

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>  
C12N 5/00  
A61K 35/14  
A61K 35/28  
A61P 7/00  
A61P 43/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 99815503.9

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 3 日 [11] 授权公告号 CN 1213143C

[22] 申请日 1999. 11. 10 [21] 申请号 99815503. 9  
[30] 优先权  
[32] 1998. 11. 11 [33] US [31] 09/189577  
[86] 国际申请 PCT/US1999/026773 1999. 11. 10  
[87] 国际公布 WO2000/027998 英 2000. 5. 18  
[85] 进入国家阶段日期 2001. 7. 9  
[71] 专利权人 埃莫里大学  
地址 美国乔治亚州亚特兰大  
[72] 发明人 E · K · 瓦勒  
审查员 王灵茹

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 罗 宏 周慧敏

权利要求书 1 页 说明书 13 页

[54] 发明名称 同源异型的造血系统重构细胞的制  
药应用

[57] 摘要

提供了用以在同源异型造血系统重构细胞移植受体中降低或防止移植物 VS. 宿主疾病的方法，该方法包括以同源异型造血系统重构细胞对受体进行给药，在该系统中树状细胞的数量被有效地降低，如此便降低或防止了移植物 VS. 宿主疾病。提供了用以增加同源异型造血系统重构细胞移植受体存活的机率的方法，该方法包括以同源异型造血系统重构细胞对受体进行给药，在该系统中树状细胞的数量被有效地降低，如此便增加了该受体存活的机率。公开了一种柱系统，该系统用于在移植前制备造血系统重构细胞，用以选择 CD34 细胞除去树状细胞。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 树状细胞的数量已有效减少的同源异型的造血系统重构细胞在制备施用于需要进行同源异型造血系统重构细胞移植的患者的药物中的应用，其中树状细胞的数量是通过除去具有一个或多个细胞表面标记 CD123、CD45RA、CD4 和 CD36 的 CD3<sup>-</sup>细胞而不除去 CD3<sup>+</sup>细胞而有效减少的。

2. 权利要求 1 的应用，其中树状细胞为树状细胞祖细胞。

3. 权利要求 2 的应用，其中施用的树状细胞祖细胞的数量低于  $0.25 \times 10^6$  / 千克受者体重。

4. 权利要求 1 的应用，其中该树状细胞使用荧光激活的细胞分选而除去。

5. 权利要求 1 的应用，其中树状细胞通过以下方法除去：a) 令造血细胞同结合于顺磁支持物的配基相接触，该配基特异地结合树状细胞表面的受体，以及 b) 以磁体从同源异型造血系统重构细胞中除去树状细胞。

6. 权利要求 1 的应用，其中树状细胞通过令同源异型造血系统重构细胞通过一根或几根柱子而被除去，所述的柱子含有支持材料，该支持材料结合有一种或多种配基，这些配基与表达于树状细胞表面的一种或多种蛋白相结合。

7. 权利要求 5 的应用，其中配基选自：IL3，抗 CD123，抗 CD45RA，抗 CD4 和抗 CD36。

8. 权利要求 6 的应用，其中配基选自：IL3，抗 CD123，抗 CD45RA，抗 CD4 和抗 CD36。

9. 权利要求 3 的应用，其中树状细胞祖细胞通过令同源异型造血系统重构细胞与 IL-3-毒性部分偶联体相接触被除去，其中树状细胞祖细胞被毒性部分破坏。

10. 权利要求 9 的应用，其中毒性部分选自白喉毒素，蓖麻毒素和百日咳毒素。

## 同源异型的造血系统重构细胞的制药应用

## 5 本发明的领域

本发明的领域为将来自供体的同种异型的造血体系重构细胞移植入遗传上不同的受体的改进方法，本领域还涉及到特定的造血细胞类型的去除，这些被除去的细胞类型的存在相关于移植受体存活的降低。

## 10 发明背景

对于多种恶性和遗传的血液病和造血细胞疾病，同种异型骨髓移植是优选的治疗方法。这一疗法的广泛应用受限制于合适的骨髓供体的获得，该供体同患者在遗传上相关并在血细胞表面具有相同的移植抗原。只有 25% 的患者具有一个同胞为抗原匹配的潜在供体。缺乏适当的同胞供体的患者可以通过使用来自抗原匹配但遗传上无关的供体（由 national registry 鉴别）的骨髓，或通过使用来自遗传上相关，但在 6 个人类白细胞抗原上有 1 到 3 个同患者不同的同胞或亲本的骨髓来进行骨髓移植。但是，使用抗原不匹配而遗传上相关的亲本或同胞或者抗原上匹配但遗传上无关的供体时，致命的移植物 vs. 宿主症 (GvHD) 和/或抑制物排异的可能性从匹配的同胞供体的 25%，在匹配的无关供体和来自患者家庭的不匹配的相关供体的情况下提高至 50%。进一步，当无关供体在 6 个主要移植抗原上有 1 个不匹配时，移植物排异和/或致命的 GvHD 的可能性提高至 60%。

GvHD 是一种发病率较高的疾病。产生急性 GvHD 的患者可能在其皮肤表面发生水泡，发生大规模的胃肠道出血或急性肝衰竭和黄疸。产生慢性 GvHD 的患者可能发生导致关节挛缩的硬皮病，皮肤溃疡，毛发脱落和全身性消瘦综合征 (generalized wasting syndrome)。患有急性或慢性 GvHD 的患者的免疫受抑制并有罹患致命的条件性感染的危险，这类似于 AIDS 患者所发生的感染。

30 目前，现有的移植技术涉及到 T 细胞的耗竭 (depletion)，其根据是研究表明这些细胞的去除导致移植物 vs. 宿主的反应的几率降低。供体骨髓的 T 细胞通过使用几种工艺之一来去除，例如 CD3<sup>+</sup>细胞的除

去, E 红细胞形成玫瑰花结和大豆凝集素的使用。或者使用供体骨髓的富集在同源异型移植物上诱导临床试验, 基于表面标记 CD34 的存在而对造血干细胞正选择来进行富集, 通过该方法去除了大量的 T 细胞。在这一审验中, 在 CD34<sup>+</sup>选择后进行 CD2<sup>+</sup>细胞的去除, 该去除耗竭了 T 细胞和自然杀伤细胞 (NK) 的一个额外的群体 (Clarke, E., Potter, M.N., Steward, C.G., Cornish, J.M., Marks, D., Oakhill, A., and Pamphilon, D.H. 1997 Blood 90(10)Suppl. 1; page 37A; Abst. No. 1662 ; “ Double T-cell depletion using sequential +/- Immunoaffinity or CD34<sup>+</sup> cell selection followed by campath-M: Effect on CD34<sup>+</sup> and progenitor cell recovery”; Bunjes, D., M. Wiesneth, S. Von Harsdorf, J. Duyster, T. Shreiner, C. Duncker, B. Macari, B. Kubanek 1997 Blood 90(10)Suppl. 1; page 1034; Abst. No. 454; “T cell depleted allogeneic PBSC transplant In 30 patients with hematological malignancies: Benefis and risks”)。使用目前的 CD34<sup>+</sup>选择设备 T 细胞平均耗竭 2~3 个数量级; 例如, 一个典型的 CD34<sup>+</sup>选择移植物的移植相对于每 kg 受体体重可含有  $2-4 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>细胞和  $0.1-0.5 \times 10^6$  CD3<sup>+</sup>细胞 (即 T 细胞)。然而, 即使经该处理, 这样的患者还需要 GvHD 预防。

此外, 尽管来自匹配的无关或不匹配的相关同胞供体所移植的骨髓中的 T 细胞的去除减少了 GvHD, 它还是与患者对同源异型骨髓的排斥的升高的发生率有联系。因此, 存在于同源异型骨髓移植物中的白细胞, 尤其是 T 细胞, 对于确保在抗原性上和遗传上不匹配的受体中的移植十分重要., 存在于同源异型骨髓移植物中的 T 细胞还在消除受体中的残余癌细胞中起重要作用, 该作用称为“移植物 vs. 白血病效应”。

为最小化以 T 细胞进行给药的不良影响, Waller 等人以非增殖的 T 细胞进行给药, 该非增殖的 T 细胞在缺少 GvHD 的情况下改善移植 (美国专利号 No. 5, 800, 539)。在另一个临床研究中, Aversa 等人 (New Engl. J. Med. 339:1186-1193) 对受体以额外剂量的供体外周血单核细胞进行给药, 该受体接受了一个含有骨髓或外周血单核细胞的完全单体的不匹配供体移植物, 该供体外周血单核细胞已经进行了 T 细胞耗竭并且随后进行了 CD34<sup>+</sup>选择。

这样，自从 30 年以前的第一例人类骨髓移植成功以来，尽管移植工艺稳步提高，接受同源移植物的患者仍死于移植物排斥和移植物 vs. 宿主疾病以及其它并发症。开发一种同源异型骨髓移植的最佳程序仍是迫切需要的。

- 5 本发明基于在供体移植物中一个相关细胞类型家族的存在，该家族的存在与移植物的存活的降低有关。除去这些细胞类型的一种或几种提高了同源异型移植物在受体中的存活，这些类型细胞被称为树状细胞或树状细胞前体（DCP）。

#### 发明概述

- 10 本发明提供了一种方法，该方法用以在同源异型造血系统重构细胞（reconstituting cell）移植受体中降低或防止移植物 VS. 宿主疾病，该方法包括以同源异型造血系统重构细胞对受体进行给药，在该系统中树状细胞的数量被有效地降低，如此便降低或防止了移植物 VS. 宿主疾病。本发明还提供了一种方法，该方法用以增加同源异型造血系统重构细胞移植受体存活的机率，该方法包括以同源异型造血系统
- 15 重构细胞对受体进行给药，在该系统中树状细胞的数量被有效地降低，如此便增加了该受体存活的机率。本发明还提供了一种方法，该方法用以增加同源异型骨髓受体存活的机率，该方法包括以同源异型造血系统重构细胞对受体进行给药，在该系统中被用于给药的树状祖细胞
- 20 的数量低于  $0.25 \times 10^6$  / 千克受体体重。本发明还提供了—个柱系统，该系统用于在移植前制备造血系统的重构细胞，该系统包括的第一根柱子含有一种结合有可以特异结合 CD34 的抗体的支持物，第二根柱子含有一种结合有可以特异结合表达于树状细胞前体表面的标记的抗体的支持物，其中第一根柱子在造血系统的重构细胞通过时吸附了至少 30
- 25 % 的 CD34<sup>+</sup>细胞，以从第一根柱子释放出的被吸附的细胞组分通过第二根柱子并且吸附表达树状细胞前体表面的标记的细胞，这样便有效地减少了树状祖细胞的数量。

#### 发明详述

- 30 通过参考本文在以下所包括的定义，实施方案的详细描述和实施例可以更容易理解本发明。

#### 定义

本文所用的“一个”或“一种”可以指一个或多于一个，这取决

于其所使用时的上下文。例如，“一种”细胞可能指一个或多个细胞。

本文所用的“树状细胞”或“DC”指一种成熟的抗原呈递细胞或如下定义的树状细胞母细胞，或以上两者，该成熟的抗原呈递细胞通过其表面的以下标记中的一种或多种来确认：CD1a, CD1b 和 CD1c, CD4, Cd11c, CD33, CD40, CD80, CD86, CD83, HLA-DR。

本文中可互换使用的“树状细胞祖细胞”、“树状祖细胞”、“树状细胞前体”或树状前体细胞“DCP”指的是一种造血细胞，该细胞通过其表面的以下标记中的一种或多种的表达来确认：CD123, CD45RA, CD36 和 CD4。

“有效地降低”指的是，在一个造血系统的同源移植物的重构细胞中，DC 和 / 或 DCP 的数量被降低至满足以下方程：

$$[CD34^+ \text{细胞数}] - 2 \times [DC/DCP \text{数}] \geq 1.5 \times 10^6 \text{ 细胞/千克受体体重。}$$

“造血系统重构细胞”指的是一个细胞群体，在优选情况下是人类细胞群体，该群体有分裂并产生后代的能力，该后代包括血液中所有成形的细胞成分。造血系统重构细胞的来源可以包括骨髓（胎儿和成人）和外周血单核细胞（PBMC）。

“供体”和“供体来源”指的是动物，在优选情况下是人类，该动物为天然来源，造血系统的重构细胞可从中原始地移除。

“受体”指的是动物，在典型情况下是人类，该动物被移植入了造血系统的重构细胞。

“同源异型”指的是受体并非造血系统的重构细胞可从中原始地移除的天然来源。

“移植体”、“同源移植物”和“移植物”在本文中可互换使用，它们指的是被移植入一个受体的造血系统的重构细胞。

## 25 详细描述

本发明提供了一种方法，该方法用以增加同源异型造血系统重构细胞移植受体存活的机率，该方法包括以同源异型造血系统重构细胞对受体进行给药，在该系统中树状细胞的数量被有效地降低。即，移植体中 CD34<sup>+</sup>细胞的数量同 DC 细胞的数量比值符合以下方程：

$$[CD34^+ \text{细胞数}] - 2 \times [DC \text{数}] \geq 1.5 \times 10^6 \text{ 细胞/千克受体体重。}$$

在一个实施方案中，用以增加同源异型造血系统重构细胞移植受体存活的机率的方法包括以同源异型造血系统重构细胞对受体进行给

药，在该系统中树状细胞前体或 DCP 的数量被有效地降低。即，移植  
物中 CD34<sup>+</sup>细胞的数量同 DCP 细胞的数量比值符合以下方程：

$$[\text{CD34}^+\text{细胞数}] - 2 \times [\text{DCP 数}] \geq 1.5 \times 10^6 \text{ 细胞/千克受体体重。}$$

表 1 所示为反映出有效降低的移植物的 CD34<sup>+</sup>细胞和 DCP 细胞的代  
5 表性组合。

表 1. 本发明的一种移植植物中的细胞数

| CD34 <sup>+</sup> 细胞数 | DCP 细胞数* | df 值 |
|-----------------------|----------|------|
| 4.73                  | 0.02     | 4.69 |
| 4.4                   | 1.4      | 1.6  |
| 2.7                   | 0.5      | 1.6  |
| 1.9                   | 0.15     | 1.6  |
| 2.38                  | 0.3      | 1.77 |
| 3.34                  | 0.04     | 3.27 |

\*  $\times 10^6 / \text{每千克受体体重 (df=函数差)}$

10

尽管不想通过理论加以限制，据认为从同源移植植物中除去树状细胞可以降低移植 vs. 宿主疾病 (GvHD)。因此，在另一个实施方案中，本发明提供了一种方法，该方法用以在同源异型造血系统重构细胞移植受体中降低并或许防止移植 vs. 宿主疾病，该方法包括以同源异型造血系统重构细胞对受体进行给药，在该系统中树状细胞的数量被有效地降低。在另一个实施方案中，用以在同源异型造血系统重构细胞移植受体中降低并或许防止移植 vs. 宿主疾病的方法包括以同源异型造血系统重构细胞对受体进行给药，在该系统中树状细胞前体 (DCP) 的数量被有效地降低。在一个特定的实施方案中，发明还提供了一种方法，该方法用以在同源骨髓移植植物移植受体中降低或防止移植 vs. 宿主疾病，该方法包括以同源异型造血系统重构细胞对受体进行给药，在该系统中被用于给药的树状细胞前体的数量低于  $0.25 \times 10^6 / \text{千克受体体重}$ 。

20

在一个实施方案中，将被移植的同源异型造血系统重构细胞经过

针对 CD34<sup>+</sup>表型的正选择, 即针对 CD34 细胞表面标记表达的选择。“正选择”指的是表达 CD34 蛋白的细胞通过本领域已知的方法被收集, 方法例如荧光激活的细胞分选或免疫磁性层析, 描述见本文实施例和引用的参考。对重构细胞的 CD34<sup>+</sup>造血系统的正选择可以在造血系统的重构细胞中的树状细胞的耗竭或去除之前或之后进行。

本发明的方法可以同其它用于移植造血系统的重构细胞的方法或过程进行组合使用。例如, 本文所披露的方法可以同 Waller 等人的方法(美国专利 No. 5, 800, 539) 综合使用, Waller 等人的方法包括以非增殖的 T 细胞进行给药, 非增殖的 T 细胞可增强移植以改善同源异型细胞移植。在替代情况下, 或者同 Waller 等人包括以非增殖的 T 细胞进行给药的方法进一步综合使用的情况下, 本文所述的方法可以同 Aversa 等人的方法(New Engl. J. Med. 339:1186-1193) 综合使用, Aversa 等人的方法包括以额外剂量的经过 T 细胞耗竭的 CD34<sup>+</sup>供体外周血液单核细胞进行给药以提高同源异型细胞移植。

本发明的效能可以通过存活者数量的增加来显示, 这一提高是在移植后 2 或 3 年在本发明方法的移植造血系统的重构细胞的受体群体中, 同非本发明方法的移植造血系统的重构细胞的受体群体相比较来测量。本发明在降低或防止移植物 vs. 宿主疾病上的效能可以通过临床医生所熟知的一批临床指数在临床上测定, 例如完全移植时间(time to full engraftment) 或减低的移植失败率。

#### 树状细胞或树状前体细胞的标记

树状细胞是抗原呈递细胞, 它们在免疫应答的起始中十分重要。根据体外培养和特征研究, DC 被认为代表了相关细胞类型的一个家族, 它们可能来自于同一个谱系。基于特定的细胞表面标记的表达, 目前在许多组织中鉴别出 DC 的母细胞(DCP), 如骨髓和血液。在表皮中发现了前体细胞的一个类型, 郎格罕氏细胞。在郎格罕氏细胞上的工作显示, 这些未成熟的前体细胞能够摄取抗原, 但在分化成成熟的 DC 之前不表现出刺激 T 细胞的显著能力。

多种可用于定义树状细胞家族的特定细胞类型的标记已被鉴别出来。例如, 表达于成熟树状细胞表面的标记包括 CD1a, CD11c, DEC-205, CD4, CD33, CD40, CD80, CD83 和 CD86。在典型情况下, 在成熟树状细胞表面找不到以下标记: CD20, CD3, CD14, CD16, CD2, CD45RA, CD56

和 CD19。存在于树状细胞前体的细胞表面标记包括 CD4, CD45RA, CD34, CD10, CD123 和 CD36, 而树状细胞前体表面找不到以下标记: CD11c, CD1a, CD8, CD40, CD80, CD83 和 CD86(例见 Caux et al. Intl. Immunology 1994 6(8):1177-1185; Steptoe et al. J. Immunology 1997 159:5483-5491; Grouard et al. (J. Exp. Med. 1997 185(6):1101-1111; O'Dokherty et al. Immunology 1994 82:487-493; Galy et al. J. Immunotherapy 1998 21(2):132-141; Strunk et al. J. Exp. Med. 1997 185(6):1131-1136; Olweus et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997 94:12551-12556; Prignano et al., Intl. J. Dermatol. 1998 37:116-119)。通过这些标记的适当使用可以将树状细胞同树状细胞母细胞区分开来。

#### 用于在造血系统重构细胞中除去和 / 或降低 DC 和 / 或 DCP 的方法

树状细胞和 / 或树状细胞前体从造血系统的重构细胞中的去除可以通过一批方案, 使用细胞分选和收集技术来完成, 这些技术在本领域中为人熟知(例如, Olweus et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997 94:12551-12556), 它们包括荧光激活的细胞分选(FACS)和免疫磁性层析。

例如, 为从造血系统的重构细胞中除去 DC, 该造血系统重构细胞首先同荧光标记的抗体接触, 如, FITC 标记的抗体, 该抗体特异地同成熟树状细胞标记相结合, 例如 CD1a, CD11c, DEC-205, CD4, CD33, CD40, CD80, CD83 和 CD86, 随后该造血系统的重构细胞被用于荧光激活的流式细胞仪。在尺度为四十(four decade)的对数图上表现出 FITC 信号高于二十(second decade)的细胞被除去, 而包括 CD34<sup>+</sup>细胞在内的不发光的细胞被收集用于移植。

用于去除 DCP 的方案的目标是除去具有 CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>表型的细胞群体, 该群体的进一步特征在于其在 FASC(荧光激活的细胞分选)图中具有比典型的单核细胞更低的侧向散射。然而, 如下文详述, 这一群体可以根据一批不同的表型标记来鉴别和去除。

一种用于有效地降低 DCP 的数量的方案是除去 CD123<sup>+</sup>细胞, 该 CD123 表面蛋白为白细胞介素 3(IL-3)受体的 $\alpha$ 链(IL-3R- $\alpha$ )。作为一个例子, 可以将附着于顺磁珠的与 CD123 特异结合的抗体(可获自 PharMingen/Becton-Dickinson, San Diego, CA)同造血系统的重构

细胞相接触，接触时磁珠和靶细胞比例为 50:1，随后使用一永磁体或磁化物质将磁珠从造血系统的重构细胞中除去。在另一个实施方案中，特异结合 CD123 的抗体被结合于一固定支持物，随后将造血系统的重构细胞通过该支持物，被洗脱的细胞被耗竭了 DCP。在另一个实施方案中，DCP 可以通过先以荧光标记的单克隆抗体结合 IL-3R- $\alpha$  / CD1231 蛋白，随后经荧光激活的细胞分选除去。在这些实施方案中，所产生的用于移植的造血系统的重构细胞不会表达 CD123，但该系统包括有 CD34<sup>+</sup>细胞。

DCP 还可以基于 CD4 蛋白的在细胞表面的存在而从造血系统的重构细胞中除去。在一个特定的实施方案中，一个荧光标记的抗 CD4 的抗体被加入造血系统的重构细胞。该造血系统的重构细胞被用于荧光激活的流式细胞仪，在尺度为四十的对数图上表现出 FITC 信号高于二十的细胞被除去，而包括 CD34<sup>+</sup>细胞在内的不表达的细胞被收集。

同样地，其他用于除去树状细胞和 / 或树状细胞母细胞的配基可被附着于顺磁珠，该顺磁珠同造血系统的重构细胞相接触，随后通过一永磁体除去磁珠。这些配基可以是任何与细胞表面蛋白结合的分子。例如，配基可以是抗体，细胞因子或激素。配基抗体可以是多克隆或单克隆并且可以通过该领域所熟知的方法产生。

在替代情况下，配基可以同一支持物相结合，造血系统的重构细胞被通过该支持物并收集未结合的细胞。在另一实施方案中，给配基可以偶联一荧光标记，以使被标记的细胞通过经荧光激活的流式细胞仪的分选而被除去。这些方案的结果为 DC/DCP 耗竭的造血系统的重构细胞。除抗 CD123 或抗 CD4 之外，其它可用于在本发明中除去 DCP 的配基还有 CD45RA 抗体和 CD36 抗体。被发明的任何配剂均可单独使用或综合使用以获得树状细胞群体经有效降低的造血系统的重构细胞。

在替代情况下，IL-3 作为 CD123 表面蛋白的配基其本身可用于从造血系统的重构细胞中除去 DCP。如上文对抗体配基的描述，IL-3 可结合于一根柱子上或附着于顺磁珠上以从移植物中除去 DCP。在另一个实施方案中，IL-3 被偶联于一毒性部分并同造血系统的重构细胞孵育该 IL-3-毒性部分结合于 DCP 表面并被摄入细胞，该细胞为该毒性部分杀死。这样，DCP 通过选择性细胞杀伤而从造血系统的重构细胞中消除。

任何对于人类细胞有毒性并可以同 IL-3 共价偶联的微粒均可被使用；毒性部分的例子包括 diphtheria toxin, 蓖麻毒素和百日咳毒素以及该领域已知的其他毒素, 但不限于此。

这些用于除去 DC / DCP 的工艺的任何一种或任何一种组合均可被使用以有效地降低在一个造血系统重构细胞的同源移植物中的 DC / DCP 数量。例如, 一个同源移植物可以通过上述的一种或几种工艺处理来去除 CD4<sup>+</sup>和 CD123<sup>+</sup>细胞。或者, 一同源移植物可以经处理除去以下任何一种组合: CD123<sup>+</sup>和 CD45RA<sup>+</sup>细胞; CD123<sup>+</sup>和 CD36<sup>+</sup>细胞; CD45RA<sup>+</sup>和 CD36<sup>+</sup>细胞; CD123<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>和 CD45RA<sup>+</sup>细胞; CD123<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>和 CD36<sup>+</sup>细胞; 或 CD4<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>和 CD36<sup>+</sup>细胞。在一个特定的实施方案中, 该同源移植物一开始进行正选择, 该选择针对在表面表达 CD34 标记的细胞, 这些 CD34 正选择的细胞随后经处理以除去表达某些细胞表面蛋白的细胞, 这些蛋白为以下组合任何一种: CD123<sup>+</sup>和 CD45RA<sup>+</sup>细胞; CD4<sup>+</sup>和 CD123<sup>+</sup>细胞; CD123<sup>+</sup>和 CD36<sup>+</sup>细胞; CD45RA<sup>+</sup>和 CD36<sup>+</sup>细胞; CD123<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>和 CD45RA<sup>+</sup>细胞; CD123<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>和 CD36<sup>+</sup>细胞; 或 CD4<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>和 CD36<sup>+</sup>细胞。

通过使用任何先前用于除去 DCP 的工艺, 本发明提供了一种组合物, 该组合物适用于向有需要的受体移植造血系统的重构细胞的一种移植物, 该组合物包括造血系统的重构细胞, 在该系统中树状细胞母细胞的数量被有效地降低。

本发明还提供了柱子和柱系统以用于在移植前制备造血系统的重构细胞, 这样可使移植物中 DCP 的数量被有效地降低。作为例子提供了一种双柱系统, 该系统包括的第一根柱子含有一种支持物, 该支持物结合有可特异结合 CD34 的抗体, 第二根柱子含有一种支持物, 该支持物结合有抗体, 该抗体与表达于树状细胞母细胞的表面标记特异地结合, 其中第一根柱子吸附了至少百分之三十 (30%) 的 CD34<sup>+</sup>细胞。被吸附的 CD34<sup>+</sup>细胞从第一根柱子释放 (例如, 通过搅动) 后随即通过第二根柱子, 该柱子含有足量的被结合抗体以吸附表达 DCP 表面标记的细胞, 这样便有效地降低了第二根柱子的洗脱流分 (pass-through) 中的 DCP 数量。在一个特定的实施方案中, 经该双柱系统处理后的移植物的细胞组分含有至少  $2 \times 10^6$  CD34 细胞 / 千克和少于  $0.25 \times 10^6$  DCP / 千克受体体重。

在其它的实施方案中，一个用于在移植前制备造血系统的重构细胞以使移植物中 DCP 的数量被有效地降低的柱子包括一种支持物，该支持物结合有一种抗体，该抗体可与选自以下组合群体的一种细胞表面标记的组合结合：CD4 和 CD123；CD123 和 CD45RA；CD123 和 CD36；  
5 CD45RA 和 CD36；CD123，CD4 和 CD45RA；CD123，CD4 和 CD36；或 CD4，CD123，CD45RA 和 CD36。在一个特定的实施方案中，该柱系统含有足量的被结合抗体以吸附表达 DCP 表面标记的细胞，这样便使造血系统的重构细胞中的 DCP 数量少于  $0.25 \times 10^6$  DCP / 千克受体体重。

本申请自始至终引用了多种出版物。这些出版物的披露内容在此  
10 全文引入作为参考。

以下的实施例意图在于阐释而非限定本发明。尽管它们在是典型的可能被用到的方法，其它为本领域的技术人员所知的步骤可能在替代的情况下被使用。

#### 实施例

##### 15 实施例 1. 移植患者检查

对移植体或同源移植物的调查的特点在于其在 104 位患者上进行，这些患者接受了未经 T 细胞耗竭的同源异型骨髓移植体，该移植体来自 HLA 匹配的同胞共体。对这些患者的移植前状态调整包括：二甲磺酸丁酯处理 (n=89)，全身照射并给药环磷酰胺 (n=10) 以及环  
20 磷酰胺 (n=5)。移植物中的细胞总数平均为  $3 \times 10^8$  细胞 / 千克受体体重。CD34<sup>+</sup>细胞的数目正向关于存活率的提高 (p=0.0004，全体存活；p=0.001，无疾病存活)。另外对移植物的一个细胞群体进行了定量，该群体的特征在于 CD3<sup>-</sup>，CD4<sup>+(Hi)</sup>，CD8<sup>-</sup>，低侧向散射，在此被认为 DCP，这些细胞在移植物中的数量负相关于整体存活率 (OS) 和无疾病存活  
25 率 (DFS, p=0.005)。在该调查中，供体年龄和性别，CFU-GM ( $0 - 41 \times 10^4$  每千克体重)，总 CFU ( $4 - 282 \times 10^4$  每千克体重) 以及 T 细胞亚集 (subset)、NK 细胞、B 细胞和单核细胞的数量在任何多变量模型中均非显著变量。

这样，可以基于移植物中的 CD34<sup>+</sup>细胞和 DCP 数量描述出一个简单的  
30 数学关系 (一个微分方程，df) 如下：df = (CD34<sup>+</sup>细胞数) -  $2 \times$  (DCP 数)。对于 df 的一个阈值， $1.5 \times 10^6$  每千克体重，将这些患者分为两组：移植物 df 大于或等于  $1.5 \times 10^6$  每千克体重的患者在 3 年内 DFS 为 67%，

与之相比移植物 df 小于  $1.5 \times 10^6$  每千克体重的患者在 3 年内 DFS 为 34 %

## 实施例 2. 选中的干细胞的移植

5 供体来源: 收集自 HLA 匹配或不匹配的供体的骨髓或外周血液干细胞。

供体 PBSC 收集: 为固定化 PBSC, 每天以 G-CSF 进行给药直至完成对白细胞的去除。供体根据其实际体重接受  $10 \mu\text{g/kg/天}$  皮下注射 G-CSF。在动员和白细胞去除期间必须遵从供体支持护理的制度标准。PBSC 通过白细胞消除法收集。白细胞去除应根据制度标准方法在一台连续的流式分离仪器上进行。每次白细胞去除收集的终点应为对多于 12 升全血量的加工或 4 小时的白细胞去除。白细胞去除应在供体 G-CSF 治疗的 +5 天开始并且每天进行 (白细胞去除最大为四天) 直至达到  $2 \times 10^6 \text{CD}34^+$  细胞 / 千克受体体重的目标 (加工后)。每天根据流式细胞仪分析  $\text{CD}34^+$  细胞数量来决定去除术是否应继续。

15 供体细胞制备: 按照已公开的方案 (例如, Kvalheim G, Pharo A, Holte H et al. The Use of immuneomagnetic beads and Isolex 300 gives high purity and yield of  $\text{CD}34^+$  cells from peripheral blood progenitor cell products. Bone Marrow Transplant 1996; 17(suppl 1): S57; and Cancelas JA, Canais C, Querol S et al.  $\text{CD}34^+$  cell transplantation from mobilized peripheral blood by immuneomagnetic absorption in breast cancer patients. Bone Marrow Transplant 1996; 17 suppl 1): S32) 使用免疫磁性吸附细胞系统来选择骨髓或 PBSC, 例如 Isolex300 系统 (Baxter Immunotherapy, Irvine, CA) 或下一代 Isolex300i 系统, 该系统可按照出版的方案 (Report Series 8, Initial Performance of Automates Isolex 300i System in Mulicenter International clinical Trials. I. Purity) 完全自动操作。这些设备产生的最终移植物平均纯度为 77-93%, 选择后细胞数为  $1.1-6.4 \times 10^6 \text{CD}34^+$  细胞每千克。如果适当, 额外量的移植物被冷冻保存与液氮的气相中以备进一步灌输。

30  $\text{CD}34^+$  选择的移植物随后经处理以除去 DCP (见下文实施例 3)。所产生的  $\text{CD}34^+$ , DCP 耗竭的移植物含有至少  $2 \times 10^6 \text{CD}34^+$  细胞 / 千克受体

体重并且少于  $0.25 \times 10^6$  DCP 每千克, 该移植物被灌输入受体。如果适当, 额外量的移植物被冷冻保存与液氮的气相中以备进一步灌输。

供体细胞移植: 以如上制备的供体细胞对需要这样的移植物的患者通过中央静脉导管 (典型的在胸部) 进行给药。在接受供体细胞灌输前的一至两天, 接受这些供体细胞的患者可能需要状态预调整处理。该状态预调整处理为全身照射或二甲磺酸丁酯处理同免疫抑制剂治疗联合使用, 免疫抑制治疗如 fludarabine, 三胺硫磷, 环磷酰胺和抗体处理以耗竭 T 细胞。

### 实施例 3. 细胞分选

细胞分选的一般方案。使用 FITC 偶联的 CD34 特异性单克隆抗体和识别 CD4, CD123, CD36 或 CD45RA 的 PE 偶联的单克隆抗体 (Becton-Dickinson, San Jose, CA) 对细胞进行染色。用直接偶联的同种型匹配的无关抗体作为参照。细胞在  $4^{\circ}\text{C}$  下在染色缓冲液中染色 30 分钟, 缓冲液的成份为 Hank's 盐缓冲溶液 (HBSS, Mediatech, Herndon, VA), 溶液中含 2% v/v 自体同源的人类血浆或 1% 人类血清白蛋白。过量的抗体通过以 10 倍体积的染色缓冲液稀释并随后  $500 \times g$  离心而除去。被染色的细胞使用 FACSCAN 流式细胞仪 (BDIS, San Jose, CA) 而间接分析或使用 FACSVANTAGE 细胞分选仪 (BDIS, San Jose, CA) 而进行无菌分选。使用适于可存活的有核细胞的中央和边缘散射门以获得表  
单模式数据 (list-mode data)。使用 CellQuest™ 或 LYSIS-II 软件 (BDIS, San Jose, CA) 进行数据分析。通过设置光学分选门以涵盖表达 CD34 的细胞 (一次 FITC 正事件) 并排除表达 DCP 标记的细胞 (一次 PE 正事件) 来分选  $\text{CD34}^+\text{DCP}^-$  细胞, 将  $\text{CD34}^+\text{DCP}^-$  细胞收集入灭菌的管中。

### 25 实施例 4. 分离的 DCP 的特征

树状细胞通过磁性柱分离而分离和纯化, 该过程使用 Miltenyi Biotec MACS 系统以吸附 (耗竭) 表达淋巴细胞、粒细胞或单核细胞标记的血缘正性细胞 (即 Lineage<sup>-</sup>)。随后使用 CD123-PE 和 CD11c-APC (FACS Vantage 系统, 自动分选选项, 使用一个初级 Enterprise488 氩激光和刺激染色激光) 进行的 Lineage<sup>-</sup> 群体细胞分选显示出树状细胞  
30 的两个不同群体, 区别在于这两种细胞表面抗原的表达模式: DC1 为  $\text{CD11c}^+$  和  $\text{CD123}^-$ , DCP2 为  $\text{CD123}^+$  和  $\text{CD11c}^-$ 。对这两种亚型的进一步

分析表明 DCP2 群体不能表达共刺激分子 CD80, CD86 和 CD40, 而 DC1 群体表现得可以表达这些标记。如本文所讨论, 这三种标记移植表达于成熟的树状细胞, 但不表达于树状细胞前体细胞。显示本文披露的两种用于树状细胞前体的方法的相关性的散射图显示的良好相关性  
5 (系数 = 0.82) 证实这些标记鉴别了相同的细胞群体, 这两种方法中 CD4<sup>+</sup> / CD3<sup>-</sup> 低侧向散射为其中一种, CD11c<sup>-</sup> / CD123<sup>+</sup> 为第二种。