

体外大量制备新型 gp96 肿瘤疫苗及其诱导的特异性抗肿瘤免疫应答分析

闫晓丽, 李长菲, 张小俊, 鞠莹, 赵报, 孟颂东

中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

摘要: 旨在体外组装酵母菌表达的 gp96 (Recombinant gp96, rgp96) 蛋白与 B16.F10 黑色素瘤抗原, 大量制备新型 gp96 肿瘤疫苗, 并研究其诱导的特异性抗肿瘤免疫应答。利用体外组装的 rgp96-肿瘤抗原复合物免疫 C57BL/6 小鼠, 并通过酶联免疫斑点实验、细胞因子染色、杀伤实验技术进行分析, 结果显示与单纯 rgp96 或肿瘤抗原免疫组相比, 体外组装的 rgp96-肿瘤抗原复合物免疫能够显著抑制 B16 肿瘤的生长, 而且能够明显提高肿瘤特异性 T 细胞活性。rgp96-肿瘤抗原复合物的抗肿瘤免疫活性与从肿瘤组织中提取的 gp96 接近。研究结果为大量制备新型 gp96 肿瘤疫苗提供了依据。

关键词: gp96, 肿瘤抗原, 组装, 肿瘤疫苗, T 细胞

Large-scale *in vitro* preparation of new gp96 tumor vaccine and analysis of its induction of specific anti-tumor immunoresponses

Xiaoli Yan, Changfei Li, Xiaojun Zhang, Ying Ju, Bao Zhao, and Songdong Meng

CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Heat shock protein gp96 isolated from tumor tissues holds great promise for tumor immunotherapy. However, at present only very limited amount of gp96 protein can be isolated from tumor tissues. Here, we reconstituted the yeast-expressed gp96 (recombinant gp96, rgp96) with B16.F10 melanoma antigens *in vitro* to prepare new gp96 tumor vaccine on large-scale, and analyzed its induction of specific anti-tumor immunoresponses by ELISPOT, IFN- γ intracellular staining and cytotoxicity assays. Immunization with rgp96-tumor antigen complexes significantly inhibited B16 tumor growth compared with either rgp96 or tumor antigens alone and led to enhancement of tumor-specific T-cell activities, which was found similar to that of tumor tissue derived gp96. Our results therefore may provide bases for large-scale preparation of the new generation of gp96 tumor vaccines.

Received: April 6, 2011; **Accepted:** May 11, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81021003, 91029724).

Corresponding author: Songdong Meng. Tel: +86-10-64807350; E-mail: mengsd@im.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81021003, 91029724) 资助。

Keywords: gp96, tumor antigen, reconstitution, tumor vaccine, T cell

恶性黑色素瘤是一种恶性程度极高、发生隐匿的肿瘤,易发生播散性病变,对常规手术、放疗和化疗有很高的抗性,传统方法难以治愈^[1]。近年来由于在患者体内可检测到自发肿瘤特异性 CTL,这使得肿瘤免疫治疗逐渐得到重视,确定合适的肿瘤抗原特别是 T 细胞抗原表位是免疫治疗成功的关键^[2-6]。

热休克蛋白 gp96 与细胞质热休克蛋白 HSP90 高度同源,它是内质网中重要的分子伴侣。研究发现 gp96 在天然免疫和获得性免疫应答的激活中均发挥重要作用。在内质网中 gp96 可以和蛋白酶体加工来源的抗原小肽结合,进而将抗原肽呈递给 MHC I 型或者 MHC II 型分子复合物,递呈于细胞表面^[7-9]。因此,热休克蛋白 gp96 可天然结合肿瘤细胞中各种肿瘤抗原,这些肿瘤排斥性抗原可作为肿瘤疫苗进行免疫治疗^[10-12]。用肿瘤来源的 gp96 免疫后, gp96 通过受体依赖的内吞途径进入并活化抗原递呈细胞,将其结合的抗原小肽交叉递呈给 MHC I 类或 II 类分子,从而激活特异性于 CD8⁺ T 细胞或者递呈于 CD4⁺ T 细胞,从而激活针对其结合小肽而非 gp96 自身引发肿瘤的特异性细胞免疫反应。动物实验表明从肿瘤细胞中分离的 gp96 具有很强的抗肿瘤免疫活性^[13],目前从肿瘤组织中分离的 gp96 作为自体疫苗临床上已用于黑色素瘤、肾癌、神经胶质瘤等多种肿瘤的免疫治疗,并取得较好的效果^[14],例如对未转移肾癌患者治疗的 III 期临床资料发现中等风险患者 ($n=362$) (包括 I / II 期, III 期的 T1/2/3) 接受 gp96 自体疫苗治疗,复发时间延长 45% ($P<0.01$),与对照相比复发时间延长约 1.8 年^[15]。目前存在的主要问题是用于治疗的 gp96 自体疫苗均为从术后切除的肿瘤组织中提取,原因主要有两点:一是肿瘤抗原特异性不仅表现在不同类型的肿瘤之间有很大差别,而且同种肿瘤不同个体之间也有很大差异^[15],对于大多数肿瘤很难

找到有效的普遍性抗原,而 gp96 携带每位患者肿瘤所有特异性抗原,作为自体疫苗免疫免除了寻找和鉴定肿瘤特异抗原的麻烦;二是虽然有许多研究尝试利用大肠杆菌、肿瘤细胞发酵等表达制备 gp96,但大肠杆菌表达的 gp96 蛋白因存在容易降解、稳定性差、易聚集且内毒素很难去除等缺点免疫活性很低^[16-18],而肿瘤细胞表达 gp96 产量低(表达水平仅为 5~7 mg/L)、成本高^[19-20]。正因如此,用于肿瘤治疗的 gp96 来源非常有限,这已成为免疫治疗的瓶颈^[21-23]。如何利用有限的肿瘤组织制备足够的 gp96 肿瘤疫苗成为亟待解决的问题。

我们前期研究和其他人的研究均发现,将 gp96 与乙肝病毒或疱疹病毒抗原体外组装成复合物或制成融合蛋白,可激活抗原特异性 T 细胞,说明 gp96 具有很强的 T 细胞佐剂功能^[18,24-26],我们近期利用汉逊酵母首次表达具有较高免疫活性的 gp96 蛋白^[27],表达水平在 150 mg/L。在此基础上,本研究的目的是将表达的重组 gp96 与肿瘤抗原体外组装成复合物,并检测复合物抗肿瘤的免疫学功能,从而为大量制备 gp96 肿瘤疫苗提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 gp96 的制备及 Western blotting 鉴定

根据 Li 等^[27]利用汉逊酵母表达纯化重组热休克蛋白 gp96 (Recombinant gp96, rgp96),获得的蛋白通过 10%的 SDS-PAGE 和 Western blotting (Santa Cruz, CA, USA) 进行鉴定。从肿瘤组织中纯化 gp96 (Tumor-derived gp96, tgp96) 的方法见文献^[28]。

1.2 肿瘤抗原的提取

收集 B16. F10 黑色素瘤细胞,反复冻融 3 次使细胞完全裂解,用终浓度为 70%的硫酸铵 4 °C 沉淀过夜,12 000 r/min 离心弃上清,用 PBS 溶解沉淀,3 kDa 超滤管超滤换液以除去杂质盐离子并浓缩得

到肿瘤抗原。

1.3 小鼠肿瘤模型

雌性 C57BL/6J 小鼠 (6~8 周龄) 购于北京维通利华实验动物有限公司, 在北京大学医学院实验动物中心 SPF 级环境下饲养。按照每组 8 只小鼠随机分为 5 组: PBS 组、Ag (抗原, 100 μg) 组、rgp96 组 (20 μg)、rgp96+Ag 组 (将 100 μg 的抗原与 20 μg 的 rgp96 蛋白在室温下孵育 30 min, 制备 rgp96-肿瘤抗原复合物) 和 tgp96 组。其中, 从肿瘤组织中纯化的 gp96 免疫组 (tgp96 组) 作为阳性对照。小鼠在 1、3、4 周皮下免疫 3 次, 最后一次免疫后 2 d, 在小鼠右侧大腿皮下接种 3×10^4 B16. F10 黑色素瘤细胞。跟踪监测小鼠肿瘤生长情况, 并在肿瘤长出后 2 周处死小鼠, 称取各组小鼠肿瘤重量, 根据 Liu 等^[25]方法分离获得小鼠脾脏淋巴细胞。

1.4 酶联免疫斑点实验

根据 ELISPOT 试剂盒 (BD-Pharmingen, San Diego, CA) 的说明书, 首先以 anti-IFN- γ 单抗包被 96 孔 PVDF ELISPOT 板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 用无菌 PBS 清洗 5 次, 再以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 封闭 2 h, 弃去培养基。按照 1×10^6 /孔 (100 μL) 加入淋巴细胞, 每只小鼠实验孔 20 μg 肿瘤抗原, 阴性孔加入 20 μg BSA, 阳性孔加入 4 μg PHA。在细胞培养箱内孵育 24 h 后加入生物素标记的 anti-IFN- γ 单抗室温孵育 2 h, PBST 洗 5 次, 再加入 HRP 标记的二抗后室温孵育 1 h, PBST 洗 5 次, 后加入底物显色。充分干燥后用 ELISPOT Reader (Biosys, Germany) 计数。

1.5 细胞内因子染色

按照 Cytotfix/Cytoperm kit (BD-Pharmingen, San Diego, CA) 试剂盒的说明书, 每只小鼠各取 3×10^6 的脾脏淋巴细胞铺于 48 孔板, 加入 PMA 和的离子霉素 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 终浓度分别为 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 500 $\mu\text{g}/\text{L}$, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 刺激 30 min 后加入高尔基体阻断剂 BFA, 在细胞培养箱内培养 4 h, 收

集细胞, 用含 5% BSA 的 PBS 封闭 30 min, 加入 Percp-Cy5.5-anti-CD3, FITC-anti-CD8 (eBioscience), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, PBS 清洗, 每管加入 250 μL 固定/破膜剂, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 后用破膜/清洗剂清洗 2 次, 在 50 μL 体系中加入 APC-anti-IFN- γ , 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 清洗剂清洗 2 次, 用流式细胞仪 (FACSCaliber, Becton Dickinson, Mountain View, CA) 检测 IFN- γ^+ CD8 $^+$ T 细胞。

1.6 杀伤实验

杀伤实验参照 Jedema 等^[29]的实验方法, 用 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CFSE 标记 B16. F10 黑色素瘤细胞铺到 96 孔 U 型板中作为靶细胞, 用肿瘤抗原刺激 3 d 后的脾脏淋巴细胞作为效应细胞。按照效应细胞:靶细胞比例分别为 5:1, 10:1 和 20:1 将效应细胞铺到培养板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 4 h 后收集细胞, PI 染色, 用流式细胞仪检测效应细胞的杀伤。

1.7 统计学分析

以 Student's *t*-test 比较组间差异, $P < 0.05$ 用 * 表示, $P < 0.01$ 用 ** 表示, 所有数据按照 $\bar{x} \pm s$ 来表示。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定 gp96 蛋白

10% SDS-PAGE 结果显示从汉逊酵母表达纯化的重组蛋白大小为 96 kDa, Western blotting 鉴定该条带为目的蛋白 gp96 (图 1)。

2.2 rgp96-肿瘤抗原复合物免疫能显著抑制肿瘤生长

小鼠免疫实验结果显示, 与单独使用 rgp96 或肿瘤抗原 (Ag) 免疫相比, 使用体外组装的 rgp96-肿瘤抗原复合物 (rgp96+Ag) 免疫显著抑制 B16 黑色素瘤的生长。相对于对照 (PBS), 单独使用肿瘤抗原或 rgp96 免疫对肿瘤生长也有一定的抑制作用 (图 2 A)。待肿瘤生长 2 周后, 处死小鼠,

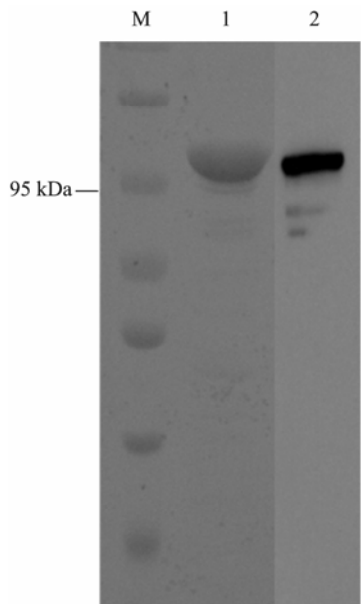


图 1 热休克蛋白 gp96 的提取鉴定

Fig. 1 Purification and identification of heat shock protein gp96. Purified recombinant gp96 expressed in *H. polymorpha* was analyzed on a 10% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie Blue (lane 1) or immunoblotted with an anti-gp96 Ab (lane 2).

分离出肿瘤称取重量。PBS 组、Ag 组、rgp96 组、rgp96+Ag 组和 tgp96 组肿瘤重量分别为 (4.55 ± 0.72) g、 (4.31 ± 0.51) g、 (2.80 ± 0.47) g、 (0.93 ± 0.22) g 和 (0.74 ± 0.24) g，其中应用 rgp96+Ag 免疫抑瘤效果比单独使用肿瘤抗原和 rgp96 免疫肿瘤质量分别降低了 78.4% ($P < 0.01$) 和 66.8% ($P < 0.01$) (图 2 B)。rgp96+Ag 免疫组与阳性对照 tgp96 免疫组的抑瘤效果接近。

2.3 rgp96-肿瘤抗原复合物免疫有效激活肿瘤特异性 T 细胞

ELISPOT 检测结果显示，PBS 组、Ag 组、rgp96 组、rgp96+Ag 组和 tgp96 组小鼠每 10^6 脾脏淋巴细胞分泌 IFN- γ 的 T 细胞数目 (即斑点数) 分别为 (27 ± 5) 、 (33 ± 9) 、 (65 ± 12) 、 (130 ± 17) 和 (152 ± 25) (图 3 A)。与单独使用肿瘤抗原和 rgp96 相比，使用 rgp96-肿瘤抗原复合物免疫提高肿瘤特异性 T 细胞水平分别为 3.9 倍 ($P < 0.01$) 和 2 倍 ($P < 0.01$)，与 tgp96 免疫组接近 (图 3 B)。

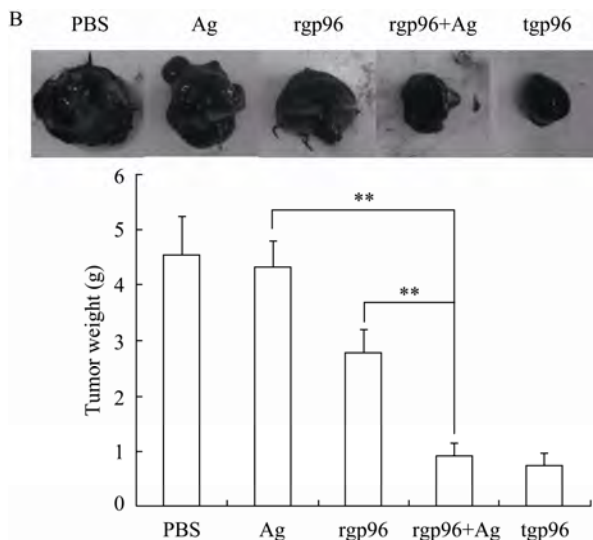
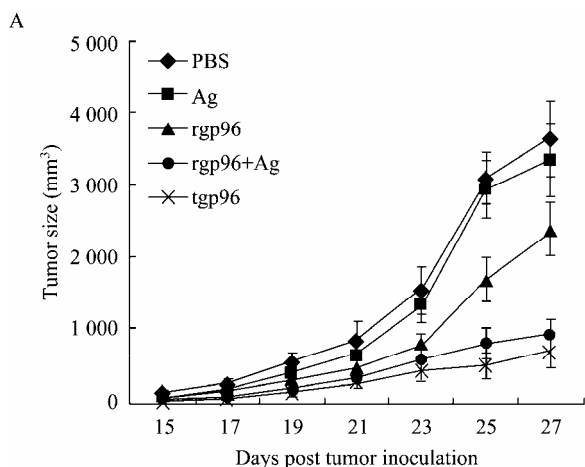


图 2 rgp96 显著增强肿瘤抗原的抗肿瘤效果

Fig. 2 rgp96 enhanced the anti-tumor efficiency of B16 tumor antigens. Female C57BL/6J mice were immunized with PBS, B16 tumor antigens (Ag), rgp96, rgp96-tumor antigens complexes (rgp96+Ag) or Tumor-derived gp96 (tgp96) for three times. These mice were inoculated subcutaneously with 3×10^4 B16.F10 melanoma cells/mice 2 days after the last immunization. (A) Tumor diameter was measured every other day for total of 14 days. (B) Tumor weight was measured when mice were sacrificed on day 14. Data show $\bar{x} \pm s$ of eight mice. Student's *t*-test was used to determine *P*-values. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Data are representative of two independent experiments.

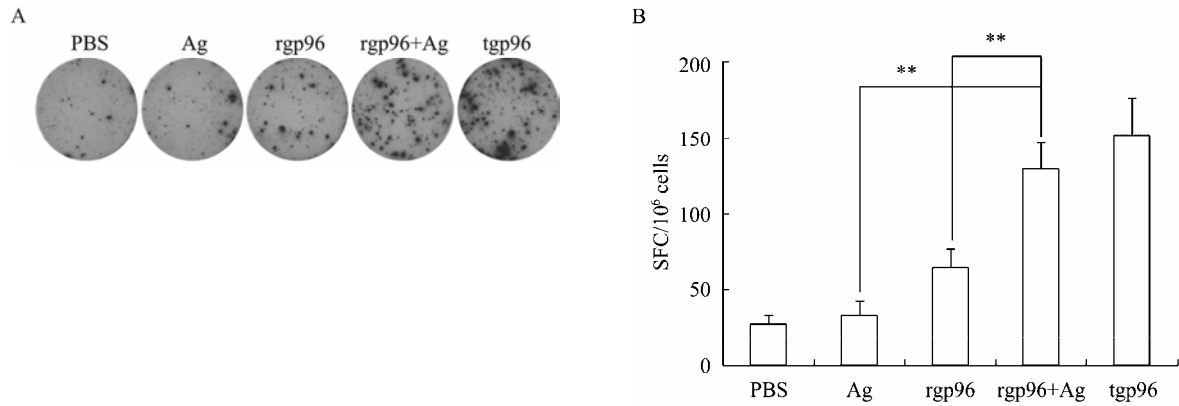


图3 ELISPOT 检测肿瘤特异性 T 细胞

Fig. 3 Tumor-specific CTL detection by ELISPOT assay. (A) Splenocytes at 1×10^6 cells/well were stimulated with 20 μg of B16 tumor antigens or control BSA for background evaluation. (B) Data show $\bar{x} \pm s$ of eight mice. Student's *t*-test was used to determine *P*-values. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. SFC is short for spot-forming cells. Data are representative of two independent experiments.

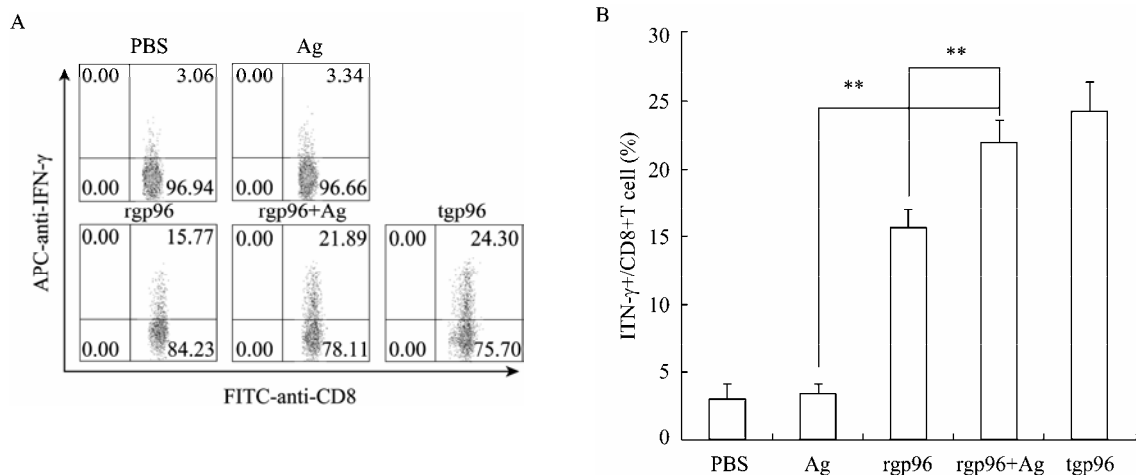


图4 流式细胞术检测分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞

Fig. 4 IFN- γ -producing CD8⁺ T cells were detected by IFN- γ staining. Splenocytes were stained with Percp-Cy5.5-anti-CD3, FITC-anti-CD8 and APC-anti-IFN- γ . (A) Flow cytometric analysis was performed to determine the percentage of IFN- γ^+ CD8⁺ T cells. (B) Data show $\bar{x} \pm s$ of eight mice. Student's *t*-test was used to determine *P*-values. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Data are representative of two independent experiments.

2.4 rgp96-肿瘤抗原复合物免疫显著提高分泌 IFN- γ 的 CTL 的数量

流式细胞检测表明 PBS 组、Ag 组、rgp96 组、rgp96+Ag 组和 tgp96 组小鼠 IFN- γ^+ CD8⁺ T 细胞的比例分别为 (3.03 \pm 1.12)%、(3.37 \pm 0.84)%、(15.6 \pm 1.43)%、(22.19 \pm 1.88)%和 (23.8 \pm 2.1) (图 4)。rgp96+Ag 实验组 IFN- γ^+ CD8⁺ T 细胞的比例显著高于 Ag 组和 rgp96 组 ($P < 0.01$)。

2.5 rgp96-肿瘤抗原复合物免疫有效增强 T 细胞对 B16 肿瘤细胞的杀伤

流式检测小鼠 T 细胞对靶细胞 B16 细胞的杀伤,结果显示 rgp96+Ag 组小鼠效应细胞对靶细胞的杀伤分别为 (35.37 \pm 1.81)%, (56.76 \pm 4.12)%, (60.51 \pm 3.79)%, 均显著高于肿瘤抗原组和 rgp96 组 ($P < 0.01$) (图 5)。以上结果表明, rgp96 能有效提高效应 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。

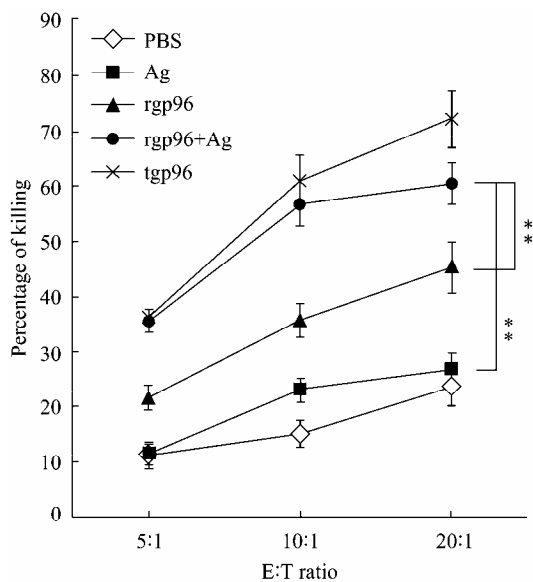


图 5 细胞毒实验检测效应 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤
 Fig. 5 Cytotoxicity assay. B16 cells were labeled with 2 μmol/L CFSE as the target cells, and seeded into a 96-well U-bottom microtiter plate. Splenocytes were added at different effector-target ratios: 5:1, 10:1 and 20:1. After 4 h, PI staining was then assessed in the CFSE labeled target cell population to quantify apoptosis by flow cytometric analysis. Data show $\bar{x} \pm s$ of eight mice. Student's *t*-test was used to determine *P*-values. * *P*<0.05, ** *P*<0.01. Data are representative of two independent experiments.

3 讨论

自从在化学诱导的 BALB/c 小鼠肉瘤中被发现起, 热休克蛋白 gp96 作为肿瘤排拆抗原的研究已有 20 余年^[30]。肿瘤自体 gp96 疫苗活性的免疫学机制和抗肿瘤免疫学功能得到了广泛研究。Gp96 是目前发现的唯一用于临床治疗的天然免疫活性分子, 它能天然结合肿瘤细胞中各种特异抗原, 携带有肿瘤抗原的 gp96 可作为高效肿瘤疫苗激活肿瘤特异性 T 细胞^[31], 具有独特的免疫学功能和治疗效果。但由于临床使用的 gp96 均为从肿瘤组织中提取, 提取量非常有限, 严重限制了它在临床的应用^[32], 多数患者由于免疫剂量不足而影响治疗效果。

Gp96 肿瘤特异的免疫原性来源于其结合的抗原肽而非 gp96 本身, 结合抗原的 gp96 分子可与抗原呈递细胞表面的受体如 CD91、TLR4 等相互作

用进入细胞, 进而通过抗原呈递活化特异性 T 细胞^[33-35]。gp96 的这一佐剂功能在我们前期抗 HBV 免疫研究中得到证实。结合有 HbcAg₈₇₋₉₅ 抗原肽的 gp96 在小鼠体内可以有效激活多肽特异性 CTL 反应^[36]。我们近期利用酵母成功表达了具有免疫学功能的全长 gp96 蛋白。在此基础上, 本研究中将重组 gp96 与 B16 细胞肿瘤抗原体外组装, 尝试制备新型 gp96 肿瘤疫苗。研究发现 B16 肿瘤抗原自身免疫并不能有效抑制肿瘤的生长, 而与重组 gp96 组装后能够显著降低肿瘤的生长速度 (图 2)。接着对疫苗的免疫学功能进行研究, rgp96 与肿瘤抗原联合免疫能显著激活肿瘤特异性的 CTL 反应, 通过 ELISPOT、IFN-γ 细胞因子内染检测和 T 细胞杀伤实验发现 rgp96-肿瘤抗原复合物免疫组小鼠 T 细胞活性明显高于单纯肿瘤抗原或 rgp96 免疫组。体外组装的 rgp96-肿瘤抗原复合物的抗肿瘤免疫活性与从肿瘤组织中提取的天然 gp96 接近。这些结果表明肿瘤抗原以外源 rgp96 为佐剂, 可大幅提高所有肿瘤抗原的免疫原性, 有效激活特异性 CTL, 引发抗肿瘤免疫应答。

综上所述, 本研究采用人工高效表达具有免疫活性的 gp96 蛋白, 发现重组 gp96 可与肿瘤抗原体外组装, 组装成的复合物具有与肿瘤组织天然提取的 gp96 相类似的抗肿瘤的免疫原性, 这样可以体外大量制备 gp96 肿瘤疫苗, 从而解决了目前 gp96 抗肿瘤免疫机制研究和疫苗研发中遇到的 gp96 提取量很低这一瓶颈问题, 为进一步研究 gp96 免疫学功能和临床免疫治疗奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer*, 2007, 109(3): 455-464.
- [2] Kudela P, Sun Z, Fourcade J, et al. Epitope hierarchy of spontaneous CD4⁺ T cell responses to LAGE-1. *J Immunol*, 2011, 186(1): 312-322.
- [3] Rogel A, Vignard V, Bobinet M, et al. A long peptide from

- MELOE-1 contains multiple HLA class II T cell epitopes in addition to the HLA-A*0201 epitope: an attractive candidate for melanoma vaccination. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(3): 327–337.
- [4] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*, 2004, 10(9): 909–915.
- [5] Baba T, Sato-Matsushita M, Kanamoto A, et al. Phase I clinical trial of the vaccination for the patients with metastatic melanoma using gp100-derived epitope peptide restricted to HLA-A*2402. *J Transl Med*, 2010, 8:84–95.
- [6] Palermo B, Del Bello D, Sottini A, et al. Dacarbazine treatment before peptide vaccination enlarges T-cell repertoire diversity of melan-a-specific, tumor-reactive CTL in melanoma patients. *Cancer Res*, 2010, 70(18): 7084–7092.
- [7] Udono H, Levey DL, Srivastava PK. Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8⁺ T cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(8): 3077–3081.
- [8] Gidalevitz T, Biswas C, Ding H, et al. Identification of the N-terminal peptide binding site of glucose-regulated protein 94. *J Biol Chem*, 2004, 279(16): 16543–16552.
- [9] Kropp LE, Garg M, Binder RJ. Ovalbumin-derived precursor peptides are transferred sequentially from gp96 and calreticulin to MHC class I in the endoplasmic reticulum. *J Immunol*, 2010, 184(10): 5619–5627.
- [10] Qian JF, Hong S, Wang SQ, et al. Myeloma cell line-derived, pooled heat shock proteins as a universal vaccine for immunotherapy of multiple myeloma. *Blood*, 2009, 114(18): 3880–3889.
- [11] Schreiber TH, Deyev VV, Rosenblatt JD, et al. Tumor-induced suppression of CTL expansion and subjugation by gp96-Ig vaccination. *Cancer Res*, 2009, 69(5): 2026–2033.
- [12] Maki RG, Livingston PO, Lewis JJ, et al. A phase I pilot study of autologous heat shock protein vaccine HSPPC-96 in patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(8): 1964–1972.
- [13] Nicchitta CV. Re-evaluating the role of heat-shock protein-peptide interactions in tumour immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(5): 427–432.
- [14] Parmiani G, De Filippo A, Pilla L, et al. Heat shock proteins gp96 as immunogens in cancer patients. *Int J Hyperthermia*, 2006, 22(3): 223–227.
- [15] Jin WS, Hu K, Yang RG, et al. Progress of HSP-peptide complex vaccine for tumor therapy. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2010, 37(8): 963–966. 金文松, 胡坤, 杨日高, 等. 热休克蛋白-多肽复合物疫苗用于肿瘤治疗的研究进展. *肿瘤防治研究*, 2010, 37(8): 963–966
- [16] Linderth NA, Simon MN, Rodionova NA, et al. Biophysical analysis of the endoplasmic reticulum-resident chaperone/heat shock protein gp96/GRP94 and its complex with peptide antigen. *Biochemistry*, 2001, 40(5): 1483–1495.
- [17] Li HT, Zhou MH, Han JL, et al. Generation of murine CTL by a hepatitis B virus-specific peptide and evaluation of the adjuvant effect of heat shock protein glycoprotein 96 and its terminal fragments. *J Immunol*, 2005, 174(1): 195–204.
- [18] Bolhassani A, Zahedifard F, Taghikhani M, et al. Enhanced immunogenicity of HPV16E7 accompanied by Gp96 as an adjuvant in two vaccination strategies. *Vaccine*, 2008, 26(26): 3362–3370.
- [19] Tang YJ, Li HM, Hamel JFP. Suspension culture process of MethA tumor cell for the production of heat-shock protein glycoprotein 96: process optimization in spinner flasks. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(6): 1363–1377.
- [20] Tang YJ, Li HM, Hamel JFP. Effects of dissolved oxygen tension and agitation rate on the production of heat-shock protein glycoprotein 96 by MethA tumor cell suspension culture in stirred-tank bioreactors. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009, 32(4): 475–484.
- [21] Li ZH. Priming of T cells by heat shock protein-peptide complexes as the basis of tumor vaccines. *Semin Immunol*, 1997, 9(5): 315–322.
- [22] Oki Y, Younes A. Heat shock protein-based cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2004, 3(4): 403–411.
- [23] Testori A, Richards J, Whitman E, et al. Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 Study Group. *J Clin Oncol*, 2008, 26(6): 955–962.
- [24] Meng SD, Gao T, Gao GF, et al. HBV-specific peptide associated with heat-shock protein gp96. *Lancet*, 2001, 357(9255): 528–529.
- [25] Liu Z, Li XH, Qiu LP, et al. Treg suppress CTL responses

- upon immunization with HSP gp96. *Eur J Immunol*, 2009, 39(11): 3110–3120.
- [26] Yan JB, Liu XQ, Wang Y, et al. Enhancing the potency of HBV DNA vaccines using fusion genes of HBV-specific antigens and the N-terminal fragment of gp96. *J Gene Med*, 2007, 9(2): 107–121.
- [27] Li Y, Song HL, Li J, et al. *Hansenula polymorpha* expressed heat shock protein gp96 exerts potent T cell activation activity as an adjuvant. *J Biotechnol*, 2011, 151(4): 343–349.
- [28] Meng SD, Song J, Rao ZH, et al. Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. *J Immunol Methods*, 2002, 264(1): 29–35.
- [29] Jedema I, van der Werff NM, Barge RMY, et al. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood*, 2004, 103(7): 2677–2682.
- [30] Palladino MA Jr, Srivastava PK, Oettgen HF, et al. Expression of a shared tumor-specific antigen by two chemically induced BALB/c sarcomas. *Cancer Res*, 1987, 47(19): 5074–5079.
- [31] Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(3): 185–194.
- [32] Wood CG, Mulders P. Vitespen: a preclinical and clinical review. *Future Oncol*, 2009, 5(6): 763–774.
- [33] Zhang YX, Zan YL, Shan M, et al. Effects of heat shock protein gp96 on human dendritic cell maturation and CTL expansion. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(2): 581–587.
- [34] Warger T, Hilf N, Rechtsteiner G, et al. Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 22545–22553.
- [35] Kurotaki T, Tamura Y, Ueda G, et al. Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. *J Immunol*, 2007, 179(3): 1803–1813.
- [36] Li HT, Yan JB, Li J, et al. Enhancement of humoral immune responses to HBsAg by heat shock protein gp96 and its N-terminal fragment in mice. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(19): 2858–2863.