



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113440605 A

(43)申请公布日 2021.09.28

(21)申请号 202010223563.2

A61K 9/16(2006.01)

(22)申请日 2020.03.26

A61K 9/50(2006.01)

(71)申请人 苏州大学

A61K 47/34(2017.01)

地址 215131 江苏省苏州市相城区济学路8号

A61P 35/00(2006.01)

(72)发明人 刘密

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 常亮

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/39(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 9/14(2006.01)

A61K 9/51(2006.01)

权利要求书1页 说明书23页 附图21页

(54)发明名称

一种全细胞组分的输送系统及其应用

(57)摘要

本申请属于免疫治疗领域,公开了一种利用纳米级尺寸或微米级尺寸的粒子递送全细胞组分的水溶性成分和非水溶性成分的输送系统,以及用于制备预防和治疗癌症的疫苗中的应用。本发明所述全细胞组分的输送系统由纳米级尺寸或微米级尺寸的粒子和所述粒子负载的全细胞组分组成,所述全细胞组分为细胞或组织中全细胞的水溶性成分和非水溶性成分。因为水溶性部分和非水溶性部分都被负载于纳米粒子或微米粒子中,所以细胞组分中因为癌症所产生的变异蛋白质或多肽就都被负载于纳米粒子或微米粒子中。利用全细胞组分中这些因疾病突变而产生的具有免疫原性的物质即可用于癌症的预防和治疗。本发明所述全细胞组分的输送系统可以制备预防和/或治疗癌症的疫苗。

1. 一种全细胞组分的输送系统,由纳米级尺寸或微米级尺寸的粒子和所述粒子负载的全细胞组分组成,所述全细胞组分为细胞或组织中全细胞的水溶性成分和非水溶性成分。

2. 根据权利要求1所述的输送系统,所述负载方式为全细胞的水溶性成分和非水溶性成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。

3. 根据权利要求2所述的输送系统,所述粒子内部和/或表面还包括免疫增强佐剂。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的输送系统,所述细胞或组织中全细胞的水溶性成分为细胞或组织中全细胞的可溶于纯水或不含增溶剂的水溶液中的原水溶性部分;所述细胞或组织中全细胞的非水溶性成分为细胞或组织中全细胞的原非水溶性部分采用适当增溶方法由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。

5. 根据权利要求4所述的输送系统,所述增溶剂为尿素、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、DMSO、乙腈、乙醇、甲醇、DMF、丙醇、异丙醇、吐温、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;所述有机溶剂为DMSO、乙腈、乙醇、甲醇、DMF、异丙醇、二氯甲烷、丙醇、乙酸乙酯。

6. 根据权利要求3所述的输送系统,所述免疫增强佐剂为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、中药类中的至少一类。

7. 根据权利要求3所述的输送系统,所述免疫增强佐剂为模式识别受体激动剂、卡介苗、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、胸腺素、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、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polyICLC、短小棒状杆菌、溶血性链球菌制剂、辅酶Q10、左旋咪唑、聚胞苷酸、白细胞介素、干扰素、聚肌苷酸、聚腺苷酸、明矾、磷酸铝、羊毛脂、植物油、内毒素、脂质体佐剂、GM-CSF、MF59、双链RNA、双链DNA、氢氧化铝、CAF01、人参、黄芪的有效成分中的至少一种。

8. 根据权利要求1-3任一项所述的输送系统,所述纳米级尺寸的粒子的粒径为1nm-1000nm;所述微米级尺寸的粒子的粒径为1 $\mu$ m-1000 $\mu$ m;所述的纳米尺寸粒子或微米尺寸粒子表面为电中性,带负电或者带正电。

9. 根据权利要求1-3任一项所述的输送系统,所述纳米级尺寸或微米级尺寸的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。

10. 根据权利要求9所述的输送系统,所述有机合成高分子材料为PLGA、PLA、PGA、PEG、PCL、Poloxamer、PVA、PVP、PEI、PTMC、聚酸酐、PDON、PPDO、PMMA、聚氨基酸、合成多肽;所述的天然高分子材料为卵磷脂、胆固醇、海藻酸钠、白蛋白、胶原蛋白、明胶、细胞膜成分、淀粉、糖类、多肽;所述的无机材料为三氧化二铁、四氧化三铁、碳酸钙、磷酸钙。

11. 根据权利要求1-3任一项所述的输送系统,其形状为球形、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。

12. 权利要求1所述全细胞组分的输送系统在制备预防和/或治疗癌症的疫苗中的应用。

## 一种全细胞组分的输送系统及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫治疗领域,具体涉及一种全细胞组分的输送系统及其应用,尤其是涉及一种全细胞组分的输送系统及其在制备癌症的预防性和治疗性疫苗中的应用。

### 背景技术

[0002] 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,从而破坏和排斥进入人体的抗原物质(如病毒和细菌等),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。近些年来免疫技术的发展极其迅速,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。

[0003] 最近几年PD-1抗体和CAR-T等疗法相继获批进入临床,其临床效果良好,但是也有很大的局限性。目前基于PD-1抗体和CAR-T的癌症免疫治疗只对某一部分特定患者有效。以CAR-T为例,由于其所采用的抗原靶点为CD19、CD20和CD22等B细胞表面特异性的靶点在实体瘤中极难发现或几乎没有,所以CAR-T等疗法目前只适用于血液肿瘤的治疗。

[0004] 为了改善实体瘤等的治疗,美国和德国的科学家等采用新技术从癌症病人的肿瘤细胞分析鉴别癌症特异性的或癌症相关的抗原多肽,然后体外人工合成以制备癌症疫苗用于癌症的治疗。该技术在癌症病人的临床试验中表现出了一定的疗效。但是该类方法费时费力,花费巨大。而且所采用的方法都是只从癌细胞水溶性组分中提取分析癌细胞与正常细胞的差异进而寻找有差异的多肽,因而该类方法和技术只能找到有限的几种水溶性好的抗原多肽,从而极大的限制了该类方法的应用。而人体真实环境中的免疫原性强的抗原蛋白质或多肽很多都是在纯水中不溶的,需要借助与蛋白质结合、吸附或者位于膜上或膜表面以存在于体内,所以这部分不溶于纯水中的非水溶性蛋白质和多肽就非常重要和关键。而目前尚未有方法可以将癌细胞全细胞组分作为疫苗用于预防和治疗癌症。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于针对现有技术存在的问题,提供一种既包含水溶性组分又包含不溶于纯水或不含增溶剂的水溶液的非水溶性组分的全细胞组分的输送系统及其应用。

[0006] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种全细胞组分的输送系统,由纳米级尺寸或微米级尺寸的粒子和所述粒子负载的全细胞组分组成,所述全细胞组分为细胞或组织中全细胞的水溶性成分和非水溶性成分。

[0008] 在本发明所述的输送系统中,所述负载方式为全细胞的水溶性成分和非水溶性成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成分同时装载于粒子中和负载于粒子表面,非水溶性成分同时装载于粒子中和负载于粒子表面,水溶性成分装载于粒子中而非水溶性成分负载于粒子表面,非水溶性成分装载于

粒子中而水溶性成分负载于粒子表面,水溶性成分和非水溶性成分装载于粒子中而只有非水溶性成分负载于粒子表面,水溶性成分和非水溶性成分装载于粒子中而只有水溶性成分负载于粒子表面,水溶性成分装载于粒子中而水溶性成分和非水溶性成分同时负载于粒子表面,非水溶性成分装载于粒子中而水溶性成分和非水溶性成分同时负载于粒子表面,水溶性成分和非水溶性成分同时装载于粒子中而且水溶性成分和非水溶性成分同时负载于粒子表面。

[0009] 在一些实施方案中,所述的输送系统中,所述粒子内部和/或表面还包括免疫增强佐剂。

[0010] 所述的免疫增强剂的添加方式包括装载于纳米粒子或微米粒子内,或者负载于纳米粒子或微米粒子表面,或者同时装载于纳米粒子或微米粒子内及负载于纳米粒子或微米粒子表面。

[0011] 在本发明所述的输送系统中,所述全细胞组分按照在纯水或不含增溶剂的水溶液中的溶解性可分为两部分:水溶性成分和非水溶性成分。所述水溶性成分为可溶于纯水或不含增溶剂的水溶液的原水溶性部分,所述非水溶性成分为在纯水中不溶的原非水溶性部分,采用适当增溶方法由在纯水或不含增溶剂的水溶液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。所述全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或有机溶剂溶解。

[0012] 在本发明所述的输送系统中,所述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;所述有机溶剂为可以溶解蛋白质或多肽的有机溶剂。

[0013] 在本发明所述的输送系统中,所述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、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。

[0014] 在本发明所述的输送系统中,所述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。

[0015] 在本发明所述的输送系统中,所述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。

[0016] 在本发明中,所述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)、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、白细胞介素、干扰素、聚肌苷酸、聚腺苷酸、明矾、磷酸铝、羊毛脂、植物油、内毒素、脂质体佐剂、GM-CSF、MF59、双链RNA、双链DNA、氢氧化铝、CAF01、人参、黄芪的有效成分

中的至少一种。

[0017] 本领域技术人员可以理解,所述免疫增强佐剂也可采用其他可使免疫反应增强的物质。

[0018] 在本发明所述的输送系统中,所述纳米级尺寸的粒子的粒径为1nm-1000nm。在一些实施方案中,所述纳米尺寸粒子的粒径为50nm-800nm。进一步的,在一些实施方案中,所述纳米尺寸粒子的粒径为100nm-600nm。

[0019] 在本发明所述的输送系统中,所述微米级尺寸的粒子的粒径为1 $\mu$ m-1000 $\mu$ m。在一些实施方案中,所述微米尺寸粒子的粒径为1 $\mu$ m-100 $\mu$ m。在一些实施方案中,所述微米尺寸粒子的粒径为1 $\mu$ m-10 $\mu$ m。进一步的,在一些实施方案中,所述微米尺寸粒子的粒径为1 $\mu$ m-5 $\mu$ m。

[0020] 在本发明所述的输送系统中,所述的纳米尺寸粒子或微米尺寸粒子表面可为电中性,带负电或者带正电。

[0021] 在本发明所述的输送系统中,所述纳米级尺寸或微米级尺寸的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。

[0022] 其中所述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PLGA、PLA、PGA、Poloxamer、PEG、PCL、PEI、PVA、PVP、PTMC、聚酸酐、PDON、PPDO、PMMA、聚氨基酸、合成多肽。

[0023] 所述的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、糖类、多肽、海藻酸钠、白蛋白、胶原蛋白、明胶、细胞膜成分。

[0024] 所述的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。

[0025] 本发明所述的输送系统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。

[0026] 本发明所述的输送系统的可以按照纳米尺寸粒子和微米尺寸粒子已开发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,所述的输送系统采用溶剂挥发法中的复乳法制备得到。

[0027] 本发明所述全细胞组分的输送系统可将装载的全细胞组分递送给相关免疫细胞,通过所装载成分的免疫原性而激活和增强自身免疫系统对癌细胞的杀伤作用。因此本发明还提供了所述全细胞组分的输送系统在制备预防和/或治疗癌症的疫苗中的应用。

[0028] 本发明所述全细胞组分的输送系统在预防或治疗疾病时可以同时使用只负载水溶性组分的纳米粒子或微米粒子和只负载非水溶性组分的纳米粒子或微米粒子、使用只负载水溶性组分的纳米粒子或微米粒子、使用只负载非水溶性组分的纳米粒子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或微米粒子。

[0029] 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非水溶性成分的输送系统,以及用于制备预防和/或治疗癌症的疫苗中的应用。因为相关细胞或组织的全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纳米粒子或微米粒子中,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纳米粒子或微米粒子中。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免疫反应。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癌症的治疗。

[0030] 本发明所述全细胞组分的输送系统可以制备预防和/或治疗癌症的疫苗。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或癌症发生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。

## 附图说明

[0031] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0032] 图1示本发明所述疫苗的制备过程及应用领域示意图;a:水溶性组分和非水溶性组分分别收集和制备纳米疫苗或微米疫苗的示意图;b:采用含有增溶剂的增溶液溶解全细胞组分和制备纳米疫苗或微米疫苗的示意图;

[0033] 图2-图17为载有水溶性和非水溶性细胞组分的纳米尺寸粒子或微米尺寸粒子的结构示意图,其中1:细胞或组织组分中的水溶性成分;2,细胞或组织组分中的非水溶性成分;3,免疫增强佐剂;4,纳米粒子或微米粒子;5:纳米粒子中的内核部分;图2-图5中纳米粒子或微米粒子表面和内部均含有免疫增强佐剂;图6-图9中免疫增强剂只分布于纳米粒子或微米粒子的内部;图10-图13中纳米粒子或微米粒子只在外表面含有免疫增强佐剂;图14-图17纳米粒子或微米粒子内部和外表面均无免疫增强佐剂;图2,图6,图10和图14中纳米粒子或微米粒子所负载的细胞或组织组分中的水溶性成分或非水溶性成分分布于纳米粒子或微米粒子内部时未形成明显的内核;图3,图7,图11和图15中纳米粒子或微米粒子所负载的细胞或组织组分中的水溶性成分或非水溶性成分分布于纳米粒子或微米粒子内部时形成了一个内核部分,内核可为制备过程中生成或通过使用聚合物或无机盐等方式形成;图4,图8,图12和图16中纳米粒子或微米粒子所负载的细胞或组织组分中的水溶性成分或非水溶性成分分布于纳米粒子或微米粒子内部时形成了多个内核部分,内核可为制备过程中生成或通过使用聚合物或无机盐等方式形成;图5,图9,图13和图17中纳米粒子或微米粒子所包载的细胞或组织组分中的水溶性成分或非水溶性成分分布于纳米粒子或微米粒子内部时位于所形成内核的外层;a:纳米粒子或微米粒子内部包载和表面负载的均为细胞或组织组分中的水溶性成分;b:纳米粒子或微米粒子内部包载和表面负载的均为细胞或组织组分中的非水溶性成分;c:纳米粒子或微米粒子内部包载的为细胞或组织组分中的非水溶性成分而表面负载的均为细胞或组织组分中的水溶性成分;d:纳米粒子或微米粒子内部包载的为细胞或组织组分中的水溶性成分而表面负载的均为细胞或组织组分中的非水溶性成分;e:纳米粒子或微米粒子内部同时包载的细胞或组织组分中的水溶性成分和非水溶性成分,而纳米粒子或微米粒子表面也同时负载细胞或组织组分中的水溶性成分和非水溶性成分;f:纳米粒子或微米粒子内部同时包载的细胞或组织组分中的水溶性成分和非水溶性成分,而纳米粒子或微米粒子表面只负载细胞或组织组分中的水溶性成分;g:纳米粒子或微米粒子内部同时包载的细胞或组织组分中的水溶性成分和非水溶性成分,而纳米粒子

或微米粒子表面只负载细胞或组织组分中的非水溶性成分;h:纳米粒子或微米粒子内部只负载的细胞或组织组分中的非水溶性成分,而纳米粒子或微米粒子表面同时负载细胞或组织组分中的水溶性成分和非水溶性成分;i:纳米粒子或微米粒子内部只负载的细胞或组织组分中的水溶性成分,而纳米粒子或微米粒子表面同时负载细胞或组织组分中的水溶性成分和非水溶性成分;

[0034] 图18-21分别为实施例1-3中纳米疫苗用于治疗黑色素瘤时对小鼠肿瘤生长速度和生存期影响的实验结果;a,纳米疫苗治疗对肿瘤生长速度的抑制效果实验( $n \geq 8$ );b,纳米疫苗治疗对小鼠接种肿瘤生存期影响的实验( $n \geq 8$ ),每个数据点为平均值 $\pm$ 标准误差(mean $\pm$ 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;\*表示该组与PBS空白对照组相比 $p < 0.05$ ,有显著性差异;☆代表该组与空白纳米粒+细胞裂解物+PD-1抗体对照组相比 $p < 0.05$ ,有显著性差异;

[0035] 图22为实施例4和5中纳米疫苗用于预防黑色素瘤时对小鼠肿瘤生长速度和生存期影响的实验结果;a,纳米疫苗治疗对肿瘤生长速度的抑制效果实验( $n \geq 8$ );b,纳米疫苗治疗对小鼠接种肿瘤生存期影响的实验( $n \geq 8$ ),每个数据点为平均值 $\pm$ 标准误差(mean $\pm$ 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;\*表示该组与PBS空白对照组相比 $p < 0.05$ ,有显著性差异;

[0036] 图23-28分别为实施例6-11中纳米疫苗或微米疫苗用于预防或治疗乳腺癌时对小鼠肿瘤生长速度和生存期影响的实验结果;a,纳米疫苗或微米疫苗治疗对肿瘤生长速度的抑制效果实验( $n \geq 7$ );b,纳米疫苗或微米疫苗治疗对小鼠接种肿瘤生存期影响的实验( $n \geq 7$ ),每个数据点为平均值 $\pm$ 标准误差(mean $\pm$ 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;\*表示该组与PBS空白对照组相比 $p < 0.05$ ,有显著性差异;☆代表该组与空白纳米粒+细胞裂解物+PD-1抗体对照组相比 $p < 0.05$ ,有显著性差异。

### 具体实施方式

[0037] 本发明公开了一种全细胞组分的输送系统及其应用。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及产品已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0038] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0039] 一种全细胞组分的输送系统,由纳米级尺寸或微米级尺寸的粒子和所述粒子负载的全细胞组分组成,所述全细胞组分为细胞或组织中全细胞的水溶性成分和非水溶性成分。

[0040] 本发明在将癌细胞或组织裂解后首先获取在纯水或不含增溶剂的水溶液中可溶的水溶性组分,尔后采用含有增溶剂的增溶水溶液将水不溶性的组分溶解于增溶液中,这样就可将所有的细胞组分都转变为可在水溶液中溶解的组分并进而将其负载于纳米粒子

或微米粒子内外以制备纳米疫苗或微米疫苗用于癌症的预防和治疗。在实际应用中也可将细胞或组织裂解后直接采用含有增溶剂的增溶水溶液溶解全细胞组分而不分别收集水溶性组分和非水溶性组分,并采用增溶水溶液溶解后的全细胞组分制备纳米疫苗或微米疫苗。

[0041] 本发明通过采用含有增溶剂的水溶液将细胞中不溶于纯水或不含增溶剂水溶液的组分转化为在特定增溶溶液中可溶并可被用于制备纳米粒子和微米粒子,从而提高了纳米粒子或微米粒子所负载的抗原物质或成分的全面性和免疫原性。

[0042] 本发明将癌细胞或肿瘤组织中全细胞组分为可在纯水或不含增溶剂水溶液中溶解的水溶性部分和可用一定增溶剂溶解于水溶液中的非水溶性部分,并将水溶性部分和非水溶性部分包载于纳米粒子或微米粒子中和负载于其表面,从而保证了绝大部分抗原物质被负载于所制备的疫苗中。

[0043] 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和组分。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机体针对癌细胞的免疫反应。利用全细胞组分中这些因为疾病突变而产生的具有癌细胞特异性免疫原性的物质即可用于癌症的预防和治疗。

[0044] 为了增强疫苗的免疫原性和效果也可在其中加入一定的具有免疫调节功能的免疫增强剂。

[0045] 本发明所述全细胞组分的输送系统可用于制备预防和/或治疗癌症的疫苗,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疫苗或微米疫苗;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疫苗或微米疫苗。

[0046] 本发明所述全细胞组分在裂解前或(和)裂解后既可经过灭活或(和)变性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放射线辐照、高压、冷冻干燥和甲醛等灭活或变性处理方法。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。

[0047] 本发明所述全细胞组分的输送系统其结构示意图如图2-图17所示。在实际使用过程中可以为只使用其中的某一种特定结构的纳米粒子或微米粒子,或者是同时使用两种或两种以上的不同结构的纳米粒子或微米粒子。

[0048] 在实施例中,免疫增强剂包载于纳米粒子或微米粒子内并同时负载于纳米粒子或微米粒子表面,在实际使用过程中免疫增强剂也可只包载于纳米粒子或微米粒子内,或者只负载于纳米粒子或微米粒子表面,或者不加入免疫增强剂。

[0049] 在一些实施例中,如图2,本发明先将细胞组分中的可溶于纯水的水溶性部分或(和)非水溶性部分经增溶剂进行增溶后包载于纳米粒子或微米粒子内,同时包载免疫增强



剂;然后,将细胞组分中的水溶性部分或(和)非水溶性部分吸附于纳米粒子表面,同时吸附有免疫增强剂。这样就使得纳米粒子或微米粒子中细胞的水溶性组分或非水溶性组分的负载能力可以达到最大。在实际应用中,也可以直接采用含有增溶剂的增溶液(如8M尿素水溶液或6M盐酸胍水溶液)直接裂解细胞或组织并直接溶解全细胞组分,尔后以此制备纳米疫苗或微米疫苗。

[0050] 在本发明所述制备纳米疫苗及微米疫苗的方法为常用制备方法。在一些实施方案中,制备纳米疫苗采用溶剂挥发法中的复乳法,所采用的纳米粒子制备材料为有机高分子聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)分子量为24KDa-38KDa,所采用的免疫佐剂为poly(I:C)、卡介苗(BCG)或CpG。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对制备方法、制备过程、所采用的纳米粒子制备材料、免疫佐剂的种类和浓度等进行适当调整。

[0051] 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:

[0052] 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。

[0053] 在一些实施例中,水相溶液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8M尿素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8M尿素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1ng/mL,之所以选择这样的浓度,是发明人经大量试验发现,一般所用细胞裂解物水溶液浓度越大,制备的纳米粒中包载的各类癌症抗原越多,当制备得到的蛋白质多肽浓度大于1ng/mL,也即第一预定浓度大于1ng/mL时,才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0.01ng/mL。另外,第一预定体积为600 $\mu$ L。

[0054] 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8M尿素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8M尿素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1ng/mL,之所以选择这样的浓度,是发明人经大量试验发现,一般所用肿瘤组织裂解物水溶液浓度越大,制备的纳米粒中包载的各类癌症抗原越多,当制备得到的蛋白质多肽浓度大于1ng/mL,也即第一预定浓度大于1ng/mL时,才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0.01ng/mL。另外,第一预定体积为600 $\mu$ L。

[0055] 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,得到的有机相的体积,也即第二预定体积为2mL。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100mg/mL。

[0056] 在本发明中,之所以选择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,因而适合作为疫苗制备时的辅料。

[0057] 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的尺寸大小。

[0058] 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。

[0059] 该步骤是为了进行纳米化,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2秒,搅拌速度大于50rpm,搅拌时间大于1分钟。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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5mL,第三预定浓度为20mg/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。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 本步骤中,乳化剂水溶液依然为PVA,第四预定体积为大于50mL,

[0066] 第四预定浓度为5mg/mL,第四预定浓度的选择,以得到尺寸大小合适的纳米粒为依据。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。

[0067] 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。

[0068] 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100RPM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。

[0069] 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表面吸附癌细胞裂解物的相关实验。

[0070] 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表面吸附癌细胞裂解物的相关实验。

[0071] 在本发明中,所述冻干保护剂选用海藻糖(Trehalose)。

[0072] 在本发明中,该步骤的冻干保护剂的第五预定体积为20mL,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。

[0073] 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。

[0074] 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静置大于1分钟即得纳米疫苗或微米疫苗。

[0075] 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。

[0076] 在一些实施例中,所述重悬的纳米粒子混悬液体积为10mL,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1mL。

[0077] 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溶于8M尿素中的原非水溶性组分中含有poly (I:C)、卡介苗 (BCG) 或CpG,且poly (I:C)、BCG或CpG的浓度为大于1ng/mL。

[0078] 纳米疫苗或微米疫苗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。纳米疫苗的粒径大小为1nm-1000nm,更优选地,粒径大小为30nm-1000nm,最优选地,粒径大小为100nm-600nm;微米疫苗的粒径大小为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。本实施例中,纳米粒疫苗粒径大小为100nm-600nm,微米疫苗粒径大小为1 $\mu$ m-5 $\mu$ m。

[0079] 另外,在本发明中,采用尿素和盐酸胍来增溶癌细胞裂解物或肿瘤组织裂解物中的原非水溶性组分,在实际使用中亦可使用任何其他可使癌细胞裂解物或肿瘤组织裂解物中的原非水溶性组分溶解于水溶液的增溶物质,如脱氧胆酸钠,SDS,pH大于7的碱性溶液,pH小于7的酸性溶液,白蛋白,卵磷脂、高浓度无机盐、Triton、吐温、DMSO、乙腈、乙醇、甲醇、DMF、异丙醇、丙醇、醋酸、胆固醇、氨基酸、糖苷、胆碱、Brij<sup>TM</sup>-35、Octaethylene glycol monododecyl ether、CHAPS、Digitonin、lauryldimethylamine oxide、IGEPAL<sup>®</sup>CA-630;或者也可以使用上述增溶液同时溶解水溶性组分和非水溶性组分。

[0080] 另外,在本发明中,采用8M的尿素和6M的盐酸胍水溶液来增溶癌细胞裂解物或肿瘤组织裂解物中的原非水溶性组分,在实际使用中亦可使用任何其他可使癌细胞裂解物或肿瘤组织裂解物中的原非水溶性组分溶解于水溶液的尿素浓度或盐酸胍浓度;或者使用8M尿素水溶液同时溶解水溶性组分和非水溶性组分。

[0081] 另外,在本发明中,纳米疫苗的制备采用复乳法,在实际中也可采用任何其他常用的纳米粒子或微米粒子制备方法。

[0082] 另外,在本发明中,纳米疫苗的制备材料为PLGA,在实际中亦可采用任何其他可以制备纳米粒子或微米粒子的材料。

[0083] 另外,在本发明中,癌细胞裂解物或肿瘤组织裂解物中水溶性组分或者溶于8M尿素中的原非水溶性组分分别包载在纳米粒子内部和吸附在纳米粒子表面,在实际使用时,癌细胞裂解物或肿瘤组织裂解物中水溶性组分和溶于8M尿素中的原非水溶性组分亦可混合后再包载到纳米粒子内部或吸附到纳米粒子表面;或者也可以采用8M尿素同时溶解水溶性组分和非水溶性组分然后包载于纳米粒子或微米粒子内部和/或吸附于纳米粒子或微米粒子表面。

[0084] 另外,在本发明中,采用poly (I:C)、卡介苗 (BCG) 和CpG为免疫佐剂,在实际中亦可

不加入免疫佐剂或者加入任何其他具有免疫增强功能的免疫佐剂,如模式识别受体激动剂、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、白细胞介素、干扰素、聚肌苷酸、聚腺苷酸、明矾、磷酸铝、羊毛脂、植物油、内毒素、脂质体佐剂、GM-CSF、MF59、双链RNA、双链DNA、氢氧化铝、CAF01、人参、黄芪等中药有效成分。

[0085] 另外,在本发明中,部分实施例中采用的疫苗为纳米疫苗,部分实施例采用的是微米疫苗。本领域技术人员在实际中可以根据实际情况选择采用纳米疫苗或微米疫苗。

[0086] 为了进一步理解本发明,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0087] 如无特殊说明,本发明实施例中所使用的方法均为常规方法;所使用的材料、试剂等均可从商业途径得到。本发明实施例中所涉及到的纳米尺寸粒子或微米尺寸粒子结构、制备方法、疾病治疗时的使用策略、与其他免疫治疗药物的联用策略、与其他靶向治疗药物的联用策略等仅为代表性方法,其他纳米尺寸粒子或微米尺寸粒子结构、制备方法、疾病治疗时的使用策略、与其他免疫治疗药物的联用策略、与其他靶向治疗药物的联用策略亦可采用本发明所述的方法。实施例中仅列出了本发明在部分癌症中的应用,但是本发明亦可用在其他癌症。对于实施例中所用到的具体方法或材料,本领域技术人员可以在本发明技术思路的基础上,根据已有的技术进行常规的替换选择,而不仅限于本发明实施例的具体记载。

[0088] PD-1抗体因为其优异的临床疗效而获批用于很多癌症的治疗,为此,本发明实施例中,申请者除了只应用所述纳米或微米疫苗治疗癌症以外也测试了纳米或微米疫苗与PD-1抗体联用治疗癌症。在实际应用时具体给药时间、给药次数、给药方案、与其他药物联用情况可根据情况调整。

[0089] 实施例1、黑色素瘤细胞全细胞组分负载于纳米粒子内部和表面用于癌症的治疗

[0090] 本实施例以小鼠黑色素瘤为癌症模型来说明如何制备负载有全细胞组分的纳米疫苗,并应用该疫苗治疗黑色素瘤。

[0091] PD-1抗体因为其优异的临床疗效而获批用于很多癌症的治疗。为此,本实施例中,申请者除了只应用所述纳米疫苗治疗黑色素瘤以外也测试了纳米疫苗与PD-1抗体联用以治疗黑色素瘤。在实际应用时具体给药时间、给药次数、给药方案可根据情况调整。

[0092] 本实施例中,以B16F10小鼠黑色素瘤细胞为癌细胞模型。首先裂解B16F10以制备B16F10细胞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Polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C))为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有B16F10细胞的水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗。然后采用该纳米疫苗来治疗B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠体内的肿瘤。

[0093] (1) 癌细胞的裂解及各组分的收集

[0094] 收集一定量的B16F10细胞,去除培养基后采用-20℃到-273℃冷冻,加一定量超纯水后反复冻融3次以上,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100g的转速离心1分钟以上并取上清液即为B16F10中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B16F10中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。上述所得来源于癌细胞裂解物的水溶性组分和溶解于8M尿素中的原非水溶性组分即为制备用于治疗癌症的纳米疫苗的原料来源。

[0095] (2) 纳米疫苗的制备

[0096] 本实施例中制备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,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吸附于纳米粒子表面。制备方法如前所述。在纳米粒子表面负载细胞组分和免疫佐剂之前纳米粒子平均粒径为250nm左右,纳米粒子表面吸附细胞组分和免疫佐剂后所得纳米疫苗平均粒径为300nm左右,纳米疫苗表面电位Zeta potential为-5mV左右。每1mg PLGA纳米粒子约负载150μg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0.01mg且内外各半。空白纳米粒粒径为215nm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,空白纳米粒子外表面吸附与纳米疫苗等量的poly (I:C) 。

[0097] (3) 纳米疫苗用于癌症的治疗

[0098] 本研究分别研究两种不同的给药方式:只使用纳米疫苗;纳米疫苗与PD-1抗体联用。对照组分别是PBS组和PD-1抗体+空白纳米粒+细胞裂解物组。

[0099] 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。

[0100] 只使用纳米疫苗组给药方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射200μL内部和表面都负载癌细胞裂解物中水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子和200μL内部和表面都负载溶于8M尿素中原非水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子。

[0101] 纳米疫苗与PD-1抗体联用组给药方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射200μL内部和表面都负载癌细胞裂解物中水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子和200μL内部和表面都负载溶于8M尿素中原非水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子。在第3天、第6天、第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为10mg/kg。

[0102] PBS空白对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射400μL PBS。

[0103] PD-1抗体+空白纳米粒+细胞裂解物对照组:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射等量癌细胞裂解物中水溶性成分,等量癌细胞裂解物中溶于8M尿素中的原非水溶性成分以及负载等量poly (I:C) 而不负载任何细胞裂解物成分的4mg PLGA空白纳米粒。注意以上三者需分开给药并注射在不同部位,以免游离的细胞裂解物吸附于空白纳米粒表面。在第3天,第6天,第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为10mg/kg。

[0104] 在实验中,从第6天开始每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52*a*b^2$ 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。

#### [0105] (4) 实验结果

[0106] 如图18所示,与PBS空白对照组相比,空白纳米粒+细胞裂解物+PD1抗体对照组小鼠肿瘤生长速度明显变慢 ( $p<0.05$ ) 且小鼠生存期明显延长 ( $p<0.05$ )。其次,与PBS空白对照组和空白纳米粒+细胞裂解物+PD1抗体对照组相比,纳米疫苗单独给药组和纳米疫苗+PD1抗体联用组肿瘤生长速度明显变慢 ( $p<0.05$ ) 且小鼠生存期明显延长 ( $p<0.05$ )。而且,两组给药组中有25%的小鼠被治愈肿瘤完全消失。当采用该实施例中纳米疫苗与PD1抗体联用的给药方案时,二者在延长小鼠生存期方面的协同效应不显著。

[0107] 综上所述,本发明所述的负载癌细胞水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗对黑色素瘤具有治疗效果且可部分治愈黑色素瘤。

[0108] 实施例2、黑色素瘤癌细胞水溶性细胞组分负载于纳米粒子内部和表面用于癌症的治疗

[0109] 本实施例以小鼠黑色素瘤为癌症模型来说明如何制备只负载有细胞组分中水溶性部分的纳米疫苗,并应用该疫苗治疗黑色素瘤。

[0110] PD-1抗体因其优异的临床疗效而获批用于很多癌症的治疗。为此,本实施例中,申请者应用所述纳米疫苗与PD-1抗体联用以治疗黑色素瘤。在实际应用时,也可以只应用细胞组分中的原非水溶性部分制备的纳米疫苗进行治疗。此外,具体给药时间、给药次数、给药方案可根据情况调整。

[0111] 本实施例中,以B16F10小鼠黑色素瘤细胞为癌细胞模型。首先裂解B16F10以制备B16F10细胞的水溶性组分和非水溶性组分。然后,以有机高分子材料PLGA为纳米粒子骨架材料,以poly (I:C) 为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有B16F10细胞的水溶性组分的纳米疫苗。然后采用该纳米疫苗来治疗黑色素瘤荷瘤小鼠体内的肿瘤。

#### [0112] (1) 癌细胞的裂解及各组分的收集

[0113] 收集一定量的B16F10细胞,去除培养基后采用-20℃到-273℃冷冻,加一定量超纯水后反复冻融3次以上,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100g的转速离心5min取上清液即为B16F10中可溶于纯水的水溶性组分。上述所得来源于癌细胞裂解物的水溶性组分即为制备用于治疗癌细胞的纳米疫苗的原料来源。

#### [0114] (2) 纳米疫苗的制备

[0115] 本实施例中制备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,所采用的纳米粒子制备材料为有机高分子材料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吸附于纳米粒子表面。制备方法如前所述。在纳米粒子表面负载细胞组分和免疫佐剂之前纳米粒子平均粒径为250nm左右,纳米粒子表面吸附细胞组分和免疫佐剂后所得纳米疫苗粒径为300nm左右,纳米粒子平均表面电位Zeta potential为-5mV左右。每1mg PLGA纳米粒子负载150μg蛋白质或多肽组分,每1mgPLGA纳米粒内外所使用的poly (I:C) 免疫佐剂为0.01mg且内外各半。空白纳米粒粒径为215nm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,空白纳米粒子外表面吸附与纳米疫苗等量的poly (I:C)。

#### [0116] (3) 纳米疫苗用于癌症的治疗

[0117] 研究采用只含水溶性组分的纳米疫苗与PD-1抗体联用治疗癌症。

[0118] 选取6-8周的雌性C57BL/6制备黑色素瘤荷瘤小鼠。

[0119] 纳米疫苗与PD-1抗体联用组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞。在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射200 $\mu$ L内部和表面都负载有癌细胞裂解物中水溶性成分的2mg PLGA纳米疫苗,200 $\mu$ L负载等量poly (I:C)的2mg PLGA空白纳米粒以及细胞裂解物中的溶于8M尿素的非水溶性组分(含等量poly (I:C)),三者注射于不同皮下部位。在第3天、第6天、第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为10mg/kg。

[0120] PBS空白对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞。在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射400 $\mu$ L PBS。

[0121] PD-1抗体+空白纳米粒+细胞裂解物对照组:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞。在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射200 $\mu$ L等量癌细胞裂解物中水溶性成分,200 $\mu$ L等量癌细胞裂解物中溶于8M尿素中的原非水溶性成分以及负载有等量poly (I:C)而不负载任何细胞裂解物成分的4mg PLGA空白纳米粒。注意以上三者需分开给药并注射在不同部位,以免游离的细胞裂解物吸附于空白纳米粒表面。在第3天,第6天,第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为10mg/kg。

[0122] 在实验中,从第6天开始每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52*a*b^2$ 计算,其中 $v$ 为肿瘤体积, $a$ 为肿瘤长度, $b$ 为肿瘤宽度。由于动物实验伦理,在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过2000 $mm^3$ 即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

[0123] (4) 实验结果

[0124] 如图19所示,与PBS空白对照组相比,空白纳米粒+细胞裂解物+PD-1抗体对照组和纳米疫苗给药组中小鼠肿瘤体积生长速度均明显变慢( $p<0.05$ )且小鼠生存期均明显延长( $p<0.05$ )。而且,与空白纳米粒+细胞裂解物+PD-1抗体对照组相比,纳米疫苗给药组中小鼠的肿瘤生长速度明显变慢( $p<0.05$ )。并且,在纳米疫苗给药组中有12.5%的小鼠被治愈肿瘤完全消失。由此可见,本发明所述的负载癌细胞水溶性组分的纳米疫苗对黑色素瘤具有治疗效果且可部分治愈黑色素瘤。

[0125] 实施例3、黑色素瘤肿瘤组织裂解组分负载于纳米粒子内部和表面用于癌症的治疗

[0126] 本实施例以小鼠黑色素瘤来说明如何制备负载有黑色素瘤肿瘤组织裂解物组分的纳米疫苗,并应用该疫苗治疗黑色素瘤。

[0127] 本实施例中,申请者测试了所述纳米疫苗与PD-1抗体联用治疗黑色素瘤的效果,在实际应用中也可只使用纳米疫苗治疗癌症。

[0128] 本实施例中,将小鼠黑色素瘤肿瘤组织裂解组分负载于纳米粒子内部和表面以制备纳米疫苗。首先取得小鼠黑色素瘤肿瘤瘤块并将其裂解以制备瘤块组织的水溶性组分和溶于8M尿素中的原非水溶性组分。然后,以PLGA为纳米粒骨架材料,以poly (I:C)为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有肿瘤组织裂解物的水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗。然后采用该纳米疫苗来治疗黑色素瘤荷瘤小鼠体内的肿瘤。

[0129] (1) 肿瘤组织的裂解及各组分的收集

[0130] 在每只C57BL/6小鼠背部皮下接种150000个B16F10黑色素瘤细胞,在各只小鼠所接种肿瘤长到体积分别为约80 $mm^3$ 、200 $mm^3$ 、400 $mm^3$ 、1000 $mm^3$ 时处死小鼠并摘取肿瘤组织。将

相同大小的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。待肿瘤组织部位细胞裂解后,将瘤块组织的细胞裂解物以大于12000RPM的转速离心5min取上清液即为瘤块组织中可溶于纯水的水溶性组分;在所得沉淀部分中加入8M尿素水溶液溶解沉淀部分即可将不溶于纯水的原非水溶性组分转化为在8M尿素水溶液中可溶。上述所得肿瘤组织裂解物的水溶性组分和溶解于8M尿素中的原非水溶性组分即为制备用于治疗癌细胞的纳米疫苗的原料来源。

#### [0131] (2) 纳米疫苗的制备

[0132] 本实施例中制备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,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吸附于纳米粒子表面。制备方法如前所述。在纳米粒子表面负载细胞组分和免疫佐剂之前纳米粒子平均粒径为250nm左右,纳米粒子表面吸附细胞组分和免疫佐剂后所得纳米疫苗粒径为300nm左右,纳米粒子平均表面电位Zeta potential为-5mV左右。每1mg PLGA纳米粒子负载160 $\mu$ g蛋白质或多肽组分,每1mgPLGA纳米粒内外所使用的poly (I:C) 免疫佐剂为0.01mg且内外各半。空白纳米粒粒径为215nm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,空白纳米粒子表面吸附与纳米疫苗等量的poly (I:C) 。

#### [0133] (3) 纳米疫苗用于癌症的治疗

[0134] 选取6-8周的雌性C57BL/6制备黑色素瘤荷瘤小鼠。

[0135] 纳米疫苗组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞,在第4天、第7天、第10天、15天和第20天分别皮下注射200 $\mu$ L内部和表面都负载肿瘤组织裂解物中水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子和200 $\mu$ L内部和表面都负载溶于8M尿素中原非水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子。其中第4天和第7天所注射纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约80mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,第10天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约200mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,第15天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约400mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,第20天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约1000mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块。在第3天,第6天,第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为10mg/kg。

[0136] PBS空白对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射400 $\mu$ L PBS。

[0137] PD-1抗体+空白纳米粒+细胞裂解物对照组:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射等量癌细胞裂解物中水溶性成分,等量癌细胞裂解物中溶于8M尿素中的原非水溶性成分以及负载有等量poly (I:C) 而不负载任何细胞裂解物成分的4mg PLGA空白纳米粒。注意以上三者需分开给药并注射在不同部位,以免游离的细胞裂解物吸附于空白纳米粒表面。在第3天,第6天,第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为10mg/kg。

[0138] 在实验中,从第6天开始每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52*a*b^2$ 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。

#### [0139] (4) 实验结果



[0140] 如图20所示,与PBS空白对照组以及空白纳米粒+组织裂解物+PD1抗体对照组相比,纳米疫苗给药组肿瘤体积增长速度明显变慢( $p < 0.05$ )且小鼠生存期明显延长( $p < 0.05$ )。而且,纳米疫苗给药组有25%的小鼠被治愈肿瘤完全消失。由此可见,本发明所述的负载肿瘤组织裂解物中水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗对黑色素瘤具有治疗效果且可部分治愈黑色素瘤。

[0141] 实施例4、黑色素瘤癌细胞全细胞组分负载于纳米粒子内部和表面用于癌症的预防

[0142] 本实施例以小鼠黑色素瘤为癌症模型来说明如何制备负载有全细胞组分的纳米疫苗,并应用该疫苗预防黑色素瘤。

[0143] 本实施例中,以B16F10小鼠黑色素瘤细胞为癌细胞模型。首先裂解B16F10细胞以制备B16F10细胞的水溶性组分和非水溶性组分。然后,以PLGA为纳米粒子骨架材料,以poly(I:C)为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有B16F10细胞的水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗。然后采用该纳米疫苗来预防黑色素瘤。

[0144] (1) 癌细胞的裂解及各组分的收集

[0145] 癌细胞的裂解方法及各组分的收集方法与实施例1相同。

[0146] (2) 纳米疫苗的制备

[0147] 本实施例中制备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,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吸附于纳米粒子表面。制备方法如前所述。在纳米粒子表面负载细胞组分和免疫佐剂之前纳米粒子平均粒径为250nm左右,纳米粒子表面吸附细胞组分和免疫佐剂后所得纳米疫苗粒径为300nm左右,纳米粒子平均表面电位Zeta potential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1mg PLGA纳米粒内外所使用的poly(I:C)免疫佐剂为0.01mg且内外各半。空白纳米粒粒径为215nm左右,空白纳米粒制备时分别采用含有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,空白纳米粒子表面吸附与纳米疫苗等量的poly(I:C)。

[0148] (3) 纳米疫苗用于癌症的预防

[0149] 选取6-8周的雌性C57BL/6制备黑色素瘤荷瘤小鼠。在接种B16F10癌细胞之前第42天、之前第35天、之前第28天、之前第21天和之前第14天分别皮下注射200 $\mu$ L内部和表面都负载癌细胞裂解物中水溶性成分的2mg PLGA纳米疫苗和200 $\mu$ L内部和表面都负载溶于8M尿素中原非水溶性成分的2mg PLGA纳米疫苗。最后一针纳米疫苗注射完后14天,在每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16-F10细胞,并将该天设为肿瘤细胞接种的第0天。

[0150] 在本实验中,对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞。

[0151] 在实验中,从第6天开始每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v = 0.52 * a * b^2$ 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,在小鼠生存期实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。

[0152] (4) 实验结果

[0153] 如图21所示,与对照组相比,纳米疫苗预防组肿瘤增长速度明显变慢( $p < 0.05$ )且小鼠生存期明显延长( $p < 0.05$ )。而且,有约35%的小鼠肿瘤接种后消失。由此可见,本发明

所述的负载癌细胞裂解物中水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗对黑色素瘤具有预防效果且可使部分接种者不得黑色素瘤。

[0154] 实施例5、黑色素瘤肿瘤组织裂解组分负载于纳米粒子内部和表面用于癌症的预防

[0155] 本实施例以小鼠黑色素瘤为癌症模型来说明如何制备负载有黑色素瘤肿瘤组织裂解物组分的纳米疫苗,并应用该疫苗预防黑色素瘤。

[0156] 本实施例中,将小鼠黑色素瘤肿瘤组织裂解组分负载于纳米粒子内部和表面以制备纳米疫苗。首先取得小鼠黑色素瘤肿瘤瘤块并将其裂解以制备瘤块组织的水溶性组分和溶于8M尿素中的原非水溶性组分。然后,以PLGA为纳米粒子骨架材料,以poly (I:C)为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有肿瘤组织裂解物的水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗。然后采用该纳米疫苗来治疗B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠体内的肿瘤。

[0157] (1) 肿瘤组织的裂解及各组分的收集

[0158] 肿瘤组织的处理方法与实施例3相同。首先在每只C57BL/6小鼠背部皮下接种150000个B16F10黑色素瘤细胞,在各只小鼠所接种肿瘤长到体积分别为约80mm<sup>3</sup>、200mm<sup>3</sup>、400mm<sup>3</sup>、1000mm<sup>3</sup>时处死小鼠并摘取肿瘤组织。将相同大小的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3次以上。待肿瘤组织细胞裂解后,将瘤块组织的细胞裂解物以12000g的转速离心5分钟取上清液即为瘤块组织中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B16F10中不溶于纯水的原非水溶性组分转化为在8M尿素水溶液中可溶。上述所得肿瘤组织裂解物的水溶性组分和原非水溶性组分即为制备用于预防黑色素瘤的纳米疫苗的原料来源。

[0159] (2) 纳米疫苗的制备

[0160] 本实施例中制备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,所采用的纳米粒子制备材料为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吸附于纳米粒子表面。制备方法如前所述。在纳米粒子表面负载细胞组分和免疫佐剂之前纳米粒子平均粒径为250nm左右,纳米粒子表面吸附细胞组分和免疫佐剂后所得纳米疫苗粒径为300nm左右,纳米粒子平均表面电位Zeta potential为-5mV左右。每1mg PLGA纳米粒子负载160μg蛋白质或多肽成分,每1mgPLGA纳米粒内外所使用的poly (I:C)免疫佐剂为0.01mg且内外各半分。空白纳米粒粒径为215nm左右,空白纳米粒制备时分别采用等量含有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,空白纳米粒子表面吸附与纳米疫苗等量的poly (I:C)。

[0161] (3) 纳米疫苗用于癌症的预防

[0162] 选取6-8周的雌性C57BL/6制备黑色素瘤小鼠。在接种肿瘤细胞之前第42天、之前第35天、之前第28天、之前第21天和之前第14天分别皮下注射200μL内部和表面都负载水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子和200μL内部和表面都负载溶于8M尿素中原非水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子。其中肿瘤接种之前第42天和之前第35天所注射纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约80mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,小鼠肿瘤接种之前第28天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约200mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,肿瘤接种之前第21天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约400mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,肿瘤接种之前第14天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约1000mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块。注射完

最后一次纳米疫苗14天以后给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞,并将该天设为肿瘤接种的第0天。

[0163] 在本实验中,对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞。

[0164] 在实验中,从第6天起每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v = 0.52 * a * b^2$ 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。

[0165] (4) 实验结果

[0166] 如图22所示,与PBS空白对照组相比,纳米疫苗预防组肿瘤生长速度明显变慢( $p < 0.05$ )且小鼠生存期明显延长( $p < 0.05$ )。而且,有约35%的小鼠肿瘤接种后消失。由此可见,本发明所述的负载肿瘤组织裂解物中水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗对黑色素瘤具有预防效果且可使部分接种者不得黑色素瘤。

[0167] 实施例6、乳腺癌细胞全细胞组分负载于纳米粒子内部和表面用于癌症的治疗

[0168] 本实施例以小鼠乳腺癌治疗来说明如何制备负载有全细胞组分的纳米疫苗并应用该疫苗治疗乳腺癌。

[0169] 本实施例中,申请者除了只应用所述纳米疫苗治疗乳腺癌以外也测试了纳米疫苗与PD-1抗体联用治疗乳腺癌。在实际应用时具体给药时间、给药次数、给药方案可根据情况调整。

[0170] 本实施例中,以4T1小鼠三阴性乳腺癌细胞为癌细胞模型。首先裂解4T1细胞以制备4T1细胞的水溶性组分和非水溶性组分。然后,以PLGA为纳米粒子骨架材料,以poly(I:C)为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有4T1细胞的水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗。然后采用该纳米疫苗来治疗4T1乳腺癌荷瘤小鼠体内的肿瘤。

[0171] (1) 癌细胞的裂解及各组分的收集

[0172] 该实施例中癌细胞裂解及裂解物收集和增溶方法同实施例1,只是将B16F10细胞换成4T1细胞。

[0173] (2) 纳米疫苗的制备

[0174] 本实施例中纳米疫苗的制备方法、所使用的材料等均与实施例1相同,只是将B16F10细胞换成4T1细胞。

[0175] (3) 纳米疫苗用于癌症的治疗

[0176] 选取6-8周的雌性BALB/c小鼠制备4T1荷瘤小鼠。

[0177] 纳米疫苗组给药方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射 $200\mu\text{L}$ 内部和表面都负载癌细胞裂解物中水溶性成分的 $2\text{mg}$  PLGA纳米粒子和 $200\mu\text{L}$ 内部和表面都负载溶于 $8\text{M}$ 尿素中原非水溶性成分的 $2\text{mg}$  PLGA纳米粒子。

[0178] 纳米疫苗与PD-1抗体联用组给药方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射 $200\mu\text{L}$ 内部和表面都负载水溶性成分的 $2\text{mg}$  PLGA纳米粒子和 $200\mu\text{L}$ 内部和表面都负载溶于 $8\text{M}$ 尿素中原非水溶性成分的 $2\text{mg}$  PLGA纳米粒子。在第3天、第6天、第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为 $10\text{mg}/\text{kg}$ 。

[0179] PBS空白对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射400 $\mu$ L PBS。

[0180] PD-1抗体+空白纳米粒+细胞裂解物对照组:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射癌细胞裂解物中水溶性成分,癌细胞裂解物中溶于8M尿素中的原非水溶性成分以及负载有等量poly (I:C) 而不负载任何细胞裂解物成分的4mg PLGA空白纳米粒。注意以上三者需分开给药并注射在不同皮下部位,以免游离的细胞裂解物吸附于空白纳米粒表面。在第3天,第6天,第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为10mg/kg。

[0181] 只含水溶性组分的纳米疫苗与PD-1抗体联用组给药方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种150000个B16F10细胞。在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射200 $\mu$ L内部和表面都负载有癌细胞裂解物中水溶性成分的2mg PLGA纳米疫苗,200 $\mu$ L只负载等量poly (I:C) 的2mg PLGA空白纳米粒以及溶于8M尿素中的非水溶性组分,三者注射于不同皮下部位。在第3天、第6天、第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为10mg/kg。

[0182] 在实验中,从第6天起每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v = 0.52 * a * b^2$ 计算,其中 $v$ 为肿瘤体积, $a$ 为肿瘤长度, $b$ 为肿瘤宽度。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。

[0183] (4) 实验结果

[0184] 如图23所示,与PBS空白对照组和空白纳米粒+细胞裂解物+PD1抗体对照组相比,纳米疫苗给药组肿瘤生长速度明显变慢 ( $p < 0.05$ ) 且小鼠生存期明显延长 ( $p < 0.05$ )。由此可见,本发明所述的负载癌细胞水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗对乳腺癌具有治疗效果。

[0185] 当采用该实施例中纳米疫苗与PD1抗体的联用给药方案时,二者对肿瘤生长速度抑制和小鼠生存期延长的协同效应不明显。

[0186] 只含有水溶性组分的纳米疫苗+PD1抗体组与空白纳米粒+细胞裂解物+PD1抗体对照组相比在抑制肿瘤生长速度和延长小鼠生存期两个方面均无显著性差异。这说明在治疗乳腺癌时只使用仅含水溶性组分的纳米疫苗治疗效果不显著。

[0187] 实施例7、乳腺癌肿瘤组织裂解组分负载于纳米粒子内部和表面用于癌症的治疗

[0188] 本实施例以小鼠乳腺癌为癌症模型来说明如何制备负载有乳腺癌肿瘤组织裂解物组分的纳米疫苗并应用该疫苗治疗乳腺癌。在实际应用时可根据情况对具体给药时间、给药次数、给药方案进行调整。

[0189] 本实施例中,将小鼠乳腺癌肿瘤组织裂解组分负载于纳米粒子内部和表面以制备纳米疫苗。首先取得小鼠乳腺癌肿瘤瘤块并将其裂解以制备瘤块组织的水溶性组分和溶于8M尿素中的原非水溶性组分。然后,以PLGA为纳米粒子骨架材料,以poly (I:C) 为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有肿瘤组织裂解物中水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗。然后采用该纳米疫苗来治疗乳腺癌荷瘤小鼠体内的肿瘤。

[0190] (1) 肿瘤组织的裂解及各组分的收集

[0191] 该实施例中癌细胞裂解及裂解物收集和增溶方法同实施例3,只是将黑色素瘤瘤块细胞换成乳腺癌瘤块。

[0192] (2) 纳米疫苗的制备

[0193] 本实施例中纳米疫苗的制备方法、所使用的材料等均与实施例3相同,只是将黑色素瘤肿瘤组织换成了乳腺癌肿瘤组织。

[0194] (3) 纳米疫苗用于癌症的治疗

[0195] 选取6-8周的雌性BALB/c制备4T1荷瘤小鼠。

[0196] 纳米疫苗治疗组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射200 $\mu$ L内部和表面都负载水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子和200 $\mu$ L内部和表面都负载溶于8M尿素中原非水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子。其中第4天和第7天所注射纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约80mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,第10天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约200mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,第15天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约400mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,第20天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约1000mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块。

[0197] PBS空白对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射400 $\mu$ L PBS。

[0198] 在实验中,从第6天开始每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52*a*b^2$ 计算,其中v为肿瘤体积,a为肿瘤长度,b为肿瘤宽度。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。

[0199] (4) 实验结果

[0200] 如图24所示,与PBS空白对照组相比,纳米疫苗给药组肿瘤生长速度明显变慢( $p<0.05$ )且小鼠生存期明显延长( $p<0.05$ )。由此可见,本发明所述的负载肿瘤组织水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗对乳腺癌具有治疗效果。

[0201] 实施例8、乳腺癌细胞全细胞组分负载于微米粒子内部和表面用于癌症的治疗

[0202] 本实施例以小鼠乳腺癌为癌症模型来说明如何制备负载有全细胞组分的微米疫苗并应用该疫苗治疗乳腺癌。

[0203] 本实施例中,以4T1小鼠三阴性乳腺癌细胞为癌细胞模型。首先裂解4T1细胞以制备4T1细胞的水溶性组分和非水溶性组分。然后,以PLGA为微米粒骨架材料,以poly(I:C)为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有4T1细胞中水溶性组分和非水溶性组分的微米疫苗。然后采用该微米疫苗来治疗4T1乳腺癌荷瘤小鼠体内的肿瘤。

[0204] (1) 癌细胞的裂解及各组分的收集

[0205] 该实施例中癌细胞裂解及裂解物收集和增溶方法同实施例1,只是将B16F10细胞换成4T1细胞。

[0206] (2) 微米疫苗的制备

[0207] 本实施例中微米疫苗及空白微米粒子的制备方法、所使用的材料等均与实施例1类似,只是在采用复乳法制备微米粒子过程中初乳和复乳的超声时间更短。所制备微米疫苗平均粒径为2 $\mu$ m左右,微米粒子表面Zeta电位为-4mV,每1mg PLGA微米粒子内外负载蛋白质和多肽组分为200 $\mu$ g,每1mg PLGA纳米粒内外所使用的poly(I:C)免疫佐剂共0.01mg且内外各半。

[0208] (3) 微米疫苗用于癌症的治疗

[0209] 选取6-8周的雌性BALB/c制备4T1荷瘤小鼠。

[0210] 微米疫苗治疗组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射200 $\mu$ L内部和表面都负载癌水溶性成分的2mg PLGA微米粒子和200 $\mu$ L内部和表面都负载溶于8M尿素中原非水溶性成分的2mg PLGA微米粒子。

[0211] PBS空白对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射400 $\mu$ L PBS。

[0212] 空白微米粒+细胞裂解物对照组:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天,第7天,第10天,第15天和第20天分别皮下注射等量癌细胞裂解物中水溶性成分,等量癌细胞裂解物中溶于8M尿素中的原非水溶性成分以及负载有等量poly(I:C)而不负载任何细胞裂解物成分的4mg PLGA空白微米粒。注意以上三者需分开给药并注射在不同皮下部位,以免游离的细胞裂解物吸附于空白纳米粒表面。

[0213] 在实验中,每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52*a*b^2$ 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2000 $mm^3$ 即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

[0214] (4) 实验结果

[0215] 如图25所示,与PBS空白对照组以及空白微米粒子对照组相比,微米疫苗给药组肿瘤生长速度明显变慢( $p<0.05$ )且小鼠生存期明显延长( $p<0.05$ )。由此可见,本发明所述的负载癌细胞水溶性组分和非水溶性组分的微米疫苗对乳腺癌具有治疗效果。

[0216] 实施例9、乳腺癌肿瘤组织裂解组分负载于纳米粒子内部和表面用于癌症的预防

[0217] 本实施例以小鼠乳腺癌为癌症模型来说明如何制备负载有乳腺癌肿瘤组织裂解物组分的纳米疫苗并应用该疫苗预防乳腺癌。

[0218] 本实施例中,将小鼠乳腺癌肿瘤组织裂解组分负载于纳米粒子内部和表面以制备纳米疫苗。首先取得小鼠乳腺癌肿瘤瘤块并将其裂解以制备瘤块组织的水溶性组分和溶于8M尿素中的原非水溶性组分。然后,以PLGA为纳米粒子骨架材料,以poly(I:C)为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有肿瘤组织裂解物的水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗。然后采用该纳米疫苗来治疗乳腺癌荷瘤小鼠体内的肿瘤。

[0219] (1) 肿瘤组织的裂解及各组分的收集

[0220] 该实施例中肿瘤组织的裂解及裂解物收集和增溶方法同实施例3,只是将黑色素瘤瘤块换成了乳腺癌瘤块。

[0221] (2) 纳米疫苗的制备

[0222] 本实施例中纳米疫苗的制备方法、所使用的材料等均与实施例3相同,只是将黑色素瘤瘤块换成了乳腺癌瘤块。在纳米粒子表面负载细胞组分和免疫佐剂之前纳米粒子平均粒径为250nm左右,纳米粒子表面吸附细胞组分和免疫佐剂后所得纳米疫苗平均粒径为300nm左右,每1mg PLGA纳米粒子所负载的蛋白质和多肽为150 $\mu$ g,每1mgPLGA纳米粒内外所使用的poly(I:C)免疫佐剂为0.01mg且内外各半。所得纳米疫苗表面zeta电位为-5mV。

[0223] (3) 纳米疫苗用于癌症的预防

[0224] 选取6-8周的雌性BALB/c小鼠制备4T1荷瘤小鼠。

[0225] 纳米疫苗预防组方案:在接种肿瘤细胞之前第42天、之前第35天、之前第28天、之

前第21天和之前第14天分别皮下注射200 $\mu$ L内部和表面都负载水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子和200 $\mu$ L内部和表面都负载溶于8M尿素中原非水溶性成分的2mg PLGA纳米粒子。其中肿瘤接种之前第42天和之前第35天所注射纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约80mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,小鼠肿瘤接种之前第28天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约200mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,肿瘤接种之前第21天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约400mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,肿瘤接种之前第14天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约1000mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块。注射完最后一次疫苗14天以后给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞并将改天定为第0天。

[0226] 对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞。

[0227] 在实验中,从第6天起每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52*a*b^2$ 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。

[0228] (4) 实验结果

[0229] 如图26所示,与对照组相比,纳米疫苗预防组肿瘤体积生长速度明显变慢( $p<0.05$ )且小鼠生存期明显延长( $p<0.05$ )。由此可见,本发明所述的负载癌乳腺癌瘤块组织裂解物中水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗对黑色素瘤具有预防效果。

[0230] 实施例10、乳腺癌细胞全细胞组分负载于纳米粒子内部和表面并以卡介苗(BCG)为免疫佐剂的纳米疫苗用于癌症的治疗

[0231] 本实施例以小鼠乳腺癌为癌症模型并以BCG为免疫佐剂来说明如何制备负载有全细胞组分的纳米疫苗并应用该疫苗治疗乳腺癌。

[0232] 本实施例中,以4T1小鼠三阴性乳腺癌细胞为癌细胞模型。首先裂解4T1细胞以制备4T1细胞的水溶性组分和非水溶性组分。然后,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负载有4T1细胞中水溶性组分和非水溶性组分的纳米疫苗。然后采用该纳米疫苗来治疗4T1乳腺癌荷瘤小鼠体内的肿瘤。

[0233] (1) 癌细胞的裂解及各组分的收集

[0234] 该实施例中癌细胞裂解及裂解物收集和增溶方法同实施例1,只是将B16F10细胞换成4T1细胞。

[0235] (2) BCG的裂解及各组分的收集

[0236] 该实施例中BCG的裂解及裂解物收集和增溶方法同实施例1中癌细胞的裂解方法,只是将癌细胞换成BCG。

[0237] (3) 纳米疫苗的制备

[0238] 本实施例中纳米疫苗的制备方法、所使用的材料等均与实施例6相同。但是在该实施例中,纳米疫苗内部包载的免疫佐剂由poly(I:C)换成了BCG裂解物中的水溶性成分或非水溶性成分;而纳米疫苗表面吸附的免疫佐剂是未经裂解的BCG佐剂。在纳米粒子表面负载细胞组分和免疫佐剂之前纳米粒子平均粒径为250nm,纳米粒子表面吸附细胞组分和免疫佐剂后所制备纳米疫苗平均粒径为310nm,每1mg PLGA微米粒子内外负载蛋白质和多肽为150 $\mu$ g,每1mgPLGA纳米粒内外所使用的BCG免疫佐剂为0.1mg且内外各半。

[0239] (4) 纳米疫苗用于癌症的治疗

[0240] 选取6-8周的雌性BALB/c小鼠制备4T1荷瘤小鼠。

[0241] 纳米疫苗与PD-1抗体联用组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射200 $\mu$ L内部和表面都负载水溶性成分的2mg PLGA纳米疫苗和200 $\mu$ L内部和表面都负载溶于8M尿素中原非水溶性成分的2mg PLGA纳米疫苗。在第3天、第6天、第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为10mg/kg。

[0242] 在本实验中,PBS空白对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射400 $\mu$ L PBS。

[0243] PD-1抗体+空白纳米粒+细胞裂解物对照组:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天分别皮下注射等量癌细胞裂解物中水溶性成分,等量癌细胞裂解物中溶于8M尿素中的原非水溶性成分以及含有等量BCG而不负载任何细胞裂解物成分的4mg PLGA空白纳米粒。注意以上三者需分开给药并注射在不同皮下部位,以免游离的细胞裂解物吸附于空白纳米粒表面。在第3天,第6天,第9天和第14天分别腹腔注射PD-1抗体,每只小鼠的注射剂量为10mg/kg。

[0244] 在实验中,从第6天起每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52*a*b^2$ 计算,其中 $v$ 为肿瘤体积, $a$ 为肿瘤长度, $b$ 为肿瘤宽度。在小鼠生存期试验中当小鼠肿瘤体积超过2000 $mm^3$ 即视为小鼠死亡并将小鼠安乐死。

[0245] (4) 实验结果

[0246] 如图27所示,与PBS空白对照组以及PD-1抗体+空白纳米粒+细胞裂解物对照组相比,以BCG为佐剂的纳米疫苗给药组肿瘤生长速度明显变慢( $p<0.05$ )且小鼠生存期明显延长( $p<0.05$ )。由此可见,本发明所述负载癌细胞全细胞组分的纳米疫苗在以BCG为免疫佐剂时对乳腺癌具有治疗效果。

[0247] 实施例11、6M盐酸胍溶解肿瘤组织组分并负载于微米粒子内部和表面用于癌症的治疗

[0248] 本实施例以小鼠乳腺癌为癌症模型来说明如何采用6M盐酸胍溶解全细胞组分并制备负载有全细胞组分的微米疫苗以治疗乳腺癌。本实施例中,以4T1小鼠三阴性乳腺癌细胞为癌细胞模型。首先对肿瘤组织细胞进行灭活和变性处理并以6M盐酸胍裂解肿瘤组织并溶解全细胞组分。然后,以PLGA为微米粒子骨架材料,以CpG为免疫佐剂采用溶剂挥发法制备负载有肿瘤组织全细胞组分的微米疫苗。然后采用该微米疫苗来治疗4T1乳腺癌荷瘤小鼠体内的肿瘤。

[0249] (1) 癌细胞的裂解及各组分的收集

[0250] 在每只BALB/c小鼠背部皮下接种400000个4T1乳腺癌细胞,在各只小鼠所接种肿瘤长到体积分别为约80 $mm^3$ 、200 $mm^3$ 、400 $mm^3$ 、1000 $mm^3$ 时处死小鼠并摘取肿瘤组织。将相同大小的肿瘤组织切块后研磨,通过细胞过滤网过滤并收集过滤所得肿瘤组织细胞。所得肿瘤组织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盐酸胍裂解肿瘤组织细胞并溶解组织裂解物即为制备微米疫苗的原料来源。

[0251] (2) 微米疫苗的制备

[0252] 本实施例中微米疫苗及空白微米粒子的制备方法、所使用的材料等与实施例8类似,只是采用CpG为免疫佐剂。所制备微米疫苗平均粒径为2.5 $\mu$ m左右,微米粒子表面Zeta电位为-4mV。每1mg PLGA微米粒子内外负载蛋白质和多肽组分为210 $\mu$ g,每1mg PLGA纳米粒内



外所使用的CpG免疫佐剂共0.01mg且内外各半。

[0253] (3) 微米疫苗用于癌症的治疗

[0254] 选取6-8周的雌性BALB/c制备4T1荷瘤小鼠。

[0255] 微米疫苗治疗组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天、第7天、第10天、第15天和第20天皮下注射100 $\mu$ L内部和表面都负载肿瘤组织全细胞组分的2mg PLGA微米疫苗。其中第4天和第7天所注射纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约80mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,第10天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约200mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,第15天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约400mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块,第20天注射的纳米疫苗所负载的肿瘤组织裂解物来源于大约1000mm<sup>3</sup>大小的肿瘤瘤块。

[0256] PBS空白对照组方案如下:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第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。

[0257] 空白微米粒+细胞裂解物对照组:在第0天给每只小鼠背部右下方皮下接种400000个4T1细胞,在第4天,第7天,第10天,第15天和第20天分别皮下注射等量肿瘤组织裂解物,以及负载有等量CpG而不负载任何细胞裂解物成分的2mg PLGA空白微米粒。注意以上二者需分开给药并注射在不同皮下部位,以免游离的细胞裂解物吸附于空白纳米粒表面。

[0258] 在实验中,每三天记录一次小鼠肿瘤体积的大小。肿瘤体积采用公式 $v=0.52*a*b^2$ 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。

[0259] (4) 实验结果

[0260] 如图28所示,与PBS空白对照组以及空白微米粒子对照组相比,微米疫苗给药组肿瘤生长速度明显变慢( $p<0.05$ )且小鼠生存期明显延长( $p<0.05$ )。由此可见,本发明所述的负载肿瘤组织全细胞组分的微米疫苗对乳腺癌具有治疗效果。

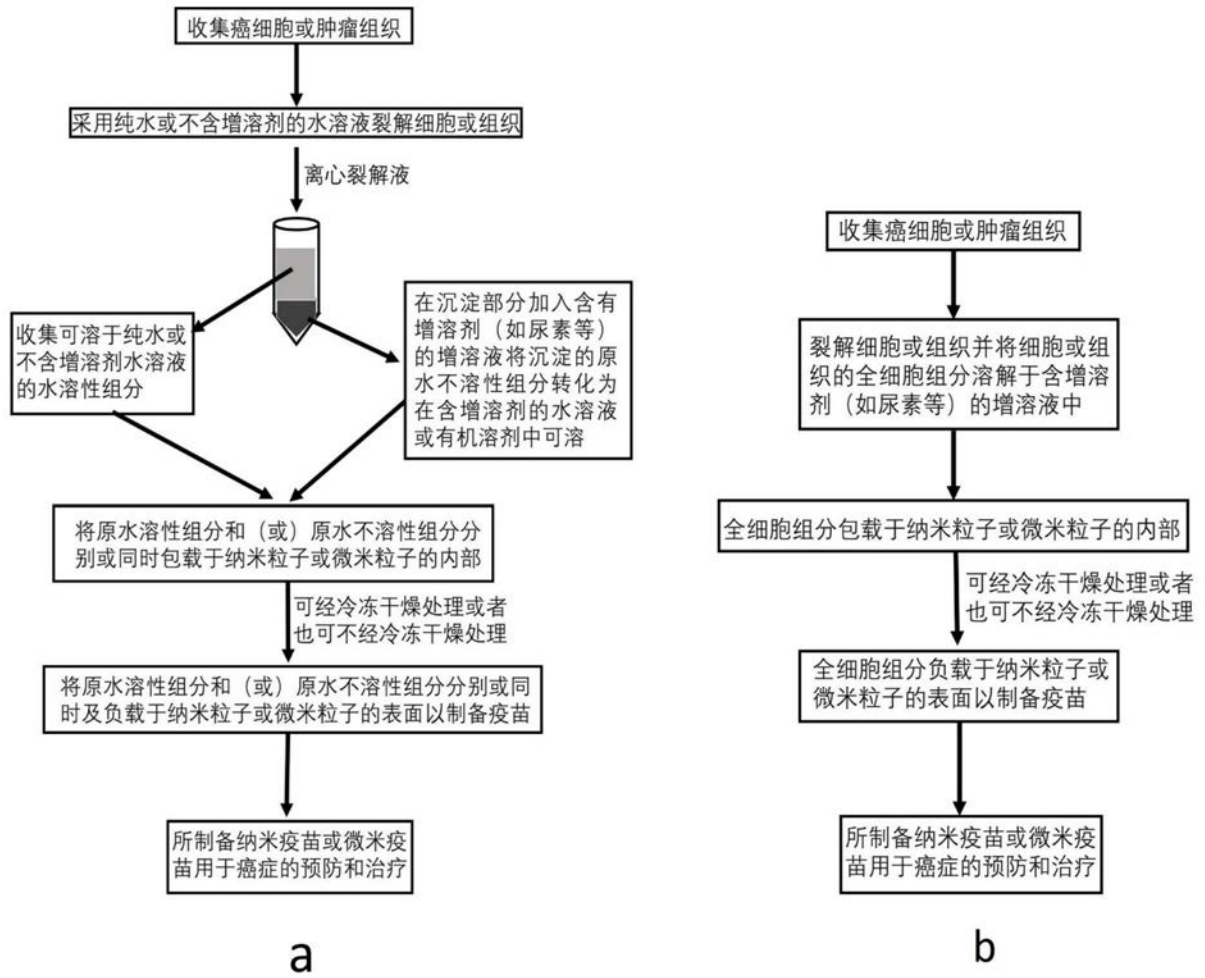


图1

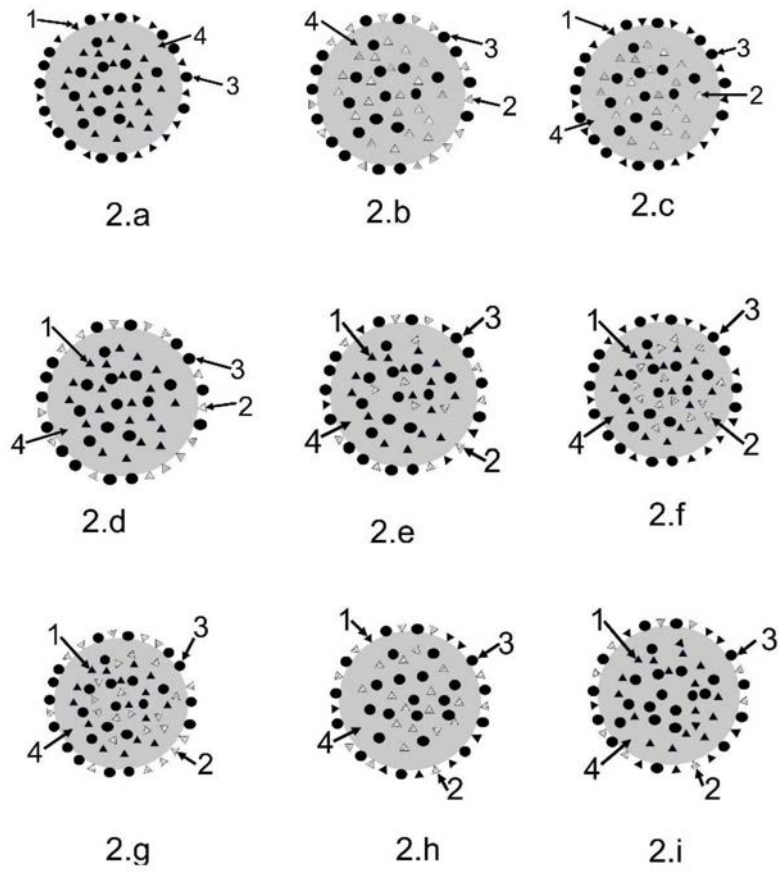


图2

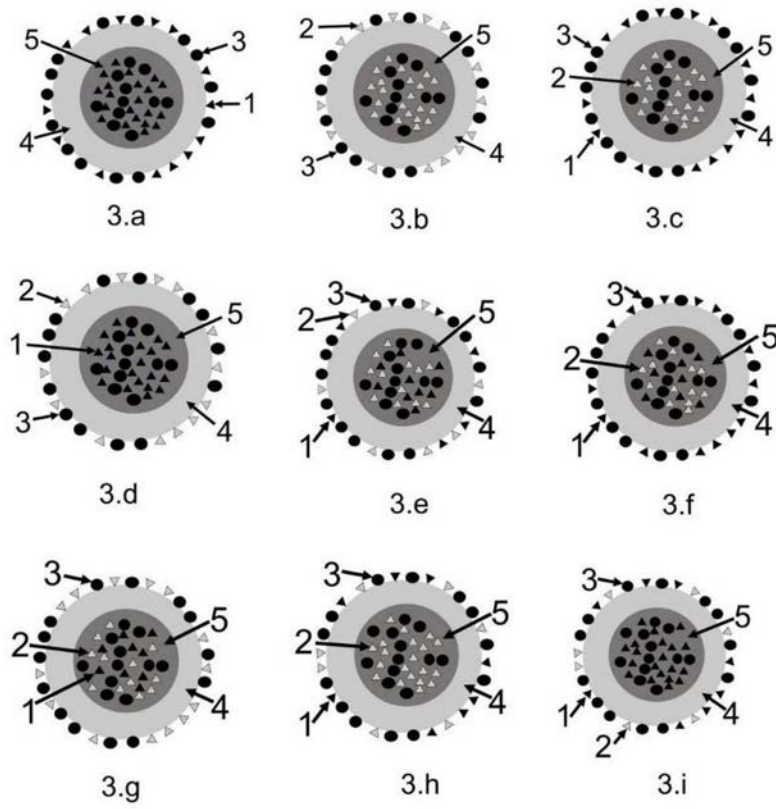


图3

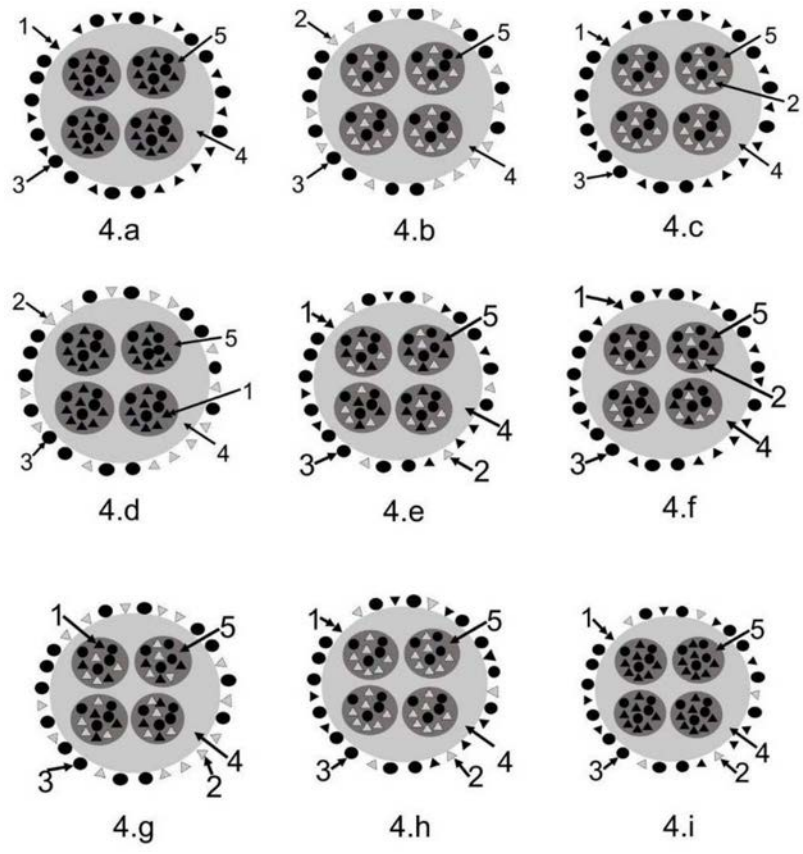


图4

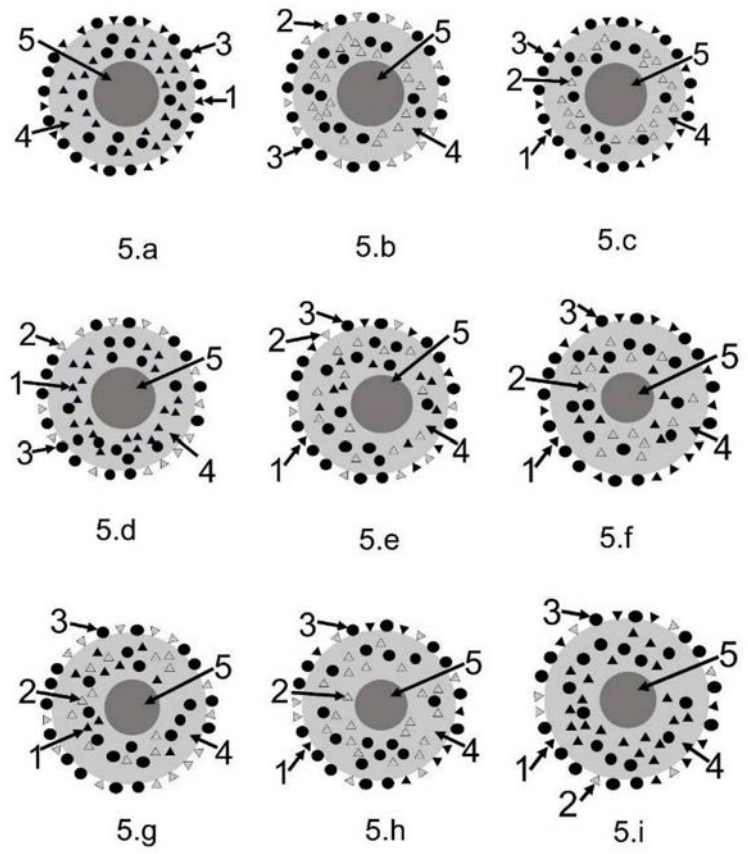


图5

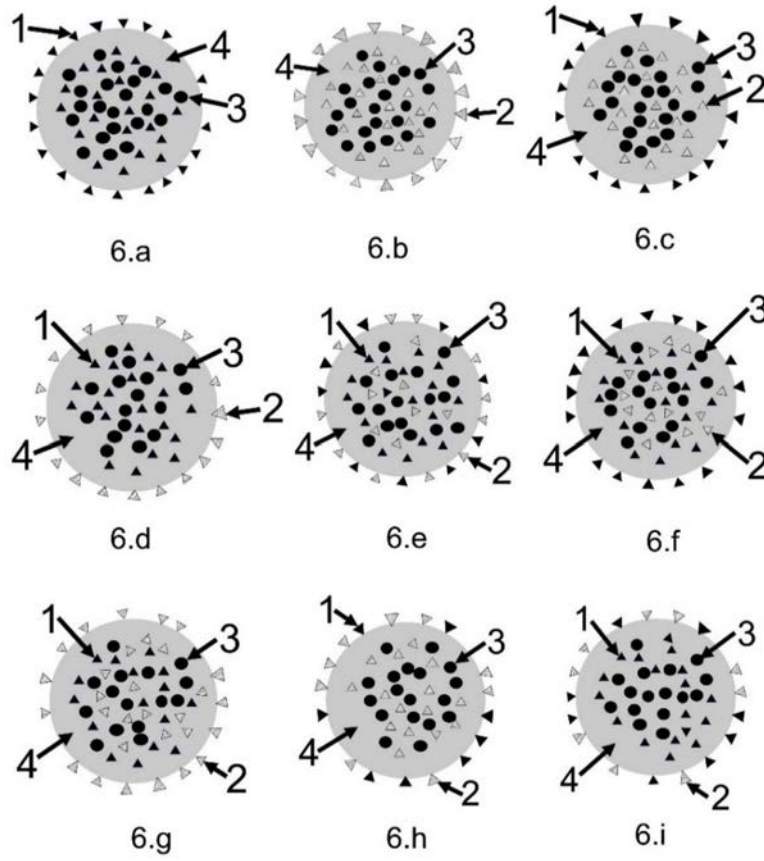


图6

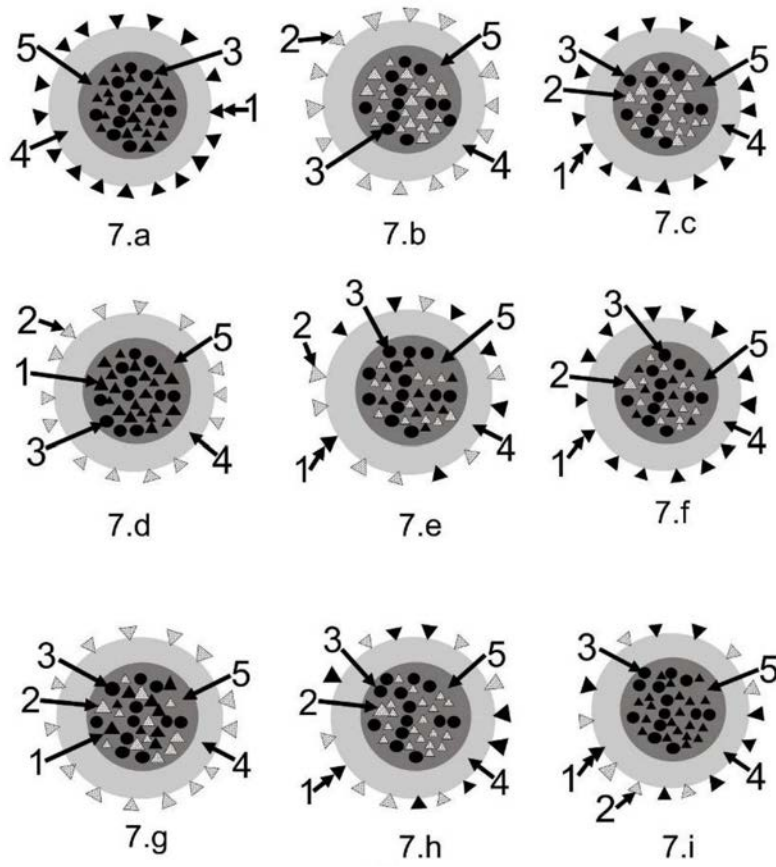


图7



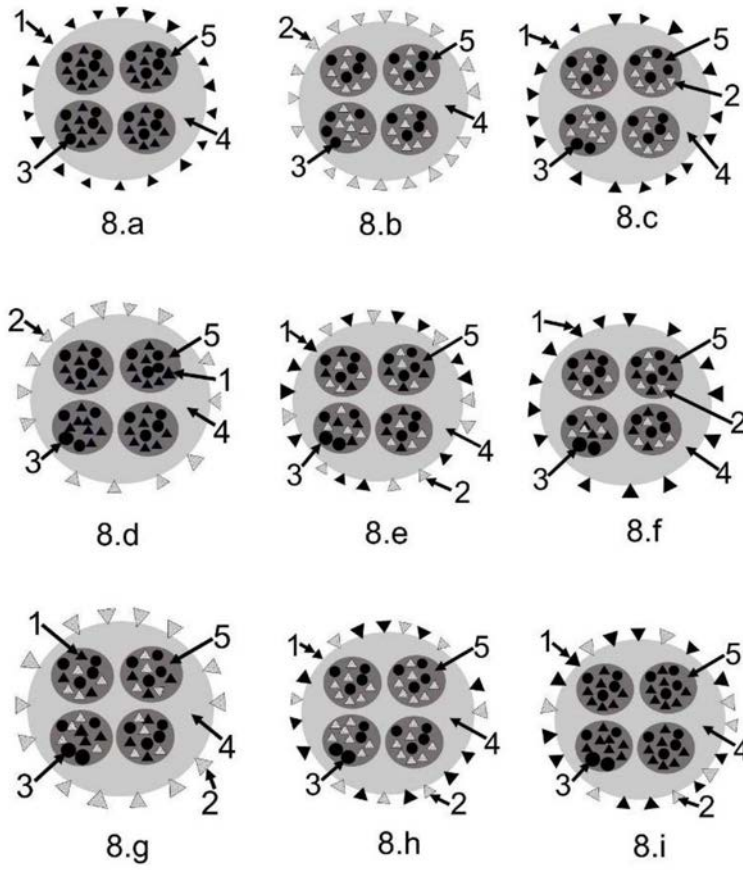


图8

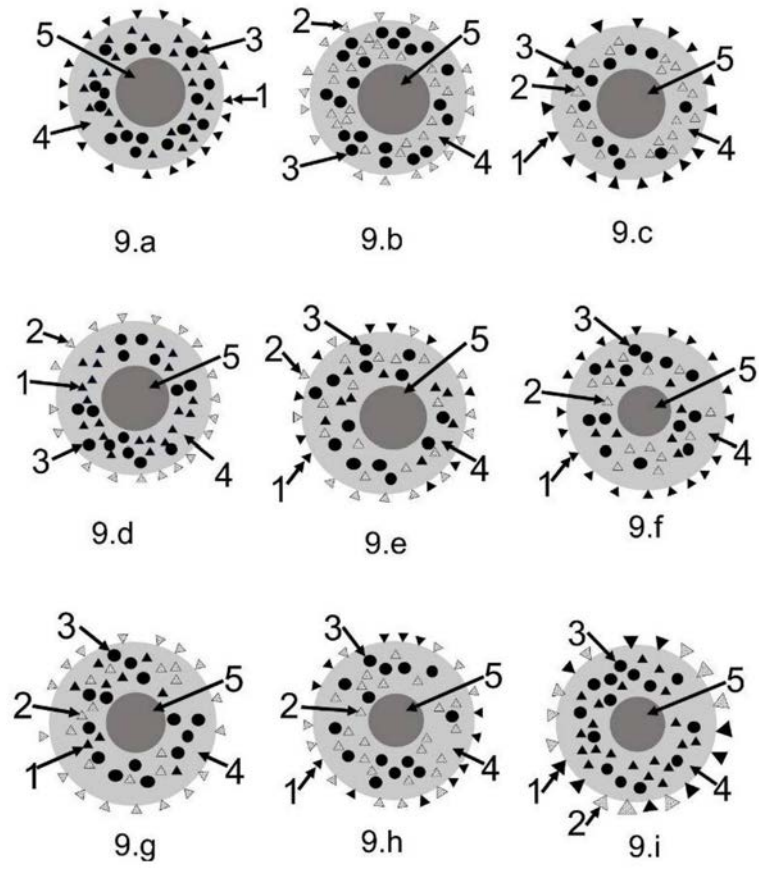


图9

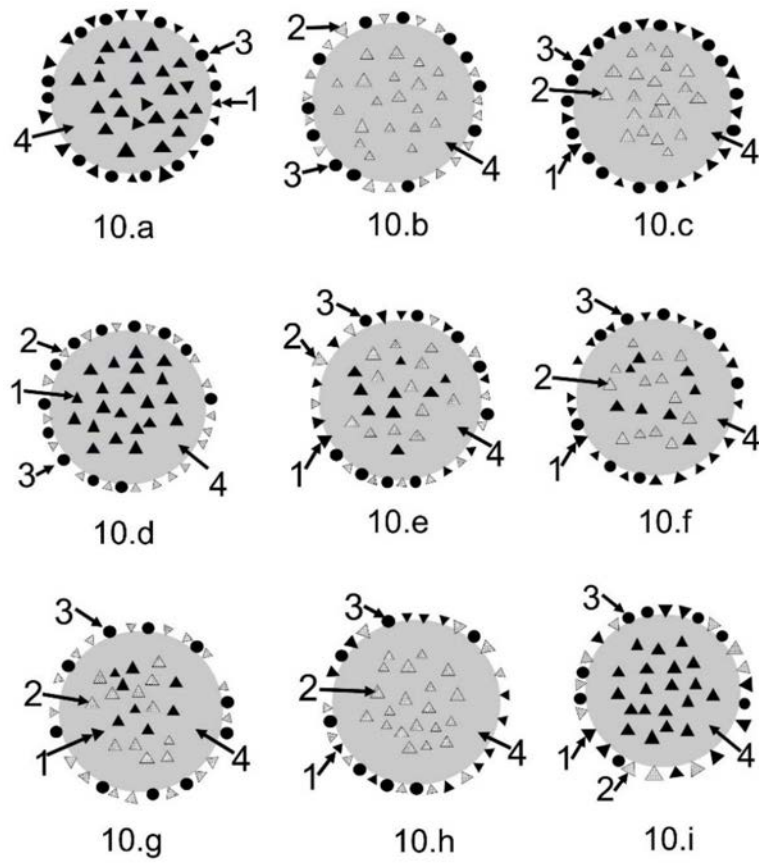


图10

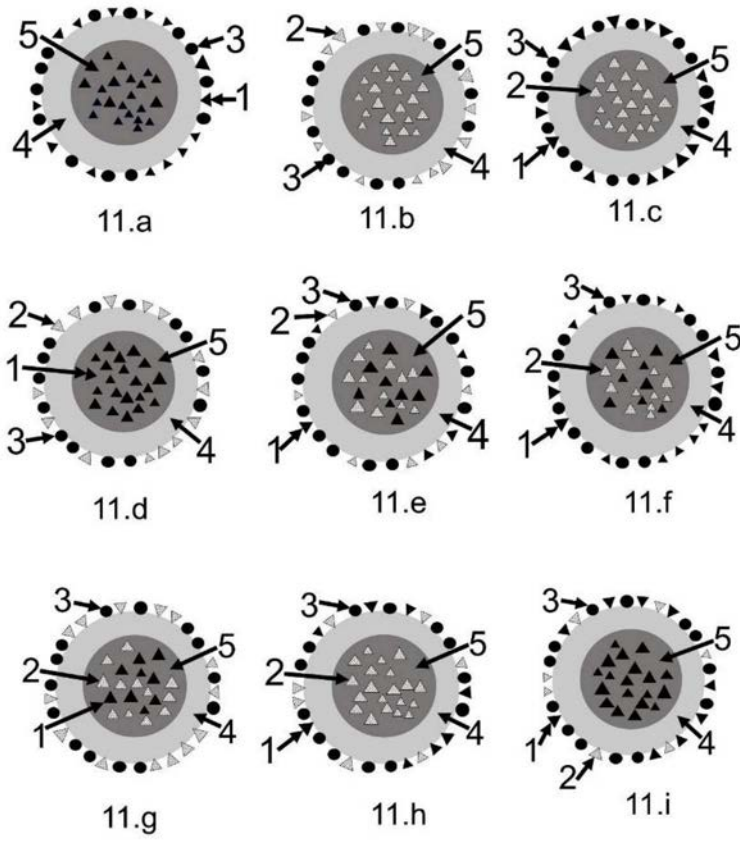


图11

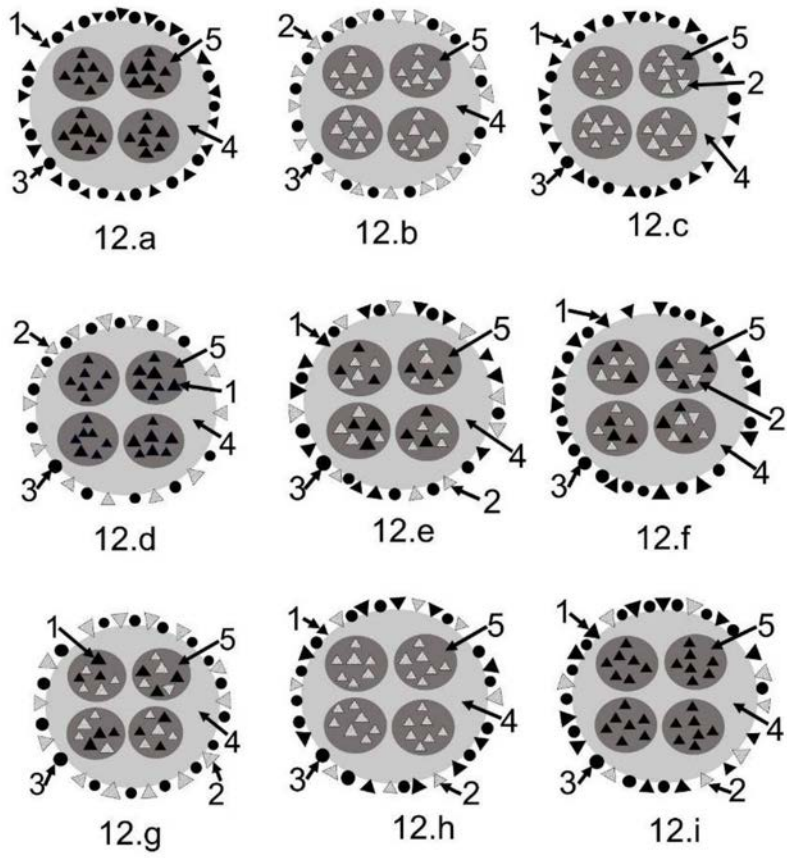


图12

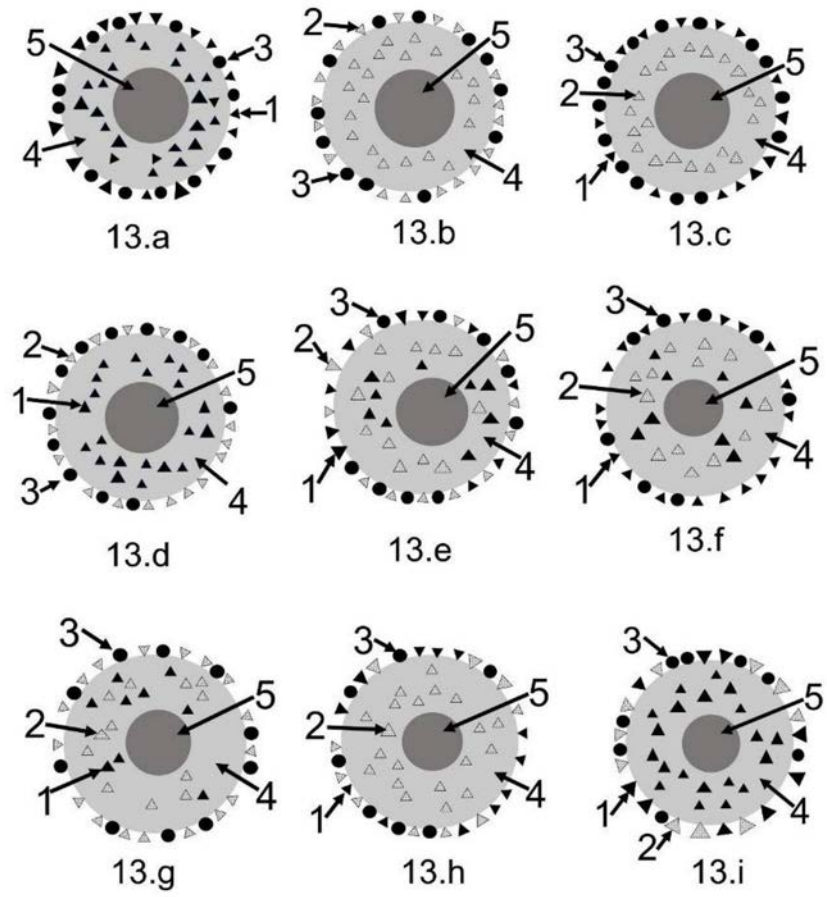


图13

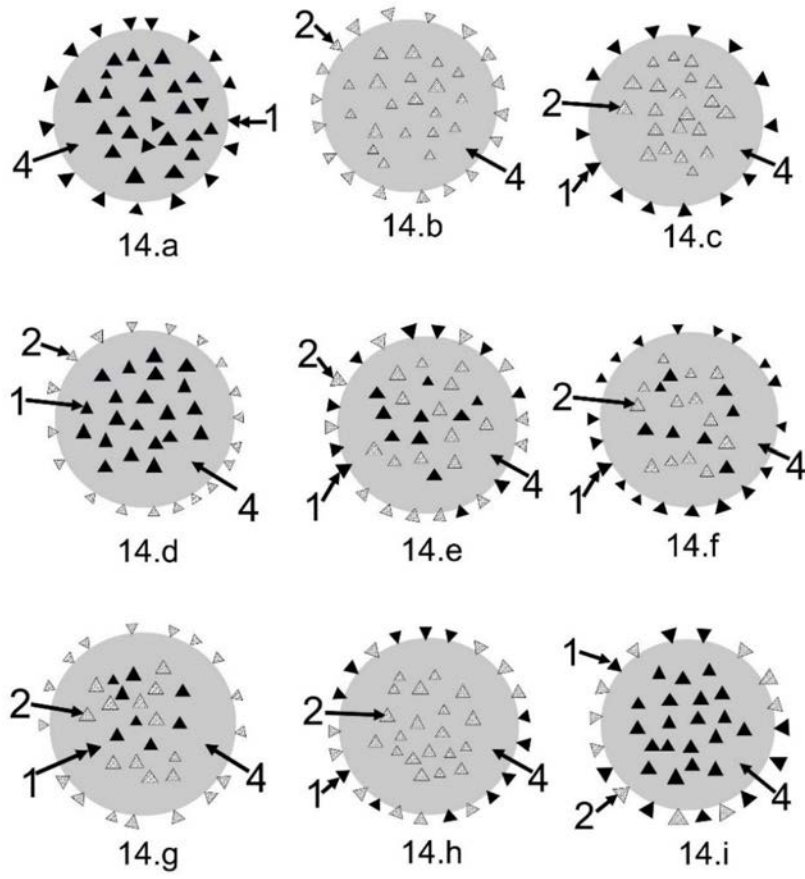


图14

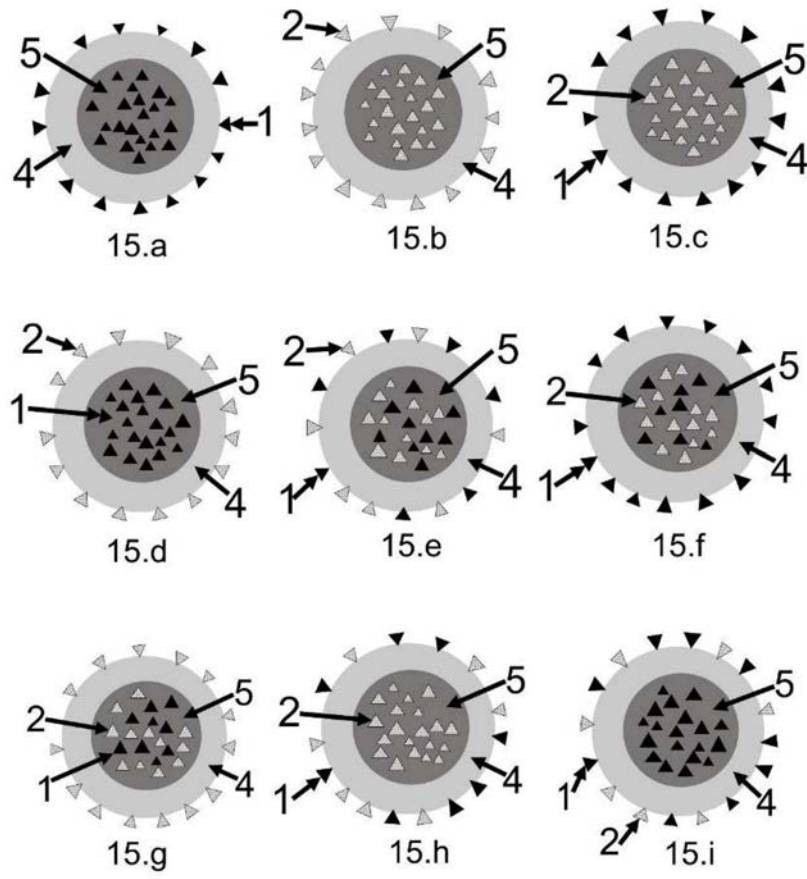


图15



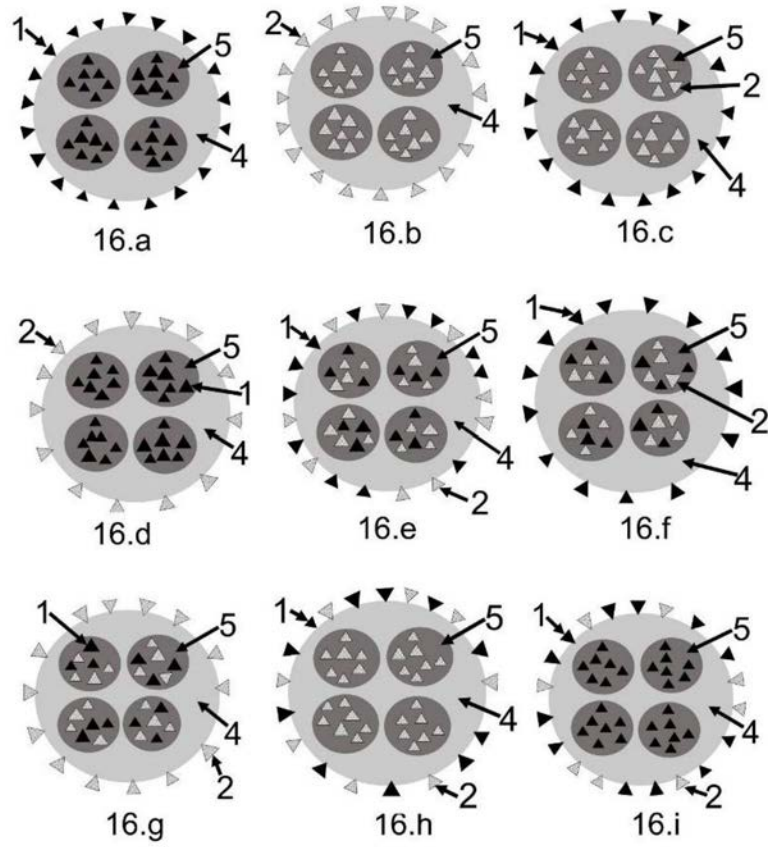


图16

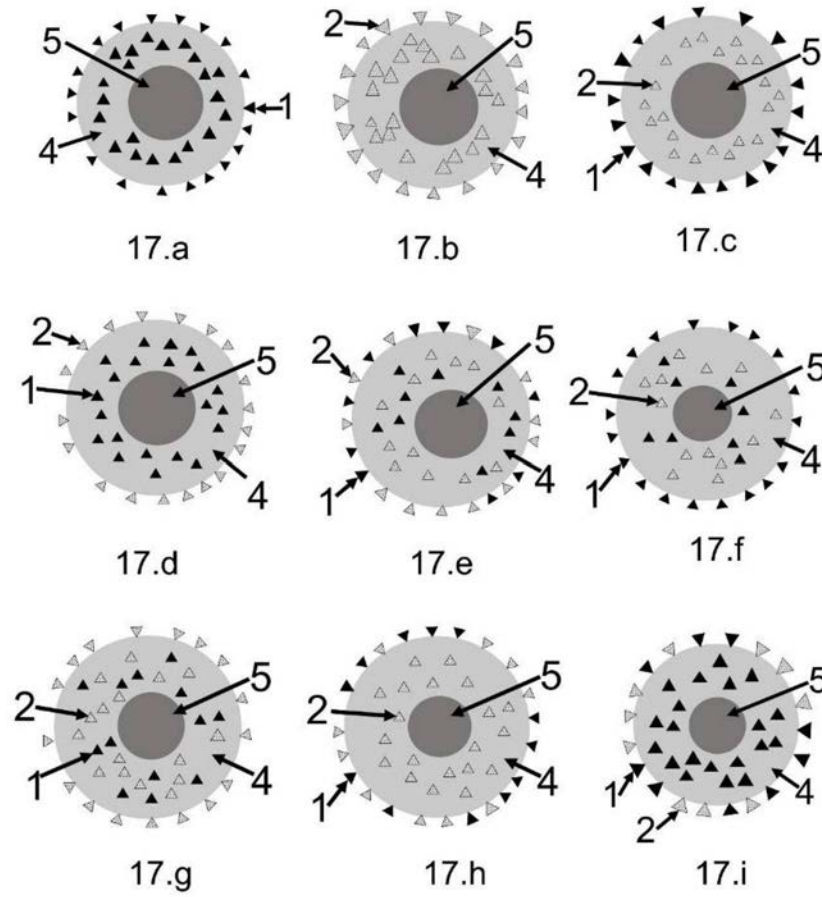


图17

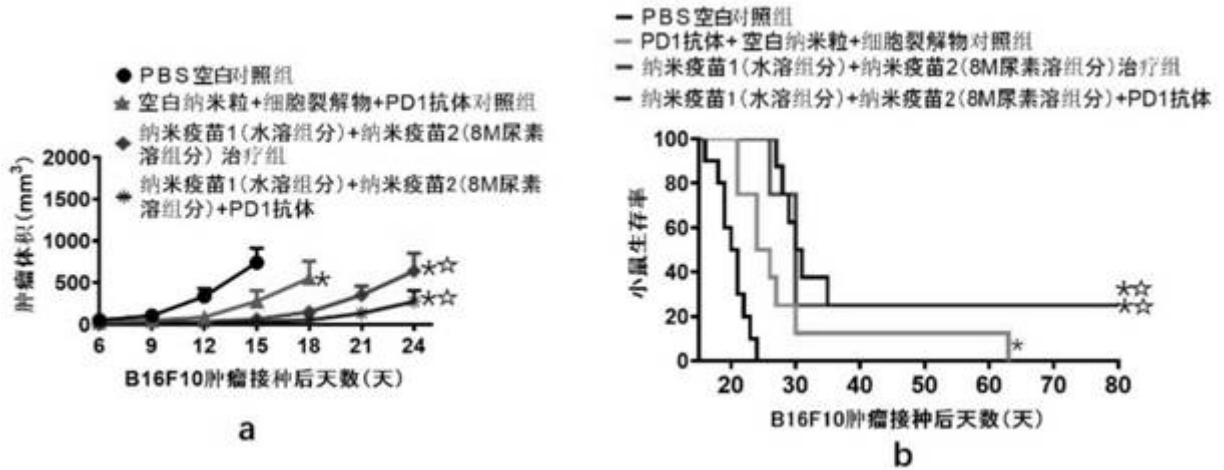


图18

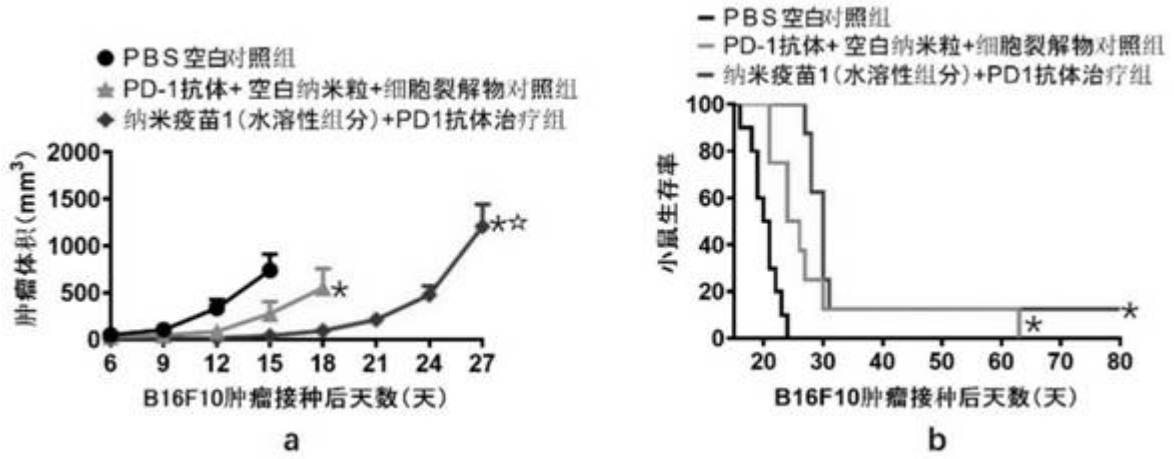


图19

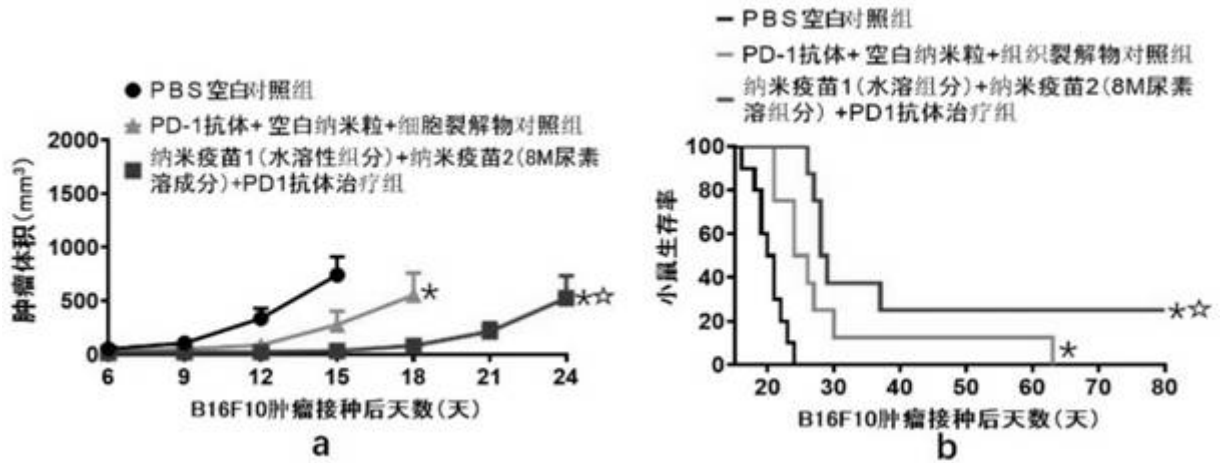


图20

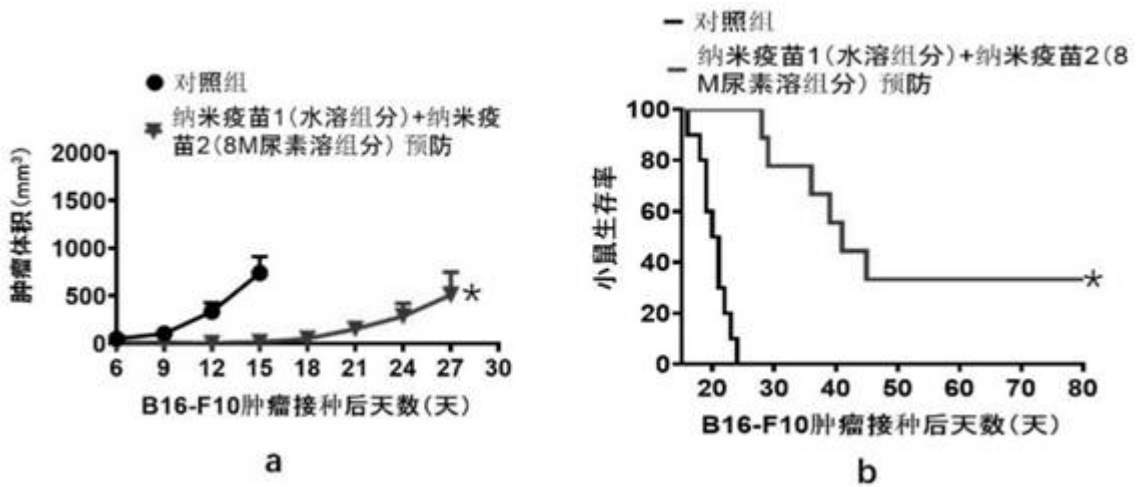


图21

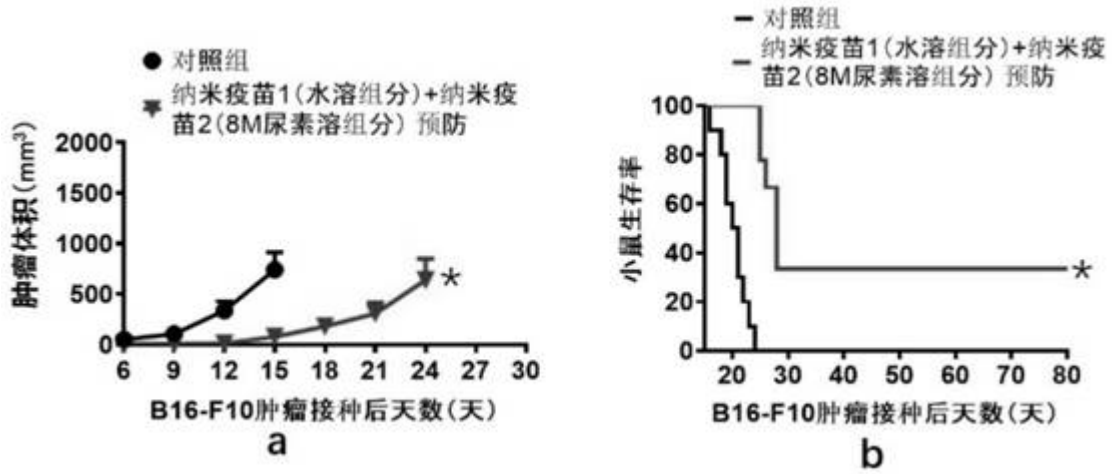


图22

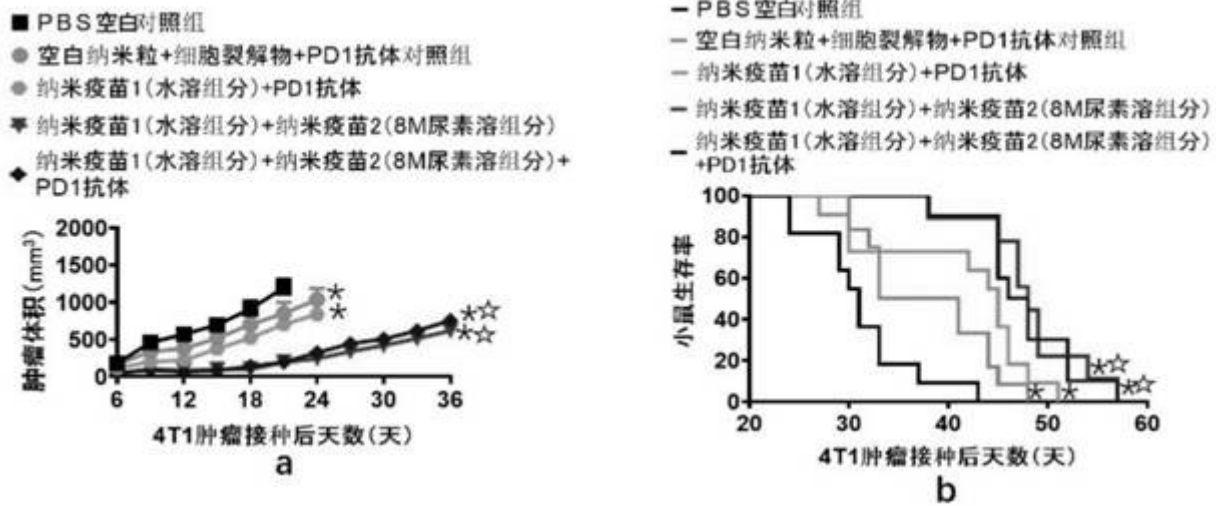


图23

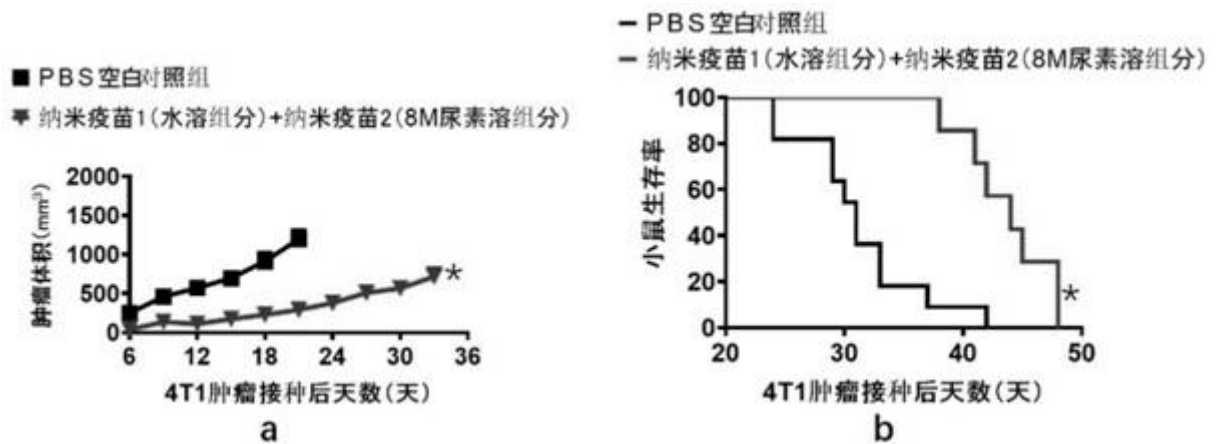


图24

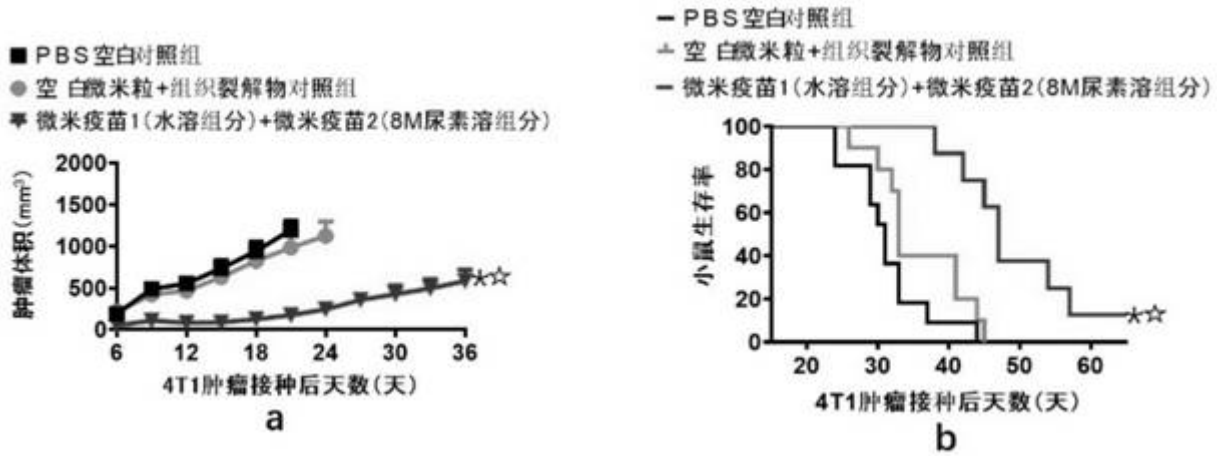


图25

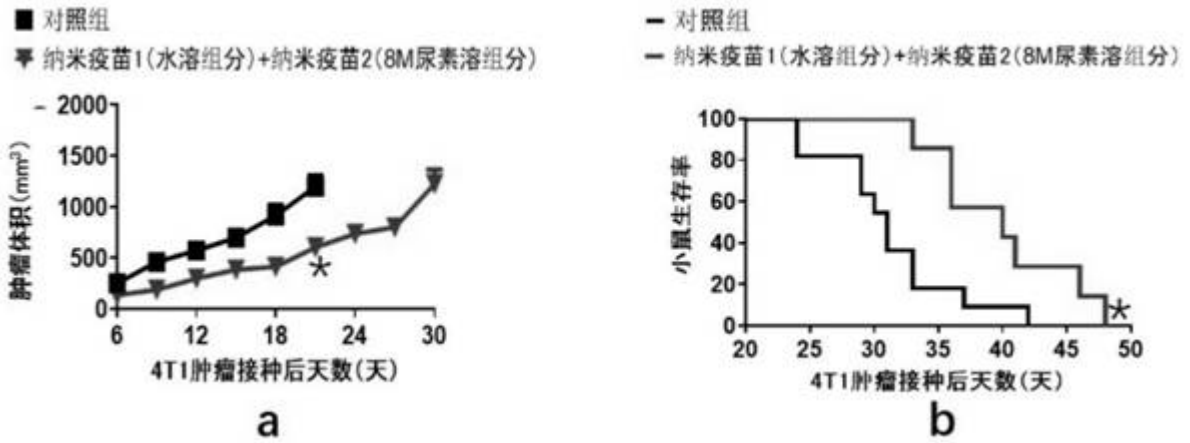


图26

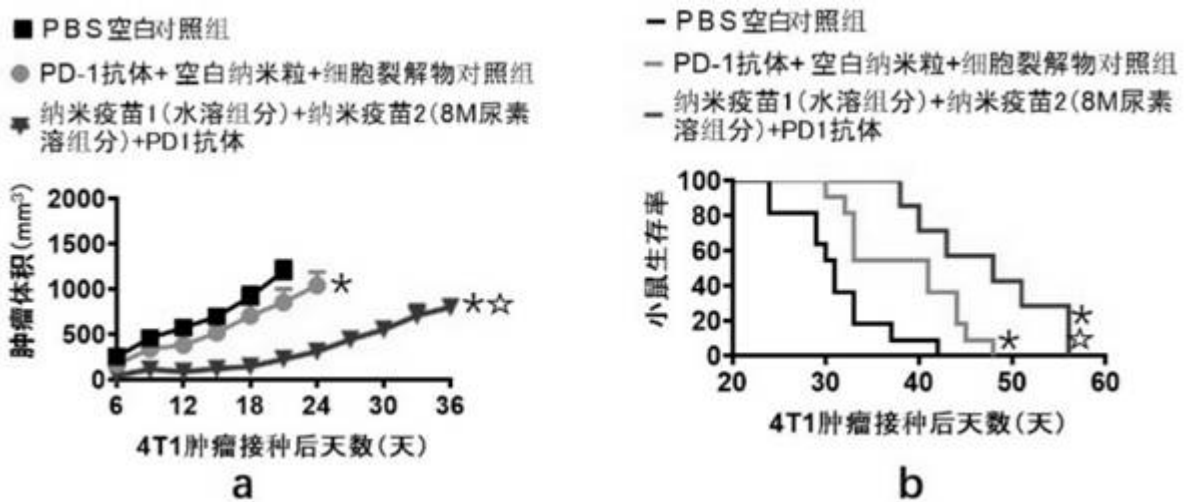


图27

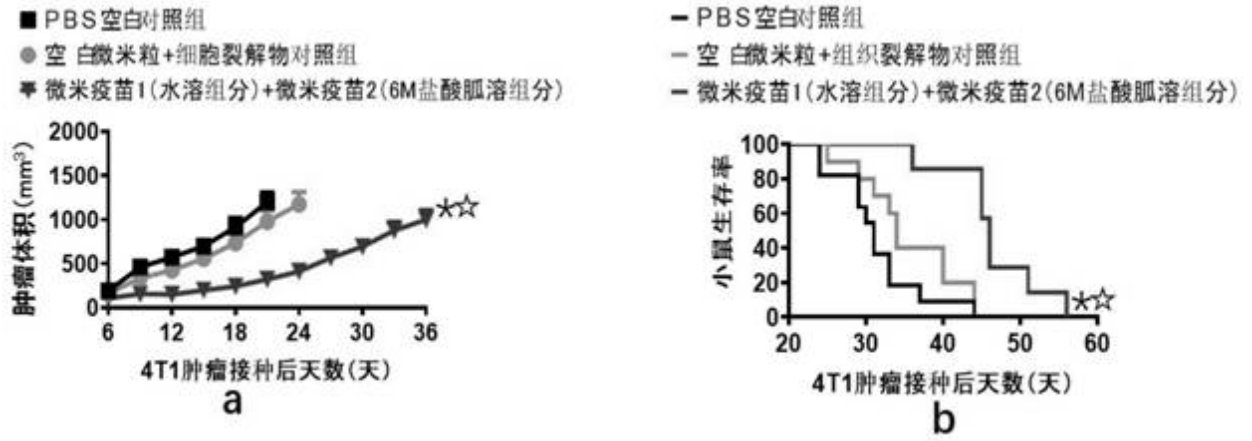


图28