序列做优化,通过基因合成的方式直接获得DNA序列(委托金斯瑞公司合成)。最后,将合成的基因表达盒DNA序列插入至可用于体外RNA转录的表达载体中,得到用于制备重组核酸疫苗的载体质粒,包含本发明基因表达盒架构的重组载体质粒示意图如图3所示。

[0088] 根据上述方法,制备用于实验的(1)-(4)载体,其中本发明的重组核酸疫苗为疫苗B、疫苗D,对照疫苗为疫苗A、疫苗C。

[0089] (1) 仅表达Fluc表位多肽的重组核酸疫苗(疫苗A)制备载体

[0090] 步骤a:合成Fluc表位多肽基因片段作为抗原序列;

[0091] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体;

[0092] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。优选地,载体为pUC57,以下疫苗B、疫苗C、疫苗D中的载体也可为pUC57。

[0093] 步骤c:制备重组质粒

[0094] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到仅表达Fluc表位多肽的重组核酸疫苗制备载体。

[0095] (2) 基于本发明的重组核酸疫苗(疫苗B)制备载体

[0096] 步骤a:如上述(1)步骤a,合成信号肽-Fluc表位多肽-GS linker-FcRn序列跨膜区和胞质区基因片段,其中Fluc表位多肽作为抗原序列;

[0097] 步骤b:如上述(1)步骤b,构建核酸疫苗架构载体;

[0098] 步骤c:制备重组质粒

[0099] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到表达基于本发明的重组核酸疫苗制备载体。

[0100] (3) 仅表达内参蛋白Tubulin的重组核酸疫苗(疫苗C)制备载体

- [0101] 步骤a:如上述(1)步骤a,合成鼠源的Tubulin(mTubulin)基因片段作为抗原序列;
- [0102] 步骤b:如上述(1)步骤b,构建核酸疫苗架构载体;
- [0103] 步骤c:制备重组质粒
- [0104] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到表达基于mTubulin 的重组核酸疫苗制备载体。
- [0105] (4) 基于本发明且表达EGFP蛋白的重组核酸(疫苗D)制备载体
- [0106] 步骤a:如上述(1)步骤a,信号肽-EGFP-GS linker-FcRn序列跨膜区和胞质区基因片段,其中EGFP为绿色荧光蛋白,用于细胞定位;
- [0107] 步骤b:如上述(1)步骤b,构建核酸疫苗架构载体;
- [0108] 步骤c:制备重组质粒
- [0109] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明且表达EGFP蛋白的重组核酸(疫苗D)制备载体。
- [0110] 表1 实施例1中涉及的氨基酸序列

元件名称以及序列编号	序列
融合蛋白分子SEQ ID NO:1	MTRLTVLALLAGLLASSRAAHIEVDITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLSMGIQPTVVVFSKKGKILNVQKKLPGGSGGGGGSGGNQIIPDTAILSVVPPFHHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPLGSGLGGGGSGVLVVGIVIGVLLLTAAGVGGALLWRMRSGLPAPWISLRGDDTGVLPTPGEAQDADLKDVNVIPATA
信号肽SEQ ID NO:2	MTRLTVLALLAGLLASSRA
GS linker SEQ ID NO:3	GGSGGGSGG
FcRn序列跨膜区和胞质区SEQ ID NO:4	VLVVGIVIGVLLLTAAGVGGALLWRRMRSGLPAPWISLRGDDTGVLPTPGEAQDADLKDVNVIPATA
Fluc表位多肽SEQ ID NO:5	GNQIIPDTAILSVVPPFHHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPL
FcRn序列跨膜区SEQ ID NO:6	VLVVGIVIGVLLLTAAGVGGALLW
FcRn序列胞质区SEQ ID NO:7	RRMRSGLPAPWISLRGDDTGVLPTPGEAQDADLKDVNVIPATA
mTubulin序列SEQ ID NO:19	MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGKHVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIDLVLDRIRKLADQCTGLQGFLVFHSFGGGTSGGFTSLLMERLSVDYGGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTHTTLEHSDCAFMDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNLIGQIVSSITASLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFPLATYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYMACCLLYRGDVVVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPTGFKVGINYQPPTVPPGDLAKVQRAVCMLSNNTTAIAEAWARLDHKFDL MYAKRAFVHVYVGE GMEEGEFSEAREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGEEGEEY

EGFP序列SEQ ID NO:20	MVSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTT LTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKG IDFKEDGNILGHKLEYNYNVSHVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSQLADHYQQNTPIGDG PVLLPDNHVLSLQALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDLYK
-----------------------	--

[0112] 实施例2本发明重组核酸疫苗与对照疫苗制备

[0113] (1) 加帽mRNA疫苗制备

[0114] 步骤a:将实施例1中用于生产加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0115] 步骤b:将线性化的质粒进行体外共转录加帽反应,将7-甲基化鸟苷酸帽结构加至转录的mRNA的5'端,并对模板DNA进行降解。

[0116] (2) 非加帽mRNA疫苗制备

[0117] 步骤a:将实施例1中用于生产非加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0118] 步骤b:将线性化的质粒进行体外非加帽的转录反应,并对模板DNA进行降解。

[0119] (3) DNA疫苗制备

[0120] 步骤a:将实施例1中用于生产DNA疫苗的载体质粒进行扩增,获得大量用于纯化的目的质粒。

[0121] 步骤b:用去内毒素质粒提取及纯化试剂盒对目的质粒进行提取纯化。

[0122] 实施例3本发明重组核酸疫苗与对照疫苗质量控制

[0123] 以实施例2中的加帽mRNA疫苗制备的方法制备获得疫苗A、疫苗B、疫苗C、疫苗D。对生产的重组核酸进行纯度检测,用于实验的5组重组核酸疫苗纯度均大于85%,如图4A-D所示。具体描述为:(1)图4A显示,仅表达Fluc表位多肽的重组核酸(疫苗A),纯度为92.6%;(2)图4B显示,基于本发明的重组核酸(疫苗B),纯度为91.8%;(3)图4C显示,仅表达内参蛋白mTubulin的重组核酸(疫苗C),纯度为85.9%。(4)图4D显示,基于本发明且表达EGFP蛋白的重组核酸(疫苗D),纯度为88.6%。上述纯度均符合生产疫苗的质量要求。

[0124] 实施例4基于本发明的疫苗在细胞内的呈递途径

[0125] 通过细胞转染试剂,将实施例3中的疫苗D转染进DC 2.4细胞,检测基于本发明架构的核酸疫苗,所表达出的蛋白在内质网、内体、溶酶体中的共定位情况。

[0126] 检测结果如图5所示,DAPI显色区域为细胞核,Calnexin显色区域为内质网,Rab11显色区域为胞内体(Endosome),LAMP-1显色区域为溶酶体,EGFP为绿色荧光蛋白,Merge图片为右侧三张图片的融合。由于EGFP是基于本发明所述的FcRn疫苗架构表达,因此可以显示出基于本发明的疫苗在细胞内的表达情况、定位及呈递路径。

[0127] 从结果图中可以看出,基于本发明FcRn架构表达的EGFP主要定位于内质网和胞内体(白色箭头所示),由于EGFP蛋白在溶酶体中发生降解,因此溶酶体中荧光信号相对较少,但仍旧足够显示存在共定位。上述结果证明了本发明的理论机制:FcRn架构能够将抗原导向到胞内体,胞内体酸化后与溶酶体融合,促使抗原降解为抗原肽,随后与MHC I类或II类分子结合,从而达到促进抗原呈递的目的。

[0128] 实施例5重组核酸疫苗在小鼠体内的免疫效果

[0129] 将实施例3中获得的高质量重组核酸疫苗A、B、C分别进行LNP包裹,用于本实施例

的小鼠免疫实验。

[0130] 实验选用6-8周龄的C57BL/6 品系雌性小鼠共15只,每只体重20 g左右。其中,每组实验5只小鼠,共3组。具体如表2所示,本表以及下文中剂量指活性成分量。

[0131] 表2免疫实验动物分组及处理方式

疫苗组别	免疫日程	
	Day0	Day21
[0132] A	s.c. 剂量 5 μ g/只	s.c. 剂量 5 μ g/只
B	s.c. 剂量 5 μ g/只	s.c. 剂量 5 μ g/只
C	s.c. 剂量 5 μ g/只	s.c. 剂量 5 μ g/只

[0133] 注:s.c.代表通过注射方式,在小鼠腹股沟皮下进行给药。

[0134] 将上述各组小鼠按照表2的免疫流程进行初免和二免,第28天(Day28)处死小鼠,获取新鲜脾脏,制备脾细胞悬液,通过ELISPOT检测脾细胞悬液中的特异性T细胞。免疫及取样流程如图6所示。

[0135] ELISPOT实验所使用的抗原肽(peptide)刺激物如表3所示,均为针对疫苗A、B所使用外源抗原Fluc蛋白的刺激物。其中,peptide pool为Flucpep-1、Flucpep-2和Flucpep-3的混合物。由于疫苗C所使用抗原为小鼠内源性的Tubulin蛋白(内参组),理论上不会产生针对Fluc蛋白产生特异性细胞免疫,使用PMA和PHA刺激物处理细胞作为阳性对照;此外,将不添加任何刺激物的内参组细胞作为阴性对照。

[0136] 表3 ELISPOT实验所使用的peptide刺激物

名称	序列(编号)	MHC分型
Flucpep-1	ITYAEYFEM (SEQ ID NO:8)	H2-Kb
Flucpep-2	SVVPFHGFG (SEQ ID NO:9)	H2-Kb
Flucpep-3	YDLSNLHEI (SEQ ID NO:10)	H2-Db
Flucpep-4	LMYRFEEEL (SEQ ID NO:11)	H2-Db
Flucpep-5	GALFIGVAVAPANDI (SEQ ID NO:12)	H2-IAb

[0138] ELISPOT检测结果如图7和图8所示,其中图7为基于本发明的重组疫苗B和基于常规分子架构疫苗A、C的ELISPOT结果对比图,图8为基于本发明的重组疫苗B和基于常规分子架构疫苗A、C的ELISPOT原始结果图。由实验结果可知,用仅表达Fluc表位多肽的常规重组核酸(疫苗A)免疫小鼠,能够诱导小鼠产生针对外源性抗原的细胞免疫,但细胞免疫水平很低。结合疫苗C(对照组)的实验结果,证明疫苗A诱导的特异性细胞免疫效果不佳,与阴性对照结果相当。而基于本发明的重组核酸疫苗(疫苗B)能够诱导显著的抗原特异性细胞免疫应答,效果远远优于疫苗A,接近于对照组中阳性刺激物引起的细胞免疫水平。图8为上述结果的原始ELISPOT图,作为佐证材料展示。

[0139] 分析产生上述结果的原因,常规分子架构无法将抗原靶向性地引入细胞免疫呈递途径,只能诱导产生低水平的抗原特异性细胞免疫。而基于本发明的重组核酸疫苗,以FcRn的跨膜区和胞质区作为促进抗原呈递的关键架构元件,将抗原多肽靶向聚集在MHC II富集的溶酶体中,从而促进抗原CD4表位的高效递呈,这点从Flucpep-5的检测结果中可以得到验证。随后,CD4⁺T细胞辅助CD8⁺T细胞的活化,从而获得了更高水平的抗原特异性细胞免疫。此外,FcRn具有特殊的recycling(回收)属性,在溶酶体中未降解的蛋白会通过“recycle”

系统重新回到溶酶体中再次降解,理论上能够获得更高的蛋白降解效率。

[0140] 实施例6基于本发明的重组核酸疫苗对C1498急性骨髓性白血病小鼠模型的免疫治疗效果

[0141] 依据实施例5的结果和分析,已经能够得出结论:基于本发明的重组核酸疫苗能够有效激活抗原特异性的细胞免疫反应,并显著优于当前其他发明的架构。为了验证所诱导的细胞免疫反应能够起到治疗的效果,以C1498急性骨髓性白血病小鼠模型作为实验对象,验证基于本发明的疫苗能够提供良好的治疗效果。

[0142] 实验选用C57BL/6 品系小鼠建立肿瘤模型,并验证疫苗疗效。实验小鼠具体分组如表4所示,通过皮下注射方式进行给药。

[0143] 表4实施例6中治疗实验动物分组及处理方式

疫苗组别	小鼠数量(只)	处理方式
阴性对照	6	不接种疫苗
mTubulin	8	接种含有内源蛋白Tubulin的疫苗
疫苗I	8	接种含有基于本发明的疫苗I
疫苗II	9	接种含有基于本发明的疫苗II

[0145] 其中,疫苗I、疫苗II的抗原为串联表达C1498 TAA靶点肽段,所涉及抗原靶标为BY55(CD160 antigen)、SPRY4(Protein sprouty homolog 4)、TCF7(Transcriptionfactor 7)和WNT6(Protein Wnt-6)。其中,疫苗I的架构示意图如图9所示,从5'到3'端,依次包含信号肽、靶标抗原BY55、GS linker、靶标抗原SPRY4、GS linker、本发明FcRn片段(即FcRn序列跨膜区和胞质区),BY55氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,SPRY4氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,其他元件氨基酸序列如表1所示。

[0146] BY55氨基酸序列:DGITEKSSQLVFTIEQATPSDSGTYYCCARSQKPEIYIHGHFLSVLVTGNHTEIRQRQRSHPDFSHINGTLSSG(SEQ ID NO:13)。

[0147] SPRY4氨基酸序列:VGADDRSWVFSYAQRKWHSMLANEKAPIKGIQPEKVGLLLDYEAKKLSLVDVSRISVIHTLQTDFRGPVAPAFALWDGELLTHSGL(SEQ ID NO:14)。

[0148] 其中,疫苗II的架构示意图如图10所示,从5'到3'端,依次包含信号肽、靶标抗原TCF7、GS linker、靶标抗原WNT6、GS linker、本发明FcRn片段(即FcRn序列跨膜区和胞质区),TCF7氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,WNT6氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示,其他元件氨基酸序列如表1所示。

[0149] TCF7氨基酸序列:SLTSGSMGQLPHTVSWSPPLYPLSPSCGYRQHFPAPTAAPGAPYPRFTHPSLMLGSGVPGHPAAIHPAIVPSSGK(SEQ ID NO:15)。

[0150] WNT6氨基酸序列:QAPRGRAPPRPSGLLGTGPPGPTGSPDASAAWEWGGCGDDVDFGDEKSRLFMDAQHKRGRGDIALVQLHNNEAGRLAVRSH(SEQ ID NO:16)。

[0151] 将上述各组小鼠按照图11A所示的免疫流程进行免疫治疗,疗程中共注射4次疫苗,每次注射剂量20 μ g,第18天处死小鼠,测量肿瘤体积并进行统计分析。

[0152] 由图11B所示的统计结果可知,基于本发明的重组核酸疫苗I和疫苗II均能够激活荷瘤小鼠的免疫系统,并提供有效免疫保护。在接种第三针疫苗之后,肿瘤体积显著小于阴性对照组,并且持续抑制肿瘤生长。基于本发明的疫苗I和疫苗II具有类似的效果,均可达到统计学意义上显著的肿瘤抑制效果。

[0153] mTubulin组虽然是内源蛋白,理论上不会诱导产生肿瘤特异的免疫反应。但重组核酸疫苗由LNP包裹递送,可能会激活非特异性的免疫反应,对C1498肿瘤产生抑制作用,因此在结果中显示出较弱的肿瘤抑制效果。

[0154] 实施例7基于本发明的重组核酸疫苗对B16-F10黑色素瘤小鼠模型的免疫治疗与预防效果

[0155] B16-F10黑色素瘤小鼠模型是用于验证黑色素瘤疫苗效果的经典模型。本实施例以此作为实验对象,验证基于本发明的疫苗能够提供良好的治疗和预防效果。

[0156] 实验选用C57BL/6 品系小鼠作为预防及治疗实验的动物模型,具体分组如表5和表6所示,通过皮下注射方式进行给药。

[0157] 表5实施例7中治疗实验动物分组及处理方式

疫苗组别	小鼠数量(只)	处理方式
阴性对照	9	不接种疫苗
疫苗Ⅲ	9	接种含有基于本发明的疫苗Ⅲ
疫苗Ⅳ	9	接种含有基于本发明的疫苗Ⅳ
疫苗Ⅲ&疫苗Ⅳ	9	接种含有基于本发明的疫苗Ⅲ和疫苗Ⅳ

[0159] 表6实施例7中预防实验动物分组及处理方式

疫苗组别	小鼠数量(只)	处理方式
阴性对照	5	不接种疫苗
mTubulin	5	接种含有内源蛋白Tubulin的疫苗
疫苗Ⅲ&疫苗Ⅳ	5	接种含有基于本发明的疫苗Ⅲ和疫苗Ⅳ

[0161] 其中,疫苗Ⅲ、疫苗Ⅳ的抗原为B16-F10的经典抗原表位,所涉及靶标抗原分别为Trp1(Short transient receptor potential channel 1)、Trp2(Short transient receptor potential channel 2)。

[0162] 疫苗Ⅲ的架构示意图如图12所示,从5'到3'端,依次包含信号肽、靶标抗原Trp1、GS linker、本发明FcRn片段(即FcRn序列跨膜区和胞质区),Trp1氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,其他元件氨基酸序列如表1所示。

[0163] Trp1氨基酸序列:HNCGTCRPGWRGAACNQKILTVRRNLLDLSPEEKSHFVRALDMAKRTTHPQFV IATRRLEDILGPDGNTQPQFENISVYNYFVWTHYYSVKKTFLGGSGGGSGGSFRNTVEGYSAPTGYDPAVRSLHN LAHLFLNGTGGQTHLSPNDPIFVLLHTFTDAVFDEWLRRYNADISTFPLENAPIGHNQRQYNMVPFVPPVTNTEMFV TAPDNLGYAYEVQW(SEQ ID NO:17)。

[0164] 疫苗Ⅳ的架构示意图如图13所示,从5'到3'端,依次包含信号肽、靶标抗原Trp2、GS linker、本发明FcRn片段(即FcRn序列跨膜区和胞质区),Trp2氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,其他元件氨基酸序列如表1所示。

[0165] Trp2氨基酸序列:VQTDTRPWSGPYILRNQDDREQWPRKFFNRTCKCTGNFAGYNCGGCKFGWTGP DCNRKKPAILRRNIHSLTAQEREQFLGALDLAKKSIHPDYVITTHWLGLLGPNGTQPQIANCSVYDFFVWLHYYS VRDTLLGGSGGGSGGDGTLDSQVMNLHNLHLSFLNGTNALPHSAANDPVFVVLHSFTDAIFDEWLKRNNPSTDAW PQELAPIGHNRMVMPFFPPVTNEELFLTAEQLGYNYAVDLSEEEA(SEQ ID NO:18)。

[0166] 在治疗实验中,将表5中的各组小鼠按照图14A所示的免疫流程进行免疫治疗,每次治疗注射20 μ g,记录肿瘤体积变化情况,评估治疗效果。其中,疫苗Ⅲ&疫苗Ⅳ组为疫苗Ⅲ

和疫苗IV联用,活性成分质量比例为1:1(10 μ g:10 μ g)。

[0167] 图14B为治疗实验中本发明的重组疫苗对B16-F10黑色素瘤小鼠模型的抑制肿瘤体积治疗效果。由图14B所示的统计结果可知,基于本发明的重组核酸疫苗III和疫苗IV均能够起到治疗作用,抑制肿瘤体积的增长;疫苗III和疫苗IV联合施用(疫苗III&疫苗IV),效果更佳,可以极大程度抑制肿瘤增殖,几乎达到完全抑制。这一结果证明,基于本发明的重组核酸疫苗能够提供治疗肿瘤的效果。

[0168] 基于上述治疗实验结果,疫苗III&疫苗IV效果最佳。因此,在预防实验中仅将疫苗III&疫苗IV纳入测试。

[0169] 将表6中的各组小鼠按照图15A所示的免疫流程进行免疫,每次注射剂量20 μ g,第22天接种B16-F10肿瘤细胞,随后持续观察,记录肿瘤体积和存活率,并进行统计分析。

[0170] 图15B为预防实验中本发明的重组疫苗对B16-F10黑色素瘤小鼠模型的抑制肿瘤体积预防效果。图15C为预防实验中本发明的重组疫苗对B16-F10黑色素瘤小鼠模型的存活率预防效果。由图15B和图15C所示的统计结果可知,基于本发明的重组核酸疫苗III和疫苗IV能够起到预防作用,抑制肿瘤增殖,并有效提高小鼠存活率。阴性对照组和mTubulin组都于荷瘤后25天内死亡;接种基于本发明的重组核酸疫苗疫苗III&疫苗IV后,在荷瘤第25天仍旧有80%小鼠存活。这一结果证明,基于本发明的重组核酸疫苗能够提供预防肿瘤的效果。

[0171] 同时,本发明实验结果显示,基于本发明的重组核酸疫苗所诱导的免疫保护具有特异性,无法免疫靶点之外的肿瘤。这也侧面证明了,基于本发明的重组核酸疫苗是通过促进抗原呈递,激活了抗原特异的细胞免疫反应,从而达到预防和治疗的效果。

[0172] 本公开的上述实施例仅是为清楚地说明本公开所作的举例,而并非是对本公开的实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其他不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本公开的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本公开权利要求的保护范围之内。

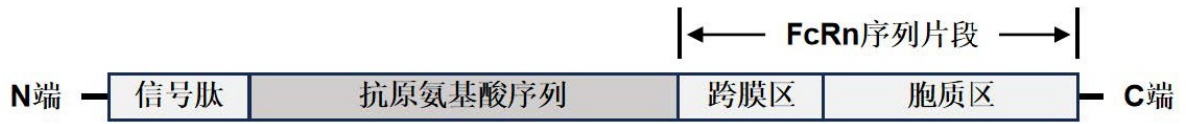


图1

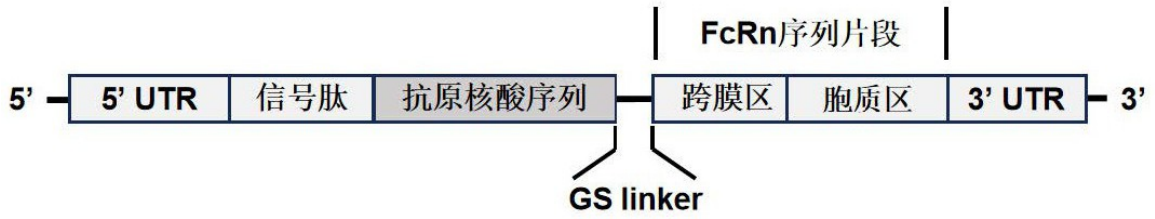


图2

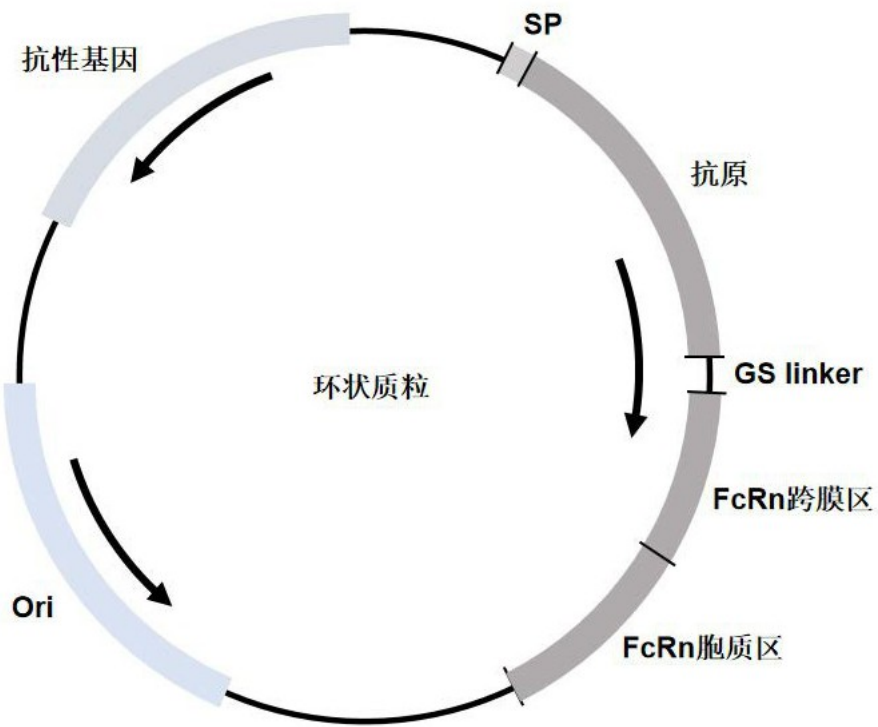


图3

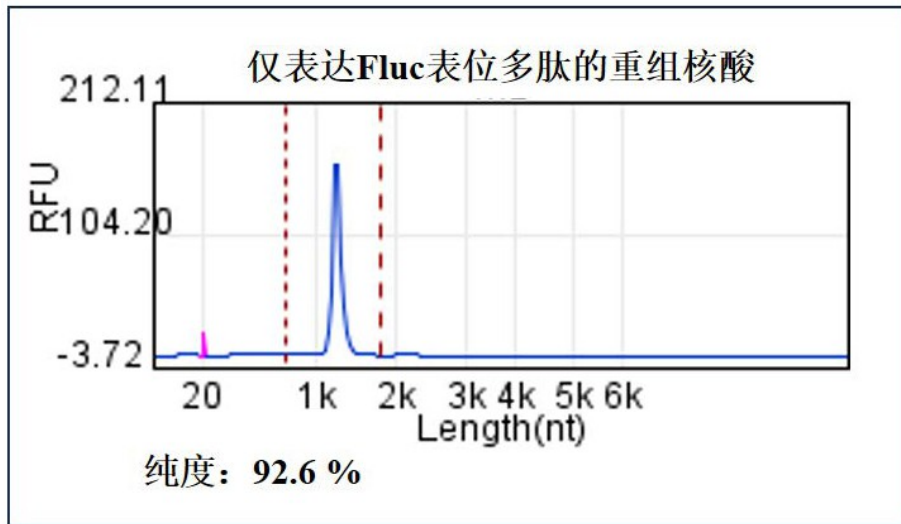


图4A

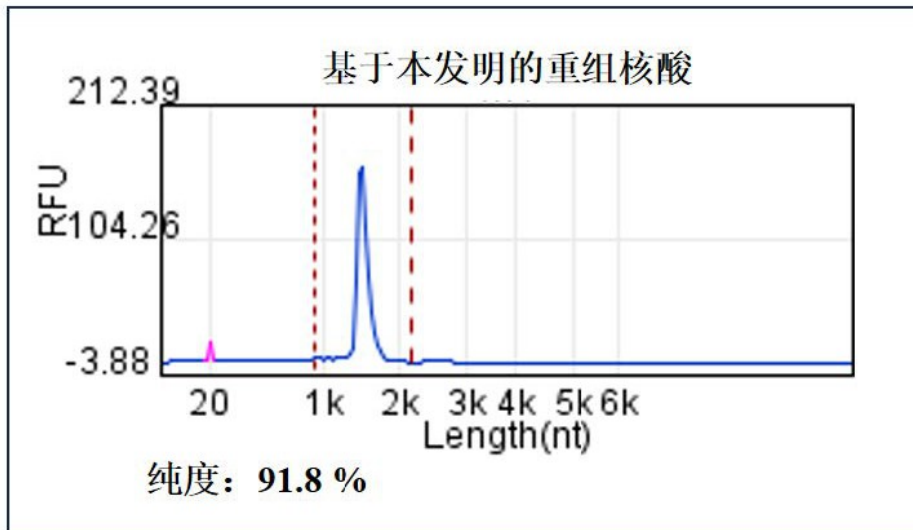


图4B

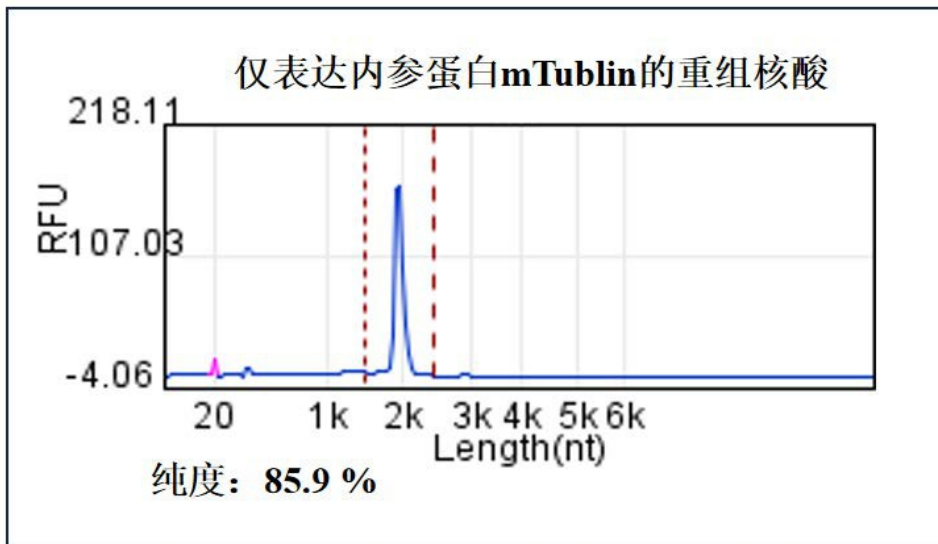


图4C

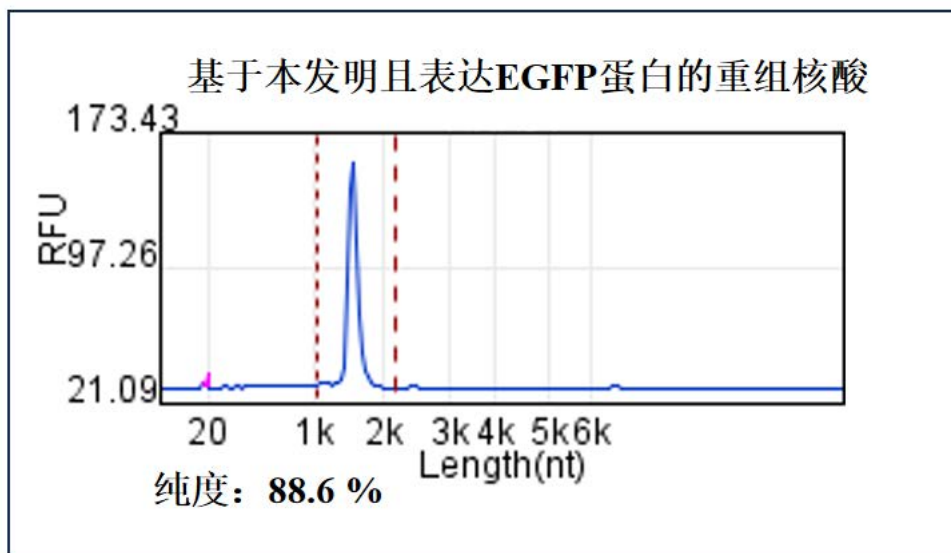


图4D

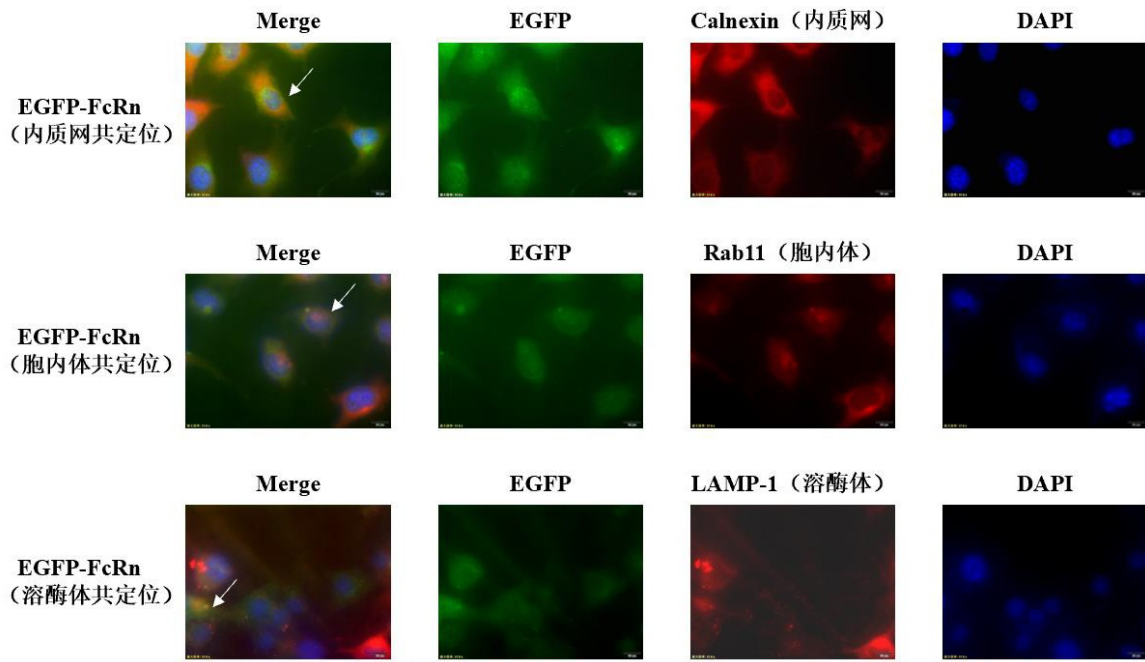


图5

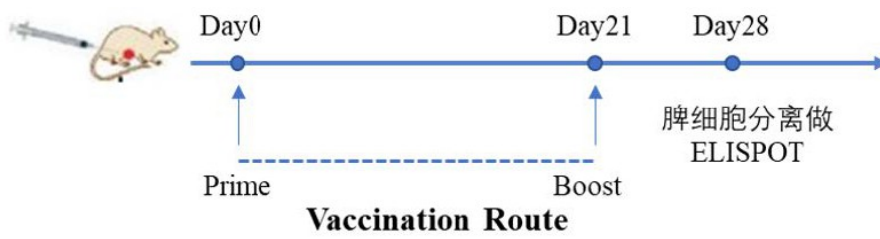


图6

ELISPOT检测小鼠脾淋巴细胞IFN- γ 的表达

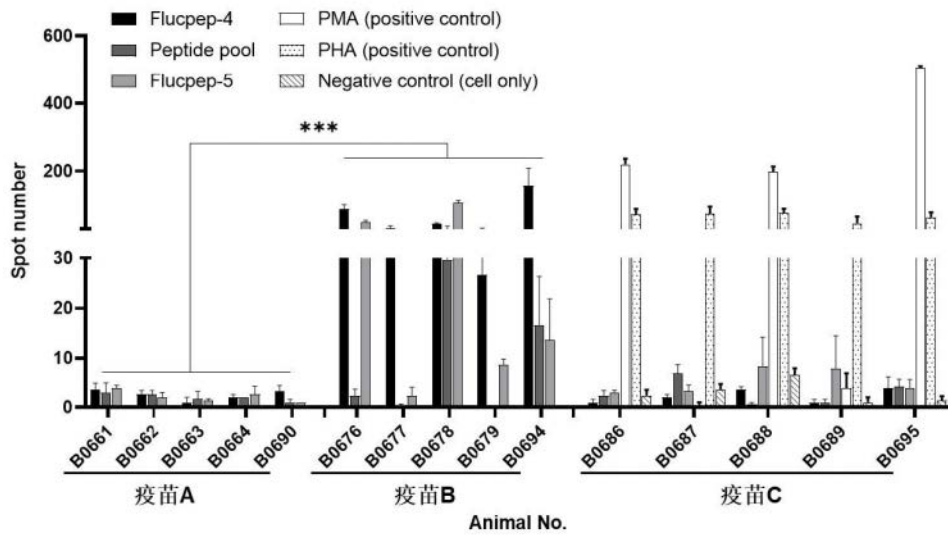


图7

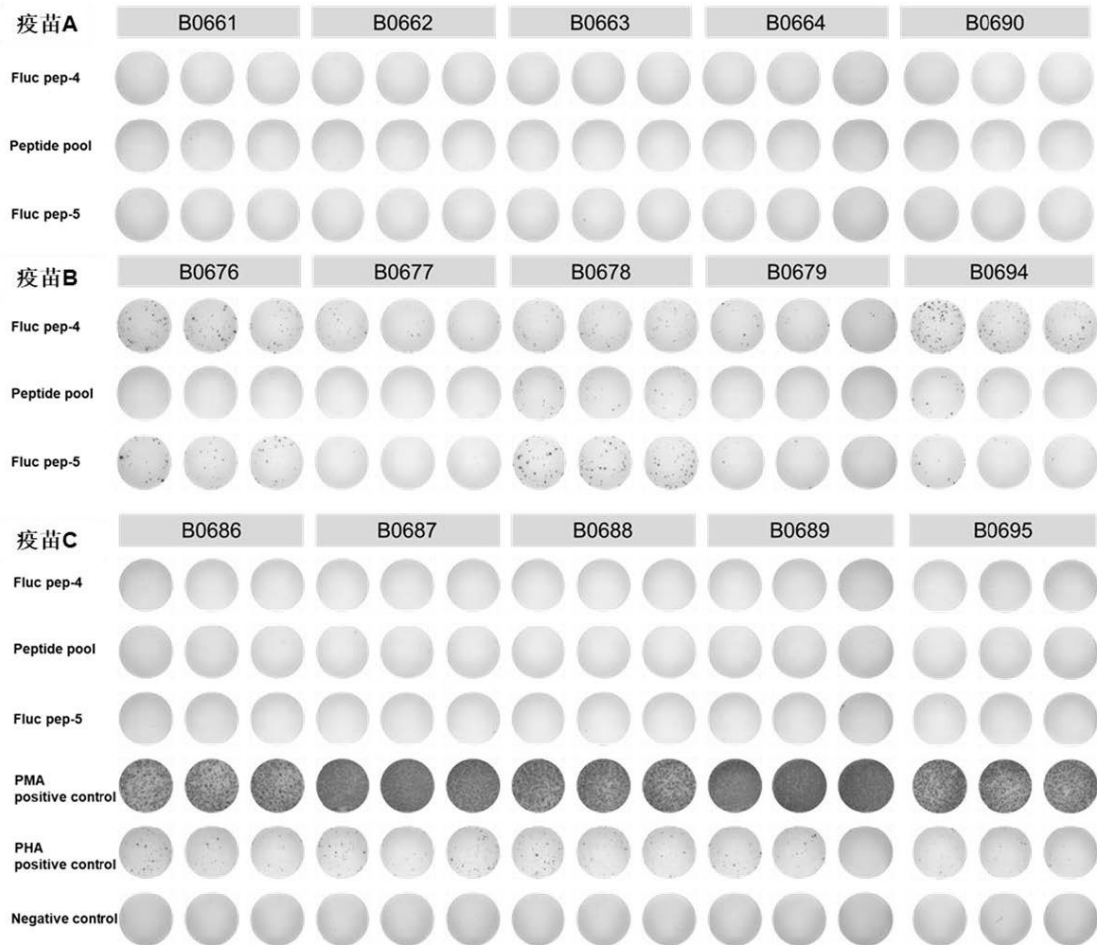


图8

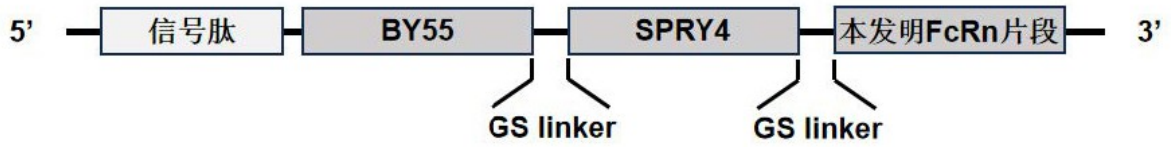


图9

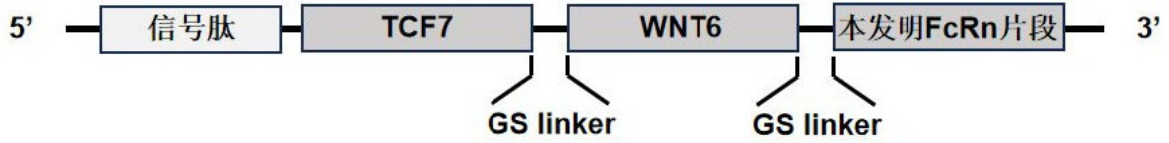


图10

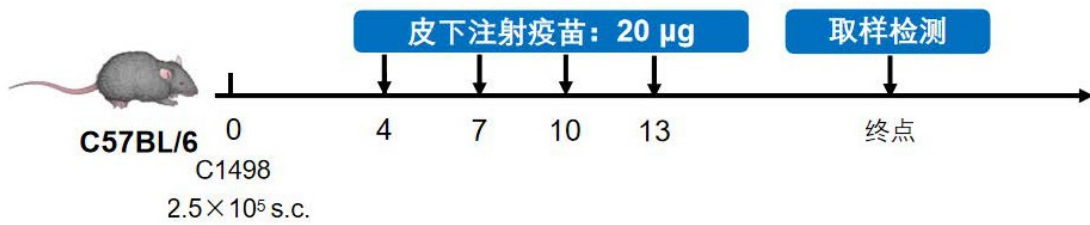


图11A

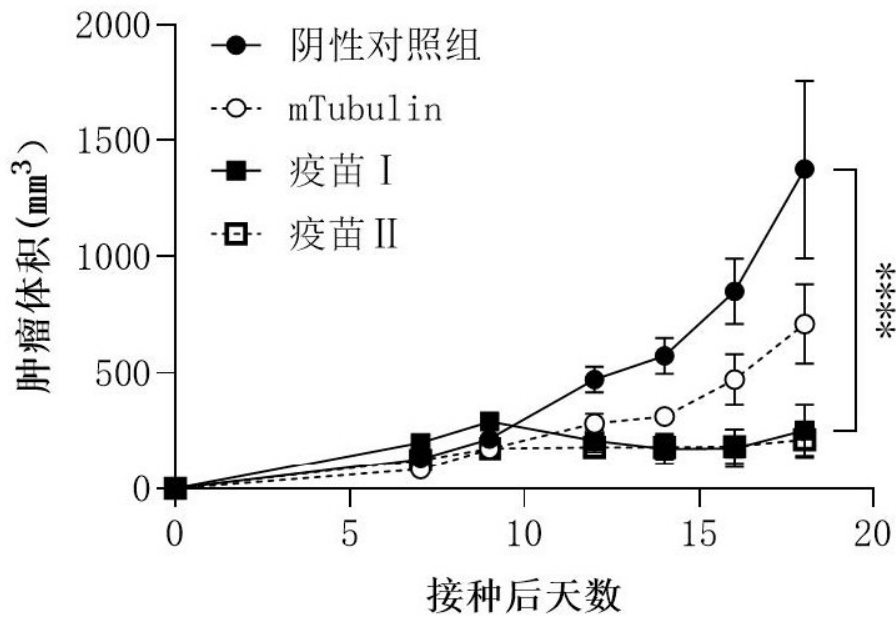


图11B

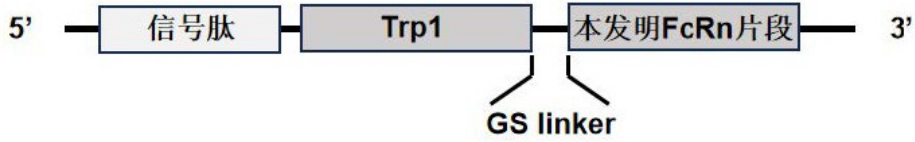


图12

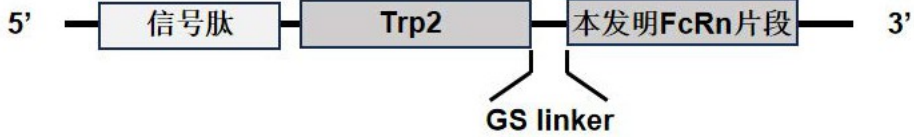


图13

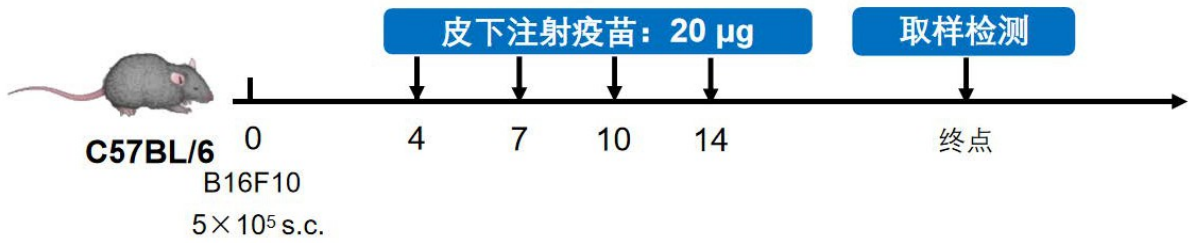


图14A

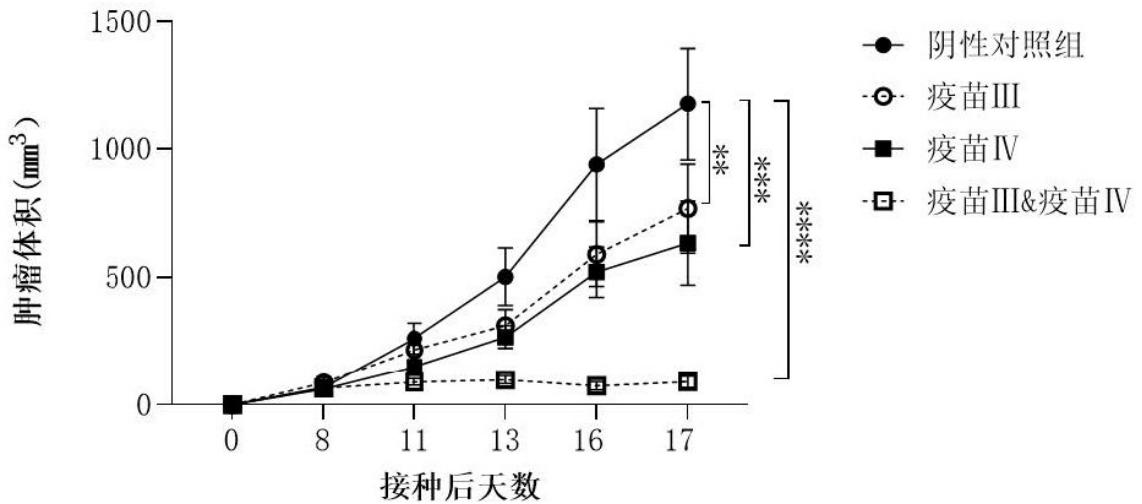


图14B

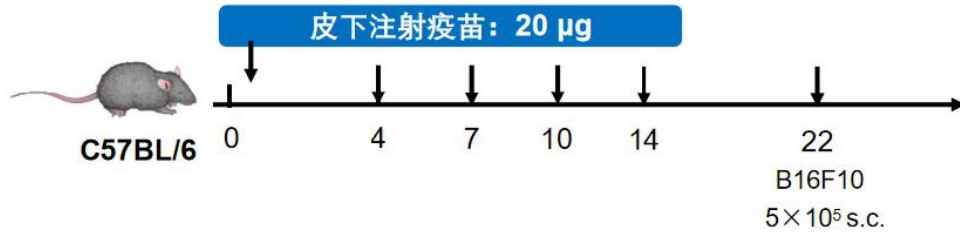


图15A

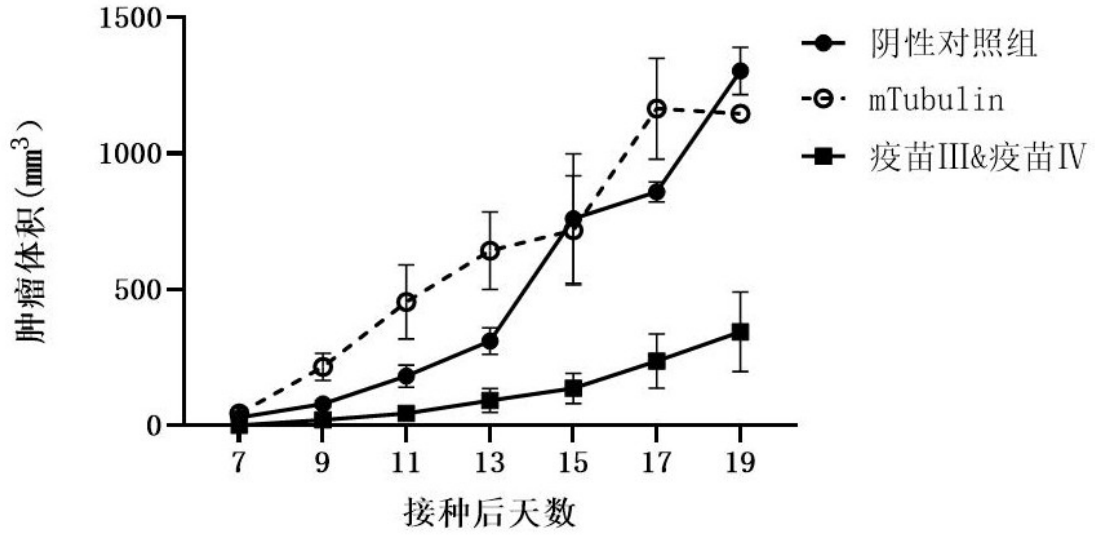


图15B

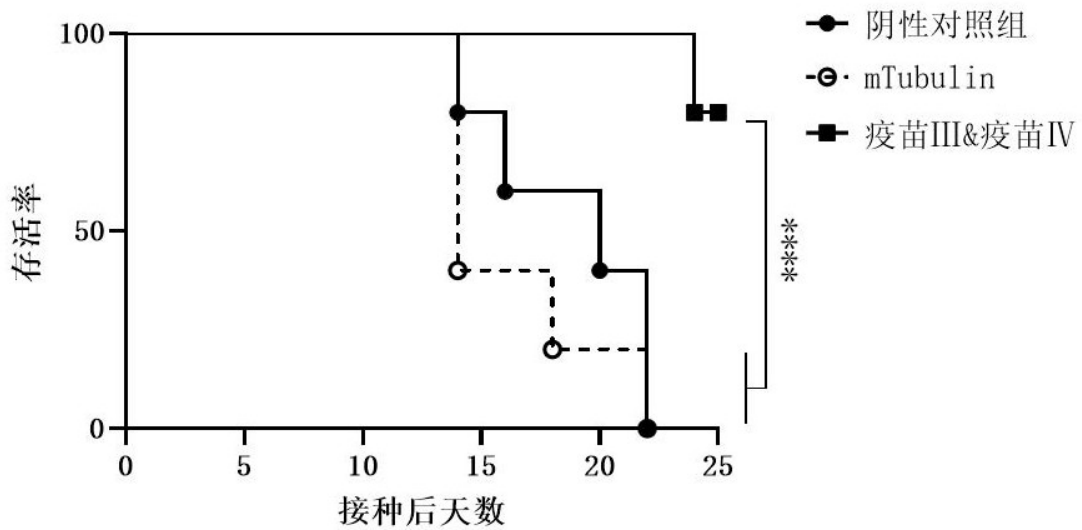


图15C