

一种抗胰腺癌的疫苗、及其医药用途

本申请要求享有 2021 年 11 月 4 日向中国国家知识产权局提交的，专利申请号为 202111301004X，发明名称为“一种抗胰腺癌的疫苗、及其医药用途”的在先申请的优先权权益。所述在先申请的全文通过引用的方式结合于本申请中。

技术领域

本发明涉及一种融合蛋白的应用，具体涉及一种含有人 MUC1 的融合蛋白用于制备预防和治疗胰腺癌的药物中的用途。

背景技术

胰腺癌五年生存率小于 5%，被称为“癌王”。胰腺癌早期症状不明显，容易被忽视，胰腺癌被诊断时一般达到了癌症晚期。胰腺周围有丰富的血管、神经和肾、肝等重要的器官，难以手术，而且由于一般发现晚，只有 10-15% 早期患者适合于手术治疗。大部分患者只能用吉西他滨进行治疗，并联合卡铂、卡培他滨等，但不论哪种方案，治疗效果也只是比不治疗略好。晚期和转移的胰腺癌患者的存活时间一般只有几个月。胰腺癌在进展时会利用周围组织基质的免疫的、血管的、结缔组织损伤后修复反应来创造一个有利的肿瘤微环境，便于肿瘤生长。虽然免疫点监测疗法在多种癌症中治疗效果不错，但是对于胰腺癌，治疗反应非常差。

肿瘤细胞疫苗有可能激活免疫系统，让它们直面癌症细胞。肿瘤疫苗诱导肿瘤特异的免疫反应，激活免疫系统进攻带有特殊抗原的癌细胞。在众多免疫抗原中，粘蛋白 MUC1 被赋予希望。最初发现 MUC1 具有保护和润滑上皮的功能。后来陆续发现它在细胞信号传导以及从恶性细胞转化到肿瘤扩散的肿瘤发生的所有阶段均起着重要作用。MUC1 是一种高度糖基化的跨膜蛋白，是一种 I 型跨膜蛋白，具有高度糖基化的胞外结构域，从细胞表面延伸 200-500 纳米。全长分为胞外区、跨膜区和胞内区。胞外区由脯氨酸，苏氨酸和富含丝氨酸的（PTS）域和 SEA 域组成。PTS 域，也叫可变数目串联重复序列（VNTR）区，由高度多态的外显子编码，该外显子编码多个 20-21 个氨基酸序列重复序列组成，而 MUC1 的胞内区（CT）是高度保守的。MUC1 的过表达通常与结肠癌，乳腺癌，卵巢癌，肺癌和胰腺癌有关。MUC1 被证明存在于各种腺癌中。在一项原发性肝癌的病人治疗研究中，MUC1 高表达的病人比例高

达 68%。同时手术后复发的比例也是最高，跟 MUC1 表达强度呈正相关。另外，MUC1 在一些血液恶性肿瘤的也是过度表达。肿瘤组织和正常组织的 MUC1 不仅在表达量上有差异，肿瘤与正常组织的 MUC1 糖基化也存在差异。低糖基化的 MUC1 是在肿瘤细胞的整个表面过度表达，使肿瘤细胞粘附力的降低，为肿瘤转移提供了便利。已经形成的肿瘤中，大量 MUC1 可以抑制 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用，还可以抑制细胞毒淋巴细胞（CTL）的增殖，甚至可以诱导 CTL 凋亡。

疫苗接种可以为宿主提供长期的保护作用，且几乎没有副作用，是治疗癌症的重要方法之一。理论上 MUC1 应该是一个非常好的疫苗抗原，但在人体临床试验中的临床效果并不理想。疫苗产生的抗体大多不能与肿瘤细胞很好地结合，无法有效保护机体杀灭肿瘤。

我们的研究表明 MUC1 可以被连接到细菌或者病毒上的蛋白质，产生针对癌细胞的 T 细胞反应，产生抗肿瘤效应。目前研究较为火热的新生抗原（neoantigen）疫苗需要高通量的测序和生物信息学的筛选，时间花费和资源需求较大，难以造福患者。开发花费较低、效果更好的治疗性癌症疫苗被寄予厚望。本发明公开一种可用于价格低廉的治疗性癌症疫苗制备的、适用于大肠杆菌生产且抑制胰腺癌细胞生长的重组蛋白质的基因优化方法。

发明内容

为了提供更为有效的胰腺癌预防和治疗生物制剂，本发明提供了一种融合蛋白在制备抗肿瘤药物，尤其是胰腺癌药物中的用途。本发明通过如下技术方案实现：

一种融合蛋白在制备预防和/或治疗肿瘤药物中的用途。

根据本发明，所述肿瘤为 MUC1 阳性的肿瘤，例如表达 MUC1 的腺癌或表达 MUC1 的血液肿瘤，更优选所述肿瘤为胰腺癌。

本发明还提供一种融合蛋白在制备预防和/或治疗胰腺癌药物中的用途。

根据本发明，所述融合蛋白包括麦芽糖结合蛋白 MBP 和/或蛋白 MUC1-N。

根据本发明，所述融合蛋白由麦芽糖结合蛋白 MBP 和/或蛋白 MUC1-N 串联而成。

更进一步地，所述 MUC1-N 的基因核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 MBP 的基因核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

更进一步地，所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

本发明还提供了一种抑制胰腺癌的肿瘤细胞生长的方法，所述方法包括给与本发明所述的融合蛋白。

本发明提供一种药物组合物，其包含本发明的融合蛋白。

根据本发明，所述药物用于治疗肿瘤，优选地，所述肿瘤为 MUC1 阳性的肿瘤，例如表

达 MUC1 的腺癌或表达 MUC1 的血液肿瘤，更优选胰腺癌。

根据本发明，所述药物用于治疗乳腺癌。

根据本发明，所述融合蛋白包括麦芽糖结合蛋白 MBP 和/或蛋白 MUC1-N。

根据本发明，所述融合蛋白由麦芽糖结合蛋白 MBP 和/或黏蛋白 MUC1-N 串联而成。

更进一步地，所述 MUC1-N 的基因核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 MBP 的基因核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

更优选地，所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

本发明还提供了一种融合蛋白在保健品、化妆品、食品或食品添加剂中的应用，其特征在于，其中所述融合蛋白包括麦芽糖结合蛋白 MBP 和/或蛋白 MUC1-N。

根据本发明，所述保健品、化妆品、食品或食品添加剂可用于抑制肿瘤。

优选地，所述肿瘤为 MUC1 阳性的肿瘤，例如表达 MUC1 的腺癌或表达 MUC1 的血液肿瘤，更优选胰腺癌。

本申请优选实施方式，所述融合蛋白由麦芽糖结合蛋白 MBP 和蛋白 MUC1-N 串联而成。

更进一步地，所述 MUC1-N 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 MBP 基因核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

更优选地，所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

本发明还提供了蛋白 MBP 基因和/或蛋白 MUC1-N 基因在制备预防和/或治疗肿瘤药物中的用途，其特征在于，所述 MUC1-N 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 MBP 基因如 SEQ ID NO.2 所示。

根据本发明，所述癌症包括所有表达 MUC1 的癌症，包括表达 MUC1 的腺癌或表达 MUC1 的血液肿瘤，更优选为胰腺癌。

本发明还提供了蛋白 MBP 基因和/或蛋白 MUC1-N 基因在制备预防和/或治疗胰腺癌药物中的用途，其特征在于，所述 MUC1-N 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 MBP 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

本发明的有益效果:

本发明通过动物实验证明本发明的融合蛋白和基因对于不同剂量的胰腺癌细胞生长均具有显著的抑制作用，对于胰腺癌具有显著的预防和治疗效果。

附图说明

图 1: 蛋白质表达和纯化后的胶图;

图 2: MBP-Muc1-N 抑制胰腺癌细胞增殖实验;

图 3: MBP-Muc1-N 抑制胰腺癌细胞增殖实验;

图4: 双佐剂疫苗单药治疗pan-02胰腺癌实验结果。

具体实施方式

以下通过实施例对本发明进行说明。但本领域技术人员知悉。下述实施例不是对本发明保护范围的限制,任何在本发明实施例基础上做出的改变和变化,都在本发明的保护范围之内。

实施例 1、融合蛋白的构建及表达

1. 基因优化

优化后 MUC1-N 蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示:

```
gggtgtacttctgctcctgatactgctcctggttctactgcaccgccagcacatggcgtgacgtctgcgccagatacccgctccggcaccg
gggtccaccgccccaccggcacacggcgtaacctccgcgccagacacccgctccagcgccaggttctaccgctccgctgctcatggtgttacc
tctgccccggacactcgtccggctccaggttctactgccccgccagctcatggcgtcacttccgccccggatacccgctcgtccccgggtctta
ctgcgctccggctcaccggcttacctctgcaccggatactcgtccggctccgggtctaccgcaccacctgctcatggcgtaacgagcgctcc
tgatacccgctccggctccgggttccactgcacctccggccccac
```

优化后 MBP 蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示:

```
aaaatcgaagaaggcaactggtgatctggatcaaacggtgataagggtataacggctggcggaagtaggcaagaaattcgaaaaagacacc
gggtatcaaagttaccgtgaacatccagacaaaactggaagaaaaattccctcaggtggcggtaccggcgacggccctgatcatctttctgggc
acatgatcgttttggcggttacgcgcagcttgccctgctggcagaaatcacgccgataaggcgttcaggacaaaactgtacccttttacctggg
acgcggtgcgttacaacggcaactgatcgcttaccgatcgagtggaagctctgtccctgatctacaataaggacgtgctccgaaccgccc
taaaacgtgggaagaaatccggccctggacaagaactgaaagcaaaaggtaagagcgctctgatgttcaatctgcaggaaccgtacttcac
ttggccgctgatcgacgtgacggcggttatgcgtttaataacgaaacggtaaatatgacattaaggacgtcgcggttgataacgcccggcgcc
aaagcgggcctgacctttctggtcgacctgatcaaaacaacacatgaacgctgacaccgattattctattcgaggcggttttaacaaggg
cgagaccgcaatgaccatcaacggctccgtgggttggtctaatacgacacctccaaagtaaaattacgggtgtaccgtcctgccgaccttcaaag
gtcaaccgagcaaacggttcgtggcgctgctgctccgaggtatcaacgctgctccccaacaaagagctggccaaagagttcctggaaaact
atctgctgaccgacgaaggcctggaagctgttaataaagacaaaccgctgggtgctgttgactgaaatcctatgaagaagaactggtcaaaga
tccgctatttccgccactatggagaacgcgcagaaaggtaaatcatgccgaacatcccgcaaatgtccgctttttgtacgcggtgcgtacc
gctgtaattaacgcggcgctccggtcgtcagactgtcgatgaagcgctgaagatgctcagactaactctagctctaacaataacaataatacaa
caacaacaatctgggtattgaaggctgcacatctt
```

MUC1-N 融合 MBP 优化基因序列的合成

为实现 MBP 和 Muc1-N 的依次串联表达，获得融合蛋白序列为 SEQ ID NO.3 所示：

KIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGP
DIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYN
KDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDI
KDVGVNDAGAKAGLTFLVDLIKNNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDT
SKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKP
LGAVALKSYYYEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVD
EALKDAQTNSSSSNNNNNNNNNNNLGIEGRISGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA
PGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPG
STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH。

根据 MBP 和 Muc1-N 融合蛋白质的基因序列进行串联合成。为此，先合成 1a_1、1a_2、1a_3、1a_4、1a_5、1a_6、1a_7、1a_8、1a_9、1a_10、1a_11、1a_12、1a_13、1a_14、1a_15、1a_16、1a_17、1a_18、1a_19、1a_20、1a_21、1a_22、1a_23、1a_24、1a_25、1a_26、1a_27、1a_28、1a_29、1a_30 寡核苷酸序列，再合成 1b_1、1b_2、1b_3、1b_4 序列，利用 1-seq2、1-R 序列进行基因扩增，获得 MUC1-N 融合 MBP 优化基因序列。

编号	序列	碱基数
1-seq2	tacttcacttgccgctgat	20
1-R	ggcctctgcagtcgacgggccccggggaagacttgacgcgtatccggtgcagaagtaacgccgtgtgcc ggcgggtgcagtggaacccggcgctggacgagatccggcgacacgt	116
1a_1	aacgacggccagagaattcagctcggatccctcctcgtgccagccggcgatggcc	64
1a_2	cccttaccggtgatccagatcaccagtttgccttctcgtttatccatggccatgccggctg	68
1a_3	caacggtgataagggttataacggctctggcgggaagtaggcaagaaattcgaagacaccgggtatca	68
1a_4	acctgaggggaattttcttcagttgtctggatgttaacggtaactttgataccgggtgtctt	64
1a_5	aaaatccctcaggtggcggctaccggcgacggccctgatatcatttctgggcacatgatcgttttg	68
1a_6	aacgccttaccggcggtgatttctgccagcaggccagactgcgcgtaaccgcaaacgatcatgtg	67
1a_7	ggcggataaggcggtccaggacaaactgtaccctttacctgggacgcggtgcgttacaacggcaa	66
1a_8	cttattgtatcagggacagagcttccactgcgacgggtaagcgtatcagtttgcggttgaacgc	67
1a_9	ctgatctacaataaggacctgctgccgaacccgcctaaaacgtgggaagaaatccggccctggacaaa	69
1a_10	cgggtcctgcagattgaacatcagagcgtcttaccttttcttcagttcttcttcagggccgg	66
1a_11	aatctgcaggaaccgtacttcacttggccgctgatcgcagctgacggcggttatgcgtttaaatcag	67
1a_12	tttggcgccggcggtatcaaacggcgacgtccttaagtcatattaccgtttctgtatttaaacgat	68
1a_13	aacggcgccgcaaacggcgctgaccttctggtgcacctgatcaaaaacaacacatgaacgct	66
1a_14	ggggtctcggcctgtttaaaggccgctccgcaatagaataatcggtgtcagcgttcatgtgtt	65
1a_15	caaggcgagaccgcaatgacctcaacggctcgtgggcttggctaacatcgacacctcaa	63

1a_16	ttgctcggttgaccttgaaggcggcaggacggtaacaccgtaatttactttggaggtgctgatg	66
1a_17	agggtcaaccgagcaaaccgttcgtggcgctgtccgcaggtatcaacgctgcctcccaaaacaaa	67
1a_18	ccttcgtcggcagcagatagttttccaggaactctttggccagctcttggttgggaggcc	62
1a_19	gctgaccgacgaaggcctggaagctgtaataaagacaaaccgctgggtgctgttgactgaaa	64
1a_20	ctccatagtgccggcaatacgcggatctttgaccagttcttctcataggatttcagtgaacagc	66
1a_21	gccgccactatggagaacgcgcagaaaagtgaaatcatgccgaacatcccgaatatgtccgc	62
1a_22	ctgacgaccggacgccggttaattacagcggtagcaccgcgtacaaaaagcggacatttgcggg	67
1a_23	gcgtccggcgtcagactgtcgtatgaagcgtgaaagatgctcagactaactctagctctaaca	64
1a_24	gagatgcgacctcaataccagattgtgtgtgtattattgtattgttagagctagagt	64
1a_25	tgaaggcgcacatctctggcgttactagcgcaccgatacccgccggcaccgggctctaccgct	64
1a_26	cggagcgggaagtaacaccgtgagcaggcggagcggtagagcccg	45
1a_27	tgttacttccgctccggacacccgtccagcggcagggttccaccgcaccgccggcacacggcgttacctccg ctccagatactcgcc	86
1a_28	agtatccggcgcagacgtgacgccgtgcgctggcgggtgcagtagaaccgggtgccgggcgagtatctgg ag	71
1a_29	tctgcgccggatactgtccagcgcgggttccactgcaccgccggcacacggcgttacttctgcaccgga tacgcgtccaagtcttc	89
1a_30	ggcctctgcagtcgacgggccccggggaagacttggacgc	39
1b_1	ccaatgggtctcagtcggctccaggttctactgccccgccggcacatggcgttacctctg	60
1b_2	cgtgcgccggaggagcgggtgctgcctggtgcagggcgagtgctccggggcagaggtaacgccat	63
1b_3	ctcctccggcgcacgggtgtcacttctgtccagacacc	39
1b_4	ggccgcaagcttgcgacggagctcgaattctcagtcgccggcggggcgggtgctgccggagccggac gggtgtctggagcag	84

2、蛋白质重组表达与纯化

将融合基因的 5'PCR 引物附加 NcoI 酶切位点，3'PCR 引物附加 EcoI 酶切位点，扩增出的基因双酶切，插入到同样双酶切的 pET26b(+)大肠杆菌表达载体中。经过抗性细菌培养板的筛选和单克隆挑选，用卡那霉素抗性的培养基培养和 IPTG 诱导操纵子的表达。将未优化的序列、优化的序列进行实验。最后得到的全菌液用含有 SDS 的缓冲液进行 95℃预处理，用 5%-12%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。结果显示：优化前的序列 MBP-Muc1-N 表达量只有总蛋白的 2%，优化后的序列 1 MBP-Muc1-N 表达量占总蛋白的 51%，上升了 25.5 倍。经过亲和柱纯化后，未优化的基因表达的蛋白质进行 10 倍浓缩才能上样观察，浓缩后纯化蛋白质产量为 100ml 培养物 0.8mg，而优化后的序列 MBP-Muc1-N 产量为 9.6mg，上升了 12 倍。

实施例2、MBP-Muc1-N融合蛋白的活性测试

1.材料

实验试剂：使用本申请的方法重组MBP-MUC1-N融合蛋白；Pan-02胰腺癌细胞购自国家实验细胞资源中心；注射生理盐水购自北京天坛生物制品股份有限公司。

实验动物：C57 BL/6J小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司。

2.方法

(1) 每组6只C57BL/6J，雄性，6-8周龄。接种Pan-02胰腺癌细胞数量为 1.75×10^5 个/只，接种位置为右腋皮下，接种MBP-Muc1-N为每剂50 μ g。接种后第7天，可见肿瘤约5mm左右，腿部肌肉注射第一针MBP-Muc1-N；接种后第50天，注射第二针MBP-Muc1-N；此后接种后第54天、57天注射第三、第四针MBP-Muc1-N。

(2) 每组6只C57BL/6J，雄性，6-8周龄。接种Pan-02胰腺癌细胞数量为 1.0×10^6 个/只，接种位置为右腋皮下，接种MBP-Muc1-N为每剂50 μ g。接种后第7天，可见肿瘤约5mm左右；接种后第17天，注射第二针MBP-Muc1-N；此后接种后第20天、24天、27天、31天注射第三、第四、第五、第六针MBP-Muc1-N。

3. 检测结果

3.1 方法1中，从附图2可见，接种Pan-02胰腺癌细胞数量为 1.75×10^5 个/只后第7天，可见肿瘤约5mm左右，腿部肌肉注射第一针MBP-Muc1-N；此后可见肿瘤生长缓慢，直到接种后第50天，肿瘤生长迅速，注射第二针MBP-Muc1-N；此后接种后第54天、57天注射第三、第四针MBP-Muc1-N。注射第三、第四针MBP-Muc1-N后可见肿瘤生长受到显著抑制。

表1. 胰腺癌长周期给药的效果

	对照组	MBP-Muc1-N 组	抑制率
57 天	3739 $\pm$ 460 mm ³	2131 $\pm$ 1087mm ³	43%
60 天	4075 $\pm$ 983 mm ³	2739 $\pm$ 970mm ³	33%

3.2 方法2中，从附图3可见，接种后第7天，可见肿瘤约5mm左右；此后肿瘤生长缓慢，直到接种后第17天，注射第二针MBP-Muc1-N；此后接种后第20天、24天、27天、31天注射第三、第四、第五、第六针MBP-Muc1-N。注射第二、第三、第四、第五、第六针MBP-Muc1-N后可见肿瘤生长受到显著抑制。

表2. 胰腺癌短周期给药的效果

	对照组	MBP-Muc1-N 组	抑制率
21 天	610 $\pm$ 141 mm ³	450 $\pm$ 90mm ³	26%
24 天	780 $\pm$ 159 mm ³	508 $\pm$ 191mm ³	35%
28 天	980 $\pm$ 149mm ³	632 $\pm$ 205mm ³	36%
31 天	1127 $\pm$ 318mm ³	625 $\pm$ 249mm ³	45%
33 天	1330 $\pm$ 318mm ³	577 $\pm$ 172mm ³	57%

综上所述，本发明通过改造后的MBP-Muc1-N动物实验，测定改造后的融合蛋白对于不

同浓度的胰腺癌细胞生长均具有显著的抑制作用，能够有效预防和/或治疗胰腺癌。

实施例3、单佐剂疫苗单药治疗pan-02胰腺癌

1.材料

实验试剂：使用本申请的方法重组MBP-MUC1-N融合蛋白表达菌株。抗PD-1抗体购自Bioxcell公司；pan-02胰腺癌细胞购自国家实验细胞资源中心；氢氧化铝佐剂购自禾大公司。

实验动物：C57 BL/6J小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司。

2.方法

2.1 MBP-MUC1-N融合蛋白的生产

使用本申请的方法重组MBP-MUC1-N融合蛋白表达菌株进行发酵，收集发酵液，完成菌体澄清和破碎，离心收集上清上amylose-resin，用麦芽糖洗脱完成MBP-MUC1-N融合蛋白的亲和纯化。随后透析更换缓冲液，上Q-sepharose，用高浓度NaCl完成阴离子交换纯化。再更换到柠檬酸缓冲液，上SP-sepharose，用高浓度精氨酸完成阳离子交换纯化。纯化产品的内毒素、残留宿主DNA、残留蛋白质均达到原液要求。透析将缓冲液更换为20mM醋酸-醋酸钠缓冲液，150mM精氨酸。

2.2小鼠免疫

将小鼠称重，随机分组，每组10只鼠，将pan-02胰腺癌细胞按照 1×10^6 个细胞/只用PBS稀释，总量100 μ l/只接种到C57BL/6J小鼠右侧腋下，建模。待肿瘤直径达到5mm后（10天）分为5组，分别是氢氧化铝对照组（100 μ l，每周两次，肌肉注射）、MNRvax低剂量组（0.2mg/kg，100 μ l，每周两次，肌肉注射）、MNRvax中剂量组（2mg/kg，100 μ l，每周两次，肌肉注射）、MNRvax高剂量组（8mg/kg，100 μ l，每周两次，皮下注射）、免疫检测点抑制剂抗PD-1抗体组（10mg/kg，100 μ l，每周两次，腹腔注射）。

于荷瘤后第10、13、17、20天注射药物，第10、13、17、20、24天测定肿瘤大小。计算各组皮下胰腺癌移植瘤抑制率和肿瘤抑制率。公式如下：[肿瘤抑制率=（对照组平均瘤重-实验组平均瘤重）/对照组平均瘤重 $\times 100\%$]。[肿瘤治愈率=（未长肿瘤小鼠个数/10只） $\times 100\%$]。

3.结果

表3.小鼠肿瘤瘤重(g)及肿瘤抑制率(%)和肿瘤治愈率

	瘤体积 (cm ³)	肿瘤抑制率	肿瘤治愈率
佐剂组	0.408±0.091	0	0
低剂量疫苗组	0.332±0.068	17	20
中剂量疫苗组	0.327±0.091	20	20
高剂量疫苗组	0.320±0.112	22	20
PD-1组	0.338±0.087	17	10

表4.不同剂量的治疗效果

cm ³	对照组	低剂量疫苗组	中剂量疫苗组	高剂量疫苗组	PD-1 抗体组
10 天	0.172±0.014	0.172±0.014	0.172±0.014	0.172±0.016	0.172±0.014
13 天	0.177±0.015	0.179±0.019	0.180±0.013	0.180±0.021	0.180±0.033
17 天	0.213±0.015	0.213±0.034	0.217±0.038	0.234±0.073	0.204±0.049
20 天	0.359±0.079	0.295±0.072	0.286±0.062*	0.291±0.083	0.301±0.075
24 天	0.408±0.091	0.332±0.068*	0.327±0.091	0.320±0.112	0.338±0.087

* p<0.05 (vs 对照组)

从表3和表4中可以看出，低、中、高剂量的MBP-Muc1-N疫苗治疗组相对于对照组，可以显著消除肿瘤。荷瘤后的20、24天，肿瘤显著缩小。分别从0.359±0.079mm³缩小到0.286±0.062、0.295±0.072、0.291±0.083mm³；从0.408±0.091mm³缩小到0.332±0.068、0.327±0.091、0.320±0.112mm³；p值分别为0.077、0.036、0.081和0.049、0.062、0.069，存在显著差异。而PD-1抗体治疗组的肿瘤从0.359±0.079mm³缩小到0.301±0.075mm³，0.408±0.091mm³缩小到0.338±0.087 mm³，表明MBP-Muc1-N疫苗效果比PD-1抗体效果好。

实施例4、双佐剂疫苗单药治疗pan-02胰腺癌

1.材料

实验试剂：重组MBP-MUC1-N融合蛋白制备方法同上。氢氧化铝佐剂购自禾大公司，CpG1826 佐剂（5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3'）、硫代 *CpG1826* 佐剂（5'-T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T-3'）购自上海生物工程公司。

实验动物：C57 BL/6J小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司。

2.方法

2.1 MBP-MUC1-N融合蛋白的生产

三步纯化法得到重组MBP-MUC1-N融合蛋白。纯化产品的内毒素、残留宿主DNA、残留蛋白质均达到原液要求。

2.2小鼠免疫

将小鼠称重，随机分组，每组6只鼠，将pan-02胰腺癌细胞按照 1×10^6 个细胞/只用PBS稀释，总量100 μ l/只)接种到C57BL/J小鼠右侧腋下，建模。待肿瘤直径达到5mm后（10天）分为6组，分别是PBS对照组（100 μ l，每周两次，肌肉注射）、MNRvax组（2mg/kg，100 μ l，每周两次，肌肉注射）、CpG组（10 μ g/只，100 μ l，每周两次，肌肉注射）、*CpG*组（10 μ g/只，100 μ l，每周两次，肌肉注射）、MNRvax+CpG组、MNRvax+*CpG*组。

于荷瘤后第8、21、29、36天注射药物，第43天测定肿瘤大小。计算各组皮下胰腺癌移植瘤抑制率和肿瘤抑制率。公式如下：[肿瘤抑制率=(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$]。[肿瘤治愈率=(未长肿瘤小鼠个数/10只) $\times 100\%$]。

3. 结果

表 5. 小鼠肿瘤瘤重(g)及肿瘤抑制率(%)和肿瘤治愈率

	瘤体积 (cm ³)	肿瘤抑制率	肿瘤治愈率
PBS 组	2.26 $\pm$ 0.78	0	0
MNRVax 疫苗组	2.06 $\pm$ 0.34	9	0
CpG 组	1.50 $\pm$ 0.58	34	17
*CpG*组	0.99 $\pm$ 0.79*#	56	33
MNRVax+CpG 组	0.75 $\pm$ 0.39**###¶	67	33
MNRVax+*CpG*组	1.21 $\pm$ 0.43*##	46	0

* p<0.05; ** p<0.01 (vs PBS)

#p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001 (vs MNRVax).

¶p<0.05 (vs CpG)

4. 结论

醋酸-醋酸钠缓冲液体系配制的重组MBP-MUC1-N融合蛋白疫苗对肿瘤抑制作用较低，而添加CpG1826可以提升这种抑制作用。

实施例5. 疫苗单药治疗pan-02胰腺癌作用机制研究

1. 材料

实验试剂：重组MBP-MUC1-N融合蛋白自制。抗PD-1抗体购自Bioxcell公司；pan-02胰腺癌细胞购自国家实验细胞资源中心；氢氧化铝佐剂购自禾大公司。PE/DAZZLIE594-CD3抗体（17A2克隆，大鼠IgG2b, κ ）、BV421-CD4抗体（GK1.5克隆，大鼠IgG2b, κ ）、APC-FIRE75-CD8a（53-6.7克隆，大鼠IgG2a, κ ）、APC-CD335（29A1.4克隆，大鼠IgG2a, κ ）、PE-CD19（6D5克隆，大鼠IgG2a, κ ）、PE-CY7-F4/80(BM8克隆，大鼠IgG2a, κ ）、FITC CD45(30-F11克隆，大鼠IgG2b, κ)、BV711-CD11c（N418克隆，亚美尼亚仓鼠IgG）购自Biolegend公司；eFluor 506-L/D购自Invitrogen公司；BB700CD11b(M1/70克隆，大鼠IgG2b, κ)购自BD公司。小鼠肿瘤

解离试剂盒购自Miltenyi公司。

实验动物：C57 BL/6J小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司。

2.方法

2.1小鼠免疫

将小鼠称重，随机分组，每组10只鼠，将pan-02胰腺癌细胞按照 3×10^6 个细胞/0.1ml•只用PBS稀释，总量100 μ l/只)接种到C57BL/J小鼠右侧腋下，建模。待肿瘤直径达到5mm后(10天)分为5组，分别是氢氧化铝对照组(100 μ l，每周两次，肌肉注射)、MNRvax低剂量组(0.2mg/kg，100 μ l，每周两次，肌肉注射)、MNRvax中剂量组(2mg/kg，100 μ l，每周两次，肌肉注射)、MNRvax高剂量组(8mg/kg，100 μ l，每周两次，皮下注射)、免疫检测点抑制剂抗PD-1抗体组(10mg/kg，100 μ l，每周两次，腹腔注射)。

2.2 小鼠样本分离

2.2.1 小鼠肿瘤样本分离

向管中加入Miltenyi的酶D、R和A混合酶溶液，加入直径3mm大小肿瘤块，安装到gentleMACS组织处理器的套管中，使用带加热模块的gentleMACS Octo组织处理器，运行程序37C_m-TDK1。重悬样本，用70 μ m细胞筛网过滤，50mL离心管收集细胞悬液。用20 mL RPMI 1640冲洗筛网。将细胞悬液1500rpm离心5分钟，弃上清。加入20ml的PBS重悬细胞中，涡旋混匀，1500rpm离心5分钟，弃上清。重悬细胞至合适体积的PBS中，涡旋混匀，取10 μ l细胞悬液在细胞计数仪上计数，然后将剩余的细胞悬液1500rpm离心5分钟，弃上清。根据计数结果加入合适体积的PBS重悬细胞，涡旋混匀，将细胞浓度调整到 2×10^7 个/ml备用。

2.2.2 小鼠脾脏/淋巴结细胞解离

将收集的脾脏/淋巴结放置在含有3ml RPMI 1640培养基的六孔板中，用注射器挤压脾脏，使其分解成单细胞悬液。将细胞筛网放置在15ml锥形管顶部，使六孔板中细胞悬液通过筛网，以去除细胞团块和碎片。用5mL RPMI 1640冲洗筛网，将细胞悬液1500rpm离心5分钟，弃上清。加入2ml红细胞裂解液重悬细胞，涡旋混匀，1500rpm离心5分钟，弃上清。加入10ml RPMI 1640重悬细胞，涡旋混匀，1500rpm离心5分钟，弃上清。加入合适体积的FACS缓冲液重悬细胞，计数，然后1500rpm离心5分钟，弃上清。根据计数结果加入合适体积的FACS缓冲液重悬细胞，将细胞浓度调整至 2×10^7 个/ml备用。

2.3小鼠肿瘤/血液样本染色

于实验结束后分离肿瘤细胞、脾脏细胞、淋巴结细胞和血液细胞进行CD3、CD4、CD8、CD11、CD19、CD45、CD335的流式细胞分析免疫细胞亚群。CD45+代表白细胞；CD45+CD19+

代表B细胞；CD45+CD19-CD3+代表T细胞；CD45+CD19-CD3+CD8+代表细胞毒T细胞；CD45+CD19-CD3+CD4+代表辅助性T细胞；CD45+CD19-CD3-CD11b+F4/80+代表巨噬细胞；CD45+CD19-CD3-CD11c+代表星状细胞；CD45+CD19-CD3-CD335+代表天然杀伤细胞。

将重悬好的肿瘤/脾脏/淋巴结/血液细胞涡旋混匀，加入FcR Blocking Reagent，4度避光孵育10分钟。将所有抗体（包括死活染料）按照抗体推荐量制备成抗体混合液，并充分混匀。向对应的流式管中加入合适体积的抗体混合液，同时按照要求制备FMO管，空白管，单阳管，轻柔涡旋使抗体与细胞充分混合，4℃避光孵育30分钟。加入2mL红细胞裂解液至所有流式管中，涡旋混匀，室温避光孵育10分钟。孵育完成后1500rpm离心5分钟，弃上清。加入2 mL FACS缓冲液至所有流式管中，涡旋混匀，1500rpm离心5分钟，弃上清。重复一次。加入50ul FACS缓冲液重悬细胞，涡旋混匀，准备上机。

5.4 数据分析

所有经流式细胞仪产生的数据已用Kaluza软件分析，为了比较不同处理组的免疫细胞亚群，首先我们使用Bartlett检验来验证所有组间的方差齐性假设。当Bartlett检验的p值不小于0.05时，单因素方差分析将被用于检验所有组均值是否相等。若单因素方差分析的p值小于0.05，我们将用Tukey HSD检验进行所有组之间的两两比较，或用Dunnett's t检验进行每个治疗组和对照组之间的两两比较。当Bartlett检验的p值 小于0.05时，Kruskal Wallis检验将被用于检验所有组的中位数是否相等。若Kruskal Wallis检验的p值小于0.05，我们将用Conover检验进行所有组之间的两两比较或每个治疗组和对照组之间的两两比较，并根据多重检验的组数进行相应的p值校正。所有的统计分析和图形绘制都在R语言环境中进行。非特别说明的情况下，所有检验均为双尾检验，p值小于0.05时被认为具有统计显著性。

3. 结果

用癌症疫苗后35天，肿瘤内白细胞百分比从 27.06 ± 4.61 升高到 34.44 ± 5.61 ($p=0.005$) (图4A)。肿瘤组织内CD8+T细胞占总T细胞占比从对照组的 $25.99 \pm 5.84\%$ 升高到 $32.75 \pm 9.74\%$ ($p<0.01$) (图4B)，占总白细胞比率从 $2.24 \pm 0.58\%$ 升高到 $4.33 \pm 2.95\%$ ($p<0.05$) (图4C)。用癌症疫苗后35天，淋巴结内白细胞百分比从 99.81 ± 0.12 升高到 99.93 ± 0.06 ($p=0.011$) (图4D)。淋巴结内CD4+T细胞占总T细胞占比从对照组的 $29.85 \pm 5.96\%$ 升高到 $37.75 \pm 4.71\%$ ($p<0.01$) (图4E)，占总白细胞比率从 $19.22 \pm 3.73\%$ 升高到 $26.70 \pm 3.3\%$ ($p<0.001$) (图4F)。用癌症疫苗后35天，脾脏内T细胞百分比从 20.91 ± 3.55 升高到 26.03 ± 4.93 ($p=0.017$) (图4G)。脾脏内CD4+T细胞占总T细胞占比从对照组的 $47.00 \pm 2.96\%$ 升高到 $48.64 \pm 4.88\%$ ($p>0.05$) (图4H)，占总白细胞比率从 $9.80 \pm 1.69\%$ 升高到 $12.63 \pm 2.66\%$ ($p<0.05$) (图4I)。

4. 结论

接种MNRVax疫苗后，胰腺癌内的CD8+T淋巴细胞显著增加，直接杀灭癌细胞。而淋巴结内CD8+T淋巴细胞显著增加，脾脏内总的T细胞显著增加。提示接种MNRVax疫苗可以调动免疫细胞进入肿瘤内。

以上，对本发明的实施方式进行了说明。但是，本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种融合蛋白在制备用于预防和/或治疗肿瘤药物中的用途，其特征在于，所述肿瘤为 MUC1 阳性的肿瘤，表达 MUC1 的腺癌或表达 MUC1 的血液肿瘤，优选地，所述肿瘤为胰腺癌。

2. 一种融合蛋白在制备预防和/或治疗胰腺癌药物中的用途。

3. 根据权利要求 1-2 中任一所述用途，其特征在于，其中所述融合蛋白含有蛋白 MBP 基因和/或蛋白 MUC1-N 基因。优选为麦芽糖结合蛋白 MBP 基因和/或黏蛋白 MUC1-N 基因。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述用途，其特征在于，其中所述融合蛋白由麦芽糖结合蛋白 MBP 基因和黏蛋白 MUC1-N 基因串联而成。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述用途，其特征在于，其中所述 MUC1-N 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 MBP 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

优选地，所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

6. 一种融合蛋白在保健品、化妆品、食品或食品添加剂中的应用，其特征在于，其中所述融合蛋白含有蛋白 MBP 基因或蛋白和/或 MUC1-N 基因或蛋白。优选为麦芽糖结合蛋白 MBP 基因或蛋白和/或黏蛋白 MUC1-N 基因或蛋白。

优选地，所述保健品、化妆品、食品或食品添加剂可用于抑制肿瘤。

还优选地，所述肿瘤为 MUC1 阳性的肿瘤，表达 MUC1 的腺癌或表达 MUC1 的血液肿瘤，更优选，所述肿瘤为胰腺癌。

7. 根据权利要求 6 所述用途，其特征在于，所述融合蛋白由结合蛋白 MBP 基因和黏蛋白 MUC1-N 基因串联而成。

优选地，其中所述 MUC1-N 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，优选地，所述 MBP 基因如 SEQ ID NO.2 所示。

优选地，所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

8. MBP 基因或蛋白和/或 MUC1-N 基因在制备预防和/或治疗肿瘤药物中的用途，其特征在于，所述 MUC1-N 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 MBP 基因如 SEQ ID NO.2 所示。

优选地，所述癌症包括所有表达 MUC1 的癌症，包括表达 MUC1 的腺癌或表达 MUC1 的血液肿瘤，更优选为胰腺癌。

9. 蛋白 MBP 基因和/或蛋白 MUC1-N 基因在制备预防和/或治疗胰腺癌药物中的用途，

其特征在于，所述 MUC1-N 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 MBP 基因如 SEQ ID NO.2 所示。

10. 用于预防和/或治疗肿瘤的药物组合物，其包含由麦芽糖结合蛋白 MBP 基因和黏蛋白 MUC1-N 基因串联而成的融合蛋白，以及氢氧化铝佐剂和 CpG 佐剂，所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示，优选所述 CpG 佐剂为部分或全部硫代修饰。

11. 权利要求 10 所述组合物在制备预防和/或治疗胰腺癌药物中的用途。