

异源黑色素瘤DNA疫苗结合IL-12和Ii-PADRE 抗鼠黑色素瘤的研究

刘祥磊¹ 张利红¹ 孙蕴淳² Steve Kay³ 吴炯^{1,2,3*}

(¹浙江理工大学生命科学院, 新元医药与生物技术研究所, 杭州 310018; ²理查罗伯茨生物科技研究院, 宜兴 214200; ³盐城肿瘤生物和靶向治疗工程技术研究中心, 盐城 224005)

摘要 研究酪氨酸激酶相关蛋白2(tyrosinase related protein 2, TRP-2)和gp100质粒DNA在B16黑色素瘤小鼠模型中的抗肿瘤作用。TRP-2及gp100在人类和鼠类黑色素瘤中均高度表达。鼠源gp100(mgp100)和鼠源TRP-2(mTRP-2)在小鼠中的免疫原性较差, 而异源黑色素瘤相关抗原可打破这些免疫耐受。使用电脉冲法免疫人源gp100(hgp100)和人源TRP-2(hTRP-2)质粒在B16F10肿瘤模型中表现出显著的保护作用。TRP-2和gp100质粒免疫结合Ii-PADRE(invariant Pan DR reactive epitope)和鼠源白介素-12(murine interleukin-12, mIL-12)质粒有效消退了建立的皮下B16F10肿瘤。上述结果表明, 肌肉内注射异源DNA疫苗结合Ii-PADRE与IL-12质粒使用可能是一种有效治疗黑色素瘤的策略。

关键词 gp100; TRP-2; B16F10黑色素瘤; 肿瘤消退

Improved Anti-tumor Immunity Using Xenogenic Melanoma DNA Vaccines Combined with IL-12 and Ii-PADRE in Murine Melanoma

Liu Xianglei¹, Zhang Lihong¹, Sun Yunchun², Steve Kay³, Wu Jiong^{1,2,3*}

(¹Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; ²Richard J. Roberts Institute of Biotechnology, Yixing 214200, China; ³Yancheng Research Center of Tumor Biology and Targeted Therapy Engineering Technology, Yancheng 224005, China)

Abstract Active immunization with plasmid DNA encoding tyrosinase related protein 2 (TRP-2) and gp100 mediate anti-tumor immunity in the B16 murine melanoma model. TRP-2 and gp100 are highly expressed in both human and mouse melanoma. In this study, we used plasmid DNA encoding xenogenic (human) antigens to break tolerance to these antigens, since mouse gp100 (mgp100) and mouse TRP-2 (mTRP-2) are poorly immunogenic in mice. Immunization with plasmids encoding human gp100 (hgp100) and human TRP-2 (hTRP-2) showed significant protection in a B16F10 challenge model. Immunization with hgp100 and hTRP-2 combined with plasmid encoding Ii-PADRE (invariant Pan DR reactive epitope) and murine interleukin-12 caused regression of established B16F10 subcutaneous tumors. These results indicated that our approach of using intramuscular DNA vaccines encoding xenogenic antigens, combined with Ii-PADRE and IL-12 plasmid DNA could be an effective strategy against melanoma.

Key words gp100; TRP-2; B16F10 melanoma; tumor regression

收稿日期: 2014-04-08 接受日期: 2014-05-27

浙江理工大学研究启动经费(批准号: 1016834-Y)、国家自然科学基金(批准号: 81272687)、浙江省自然科学基金(批准号: LZ13H160004)和浙江省高校生物学重中之重(一级)学科资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843181, E-mail: jwu1867@yahoo.com

Received: April 8, 2014 Accepted: May 27, 2014

This work was supported by Zhejiang Sci-Tech University Study Start-up Grants (Grant No.1016834-Y), the National Nature Science Foundation of China (Grant No.81272687), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LZ13H160004) and Zhejiang Provincial University Top Key Discipline of Biology (the first grade)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843181, E-mail: jwu1867@yahoo.com

网络出版时间: 2014-08-20 15:58 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0116.html>

近年来,黑色素瘤特异性抗原分子成为了研究的热点,极大推动了针对该疾病的DNA疫苗的开发^[1]。黑色素瘤DNA疫苗具有利于癌症相关抗原递呈、免疫程序简易化、肿瘤抗原序列和基因佐剂内含物个性化等优点^[2]。然而,尽管已在动物模型中取得了喜人成果,黑色素瘤DNA疫苗仍然存在着免疫应答弱、传递效率低等问题。

作为自身抗原所诱导的免疫应答微弱是多数癌症抗原普遍存在的一个问题^[3],其很大原因在于此类抗原会引发强烈的外周耐受反应。本实验尝试着使用异源抗原打破同源抗原造成的免疫耐受,让DNA疫苗诱导更强的免疫应答反应。小鼠动物模型研究表明,mgp100和mTRP-2极易引发免疫耐受,而与之相对应的异种抗原的氨基酸序列具有高度同源性,能够高效交叉诱发针对宿主体内同源抗原的免疫应答^[4]。目前,临床试验正在尝试针对黑色素瘤与其他癌症靶标的异源或人工合成抗原以改善疫苗效果^[5-6]。

为了最大限度提升疫苗的效果,仅使用异源抗原免疫可能还不够,因此本实验选择了基因佐剂Ii-PADRE和白介素-12(interleukin-12, IL-12)辅助DNA疫苗。PADRE(pan DR reactive epitope)是一种辅助T细胞表位,具有辅助生成CD4+ T细胞的功能^[7-8]。近期, Wu等^[9]提出一种新策略,即以辅助T细胞表位PADRE序列替换恒定链(invariant chain, Ii)蛋白的CLIP(class II-associated invariant chain peptide)区,使得表位对CD4+ T细胞选择最优化。IL-12是一种具有强烈抗肿瘤活性的细胞因子,通过诱导T细胞和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)分泌干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)发挥抗肿瘤作用,从而增强细胞免疫应答^[10]。上述两者均可作为DNA疫苗治疗创造更适宜的肿瘤微环境,并已多次应用于小鼠模型和临床实验。在上述理论的基础上,我们尝试使用异源基因编码序列结合基因佐剂改进以DNA为基础的癌症疫苗,以期使我们的黑色素瘤DNA疫苗的抗肿瘤效果最大化。

1 材料与方法

1.1 材料

hgp100、hTRP-2、mgp100、mTRP-2和Ii-PADRE基因序列由上海捷瑞公司进行密码子优化并合成。DNA质粒载体pVax购自Life Technologies公司。ELISPOT检测试剂盒购自R&D Systems公

司。CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒购自Promega公司。6~8周龄C57BL/6雌性鼠(H-2^b)由杭州师范大学模式生物研究中心提供并饲养。鼠黑色素瘤细胞株B16F10购自ATCC公司。

1.2 细胞培养

B16F10细胞使用含10%胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 IU/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的DMEM完全培养基,于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

1.3 DNA免疫

每种质粒DNA各取15 μ g溶于40 μ L PBS中,对小鼠后肢进行肌肉免疫。加入空载体以保持各组免疫质粒数量一致。注射质粒后使用ECM830(BTX Harvard Aparatus, MA)在注射区域电击(130 V/cm, 50 ms/次,电击2次)。B16F10细胞成瘤8 d后,肿瘤体积约30~50 mm³时,以电脉冲法瘤内免疫(400 V/cm, 25 ms/次,电击2次)鼠源IL-12质粒(10 μ g质粒溶于20 μ L PBS中)或空载体。

1.4 体内肿瘤预防实验

在预防实验中,取6~8周龄C57BL/6雌性鼠随机分为5组:pVax组、mgp100组、mTRP-2组、mgp100+mTRP-2组和hgp100+hTRP-2组,每组7只。各组小鼠分别于0 d和14 d以相应疫苗免疫,并于最后1次免疫后7 d皮下注射 2×10^5 小鼠黑色素瘤细胞株B16F10使小鼠成瘤。使用游标卡尺测量肿瘤的最长直径(a)和最短宽度(b),每周测量肿瘤体积3次。将上述测量数据代入公式 $V(\text{mm}^3)=0.5 \times ab^2$ 计算肿瘤体积。肿瘤体积 $>1\ 500\ \text{mm}^3$ 时对其进行安乐死。

1.5 体内肿瘤治疗实验

在Ii-PADRE和瘤内注射IL-12治疗实验中,取6~8周龄C57BL/6雌性鼠皮下注射 2×10^5 B16F10细胞使小鼠成瘤,肿瘤体积达到50 mm³左右时,将其随机分为2组:pVax+pmIL-12组和phgp100+phTRP-2+pli-PADRE+pmIL-12组,每组7只。小鼠分别于6, 13, 20 d使用相应DNA质粒免疫,8 d时瘤内注射IL-12质粒同时进行电击处理。测量肿瘤体积方法同上。在增加注射IL-12实验中,两组小鼠分别于6, 13, 20, 27, 34, 41 d使用疫苗免疫,在10 d注射IL-12质粒后,分别于13, 20, 27 d增加3次IL-12注射。

1.6 酶联免疫斑点实验(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)

取6~8周龄C57BL/6雌性鼠随机分为4组:pVax组、mgp100组、mgp100+mTRP-2组和hgp100+hTRP-2

组, 每组7只。各组小鼠分别于0 d和14 d以相应疫苗免疫。第2次免疫之后2周, 取各实验组小鼠的脾细胞, 并以RBC缓冲液去除其中红细胞制备成单细胞悬液。96孔细胞培养板以抗鼠源IFN- γ 单抗4 °C孵育过夜后, 清洗并以封闭缓冲液封闭。将各组脾细胞依次加入相应孔中并分别加入1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hgp100多肽KVPRNQDWL(aa25-33)、mgp100多肽EGSRNQDWL(aa25-33)或TRP-2多肽SVYDFFVWL(aa180-188)孵育48 h。上述多肽均由上海生工生物工程公司合成。清洗培养板并根据ELISPOT试剂盒说明书进行后续操作。

1.7 体外毒性实验

取6~8周龄C57BL/6雌性鼠随机分为4组: pVax组、mgp100组、mgp100+mTRP-2组和hgp100+hTRP-2组, 每组7只。各组小鼠分别于0 d和14 d以相应疫苗免疫。第2次免疫14 d后, 取各实验组小鼠的脾细胞, 并以丝裂霉素C处理的B16F10细胞和10 IU/mL的鼠源IL-2(eBioscience)体外刺激。刺激6 d后, 以Histopaque-1077(Sigma)梯度离心法纯化分离出有效的效应细胞, 并按各种效应细胞:靶细胞(E:T)比例与混合靶细胞($10^4/\text{孔}$)加入U底96孔细胞培养(Falcon), 每孔总体积100 μL 。B16F10细胞经100 IU/mL鼠源IFN- γ 处理过夜, 并以EL-4细胞作为靶细胞。使用CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒检测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放入培养液含量。37 °C孵育5 h后, 取50 μL 培养液检测培养液中的LDH量。最后使用下面公式计算每个效靶比所产生的细胞毒性百分比: $100 \times (A-B)/(C-D)$, 其中A为实验读数-靶细胞自发背景值, B为效应细胞自发背景值, C为靶细胞最大值, D为靶细胞自发背景值。

1.8 统计学处理

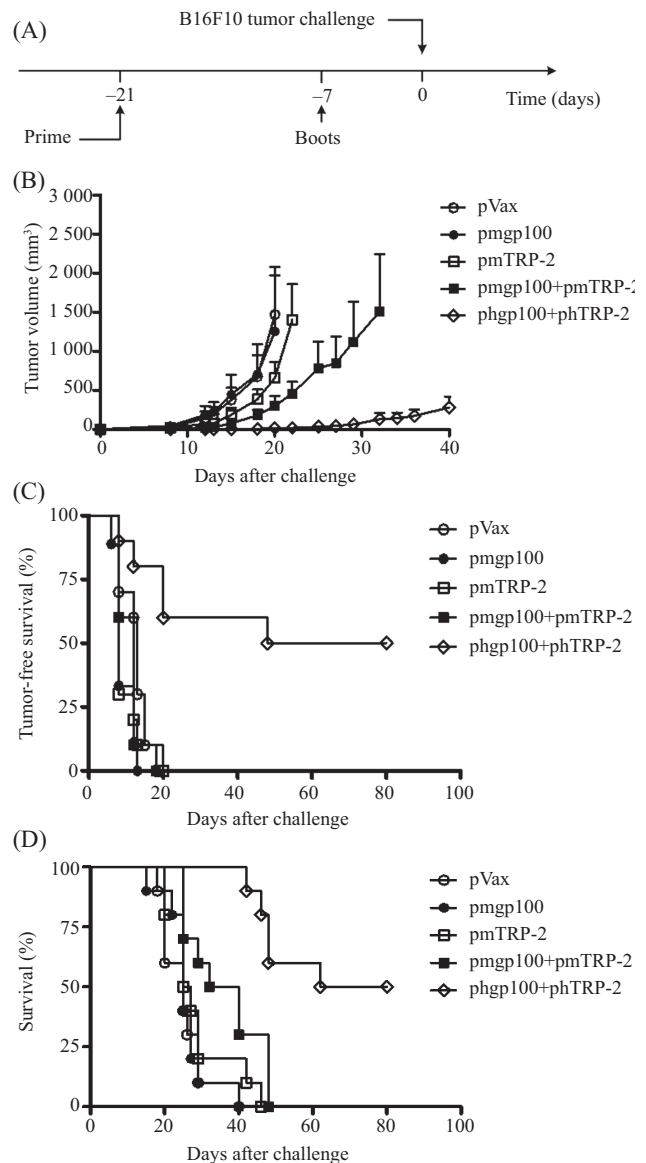
计量材料实验数据以“均值 \pm 标准差”表示。采用SigmaPlot 11.0数据统计软件。以 t 分布检验进行显著性差异分析。Kaplan-Meier法分析动物存活实验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 hgp100和hTRP-2DNA疫苗免疫介导肿瘤消退

在预防实验中, 我们发现2次肌肉免疫10 μg 一种抗原质粒(mgp100或是mTRP-2)的肿瘤生长状况与注射空载体相似, 说明鼠源抗原在老鼠体内只能诱导微弱的免疫应答(图1B)。mgp100和mTRP-2结

合免疫效果强于mgp100或mTRP-2单独免疫, 说明多种抗原结合使用的免疫效果优于一种抗原。而结合免疫异源抗原hgp100和hTRP-2质粒可显著抑制



A: 预防实验免疫流程; B: pVax、mgp100、pmTRP-2、mgp100+pmTRP-2和phgp100+phTRP-2疫苗免疫小鼠的肿瘤体积, 数据以均值 \pm 标准差方式表示, $n=7$; C: pVax、mgp100、pmTRP-2、mgp100+pmTRP-2和phgp100+phTRP-2疫苗免疫小鼠的无瘤生存率, $n=7$; D: pVax、mgp100、pmTRP-2、mgp100+pmTRP-2和phgp100+phTRP-2疫苗免疫小鼠的存活率, $n=7$ 。

A: immune process of prophylactic study; B: tumor volume of mice immunized with pVax, pmgp100, pmTRP-2, pmgp100+pmTRP-2 and phgp100+phTRP-2 vaccines. $n=7$; C: tumor-free survival of mice immunized with pVax, pmgp100, pmTRP-2, pmgp100+pmTRP-2 and phgp100+phTRP-2 vaccines. $n=7$; D: survival of mice immunized with pVax, pmgp100, pmTRP-2, pmgp100+pmTRP-2 and phgp100+phTRP-2 vaccines. $n=7$.

图1 免疫肿瘤抗原hgp100和hTRP-2介导肿瘤消退

Fig.1 Tumor rejection mediated by immunization with combination of plasmid DNAs encoding hgp100 and hTRP-2

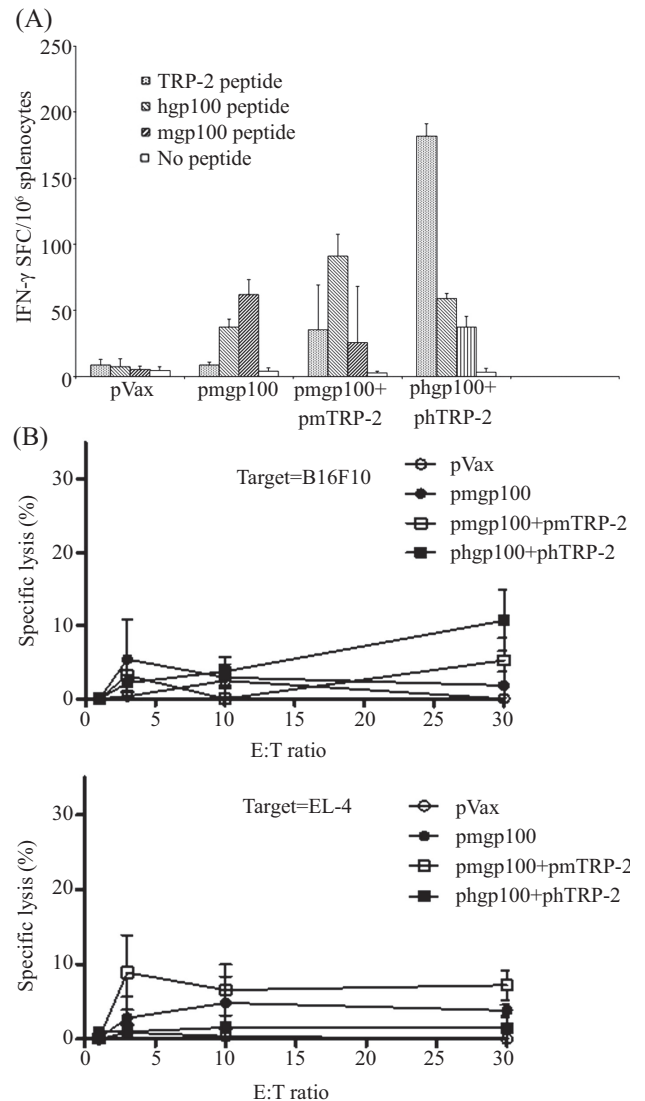
B16F10肿瘤生长(图1B)。在超过80 d的观测期内,小鼠无瘤生存率为50%且存活率明显提高(图1B和图1C)。因此,异源gp100和TRP-2可有效打破这些同源抗原引起的免疫耐受。

2.2 phgp100和phTRP-2共免疫显著促进黑色素瘤特异性免疫应答

为确定电脉冲法调节phgp100和phTRP-2是否能够在体外增强抗肿瘤反应,我们通过ELISPOT检测IFN- γ 分泌细胞的方式检测各实验组小鼠是否诱导gp100或TRP-2特异性免疫应答产生。如图2A所示,电脉冲法免疫phgp100+phTRP-2疫苗显著提高了TRP-2特异性免疫应答,而空载体或鼠源gp100疫苗免疫的小鼠则无法大量产生TRP-2特异性免疫应答。而与鼠源gp100和TRP-2疫苗免疫的小鼠相比,phgp100+phTRP-2疫苗免疫的小鼠所产生的TRP-2特异性免疫应答提高了近5倍,表明异源疫苗可有效打破同源黑色素瘤疫苗所造成的免疫耐受(图2A)。而这些疫苗并未诱导更强的gp100特异性免疫应答,这可能是由gp100之外的其他未确定的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位引发的免疫应答^[11-19]。此外,我们还进一步验证了这些特异性免疫应答是否专门针对gp100和TRP-2。我们收集了各实验组老鼠的脾细胞,并以体外毒性实验分别检测了CTL介导的抗B16F10细胞(gp100和TRP-2阳性细胞)以及抗EL-4细胞(gp100和TRP-2阴性细胞)的细胞毒性。如图2B所示,phgp100+phTRP-2实验组小鼠的脾细胞所显示的抗B16F10细胞毒性高于单独免疫phgp100或phTRP-2实验组。而EL-4细胞的细胞毒性作用无明显差异,说明该细胞毒性特异性针对gp100和TRP-2。

2.3 pIi-PADRE和mIL-12质粒结合黑色素瘤DNA疫苗介导B16F10黑色素瘤消退

为验证pIi-PADRE结合瘤内注射鼠源IL-12质粒是否会进一步提高黑色素瘤疫苗的抗肿瘤作用,我们对皮下注射B16F10细胞的小鼠免疫空载体或黑色素瘤疫苗(phgp100+phTRP-2+pIi-PADRE),同时瘤内免疫鼠源IL-12质粒,如图3A所示。瘤内注射空载体结合电脉冲法免疫小鼠的肿瘤生长曲线较之前(~3 d)略有延缓,说明单独电击处理可能会在一定程度上抑制肿瘤生长但无法引发肿瘤消退。而IL-12(瘤内免疫)、pIi-PADRE和黑色素瘤疫苗(肌肉免疫)结合使用则明显消退了B16F10肿瘤(图3B)。为



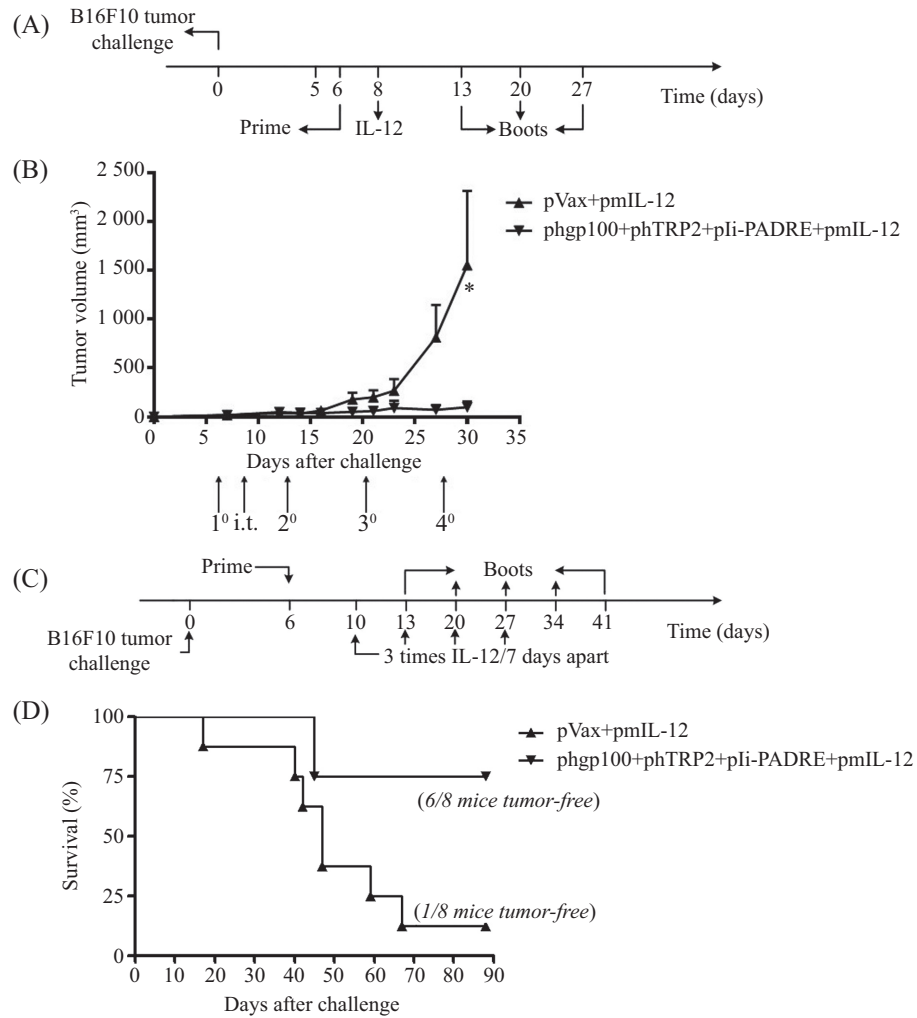
A: pVax、pmgp100、pmgp100+pmTRP-2和phgp100+phTRP-2疫苗免疫小鼠的ELISPOT分析,检测gp100-或TRP-2-特异性免疫应答情况, $n=7$; B: pVax、pmgp100、pmgp100+pmTRP-2和phgp100+phTRP-2疫苗免疫小鼠的体外毒性分析, $n=7$ 。

A: ELISPOT assay of mice immunized with pVax, pmgp100, pmgp100+pmTRP-2 and phgp100+phTRP-2 vaccines, and characterized for the presence of gp100- or pTRP-2-specific immune responses. $n=7$; B: *in vitro* cytotoxicity assay of mice immunized with pVax, pmgp100, pmgp100+pmTRP-2 and phgp100+phTRP-2 vaccines. $n=7$.

图2 phgp100和phTRP-2共免疫显著促进黑色素瘤特异性免疫应答

Fig.2 Co-immunization of phgp100 with phTRP-2 significantly enhanced melanoma antigens-specific immune responses

了最大限度提高黑色素瘤疫苗的抗肿瘤作用,我们尝试着将瘤内注射IL-12质粒的次数增加3次(图3C)。小鼠成瘤70 d后,多次瘤内注射IL-12质粒与黑色素瘤疫苗(肌肉免疫)结合免疫的无瘤生存率为75%,而IL-12(瘤内免疫)单独使用只有25%(图3D)。上述结果表明,电脉冲法免疫IL-12(瘤内免疫)与黑色素瘤



A: IL-12免疫流程; B: pVax+pmIL-12和phgp100+phTRP-2+pIi-PADRE+pmIL-12疫苗免疫小鼠的肿瘤体积, 数据以均值±标准差方式表示, $n=7$, $*P<0.05$, 与pVax+pmIL-12组比较; C: IL-12重复免疫流程; D: pVax+pmIL-12和phgp100+phTRP-2+pIi-PADRE+pmIL-12疫苗重复免疫小鼠的存活率, 数据以均值±标准差方式表示, $n=7$ 。

A: IL-12 immune process; B: tumor volume of mice immunized with pVax+pmIL-12 and phgp100+phTRP-2+pIi-PADRE+pmIL-12 vaccines. Results are presented as mean±S.D., $n=7$, $*P<0.05$ vs pVax+pmIL-12 group; C: IL-12 repeated immune process; D: survival of mice repeated immunized with pVax+pmIL-12 and phgp100+phTRP-2+pIi-PADRE+pmIL-12 vaccines. Results are presented as mean±S.D., $n=7$.

图3 pIi-PADRE和mIL-12质粒结合黑色素瘤DNA疫苗介导B16F10黑色素瘤消退

Fig.3 Combination of melanoma DNA vaccines with plasmid encoding pIi-PADRE and mIL-12 caused rejection of established B16F10 tumors

疫苗(肌肉免疫)在治疗B16F10肿瘤过程中表现出协同增强的效果。

3 讨论

目前, 新型癌症DNA疫苗已发展为治疗黑色素瘤的一种重要策略。然而, 尽管已经取得了喜人的成果, 黑色素瘤DNA疫苗在免疫强度和传递效率等方面还有待改善, 如何提高其在机体内诱导肿瘤特异性免疫反应的效率仍是今后的研究重点。黑色素瘤抗原极易引起强烈的外周耐受反应, 这成为疫苗诱导有效肿瘤免疫反应的一个主要障碍。为了克服

这一难题, 我们尝试使用异源黑色素瘤抗原提高疫苗的抗肿瘤效果。Mendiratta等^[3]在B16预防模型中以电脉冲法免疫100 μg hgp100与mTRP-2表达质粒3次, 得到了可观的抗肿瘤效果。在其基础上, 我们使用了两种异源抗原gp100和TRP-2, 借此提供更多的肿瘤抗原表位以避免肿瘤逃避免疫监视; 同时以内源性表达抗原的B16F10细胞扩大这些抗原的特异性CTLs。结果在同样的肿瘤模型中仅需免疫10 μg DNA 2次即可诱导明显的保护作用。上述结果表明, 我们的疫苗与电击条件明显优于之前的研究, 且对于免疫原性弱的抗原如gp100和TRP-2, 使用异源序

列打破其免疫耐受是十分必要的^[14]。

此外, DNA疫苗本身无法诱导强烈的免疫反应, 需要使用适当的基因佐剂加强其免疫效果。我们首次尝试着使用基因佐剂Ii-PADRE和IL-12表达质粒结合DNA疫苗免疫。PADRE可促进CD4⁺ T细胞生成, Ii链的CLIP区被PADRE替换后在小鼠模型中会诱导产生PADRE特异性CD4⁺ T细胞免疫应答^[9]。共免疫DNA疫苗与Ii-PADRE表达质粒—pIi-PADRE, 能够激活泛-CD4⁺ T细胞分泌相应细胞因子, 为诱导产生抗DNA疫苗编码抗原的CTL提供一个适宜环境。之前我们曾尝试着使用pIi-PADRE结合多种肿瘤抗原免疫, 结果均取得了理想的抗肿瘤效果, 说明Ii-PADRE表达质粒可作为基因佐剂广泛用于电脉冲法肌肉免疫癌症疫苗。

为了进一步提高疫苗的抗肿瘤效果, 我们还使用了另一种基因佐剂IL-12。有关IL-12的抗肿瘤潜力已在许多免疫治疗研究中报道^[11,20]。IL-12可上调T细胞和NK细胞并诱导产生IFN- γ , 随后依次起始抗血管增生因子的释放并上调MHC-I(major histocompatibility complex class-I)类分子^[10]。瘤内注射表达质粒可使IL-12仅集中在肿瘤位点从而降低因全身暴露带来的副作用, 而肌肉注射黑色素瘤DNA疫苗结合瘤内注射IL-12质粒免疫则有助于募集DNA疫苗至肿瘤位点, 并为其诱导CTL提供一个适宜环境。此外, IL-12的抗血管增生作用还能抑制肿瘤生长, 并为DNA疫苗诱导CTL提供足够的时间。Lucas等^[10]使用电脉冲法瘤内注射50 μ g IL-12质粒的方法治愈了47%荷瘤小鼠, 说明单独瘤内注射IL-12会引发一定程度的免疫反应抑制肿瘤生长, 但其效果还不足以令肿瘤完全消退。我们在其基础上对电击条件和IL-12的注射剂量进行了优化, 同时以Ii-PADRE与之结合辅助我们的黑色素瘤疫苗免疫, 结果显示这一实验方案在B16黑色素瘤小鼠模型中发挥了明显的抗肿瘤效果。多次瘤内注射IL-12质粒与黑色素瘤疫苗(肌肉免疫)结合重复免疫效果更佳, 可完全消退建立的侵袭性B16F10肿瘤(>50 mm³)。这是首次报道Ii-PADRE和IL-12表达质粒与hgp100和hTRP-2两种黑色素瘤疫苗配合电脉冲法免疫表现出协同作用。

综上所述, 电脉冲法肌肉免疫低剂量hgp100和hTRP-2 DNA表达质粒可有效打破免疫耐受并诱导强烈的抗肿瘤反应, 显著促进DNA疫苗的抗肿瘤作用, 且不会产生针对正常的黑色素细胞的自身免

疫反应。基因佐剂Ii-PADRE和IL-12可进一步增加DNA疫苗的效果。诱导有效的抗肿瘤反应很可能需要重复注射疫苗。体内电脉冲法免疫DNA疫苗可能是目前最经济有效的癌症免疫治疗方式, 在不久的将来必将为广大癌症患者带来福音。

参考文献 (References)

- 1 Rosenberg SA. Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(22): 1635-44.
- 2 Barouch DH. Rational design of gene-based vaccines. *J Pathol* 2006; 208(2): 283-9.
- 3 Mendiratta SK, Thai G, Eslahi NK, Thull NM, Matar M, Bronte V, *et al.* Therapeutic tumor immunity induced by polyimmunization with melanoma antigens gp100 and TRP-2. *Cancer Res* 2001; 61(3): 859-63.
- 4 Tanaka M, Kaneda Y, Fujii S, Yamano T, Hashimoto K, Huang SK, *et al.* Induction of a systemic immune response by a polyvalent melanoma-associated antigen DNA vaccine for prevention and treatment of malignant melanoma. *Mol Ther* 2002; 5(3): 291-9.
- 5 Wolchok JD, Yuan J, Houghton AN, Gallardo HF, Rasalan TS, Wang J, *et al.* Safety and immunogenicity of tyrosinase DNA vaccines in patients with melanoma. *Mol Ther* 2007; 15(11): 2044-50.
- 6 Wolchok JD, Gregor PD, Nordquist LT, Slovin SF, Scher HI. DNA vaccines: An active immunization strategy for prostate cancer. *Semin Oncol* 2003; 30(5): 659-66.
- 7 Bonehill A, Heirman C, Tuyaeerts S, Michiels A, Zhang Y, van der Bruggen P, *et al.* Efficient presentation of known HLA class II-restricted MAGE-A3 epitopes by dendritic cells electroporated with messenger RNA encoding an invariant chain with genetic exchange of class II-associated invariant chain peptide. *Cancer Res* 2003; 63(17): 5587-94.
- 8 Rice J, Elliott T, Buchan S, Stevenson FK. DNA fusion vaccine designed to induce cytotoxic T cell responses against defined peptide motifs: Implications for cancer vaccines. *J Immunol* 2001; 167(3): 1558-65.
- 9 Hung CF, Tsai YC, He L, Wu TC. DNA vaccines encoding Ii-PADRE generates potent PADRE-specific CD4⁺ T-cell immune responses and enhances vaccine potency. *Mol Ther* 2007; 15(6): 1211-9.
- 10 Lucas ML, Heller L, Coppola D, Heller R. IL-12 plasmid delivery by *in vivo* electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma. *Mol Ther* 2002; 5(6): 668-75.
- 11 Rakhmievich AL, Timmins JG, Janssen K, Pohlmann EL, Sheehy MJ, Yang NS. Gene gun-mediated IL-12 gene therapy induces antitumor effects in the absence of toxicity: A direct comparison with systemic IL-12 protein therapy. *J Immunother* 1999; 22(2): 135-44.
- 12 Alexander J, Sidney J, Southwood S, Ruppert J, Oseroff C, Maewal A, *et al.* Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-

- blocking peptides. *Immunity* 1994; 1(9): 751-61.
- 13 Nagata T, Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Kim YH, Yang Z, *et al.* Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* by immunization with plasmid DNA expressing a helper T-cell epitope that replaces the class II-associated invariant chain peptide of the invariant chain. *Infect Immun* 2002; 70(5): 2676-80.
- 14 Steitz J, Bruck J, Gambotto A, Knop J, Tuting T. Genetic immunization with a melanocytic self-antigen linked to foreign helper sequences breaks tolerance and induces autoimmunity and tumor immunity. *Gene Ther* 2002; 9(3): 208-13.
- 15 Ahlen G, Soderholm J, Tjelle T, Kjekken R, Frelin L, Höglund U, *et al.* *In vivo* electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J Immunol* 2007; 179(7): 4741-53.
- 16 Andre F, Mir LM. DNA electrotransfer: Its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther* 2004; 11(Suppl 1): S33-42.
- 17 Nawrath M, Pavlovic J, Moelling K. Synergistic effect of a combined DNA and peptide vaccine against gp100 in a malignant melanoma mouse model. *J Mol Med (Berl)* 2001; 79(2/3): 133-42.
- 18 Cheng WF, Hung CF, Chai CY, Hsu KF, He L, Ling M, *et al.* Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J Clin Invest* 2001; 108(5): 669-78.
- 19 Engelhorn ME, Guevara-Patino JA, Merghoub T, Liu C, Ferrone CR, Rizzuto GA, *et al.* Mechanisms of immunization against cancer using chimeric antigens. *Mol Ther* 2008; 16(4): 773-81.
- 20 Dabrowska A, Giermasz A, Golab J, Jakobisiak M. Potentiated antitumor effects of interleukin 12 and interferon alpha against B16F10 melanoma in mice. *Neoplasma* 2001; 48(5): 358-61.