[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410037910.3

[51] Int. Cl.
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 100342017C

[51] Int. Cl. (续)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

[22] 申请日 2004.5.10

[21] 申请号 200410037910.3

[73] 专利权人 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所

地址 100021 北京市朝阳区潘家园南里 17 号

[72] 发明人 张叔人 林 晨 孙文欣 覃汉军 周春霞 梁 萧 王冬梅 马文波 张雪燕 付 明

[56] 参考文献

WO0140311 A1 2001.6.7

次级淋巴组织趋化因子研究进展 梁春敏，国外医学免疫学分册，第 27 卷第 1 期 2004

小鼠 SLC 基因真核表达载体的构建及其趋化活性鉴定 马飞等，细胞与分子免疫学杂志，第 19 卷第 6 期 2003

审查员 徐益君

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程 伟

权利要求书 1 页 说明书 29 页 附图 8 页

[54] 发明名称

基因重组趋化抗原疫苗

[57] 摘要

本发明涉及一种重组基因序列，该序列包括人 SLC 基因，抗原基因和 IgG1 的 Fc 片段基因，其中在抗原基因上游连接 SLC 基因；在抗原基因下游连接 IgG1 的 Fc 片段基因。 本发明还涉及该重组基因序列在制备基因疫苗和其编码的融合蛋白的多肽疫苗中的应用。

1. 一种重组基因序列，该序列包括人 SLC 基因，抗原基因和 IgG1 的 Fc 片段基因，其中在抗原基因上游连接 SLC 基因；在抗原基因下游连接 IgG1 的 Fc 片段基因。

2. 根据权利要求 1 所述的重组基因序列，其中所述的抗原基因包括：Her2/neu、P53、PSA、PAP、PSM、MAGE1、MAGE2、MAGE3、BAGE、GAGE1、GAGE 2、CAG3、RAGE、NY-ESO-1、Tyrosinase、CEA、Ig idiotype、 gp100、melan A、gp75、TRP-1、TRP-2、CDK4、CASP-8、ras、bcr/abl、MUC-1、HCV、HIV 病毒和致病微生物相关蛋白基因的一个或多个。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的重组基因序列，其中在 SLC 基因和抗原基因之间具有 EcoRI 酶切位点和 3 个甘氨酸，而在抗原基因和 IgG1 的 Fc 片段基因之间具有 EcoRV 酶切位点和 5 个甘氨酸。

4. 根据权利要求 1 所述的重组基因序列，其特征在于该序列是序列 1。

5. 根据权利要求 1 所述的重组基因序列，其特征在于该序列是序列 12。

6. 根据权利要求 1 所述的重组基因序列表达的氨基酸序列。

7. 一种由权利要求 4 所述的序列 1 表达的氨基酸序列，其特征在于该序列是序列 2。

8. 一种由权利要求 5 所述的序列 12 表达的氨基酸序列，其特征在于该序列是序列 13。

9. 一种基因疫苗，其特征在于含有如权利要求 1 所述的重组基因序列。

10. 如权利要求 9 所述的基因疫苗，其特征在于所述的基因序列是序列 1 或者序列 12。

11. 一种多肽疫苗，其特征在于含有由权利要求 1 所述的重组基因序列表达的氨基酸序列。

12. 如权利要求 11 所述的多肽疫苗，其特征在于所述的氨基酸序列是序列 2 或序列 13。

基因重组趋化抗原疫苗

技术领域

本发明涉及一种新的重组基因序列及其表达的融合蛋白，和由该基因制成的疫苗；并通过置换其中的抗原基因形成不同的基因疫苗，或其表达产物作为融合多肽疫苗。

背景技术

人次级淋巴组织趋化性细胞因子（secondary lymphoid tissue chemokine, SLC ）自发现以来逐渐受到重视。SLC 调节细胞因子的分泌，改变肿瘤微环境的免疫抑制状态，促进 Th1 的发展，有利于抗肿瘤免疫；SLC 具有较强的趋化淋巴细胞和树突状细胞（DC）作用。瘤内注射可诱导肿瘤局部和宿主的抗肿瘤免疫应答；SLC 还可调节抑制肿瘤的血管生成；因此，SLC 在肿瘤免疫治疗中具有广泛的应用前景。然而，单独使用 SLC 蛋白或转基因的方法用于抗肿瘤免疫效果不理想。Si-Yi Chen 等人将 IgG 的 Fc 片段基因与肿瘤抗原基因重组于逆转录病毒载体上转染 DC，免疫小鼠可获得较好的抗肿瘤免疫效应。其原理是 DC 分泌表达的融合体再被 DC 通过 Fc 受体(FcR)捕捉，并通过 MHC II 类分子递呈给 T 辅助细胞（Th）以及通过 MHC I 类分子交叉递呈给细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL），进而全面引发抗肿瘤的体液免疫和细胞免疫。Serre K 等人报道 DC 通过 FcR 介导的内吞比通过胞饮捕获抗原强 10，000 倍。但是，DC 的分离、扩增、转基因等增加了疫苗制备的复杂性，并且只能是因人制备，质量控制较难，不能产业化生产。

发明内容

为了克服现有技术的不足之处，本发明的目的在于提供一种新的重组基因序列。

本发明的另一目的在于提供由该重组基因序列表达的融合蛋白；

本发明的再一目的在于提供经过本发明基因序列表达融合蛋白的基因疫苗及其表达的多肽疫苗。

本发明的目的还在于提供一种基因重组肿瘤趋化抗原基因疫苗及其表达的多肽疫苗。

为了完成本发明的目的，本发明采用如下技术方案：

本发明涉及一种重组基因序列，该序列包括人 SLC 基因，抗原基因和 IgG1 的 Fc 片段基因，其中在抗原基因上游连接 SLC 基因；在抗原基因下游连接 IgG1 的 Fc 片段基因。所述的抗原基因包括：Her2/neu、P53、PSA、PAP、PSM、MAGE1、MAGE2、MAGE3、BAGE、GAGE1、 GAGE 2 、CAG3、RAGE、 NY-ESO-1、Tyrosinase、CEA、Ig idiotype、 gp100、melan A、gp75、TRP-1、TRP-2、CDK4、CASP-8、ras、bcr/abl、MUC-1、以及 HCV、HIV 病毒和其他致病微生物等相关蛋

白基因。在本发明的 SLC 基因和抗原基因之间具有 EcoRI 酶切位点和 3 个甘氨酸，而在抗原基因和 IgG1 的 Fc 片段基因之间具有 EcoRV 酶切位点和 5 个甘氨酸。

本发明还涉及本发明的重组基因序列在制备基因疫苗中的应用。即一种基因疫苗，其含有本发明所述的基因序列，特别是序列 1 或者序列 12 以及其相应的蛋白序列序列 2 和序列 13。

换言之，本发明涉及一种重组基因序列，该序列包括人 SLC 基因，抗原基因和 IgG1 的 Fc 片段基因，(参见图 13)在抗原基因上游连接 SLC 基因，并引入 EcoRI 酶切位点和 3 个甘氨酸；在抗原基因下游连接 IgG1 的 Fc 片段基因，并引入 EcoRV 酶切位点和 5 个甘氨酸。

本发明通过上述的基因中的酶切位点更换不同抗原基因，能够形成各种趋化抗原融合基因。

本发明还具体涉及一种重组基因，该基因具有序列 1 的核苷酸序列。序列 1 所述的核苷酸序列是一种人工拼接的 SLC-Her2/P53-Fc 的基因序列，其中

SLC基因 是位于第1~402的核苷酸的位置；而Her2拼接基因是位于 418~711 个核苷酸的位置；其中重组基因位置418~444为Her2/neu读码框架的1105~1131；重组基因位置445~546为Her2/neu读码框架的244~345（第250位"G"突变为"C"），重组基因位置547~711为Her2/neu读码框架1333~1497。P53部分基因是位于第712~1113个的位置为p53读码框架 475~876。IgG Fc基因(带内含子)是位于第1147~2057个核苷酸的位置，其中内含子位于1189~1309以及1640~1739的位置。第1147~1189个核苷酸的位置是C-region hinge，第1310～1639个核苷酸的位置是CH2，而第1740 ～2057核苷酸的位置是CH3。Her2/P53上游连接处引入三个甘氨酸和EcoRI酶切位点序列，下游引入五个甘氨酸和EcoRV酶切位点序列。本发明在抗原基因上、下游连接处设有3~5个甘氨酸基因，使表达的上下游因子能正常发挥生物学功能，其产生的效果是防止重组抗原对其空间结构产生干扰。

本发明还具体涉及一种由序列1的核苷酸序列表达的序列2的氨基酸序列，其中序列1，即人工拼接的SLC-Her2/P53-Fc的基因对应的氨基酸序列（612aa、mat589aa）是SLC 位于第1~134个氨基酸的位置，甘氨酸x3位于第135~137个氨基酸的位置，而Her2部分多肽位于140~237。其中融合蛋白第140~148为Her2/neu第369~377位的氨基酸；融合蛋白第149~182个氨基酸的位置为Her2/neu第 82~115位氨基酸，其中84位 "V"突变为"L")；融合蛋白第183~237个氨基酸的位置为Her2/neu第 445~499位氨基酸，P53部分多肽序列位于第238~371 (相当于P53的159~292位氨基酸) 个氨基酸的位置，而甘氨酸x 5 位于第374~378个氨基酸的位置；IgG Fc 位于第383~612个氨基酸的位置，其中第383~396个氨基酸的位置是C-region hinge，第397~506个氨基酸的位置是CH2，第507~612个氨基酸的位置是CH3。

本发明还具体涉及另一种编码前列腺癌疫苗的重组基因，该基因具有序列 12 的核苷酸序列。序列 12 所述的核苷酸序列是一种人工拼接的 SLC-PSM-mPAP-PSA-Fc（简称 SLC-3P-Fc）的基因序列，其中 PSM(人前列腺特异性膜抗原)、mPAP（小鼠前列腺酸性磷酸酶）、PSA（人前列腺特异性抗原）均为部分序列。SLC 基因是位于融合基因第 1~402 的核苷酸的位置；PSM 部分基因是位于融合基因第 418~603 个核苷酸的位置，为 PSM 读码框架的 1987~2172 ；mPAP 基因位于融合基因第 604~759 为 mPAP 读码框架的 328~484；PSA 基因是位于融合基因第 760~981 为 PSA 读码框架的 151~372；IgG Fc 基因(带内含子)是位于第 1003~1925 个核苷酸的位置。IgG Fc 基因是位于第 1003~1925 个核苷酸的位置；其中内含子位于 1057~1177; 1508~1607 的位置。 3P 上游连接处引入三个甘氨酸和 EcoRI 酶切位点序列，下游引入五个甘氨酸和 EcoRV 酶切位点序列。

本发明还具体涉及由序列12的核苷酸序列表达的序列13的氨基酸序列，即人工拼接的SLC-3P-Fc的基因对应的氨基酸序列(568aa)。SLC 位于融合蛋白第1~134个氨基酸的位置，甘氨酸x3位于第135~137个氨基酸的位置，PSM部分多肽位于融合蛋白140~201。mPAP部分多肽位于融合蛋白第202~253；PSA部分多肽位于融合蛋白第254~327个氨基酸的位置；甘氨酸x 5 位于第374~378个氨基酸的位置；IgG1-Fc 位于融合蛋白第335~568个氨基酸的位置。

本发明还涉及含有本发明重组基因序列，包括序列 1 在制备疫苗中的用途。

由此可见，本发明的趋化抗原策略是：将抗原的上游与趋化因子 SLC 重组，下游与 IgG 的 Fc 重组。此融合的三联基因直接导入健康或肿瘤组织进行分泌表达，通过 Fc 铰链区形成两联体。该重组蛋白在体内通过 SLC 的趋化作用，主动吸引 DC 和 T 细胞。DC 通过胞饮，尤其通过 Fc 受体和 SLC 受体 CCR7 高效捕获融合蛋白，同时将抗原带入胞内；经过加工处理后通过 MHC-II 类分子递呈或通过 MHC-I 类分子交叉递呈给 Th 和 CTL，最终全面诱发特异性抗肿瘤细胞免疫和体液免疫反应。此外，Fc 段与 DC 的 Fc 受体结合可活化 DC。而 SLC 除了可主动趋化 DC 和 T 淋巴细胞，还可促进 IL-12、IFN-γ、干扰素诱导蛋白（IP-10）等因子分泌，促进 Th1 的发展，并可下调 TGF-β和 VEGF 的产生，有利于抗肿瘤免疫。所以这种组合具有较好协同作用，产生较强的抗肿瘤免疫效应（见图 1）。

在本发明中，非限定性地采用了不同的重组基因，进行对照研究发现这种重组的趋化抗原无论是质粒基因还是制备成融合蛋白均可产业化生产，使用中省去了 DC 的制备，但在体内对 DC 具有高效的靶向性。此外，在重组基因序列中抗原基因的两端引入酶切位点，可更换不同的抗原，形成针对各种肿瘤或非瘤的趋化抗原疫苗。重组基因 x 即用前列腺癌相关抗原置换 SLC-HP-Fc 中的 HP 抗原形成新的趋化抗原疫苗。

该重组基因可构建于各种真核表达载体中，采用质粒直接体内或瘤内注射，也可采用基因枪，电脉冲等方法增强导入率和表达效率；也可构建重组病毒，如：

逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、痘苗病毒、疱疹病毒等，作为疫苗直接体内注射。还可以将表达质粒导入 CHO 等真核细胞，体外培养，进行分泌表达。通过融合蛋白的 Fc 段采用亲和层析等方法可简单而高效地提取纯化融合蛋白，并作为蛋白疫苗。

附图说明

图 1、是本发明趋化抗原基因疫苗作用机制示意图。

图 2、 构建的表达质粒示意图，其中 HP：Her2/neu-p53 拼接基因 sig：SLC 分泌肽基因。

图 3、是本发明 SLC-Her2/neu-Fc 基因重组示意图。

图 4、是采用 Western Blot 检测 pSLC-HP-Fc 基因疫苗转导细胞的胞内和分泌表达的重组蛋白转染细胞检测，其中 A: pSLC-HP-Fc 转染细胞裂解物；B: 转染细胞培养上清；C: pcDNA 转染细胞培养上清。

图 5、是预防接种肿瘤趋化抗原核酸疫苗（pSLC-HP-Fc）体内抑瘤效应。

图 6、是预防接种肿瘤趋化抗原核酸疫苗（pSLC-HP-Fc）荷瘤鼠的生存期。

图 7、是肿瘤趋化抗原核酸疫苗治（pSLC-HP-Fc）疗肿瘤的体内抑瘤效应。

图 8、是肿瘤趋化抗原核酸疫苗（pSLC-HP-Fc）治疗肿瘤的生存期。

图 9、是肿瘤趋化抗原核酸疫苗（pSLC-HP-Fc）免疫后 CTL 活性。

图 10、是动物经免疫后， 2 周和 4 周时血清中特异性的抗 HP 抗体的抗体应检测结果。小鼠血清以 1:100 稀释，ELISA 法检测。

图 11、是 pSLC-HP-Fc 疫苗体外诱导抗 Her2/neu、p53 人特异性 CTL。

图 12、是 pSLC-3P-Fc 表达质粒构建示意图

图 13、是 pSLC-3P-Fc 核酸疫苗治疗肿瘤的体内抑瘤效应。

图 14、是 pSLC-3P-Fc 核酸疫苗治疗肿瘤的生存期。

图 15、是本发明重组基因表达融合基因的特征结构。

具体实施方式

以下将结合附图详细描述本发明的具体实施方案，涉及的实施例仅仅是说明之目的，而非用于限定本发明的保护范围。

实施例一 人 SLC 基因的克隆

从肿瘤患者淋巴结中提取 mRNA。采用本领域技术人员公知的方法，将 SLC 上游引物 5'-cggtaccacagacatggctcagtcac-3' 引入 Kpn1 酶切位点；下游引物 5'-tgaattctcctcctcctggcccctttagg-3'引入编码三个甘氨酸的序列和 EcoR1 酶切位点，

RT-PCR 获取 SLC 基因，纯化 SLC 基因插入 pUCmT 测序载体(pUC-SLC)，测序结果，与预计序列完全一致 (带下划线部分)。

本发明采用四色荧光末端终止法测序，依据 SANGER 的双脱氧链终止法。所用测序仪器是 ABI 公司的 377 测序仪测序结果：参见序列 3，其中序列中 36 到 464 位置是本发明的克隆序列。

实施例二 Her-2/neu 基因的获取和拼接

首先用 PCR 方法分别调取 Her-2/neu 基因的两段序列，**第一段**：上游引物 5'-agaattcaagatctttgggagcctggcatttctgggctacctgctcatcgctca c-3'，引入 EcoRI 酶切位点；下游引物 5'-gatgcccagcccttgcagggccagggcatagttgtc-3'；以 neu 基因的胞外区质粒为模板，扩增其氨基酸序列的第 82-115 位对应的基因，其中第 103 位的 V 被 L 取代。**第二段**：上游引物 5'-ctgcaagggctgggcatc-3'；下游引物 5'-tccatggcccggttggcagtgtggag-3'，引入 NcoI 酶切位点，扩增其氨基酸序列的第 445-499 位对应的基因。

回收以上两段 PCR 产物，放于同一 PCR 体系中经过一次 PCR 后可拼接为模板，再加入第一段的上游引物与第二段的下游引物进行 PCR，扩增出 294bp 大小的融合基因,插入 pUCmT 载体(pUC-Her2P),测序结果与预计序列完全一致(带下划线部分)。

测序结果：参见序列 4， 其中 121 到 465 位置是本发明的克隆序列。

实施例三 p53 部分基因克隆

以全长 p53 质粒为模板，上游引物 5'-acc atg gcc atc tac aag cag tca cag cac atg ac-3'，含有一个 NcoI 酶切位点；下游引物 5'-tga tat ctt tct tgc gga gat tct ctt c-3'，引入 EcoRV 酶切位点。扩增 p53 的 402bp 片段，编码 p53 氨基酸序列的第 156-289 位，插入 pUCmT 载体(pUC-p53P),测序结果与预计序列完全一致(带下划线部分)。

测序结果：参见序列 5，其中 39 到 445 位置是本发明的克隆序列。

实施例四 Her2/neu 与 p53 片段的拼接

参见图 3，将 pUC-Her2P 用 EcoRI, NcoI 酶切的小片段, pUC-p53P 用 NcoI, EcoRV 酶切的小片段, 与 pcDNA3z 用 EcoR1 和 EcoRV 酶切的大片段进行连接所获质粒 **pcDNA-Her2/p53**，简称为 **pcDNA-HP(HP：即为 Her2/neu 与 p53 片段拼接基因)**。人工拼接的 Her2/neu-p53 片段基因富含多种 HLA-I 类分子结合肽基因和少量 HLA-II 类分子结合肽基因。

实施例五 PcDNA-Fc 构建

首先人工合成多酶切点置换 pcDNA3.1 的多酶切点（所获质粒称为 pcDNAf）

构建过程：人工合成两条寡核苷酸

上游

5'-GCTAGCGAAGCTTTGGTACCGTAGGATCCACGAATTCAGTCCAGGATATCGGCGGTGG-3'

下游

5'-GGTTTAAACGTTAACCCCGGGCCCTCGAGCTCTAGAGCCTCCTCCACCGCCGATATC-3'

3'末端有 15 个碱基互补。按 1:1 混合后，加入 Taq DNA 聚合酶和 dNTP 在 45℃条件下复性，延伸，纯化后插入 pUCmT 载体测序，测序结果与原设计一致，下划线为人工合成的多酶切点。其形成的酶切位点为"NheI-HindIII-Kpn1-BamH1-EcoR1-EcoRV- **Glysine×5** -XbaI- Xho1- Apa1-Sma1-Hpa1-Pme1"。其中 EcoRV 和 XbaI 之间插入编码五个甘氨酸的基因序列（GGCGGTGGAGGAGGC）。将克隆的质粒经 NheI、Pme1 酶切后取约 100bp 小片段与经 NheI、Pme1 酶切的 pcDNA3.1 大片段连接后形成新载体，并称为 **pcDNAf**。

人工合成多酶切点测序结果：参见序列 6，其中 3 到 100 位置是本发明的克隆序列。

PcDNA-Fc 构建过程

将含有 IgG1 的 Fc 片段基因的质粒用 XbaI、ApaI 内切酶切取 Fc 基因片段，插入同样酶切的 pcDNAf 载体上，称为 **PcDNA-Fc**，测序证实为 IgG1 的 Fc 基因片段。

Fc 段基因序列测定：

应用 Fc 段基因上游引物 5'-gaattcggagttaacgagcccaaatcttg-3' 和下游引物 5'-gggccctcatttacccggagac-3'，含 IgG1 Fc 基因的质粒为模板 PCR 扩增的约 900bp 的片段插入 pUCmT 载体测序，结果为 IgG1 的铰链区、CH2 和 CH3 区基因（即 Fc 段基因，见下滑线部分）。测序结果：（为双向测序后拼接的序列）参见序列 7，其中 78 到 991 位置是本发明的克隆序列。

实施例六 SLC-Her2/neu-Fc 基因的拼接

参见图 3，pcDNA-HP 用 Kpn1、EcoR1 酶切的大片段和 pUC-SLC 用 Kpn1、EcoR1 酶切的小片段进行连接(pcDNA-SLC-HP)→再用 Kpn1、EcoRV 酶切的小片段与 pcDNA-Fc 用 Kpn1 和 EcoRV 酶切的大片段连接为 pcDNA-SLC-HP-Fc（简称 **pSLC-HP-Fc**。

构建的对照组质粒示意图见图 2。

实施例七 Western Blot 检测基因疫苗转导细胞的胞内和分泌表达的重组蛋白

重组质粒 pSLC-HP-Fc 用脂质体方法转染 B16-F10 细胞，并用 G418 筛选出抗 G418 阳性转染克隆，收集培养上清（收集前用无血清 1640 培养 24 小时，收集后进行浓缩），Western Blot 法分析融合蛋白的表达。一抗采用兔抗人 p53 多克隆抗体，二抗是 HRP 标记的山羊抗兔抗体，用 ECL-Plus chemiluminescent detection kit 检测 (Amersham Pharmacia Biotech.)。最后压片，放射自显影于 X 光片上。结果显示：pSLC-HP-Fc 转染的 B16-F10 细胞培养上清和细胞裂解液，可测出融合蛋白的表达，分子量与预计大小完全一致（参见图 4）。经证明得到的融合蛋白为序列 2 的氨基酸。

实施例八 人 PSM(前列腺特异性膜抗原)基因克隆

从人前列腺癌细胞 LNCaP 提取总 RNA，上游引物为 5'-ACTCGAGATGAAGACATACAGTGTATC-3'，下游引物为 5'-TGATATCTTAGGCTACTTCACTCAAAG-3' 行 RT-PCR，电泳、切取 hPSM 390bp 条带，经玻璃奶法纯化回收目的片段，并与 pUCm-T 载体连接成 **pUCm-hPSM**，挑取阳性克隆测序，测序结果正确。详见序列 8，所获基因相当于人 PSM 读码框架的 1864~2253。该序列中 229 到 618 的位置是本发明克隆序列。

实施例九 人 PSA(前列腺特异性抗原)基因克隆

从人前列腺癌细胞 LNCaP 提取总 RNA，上游引物为 5'-TCTCGAGGGCGGTGTTCTGGTGCA-3'，下游引物为 5'-AGATATCATGTCCAGCGTCCAGCAC-3' 行 RT-PCR，琼脂糖电泳、切取约 600bp 条带经玻璃奶法纯化回收目的片段，并与 pUCm-T 载体连接成 **pUCm-PSA**，挑取阳性克隆测序，测序结果正确。详见序列 9，所获基因相当于人 PSA 读码框架的 151~609。该序列中 45 到 503 的位置是本发明克隆序列。

实施例十 小鼠 PAP(前列腺特异性抗原, mPAP)基因克隆

从小鼠前列腺组织中提取总 RNA，以 5'-TCTAGATGAGAGCTGTTCCTCTG-3'作上游引物，5'-GGGCCCTTAATTCCGTCCTTGGTG-3'作下游引物进行 RT-PCR，电泳、切取 mPAP 1146bp 条带，经玻璃奶法纯化回收目的片段，并与 pUCm-T 载体连接成 **pUCm-mPAP**，挑取阳性克隆测序，测序结果见序列 10。该序列中 48 到 1193 的位置是本发明克隆序列。

实施例十一 PSM、mPAP 和 PSA 部分基因的拼接（3P）

以 5'-AGAATTCATGATGAATGATCAACTCATG-3'（为 hPSM 读码框架的 1987-2007，并引入 EcoRI 酶切位点)为上游引物、5'-AGCACTCATCAAAGT CCTGGCCTTGGAAGGG TCCAC-3'（下滑线部分为 mPAP 读码框架的 328-345，其余部分为 hPSM 读码框架的 2155-2172） 为下游引物、pUCm-hPSM 为模板行 PCR，电泳后切取 hPSM 目的条带用玻璃奶纯化回收备用；以 5'-AGGACTTTGATGAGTGCTATG-3'（ 为 mPAP 读码框架的 328~348）为上游引物、5'-AGGGCAGTCTCTGAAAGGCAG-3'（ 为 mPAP 读码框架的 463~483）为下游引物、pUCm-hPMP 为模板行 PCR，电泳、切取 hPMP 目的条带用玻璃奶纯化回收备用；以 S2-CCTTTCAGAGACTGCCCTGGCGGTGTTCTGGTGCAC-3' （下滑线部分为 mPAP 读码框架的 466~483，其余为 hPSA 读码框架的 151~168）为上游引物、5'-AGATATCGAGCAGCATGAGGTCGT-3'G 为下游引物、pUCm -hPSA 为模板行 PCR，电泳、切取 hPSA 目的条带用玻璃奶纯化回收备用。

分别以 hPSM 为模板 5'-AGAATTCATGATGAATGATCAACTCATG-3'(同前)为引物、PAP 为模板 5'-AGGGCAGTCTCTGAAAGGCAG-3' (同前)为引物在 25μl 体系进行 10 个循环单向 PCR。然后，将两者产物合并在 50μl 体系中进行 18 个循环的 PCR，电泳，切取 hPSM-mPAP 352bp 目的条带用玻璃奶纯化回收备用。

以 mPAP 为模板 5'-AGGACTTTGATGAGTGCTATG（为 mPAP 读码框架的 328-348）为引物，hPSA 为模板 5'-AGATATCGAGCAGCATGAGGTCGTG-3'（ 为 PSA 读码框架的 355-372）为引物在 25μl 体系进行 10 个循环单向 PCR；再将两者产物合并在 50μl 体系中进行 18 个循环的 PCR；电泳、切取 mPAP-hPSA 378bp 目的条带用玻璃奶纯化回收备用。

分别以 hPSM-mPAP 为模板 5'-AGAATTCATGATGAATGATCAACTCA TG-3' 为引物、mPAP-hPSA 为模板 5'-AGATATCGAGCAGCATGA GGTCGTG-3'为引物在 25μl 体系进行 10 个循环单向 PCR；再将两者产物合并在 50μl 体系中进行 18 个循环的 PCR；电泳、切取 hPSM-mPAP-hPSA 564bp 目的条带用玻璃奶纯化回收并与 pUCm-TV 连接，挑取阳性克隆双向测序，测序结果正确。详见序列 11，为双向测序拼接结果。该序列中 54 到 629 的位置是本发明克隆序列。

实施例十二 SLC-3P-Fc 趋化抗原基因重组

将序列测定后的 3P 基因（3P: PSM-PAP-PSA 部分拼接基因，564bp，编码 188 个氨基酸）正确的质粒用 EcoRI 和 EcoRV 切取 3P 基因小片段，与同样酶切的 pSLC-HP-Fc 的大片段载体连接，形成 pSLC-3P-Fc（见图 12）。SLC-3P-Fc 基因重组序列见序列 12，其对应的氨基酸序列见序列 13。

实验例一　趋化小室检测融合蛋白趋化免疫细胞的活性

人 SLC 的体外趋化活性：

A.将质粒 pcDNA3z-SLC-HP-Fc 及其对照质粒转染 B16-F10 黑色素瘤细胞，48 小时后收集细胞培养上清（未转染的细胞培养上清作为阴性对照），PEG20000 浓缩待用。

B.抽取健康人外周血 5ml，稀释后用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞，生理盐水洗两遍，无血清 1640 培养液重悬细胞，台盼蓝记数，调细胞浓度为 1×10^6/ml，待用。

C. 趋化小室准备：趋化小室购自 Neuro Probe，在下层小室中加入 27μl 的细胞上清浓缩液，每个设三复孔。孔上覆以 5μm 孔径多聚碳酸酯膜，装好上层小室，在各小室中加入 50μl 浓度为 1×10^6/ml 的人外周血单个核细胞悬液，然后，将小室置于 37℃,5%CO_2 孵箱中作用 4 小时。

D. 取下膜，用细胞刮子仔细刮下上层小室面的细胞，经固定，染色，于显微镜下计数迁移至膜下层的细胞数，计算趋化指数（CI=实验孔 5 个高倍视野的细胞数/对照孔 5 个高倍视野的细胞数）。阴性对照组 CI 值为 1。高倍视野为 200×

表 1. 融合蛋白的体外趋化活性测定

组别	趋化细胞数	趋化指数 CI	P 值
阴性对照	34±10.4	1	
空载体	44.6±11.9	1.31	>0.05*
psig-HP	68.6±9.5	2.02	<0.05*
pSLC-HP-Fc	157.4±19.2	4.63	<0.01* <0.05**
pSLC	156.6±20.3	4.61	<0.01* <0.05**

* 与阴性对照相比。 ** 与 psig-HP 相比。

【结果】：pSLC-HP-Fc 转导细胞的无血清培养上清具有明显的趋化活性，表明该质粒的导入不仅表达且有活性。其水平与单纯 pSLC 转导细胞产生的趋化活性一致，说明融合蛋白对 SLC 活性无影响。

实验例二　人趋化抗原核酸疫苗在小鼠体内抗肿瘤的免疫效应

基因导入方法采用将质粒（裸基因）挂载到金粉颗粒上，并附着在塑料管内壁上切割成适宜大小，作为基因枪子弹备用。每发子弹约含有 1μg DNA。详细方法见 BioRad 公司说明书。实验中设有对照组：空载体，pSLC-Fc、含有 SLC 前导肽的 HP 表达质粒 psig-HP、pSLC-HP 和 psig-HP-Fc。

实验例三 预防肿瘤免疫实验

pSLC-HP-Fc 及其对照组于肿瘤接种前 14 和 7 天基因枪腹部分别免疫动物二次。第 0 天小鼠腋下接种 B16F10-HP 瘤细胞 （B16F10 黑色素瘤细胞转入 HP 基因，并经过 G418 加压筛选）5×10^4/0.2ml/只，以后每周两到三次测量肿瘤大小，按公式：长(cm)× 宽(cm^2) 计算肿瘤大小。

【结果】： pSLC-HP-Fc 三联疫苗仅免疫两次即显示了显著的抑瘤效果（参见图 5、6），平均生存期明显延长，与任何一种两联疫苗相比都有显著差异（$P<0.05$）。说明 SLC 和 Fc 有协同免疫增强效果。

实验例四 治疗肿瘤免疫实验

第 0 天动物腋下接种 5×10^4/0.2ml/只的 B16F10-HP 瘤细胞，第 6，12，18 天基因枪免疫三次，以后每周两到三次测量肿瘤大小，计算方法同上。

【结果】：参见图 7、8，三联 pSLC-HP-Fc 疫苗的抑瘤效果最为显著，并且在第 28 天，pSLC-HP-Fc 组与两联 psig-HP-Fc 组相比也有显著差异（$P<0.05$）；平均生存期也显著延长。B16（pSLC-HP-Fc）组的小鼠接种的为野生型 B16，经过三次 SLC-HP-Fc 免疫后，无抑瘤效果，说明该疫苗诱导的是针对 HP 抗原的特异性免疫反应。

实验例五 肿瘤趋化抗原核酸疫苗诱导的 CTL 活性

荷瘤鼠经三次基因枪免疫 2 周后，处死动物，取脾细胞做 CTL 细胞毒性活性测定，采用 Promega 公司 LDH 检测试剂盒，将脾细胞与靶细胞 B16F10-HP 以不同效靶比（40:1, 20:1, 10:1）进行细胞毒测定。

【结果】：经趋化抗原核酸疫苗免疫后的淋巴细胞对 B16F10-HP 产生显著的杀伤作用（参见图 9）。在 E:T 比值为 40:1 和 20:1 时，三联与两联疫苗相比仍有显著差异（$P<0.05$）。说明三联疫苗可以诱导更强的 CTL 活性。

实验例六 免疫后血清中抗体滴度的检测

动物经基因枪免疫（pSLC-HP-Fc）后，在 2 周和 4 周时取血清检测抗体反应（ELISA 法）。重组 p53 蛋白包被酶标板过夜，20%牛血清封闭，依次加入一抗（不同稀释度的小鼠血清），二抗（羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记），中间洗涤，OPD（邻苯二胺）显色，490nm 测 OD 值。P53 单克隆抗体作为阳性对照，正常小鼠血清作

为阴性对照。

【结果】：SLC-HP-Fc 疫苗免疫小鼠抗 p53 抗体效价最高，显著优于两联疫苗（参见图 10）。

实验例七 pSLC-HP-Fc 疫苗体外诱导抗 Her2/neu、p53 人特异性 CTL

取 HLA-$A2^+$健康人血，淋巴细胞分离液密度梯度分离单个核细胞（MNC）。部分细胞用脂质体法将 pSLC-HP-Fc 质粒导入，再与未处理的 MNC 按 1:1 混合培养，37℃，5% CO_2 条件下培养。第 6 天计数活细胞用培养液重新混悬，按不同效应细胞：靶细胞比例加入 96 孔培养板与不同靶细胞混合培养。细胞毒测定采用 LDH 法（Promega 试剂盒）。

【结果】：导入 pSLC-HP-Fc 质粒的 MNC，自身混合淋巴细胞培养后，诱导的 CTL 特异性杀伤 Her2/neu 高表达或 p53 堆积的肿瘤细胞，并且受 MHC 限制（图 11）。即只对 HLA-$A2^+$的并且 Her2/neu 高表达或 p53 堆积的肿瘤细胞产生显著的杀伤效应。说明趋化抗原基因疫苗可诱导人肿瘤抗原特异性 CTL。

实验例八 前列腺癌 pSLC-3P-Fc 趋化抗原基因疫苗小鼠体内抗肿瘤效应

$5x10^4$ B16-3P 肿瘤细胞（pcDNA-3P 表达质粒转染的 B16 细胞，G418 筛选），接种 C57BL/6 小鼠侧腹壁（每组八只小鼠）、肿瘤接种后第 3 天、第 8 天、第 13 天基因枪免疫三次，设了空载体、pSLC-Fc、psig-3P(3P 基因前端含有 SLC 分泌肽基因的表达质粒)为对照组。观察肿瘤大小和小鼠的生存期。

【结果】：参见图 13、14，三联趋化抗原基因疫苗（pSLC-3P-Fc）组肿瘤生长明显受到抑制（与各种对照组相比 $P<0.05$），并显著地延长了生存期($P<0.05$)，说明该趋化抗原疫苗结构中间更换抗原基因即可产生针对不同靶抗原的疫苗。

序列表

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所

<120> 基因重组趋化抗原疫苗

<130> CGCNC41111

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 2060
<212> DNA
<213> 人

<400> 1
atggctcagt cactggctct gagcctcctt atcctggttc tggcctttgg catccccagg 60

acccaaggca gtgatggagg ggctcaggac tgttgcctca agtacagcca aaggaagatt 120

cccgccaagg ttgtccgcag ctaccggaag caggaaccaa gcttaggctg ctccatccca 180

gctatcctgt tcttgccccg caagcgctct caggcagagc tatgtgcaga cccaaaggag 240

ctctgggtgc agcagctgat gcagcatctg gacaagacac catccccaca gaaaccagcc 300

cagggctgca ggaaggacag gggggcctcc aagactggca agaaaggaaa gggctccaaa 360

ggctgcaaga ggactgagcg gtcacagacc cctaaagggc caggaggagg agaattcaag 420

atctttggga gcctggcatt tctgggctac ctgctcatcg ctcacaacca agtgaggcag 480

gtcccactgc agaggctgcg gattgtgcga ggcacccagc tctttgagga caactatgcc 540

ctggccctgc aagggctggg catcagctgg ctggggctgc gctcactgag ggaactgggc 600

agtggactgg ccctcatcca ccataacacc cacctctgct tcgtgcacac ggtgccctgg 660

gaccagctct ttcggaaccc gcaccaagct ctgctccaca ctgccaaccg ggccatggcc 720

atctacaagc agtcacagca catgacggag gttgtgaggc gctgccccca ccatgagcgc 780

tgctcagata gcgatggtct ggcccctcct cagcatctta tccgagtgga aggaaatttg 840

cgtgtggagt atttggatga cagaaacact tttcgacata gtgtggtggt gccctatgag 900

ccgcctgagg ttggctctga ctgtaccacc atccactaca actacatgtg taacagttcc 960

tgcatgggcg gcatgaaccg gaggcccatc ctcaccatca tcacactgga agactccagt 1020

ggtaatctac tgggacggaa cagctttgag gtgcgtgttt gtgcctgtcc tgggagagac 1080

cggcgcacag aggaagagaa tctccgcaag aaagatatcg gcggtggagg aggctctaga 1140

gtcgacgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc aggtaagcca 1200

gcccaggcct cgccctccag ctcaaggcgg gacaggtgcc ctagagtagc ctgcatccag 1260

ggacaggccc cagccgggtg ctgacacgtc cacctccatc tcttcctcag cacctgaact 1320

cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc 1380

ccggaccccc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa 1440

gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga 1500

gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct 1560

gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa 1620

aaccatctcc aaagccaaag gtgggacccg tggggtgcga gggccacatg gacagaggcc 1680

ggctcggccc accctctgcc ctgagagtga ccgctgtacc aacctctgtc cctacagggc 1740

agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc 1800

aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg 1860

agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg 1920

gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg 1980

tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct 2040

ccctgtctcc gggtaaatga 2060

<210> 2
<211> 612
<212> PRT
<213> 人

<400> 2

Met Ala Gln Ser Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Ala Phe
1 5 10 15

Gly Ile Pro Arg Thr Gln Gly Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys
20 25 30

Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr
35 40 45

Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe
50 55 60

Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu
65 70 75 80

Leu Trp Val Gln Gln Leu Met Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro
85 90 95

Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr
100 105 110

Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Arg Ser
115 120 125

Gln Thr Pro Lys Gly Pro Gly Gly Gly Glu Phe Lys Ile Phe Gly Ser
130 135 140

```
Leu Ala Phe Leu Gly Tyr Leu Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln
145                 150                 155                 160

Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu
                165                 170                 175

Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly
            180                 185                 190

Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His
        195                 200                 205

Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe
    210                 215                 220

Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Ala Met Ala
225                 230                 235                 240

Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro
                245                 250                 255

His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His
            260                 265                 270

Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg
        275                 280                 285

Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val
    290                 295                 300

Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser
305                 310                 315                 320
```

Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu
325 330 335

Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg
340 345 350

Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu
355 360 365

Arg Lys Lys Asp Ile Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Val Asp Glu Pro
370 375 380

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Ala Pro Glu Leu
385 390 395 400

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
405 410 415

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
420 425 430

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
435 440 445

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
450 455 460

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
465 470 475 480

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
485 490 495

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro Arg Glu Pro Gln
500 505 510

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
515 520 525

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
530 535 540

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
545 550 555 560

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
565 570 575

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
580 585 590

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
595 600 605

Ser Pro Gly Lys
610

<210> 3
<211> 512
<212> DNA
<213> 人

<400> 3
atatcccatg ggcggccgcc tgcagaccag gtctcggtac cacagacatg gctcagtcac 60

tggctctgag cctccttatc ctggttctgg cctttggcat ccccaggacc caaggcagtg 120

atggaggggc tcaggactgt tgcctcaagt acagccaaag gaagattccc gccaaggttg 180

tccgcagcta ccggaagcag gaaccaagct taggctgctc catcccagct atcctgttct 240

tgccccgcaa gcgctctcag gcagagctat gtgcagaccc aaaggagctc tgggtgcagc 300

agctgatgca gcatctggac aagacaccat ccccacagaa accagcccag ggctgcagga 360

aggacagggg ggcctccaag actggcaaga aaggaaaggg ctccaaaggc tgcaagagga 420

ctgagcggtc acagacccct aaagggccag gaggaggaga attcaaagac tggagatctg 480

gatccctcga gtctagagtc gacctgcagg ca 512

<210> 4
<211> 498
<212> DNA
<213> 人

<400> 4
gtgagttagc tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg 60

ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 120

gaattcgagc tcggtacccg gggatcctct agagattaga attcaagatc tttgggagcc 180

tggcatttct gggctacctg ctcatcgctc acaaccaagt gaggcaggtc ccactgcaga 240

ggctgcggat tgtgcgaggc acccagctct ttgaggacaa ctatgccctg gctctgcaag 300

ggctgggcat cagctggctg gggctgcgct cactgaggga actgggcagt ggactggccc 360

tcatccacca taacacccac ctctgcttcg tgcacacggt gccctgggac cagctctttc 420

ggaacccgca ccaagctctg ctccacactg ccaaccgggc catggaaatc gtcgacctgc 480

aggcatgcaa gcttggca 498

<210> 5
<211> 721
<212> DNA
<213> 人

<400> 5

gccagtgcca agcttgcatg cctgcaggtc gacgattacc atggccatct acaagcagtc 60

acagcacatg acggaggttg tgaggcgctg cccccaccat gagcgctgct cagatagcga 120

tggtctggcc cctcctcagc atcttatccg agtggaagga aatttgcgtg tggagtattt 180

ggatgacaga aacacttttc gacatagtgt ggtggtgccc tatgagccgc ctgaggttgg 240

ctctgactgt accaccatcc actacaacta catgtgtaac agttcctgca tgggcggcat 300

gaaccggagg cccatcctca ccatcatcac actggaagac tccagtggta atctactggg 360

acggaacagc tttgaggtgc gtgtttgtgc ctgtcctggg agagaccggc gcacagagga 420

agagaatctc cgcaagaaag atatcaaatc tctagaggat ccccgggtac cgagctcgaa 480

ttcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 540

caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact 600

cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg 660

cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct 720

t 721

<210> 6
<211> 335
<212> DNA
<213> 人

<400> 6
tggctagcga agctttggta ccgtaggatc cacgaattca gtccaggata tcggcggtgg 60

aggaggctct agagctcgag ggcccggggt taacgtttaa acccgctgat cagcctcgac 120

tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct 180

ggaaggtgcc actcccactg tcctttcctа ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct 240

gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg 300

ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgg 335

<210> 7
<211> 1077
<212> DNA
<213> 人

<400> 7
tatgccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac tctagactcg agggatccag atctccagtc 60

ttgaattcgg agttaacgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc 120

caggtaagcc agcccaggcc tcgccctcca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag 180

cctgcatcca gggacaggcc ccagccgggt gctgacacgt ccacctccat ctcttcctca 240

gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 300

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 360

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 420

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 480

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 540

cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc gtggggtgcg agggccacat 600

ggacagaggc cggctcggcc caccctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctctgt 660

ccctacaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct 720

gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc 780

cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 840

ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca 900

gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca 960

gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaatg agggcccaga cctggtctgc aggcggccgc 1020

ccatgggata tcatcgatca tatgtcgccc tatagtgagt cgtattacgg taccgag 1077

<210> 8
<211> 651
<212> DNA
<213> 人

<400> 8
tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat 60

taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc 120

ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct tgcatgcctg 180

caggtcgact ctagactcga gggatccaga tctccagtct tactcgagat gaagacatac 240

agtgtatcat ttgattcact tttttctgca gtaaagaatt ttacagaaat tgcttccaag 300

ttcagtgaga gactccagga ctttgacaaa agcaacccaa tagtattaag aatgatgaat 360

gatcaactca tgtttctgga aagagcattt attgatccat tagggttacc agacaggcct 420

ttttataggc atgtcatcta tgctccaagc agccacaaca agtatgcagg ggagtcattc 480

ccaggaattt atgatgctct gtttgatatt gaaagcaaag tggacccttc caaggcctgg 540

ggagaagtga agagacagat ttatgttgca gccttcacag tgcaggcagc tgcagagact 600

ttgagtgaag tagcctaaga tatcaagacc tgatctgcag gcggccgccc a 651

<210> 9
<211> 643
<212> DNA
<213> 人

<400> 9
atgatatccc atgggcggcc gcctgcagac caggtcttct cgagggcggt gttctggtgc 60

acccccagtg ggtcctcaca gctgcccact gcatcaggaa caaaagcgtg atcttgctgg 120

gtcggcacag cctgtttcat cctgaagaca caggccaggt atttcaggtc agccacagct 180

tcccacaccc gctctacgat atgagcctcc tgaagaatcg attcctcagg ccaggtgatg 240

actccagcca cgacctcatg ctgctccgcc tgtcagagcc tgccgagctc acggatgctg 300

tgaaggtcat ggacctgccc acccaggagc cagcactggg gaccacctgc tacgcctcag 360

gctggggcag cattgaacca gaggagttct tgaccccaaa gaaacttcag tgtgtggacc 420

tccatgttat ttccaatgac gtgtgtgcgc aagttcaccc tcagaaggtg accaagttca 480

tgctgtgtgc tggacgctgg acatgatatc taagactgga gatctggatc cctcgagtct 540

agagtcgacc tgcaggcatg caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg 600

aaattgttat ccgctcacaa ttccacacaa catacgaacc cgg 643

<210> 10
<211> 1257
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 10
gatcgatgat atcccatggg cggccgcctg cagaccaggt cttctagatg agagctgttc 60

ctctgcccct gagcccgaca gcaagcctca gccttggctt cttgctcctg ctttctctct 120

gcctggaccc aggccaagcc aaggagttga agtttgtgac attggtgttt cgacatggag 180

accgaggtcc catcgagacc tttcctaccg accccattac ggaatcctcg tggccacaag 240

gatttggcca actcacccag tggggcatgg aacagcacta cgaacttgga agttatataa 300

ggaaaagata cggaagattc ttgaacgaca cctataagca tgatcagatt tatatccgga 360

gcacagatgt ggacaggact ttgatgagtg ctatgacaaa ccttgcagcc ctgtttcctc 420

cagaggggat cagcatctgg aatcctagac tgctctggca gcccatccca gtgcacaccg 480

tgtctctctc tgaggatcgg ttgctgtacc tgcctttcag agactgccct cgttttgaag 540

aactcaagag tgagacttta gaatctgagg aattcttgaa gaggcttcat ccatataaaa 600

gcttcctgga caccttgtcg tcgctgtcgg gattcgatga ccaggatctt tttggaatct 660

ggagtaaagt ttatgaccct ttattctgcg agagtgttca caatttcacc ttgccctcct 720

gggccaccga ggacgccatg attaagttga gagagctatc agaattatct ctgctatcac 780

tttatggaat tcacaagcag aaagagaaat ctcgactcca agggggcgtc ctggtcaatg 840

aaatcctcaa gaatatgaag cttgcaactc agccacagaa gtataaaaag ctggtcatgt 900

attccgcaca cgacactacc gtgagtggcc tgcagatggc gctagatgtt tataatggag 960

ttctgcctcc ctacgcttct tgccacatga tggaattgta ccatgataag gggggcact 1020

ttgtggagat gtactatcgg aatgagaccc agaacgagcc ctacccactc acgctgccag 1080

gctgcaccca cagctgccct ctggagaagt ttgcggagct actggacccg gtgatctccc 1140

aggactgggc cacggagtgt atggccacaa gcagccacca aggacggaat taagggccca 1200

agactggaga tctggatccc tcgagtctag agtcgacctg caggcatgca agcttgg 1257

<210> 11
<211> 652
<212> DNA
<213> 人和小鼠

<400> 11
cttgcatgcc tgcaggtcga ctctagactc gagggatcca gatctccagt ctagaattca 60

tgatgaatga tcaactcatg tttctggaaa gagcatttat tgatccatta gggttaccag 120

acaggccttt ttataggcat gtcatctatg ctccaagcag ccacaacaag tatgcagggg 180

agtcattccc aggaatttat gatgctctgt ttgatattga aagcaaagtg gacccttcca 240

aggccaggac tttgatgagt gctatgacaa accttgcagc cctgtttcct ccagagggga 300

tcagcatctg gaatcctaga ctgctctggc agcccatccc agtgcacacc gtgtctctct 360

ctgaggatcg gttgctgtac ctgcctttca gagactgccc tggcggtgtt ctggtgcacc 420

cccagtgggt cctcacagct gcccactgca tcaggaacaa aagcgtgatc ttgctgggtc 480

ggcacagcct gtttcatcct gaagacacag gccaggtatt tcaggtcagc cacagcttcc 540

cacacccgct ctacgatatg agcctcctga agaatcgatt cctcaggcca ggtgatgact 600

ccagccacga cctcatgctg ctcgatatct aaacctggtc tgcaggcggc cg 652

<210> 12
<211> 1928
<212> DNA
<213> 人和小鼠

<400> 12
atggctcagt cactggctct gagcctcctt atcctggttc tggcctttgg catccccagg 60

acccaaggca gtgatggagg ggctcaggac tgttgcctca agtacagcca aaggaagatt 120

cccgccaagg ttgtccgcag ctaccggaag caggaaccaa gcttaggctg ctccatccca 180

gctatcctgt tcttgccccg caagcgctct caggcagagc tatgtgcaga cccaaaggag 240

ctctgggtgc agcagctgat gcagcatctg gacaagacac catccccaca gaaaccagcc 300

cagggctgca ggaaggacag gggggcctcc aagactggca agaaaggaaa gggctccaaa 360

ggctgcaaga ggactgagcg gtcacagacc cctaaagggc caggaggagg agaattcatg 420

atgaatgatc aactcatgtt tctggaaaga gcatttattg atccattagg gttaccagac 480

aggccttttt ataggcatgt catctatgct ccaagcagcc acaacaagta tgcaggggag 540

tcattcccag gaatttatga tgctctgttt gatattgaaa gcaaagtgga cccttccaag 600

gccaggactt tgatgagtgc tatgacaaac cttgcagccc tgtttcctcc agaggggatc 660

agcatctgga atcctagact gctctggcag cccatcccag tgcacaccgt gtctctctct 720

gaggatcggt tgctgtacct gcctttcaga gactgccctg gcggtgttct ggtgcacccc 780

cagtgggtcc tcacagctgc ccactgcatc aggaacaaaa gcgtgatctt gctgggtcgg 840

cacagcctgt ttcatcctga agacacaggc caggtatttc aggtcagcca cagcttccca 900

cacccgctct acgatatgag cctcctgaag aatcgattcc tcaggccagg tgatgactcc 960

agccacgacc tcatgctgct cgatatcggc ggtggaggag gctctagagt cgacgagccc 1020

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag gtaagccagc ccaggcctcg 1080

ccctccagct caaggcggga caggtgccct agagtagcct gcatccaggg acaggcccca 1140

gccgggtgct gacacgtcca cctccatctc ttcctcagca cctgaactcc tgggggacc 1200

gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga 1260

ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta 1320

cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 1380

cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga 1440

gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa 1500

agccaaaggt gggacccgtg gggtgcgagg gccacatgga cagaggccgg ctcggcccac 1560

cctctgccct gagagtgacc gctgtaccaa cctctgtccc tacagggcag ccccgagaac 1620

cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga 1680

cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc 1740

agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc 1800

tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct 1860

ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg 1920

gtaaatga 1928

<210> 13
<211> 568
<212> PRT
<213> 人和小鼠

<400> 13

Met Ala Gln Ser Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Ala Phe
1 5 10 15

```
Gly Ile Pro Arg Thr Gln Gly Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys
            20                  25                  30

Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr
        35                  40                  45

Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe
    50                  55                  60

Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu
65                  70                  75                  80

Leu Trp Val Gln Gln Leu Met Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro
                85                  90                  95

Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr
            100                 105                 110

Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Arg Ser
        115                 120                 125

Gln Thr Pro Lys Gly Pro Gly Gly Gly Glu Phe Met Met Asn Asp Gln
    130                 135                 140

Leu Met Phe Leu Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp
145                 150                 155                 160

Arg Pro Phe Tyr Arg His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys
                165                 170                 175

Tyr Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile
            180                 185                 190
```

```
Glu Ser Lys Val Asp Pro Ser Lys Ala Arg Thr Leu Met Ser Ala Met
        195                 200                 205

Thr Asn Leu Ala Ala Leu Phe Pro Pro Glu Gly Ile Ser Ile Trp Asn
    210                 215                 220

Pro Arg Leu Leu Trp Gln Pro Ile Pro Val His Thr Val Ser Leu Ser
225                 230                 235                 240

Glu Asp Arg Leu Leu Tyr Leu Pro Phe Arg Asp Cys Pro Gly Gly Val
                245                 250                 255

Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Arg Asn
            260                 265                 270

Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu Phe His Pro Glu Asp
        275                 280                 285

Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe Pro His Pro Leu Tyr
    290                 295                 300

Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg Pro Gly Asp Asp Ser
305                 310                 315                 320

Ser His Asp Leu Met Leu Leu Asp Ile Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg
                325                 330                 335

Val Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            340                 345                 350

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        355                 360                 365
```

```
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    370                 375                 380

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
385                 390                 395                 400

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
                405                 410                 415

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            420                 425                 430

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        435                 440                 445

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro
    450                 455                 460

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
465                 470                 475                 480

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                485                 490                 495

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
            500                 505                 510

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
        515                 520                 525

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
    530                 535                 540
```

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
545 550 555 560

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565

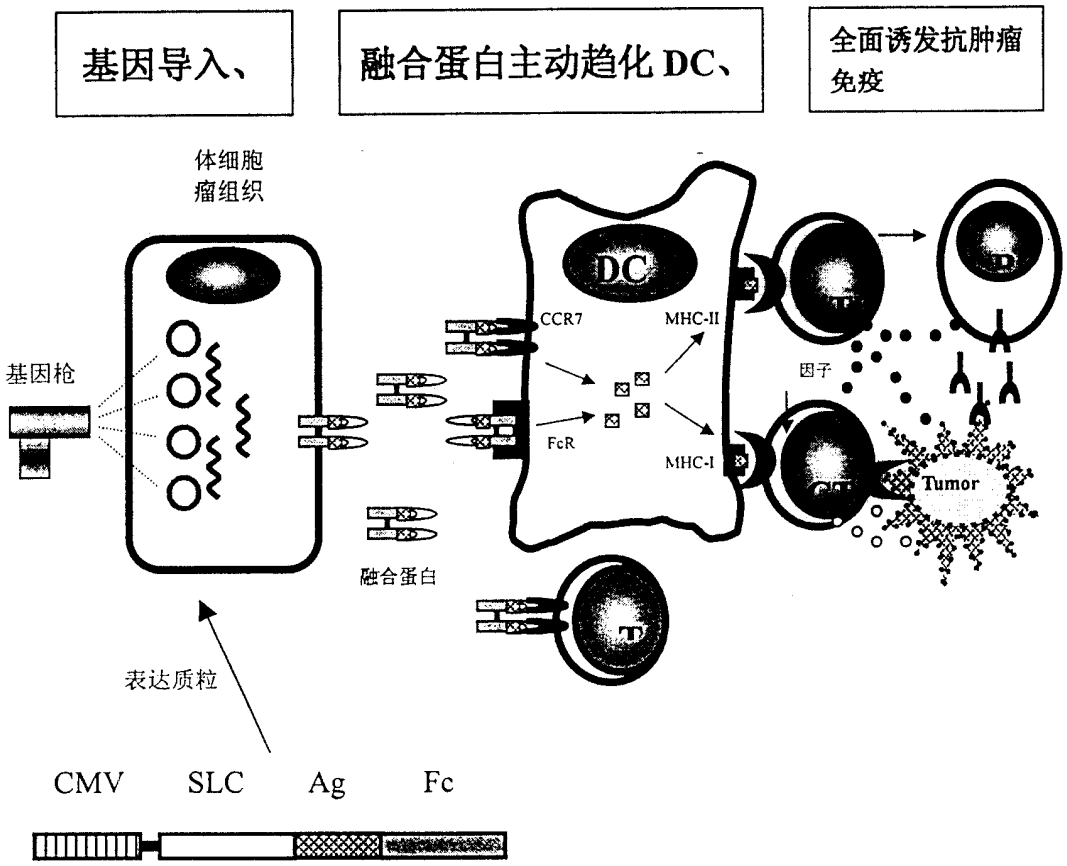

基因导入、
融合蛋白主动趋化 DC、
全面诱发抗肿瘤免疫
体细胞
瘤组织
基因枪
DC
CCR7
MHC-II
FcR
MHC-I
因子
Tumor
融合蛋白
表达质粒
CMV
SLC
Ag
Fc

图 1

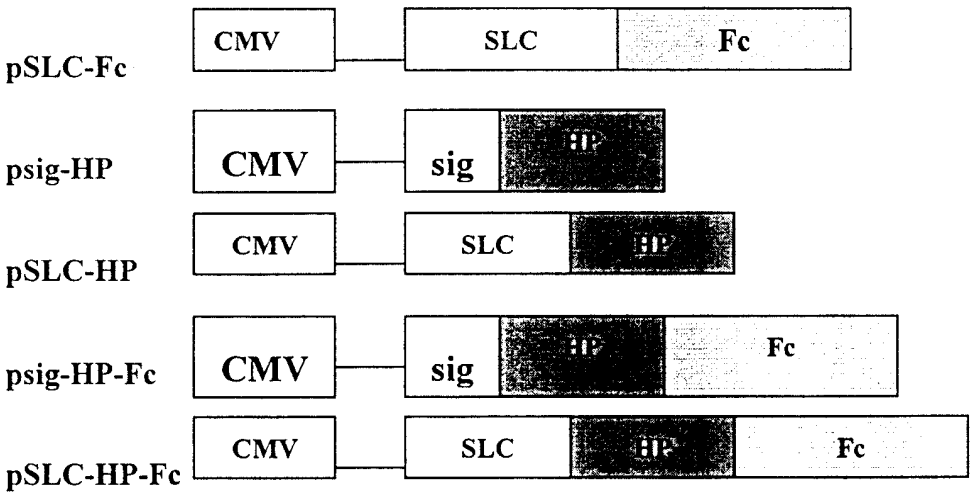

pSLC-Fc
CMV
SLC
Fc
psig-HP
CMV
sig
HP
pSLC-HP
CMV
SLC
HP
psig-HP-Fc
CMV
sig
HP
Fc
pSLC-HP-Fc
CMV
SLC
HP
Fc

图 2

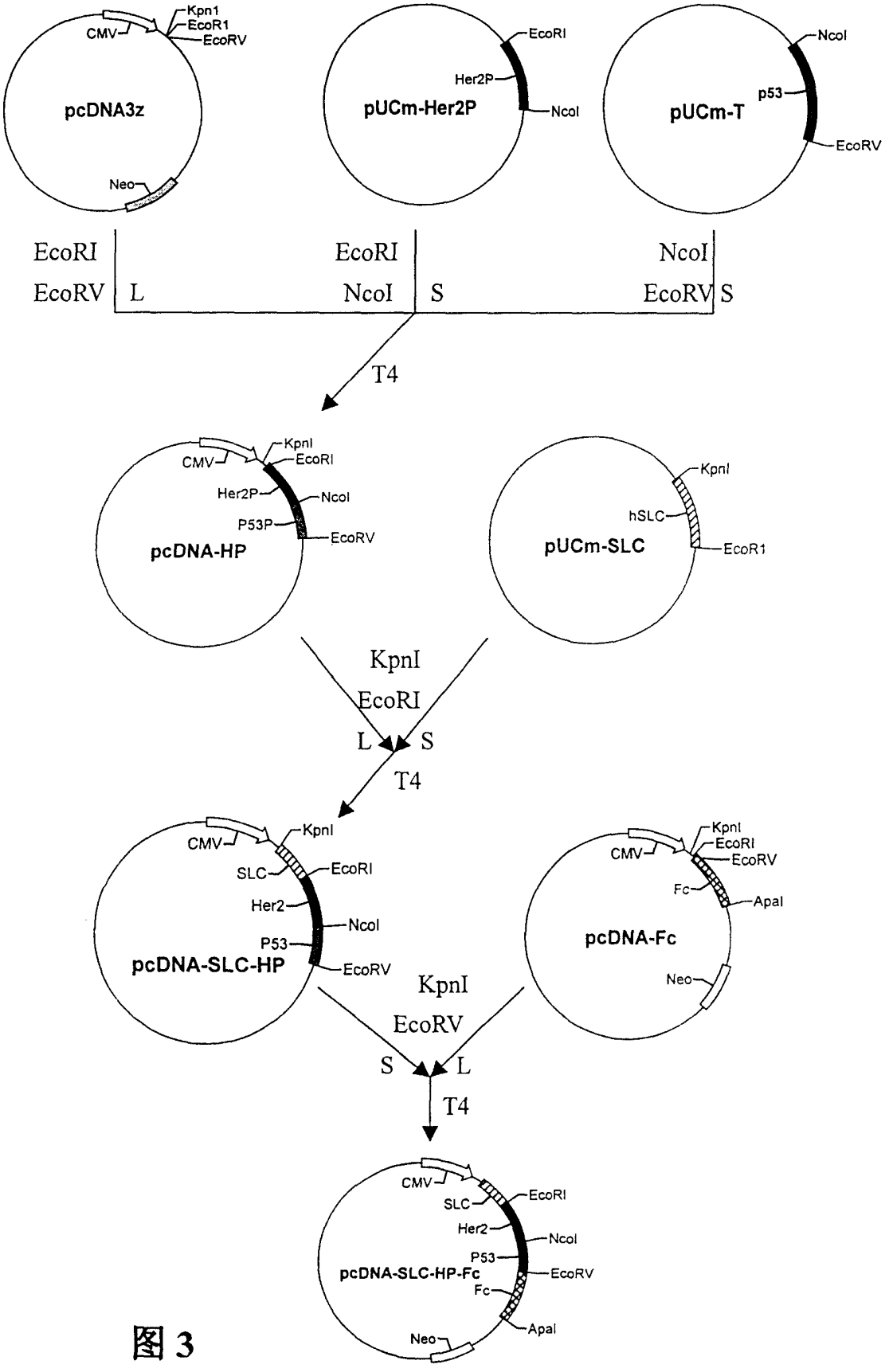

pcDNA3z
CMV
Kpn1
EcoR1
EcoRV
Neo
pUCm-Her2P
Her2P
EcoRI
NcoI
pUCm-T
p53
NcoI
EcoRV
EcoRI
EcoRV
L
EcoRI
NcoI
S
NcoI
EcoRV
S
T4
pcDNA-HP
CMV
KpnI
EcoRI
Her2P
NcoI
P53P
EcoRV
pUCm-SLC
KpnI
hSLC
EcoR1
KpnI
EcoRI
L
S
T4
pcDNA-SLC-HP
CMV
KpnI
SLC
EcoRI
Her2
NcoI
P53
EcoRV
pcDNA-Fc
CMV
KpnI
EcoRI
EcoRV
Fc
ApaI
Neo
KpnI
EcoRV
S
L
T4
pcDNA-SLC-HP-Fc
CMV
SLC
EcoRI
Her2
NcoI
P53
EcoRV
Fc
ApaI
Neo

图 3

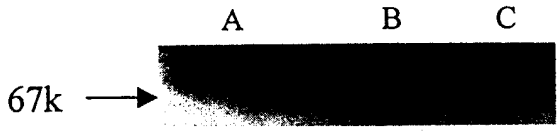

A
B
C
67k

图 4

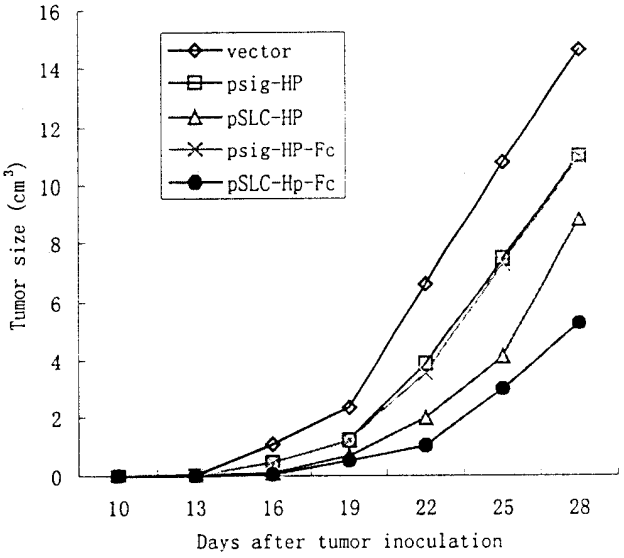

vector
psig-HP
pSLC-HP
psig-HP-Fc
pSLC-Hp-Fc
Tumor size (cm3)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
10
13
16
19
22
25
28
Days after tumor inoculation

图 5

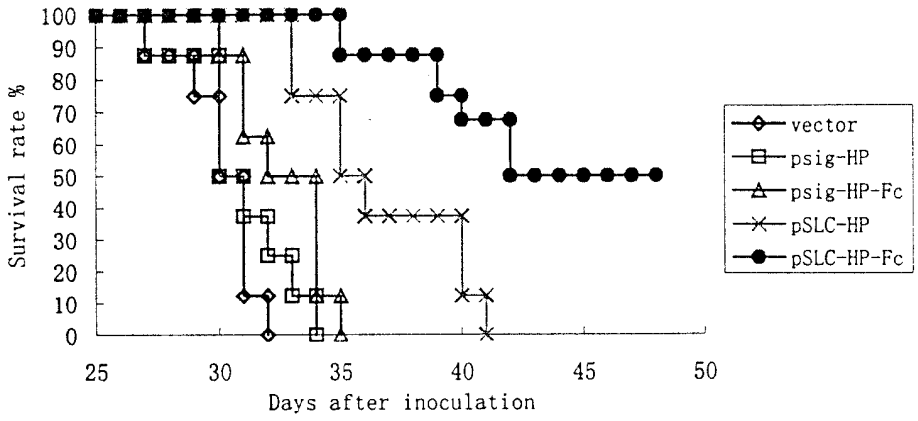

Survival rate %
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
25
30
35
40
45
50
Days after inoculation
vector
psig-HP
psig-HP-Fc
pSLC-HP
pSLC-HP-Fc

图 6

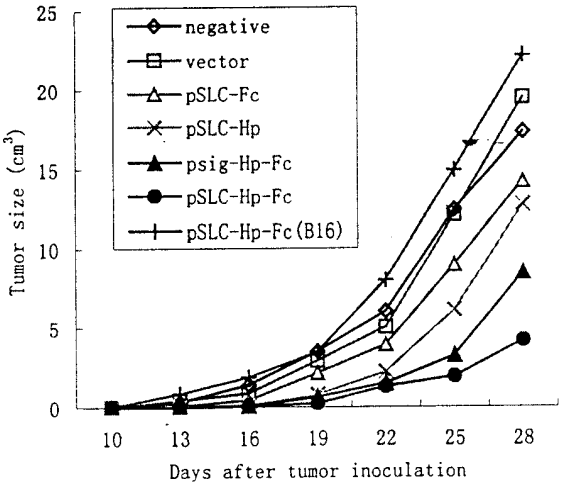

negative
vector
pSLC-Fc
pSLC-Hp
psig-Hp-Fc
pSLC-Hp-Fc
pSLC-Hp-Fc(B16)
Tumor size (cm3)
Days after tumor inoculation
0
5
10
15
20
25
10
13
16
19
22
25
28

图 7

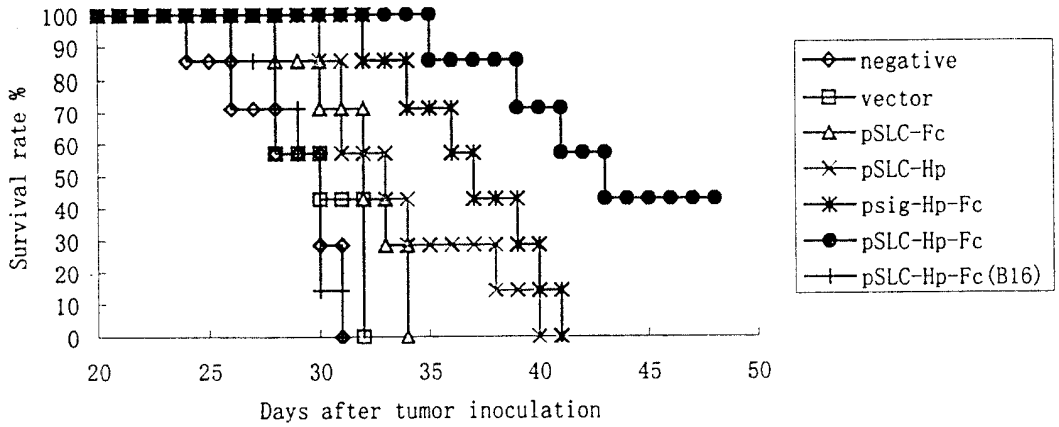

Survival rate %
Days after tumor inoculation
negative
vector
pSLC-Fc
pSLC-Hp
psig-Hp-Fc
pSLC-Hp-Fc
pSLC-Hp-Fc(B16)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
20
25
30
35
40
45
50

图 8

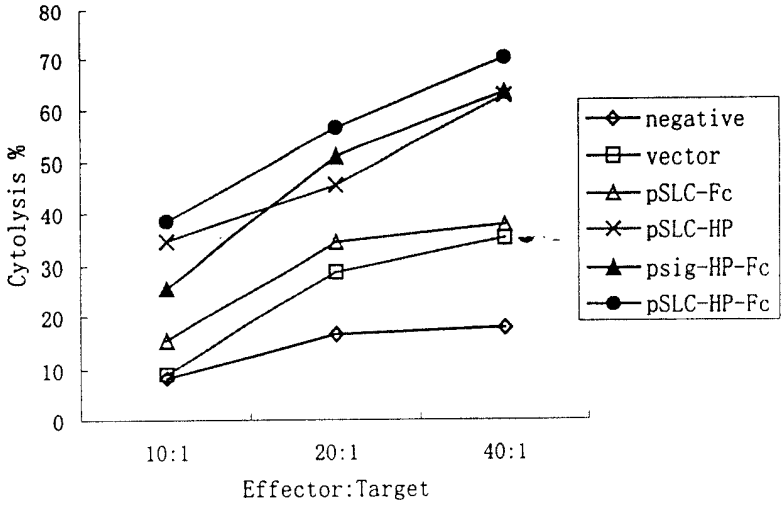

80
70
60
50
40
30
20
10
0
Cytolysis %
10:1
20:1
40:1
Effector:Target
negative
vector
pSLC-Fc
pSLC-HP
psig-HP-Fc
pSLC-HP-Fc

图 9

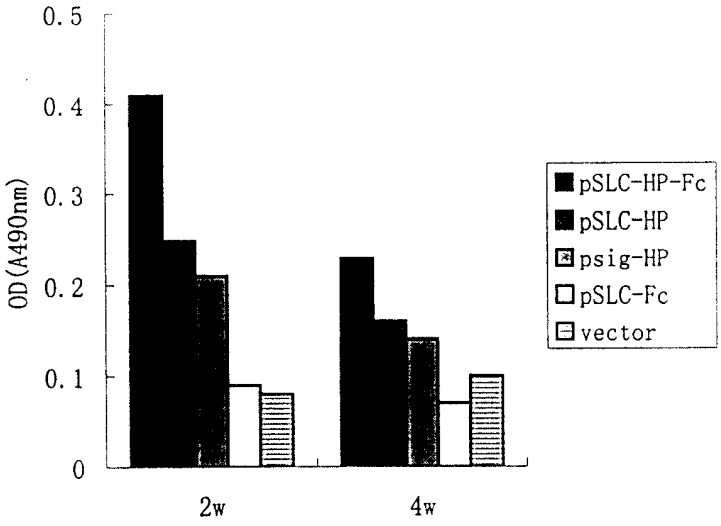

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD(A490nm)
2w
4w
pSLC-HP-Fc
pSLC-HP
psig-HP
pSLC-Fc
vector

图 10

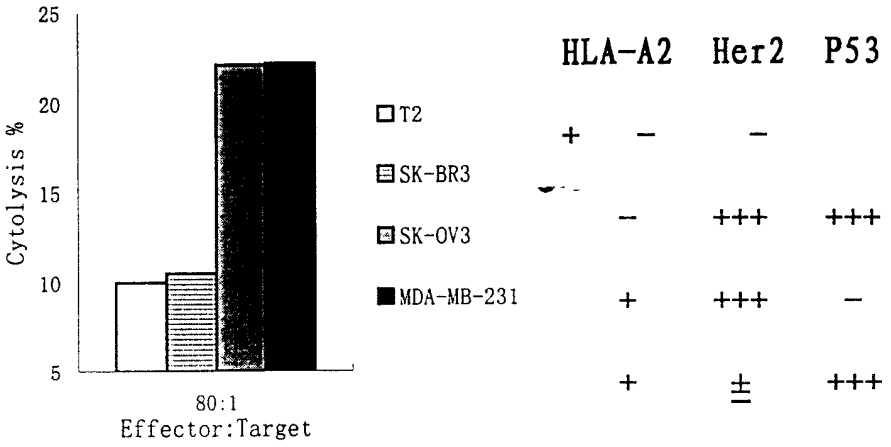

25
20
15
10
5
Cytolysis %
80:1
Effector:Target
T2
SK-BR3
SK-OV3
MDA-MB-231
HLA-A2 Her2 P53
+ − −
− +++ +++
+ +++ −
+ ± +++

图 11

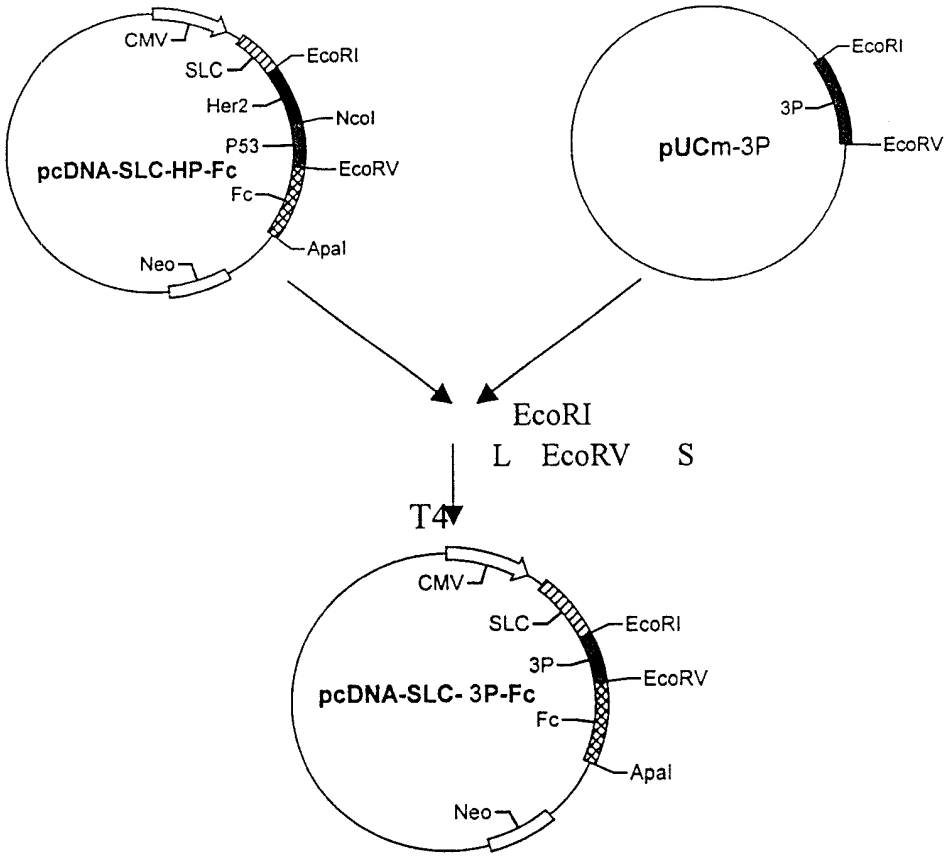

CMV
SLC
EcoRI
Her2
NcoI
P53
EcoRV
pcDNA-SLC-HP-Fc
Fc
ApaI
Neo
EcoRI
3P
pUCm-3P
EcoRV
EcoRI
L EcoRV S
T4
CMV
SLC
EcoRI
3P
EcoRV
pcDNA-SLC- 3P-Fc
Fc
ApaI
Neo

图 12

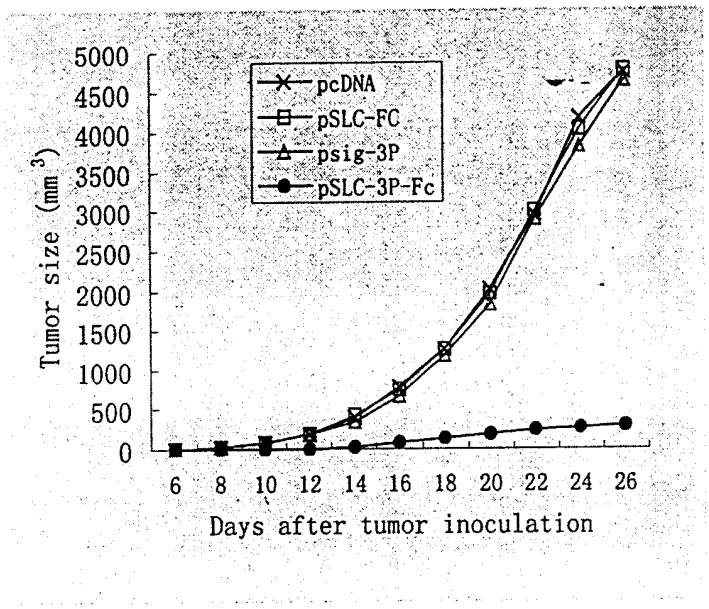

Tumor size (mm 3)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26
Days after tumor inoculation
pcDNA
pSLC-FC
psig-3P
pSLC-3P-Fc

图 13

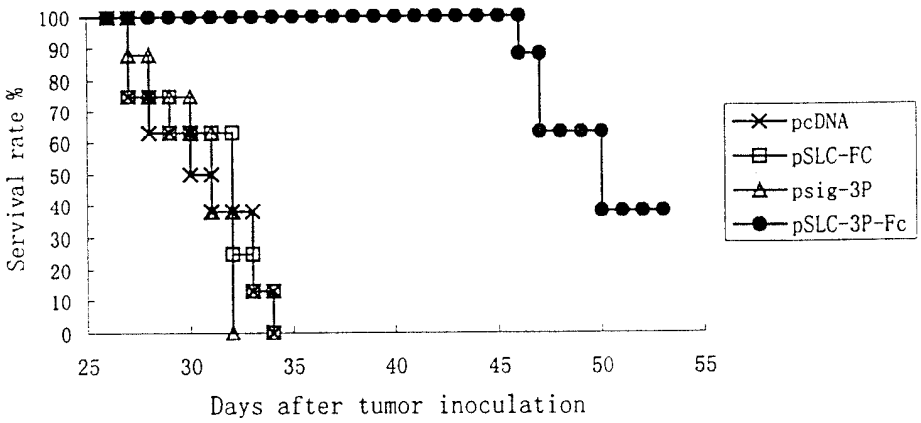

Servival rate %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
25 30 35 40 45 50 55
Days after tumor inoculation
pcDNA
pSLC-FC
psig-3P
pSLC-3P-Fc

图 14

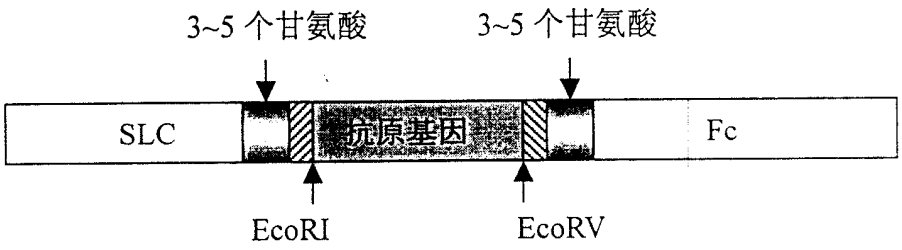


图 15