

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610155210.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/65 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 6 月 27 日

[11] 公开号 CN 1986792A

[22] 申请日 2006.12.14

[21] 申请号 200610155210.3

[71] 申请人 方炳良

地址 313300 浙江省安吉县范潭工业园区灵
峰南路安吉福浪莱工业有限公司

[72] 发明人 方炳良

[74] 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司
代理人 胡红娟

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 5 页

[54] 发明名称

致病细胞的外来抗原标记方法

[57] 摘要

本发明公开了致病细胞的外来抗原标记方法，将外来抗原的基因连接到基因载体上后，将基因载体转染到致病细胞中，通过启动子实现抗原基因在致病细胞中的表达。将外来抗原基因转染到患者的体细胞后，外来抗原即可在被转染的体细胞内表达，刺激免疫系统，使其对外来抗原产生免疫反应。然后将同样的外来抗原转染到致病细胞或恶性细胞，如癌细胞中，使同样的外来抗原在恶性细胞中表达。这样，患者的免疫系统就能攻击被外来抗原标记的致病细胞或恶性细胞，并将它们排斥。

1. 一种致病细胞的外来抗原标记方法，其特征在于：将外来抗原的基因连接到基因载体上后，导入到致病细胞中，通过启动子实现抗原基因在致病细胞中的表达；所述的外来抗原的基因为植物抗原基因、动物抗原基因、异种异体抗原基因、细菌抗原基因、病毒抗原基因或真菌抗原基因中的一种或多种。

2、如权利要求1所述的致病细胞的外来抗原标记方法，其特征在于：所述的外来抗原的基因为编码一个多肽的基因或几个多肽的融合基因。

3、如权利要求2所述的致病细胞的外来抗原标记方法，其特征在于：所述的多肽为带有标记的多肽，标记加在多肽的氨基末端、C—末端或多肽的内部。

4、如权利要求1所述的致病细胞的外来抗原标记方法，其特征在于：所述的基因载体为病毒载体或非病毒载体。

5、如权利要求1所述的致病细胞的外来抗原标记方法，其特征在于：所述的启动子为CMV启动子、RSV启动子、SV40启动子、端粒酶启动子、AFP启动子、Probasin启动子、Medkine启动子、Survivin启动子、组织特异性启动子、肿瘤特异性启动子、人工合成启动子或组合启动子。

6、如权利要求1所述的致病细胞的外来抗原标记方法，其特征在于：所述的基因载体通过纳米技术、导管介导技术、皮内接种、皮下接种、肌肉注射、腹腔注射、静脉注射、口服或雾化吸入转染到致病细胞中。

7、如权利要求1所述的致病细胞的外来抗原标记方法，其特征在于：所述的致病细胞为癌细胞、病变细胞或恶性增殖细胞。

致病细胞的外来抗原标记方法

技术领域

本发明属基因工程领域,尤其是将外来抗原标记到致病细胞的标记方法,通过本发明方法标记后的致病细胞,更利于自身免疫系统的识别。

背景技术

现代肿瘤学与免疫学都已证实,由于基因突变,去分化,或某些基因在肿瘤细胞中的高度表达,或肿瘤相关病毒的感染,肿瘤细胞中通常存在各种肿瘤特异性抗原,肿瘤相关抗原,肿瘤相关病毒抗原。这也是现代肿瘤免疫疗法的基础。现代肿瘤免疫疗法包括被动免疫疗法与主动免疫疗法。被动免疫疗法是应用肿瘤特异性抗体或淋巴细胞进行肿瘤治疗。如 Herceptin 为抗Her2/Neu抗体,已在临床用于乳腺癌的治疗。主动免疫则应用肿瘤抗原为疫苗,或用各种免疫因子,如免疫刺激因子,细胞因子,白介素等以激活免疫系统,增强其对肿瘤抗原的识别与攻击。然而,这些免疫疗法的疗效取决于免疫系统对肿瘤抗原的识别能力。由于肿瘤抗原的微弱抗原性及肿瘤细胞的异质性,即同一肿瘤的不同细胞可含有不同的基因突变和肿瘤抗原,使得肿瘤免疫疗法面临两大难题。第一,对于某一特定病人,相当一部份肿瘤细胞得以逃避免疫系统的识别与攻击,导致治疗失败。临床实验业已证明,应用各种不同的肿瘤疫苗进行肿瘤治疗的成功率仅为2.6%。第二,对于某一癌症病人群体,由于其基因突变与肿瘤抗原的不同,需要使用不同的肿瘤抗原疫苗,即免疫治疗个体化,从而大大提高治疗成本。

应用外来抗原进行肿瘤或癌症的治疗已有较多的研究并在临床应用。例如,将卡介苗灌注到膀胱内以治疗浅表性膀胱癌已在临床使用多年。这一治疗方法在广意上,也是应用外来抗原进行疾病治疗。但是以往的研究,包括现在用卡介苗于治疗浅表性膀胱癌的临床应用都不包含对病人或

生病个体进行免疫诱导的阶段,也并不将外来抗原直接标记到肿瘤细胞或癌细胞上。而是简单地将外来抗原传递到肿瘤的外围或局部,利用免疫系统对外来抗原的攻击时所产生的炎症反应,而达到治疗目的。其疗效常因下述原因而受限制: 1) 由於没有免疫诱导,直接将外来抗原传递到肿瘤局部时,免疫系统对外来抗原的攻击能力可能不够强烈。2) 肿瘤局部通常存在各种免疫抑制机理,会进一步削弱免疫系统对外来抗原的攻击力。3) 免疫系统攻击外来抗原时,并不直接攻击肿瘤细胞或癌细胞,因此其消化处理肿瘤相关抗原的机会也将降低。起不到对该治疗局部以外的肿瘤细胞,如转移病灶,的治疗作用。

发明内容

本发明是一种将外来抗原标记到致病细胞的标记方法,通过本发明方法标记后的致病细胞,更利于自身免疫系统的识别。

一种致病细胞的外来抗原标记方法,主要通过基因工程,将外来抗原的基因连接到基因载体上。在用外来抗原免疫患病个体之后,再将基因载体导入到致病细胞中,通过启动子实现抗原基因在致病细胞中的表达。从而导致免疫系统对致病细胞的攻击,达到消除致病细胞的目的。

所述的外来抗原的基因是指非自身的异种抗原基因。异种抗原是指在患者同一物种中不存在,而存在于与患者不同物种中的抗原。若患者为病人,则外来抗原是指在人群中不存在,而存在于动物,植物,微生物的抗原。所以,外来抗原基因包括植物抗原基因,动物抗原基因,异种异体抗原基因,细菌抗原基因,病毒抗原基因,真菌抗原基因,以及其他能被患者个体免疫系统识别的任何异种抗原的基因。具体如细菌的LacZ基因,流感病毒基因,非典病毒抗原基因,甲肝病毒抗原基因,乙肝病毒抗原基因,疱疹病毒抗原基因,牛痘病毒抗原基因等。

如果外来抗原是为蛋白抗原,则外来抗原基因为直接编码该蛋白抗原的基因。如果外来抗原是多糖抗原,多聚体抗原,糖蛋白抗原,脂蛋白抗原等,则外来抗原基因为编码合成这些多糖抗原,多聚体抗原,糖蛋白抗原,脂蛋白抗原等所必需的酶基因。

所述的外来抗原的基因可为某一单独的异种抗原基因，或一个，两个，几个或多个抗原基因或它们的混合，一种，两种，几种或多种抗原基因或它们的混合。外来抗原基因也可为复制缺陷型或可复制型病毒基因或病毒基因组等。

所述的外来抗原的基因可为编码一个多肽的基因，或几个多肽的融合基因。所述的多肽可以是带有标记（Tag）的多肽，Tag可加在多肽的氨基末端，C-末端，或多肽的内部。可用Tag如Ubiquitin, Flag, Myc, Hemagglutinin (HA)。其中，Ubiquitin, Flag, Myc, Hemagglutinin (HA)等Tag可为一个，两个或多个。

用于刺激，诱导患者免疫系统对外来抗原产生免疫反应的外来抗原制剂也可为抗原本身或表达外来抗原的基因。

表达外来抗原的基因可通过各种基因载体，将外来抗原基因转染到患者的体细胞和致病细胞、恶性细胞中，使外来抗原在这些细胞中表达，从而达到免疫诱导与免疫治疗的目的。

表达外来抗原的基因可通过各种基因载体，用基因治疗的技术，纳米技术，导管介导技术等将其转染到患者的体细胞或恶性细胞中，使外来抗原基因在这些细胞中表达。

所述的基因载体可为病毒载体，或非病毒载体。病毒载体如腺病毒载体，腺病毒相关病毒载体（AAV），疱疹病毒载体（HSV），逆转录病毒载体，Lentivirus载体，牛痘病毒载体等。可为复制缺陷型载体或可复制型载体。非病毒载体如质粒DNA，RNA，DNA或/和RNA加各转染制剂，如脂质体，多聚物，纳米材料，基因枪等。

所述的外来抗原的基因可通过各种启动子使其在体内或致病细胞，癌细胞，肿瘤细胞中表达。如CMV启动子，RSV启动子，SV40启动子，端粒酶启动子，AFP启动子，Probasin启动子，Medkine启动子，Survivin启动子，组织特异性启动子，肿瘤特异性启动子，人工合成启动子，或组合启动子等。

所述的外来抗原基因载体可通过皮内接种，皮下接种，肌肉注射，腹腔注射，静脉注射，口服，雾化吸入，患病灶内直接注射等将外来抗原

基因转染到患者的体细胞或恶性细胞中，刺激免疫反应，或使致病细胞，恶性细胞，癌细胞，肿瘤细胞等获得外来抗原的标记，从而引导免疫系统对它们发起攻击。

所述的患者是指患有疾病，需要治疗的人(如病人)或哺乳动物。本专利所述的疾病治疗包括各种肿瘤，各种癌症，心血管疾病，传染性疾病，代谢性疾病，自身免疫疾病或其他难治疾病。

所述的外来抗原基因，基因载体，表达外来抗原基因的启动子，转染外来抗原基因至患者体细胞的技术，方法和程序可作各种修改与调整，而获得同样得治疗结果。因次，对本专利所述的外来抗原基因，基因载体，表达外来抗原基因的启动子，转染外来抗原基因至患者体细胞的技术，方法和程序的修改与调整也包含在本专利的范畴之内。

一般癌症病人的免疫系统仍然能有效地识别外来抗原，如细菌，病毒感染等，并有效地将外来抗原排除出去。如果免疫系统对外来抗原（或异种抗原）的识别，攻击与破坏作用引导到致病细胞，恶性细胞，或癌细胞上，就能将致病细胞，恶性细胞，或癌细胞排除。这一过程可应用外来抗原，外来抗原基因，及将外来抗原基因转染到患者体细胞的技术来实施。

首先，使病人或患者的免疫系统对外来抗原产生免疫力，这一过程称为免疫诱导。这一过程可通过对病人或患者接种外来抗原或表达外来抗原的基因而实现。通常需要一周到八周不等。一次，二次，几次或多次免疫接种可达到或增强免疫系统对外来抗原的免疫力。第二阶段为免疫治疗，即将外来抗原标记到致病细胞，恶性细胞，或癌细胞上。这一过程可通过基因治疗技术或纳米技术等来完成。治疗的次数可一次，二次，几次，或多次不等。将外来抗原的基因转染到肿瘤细胞，癌细胞中，外来抗原基因在这些细胞中表达与降解，其碎片与组织相融抗原相结合，便使这些细胞的表面含有外来抗原。外来抗原也可通过一些病毒载体，脂质体，或纳米技术直接转导到肿瘤细胞或癌细胞中。外来抗原在细胞中消化处理，降解后的碎片与组织相融抗原（H L A）相结合，便呈现到细胞表面。一旦外来抗原出现在肿瘤细胞或癌细胞的表面，免疫系统对外来抗原的攻击与破坏将导致被外来抗原标记的致病细胞，恶性细胞，或癌细胞的杀伤与死亡。

在这一过程中,免疫系统将消化处理被其杀伤的细胞,肿瘤细胞或癌细胞中的肿瘤相关抗原也被免疫系统消化处理。其信息反馈,可增强免疫系统对肿瘤相关抗原的识别能力,导致免疫系统对未被外来抗原标记的肿瘤细胞或癌细胞的攻击和排斥。

附图说明

图1 应用外来抗原基因转染技术进行肿瘤治疗的实验示意图;

图2A UV2237纤维肉瘤在小鼠皮下的生长曲线;

其中曲线1为PBS || PBS

其中曲线2为Ad/GFP || Ad/GFP

其中曲线3为Ad/LacZ || Ad/GFP

其中曲线4为Ad/LacZ || Ad/LacZ

图2B UV2237纤维肉瘤在小鼠皮下体积增长倍数;

其中曲线1为PBS || PBS

其中曲线2为Ad/GFP || Ad/GFP

其中曲线3为Ad/LacZ || Ad/GFP

其中曲线4为Ad/LacZ || Ad/LacZ

图3A UV2237纤维肉瘤小鼠的存活率;

图3B UV2237纤维肉瘤小鼠的存活率;

图4 K1735黑色素细胞癌小鼠的存活率;

图5 治疗后CT26肿瘤增长曲线

具体实施方式

实施例1 应用表达LacZ基因的腺病毒或表达GFP基因的腺病毒治疗纤维肉瘤。

我们用小鼠的肿瘤为实验对象。首先给C3H小鼠皮下接种 1×10^{10} 表达LacZ基因的腺病毒或表达GFP基因的腺病毒的病毒颗粒。对照组注射PBS。三周后在小鼠皮下接种 1×10^6 UV2237细胞。当肿瘤长到直径约0.5公分时,我们在肿瘤局部注射 5×10^{10} 表达LacZ基因的腺病毒或表达GFP

基因的腺病毒的病毒颗粒。每三天一次，重复三次。此后观察肿瘤生长状况。其结果见图1、表1。

表1 在纤维肉瘤模型中的实验结果（患瘤小鼠治愈率）

免疫 治疗	1	2	3	4
PBS PBS	0/2	0/5		
Ad/GFP Ad/GFP	2/5	NT		
Ad/LacZ Ad/GFP	0/4	4/10	2/10	
Ad/LacZ Ad/LacZ	3/5	7/14	6/15	6/10
PBS Ad-LacZ	NT	0/5	0/10	0/10
Ad/LacZ PBS	NT	0/5	0/5	0/10

应用LacZ腺病毒免疫再用LacZ腺病毒治疗，或应用GFP腺病毒免疫再用GFP腺病毒治疗的效果明显高于其他实验组。约40%-50%的动物经同类外来抗原免疫/同类外来抗原治疗后，其肿瘤完全消失。相反，未经免疫的小鼠，尽管接受同样的外来抗原治疗，其肿瘤排除频率为0。说明现接受外来抗原的免疫诱导在本治疗方法中起到重要作用。

同样，如图2、3所示，与其他治疗组相比，用同类外来抗原免疫再用同类外治疗，可明显抑制肿瘤生长，并延长小鼠的生存期。未经免疫治疗，或经免疫而不经同类抗原治疗，或不经免疫而经同类抗原治疗的小鼠，都应肿瘤生长，而在60-70天内全部死去。相比之下，经表达LacZ基因的腺病毒免疫及治疗的小鼠，有60%将肿瘤完全排除，存活120多天，未见肿瘤复发。

实施例2 应用表达LacZ基因或非典病毒抗原的质粒子治疗纤维肉瘤

构建能在哺乳细胞中表达的质粒。它们分别表达LacZ基因，非典病毒Sparkle抗原(SARS)，与野生型或突变型Ubiquitin 融合的非典病毒

Sparkle抗原(分别以USARS, UfSARS表示)。这质粒经过提纯,去除内毒素,并与脂质体(Liposome)形成复合体。实验小鼠首先在皮下接种这些复合体,使其对所含质粒所携带的基因编码的抗原产生免疫。然后,按实施例一所述,在皮下注射肿瘤细胞,待肿瘤长到0.5公分大小时,再向肿瘤注射同样的质粒/脂质体复合物。重复3-4次。然后,观察肿瘤的生长与消退。我们发现,用同样的质粒/脂质体复合物进行免疫与治疗,都可不同程度地使一些小鼠的肿瘤完全消失(结果见表2)。相反,未经免疫而用质粒/脂质体复合物治疗的则无效。本实验结果说明,用不同的基因治疗载体,或不同的基因,或融合基因,按本发明所述的技术方案,都可获得肿瘤治疗效果。

表2 排斥肿瘤依靠其它外来基因实验结果

免疫 治疗	消退肿瘤小鼠
PBS PBS	0/5
PBS pUfSARS	0/5
pLZ pLZ	4/5
pSARS pSARS	2/7
pUSARS pUSARS	2/6
pUfSARS pUfSARS	1/6

实施例3 用本发明的治疗方案治愈的小鼠完全排斥不含外来抗原的同一肿瘤。

在被治愈的小鼠上再次接种UV2237纤维肉瘤细胞。这些细胞并不携带用来免疫与治疗的外来基因。我们也将一些未治愈的小鼠的肿瘤切除,并在这些小鼠皮下接种同一批肿瘤细胞,以作对照。我们发现,凡被本治疗方案治愈的小鼠,都能将所接种地肿瘤细胞排除,不长肿瘤。相反,凡未被治愈的小鼠,不管它们接受何种免疫与治疗,都不能将再接种的肿瘤细胞排除。结果见表3。

表3 再次接种排出率

免疫 治疗	治疗反应	实验1	实验2
Ad/ GFP Ad/GFP	Yes	1/2	
Ad/ GFP Ad/GFP	No	0/2	
PBS PBS	No	0/3	
Ad/LacZ Ad/GFP	No	0/3	
Ad/LacZ Ad/GFP	Yes	NA	4/4
Ad/LacZ Ad/LacZ	Yes	3/3	5/5
Ad/LacZ Ad/LacZ	No	0/2	

这一结果说明,本发明可以诱导免疫系统对肿瘤细胞产生免疫,并排除同样的肿瘤细胞,尽管这些肿瘤细胞并不含有外来抗原。

为了进一步检验由本方法的肿瘤免疫是否具有肿瘤特异性,我们在治愈的小鼠两侧分别接种被治愈的肿瘤(UV2237)之细胞与另一种不同的肿瘤细胞(K1735)。UV2237为纤维肉瘤,而 K1735为黑色素细胞癌。我们也将一些未治愈的小鼠的肿瘤切除,并在这些小鼠皮下接种同样的肿瘤细胞,以作对照。我们发现在未治愈的小鼠身上,纤维肉瘤和黑色素细胞癌都能生长。而在携有纤维肉瘤而被治愈的小鼠身上,仅长黑色素细胞癌,并不长纤维肉瘤,结果见表4。

表4 再次接种排出率

免疫 治疗	原始 UV2237 反应	再次接种 UV2237	再次接种 K1735
PBS PBS	No	0/4	0/4
PBS Ad/LacZ	No	0/4	0/4
Ad/LacZ Ad/LacZ	Yes	4/4	0/4

实施例4 应用表达LacZ基因的腺病毒治疗黑色素细胞癌。

按实施例1中所述的方法,先给C3H小鼠皮下接种 1×10^{10} 表达LacZ基

因的腺病毒，以诱导小鼠对LacZ抗原及腺病毒抗原产生免疫。对照组则注射PBS。三周后在小鼠皮下接种 1×10^6 K1735黑色素细胞癌细胞。当肿瘤长到直径约0.5公分时，我们在肿瘤局部注射 5×10^{10} 表达LacZ基因的腺病毒颗粒或PBS。每三天一次，重复三次。此后观察肿瘤生长状况。其结果见图4。我们发现，应用LacZ腺病毒免疫再用LacZ腺病毒治疗的治疗效果明显比其他两组的效果好。经外来抗原免疫而不经同类抗原治疗的小鼠在80天内全部死于肿瘤，肿瘤排斥率为(0/10)。未经外来抗原免疫而经外来抗原治疗的小鼠，仅有1/10的小鼠排斥肿瘤，其肿瘤排斥率或治愈率为10%。相比之下，经表达LacZ基因的腺病毒免疫及治疗的小鼠，有40% (4/10)将肿瘤完全排除，存活120多天，未见肿瘤复发。分析表明，与其他两组相比，经外来抗原免疫再经外来抗原治疗的效果具有显著意义 ($P < 0.05$)。

实施例5 应用牛痘病毒(Vaccinia Virus)治疗CT26结肠癌细胞肿瘤。

先给Balb/C小鼠皮下接种 2×10^6 的牛痘病毒，每周一次，共3次，以诱导小鼠对牛痘病毒抗原产生免疫。对照组则注射PBS。在第四周，我们在小鼠皮下接种 1×10^6 CT26结肠癌细胞。当肿瘤长到直径约0.5公分时，我们在肿瘤局部注射 1×10^7 的牛痘病毒颗粒或PBS。每三天一次，重复三次。此后观察肿瘤生长状况。其结果见图5。我们发现，应用牛痘病毒免疫再用牛痘病毒治疗的治疗效果明显比其他三组的效果好。经外来抗原免疫而不经同类抗原治疗的小鼠在20天内全部死于肿瘤，肿瘤排斥率为(0/7)。未经外来抗原免疫而经外来抗原治疗的小鼠，虽然肿瘤生长有所延晚，但其肿瘤排斥率或治愈率也为0 (0/7)。相比之下，经表牛痘病毒免疫及治疗的小鼠，有44% (3/7)将肿瘤完全排除。分析表明，与其他三组相比，先用牛痘病毒免疫再用牛痘病毒治疗的效果具有显著意义 ($P < 0.05$)。

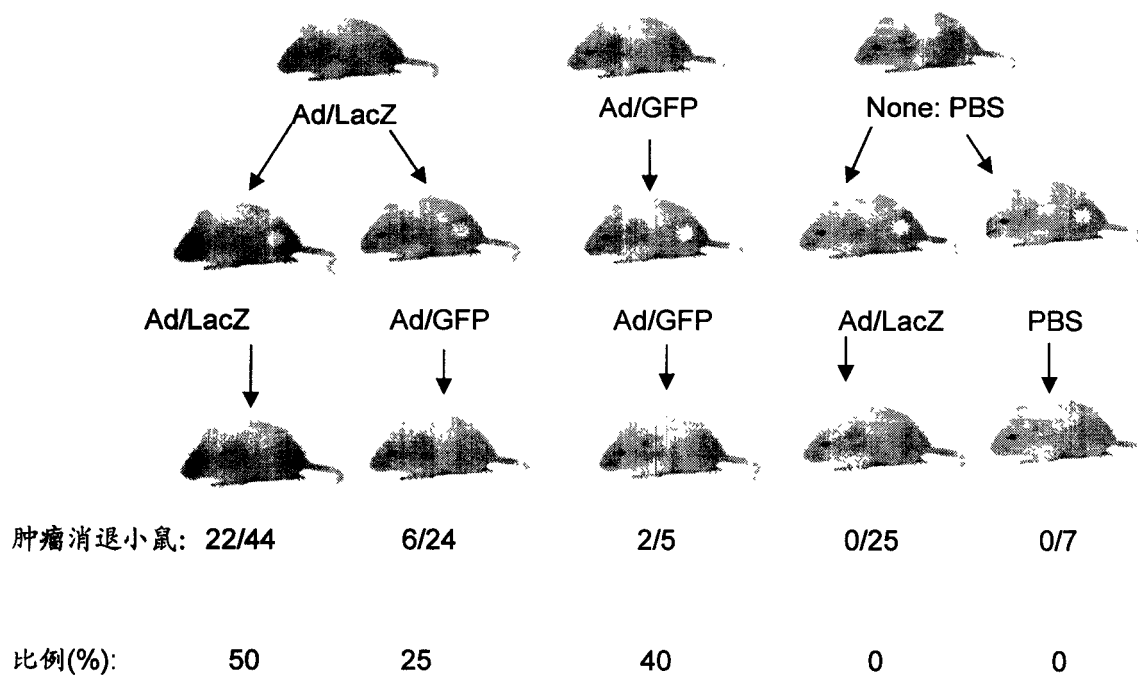


图 1

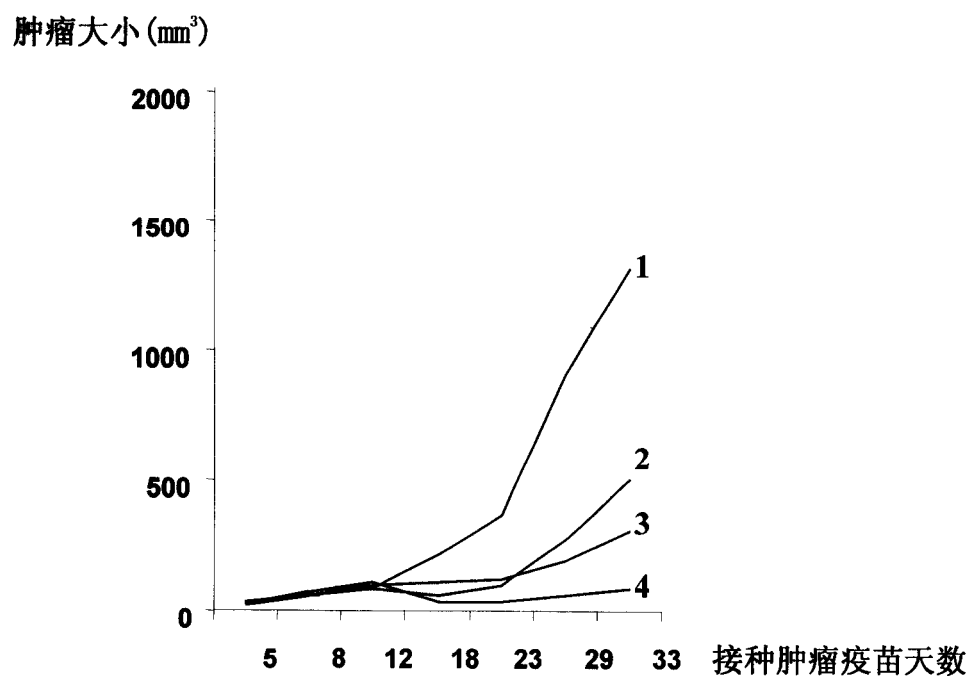


图 2A

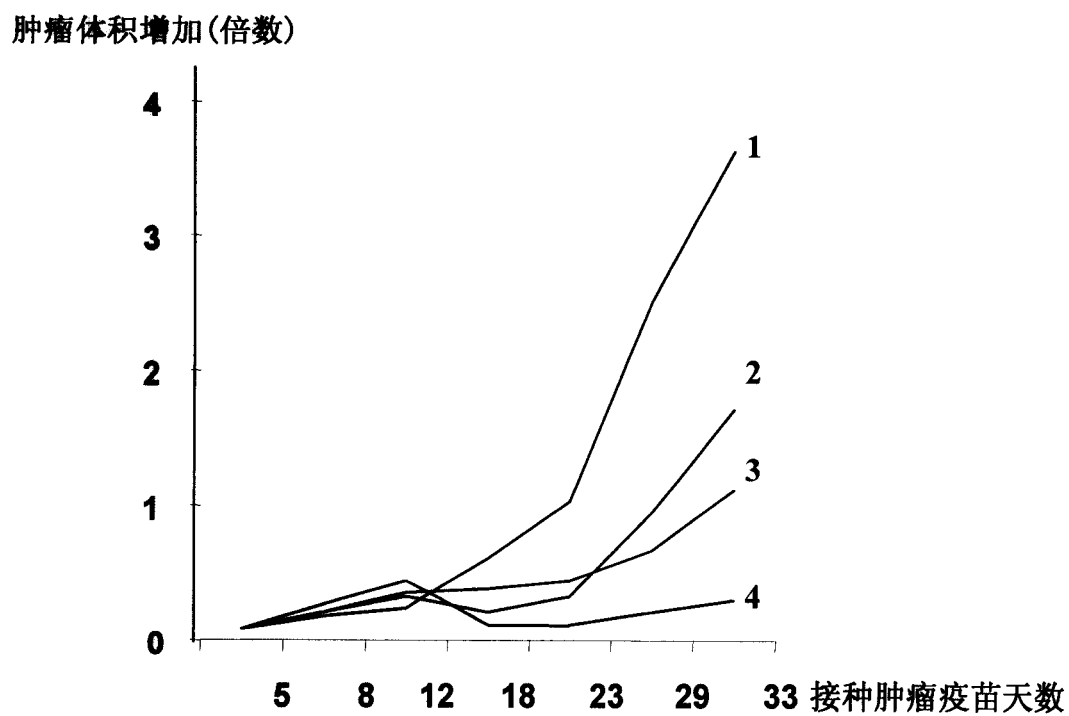


图 2B

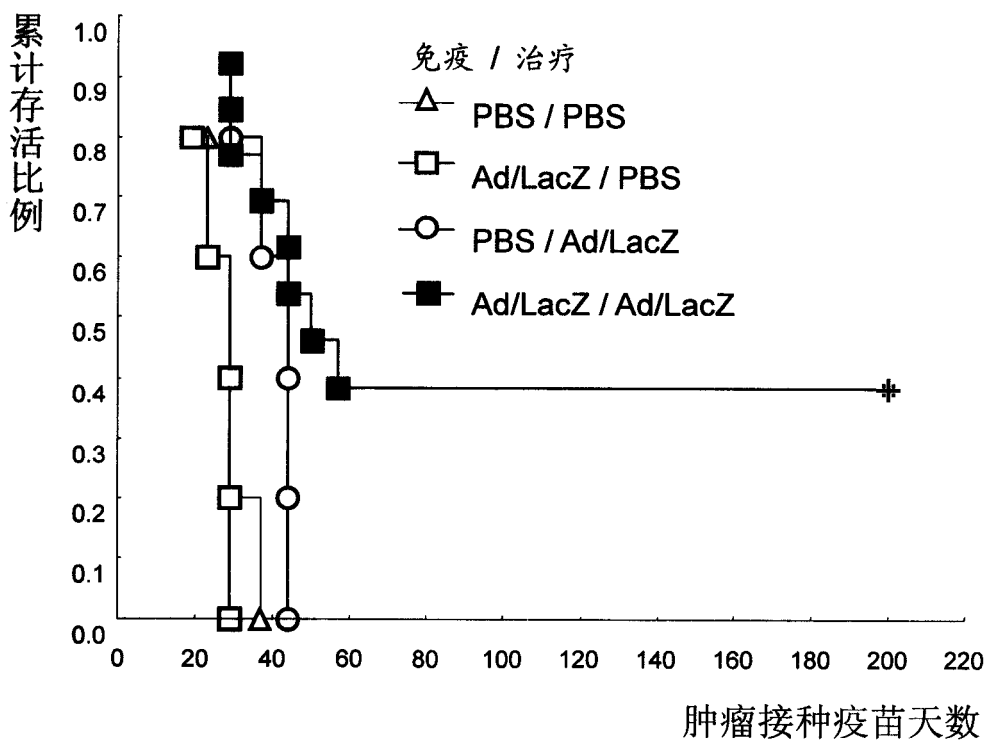


图 3A

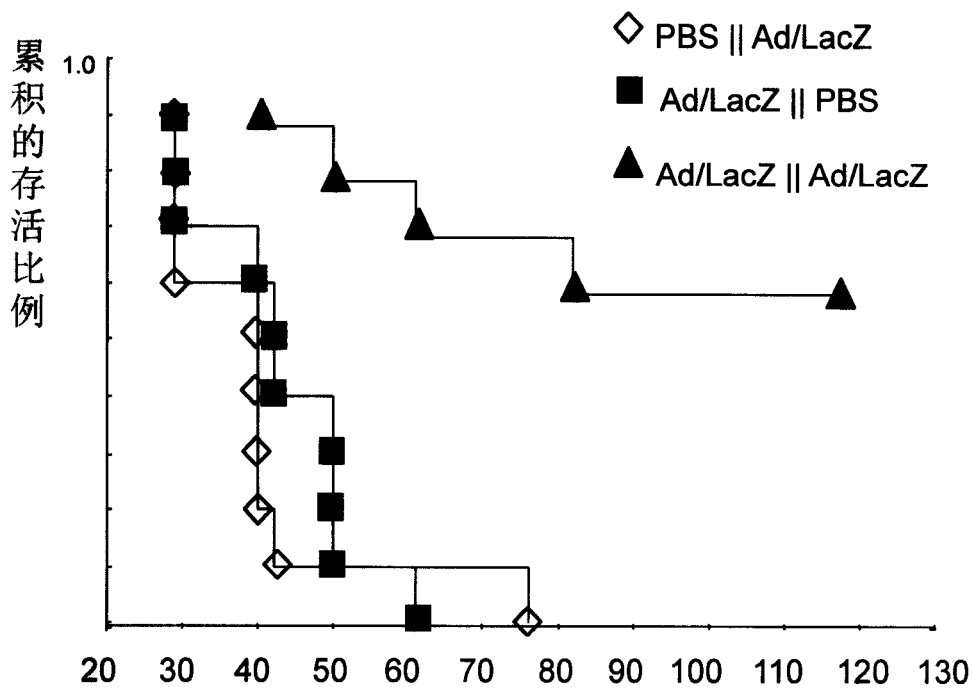


图 3B

累积的存活比例

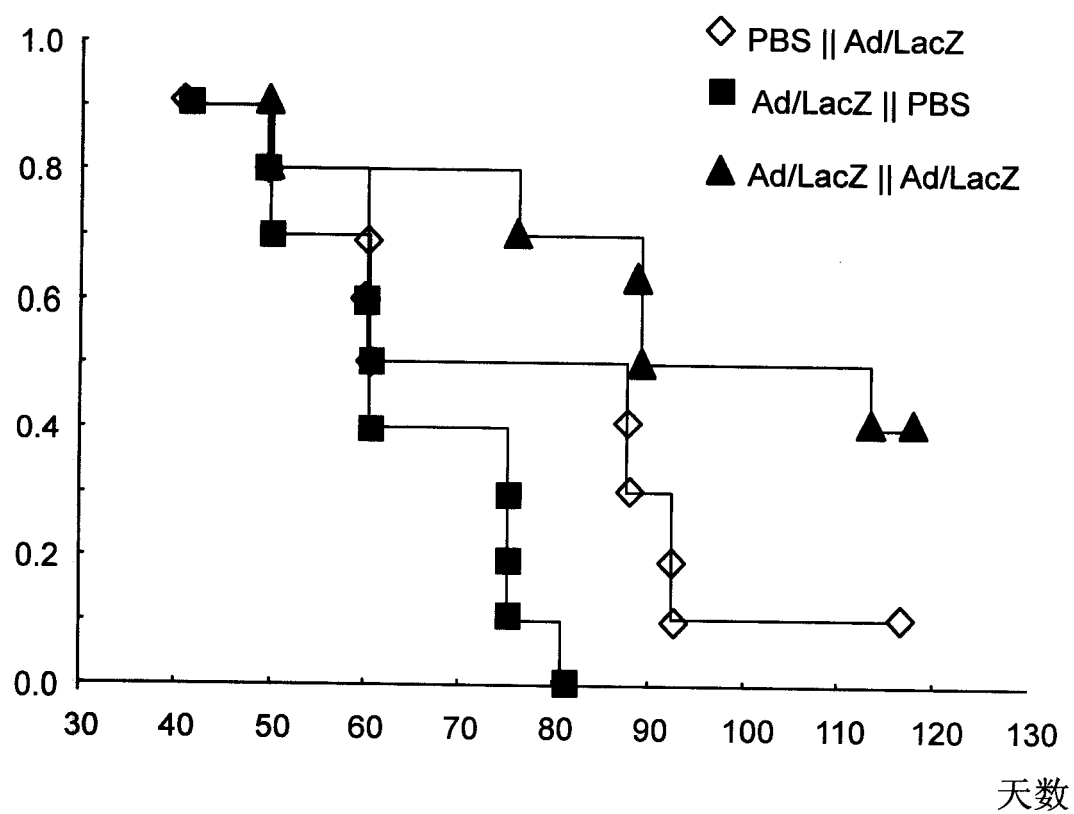


图 4

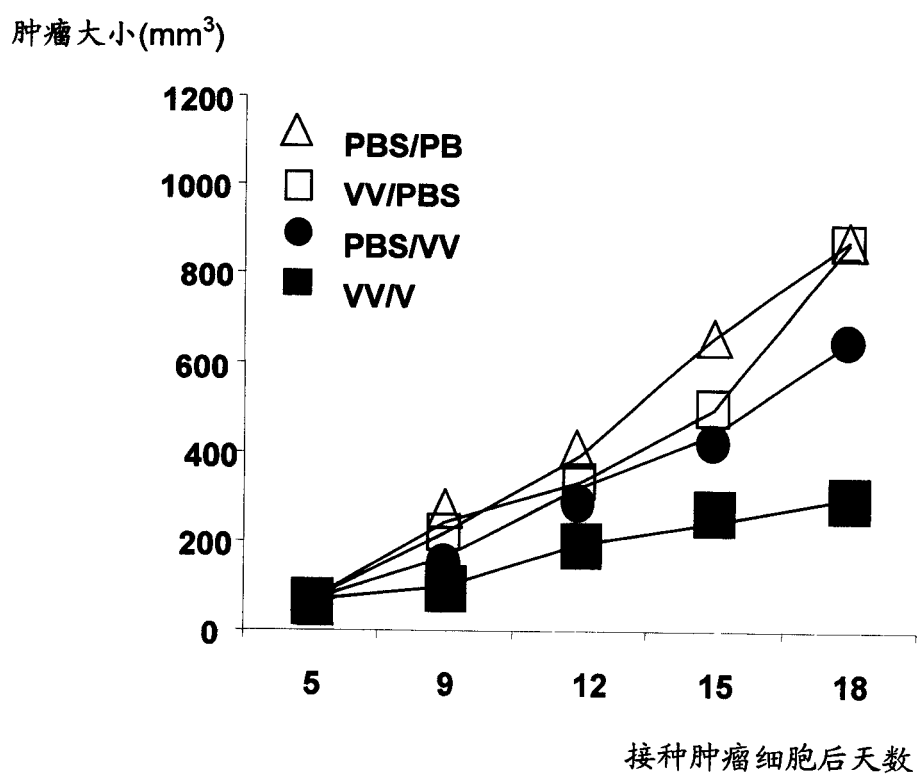


图 5

专利名称(译)	致病细胞的外来抗原标记方法		
公开(公告)号	CN1986792A	公开(公告)日	2007-06-27
申请号	CN200610155210.3	申请日	2006-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	方炳良		
申请(专利权)人(译)	方炳良		
当前申请(专利权)人(译)	方炳良		
[标]发明人	方炳良		
发明人	方炳良		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/65 C12N15/62 G01N33/53 G01N33/574		
代理人(译)	胡红娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了致病细胞的外来抗原标记方法，将外来抗原的基因连接到基因载体上后，将基因载体转染到致病细胞中，通过启动子实现抗原基因在致病细胞中的表达。将外来抗原基因转染到患者的体细胞后，外来抗原即可在被转染的体细胞内表达，刺激免疫系统，使其对外来抗原产生免疫反应。然后将同样的外来抗原转染到致病细胞或恶性细胞，如癌细胞中，使同样的外来抗原在恶性细胞中表达。这样，患者的免疫系统就能攻击被外来抗原标记的致病细胞或恶性细胞，并将它们排斥。

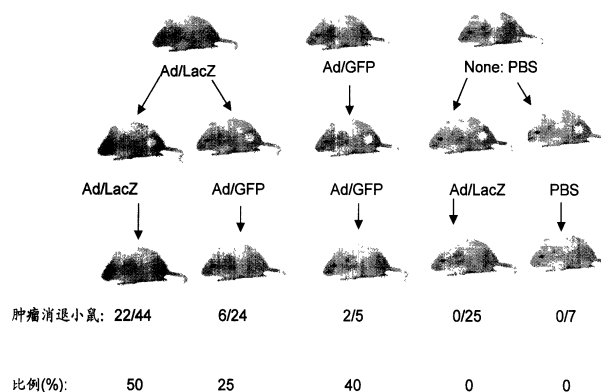


图 1