

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03809115.1

[51] Int. Cl.

*A61K 35/12 (2006.01)*

*A61K 39/00 (2006.01)*

*C12N 15/85 (2006.01)*

[43] 公开日 2006 年 5 月 17 日

[11] 公开号 CN 1774255A

[22] 申请日 2003.2.21 [21] 申请号 03809115.1  
[30] 优先权

[32] 2002.2.22 [33] US [31] 60/358,431

[86] 国际申请 PCT/US2003/005154 2003.2.21

[87] 国际公布 WO2003/072032 英 2003.9.4

[85] 进入国家阶段日期 2004.10.22

[71] 申请人 英特拉舍尔资源有限责任公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 M·V·哈斯佩尔 N·波马托

M·G·小汉纳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 李 波 王景朝

权利要求书 5 页 说明书 34 页 附图 4 页

## [54] 发明名称

无菌免疫原性非 - 致瘤性肿瘤细胞组合物和  
方法

## [57] 摘要

本发明涉及除去细胞聚集物中的生物负荷从而得到用于生产疫苗的、仍是活的及免疫原性的细胞的方法。本发明还涉及一种引发免疫应答从而防止转移瘤复发的方法,包括制备并给予一种来源于实体肿瘤的无菌疫苗。所述疫苗是通过切除癌症患者的实体肿瘤、用酶消化肿瘤细胞从而得到解离细胞、辐射解离细胞使细胞不会致瘤、并将细胞灭菌而制备的。

1. 一种用于引发免疫应答从而防止转移瘤复发的方法，包括：  
切除癌症患者的实体肿瘤组织，  
处理肿瘤组织以减少内源性生物负荷，  
5 用酶消化肿瘤组织从而得到解离的肿瘤细胞，  
将辐射剂量应用于所述解离肿瘤细胞从而使所述肿瘤细胞不会致  
瘤且无菌，

以足以引发免疫应答从而防止转移瘤复发的剂量和方式给予所述  
患者所述无菌非致瘤性细胞。

10 2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述辐射剂量是足以灭活  
微生物并仍然保持所述肿瘤细胞的存活力、代谢活性和免疫原性的  
量。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述剂量含有约  $10^7$  个活  
的肿瘤细胞，并且包含具有至少 80% 存活力的肿瘤细胞群。

15 4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中所述治疗方式在除去肿瘤  
后 4-5 周开始，并且包含以每周一次的间隔给予至少 3 剂。

5. 根据权利要求 4 所述方法，其中所述三剂的前两剂与佐剂或  
免疫刺激剂联合。

6. 根据权利要求 4 所述的方法，其中在第一次注射后 5 个月或  
20 更多个月，给患者注射第 4 剂。

7. 根据权利要求 1 所述的方法，进一步包括在切除之前，用生  
理溶液有力洗涤所述肿瘤。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，进一步包括在切除之前，用至  
少更换一次的含有洗涤剂的生理溶液洗涤所述肿瘤以减少生物负荷以  
25 减少生物负荷。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述洗涤剂选自 Triton  
X-100、NP40 和 Tween 80。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，进一步包括在 0-6℃ 的温度下，  
将所述切除的肿瘤运送到含有抗生素的生理溶液中。

30 11. 根据权利要求 1 所述的方法，进一步包括在解离之前，用可  
提供抗-微生物活性同时使细胞毒性减到最小的浓度的消毒剂 and 持续  
时间处理肿瘤。

12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中所述消毒剂选自氧氯苯磺酸钠、次氯酸钠和稳定的二氧化氯。

13. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述解离酶是胶原酶。

14. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述解离是在有抗生素和抗霉菌剂存在的条件下进行的, 以减少生物负荷。

15. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是在消化后, 通过以约-1℃/分钟的受控速率冷冻至约-80℃而冷冻保存的, 并在冷冻状态下维持, 直到在给予患者之前融化。

16. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中所述肿瘤细胞被辐射同时冷冻。

17. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中所述辐射剂量是约 200,000 拉德。

18. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述佐剂或免疫刺激剂包括炎症-诱导剂。

19. 根据权利要求 18 所述方法, 其中所述炎症-诱导剂是卡介苗或小棒杆菌。

20. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述佐剂或免疫刺激剂是一种免疫原性辅助抗原。

21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述免疫原性辅助抗原是匙孔血蓝蛋白。

22. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述佐剂或免疫刺激剂是淋巴因子-细胞因子。

23. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中所述淋巴因子-细胞因子是粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子或干扰素。

24. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中佐剂、辅助抗原或免疫刺激剂是彼此联合给药的。

25. 一种用于在人类结肠癌患者中提供免疫原性反应的可注射疫苗, 它含有约  $10^7$  个解离的结肠肿瘤细胞及药学上可接受的载体, 其中所述肿瘤细胞是无菌、非致癌、所述患者自体的, 且通过台盼蓝排斥法测量具有至少 80% 存活力, 其中当经由真皮内注射到所述患者中而给药时, 所述组合物产生免疫原性反应。

26. 根据权利要求 25 所述的组合物, 其中所述组合物还含有佐

剂或免疫刺激剂。27. 根据权利要求 26 所述的组合物, 其中所述佐剂或免疫刺激剂选自卡介苗、小棒杆菌、匙孔血蓝蛋白、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、和干扰素。

28. 根据权利要求 26 所述的组合物, 其中所述佐剂或免疫刺激剂是卡介苗。

29. 根据权利要求 26 所述的组合物, 其中佐剂或免疫刺激剂与肿瘤细胞的比例是约 1:1。

30. 一种用于制备活的肿瘤细胞的无菌非-致瘤性组合物的方法, 包括:

10 得到肿瘤组织;

用洗涤剂处理肿瘤组织以减少组织的微生物污染;

用酶消化组织从而得到解离的肿瘤细胞;

将解离的肿瘤细胞冷冻;

15 以足以灭活微生物和致瘤性并保持细胞存活力的量将辐射剂量应用于冷冻细胞, 从而得到无菌非-致瘤性肿瘤细胞; 且

其中通过台盼蓝排斥法测量, 该无菌非-致瘤性肿瘤细胞具有至少 80% 存活力。

31. 根据权利要求 30 所述方法, 其中所述无菌非-致瘤性肿瘤细胞是免疫原性的。

20 32. 根据权利要求 30 所述的方法, 其中得到肿瘤组织进一步包括用含有洗涤剂的生理溶液洗涤该组织。

33. 根据权利要求 32 所述的方法, 其中所述洗涤剂选自 Triton X-100、NP40、和 Tween 80。

25 34. 根据权利要求 30 所述的方法, 其中用消毒剂处理肿瘤进一步包括在用选自氧氯苯磺酸钠、次氯酸钠、和稳定的二氧化氯的消毒剂解离之前处理肿瘤组织。

35. 根据权利要求 30 所述的方法, 其中所述解离酶是胶原酶。

36. 根据权利要求 30 所述的方法, 其中所述解离是在有至少一种抗生素和一种抗-霉菌剂存在的条件下进行的。

30 37. 根据权利要求 30 所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是在解离后, 通过以约-1℃/分钟的受控速率冷冻至约-80℃而冷冻保存的, 并在冷冻状态下维持, 直到在给予患者之前融化。

38. 根据权利要求 30 所述的方法，其中所述辐射量是约 190,000-200,000 拉德。

39. 根据权利要求 36 所述的方法，其中所述抗生素选自庆大霉素、伊米配能、和左氟沙星。

5 40. 根据权利要求 30 所述的方法，其中所述肿瘤组织是结肠肿瘤。

41. 一种通过权利要求 30 的方法制备的含有无菌非-致瘤性肿瘤细胞的组合物。

42. 一种用于制备可注射的免疫原性剂量的无菌非-致瘤性结肠  
10 肿瘤细胞的方法，包括：

用含有洗涤剂的洗涤溶液洗涤结肠肿瘤组织；

切除结肠癌患者的洗涤过的肿瘤组织；

用消毒剂处理切除的肿瘤组织以减少组织的微生物污染；

15 在有至少一种抗生素和抗-霉菌剂存在的条件下，用解离酶消化肿瘤组织，从而得到至少约  $10^7$  个解离的肿瘤细胞；

冷冻解离的肿瘤细胞；

将约 150,000-200,000 拉德剂量的  $\gamma$  射线应用于冷冻的肿瘤细胞，使肿瘤细胞无菌且不会致瘤；

20 将所述肿瘤细胞与用于真皮内注射的药学上可接受的载体结合，制备含有至少约  $10^7$  个解离肿瘤细胞的可注射剂量；且

其中通过台盼蓝排斥法测量，所述剂量含有的无菌非-致瘤性肿瘤细胞具有至少 80% 的存活力，且当注射到患者中时，可引发免疫原性反应。

25 43. 根据权利要求 42 所述的方法，其中所述洗涤剂是 Triton X-100。

44. 根据权利要求 42 所述的方法，其中所述消毒剂是氧氯苯磺酸钠。

30 45. 根据权利要求 42 所述的方法，其中所述组织是在有至少一种选自庆大霉素、伊米配能、左氟沙星和两性霉素 B 的抗生素或抗-霉菌剂存在的条件下消化的。

46. 根据权利要求 42 所述的方法，其中所述消化组织是通过以约  $-1^\circ\text{C}$ /分钟的受控速率冷冻至约  $-80^\circ\text{C}$  而冷冻保存的。

47. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述辐射剂量是约 190,000 - 200,000 拉德。

48. 根据权利要求 42 所述的方法,进一步包括在足以引发免疫应答从而防止转移瘤复发的治疗方式中给予所述患者至少 3 剂。

5 49. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述剂量是在除去患者的结肠肿瘤后约 4-5 周开始以每周一次的间隔给予的。

50. 根据权利要求 49 所述的方法,进一步包括在第一次注射后约 5 个月或更多个月给予第 4 剂。

## 无菌免疫原性非-致瘤性肿瘤细胞组合物和方法

本申请要求 2002 年 2 月 22 日提交的美国临时申请系列  
5 60/358,431 的权益，其全部内容均引入此处作为参考。

### 发明领域

本发明一般涉及生物学细胞灭菌方法及所得的无菌细胞产物；更具体而言，但不作为限制，还涉及癌症疫苗及用于制备无菌免疫原性且活的、但不会致瘤的肿瘤细胞组合物的方法。

### 10 发明背景

很难使用于预防和治疗目的的生物细胞组合物灭菌是因为细胞的化学、物理、或生理性质可能由于细胞周围环境的改变而被明显改变。例如，已知使用环氧乙烷进行的气体灭菌有毒而且致癌。用约 1-3MRads  
15 （兆拉德）辐射虽然足以杀死微生物，但会改变蛋白、DNA、RNA 等的结构，且或者生物学改变细胞预期的免疫原性或其它生物学功能或者使细胞完全灭活。当重要的是所运用的任何化学或物理方法不仅要获得高水平的无菌，而且细胞的代谢和免疫原性基本不会降低时，这些困难加剧。

美国专利 US 5,484,596 (“’596 专利”)，名称为“有效的特异性  
20 免疫疗法”，涉及一种治疗患有可切除实体肿瘤的人结肠癌患者，从而抑制转移瘤复发和形成的方法。所述方法包括手术除去人类癌症患者的结肠肿瘤组织，处理肿瘤组织以得到肿瘤细胞，（用 20,000 拉德）辐射肿瘤细胞至活的但不会致瘤，制备含有活的非-致瘤性肿瘤细胞的疫苗，并在癌症患者的免疫系统已经从手术恢复后，真皮内注射该  
25 疫苗。

依靠大肠内结肠肿瘤的来源，通过’596 专利方法生产的癌症疫苗不是无菌的。虽然按照该专利制备的疫苗产品（OncoVAX®）已经给予过几百名人类患者，但是管理机构现在要求这种疫苗产品必需是无菌的。为了获得免疫原性细胞制剂，肿瘤细胞必须是活的及代谢活性的。  
30 因此，使细胞无菌的任何处理都必须不会过度危害功效所需的细胞的重要生物学性质。我们所需要的是一种使细胞制剂无菌，同时维持存活活力及免疫原性的方法。优选，这种灭菌方法可很容易被结合到现有

的产品制造方法中。

本发明的目的是获得安全、无菌的肿瘤细胞组合物，而不会对肿瘤细胞的免疫原性造成重大改变。这些目的并非必需兼容。例如，灭菌可灭活微生物感染但也会大量灭活哺乳动物细胞；消毒剂可杀死微生物但也会杀死哺乳动物细胞；辐射可使微生物感染灭活但也会大大改变哺乳动物细胞的免疫原性和其它性质。因此，希望提供一种获得无菌非-致瘤性肿瘤细胞组合物的方法，其基本上不会干扰细胞的重要代谢和免疫原性。

#### 发明概述

本发明提供一种用于除去和灭活肿瘤细胞中生物负荷的十分有效的化学和物理方法的联合，从而获得用于生产治疗和预防性产品的、仍是活的和免疫原性的无菌细胞组合物。这种灭菌处理方法被认为可用于各种细胞类型；然而，它被认为特别适用于将实体肿瘤组织灭菌，用于制备癌症疫苗，包括，例如，'596 专利的自体结肠癌疫苗。

本发明还涉及通过给予一种源于实体肿瘤的无菌疫苗而治疗癌症和防止转移瘤复发的方法，所述实体肿瘤包括，但不限制于，结肠癌、肾癌、乳腺癌、肺癌、和肉瘤，包括骨肉瘤。在其中一个实施方案中，本发明提供一种完整的多步方法，它以原位肿瘤开始，并产生无菌的肿瘤细胞疫苗，该疫苗被证实没有微生物生长。

根据本发明另一实施方案，用含有生理盐水和洗涤剂的洗涤溶液有力洗涤原位结肠肿瘤。有力洗涤可通过将无菌端口无菌装在含有洗涤溶液的袋上，并将这种溶液“喷”在肿瘤和周围组织上而获得。适宜的洗涤剂包括，例如，Triton X-100、NP40 和 Tween 80。然后切除该肿瘤，并在可控条件下运送到用于制备疫苗的设备上。

然后解剖切除的肿瘤，用化学消毒剂处理，并在消化前破碎，释放单个肿瘤细胞。对消毒剂的浓度和处理的持续时间进行选择可提高抗微生物的活性，同时使细胞毒性减到最小。适宜的消毒剂包括，但不限制于，Clorpactin®（氧氯苯磺酸钠）（United-Guardian, Inc.）、次氯酸钠、和 Oxygene®（稳定的二氧化氯）（Oxyfresh Worldwide, Inc.）。消毒后，使肿瘤破碎并利用解离酶消化，优选在有抗生素和一种或多种抗-霉菌剂存在的条件下进行。适宜解离酶的例子包括胶原酶和胰蛋白酶。解离过程中所用的抗生素和抗-霉菌剂包括氨基苄



类抗生素(如庆大霉素)、 $\beta$ -内酰胺沙纳霉素类抗生素(如 Primaxin® (伊米配能)(Merck & Co., Inc.))、喹诺酮类抗生素(如 Levaquin® (左氟沙星)(Ortho-McNeil))、和抗-霉菌剂(如两性霉素 B)。

解离后,可以约-1℃/分钟的受控速率冷冻至约-80℃而冷冻保存混悬的肿瘤细胞。然后对肿瘤细胞,优选仍然冷冻的肿瘤细胞进行辐射,辐射的剂量足以灭活微生物和致瘤性,而不会不利地影响细胞的存活力、代谢活性、和免疫原性。辐射剂量是约 100,000-200,000 拉德  $\gamma$  射线;优选约 150,000-200,000 拉德;且更优选约 190,000-200,000 拉德。辐射细胞在冷冻状态下维持,直到在给予患者前融化。

通过真皮内注射,优选以约  $10^7$  个活的肿瘤细胞/剂给予患者癌症疫苗形式的融化无菌细胞,从而引发免疫应答并防止转移瘤复发。通过台盼蓝排斥法测量,所述剂量所含的肿瘤细胞通常具有至少 80% 的存活力。疫苗可以多个剂量给予患者,包括每周一次最少 3 周。剂量可与佐剂或免疫刺激剂在生理盐水中结合,以便进一步加强免疫应答。适宜佐剂和免疫刺激剂的例子包括 BCG(卡介苗(Organon, Inc.))、小棒杆菌(GlaxoSmithKline)、“辅助”抗原,如 KLH(匙孔血蓝蛋白(Intracel Corp.))、和淋巴因子-细胞因子,如 GM-CSF(粒细胞-巨噬细胞集落-刺激因子(Leukine®))(Schering-Plough)) 和干扰素(Avonex®(Biogen, Inc.))。

按照特别优选的实施方案,本发明的灭菌方法包括:(1)每次用 500mL 量的无菌生理盐水有力洗涤原位结肠肿瘤和周围组织 4 次,其中至少一次生理盐水洗涤含有 1% Triton X-100;(2)在 0-6℃ 的温度下运送肿瘤,其中手术切除与解离过程开始之间间隔至少 48 小时;(3)在破碎前,用 0.4% Clorpectin®处理肿瘤碎片 2 分钟;(4)在有庆大霉素、Primaxin®、Levaquin®、和两性霉素 B 存在的条件下解离肿瘤;并(5)用 200,000 拉德辐射解离的细胞,同时冷冻。生物等价研究是使用所得的无菌肿瘤细胞开始的。阳性免疫原性的标准是第三次注射的延迟皮肤过敏(“DCH”)反应 $\geq 5$ mm。迄今为止,已经治疗过 12 名患者。所有患者都具有超过阳性免疫原性反应标准的 DCH 反应(平均 14.6 X 13.4 mm)。根据癌症的诊断分期,患者在第一次注射后 5-9 个月接受第 4 次治疗。接受第 4 次治疗的 6 名患者中的 5 名具有 15.1 x 15.1 mm 的平均 DCH 反应。这些反应是对无菌肿瘤细

胞的长期免疫性以及因此对结肠直肠癌复发的免疫性的发展的指示。

根据连同附图一起提供的下列详细描述可更容易地理解本发明的这些和其它优点及特征。当在下面的实施例中讨论结肠肿瘤和自体结肠癌疫苗制剂时，本发明的教导可应用于将要经历灭菌并仍然保持存活力、代谢活性、非-致瘤性和免疫原性的任何实体肿瘤细胞。

#### 附图简述

图 1 证实在用于研究 OncoVAX®的实验模型中试验的、按照本发明制备的疫苗细胞的免疫原性功效，并与通过原始非-无菌 OncoVAX®方法制备的疫苗细胞的功效进行了比较。正如所见到的那样，改进的灭菌方法对功效没有消极影响。如实施例 6 证实的那样，这些数据被证实并通过对使用按照本发明制备的 OncoVAX®治疗人类患者进行的研究而扩展。

图 2 证实洗涤条件对生物学物质的生物负荷的作用。通过将 HBSS/G 倾注在肿瘤上 (P)，或将单独的生理盐水 (S) 或生理盐水结合 Triton X-100 (T) 喷在肿瘤上而原位洗涤 15 个肿瘤。然后解剖肿瘤组织。使用膜过滤法测定细胞混悬液中的生物负荷，并接种在 TSA-SB 和 SAB 平板上。生物负荷是以集落形成单位 (CFU) /  $10^7$  个肿瘤细胞，约一个剂量的 OncoVAX®表示的。

图 3 证实仅仅使用生理盐水进行的肿瘤洗涤循环次数对生物负荷的作用。在解剖前，使用生理盐水洗涤 5 个肿瘤 5 次。单独收集每次洗涤后的液体，并通过直接在 TSA-SB 平板上接种而测定生物负荷。对于每个肿瘤而言，用每次洗涤得到的原始集落数除以第一次洗涤液中的 CFU，从而使数据标准化。绘制标准化数据的平均值和标准差。

图 4 证实使用生理盐水和 Triton X-100 进行的肿瘤洗涤循环次数对生物负荷的作用。在解剖前，洗涤 5 个肿瘤 5 次。第 1、2、3、4 和 5 次洗涤都含有生理盐水。第 2 次洗涤是 1% Triton X-100 的生理盐水溶液。单独收集每次洗涤后的液体，并通过直接在 TSA-SB 平板上接种而测定生物负荷。对于每个肿瘤而言，用每次洗涤得到的原始集落数除以第一次洗涤液中的集落数，从而使数据标准化。绘制标准化数据的平均值和标准差。

#### 发明详述

用于本发明目的的词语“无菌”或“灭菌”用于表示组织或细胞

已经完全没有可检测到的细菌、酵母和真菌。这一点与所有适合的管理要求相一致。

5 手术室无菌过程可减少切除肿瘤细胞的外部污染的可能性。就结肠肿瘤而言，在手术前对患者进行抗生素治疗和灌肠以及结肠切除术可进一步减少内源性生物负荷和粪便污染。然而，由于解剖学位置和肠微生物的存在，这种措施虽然有效，但仅仅是疫苗研制所需的使肿瘤无菌的第一步。

10 进行肿瘤细胞最初的病理学处理的优选地点是无菌手术室或其它可控环境。这里，在切除结肠肿瘤前，通过除去残留的粪便、粘蛋白状、或其它外来物质而洗涤包含肿瘤的结肠或其它器官以及原位肿瘤可减少生物负荷。优选有力洗涤，并且可通过使用喷射瓶将无菌洗涤溶液喷在肿瘤和周围组织表面洗涤结肠而实现。洗涤溶液可以是，例如，无菌生理盐水和洗涤剂。洗涤剂必须不会过度干扰随后的组织学技术，包括免疫组织化学。适宜的洗涤剂包括 Triton X-100、NP40、  
15 和 Tween 80，虽然也可使用各种其它洗涤剂。

有力洗涤原位肿瘤时，可用无菌端口将静脉内用生理盐水无菌装到 500mL 软袋中，然后将袋转换到喷射瓶中。例如，可垂直或水平持有结肠（将包含肿瘤的结肠区域略微升高），多次将 500mL 洗涤液有力喷在肿瘤上，除去可能在随后的解剖过程中进一步污染肿瘤的粪便。  
20 根据这里的教导，可使用不同量的洗涤溶液和洗涤剂和/或抗生素，包括不同的洗涤条件（倾注洗涤溶液，有力洗涤）、不同的洗涤循环次数、和不同的洗涤溶液和用量。我们已经发现通过有力喷射 4 次、每次 500mL 生理盐水洗涤原位肿瘤和有力喷射 1 次 500mL 1% Triton X-100 的生理盐水溶液可充分除去生物负荷，以进行随后的肿瘤处理。

25 洗涤原位肿瘤后，病理学家可在手术室（或其它可控环境）中除去并解剖肿瘤，随后运送给疫苗制造商或运送到进一步处理的其它设备中。解剖的肿瘤可通过在运送过程中维持适宜温度条件的任何适当方法运送。优选，在肿瘤运送或贮藏前，将抗生素，如庆大霉素加入到运送培养基（例如，含有 50μg 庆大霉素/ml 的 Hank's 平衡盐水溶液（HBSS）（HBSS/G））中。我们已经发现，如果在培养基中加入适宜的抗生素并将解剖的肿瘤维持在约 0-6℃ 的温度下，则可在约 48 小时  
30 或更长的时间内，将解剖的肿瘤从手术医院运送到较远的设备。

解剖肿瘤表面污染的进一步减少是通过在进一步破碎和解离之前，将肿瘤碎片消毒而获得的。然而，化学消毒剂广泛发挥作用，因此不能区分哺乳动物和细菌（或真菌）细胞。所以，与使用抗生素处理不同，以杀微生物的浓度对解离的肿瘤细胞使用化学消毒剂可导致不可接受水平的肿瘤细胞毒性。

切除的肿瘤通常包含若干碎片，这是因为病理学家频繁切割肿瘤以确定侵入的最深边缘。在进行消毒步骤之前，优选在有 HBSS/G 存在的条件下进一步解剖这些碎片，从而除去任何外来的非-肿瘤和坏死组织。结肠肿瘤的腔表面通常包含最大量的生物负荷。化学消毒剂可杀死任何暴露的微生物连同暴露的肿瘤细胞。以这种方式，使用消毒剂可化学“烧灼”解剖肿瘤碎片的外部，表面生物负荷即位于此处。在破碎之前这样处理解剖组织可将肿瘤碎片的表面消毒，同时使最小的表面积与消毒剂接触。肿瘤的更深方面因此而未受影响，并由此保留了活的肿瘤细胞的来源。由于结肠肿瘤的息肉样性质及其多处内陷，这些区域会捕获细菌并免受消毒剂作用。因此，通过用适宜的消毒剂处理，固有的生物负荷可显著降低，但不能完全消除。

可使用各种消毒剂和用量，包括各种浓度的 Carrel-Dakin 溶液（缓冲的 0.5%次氯酸钠）和 Clorpactin®以及接触时间。在其中一个实施方案中，使解剖的肿瘤碎片与 0.4% Clorpactin®接触 2 分钟。消毒可很方便地通过任何适宜的方法进行，包括将解剖的肿瘤碎片放在含有消毒溶液（例如，约 125 mL 0.4% Clorpactin®）的烧瓶中，然后在旋转平台摇动器上以约 200rpm 摇动约 2 分钟。就结肠肿瘤碎片而言，我们已经发现在肿瘤破碎和解离之前，用约 0.4% Clorpactin®进行单一的 2 分钟处理可提供有益的结果。通常，在化学处理之后，化学消毒剂可通过用生理盐水洗涤而除去。

肿瘤消毒过程之后，再次污染的可能性可通过适宜的无菌技术而降低，如线清除和生物安全柜（BSC）的卫生处理。可导致产品与环境接触的所有步骤都应当在 BSC 中进行，在将物质放在 BSC 中之前，所有物质都应当用 70%异丙醇或其它适宜的消毒剂喷洒或擦拭。

然后通过任何适宜的方法使消毒的肿瘤碎片破碎，得到较小的碎片（如，约  $2-4\text{mm}^2$ ）用于解离过程。破碎可通过使更多肿瘤表面与解离酶接触而促进解离过程。碎片可用，例如，HBSS/G 清洗，并在 Kryorack

中，在约 0-+6℃下维持，直到肿瘤已经完全破碎，并获得适宜量，例如，约 3.0 克的肿瘤碎片，随后通过解离酶消化成游离的单个肿瘤细胞。

解离前，可用含有抗生素（例如，庆大霉素）的生理溶液（例如，HBSS）（HBSS/G）洗涤肿瘤碎片。为了进行解离过程，将已经修剪过并切碎成碎片的肿瘤碎片转移到烧瓶或其它适宜溶液中，与酶解离培养基培养一段时间，这段时间足以形成肿瘤细胞的混悬液。持续时间取决于酶的浓度和选择，以及解离循环的次数。所述酶通常是溶于 HBSS 中的胶原酶-DNA 酶溶液（例如，30-40 ml 0.14%（200 个单位/mL）1 型胶原酶（Advance Biofacture）和 0.1%（500 Kunitz 单位/ml）1 型脱氧核糖核酸酶（Sigma D-0876）），但任何适宜的解离酶溶液都可使用。可使用无菌的 HBSS 连同庆大霉素或其它抗生素洗涤通过酶解离得到的细胞混悬液。在其中一个实施方案中，酶解离培养基（30 mL）是 0.14%胶原酶、0.1% DNA 酶溶于含有庆大霉素的 HBSS 溶液（HBSS/G）。就约 2-4mm<sup>2</sup> 的肿瘤碎片而言，我们已经发现在 36-38℃下进行 3 次解离循环，每次 35-45 分钟，可产生约  $7.2 \times 10^7$  个肿瘤细胞或更多。每次解离循环之后，可将细胞离心、清洗、重悬浮在无菌的 HBSS/G 中。

如果需要，还可使用尼龙筛将所得的细胞混悬液过滤，从而除去任何细胞凝块。封闭系统，如儿科输液试剂盒，可用于进一步减少污染的任何可能性。然后将所得的解离细胞装入小瓶，并保留随机的质量控制样品用于试验和释放用于质量控制目的的试验产品。

肿瘤内陷内捕获的微生物通常在破碎和酶解离过程中释放。酶解离还可在有利于肠微生物生长的条件下进行。我们已经发现解离过程中抗生素的存在可减少解离过程中释放的生物负荷，并抑制解离过程中微生物的进一步生长。抗生素通常可在较长时间内发挥作用。因为解离过程的持续时间相对较短，然而，某些抗生素/抗-霉菌鸡尾酒优选在与解离酶培养的过程中使用。在解离过程中与酶培养的优选抗生素和抗-霉菌剂包括有效抗厌氧菌的抗生素（如，Primaxin®）、有效抗革兰氏阳性需氧菌的抗生素（如，喹诺酮类抗生素，例如左氟沙星）、和作用于不受抗生素影响的酵母菌的抗-霉菌剂。优选的抗-霉菌剂是两性霉素 B。在其中一个实施方案中，酶解离培养基含有 25μg Levaquin®、100μg Primaxin®、和 1μg 两性霉素 B/mL 酶解离培养基。

在冷冻保存前，将解离细胞的混悬液离心用于进一步洗涤。离心后，可将颗粒状物重悬浮在生物物质小瓶中的适宜体积的 HBSS/G 连同冷冻培养基（含有 15 % 二甲基亚砷(DMSO)和 1 % 人血清白蛋白(HSA)的 2X 冷冻培养基）中。将细胞放在冷冻小瓶中，并通过以约-1℃/分钟 5 的受控速率冷冻至约-80℃的温度而冷冻保存。冷冻保存循环直到小瓶和冷冻室已经平衡到+4℃的温度才开始。所得的冷冻混悬液可在，例如，液氮中贮存。细胞通常在冷冻保存状态下维持，直到融化用于给予患者。它们应被转移到干冰上，尽快从受控速率的冰箱到液氮贮存系统。然后，冷冻的生物学物质释放用于冷冻小瓶的辐射。

10 选择辐射剂量，从而不仅使肿瘤细胞不会致癌（通常约 200,000 拉德），而且灭活解离细胞混悬液中的任何残留生物负荷。然而兆拉德的辐射剂量与活的、代谢活性的哺乳动物细胞不相容。本发明的优选剂量是约 100,000-200,000、更优选约 150,000-200,000、最优选 190,000-200,000 拉德的 γ 射线。如此提供了冷冻肿瘤细胞小瓶辐射 15 的适宜杀微生物剂量，连同方法中其它减少生物负荷的步骤，使细胞无菌。辐射肿瘤细胞同时冷冻还具有在试验并释放细胞用于患者治疗前允许辐射的优点。这与'596 专利的方法相反，其在给予患者制剂前，将 20,000 拉德应用于液体细胞混悬液。

20 在本发明其中一个实施方案中，除去液氮贮存系统中的解离肿瘤细胞的冷冻小瓶，并放在辐射器的辐射容器内的 2-5cm 干冰床上。然后用干冰完全覆盖小瓶，填满辐射容器。如果需要，辐射循环开始并每隔 2 小时暂停 1 次，以便用干冰再次填满容器。应用 200,000 拉德后，将小瓶放回到液氮中。

25 辐射优选在一个或多个中央制造中心进行。这样可消除每个门诊地点对辐射器的需要，并由疫苗或其它无菌细胞产品的制造商控制过程。进行各种质量控制试验，以确保无菌、安全且有效的疫苗产品。这种在产品释放前对随机选择的质量控制样品进行的试验通常包括无菌、细胞计数、身份、和效能试验。

30 最终的疫苗制剂可由药剂师用有限的设备要求进行，因为在已经进行了完全的质量控制过程之后，可将冷冻的辐射细胞运送给药剂师—照料患者的人，或疫苗的其它最终使用者，从而给予需要治疗的患者所述产品。

疫苗配制的的第一步通常是融化无菌的免疫原性非-致瘤性肿瘤细胞。冷冻的肿瘤细胞可在辐射后,通过任何适宜的方法,包括水浴融化。优选热阻使水中污染物污染肿瘤细胞小瓶的可能性减到最小。在该点,可通过连续的循环离心和在新鲜的 HBSS 中重悬浮而用 HBSS 进一步洗涤融化的细胞。各种技术均可选择,只要其中教导了制备制剂,按照各种给药方式给予患者,如'596 专利公开的那些。在特别优选的实施方案中,将通过上述方法制备的  $10^7$  个活的无菌结肠肿瘤细胞真皮内注射到已经从中得到肿瘤的癌症患者中。这种自体疫苗的 3 次给药是以每周一次的间隔注射的。前 2 次注射还包含大约  $10^7$  个 BCG 生物;第 3 次注射不包含任何 BCG。在'596 专利中没有教导增加第 4 次加强注射,第 4 次加强注射包含自体肿瘤细胞而没有任何 BCG,其在第一次治疗后 5 个月或更多个月给药。

所述无菌细胞混悬液可很容易被运送到冷的包装上给门诊病人,并按照由制造商和照料患者的人提出的特殊的给药和治疗方式给药。

### 实施例 1

#### 解剖前洗涤结肠和原位肿瘤

静脉内用的生理盐水(不同于 HBSS)是在 500mL 软袋中获得的。通过将无菌端口(例如,Combi-端口)无菌装在袋中,可基本上将袋子转换到喷射瓶中。通过挤压袋子,可用力将生理盐水流直接喷在肿瘤和周围的结肠粘膜上。

第一次洗涤时,可垂直持有结肠,并用 500mL 生理盐水从上面开始向下洗涤。在初步实验中,第二次 500mL 洗涤包括生理盐水或 1% Triton X-100(溶于生理盐水中),并直接针对肿瘤及其接近的相邻区域。当垂直持有结肠时,同样进行这种洗涤。然后水平持有结肠,并将含有肿瘤的结肠区域略微升高。然后针对肿瘤进行进一步的洗涤(2-3 次),每次含有 500mL 生理盐水。将每次洗涤后的液体收集在单独的无菌盆中并测定,提供生物负荷除去的间接测量值。当可得到时,使肿瘤解离,并测定(冷冻保存前)细胞混悬液的生物负荷,提供该过程功效的直接证据。

为了评估洗涤方法,进行生物负荷的直接测定,即,测定解离后细胞混悬液中的微生物数量。如图 2 所示,与使用单独的生理盐水或

使用生理盐水结合 Triton X-100 喷射的肿瘤相比，在从通过将 HBSS/G 倾注在结肠和结肠肿瘤的肿瘤解离的细胞混悬液中观察到更高的生物负荷（以集落形成单位 CFU/ $10^7$  个肿瘤细胞表示）。显然，因为有力洗涤过程所用的体积（2000 或 2500mL）要大于倾注生理盐水方法所用的体积（1000mL），因此不能认为降低的多少是由于所用的体积或方法。然而，很明显新的有力洗涤方法被证实更好。

洗涤过程在解剖之前进行。因为洗涤步骤包括在用于除去解剖过程中可进一步污染肿瘤的粪便的过程中，因此它不适合在洗涤前通过解剖将肿瘤细分从而在解离的细胞中进行生物负荷的比较研究。此外，不能以更少或更多次原位洗涤用单独的生理盐水洗涤肿瘤的一半或用 Triton X-100 结合生理盐水洗涤肿瘤的一半。所以，不能在同一患者的材料上进行比较研究。每次洗涤后的液体中的生物负荷测定可提供不同洗涤溶液功效的证据。每次实验中的绝对生物负荷水平广泛变化，这是因为患者与患者之间的粪便菌丛量不同。为了评估每次洗涤的相对有效性，用每次洗涤液生物负荷值除以 #1 洗涤液中的生物负荷从而使数据标准化。当使用单独的生理盐水（5 个肿瘤）时，洗涤液中生物负荷的量存在一致的降低（图 3）。

【为了评估洗涤方法，进行生物负荷的直接测定，即，测定解离后细胞混悬液中的微生物数量。如图 2 所示，与使用单独的生理盐水或使用生理盐水结合 Triton X-100 喷射的肿瘤相比，在从通过将 HBSS/G 倾注在结肠和结肠肿瘤的肿瘤解离的细胞混悬液中观察到更高的生物负荷（以集落形成单位 CFU/ $10^7$  个肿瘤细胞表示）。显然，因为有力洗涤过程所用的体积（2000 或 2500mL）要大于倾注生理盐水方法所用的体积（1000mL），因此不能认为降低的多少是由于所用的体积或方法。然而，很明显新的有力洗涤方法被证实更好。

洗涤过程在解剖之前进行。因为洗涤步骤包括在用于除去解剖过程中可进一步污染肿瘤的粪便的过程中，因此它不适合在洗涤前通过解剖将肿瘤细分从而在解离的细胞中进行生物负荷的比较研究。此外，不能以更少或更多次原位洗涤用单独的生理盐水洗涤肿瘤的一半或用 Triton X-100 结合生理盐水洗涤肿瘤的一半。所以，不能在同一患者的材料上进行比较研究。每次洗涤后的液体中的生物负荷测定可提供不同洗涤溶液功效的证据。每次实验中的绝对生物负荷水平广



泛变化，这是因为患者与患者之间的粪便菌丛量不同。为了评估每次洗涤的相对有效性，用每次洗涤液的生物负荷值除以 #1 洗涤液中的生物负荷从而使数据标准化。当使用单独的生理盐水（5 个肿瘤）时，洗涤液中生物负荷的量存在一致的降低（图 3）。#2 洗涤液中的平均值是 #1 洗涤液中存在的生物负荷的 25%（3.6%-74%）。#3 洗涤液中的平均生物负荷是 #1 洗涤液的 7%（0.6-13%）。与之相比，在用 Triton X-100 处理的 5 个肿瘤的 2 个中，与第一次的洗涤液相比，含有 Triton X-100 的第二次洗涤液中存在更多生物负荷（241% 和 513%）（图 4）。第三次洗涤液中的生物负荷再次降低。这些数据暗示利用 Triton X-100 除去更多生物负荷。我们建议在第二次洗涤步骤中使用 Triton X-100。可通过洗涤除去的绝大多数生物负荷是通过前三次洗涤除去的；只有少量是通过第 4 次或第 5 次洗涤除去的。

以上述研究为基础，我们采用将洗涤溶液有力喷在结肠和肿瘤上，而不是倾注在结肠和肿瘤上的洗涤过程。充分支持向其中一次的洗涤溶液中加入表面活性剂 Triton X-100。因此，优选的解剖前处理包括开始用 500mL 生理盐水洗涤，接着用 500mL Triton X-100 洗涤，并用单独的生理盐水进行两次额外洗涤（500mL）结束。

## 实施例 2

### 酶解离前的结肠肿瘤的化学消毒

就病理学阶段目的而言，病理学家切割肿瘤以确定侵入的最深边缘。因此，切除的肿瘤包含若干肿瘤组织碎片。解剖该组织以除去外来的非肿瘤和坏死组织。将修剪过的肿瘤碎片进一步细分以实现均匀性，并分成 2-4 个组，用于按照实验设计处理。将组织尽可能平衡地分配在样品中，尽可能使实验组中的肿瘤碎片看起来相同。将修剪过的碎片加入到含有 40mL 消毒剂的试管中，然后通过旋转平台摇动器上以 200rpm 摇动 2 分钟而处理。然后用 HBSS 洗涤修剪过的肿瘤碎片 3 次，之后解离。解离肿瘤的量是通过在解离前和解离循环完成后，将肿瘤碎片称重而测定的。解离后，测定肿瘤细胞混悬液中的肿瘤细胞存活力百分比、活的肿瘤细胞数、肿瘤细胞的效能和生物负荷。产率被定义为每克确实解离肿瘤获得的活的肿瘤细胞数。使生物负荷标准化至 CFU/10<sup>7</sup> 个活的肿瘤细胞，约 1 剂的产品。

在初始实验中，相对于对照组，有效减少生物负荷的次氯酸钠浓度还可显著减少肿瘤细胞产率。在试验浓度下，相对于对照组，Clorpectin®可减少样品中的生物负荷，更适度降低肿瘤细胞产率。用消毒剂处理修剪过的肿瘤碎片可减少生物负荷，但不能使肿瘤细胞混悬液无菌。

作为单一步骤，消毒实验的最初目的是使解离的肿瘤细胞无菌。对该方法进行改变，将消毒看作是完整的、多步过程的一部分，而使产品无菌。因此在解离前，再次对肿瘤进行消毒，且使用Clorpectin®获得的初步结果被证实并通过进一步的实验研究被扩展。此外，还评估了通过不同生物学机理发挥作用的其它抗菌剂（对氯间二甲酚）。对氯间二甲酚，或 PCMX，也是手术消毒的活性成分，Techni-CareX (Care-Tech Labs., Inc.)。

该研究的结果在表 1 中提出。用生理盐水洗涤肿瘤样品 500-0051-KNO，第二次用 Triton X-100 洗涤，接着再用生理盐水洗涤 3 次（见实施例 1）。最终的生物负荷低于测定法的检测限度。为了评估消毒剂除去生物负荷的能力，在对照样品中必须检测到 1-2 个对数的生物负荷。为了使肿瘤中可能的生物负荷达到最大并对消毒剂提出更大挑战，对该过程进行了下列改进：在进行病理学解剖前对肿瘤进行最小限度的洗涤（1 个 500mL 量）；解离是在没有庆大霉素存在的条件下进行的。

相对于对照组，用 Clorpectin®处理修剪过的肿瘤碎片导致生物负荷降低至几乎 3 个数量级，细胞产率仅适度损失。肿瘤 500-052-EVA 的对照样品具有相对于对照组而言异常低的细胞产率，和因此相对于实验样品而言异常高的产率百分比（相对于该对照）。制造商建议的 Clorpectin®剂量是 0.2%-0.4%。当在这些研究中使用 0.8% 时，观察到生物负荷没有进一步降低；然而，活的肿瘤细胞产率进一步降低。由于这个原因，选择 0.4% Clorpectin®作为工作浓度进行进一步研究。0.8% Clorpectin®处理样品中偶然更高水平的生物负荷大概是由于将肿瘤碎片分成具有相等水平生物负荷的相等部分的固有困难。尽管很少或没有杀微生物作用，PCMX 的细胞毒性高于 Clorpectin®，导致产率显著降低。

Clorpectin®的临床用途包括用新鲜的消毒剂冲洗受影响的区

域。因此，作为活性成分，氯消散，然后将新鲜的消毒剂应用于该区域。最后的研究比较了两个连续的两分钟处理，每个使用新鲜的 0.4 % Clorpactin®，以及通常进行的单一的两分钟处理。观察到两次处理没有益处。

- 5 以这些研究为基础，在破碎和解离前，用 0.4 % Clorpactin®对肿瘤碎片进行单一的、2 分钟处理作为优选的完整多步过程的一部分被执行，从而使肿瘤细胞无菌。

表 1. 解离前的肿瘤消毒

患者样品	处理	存活力 (%)	产率 (%)	效能 (%)	生物负荷 <sup>7</sup> 个细胞) & (减少 %)				无菌	
					TSA-SB4 需氧	TSA-SB 厌氧	SAB-CM5 需氧	FTG 3		
500-0051-KNO	对照 (HBSS)	94	100	97	<44	<44	<44		F	P
	0.4% Clorpactin®	91	132	94	<49	<49	<49		P	P
	0.33% PCMX	94	201	97	<34	136	<34		F	F
500-0052-EVA6	对照 (PBS)	90	100	98	105,000	117,000	89,000		F	F
	0.4% Clorpactin®	90	346	99	3910	3890	207		F	F
	0.8% Clorpactin®	93	272	96	7100	8870	4452		F	F
500-0053-VBO6	对照 (HBSS)	91	100	N/D	10	1100	10		F	P
	0.4% Clorpactin®	94	90	N/D	<11	343	≤11		F	F
	0.8% Clorpactin®	96	67	N/D	<13	1364	≤13		F	F
500-0054-ETA6	1.5% PCMX	89	35	N/D	<27	1490	≤27		F	P
	对照 (HBSS)	93	100	99	33	68	≤17		F	F
	0.4% Clorpactin®	95	100	98	<23	<23	≤23		F	F
Roc-00-00016	对照 (HBSS)	95	100	97	160	>300	≤2		F	P
	0.4% Clorpactin® 1次处理	96	158	97	2	294	≤2		F	P
	0.4% Clorpactin® 2次处理	90	67	98	≤2	3800	≤2		F	F
Roc-00-0002	对照 (HBSS)	91	100	99	≤2	≤2	≤2		P	F
	0.4% Clorpactin® 1次处理	92	164	100	≤2	≤2	≤2		P	P
	0.4% Clorpactin® 2次处理	90	99	97	≤2	≤2	≤2		F	P

1. 将无菌评价为通过 (P) (没有微生物生长的证据) 和失败 (F) (微生物生长)

2. TSA, 胰蛋白酶大豆培养液

3. FTG, 液体硫基乙酸盐培养液

4. TSA-SB, 含有绵羊血的胰蛋白酶大豆琼脂

5. SAB-CM, 含有氯霉素的 Sabouraud's 葡萄糖琼脂

6. 这些肿瘤被最低程度地原位洗涂, 而且在解离过程中不含庆大霉素, 从而使可能的生物负荷达到最大。

\* 不能计算降低的百分比, 这是因为或者在未处理的对照组中没有检测到生物负荷, 或者因为处理过的样品中的生物负荷水平高于对照组

### 实施例 3

#### 结肠肿瘤解离过程中抗生素存在的作用

结肠肿瘤中的内陷内捕获的肠微生物在酶解离过程中释放。此外，酶解离过程在有利于肠微生物生长的条件下（37℃）发生。由于这些原因，而研究了向解离酶溶液和其它处理溶液中加入抗生素的作用。

抗生素通常可在较长时间内使用。第一组实验被设计用来评估各种抗生素在较短接触时间内的功效。下一组实验则检验当包含在解离酶溶液中时，所述抗生素的有效性。

在 4℃ 或 37℃ 下，将适宜的试验微生物与抗生素培养不同的时间。“未处理的”对照组与 HBSS 一起培养。处理完成后，利用膜过滤法在含有 5% 绵羊血的胰蛋白酶大豆琼脂（TSA-SB）和 Sabouraud's 葡萄糖培养基（SAB）上测定样品的生物负荷。这些实验中所用的检测真菌的 SAB 培养基不含氯霉素，且因此还可支持细菌的生长。

在与（等体积）没有庆大霉素的冷冻保护培养基混合之前，庆大霉素（50μg/mL）存在于所有溶液中，包含用于使细胞混悬的 HBSS。将 3 种其它抗生素-抗霉菌溶液仅仅加入到用于解离肿瘤的胶原酶-DNA 酶溶液中。用于洗涤通过酶解离获得的细胞混悬液的 HBSS 仅含庆大霉素。这些实验中所用的其它抗生素是伊米配能（Primaxin®）（100μg/mL）、左氟沙星（Levaquin®）（25μg/mL）和两性霉素 B（1μg/mL）。这些浓度是在培养细胞上测定的，用试验微生物测试，寻找细胞毒性和抗微生物活性。

将结肠肿瘤碎片在含有庆大霉素的 HBSS 中洗涤，修剪至没有非-肿瘤或坏死物质，并切碎成碎片。将碎片相等分配在 3 个烧瓶中。一份平行测定的碎片在没有全部抗生素存在的条件下解离，从而再次产生用于生产早期研究中所用疫苗的条件。随后，用没有任何庆大霉素的 HBSS 洗涤细胞。第二组碎片在有庆大霉素存在的条件下解离。用于洗涤解离细胞的 HBSS 含有庆大霉素。第三份平行测定的碎片在有庆大霉素和其它试验抗生素存在的条件下解离。每个解离循环完成之后，将细胞重悬浮并用仅含庆大霉素的 HBSS 洗涤。

对于前 4 个处理过的肿瘤而言，将在有庆大霉素或庆大霉素连同

其它抗生素存在的条件下解离的细胞混悬液的一部分与相同的抗生素再培养 1 小时（解离完成后）。评估这种额外培养是否进一步减少了生物负荷。

5 庆大霉素由于其热稳定性和广谱抗菌性而优选在肿瘤运送过程中和洗涤溶液中使用。庆大霉素还可包含在酶解离溶液中。因此根据与庆大霉素互补而选择其它抗生素。

10 厌氧菌是结肠中的主要微生物。经试验，甲硝唑（2.5 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）可抗普通拟杆菌，并发现在这些实验中所用的需氧培养条件下无效。然后又试验出林可霉素（林可霉素盐酸盐）（Sigma-Aldrich Co.）和 Primaxin®可抗这种厌氧菌。当过夜（4 $^{\circ}\text{C}$ ）培养或额外培养时（即，37 $^{\circ}\text{C}$  40 分钟、4 $^{\circ}\text{C}$  60 分钟、接着又是 37 $^{\circ}\text{C}$  60 分钟），Primaxin®都显示出与林可霉素相比更高的有效性。4 $^{\circ}\text{C}$ 下，Primaxin®（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）诱导 1 个对数的减少，而林可霉素（直到 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）没有作用。当在扩展条件下培养时，Primaxin®诱导 2 个对数的减少，而林可霉素诱导 1 个对数的减少。

20 还评估了喹诺酮类抗生素的两个成员诺氟沙星（Noroxin®（Merck & Co., Inc.））和左氟沙星（Levaquin®（Ortho-McNeil））。在初步实验中，经试验，诺氟沙星可抗粪肠球菌和绿脓假单胞菌。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 1 小时，诺氟沙星（12.5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）对绿脓假单胞菌十分有效，但对粪肠球菌无效。当对粪肠球菌进行试验时，左氟沙星显示出微小但可再现的抑制。

25 选择两性霉素 B 作用于酵母菌和霉菌。用两性霉素 B（0.5-1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）处理后 1 天，观察到白色念珠菌菌落明显减少。然而，这种作用是制霉菌而不是杀霉菌；当在培养 8 天后观察时，在较高浓度下仅有轻微抑制。

30 因此，除了庆大霉素外，根据它们不同的敏感微生物菌谱，选择了 3 种抗生素/抗-霉菌剂，并开始对实验室菌株进行试验。伊米配能（Primaxin®（Merck））是一种 $\beta$ 内酰胺类沙纳霉素抗生素。它与庆大霉素互补，特别用于厌氧菌。左氟沙星（Levaquin®（Ortho-McNeil））是喹诺酮类抗生素的成员。它与庆大霉素和伊米配能互补，用于革兰氏阳性需氧菌。最后，还包含抗霉菌的两性霉素 B，其作用于酵母菌而不受抗生素的影响。

利用上述方式解离 7 个肿瘤。如表 2 所示，当在有庆大霉素存在的条件下解离肿瘤时，在所有情况下，微生物的生物负荷均降低，正如通过至少一个试验培养基所检测到的那样。

在有庆大霉素存在的条件下解离的肿瘤中的 4 个具有残留的生物负荷。在有全部抗生素存在的条件下，从这 4 个肿瘤产生的细胞混悬液中的 3 份（ROC-99-0035、ROC-99-0038、ROC-99-0039）具有生物负荷的进一步降低，尽管这种降低比较小。第 4 份肿瘤细胞混悬液（ROC-99-0036 [SAB]）中的生物负荷没有改变。无法说清的是，在第 5 个肿瘤（ROC-99-0041 [TSA]）中，在有全部抗生素存在的条件下产生的细胞混悬液中的生物负荷比在仅有庆大霉素存在的条件下产生的细胞混悬液中的生物负荷更高。

如表 3 所示，与庆大霉素额外培养导致两份肿瘤制剂中的生物负荷进一步微小降低。虽然在 SAB 上检测到 CFU 降低了 80%（ROC-99-0035），但当接种在 TSA 平板上时，该肿瘤细胞混悬液中的 CFU 增加了 3 倍。TSA 平板上 CFU 的大大增加还可用肿瘤细胞混悬液 ROC-99-0036 观察到。因此，与单独的庆大霉素进一步培养似乎更有害而不是更有益。除在 SAN 上试验的 ROC-99-0036 之外，与全部抗生素进一步培养对生物负荷没有作用。使用这种单一样品观察到了生物负荷明显降低。

向解离酶和解离后的处理溶液中加入庆大霉素可导致存在于结肠肿瘤中的内源性生物负荷的一致降低。在有其它抗生素存在的条件下解离的肿瘤的一些，而不是全部，存在生物负荷的进一步降低。

表 2. 酶解离过程中抗生素的作用

肿瘤ID	培养基	生物负荷 (CFU/10 <sup>7</sup> 个细胞)和生物负荷减少的%		
		没有抗生素	只有庆大霉素	所有抗生素
ROC-99-0035	TSA	1.0 × 10 <sup>3</sup>	≤ 9 (≥99%)	≤ 9 (≥99%)
	SAB	6.0 × 10 <sup>2</sup>	90 (85%)	36 (94%)
ROC-99-0036	TSA	5.0 × 10 <sup>3</sup>	≤10 (≥99)	≤10 (≥99)
	SAB	1.7 × 10 <sup>3</sup>	2.4 × 10 <sup>2</sup> (86%)	2.0 × 10 <sup>2</sup> (88%)
ROC-99-0037	TSA	30	≤ 6 (≥80%)	≤ 6 (≥80%)
	SAB	45	≤ 6 (≥87%)	≤ 6 (≥87%)
ROC-99-0038	TSA	5.4 × 10 <sup>2</sup>	1.4 × 10 <sup>2</sup> (74%)	23 (8%)
	SAB	61	1.1 × 10 <sup>2</sup> (0%)	56 (92%)
ROC-99-0039	TSA	≥3.5 × 10 <sup>4</sup>	1.2 × 10 <sup>4</sup> (≥66%)	3.0 × 10 <sup>3</sup> (≥91%)
	SAB	≥3.5 × 10 <sup>4</sup>	1.8 × 10 <sup>4</sup> (≥49%)	4.1 × 10 <sup>3</sup> (≥88%)
ROC-99-0040	TSA	1.0 × 10 <sup>2</sup>	≤12 (≥88%)	≤12 (≥88%)
	SAB	≤9	≤24	≤12
ROC-99-0041	TSA	1.6 × 10 <sup>3</sup>	≤20 (≥98%)	5.1 × 10 <sup>2</sup> (68%)
	SAB	1.1 × 10 <sup>3</sup>	≤20 (≥98%)	≤18 (≥98%)



表 3. 酶解离后用抗生素额外培养的作用

肿瘤ID	培养基	生物负荷 (CFU/10 <sup>7</sup> 个细胞) 和生物负荷减少的%					
		生物负荷		用庆大霉素解离		用所有抗生素解离	
		没有培养	额外培养	没有培养	额外培养	没有培养	额外培养
Roc-99-0035	TSA	≤9	34 (>)			≤9	≤9
	SAB	90	17 (81)			36	36
Roc-99-0036	TSA	≤10	139 (>>)			≤10	≤10
	SAB	2.4 x 10 <sup>2</sup>	1.8 x 10 <sup>2</sup> (25)			2.0 x 10 <sup>2</sup>	20 (90)
Roc-99-0037	TSA	≤6	≤6			≤6	≤6
	SAB	≤6	≤6			12	≤6
Roc-99-0038	TSA	1.4 x 10 <sup>2</sup>	82 (41)			23	23
	SAB	1.1 x 10 <sup>2</sup>	82 (25)			56	79 (>)

## 实施例 4

### 解离肿瘤细胞的辐射

为了评估增加辐射剂量的可行性，在（干冰上）冷冻的同时，对  
5 冷冻保存的解离肿瘤细胞小瓶进行辐射至 20,000 拉德（约 1 小时）  
或 200,000 拉德（约 10 小时）的剂量。将细胞放回到液氮中贮存直到测定。然后使小瓶迅速融化，并根据先前测试的生物负荷、无菌、  
生物负荷或两者来测定细胞的存活力；效能。在以不同辐射剂量辐射  
的细胞之间观察到其存活力或效能没有差异（没有给出数据）。

10 从表 4 可以看出，很意外的是，在以 200,000 拉德辐射后，生物  
负荷显著降低。所测试的 5 个肿瘤中有 3 个通过更高剂量的辐射而无  
菌。另外两个肿瘤显示出生物负荷显著降低。无法说清的是，接受  
200,000 拉德辐射的其中一个样品（患者 ROC-00-0013）（40CFU）较  
之接受 20,000 拉德的样品（8CFU）具有更高的生物负荷；与之相比，  
15 较之 20,000 拉德（168CFU），在 200,000 拉德下，厌氧菌的菌落数显  
著降低（ $\leq 2$ CFU）。

虽然体外研究已经证实了在与两个辐射剂量接触并通过多步过程  
处理的细胞之间，其重要的生物学特性不存在可区别的差异，从而证  
实了这点，但我们还是评估了对豚鼠肝癌模型中辐射细胞免疫原性的  
20 作用，该豚鼠肝癌模型可作为临床研究的基础（实施例 5）。生物等价  
I-II 期研究的临时结果在实施例 6 中提供。

表 4. 辐射对生物负荷及无菌的作用

样品	辐射剂量	生物负荷 (CFU/mL)			无菌	
		TSA (需氧)	TSA (厌氧)	SAB	疏基乙酸盐	胰蛋白酶大豆培养液
Roc-00-0006	20,000	4	90	≤2	F	P
	200,000	≤2	≤2	≤2	P	P
Roc-00-0007	20,000	ND	ND	ND	F	P
	200,000	ND	ND	ND	P	P
Roc-00-0009	20,000	ND	ND	ND	F	F
	200,000	ND	ND	ND	P	P
Roc-00-0010	20,000	13,600	14,000	644	ND	ND
	200,000	500	888	148	ND	ND
Roc-00-0013	20,000	8	168	ND	ND	ND
	200,000	40	≤2	ND	P	F

### 实施例 5

#### 通过本发明的无菌 ONCOVAX®方法制备的 LINE 10 细胞保护豚鼠免受 肿瘤细胞侵袭的功效

5        本研究的目的是确定被设计用于使人结肠肿瘤疫苗无菌的优选方法是否可产生有效的产物。该实验提供研究的方法和结果，该研究被设计用于评估本发明的灭菌方法对解离、辐射细胞保护豚鼠免受致死剂量的移植 L-10 细胞侵袭的能力。与肿瘤细胞制备的历史方法相比，改进的方法包括用 1 % Triton X-100 洗涤肿瘤，用 0.4 %  
10 Clorpactin®将它们消毒，在有抗生素/抗霉菌药物（庆大霉素、Primaxin®、Levaquin®和两性霉素 B）存在的条件下进行酶解离，并用 200,000 拉德辐射。这些方法的改变对疫苗功效的影响是在相同的豚鼠活性-特异性免疫疗法模型中评估的，该模型可用于导致 OncoVAXO 产品发展的所有临床前研究。

15        生产两种类型的试验材料进行此项研究：腹水细胞和实体肿瘤。腹水细胞用于产生进行比较免疫研究的实体肿瘤。腹水细胞还可用于侵袭免疫动物。实体肿瘤是通过肌内注射 Line 10 (L-10) 腹水细胞而产生的。将所得实体肿瘤切除、并通过原始或改进的无菌制造方法处理和解离。然后通过受控速率冷冻将细胞冷冻保存。用 20,000 或  
20 200,000 拉德辐射细胞。通过真皮内途径，使用下列之一将 10 只 2 种豚鼠（5 只雄性和 5 只雌性）免疫 2 次（每周一次）：

1. 通过原始方法产生、用 20,000 拉德辐射并与 BCG 混合的细胞，或
2. 通过改进的无菌方法产生、用 200,000 拉德辐射并与 BCG 混合的细胞，或
- 25 3. 单独的 BCG。

      免疫完成后 3 周，用  $10^7$  个未-辐射的 L-10 腹水细胞真皮内侵袭动物。选择这种高度致癌剂量是为了更完全侵袭动物的抗-肿瘤反应，并由此证实两种疫苗制备方法之间的任何差异。测量每个侵袭注射部位的结节直径，随后确定肿瘤的进展。侵袭后第 22 天，用 BCG 处理  
30 过的动物具有 20mm 测量直径的结节。对这些动物连同它们的肿瘤已经被确定为进展或退化的所有动物实施无痛致死术。有 4 只动物的肿瘤进展/退化的意义不明确。直到第 28 天才观察这些动物。

用单独的 BCG 免疫的所有动物都进展成进展性不减弱的肿瘤。使用先前按照原始和改进方法生产并辐射的细胞免疫的 10 只动物中的 1 只的肿瘤进展。因此，改进的无菌生产方法不会影响疫苗细胞保护免受肿瘤侵袭的能力，并因此不会不利地影响 L-10 豚鼠肝癌细胞的免疫原性。以这些结果为基础，我们总结出被设计用于使人结肠肿瘤无菌的新灭菌方法将产生与通过原始 OncoVAX®方法所制造疫苗同样有效的疫苗。

使用两种 L-10 肿瘤细胞制剂进行本研究：腹水细胞和实体肿瘤。腹水细胞用于生产进行接种的实体肿瘤，并用肿瘤负荷侵袭免疫的动物。实体肿瘤是通过肌肉注射 L-10 腹水细胞而产生的。通过原始或改进的制造方法处理并解离实体肿瘤。用 20,000 或 200,000 拉德辐射细胞。

使 L-10 腹水细胞融化并洗涤。3 只豚鼠（4 周大）是通过腹膜内途径用  $5 \times 10^6$  个细胞接种的。此外，4 只豚鼠（4-9 周大）是用 L-10 细胞（ $5 \times 10^6$  个细胞/部位，4 个部位/只动物）皮下注射。动物是通过皮下途径注射产生实体肿瘤进行处理的，据信肿瘤将局部生长，很少具有可能伴有肌肉肿瘤的不适。此外，推测很少有动物需要产生这些研究所需的肿瘤量。出乎意料的是，用肿瘤细胞皮下注射的动物发展成胸膜积液和/或腹膜腹水，而不是局部肿瘤。随后对这些动物实施无痛致死术，没有获得任何肿瘤物质。10 天后，对已经通过腹膜内途径接种的动物实施无痛致死术，收集腹水液，并通过受控速率冷冻将细胞冷冻保存。贮存这些新鲜冷冻保存的腹水细胞，进一步用于生产实体肿瘤进行疫苗处理和研究的肿瘤侵袭阶段。

因为通过皮下途径注射不能满足于生产实体肿瘤进行疫苗处理，因此使用肌肉途径。使 L-10 细胞融化并洗涤。给 13 只豚鼠的每个大腿肌肉注射  $5 \times 10^6$  个 L-10 细胞。17 天后，对动物实施无痛致死术。切除 9 只动物的 18 个肿瘤（总重 109.2 克），并通过原始过程解离，切除 4 只动物的 8 个肿瘤（63.5 克），并通过新的无菌方法解离。

原始过程如下：

4 次，每次用 10mL 无菌生理盐水原位洗涤每个肿瘤。生理盐水是用 25mL 吸量管有力喷射的。然后切除肿瘤，称重并运送到肿瘤-处理实验室的含庆大霉素（50 $\mu$ g/mL）的 HBSS（HBSS/G）中。然后，通过

用于生产 III 期研究所用疫苗的原始方法处理肿瘤。用 HBSS/G 洗涤肿瘤 3 次，并修剪至没有非-肿瘤和坏死物质。将肿瘤碎片破碎并用 HBSS/G 再次冲洗 3 次。将肿瘤碎片称重，并在没有全部抗生素存在的条件下，经过 3 次酶解离循环。解离步骤后所用的处理溶液都不含任何庆大霉素。所得细胞的存活率为 96%，以  $1.2 \times 10^7$  个细胞/小瓶获得 90 个小瓶。然后将解离的肿瘤细胞冷冻保存。

优选的新方法如下：

每次用 25-mL 吸量管有力分散 10mL 液体而将每个肿瘤原位洗涤 4 次。第一、第三和第四次洗涤均由无菌生理盐水组成。第二次洗涤由在生理盐水中制备的无菌 1% Triton X-100 组成。然后切除肿瘤，称重并运送到肿瘤-处理实验室的 HBSS/G 中。然后通过改进的无菌方法处理肿瘤。用 HBSS/G 冲洗肿瘤 3 次，修剪肿瘤使其没有非-肿瘤和坏死物质。室温下，用 0.4% Clorpackin®（在生理盐水中制备的）处理（在轨道摇动器上，200 RPM）修剪过的肿瘤碎片 2 分钟，然后用 HBSS/G 冲洗 3 次。然后使肿瘤碎片破碎，用 HBSS/G 冲洗 3 次，称重，并经过 3 个酶解离循环。酶解离溶液含有庆大霉素、Primaxin®、Levaquin®和两性霉素 B。所得细胞的存活率为 94%，且以  $1.2 \times 10^7$  个细胞/小瓶获得 50 个小瓶。将细胞冷冻保存。

然后对细胞的冷冻小瓶进行辐射。通过原始解离方法获得的细胞是用 20,000 拉德辐射的。通过改进解离方法获得的细胞是用 200,000 拉德辐射的。辐射后，将红色鉴别线插入到用 200,000 拉德辐射的小瓶的盖子中。将黄色鉴别盖片装在用 20,000 拉德辐射的小瓶上。

因为 Line 10 肝癌细胞与 Sewall-Wright 2 种豚鼠同源，因此所有试验动物都属于这个种。每只豚鼠接受的第一次免疫（0.2mL）是按照上面所述真皮内给药的，并位于右腋区域的后面。每组由 10 只动物组成（5 只雌性和 5 只雄性）。给 C 组动物注射通过原始方法产生、用 20,000 拉德辐射并与 BCG ( $1 \times 10^7$  CFU) 混合的细胞。给 E 组动物注射通过新方法产生、用 200,000 拉德辐射并与 BCG ( $1 \times 10^7$  CFU) 混合的细胞。最后，给 F 组的豚鼠注射单独的 BCG ( $1 \times 10^7$  CFU)。6 天后，用标准的测径规测量每个接种部位的硬结大小。

豚鼠接受第二次免疫，第二次免疫与第一次免疫相同，区别在于它是按照上面所述在左腋区域后面给予的。6 天后，用校准测径规测

量第二次接种部位的硬结大小（两个直径）（表 5）。

所有动物都是用活的、未-辐射的、从腹水肿瘤获得的 L-10 细胞侵袭的。侵袭注射是在第二次免疫后 21 天进行的，包括真皮内给予  $1 \times 10^7$  个未-辐射的细胞（0.2mL）。40 个小时后，使用校准测径规测量（2 个直径）侵袭注射部位的硬结大小（表 6）。

每天观察豚鼠的死亡率和濒死率。注射未-辐射的肿瘤细胞后，用校准测径规每周 2 次测量注射部位（两个直径）。Bonferroni 检验（变量的单向分析[ANOVA]）用于评估治疗组任何差异的统计学显著性。

如表 5 所示，在每次用与 BCG 混合的各种细胞制剂或单独的 BCG 免疫后 6 天测量的硬结大小方面，没有观察到显著差异。与之相比，较之用单独的 BCG 免疫的动物，已经用混合了 BCG 的肿瘤细胞接种的动物对未-辐射肿瘤细胞的侵袭注射具有明显更大的反应（48 小时后测量的硬结）（表 6）。通过用肿瘤细胞侵袭的动物的命运证明了对肿瘤细胞的细胞免疫性的发展（表 6，图 1）。已经用单独的 BCG 注射的全部 10 只动物（F 组）在 3 周的观察期内都进展成进展性不减弱的肿瘤；没有一只动物能够抵御肿瘤细胞的侵袭。当在侵袭注射后 22 天测量时，F 组动物肿瘤的平均直径（18.8mm [ $\pm 1.05$ mm]）明显大于疫苗治疗组的结节大小。当在第 11 和 18 天测量时，这组动物的平均肿瘤大小还明显大于其它三组。用与通过原始方法解离的 L-10 细胞混合的 BCG 接种并（20,000 拉德）辐射（C 组）或用与通过新方法解离的 L-10 细胞混合的 BCG 接种并（200,000 拉德）辐射（E 组）的豚鼠中均有一只具有进展性肿瘤。这两组每组中的其它 9 只动物能够抵御  $10^7$  个未-辐射肿瘤细胞的侵袭。在第 22 天，C 组和 E 组侵袭部位的结节平均直径分别为 1.3mm ( $\pm 4.1$ mm) 和 3.6mm ( $\pm 6.1$ mm)。肿瘤大小的这种差异并不显著；此外，在其它时间点没有观察到 C 组和 E 组之间的显著性差异。在第 22 天，该研究已经满足终止方案标准的其中一条（当肿瘤直径达到 2cm）。在该时间点，除了 2 只以外的所有动物的肿瘤命运可能都是不明确的，对绝大多数动物实施无痛致死术。正在争论的 2 只豚鼠（E 组 # 684、# 689）的肿瘤或者静止，或者正在非常缓慢地退化。观察这些动物到第 28 天（研究终止的第二条方案标准）。在第 25 天，已经在非常缓慢退化的肿瘤（# 689 动物）完全消失；另

外一只动物（#684）的肿瘤继续被抑制且没有进展。当在第28天检查时，肿瘤（#684动物）也已被完全抵御。

5 用高剂量活的、未-辐射的 L-10 细胞侵袭本研究的动物，从而可能检测疫苗细胞免疫原性的细小差异。虽然剂量反应曲线没有包括在本研究中，历史性地，当把  $10^6$  个 L-10 细胞真皮内注射到 2 种天然豚鼠中时，100% 动物在 60-90 天中死亡，这是因为已经转移到重要器官。在本研究中，侵袭剂量为 10 倍。与所用方法无关，与单独的 BCG 相比，所有 L-10 疫苗对随后的肿瘤细胞侵袭都产生统计学上显著的保护。在用通过原始（C 组）或改进（E 组）过程生产的疫苗处理的  
10 动物中都没有观察到肿瘤进展的差异。

总之，对原始制造方法的若干步骤进行改进可降低结肠肿瘤内源性肠微生物的浓度，并因此使自体疫苗无菌。体外研究（如存活力、身份和功效）具有它们的价值，且还没有证实在通过两种制造方法获得的细胞之间存在任何差异，它是疫苗细胞的免疫原性，即功效的决定性标准。正如通过免受高剂量 L-10 肿瘤细胞侵袭所测定的那样，  
15 分离并通过原始或改进灭菌方法处理的 L-10 细胞的免疫原性没有差异。由于 L-10 肝癌 2 种豚鼠模型是 OncoVAX®临床应用的临床前基础，因此我们总结出通过新方法处理的人结肠肿瘤将同样有效。



表 5. 注射后 6 天测量的接种部位的硬结大小 ( 2 个直径的平均值 [mm] )

组	动物 #	接种部位 # 1	接种部位 # 2	组 #	动物 #	接种部位 # 1	接种部位 # 2
F组 单独的BCG	657	12	11.5	E组 改进的 方法 200,000拉德	682	13	15.5
	658	12	12.25		683	14.5	14.5
	659	12	13		684	14.75	14
	660	13.5	14.25		685	13.75	14
	661	13.75	11.5		686	15.25	15.5
	662	11.25	13.5		687	12.75	15.5
	663	10.75	14		688	13.5	16.25
	664	10.5	12.25		689	14.5	15.75
	665	9.75	12.25		690	15.25	14.25
	666	9.25	12.5		691	11.5	13.15
C组 原始 方法 20,000 拉德	626	12	13				
	627	11	14				
	628	8.75	11.25				
	629	10	14				
	630	12	16.25				
	631	14.25	13.5				
	632	13.5	14.5				
	633	12.5	13.5				
	634	12.5	14.25				
	635	12	14.75				

表 6. 通过未-辐射细胞的侵袭注射引发的 L-10 肿瘤的进展

组	动物 #	结节大小 (2个直径的平均值 [mm])											肿瘤进展
		侵袭后的天数											
		2	7	11	15	18	22	25	28				
F组 单独的 BCG	657	12.5	12.75	14.75	14.25	16.75	17.5 (P)						
	658	10.75	16	14.75	15.5	18.5	19.75 (P)						
	659	10	14.5	15.25	16.25	16.25	18 (P)						
	660	12.5	13.25	15.25	16	18	18 (P)						
	661	11.25	12	13.5	14.5	16.75	19.25 (P)						
	662	12.25	13.25	14.5	16	17.5	18.25 (P)						
	663	12	13.5	13.5	14	16.5	17.75 (P)						
	664	13.25	14.25	15.75	16.75	19	20.5 (P)						
	665	10.5	13.25	14.25	15	18	20 (P)						
	666	13	12.5	14	14.5	17.5	18.5 (P)						
C组 原始 方法 20,000 拉德	626	16.5	12.5	11.5	8.5	0	0						
	627	15.25	12.5	9.75	7.5	0	0						
	628	14.5	13	13.75	10.5	11.5	13 (P)						
	629	14.25	12.75	10.25	7	0	0						
	630	16.25	14.25	12.5	7.5	0	0						
	631	15.25	11.75	11.25	7.5	0	0						
	632	14.25	11.5	10	8.25	7.25	0						
	633	14.75	12.5	12	7.5	0	0						
	634	15	13	10.75	7	0	0						
	635	15.5	13.25	10	7.75	7.5	0						

E组 改进的 方法 200,000 拉德	682	18	12	11.75	8.75	9.75	0				
	683	18	13.25	12.5	8.25	8	0				
	684	15.5	14.75	13.5	11.5	11.5	11.25	11.25	0		
	685	14.25	13.75	11	8.25	8.25	0				
	686	17.25	14	11	8.25	0	0				1/10
	687	16.25	14.75	12	8.75	7.25	0				
	688	19	12.5	10.25	7.75	0	0				
	689	18.25	14.25	13	10.75	9.25	9	0			
	690	13.25	13.75	13	13.25	14	16 (P)				
	691	15	11.5	11	9	9.25	0				

(P) 进展性肿瘤

## 实施例 6

### 无菌方法对疫苗质量和临床功效的影响

#### I/II 期生物等价研究的临时结果

5 开始进行生物-等价研究。迄今为止，已经用通过改进无菌方法制造的 OncoVAX0®治疗了十二（12）名患者。

疫苗功效的决定性因素是活的肿瘤细胞的绝对数量和细胞的情况。在免疫应答发展的重要时期，细胞必须能够在接种部位持续发挥作用。因此，细胞必须是活的及代谢活性的。这些决定性参数可作为接受规定的准则（表 7）。此外，确定细胞为腺癌来源的身份测定是 QC 试验组的一部分。安全性是通过测试内毒素和无菌而保证的。

在引入无菌方法后，这些规定中的一些被制订得更加严格。存活力的规定从 $\geq 70\%$ 增加至 $\geq 80\%$ ，功效的规定从 $\geq 70\%$ 增加至 $\geq 90\%$ ，无菌的规定从“信息”变成没有生长。

15 按照上面实施例所述处理 32 个结肠肿瘤，当通过非常有效的无菌测定法测试无菌时，26 个制剂是无菌的（81%）。以先前的数据为基础，可预期在通过 596 专利的原始过程处理的这些肿瘤中，26 个肿瘤都没有产生无菌的 OncoVAX0®制剂。

第 3 和第 4 次接种包含辐射、活的、无菌的自体肿瘤细胞，给药时没有加入佐剂 BCG。因此，任何延迟皮肤过敏（DCH）反应（硬结）都可表示患者对疫苗细胞的细胞免疫应答。从 III 期研究获得的数据可表明硬结大小和临床结果之间的相互关联。阳性临床结果与在注射后 48 小时的第 3（或第 4）次注射部位观察到的直径 $\geq 5\text{mm}$ 的硬结有关。该标准已经被 United States Food and Drug Administration 接受用于进行无菌 OncoVAX®疫苗的生物等价研究。

25 这些无菌疫苗中的 12 支已经给予了患者，所有患者都接受了至少 3 次治疗。一旦已经给予了第一次注射，所有参加的患者都没有退出研究。患者的年龄为 38-88，中值年龄 65.5。12 名患者中的 5 名被诊断为 III 期结肠癌；剩余的 7 名患者是 II 期。给药剂量的规定范围是  $0.7-1.3 \times 10^7$  个活的肿瘤细胞。给药剂量为  $0.76 \times 10^7-1.3 \times 10^7$  个活的肿瘤细胞，平均剂量为  $0.99 \times 10^7$ （中值= $0.98 \times 10^7$ ）。

接种后 2 天，测量第 3 和第 4 次注射部位（给予解离的肿瘤细胞

时没有给予 BCG) 的硬结 (以及红斑)。正如表 8 所述, 已经接受了 3 次接种的全部 12 名患者都对第 3 次接种 (没有 BCG 的肿瘤细胞) 显示出延迟皮肤过敏 (DCH) 反应, 其超过  $\geq 5\text{mm}$  的标准。92% (11/12) 具有等于或大于  $10\text{mm}$  至少一个次数的反应。平均反应为  $14.6 \times 13.4$  mm。值得注意的是, 当与先前使用 128 OncoVAX® 治疗患者的 III 期试验相比, 产品的无菌性很少达到。在该试验中, 绝大多数疫苗具有胃肠道菌丛污染。在第 3 次接种后 48 小时测量的 DCH 反应  $\geq 10\text{mm}$ , 86.7% 具有  $17.3 \times 18.0\text{mm}$  的平均硬结。因此, 本结果表明无菌疫苗是免疫原性的, 且免疫原性并不主要与微生物污染有关, 而是与肿瘤相关抗原有关。

II 期结肠癌患者平均在第一次接种后 20 周接受第 4 次治疗。III 期结肠癌患者在完成化疗后约 1 个月接受第 4 支疫苗。两名 III 期患者在第一次治疗后 32-36 周接受第 4 次免疫。上述 12 名患者中的 7 名已经达到第 4 次治疗的时间点。7 名患者中的 1 名没有接受第 4 次治疗。已经接受 4 次治疗的 6 名患者中的 5 名显示出显著的 DCH 反应。这些高度反应性患者中的 2 名具有 III 期疾病。他们的反应没有受到化疗干预过程和疫苗给药延迟 12-16 周的影响。这 5 名患者对第 4 次接种的平均反应为  $15.1 \times 15.1$  mm。剩余的患者, 568-003, 对第 4 支疫苗没有可证实的 DCH 反应。该 II 期患者比平均值更年轻 (53), 接受其中一个最高的疫苗剂量 ( $1.24 \times 10^7$  个活的肿瘤细胞), 并对第 3 支疫苗显示出最强的 DCH 反应 ( $14.6\text{mm} \times 16.1\text{mm}$ )。除了给予第 4 支疫苗的临床医师技术较差外, 对于该患者缺少反应性没有似乎合理的原因。

改进的灭菌方法对先前显示对疫苗功效很关键的重要生物学特性没有消极影响, 该改进的灭菌方法包括用洗涤剂处理原位结肠肿瘤, 在用解离酶消化之前用消毒剂对解剖的肿瘤进行消毒, 在解离过程中与抗生素接触, 并用约 200,000 拉德辐射。通过灭菌方法产生的疫苗细胞能够引发免疫应答, 超过了与每位患者中的积极临床结果有关的最低规定。

表 7. 生物学产品的释放试验

试验类型	试验方法	规定
效能	肿瘤细胞活力/代谢活性	≥80%
	活的肿瘤细胞数	≥ $3.5 \times 10^6$ 个活的肿瘤细胞/小瓶
	细胞酯酶活性/效能测定	≥90%的台盼蓝排斥法细胞具有胞内酯酶活性
身份	组织病理学	II 期或 III 期结肠腺癌的病理解证明
	使用 88BV59 肿瘤标记的免疫荧光	对肿瘤细胞为阳性
酶素	动力学产色方法	≤ 150 EU/小瓶
无菌	21 CFR 610.12	对生长为阴性

表 8. 第 3 次和第 4 次接种后 48 小时测量的延迟皮肤过敏反应

患者 ID	年龄	性别	人种来源	TNM 阶段	剂量 ( $\times 10^7$ )	第 3 支疫苗的 DCH (mm X mm)	第 1 和第 4 次处理 之间的间隔 (周)	第 4 支疫苗的 DCH (mm X mm)
539-001	83	F	5	III	1.30	15.0 x 16.0	36.0	16.0 x 18.0
535-001	38	M	5	II	0.98	30.0 x 25.0	20.7	20.0 x 20.5
568-001	66	F	2	III	0.82	11.3 x 13.1	32.1	10.4 x 9.2
568-002	60	F	2	III	0.84	10.1 x 13.1	-	ND
539-002	65	F	5	II	0.85	9.0 x 10.0	19.7	11.0 x 15.0
568-003	53	F	5	II	1.24	14.6 x 16.1	20.0	0.4 x 0.4
539-003	63	F	5	II	1.10	12.0 x 10.0	22.1	18.0 x 13.0
539-004	69	M	5	II	0.98	11.0 x 11.0	-	NA
539-005	68	M	5	II	0.76	8.0 x 08.0	-	NA
539-006	81	F	5	II	1.24	20.0 X 13.0	-	NA
539-007	65	F	5	III	1.30	19.0 X 11.0	-	NA
539-008	88	F	5	III	0.80	15.0 X 14.0	-	NA

人种来源: 2=亚洲人或太平洋岛民, 5=非西班牙来源的白种人

ND. 没有完成 (该患者的第 4 支疫苗在医院被偶然破坏)

NA. 没有得到 (第 4 次处理还没有给出)

这里引证的所有专利和公开出版物都引入此处作为参考。应当很容易理解本发明不限于上面所述和举例说明的具体实施方案。此外，可对本发明进行改进从而引入任何数量的肿瘤细胞类型、细胞解离技术、消毒和洗涤过程、抗生素、和这里没有描述过的其它变化、改变、替换或等价安排，它们与本发明的精神和范围相等同。例如，虽然已经相对于进行本发明的结肠肿瘤细胞疫苗的无菌制造等的某些优选实施方案描述了本发明，但本发明还可用于制造无菌的肾癌、肺癌、和其它实体肿瘤细胞制剂，这些制剂必须是无菌的、活的和非-致瘤性的。因此，上述描述不能限制本发明，本发明的范围只能由权利要求限定。



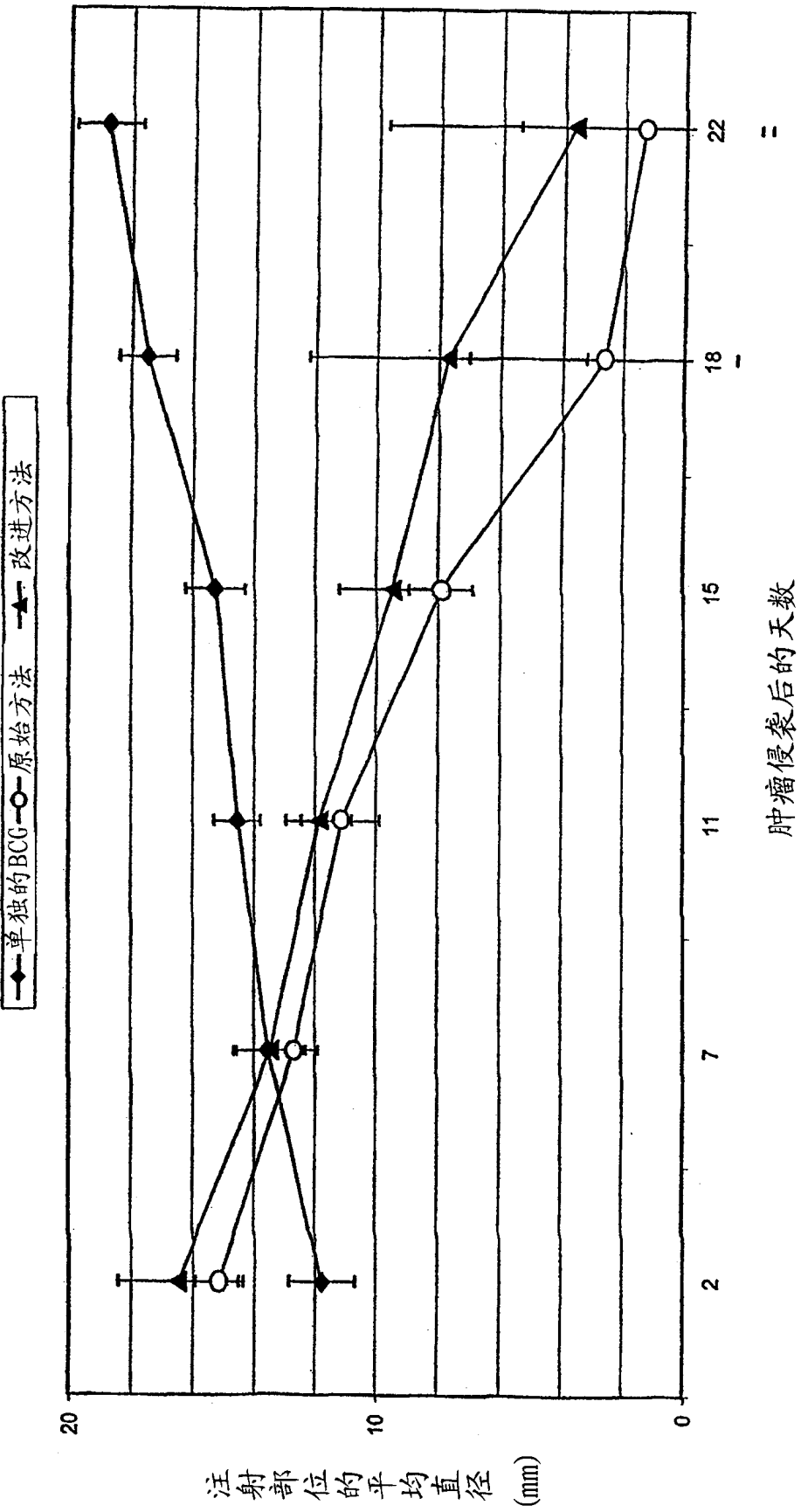


图 1

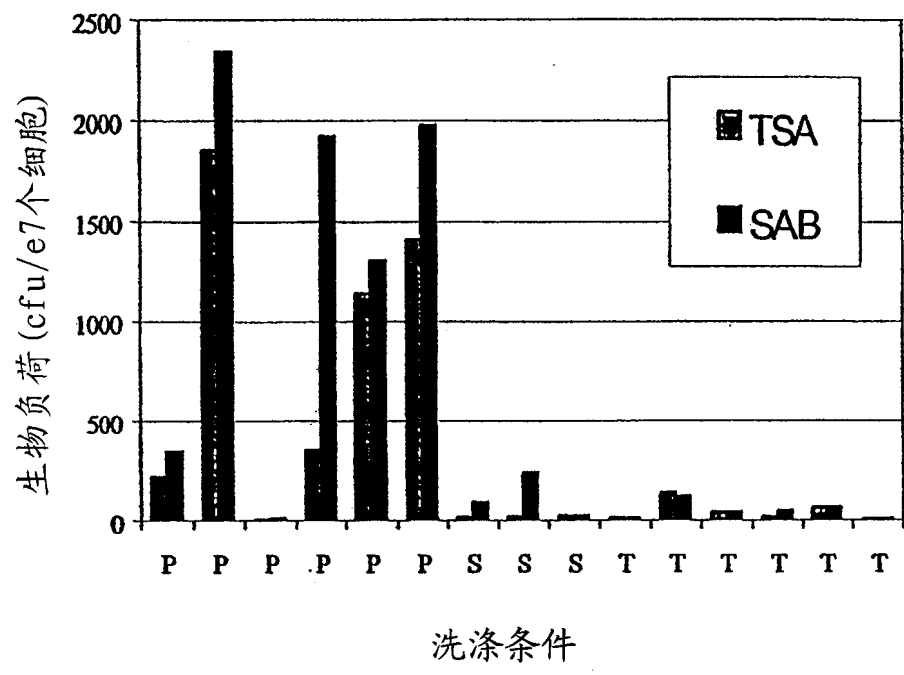


图 2

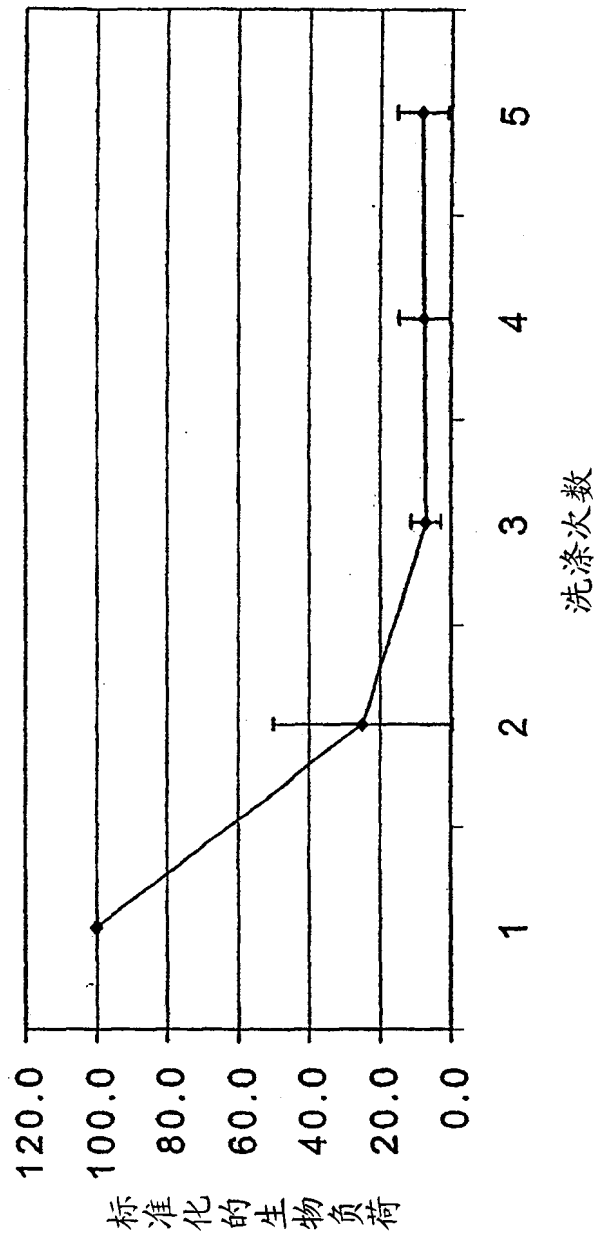


图 3

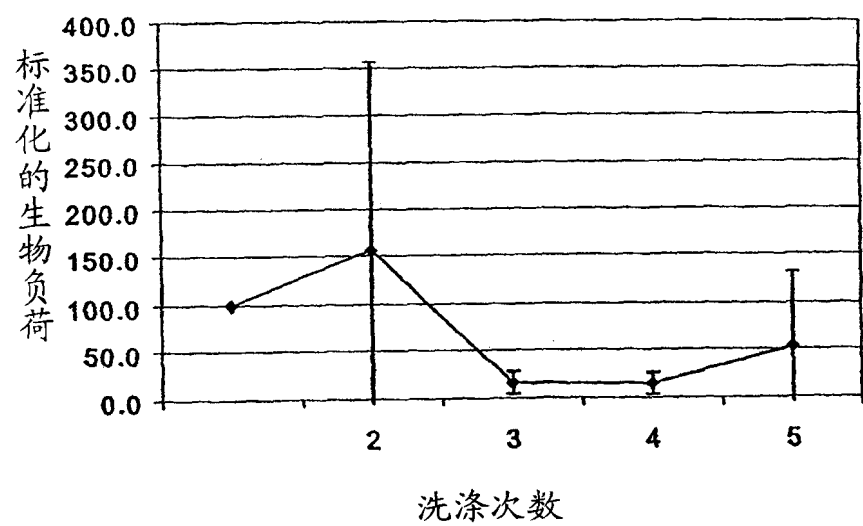


图 4