



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113069537 A

(43) 申请公布日 2021.07.06

(21) 申请号 202110476341.6

(22) 申请日 2021.04.29

(71) 申请人 江苏欣生元生物科技有限公司
地址 226000 江苏省南通市崇川区陈桥高科技创业园12楼

(72) 发明人 王建新 顾云 张聿恒

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

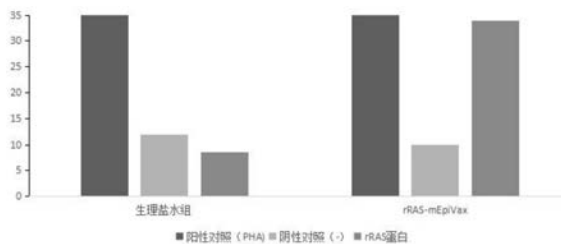
权利要求书1页 说明书8页
序列表5页 附图2页

(54) 发明名称

一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗及其制备方法

(57) 摘要

本发明的一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗,属于治疗性肿瘤疫苗领域。所述“抗原表位融合蛋白”疫苗包含了至少可以引起人细胞癌变的4种RAS新生抗原,并加入具有刺激抗体生成和T细胞反应的佐剂;该疫苗可以通过皮下或肌肉注射施用,所产生的抗变异RAS新生抗原的杀伤性T细胞可以精准识别带有RAS变异的癌变细胞并将其杀死,从而达到治疗肿瘤的目的。



1. 一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗,其特征在于,包括不少于4种17个氨基酸的多肽片段,多肽片段见序列列表,多肽之间用蛋白接头(GGGGS)_n进行无顺序差别的随机连接形成融合蛋白的形式,并与免疫佐剂及纳米颗粒组成一种混合微粒。

2. 根据权利要求1所述的一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗,其特征在于,免疫佐剂为Poly-ICLC。

3. 根据权利要求1或2所述的一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗,其特征在于,纳米颗粒是可降解的。

4. 根据权利要求1或2所述的一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗,其特征在于,纳米颗粒是壳聚糖。

5. 制备权利要求1至4所述的一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗方法,其特征在于:

(1) 表达载体的构建:选取7种上述可能的变异多肽氨基酸序列用(GGGGS)₃序列作为融合蛋白接头进行适当排序设计成融合蛋白基因,按照大肠杆菌密码子偏好优化后进行合成,构建于质粒pET-28a(+)的NdeI和EcoRI酶切位点间形成rRAS-mEpiVax融合蛋白载体,经测序鉴定后备用;

(2) 转化:将大肠杆菌感受态加入rRAS-mEpiVax融合蛋白载体在培养基上培养菌落;

(3) 诱导分泌表达:将活化的含载体rRAS-mEpiVax的BL21重组菌株接种到卡那霉素的新鲜TB培养基中进行分泌表达;

(4) 纯化:对RAS重组多肽裂解液进行纯化;

(5) 疫苗制备:表达纯化得到的融合蛋白与纳米颗粒及免疫佐剂组成一种混合微粒。

6. 根据权利要求5所述的制备一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗方法,其特征在于,免疫佐剂为Poly-ICLC。

7. 根据权利要求5或6所述的制备一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗方法,其特征在于,纳米颗粒是可降解的。

8. 根据权利要求5或6所述的制备一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗方法,其特征在于,纳米颗粒是壳聚糖。

一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫治疗性疫苗领域,涉及一种特定RAS基因变异所产生的多种肿瘤新生抗原表位组合形成的融合蛋白疫苗。

背景技术

[0002] 肿瘤新生抗原是一类由于肿瘤细胞基因突变所导致的变异蛋白序列中具有宿主抗原性的多肽片段。这类新生抗原可以被宿主免疫系统识别为“外源性”抗原而激活特异性免疫反应。基于肿瘤“新生抗原”的治疗性疫苗通过激活患者体内可能存在的新生抗原的免疫细胞,达到识别和杀伤肿瘤的目的。同时也可以通过主动免疫建立抗肿瘤免疫记忆。

[0003] 绝大部分肿瘤新生抗原具有强烈的个性特点。从基因变异来看,不同肿瘤会带有不同蛋白靶点变异,而同一蛋白靶点也可能有不同核酸和氨基酸变异以及不同基因变异模式等。而从患者免疫系统来看,由于个体HLA亚型不同也会导致个体对同一变异免疫反应的差异。这种差异决定针对肿瘤新生抗原的治疗性疫苗通常具有非常明显的个性化。但与此同时,科学界也在积极寻求具有相对“共享性”的新生抗原并研发相对的“预制性”和“通用性”的治疗性肿瘤性疫苗。

[0004] RAS是细胞生长信号通道中最为重要的一个蛋白。RAS通过反复磷酸化和去磷酸化控制着细胞生长的速度。一旦RAS蛋白发生变异,失去调节作用,让细胞生长信号通道处于“永久开放”状态,细胞癌变就不可避免了。正因为其作用如此重要,RAS蛋白在人类基因组中保持高度一致,为人类基因组中极少不具有“基因多样性”的蛋白。同时,RAS致癌变异在位点和种类方面也保持高度的局限性和特异性。例如发生在第12位和61位氨基酸的不超过10种变异涵盖了99%以上的RAS。这些特点都让源自RAS的肿瘤新生抗原成为理想的免疫治疗靶点。

[0005] 基于RAS肿瘤新生抗原的治疗性肿瘤疫苗已经在多个临床实验中进行测试。这类疫苗包括多肽疫苗和mRNA疫苗,这两类技术平台都有其优点和缺点。多肽疫苗安全性高,但是抗原过于分散不利于免疫系统的识别和激活。而mRNA疫苗则具有递送和保存,以及在体内转录成多肽抗原的效率等其他方面的问题。

发明内容

[0006] 本发明的目的是:通过构建并表达包含主要RAS变异抗原多肽的融合蛋白,达到集聚抗原,增大体积,定量免疫目的。

[0007] 本发明的一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗,该蛋白包括至少4种不同的RAS突变基因,这些突变涵盖了常见胰腺癌、结直肠癌以及包括肺癌在内的各种肿瘤中RAS蛋白99%以上的突变。利用不少于4种17个氨基酸的多肽片段进行随机组合($N \geq 4$),多肽片段见序列列表,多肽之间用蛋白接头(GGGGS)_n进行无顺序差别的随机连接形成融合蛋白的形式,并与免疫佐剂及纳米颗粒组成一种混合微粒。免疫佐剂为Poly-ICLC。纳米

颗粒是可降解的。

[0008] 一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗方法,其步骤如下:

[0009] (1) 表达载体的构建:选取7种上述可能的变异多肽氨基酸序列用(GGGGS)3序列作为融合蛋白接头进行适当排序设计成融合蛋白基因,按照大肠杆菌密码子偏好优化后进行合成,构建于质粒pET-28a(+)的NdeI和EcoRI酶切位点间形成rRAS-mEpivax融合蛋白载体,经测序鉴定后备用;

[0010] (2) 转化:将大肠杆菌感受态加入rRAS-mEpivax融合蛋白载体在培养基上培养菌落;

[0011] (3) 诱导分泌表达:将活化的含载体rRAS-mEpivax的BL21重组菌株接种到卡那霉素的新鲜TB培养基中进行分泌表达;

[0012] (4) 纯化:对RAS重组多肽裂解液进行纯化;

[0013] (5) 疫苗制备:表达纯化得到的融合蛋白与纳米颗粒及免疫佐剂组成一种混合微粒。免疫佐剂为Poly-ICLC。纳米颗粒是可降解的,可为壳聚糖。

[0014] 有益效果:1) 本疫苗将数个主要的RAS变异抗原组合成一个重组蛋白,达到一次性表达和制备,减少了生产程序,进一步降低制备成本;2) 本疫苗通过融合蛋白来增加抗原的体积,与合成多肽相比从而可以更容易被“抗原递送细胞”(APC)识别和吞噬,并加以处理;3) 经过APC处理的抗原将采用一种“由内至外”的主动性递呈,其效果类似mRNA疫苗,但是可以更加定量的保证抗原的表达和递呈;4) 通过与疫苗佐剂共同组入纳米颗粒,可以提高抗原和佐剂的局部浓度,以及协调免疫相互作用。

[0015] 因此,本发明提供一种介于合成多肽疫苗和mRNA疫苗之间的一种疫苗构建方法。通过构建并表达包含主要RAS变异抗原多肽的融合蛋白,达到集聚抗原,增大体积,定量免疫等几大优点。

附图说明

[0016] 图1:本发明一个实施例中rRAS-mEpivax融合蛋白表达westernblot验证图谱,其中lane1:Marker;lane2:对照上清;lane3:克隆1上清;lane4:克隆2上清;lane5:对照裂解液;lane6:克隆1裂解液;lane7:克隆2裂解液。

[0017] 图2:本发明一个实施例中rRAS-mEpivax融合蛋白疫苗免疫小鼠后诱导小鼠产生保护性抗体柱状图。

[0018] 图3:本发明一个实施例中rRAS-mEpivax融合蛋白疫苗免疫小鼠诱导小鼠产生特异性细胞免疫的ELISPOT结果图。

[0019] 图4:本发明一个实施例中rRAS-mEpivax融合蛋白疫苗免疫小鼠诱导小鼠产生特异性细胞免疫柱状图。

具体实施方式

[0020] 1) 突变表位序列

[0021] 近年来随着基因测序的普及化,很多影响胰腺癌发生和发展的基因变异均被确认。人类原癌基因家族编码的21kD鸟嘌呤核苷酸结合蛋白RAS(p21RAS)是细胞生长信号链中重要的一员。在肿瘤细胞中,由于RAS基因中的单核酸突变,导致在12位或13位中发生单

个氨基酸取代。这一变异使得RAS处于持续的信号激活状态,从而导致不受控制的细胞生长和癌变。

[0022] 研究表明,相同的肿瘤性胰腺中可能存在多个RAS突变。虽然在胰腺癌中,RAS突变主要发生在12位,但在13位和61位中也有一定程度的变异。这些变异抗原代表了常见胰腺癌、结直肠癌以及包括肺癌在内的各种肿瘤中RAS蛋白99%以上的突变。

[0023] 本融合蛋白疫苗由至少4种不同的17个氨基酸的多肽段组成,其序列相对应于野生型RAS蛋白氨基酸序列,但在第12位、第13位,第61位以及146位处被一个不同的氨基酸取代。其具体序列见下表:

抗原代码	氨基酸序列
G12A	KLVVVGAAGVGKSALTI
G12C	KLVVVGACGVGKSALTI
G12D	KLVVVGADGVGKSALTI
G12R	KLVVVGARGVGKSALTI
G12S	KLVVVGASGVGKSALTI
G12V	KLVVVGAAGVGKSALTI
G13D	KLVVVGAGDVGKSALTI
Q61R	DILDTAGREEYSAMRDQ
Q61H	DILDTAGHEEYSAMRDQ
Q61L	DILDTAGLEEYSAMRDQ
A146V	IPFIETSVKTRQGVDDA
A147P	IPFIETSPKTRQGVDDA
A146T	IPFIETSTKTRQGVDDA

[0025] 2) 融合蛋白的制备

[0026] 2.1. 表达载体的构建

[0027] 选取7种上述可能的变异多肽氨基酸序列用(GGGGS)3序列作为融合蛋白接头进行适当排序设计成融合蛋白基因,按照大肠杆菌密码子偏好优化后由苏州金唯智进行合成,构建于质粒pET-28a(+)的NdeI和EcoRI酶切位点间形成融合蛋白(rRAS)载体,经测序鉴定后备用。序列见序列列表如下:

[0028] MKLVVVVGARGVGKSALTI GGGGSGGGGSGGGGSKLVVVVGASGVGKSALTI GGGGSGGGGSGGGGSKLVVGAAGVGKSALTI GGGGSGGGGSGGGGSKLVVVGAVGVGKSALTI GGGGSGGGGSGGGGSKLVVVGACGVGKSALTI GGGGSGGGGSGGGGSKLVVVGAGDVGKSALTI GGGGSGGGGSGGGGSKLVVVGADGVGKSALTI HHHHHH。

[0029] 其对应的核苷酸序列如下:

[0030] ATGAAATTAGTAGTTGTGGGAGCTAGAGGGTAGGCAAAAGTGCATTGACAATCGGCGCGGGGGCTC
TGGTGGTGGTGGCTCCGGTGGGGAGGCTCGAAACTCGTTGTGGTTGGAGCGTCGGGCGTGGGAAAATCAGCATTG
ACCATAGGTGGCGCGGGTCCGGAGGTGGCGGTTCCGGAGGCGGGGGAAGTAAATTAGTTGTTGTCGGAGCTGCAG
GTGTCGGCAAATCAGCTCTCACCATTGGTGGCGGCGGAAGCGGGGGGGGGTAGTGGGGCGGAGGAAGTAAGCT
CGTGGTTGTGGGTGCCGTAGGTGTGGGCAAAAGTGCCTACTATAGGTGGCGGGGTTCCGGTGGAGGCGGTTCC
GGAGGGGGCGGCTCAAACTAGTCGTCGTTGGCGCTCGGGGTTGAAAAAGCGCCCTGACTATAGGCGGCGGGG
GTAGTGGCGGAGGCGGGAGTGGGGTGGTGGTTCTAAGCTGGTAGTCGTCGGTGCCGGTGACGTTGAAAAGAGCGC

CCTGACCATTGGCGGCGGAGGTAGTGGGGGGGAGGTAGCGGCGGGGTGGGTCAAACTGGTCGTGGTAGGCGCC
GATGGTGTGGCAAAAGCGCCTTGACTATCCATCATCATCATCATTA.

[0031] 2.2. 转化

[0032] 取100 μ L大肠杆菌感受态(BL21,DE3),加入20 μ L rRAS融合蛋白质粒(20ng/ μ L)。冰浴40min后,42 $^{\circ}$ C水浴热激90s,马上放回冰上,冰浴3min加入100 μ L不含卡那霉素的LB液体培养基,37 $^{\circ}$ C水浴45min。用接种环蘸取少许菌液在含100 μ g/mL卡那霉素的LB固体培养基上划线,待干燥后,37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜。

[0033] 2.3. 诱导分泌表达

[0034] 用接种环挑取单菌落至3mLTB培养基,37 $^{\circ}$ C,250rpm,培养3小时。取1mL活化的含载体rRAS-mEpiVax的BL21重组菌株,接种到100mL含100 μ g/mL,卡那霉素的新鲜TB培养基中,37 $^{\circ}$ C,250rpm,培养3小时。取部分菌液作为未诱导的对照组,余下的加IPTG(0.22 μ m过滤除菌)使最终浓度为0.1mmol/L,然后20 $^{\circ}$ C继续培养16小时。10000转离心15分钟,分离收集上清液。沉淀加0.3mL的20mmol/L的Tris-HCl(pH 8.0),超声波功率40%,超声6秒暂停9秒,超声1小时,冰上操作。10000转离心30分钟离心,分离并收集上清液。沉淀中加30mL的20mmol/L的Tris-HCl(pH 8.0)8M尿素,获得裂解液。通过Western-Blot的方法,用His抗体(上海碧云天)检测外源基因表达。经鉴定,该融合蛋白在重组菌株裂解液中成功表达。

[0035] 2.4 纯化

[0036] 2.4.1 柱子制备

[0037] 轻轻颠倒翻转瓶子几次,使介质混合均匀;吸取10mL的介质加入到柱子中,让介质自由沉降,并放干储存液;加入4倍柱体积的平衡缓冲液平衡层析介质。

[0038] 2.4.2 柱子纯化

[0039] 将RAS重组多肽裂解液上样至柱中,流速控制为0.5-1ml/分钟,收集流出液以待后续分析;以流速为1ml/分钟的洗涤缓冲液洗涤柱子以去除杂蛋白,一般用量为8倍柱体积;用5-10倍柱体积的洗脱缓冲液以0.5-1ml/分钟的流速洗脱,收集洗脱液。将目的蛋白透析到20mM Tris-HCl(pH 8.0)或者1 \times PBS(pH 7.4)中。经WesternBlot检测蛋白纯化情况。

[0040] 经检测结果(见图1)显示,挑取的两个转化克隆蛋白表达裂解液中,约25KD分子量处有特异性蛋白表达。

[0041] 3) 佐剂挑选

[0042] 免疫佐剂是指与抗原同时或预先应用,能非特异性地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答,以增强相应抗原的免疫原性或改变免疫反应类型,而本身无抗原性的物质。

[0043] 可降解的聚酯类纳米颗粒和病原体大小相当,可通过组织间隙,穿过机体最小的毛细血管,且具有生物相容性,低毒性、靶向性,以及能使疫苗抗原长效释放和表达,引起全身的免疫系统反应。壳聚糖作为自然界中唯一带正电荷的多糖,纳米化后具有良好的生物降解性,粘膜粘附性,免疫诱导活性,缓释和控释作用,已成为疫苗免疫佐剂的优良载体。壳聚糖纳米粒的制备方法有多种,通常采用离子交联法、复凝聚法和沉淀法。用于蛋白类疫苗时,多采用离子交联法制备纳米粒,其包封率和载药率均很高,且不会改变抗原本身的性质。

[0044] poly-ICLC是一种双链RNA复合物,作为一种病毒模拟物,由内质体受体TLR3和细胞质传感器MDA-5和DHX/DDX RNA解旋酶所识别。其佐剂作用是多方面的,包括激活典型的

树突状细胞以表达高水平的IL-12和I型IFN以促进Th1极化。在入源化小鼠模型中的研究已经证实了Poly-IC作为一种有效的佐剂对于驱动DC诱导的炎症和抗原特异性细胞毒性T细胞活化的意义。在对健康志愿者和癌症患者进行的临床试验中,发现poly-ICLC总体安全且具有免疫原性。据报道,Poly-IC无论是单独给药还是与其他成分联合给药在提高免疫原性和诱导病毒控制方面比其他TLR配体更有效。

[0045] 4) 疫苗制备

[0046] 4.1壳聚糖纳米颗粒的制备

[0047] 4.1.1试剂的配制

[0048] 储存液:

[0049] • 水

[0050] • 5MNaCl

[0051] • 用150mM NaCl配制3mg/ml壳聚糖:

[0052] o向50ml锥形管中添加48.5ml dH₂O。

[0053] o向试管中添加1.5ml 5MNaCl。

[0054] o在精确天平上称取150毫克壳聚糖,并添加到试管中。

[0055] o盖上试管,摇匀,直到壳聚糖溶解。

[0056] o稀释至所需的工作浓度。在60mMNaCl中制备10ml工作浓度为1.2mg/ml壳聚糖,向6ml dH₂O中加入4ml储备溶液。

[0057] • 1.0至1.5mg/ml肽溶液。用dH₂O混合多肽。

[0058] • 10mg/mlNa₅P₃O₁₀(三磷酸氢钠,又称三聚磷酸钠,TPP)溶于100mMNaCl中。

[0059] • 可选:含有附加佐剂的溶液。

[0060] 工作液:

[0061] • 60mM NaCl 1.2mg/ml壳聚糖。

[0062] • 1.0to 1.5mg/ml多肽溶液。

[0063] • 10mMNaCl 1mg/ml TPP。

[0064] 4.1.2混合疫苗-制备

[0065] 1.将工作溶液加热至50至60摄氏度(50毫升锥形管加热15分钟;15毫升锥形管加热10分钟),以确保其无病毒。

[0066] 2.用肥皂和水清洗小烧杯和搅拌棒,然后用酒精浸过的纸巾擦干。

[0067] 3.将烧杯和磁性搅拌棒放在磁力搅拌器上。

[0068] 4.向烧杯中加入7.2ml壳聚糖工作液。慢慢打开搅拌器将搅拌速度至少提高到500rpm。

[0069] 5.添加高达1.5毫升的肽溶液(按50-100ug/只进行添加)。如果添加较少的肽溶液,在dH₂O中补充体积,使总量达到1.5ml。

[0070] 6.此时应添加可选的佐剂溶液。本实施例中用Poly ICLC作为免疫佐剂(按100-200ug/只进行混合免疫)。

[0071] 7.缓慢加入1.3毫升TPP溶液,一滴一滴,加入最后一滴后继续搅拌至少5分钟。

[0072] 8. 4°C,14000g离心30分钟或在9000g离心60分钟,弃去上清,用生理盐水重悬至所需体积,此时得到的混合物即为rRAS-mEpivax疫苗。

[0073] 5) 小鼠尾静脉注射进行免疫

[0074] 将小鼠固定好,将尾巴拉直,绷紧。用酒精棉球擦拭尾巴或者用热水或者热毛巾焐热尾巴,使尾部静脉扩张。用左手的食指,中指,无名指及大拇指将小鼠尾巴固定。手法:握住1ml注射器前面0.1ml处。右手小指搭在拽着鼠尾的左手拇指处平行进针。注射时左手扯尾,使尾巴紧贴桌面,一般选择距尾尖1/4或1/3处进针,此处皮肤较薄,血管清晰,进针容易。每只小鼠注射200ul rRAS-mEpiVax疫苗、单独佐剂-壳聚糖纳米颗粒混合物和或生理盐水,注射结束后,使用医用棉花止血即可。

[0075] 实验设3组,分别为:空白组(注射生理盐水作为阴性对照);纳米-RAS尾静脉注射组;纳米颗粒尾静脉注射组。ICR小鼠数量:每组3只,共9只。每隔一周进行一次免疫,共免疫4次,免疫结束后1周采集小鼠血样。

[0076] 6) 血清抗体检测

[0077] 6.1 小鼠取血、血清制备及PBMC分离

[0078] 手术器械高温高压灭菌,用剪刀剪掉小鼠胡须,用镊子摘除小鼠眼球取血,悬空将血滴入EDTA抗凝采血管中,颠倒几次混匀。留2滴血液于普通灭菌EP管中4℃静置过夜。用RPMI 1640基础培养基1:1稀释小鼠抗凝血,15ml离心管加入等量小鼠pbmc分离液,将稀释血液慢慢加于分离液上,800g,离心30min(升速降速设为最低)。小心吸取中间白雾层细胞,加10ml PBS重悬,250g离心10min,去上清,10mlpbs重悬,250离心10min,去上清,1ml RPMI 1640完全培养基重悬细胞,计数。将细胞调整为 2×10^6 /ml浓度。

[0079] 6.2 Elisa检测小鼠血清抗体产生情况

[0080] 抗原包被:96孔酶标板,50ul 5ug/ml的多肽(本实验选取四种抗原多肽,分别为G12C,G12D.G12R.G12V),封膜,4℃过夜;

[0081] 洗涤:甩去抗原包被液,在吸水纸轻拍掉残留包被液,250ul/孔PBS洗涤三次;

[0082] 封闭:每孔加260ul 1%BSA-PBS,封膜,室温放置1h;

[0083] 吸取过夜小鼠血清按1:500-1:1000的浓度梯度范围进行稀释检测,250ul/孔,PBS洗涤三次,每孔加入稀释血清100ul,封膜,37℃放置1h;

[0084] 重复洗涤步骤;

[0085] 二抗孵育:加入HRP标记抗小鼠二抗,100ul/孔,封膜,37℃放置1h

[0086] 重复洗涤步骤;

[0087] 每孔加100ul显色液,室温避光反应15min后,每孔加50ul终止液,450nm测定吸光度。

[0088] 抗体滴度检测结果见图2和表1,经免疫后的ICR小鼠的血清较未免疫之前产生了明显的特异性抗体,分别与其中的四种多肽进行ELISA检测,发现都有强弱不等的特异性结合,说明免疫后ICR小鼠产生了针对这八种特异性抗原表位的抗体。

[0089] 表1

多肽序号	阴性对照			平均值	纳米佐剂			平均值	rRAS-mEpivax			平均值
G12C	0.121	0.152	0.133	0.135	0.18	0.174	0.181	0.178	0.301	0.298	0.221	0.273
G12D	0.162	0.127	0.186	0.158	0.177	0.159	0.175	0.170	0.25	0.267	0.228	0.248
G12R	0.132	0.173	0.155	0.153	0.183	0.135	0.185	0.168	0.258	0.321	0.278	0.286
G12V	0.149	0.137	0.115	0.134	0.178	0.183	0.152	0.171	0.262	0.354	0.357	0.324

[0090]

[0091] 7) Elispot检测小鼠pbmc特异性细胞免疫反应

[0092] 7.1工作液:

[0093] 抗体液A:用稀释液A稀释抗体A.每个96孔板需用40 μ l抗体A加入10mL稀释液A。[0094] 抗体液B:用稀释液B稀释抗体B.每个96孔板需用40 μ l抗体B加入10mL稀释液B。[0095] 酶溶液C:用稀释液C稀释Strep-AP.每个96孔板需用10 μ l Strep-AP加入10mL稀释液C。

[0096] 显色液:用稀释液D稀释显色试剂。

[0097] 步骤1-将160 μ l S1到10ml的稀释液D混匀。[0098] 步骤2-加入160 μ l S2混匀。[0099] 步骤3-加入92 μ l S3混匀。

[0100] 显色液10min内使用,避光。

[0101] 洗涤液:

[0102] 0.05%PBST:每200mL PBS加100 μ l Tween-20

[0103] PBS,100ml。

[0104] 纯水,100ml。

[0105] 7.2 Elispot检测

[0106] 7.2.1 DAY0(无菌操作,取血前一天)

[0107] 1.准备抗体液A;

[0108] 2. 80 μ l/孔加入抗体液A,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0109] 7.2.2DAY 1(无菌操作)

[0110] 1.制备培养基:RPMI1640+10%FBS+1%L-Gln+1%双抗(500IU/mL hrIL-2);

[0111] 2.制备含2X RAS融合蛋白(rRAS)实验终浓度的培养基;

[0112] 3.轻轻倒掉孵育过夜的抗体液A,PBS洗一遍;

[0113] 4.按100 μ l/孔各加入1) rRAS组:含2X RAS融合蛋白(rRAS)的培养基,2)阳性对照:PHA溶液,阴性对照组不加任何样品。37 $^{\circ}$ C培养箱孵育20分钟;[0114] 5.用培养基将PBMC调整至 1×10^6 /mL,100 μ l/孔加入小鼠PBMC;[0115] 6. 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养24小时。

- [0116] 7.2.3 DAY2
- [0117] 1. 准备洗涤液:PBS,纯水和PBST;
- [0118] 2. 准备抗体液B;
- [0119] 3. PBS和0.05%PBST各洗两次,每次200 μ l/孔;
- [0120] 4. 每孔加入80 μ L抗体液B.室温孵育两小时;
- [0121] 5. 准备溶液C;
- [0122] 6. 200 μ l/孔0.05%PBST洗两次;
- [0123] 7. 每孔加入80 μ l酶溶液C,室温孵育30分钟;
- [0124] 8. 孵育同时准备显色液;
- [0125] 9. 0.05%PBST和纯水各洗两遍,每次200 μ l/孔;
- [0126] 10. 每孔加入80 μ l显色液,室温孵育15分钟;
- [0127] 11. 用自来水轻轻冲洗PVDF膜三次即终止反应;
- [0128] 12. 去除底盖,用自来水轻轻冲洗PVDF膜背面;
- [0129] 13. 将PVDF96孔板倒扣于通风操作台2小时或者普通工作台24小时晾干扫描并计数。

[0130] 结果见图3及图4,显示相较于用生理盐水免疫的对照组小鼠的PBMC细胞,用rRAS-mEpivax融合蛋白免疫的小鼠PBMC可以被诱导表达特异性的干扰素 γ (INF- γ)。

[0131] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

序列表

<110> 江苏欣生元生物科技有限公司

<120> 一种基于RAS变异新生抗原表位的融合蛋白纳米疫苗及其制备方法

<141> 2021-04-28

<160> 15

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ala Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15

Ile

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15

Ile

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15

Ile

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15

Ile

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15

Ile

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15

Ile

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15

Ile

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 8

Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp
1 5 10 15

Gln

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 9

Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly His Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp
1 5 10 15

Gln

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 10

Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp

1

5

10

15

Gln

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 11

Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Val Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp

1

5

10

15

Ala

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 12

Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Pro Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp

1

5

10

15

Ala

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 13

Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Thr Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp

1

5

10

15

Ala

<210> 14

<211> 216

<212> PRT

<213> Human

<400> 14

Met Lys Leu Val Val Val Gly Ala Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

1	5	10	15
Thr Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	20	25	30
Ser Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu			
	35	40	45
Thr Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	50	55	60
Ser Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ala Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu			
65	70	75	80
Thr Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	85	90	95
Ser Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu			
	100	105	110
Thr Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	115	120	125
Ser Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu			
130	135	140	
Thr Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
145	150	155	160
Ser Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu			
	165	170	175
Thr Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	180	185	190
Ser Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu			
	195	200	205
Thr Ile His His His His His His			
	210	215	

<210> 15

<211> 651

<212> DNA/RNA

<213> Human

<400> 15

```

atgaaattag tagttgtggg agctagaggg gtaggcaaaa gtgcattgac aatcggcggc 60
gggggctctg gtggtggtgg ctccggtggg ggaggctcga aactcgttgt ggttggagcg 120
tcgggcgtgg gaaaatcagc attgaccata ggtggcggcg ggtccggagg tggcggttcg 180
ggaggcgggg gaagtaaatt agttgttctc ggagctgcag gtgtcggcaa atcagctctc 240
accattggtg gcggcggaag cggggggggg gtagtgggg gcggaggaag taagctcgtg 300
gttggtgggtg ccgtaggtgt gggcaaaagt gcgctcacta taggtggcgg gggttccggt 360
ggaggcggtt ccggaggggg cggctcaaaa ctagtcgtcg ttggcgcctg cggggttggg 420

```

aaaagcgccc tgactatagg cggcgggggt agtggcggag gcgggagtgg ggtggtggt 480
tctaagctgg tagtcgtcgg tgccggtgac gttggaaaga gcgccctgac cattggcggc 540
ggaggtagtg gggggggagg tagcggcggg gttgggtcaa aactggtcgt gtaggcgcc 600
gatggtgttg gcaaaagcgc cttgactatc catcatcatc atcatcatta a 651

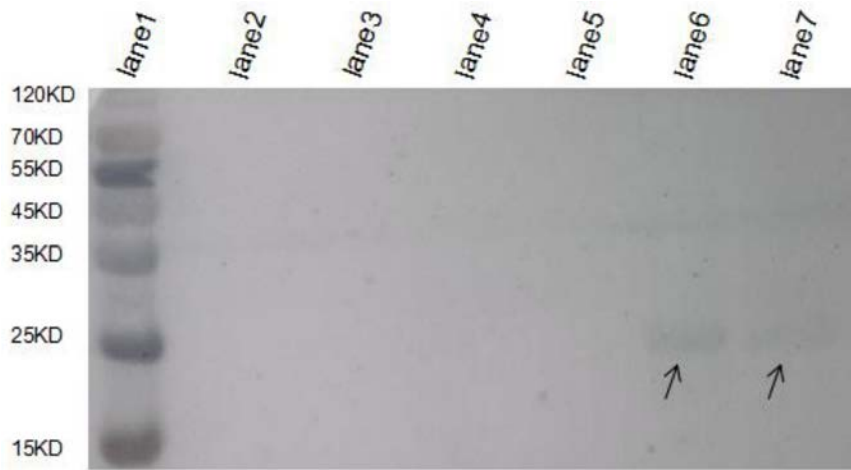


图1

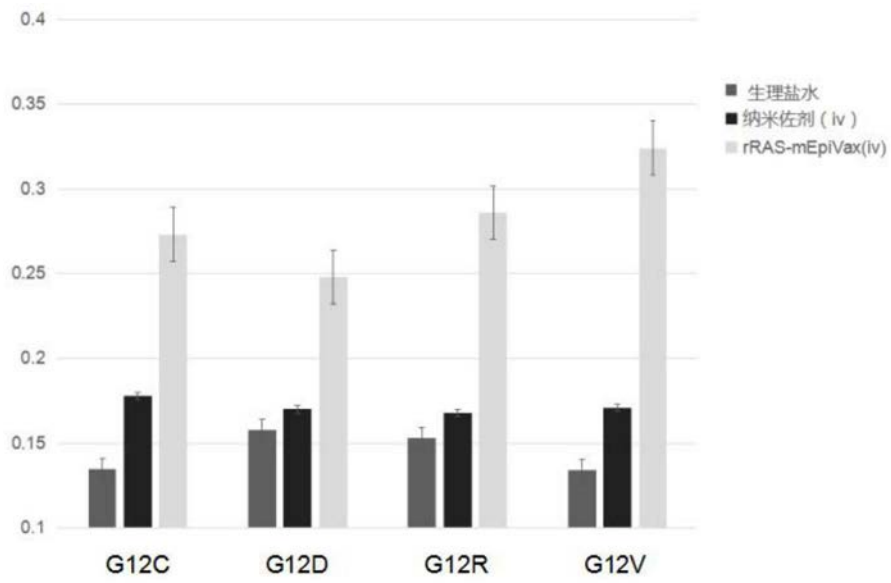


图2

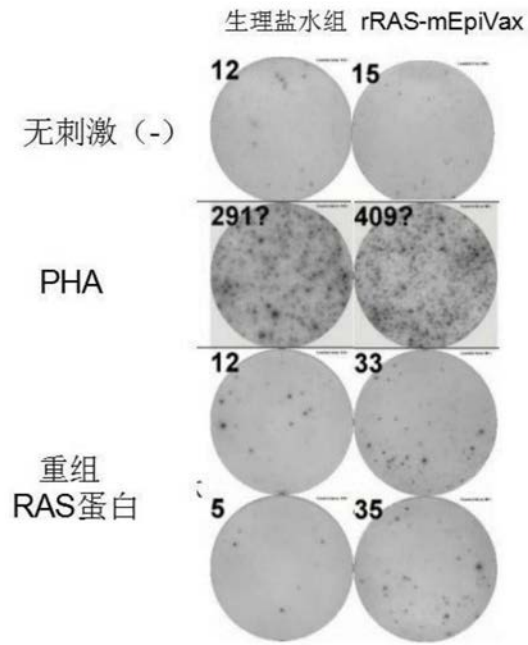


图3

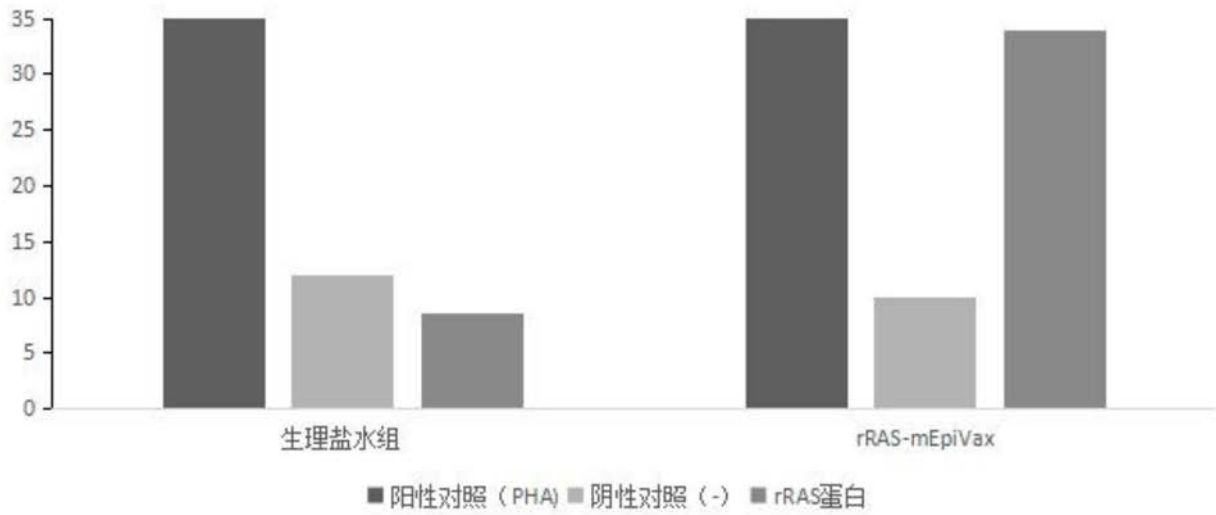


图4