



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95194968.3

[43]公开日 1997 年 8 月 20 日

[11] 公开号 CN 1157560A

[22]申请日 95.6.29

[30]优先权

[32]94.7.8 [33]US[31]08 / 272,189

[32]95.6.5 [33]US[31]08 / 462,249

[86]国际申请 PCT / US95 / 08151 95.6.29

[87]国际公布 WO96 / 01611 英 96.1.25

[85]进入国家阶段日期 97.3.7

[71]申请人 巴克斯特国际有限公司

地址 美国伊利诺伊州

[72]发明人 R · L · 吉勒 J · H · 布劳克

W · D · 约翰斯顿 S · A · 列冯

D · A · 马里亚诺夫

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

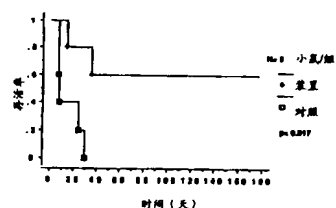
代理人 罗 宏 吴大建

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图页数 14 页

[54]发明名称 用于治疗癌症的装载有肿瘤细胞的可植入装置

[57]摘要

一种预防或治疗癌症的可植入装置,它包括装载有肿瘤细胞,或基因工程化以表达相应于病人肿瘤抗原的至少一种抗原的体细胞的可植入盒;具有孔壁的盒,以便在应用中给病人免疫细胞和所装载细胞之间提供一个多孔边界;边界的孔隙度足以使亚细胞抗原物质穿过边界,而阻止所装载的细胞和病人免疫细胞穿过边界。



权 利 要 求 书

1. 用于预防或治疗癌症的可植入装置, 包括:

(a) 一种装载有肿瘤细胞或基因工程化以表达相应于病人肿瘤抗原的至少一种抗原的体细胞的可植入盒;

5 (b) 该盒具有多孔壁, 以在使用时, 在病人免疫细胞和所装载细胞之间提供多孔边界;

(c) 边界的孔隙度足够允许亚细胞抗原物质穿过边界, 而阻止所装载细胞及病人免疫细胞穿过边界。

10 2. 权利要求 1 装置还包括装于所述盒内或与其分开的免疫增强分子来源。

3. 权利要求 2 的装置, 其中所说的免疫增强分子为淋巴毒素, 巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF), GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF, TGF- β 或一种肿瘤抗原。

15 4. 权利要求 2 的装置, 其中所说的来源为含有免疫增强分子的脂质体。

5. 权利要求 2 的装置, 其中所说的来源为含有免疫增强分子的微胶囊。

6. 权利要求 2 的装置, 其中所说的来源为也装载于所述盒里的、已被基因工程化以表达和分泌免疫增强分子的体细胞。

20 7. 权利要求 1 的装置, 其中所说的肿瘤细胞已被基因工程化以表达和分泌免疫增强分子。

8. 上述权利要求之任一的装置, 其中所说的肿瘤细胞是可存活的。

9. 权利要求 1 - 7 任何一个的装置, 其中所说的肿瘤细胞为非致瘤的。

25 10. 权利要求 1 - 7 任何一个的装置, 其中所说的肿瘤细胞已被照射。

11. 权利要求 1 的装置, 其中肿瘤细胞是自体的。

12. 权利要求 1 的装置, 其中肿瘤细胞是同种异体的。

13. 权利要求 1 的装置, 其中肿瘤细胞来自同种异体的肿瘤细胞株。

30 14. 根据前面任意一项权利要求的可植入装置, 它与非致瘤的、并不装载于盒中的可以施用的第二种肿瘤细胞相组合。。

15. 权利要求 14 的装置, 其中所说的肿瘤细胞是自体的。

16. 权利要求 14 的装置, 其中第二种肿瘤细胞是同种异体的。

17. 权利要求 14 的装置, 其中第二种肿瘤细胞来自同种异体的肿瘤细胞株。

18. 权利要求 14 的装置, 其中至少所说的第二种肿瘤细胞部分被基因工程化以表达和分泌免疫增强分子。

5 19. 权利要求 14 的装置, 其中第二种肿瘤细胞为基因工程化以表达相应于病人肿瘤细胞抗原的至少一种抗原的人非肿瘤细胞。

20. 权利要求 1 - 18 之任一的装置, 其中肿瘤细胞为一种防治病人癌症的方法, 它包括基因工程化以表达相应于病人肿瘤细胞抗原的至少一种抗原的人非肿瘤细胞。

10 21. 权利要求 20 的装置, 其中所说的人非肿瘤细胞为间皮细胞, 上皮细胞, 内皮细胞, 肝细胞, 成肌细胞或成纤维细胞。

22. 上述权利要求之任一的装置, 其中该盒包括微胶囊, 中空纤维, 超滤膜盒, 膜扩散盒, 或导管灌注装置。

15 23. 上述权利要求之任一的装置, 其中所说的盒包括提供进入盒的开口 (port) 装置。

24. 可植入装置在生产中的应用包括具有多孔壁的盒, 以在使用时提供防止病人免疫细胞穿过边界而允许亚细胞抗原物质穿过边界的多孔边界, 包括为了治疗或预防病人的癌症, 装入盒中并不能穿过边界的细胞, 该细胞为具有相应于病人肿瘤细胞抗原中至少一种抗原的肿瘤细胞, 基因工程化以表达相应于病人肿瘤细胞抗原中至少一种抗原的人非肿瘤细胞, 或基因工程化以表达相应于病人肿瘤细胞抗原中至少一种抗原的其它体细胞。

20

25. 依据权利要求 24 为治疗或预防实体瘤, 转移性肿瘤或白血病的癌症的应用。

25 26. 依据权利要求 24 为治疗或预防淋巴瘤, 黑色素瘤, 结肠癌, 乳腺癌, 肺癌, 纤维肉瘤, 肾癌或成神经细胞瘤的应用。

说明书

用于治疗癌症的装载有肿瘤细胞的可植入装置

发明领域

- 5 本发明涉及通过将肿瘤细胞植入病人体内进行癌症预防和治疗，该治疗细胞装入一个小室使其与病人的组织分开。

发明背景

- 10 目前，多数肿瘤接受的疗法是手术，化疗，放疗，骨髓植入或这些疗法的不同组合。总之这些疗法通过不依赖于病人免疫系统激活的机制，目的在于破坏肿瘤细胞。在放疗和化疗过程中，对免疫系统的明显损害是一个不幸的副作用。而且，对于某些肿瘤，这些疗法的长期效用是可疑的。

a. 免疫系统的激活

- 15 在最近十年中，已发展了基于免疫系统的激活来介导抗肿瘤活性的疗法。一般地，正常宿主对肿瘤细胞的应答开始于肿瘤细胞上肿瘤相关抗原的 T 细胞识别或通过抗原细胞递呈细胞。通过 T 细胞抗原受体识别触发介导 T 细胞激活的信号传递通路。这导致从 T 细胞及辅助细胞分泌白细胞介素 - 2 (IL - 2)， γ - 干扰素，肿瘤坏死因子 - α 及其其它细胞因子。因而宿主免疫系统被动员起来杀死肿瘤细胞。然而由于鲜为人知的原因，对许多肿瘤这种宿主反应没有发生或不足以杀死肿瘤细胞。

- 20 设计以激活免疫系统的一种疗法是系统施用 IL - 2。然而，获得足够扩增所需要的 IL - 2 剂量证明对病人有毒。激活免疫系统的细胞免疫疗法集中于两种类型细胞：LAK 细胞和 TIL 细胞。LAK (淋巴因子激活的杀伤) 细胞是通过使用如 IL - 2 的细胞因子 (Lotze et al ., Cancer Res .41 ,P4420 - 4425 (1981); Grimm et al ., J. Exp. Med. 155 ,P1823 - 1844 (1982)) 和/或如抗 - CD3 的单克隆抗体 (Ochoa et al ., Cancer Res .49 ,P693 - 700 (1989)) 被非特异地激活的免疫系统的细胞。这些细胞能介导显著的抗肿瘤活性，而没有主要组织相容性复合体 (MHC) 相关的典型细胞溶解 T - 细胞 (CTL) 的 T - 细胞受体的限制特征。在一项最近的研究中，对晚期肿瘤持续融合 IL - 2 和 LAK 细胞，得到 12 % 黑色素瘤病人和 3 % 肾细胞癌病人的应答 (Lotze ,Cell Transplantation

2 ,P33-47 (1993)) 。 虽然目前多数 LAK 细胞特征性地由激活的天然杀伤 (NK) 细胞组成 (Oratldo et al ., J.Exp .Med 164 ,P1193 - 1205(1986) ; Ferrini et al., J. Immunol. 138, P1297 - 1302 (1987) ; Phillips and Lanier, J. Exp. Med 164, P814 - 825 (1986)) , LAK 细胞也可以从 T - 细胞的一个亚系列, 叫作 $\gamma\delta$ T - 细胞 (缺少 T - 细胞受体典型 $\alpha\beta$ 亚基, 并取而代之表达 $\gamma\delta$ 亚基的 T - 细胞) 产生 (Ochoa et al .,Cancer Res .49 P693 - 700 (1989)) 。 LAK 细胞也可产生于培养在 IL - 2 和抗 CD3 单克隆抗体存在下的分离 CD4 + 或 CD8 + T - 细胞 (Geller et al .,J .Immunol .146, P3280 -3288 (1991)) 。 TIL (肿瘤浸润淋巴细胞) 细胞是外体从肿瘤中分离的淋巴细胞。像 LAK 细胞, 这些细胞可以通过在细胞因子如 IL - 2 或 IL - 4 存在下培养扩张, 但不同于 LAK 细胞, 这些细胞为肿瘤特异的。使用 TIL 细胞, 在黑色素瘤病人中观察到 20 - 50 % 的应答率 (Lotze ,Cell Transplantation 2 ,P .33 - 47 (1993)) 。

b. 增强肿瘤的免疫原性

15 肿瘤免疫疗法的其它方法包括增加肿瘤细胞的免疫原性而非增强应答淋巴细胞的活性。许多肿瘤细胞被认为缺少诱导足够的免疫应答所需要的一定程度的免疫原性 (Houghton and Lewis ,” “ Cgtokine Indnced Tumer Immuogenicity ,” ed. Forni et al., Acafemic Press, P35 - 54 (1994)) 。

20 一般地, 刺激细胞 (如肿瘤细胞) 通过 T - 细胞受体与刺激细胞上 I 类或 II 类 MHC 分子相关肽结合, 结合 T - 细胞。这些肽可以被刺激细胞从外部环境中摄取, 在这种情况下它们被加工并与 MHC II 类递呈, 或者它们可以是由刺激细胞内源产生的肽, 然后与 MHC I 类分子递呈。由刺激细胞外源衍生物肽引起的递呈被称为间接递呈, 因为该肽不被它们所来自的细胞递呈。在直接递呈的情况下, 肽在它们所来自的细胞的表面递呈。图为表示直接与间接递呈的图解。

除 T - 细胞受体和 MHC 抗原外, 已鉴别了一些可能在抗原递呈细胞和应答 T - 细胞之间相互作用中起介导作用的细胞表面抗原。这些共刺激分子包括细胞间粘附分子 (ICAMs), 血管细胞粘附分子 (VCAM
30 - 1) , 淋巴细胞功能相关抗原 3 (LFA - 3) , 热稳定抗原 (HSA) 和淋巴细胞上的 CD28 , 以及必须在抗原递呈细胞上被递呈的 B7 配基 (Pardi et al .,Immunol .Today 13 ,P .224 - 230 (1992) ;Chem et

al., Immunol. Today 14, P 483 - 486 (1993))。无共刺激分子存在下 T - 细胞受体与抗原递呈细胞的结合会导致 T - 细胞无反应性及对肿瘤的免疫应答失败 (Gimmi et al, Proc. Natd. Sci, 90, P6586 - 6590 (1993))。

对几种肿瘤已定义了唯一的肿瘤抗原, 包括黑色素瘤的 MAGE
5 (Van der Bruggen et al., Science 254, P1643 - 1650 (1991)) 和 MART
(Kanakami, Proc. Natl. Sci. Llsa 91, P 3515 - 3519 (1994) ;Boon et
al., Ann. Rev Immunol 12 P337 - 365 (1994)) 抗原, 及乳腺癌和胰腺癌的
粘蛋白 (Finn, J. Cellular Biochem. 170, P92 (1993) ;Domench et al., J
Cellular Bio Chem 17D, P108 (1997) ;Fontenot et al., J. Cellular Bio
10 Chem 17D, P125 (1993))。见 Brown, J. P. 等美国专利号 5,141,742 (黑色
素瘤相关抗原) 已经观察到即使当细胞确实表达 MHC 抗原时, 肿瘤细胞
也不有效地递呈自身 - 肽 (直接递呈), 这提示由肿瘤细胞进行抗原有效
的直接递呈所必需的另一分子中可能有缺陷/缺乏。许多肿瘤细胞已证
明表达低水平的 B7。因此, 一种疗法为通过向病人肿瘤细胞导入 B7 基
15 因, 重建肿瘤细胞的免疫抗原性, 从而促进直接肿瘤抗原递呈 (Chen et
al., Cell 71, P1093 - 1102 (1993) 和 Epo 600591 ;Chen et al., J. Exp
.Med. 179, P 523 - 532 (1994) ;Townsend and Alison, Science 259, P368 -
370 (1993) ;Baskar et al. Proc Natl. Acad. Sci USA 90, P5687 - 5690
(1993))。CD28 配基 B7 导入免疫原性淋巴病, 肥大细胞瘤, 黑色素瘤
20 或肉瘤导致对野生型肿瘤的 CTL 活性增加和对后来注射野生型肿瘤的保护
(Chen et al., Cell 71, P1093 - 1102 (1993)(黑色素瘤) ;Chen et
al., J. Exp. Med. 179, P 523 - 532 (1994) (肥大细胞瘤, 纤维肉瘤, 淋巴
瘤, 黑色素瘤, 癌) ; Townsend and Alison, Science 259, P368 - 370
(1993) ;Baskar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, P5687 - 5690 (肉瘤))。
25 而且, 注射表达 B7 的 EL4 淋巴瘤细胞导致具有 EL4 衍生肿瘤的小鼠 60
% 的治愈率 (Chen et al., J. Exp. Med. 179, P523 - 532 (1994)), 相似地,
用鼠 I 类分子的基因转染鼠结肠腺肉瘤或纤维肉瘤可介导未修饰肿瘤的
消退, 虽然肿瘤未完全消除 (Plautz et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA
90, P4645-4649 (1993) (纤维肉瘤, 结肠癌))。这个方法现在正在进行临
30 床试验 (Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, P94 - 97 (1993) (黑色素
瘤))。在这两个例子中, 外来基因的导入直接增强了 I 类介导的宿主
效应细胞对肿瘤细胞的识别。该反应是肿瘤特异性的。对遗传修饰肿瘤

的治疗对非相关治疗的生长没有影响。这种反应被认为需要直接的细胞-细胞接触。见 Hock et al., *Gene Therapy Weekly*, P22(January 9, 1995)(表达 II 类 MHC 的小鼠或神经细胞瘤细胞)。

Trojan et al., 采用稍有不同的方法治疗成胶质细胞瘤。神经胶质瘤细胞表达水平的胰岛素样生长因子 I (IGF - 1)。用 IGF - 1 的反义基因治疗神经胶质瘤细胞好象逆转了递呈细胞免疫原性的致瘤表型。在这些研究中, 向神经胶质瘤细胞注射表达 IGF - 1 反义序列导致在所有被处理动物中先前存在肿瘤的消除 (Trojan et al., *Science* 259, P94 - 97 (1993))。虽然这个应答显示通过 CD8 + T - 细胞介导, 但它们是直接被修饰的肿瘤细胞激活, 还是通过抗原递呈细胞捕捉抗原而激活或两者兼有, 尚不清楚。

其它增强肿瘤免疫原性的方法包括工程化肿瘤细胞以表达细胞因子基因如 IL - 2, IL - 4, IL - 6, 肿瘤坏死因子, 干扰素 - γ 或粒细胞巨噬细胞克隆刺激因子 (GM - SCF) (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, p. 3539 - 3543(1993); Golumbek et al., *Science* 254, p. 713 - 716(1999) (肾细胞癌); Gansbacher et al., *Cancer Res.* 50, p. 7820 - 7825 (1990); Gansbacher et al., *J. Exp. Med.* 172, p. 1217 - 1224 (1990); Bannerji et al., *Immunol.* 152, p. 2324 - 2332 (1994) (纤维肉瘤); Fearon et al., *Cell* 60, p. 397 - 403 (1990) (结肠癌); Columbo et al., *J. Exp. Med.* 173, p. 889 - 897 (1991) (腺癌); Haddada et al., *Hum. Gene Therapy* 4, p. 703 - 711 (1993) (肥大细胞瘤); Lollini et al., *Int. J. Cancer* 55, p. 320 - 329 (1993) (乳腺癌); Watanabe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, p. 9456 - 9460 (1989) (成神经细胞瘤); Pardoll, *Curr. Opin. Oncol.* 4, p. 1124 - 1129 (1992); Tepper and Mule, *Hum. Gene Therapy* 5, p. 153 - 164 (1994); Porgador et al., *Cancer Res.* 52, p. 3679 - 3686 (1992) (Lewis 肺癌); 见 WO 92/05262 Hopkins / University of Texas。因此基因修饰的肿瘤细胞能够在亲代瘤株没有免疫原性的情况下激发免疫应答。此领域研究人员已观察到该免疫应答延伸到破坏未修饰的肿瘤细胞和已工程化的肿瘤细胞, 并能在某些情况下导致实验动物中先前存在的肿瘤的完全消退 (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, p. 3539 - 3543(1993); Golumbek et al., *Science* 254, p. 713 - 716(1999);

Gansbacher et al., *Cancer Res.* 50, p. 7820 - 7825 (1990); Gansbacher et al., *J. Exp. Med.* 172, p. 1217 - 1224 (1990); Bannerji et al., *Immunol.* 152, p. 2324 - 2332 (1994) (纤维肉瘤); Fearon et al., *Cell* 60, p. 397 - 403 (1990); Columbo et al., *J. Exp. Med.* 173, p. 889 - 897 (1991); Haddada et al., *Hum. Gene Therapy* 4, p. 703 - 711 (1993); Lollini et al., *Int. J. Cancer* 55, p. 320 - 329 (1993); Watanabe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, p. 9456 - 9460 (1989); Pardoll, *Curr. Opin. Oncol.* 4, p. 1124 - 1129 (1992); Tepper and Mule, *Hum. Gene Therapy* 5, p. 153 - 164 (1994); Porgador et al., *Cancer Res.* 52, p. 3679 - 3686 (1992); Vieweg et al., *Gene Therapy Weekly*, p. 20 (November 21, 1994) (前列腺癌))。

这些实验方法一般地包括用已经遗传学工程化表达外源基因的被照射肿瘤细胞，免疫动物一次或多次。照射防止细胞分裂，但不会减弱其抗原性。然后抗肿瘤反应以三种方式之一测试：(i) 免疫过程完成后，动物用未修饰的肿瘤细胞攻击；(ii) 在免疫接种过程中动物用未修饰的肿瘤细胞攻击；或(iii) 用修饰的肿瘤细胞免疫之前，已形成小肿瘤。

大多数利用遗传学工程化的肿瘤细胞进行的研究包括向各种肿瘤中导入细胞因子基因(见 Pardoll, *Curr. Opin.* 4, p. 1124 - 1129 (1992); Tepper and Mule, *Hum. Gene Therapy* 5, p. 153 - 164 (1994))。最有效的分子之一是 GM - CSF (粒细胞巨噬细胞 - 克隆刺激因子)，它增加了几种类型肿瘤特异免疫性 (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, p 3539 - 3543 (1993) (B16 黑色素瘤，结癌，肺癌，纤维肉瘤，肾癌))。GM - CSF 是唯一的，因为它可以通过刺激树突 (dendritic) 细胞的增殖和分化介导抗肿瘤作用，这些细胞是能够向 CD4 + CD8 + T - 细胞递呈抗原的特别有效的抗原递呈细胞 (Steinman, *Ann. Rev. Immunol.* 9, p 271 - 296 (1991))。Metzinger 最近提示激活免疫系统与肿瘤反应的唯一途径是通过被专职抗原递呈细胞如树突细胞拾取且递呈的脱落抗原 (Metzinger, *Ann. Rev. Immunol.*, 12, p 991 - 1045 (1994))。相似地，Bannerji 等在最近提示：分泌 IL - 2 的纤维细胞瘤细胞的排斥不是由 T - 细胞介导的，虽然随后的系统免疫依赖于 CD4 + 和 CD8 + T - 细胞的递呈 (Bannerji et al., *J. Immunol.* 152, p 2324 - 2332 (1994))。他们假设已修饰细胞的破坏由 NK 细胞介导，

导致肿瘤抗原的释放，这些抗原可被在细胞表面表达 I 类和 II 类分子的抗原递呈细胞捕获。这些细胞然后能激活 CD4 + 和 CD8 + T - 细胞。Shosker 和 Wood 已讨论了相似的模型 (Shoskes and Wood, Immunol. today 15, p32 - 38 (1994)) 。

- 5 Cohen 和同事们在最近的实验中，已经能够通过给动物注射已转染 IL - 2 基因和从黑色素瘤细胞分离的 DNA 的同种异体成纤维细胞，来延长已具有黑色素瘤的小鼠生命 (Kim and Cohen, Cancer Res. 54, p2531 - 2535 (1994))。使用同种异体的细胞时不必照射细胞，那可能影响细胞因子的表达。因为被转染细胞为成纤维细胞，它们不形成肿
10 瘤，并且因为它们是同种异体的所以容易激活免疫系统。然而，由于它们容易被排斥，就没有对免疫系统的长期刺激。其它人将表达细胞因子的成纤维细胞与已照射的肿瘤细胞混和，然后将混和物作为疫苗接种 (WO 93/07906, PCT US 92/08999)。还有人将无瘤成纤维细胞偶联到佐剂上，并施用这种细胞用作肿瘤疫苗 (Eggers, U. S. Patent No.
15 5,208,022)。

- 还有另一种预防和治疗肿瘤的方法是用肿瘤抗原免疫 (WO 93/06867 Pardoll, Mulligan)。另一种接种方法是同时施用照射的肿瘤细胞和细菌佐剂 (Pardoll, 5 Cur. Opin. Immunology, p 719 - 725 (1993))。还有的照射未修饰的肿瘤细胞并单独注射它们作为疫苗
20 (Dranoff et al., 90 PNAS, p 3539 - 3543, 图 4A (1993))。

c. 肿瘤演变

- 大多数癌被认为开始是克隆的，在癌的演变过程中，根据具有生长优势的遗传变种的达尔文选择不断出现新的亚群。有些遗传变种以特殊肿瘤类型为特征，实际上可作为肿瘤严格分类的基础，在其它情况下这
25 些变化基因型的，即对个体自身的肿瘤特异。引起生长优势的突变包括生长调节基因突变，形态变化，激素依赖，酶型和表面抗原。这些变化中有些可以允许非正常细胞逃脱病人的自身稳定控制和治疗引起的破坏。常规化疗经常开始在减缓疾病进展中有效。然而，随时间和重复治疗，可能通过连续敏感降低的克隆的演变变得效力降低。 (G. Klein and
30 Klein, PNAS USA 74, p2121 (1977))。也见 Schreiber, H., " Tumor Immunology " 基础免疫学中第 22 章, W. Paul, ed. (1993)。

d. 扩散盒

防止细胞与细胞接触的扩散盒已被许多年来用于研究免疫学机制。Klein 等已经用扩散盒里的肿瘤细胞作为模型, 研究对肿瘤细胞的宿主免疫应答。他们推断肿瘤细胞产生促进延迟型高敏感性的可溶性因子, 并且还刺激促进肿瘤生长的血管生成 (Tumor Biol., 15 , p160 - 165 (1994)) 。

Stillstrom 已将肿瘤细胞植入扩散盒, 以诱导啮齿动物的免疫性, 并发现十周后通过皮下放置含有肿瘤细胞的扩散盒 7 天诱导的免疫水平比直接接种细胞获得的低 10 - 100 倍。在其它的实验中他们发现直接接种和施用含肿瘤细胞扩散盒的动物的免疫状态无明显差异。他还发现如果扩散盒留在皮下几周后被排斥 (Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B82, p676 - 686 (1974)) 。

Biggs 和 Eiselein 用扩散盒表明某一种肿瘤细胞类型释放病毒颗粒, 它们从盒中扩散出来, 给随后的用肿瘤细胞攻击提供免疫性。他们还显示极低扩散盒孔隙度能防止免疫作用 (Cancer Research, Vol 25 , p 1888 - 1893 (1965)) 。

Cochrum 等美国专利 No. 5, 015, 476 公开淋巴因子或细胞因子用作佐剂, 当微封装寄生虫并植入它们以获得对寄生虫感染的免疫作用。

发明概述

20 申请人的新癌症疗法治愈了 60 % 的荷有实验性肿瘤的动物。该方法当用于癌症预防时 100 % 有效。除了注射 10^6 肿瘤细胞以进行攻击外, 没有实验动物长肿瘤。

25 申请人的发明是一种预防或治疗癌症的方法, 包括: 施用第一批肿瘤细胞, 其中至少有一些具有对应于病人肿瘤细胞中已发现的抗原的至少一种肿瘤抗原, 其中肿瘤细胞装在可植入小盒中, 该盒通过多孔边界方式将病人免疫细胞和装入细胞分开, 所说的边界方式能被亚细胞抗原物质通透, 凭借此边界方式防止病人免疫细胞与装有的肿瘤细胞接触, 并允许亚细胞抗原物质离开该盒。被施用的肿瘤细胞可以不修饰或修饰以表达和分泌免疫加强分子 (如淋巴因子) 。

30 或者替代肿瘤细胞, 施用的细胞可以是被工程化表达肿瘤相关抗原或其它抗原的非转化体细胞; 而且它们可进一步工程化为表达细胞因子。肿瘤细胞可以是活的或照射的。肿瘤细胞可预防地施用以防止肿瘤

生成，或治疗地施用以治疗存在的肿瘤或转移。该肿瘤细胞可以是手术切除肿瘤后施用的自体肿瘤细胞。也可以是同种异体的。或从同种异体供者建立的肿瘤细胞株。该肿瘤细胞可在癌症治疗如化疗或放疗的前、后或期间施用。它们可与使用如脂质体的局部施用细胞因子同时施用。

- 5 根据本发明，所给的肿瘤细胞用合适的装载有可植入细胞的盒与病人的细胞隔开，该盒能保留肿瘤细胞而允许亚细胞物质进出该盒。该盒防止施用的细胞与病人免疫细胞之间的细胞间接触。该肿瘤细胞可植入于存在肿瘤的部位或远离肿瘤的部位。

本发明还提供含肿瘤细胞的盒。

- 10 在一替代实施方案中，照射的肿瘤细胞在盒中施用，盒中还有或没有活的肿瘤细胞。该盒优选使活的肿瘤细胞植入后，比起假如与病人的免疫系统细胞接触，可存活较长时间。

- 在另一个实施方案中，该盒使其中装载有的照射的肿瘤细胞植入后比假如与病人免疫系统的细胞接触存活较长时间。换句话说，该盒优选
15 延迟或防止装载有细胞的排斥。在优选实施方案中，该盒是一种在其表面引起慢性伤口愈合炎症，其作为佐剂来增强病人对植入肿瘤细胞的免疫反应。

- 本发明还提供一种新的癌症疗法，包括（i）施用在装载有细胞的可植入盒中的肿瘤细胞，并联合（ii）施用已变为无致瘤性的肿瘤细胞。
20 已变为无致瘤性的肿瘤细胞作为“游离”细胞接种物在盒外施用。它们优选通过照射变为无致瘤性。或者可使用任何使它们变为无致瘤性的方法。例如，已报道未照射的肿瘤细胞与 IL - 2 一起施用使它们变为不致瘤。根据本发明盒外施用的肿瘤细胞可不修饰或修饰为表达免疫增强多肽。或者替代肿瘤细胞盒外面施用的细胞可以是工程化以表达肿瘤相关
25 抗原或其它抗原的非转化细胞，和细胞因子共同或单独施用。它们可以是自体的或同种异体的。或者，它们可以是来自自体或同种异体细胞建立的细胞株。

- 植入于盒内或盒外的肿瘤细胞可以是自体的，即取自病人存在的肿瘤。或者，它们可是同种异体的：取自具有肿瘤细胞的另一个体，这些
30 细胞具有对应于发现于病人肿瘤细胞的肿瘤抗原。或者它们可来自相应于病人中要治疗或预防的肿瘤类型的肿瘤细胞株。它们还可以是工程化以表达肿瘤相关抗原或其它抗原的非肿瘤细胞，有或没有细胞因子的同

时表达。

附图简述

图 1 是解释直接/间接抗原递呈的示意图。

图 2 是用于本发明优选实施方案的盒的图。

5 图 3 是显示如实施例 1 所述, 根据本发明治疗后小鼠对肿瘤攻击反应的表。动物植入两种各含 10^6 细胞的装置。一个动物只接受一种装置。所有动物在植入三周的后施用 10^6 游离 MCA - 38 细胞的第一次攻击。在实验 I 中, 第二次攻击在植入后 8 周; 在实验 II 中, 第二次攻击在植入后 11 周。

10 图 4 表示如实施例 1 所述, 动物在装置植入时用 10^3 MCA - 38 细胞攻击, 在攻击部位发现肿瘤的天数。对照动物不接受装置。

图 5 表示如实施例 2 所述, 植入装载有来自一切除块组织的装置后, 狗 142 - 3 留在皮下团块的大小。

15 图 6 说明手术切除 >95 % 肿瘤后狗 4008 剩余肿瘤块的大小。如实施例 2 所述, 切除的肿瘤用作组织来源以填装皮下植入装置。

图 7 (来自实施例 3) 表示 C57/B6 小鼠的存活率, 其先前存在的 MCA - 38 肿瘤通过在盒内和盒外施用照射的 MCA - 38 肿瘤细胞进行处理。它还表示在盒内未照射的细胞与盒外照射的细胞同时施用后的存活率。

20 图 8 (来自实施例 3) 表示 C57/B6 小鼠的存活率, 其先前存在的 MCA - 38 肿瘤通过在盒内和盒外施用照射的和未照射的 MCA - 38 肿瘤细胞处理。

25 图 9 (来自实施例 3) 表示 C57/B6 小鼠的存活率, 其先前存在于背侧皮下空间的 MCA - 38 肿瘤通过盒内和盒外施用照射的肿瘤细胞处理。

图 10 表示实施例 4 的实验方案。

图 11 (来自实施例 4) 表示 C57/B6 小鼠的存活率, 其先前存在的 MCA - 38 肿瘤被切除, 然后施用盒内装载有未照射 MCA - 38 肿瘤细胞进行处理, 盒外无细胞。

30 图 12 表示实施例 5 的实验方案。

图 13 (来自实施例 5) 表示 C57/B6 小鼠第一次被生长和转自同系动物的 B16 黑色素瘤免疫后, 用 B16 黑色素瘤攻击的存活率。

图 14（来自实施例 6）表示 C57/B6 小鼠第一次被游离的照射 C57 卵巢肿瘤细胞和含有照射的 C57 卵巢肿瘤的装置免疫后四周，用 C57 卵巢肿瘤攻击的存活率。

发明详述

5 描述一种新的肿瘤治疗方法，包括施用病人肿瘤细胞，同时防止至少部分所给肿瘤细胞与病人免疫细胞之间的细胞与细胞接触。在此使用的“肿瘤”应包括实体瘤，转移的肿瘤和血液、骨髓及淋巴系统的非实体癌。“肿瘤”应包括：癌（来自上皮细胞的癌），肉瘤（来自间质组织），淋巴瘤（淋巴组织的实体瘤）和白血病（淋巴细胞或其它造血细胞
10 骨髓或血液生成肿瘤）。

在此使用的癌的“治疗”或“疗法”应该包括申请人的方法，即消除存在的肿瘤，延迟疾病进展，减小存在肿瘤的体积，防止没有治疗或
15 疗法会发生的肿瘤增大，延缓肿瘤形成的发生，延缓肿瘤增大，以及防止、减少或延缓转移的方法。在此使用的“转移”应指与原发肿瘤位于不连续部位的肿瘤细胞，常常通过肿瘤细胞的淋巴和/或血原性传播。

根据本发明，用盒将肿瘤细胞植入给病人意味着防止肿瘤细胞与病人免疫细胞之间的接触。这种隔离优选使用公布在 PCT 专利申请 WO 92/07525 上的装置完成，它在此全文引入作为参考，或者在美国专利申请系列 No. 8/179,860 中所述的装置，也在此全文引入作为参考。使用这
20 种防止细胞与细胞接触的装置，允许亚细胞物质穿过盒，并在植入部位为病人提供脉管系统。此外，它避免传统外体被膜的形成，并在其表面作为佐剂提供一种慢性伤口愈合炎症。

允许植入的肿瘤细胞与病人免疫系统通过以细胞间直接接触之外的任何方式相互作用的任何细胞隔离装置均合适。其它方式包括中空纤维，片膜或单个肿瘤细胞或肿瘤细胞群的封装，例如藻酸盐大一或小一
25 胶囊或脂质体。优选使用可从病人完整收回的盒，尤其是如果盒内施用活肿瘤细胞。这提供了能从病人移去装载的肿瘤细胞的优点。优选盒的使用还具有允许施用活的自体肿瘤细胞，活的同种异体肿瘤细胞或工程化以表达肿瘤抗原的非肿瘤同种异体或自体细胞的优点。

30 施用病人肿瘤细胞疫苗的现有技术一般使用没有盒或封装技术的照射肿瘤细胞或同种异体细胞。根据本发明的实施方案，装入盒中的未照射活细胞不被宿主免疫反应排斥或损坏，并被认为具有与它们存活相同

时间的持续免疫刺激作用。与此相比，现有技术的不可存活的肿瘤细胞只提供短暂刺激，因为它们很快被宿主清除，盒可以植入病人然后负载细胞，或者在盒植入前先负载。

- 5 令人惊奇地，联合施用在盒中的肿瘤细胞和游离的照射细胞可提供优于单独使用任何一种的疗法。虽然申请人不知道该结果的机制，但认为游离细胞的使用让早期细胞间接触以启动增强的免疫应答，而盒中细胞的使用让此后增强的免疫应答延长。

- 10 治疗存在肿瘤的情况下，施用细胞优选自体细胞，并优选包含所有在异种肿瘤中存在的各种细胞的混和物。所给肿瘤细胞优选反应病人自身肿瘤的异质性。病人中存在肿瘤的大部分用常规手术切除。收集切除的肿瘤细胞，混于合适的培养基中，并根据所需细胞的量装入一个或多个盒。盒中的细胞可照射也可不照射。该盒可植入皮下，腹腔，肿瘤部位上或肿瘤部位内，不考虑组织类型或其它合适的部位。装载的盒可以也可不与在盒植入部位或远离盒植入部位的游离不存活（照射的）肿瘤
- 15 细胞联合施用。可使用多个盒和多部位。

如果使用同种异体肿瘤细胞，则其优选表达至少一种通过肿瘤活检确定的病人肿瘤表达的抗原的肿瘤细胞株。该同种异体细胞于这里所述的盒中施用。所装载细胞可以或不照射。此外，同种异体细胞可以照射并以游离细胞施用。

- 20 或者根据本发明，装载有肿瘤细胞的盒可与一定剂量免疫增强分子（如淋巴因子）一起施用。可采用工程化以表达和分泌免疫增强分子（如淋巴因子）的非肿瘤细胞（如成纤维细胞）。装载的盒可以与或不与游离的照射肿瘤细胞、免疫增强分子一起施用。工程化的细胞可表达不止一种细胞因子或免疫增强分子。其它用于直接局部施用免疫增强分子的材料可采用，如质脂体、微胶囊、缓释胶囊或微泵，它们均在药物传送
- 25 技术中已知。

- 在此使用的“免疫增强分子”包括当与本发明的盒及肿瘤细胞联合使用时，刺激或增强免疫系统活性的任何分子。本发明的技术人员会公认这可以包括细胞因子和抗原脂类包括磷脂，激素，糖，核酸，病毒颗粒成分，细菌细胞抗原和蛋白质。本领域的技术人员会公认，用于本发
- 30 明的免疫增强分子必须具有足够高的量与足以增强、刺激或引发免疫反应的抗原程度。免疫增强分子可从活的或照射细胞分泌或发散，或者可

以是死细胞的降解产物；或者可以是合成的或纯化的药物。一些免疫增强分子描述于 Frost 等 WO 92/05262。细胞因子用作习用的免疫佐剂在技术上已知，由 Houghton 和 Lenis 在 “Active Specific Immunotherapy in Humans” Chapter 5 of “Cytokine Induced Tumor Immunogenity,” Eds. Forni, G. et al. (1994) 中描述。Golumbek, P. T. 等描述照射的肿瘤细胞加 GM-CSF 装入微胶囊中共注射，在小鼠模型中作为一种癌症疫苗 (Cancer Research, 53, p5841 - 5844 (12月15日, 1993))。

在确定方案包括合适的剂量中，本领域的技术人员会参考许多被国立卫生研究所重组 DNA 指导委员会同公开的方法，它们用照射的修饰或未修饰肿瘤细胞作为癌症疫苗。例如，见 Haman Gene Therapy April 1994 Vol 5 p553 - 563 及其中对公布方法的参考文献。这些公布的方法包括：(i) 用通过插入肿瘤坏死因子基因修饰的自体癌症细胞免疫癌症病人，主要研究者 S. A. Rosenberg, Human Gene Therapy 3, p. 57 - 73 (1992)；(ii) 用通过插入白介素-1 基因修饰的自体癌症细胞免疫癌症病人，主要研究者 S. A. Rosenberg, Human Gene Therapy 3, p.75 - 90 (1992)；(iii) 用分泌白介素-2 的自体 HLA-A2 与肾细胞癌细胞免疫晚期肾细胞癌病人和试点研究，主要研究者 B. Gansbacher, Human Gene Therapy 3, p.691 - 703 (1992)；(iv) 用白介素-2 转染的黑色素瘤细胞免疫。对具有转移黑色素瘤病人的 I - II 期研究，Human Gene Therapy 4, p.323 - 330 (1993)；(v) 癌症的基因治疗：IL-4 基因修饰的成纤维细胞与自体肿瘤混和以引起免疫反应的试点研究，主要研究者 M. T. Lotze and I. Rubin, Human Gene Therapy 5, p.41 - 55 (1994) (黑色素瘤，肾细胞癌，乳腺，结肠)，(vi) 1995 年 2 月 17 日通过的结肠癌的方案，它结合肿瘤细胞与工程化以表达 IL-2 的成纤维细胞 (San Diego Regional Cancer)；(vii) 用于治疗复发/顽固性成神经细胞瘤的细胞因子基因修饰的自体成神经细胞瘤细胞的 I 期研究，主要研究者：M. K. Brenner；RAC Approval No. 9206 - 018；(viii) 用有或没有粒细胞-巨噬细胞克隆刺激因子基因转导细胞的非复制自体肿瘤细胞注射具有转移肾细胞癌病人的 I 期研究；主要研究者：J. Simons；RAC Approval No.9303 - 040；(ix) 人 γ 干扰素转导的自体肿瘤细胞对具有散布恶性黑色素瘤病人的 I 期临床；主要研究者：H. F. Seigler；RAC Application No.9306 - 043；(x) 表达

白介素 - 2 基因产物的转染癌症细胞在有限阶段小细胞肺癌的 I 期研究; (xi) 用表达限定的同种组织相容性抗原的分泌白介素 - 2 的黑色素瘤细胞免疫恶性黑色素瘤病人, 主要研究者 T. K. Das Gupta; RAC Application No.9309 - 056; 和 (xii) 基因工程化产生白介素 - 2 的自体肿瘤疫苗, 用于治疗转移黑色素瘤; 主要研究者: J. S. Economon RAC Application No.9309 - 058。这些方法在此全文引入作为参考。也见公布的 PCT 申请 WO 93/07906, 其描述了对表达 IL - 2 细胞的癌症治疗方法以及 PCT 申请 WO 94/18995, 它描述了施用分泌 IL - 2 的同种异体黑色素瘤细胞的方法 (RAC Approval No. 9206 - 021)。

10 本领域的技术人员会公认其中关于病人选择, 剂量, 预处理评价, 共存 (concurrent) 疗法和潜在毒性的处理均在此适用。一般地, 所需剂量为有效引发病人对肿瘤细胞保护性免疫反应的细胞数。例如, 为了治疗具有约重 150 克肿瘤的 70kg 病人, 应施用约 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ 自体照射的或未照射的肿瘤细胞, 装在总共 5 - 10 个具有 40 μ l 腔的装置中,

15 它们于 1994 年 1 月 11 日提交的未决美国专利申请序列 No 8/179, 860 中有描述, 或者装载所需数量肿瘤细胞所需的一些这种装置。最多相似数量的游离照射细胞可同时施用。从约三周到几个月之内, 病人肿瘤体积之减小应该是明显的。转移的消除较难检测到。

该植入物可留在病人体内几周时间起短暂作用。对于治疗存在的肿瘤, 植入物优选保留在病人体内与存在肿瘤的可能性一样长。为了预防肿瘤, 植入物应保留在病人体内与病人持续处于发生肿瘤的危险一样长。一个或多个植入物可不时被移出以评价植入肿瘤细胞的存活。游离的照射细胞可在植入时施用, 并过一段时间再施用, 因为原先的游离照射细胞可能被病人免疫系统在约 2 - 6 周时破坏。如果如实施方案, 需要肿瘤细胞的持续存活, 植入装置可以切除并且需要的话换以装载新鲜肿瘤细胞的新装置。或者, 不切除植入物, 而是将其排空, 再重新装填, 如果施用自体肿瘤细胞替换肿瘤细胞可以是原发肿瘤切除时收集并冷冻用于以后使用的细胞。

20 25

就施用同种异体肿瘤细胞来说亦遵循相似的方针。至少供体肿瘤细胞的某些抗原或可溶因子优选对应于病人肿瘤细胞上如肿瘤活检测定所发现的。

30

按照本发明, 需要的话肿瘤细胞可通过照射, 丝裂霉素 C 处理或其

它本领域已知的处理变为非致瘤的。

工程化以表达已知人类肿瘤特异抗原的人细胞系可被创造，然后按照本发明给药。这些已知肿瘤抗原的例子包括 MAGE，MART 和粘蛋白。Brown 等的美国专利 No. 5, 141, 742 描述黑色素瘤相关抗原。再者，所给细胞的抗原优选至少部分与通过肿瘤活检测定的病人肿瘤细胞的抗原相应。人细胞系的制备以及这些细胞工程化以表示目的抗原涉及本领域技术人员已知的技术。细胞优选有效表达目的抗原或可溶因子的类型。细胞的遗传修饰可通过基因治疗领域已知的一个或多个技术完成（Human Gene Therapy April 1994, Vol. 5, p543 - 563）。一种将外源 DNA 导入细胞所常用的技术包含逆转录病毒载体的使用。这些载体可感染大部分靶细胞并整合到细胞基因组中。构建的逆转录病毒载体在所选细胞系中为复制缺陷的，因此不能感染未转染的细胞。已被建议或用作将 DNA 导入细胞的其它病毒载体包括腺病毒，腺相关病毒，疱疹病毒和脊髓灰质炎病毒。逆转录病毒和腺相关病毒载体最常建议或用于离体基因治疗，即 DNA 导入从病人体内分离的细胞。

已经使用或建议用于基因治疗的非逆转录病毒传送技术包括 DNA-配基复合物，基因枪技术和电穿孔以及脂转染。在大多数情况下，这些传送技术的某些病毒载体如腺病毒载体不导致 DNA 在细胞基因组的明显整合。这意味着外源 DNA 对受体细胞的稳定转化以极低频率发生。依赖于具体条件，病毒或非病毒方法将适于基因导入细胞，该细胞然后依照本发明植入。原代谢肿瘤细胞的遗传操作已先前描述（Patel et al., Human Gene Therapy 5, 0557 - 584 (1994)）。

申请人的预防癌症方法尤其适于发生肿瘤的高危病人，如通过遗传普查确认为发生肿瘤的高危个体。作为被诊断患有癌症的病人的治疗，申请人的疗法特别适合于已成功进行肿瘤切除的病人和存在微小转移高危的病人。

本发明使用的盒防止病人免疫系统的细胞和盒中细胞间的直接接触。本发明优选的盒（图 2）为一种装置，它包括两个双层膜（1）被聚酯网包围（2）声波焊接到一起，有一个口（3）以进入腔（4）。每个双层包括由 Gore, Flagstaff, Arizona, 制造的 5 μ m PTFE 膜，Product No. L31324 和 Mitlipore, Bedford., Massachusetts 制造的 0.45 μ m PTFE 膜，Product No SFIR 848E1。在一端有一个聚酯（PE - 90 ID

0.34" by OD 0.050")口以允许负载细胞进入装置的内部。该装置有一个内腔。装置描述于1994年1月11日提交的申请号为8/179,860和1994年3月17日提交的申请号为8/210,068的共同未决的系列申请中。先前的研究表明这种优选装置具有能保护同种异体植入组织在延续时期不被免疫排斥的优点(虽然不是对本发明的所有实施方案都需要)(Carr-Brendel et al., J. Cellular Biochem. 18A, p. 223(1994) and Johnson et al., Cell Transplantation 3, p. 220(1994))。

在本发明中本领域的技术人员可能发现有用的其它装载有细胞的盒包括: 琼脂糖微胶囊(Iwata et al., J. Biomed. Mater Res. 26, p. 967 - 977 (1991); J. Bioact. and Comp. Polymers 3, p. 356 - 369 (1988), and Depuy et al., J. Biomed. Mater Res. 22, p. 1061 - 1070 (1988)); XM50 中空纤维(Winn et al., J. Biomed. Mater Res. 23, p. 31 - 44 (1989) and Altman et al., Proc. of Third Meeting of ISAO, Supp. 5, p. 776 - 779 (1981); Diabetas, 35, p. 625 - 633 (1986)); 藻酸盐-多聚赖氨酸(Wong et al., Biomat., Art. Cells and Immob. Biotech. 19, p. 675 - 686 (1992)); 藻酸盐-多聚赖氨酸的微胶囊(O'Shea et al., Biochim. et Biophys. Acta 804, p. 133 - 136 (1984), Sun et al., App. Biochem. and Biotech. 10, p. 87 - 99 (1984), Chichepoetichie et al., Diabetologia 31, 54 - 57 (1988) and Goosen et al., U. S. Patent No. 4,689,293, August 25, 1987; U. S. Patent No. 4,487,758, December 11, 1984; U. S. Patent No. 4,806,355, February 21, 1989, and U. S. Patent No. 4,673,566, June 16, 1987); 脱乙酰壳多糖-藻酸盐(McKnight et al., J. of Bioact. and Comp. Poly. 3, p. 334 - 355 (1988)); 在U型装置中的聚丙烯腈或其它超滤膜(Moussy et al., Artif. Org. 13, p. 109 - 115 (1989), Lepeintre et al., Artif. Org. 14, p. 20 - 27 (1990), and Jaffrin and Reach, U. S. Patent No. 4,578,919, March 25, 1986); 聚丙烯腈的中空纤维(Aebischer et al., Biomat. 12, p. 50 - 56 (1991) and Lacy et al., Science 254, p. 1782 - 1784 (1991); 轨道蚀刻的聚碳酸酯膜扩散盒(Gates and Lazarus, Lancet. Dec. 17, p. 1257 - 1259 (1977)); 聚合的2-羟乙基异丁烯酸酯 pHEMA 膜装置 Ronel et al., J. Biomed., Mater., Res, 17, p. 855 - 864 (1983)); 聚丙烯酸酯的微胶囊(Douglas and Sefton, Biotech and Bioeng. 36, p. 653 - 664 (1990); Trans Am. Soc.

Artif Inter. Org. 35, p. 791 - 799 (1989)); 丙烯共聚物中空纤维 (Lanza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88, p. 11100 - 11104 (1991)); polyol copolymer film WO 93/2247; 血管内装置 (Berguer, U. S. Patent No. 4,309,776, January 12, 1982) and Gaskill, U. S. Patent No. 4,911,717, 5 March 27, 1990); 阳离子 - 阴离子交联膜, 如脱乙酰壳多糖和聚天冬氨酸或聚谷氨酸 (Jarvis, U. S. Patent No. 4,803,168, February 7, 1989); 用于细胞胶囊化的多功能材料的表面形成键合桥层和半透聚合物层 (Cochrum U. S. Patent No.4,696,286, September 29, 1987); 血管灌流装置 (Chick et al., U. S. Patent No.5,002,661, March 26, 1991); 大分子聚 10 合物胶囊化, Desai et al., WO 93/16687; 钡 - 藻酸盐交联微胶囊 (Zekorn et al., Acta. Diabetol. 29, p 99 - 106 (1992)), 其它膜装置 (Ward et al., Fourth World Biomat. Con., Berlin, P, 152, April 24 - 28, 1992)); 其它胶囊化装置 (Aebischer, WO 94/07999; U. S. Patent No.5,283,187; WO 93/00128; WO 93/00127; WO 93/00063; WO 15 92/19195; WO 91/10470; WO 91/10425; WO 90/15637; WO 90/02580) 和细胞植入装置 U. S. Patent Nos.4,241,187; 4,892,538; and 4,391,909. " Islet Transplantation with Immunoisolation ", Lanza, R. P. et al., 41 Diabetes, p. 1503 (1992) 综述用来装载细胞的各种盒, 如 Langer 和 Vacanti 在 " Tissue Engineerig," 260 Science, p 920 (1993) 所述。 20 假如上述个别的盒通透性不足以使亚细胞材料从植入的肿瘤细胞中出入, 本领域的技术人员会懂得在不改变盒的基本设计下可以改变这些盒的通透性。

再者, 申请人相信这里没有提到的其它装置, 如果具有以防止将植入细胞和宿主免疫细胞直接接触的方式定位植入的细胞的特性, 并允许 25 释放刺激病人免疫反应的亚细胞抗原物质, 也可以用于本发明。虽然申请人没有分离或鉴定引起病人免疫反应的亚细胞物质, 他们认为包括从所装载肿瘤细胞中排出或分泌的免疫原分子 (抗原)。肿瘤细胞排出许多抗原, 不仅是肿瘤相关抗原。这被认为募集大量巨噬细胞和抗原递呈细胞到该部位, 以提供增强的免疫反应。施用一种免疫增强分子如细胞 30 因子, 在该部位进一步增强免疫反应。

申请人的发明具有许多相对于现有癌症免疫疗法的优点。许多至今发表的研究需要单独施用 " 游离 " 照射细胞, 即未装入盒的细胞。该细

胞被照射，作为一种安全性预防以阻止其增强并引起其它肿瘤。然而，如果仅一个短暂剂量它们在 1 - 2 周内被机体清除，并且在某些情况下，照射会妨碍基因工程化进入细胞的细胞因子的产生。在申请人的发明中，不总是需要照射装载的细胞。即使当使用照射的细胞，它们很可能在盒中保持以免疫原存在的时间比现有技术中游离的照射细胞长。申请人对盒的使用提供了隔离肿瘤细胞的安全性，不同于现有技术，使游离肿瘤不必导入病人体内。再者，在优选使用盒的优选实施方案中，盒本身作为亚细胞抗原物质的佐剂。巨噬细胞被吸引到装置的外表面，因而处于拾取从装置中的肿瘤细胞排出抗原物质的位置。

可根据本发明使用的基因工程化细胞的例子包括工程化以分泌细胞因子的肿瘤细胞 (Sobol et al., WO 95/07105; Addison et al., Gene Therapy Weekly, p19(November 1994)); 工程化以表达外来抗原以增加细胞和/或体液抗原瘤活性的细胞 (Plantz et al., PNAS 90, p 4645 (1993) (同种异体组织相容性基因)); Gansbacher WO 94/18995 (工程化以表达细胞因子, 粘附分子, 共刺激因子或肿瘤相关抗原的同种异体肿瘤细胞); Allione et al., Gene Therapy Weekly, p. 20 (January 1995) 工程化以表达 IL - 2, IL - 4, IL - 6, IL - 7, IL - 10, TNF α , GM-CSF 的乳腺癌细胞); Hock et al., Gene Therapy Weekly, p22 (January 1995) (表达 II 类 MHC 的小鼠成神经细胞瘤) (虽然该方法被认需要细胞与细胞间的直接接触, 但是根据本发明, 释放的 MHC 可能为免疫增强分子)); 以及免疫增强分子和自杀基因在肿瘤来源细胞的共表达 (Frost et al, WO 92/05262) 。

总之, 下列实例和图中的数据证明在一些不同的实验条件下申请人发明的有效。当装载有肿瘤细胞的盒用作疫苗时 (即在肿瘤形成之前), 它有效地防止多达 100 % 实验动物的肿瘤形成。当在微小肿瘤存在下将植入, 我们证明在被试动物 75 % 有效。最后, 当与手术切除大肿瘤联合时, 植入装置预防 60 % 被植入动物的肿瘤再生长。

总之, 从这些数据可归纳几个结论。首先, 当回顾所有实例, 可以得出结论, 虽然治愈未在 100 % 动物中实现, 但有盒比没有要好。在最坏的情况下, 肿瘤发展较慢, 在最好的情况下动物不长肿瘤; 有盒存在时在任何情况下动物没有比对照动物肿瘤发展更快或具有更大肿瘤。数据进一步证明当使用盒时, 没有遗传修饰的肿瘤细胞可有效地用来产生

抗肿瘤免疫应答。盒中的肿瘤细胞比游离的肿瘤细胞在产生这种免疫反应中要有效得多，并且盒中照射的细胞似乎比活细胞更有效。假定这是由于照射引起细胞内的变化。使细胞的免疫原性增加。

下列实施例用于解释本发明的几个实施方案，不应解释为来限制发明范围。

实施例 1：啮齿类动物腺癌模型

使用的细胞株：MCA - 38 (Dr. Augusto Ochoa, NCI 惠赠) 是可以体内或体外保持的小鼠结肠癌。对于体外保持，细胞生长在补充以 1mM HEPES，1 % 非必需氨基酸，1 % L - 谷氨酰胺，1 % 丙酮酸钠，1 % 青链霉素 (Sigma)，0.1 % β - 巯基乙醇和 10 % 胎牛血清 (Irvine Scientific, Irvine CA) 的 RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, St.Louis MO) 中。细胞每周两次常规通过胰酶消化传代。

使用的动物：多数实验使用雌性 C57/B6 小鼠 (Harlan Sprague Dawley)。提示的地方使用无胸腺小鼠 (Harlan Sprague Dawley)。所有动物依据实验动物管理和使用的标准程序维持。

装置：这些研究使用声波密封的 4.5 μ l 或 20 μ l 的有口装置，采用上述的及美国专利申请系列 No.8/179,860 中的层状膜。装置在 70 % 乙醇中消毒过夜，然后除去乙醇，用无菌生理盐水 (Baxter Scientific Products,Waukegan IL) 洗三次。

装置的植入：MCA - 38 细胞被胰酶消化，洗涤及离心沉淀用于装载。除了指明的外，MCA - 38 细胞封装入 4.5 μ l 有口装置，通过使用 Hamilton 注射器将 3 μ l 中的 10^6 细胞装入装置的中央腔。较大的装置装载 20 μ l 的 10^7 细胞。装置用 23 号针头和注射器射出的硅酮栓封口。装置的口完全用硅酮填满并且该口被切去一半。剩下的口短暂的浸入 70 % 乙醇。该装载的装置用生理盐水洗三次。装置置于上述被补充的 RPMI 1640 中，于 37 °C 温浴直至植入。

接受植入的动物通过腹腔注射 1ml 克他命 (Fort Dodge laboratories,Fort dodge,Iowa) 和 0.75ml 甲苯噻嗪 (Rugby laboratories,Rockville Center,New york) 用 1ml 无菌生理盐水稀释的 0.2 - 0.3ml 混合物进行麻醉。腹部区域用聚烯吡酮碘擦拭并且在腹面中线切开。用止血钳在中线切口的两侧各制造一个皮下小袋，每个袋中植入一个 4.5 μ l 的装置。装置植入后切口立即用无菌棉线缝合，腹部区域再次

用聚烯吡酮碘擦拭。当使用 20 μ l 的装置时只植入一个。

5 肿瘤攻击: 在指定的时间, 动物通过注射未封装的 MCA - 38 细胞攻击。对于植入后的攻击, 10⁶ 新鲜消化的 MCA - 38 细胞稀释于 50 μ l 无菌生理盐水, 并注射到右后腿的肌肉中。就再次攻击而言, 第二次 10⁶ 细胞注射入左后腿, 需要时, 第三次 10⁶ 细胞注射入右腿。对于在植入时攻击, 动物用 10³ 游离 MCA - 38 细胞攻击。先前的研究显示, 少至 500 个游离的 MCA - 38 细胞对肿瘤形成是足够的。

10 组织学: 每个实验结束时, 植入装置被回收并用戊二醛固定, 切割, 通过苏木精和曙红染色, 用光学显微镜分析装置中存活肿瘤细胞的存在。

15 免疫分离装置中 MCA - 38 细胞的存活: 为了评价没有免疫攻击时装置中 MCA - 38 的存活能力, 10⁴ 或 10⁶ 细胞被封装入 4.5 μ l 装置中并植入到无胸腺小鼠。在三周植入阶段末装置被取出, 进行组织学加工并分析活组织的存在。MCA - 38 细胞确实在装置内存活。在所有情况下, 在装置的中央有一个基本坏死区, 但是看起来健康的细胞存在于外周。坏死区的宽度依赖于装入装置中的起始细胞数 (即含有 10⁶ 细胞比含有 10⁴ 细胞的装置有更多坏死)。

20 用含有 MCA - 38 细胞的装置做为肿瘤疫苗: 同源 C57/B6 小鼠植入两个各含 10⁶ MCA - 38 细胞的装置三或四周。然后这些动物通过注射上述 10⁶ 游离 MCA - 38 细胞进行攻击。如图 3 所示, 在两个实验中 0/8 动物在攻击部位发生肿瘤, 而对照组所有动物在注射 10 天内发生肿瘤。空装置植入到小鼠不能保护它们对抗后来游离 MCA - 38 细胞的攻击。

25 这些动物中五只在初始植入后 8 - 11 周接受 10⁶ 细胞的第二次攻击。在这种情况下, 4/5 植入动物在两个植入部位仍没有肿瘤; 而所有对照组动物在注射部位发生肿瘤。一只实验动物在二次注射部位确实产生一个肿瘤, 这只动物只植入了一个装置。

30 三只动物在植入装置后 7 个月给以第三次攻击, 仍未出现肿瘤。由于其中两只动物在给以肿瘤攻击前皮下装置被除去, 第三只动物则装置保留在原处进行攻击。带有装置的动物在第三次攻击后仍无肿瘤, 而那两只装置被除去的动物同所有从未接受装置的对照组动物一样产生了肿瘤。然而, 移去装置的动物, 虽然产生肿瘤, 但它们比对照组动物要晚得多。对照组攻击后 10 天产生肿瘤。实验组中一只动物攻击后 25 天产

生肿瘤，第二只攻击后 36 天产生肿瘤。去除装置的组织学显示 >90 % 的细胞死亡，并且装置内部材料有广泛钙化。但是，有几个存活细胞的证据。这些结果暗示装置本身并不介导抗肿瘤作用，因为装置被除去的动物与从未植入装置的对照组具有不发生肿瘤的相同几率。同时，该装置似乎对保持抗肿瘤的免疫保护作用 is 必需的；装置被除去的动物中肿瘤出现的更晚，没有那些装置存在下，被植入装置的动物中似乎没有长期免疫作用。

用含有 MCA - 38 细胞的装置做为肿瘤疗法：在另一系列实验中，动物在植入含有 MCA - 38 细胞的装置是用游离 MCA - 38 细胞攻击。在这种情况下动物用 10^3 游离肿瘤细胞攻击。在一个实验中，我们能够显著延迟肿瘤形成时间（图 4） $p=0.036$ 。在这个实验中一只动物在 32 天处死时没有肿瘤。在第二个实验中没有装置的所有动物，在第 16 天已经产生肿瘤，此时植入动物只有 1/10 在攻击部位发生肿瘤。这些结果暗示，植入含有肿瘤细胞的装置能够延迟或阻止植入时诱发的肿瘤生长。

15 实施例 2：犬科动物模型

使用的动物：一只 Baxter 动物实验设备的狗（142-3）被确认具有几个皮下团块，大小从针头大到约 1 夸脱。组织学分析诊断这些团块为皮肤包含物囊肿。第二只狗（4008）购自外面的卖主。这只狗具有直径约 10cm 的乳腺癌，被活检并诊断为管内乳腺癌。

20 装置：这些研究使用声波密封的 40 μ l 的有口装置，采用上述的及美国专利申请系列 No.8/179,860 中的层状膜。装置在 70 % 乙醇中消毒过夜，然后除去乙醇，用无菌生理盐水（Baxter Scientific Products, Waukegan IL）洗三次。

装置的植入：狗用标准方法麻醉。肿瘤的周围区域刮毛。对于狗 142-3，手术切除最大的团块并置于无菌生理盐水中。用外科剪刀将团块切成小碎块。剪碎的小块如下装入免疫隔离装置中：80 μ l 重力沉降组织装入 Hamilton 注射器。注射器的针头插入装置的口部，内容物排空到装置的内腔。装置用 23 号针头和注射器射出的硅酮栓封口。装置的口完全用硅酮填满并且该口被切去一半。用止血钳在肿瘤植入部位的两侧各制造一个皮下小袋，每个袋中植入一个装置。装置植入后切口立即关闭缝合，腹部区域再次用聚烯吡酮碘擦拭。

对狗 4008，~ 95 % 瘤块被手术切除并烧灼相关血管。然后切口缝合

并对剩余肿瘤进行基本测量。切除的肿瘤被切开并在不同深度取出几个直径为 0.5cm 的碎块。这些碎块进一步用手术剪剪碎。剪碎的碎块如上述装入 8 个装置。相对于切除肿瘤的位置做四个小的腹部皮下切口，并在每个切口植入两个装置。切口然后缝合，腹部区域用聚烯吡酮碘擦拭。

动物的监测：狗 142-3 中留存的团块一周测量两到三次。测量以二维进行，并用来计算每个团块的总表面积。两个不同技术人员进行重复测量，每个时间点取平均值。相似地，狗 4008 中留存的肿瘤每周三次进行二维测量。

10 从狗 142-3 切除最大的团块并植入含有切碎团块组织的装置后，通过两次分别测量测得四个留存生长中的两个显示大小显著下降（图 5）。另外两个形态清晰大小没有变化。留存团块发生体积的减小没有任何动物的其它处理。

15 狗 4008 中留存肿瘤的大小似乎开始增加，但这可能由于手术创伤所至的水肿（注意在第 7 天增加，图 6）。然后通过手术后>30 天的两套独立测量，测得留存肿瘤的体积具有稳定的减小。

实施例 3：小的先前存在肿瘤

20 使用的细胞株：MCA - 38 是可以体内或体外保持的小鼠结肠癌。对于体外保持，细胞生长在补充以 1mM HEPES，1 % 非必需氨基酸，1 % L - 谷氨酰胺，1 % 丙酮酸钠，1 % 青链霉素（Sigma），0.1 % β - 巯基乙醇和 10 % 胎牛血清（Irvine Scientific, Irvine CA）的 RPMI 1640（Sigma Chemical Company, St.Louis MO）中。细胞每周两次常规通过胰酶消化传代。

25 使用的动物：使用雌性 C57/B6 小鼠（Harlan Sprague Dawley）。所有动物依据实验动物管理和使用的标准程序维持。

免疫隔离装置：这些研究使用声波密封的 4.5 μ l 的有口装置，采用在共同未决的美国专利申请系列 Nos.7/735,401 和 7/861,512 中描述的层状膜。装置在 70 % 乙醇中消毒过夜，然后除去乙醇，用无菌生理盐水（Baxter Scientific Products, Waukegan IL）洗三次。

30 装置的植入：MCA - 38 细胞被胰酶消化，洗涤及离心沉淀用于装载。除了指明的外， 10^6 MCA - 38 细胞封装入 4.5 μ l 有口装置，通过使用 Hamilton 注射器将 3 μ l 细胞沉淀装入免疫隔离装置的中央腔。

在指明的地方，细胞在装载前暴露于 3500 Rads。装置用 23 号针头和注射器射出的硅酮栓封口。装置的口完全用硅酮填满并且该口被切去一半。剩下的口短暂的浸入 70 % 乙醇。该装载的装置用生理盐水洗三次。装置置于上述被补充的 RPMI 1640 中，于 37 °C 温浴直至植入。

5 接受植入的动物通过腹腔注射 1ml 克他命和 0.75ml rompum 用 1ml 无菌生理盐水稀释的 0.2 - 0.3ml 混合物进行麻醉。腹部区域用聚烯吡酮碘擦拭并且在腹面中线切开。用止血钳在中线切口的两侧各制造一个皮下小袋，每个袋中植入一个装置。装置植入后切口立即用无菌棉线缝合，腹部区域再次用聚烯吡酮碘擦拭。

10 注射游离的照射细胞：在植入的同时，一些实验动物还给以注射游离的被照射肿瘤细胞。关于照射，细胞如上所述进行制备用于装载。细胞以 50ml 中 10^6 细胞的浓度悬浮。细胞从钴-60 源得到 3500 - 4000Rads。照射 10^6 细胞。

15 肿瘤攻击：对于植入前的初始肿瘤，动物在植入前 3 - 7 天注射 10^3 游离 MCA - 38 细胞。注射可通过肌肉注射入右后腿或背部皮下空间。先前的研究显示，少至 500 个游离的 MCA - 38 细胞对肿瘤形成是足够的。就植入后第二次攻击而言，第二次注射到左后腿。

20 先前存在肿瘤的治疗：动物在植入前 3 天注射 10^3 游离肿瘤细胞。植入时，它们得到含有照射的 MCA - 38 细胞的两个装置，并在装置外注射 10^6 游离的照射肿瘤细胞。如图 7 所示，在最初的 90 天里，在装置的内外用照射细胞处理的 5 只动物均未发生肿瘤。在第 90 天，这些动物中的两只用 10^6 肿瘤细胞攻击，其中一只这次攻击后产生肿瘤。其余的所有动物 >150 天未发生肿瘤。如图 8 中所示，这种治疗以装置内为照射细胞，与装置外注射游离的照射细胞联合使用效果最好。虽然有些保护通过装置内给以未照射的肿瘤细胞与游离的照射细胞联合使用被提供，但是不如装置内给以照射细胞与游离的照射细胞联合使用有效。单独注射游离的照射细胞对肿瘤的发展没有作用。

25 当肿瘤在背部皮下空间始发时，植入含照射细胞的装置并注射游离照射细胞能够挽救 60 % 的处理动物（所有的未处理动物在原发瘤始发部位产生肿瘤）（图 9）。

实施例 4：肿瘤切除后的装置治疗

使用的细胞株：MCA - 38 是可以体内或体外保持的小鼠结肠癌。对

于体外保持，细胞生长在补充以 1mM HEPES，1 % 非必需氨基酸，1 % L - 谷氨酰胺，1 % 丙酮酸钠，1 % 青链霉素（Sigma），0.1 % β - 巯基乙醇和 10 % 胎牛血清（Irvine Scientific, Irvine CA）的 RPMI 1640（Sigma Chemical Company, St.Louis MO）中。细胞每周两次常规通过胰酶消化传代。

使用的动物：使用雌性 C57/B6 小鼠（Harlan Sprague Dawley）。所有动物依据实验动物管理和使用的标准程序维持。

免疫隔离装置：这些研究使用声波密封的 4.5 μ l 的有口装置，采用在共同未决的美国专利申请系列 Nos.7/735,401 和 7/861,512 中描述的层状膜。装置在 70 % 乙醇中消毒过夜，然后除去乙醇，用无菌生理盐水（Baxter Scientific Products, Waukegan IL）洗三次。

装置的植入：MCA - 38 细胞被胰酶消化，洗涤及离心沉淀用于装载。除了指明的外， 10^6 MCA - 38 细胞封装入 4.5 μ l 有口装置，通过使用 Hamilton 注射器将 3 μ l 细胞沉淀装入免疫隔离装置的中央腔。

在指明的地方，细胞在装载前暴露于 3500 Rads。装置用 23 号针头和注射器射出的硅酮栓封口。装置的口完全用硅酮填满并且该口被切去一半。剩下的口短暂的浸入 70 % 乙醇。该装载的装置用生理盐水洗三次。装置置于上述被补充的 RPMI 1640 中，于 37 $^{\circ}$ C 温浴直至植入。

接受植入的动物通过腹腔注射 1ml 克他命和 0.75ml rompum 用 1ml 无菌生理盐水稀释的 0.2 - 0.3ml 混合物进行麻醉。腹部区域用聚烯吡酮碘擦拭并且在腹面中线切开。用止血钳在中线切口的两侧各制造一个皮下小袋，每个袋中植入一个装置。装置植入后切口立即用无菌棉线缝合，腹部区域再次用聚烯吡酮碘擦拭。

肿瘤攻击：为了始发肿瘤，动物在植入前 3 - 7 天注射 10^5 游离 MCA - 38 细胞。注射在背部皮下空间进行。先前的研究显示，少至 500 个游离的 MCA - 38 细胞对肿瘤形成是足够的。

用含 MCA - 38 细胞的免疫隔离装置做为肿瘤切除后的肿瘤治疗方法：本实验的步骤概括于图 10。简要地，动物在背部皮下空间注射 10^5 细胞并监测至观察到可触及的肿瘤。在第 10 天从所有的动物中手术切除肿瘤。一半动物（n=5）不得到进一步治疗。另一半（n=5）植入两个各含 10^6 未照射 MCA - 38 细胞的装置。装置被皮下植入于腹侧。两组动物均被监测原发瘤部位肿瘤的再产生。如图 11 所示，所有的对照组动

物（没有植入）在手术的 30 天内于原发瘤部位再发生肿瘤。虽然植入动物中的两只也再发生肿瘤，但是有三只没有，并且保持>180 天没有肿瘤。这些组之间的差异是十分显著的（ $p<0.05$ ）。

实施例 5：啮齿类动物黑色素瘤模型

5 使用的细胞株： B16 是可以体内或体外保持的小鼠黑色素瘤。对于体外保持，细胞生长在补充以 1mM HEPES， 1 % 非必需氨基酸， 1 % L - 谷氨酰胺， 1 % 丙酮酸钠， 1 % 青链霉素（Sigma）， 0.1 % β - 巯基乙醇和 10 % 胎牛血清（Irvine Scientific, Irvine CA）的 RPMI 1640（Sigma Chemical Company, St.Louis MO）中。细胞每周两次常规通过
10 胰酶消化传代。

使用的动物： 使用雌性 C57/B6 小鼠。所有动物依据实验动物管理和使用的标准程序维持。

免疫隔离装置： 这些研究使用声波密封的 4.5 μ l 的有口装置，采用在共同未决的美国专利申请系列 Nos.7/735,401 和 7/861,512 中描述的层状
15 膜。装置在 70 % 乙醇中消毒过夜，然后除去乙醇，用无菌生理盐水（Baxter Scientific Products, Waukegan IL）洗三次。

装置的植入： B16 细胞被胰酶消化，洗涤及离心沉淀用于装载。除了指明的外， 10⁶ B16 细胞封装入 4.5 μ l 有口装置，通过使用 Hamilton 注射器将 3 μ l 细胞沉淀装入免疫隔离装置的中央腔。装置用 23 号针头和注射
20 器射出的硅酮栓封口。装置的口完全用硅酮填满并且该口被切去一半。剩下的口短暂的浸入 70 % 乙醇。该装载的装置用生理盐水洗三次。装置置于上述被补充的 RPMI 1640 中，于 37 °C 温浴直至植入。

 接受植入的动物通过腹腔注射 1ml 克他命和 0.75ml rompum 用 1ml 无菌生理盐水稀释的 0.2 - 0.3ml 混合物进行麻醉。腹部区域用聚烯吡酮碘
25 擦拭并且在腹面中线切开。用止血钳在中线切口的两侧各制造一个皮下小袋，每个袋中植入一个装置。装置植入后切口立即用无菌棉线缝合，腹部区域再次用聚烯吡酮碘擦拭。

注射游离的照射细胞： 在植入的同时，所有带有植入装置的动物在攻击部位注射 10⁶ 游离照射培养的 B16 细胞。关于照射，细胞如上所述的
30 用于装载制备。细胞以 50ml 中 10⁶ 细胞的浓度悬浮。细胞从钴-60 源得到 3500 - 4000Rads。

肿瘤攻击： 植入装置后 4 周，动物用注射未照射的 B16 细胞攻击。对

于攻击， 5×10^5 新鲜消化的 B16 细胞稀释于 50 μ l 无菌生理盐水，并注射到右后腿的肌肉中。先前的研究显示， 10^4 游离 B16 细胞对肿瘤形成是足够的。

- 用含有体内衍生的肿瘤组织的免疫隔离装置做为肿瘤疫苗：本实验的步骤概括于图 12，简要地，动物在第一轮用含有未照射的 B16 细胞的装置处理或注射游离的照射 B16 细胞。所有这些动物用 5×10^4 B16 细胞攻击后发生肿瘤。两组动物的肿瘤被手术切除，切细成约 1mm² 小块并装入 4.5 μ l 装置中。第三套装置也制备成含有培养的未照射 B16 细胞。这三套装置植入到第二套未成熟动物，并且三组动物均注射游离，照射培养的 B16 细胞；对照组动物不进行处理。动物 4 周后用培养的 B16 细胞攻击。如图 13 所示，用含有在动物中长大的肿瘤的装置免疫的 3 只动物中 1 只仅通过注射游离照射细胞处理，攻击后 >140 天没有肿瘤。因而用于免疫未成熟动物的肿瘤细胞不是培养细胞，而是在第一轮动物中长大的经过演变的细胞。这些数据表明含有已经演变的肿瘤细胞，如自体人肿瘤细胞的盒可能在实施申请人发明中有用。

实施例 6：啮齿类动物卵巢肿瘤

- 使用的细胞株：C57ov 是可以体内或体外保持的小鼠肿瘤。它在实验室在腹腔注射 B16 细胞（ 5×10^5 ）的动物中被鉴定。组织学检验提示它不来自 B16。对于体外保持，细胞生长在补充以 1mM HEPES，1% 非必需氨基酸，1% L - 谷氨酰胺，1% 丙酮酸钠，1% 青链霉素（Sigma），0.1% β - 巯基乙醇和 10% 胎牛血清（Irvine Scientific, Irvine CA）的 RPMI 1640（Sigma Chemical Company, St.Louis MO）中。细胞每周两次常规通过胰酶消化传代。

- 使用的动物：使用雌性 C57/B6 小鼠。所有动物依据实验动物管理和使用的标准程序维持。

免疫隔离装置：这些研究使用声波密封的 4.5 μ l 的有口装置，采用在共同未决的美国专利申请系列 Nos.7/735,401 和 7/861,512 中描述的层状膜。装置在 70% 乙醇中消毒过夜，然后除去乙醇，用无菌生理盐水（Baxter Scientific Products, Waukegan IL）洗三次。

- 装置的植入：C57ov 细胞被胰酶消化，洗涤及离心沉淀用于装载。除了指明的外， 10^6 C57ov 细胞封装入 4.5 μ l 有口装置，通过使用 Hamilton 注射器将 3 μ l 细胞沉淀装入免疫隔离装置的中央腔。装置用 23 号针头和

注射器射出的硅酮栓封口。装置的口完全用硅酮填满并且该口被切去一半。剩下的口短暂的浸入 70 % 乙醇。该装载的装置用生理盐水洗三次。装置置于上述被补充的 RPMI 1640 中，于 37 °C 温浴直至植入。

- 5 接受植入的动物通过腹腔注射 1ml 克他命和 0.75ml rompum 用 1ml 无菌生理盐水稀释的 0.2 - 0.3ml 混合物进行麻醉。腹部区域用聚烯吡酮碘擦拭并且在腹面中线切开。用止血钳在中线切口的两侧各制造一个皮下小袋，每个袋中植入一个装置。装置植入后切口立即用无菌棉线缝合，腹部区域再次用聚烯吡酮碘擦拭。

- 10 注射游离的照射细胞：在植入的同时，所有带有植入装置的动物在攻击部位注射 10^6 游离照射培养的 C57ov 细胞。关于照射，细胞如上所述用于装载的制备。细胞以 50 μ l 中 10^6 细胞的浓度悬浮。细胞从钴-60 源得到 3500 - 4000 Rads。

- 15 肿瘤攻击：植入装置后 4 周，动物用注射未照射的 C57ov 细胞攻击。对于攻击， 5×10^4 新鲜消化的 C57ov 细胞稀释于 50 μ l 无菌生理盐水，并注射到右后腿的肌肉中。先前的研究显示， 10^3 游离 C57ov 细胞对肿瘤形成是足够的。

- 20 用含有 C57ov 的免疫隔离装置做为肿瘤疫苗：动物被植入两个各含有 10^6 照射的 C57ov 细胞装置。在植入的同时，动物还接受注射 10^6 照射的 C57ov 细胞。四周后动物用 C57ov 攻击。结果见图 14，60 % 的动物 >30 没有肿瘤。

虽然本发明根据具体的方法和装置被描述，但可以理解本免疫的技术人员将在对本发明考虑的基础上进行变化和修改。

- 25 对于本领域的技术人员，可预期在本发明中，对上述说明实施例有多种修正和变动，其结果是，仅有如从属权利要求中的这些限制出现。因而，从属权利要求欲覆盖所有这样等价的变动，这些变动都在本发明的权利要求范围之内。

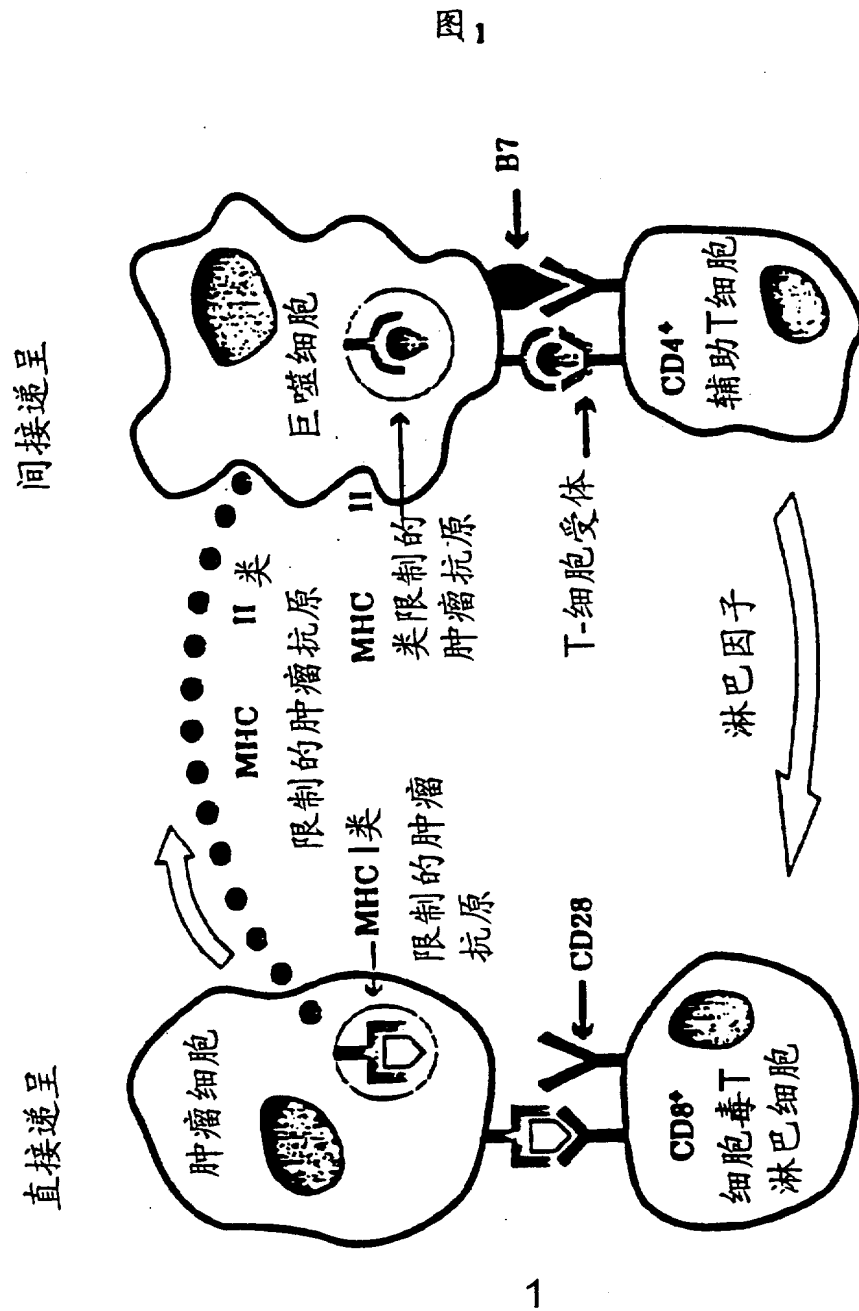


图 2

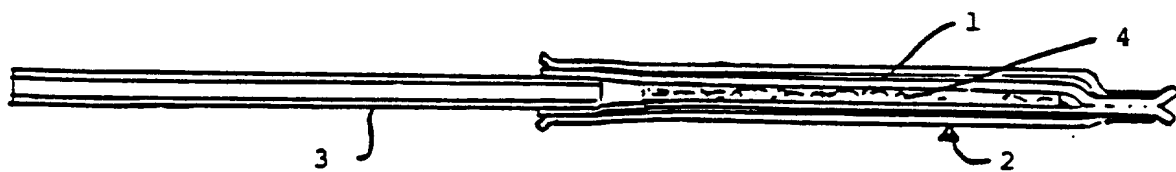
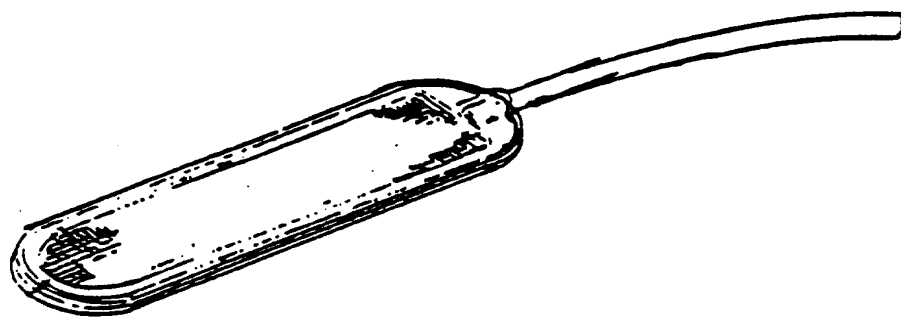


图 3

植入小鼠对游离MCA-38细胞攻击的反应

实验	植入装载有MCA-38 细胞的装置	肿瘤攻击1 荷瘤 小鼠数目/小鼠总数	肿瘤攻击2 荷瘤 小鼠数目/小鼠总数
I	+	0/4	1/3
	-	4/4	4/4
II	+	0/4	0/2
	-	4/4	4/4

图 4

肿瘤形成
在移植时攻击

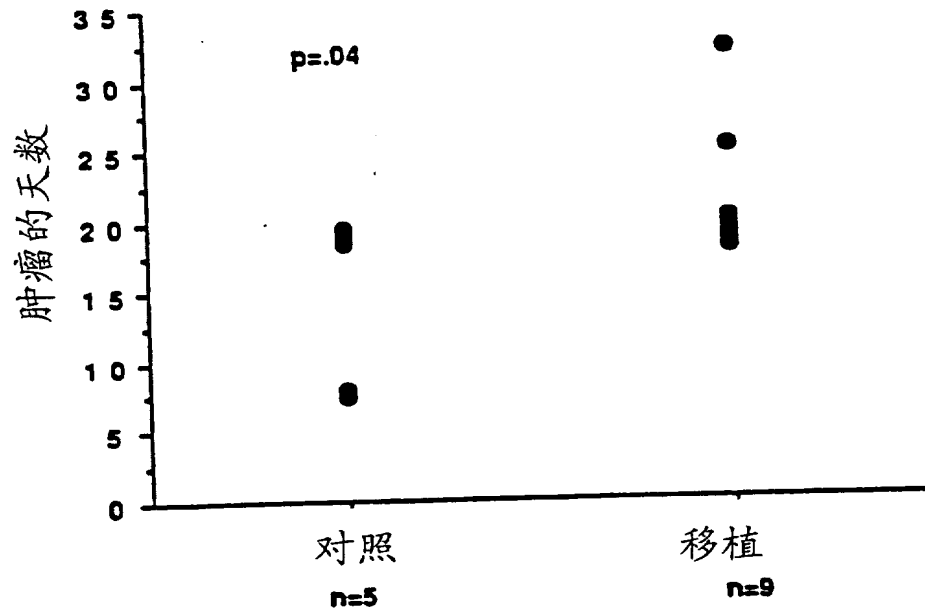


图 5

狗142-3中剩余生长的大小

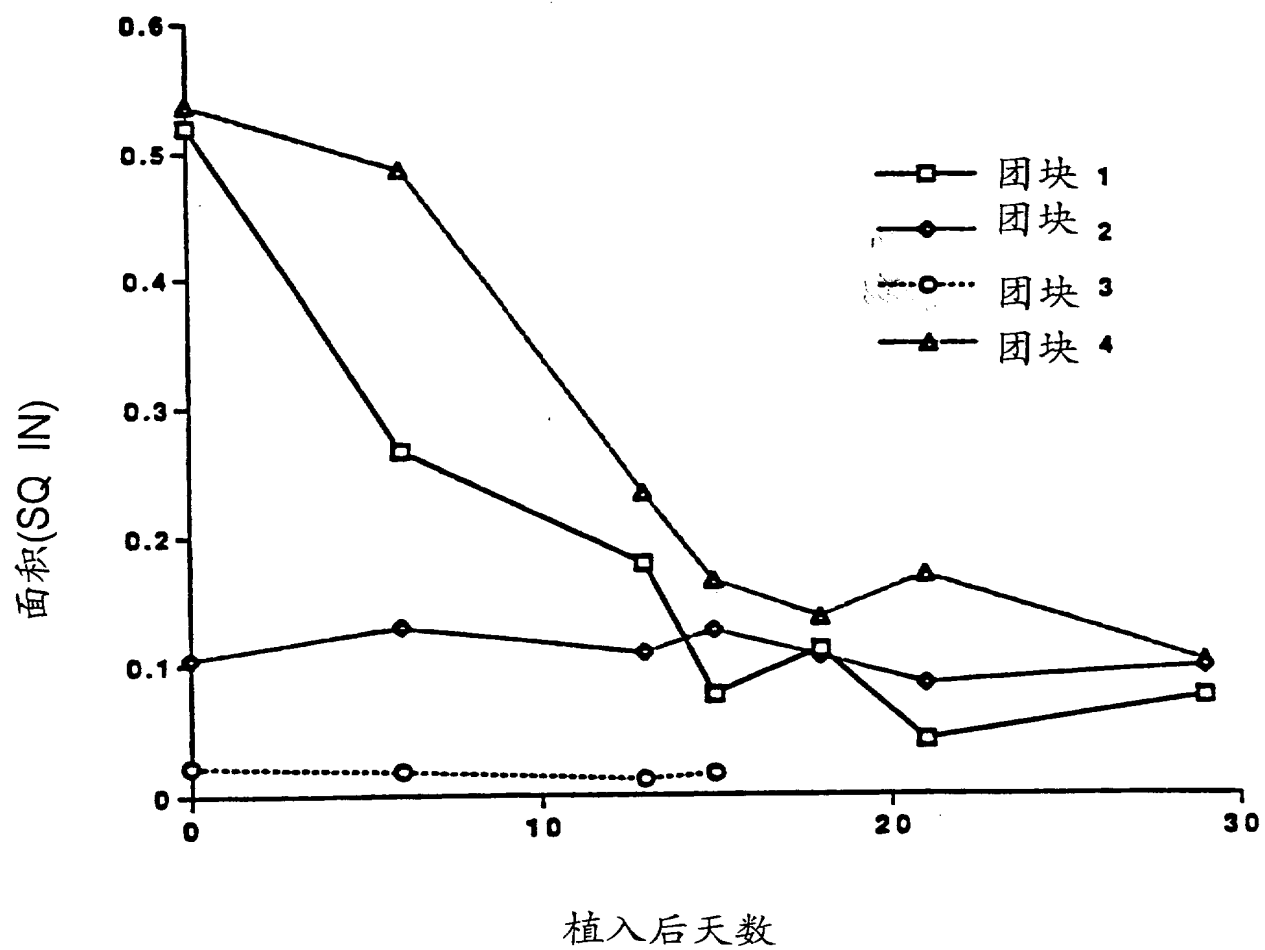


图 6

狗4008中剩余肿瘤的大小

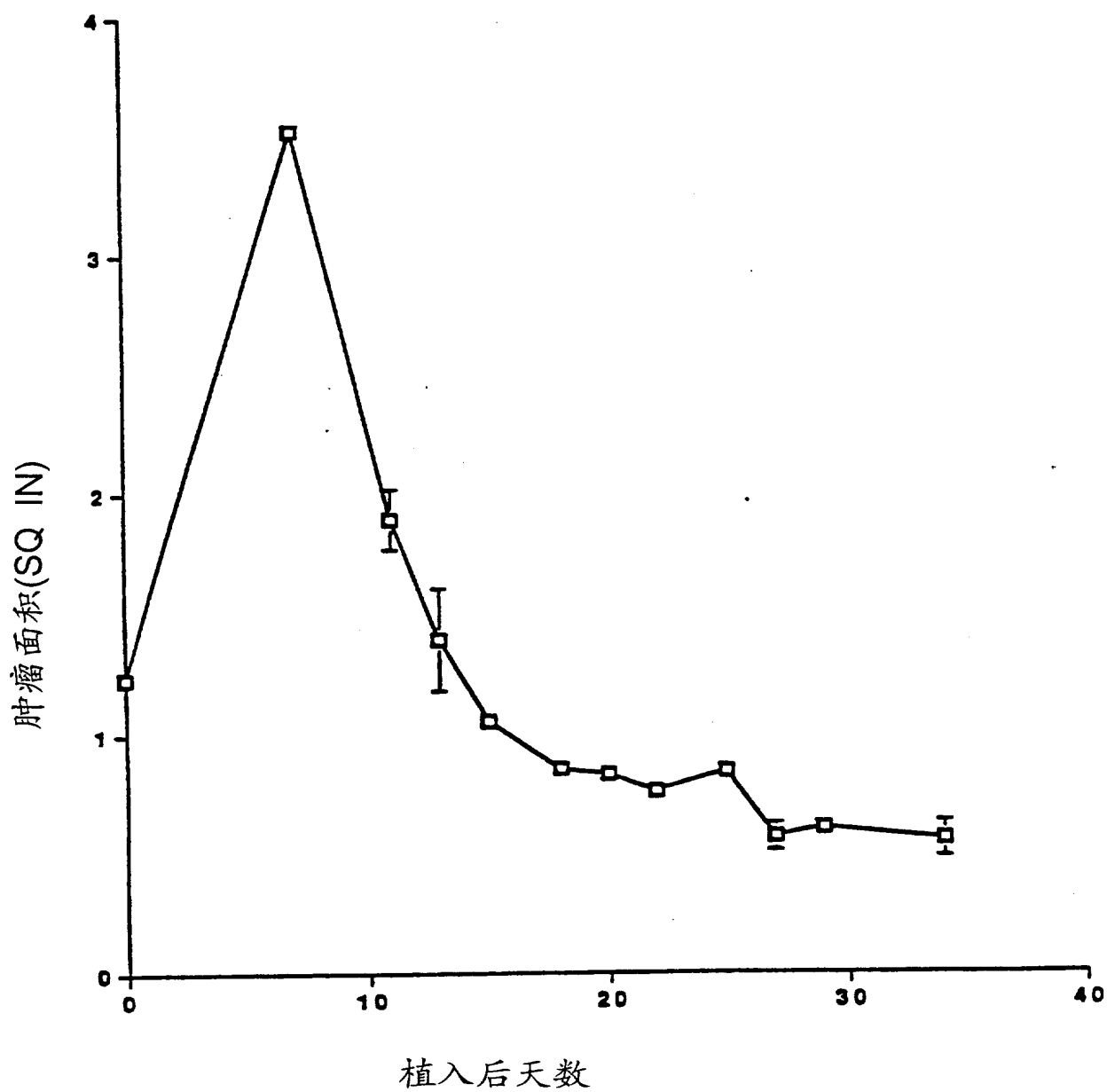


图 7

先前存在的肿瘤 (3天)

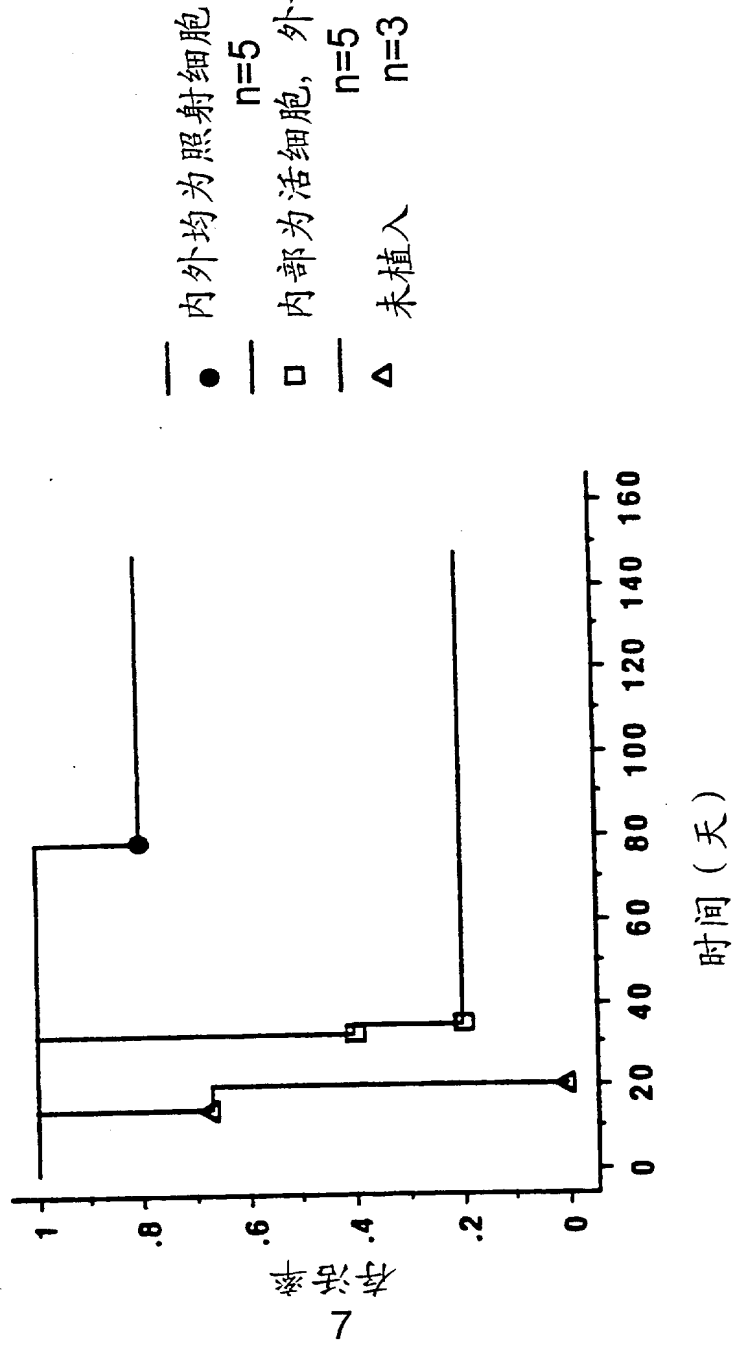


图 8

先前存在的肿瘤 (5天)



图 9

先前存在的背侧SQ肿瘤 (3天)

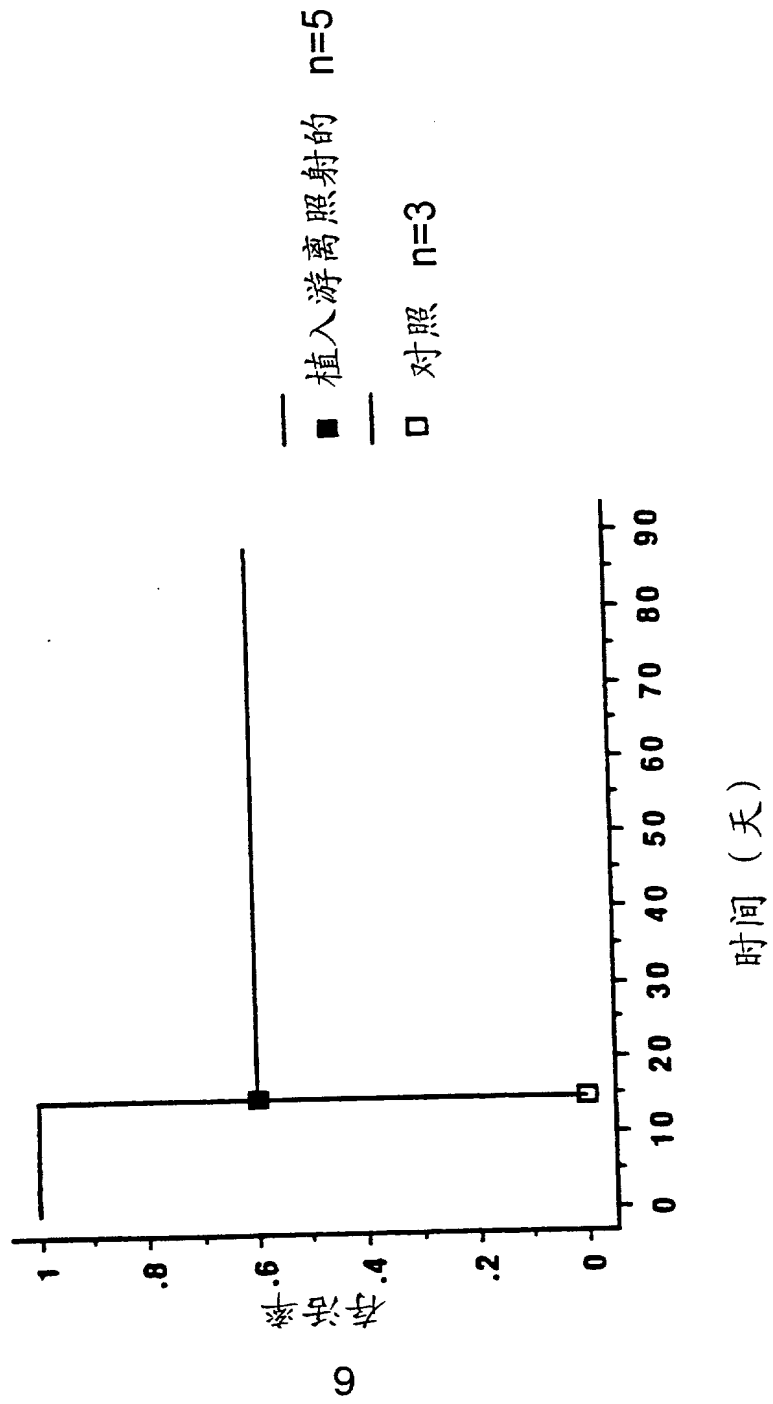


图 10
肿瘤切除实验

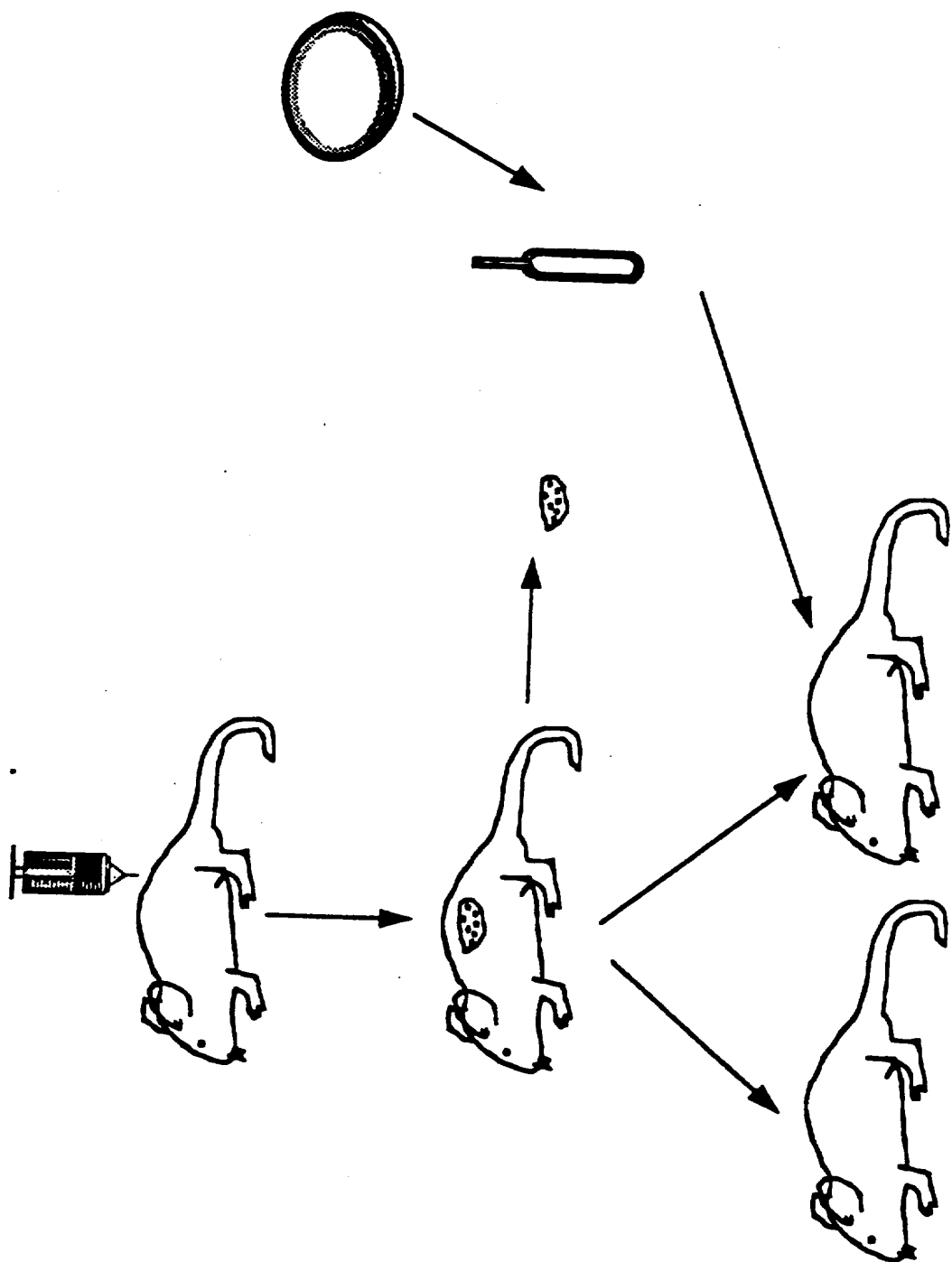


图 11
肿瘤切除模型

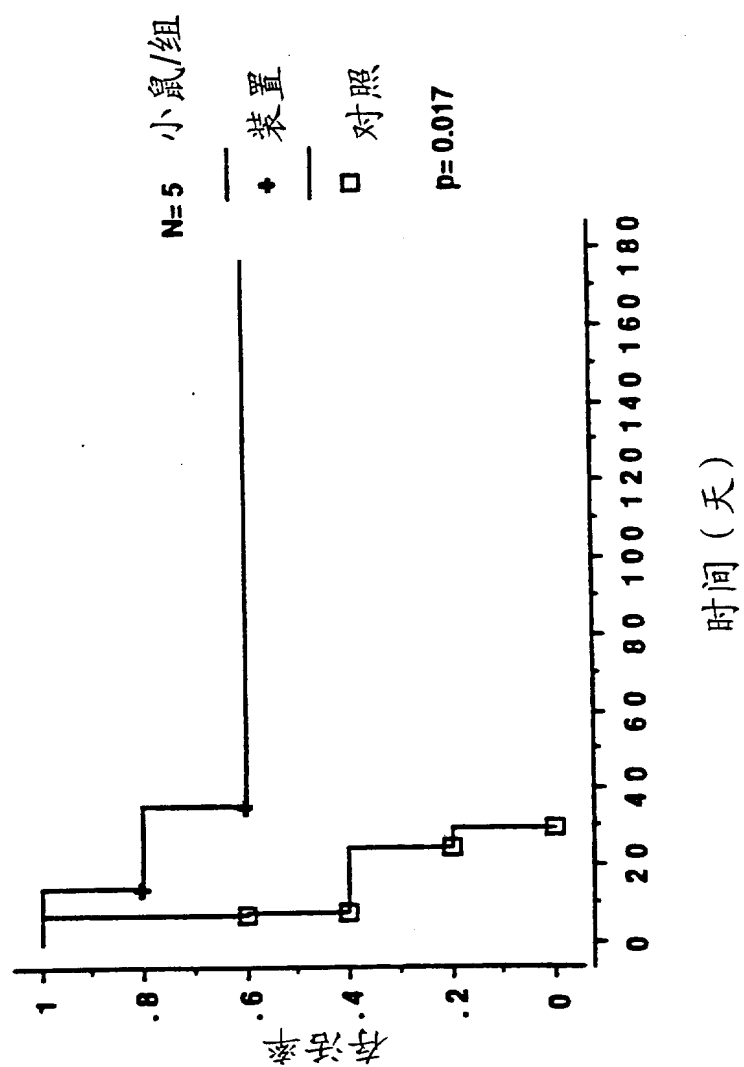
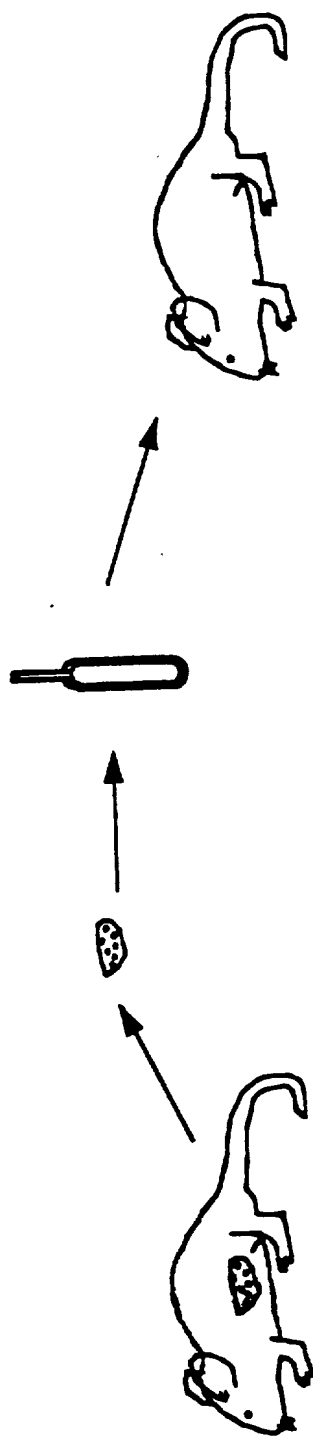


图 12
肿瘤转移试验



1. 来自用含B16细胞的装置处理小鼠的肿瘤

2. 来自用照射的B16细胞处理小鼠的肿瘤

3. 培养的B16细胞

4. 未处理

图 13
动物存活:
用转移的黑色毒瘤处理

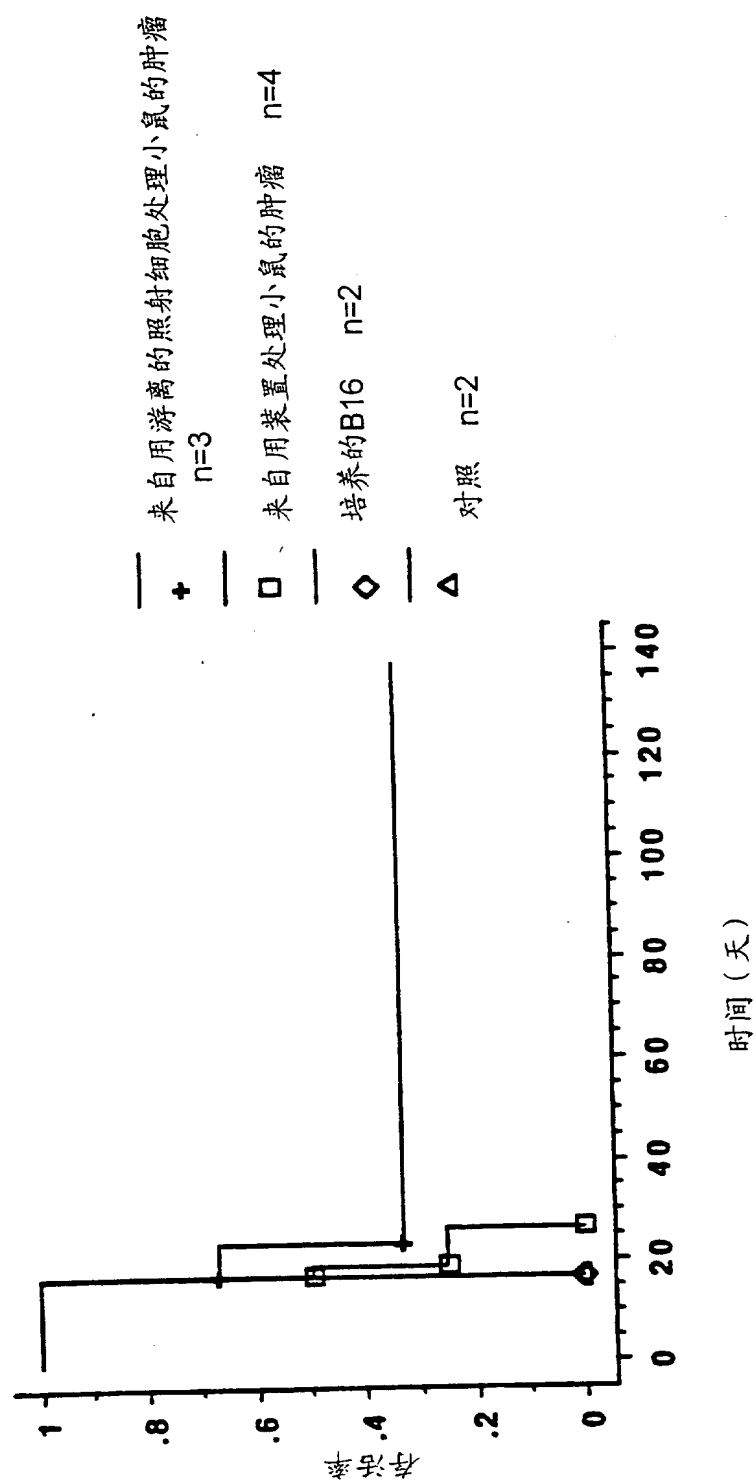


图 14
C57ov-疫苗模型

