



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101856496 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 13

(21) 申请号 201010193091. 7

(22) 申请日 2010. 06. 07

(71) 申请人 四川大学

地址 610041 四川省成都市高新区高朋大道
科园四路 1 号

(72) 发明人 魏于全 陈县城 周莉娜 杨莉

(74) 专利代理机构 成都科海专利事务有限责任
公司 51202

代理人 岳英

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006. 01)

C12N 5/0735 (2010. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 3 页

(54) 发明名称

胎盘干细胞抗肿瘤疫苗及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及生物医学工程技术,特别是一种用胎盘干细胞制作的抗肿瘤疫苗及其制备方法与应用。本发明的疫苗是在小冻存管中保存有培养 8 代后的胎盘干细胞,每只小冻存管有胎盘干细胞数量为 5×10^5 个 ($200 \mu l$)。其疫苗的制备方法有四个步骤:(1) 处理胎盘组织,(2) 胎盘干细胞的获取,(3) 胎盘干细胞的培养并传代 8 次,(4) 制作胎盘干细胞抗肿瘤疫苗。本发明提供一种在肿瘤建立之前可以起到疫苗防御作用的,使机体对肿瘤干细胞产生特异性免疫抗体与致敏淋巴细胞,抑制肿瘤干细胞生长与迁徙,从而达到阻断体内肿瘤发生、发展与转移的细胞生物制剂。抑瘤率可以达到 70% 以上,可以用于多种肿瘤,如肺癌、乳腺癌、结肠癌、黑色素瘤等的防治。

1. 一种胎盘干细胞抗肿瘤疫苗,其特征在于:在 1ml 的小冻存管中保存有培养 8 代后的胎盘干细胞,每只小冻存管含胎盘干细胞抗肿瘤疫苗和人 AB 血清,总体积为 200 μ l,其中胎盘干细胞数量为 5×10^5 个,置于 -80°C 冰箱保存待用。

2. 根据权利要求 1 所述的胎盘干细胞抗肿瘤疫苗的制备方法,下面操作是在无菌条件下进行,其特征在于:

(1) 处理胎盘组织:取足月生产的胎盘组织,将胎盘组织剪碎成 $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 大小,用总体积 2L 的 D-Hank's 平衡盐溶液,冲洗 3 次,直接用滤网过滤后收集胎盘组织,

(2) 胎盘干细胞的获取:取上述收集到的胎盘组织用 0.25% 胰蛋白酶 10ml 37°C 消化 5min,终止消化后,200 目滤网过滤,收集单细胞,

(3) 胎盘干细胞的培养:将上述单细胞用 D-Hank's 平衡盐溶液 35ml 洗一遍,加入配好的含 5% 人 AB 血清的 DMEM 培养基,调整培养细胞浓度为 4×10^5 个 /ml,接种于 75cm^2 的培养瓶内,置于 37°C , 5% CO_2 , 饱和湿度 95% 的培养箱培养,每 3 ~ 4 天进行换液,即将培养瓶中培养基倒出,换为新鲜配制的培养基,当胎盘干细胞生长至培养瓶壁 70% ~ 80%,单层,即吸尽培养基,加入 2 ~ 3ml 的 0.25% 胰酶,消化 3 ~ 5min,在倒置显微镜下观察,当 90% 的细胞漂浮变圆时,加入大于 2 倍于胰酶体积的培养基终止消化,并用弯管吹打混匀,转移到 15ml 离心管中,离心 1500rpm, 3min,弃上清,加少许培养基混匀,分装入 2 ~ 4 个装有约 10ml 培养基的 75cm^2 培养瓶中,扩大培养,3 ~ 4 天传代 1 次,直至传代 8 次,

(4) 制作胎盘干细胞抗肿瘤疫苗:当传代 8 次后的胎盘干细胞生长至培养瓶壁 70% ~ 80%,单层,即按上述步骤消化细胞,离心,弃上清后,加入人 AB 血清,将细胞吹散混匀,并将细胞浓度调至 2.5×10^6 /ml,按照 200 μ l,即 5×10^5 个胎盘干细胞,分装于 1ml 小冻存管中,然后置于 -80°C 冰箱中保存待用。

3. 根据权利要求 1 所述的胎盘干细胞抗肿瘤疫苗的应用,其特征在于:生产直接用于抑制肿瘤的发生、发展和转移,预防和治疗肿瘤的疫苗的应用。

胎盘干细胞抗肿瘤疫苗及其制备方法与应用

[0001] 技术领域 本发明涉及生物医学工程技术,特别是一种用胎盘干细胞制作的抗肿瘤疫苗以及该疫苗的制备方法与应用

[0002] 背景技术 无论是在发展中国家还是发达国家,恶性肿瘤依然是一类常见的疾病,其发病率与死亡率居高不下,甚至有增无减,仍然是威胁人类生存的头号杀手,严重干扰患者的健康和影响生存质量。目前治疗肿瘤的技术方法有化疗、放疗、手术与生物治疗四大模式。化疗对患者有着严重的毒副作用,例如骨髓抑制,包括粒细胞减少等;脏器损伤,包括肾脏,肝脏等的严重毒副作用;消化道反应,包括食欲减退、恶心、呕吐等;此外还包括脱发、局部组织坏死、静脉炎等。放疗的毒副作用主要表现在皮肤、粘膜放射性溃疡及糜烂;对眼睛、骨骼、肺等也存在严重副作用。肿瘤的手术治疗也存在许多不足,包括创面大、易伴发感染、出血等严重副作用。肿瘤的生物治疗目前比较热门的包括细胞因子治疗、基因治疗、免疫治疗等。肿瘤细胞因子治疗的缺点主要是制备过程繁琐,细胞本身具有毒副作用。基因治疗的主要缺点包括基因载体构建困难、载体的毒副作用,以及基因转染效率低等。目前对肿瘤疫苗的研究,主要包括树突状细胞肿瘤疫苗,但该疫苗制作过程繁琐、且在大多数肿瘤中,没有可被树突状细胞呈递的供 T 细胞识别的抗原决定簇。这些局限性导致其应用很有限,且预防肿瘤形成的效果不明显。因此,寻求效果更佳策略和方案一直是恶性肿瘤预防与治疗学研究的重要课题。

[0003] 发明内容 本发明正是为了克服上述现有技术中的不足之处,而提供一种在肿瘤建立之前可以起到疫苗防御作用的,使机体对肿瘤干细胞产生特异性免疫抗体与致敏淋巴细胞,抑制肿瘤干细胞生长与迁徙,从而达到阻断体内肿瘤形成与转移的细胞生物制剂:胎盘干细胞抗肿瘤疫苗及其制备方法与应用。

[0004] 越来越多证据表明肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是肿瘤形成的起始细胞与肿瘤转移的先锋细胞,同时也为肿瘤复发的根源。由于肿瘤干细胞免疫原性低下,对机体免疫系统持续刺激易于诱导免疫耐受,从而有利于肿瘤产生与转移形成,刺激机体打破对肿瘤干细胞的免疫耐受,产生特异免疫抗体与致敏淋巴细胞,抑制肿瘤干细胞增生,可能成为将来防治肿瘤的有效新途径。近期研究表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)与肿瘤干细胞之间有许多类似的生物学特征包括免疫原性与反应原性,二者之间可能具有交叉免疫性。间充质干细胞可通过免疫原性的提高,从而打破免疫系统对肿瘤干细胞的免疫耐受。人胎盘衍生的干细胞(human placenta-derived stem cells, hPDSCs)更是近几年备受关注的研究领域, hPDSCs 来源于孕产妇生产过程中的胎盘,属于人体遗弃组织,取材方便、来源充足,没有伦理及法律方面的制约;先期研究结果表明 hPDSCs 具有间充质干细胞的生物学性状。人胎盘干细胞有着和其他来源的间充质干细胞相似的生物学特征,具有大规模培养的可能,可以为肿瘤生物学防治提供潜在的理想方法。hPDSCs 在形态上与骨髓 MSC 类似,光学显微镜下胎盘干细胞呈长梭形,为典型的成纤维细胞样,排列规则,经 2 周后逐渐形成扁平单层细胞,并呈漩涡状或成簇生长(参见说明书附图 1),随着细胞密度的增加,胞体变得细长,形态类似成纤维细胞。

[0005] 本发明的任务是这样实现的:胎盘干细胞抗肿瘤疫苗,是在 1ml 的小冻存管中保

存有培养 8 代后的胎盘干细胞,每只小冻存管含胎盘干细胞抗肿瘤疫苗和人 AB 血清,总体积为 200 μ l,其中胎盘干细胞数量为 5×10^5 个,置于 -80°C 冰箱保存待用。

[0006] 上述胎盘干细胞抗肿瘤疫苗的制备方法,其操作是在无菌条件下进行,分为四个步骤:(1) 处理胎盘组织,(2) 胎盘干细胞的获取,(3) 胎盘干细胞的培养并传代 8 次,(4) 制作胎盘干细胞抗肿瘤疫苗。

[0007] 胎盘干细胞抗肿瘤疫苗的应用是生产直接用于抑制肿瘤的发生、发展和转移,预防和治疗肿瘤的疫苗。本发明的胎盘干细胞抗肿瘤疫苗的使用选择在肿瘤发生之前,即在动物模型上,我们先定期对动物接种疫苗,注射部位选择背侧部右后方皮下,为了避免短期重复免疫而使机体产生免疫耐受,第一次与第二次接种疫苗的时间间隔为 1 ~ 2 周,第二次与第三次疫苗接种间隔为 1 周,一共接种疫苗 3 次,以加强小鼠对干细胞的免疫功能,第三次接种后间隔 1 周接种肿瘤细胞。

[0008] 附图说明 以下是本发明说明书附图的图面说明:

[0009] 图 1 是本发明分离的人胎盘干细胞(hPDSCs)的形态。

[0010] 图 2 是本发明抗成瘤比较-肺癌模型,实验组应用胎盘干细胞抗肿瘤疫苗,肿瘤体积明显小于对照组,甚至不形成肿瘤。

[0011] 图 3 是本发明抗成瘤比较-乳腺癌模型,实验组应用胎盘干细胞抗肿瘤疫苗,肿瘤体积明显小于对照组,甚至不形成肿瘤。

[0012] 图 4 是本发明抗成瘤比较-结肠癌模型,实验组应用胎盘干细胞抗肿瘤疫苗,肿瘤体积明显小于对照组,甚至不形成肿瘤。

[0013] 图 5 是抗成瘤比较-黑色素瘤模型,实验组应用胎盘干细胞抗肿瘤疫苗,肿瘤体积明显小于对照组,甚至不形成肿瘤。

[0014] 图 6 是本发明实验组虽经多次加强免疫,相关内脏仍无明显异常,但脾呈显著免疫增生反应。

[0015] 本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0016] 1. 应用胎盘干细胞,作用于成瘤前的机体,诱导体内产生针对肿瘤干细胞的抗体与致敏淋巴细胞,从而使机体免于肿瘤的发生;

[0017] 2. 可以用于多种肿瘤,如肺癌、乳腺癌、结肠癌、黑色素瘤等的防治;

[0018] 3. 可以抑制多种肿瘤的生长和转移,延长荷瘤小鼠的生存期,抑瘤率可以达到 70% 以上;

[0019] 4. 人胎盘衍生的干细胞(hPDSCs)来源于孕产妇生产过程中的胎盘,属于人体遗弃组织,取材方便、容易获取,资源丰富,没有伦理及法律方面的制约,具有大规模培养的可能,为肿瘤生物学治疗提供潜在的理想方法。

[0020] 具体实施方式 本发明以下将结合实施例和说明书附图作进一步详述:

[0021] 实施例 1. 一种胎盘干细胞抗肿瘤疫苗,是在 1ml 的小冻存管中保存有培养 8 代后的胎盘干细胞,每只小冻存管含胎盘干细胞抗肿瘤疫苗和人 AB 血清,总体积为 200 μ l,其中胎盘干细胞数量为 5×10^5 个,置于 -80°C 冰箱保存待用。

[0022] 实施例 2. 胎盘干细胞抗肿瘤疫苗的制备方法:

[0023] 其操作是在无菌条件下进行,分为四个步骤:(1) 处理胎盘组织,(2) 胎盘干细胞的获取,(3) 胎盘干细胞的培养并传代 8 次,(4) 制作胎盘干细胞抗肿瘤疫苗。以下分这四

个步骤详细说明：

[0024] (1) 处理胎盘组织：取足月生产的胎盘组织（捐献者均签署知情同意书，并经过医院伦理委员会同意），将胎盘组织剪碎成 $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 大小，用总体积 2L 的 D-Hank's 平衡盐溶液，冲洗 3 次，直接用滤网过滤后收集胎盘组织。

[0025] (2) 胎盘干细胞的获取：取上述收集到的胎盘组织用 0.25% 胰蛋白酶 10ml 37℃ 消化 5min，终止消化后，200 目滤网过滤，收集单细胞。参见说明书附图 1 就是本发明分离的人胎盘干细胞 (hPDSCs) 的形态。

[0026] (3) 胎盘干细胞的培养：将上述单细胞用 D-Hank's 平衡盐溶液 35ml 洗一遍，加入配好的含 5% 人 AB 血清的 DMEM 培养基，调整培养细胞浓度为 4×10^5 个 /ml，接种于 75cm^2 的培养瓶内，置于 37℃，5% CO_2 ，饱和湿度 95% 的培养箱培养，每 3～4 天进行换液，即将培养瓶中培养基倒出，换为新鲜配制的培养基，当胎盘干细胞生长至培养瓶壁 70%～80%，单层，即吸尽培养基，加入 2～3ml 的 0.25% 胰酶，消化 3～5min，在倒置显微镜下观察，当 90% 的细胞漂浮变圆时，加入大于 2 倍于胰酶体积的培养基终止消化，并用弯管吹打混匀，转移到 15ml 离心管中，离心 1500rpm，3min，弃上清，加少许培养基混匀，分装入 2～4 个装有约 10ml 培养基的 75cm^2 培养瓶中，扩大培养，3～4 天传代 1 次，直至传代 8 次。

[0027] (4) 制作胎盘干细胞抗肿瘤疫苗：当传代 8 次后的胎盘干细胞生长至培养瓶壁 70%～80%，单层，即按上述步骤消化细胞，离心，弃上清后，加入人 AB 血清，将细胞吹散混匀，并将细胞浓度调至 2.5×10^6 /ml，按照 200 μl ，即 5×10^5 个胎盘干细胞，分装于 1ml 小冻存管中，然后置于 -80℃ 冰箱中保存待用。

[0028] 实施例 3. 胎盘干细胞抗肿瘤疫苗抑制肿瘤发生的动物模型构建：

[0029] 采用 6-8 周龄、18-24g 的 C57BL/6 小鼠建立肺癌与黑色素瘤模型，采用 6-8 周龄、18-24g 的 BALB/c 小鼠建立乳腺癌和结肠癌模型。实验组动物分成两组，每只右侧胁部皮下接种胎盘干细胞抗肿瘤疫苗 5×10^5 个 (200 μl)，于第一次免疫后 1～2 周（隔 1 周与隔 2 周免疫组）进行第二次免疫，部位和剂量同第一次。并且观察小鼠的精神状态，有无成瘤，有无消瘦，食欲不振，死亡等不良反应。于第二次免疫后 1 周行第三次免疫，第三次免疫后 1 周，接种肺癌、乳腺癌、结肠癌与黑色素瘤等肿瘤细胞。

[0030] 实施例 4. 胎盘干细胞抗肿瘤疫苗体内注射抑制肿瘤的发生：

[0031] 第三次免疫后 1 周接种 Lewis 肺癌 (LL/2c) 细胞、乳腺癌 (4T1) 细胞、结肠癌细胞 (C26) 细胞、黑色素瘤 (B16-F10) 细胞，每只 5×10^5 个 (200 μl)，并于接种后每隔 4 天测量一次肿瘤体积和小鼠体重，观察有无体重减轻等不良反应。接种肿瘤后第 6 天，对照组有一半小鼠可以扪及肿瘤，第 9 天对照组所有小鼠可以扪及肿瘤；与对照组相比，实验组在接种后第 12 天，有一半小鼠可扪及肿瘤，第 27 天 60-80% 小鼠可扪及肿瘤。实验组在肿瘤接种后第 21 和 30 天的抑瘤率分别达到了 71.5% 和 59%。实验组肿瘤的生长明显较对照组慢，20-40% 的小鼠甚至不形成肿瘤，结果具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

[0032] 参见说明书附图 2，就是本发明抗成瘤比较 - 肺癌模型，实验组应用胎盘干细胞抗肿瘤疫苗，肿瘤体积明显小于对照组，甚至不形成肿瘤。

[0033] 参见说明书附图 3，就是本发明抗成瘤比较 - 乳腺癌模型，实验组应用胎盘干细胞抗肿瘤疫苗，肿瘤体积明显小于对照组，甚至不形成肿瘤。

[0034] 参见说明书附图 4，就是本发明抗成瘤比较 - 结肠癌模型，实验组应用胎盘干细胞

抗肿瘤疫苗,肿瘤体积明显小于对照组,甚至不形成肿瘤。

[0035] 参见说明书附图 5,就是抗成瘤比较 - 黑色素瘤模型,实验组应用胎盘干细胞抗肿瘤疫苗,肿瘤体积明显小于对照组,甚至不形成肿瘤。

[0036] 实施例 5. 胎盘干细胞抗肿瘤疫苗体内注射抑制肿瘤血管生成

[0037] 我们通过对肿瘤组织免疫组化染色,观察到实验组肿瘤组织中的新生血管明显少于对照组,这也与肿瘤体积明显小于对照组相呼应。

[0038] 实施例 6. 胎盘干细胞抗肿瘤疫苗体内注射抑制肿瘤干细胞的生长

[0039] 与对照组相比,肿瘤组织的 CD133 免疫组化染色显示,实验组肿瘤组织中肿瘤干细胞明显少于对照组,这与实验组肿瘤体积显著小于对照组,甚至实验组有小鼠不成瘤有关,结果有统计学意义 ($P < 0.05$)。

[0040] 实施例 7. 胎盘干细胞抗肿瘤疫苗体内注射增加自然杀伤 (NK) 细胞在肿瘤周围的数量及活性

[0041] 与对照比较,肿瘤组织 CD56、CD57 免疫组化染色显示,实验组肿瘤组织周围及肿瘤组织中的自然杀伤 (NK) 细胞和 T 细胞明显多于对照组,结果有统计学意义 ($P < 0.05$)。

[0042] 实施例 8. 胎盘干细胞抗肿瘤疫苗体内注射无成瘤性及毒副作用

[0043] 在注入胎盘干细胞抗肿瘤疫苗后,我们定期观察小鼠右侧胁部有无成瘤,未发现有成瘤现象。小鼠无消瘦,脱毛,食欲不振等不良反映。处死小鼠后,心、肝、脾、肺、肾 HE 染色显示实验组未发现明显毒副作用。

[0044] 参见说明书附图 6,实验组虽经多次加强免疫,相关内脏仍无明显异常,但脾脏呈显著免疫增生反应。

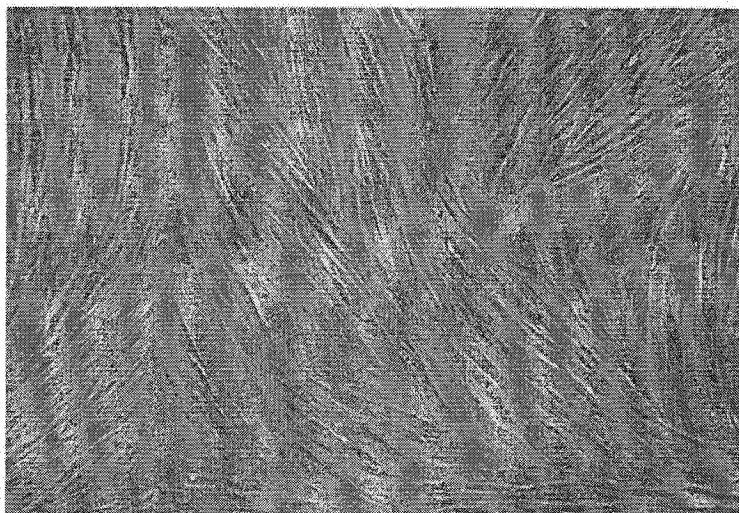


图 1

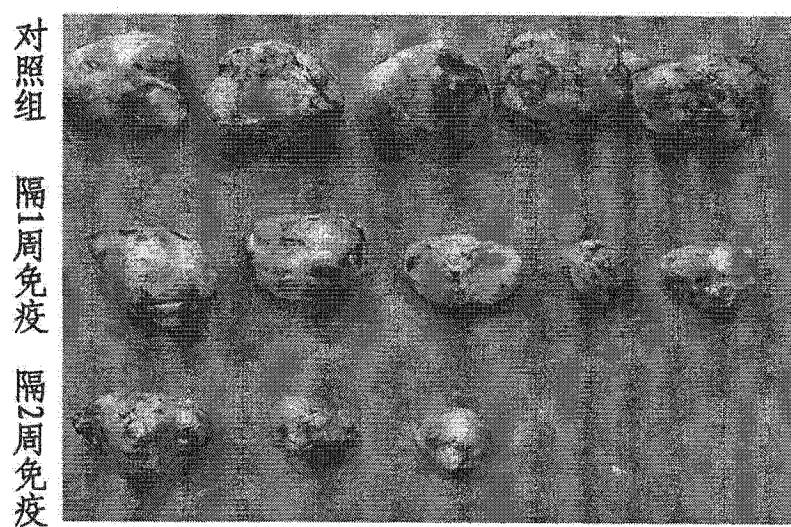


图 2

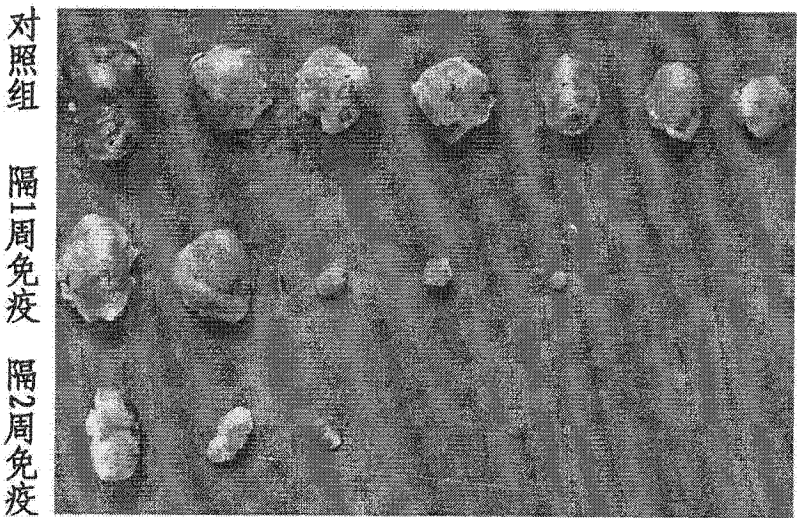


图 3

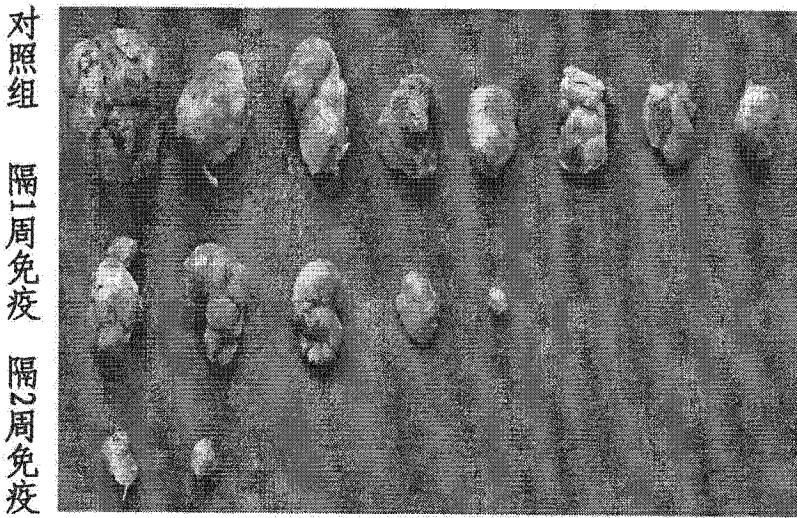


图 4

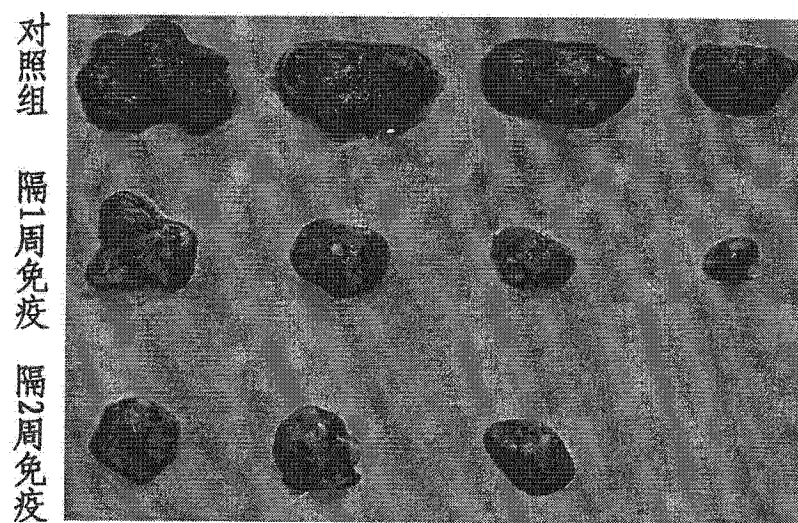


图 5

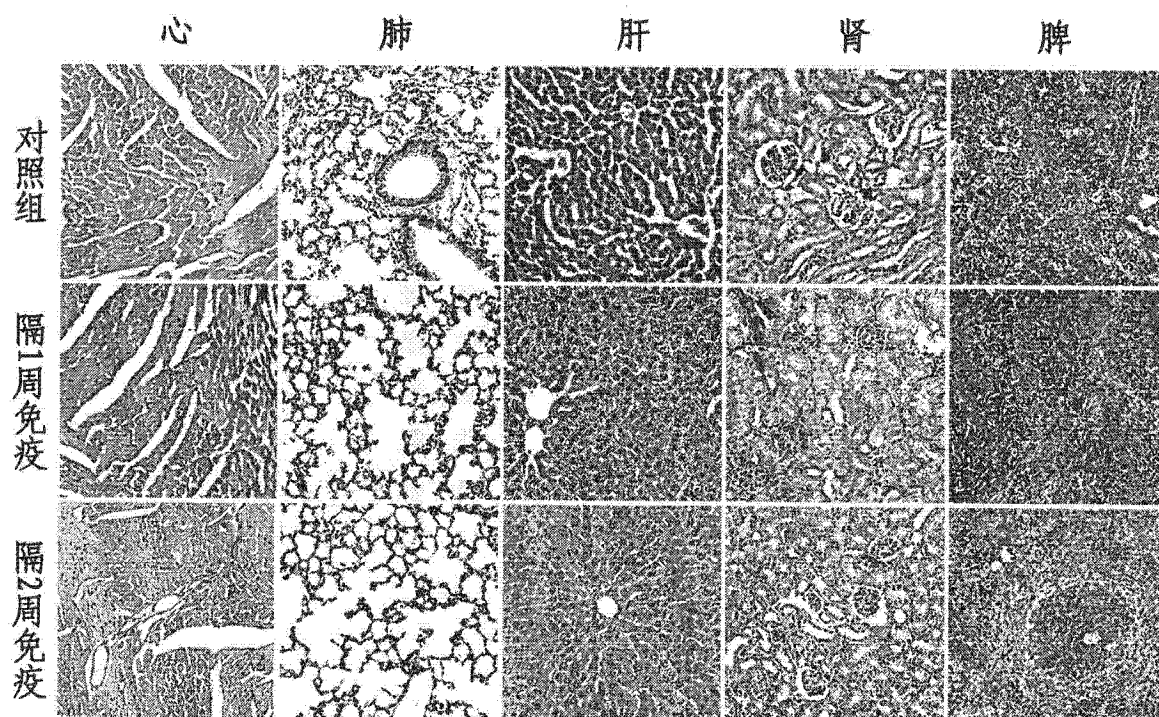


图 6