



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1738619 B

(45) 授权公告日 2012.04.18

(21) 申请号 200380108975.6

(22) 申请日 2003.12.05

(30) 优先权数据

60/431,267 2002.12.06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.07.19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2003/038672 2003.12.05

(87) PCT申请的公布数据

W02004/053072 EN 2004.06.24

(73) 专利权人 西北生物治疗药物公司

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 M·L·博希

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 赵艳华

(51) Int. Cl.

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 35/26 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 0047719 A, 2000.08.17, 权利要求 6.

NESTLE F.O. Dendritic cell

vaccination for cancer therapy.

Oncogene19. 2000, 196673-6679 页.

KADOWAKI N. ET AL. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidilic acid doublestranded RNA, respectively stimulate CD 11c- type 2 dendritic cell precursors and CD 11+ dendritic cells to produce type I IFN. THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY 166. 2001, 2291 - 2295.

TSUJI S. ET AL. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll like receptors'. INFECTION AND IMMUNITY 68. 2000, 6883 - 6890 页.

卞建民. 树突细胞用于肿瘤特异性免疫治疗的研究进展. 国外医学外科学分册 5. 1998, (5), 264 页.

NESTLE F.O. Dendritic cell vaccination for cancer therapy. Oncogene19. 2000, (19), 6673-6679 页.

审查员 张婷

权利要求书 2 页 说明书 11 页

(54) 发明名称

给予体外部分成熟的树突细胞治疗肿瘤的制
药用途

(57) 摘要

本发明提供可用于肿瘤个体给药的包含部分成熟树突细胞的细胞群体。与树突细胞成熟试剂作用约 1- 约 10 小时或更久的部分成熟的树突细胞,可在肿瘤部位有效摄取和加工肿瘤抗原,并完全成熟,随后可迁移至治疗个体的淋巴结处。一旦到达淋巴结内,已完全成熟的抗原提呈树突细胞分泌适当的细胞因子(例如 TNF α 和 IL-12),与 T 细胞作用诱导后续的抗肿瘤免疫应答。

1. 一种组合物, 包含在树突细胞成熟剂存在条件下体外部分成熟的树突细胞, 与用于体内肿瘤内给药的药物可接受载体相结合,

其中所述树突细胞成熟剂为卡介苗 (BCG)、BCG 和干扰素 γ (IFN γ)、脂多糖 (LPS)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、咪唑并喹啉化合物、合成的双链多核糖核苷酸、Toll-样受体激动剂 (TLR)、含有已知诱导 DC 成熟的未甲基化 CpG 基序的核酸序列、或其任意组合,

其中所述部分成熟的树突细胞

- 产生 TNF α 、IL-6、IL-10 和 / 或 IL-12 ;
- 上调共刺激分子 CD80、CD86 和 / 或 CD54 的表达 ; 及
- 保持摄取和加工抗原的能力。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中树突细胞从皮肤、脾脏、骨髓、胸腺、淋巴结、脐带血或外周血中获得。

3. 根据权利要求 2 所述的组合物, 其中树突细胞从待治疗个体获得。

4. 根据权利要求 2 所述的组合物, 其中树突细胞从与待治疗个体 HLA 相匹配的健康个体获得。

5. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中 BCG 包括完整 BCG, BCG 细胞壁成分, BCG 来源的 lipoarabidomannans, 或 BCG 组分。

6. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述 BCG 为热灭活 BCG 或福尔马林处理的 BCG。

7. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中有效剂量的 BCG 为每毫升组织培养基约 10^5 - 10^7 cfu, 有效剂量的 IFN γ 为每毫升组织培养基大约 100- 大约 1000 单位。

8. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中咪唑喹啉化合物为咪唑并喹啉 -4- 胺化合物。

9. 根据权利要求 8 所述的组合物, 其中咪唑并喹啉 -4- 胺化合物为 4- 氨基 -2- 乙氧基甲基 - α , α - 二甲基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -1- 乙醇, 或 1-(2- 甲基丙基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -4- 胺。

10. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中合成的双链多核糖核苷酸为聚 [I] : 聚 [C(12) U]。

11. 根据权利要求 1-10 任一项所述的组合物, 其中给予部分成熟树突细胞作为放疗、化疗或其组合的辅剂。

12. 根据权利要求 1-10 任一项所述的组合物, 其中组合物包含大约 10^2 - 大约 10^{10} 的部分成熟树突细胞。

13. 根据权利要求 1-10 任一项所述的组合物, 其中部分成熟树突细胞在部分成熟之后冷冻保存。

14. 根据权利要求 1-10 任一项所述的组合物, 其中部分成熟的树突细胞直接给药至肿瘤内, 给药至外科手术除去或切除肿瘤后的肿瘤基床内, 给药至肿瘤周围的组织区域, 给药至直接引流肿瘤区域的淋巴结内, 直接给药至为肿瘤、肿瘤基床或肿瘤侵袭器官输送血液或淋巴液的循环脉管内, 或给药至循环系统, 以便细胞可以输送到肿瘤、肿瘤基床或肿瘤侵袭器官。

15. 根据权利要求 11 的组合物, 其中部分成熟的树突细胞直接给药至肿瘤内, 给药至外科手术除去或切除肿瘤后的肿瘤基床内, 给药至肿瘤周围的组织区域, 给药至直接引流肿瘤区域的淋巴结内, 直接给药至为肿瘤、肿瘤基床或肿瘤侵袭器官输送血液或淋巴液的

循环脉管内,或给药至循环系统,以便细胞可以输送到肿瘤、肿瘤基床或肿瘤侵袭器官。

16. 根据权利要求 12 的组合物,其中部分成熟的树突细胞直接给药至肿瘤内,给药至外科手术除去或切除肿瘤后的肿瘤基床内,给药至肿瘤周围的组织区域,给药至直接引流肿瘤区域的淋巴结内,直接给药至为肿瘤、肿瘤基床或肿瘤侵袭器官输送血液或淋巴液的循环脉管内,或给药至循环系统,以便细胞可以输送到肿瘤、肿瘤基床或肿瘤侵袭器官。

17. 根据权利要求 13 的组合物,其中部分成熟的树突细胞直接给药至肿瘤内,给药至外科手术除去或切除肿瘤后的肿瘤基床内,给药至肿瘤周围的组织区域,给药至直接引流肿瘤区域的淋巴结内,直接给药至为肿瘤、肿瘤基床或肿瘤侵袭器官输送血液或淋巴液的循环脉管内,或给药至循环系统,以便细胞可以输送到肿瘤、肿瘤基床或肿瘤侵袭器官。

给予体外部分成熟的树突细胞治疗肿瘤的制药用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2002 年 12 月 6 日申请的美国临时申请 60/431,267 的优先权,此处引入其全部内容作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 树突细胞 (DCs) 被认为是肿瘤主动免疫疗法的首选载体。动物试验表明,基于 DC 的免疫疗法具有保护小鼠免于生成肿瘤和消除已形成肿瘤的潜力。这种成功至少部分地重现于小规模的人体临床试验中。从小规模的安全性或理论验证试验,向阐明活性或有效性的大规模试验的过渡,由于 DC 制备的艰巨和繁重而停滞不前(见下文)。因此,尽管这种产品具有很大的治疗潜在性,很少有公司对开发基于 DC 的肿瘤疫苗感兴趣。

[0005] 肿瘤内 (IT) 注射 DCs 是一种特殊形式的基于 DC 的免疫疗法。注射后,DCs 从凋亡或垂死的肿瘤细胞中摄取抗原,并迁移到淋巴结将抗原提呈给 T 细胞。实际上在动物模型中发现这种治疗的有效性与肿瘤的凋亡程度相关 (Candido 等人, Cancer Res. 61 : 228-236, 2001), 其表明这种方法与注射 DCs 前采用化学疗法或放射疗法治疗肿瘤完全相容。此外,已有好几个小组证明,这种联合治疗对已经形成的肿瘤特别有效 (Nikitina 等人, Int. J. Cancer 94 :825-833, 2001 ;Tanaka 等 人, Int. J. Cancer 101 :265-269, 2002 ; Tong 等人, CancerRes. 61 :7530-7535, 2001)。

[0006] 由于肿瘤细胞是抗原的来源,在肿瘤内注射前需要选择和制备肿瘤抗原,就像目前它们在大多数体外基于 DC 治疗的方法中应用的那样。肿瘤抗原的选择常常受公司对专有地位的要求所驱动,而迄今为止已鉴别的少数肿瘤抗原是否能提供显著的临床疗效还有待证明。此外,使用这种肿瘤抗原通常产生单价疫苗,如果肿瘤细胞下调免疫抗原的表达水平,单价疫苗可能会失去其效力。当然,在符合优良制造规范 (GMP) 要求的条件下制造肿瘤抗原的要求在传统的基于 DC 免疫方法上增加了额外的费用。

[0007] DCs 的肿瘤内注射使树突细胞处于免疫抑制的肿瘤环境中。已知肿瘤产生细胞因子,其灭活 DCs 或能够使 T 细胞反应偏向效应较小的 Th2- 型反应。几个研究小组使用遗传修饰的 DCs,以期克服这些抑制性影响,具体是通过产生细胞因子白介素 12 (IL-12 ; Nishioka 等人, CancerRes. 59 :4035-4041, 1999 ;Melero 等, Gene Therapy 6 :1779-1784, 1999) 或表达 CD40 配基 (Kikuchi 等人, Blood 96 :91-99, 2000)。这些小组描述的结果令人鼓舞,进一步表明了肿瘤内注射 DCs 作为一种治疗方法的可行性。

[0008] Triozzi 等人 (Cancer 89 :2647-2654, 2000) 描述了转移性黑色素瘤或乳腺癌患者的 DCs IT 注射。他们在 4 名黑色素瘤患者和 2 名乳癌患者中获得了肿瘤消退的结果。消退病灶活组织检查显示浸润的 T 细胞,表明 DC 实际已经激活了针对肿瘤细胞的免疫反应。所有这些数据表明人体肿瘤内注射 DCs 是可行的,可以提供显著的临床疗效。然而,已观察到 MHC II 类抗原和 B7-2 共刺激分子对注射的 DCs 有明显的下调。这些关键性分子的下调将会降低 DCs 的免疫刺激潜力,但如本发明所提供的,这可以通过给药前 DCs 的部分成熟而避免。

[0009] DCs 以未成熟形式存在于外周组织中,准备摄取和加工抗原。正是这些未成熟细

胞,在 GM-CSF 和 IL-4 存在时,被单核细胞所产生的 DCs 最接近地模拟。多种刺激可启动 DCs 的成熟,成熟过程中细胞失去其有效摄取抗原的能力,而获得其 T 细胞刺激功能。这一过程是复杂的,至少在体外要持续 48 小时才能完成。成熟的另一个结果是细胞迁移性质方面发生变化。例如,成熟诱导若干趋化因子受体,包括 CCR7,CCR7 引导细胞至流向淋巴结的 T 细胞区域,在该区域内成熟的 DCs 激活 T 细胞,抵抗 I 类和 II 类 MHC 分子提呈至 DC 表面的抗原。

[0010] 诱导耐受性与 DCs 交叉提呈的(自身)抗原有关(Kurts 等人, J. Exp. Med. 186 : 239-245, 1997),现在主要的假说假定未成熟 DC 不断把抗原提呈给免疫系统,以维持耐受性(Kurts 等人, J. Exp. Med. 184 :923-930, 1996),认为需要体内成熟 DCs 以产生有效的免疫刺激。现已明确 DC 成熟可能产生免疫刺激或免疫抑制性 DCs(Chakraborty 等人, Clin. Immunol. 94 :88-98, 1999)。现今尚未阐明导致两种结果中任何一种的成熟刺激物的确切性质,但普遍接受免疫刺激 DCs 产生 IL-12 并表达 CD40 配基(Albert 等人, Nature Immunol. 2 :988-989, 2001 ;Lanzavecchia, Haematologica 84 Suppl. EHA 4 :23-25, 1999)。因此,部分成熟的 DC 应可用于 IT 注射,特别是当已知使未成熟树突状细胞成熟的刺激物可导致 CD40 配基表达和 IL-12 的产生时。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供一种方法,用于产生抗肿瘤免疫应答,包括给予含有已经体外部分成熟的树突细胞的细胞群体,以使个体在给药后,部分成熟的树突细胞保留摄取肿瘤抗原的能力并能诱导免疫应答。尽管肿瘤内整体的免疫抑制环境,本方法允许在肿瘤和肿瘤基床(bed)内对肿瘤抗原的有效摄取和加工。由于对树突细胞免疫刺激性的负面影响,这种免疫抑制环境会妨碍树突细胞的功能。而且,不能给予肿瘤成熟的树突细胞,因为该细胞不能有效地加工抗原。

[0013] 部分成熟的树突细胞可直接给药至已存在的肿瘤内。而且,可给药至肿瘤基床、肿瘤内部和周围的组织区域,可在治疗即外科手术除去或切除肿瘤之前或之后进行,在化疗、放疗或其组合治疗之前、同时或之后进行,等等。部分成熟的树突细胞还可以给药至直接流向肿瘤或肿瘤周围区域的淋巴结或淋巴区域。此外,部分成熟的树突细胞可给药至直接为肿瘤或肿瘤基床或肿瘤侵袭器官或具有肿瘤的器官输送血液或淋巴液的循环血管或淋巴区域内。更进一步,部分成熟的树突细胞通常可给药至循环或淋巴系统,以便细胞能被运送到肿瘤区域。

[0014] 本发明可用的树突细胞或其前体,可从例如皮肤、脾脏、骨髓、胸腺、淋巴结、脐带血或外周血等中获得。此外,树突细胞可从待治疗个体或与待治疗个体 HLA 相匹配的健康个体获得。在与成熟剂接触并配制成用于个体给药的组合物之前,树突细胞或其前体可以冷冻保存。

[0015] 用于本发明方法的树突细胞是在体外部分成熟的。用于诱导树突细胞成熟的适当试剂包括,例如但不限于,卡介苗(BCG)、干扰素 γ (IFN γ)、脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子 α (TNF α) ;咪唑并喹啉化合物,例如咪唑并喹啉-4-胺化合物,如 4-氨基-2-乙氧基甲基- α , α -二甲基-1H-咪唑并[4,5-c]-1-乙醇(命名为 R848)或 1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺,及其衍生物(W000/47719,此处全部引用作为参考),合成的双链多核糖核苷酸,例如聚[I]:聚[C(12)U],等等;Toll-样受体(TLR)激动剂,例如 TLR-3,

TLR-4, TLR-7 和 / 或 TLR-9 ; 含有已知诱导 DC 成熟的非甲基化 CpG 基序的核酸序列等, 或其组合。

[0016] 用于本发明的 BCG 可包括完整 BCG, BCG 细胞壁成分, BCG- 来源的 lipoarabidomannans, 或 BCG 任何其它组分。在某些实施方案中, BCG 为热灭活 BCG 或福尔马林处理 BCG。虽然作为选择 BCG 可单独使用, 但一般 BCG 和 IFN γ 联合使用来诱导树突细胞的部分成熟。BCG 的有效量一般每毫升组织培养基约为 10^5 - 10^7 cfu, IFN γ 的有效量一般每毫升组织培养基约为 100-1000 单位。在另一个实施方案中树突细胞活化剂为咪唑并喹啉 R898。TLR-4 激动剂 R898 的有效剂量通常使用大约 1-50 μ g/ml, 更常用每毫升组织培养基为 5-10 μ g。可单独使用咪唑并喹啉, 也可将其与例如有效量的 BCG 和 / 或 IFN γ 联合使用。

[0017] 本发明还包括组合物, 该复合物包含, 在树突细胞成熟剂存在条件下体外部分成熟的树突细胞, 与之结合的生理可接受的载体、缓冲液和 / 或赋形剂, 用于患肿瘤个体给药。本发明中组合物所用的部分成熟树突细胞通常上调共刺激分子例如, 但不限于 CD80、CD86 或 CD54 的表达。所述细胞可表达或不表达细胞表面标志 CD83, 但仍能摄取和加工抗原。所述组合物通常包括约 10^2 - 10^{10} , 也可包括更多部分成熟的树突细胞。给药个体前, 树突细胞部分成熟后可冷冻保存一段时间。可从肿瘤患者体内分离细胞, 用于制备本发明组合物包含的部分成熟树突状细胞, 或从与患者 HLA 相匹配的个体分离细胞, 用于制备部分成熟的树突细胞。

[0018] 发明详述

[0019] 树突细胞是在多种淋巴和非 - 淋巴组织中发现的多种抗原提呈细胞。(见 Liu, Cell, 106 :259-62 (2001) ; Steinman, Ann. Rev. Immunol. 9 :271-96 (1991))。树突细胞包括脾淋巴树突细胞、表皮朗格罕氏细胞以及血液循环中的遮蔽 (veiled) 细胞。总的来说, 根据其形态、表面 II 类 MHC 的高水平表达和缺少某些其它 T 细胞、B 细胞、单核细胞和自然杀伤细胞表达的表面标志来划分树突细胞群。具体而言, 单核细胞 - 来源的树突细胞 (也称为单核细胞树突细胞) 通常表达 CD11c、CD80、CD86, 为 HLA-DR⁺, 但为 CD14⁻。

[0020] 相反, 单核细胞树突细胞的前体 (一般为单核细胞) 通常为 CD14⁺。单核细胞树突细胞的前体可从任何存在它们的组织, 具体而言淋巴组织, 例如脾、骨髓、淋巴结和胸腺中获得。单核细胞树突细胞的前体也可从循环系统中分离。外周血也是单核细胞树突细胞前体的易得来源。脐带血是单核细胞树突细胞前体的另一个来源。可从多种有机体中分离单核细胞树突细胞的前体, 其中有机体内的免疫应答是可引发的。这类有机体包括动物, 例如包括人类和非人类动物, 例如灵长类动物、哺乳动物 (包括犬、猫、小鼠和大鼠)、鸟类 (包括鸡) 以及其转基因物种。

[0021] 在某些实施方案中, 可从健康受试者或需要免疫刺激的受试者体内, 分离单核细胞树突细胞的前体和 / 或未成熟的树突细胞, 例如如肿瘤患者或可能受益于或需要细胞免疫刺激的其它受试者 (即细菌或病毒感染等等的受试者)。树突细胞前体和 / 或未成熟的树突细胞也可从 HLA- 匹配的健康个体获得, 用于部分活化和给药至需要免疫刺激的 HLA- 匹配受试者。

[0022] 树突细胞前体和未成熟的树突细胞

[0023] 本领域已知从多种来源包括血液和骨髓中分离富含树突细胞前体和未成熟树突

细胞的细胞群体的方法。例如,可通过收集肝素抗凝血液、单采血液成分术或白细胞除去法、制备血沉棕黄层、形成玫瑰花结、离心、密度梯度离心(例如使用 Ficol1[®](例如 FICOLL-PAQUE[®])、PERCOLL[®](胶体硅粒子(直径 15-30nm)包被非解析聚乙烯吡咯烷酮(PVP))、蔗糖等)、细胞差速裂解、过滤等,分离树突细胞前体和未成熟树突细胞。在某些实施方案中,可通过例如收集受试者血液,去纤维蛋白原以除去血小板并裂解红细胞,制备白细胞群。可通过例如 PERCOLL[®] 梯度离心、抗体淘选(panning)等方法,任选性地对于单核细胞树突细胞前体而富集树突细胞前体和未成熟树突细胞。

[0024] 任选性地可在密闭的无菌体系内制备树突细胞前体和未成熟树突细胞。此处所用术语“密闭的无菌体系”或“密闭系统”是指减少或消除其暴露于非无菌环境或循环空气或其它非无菌情况。用于分离树突细胞前体和未成熟树突细胞的密闭系统,通常不包括在顶部开口试管中的密度梯度离心、室外细胞转移、在组织培养平板或未密封摇瓶中细胞的培养等等。在一个代表性实施方案中,密闭系统容许在不暴露于非无菌空气的情况下,将树突细胞前体和未成熟树突细胞从起始收集器中无菌转移到可密封的组织培养皿内。

[0025] 另一个报导用于分离树突细胞前体的方法是,采用商品化的处理塑料基质(例如小珠或磁性小珠),选择性去除附着的单核细胞及其它“非树突细胞前体”(见例如美国专利号 5,994,126 和 5,851,756)。弃去附着的单核细胞和非树突细胞前体,保留非粘附细胞,用于体外培养和成熟。在另一方法中,单采血液成分术的细胞培养于塑料培养袋中,向其中加入塑料即聚苯乙烯或苯乙烯微载体珠以提高袋子的表面面积。细胞充分培养一段时间,至某些细胞粘附于珠上,而将非粘附细胞从袋中洗去。(Maffei 等人,Transfusion 40:1419-1420(2000);WO 02/44338,在此引入作为参考)。

[0026] 在某些其它实施方案中,单核细胞树突细胞前体通过与单核细胞结合基质粘附而分离,如 WO 03/010292 所述,在此引入其公开内容作为参考。例如,白细胞群(例如通过白细胞除去法分离的)可与单核细胞树突细胞前体的粘附基质接触。当白细胞群与基质接触时,白细胞群体中的单核细胞树突细胞前体优先粘附于基质上。其它白细胞(包括其它潜在性树突细胞前体)结合基质亲和力降低,从而容许单核细胞的树突细胞前体优先富集在基质表面上。

[0027] 适当的基质包括,例如表面面积与体积之比较大的那些基质。基质可以是例如微粒或纤维状基质。适当的微粒基质包括,例如玻璃微粒、塑料微粒、玻璃包被的塑料微粒、玻璃包被的聚苯乙烯微粒及其他适于吸附蛋白质的珠粒。适于本发明使用的纤维状基质包括微毛细管和微绒毛膜等等。微粒或纤维状基质通常在基本不降低粘附细胞存活力的情况下,容许将粘附的单核细胞树突细胞前体洗脱下来。微粒或纤维状基质可以是基本无孔的,以便从基质上洗脱单核细胞树突细胞前体或树突细胞。“基本无孔的”基质是指至少存在于基质中的大部分气孔比细胞小,以使基质内诱捕的细胞减至最少。

[0028] 通过加入结合介质,可任选地增强单核细胞树突细胞前体与基质的粘附。适当的结合介质包括单核细胞树突细胞前体培养基(例如 AIM-V[®], RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 15[®],等等),单独或以任意组合补充例如细胞因子(例如粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素 4(IL-4),或白细胞介素 13(IL-13));血浆、血清(例如人血清,如自

体的或异源血清) ;纯化的蛋白质,如血清白蛋白 ;二价阳离子 (例如钙和 / 或镁离子) ;以及其它有助于单核细胞树突细胞前体与基质特异性粘附的分子,或阻止非单核细胞树突细胞前体与基质粘附的分子。在某些实施方案中,血浆或血清可经加热灭活。加热灭活的血浆既可以是与白细胞同体的也可以是异体的。

[0029] 单核细胞树突细胞前体粘附到基质上后,非粘附白细胞与单核细胞树突细胞前体 / 基质复合物分开。任何适当的方法均可用于非粘附细胞与复合物的分离。例如,可以沉淀非粘附白细胞和复合物的混合物,去除或排干非粘附白细胞和培养基上清液。作为选择,可以离心混合物,去除或排干包含非粘附白细胞的上清液,使其与沉淀复合物分开。

[0030] 在另一方法中,可从富含白细胞的细胞群中分离单核细胞树突细胞前体,其中白细胞利用切向过滤装置制备 (如 2003 年 6 月 19 日申请,国际专利号 PCT/US03/19428 所述,此处引入作为参考)。用于分离富含单核细胞树突细胞前体的细胞群体的切向过滤装置,可包含具有交互流动 (cross-flow) 室的移除单元、滤液室和位于二者之间的滤器。滤器在一侧截留表面和交互流动室进行流体交流,在另一侧滤过表面和滤液室进行流体交流。交互流动室具有入口,适于将包括白细胞的血液成分样品导入交互流动室,与滤器截留面平行。同时,交互流动室提供出口,居中置于槽内正对着滤器截留表面的部分。适合用于切向过滤装置的滤器平均孔径通常约 1-10 微米。滤器平均孔径可为约 3-7 微米。还可包括以设定样品进入速率提供进入交叉流动室入口的装置,以及控制滤液通过滤器进入滤液室的过滤速度的装置。过滤速度控制装置限制过滤速度低于滤器的非对抗过滤速度。包括血液组分在内的样品,可由源装置例如白细胞除去法装置,或含有从白细胞除去法装置收集的样品的容器提供。

[0031] 单核细胞树突细胞前体和用于前体富集的细胞群,可离体培养以分化、部分成熟和 / 或扩增。此处所用分离的未成熟树突细胞、树突细胞前体以及其它细胞,是指经手工处理与其天然环境分开存在的细胞,而非天然产物。分离的细胞可以纯化、半纯化的形式存在,或处于非天然环境下。简言之,离体分化一般包括在一种或多种分化剂存在的情况下,培养单核细胞树突细胞前体、或具有树突细胞前体的细胞群。适当的分化剂可包括,例如细胞生长因子 (例如细胞因子如 (GM-CSF)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 7 (IL-7)、白细胞介素 13 (IL-13) 和 / 或其组合)。在某些实施方案中,单核细胞树突细胞前体分化形成单核细胞来源的未成熟树突细胞。

[0032] 树突细胞前体可在适当的培养条件下进行培养和分化。适当的组织培养基包括,但不限于, AIM-V[®], RPMI 1640, DMEM, X-VIVO15[®] 等等。可向组织培养基中补充血清、氨基酸、维生素、细胞因子如 GM-CSF 和 / 或 IL-4、IL-7、IL-13、二价阳离子等等,以促进细胞的分化。在某些实施方案中,树突细胞前体可培养于无血清培养基中。培养条件可任选排除任何动物来源的产物。典型的用于树突细胞培养基的细胞因子组合包括 GM-CSF 和 IL-4、IL-7 或 IL-13,每种约 500 单位 /ml。树突细胞前体分化形成未成熟的树突细胞时,表型类似于皮肤郎格罕氏细胞。未成熟的树突细胞一般为 CD14⁻ 和 CD11c⁺,低水平表达 CD86 和 CD83,并能通过特异的细胞内吞作用俘获可溶性抗原。

[0033] 树突细胞成熟剂可包括,例如但不限于, BCG、IFN γ 、LPS、TNF α 、咪唑并喹啉化合物,例如咪唑并喹啉 -4- 胺化合物如 4- 氨基 -2- 乙氧基甲基 - α , α - 二甲基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -1- 乙醇 (称为 R848) 或 1-(2- 甲基丙基) -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -4- 胺,

以及它们的衍生物 (W000/47719, 此处引入作为参考); 合成的双链多核糖核苷酸, 例如聚 [I]; 聚 [C(12)U] 等; Toll-样受体 (TLR) 激动剂, 如 TLR-3、TLR-4、TLR-7 和 / 或 TLR-9; 包含已知诱导 DC 成熟的未甲基化 CpG 基序的核酸序列等, 或其任意组合。BCG 有效剂量一般为每毫升组织培养基大约 10^5 - 10^7 cfu。IFN γ 有效剂量一般为每毫升组织培养基约 100-1000U。卡介苗 (BCG) 为 *M. bovis* 的无毒株。用于此处的 BCG 指完整 BCG 以及细胞壁组分、BCG 来源的 lipoarabidomannans 以及其它 BCG 组分。BCG 任选是灭活的, 例如加热灭活 BCG、福尔马林处理 BCG 等。咪唑并喹啉化合物例如咪唑并喹啉-4-胺化合物, 如 4-氨基-2-乙氧基甲基- α , α -二甲基-1H-咪唑并 [4,5-c] 喹啉-1-乙醇 (称为 R848) 的使用有效剂量为每毫升培养基约 1-50 μ g, 更典型地, 每毫升培养基使用大约 5-10 μ g。咪唑并喹啉化合物可单独使用, 或与例如 BCG 和 / 或 IFN γ 或其它 TLR 激动剂组合使用。

[0034] 一般未成熟 DCs 与有效剂量的树突细胞成熟剂, 例如 BCG 和 IFN γ 作用大约 1-10 小时。完全成熟一般至少需要温育 24 小时, 更典型地温育大约 48-72 小时。未成熟的树突细胞可在适当的培养条件下进行培养和部分成熟。适当的组织培养基包括: AIM-V[®]、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO15[®] 等等。可向组织培养基中补充氨基酸、维生素、细胞因子如 GM-CSF 和 / 或 IL-15、二价阳离子等, 以促进细胞的成熟。典型的细胞因子组合为 500 单位 /ml 的 GM-CSF 和 100ng/ml 的 IL-15。

[0035] 可采用本领域针对树突细胞已知的方法来监控未成熟树突细胞的部分成熟。可采用本领域熟知技术, 如流式细胞术、免疫组织化学等, 来检测细胞表面标记物。还可以通过细胞因子的产生 (例如通过 ELISA、其它免疫测定法或利用寡核苷酸阵列方法) 来监控细胞。在树突细胞成熟剂, 例如 GM-CSF 和 IL-4 存在情况下, 根据本发明培养和部分成熟的 DCs 中, 可采用本领域熟知方法测定磷酸化 JAK2 (janus 激活激酶 2) 的水平, 以指示成熟的起始。细胞表面标记物和细胞因子的诱导表达, 以及信号分子磷酸化作用, 例如 jak2, 也被看作树突细胞适于给予个体以诱导免疫应答的指示剂。

[0036] 未成熟的树突细胞仅成熟一段时间, 以使树突细胞部分成熟。完全成熟的 DCs 失去了摄取抗原的能力并上调共刺激性细胞表面分子以及多种细胞因子的表达。具体而言, 成熟 DCs MHC I 类和 II 类抗原的表达水平高于未成熟的树突细胞, 成熟的树突细胞通常鉴定为 CD80⁺、CD83⁺、CD86⁺ 和 CD14⁺。MHC 高表达导致 DC 表面抗原密度增加, 而共刺激分子 CD80 和 CD86 的上调, 通过共刺激分子的对应物 (counterpart), 例如 T 细胞上的 CD28, 使 T 细胞活化信号得以加强。用于本发明的部分成熟的树突细胞, 一般包括曾暴露于树突细胞成熟剂, 表现出共刺激分子——包括但不限于 CD80、CD86 和 / 或 CD54 的表达上调的树突细胞。该细胞可表达或不表达 CD83, 但保持摄取和加工抗原的能力。此外, 部分成熟的树突细胞可产生 TNF- α 、IL-6、IL-10 和 / 或 IL-12, 一般未成熟树突细胞不会产生这些分子。

[0037] 完全成熟的树突细胞不是本发明的优选, 因为它们不能有效加工抗原。此外, 用于现有方法中的未成熟树突细胞也不是所需的, 因为肿瘤内一般自然形成免疫抑制环境, 包括已知会防止未成熟树突细胞抗原加工的较大浓度的细胞因子。在本发明中, 部分成熟的未成熟树突细胞下调细胞表面上的细胞因子受体, 降低它们对存在于肿瘤内部空间的细胞因子的免疫抑制影响的敏感性或反应性, 使细胞可有效加工存在于肿瘤内的肿瘤抗原。一旦部分成熟的树突细胞在肿瘤内成熟, 其通过例如 TNF- α 和 IL-12 的产生、趋化因子受体

CCR7 的表达进行确定,细胞可迁移到淋巴结处,在那里细胞将与 T 细胞接触,上调对肿瘤抗原的免疫应答。

[0038] 根据本发明的另一方面,在成熟之前或部分成熟后给予患者之前,DCs 可以保存,例如低温保存。可以使用的低温保存剂,包括但不限于,二甲亚砜 (DMSO)、甘油、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、白蛋白、葡聚糖、蔗糖、乙二醇 (ethylene glycol)、i- 赤藓醇、D- 核糖醇、D- 甘露醇、D- 山梨糖醇、i- 肌醇、D- 乳糖、氯化胆碱、氨基酸、甲醇、乙酰胺、单乙酸甘油酯和无机盐。控制慢速冷却是非常关键的。不同的防冻剂和不同的细胞类型一般采用不同的最佳冷却速率。一般应使水结成冰的融结 (fusion) 阶段的热减至最少。冷却过程可利用,例如可程序控制的冷冻装置或甲醇浴方法来完成。程序化冷冻装置容许确定最佳冷却速率,便于标准化并可以重复的冷却。程序化控制速率冷冻器,例如 Cryomed 或 Planar,可以将冷冻方式调整至所需的冷却速率曲线。

[0039] 在彻底冷冻后,单核细胞前体细胞、未成熟的 DCs 或部分成熟的 DCs,可迅速转入长期的低温保存容器内。在一个典型的实施方案中,样品可低温保存于液氮 (-196°C) 或其蒸气 (-165°C) 内。对于造血干细胞,具体而言自骨髓或外周血的造血干细胞,所述原则、操作、冷冻保存和长期保存,非常适合于本发明的细胞。其论述可参见,例如下面的参考文献,在此引入作为参考:Taylor 等人, *Cryobiology* 27:269-78 (1990); Gorin, *Clinics in Haematology* 15:19-48 (1986); Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, Jul. 22-26, 1968, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 107-186。

[0040] 优选地,冷冻细胞迅速解冻 (例如保持于 $37-41^{\circ}\text{C}$ 的水浴中),解冻后立即冷却。可能需要处理细胞以免解冻后细胞凝集。可使用多种方法阻止凝集,包括但不限于,冷冻之前和 / 或之后加入 DNase (Spitzer 等 *Cancer* 45:3075-85 (1980))、低分子量葡聚糖和柠檬酸盐、羟乙基淀粉 (Stiff 等, *Cryobiology* 20:17-24 (1983)), 等等。如果防冻剂对人体有毒性,应在治疗应用之前将其从解冻的部分成熟 DCs 中除去。一种除去防冻剂的方法是将其稀释至极微浓度。冷冻的部分成熟 DCs 一经解冻和恢复,即可按照本文关于非冷冻的部分成熟 DCs 的描述进行给药。

[0041] 体内给予部分成熟的树突细胞

[0042] 本发明提供了给予肿瘤患者部分成熟树突细胞或富含这种细胞的细胞群体的方法。在某些实施方案中,通过获得树突细胞前体或未成熟的树突细胞,在树突细胞成熟剂,例如 BCG 和 $\text{IFN } \gamma$, 或任一其它如上文列举的成熟剂存在的情况下,分化和部分成熟这些细胞,来实现上述方法。部分成熟的树突细胞可使用本领域技术人员熟知的方法和组合物与生理学可接受的载体、赋形剂、缓冲液或稀释剂一起配制。部分成熟的树突细胞可直接给与需要免疫刺激的患者。一般大约 10^2-10^{10} 的细胞悬浮于药物可接受的载体中。细胞直接注射入肿瘤,或注射入肿瘤或肿瘤基床近旁、邻近或与肿瘤或肿瘤基床相接触的循环或淋巴区域,以保证细胞可以接近肿瘤抗原。

[0043] 例如但不限于,细胞可直接给药至肿瘤内、在外科手术除去或切除肿瘤后的肿瘤基床、肿瘤周围、与肿瘤直接接触的引流 (draining) 淋巴结、流向或供给肿瘤或肿瘤侵袭器官的血管或淋巴管内,例如门静脉或肺静脉或动脉等等。可在其它肿瘤治疗,例如化疗或放疗的同时或之后,给予本发明的部分成熟的树突细胞。此外,本发明部分成熟的树突细胞

可与其它试剂共同给药,所述试剂起助剂作用,使树突状细胞成熟,和/或对肿瘤或靠近或邻近肿瘤区域内的抗原进行加工。此外,树突细胞还可以配制或混合到缓释基质内,植入肿瘤或肿瘤基床内部或周围区域,以便细胞缓慢释放到肿瘤或肿瘤基床内部,与肿瘤抗原接触。

[0044] 可采用任何适于给药的剂型和方式给予本发明部分成熟的树突细胞。例如,细胞可与药物可接受的载体结合,可采用注射器、导管、插管等等给药。如上所述,细胞可配制于缓释基质内。当以这种方式给药时,制剂可通过适于使用的基质的方法给药。其它适用于本发明的给药方法和方式为本领域技术人员所熟知。

[0045] 本发明的组合物可本身用于个体治疗。此外,也可将组合物与任何其它方法组合使用来治疗肿瘤。例如,本发明方法可与肿瘤外科手术切除术、化疗(细胞毒性药物,凋亡试剂,抗体等等)、放射疗法、冷冻疗法、近距离疗法、免疫疗法(给予抗原特异性成熟的活化树突细胞、NK细胞,肿瘤抗原特异性抗体等)等等组合使用。这些方法中的任一种或全部也可以任意组合使用。组合治疗可以同时或顺次进行,由治疗医师所确定的任何顺序给药。

[0046] 在另一个实施方案中,树突细胞与受体受试者具有相同的MHC(HLA)单倍型。确定受试者HLA单倍型的方法为本领域已知。在相关实施方案中,部分成熟的树突细胞与受体受试者是异体的。异体细胞一般与至少一个MHC等位基因相匹配(例如共有至少一个但并非所有MHC等位基因)。在一个不太典型的实施方案中,树突细胞和受体受试者彼此完全是异体的,但都至少有一个共同的MHC等位基因。

[0047] 实施例

[0048] 下列实施例仅用于说明本发明的各个方面,而不应以任何方式解释为对本发明的限定。

[0049] 实施例1

[0050] 在本实例中,通过切向流过滤分离的单核细胞树突细胞前体,用补充有2%人血清白蛋白(HSA)和500U/ml GM-CSF的X-VIVO15[®],在培养瓶或细胞袋中以浓度为每毫升 10^6 的单核细胞培养。5天后,来自培养瓶和细胞袋的DCs,或者留下不处理(iDCs),或者在BCG(1:400稀释)和干扰素 γ (IFN γ ,500U/ml)(pmDCs)存在条件下部分成熟4小时。收集细胞,洗涤并与等量放射荧光标记的PKH67-A549肿瘤细胞混合48小时。孵育后,洗涤细胞,用藻红蛋白(PE)标记的CD11c特异性单克隆抗体进行染色,并经流式细胞术分析。提供于表1的数值表示DC内的CD11c⁺细胞,也即标记的PKH67抗原阳性细胞(MFI=平均荧光强度)的百分比。对照包括分析前刚与PKH67-A549细胞混合的DCs。

[0051] 表1.

处理	%CD11c ⁺ PKH67 ⁺ 细胞	MFI
iDCs-培养瓶	87.6	235.2
pmDCs-培养瓶	90.7	610.2
iDCs-袋	72.8	403.5
pmDCs-袋	91.3	557.5

[0052] 这些数据表明,如摄取抗原的细胞百分比或肿瘤细胞吸收物质的数值所测量的,在本实验中,部分成熟的 DCs 与未成熟的树突细胞相比,在抗原摄取方面更好。

[0053] 在另一个实例中,经外科手术除去生长肿瘤后,对患者进行了白细胞除去法。通过切向过滤从白细胞除去法产物中纯化单核细胞。纯化的单核细胞如上所述进行分化和通过暴露于热灭活和福尔马林固定的 BCG (5×10^6 cfu/ml) IFN γ (500U/ml) 部分成熟。配制用于给药的部分成熟的树突细胞,并在超声引导下注射入个体肿瘤基床。体外测定发现,从个体分离的树突细胞,能诱导肿瘤异性的细胞毒 T 细胞应答。此外,还发现肿瘤复发时间被阻滞或在很大程度是被推迟。

[0054] 实施例 2

[0055] 在本实施例中,采用熟知方法将人结肠癌细胞移植给小鼠,使之产生异种移植肿瘤。肿瘤形成后,将动物分组,向每组动物肿瘤内给予安慰剂、未成熟的树突细胞或者部分成熟的树突细胞。随后测定各组肿瘤的大小并进行比较。

[0056] 简言之,通过向右肋腹皮下注射 100,000 个肿瘤细胞,在雌性 Balb/c 小鼠身上生成 CT26 结肠癌肿瘤。治疗开始于第 15 天,此时所有小鼠均已明显带有肿瘤,肿瘤大小为 10mm^2 – 45mm^2 。

[0057] 按照标准方案从雌性 Balb/c 小鼠股骨髓制备树突细胞。简言之,红细胞裂解后的骨髓细胞与鼠 GM-CSF (200U/ml) 和 IL-4 (200U/ml),在补充有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 中孵育 13–14 天,在第 3 和第 7 天后加入含细胞因子的新鲜培养基。为获得部分成熟的树突细胞,将细胞暴露于稀释 400 倍的灭活卡介苗 (BCG) 和每毫升 500 单位的鼠 γ 干扰素 (IFN γ) 中,其中灭活前 BCG 活性为每毫升 0.5 – 1×10^6 菌落形成单位。细胞孵育 8 小时,然后用 14.5% 的甲泛葡胺 (metrizamide) 分层并于 4°C , 1750rpm 离心 15 分钟。收集交界面细胞,洗涤,在 10% 二甲亚砜 (DMSO) 中可存活地冻存于液氮内。在 37°C 下解冻后,细胞洗涤两次,重悬,浓度为每 50 微升 1 百万个细胞。

[0058] 在第 15 和 17 天腹膜内给予环磷酸胺处理荷瘤小鼠 (50mg/kg)。在第 16, 17, 18 和 21 天将树突状细胞注射到肿瘤内 (模拟注射 $50 \mu\text{l}$ 的磷酸盐缓冲盐水、未成熟的 DC 或者成熟 8 小时的 DC)。隔日测定肿瘤的生长,测 60 天。

[0059] 在磷酸盐缓冲盐水肿瘤内处理组中,第 40 天或之前全部 4 只小鼠肿瘤均大于 100mm^2 。相反,肿瘤内用未成熟 DC 处理的小鼠肿瘤生长减缓,第 40 天 4 只小鼠中有 2 只肿瘤小于 100mm^2 。第 40 天用部分成熟 DC 处理的 4 只小鼠中有 3 只肿瘤小于 100mm^2 ,并且这些动物中有 2 只,在第 50 天仍没有明显的肿瘤。

[0060] 实施例 3

[0061] 在本实施例中,采用熟知方法将人结肠癌细胞注射给小鼠,使之产生异种移植肿瘤。在第一次注射肿瘤细胞后,再给予动物一个剂量的肿瘤细胞。15 天后,将动物分组,向每组动物肿瘤内给予安慰剂、未成熟的树突细胞或者部分成熟的树突细胞。随后测定各组肿瘤的大小并进行比较。

[0062] 简言之,通过向右肋腹皮下注射 100,000 个肿瘤细胞,在雌性 Balb/c 小鼠身上生成 CT26 结肠癌肿瘤。随后在第 3 天向左肋注射 100,000 个肿瘤细胞。治疗开始于第 15 天,此时所有小鼠右肋腹均已明显带有肿瘤,肿瘤大小为 10mm^2 – 45mm^2 。

[0063] 按照标准方案从雌性 Balb/c 小鼠股骨髓制备树突细胞。简言之,红细胞裂解后的

骨髓细胞与鼠 GM-CSF (200U/ml) 和 IL-4 (200U/ml), 在补充有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 中孵育 13-14 天, 在第 3 和第 7 天后加入含细胞因子的新鲜培养基。为获得部分成熟的树突细胞, 将细胞暴露于 400 倍稀释的灭活卡介苗 (BCG) 和每毫升 500 单位的鼠 γ 干扰素 (IFN γ) 中, 其中灭活前 BCG 活性为每毫升 $0.5-1 \times 10^6$ 集落形成单位。细胞然后用 14.5% 的甲泛葡胺分层并于 4°C, 每分钟 1750rpm 离心 15 分钟。收集交界面细胞, 洗涤, 并在 10% 二甲亚砜 (DMSO) 中可存活地冻存于液氮内。在 37°C 下解冻后, 细胞洗涤两次, 重悬, 浓度为每 50 微升 1 百万个细胞。

[0064] 在第 15 和 17 天腹膜内给予环磷酰胺处理荷瘤小鼠 (50mg/kg)。在第 16, 17, 18 和 21 天, 将树突细胞注射到右肋腹肿瘤内 (或者模拟注射 50 μ l 的磷酸盐缓冲盐水、未成熟的 DC、成熟 8 小时的 DC 或者成熟 24 小时的 DC)。隔日测定肿瘤的生长, 测 60 天。

[0065] 在磷酸盐缓冲盐水肿瘤内处理组中, 全部 5 只小鼠在第 35 天之前右肋腹肿瘤大于 100mm², 3/5 的动物在第 40 天或之前左肋腹肿瘤大于 100mm²。相反, 用未成熟 DC 治疗肿瘤内 (仅右侧) 的小鼠肿瘤生长减缓: 一只小鼠在第 60 天双侧均无明显肿瘤, 并且 5 只小鼠中的 4 只第 40 天双侧肿瘤均小于 100mm²。用 8 小时部分成熟 DC 处理的 5 只小鼠中有 3 只到第 50 天时肿瘤完全消解。用 24 小时部分成熟 DC 处理的组中肿瘤生长进一步下降。5 只小鼠中的 3 只第 50 天双侧肿瘤完全消解, 一只动物左肋腹肿瘤完全消解, 右肋腹肿瘤部分控制 (第 40 天 < 100mm²), 一只动物两侧肿瘤部分控制 (第 40 天两侧都 < 50mm²)。

[0066] 实施例 4

[0067] 在本实施例中, 如上所述用人肿瘤细胞在小鼠肿瘤身上产生异源肿瘤。通过将细胞暴露于咪唑并喹啉 R898 或 R898 联合 BCG 和 IFN γ 的树突细胞成熟剂, 使分化的未成熟的树突细胞部分成熟。向肿瘤内给予部分成熟的树突细胞、未成熟的树突细胞和安慰剂, 比较各组肿瘤的大小。

[0068] 简言之, 按照实施例 2 在小鼠身上形成肿瘤。按照实施例 2 和 3 制备树突细胞, 不过部分成熟细胞是通过将细胞暴露于 5 μ g/ml 的免疫反应调节剂 (树突细胞成熟剂) R848, 或 5 μ g/ml 的免疫反应调节剂 R848 与实施例 2 和 3 所述浓度的 BCG 和干扰素 γ 中 8 小时而获得。

[0069] 处理方法同实施例 3。磷酸盐缓冲盐水肿瘤内注射的小鼠的肿瘤生长未得到控制。单独用 R848 部分成熟 DC 处理的 5 只小鼠中, 有一只肿瘤生长完全消解, 而联合用 R848 与 BCG 和 IFN γ 部分成熟 DC 肿瘤内处理的 5 只小鼠中, 有 3 只肿瘤生长完全消解。来自实施例 3 和 4 中肿瘤完全消解的 9 只小鼠, 在肿瘤消退后约 30 天用 1 百万个肿瘤细胞在右肋腹攻击。没有动物出现可检测的肿瘤生长, 表现出对 CT26 肿瘤细胞的免疫保护作用。

[0070] 实施例 5

[0071] 本实施例中, 对以上实施例中制备的树突细胞进行表面分子的表达检定。简言之, 实验 2-4 制备的小鼠树突细胞, 通过荧光抗体染色后流式细胞术分析, 来检定细胞表面分子的表达。结果以表面标志表型阳性细胞的百分比和某表面标志的平均荧光强度表示, 如表 2 和 3。

[0072] 表 2

	阳性细胞百分比					
处理	CD11c	MHC-II	CD80	CD86	CD54	CD40
未成熟	66.9	68.1	62.2	28.1	62.6	1.4
R848 (8hrs)	60.7	76.4	73.4	31.3	96.6	1.5
BCG/IFN (8hrs)	59.5	85.5	84.9	66.0	96.0	2.0
BCG/IFN/R848 (8hrs)	58.4	88.8	82.4	61.8	96.6	2.6
BCG/IFN (24hrs)	66.3	91.5	90.0	84.4	95.3	3.3

[0073] 表 3

	平均荧光强度				
处理	MHC-II	CD80	CD86	CD54	CD40
未成熟	395.7	50.0	30.7	53.8	3.0
R848 (8hrs)	515.5	54.7	30.0	90.0	8.0
BCG/IFN (8hrs)	751.1	79.1	74.6	120.3	7.2
BCG/IFN/R848 (8hrs)	757.8	79.3	66.4	132.9	13.9
BCG/IFN (24hrs)	876.8	97.9	99.0	126.9	11.4

[0074] 实施例 7

[0075] 诊断患有实体瘤的患者采用化疗、放射疗法、冷冻疗法或近距疗法治疗后,肿瘤内给予部分成熟的树突细胞。治疗后,肿瘤消退且可防止患者肿瘤复发。

[0076] 上述实施例仅供说明,而非限制本发明要求权项的范围。对本领域技术人员而言本发明的其它变化显而易见,并包含于附加权利要求中。此处引用的所有发表物、专利、专利申请及其它参考文献,其内容也全部引入作为参考。