



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109810946 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 21

(21) 申请号 201811393936.X

C12N 15/70 (2006.01)

(22) 申请日 2018.11.21

C12N 1/21 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 39/00 (2006.01)

申请公布号 CN 109810946 A

A61P 35/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.05.28

### (56) 对比文件

(66) 本国优先权数据

CN 102861103 A, 2013.01.09

201711164959.9 2017.11.21 CN

CN 106389397 A, 2017.02.15

(73) 专利权人 中国科学院上海药物研究所

CN 106674353 A, 2017.05.17

地址 201203 上海市浦东新区张江祖冲之路555号

CN 102258772 A, 2011.11.30

CN 101469016 A, 2009.07.01

(72) 发明人 黄永焯 吴爱花 陈应之

吴小昌等. 富伴侣分子肿瘤抗原肽复合物的制备.《中国中西医结合外科杂志》.2009,第15卷(第1期),第68-70页.

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司

吴小昌等. 富伴侣分子肿瘤抗原肽复合物的制备.《中国中西医结合外科杂志》.2009,第15卷(第1期),第68-70页.

31266

专利代理师 徐迅 崔佳佳

审查员 赵秋歌

(51) Int. Cl.

C12N 5/0784 (2010.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书2页 说明书20页

序列表8页 附图19页

### (54) 发明名称

天花粉蛋白用于致敏和/激活树突状细胞中的应用

### (57) 摘要

本发明提供了一种天花粉蛋白用于致敏和/激活树突状细胞中的应用。具体地,本发明提供了一种天花粉蛋白(trichosanthin, TCS)或其编码基因的用途,用于制备树突状细胞激活剂和/或致敏剂。本发明人发现,天花粉蛋白可以有效激活和/或致敏树突状细胞,从而加强其抗原提呈能力,而含有肿瘤抗原和天花粉蛋白的融合蛋白能够经过树突状细胞的加工以及提呈后,特异性激活体内针对肿瘤的免疫系统,达到抑制肿瘤生长以及扩散的作用,从而成为肿瘤的治疗性疫苗。而天花粉蛋白安全性高,毒副作用小,是理想的肿瘤治疗性疫苗制剂的组成部分。

1. 一种天花粉融合蛋白或其编码基因的用途,其特征在于,用于制备树突状细胞激活剂和/或致敏剂;

其中,所述的天花粉融合蛋白具有式Ia或式Ib所示的结构:

T-E1-P-E2-A 式Ia,

A-E1-P-E2-T 式Ib;

其中,元件T为任选的穿膜肽,元件A为肿瘤抗原,元件P为天花粉蛋白;E1和/或E2为任选的连接肽,“-”为肽键;

并且,所述天花粉融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO: 2所示。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述用途还包括进一步制备肿瘤治疗性疫苗。

3. 一种体外激活和/或致敏树突状细胞的方法,其特征在于,包括步骤:

(a) 提供一种含有天花粉蛋白和肿瘤抗原的混合物,其中,所述天花粉蛋白和肿瘤抗原为融合蛋白,

并且,所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO: 2所示;

(b) 在(a)所述混合物的存在下,培养树突状细胞,从而激活和/或致敏树突状细胞。

4. 一种树突状细胞激活和/或致敏体系,其特征在于,所述的体系包括:

(i) 天花粉融合蛋白,所述的天花粉融合蛋白具有式Ia或式Ib所示的结构:

T-E1-P-E2-A 式Ia,

A-E1-P-E2-T 式Ib;

其中,元件T为任选的穿膜肽,元件A为肿瘤抗原,元件P为天花粉蛋白;E1和/或E2为任选的连接肽,“-”为肽键;

并且,所述天花粉融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO: 2所示;和

(ii) 分离的树突状细胞。

5. 如权利要求4所述的体系,其特征在于,所述的肿瘤抗原为SEQ ID NO: 6。

6. 如权利要求4所述的体系,其特征在于,所述体系中的树突状细胞与所述天花粉融合蛋白的比例为 $10^5$ - $5 \times 10^5$ :1,当树突状细胞数量为 $10^5$ - $5 \times 10^5$ 时,天花粉融合蛋白的终浓度为 $1\mu\text{M}$ 。

7. 一种融合蛋白,其特征在于,所述的融合蛋白具有式Ia或式Ib所示的结构:

T-E1-P-E2-A 式Ia,

A-E1-P-E2-T 式Ib;

其中,元件T为任选的穿膜肽,元件A为肿瘤抗原,元件P为天花粉蛋白;E1和/或E2为任选的连接肽,“-”为肽键;

并且,所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO: 2所示。

8. 一种多核苷酸,其特征在于,所述的多核苷酸编码权利要求7所述的融合蛋白。

9. 如权利要求8所述的多核苷酸,其特征在于,编码SEQ ID NO: 2所示融合蛋白的多

核苷酸如SEQ ID NO: 3所示。

10. 一种载体,其特征在于,所述的载体含有权利要求8所述的多核苷酸。

11. 一种宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞含有权利要求10所述的载体,或所述的宿主细胞的基因中整合有权利要求8所述的多核苷酸。

12. 一种肿瘤疫苗组合物,其特征在于,所述肿瘤疫苗组合物含有:

A) 权利要求7所述的融合蛋白;

B) 疫苗学上可接受的载体。

13. 如权利要求12所述的肿瘤疫苗组合物,其特征在于,所述疫苗学上可接受的载体包括霍乱毒素、CpG ODN、氢氧化铝、或表面活性剂。

14. 一种制备权利要求7所述融合蛋白的方法,其特征在于,包括步骤:

(I) 在合适的条件下,培养权利要求11所述的宿主细胞,从而获得表达所述的融合蛋白。

15. 一种体外非治疗性抑制肿瘤细胞的方法,其特征在于,包括步骤:向肿瘤细胞培养物中加入权利要求7所述的融合蛋白或权利要求12所述的肿瘤疫苗组合物,从而抑制肿瘤细胞。

## 天花粉蛋白用于致敏和/激活树突状细胞中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,更具体而言,本发明涉及天花粉蛋白在激活树突状细胞中的应用,以及利用该特性制备的含天花粉蛋白以及肿瘤抗原的融合蛋白。

### 背景技术

[0002] 恶性肿瘤严重威胁着人类的健康。随着人们生活习惯的改变,肿瘤的发病率与病死率呈上升趋势。肿瘤的治疗手段通常包括手术切除,化学治疗,放射治疗和免疫治疗等。

[0003] 尽管近些年癌症药物治疗已经取得了较大的进展,但是大分子药物在癌症治疗中的应用较少。随着生物技术的发展,大分子药物,尤其是蛋白类药物,受到越来越多的关注。

[0004] 肿瘤是机体正常细胞恶变的产物,其特点是不断增殖并在体内转移。因此肿瘤细胞在免疫学上的突出特点是出现某些在同类正常细胞中看不到的新的抗原标志。现已陆续发现的肿瘤抗原包括肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原。前者为肿瘤细胞所独有;后者大多指胚胎性抗原,为胚胎组织与肿瘤组织所共有。尽管机体内具有一系列的免疫监视机制,但仍难以阻止肿瘤的发生和发展。少量肿瘤细胞不易引起机体应答,待肿瘤生长至一定程度,超越了机体免疫应答的能力,肿瘤细胞即得以逃逸。

[0005] 因此,如何在机体的免疫系统中建立抗肿瘤的机制,尤其是利用蛋白类药物对肿瘤进行免疫治疗,成了目前热门的话题。然而事实上,由于肿瘤抗原免疫原性不足、抗原提呈体系效率低下,如何有效建立机体对肿瘤的免疫性,高效、特异性地提高机体对肿瘤的识别并杀死肿瘤细胞等仍然是本领域中亟待解决的问题。

### 发明内容

[0006] 本发明第一方面,提供了一种天花粉蛋白(trichosanthin,TCS)或其编码基因的用途,用于制备树突状细胞激活剂和/或致敏剂。

[0007] 在另一优选例中,所述用途还包括进一步制备肿瘤治疗性疫苗。

[0008] 在另一优选例中,所述天花粉蛋白或其编码基因还可与其他抗肿瘤药物联用。

[0009] 在另一优选例中,所述其他抗肿瘤药物包括抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体。

[0010] 在另一优选例中,所述抗PD-1抗体包括:PD-1/PD-L1检查点的抗体和小分子抑制剂,CTLA4抗体,或其他作用于免疫细胞的抗体。

[0011] 本发明第二方面,提供了一种体外激活和/或致敏树突状细胞的方法,包括步骤:

[0012] (a) 提供一种含有天花粉蛋白和肿瘤抗原的混合物;

[0013] (b) 在(a)所述混合物的存在下,培养树突状细胞,从而激活和/或致敏树突状细胞。

[0014] 在另一优选例中,(a)中所述的混合物中,天花粉蛋白和肿瘤抗原经物理混合或互相偶联。

[0015] 在另一优选例中,所述天花粉蛋白和肿瘤抗原为融合蛋白。

[0016] 在另一优选例中,所述的融合蛋白还偶联有穿膜肽。

[0017] 在另一优选例中,所述穿膜肽序列包括R9肽(RRRRRRRRRR)、LMWP(VRRRRRRGGRRRR, SEQ ID NO.:4)、或TAT肽(YGRKKRRQRRR, SEQ ID NO.:5)所示的多肽。

[0018] 在另一优选例中,所述的融合蛋白具有式Ia或式Ib所示的结构:

[0019] T-E1-P-E2-A式Ia,

[0020] A-E1-P-E2-T式Ib;

[0021] 其中,元件T为穿膜肽,元件A为肿瘤抗原,元件P为天花粉蛋白;E1和/或E2为任选的连接肽、标签序列、信号肽和/或1-3个氨基酸残基,“-”为肽键。

[0022] 在另一优选例中,所述的肿瘤包括头颈癌、甲状腺癌、脑部恶性肿瘤、肺癌、皮肤癌、黑色素瘤、胃癌、胰腺癌、肝癌、胆囊癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、或骨肉瘤。

[0023] 在另一优选例中,所述的肿瘤抗原包括蛋白、肽段和/或DNA片段。

[0024] 在另一优选例中,所述的肿瘤抗原包括在肿瘤细胞表面过度表达的抗原、分化抗原、或病毒诱发的肿瘤抗原。

[0025] 在另一优选例中,所述的肿瘤抗原包括SEQ ID NO.:6(EDVTPENFLAVLR)、SEQ ID NO.:7(TPENFLAVL)、或SEQ ID NO.:8(HSVTYEHALRPLY)。

[0026] 在另一优选例中,所述的培养条件包括在含10%胎牛血清的高糖1640完全培养基,含10%胎牛血清的1640完全培养基,含10%胎牛血清的DMEM完全培养基,37°C,5%CO<sub>2</sub>。

[0027] 在另一优选例中,所述(a)的混合物中,还包括其他抗肿瘤药物。

[0028] 在另一优选例中,所述其他抗肿瘤药物包括抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体。

[0029] 在另一优选例中,所述抗PD-1抗体包括:PD-1/PD-L1检查点的抗体和小分子抑制剂,CTLA4抗体,或其他作用于免疫细胞的抗体。

[0030] 本发明第三方面,提供了一种树突状细胞激活和/或致敏体系,所述的体系包括:

[0031] (i) 天花粉蛋白;

[0032] (ii) 肿瘤抗原;和

[0033] (iii) 分离的树突状细胞。

[0034] 在另一优选例中,所述体系中的天花粉蛋白和肿瘤抗原经物理混合或互相偶联。

[0035] 在另一优选例中,所述的融合蛋白还偶联有穿膜肽。

[0036] 在另一优选例中,在合适的培养条件下,所述体系中天花粉蛋白和肿瘤抗原与所述分离的树突状细胞进行接触后,所述树突状细胞被激活和/或致敏。

[0037] 本发明第四方面,提供了一种激活和/或致敏的树突状细胞,是由本发明第二方面所述方法制备的。

[0038] 在另一优选例中,所述被激活和/或致敏的树突状细胞具有以下活性:

[0039] (1) CD80的表达量上升了至少20%,优选至少为25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%;和/或

[0040] (2) 刺激T细胞分泌IFN- $\gamma$ 的量上升了至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0041] 本发明第五方面,提供了一种融合蛋白,所述的融合蛋白具有式Ia或式Ib所示的结构:

[0042] T-E1-P-E2-A式Ia,

[0043] A-E1-P-E2-T式Ib;

[0044] 其中,元件T为任选的穿膜肽,元件A为肿瘤抗原,元件P为天花粉蛋白;E1和/或E2为任选的连接肽、标签序列、信号肽和/或1-3个氨基酸残基,“-”为肽键。

[0045] 在另一优选例中,所述的融合蛋白的序列如SEQ ID NO.:1(融合蛋白含穿膜肽和抗原1)或12所示(融合蛋白含穿膜肽和抗原2)

[0046] (RRRRRRGGRRRR(穿膜肽)DVSFRLSGATSSSYGVFISNLRKALPNERKLYDIPLLRSSLPGSQRYALIHLTNYADETISVAIDVTNVYIMGYRAGDTSYFFNEASATEAAKYVFKDAMRKVTLPYSGNYERLQTAAGKIRENIPLGLPALDSAITTLFYNNANSAASALMVLIQSTSEAARYKFIEQQIGKRVDKTFLPSLAIISLENSWSALSQIQIASTNNGQFESPVVLLINAQNQRVTITNVDAGVVTSNIALLLNRNNMA(天花粉蛋白)GGGG(连接肽)EDVTPENFLAVLR(肿瘤抗原))

[0047] SEQ ID NO.:12

[0048] YGRKKRRQRRRGGGGDVSFRLSGATSSSYGVFISNLRKALPNERKLYDIPLLRSSLPGSQRYALIHLTNYADETISVAIDVTNVYIMGYRAGDTSYFFNEASATEAAKYVFKDAMRKVTLPYSGNYERLQTAAGKIRENIPLGLPALDSAITTLFYNNANSAASALMVLIQSTSEAARYKFIEQQIGKRVDKTFLPSLAIISLENSWSALSQIQIASTNNGQFESPVVLLINAQNQRVTITNVDAGVVTSNIALLLNRNNMAGGGGEDVTPENFLAVLR

[0049] 在另一优选例中,所述信号肽包括内含肽;所述标签序列包括CBD标签序列、GST标签序列、MBP标签序列、或6His标签序列。

[0050] 本发明第六方面,提供了一种多核苷酸,所述的多核苷酸编码本发明第五方面所述的融合蛋白。

[0051] 在另一优选例中,所述的融合蛋白的序列如SEQ ID NO.:2(不含穿膜肽的融合蛋白)所示

[0052] (MDVSFRLSGATSSSYGVFISNLRKALPNERKLYDIPLLRSSLPGSQRYALIHLTNYADETISVAIDVTNVYIMGYRAGDTSYFFNEASATEAAKYVFKDAMRKVTLPYSGNYERLQTAAGKIRENIPLGLPALDSAITTLFYNNANSAASALMVLIQSTSEAARYKFIEQQIGKRVDKTFLPSLAIISLENSWSALSQIQIASTNNGQFESPVVLLINAQNQRVTITNVDAGVVTSNIALLLNRNNMAGGGGEDVTPENFLAVLR)

[0053] 在另一优选例中,编码SEQ ID NO.:2所示蛋白的多核苷酸如SEQ ID NO.:3所示(编码序列)

[0054] (GATGTTAGCTTCGGTTTATCAGGTGCAACAAGCAGTTCCTATGGAGTTTTCATTTCAAATCTGAGAAAGCTCTTCCAAATGAAAGGAACTGTACGATATCCCTCTGTTACGTTCTCTTCCAGGTTCTCAACGCTACGCATTGATCCATCTCACAAATTACGCCGATGAAACCATTTTCAGTGGCCATAGACGTAACGAACGCTCTATATTATGGGATATCGCGCTGGCGATACATCCTATTTTTTCAACGAGGCTTCTGCAACAGAAGCTGCAAAAATATGTATTCAAAGACGCTATGCGAAAAGTTACGCTTCCATATTCTGGCAATTACGAAAGGCTTCAAACGCTGCAGGCAAAAATAAGGGAAAAATATTCCGCTTGACTCCCTGCTTTGGACAGTGCCATTACCACTTTGTTTTACTACAACGCCAATTCTGCTGCGTCGGCACTTATGGTACTCATTTCAGTCGACGCTCTGAGGCTGCGAGGTATAAATTTATTGAGCAACAAATTGGGAAGCGTGTGACAAAACCTTCTACCAAGTTTAGCAATTATAAGTTTGGAAAATAGTTGGTCTGCTCTCTCCAAGCAAATTCAATGATAGCGAGTACTAATAATGGACAGTTTGAAGTCCTGTTGTGCTTATAAATGCTCAAACCAACGAGTCCAGATAACCAATGTTGATGCTGGAGTTGTAACCTCCAACATCGCGTTGCTGCTGAATAGAAACAATATGGCAGGCGGTGGTGGCAAGATGTGACACCTGAAAATTTTCTGGCAGTGCTGCGT)。

[0055] 本发明第七方面,提供了一种载体,所述的载体含有本发明第六方面所述的多核

苷酸。

[0056] 本发明第八方面,提供了一种宿主细胞,所述的宿主细胞含有本发明第七方面所述的载体,或所述的宿主细胞的基因中整合有本发明第六方面所述的多核苷酸。

[0057] 本发明第九方面,提供了一种肿瘤疫苗组合物,所述肿瘤疫苗组合物含有:

[0058] A) 本发明第五方面所述的融合蛋白;

[0059] B) 疫苗学上可接受的载体。

[0060] 在另一优选例中,所述疫苗学上可接受的载体包括霍乱毒素、CpG ODN、氢氧化铝、或表面活性剂。

[0061] 本发明第十方面,提供了一种制备本发明第五方面所述融合蛋白的方法,包括步骤:

[0062] (I) 在合适的条件下,培养本发明第八方面所述的宿主细胞,从而获得表达所述的融合蛋白。

[0063] 在另一优选例中,所述的方法还可包括步骤:

[0064] (II) 对获得的融合蛋白进行分离和纯化。

[0065] 在另一优选例中,所述的分离和纯化包括直接采用内含肽介导的分离和纯化。

[0066] 在另一优选例中,所述的天花粉蛋白来源于天花粉葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 或双边栝楼 *Trichosanthes rosthornii* Herms 的干燥根

[0067] 在另一优选例中,所述的天花粉蛋白包括天花粉蛋白全长或其片段。

[0068] 在另一优选例中,所述的天花粉蛋白序列包括如SEQ ID NO.:9所示的野生型全长序列

[0069] (MDVSFRLSGATSSSYGVFISNLRKALPNERKLYDIPLLRSSLPGSQRYAL IHLTNYADETISVAIDV TNVYIMGYRAGDTSYFFNEASATEAAKYVFKDAMRKVTL PYSNGYERLQTAAGKIRENIPLGLPALDSAITTLFY NANS AASALMVL IQSTSEAARYKFIEQQIGKRV DKTFLPSLAI ISLENSWSALS KQIQI ASTNNGQFESPVVLINA QNQRVTITNVDAGVVTSNIALLLNRNNMAGGGGEDVTPENFLAVLR)、或如SEQ ID NO.:10所示的重组型天花粉蛋白

[0070] (MDVSFRLSGATSSSYGVFISNLRKALPNERKLYDIPLLRSSLPGSQRYAL IHLTNYADETISVAIDV TNVYIMGYRAGDTSYFFNEASATEAAKYVFKDAMRKVTL PYSNGYERLQTAAGKIRENIPLGLPALDSAITTLFY NANS AASALMVL IQSTSEAARYKFIEQQIGKRV DKTFLPSLAI ISLENSWSALS KQIQI ASTNNGQFESPVVLINA QNQRVTITNVDAGVVTSNIALLLNRNNMA)。

[0071] 在另一优选例中,所述的天花粉蛋白的编码基因如SEQ ID NO.:11所示野生型蛋白序列。

[0072] (GATGTTAGCTTCGGTTTATCAGGTGCAACAAGCAGTTCCTATGGAGTTTTCAATTCAGAA AAGCTCTTCAAATGAAAGGAACTGTACGATATCCCTCTGTTACGTTCTCTTCCAGGTTCTCAACGCTACGC ATTGATCCATCTCACAAATTACGCCGATGAAACCATTTAGTGGCCATAGACGTAACGAACGTCTATATTATGGGA TATCGCGCTGGCGATACATCCTATTTTTTCAACGAGGCTTCTGCAACAGAAGCTGCAAAATATGTATTCAAAGACG CTATGCGAAAAGTTACGCTTCCATATTCTGGCAATTACGAAAGGCTTCAAACGTCTGCAGGCAAAATAAGGGAAAA TATTCCGCTTGACTCCCTGCTTTGGACAGTGCCATTACCACTTTGTTTTACTACAACGCCAATTCTGCTGCGTCC GCACCTTATGGTACTCATTAGTCGACGTCTGAGGCTGCGAGGTATAAATTTATTGAGCAACAAATTGGGAAGCGTG

TTGACAAAACCTTCCTACCAAGTTTAGCAATTATAAGTTTGGAAAATAGTTGGTCTGCTCTCTCCAAGCAAATTCA  
GATAGCGAGTACTAATAATGGACAGTTTAAAGTCCTGTTGTGCTTATAAATGCTCAAACCAACGAGTCACGATA  
ACCAATGTTGATGCTGGAGTTGTAACCTCCAACATCGCGTTGCTGCTGAATAGAAACAATATGGCAGGCGGTGGTG  
CGGAAGATGTGACACCTGAAAATTTTCTGGCAGTGCTGCGT)

[0073] 在另一优选例中,所述的肿瘤疫苗组合物还包括其他抗肿瘤药物。

[0074] 在另一优选例中,所述其他抗肿瘤药物包括抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体。

[0075] 在另一优选例中,所述抗PD-1抗体包括:PD-1/PD-L1检查点的抗体和小分子抑制剂,CTLA4抗体,或其他作用于免疫细胞的抗体。

[0076] 本发明第十一方面,提供了一种体外非治疗性抑制肿瘤细胞的方法,包括步骤:向肿瘤细胞培养物中加入本发明第四方面所述的树突状细胞、本发明第五方面所述的融合蛋白或本发明第七方面所述的肿瘤疫苗组合物,从而抑制肿瘤细胞。

[0077] 本发明第十二方面,提供了一种治疗肿瘤的方法,包括步骤:向需要的对象施用安全有效量的本发明第四方面所述的树突状细胞、本发明第五方面所述的融合蛋白或本发明第九方面所述的肿瘤疫苗组合物。

[0078] 在另一优选例中,所述所需要的对象为哺乳动物,包括小鼠、大鼠、或人,优选为人。

[0079] 本发明第十三方面,提供了一种药物组合物或制剂,其特征在于,包括:

[0080] (a) 第一活性成分天花粉蛋白或其编码基因;

[0081] (b) 第二活性成分抗PD-1抗体;和

[0082] (c) 药学上可接受的载体。

[0083] 在另一优选例中,所述药物组合物或制剂中,所述(a)包括如本发明第五方面所述的融合蛋白。

[0084] 在另一优选例中,所述药物组合物或制剂包括:将(a)载入载体脂质体,而获得的脂质体。

[0085] 在另一优选例中,所述脂质体的水力直径为50-200nm,较佳地80-150nm,更佳地100-120nm,最佳地110nm。

[0086] 在另一优选例中,所述药物组合物或制剂中,所述(b)包括:PD-1/PD-L1检查点的抗体和小分子抑制剂,CTLA4抗体,或其他作用于免疫细胞的抗体。

[0087] 在另一优选例中,所述药物组合物或制剂中,所述(a)和(b)的总重量占所述药物组合物或制剂总重量的0.1-99.9wt%,较佳地10-99.9wt%,更佳地70%-99.9wt%。

[0088] 在另一优选例中,所述药物组合物为液态、固体、或半固体。

[0089] 在另一优选例中,所述的药物组合物的剂型为口服剂型、注射剂、或外用药物剂型。

[0090] 在另一优选例中,所述药物组合物的剂型包括胶囊、口服液、或注射剂。

[0091] 在另一优选例中,所述药物组合物或制剂为液态制剂。

[0092] 在另一优选例中,所述组合物为口服制剂。

[0093] 在另一优选例中,所述的载体选自下组:输液剂载体和/或注射剂载体,较佳地,所述的载体是选自下组的一种或多种载体:生理盐水、葡萄糖盐水、或其组合。

[0094] 在另一优选例中,所述组合物或制剂可单独使用,或联合使用。

[0095] 在另一优选例中,所述的联合使用包括:与其它治疗和/或预防肿瘤的药物联合使用。

[0096] 本发明的第十四方面,提供了一种治疗和/或预防肿瘤的方法,其特征在于,所述方法包括步骤:向需要治疗和/或预防肿瘤的受试者施用治疗有效量的如本发明第三方面所述的体系、如本发明第五方面所述的融合蛋白、如本发明第六方面所述的多核苷酸、如本发明第七方面所述的载体、如本发明第八方面所述的宿主细胞、如本发明第九方面所述的肿瘤疫苗组合物,或如本发明第十三方面所述的药物组合物或制剂。

[0097] 在另一优选例中,所述所需要的对象为哺乳动物,包括小鼠、大鼠、或人,优选为人。

[0098] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

### 附图说明

[0099] 图1为根据发明制备实施例1的TCS-抗原肽融合蛋白纯化后的电泳图。

[0100] 图2为根据发明制备实施例1中TCS-抗原肽融合蛋白的纯化色谱图。

[0101] 图3为根据发明制备实施例2中穿膜肽-TCS-抗原肽融合蛋白纯化后的电泳图。

[0102] 图4为根据发明制备实施例2中穿膜肽-TCS-抗原肽融合蛋白的纯化色谱图。

[0103] 图5为根据发明制备实施例1和2中制备所得纯化后的TCS-抗原肽、穿膜肽-TCS-抗原肽的电泳图。

[0104] 图6为根据实验实施例1中TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽对树突状细胞DC2.4的增殖的抑制效果。

[0105] 图7为根据实验实施例2中TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽在树突状细胞DC2.4细胞的细胞摄取情况荧光图。

[0106] 图8为根据实验实施例2中TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽在树突状细胞DC2.4细胞的细胞摄取情况的流式分析图。

[0107] 图9为根据本发明实验实施例3中TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽在体外致敏BMDC的CD80图。

[0108] 图10为根据本发明实验实施例4中TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽在体外诱导T细胞增殖图。

[0109] 图11为根据实验实施例5中TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽在CT26皮下荷瘤小白鼠模型中体内抗肿瘤治疗中的肿瘤体积增长曲线图。

[0110] 图12为根据本发明实验实施例5中TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽在CT26皮下荷瘤小白鼠模型中体内抗肿瘤治疗终点时各治疗组肿瘤照片。

[0111] 图13为根据本发明实验实施例5中TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽在CT26皮下荷瘤小白鼠模型中体内抗肿瘤的各治疗组的动物体重变化曲线图。

[0112] 图14为根据本发明实验实施例5中TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽在CT26皮下荷瘤小白鼠模型中体内抗肿瘤的各治疗组的动物生存曲线图。

[0113] 图15为根据本发明实验实施例6的给药过程中的肿瘤体积增长图。

- [0114] 图16为根据本发明实验实施例6的给药过程中各组别小鼠的体重变化图。
- [0115] 图17为根据本发明实验实施例6的给药过程中各组别小鼠的生存曲线。
- [0116] 图18为根据本发明实验实施例7的给药过程中的肿瘤体积增长图。
- [0117] 图19为根据本发明实验实施例7的给药过程中各组别小鼠的体重变化图。
- [0118] 图20为根据本发明实验实施例7的治疗终点各组别小鼠的脾脏中CD8<sup>+</sup>T细胞数量的变化。
- [0119] 图21为根据本发明实验实施例7的治疗终点各组别小鼠的肿瘤组织中CD8<sup>+</sup>T细胞数量的变化。图22为制备的TCS-抗原肽脂质体的粒径图。
- [0120] 图23为制备的TCS-抗原肽脂质体纯化后的SDS-PAGE电泳图。
- [0121] 图24为根据本发明实施例8的给药过程中的肿瘤体积增长图。
- [0122] 图25为根据本发明实施例8的给药过程中各组别小鼠的体重变化图。
- [0123] 图26为根据本发明实施例8的各组别小鼠的生存曲线。
- [0124] 图27为根据本发明实施例8的治疗终点各组别小鼠的淋巴结中CD8<sup>+</sup>T细胞数量的变化。
- [0125] 图28为根据本发明实施例8的治疗终点各组别小鼠的肿瘤组织中CD8<sup>+</sup>T细胞数量的变化。

### 具体实施方式

[0126] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次意外地发现,天花粉蛋白可以有效激活和/或致敏树突状细胞,从而加强其抗原提呈能力,而含有肿瘤抗原和天花粉蛋白的融合蛋白能够经过树突状细胞的加工以及提呈后,特异性激活体内针对肿瘤的免疫系统,达到抑制肿瘤生长以及扩散的作用,从而成为肿瘤的治疗性疫苗。而天花粉蛋白安全性高,毒副作用小,是理想的肿瘤治疗性疫苗制剂的组成部分。在此基础上,完成了本发明。

[0127] 天花粉蛋白

[0128] 天花粉蛋白是从中华民族丰富的医药宝库中发掘出来的抗孕的新药。而天花粉蛋白是从葫芦科植物栝楼的根提取出来的一种蛋白。且经过50多年临床实践,证明了天花粉蛋白是安全有效的中期引产药。天花粉蛋白TCS是分子量为27kDa的I型核糖体失活蛋白,它具有N-糖苷酶活性,能够识别哺乳动物细胞的核糖体大亚基并使其脱嘌呤,从而抑制细胞的蛋白质合成,导致细胞死亡。因其具有较强的免疫原性,同时,其分子量较小,容易被肾清除,缺乏一定的肿瘤靶向性。这些都限制了它在临床上的应用。

[0129] 本发明中的天花粉蛋白为已批准上市的中期引产药物,其人体应用的安全性已得到确证。故可以合理充分利用,将其作为一种新型的肿瘤疫苗组分,既可以保证其安全性和有效性,又可以拓宽该蛋白的临床应用范围。

[0130] 可用于本发明的天花粉蛋白没有特殊限制,可以包括野生型和重组型的天花粉蛋白及其活性片段,只要该蛋白或其片段具有或基本具有(如保留了70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%)N-糖苷酶活性即可。

[0131] 优选地,可用于本发明的天花粉蛋白如SEQ ID NO.:9所示(野生型),也可以是如SEQ ID NO.:10所示蛋白(重组型),其中编码SEQ ID NO.:9所示蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.:11所示。

[0132] 融合蛋白及其制备

[0133] 在本发明中，“融合蛋白”、“本发明蛋白”、“本发明融合蛋白”、“天花粉蛋白-肿瘤抗原融合蛋白”、“TSC-抗原肽”可互换使用，指具有式Ia或式Ib所述结构，

[0134] T-E1-P-E2-A 式Ia，

[0135] A-E1-P-E2-T 式Ib；

[0136] 即含有包括天花粉蛋白元件和肿瘤抗原相偶联的融合蛋白，任选地，所述的融合蛋白还可以含穿膜元件(T)、和任选的连接肽、标签序列、信号肽和/或1-3个氨基酸残基。本发明蛋白可以是单体或由单体形成的多聚体(如二聚体)。此外，应理解，所述术语还包括融合蛋白的活性片段和衍生物。

[0137] 就连接顺序而言，本发明融合蛋白没有特殊限制，可以从N端-C端或C端-N端的顺序构建本发明融合蛋白；当所述融合蛋白中含有穿膜肽时，优选将穿膜肽和肿瘤抗原构建于所述融合蛋白的两端，而天花粉蛋白构建于穿膜肽与肿瘤抗原之间。

[0138] 一种优选的融合蛋白为分离的重组融合蛋白序列如SEQ ID NO.:1、SEQ ID NO.:2和12所示。

[0139] 本发明融合蛋白具有激活和/或致敏树突状细胞(DC)细胞，并增强其对肿瘤抗原的加工与提呈的作用。本发明还包括根据本发明融合蛋白的活性片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持其对肿瘤抗原的加工与提呈增强作用的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或几个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)融合蛋白与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合于此多肽序列而形成的多肽(与前导序列、分泌序列或6His等标签序列融合而形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0140] 一类优选的活性衍生物指与式Ia或式Ib的氨基酸序列相比，有至多3个，较佳地至多2个，更佳地至多1个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表1进行氨基酸替换而产生，优选地，所述的衍生物不含有Cys。

[0141] 表1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala

[0142]

[0143]	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
	Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0144] 本发明还提供本发明融合蛋白的类似物。这些类似物与SEQ ID NO: .3所示的多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 $\beta$ 、 $\gamma$ -氨基酸)的类似物。应理解,本发明的多肽并不限于上述列举的代表性的多肽。

[0145] 修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

[0146] 本发明多肽还可以以由药学上或生理学可接受的酸或碱衍生的盐形式使用。这些盐包括(但不限于)与如下酸形成的盐:氢氯酸、氢溴酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、草酸、富马酸、马来酸、草酰乙酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、或羟乙磺酸。其他盐包括:与碱金属或碱土金属(如钠、钾、钙或镁)形成的盐,以及以酯、氨基甲酸酯或其他常规的“前体药物”的形式。

[0147] 如本文所用,“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质,原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多核苷酸和多肽是没有分离纯化的,但同样的多核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开,则为分离纯化的。

[0148] 如本文所用,“分离的重组融合蛋白”是指重组融合蛋白基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化重组融合蛋白。基本上纯的蛋白在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。

[0149] 编码多核苷酸、载体、宿主及融合蛋白的合成

[0150] 编码本发明融合蛋白的本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

[0151] 本发明还涉及上述多核苷酸的变异体,其编码与本发明有相同的氨基酸序列的蛋白质片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的,等位变异体是一个多核苷酸的替换形式,它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入,但不会从实质上改变其编码多肽的功能。

[0152] 本发明融合蛋白或其元件的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据已公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

[0153] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0154] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

[0155] 应用PCR技术扩增DNA/RNA的方法被优选用于获得本发明融合蛋白的编码基因。用于PCR的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择,并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的DNA/RNA片段。

[0156] 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体,以及用本发明的载体或融合蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞,以及经重组技术产生本发明所述蛋白质的方法。

[0157] 通过常规的重组DNA技术,可利用本发明的多核苷酸序列来表达或生产重组蛋白。一般来说有以下步骤:

[0158] (1).用本发明的编码本发明蛋白的多核苷酸(或变异体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0159] (2).在合适的培养基中培养宿主细胞;

[0160] (3).从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

[0161] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含本发明蛋白的编码DNA序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导mRNA合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

[0162] 此外,表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状,如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP),或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

[0163] 包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0164] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属的细菌细胞;真菌细胞如酵母;植物细胞;果蝇S2或Sf9的昆虫细胞;CH、NS0、COS7、或293细胞的动物细胞等。

[0165] 用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获,用CaCl<sub>2</sub>法处理,所

用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl<sub>2</sub>。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的DNA转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

[0166] 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0167] 在上面的方法中的蛋白质可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0168] 本发明还提供了所述融合蛋白的前体蛋白,所述前体蛋白利用了内含肽介导的融合蛋白获得方式,在融合蛋白的基因构建物中加入了内含肽的编码基因,并在表达蛋白后通过标签剪切,直接获得了高纯度的融合蛋白,从而无需进一步采用其它分离或纯化步骤。

[0169] 穿膜肽

[0170] 本发明提供的融合蛋白中,优选含有穿膜肽。穿膜肽是从自然中发现或通过人工筛选得到的一类具有穿透细胞膜活性的多肽。可用于本发明的穿膜肽没有特殊限制,可以为任何富含碱性氨基酸的穿膜肽和具有两亲性的穿膜肽,只要可以促进细胞对本身缺乏入胞能力的TCS摄取。优选地,本发明的穿膜肽包括低分子量鱼精蛋白LMWP(VRRRRRRGGRRRR(SAQ ID NO.:4))、TAT(YGRKKRRQRRR(SAQ ID NO.:5))、R9(RRRRRRRRR)本发明穿膜肽不仅能够自己入胞,还能携带本发明TCS进入细胞,尤其是树突状细胞。此外,本发明穿膜肽可通过在表达融合蛋白的表达载体中导入穿膜肽的基因直接获得含穿膜肽的融合蛋白,或也可以通过内含肽介导而获得有穿膜肽修饰的方法,优选的方法包括:

[0171] (a) 将重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞;

[0172] (b) 将含有重组质粒的菌株用LB培养基培养至对数生长期,加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导目的蛋白表达;

[0173] (c) 离心收集菌体并超声破碎;

[0174] (d) 将含有C端融合内含肽与CBD标签的目的蛋白的上清液用几丁质柱亲和纯化,洗去杂蛋白后,用含有2-巯基乙烷磺酸钠(MESNA)的缓冲液进行柱上切割过夜,收集洗脱液;

[0175] (e) 超滤浓缩后,加入上述穿膜肽,反应过夜,形成TCS-穿膜肽连接物,其中蛋白与多肽的摩尔比为1:20;用脱盐柱除去溶液中多余的多肽,从步骤(e)中得到的TCS-穿膜肽连接物产率为90%-95%。

[0176] 树突状细胞

[0177] 树突状细胞(Dendritic cells,DC)是机体功能最强的专职抗原递呈细胞(Antigen presenting cells,APC),它能高效地摄取、加工处理和递呈抗原,未成熟DC具有较强的识别和吞噬能力,成熟DC能有效激活初始型T细胞,处于启动、调控、并维持免疫应答的中心环节。

[0178] 人体内大部分DC处于非成熟状态,表达低水平的共刺激因子和粘附因子,体外激发同种混合淋巴细胞增殖反应的能力较低,但未成熟DC具有极强的抗原吞噬能力,在摄取抗原(包括体外加工)或受到某些因素刺激时即分化为成熟DC,而成熟的DC表达高水平的共刺激因子和粘附因子。DC在成熟的过程中,由接触抗原的外周组织迁移进入次级淋巴器官,与T细胞接触并激发免疫应答。DC作为目前发现的功能最强的APC,能够诱导特异性的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)生成。近年来研究表明,应用肿瘤相关抗原或抗原多肽体外冲击致敏DC,回输或免疫接种于载瘤宿主,可诱发特异性CTL的抗肿瘤免疫反应。

[0179] 而采用本发明组合物或融合蛋白对树突状细胞进行共培养,能够激活和/或致敏未成熟状态的树突状细胞成为成熟状态的树突状细胞,使其抗原提呈能力显著增强,具体表现为:

[0180] (1) CD80的表达量上升了至少20-100%,优选至少为25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%;和/或

[0181] (2) 刺激T细胞分泌IFN- $\gamma$ 的量上升了至少20-100%,优选至少为25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0182] 可用于本发明的树突状细胞没有特别限制,可以为来源于所需治疗对象本身的树突状细胞,其可采用常规方法获得或经市售购买,一种优选的分离方式包括通过常规方法从哺乳动物的骨髓中分离筛选获得。

[0183] 优选的树突状细胞来源于哺乳动物,例如小鼠、大鼠、人类等。

[0184] 通常,足以激活机体肿瘤免疫系统的所需树突状细胞大约为 $1-5 \times 10^{5-6}$ 个/剂。

[0185] 肿瘤抗原

[0186] 通常,可用于本发明的肿瘤抗原没有特别限制,包括主要从肿瘤细胞获取肿瘤基因,通过基因重组方式构建质粒并转化至表达载体中(如大肠杆菌)表达,具体的表达方法如本领域技术人员所熟知。片段长度一般为10-50bp。

[0187] 优选地,本发明肿瘤抗原来源于以下肿瘤:包括头颈癌、甲状腺癌、脑部恶性肿瘤、肺癌、皮肤癌、黑色素瘤、胃癌、胰腺癌、肝癌、胆囊癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、或骨肉瘤。优选地,本发明的肿瘤抗原来源于结直肠癌、乳腺癌、黑色素瘤或肺癌。

[0188] 一种优选的肿瘤抗原包括如SEQ ID NO.:6、7或8所述的抗原,为从小鼠肺上皮TC-1细胞诱导的肿瘤细胞中获取的基因所构建的抗原肽,片段长短不一为14-39bp。

[0189] 此外,还可以从常见的肿瘤细胞系中提取肿瘤抗原,例如黑色素瘤B16细胞和/B16-F10细胞,人卵巢癌SKOV-3细胞和人卵巢癌ES2细胞,结直肠癌细胞HCT116等。

[0190] 激活和/或致敏组合物

[0191] 本发明还提供了一种将天花粉蛋白以及肿瘤抗原进行物理混合后的组合物,用于作为激活和/或致敏DC细胞的激活和/或致敏组合物。

[0192] 在本发明组合物中,天花粉蛋白以及肿瘤抗原的比例为0.5:1-1:50,优选地为1:1-1:10,通常采用冰浴物理混合,混合条件-20 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ C并在相同条件下保存。本发明组合物优选为液体形式,也可以制成注射剂,例如液体溶液或悬液;还可制成在注射前适合配入溶液或悬液中、液体载体的固体形式。

[0193] 此外,除了作为活性成分的天花粉蛋白以及肿瘤抗原以外,该组合物还可以含有维持活性成分功能的药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂(例如本发明组合物)给药的载体。该术语指这样一些药剂载体:它们本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体,且给药后没有过分的毒性。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。在Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub.Co.,N.J.1991)中可找到关于药学上可接受的载体的充分讨论。这类载体包括如水、盐水、甘油和乙醇。另外,这些载体中还可能存在辅助性的物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。此外,免疫组合物中还可以含有免疫佐剂。

[0194] 树突状细胞激活和/或致敏体

[0195] 本发明提供了一种含有天花粉蛋白、肿瘤抗原以及分离的树突状细胞的激活和/或致敏体系。

[0196] 在该体系中,所述的天花粉蛋白、肿瘤抗原可以以物理混合(即本发明激活和/或致敏组合物)或偶联形成融合蛋白的形式存在。其中,有效量的树突状细胞通常含有 $1-5 \times 10^{5-6}$ 个细胞/剂,优选为 $1-2 \times 10^{5-6}$ 个细胞/剂,而其与本发明组合物的比例为 $10^5-5 \times 10^5$ ;与本发明融合蛋白的比例 $10^5-5 \times 10^5$ ,当细胞数量为 $10^5-5 \times 10^5$ 时,蛋白的终浓度为 $1\mu\text{M}$ 。

[0197] 本文所用的术语“有效量”指治疗剂治疗、缓解或预防目标疾病或状况的量,或是表现出可检测的治疗或预防效果的量。对于某一对象的精确有效量取决于该对象的体型和健康状况、病症的性质和程度、以及选择给予的治疗剂和/或治疗剂的组合。

[0198] 应用

[0199] 本发明组合物、融合蛋白可用于体外对树突状细胞的培养,例如将本发明组合物、融合蛋白与一定量的树突状细胞在合适的条件下进行共培养,从而激活和/或致敏树突状细胞,并将近树突状细胞处理的抗原用于T细胞的激活,从而建立针对特定肿瘤类型的细胞免疫,以达到肿瘤治疗性疫苗的效果。

[0200] 通用方法:

[0201] 试剂和药品

[0202] 原核表达载体pMXB10购自New England Biolabs,TCS-抗原肽融合蛋白及穿膜肽-TCS-抗原肽融合蛋白的重组表达质粒由上海捷瑞生物科技有限公司代为构建,流式抗体(Anti-Mouse CD80)和(Anti-Mouse CD8)购自BD Bioscience。鼠源结肠癌CT26,鼠源黑色素瘤细胞B16-F10,鼠源树突状细胞DC2.4均购自中国科学院细胞库。其它实验所用材料均来源于常规市售产品。

[0203] 制备实施例1

[0204] 融合蛋白1(TCS-抗原肽蛋白)的制备

[0205] TCS-抗原肽蛋白的原核表达和纯化

[0206] a:代构的质粒TCS-抗原肽转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中。

[0207] b:将含有重组质粒TCS-抗原肽的菌株转至含有 $100\mu\text{g}/\text{ml}$  Amp的LB培养基中,于 $37^\circ\text{C}$ 恒温摇床中 $220\text{rpm}$ 培养至对数生长期( $600\text{nm}$ 吸光值为 $0.6-0.8$ ),加入终浓度为 $1\text{mM}$ 的IPTG,于 $25^\circ\text{C}$ , $150\text{rpm}$ 表达过夜(16h)。

[0208] c:用离心机 $4^\circ\text{C}$ , $9,000\text{rpm}$ 离心3min,收集菌体。

[0209] d:用HEPES缓冲液(含 $20\text{mM}$  HEPES, $150\text{mM}$  NaCl, $1\text{mM}$  EDTA, $0.5\%$ 吐温20,pH 8.5)

将菌体重悬。

[0210] e:用探头超声破碎仪以400W功率超声破碎细胞35min。

[0211] f:12,000rpm,4℃离心30min,收集上清液。

[0212] g:将含有目的蛋白的上清液过用HEPES缓冲液预平衡的几丁质柱,流速为1ml/min。上样完成后,用25倍柱体积的HEPES缓冲液洗去非特异性结合的杂蛋白。

[0213] h:用3倍柱体积的含有50mM半胱氨酸的HEPES缓冲液流经柱子,并保留少量缓冲液,关闭柱子出口,在柱上切割过夜(16h)。

[0214] i:打开柱子出口,收集流出的含有目的蛋白的缓冲液,并继续加入3倍柱体积的HEPES缓冲液,继续将目的蛋白洗脱下来。

[0215] J:将收集到的蛋白洗脱液用截留分子量为10,000的超滤管进行浓缩,并用脱盐柱除去溶液中多余的半胱氨酸,得到目的重组蛋白TCS-抗原肽。(图1为SDS-PAGE电泳图、图2为经脱盐柱纯化图。)

[0216] 制备实施例2

[0217] 融合蛋白2(穿膜肽-TCS-抗原肽蛋白)的制备

[0218] 穿膜肽-TCS-抗原肽蛋白的原核表达和纯化

[0219] a:将代构的质粒穿膜肽-TCS-抗原肽转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中。

[0220] b:将含有重组质粒穿膜肽-TCS-抗原肽的菌株转至含有100μg/ml Amp的LB培养基中,于37℃恒温摇床中220rpm培养至对数生长期(600nm吸光值为0.6-0.8),加入终浓度为1mM的IPTG,于37℃,220rpm表达过夜(16h)。

[0221] c:用预冷过的离心机4℃,9,000rpm离心3min,收集菌体。

[0222] d:用HEPES缓冲液(含20mM HEPES,150mM NaCl,1mM EDTA,0.5%吐温20,pH 8.5)将菌体重悬。

[0223] e:用探头超声破碎仪以400W功率超声破碎细胞35min。

[0224] f:12,000rpm,4℃离心30min,收集上清液。

[0225] g:将有目的蛋白的上清液过用HEPES缓冲液预平衡的几丁质柱,流速为1ml/min。上样完成后,用25倍柱体积的HEPES缓冲液洗去非特异性结合的杂蛋白。

[0226] h:用3倍柱体积的含有50mM半胱氨酸的HEPES缓冲液流经柱子,并保留少量缓冲液,关闭柱子出口,在柱上切割过夜(16h)。

[0227] i:打开柱子出口,收集流出的含有目的蛋白的缓冲液,并继续加入3倍柱体积的HEPES缓冲液,继续将目的蛋白洗脱下来。

[0228] J:将收集到的蛋白洗脱液用截留分子量为10,000的超滤管进行浓缩,并用脱盐柱除去溶液中多余的半胱氨酸,得到目的重组蛋白TCS-抗原肽。(图3为SDS-PAGE电泳图、图4为经脱盐柱纯化图。)

[0229] 实验实施例1

[0230] MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴蓝,商品名:噻唑蓝)法分别测定重组蛋白类药物TCS、TCS-抗原肽、穿膜肽-TCS-抗原肽的细胞毒作用将对数生长期的鼠源树突状细胞DC2.4细胞消化并计数,稀释成密度为 $4 \times 10^4$ 个细胞/mL的细胞悬液,转移到96细胞培养孔板中,每孔加入100μL细胞悬液,用含10%小牛血清的DMEM完全培养基培养12h(37℃,5%CO<sub>2</sub>)。

[0231] 通过预实验确定最佳药物浓度范围,加入不同浓度的溶液,每个浓度做6个复孔。培养48小时,加入MTT(5mg/ml,购自美国Sigma-Aldrich公司) 20 $\mu$ l,培养4h,小心吸取培养上清,每孔加入DMSO 200 $\mu$ L,轻摇震荡使结晶物充分溶解混匀。用酶标仪(Thermo Scientific)测定各组的OD值,主波长为490nm,参考波长为570nm。计算各组的细胞存活率:细胞存活率(%) = 实验组平均OD值/对照组平均OD值  $\times$  100%。

[0232] 结果如下:

[0233] TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽对树突状细胞DC2.4的存活率的影响:三者对树突状细胞DC2.4的生存率均没有明显的影响,这证明了抗原肽和/或TCS对树突状细胞的细胞毒性不大(图6)。且在相同的低浓度蛋白条件下,此重组蛋白药物不会抑制树突状细胞的增殖,因此该药物组合是安全的。

[0234] 实验实施例2

[0235] TCS和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽融合蛋白在树突状细胞DC2.4细胞中的细胞摄取情况

[0236] 1. 蛋白药物的罗丹明(Rhodamine B)荧光标记

[0237] 将制备实施例1、2中得到的融合蛋白1(TCS-抗原肽融合蛋白)、融合蛋白2(穿膜肽-TCS-抗原肽融合蛋白)及我们之前构建的重组天花粉蛋白TCS与摩尔比3倍过量的罗丹明B混合,于4 $^{\circ}$ C避光反应过夜。用脱盐柱除去多余的罗丹明B荧光素。用BCA法测定蛋白的浓度。

[0238] 2. 树突状细胞DC2.4中的细胞摄取实验

[0239] 将对数生长期的鼠源树突状细胞DC2.4细胞消化,细胞计数,调整浓度制备成 $5 \times 10^4$ 个细胞/mL的细胞悬液,接种至12孔细胞培养板内,每孔加入1mL。待细胞长到适宜密度后进行摄取实验。加入罗丹明B标记的各蛋白药物1 $\mu$ M,继续在培养箱中培养4小时。弃去培养基,并用PBS洗涤三次,加4%多聚甲醛固定12分钟,PBS洗涤三次,然后DAPI染色10分钟,PBS洗涤三次,用荧光显微镜(Zeiss)进行拍摄(图7)。另取细胞约 $1 \times 10^5$ 个细胞/mL的细胞悬液,按照上述方法进行摄取实验,实验终点PBS洗三次后,用0.25%胰酶消化分散后用流式细胞仪(BD Pharmingen)的FL2通道检测细胞摄取情况(图8)。

[0240] 结果如下:

[0241] 从图7、图8中可见,TCS本身入胞较少,TCS-抗原肽融合蛋白有一定程度的入胞,而穿膜肽-TCS-抗原肽融合蛋白的荧光强度有所增强。这证明了虽然TCS-抗原肽融合蛋白能够具有一定的细胞穿透能力,但融合了穿膜肽后能提高TCS的入胞效率,从而使胞内药物荧光强度更强。

[0242] 实验实施例3

[0243] 重组蛋白TCS和融合蛋白1(TCS-抗原肽)及融合蛋白2(穿膜肽-TCS-抗原肽)在体外致敏抗原提呈细胞实验

[0244] 1. 骨髓来源的树突状细胞(BMDC)的提取

[0245] 取6-8周大的C57BL/6小鼠作为骨髓细胞来源。实验前将所用器械经高温高压灭菌处理。小鼠安乐死后浸泡于75%的乙醇中10分钟,剥离出股骨和胫骨,并浸泡于75%的乙醇中5分钟,无菌PBS中浸泡5分钟,重复2次。剪去股骨和胫骨的两端,使用1mL注射器吸取无血清DMEM培养基,将骨髓冲出,1800rpm离心5分钟,弃上清。加入3至5mL的红细胞裂解液,室温

静置3分钟,离心,去上清。用BMDC诱导培养基(含20ng/mL GM-CSF+10ng/mL IL-4)将细胞重新分散,转移至12孔板中,并于37℃、5%二氧化碳培养箱中培养。培养三天后更换新的培养基,共培养7天。

[0246] 2. 重组蛋白TCS、TCS/抗原肽(物理混合组合物)和TCS-抗原肽融合蛋白及穿膜肽-TCS-抗原肽融合蛋白致敏BMDC实验

[0247] 经培养后的第5至7天可看到聚集体生成,即为树突状细胞(BMDC)。当观察到有足够多的聚集体生成时,分别加入1 $\mu$ M的各重组蛋白,并且以LPS为阳性对照,继续在培养箱中培养16至24小时。收集非贴壁、非增殖、成熟的BMDC,3,000rpm,离心5分钟,弃上清,并用流式抗体CD80进行标记,冰上孵育0.5至1小时,用流式细胞仪(BD Pharmingen)进行检测。

[0248] 结果如下:

[0249] 从图9可见实验组的每一组中CD80均明显地增强,实验组的阳性率较对照组的阳性率提升了43.7%。由于CD80是表达在抗原提呈细胞上的重要的共刺激分子,与T细胞上的CD28分子结合,激活T淋巴细胞,发挥免疫效应。用TCS/抗原肽(物理混合组合物)、TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽等融合蛋白药物对抗原提呈细胞BMDC进行处理后,CD80均有明显的上调,表现在流式结果上为:用药物处理后,第一个峰值减弱,第二个峰的峰值显著增加,且两峰对比显著增强,表明阳性率增加。该结果表明所构建的重组融合蛋白以及物理混合物均可以较好地激活DC细胞,提高其抗原提呈能力,其中,重组融合蛋白更优。

[0250] 实验实施例4

[0251] 重组蛋白TCS、TCS/抗原肽混合物和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽在体外促进T细胞增殖实验

[0252] 1. 骨髓来源的树突状细胞(BMDC)的提取

[0253] 取6-8周大的C57BL/6小鼠作为骨髓细胞来源。实验前将所用器械经高温高压灭菌处理。小鼠安乐死后浸泡于75%的乙醇中10分钟,剥离出股骨和胫骨,并浸泡于75%的乙醇中5分钟,无菌PBS中浸泡5分钟,重复2次。剪去股骨和胫骨的两端,使用1mL注射器吸取无血清DMEM培养基,将骨髓冲出,1800rpm离心5分钟,弃上清。加入3至5mL的红细胞裂解液,室温静置3分钟,离心,去上清。用BMDC培养基(含20ng/mL GM-CSF+10ng/mL IL-4)将细胞重新分散,转移至12孔板中,并于37℃、5%二氧化碳培养箱中培养。培养三天后更换新的培养基,共培养5天。

[0254] 2. 重组蛋白TCS、TSC/抗原肽物理混合组合物和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽对T细胞的增殖实验

[0255] 在培养后的第5天加入相对应的1 $\mu$ M的各重组蛋白,并设置不处理的BMDC细胞为空白对照,继续于培养箱中培养12至24小时。

[0256] 3. 脾脏内淋巴细胞的提取

[0257] 取6-8周大的C57BL/6小鼠作为淋巴细胞来源。实验前将手术所用器械经高温高压灭菌处理。小鼠安乐死后浸泡于75%的乙醇中10分钟,于超净台中剥离出脾脏。此过程注意无菌操作。在35mm培养皿中放入4mL Mouse 1 $\times$ 淋巴细胞分离液,研磨。把悬有脾脏细胞的分离液立即转移到15mL离心管中,覆盖1mL的RPMI 1640培养基。室温,800g离心30分钟。注意设置较慢的加速度和减速度。吸出淋巴细胞层,再加入10mL RPMI 1640培养基,颠倒洗涤。室温,250g离心10分钟收集细胞。倾倒上清液,用DMEM重悬。细胞均分,加入上述培养板

里,继续于培养箱中培养3天。收集上清,用ELISA试剂盒检测IFN- $\gamma$ 的浓度。

[0258] 结果如下:

[0259] 从图10中看出,BMDC细胞经各组药物处理后,与T淋巴细胞共孵育,相较于对照组,实验组的IFN- $\gamma$ 的浓度都有明显地提高,表明T淋巴细胞被激活并增殖,说明天花粉蛋白能够促进成熟DC与T细胞之间的抗原交叉呈递过程。

[0260] 实验实施例5

[0261] 重组蛋白TCS、TSC/抗原肽物理混合物和TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽在皮下瘤模型中的微针经皮给药的体内药效情况

[0262] 1. CT26皮下荷瘤小鼠模型的建立

[0263] 将对数生长期的CT26细胞经0.25%胰酶消化分散后,细胞计数调整浓度制备 $4 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞悬液。取体质量为18-22g的Balb/c白鼠(购自上海斯莱科实验动物有限公司)25只,在白鼠背部皮下注射细胞悬液100 $\mu$ L/只。观察CT26细胞在Balb/c体内的生长和成瘤情况。

[0264] 2. 融合蛋白的抗肿瘤效应

[0265] 在肿瘤后第五天将实验小鼠随机分成5组:TCS组、TCS/抗原肽组、TCS-抗原肽组、穿膜肽-TCS-抗原肽组,以PBS组为阴性对照。各组均采用微针经皮方式给药。给药前,用微针预处理。给药剂量均为10mg/kg。每三天给一次药,给药次数为四次。给药期间每天监视白鼠体重变化,并测定瘤的长径(a)、短径(b),计算肿瘤体积: $V = a \times b^2 / 2$ 。待PBS组的肿瘤体积到达2000mm<sup>3</sup>时判定为死亡终点,将白鼠安乐死,取下肿瘤,小心去除瘤表面的血迹及包膜,称重。

[0266] 结果如下:

[0267] 图11为给药过程中的肿瘤体积增长图。从图中可以看到,相对于PBS组,TCS组和TCS/抗原肽组对肿瘤的生长有一定的抑制作用。而TCS-抗原肽组和穿膜肽-TCS-抗原肽组有更为显著的抑瘤效果。图12则直观地显示了给药完成后各组的肿瘤照片,从图中可见,经PBS处理的小鼠肿瘤明显较大,而经TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽蛋白药物处理的小鼠肿瘤有不同程度的减小。

[0268] 图13为给药过程中各组别小鼠的体重变化图。从图中可见,各实验组在给药过程中,实验动物的体重并未发生明显的变化,证明本发明所构建的TCS-抗原肽及穿膜肽-TCS-抗原肽融合蛋白具有良好的生物相容性,系统毒性较低。

[0269] 图14为给药组各组的生存曲线,可以看出,PBS组的生存期最短,重组蛋白TCS-抗原肽组小鼠的生存期最长。这证明了本发明所构建的融合蛋白TCS-抗原肽具有延长生存期的作用,同时也证明了重组蛋白TCS-抗原肽的抗肿瘤作用。

[0270] 实验实施例6

[0271] 重组天花粉蛋白协同anti-PD-1抗体在皮下瘤模型中的体内药效情况

[0272] 1. CT26皮下荷瘤小鼠模型的建立

[0273] 将对数生长期的CT26细胞经0.25%胰酶消化分散后,细胞计数调整浓度制备 $4 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞悬液。取体质量为18-22g的Balb/c白鼠(购自上海斯莱科实验动物有限公司)20只,在白鼠背部皮下注射细胞悬液100 $\mu$ L/只。观察CT26细胞在Balb/c体内的生长和成瘤情况。

[0274] 2. 天花粉蛋白协同anti-PD-1抗体的抗肿瘤效应

[0275] 在肿瘤后的第6天将实验小鼠随机分成4组:天花粉蛋白组、anti-PD-1组、天花粉蛋白+anti-PD-1组,以PBS组为阴性对照。天花粉蛋白和PBS采用瘤旁注射方式给药,anti-PD-1采用腹腔注射方式给药。天花粉蛋白的给药剂量为5 $\mu$ g/只/4天,共给药3次;anti-PD-1的给药剂量为250 $\mu$ g/只/2天,共给药5次。给药期间每天监视白鼠体重变化,并测定瘤的长径(a)、短径(b),计算肿瘤体积: $V=a \times b^2/2$ 。待肿瘤体积到达2000 $\text{mm}^3$ 时判定为死亡终点,将白鼠安乐死,取下肿瘤,小心去除瘤表面的血迹及包膜,称重。

[0276] 结果如下:

[0277] 图15为给药过程中的肿瘤体积增长图。从图中可以看到,相对于对照组,天花粉蛋白组和anti-PD-1组对肿瘤的生长均有明显的抑制作用,而天花粉蛋白+anti-PD-1组具有更为显著的抑瘤效果。这证明了本发明所构建重组天花粉蛋白可以协同PD-1/PD-L1免疫检查点治疗,提高PD-1/PD-L1免疫检查点疗法的治疗响应率,改善肿瘤的免疫治疗效果。

[0278] 图16为给药过程中各组别小鼠的体重变化图。从图中可见,各实验组在给药过程中,实验动物的体重并未发生明显的变化,证明本发明所构建的重组天花粉蛋白具有良好的生物相容性,系统毒性较低。

[0279] 图17为各组别小鼠的生存曲线,可以看出,对照组的生存期最短,天花粉蛋白+anti-PD-1组小鼠的生存率最高、生存期最长。这证明了本发明所构建天花粉蛋白可以协同PD-1/PD-L1免疫检查点治疗,提高PD-1/PD-L1免疫检查点疗法的治疗响应率,改善肿瘤的免疫治疗效果。

[0280] 实验实施例7

[0281] 重组TCS-抗原肽协同anti-PD-1抗体在皮下瘤模型中的体内药效情况

[0282] 1. CT26皮下荷瘤小鼠模型的建立

[0283] 将对数生长期的CT26细胞经0.25%胰酶消化分散后,细胞计数调整浓度制备 $4 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞悬液。取体质量为18-22g的Balb/c白鼠(购自上海斯莱科实验动物有限公司)20只,在白鼠背部皮下注射细胞悬液100 $\mu$ L/只。观察CT26细胞在Balb/c体内的生长和成瘤情况。

[0284] 2. TCS-抗原肽协同anti-PD-1的抗肿瘤效应

[0285] 在肿瘤后的第6天将实验小鼠随机分成4组:TCS-抗原肽组、anti-PD-1组、TCS-抗原肽+anti-PD-1组,以PBS组为阴性对照。TCS-抗原肽和PBS采用瘤旁注射方式给药,anti-PD-1采用腹腔注射方式给药。TCS-抗原肽的给药剂量为2 $\mu$ g/只/2天,共给药3次;anti-PD-1的给药剂量为200 $\mu$ g/只/2天,共给药5次。给药期间每天监视白鼠体重变化,并测定瘤的长径(a)、短径(b),计算肿瘤体积: $V=a \times b^2/2$ 。待PBS组的肿瘤体积到达2000 $\text{mm}^3$ 时判定为死亡终点,将白鼠安乐死,取下肿瘤,小心去除瘤表面的血迹及包膜,称重。

[0286] 结果如下:

[0287] 图18为给药过程中的肿瘤体积增长图。从图中可以看到,相对于对照组,TCS-抗原肽组对肿瘤的生长有一定的抑制作用,而anti-PD-1组和TCS-抗原肽+anti-PD-1组均具有显著的抑瘤效果,且TCS-抗原肽+anti-PD-1组表现出最好的抑制肿瘤生长的效果。这证明了本发明所构建TCS-抗原肽可以协同PD-1/PD-L1免疫检查点治疗,提高PD-1/PD-L1免疫检查点疗法的治疗响应率,改善肿瘤的免疫治疗效果。

[0288] 图19为给药过程中各组别小鼠的体重变化图。从图中可见,各实验组在给药过程中,实验动物的体重并未发生明显的变化,证明本发明所构建的重组TCS-抗原肽具有良好的生物相容性,系统毒性较低。

[0289] 图20为治疗终点各组别小鼠的脾脏中CD8<sup>+</sup>T细胞数量的变化,可以看出,TCS-抗原肽+anti-PD-1组可以明显提高脾脏中CD8<sup>+</sup>T细胞的比例。图21为治疗终点各组别小鼠的肿瘤组织中CD8<sup>+</sup>T细胞数量的变化,可以看出,TCS-抗原肽+anti-PD-1组可以明显提高肿瘤组织中的CD8<sup>+</sup>T细胞的比例。这证明了本发明所构建TCS-抗原肽可以协同PD-1/PD-L1免疫检查点治疗,通过提高脾脏和肿瘤组织中CD8<sup>+</sup>T细胞的数量来改善肿瘤的免疫治疗效果。

[0290] 实验实施例8

[0291] 将重组TCS-抗原肽载入脂质体可以进一步改善重组TCS-抗原肽的肿瘤免疫治疗的疗效。

[0292] 重组TCS、TCS-抗原肽、抗原肽和TCS-抗原肽脂质体在皮下瘤模型中的体内药效情况

[0293] 1. TCS-抗原肽脂质体的制备

[0294] 将磷脂和胆固醇溶于10ml二氯甲烷中,在水浴超声下将TCS-抗原肽注入脂质溶液中,改用探头超声3min(300W,超1.5s,停1.5s)。旋蒸除去二氯甲烷,加入9ml超纯水水化,探头超声3min(300W,超1.5s,停1.5s)。用挤压仪反复推挤得到TCS-抗原肽脂质体。

[0295] 2. TCS-抗原肽脂质体的粒径表征

[0296] 取1ml脂质体溶液,采用动态光散射仪测定TCS-抗原肽脂质体的水力直径。

[0297] 3. TCS-抗原肽脂质体的载药量和包封率表征

[0298] 将TCS-抗原肽脂质体转入超滤管,通过离心超滤除去未被包载的TCS-抗原肽。纯化后的TCS-抗原肽脂质体破乳后,采用SDS-PAGE电泳表征TCS-抗原肽的包载情况。

[0299] 4. B16-F10皮下荷瘤小鼠模型的建立

[0300] 将对数生长期的B16-F10细胞经0.25%胰酶消化分散后,细胞计数调整浓度制备 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞悬液。取体质量为18-22g C57BL/6黑鼠(购自上海斯莱科实验动物有限公司)25只,在黑鼠背部皮下注射细胞悬液100 $\mu$ L/只。观察B16-F10细胞在C57BL/6黑鼠体内的生长和成瘤情况。

[0301] 5. TCS-抗原肽脂质体的抗肿瘤效应

[0302] 在种瘤后的第10天将实验小鼠随机分成5组:重组TCS组、TCS-抗原肽组、抗原肽组、TCS-抗原肽脂质体组,以PBS组为阴性对照。各组均采用皮下注射方式给药。给药剂量为5 $\mu$ g TCS/只/3天,共给药4次。给药期间每天监视黑鼠体重变化,并测定瘤的长径(a)、短径(b),计算肿瘤体积: $V = a \times b^2 / 2$ 。待肿瘤体积到达2000mm<sup>3</sup>时判定为死亡终点,将黑鼠安乐死,取下肿瘤,小心去除瘤表面的血迹及包膜,称重。

[0303] 结果如下:

[0304] 图22为制备的TCS-抗原肽脂质体的粒径图。从图中可以看到,脂质体的水力直径为110nm,具有较好的分散度。

[0305] 图23为制备的TCS-抗原肽脂质体纯化后的SDS-PAGE电泳图。从图中可以看到,制备的脂质体可以有效包载TCS-抗原肽。表明TCS-抗原肽脂质体的制备成功。

[0306] 图24为给药过程中的肿瘤体积增长图。从图中可以看到,相对于对照组,重组TCS

组和抗原肽组对肿瘤的生长有一定的抑制作用,而TCS-抗原肽组和TCS-抗原肽脂质体组均具有显著的抑瘤效果,且TCS-抗原肽脂质体组表现出最好的抑制肿瘤生长的效果。这证明了本发明所构建TCS-抗原肽脂质体可以改善TCS-抗原肽对肿瘤的免疫治疗效果。

[0307] 图25为给药过程中各组别小鼠的体重变化图。从图中可见,各实验组在给药过程中,实验动物的体重并未发生明显的变化,证明本发明所构建的重组TCS-抗原肽和TCS-抗原肽脂质体均具有良好的生物相容性,系统毒性较低。

[0308] 图26为各组别小鼠的生存曲线,可以看出,对照组的生存期最短,TCS-抗原肽脂质体组小鼠的生存期最长。这证明了本发明所构建的TCS-抗原肽脂质体具有延长生存期的作用,同时也证明了TCS-抗原肽脂质体较TCS-抗原肽具有更强的抗肿瘤作用。

[0309] 图27为治疗终点各组别小鼠的淋巴结中CD8<sup>+</sup>T细胞数量的变化,可以看出,TCS-抗原肽脂质体组可以明显提高淋巴结中CD8<sup>+</sup>T细胞的比例。

[0310] 图28为治疗终点各组别小鼠的肿瘤组织中CD8<sup>+</sup>T细胞数量的变化,可以看出,TCS-抗原肽脂质体组可以有效提高肿瘤组织中的CD8<sup>+</sup>T细胞的比例。这证明了本发明所构建TCS-抗原肽脂质体可以通过提高淋巴结和肿瘤组织中CD8<sup>+</sup>T细胞的数量来改善TCS-抗原肽的抗肿瘤效果。

[0311] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 中国科学院上海药物研究所  
 [0003] <120> 天花粉蛋白用于致敏和/激活树突状细胞中的应用  
 [0004] <130> P2017-1667  
 [0005] <150> CN201711164959.9  
 [0006] <151> 2017-11-21  
 [0007] <160> 12  
 [0008] <170> PatentIn version 3.5  
 [0009] <210> 1  
 [0010] <211> 276  
 [0011] <212> PRT  
 [0012] <213> 人工序列(artificial sequence)  
 [0013] <400> 1  
 [0014] Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg Asp Val Ser Phe  
 [0015] 1 5 10 15  
 [0016] Arg Leu Ser Gly Ala Thr Ser Ser Ser Tyr Gly Val Phe Ile Ser Asn  
 [0017] 20 25 30  
 [0018] Leu Arg Lys Ala Leu Pro Asn Glu Arg Lys Leu Tyr Asp Ile Pro Leu  
 [0019] 35 40 45  
 [0020] Leu Arg Ser Ser Leu Pro Gly Ser Gln Arg Tyr Ala Leu Ile His Leu  
 [0021] 50 55 60  
 [0022] Thr Asn Tyr Ala Asp Glu Thr Ile Ser Val Ala Ile Asp Val Thr Asn  
 [0023] 65 70 75 80  
 [0024] Val Tyr Ile Met Gly Tyr Arg Ala Gly Asp Thr Ser Tyr Phe Phe Asn  
 [0025] 85 90 95  
 [0026] Glu Ala Ser Ala Thr Glu Ala Ala Lys Tyr Val Phe Lys Asp Ala Met  
 [0027] 100 105 110  
 [0028] Arg Lys Val Thr Leu Pro Tyr Ser Gly Asn Tyr Glu Arg Leu Gln Thr  
 [0029] 115 120 125  
 [0030] Ala Ala Gly Lys Ile Arg Glu Asn Ile Pro Leu Gly Leu Pro Ala Leu  
 [0031] 130 135 140  
 [0032] Asp Ser Ala Ile Thr Thr Leu Phe Tyr Tyr Asn Ala Asn Ser Ala Ala  
 [0033] 145 150 155 160  
 [0034] Ser Ala Leu Met Val Leu Ile Gln Ser Thr Ser Glu Ala Ala Arg Tyr  
 [0035] 165 170 175  
 [0036] Lys Phe Ile Glu Gln Gln Ile Gly Lys Arg Val Asp Lys Thr Phe Leu  
 [0037] 180 185 190  
 [0038] Pro Ser Leu Ala Ile Ile Ser Leu Glu Asn Ser Trp Ser Ala Leu Ser

[0039]	195	200	205
[0040]	Lys Gln Ile Gln Ile Ala Ser Thr Asn Asn Gly Gln Phe Glu Ser Pro		
[0041]	210	215	220
[0042]	Val Val Leu Ile Asn Ala Gln Asn Gln Arg Val Thr Ile Thr Asn Val		
[0043]	225	230	235
[0044]	Asp Ala Gly Val Val Thr Ser Asn Ile Ala Leu Leu Leu Asn Arg Asn		
[0045]	245	250	255
[0046]	Asn Met Ala Gly Gly Gly Gly Glu Asp Val Thr Pro Glu Asn Phe Leu		
[0047]	260	265	270
[0048]	Ala Val Leu Arg		
[0049]	275		
[0050]	<210> 2		
[0051]	<211> 265		
[0052]	<212> PRT		
[0053]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0054]	<400> 2		
[0055]	Met Asp Val Ser Phe Arg Leu Ser Gly Ala Thr Ser Ser Ser Tyr Gly		
[0056]	1	5	10
[0057]	Val Phe Ile Ser Asn Leu Arg Lys Ala Leu Pro Asn Glu Arg Lys Leu		
[0058]	20	25	30
[0059]	Tyr Asp Ile Pro Leu Leu Arg Ser Ser Leu Pro Gly Ser Gln Arg Tyr		
[0060]	35	40	45
[0061]	Ala Leu Ile His Leu Thr Asn Tyr Ala Asp Glu Thr Ile Ser Val Ala		
[0062]	50	55	60
[0063]	Ile Asp Val Thr Asn Val Tyr Ile Met Gly Tyr Arg Ala Gly Asp Thr		
[0064]	65	70	75
[0065]	Ser Tyr Phe Phe Asn Glu Ala Ser Ala Thr Glu Ala Ala Lys Tyr Val		
[0066]	85	90	95
[0067]	Phe Lys Asp Ala Met Arg Lys Val Thr Leu Pro Tyr Ser Gly Asn Tyr		
[0068]	100	105	110
[0069]	Glu Arg Leu Gln Thr Ala Ala Gly Lys Ile Arg Glu Asn Ile Pro Leu		
[0070]	115	120	125
[0071]	Gly Leu Pro Ala Leu Asp Ser Ala Ile Thr Thr Leu Phe Tyr Tyr Asn		
[0072]	130	135	140
[0073]	Ala Asn Ser Ala Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Ile Gln Ser Thr Ser		
[0074]	145	150	155
[0075]	Glu Ala Ala Arg Tyr Lys Phe Ile Glu Gln Gln Ile Gly Lys Arg Val		
[0076]	165	170	175
[0077]	Asp Lys Thr Phe Leu Pro Ser Leu Ala Ile Ile Ser Leu Glu Asn Ser		

[0078]	180	185	190
[0079]	Trp Ser Ala Leu Ser Lys Gln Ile Gln Ile Ala Ser Thr Asn Asn Gly		
[0080]	195	200	205
[0081]	Gln Phe Glu Ser Pro Val Val Leu Ile Asn Ala Gln Asn Gln Arg Val		
[0082]	210	215	220
[0083]	Thr Ile Thr Asn Val Asp Ala Gly Val Val Thr Ser Asn Ile Ala Leu		
[0084]	225	230	235
[0085]	Leu Leu Asn Arg Asn Asn Met Ala Gly Gly Gly Gly Glu Asp Val Thr		
[0086]	245	250	255
[0087]	Pro Glu Asn Phe Leu Ala Val Leu Arg		
[0088]	260	265	
[0089]	<210> 3		
[0090]	<211> 792		
[0091]	<212> DNA		
[0092]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0093]	<400> 3		
[0094]	gatgtagct tccgtttatc aggtgcaaca agcagttcct atggagtttt catttcaaat	60	
[0095]	ctgagaaaag ctcttccaaa tgaaaggaaa ctgtacgata tccctctggt acgttcctct	120	
[0096]	cttccaggtt ctcaacgcta cgcattgata catctcacia attacgccga tgaaaccatt	180	
[0097]	tcagtggcca tagacgtaac gaacgtctat attatgggat atcgcgctgg cgatacatcc	240	
[0098]	tattttttca acgaggcttc tgcaacagaa gctgcaaaat atgtattcaa agacgctatg	300	
[0099]	cgaaaagtta cgcttcata ttctggcaat tacgaaaggc ttcaaactgc tgcaggcaaa	360	
[0100]	ataagggaaa atattccgct tggactcctt gctttggaca gtgccattac cactttgttt	420	
[0101]	tactacaacg ccaattctgc tgcgtcggca cttatggtac tcattcagtc gacgtctgag	480	
[0102]	gctgcgaggt ataaatttat tgagcaacaa attgggaagc gtgttgacaa aaccttcccta	540	
[0103]	ccaagttag caattataag tttggaaaat agttggtctg ctctctccaa gcaaattcag	600	
[0104]	atagcgagta ctaataatgg acagtttgaa agtcctgttg tgcttataaa tgctcaaaac	660	
[0105]	caacgagtca cgataaccaa tgttgatgct ggagttgtaa cctccaacat cgcgttgctg	720	
[0106]	ctgaatagaa acaatatggc aggcggtggt ggcaagatg tgacacctga aaattttctg	780	
[0107]	gcagtgctgc gt 792		
[0108]	<210> 4		
[0109]	<211> 13		
[0110]	<212> PRT		
[0111]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0112]	<400> 4		
[0113]	Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg		
[0114]	1	5	10
[0115]	<210> 5		
[0116]	<211> 11		

[0117] <212> PRT  
 [0118] <213> 人工序列(artificial sequence)  
 [0119] <400> 5  
 [0120] Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 [0121] 1 5 10  
 [0122] <210> 6  
 [0123] <211> 13  
 [0124] <212> PRT  
 [0125] <213> 智人(homo sapiens)  
 [0126] <400> 6  
 [0127] Glu Asp Val Thr Pro Glu Asn Phe Leu Ala Val Leu Arg  
 [0128] 1 5 10  
 [0129] <210> 7  
 [0130] <211> 9  
 [0131] <212> PRT  
 [0132] <213> 智人(homo sapiens)  
 [0133] <400> 7  
 [0134] Thr Pro Glu Asn Phe Leu Ala Val Leu  
 [0135] 1 5  
 [0136] <210> 8  
 [0137] <211> 13  
 [0138] <212> PRT  
 [0139] <213> 智人(homo sapiens)  
 [0140] <400> 8  
 [0141] His Ser Val Thr Tyr Glu His Ala Leu Arg Tyr Leu Tyr  
 [0142] 1 5 10  
 [0143] <210> 9  
 [0144] <211> 265  
 [0145] <212> PRT  
 [0146] <213> 栝楼(Trichosanthes kirilowii Maxim)  
 [0147] <400> 9  
 [0148] Met Asp Val Ser Phe Arg Leu Ser Gly Ala Thr Ser Ser Ser Tyr Gly  
 [0149] 1 5 10 15  
 [0150] Val Phe Ile Ser Asn Leu Arg Lys Ala Leu Pro Asn Glu Arg Lys Leu  
 [0151] 20 25 30  
 [0152] Tyr Asp Ile Pro Leu Leu Arg Ser Ser Leu Pro Gly Ser Gln Arg Tyr  
 [0153] 35 40 45  
 [0154] Ala Leu Ile His Leu Thr Asn Tyr Ala Asp Glu Thr Ile Ser Val Ala  
 [0155] 50 55 60



[0195]	Ile Asp Val Thr Asn Val Tyr Ile Met Gly Tyr Arg Ala Gly Asp Thr
[0196]	65 70 75 80
[0197]	Ser Tyr Phe Phe Asn Glu Ala Ser Ala Thr Glu Ala Ala Lys Tyr Val
[0198]	85 90 95
[0199]	Phe Lys Asp Ala Met Arg Lys Val Thr Leu Pro Tyr Ser Gly Asn Tyr
[0200]	100 105 110
[0201]	Glu Arg Leu Gln Thr Ala Ala Gly Lys Ile Arg Glu Asn Ile Pro Leu
[0202]	115 120 125
[0203]	Gly Leu Pro Ala Leu Asp Ser Ala Ile Thr Thr Leu Phe Tyr Tyr Asn
[0204]	130 135 140
[0205]	Ala Asn Ser Ala Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Ile Gln Ser Thr Ser
[0206]	145 150 155 160
[0207]	Glu Ala Ala Arg Tyr Lys Phe Ile Glu Gln Gln Ile Gly Lys Arg Val
[0208]	165 170 175
[0209]	Asp Lys Thr Phe Leu Pro Ser Leu Ala Ile Ile Ser Leu Glu Asn Ser
[0210]	180 185 190
[0211]	Trp Ser Ala Leu Ser Lys Gln Ile Gln Ile Ala Ser Thr Asn Asn Gly
[0212]	195 200 205
[0213]	Gln Phe Glu Ser Pro Val Val Leu Ile Asn Ala Gln Asn Gln Arg Val
[0214]	210 215 220
[0215]	Thr Ile Thr Asn Val Asp Ala Gly Val Val Thr Ser Asn Ile Ala Leu
[0216]	225 230 235 240
[0217]	Leu Leu Asn Arg Asn Asn Met Ala
[0218]	245
[0219]	<210> 11
[0220]	<211> 792
[0221]	<212> DNA
[0222]	<213> 栝楼(Trichosanthes kirilowii Maxim)
[0223]	<400> 11
[0224]	gatgtagct tccgtttatc aggtgcaaca agcagttcct atggagtttt catttcaaat 60
[0225]	ctgagaaaag ctcttccaaa tgaaaggaaa ctgtacgata tccctctggt acgttcctct 120
[0226]	cttccagggt ctcaacgcta cgcattgate catctcacia attacgccga tgaaaccatt 180
[0227]	tcagtggcca tagacgtaac gaacgtctat attatgggat atcgcgctgg cgatacatcc 240
[0228]	tattttttca acgaggcttc tgcaacagaa gctgcaaaat atgtattcaa agacgctatg 300
[0229]	cgaaaagtta cgcttccata ttctggcaat tacgaaagge ttcaaactgc tgcaggcaaa 360
[0230]	ataagggaaa atattccgct tggactccct gctttggaca gtgccattac cactttgttt 420
[0231]	tactacaacg ccaattctgc tgcgtcggca cttatggtag tcattcagtc gacgtctgag 480
[0232]	gctgcgaggt ataaatttat tgagcaacaa attgggaagc gtgttgacaa aaccttcccta 540
[0233]	ccaagtttag caattataag tttggaaaat agttggtctg ctctctccaa gcaaattcag 600

[0234] atagcgagta ctaataatgg acagtttgaa agtcctgttg tgcttataaa tgctcaaaac 660  
 [0235] caacgagtca cgataaccaa tgttgatgct ggagttgtaa cctccaacat cgcgttgctg 720  
 [0236] ctgaatagaa acaatatggc aggcggtggt ggcgaagatg tgacacctga aaattttctg 780  
 [0237] gcagtgctgc gt 792  
 [0238] <210> 12  
 [0239] <211> 279  
 [0240] <212> PRT  
 [0241] <213> 人工序列(artificial sequence)  
 [0242] <400> 12  
 [0243] Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Gly Gly Asp  
 [0244] 1 5 10 15  
 [0245] Val Ser Phe Arg Leu Ser Gly Ala Thr Ser Ser Ser Tyr Gly Val Phe  
 [0246] 20 25 30  
 [0247] Ile Ser Asn Leu Arg Lys Ala Leu Pro Asn Glu Arg Lys Leu Tyr Asp  
 [0248] 35 40 45  
 [0249] Ile Pro Leu Leu Arg Ser Ser Leu Pro Gly Ser Gln Arg Tyr Ala Leu  
 [0250] 50 55 60  
 [0251] Ile His Leu Thr Asn Tyr Ala Asp Glu Thr Ile Ser Val Ala Ile Asp  
 [0252] 65 70 75 80  
 [0253] Val Thr Asn Val Tyr Ile Met Gly Tyr Arg Ala Gly Asp Thr Ser Tyr  
 [0254] 85 90 95  
 [0255] Phe Phe Asn Glu Ala Ser Ala Thr Glu Ala Ala Lys Tyr Val Phe Lys  
 [0256] 100 105 110  
 [0257] Asp Ala Met Arg Lys Val Thr Leu Pro Tyr Ser Gly Asn Tyr Glu Arg  
 [0258] 115 120 125  
 [0259] Leu Gln Thr Ala Ala Gly Lys Ile Arg Glu Asn Ile Pro Leu Gly Leu  
 [0260] 130 135 140  
 [0261] Pro Ala Leu Asp Ser Ala Ile Thr Thr Leu Phe Tyr Tyr Asn Ala Asn  
 [0262] 145 150 155 160  
 [0263] Ser Ala Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Ile Gln Ser Thr Ser Glu Ala  
 [0264] 165 170 175  
 [0265] Ala Arg Tyr Lys Phe Ile Glu Gln Gln Ile Gly Lys Arg Val Asp Lys  
 [0266] 180 185 190  
 [0267] Thr Phe Leu Pro Ser Leu Ala Ile Ile Ser Leu Glu Asn Ser Trp Ser  
 [0268] 195 200 205  
 [0269] Ala Leu Ser Lys Gln Ile Gln Ile Ala Ser Thr Asn Asn Gly Gln Phe  
 [0270] 210 215 220  
 [0271] Glu Ser Pro Val Val Leu Ile Asn Ala Gln Asn Gln Arg Val Thr Ile  
 [0272] 225 230 235 240

---

[0273]	Thr Asn Val Asp Ala Gly Val Val Thr Ser Asn Ile Ala Leu Leu Leu
[0274]	245 250 255
[0275]	Asn Arg Asn Asn Met Ala Gly Gly Gly Gly Glu Asp Val Thr Pro Glu
[0276]	260 265 270
[0277]	Asn Phe Leu Ala Val Leu Arg
[0278]	275

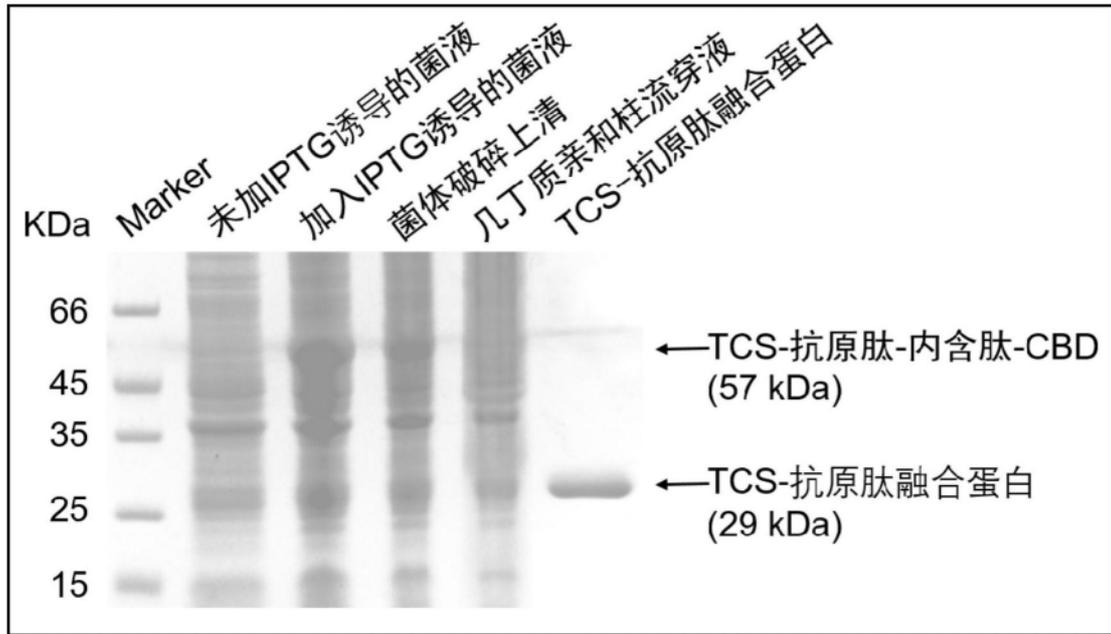


图1

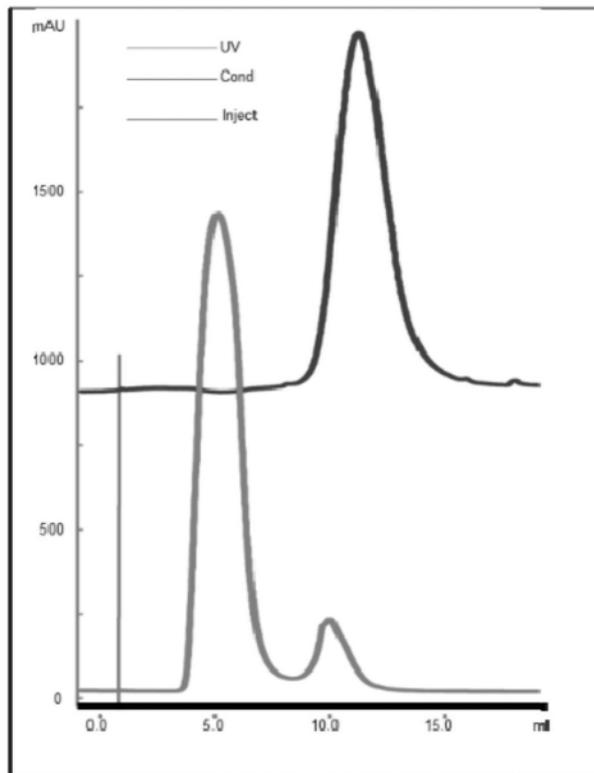


图2

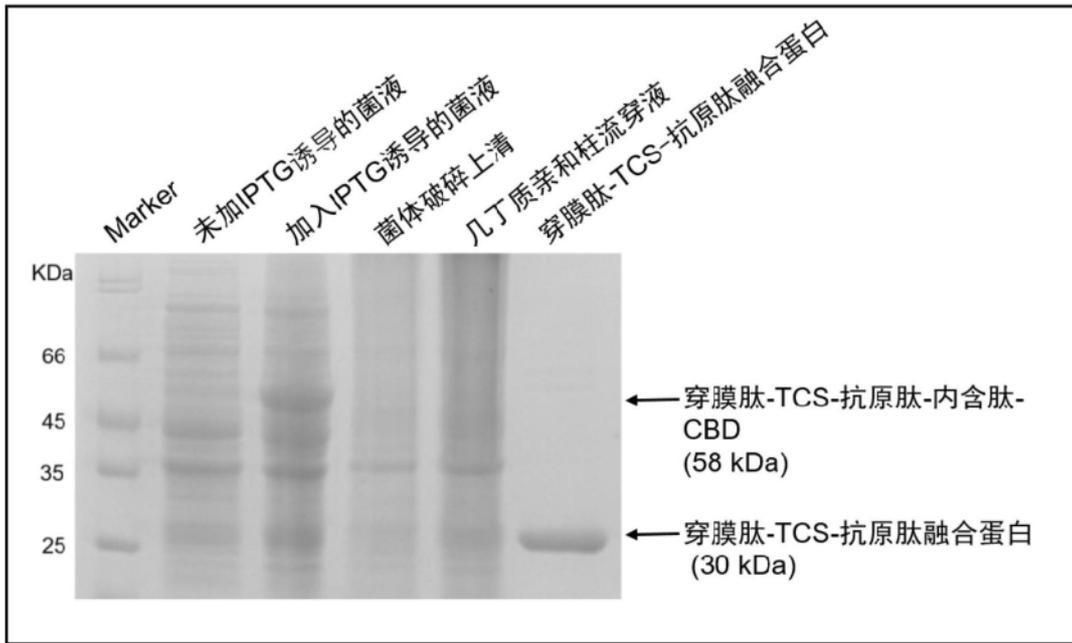


图3

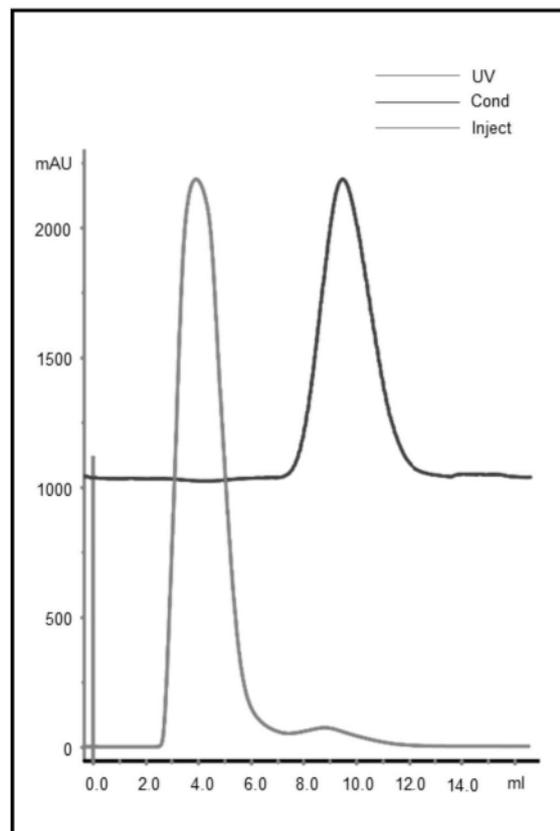


图4

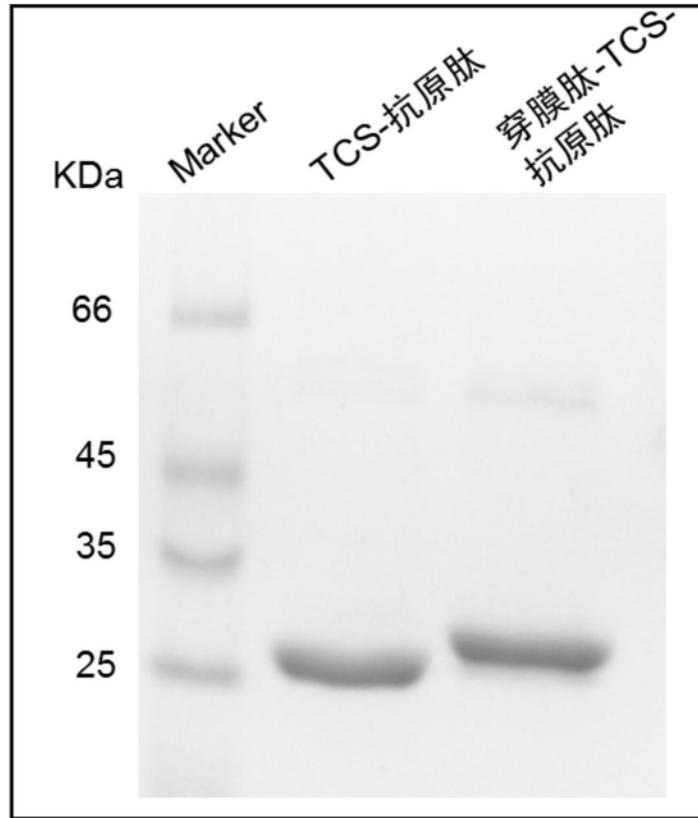


图5

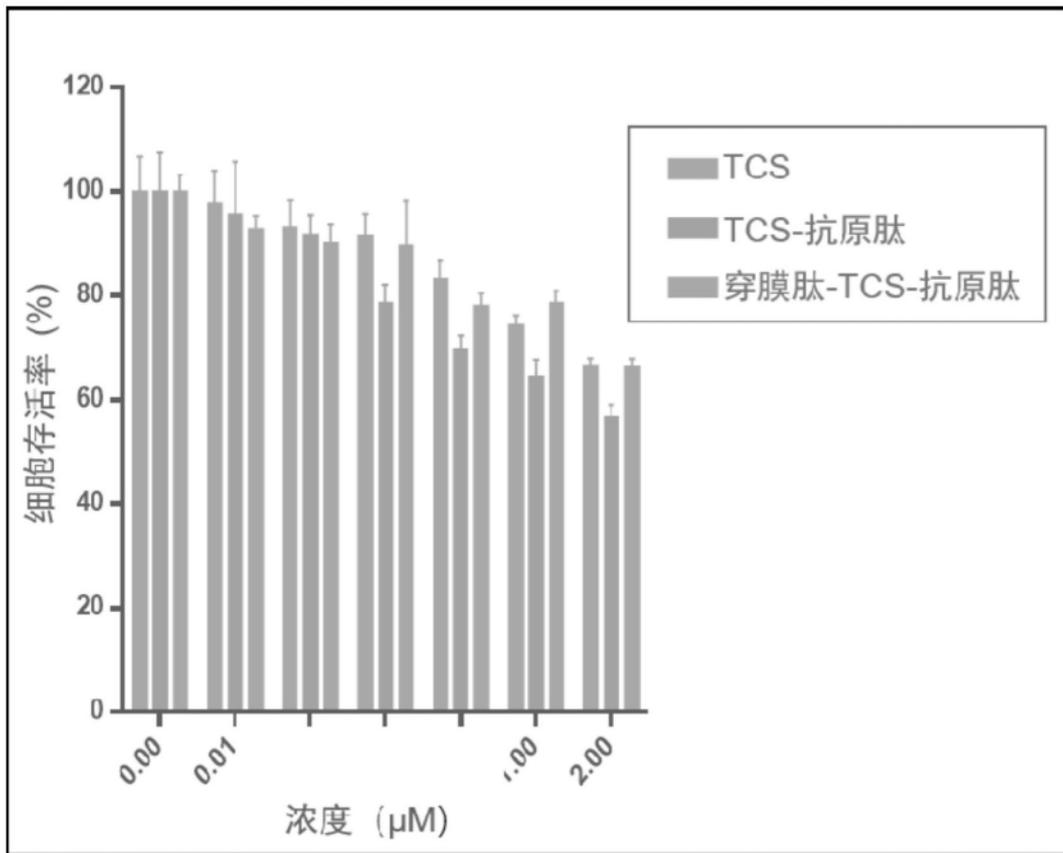


图6

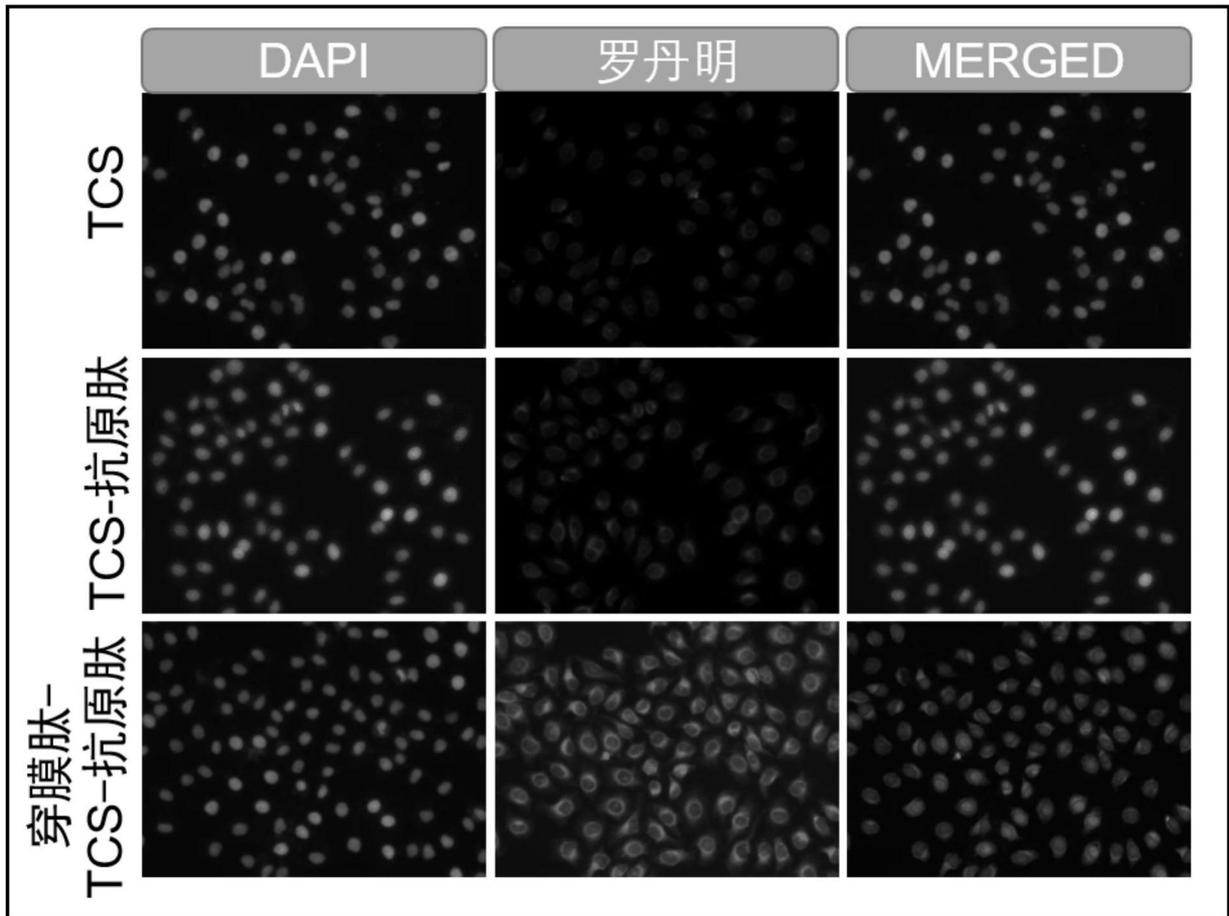


图7

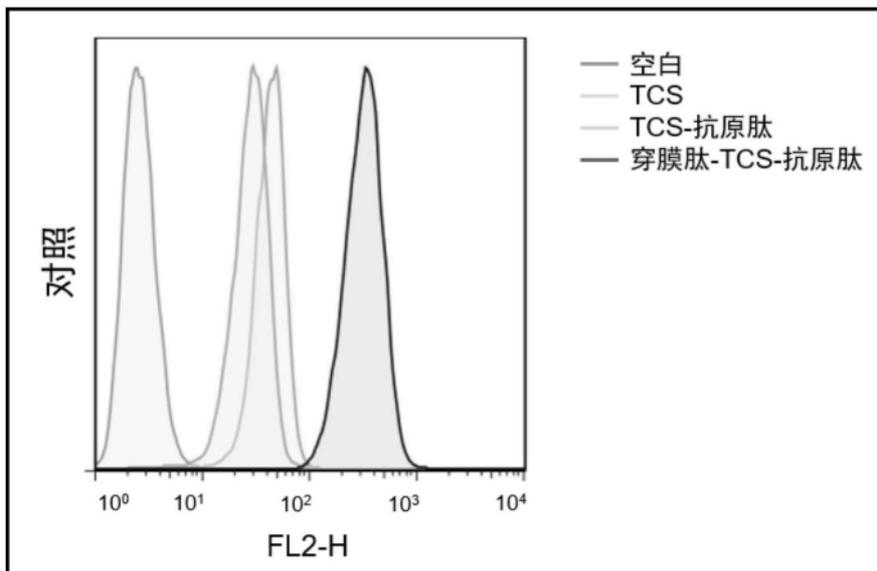


图8

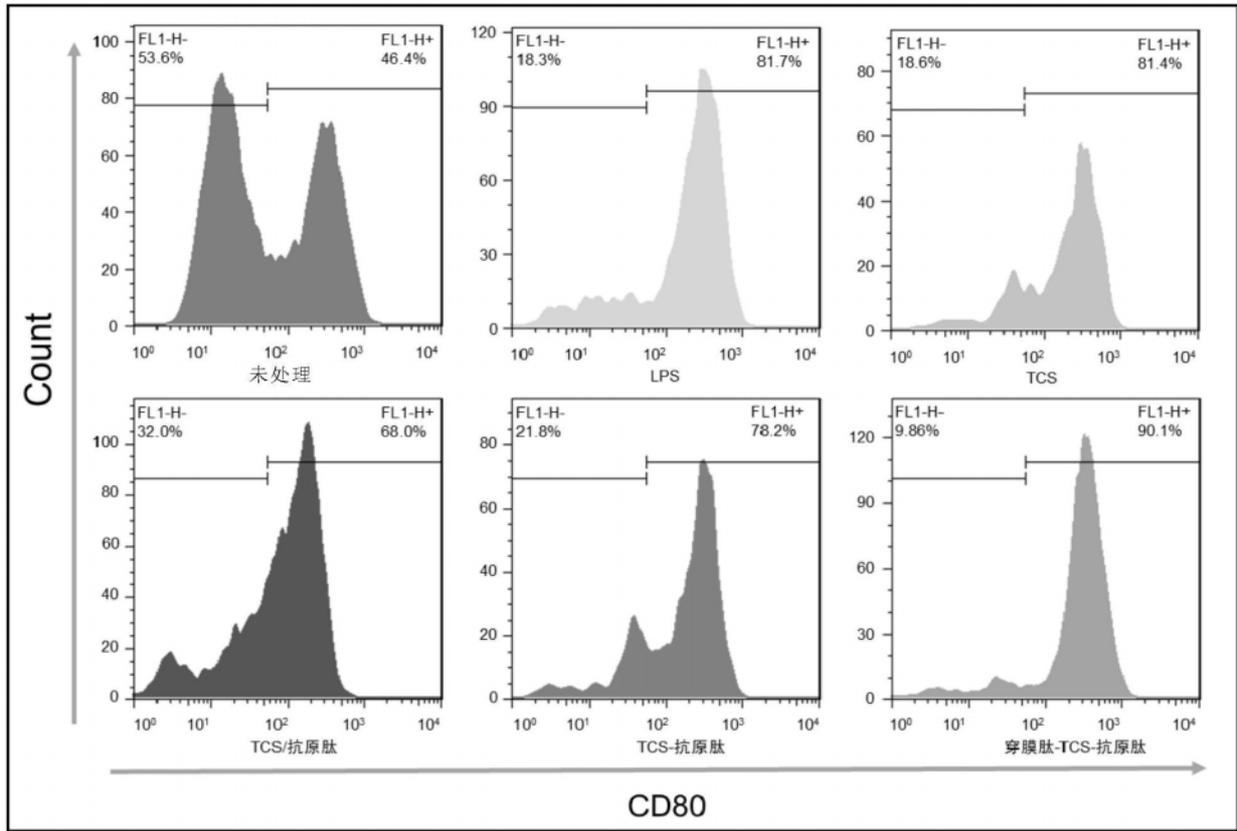


图9

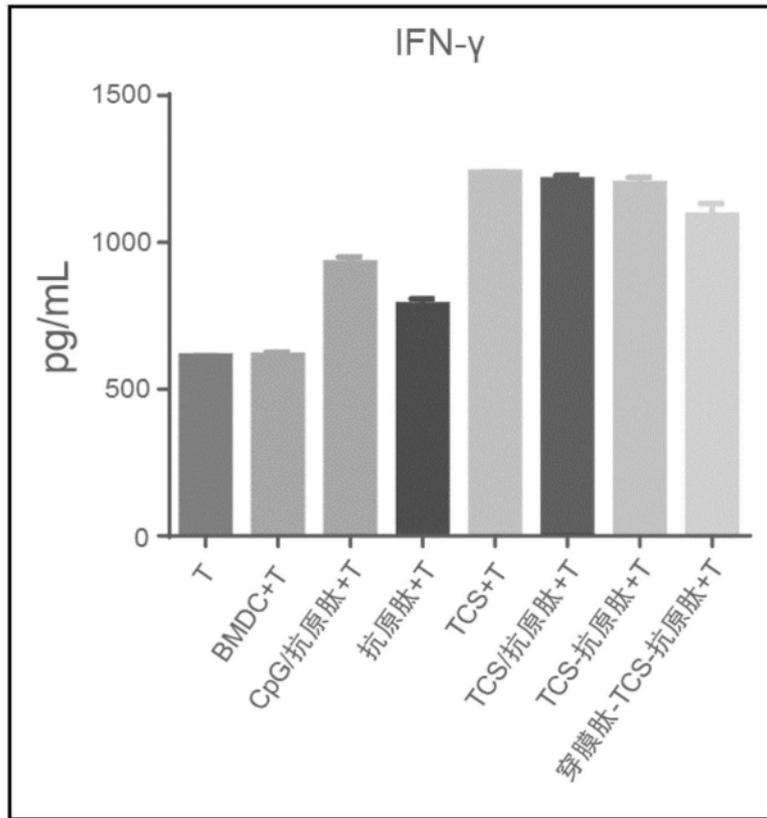


图10

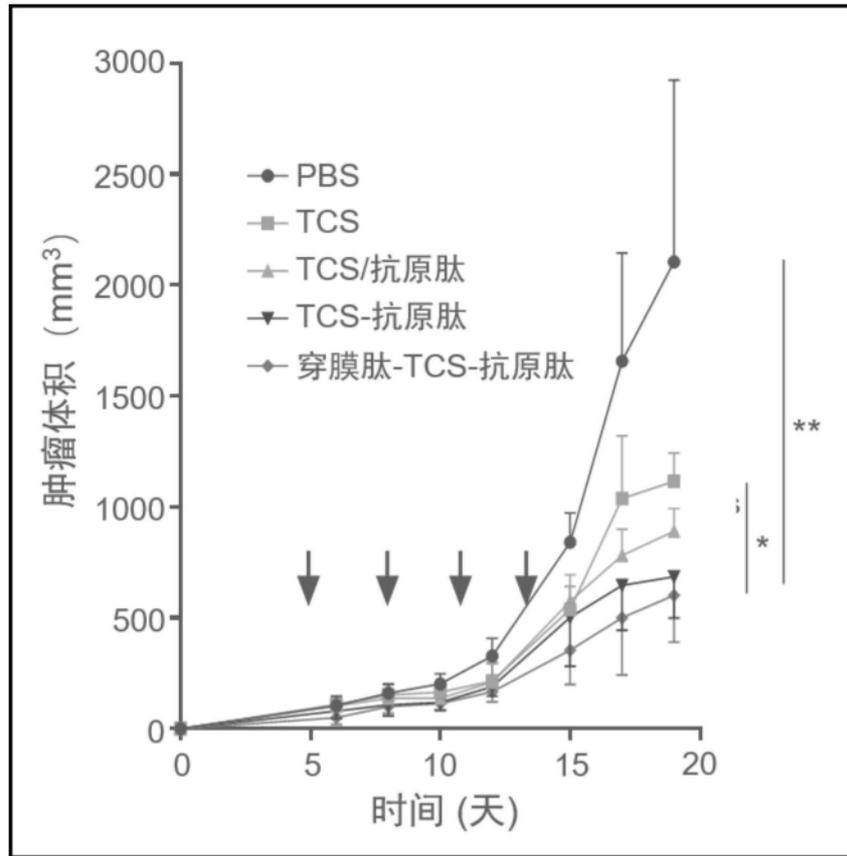


图11

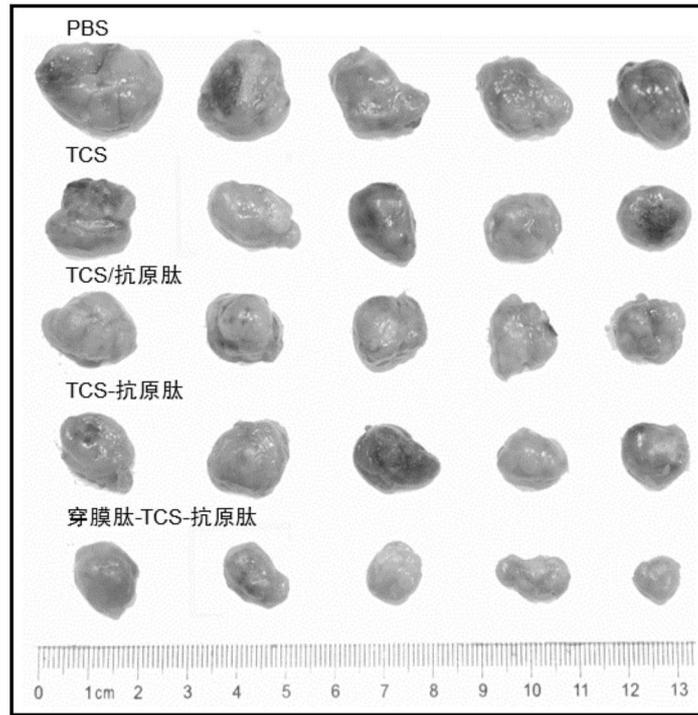


图12

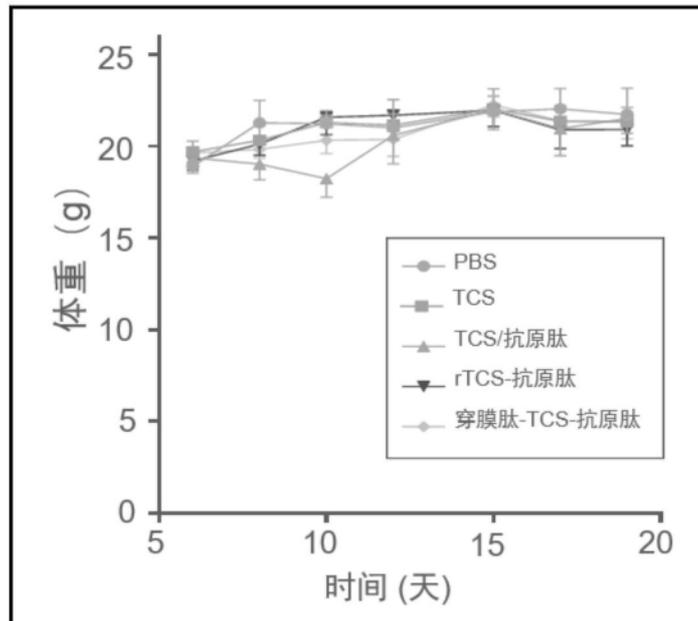


图13

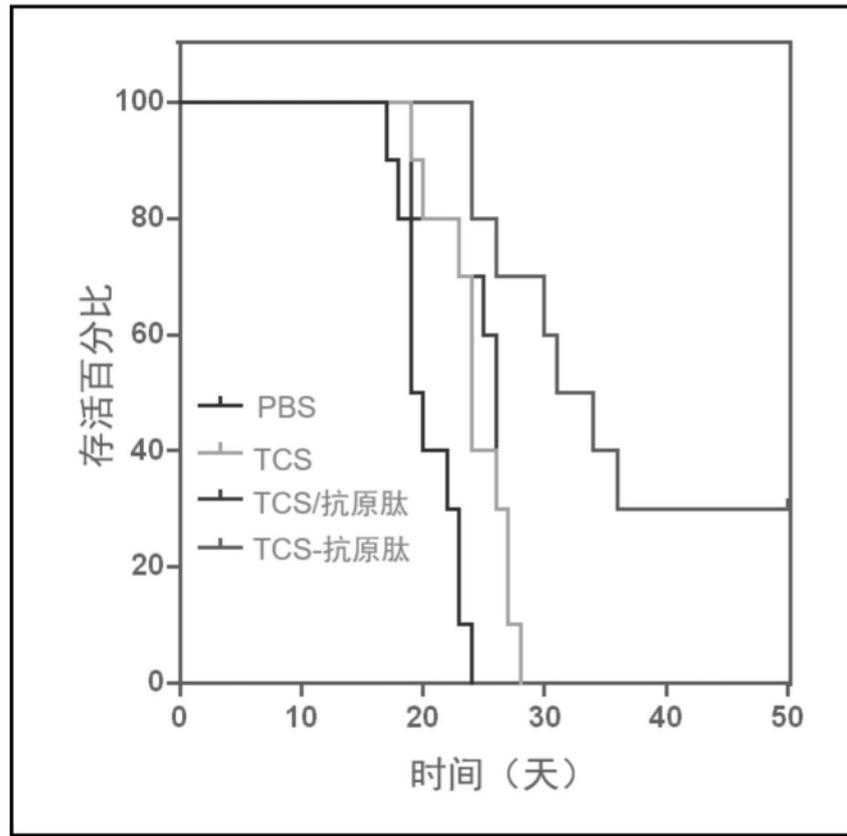


图14

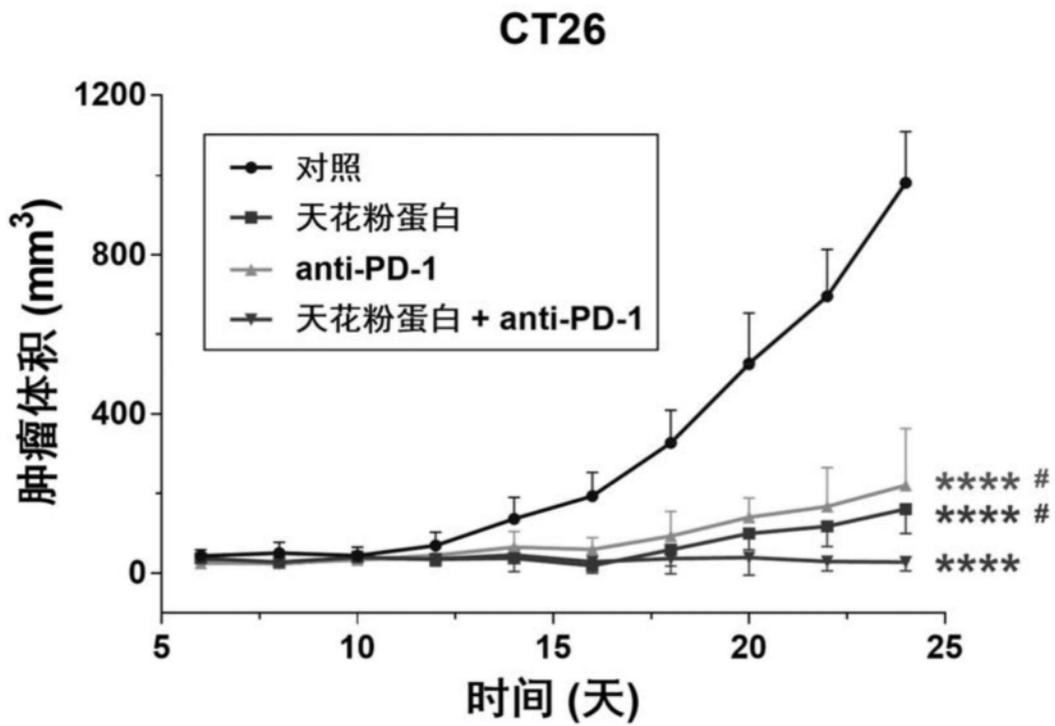


图15

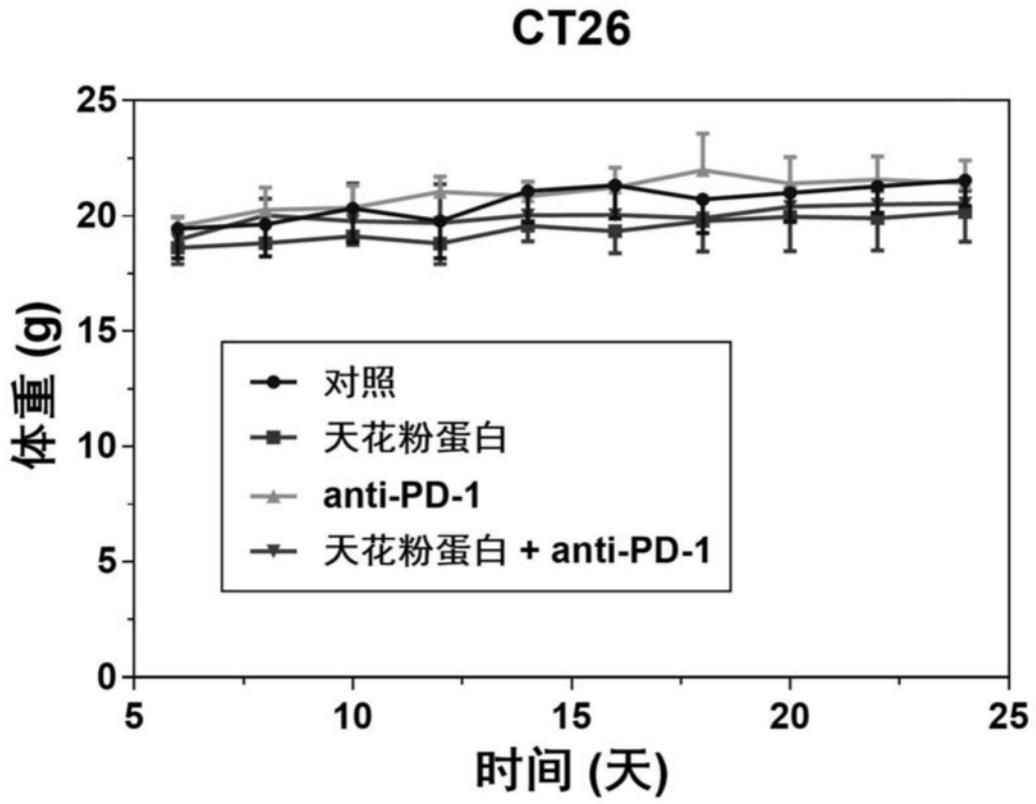


图16

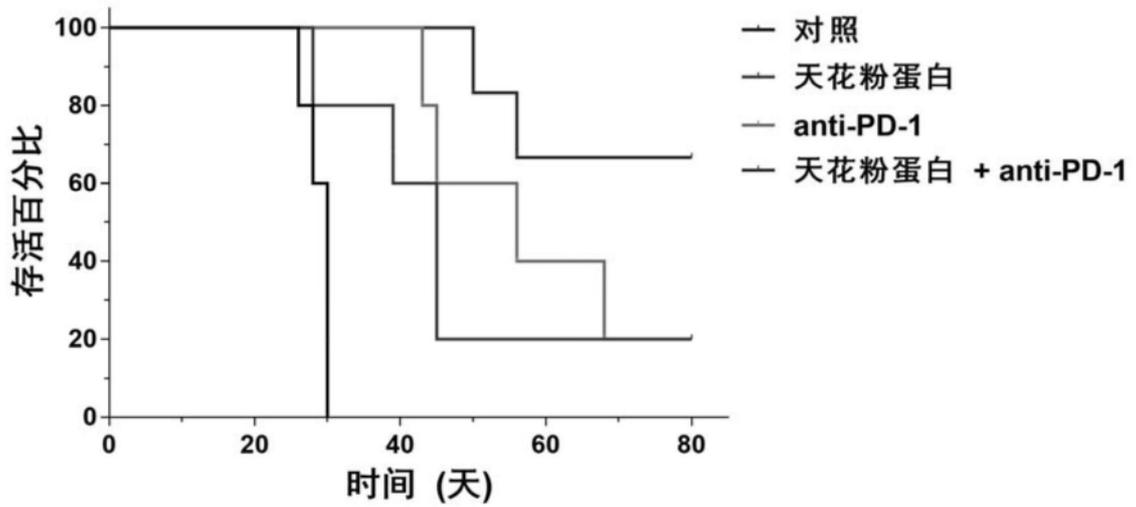


图17

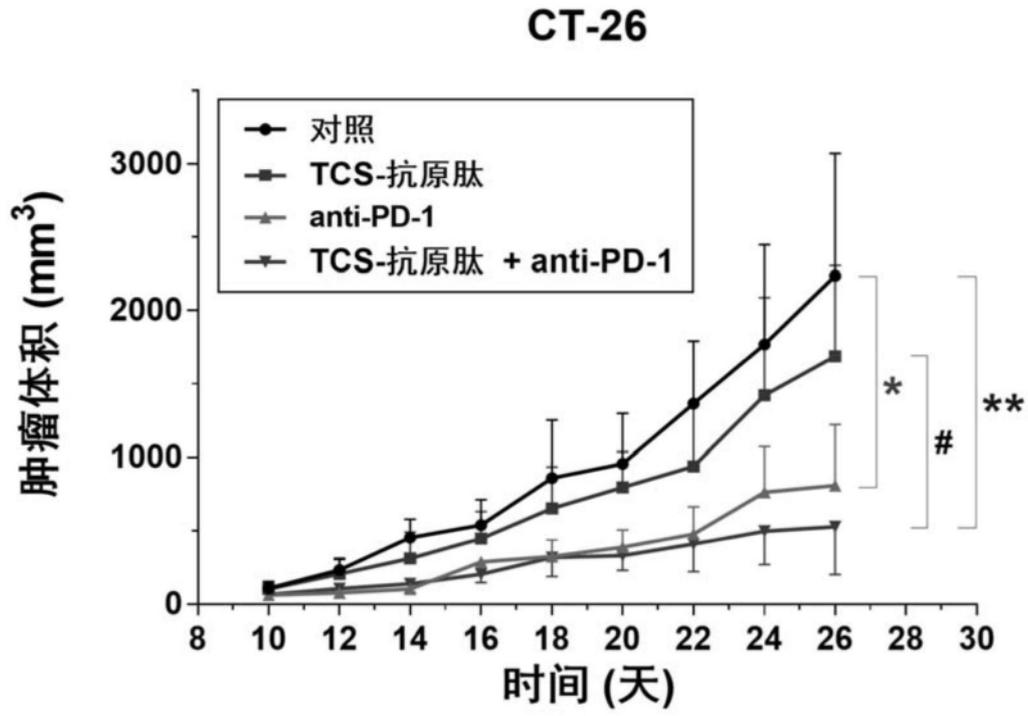


图18

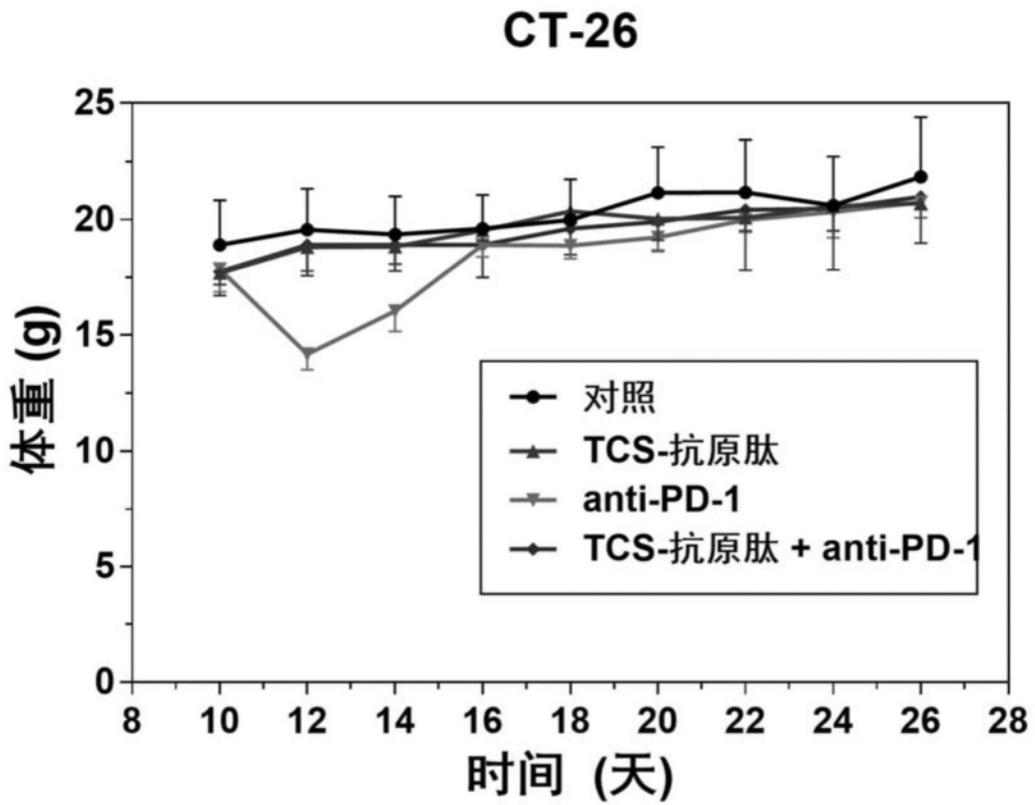


图19

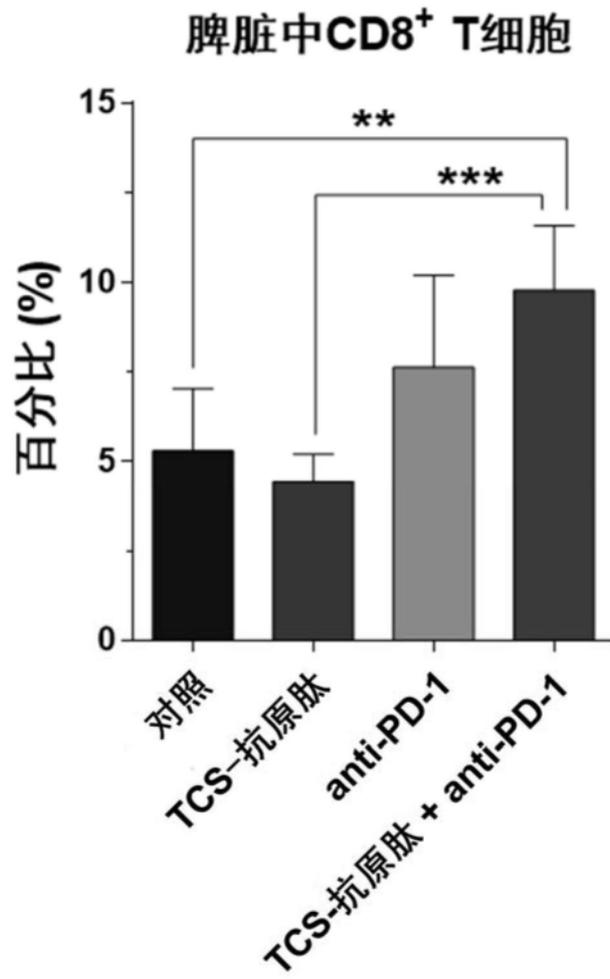


图20

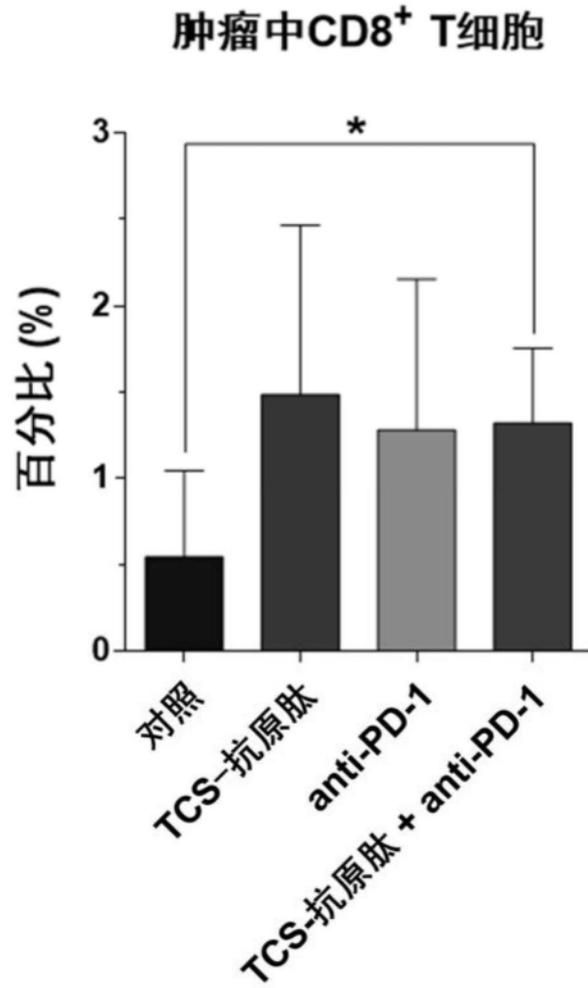


图21

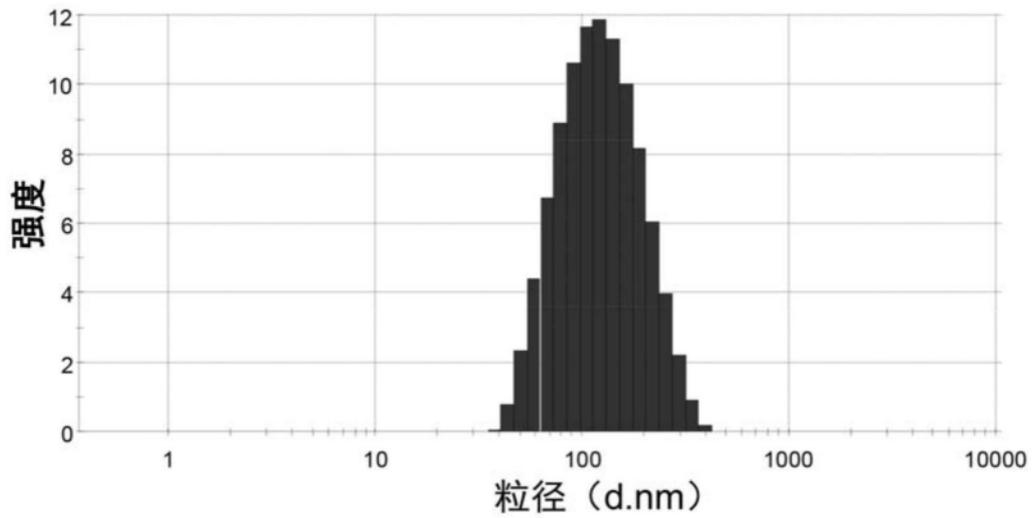


图22

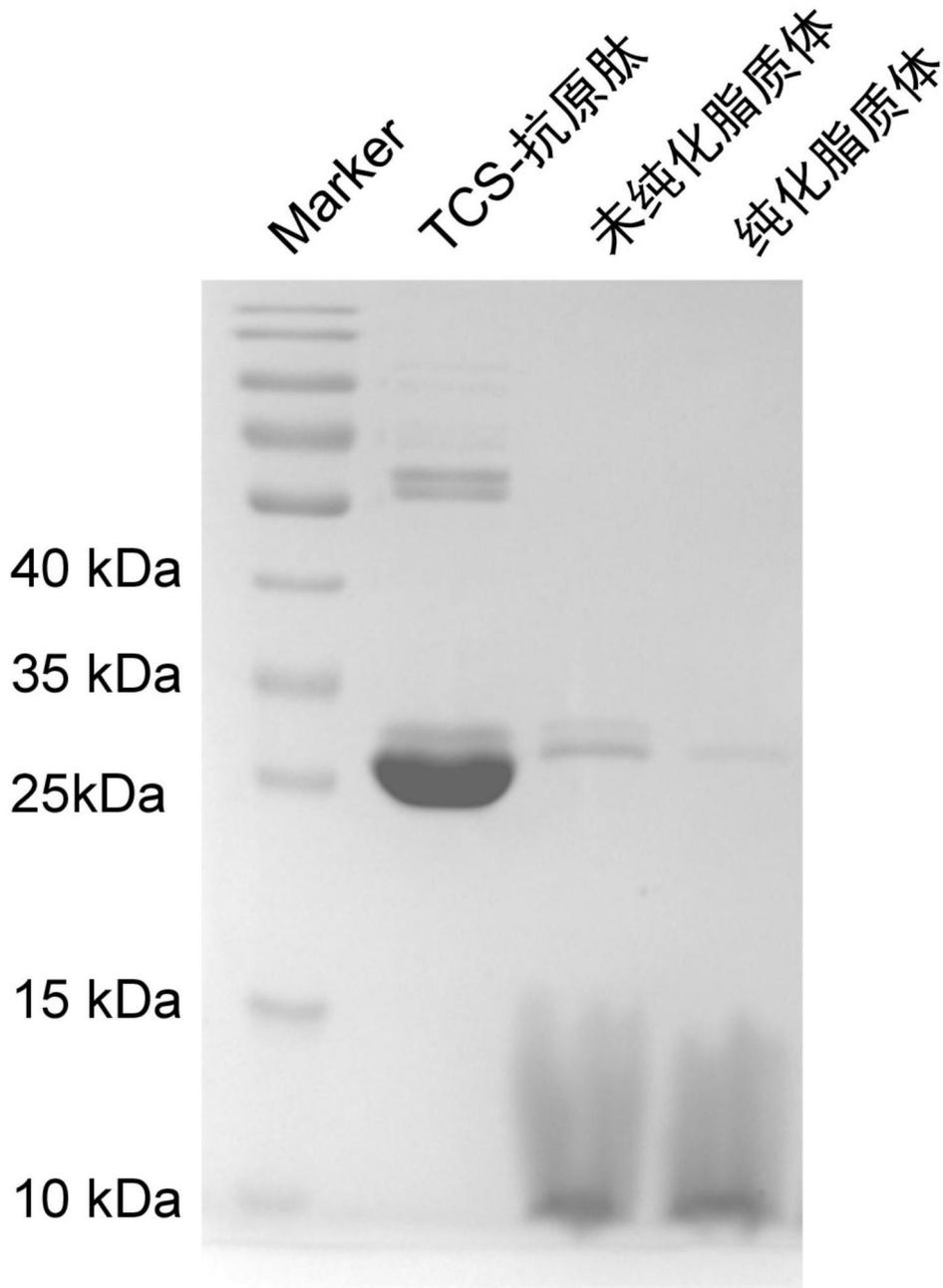


图23

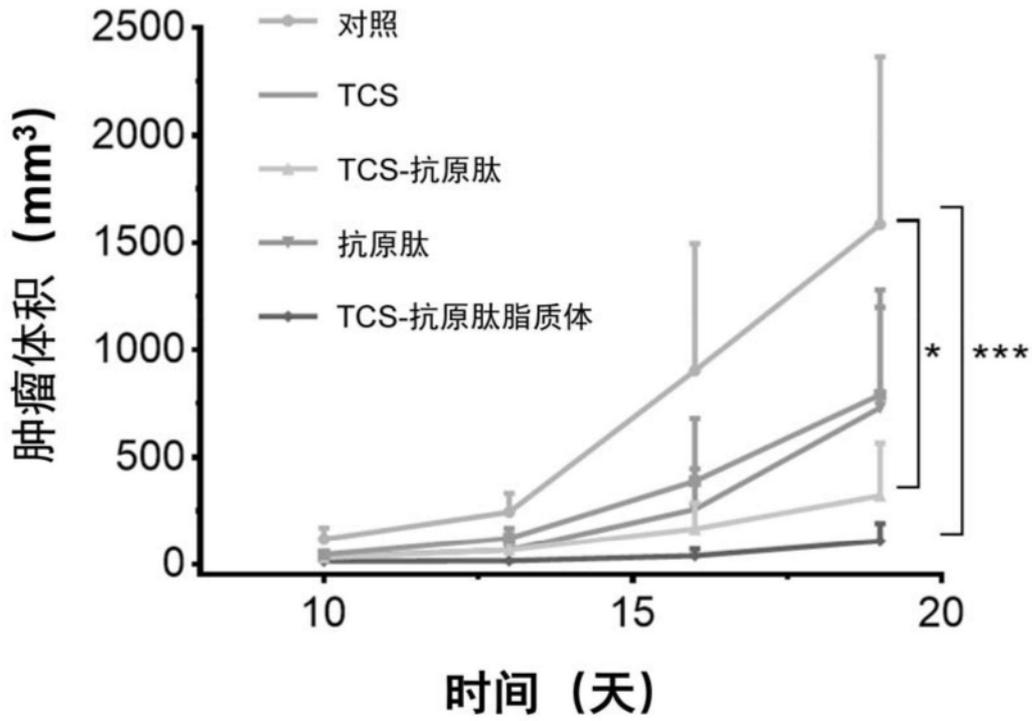


图24

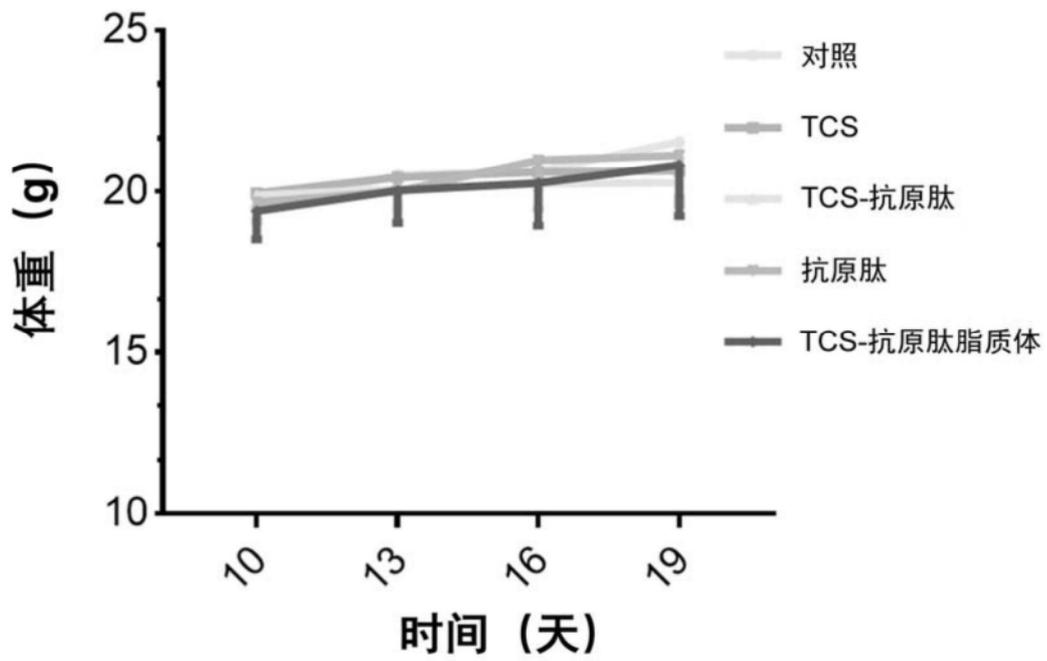


图25

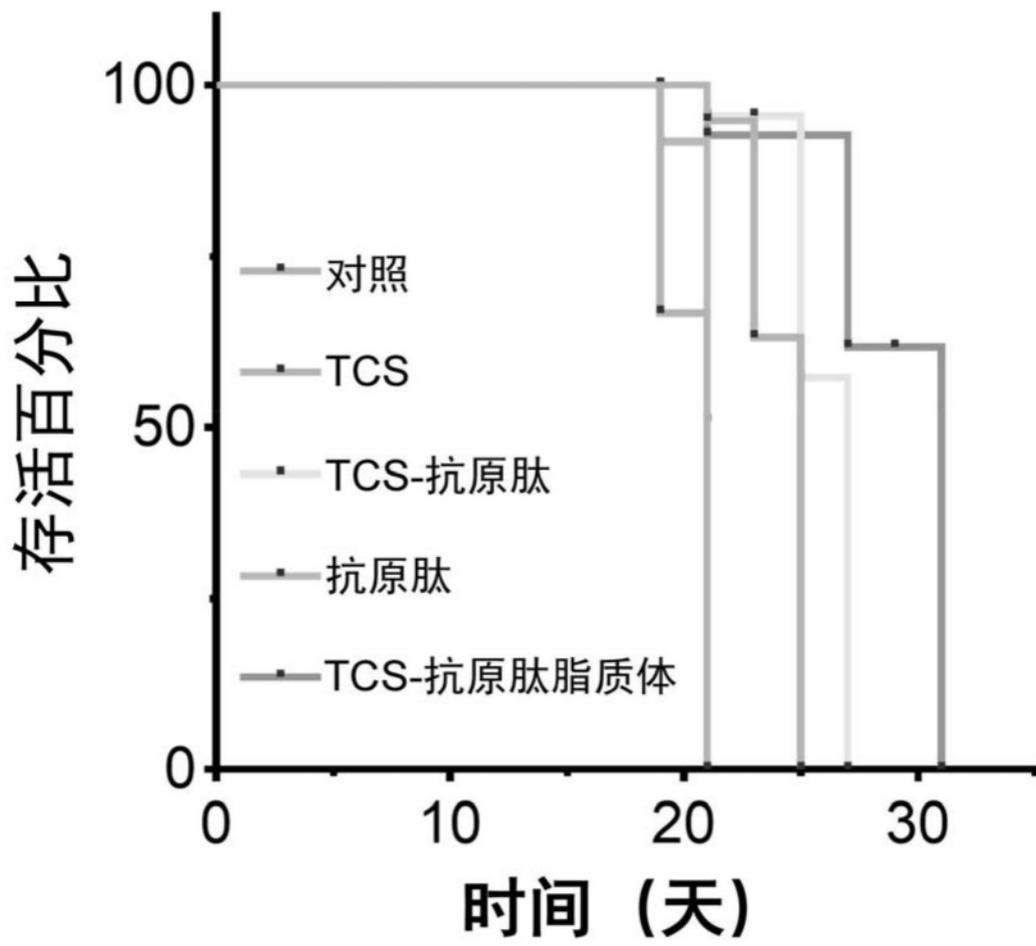


图26

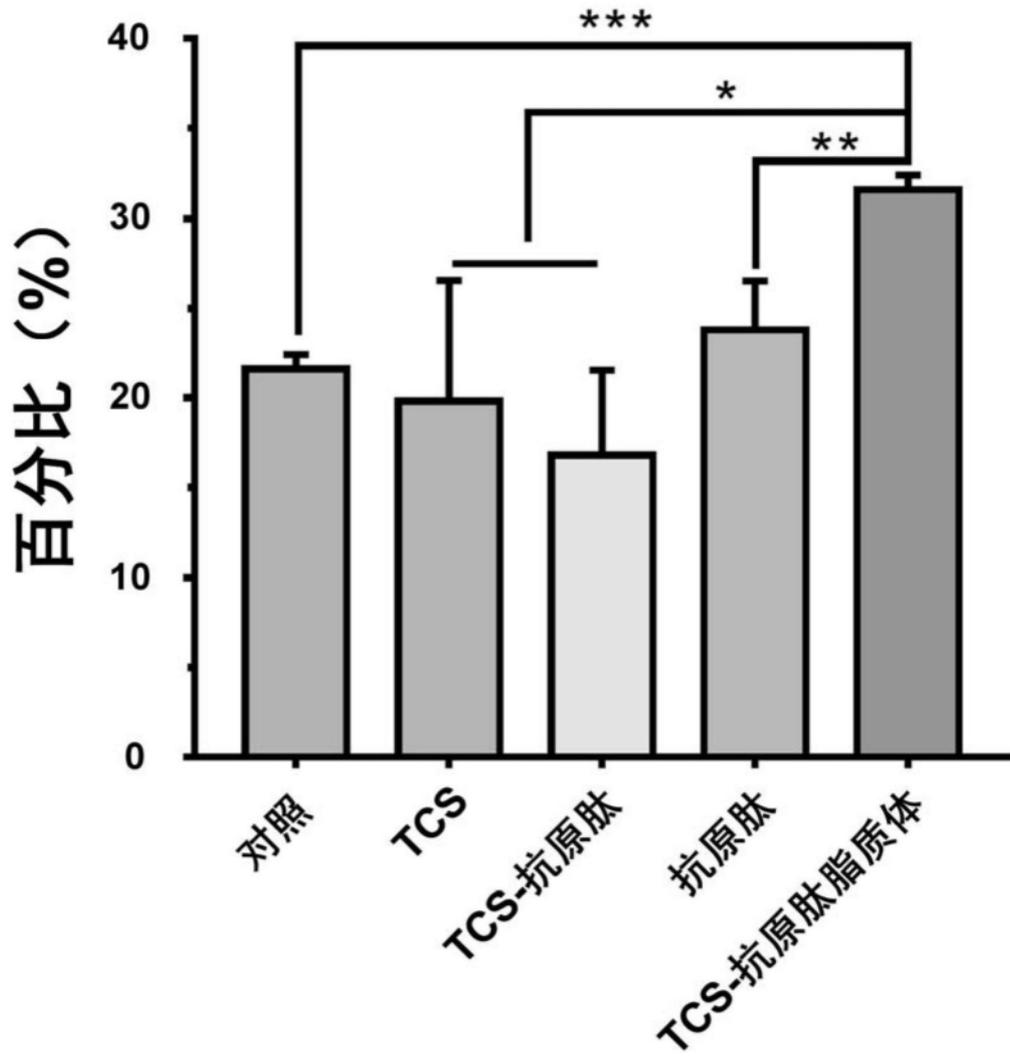


图27

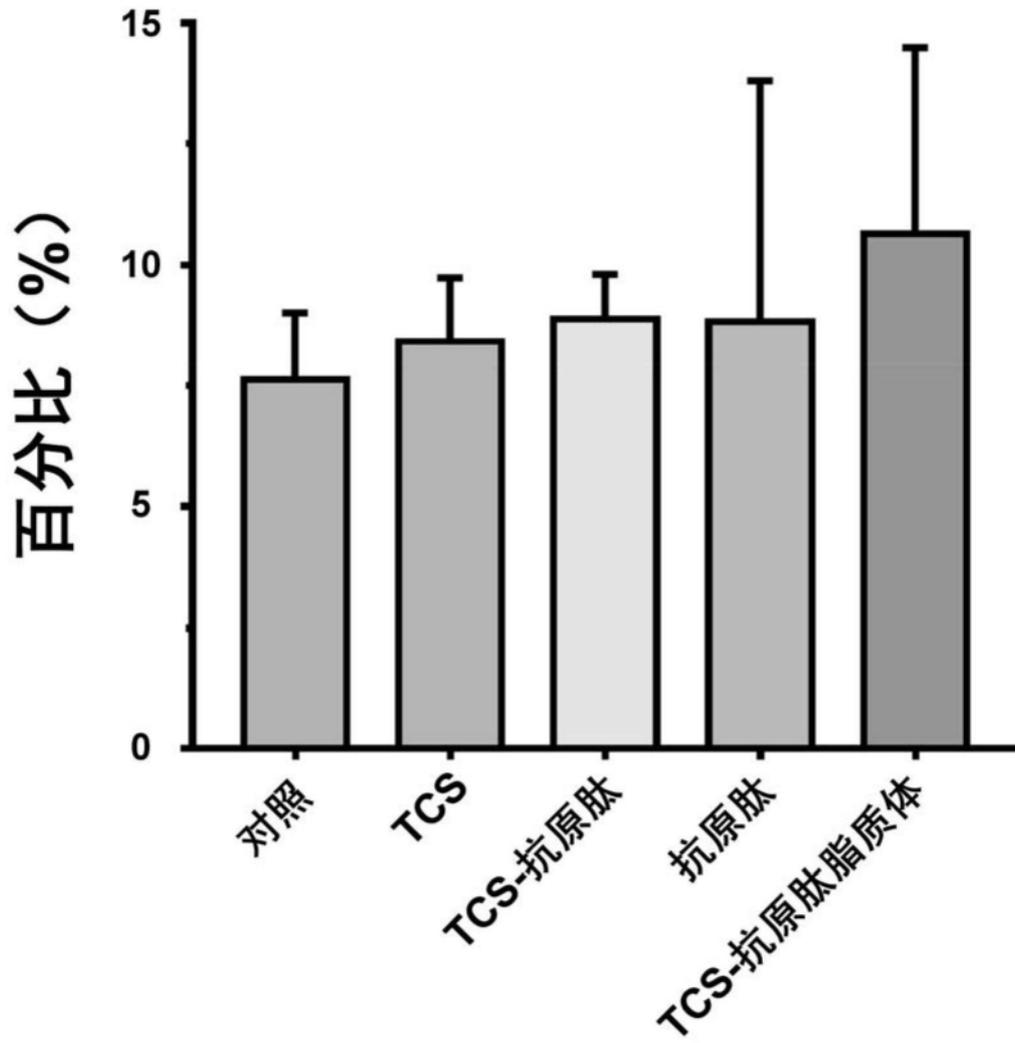


图28