

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03152271.8

[51] Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1296477C

[22] 申请日 1997.3.21 [21] 申请号 03152271.8
分案原申请号 97193544.0

[30] 优先权

[32] 1996. 4. 3 [33] US [31] 08/625, 595

[32] 1996. 11. 7 [33] US [31] 08/745, 063

[73] 专利权人 罗格森研究所

地址 美国纽约州

[72] 发明人 坎蒂·贾殷 阿尔伯特·L·鲁宾

希林·阿西纳 伯里·史密斯

库尔特·施滕策尔

[56] 参考文献

US4798786A 1989. 1. 17 C12N5/02

US4673566A 1987. 1. 16 A61K9/50

US5053332A 1991. 10. 1 C12N11/10

US4663286A 1987. 5. 5 C12N5/02

US4647536A 1987. 3. 3 C12N5/00

US4971833A 1990. 11. 20 G01N30/48

审查员 徐益君

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 15 页

[54] 发明名称

含有抑制癌细胞增殖的因子的条件培养基及其制备方法

[57] 摘要

可植入的珠(其由琼脂糖和胶原组成, 和/或包被有一层琼脂糖)内已经掺入细胞样品。所说的细胞产生扩散性生物产物。这些珠可以用作植入物来调节接受者的免疫反应。这些珠也可以用于在体外环境中促进特定类型的细胞生长, 从而在培养物中产生所需产物, 或者也可以用于抑制某些细胞的生长。在施用到受治疗者后, 所说的植入物也可以抑制某些细胞生长。

1、一种具有癌细胞增殖抑制作用的条件培养基，其由包括如下步骤的方法生产：使癌细胞受限于一种包含琼脂糖的珠中，将所述受限的癌细胞培养于培养基中，其中所述癌细胞的生长因癌细胞受限于所述珠中而被限制，由此使得所述癌细胞产生一种抑制癌细胞增殖的物质，所述物质透过所述珠进入所述培养基中以产生条件培养基，以及收集该条件培养基。

2、权利要求 1 的条件培养基，其中所述的珠是琼脂糖包被的固体琼脂糖胶原珠。

3、权利要求 1 的条件培养基，其中所述的珠是固体状琼脂糖包被的含琼脂糖珠。

4、权利要求 1 的条件培养基，其中所述的癌细胞是肾癌细胞。

5、权利要求 1 的条件培养基，其中所述的癌细胞是乳腺癌细胞。

6、权利要求 1 的条件培养基，其中所述的珠含有 10,000~200,000 个细胞。

7、权利要求 6 的条件培养基，其中所述的珠含有 30,000~100,000 个细胞。

8、权利要求 1 的条件培养基，其是冷冻的。

9、权利要求 8 的条件培养基，其冷冻于-20℃。

10、权利要求 1 的条件培养基，其中所述受限的癌细胞是人类癌细胞。

11、权利要求 1 的条件培养基，其中所述受限的癌细胞是小鼠癌细胞。

12、一种用于制备具有癌细胞增殖抑制作用的条件培养基的方法，其包含使癌细胞受限于一种包含琼脂糖的珠中，将所述受限的癌

细胞培养于培养基中，其中所述癌细胞的生长因癌细胞受限于所述珠中而被限制，由此使得所述癌细胞产生一种抑制癌细胞增殖的物质，所述物质透过所述珠进入所述培养基中以产生条件培养基，以及收集该条件培养基。

13、权利要求 12 的方法，其中所述的珠是琼脂糖包被的固体琼脂糖胶原珠。

14、权利要求 12 的方法，其中所述的珠是固体状琼脂糖包被的含琼脂糖珠。

15、权利要求 12 的方法，其中所述的癌细胞是肾癌细胞。

16、权利要求 12 的方法，其中所述的癌细胞是乳腺癌细胞。

17、权利要求 12 的方法，其中所述的珠含有 10,000-200,000 个细胞。

18、权利要求 17 的方法，其中所述的珠含有 30,000-100,000 个细胞。

19、权利要求 12 的方法，其中所述的培养基是 RPMI 完全培养基。

20、权利要求 12 的方法，其中所述受限的癌细胞是人类癌细胞。

21、权利要求 12 的方法，其中所述受限的癌细胞是小鼠癌细胞。

含有抑制癌细胞增殖的因子的条件培养基及其制备方法

本申请是申请日为 1997 年 3 月 21 日、申请号为 97193544.0、发明名称为“含有产生扩散性生物产物的细胞的可植入的琼脂糖-胶原珠及其应用”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

本发明涉及运用琼脂糖和胶原胶囊化细胞随后用琼脂糖包被的方法，并涉及含有抑制癌细胞增殖的因子的条件培养基及其制备方法。

背景技术

用生物相容性物质胶囊化各种生物物质是运用了一段时间的技术，尽管成功率有限。该技术的例子是美国专利 5,227,298 (Weber 等); 5,053,332 (Cook 等); 4,997,443 (Walthall 等); 4,971,833 (Larsson 等); 4,902,295 (Walthall 等); 4,798,786 (Tice 等); 4,673,566 (Goosen 等); 4,647,536 (Mosbach 等); 4,409,331 (Lim); 4,392,909 (Lim); 4,352,883 (Lim); 和 4,663,286 (Tsang 等)。另一个例子是共同未决申请 08/483,738(1995 年 6 月 7 日提交，申请人 Jain 等，本文一并参考)。Jain 等较详细地讨论了用各种生物相容性物质胶囊化分泌细胞的方法。如其中所讨论的，分泌细胞是分泌生物产物的细胞。一般而言，分泌细胞具有内分泌细胞的至少某些性质，并且一般可以作为本质上是内分泌细胞的细胞等同物对待。所说的共同未决申请讨论了，例如将产生胰岛素的细胞（优选的以胰岛形式）胶囊化到包被有琼脂糖的琼脂糖-胶原珠中的方法。所形成的产物在患者需要胰岛素治疗的疾病（如糖尿病）的治疗中是有用的。

Jain 等的申请较详细地讨论了移植治疗中的技术所采用的现有方法。这里也总结了这些。

大家知道保护所移植的组织使之免受宿主的免疫反应主要有五种方法。所有方法均涉及将所移植的组织与宿主的免疫系统隔开的尝试。至今采用的免疫分离技术包括：血管外扩散室，血管内扩散室，血管内超滤室，微囊化，以及大胶囊化。然而，所有这些方法都是失败的，因为存在下列问题中一种或多种：宿主对植入材料的纤维化反应，植入材料的不稳定性，透过半透膜营养扩散的有限性，促分泌素和产物的通透性，以及透过半透膜障碍扩散的时间落后性。

例如，用于将活细胞，组织，以及其它易变的膜包裹在半透膜中的微囊化作用方法于 1978 年由 Lim 研制(Lim, 研究报导, Damon 公司(1978))。Lim 采用藻酸盐和聚 L-赖氨酸微胶囊来密封朗氏胰岛。1980 年，在糖尿病研究中报导了体内应用这一新奇技术的首次成功(Lim 等, 科学 210: 908 (1980))。这些微胶囊化朗氏胰岛的植入使患糖尿病的动物维持血糖量正常状态。然而，其它研究者重复这些实验，发现藻酸盐引起组织反应，且不能再现 Lim 等的结果(Lamberti 等, 应用生物化学和生物技术 10: 101 (1984); Dupuy 等, 生物医学材料和研究杂志, 22: 1061 (1988); Weber 等, 移植 49: 396 (1990); 和 Doon-shiong 等, 移植进展 22: 754 (1990))。现在认为是这些聚合物的水溶解性造成体内这些微胶囊有限的稳定性和生物相容性 (Dupuy 等, 同上, Weber 等, 同上, Doon-shiong 等, 同上, 以及 Smidsrod, 化学学会 Faraday 讨论, 57: 263 (1974))。

前不久, Iwata 等, (Iwata 等, 生物医学材料和研究杂志. 26: 967 (1992)) 用琼脂糖对异源胰腺胰岛进行微囊化作用，并且发现它能作为制备微珠的介质。在他们的研究中，将 1500-2000 个胰岛在 5%琼

脂糖中分别进行微胶囊化，并且植入链脲佐菌素引起的糖尿病的小鼠中。移植物存活了一段较长的时间，接受者确实保持血糖量正常。

然而，他们的方法有一些弊端，其麻烦及不精确。例如，许多珠只是部分地涂布有一层琼脂糖并有几百粒空的琼脂糖形式的珠。这样要求额外时间把胶囊化的胰岛与空的珠分离。此外，大多数植入的微珠聚集在骨盆沟槽，要求大量完全被包被的胰岛个体珠来维持血糖量正常。此外，所移植的珠很难重新取出，易于破碎，并且在轻微破坏下即容易释放胰岛。

也试验了大胶囊化方法。将采用各种不同材料（如聚-2-羟乙基-甲基丙烯酸，聚氯乙烯-c-丙烯酸，和乙酸纤维素）的大胶囊用做朗氏胰岛的免疫分离物。（参见 Altman 等，糖尿病 35: 625 (1986); Altman 等，移植：人造内部的器官的美国学会 30: 382 (1984); Ronel 等，生物医学材料和研究杂志，17: 855 (1983); Klomp 等，生物医学材料和研究杂志 17: 865 -871 (1983))。在所有这些研究中，仅仅一例糖血症短时间内达到正常化。

Archer 等（外科研究期刊 28: 77 (1980)）利用丙烯酸共聚物的中空纤维临时阻止胰岛异种移植的排斥作用。他们报导：在中空纤维中分散的幼鼠胰腺移植物（其被移植入患糖尿病的仓鼠中）能长期的存活。前不久，Lacy 等，科学 254: 1782 -1784 (1991)证实了他们的结果，但是发现血糖量正常状态时间很短。他们发现，当将胰岛注射入纤维，它们在中空的管内聚集，导致胰岛块中央部分形成坏死区。中央坏死区排除了移植物的长时间存活。为解决这一问题，它们利用藻酸盐分散纤维内的胰岛。然而，这一实验还没有广泛重复。因此，作为人类胰岛移植的介质的膜的机能尚存在问题。

因而，需要实现分泌细胞的移植，尤其是，不使用慢性免疫抑制

剂的胰腺胰岛的异源和异种移植物的存活。

在 Jain 等上述讨论的工作中,发明人报导了在亲水凝胶材料中胶囊化分泌细胞形成一种有功能的,非免疫原性的材料,这一材料可以移植入动物中,并能长时间存活。该胶囊化分泌细胞技术为分泌细胞的移植提供了一种更有效和更便于施用的技术。该胶囊化技术对密封其它生物成分同样有用,例如酶,微生物,营养剂包括重组产生的营养剂,细胞毒性剂,和化学化疗剂。讨论了胶囊化的生物制剂对治疗已知对生物试剂有反应的疾病很有用。

所说的申请没有深入讨论可产生扩散性生物物质细胞的掺入方法,这些细胞在治疗中 useful。本文中区别了分泌细胞与产生扩散性生物材料的细胞二者之间的差异。前者,在如 Jain 的申请中所给出的每个例子中,一般地指产物如激素,细胞信号剂等等,这些通常被认为是生物"信使"。相反地,扩散性生物物质指这样的物质如 MHC 呈递的肽,细胞表达调节物如抑制子,启动子,诱导子,等等。如下列所讨论的,在肿瘤学等领域中将显示其差异。

广泛癌研究包括关于异源细胞的提取物,以及各种细胞组分的工作。通过利用单克隆抗体,现有技术已确定相关的癌抗原,例如,GM2, TF, STn MUC-1, 以及由此衍生的各种抗原决定基。当前的理论提出:从各种肿瘤标记中衍生的抗原决定基与 MHC 分子非共价复合,因而通过特异性溶细胞 T 细胞而形成不同类型。这一机理不同于各种对病毒感染的生物反应中所牵涉的各种机制。Van der Bruggen 等,科学 254: 1643 -1647 (1991); Boon 等, 5,405,940, 以及 Boon 等, 5,342,774(本文一并参考)描述了这一点,所有这些并入参考中。

平行于该工作的另外的研究(关于鉴定所谓的癌抗原决定基)集中在研究癌增殖的调节,例如通过抑制或更常见地,是生物调节。参

见,例如, Mitchell, 临床药理学杂志, 32: 2 -9 1992); Maclean 等, 加拿大肿瘤学杂志, 4: 249-254 (1994)。结合所有这些各种各样的对付癌的方法, 其目标是宿主免疫反应的修饰作用, 以引起患者症状的某些改善。

所有这些方法的关键是一种或多种扩散性生物产物的活性, 与其它材料相协调以调节免疫反应。Boon 等以及 Van der Bruggen 等, 例如, 揭示了小肽分子。Mitchell 讨论了起作用的大分子, 如抑制子。

使用这些材料的所有治疗方法的一个问题是如何以一种安全, 有效的形式进行递送。这不容易完成。现在已经惊人地发现, Jain 等的教导(其对需要分泌细胞产物的疾病的治疗法的开发中非常有用)现在可以用于其它领域中。

发明内容

本发明包括包含琼脂糖包被的固体琼脂糖胶原珠或包含固体状琼脂糖包被的含琼脂糖珠的组合物以及这些组合物的制备方法, 本发明还包括上述组合物在制备一种用于将抑制癌细胞增殖的因子施用到受治疗者的植入物中的应用。此外, 含有抑制癌细胞增殖的因子的条件培养基及其制备方法也是本发明的内容。本发明的其他方面和实施方案进一步详细描述如下。

具体实施方式

实施例 1

这一实施例及以下那些实施例采用 RENCA 细胞。这些是 BALB/C 小鼠的自发性肾癌细胞(其可供广泛地获得), 保持在体外和体内培养物中。参见, Franco 等, 溶细胞诱发肿瘤免疫原性, 181—193 (1994)。

将冻结的 RENCA 细胞的样品在 37℃ 解冻, 然后放置在含

Dulbecco 修饰培养基(D-MEM)的组织培养瓶中,其已补充了 10%牛血清,青霉素(100 u/ml)和链霉素(50 ug/ml),以给出此后所指的"完全培养基"。

待细胞培育至汇合生长,则进行胰酶消化,接着用 Hank 平衡盐溶液洗涤,然后用以上所提及的完全培养基洗涤。

为了鉴定 RENCA 细胞是否有效地产生肿瘤,以 10^6 个该细胞对两只 BALB/C 小鼠腹膜内注射。观察小鼠 3-4 周。临床上,头两周它们表现健康,并表现出正常活性。此后,癌症临床表现明显。一只小鼠 23 天后死去,并且第二只 25 天后也死去。小鼠死亡后,对其检查,注意到有许多各种大小的肿瘤。其中一些肿瘤也显示出血性。

将从一只小鼠取下的一个肿瘤样品固定在 10%福尔马林中,以进行组织学检查。

实施例 2

依据 RENCA 细胞确实在体内生长的情况,进行研究以测定依据本发明这些细胞是否在珠中生长。如前所述,待细胞培育至汇合生长,则进行胰酶消化,接着洗涤(同样如前所述)。制备 60,000 个到 90,000 个细胞样品。然后将细胞以 750rpm 离心,移走液体。接着将细胞悬浮在 1%的 atelocollagen 溶液(在 pH 为 6.5 的磷酸缓冲盐溶液中)中。

在最小基本培养基(MEM)中制备 1%低粘度的琼脂糖溶液,在 60 °C 下保存,然后,加 100ul 至上述 RENCA 细胞和 atelocollagen 的悬浮液中。然后立即将材料以一大滴的形式转移到无菌室温矿物油中。混合物形成单一,光滑,半固性的珠。重复这一操作以制备大量珠。

一分钟之后,在 37 °C 下,将珠转移到上述完全培养基中。用最小基本培养基(包含前面所列的抗生素)将珠洗涤三次。然后在 37 °C、5%CO₂ 的湿润的空气中过夜温育珠。温育后,将已为固体的珠转

移到盛有 1ml 在最小基本培养基中的 5%琼脂糖的无菌勺中。将珠在溶液中翻滚 2-3 次以使它们均匀地涂布一层琼脂糖。在琼脂糖固化之前，将珠转移到矿物油中，以形成平滑的外表面。60 秒后，在 37℃，用完全培养基洗涤珠五次以去掉油。接着过夜温育(37 °C，5%CO₂ 的湿润空气)。

这些包含 RENCA 的珠用于以下的实验中。

实施例 3

在体内研究开展之前，有必要检测 RENCA 细胞是否能在以上述方式制备的珠中生长。

为证实这一点，将实施例 2 中所制备的珠，按所列出的条件，在如实施例 2 中所述的培养基中温育三周。然后将这些珠的三个切成小片，在标准培养瓶中培养，直接与烧瓶和培养基相接触。

对这些培养物的观察表明：细胞能生长并形成标准的 RENCA 集落。这表明细胞在珠中仍然能存活。

实施例 4

然后在体内进行实验。实验中将珠在 37 °C温育七天，然后让受试小鼠接收珠移植。为做到这一点，对四只小鼠中的每只做一个深至腹膜内的中等切口。移植进三粒均包含 60,000 个 RENCA 细胞的珠。然后利用可吸收缝合线缝合切口(两层缝合)。四只雄性小鼠(BALB/C)均正常，重量为 24-26 克之间，并且表现健康。建立两组对照。在第一组中，两只小鼠接收不包含任何 RENCA 细胞的三粒珠，而第二组，两只小鼠未经任何处理。

在植入三周后，所有小鼠接收 10⁶ RENCA 细胞的腹膜内注射。再过十八天，一组对照组的小鼠死去。然后处死所有剩下的小鼠，进行观察。

对照组小鼠出现了许多肿瘤,而接收了珠-胶囊化细胞移植的小鼠只在腹腔中出现随机小结。

这些令人鼓舞的结果使得提出下面实施例中的实验设计。

实施例 5

在这些实验中,对六只 BALB/C 小鼠的每只进行肾膜内 RENCA 细胞的注射,而产生癌。十五天后,将小鼠分成两小组。如前实施例 4 所描述的,将第一组中的三只小鼠分别接收三粒珠。第二小组(对照组小组)接收不含 RENCA 细胞的珠。

4-5 天之后,曾接收含 RENCA 细胞的移植物的老鼠看上去无生气,皮毛变得粗短刺状,而对照组小组仍然是精力旺盛,其皮毛状况没有发生变化。

然而,植入十天后(RENCA 细胞注射 25 天后),对照组小鼠变得行动迟缓,并且腹部胀大。珠移植十四天后,对照组三只小鼠的一只死去。然后处死小鼠。

对照组小鼠的体腔内显示出大量出血,有很多的肿瘤遍布营养消化道,肝,胃部和肺脏。整个腹腔因为猖獗的肿瘤生长而无法分辨出。然而曾接收了胶囊化 RENCA 细胞的珠的小鼠无任何出血,仅仅在消化道癌上有一些小结节。试验组与对照组的比较说明在试验组中肿瘤没有发展。

实施例 6

当与胶囊化 RENCA 细胞同时温育时,自由接种的 RENCA 细胞的生长则被抑制。进一步进行了一组实验以检测这一影响是否对其它细胞也明显。

从美国典型培养物保藏中心获得腺癌细胞系,即 MMT (小鼠乳房肿瘤)。如上述,用 MMT 细胞制备胶囊化的 MMT 细胞,产生每珠包

含 120,000 个或者 240,000 个细胞的珠。制备珠后，用它们来检测其是否能抑制 RENCA 细胞在体外的增殖。具体地说，准备两个六孔培养平板，并在 4ml 培养基中每孔接种 1×10^4 RENCA 细胞。在每个平板中，三个孔作为对照组，另三个为试验组。让每平板中的三个对照组的一个孔接收一粒珠。其它两孔的每孔接收两个或者三个空的珠。同样处理第二组，点样孔中分别接收一粒，两粒或者三粒含 120,000 个或者 240,000 个 MMT 细胞的珠。37℃ 下温育点样孔一周，在之后用胰酶消化 RENCA 细胞，洗涤，并且利用血细胞计来计数。结果如下：

平皿# 1 (空大珠) #一周后重新得到的细胞数			平皿# 2 (含 MMT 细胞的大珠) #一周后重新得到的细胞数	
点样孔#	对照组	空	120,000 个 MMT 细胞	240,000 个 MMT 细胞
1	2.4×10^5	2.8×10^5	1.4×10^5	1×10^5
2	2.0×10^5	3.5×10^5	1.2×10^5	7×10^4
3	4.4×10^5	2.5×10^5	1.25×10^5	9×10^4

实施例 7

接着实施例 6 的结果，利用 1×10^4 MMT 细胞而非 RENCA 细胞进行了相同的实验。实验精确地按实施例 6 进行。结果如下所示。

点样孔#	对照组	空大珠	(1) MMT 大珠	(2) MMT 大珠
1	3.1×10^6	2.8×10^6	1.6×10^6	1.3×10^6
2	3.3×10^6	2.6×10^6	1.0×10^6	1.1×10^6
3	3.0×10^6	2.8×10^6	6.0×10^5	5.0×10^5

这些结果促进了体内实验的应用。这点在实施例 8 中说明。

实施例 8

如前面实施例中使用的 RENCA 细胞是肾癌细胞。为更完全显示本

发明的普遍效应，利用不同类型的癌细胞进行了研究。具体地说，即利用腺癌细胞。

从美国典型培养物保藏中心获得小鼠乳房肿瘤细胞系(MMT)。利用前面的方案，制备每珠包含 120,000 个细胞，和包含 240,000 个细胞的植入物。

所利用实验模型是前面的小鼠模型。将二十二只小鼠划分成 4 只、9 只、9 只各组。第一小组，即对照组，进一步划分成三组分别为两只，一只，一只。第一亚组所接收的植入物是不包含任何细胞的一粒珠。一只小鼠接收两个空的珠，同时另一只接收三个空的珠。

在实验小组 A(9 只动物)中是包含 120,000 个细胞的珠，而在 B 小组中是包含 240,000 个细胞的珠。在小组"A"和"B"中，再分组为三个亚组，每亚组有三只小鼠。亚组中小鼠分别接收一粒，两粒或者三粒包含 MMT 细胞的珠。

植入二十一天后，给所有动物注射 40,000 个 RENCA 细胞。注射后，小鼠立即无生气，毛发粗短刺状。大约持续五天，在这之后观察到正常的行为。

二十天之后，对照组小鼠腹部胀大，毛发表现明显粗短刺状。在注射 25 天后，一只对照组小鼠死去，且余下的对照组小鼠呈现将死状态。处死所有小鼠，观察肿瘤发展情况。观察记录如下：

小鼠内的大珠数目	对照组	实验组 A	实验组 B
1	++++	--	--
1	++++	--	--
1		+	++
2	++++	--	--
2		--	--
2		++	++
3	++++	--	--
3		--	--
3		--	+++

这些结果表明，检验的十八只小鼠中，有十三只不显示任何疾病。在小组 A 中，一只小鼠有少量模块，另一只小鼠有少量肿瘤。接收两粒珠的一只小鼠有一些肿瘤。

在小组 B 中，接收一粒珠的一只小鼠，及接收两粒珠的一只小鼠，显示出一些围绕肠的肿瘤。接收三粒珠的一只小鼠长了一个大的实体肿瘤，并且呈现明显病态。但是，总体结果表明胶囊化的小鼠乳腺癌细胞抑制肿瘤形成。

实施例 9

如前述，本发明的实践产生一些物质或因子，它们抑制和/或防止肿瘤细胞增殖。这点在以下实验中作进一步探讨。

除不加 atellocallogen 外，按照前面实施例 2 所述制造出另外的珠。因此，这些珠是琼脂糖/琼脂糖珠。将上述的 RENCA 细胞再一次按如上所述掺入到这些珠中。

然后，用三个为一组的两套六孔平板分别作为对照组和实验组。

在对照组中，在孔中加入 4ml RPMI 完全培养基（10%胎牛血清和 11ml/l 青霉素）。然后给每一对照组接种 10,000 个 RENCA 细胞。

实验组中，在含 50ml RPMI 完全培养基的 35x100 mm 培养平板中，加入经温育 10 粒包含 RENCA 的免疫-隔离的珠(每珠含 120,000 个细胞)而得到的物质，调节 RPMI 完全培养基条件。温育五天后，从平板收集培养基，并将 4ml 的培养基放置在每一检验孔中。然后给这些孔接种 10,000 个 RENCA 细胞。

所有平板(对照组和实验组)在 37℃ 温育五天。温育后，用胰蛋白酶消化洗涤细胞，并用血细胞计计数。胰蛋白酶消化后，将平板中每个孔中的细胞集中起来，并且计数，结果如下。

点样孔 #	(细胞) 对照组	(细胞) 条件组
1	7×10^5	3×10^5
2	8×10^5	2.5×10^5
3	7×10^5	3.4×10^5

这些结果表明这些细胞当限制在本发明珠中时产生某些抑制肿瘤细胞增殖的因子。这些细胞由于陷入珠中而产生限制性抑制因子，其不同于其它物质，如当细胞相互接触时产生的接触性抑制因子。

实施例 10

前面进行的实验表明，在条件培养基中 RENCA 细胞生长率是对照组培养基中细胞生长率的一半。此处进行的实验用于检查在条件培养基被冷冻之后抑制因子是否仍能保持活性。

温育 10 粒包含免疫分离的 RENCA 的珠五天，从而制备 RENCA 条件培养基。37 °C，在 35x100mm 培养平板中，用 50ml RMPI 完全培养基进行温育。温育后，收集培养基并存放于 -20℃。温育包含免

疫分离的 MMT(小鼠乳房肿瘤)细胞的珠,从而制备条件培养基。每个珠包含 240,000 个细胞;其它所有条件都相同。

冷冻培养基在 37℃ 下解冻,然后用于下列检验。三个六孔平板分别用于每种处理,即(1)RMPI 对照组培养基,(2)RENCA 冷冻的条件培养基,(3)MMT 冷冻的条件培养基。总共为 4ml 的培养基分配到每个孔中。然后给所有孔接种 10,000 个 RENCA 细胞,37℃ 温育五天。温育后,从两个平板的每个孔中取出样品,用胰酶消化,集中起来并且用血细胞计计数。八天后,将余下的三个平板的每个孔以相同的方法进行检验。

结果如下:

5 天皿	对照培养基	RENCA 冷冻条件培养基	MMT 冷冻条件培养基
1	6×10^5	5×10^5	8×10^4
2	6.8×10^5	4.2×10^5	8.5×10^4
8 天皿			
3	2.8×10^6	2×10^6	8×10^4

将结果与前面实施例 6 的结果比较发现:尽管冷冻/解冻的 RENCA 条件培养基不能抑制生长达未冷冻培养基所能达到的相同程度(比较实施例 6 和 7),但是它仍然抑制生长。采用 MMT 细胞的冷冻条件培养基比未冷冻的 MMT 条件培养基更能抑制生长。这些结果表明:18 只检验小鼠中,13 只无任何疾病。小组(A)的小鼠中,一只小鼠有少量模块,另一只小鼠有少量肿瘤。

前面所提及的内容描述了可植入珠的制造,其含有一个或多个类型的能产生一种扩散性生物产物的细胞,在这里定义这一词组。扩散性生物产物是一种对植入了珠的受治疗者有作用的物质。优选的这一作用是免疫调节,如刺激免疫反应,或者抑制反应。在癌症的情况下,

例如，扩散性生物产物可能是一种肽，其与受治疗者中癌细胞上的MHC分子复合，由此引起CTL作用，反过来导致降低受治疗者中肿瘤出现。扩散性产物也可以是肿瘤生长的抑制剂。与此治疗形式有关的，在所确定的肿瘤内或附近放置所植入的珠是可能的（虽然不一定是优选的）。

此处所使用的"扩散性生物产物"指诸如蛋白质，糖蛋白，脂蛋白，碳水化合物，类脂，糖脂，以及肽。更具体地说，例如抗体，细胞因子，激素，酶，等等之类的物质，但不仅仅指所包括的这些物质类型。已知的细胞过程中的"终产物"，如CO₂和H₂O不包括在内。

如实验所示，可植入的珠也能用于预防。大家知道，癌症患者人群中至少一部分易于再发病。本文所描述的实验表明，植入物可以通过扩散性产物对受治疗者系统的生物效应而抑制癌的发生或者再发生。

本发明的讨论集中于体内方法。同样必须了解本发明也包括体外方法，在这里讨论了一些。例如，众所周知，能产生所需产物的许多细胞在体外培养时，需要存在饲养细胞。针对饲养细胞总有些争论，它们可能比所需细胞生长快，从而导致了感兴趣物质的"窒息"。此外，存在饲养细胞层产生各种有毒产物的问题。本发明的可植入的珠几乎作为细胞温箱起作用，保护掺入进的细胞，同时使扩散性产物进入培养基，例如，可收集它们的地方。

如前所述，制备可植入的珠首先要求细胞悬浮在溶液中，优选地是悬浮在含水胶原中。优选地，胶原是约0.5%到约2%的 atelocollagen 溶液。根据所用细胞类型，在给定时间时，溶液中细胞数量，由此珠中的细胞数量都将变化。优选地，每个珠用约10,000到约200,000个细胞，更优选地，用约30,000到约100,000个细胞。最优选地，用约40,000到约60,000个细胞。

将细胞悬浮在胶原溶液中后，加入琼脂糖溶液。优选地，琼脂糖溶液从约 0.5%到约 5 %的范围，优选地约 1%。将混合物滴在惰性物质上或滴入进，如 TEFLON®或矿物油中，形成珠。这个珠是半固体。然后将半固体珠转移到无菌培养基中，优选地为包含抗生素的培养基，进行洗涤，及温育以使胶原聚合。胶原聚合是一种充分研究过的现象，这一现象发生的条件不必在这里详细描述。

珠凝固后，用琼脂糖包被，优选地是通过使它在琼脂糖溶液中翻滚包被。一种优选的完成这一操作的方式是简单的涂布有 TEFLON®的勺子，勺子盛有琼脂糖的溶液（优选为 5%到 10%）。

前面所提及的关于扩散性生物产物的讨论，不应该限制在野生型的物质。例如，人们可以容易地掺入转导或者转染的宿主细胞，如真核细胞(例如，293 细胞，CHO 细胞，COS 细胞)，或甚至是原核细胞（如大肠杆菌），这些细胞经过处理以产生异源的蛋白质，或者经过修饰，如同源重组，而产生增加量的所需生物产物，其它材料，例如杂交瘤也可以使用，其扩散性生物产物是单克隆抗体。

本发明的其它特性与方面对于技术人员来说很清楚，这里不必叙述。

采用的表达和术语用来作为描述的术语但不是限制的术语，无意于用这些术语和表达来排除所示的或所描述的特征的任何等同特征或者其部分，应认识到在本发明的范围内进行各种修改是可能的。