



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101837123 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201010184853. 7

(22) 申请日 2010. 05. 27

(73) 专利权人 四川大学

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号

(72) 发明人 阚兵 魏于全 杨莉 王永生

(74) 专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通合伙) 51124

代理人 梁鑫

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

审查员 王溯铭

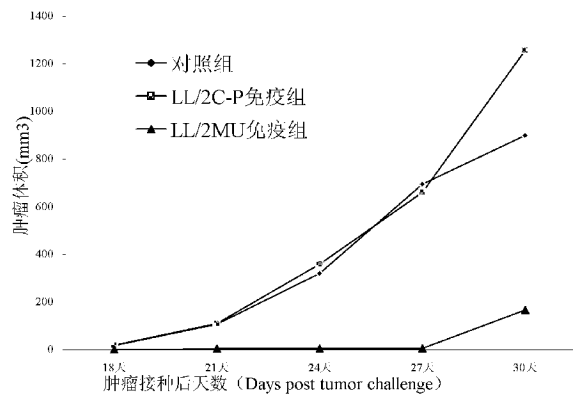
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

肿瘤细胞疫苗及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于肿瘤生物治疗领域,具体涉及一种肿瘤细胞疫苗及其制备方法。本发明所要解决的技术问题是提供一种有效的防治肿瘤的疫苗。本发明解决技术问题的技术方案是提供一种肿瘤细胞疫苗。该肿瘤细胞疫苗以经过灭活处理至失去分化、增生能力,但仍能表达血管内皮生长因子的含有血管内皮生长因子表达载体的肿瘤细胞作为主要活性成分。



1. 肿瘤细胞疫苗,其特征在于:以经过灭活处理至失去分化、增生能力,但仍能表达血管内皮生长因子的含有血管内皮生长因子表达载体的肿瘤细胞作为主要活性成分。
2. 根据权利要求1所述的肿瘤细胞疫苗,其特征在于:所述的灭活处理为辐照灭活。
3. 根据权利要求1所述的肿瘤细胞疫苗,其特征在于:所述的肿瘤细胞为肺癌细胞。
4. 根据权利要求1所述的肿瘤细胞疫苗,其特征在于:所述的内皮生长因子表达载体为可表达VEGF的质粒VEGF-pSectag2。
5. 制备权利要求1~4任一项所述肿瘤细胞疫苗的方法,其特征在于包括以下步骤:将VEGF真核表达载体转入肿瘤细胞内,筛选了VEGF稳定表达株;将VEGF稳定表达株用钴60灭活处理至其无法分化、增生,但还能表达分泌VEGF的状态。
6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述的肿瘤细胞为肺癌细胞。
7. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述的内皮生长因子表达载体为可表达VEGF的质粒VEGF-pSectag2。
8. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述的钴60灭活条件为10~30Grays的剂量照射10~30分钟。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述的钴60灭活条件为20Grays的剂量照射20分钟。
10. 权利要求1~4任一项所述肿瘤细胞疫苗在制备防治肿瘤的药物中的用途。

肿瘤细胞疫苗及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤生物治疗领域,具体涉及一种肿瘤细胞疫苗及其制备方法。

背景技术

[0002] 众所周知,肿瘤抗原免疫原性弱,宿主难以产生特异性免疫反应,肿瘤细胞得以逃避机体的免疫监视,是导致肿瘤细胞的增殖难以控制的主要原因之一。巨噬细胞广泛分布于机体各组织,是免疫应答起始阶段的重要辅助细胞,也是机体处理外来抗原和机体免疫的第一道屏障。但是如何发动吞噬细胞有效获取肿瘤抗原,将大量的肿瘤抗原表位呈递至巨噬细胞表面并呈递给T细胞,从而有效地激发机体的免疫反应,产生对肿瘤的防治效果,是本领域长期以来想要解决的问题。肿瘤疫苗的研制是当今世界肿瘤免疫治疗的重要热点课题。目前有很多肿瘤疫苗的研究报告在动物实验中取得结果,但仍然存在很多问题。主要是目前多数研究对肿瘤细胞中的某单一抗原分子,以及相应的基因靶点作为疫苗的研究对象,但近年来肿瘤的发生已被认识到不是单一基因的变异所致,而是由多个靶点的基因或蛋白分子变异导致的。本领域目前需要开发有效的防治肿瘤的疫苗。

[0003] 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)是目前已知内皮细胞最强的有丝分裂刺激因子,能刺激血管内皮细胞增殖,促进肿瘤生血管的形成,有利于肿瘤的生长,在肿瘤新生血管生成和抗血管生成治疗中研究最多。但是,VEGF还能通过单核细胞表面的受体FLT-1的相互作用对单核具有趋化作用,但目前对VEGF的这一功能及其在肿瘤发生发展中的意义研究较少。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种有效的防治肿瘤的疫苗。本发明解决技术问题的技术方案是提供一种肿瘤细胞疫苗。

[0005] 该肿瘤细胞疫苗以经过灭活处理至失去分化、增生能力,但仍能表达血管内皮生长因子的含有血管内皮生长因子表达载体的肿瘤细胞为主要活性成分。

[0006] 上述肿瘤细胞疫苗中所述的灭活处理为辐照灭活。

[0007] 上述肿瘤细胞疫苗中所述的肿瘤细胞为肺癌细胞。

[0008] 上述肿瘤细胞疫苗中所述的内皮生长因子表达载体为可表达VEGF的质粒VEGF-pSectag2。

[0009] 本发明还提供了制备上述肿瘤细胞疫苗的方法。上述方法包括以下步骤:将VEGF真核表达载体转入肿瘤细胞内,筛选了VEGF稳定表达株;将VEGF稳定表达株用钴60灭活处理至其无法分化、增生,但还能表达分泌VEGF的状态。

[0010] 上述制备肿瘤细胞疫苗方法中所述的肿瘤细胞为肺癌细胞。

[0011] 上述制备肿瘤细胞疫苗方法中所述的内皮生长因子表达载体为可表达VEGF的质粒VEGF-pSectag2。

[0012] 上述制备肿瘤细胞疫苗方法中所述的钴60灭活条件为10~30Grays的剂量照射10

~30分钟。

[0013] 上述制备肿瘤细胞疫苗方法中所述的钴60灭活条件为20Grays的剂量照射20分钟。

[0014] 进一步的,进行上述钴60灭活时的肿瘤细胞浓度为 $1 \times 10^6 \sim 100 \times 10^6$ 个/ml。

[0015] 本发明还提供了上述肿瘤细胞疫苗在制备防治肿瘤的药物中的用途。

[0016] 技术路线:本发明肿瘤疫苗能利用其在体内分泌的VEGF对单核细胞的趋化作用,将单核细胞吸引至肿瘤细胞周围活化为巨噬细胞,以吞噬肿瘤细胞和提呈肿瘤抗原,诱导机体产生特异性免疫反应,以达到防治肿瘤的目的。

[0017] 本发明技术方案较目前的树突状细胞疫苗具有明显的优势:树突状细胞虽是目前已知最强的抗原呈递细胞,但其吞噬功能很弱或无,目前多采用体外培养扩增DC细胞后,用肿瘤抗原肽、肿瘤抗原或与肿瘤细胞融合作为肿瘤疫苗,而巨噬细胞则同时具有强大的吞噬功能和抗原呈递功能,因此利用VEGF的趋化活性吸引激活单核吞噬细胞至灭活肿瘤细胞的免疫局部,即可有效吞噬肿瘤细胞并处理肿瘤抗原,将大量的肿瘤抗原表位呈递至巨噬细胞表面并呈递给T细胞,从而有效地激发机体的免疫反应。

[0018] 本发明疫苗制备工艺适用于临床用肿瘤疫苗的制备。其基本技术路线有两种:一是将VEGF基因导入体外已建系的肿瘤细胞系,使其过表达VEGF,构建出人体各系统转VEG基因肿瘤细胞系作通用型肿瘤疫苗;二是取术后病人的肿瘤组织,分离原代肿瘤细胞,用腺病毒或慢病毒介导导入VEGF基因,使其过表达VEGF。VEGF过表达的肿瘤细胞再经r射线照射灭活后,20Grays左右的剂量照射20分钟左右即得到本发明肿瘤疫苗。r射线照射灭的要求为经过G.60灭活处理至其没有分化、生长的活性,但还能存活,有分泌细胞因子的活性,每种肿瘤细胞根据其自身的情况,照射时间和照射强度都有所不同,照射时候的细胞的浓度也可以调整。将本发明肿瘤疫苗注入病人体内(皮下、腹腔或静脉),能增强机体对肿瘤细胞免疫应答,有效清除机体残余的肿瘤细胞,防治肿瘤的复发和转移。

[0019] 在本发明的一个实例中,用VEGF真核表达载体转染肿瘤细胞,筛选高表达的VEGF的肿瘤细胞克隆,经Co60机r照射去分化,剂量为使之失去增殖能力,但保留肿瘤细胞一定的活性,具有分泌VEGF能力,将这一程序处理的修饰的肿瘤细胞作为瘤苗,在LL/2肺癌小鼠模型中取得了好的防治效果。

[0020] 肿瘤的治疗包括手术、放疗、化疗和生物治疗四个方面。临床上利用本疫苗将这四种治疗手段结合在一起:手术摘除肿瘤组织,分离制备修饰的肿瘤疫苗,选择不同放疗和化疗方案,甚至选择低于常规剂量方案,对机体免疫系统影响小,对肿瘤的生长有一定的抑瘤作用,再辅以本发明肿瘤疫苗,以激活机体产生特异的免疫应答,可有效防治肿瘤的复发和转移。

[0021] 本发明的有益效果为本发明肿瘤疫苗能吸引激活单核吞噬细胞至灭活肿瘤细胞的部位,即可有效吞噬肿瘤细胞并处理肿瘤抗原,将大量的肿瘤抗原表位呈递至巨噬细胞表面并呈递给T细胞,从而有效地激活机体产生特异的免疫应答,可有效防治肿瘤的发生、复发和转移。为本领域提供了一种新的有效的肿瘤疫苗。

附图说明

[0022] 图1肿瘤预防试验的时间-肿瘤体积曲线图。结果表明VEGF过表达LL/2肿瘤细胞

免疫接种小鼠,能有效保护小鼠免受亲代LL/2肿瘤细胞的攻击。

[0023] 图2肿瘤预防试验的肿瘤照片,上排为LL/2MV组,中排为LL/2c-p组,下排为对照组。

具体实施方式

[0024] 以下结合附图通过具体实施方式对本发明进行具体说明。

[0025] 实施例一本发明肿瘤疫苗的制备

[0026] 以小鼠LL/2肺癌细胞为模型为实例:以LL/2小鼠肺癌为动物模型,将小鼠VEGF164真核表达基因导入LL/2载肿瘤细胞内,筛选了VEGF稳定高表达株(LL/2MV);用VEGF高表达的LL/2肿瘤细胞株,经过G₆₀灭活处理至其没有分化、生长的活性,但还能存活,有分泌细胞因子的活性。将这种灭活的肿瘤细胞接种C57小鼠后,再给小鼠接种亲代LL/2肿瘤细胞,观察到这种灭活的肿瘤细胞疫苗亲代LL/2肿瘤细胞的保护作用。

[0027] 具体操作过程:

[0028] 1. 转染与筛选高表达mVEGF1640的LL/2细胞株

[0029] 将LL/2培养于含10%灭活胎牛血清的DMEM基质(含丁胺卡那霉素100u/ml),取对数生长的LL/2细胞 1×10^6 个于六孔板培养,只加2孔培养。次日,用2ug的mVEGF-pSectag2质粒(hVEGF mRNA的序列见Gene Bank序列号:GI:3719221;mVEGF蛋白Gene Bank序列号:GI:346974Wei;载体的构建参见YQ,Huang MJ,Yang L,et al.,2001,Immunogene therapy oftumors with vaccine based on Xenopus homologous vascular endothelial growth factor as a modelantigen.PNAS 98:11545-11550.)或2ug空载体pSectag2质粒,按照操作说明书,与5ul脂质体混匀,转染LL/2细胞,转染48小时后,用100ug/ml的Zeocin(博来霉素)筛选,直至筛选时间达一个月。筛选出5个Zeocin抗性克隆的血清,用mVEGF检测试剂盒检测,选择一个高表达mVEGF的抗性Zeocin LL/2克隆,其 10^6 个肿瘤细胞24小时内分泌mVEGF达80.4ng;而亲代LL/2只有1.0ng,空载体转染LL/2为1.2ng。将这株高表达mVEGF1640的LL/2称为LL/2MV,空载体转染的LL/2为LL/2C-P。LL/2MV和LL/2C-P的体外倍增时间、形态与亲代LL/2相一致,没有明显区别。

[0030] 实施例二 使用本发明肿瘤疫苗进行肿瘤防治的试验

[0031] 取15只8周龄雌性C57小鼠,随机分为3组作预防试验。将对数生长的LL/2MV和LL/2C-P的肿瘤细胞收集,同样用无血清基质离心洗涤3次,用血细胞计数尺计数,调细胞数为 20×10^6 个/ml,用Co60机经20Grays的剂量照射20分钟。将这种方法处理LL/2MV和LL/2C-P分别于小鼠背部皮下注射100u1(即每只小鼠注射 2×10^6 个经放射线处理的肿瘤细胞)各5只小鼠,另5只背部皮下注射100u1天血清基质作对照。间隔15天,每组按照以上方法再注射1次。再间隔15天,再收集对数生长的亲代LL/2肿瘤细胞离心洗涤3次,用无血清基质调肿瘤细胞浓度为 4×10^6 个/ml,给这3组小鼠右腋皮下接种50u1(即 2×10^5 个/只小鼠),观察亲代LL/2肿瘤细胞的生长情况,同样直至扪及皮下肿瘤包块时,每3天测量肿瘤纵、横径,直到有荷瘤鼠瘤体过大,濒临死亡时,全部处死荷瘤鼠,并分别收集3组的小鼠血清,称瘤组织重量,并固定肿瘤组织,经石蜡包埋,切片作HE染色。

[0032] 实验结果:肿瘤保护试验发现放射线灭活的LL/2MV肿瘤细胞保护小鼠受亲代LL/2肿瘤细胞攻击。接种亲本LL/2肿瘤细胞后18天,对照组和LL/2C-P组均可扪及 $3 \times 4\text{mm}^2$ 左右

的包块,而LL/2MV组未扪及。之后对照组和LL/2C-P两组肿瘤组织,呈进行性增长,2周后对照组5只小鼠均生长至 $11 \times 11.5\text{mm}^2$,LL/2L-P组5只小鼠均生长达 $12 \times 10.5\text{mm}^2$ 而LL/2MV组有2只长至 $6 \times 6.5\text{mm}^2$,有3只未扪及(图1)。接种亲代LL/2肿瘤细胞33天眼球取血并处死荷瘤鼠,称瘤组织重量,LL/2MV组瘤组织重量明显低于LL/2MV组(图2)。结果表明本发明肿瘤疫苗有明显的功效,且有较好的安全性。

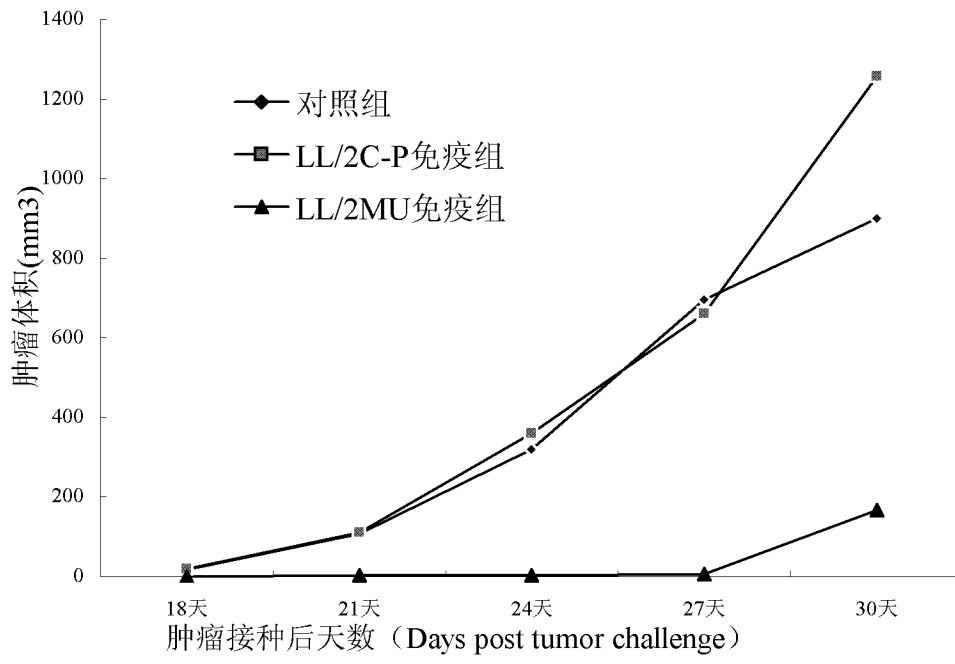


图1

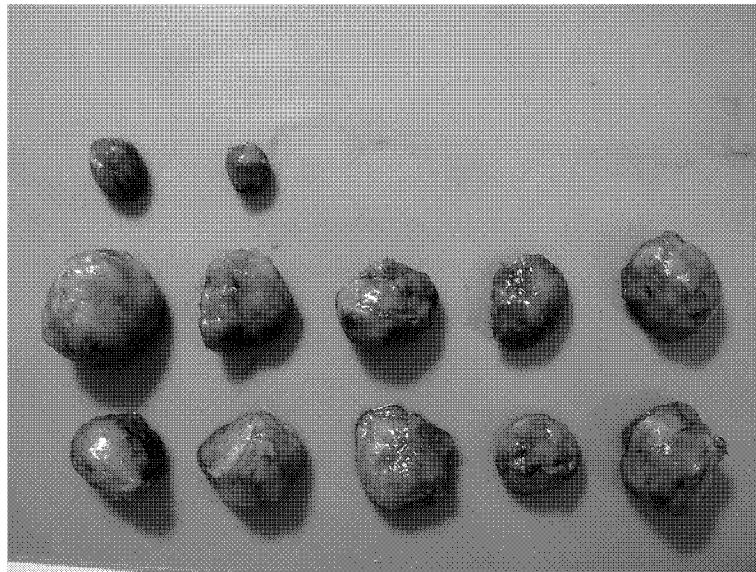


图2