

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410075742.7

A61K 45/00

A61K 31/37

A61P 37/02

A61P 19/02

A61P 29/00

A61P 3/10

A61P 17/00

[43] 公开日 2005 年 8 月 31 日

[11] 公开号 CN 1660427A

[22] 申请日 2004.12.23

[21] 申请号 200410075742.7

[30] 优先权

[32] 2003.12.23 [33] US [31] 60/532076

[71] 申请人 特拉科斯有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 D·佩里特 K·坎贝尔

J·吉尔斯-科马 G·哈里曼

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 刘 玥

A61P 9/10A61P 1/00A61P 25/00A61P 43/00

权利要求书 3 页 说明书 26 页

[54] 发明名称 体外光除去法与抗-TNF 治疗的组合

[57] 摘要

治疗自身免疫疾病、特应性疾病、移植排斥或 GVHD 或者改善其的一种或多种症状的方法，包括使用组合治疗。该治疗包括给予个体体外光除去法和 TNF α 拮抗剂。

ISSN 1008-4274

1. 一种治疗自身免疫疾病或改善一种或多种其症状的方法, 包括:
 - a) 给予患者已经受程序性细胞死亡诱导处理的细胞群; 和
 - 5 b) 给予个体有效量的 TNF 拮抗剂。
2. 权利要求 1 的方法, 其中细胞是自体白细胞。
3. 权利要求 1 的方法, 其中程序性细胞死亡诱导处理是 ECP 处理过程, 其使用可光活化化合物与活化所述可光活化化合物的一定波长的光。
4. 权利要求 2 的方法, 其中可光活化化合物是补骨脂素, 光是 UVA。
- 10 5. 权利要求 4 的方法, 其中补骨脂素是 8-MOP。
6. 权利要求 1 的方法, 其中 TNF- α 拮抗剂选自: REMICADE[®]、HUMIRA[®] 和 ENBREL[®] 治疗剂。
7. 一种用于治疗系统性红斑狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎、甲状腺炎、移植物抗宿主病、硬皮病、糖尿病、葛雷夫斯氏病; 肉样瘤病、慢性炎性肠病、
15 溃疡性结肠炎、弥漫性血管内凝血、动脉粥样硬化、和川崎病、多发性硬化和急性横向脊髓炎; 皮质脊髓系统损伤; 基底神经节病症或小脑障碍; 亨廷顿舞蹈病和老年舞蹈病; 药物诱导的运动障碍、帕金森氏症; 进行性核上麻痹症; 小脑和脊髓小脑障碍、脊髓小脑变性 (脊髓共济失调、弗里德赖希氏共济失调、小脑皮层恶化、多发性系统变性 (Mencel、Dejerine-Thomas、Shi-Drager 和
20 Machado-Joseph); 和系统性病症 (Refsum's 疾病、 β -脂蛋白缺血症、共济失调、毛细管扩张和线粒体多系统病症); 多发性硬化、急性横向脊髓炎; 神经原性肌肉、肌萎缩性脊髓侧索硬化、婴儿脊髓肌肉萎缩和青少年脊髓肌肉萎缩; 阿尔茨海默病; 中年 Down's 综合病症; 弥漫性雷维小体疾病; 雷维小体型老年痴呆; Wernicke-Korsakoff 综合病症; 慢性酒精中毒; Creutzfeldt-Jakob 疾病;
25 亚急性硬化全脑炎、Hallerorden-Spatz 疾病; 和拳击员痴呆 pugilistica, 白血病; 霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤, 和酒精诱导的肝炎的方法, 包含
 - a) 将细胞群给予需要其的个体, 该细胞群获自经受了用 UVA 光和 8-MOP 的 ECP 处理过程的个体血液的一部分; 和
 - b) 给予个体有效量的 TNF- α 拮抗剂。
- 30 8. 权利要求 7 的方法, 其中 TNF- α 拮抗剂是 REMICADE[®]、HUMIRA[®]

或 ENBREL® 治疗剂。

9. 权利要求 7 的方法，其中 TNF- α 拮抗剂是 REMICADE® 治疗剂。

10. 一种治疗类风湿性关节炎或改善其的一种或多种症状的方法，包括：

5 a) 将细胞群给予需要其的个体，该细胞群获自经受了用 UVA 光和 8-MOP 的 ECP 处理过程的个体血液的一部分；和

b) 给予个体 TNF- α 拮抗剂，其选自 REMICADE®、HUMIRA® 和 ENBREL®。

11. 权利要求 10 的方法，其中 TNF- α 拮抗剂是 REMICADE®。

10 12. 一种治疗特应性疾病或改善其的一种或多种症状的方法，包括：a) 将细胞群给予需要其的个体，该细胞群获自经受了程序性细胞死亡诱导处理的个体血液的一部分；和 b) 给予个体有效量的 TNF α 拮抗剂。

13. 一种方法包括：a) 在移植前，给予移植受体获自移植受体血液一部分的细胞群，其中所述的细胞群经受了程序性细胞死亡诱导处理；和 b) 给予所述的移植受体有效量的 TNF α 拮抗剂。

15 14. 权利要求 13 的方法，其中步骤 a) 和 b) 根据选自以下的时间表实施：在移植之前的一周进行 2 天；在收获所述移植之前的一周进行 3 天；在移植之前进行 2 周，每周进行 2 天；和在移植之前进行 3 周，每周进行 3 天。

15. 权利要求 13 的方法，其中可光活化化合物是补骨脂素，光是 UVA。

16. 一种方法包括：

20 a) 在所述受体接受所述植入前，给予植入受体获自植入受体血液一部分的细胞群，其中所述的细胞群经受了程序性细胞死亡诱导处理；

b) 给予所述的植入受体有效量的 TNF α 拮抗剂；和

c) 在所述受体接受所述移植后，给予所述受体获自所述受体血液一部分的细胞群，其中所述的细胞群经受了程序性细胞死亡诱导处理。

25 17. 权利要求 15 的方法，其中步骤 a) 和 b) 根据选自以下的时间表实施：在所述接受者接受所述植入之前的一周进行 2 天；在所述接受者接受所述植入之前的一周进行 3 天；在所述接受者接受所述植入之前进行 2 周，每周进行 2 天；和在所述接受者接受所述植入之前一周 3 天进行 3 周；和步骤 c) 根据选自以下组成的时间表实施：每周一次、每月一次、每月两次、每月三次、每隔一月一次、每三个月一次、每六个月一次和每年一次。

30

18. 一种治疗患有病症或倾向于患有病症的患者的方法，包括：测试患者以测定该患者是否患有病症，如果该患者患有病症或倾向于患有病症，则给予TNF α 拮抗剂和 ECP。

体外光除去法与抗-TNF 治疗的组合

5 背景技术

本发明涉及免疫相关病症的治疗。

自身免疫疾病包括与自身组织抗性反应的免疫细胞的不适当活化作用。这些活化的免疫细胞促进与该疾病病理学相关的细胞因子和自身抗体的产生。其它包含 T-细胞的疾病包括发生在移植事件中的移植物抗宿主病 (GVHD)。在
10 GVHD 中供体 T-细胞通过对受体身体发动攻击而排斥受体的组织和器官。宿主的其它疾病包括宿主免疫系统的无规则性。一些用药物能很好地治疗, 一些用生物方法, 其它的用例如体外光除去法治疗, 而还有一些治疗选择很有限。

体外光除去法 (ECP) 在某些 T-细胞介导的疾病中已显示出一种有效的治疗。在 GVHD 情况下, 光除去法已被用作与典型的氟羟脱氢皮醇膏剂、抗真
15 菌、抗病毒、抗生素、免疫球蛋白和氨甲蝶呤一起联合治疗。ECP 也已与免疫抑制剂如霉酚酸酯、他克莫司、强的松、环孢菌素、羟氯喹、类固醇、FK-506 和用于 cGVHD 和难治 cGVHD 的沙立度胺一起使用。对于实体器官移植, ECP 已与免疫抑制剂联合使用以减少与肾同种异体移植和心脏移植相关的急性同种异体移植排斥事件的数量。例如, ECP 已与 OKT3 和/或免疫抑制剂强的松、
20 硫唑嘌呤和环孢菌素一起使用, 以逆转急性肾同种异体移植排斥。ECP 也已与环磷酰胺、分次全身照射和鬼臼亚乙苷一起用于急性骨髓白血病、急性淋巴母细胞白血病、慢性骨髓白血病、非霍奇金淋巴瘤或者严重再生障碍性贫血的异体基因骨髓移植。

尽管目前 ECP 与其它治疗剂的联合使用, 仍然需要一种 ECP 与伴随剂的
25 组合以治疗患有免疫介导疾病、特异性超敏感症或者 GVHD 的患者, 现有的治疗不象它们可能的那么有效, 或者它们可能具有严重的副作用或者很难以任一治疗其自身释放的水平给药。

单核细胞和巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 (TNF- α) 在对内毒素或者其它刺激物的应答中作为一种细胞因子。TNF- α 是一种 17kD 蛋白亚单位的可溶性
30 同源三聚体。除了单核细胞或者巨噬细胞外的细胞也产生 TNF- α 。例如, 人

非单核细胞肿瘤细胞系能产生 TNF。TNF- α 已涉及炎症疾病、自身免疫疾病、病毒、细菌和寄生虫感染、恶性肿瘤和/或神经发生性疾病，是一种疾病如类风湿性关节炎和局限性回肠炎的特定生物治疗有用靶物质，抗体给药作为一种治疗已经不是问题。例如，用一种 TNF- α 拮抗剂，在某些情况下已经有助于严重感染的发生。减少该物质的剂量会减少治疗的并发症。

成功使用 TNF 拮抗剂如英夫单抗和 etanercept 与氨甲蝶呤 (MTX) 组合用于关节炎治疗已有报道，这些试剂中的几个目前被制定规章机构批准用于该用途。这些试剂对于关节炎治疗已向前进的一大步，由于各种原因实质上存在少数病人，他们对于这些试剂不应答或者应答较弱。对于患有类风湿性关节炎的病人仍然存在难治疗的问题。许多目前的治疗具有高的副反应发生率或者不能完全防止疾病发展。即使像氨甲蝶呤、类固醇和其它化学治疗剂的试剂在各种免疫疾病包括类风湿性关节炎的治疗中有很长的使用历史，使用这些化合物的病人可能具有较大的毒作用，如肝、肺、肾和骨髓的异常。使用这些化合物的病人可能也具有较小的副作用如口腔炎、身体不适、恶心、腹泻、头痛和轻微脱发；然而，这些可以补充叶酸治疗。因此，需要一种更安全的、除目前批准的产品以外的与 TNF 拮抗剂一起组合治疗关节炎。

发明概述

一方面，本发明是一种用有效量的程序性死亡细胞和 TNF α 拮抗剂的组合来治疗患有自身免疫疾病或反应、特应性疾病、GVHD 或者移植排斥的个体的方法。

另一方面，本发明是一种在移植之前用体外光除去法和 TNF α 拮抗剂的组合来治疗移植供体和/或移植受体，或者植入受体的方法。

另一方面，在收获移植之前用体外光除去法和 TNF α 拮抗剂的组合来治疗移植供体。还有另一方面，移植受体在接受移植后进行进一步治疗。

还有另一方面，在接受植入之前用体外光除去法和 TNF α 拮抗剂的组合来治疗植入受体。植入受体接受植入后可能进行进一步治疗。

还有另一方面，在 ECP 中使用的可光活化化合物是补骨脂素或者补骨脂素衍生物。

本发明的方法通过能降低 TNF α 抑制剂的剂量（因而减少了毒性）、延长输注之间的时间和增加细胞治疗（如 ECP）和 TNF α 抑制剂的功效，改善了

GVHD 和其它免疫相关病症的治疗。

发明详述

说明书中引用的所有参考文献以其整体加入到该说明中。术语“个体”或者“患者”可交换使用，指一种动物，优选哺乳动物，更优选人。

5 一个“细胞群”一般包括血液中发现的一个细胞类型。该术语可以包括一个或更多类型的血细胞，特别地，红细胞、血小板和白细胞。一个细胞群可以包含白细胞的亚型，例如，T-细胞、树状细胞、B-细胞等。在一个实施方案中，一个细胞群可以包含一种细胞类型的混合物或者库。可供选择地，一个细胞群可以包含一个基本上纯化的细胞类型，例如，T-细胞或者树状细胞。

10 “ECP 处理过程”或者“ECP”是指体外光除去法，也被认为是体外光治疗。它是一种细胞群经受 UVA 光和可光活化化合物的治疗。优选细胞群源自器官或组织；更优选地，细胞群是血液的一部分；最优选地，细胞群是血沉棕黄层。ECP 有时用于其中存在 DNA 交联剂如补骨脂素（优选 8-MOP）时用 UVA 光使细胞群经受程序性细胞死亡诱导程序的过程。

15 本说明书中所指的副作用是治疗性伴随剂的不想要的和不利的的作用。不利作用总是不想要的，但是不想要的的作用不一定是有害的。治疗剂的不利作用可能是有害的或者不舒服的或者危险的。用抗 TNF- α 给药治疗的副作用可能包括，但不限于感染和超敏感反应的危险。其它副作用的范围从非特异性症状如发烧或者受风寒、搔痒症或者风疹，与心肺相关的反应如胸痛、低血压、高血压或者呼吸困难，到如肌痛和/或关节痛、皮疹、面部、手或嘴唇浮肿、吞咽困难、喉咙痛和头痛等作用。还有其它副作用可能包括，但不限于腹部疝气、脾脏梗死、脾肿大、眩晕、上部运动神经元损伤、红斑狼疮综合病症、类风湿性结节、盯眵分泌过多、腹痛、腹泻、胃溃疡、肠梗阻、肠穿孔、肠狭窄、恶心、胰腺炎、呕吐、背痛、骨折、腱病症或损伤、心衰竭、心肌萎缩、淋巴瘤、血
20 小板减少、蜂窝组织炎、焦虑、慌乱、精神错乱、压抑、嗜眠、自杀企图、贫血、砂眼、细菌感染和脓血症。

术语“病症”和“疾病”在本说明书中可交换使用。术语“特应性疾病”可与术语“炎症病症”交换使用，是指个体的一种情形，其特征是炎症如慢性炎症。自身免疫病症可能与或者可能不与炎症相关。此外，炎症可能是或者可能不是由自身免疫病症引起的。因此，某些病症可能具有自身免疫和炎症病症
25 30

的特征。

本发明的伴随剂包括一种与 TNF- α 相关的免疫调节剂。一个实施方案中，本发明的组合治疗中使用的免疫调节剂是一种 TNF- α 拮抗剂。这些优选地为 REMICADE®、HUMIRA®或者 ENBREL®治疗剂。也可以使用具有 TNF- α 抑制作用的小分子如 p38 抑制剂进行治疗。

本发明的肿瘤坏死因子抗体或者它们的片断和其类似物在体外、原位和/或优选在体内降低、阻止、抑制、取消或者干扰 TNF α 活性。例如，本发明合适的人抗体可以结合 TNF α ，包括特异性结合 TNF α 的抗-TNF 抗体、其抗原结合片断和其特定的突变体或者结构域。一个合适的抗-TNF α 抗体或者片断也能降低、阻止、取消、干扰、防止和/或抑制 TNF RNA、DNA 或者蛋白质的合成、TNF α 的释放、TNF α 受体信号、膜 TNF α 剪切、TNF α 活性、TNF α 产生和/或合成。

嵌合抗体 cA2 由高亲和性中和小鼠抗人 TNF α IgG1 抗体的抗原结合可变区、设计的 A2 和人 IgG1 的恒定区、kappa 免疫球蛋白组成。人 IgG1 Fc 区增强了异源抗体效应物功能，增加了循环血清的半衰期和降低了抗体的免疫原性。嵌合抗体 cA2 的亲力和表位特异性源自鼠抗体 A2 的可变区。一个特别的实施方案中，编码鼠抗体 A2 可变区的核酸的优选来源是 A2 杂交瘤细胞系。

嵌合体 A2 (cA2) 以剂量依赖的方式帮助中和天然和重组人 TNF α 的细胞毒素作用。根据嵌合抗体 cA2 和重组人 TNF α 的结合试验，计算出嵌合抗体 cA2 的亲合常数为 $1.04 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 。

一个特别的实施方案中，鼠单克隆抗体 A2 是由命名为 c134A 的细胞系产生的。嵌合抗体 cA2 是由命名为 c168A 的细胞系产生的。可用于本发明中的单克隆抗-TNF α 抗体的另外例子描述在文献中（见例如美国专利 5,231,024; Moller, A. 等人, Cytokine 2(3):162-169(1990); 美国专利申请 07/943,852(1992-09-11); Rathjen 等人, 国际公开号 WO91/02078(1991-02-21 公开); Rubin 等人, EPO 专利公开号 0 218 868(1987-04-22 公开); Yone 等人, EPO 专利公开号 0 288 088(1988-10-26); Liang, 等人, Biochem.Biophys.Res.Comm.137:847-854(1986); Meager, 等人, Hybridoma 6:305-311(1987); Fendly 等人, Hybridoma 6:359-369(1987); Bringman, 等人, Hybridoma 6:489-507(1987); 和 Hirai, 等人, J.Immunol.Meth.96:57-62(1987)。

本发明中有用的优选的 TNF 受体分子是高亲和性结合 TNF α 和选择地拥有低免疫原性的那些分子。特别的, 55 kDa (p55 TNF α -R) 和 75 kDa (p75 TNF-R) TNF α 细胞表面受体在本发明中是有用的。这些受体的截断形式, 包括受体的细胞外结构域 (ECD) 或者其功能部分在本发明中也是有用的。TNF 接受者的截断形式, 包括 ECD, 已在尿和血清中被检测到为 30 kDa 和 40 kDa TNF- α 抑制性结合蛋白。

本发明中有用的 TNF α 受体多聚体分子包含两个或多个 TNF α 受体的 ECD 的所有或者功能部分, 其通过一个或多个多肽连接体或者其它非肽连接体如聚乙二醇 (PEG) 连接。多聚体分子可以进一步包含一个分泌蛋白质的信号肽以指导多聚体分子的表达。这些多聚体分子和它们的产生方法已在美国申请号 08/437,533 (1995-05-09 入档) 中描述了。

TNF 受体分子的功能等同物、衍生物、片断或区域是指 TNF 受体分子的部分, 或者编码 TNF α 受体分子的 TNF 受体分子序列的部分, 其具有足够大小和序列以功能类似于可用于本发明的 TNF α 受体分子 (例如高亲和性结合 TNF α 和拥有低免疫原性)。TNF α 受体分子的功能等同物也包括修饰的 TNF α 受体分子, 其功能类似于可用于本发明的 TNF α 受体分子 (例如高亲和性结合 TNF α 和拥有低免疫原性)。例如, TNF α 受体分子的功能等同物可含有一个“沉默”密码子或者一个或多个氨基酸取代、缺失或添加 (例如一个酸性氨基酸取代另一个酸性氨基酸; 或者一个编码相同或不同疏水性氨基酸的密码子取代另一个编码疏水性氨基酸的密码子)。

优选的人治疗剂是那些高亲和性抗体和片断、区域和衍生物, 其在体内具有有效的 TNF α 抑制和/或阻止 TNF 诱导 IL-6 分泌的中和活性。也优选的人治疗用途是这些高亲和性抗 TNF α 抗体, 其片断、区域和衍生物, 其阻止 TNF 诱导的前凝血剂活性, 包括在体内和体外阻止 TNF 诱导的细胞粘附分子如 ELAM-I 和 ICAM-I 的表达以及阻止 TNF 促有丝分裂的活性。

本发明的 TNF α 拮抗剂优选通过肠胃外、皮下、肌肉内、静脉内或者关节内方式给药。其它方式也是可能的, 包括支气管内、腹内、胶囊内、软骨内、腔内、腹腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨骼内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊髓内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、丸剂、阴道、直肠、口

腔、舌下、鼻内或者经皮肤的方式。

本发明的实施方案中提供了防止、治疗或者改善个体中与自身免疫或者特应性疾病相关的一个或更多症状的组合作用，该治疗包括给予个体一个细胞群，该细胞群已经经受了程序性细胞死亡诱导处理，例如，细胞群已经进行了
5 体外光除去法（ECP），和至少一种 TNF α 拮抗剂。

ECP 和伴随剂（即 TNF α 拮抗剂）的组合在个体中产生了比任一单独治疗更好的治疗作用。在某些实施方案中，ECP 和伴随剂的组合在患有自身免疫疾病、特应性疾病、GVHD 或移植排斥的个体中取得了任一单独治疗的 2 倍或更好（优选 10 至 20 倍）的治疗作用。在其它实施方案中，ECP 和一个或多个
10 TNF 拮抗剂的组合在患有自身免疫疾病、特应性疾病、GVHD 和植入或移植排斥的个体中具有更多的附加作用。本发明的组合作用对患有自身免疫或者特应性疾病的个体能降低 ECP 给药的频率以达到治疗作用；能降低用于结合 ECP 以防止或者治疗自身免疫性免疫疾病、特应性疾病或者 GVHD 的 TNF α 拮抗剂的剂量和/或对患有自身免疫疾病、特应性疾病或者 GVHD 的个体降低 TNF
15 α 拮抗剂给药的频率，以达到治疗作用。它们减少或避免了与用于自身免疫疾病、特应性疾病或者 GVHD 的目前单独试剂治疗和/或现有的组合作用给药相关的不想要的或不利的副作用，其依次改善了患者对治疗的方案服从。

降低对患有自身免疫或特应性疾病的个体进行 ECP 或者伴随剂给药的剂量和/或频率，改善了经历该治疗的患者的生活质量。对患有自身免疫或炎症疾病的个体进行 ECP 或者伴随剂给药的剂量和/或频率可以降低，且在患者特定
20 器官、组织或关节的炎症中仍然达到 20%或更高的效果（优选 90%-98%或更大的降低）。

一个实施方案中，使用 ECP 与单克隆抗-TNF α 抗体组合。最优选的单克隆抗 TNF 抗体是英夫单抗（Remicade®）、etanercept（Enbrel®）和（HUMIRA®）。
25 一个特别的实施方案中，用于本发明的组合和方法中的 TNF α 拮抗剂是英夫单抗（REMICADE®）；Centocor），其衍生物、类似物或者抗原结合片断。英夫单抗（REMICADE®）是一种结合肿瘤坏死因子 α （TNF- α ）的嵌合单克隆抗体。英夫单抗一般给药的剂量是每 4 至 8 周约 1 至 20 mg/kg 体重。根据个体给药剂量可以为每 4 至 8 周约 3 至 10 mg/kg 体重。

30 本发明另一个优选的实施方案中，REMICADE®（英夫单抗）是以静脉

输注的无菌冻干粉供给的，用 10 ml 无菌水重组用于注射。每个单独用小瓶 REMICADE®（英夫单抗）含有 100 mg 英夫单抗、500 mg 蔗糖、0.5 mg 聚山梨醇酯 80、2.2 mg 磷酸二氢钠和 6.1 mg 磷酸氢二钠。根据医师工作参考（55ed.,2001），重组产物的总剂量必须进一步用 0.9%氯化钠注射液，USP 稀

5 释至 250 ml，输注浓度范围介于 0.4 mg/ml 和 4 mg/ml 之间。本发明的一个实施方案中，REMICADE®的推荐剂量是 0.1 至 10 mg/kg，更优选 1 至 7 mg/kg，甚至更优选 2 至 6 mg/kg，最优选 3 至 5 mg/kg。在最优选的实施方案中，剂量不超过 3 mg/kg。在某些优选实施方案中，REMICADE®（英夫单抗）通过静脉内输注给药，接着在首次输注后，在 2 和 6 周以附加剂量，然后每 8 周进行。

10 本发明优选的实施方案，REMICADE®（英夫单抗）以约为 0.01 mg/kg 至 50 mg/kg 的剂量与 ECP 组合给药，更优选约为 1 mg/kg 至 40 mg/kg，最优选约为 2.5 mg/kg 至约 20 mg/kg。更优选的实施方案中，当协同作用很强且疾病许可（如 GVHD）时，Remicade 的量显著地较低以降低毒性。在这些实施方案中，ECP 和/或抗 TNF α 治疗的频率减少 20%，更优选 40%，最优选至少

15 50%。因此，在优选的实施方案中，通过静脉内输注给予最多 600 mg REMICADE®（英夫单抗），接着在首次输注后，在 2 和 6 周给予附加剂量，然后每 8 周进行。其它的实施方案中，在 1 至 12 周给予附加剂量，优选 4 至 12 周，更优选 6 至 12 周，甚至更优选 8 至 12 周；优选每隔一周给予 ECP 治疗一天或者，更优选，每月一次，总计不超过 20 次治疗。

20 另一方面，本发明的组合物和方法中使用的 TNF- α 拮抗剂是 etanercept（ENBREL®）或者 adalimumab（HUMIRA®），或者其片断、衍生物或类似物。Etanercept（例如 ENBREL®）是一种结合肿瘤坏死因子（TNF）和阻止其与 TNF 受体相互作用的二聚体融合蛋白。一般给予 etanercept 的剂量约为成人每周 10 至 100 mg，优选剂量约为每周 50 mg。青少年个体的剂量范围约为每周 0.1 至

25 50 mg/kg 体重，最大约为每周 50 mg。本发明的另一个优选实施方案中，ENBREL®是以无菌无防腐剂冻干粉供给的，其用 1 ml 供给的用于注射的无菌抑菌水，USP（含有 0.9%苯甲基乙醇）重组后用于肠胃外给药。根据医师工作参考（55th ed.,2001），每个单独使用小瓶 ENBREL®含有 25 mg etanercept、40 mg 甘露醇、10 mg 蔗糖和 1.2 mg 三羟甲基氨基甲烷。

30 ECP 以任一顺序与本发明的 TNF α 拮抗剂有顺序地给药。这也可以周期

性实施。周期性治疗包括给予伴随剂一段时间，接着给予包含程序性死亡细胞的细胞群一段时间，且重复这样顺序的给药。优选地，包含程序性死亡细胞（如 ECP 期间获得的）的细胞群在伴随剂之前或之后至少约 15-60 分钟给药。然而，包含程序性死亡细胞的细胞群可以在 TNF α 拮抗剂之前或之后以更大的时间间隔给药。例如，某些情况下可能在给予伴随剂之前或之后至少约 1 天至 30 天或更长，用包含程序性死亡细胞的细胞群给药，且仍然获得该组合治疗的有益作用。

本发明治疗方法中有用的细胞群包含“程序性死亡细胞”，其包括细胞和细胞体，即程序性死亡细胞体，其呈现或将要呈现一种或多种程序性死亡描述的特征。程序性死亡细胞可以包含处于诱导期、效应期或者降解期的任何细胞。本发明治疗中的细胞群也可以包含程序性死亡诱导剂处理过并仍然活着的细胞。例如，在对个体给药后，该细胞可以在某点上呈现程序性死亡描述的特征。

ECP 直接诱导显著的程序性死亡水平。这已被观察到，例如，在 CTCL、GVHD 和硬化病病人的淋巴细胞中。程序性死亡细胞有助于观察到的临床作用。

程序性死亡描述的特征可以包括，但不限于磷脂酰丝氨酸的表面暴露，如通过标准的、认可的检测方法如 Annexin V 染色观察到的；通过标准的、认可的方法（例如 Salvioli et al., 411 FEBS LETTERS 77-82 (1997)）测量的线粒体膜渗透性的改变；DNA 分裂的证据如从细胞中提取 DNA 后进行琼脂糖凝胶电泳 DNA 梯度的出现（Teiger et al., 97 J. CLIN. INVEST. 2891-97 (1996)），或者通过原位标记（Gavrieli et al., 1992, 参考上面）。

本发明中使用的细胞群可以被诱导成来自体内即体外进行的程序性死亡，且与那些个体、供体或者受体的相容。细胞群实质上可以从任何类型的哺乳动物细胞包括培养的细胞系中制备。例如，细胞群可以从源自哺乳动物个体自身的细胞类型或者从建立的细胞系中制备。特别地，细胞群可以从与哺乳动物个体血液相容的白细胞中，更优选地，从个体自身的白细胞中，甚至更特别地从个体自身的 T 细胞中制备。

细胞群也可以从建立的细胞系中制备。本发明方法中可能有用的细胞系包括，例如 Jurkat 细胞（ATCC No. TIB-152）。本发明方法中适合使用的其它细胞系可以由本领域的普通技术人员识别和/或检测。在对个体、供体或受体给药

之前,可以体外制备细胞群。因此,在一个实施方案中,可以不考虑个体血液、受体血液或供体血液的等分试样,例如通过静脉穿刺,而且至少其白细胞的一部分在体外经受了程序性死亡诱导的条件。

一个实施方案中,细胞群可以包含细胞的特定亚型包括,但不限于树状细胞、CD25⁺CD4⁺ T-调节细胞和 CD4⁺T-细胞。血液组分的分离和纯化是本领域的普通技术人员熟知的。的确,血液组分治疗的出现已经引起许多设计用于特定血液组分收集的系统。这些收集系统的几个可以从例如 Immunicon 公司 (Huntingdon Valley, PA)、Baxter International (Deerfield, IL) 和 Dynal Biotech (Oslo, Norway) 商业性获得。

Immunicon 的分离系统是使用与血样中目标组分连接即形成复合物的抗体包裹的磁纳米颗粒(铁磁流体)来分离血液组分。然后将血样在强大的磁场中孵育,目标复合物从剩余样品中移出,然后可以将其收集。见例如美国专利 6,365,362; 6,361,749; 6,228,624; 6,136,182; 6,120,856; 6,013,532; 6,013,188; 5,993,665; 5,985,153; 5,876,593; 5,795,470; 5,741,714; 5,698,271; 5,660,990; 5,646,001; 5,622,831; 5,597,531; 5,541,072; 5,512,332; 5,466,574; 5,200,084; 5,186,827; 5,108,933;和 4,795,698。

Dynal's Dynabeads® Biomagnetic 分离系统是使用与血样中目标组分连接的抗体包裹的磁珠,形成 Dynabeads 目标复合物来分离血液组分。然后用磁粒浓缩器(Dynal MPC®)将该复合物从样品中除去。使用该分离系统可以收集几个不同的细胞类型,包括例如源自单核细胞的树状细胞(单核细胞负向分离试剂盒, Prod.No.113.09)、源自 CD34⁺细胞的树状细胞(Dynal® CD34 原初细胞选择系统, Prod.No.113.01)和人单核细胞(Dynabeads® CD14: 用于分子分析的单核细胞正向分离, Prod.Nos.111.11 或 111.12)。T 细胞和 T 细胞亚型也可以正向或负向从自全血、血沉棕黄层、梯度单核细胞或组织消化物中分离或排除,使用例如 CELLlection™ CD2 试剂盒(Prod.No.116.03)、Dynabeads® M-450 CD2 (Prod.No.111.01/02)、Dynabeads® CD3 (Prod.No.111.13/14)、Dynabeads® plus DETACHaBEAD (Prod.No.113.03)、Dynabeads® M-450 CD4 (Prod.No.111.05/06)、CD4 负向分离试剂盒(Negative Isolation Kit)(T 辅助/诱导细胞)(Prod.No.113.17)、CD8 正向分离试剂盒(Positive Isolation Kit) (Prod.No.113.05)、Dynabeads® CD8 (Prod.No.111.07/08)、CD8 负向分离试剂

盒 (Negative Isolation Kit) (Prod.No.113.19)、T 细胞负向分离试剂盒 (Negative Isolation Kit) (Prod.No.113.11)、Dynabeads® CD25 (Prod.No.111.33/34) 和 Dynabeads® CD3/CD28 T 细胞扩增器 (Prod.No.111.31)。Baxter International 已发展了几个基于离心特性的脱落系统, 包括 CS-3000 血细胞分离器、Amicus 5 分离器和 Autopheresis-C 系统。CS-3000 Plus 血细胞分离器能收集细胞脱落产物和血浆。它包含一个具有收集脱落产物的双室离心系统的持续流动分离器。Amicus 以持续流动或间断流动形式操作来收集单个供体的血小板和血浆。Autopheresis-C 系统被设计用于收集供体的血浆, 且能收集多于 250 mL 的血浆。一般见美国专利 6,451,203; 6,442,397; 6,315,707; 6,284,142; 6,251,284; 6,033,561; 10 6,027,441; 和 5,494,578。

本发明最优的实施方案中, ECP 用于诱导程序性细胞死亡。这包括添加可光活化化合物到来自体内的细胞群。该光敏感化合物可以给予包含血细胞的细胞群, 接着在紫外光暴露之前或之时, 在情况可能时, 将其从个体、受体或供体中回收。如果目标血细胞或血液组分接受光敏感化合物, 则光敏感化 15 合物可以给予包含全血或其片断的细胞群。另一方面, 个体血液、受体血液或者供体血液的部分能先用已知的方法处理以基本上除去红细胞, 然后光活性化合物可以给予得到的包含富有白细胞片断的细胞群。

一个可供选择的实施方案中, 可光活化的化合物可以体内给予。光敏感化合物, 当给予包含个体血液、受体血液或供体血液的细胞群时, 情况可能时, 20 在体内可以口服给药, 但也可以静脉内给药和/或通过其它常用的给药途径。光敏感化合物的口服剂量范围可以为约 0.3 至 0.7 mg/kg, 更特别地, 约 0.6 mg/kg。当口服给药时, 光敏感化合物可以在光除去法处理之前至少约 1 小时给予, 且在光除去法处理之前不超过约 3 小时。

根据本发明使用的可光活化的化合物包括, 但不限于已知的补骨脂素 (或 25 呋喃饼香豆精) 及其衍生物化合物, 如描述于例如美国专利 4,321,919 和美国专利 5,399,719。优选的化合物包括 8-甲氧基补骨脂素; 4,5',8-三甲基补骨脂素; 5-甲氧基补骨脂素; 4-甲基补骨脂素; 4,4-二甲基补骨脂素; 4-5'-二甲基补骨脂素; 4'-氨基甲基-4,5',8-三甲基补骨脂素; 4'-羟基甲基-4,5',8-三甲基补骨脂素; 4',8-甲氧基补骨脂素; 和 4-(ω -氨基-2-氧杂)烷基-4,5',8-三甲基补骨脂素, 包括但不限于 4-(4-氨基-2-氧杂)丁基-4,5',8-三甲基补骨脂素。一个实施方案中, 可使用的 30

光敏感化合物包含补骨脂素衍生物、amotosalen (S-59) (Cerus, Corp., Concord, CA)。另一个实施方案中, 光敏感化合物包含 8-甲氧基补骨脂素 (8MOP)。

将已加入可光活化化合物的细胞群用激活可光活化化合物的波长的光线处理。激活可光活化化合物的处理步骤优选使用长波长紫外光 (UVA) 进行, 例如, 波长范围在 320 至 400nm。光除去法处理期间紫外光的暴露优选给予足够长的时间以传递约 1-2 J/cm² 给细胞群。

本发明方法中有用的体外光除去法仪器包括那些由 Therakos, Inc. 制造的, (Exton, PA) 名称为 UVAR® 的仪器。该仪器的说明在美国专利 4,683,889 中可找到。UVAR® 系统使用一个处理系统, 由三个阶段组成, 包括: 1) 收集血沉棕黄层级分 (富含白细胞), 2) 照射收集的血沉棕黄层级分, 和 3) 再输注处理后的白细胞。收集阶段有 6 个血液回收、离心和再输注步骤的循环。每一循环期间, 在一个提取碗中离心和分离全血。从该分离中, 在每一收集循环中保存血浆 (每次循环中由 UVAR® 仪器操作者检测的体积) 和 40 ml 血沉棕黄层。在开始下一个收集循环之前, 将红细胞和所有附加的血浆重新输注给患者。最后, 总计 240 ml 血沉棕黄层和 300 ml 血浆被分离并保存用于 UVA 照射。

在首次收集循环的血沉棕黄层收集期间, 开始照射循环内富含白细胞的血液的照射。用 200 ml 肝素化标准盐和 200 mg UVADEX® (水溶性 8-甲氧基补骨脂素) 将收集的血浆和血沉棕黄层混合。该混合物通过插入两层 PHOTOCETTE® UVA 灯的 PHOTOCETTOR® 光活化室流入一个 1.4 mm 的厚层。PHOTOCETTE® UVA 灯照射该 UVA 透明的 PHOTOCETTOR® 室的两边, 允许暴露于紫外 A 光 180 分钟, 使每个淋巴细胞平均暴露为 1-2 J/cm²。最后的血沉棕黄层制备包含估计全部外周血单核细胞组分的 20% 至 25%, 且具有血细胞比容为 2.5% 至 7%。光活化阶段之后, 将该容量在 30 至 45 分钟内重新输注给患者。美国专利申请 09/480,893 (这里结合作参考) 描述了另一个 ECP 给药中使用的系统。美国专利 5,951,509; 5,985,914; 5,984,887, 4,464,166; 4,428,744; 4,398,906; 4,321,919; PCT 公开 WO 97/36634; 和 WO 97/36581 也包含在这点上有用的装置和方法的说明。

本发明方法中可能有用的另一个系统在美国专利申请 09/556,832 中描述了。该系统包括一个仪器, 通过它可减少在 ECP 期间从个体收集或除去的净流量。传送给细胞群的光能有效量可以使用美国专利 6,219,584 中描述的方法

和系统检测。

在细胞群中诱导程序性细胞死亡的各种其它方法是熟知的，可以被本发明采纳使用。一种这样的处理包含使细胞群经受电离辐射（ γ -射线、X-射线等）和/或非电离电磁辐射包括紫外光、加热、冷却、血清剥夺、生长因子剥夺、酸化、稀释、碱化、离子强度变化、血清剥夺、辐射或者其组合。可供选择地，程序性细胞死亡可以通过使细胞群经受超声波进行诱导。

还有另外的诱导程序性细胞死亡的方法，包含体外运用氧化加压给细胞群。这个可以通过在悬浮中用化学氧化剂如过氧化氢、其它过氧化物和过氧化氢物、臭氧、高锰酸盐、高碘酸盐及其类似物处理细胞群达到。可使用生物学上可接受的氧化剂以减少与如此形成的程序性细胞死亡诱导的细胞群残余和污染相关的潜在问题。

在制备程序性细胞死亡诱导的细胞群中，应注意不要运用过高水平的氧化压、辐射、药物治疗等，因为否则在治疗中可能存在引起至少一些细胞坏死的重大危险。坏死引起细胞膜破裂并释放细胞内容物，经常伴有生物学上有害的后果，特别是炎症事件，以致于最好避免坏死细胞和其组分与包含程序性死亡细胞的细胞群一起存在。诱导程序性细胞死亡的细胞群处理的适合水平和选择诱导程序性细胞死亡的处理类型，是本领域的技术人员容易确定的。

本发明的一个过程包含个体细胞或者相容性哺乳动物细胞系的培养。然后可将培养后的细胞体外处理以诱导程序性细胞死亡，并从中产生细胞群。可从以下组中选择体外处理：抗体、化学治疗剂、辐射、体外光除去法、超声波、蛋白质和氧化剂。然后，可以按照如下显示的，对悬浮于个体血浆或者另外合适的悬浮培养基，如盐或平衡的哺乳动物细胞培养基中的细胞给药。

检测和定量程序性细胞死亡的方法对于本发明中测定对个体给药的制品中程序性细胞死亡的存在和水平是有用的。要求获得所要求的个体临床效益的细胞群中程序性死亡细胞的数量，可以根据细胞来源、个体条件、个体的年龄和体重及其它相关因素而改变，这通过熟知的方法很容易确定。优选地，给予患者的程序性死亡细胞的数量为 10 至 500 亿，更优选地 10 至 100 且最优选地 25 至 75 亿。

一方面，可以通过琼脂糖凝胶电泳上呈现的，由于 DNA 剪切成一系列片段而产生的特征性梯状 DNA 来识别经受程序性死亡的细胞。另一方面，细胞

上磷脂酰丝氨酸的表面表达可以用于识别和/或定量程序性死亡诱导的细胞群。

反映线粒体膜渗透性变化的线粒体膜电位变化的测量，是识别细胞群的另一个公认的方法。许多识别经受程序性死亡的细胞和细胞群的其它方法，许多对细胞群使用抗特定标记的单克隆抗体，在科学文献中也已经描述了。

- 5 本发明程序性死亡细胞和 TNF- α 拮抗剂的给药在治疗关节炎和其它自身免疫疾病中发现了效用。其在细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种自身免疫相关疾病的治疗或预防中也是有用的，包括但不限于急性和慢性免疫和自身免疫病症，如系统性红斑狼疮、thyroidosis、移植物抗宿主病、硬皮病、糖尿病、葛雷夫斯氏病和类似的；特应性疾病，如慢性炎症病变和血管炎症病
- 10 变，包括慢性炎症病变如肉样瘤病、慢性炎症肠病、溃疡性结肠炎和 Crohn's 病症，以及血管炎症病变，例如但不限于弥漫性血管内凝血、动脉粥样硬化和川崎病。

- 作为例子，通过本发明的方法处理实体器官移植比通过单独给予 TNF- α 拮抗剂更加有效。肺移植后 30%至 60%的患者发生急性实体器官移植排斥，
- 15 由于免疫抑制剂的成效，肝脏、肾脏、心脏等程度更低。淋巴细胞（细胞）介导的抗移植抗原的免疫反应是急性排斥的主要机理。移植后几个月至几年内延迟的或慢性的排斥引起移植破坏，且特点在于导致移植组织坏死的血管破坏。根据标准规则该排斥通常在较大程度上不被抑制，因此更加持续的免疫耐受性的需要是一个明显未满足的需求。

- 20 偶尔发生晚期移植恶化，且该慢性类型排斥经常危险地发展，尽管增强了免疫抑制剂治疗。该病理图不同于急性排斥的。主要涉及动脉内皮，具有大范围的增殖，其可以逐渐地闭塞管腔，导致移植缺血和纤维化。

- 免疫抑制剂通常广泛地用于控制排斥反应，主要负责成功移植。然而，这些药物抑制所有的免疫学反应，因此在移植受体中使无法抵抗的感染成为死亡
- 25 的主导原因。

- 在不同移植类型的情况下，存在的免疫抑制剂治疗可以不同。肝脏的同种异体移植比其它器官的同种异体移植具有更少的攻击性排斥。例如，在对 HLA 抗原或 ABO 不相容预敏感的患者中，肝脏移植的过急性排斥总是不会发生。成人中典型的免疫抑制剂治疗包含使用环孢菌素，通常在移植时开始以 4 至 6
- 30 mg/kg/天给予IV型，然后当供给达到耐药性时给予 8 至 14 mg/kg/天。如果肾脏

发生功能病症，则向下调整剂量，且血液水平用作足够剂量的近似测量。

在心脏移植中，免疫抑制剂控制类似于肾脏或肝脏移植的。然而，在肺和心肺移植中，急性排斥在>80%的患者中发生但可以成功地控制。用皮质甾类治疗患者，以高剂量迅速地给予IV、ATG 或者 OKT3。在移植后的第一个两周期间也经常给予预防疾病的 ALG 或者 OKT3。胰腺移植在血管化器官移植中是独特的：其尝试稳定或防止 I 型糖尿病目标器官并发症的破坏，而不是用于救治生命。因为受体以免疫抑制的危险交换了胰岛素注射的危险，胰腺移植一般主要限制于已经需要接受免疫抑制剂药物的患者（即肾衰竭的、正接受肾脏移植的糖尿病患者）。

10 患有急性骨髓或淋巴母细胞白血病的患者可以受益于骨髓移植（BMT）。由于其在治疗患有遗传疾病（例如，地中海贫血症、镰状细胞血症、免疫缺陷症、先天性代谢缺陷）的儿童具有潜力，儿科的 BMT 已经扩展。BMT 的另一选择是自体同源移植（当完全免除已被诱导时，切除患者自己的骨髓，接着切除性治疗具有破坏任何残余肿瘤希望的患者，并用患者自己的骨髓进行拯救）。15 由于使用自体移植，免疫抑制是不必要的，除了短期高剂量的化疗用于肿瘤根除和骨髓切除；GVHD 的移植后问题是最小的。

从 HLA 一致性供体中用于白血病患者移植的排斥率小于 5%。对于多重输血的患有再生障碍性贫血的患者，由于移植诱导期间增加的免疫抑制也已经显著地减少了排斥率。虽然如此，并发症可能出现包括由骨髓移植的宿主引起的排斥、急性 GVHD 和感染。后期的并发症包括慢性 GVHD、延长的免疫缺陷和疾病复发。20

用本发明的方法治疗移植物抗宿主病（GVHD）比单独给予 TNF- α 拮抗剂或者 ECP 更加有效。在同种异源骨髓移植（BMT）之后，慢性移植物抗宿主病（cGVHD）在 30%至 60%的患者中发生。ECP 和抗 TNF α 治疗在该疾病中都已显示出肯定的作用，但两者都是不完善的，抗 TNF α 已与一系列不利结果相关。25

许多其它移植与本发明的治疗结合可以更加有效。例子包括角膜移植、皮肤同种异体移植、软骨同种异体移植、骨移植和小肠移植。

用本发明的方法能更加有效地治疗其它病症的宿主。例如，皮肤的 T-细胞淋巴瘤是一种 T-淋巴细胞变得恶化且影响皮肤的疾病。通常使用三种治疗：30

辐射、化疗和光除去法。皮肤 T-细胞淋巴瘤的治疗依据疾病的发展阶段和患者的年龄和整体健康状况。由于过去研究中其在患者中的效力可以考虑标准治疗，或者可以考虑临床试验的参与。许多患有皮肤 T 细胞淋巴瘤的患者用标准治疗没有治愈，且一些标准治疗可能具有比期望的更多的副反应。用本发明的方法治疗同样可以用于治疗该疾病。

本发明的方法也可以用于移植手术，例如，移植手术通常实施于美容或者非美容的整型手术。这样的移植可以包括牙齿，脂肪移植例如到脸颊、嘴唇和屁股，面部移植包括移植到鼻子、脸颊、前额、下巴和脑壳，屁股移植，胸部移植等。其它移植包括，但不限于角膜环、皮层、眼眶、耳蜗、肌肉（所有肌肉，包括胸肌、臀肌、腹肌、腓肠肌、比目鱼肌、二头肌、三头肌）、异源的关节和骨替代物、骨修复移植（螺旋状、杆状、珠状、条状、弹簧状）、金属板、脊髓、脊椎、头发、botox/胶原/restylane/perlane 注射、阴茎移植、前列腺结实移植、乳房移植（美容和重建）、子宫间装置、荷尔蒙移植、胚胎或干细胞移植、起搏器、除纤颤器、人造动脉/静脉/阀和人造器官。

用本发明的方法也可以更加有效地治疗自身免疫疾病。这些是免疫系统对于内生性抗原产生自身抗体的疾病，结果伤害了组织。用几种方法可以识别个体患有疾病，包括但不限于 HLA 连锁定型、基于血液或血清的试验，或者基因突变的识别，例如，单核苷酸多态性（SNPs）。例如，一旦个体被测定具有 HLA DR4 连锁，且已被诊断为具有类风湿性关节炎，可以采取 ECP 和 TNF- α 拮抗剂的组合治疗。最优选地，TNF- α 拮抗剂是 REMICADE®、HUMIRA® 或者 ENBREL® TNF- α 拮抗剂。其它 HLA 等位基因，也被认为是 MHC 等位基因，其与自身免疫疾病相关包括 B27（连结脊椎炎）；DQA1*0501 和 DQB1*0201（腹腔疾病）；DRB1*03、DRB1*04、DQB1*0201、DQB1*0302 和 DMA*0101（I 型糖尿病）；和 Cw6（牛皮癣）。这些等位基因也可以用于测定个体是否正在经受自身免疫疾病，从而是否可以使用 ECP 和 TNF- α 拮抗剂的组合治疗。

基于血液或血清的试验可以用于评定疾病的诱因。例如，有一种试验检测血清中自身核抗体的存在，其可能导致狼疮的发作。也存在用于预测自身免疫心肌炎的基于血清的试验。另外，基于血清的试验可以用于测定胰岛素水平（糖尿病）或其它疾病的肝脏或心脏的酶。T-3 水平可以预测 Hashimotos 甲状腺炎。

在个体用基于血液或血清的试验被测定为患有一种疾病之后，本发明的方法可以用于防止或延迟这些疾病的发作或减少其影响。通过识别遗传变异包括但不限于 SNP，可以识别个体易患疾病。因此，本发明的进一步方面，首先进行测定患者患有自身免疫病症或者易患某种疾病，然后对患者采取 ECP（或其它程序性死亡细胞的给予）和 TNF- α 拮抗剂的组合治疗。

本发明的方法也可以用于治疗特应性疾病，其是一种过敏性疾病，个体对于外在过敏原很敏感。特应性疾病包括，但不限于过敏性皮炎、过敏性支气管哮喘、风疹、过敏性鼻炎、过敏性肠胃炎及其类似的。

标准诊断测试可以用于测定患者是否患有上面描述类型的病症。

10 实施例

如下非限制性的实施例进一步描述了本发明。

在实施例 1-5 中，获得如下单核细胞衍生的树状细胞：通过 Ficoll-Hypaque 梯度离心分馏从健康供体的外周血细胞中分离 PBMC。用 MACS CD14 分离试剂盒和 Automacs 系统（Miltenyi Biotec, 德国）正向筛选单核细胞。在补充了 40 ng/ml IL-4 和 GM-CSF（R&D 系统）的完全培养基 RPMI 中培养 CD14⁺单核细胞 5 天。用脂多糖（“LPS”，Sigma）刺激树状细胞来诱导细胞因子分泌。标准的 ELISA 方法用于测定培养物上清液中 TNF α 和 IL-12（R&D 系统）的水平。

实施例 1（TNF α 生产抑制的体外研究）

20 将刚分离的 CD14⁺细胞和单核细胞衍生的树状细胞（ 5×10^5 细胞/孔）在具有 ECP 处理的 CD15⁺细胞（ 2.5×10^6 细胞/孔）的 24 孔组织培养板中共培养。2 小时后，将 0.5 mg/ml LPS 加入到这些培养物中。刺激 24 小时后，从这些培养物中收集上清液用于细胞因子测定。从 LPS 活化的抗原呈递细胞中发现 ECP 处理过的细胞抑制 TNF α 产生。

25 实施例 2（TNF α 生产抑制的体外研究）

将单核细胞衍生的树状细胞（ 1×10^5 细胞/孔）在提供增量的 LPS 中单独或者和 ECP-处理的 CD15⁺细胞（ 5×10^5 细胞/孔）、和单独的 200 ng/ml Remicade mAb、或者和 mAb 与 ECP 处理的 CD15⁺细胞的组合物一起培养。48 小时后从这些培养物中收获培养物上清液用于 TNF α 产生的测定。发现用 Remicade mAb 单独处理的细胞具有约 100 pg/ml TNF α 。发现那些用 ECP 单独处理的细胞具

有约 1000 pg/ml。这些处理的每一个表示相对于超过 1000 pg/ml 的基线值的降低，当使用本发明的方法时，该水平降至少于 50 pg/ml 的平均值。

实施例 3 (TNF α 生产抑制的体外研究)

将单核细胞衍生的树状细胞 (1×10^5 细胞/孔) 在提供 0.1 mg/ml LPS 中单独或者和 ECP 处理的新鲜 CD15⁺细胞 (5×10^5 细胞/孔)、和单独的 200 ng/ml Remicade Mab、或者和 mAb 与 ECP 处理的 CD15⁺细胞的组合物一起培养。48 小时后从这些培养物中收获培养物上清液用于 TNF α 生产的定量。发现用 Remicade mAb 单独处理的细胞具有约 500 pg/ml TNF α 。发现那些用 ECP 单独处理的细胞具有约 1700 pg/ml。这些处理的每一个表示相对于超过 2300 pg/ml 的基线值的降低，当使用本发明的方法时，该水平降至约 100 pg/ml 的平均值。

实施例 4 (TNF α 生产抑制的体外研究)

将单核细胞衍生的树状细胞 (1×10^5 细胞/孔) 在提供增量的 LPS 中单独或者和 ECP-处理的 CD15⁺细胞 (5×10^5 细胞/孔)、和单独的 200 ng/ml Remicade mAb、或者和 Remicade mAb 与 ECP 处理的 CD15⁺细胞的组合物一起培养。48 小时后从这些培养物中收获培养上清液用于 TNF α 生产的测定。将另一组树状细胞进行类似处理，48 小时后从这些培养物中收获培养物上清液用于 TNF α 生产的定量。发现用约 2 ng/ml Remicade mAb 单独处理的细胞具有将近 1000 pg/ml TNF α 。当给予该相同剂量的 Remicade mAb 时，ECP 的诱导水平降至约 1500 pg/ml。当单独给予 8 ng/ml Remicade mAb 时，该水平大于 1300 pg/ml；附加的 ECP 处理将其降至约 100 pg/ml。含或不含 ECP 组合物的 40 ng/ml 和更多的 Remicade mAb 的剂量，将该水平降低至少于 100 pg/ml。在低水平给予 Remicade mAb (例如，2 ng/ml) 时组合治疗的作用是最显著的。该剂量通常不认为具有治疗性，而在不利作用非正常预期的水平时证明功效。

实施例 5 (其它促炎细胞因子抑制的体外研究)

将单核细胞衍生的树状细胞 (1×10^5 细胞/孔) 在提供增量的 Remicade mAb 中单独或者和 ECP-处理的新鲜 CD15⁺细胞 (5×10^5 细胞/孔) 的组合物一起培养。然后用 0.8 ng/ml LPS 刺激细胞。48 小时后从这些培养物中收获培养物上清液用于 IL-12 生产的测定。通过使用 ECP，IL-12 水平从约 150 pg/ml 的基线值降低至约 125 pg/ml。ECP 和 2 ng/ml Remicade mAb 的组合物导致 IL-12 水平降低至约 10 pg/ml。当与 ECP 组合使用 200 ng/ml Remicade mAb 时，几乎无法

检测到 IL-12 的水平。因此, ECP 处理过的细胞和 Remicade mAb 的组合物显著地减少树状细胞的 IL-12 生产。

实施例 6 (体内应用的小鼠模型) (预测的)

小鼠

5 雄性 C3H/HeJ (C3H;H2k)、(B6xC3H) F1 (H2bxk)、(B6xDBA/2) F1 (H2bxd)、C57BL/6 (B6;H2b) 和 CBA/JCr (CBA;H2k) 小鼠可购自国家癌症学会研究和发展中心 (Frederick, MD)。B10.BR (H2k) 小鼠可购自 Jackson 实验室 (Bar Harbour, ME)。用于试验的小鼠可在 6-10 周龄之间, 养在一个特定的无病菌的设备中的无菌的微小隔离笼中, 接受高压灭菌过的食物和水进行饲养。

培养基

磷酸缓冲盐 (PBS) 补充了 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA; Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 可用于供体骨髓和淋巴细胞的所有体外操作。在马上注射之前, 冲洗细胞并在仅有 PBS 中重悬浮。为维持细胞系和体外试验, 将使用补充了 10
15 % 胎牛血清 (FBS; GIBCO, Grand Island, NY)、2 mmol/L L-谷氨酸盐、50 IU/mL 青霉素和 50 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基 (Mediatech, Herndon, VA)。

抗体

cV1q (aka. CNTO 2213) mAb, 一种用对鼠 TNF α 特异性的大鼠 (Fab) 2 单位构建的大鼠/小鼠 Fc 嵌合 IgG2a, 和其同型对照 M-T412, 一种人抗-CD4
20 mAb 将由 Centocor, Malvern, PA 提供。含有 mAb 的腹水将产生自特异于 Thy-1.2 (J1j; ATTC TIB-184)、CD4 (RL172) 或 CD8 (3.168) 蛋白质的杂交瘤系, 将用于细胞移植的准备。亲和纯化的山羊抗小鼠 IgG (Cappel, Cosa Mesa, CA) 将用于 B 细胞缺失。豚鼠补体将购自 Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA)。抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8、抗 B220 和同型对照 mAb, 所有连接于藻红
25 蛋白 (PE), 将全部购自 BD Biosciences (Palo Alto, CA)。

试验性光除去法

脾细胞收获自同源同窝出生的健康小鼠, 并通过在 PBS 中用注射器的背面研磨制成单细胞悬液。这些细胞将重新悬浮, 且在 12.5×10^6 细胞/mL PBS 中重悬浮之前, 用 PBS 清洗细胞两次。清洗细胞后将其在冰冷培养基中重悬浮,
30 并以约 10^6 细胞/ml 接种在 T75 烧瓶中。添加补骨脂素 (UVADEX 溶液) 至终

浓度为 200 ng/ml, 其是将 Therakos 提供的母液稀释了 100 倍。将烧瓶平躺放置在 UVA 辐射室中并给约 1.5 J/cm² 的光, 其相应于当盘离光源 6 cm 时 1.5 分钟的底光。快速地将细胞从烧瓶中除去以避免粘附并置于合适的浓度用于注射。如果存在粘附, 则将烧瓶轻轻地刮擦或轻拍以除去大多数细胞。

5 骨髓移植

骨髓收获自供体小鼠的胫骨和股骨, 用含有 0.01%BSA 的 PBS (PBS/BSA) 冲洗。于 37°C 使用以 1: 100 稀释的抗-Thy 1.2 mAb (J1j; 美国典型培养收集, Rockville, MD) 和以 1: 6 稀释的豚鼠补体 (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) 45 分钟, 将减少骨髓细胞的 T 细胞。淋巴细胞分离自供体小鼠的脾脏和淋巴结。用含有 0.7%氯化铵 (NH₄Cl) 的 Gey's 平衡盐细胞溶解液处理脾细胞以除去红细胞 (RBCs)。除去 RBC 后, 通过平铺在塑料有盖培养皿上, 将脾脏和淋巴结细胞合并并且除去 B 细胞, 并在 4°C 用 5 mg/ml 稀释的山羊抗小鼠 IgG 预涂 1 小时。预计这些处理导致约 90%-95% 的 CD3⁺ 细胞的供体细胞群, 用荧光流式细胞计数器定量。然后通过使用抗 CD8 (3.168) 或抗 CD4 mAb (RL172) 和补体进行负向选择分离 T 细胞亚型。预计这些处理将降低目标 T 细胞亚型群至背景水平, 用流式细胞计数分析测定。将受体小鼠暴露于来自 ¹³⁷CS 源的以 1.43 Gy/min 进行 13Gy 整体辐射, 以每次 6.5 Gy 的分开剂量传送, 分离 3 小时。然后将这些小鼠用 2 × 10⁶ 抗 Thy 1.2 处理过的骨髓细胞 (ATBM: T 细胞除去的) 与指定数量的合适 T 细胞 (供体 CD4 或 CD8 富集的 T 细胞) 一起经尾部静脉进行静脉内 (i.v.) 移植。在移植前用 cV1q 抗 TNF-α 或同型对照 M-T412 mAb (1 mg; i.p.) 处理小鼠 1 天, 且在第 0、4、8 和 12 天再次处理 (所有以 0.5 mg; i.p.)。对于 GVL 试验, 在供体 ATBM 和 T 细胞移植之前 1 天, 用注射 MMB3.19 细胞 (0.5 mL PBS 中 1 × 10⁵ 个; i.p.) 激发 B6 受体小鼠, 用相似进程表进行抗 TNF α mAb 处理。在 GVHD 和 GVL 试验中, 每天检查小鼠的发病率和死亡率直到试验完成。从 2-3 个分离的试验中合并数据, 通过所有天数的死亡数据点包括零点, 测定半数存活时间 (MST) 作为插入的线性回归的 50% 存活点。通过非参数性 Wilcoxon 空白测试, 在试验组之间进行存活的统计学比较。通过 T 测试在个体时间点上测定重量比较的显著性。

流式细胞计数器

30 在 4°C 下将容量为 25 μL 的合适 mAbs 与 96 孔 U-底微平板孔中的 2-5 × 10⁵

个细胞一起孵育 30 分钟, 以 1500 rpm 离心 3 分钟, 用含有 0.1%BSA 和 0.01 %叠氮化钠的 PBS (清洗缓冲液) 清洗。计算每一样品的阳性细胞的百分率和荧光亮度的算数平均值。

病理分析

5 全浓度的耳朵活组织检查 (3×2 mm) 取样自各种处理组别的每只小鼠, 并立即用 4%戊二醛固定过夜, 然后用 0.1 M 二甲砷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 冲洗。将组织用 2%钼酸后固定 2 小时, 用梯度乙醇脱水并用 Epon 812 包埋。用 Porter-Blum MT2B 超薄切片机切成 1 微米厚的切片, 用甲苯胺蓝染色, 最后在 95%乙醇中浸泡用于光学显微镜分析。如先前测定的角化不良表皮细胞/长度 10 mm 的数量, 将在×100 物镜和×10 目镜的光学显微镜下计数。在每一动物中和每一时间点上评定大于 10 长度 mm 的表皮。对于治疗组在黑暗条件下进行分析。

在 CD8 T 细胞介导的 GVHD 中抗 TNF α mAb 的作用

为了测定抗 TNF α mAb 治疗是否能影响 CD8⁺ T 细胞介导的 GVHD 的发展, 将利用 MHC 匹配的、miHA-异种 B10.BRaCBA GVHD 模型, 因为其具有很好建立的病原学。将 CBA 小鼠进行致命性辐射 (13 Gy, 分剂量), 并单独或附加地用 B10.BR ATBM 细胞 (2×10^6) 移植, 以高度富集 CD8⁺ T 细胞 (3×10^6) 的群体 (95%)。将小鼠或者不处理、或者在移植前一天 (1 mg, i.p.) 和在第 0、4、8 和 12 天 (0.5 mg, i.p.) 用同型匹配的对照 MT412 mAb 处理、或者进行抗 TNF α mAb (cV1q) mAb。然而所有单独 ATBM 细胞的受体至少存活 70 天, 用供体 T 细胞移植的和未处理的或者用对照 MT412 mAb 处理的小鼠将死于 GVHD, 其相似的 MST 值约为 20 天。相反, 供体 T 细胞的 CBA 受体, 但给予 cV1q mAb, 显示出约 40%存活, 其 MST 约为 50 天, 其明显不同于 MT412 对照组。另外, 存活的抗 TNF α mAb 处理的小鼠没有显示明显的 GVHD 症状 (例如, 褶皱的皮毛、皮肤损伤、体态隆起或者腹泻), 且它们的体重在一个相对恒定的水平, 比对照的 ATBM 移植组体重低范围 5-12%。存在 cV1q 时发展成致命的 GVHD 的小鼠是这样的, 其比未处理的或 MT412 处理组具有更慢的动力学。当以 0.1 mg i.p.给予 cV1q 时, GvHD 发作没有显著的减少。

30 与 BMT 同一天及 3 天后, 通过静脉内注射来自同窝出生的对照小鼠的 10^7

同源脾细胞而给予试验性 ECP。供体 T 细胞的 CBA 受体，但给予 ECP 处理的细胞，显示出约 20% 存活，其 MST 约为 30 天，这明显不同于对照组。另外，存活 ECP 处理的小鼠显示出 GVHD 症状（例如，褶皱的皮毛、皮肤损伤、体态隆起或者腹泻）的减少迹象，且它们的体重在一个相对恒定的水平，比对照的 ATBM 移植组体重低范围 5-20%。存在 ECP 处理的细胞时发展成致命的 GVHD 的小鼠是这样的，其比未处理组具有更慢的动力学。

ECP 治疗和较有效剂量的抗 TNF α 治疗结合会优于任何一种单独治疗。供体 T 细胞的 CBA 受体，但以 0.1 mg 与 ECP 一起给予 cV1q mAb，显示出约 60% 存活，其 MST 约为 70 天，这明显不同于对照组。另外，存活的双重处理的小鼠没有显示出明显的 GVHD 症状（例如，褶皱的皮毛、皮肤损伤、体态隆起或者腹泻），且它们的体重在一个相对恒定的水平，比对照的 ATBM 移植组体重低范围 5-12%。存在双重治疗时发展成致命的 GVHD 的小鼠是这样的，其比未处理组具有更慢的动力学且比单独 ECP 或者抗 TNF 组更低。

交叉有 MHC 障碍的 GVHD 中抗 TNF α mAb 的作用

利用单倍同一性的 C3Ha(B6 $\times$ C3H)F1 小鼠模型测定由 cV1q 处理的 TNF α 的中和反应是否能影响交叉有完全 MHC 障碍的 GVHD 的过程。将 C3H T 细胞 (CD4⁺和 CD8⁺; 5×10^6) 和 ATBM 细胞 (2×10^6) 静脉内移植到致命性辐射的 (13 Gy, 分剂量) (B6 $\times$ C3H) F1 小鼠中，其诱导迅速的急性 GVHD 应答，特征为严重的体重降低和早期死亡 (MST 约为 5 天)。用对照的 MT412 mAb 处理的受体中获得相似的结果，但是那些用 cV1q 处理的小鼠（前一天以 1 mg i.p., 在第 0、4、8 和 12 天以 0.5 mg）显示出约 40% 的长期存活，其 MST 约为 40 天，其明显不同于未处理的或者 MT412 对照组。用 0.1 mg cV1q 治疗对于 GvHD 发作具有非显著的但值得注意的作用。

与 BMT 同一天及 3 天后，通过静脉内注射来自同窝出生的对照小鼠的 10^7 个同源脾细胞而给予试验性 ECP。供体 T 细胞的 CBA 受体，但给予 ECP 处理的细胞，显示出约 20% 存活，其 MST 约为 10 天，这不同于但非显著不同于对照组。另外，存活 ECP 处理的小鼠显示出 GVHD 症状（例如，褶皱的皮毛、皮肤损伤、体态隆起或者腹泻）减少的迹象，且它们的体重在一个相对恒定的水平，比对照的 ATBM 移植组体重低范围 5-20%。存在 ECP 处理的细胞时发展成致命的 GVHD 的小鼠是这样的，其比未处理组具有更慢的动力学。

ECP 治疗和较有效剂量的抗 $\text{TNF } \alpha$ 治疗结合会优于任何一种单独治疗。供体 T 细胞的 CBA 受体,但以 0.1 mg 与 ECP 一起给予 cV1q mAb,显示出约 60%存活,其 MST 约为 70 天,这显著不同于对照组。另外,存活的双重处理的小鼠没有显示出明显的 GVHD 症状(例如,褶皱的皮毛、皮肤损伤、体态隆起或者腹泻),且它们的体重在一个相对恒定的水平,比对照的 ATBM 移植组体重低范围 5-12%。存在双重治疗时发展成致命的 GVHD 的小鼠是这样的,其比未处理组具有更慢的动力学且比单独 ECP 或者抗 TNF 组更低。

根据体重降低,由于辐射条件在开始的几天内最初轻微的下降之后,对照的 ATBM 小鼠在整个剩下的试验中会稳定地获得重量。另一方面,用供体的 T 细胞移植未处理的和 MT412 处理的组不会从最初的下降恢复,可能取而代之的是继续迅速地降低体重直到它们死亡,这与严重的 GVHD 一致。然而,cV1q 抗 $\text{TNF } \alpha$ mAb-处理的小鼠到第 9 天会恢复一点,第 37 天后存活的动物在试验的剩余过程中会继续获得体重,追踪低于 ATBM 组约 6-12%。用 0.1 mg cV1q 处理的动物会以仅仅稍微较好的动力学降低体重,虽然非显著地不同于对照动物。ECP 处理的动物会获得显著改善的体重,且抗 TNF 和 ECP 的组合实质上与不给予 BMT 的对照动物或者 1 mg 抗 TNF 组是同样的。

CD4⁺ T 细胞介导的 GVHD 中抗 $\text{TNF } \alpha$ mAb 的作用

当移植完整的供体 T 细胞接种体时,在 C3Ha (B6×C3H) F1 模型中由于供体 CD4⁺ T 细胞应答趋向于支配 GVHD 的发展,且根据最初观察到的抗 $\text{TNF } \alpha$ mAb 处理的适度作用,我们将注意力集中在 CD4 介导的 GVHD 组分。将 3×10^6 个 C3H CD4⁺ T 细胞与 2×10^6 个 ATBM 细胞一起注射到辐射 (13 Gy, 分剂量) 过的 (B6×C3H) F1 小鼠中,会导致多数未处理的 (约 75%; MST 为 10-30 天) 和对照 MT412 处理的 (约 80%; MST 为 10-30 天) 小鼠死于严重的急性 GVHD。相反,100%的用 cV1q 抗- $\text{TNF } \alpha$ mAb 处理 (前一天以 1 mg i.p., 在第 0、4、8 和 12 天以 0.5 mg) 的小鼠存活超过 60 天。相应于 ATBM 对照组,这些小鼠没有显示出任何显著的 GVHD 症状,且辐射后从它们最初的体重降低迅速地恢复,继续获得体重直到试验结束。在 CD4 介导的 GVHD 中 cV1q 处理对于存活的高显著作用,暗示了先前用整个供体 T 细胞接种体的转移观察到的更加适度的作用可能归因于 CD8 介导的抗 MHC 类型 I 应答的较少抑制。然而,这不能在该模型中直接测定,因为纯化的 C3H CD8⁺ T 细胞在不存在 CD4⁺

T 细胞时，其自身不能介导致命的 GVHD。

用 0.1 mg cV1q 抗 TNF α 抗体治疗在抑制 GvHD 上具有更加适度的作用。约 40% 的动物存活超过 60 天。存活的小鼠显示出 GvHD 的最初迹象，但它们会衰弱且体重降低不会像 1 mg cV1q 组中改善得那样快，但明显不同于对照的。

5 与 BMT 同一天及 3 天后，通过静脉内注射来自同窝出生的对照小鼠的 10^7 个同源脾细胞而给予试验性 ECP。供体 T 细胞的 F1 受体，但给予 ECP 处理的细胞，显示出约 20% 存活，其 MST 约为 10-25 天，这不同于但非明显不同于对照组。另外，存活的 ECP 处理的小鼠显示出 GVHD 症状（例如，褶皱的皮毛、皮肤损伤、体态隆起或者腹泻）减少的迹象，且它们的体重在一个相对恒定的水平，比对照的 ATBM 移植组体重低范围 5-20%。存在 ECP 处理的细胞
10 时发展成致命的 GVHD 的小鼠是这样的，其比未处理组具有更慢的动力学。

ECP 治疗和较有效剂量的抗 TNF α 治疗结合会优于任何一种单独治疗。供体 T 细胞的 CBA 受体，但以 0.1 mg cV1q mAb 与 ECP 一起给予，在第 60 天显示出约 90% 存活，这明显不同于对照组。另外，存活的双重处理的小鼠没有显示出明显的 GVHD 症状（例如，褶皱的皮毛、皮肤损伤、体态隆起或者腹泻），且它们的体重在一个相对恒定的水平，比对照的 ATBM 移植组体重低范围 5-12%。存在双重治疗时发展成致命的 GVHD 的小鼠是这样的，其比未处理组具有更慢的动力学，且虽然不是统计上显著，但比单独 ECP 或者抗 TNF
15 组更低。

20 实施例 7（对于协同增加和降低单独抗 TNF α 治疗毒性的人类应用）（预测的）

实施例概述

该实施例将证实与 ECP 一起的抗-TNF α 的强度控制比那些在文献中建议的具有明显更好的毒性图谱。最初使用 1 mg/kg 的英夫单抗抗 TNF α 。然而，
25 有用剂量的范围可以为从 0.1 mg/kg 至 10 mg/kg 的范围。

患者

根据位点和相一致的协议使用标准控制的规定，患者将接受同种异体的造血干细胞（HSC）移植，且不限于以下药物治疗；包括口服和静脉内给予皮质类固醇、环孢菌素、他克莫司、西罗莫司、霉酚酸酯（MMF）。接受非重度骨髓抑制 HSC 移植的患者，将接受用百消安和氟达拉滨条件性的化疗和全面的
30

不同 GVHD 预防控制。供体-受体对的 CMV 血清状况和半数追踪时间要相似。在 HSC 之前用标准方法给予 ECP, 可能在 HSC 后以不同次数给予。在 HSC 后以 0.5 mg/kg 的剂量给予英夫单抗。用标准方法如改良的 Glucksberg 尺度追踪评价患者, 且收集关于 GVHD 预防控制、发作数据和最大的全面和器官特异性级别的数据。

根据 2002 年欧洲癌症研究和治疗组织 (EORTC) / 国家过敏和感染疾病学会 (NIAID) 的国际性一致意见将 IFIs 进行分类。通过查看一群鉴定过的所有患者的医疗记录和所有的病理学、微生物学、感染控制和放射医学数据库, 鉴定 IFI 的情况。医生们在不知道英夫单抗辐射情况下记录了他们的发现。不属于假丝酵母种的仅仅被证实的或可能的 IFI 将被考虑分析。当实施诊断方法用于证实的 IFI 的那一天, 或者当对于临床医生而言可获得用于可能的 IFI 的放射医学和微生物学数据的那一天, 将记录为 IFI 日期。如果在死亡后进行 IFI 诊断, 则 IFI 日期被认为是死亡日期, 但如果在尸体检查时确定可能的 IFI 诊断, 则 IFI 日期被记录为当进行可能的 IFI 诊断的那一天。

用皮质类固醇等价表, 将患有严重 GVHD 的患者获得的任何皮质类固醇的所有剂量转换成强的松等同物。计算调整体重的累积皮质类固醇的剂量, 从 HSCT 的那一天开始直到死亡、IFI 的发展、同组追踪末期, 或者当皮质类固醇渐缩在 20 mg/d 以下作用多于 30 天。记录经验的和预防性的抗真菌用途。

在那天或在那天之前最后一次观察时检查存活的患者。通过合适的控制调节身体完成该研究。

统计分析

2-边 Fisher 精确检验、Wilcoxon 检验或 t 检验将用作合适的基线特征的比较。根据不同辐射种类, 从 HSCT 组移植的那天起和从发展成严重 GVHD 的患者 GVHD 发作的那天起, 计算 IFI 的影响速度和影响速度比率; 在死亡或追踪结束前最后一次观察时检查患者。用 Haensze 和 Byar 方法分别计算影响速度和影响速度比率的置信区间。计算 Kaplan-Meier 曲线用于从移植之日起的存活和到 IFI 的时间。在那些患严重 GVHD 的患者中, 也计算从急性 GVHD 发作起到 IFI 的时间。用 log-排列测试比较事件的次数。将进行从 GVHD 发作起到 IFI 的时间的时间依赖性 Cox 衰退分析, 以控制在患严重 GVHD 患者的变量中可能的混淆或相互作用。对于患严重 GVHD 患者中所有可能的危险因素计算

单变量的 Cox 模型。所有 IFI 单变量 Cox 分析中与小于 0.2 的 P 值共变的量将在多变量 Cox 模型中考虑。英夫单抗将被模拟成一个时间依赖性变量；一旦开始每周的输注，则假定其辐射是恒定的。只有在最终模型中与 IFI 统计上显著相关的 ($P < 0.05$) 候选变量才被保留除非显著混淆是明显的。用于 Windows 的 8.01 版本的 SAS 系统将用于以上分析。

结果

对于急性 GVHD 的影响和治疗

在 HSC 之前第 10 天至 HSC 之前第 4 天给予 ECP 约 2 次。另外，在移植后的第一个 100 天中约每周给予 ECP 治疗以进一步防止急性 GvHD 的发展。

初步分析证明在不患 GVHD 和患 I 至 II 级 GVHD 的患者中具有相似的存活和 IFI 比率；因此，将这些组一起合并到没有或非严重的 GVHD 中。严重 GVHD 定义为 III 或 IV 级的全部。群体中约 20% 将发展成急性严重 GVHD。当与群体中其余的比较时，患严重 GVHD 的患者中无关的供体的比例会更高；另外，基线特征是相似的。在重度骨髓抑制和非重度骨髓抑制的 HSC 移植受体中，任何级别的 GVHD 或严重 GVHD 的比例是相似的。

诊断患有严重 GVHD 的患者可以接受多重药物治疗，其可以包括以最初剂量至少为 2 mg/kg/d 的 MMF 和皮质类固醇以渐缩应答，和钙神经素抑制剂或西罗莫司的附加或增加剂量。

在最初的急性 GVHD 诊断后开始给予英夫单抗约 10-50 天。患者以每周或两周 1 mg/kg 的基准接受 2-15 次剂量。当与不接受英夫单抗的患者比较时，受体更可能具有 GVHD 的迹象和症状。

群体中的 IFI

在观察期间，将诊断群体中不属于假丝酵母种（曲霉病、接合菌病等）的证实的或可能的 IFI。

患严重 GVHD 的患者中全面的 IFI IR 约为 1 例/1000 GVHD 患者-天。在基线特征中，非重度骨髓抑制性 HSCT 与显著增加的约为 3 例/1000 GVHD 患者-天的 IFI IR 相关，然而已发展成严重 GVHD 的重度骨髓抑制性 HSC 移植受体具有小于 1 例/1000 GVHD 患者-天的 IFI IR。非重度骨髓抑制性 HSCT 协议的特征，如条件控制、接受外周血干细胞和用于 GVHD 预防的环孢菌素，也与稍微较高危险的 IFI 相关。

通过使用 10 mg/kg 英夫单抗，将患严重 GVHD 的患者中从 GVHD 发作开始到 IFI 的时间进行分级。在英夫单抗受体中存在显著更高的 IFI 概率。用 ECP 治疗没有显示出统计学上 IFI 的显著增加。

在患严重 GVHD 的患者中用于发展 IFI 的时间依赖性 Cox 衰退分析模型将被开发。对所有可能的 IFI 危险因素计算单变量危险比率 (HRs)。只有具有小于 0.20 的未调整 HR P 值的特征才会在多变量模型中考虑。

分别不包括与描述的非重度骨髓抑制性 HSCT 共线的变量，且假设分析 10 IFIs 时，在最终模型中保留具有最高 HR 和小于 0.05 的 P 值的 2 个共变量。假设将英夫单抗优先给予患严重肠胃 GVHD 的患者，且在单变量 Cox 中发现肠胃器官特异性级别 3 或 4 与 IFI 显著相关，则根据指示将该共变量保留在最终模型中以将混淆减至最低，即使存在其它共变量的模型中其变得不是显著的。作为一种时间依赖性共变量的用英夫单抗调整的 HR 约为 14；调整的非重度骨髓抑制性 HSCT 的 HR 约为 8。在存在使用英夫单抗和移植类型作为共变量时，严重肠胃器官特异性级别 3 或 4 GVHD 的调整的 HR 约为 4。10 mg/kg 英夫单抗辐射的 IFI 危险作用划分的时间显示出增加的危险时间。使用 1 mg/kg 或更少的英夫单抗不显示 HR 显著的增加。单独 ECP 显示出 HR 非显著不同于那些仅用标准控制治疗的患者。低剂量英夫单抗与 ECP 组合比单独高剂量的英夫单抗具有显著更低的 HR。与增加的功效一起给予，该治疗控制是一种更加有效的、安全的治疗形式。

存活

在追踪结束时整个群体的半数存活约为 250-400 天。当根据 GVHD 的严重性分级时，患严重 GVHD 患者的半数存活显著低于不患或患非严重 GVHD 的患者。在患严重 GVHD 的患者中，10 mg/kg 英夫单抗受体的半数存活可以显著低于非受体。ECP 治疗的患者比标准控制的患者或者接受单独低剂量英夫单抗的患者具有更显著的存活模式。更加降低英夫单抗的剂量至 1 mg/kg 与标准 ECP 控制结合，将导致 GvHD 评价中显著的改善，然而与更高水平英夫单抗相关的 IFI 将在统计学上显著地减少。