專利申請案第 93139924 號
ROC Patent Appln. No. 93139924
修正後無劃線之中文說明書替換頁-附件(五)
Amended Page of the Chinese Specification-Encl. (V)
(民國 102 年 4 月 25 日送呈)
(Submitted on April 25, 2013)

102 年 4 月 25 日修正

修正頁 102.4.25 補充

公告本

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：93139924

※ 申請日期：93.12.22

※IPC 分類：A61M 1/36, A61K 39/395, A61P 37/06

一、發明名稱：（中文/英文）

接受體外光量子療法之細胞與 TNF 拮抗劑之組合產品
COMBINED PRODUCT OF CELLS SUBJECTED TO EXTRACORPOREAL PHOTOPHERESIS AND A TNF ANTAGONIST

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

美商塞若克斯公司

THERAKOS, INC.

代表人：（中文/英文）

陶德/VOLYN, TODD, F.

住居所或營業所地址：（中文/英文）

美國賓州愛克斯城開利大道 437 號

437 Creamery Way, Exton, PA 19341, U.S.A.

國　籍：（中文/英文）

美國/U.S.A.

三、發明人：（共 4 人）

姓　名：（中文/英文）

1.彼大衛/PERITT, DAVID

2.康金/CAMPBELL, KIM

3.基吉爾/GILES-KOMAR, JILL

4.哈喬治/HARRIMAN, GREGORY

國　籍：（中文/英文）

1.~4.均為美國/U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國;西元 2003 年 12 月 23 日;60/532,076

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

用以治療一自體免疫疾病、異位性疾病、移植排斥或 GVHD 或減輕其一或多種症狀之方法，其關於使用一組合療法。該療法涉及將一體外光量子療法與一 TNF-α 拮抗劑投予一個體。

六、英文發明摘要：

Methods of treating an autoimmune disease, an atopic disease, transplantation rejection or GVHD or ameliorating one or more symptoms thereof involves the use of a combination therapy. The therapy involves administering to a subject an extracorporeal photopheresis and a TNF α antagonist.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（　　）圖。無

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

背景

本發明係關於免疫相關疾病之治療。

【先前技術】

自體免疫疾病係有關對本身組織反應的免疫細胞之不適當活化。這些活化的免疫細胞會促進涉及疾病病理學之細胞激素及自體抗體的產生。其他涉及T細胞的疾病包括發生在移植情況內之移植物對抗宿主疾病(GVHD)。在GVHD中，供給者T細胞會藉由發起對接受者身體的攻擊而排斥接受者的組織及器官。其他疾病之宿主涉及宿主免疫系統之去調控作用，某些疾病以藥品、某些疾病以生物劑有最好的治療效果，其他疾病則以例如體外光量子療法治療有最好治療效果，而其他疾病有非常有限之治療選擇。

體外光量子療法(ECP)已顯示為一種在特定T細胞媒介的疾病上有效的療法。在GVHD情況下，光量子療法已作為與局部曲安奈德(triamcinolone)軟膏、抗真菌劑、抗病毒劑、抗生素、免疫球蛋白、及甲氨喋呤相關之治療。ECP亦已與免疫抑制劑例如黴酚酸嗎啉乙酯、他克莫司(tacrolimus)、潑尼松(prednisone)、環孢黴素、羥基氯喹、類固醇、FK-506、及沙利竇邁(thalidomide)一起使用於cGVHD及難治性cGVHD。對固體器官移植物而言，ECP已與免疫抑制劑共同使用以降低與腎臟異體移植排斥相關之急性異體移植排斥事件之數目。例如，ECP已與OKT3及/或免疫抑制劑潑尼松、硫唑嘌呤(azathioprine)、及環孢黴素一起使用以反轉

急性腎臟異體移植排斥作用。ECP 亦已與環磷醯胺、分次全身放射線照射、依託泊苷(etoposide)一起使用於對於急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、非何杰金氏症淋巴瘤、或嚴重再生障礙性貧血之異基因骨髓移植。

不論有目前ECP與其他治療藥劑之組合使用，仍存有對於ECP與伴隨藥劑之組合以治療具有免疫媒介疾病、異位性過敏或GVHD之需求，其中現存的治療並不如其原先可能有效或可能有副作用或有困難以其中由任一治療本身傳遞的含量投予。

單核細胞及巨噬細胞會分泌腫瘤壞死因子(TNF-α)作為細胞激素以對內毒素或其他刺激物反應。TNF-α為一種可溶性 17 kD 蛋白質次單元之同三聚體。除單核細胞或巨噬細胞以外之細胞亦會製造 TNF-α，舉例而言，人類非單核細胞性腫瘤細胞系會製造 TNF。TNF-α已被認為相關於發炎疾病、自體免疫疾病、病毒、細菌及寄生蟲感染、惡性腫瘤、及/或神經發生疾病(neurogenerative diseases)，且為對疾病之特定生物療法的有效目標，例如類風濕性關節炎及克隆氏疾病。抗體作為治療之投予已非完全無問題，例如，在某些情況下，使用 TNF-α拮抗劑會造成嚴重感染的發生，降低這類物質之劑量會減少治療之併發症。

TNF 拮抗劑之成功使用例如因福利美(infliximab)及依那西普(etanercept)與甲氨喋呤組合使用於關節炎治療已被報導，且一些這些藥劑為目前此用途的管理機關所核准。雖然這些藥劑已對於治療關節炎上為極大的向前一步，但是就許多理由而言，對這些藥劑不反應或反應微弱的病患有實質的缺點。對於患有類風濕性關節炎的病患仍存在困難治療之議題，許多目前的治療有高發生

率之副作用或無法完全預防疾病之進展。即使藥劑例如甲氨喋呤、類固醇及其他化學治療藥劑具有於治療多種免疫疾病、包括類風濕性關節炎上長期的使用歷史，但使用這些化合物之病患可有主要的毒性作用，例如肝臟、肺部、腎臟及骨髓異常。使用這些化合物之病患也可有輕微的副作用，例如口炎、不適、反胃、腹瀉、頭痛及輕微禿髮；然而，這些情況可以補充葉酸而治療。因此，仍存有對於關節炎除了目前核准的產品以外與 TNF 拮抗劑較安全的組合治療之需求。

【發明內容】

發明摘述

在一方面，本發明為一種以有效量的細胞凋亡細胞及 TNF-α 拮抗劑之組合治療患有自體免疫疾病或反應、異位性疾病、GVHD 或移植排斥之方法。

在另一方面，本發明係為一種在移植前以體外光量子療法與 TNF α拮抗劑之組合治療移植物供給者及/或移植物接受者、或植入物接受者之方法。

在另一具體例中，移植物供給者係在收集移植物前以體外光量子療法及 TNF-α拮抗劑之組合治療。在另一具體例中，移植物接受者係進一步在接受移植物後治療。

在另外的具體例中，植入物接受者係在接受植入物前以體外光量子療法與 TNF α拮抗劑之組合治療。植入物接受者係進一步在接受植入物後治療。

在另外的具體例中，用於 ECP 之可光活化的化合物為補骨脂

素或補骨脂素衍生物。

本發明的方法改善對 GVHD 及其他免疫相關疾病之治療，其藉由使得較低劑量的 TNF α抑制劑(且因而減低毒性)、延長輸注間的時間、且增加細胞治療(例如 ECP)及 TNF α抑制劑兩者的功效。

發明之詳細說明

在此說明內引用的所有參考資料係完整併入此說明書中。"個體"或"病患"一詞為互換使用且係指動物、較佳為哺乳動物且更佳為人類。

"細胞群"通常包括發現於血液中之細胞類型。此名詞可包括一或多種血液細胞類型，特定而言，紅血球細胞、血小板、及白血球細胞。一細胞群可包含白血球細胞次型，例如 T-細胞、樹突狀細胞、B-細胞等。在一個具體例中，一細胞群可包含細胞類型之混合物或庫。或是，一細胞群可包含實質上純化的細胞類型，例如 T-細胞或樹突狀細胞。

"ECP 程序"或"ECP"係指體外光量子療法，亦已知為體外光療法。其為一種已接受 UVA 光及可光活化的化合物之細胞群之治療。較佳地，細胞群係來自器官或組織；更佳地，細胞群為血液一部分；且更佳地，細胞群為白血球衣(buffy coat)。ECP 有時用於指一種其中細胞群已接受以 UVA 光在 DNA 交聯劑例如補骨脂素(較佳為 8-MOP)存在下之細胞凋亡誘發過程之方法。

此說明中所指的副作用為治療伴隨藥劑之不欲且負面的作用。面作用通常為不欲的，但不欲的作用並非必然為負面的。來

自治療藥劑之負面作用可為有害或不舒服或危險的。來自投予抗TNF-α治療之副作用可包括但不限於感染及過敏反應的危險性。其他副作用範圍由非專一性的症狀，例如發熱或發冷、瘙癢症或蕁麻疹，及心肺反應例如胸痛、低血壓、高血壓或呼吸困難，到影響例如肌痛及/或關節痛、疹、面部、手部或唇部水腫、吞嚥困難、喉嚨痛、及頭痛。其他副作用可包括但不限於腹部疝氣、脾梗塞、脾腫大、頭昏、上運動神經元病變、紅斑性狼瘡症狀、類風濕性結節、耳垢、腹痛、腹瀉、胃潰瘍、腸阻塞、腸穿孔、腸硬化、反胃、胰臟炎、嘔吐、背痛、骨折、肌腱病症或損傷、心臟衰竭、心肌缺血、淋巴瘤、血小板減少、蜂窩性組織炎、焦慮、混淆、譫妄、憂鬱、嗜睡、自殺企圖、貧血、膿腫、細菌感染、及敗血症。

名詞“病症”或“疾病”係於此說明書中互換使用。“異位性疾病”一詞係與“發炎病症”互換使用以指以發炎例如慢性發炎為特徵的個體之狀況。自體免疫疾病可能獲可能不予發炎相關，此外，發炎可能或不可能由自體免疫病症造成。因此，特定疾病可以自體免疫及發炎病症兩者為特徵。

此發明之伴隨藥劑包括關於TNF-α的免疫調節劑。在一個具體例中，用於本發明組合療法中之免疫調節劑為TNF-α拮抗劑，這些較佳為REMICADE®、HUMIRA®或ENBREL®治療劑。也可使用以小分子之療法例如具有抑制TNF-α作用的p38抑制劑。

本發明的腫瘤壞死因子抗體或其等片段及類似物係於試管內、原位及/或較佳於體內降低、阻斷、取消或干擾TNF-α活性。舉例而言，本發明合適的人類抗體可與TNFα結合且包括抗TNF

抗體、其抗原結合片段、及其專一性結合 TNFα之特定突變物或功能部位。合適的抗 TNFα抗體或片段也可降低、阻斷、取消、干擾、防止及/或抑制 TNF RNA、DNA 或蛋白質合成、TNFα釋放、TNFα受體遞訊、膜 TNFα裂解、TNFα活性、TNFα製造及/或合成。

嵌合型抗體 cA2 係由高親和性中和的小鼠抗-人類 TNFα IgG1 抗體之抗原結合可變區(命名為 A2)、以及人類 IgG1 的恆定區(即κ免疫球蛋白)所組成。人類 IgG1 Fc 區域會促進異基因抗體作用功能，增加循環血清半生期且降低抗體的免疫生成性。此嵌合型抗體 cA2 之抗體親抗原性及抗原決定部位專一性係源自於鼠性抗體 A2 的可變區。在一特別的具體例中，編碼鼠性抗體 A2 可變區之核酸的較佳來源為 A2 融合瘤細胞系。

嵌合型 A2 (cA2)係以劑量依賴方式輔助中和自然及重組人類 TNFα兩者之細胞毒性效應。根據嵌合型抗體 cA2 及重組人類 TNFα之結合分析，嵌合型抗體 cA2 的親合性常數被計算為 $1.04 \times 10^{10}\ M^{-1}$。

在一特別的具體例中，鼠性單株抗體 A2 係由命名為 c134A 的細胞系所製造，嵌合型抗體 cA2 係由命名為 c168 的細胞系所製造。可用於本發明單株抗-TNFα抗體之額外實例敘述於此技藝中(參見如美國專利案第 5,231,024 號；Möller, A. et al., Cytokine 2(3):162-169 (1990)；美國申請案第 07/943,852 號(於 1992 年 9 月 11 日申請)；Rathjen et al.,國際公開案號 WO 91/02078 (於 1991 年 2 月 21 日公開)；Rubin et al., EPO 專利公開案號 0 218 868 (於 1987 年 4 月 22 日公開)；Yone et al., EPO 專利公開案號 0 288 088 (1988

年 10 月 26 日)；Liang et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:847-854 (1986)；Meager, et al., *Hybridoma* 6:305-311 (1987)；Fendly et al., *Hybridoma* 6:359-369 (1987)；Bringman, et al., *Hybridoma* 6:489-507 (1987)；及 Hirai, et al., J. *Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987))。

可用於本發明之較佳的 TNF 受體分子為那些以高親和性與 TNFα結合且視情況具低免疫生成性者。特別是，55 kDa (p55 TNFα-R)及 75 kDa (p75 TNF-R)細胞表面受體可用於本發明中。這些受體的截短形式，包含受體之細胞外功能部位(ECD)或其功能部分，也可用於本發明中。TNF 受體的截短形式，包含 ECD，以於尿液及血清中以 30 kDa 及 40 kDa TNFα抑制結合蛋白質被偵測得。

可用於本發明的 TNFα受體多聚體分子包含兩個或多個 TNFα受體經由一或多個多肽連接子或其他非肽連接子例如聚乙二醇(PEG)連接之 ECD 的所有或功能部分。多聚體分子可另外包含分泌蛋白質的訊息肽以引導多聚體分子的表現。這些多聚體分子及其等製造方法已敘述於美國專利申請案第 08/437,533 號(於 1995 年 5 月 9 日申請)。

TNF 受體分子的功能等同物、衍生物、片段或區域係指 TNF 受體分子的部分，或編碼 TNFα受體分子的 TNF 受體分子序列部分，其具有足夠大小及序列以與可用於本發明的 TNFα受體分子功能上類似(例如以高親和性與 TNFα結合且具有低免疫生成性)。TNFα受體分子之功能等同物也包括功能上類似於可用於本發明的 TNFα受體分子之經修飾的 TNFα受體分子(例如以高親和

性與 TNFα結合且具有低免疫生成性)。舉例而言，TNFα受體分子的功能等同物可含有一"休止"密碼子或一或多個胺基酸取代、缺失或添加(例如一個酸性胺基酸取代為另一個酸性胺基酸；或一個編碼該胺基酸的密碼子取代為另一個編碼疏水性胺基酸的密碼子)。

較佳的人類治療劑為那些具有活體內有效抑制 TNFα及/或阻斷 TNF 誘發的 IL-6 分泌的中和活性之高親和性的抗體、及片段、區域及衍生物。另外較佳於人類治療劑用途上的是這類高親和性抗-TNFα抗體、及其片段、區域和衍生物，其可阻斷 TNF 誘發的促凝血活性，包括於活體內或活體外阻斷 TNF 誘發之細胞黏連分子例如 ELAM-1 及 ICAM-1 的表現以及阻斷 TNF 有絲分裂活性。

本發明的 TNFα拮抗劑較佳經由非經腸胃、皮下、肌內、靜脈內、或動脈內方式。其他方式也可能包括支氣管內、腹部內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、結腸內、頸管內、胃內、肝內、心肌內、骨骼內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、椎管內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、大丸劑、陰道的、直腸的、頰部的、舌下的、鼻內的、或經皮膚的方式。

在本發明的具體例中，其提供用於預防、治療或減緩個體中與自體免疫或異位性疾病相關的一或多個症狀之組合療法，該療法包括投予已接受細胞凋亡誘發治療的細胞群，例如已接受體外光量子療法(ECP)，以及至少一種 TNFα拮抗劑於一個體中。

ECP 與伴隨藥劑(即 TNFα拮抗劑)之組合會產生相較於個別單獨治療較好的治療效果於一個體中。在特定具體例中，ECP 與伴

隨藥劑之組合達到相較於各別單獨治療 2 倍或更高(且較佳為 10 至 20 倍)較好的治療效果於一患有自體免疫疾病、異位性疾病、GVHD 或移植排斥之個體中。在其他具體例中，ECP 與一或多種 TNF 拮抗劑之組合具有超過加成效果於一患有自體免疫疾病、異位性疾病、GVHD 或植入物或移植排斥之個體中。本發明的組合療法可使 ECP 投予至患有自體免疫或異位性疾病的個體之頻率較低而達到治療效果；可使與 ECP 共同使用的 TNFα拮抗劑在預防或治療自體免疫疾病、異位性疾病、或 GVHD 上使用較低劑量及/或可使這類 TNFα拮抗劑投予至患有自體免疫疾病、異位性疾病、或 GVHD 的個體之頻率較低而達到治療效果。其等降低或防止與投予目前單一藥劑治療及/或用於自體免疫疾病、異位性疾病、或 GVHD 的現存組合療法相關之不欲或負面作用。

降低 ECP 或伴隨藥劑至患有自體免疫疾病或異位性疾病之劑量及/或投予頻率促進進行此療法的病患之生命品質。ECP 或伴隨藥劑至患有自體免疫疾病或異位性疾病之劑量及/或投予頻率可降低，且仍於病患的特定器官、組織或關節發炎上達到 20%或更高(且較佳 90%-98%或更高之降低)。

在一個具體例中，ECP 是與單株抗-TNFα抗體合併使用。最佳的單株抗-TNF 抗體為因福利美(Remicade®)、依那西普(Enbrel®)及(HUMIRA®)。在一特定具體例中，用於本發明組成物及方法之 TNFα拮抗劑為因福利美(REMICADE®；Centocor)其衍生物、類似物或抗原結合片段。因福利美(REMICADE®)為一種與腫瘤壞死因子α(TNFα)結合的嵌合型單株抗體。因福利美一般是以每四至八週約 1 至 20 毫克/公斤體重之劑量投予。約 3 至 10 毫克/公

斤體重的劑量可視個體每四至八週投予。

在本發明的另一個具體例中，REMICADE® (因福利美)是以無菌及冷凍乾燥粉末供應以用於以 10 毫升無菌水重組的靜脈輸液以注射用。每單一使用的 REMICADE® (因福利美)小管含有 100 毫克因福利美、500 毫克蔗糖、0.5 毫克聚山梨糖醇酯 80、2.2 毫克磷酸二氫鈉及 6.1 毫克磷酸氫二鈉。根據美國臨床醫師手冊(Physician's Desk Reference)(第 55 版，2001)，再重組產物之總劑量必需進一步稀釋為具注入濃度介於 0.4 毫克/毫升及 4 毫克/毫升之 0.9%氯化鈉注射液 USP 之 250 毫升。在本發明之具體例中，REMICADE®的建議劑量為 0.1 至 10 毫克/公斤，且更佳為 1 至 7 毫克/公斤，更甚佳為 2 至 6 毫克/公斤，且最佳為 3 至 5 毫克/公斤。在最佳的具體例中，劑量不超過 3 毫克/公斤。在特定較佳具體例中，REMICADE®(因福利美)是經由靜脈內注入、接著在第一注入及隨後每 8 週後 2 及 6 週時額外的劑量投予。

在本發明的一個較佳具體例中，REMICADE®(因福利美)係以約 0.01 毫克/公斤至約 50 毫克/公斤、更佳約 1 毫克/公斤至 40 毫克/公斤、且最佳違約 2.5 毫克/公斤至約 20 毫克/公斤的劑量與 ECP 組合投予。在較佳具體例中，Remicade 量顯著較低以降低當協乘性強且疾病獲保證(例如 GVHD)時的毒性。在這些具體例中，ECP 及/或抗 TNFα治療的頻率下降 20%、更佳 40%且最佳至少 50%。因此，在一較佳具體例中，不超過 600 毫克的 REMICADE®(因福利美)係以靜脈內注入、接著在第一注入及隨後每 8 週後 2 及 6 週時額外的劑量給予。在其他具體例中，額萬的劑量是以 1 至 12 週、較佳 4 至 12 週、更佳 6 至 12 週時投予；

ECP 治療較佳係每隔一週一天、或更佳每月一次投予，總共不超過 20 次治療。

在另一具體例中，用於本發明的組成物及方法之 TNFα拮抗劑為依那西普(ENBREL®)或阿德慕拉(adalimulab)(HUMIRA®)，或其片段、衍生物或類似物。依那西普(如 ENBREL®)為與腫瘤壞死因子(TNF)結合且阻斷其與 TNF 受體相互作用之二聚體融合蛋白質。依那西普的一般投予劑量為成人每週約 10 至 100 毫克，且較佳劑量為每週約 50 毫克。少年個體之劑量係介於每週約 0.1 至 50 毫克/公斤體重，最大量為每週約 50 毫克。在本發明的另一較佳具體例中，ENBREL®係在以 1 毫升供應的注射用無菌細菌抑制水 USP (含有 0.9%苯甲醇)重組後以無菌、不含防腐劑、冷凍乾燥粉末供應用於非經腸胃投予。根據美國臨床醫師手冊(第 55 版，2001)，每單一使用的 ENBREL®小管含有 25 毫克依那西普、40 毫克甘露醇、及 1.2 毫克氨丁三醇(tromethamine)。

ECP 係與本發明的 TNFα拮抗劑以任依順序連續投予。此也可以循環式進行，循環式療法涉及伴隨藥劑投予一段時間、接著包含凋亡細胞的細胞群投予一段時間且重複此連續投予。較佳地，包含凋亡的細胞群(例如一種在 ECP 期間得到者)是在伴隨藥劑之前或之後至少約 15-60 分鐘投予。然而，包含凋亡細胞的細胞群可在 TNFα拮抗劑之前或之後以較大間隔投予。舉例而言，在某些情況下，包含凋亡細胞的細胞群可能在伴隨藥劑之前或之後至少約 1 天至 30 天或更久投予，且仍得到組合療法的有利效果。

可用於本發明方法的療法中之細胞群包含“凋亡細胞”，其包括細胞及細胞體，亦即細胞凋亡體，其顯示或將顯示一或更多以細

胞凋亡為特徵的特性。凋亡細胞可包含於誘發期、效應期或降解期之任何細胞。在本發明療法中的細胞群也可包含已經細胞凋亡誘發劑處理且仍存活之細胞。這類細胞可顯示在每些方面例如在投予至個體之後以細胞凋亡為特徵的特性。

ECP 直接誘發顯著細胞凋亡含量，此已被觀察例如於 CTCL、GVHD、及硬腫症病患中。凋亡細胞會造成觀察到的臨床作用。

以細胞凋亡為特徵的特性可包括但不限於：磷脂醯絲胺酸的表面暴露，其可經標準、容許的偵測方法例如 Annexin V 染色法偵測到；經標準、容許的方法測量之粒腺體膜滲透性之變化(例如 Salviolo et al., 411 FEBS LETTERS 77-82 (1997))；DNA 斷裂的證據，例如在 DNA 自細胞中萃取出之後於瓊脂糖凝膠電泳上的 DNA 階梯狀外觀(Tieger et al., 97 J. CLIN. INVEST. 2891-97 (1996))，或經由原位標記(Cavrieli et al., 1992, 如上參考)。

用於本發明的細胞群可於活體外(即體外)誘發成為凋亡細胞，且與個體供給者或接受者相容。細胞群可由實質上任何種類的哺乳動物細胞包括培養的細胞系製備，例如，細胞群可由源自哺乳動物個體本身的身體之細胞種類或由已建立的細胞系製備。特定而言，細胞群可由與哺乳動物個體相容的血液之白血球細胞製備，更特定而言，由個體本身的白血球細胞，且更甚特定是由個體本身的 T-細胞製備。

細胞群也可由已建立的細胞系製備，可用於本發明方法中之細胞系包括例如 Jurkat 細胞(ATCC No. TIB-152)。根據本發明方法合適使用之其他細胞系可由一般熟習此技藝者鑑定及/或決定，細胞群可在投予至個體、供給者或接受者之前經體外製備。因此，

在一個具體例中，個體的血液、接受者的血液、或供給者的血液等量樣本可經由如靜脈穿刺抽出，且其至少一部分白血球細胞在體外接受細胞凋亡誘發條件。

在一個具體例中，細胞群可包含一特定細胞亞群，包括但不限於樹突狀細胞、$CD25^+$ CD4 T-調節細胞、及 $CD4^+$細胞。血液成分之分離及純化為那些一般熟習此技藝者所熟知，的確，血液成分療法的出現已導致一些設計用於收集血液成分之系統。這些收集系統一些為商業上可得自例如 Immunicon Corp. (Huntingdon Valley, PA)、Baxter International (Deerfield, IL)、及 Dynal Biotech (Oslo, Norway)。

Immunicon 的分離系統是使用經與血液樣本中目標成分結合(即形成複合物)的抗體塗覆之磁性毫微顆粒(磁性流體(ferrofluid))而分離血液成分。然後，血液樣本於強磁場中培養，且目標複合物會自樣本其他部分遠離移動而其可接著被收集。參見美國專利案號 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；5,662,831；5,597,531；5,541,072；5,512,332；5,466,574；5,200,084；5,186,827；5,108,933；及 4,795,698。

Dynal 之 Dynabeads®生物磁性分離系統是使用塗覆與血液中目標成分結合的抗體(形成 Dynabeads-目標複合物)之磁性小珠而分離血液成分。然後，使用磁性顆粒聚集器(Dynal MPC®)將複合物移除。一些不同的細胞種類可使用此分離系統收集，包括例如源自單核細胞的樹突狀細胞(單核細胞陰性分離套組，產品號碼

113.09)、源自 $CD34^+$細胞之樹突狀細胞(Dynal® CD34 原始細胞選擇系統，產品號碼 113.01)、及人類單核細胞(Dynabeads® CD14: 用於分子分析的單核細胞陽性分離，產品號碼 111.11 或 111.12)。T 細胞及 T 細胞亞群也可自全血、白血球衣、梯度單核細胞或組織消化物經陽性或陰性地分離或耗盡，使用例如 CELLection™ CD2 套組(產品號碼 116.03)、Dynabeads® M-450 CD2 (產品號碼 111.01/02)、Dynabeads® CD3 (產品號碼 111.13/14)、Dynabeads® 加 DETACHaBEAD (產品號碼 113.03)、Dynabeads® M-450 CD4 (產品號碼 111.05/06)、CD4 陰性分離套組(T 輔助/誘發細胞) (產品號碼 113.17)、CD8 陽性分離套組(產品號碼 113.05)、Dynabeads® CD8 (產品號碼 111.07/08)、CD8 陰性分離套組(產品號碼 113.19)、T 細胞陰性分離套組(產品號碼 113.11)、Dynabeads® CD25 (產品號碼 111.33/34)、及 Dynabeads® CD3/CD28 T 細胞擴增儀(產品號碼 111.31)。Baxter International 已發展一些以離心為主的分離系統，包括 CS-3000 血液細胞分離器、Amicus 分離器、及 Autopheresis-C 分離系統。CS-3000 加血液細胞分離器係收集細胞分離產物及血漿兩者，其包含具有雙室離心系統且收集分離產物的連續流分離器。Amicus 係以連續流或間歇流模式收集單一供給者的血小板及血漿。Autopheresis C 系統係設計為自供給者收集血漿且可收集超過 250 毫升的血漿。通常參見美國專利案號 6,451,203；6,442,397；6,315,707；6,284,142；6,251,284；6,033,561；6,027,441；及 5,494,578。

在本發最佳的具體例中，ECP 係用於誘發細胞凋亡作用，此涉及活體外添加至細胞群之可光活化的化合物。光敏性化合物在如

此情況可能時其自個體、接受者、或供給者中抽回之後、且在暴露於紫外光之前或同時可投予至包含血液細胞的細胞群中。若目標血液細胞或血液成分接受光敏性化合物時，光敏性化合物可投予至包含全血或其部分的細胞群中。在另一具體例中，個體血液、接受者血液、或供給者血液之一部分可首先使用已知方法處理以實質上移除紅細胞，且可光活化的化合物接著可投予至包含富含白血球部分之所得細胞群中。

在另一具體例中，可光活化的化合物可在活體內投予。當投予至包含個體血液、接受者血液、或供給者血液的細胞群中時，可光活化的化合物如此狀況可能時在活體內可經口投予，但也可經靜脈內即/或其他習知投予途徑來投予。可光活化的化合物之口服劑量可介於約 0.3 至約 0.7 毫克/公斤，更特別是約 0.6 毫克/公斤。當經口服投予時，可光活化的化合物可在光量子療法治療前至少約一小時及光量子療法前不超過約三小時投予。

根據本發明供使用之可光活化之化合物包括，但不限於已知為補骨脂素(psorlens)(或氟蕙草素)以及補骨脂素衍生物，如彼等揭述於如美國專利第 4,321,919 號及美國專利第 5,399,719 號。較佳之化合物包括 8-甲氧基補骨脂素、4,5',8-三甲基補骨脂素、5-甲氧基補骨脂素、4-甲基補骨脂素、4,4-二甲基補骨脂素、4,5'-二甲基補骨脂素、4'-胺基甲基-4,5',8-三甲基補骨脂素、4'-羥甲基-4,5',8-三甲基補骨脂素、4',8-甲氧基補骨脂素及 4'-(ω-胺基-2-氧)烷基-4,5',8-三甲基補骨脂素，包括但不限於 4'-(4-胺基-2-氧)丁基-4,5',8-三甲基補骨脂素。一具體例中，可使用之光敏性化合物包括補骨脂素衍生物阿摸多沙林(amotosalen)(S-59)(Cerus,

Corp., Concord, CA)。另一具體例中，光敏性化合物包含 8-甲氧基補骨脂素(8 MOP)。

已添加可光活化之化合物的細胞群以波長會活化可光活化之化合物的光處理。活化可光活化之化合物的處理步驟較佳使用長波長紫外光(UVA)進行，例如在 320 至 400 nm 範圍內之波長下。光除去處理期間之紫外光曝露較佳投予足夠之時間以傳送約 1-2 J/cm^2 至細胞群。

有用於根據發明之方法中之體外光除去裝置包括 Therakos, Inc. (Exton, PA)所製造名稱為 UVAR®者。如此裝置之說明述於美國第 4,683,889 號專利中。UVAR®系統使用處理系統且由三階段所組成，其包括：1)白血球衣(buffy coat)部分(富含白血球)之採集，2)所採集白血球衣部分之照射，及 3)經處理之白血球之再注入。採集階段有 6 個血抽取、離心及再注入步驟之循環。各循環期間，全血被離心及於除去裝置中被分離。由此分離，血漿(每一循環中之體積由 UVAR®儀器操作者測定)及 40 毫升白血球衣在每一採集循環中被保留。紅血球及所有額外之血漿在開始下一個採集循環前再注入病患中。最後，總計 240 毫升白血球衣及 300 毫升血漿被分離且被保留供 UVA 照射用。

富含白血球之血液在照射線路內的照射開始於第一個採集循環的白血球衣採集期間。所採集之血漿及白血球衣與 200 毫升肝素化正常食鹽水及 200 毫克 UVADEX®(水溶性 8-甲氧基補骨脂素)混合。此混合物以 1.4 mm 厚層流過 PHOTOCEPTOR®可光活化室，其差入於 PHOTOSETTE®之 UVA 燈的兩個組合間。PHOTOSETTE®UVA 燈照射此 UVA-透明 PHOTOCEPTOR®室之

兩邊，使達到紫外 A 光之 180 分鐘的曝露，產生每一淋巴球 1-2 J/cm^2 之平均曝露。最終之白血球衣製備物含有估計 20%至 25%之總周邊血液單核細胞成分及血球容積計 2.5%至 7%。光活化期後，容積於 30 至 45 分鐘期間內再注入病患中。美國第 09/480,893 號專利申請案(併於此供參考)述及另一用於 ECP 投予之系統。美國第 5,951,509、5,985,914、5,984,887、4,464,166、4,428,744、4,398,906、4,321,919、PCT 公告號 WO97/366634 及 WO97/36581 亦含有此方面有用之裝置及方法的敘述。

另一可用於本發明之方法的系統述於美國第 09/556,832 號申請案中。該系統包括 ECP 期間可減少自患者採集或去除之淨流體體積的裝置。有效量之傳送至細胞群的光能可使用述於美國第 6,219,584 號專利之方法及系統決定。

各種誘發細胞群之細胞凋亡的其他方法為眾所周知且可採用於本發明中。一種如此之處理包含使細胞群接受離子化幅射(γ 射線、x 射線等)及/或非離子化電磁幅射，包括紫外光、加熱、冷卻、血清剝奪、成長因子剝奪、酸化、稀釋、鹼化、離子強度改變、血清剝奪照射或其組合。或者，細胞凋亡可藉由使細胞群接受超音波而誘發。

又一誘發細胞凋亡之方法包含氧化性壓力對細胞群之體外施予。此可藉由使用化學性氧化劑(如過氧化氫、其他過氧化物及氫過氧化物、臭氧、高錳酸鹽、高碘酸鹽等)。生物可接受之氧化劑可用以減少與形成誘發細胞凋亡之細胞群的殘留物與污染相關之潛在問題。

製備經誘發細胞凋亡之細胞群時，應注意不要施予過量之氧化

性壓力、幅射、藥物處理等，否則可能有造成至少某些細胞在該處理下壞死之風險。壞死造成細胞膜破壞並釋出通常具生物性損害結果(特別是發炎結果)之細胞內容物，以致於最好避免壞死細胞及其成分以及包含凋亡之細胞的細胞群之存在。經誘發細胞凋亡之細胞群的適當處理量及所選用誘發細胞凋亡之處理類型可輕易地由彼等熟諳此藝者所決定。

根據本發明之一方法包含取自患者或相容性哺乳細胞株之細胞的培養。培養的細胞再經體外處理以誘發細胞凋亡及於其中產生細胞群。體外處理可選自由下列組成之群組：抗體、化學治療劑、幅射、體外光除去、超音波、蛋白質及氧化劑。懸浮於患者血漿或另一適當之懸浮介質，如食鹽水或經平衡之哺乳動物細胞培養基，之細胞可再依下述投予。

檢測及量化細胞凋亡之方法有用於測定本發明中待投至患者之製備物中細胞凋亡之存在與量。為取得患者需要之臨床利益所需之細胞製備物中凋亡之細胞數目可視細胞來源、患者狀況、年齡及重量以及其他相關因素而改變，其可藉由眾所周知之方法決定。較佳，投予至病患之凋亡細胞的數目為 1 至 500 億，更佳 10 至 100 億及最佳 25 至 75 億個。

一具體例中，進行細胞凋亡之細胞可藉由瓊脂糖凝膠電泳上所見 DNA 之特徵性"階梯狀"，其由 DNA 分裂成系列片斷所產生。另一具體例中，細胞上磷脂醯絲胺酸之表面表現可用以確認及/或量化經誘發細胞凋亡之細胞群。粒腺體膜電壓改變之測量反應粒腺體膜穿透性之改變，為另一確認細胞群之被認可的方法。若干確認進行細胞凋亡之細胞的其他方法中，許多使用細胞群之特

定標記的單株抗體者亦已述於科學文獻中。

本發明之凋亡細胞及TNF-α拮抗劑之投予在治療關節炎及其他自體免疫疾病上有其用途。彼等亦可用於治療或預防細胞、組織、器官、動物或病患中至少一種自體免疫相關之疾病，包括但不限於急性及慢性免疫及自體免疫病理，如全身性紅斑性狼瘡、甲狀腺官能症、移植物對宿主疾病、硬皮病、糖尿病、格雷武司氏症等；異位性疾病，如慢性炎性病理及血管炎性病理，包括慢性炎性病理，如肉狀瘤慢性炎性腸疾病、潰瘍性結腸炎及克隆氏病理及血管炎性病理，例如但不包括散布性血管內凝固、動脈硬化及川崎症。

經由實例，固態器官移植以本發明方法治療較單獨投予TNF-α拮抗劑更有利。急性固體器官移植排斥因免疫抑制劑之成功而發生於肺移植後之30%至60%的病患中且於肝、腎、心等排斥程度更低。對抗移植抗原產生之經淋巴球(細胞)傳介之免疫反應為急性排斥之主要機制。延遲或慢性排斥造成移植後移植物在數月至數年間毀壞且其特徵為造成被移植之組織壞死的血管破壞。此排斥目前尚未藉由標準療法大幅壓制，因此對於更可持久之免疫容忍的需要為有意義之未被滿足者。

後期移植物破壞有時發生且儘管增加免疫抑制治療，此慢性類型之排斥仍常在不知不覺中進行。病理圖像不同於急性排斥者。動脈內皮首先被涉及，其廣泛性增殖，逐漸阻塞脈管腔，造成移植物之局部缺血及纖維化。

免疫抑制劑目前被廣泛使用以控制排斥反應且主要成為移植成功之原因，然而此等藥物抑制所有的免疫反應，因此使感染成

為接受移植者死亡之壓倒性主要原因。

現存之免疫抑制劑治療在不同類型移植物之情形下可不同。肝異源移植較其他器官異源移植較不具侵略性之排斥。例如，肝移植物之極急性排斥經常不會發生在對 HLA 抗原或 ABO 不相容性預敏化之患者上。對成人之典型免疫抑制治療包含使用環孢素，通常開始於移植時，靜脈投予 4 至 6 毫克/公斤/天且之後當允許餵食時腹膜投予 8 至 14 毫克/公斤/天。若腎官能障礙產生時，劑量往下調整，及血中含量用作劑量足夠之適當指標。

心臟移植中，免疫抑制療法類似腎或肝移植者。然而，肺及心肺移植中，>80%之病患發生急性排斥，但可成功地控制。病患以皮質類固醇 ATG 或 OKT3 治療，高劑量快速靜脈投予。在移植後前二週亦常給予預防性 ALG 或 OKT3。胰臟移植在血管化器官移植物中是獨特的：非用以拯救生命，其嘗試穩定或預防第 I 型糖尿病之毀壞性目標器官併發症。因接受者以免疫抑制之風險交換胰島素注射之風險，胰臟移植通常主要已侷限於已需接受免疫抑制藥物之病患(亦即接受腎移植之腎衰竭糖尿病患)。

急性骨髓或淋巴胚細胞白血病之病患可由骨髓移植獲利(BMT)。小兒科 BMT 因其治療具遺傳疾病(如地中海貧血、鐮狀細胞性貧血、免疫不全症、代謝先天異常)之孩童的潛力已被發展。另 BMT 之選擇為自體移植(當完全之緩解已被誘發時，去除病患本身之骨髓，接著進行病患之脫離處理，希望破壞任一殘留腫瘤及以病患本身之骨髓援救)。既然自體移植物被使用，除了用於根除腫瘤及骨髓脫離之短期高劑量化學療法外，不需免疫抑制；GVHD 之移植後問題被減到最少。

對於取自 HLA-相同供給者之白血病患的移植，排斥率＜5%。對於成形不全性貧血之多次輸血病患，因移植誘發期間增加之免疫抑制而亦被顯著降低。然而，併發症可產生，包括骨髓移植物之宿主排斥急性 GVHD 及感染。後期併發症包括慢性 GVHD、長期免疫不全、及疾病復發。

移植物對宿主疾病(GVHD)使用本發明方法治療較單獨投予 TNF-α拮抗劑或 ECP 更有利。異源骨髓移植(BMT)後 30%至 60%之病患產生慢性移植物-對-宿主疾病(cGVHD)。ECP 及抗-TNFα療法二者在此疾病上已顯現正面效果，但二者均未完全且抗-TNFα與嚴重負面事件相關聯。

使用本發明之組合治療可使各種其他之移植更有效。範例包括角膜移植、皮膚自體移植、軟骨自體移植、骨移植及小腸移植。

其他疾病之宿主可使用本發明方法更有效地治療。例如，皮膚 T-細胞淋巴瘤為 T-淋巴球變惡性且影響皮膚之疾病。三種治療常被使用：幅射、化學療法及光除去法。皮膚 T-細胞淋巴瘤之治療視疾病之階段及病患之年齡及整體健康而定。標準療法因其在過去研究中對病患之有效性可被考慮，或參與臨床試驗可被考慮。大多數皮膚 T-細胞淋巴瘤之病患不是以標準療法治療，且某些標準療法可能具有較所欲者更多之副作用。使用本發明方法之治療亦可用於此疾病之治療。

本發明之方法亦可用於植入手術中，例如，常於美容或非美容之整形外科中進行之植入手術。如此之植入物可包括牙科、脂肪移植，如至頰、唇及臀、臉部植入物，包括彼等至鼻、頰、前額、頦及頭顱，臀部植入物、乳房植入物等。其他植入物包括，但不

限於角膜環、皮質、眼框、耳蝸、肌肉(所有肌肉，包括胸、臀、腹、腓腸肌、比目魚肌、二頭肌、三頭肌)、異種造形之關節及骨替代物、骨修補植入物(螺旋、桿、線、棒、彈簧)、金屬板、脊、椎骨、髮、肉毒桿菌素/膠原蛋白/瑞氏蘭(restylane)/普蘭(perlane)注射、陰莖植入物、攝護腺微粒植入物、乳房植入物(美容且非重建)、輸尿管間裝置、荷爾蒙植入物、胎或幹細胞植入物、節律器、去組織纖維器、人造動脈/靜脈/閥及人造器官。

自體免疫疾病亦可使用本發明之方法有效地治療。此等為免疫系統製造內源性抗原之自身抗體，結果傷害組織之疾病。個體可藉由數個方法確認患病，包括，但不限於 HLA 連結定型、血液或血清為基礎之檢驗或基因變異體之確認，如單核苷酸多形性(SNPs)。例如，一旦個體被判定為具 HLA DR4 連結且已被診斷患有風濕性關節炎，ECP 及 TNF-α拮抗劑組合療法可被指示。最佳，TNF-α拮抗劑為 REMICADE®、HUMIRA®或 ENBREL®TNF-α拮抗劑。其他與自體免疫疾病有關之 HLA 對偶基因(亦已知為 MHC 對偶基因)包括 B27(關節黏連脊椎炎)；DQA1*0501 及 DQB1*0201(腹腔疾病)；DRB1*03、DRB1*04、DQB1*0302 及 DMA*0101(第 I 型糖尿病)；及 Cw6(牛皮癬)。此等對偶基因亦可用以判定個人是否患有自體免疫疾病及因而 ECP 及 TNF-α拮抗劑組合是否可用。

血液或血清為基礎之檢驗可用以評估疾病之因素。例如，存有檢測血清中自核抗體之存在的檢驗，其該抗體可能導致狼瘡之開始。亦存在預測自體免疫心肌炎之以血清為基礎之檢驗。此外，血清為基礎之檢驗可用以測定胰島素含量(糖尿病)或其他疾病肝

或心臟酵素。 T-3 含量可為慢柱甲狀腺炎之指標。在使用血液或血清為基礎之檢驗判定個人患病後，本發明之方法可用以預防或延遲此等疾病之開始或降低其影響。個人可透過基因變異之鑑定，包括但不限於 SNPs，確認為易患病。因此，本發明之又一方面中，首先判定病患罹患自體免疫疾病或易於患病且再處以 ECP(或其它凋亡細胞之投予)及 TNF-α拮抗劑組合。

本發明之方法亦可應用在異位性疾病，其為個人對外部敏感源非常敏感之過敏症。異位性疾病包括但不限於異位性皮膚炎、外支氣管性氣喘、蕁麻疹、過敏性鼻炎、過敏性腸胃炎等。

標準診斷試驗可用以判定病患是否罹患上述類型之疾病。

【實施方式】

實施例

下列非限制性實施例進一步說明本發明。

實施例 1-5 中，衍生自單核細胞之樹突狀細胞如下取得：藉由 Ficoll-Hypaque 梯度離心之分步分離自健康供給者之周圍血液單離出 PBMC。使用 MACS CD14 單離套組及 Automacs 系統(德國 Miltenyi Biotec)確實地被選出。$CD14^+$ 單核細胞被培養於補充 40 毫微克/毫升 IL-4 及 GM-CSF(R&D 系統)之完全 RPMI 中 5 天。細胞激素分泌藉由使用脂多醣(lypopolysaccharides；"LPS"，Sigma)刺激樹突狀細胞誘發。使用標準 ELISA 程序測定培養物上清液中 TNF-α及 IL-12(R&D Systems)含量。

實施例 1(活體外 TNFα製造之抑制研究)

共培養剛單離出之 $CD14^+$ 細胞及衍生自單核細胞之樹突狀

細胞(5×10^5 細胞/孔)於含經 ECP 處理之 $CD15^+$ 細胞(2.5×10^6 細胞/孔)之 24 孔組織培養盤中。2 小時後，將 0.5 毫克/毫升 LPS 加入此等培養物中。24 小時之刺激後，自此等培養物收集上清液供細胞激素測定用。發現經 ECP 處理之細胞抑制 TNFα於存在經 LPS 活化之抗原的細胞內之製造。

實施例 2(活體外 TNFα製造之抑制研究)

衍生自單核細胞之樹突狀細胞(1×10^5 細胞/孔)於單獨增加 LPS 量存在下被培養或與被 ECP 處理之 $CD\ 15^+$ 細胞(5×10^5 細胞/孔)，單獨與 200 毫微克/毫升 Remicade mAb 或與 mAb 及經 ECP 處理之 $CD15^+$ 細胞之組合被培養。在 48 小時時自此等培養物收取培養物上清液供 TNFα製造之測量用。發現單獨以 Remicade mAb 處理之細胞含約 100 微微克/毫升 TNFα。發現彼等單獨以 ECP 處理之細胞含約 1000 微微克/毫升 TNFα。當此等處理各別呈現自超過 1000 微微克/毫升之基線值的減少時，使用本發明之方法時其含量降至平均低於 50 微微克/毫升。

實施例 3(活體外 TNFα製造之抑制研究)

衍生自單核細胞之樹突狀細胞(1×10^5 細胞/孔)於 0.1 毫克/毫升 LPS 單獨存在下被培養或與被 ECP 處理之 $CD\ 15^+$ 細胞(5×10^5 細胞/孔)，單獨與 200 毫微克/毫升 Remicade mAb 或與 mAb 及經 ECP 處理之 $CD15^+$ 細胞之組合被培養。在 48 小時時自此等培養物收取培養物上清液供 TNFα製造之測量用。發現單獨以 Remicade mAb 處理之細胞含約 500 微微克/毫升 TNFα。發現彼等單獨以 ECP 處理之細胞含約 1700 微微克/毫升 TNFα。當此等處理各別呈現自超過 2300 微微克/毫升之基線值的減少時，使用

本發明之方法時其含量降至平均低於 100 微微克/毫升。

實施例 4(TNFα製造之抑制的活體外研究)

衍生自單核細胞之樹突狀細胞(1 x 10^5 細胞/孔)於單獨增加 LPS 量存在下被培養或與被 ECP 處理之 CD 15^+ 細胞(5 x 10^5 細胞/孔)，單獨與 200 毫微克/毫升 Remicade mAb 或與 mAb 及經 ECP 處理之 $CD15^+$ 細胞之組合被培養。在 48 小時時自此等培養物收取培養物上清液供 TNFα製造之測量用。另一組樹突狀細胞經類似處理且在 48 小時時自此等培養物收取培養物上清液供 TNFα製造之定量用。發現單獨以 2 毫微克/毫升 Remicade mAb 處理之細胞含近 100 微微克/毫升 TNFα。當此相同劑量之 Remicade mAb 被投予及進行 ECP 時，含量降至約 1500 微微克/毫升。當單獨投予 8 毫微克/毫升 Remicade mAb 時，含量大於 1300 微微克/毫升；加入 ECP 處理將此降低至約 100 微微克/毫升。40 毫微克/毫升或更大劑量之 Remicade mAb 或不具 ECP 組合將含量降至低於 100 微微克/毫升。組合療法之效果在低劑量之 Remicade mAb 投予(如 2 毫微克/毫升)下最顯著。此等劑量通常不被認為具療效且證實在通常不會預期有負作用之含量下具功效。

實施例 5(其它原-發炎性細胞激素製造之抑制的活體外研究)

衍生自單核細胞之樹突狀細胞(1 x 10^5 細胞/孔)於單獨增加 LPS 量存在下被培養或與被 ECP 處理之新鮮 CD 15^+ 細胞(5 x 10^5 細胞/孔)被培養。細胞再已 0.8 毫微克/毫升 LPS 刺激。在 48 小時時自此等培養物收取培養物上清液供 IL-12 製造之測量用。發現藉由 ECP 之使用 IL-12 含量自約 125 微微克/毫升之基線值降低。ECP 與 2 毫微克/毫升 Remicade mAb 之組合造成 IL-12 含量

降至約 10 微微克/毫升。當使用 200 毫微克/毫升組合 ECP 時，IL-12 含量幾乎無法測得。因此，經 ECP 處理之細胞與 Remicade mAb 之組合顯著降低樹突狀細胞之 IL-12 製造。

實施例 6(小鼠模型活體內應用)(前兆性)

小鼠

雄性 C3H/HeJ(C3H；H2k)、(B6xC3H)F1(H2bxk)、(B6xDBA/2)F1(H2bxd)、C57BL/6(B6；H2b)及 CBA/JCr(CBA；H2k)小鼠購自國家癌症機構研發中心(Frederick，MD)。B10.BR(H2k)小鼠購自傑克遜實驗室(Bar Harbour，ME)。實驗用小鼠年齡介於 6 至 10 週且養養於不含特定病原菌之設施中的無菌微單離籠中，無限制地餵食高溫滅菌之食物及水。

培養基

補充 0.1%牛血清白蛋白(BSA；Sigma Chemical Co., St Louis, MO)之磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)用於所有供給者骨髓及淋巴球之活體外操作中。注射前即刻清洗細胞及再懸浮於單獨之 PBS 中。為保持細胞株及供活體外檢驗用，使用 RPMI 1640 培養基(Mediatech，Herndon，VA)，其補充有 10%胎牛血清(FBS；GIBCO；Grand Island，NY)、2 毫莫耳/升 L-穀胺醯胺、50 IU/毫升青黴素及 50 微克/毫升鏈黴素。

抗體

含對鼠 TNFα具專一性之大鼠$(Fab)_2$單元之 cV1q(aka.CNTO2213)mAb、大鼠/小鼠 Fc 嵌合 IgG2a 建構體及其同型對照 M-T412、人類抗 CD4 mAb 由 Centocor，Malverne，PA 提供。含 mAb 之腹水由對 Thy-1.2(J1j；ATTC TIB-184)、

CD4(RL172)或 CD8(3.168)蛋白質具專一性之融合瘤細胞株產生，且用於製備細胞移植物。經親和性純化之羊抗鼠 IgG(Cappel，Cosa Mesa，CA)用於耗盡 B 細胞。天竺鼠補體購自 Rockland Immunochemicals(Gilbertsville, PA)。所有偶合至藻紅質(PE)之抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8、抗 B220 及同型對照 mAb 均購自 BD Biosciences(Palo Alto，CA)。

實驗性光除去法

自同基因同窩健康小鼠採集脾細胞並藉由使用針筒後端於 PBS 中研磨而製成單細胞懸浮液。此等細胞於 12.5 x 10^6 細胞/毫升 PBS 再懸浮前經再懸浮及以 PBS 清洗二次。清洗細胞時，彼等在懸浮於冰冷培養基中且以約 10^6 細胞/毫升接種於 T75 燒瓶中。補骨脂素(UVADEX 溶液)被加至最終濃度 200 毫微克/毫升，其為 Therakos 提供之儲料溶液稀釋 100 倍。燒瓶躺於 UVA 照射室中且給予約 1.5 焦耳/平方公分之光，其在盤離光源 6 公分時，對應底光 1.5 分鐘。細胞快速自燒瓶移除以避免黏著並以適當濃度置放供注射用。若產生黏著，溫和地刮燒瓶或輕拍以去除大部分之細胞。

骨髓移植

藉由使用含 0.01%BSA 之 PBS(PBS/BSA)沖洗自供給者小鼠之脛骨及股骨獲取骨髓。骨髓細胞使用 1:100 稀釋度之抗-Thy1.2mAb(J1j；美國標準菌種保存中心，Rockville, MD)及 1:6 稀釋度之天竺鼠補體(Rockland Immunochemicals, Gilvertsville, PA)在 37℃下 45 分鐘耗盡 T 細胞。自供給者小鼠之及脾及淋巴節單離出淋巴球。脾細胞以含有 0.7%氯化銨(NH_4Cl)Gey's 平衡鹽溶

解溶液處理以去除紅血球(RBCs)。RBC 罄盡後，脾及淋巴節細胞聚集在一起並藉由置放於預塗覆 5 毫克/毫升稀羊抗鼠 IgG 之塑膠培養皿上 4℃下 1 小時使 B 細胞罄盡。預期此等處理將產生約 90%-95% $CD3^+$細胞之供給者群，其由螢光流動細胞計數法量化。T 細胞次組再使用抗-CD8(3.168)或抗-CD4 mAb(RL172)及補體經負向選擇單離出。預期此等處理會降低 T 細胞次組群至背景含量，由流動細胞計數分析法測定。接受小鼠曝露於來自 ^{137}CS 源 1.43Gy/分鐘，以各 6.5Gy 之分解劑量，分別 3 小時之 13 Gy 全身照射。此等小鼠再以經 2 $x10^6$ 抗-Thy 1.2 處理之骨髓細胞(ATBM；T 細胞罄盡)，以及指定數量之適當 T 細胞(富含供給者 CD4 或 CD8 之 T 細胞)經尾靜脈靜脈內移植。小鼠在移植前一天以 cV1q 抗 TNF-α或同型對照組 M-T412 mAb(1 毫克；腹膜內給予)處理並在第 0、4、8 及 12 天(均為 0.5 毫克；腹膜內給予)時再次處理。對於 GVL 實驗，B6 接受小鼠將在移植供給者 ATBM 及 T 細胞前一天注射 MMB3.19 細胞($1x10^5$ 細胞於 0.5 毫升 PBS 中；腹膜內給予)攻擊，程序類似抗 TNFα mAb 處理。GVHD 及 GVL 二實驗中，每天檢查小鼠之罹病率及死亡率直到完成。來自 2 至 3 個各別實驗之數據被聚集在一起並測定中間存活時間(MST)作為通過所有死亡數據點之天數(包括 0)之線性回歸的內插 50%存活點。各實驗組間存活之統計比較藉由使用非參數 Wilcoxon 標識之秩試驗進行。權重比較之顯著性藉由個別時間點之 T-檢驗測定。

流動細胞計數法

體積 25 微升之適當的 mAbs 與 2-5 $x10^5$ 細胞於 96 孔 U 型底微盤

中 4℃下培育 30 分鐘，1500 rpm 下離心 3 分鐘並以含 0.1%BSA 及 0.01%疊氮化鈉之 PBS(清洗緩衝液)清洗。計算各樣本之陽性細胞百分比及算數平均螢光強度。

病理分析

全厚度耳切片(3 x 2 公釐)自各種處理組之各小鼠取樣並立即於 4%戊二醛固定過夜，再以 0.1M 二甲胂酸鈉緩衝液(pH 7.4)洗濯。組織再用 2%四氧化鋨作固定後處理 2 小時，於分級乙醇中脫水及浸於 Epon 812。以 Porter-Blum MT2B 超微切片機切 1 微米厚切片，使用鄰甲苯胺藍染色，最後浸入 95%乙醇中供光顯微鏡分析。角化不良的表皮細胞數目/直線公釐，如先前所測定，在光顯微鏡 x100 對物透鏡及 x10 接目鏡下計算。對各動物及各時點評估多於 10 個直線公釐之表皮。在盲目條件下對處理組進行分析。

抗-TNFα mAb 於 CD8 T 細胞-媒介 GVHD 之效應

為測定是否抗-TNFα mAb 治療可影響 $CD8^+$ T 細胞-媒介 GVHD 之發生，基於其具有充分發展之病原學，因而使用了 MHC-配對的 miHA-不同的 B10.BRàCBA GVHD 模式。CBA 小鼠經致死之輻射(13Gy，分裂劑量)後單獨以 B10.BR ATBM 細胞($2x10^6$)移植，或與高含量群落(95%)的 $CD8^+$ T 細胞($3x10^6$)共同進行。接著該小鼠分為未處理、以同種型-配對對照之 MT412 mAb 處理或抗-TNFα mAb(cV1q) mAb 於第 1 天(1 毫克，腹膜內給予)及第 0、4、8 及 12 天移植(0.5 毫克，腹膜內給予)。雖然所有單獨 ATBM 細胞之接受者於至少 70 天內均存活，受供給者 T 細胞移植者，

以及未處理或以對照組 MT412 mAb 處理的小鼠均於類似的 MST 值約 20 天之 GVHD 下死亡。相反地，接受供給者 T 細胞但投予 cV1q mAb 之 CBA 接受者，於 MST 約 50 天表現了約 40%之存活率，其明顯不同於 MT412 對照組。此外，存活之受抗-TNFα mAb 治療之小鼠並不表現可證明 GVHD 之表徵(如毛髮摺皺、皮膚損傷、姿勢彎曲或腹瀉)，及其體重位於一低於對照 ATBM 移植群組 5-12%之相對固定程度範圍。於 cV1q 存在下發生致死 GVHD 的小鼠較未治療或以 MT412-治療之群組以較慢之動力學進行。當 cV1q 以 0.1 毫克腹膜內給予投藥時，GVHD 的開始並未明顯地降低。實驗 ECP 以 i.v.投藥注射 10^7 的得自於 BMT 同一天及 3 天後之同胎(littermate)之對照小鼠同源脾細胞。接受供給者 T 細胞但投予經 ECP-治療細胞之 CBA 接受者，於 MST 約 30 天表現了約 20%之存活率，其明顯不同於對照組。此外，存活之受 ECP-治療之小鼠表現出降低的可證明 GVHD 之表徵(如毛髮摺皺、皮膚損傷、姿勢彎曲或腹瀉)，及其體重位於一低於對照 ATBM 移植群組 5-20%之相對固定程度範圍。於經 ECP-治療細胞存在下發生致死 GVHD 的小鼠較未治療之群組以較慢之動力學進行。

ECP 治療與次-效果(sub-efficacious)劑量的抗-TNFα 治療之組合較其單獨治療更為優越。接受供給者 T 細胞但投予 cV1q mAb 0.1 毫克與 ECP 之 CBA 接受者，於 MST 約 70 天表現了約 60%之存活率，其明顯不同於對照組。此外，存活之受雙重治療的小鼠並未表現出可證明 GVHD 之表徵(如毛髮摺皺、皮膚損傷、姿勢彎曲或腹瀉)，及其體重位於一低於對照 ATBM 移植群組 5-12%之相對固定程度範圍。於經雙重治療存在下發生致死 GVHD 的小

鼠較未治療之群組以較慢之動力學進行，且慢於 ECP 或抗 TNF 單獨處理之群組。

抗-TNFα mAb 於 GVHD 越過 MHC 障壁之效應

半相合之 C3Hà(B6xC3H)F1 小鼠模式被用以測定 TNFα 藉 cV1q 治療之中和是否影響 GVHD 越過一完全 MHC 障壁的進行。C3H T 細胞($CD4^+$與 $CD8^+$; $5x10^6$)與 ATBM 細胞($2x10^6$)被 i.v.移植入經致命地輻射(13Gy，分裂劑量)(B6xC3H)之 F1 小鼠，其引發一快速急性的特徵為嚴重減重及早期致死(MST 約 5 天)之 GVHD 反應。類似之結果可得自於受對照 MT412 mAb 治療之接受者，但是以 cV1q 治療之小鼠(於第一天 1 毫克腹膜內給予且於第 0、4、8 與 12 天 0.5 毫克)於 MST 約 40 天表現了約 40%之長期存活率，其相較於未治療或MT412對照組明顯不同。以0.1毫克的cV1q治療可達成一不明顯但值得注意之 GVHD 開始的效應。

實驗 ECP 以 i.v.投藥注射 10^7 的得自於 BMT 同一天及 3 天後之同胎之對照小鼠同源脾細胞。接受供給者 T 細胞但投予經 ECP-治療細胞之 CBA 接受者，於 MST 約 10 天表現了約 20%之存活率，其相較於對照組有所不同但非明顯不同。此外，存活之受 ECP-治療之小鼠表現出降低的可證明 GVHD 之表徵(如毛髮摺皺、皮膚損傷、姿勢彎曲或腹瀉)，及其體重位於一低於對照 ATBM 移植群組 5-20%之相對固定程度範圍。於經 ECP-治療細胞存在下發生致死 GVHD 的小鼠較未治療之群組以較慢之動力學進行。

ECP 治療與次-效果劑量的抗-TNFα 治療之組合較其單獨治療更為優越。接受供給者 T 細胞但投予 cV1q mAb 0.1 毫克與 ECP

之 CBA 接受者，於 MST 約 70 天表現了約 60%之存活率，其明顯不同於對照組。此外，存活之受雙重治療的小鼠並未表現出可證明 GVHD 之表徵(如毛髮摺皺、皮膚損傷、姿勢彎曲或腹瀉)，及其體重位於一低於對照 ATBM 移植群組 5-12%之相對固定程度範圍。於經雙重治療存在下發生致死 GVHD 的小鼠較未治療之群組以較慢之動力學進行，且慢於 ECP 或抗 TNF 單獨處理之群組。

由體重減輕之觀點，於前幾天基於輻射調節所致起始輕微下降後，對照之 ATBM 小鼠於剩下的實驗期中不斷地增加體重。另一方面，移植供給者 T 細胞之未治療者與經 MT412 治療之群組從未自起始降低回復且可能繼續快速降低直至死亡於一致的嚴重 GVHD。然而， cV1q 抗-TNFα mAb-治療之小鼠於第 9 天稍微回復且存活的動物於第 37 天後繼續於剩下的實驗期中獲得體重，其低於 ATBM 群組約 6-12%。以 0.1 毫克之 cV1q 治療的動物相較於對照組動物僅以一縱令為不明顯之差異但輕微較佳之動力學減重。經 ECP 治療之動物其獲得體重具明顯改善且抗 TNF 與 ECP 之組合幾乎與未給予 BMT 或 1 毫克抗 TNF 之群組的對照組動物相同。

抗-TNFα mAb 於 $CD4^+$ T 細胞-媒介 GVHD 之效應

由於供給者 $CD4^+$ T 細胞反應傾向於在 C3Hà(B6xC3H)F1 模式優先發生 GVHD 且由當一完整的 T 細胞接種被移植時之抗 TNFα mAb 治療的緩和效應之起始觀察觀之，吾人應將注意的焦點置於 CD4-媒介之 GVHD 成分。將 $3x10^6$ C3H $CD4^+$ T 細胞與 $2x10^6$ ATBM 細胞注入經輻射(13Gy，分裂劑量)的(B6xC3H)F1 小鼠導致

大部分的未經治療(約 75%；MST 為 10-30 天)及經 MT412-治療的對照組(約 80%；MST 為 10-30 天)的小鼠因嚴重急性 GVHD 而死亡。相反地，100%的以 cV1q 抗-TNFα mAb-治療之小鼠(於第一天 1 毫克腹膜內給予且於第 0、4、8 與 12 天 0.5 毫克)將存活超過 60 天。這些小鼠相較於 ATBM 對照組並未表現出任何可觀察之 GVHD 表徵且快速地回復其起始因輻射後減少的體重並繼續獲得體重直至實驗終了。存活者於 CD4-媒介之 GVHD 之 cV1q 治療的高度明顯效應建議了先前觀察一全部供給者 T 細胞接種轉移之較適度之效應可能基於對 CD8-媒介之抗-MHC 第一型反應之較少抑制所致。然而，以此模式無法被直接測試，因為純化之 C3H $CD8^+$ T 細胞無法在 $CD4^+$ T 細胞不存在下媒介致死的 GVHD。

以 0.1 毫克的 cV1q 抗 TNFα 抗體治療於抑制 GVHD 有較適度之效應。約有 40%的動物於 60 天後存活。存活之小鼠表現出 GVHD 起始之狀況但逐漸消失且體重的減輕不會如 1 毫克 cV1q 群組的快速但會明顯與對照組不同。

實驗 ECP 以 i.v.投藥注射 10^7 的得自於 BMT 同一天及 3 天後之同胎之對照小鼠同源脾細胞。接受供給者 T 細胞但投予經 ECP-治療細胞之 F1 接受者，於 MST 約 10-25 天表現了約 20%之存活率，其相較於對照組有所不同但非明顯不同。此外，存活之受 ECP-治療之小鼠表現出降低的可證明 GVHD 之表徵(如毛髮摺皺、皮膚損傷、姿勢彎曲或腹瀉)，及其體重位於一低於對照 ATBM 移植群組 5-20%之相對固定程度範圍。於經 ECP-治療細胞存在下發生致死 GVHD 的小鼠較未治療之群組以較慢之動力學進行。

ECP 治療與次-效果劑量的抗-TNFα 治療之組合較其單獨治療更為優越。接受供給者 T 細胞但投予 cV1q mAb 0.1 毫克與 ECP 之 CBA 接受者，於約 60 天表現了約 90%之存活率，其明顯不同於對照組。此外，存活之受雙重治療的小鼠並未表現出可證明 GVHD 之表徵(如毛髮摺皺、皮膚損傷、姿勢彎曲或腹瀉)，及其體重位於一低於對照 ATBM 移植群組 5-12%之相對固定程度範圍。於經雙重治療存在下發生致死 GVHD 的小鼠較未治療之群組以較慢之動力學進行，且，雖然無統計上明顯處，仍慢於 ECP 或抗 TNF 單獨處理之群組。

實施例 7 (協乘及降低抗-TNFα 單獨治療的毒性之人類應用)(預示)

實例摘要

此實施例將描述抗-TNFα 與 ECP 之強度攝生法(intensity regimen)具有一相較於文獻中所預測者明顯較佳的毒性分布。開始時 1 毫克/公斤的因福利美抗 TNFα 被使用。然而，可用之劑量範圍可自 0.1 毫克/公斤至 10 毫克/公斤。

病患

病患可使用與下列治療方式相符之位置及方法且不限於下列治療方式的標準攝生法接受一同種異基因之造血幹細胞(HSC)移植；包含口服與靜脈注射皮質類固醇、環孢靈素、他克莫司、西羅莫司(sirolimus)、黴酚酸嗎啉乙酯(MMF)。接受非骨髓清除性 HSC 移植的病患將接受白消安(busulfan)與氟達拉賓(fludarabine)

條件化之化療，與完全不同的 GVHD 預防攝生法。供給者-接受者配對之 CMV 血清狀態與中間之追蹤次數(median follow-up times)均類似。ECP 於 HSC 前及可能於 HSC 後之不同時點以標準程序使用而投予。因福利美於 HSC 後以 0.5 毫克/公斤之劑量予以投藥。追蹤病患並使用標準程序如修正之格魯茲堡量表(Glucksberg scale)記錄，且數據於 GVHD 預防攝生法、進行之日期及最大之全部及特定器官之等級收集。

IFIs 根據與 2002 歐洲癌症研究與治療組織(EORTC)/國際過敏與感染性疾病研究院(NIAID)之國際一致者加以分類。IFI 之案例藉由回顧所有病患的醫療記錄與回顧病理學、微生物學、感染控制與放射學資料庫而鑑定。醫生在不需有因福利美曝露之知識下可將其發現製作文件。僅由經證實的或可能的非基於念珠菌種之 IFI 始可被考慮用於分析。IFI 日期可藉當診斷過程用以證明 IFI 的日期或當臨床研究者可獲得針對可能之 IFI 的放射學與微生物學數據的日期製成文件。若 IFI 之診斷於死亡後作成，該 IFI 日期被認為係死亡日，但是若可能的 IFI 診斷於死後試驗，該 IFI 日期係以當可能的 IFI 診斷作成之日製作文件。

嚴重 GVHD 病患所接受的任何皮質類固醇之所有劑量使用皮質類固醇相當性表被轉變為強體松(prednisone)當量。累積的皮質類固醇劑量，經調整為體重，由 HSCT 之日至死亡時、IFI 之發生、群組追蹤期間、或皮質類固醇於超過 30 天逐漸減少至低於 20 毫克/d 加以計算。經驗的及預防的抗真菌之用途可被作成文件。

存活之病患可於該日期或該日期前最後一次探訪時被檢驗。該研究可藉適當的調整/調節身體而證實。

統計分析

2-面費雪精確試驗(2-sided Fisher exact test)、威康森試驗(Wilcoxon test)或 t 試驗(t test)可適用於基礎線特徵的比較。IFI 影響速率及影響速率比可根據自 HSCT 群組中移植日以及自 GVHD 於發展成嚴重 GVHD 進行之日的不同暴露範圍而計算；病患可於死亡時或追蹤結束前最後一次探訪時被檢驗。影響速率及影響速率比的精確區間可使用漢斯與拜耳法(Haensze and Byar method)分別計算之。卡普蘭-梅爾圖(Kaplan-Meier curves)可用以計算自移植日之存活及至 IFI 的時間。於嚴重 GVHD 的病患中，自進行急性 GVHD 之至 IFI 的時間亦被計算。至事件的時間可使用對數-秩試驗(log-rank test)加以比較。自進行 GVHD 之至 IFI 的時間之時間-依賴的卡斯迴歸分析(Cox regression analysis)可被完成以控制可能的具有嚴重 GVHD 的病患之變數中之混淆或交互作用。單變數的卡斯模式可計算所有可能的具有嚴重 GVHD 的病患之風險因子。於 IFI 單變數卡斯分析中，所有具有 P 值小於.2 的共變數可被考慮於多變數卡斯模式中。因福利美可被模式化為一時間-依賴的變數；其暴露可被假設為固定每週一次之注入將被開始。僅有於最終模式中統計上明顯伴隨(P<.05)於 IFI 的候選變數被保留，除非注意到明顯之混淆。視窗的 SAS 系統，第 8.01 版(SAS Institute, Carey, NC)可被用於前述的分析。

結果

急性 GVHD 的影響及其治療

ECP 於 HSC 前-10 至-4 天被投予約兩次。此外，ECP 治療約每週進行投予以進一步避免急性 GVHD 於移植後前 100 天發生。一初步分析顯示於無 GVHD 及第一至二級 GVHD 間有類似的存活及 IFI 速率；同時，這些群組可被歸類為無或非-嚴重 GVHD。嚴重 GVHD 可被定義為第三或四級全部。群組中約 20%會發展為急性嚴重 GVHD。當比較群組時，無關聯供給者之部分會高於具有嚴重 GVHD 的病患；否則，其基礎線特徵會類似。於造血及非造血 HSC 移植接受者中，任一程度的 GVHD 或嚴重 GVHD 的部分均類似。

診斷為嚴重 GVHD 的病患可接受多種醫療方式，其可包含 MMF 及起始濃度為至少 2 毫克/公斤/d 的皮質固醇類，逐漸減弱至反應，以及增加或提高鈣調神經磷酸酶(calcineurin)抑制劑或西羅莫司的劑量。

因福利美之投藥可開始於急性 GVHD 的起始診斷約 10-50 天後。病患接受每週或每兩週 1 毫克/公斤為基礎的 2-15 劑量。當相較於未接受因福利美的病患，接受者較可能具有 GVHD 的現象及表徵。

群組中的 IFIs

非基於念珠菌種(麴菌病、接合黴菌病…等)之已證實或可能的 IFI 可於觀察期間於群組中診斷。

於具有嚴重 GVHD 的病患中，所有的 IFI IR 約為 1 案例/1000 GVHD 病患-天。於基礎線特徵中，非-造血 HSCT 伴隨著一約 3 案例/1000 GVHD 病患-天的明顯升高，然而發展為嚴重 GVHD 的

造血 HSC 移植接受者具有小於 1 案例/1000 GVHD 病患-天。非-造血 HSCT 方法之特徵，如條件式攝生法，接受週邊血液的幹細胞，以及環孢靈素用於 GVHD 的預防，亦可伴隨著一稍高的 IFI 危險。

於具有嚴重 GVHD 的病患中進行 GVHD 之至 IFI 的時間可藉使用 10 毫克/公斤的因福利美而層化。其於因福利美接受者中具有一明顯較高的 IFI 可能性。以 ECP 治療並未表現出統計上明顯的 IFI 升高。

一用於發展具有嚴重 GVHD 的病患之 IFI 的時間-依賴的卡斯迴歸分析模式可被建立。單變量風險比(HRs)可用以計算所有可能的 IFI 風險因子。僅有具有未調整的 HR P 值小於.20 之特徵被考慮於多變量模式中。

變數於非造血 HSCT 所描述者為共線性而不分別包含，以及設若 10 IFIs 被分析，具有最高 HR 與 P 值小於.05 的 2 共變數可被保持於最終模式中。設若因福利美較佳地提供予具有嚴重胃腸 GVHD 及胃腸器官-特定的病患，第 3 或第 4 級於單變量卡斯被發現明顯伴隨於 IFI，此種共變數可被保持於最終模式以使指示之混淆最小化，即使其於其他共變數模式存在下變為不明顯。作為時間-依賴的共變數之使用因福利美的調整 HR 約為 14；非造血 HSCT 的調整 HR 約為 8。嚴重胃腸器官-特定的第 3 或 4 級 GVHD 於使用因福利美及將移植型態作為共變數之存在下的調整 HR 約為 4。於 10 毫克/公斤的因福利美暴露至 IFI 危險作用的時間圖顯示危險隨時間而升高。使用 1 毫克/公斤或更少的因福利美並未顯示 HR 的明顯提升。單獨 ECP 顯示一 HR 並未明顯地與僅以標準

攝生法治療之病患有所差異。低劑量因福利美與 ECP 之組合具有明顯較高劑量因福利美為低的 HR。將提高的效果合併觀之，此治療攝生法係一較具效果、更為安全的治療模式。

存活

所有群組於追加終了時之中間存活(median survival)為約 250-400 天。當根據 GVHD 之嚴重性層化時，具有嚴重 GVHD 的病患之中間存活明顯低於無或非-嚴重 GVHD 的病患。於具有嚴重 GVHD 的病患中，10 毫克/公斤的因福利美接受者之中間存活明顯低於非接受者。經 ECP 治療之病患具有一較標準攝生法病患或單獨接受低劑量的病患更明顯的存活範式。將因福利美的劑量降低至 1 毫克/公斤與標準 ECP 攝生法將導致 GVHD 記錄的明顯改善，甚至伴隨於大量因福利美的 IFI 亦將戲劇性地與統計上地降低。

102年4月25日 修正補充 45-46頁

十、申請專利範圍：

公告本

1. 一種組合產品，其包含：

a)已接受活體外細胞凋亡-誘發治療之活體外細胞群，其中該細胞群係得自血液之一部分；以及

b)不超過 3 毫克/公斤的劑量之因福利美(infliximab)，

其用於同時或連續投予至病患中，以治療自體免疫疾病或減輕其一或多種症狀。

2. 如申請專利範圍第 1 項之組合產品，其用於同時投予。

3. 如申請專利範圍第 1 項之組合產品，其中該細胞為自體的白血球。

4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合產品，其中該細胞凋亡-誘發治療係為一 ECP 程序，其係使用一光可活化的化合物與一波長可活化該光可活化的化合物之光。

5. 如申請專利範圍第 4 項之組合產品，其中該光可活化的化合物為補骨脂素且該光為 UVA。

6. 如申請專利範圍第 5 項之組合產品，其中該補骨脂素為 8-甲氧基補骨脂素(8-MOP)。

7. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合產品，其用於治療全身性紅斑性狼瘡(SLE)、類風濕性關節炎、甲狀腺炎(thyroidosis)、移植物對抗宿主疾病、硬皮病、糖尿病、葛瑞夫茲氏病、類肉瘤病、慢性炎性腸道疾病、潰瘍性結腸炎及克隆氏病(Crohn's pathology)。

8. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合產品，其用於治療移植物

對抗宿主疾病。

9. 如申請專利範圍第1或2項之組合產品，其用於投予至移植接受者。

10. 如申請專利範圍第9項之組合產品，其中a)與b)係適於根據選自由下列組成的群組之時間表投予：移植前一週兩天；採集該移植物前一週三天；移植前一週兩天共兩週；以及移植前一週三天共三週。

11. 如申請專利範圍第1或2項之組合產品，其中該細胞群係得自接受移植物前的病患之自體群，且其中該產品進一步包含在該病患已接受該移植物後得自該病患之第二自體細胞群，其中該第二細胞群已接受細胞凋亡-誘發治療。

12. 如申請專利範圍第11項之組合產品，其中a)與b)係適於根據選自下列組成的群組之時間表投予：接受者接受該植入物前一週兩天；接受者接受該植入物前一週三天；接受者接受該植入物前一週兩天共兩週；以及接受者接受該植入物前一週三天共三週；且該第二自體細胞群係適於根據選自下列組成的群組之時間表投予：於每週、每月、每月兩次、每月三次、每隔一月、每三個月、每六個月及每年。