(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113476478 A
(43)申请公布日 2021.10.08

(21)申请号 202110629293.X

(22)申请日 2014.02.07

(30)优先权数据
61/769,596 2013.02.26 US

(62)分案原申请数据
201480023239.9 2014.02.07

(71)申请人 小利兰·斯坦福大学托管委员会
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 塞缪尔·斯特罗伯
罗伯特·洛夫斯基

(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理有限公司 11363
代理人 郭放 王翠华

(51)Int.Cl.
A61K 35/28(2015.01)
A61K 35/17(2015.01)
C12N 5/0783(2010.01)
C12N 5/0789(2010.01)
A61P 37/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书60页 附图4页

(54)发明名称

实现移植物移植耐受的联合器官和造血细胞

(57)摘要

提供了用于向受者联合移植实体器官和造血细胞的方法和组合物,其中对移植物的耐受通过产生持久的混合嵌合状态而确立。具有持久的混合嵌合状态,通常持续至少六个月的时间段的个体能够在足以确立耐受的一段时间后撤去免疫抑制药物的使用。

CN 113476478 A

1.一种制备工程化造血细胞组合物的方法,所述方法包括:

接收包含$CD34^+$细胞和$CD3^+$的血浆分离置换产品;

从所述血浆分离置换产品中去除血细胞和血小板;

从所述血浆分离置换产品富集一定量的$CD34^+$细胞并收集;

通过将至少一部分收集到的$CD34^+$加回到包含$CD3^+$细胞的血浆分离置换产品中来制备所述工程化造血细胞组合物,其中所述加回到血浆分离置换产品中的所述部分的收集到的$CD34^+$细胞是基于受者的体重,并且将所述收集到的$CD34^+$细胞以产生包含至少$0.5x10^6$个CD34+细胞/kg受者和至少$1x10^6$个$CD3^+$T细胞/kg受者的工程化造血细胞组合物的量加回到所述血浆分离置换产品。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述工程化造血细胞组合物用冷冻保存介质进行冷冻保存。

3.根据权利要求2所述的方法,其中,所述冷冻保存介质是二甲基亚砜(DMSO)。

4.根据权利要求3所述的方法,其中所述DMSO以10%或更少的量存在。

5.根据权利要求1所述的方法,其中,所述血浆分离置换产品是从与受者HLA配型相合的人获得的。

6.根据权利要求1所述的方法,其中,所述血浆分离置换产品是从与受者HLA配型不合的人获得的。

7.根据权利要求1所述的方法,其中,所述工程化造血细胞组合物供受者使用,并且所述受者是已经接受了器官移植的人。

8.根据权利要求7所述的方法,其中,所述受者已经接受了肾移植。

9.根据权利要求1所述的方法,其中,所述工程化造血细胞组合物供受者使用,并且所述受者是已经接受了器官移植并且已用非清髓性调理处理过的人。

10.根据权利要求9所述的方法,其中所述非清髓性调理包括与T细胞耗竭抗体或药物联合的淋巴组织照射。

实现移植物移植耐受的联合器官和造血细胞

[0001] 本申请为申请日2014年2月7日、发明名称为“实现移植物移植耐受的联合器官和造血细胞”的中国专利申请号201480023239.9的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求提交于2013年2月26日的美国临时申请号61/769,596的权益，该申请以引用方式并入本文。

技术领域

[0004] 本申请涉及造血细胞，尤其是涉及实现移植物移植耐受的联合器官和造血细胞。

背景技术

[0005] 外科技术的进步以及防止感染和排斥的改良药物已使得实体器官移植成为许多疾病的有效治疗。移植的器官包括心脏、肠、肝、肺、胰腺和肾。肾移植或肾脏移植是将肾器官移植到患有终末期肾病的患者中。肾移植可分类为死亡供者或活体供者移植，并可根据供者与受者之间的关系程度(亲属或非亲属)以及根据人类白细胞抗原(HLA)配型相合或HLA配型不合的数量而进一步分类。

[0006] 肾移植的适应症是终末期肾病(ESRD)，而不论主要原因如何，其定义为肾小球滤过率低于预定的水平。导致ESRD的常见疾病包括恶性高血压、感染、糖尿病和局灶性节段性肾小球硬化；遗传原因包括多囊性肾病、多种先天性代谢缺陷和诸如狼疮的自身免疫病症。糖尿病是肾移植的常见原因，在美国约占那些原因中的大约25％。大部分肾脏移植受者在移植时在进行透析。

[0007] 在遗传上不同的患者之间进行器官移植的主要障碍在于受者的免疫系统，其可对移植的器官作出反应而视为“非自身的”并加以排斥。因此，必须用药物来抑制免疫系统，然而，抑制个体的免疫系统除了药物的副作用外还使个体处于更高的感染和癌症风险。受者通常接受包括钙调磷酸酶抑制剂(诸如环孢霉素A、他克莫司或西罗莫司)、泼尼松和核酸合成抑制剂(诸如麦考酚酸莫酯)的三种维持性免疫抑制药物的混合物。后面的药物的副作用包括高血压、肾毒性、感染和造成长期患者残疾及移植物失功的心脏病。尽管存在现代免疫抑制药物，但在一些中心，急性排斥仍可在移植后在10-25％的人中发生。

[0008] 一般来讲，只要移植的肾要发挥功能，移植受者就将一直采用免疫抑制抗排斥药物。甚至对于广泛使用的免疫抑制剂的混合物，成本也会很高。

[0009] 临床前研究表明，用全淋巴照射(TLI)和抗胸腺细胞球蛋白(ATG)预处理对于在联合器官和骨髓移植后诱导耐受是有利的，因为预处理方案与全身照射(TBI)相比防止移植物抗宿主病(GVHD)。有关综述，参见Strober等(2011)Seminars in Immunology 23:273-281。

[0010] 因此临床上非常关注开发治疗性方案，其在成年移植患者中实现耐受和免疫抑制药物的完全撤除且不引起GVHD。

发明内容

[0011] 本文提供了用于向受者联合移植实体器官和造血细胞的方法和组合物,其中对移植物的耐受通过产生稳定的混合嵌合状态而确立。优选地,实体器官为肾。具有稳定的混合嵌合状态,通常持续至少六个月的时间段的个体能够在足以确立耐受的一段时间后撤去免疫抑制药物的使用。

[0012] 本文公开的是用于器官移植的方法。本文提供的方法在一些情况下描述在移植HLA配型相合或HLA配型不合的实体器官后,向受者施用来源于供者的造血干细胞。在一些情况下,来源于供者的造血干细胞可在配制成工程化造血细胞组合物前制备成至少70%纯的。

[0013] 在一些情况下,公开了用于移植来自供者的HLA配型不合的实体器官的方法,其包括:将来自供者的HLA配型不合的实体人类器官植入受者人体,用非清髓性预处理(non-myeloablative conditioning)来处理受者,向受者输注包含至少$1x10^6$个$CD34^+$细胞/kg和至少$1.0x10^7$个$CD3^+$细胞/kg的工程化造血细胞组合物,以及将受者维持免疫抑制方案一段足以产生混合嵌合状态的至少六个月的时间。

[0014] 在一些情况下,方法可包括将至少$10x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和至少$1.0x10^6$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。在一些情况下,将至少$10x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和至少$1.0x10^7$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。在一些情况下,将至少$10x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和$1.0-5.0x10^6$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。在一些情况下,将少于$15x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和至少$50x10^6$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。

[0015] 在一些情况下,提供了用于移植实体器官的方法,所述方法包括:将来自供者的实体人类器官植入受者人体,以及向受者输注包含来源于供者的$CD34^+$细胞和$CD3^+$细胞的异基因造血细胞组合物,所述输注持续一段时间,其足以允许撤去所述受者中持续至少六个月的时间段的免疫抑制药物。例如,在来源于供者的$CD34^+$细胞中铁(例如,结合的或内化的)的细胞浓度和/或在来源于供者的$CD3^+$细胞中铁的细胞浓度可在5与100pg之间。

[0016] 在一些情况下,提供了用于移植实体器官的方法,所述方法包括:将来自供者的实体人类器官植入受者人体;以及向受者输注包含纯度为至少70%的来源于供者的$CD34^+$细胞和$CD3^+$细胞的异基因造血细胞组合物,所述输注持续一段时间,其足以允许撤去所述受者中持续至少六个月的时间段的免疫抑制药物。

[0017] 在一些情况下,所述方法可包括从至少一个血浆分离置换(apheresis)产品、两个血浆分离置换产品、三个血浆分离置换产品、四个血浆分离置换产品或五个血浆分离置换产品分离CD34+细胞。在一些情况下,血浆分离置换产品从实体器官供者分离。在一些情况下,CD3+细胞从血浆分离置换产品的CD34-耗竭组分分离。在一些情况下,血浆分离置换产品的CD34-耗竭组分是来自亲和柱的CD34-耗竭流过组分。

[0018] 在一些情况下,所述方法可包括将来自供者的实体器官移植给供者,其中实体器官选自心脏、肠、肝、肺、胰腺和肾。实体器官可以是全器官的一部分,可得自活体供者或死亡供者和/或可与受者为亲属或非亲属。

[0019] 在一些情况下,所述方法可包括通过对供者和受者每一者中的HLA-A、HLA-B和HLA-DR的六个HLA等位基因分型而确定供者和受者是HLA配型相合的还是HLA配型不合的。HLA配型相合的细胞是其中所有六个HLA等位基因在供者与受者之间均相同的那些。HLA配

型不合的细胞是其中六个中的至少一个HLA等位基因在供者与受者之间不同的那些。

[0020] 在一些情况下,所述方法可包括受者经历非清髓性预处理,所述预处理包括在输注细胞组合物之前与T细胞耗竭抗体或药物联合的淋巴组织照射。在一些情况下,所述方法可包括受者经历免疫抑制方案,所述方案可包括但不限于至少六个月的时间段的钙调磷酸酶抑制剂和嘌呤代谢抑制剂。

[0021] 在一些情况下,所述方法还可以包括监控受者的稳定的混合嵌合状态。混合嵌合状态定义为个体具有至少1%且低于95%的循环供者造血和/或免疫细胞。在一些情况下,稳定的混合嵌合状态定义为具有至少1%且低于10%的循环供者造血和/或免疫细胞,低于15%、低于20%、低于25%、低于30%、低于35%、低于40%、低于45%、低于50%、低于55%、低于60%、低于65%、低于70%、低于75%、低于80%、低于85%或低于90%的循环供者造血和/或免疫细胞,其持续一段时间,例如持续至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月。

[0022] 在一些情况下,所述方法可包括从发现具有至少三个月、至少六个月或至少十二个月的混合嵌合状态的个体撤去免疫抑制。

[0023] 本文公开了与器官移植一起使用的组合物。本文所提供的组合物在一些情况下可用于在移植HLA配型相合或HLA配型不合的实体器官后向受者施用来源于供者的造血干细胞的组合物。在一些情况下,此类组合物包含来源于供者的造血干细胞,其可以为至少70%纯的。在一些情况下,异基因造血细胞组合物包含来源于供者的$CD34^+$细胞和来源于供者的$CD3^+$细胞,在每个来源于供者的细胞中铁的细胞浓度在5与100pg之间,其中细胞的数量是这样的量,其足以允许在实体器官移植后移植于受者至少一年时撤去免疫抑制药物。

[0024] 在一些情况下,组合物可包括将至少$10x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和至少$1.0x10^6$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。在一些情况下,将至少$10x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和至少$1.0x10^7$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。在一些情况下,将至少$10x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和$1.0-5.0x10^6$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。在一些情况下,将少于$15x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和至少$50x10^6$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。

[0025] 在一些情况下,实体器官为HLA配型相合的或HLA配型不合的。在一些情况下,实体器官选自心脏、肠、肝、肺、胰腺和肾。

[0026] 在一些情况下,组合物可与向受者移植来自供者的实体器官一起施用,其中实体器官选自心脏、肠、肝、肺、胰腺和肾。实体器官可以是全器官的一部分,可得自活体供者或死亡供者和/或可与受者为亲属或非亲属。

[0027] 在一些情况下,可在通过对供者和受者中的HLA等位基因HLA-A、HLA-B和HLA-DR分型而确定供者和受者是HLA配型相合的还是HLA配型不合的之后施用组合物。HLA配型相合可指这样一种配型相合,其中在HLA-A、HLA-B和HLA-DR处的每个HLA等位基因在供者与受者之间相同。HLA配型不合可指这样一种配型相合,其中在HLA-A、HLA-B和HLA-DR处的至少一个HLA等位基因在供者与受者之间不同。

[0028] 在一些情况下,经配制以供施用给受者的分离的造血细胞的组合物可包含至少$1x10^6$个/kg预期受者的从来源于供者的血浆分离置换产品分离的$CD34^+$细胞,其中在$CD34^+$细胞中铁的细胞浓度在5与100pg铁/细胞之间,以及至少$1x10^7$/kg预期受者的从来源于供者的血浆分离置换产品分离的$CD3^+$T细胞,其中在$CD3^+$细胞中铁的细胞浓度在5与100pg铁/

细胞之间，以及药用载体。在配制工程化产品前可确定预期受者的体重。或者，可用适当数量或比率的$CD34^+$细胞和$CD3^+$细胞配制产品，并将适当体积的产品施用给受者。

[0029] 在一些情况下，可从来源于用至少10微克/kg的G-CSF处理的供者的血浆分离置换产品产生组合物。在一些情况下，将G-CSF以两个剂量施用给供者。在一些情况下，在第二剂量的G-CSF后五小时以内从供者分离血浆分离置换产品。

[0030] 在一些情况下，组合物可包含用至少亲和剂和柱从血浆分离置换产品分离的CD34+细胞和CD3+细胞，CD34+细胞位于柱的洗出液中并且CD3+细胞位于柱的CD34+细胞耗竭流过组分中。

[0031] 在一些情况下，组合物中$CD34^+$细胞中铁的细胞浓度在5与100pg/细胞之间，例如5与10pg铁/细胞之间、7.5与15pg铁/细胞之间、10与20pg铁/细胞之间、15与30pg铁/细胞之间、20与40pg铁/细胞之间、30与50pg铁/细胞之间、40与60pg铁/细胞之间、50与70pg铁/细胞之间、60与80pg铁/细胞之间、70与90pg铁/细胞之间或80与100pg铁/细胞之间。

[0032] 在一些情况下，组合物中$CD3^+$细胞中铁的细胞浓度在5与10pg铁/细胞之间、7.5与15pg铁/细胞之间、10与20pg铁/细胞之间、15与30pg铁/细胞之间、20与40pg铁/细胞之间、30与50pg铁/细胞之间、40与60pg铁/细胞之间、50与70pg铁/细胞之间、60与80pg铁/细胞之间、70与90pg铁/细胞之间或80与100pg铁/细胞之间。

[0033] 在一些情况下，造血细胞组合物的CD34+细胞在配制造血细胞组合物前为至少70％纯的。在一些情况下，将组合物施用给与CD34+细胞和CD3+细胞的HLA配型相合或与CD34+细胞和CD3+细胞的HLA配型不合的受者。在一些情况下，通过对供者和受者中的HLA等位基因HLA-A、HLA-B和HLA-DR分型而确定组合物的细胞是HLA配型相合的或HLA配型不合的。

[0034] 在一些情况下，从HLA配型相合的造血细胞产生细胞组合物，其中HLA等位基因HLA-A、HLA-B、HLA-DR在供者与受者之间相同。在一些情况下，从HLA配型不合的造血细胞产生组合物，其中HLA-A、HLA-B、HLA-DR的至少一个HLA等位基因在供者与受者之间不同。在一些情况下，从取自与受者为亲属或非亲属的供者的血浆分离置换产品产生组合物。

[0035] 在一些情况下，组合物可包含从至少一个血浆分离置换产品、两个血浆分离置换产品、三个血浆分离置换产品、四个血浆分离置换产品或五个血浆分离置换产品分离的CD34+细胞。在一些情况下，血浆分离置换产品从实体器官供者分离。在一些情况下，CD3+细胞从血浆分离置换产品的CD34-耗竭组分分离。在一些情况下，血浆分离置换产品的CD34-耗竭组分是来自亲和柱的CD34-耗竭流过组分。

[0036] 本文公开的是用于器官移植的试剂盒。本文提供的试剂盒在一些情况下描述可在移植HLA配型相合的或HLA配型不合的实体器官后施用给受者的造血干细胞组合物的制备。在一些情况下，能够用于制备工程化造血细胞组合物的多个组成部分的试剂盒包含：至少一种CD34的亲和试剂，至少一种用于从多种细胞中分离CD34+细胞的装置，至少一种用于确定CD3+细胞数量的药剂，以及使用至少试剂盒的所述组成部分从多种细胞分离CD34+细胞并确定CD3+细胞数量以生成工程化造血细胞组合物的说明书。

[0037] 以引用方式并入

[0038] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均以引用方式并入本文，达到如同各个出版物、专利或专利申请具体且单独地表明以引用方式并入的相同程度。

[0039] 附图简述

[0040] 本公开的新型特征在所附权利要求书中详细示出。通过阐述利用本发明原理的示例性实例及其附图的以下详细描述，将得到对本公开的特征和优点的更好理解：

[0041] 图1示出单倍型配型相合的供者和受者的肾及造血细胞移植方案。

[0042] 图2是单倍型配型相合的器官移植的结果表。

[0043] 图3提供在图2的患者#2中在单倍型配型相合的联合器官移植后嵌合状态的评估图线。

[0044] 图4A-4D提供4个不同的受者的嵌合状态的评估图线。每个受者在图A、B、C和D之一中示出。施用给受者的CD34+和CD3+细胞的数量在图线上方示出。

具体实施方式

[0045] 虽然本文示出并描述了本公开的优选方面，但是应当理解，本公开不限于下述公开内容的特定方面，因为可作出这些特定方面的变型，并且这些变型仍落在所附权利要求书的范围内。还应当理解，所用的术语只是为了描述本公开的特定方面，并非旨在进行限制。相反，本公开的范围由所附权利要求书确立。在本说明书和所附权利要求书中，单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括多个指代物，除非上下文另有明确指出。

[0046] 定义

[0047] 如果提供了值的范围，则应当理解，介于该范围上限与下限之间的每个居间值(直至下限单位的十分之一，除非上下文另有明确指出)以及该所述范围内的任何其它所述值或居间值均涵盖在本文提供的公开内容内。这些较小范围的上限和下限可独立地包含在所述较小范围内，并且也涵盖在本发明内，受所述范围内任何具体排除的限值的约束。如果所述范围包含所述限值的一者或两者，则排除这些所含限值一者或两者的范围也包括在本文提供的公开内容内。

[0048] 除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属技术领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。虽然类似于或等同于本文所述的那些的任何方法、装置和材料均可用于实践或检验本公开，但是现在描述优选的方法、装置和材料。

[0049] “主要组织相容性复合体抗原”(“MHC”，也称为“人类白细胞抗原”，HLA)是在细胞表面上表达的蛋白分子，其赋予这些分子独特的抗原身份。MHC/HLA抗原是被T细胞和自然杀伤(NK)细胞认为来源于与免疫效应细胞相同的造血干细胞来源(“自身的”)或认为来源于造血重建细胞的另一来源(“非自身的”)的目标分子。公认有两大类HLA抗原：HLA I类和HLA II类。HLAI类抗原(在人类中为A、B和C)使得每个细胞可被认为是“自身的”，而HLA II类抗原(在人类中为DR、DP和DQ)参与淋巴细胞与抗原呈递细胞之间的反应。两者都在移植器官的排斥中存在牵连。

[0050] HLA抗原系统的重要方面是其多态性。每个基因MHC I类(A、B和C)和MHC II类(DP、DQ和DR)以不同的等位基因存在。HLA等位基因由数字和下标命名。例如，两个非亲属个体可分别携带I类HLA-B基因B5和Bw41。等位基因产物在α和/或β结构域中在一个或多个氨基酸处不同。使用表达I类和II类分子的白细胞，将大量的特异性抗体或核酸试剂用于对个体的HLA单倍型分型。对于HLA分型最重要的基因是六种MHC I类和II类蛋白，即HLA-A、HLA-B和HLA-DR每一者各两个等位基因。

[0051] HLA基因在存在于染色体位置6p21上的“超级基因座”中成簇，所述超级基因座编码六个经典的移植HLA基因和至少132个蛋白编码基因，这些基因在免疫系统调控以及某些其它基础分子和细胞过程中具有重要作用。完整的基因座尺寸约为3.6Mb，具有至少224个基因座。该成簇的一个作用是“单倍型”(即存在于单条染色体上的一套等位基因，其从单个亲代遗传)倾向于作为一个组遗传。从每个亲代遗传的该套等位基因形成单倍型，其中一些等位基因倾向于连在一起。鉴定患者的单倍型可有助于预测发现配型相合的供者的概率并帮助开发搜索策略，因为一些等位基因和单倍型比其它更常见并且它们以不同的频率在不同的种族和民族群体中分布。

[0052] 如本文所用，术语“HLA配型相合的”是指这样的供者受者对，其中没有HLA抗原在供者与受者之间配型不合。HLA配型相合(即，其中所有6个等位基因均配型相合)的供者/受者对相对于配型不合的对(即，其中6个等位基因中至少一个配型不合)具有降低的移植物抗宿主病(GVHD)风险。

[0053] 如本文所用，术语“HLA配型不合”是指这样的供者受者对，其中至少一个HLA抗原，尤其是对于HLA-A、HLA-B和HLA-DR，在供者与受者之间配型不合。在一些情况下，一个单倍型配型相合而另一个配型不合。该情形常见于得自活体或死亡供者的器官。HLA配型不合的供者/受者对相对于配型完美相合的对(即，其中所有6个等位基因均配型相合)具有升高的GVHD风险。

[0054] HLA等位基因通常用多种水平的详细描述来表示。大多数命名始于HLA-和基因座名称，然后是*和一些指定等位基因的(偶数)数字。前两个数字指定一组等位基因。较老的分型方法通常无法完全区分等位基因并因此在该水平上停止。第三至第四个数字指定同义等位基因。第五至六个数字表示基因编码框内的任何同义突变。第七至八个数字区分编码区以外的突变。诸如L、N、Q或S的字母可跟在等位基因名称后面以指定表达水平或关于其已知的其它非基因组数据。因此，完整描述的等位基因可最多9个数字长，不包括HLA-前缀和基因座注释。

[0055] 如本文所用，“受者”是已向其转移了来自通常相同物种的另一个体(供者)的器官、组织或细胞的个体。出于本公开的目的，受者和供者为HLA配型相合或HLA配型不合的。

[0056] 如本文所用，术语“实体器官移植”根据该术语的常规含义使用，其中将得自供者(所述供者可以是活的或死亡的)的器官置于受者体内的适当位置并将心血管连接生理整合到受者中。肾移植是本公开的方法尤其关注的，但所述方法不排除其它器官移植，例如，如本领域已知的胰腺并包括胰岛细胞、心脏、肺、肠、肝等。移植的器官可称为“移植物”，并且器官的生理整合可称为植入(engraftment)。

[0057] 造血干细胞移植(HCT)是通常来源于骨髓、外周血或脐带血的多能造血干细胞的移植。对于本公开的方法，可将造血细胞工程化成两种产品中的一种。将造血细胞工程化成具有特定的预定数量的纯化(例如，纯度≥70％)CD34+祖细胞和CD3+T细胞的输注产品。造血细胞可得自实体器官供者，并因此与实体器官为HLA配型相合的，并与器官受者为HLA配型不合的。造血细胞可得自实体器官供者，并因此与实体器官为HLA配型相合的，且与器官受者为HLA配型相合的。

[0058] 如果供者为死亡的，则造血细胞可得自骨髓(例如，椎骨、腰骨等)。如果供者为活体供者，则可动员造血细胞(例如，用G-CSF)，并通过血浆分离置换或类似的方法收集。或

者,细胞可得自骨髓(例如,腰骨等)。

[0059] 可长期冷冻(例如,冷冻保存)造血细胞而不损坏显著量的细胞。为了冷冻保存HSC,必须添加防腐剂DMSO,并且必须在受控速率冷冻机中非常缓慢地冷却细胞以防止在冰晶形成过程中的渗透压细胞损伤。HSC可在通常使用液氮的低温冷冻机中储存数年。

[0060] 将受者的免疫系统在输注造血细胞前用非清髓性程序预处理。非清髓性移植使用太低而不能根除受者的所有骨髓细胞的抗体和照射剂量,从而使得能够实现所需的稳定混合嵌合状态目标,其中受者和供者HSC均在骨髓空间中共存。预处理方案包括用通常持续约10至12天的时间段(例如,持续约11天)的抗胸腺细胞球蛋白(ATG)、全淋巴照射和皮质类固醇(例如泼尼松)处理。

[0061] 如本文所用的"免疫抑制"是指用主要减弱宿主免疫系统对移植物的免疫反应的药剂来处理移植物受者,但该药剂也可减弱供者造血细胞的GVHD。示例性免疫抑制方案在本文更详细地描述,但通常的是持续约6至12个月的时间段。测试受者的造血系统的混合嵌合状态,并且如果发现在至少6个月后维持混合嵌合状态,则将逐渐降低免疫抑制。

[0062] 移植患者的免疫抑制处理始于诱导期、围术期和紧接移植后。然后继续维持疗法,直到对于表现出稳定的混合嵌合状态的个体撤去。诱导和维持策略以特定的剂量或以实现目标治疗水平而调整的剂量使用不同的药物,从而为移植患者对长期移植物存活带来最大的希望。

[0063] 主要的免疫抑制剂包括钙调磷酸酶抑制剂,其与结合蛋白组合以抑制钙调磷酸酶活性,并且其包括例如他克莫司、环孢霉素A等。必须小心监控环孢霉素和他克莫司两者的水平。最初,可将水平保持在10-20ng/mL的范围内,但在3个月后,可保持较低的水平(5-10ng/mL)以降低肾毒性风险。

[0064] 佐剂通常与钙调磷酸酶抑制剂组合并包括类固醇、硫唑嘌呤、麦考酚酸莫酯和西罗莫司。所关注的方案包括钙调磷酸酶抑制剂与麦考酚酸莫酯。佐剂的使用允许临床医生实现足够的免疫抑制同时降低各个药剂的剂量和毒性。在若干临床试验已证实麦考酚酸莫酯与硫唑嘌呤相比显著降低的急性细胞性排斥发生率和1年治疗失败的降低后,麦考酚酸莫酯在肾移植受者中已显现出在免疫抑制中的重要作用。

[0065] 基于抗体的疗法使用单克隆(例如,莫罗单抗-CD3)或多克隆抗体或抗-CD25抗体(例如,巴利昔单抗、达利珠单抗)并在移植后早期(最多8周)施用。基于抗体的疗法使得可以避免钙调磷酸酶抑制剂或降低其剂量,从而可能降低肾毒性风险。多克隆和单克隆抗体的不良作用特性限制了它们在某些患者中的使用。

[0066] 移植物抗宿主病(GVHD)是造血细胞移植所特有的炎性疾病。其为供者骨髓的免疫细胞攻击受者的组织。GVHD是HLA配型相合和配型不合的移植均存在的风险。即使供者和受者为HLA配型相合的也可发生GVHD,因为免疫系统仍可识别他们的组织之间的其它差异。GVHD通常由T细胞介导,这些细胞与宿主MHC上呈递的外源肽反应。GVHD的风险在具有混合嵌合状态而不是完全嵌合状态的患者中明显降低,并出于该原因,实现混合嵌合状态是所需的。此外,免疫缺陷和感染在完全嵌合状态中比在混合嵌合状态中更常观察到。

[0067] 存在两种类型的GVHD:急性的和慢性的。急性GVHD通常在移植后的前3个月中出现并可涉及皮肤、肠或肝。高剂量的皮质类固醇诸如泼尼松是标准治疗。

[0068] 慢性GVHD也可在单倍型配型相合的移植后发生,并通常在移植后的前3个月中出

现。其为后期治疗相关并发症的主要原因，但其不太常导致死亡。除了炎症外，慢性GVHD还可导致发生纤维变性或瘢痕组织(类似于硬皮病)；其可导致功能残疾并需要长期免疫抑制疗法。

[0069] “急性移植排斥”是移植的器官被免疫系统排斥。急性排斥的特征在于移植的组织被受者的免疫细胞浸润，这些细胞执行它们的效应功能并破坏移植的组织。急性排斥的发生是快速的并通常在人类中在移植手术后几周内出现。

[0070] 一般来讲，通过免疫抑制药物抑制或阻抑急性排斥。类固醇是急性排斥发作的主要疗法。典型的剂量为3-5mg/kg/d持续3-5天，然后逐渐降低到维持剂量。ATG和莫罗单抗-CD3也是有用的。

[0071] “慢性移植排斥”通常在人类中在植入后几个月至几年内出现，甚至在存在对急性排斥的成功免疫抑制的情况下。纤维变性是所有类型的器官移植的慢性排斥中的共同因素。慢性排斥通常可由一系列特定器官特有的特定障碍描述。例如，在肺移植中，此类障碍包括呼吸道的纤维增生性破坏(闭塞性细支气管炎)；在心脏移植或心脏组织的移植中，诸如瓣膜换置术中，此类障碍包括纤维变性动脉粥样硬化；在肾移植中，此类障碍包括梗阻性肾病、肾硬化、肾小管间质性肾病变；以及在肝移植中，此类障碍包括消失型胆管综合征。

[0072] 慢性排斥的特征还可以在于缺血损伤、移植组织的去神经支配、高脂血症和与免疫抑制药物相关的高血压。除非免疫抑制不足是排斥的原因，否则免疫抑制疗法的变化一般不能有效逆转慢性排斥。血压控制、高脂血症治疗和糖尿病管理是移植物保持的现行主要治疗。

[0073] 术语“移植排斥”涵盖急性和慢性移植排斥两者。在移植排斥中，移植的组织受到受者免疫系统的排斥和破坏。除了同卵双胞胎的情况或在免疫抑制期间，急性排斥在一定程度上可在所有移植中出现。急性排斥可在移植后一周就开始，并且发生急性排斥的最大风险出现在移植后的前三个月。慢性排斥是移植的器官的长期失功。

[0074] 造血细胞移植失功是在同种异体移植后第+45天不存在供者源的造血重建(原发性移植物排斥)，或在供者-源造血的短暂植入后经确认的供者细胞损失。肾移植失败是肌酐清除率降低到低于10ml/min或患者回到透析，或患者回到重新移植的移植清单。

[0075] 如本文所用的嵌合状态除非另外说明否则一般是指造血系统的嵌合状态。确定个体是全嵌合体、混合嵌合体还是非嵌合的通过如本领域已知的对得自移植物受者的造血细胞样品(例如外周血、骨髓等)的分析而进行。可通过任何便利的分型方法进行分析。在一些实施方案中，使用具有用于微卫星分析的探针的PCR，定期监控在所有单核细胞、T细胞、B细胞、CD56+NK细胞和CD15+中性粒细胞之间的嵌合程度。例如，区分供者和宿主源的短末端重复长度内的多态性的商业试剂盒可以获得。自动化读取仪基于得自人工供者和宿主细胞混合物的标准曲线而提供供者类型细胞的百分比。

[0076] 在移植后的任何时间通过这种分析在给定的血细胞谱系中表现出大于95％的供者细胞的个体被称为在该移植患者组中具有全供者嵌合状态。混合嵌合状态定义为在这种分析中大于1％的供者DNA但低于95％的供者DNA。可对表现出混合嵌合状态的个体根据嵌合状态的演变而进一步分类，其中改善混合嵌合状态定义为在至少6个月的时间段中供者细胞比例的连续增加。稳定的混合嵌合状态定义为受者细胞的百分比随着时间的波动，而供者细胞不完全丧失。可撤去免疫抑制的候选者具有混合嵌合状态，直到移植后至少6个

月。

[0077] 如本文所用的“诊断”通常包括受试者对于疾病或障碍的易感性的确定、受试者目前是否受到疾病或障碍影响的确定、受疾病或障碍影响的受试者的预后(例如,转移前或转移性癌症状态、癌症阶段或癌症对治疗的反应性的鉴定)以及治疗措施(therametrics)的使用(例如监控受试者状况以提供关于治疗效果或功效的信息)。

[0078] 术语“生物样品”涵盖多种得自生物体的样品类型,并可用于诊断或监控测定。该术语涵盖生物源的血液和其它液体样品、固体组织样品(诸如活检标本)或组织培养物或来源于该组织培养物的细胞及其子代。该术语涵盖在取得后以任何方式操纵的样品,诸如用试剂处理、溶解或富集某些成分。该术语涵盖临床样品,并且也包括细胞培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解液、血清、血浆、生物体液和组织样品。

[0079] 术语“治疗”、“处理”等在本文用于通常表示取得期望的药理学和/或生理学效应。该效应在完全或部分防止疾病或其症状方面可以是预防性的,和/或在部分或完全稳定或治愈疾病和/或由该疾病引起的不利影响方面可以是治疗性的。

[0080] 如本文所用的“治疗”涵盖对哺乳动物尤其是人类中的疾病的任何治疗,并包括:(a)防止可能有患病或出现症状倾向但尚未诊断为患有该疾病或出现症状的受试者中的疾病或症状的出现;(b)抑制疾病症状,即阻止其发展;或(c)缓解疾病症状,即,使疾病或症状消退。

[0081] 术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文可互换使用并指需要诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者,尤其是人。

[0082] 术语“移植物管理”是指诱导和/或促进实体器官的修复植入(包括但不限于肾移植)的治疗方法。

[0083] 如本文所用的术语“药学上可接受的”是指不会以危害受者活力的程度损害受者人或动物的生理机能的一种化合物或多种化合物的组合。优选地,施用的一种化合物或多种化合物的组合将最多引起对受者人或动物健康的暂时性有害影响。

[0084] 如本文所用的术语“载体”是指将允许治疗性组合物直接施用到皮肤伤口的任何药学上可接受的药剂溶剂。载体将允许组合物局部施加到供移植的器官的暴露表面和将放置该器官的受者部位。因此,如本文所用的“载体”是指诸如但不限于水、盐水、油-水乳液的溶剂,或本领域技术人员已知的受者人或动物在药学上和生理学上可接受的任何其它溶剂或溶剂和化合物的组合。

[0085] 术语“评估”和“评价”可互换地用于指任何形式的测量,并包括确定是否存在某种要素。术语“确定”、“测量”、“评估”和“测定”可互换使用,并同时包括定量和定性确定。评估可以是相对的或绝对的。“评估...的存在”包括确定存在的某物的量,以及确定其存在或不存在。

[0086] 方法

[0087] 下文详细讨论本公开的方法。在一些情况下,本文所述的方法可包括以下步骤:对供者和受者进行HLA分型以确定HLA配型相合或HLA-配型不合的对。“HLA配型相合的”表示所有6个HLA抗原(例如,HLA-A、B、DR)均在供者与受者之间配型相合。“HLA配型不合的”表示6个HLA抗原(例如,HLA-A、B、DR)中的至少1个、至少2个、至少3个配型不合。一般来讲,6个HLA抗原(例如,HLA-A、B、DR)中的至少一部分配型相合,例如至少1个、至少2个、至少3个、至

少4个、至少6个配型相合。

[0088] 在一些情况下,所述方法可包括至少以下步骤:从供者获得实体器官和造血细胞;分离适当类型和剂量的造血细胞;移植实体器官;在移植实体器官后并在输注工程化造血细胞前对受者执行预处理方案;将受者维持免疫抑制方案至少六个月;监控受者的造血系统的混合嵌合状态;以及如果受者显示出稳定的混合嵌合状态则撤去免疫抑制。本文所述的方法既适用于HLA配型相合的也适用于HLA配型不合的移植条件。

[0089] 为本文所述的方法选择的个体可满足以下标准:(i)需要实体器官移植物;并且(ii)具有可从其获得实体器官和造血细胞的HLA配型相合或HLA配型不合的供者。通过执行适于该个体的实体器官和工程化造血细胞输注的联合移植,连同非清髓性预处理,患者可具有产生至少6个月的持久混合嵌合状态的高概率。持续至少6个月的混合嵌合状态可允许随着时间撤去免疫抑制。

[0090] 对人类白细胞抗原分型

[0091] 本领域已知的任何方法均可用于对来源于供者的细胞和来自受者的样品分型。例如,三大方法可用于执行HLA分型。第一种是常规的血清学细胞毒性方法,其中将淋巴细胞的样品(例如,采自血液或脾脏)添加到Terasaki板。在一些情况下,B淋巴细胞可用于II类分型。在其它情况下,I类分型可用剩余的白细胞进行。磁珠可用于从血或脾脏纯化细胞。

[0092] 在一些情况下,Terasaki板的每个孔可包含多种抗体(例如,得自母体血清或制造的单克隆抗体)。在一些情况下,由细胞表达的HLA抗原结合到孔中的抗体。在添加补体后,可杀死位于结合HLA抗原和抗体的孔中的细胞。在一些情况下,可从孔中确定细胞死亡模式。该模式可允许推导存在于原始组织上的HLA抗原的组合。在一些情况下,推导HLA抗原的组合可导致对HLA抗原的分型。

[0093] 可用于HLA分型的另一种方法是流式细胞术。不同于常规的血清学细胞毒性方法,流式细胞术可用于鉴定一个或多个HLA等位基因。在该方法中,可将白细胞与结合到所关注的HLA类型的抗体组合。在一些情况下,抗体可以是单克隆的或多克隆的。在一些情况下,抗体可包含可检测标记。在一些情况下,抗体可直接偶联到可检测标记。在其它情况下,具有可检测标记的不同抗体结合到HLA抗体,然后检测该复合物。可用于通过流式细胞术进行HLA分型的可检测标记的类型容易获得并且是本领域技术人员已知的。可分析样品以确定哪些HLA抗体已结合到细胞。

[0094] 可用于HLA分型的又一种方法是DNA分型。在一些情况下,DNA分型涉及从细胞提取DNA并使用生成序列数据的聚合酶链式反应技术来扩增编码HLA肽的基因。聚合酶链式反应技术可包括本领域技术人员已知的生成序列数据的任何聚合酶链式反应技术。

[0095] 在一些情况下,基因的序列可与位于若干基因(例如,基因库)数据库的至少一个中的HLA等位基因的已知核苷酸序列匹配。在一些情况下,基因库数据库可以是IMGT/HLA(International Immunogenetics Project)数据库。

[0096] 实体器官移植

[0097] 可从供者将实体器官移植给受者,以使得将器官置于受者体内的适当位置。在一些情况下,可将实体器官之间的心血管连接在生理上整合到受者体内。在一些情况下,器官可来自活体供者。在其它情况下,器官可来自死亡供者。在一些情况下,实体器官在供者与受者之间可以为HLA配型相合的。在其它情况下,实体器官在供者与受者之间可以为HLA配

型不合的。

[0098] 可用于器官移植的任何实体器官均可与本文所述的方法一起使用。在一些情况下，器官可以是本领域的技术人员已知的肾、肺、胰腺、胰岛细胞、心脏、肠、结肠、肝、皮肤、肌肉、齿龈、眼睛、牙齿等。在一些情况下，器官可以是完整器官。在其它情况下，器官可以是器官的一部分。在其它情况下，器官可以是器官的组织中的细胞。

[0099] 使用本文所述的方法，根据常规实践来收获和移植实体器官。在一些情况下，可在输注工程化造血细胞前至少一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、十一天、十二天、十三天、十四天、十五天、十六天、十七天、十八天、十九天或至少二十天移植实体器官。

[0100] 获得用于移植的造血干细胞

[0101] 造血干细胞移植(HCT)包括将得自供者的多能造血干细胞移植给供者。对于本文所述的方法，HCT可与实体器官移植联合。在一些情况下，造血干细胞在供者与受者之间可以为HLA配型相合的。在其它情况下，造血干细胞在供者与受者之间可以为HLA配型不合的。

[0102] 在一些情况下，造血干细胞从实体器官供者分离和纯化。实体器官供者可以是活的或死亡的。就活体供者而言，可使用本领域技术人员已知的任何各种方法从实体器官供者获得造血细胞，这些方法包括：得自活体供者的动员后外周血的血浆分离置换；从死亡供者的骨髓收获造血细胞，等等。在死亡供者的情况下，可从骨髓获得造血细胞。例如，细胞可得自含有供提取造血细胞的足量骨髓的椎骨、腰骨、股骨或任何其它骨骼中的骨髓。

[0103] 在一些情况下，可在分离和纯化前动员造血细胞。在一些情况下，可通过用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)处理供者而动员造血细胞。例如，可在分离和纯化造血细胞前将供者用一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或多于十个剂量的G-CSF处理。

[0104] 在一些情况下，可在一天(例如，24小时一天)或在多天的过程中将多个剂量的G-CSF递送给供者。例如，多天可包括两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天或多于十天。在优选的情况下，供者每天接受两个剂量。

[0105] 在一些情况下，递送到供者的每个G-CSF剂量为16微克/kg供者体重。在其它情况下，递送到供者的每个G-CSF剂量为8微克/kg供者体重。例如，每个G-CSF剂量可高于1微克/kg供者体重、2微克/kg供者体重、3微克/kg供者体重、4微克/kg供者体重、5微克/kg供者体重、6微克/kg供者体重、7微克/kg供者体重、8微克/kg供者体重、9微克/kg供者体重、10微克/kg供者体重、11微克/kg供者体重、12微克/kg供者体重、13微克/kg供者体重、14微克/kg供者体重、15微克/kg供者体重、16微克/kg供者体重、17微克/kg供者体重、18微克/kg供者体重、19微克/kg供者体重、20微克/kg供者体重或高于20微克/kg供者体重。在优选的情况下，递送给供者的每个G-CSF剂量为8微克/kg供者体重。

[0106] 在一些情况下，血浆分离置换可在供者接受单剂量的G-CSF后进行。例如，血浆分离置换可在供者接受单剂量的G-CSF后一小时、两小时、三小时、四小时、五小时、六小时、七小时、八小时、九小时、十小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、25小时、26小时、27小时、28小时、29小时、30小时、31小时、32小时、33小时、34小时、35小时、36小时、37小时、38小时、39小时、40小时、41小时、42小时、43小时、44小时、45小时、46小时、47小时、48小时或48小时以上进行。

[0107] 在一些情况下，血浆分离置换可在供者接受多个剂量的G-CSF的最终剂量后进行。

例如,血浆分离置换可在供者接受多个剂量的G-CSF的最终剂量后一小时、两小时、三小时、四小时、五小时、六小时、七小时、八小时、九小时、十小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、25小时、26小时、27小时、28小时、29小时、30小时、31小时、32小时、33小时、34小时、35小时、36小时、37小时、38小时、39小时、40小时、41小时、42小时、43小时、44小时、45小时、46小时、47小时、48小时或48小时以上进行。

[0108] 在一些情况下,可进行血浆分离置换以从供者获得血浆分离置换产品。例如,可从供者获得至少一个血浆分离置换产品、两个血浆分离置换产品、三个血浆分离置换产品、四个血浆分离置换产品或五个血浆分离置换产品。在一些情况下,可从供者获得至少两个血浆分离置换产品、三个血浆分离置换产品、四个血浆分离置换产品、五个血浆分离置换产品、六个血浆分离置换产品、七个血浆分离置换产品、八个血浆分离置换产品、九个血浆分离置换产品、十个血浆分离置换产品、11个血浆分离置换产品、12个血浆分离置换产品、13个血浆分离置换产品、14个血浆分离置换产品或至少15个血浆分离置换产品。

[0109] 在一些情况下,造血细胞可得自与受者HLA配型相合的实体器官供者。在这种情况下,造血细胞与实体器官和实体器官受者HLA配型相合。在一些情况下,造血细胞可得自与受者HLA配型不合的实体器官供者。在这种情况下,造血细胞与实体器官HLA配型相合而与实体器官受者HLA配型不合。

[0110] 对于本文所述的方法,可在从实体器官供者分离后或分离和纯化后冷冻(例如,冷冻保存)造血细胞。在一些情况下,可使用本领域技术人员已知的冷冻保存介质和冷冻保存方法来冷冻保存造血细胞。在一些情况下,可使用包含二甲基亚砜(DMSO)、Normosol、羟乙基淀粉和人血清白蛋白(HSA)的冷冻保存介质来冷冻保存造血细胞。

[0111] 在一些情况下,冷冻保存介质中的DMSO浓度可低于0.1%DMSO、0.2%DMSO、0.3%DMSO、0.4%DMSO、0.5%DMSO、0.6%DMSO、0.7%DMSO、0.8%DMSO、0.9%DMSO、1.0%DMSO、1.1%DMSO、1.2%DMSO、1.3%DMSO、1.4%DMSO、1.5%DMSO、1.6%DMSO、1.7%DMSO、1.8%DMSO、1.9%DMSO、2.0%DMSO、2.1%DMSO、2.2%DMSO、2.3%DMSO、2.4%DMSO、2.5%DMSO、2.6%DMSO、2.7%DMSO、2.8%DMSO、2.9%DMSO、3.0%DMSO、3.1%DMSO、3.2%DMSO、3.3%DMSO、3.4%DMSO、3.5%DMSO、3.6%DMSO、3.7%DMSO、3.8%DMSO、3.9%DMSO、4.0%DMSO、4.1%DMSO、4.2%DMSO、4.3%DMSO、4.4%DMSO、4.5%DMSO、4.6%DMSO、4.7%DMSO、4.8%DMSO、4.9%DMSO、5.0%DMSO、5.1%DMSO、5.2%DMSO、5.3%DMSO、5.4%DMSO、5.5%DMSO、5.6%DMSO、5.7%DMSO、5.8%DMSO、5.9%DMSO、6.0%DMSO、6.1%DMSO、6.2%DMSO、6.3%DMSO、6.4%DMSO、6.5%DMSO、6.6%DMSO、6.7%DMSO、6.8%DMSO、6.9%DMSO、7.0%DMSO、7.1%DMSO、7.2%DMSO、7.3%DMSO、7.4%DMSO、7.5%DMSO、7.6%DMSO、7.7%DMSO、7.8%DMSO、7.9%DMSO、8.0%DMSO、8.1%DMSO、8.2%DMSO、8.3%DMSO、8.4%DMSO、8.5%DMSO、8.6%DMSO、8.7%DMSO、8.8%DMSO、8.9%DMSO、9.0%DMSO、9.1%DMSO、9.2%DMSO、9.3%DMSO、9.4%DMSO、9.5%DMSO、9.6%DMSO、9.7%DMSO、9.8%DMSO、9.9%DMSO、10%DMSO、10.5%DMSO、11%DMSO、11.5%DMSO、12%DMSO、12.5%DMSO、13%DMSO、13.5%DMSO、14%DMSO、14.5%DMSO、15%DMSO、15.5%DMSO、16%DMSO、16.5%DMSO、17%DMSO、17.5%DMSO、18%DMSO、18.5%DMSO、19%DMSO、20%DMSO、20.5%DMSO、21%DMSO、21.5%DMSO、22%DMSO、22.5%DMSO、23%DMSO、23.5%DMSO、24%DMSO、24.5%DMSO、25%DMSO、25.5%DMSO、

26％DMSO、26.5％DMSO、27％DMSO、27.5％DMSO、28％DMSO、28.5％DMSO、29％DMSO、29.5％DMSO、30％DMSO、40％DMSO或低于50％DMSO。

[0112] 在一些情况下，冷冻保存介质中的normosol浓度可低于0.1％normosol、0.2％normosol、0.3％normosol、0.4％normosol、0.5％normosol、0.6％normosol、0.7％normosol、0.8％normosol、0.9％normosol、1.0％normosol、1.1％normosol、1.2％normosol、1.3％normosol、1.4％normosol、1.5％normosol、1.6％normosol、1.7％normosol、1.8％normosol、1.9％normosol、2.0％normosol、2.1％normosol、2.2％normosol、2.3％normosol、2.4％normosol、2.5％normosol、2.6％normosol、2.7％normosol、2.8％normosol、2.9％normosol、3.0％normosol、3.1％normosol、3.2％normosol、3.3％normosol、3.4％normosol、3.5％normosol、3.6％normosol、3.7％normosol、3.8％normosol、3.9％normosol、4.0％normosol、4.1％normosol、4.2％normosol、4.3％normosol、4.4％normosol、4.5％normosol、4.6％normosol、4.7％normosol、4.8％normosol、4.9％normosol、5.0％normosol、5.1％normosol、5.2％normosol、5.3％normosol、5.4％normosol、5.5％normosol、5.6％normosol、5.7％normosol、5.8％normosol、5.9％normosol、6.0％normosol、6.1％normosol、6.2％normosol、6.3％normosol、6.4％normosol、6.5％normosol、6.6％normosol、6.7％normosol、6.8％normosol、6.9％normosol、7.0％normosol、7.1％normosol、7.2％normosol、7.3％normosol、7.4％normosol、7.5％normosol、7.6％normosol、7.7％normosol、7.8％normosol、7.9％normosol、8.0％normosol、8.1％normosol、8.2％normosol、8.3％normosol、8.4％normosol、8.5％normosol、8.6％normosol、8.7％normosol、8.8％normosol、8.9％normosol、9.0％normosol、9.1％normosol、9.2％normosol、9.3％normosol、9.4％normosol、9.5％normosol、9.6％normosol、9.7％normosol、9.8％normosol、9.9％normosol、10％normosol、10.5％normosol、11％normosol、11.5％normosol、12％normosol、12.5％normosol、13％normosol、13.5％normosol、14％normosol、14.5％normosol、15％normosol、15.5％normosol、16％normosol、16.5％normosol、17％normosol、17.5％normosol、18％normosol、18.5％normosol、19％normosol、20％normosol、20.5％normosol、21％normosol、21.5％normosol、22％normosol、22.5％normosol、23％normosol、23.5％normosol、24％normosol、24.5％normosol、25％normosol、25.5％normosol、26％normosol、26.5％normosol、27％normosol、27.5％normosol、28％normosol、28.5％normosol、29％normosol、29.5％normosol、30％normosol、40％normosol或低于50％normosol。

[0113] 在一些情况下，冷冻保存介质中的羟乙基淀粉浓度可低于0.1％羟乙基淀粉、0.2％羟乙基淀粉、0.3％羟乙基淀粉、0.4％羟乙基淀粉、0.5％羟乙基淀粉、0.6％羟乙基淀粉、0.7％羟乙基淀粉、0.8％羟乙基淀粉、0.9％羟乙基淀粉、1.0％羟乙基淀粉、1.1％羟乙基淀粉、1.2％羟乙基淀粉、1.3％羟乙基淀粉、1.4％羟乙基淀粉、1.5％羟乙基淀粉、1.6％羟乙基淀粉、1.7％羟乙基淀粉、1.8％羟乙基淀粉、1.9％羟乙基淀粉、2.0％羟乙基淀粉、2.1％羟乙基淀粉、2.2％羟乙基淀粉、2.3％羟乙基淀粉、2.4％羟乙基淀粉、2.5％羟乙基淀粉、2.6％羟乙基淀粉、2.7％羟乙基淀粉、2.8％羟乙基淀粉、2.9％羟乙基淀粉、3.0％羟乙基淀粉、3.1％羟乙基淀粉、3.2％羟乙基淀粉、3.3％羟乙基淀粉、3.4％羟乙基淀粉、3.5％

羟乙基淀粉、3.6%羟乙基淀粉、3.7%羟乙基淀粉、3.8%羟乙基淀粉、3.9%羟乙基淀粉、4.0%羟乙基淀粉、4.1%羟乙基淀粉、4.2%羟乙基淀粉、4.3%羟乙基淀粉、4.4%羟乙基淀粉、4.5%羟乙基淀粉、4.6%羟乙基淀粉、4.7%羟乙基淀粉、4.8%羟乙基淀粉、4.9%羟乙基淀粉、5.0%羟乙基淀粉、5.1%羟乙基淀粉、5.2%羟乙基淀粉、5.3%羟乙基淀粉、5.4%羟乙基淀粉、5.5%羟乙基淀粉、5.6%羟乙基淀粉、5.7%羟乙基淀粉、5.8%羟乙基淀粉、5.9%羟乙基淀粉、6.0%羟乙基淀粉、6.1%羟乙基淀粉、6.2%羟乙基淀粉、6.3%羟乙基淀粉、6.4%羟乙基淀粉、6.5%羟乙基淀粉、6.6%羟乙基淀粉、6.7%羟乙基淀粉、6.8%羟乙基淀粉、6.9%羟乙基淀粉、7.0%羟乙基淀粉、7.1%羟乙基淀粉、7.2%羟乙基淀粉、7.3%羟乙基淀粉、7.4%羟乙基淀粉、7.5%羟乙基淀粉、7.6%羟乙基淀粉、7.7%羟乙基淀粉、7.8%羟乙基淀粉、7.9%羟乙基淀粉、8.0%羟乙基淀粉、8.1%羟乙基淀粉、8.2%羟乙基淀粉、8.3%羟乙基淀粉、8.4%羟乙基淀粉、8.5%羟乙基淀粉、8.6%羟乙基淀粉、8.7%羟乙基淀粉、8.8%羟乙基淀粉、8.9%羟乙基淀粉、9.0%羟乙基淀粉、9.1%羟乙基淀粉、9.2%羟乙基淀粉、9.3%羟乙基淀粉、9.4%羟乙基淀粉、9.5%羟乙基淀粉、9.6%羟乙基淀粉、9.7%羟乙基淀粉、9.8%羟乙基淀粉、9.9%羟乙基淀粉、10%羟乙基淀粉、10.5%羟乙基淀粉、11%羟乙基淀粉、11.5%羟乙基淀粉、12%羟乙基淀粉、12.5%羟乙基淀粉、13%羟乙基淀粉、13.5%羟乙基淀粉、14%羟乙基淀粉、14.5%羟乙基淀粉、15%羟乙基淀粉、15.5%羟乙基淀粉、16%羟乙基淀粉、16.5%羟乙基淀粉、17%羟乙基淀粉、17.5%羟乙基淀粉、18%羟乙基淀粉、18.5%羟乙基淀粉、19%羟乙基淀粉、20%羟乙基淀粉、20.5%羟乙基淀粉、21%羟乙基淀粉、21.5%羟乙基淀粉、22%羟乙基淀粉、22.5%羟乙基淀粉、23%羟乙基淀粉、23.5%羟乙基淀粉、24%羟乙基淀粉、24.5%羟乙基淀粉、25%羟乙基淀粉、25.5%羟乙基淀粉、26%羟乙基淀粉、26.5%羟乙基淀粉、27%羟乙基淀粉、27.5%羟乙基淀粉、28%羟乙基淀粉、28.5%羟乙基淀粉、29%羟乙基淀粉、29.5%羟乙基淀粉、30%羟乙基淀粉、40%羟乙基淀粉或低于50%羟乙基淀粉。

[0114] 在一些情况下,冷冻保存介质中的HSA浓度可低于0.1%HSA、0.2%HSA、0.3%HSA、0.4%HSA、0.5%HSA、0.6%HSA、0.7%HSA、0.8%HSA、0.9%HSA、1.0%HSA、1.1%HSA、1.2%HSA、1.3%HSA、1.4%HSA、1.5%HSA、1.6%HSA、1.7%HSA、1.8%HSA、1.9%HSA、2.0%HSA、2.1%HSA、2.2%HSA、2.3%HSA、2.4%HSA、2.5%HSA、2.6%HSA、2.7%HSA、2.8%HSA、2.9%HSA、3.0%HSA、3.1%HSA、3.2%HSA、3.3%HSA、3.4%HSA、3.5%HSA、3.6%HSA、3.7%HSA、3.8%HSA、3.9%HSA、4.0%HSA、4.1%HSA、4.2%HSA、4.3%HSA、4.4%HSA、4.5%HSA、4.6%HSA、4.7%HSA、4.8%HSA、4.9%HSA、5.0%HSA、5.1%HSA、5.2%HSA、5.3%HSA、5.4%HSA、5.5%HSA、5.6%HSA、5.7%HSA、5.8%HSA、5.9%HSA、6.0%HSA、6.1%HSA、6.2%HSA、6.3%HSA、6.4%HSA、6.5%HSA、6.6%HSA、6.7%HSA、6.8%HSA、6.9%HSA、7.0%HSA、7.1%HSA、7.2%HSA、7.3%HSA、7.4%HSA、7.5%HSA、7.6%HSA、7.7%HSA、7.8%HSA、7.9%HSA、8.0%HSA、8.1%HSA、8.2%HSA、8.3%HSA、8.4%HSA、8.5%HSA、8.6%HSA、8.7%HSA、8.8%HSA、8.9%HSA、9.0%HSA、9.1%HSA、9.2%HSA、9.3%HSA、9.4%HSA、9.5%HSA、9.6%HSA、9.7%HSA、9.8%HSA、9.9%HSA、10%HSA、10.5%HSA、11%HSA、11.5%HSA、12%HSA、12.5%HSA、13%HSA、13.5%HSA、14%HSA、14.5%HSA、15%HSA、15.5%HSA、16%HSA、16.5%HSA、17%HSA、17.5%HSA、18%HSA、18.5%HSA、19%HSA、20%HSA、20.5%HSA、21%HSA、21.5%HSA、22%HSA、22.5%HSA、23%HSA、23.5%HSA、24%HSA、24.5%HSA、25%HSA、25.5%HSA、26%

HSA、26.5%HSA、27%HSA、27.5%HSA、28%HSA、28.5%HSA、29%HSA、29.5%HSA、30%HSA、40%HSA或低于50%HSA。

[0115] 在一些情况下，冷冻保存介质可包含其它成分以便根据本文所述的方法冷冻保存造血细胞并与本文所述的方法一起使用。

[0116] 对于本文所述的方法，可在从实体器官供者分离后或分离和纯化后冷冻(例如，冷冻保存)造血细胞。在一些情况下，可使用本领域技术人员已知的冷冻保存介质和冷冻保存方法来冷冻保存造血细胞。在一些情况下，可使用包含二甲基亚砜(DMSO)、胎牛血清(FCS)和RPMI培养基的冷冻介质来冷冻保存造血细胞。

[0117] 在一些情况下，冷冻保存介质中的DMSO浓度可低于0.1%DMSO、0.2%DMSO、0.3%DMSO、0.4%DMSO、0.5%DMSO、0.6%DMSO、0.7%DMSO、0.8%DMSO、0.9%DMSO、1.0%DMSO、1.1%DMSO、1.2%DMSO、1.3%DMSO、1.4%DMSO、1.5%DMSO、1.6%DMSO、1.7%DMSO、1.8%DMSO、1.9%DMSO、2.0%DMSO、2.1%DMSO、2.2%DMSO、2.3%DMSO、2.4%DMSO、2.5%DMSO、2.6%DMSO、2.7%DMSO、2.8%DMSO、2.9%DMSO、3.0%DMSO、3.1%DMSO、3.2%DMSO、3.3%DMSO、3.4%DMSO、3.5%DMSO、3.6%DMSO、3.7%DMSO、3.8%DMSO、3.9%DMSO、4.0%DMSO、4.1%DMSO、4.2%DMSO、4.3%DMSO、4.4%DMSO、4.5%DMSO、4.6%DMSO、4.7%DMSO、4.8%DMSO、4.9%DMSO、5.0%DMSO、5.1%DMSO、5.2%DMSO、5.3%DMSO、5.4%DMSO、5.5%DMSO、5.6%DMSO、5.7%DMSO、5.8%DMSO、5.9%DMSO、6.0%DMSO、6.1%DMSO、6.2%DMSO、6.3%DMSO、6.4%DMSO、6.5%DMSO、6.6%DMSO、6.7%DMSO、6.8%DMSO、6.9%DMSO、7.0%DMSO、7.1%DMSO、7.2%DMSO、7.3%DMSO、7.4%DMSO、7.5%DMSO、7.6%DMSO、7.7%DMSO、7.8%DMSO、7.9%DMSO、8.0%DMSO、8.1%DMSO、8.2%DMSO、8.3%DMSO、8.4%DMSO、8.5%DMSO、8.6%DMSO、8.7%DMSO、8.8%DMSO、8.9%DMSO、9.0%DMSO、9.1%DMSO、9.2%DMSO、9.3%DMSO、9.4%DMSO、9.5%DMSO、9.6%DMSO、9.7%DMSO、9.8%DMSO、9.9%DMSO、10%DMSO、10.5%DMSO、11%DMSO、11.5%DMSO、12%DMSO、12.5%DMSO、13%DMSO、13.5%DMSO、14%DMSO、14.5%DMSO、15%DMSO、15.5%DMSO、16%DMSO、16.5%DMSO、17%DMSO、17.5%DMSO、18%DMSO、18.5%DMSO、19%DMSO、20%DMSO、20.5%DMSO、21%DMSO、21.5%DMSO、22%DMSO、22.5%DMSO、23%DMSO、23.5%DMSO、24%DMSO、24.5%DMSO、25%DMSO、25.5%DMSO、26%DMSO、26.5%DMSO、27%DMSO、27.5%DMSO、28%DMSO、28.5%DMSO、29%DMSO、29.5%DMSO、30%DMSO、40%DMSO或低于50%DMSO。

[0118] 在一些情况下，冷冻保存介质中的FCS浓度可高于1.0%FCS、2.0%FCS、3.0%FCS、4.0%FCS、5.0%FCS、6.0%FCS、7.0%FCS、8.0%FCS、9.0%FCS、10%FCS、10.5%FCS、11%FCS、11.5%FCS、12%FCS、12.5%FCS、13%FCS、13.5%FCS、14%FCS、14.5%FCS、15%FCS、15.5%FCS、16%FCS、16.5%FCS、17%FCS、17.5%FCS、18%FCS、18.5%FCS、19%FCS、20%FCS、20.5%FCS、21%FCS、21.5%FCS、22%FCS、22.5%FCS、23%FCS、23.5%FCS、24%FCS、24.5%FCS、25%FCS、25.5%FCS、26%FCS、26.5%FCS、27%FCS、27.5%FCS、28%FCS、28.5%FCS、29%FCS、29.5%FCS、30%FCS、30.5%FCS、31%FCS、31.5%FCS、32%FCS、32.5%FCS、33%FCS、33.5%FCS、34%FCS、34.5%FCS、35%FCS、35.5%FCS、36%FCS、36.5%FCS、37%FCS、37.5%FCS、38%FCS、38.5%FCS、39%FCS、40%FCS、40.5%FCS、41%FCS、41.5%FCS、42%FCS、42.5%FCS、43%FCS、43.5%FCS、44%FCS、44.5%FCS、45%FCS、45.5%FCS、46%FCS、46.5%FCS、47%FCS、47.5%FCS、48%FCS、48.5%FCS、49%FCS、50%

FCS、50.5%FCS、51%FCS、51.5%FCS、52%FCS、52.5%FCS、53%FCS、53.5%FCS、54%FCS、54.5%FCS、55%FCS、55.5%FCS、56%FCS、56.5%FCS、57%FCS、57.5%FCS、58%FCS、58.5%FCS、59%FCS、60%FCS、60.5%FCS、61%FCS、61.5%FCS、62%FCS、62.5%FCS、63%FCS、63.5%FCS、64%FCS、64.5%FCS、65%FCS、65.5%FCS、66%FCS、66.5%FCS、67%FCS、67.5%FCS、68%FCS、68.5%FCS、69%FCS、70%FCS、70.5%FCS、71%FCS、71.5%FCS、72%FCS、72.5%FCS、73%FCS、73.5%FCS、74%FCS、74.5%FCS、75%FCS、75.5%FCS、76%FCS、76.5%FCS、77%FCS、77.5%FCS、78%FCS、78.5%FCS、79%FCS或高于80%FCS。

[0119] 在一些情况下，冷冻保存介质中的RPMI浓度可高于1.0%RPMI、2.0%RPMI、3.0%RPMI、4.0%RPMI、5.0%RPMI、6.0%RPMI、7.0%RPMI、8.0%RPMI、9.0%RPMI、10%RPMI、10.5%RPMI、11%RPMI、11.5%RPMI、12%RPMI、12.5%RPMI、13%RPMI、13.5%RPMI、14%RPMI、14.5%RPMI、15%RPMI、15.5%RPMI、16%RPMI、16.5%RPMI、17%RPMI、17.5%RPMI、18%RPMI、18.5%RPMI、19%RPMI、20%RPMI、20.5%RPMI、21%RPMI、21.5%RPMI、22%RPMI、22.5%RPMI、23%RPMI、23.5%RPMI、24%RPMI、24.5%RPMI、25%RPMI、25.5%RPMI、26%RPMI、26.5%RPMI、27%RPMI、27.5%RPMI、28%RPMI、28.5%RPMI、29%RPMI、29.5%RPMI、30%RPMI、30.5%RPMI、31%RPMI、31.5%RPMI、32%RPMI、32.5%RPMI、33%RPMI、33.5%RPMI、34%RPMI、34.5%RPMI、35%RPMI、35.5%RPMI、36%RPMI、36.5%RPMI、37%RPMI、37.5%RPMI、38%RPMI、38.5%RPMI、39%RPMI、40%RPMI、40.5%RPMI、41%RPMI、41.5%RPMI、42%RPMI、42.5%RPMI、43%RPMI、43.5%RPMI、44%RPMI、44.5%RPMI、45%RPMI、45.5%RPMI、46%RPMI、46.5%RPMI、47%RPMI、47.5%RPMI、48%RPMI、48.5%RPMI、49%RPMI、50%RPMI、50.5%RPMI、51%RPMI、51.5%RPMI、52%RPMI、52.5%RPMI、53%RPMI、53.5%RPMI、54%RPMI、54.5%RPMI、55%RPMI、55.5%RPMI、56%RPMI、56.5%RPMI、57%RPMI、57.5%RPMI、58%RPMI、58.5%RPMI、59%RPMI、60%RPMI、60.5%RPMI、61%RPMI、61.5%RPMI、62%RPMI、62.5%RPMI、63%RPMI、63.5%RPMI、64%RPMI、64.5%RPMI、65%RPMI、65.5%RPMI、66%RPMI、66.5%RPMI、67%RPMI、67.5%RPMI、68%RPMI、68.5%RPMI、69%RPMI、70%RPMI、70.5%RPMI、71%RPMI、71.5%RPMI、72%RPMI、72.5%RPMI、73%RPMI、73.5%RPMI、74%RPMI、74.5%RPMI、75%RPMI、75.5%RPMI、76%RPMI、76.5%RPMI、77%RPMI、77.5%RPMI、78%RPMI、78.5%RPMI、79%RPMI或高于80%RPMI。

[0120] 在一些情况下，冷冻保存介质可包含其它成分以便根据本文所述的方法冷冻保存造血细胞并与本文所述的方法一起使用。

[0121] 造血细胞的冷冻保存包括在含于冷冻保存介质中后以受控的速率冷冻细胞的过程。在一些情况下，可将配有控制以受控的速率进行冷冻的速率和温度的计算机的低温冷冻机用于执行造血细胞的冷冻保存。例如，可将造血细胞置于室温度在6.5℃或以下的低温冷冻机中。计算机可控制以受控的速率进行冷冻的速率和温度，以使得低温冷冻机达到至少-130℃或以下的温度，以便以根据本文所述的方法的方式保存造血细胞。在一些情况下，低温冷冻机使用液氮来控制储存造血细胞所处的冷冻机温度。

[0122] 在一些情况下，在递送到受者之前可将造血细胞冷冻保存并储存在低温冷冻机中。在一些情况下，可将造血细胞冷冻保存短于一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天、35天、36天、37天、38

天、39天、40天、41天、42天、43天、44天、45天、46天、47天、48天、49天、50天、51天、52天、53天、54天、55天、56天、57天、58天、59天或短于60天。

[0123] 在一些情况下，可将造血细胞冷冻保存短于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、24个月、25个月、26个月、27个月、28个月、29个月、30个月、31个月、32个月、33个月、34个月、35个月、36个月、37个月、38个月、39个月、40个月、41个月、42个月、43个月、44个月、45个月、46个月、47个月、48个月、49个月、50个月、51个月、52个月、53个月、54个月、55个月、56个月、57个月、58个月、59个月或短于60个月。

[0124] 在一些情况下，可将造血细胞冷冻保存短于一年、两年、三年、四年、五年、六年、七年、八年、九年、十年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50年、51年、52年、53年、54年、55年、56年、57年、58年、59年或短于60年。

[0125] 在一些情况下，可将造血细胞冷冻保存长于一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天、35天、36天、37天、38天、39天、40天、41天、42天、43天、44天、45天、46天、47天、48天、49天、50天、51天、52天、53天、54天、55天、56天、57天、58天、59天或长于60天。

[0126] 在一些情况下，可将造血细胞冷冻保存长于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、24个月、25个月、26个月、27个月、28个月、29个月、30个月、31个月、32个月、33个月、34个月、35个月、36个月、37个月、38个月、39个月、40个月、41个月、42个月、43个月、44个月、45个月、46个月、47个月、48个月、49个月、50个月、51个月、52个月、53个月、54个月、55个月、56个月、57个月、58个月、59个月或长于60个月。

[0127] 在一些情况下，可将造血细胞冷冻保存长于一年、两年、三年、四年、五年、六年、七年、八年、九年、十年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50年、51年、52年、53年、54年、55年、56年、57年、58年、59年或长于60年。

[0128] 在一些情况下，冷冻保存可导致造血细胞死亡，其在输注到受者中之前在解冻细胞后进行确定。使用本领域技术人员已知的确定细胞死亡的常规方法(例如台盼蓝染色、流式细胞术等)，可以确定一批冷冻保存的造血细胞中死亡细胞的百分比。在一些情况下，在解冻冷冻保存的细胞后，可存在少于0.1％的死细胞、0.2％的死细胞、0.3％的死细胞、0.4％的死细胞、0.5％的死细胞、0.6％的死细胞、0.7％的死细胞、0.8％的死细胞、0.9％的死细胞、1.0％的死细胞、1.1％的死细胞、1.2％的死细胞、1.3％的死细胞、1.4％的死细胞、1.5％的死细胞、1.6％的死细胞、1.7％的死细胞、1.8％的死细胞、1.9％的死细胞、2.0％的死细胞、2.1％的死细胞、2.2％的死细胞、2.3％的死细胞、2.4％的死细胞、2.5％的死细胞、

2.6%的死细胞、2.7%的死细胞、2.8%的死细胞、2.9%的死细胞、3.0%的死细胞、3.1%的死细胞、3.2%的死细胞、3.3%的死细胞、3.4%的死细胞、3.5%的死细胞、3.6%的死细胞、3.7%的死细胞、3.8%的死细胞、3.9%的死细胞、4.0%的死细胞、4.1%的死细胞、4.2%的死细胞、4.3%的死细胞、4.4%的死细胞、4.5%的死细胞、4.6%的死细胞、4.7%的死细胞、4.8%的死细胞、4.9%的死细胞、5.0%的死细胞、5.1%的死细胞、5.2%的死细胞、5.3%的死细胞、5.4%的死细胞、5.5%的死细胞、5.6%的死细胞、5.7%的死细胞、5.8%的死细胞、5.9%的死细胞、6.0%的死细胞、6.1%的死细胞、6.2%的死细胞、6.3%的死细胞、6.4%的死细胞、6.5%的死细胞、6.6%的死细胞、6.7%的死细胞、6.8%的死细胞、6.9%的死细胞、7.0%的死细胞、7.1%的死细胞、7.2%的死细胞、7.3%的死细胞、7.4%的死细胞、7.5%的死细胞、7.6%的死细胞、7.7%的死细胞、7.8%的死细胞、7.9%的死细胞、8.0%的死细胞、8.1%的死细胞、8.2%的死细胞、8.3%的死细胞、8.4%的死细胞、8.5%的死细胞、8.6%的死细胞、8.7%的死细胞、8.8%的死细胞、8.9%的死细胞、9.0%的死细胞、9.1%的死细胞、9.2%的死细胞、9.3%的死细胞、9.4%的死细胞、9.5%的死细胞、9.6%的死细胞、9.7%的死细胞、9.8%的死细胞、9.9%的死细胞、10%的死细胞、10.5%的死细胞、11%的死细胞、11.5%的死细胞、12%的死细胞、12.5%的死细胞、13%的死细胞、13.5%的死细胞、14%的死细胞、14.5%的死细胞、15%的死细胞、15.5%的死细胞、16%的死细胞、16.5%的死细胞、17%的死细胞、17.5%的死细胞、18%的死细胞、18.5%的死细胞、19%的死细胞、20%的死细胞、20.5%的死细胞、21%的死细胞、21.5%的死细胞、22%的死细胞、22.5%的死细胞、23%的死细胞、23.5%的死细胞、24%的死细胞、24.5%的死细胞、25%的死细胞、25.5%的死细胞、26%的死细胞、26.5%的死细胞、27%的死细胞、27.5%的死细胞、28%的死细胞、28.5%的死细胞、29%的死细胞、29.5%的死细胞、30%的死细胞、40%的死细胞或少于50%的死细胞。

[0129] 造血干细胞的分离和纯化

[0130] 对于本文所述的方法，造血干细胞可来源于骨髓、外周血或脐带血。在一些情况下，造血干细胞在供者与受者之间可以为HLA配型相合的。在其它情况下，造血干细胞在供者与受者之间可以为HLA配型不合的。

[0131] 在一些情况下，特定类型的细胞可从造血干细胞分离和纯化。在一些情况下，可从造血干细胞分离和纯化的细胞为CD34+细胞和CD3+细胞。在一些情况下，CD34+和CD3+细胞从造血干细胞的相同组分分离。在一些情况下，CD34+和CD3+细胞从造血干细胞的不同组分分离。在一些情况下，CD34+细胞为祖细胞。在一些情况下，CD3+细胞为T细胞。

[0132] 在一些情况下，CD34+细胞从供者造血细胞分离和纯化。例如，CD34+细胞可通过选择性结合合适的CD34亲和试剂而从供者造血细胞分离和纯化。在一些情况下，CD34亲和试剂可以是抗体、全长抗体、抗体片段、天然存在的抗体、合成抗体、工程化抗体、全长亲和体、亲和体片段、全长affilin、affilin片段、全长anticalin、anticalin片段、全长avimer、avimer片段、全长DARPin、DARPin片段、全长fynomer、fynomer片段、全长kunitz结构域肽、kunitz结构域肽片段、全长单体、单体片段、肽、聚氨基酸等。

[0133] 在一些情况下，亲和试剂直接偶联到检测试剂和/或纯化试剂。在一些情况下，检测试剂和纯化试剂相同。在其它情况下，检测试剂和纯化试剂不同。例如，检测试剂和/或纯化试剂为荧光的、磁性的等。在一些情况下，检测试剂和/或纯化试剂为用于柱纯化的磁粒。

例如，磁性柱纯化可使用本领域技术人员已知的柱、抗体、缓冲剂、制备材料和试剂的Miltenyi系统进行。

[0134] 在一些情况下，使用磁粒分离和纯化的CD34+细胞可含有铁。分离和纯化的CD34+细胞的铁含量在使用磁粒分离和纯化后可大于在分离和纯化前CD34+细胞中的铁含量。例如，分离和纯化的CD34+细胞可含有低于500pg铁/细胞、450pg铁/细胞、400pg铁/细胞、350pg铁/细胞、300pg铁/细胞、250pg铁/细胞、225pg铁/细胞、200pg铁/细胞、190pg铁/细胞、180pg铁/细胞、170pg铁/细胞、160pg铁/细胞、150pg铁/细胞、140pg铁/细胞、130pg铁/细胞、120pg铁/细胞、110pg铁/细胞、109pg铁/细胞、108pg铁/细胞、107pg铁/细胞、106pg铁/细胞、105pg铁/细胞、104pg铁/细胞、103pg铁/细胞、102pg铁/细胞、101pg铁/细胞、100pg铁/细胞、99pg铁/细胞、98pg铁/细胞、97pg铁/细胞、96pg铁/细胞、95pg铁/细胞、94pg铁/细胞、93pg铁/细胞、92pg铁/细胞、91pg铁/细胞、90pg铁/细胞、89pg铁/细胞、88pg铁/细胞、87pg铁/细胞、86pg铁/细胞、85pg铁/细胞、84pg铁/细胞、83pg铁/细胞、82pg铁/细胞、81pg铁/细胞、80pg铁/细胞、79pg铁/细胞、78pg铁/细胞、77pg铁/细胞、76pg铁/细胞、75pg铁/细胞、74pg铁/细胞、73pg铁/细胞、72pg铁/细胞、71pg铁/细胞、70pg铁/细胞、69pg铁/细胞、68pg铁/细胞、67pg铁/细胞、66pg铁/细胞、65pg铁/细胞、64pg铁/细胞、63pg铁/细胞、62pg铁/细胞、61pg铁/细胞、60pg铁/细胞、59pg铁/细胞、58pg铁/细胞、57pg铁/细胞、56pg铁/细胞、55pg铁/细胞、54pg铁/细胞、53pg铁/细胞、52pg铁/细胞、51pg铁/细胞、50pg铁/细胞、49pg铁/细胞、48pg铁/细胞、47pg铁/细胞、46pg铁/细胞、45pg铁/细胞、44pg铁/细胞、43pg铁/细胞、42pg铁/细胞、41pg铁/细胞、40pg铁/细胞、39pg铁/细胞、38pg铁/细胞、37pg铁/细胞、36pg铁/细胞、35pg铁/细胞、34pg铁/细胞、33pg铁/细胞、32pg铁/细胞、31pg铁/细胞、30pg铁/细胞、29pg铁/细胞、28pg铁/细胞、27pg铁/细胞、26pg铁/细胞、25pg铁/细胞、24pg铁/细胞、23pg铁/细胞、22pg铁/细胞、21pg铁/细胞、20pg铁/细胞、19pg铁/细胞、18pg铁/细胞、17pg铁/细胞、16pg铁/细胞、15pg铁/细胞、14pg铁/细胞、13pg铁/细胞、12pg铁/细胞、11pg铁/细胞、10pg铁/细胞、9pg铁/细胞、8pg铁/细胞、7pg铁/细胞、6pg铁/细胞、5pg铁/细胞、4pg铁/细胞、3pg铁/细胞、2pg铁/细胞或低于1pg铁/细胞。

[0135] 在一些情况下，CD3+细胞从供者造血细胞分离和纯化。例如，CD3+细胞可通过选择性结合合适的CD3亲和试剂而从供者造血细胞分离和纯化。在一些情况下，CD3亲和试剂可以是抗体、全长抗体、抗体片段、天然存在的抗体、合成抗体、工程化抗体、全长亲和体、亲和体片段、全长affilin、affilin片段、全长anticalin、anticalin片段、全长avimer、avimer片段、全长DARPin、DARPin片段、全长fynomer、fynomer片段、全长kunitz结构域肽、kunitz结构域肽片段、全长单体、单体片段、肽、聚氨基酸等。

[0136] 在一些情况下，亲和试剂直接偶联到检测试剂和/或纯化试剂。在一些情况下，检测试剂和纯化试剂相同。在其它情况下，检测试剂和纯化试剂不同。例如，检测试剂和/或纯化试剂为荧光的、磁性的等。在一些情况下，检测试剂和/或纯化试剂为用于柱纯化的磁粒。例如，磁性柱纯化可使用本领域技术人员已知的柱、抗体、缓冲剂、制备材料和试剂的Miltenyi系统进行。

[0137] CD3+细胞可选自两个细胞群之一。在一些情况下，可将血浆分离置换产品分成两个部分，一个部分用于分离和纯化CD3+细胞而另一个部分用于分离和纯化CD34+细胞。在一些情况下，从形成CD34-阴性细胞组分的血浆分离置换产品分离和纯化CD34+细胞。在一些

情况下，可确定CD34-阴性组分中CD3+细胞的数量，并将一定体积的含有适当剂量的CD3细胞的CD34-阴性组分与一定体积的分离和纯化的CD34+细胞合并。例如，CD34+细胞和CD3+细胞用至少亲和剂和柱从至少一个血浆分离置换产品分离，CD34+细胞位于柱的洗出液中并且CD3+细胞位于柱的CD34-耗竭流过组分中。在另一个实例中，血浆分离置换产品的CD34-耗竭组分是来自亲和柱的CD34-耗竭流过组分。

[0138] 在一些情况下，可使用CD3+的亲和试剂确定阴性组分中CD3+细胞的数量。例如，亲和试剂可以是之前在本公开中所述的抗体、肽等。在一些情况下，亲和试剂可包含检测部分。例如，检测部分可如之前在本公开中所述为荧光的、磁性的等。

[0139] 在一些情况下，使用磁粒分离和纯化的CD3+细胞可含有铁。分离和纯化的CD3+细胞的铁含量在使用磁粒分离和纯化后可大于在分离和纯化前CD3+细胞中的铁含量。例如，分离和纯化的CD3+细胞可含有低于500pg铁/细胞、450pg铁/细胞、400pg铁/细胞、350pg铁/细胞、300pg铁/细胞、250pg铁/细胞、225pg铁/细胞、200pg铁/细胞、190pg铁/细胞、180pg铁/细胞、170pg铁/细胞、160pg铁/细胞、150pg铁/细胞、140pg铁/细胞、130pg铁/细胞、120pg铁/细胞、110pg铁/细胞、109pg铁/细胞、108pg铁/细胞、107pg铁/细胞、106pg铁/细胞、105pg铁/细胞、104pg铁/细胞、103pg铁/细胞、102pg铁/细胞、101pg铁/细胞、100pg铁/细胞、99pg铁/细胞、98pg铁/细胞、97pg铁/细胞、96pg铁/细胞、95pg铁/细胞、94pg铁/细胞、93pg铁/细胞、92pg铁/细胞、91pg铁/细胞、90pg铁/细胞、89pg铁/细胞、88pg铁/细胞、87pg铁/细胞、86pg铁/细胞、85pg铁/细胞、84pg铁/细胞、83pg铁/细胞、82pg铁/细胞、81pg铁/细胞、80pg铁/细胞、79pg铁/细胞、78pg铁/细胞、77pg铁/细胞、76pg铁/细胞、75pg铁/细胞、74pg铁/细胞、73pg铁/细胞、72pg铁/细胞、71pg铁/细胞、70pg铁/细胞、69pg铁/细胞、68pg铁/细胞、67pg铁/细胞、66pg铁/细胞、65pg铁/细胞、64pg铁/细胞、63pg铁/细胞、62pg铁/细胞、61pg铁/细胞、60pg铁/细胞、59pg铁/细胞、58pg铁/细胞、57pg铁/细胞、56pg铁/细胞、55pg铁/细胞、54pg铁/细胞、53pg铁/细胞、52pg铁/细胞、51pg铁/细胞、50pg铁/细胞、49pg铁/细胞、48pg铁/细胞、47pg铁/细胞、46pg铁/细胞、45pg铁/细胞、44pg铁/细胞、43pg铁/细胞、42pg铁/细胞、41pg铁/细胞、40pg铁/细胞、39pg铁/细胞、38pg铁/细胞、37pg铁/细胞、36pg铁/细胞、35pg铁/细胞、34pg铁/细胞、33pg铁/细胞、32pg铁/细胞、31pg铁/细胞、30pg铁/细胞、29pg铁/细胞、28pg铁/细胞、27pg铁/细胞、26pg铁/细胞、25pg铁/细胞、24pg铁/细胞、23pg铁/细胞、22pg铁/细胞、21pg铁/细胞、20pg铁/细胞、19pg铁/细胞、18pg铁/细胞、17pg铁/细胞、16pg铁/细胞、15pg铁/细胞、14pg铁/细胞、13pg铁/细胞、12pg铁/细胞、11pg铁/细胞、10pg铁/细胞、9pg铁/细胞、8pg铁/细胞、7pg铁/细胞、6pg铁/细胞、5pg铁/细胞、4pg铁/细胞、3pg铁/细胞、2pg铁/细胞或低于1pg铁/细胞。

[0140] 在一些情况下，使用磁粒分离和纯化的CD34+和CD3+细胞两者都可以含有铁。分离和纯化的CD34+和CD3+细胞的铁含量在使用磁粒分离和纯化后可大于在分离和纯化前CD34+和CD3+细胞中的铁含量。例如，分离和纯化的CD34+和CD3+细胞可含有低于500pg铁/细胞、450pg铁/细胞、400pg铁/细胞、350pg铁/细胞、300pg铁/细胞、250pg铁/细胞、225pg铁/细胞、200pg铁/细胞、190pg铁/细胞、180pg铁/细胞、170pg铁/细胞、160pg铁/细胞、150pg铁/细胞、140pg铁/细胞、130pg铁/细胞、120pg铁/细胞、110pg铁/细胞、109pg铁/细胞、108pg铁/细胞、107pg铁/细胞、106pg铁/细胞、105pg铁/细胞、104pg铁/细胞、103pg铁/细胞、102pg铁/细胞、101pg铁/细胞、100pg铁/细胞、99pg铁/细胞、98pg铁/细胞、97pg铁/细胞、

96pg铁/细胞、95pg铁/细胞、94pg铁/细胞、93pg铁/细胞、92pg铁/细胞、91pg铁/细胞、90pg铁/细胞、89pg铁/细胞、88pg铁/细胞、87pg铁/细胞、86pg铁/细胞、85pg铁/细胞、84pg铁/细胞、83pg铁/细胞、82pg铁/细胞、81pg铁/细胞、80pg铁/细胞、79pg铁/细胞、78pg铁/细胞、77pg铁/细胞、76pg铁/细胞、75pg铁/细胞、74pg铁/细胞、73pg铁/细胞、72pg铁/细胞、71pg铁/细胞、70pg铁/细胞、69pg铁/细胞、68pg铁/细胞、67pg铁/细胞、66pg铁/细胞、65pg铁/细胞、64pg铁/细胞、63pg铁/细胞、62pg铁/细胞、61pg铁/细胞、60pg铁/细胞、59pg铁/细胞、58pg铁/细胞、57pg铁/细胞、56pg铁/细胞、55pg铁/细胞、54pg铁/细胞、53pg铁/细胞、52pg铁/细胞、51pg铁/细胞、50pg铁/细胞、49pg铁/细胞、48pg铁/细胞、47pg铁/细胞、46pg铁/细胞、45pg铁/细胞、44pg铁/细胞、43pg铁/细胞、42pg铁/细胞、41pg铁/细胞、40pg铁/细胞、39pg铁/细胞、38pg铁/细胞、37pg铁/细胞、36pg铁/细胞、35pg铁/细胞、34pg铁/细胞、33pg铁/细胞、32pg铁/细胞、31pg铁/细胞、30pg铁/细胞、29pg铁/细胞、28pg铁/细胞、27pg铁/细胞、26pg铁/细胞、25pg铁/细胞、24pg铁/细胞、23pg铁/细胞、22pg铁/细胞、21pg铁/细胞、20pg铁/细胞、19pg铁/细胞、18pg铁/细胞、17pg铁/细胞、16pg铁/细胞、15pg铁/细胞、14pg铁/细胞、13pg铁/细胞、12pg铁/细胞、11pg铁/细胞、10pg铁/细胞、9pg铁/细胞、8pg铁/细胞、7pg铁/细胞、6pg铁/细胞、5pg铁/细胞、4pg铁/细胞、3pg铁/细胞、2pg铁/细胞或低于1pg铁/细胞。

[0141] 工程化和制备用于药物组合物的造血干细胞

[0142] 可将使用本文所述的方法的来源于供者的CD34+和CD3+细胞的组合工程化成供施用给实体器官受者的药物组合物。在一些情况下，可将造血细胞工程化成供输注到受者中的单种药物组合物。在其它情况下，可将造血细胞工程化成供输注到受者中的多种药物组合物。在一些情况下，CD34+和CD3+细胞在供者与受者之间可以为HLA配型相合的。在其它情况下，CD34+和CD3+细胞在供者与受者之间可以为HLA配型不合的。

[0143] 在一些情况下，可将造血细胞工程化成具有预定的CD34+造血细胞纯度的药物组合物。例如，工程化造血细胞中CD34+祖细胞的纯度可为≥30％、≥40％、≥50％、≥55％、≥60％、≥65％、≥70％、≥75％、≥80％、≥85％、≥90％、≥95％或≥98％。在另一个实例中，工程化造血细胞中CD34+祖细胞的纯度可在10与30％之间、15与35％之间、20与40％之间、25与45％之间、30与50％之间、35与55％之间、40与60％之间、45与65％之间、50与70％之间、55与75％之间、60与80％之间、65与85％之间、70与90％之间、75与95％之间和80与100％之间。在示例性情况下，工程化造血细胞中CD34+祖细胞的纯度≥70％。

[0144] 例如，工程化造血细胞中CD3+细胞的纯度可为≥30％、≥40％、≥50％、≥55％、≥60％、≥65％、≥70％、≥75％、≥80％、≥85％、≥90％、≥95％或≥98％。在另一个实例中，工程化造血细胞中CD3+细胞的纯度可在10与30％之间、15与35％之间、20与40％之间、25与45％之间、30与50％之间、35与55％之间、40与60％之间、45与65％之间、50与70％之间、55与75％之间、60与80％之间、65与85％之间、70与90％之间、75与95％之间和80与100％之间。在示例性情况下，在与CD34+细胞合并前工程化造血细胞中CD3+细胞的纯度为≥70％。

[0145] 在一些情况下，可将造血细胞工程化成具有预定的CD34+祖细胞纯度的产品。例如，工程化造血细胞中CD34+祖细胞的纯度可为≥30％、≥40％、≥50％、≥55％、≥60％、≥65％、≥70％、≥75％、≥80％、≥85％、≥90％、≥95％或≥98％。在另一个实例中，工程化造血细胞中CD34+祖细胞的纯度可在10与30％之间、15与35％之间、20与40％之间、25与

45％之间、30与50％之间、35与55％之间、40与60％之间、45与65％之间、50与70％之间、55与75％之间、60与80％之间、65与85％之间、70与90％之间、75与95％之间和80与100％之间。在示例性情况下，在与CD3+细胞合并前工程化造血细胞中CD34+祖细胞的纯度为≥70％。

[0146] 工程化造血细胞可包含特定数量的供注入受者的CD34+细胞。在一些情况下，待注入受者的CD34+细胞的目标剂量为≥$10x10^3$个细胞/kg体重、≥$15x10^3$个细胞/kg体重、≥$20x10^3$个细胞/kg体重、≥$25x10^3$个细胞/kg体重、≥$30x10^3$个细胞/kg体重、≥$35x10^3$个细胞/kg体重、≥$40x10^3$个细胞/kg体重、≥$45x10^3$个细胞/kg体重、≥$50x10^3$个细胞/kg体重、≥$55x10^3$个细胞/kg体重、≥$60x10^3$个细胞/kg体重、≥$65x10^3$个细胞/kg体重、≥$70x10^3$个细胞/kg体重、≥$75x10^3$个细胞/kg体重、≥$80x10^3$个细胞/kg体重、≥$85x10^3$个细胞/kg体重、$90x10^3$个细胞/kg体重、≥$95x10^3$个细胞/kg体重、≥$10x10^4$个细胞/kg体重、≥$15x10^4$个细胞/kg体重、≥$20x10^4$个细胞/kg体重、≥$25x10^4$个细胞/kg体重、≥$30x10^4$个细胞/kg体重、≥$35x10^4$个细胞/kg体重、≥$40x10^4$个细胞/kg体重、≥$45x10^4$个细胞/kg体重、≥$50x10^4$个细胞/kg体重、≥$55x10^4$个细胞/kg体重、≥$60x10^4$个细胞/kg体重、≥$65x10^4$个细胞/kg体重、≥$70x10^4$个细胞/kg体重、≥$75x10^4$个细胞/kg体重、≥$80x10^4$个细胞/kg体重、≥$85x10^4$个细胞/kg体重、$90x10^4$个细胞/kg体重、≥$95x10^4$个细胞/kg体重、≥$10x10^5$个细胞/kg体重、≥$15x10^5$个细胞/kg体重、≥$20x10^5$个细胞/kg体重、≥$25x10^5$个细胞/kg体重、≥$30x10^5$个细胞/kg体重、≥$35x10^5$个细胞/kg体重、≥$40x10^5$个细胞/kg体重、≥$45x10^5$个细胞/kg体重、≥$50x10^5$个细胞/kg体重、≥$55x10^5$个细胞/kg体重、≥$60x10^5$个细胞/kg体重、≥$65x10^5$个细胞/kg体重、≥$70x10^5$个细胞/kg体重、≥$75x10^5$个细胞/kg体重、≥$80x10^5$个细胞/kg体重、≥$85x10^5$个细胞/kg体重、$90x10^5$个细胞/kg体重、≥$95x10^5$个细胞/kg体重、≥$10x10^6$个细胞/kg体重、≥$15x10^6$个细胞/kg体重、≥$20x10^6$个细胞/kg体重、≥$25x10^6$个细胞/kg体重、≥$30x10^6$个细胞/kg体重、≥$35x10^6$个细胞/kg体重、≥$40x10^6$个细胞/kg体重、≥$45x10^6$个细胞/kg体重、≥$50x10^6$个细胞/kg体重、≥$55x10^6$个细胞/kg体重、≥$60x10^6$个细胞/kg体重、≥$65x10^6$个细胞/kg体重、≥$70x10^6$个细胞/kg体重、≥$75x10^6$个细胞/kg体重、≥$80x10^6$个细胞/kg体重、≥$85x10^6$个细胞/kg体重、$90x10^6$个细胞/kg体重、≥$95x10^6$个细胞/kg体重、≥$10x10^7$个细胞/kg体重、≥$15x10^7$个细胞/kg体重、≥$20x10^7$个细胞/kg体重、≥$25x10^7$个细胞/kg体重、≥$30x10^7$个细胞/kg体重、≥$35x10^7$个细胞/kg体重、≥$40x10^7$个细胞/kg体重、≥$45x10^7$个细胞/kg体重、≥$50x10^7$个细胞/kg体重、≥$55x10^7$个细胞/kg体重、≥$60x10^7$个细胞/kg体重、≥$65x10^7$个细胞/kg体重、≥$70x10^7$个细胞/kg体重、≥$75x10^7$个细胞/kg体重、≥$80x10^7$个细胞/kg体重、≥$85x10^7$个细胞/kg体重、$90x10^7$个细胞/kg体重、≥$95x10^7$个细胞/kg体重、≥$10x10^8$个细胞/kg体重、≥$15x10^8$个细胞/kg体重、≥$20x10^8$个细胞/kg体重、≥$25x10^8$个细胞/kg体重、≥$30x10^8$个细胞/kg体重、≥$35x10^8$个细胞/kg体重、≥$40x10^8$个细胞/kg体重、≥$45x10^8$个细胞/kg体重、≥$50x10^8$个细胞/kg体重、≥$55x10^8$个细胞/kg体重、≥$60x10^8$个细胞/kg体重、≥$65x10^8$个细胞/kg体重、≥$70x10^8$个细胞/kg体重、≥$75x10^8$个细胞/kg体重、≥$80x10^8$个细胞/kg体重、≥$85x10^8$个细胞/kg体重、$90x10^8$个细胞/kg体重、≥$95x10^8$个细胞/kg体重或≥$10x10^9$个细胞/kg体重。

[0147] 工程化造血细胞可包含特定数量的供注入受者的CD3+细胞。在一些情况下，待注入受者的CD3+细胞的目标剂量为≥$10x10^3$个细胞/kg体重、≥$15x10^3$个细胞/kg体重、≥

$20x10^3$个细胞/kg体重、≥$25x10^3$个细胞/kg体重、≥$30x10^3$个细胞/kg体重、≥$35x10^3$个细胞/kg体重、≥$40x10^3$个细胞/kg体重、≥$45x10^3$个细胞/kg体重、≥$50x10^3$个细胞/kg体重、≥$55x10^3$个细胞/kg体重、≥$60x10^3$个细胞/kg体重、≥$65x10^3$个细胞/kg体重、≥$70x10^3$个细胞/kg体重、≥$75x10^3$个细胞/kg体重、≥$80x10^3$个细胞/kg体重、≥$85x10^3$个细胞/kg体重、$90x10^3$个细胞/kg体重、≥$95x10^3$个细胞/kg体重、≥$10x10^4$个细胞/kg体重、≥$15x10^4$个细胞/kg体重、≥$20x10^4$个细胞/kg体重、≥$25x10^4$个细胞/kg体重、≥$30x10^4$个细胞/kg体重、≥$35x10^4$个细胞/kg体重、≥$40x10^4$个细胞/kg体重、≥$45x10^4$个细胞/kg体重、≥$50x10^4$个细胞/kg体重、≥$55x10^4$个细胞/kg体重、≥$60x10^4$个细胞/kg体重、≥$65x10^4$个细胞/kg体重、≥$70x10^4$个细胞/kg体重、≥$75x10^4$个细胞/kg体重、≥$80x10^4$个细胞/kg体重、≥$85x10^4$个细胞/kg体重、$90x10^4$个细胞/kg体重、≥$95x10^4$个细胞/kg体重、≥$10x10^5$个细胞/kg体重、≥$15x10^5$个细胞/kg体重、≥$20x10^5$个细胞/kg体重、≥$25x10^5$个细胞/kg体重、≥$30x10^5$个细胞/kg体重、≥$35x10^5$个细胞/kg体重、≥$40x10^5$个细胞/kg体重、≥$45x10^5$个细胞/kg体重、≥$50x10^5$个细胞/kg体重、≥$55x10^5$个细胞/kg体重、≥$60x10^5$个细胞/kg体重、≥$65x10^5$个细胞/kg体重、≥$70x10^5$个细胞/kg体重、≥$75x10^5$个细胞/kg体重、≥$80x10^5$个细胞/kg体重、≥$85x10^5$个细胞/kg体重、$90x10^5$个细胞/kg体重、≥$95x10^5$个细胞/kg体重、≥$10x10^6$个细胞/kg体重、≥$15x10^6$个细胞/kg体重、≥$20x10^6$个细胞/kg体重、≥$25x10^6$个细胞/kg体重、≥$30x10^6$个细胞/kg体重、≥$35x10^6$个细胞/kg体重、≥$40x10^6$个细胞/kg体重、≥$45x10^6$个细胞/kg体重、≥$50x10^6$个细胞/kg体重、≥$55x10^6$个细胞/kg体重、≥$60x10^6$个细胞/kg体重、≥$65x10^6$个细胞/kg体重、≥$70x10^6$个细胞/kg体重、≥$75x10^6$个细胞/kg体重、≥$80x10^6$个细胞/kg体重、≥$85x10^6$个细胞/kg体重、$90x10^6$个细胞/kg体重、≥$95x10^6$个细胞/kg体重、≥$10x10^7$个细胞/kg体重、≥$15x10^7$个细胞/kg体重、≥$20x10^7$个细胞/kg体重、≥$25x10^7$个细胞/kg体重、≥$30x10^7$个细胞/kg体重、≥$35x10^7$个细胞/kg体重、≥$40x10^7$个细胞/kg体重、≥$45x10^7$个细胞/kg体重、≥$50x10^7$个细胞/kg体重、≥$55x10^7$个细胞/kg体重、≥$60x10^7$个细胞/kg体重、≥$65x10^7$个细胞/kg体重、≥$70x10^7$个细胞/kg体重、≥$75x10^7$个细胞/kg体重、≥$80x10^7$个细胞/kg体重、≥$85x10^7$个细胞/kg体重、$90x10^7$个细胞/kg体重、≥$95x10^7$个细胞/kg体重、≥$10x10^8$个细胞/kg体重、≥$15x10^8$个细胞/kg体重、≥$20x10^8$个细胞/kg体重、≥$25x10^8$个细胞/kg体重、≥$30x10^8$个细胞/kg体重、≥$35x10^8$个细胞/kg体重、≥$40x10^8$个细胞/kg体重、≥$45x10^8$个细胞/kg体重、≥$50x10^8$个细胞/kg体重、≥$55x10^8$个细胞/kg体重、≥$60x10^8$个细胞/kg体重、≥$65x10^8$个细胞/kg体重、≥$70x10^8$个细胞/kg体重、≥$75x10^8$个细胞/kg体重、≥$80x10^8$个细胞/kg体重、≥$85x10^8$个细胞/kg体重、$90x10^8$个细胞/kg体重、≥$95x10^8$个细胞/kg体重或≥$10x10^9$个细胞/kg体重。

[0148] 在一些情况下，工程化造血细胞可包含供输注到HLA配型相合的或HLA配型不合的受者中的$CD34^+$和$CD3^+$细胞的组合。在一种情况下，将至少$10x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和至少$1.0x10^6$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。在另一种情况下，将至少$10x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和至少$1.0x10^7$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。在另一种情况下，将至少$10x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和$1.0-5.0x10^6$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。在另一种情况下，将少于$15x10^6$个$CD34^+$细胞/kg受者体重和至少$50x10^6$个$CD3^+$细胞/kg输注到受者中。

[0149] 分离和纯化的CD34+细胞和CD3+细胞可在用于工程化造血细胞组合物中之前新分离或冷冻(例如，冷冻保存)。在一些情况下，可在用作新分离或冷冻的细胞以制备工程化造

血细胞组合物前将CD34+细胞与CD3+细胞合并。

[0150] 在一些情况下，将CD34+和CD3+细胞作为新分离的细胞或作为冷冻保存的细胞单独维持。例如，可将新维持的CD34+细胞和CD3+细胞合并，以使得在供输注的工程化组合物中实现CD34+和CD3+细胞的目标剂量。在其它情况下，可将独立地冷冻保存的CD34+和CD3+细胞解冻，并在解冻后确定每种细胞类型的目标剂量。可将解冻的CD34+细胞和CD3+细胞合并，以使得在供输注的工程化组合物中实现CD34+和CD3+细胞的目标剂量。

[0151] 加工工程化造血细胞以用于药物组合物

[0152] 工程化造血细胞(例如，CD34+和CD3+细胞)在产生供施用给供者的药物组合物前可以是新制备的或之前冷冻的(例如，冷冻保存的)。在一些情况下，CD34+和CD3+细胞在供者与受者之间可以为HLA配型相合的。在其它情况下，CD34+和CD3+细胞在供者与受者之间可以为HLA配型不合的。

[0153] 冷冻保存的方法在本文其它地方描述。在一些情况下，解冻CD34+细胞的一个等分试样。在其它情况下，解冻CD34+细胞的多于一个等分试样。例如，解冻至少一个等分试样、两个等分试样、三个等分试样、四个等分试样、五个等分试样、六个等分试样、七个等分试样、八个等分试样、九个等分试样、10个等分试样、11个等分试样、12个等分试样、13个等分试样、14个等分试样、15个等分试样、16个等分试样、17个等分试样、18个等分试样、19个等分试样、20个等分试样、21个等分试样、22个等分试样、23个等分试样、24个等分试样、25个等分试样、26个等分试样、27个等分试样、28个等分试样、29个等分试样、30个等分试样、31个等分试样、32个等分试样、33个等分试样、34个等分试样、35个等分试样、36个等分试样、37个等分试样、38个等分试样、39个等分试样、40个等分试样、41个等分试样、42个等分试样、43个等分试样、44个等分试样、45个等分试样、46个等分试样、47个等分试样、48个等分试样、49个等分试样、50个等分试样或多于50个等分试样。

[0154] 在一些情况下，解冻CD3+细胞的一个等分试样。在其它情况下，解冻CD3+细胞的多于一个等分试样。例如，解冻至少一个等分试样、两个等分试样、三个等分试样、四个等分试样、五个等分试样、六个等分试样、七个等分试样、八个等分试样、九个等分试样、10个等分试样、11个等分试样、12个等分试样、13个等分试样、14个等分试样、15个等分试样、16个等分试样、17个等分试样、18个等分试样、19个等分试样、20个等分试样、21个等分试样、22个等分试样、23个等分试样、24个等分试样、25个等分试样、26个等分试样、27个等分试样、28个等分试样、29个等分试样、30个等分试样、31个等分试样、32个等分试样、33个等分试样、34个等分试样、35个等分试样、36个等分试样、37个等分试样、38个等分试样、39个等分试样、40个等分试样、41个等分试样、42个等分试样、43个等分试样、44个等分试样、45个等分试样、46个等分试样、47个等分试样、48个等分试样、49个等分试样、50个等分试样或多于50个等分试样。

[0155] 在一些情况下，解冻CD34+细胞和CD3+细胞的组合的一个等分试样。在其它情况下，解冻CD34+细胞和CD3+细胞的组合的多于一个等分试样。例如，解冻至少一个等分试样、两个等分试样、三个等分试样、四个等分试样、五个等分试样、六个等分试样、七个等分试样、八个等分试样、九个等分试样、10个等分试样、11个等分试样、12个等分试样、13个等分试样、14个等分试样、15个等分试样、16个等分试样、17个等分试样、18个等分试样、19个等分试样、20个等分试样、21个等分试样、22个等分试样、23个等分试样、24个等分试样、25个

等分试样、26个等分试样、27个等分试样、28个等分试样、29个等分试样、30个等分试样、31个等分试样、32个等分试样、33个等分试样、34个等分试样、35个等分试样、36个等分试样、37个等分试样、38个等分试样、39个等分试样、40个等分试样、41个等分试样、42个等分试样、43个等分试样、44个等分试样、45个等分试样、46个等分试样、47个等分试样、48个等分试样、49个等分试样、50个等分试样或多于50个等分试样。

[0156] 在一些情况下，可使用本领域技术人员已知的方法离体扩增新制备的工程化造血细胞。在其它情况下，可使用本领域技术人员已知的方法离体扩增之前冷冻的工程化造血细胞。在一些情况下，可通过使用至少一种生长因子离体扩增新制备的或之前冷冻的工程化造血细胞。在一些情况下，可将多于一种生长因子用于扩增细胞。例如，生长因子可以是激活素A、ADAM-10、血管生成素、血管生成素-1、血管生成素-2、血管生成素-3、血管生成素-4、BIO、骨形态发生蛋白-2、骨形态发生蛋白-3、骨形态发生蛋白-4、骨形态发生蛋白-5、骨形态发生蛋白-6、骨形态发生蛋白-7、脑源性神经营养因子、E-钙粘蛋白、Fc嵌合体、组织蛋白酶G、ch2抑制剂II、表皮生长因子、嗜酸细胞活化趋化因子、嗜酸细胞活化趋化因子-2、嗜酸细胞活化趋化因子-3、Fas、成纤维细胞生长因子-4、成纤维细胞生长因子-5、成纤维细胞生长因子-6、成纤维细胞生长因子-8b、成纤维细胞生长因子-8c、成纤维细胞生长因子-9、成纤维细胞生长因子-10、成纤维细胞生长因子-17、成纤维细胞生长因子-18、成纤维细胞生长因子、酸性成纤维细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、牛碱性成纤维细胞生长因子片段1-24、成纤维细胞生长因子受体1a、成纤维细胞生长因子受体1b、成纤维细胞生长因子受体2a、成纤维细胞生长因子受体2b、成纤维细胞生长因子受体3a、成纤维细胞生长因子受体4、flt-3、flk-2配体、粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、GROa、GROb、肝素结合EGF样生长因子、调蛋白-a1 EGF结构域、调蛋白-b1 EGF结构域、调蛋白B、胰岛素样生长因子-1、胰岛素样生长因子-II片段33-40、胰岛素样生长因子结合蛋白-2、胰岛素样生长因子-1、胰岛素样生长因子II、干扰素a、干扰素aA、干扰素aA/D、干扰素b、干扰素g、干扰素、干扰素g受体1、白介素-1a、白介素-1b、白介素可溶性受体II型、白介素-2、白介素-2可溶性受体a、白介素-2可溶性受体b、白介素-2可溶性受体g、白介素-3、白介素-5、白介素-6、白介素-6可溶性受体、白介素-7、白介素-8、白介素-11、白介素-12、白血病抑制因子、LONG EGF、LONG R2 IGF-1、LYN A、巨噬细胞炎症蛋白-1a、巨噬细胞炎症蛋白-1b、巨噬细胞炎症蛋白-1g、基质金属蛋白酶-1、基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-9、MIG、单核细胞趋化蛋白-1、单核细胞趋化蛋白-3、单核细胞趋化蛋白-4、单核细胞趋化蛋白-5、神经生长因子受体、神经营养因子-3、神经营养因子-4、头蛋白(noggin)、notch-1、抑瘤素M、抑瘤素M受体b、骨桥蛋白、骨保护素、氧化苯肿、血小板衍生生长因子、血小板衍生生长因子-AB、血小板衍生生长因子-BB、血小板衍生生长因子可溶性受体a、血小板衍生生长因子受体b、抗-POU5F1、oct4、RANTES、SCF可溶性受体、L-选择素、干细胞因子、基质细胞衍生因子1a、基质细胞衍生因子1b、促血小板生成素、Tie-1、金属蛋白酶组织抑制因子-2、转化生长因子-a、转化生长因子-b1、转化生长因子-b2、转化生长因子-b3、转化生长因子-b1受体II可溶性片段、转化生长因子-b可溶性受体III、TrkB、血管内皮生长因子120、血管内皮生长因子121、血管内皮生长因子164、VEGF受体-2/Flk1/KDR和/或VEGF受体-3/Flt-4。用于离体扩增的每种生长因子的量是本领域技术人员已知的并适于与本文所述的方法一起使用。

[0157] 在一些情况下，可通过使用至少一种类型的饲养细胞离体扩增新制备的或之前冷

冻的工程化造血细胞。可以使用任何类型的饲养细胞，以使得饲养细胞维持工程化造血细胞的活力，并促进工程化造血细胞增殖和分化。在一些情况下，可使用与至少一种饲养细胞组合的至少一种生长因子，以使得饲养细胞维持工程化造血细胞的活力，并促进工程化造血细胞增殖和分化。在一些情况下，饲养细胞可以是有丝分裂不活跃的。在一些情况下，可将多于一种类型的饲养细胞用于扩增细胞。在一些情况下，一种类型的饲养细胞可来源于成年小鼠内皮细胞、胚胎小鼠内皮细胞、成年小鼠成纤维细胞、胚胎小鼠成纤维细胞、成人内皮细胞、胚胎人内皮细胞、成人成纤维细胞、胚胎人成纤维细胞、成年非人灵长类动物内皮细胞、胚胎非人灵长类动物内皮细胞、成年非人灵长类动物成纤维细胞、胚胎非人灵长类动物成纤维细胞、成年牛内皮细胞、胚胎牛内皮细胞、成年牛成纤维细胞、胚胎牛成纤维细胞、成年猪内皮细胞、胚胎猪内皮细胞、成年猪成纤维细胞、胚胎猪成纤维细胞等。

[0158] 在一些情况下，可修饰饲养细胞。例如，修饰可以是遗传修饰。在一些情况下，饲养细胞可表达非天然基因、抑制天然基因的表达或过表达天然基因。例如，饲养细胞可表达LacZ、GFP、RFP等。

[0159] 造血干细胞组合物

[0160] 本文提供的方法的造血干细胞及其组合物可以药物组合物的形式提供，其包含在足够无菌的条件下制备供人类施用的等渗赋形剂。组合物的细胞赋形剂和任何随附元素的选择根据用于施用的途径和装置而调整。有关药物制剂中的一般原则，读者可参考Cell Therapy:Stem Cell Transplantation,Gene Therapy,and Cellular Immunotherapy,G.Morstyn&W.Sheridan编,Cambridge University Press,1996;和Hematopoietic Stem Cell Therapy,E.D.Ball,J.Lister&P.Law,Churchill Livingstone,2000。

[0161] 在一些情况下，造血干细胞在供者与受者之间可以为HLA配型相合的。在其它情况下，造血干细胞在供者与受者之间可以为HLA配型不合的。

[0162] 在一些情况下，药物组合物可包含增强造血细胞在受者中的植入的药剂。在其它情况下，药物组合物可包含不影响造血细胞在受者中的植入的药剂。在一些情况下，药物组合物可包含防止受者对造血细胞的负面反应的药剂。例如，如上所述的任何药剂可以是细胞因子、趋化因子、生长因子、赋形剂、载体、惰性分子、抗体或其片段、小分子、药物、激动剂、拮抗剂、化学品等。在受者中用于造血细胞药物组合物的任何药剂是生理上可接受的。

[0163] 多种方法可用于将造血细胞递送给受者，并且本领域技术人员已知的任何方法均可适用于本文所述的造血细胞。例如，可通过使用针、导管、中央导管等注射而将造血细胞递送给受者。在一些情况下，造血细胞可通过以下方式递送:经血管内、静脉内、动脉内、颅内、腹腔内、皮下、肌内、眶内或通过允许造血细胞回到受者中的适当部位以使得造血细胞在受者中存留、再生和分化的任何来源。

[0164] 工程化造血细胞组合物还可以包含或伴有有利于细胞的植入或功能动员的一种或多种其它成分。例如，成分可包括支持细胞、促进细胞或补充细胞类型(例如，内皮细胞)粘附的基质蛋白。

[0165] 在一些情况下，造血细胞可回到受者内的器官、组织或细胞类型。例如，器官可以是脑、甲状腺、眼、皮肤、肺、胰腺、脾脏、膀胱、前列腺、肾、胃、肝、心脏、肾上腺、支气管、大肠、小肠、脊髓、骨、骨髓、脑下垂体、唾液腺、胆囊、喉、淋巴结、前列腺、骨骼肌、阑尾、食道、甲状旁腺、气管、尿道、卵巢、睾丸、子宫、输尿管、输卵管或体内的任何腺体。在一些情况下，

组织或细胞类型可以为器官的一部分。在一些情况下，组织或细胞类型可来源于器官。在一些情况下，组织或细胞类型可从器官分离。

[0166] 在一些情况下，造血干细胞的受者可以未接受实体器官移植。在其它情况下，受者可以已经接受了实体器官移植。在一些情况下，实体器官移植可在向受者施用工程化造血干细胞前至少0.1天、0.2天、0.3天、0.4天、0.5天、0.6天、0.7天、0.8天、0.9天、1.0天、1.1天、1.2天、1.3天、1.4天、1.5天、1.6天、1.7天、1.8天、1.9天、2.0天、2.1天、2.2天、2.3天、2.4天、2.5天、2.6天、2.7天、2.8天、2.9天、3.0天、3.1天、3.2天、3.3天、3.4天、3.5天、3.6天、3.7天、3.8天、3.9天、4.0天、4.1天、4.2天、4.3天、4.4天、4.5天、4.6天、4.7天、4.8天、4.9天、5.0天、5.1天、5.2天、5.3天、5.4天、5.5天、5.6天、5.7天、5.8天、5.9天、6.0天、6.1天、6.2天、6.3天、6.4天、6.5天、6.6天、6.7天、6.8天、6.9天、7.0天、7.1天、7.2天、7.3天、7.4天、7.5天、7.6天、7.7天、7.8天、7.9天、8.0天、8.1天、8.2天、8.3天、8.4天、8.5天、8.6天、8.7天、8.8天、8.9天、9.0天、9.1天、9.2天、9.3天、9.4天、9.5天、9.6天、9.7天、9.8天、9.9天、10天、10.5天、11天、11.5天、12天、12.5天、13天、13.5天、14天、14.5天、15天、15.5天、16天、16.5天、17天、17.5天、18天、18.5天、19天、20天、20.5天、21天、21.5天、22天、22.5天、23天、23.5天、24天、24.5天、25天、25.5天、26天、26.5天、27天、27.5天、28天、28.5天、29天、30天、30.5天、31天、31.5天、32天、32.5天、33天、33.5天、34天、34.5天、35天、35.5天、36天、36.5天、37天、37.5天、38天、38.5天、39天、40天、40.5天、41天、41.5天、42天、42.5天、43天、43.5天、44天、44.5天、45天、45.5天、46天、46.5天、47天、47.5天、48天、48.5天、49天或至少50天进行。

[0167] 在一些情况下，可向实体器官移植受者施用一个剂量的工程化造血干细胞。在其它情况下，可向实体器官移植受者施用多于一个剂量的工程化造血干细胞。在一些情况下，在每个工程化造血干细胞剂量之间流逝的时间可以相同。在其它情况下，在每个工程化造血干细胞剂量之间流逝的时间可以不同。

[0168] 例如，可在实体器官移植后至少0.1天、0.2天、0.3天、0.4天、0.5天、0.6天、0.7天、0.8天、0.9天、1.0天、1.1天、1.2天、1.3天、1.4天、1.5天、1.6天、1.7天、1.8天、1.9天、2.0天、2.1天、2.2天、2.3天、2.4天、2.5天、2.6天、2.7天、2.8天、2.9天、3.0天、3.1天、3.2天、3.3天、3.4天、3.5天、3.6天、3.7天、3.8天、3.9天、4.0天、4.1天、4.2天、4.3天、4.4天、4.5天、4.6天、4.7天、4.8天、4.9天、5.0天、5.1天、5.2天、5.3天、5.4天、5.5天、5.6天、5.7天、5.8天、5.9天、6.0天、6.1天、6.2天、6.3天、6.4天、6.5天、6.6天、6.7天、6.8天、6.9天、7.0天、7.1天、7.2天、7.3天、7.4天、7.5天、7.6天、7.7天、7.8天、7.9天、8.0天、8.1天、8.2天、8.3天、8.4天、8.5天、8.6天、8.7天、8.8天、8.9天、9.0天、9.1天、9.2天、9.3天、9.4天、9.5天、9.6天、9.7天、9.8天、9.9天、10天、10.5天、11天、11.5天、12天、12.5天、13天、13.5天、14天、14.5天、15天、15.5天、16天、16.5天、17天、17.5天、18天、18.5天、19天、20天、20.5天、21天、21.5天、22天、22.5天、23天、23.5天、24天、24.5天、25天、25.5天、26天、26.5天、27天、27.5天、28天、28.5天、29天、30天、30.5天、31天、31.5天、32天、32.5天、33天、33.5天、34天、34.5天、35天、35.5天、36天、36.5天、37天、37.5天、38天、38.5天、39天、40天、40.5天、41天、41.5天、42天、42.5天、43天、43.5天、44天、44.5天、45天、45.5天、46天、46.5天、47天、47.5天、48天、48.5天、49天或至少50天向实体器官移植受者施用第一剂量的工程化造血干细胞。

[0169] 在一些情况下，可向受者施用第二剂量的工程化造血干细胞。在一些情况下，实体器官移植可在施用第一剂量的工程化造血干细胞后至少0.1天、0.2天、0.3天、0.4天、0.5天、0.6天、0.7天、0.8天、0.9天、1.0天、1.1天、1.2天、1.3天、1.4天、1.5天、1.6天、1.7天、1.8天、1.9天、2.0天、2.1天、2.2天、2.3天、2.4天、2.5天、2.6天、2.7天、2.8天、2.9天、3.0天、3.1天、3.2天、3.3天、3.4天、3.5天、3.6天、3.7天、3.8天、3.9天、4.0天、4.1天、4.2天、4.3天、4.4天、4.5天、4.6天、4.7天、4.8天、4.9天、5.0天、5.1天、5.2天、5.3天、5.4天、5.5天、5.6天、5.7天、5.8天、5.9天、6.0天、6.1天、6.2天、6.3天、6.4天、6.5天、6.6天、6.7天、6.8天、6.9天、7.0天、7.1天、7.2天、7.3天、7.4天、7.5天、7.6天、7.7天、7.8天、7.9天、8.0天、8.1天、8.2天、8.3天、8.4天、8.5天、8.6天、8.7天、8.8天、8.9天、9.0天、9.1天、9.2天、9.3天、9.4天、9.5天、9.6天、9.7天、9.8天、9.9天、10天、10.5天、11天、11.5天,12天、12.5天、13天、13.5天、14天、14.5天、15天、15.5天、16天、16.5天、17天、17.5天、18天、18.5天、19天、20天、20.5天、21天、21.5天、22天、22.5天、23天、23.5天、24天、24.5天、25天、25.5天、26天、26.5天、27天、27.5天、28天、28.5天、29天、30天、30.5天、31天、31.5天、32天、32.5天、33天、33.5天、34天、34.5天、35天、35.5天、36天、36.5天、37天、37.5天、38天、38.5天、39天、40天、40.5天、41天、41.5天、42天、42.5天、43天、43.5天、44天、44.5天、45天、45.5天、46天、46.5天、47天、47.5天、48天、48.5天、49天或至少50天进行，以使得工程化造血干细胞的施用为递归的。

[0170] 在一些情况下，可向实体器官移植受者施用多于两个剂量的工程化造血干细胞。例如，可在第二和第三剂量的工程化造血干细胞的施用之间经过至少.1天、0.2天、0.3天、0.4天、0.5天、0.6天、0.7天、0.8天、0.9天、1.0天、1.1天、1.2天、1.3天、1.4天、1.5天、1.6天、1.7天、1.8天、1.9天、2.0天、2.1天、2.2天、2.3天、2.4天、2.5天、2.6天、2.7天、2.8天、2.9天、3.0天、3.1天、3.2天、3.3天、3.4天、3.5天、3.6天、3.7天、3.8天、3.9天、4.0天、4.1天、4.2天、4.3天、4.4天、4.5天、4.6天、4.7天、4.8天、4.9天、5.0天、5.1天、5.2天、5.3天、5.4天、5.5天、5.6天、5.7天、5.8天、5.9天、6.0天、6.1天、6.2天、6.3天、6.4天、6.5天、6.6天、6.7天、6.8天、6.9天、7.0天、7.1天、7.2天、7.3天、7.4天、7.5天、7.6天、7.7天、7.8天、7.9天、8.0天、8.1天、8.2天、8.3天、8.4天、8.5天、8.6天、8.7天、8.8天、8.9天、9.0天、9.1天、9.2天、9.3天、9.4天、9.5天、9.6天、9.7天、9.8天、9.9天、10天、10.5天、11天、11.5天、12天、12.5天、13天、13.5天、14天、14.5天、15天、15.5天、16天、16.5天、17天、17.5天、18天、18.5天、19天、20天、20.5天、21天、21.5天、22天、22.5天、23天、23.5天、24天、24.5天、25天、25.5天、26天、26.5天、27天、27.5天、28天、28.5天、29天、30天、30.5天、31天、31.5天、32天、32.5天、33天、33.5天、34天、34.5天、35天、35.5天、36天、36.5天、37天、37.5天、38天、38.5天、39天、40天、40.5天、41天、41.5天、42天、42.5天、43天、43.5天、44天、44.5天、45天、45.5天、46天、46.5天、47天、47.5天、48天、48.5天、49天或至少50天，以使得工程化造血干细胞的施用为递归的。

[0171] 也可在第三与第四剂量、第四与第五剂量、第五与第六剂量、第六与第七剂量、第七与第八剂量、第八与第九剂量、第九与第十剂量等等之间经过任何上述时间范围。

[0172] 非清髓性预处理

[0173] 在移植HLA配型相合或HLA配型不合的实体器官后，可将受者用非清髓性预处理来处理。在一些情况下，可使用本领域技术人员已知的方法来进行非清髓性预处理。在其它情

况下,受者可接受包括多种药剂的非清髓性预处理。在一些情况下,药剂可包括甲状腺球蛋白(ATG)、T细胞耗竭剂和/或照射。

[0174] 在一些情况下,可经静脉内递送ATG。在一些情况下,可向受者递送单剂量的ATG。在其它情况下,受者可接受多于一个剂量的ATG。例如,受者可接受至少一个剂量的ATG、两个剂量的ATG、三个剂量的ATG、四个剂量的ATG、五个剂量的ATG、六个剂量的ATG、七个剂量的ATG、八个剂量的ATG、九个剂量的ATG、10个剂量的ATG、11个剂量的ATG、12个剂量的ATG、13个剂量的ATG、14个剂量的ATG、15个剂量的ATG、16个剂量的ATG、17个剂量的ATG、18个剂量的ATG、19个剂量的ATG或至少20个剂量的ATG。

[0175] 在一些情况下,每个ATG剂量可为至少0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3.0mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5.0mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6.0mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7.0mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8.0mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9.0mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10mg/kg、10.5mg/kg、11mg/kg、11.5mg/kg、12mg/kg、12.5mg/kg、13mg/kg、13.5mg/kg、14mg/kg、14.5mg/kg、15mg/kg、15.5mg/kg、16mg/kg、16.5mg/kg、17mg/kg、17.5mg/kg、18mg/kg、18.5mg/kg、19mg/kg或至少20mg/kg。

[0176] ATG可在实体器官移植的当天施用。在一些情况下,可在器官移植后的一段时间内施用多个ATG剂量。在一些情况下,多个ATG剂量可在至少0.1天、0.2天、0.3天、0.4天、0.5天、0.6天、0.7天、0.8天、0.9天、1.0天、1.1天、1.2天、1.3天、1.4天、1.5天、1.6天、1.7天、1.8天、1.9天、2.0天、2.1天、2.2天、2.3天、2.4天、2.5天、2.6天、2.7天、2.8天、2.9天、3.0天、3.1天、3.2天、3.3天、3.4天、3.5天、3.6天、3.7天、3.8天、3.9天、4.0天、4.1天、4.2天、4.3天、4.4天、4.5天、4.6天、4.7天、4.8天、4.9天、5.0天、5.1天、5.2天、5.3天、5.4天、5.5天、5.6天、5.7天、5.8天、5.9天、6.0天、6.1天、6.2天、6.3天、6.4天、6.5天、6.6天、6.7天、6.8天、6.9天、7.0天、7.1天、7.2天、7.3天、7.4天、7.5天、7.6天、7.7天、7.8天、7.9天、8.0天、8.1天、8.2天、8.3天、8.4天、8.5天、8.6天、8.7天、8.8天、8.9天、9.0天、9.1天、9.2天、9.3天、9.4天、9.5天、9.6天、9.7天、9.8天、9.9天、10天、10.5天、11天、11.5天、12天、12.5天、13天、13.5天、14天、14.5天、15天、15.5天、16天、16.5天、17天、17.5天、18天、18.5天、19天或至少20天的时间段内施用。

[0177] 在一些情况下,将ATG在用宿主血灌注移植的器官之前在术中递送。在其它情况下,将ATG在用宿主血灌注移植的器官之后在术中递送。在一些情况下,将ATG在用宿主血灌注移植的器官之前经静脉内递送。在其它情况下,将ATG在用宿主血灌注移植的器官之后经

静脉内递送。在一些情况下，将ATG在用宿主血灌注移植的器官之前经动脉内递送。在其它情况下，将ATG在用宿主血灌注移植的器官之后经动脉内递送。在一些情况下，将ATG在用宿主血灌注移植的器官之前经皮下递送。在其它情况下，将ATG在用宿主血灌注移植的器官之后经皮下递送。在一些情况下，将ATG在用宿主血灌注移植的器官之前经腹腔内递送。在其它情况下，将ATG在用宿主血灌注移植的器官之后经腹腔内递送。

[0178] 可在施用ATG前给予皮质类固醇疗法作为药物治疗。在一些情况下，可施用甲强龙，但可以按有效的剂量使用足以减轻ATG副作用的本领域技术人员已知的任何皮质类固醇。在一些情况下，在施用ATG的当天施用皮质类固醇。例如，甲强龙可按0-40mg、5-50mg、10-60mg、15-65mg、20-70mg、25-75mg、30-80mg、35-85mg、40-90mg、45-95mg、50-100mg、55-105mg、60-110mg、65-115mg、70-120mg、75-125mg、80-130mg、85-135mg、90-140mg、95-145mg、100-150mg、105-155mg、110-160mg、115-165mg、120-170mg、125-175mg、130-180mg、135-185mg、140-190mg、145-195mg或150-200mg范围内的剂量施用。

[0179] 在将最终剂量的ATG施用给受者后，可施用泼尼松。在一些情况下，可施用单剂量的泼尼松。在其它情况下，可施用多于一个剂量的泼尼松。例如，可根据逐渐降低的过程或恒定的过程施用多个剂量的泼尼松。

[0180] 在一些情况下，对于逐渐降低的过程，第一剂量的泼尼松可始于100mg/d然后剂量降低5mg/d直到在5mg/d恒定至少15天，第一剂量的泼尼松可始于90mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少15天，第一剂量的泼尼松可始于80mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少15天，第一剂量的泼尼松可始于70mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少15天，第一剂量的泼尼松可始于60mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少15天，第一剂量的泼尼松可始于50mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少15天，第一剂量的泼尼松可始于40mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少15天，第一剂量的泼尼松可始于30mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少15天，第一剂量的泼尼松可始于20mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少15天或第一剂量的泼尼松可始于10mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少15天。在一些情况下，对于恒定的过程，泼尼松的剂量可以为100mg/d、90mg/d、80mg/d、70mg/d、60mg/d、50mg/d、40mg/d、30mg/d、20mg/d、10mg/d或5mg/d持续至少15天。

[0181] 在一些情况下，对于逐渐降低的过程，第一剂量的泼尼松可始于100mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少30天，第一剂量的泼尼松可始于90mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少30天，第一剂量的泼尼松可始于80mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少30天，第一剂量的泼尼松可始于70mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少30天，第一剂量的泼尼松可始于60mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少30天，第一剂量的泼尼松可始于50mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少30天，第一剂量的泼尼松可始于40mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少30天，第一剂量的泼尼松可始于30mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少30天，第一剂量的泼尼松可始于20mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少30天或第一剂量的泼尼松可始于10mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少30天。在一些情况下，对于恒定的过程，泼尼松的剂量可以为100mg/d、90mg/d、80mg/d、70mg/d、60mg/d、50mg/d、40mg/d、30mg/d、20mg/d、10mg/d或5mg/d持续至少30天。

[0182] 在一些情况下，对于逐渐降低的过程，第一剂量的泼尼松可始于100mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少45天，第一剂量的泼尼松可始于90mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少45天，第一剂量的泼尼松可始于80mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少45天，第一剂量的泼尼松

可始于70mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少45天，第一剂量的泼尼松可始于60mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少45天，第一剂量的泼尼松可始于50mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少45天，第一剂量的泼尼松可始于40mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少45天，第一剂量的泼尼松可始于30mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少45天，第一剂量的泼尼松可始于20mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少45天或第一剂量的泼尼松可始于10mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少45天。在一些情况下，对于恒定的过程，泼尼松的剂量可以为100mg/d、90mg/d、80mg/d、70mg/d、60mg/d、50mg/d、40mg/d、30mg/d、20mg/d、10mg/d或5mg/d持续至少45天。

[0183] 在一些情况下，对于逐渐降低的过程，第一剂量的泼尼松可始于100mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少60天，第一剂量的泼尼松可始于90mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少60天，第一剂量的泼尼松可始于80mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少60天，第一剂量的泼尼松可始于70mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少60天，第一剂量的泼尼松可始于60mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少60天，第一剂量的泼尼松可始于50mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少60天，第一剂量的泼尼松可始于40mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少60天，第一剂量的泼尼松可始于30mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少60天，第一剂量的泼尼松可始于20mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少60天或第一剂量的泼尼松可始于10mg/d然后降低5mg/d直到恒定至少60天。在一些情况下，对于恒定的过程，泼尼松的剂量可以为100mg/d、90mg/d、80mg/d、70mg/d、60mg/d、50mg/d、40mg/d、30mg/d、20mg/d、10mg/d或5mg/d持续至少60天。

[0184] 可经血管内、静脉内、动脉内、颅内、腹腔内、皮下、肌内、眶内、口腔、局部或通过允许皮质类固醇和/或泼尼松被受者正确代谢的任何来源施用皮质类固醇和/或泼尼松。

[0185] 在一些情况下，可将本领域技术人员已知的任何T细胞耗竭剂用作受者的非清髓性预处理方案的一部分。在一些情况下，T细胞耗竭剂可以是抗-T细胞单克隆抗体或T细胞耗竭药物(例如，氟达拉滨)。在一些情况下，向受者施用单种T细胞耗竭剂。在其它情况下，向受者施用多于一种T细胞耗竭剂。

[0186] 在一些情况下，可经静脉内递送T细胞耗竭剂。在一些情况下，可向受者递送单剂量的T细胞耗竭剂。在其它情况下，受者可接受多于一个剂量的T细胞耗竭剂。例如，受者可接受至少一个剂量的T细胞耗竭剂、两个剂量的T细胞耗竭剂、三个剂量的T细胞耗竭剂、四个剂量的T细胞耗竭剂、五个剂量的T细胞耗竭剂、六个剂量的T细胞耗竭剂、七个剂量的T细胞耗竭剂、八个剂量的T细胞耗竭剂、九个剂量的T细胞耗竭剂、10个剂量的T细胞耗竭剂、11个剂量的T细胞耗竭剂、12个剂量的T细胞耗竭剂、13个剂量的T细胞耗竭剂、14个剂量的T细胞耗竭剂、15个剂量的T细胞耗竭剂、16个剂量的T细胞耗竭剂、17个剂量的T细胞耗竭剂、18个剂量的T细胞耗竭剂、19个剂量的T细胞耗竭剂或20个剂量的T细胞耗竭剂。

[0187] 可在实体器官移植的当天施用T细胞耗竭剂。在一些情况下，可在器官移植后的一段时间内递送多个T细胞耗竭剂剂量。在一些情况下，多个T细胞耗竭剂剂量可在至少0.1天、0.2天、0.3天、0.4天、0.5天、0.6天、0.7天、0.8天、0.9天、1.0天、1.1天、1.2天、1.3天、1.4天、1.5天、1.6天、1.7天、1.8天、1.9天、2.0天、2.1天、2.2天、2.3天、2.4天、2.5天、2.6天、2.7天、2.8天、2.9天、3.0天、3.1天、3.2天、3.3天、3.4天、3.5天、3.6天、3.7天、3.8天、3.9天、4.0天、4.1天、4.2天、4.3天、4.4天、4.5天、4.6天、4.7天、4.8天、4.9天、5.0天、5.1天、5.2天、5.3天、5.4天、5.5天、5.6天、5.7天、5.8天、5.9天、6.0天、6.1天、6.2天、6.3天、6.4天、6.5天、6.6天、6.7天、6.8天、6.9天、7.0天、7.1天、7.2天、7.3天、7.4天、7.5天、7.6

天、7.7天、7.8天、7.9天、8.0天、8.1天、8.2天、8.3天、8.4天、8.5天、8.6天、8.7天、8.8天、8.9天、9.0天、9.1天、9.2天、9.3天、9.4天、9.5天、9.6天、9.7天、9.8天、9.9天、10天、10.5天、11天、11.5天、12天、12.5天、13天、13.5天、14天、14.5天、15天、15.5天、16天、16.5天、17天、17.5天、18天、18.5天、19天或至少20天的时间段内递送。

[0188] 在一些情况下，T细胞耗竭剂在用宿主血灌注移植的器官之前在术中递送。在其它情况下，T细胞耗竭剂在用宿主血灌注移植的器官之后在术中递送。在一些情况下，T细胞耗竭剂在用宿主血灌注移植的器官之前经静脉内递送。在其它情况下，T细胞耗竭剂在用宿主血灌注移植的器官之后经静脉内递送。在一些情况下，T细胞耗竭剂在用宿主血灌注移植的器官之前经动脉内递送。在其它情况下，T细胞耗竭剂在用宿主血灌注移植的器官之后经动脉内递送。在一些情况下，T细胞耗竭剂在用宿主血灌注移植的器官之前经皮下递送。在其它情况下，T细胞耗竭剂在用宿主血灌注移植的器官之后经皮下递送。在一些情况下，T细胞耗竭剂在用宿主血灌注移植的器官之前经腹腔内递送。在其它情况下，T细胞耗竭剂在用宿主血灌注移植的器官之后经腹腔内递送。

[0189] 在一些情况下，可经静脉内递送氟达拉滨。在一些情况下，可向受者递送单剂量的氟达拉滨。在其它情况下，受者可接受多于一个剂量的氟达拉滨。例如，受者可接受至少一个剂量的氟达拉滨、两个剂量的氟达拉滨、三个剂量的氟达拉滨、四个剂量的氟达拉滨、五个剂量的氟达拉滨、六个剂量的氟达拉滨、七个剂量的氟达拉滨、八个剂量的氟达拉滨、九个剂量的氟达拉滨、10个剂量的氟达拉滨、11个剂量的氟达拉滨、12个剂量的氟达拉滨、13个剂量的氟达拉滨、14个剂量的氟达拉滨、15个剂量的氟达拉滨、16个剂量的氟达拉滨、17个剂量的氟达拉滨、18个剂量的氟达拉滨、19个剂量的氟达拉滨或至少20个剂量的氟达拉滨。

[0190] 在一些情况下，每个氟达拉滨剂量可为至少0.1mg/m2/d、0.2mg/m2/d、0.3mg/m2/d、0.4mg/m2/d、0.5mg/m2/d、0.6mg/m2/d、0.7mg/m2/d、0.8mg/m2/d、0.9mg/m2/d、1.0mg/m2/d、1.1mg/m2/d、1.2mg/m2/d、1.3mg/m2/d、1.4mg/m2/d、1.5mg/m2/d、1.6mg/m2/d、1.7mg/m2/d、1.8mg/m2/d、1.9mg/m2/d、2.0mg/m2/d、2.1mg/m2/d、2.2mg/m2/d、2.3mg/m2/d、2.4mg/m2/d、2.5mg/m2/d、2.6mg/m2/d、2.7mg/m2/d、2.8mg/m2/d、2.9mg/m2/d、3.0mg/m2/d、3.1mg/m2/d、3.2mg/m2/d、3.3mg/m2/d、3.4mg/m2/d、3.5mg/m2/d、3.6mg/m2/d、3.7mg/m2/d、3.8mg/m2/d、3.9mg/m2/d、4.0mg/m2/d、4.1mg/m2/d、4.2mg/m2/d、4.3mg/m2/d、4.4mg/m2/d、4.5mg/m2/d、4.6mg/m2/d、4.7mg/m2/d、4.8mg/m2/d、4.9mg/m2/d、5.0mg/m2/d、5.1mg/m2/d、5.2mg/m2/d、5.3mg/m2/d、5.4mg/m2/d、5.5mg/m2/d、5.6mg/m2/d、5.7mg/m2/d、5.8mg/m2/d、5.9mg/m2/d、6.0mg/m2/d、6.1mg/m2/d、6.2mg/m2/d、6.3mg/m2/d、6.4mg/m2/d、6.5mg/m2/d、6.6mg/m2/d、6.7mg/m2/d、6.8mg/m2/d、6.9mg/m2/d、7.0mg/m2/d、7.1mg/m2/d、7.2mg/m2/d、7.3mg/m2/d、7.4mg/m2/d、7.5mg/m2/d、7.6mg/m2/d、7.7mg/m2/d、7.8mg/m2/d、7.9mg/m2/d、8.0mg/m2/d、8.1mg/m2/d、8.2mg/m2/d、8.3mg/m2/d、8.4mg/m2/d、8.5mg/m2/d、8.6mg/m2/d、8.7mg/m2/d、8.8mg/m2/d、8.9mg/m2/d、9.0mg/m2/d、9.1mg/m2/d、9.2mg/m2/d、9.3mg/m2/d、9.4mg/m2/d、9.5mg/m2/d、9.6mg/m2/d、9.7mg/m2/d、9.8mg/m2/d、9.9mg/m2/d、10mg/m2/d、10.5mg/m2/d、11mg/m2/d、11.5mg/m2/d、12mg/m2/d、12.5mg/m2/d、13mg/m2/d、13.5mg/m2/d、14mg/m2/d、14.5mg/m2/d、15mg/m2/d、15.5mg/m2/d、16mg/m2/d、16.5mg/m2/d、17mg/m2/d、17.5mg/m2/d、18mg/m2/d、18.5mg/m2/d、19mg/m2/d、20mg/m2/d、20.5mg/m2/d、21mg/m2/d、21.5mg/

m2/d、22mg/m2/d、22.5mg/m2/d、23mg/m2/d、23.5mg/m2/d、24mg/m2/d、24.5mg/m2/d、25mg/m2/d、25.5mg/m2/d、26mg/m2/d、26.5mg/m2/d、27mg/m2/d、27.5mg/m2/d、28mg/m2/d、28.5mg/m2/d、29mg/m2/d、30mg/m2/d、30.5mg/m2/d、31mg/m2/d、31.5mg/m2/d、32mg/m2/d、32.5mg/m2/d、33mg/m2/d、33.5mg/m2/d、34mg/m2/d、34.5mg/m2/d、35mg/m2/d、35.5mg/m2/d、36mg/m2/d、36.5mg/m2/d、37mg/m2/d、37.5mg/m2/d、38mg/m2/d、38.5mg/m2/d、39mg/m2/d、40mg/m2/d、40.5mg/m2/d、41mg/m2/d、41.5mg/m2/d、42mg/m2/d、42.5mg/m2/d、43mg/m2/d、43.5mg/m2/d、44mg/m2/d、44.5mg/m2/d、45mg/m2/d、45.5mg/m2/d、46mg/m2/d、46.5mg/m2/d、47mg/m2/d、47.5mg/m2/d、48mg/m2/d、48.5mg/m2/d、49mg/m2/d、50mg/m2/d、50.5mg/m2/d、51mg/m2/d、51.5mg/m2/d、52mg/m2/d、52.5mg/m2/d、53mg/m2/d、53.5mg/m2/d、54mg/m2/d、54.5mg/m2/d、55mg/m2/d、55.5mg/m2/d、56mg/m2/d、56.5mg/m2/d、57mg/m2/d、57.5mg/m2/d、58mg/m2/d、58.5mg/m2/d、59mg/m2/d或至少60mg/m2/d。

[0191] 可在实体器官移植的当天施用氟达拉滨。在一些情况下，可在器官移植后的一段时间内递送多个氟达拉滨剂量。在一些情况下，多个氟达拉滨剂量可在至少0.1天、0.2天、0.3天、0.4天、0.5天、0.6天、0.7天、0.8天、0.9天、1.0天、1.1天、1.2天、1.3天、1.4天、1.5天、1.6天、1.7天、1.8天、1.9天、2.0天、2.1天、2.2天、2.3天、2.4天、2.5天、2.6天、2.7天、2.8天、2.9天、3.0天、3.1天、3.2天、3.3天、3.4天、3.5天、3.6天、3.7天、3.8天、3.9天、4.0天、4.1天、4.2天、4.3天、4.4天、4.5天、4.6天、4.7天、4.8天、4.9天、5.0天、5.1天、5.2天、5.3天、5.4天、5.5天、5.6天、5.7天、5.8天、5.9天、6.0天、6.1天、6.2天、6.3天、6.4天、6.5天、6.6天、6.7天、6.8天、6.9天、7.0天、7.1天、7.2天、7.3天、7.4天、7.5天、7.6天、7.7天、7.8天、7.9天、8.0天、8.1天、8.2天、8.3天、8.4天、8.5天、8.6天、8.7天、8.8天、8.9天、9.0天、9.1天、9.2天、9.3天、9.4天、9.5天、9.6天、9.7天、9.8天、9.9天、10天、10.5天、11天、11.5天、12天、12.5天、13天、13.5天、14天、14.5天、15天、15.5天、16天、16.5天、17天、17.5天、18天、18.5天、19天或至少20天的时间段内递送。

[0192] 在一些情况下，将氟达拉滨在用宿主血灌注移植的器官之前在术中递送。在其它情况下，将氟达拉滨在用宿主血灌注移植的器官之后在术中递送。在一些情况下，将氟达拉滨在用宿主血灌注移植的器官之前经静脉内递送。在其它情况下，将氟达拉滨在用宿主血灌注移植的器官之后经静脉内递送。在一些情况下，将氟达拉滨在用宿主血灌注移植的器官之前经动脉内递送。在其它情况下，将氟达拉滨在用宿主血灌注移植的器官之后经动脉内递送。在一些情况下，将氟达拉滨在用宿主血灌注移植的器官之前经皮下递送。在其它情况下，将氟达拉滨在用宿主血灌注移植的器官之后经皮下递送。在一些情况下，将氟达拉滨在用宿主血灌注移植的器官之前经腹腔内递送。在其它情况下，将氟达拉滨在用宿主血灌注移植的器官之后经腹腔内递送。

[0193] 在一些情况下，将受者用照射处理。照射可分次或不分次。在将受者用多于一个剂量的照射处理的情况下，所有剂量均可分次。在将受者用多于一个剂量的照射处理的另一种情况下，所有剂量均可不分次。在将受者用多于一个剂量的照射处理的另一种情况下，剂量可以是分次与不分次的混合形式。

[0194] 在一些情况下，照射在术中递送。在一些情况下，照射经静脉内递送。在一些情况下，照射经动脉内递送。在一些情况下，照射经皮下递送。在一些情况下，照射经腹腔内递送。

[0195] 在一些情况下，可向受者递送单剂量的照射。在其它情况下，受者可接受多于一个剂量的照射。例如，受者可接受至少一个剂量的照射、两个剂量的照射、三个剂量的照射、四个剂量的照射、五个剂量的照射、六个剂量的照射、七个剂量的照射、八个剂量的照射、九个剂量的照射、10个剂量的照射、11个剂量的照射、12个剂量的照射、13个剂量的照射、14个剂量的照射、15个剂量的照射、16个剂量的照射、17个剂量的照射、18个剂量的照射、19个剂量的照射或至少20个剂量的照射。

[0196] 在一些情况下，每个照射剂量可为至少1cGy、2cGy、3cGy、4cGy、5cGy、6cGy、7cGy、8cGy、9cGy、10cGy、11cGy、12cGy、13cGy、14cGy、15cGy、16cGy、17cGy、18cGy、19cGy、20cGy、21cGy、22cGy、23cGy、24cGy、25cGy、26cGy、27cGy、28cGy、29cGy、30cGy、31cGy、32cGy、33cGy、34cGy、35cGy、36cGy、37cGy、38cGy、39cGy、40cGy、41cGy、42cGy、43cGy、44cGy、45cGy、46cGy、47cGy、48cGy、49cGy、50cGy、51cGy、52cGy、53cGy、54cGy、55cGy、56cGy、57cGy、58cGy、59cGy、60cGy、61cGy、62cGy、63cGy、64cGy、65cGy、66cGy、67cGy、68cGy、69cGy、70cGy、71cGy、72cGy、73cGy、74cGy、75cGy、76cGy、77cGy、78cGy、79cGy、80cGy、81cGy、82cGy、83cGy、84cGy、85cGy、86cGy、87cGy、88cGy、89cGy、90cGy、91cGy、92cGy、93cGy、94cGy、95cGy、96cGy、97cGy、98cGy、99cGy、100cGy、105cGy、110cGy、115cGy、120cGy、125cGy、130cGy、135cGy、140cGy、145cGy、150cGy、155cGy、160cGy、165cGy、170cGy、175cGy、180cGy、185cGy、190cGy、195cGy、200cGy、205cGy、210cGy、215cGy、220cGy、225cGy、230cGy、235cGy、240cGy、245cGy、250cGy、255cGy、260cGy、265cGy、270cGy、275cGy、280cGy、285cGy、290cGy、295cGy、300cGy、305cGy、310cGy、315cGy、320cGy、325cGy、330cGy、335cGy、340cGy、345cGy、350cGy、355cGy、360cGy、365cGy、370cGy、375cGy、380cGy、385cGy、390cGy、395cGy、400cGy、405cGy、410cGy、415cGy、420cGy、425cGy、430cGy、435cGy、440cGy、445cGy、450cGy、455cGy、460cGy、465cGy、470cGy、475cGy、480cGy、485cGy、490cGy、495cGy或至少500cGy。

[0197] 可在实体器官移植的当天施用照射。在一些情况下，可在器官移植后的一段时间内递送多个照射剂量。在一些情况下，多个照射剂量可在至少0.1天、0.2天、0.3天、0.4天、0.5天、0.6天、0.7天、0.8天、0.9天、1.0天、1.1天、1.2天、1.3天、1.4天、1.5天、1.6天、1.7天、1.8天、1.9天、2.0天、2.1天、2.2天、2.3天、2.4天、2.5天、2.6天、2.7天、2.8天、2.9天、3.0天、3.1天、3.2天、3.3天、3.4天、3.5天、3.6天、3.7天、3.8天、3.9天、4.0天、4.1天、4.2天、4.3天、4.4天、4.5天、4.6天、4.7天、4.8天、4.9天、5.0天、5.1天、5.2天、5.3天、5.4天、5.5天、5.6天、5.7天、5.8天、5.9天、6.0天、6.1天、6.2天、6.3天、6.4天、6.5天、6.6天、6.7天、6.8天、6.9天、7.0天、7.1天、7.2天、7.3天、7.4天、7.5天、7.6天、7.7天、7.8天、7.9天、8.0天、8.1天、8.2天、8.3天、8.4天、8.5天、8.6天、8.7天、8.8天、8.9天、9.0天、9.1天、9.2天、9.3天、9.4天、9.5天、9.6天、9.7天、9.8天、9.9天、10天、10.5天、11天、11.5天、12天、12.5天、13天、13.5天、14天、14.5天、15天、15.5天、16天、16.5天、17天、17.5天、18天、18.5天、19天、20天、20.5天、21天、21.5天、22天、22.5天、23天、23.5天、24天、24.5天、25天、25.5天、26天、26.5天、27天、27.5天、28天、28.5天、29天、30天、30.5天、31天、31.5天、32天、32.5天、33天、33.5天、34天、34.5天、35天、35.5天、36天、36.5天、37天、37.5天、38天、38.5天、39天、40天、40.5天、41天、41.5天、42天、42.5天、43天、43.5天、44天、44.5天、45天、45.5天、46天、46.5天、47天、47.5天、48天、48.5天、49天或至少50天的时间段内递送。

[0198] 在一些情况下，在施用过程中以定期的间隔递送照射剂量。在其它情况下，在施用

过程中不以定期的间隔递送照射剂量。例如,可在移植后的第1至4天和第7至11天向胸腺递送照射。

[0199] 照射可靶向受者身体的特定位置。在一些情况下,照射可靶向组织、器官、身体区域或全身。在一些情况下,照射可靶向淋巴结、脾脏或胸腺或本领域技术人员已知的任何其它区域。在一些情况下,当将至少多于一个剂量的照射递送给患者时,照射可靶向相同的位置。在其它一些情况下,当将至少多于一个剂量的照射递送给患者时,照射可靶向不同的位置。

[0200] 在非清髓性预处理期间,可监控受者出现与非清髓性预处理相关的病症。此类疾病包括中性粒细胞减少症(例如,粒细胞<2,000/mL)、血小板减少(例如,血小板<60,000/mL)和继发性感染。在一些情况下,对于中性粒细胞减少症,可施用G-CSF(例如,10μg/kg/天)。在一些情况下,对于血小板减少或任何继发性感染,可施用本领域技术人员已知的任何标准治疗。

[0201] 在一些情况下,如果受者出现中性粒细胞减少症、血小板减少或任何继发性感染,则可暂时停止非清髓性预处理。一旦中性粒细胞减少症、血小板减少或任何继发性感染消退后,即可继续非清髓性预处理。在一些情况下,如果受者的白细胞计数低于1,000个细胞/mm^3,则可在非清髓性预处理后用G-CSF(例如,10μg/kg/天)治疗受者。

[0202] 免疫抑制和移植物管理

[0203] 在HLA配型相合或HLA配型不合的实体器官移植并施用工程化HLA配型相合或HLA配型不合的造血细胞后,受者可接受免疫抑制方案。免疫抑制方案可具有两个期:诱导期和维持期。诱导和维持期策略可使用不同的药物,其剂量经调整以实现目标治疗水平以增强受者中的长期移植持久性。在一些情况下,诱导期可在围术期开始。在一些情况下,诱导期可在移植后立即开始。在一些情况下,诱导期既可以是围术期也可以是移植后立即。在一些情况下,免疫抑制方案可作为维持疗法而继续,直到受者实现嵌合状态。例如,嵌合状态可以是如本文所述的稳定的混合嵌合状态。

[0204] 在一些情况下,免疫抑制方案可包括一种药剂。在其它情况下,免疫抑制方案可包括多于一种药剂。例如,免疫抑制方案的合适药剂可包括钙调磷酸酶抑制剂和/或佐剂。在一些情况下,主要的免疫抑制剂包括钙调磷酸酶抑制剂,其与结合蛋白组合以抑制钙调磷酸酶活性。在一些情况下,钙调磷酸酶抑制剂可以是他克莫司、环孢霉素A或本领域技术人员已知的任何钙调磷酸酶抑制剂,并且可以按作为钙调磷酸酶抑制剂而有效提供目标免疫抑制的剂量施用给受者。

[0205] 在一些情况下,环孢霉素A可在短于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或短于24个月的持续时间后从受者撤去。

[0206] 在一些情况下,环孢霉素A可在长于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或长于24个月的持续时间后从受者撤去。

[0207] 在一些情况下,环孢霉素A的剂量可在受者满足缺乏排斥和GVHD的临床标准后缓

慢地逐渐降低。例如，施用的环孢霉素A的总量可随着时间而减少。在一些情况下，环孢霉素A的逐渐降低可发生短于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或短于24个月的持续时间，以使得在逐渐降低方案结束时，环孢霉素A的剂量逐渐降低到零。在一些情况下，环孢霉素A的逐渐降低可发生长于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或长于24个月的持续时间，以使得在逐渐降低方案结束时，环孢霉素A的剂量逐渐降低到零。

[0208] 在一些情况下，环孢霉素A可通过单剂量递送给受者。在其它情况下，受者可接受多于一个剂量的环孢霉素A。例如，受者可接受至少一个剂量的环孢霉素A、两个剂量的环孢霉素A、三个剂量的环孢霉素A、四个剂量的环孢霉素A、五个剂量的环孢霉素A、六个剂量的环孢霉素A、七个剂量的环孢霉素A、八个剂量的环孢霉素A、九个剂量的环孢霉素A、10个剂量的环孢霉素A、11个剂量的环孢霉素A、12个剂量的环孢霉素A、13个剂量的环孢霉素A、14个剂量的环孢霉素A、15个剂量的环孢霉素A、16个剂量的环孢霉素A、17个剂量的环孢霉素A、18个剂量的环孢霉素A、19个剂量的环孢霉素A或20个剂量的环孢霉素A。

[0209] 在一些情况下，可在器官移植后的一段时间内递送多个环孢霉素A剂量。在一些情况下，多个环孢霉素A剂量可在至少0.1天、0.2天、0.3天、0.4天、0.5天、0.6天、0.7天、0.8天、0.9天、1.0天、1.1天、1.2天、1.3天、1.4天、1.5天、1.6天、1.7天、1.8天、1.9天、2.0天、2.1天、2.2天、2.3天、2.4天、2.5天、2.6天、2.7天、2.8天、2.9天、3.0天、3.1天、3.2天、3.3天、3.4天、3.5天、3.6天、3.7天、3.8天、3.9天、4.0天、4.1天、4.2天、4.3天、4.4天、4.5天、4.6天、4.7天、4.8天、4.9天、5.0天、5.1天、5.2天、5.3天、5.4天、5.5天、5.6天、5.7天、5.8天、5.9天、6.0天、6.1天、6.2天、6.3天、6.4天、6.5天、6.6天、6.7天、6.8天、6.9天、7.0天、7.1天、7.2天、7.3天、7.4天、7.5天、7.6天、7.7天、7.8天、7.9天、8.0天、8.1天、8.2天、8.3天、8.4天、8.5天、8.6天、8.7天、8.8天、8.9天、9.0天、9.1天、9.2天、9.3天、9.4天、9.5天、9.6天、9.7天、9.8天、9.9天、10天、10.5天、11天、11.5天、12天、12.5天、13天、13.5天、14天、14.5天、15天、15.5天、16天、16.5天、17天、17.5天、18天、18.5天、19天或至少20天的时间段内递送。

[0210] 在一些情况下，每个环孢霉素A剂量可为至少0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3.0mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5.0mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6.0mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7.0mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8.0mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、

8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9.0mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg或至少10mg/kg。

[0211] 在一些情况下，施用给患者的环孢霉素A的量可由血流中的环孢霉素A的量确定。例如，环孢霉素A可按一定的剂量施用以实现0-40mg、5-50mg、10-60mg、15-65mg、20-70mg、25-75mg、30-80mg、35-85mg、40-90mg、45-95mg、50-100mg、55-105mg、60-110mg、65-115mg、70-120mg、75-125mg、80-130mg、85-135mg、90-140mg、95-145mg、100-150mg、105-155mg、110-160mg、115-165mg、120-170mg、125-175mg、130-180mg、135-185mg、140-190mg、145-195mg、150-200mg、160-210mg、170-220mg、180-230mg、190-240mg、200-250mg、210-260mg、220-270mg、230-280mg、240-290mg、250-300mg、260-310mg、270-320mg、280-330mg、290-340mg、300-350mg、310-360mg、320-370mg、330-380mg、340-390mg、350-400mg、360-410mg、370-420mg、380-430mg、390-440mg、400-450mg、410-460mg、420-470mg、430-480mg、440-490mg、450-500mg、46-510mg、470-520mg、480-530mg、490-540mg、500-550mg、510-560mg、520-570mg、530-580mg、540-590mg、550-600mg、560-610mg、570-620mg、580-630mg、590-640mg、600-650mg、610-660mg、620-670mg、630-680mg、640-690mg、650-700mg或高于700mg的范围。

[0212] 在一些情况下，他克莫司可在长于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或长于24个月的持续时间后从受者撤去。在一些情况下，他克莫司的剂量可在受者满足缺乏排斥和GVHD的临床标准的前提下缓慢地逐渐降低。例如，施用的他克莫司的总量可随着时间而减少。在一些情况下，他克莫司的逐渐降低可发生短于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或短于24个月的持续时间，以使得在逐渐降低方案结束时，他克莫司的剂量逐渐降低到零。

[0213] 在一些情况下，他克莫司可在短于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或短于24个月的持续时间后从受者撤去。在一些情况下，他克莫司的剂量可在受者满足缺乏排斥和GVHD的临床标准的前提下缓慢地逐渐降低。例如，施用的他克莫司的总量可随着时间而减少。在一些情况下，他克莫司的逐渐降低可发生长于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或长于24个月的持续时间，以使得在逐渐降低方案结束时，他克莫司的剂量逐渐降低到零。

[0214] 在一些情况下，他克莫司可通过单剂量递送给受者。在其它情况下，受者可接受多于一个剂量的他克莫司。例如，受者可接受至少一个剂量的他克莫司、两个剂量的他克莫司、三个剂量的他克莫司、四个剂量的他克莫司、五个剂量的他克莫司、六个剂量的他克莫司、七个剂量的他克莫司、八个剂量的他克莫司、九个剂量的他克莫司、10个剂量的他克莫司、11个剂量的他克莫司、12个剂量的他克莫司、13个剂量的他克莫司、14个剂量的他克莫

司、15个剂量的他克莫司、16个剂量的他克莫司、17个剂量的他克莫司、18个剂量的他克莫司、19个剂量的他克莫司或至少20个剂量的他克莫司。

[0215] 在一些情况下，可在器官移植后的一段时间内递送多个他克莫司剂量。在一些情况下，多个他克莫司剂量可在至少0.1天、0.2天、0.3天、0.4天、0.5天、0.6天、0.7天、0.8天、0.9天、1.0天、1.1天、1.2天、1.3天、1.4天、1.5天、1.6天、1.7天、1.8天、1.9天、2.0天、2.1天、2.2天、2.3天、2.4天、2.5天、2.6天、2.7天、2.8天、2.9天、3.0天、3.1天、3.2天、3.3天、3.4天、3.5天、3.6天、3.7天、3.8天、3.9天、4.0天、4.1天、4.2天、4.3天、4.4天、4.5天、4.6天、4.7天、4.8天、4.9天、5.0天、5.1天、5.2天、5.3天、5.4天、5.5天、5.6天、5.7天、5.8天、5.9天、6.0天、6.1天、6.2天、6.3天、6.4天、6.5天、6.6天、6.7天、6.8天、6.9天、7.0天、7.1天、7.2天、7.3天、7.4天、7.5天、7.6天、7.7天、7.8天、7.9天、8.0天、8.1天、8.2天、8.3天、8.4天、8.5天、8.6天、8.7天、8.8天、8.9天、9.0天、9.1天、9.2天、9.3天、9.4天、9.5天、9.6天、9.7天、9.8天、9.9天、10天、10.5天、11天、11.5天、12天、12.5天、13天、13.5天、14天、14.5天、15天、15.5天、16天、16.5天、17天、17.5天、18天、18.5天、19天或至少20天的时间段内递送。

[0216] 在一些情况下，每个他克莫司剂量可为至少0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3.0mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5.0mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6.0mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7.0mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8.0mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9.0mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg或至少10mg/kg。

[0217] 在一些情况下，施用给患者的他克莫司的量由血流中他克莫司的量确定。例如，他克莫司可按一定的剂量施用以实现0-40mg、5-50mg、10-60mg、15-65mg、20-70mg、25-75mg、30-80mg、35-85mg、40-90mg、45-95mg、50-100mg、55-105mg、60-110mg、65-115mg、70-120mg、75-125mg、80-130mg、85-135mg、90-140mg、95-145mg、100-150mg、105-155mg、110-160mg、115-165mg、120-170mg、125-175mg、130-180mg、135-185mg、140-190mg、145-195mg、150-200mg、160-210mg、170-220mg、180-230mg、190-240mg、200-250mg、210-260mg、220-270mg、230-280mg、240-290mg、250-300mg、260-310mg、270-320mg、280-330mg、290-340mg、300-350mg、310-360mg、320-370mg、330-380mg、340-390mg、350-400mg、360-410mg、370-420mg、380-430mg、390-440mg、400-450mg、410-460mg、420-470mg、430-480mg、440-490mg、450-500mg、46-510mg、470-520mg、480-530mg、490-540mg、500-550mg、510-560mg、520-570mg、530-580mg、540-590mg、550-600mg、560-610mg、570-620mg、580-630mg、590-640mg、600-

650mg、610-660mg、620-670mg、630-680mg、640-690mg、650-700mg或高于700mg的范围。

[0218] 可监控受者中环孢霉素或他克莫司的水平。在免疫抑制开始时，受者中环孢霉素或他克莫司的水平可例如在0-15ng/mL、5-15ng/mL、10-20ng/mL、15-25ng/mL、20-30ng/mL、25-35ng/mL、30-40ng/mL、35-45ng/mL或40-50ng/mL的范围内。在一些情况下，受者中环孢霉素或他克莫司的水平可在一段时间后降低。例如，所述一段时间可短于一周、两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周、九周、十周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周或短于33周。在一些情况下，受者中环孢霉素或他克莫司的水平可降低到0-1ng/mL、0.5-1.5ng/mL、1.0-2.0ng/mL、1.5-2.5ng/mL、2.0-3.0ng/mL、2.5-3.5ng/mL、3.0-4.0ng/mL、3.5-4.5ng/mL、4.0-5.0ng/mL、5.5-6.5ng/mL、6.0-7.0ng/mL、6.5-7.5ng/mL、7.0-8.0ng/mL、8.5-9.5ng/mL或9.0-10.0ng/mL的范围内。

[0219] 在一些情况下，可将钙调磷酸酶抑制剂与嘌呤代谢抑制剂(例如，麦考酚酸莫酯)组合施用给受者。例如，环孢霉素A和麦考酚酸莫酯可用于肾移植的情况。

[0220] 在一些情况下，佐剂可在长于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或长于24个月的持续时间后从受者撤去。在一些情况下，佐剂的剂量可在受者满足缺乏排斥和GVHD的临床标准的前提下缓慢地逐渐降低。例如，施用的佐剂的总量可随着时间而减少。在一些情况下，佐剂的逐渐降低可发生长于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或长于24个月的持续时间，以使得在逐渐降低方案结束时，嘌呤代谢抑制剂的剂量逐渐降低到零。

[0221] 在一些情况下，佐剂可在短于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或短于24个月的持续时间后从受者撤去。在一些情况下，佐剂的剂量可在受者满足缺乏排斥和GVHD的临床标准的前提下缓慢地逐渐降低。例如，施用的佐剂的总量可随着时间而减少。在一些情况下，佐剂的逐渐降低可发生短于一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或短于24个月的持续时间，以使得在逐渐降低方案结束时，嘌呤代谢抑制剂的剂量逐渐降低到零。

[0222] 佐剂可用于增强免疫抑制，同时降低作为免疫抑制方案一部分的其它各个药剂的剂量和毒性。在一些情况下，佐剂可与钙调磷酸酶抑制剂组合。例如，佐剂可包括类固醇、硫唑嘌呤、麦考酚酸莫酯、西罗莫司、抗体或本领域技术人员已知的任何佐剂，并可以按有效增强免疫抑制的剂量施用给受者。

[0223] 在一些情况下，可将基于抗体的疗法用来避免或降低免疫抑制方案中钙调磷酸酶抑制剂的剂量。例如，基于抗体的疗法可包括单克隆(例如，莫罗单抗-CD3)抗体、多克隆抗体和/或抗-CD25抗体(例如，巴利昔单抗、达利珠单抗)。在一些情况下，基于抗体的疗法可在移植后早期施用。例如，移植后早期可最多为移植后8周。

[0224] 移植物管理可包括通过免疫抑制药物预防、抑制或阻抑急性排斥。在一些情况下，可使用多种药剂来预防、抑制或阻抑急性排斥的发作。例如，药剂可以为类固醇。在一些情况下，可使用一种或多于一种类固醇来预防、抑制或阻抑急性排斥的发作。可以使用本领域技术人员已知的适于预防、抑制或阻抑急性排斥的任何类固醇。例如，可以使用本领域技术人员已知的适于预防、抑制或阻抑急性排斥的任何类固醇的任何剂量、施用模式和施用持续时间。在一些情况下，类固醇的施用可逐渐降低到维持剂量。

[0225] 例如，药剂可以是抗胸腺细胞球蛋白。在一些情况下，可使用抗胸腺细胞球蛋白来预防、抑制或阻抑急性排斥的发作。例如，可以使用适于预防、抑制或阻抑急性排斥的抗胸腺细胞球蛋白的任何剂量、施用模式和施用持续时间。在一些情况下，抗胸腺细胞球蛋白的施用可逐渐降低到维持剂量。

[0226] 例如，药剂可以是莫罗单抗-CD3。在一些情况下，可使用莫罗单抗-CD3来预防、抑制或阻抑急性排斥的发作。可以使用适于预防、抑制或阻抑急性排斥的莫罗单抗-CD3的任何剂量、施用模式和施用持续时间。在一些情况下，莫罗单抗-CD3的施用可逐渐降低到维持剂量。

[0227] 嵌合状态

[0228] 在HLA配型相合或HLA配型不合的实体器官移植并施用工程化HLA配型相合或HLA配型不合的造血细胞后，可监控受者的嵌合状态。在移植后的任何时间通过确定嵌合状态的任何分析而在给定的血细胞谱系中表现出大于95％的供者细胞的受者可被分类为具有全供者嵌合状态。在一些情况下，混合嵌合状态可以为给定谱系中大于1％的来源于供者的细胞，但低于95％的来源于供者的DNA。

[0229] CD3+细胞和CD34+细胞的相对剂量以及这些细胞的总剂量可影响个体是否产生稳定的混合嵌合状态。在一些情况下，例如，如果CD3+细胞和CD34+细胞在供者与受者之间为HLA配型相合的，则CD3+细胞的剂量可为至少约$1x10^6$个细胞/kg并且CD34+细胞的剂量可为至少约$0.5x10^6$个/kg。在一些情况下，如果CD3+细胞和CD34+细胞在供者与受者之间为HLA配型不合的，则CD3+细胞的剂量可为至少约$10x10^6$个细胞/kg并可低于$50x10^7$个细胞/kg，并且CD34+细胞的剂量可为至少约$1x10^6$个/kg、至少约$5x10^6$个/kg、至少约$10x10^6$个/kg、至少$15x10^6$个/kg或更高。如果CD34+细胞的剂量低于$15x10^6$个/kg，则可能所需的是施用更高剂量的CD3+细胞，例如，高达约$25x10^6$个/kg、高达约$30x10^6$个/kg、高达约$35x10^6$个/kg、高达约$40x10^6$个/kg、高达约$45x10^6$个/kg、高达约$50x10^6$个/kg。

[0230] 对于HLA配型相合的患者，需要至少注射，但在HLA配型不合的情况下，需要与CD34细胞一起注射至少10x10ˆ6个T细胞/kg以实现至少6个月的持久混合嵌合状态。如果在配型不合的患者中CD34细胞剂量低于15x10ˆ6个细胞/kg，则需要至少50X10ˆ6个T细胞/kg。

[0231] 可对表现出混合嵌合状态的个体根据嵌合状态的演变而进一步分类，其中改善混合嵌合状态可以是在一段时间内(例如，至少6个月)供者细胞比例的连续增加。在一些情况下，稳定的混合嵌合状态可包括受者细胞的百分比随着时间的波动，而供者细胞不完全丧失。

[0232] 对用于工程化造血细胞组合物的CD34+和CD3+细胞的剂量进行选择，以便在移植后在受者中实现稳定的混合嵌合状态。混合嵌合状态定义为大于1％的受者DNA。在一些情况下，混合嵌合状态可包含一定百分比的来源于供者的细胞和一定百分比的来源于受者的

细胞。在一些情况下，混合嵌合状态在受者中具有大于70％的来源于供者的细胞。在其它情况下，混合嵌合状态是受者中多于10％的细胞来源于供者、受者中多于15％的细胞来源于供者、受者中多于20％的细胞来源于供者、受者中多于25％的细胞来源于供者、受者中多于30％的细胞来源于供者、受者中多于35％的细胞来源于供者、受者中多于40％的细胞来源于供者、受者中多于45％的细胞来源于供者、受者中多于50％的细胞来源于供者、受者中多于55％的细胞来源于供者、受者中多于56％的细胞来源于供者、受者中多于57％的细胞来源于供者、受者中多于58％的细胞来源于供者、受者中多于59％的细胞来源于供者、受者中多于60％的细胞来源于供者、受者中多于61％的细胞来源于供者、受者中多于62％的细胞来源于供者、受者中多于63％的细胞来源于供者、受者中多于64％的细胞来源于供者、受者中多于65％的细胞来源于供者、受者中多于66％的细胞来源于供者、受者中多于67％的细胞来源于供者、受者中多于68％的细胞来源于供者、受者中多于69％的细胞来源于供者、受者中多于70％的细胞来源于供者、受者中多于71％的细胞来源于供者、受者中多于72％的细胞来源于供者、受者中多于73％的细胞来源于供者、受者中多于74％的细胞来源于供者、受者中多于75％的细胞来源于供者、受者中多于76％的细胞来源于供者、受者中多于77％的细胞来源于供者、受者中多于78％的细胞来源于供者、受者中多于79％的细胞来源于供者、受者中多于80％的细胞来源于供者、受者中多于81％的细胞来源于供者、受者中多于82％的细胞来源于供者、受者中多于83％的细胞来源于供者、受者中多于84％的细胞来源于供者、受者中多于85％的细胞来源于供者、受者中多于86％的细胞来源于供者、受者中多于87％的细胞来源于供者、受者中多于88％的细胞来源于供者、受者中多于89％的细胞来源于供者、受者中多于90％的细胞来源于供者、受者中多于91％的细胞来源于供者、受者中多于92％的细胞来源于供者、受者中多于93％的细胞来源于供者、受者中多于94％的细胞来源于供者、受者中多于95％的细胞来源于供者、受者中多于96％的细胞来源于供者、受者中多于97％的细胞来源于供者、受者中多于98％的细胞来源于供者或受者中多于99％的细胞来源于供者。

[0233] 混合嵌合状态可在移植后使用本文所述的CD34+/CD3+工程化造血细胞组合物而稳定。在一些情况下，混合嵌合状态是稳定的。在一些情况下，稳定的混合嵌合状态在用本文所述的CD34+/CD3+细胞的任何工程化造血细胞组合物治疗后持续至少6个月。在一些情况下，稳定的混合嵌合状态可持续五天以上、10天以上、15天以上、20天以上、25天以上、30天以上、35天以上、40天以上、45天以上、50天以上、55天以上、60天以上、65天以上、70天以上、75天以上、80天以上、85天以上、90天以上、95天以上、100天以上、105天以上、110天以上、115天以上、120天以上、125天以上、130天以上、135天以上、140天以上、145天以上、150天以上、155天以上、160天以上、165天以上、170天以上、175天以上、180天以上、185天以上、190天以上、195天以上、200天以上、205天以上、210天以上、215天以上、220天以上、225天以上、230天以上、235天以上、240天以上、245天以上、250天以上、255天以上、260天以上、265天以上、270天以上、275天以上、280天以上、285天以上、290天以上、295天以上、300天以上、305天以上、310天以上、315天以上、320天以上、325天以上、330天以上、335天以上、340天以上、345天以上、350天以上、355天以上、360天以上、365天以上、370天以上、375天以上、380天以上、385天以上、390天以上、395天以上、400天以上、405天以上、410天以上、415天以上、420天以上、425天以上、430天以上、435天以上、440天以上、445天以上、450天以上、455天以

上、460天以上、465天以上、470天以上、475天以上、480天以上、485天以上、490天以上、495天以上或500天以上。

[0234] 混合嵌合状态可通过测量受者内单一细胞类型的供者细胞百分比而确定。例如，可通过受者中来源于供者的粒细胞的百分比来确定混合嵌合状态。在一些情况下，混合嵌合状态可通过测量受者内多种细胞类型的供者细胞百分比而确定。例如，可通过受者中来源于供者的粒细胞、自然杀伤细胞、B细胞和T细胞的百分比来确定混合嵌合状态。

[0235] 在一些情况下，可以测量在受者中来源于供者的粒细胞的百分比。在一些情况下，来源于供者的粒细胞的百分比可在移植后在受者中恒定。在其它情况下，来源于供者的粒细胞的百分比可在移植后在受者中不恒定。在其它情况下，来源于供者的粒细胞的百分比在移植后在受者中随着时间而变化。例如，在移植后的60天的时间段内，在受者中来源于供者的粒细胞的百分比可为至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、20%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%。

[0236] 在一些情况下，可以测量在受者中来源于供者的自然杀伤细胞的百分比。在一些情况下，来源于供者的自然杀伤细胞的百分比可在移植后在受者中恒定。在其它情况下，来源于供者的自然杀伤细胞的百分比可在移植后在受者中不恒定。在其它情况下，来源于供者的自然杀伤细胞的百分比在移植后在受者中随着时间而变化。例如，在移植后的60天的时间段内，在受者中来源于供者的自然杀伤细胞的百分比可以为至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、20%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%。

[0237] 在一些情况下，可以测量在受者中来源于供者的B细胞的百分比。在一些情况下，来源于供者的B细胞的百分比可在移植后在受者中恒定。在其它情况下，来源于供者的B细胞的百分比可在移植后在受者中不恒定。在其它情况下，来源于供者的B细胞的百分比在移植后在受者中随时间而变化。例如，在移植后的60天的时间段内，在受者中来源于供者的B细胞的百分比可以为至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、20%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、

88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或至少99％。

[0238] 在一些情况下，可以测量在受者中来源于供者的T细胞的百分比。在一些情况下，来源于供者的T细胞的百分比可在移植后在受者中恒定。在其它情况下，来源于供者的T细胞的百分比可在移植后在受者中不恒定。在其它情况下，来源于供者的T细胞的百分比在移植后在受者中随时间而变化。例如，在移植后的60天的时间段内，在受者中来源于供者的T细胞的百分比可以为至少1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、21％、22％、23％、24％、25％、26％、27％、28％、29％、20％、31％、32％、33％、34％、35％、36％、37％、38％、39％、40％、41％、42％、43％、44％、45％、46％、47％、48％、49％、50％、51％、52％、53％、54％、55％、56％、57％、58％、59％、60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或至少99％。

[0239] 有多种可容易获得且为本领域技术人员已知的测试嵌合状态的方法。任何区分细胞的供者或受者源的嵌合状态测试方法均适用于本文所述的方法。

[0240] 在一些情况下，嵌合状态测试方法可包括基于遗传的方法。例如，可以使用利用探针的基于聚合酶链式反应(PCR)的方法。在一些情况下，用于基于PCR的方法的探针可以是用于微卫星分析的探针。又如，区分供者和宿主源的短末端重复长度内的多态性的商业试剂盒可容易获得并为本领域技术人员已知的。

[0241] 在一些情况下，主要组织相容性复合体(MHC)分型可用于测试嵌合状态。例如，MHC分型可用于测试血液中的细胞类型。在一些情况下，MHC分型可与流式细胞术组合使用。在一些情况下，可执行通过流式细胞术对HLA染色细胞的分析。

[0242] 提供本文所述的方法以使得受者可实现足以允许撤去免疫抑制药物的稳定的混合嵌合状态。例如，撤去免疫抑制药物可包括逐渐降低免疫抑制药物。在其它情况下，撤去免疫抑制药物可包括立即撤去免疫抑制药物。在一些情况下，混合嵌合状态在撤去免疫抑制药物前持续至少六个月。在其它情况下，混合嵌合状态持续至少一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或至少24个月。在一些情况下，佐剂的剂量可在受者满足缺乏排斥和GVHD的临床标准的前提下缓慢地逐渐降低。例如，施用的佐剂的总量可随着时间而减少。在一些情况下，佐剂的逐渐降低可发生至少一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或至少24个月的持续时间。

[0243] 在一些情况下，在撤去免疫抑制药物前缺乏排斥发作可与混合嵌合状态一致。在一些情况下，在撤去免疫抑制药物前缺乏排斥发作可持续至少六个月。在其它情况下，缺乏排斥发作可持续至少一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或至少24个月。在一些情况下，佐剂的剂量可在受者满足缺乏排斥和GVHD的临床标准的前提下缓慢地逐渐降低。例如，施用的佐剂的总量可随着时间而减少。在一些情况下，佐剂的逐渐降低可发生至少一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、

六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或至少24个月的持续时间。

[0244] 在一些情况下，在撤去免疫抑制药物前缺乏GVHD和缺乏排斥发作与混合嵌合状态一致。在一些情况下，在撤去免疫抑制药物前缺乏GVHD和缺乏排斥发作可持续至少六个月。在其它情况下，缺乏GVHD和缺乏排斥发作可持续至少一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或至少24个月。在一些情况下，佐剂的剂量可在受者满足缺乏排斥和GVHD的临床标准的前提下缓慢地逐渐降低。例如，施用的佐剂的总量可随着时间而减少。在一些情况下，佐剂的逐渐降低可发生至少一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月或至少24个月的持续时间。

[0245] 为了确定免疫抑制方案的逐渐降低是否适于受者，可通常以定期的间隔测试受者的混合嵌合状态。例如，定期的间隔可以是一月一次、半月一次、一周一次、两月一次、一年一次、两年一次等。

[0246] 现已完整描述了本发明，对本领域的普通技术人员而言显而易见的是，可在不脱离本发明的精神或范围的情况下作出各种改变和修改。

[0247] 实施例

[0248] 已根据经发现或表明包括实践本公开的优选模式的特定情况描述了本公开。本领域的技术人员将认识到，根据本公开，可在不脱离本公开的预期范围的情况下在举例说明的特定实施方案中作出许多修改和改变。例如，由于密码子冗余，可在不影响蛋白序列的情况下对潜在的DNA序列作出改变。此外，由于生物功能等效性考虑，可在不影响生物作用的种类或量的情况下在蛋白结构中作出改变。所有此类修改均旨在包括在所附权利要求书的范围内。

[0249] 有关可用于实践本公开的一般技术的进一步详细说明，从业者可参考细胞生物学、组织培养和胚胎学中的标准教科书和综述。关于组织培养和胚胎干细胞，读者宜参考Teratocarcinomas and embryonic stem cells:A practical approach(E.J.Robertson编,IRL Press Ltd.1987);Guide to Techniques in Mouse Development(P.M.Wasserman等编,Academic Press 1993);Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro(M.V.Wiles,Meth.Enzymol.225:900,1993);Properties and uses of Embryonic Stem Cells:Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy(P.D.Rathjen等,Reprod.Fertil.Dev.10:31,1998)。

[0250] 分子和细胞生物化学中的一般方法可见于诸如以下标准教科书:Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版(Sambrook等,Harbor Laboratory Press 2001);Short Protocols in Molecular Biology,第4版(Ausubel等编,John Wiley&Sons 1999);Protein Methods(Bollag等,John Wiley&Sons 1996);Nonviral Vectors for Gene Therapy(Wagner等编,Academic Press 1999);Viral Vectors(Kaplift&Loewy编,Academic Press 1995);Immunology Methods Manual(.Lefkovits编,Academic Press 1997)和Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology(Doyle&

Griffiths,John Wiley&Sons 1998)。本公开涉及的用于遗传操作的试剂、克隆载体和试剂盒可得自商业供应商,诸如BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich和ClonTech。

[0251] 提出以下实施例以便为本领域的普通技术人员提供有关如何实施和使用本发明的完整披露和描述,并且这些实施例并非意在对视为本公开的范围进行限制,也并非意指下文的实验是所执行的全部实验或仅是所执行的实验。已作出了努力以确保关于所用数值(例如,量、温度等)的准确性,但是应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数均为重量份,分子量均为重均分子量,温度均为摄氏度,压力均为大气压或接近大气压。

[0252] 实施例1-用于肾及血干细胞联合移植的TLI和ATG预处理

[0253] 产生对HLA单倍型配型相合的活体亲属供者肾同种异体移植物的免疫耐受,以便消除终身使用免疫抑制药物的需要并改善长期移植物存活。目前,这些单倍型配型相合的受者在美国占大多数医疗中心开展的活体亲属供者肾移植的大约一半。在过去10年,在大多数中心,比例越来越高的移植物来自活体亲属供者,作为尸体移植物的替代。虽然活体亲属供者移植与尸体移植相比改善了存活,但约40至50%的活体供者移植物仍在约10年内失功。此外,受者通常接受包括钙调磷酸酶抑制剂、泼尼松和麦考酚酸莫酯的3种维持性免疫抑制药物的混合物。后面的药物的副作用包括高血压、肾毒性和造成长期患者残疾及移植物失功的心脏病。

[0254] 我们的临床前研究表明,用TLI和ATG预处理对于在联合器官和骨髓移植后诱导耐受是有利的,因为预处理方案与TBI相比防止GVHD。与使用TBI预处理相比,使用TLI/ATG需要大约高1,000倍的供者T细胞才能诱导致死性GVHD。防止GVHD的基础是有利于宿主自然杀伤(NK)T细胞亚群的残余宿主T细胞的平衡变化。后者的细胞在TLI/ATG预处理的小鼠中变成主要的T细胞亚群,并产生大量的IL-4,其使常规的供者T细胞向Th2偏倚极化,从而减轻GVHD。若干实验室已证实,在体内照射中存活的NK T细胞自身向Th2偏倚极化。

[0255] 基于在临床前研究中TLI/ATG防GVHD的保护性作用,已作为用于患者的HLA配型相合细胞移植的非清髓性方案成功测试了该预处理方案。对于这种修改,在预处理方案和造血细胞移植物构成方面作出了修改。将造血细胞移植物“工程化”以包含限定数量的通过免疫磁珠柱而选择的纯化CD34+造血祖细胞,以及限定数量的供者T细胞。预处理方案的其它方面保持相同,包括TLI和ATG计划。从接受造血细胞移植的患者的标准方案修改1个月MMF和6个月环孢霉素的移植后免疫抑制方案,以治疗白血病和淋巴瘤。值得注意的是,预处理方案以在第0天的移植手术作为开始而进行,并在第11天施用供者造血细胞输注。这允许在将来对尸体移植方案作进一步修改,以及对用在采用TLI/ATG的许多联合移植临床前研究中的计划作进一步修改。

[0256] 向二十名患者给予联合HLA配型相合移植物,随访5至86个月。其中十九名变为嵌合体,而未产生GVHD。十七名产生了持久的嵌合状态(>6个月),并且其中14名撤去了免疫抑制药物,17名患者中的2名正在经历药物逐渐降低,并且20名患者中的4名未能撤去药物(由于未能维持>6个月的嵌合状态,或排斥发作)。所有20名患者目前在最后一个观测点均具有优异的移植物功能,并在移植手术后住院约5天出院。患者需要3-16个CD34+细胞/kg和1x106个CD3+细胞/Kg。

[0257] 为了将上述耐受方案应用于HLA配型不合的患者,基于对给予TLI和ATG预处理方案及供者细胞移植的17名HLA单倍型配型不合的患者开展的初步研究,对CD34+和CD3+供者

细胞的剂量进行了调整,以治疗白血病或淋巴瘤。将CD34+细胞的剂量逐渐升到≥10x106个/Kg并将CD3+剂量逐渐升到10x106个细胞/kg。给予后一种细胞剂量的大部分患者实现了混合嵌合状态,而给予的细胞剂量低于这些水平的患者均未实现混合嵌合状态。因此,对给予肾及造血细胞联合移植的4名HLA单倍型配型相合的患者进行了剂量增加临床研究,目标是实现≥10x106个/Kg的CD34+细胞和≥10x106个/Kg的CD3+细胞的目标剂量。研究目的是确定实现这些目标剂量是否会导致产生>6个月的混合嵌合状态并且能够在之后撤去免疫抑制药物。临床方案的一些细节在下文给出。

[0258] 基因阵列测试表明,在满足药物撤去标准的患者中在移植前后的基因表达谱中存在变化,以使得他们的表达谱变得与停用常规免疫抑制药物且在其第一个监控时间点未产生移植物排斥的罕见的“手术”耐受患者的那些表达谱明显更好地匹配。未能满足撤去标准的患者则不是如此。在2组之间在基因表达模式中的差异在随后的时间点减小。应当注意到,“手术”耐受患者均为HLA配型不合的。这表明可将耐受基因表达谱用于预测配型相合和配型不合的两种患者中的耐受状态。

[0259] 临床方案

[0260] 这是一项在成年肾移植患者中进行的单中心、开放标记研究。患者接受了TLI、RATG和G-CSF“动员后血液”单核细胞输注,所述单核细胞富集了CD34+细胞并含有限定数量的CD34+和CD3+供者细胞。免疫抑制药物由9个月的麦考酚酸莫酯(MMF;15mg/Kg,每天两次,在第10天开始)和每天的他克莫司逐渐降低过程组成,他克莫司始于第0天,并在12个月的目标点停止。钙调磷酸酶抑制剂和嘌呤代谢抑制剂的免疫抑制药物组合与之前所用的类似。在若干时间点,(1)监控移植物功能,(2)在受者白细胞亚群中测量嵌合状态,以及(3)获得移植物的方案活检样本。如果嵌合状态未能在前六个月中产生或嵌合状态在前六个月中失去,或如果发生排斥发作或GVHD,或如果在移植物活检样本中存在排斥的组织学证据,则不撤去他克莫司和/或MMF,并且之后将作为治疗失败而跟踪患者。向本研究中的受者给予≥10x106个CD34+细胞/kg的目标剂量和渐增的T细胞剂量以实现得自从供者收获的“动员后”外周血单核细胞的1x107/Kg的T细胞目标剂量。在本方案招募的4名患者之中,2名未接受目标细胞剂量,2名接受目标细胞剂量(表1)。

[0261] 研究疗法。在本研究的过程中,患者接受5次兔ATG(即复宁(Thymoglobulin))静脉内注射、总共1,200cGy的全淋巴照射、单次供者细胞输注、短暂的免疫抑制(MMF和他克莫司)以及预防性抗病毒、抗真菌和抗细菌剂。

[0262] 患者在5天的时间段中接受总共5个即复宁静脉内剂量,每个剂量为1.5mg/kg。即复宁在移植当天(在用宿主血灌注移植的器官之前在术中)以及在移植后的后续4天施用。

[0263] 患者在移植后的第1至4天和第7至11天接受靶向淋巴结、脾和胸腺的十个分次照射(每次120cGy)治疗,以使得TLI的总剂量为1,200cGy。在第10或11天给予两个剂量以实现总共10个剂量。给予TLI倒Y型(inverted Y)照野和斗篷照野(mantle field)。在TLI施用期间,监控患者的中性粒细胞减少症(粒细胞<2,000/mL)、血小板减少(血小板<60,000/mL)和感染发生情况。对于任何这些问题,保持TLI;并且对于中性粒细胞减少症,给予G-CSF(10μg/kg/天)。一旦中性粒细胞减少症和/或血小板减少消退,则恢复TLI。在完成TLI时,如果白细胞计数低于1,000个细胞/mm3,则向所有患者给予G-CSF(10μg/kg/天)。如果不保持剂量,则到第11天时完成TLI。

[0264] 在完成TLI的当天,向患者施用已经“工程化”的冷冻保存的HLA-单倍型配型相合的活体亲属供者G-CSF动员后血液单核细胞(使用血浆分离置换从供者外周血回收)的单次静脉内输注。按以下方式进行供者细胞的收获:在肾脏移植前大约6周,向供者每天给予G-CSF(16mg/kg/天)持续五天,并根据之前由Stanford Committee on Medical Human Subjects批准的用于HLA-单倍型配型相合的外周血干细胞(PBSC)移植的程序通过血浆分离置换最多20升而收获单核细胞。此外,对于最佳的细胞回收,可执行最多12升的第二次血浆分离置换。在Isolex柱上针对CD34+细胞来选择细胞,并且还收集柱流过液。将CD34+细胞和流过细胞均在Stanford Blood and Marrow Transplantation实验室根据标准程序冷冻保存和解冻。待注射的CD34+细胞的目标剂量为≥10x106个细胞/kg。通过与富集的CD34+细胞一起注射柱流过细胞而施用限定目标剂量(1x107/kg CD3+)的T细胞。基于通过免疫荧光染色而确定的CD3+细胞的含量,计算流过细胞的剂量。将该剂量用于具有白血病和淋巴瘤的17名单倍型配型相合患者。这些患者中的大部分都产生了持久的混合嵌合状态,并且没有患者发生急性GVHD。如果联合移植的前3名受者未能实现持久的嵌合状态,则提高T细胞的剂量,并且如果前3名受者产生了完整的嵌合状态或如果任何患者发生GVHD则降低T细胞的剂量。

[0265] 在ATG输注当天作为术前用药将皮质类固醇疗法限于60-120mg甲强龙(I.V.)以减轻ATG副作用。在最后一剂ATG后,给予始于30mg/d并以5mg/d降低的泼尼松逐渐降低过程,直到第10天。

[0266] MMF疗法在供者细胞输注当天(第10天)以15mg/Kg每天两次开始。将MMF疗法维持6个月,然后逐渐降低并在9个月时停止。

[0267] 他克莫司在第0天开始,经调整以实现不变的全血谷水平。只要满足免疫抑制药物逐渐降低的标准,即在第9个月开始逐渐降低他克莫司并到第12个月时停止。

[0268] 继续经过第12个月逐渐降低免疫抑制药物(他克莫司)以及经过第9个月逐渐降低MMF的标准如下:1)至少6个月的持续嵌合状态;2)无临床排斥发作;3)方案活检样本未显示出急性或慢性排斥的证据;4)无GVHD。未满足这些标准的患者被视为治疗失败,并且不进行药物的进一步逐渐降低。

[0269] 如果观察到将通常用免疫抑制药物治疗的急性或慢性GVHD,则将患者视为治疗失败。根据标准实践施用免疫抑制药物。

[0270] 排斥发作通过用包括使用静脉内甲基泼尼松龙的标准抗排斥疗法治疗,并将患者视为治疗失败。如果发现对于两个类固醇过程无反应,则给予抗淋巴细胞抗体过程。在排斥发作期间以常规剂量给予他克莫司。一旦发生排斥发作,则患者将回到维持性免疫抑制药物的常规剂量,并且根据上述方案不尝试进一步逐渐降低。目前,使95%的急性排斥发作逆转。

[0271] 由于预计TLI和ATG的初始过程引起T细胞的明显耗竭,因此与常规的免疫抑制方案相比,存在升高的新或复发病毒感染的风险,包括巨细胞病毒(CMV)、EB病毒、带状疱疹和单纯疱疹病毒。如下给予CMV的抗病毒预防:前14天给予缬更昔洛韦(900mg/d:P.O.),根据肾功能而调整;或在前14天中,IV给予5mg/kg的更昔洛韦(DHPG),根据肾功能而调整。在14天的过程后,将所有方案移植受者均置于缬更昔洛韦(900mg/d),根据肾功能而调整。将此继续最少90天,并且如果绝对淋巴细胞计数低于400,则继续直到停用类固醇时。

[0272] 经口给予复方新诺明(每天1片单强度片剂)持续一年以预防卡氏肺囊虫肺炎(PCP),并每天施用制霉菌素漱口水持续三周以预防念珠菌。标准围术期抗生素将包括Ancef(1mg,i.v.,3个剂量,以8小时为间隔)和庆大霉素(1.7mg/kg,i.v.,在移植时一个剂量)。抗菌剂根据患者过敏而适当替换。

[0273] 在移植后就在停止所有免疫抑制药物前进行监控活检。此外,在未得到解释或未消退的血清肌酐升高20%的48小时内,获得"原因分析"活检样本。

[0274] 在未接受目标细胞剂量的两名患者之中,患者#1未能具有持续1个月以上的混合嵌合状态。该患者接受了3x106个CD3+细胞/kg作为剂量增加研究的一部分,但确实接受了目标数量的CD34+细胞/kg。该患者未撤去免疫抑制药物,并以良好的移植物功能维持他克莫司和MMF。

[0275] 患者#2和#3接受了目标细胞剂量的CD3+T细胞(10x106个细胞/kg)和目标剂量的CD34+细胞。两名患者目前均分别出现了10个月和5个月的持久混合嵌合状态,并且满足药物撤去标准。持久混合嵌合状态的模式在图2中对于患者#3而言较短。

[0276] 患者#4接受了10x106个CD3+细胞/kg,但因供者CD34+细胞的动员不良而未满足必需数量的CD34+细胞,尽管向供者施用了两个过程的G-CSF。该患者未能产生嵌合状态,并且以良好的移植物功能维持免疫抑制药物。

[0277] 实施例2.T细胞剂量对混合嵌合状态的产生的作用。

[0278] 如实施例1中所述,进行患者移植。HLA配型相合特性、预处理方案和供者细胞组成根据表1进行。

[0279] 表1

[0280]

患者编号 移植后的月数	年龄/ 性别	ESRD 原因	总剂量 TLI (cGy)	$CD34^+$ 细胞剂量 ($x10^6$ /kg)	$CD3^+$ 细胞剂量 ($x10^6$ /kg)	最后一次观测的血清肌酐 (mg/dL)	嵌合状态持续时间	嵌合状态(>30%的供者型细胞)
1(37个月)	47/M	IgA	1200	11.8	3	1.7	1个月	-
2(19个月)	24/F	SLE	1200	14.5	10	1.1	12个月	+
3(16个月)	35/F	未知	1200	21.9	10	1.1	12个月	+
4(16个月)	33/M	未知	1200	9	10	1.4	<1个月	-
5(7个月)	26/F	SLE	1200	7.5	10	1.1	<1个月	-
6(4个月)	21/M	FSG	1200	7.5	20	1.3	<1个月	-
7(4个月)	47/F	GN	1200	11.0	20	1.3	1个月	-

[0281]

8(2个月)	26/F	MGN	1200	8.8	50	1.3	>1个月	+
9(2个月)	55/M	FGN	1200	11.0	50	1.5	>1个月	+

[0282] 如这些数据和图4所示,在接受HLA配型不合的造血细胞移植的个体中,通过高剂量的CD3+细胞(最高$50x10^7$/kg)可以得到稳定的混合嵌合状态,并且该剂量的T细胞可战胜低数量的CD34+细胞。例如,患者7和9接受了相同剂量的CD34+细胞,但只有接受高T细胞剂量的患者9实现了混合嵌合状态。

[0283] 实施例3-外周血祖细胞的收集以用于造血细胞移植

[0284] 收集质量和数量足够的外周血祖细胞,这将导致造血移植可接受的祖细胞活力和恢复。这种类型的手术可对潜在的BMT移植患者或供者进行以及用于储存目的。

[0285] 从供者收集淋巴细胞，目的是产生移植物抗白血病效应。

[0286] 收集树突细胞或另一种细胞系以用于研究调查。

[0287] -对于体重低于40Kg的患者，参见Pediatric **COBE®** Spectra™ Procedure了解手术位置、血或白蛋白主要标准和其它年龄特定的问题。

[0288] 表2

[0289]

白细胞套件-功能上封闭	功能上封闭的 COBE Spectra 一次性管路套件，其允许向产品袋添加抗凝剂以及术中或术后取样。
样品球管组件	样品球管组件由 2 个具有取样口、Y 型连接器、3 个滑动夹和通往产品袋的引管的样品球管组成。
样品球管	用于获得和取出产品样品的 4 ml 塑料球管。
取样口	连接到每个样品球管的口，其允许通过钝头针和注射器取出产品样品。
附属管线	附属管线连接到收集管线，并包括无菌屏障过滤器，其具有鲁尔连接(leer connection)、易碎件(frangible)和滑动夹。
易碎件	在护士准备添加抗凝剂前防止产品排到无菌屏障过滤器中的易破碎的屏障。
无菌屏障过滤器	0.2 微米过滤器，其允许向产品袋添加抗凝剂，同时维持功能上封闭的管路套件。

[0290] 管路安装

[0291] 接通血浆分离置换机(例如Spectra)电源以执行短暂自检，以确保电源以正确的电压工作。确认显示“cobe spectra(version__software)”，黄色警告led点亮，暂停led闪烁，筒夹处于未加载位置，单级充填器就位。将一次性套件包装置于离心机盖上，并取下纸带。通过将包装置于前面板上的挂钩之下而牢固固定。

[0292] 取出入口盘管并悬挂以确保在静脉输液架的左侧在挂钩上的入路连接。将入路盐水(绿色)管线置于机器的顶部上。取出回路盘管并将回路连接悬挂在静脉输液架的左侧的挂钩上。将回路盐水管线置于机器的顶部上。将各袋子从左至右悬挂在静脉输液架上:ac最左边、盐水、废液、血浆、产品袋在右边。将滑动夹在产品袋与y型连接器之间在样品球管组件上闭合，以防止产品过早进入。将回路泵筒从包装的右侧取出，然后卡入血浆与收集/置换泵之间的筒夹。

[0293] 将入路泵筒从包装的左侧取出，然后卡入ac与入口泵之间的筒夹。(筒上的cobe标记应直立并朝外。放置ac检测器中的ac管线，并且程序继续将管路加载到泵中。将管线置于收集/置换阀和血浆阀中。

[0294] 将回路压力传感器置于其壳体中并向下推然后顺时针旋转以锁定到位。将rbc管线置于rbc阀中，完全插入rbc检测器。将回路和入口气室定位在空气检测器中，使废液换向管线向前。对气室过滤器定位，以便室的顶部与空气检测器壳体对齐。将保护帽从回路气室上方的公/母鲁尔连接器上取下，并将废液换向管线置于废液换向阀门总成中。首先将“y”型连接器推进去，然后“以剔牙方式”(flossed)使管路回到位。

[0295] 将管线置于离心机压力传感器壳体中，并将入路压力传感器置于其壳体中、向下推然后顺时针旋转以锁定到位。将回路(蓝色)管线置于回路阀中，以便管线通过阀的中心

水平座置。将通道从包装中取出。

[0296] 将装置解锁，然后置于离心机中。旋转离心机，以使得加载口向前敞开，并且离心机卡圈支架搁在充填器外缘上。使连接到通道的管路伸长，并将离心机顺时针旋转几次，以确保管路未扭结且上轴承保持就位。关闭和盖上离心机门，然后运行一次性管路套件的标准预充程序。

[0297] 连接患者并执行血浆分离置换

[0298] 使用入路导管：夹住导管并用酒精棉准备套头连接(hub connection)。取出无针连接器，并将套头和螺纹用新的酒精棉用力清洁。附接采血针保持器(vacutainer holder)，并打开导管上的弹簧夹。将从导管中抽出的前5ml置于废液盒(waste draw)中，然后抽取实验室标本。关闭导管上的弹簧夹，将附接的针从spectra入路管线取下，将入路管线附接到导管动脉管线。评价样品的血液稀释。将盐水辊夹的入路关闭，同时将管线弹簧夹的入路打开。启动血浆分离置换机上的程序。将回路管线连接到导管静脉管线，同时将弹簧夹打开并关闭回路盐水管线上的辊夹。

[0299] 使用入路静脉穿刺：将静脉穿刺部位用皮肤准备酒精棉通过葡糖酸氯己定2％清洁约30秒，并风干约30秒。使用附接到spectra入路管线的17号针或来自库存的18号针进行入路静脉穿刺。针对血液稀释的可能性，抽取实验室标本。以20-17g iv/针进行回路静脉穿刺。将spectra入路和回路管线连接到入路和回路针。打开入路和回路管线上的白色弹簧夹。调整回路盐水管线上的辊夹以保持静脉打开，以防止在穿过针返回时存在延迟的情况下回路针凝结。关闭入路盐水辊夹的进入，并将袖带压力充到40mm hg，然后继续开始运行模式。

[0300] 技术规范：在colorgram上以2-4％的hct使用程序收集单核细胞(非常轻，将经历二次加工例如Isolex或clinimacs的产品的0.5-1.5％)。将colorgram插入最小的透明收集管线之下其退出离心机室的位置，正好在多内腔连接器的下方。比较colorgram上的彩色矩形与收集管线的颜色。单核细胞收集应当具有最低数量的红细胞。通常，在红细胞的顶层中存在显著数量的白细胞。为了最高的单核细胞得率，有必要收集一些红细胞。然而，如果产品要进一步加工以进行细胞选择，则粒细胞将在CD34+选择仪中与CD34+细胞竞争。收集物越轻，收集到的粒细胞越少，血小板越多。如果收集管线的颜色太深，则每3-5分钟将血浆泵流量降低0.3至1ml/分钟。如果收集管线的颜色太浅，则将血浆泵流量通过相同的调节而增加。

[0301] 在完成快速启动后收集血浆，直到目标运行时间结束。收集血浆可导致暂时的接口不稳定和高回路压力警报。为了避免这个问题，通过以下方式收集血浆：打开血浆管线上的滑动夹，按下目标值，按下血浆，输入血浆体积以进行收集，并按下回车键(enter)。在血浆收集快结束时，将流量降低到30-40ml/min，当回路压力限值允许时，随后逐渐升高到之前的流量。

[0302] 对于冷冻保存的产品：如果白细胞计数大于或等于30k/ul且血小板计数大于或等于30k/ul(对患者而言)或200k/ul(对供者而言)，则增大收集速率以使得产品袋含有最少300ml。

[0303] 关闭附属管线上的易碎件上方的滑动夹，并通过来回弯曲含有该易碎件的管路而使易碎件完全破碎。将无菌技术用于从无菌屏障过滤器下方的鲁尔连接上取下帽盖，并附

接含有所需量的抗凝剂的注射器。打开易碎件上方的滑动夹，并将抗凝剂缓慢通过无菌屏障过滤器注射到产品袋中。关闭易碎件正上方的管路上的滑动夹，然后取下注射器以防止流体回流。将含有大约3ml的无防腐剂的盐水的注射器附接到无菌屏障过滤器下方的鲁尔连接。打开易碎件上方的滑动夹，并通过无菌屏障过滤器注入盐水以将抗凝剂冲入产品袋中。打开易碎件正上方的管路上的滑动夹，并放回帽盖。

[0304] 通过关闭产品袋与球管组件上的y型连接器之间的滑动夹以及样品球管之一与y型连接器之间的管路上的滑动夹而获得中号袋样品。将产品袋混匀以确保得到代表性样品，并打开产品袋与样品球管组件上的y型连接器之间的滑动夹。通过打开的滑动夹挤压附接到管路的样品球管，以仅取出所需的产品样品量。如果取出了过多的产品样品，则通过以下方式使多余的产品样品转回产品袋：在产品袋液位上方颠倒样品球管，挤压样品球管以使多余的产品样品转回产品袋并通过以下方式用残余空气清扫管路的产品样品：保持样品球管直立且处于产品袋下方，使用样品球管中的残余空气挤压样品球管以将管路中的产品样品推回产品袋，并在维持样品球管上的压力的同时，关闭y型连接器正下方的滑动夹。

[0305] 通过以下方式用钝头18号1英寸针和注射器从取样口抽吸产品样品：将附接有注射器的钝头针插入取样口，颠倒样品球管，将产品样品缓慢吸入注射器，从取样口取下附接有注射器的针，并将产品样品转移到试管。

[0306] 反冲

[0307] 使用入路导管开始反冲：打开绿色盐水管线上的辊夹，并用10ml盐水冲洗入路导管，然后关闭入路管线上的白色弹簧夹。将回路管线用10ml盐水冲洗，并关闭回路管线上的白色弹簧夹。关闭盐水管线上的辊夹，并用酒精清洁连接部位。夹住导管，关闭入路管线，然后将新的无针连接器用肝素预填充。用3ml 100单位/ml的肝素冲洗内腔，并取下注射器并再夹住导管。对于回路管线重复相同的程序。

[0308] 使用入路静脉穿刺开始反冲：释放袖带上的压力，并打开绿色盐水管线上的辊夹以冲洗针，然后关闭入路管线上的白色弹簧夹。取下抽吸管线针。关闭回路管线上的白色弹簧夹，取下回路针。向静脉穿刺部位施加压力，并关闭盐水管线上的辊夹。

[0309] 实施例4-从血浆分离置换产品分离和纯化CD34+细胞

[0310] 将CliniMACS系统用于选择和富集CD34+造血祖细胞(HPC)。CliniMACS系统采用偶联到磁粒的CD34抗体作为标记目标祖细胞的手段。用这些磁粒标记后，使细胞悬液通过CliniMACS装置上的选择柱内的强磁性梯度。磁标记的CD34+细胞保持在柱内，而未标记的细胞则流过柱并收集在贫组分(Reduced Fraction)袋中。当将柱从磁场中移出时，释放CD34阳性细胞以收集在富组分(Enriched Fraction)袋中。

[0311] 试剂制备

[0312] 表3

[0313]

溶液	试剂	体积	最终浓度	储存
CliniMACS 缓冲液	PBS 缓冲液，含有 1mM EDTA pH 7.2 25% HSA	1L 20 ml	CliniMACS 缓冲液中 0.5% HSA	1 袋 COBE 1 袋 CliniMACS 1 袋 BSC/COBE
HSA/Normosol 配方介质	Normosol 25% HSA	46 ml 4 ml	2% HSA/Normosol	4C 冰箱

[0314]

冷冻保护剂介质	羟乙基淀粉 25% HSA DMSO	12.2 ml 4.8 ml 3 ml	1.8 % HES 2.5 % HSA 7.5 % DMSO	4C 冰箱

[0315] 产品制备

[0316] 将沉降平皿(settle plate)置于生物安全柜的每一侧上，并将产品带入柜中。对于HPC-血浆分离置换产品，在混合前对每个产品进行测试。将3通取样传输套件插入袋中。对于将在冷藏机中储存过夜的产品，添加自体供者血浆以得到<200x10E6/ml的细胞浓度。在第二天早上，产品在加工前先在室温下平衡以防止结块。

[0317] 将细胞从血浆分离置换收集袋转移到标记为“细胞制备”的600ml转移包(transfer pack)(热密封留下6-8英寸的转移包管路以用于随后的无菌对接)。对产品称重并计算产品体积。

[0318] 当产品>200ml移除多余的血浆：对产品进行平衡，然后以250g在室温下无制动离心15分钟。将无菌产品袋对接到标记为“废血浆”的600ml转移包，通过止血钳夹住管路。将产品袋从离心机桶取出以避免干扰细胞沉渣，并悬挂在血浆提取器上。使用血浆提取器手柄，打开止血钳，并将血浆转入废液袋。将管路用止血钳夹住以停止流动。从血浆提取器取下细胞袋，并重悬细胞沉淀。将细胞置于去皮重的称上，并将空气和血浆均转回细胞袋，直到袋体积<200ml。关闭止血钳，通过轻轻涡旋袋子而将细胞沉淀重悬在细胞制备袋中。转到血小板洗涤。

[0319] 当产品<200ml时进行血小板洗涤：将血浆转移套件附接到准备好的缓冲液袋之一，并将转移套件的管路无菌对接到细胞袋。打开辊夹，并用缓冲液灌装细胞制备袋。将细胞制备袋与缓冲液袋之间的管路留下6-8英寸的空余而热密封。保持缓冲液袋的其余部分以用于移除多余的试剂。对离心机进行平衡，并将袋子以250g在室温下无制动离心15分钟。将产品袋无菌对接到标记为“血小板废液”的600ml转移包，通过止血钳夹住管路。将产品袋悬挂在血浆提取器销轴上，从血浆提取器手柄释放血浆，打开止血钳并将血浆转入废液袋。将管路用止血钳夹住以停止流动，并将细胞袋从血浆提取器取下，将细胞重悬。将产品袋置于去皮重的称上，调整到适当的抗体孵育重量(参见下表的CD34试剂重量参数)。总有核细胞和/或CD34+细胞含量以及产品和试剂体积均在实现细胞的最佳标记的规定范围内。

[0320] 表4

[0321]

TNC 和 CD34 限值	$<60 \times 10^9$ TNC 或 $<600 \times 10^6$ CD34	$>60 \times 10^9$ TNC 或 $>600 \times 10^6$ CD34

[0322]

孵育重量	95 g (90-100 g)	190g (180 - 200 g)
CliniMACS CD34 试剂	1 个小瓶(7.5 ml)	2 个小瓶(15.0 ml)

[0323] CliniMACS建立

[0324] 在生物安全柜内准备管路套件,并将“CD34富集”收集袋热密封。从转移袋取出150ml并附接受者袋,将蓝色销轴插入并连接到CliniMACS鲁尔连接器。将Pall过滤器经由钝端插到CliniMACS气泡捕集器尖刺。接通CliniMACS装置电源,运行自诊断程序。

[0325] 预充

[0326] 一旦启动程序,CliniMACS系统即自动预充。缓冲液循环通过管路套件,并收集在预充废液袋和缓冲液废液袋两者中。

[0327] CD34试剂标记

[0328] 对总细胞数计数,并基于收集的细胞总数将所需瓶数的CD34试剂加到产品袋。将细胞制备袋的内容物使用温和的翻滚(end-over-end)运动以5-10分钟的间隔彻底混合,或将袋子置于处于25rpm和角度10%的摇床上30分钟。

[0329] 除了将两个转移袋一个标记为“试剂洗涤1”一个标记为“试剂洗涤2”外,通过重复“血小板洗涤部分”中的步骤移除多余的试剂,以替代血小板废液袋。添加CliniMACS缓冲液并进行洗涤。将产品在去皮重的称上称重,并将产品重量调整到80g与318g之间的开始产品重量范围。

[0330] CD34选择

[0331] 将开始产品袋连接到CliniMACS,并将Pall过滤器顶部上的帽盖取下以刺入开始产品袋。将开始产品袋置于中心吊架杆上,并通过按下CliniMACS上的运行(RUN)而启动CD34+选择程序。选择过程自动开始并持续约40分钟。

[0332] 细胞配制

[0333] 获取来自贫组分袋的样品以确定细胞计数、活力、无菌性,并针对CD3+细胞计数执行FACS测定。

[0334] 冷冻保存

[0335] 将离心机预冷却到4℃并获取来自CD34富组分袋的样品以确定细胞计数、活力、任何集落形成单位和流式细胞术测定。将CD34富组分袋的内容物在两根标记的50ml锥形管之间等量转移。将CD34富组分袋用Normosol/2%洗涤混合物冲洗,并分成两根管。将管以1700rpm在4℃下低制动离心8分钟。移除上清液,并转移到无菌废液管,将团块通过轻敲而重悬。将上清液用于细胞计数、无菌性和内毒素测试。

[0336] 将4ml Normosol/2%HSA添加到一根管中,混合内容物,然后转移到另一根管。将第一根管用2ml Normosol/2%HSA冲洗,然后转移到另一根管,将细胞体积调整到7.8ml,将细胞悬液在冷藏机中冷却5-30分钟。

[0337] 根据制造商方案准备受控速率冷冻机以进行受控速率冷冻,并在下文的实施例4中进一步阐释。一旦受控速率冷冻机处于-6℃以下的温度,即向细胞添加7.8ml冷冻保护剂溶液。将15ml细胞/冷冻保护剂添加到50ml冷冻袋并热密封。将样品探头用一条胶带附接到冷冻袋的中心,并将袋子置于压机中,以使得孔口从压机的顶部突出。关闭压机,将标记的

盒置于受控速率冷冻机中，然后激活受控速率冷冻机运行。

[0338] 实施例5-得自血浆分离置换产品的CD34+细胞的冷冻保存

[0339] 使用冷冻保护剂和缓慢的冷却速率实现最佳的冷冻治疗细胞活力。将使用DMSO作为冷冻保护剂的冷冻溶液添加到细胞产品中以防止因形成冰晶而对细胞造成的伤害。CBS受控速率冷冻系统由以下部分组成：冷冻室、配有Microsoft Windows操作系统的笔记本电脑、低温冷冻软件、样品探头、样品架和LN_2输送软管。已添加打印机以使得每个产品可具有其相应运行的冷冻曲线的副本，以包括在加工记录中。CRF以预定的用户可编程速率冷冻。将热电偶探头附接到一个冷冻袋或插入监控冷冻小瓶。对室温度进行连续监控。当热电偶记录到预定的目标温度时，冷冻保存曲线步骤开始推进。当实现由曲线规定的最终室温度时，警报响起，将产品取出并置于永久储存冷冻机中。如果检测到室温度与编程目标温度之间的偏差，则发生声光报警。

[0340] 冷冻保护剂制备

[0341] 如下表中所述制备适当的冷冻保护剂溶液。将冷冻保护剂溶液在使用前在4-6℃冷却至少30分钟。

表5

[0342]

成分	未操纵的 HPC/TC（50 或 100ml 总体积）		洗涤后的产品（富集的或耗竭的产品 - 不含血浆）（1 ml 小瓶或 15ml 袋总体积）	
细胞悬液：冷冻保护剂比率		70:30		50:50
	体积	产品中的最终浓度	体积	产品中的最终浓度
DMSO	10 ml	10%	3 ml	7.5%

[0343]

Normosol	20.4 ml	20%		
HSA (25%)			4.8 ml	4%
羟乙基淀粉			12.2 ml	3%
总计	30.4 ml		20.0 ml	

[0344] 冷冻保护容器选择

[0345] 待使用的适当的冷冻保护容器基于细胞密度、产品类型、体积和个体方案要求。根据各个加工程序，按照下表选择适当的冷冻容器和配制细胞/冷冻保护剂体积。

[0346] 表6

[0347]

初始产品 TNC	冷冻前体积	冷冻混合物体积	#冷冻袋/小瓶
TNC ≤ 3 x 10^9	35 ml	15 ml	1 (250 ml)
TNC > 3 - ≤ 25 x 10^9 (儿科患者< 50 kg)	35 ml	15 ml	1 (250 ml)
TNC > 3-50 x 10^9	70 ml	30 ml	1 (500 ml)
TNC > 50 - 100 x 10^9	140 ml	60 ml	2 (500 ml)
TNC > 100 - 150 x 10^9	210 ml	90 ml	3 (500 ml)
TNC > 150 - 200 x 10^9	280 ml	120 ml	4 (500 ml)
TNC > 200 - 250 x 10^9	350 ml	150 ml	5 (500 ml)
TNC > 1 - 100 x 10^6	0.5 ml	0.5	1 ml 每 1.8 ml 小瓶

[0348] 向产品添加冷冻保护剂

[0349] 一旦受控速率冷冻机达到接受产品的温度,即向产品添加冷冻介质。根据各个加工程序,向每个小瓶或袋添加适当体积的冷冻保护剂。当添加冷冻保护剂与将产品放入CRF之间的时间最短时,实现了最佳的活力。将冷冻袋热密封并移除过多的管路。

[0350] 将袋置于适当的储存盒中,然后将每个盒置于受控速率冷冻机中。对于250-0500ml冷冻袋,将冷冻的产品之一置于含有监控探头的盒中。将准备用于长期储存该产品的盒通过监控盒置于受控速率冷冻机中,以使得在运行结束时将冷冻产品转移到冷盒中。

[0351] 室准备

[0352] 将适当的架子置于室内,大号盒架用于250-500ml冷冻袋中的产品,袋压机(bag press)用于50ml冷冻袋,或冷冻小瓶架用于冷冻小瓶中的产品。对于250-500ml冷冻袋,将样品探头用胶带附接到盒子,以使得探头的突出侧面向上,并定位成使得其接触冷冻袋的中心点(最满的部分)。对于冷冻小瓶,将针式热电偶探头插入橡胶塞以密封监控冷冻小瓶。对于小的50ml的冷冻袋,将样品探头直接用胶带粘到产品的中心,然后置于袋压机中。样品探头连接位于室内风扇罩的左上角。将探头插入夹套,固定室门。

[0353] 冷冻保存

[0354] 一旦室达到<6.5℃后,即将准备用于冷冻保存的产品添加到室中。对于250和500ml的袋,将一个产品置于附接有探头的盒中使得探头压贴冷冻袋背面的中心(最满的部分),并将产品关到盒中。对于50ml的冷冻袋,将探头用一条胶带附接到袋子的背面中心,并将产品定位在袋压机中,以使得孔口从压机的顶部突出。关闭压机,并将第二个50ml的袋子置于第二压机中,必要时彼此堆叠在一起。根据标准步骤启动冷冻程序。

[0355] 实施例6-解冻和洗涤细胞产品

[0356] 该实施例适用于供SHC或LPCH的受者使用的已在内部收集和加工或由外部机构收集、加工和运输的HPC/TC产品。在医学和/或实验室主任及主治医生的要求下,实验室将在产品输注前在实验室中解冻和洗涤冷冻保存的产品。将解冻的产品用低分子量右旋糖和白蛋白洗涤。进行产品洗涤以移除超过红细胞容积限制的HPC/TC产品的过多血红蛋白,减小DMSO体积(特别是对于小受者(<50kg)),移除异基因情形下过多的血浆蛋白,以及提高活细胞的回收率。

[0357] 试剂和设备准备-输注前一天

[0358] 将10%LMD、ACD-A和5%HSA置于受到监控的冷藏机中,并将足够的冷凝胶垫置于

冷藏机中。准备水浴。

[0359] 试剂和设备准备-输注当天

[0360] 准备水浴、BSC和加工套装，并将离心机冷却到6℃保持30分钟。将两个冷凝胶垫用IPA湿巾清洁，并将每一个置于无菌塑料袋内。将袋子密封，并放回受到监控的冷藏机中。将运输冷却器和中等大小的冷冻凝胶包用IPA湿巾清洁。

[0361] 介质准备

[0362] 解冻介质：将标记为“解冻介质”的150ml转移袋上的管路热密封，并将蓝色分配销轴附接到一个口。将蓝色分配销轴插入10％LMD袋的适当的口中。将60ml注射器用于抽取60ml 10％的LMD并转移到解冻介质袋中。将小型尖刺插入5％HSA瓶的口中。将60ml注射器用于抽取60ml 5％的HSA瓶并转移到解冻介质袋中。将蓝色分配销轴插入ACD-A袋的适当的口中。将12ml注射器用于抽取12ml的ACD-A并转移到解冻介质袋中。彻底混合解冻介质。

[0363] 复原介质：将标记为“复原介质”的150ml转移袋上的管路热密封，并将蓝色分配销轴附接到一个口。将60ml注射器用于抽取60ml 10％的LMD并转移到复原介质袋中。将60ml注射器用于抽取60ml 5％的HSA并转移到复原介质袋中。彻底混合复原介质。

[0364] 产品解冻

[0365] 仅将产品解冻到仍为“融雪状”的点；存在一些冰是可以接受的。将产品袋用IPA湿巾擦拭，并置于BSC内。将产品在BSC中包裹在冷凝胶垫中，在剩余的加工步骤中产品保持冷却

[0366] 等于或低于30ml的产品：将两个袋子和三个管段的细胞洗涤/输注袋套件用于这些体积。将具有2个尖刺的管路连接到冷冻袋，将具有蓝色鲁尔接头的管路连接到含有解冻介质的注射器。收集洗涤后的产品，并在标记为“细胞洗涤/输注袋”的袋中离心，将上清液转移到剩余的袋中。关闭洗涤/输注套件夹子，将冷冻袋的外部孔口盖用无菌酒精棉片清洁。

[0367] 将袋子保持直立并且对于每个口，用一只手的拇指和食指持住口的硬质部分。用另一只手，将输注套件尖刺插入消毒后的口中并固定。通过释放解冻介质注射器与冷冻袋之间的管路上的夹子，将解冻介质无菌添加到袋中。将一半解冻介质在轻轻混合下转移到两个冷冻袋隔室中。

[0368] 打开通往细胞洗涤/输注袋的夹子，并将稀释后的细胞悬液从冷冻袋转移到细胞洗涤/输注袋中。对于冲洗过程，关闭细胞洗涤/输注袋上的夹子。添加少量的剩余解冻介质以冲洗冷冻袋的两个隔室并将冲洗液转移到细胞洗涤/输注袋。混合物平衡5分钟。

[0369] 将10％LMD的等分试样添加到冷冻袋，冲洗冷冻袋，并将冲洗液转移到细胞洗涤/输注袋。重复以上步骤，直到将适量的10％LMD分配到冷冻袋中。

[0370] 将细胞洗涤/输注袋置于塑料离心袋中，平衡离心机，然后将产品以400 x g在6℃下低制动离心20分钟。将稀释产品袋置于血浆挤压机中并将上清液缓慢转到附接的上清液袋中，通过止血钳控制流量。将分配销轴插入细胞洗涤/输注袋的一个口中，按揉细胞团块以重悬。将复原介质添加到细胞洗涤/输注袋，并彻底混合内容物。

[0371] 大于30ml的产品：将分配销轴插入冷冻袋的一个口中，并将含有解冻介质的注射器附接到分配销轴。将一半解冻介质转移到冷冻袋中，混合，并将冷冻袋用300或600ml转移包刺入，将冷冻袋的内容物转移到转移包。将冷冻袋用剩余的解冻介质冲洗，并添加到含有

细胞的转移包中，将混合物平衡5分钟。

[0372] 将10％LMD的等分试样添加到冷冻袋，冲洗冷冻袋，并将冲洗液转移到细胞洗涤/输注袋。重复以上步骤，直到将适量的10％LMD分配到冷冻袋中。

[0373] 将细胞洗涤/输注袋置于塑料离心袋中，平衡离心机，然后将产品以400 x g在6℃下低制动离心20分钟。将稀释产品袋置于血浆挤压机中并将上清液缓慢转到附接的上清液袋中，通过止血钳控制流量。将分配销轴插入细胞洗涤/输注袋的一个口中，按揉细胞团块以重悬。将复原介质添加到细胞洗涤/输注袋，并彻底混合内容物。

[0374] 解冻后计数

[0375] 将上清液彻底混合，并将样品用于细胞计数。对上清液袋称重，并计算上清液TNC。

[0376] 供输注的细胞

[0377] 取出两个样品进行分析，1mL用于流动分析，0.2ml用于有核细胞计数、CFU和活力。对输注袋称重，置于无菌塑料袋中，并储存在具有冷冻凝胶包的运输冷却器中，直到输注。计算解冻后TNC和％TNC回收，并根据下表6再次离心细胞。

[0378] 表7

[0379]

上清液 NC x 10E06/ml	输注细胞 % TNC 回收	再次离心上清液
≤ 2	≥80 %	否
≤ 2	< 80%	询问监督员/实验室主任
>2	< 80%	是
>2	≥ 80 %	否

[0380] 再次离心上清液

[0381] 将上清液转移到另一个转移袋，并以400 x g在6℃下低制动离心20分钟。然后将袋子置于血浆挤压机中，将蓝色分配销轴插入袋子的一个口中。将鲁尔连接器附接到转移袋的分配销轴，释放挤压器手柄以挤出上清液，通过止血钳控制流量。将10％LMD和5％HSA各5ml添加到该第二细胞袋中，将细胞重悬，并将回收的细胞添加到初始细胞输注袋。

[0382] 从细胞输注袋取出样品用于有核细胞计数和活力、流动分析和CFU测定。对输注袋称重，计算并记录体积。

[0383] 计算

[0384] ％TNC回收＝解冻后TNC(细胞)÷[解冻后TNC(细胞)+上清液TNC]x100

[0385] $$\text{总 CFU 计数 X} = \frac{\text{TNC x (每 10E05 个铺板的细胞的集落计数)}}{\text{10E05}}$$

[0386] $$\text{CD34 细胞计数/}\mu\text{l} = \frac{\text{(NC x 10E06/ml) x \%CD34}}{1000}$$

[0387] 输注

[0388] 从准备好的具有冷冻凝胶包的运输冷却器中取出输注细胞袋，取解冻后的产品到病房(unit)。

[0389] 实施例7-得自新鲜或冷冻保存的同种异体移植物或自体移植物的造血祖细胞和治疗性细胞输注

[0390] 同种异体移植物(同种异体的)移植涉及将供者骨髓、造血祖细胞(HPC)或治疗性细胞(TC)输注到遗传上不同的受者中。配型相合或部分配型相合的家族成员或非亲属供者可用作供者。收集造血细胞,然后在24小时内输注到受者中。收集治疗性细胞,并通常在24小时内输注。或者,可收集并冷冻保存造血细胞。

[0391] 非亲属脐带血(UCB)是HPC移植的供者细胞的宝贵来源,从而将这种治疗模式扩展到缺乏其他供者的患者。

[0392] 自体移植物(自体同源的)移植涉及受者接受其自身的骨髓或造血祖细胞(hpc)。

[0393] 如果要输注大量的hpc(多于4袋),则医师可在一半的袋子后停止,然后在1至2小时后恢复移植。这是为了防止因在一段较短的时间内输注大量的流体而造成的循环负荷过重。医师进行检查以确定患者是否应在恢复移植前重新用药。

[0394] 表8

[0395]

护理活动	关键点
施用前:	
A. 确定移植物的来源,并向患者解释输注方法。说明可能的副作用,并指导患者告知若有的任何 RN。 **1. 施用检查类似于其它血液产品。** **2. 检查异基因患者的 ABO 相容性。** **B. 确定计划的输注的大约时间。按要求在移植前对患者进行术前用药。**	**由于添加到 hpc 的培养基和/或红细胞的溶血,尿液在 24 小时内可能为粉红色。** **需要术前用药。如果 ABO 不相容,则必须从移植物除去红细胞。术前用药可由苯海拉明(Benadryl)和氢化可的松组成以最大程度减少可能的反应。**

C. 在室内配备 O_2 与鼻套管和吸气装置。苯海拉明(Benadryl)和速尿(Lasix)可容易获得（在 Pyxis Station 中）。在输注一小时内确立基线生命体征。 在出现过敏反应或体液过多的情况下。

D. 使用一级和二级 IV 管路（无过滤器），连接 NS 以预充一级管路作为备用物。回洗以预充将输注细胞的二级管路。获得待输注的每袋细胞的新的二级管路。

E. 将中心静脉导管(CVC)的大内腔用于移除无针连接器，并将 IV 管路直接附接到大内腔的套头。 在输注细胞前评估管线的开放情况。管线必须在重力作用下完全开放运行。如果需要，准备开始外周 IV。

F. MD 注射抗凝剂到冷冻保存的产品中以防止细胞凝结。

G. 产品由 MD 带到床边。(该产品不进行照射或过滤)。 将冷冻保存的hpc在解冻后10-15分钟内输注以保持细胞活力。在解冻后 30 分钟内完全输注细胞。

施用:

[0396]

A. *新鲜（未冷冻保存的）骨髓、HPC 或 TC:*

1. 将二级管路的尖刺插入细胞袋中。将 IV 泵编程到适当的时间和体积。
2. 以 250ml/h 输注细胞。
3. 可存在 1 或 2 袋细胞。 直到输注完第一袋后才释放第二袋细胞。细胞输注长度可因细胞总体积而变化
4. 在开始输注后 15 分钟记录生命体征。 监控过敏反应的体征和症状。

冷冻保存的 HPC 或 TC:

1. 将二级管路的尖刺插入细胞袋中。将 IV 泵编程到适当的时间和体积
2. 经 10 分钟输注冷冻保存的细胞。 为了维持细胞活力，在解冻后 30 分钟完全输注细胞。
3. 在输注细胞后，冲洗输注管路，通过 NS 回洗而排空袋子。使用该回洗方法输注剩余的细胞。 将 CD 34 选择后的细胞用 2%人血清白蛋白和 normalsol 的注射器冲洗。

4. 如果要输注大量的 hpc（多于 4 袋），则在输注中途和临床上需要时重复生命体征和肺评估。

在一段较短的时间内输注大量流体可导致体液过多。
主治医生必须直接监督 TC 的输注。

C. 冷冻保存的/冷冻的治疗性细胞：

1. 如果细胞体积较小（例如 Tc），则可使用注射器在导管套头处通过直接静脉推注方法施用细胞。在细胞输注前后用盐水冲洗导管。

[0397]

施用后：

A. 在输注结束时，评估患者呼吸状态和皮肤的可能反应。在输注后 1 小时内再次评估生命体征。

反应体征和症状可包括恶心、僵硬、肺栓塞、呼吸浅短、心动过速、心动过缓（使用冷冻的细胞）和心脏负荷过重。

C. 在输注结束时，设置新的无针连接器，然后用肝素锁住中心导管。也可恢复之前的溶液输注。

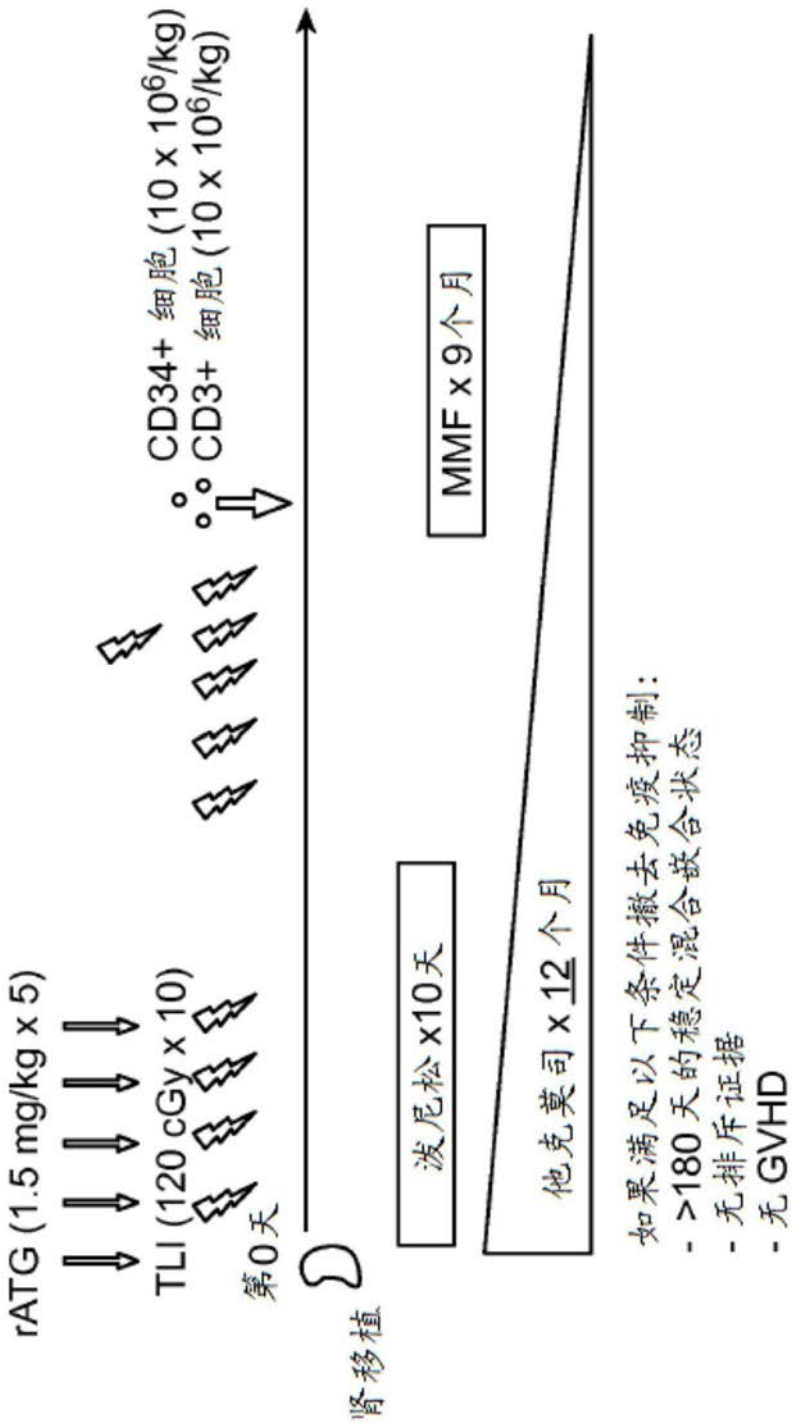

rATG (1.5 mg/kg x 5)
TLI (120 cGy x 10)
第0天
肾移植
CD34+ 细胞 (10 x 10^6/kg)
CD3+ 细胞 (10 x 10^6/kg)
波尼松 x10天
他克莫司 x 12 个月
MMF x 9个月
如果满足以下条件撤去免疫抑制:
- >180 天的稳定混合嵌合状态
- 无排斥证据
- 无 GVHD

图1

患者*	年龄/性别	ESRD原因	总剂量 TLI (cGy)	CD34*细胞剂量(x10^5/kg)	CD3*细胞剂量 (x10^5/kg)	最后一次观测时的血清肌酐 (mg/dL)	嵌合状态持续时间
1 (26 mo)	47/M	IgA	1200	11.8	3	1.7	1 mo
2 (10 mo)	24/F	SLE	1200	14.5	10	0.9	10 mo
3 (6 mo)	35/F	未知	1200	21.9	10	1.0	6 mo
4 (6 mo)	33/M	未知	1200	9	10	1.3	<1 mo

* 括号显示从肾移植后的随访持续时间

图2

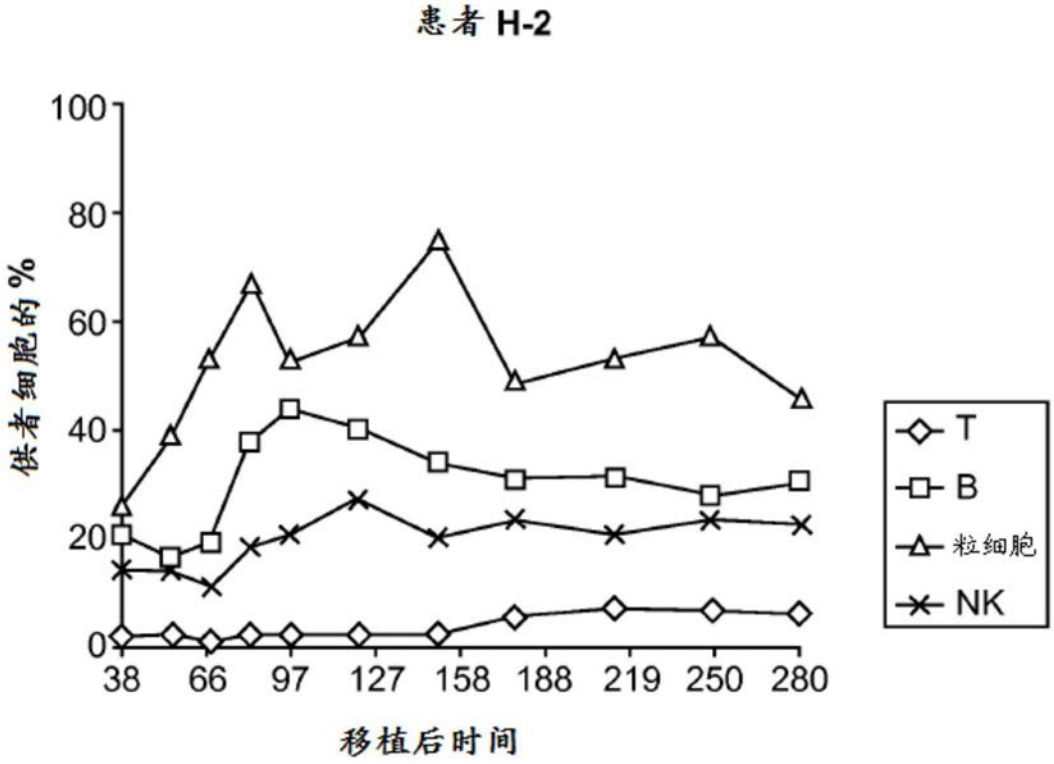

患者 H-2
100
80
60
40
20
0
供者细胞的 %
38
66
97
127
158
188
219
250
280
移植后时间
T
B
粒细胞
NK

图3

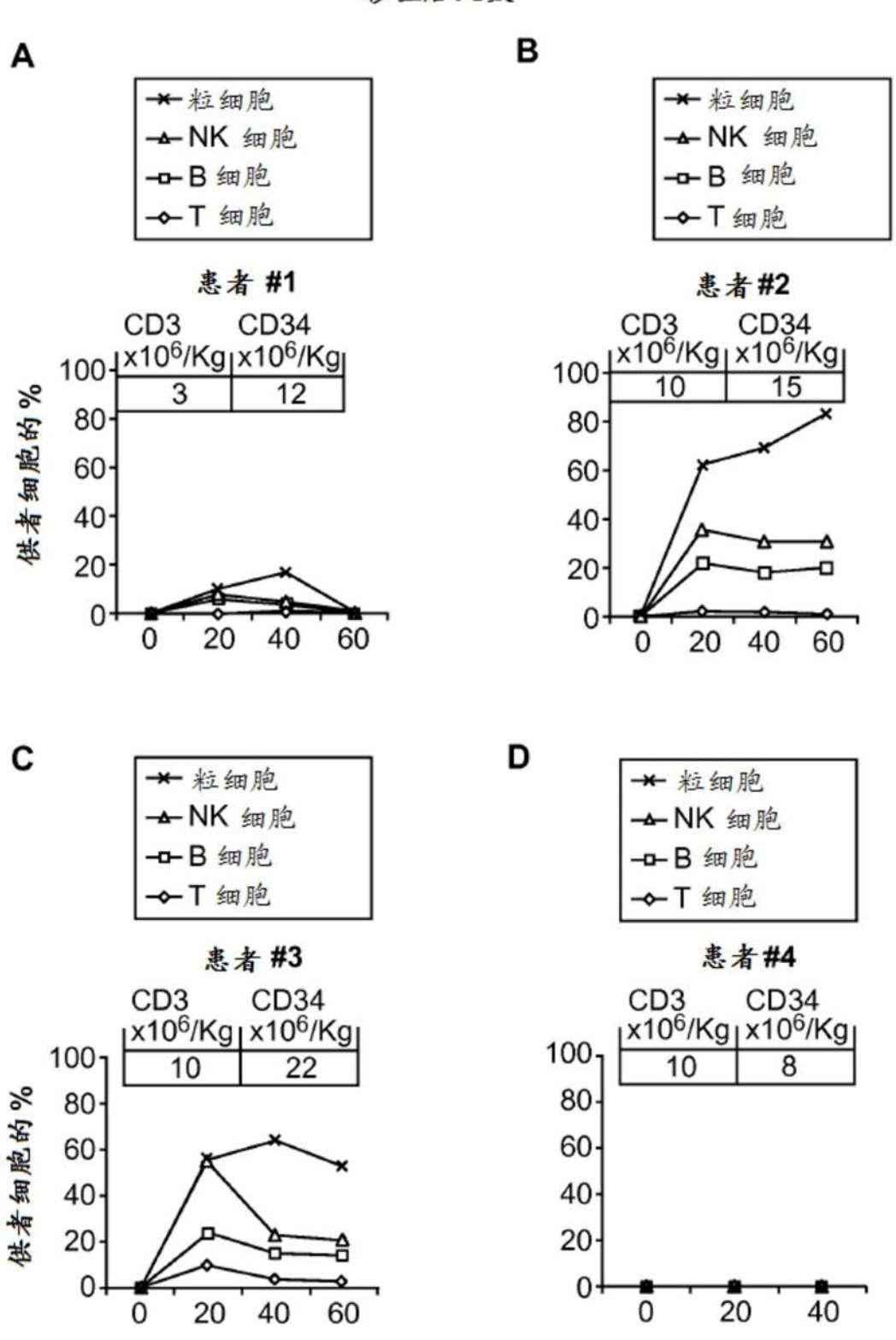

移植后天数
A
粒细胞
NK 细胞
B 细胞
T 细胞
患者 #1
CD3 x10⁶/Kg
CD34 x10⁶/Kg
3
12
供者细胞的 %
B
患者#2
10
15
C
患者 #3
22
D
患者#4
8

图4