

(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



(10) 国际公布号  
WO 2023/115676 A1

(43) 国际公布日  
2023年6月29日 (29.06.2023)

- (51) 国际专利分类号:  
C12N 5/0784 (2010.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01) A61K 9/14 (2006.01)  
A61K 39/39 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/073141
- (22) 国际申请日: 2022年1月21日 (21.01.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
202111603486.4 2021年12月24日 (24.12.2021) CN
- (71) 申请人: 苏州尔生生物医药有限公司 (SUZHOU  
ERSHENG BIOMEDICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中

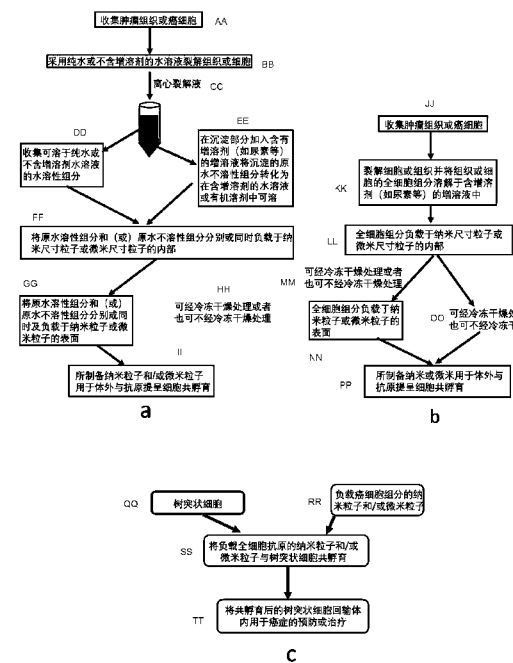
国江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州  
片区苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二  
期乐橙广场5幢E637单元, Jiangsu 215000 (CN)。

(72) 发明人: 刘密 (LIU, Mi); 中国江苏省苏州市工  
业园区仁爱路199号, Jiangsu 215000 (CN)。刁  
璐 (DIAO, Lu); 中国江苏省苏州市工业园区仁  
爱路199号, Jiangsu 215000 (CN)。

(74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理  
事务所 (普通合伙) (CENTRAL SOUTH WELL  
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江  
苏省苏州市吴中区石湖西路188号吴  
中万达广场A座苏州大学国家科技园  
2303, Jiangsu 215000 (CN)。

(54) Title: DENDRITIC CELL CANCER VACCINE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种树突状细胞癌症疫苗及其应用



- AA Collect tumor tissues or cancer cells
- BB Lyse the tissues or cells by using pure water or an aqueous solution without any solubilizing agents
- CC Centrifuged lysate
- DD Collect water-soluble components that can be dissolved in pure water or the aqueous solution without any solubilizing agents
- EE Add a solubilizing solution containing solubilizing agents (such as urea) to the precipitate so as to convert the original water-insoluble components in the precipitate into soluble components in an aqueous or organic solvent containing solubilizing agents
- FF Load the original water-soluble and/or water-insoluble components separately or simultaneously inside nanoparticles or microparticles.
- GG Load the original water-soluble and/or water-insoluble components separately or simultaneously inside nanoparticles or microparticles
- HH Optional freeze-drying treatment
- II The prepared nanoparticles and/or microparticles are used for co-incubating with antigen-presenting cells in vitro
- JJ Collect tumor tissue or cancer cells
- KK Lyse the cells or the tissues and dissolve the whole-cell components of the tissues or cells in a solubilizing solution containing solubilizing agents (such as urea)
- LL Load whole-cell components inside nanoparticles or microparticles
- MM Optional freeze-drying treatment
- NN Load the whole-cell components onto the surface of nanoparticles or microparticles
- OO Optional freeze-drying treatment
- PP Co-incubate dendritic cells with nanoparticles and/or microparticles loaded with whole-cell antigens
- QQ Dendritic cells
- RR Nanoparticles and/or microparticles loaded with cancer cell components
- SS Co-incubate dendritic cells with nanoparticles and/or microparticles loaded with whole-cell antigens.
- TT Reintroduce the co-incubated dendritic cells back into the body for cancer prevention or treatment

图1

(57) Abstract: Provided is a dendritic cell cancer vaccine, which is obtained by delivery particles loaded with cell components activating dendritic cells in vitro, wherein the delivery particles are nanoparticles and/or microparticles, the cell components are derived from water-soluble components and/or non-water-soluble components of cancer cells and/or tumor tissue cells, and activation is a process in which the delivery particles loaded with the cell components and the dendritic cells are co-incubated.

(57) 摘要: 提供一种树突状细胞癌症疫苗, 由负载细胞组分的递送粒子体外激活树突状细胞得到; 其中, 递送粒子为纳米粒子和/或微米粒子, 细胞组分来源于癌细胞和/或肿瘤组织中细胞的水溶性组分和/或非水溶性组分, 激活是将负载细胞组分的递送粒子与树突状细胞共孵育。

(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, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))。

## 一种树突状细胞癌症疫苗及其应用

### 技术领域

本发明涉及免疫治疗技术领域，尤其涉及一种树突状细胞癌症疫苗及其应用。

### 5 背景技术

免疫是人体的一种生理功能，人体依靠这种功能识别“自己”和“非己”成分，从而破坏和清除人体内的异常物质（如病毒、细菌等），或人体本身所产生的损伤细胞和肿瘤细胞等，以维持人体的健康。近些年来免疫技术发展很快，尤其是癌症的免疫治疗领域。随着对癌症认识的不断提高，人们发现人体的免疫系统和各类免疫细胞在抑制癌症发生、发展的过程中扮演着关键角色。通过调节机体免疫系统的平衡，我们有望影响和控制癌症的发生、发展和治疗。

癌症疫苗在癌症免疫治疗和预防的重要方法之一。树突状细胞（DC）是最重要的抗原提呈细胞，是特征特异性免疫反应激活的主要细胞。树突状细胞源于骨髓淋巴细胞，可定居在全身组织，对周围环境进行监视，并随时将捕获的信息传送至适应性免疫系统（T 淋巴细胞（以下简称 T 细胞）和 B 淋巴细胞（以下简称 B 细胞）），是表达主要组织相容性复合物（MHC）I 和 II 类分子的专职抗原呈递细胞，是固有免疫和适应性免疫的关键关联纽带。树突状细胞将从外周获取的抗原内化分解为短肽段，以肽段-MHC 复合物形式表达于树突状细胞表面，这一过程也是树突状细胞成熟的过程，然后载有抗原肽的树突状细胞迁移至二级淋巴器官，在此激活 T 细胞。与其他抗原呈递细胞相比，树突状细胞抗原提呈效率极高，且可诱导极少数 T 细胞应答，成为 T 细胞和 B 细胞反应最有效的内源性刺激。

树突状细胞癌症疫苗是癌症疫苗的一种，目前树突状癌症疫苗的开发主要是选择几种多肽抗原或者几种蛋白质抗原或者癌细胞裂解液中的上清液体外激活树突状细胞，再回输体内。目前已有研究证明，肿瘤周围树突状细胞可以捕获肿瘤细胞释放的肿瘤抗原，这些抗原来源于死亡的肿瘤细胞或通过树突状细胞吞噬活的肿瘤细胞，再将这些抗原交叉提呈给肿瘤引流淋巴结内 T 细胞，从而诱导肿瘤抗原特异性细胞毒性 T 细胞（CTL）的产生，杀伤肿瘤细胞。然而在临床实践中，由于肿瘤的整体免疫抑制大环境和肿瘤局部免疫微环

境中多种细胞相互作用，使得树突状细胞无法顺利完成免疫应答，而且在肿瘤微环境中肿瘤细胞表达分泌的多种分子可以抑制树突状细胞活化并驱使树突状细胞向抑制型或调节型表型转化，抑制肿瘤的免疫应答。因此，即使树突状细胞疫苗有一定的效果，但并非所有的临床试验均显示树突状细胞疫苗可使肿瘤患者生存获益。如 Walker 等的 I 期临床试验纳入 9 例胶质母细胞瘤患者和 4 例间变性星形细胞瘤患者，予树突状细胞疫苗联合胶质瘤标准治疗，再次手术后肿瘤标本中 T 细胞浸润增多，但总生存期并无明显延长。2010 年美国食品与药品管理局（FDA）批准首个树突状细胞疫苗 Provenge 用于治疗难治性前列腺癌，但是由于 Provenge 疫苗在制备过程中只使用了有限的几种抗原体外刺激激活树突状细胞，所以其临床疗效很有限。此后，树突状细胞疫苗相继在乳腺癌、膀胱癌、肾癌、结肠癌和直肠癌、肺癌、黑色素瘤的治疗中取得一定疗效，但其仅通过部分抗原激活树突状细胞，治疗效果仍有待改进。

癌症疫苗的基础是选择合适的癌症抗原来激活人体免疫系统对异常突变的癌细胞的识别，癌细胞和肿瘤组织异质性很高，突变很多，所以癌症细胞或者癌症肿瘤组织本身是最好的癌症抗原的来源。树突状细胞越多，吞噬的抗原量越多，疫苗的疗效就会越好。但是直接将肿瘤裂解液与树突状细胞混合孵育，因为细胞膜为脂溶性而之前研究者使用的细胞裂解液中的上清液中的组分为水溶性不易被树突状细胞吞噬摄取。因此，仍需要一种新的制备树突状细胞疫苗的方法。

## 发明内容

为解决上述技术问题，本发明提供了一种树突状细胞疫苗，该疫苗基于负载一种或多种癌症细胞和/或一种或多种肿瘤组织的全细胞组分或其混合物的微米或纳米粒子在体外激活树突状细胞。

本发明的一种树突状细胞癌症疫苗，该癌症疫苗由负载细胞组分的递送粒子体外激活树突状细胞得到，其中，递送粒子为纳米粒子和/或微米粒子，细胞组分来源于一种或多种癌细胞和/或一种或多种肿瘤组织中细胞的水溶性组分和/或非水溶性组分，激活是指将负载细胞组分的递送粒子与树突状细胞共孵育。

本发明中，细胞组分来源于一种或多种癌细胞和/或一种或多种肿瘤组织全细胞中得到的组分，将非水溶性组分负载到递送粒子上，使该疫苗系统中含有更多的抗原，更优选地，将水溶性组分和非水溶性组分同时负载到递送粒子上，使递送粒子上负载了全部抗原，

然后在体外与树突状细胞共孵育，被树突状细胞吞噬后可被树突状细胞进行抗原提呈和激活，回输回体内后即可归巢淋巴结并利用 DC 细胞负载的抗原激活癌症特异性 T 细胞。

进一步地，树突状细胞为自体树突状细胞和/或异体树突状细胞。本发明采用体外激活树突状细胞，而未采用体内激活的方式，是因为经过发明人的大量实验发现，由于体内  
5 激活和体外激活的环境不同，体内不一定可以发挥 DC 细胞的呈递功能，从而导致治疗效果差异。

进一步地，树突状细胞来源于任何可以制备分离树突状细胞的细胞，包括但不限于来自于干细胞、骨髓细胞、外周免疫细胞。

进一步地，递送粒子及其负载的细胞组分与树突状细胞共孵育至少 4 时间，使微纳粒  
10 子负载的细胞组分能够递送到树突状细胞内，且可被树突状细胞处理和进行抗原提呈。下述实施例中，共孵育时间至少为 4 小时，优选为 48 - 96 小时。

进一步地，本发明中的水溶性组分为细胞或组织中的可溶于纯水或不含增溶剂的水溶液中的原水溶性部分，非水溶性组分为细胞或组织中原非水溶性部分采用适当增溶方法由  
15 在纯水中不溶变为在含增溶剂的水溶液中或有机溶剂中可溶的部分。其中，细胞组分由一种或多种癌细胞和/或肿瘤组织的全细胞裂解得到，或者由一种或多种癌细胞和/或肿瘤组织的全细胞裂解后加工得到，或者由一种或多种癌细胞和/或肿瘤组织的全细胞加工后裂解得到。

进一步地，细胞组分中的水溶性部分和非水溶性部分都可以被含增溶剂的增溶水溶液  
20 或有机溶剂溶解。增溶剂为可以增加蛋白质或多肽在水溶液中溶解性的增溶剂中的至少一种；有机溶剂为可以溶解蛋白质或多肽的有机溶剂。

进一步地，增溶剂包括但不限于尿素、盐酸胍、脱氧胆酸钠、SDS、甘油、pH 大于 7  
的碱性溶液、pH 小于 7 的酸性溶液、各类蛋白质降解酶、白蛋白、卵磷脂、高浓度无机盐、Triton、吐温、DMSO、乙腈、乙醇、甲醇、DMF、丙醇、异丙醇、醋酸、胆固醇、氨基酸、糖苷、胆碱、Brij™-35、Octaethylene glycol monododecyl ether、CHAPS、Digitonin、  
25 lauryldimethylamine oxide、IGEPAL® CA-630。本领域技术人员可以理解，所述非水溶性成分也可采用其他可使蛋白质和多肽片段增溶的方法由在纯水中不溶变为可溶。有机溶剂包括但不限于 DMSO、乙腈、乙醇、甲醇、DMF、异丙醇、丙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯。本领域技术人员可以理解，所述有机溶剂也可采用其他可使蛋白质和多肽片段增溶的含有

机溶剂的方法。

进一步地，用于激活树突状细胞的纳米粒子和/或微米粒子系统包括纳米级尺寸或微米级尺寸的粒子和该粒子负载的细胞组分或其混合物，混合物包括但不限于水溶性组分互相混合，或者非水溶性组分互相混合，或者全部或部分水溶性组分与全部或部分水溶性组分互相混合。

进一步地，细胞组分或其混合物被负载于微纳粒子内部和/或表面，具体的，所述负载方式为细胞的水溶性组分和非水溶性组分分别或同时被包载于粒子内部，和/或分别或同时负载于粒子表面，包括但不限于水溶性组分同时装载于粒子中和负载于粒子表面，非水溶性组分同时装载于粒子中和负载于粒子表面，水溶性组分装载于粒子中而非水溶性组分负载于粒子表面，非水溶性组分装载于粒子中而水溶性组分负载于粒子表面，水溶性组分和非水溶性组分装载于粒子中而只有非水溶性组分负载于粒子表面，水溶性组分和非水溶性组分装载于粒子中而只有水溶性组分负载于粒子表面，水溶性组分装载于粒子中而水溶性组分和非水溶性组分同时负载于粒子表面，非水溶性组分装载于粒子中而水溶性组分和非水溶性组分同时负载于粒子表面，水溶性组分和非水溶性组分同时装载于粒子中而且水溶性组分和非水溶性组分同时负载于粒子表面。

进一步地，用于激活树突状细胞的微纳粒子内部和/或表面还包括免疫增强佐剂。免疫增强佐剂包括但不限于微生物来源的免疫增强剂、人或动物免疫系统的产物、固有免疫激动剂、适应性免疫激动剂、化学合成药物、真菌多糖类、中药及其他类中的至少一类；免疫增强佐剂包括但不限于模式识别受体激动剂、卡介苗（BCG）、锰相关佐剂、卡介苗细胞壁骨架、卡介苗甲醇提取残余物、卡介苗胞壁酰二肽、草分枝杆菌、多抗甲素、矿物油、病毒样颗粒、免疫增强的再造流感病毒小体、霍乱肠毒素、皂苷及其衍生物、Resiquimod、胸腺素、新生牛肝活性肽、米喹莫特、多糖、姜黄素、免疫佐剂 CpG、免疫佐剂 poly(I:C)、免疫佐剂 poly ICLC、短小棒状杆菌苗、溶血性链球菌制剂、辅酶 Q10、左旋咪唑、聚胞苷酸、锰佐剂、铝佐剂、钙佐剂、各种细胞因子、白细胞介素、干扰素、聚肌苷酸、聚腺苷酸、明矾、磷酸铝、羊毛脂、角鲨烯、细胞因子、植物油、内毒素、脂质体佐剂、MF59、双链 RNA、双链 DNA、铝相关佐剂、CAF01、人参、黄芪的有效成分中的至少一种。本领域技术人员可以理解，此处为列举并非穷举，免疫增强佐剂也可采用其他可使免疫反应增强的物质。

进一步的，将免疫佐剂与细胞组分共负载于纳米粒子或微米粒子中，在纳米粒子或微米粒子被树突状细胞吞噬后可以更好的激活树突状细胞，以利于树突状细胞回输回体内后发挥预防或治疗癌症的功效。

5 进一步地，微纳粒子的表面可以不连接具有主动靶向功能的靶头，或者连接有主动靶向功能的靶头，该靶头可为甘露糖、CD32 抗体、CD11c 抗体、CD103 抗体、CD44 抗体等常用的靶头，带领粒子系统靶向输送进树突状细胞。

进一步地，负载细胞组分的微纳粒子系统可以采用已有的制备方法制备得到，包括但不限于常见的溶剂挥发法、透析法、挤出法、热熔法。在一些实施方案中，采用溶剂挥发法中的复乳法制备得到。

10 进一步地，纳米粒子和/或微米粒子（本发明中纳米和/或微米粒子简称为微纳粒子）在制备过程中可以不做修饰处理，也可以采用适当的修饰技术以提高纳米疫苗或微米疫苗的抗原负载量和/或免疫原性并进而提高树突状细胞疫苗的疗效。

进一步地，细胞组分或其混合物被负载于纳米和/或微米粒子内部的形式为任何可以将细胞组分或其混合物负载于纳米和/或微米粒子内部的方式。

15 进一步地，细胞组分或其混合物被负载于纳米和/或微米粒子表面的方式包括但不限于吸附、共价连接、电荷相互作用（如添加带正电的物质、添加带负电的物质）、疏水相互作用、一步或多步的固化、矿化、包裹等。

进一步地，负载于微纳粒子表面的水溶性组分和/或非水溶性组分负载后为一层或多层，疫苗表面负载多层水溶性组分和/或非水溶性组分时，层与层之间为修饰物。

20 进一步地，纳米粒子或微米粒子的粒径大小为纳米级或微米级，这样能保证疫苗被抗原提呈细胞吞噬，而为了提高吞噬效率，粒径大小要在适宜的范围内。纳米粒子的粒径大小为 1nm-1000nm，更优选地，粒径大小为 30nm-1000nm，最优选地，粒径大小为 100nm-600nm；微米粒子的粒径大小为 1 $\mu$ m-1000 $\mu$ m，更优选地，粒径大小为 1 $\mu$ m-100 $\mu$ m，更优选地，粒径大小为 1 $\mu$ m-10 $\mu$ m，最优选地，粒径大小为 1 $\mu$ m-5 $\mu$ m。

25 进一步地，微纳粒子表面可为电中性，带负电或者带正电。

进一步地，微纳粒子的制备材料为有机合成高分子材料、天然高分子材料或者无机材料。其中，有机合成高分子材料为生物相容或可降解的高分子材料，包括但不限于聚乳酸-羟基乙酸共聚物 PLGA、PLA、PGA、Poloxamer、PEG、PCL、PEI、PVA、PVP、PTMC、聚酸

酞、PDON、PPDO、PMMA、聚氨基酸、合成多肽、合成脂质；天然高分子材料为生物相容或可降解的高分子材料，包括但不限于卵磷脂、胆固醇、淀粉、脂类、糖类、多肽、海藻酸钠、白蛋白、胶原蛋白、明胶、细胞膜成分；无机材料为无明显生物毒性的材料，包括但不限于三氧化二铁、四氧化三铁、碳酸钙、磷酸钙等。

5 进一步地，微纳粒子的形状为常见的任意形状，包括但不限于球形、椭球形、桶形、多角形、棒状、片状、线形、蠕虫形、方形、三角形、蝶形或圆盘形。

在一些实施方案中，本发明所采用的复乳法的具体制备方法如下：

步骤 1，将第一预定体积的含有第一预定浓度的水相溶液加入第二预定体积的含有第二预定浓度医用高分子材料的有机相中。

10 在一些实施例中，水相溶液可含有癌细胞裂解物中的各组分以及免疫增强佐剂 poly(I:C)、BCG、锰佐剂、钙佐剂或 CpG；癌细胞裂解物中的各组分在制备时分别为水溶性组分或者是溶于尿素或盐酸胍中的原非水溶性组分。水相溶液所含有来自癌细胞的水溶性组分的浓度或者是来自癌细胞的溶于尿素或盐酸胍中的原非水溶性组分的浓度，也即第一预定浓度要求蛋白质多肽浓度含量大于 1 ng/mL，能负载足够癌症抗原以激活相关免疫  
15 反应。免疫增强佐剂在初始水相中的浓度为大于 0.01 ng/mL。

在一些实施例中，水相溶液含有肿瘤组织裂解物中的各组分以及免疫增强佐剂 poly(I:C)，BCG、锰佐剂、钙佐剂或 CpG；肿瘤组织裂解物中的各组分在制备时分别为水溶性组分或者是溶于尿素或盐酸胍中的原非水溶性组分。水相溶液所含有得来自肿瘤组织的水溶性组分的浓度或者是来自肿瘤组织的溶于尿素或盐酸胍中的原非水溶性组分的浓  
20 度，也即第一预定浓度要求蛋白质多肽浓度含量大于 0.01 ng/mL，能负载足够癌症抗原以激活相关免疫反应。免疫增强佐剂在初始水相中的浓度为大于 0.01 ng/mL。

在本发明中，将医用高分子材料溶解于有机溶剂中，得到第二预定体积的含有第二预定浓度医用高分子材料的有机相。在一些实施例中，医用高分子材料为 PLGA，有机溶剂选用二氯甲烷。另外，在一些实施例中，医用高分子材料的第二预定浓度的范围为  
25 0.5mg/mL-5000mg/mL，优选为 100 mg/mL。

在本发明中，之所以选择 PLGA 或修饰的 PLGA，是由于该材料为生物可降解材料且已被 FDA 批准用作药物敷料。研究表明 PLGA 具有一定的免疫调节功能，因而适合作为纳米粒子或微米粒子制备时的辅料。



实际中，有机相的第二预定体积根据其和水相的第一预定体积的比例进行设定，在本发明中，水相的第一预定体积和有机相的第二预定体积之比的范围为 1:1.1-1:5000，优先地为 1:10。在具体实施过程中可根据需要对第一预定体积、第二预定体积和第一预定体积与第二预定体积之比进行调整以调整制备的纳米粒或微米粒的尺寸大小。

- 5 优选的，水相溶液为裂解物组分溶液时，其中蛋白质和多肽的浓度大于 1 ng/mL，优选 1 mg/mL~100 mg/mL；水相溶液为裂解物组分/免疫佐剂溶液时，其中蛋白质和多肽的浓度大于 1 ng/mL，优选 1 mg/mL~100 mg/mL，免疫佐剂的浓度大于 0.01 ng/mL，优选 0.01 mg/mL~20 mg/mL。高分子材料有机相溶液中，溶剂为 DMSO、乙腈、乙醇、氯仿、甲醇、DMF、异丙醇、二氯甲烷、丙醇、乙酸乙酯等，优选二氯甲烷；高分子材料的浓度为
- 10 0.5 mg/mL~5000 mg/mL，优选为 100 mg/mL。第一乳化剂溶液优选为聚乙烯醇水溶液，浓度为 10 mg/mL~50 mg/mL，优选 20 mg/mL。第二乳化剂溶液优选为聚乙烯醇水溶液，浓度为 1 mg/mL~20 mg/mL，优选 5 mg/mL。分散液为 PBS 缓冲液或生理盐水或纯水。

- 步骤 2，将步骤 1 得到的混合液进行大于 2 秒的超声处理或大于 1 分钟的搅拌或均质处理或微流控处理。优选的，搅拌为机械搅拌或者磁力搅拌时，搅拌速度大于 50 rpm，搅
- 15 拌时间大于 1 分钟，比如搅拌速度为 50 rpm~1500 rpm，搅拌时间为 0.1 小时~24 小时；超声处理时，超声功率大于 5W，时间大于 0.1 秒，比如 2~200 秒；均质处理时使用高压/超高压均质机或高剪切均质机，使用高压/超高压均质机时压力大于 5 psi，比如 20psi~
- 20 100psi，使用高剪切均质机时转速大于 100 rpm，比如 1000 rpm~5000 rpm；使用微流控处理流速大于 0.01 mL/min，比如 0.1 mL/min-100 mL/min。超声或者搅拌或者均质处理或者微流控处理进行纳米化和/或微米化，超声时间长短或搅拌速度或均质处理压力及时间能控制制备的微纳粒子大小，过大或过小都会带来粒径大小的变化。

- 步骤 3，将步骤 2 处理后得到的混合物加入第三预定体积的含有第三预定浓度乳化剂的水溶液中并进行大于 2 秒的超声处理或大于 1 分钟的搅拌或进行均质处理或微流控处理。该步骤将步骤 2 得到的混合物加入到乳化剂水溶液中继续超声或搅拌纳米化或微米化。该
- 25 步骤是为了进行纳米化或微米化，超声时间长短或搅拌速度及时间能控制制备的纳米粒子或微米粒子大小，过长或过短都会带来粒径大小的变化，为此，需要选择合适的超声时间。在本发明中，超声时间大于 0.1 秒，比如 2~200 秒，搅拌速度大于 50rpm，比如 50 rpm~
- 500 rpm，搅拌时间大于 1 分钟，比如 60~6000 秒。优选的，搅拌为机械搅拌或者磁力搅

拌时，搅拌速度大于 50 rpm，搅拌时间大于 1 分钟，比如搅拌速度为 50 rpm~1500 rpm，搅拌时间为 0.5 小时~5 小时；超声处理时，超声功率为 50W~500W，时间大于 0.1 秒，比如 2~200 秒；均质处理时使用高压/超高压均质机或高剪切均质机，使用高压/超高压均质机时压力大于 20psi，比如 20psi~100psi，使用高剪切均质机时转速大于 1000 rpm，  
5 比如 1000 rpm~5000 rpm；使用微流控处理流速大于 0.01 mL/min，比如 0.1 mL/min-100 mL/min。超声或者搅拌或者均质处理或者微流控处理进行纳米化或微米化，超声时间长短或搅拌速度或均质处理压力及时间能控制制备的纳米或微米粒子大小，过大或过小都会带来粒径大小的变化。

在本发明中，乳化剂水溶液为聚乙烯醇（PVA）水溶液，第三预定体积为 5 mL，第三  
10 预定浓度为 20 mg/mL。第三预定体积根据其第二预定体积的比例进行调整。在本发明中，第二预定体积与第三预定体积之的范围为 1:1.1 -1:1000 进行设定，优先地可以为 2:5。在具体实施过程中为了控制纳米粒子或微米粒子的尺寸，可以对第二预定体积和第三预定体积之比进行调整。同样地，本步骤的超声时间或搅拌时间、乳化剂水溶液的体积以及浓度的取值根据，均为了得到尺寸大小合适的纳米粒或微米粒。

15 步骤 4，将步骤 3 处理后得到的液体加入第四预定体积的第四预定浓度的乳化剂水溶液中，并进行搅拌直至满足预定搅拌条件。

本步骤中，乳化剂水溶液依然为 PVA。

第四预定浓度为 5 mg/mL，第四预定浓度的选择，以得到尺寸大小合适的纳米粒或微米粒为依据。第四预定体积的选择依据第三预定体积与第四预定体积之比决定。在本发明  
20 中，第三预定体积与第四预定体积之比为范围为 1:1.5-1:2000，优先地为 1:10。在具体实施过程中为了控制纳米粒子或微米粒子的尺寸可以对第三预定体积和第四预定体积之比进行调整。

在本发明中，本步骤的预定搅拌条件为直至有机溶剂挥发完成，也即步骤 1 中的二氯甲烷挥发完成。

25 步骤 5，将步骤 4 处理满足预定搅拌条件的混合液在以大于 100 RPM 的转速进行大于 1 分钟的离心后，去除上清液，并将剩下的沉淀物重新混悬于第五预定体积的第五预定浓度的含有冻干保护剂的水溶液中或者第六预定体积的 PBS（或生理盐水）中。

在本发明一些实施方案中，步骤 5 所得沉淀重新混悬于第六预定体积的 PBS（或生理

盐水) 中时不需要冻干, 可直接进行后续纳米粒子或微米粒子表面吸附癌细胞裂解物的相关实验。

在本发明一些实施方案中, 步骤 5 所得沉淀重新混悬于含有冻干保护剂的水溶液中时需进行冷冻干燥, 再冷冻干燥以后再进行后续纳米粒子或微米粒子表面吸附癌细胞裂解物的相关实验。

在本发明中, 所述冻干保护剂选用海藻糖 (Trehalose)。

在本发明中, 该步骤的冻干保护剂的第五预定浓度为质量百分比 4%, 之所以如此设定, 是为了在后续进行冷冻干燥中不影响冻干效果。

步骤 6, 将步骤 5 得到的含有冻干保护剂的混悬液进行冷冻干燥处理后, 将冻干物质备用。

步骤 7, 将第六预定体积的步骤 5 中得到的重悬于 PBS (或生理盐水) 中的含纳米粒的混悬液或者采用第六预定体积的 PBS (或生理盐水) 重悬步骤 6 得到的冷冻干燥后的含有纳米粒或微米粒和冻干保护剂的冻干物质, 与第七预定体积的水溶性组分或者溶于 8M 尿素中的原非水溶性组分混合后即得纳米粒子或微米粒子系统。

在本发明中, 第六预定体积与第七预定体积的体积比为 1:10000 到 10000:1, 优先体积比为 1:100 到 100:1, 最优体积比为 1:30 到 30:1。

在一些实施例中, 所述重悬的纳米粒子混悬液体积为 10 mL 时, 含有癌细胞裂解物或含有肿瘤组织裂解物中的水溶性组分或者溶于 8M 尿素中的原非水溶性组分的体积与为 1 mL。在实际使用时可将二者体积和比例根据需要进行调整。

步骤 8, 将步骤 7 制备的纳米粒子和/或微米粒子与树突状细胞混合孵育一定时间。

步骤 9, 收集步骤 8 激活后的树突状细胞并回输体内预防或治疗癌症。

在另一些实施方案中, 本发明所采用的复乳法的具体制备方法如下:

步骤 1, 将第一预定体积的含有第一预定浓度的水相溶液加入第二预定体积的含有第二预定浓度医用高分子材料的有机相中。

在一些实施例中, 水相溶液可含有癌细胞裂解物中的各组分以及免疫增强佐剂 poly(I:C)、锰佐剂、钙佐剂、BCG 或 CpG; 癌细胞裂解物中的各组分在制备时分别为水溶性组分或者是溶于尿素或盐酸胍中的原非水溶性组分。水相溶液所含有来自癌细胞的水溶

性组分的浓度或者是来自癌细胞的溶于尿素或盐酸胍中的原非水溶性组分的浓度，也即第一预定浓度要求蛋白质多肽浓度含量大于 0.01 ng/mL，能负载足够癌症抗原以激活相关免疫反应。免疫增强佐剂在初始水相中的浓度为大于 0.01 ng/mL。

5 在一些实施例中，水相溶液含有肿瘤组织裂解物中的各组分以及免疫增强佐剂 poly(I:C)，锰佐剂、钙佐剂、BCG或CpG；肿瘤组织裂解物中的各组分在制备时分别为水溶性组分或者是溶于尿素或盐酸胍中的原非水溶性组分。水相溶液所含有得来自肿瘤组织的水溶性组分的浓度或者是来自肿瘤组织的溶于尿素或盐酸胍中的原非水溶性组分的浓度，也即第一预定浓度要求蛋白质多肽浓度含量大于0.01 ng/mL，能负载足够癌症抗原以激活相关免疫反应。免疫增强佐剂在初始水相中的浓度为大于0.01 ng/mL。

10 在本发明中，将医用高分子材料溶解于有机溶剂中，得到第二预定体积的含有第二预定浓度医用高分子材料的有机相。在一些实施例中，医用高分子材料为 PLGA，有机溶剂选用二氯甲烷。另外，在一些实施例中，医用高分子材料的第二预定浓度的范围为 0.5mg/mL-5000mg/mL，优选为 100 mg/mL。

15 在本发明中，之所以选择 PLGA 或修饰的额 PLGA，是由于该材料为生物可降解材料且已被 FDA 批准用作药物敷料。研究表明 PLGA 具有一定的免疫调节功能，因而适合作为纳米粒子或微米粒子制备时的辅料。

实际中，有机相的第二预定体积根据其和水相的第一预定体积的比例进行设定，在本发明中，水相的第一预定体积和有机相的第二预定体积之比的范围为 1:1.1-1:5000，优先地为 1:10。在具体实施过程中可根据需要对第一预定体积、第二预定体积和第一预定体积  
20 与第二预定体积之比进行调整以调整制备的纳米粒或微米粒的尺寸大小。

优选的，水相溶液为裂解物组分溶液时，其中蛋白质和多肽的浓度大于 1 ng/mL，优选 1 mg/mL~100 mg/mL；水相溶液为裂解物组分/免疫佐剂溶液时，其中蛋白质和多肽的浓度大于 1 ng/mL，优选 1 mg/mL~100 mg/mL，免疫佐剂的浓度大于 0.01 ng/mL，优选 0.01 mg/mL~20 mg/mL。高分子材料有机相溶液中，溶剂为 DMSO、乙腈、乙醇、氯仿、甲  
25 醇、DMF、异丙醇、二氯甲烷、丙醇、乙酸乙酯等，优选二氯甲烷；高分子材料的浓度为 0.5 mg/mL~5000 mg/mL，优选为 100 mg/mL。第一乳化剂溶液优选为聚乙烯醇水溶液，浓度为 10 mg/mL~50 mg/mL，优选 20 mg/mL。第二乳化剂溶液优选为聚乙烯醇水溶液，浓度为 1 mg/mL~20 mg/mL，优选 5 mg/mL。分散液为 PBS 缓冲液或生理盐水或纯水。

- 步骤 2, 将步骤 1 得到的混合液进行大于 2 秒的超声处理或大于 1 分钟的搅拌或均质处理或微流控处理。优选的, 搅拌为机械搅拌或者磁力搅拌时, 搅拌速度大于 50 rpm, 搅拌时间大于 1 分钟, 比如搅拌速度为 50 rpm~1500 rpm, 搅拌时间为 0.1 小时~24 小时; 超声处理时, 超声功率大于 5W, 时间大于 0.1 秒, 比如 2~200 秒; 均质处理时使用高压/
- 5 超高压均质机或高剪切均质机, 使用高压/超高压均质机时压力大于 5 psi, 比如 20psi~100psi, 使用高剪切均质机时转速大于 100 rpm, 比如 1000 rpm~5000 rpm; 使用微流控处理流速大于 0.01 mL/min, 比如 0.1 mL/min-100 mL/min。超声或者搅拌或者均质处理或者微流控处理进行纳米化和/或微米化, 超声时间长短或搅拌速度或均质处理压力及时间能控制制备的微纳粒子大小, 过大或过小都会带来粒径大小的变化。
- 10 步骤 3, 将步骤 2 处理后得到的混合物加入第三预定体积的含有第三预定浓度乳化剂的水溶液中并进行大于 2 秒的超声处理或大于 1 分钟的搅拌或进行均质处理或微流控处理。该步骤将步骤 2 得到的混合物加入到乳化剂水溶液中继续超声或搅拌纳米化或微米化。该步骤是为了进行纳米化或微米化, 超声时间长短或搅拌速度及时间能控制制备的纳米粒子或微米粒子大小, 过长或过短都会带来粒径大小的变化, 为此, 需要选择合适的超声时间。
- 15 在本发明中, 超声时间大于 0.1 秒, 比如 2~200 秒, 搅拌速度大于 50rpm, 比如 50 rpm~500 rpm, 搅拌时间大于 1 分钟, 比如 60~6000 秒。优选的, 搅拌为机械搅拌或者磁力搅拌时, 搅拌速度大于 50 rpm, 搅拌时间大于 1 分钟, 比如搅拌速度为 50 rpm~1500 rpm, 搅拌时间为 0.5 小时~5 小时; 超声处理时, 超声功率为 50W~500W, 时间大于 0.1 秒, 比如 2~200 秒; 均质处理时使用高压/超高压均质机或高剪切均质机, 使用高压/超高压
- 20 均质机时压力大于 20psi, 比如 20psi~100psi, 使用高剪切均质机时转速大于 1000 rpm, 比如 1000 rpm~5000 rpm; 使用微流控处理流速大于 0.01 mL/min, 比如 0.1 mL/min-100 mL/min。超声或者搅拌或者均质处理或者微流控处理进行纳米化或微米化, 超声时间长短或搅拌速度或均质处理压力及时间能控制制备的纳米或微米粒子大小, 过大或过小都会带来粒径大小的变化。
- 25 在本发明中, 乳化剂水溶液为聚乙烯醇 (PVA) 水溶液, 第三预定体积为 5 mL, 第三预定浓度为 20 mg/mL。第三预定体积根据其与第二预定体积的比例进行调整。在本发明中, 第二预定体积与第三预定体积之的范围为 1:1.1 -1:1000 进行设定, 优先地可以为 2:5。在具体实施过程中为了控制纳米粒子或微米粒子的尺寸, 可以对第二预定体积和第三预定

体积之比进行调整。同样地，本步骤的超声时间或搅拌时间、乳化剂水溶液的体积以及浓度的取值根据，均为了得到尺寸大小合适的纳米粒或微米粒。

步骤 4，将步骤 3 处理后得到的液体加入第四预定体积的第四预定浓度的乳化剂水溶液中，并进行搅拌直至满足预定搅拌条件或者也可不进行搅拌直接进行后续处理。

5 本步骤中，乳化剂水溶液依然为 PVA。

第四预定浓度为 5 mg/mL，第四预定浓度的选择，以得到尺寸大小合适的纳米粒或微米粒为依据。第四预定体积的选择依据第三预定体积与第四预定体积之比决定。在本发明中，第三预定体积与第三预定体积之比为范围为 1:1.5-1:2000，优先地为 1:10。在具体实施过程中为了控制纳米粒子或微米粒子的尺寸可以对第三预定体积和第四预定体积之比进行调整。

10

在本发明中，本步骤的预定搅拌条件为有机溶剂挥发完成，也即步骤 1 中的二氯甲烷挥发完成。也不不经搅拌进行后续试验。

步骤 5，将步骤 4 处理满足预定搅拌条件的混合液在以大于 100 RPM 的转速进行大于 1 分钟的离心后，去除上清液，并将剩下的沉淀物重新混悬于第五预定体积的第五预定浓度的含有全细胞组分中水溶性和/或非水溶性组分的溶液中，或者将剩下的沉淀物重新混悬于第五预定体积的第五预定浓度的含有全细胞组分中水溶性和/或非水溶性组分与佐剂混合的溶液中。

15

步骤 6，将步骤 5 处理满足预定搅拌条件的混合液在以大于 100 RPM 的转速进行大于 1 分钟的离心后，去除上清液，并将剩下的沉淀物重新混悬于第六预定体积的固化处理试剂或矿化处理试剂，作用一定时间后离心洗涤，然后加入第七预定提交的含有带正电或者带负电的物质并作用一定时间。

20

在本发明一些实施方案中，步骤 6 所得沉淀重新混悬于第七预定体积的带电物质后可不需要冻干，可直接进行后续纳米粒子或微米粒子表面负载癌细胞/组织裂解物的相关实验。

在本发明一些实施方案中，步骤 6 所得沉淀重新混悬于含有干燥保护剂的水溶液中后进行室温真空干燥或者冷冻真空干燥，在干燥以后再进行后续纳米粒子或微米粒子表面吸附癌细胞裂解物的相关实验。

25

在本发明中，所述冻干保护剂选用海藻糖（Trehalose），或者甘露醇与蔗糖的混合

溶液。在本发明中，该步骤的干燥保护剂的浓度为质量百分比 4%，之所以如此设定，是为了在后续进行干燥中不影响干燥效果。

步骤 7，将步骤 6 得到的含有干燥保护剂的混悬液进行干燥处理后，将干燥后的物质备用。

- 5 步骤 8，将第八预定体积的步骤 6 中得到的重悬于 PBS（或生理盐水）中的含纳米粒的混悬液或者采用第八预定体积的 PBS（或生理盐水）重悬步骤 7 得到的干燥后的含有纳米粒或微米粒和干燥保护剂的干燥后物质，与第九预定体积的水溶性组分或者非水溶性组分混合后即得纳米粒子或微米粒子。

- 在本发明中，步骤 5-步骤 8 的修饰和抗原负载步骤可重复多次以提高抗原的负载量。  
10 而且在添加带正电或带负电的物质时可以多次添加带同种电荷的或者也可以交替添加带不同电荷的物质。

在一些实施例中，所述重悬的纳米粒子混悬液体积为 10 mL 时，含有癌细胞裂解物或含有肿瘤组织裂解物中的水溶性组分或者原非水溶性组分的体积与为 0.1 -100 mL。在实际使用时可将二者体积和比例根据需要进行调整。

- 15 步骤 9，将步骤 8 制备的纳米粒子和/或微米粒子与树突状细胞混合孵育一定时间。

步骤 10，收集步骤 9 激活后的树突状细胞并回输体内预防或治疗癌症。

在本发明中，所采用的含有癌细胞裂解物或含有肿瘤组织裂解物中水溶性组分或者原非水溶性组分中含有 poly(I:C)、锰佐剂、卡介苗（BCG）或 CpG，且 poly(I:C)、钙佐剂、BCG 或 CpG 的浓度为大于 0.01 ng/mL。

- 20 进一步地，本发明所述疫苗在制备时，在体外激活树突状细胞时可以同时使用只负载水溶性组分的纳米粒子和/或微米粒子和只负载非水溶性组分的纳米粒子和/或微米粒子、使用只负载水溶性组分的纳米粒子和/或微米粒子、使用只负载非水溶性组分的纳米粒子和/或微米粒子或者使用同时负载水溶性组分和非水溶性组分的纳米粒子和/或微米粒子。

- 由上述技术方案可知本发明提供了一种利用纳米级尺寸或微米级尺寸的粒子递送细胞水溶性成分和/或非水溶性成分的输送系统，并采用上述微纳粒子系统体外激活树突状  
25 细胞以应用于预防和治疗癌症。因为相关细胞或组织的细胞组分按照在纯水中的溶解性被分为两部分，可溶于纯水的水溶性部分和在纯水中不溶的非水溶性部分，并且水溶性部分和非水溶性部分都被负载于微纳粒子中，所以细胞组分中因为癌症所产生的变异蛋白质或

多肽就大部分都被负载于微纳粒子中用于体外激活树突状细胞。细胞组分中水溶性部分和非水溶性部分囊括了整个细胞的成分；细胞组分中水溶性部分和非水溶性部分也可以同时被含有增溶剂的水溶液溶解，其中与正常细胞成分相同未突变的蛋白质、多肽和基因因为自身免疫系统发育过程中所产生的免疫耐受不会引起免疫反应；而因为癌症等产生的基因、蛋白质和多肽的突变因为没有自身免疫系统发育过程中所产生的免疫耐受因而具有免疫原性且可激活树突状细胞。利用全细胞组分中这些因为疾病突变而产生的具有免疫原性的物质即可用于树突状细胞的激活以用于癌症的预防、治疗及复发。

进一步地，癌细胞或肿瘤组织中至少有一种与目标疾病类型相同。

进一步地，在用作癌症疫苗以预防和治疗癌症时，本发明所述的疫苗可以在癌症发生前、癌症发生后或手术切除肿瘤组织后多次给药以激活机体免疫系统，从而延缓癌症的进展、治疗癌症或者预防癌症的复发。

借由上述方案，本发明至少具有以下优点：

本发明提供了一种基于纳米级尺寸或微米级尺寸的粒子递送细胞水溶性成分和/或非水溶性成分的输送系统体外激活树突状细胞以应用于预防和治疗癌症的疫苗系统，从而使树突状细胞体外吞噬和提呈的抗原种类实现了最大化，利用全细胞组分或其混合物中的抗原激活的癌症特异性 T 细胞即可预防或治疗癌症。

上述说明仅是本发明技术方案的概述，为了能够更清楚了解本发明的技术手段，并可依照说明书的内容予以实施，以下以本发明的较佳实施例并配合详细附图说明如后。

### 附图说明

为了使本发明的内容更容易被清楚的理解，下面根据本发明的具体实施例并结合附图，对本发明作进一步详细的说明。

图 1 为本发明疫苗系统的制备过程及应用领域示意图；其中，a 为水溶性组分和非水溶性组分分别收集和制备纳米粒子或微米粒子的示意图；b 为采用含有增溶剂的增溶液溶解全细胞组分和制备纳米粒子或微米粒子的示意图；c 为采用 a 或 b 中制备的上述粒子激活树突状细胞疫苗并用该疫苗预防或治疗癌症的示意图；

图 2-13 分别为实施例 1-12 中用树突状细胞疫苗预防或治疗癌症时小鼠肿瘤生长速度和生存期实验结果；a，疫苗预防或治疗癌症时的肿瘤生长速度实验结果（ $n \geq 8$ ）；b，疫苗预防或治疗癌症时的小鼠生存期实验结果（ $n \geq 8$ ），每个数据点为平均值  $\pm$  标准误差



(mean±SEM)；a 图中肿瘤生长抑制实验的显著性差异采用 ANOVA 法分析，b 图中显著性差异采用 Kaplan-Meier 和 log-rank test 分析；\*\*\*表示疫苗组与 PBS 空白对照组相比  $p < 0.005$ ，有显著性差异；###空白纳米粒激活的树突状细胞对照组对照组相比  $p < 0.005$ ，有显著性差异；&表示疫苗组与裂解物直接激活树突状细胞对照组相比  $p < 0.05$ ，有显著性差异；&&表示疫苗组与裂解物直接激活树突状细胞对照组相比  $p < 0.01$ ，有显著性差异；&&&表示疫苗组与裂解物直接激活树突状细胞对照组相比  $p < 0.005$ ，有显著性差异；\$代表修饰后纳米粒激活的树突状细胞疫苗组与未修饰纳米粒激活的树突状细胞疫苗组相比  $p < 0.05$ ，有显著性差异；\$\$代表修饰后纳米粒激活的树突状细胞疫苗组与未修饰纳米粒激活的树突状细胞疫苗组相比  $p < 0.01$ ，有显著性差异；★代表负载全细胞组分的纳米粒激活的树突状细胞疫苗组与负载多种多肽新生抗原的纳米粒激活的树突状细胞疫苗组相比  $p < 0.05$ ，有显著性差异；δ 代表同时负载细胞组分和佐剂的纳米粒激活的树突状细胞疫苗组与只负载细胞组分的纳米粒激活的树突状细胞疫苗组相比  $p < 0.05$ ，有显著性差异；τ 代表带有靶头的纳米粒激活的树突状细胞疫苗组与不带靶头的纳米粒激活的树突状细胞疫苗组相比  $p < 0.05$ ，有显著性差异。

## 15 具体实施方式

下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明，以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施，但所举实施例不作为对本发明的限定。

本发明所述全细胞组分或其混合物的输送系统可用于体外激活树突状细胞以制备预防和/或治疗癌症的树突状细胞疫苗，其制备过程及应用领域如图 1 所示。在制备时可裂解细胞或组织后先分别收集水溶性组分和水不溶性组分并分别制备纳米或微米粒子系统；或者也可以直接采用含有增溶剂的增溶液直接裂解细胞或组织并溶解全细胞组分并制备纳米或微米粒子系统。

本发明所述全细胞组分在裂解前或（和）裂解后既可经过包括但不限于灭活或（和）变性、固化、生物矿化、离子化、化学修饰、核酸酶处理等处理后再制备纳米疫苗或微米疫苗；也可细胞裂解前或（和）裂解后不经过任何灭活或（和）变性、固化、生物矿化、离子化、化学修饰、核酸酶处理直接制备纳米疫苗或微米疫苗。本发明部分实施例中，肿瘤组织细胞在裂解前经过了灭活或（和）变性处理，在实际使用过程中也可以在细胞裂解后做灭活或（和）变性处理，或者也可以细胞裂解前和裂解后均做灭活或（和）变性处理；

本发明部分实施例中细胞裂解前或（和）裂解后的灭活或（和）变性处理方法为紫外照射和高温加热，在实际使用过程中也可以采用包括但不限于放射线辐照、高压、固化、生物矿化、离子化、化学修饰、核酸酶处理、胶原酶处理、冷冻干燥等处理方法。本领域技术人员可以理解，在实际应用过程中技术人员可根据具体情况进行适当调整。

## 5       **实施例1 负载肿瘤组织全细胞组分的纳米粒子体外激活树突状细胞后回输用于黑色素瘤的治疗**

本实施例以小鼠黑色素瘤为癌症模型来说明如何使用负载有黑色素瘤肿瘤组织的全细胞组分的纳米粒子系统体外激活树突状细胞后回输树突状细胞给小鼠以治疗黑色素瘤。本实施例中，首先裂解B16F10黑色素瘤肿瘤组织以制备肿瘤组织的水溶性组分和非水溶性  
10 组分，然后，以有机高分子材料PLGA为纳米粒骨架材料，以Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C))为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有肿瘤组织的水溶性组分和非水溶性组分的纳米粒子系统，然后将纳米粒子系统与树突状细胞（DC）体外共孵育后将树突状细胞回输体内以治疗黑色素瘤。

### （1）肿瘤组织的裂解及各组分的收集

15       在每只C57BL/6小鼠背部皮下接种 $1.5 \times 10^5$ 个B16-F10 细胞，在肿瘤长到体积分别为约 $1000 \text{ mm}^3$ 时处死小鼠并摘取肿瘤组织。将肿瘤组织切块后研磨，通过细胞过滤网加入适量纯水并反复冻融5次，并可伴有超声以破坏裂解细胞。待细胞裂解后，将裂解物以5000g的转速离心5分钟并取上清液即为可溶于纯水的水溶性组分；在所得沉淀部分中加入8M尿素溶解沉淀部分即可将不溶于纯水的非水溶性组分转化为在8M尿素水溶液中可溶。以上即为  
20 制备纳米粒子系统的抗原原料来源。

### （2）纳米粒子系统的制备

本实施例中纳米疫苗及作为对照的空白纳米粒采用溶剂挥发法中的复乳法制备。在制备时负载全细胞组分中水溶性组分的纳米疫苗和负载全细胞组分中非水溶性组分的纳米粒子分别制备，然后使用时一起使用。所采用的纳米粒子制备材料PLGA分子量为  
25 24KDa-38KDa，所采用的免疫佐剂为poly(I:C) 且poly(I:C)只分布于纳米粒子内部。制备方法如前所述，在制备过程中首先采用复乳法在纳米粒子内部负载抗原，在内部负载抗原（裂解组分）后，将100mg纳米粒子在10000g离心20分钟，并使用10 mL含4%海藻糖的超纯水重悬后冷冻干燥48 h；在使用前将其用4 mL PBS 重悬然后加入1 mL的肿瘤组织裂解液

组分（蛋白质浓度80 mg/mL）并室温作用 10 min，得到内外都负载裂解物的纳米粒子系统。该纳米粒子平均粒径为320nm左右，纳米粒子表面电位为-3mV左右；每1mg PLGA纳米粒子约负载160 $\mu$ g蛋白质或多肽组分，每1mgPLGA纳米粒所使用的poly(I:C)免疫佐剂共约为0.02mg。空白纳米粒粒径为300nm左右，空白纳米粒制备时分别采用含有等量poly(I:C)的纯水或8M尿素代替相对应的水溶性组分和非水溶性组分。

### （3）树突状细胞的制备

本实施例以从小鼠骨髓细胞制备树突状细胞为例来说明如何制备骨髓来源的树突状细胞（BMDC）。首先，取1只6-8周龄C57小鼠颈椎脱臼处死，手术取出后腿的胫骨和股骨放入PBS中，用剪刀和镊子将骨周围的肌肉组织剔除干净。用剪刀剪去骨头两端，再用注射器抽取PBS溶液，针头分别从骨头两端插入骨髓腔，反复冲洗骨髓到培养皿中。收集骨髓溶液，400g离心3 min后加入1 mL红细胞裂解液裂红。加入3 mL RPMI 1640（10% FBS）培养基终止裂解，400g离心3 min，弃上清。将细胞放置10 mm 培养皿中培养，使用RPMI 1640（10% FBS）培养基，同时加入重组小鼠GM-CSF（20 ng/mL），37度，5% CO<sub>2</sub>培养7天。第3天轻轻摇晃培养瓶，补充同样体积含有GM-CSF（20 ng/mL）RPMI 1640（10% FBS）培养基。第6天，对培养基进行半量换液处理。第7天，收集少量悬浮及半贴壁细胞，通过流式检测，当CD86<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>细胞在CD11c<sup>+</sup>细胞中的比例为15-20%之间，诱导培养的BMDC即可被用来做下一步实验。

### （4）树突状细胞的激活

将小鼠BMDC铺到细胞培养板中，在每10万个DC细胞中加入5mL RPMI 1640（10% FBS）培养基，尔后加入30 $\mu$ g负载水溶性组分的PLGA纳米粒子和30 $\mu$ g负载非水溶性组分的PLGA纳米粒子与BMDC共孵育48h，尔后收集BMDC后在300g离心5分钟，用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤两次后重悬于PBS中备用。

### （5）树突状细胞癌症疫苗用于癌症的治疗

本研究对照组分别是PBS组、空白纳米粒刺激BMDC组。选取6-8周的雌性C57BL/6为模型小鼠制备黑色素瘤荷瘤小鼠。在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种 $1.5 \times 10^5$ 个B16F10细胞。树突状细胞疫苗组给药方案如下：在接种黑色素瘤后第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射100 $\mu$ L含100万个树突状细胞的疫苗。PBS对照组方案如下：在接种黑色素瘤后第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射100 $\mu$ L PBS。空白纳

米粒对照组：在接种黑色素瘤后第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射100 $\mu$  L含50万个经空白纳米粒刺激的树突状细胞。在实验中，从第3天开始每3天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中 $v$ 为肿瘤体积， $a$ 为肿瘤长度， $b$ 为肿瘤宽度。出于动物实验伦理，在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过2000 $\text{mm}^3$ 即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

#### (4) 实验结果

如图2所示，PBS对照组和空白纳米粒对照组小鼠的肿瘤都长大，与对照组相比疫苗组小鼠肿瘤生长速度明显变慢，而且部分小鼠肿瘤消失痊愈。综上所述，本发明所述的树突状细胞疫苗对黑色素瘤具有良好的治疗效果。

### 10 实施例2 肿瘤组织全细胞组分负载于纳米粒子并体外激活树突状细胞疫苗用于黑色素瘤的预防

本实施例以小鼠黑色素瘤为癌症模型来说明如何使用树突状细胞疫苗预防癌症。本实施例中，首先裂解B16F10黑色素瘤肿瘤组织以制备肿瘤组织的水溶性组分和非水溶性组分；然后，制备负载有肿瘤组织的水溶性组分和非水溶性组分的纳米粒子系统。在本实施例中采用了硅化和添加带电物质的方法来增加抗原的负载量，而且只进行了一轮矿化处理。

#### (1) 肿瘤组织的裂解及各组分的收集

在每只C57BL/6小鼠背部皮下接种 $1.5 \times 10^5$ 个B16-F10细胞，在肿瘤长到体积分别为约1000  $\text{mm}^3$ 时处死小鼠并摘取肿瘤组织。将肿瘤组织切块后研磨，加入胶原酶在RPMI 1640培养基中孵育30min，然后通过细胞过滤网加入适量纯水并反复冻融5次，并可伴有超声以破坏裂解细胞。待细胞裂解后，将裂解物以5000g的转速离心5分钟并取上清液即为可溶于纯水的水溶性组分；在所得沉淀部分中加入8M尿素溶解沉淀部分即可将不溶于纯水的非水溶性组分转化为在8M尿素水溶液中可溶。以上即为制备粒子的抗原原料来源。

#### (2) 纳米粒子的制备

本实施例中纳米粒子及作为对照的空白纳米粒采用溶剂挥发法中的复乳法制备，对复乳法进行了适当的修饰改进，在纳米粒子制备过程中采用低温硅化技术和添加带电物质两种修饰方法提高抗原的负载量。在制备时负载全细胞组分中水溶性组分的纳米粒子和负载全细胞组分中非水溶性组分的纳米粒子分别制备，然后使用时一起使用。所采用的纳米粒子制备材料PLGA分子量为24KDa-38KDa，所采用的免疫佐剂为poly(I:C)且poly(I:C)既分

布于纳米粒子内部也负载于纳米粒子表面。制备方法如前所述，在制备过程中首先采用复乳法在纳米粒子内部负载抗原和佐剂，在内部负载抗原（裂解组分）后，将100mg纳米粒子在10000g离心20分钟，然后使用7mL PBS重悬纳米粒子并与3 mL含有细胞裂解物(60mg/mL)的PBS溶液混合，尔后在10000g离心20分钟，然后采用10mL 硅酸盐溶液（含150mM NaCl、5 80 mM 原硅酸四甲酯和1.0 mM HCl, pH 3.0)重悬，并在室温固定10 min，尔后在-80° C固定24 h，使用超纯水离心洗涤后使用 3 mL含鱼精蛋白（5 mg/mL）和聚赖氨酸（10 mg/mL）的PBS重悬并作用10 min，然后10000g离心20min洗涤，采用10 mL含有细胞裂解物（50mg/mL）的PBS溶液重悬并作用10min，然后在10000g离心20分钟并使用10 mL含4%海藻糖的超纯水重悬后冷冻干燥48 h；在粒子使用前将其用7 mL PBS 重悬然后加入3 mL含佐剂10 剂的癌组织裂解液组分（蛋白质浓度50 mg/mL）并室温作用 10 min，得到内外都负载裂解物的经冷冻硅化和添加阳离子物质的修饰的纳米粒子系统。该纳米粒子平均粒径为350nm左右，纳米粒子表面电位为-3mV左右；每1mg PLGA纳米粒子约负载300 $\mu$  g蛋白质或多肽组分，每1mgPLGA纳米粒内外所使用的poly(I:C)免疫佐剂共约为0.02mg且内外各半。

未经修饰处理的纳米粒子制备方法步骤基本与修饰处理的纳米粒子的制备相同，只是15 未经过低温硅化和添加带电物质处理这些步骤。在制备过程中首先采用复乳法在纳米粒子内部负载抗原，在内部负载抗原（裂解组分）后在10000g离心20分钟，然后使用10 mL含4%海藻糖的超纯水重悬后冷冻干燥48 h，在粒子使用前将其用7 mL PBS 重悬然后加入含佐剂的3 mL癌组织裂解液组分（蛋白质浓度50 mg/mL）并室温作用 10 min，得到内外都20 负载裂解物的纳米粒子。该纳米粒子平均粒径为320nm左右，纳米粒子表面电位为-5mV左右；每1mg PLGA纳米粒子约负载150 $\mu$  g蛋白质或多肽组分，每1mgPLGA纳米粒内外所使用的poly(I:C)免疫佐剂共约为0.02mg且内外各半。

空白纳米粒粒径为300nm左右，空白纳米粒制备时分别采用含有等量poly(I:C)的纯水或8M尿素代替相对应的水溶性组分和非水溶性组分。

### (3) 树突状细胞的制备

25 本实施例以从小鼠骨髓细胞制备树突状细胞为例来说明如何制备骨髓来源的树突状细胞（BMDC）。首先，取1只6-8周龄C57小鼠颈椎脱臼处死，手术取出后腿的胫骨和股骨放入PBS中，用剪刀和镊子将骨周围的肌肉组织剔除干净。用剪刀剪去骨头两端，再用注射器抽取PBS溶液，针头分别从骨头两端插入骨髓腔，反复冲洗骨髓到培养皿中。收集骨

髓溶液，400g离心3 min后加入1 mL红细胞裂解液裂红。加入3 mL RPMI 1640（10% FBS）培养基终止裂解，400g离心3 min，弃上清。将细胞放置10 mm 培养皿中培养，使用RPMI 1640（10% FBS）培养基，同时加入重组小鼠GM-CSF（20 ng/mL），37度，5% CO<sub>2</sub>培养7天。第3天轻轻摇晃培养瓶，补充同样体积含有GM-CSF（20 ng/mL）RPMI 1640（10% FBS）培养基。

5 第6天，对培养基进行半量换液处理。第7天，收集少量悬浮及半贴壁细胞，通过流式检测，当CD86<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>细胞在CD11c<sup>+</sup>细胞中的比例为15-20%之间，诱导培养的BMDC即可被用来做下一步实验。

#### （4）树突状细胞的激活

10 将小鼠BMDC铺到细胞培养板中，在每10万个DC细胞中加入5mL RPMI 1640（10% FBS）培养基，尔后加入20μ g负载水溶性组分的PLGA纳米粒子和20μ g负载非水溶性组分的PLGA纳米粒子与BMDC共孵育72h，尔后收集BMDC后在300g离心5分钟，PBS洗涤两次后重悬于PBS中备用。

#### （5）树突状细胞疫苗用于癌症的预防

15 选取6-8周的雌性C57BL/6为模型小鼠制备黑色素瘤荷瘤小鼠。树突状细胞疫苗组给药方案如下：在接种黑色素瘤之前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100μ L树突状细胞疫苗（50万树突状细胞）；在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种1.5×10<sup>5</sup>个B16F10细胞。PBS对照组方案如下：在接种黑色素瘤之前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100μ L PBS；在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种1.5×10<sup>5</sup>个B16F10细胞。游离裂解物对照组：在接种黑色素瘤之前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100μ L游离裂解物激活的树突状细胞；在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种1.5×10<sup>5</sup>个B16F10细胞。在实验中，从第3天开始每3天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中v为肿瘤体积，a为肿瘤长度，b为肿瘤宽度。出于动物实验伦理，在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过2000mm<sup>3</sup>即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

#### 25 （6）实验结果

如图3所示，对照组小鼠的肿瘤都长大，而经负载抗原的纳米粒子激活过的树突状细胞疫苗免疫过的小鼠肿瘤生长速度都明显变慢。而且，采用硅化和添加带电物质修饰处理的纳米粒子激活的树突状细胞疫苗对黑色素瘤预防效果优于制备过程中未做修饰处理的

纳米粒子激活树突状细胞疫苗组。

### 实施例3 癌细胞全细胞组分负载于纳米粒子激活树突状细胞用于癌症的预防

本实施例中，首先裂解B16F10黑色素瘤癌细胞以制备水溶性组分和非水溶性组分。然后，以有机高分子材料PLGA为纳米粒骨架材料，以CpG为免疫佐剂制备负载有癌细胞的全细胞组分的纳米粒子系统。在本实施例中采用了硅化、添加阳离子物质和阴离子物质的方法增加抗原的负载量，而且进行了两轮硅化处理。纳米粒子与树突状细胞共孵育后将树突状细胞回输预防癌症。

#### (1) 癌细胞的裂解及各组分的收集

将培养的B16F10黑色素瘤癌细胞系收集后在350g离心5分钟，然后弃去上清并用PBS洗涤两遍，然后采用超纯水重悬细胞并反复冻融5次，并可伴有超声以破坏裂解细胞。待细胞裂解后，将裂解物以3000g的转速离心6分钟并取上清液即为可溶于纯水的水溶性组分；在所得沉淀部分中加入8M尿素溶解沉淀部分即可将不溶于纯水的非水溶性组分转化为在8M尿素水溶液中可溶。以上即为制备粒子系统的抗原原料来源。

#### (2) 纳米粒子系统的制备

本实施例中纳米粒子及作为对照的空白纳米粒采用溶剂挥发法中的复乳法制备，对复乳法进行了适当的修饰改进，在纳米粒子制备过程中采用低温硅化技术和添加带电物质两种修饰方法提高抗原的负载量。在制备时负载全细胞组分中水溶性组分的纳米粒子和负载全细胞组分中非水溶性组分的纳米粒子分别制备，然后使用时一起使用。所采用的纳米粒子制备材料PLGA分子量为7KDa-17KDa，所采用的免疫佐剂为CpG且CpG既分布于纳米粒子内部也负载于纳米粒子表面。制备方法如前所述，在制备过程中首先采用复乳法在纳米粒子内部负载抗原，在内部负载抗原（裂解组分）后，将100mg纳米粒子在10000g离心20分钟，然后使用7mL PBS重悬纳米粒子并与3mL含有细胞裂解物(50mg/mL)的PBS溶液混合，尔后在10000g离心20分钟，然后采用10mL 硅酸盐溶液（含120mM NaCl、100 mM 原硅酸四甲酯和1.0 mM HCl, pH 3.0)重悬，并在室温固定12 h，使用超纯水离心洗涤后使用 3 mL含聚天冬氨酸（10 mg/mL）的PBS重悬并作用10 min，然后12000g离心18min洗涤，采用10 mL含有细胞裂解物（50mg/mL）的PBS溶液重悬并作用10min，然后在10000g离心20分钟。然后采用10mL 硅酸盐溶液（含150mM NaCl、80 mM 原硅酸四甲酯和1.0 mM HCl, pH 3.0），并在室温固定12 h，使用超纯水离心洗涤后使用 3 mL含组蛋白（5 mg/mL）和聚精氨酸（10

mg/mL) 的PBS重悬并作用10 min, 然后10000g离心20min洗涤, 采用10 mL含有细胞裂解物 (50mg/mL) 的PBS溶液重悬并作用10min, 然后在10000g离心20分钟, 并使用10 mL含4%海藻糖的超纯水重悬后冷冻干燥48 h; 在粒子使用前将其用7 mL PBS 重悬然后加入3 mL含佐剂的癌细胞裂解液组分 (蛋白质浓度50 mg/mL) 并室温作用 10 min, 得到内外都负载裂解物的经两轮冷冻硅化、添加阳离子物质和阴离子物质的修饰的纳米粒子。该纳米粒子平均粒径为350nm左右, 纳米疫苗表面电位为-3mV左右; 每1mg PLGA纳米粒子约负载350 $\mu$ g蛋白质或多肽组分, 每1mgPLGANanoparticle内外所使用的CpG免疫佐剂共约为0.02mg且内外各半。

未经修饰处理的纳米粒子制备方法步骤基本与修饰处理的纳米粒子的制备相同, 只是未硅化、添加阳离子物质和阴离子物质处理这些步骤。在制备过程中首先采用复乳法在纳米粒子内部负载抗原, 在内部负载抗原 (裂解组分) 后在10000g离心20分钟, 然后使用10 mL含4%海藻糖的超纯水重悬后冷冻干燥48 h, 在粒子使用前将其用7 mL PBS 重悬然后加入含佐剂的3 mL癌组织裂解液组分 (蛋白质浓度50 mg/mL) 并室温作用 10 min, 得到内外都负载裂解物的纳米粒子。该纳米粒子平均粒径为320nm左右, 纳米粒子表面电位为-5mV左右; 每1mg PLGANanoparticle约负载160 $\mu$ g蛋白质或多肽组分, 每1mgPLGANanoparticle内外所使用的CpG免疫佐剂共约为0.02mg且内外各半。

空白纳米粒粒径为300nm左右, 空白纳米粒制备时分别采用含有等量CpG的纯水或8M尿素代替相对应的水溶性组分和非水溶性组分。

### (3) 树突状细胞的制备

本实施例以从小鼠骨髓细胞制备树突状细胞为例来说明如何制备骨髓来源的树突状细胞 (BMDC)。首先, 取1只6-8周龄C57小鼠颈椎脱臼处死, 手术取出后腿的胫骨和股骨放入PBS中, 用剪刀和镊子将骨周围的肌肉组织剔除干净。用剪刀剪去骨头两端, 再用注射器抽取PBS溶液, 针头分别从骨头两端插入骨髓腔, 反复冲洗骨髓到培养皿中。收集骨髓溶液, 400g离心3 min后加入1 mL红细胞裂解液裂红。加入3 mL RPMI 1640 (10% FBS) 培养基终止裂解, 400g离心3 min, 弃上清。将细胞放置10 mm 培养皿中培养, 使用RPMI 1640 (10% FBS) 培养基, 同时加入重组小鼠GM-CSF (20 ng/mL), 37度, 5% CO<sub>2</sub>培养7天。第3天轻轻摇晃培养瓶, 补充同样体积含有GM-CSF (20 ng/mL) RPMI 1640 (10% FBS) 培养基。第6天, 对培养基进行半量换液处理。第7天, 收集少量悬浮及半贴壁细胞, 通过流式检测,



当CD86<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>细胞在CD11c<sup>+</sup>细胞中的比例为15-20%之间，诱导培养的BMDC即可被用来做下一步实验。

#### (4) 树突状细胞的激活

将小鼠BMDC铺到细胞培养板中，在每10万个DC细胞中加入5mL RPMI 1640 (10% FBS) 培养基，尔后加入20μg负载水溶性组分的PLGA纳米粒子和20μg负载非水溶性组分的PLGA纳米粒子与BMDC共孵育72h，尔后收集BMDC后在300g离心5分钟，PBS洗涤两次后重悬于PBS中备用。

#### (5) 树突状细胞疫苗用于癌症的预防

选取6-8周的雌性C57BL/6为模型小鼠制备黑色素瘤荷瘤小鼠。树突状细胞疫苗组给药方案如下：在接种黑色素瘤之前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100μL树突状细胞疫苗（100万树突状细胞）；在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种 $1.5 \times 10^5$ 个B16F10细胞。PBS对照组方案如下：在接种黑色素瘤之前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100μL PBS；在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种 $1.5 \times 10^5$ 个B16F10细胞。空白纳米粒或游离裂解物对照组：在接种黑色素瘤之前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100μL空白纳米粒或游离裂解物激活的树突状细胞；在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种 $1.5 \times 10^5$ 个B16F10细胞。在实验中，从第3天开始每3天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中v为肿瘤体积，a为肿瘤长度，b为肿瘤宽度。出于动物实验伦理，在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过2000mm<sup>3</sup>即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

#### (6) 实验结果

如图4所示，对照组小鼠的肿瘤都长大，而经负载抗原的纳米粒子激活过的树突状细胞疫苗免疫过的小鼠肿瘤生长速度都明显变慢。而且，采用硅化和添加带电物质修饰处理的纳米粒子激活的树突状细胞疫苗对黑色素瘤预防效果优于制备过程中未做修饰处理的纳米粒子激活树突状细胞疫苗组。

### 25 实施例4 负载结肠癌肿瘤组织和癌细胞的全细胞组分的纳米粒子体外激活树突状细胞治疗结肠癌

本实施例以小鼠结肠癌为癌症模型来说明如何使用树突状细胞疫苗治疗结肠癌。本实施例中，以MC38小鼠结肠癌细胞为癌症模型。首先裂解结肠癌肿瘤组织和结肠癌细胞以

制备水溶性组分和非水溶性组分。然后，以有机高分子材料PLGA为纳米粒骨架材料，以卡介苗（BCG）为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备纳米粒子，并采用该纳米粒子来体外激活树突状细胞，然后回输树突状细胞治疗结肠癌。

（1）肿瘤组织和癌细胞的裂解及各组分的收集

5 在每只C57BL/6小鼠背部皮下接种 $2 \times 10^6$ 个MC38细胞在肿瘤长到体积分别为约 $1000 \text{ mm}^3$ 时处死小鼠并摘取肿瘤组织。将肿瘤组织切块后研磨，通过细胞过滤网加入适量纯水并反复冻融5次，并可伴有超声以破坏裂解细胞。待细胞裂解后，将裂解物以大于5000g的转速离心5分钟并取上清液即为可溶于纯水的水溶性组分；在所得沉淀部分中加入8M尿素溶解沉淀部分即可将不溶于纯水的非水溶性组分转化为在8M尿素水溶液中可溶。

10 将培养的MC38癌细胞系收集后在350g离心5分钟，然后弃去上清并用PBS洗涤两遍，然后采用超纯水重悬细胞并反复冻融5次，并可伴有超声以破坏裂解细胞。待细胞裂解后，将裂解物以3000g的转速离心6分钟并取上清液即为可溶于纯水的水溶性组分；在所得沉淀部分中加入8M尿素溶解沉淀部分即可将不溶于纯水的非水溶性组分转化为在8M尿素水溶液中可溶。

15 将来自MC38肿瘤组织的和来MC38癌细胞的的水溶性组分和溶解于8M尿素中的非水溶性组分分别按照1:1的比例混合为制备纳米粒子的原料来源。

（2）BCG的裂解和各组分的收集

BCG的裂解方法和各组分的收集方法同癌细胞的裂解方法和各组分的收集方法。

（3）纳米粒子的制备

20 本实施例中纳米粒子及作为对照的空白纳米粒采用溶剂挥发法中的复乳法制备，对复乳法进行了适当的修饰改进，制备方法同实施例1，只是将实施例1中的水溶性组分或非水溶性组分换成了本实施例中相应的混合物。

（4）树突状细胞的制备

同实施例3。

25 （5）树突状细胞的激活

同实施例3。

（6）树突状细胞癌症疫苗用于癌症的治疗

本研究对照组分别是PBS组、空白纳米粒或游离裂解物组刺激BMDC组。选取6-8周的雌

性C57BL/6为模型小鼠制备荷瘤小鼠。在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种 $2 \times 10^6$ 个MC38细胞。树突状细胞疫苗组给药方案如下：在接种肿瘤后第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射 $200 \mu\text{L}$ 含100万个树突状细胞的疫苗。PBS对照组方案如下：在接种肿瘤细胞后第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射 $200 \mu\text{L}$  PBS。空白纳米粒或游离裂解物对照组：在接种肿瘤后第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射 $200 \mu\text{L}$ 含50万个经空白纳米粒或游离裂解物刺激的树突状细胞。在实验中，从第3天开始每3天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中 $v$ 为肿瘤体积， $a$ 为肿瘤长度， $b$ 为肿瘤宽度。出于动物实验伦理，在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过 $2000 \text{mm}^3$ 即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

## 10 (7) 实验结果

如图5所示，PBS对照组和空白纳米粒对照组小鼠的肿瘤都长大，与对照组相比疫苗组小鼠肿瘤生长速度明显变慢，而且部分小鼠肿瘤消失痊愈。综上所述，本发明所述的树突状细胞疫苗对结肠癌具有良好的治疗效果。

## 15 实施例5 黑色素瘤肿瘤组织和肺癌肿瘤组织全细胞组分负载于纳米粒子激活树突状细胞用于黑色素瘤的治疗

本实施例以黑色素瘤为癌症模型来说明如何使用负载黑色素瘤肿瘤组织和肺癌肿瘤组织的全细胞组分的纳米粒子激活树突状细胞，并应用该细胞疫苗治疗黑色素瘤。本实施例中，首先裂解B16F10黑色素瘤肿瘤组织和LLC肺癌肿瘤组织以制备肿瘤组织的水溶性组分和非水溶性组分。然后，以有机高分子材料PLGA为纳米粒骨架材料，以锰颗粒和CpG为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有肿瘤组织组分的纳米粒子，然后采用该纳米粒子激活树突状细胞，并采用该树突状细胞疫苗治疗黑色素瘤。

### (1) 肿瘤组织的裂解及各组分的收集

在每只C57BL/6小鼠背部皮下接种 $1.5 \times 10^5$ 个B16F10细胞或者 $2 \times 10^6$ 个LLC肺癌细胞，在肿瘤长到体积分别为约 $1000 \text{mm}^3$ 时处死小鼠并摘取肿瘤组织。肿瘤的裂解和各组分收集方法同实施例1。将来自B16-F10肿瘤组织的和来自LLC肺癌肿瘤组织的水溶性组分和溶解于8M尿素中的原非水溶性组分分别按照1:1的比例混合即为制备激活树突状细胞的纳米粒子的抗原来源。

### (2) 负载抗原的纳米粒子的制备

本实施例中纳米粒子系统及作为对照的空白纳米粒采用溶剂挥发法中的复乳法制备，对复乳法进行了适当的修饰改进，在纳米粒子系统制备过程中采用低温硅化技术和添加带电物质两种修饰方法提高抗原的负载量。在制备时负载全细胞组分中水溶性组分的纳米粒子和负载全细胞组分中非水溶性组分的纳米粒子分别制备，然后使用时一起使用。所采用的纳米粒子制备材料PLGA分子量为24KDa-38KDa，所采用的免疫佐剂为锰胶体颗粒和CpG且锰颗粒分布于纳米粒子内部而CpG分布于纳米粒子表面。先制备锰佐剂，然后将锰佐剂与全细胞组分中的水溶性组分或非水溶性组分混合后作为第一水相采用复乳法制备内部负载抗原和佐剂的纳米粒。在制备锰佐剂时，先将1 mL 0.3 M的 $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 溶液加入到9 mL生理盐水中，后加入2 mL 0.3 M的 $\text{MnCl}_2$ 溶液，放置过夜后，即得到 $\text{Mn}_2\text{O}(\text{HPO}_4)_2$ 胶体锰佐剂，锰佐剂粒径约为13nm。然后将锰佐剂与全细胞组分全细胞组分中的水溶性组分（60mg/mL）或非水溶性组分（60mg/mL）按1:3体积比混合后采用复乳法将抗原和锰佐剂负载到纳米粒内部。在内部负载抗原（裂解组分）和佐剂后，将100mg纳米粒子在10000g离心20分钟，然后使用7mL PBS重悬纳米粒子并与3 mL含有细胞裂解物（50mg/mL）的PBS溶液混合，尔后在10000g离心20分钟，然后采用10mL 硅酸盐溶液（含150mM NaCl、80 mM 原硅酸四甲酯和1.0 mM HCl, pH 3.0）重悬，并在室温固定10 min，尔后在-80°C固定24 h，使用超纯水离心洗涤后使用 3 mL含组蛋白（5 mg/mL）和聚精氨酸（10 mg/mL）的PBS重悬并作用10 min，然后10000g离心20min洗涤，采用10 mL含有细胞裂解物（50mg/mL）的PBS溶液重悬并作用10min，然后在10000g离心20分钟并使用10 mL含4%海藻糖的超纯水重悬后冷冻干燥48 h；在纳米粒子与树突状细胞孵育前将其用7 mL PBS 重悬然后加入3 mL含CpG佐剂的癌组织裂解液组分（蛋白质浓度50 mg/mL）并室温作用 10 min，得到内外都负载裂解物的经冷冻硅化和添加阳离子物质的修饰的纳米粒子。该纳米粒子平均粒径为360nm左右，纳米粒子表面电位为-3mV左右；每1mg PLGA纳米粒子约负载320 $\mu$ g蛋白质或多肽组分，每1mgPLGA纳米粒内外所使用的CpG佐剂为0.01mg。

空白纳米粒粒径为300nm左右，空白纳米粒制备时分别采用含有等量锰佐剂和CpG佐剂的纯水或8M尿素代替相对应的水溶性组分和非水溶性组分。

#### （4）树突状细胞的制备

同实施例1。

#### （5）树突状细胞的激活

同实施例1。

#### (6) 树突状细胞癌症疫苗用于癌症的治疗

本研究对照组分别是PBS组、空白纳米粒或游离裂解物组刺激BMDC组。选取6-8周的雌性C57BL/6为模型小鼠制备黑色素瘤荷瘤小鼠。在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种  
5  $1.5 \times 10^5$ 个B16F10细胞。树突状细胞疫苗组给药方案如下：在接种黑色素瘤后第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮内注射50 $\mu$  L含50万个树突状细胞的疫苗。PBS对照组方案如下：在接种黑色素瘤后第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮内注射50 $\mu$  L PBS。空白纳米粒或游离裂解物对照组：在接种黑色素瘤后第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮内注射50 $\mu$  L含50万个经空白纳米粒或游离裂解物刺激的树突状细胞。  
10 在实验中，从第3天开始每3天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中v为肿瘤体积，a为肿瘤长度，b为肿瘤宽度。出于动物实验伦理，在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过2000mm<sup>3</sup>即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

#### (7) 实验结果

如图6所示，PBS对照组和空白纳米粒对照组小鼠的肿瘤都长大，与对照组相比疫苗  
15 组小鼠肿瘤生长速度明显变慢，而且部分小鼠肿瘤消失痊愈。综上所述，本发明所述的树突状细胞疫苗对癌症具有良好的治疗效果。

### **实施例6 结肠癌和肺癌细胞水溶性组分负载于微米粒子内部和表面激活树突状细胞用于结肠癌的治疗**

本实施例说明如何制备只负载有结肠癌和肺癌细胞组分中水溶性部分的微米粒子系  
20 统。本实施例中，首先裂解MC38结肠癌肿瘤组织和LLC肺癌细胞以制备水溶性组分和非水溶性组分。然后，以有机高分子材料PLGA为微米粒子骨架材料，以锰颗粒和poly(I:C)为免疫佐剂制备负载有全细胞的水溶性组分的微米粒子，然后应用该粒子系统体外激活树突状细胞后回输治疗结肠癌。

#### (1) MC38结肠癌肿瘤组织和LLC肺癌细胞的裂解及各组分的收集

25 肿瘤组织和癌细胞的收集、裂解方法以及水溶性组分和非水溶性组分的收集方法同上。上述所得来源于结肠癌肿瘤组织和肺癌细胞的两种裂解物的水溶性组分按3:1混合即为制备微米粒子系统的抗原来源。

#### (2) 微米粒子系统的制备

本实施例中制备微米粒子及作为对照的空白微米粒采用溶剂挥发法中的复乳法，所采用的微米粒子制备材料为有机高分子材料PLGA分子量为38KDa-54KDa，所采用的免疫佐剂为锰颗粒和poly(I:C)且锰颗粒分布于疫苗内而poly(I:C)分布于粒子表面。在制备过程中，先制备锰佐剂，然后将锰佐剂与全细胞组分中的水溶性组分混合后作为第一水相采用复乳法制备内部负载抗原和佐剂的微米粒。在制备锰佐剂时，先将0.05 mL 0.6 M的Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液加入到0.95 mL生理盐水中，后加入0.1 mL 0.3 M的MnCl<sub>2</sub>溶液，即得到Mn<sub>2</sub>OHPO<sub>4</sub>胶体锰佐剂，锰佐剂粒径约为20 nm。然后将锰佐剂与全细胞组分全细胞组分中的水溶性组分（60mg/mL）按1:4体积比混合后采用复乳法将抗原和锰佐剂负载到微米粒内部。在内部负载抗原（裂解组分）和佐剂后，将100mg微米粒子在10000g离心20分钟，然后将其用8 mL PBS重悬然后加入2 mL含poly(I:C)佐剂的裂解液组分（蛋白质浓度80 mg/mL）并室温作用 10 min，得到微米粒子系统。该微米粒子平均粒径为1.5μ m左右，微米粒子表面电位为-4mV左右；每1mg PLGA微米粒子约负载200μ g蛋白质或多肽组分，每1mgPLGA微米粒所使用的poly(I:C)佐剂为0.01mg。

空白微米粒粒径为1.4 μ m左右，空白微米粒制备时分别采用含有等量锰佐剂和poly(I:C)佐剂的纯水代替相对应的水溶性组分。

#### （4）树突状细胞的制备

同实施例1。

#### （5）树突状细胞的激活

同实施例1，在共孵育过程中在细胞培养基中加入20ng/mL GM-CSF和20ng/mL的IL-2。

#### （6）树突状细胞疫苗用于癌症的治疗

本研究对照组分别是PBS组、空白微米粒或游离裂解物组。选取6-8周的雌性C57BL/6为模型小鼠制备结肠癌荷瘤小鼠，在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种 $2 \times 10^6$ 个MC38细胞。树突状细胞疫苗组给药方案如下：在第3天、第6天、第9天、第12天，第15天和第18天分别皮下注射100μ L的100万个树突状细胞。PBS对照组方案如下：在第3天、第6天、第9天、第12天，第15天和第18天分别皮下注射100μ L PBS。空白微米粒或细胞裂解物对照组：在第3天、第6天、第9天、第12天，第15天和第18天分别皮下注射100μ L空白微米粒或游离细胞裂解物体外刺激的树突状细胞（100万树突状细胞）。在实验中，从第3天开始每3天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中v为肿

瘤体积，a为肿瘤长度，b为肿瘤宽度。出于动物实验伦理，在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过 $2000\text{mm}^3$ 即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

#### (4) 实验结果

如图7所示，与对照组相比，疫苗给药组中小鼠肿瘤生长速度明显变慢。被负载水溶性组分的微米粒子体外激活的树突状细胞疫苗对结肠癌有治疗效果。

### **实施例7 6M盐酸胍溶解乳腺癌癌细胞并负载于微米粒子体外激活树突状细胞用于乳腺癌的预防**

本实施例以4T1小鼠三阴性乳腺癌为癌症模型来说明如何采用6M尿素溶解全细胞组分并制备负载有全细胞组分的微米粒子系统，并以该微米粒子系统体外激活树突状细胞预防乳腺癌。本实施例中，首先对乳腺癌细胞进行灭活和变性处理并以6M盐酸胍裂解癌细胞后溶解全细胞组分。然后，以PLGA为微米粒子骨架材料，以CpG和Poly(I:C)为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有全细胞组分的微米粒子系统，并以该微米粒子系统体外激活树突状细胞预防乳腺癌。

#### (1) 癌细胞的裂解及各组分的收集

将培养的4T1细胞在400g离心5分钟，然后用PBS洗涤两遍后重悬于超纯水中。所得癌细胞分别采用紫外线和高温加热进行灭活和变性处理，然后采用适量6M盐酸胍裂解乳腺癌细胞并溶解裂解物即为制备粒子系统的原料来源。

#### (2) 微米粒子系统的制备

本实施例中制备微米粒子系统及作为对照的空白微米粒子采用溶剂挥发法中的复乳法，所采用的微米粒子制备材料为有机高分子材料PLGA分子量为38KDa-54KDa，所采用的免疫佐剂为CpG和Poly(I:C)。制备时对复乳法进行了适当的修饰改进，在微米粒子制备过程中先采用复乳法制备内部负载抗原和佐剂的纳米粒，在内部负载抗原和佐剂后，将100mg微米粒子在10000g离心20分钟，使用10 mL含4%海藻糖的超纯水重悬后干燥48 h；在微米粒子系统注射使用前将其用8 mL PBS 重悬然后加入2 mL癌细胞裂解液组分（蛋白质浓度80 mg/mL）并室温作用 10 min，得到所需微米粒子系统。该微米粒子系统平均粒径为 $1.5\mu\text{m}$ 左右，微米粒子系统表面电位为 $-4\text{mV}$ 左右；每1mg PLGA微米粒子约负载 $140\mu\text{g}$ 蛋白质或多肽组分。空白微米粒粒径为 $1.4\mu\text{m}$ 左右，空白微米粒制备时采用含有等量CpG和Poly(I:C)佐剂的6M盐酸胍代替相对应的细胞组分。

(3) 树突状细胞的制备

同实施例1。

(4) 树突状细胞的激活

同实施例1。

5 (5) 微米粒子系统用于癌症的预防

选取6-8周的雌性BALB/c制备4T1荷瘤小鼠。疫苗预防组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天皮下注射100 $\mu$  L树突状细胞疫苗（100万个树突状细胞）；在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种 $4 \times 10^5$ 个4T1细胞。PBS空白对照组在在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天皮下注射100 $\mu$  L PBS；在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种 $4 \times 10^5$ 个4T1细胞。空白微米粒或细胞裂解物对照组在在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天皮下注射经裂解物或PLGA空白微米粒刺激后的树突状细胞（100万）；在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种 $4 \times 10^5$ 个4T1细胞。在实验中，从第3天开始每3天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中v为肿瘤体积，a为肿瘤长度，b为肿瘤宽度。生存期实验中小鼠肿瘤体积超过2000mm<sup>3</sup>即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

(6) 实验结果

如图8所示，与对照组相比，疫苗预防组肿瘤生长速度明显变慢且小鼠生存期明显延长。由此可见，本发明所述的疫苗对乳腺癌具有预防效果。

20 **实施例8 负载肿瘤组织和癌细胞全细胞组分的纳米粒子系统激活树突状细胞用于癌症转移的预防**

本实施例以小鼠黑色素瘤小鼠肺转移癌症模型来说明使用树突状细胞疫苗预防癌症转移。在实际应用时具体剂型，佐剂，给药时间、给药次数、给药方案可根据情况调整。本实施例中，将小鼠黑色素瘤肿瘤组织和癌细胞以8M尿素裂解后溶解，然后肿瘤组织裂解组分和癌细胞裂解组分按质量比1:4负载于纳米粒子系统，并用该粒子系统激活树突状细胞以预防癌症转移。在本实施例中，采用负载四种多肽新生抗原B16-M20 (Tubb3, FRRKAFLHWYTGEAMDEMEFTEAESNM)，B16-M24 (Dag1, TAVITPPTTTTKKARVSTPKPATPSTD)，B16-M46 (Actn4, NHSGLVTFQAFIDVMSRETTDTDTADQ) 和TRP2:180-188 (SVYDFFVWL) 的纳米粒子作为对照纳米粒子使用，以分析负载全细胞抗原的纳米粒子和负载多种多肽新生抗原



的纳米粒子在制备树突状细胞疫苗中的效果。

(1) 肿瘤组织和癌细胞的裂解

收集小鼠B16F10黑色素瘤肿瘤组织和培养的癌细胞后采用8M尿素裂解和溶解肿瘤组织和癌细胞全细胞组分，然后肿瘤组织组分和癌细胞组分按质量比1:4混溶。

5 (2) 纳米粒子系统的制备

本实施例中纳米粒子系统及作为对照的空白纳米粒采用溶剂挥发法中的复乳法制备，所采用的纳米粒子制备材料PLGA分子量为24KDa-38KDa，所采用的免疫佐剂为CpG和CaCl<sub>2</sub>且佐剂负载于纳米粒子内部。制备方法如前所述，在制备过程中首先采用复乳法在纳米粒子内部负载抗原，在内部负载抗原（裂解组分）后，将100mg纳米粒子在10000g离心20分  
10 钟，并使用10 mL含4%海藻糖的超纯水重悬后冷冻干燥48h后备用。该纳米粒子平均粒径为320nm左右；每1mg PLGA纳米粒子约负载160μg蛋白质或多肽组分。负载多种抗原多肽的对照纳米粒子制备方法同上，对照纳米粒子粒径为310nm左右，每1mg PLGA纳米粒子约负载150μg抗原多肽。

(3) 树突状细胞的制备

15 同实施例1。

(4) 树突状细胞的激活

同实施例1。

(5) 树突状细胞疫苗用于预防癌症的转移

选取6-8周的雌性C57BL/6为模型小鼠制备荷瘤小鼠。疫苗组在肿瘤接种前第35天、第  
20 28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100μL树突状细胞（100万）。PBS空白对照组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100μL PBS。对照疫苗组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100μL负载多肽抗原的对照纳米粒激活的树突状细胞（100万个）。在第0天给每只小鼠尾静脉注射  
25  $3 \times 10^5$ 个B16F10黑色素瘤细胞，在第15天处死小鼠取出肺部后观察小鼠肺部黑色素瘤转移形成的癌块的数量。

(6) 实验结果

如图9所示，与对照组相比，疫苗组小鼠癌症转移灶数量显著减少。而且，负载全细胞组分纳米粒子激活的树突状细胞疫苗效果好于使用负载几种抗原多肽的纳米粒子激活

的树突状细胞疫苗。这说明本发明所述使用负载全细胞组分纳米粒子体外激活的树突状细胞疫苗可以有效预防癌症转移。

### **实施例9 胰腺癌肿瘤组织和结肠癌肿瘤组织裂解组分负载于纳米粒子内部和表面用于胰腺癌的治疗**

5 本实施例以小鼠胰腺癌为癌症模型来说明使用树突状细胞疫苗治疗癌症。本实施例中，将小鼠Pan02胰腺癌肿瘤组织和MC38结肠癌肿瘤组织裂解组分按2:1的比例负载于纳米粒子。

先取得小鼠胰腺癌和结肠癌肿瘤组织并将其裂解以制备水溶性组分和溶于6M盐酸胍中的原非水溶性组分。在制备粒子时，水溶性组分为胰腺癌肿瘤组织水溶性组分和结肠癌肿瘤组织水溶性组分2:1的混合物；非水溶性组分为胰腺癌肿瘤组织非水溶性组分和结肠癌肿瘤组织非水溶性组分2:1的混合物。以PLGA为纳米粒子骨架材料，不添加任何佐剂制备纳米粒子并用该纳米粒子激活树突状细胞并回输体内治疗Pan02胰腺癌荷瘤小鼠体内的肿瘤。

#### (1) 肿瘤组织的裂解及各组分的收集

15 在每只C57BL/6小鼠腋下皮下接种 $2 \times 10^6$ 个MC38结肠癌细胞或接种 $1 \times 10^6$ 个Pan02胰腺癌细胞，在各只小鼠所接种肿瘤长到体积分别为约1000 mm<sup>3</sup>时处死小鼠并摘取肿瘤组织。裂解方法及各组分的收集方法同实施例1，只是使用6M盐酸胍而非8M尿素溶解非水溶性组分。

#### (2) 纳米粒子的制备

20 本实施例中制备纳米粒子制备方法同实施例1只是不使用佐剂。

#### (3) 树突状细胞的制备

同实施例1。

#### (4) 树突状细胞的激活

同实施例1，但是在孵育过程中在细胞培养基中加入20ng/mL的GM-CSF。

25 (5) 疫苗用于癌症的治疗

选取6-8周的雌性C57BL/6制备胰腺癌小鼠。在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种 $1 \times 10^6$ 个Pan02细胞。树突状细胞疫苗组给药方案如下：在第3天、第6天、第9天、第12天，第15天和第18天分别皮下注射100μL的100万个树突状细胞。PBS对照组方案如下：在

第3天、第6天、第9天、第12天，第15天和第18天分别皮下注射100 $\mu$  L PBS。空白纳米粒或细胞裂解物对照组：在第3天、第6天、第9天、第12天，第15天和第18天分别皮下注射100 $\mu$  L空白纳米粒或游离细胞裂解物体外刺激的树突状细胞（100万树突状细胞）。在实验中，从第3天起每3天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中 $v$ 为肿瘤体积， $a$ 为肿瘤长度， $b$ 为肿瘤宽度。出于动物实验伦理，在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过2000 $\text{mm}^3$ 即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

#### (4) 实验结果

如图10所示，与对照组相比，疫苗组肿瘤生长速度明显变慢且小鼠生存期明显延长。由此可见，负载癌症肿瘤组织的细胞组分而不添加佐剂的纳米粒子可体外激活树突状细胞并应用该树突状细胞作为疫苗治疗胰腺癌。

### **实施例10 癌细胞全细胞组分负载于甘露糖靶向修饰的纳米粒激活树突状细胞用于癌症的预防**

本实施例以小鼠黑色素瘤模型来说明如何使用树突状细胞疫苗预防癌症。在实际应用时具体剂型，佐剂，给药时间、给药次数、给药方案可根据情况调整。本实施例中，将小鼠黑色素瘤癌细胞以8M尿素裂解后溶解，然后癌细胞裂解组分负载于纳米粒子系统。该纳米粒子系统可通过树突状细胞表面的甘露糖受体摄取进入树突状细胞。

#### (1) 癌细胞的裂解

收集培养的癌细胞后采用8M尿素裂解和溶解癌细胞全细胞组分。

#### (2) 纳米粒子系统的制备

本实施例中纳米粒子系统及作为对照的只负载细胞组分不负载佐剂的纳米粒采用溶剂挥发法中的复乳法制备。所采用的纳米粒子制备材料为PLGA与甘露糖修饰的PLGA，二者比例为4:1，分子量都为7KDa-17KDa，所采用的免疫佐剂为CpG且佐剂负载于纳米粒子内部。制备方法如前所述，在制备过程中首先采用复乳法在纳米粒子内部负载细胞组分，在内部负载细胞组分后，将100mg纳米粒子在10000g离心20分钟，并使用10 mL含4%海藻糖的超纯水重悬后冷冻干燥48h后备用。带有靶头（负载佐剂）和不带靶头（负载佐剂）的纳米粒子的平均粒径均为320nm左右，每1mg PLGA纳米粒子约负载60 $\mu$  g蛋白质或多肽组分。不负载佐剂的但是带有靶头的对照纳米粒粒径也为320nm左右，制备时采用等量细胞组分但是不含任何免疫佐剂，每1mg PLGA纳米粒子约负载60 $\mu$  g蛋白质或多肽组分。

(3) 树突状细胞的制备

同实施例1。

(4) 树突状细胞的激活

同实施例1。

5 (3) 树突状细胞疫苗用于癌症的预防

选取6-8周的雌性C57BL/6为模型小鼠制备荷瘤小鼠。疫苗组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100 $\mu$  L树突状细胞疫苗（100万个）。PBS空白对照组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100 $\mu$  L PBS。在第0天给每只小鼠皮下注射 $1.5 \times 10^5$ 个B16F10黑色素瘤细胞。在实验中，从第3天起每3  
10 天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中v为肿瘤体积，a为肿瘤长度，b为肿瘤宽度。出于动物实验伦理，在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过2000mm<sup>3</sup>即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

(4) 实验结果

如11图所示，与对照组相比，疫苗组小鼠肿瘤生长速度明显变慢。而且，使用含有靶  
15 头的纳米粒子所激活的树突状细胞疫苗效果好于不含靶头纳米粒子激活的树突状疫苗，含有免疫佐剂的纳米粒子激活的树突状细胞疫苗好于不含免疫佐剂的纳米粒子激活的树突状细胞疫苗。这说明本发明所述的疫苗可以预防癌症，而且靶头和佐剂的加入有助于纳米粒子体外激活树突状细胞疫苗发挥作用。

20 **实施例11 癌细胞全细胞组分负载于以卡介苗（BCG）为佐剂的纳米粒子体外激活树突状细胞用于肝癌的预防**

本实施例以BCG为免疫佐剂来说明如何制备负载有肝癌癌细胞全细胞组分的纳米粒子并应用该粒子体外激活树突状细胞以预防肝癌。本实施例中，首先以PLGA为纳米粒子骨架材料，以BCG为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备纳米粒子系统，然后以该粒子系统激活树突状细胞并用于预防肝癌。

25 (1) 癌细胞的裂解及各组分的收集

该实施例中癌细胞裂解及裂解物收集同上。

(2) 癌细胞的裂解及各组分的收集

该实施例中癌细胞的裂解及裂解物收集和增溶方法同实施例1中的裂解方法，只是将

肿瘤组织换成癌细胞。

### (3) 纳米粒子系统的制备

本实施例中纳米粒子的制备方法、所使用的材料等均与实施例1相同。但是在该实施例中，纳米粒子负载的免疫佐剂由poly(I:C)换成了BCG。

### 5 (3) 树突状细胞的制备

同实施例1。

### (4) 树突状细胞的激活

同实施例1。

### (5) 树突状细胞疫苗用于癌症的预防

10 选取6-8周的雌性C57BL/6为模型小鼠制备荷瘤小鼠。疫苗组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100 $\mu$  L树突状细胞疫苗（100万个）。PBS空白对照组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100 $\mu$  L PBS。裂解物对照组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100 $\mu$  L游离裂解物刺激的树突状细胞（100万个）。在第0天给每只小鼠皮下注射 $2 \times 10^6$ 个Hepa1-6  
15 肝癌细胞。在实验中，从第3天起每3天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中v为肿瘤体积，a为肿瘤长度，b为肿瘤宽度。出于动物实验伦理，在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过2000mm<sup>3</sup>即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

### (6) 实验结果

20 如图 12 所示，与对照组相比，以疫苗给药组肿瘤生长速度明显变慢且小鼠生存期明显延长。由此可见，本发明所述的疫苗可以预防肝癌。

## **实施例12 负载肿瘤组织和癌细胞全细胞组分的纳米粒子系统激活树突状细胞用于癌症的预防**

本实施例以小鼠黑色素瘤小鼠模型来说明使用树突状细胞疫苗预防癌症。在实际应用时具体剂型，佐剂，给药时间、给药次数、给药方案可根据情况调整。本实施例中，  
25 小鼠黑色素瘤肿瘤组织和癌细胞以8M尿素裂解后溶解，然后肿瘤组织裂解组分和癌细胞裂解组分按质量比1:1负载于纳米粒子系统，并用该粒子系统激活树突状细胞以预防癌症。在本实施例中，采用负载四种多肽新生抗原 B16-M20 (Tubb3, FRRKAFLHWYTGEAMDEMEFTEAESNM)，B16-M24 (Dag1, TAVITPPTTTTTPKARVSTPKPATPSTD)，

B16-M46 (Actn4, NHSGLVTFQAFIDVMSRETTDTADQ) 和 TRP2:180-188 (SVYDFFVWL) 的纳米粒子作为对照纳米粒子使用, 以分析负载全细胞抗原的纳米粒子和负载多种多肽新生抗原的纳米粒子在制备树突状细胞疫苗中的效果。本实施例在纳米粒子内部和表面负载全细胞抗原后生物钙化纳米粒子, 然后与树突状细胞共孵育。

5 (1) 肿瘤组织和癌细胞的裂解

收集小鼠B16F10黑色素瘤肿瘤组织和培养的癌细胞后采用8M尿素裂解和溶解肿瘤组织和癌细胞全细胞组分, 然后肿瘤组织组分和癌细胞组分按质量比1:4混溶。

(2) 纳米粒子系统的制备

本实施例中纳米粒子系统及作为对照的空白纳米粒采用溶剂挥发法中的复乳法制备, 10 所采用的纳米粒子制备材料PLGA分子量为7KDa-17KDa, 所采用免疫佐剂CpG和Poly(I:C)负载于纳米粒子内部。制备方法如下所述, 在制备过程中首先采用复乳法在纳米粒子内部负载抗原, 在内部负载抗原(裂解组分)后, 将100mg PLGA纳米粒子使用18 mL PBS 重悬, 然后加入2 mL 溶解于8M尿素的肿瘤组织和癌细胞裂解液(60 mg/mL), 在室温作用10分  
15 钟后在10000g离心20分钟后收集沉淀。然后将该100 mg PLGA纳米粒子重悬于20 mL DMEM 培养基中, 然后加入 200  $\mu$  L of  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) 并在 37 ° C 反应两小时。然后在10000g  
离心20分钟后收集沉淀, 并采用超纯水重悬后离心洗涤两遍。然后将该100mg纳米粒子用  
10 mL RPMI 1640培养基重悬后与树突状细胞共孵育。该纳米粒子平均粒径为320nm左右;  
每1mg PLGA纳米粒子约负载150 $\mu$  g蛋白质或多肽组分。负载多种抗原多肽的对照纳米粒子  
20 制备方法同上, 对照纳米粒子粒径为310nm左右, 每1mg PLGA纳米粒子约负载150 $\mu$  g抗原  
多肽。

(3) 树突状细胞的制备

同实施例1。

(4) 树突状细胞的激活

同实施例1。

25 (5) 树突状细胞疫苗用于预防癌症

选取6-8周的雌性C57BL/6为模型小鼠制备荷瘤小鼠。疫苗组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100 $\mu$  L树突状细胞(100万)。PBS空白对照组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100 $\mu$  L PBS。对

照疫苗组在肿瘤接种前第35天、第28天、第21天、第14天和第7天分别皮下注射100 $\mu$  L负载多肽抗原的对照纳米粒激活的树突状细胞（100万个）。在第0天给每只小鼠皮下注射 $1.5 \times 10^5$ 个B16F10黑色素瘤细胞，然后从第3天起每3天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52 \times a \times b^2$ 计算，其中 $v$ 为肿瘤体积， $a$ 为肿瘤长度， $b$ 为肿瘤宽度。出于动物实验伦理，在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过2000mm<sup>3</sup>即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

#### (6) 实验结果

如图13所示，与对照组相比，疫苗组小鼠癌症肿瘤生长速度明显变慢且有部分小鼠接种癌细胞后肿瘤消失。而且，负载全细胞组分纳米粒子激活的树突状细胞疫苗效果好于使用负载几种抗原多肽的纳米粒子激活的树突状细胞疫苗。这说明本发明所述使用负载全细胞组分纳米粒子体外激活的树突状细胞疫苗可以有效预防癌症。

显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

## 权 利 要 求 书

1. 一种树突状细胞癌症疫苗，其特征在于：所述树突状细胞癌症疫苗由负载细胞组分的递送粒子体外激活树突状细胞得到；其中，所述的递送粒子为纳米粒子和/或微米粒子，所述的细胞组分来源于癌细胞和/或肿瘤组织中细胞的水溶性组分和/或非水溶性组分，  
5 所述的激活是将负载细胞组分的递送粒子与树突状细胞共孵育。
2. 根据权利要求 1 所述的树突状细胞癌症疫苗，其特征在于：所述树突状细胞为自体树突状细胞和/或异体树突状细胞。
3. 根据权利要求 1 所述的树突状细胞癌症疫苗，其特征在于：细胞组分负载于递送粒子的表面的方式包括吸附、共价连接、电荷相互作用、疏水相互作用、一步或多步的固  
10 化、矿化和包裹中的至少一种。
4. 根据权利要求 1 所述的树突状细胞癌症疫苗，其特征在于：递送粒子表面负载一层或多层细胞组分，其中，负载多层细胞组分时，层与层之间为修饰物。
5. 根据权利要求 1 所述的树突状细胞癌症疫苗，其特征在于：所述的非水溶性组分经增溶后负载于递送粒子，采用的增溶剂选自尿素、盐酸胍、脱氧胆酸钠、SDS、甘油、  
15 pH 大于 7 的碱性溶液、pH 小于 7 的酸性溶液、蛋白质降解酶、白蛋白、卵磷脂、无机盐、Triton、吐温、DMSO、乙腈、乙醇、甲醇、DMF、丙醇、异丙醇、醋酸、胆固醇、氨基酸、糖苷、胆碱、Brij™-35、Octaethylene glycol monododecyl ether、CHAPS、Digitonin、lauryldimethylamine oxide、IGEPAL® CA-630、二氯甲烷和乙酸乙酯中的至少一种。
6. 根据权利要求 1 所述的树突状细胞癌症疫苗，其特征在于：所述递送粒子的内部  
20 和/或表面负载有免疫增强佐剂。
7. 根据权利要求 1 所述的树突状细胞癌症疫苗，其特征在于：所述递送粒子的表面连接有主动靶向树突状细胞的靶头。
8. 根据权利要求 1 所述的树突状细胞癌症疫苗，其特征在于：所述水溶性组分和/或非水溶性组分负载于所述递送粒子的内部，和/或所述水溶性组分和/或非水溶性组分负载  
25 于所述递送粒子的表面。
9. 权利要求 1-8 任一项所述的树突状细胞癌症疫苗在制备癌症治疗或预防药物中的应用。



10. 根据权利要求 9 的应用, 其特征在于: 在癌症发生前、癌症发生后或手术切除肿瘤组织后多次给药激活机体免疫系统。

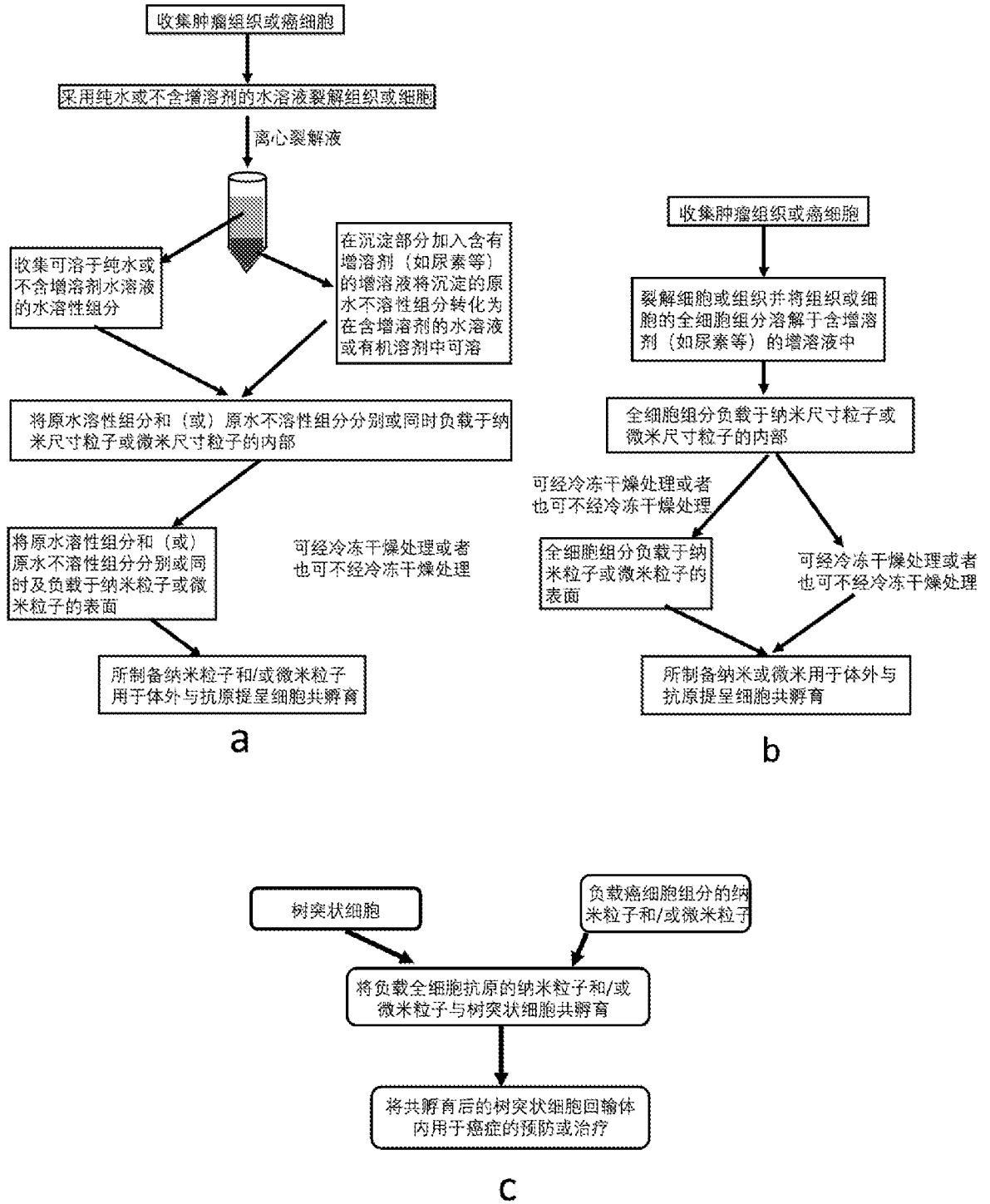


图 1

实施例1

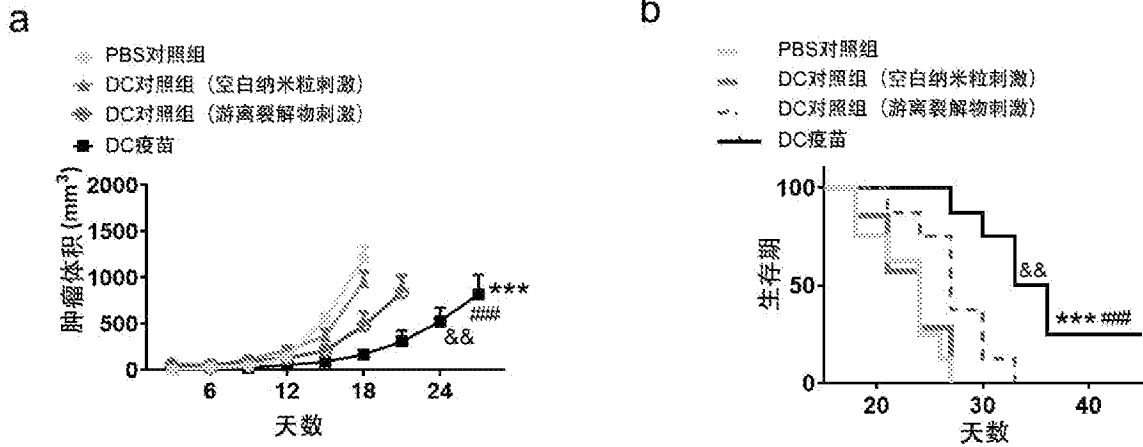


图 2

实施例2

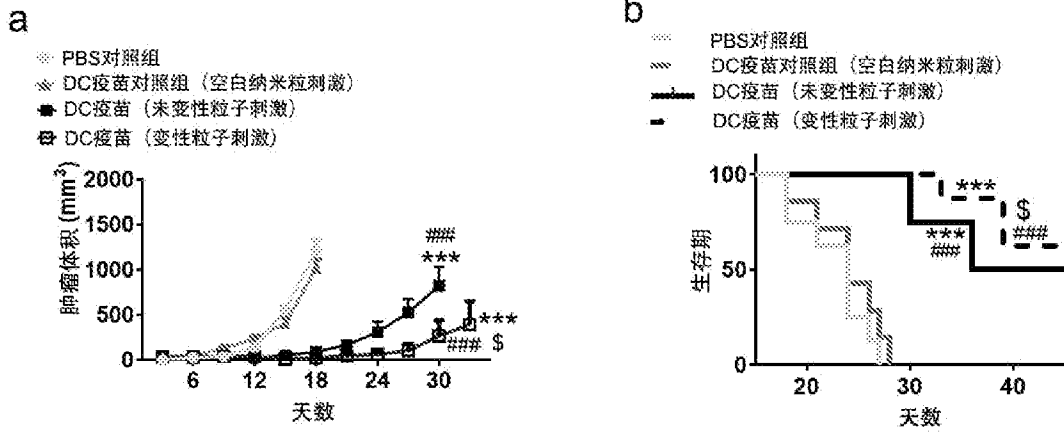


图 3

实施例3

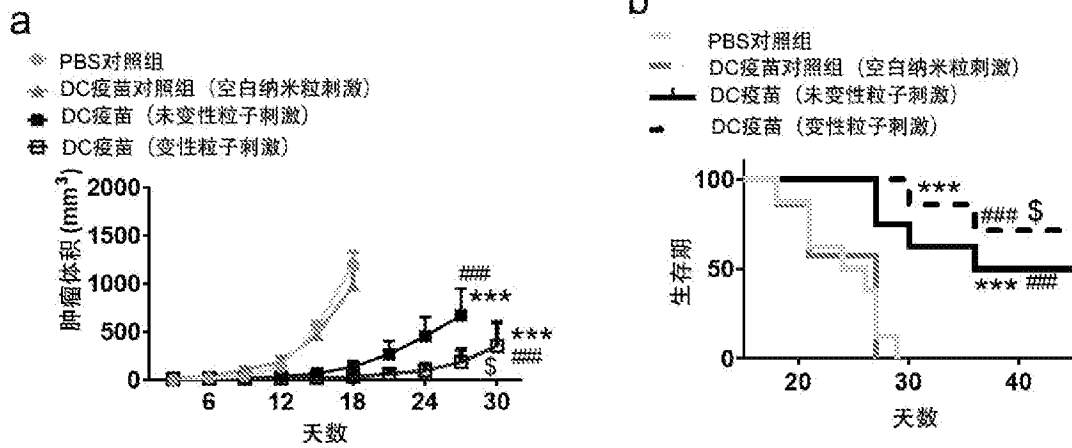


图 4

实施例 4

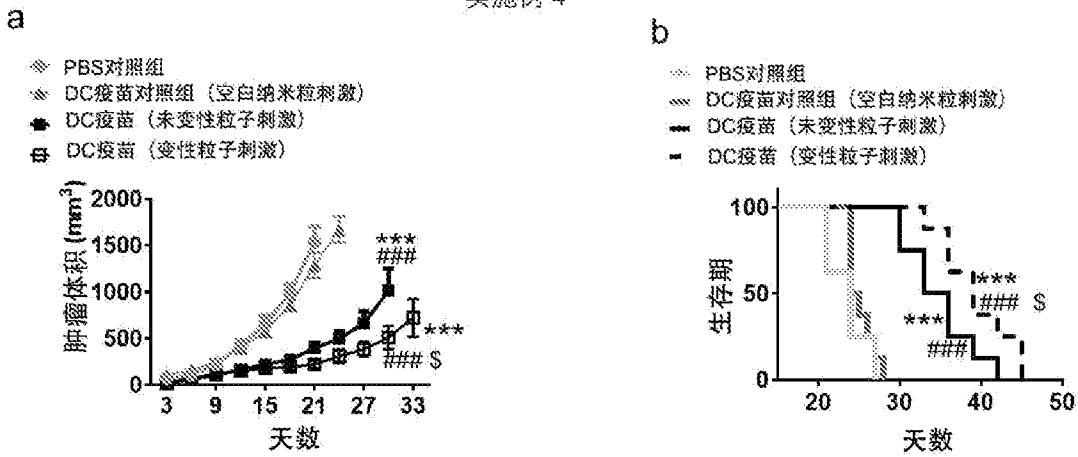


图 5

实施例5

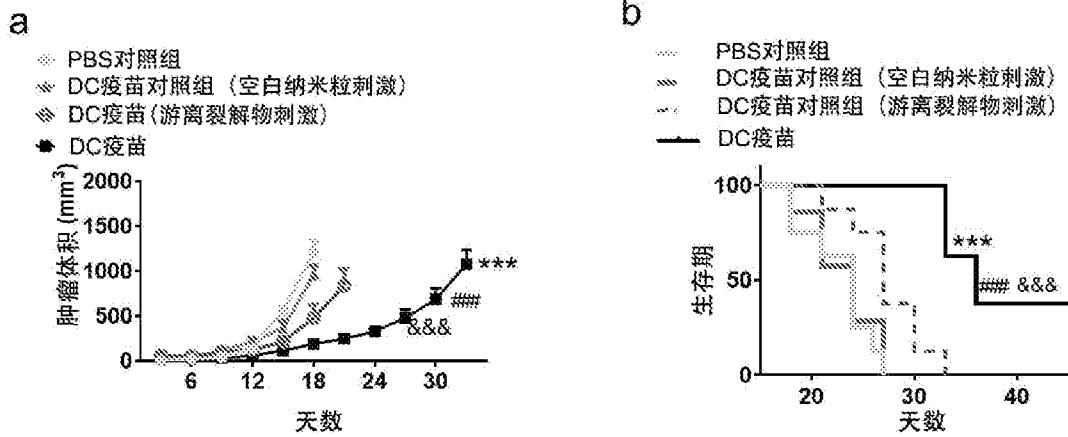


图 6

实施例 6

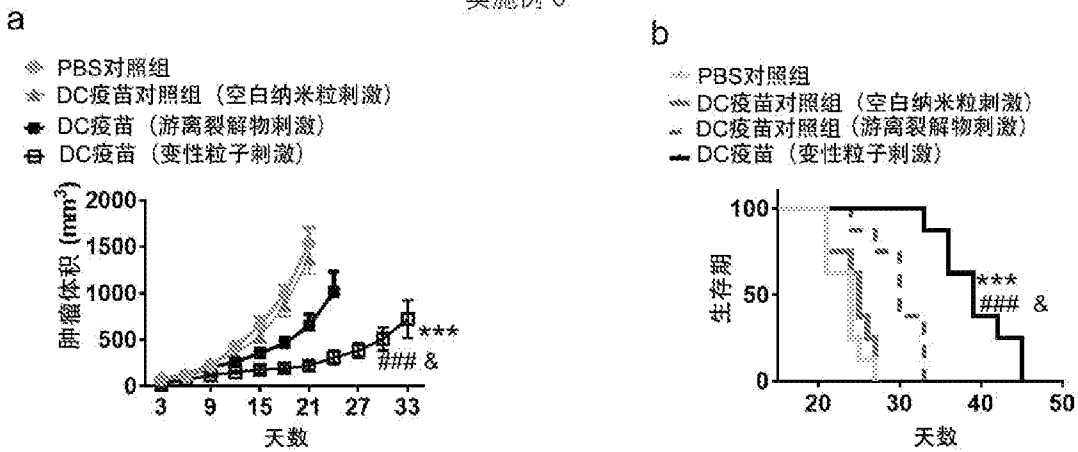


图 7

实施例7

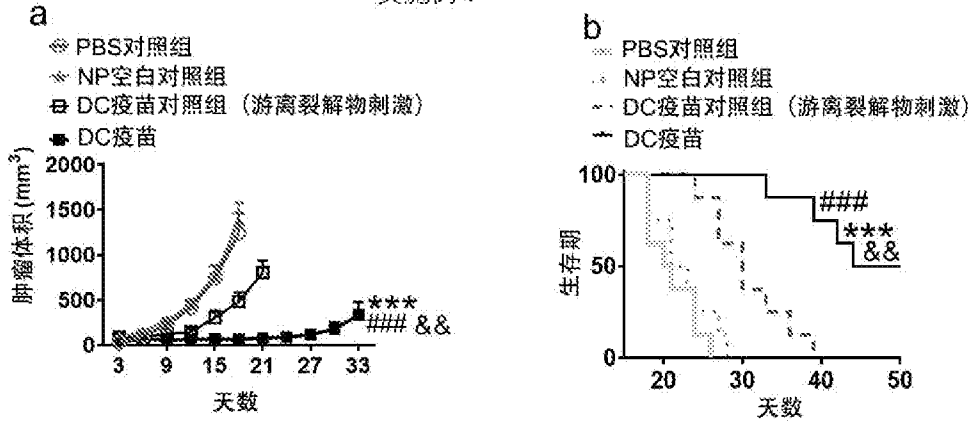


图 8

实施例8

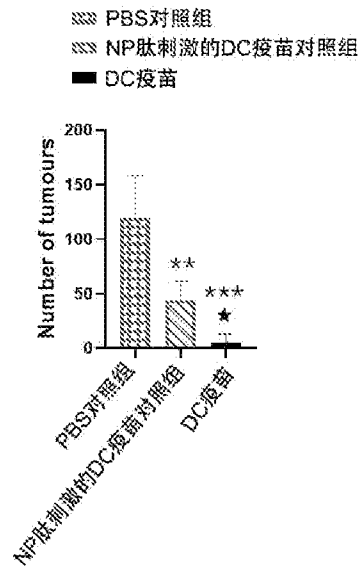


图 9

实施例9

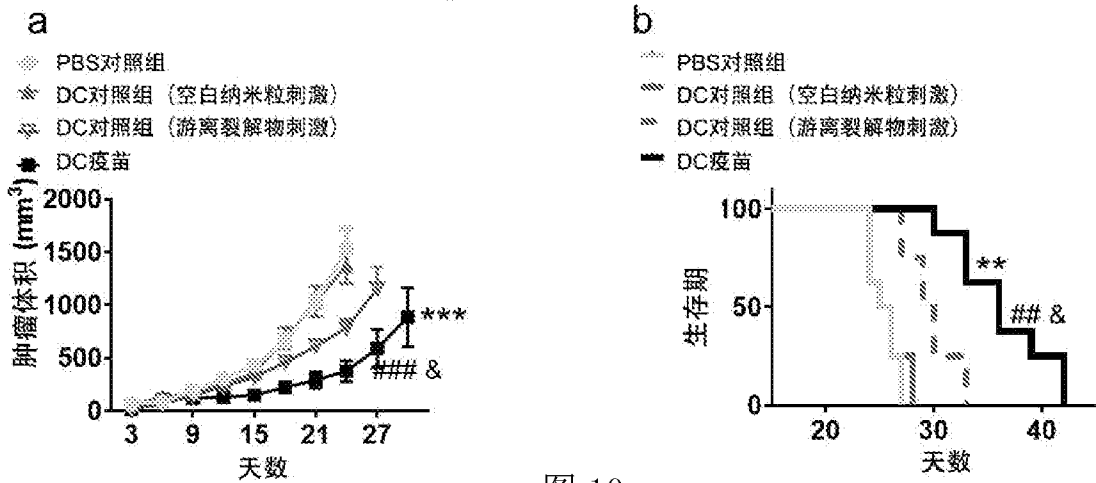


图 10

实施例10

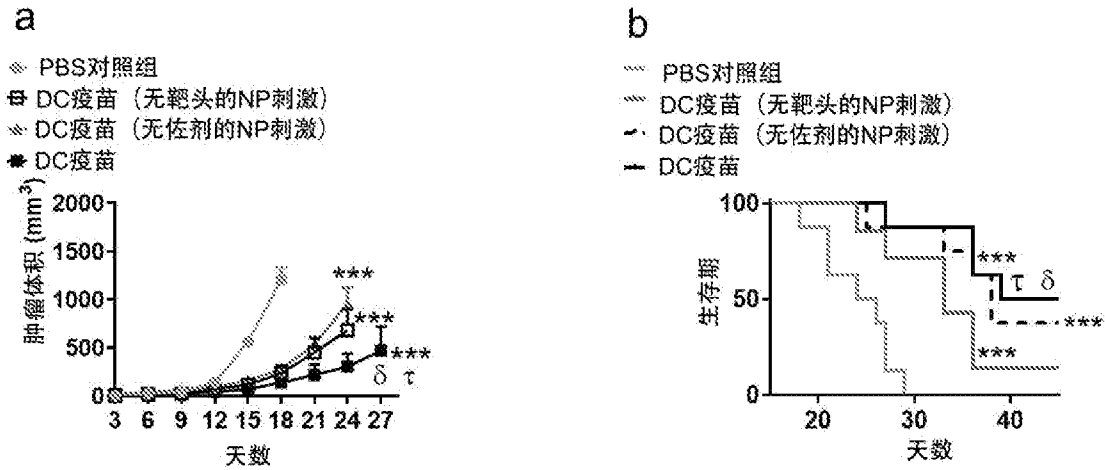


图 11

实施例 11

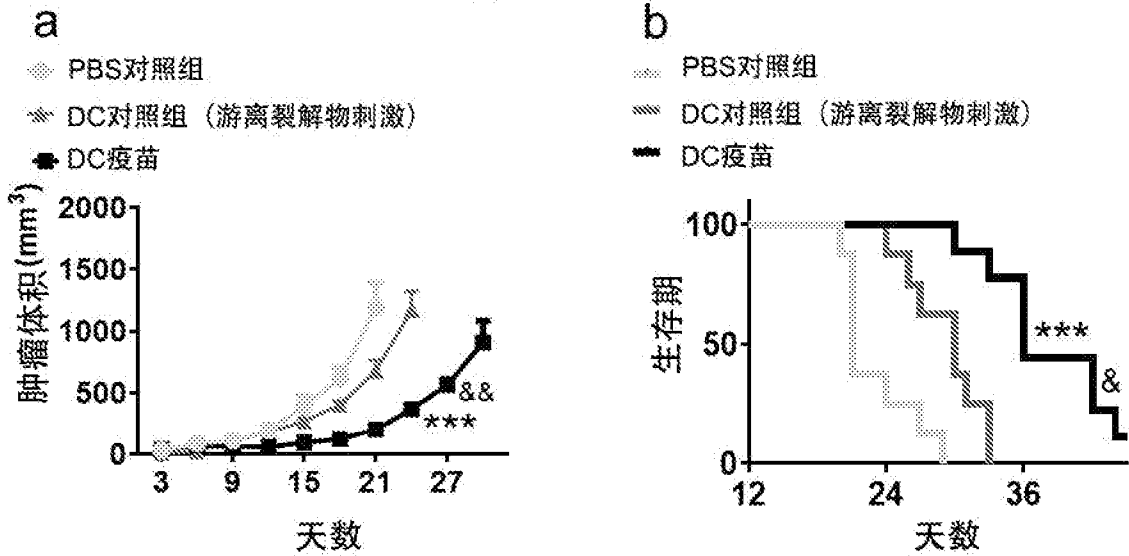


图 12

实施例12

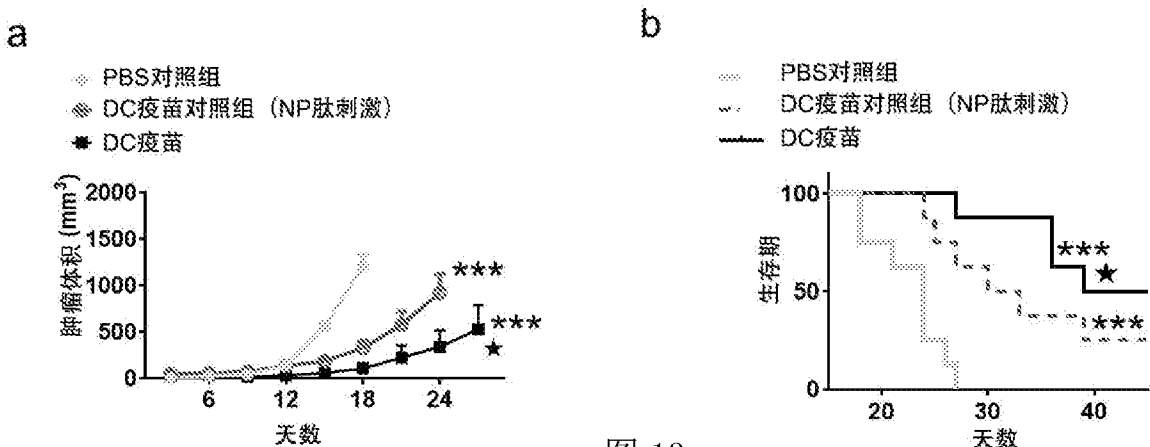


图 13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/073141

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12N 5/0784(2010.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
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) C12N; A61K; A61P		
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) VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Science, VCN, CNKI, 万方, WANFANG, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, 读秀, DUXIU, STN: 树突状细胞, dendritic cell, 肿瘤疫苗, cancer vaccine, 纳米微粒, nano-particle, 细胞组分, cell component, 水溶, 非水溶, water-soluble, water-insoluble, 递送, delivery system, 孵育, 激活, co-incubation, activat+, 吞噬, phagocytosis.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014065173 A1 (ORBIS HEALTH SOLUTION LLC) 06 March 2014 (2014-03-06) description, embodiments 1-8	1-10
Y	CN 112245574 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 22 January 2021 (2021-01-22) claims 1-10, and description, paragraphs 42-166	1-10
Y	CN 113440605 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 28 September 2021 (2021-09-28) claims 1-12	1-10
A	WO 2021233237 A1 (NATIONAL CENTER FOR NANOSCIENCE AND TECHNOLOGY) 25 November 2021 (2021-11-25) entire document	1-10
A	PATI, R. et al. "Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases" <i>Frontiers in Immunology</i> , Vol. 9, No. 5, 04 October 2018 (2018-10-04), Article 2224: 1-16	1-10
A	REBUMA, F. F. et al. "Nanoparticles versus Dendritic Cells as Vehicles to Deliver mRNA Encoding Multiple Epitopes for Immunotherapy" <i>Molecular Therapy: Methods &amp; Clinical Development</i> , Vol. 16, 31 March 2020 (2020-03-31), pp. 50-62	1-10
<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 August 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>01 September 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	薛松等 (XUE, Song et al.). "肿瘤抗原冲击的树突状细胞对小鼠肾细胞癌的治疗作用研究 (Immunotherapy of mouse renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed dendritic cells)" <i>医学研究生学报 (Journal of Medical Postgraduates)</i> , Vol. 23, No. 5, 31 May 2010 (2010-05-31), pp. 477-481	1-10
.....		



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

International application No.

**PCT/CN2022/073141**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2014065173	A1	06 March 2014	AU	2018203586	A1	05 July 2018
				US	2021252052	A1	19 August 2021
				EP	3708183	A1	16 September 2020
				AU	2013312135	A1	02 April 2015
				US	2018214484	A1	02 August 2018
				JP	2019054803	A	11 April 2019
				US	2014065190	A1	06 March 2014
				WO	2014040089	A1	13 March 2014
				EP	2892551	A1	15 July 2015
				ES	2777207	T3	04 August 2020
				US	2017319620	A1	09 November 2017
-----							
CN	112245574	A	22 January 2021	None			
-----							
CN	113440605	A	28 September 2021	None			
-----							
WO	2021233237	A1	25 November 2021	None			
-----							

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12N 5/0784(2010.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</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>C12N; A61K; A61P</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>VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Science, VCN, CNKI, 万方, 百度学术, 读秀, STN: 树突状细胞, dendritic cell, 肿瘤疫苗, cancer vaccine, 纳米微粒, nano-particle, 细胞组分, cell component, 水溶, 非水溶, water-soluble, water-insoluble, 递送, delivery system, 孵育, 激活, co-incubation, activat+, 吞噬, phagocytosis.</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>Y</td> <td>US 2014065173 A1 (Orbis Health Solution LLC) 2014年3月6日 (2014 - 03 - 06) 说明书实施例1-8</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 112245574 A (苏州大学) 2021年1月22日 (2021 - 01 - 22) 权利要求1-10, 说明书第42-166段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 113440605 A (苏州大学) 2021年9月28日 (2021 - 09 - 28) 权利要求1-12</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2021233237 A1 (国家纳米科学中心) 2021年11月25日 (2021 - 11 - 25) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>PATI, R. 等. "Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases" Frontiers in Immunology, 第9卷, 第5期, 2018年10月4日 (2018 - 10 - 04), Article 2224: 1-16</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>REBUMA, F.F. 等. "Nanoparticles versus Dendritic Cells as Vehicles to Deliver mRNA Encoding Multiple Epitopes for Immunotherapy" Molecular Therapy: Methods &amp; Clinical Development, 第16卷, 2020年3月31日 (2020 - 03 - 31), 第50-62页</td> <td>1-10</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	Y	US 2014065173 A1 (Orbis Health Solution LLC) 2014年3月6日 (2014 - 03 - 06) 说明书实施例1-8	1-10	Y	CN 112245574 A (苏州大学) 2021年1月22日 (2021 - 01 - 22) 权利要求1-10, 说明书第42-166段	1-10	Y	CN 113440605 A (苏州大学) 2021年9月28日 (2021 - 09 - 28) 权利要求1-12	1-10	A	WO 2021233237 A1 (国家纳米科学中心) 2021年11月25日 (2021 - 11 - 25) 全文	1-10	A	PATI, R. 等. "Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases" Frontiers in Immunology, 第9卷, 第5期, 2018年10月4日 (2018 - 10 - 04), Article 2224: 1-16	1-10	A	REBUMA, F.F. 等. "Nanoparticles versus Dendritic Cells as Vehicles to Deliver mRNA Encoding Multiple Epitopes for Immunotherapy" Molecular Therapy: Methods & Clinical Development, 第16卷, 2020年3月31日 (2020 - 03 - 31), 第50-62页	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
Y	US 2014065173 A1 (Orbis Health Solution LLC) 2014年3月6日 (2014 - 03 - 06) 说明书实施例1-8	1-10																					
Y	CN 112245574 A (苏州大学) 2021年1月22日 (2021 - 01 - 22) 权利要求1-10, 说明书第42-166段	1-10																					
Y	CN 113440605 A (苏州大学) 2021年9月28日 (2021 - 09 - 28) 权利要求1-12	1-10																					
A	WO 2021233237 A1 (国家纳米科学中心) 2021年11月25日 (2021 - 11 - 25) 全文	1-10																					
A	PATI, R. 等. "Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases" Frontiers in Immunology, 第9卷, 第5期, 2018年10月4日 (2018 - 10 - 04), Article 2224: 1-16	1-10																					
A	REBUMA, F.F. 等. "Nanoparticles versus Dendritic Cells as Vehicles to Deliver mRNA Encoding Multiple Epitopes for Immunotherapy" Molecular Therapy: Methods & Clinical Development, 第16卷, 2020年3月31日 (2020 - 03 - 31), 第50-62页	1-10																					
<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>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年8月3日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年9月1日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>李有朝</p> <p>电话号码 86-(10)-53961930</p>																					

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	薛松 等. “肿瘤抗原冲击的树突状细胞对小鼠肾细胞癌的治疗作用研究” 医学研究生学报, 第23卷, 第5期, 2010年5月31日 (2010 - 05 - 31), 第477-481页	1-10

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/073141

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)
US	2014065173	A1	2014年3月6日	AU 2018203586 A1	2018年7月5日
				US 2021252052 A1	2021年8月19日
				EP 3708183 A1	2020年9月16日
				AU 2013312135 A1	2015年4月2日
				US 2018214484 A1	2018年8月2日
				JP 2019054803 A	2019年4月11日
				US 2014065190 A1	2014年3月6日
				WO 2014040089 A1	2014年3月13日
				EP 2892551 A1	2015年7月15日
				ES 2777207 T3	2020年8月4日
				US 2017319620 A1	2017年11月9日
<hr/>					
CN	112245574	A	2021年1月22日	无	
<hr/>					
CN	113440605	A	2021年9月28日	无	
<hr/>					
WO	2021233237	A1	2021年11月25日	无	
<hr/>					