

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2019年5月31日 (31.05.2019)



(10) 国际公布号  
**WO 2019/101062 A1**

(51) 国际专利分类号:

*A61K 39/00* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 39/39* (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)  
*A61K 39/235* (2006.01) *C12N 15/861* (2006.01)  
*A61K 39/275* (2006.01) *C12N 15/863* (2006.01)  
*A61K 31/555* (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/116393

(22) 国际申请日: 2018年11月20日 (20.11.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201711190257.8 2017年11月24日 (24.11.2017) CN

(71) 申请人: 长春百克生物科技股份公司 (CHANGCHUN BCI BIOTECHNOLOGY CO.) [CN/CN]; 中国吉林省长春市高新开发区火炬路1260号, Jilin 130012 (CN)。 吉林大学 (JILIN

UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国吉林省长春市前进大街2699号, Jilin 130012 (CN)。

(72) 发明人: 孔维 (KONG, Wei); 中国吉林省长春市高新开发区火炬路1260号, Jilin 130012 (CN)。 张海红 (ZHANG, Haihong); 中国吉林省长春市前进大街2699号, Jilin 130012 (CN)。 于湘晖 (YU, Xianghui); 中国吉林省长春市前进大街2699号, Jilin 130012 (CN)。 陆臻桢 (LU, Zhenzhen); 中国吉林省长春市前进大街2699号, Jilin 130012 (CN)。 刘晨露 (LIU, Chenlu); 中国吉林省长春市前进大街2699号, Jilin 130012 (CN)。 徐平 (XU, Ping); 中国吉林省长春市前进大街2699号, Jilin 130012 (CN)。 耿飞 (GENG, Fei); 中国吉林省长春市前进大街2699号, Jilin 130012 (CN)。 谢雨 (XIE, Yu); 中国吉林省长春市前进大街2699号, Jilin 130012 (CN)。 郭倩倩 (GUO, Qianqian); 中国吉林省长春市前进大街2699号, Jilin 130012 (CN)。

(54) Title: RECOMBINANT VACCINE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 重组疫苗及其应用

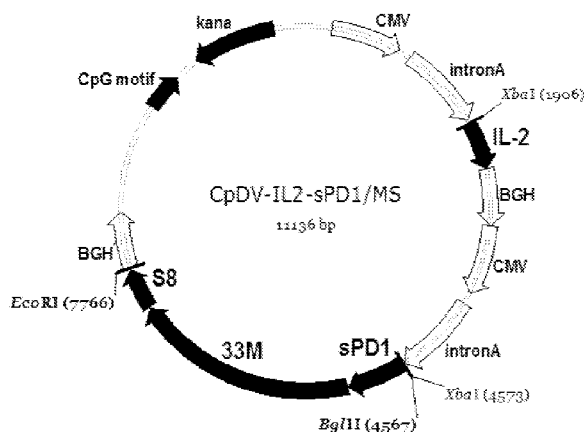


图 1

1-e

(57) Abstract: The present invention relates to the technical field of biotech drugs and in particular relates to a recombinant vaccine and an application thereof. The present invention provides a molecular assembly, comprising soluble PD-1, MUC1 and Survivin. A vaccine prepared by the molecular assembly can produce good immunogenicity and anti-tumor activity. The vaccine immunity provided according to the present invention can produce specific antibody responses and specific cellular immune responses for MUC1 and Survivin. Compared with DNA vaccine CpDV-IL2-MS, CpDV-IL2-sPD1/MS has a more significant anti-tumor effect in tumor-bearing mice. The invention further provides a combination of therapeutic vaccines and chemotherapeutic drugs.

[见续页]



WO 2019/101062 A1

(74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司(PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区中关村南大街1号16幢一层63201号, Beijing 100873 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

**本国际公布:**

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 本发明涉及生物技术药物技术领域, 尤其涉及重组疫苗及其应用。本发明提供了分子组合, 包括可溶性PD-1、MUC1和Survivin。以该分子组合制备疫苗, 能够产生良好的免疫原性与抗肿瘤活性。本发明提供的疫苗免疫可产生针对MUC1、Survivin的特异性抗体应答和特异性细胞免疫应答。与DNA疫苗CpDV-IL2-MS相比, CpDV-IL2-sPD1/MS在荷瘤小鼠中具有更显著的抗肿瘤效应。本发明进一步提供了治疗性疫苗与化学治疗药物的联合方案。

## 重组疫苗及其应用

## 技术领域

本发明涉及生物技术药物技术领域，尤其涉及重组疫苗及其应用。

## 5 背景技术

癌症或恶性肿瘤是威胁人类健康的杀手，肿瘤的诱发原因错综复杂，我们至今缺乏对其具体形成机制的深刻理解。最近的研究表明，机体免疫系统与肿瘤细胞间存在循环相互作用，即免疫系统能够识别“非我”成分的癌细胞，癌细胞也能通过多种途径逃避机体免疫系统的监控和攻击，造成患者体内肿瘤细胞的扩散转移。肿瘤免疫逃逸的分子机制包括：肿瘤抗原表达下调或丢失，肿瘤细胞分泌具有免疫抑制功能的可溶性细胞因子，肿瘤微环境招募免疫抑制性淋巴细胞，以及肿瘤细胞上调表达负性协同刺激信号等。其中，在肿瘤局部微环境及干扰素 $\gamma$ 等细胞因子的诱导下，活化的T细胞上大量表达负性共刺激分子，这些免疫抑制调控分子将直接影响效应细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的抗肿瘤活性，使其杀伤功能减弱甚至丧失。目前发现的抑制性协同刺激分子主要有

10 CTLA4/CD80(CD86)、PD1/PD-L1(PD-L2)、BTLA/HVEM、TIM3/GAL9等。

15

人程序性细胞死亡蛋白1 (Programmed Death-1,PD-1) 又名CD279，它与两个配体PD-L1(B7H1,CD274)和PD-L2(B7DC,CD273)同属免疫球蛋白超家族I型跨膜糖蛋白，由胞浆区、跨膜锚定区和胞外位点结合域三部分构成。介导PD-1信号免疫抑制功能的关键结构，是位于胞内信号转导区的免疫受体酪氨酸转换基序 (Immunoreceptortyrosine-based switch motif, ITSM)，当配受体偶联时，ITSM基序启动酪氨酸磷酸化程序以招募相关磷酸酶，使下游的信号通路PI3K/AKT (磷脂酰肌醇3激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶) 去磷酸化，从而导致细胞因子合成的中断和T细胞效应不敏感等。PD-1/PD-L1信号通路在正常组织器官及外周淋巴组织低表达或诱导性表达，对维持机体免疫耐受、防止自身免疫病的发生具有重要意义；而肿瘤部位PD-1分子的高表达，则加速了活化T细胞的凋亡。

20

25 2013年，科学杂志授予免疫检查点阻断疗法年度重大科学突破，免疫治疗也真正使人们看到治愈癌症的希望。免疫检查点阻断疗法 (Immune Checkpoint Blockade) 即应用抑制剂阻断负性调节T细胞的共抑制信号通路，解除T细胞抑制并重新释放其免疫活性。当前开发的抑制剂主要是人源化单克隆抗体，分别阻断两个重要的免疫检查点——细胞毒性T淋巴细胞蛋白4(CTLA4)和PD-1。2014年，Herbst等报导一种能有效阻断PD-1配体

30 PD-L1的单抗药物PMDL3280A治疗65例化疗无效的膀胱癌患者，结果30例PD-L1阳性患者中有13例(43%)产生明显的抑瘤肿瘤的效应，其中2人达到病情完全缓解；另外，在PD-L1阴性患者中也有11%的应答率。由此，体现出检查点阻断药物的抗肿瘤免疫应答优势，为癌症免疫治疗提供了新的研究思路。与此同时，单抗类抑制剂也存在一些弊端使得药物临床应用受到限制。例如，部分患者的肿瘤组织免疫组化检测显示没有T淋巴细胞浸润现象，可能导致此部分患者单抗治疗无效；也有一些患者在接受抗CTLA4抗体治

35 疗后，出现致命的自身免疫病相关的不良反应；此外，人源化单克隆抗体制作成本较高，用药费用昂贵。这些问题都说明检查点阻断治疗需建立更加完善的适应症治疗者筛选程序和治疗方案，而目前开发的PD-1抗体形式阻断剂则无法引导抗肿瘤主动免疫，其阻断

剂形式尚待进一步优化。文献资料显示,一种可溶型PD-1(sPD-1)蛋白可与配体PD-L1识别并结合,可作为另一PD-1/PD-L1信号通路阻断剂的形式应用于抗肿瘤免疫。

### (1) 可溶性PD-1分子的生物学特性

共刺激蛋白通常存在两种形式:锚定于细胞膜上或分泌到胞外,可溶型分子保留了膜型分子的胞外配受体结合域,以游离方式通过血液循环作用于远端效应分子,参与调节机体免疫。现已证实,天然的人PD-1分子包含上述两种蛋白形式,且膜型与可溶型PD-1(Soluble PD-1, sPD1)皆由PDCD1基因编码,其中,所编码的全长mRNA翻译产物为膜型分子,而一种缺失外显子3的mRNA剪接变体则直接翻译成sPD1。sPD1形成的另一种方式,可能是膜型PD-1在蛋白水解酶作用下脱落产生。sPD-1的IgV-IgC样结构,介导与配体PD-L1和PD-L2的结合,但由于缺乏胞内抑制基序,无法启动下游免疫抑制信号。Wan等检测类风湿性关节炎患者的关节滑液及外周血中都有sPD1分子的高表达,同时伴随IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-21等T细胞活化相关细胞因子水平升高。

人与小鼠PD-1和PD-L1蛋白的同源性分别达60%和70%,并且胞外结合关键位点的一级序列高度保守。体外试验结果表明重组人sPD1融合蛋白与小鼠的PD-L1、PD-L2有交叉结合作用,说明人源sPD-1也能阻断小鼠PD-1抑制信号通路。

### (2) 可溶型PD-1的生理功能

可溶型协同刺激分子参与调节机体免疫的相关研究,包括有sCD80、sLAG3、sPD1和sBTLA等,这些分子在病毒感染、肿瘤和自身免疫病等中有各自的生理功能。sPD1分子的免疫调节作用具体表现在四个方面:①是促进T淋巴细胞上一些激活型细胞因子的分泌(IFN- $\gamma$ 、IL-2等),同时减少抑制型因子IL-10和TGF- $\beta$ ;②sPD1作用能促进特异性CD4阳性和CD8阳性T细胞的增殖,并且活化的T细胞上调抑凋亡基因Bcl-x1的表达,使T细胞凋亡活性减弱;③流式检测sPD1分子对DC细胞的影响,观察到CD80、CD86、IL-12及MHC-II类分子荧光强度均有显著提升,表明可溶性PD-1能够促进DC细胞的成熟;④sPD-1可通过有靶向DC而促进CD8<sup>+</sup>T细胞的功能。有关于sPD1分子激活机体免疫的具体分子机制尚待研究,但我们认为其生理功能的发挥有赖于抗原特异性细胞免疫应答,单独的sPD1分子是不具备特异性免疫效应的。

### (3) 可溶型PD-1在抗肿瘤免疫中的应用

可溶性PD1分子作为一种形式的PD-1通路阻断剂,已有一定的临床前应用基础。Shin等,以疱疹病毒胸苷激酶(HSVtk)为靶点,构建了携载重组HSVtk基因和重组可溶性sPD1-Ig基因双顺反子的条件复制型腺病毒载体。将此双基因联合腺病毒进行瘤内注射,基因治疗结直肠癌肿瘤模型小鼠。结果显示,联合治疗组抑瘤效果达90%,与单一的HSVtk治疗相比有良好的协同效果;而单独的sPD1基因治疗组,则没有任何抗肿瘤作用;当删除小鼠体内CD8阳性T细胞后,sPD1的协同抗瘤作用消失。

癌症的免疫治疗中,Chen等考察了模式性sPD-1-p24抗原融合核酸疫苗对表达异种抗原GAG的恶性间皮细胞瘤的抑瘤效果。肌肉接种sPD1-p24 DNA疫苗的荷瘤小鼠,生存期达到100%,八个月后检测小鼠的特异性体液免疫和细胞免疫,结果IgG1/IgG2a及特异性CD8<sup>+</sup>T细胞数,都依然维持在高水平,体现了sPD-1抗肿瘤免疫应答是长效性。进一步研究发现,sPD-1能激发IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ 双阳T细胞的大量扩增,帮助T细胞杀伤肿瘤。另外,sPD1-p24极大地减少了免疫早期(六周以内)外周以及肿瘤微环境中的抑制因素,具体表现

在骨髓来源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSC)与调节性T细胞等抑制性T细胞数目的减少。

综上所述,可溶性PD1分子竞争性与PD-L抑制性通路结合而阻断PD1/PD-L1信号通路,同时具有增强特异性免疫效果。与抗体类药物相比,重组sPD-1疫苗的制备过程相对简单、成本较低,我们相信sPD-1用作PD-1途经阻断剂有潜在的临床应用价值。

#### (4) 肿瘤基因疫苗

本发明的发明人前期研究表明,以生存素(Survivin)和粘蛋白1(MUC1)为靶点的融合基因疫苗在抗肿瘤免疫治疗中具有一定的应用价值。Survivin属抑制凋亡蛋白超家族,主要功能是抵抗细胞凋亡并调控细胞分裂,Survivin特异性表达于胚胎组织及癌细胞,是理想的肿瘤免疫治疗靶点;MUC1是I型跨膜糖蛋白,由核心蛋白和多糖支链构成,其中核心蛋白胞外肽段包含数目不等的串联重复序列(VNTRs),MUC1在肿瘤中的表达因糖基化不完全而暴露多肽核心VNTR区,这些新的多肽表位为T细胞提供了潜在免疫攻击目标。

发明人基于两个方面进行MUC1 VNTRs和Survivin融合表达DNA疫苗抗原表位设计:一是疫苗安全性,二是疫苗免疫原性。根据文献,全长Survivin在体内以二聚体形式发挥抗凋亡功能,且二聚形成关键位点是N端第6、第7和第10位氨基酸残基。因此,发明人采用了N端缺失7个氨基酸残基的Survivin缺失剪切体(简称S8)来设计疫苗,如此既提高疫苗安全性,又在最大程度上保证Survivin表位免疫原性;发明中所涉及的另一抗原表位为MUC1 VNTR串联重复序列,该串联重复结构包含33拷贝MUC1 VNTRs(简称为33M),其中包含免疫显性结构域PDTRP序列,能够介导高效的MUC1特异性抗体反应并提高特异性CTL免疫效应。

前期研究结果显示,以33M和S8融合核酸为靶点的DNA疫苗(即MS疫苗)能够有效增强疫苗免疫的广谱性和有效性(参见申请号为200910252427.X的申请文件)。另外,MS疫苗构建于经过发明人改造的VR1012双顺反子载体CpDV中,其载体骨架包含一段CpG基序,同时能够独立编码白介素-2(IL-2)蛋白,它们作为免疫佐剂与粘蛋白1/生存素融合肿瘤抗原同步表达,其免疫增强效果已在发明人前期研究工作中开展并验证(参见专利号为ZL200910252427.x和ZL201110086366.1的专利文件)。在此基础上,进一步探究引入sPD-1的后疫苗诱导的免疫原性和抗肿瘤效果的增强作用。

#### 发明内容

鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一种重组疫苗及其应用,本发明将sPD1进一步与肿瘤抗原MS进行组合,以sPD1阻断抗原呈递DC细胞过程中所涉及的PD-1/PD-L负性信号通路从而使疫苗具有更好的免疫原性和免疫效应。

本发明提供了一种分子组合,包括PD-1、MUC1和Survivin。

本发明所述的PD-1、MUC1和Survivin可为蛋白分子亦可为核酸分子,本发明对此不做限定。

sPD-1蛋白指能够阻断PD-1通路的可溶型PD-1蛋白,sPD-1核酸指能够编码sPD-1蛋白的DNA分子。本发明中,所述sPD-1为DNA或蛋白,为人sPD-1胞外段(记为sPD1),其DNA序列来自Genbank登录号为NM\_005018.2的基因。本发明采用的sPD-1的DNA序列如SEQ ID NO:1所示,所述sPD-1的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

MUC1 蛋白衍生自野生 MUC1 VNTR 蛋白和(或)其突变体和(或)其截短体, MUC1 核酸指能够编码 MUC1 蛋白的 DNA 分子。本发明中, MUC1 的 DNA 序列如 SEQ ID NO:3 所示; 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

Survivin 蛋白衍生自野生 Survivin 蛋白和(或)其突变体和(或)其缺失剪接体, 优选为 N 端缺失 7 个氨基酸残基的 Survivin。发明中, Survivin 的 DNA 序列如 SEQ ID NO:5 所示; 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。

本发明中, PD-1、MUC1 和 Survivin, 三者可融合(记为 sPD1/MS), 亦可以非融合的形式联合使用(记为 sPD1+MS), 本发明对此不做限定。

本发明所述的分子组合在制备防治肿瘤的产品中的应用。

本发明实验表明, 以本发明提供的抗原制备疫苗能够具有防治肿瘤的作用。且 sPD1/MS 疫苗组的效果显著优于 MS 疫苗组 ( $p < 0.05$ ), 也显著优于 sPD1 疫苗 ( $p < 0.05$ )。并且, 本发明实验证明, sPD1/MS 融合制得的疫苗与 sPD1+MS 联合免疫的方式相比, 所诱导产生的特异性细胞免疫反应处于较为一致的水平, 表明 sPD1 和 MS 作为抗原, 能够对肿瘤多靶点产生作用, 而融合或非融合的方式对免疫效果的影响不显著 ( $p > 0.05$ )。

以本发明提供抗原制得疫苗能够防治的肿瘤选自黑色素瘤、结直肠癌、大肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、胆管癌、胃癌、食管癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、鼻咽癌、口腔癌、宫颈癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、鳞状细胞癌、淋巴瘤、脑癌、恶性胶质细胞瘤、髓母细胞瘤、淋巴肉瘤、绒毛膜上皮癌、骨肉瘤、甲状腺癌。

本发明以乳腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、结直肠癌、黑素瘤荷瘤小鼠作为实验对象, 结果表明, 以本发明提供抗原制得的疫苗能够起到良好的抑制肿瘤生长的作用, 且荷瘤小鼠淋巴细胞特异性分泌 IFN- $\gamma$  的能力也得到显著提高 ( $P < 0.01$ )。

本发明所述的防治肿瘤的产品中包括疫苗。

实验表明, 本发明提供抗原制得的疫苗能够起到良好的防治肿瘤的作用。所述疫苗为 DNA 载体疫苗、病毒载体疫苗、蛋白疫苗和/或树突状细胞疫苗。在一些具体实施例中, 单独给予 DNA 载体疫苗、病毒载体疫苗或蛋白疫苗即可既起到抑制肿瘤生长的作用。而在另一些实施例中, 数据表明, 初免给予 DNA 载体疫苗, 而以重组腺病毒疫苗加强免疫可以显著提升免疫效果。另有数据表明, 在免疫的同时给予抗肿瘤的药物, 能够起到增效协同的作用。所述抗肿瘤的药物为化疗药物, 优选为铂类化合物、紫杉醇和/或吉西他滨和/或顺铂。一些实施例中, 化疗药物为奥沙利铂。以奥沙利铂为实验对象, 结果表明, 重组 sPD1/MS 疫苗联合奥沙利铂治疗组荷瘤小鼠的生存期与单独的奥沙利铂治疗组荷瘤小鼠(生命延长 14%)相比, 体现显著的生命延长作用 ( $P < 0.05$ )。

因此, 本发行提供的防治肿瘤的产品中, 可包括 DNA 载体疫苗、病毒载体疫苗、蛋白疫苗和/或树突状细胞疫苗中的一种或两者以上的组合。也可以还包括化疗药物, 如奥沙利铂。

本发明还提供了包括 PD-1、MUC1 和 Survivin 的 DNA 序列的重组载体。

组织型纤溶酶原激活因子(tissue plasminogen activator,tPA), 简称 tPA 信号肽, 可有效促进蛋白的分泌, 提高其诱导抗体产生的能力。为了能够提高融合蛋白 sPD1/MS 在胞外的分泌表达能力, 本发明在 PD-1 的 DNA 序列的 5'端修饰 tPA 信号肽序列。

本发明中, sPD-1 与 tPA 信号肽序列相连的 DNA 序列如 SEQ ID NO:7 所示。

其中, tPA 信号肽的长度为 69bp, 其序列如 SEQ ID NO:11 所示。

本发明一些具体实施例中, MUC1 和 Survivin 连接的 DNA 序列(记为 MS 序列)如 SEQ ID NO:8 所示。

根据所需构建的疫苗形式, 可以不同的骨架构建不同的重组载体, 但这些重组载体  
5 中, 都应包括与 tPA 信号肽相连接的 PD-1 序列, MUC1 序列和 Survivin 序列, 本发明对  
所述与 tPA 信号肽相连接的 PD-1 序列, MUC1 序列和 Survivin 序列的连接顺序不做限定,  
其实施皆在本发明的保护范围之内。在本发明的实施例中, 融合片段的连接顺序为: 由 5'  
端至 3'端, tPA 信号肽、PD-1 序列, MUC1 序列、Survivin 序列。

为了构建 DNA 载体疫苗, 本发明提供了一种重组载体, 其包括骨架载体、SEQ ID  
10 NO:7 所示的 DNA 序列、SEQ ID NO:8 所示的 DNA 序列和佐剂序列。

在本发明实施例中, 骨架载体为 CpDV。CpDV 载体由申请号为 201110086366.1 的  
发明专利构建。

所述佐剂序列为分子内佐剂, 选自细胞因子类佐剂, 包括但不限于白介素 2(IL-2)、  
免疫刺激 DNA 的非甲基化 CpG 基序以及集落刺激因子 GM-CSF。本发明实施例中, 采  
15 用的佐剂序列为白介素-2, 其 DNA 序列如 SEQ ID NO:9 所示。

一些实施例中, 佐剂序列的插入位点为 *Xba*I 和 *Bam*HI 酶切位点之间; SEQ ID NO:7  
所示的 DNA 序列和 SEQ ID NO:8 所示的 DNA 序列的插入位点为 *Bgl*II 和 *Eco*RI 酶切位  
点之间。

一些实施例中, 本发明提供的重组载体(记为 CpDV-IL2-sPD1/MS)的图谱如图 1-d  
20 所示, 其制备方法为在骨架载体的 *Xba*I 和 *Bam*HI 酶切位点之间插入佐剂序列, 然后在  
*Bgl*II 和 *Eco*RI 酶切位点之间插入 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 所示序列。

本发明提供的重组载体在制备防治肿瘤的产品中的应用。

所述防治肿瘤的产品为 DNA 载体疫苗。

本发明还提供了一种防治肿瘤的疫苗, 其中包括本发明提供的重组载体。

25 优选的, 所述重组载体为 CpDV-IL2-sPD1/MS。

本发明提供的疫苗的制备方法为, 在骨架载体的 *Xba*I 和 *Bam*HI 酶切位点之间插入  
佐剂序列, 然后在 *Bgl*II 和 *Eco*RI 酶切位点之间插入 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 所示  
序列, 制得重组载体。

接种本发明提供的 DNA 载体疫苗的小鼠能产生高效的抗粘蛋白 1 抗体和抗生存素抗  
30 体, 并且两者的抗体滴度可达 10000 以上, 且产生抗体的量也较大, 说明本发明提供的  
DNA 载体疫苗能够启动强烈的特异性体液免疫应答。并且, 实验表明, 本发明提供规定  
DNA 载体疫苗能够有效抑制肿瘤的生长, 所述肿瘤包括乳腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、结  
直肠癌、黑素瘤, 且其效果显著优于 ( $p < 0.05$ ) 单独使用以 MS 为靶点的 DNA 载体疫苗,  
或以 sPD-1 为靶点的 DNA 载体疫苗。由于肿瘤免疫治疗机制的相似性, 认为本发明提供  
35 的 DNA 载体疫苗也能够对黑色素瘤、结直肠癌、大肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、  
胆管癌、胃癌、食管癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、鼻咽癌、口腔癌、宫颈癌、卵巢癌、  
子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、鳞状细胞癌、淋巴瘤、脑癌、恶性胶质细胞瘤、髓母细胞  
瘤、淋巴肉瘤、绒毛膜上皮癌、骨肉瘤、甲状腺癌起到良好的抑制作用。

为了构建重组蛋白疫苗, 本发明还提供了一种重组载体, 包括骨架载体、SEQ ID NO:7

所示的 DNA 序列、SEQ ID NO:8 所示的 DNA 序列。

构建重组蛋白疫苗需获得融合蛋白 (sPD1/MS)，本发明中，融合蛋白的表达采用原核表达系统。为了获得原核表达系统表达的融合蛋白，本发明提供的重组载体中骨架载体为 pRSET B 或 PET 系列载体。

5 一些实施例中，本发明提供的重组载体（记为 pET28a-sPD1/MS）的图谱如图 3-b 所示，其制备方法为在骨架载体的 Nde I 和 Xho I 酶切位点之间插入 sPD1/MS 片段。

为了制备融合蛋白 (sPD1/MS) 本发明提供了一种表达载体，由本发明提供的重组载体转染宿主细胞制得。

所述宿主细胞为大肠杆菌 BL21。

10 本发明还提供了一种融合蛋白，其由本发明提供的重组载体转染宿主细胞制得表达载体后，表达获得。

所述宿主细胞为大肠杆菌 BL21。

所述表达后，还经过纯化的步骤，所述纯化为将培养后的细胞以超声裂解后，离心 30min，沉淀以包涵体溶解 buffer 重悬后、溶解后，上清液经镍柱亲和层析，获得融合蛋白。

本发明制得的融合蛋白在制备防治肿瘤的产品中的应用。

所述防治肿瘤的产品为重组蛋白疫苗。

本发明还提供了一种防治肿瘤的疫苗，包括本发明提供的融合蛋白 (sPD1/MS)。

所述疫苗中还包括佐剂，所述佐剂为  $Al(OH)_3$ 。

20  $Al(OH)_3$  为常见的无机佐剂，其可通过诱导 T 细胞分化和体液免疫反应来提高疫苗的免疫原性，

接种本发明提供的重组蛋白疫苗能够抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长，且荷瘤小鼠脾淋巴细胞特异性分泌  $IFN-\gamma$  的能力也得到提高。所述肿瘤为结直肠癌，由于肿瘤发病机制的相似性，认为本发明提供的 DNA 载体疫苗也能够对黑色素瘤、大肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、胆管癌、胃癌、食管癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、鼻咽癌、口腔癌、宫颈癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、鳞状细胞癌、淋巴瘤、脑癌、恶性胶质细胞瘤、髓母细胞瘤、淋巴肉瘤、绒毛膜上皮癌、骨肉瘤、甲状腺癌起到良好的抑制作用。

25 为了构建病毒载体疫苗，本发明提供了一种重组载体，其中包括骨架载体、SEQ ID NO:7 所示的 DNA 序列、SEQ ID NO:8 所示的 DNA 序列，所述骨架载体为 pSC11 或 pDC316。

30 pSC11 为安卡拉痘病毒 (Modified Vaccinia Ankara, MVA) 常用的穿梭质粒，该载体上具有的胸苷激酶左臂和右臂 (TKL、TKR) 可与 MVA 同源重组，同时通过载体上 lacZ 基因，进行重组 MVA (rMVA) 的蓝斑筛选。一些实施例中，本发明提供的重组载体（记为 pSC11-sPD1/MS）的图谱如图 4-b 所示，该重组载体的制备方法为，在 pSC11-MS 质粒的 *SaI* 酶切位点处插入 sPD1 片段，所述 sPD-1 片段的 5'端连接有 tPA 信号肽片段。所述 pSC11-MS 质粒由申请号为 200910252427.X 的中国发明专利构建。

35 pDC316 为腺病毒常用穿梭质粒，一些实施例中，本发明提供的重组载体（记为 pDC316-sPD1/MS）的图谱如图 4-d 所示，该重组载体的制备方法为，在 pDC316-MS 质粒的 *EcoRI* 酶切位点处插入 sPD1 片段，所述 sPD-1 片段的 5'端连接有 tPA 信号肽片段。



所述 pDC316-MS 质粒由申请号为 200910252427.X 的中国发明专利构建。

为了构建病毒载体疫苗，本发明还提供了一种重组病毒，其以本发明提供的重组载体转染病毒制得。

在一些实施例中，所述重组载体为 pSC11-sPD1/MS，所述病毒为痘病毒。

5 在此实施例中，所述转染为：将空 MVA 病毒感染含有 TK 基因的 BHK-21 的突变细胞，然后使用 lipo2000 试剂将穿梭质粒 pSC11-sPD1/MS 共转染到 BHK 细胞，培养后以培养上清作种毒感染 BHK 细胞后，经筛选得到转染 pSC11-sPD1/MS 的痘病毒。

在一些实施例中，所述重组载体为 pDC316-sPD1/MS，所述病毒为腺病毒。

10 在此实施例中，所述转染为：将 AD 骨架和穿梭质粒 pDC316-sPD1/MS 共转染 293 细胞，经筛选得到转染 pDC316-sPD1/MS 的腺病毒。

所述腺病毒 (AD) 骨架为 pBHGlox $\Delta$ E1,3Cre。

本发明提供的重组病毒在制备防治肿瘤的产品中的应用。

本发明还提供了一种防治肿瘤的疫苗，包括本发明提供的重组病毒。

15 接种本发明提供的重组病毒疫苗能够显著抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长，其中，sPD1/MS 重组痘病毒治疗小鼠的平均肿瘤体积比对照组的肿瘤体积减小约 25%，sPD1/MS 重组腺病毒治疗小鼠的平均肿瘤体积则减小约 23%。所述肿瘤为黑素瘤，由于肿瘤疫苗机制的相似性，认为本发明提供的病毒载体疫苗也能够对结直肠癌、大肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、胆管癌、胃癌、食管癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、鼻咽癌、口腔癌、宫颈癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、鳞状细胞癌、淋巴瘤、脑癌、恶性胶质细胞瘤、髓母细胞瘤、淋巴肉瘤、绒毛膜上皮癌、骨肉瘤、甲状腺癌起到良好的抑制作用。

20 另外，本发明实验表明，初免给予 DNA 载体疫苗，然后以病毒载体疫苗进行加强免疫能够起到显著提升免疫效果的作用。具体表现为，IFN- $\gamma$  分泌增多，免疫应答增强。所述 DNA 载体疫苗中包含 CpDV-IL2-sPD1/MS，所述病毒载体疫苗为痘病毒载体疫苗 (pSC11-sPD1/MS) 或腺病毒载体疫苗 (pDC316-sPD1/MS)。

25 本发明提供了一种防治肿瘤的产品，包括本发明提供的 DNA 载体疫苗、重组蛋白疫苗和/或病毒载体疫苗。

本发明提供的防治肿瘤的产品中，可仅包含一种疫苗，也可包含两种疫苗或两者以上的疫苗组合。

30 另外，本发明实验表明，在免疫的同时给予化疗药物能够起到增效的作用。具体表现为，延长荷瘤小鼠的生存期。在疫苗与化疗联合治疗组中，观察到重组 sPD1/MS DNA 疫苗与奥沙利铂的联合使得小鼠平均生存期较 PBS 组延长 24% ( $P < 0.001$ )，其中重组 sPD1/MS DNA 疫苗联合奥沙利铂治疗组的生存期与单独的奥沙利铂治疗组 (生命延长 14%) 相比，体现显著的生命延长作用 ( $P < 0.05$ )。

35 本发明提供的防治肿瘤的产品中，还包括化疗药物。所述化疗药物选自铂类化合物、紫杉醇或吉西他滨。

另外，研究表明，融合核酸疫苗 CpDV-IL2-sPD1/MS 以及联合免疫的 CpVR-sPD1 与 CpDV-IL2-MS 疫苗都使得 T 淋巴细胞分泌 MS 特异性 IFN- $\gamma$  的 elispot 斑点数目明显增多 ( $P < 0.01$ )。同时，比较 sPD1/MS 疫苗与 sPD1+MS 联合免疫的方式，其所诱导产生的特异性细胞免疫反应处于较为一致的水平，表明 sPD1 基因与 MS 肿瘤抗原基因制备的疫

苗，具有融合核酸疫苗和联合共注射疫苗的多种疫苗形式。

本发明提供的另一种防治肿瘤的产品，包括以 MS 为靶点的疫苗和以 sPD-1 为靶点的疫苗。

所述以 MS 为靶点的疫苗由申请号为 200910252427.X 的中国发明专利构建。

5 所述以 sPD-1 为靶点的疫苗为 CpVR-sPD1，其构建方法为在载体 CpVR 的 *PstI* 和 *BamHI* 酶切位点间插入 sPD1 片段，所述 sPD-1 片段的 5'端连接有 tPA 信号肽片段。所述 CpVR 载体由专利号为 ZL 201110086366.1 的发明专利构建。

在疫苗与化药联合治疗组中，观察到重组 MS 疫苗与奥沙利铂的联合使得小鼠平均生存期较 PBS 组延长 22% ( $P < 0.001$ )。

10 本发明提供的防治肿瘤的产品中，还包括化疗药物。所述化疗药物选自铂类化合物、紫杉醇或吉西他滨。

本发明还提供了一种防治肿瘤的方法，该方法为给予本发明提供的防治肿瘤的产品。

一些具体实施例中，给予本发明提供的产品后，以活体基因导入仪刺激注射位点；所述刺激的电压为 36V；频率 1Hz；脉冲 6 次；脉宽 20ms。

15 一些具体实施例中，给予本发明提供的防治肿瘤的产品的的方法为：给予 DNA 载体疫苗。免疫的策略为采用 DNA 载体疫苗进行初免，再采用 DNA 载体疫苗进行加强免疫。所述初免的次数为 1 次，所述加强免疫的次数为 2 次。所述初免与加强免疫之间间隔 7 天，两次加强免疫间的时间间隔为 7 天。所述 DNA 载体疫苗为 CpDV-IL2-sPD1/MS。

一些具体实施例中，给予本发明提供的防治肿瘤的产品的的方法为：给予重组蛋白疫苗。20 免疫的策略为采用重组蛋白疫苗进行初免，再采用重组蛋白疫苗进行加强免疫。所述初免的次数为 1 次，所述加强免疫的次数为 2 次。所述初免与加强免疫之间间隔 7 天，两次加强免疫间的时间间隔为 7 天。所述重组蛋白疫苗由 VR1012-sPD1/MS 表达的融合蛋白制得。

一些具体实施例中，给予本发明提供的防治肿瘤的产品的的方法为：给予病毒载体疫苗。25 免疫的策略为采用病毒载体疫苗进行初免，再采用病毒载体疫苗进行加强免疫。所述初免的次数为 1 次，所述加强免疫的次数为 1 次。所述初免与加强免疫之间间隔 14 天。所述病毒载体疫苗为痘病毒载体疫苗或腺病毒载体疫苗。

一些具体实施例中，给予本发明提供的防治肿瘤的产品的的方法为：给予 DNA 载体疫苗和病毒载体疫苗。30 免疫的策略为采用 DNA 载体疫苗进行初免，再采用病毒载体疫苗进行加强免疫。所述初免的次数为 3 次，加强免疫的次数为 1 次。所述初免与加强免疫之间间隔 2 周，3 次初免的时间间隔为 2 周。所述病毒载体疫苗为腺病毒载体疫苗。

一些具体实施例中，给予本发明提供的防治肿瘤的产品的的方法为：给予 DNA 载体疫苗和病毒载体疫苗。35 免疫的策略为采用 DNA 载体疫苗进行初免，再采用病毒载体疫苗进行加强免疫。所述初免的次数为 2 次，加强免疫的次数为 1 次。所述初免与加强免疫之间间隔 2 周，2 次初免的时间间隔为 2 周。所述病毒载体疫苗为痘病毒载体疫苗。

一些具体实施例中，给予本发明提供的防治肿瘤的产品的的方法为：给予 DNA 载体疫苗和病毒载体疫苗。免疫的策略为采用 DNA 载体疫苗进行初免，再采用病毒载体疫苗进行加强免疫。所述初免的次数为 2 次，加强免疫的次数为 1 次。所述初免与加强免疫之间间隔 2 周，2 次初免的时间间隔为 2 周。所述病毒载体疫苗为腺病毒载体疫苗。

一些具体实施例中,给予本发明提供的防治肿瘤的产品的的方法为:给予 DNA 载体疫苗和病毒载体疫苗。免疫的策略为采用以 MS 为靶点的疫苗和以 sPD-1 为靶点的疫苗联合进行初免,再采用病毒载体疫苗进行加强免疫。所述初免的次数为 2 次,加强免疫的次数为 1 次。所述初免与加强免疫之间间隔 2 周,2 次初免的时间间隔为 2 周。所述病毒载体疫苗为腺病毒载体疫苗。

一些具体实施例中,给予本发明提供的防治肿瘤的产品的的方法为:给予 DNA 载体疫苗和病毒载体疫苗。免疫的策略为采用 DNA 载体疫苗进行初免,再采用病毒载体疫苗进行加强免疫。免疫同时给予化疗药物。所述初免的次数为 2 次,加强免疫的次数为 1 次。所述初免与加强免疫之间间隔 7 天,2 次初免的时间间隔为 7 天。第 1 次给予化疗药物的时间为第 2 次初免后的次日,此后每 5 天给予化疗药物,共给药 4 次。。所述病毒载体疫苗为痘病毒载体疫苗。所述化疗药物为奥沙利铂。

本发明提供了分子组合,包括 PD-1、MUC1 和 Survivin。以该抗原制备疫苗,能够具有良好的免疫原性与抗肿瘤活性。本发明提供的疫苗免疫可产生针对 MUC1、Survivin 的特异性抗体应答(见图 5)和特异性细胞免疫应答(见图 6)。与 DNA 疫苗 CpDV-IL2-MS 相比,CpDV-IL2-sPD1/MS 在荷瘤小鼠中具有更显著的抗肿瘤效应,其中对黑素瘤的肿瘤生长抑制率约 53%(见图 10),对黑素瘤荷瘤小鼠的生存期的生命延长率约 19%(见图 10);本发明进一步提供了治疗性疫苗与化学治疗药物的联合方案。在一个实施案例中,本发明提供的疫苗与奥沙利铂联合给药抑瘤率达到 74%,荷瘤小鼠肿瘤生长得到显著性抑制(见图 11);而本本发明提供的疫苗和奥沙利铂给药组小鼠的平均生存期 62 天,其生命延长效果与阳性对照奥沙利铂组相比具统计意义(见图 11);此外,将本发明提供的疫苗应用于小鼠乳腺癌、肺癌、肝癌和胃癌等模型的治疗(见图 13、14、15、16,与阴性对照组相比,疫苗组的肿瘤生长速率都明显减缓。

#### 附图说明

图 1 示 DNA 质粒载体及质粒 CpDV-IL2-sPD1/MS 的构建策略;其中,图 1-a 示重组 DNA 质粒 CpDV-IL2-MS 和质粒 CpDV-IL2-sPD1/MS;图 1-b 示质粒 T Easy-sPD1/MS 的构建策略;图 1-c 示质粒 T Easy-tPA/sPD1 的构建策略;图 1-d 示载体 CpDV-IL2 的构建策略;图 1-e 示重组 DNA 质粒 CpDV-IL2-sPD1/MS 图谱;

图 2 示 Western Blot 印迹分析显示 CpDV-IL2-MS、CpDV-IL2-sPD1/MS、CpVR-sPD1 的真核蛋白表达情况;其中,图 2-a 示以抗 MUC1 抗体检测蛋白表达情况;图 2-b 示以抗 Survivin 抗体检测蛋白表达情况;图 2-c 示以抗 PD-1 抗体检测蛋白表达情况;

图 3 示 pET28a-sPD1/MS 质粒的构建;其中,图 3-a 示重组质粒 pET28a-sPD1 图谱;图 3-b 示重组质粒 pET28a-sPD1/MS 图谱;

图 4 示重组 sPD1/MS 病毒载体疫苗的构建;其中,图 4-a 示重组穿梭质粒 pSC11-MS 图谱;图 4-b 示重组穿梭质粒 pSC11-sPD1/MS 图谱;图 4-c 显示重组穿梭质粒 pDC316-MS 图谱;图 4-d 显示重组穿梭质粒 pDC316-sPD1/MS 图谱;

图 5 示 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗诱导免疫小鼠的抗粘蛋白 1 和生存素的体液免疫应答;图 5-a 示 Balb/c 小鼠分别免疫 PBS 及重组 MS、sPD1/MS 和 sPD1 DNA 质粒后的血清 ELISA 检测抗粘蛋白 1 抗体,图 5-b 示免疫小鼠抗生存素抗体水平;图 5-c 示免疫小鼠抗可溶性 PD1 抗体水平;图 5-d 示免疫小鼠中粘蛋白 1 的 IgG1 和 IgG2a 抗体的血清水

平; 图 5-e 示免疫小鼠抗生存素的 IgG1 和 IgG2a 抗体的血清水平;

图 6 示 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗引发小鼠体内特异性细胞免疫应答; Balb/c 小鼠分别免疫 PBS、及重组 MS、sPD1/MS 和 sPD1 DNA 质粒, 取脾淋巴细胞分析粘蛋白 1 和生存素特异性免疫应答水平; 其中, 图 6-a 示为各组免疫小鼠脾淋巴细胞针对 MUC1 表位特异性的分泌 IFN- $\gamma$  的 Elispot 斑点数目, 图 6-b 示针对 Survivin 表位特异性分泌 IFN- $\gamma$  的 Elispot 斑点数目; 图 6-c 示各组免疫小鼠的脾淋巴细胞的 CTL 活性, 以脾淋巴细胞作效应细胞 E, 并选用稳定表达粘蛋白 1 和生存素蛋白的 CT26 细胞作靶细胞 T, 通过碘化丙啶和 CFSE 双荧光染料染色后所标记的杀伤靶细胞群百分比来表征 CTL 反应强度; 图 6-d 示 sPD1 与 MS 肿瘤疫苗的联合形式对小鼠脾淋巴细胞特异性分泌 IFN- $\gamma$  的 Elispot 斑点数目;

图 7 示 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗的 Prime-Boost 免疫策略; Balb/c 小鼠分别免疫 PBS、重组 sPD1/MS DNA 疫苗、重组腺病毒疫苗 rAD-MS, 以及 DNA 疫苗/rAD-MS 疫苗, 通过 Elispot 法检测各组免疫小鼠脾淋巴细胞针对粘蛋白 1 和生存素的特异性免疫应答活性; 其中, 图 7-a 示各组免疫小鼠脾淋巴细胞针对 MUC1 表位特异性的分泌 IFN- $\gamma$  的 Elispot 斑点数目, 图 7-b 示针对 Survivin 表位特异性分泌 IFN- $\gamma$  的 Elispot 斑点数目;

图 8 示 sPD1/MS 重组病毒疫苗的 Prime-Boost 免疫策略; Balb/c 小鼠分别免疫 PBS、rMVA-sPD1/MS, 以及 DNA 疫苗/rMVA-sPD1/MS 疫苗, 通过 Elispot 检测各组小鼠脾淋巴细胞针对粘蛋白 1 和生存素的特异性免疫应答活性, 其中, 图 8-a 示各组小鼠脾淋巴细胞针对 MUC1 表位的特异性分泌 IFN- $\gamma$  的 Elispot 斑点数目, 图 8-b 示针对 Survivin 表位特异性分泌 IFN- $\gamma$  的 Elispot 斑点数目;

图 9 示 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗在黑素瘤模型小鼠的治疗作用; 其中, 图 9-a 示在 C57BL/6 小鼠皮下接种 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>B16 肿瘤细胞后, 分别给予 PBS、MS 疫苗和 sPD1/MS 疫苗, 测量肿瘤大小至接种后第 17 天的情况; 图 9-b 示观察小鼠生存情况观察至肿瘤接种后第 50 天;

图 10 示 sPD1/MS 重组病毒疫苗在黑素瘤模型小鼠的治疗作用; 在 C57BL/6 小鼠皮下接种 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>B16 肿瘤细胞后, 分别给予 PBS、rMVA-sPD1/MS 重组痘病毒疫苗和 rDA-sPD1/MS 重组腺病毒疫苗, 接种肿瘤后第 12 天测量记录肿瘤生长变化曲线;

图 11 示 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗在结直肠癌模型小鼠的治疗作用; 在 Balb/c 小鼠皮下接种 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>CT26 肿瘤细胞后, 分别给予 PBS、MS 疫苗、sPD1/MS 疫苗、奥沙利铂、MS/奥沙利铂和 sPD1/MS/奥沙利铂; 其中, 图 11-a 示测量肿瘤大小至接种后第 25 天的情况; 图 11-b 示观察截止日当天处死全部小鼠, 剥取肿瘤组织并测量瘤重; 图 11-c 示小鼠生存情况观察至肿瘤接种后第 65 天;

图 12 示 sPD1/MS 重组蛋白疫苗在结直肠癌模型小鼠的治疗作用; 在 Balb/c 小鼠皮下接种 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>CT26 肿瘤细胞后, 分别给予 PBS、Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂, 以及蛋白/Al(OH)<sub>3</sub> 治疗, 接种肿瘤后第 26 天处死全部小鼠; 其中, 图 12-a 示所剥取的各组小鼠肿瘤重量; 图 12-b 示各组荷瘤小鼠脾淋巴细胞针对 MUC1 和 Survivin 表位的特异性分泌 IFN- $\gamma$  的能力;

图 13 示 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗在乳腺癌模型小鼠的治疗作用; 在 Balb/c 小鼠皮下接种 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>4T1 肿瘤细胞, 分别注射 PBS 和 sPD1/MS 疫苗, 从接种肿瘤后第 11 天开始测量小鼠肿瘤体积, 记录肿瘤生长曲线;

图 14 示 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗在肺癌模型小鼠的治疗作用; C57BL/6 小鼠皮下接种 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>Lewis 肿瘤细胞, 分别注射 PBS 和 sPD1/MS DNA 疫苗, 从接种肿瘤后第 8 天开始测量并记录小鼠肿瘤生长曲线;

图 15 示 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗在肝癌模型小鼠的治疗作用; Balb/c 小鼠皮下接种 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>H22 肿瘤细胞, 分别注射 PBS 和 sPD1/MS 疫苗, 从接种肿瘤后第 12 天开始测量并记录小鼠肿瘤生长曲线;

图 16 示 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗在胃癌模型小鼠的治疗作用; 615 小鼠皮下接种 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>MFC 肿瘤细胞, 分别注射 PBS 和 sPD1/MS 疫苗, 从接种肿瘤后第 12 天开始测量并记录小鼠肿瘤生长曲线;

图 17 示使用活体基因导入仪器后, 疫苗的细胞免疫效果得到显著提升; 其中, 图 17-a 示免疫策略; 图 17-b 示免疫后淋巴细胞分泌 IFN- $\gamma$  的水平; 图 17-c 示免疫后 CTL 水平;

图 18 示使用活体基因导入仪后, 疫苗在抑制肿瘤生长方面得到显著提升; 其中, 图 18-a 示免疫策略; 图 18-b 示免疫后肿瘤体积; 图 18-c 示免疫后 CTL 水平; 图 18-d 示免疫后 ELISPOT 检测结果。

#### 15 具体实施方式

本发明提供了重组疫苗及其应用, 本领域技术人员可以借鉴本文内容, 适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是, 所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的, 它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述, 相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文的方法和应用进行改动或适当变更与组合, 来实现和应用本发明技术。

本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、生物化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时, 为了更好地理解本发明, 下面提供相关术语的定义和解释。

抗原(antigen, Ag), 是指能够刺激机体产生(特异性)免疫应答, 并能与免疫应答产物抗体和致敏淋巴细胞在体外结合, 发生免疫效应(特异性反应)的物质。抗原为能够在呈递至宿主动物后诱导免疫反应的一段 DNA 或 DNA 片段; 多肽、表位、半抗原或其任何组合。

“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用, 意指连续氨基酸残基的聚合物。术语“核酸”、“核苷酸”可互换使用, 是指 RNA、DNA、cDNA(互补 DNA)或 cRNA (互补 RNA)及其衍生物, 例如包含经修饰主链的形式。

“融合”是指将两种或更多种蛋白融合表达以形成融合蛋白的技术。通常, 通过使用重组 DNA 技术将编码两种或更多种蛋白的 DNA 片段符合读框地连接在一起, 并进行蛋白质表达来获得融合蛋白。融合使用是指将 MS 与 sPD-1 的序列融合在一起, 制得疫苗的方法。

“联合使用”或“联合免疫”是指使用超过一种的治疗物对受试者进行治疗或免疫。

“联合”没有限制对受试者给予治疗的顺序。例如, 第一疫苗(例如, 以 MS 为靶点的疫苗)可以在对受试者给予第二疫苗(例如, 以 sPD-1 为靶点的疫苗)之前(例如, 5 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、6 小时、12 小时之前)、与其同时或在其之后(例如, 5 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、

6小时、12小时)给予。

“防治”是指治疗、预防或改善疾病或与之相关的病况或症状。

“载体(vector)”是指,可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。一种载体可以含有多种控制表达的元件,包括但不限于,启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,载体还可含有复制起始位点。

“宿主细胞”是指可用于导入载体的细胞,其包括但不限于,如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞,如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞,如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞,或者如BHK细胞,HEK293细胞或人细胞等的动物细胞。

“佐剂”是指非特异性免疫增强剂,当其与抗原一起或预先递送入机体时,其可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。佐剂有很多种,包括但不限于铝佐剂(例如氢氧化铝)、弗氏佐剂(例如完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂)、短小棒状杆菌、脂多糖、细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物试验中最常用的佐剂。氢氧化铝佐剂则在临床实验中使用较多。

“佐剂序列”是指分子内佐剂的序列,分子内佐剂是能够增强与之融合表达的目的蛋白(抗原)的免疫原性的佐剂,其通常为多肽片段。

疫苗(vaccine)是指为了预防、控制传染病的发生、流行,用于人体预防接种的疫苗类预防性生物制品。“DNA载体疫苗”是指,基于DNA或RNA(例如质粒,如表达质粒)的疫苗,其任选地还包含佐剂。“重组蛋白疫苗”是肿瘤疫苗的另一常见形式,不同于DNA疫苗或病毒载体疫苗,它是以抗原蛋白形式进入细胞,可直接激活树突状细胞;同时,由于蛋白形式无法整合到宿主细胞基因组,具有较高的安全性。“病毒载体疫苗”中所述病毒载体具有复制能力可作为外源基因的载体而保持自身传染性。

本发明采用的试材、试剂、仪器皆为普通市售品,皆可于市场购得。

本发明中涉及以MS为靶点的疫苗其构建方法参照申请号为200910252427.X的发明专利。

下面结合实施例,进一步阐述本发明:

### 实施例1: 重组DNA载体疫苗sPD1/MS的构建

#### 1.1 tPA/sPD1基因合成及TEasy-tPA/sPD1构建

根据GeneBank号NM\_005018.2基因合成人PD-1胞外段序列,其基因序列5'端连有69bp tPA信号肽序列(见SEQ ID NO: 10),引入tPA信号肽的目的是为提高融合蛋白sPD1/MS在胞外的分泌表达能力。其后,采用PCR技术在tPA/sPD1基因两端引入酶切位点,PCR反应体系50 $\mu$ l,包括0.1 $\mu$ g SEQ ID NO:1所述的tPA/sPD1 DNA模板,引物SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13终浓度20pmol,5 $\mu$ l Ex Taq Buffer(10 $\times$ ),4 $\mu$ l dNTP Mixture(各2.5mM),1.25U Ex Taq酶(Takara公司);PCR反应条件为98 $^{\circ}$ C 10s、55 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 30s,共进行35个循环扩增反应。其后将胶回收的PCR产物连接于pGEM TEasy(promega公司)载体上,反应条件为16 $^{\circ}$ C 4h。取连接产物10 $\mu$ l,转化入感受态大肠杆菌Top10(Invitrogen公司),涂布氨苄青霉素抗性平板,37 $^{\circ}$ C培养16h。挑取单克隆于5ml氨苄抗性LB培养基,37 $^{\circ}$ C 220rpm震荡培养16h。高速离心收获所培养菌体后,质粒提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取质粒,用BglII和BamHI双酶切后,0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆,获得质粒TEasy-tPA/sPD1(见图1-b)。

## 1.2 CpVR-sPD1 质粒的构建

CpVR 单顺反子是发明人前期在 VR1012 质粒骨架插入 CpG 基序改造得来(参见申请号为 201110086366.1 的发明专利), CpVR-sPD1 独立表达可溶性 PD-1 蛋白, 是作为一种 sPD1/MS 融合核酸疫苗的对照质粒形式。具体构建方法是: 以 *PstI* 和 *BamHI* 双酶切消化质粒 T Easy-tPA/sPD1, 胶回收线性 sPD1 目的基因与载体 CpVR 相互连接, 反应条件是 16°C 过夜。将连接产物 10μl 转化入感受态大肠杆菌 Top10, 涂布卡那霉素抗性平板, 37°C 培养 16h。挑取单克隆于 5ml 卡那抗性 LB 培养基震荡培养 16h。高速收获培养后的菌体, 所提取质粒采用用 *PstI* 和 *BamHI* 双酶切消化后进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳的鉴定, 筛选获得阳性克隆 CpVR-sPD1。

## 1.3 CpDV-IL2-sPD1/MS 质粒的构建

基于 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗的构建主要分为两步。首先, 将包含目的基因的质粒 CpVR-MS(参见申请号为 200910252427.X 的发明专利)采用 *BglII* 和 *BamHI* 双酶切消化, 通过 T4 DNA 连接酶作用, 将 MS 融合肿瘤抗原基因插入质粒 T Easy-tPA/sPD1 的多克隆酶切位点 *BamHI* 处, 从而获得质粒融合核酸质粒 T Easy-sPD1/MS(见图 1-c)。

其次, 构建表达白介素 2(IL-2) 基因和 sPD1/MS 融合核酸的双顺反子 CpDV-IL2-sPD1/MS, 具体技术方法是: 应用 PCR 技术扩增入白介素-2 (IL-2) 基因(序列详见 SEQ ID NO:9), 在 50μl PCR 反应体系中, 加入 0.1μg 模板质粒 CpDV-IL2-MS(参见专利号为 ZL 200910252427.X 的发明专利), 终浓度 20pmol 的引物 SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15, 其它组分和反应条件如上文所述。PCR 产物经过 *XbaI* 和 *BamHI* 双酶切消化反应, 与载体 CpDV(参见专利号为 ZL 201110086366.1 的发明专利)相连接制备过渡质粒 CpDV-IL2。再将包含 sPD1/MS 融合核酸的 T Easy-sPD1/MS 进行 *BglII* 和 *EcoRI* 双酶切消化处理, 插入到质粒骨架 CpDV-IL2 的相应多克隆酶切位点处, 制成所述 DNA 载体疫苗 CpDV-IL2-sPD1/MS(即 sPD1/MS 疫苗), 构建策略见图 1-d。

## 1.4 重组质粒体外表达肿瘤抗原及 sPD1 的 Western 印迹鉴定

以转染空载体 VR1012 的 293T 细胞裂解上清为阴性对照, 将重组质粒 CpDV-IL2-MS(简称 MS)、CpDV-IL2-sPD1/MS(简称 sPD1/MS), 和 CpVR-sPD1(简称 sPD1) 各 2μg 分别转染 293T 细胞, 72h 后收取细胞裂解上清, 经 SDS-PAGE 分离后转移到硝酸纤维素膜上进行 Western Blot 蛋白质印迹依次鉴定重组质粒抗原 MUC1、Survivin 和蛋白 sPD1 的印迹鉴定情况。结果如图 2 所示, 其中图 2-a 显示 MS 质粒、sPD1/MS 质粒和 sPD1 质粒的 MUC1 印迹, sPD1 作为对照质粒没有显示条带, 质粒 MS 和 sPD1/MS 的预期大小分别是 95KD 和 120KD, 为图中可以看出, MS 和 sPD1/MS 实际呈现系列梯度的蛋白条带, 且主条带大小都在 150KD 以上, 这可能是 MUC1 蛋白的糖基化修饰产物或特异性蛋白酶作用的裂解产物; 图 2-b 显示 MS 质粒、sPD1/MS 质粒和 sPD1 质粒的 Survivin 印迹, 由于 Survivin 与 MUC1 是融合抗原, 所以呈现的 Western 印迹与 MUC1 结果相似, 其主条带位置都在 150KD 以上; 图 2-c 显示 MS 质粒、sPD1/MS 质粒、sPD1 质粒和空载体 VR1012 的 PD-1 印迹, 空载体作为阴性对照没有显示条带, 而 sPD1/MS 质粒和 sPD1 质粒的大小分别为 150KD 和 35KD, 由该图中可见, 融合表达的 sPD1/MS 蛋白没有关于 sPD1 蛋白的糖基化修饰或水解作用, 保证了 sPD1 的结构完整性从而能够结合到 PD-L1





接下来为了获得重组痘病毒，先将滴度 0.05pfu/cell 的空 MVA 病毒感染含有 TK 基因的 BHK-21 的突变细胞，孵育 2 小时后，使用 lipo2000 试剂将穿梭质粒 pSC11-sPD1/MS 共转染到 BHK 细胞。被感染的细胞在 37℃，5%CO<sub>2</sub> 下培养 72 小时后，收集细胞。超声波裂解细胞，2000rpm 离心 10min 保留裂解上清。取适量上清作种毒，于六孔板中将痘病毒依次稀释成 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 感染 BHK 细胞 2 小时。弃去培养基，用等体积含有 1%BrdU（抑制野生 MVA 生长）且 42℃ 预温的 2% 低熔点琼脂糖和 2×DMEM-20 培养基混匀，每孔加入 2 ml 培养基，在室温下凝固，在 37℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 48 小时。铺上层选择性培养基，成分比下层琼脂多了 1/120 体积的 4% X-gal。培养过夜，挑选蓝色单斑，反复冻融三次裂解释放病毒，进行下一轮筛选，步骤相同，如此进行 6 轮以上筛选，最后直至得到只含重组病毒 MVA-MS 的克隆株。

3.2 重组腺病毒疫苗的获得

腺病毒 AdMax<sup>TM</sup> Adenovirus 载体系统 (Microbix 公司) 包含穿梭载体和腺病毒载体。本实例采用前期构建的穿梭质粒 pDC316-MS (参见专利号为 200910252427.X 的发明专利，图 4-c)，将 sPD1 基因通过 PCR 方法，由引物 SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:13 在基因的 5' 和 3' 端引入 EcoRI 酶切位点，对 pDC316-MS 和 sPD1 基因的 PCR 产物 EcoRI 双酶切消化，16℃ 连接过夜。连接产物转化入 Top10 感受态，并在 37℃ 氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中培养，经过质粒测序筛选获得阳性克隆 pDC316-sPD1/MS (见图 4-d)。

其后进行腺病毒 (AD) 的同源重组，本实例中的腺病毒骨架为 pBHGloxΔE1,3Cre。将 AD 载体和穿梭质粒 pDC316-sPD1/MS 共转染 293 细胞，利用 293 细胞中的 E1 蛋白，经过 10 天左右即产生含有 sPD1/MS 融合核酸的重组腺病毒噬斑。对噬斑进行 PCR 鉴定，反应条件 95 °C 30 s、55°C 30 s、72 °C 1 min，反应 30 个循环，从而筛选正确的噬斑进行大量的扩增和纯化。

实施例 4: sPD1/MS 肿瘤疫苗的免疫原性

4.1 sPD1/MS 融合核酸疫苗的体液免疫活性

ELISA 方法检测 sPD1/MS 融合 DNA 疫苗针对 MUC1 和 Survivin 的抗体反应，并与 MS 疫苗 (参见专利号为 ZL 200910252427.X 的发明专利) 的体液免疫效果进行比较。选用 4-6 周龄 Balb/c 小鼠，按表 1 设置 sPD1/MS 疫苗实验组、MS 疫苗对照组、单独 sPD1 质粒对照组和 PBS 阴性对照组，上述 DNA 质粒的制备均以无菌 PBS 溶解，终浓度调节至 1mg/ml。具体的免疫程序是：第 0 周和第 2 周以 DNA 载体疫苗初免，第 4 周以重组腺病毒疫苗加强免疫，选取小鼠后侧肢肌肉注射疫苗各 50μg。最后一次免疫后两周对小鼠进行眼眵采血，离心分离的血清用于 ELISA 抗体检测。

表 1 sPD1/MS 融合核酸疫苗与 MS 核酸疫苗的免疫原性

组别		第 0、2 周	第 4 周	第 6 周
1	PBS	PBS	PBS	采血检测 ELISA 抗体、 取脾检测 Elispot/CTL
2	MS	CpDV-IL2-MS	rAD-MS	
3	sPD1/MS	CpDV-IL2-sPD1/MS	rAD-MS	
4	sPD1	CpVR-sPD1	CpVR-sPD1	

结果显示,接种 sPD1/MS 疫苗的小鼠能产生高效的抗粘蛋白 1 抗体和抗生存素抗体,并且两者的抗体滴度可达 10000 以上。如图 5-a 和 5-b 所示,按 1:125 比例稀释的小鼠血清分别以原核表达并纯化收获的 MUC1 蛋白、Survivin 蛋白和可溶 sPD1 蛋白作为抗原检测特异性抗体反应,其中 sPD1/MS 疫苗组与 MS 疫苗组相比,抗 MUC1 抗体以及抗 Survivin 抗体吸光度(450nm)读出值都有显著性提高( $P < 0.001$ ),说明优化的 sPD1/MS 融合核酸肿瘤疫苗能够启动强烈的特异性体液免疫应答;而接种 CpVR-sPD1 质粒组与 PBS 组 ELISA 抗体反应都呈阴性。另外,ELISA 检测到 sPD1/MS 疫苗组以及 sPD1 质粒组小鼠血清能产生一定的抗 PD1 抗体反应(见图 5-c),然而 PD1 抗体滴度较低无法在体内产生大量的抗体来阻断 PD-1 负性信号通路,表明 sPD1 融合核酸疫苗可能是通过激活小鼠的免疫系统发挥抗肿瘤作用的。同时,sPD1/MS 疫苗在诱导抗原特异性 IgG1 (Th2 型)和 IgG2a (Th1 型)应答上也体现比 MS 疫苗组更为明显的优势(见图 5-d、5-e)。

#### 4.2 sPD1/MS 融合核酸疫苗细胞免疫活性检测

为了考察重组 sPD1/MS DNA 疫苗对粘蛋白 1 和生存素的特异性免疫应答,应用 Elispot 法测定表 1 免疫小鼠脾淋巴细胞特异性分泌 IFN- $\gamma$  的斑点数目,同时检测各组免疫小鼠淋巴细胞 CTL 杀伤活性。Elispot 检测结果如图 6-a 所揭示,经过 MUC1 蛋白刺激,sPD1 质粒组脾细胞对蛋白刺激无应答,显示单独 sPD1 蛋白无法激活机体特异性细胞免疫效应;MS 疫苗组脾细胞分泌的 IFN- $\gamma$  斑点数目较 PBS 阴性对照组有 2 倍数值的差异,而 sPD1/MS 疫苗组脾细胞分泌 IFN- $\gamma$  斑点数目则明显高出 PBS 阴性组斑点数目数倍,sPD1/MS 疫苗与 MS 疫苗组斑点数目比较没有体现差异。另外,经过 Survivin 蛋白刺激,结果如图 6-b 显示,单独的 sPD1 质粒免疫小鼠同样没有应答反应;而 MS 疫苗组和 sPD1/MS 疫苗组免疫小鼠的脾细胞分泌 IFN- $\gamma$  的斑点与 PBS 阴性对照组相比,均呈现阳性反应,sPD1/MS 疫苗与 MS 疫苗组两组之间的斑点数目相比较,sPD1/MS 疫苗显著多于 MS,且具  $P$  值 0.0141 的统计学意义。

以免疫小鼠脾淋巴细胞作为效应细胞,以稳定表达融合肿瘤抗原蛋白 MS 的 CT26 细胞(命名为 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>CT26,其中 f 为 full 缩写,代表未截短 N 端氨基酸的全长生存素蛋白)作为靶细胞,按照一定效靶比例混合后采用碘化丙啶(PI)/CFSE 双色荧光染料标记法检测 CTL 杀伤活性,结果见图 6-c。由图可知,MS 疫苗组和 sPD1/MS 疫苗组在效靶比 12.5:1 和 50:1 时,都表征出高于 PBS 组的 CTL 杀伤效应;MS 疫苗组和 sPD1/MS 疫苗组之间比较,sPD1/MS 疫苗对应不同效靶比的杀伤率分别为 34.76%和 35.56%,而 MS 疫苗杀伤率分别为 21.65%和 30.39%,显然优化的疫苗形式 CpDV-IL2-sPD1/MS 更具 CTL 杀伤活性。

综上,在 CpDV-IL2-sPD1/MS 疫苗与 CpDV-IL2-MS 疫苗的免疫原性评价中,优化的疫苗形式 sPD1/MS 能够诱导更高效的特异性体液免疫应答和细胞免疫应答。

#### 4.3 sPD1 与 MS 肿瘤疫苗的联合形式对小鼠免疫活性的作用

通常多基因疫苗的制备方式包括两种,一种是制备多基因融合表达的融合核酸疫苗,另一种则是以共注射的方式将两种或两种以上基因疫苗进行联合免疫。为了探讨 sPD1 基因联合 MS 基因所制备疫苗形式的多样性,本部分实验比较 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗,与 sPD1 联合 MS 疫苗所诱导的小鼠免疫活性。具体实验分组如表 2 所示:4-6 周龄小鼠

5 随机分成 PBS 组、sPD1/MS 组和 sPD1+MS 组，其中设置 PBS 组小鼠分别在第 0、2 和 4 周注射 100 $\mu$ l 无菌 PBS 作为阴性对照；sPD1/MS 组小鼠在第 0 和 2 周注射重组 sPD1/MS 融合核酸疫苗，第 4 周以 rAD-MS 重组腺病毒疫苗加强免疫；sPD1+MS 组小鼠在第 0 和 2 周注射事先混匀的 CpVR-sPD1 质粒和 CpDV-IL2-MS 质粒（各 100 $\mu$ g），第 4 周同样采用重组腺病毒疫苗加强免疫。

表 2 sPD1 与 MS 疫苗的联合形式

组别		第 0、2 周	第 4 周	第 6 周
1	PBS	PBS	PBS	拉颈取脾检测 Elispot 活性
2	sPD1/M S	CpDV-IL2-sPD1/ MS	rAD-MS	
3	sPD1+M S	CpVR-sPD1 + CpDV-IL2-MS	rAD-MS	

10 第 6 周检测各组小鼠脾淋巴细胞特异性分泌 IFN- $\gamma$  的能力，结果如图 6-d 所示，与 PBS 阴性对照组相比，融合核酸疫苗 CpDV-IL2-sPD1/MS 以及联合免疫的 CpVR-sPD1 与 CpDV-IL2-MS 疫苗都使得 T 淋巴细胞分泌 MS 特异性 IFN- $\gamma$  的 elispot 斑点数目明显增多（ $P < 0.01$ ）。同时，比较 sPD1/MS 疫苗与 sPD1+MS 联合免疫的方式，其所诱导产生的特异性细胞免疫反应处于较为一致的水平，表明 sPD1 基因与 MS 肿瘤抗原基因制备的疫苗，具有融合核酸疫苗和联合共注射疫苗的多种疫苗形式。

实施例 5: sPD1/MS 肿瘤疫苗的免疫策略

5.1 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗的免疫策略

15 本部分实验采用 DNA 初免-重组腺病毒加强免疫的免疫策略，考察重组腺病毒疫苗 rAD-MS 对 sPD1/MS 疫苗所诱导的粘蛋白 1 和生存素特异性免疫应答的加强作用：将 4-6 周龄小鼠按表 3 进行随机分组，每组 6 只，其中第 1 组肌肉注射 PBS 作为阴性对照；第 2 组在第 0 周单独免疫重组腺病毒疫苗 rAD-MS（ $1 \times 10^8$  pfu/只）；第 3 组分别于第-4、-2 和 0 周注射 DNA 疫苗；第 4 组则在第-6、-4 和-2 周注射 DNA 疫苗，第 0 周注射重组腺病毒疫苗。所有组别小鼠于第 2 周拉颈处死后无菌取脾，应用 Elispot 法评价免疫小鼠针对粘蛋白 1 和生存素表位的免疫应答水平。

表 3 DNA 初免-重组腺病毒加强免疫策略

组别		第-6 周	第-4、-2 周	第 0 周	第 2 周
1	PBS	PBS	PBS	PBS	拉颈取脾 检测 Elispot 活 性
2	rAD	—	—	rAD-MS	
3	DNA	—	CpDV-IL2-sPD1/MS	CpDV-IL2-sPD1/MS	
4	DNA/rAD	CpDV-IL2-sPD1/MS	CpDV-IL2-sPD1/MS	rAD-MS	

25 图 7-a 和图 7-b 为表 2 对应的各组免疫小鼠脾淋巴细胞 Elispot 检测结果。由图可以看出，经过 MUC1 表位（SEQ ID NO:21）或者 Survivin 表位（SEQ ID NO:22）刺激的各组脾淋巴细胞只有第 3 组和第 4 组产生了阳性反应，且与 PBS 阴性对照组相比，其特异

性分泌 IFN- $\gamma$  斑点数目依次增多 (依次  $P < 0.01$ ), 而单独的重组腺病毒 rAD-MS 疫苗免疫组为阴性结果, 说明单独免疫重组腺病毒无法诱导小鼠体内强烈的细胞免疫应答; 同时, 通过比较 DNA 疫苗组和 DNA/rAD 组的结果发现, DNA/rAD 组明显增强特异性免疫应答活性 ( $P < 0.05$ ), 说明 DNA 初免-重组腺病毒加强免疫的免疫策略可以显著提升 sPD1/MS 疫苗的免疫效果。

5.2 sPD1/MS 重组病毒疫苗的免疫策略

本部分实验以 sPD1/MS 重组痘病毒疫苗作为考察对象。将 4-6 周龄 C57BL/6 小鼠按表 4 随机分组, 每组 5 只小鼠, 其中阴性对照组小鼠分别在第-4、-2 和 0 周注射无菌 PBS, 单独免疫痘病毒组小鼠于第 0 周免疫 rMVA-sPD1/MS, 每只小鼠注射剂量为  $1 \times 10^8$  pfu, 另一实验组小鼠在第-4 和-2 周采用 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗进行初免, 第 0 周用 sPD1/MS 重组痘病毒疫苗进行免疫加强。所有组别小鼠于第 2 周拉颈处死后无菌取脾, 应用 Elispot 法评价免疫小鼠针对粘蛋白 1 和生存素表位的免疫应答水平。

表 4 sPD1/MS 重组病毒疫苗的免疫策略

组别	第-4 周	第-2 周	第 0 周	第 2 周
1	PBS	PBS	PBS	拉颈取脾检测 Elispot 活性
2	—	—	rMVA-sPD1/MS	
3	CpDV-IL2-sPD1/MS	CpDV-IL2-sPD1/MS	rMVA-sPD1/MS	

结果如图 8-a 和 8-b 显示, 与 PBS 阴性对照相比, 单独免疫重组痘病毒疫苗的小鼠诱导产生了阳性的粘蛋白 1 和生存素特异性分泌 IFN- $\gamma$  的 Elispot 斑点 ( $P < 0.01$ ); 而采用 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗初免、重组 sPD1/MS 痘病毒疫苗加强免疫的免疫策略的小鼠, 其体内诱导产生高效的特异性细胞免疫应答, 且与 rMVA 免疫组相比, 所产生 Elispot 斑点数目显著增多 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明融合表达 sPD1/MS 的重组病毒疫苗具有激活小鼠特异性免疫的能力, 并且应用 Prime-boost 免疫策略有利于这种激活作用的增强。

实施例 6: sPD1/MS 重组 DNA 疫苗对黑素瘤模型小鼠的抗肿瘤作用

6.1 疫苗对肿瘤生长的抑制作用

肿瘤接种实验检测重组 sPD1/MS DNA 疫苗对黑素瘤模型小鼠的治疗作用: 将 4-6 周龄 C57BL/6 小鼠按表 5 随机分组 (8 只/组)。第 0 天, 在各组小鼠右侧近尾端背部皮下接种  $1 \times 10^5$  个稳定表达融合肿瘤抗原 33M 和全长 Survivin 蛋白的 B16 细胞 (以下简称 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>B16), 第 1、8、15 天分别给予疫苗注射, 其中第 1 组注射 PBS 作为阴性对照, 第 2、3 组则分别注射 MS 疫苗和 sPD1/MS 疫苗。攻瘤后第 7 天开始观察肿瘤在小鼠体内的生长情况, 实验以对照组小鼠发生死亡为观察结点。

图 9-a 为黑素瘤模型小鼠各组肿瘤生长体积变化情况。与阴性对照 PBS 组相比, MS 疫苗与 sPD1/MS 疫苗都减缓了黑色素瘤的生长, 其中 sPD1/MS 疫苗表现显著抑瘤作用 ( $P < 0.01$ ), 截止观察终点其肿瘤体积抑制率达 52.62%。而 sPD1/MS 疫苗与 MS 疫苗比较, 从接种肿瘤第 15 天直至观察截止日, 肿瘤生长速率减缓明显 ( $P < 0.05$ ), 由此看来, 融合 sPD1 的 CpDV-IL2-sPD1/MS DNA 疫苗能够优化疫苗对荷瘤小鼠的抑瘤作用。

表 5 重组 sPD1/MS DNA 疫苗治疗黑色素瘤模型小鼠

组别		第 0 天	第 1、8 天	第 15 天
1	PBS	接种 MS <sub>f</sub> <sup>+</sup> B16 肿瘤细胞	PBS	PBS
2	MS		CpDV-IL2-MS	rAD-MS
3	sPD1/MS		CpDV-IL2-sPD1/MS	rAD-MS

6.2 黑色素瘤荷瘤小鼠的生存期研究

按表 5 分组进行黑色素瘤小鼠生存期的观察，观察截止时间到接种肿瘤后第 50 天。结果如图 9-b 所示，PBS 组平均生存期为 36 天，全部死亡截止则为接种肿瘤后第 40 天。MS 疫苗组小鼠平均生存 38.5 天，生命延长率 6.94%，与阴性对照 PBS 组相比没有生命延长作用。而 sPD1/MS DNA 疫苗组小鼠平均生存寿命 43 天，较对照组小鼠生命延长 19.44% (P 值 0.0325)。尽管 sPD1/MS DNA 疫苗治疗荷瘤小鼠的生存期与 MS 疫苗治疗组之间不具统计学意义，但从小鼠平均生存寿命和生命延长趋势上，重组 sPD1/MS DNA 疫苗更具优势。

实施例 7: sPD1/MS 重组病毒疫苗对黑色素瘤模型小鼠的抗肿瘤作用

为了考察 sPD1/MS 融合核酸疫苗的不同形式对肿瘤的抑制作用，应用 rMVA-sPD1/MS 和 rAD-sPD1/MS 重组病毒对黑色素瘤荷瘤小鼠进行抗肿瘤免疫治疗。将 4-6 周龄的 C57BL/6 小鼠随机分为 PBS 阴性组、痘病毒疫苗治疗组和腺病毒疫苗治疗组，每组各 5 只小鼠。各组小鼠在第 0 天接种  $5 \times 10^4$  个 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>B16 细胞，接种后第 1 和 15 天对治疗组小鼠分别进行 sPD1/MS 重组痘病毒疫苗或重组腺病毒疫苗的免疫，阴性组小鼠则接种等体积无菌 PBS 作为对照。攻瘤后第 10 天开始观察各组小鼠的肿瘤生长情况，结果如图 10 显示，与 PBS 阴性对照组相比，rMVA-sPD1/MS 疫苗组和 rAD-sPD1/MS 疫苗组小鼠的肿瘤生长趋势皆有较明显的减缓 (P < 0.05)，截止到攻瘤后第 24 天为止，sPD1/MS 重组痘病毒治疗小鼠的平均肿瘤体积比对照组的肿瘤体积减小约 25%，sPD1/MS 重组腺病毒治疗小鼠的平均肿瘤体积则减小约 23%，表明 sPD1/MS 融合核酸的重组病毒载体疫苗形式具有有效抑制肿瘤生长的作用。

实施例 8: sPD1/MS 重组 DNA 疫苗对结直肠癌模型小鼠的抗肿瘤作用

8.1 疫苗对肿瘤生长的抑制作用

本部分实验目的之一是考察疫苗对结直肠癌模型小鼠体内肿瘤生长的抑制作用和对荷瘤小鼠的生命延长作用，另一方面，以化疗药物奥沙利铂作为阳性对照，通过疫苗与化药奥沙利铂的联合免疫治疗来考察二者对模型小鼠肿瘤治疗的协同效果。将 4-6 周龄 Balb/c 小鼠按表 3 进行分组，每组 10 只，第 0 天在小鼠右侧近尾端后背皮下接种  $1 \times 10^6$  个 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>CT26 肿瘤细胞。第 1、8、15 天分别对各组小鼠肌肉注射疫苗，其中第 1 组为阴性对照注射 PBS，第 2、5 组给予 MS 疫苗，第 3、6 组给予 sPD1/MS 疫苗，表 6 中奥沙利铂 (Oxaliplatin, 江苏海正药业) 采用腹腔注射方式给药，每次注射剂量 0.5mg/kg，间隔 5 天给药一次共 5 次。攻瘤后第 12 天开始记录肿瘤在小鼠体内的生长情况，以 PBS 对照组小鼠开始死亡为观察时间结点。为计算各实验组的肿瘤抑制率，在观察结点拉颈处死全部小鼠，剥离肿瘤并称量瘤重。

图 11-a 为结直肠癌模型小鼠肿瘤生长体积变化曲线。由图得知，sPD1/MS 疫苗组与

PBS 阴性组相比肿瘤生长明显减缓，从第 23 天开始即表现肿瘤体积的减小 ( $P < 0.05$ )。同时，从瘤重计算的各组肿瘤抑制率(见图 11-b)来看，sPD1/MS 疫苗的抑瘤率达 30.96%，比 MS 疫苗组 17.18%的抑瘤率有提升的趋势但没有统计学意义。疫苗与化药奥沙利铂的联合治疗，结果显示 sPD1/MS 疫苗与奥沙利铂的联合使得肿瘤生长几乎停滞，抑瘤率 74.71%，而奥沙利铂组抑瘤率 58.62%。sPD1/MS 疫苗与化药联合组与单独的奥沙利铂阳性对照相比，抑制肿瘤生长效果明显 ( $P < 0.01$ )，相比之下，MS 疫苗与化药的联合抑瘤结果则与奥沙利铂组没有统计学意义。说明 sPD1/MS 疫苗在显著抑制肿瘤生长的同时，能够与化药奥沙利铂发挥协同抗肿瘤作用。

表 6 sPD1/MS DNA 疫苗治疗结直肠癌模型小鼠的免疫策略

组别		第 0 天	第 1、8 天	第 15 天
1	PBS	接种 MS <sub>f</sub> <sup>+</sup> CT26 肿瘤细胞	PBS	PBS
2	MS		CpDV-IL2-MS	rAD-MS
3	sPD1/MS		CpDV-IL2-sPD1/MS	rAD-MS
4	奥沙利铂		—	—
5	MS/奥沙利铂		CpDV-IL2-MS	rAD-MS
6	sPD1/MS/奥沙利铂		CpDV-IL2-sPD1/MS	rAD-MS
注：表 3 中的奥沙利铂给药时间为第 9、14、19、24 天				

8.2 结直肠癌荷瘤小鼠的生存期研究

按表 6 的分组进行结直肠癌荷瘤小鼠的生存期观察，观察截止时间为接种肿瘤后第 65 天。结果如图 11-c 所示，重组 MS 疫苗组小鼠平均生存 48.5 天，重组 sPD1/MS 疫苗组小鼠平均生存期为 52 天，与阴性对照（平均生存 50 天）均没有明显生命延长趋势；而在疫苗与化药联合治疗组中，观察到重组 MS 疫苗或重组 sPD1/MS DNA 疫苗与奥沙利铂的联合使得小鼠平均生存期较 PBS 组分别延长 22%和 24% ( $P < 0.001$ )，其中重组 sPD1/MS DNA 疫苗联合奥沙利铂治疗组的生存期与单独的奥沙利铂治疗组（生命延长 14%）相比，体现一定的生命延长作用 ( $P < 0.05$ )。

实施例 9: sPD1/MS 重组蛋白疫苗对结直肠癌荷瘤小鼠的抑瘤作用

根据实施例 4 和实施例 5 可知 sPD1/MS 重组核酸形式的疫苗可以诱导小鼠体内产生强烈的 MUC1 和 Survivin 特异性细胞免疫，本实施例中则采用 sPD1/MS 重组蛋白疫苗，同时结合铝佐剂 Al(OH)<sub>3</sub> 加强免疫的策略进行结直肠癌模型的治疗。具体分组情况见表 7: 随机地将 4-6 周龄 Balb/c 小鼠分成 PBS 阴性对照组、Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂组以及佐剂联合重组 sPD1/MS 蛋白疫苗治疗组，每组 5 只小鼠。各组小鼠于第 0 天接种  $1 \times 10^6$  个 MS<sub>f</sub><sup>+</sup>CT26 肿瘤细胞，第 1、8 和 15 天则接受疫苗治疗，其中阴性组小鼠给予 100 $\mu$ l 体积的无菌 PBS 溶液，Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂组小鼠注射等体积 100 $\mu$ g 剂量的 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂 (sigma 公司)，蛋白/佐剂组小鼠注射事先混匀的各 100 $\mu$ g 佐剂和重组 sPD1/MS 蛋白。为计算各实验组的肿瘤抑制率，以 PBS 对照组小鼠开始死亡为观察时间结点，在观察结点拉颈处死全部小鼠，剥离肿瘤并称量瘤重。

表 7 sPD1/MS 蛋白疫苗治疗结直肠癌模型小鼠的免疫策略

组别		第 0 天	第 1、8 天	第 15 天
1	PBS	接种 MS <sub>f</sub> <sup>+</sup> CT26 肿瘤细胞	PBS	PBS
2	Al(OH) <sub>3</sub>		Al(OH) <sub>3</sub>	Al(OH) <sub>3</sub>
3	蛋白/Al(OH) <sub>3</sub>		sPD1/Mspro + Al(OH) <sub>3</sub>	sPD1/Mspro + Al(OH) <sub>3</sub>

5 各组治疗荷瘤小鼠的平均瘤重结果如图 12-a 所示。注射 PBS 的阴性组小鼠平均瘤重 3.45g, Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂组平均瘤重 3.19g, 与 PBS 组相比单独佐剂没有抑瘤效果, 而 sPD1/MS 融合蛋白与佐剂共同免疫的小鼠平均瘤重 2.62g, 与阴性对照组相比抑瘤率约 24%, 且有  $P < 0.05$  的统计学意义。已知 Al(OH)<sub>3</sub> 为常见的无机佐剂, 其可通过诱导 T 细胞分化和体液免疫反应来提高疫苗的免疫原性, 在本实例中可以看出重组 sPD1/MS 蛋白能够抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长, 同时, 分析观察终止的各组荷瘤小鼠脾淋巴细胞特异性分泌 IFN- $\gamma$  的能力 (见图 12-b), 佐剂与蛋白疫苗共同免疫组也有较高的 Elispot 斑点数目 ( $P < 0.01$ ), 体现 sPD1/MS 重组蛋白疫苗诱导荷瘤小鼠体内特异性抗肿瘤免疫的能力。

10 实施例 10: sPD1/MS 重组 DNA 疫苗治疗乳腺癌模型小鼠

本部分实验考察 sPD1/MS 融合核酸疫苗对乳腺癌荷瘤小鼠的治疗作用: 将 4-6 周龄的 Balb/c 小鼠随机分成两组, 每组 10 只; 第 0 天对小鼠接种稳定表达粘蛋白 1 和生存素的小鼠乳腺癌细胞(MS<sub>f</sub><sup>+</sup>4T1), 其中实验组小鼠在第 1 天和第 8 天进行 sPD1/MS DNA 疫苗的注射, 第 15 天给予重组腺病毒 rAD-MS 的注射, 另组小鼠作为阴性对照, 给予等体积的无菌 PBS 注射。接种肿瘤后第 11 天左右观察小鼠肿瘤生长变化情况, 以 PBS 对照组小鼠开始死亡为观察时间结点。图 13 为乳腺癌模型小鼠肿瘤生长体积变化曲线, 截至观察终点, 重组 sPD1/MS 疫苗治疗组小鼠肿瘤与 PBS 组相比其肿瘤生长速率明显减缓, 肿瘤抑制率约 40%, 说明 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗对乳腺癌具显著性抑瘤作用( $P < 0.001$ )。

20 实施例 11: sPD1/MS 重组 DNA 疫苗治疗肺癌模型小鼠

本部分实验考察 sPD1/MS 融合核酸疫苗对肺癌荷瘤小鼠的治疗作用: 将 4-6 周龄的 C57BL/6 小鼠按照表 8 随机地分为 PBS 阴性组和 sPD1/MS DNA 疫苗治疗组, 每组各 15 只; 第 0 天对小鼠接种稳定表达粘蛋白 1 和生存素的小鼠肺癌细胞(MS<sub>f</sub><sup>+</sup>Lewis), 接种剂量为  $1 \times 10^5$  个/只; 其中 PBS 阴性组小鼠在第 1、8 和 15 天肌肉注射 100 $\mu$ l 无菌 PBS; DNA 疫苗组小鼠则在第 1、8 和 15 天进行 sPD1/MS DNA 疫苗的注射。接种肿瘤后第 8 天开始观察小鼠肿瘤生长变化, 以 PBS 对照组小鼠开始死亡为观察时间结点。

表 8 sPD1/MS DNA 疫苗治疗结直肠癌模型小鼠的免疫策略

组别		第 0 天	第 1、8、15 天
1	PBS	接种 MS <sub>f</sub> <sup>+</sup> Lewis 肿瘤细胞	PBS
2	DNA		CpDV-IL2-sPD1/MS

图 14 为肺癌模型小鼠肿瘤生长体积变化曲线, 结果测量单独免疫重组 sPD1/MS

DNA 疫苗治疗组的小鼠肿瘤，其肿瘤生长速率明显减缓，与 PBS 阴性组小鼠肿瘤相比，具有显著的抑瘤效果 ( $P < 0.05$ )。综上所述表明 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗治疗肺癌具有有效抗肿瘤治疗作用。

#### 实施例 12: sPD1/MS 重组 DNA 疫苗治疗肝癌模型小鼠

5 本部分实施例考察重组 sPD1/MS 疫苗针对肝癌荷瘤小鼠的治疗作用。将 4-6 周龄的 Balb/c 小鼠进行随机分成两组，分别为 PBS 阴性对照组和 sPD1/MS DNA 疫苗治疗组，每组各 4 只；第 0 天接种稳转粘蛋白 1 和生存素的小鼠肝癌细胞 MS<sub>F</sub><sup>+</sup>H22，其中实验组小鼠在第 1、8 和 15 天肌肉注射 sPD1/MS DNA 疫苗，在第 22 天注射重组腺病毒 rAD-MS 加强免疫，另一组小鼠注射等体积无菌 PBS 作为阴性对照。接种肿瘤后第 12 天开始观  
10 察到小鼠肿瘤的生长并测量肿瘤体积变化，结果如图 15 所示，sPD1/MS 重组 DNA 疫苗治疗的肝癌模型小鼠肿瘤生长明显趋缓 ( $P < 0.01$ )，表明 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗治疗肝癌具有显著抑瘤作用。

#### 实施例 13: sPD1/MS 重组 DNA 疫苗治疗胃癌模型小鼠

本部分实施例选取前胃癌细胞 (MFC) 建立胃癌小鼠模型以考察 sPD1/MS DNA 疫苗  
15 的抑瘤作用。将 4-6 周龄的 615 小鼠进行随机分两组，每组各 4 只。各组小鼠在第 0 天接种稳转粘蛋白 1 和生存素的小鼠前胃癌细胞 MS<sub>F</sub><sup>+</sup>MFC，其中重组 sPD1/MS 疫苗治疗组在第 1、8 和 15 天肌肉注射 DNA 疫苗，第 22 天注射重组腺病毒 rAD-MS 加强免疫，而另一组小鼠在同一时间注射等体积无菌 PBS 作为阴性对照。接种肿瘤后第 12 天开始测量各组小鼠的肿瘤生长曲线，图 16 结果表明 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗治疗的胃癌模型  
20 小鼠，取得一定的抑制肿瘤效果 ( $P < 0.05$ )。

#### 实施例 14: 活体基因导入仪促进 sPD1/MS 重组 DNA 疫苗的免疫原性和抗肿瘤效果

活体基因导入仪在注射位点通过电场的作用促进质粒进入细胞的效率。通过对活体基因导入仪器不同参数的研究，得到了适合我们疫苗的参数：电压：36V；频率：1Hz；  
25 脉冲数：6 次；脉宽：20ms。本部分实例对活体基因导入仪对 DNA 疫苗免疫促进效果进行研究。图 17 结果显示使用活体基因导入仪器后，疫苗的细胞免疫效果得到显著提升。经 survivin 和 MUC1 蛋白刺激后，淋巴细胞分泌 IFN- $\gamma$  的能力和 CTL 水平显著性升高，使用活体基因导入仪时 20ug 剂量即能达到与肌肉注射 100ug 的效果 ( $P < 0.05$ )。即使用活体基因导入增强了 DNA 的免疫原性。图 18 结果显示，在抑制肿瘤生长方面，使用活体基因导入仪后，使用较低剂量的 DNA 即可达到原来肌肉注射 100ug 的水平，  
30 并且当保持 100ug 剂量使用活体基因导入仪后，攻瘤后 18 天后开始，使用活体基因导入仪的 100ug 组小鼠肿瘤大小与肌肉注射组产生显著性差异 ( $P < 0.05$ )。检测荷瘤鼠体内免疫水平，CTL 和 ELISPOT 结果均表明，使用活体基因导入仪后，即使低剂量组较肌肉注射组的 CTL 和分泌 IFN- $\gamma$  的能力也均得到显著提升。

35 以上仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。



## 权利要求书

- 1、一种分子组合，其特征在于，包括 sPD-1、MUC1 和 Survivin。
- 2、根据权利要求 1 所述的分子组合，其特征在于，所述 sPD-1 的 DNA 序列如 SEQ ID NO:1 所示，所述 sPD-1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。
- 5 3、根据权利要求 1 所述的分子组合，其特征在于，所述 MUC1 的 DNA 序列如 SEQ ID NO:3 所示；其氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。
- 4、根据权利要求 1 所述的分子组合，其特征在于，所述 Survivin 的 DNA 序列如 SEQ ID NO:5 所示；其氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。
- 5、权利要求 1~4 任一项所述的分子组合在制备防治肿瘤的产品中的应用。
- 10 6、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述肿瘤选自黑色素瘤、结直肠癌、大肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、胆管癌、胃癌、食管癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、鼻咽癌、口腔癌、宫颈癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、鳞状细胞癌、淋巴瘤、脑癌、恶性胶质细胞瘤、髓母细胞瘤、淋巴肉瘤、绒毛膜上皮癌、骨肉瘤、甲状腺癌。
- 15 7、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述产品中包括疫苗。
- 8、根据权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述疫苗包括 sPD-1、MUC1 和 Survivin 的 DNA 序列的重组载体。
- 9、根据权利要求 8 所述的重组载体，其特征在于，所述 sPD-1 为 sPD-1 的 DNA 序列的 5'端修饰 tPA 信号肽序列。
- 20 10、根据权利要求 9 所述的重组载体，其特征在于，所述 PD-1 与 tPA 信号肽序列相连的 DNA 序列如 SEQ ID NO:7 所示。
- 11、根据权利要求 9 所述的重组载体，其特征在于，所述 MUC1 和 Survivin 连接的 DNA 序列如 SEQ ID NO:8 所示。
- 12、一种重组载体，其特征在于，包括骨架载体、SEQ ID NO:7 所示的 DNA 序列、25 SEQ ID NO:8 所示的 DNA 序列和佐剂序列。
- 13、根据权利要求 12 所述的重组载体，其特征在于，所述骨架载体为 CpDV。
- 14、根据权利要求 13 所述的重组载体，其特征在于，所述佐剂序列为白介素-2，其 DNA 序列如 SEQ ID NO:9 所示。
- 15、权利要求 12~14 任一项所述重组载体在制备防治肿瘤的产品中的应用。
- 30 16、一种防治肿瘤的疫苗，其特征在于，包括权利要求 12~14 任一项所述的重组载体。
- 17、根据权利要求 16 所述的防治肿瘤的疫苗，其特征在于，还包括 PBS 溶液，权利要求 12~14 任一项所述重组载体的浓度为 0.1 mg/mL~10mg/mL。
- 18、权利要求 16~17 任一项所述疫苗的制备方法为，在骨架载体的 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切位点之间插入佐剂序列，然后在 *Bgl* II 和 *Eco*R I 酶切位点之间插入 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 所示序列，制得重组载体后，溶解于 PBS 溶液。
- 35 19、一种重组载体，其特征在于，包括骨架载体、SEQ ID NO:7 所示的 DNA 序列和 SEQ ID NO:8 所示的 DNA 序列。
- 20、根据权利要求 19 所述的重组载体，其特征在于，所述骨架载体为 PET28a。

21、一种表达载体，其特征在于，由权利要求 19~20 任一项所述重组载体转染宿主细胞制得。

22、一种融合蛋白，其特征在于，由权利要求 21 所述的表达载体表达。

23、权利要求 22 所述的融合蛋白在制备防治肿瘤的产品中的应用。

5 24、一种防治肿瘤的疫苗，其特征在于，包括权利要求 23 所述的融合蛋白。

25、根据权利要求 24 所述的疫苗，其特征在于，其中还包括佐剂，所述佐剂为  $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、CpG、MPL、QS21、AS02、AS03、Poly-IC 及其衍生物等。

26、一种重组载体，其特征在于，包括骨架载体、SEQ ID NO:7 所示的 DNA 序列、SEQ ID NO:8 所示的 DNA 序列，所述载体为 pSC11 或 pDC316。

10 27、一种重组病毒，其特征在于，以权利要求 28 所述的重组载体转染细胞，在细胞内与感染的病毒发生同源重组制得，所述病毒为腺病毒或痘病毒。

28、权利要求 27 所述的重组病毒在制备防治肿瘤的产品中的应用。

29、一种防治肿瘤的疫苗，其特征在于，包括权利要求 27 所述的重组病毒。

15 30、一种防治肿瘤的产品，其特征在于，包括权利要求 16~17 任一项所述的疫苗、权利要求 24~25 任一项所述的疫苗和/或权利要求 29 所述的疫苗。

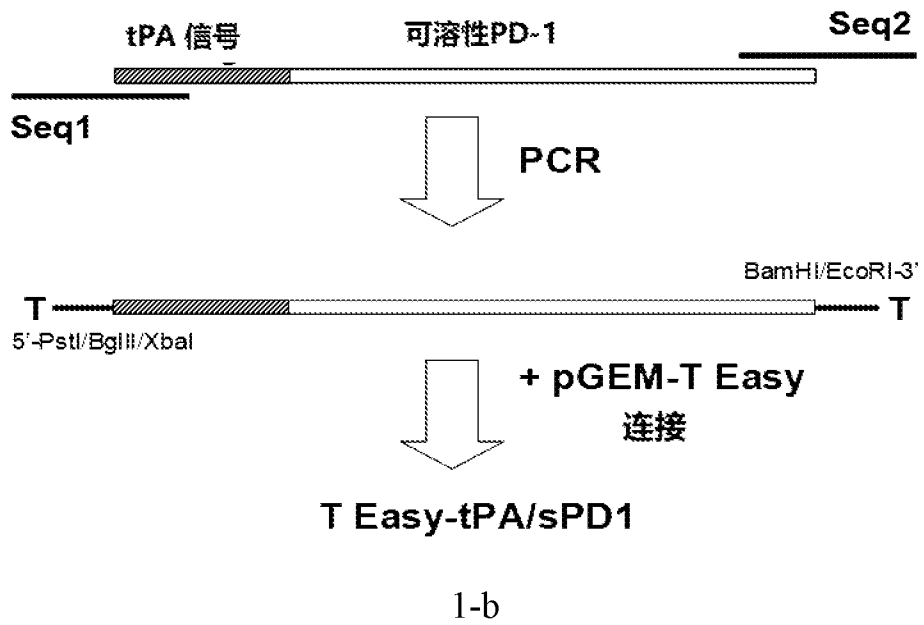
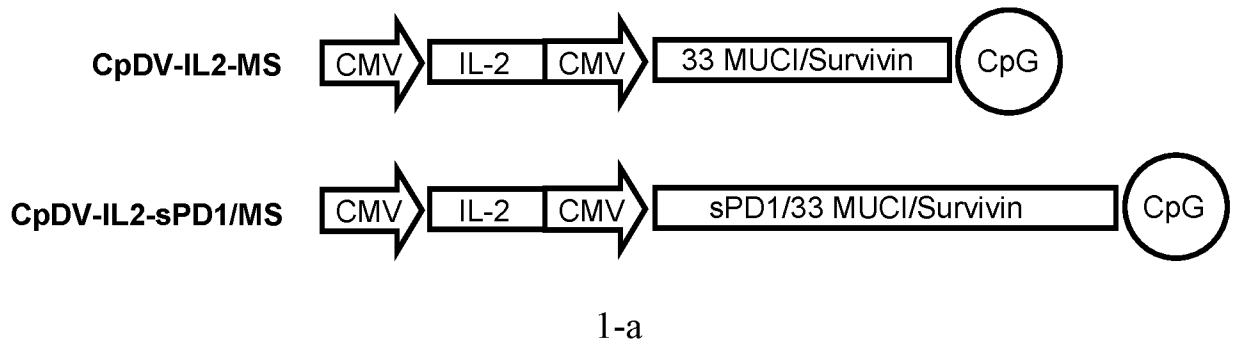
31、根据权利要求 30 所述的产品，其特征在于，其中还包括化疗药物。

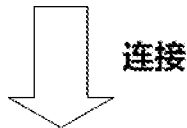
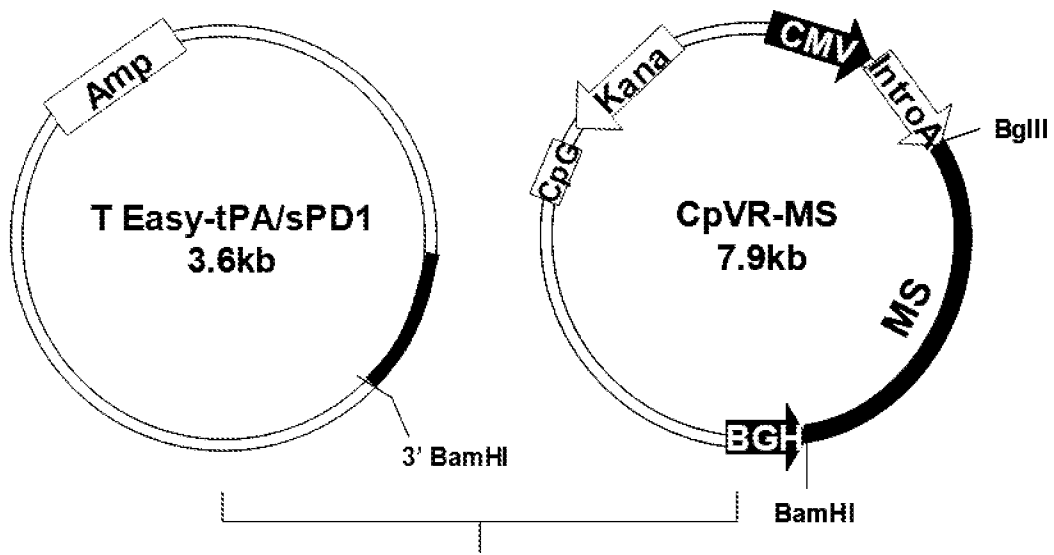
32、一种防治肿瘤的产品，其特征在于，包括以 MS 为靶点的疫苗并且 MS 与 sPD-1 融合表达的疫苗。

33、根据权利要求 32 所述的产品，其特征在于，其中还包括化疗药物。

20 34、一种防治肿瘤的方法，其特征在于，给予权利要求 30~33 任一项所述的产品。

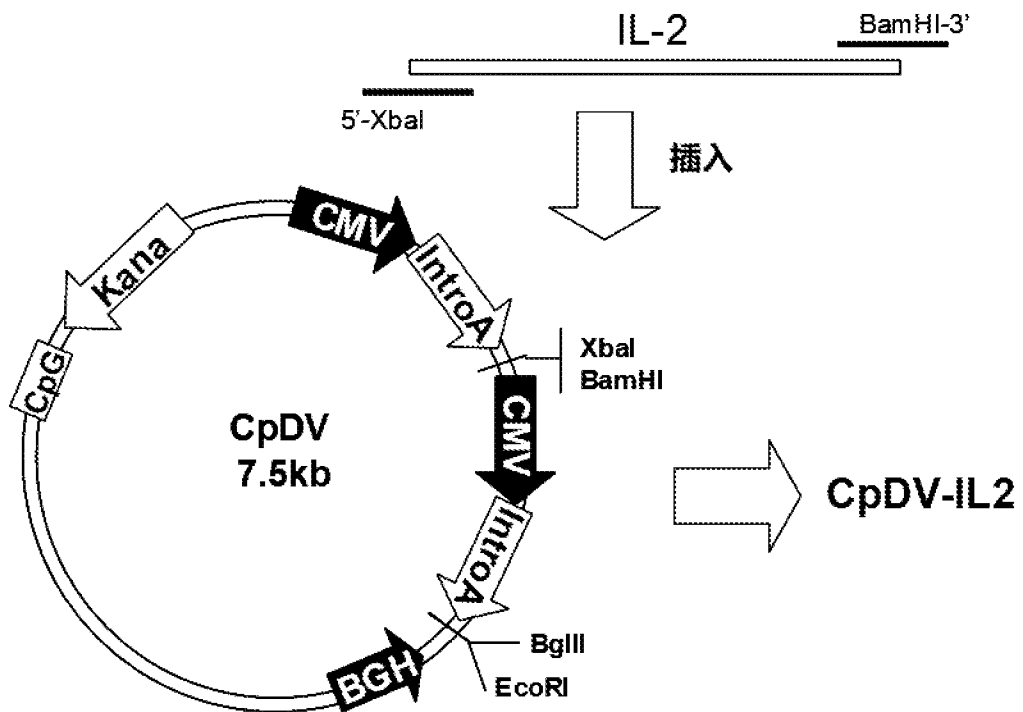
35、根据权利要求 34 所述的方法，其特征在于，给予权利要求 30~33 任一项所述的产品后，以活体基因导入仪刺激注射位点。



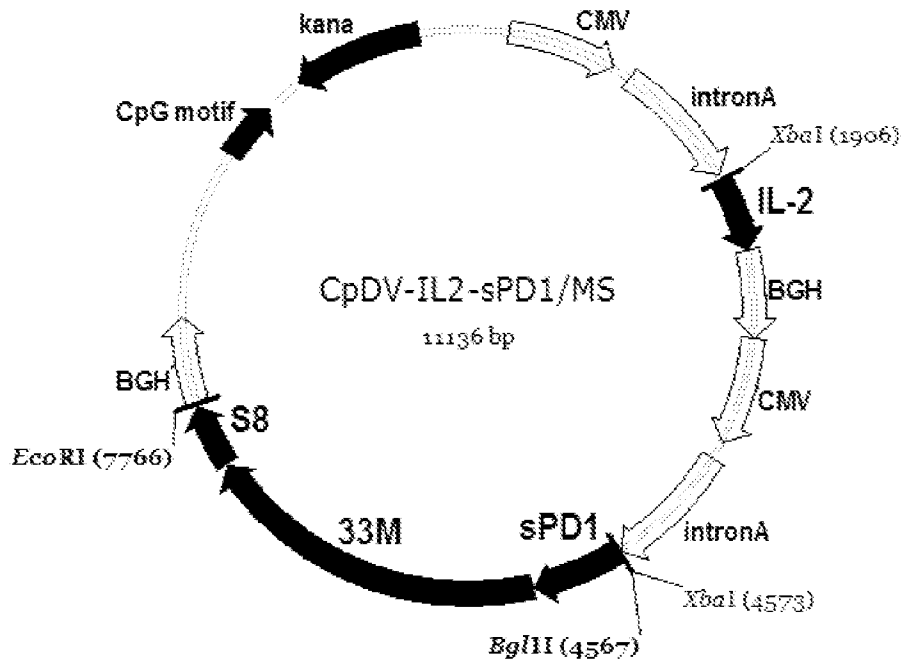


**T Easy-sPD1/MS**

1-c

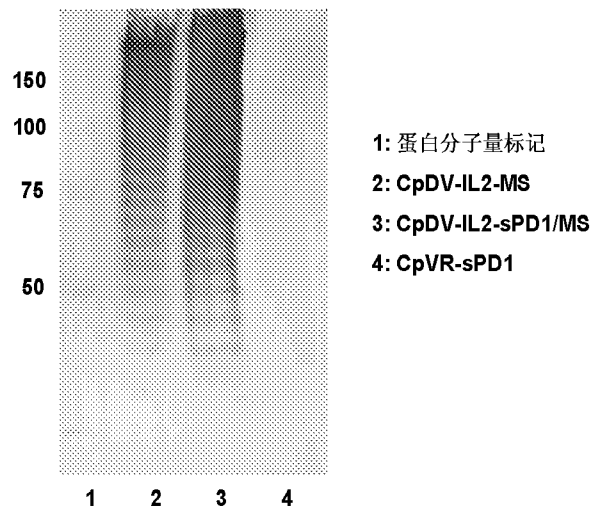


1-d

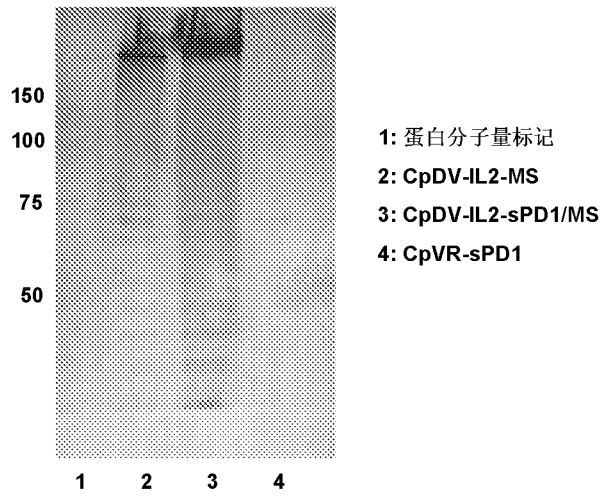


1-e

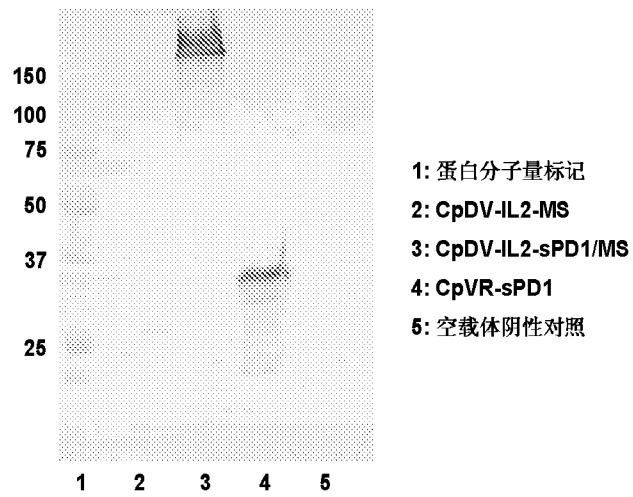
图 1



2-a

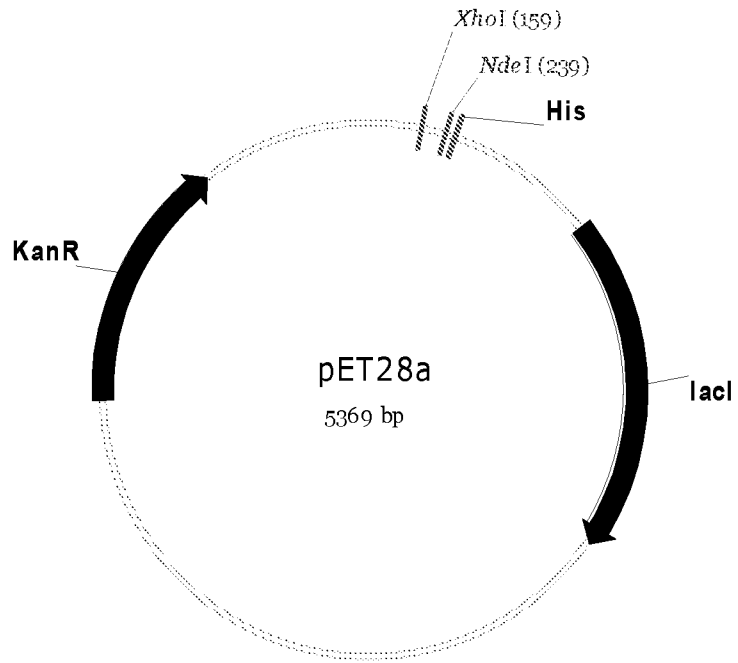


2-b

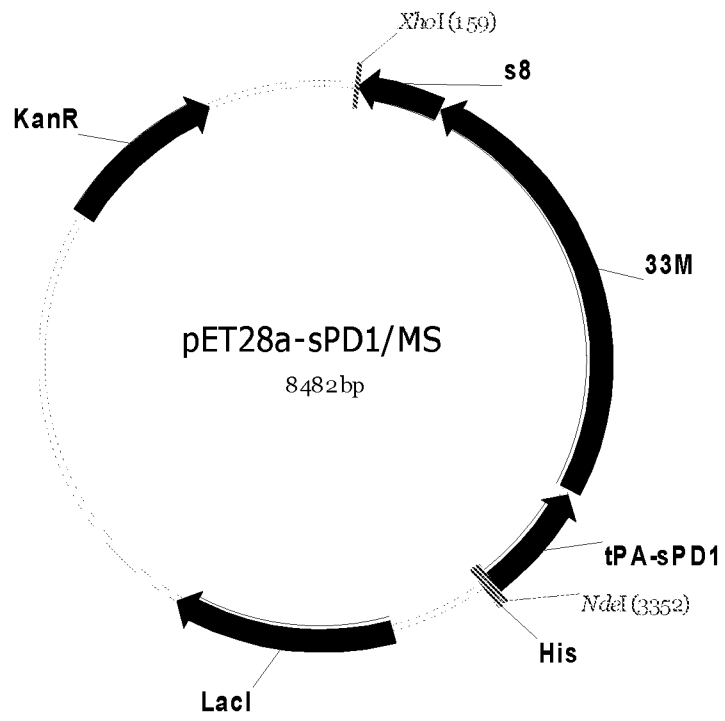


2-c

图 2

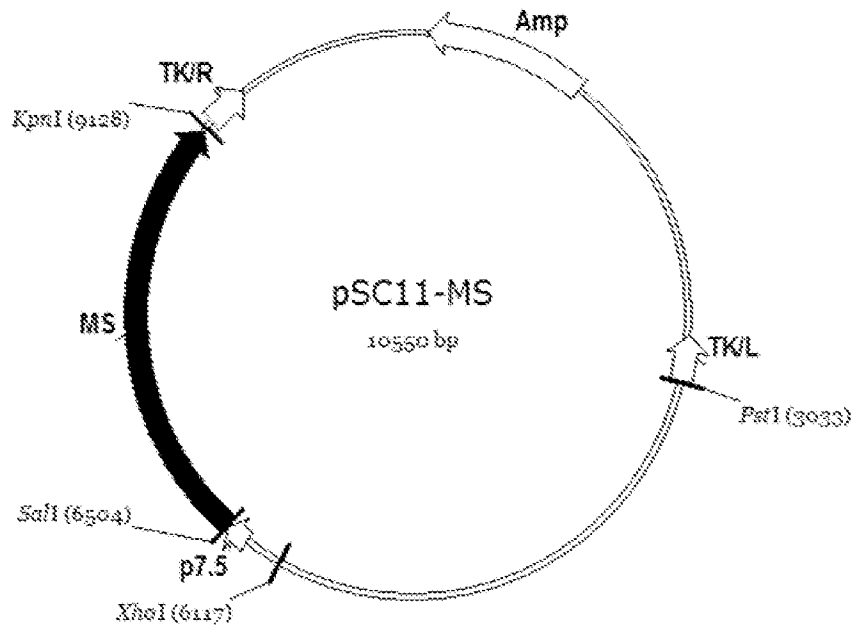


3-a

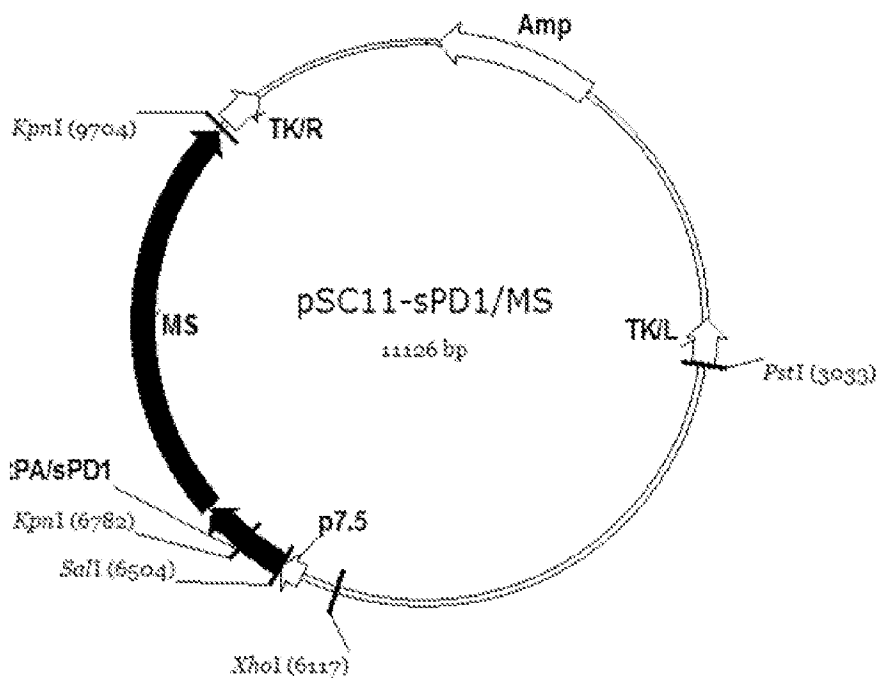


3-b

图 3

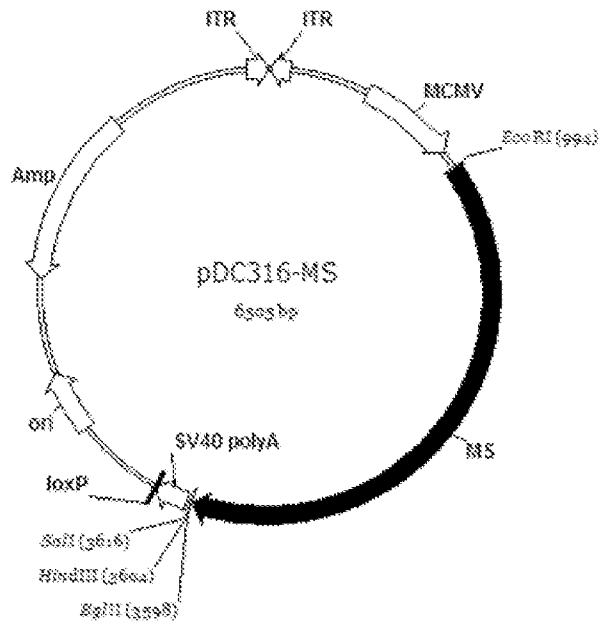


4-a

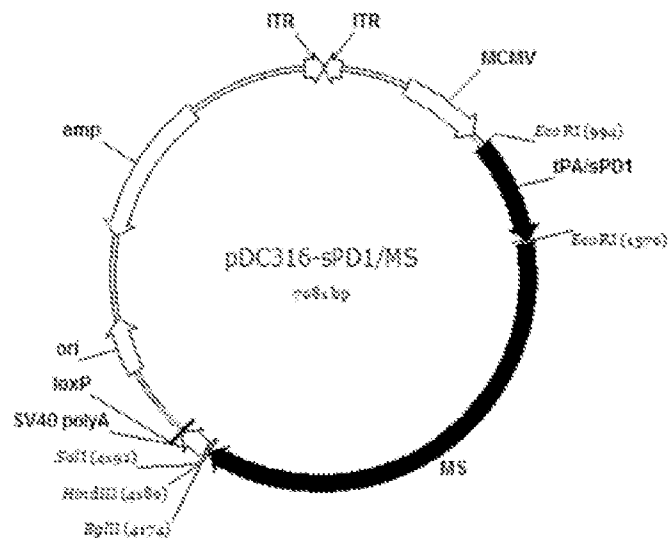


4-b



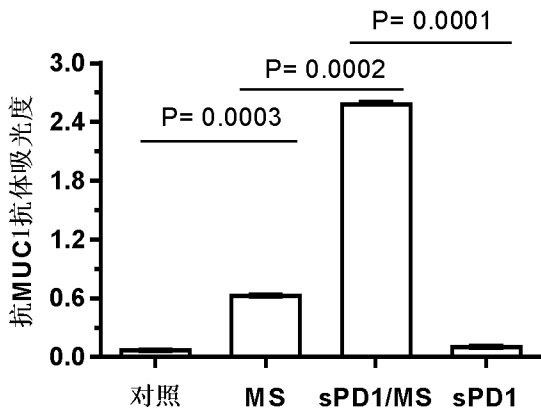


4-c

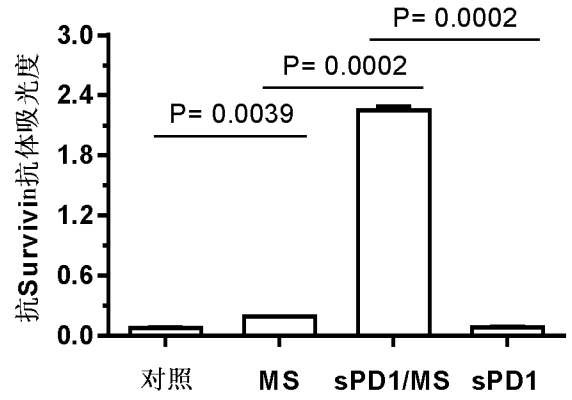


4-d

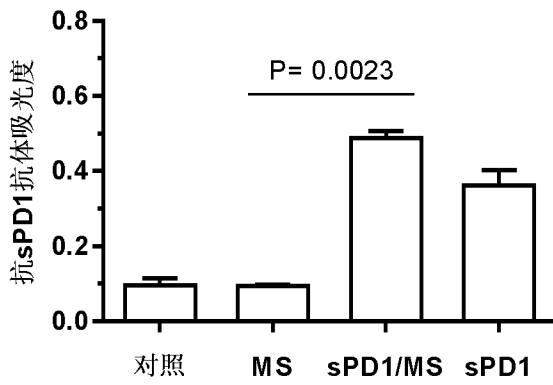
图 4



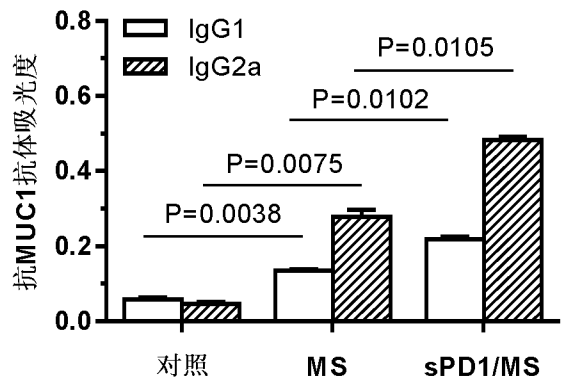
5-a



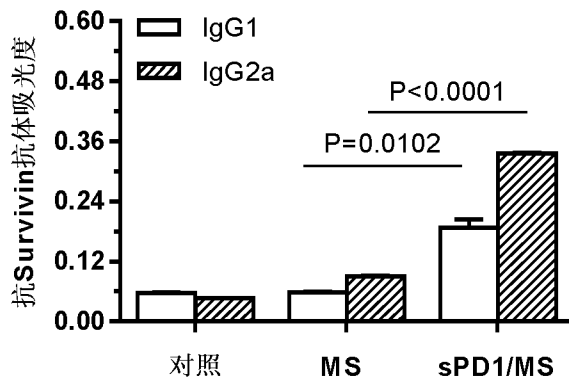
5-b



5-c

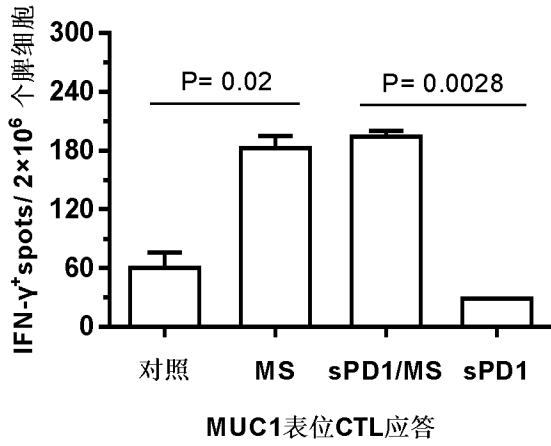


5-d

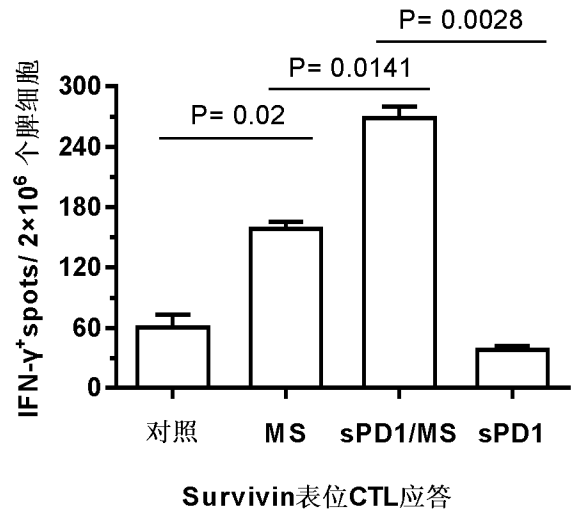


5-e

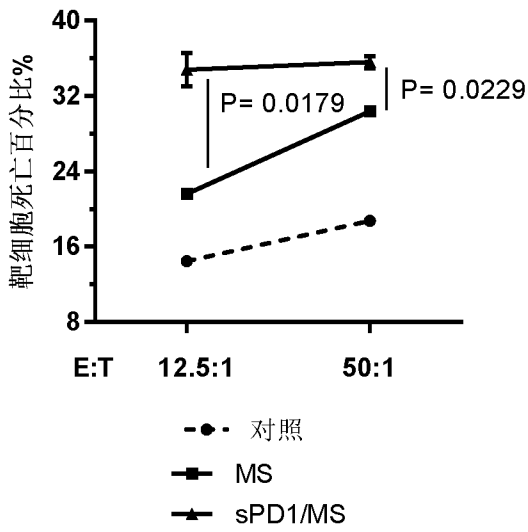
图 5



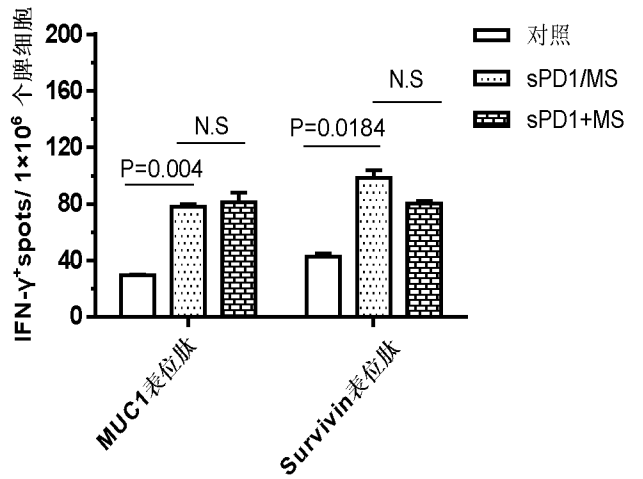
6-a



6-b

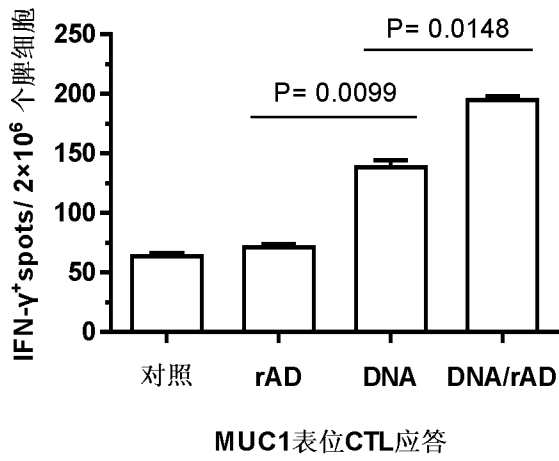


6-c

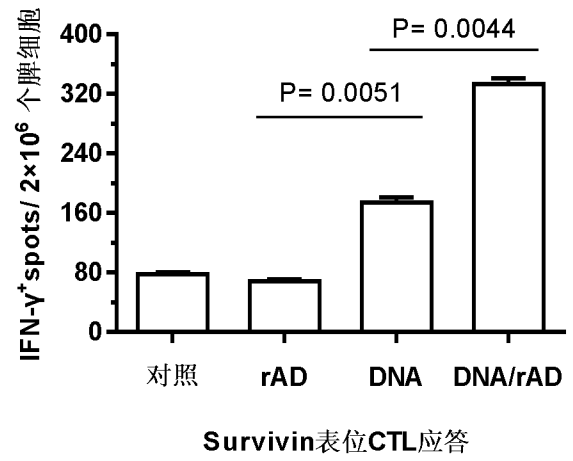


6-d

图 6

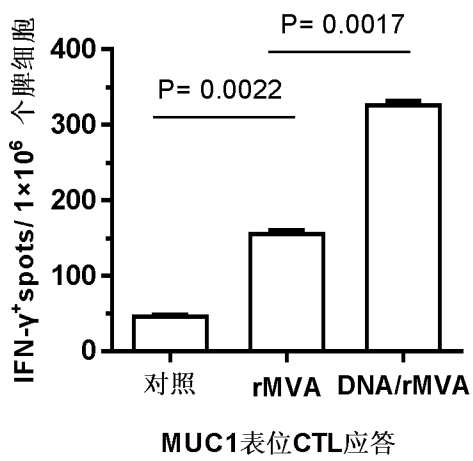


7-a

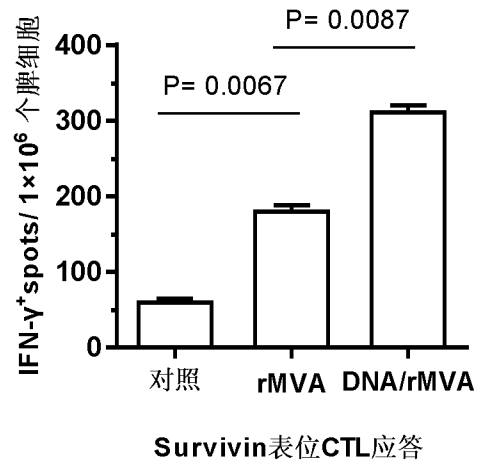


7-b

图 7

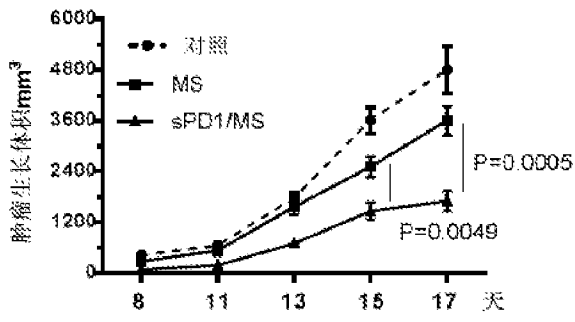


8-a

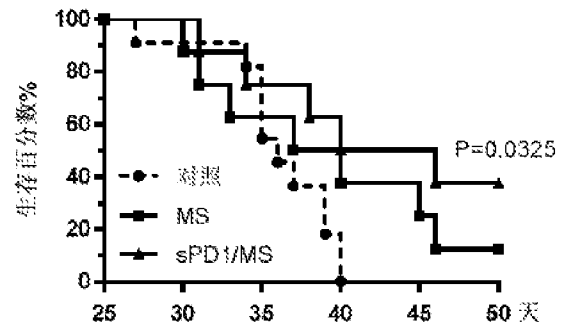


8-b

图 8



9-a



9-b

图 9

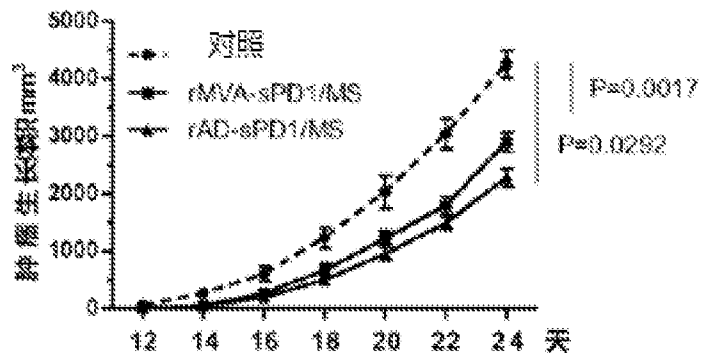
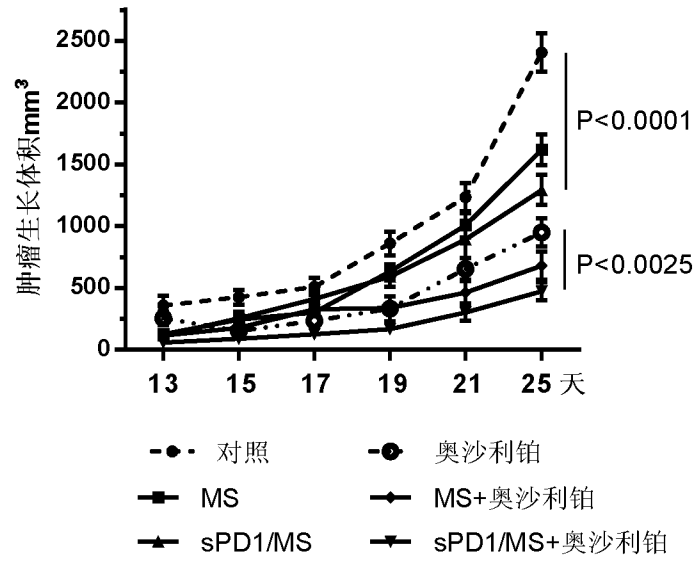
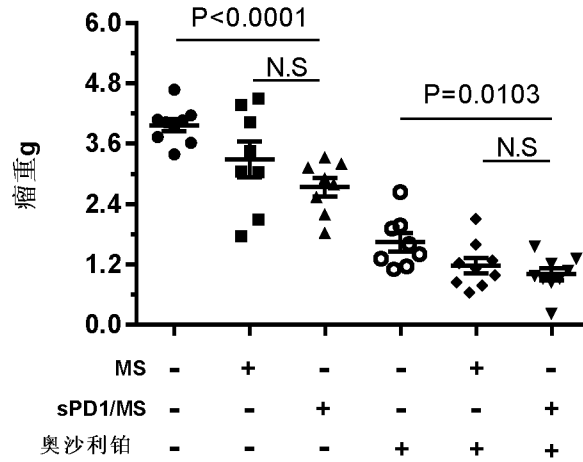


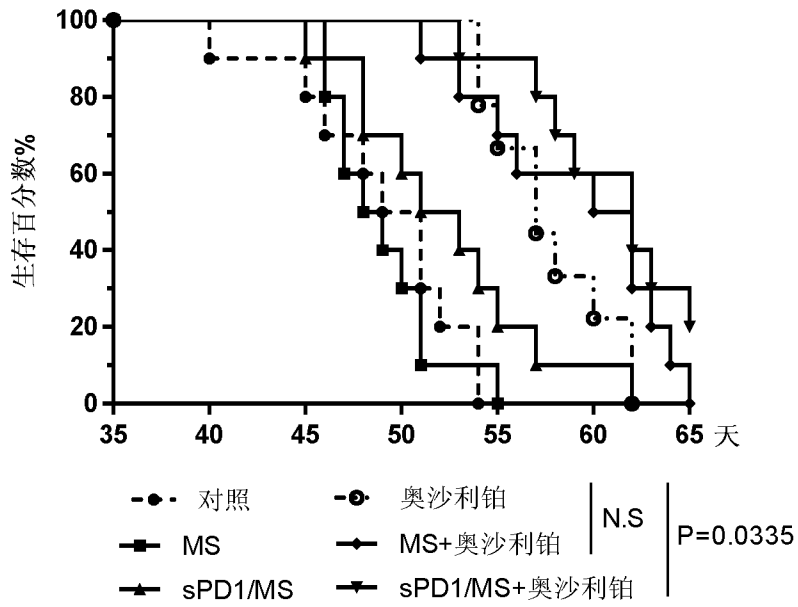
图 10



11-a

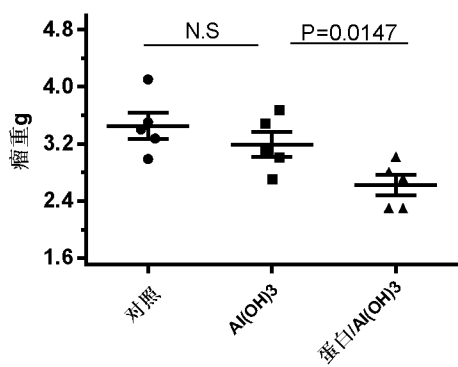


11-b

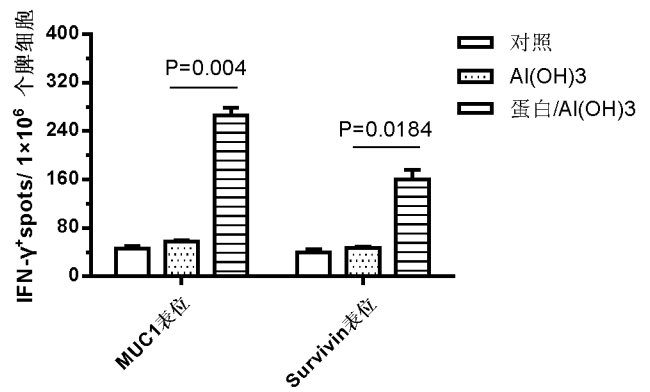


11-c

图 11



12-a



12-b

图 12

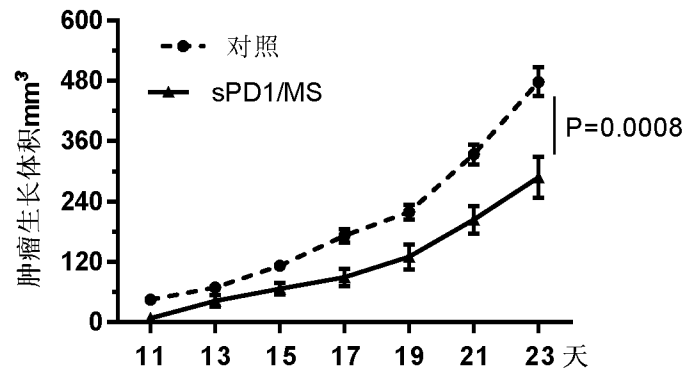


图 13

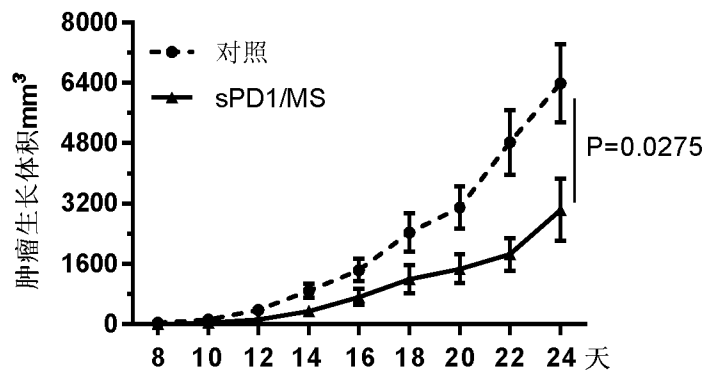


图 14

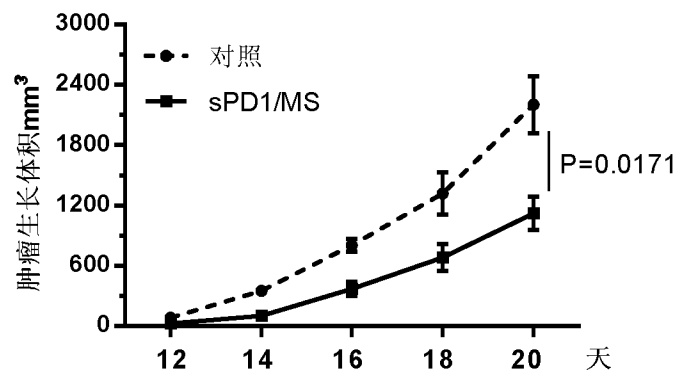


图 15



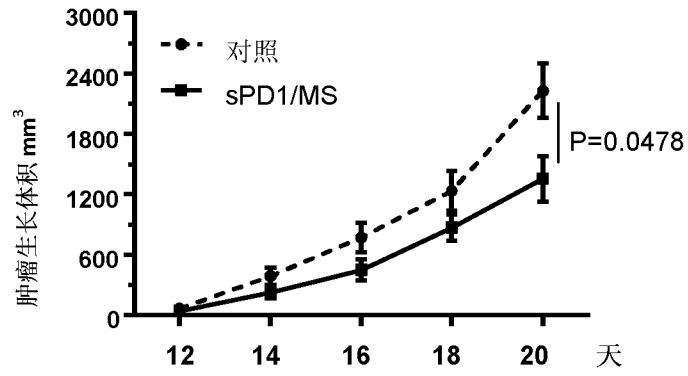


图 16

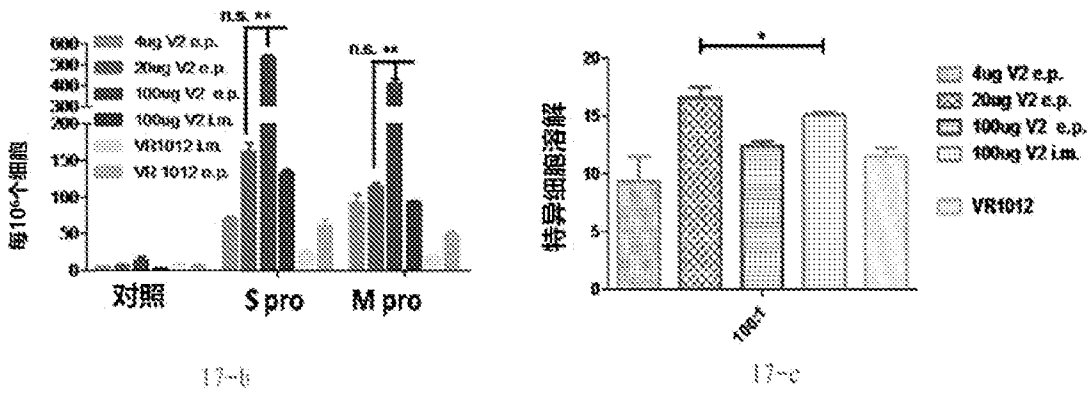
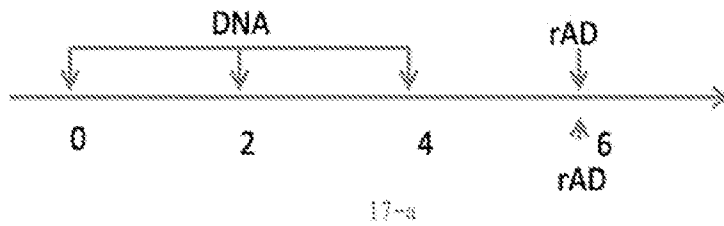


图 17

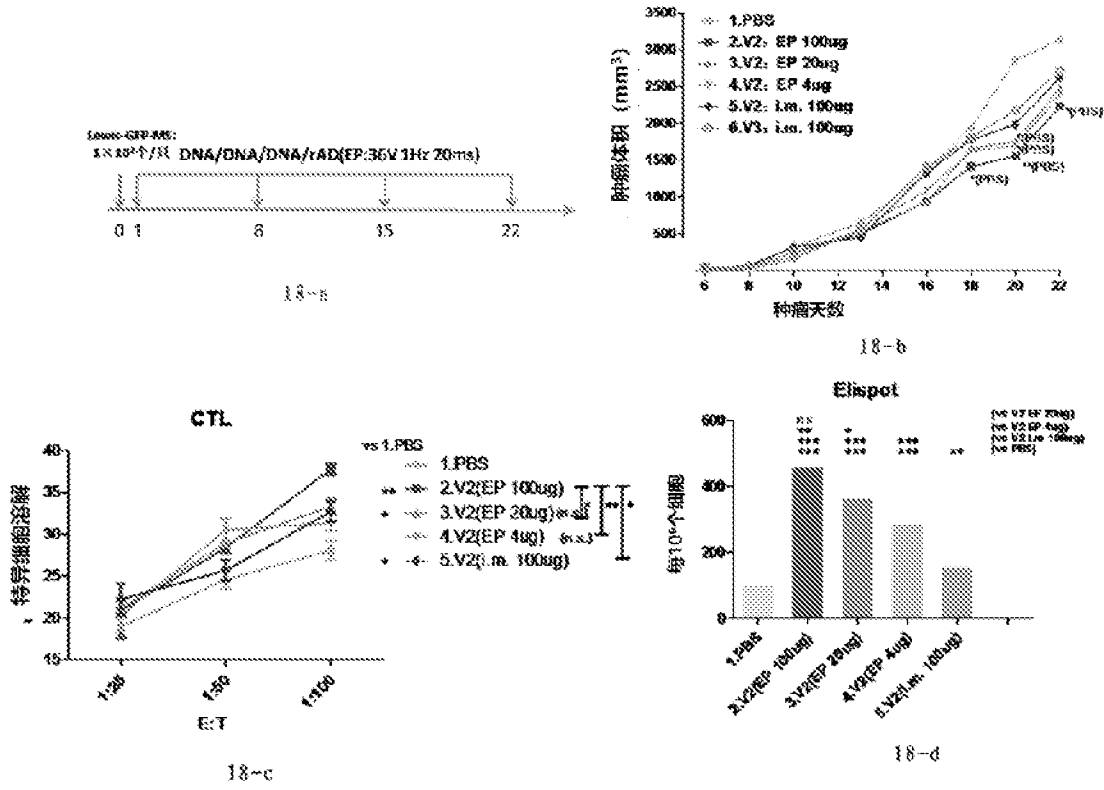


图 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/116393

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61K 39/235(2006.01)i; A61K 39/275(2006.01)i; A61K 31/555(2006.01)n; A61P 35/00(2006.01)n; C12N 15/85(2006.01)n; C12N 15/861(2006.01)n; C12N 15/863(2006.01)n; C07K 19/00(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P; C12N; C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; CNKI; VEN; USTXT; EPTXT; WOTXT; Web of Science; GenBank; NCBI; EMBL, 中国专利生物序列检索系统, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: 吉林大学, 长春百克生物科技, 黏蛋白, 生存素, 人程序性细胞死亡蛋白1, 肿瘤, 癌症, 疫苗, 信号肽, 载体, 佐剂, 白介素, 转染, 病毒, 腺病毒, 痘病毒, 活体基因导入仪, 序列, , search based on sequences 1-9, MUC1, mucin1, survivin, tumor, vaccine, tpa, Carrier, CPDV, PET28a, Interleukin, Al(OH)3, CpG, MPL, QS21, AS02, AS03, Poly-IC, Transfection, virus, Adenovirus, Pox virus, Living gene introduction		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	陆臻桢(LU, Zhenzhen). "可溶性PD-1融合肿瘤抗原MUC1和Survivin的DNA疫苗抗肿瘤研究 可溶性PD-1融合肿瘤抗原MUC1和Survivin的DNA疫苗抗肿瘤研究(Study of Soluble PD1-based DNA Vaccine Targeting MUC1 VNTR and Survivin)" CNKI, 01 May 2016 (2016-05-01), sections 3.3.4 and 3.4.4	1, 5-9, 32-35
Y	陆臻桢(LU, Zhenzhen). "可溶性PD-1融合肿瘤抗原MUC1和Survivin的DNA疫苗抗肿瘤研究 可溶性PD-1融合肿瘤抗原MUC1和Survivin的DNA疫苗抗肿瘤研究(Study of Soluble PD1-based DNA Vaccine Targeting MUC1 VNTR and Survivin)" CNKI, 01 May 2016 (2016-05-01), sections 3.3.4 and 3.4.4	4
Y	WO 2016112921 A1 (UNIV COPENHAGEN ET AL.) 21 July 2016 (2016-07-21) page 111, lines 12-19	4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>03 February 2019</b>		Date of mailing of the international search report <b>21 February 2019</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b>		Authorized officer
Facsimile No. <b>(86-10)62019451</b>		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2018/116393**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104013973 A (CHANGCHUN BCHT BIOTECHNOLOGY CO.) 03 September 2014 (2014-09-03) entire document	1-35
A	CN 102086453 A (CHANGCHUN BCHT BIOTECHNOLOGY CO.) 08 June 2011 (2011-06-08) entire document	1-35
A	CN 105531288 A (BEIGENE LTD.) 27 April 2016 (2016-04-27) entire document	1-35
A	CN 102665748 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.; GENUS ONCOLOGY, LLC.) 12 September 2012 (2012-09-12) entire document	1-35
A	CN 106029889 A (DNA TRIX, INC.; THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 12 October 2016 (2016-10-12) entire document	1-35
A	CN 1889977 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.; SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 03 January 2007 (2007-01-03) entire document	1-35

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **34-35**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  - [1] The subject matter of claims 34-35 is a method of preventing and treating tumors, which relates to a method for the treatment of a living human or animal body and falls within the subject matter for which a search is not required by the International Searching Authority defined in PCT Rule 39.1. The amendments reasonably expected for claims 34-35 are as follows:
    - [2] 34. the use of any one of product of claims 1-7 for preparing a medicament for preventing or treating tumors.
    - [3] 35. according to the use of claim 34, wherein the injection site is stimulated by a living body gene introducer after giving any one of product of claims 30-33.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/116393**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016112921	A1	21 July 2016	CA	3010975	A1	21 July 2016
				AU	2016207099	A1	17 August 2017
				US	2018125954	A1	10 May 2018
				EA	201791598	A1	29 December 2017
				US	10086056	B2	02 October 2018
				US	2018362591	A1	20 December 2018
				DE	16703049	T1	12 July 2018
				EP	3244915	A1	22 November 2017
				HK	1246654	A0	14 September 2018
-----							
CN	104013973	A	03 September 2014	None			
-----							
CN	102086453	A	08 June 2011	CN	102086453	B	07 January 2015
-----							
CN	105531288	A	27 April 2016	HK	1217501	A1	13 January 2017
				US	2015079109	A1	19 March 2015
				WO	2015035606	A1	19 March 2015
				CN	107011441	A	04 August 2017
				AU	2013400609	A8	21 July 2016
				ZA	201601953	B	28 June 2017
				US	8735553	B1	27 May 2014
				TW	1636995	B	01 October 2018
				CN	108715615	A	30 October 2018
				MX	2016003292	A	24 June 2016
				TW	201538525	A	16 October 2015
				US	9834606	B2	05 December 2017
				EP	3044234	A4	09 August 2017
				JP	2016533763	A	04 November 2016
				US	9988450	B2	05 June 2018
				CA	2924172	A1	19 March 2015
				US	2015315274	A1	05 November 2015
				US	9217034	B2	22 December 2015
				EA	201690567	A1	31 August 2016
				CN	107090041	B	16 November 2018
				AU	2013400609	A1	05 May 2016
				SG	11201601844T	A	28 April 2016
				EP	3044234	A1	20 July 2016
				IL	244514	D0	21 April 2016
				US	2018251551	A1	06 September 2018
				CN	107090041	A	25 August 2017
				KR	20160044063	A	22 April 2016
				US	2018111995	A1	26 April 2018
				BR	112016005408	A2	16 January 2018
				IN	201617011596	A	12 August 2016
-----							
CN	102665748	A	12 September 2012	US	8614186	B2	24 December 2013
				JP	2012528191	A	12 November 2012
				AU	2010253834	A1	08 December 2011
				CA	2763327	A1	02 December 2010
				JP	5702371	B2	15 April 2015
				EP	2435062	A1	04 April 2012
				US	2011015138	A1	20 January 2011
				US	2014187494	A1	03 July 2014
				EP	2435062	A4	02 January 2013

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/116393**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				MX	2011012625	A	20 April 2012
				WO	2010138740	A1	02 December 2010
				AU	2010253834	B2	19 December 2013
				US	9096687	B2	04 August 2015
				IL	216612	D0	29 February 2012
CN	106029889	A	12 October 2016	CA	2931322	A1	28 May 2015
				EP	3071697	A4	17 May 2017
				US	2016289645	A1	06 October 2016
				KR	20160137946	A	02 December 2016
				WO	2015077624	A1	28 May 2015
				AU	2014352749	A1	09 June 2016
				JP	2016540505	A	28 December 2016
				EP	3071697	A1	28 September 2016
				HK	1230236	A0	01 December 2017
				SG	11201604020	A1	29 June 2016
CN	1889977	A	03 January 2007	MA	28149	A1	01 September 2006
				IS	8374	A	27 March 2006
				ZA	200602950	B	26 September 2007
				BR	PI0415304	A	05 December 2006
				IL	174544	D0	01 August 2006
				US	2007212329	A1	13 September 2007
				ZA	200602950	A	26 September 2007
				CO	5700790	A2	30 November 2006
				AU	2004283457	A1	06 May 2005
				CA	2541695	A1	06 May 2005
				KR	20070054136	A	28 May 2007
				GB	0323965	D0	19 November 2003
				WO	2005039634	A1	06 May 2005
				EP	1687025	A1	09 August 2006
				RU	2006111847	A	20 November 2007
				JP	2007508272	A	05 April 2007
				NO	20061912	A	02 June 2006
				AU	2004283457	A1	27 April 2006
				MX	2006003861	A1	01 November 2006
				SG	120758	A1	26 May 2006
				IN	200601089	P2	20 April 2007

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61K 39/235(2006.01)i; A61K 39/275(2006.01)i;                  A61K 31/555(2006.01)n; A61P 35/00(2006.01)n; C12N 15/85(2006.01)n; C12N 15/861(2006.01)n; C12N                  15/863(2006.01)n; C07K 19/00(2006.01)n</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P; C12N; C07K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CNTXT; CNKI; VEN; USTXT; EPTXT; WOTXT; Web of Science; GenBank; NCBI; EMBL, 中国专利生物序列检索系                  统: 吉林大学, 长春百克生物科技, 黏蛋白, 生存素, 人程序性细胞死亡蛋白1, 肿瘤, 癌症, 疫苗, 信号肽, 载                  体, 佐剂, 白介素, 转染, 病毒, 腺病毒, 痘病毒, 活体基因导入仪, 序列, 基于序列1-9的序列进行检索, MUC1,                  mucin1, survivin, tumor, vaccine, tpa, Carrier, CPDV, PET28a, Interleukin, Al(OH)3, CpG, MPL, QS21,                  AS02, AS03, Poly-IC, Transfection, virus, Adenovirus, Pox virus, Living gene introduction</p>																				
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>陆臻桢. “可溶性PD-1融合肿瘤抗原MUC1和Survivin的DNA疫苗抗肿瘤研究” CNKI, 2016年 5月 1日 (2016 - 05 - 01), 第3.3.4节、3.4.4节</td> <td>1、5-9、32-35</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>陆臻桢. “可溶性PD-1融合肿瘤抗原MUC1和Survivin的DNA疫苗抗肿瘤研究” CNKI, 2016年 5月 1日 (2016 - 05 - 01), 第3.3.4节、3.4.4节</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016112921 A1 (UNIV COPENHAGEN等) 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21) 第111页第12-19行</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104013973 A (长春百克生物科技股份有限公司) 2014年 9月 3日 (2014 - 09 - 03) 全文</td> <td>1-35</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102086453 A (长春百克生物科技股份有限公司) 2011年 6月 8日 (2011 - 06 - 08) 全文</td> <td>1-35</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	陆臻桢. “可溶性PD-1融合肿瘤抗原MUC1和Survivin的DNA疫苗抗肿瘤研究” CNKI, 2016年 5月 1日 (2016 - 05 - 01), 第3.3.4节、3.4.4节	1、5-9、32-35	Y	陆臻桢. “可溶性PD-1融合肿瘤抗原MUC1和Survivin的DNA疫苗抗肿瘤研究” CNKI, 2016年 5月 1日 (2016 - 05 - 01), 第3.3.4节、3.4.4节	4	Y	WO 2016112921 A1 (UNIV COPENHAGEN等) 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21) 第111页第12-19行	4	A	CN 104013973 A (长春百克生物科技股份有限公司) 2014年 9月 3日 (2014 - 09 - 03) 全文	1-35	A	CN 102086453 A (长春百克生物科技股份有限公司) 2011年 6月 8日 (2011 - 06 - 08) 全文	1-35
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	陆臻桢. “可溶性PD-1融合肿瘤抗原MUC1和Survivin的DNA疫苗抗肿瘤研究” CNKI, 2016年 5月 1日 (2016 - 05 - 01), 第3.3.4节、3.4.4节	1、5-9、32-35																		
Y	陆臻桢. “可溶性PD-1融合肿瘤抗原MUC1和Survivin的DNA疫苗抗肿瘤研究” CNKI, 2016年 5月 1日 (2016 - 05 - 01), 第3.3.4节、3.4.4节	4																		
Y	WO 2016112921 A1 (UNIV COPENHAGEN等) 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21) 第111页第12-19行	4																		
A	CN 104013973 A (长春百克生物科技股份有限公司) 2014年 9月 3日 (2014 - 09 - 03) 全文	1-35																		
A	CN 102086453 A (长春百克生物科技股份有限公司) 2011年 6月 8日 (2011 - 06 - 08) 全文	1-35																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的                  公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体                  说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解                  发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是                  新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并                  且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发                  明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																				
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2019年 2月 3日	2019年 2月 21日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																			
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	李薇霞																			
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-512)88996455																			



C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 105531288 A (百济神州有限公司) 2016年 4月 27日 (2016 - 04 - 27) 全文	1-35
A	CN 102665748 A (达娜-法勃肿瘤研究所公司 属肿瘤有限责任公司) 2012年 9月 12日 (2012 - 09 - 12) 全文	1-35
A	CN 106029889 A (德那翠丝有限公司 得克萨斯系统大学评议会) 2016年 10月 12日 (2016 - 10 - 12) 全文	1-35
A	CN 1889977 A (葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司 史密丝克莱恩比彻姆公司) 2007年 1月 3日 (2007 - 01 - 03) 全文	1-35

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1.  权利要求: 34-35  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
  - [1] 权利要求34-35的主题是防治肿瘤的方法, 该方法涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法, 属于PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题。针对权利要求34-35合理预期的修改如下:
    - [2] 34. 权利要求30-33任一项所述的产品在制备防治肿瘤的药物中的应用。
    - [3] 35. 根据权利要求34所述的应用, 其特征在于, 给予权利要求30-33任一项所述的产品后, 以活体基因导入仪刺激注射位点。
2.  权利要求:  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
3.  权利要求:  
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/116393

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2016112921	A1	2016年 7月 21日	CA	3010975	A1	2016年 7月 21日
				AU	2016207099	A1	2017年 8月 17日
				US	2018125954	A1	2018年 5月 10日
				EA	201791598	A1	2017年 12月 29日
				US	10086056	B2	2018年 10月 2日
				US	2018362591	A1	2018年 12月 20日
				DE	16703049	T1	2018年 7月 12日
				EP	3244915	A1	2017年 11月 22日
				HK	1246654	A0	2018年 9月 14日
-----							
CN	104013973	A	2014年 9月 3日	无			
-----							
CN	102086453	A	2011年 6月 8日	CN	102086453	B	2015年 1月 7日
-----							
CN	105531288	A	2016年 4月 27日	HK	1217501	A1	2017年 1月 13日
				US	2015079109	A1	2015年 3月 19日
				WO	2015035606	A1	2015年 3月 19日
				CN	107011441	A	2017年 8月 4日
				AU	2013400609	A8	2016年 7月 21日
				ZA	201601953	B	2017年 6月 28日
				US	8735553	B1	2014年 5月 27日
				TW	1636995	B	2018年 10月 1日
				CN	108715615	A	2018年 10月 30日
				MX	2016003292	A	2016年 6月 24日
				TW	201538525	A	2015年 10月 16日
				US	9834606	B2	2017年 12月 5日
				EP	3044234	A4	2017年 8月 9日
				JP	2016533763	A	2016年 11月 4日
				US	9988450	B2	2018年 6月 5日
				CA	2924172	A1	2015年 3月 19日
				US	2015315274	A1	2015年 11月 5日
				US	9217034	B2	2015年 12月 22日
				EA	201690567	A1	2016年 8月 31日
				CN	107090041	B	2018年 11月 16日
				AU	2013400609	A1	2016年 5月 5日
				SG	11201601844T	A	2016年 4月 28日
				EP	3044234	A1	2016年 7月 20日
				IL	244514	D0	2016年 4月 21日
				US	2018251551	A1	2018年 9月 6日
				CN	107090041	A	2017年 8月 25日
				KR	20160044063	A	2016年 4月 22日
				US	2018111995	A1	2018年 4月 26日
				BR	112016005408	A2	2018年 1月 16日
				IN	201617011596	A	2016年 8月 12日
-----							
CN	102665748	A	2012年 9月 12日	US	8614186	B2	2013年 12月 24日
				JP	2012528191	A	2012年 11月 12日
				AU	2010253834	A1	2011年 12月 8日
				CA	2763327	A1	2010年 12月 2日
				JP	5702371	B2	2015年 4月 15日
				EP	2435062	A1	2012年 4月 4日
				US	2011015138	A1	2011年 1月 20日
				US	2014187494	A1	2014年 7月 3日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/116393

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
					EP	2435062	A4	2013年 1月 2日
					MX	2011012625	A	2012年 4月 20日
					WO	2010138740	A1	2010年 12月 2日
					AU	2010253834	B2	2013年 12月 19日
					US	9096687	B2	2015年 8月 4日
					IL	216612	D0	2012年 2月 29日
CN	106029889	A	2016年 10月 12日	CA	2931322	A1		2015年 5月 28日
				EP	3071697	A4		2017年 5月 17日
				US	2016289645	A1		2016年 10月 6日
				KR	20160137946	A		2016年 12月 2日
				WO	2015077624	A1		2015年 5月 28日
				AU	2014352749	A1		2016年 6月 9日
				JP	2016540505	A		2016年 12月 28日
				EP	3071697	A1		2016年 9月 28日
				HK	1230236	A0		2017年 12月 1日
				SG	11201604020	A1		2016年 6月 29日
CN	1889977	A	2007年 1月 3日	MA	28149	A1		2006年 9月 1日
				IS	8374	A		2006年 3月 27日
				ZA	200602950	B		2007年 9月 26日
				BR	PI0415304	A		2006年 12月 5日
				IL	174544	D0		2006年 8月 1日
				US	2007212329	A1		2007年 9月 13日
				ZA	200602950	A		2007年 9月 26日
				CO	5700790	A2		2006年 11月 30日
				AU	2004283457	A1		2005年 5月 6日
				CA	2541695	A1		2005年 5月 6日
				KR	20070054136	A		2007年 5月 28日
				GB	0323965	D0		2003年 11月 19日
				WO	2005039634	A1		2005年 5月 6日
				EP	1687025	A1		2006年 8月 9日
				RU	2006111847	A		2007年 11月 20日
				JP	2007508272	A		2007年 4月 5日
				NO	20061912	A		2006年 6月 2日
				AU	2004283457	A1		2006年 4月 27日
				MX	2006003861	A1		2006年 11月 1日
				SG	120758	A1		2006年 5月 26日
				IN	200601089	P2		2007年 4月 20日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)