



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101421393 B

(45) 授权公告日 2013.08.14

(21) 申请号 200780012781.4

(22) 申请日 2007.02.14

(30) 优先权数据

60/773,405 2006.02.14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.10.09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/062163 2007.02.14

(87) PCT申请的公布数据

W02007/095594 EN 2007.08.23

(73) 专利权人 塞勒兰特治疗公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 J·L·克里斯蒂森 H·卡尔塞基

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12N 5/08(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1635113 A, 2005.07.06, 全文.

TM Zimmerman等.Clinical impact of ex

vivo differentiated myeloid precursors

after highdose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell rescue. 《Bone Marrow Transplantation》.2000 Macmillan Publishers Ltd,2000, 第26卷第505-510页.

Satkiran S. Grewal等.Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood?. 《BLOOD》.2003, 第101卷(第11期), 第4233-4244页.

审查员 朱晓乐

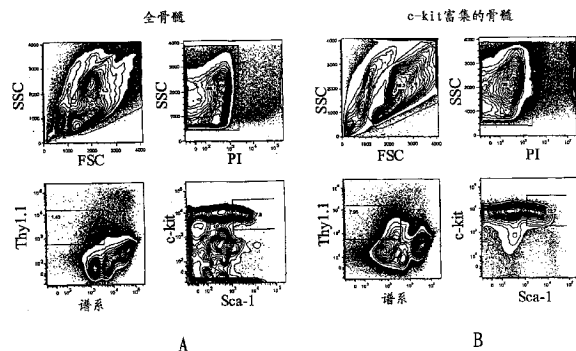
权利要求书1页 说明书16页 附图13页

(54) 发明名称

提高造血干细胞植入的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于方便造血干细胞植入的方法和组合物,包括联合施用髓系祖细胞和造血干细胞。



1. 有效量的同种异体的髓系祖细胞移植物在制备用于提高患者中的自体的或同种异体的造血干细胞移植物的植入的药物中的用途,

其中所述的同种异体的髓系祖细胞移植物与亚优化剂量的自体的或同种异体的造血干细胞联合施用,

其中所述亚优化移植物包括少于  $5.0 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞每 kg 患者体重,且

其中所述骨髓祖细胞移植物包括常见髓系祖细胞 CMP、粒 / 巨噬祖细胞 GMP、和巨核 / 红系祖细胞 MEP。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述亚优化移植物包括少于  $1.0 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞每 kg 患者体重。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述亚优化移植物是从周边血或骨髓中获得。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述亚优化移植物是从脐带血中获得。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述亚优化移植物包括少于  $4.0 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg 患者体重。

6. 权利要求 4 的用途,其中所述亚优化移植物包括衍生于少于两脐带血单位的造血干细胞。

7. 权利要求 4 的用途,其中所述亚优化移植物包括衍生于一脐带血单位的造血干细胞。

8. 权利要求 1 的用途,其中所述髓系祖细胞移植物和所述造血干细胞移植物为所述患者的同种异体移植物。

9. 权利要求 8 的用途,其中所述同种异体移植物相对于患者至少部分 MHC 错配。

10. 权利要求 8 的用途,其中所述同种异体移植物相对于患者为 MHC 完全错配。

11. 权利要求 8 的用途,其中所述同种异体移植物相对于患者为一个或多个 MHC 抗原错配。

12. 权利要求 8 的用途,其中所述同种异体移植物相对于患者为 MHC 完全相配。

13. 权利要求 1 的用途,其中所述髓系祖细胞移植物在造血干细胞移植的同时施用。

14. 权利要求 1 的用途,其中所述髓系祖细胞移植物在造血干细胞移植 12 小时内施用。

15. 权利要求 1 的用途,其中所述髓系祖细胞移植物包括扩增的髓系祖细胞。

16. 权利要求 15 的用途,其中所述扩增的髓系祖细胞移植物为同种异体髓系祖细胞的混合物。

17. 权利要求 16 的用途,其中所述同种异体髓系祖细胞移植物对于造血干细胞移植物至少部分 MHC 错配。

## 提高造血干细胞植入的方法和组合物

[0001] 1. 相关应用的交叉文献

[0002] 本申请要求根据 35U. S. C. § 119(e) 在 2006 年 2 月 14 日提交的 U. S. S. N. 60/773, 405, 所以在此全文引用作为参考。

[0003] 2. 发明领域

[0004] 本发明涉及提高干细胞治疗的方法和组合物, 而且尤其是有助亚优化剂量 (suboptimal doses) 造血干细胞植入的方法和组合物。

[0005] 3. 发明背景

[0006] 造血干细胞移植 (Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 是众多造血障碍疗法的重要组成部分。一般来讲, 有两种 HSCT: 自体移植和同种异体移植。自体移植涉及骨髓治疗后受体自身细胞的注入。自体细胞移植可最小化移植物抗宿主 (Graft versus host disease, GVHD) 疾病的风险并减少并发症。同种异体移植涉及供体干细胞的注入, 典型的是使用与受体 MHC 相配的供体。但是, 相配非相关供体 (Matched unrelated donor, MUD) 移植也有很强的移植物抗宿主反应, 因而导致较高的死亡率。

[0007] 造血干细胞 (HSC) 有三种主要来源: 骨髓, 外周血及脐带血。脐带血 (Umbilical cord blood, UCB) 是其他造血始源 (也即骨髓和动员后的外周血) 的实用替代来源, 可用于相关及非相关异体造血干细胞移植。然而不幸的是, 虽然脐带血容易获得, 并展示了较低的移植物对抗宿主疾病的发病率, 但是它有延时植入的特性。

[0008] 相应地, 尽管从脐带血中获取 HSC 用以治疗造血障碍有广大前景, 但造血功能恢复缓慢仍然是一个主要问题。Laughlin 等人, N. Eng. J. Med. 351 :22 ;2265-2275 (2004)。低温储藏的有核细胞 (Nucleated cell, NC) 剂量是决定嗜中性粒细胞恢复的主要因素, 较高的 CD34<sup>+</sup> 细胞量与非相关供体脐带血 UCB 移植中增高的存活率相关。Laughlin 等人。注入的细胞量少于  $1.8 \times 10^7$  个 NC/kg 或少于  $1.7 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 /kg 受体重量的 UCB 成人受体移植, 一般移植较差存活率较低。Wagner 等人, Blood. 100 ;511611-1618。当有核细胞量低于  $1.5 \times 10^7$  kg 时, 尤为糟糕的结果曾发生在 UCB 移植中。Grewal 等人 Blood, 101 ;11 ; 4233-4244。

[0009] 人白细胞抗原 (Human leukocyte antigen, HLA) 错配水平和 HSCT 存活率之间的关系已经被很好的建立。例如, 当移植物至少有  $1.7 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 /kg 时, 不超过两个相异 HLA 的 UCB 移植受体有较高的存活率。Wagner 等人。

[0010] 因此, 含较高细胞量的 UCB 移植物是成人患者优化移植的必须物这一事实已得到公认。Rocha 等人建议一单位的脐带血冷冻时应至少含有  $2.0 \times 10^7$  个有核细胞 /kg, 并且在与受体 HLA、B 或 DRB1 相配性上 (单一或混合), 相异体不应多于两个。Rocha 等人, N. Eng. J. Med. 351 :22 ;2276-2285 (2004)。然而可接受的最小 UCB 移植物细胞注入剂量仍未统一, 有人提出最小可接受剂量约为  $1.5 \times 10^7$  有核细胞 /kg 至约  $1.7 \times 10^5$  kg CD34<sup>+</sup> 细胞。Grewal 等人, Wagner 等人。

[0011] 不论任何情况下, 即使 UCB 细胞量等于或高于上述剂量, 其移植效率仍明显低于从骨髓或周边血而得的 HSC 移植。Rocha 等人, p. 2281 和图 A。此外, 即使只有一个错配,

移植效果也会变得更糟。Gluckman 等人, *Exp. Hema tol.* 32 :397-407 (2004)。因此,人们仍极为关注提高从 UCB 所获 HSC 的移植以及提高干细胞移植效率。

#### [0012] 4. 发明概述

[0013] 本公开内容描述了用于提高干细胞移植的方法、组合物和试剂盒。尤其是提供了辅助造血干细胞 (HSC) 移植的方法,包括对移植患者施用 HSC 移植物时联合使用髓系祖细胞 (Myeloid progenitor cell, MP) 移植物。该 MP 移植物可以是该 HSC 移植物和 / 或该患者的自体或异体物质,并且可以进一步包括异体 MP 细胞的混合体。在优选实施方案中,施用前会对 MP 细胞进行体外扩增。

[0014] 如此处所述,MP 联合 HSC 的使用能极大地提高 HSC 移植,尤其是在患者所受 HSC 为亚优化剂量的情况下。因此,一方面本发明提供了提高亚优化 HSC 移植的方法,包括对患者联合施用 HSC 移植物和 MP 移植物。一般来讲,优化的 HSC 移植剂量是指有核细胞 (NC) 和 / 或 CD34<sup>+</sup> 细胞在 HSC 移植物中的有效数量,以及 / 或者患者和 HSC 移植物 MHC 的错配程度。

[0015] 一方面为获得成功的干细胞移植,优化的 HSC 移植物需达到一临界细胞 / 患者 kg 量。优化的造血干细胞移植物一般包含至少约  $1.0 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg / 患者、至少约  $2.0 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg / 患者、优选的至少约  $3.0 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg / 患者、更优选的至少约  $4.0 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg / 患者以及最优选的高于  $5.0 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg / 患者。

[0016] 因此,一方面来讲本发明使用 MP 移植物联合亚优化 HSC 移植物的方法,该亚优化状态一般包含小于约  $5.0 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg / 患者,更具体来讲小于约  $4.0 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg / 患者、优选小于约  $3.0 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg / 患者、更优选小于约  $2.0 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg / 患者或最优选小于约  $1.0 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> 细胞每 kg / 患者。

[0017] 在某些实施方案中,从骨髓或周边血中获得亚优化移植物。在一个实施方案中,注入的亚优化移植物包括少于约  $5 \times 10^8$  个有核细胞 / kg 患者、更优选的少于  $4.5$  或  $4.0 \times 10^8$  个有核细胞 / kg 患者以及最优选的少于约  $4.1 \times 10^8$  个有核细胞 / kg 患者。另一替代实施方案中,注入的亚优化移植物可包括少于约  $6 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 / kg 患者、更优选的少于约  $4.5$  至  $5.5 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 / kg 患者 / kg 以及最优选的少于约  $5.0 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 / kg 患者。

[0018] 在某些实施方案中,从脐带血中获得亚优化移植物。在一个实施方案中,亚优化移植物包括从少于两单位脐带血中衍生的 HSC,更优选的是只从一单位脐带血中获取。在另一例实施方案中,注入的亚优化移植物包括少于约  $4 \times 10^7$  个有核细胞 / kg 患者、更优选的少于约  $3.0 \times 10^7$  个有核细胞 / kg 患者以及最优选的少于约  $3.5 \times 10^7$  个有核细胞 / kg 患者。在另一替代实施方案中,亚优化移植物可包括少于约  $5 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 / kg 患者、更优选的少于约  $3.5$  至  $4.5 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 / kg 患者 / kg 以及最优选的少于约  $4.0 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 / kg 患者。

[0019] 另一方面,亚优化移植物包括与患者表型相比多于一个 MHC 错配的 HSC。

[0020] 本发明还提供了用于提高干细胞移植的组合物。一方面,该组合物包括造血干细胞和髓系祖细胞自体或异体混合物。在一个实施方案中,该 MP 细胞在与 HSC 结合前被扩增。同时根据实验方法提供试剂盒用以分离、扩增、保存和施用 MP 和 HSC。

#### [0021] 5. 附图简述

[0022] 技术人员会理解附图只是用于说明目的,而不是在任何方面对本发明范围进行限

制。

[0023] 图 1 表示从 C57B6/Ka(Thy-1.1, CD45.2) 中收集 KTLS HSC 的分类门 (Sortgate)。

[0024] 图 2 表示从 C57B6/Ka(Thy-1.1, CD45.2) 收集 MP 的分类门。

[0025] 图 3 表示同源移植模型的存活数据。

[0026] 图 4 表示同种异体 (相匹配的非相关供体) 移植模型的存活数据。

[0027] 图 5 表示同种异体 (完全错配的) 移植模型的存活数据。

[0028] 图 6 概述三种移植模型 (同源、相匹配的非相关供体和错配异体) 的存活及嵌合数据。

[0029] 图 7 表示实施例 3 中用于纯化 KTLS C57B6/Ka(Thy-1.1, CD45.1, H2b) HSC 的分选。

[0030] 图 8 表示 AKR(Thy-1.1, CD45.2, H2k) 培育衍生的 MP 的分析数据。

[0031] 图 9 表示移植模型的存活数据, 相匹配的非相关供体 KTLSSHSC 和完全错配的同种异体培育衍生的 MP 被共同移植入此模型。

[0032] 图 10 表示移植模型的存活数据, MHC 相匹配的非相关供体 HSC 和从 2MHC 错配供体衍生的 MPC 被共同移植入此模型。

[0033] 6. 发明详述

[0034] 6.1 定义

[0035] 参照本发明公开内容, 除非特殊定义, 本文叙述所用科技术语均为本领域技术人员普遍理解的含义。因此, 以下术语有如下含义:

[0036] “同种异体的 (Allogeneic)” 指衍生于、起源于相同物种或是为相同物种的成员, 此处所说成员为遗传相关或遗传不相关但相似。“异体移植”指从供体向受体转移细胞或器官, 此处受体和供体为同一物种。

[0037] “自体的 (Autologous)” 指衍生或起源于相同目标物或患者。“自体移植”指目标物自身细胞或器官的收集和再移植。

[0038] “常见髓系祖细胞”或“髓系祖细胞”或“MP”指能最终发育成任何一种髓系终端分化细胞的多能或单能祖细胞, 但该细胞一般不会分化成淋巴系细胞。因此, “髓系祖细胞”指髓系的任何祖细胞。如此处所定义的, 髓系常见祖细胞包括寡能干细胞 CMP、GMP 和 MEP, 也包括单能红系祖细胞、巨核祖细胞、粒系祖细胞和巨嗜祖细胞。髓系祖细胞的分化细胞群不同于其他细胞的是它们的分化潜能和一套特征性的细胞标记。

[0039] “常见髓系祖细胞 (Common myeloid progenitor cell)” 或“CMP”有能生成粒/单核祖细胞 (Granulocyte/monocyte progenitor cell, GMP) 以及巨核/红系祖细胞的细胞 (Megakaryocyte/erythroid progenitor cell, MEP) 的特性。该祖细胞有有限的或不具备自我更新能力, 但能生成髓系树突状细胞、髓系红细胞、红细胞、巨核细胞、粒细胞/巨噬细胞、粒细胞和巨噬细胞。

[0040] “同类系 (Congenic)” 指衍生或起源于相同物种, 或是为相同物种的成员, 此处所说的成员除一小部分遗传区域外 (一般为单遗传位点, 即单一基因) 有相同的遗传学特性。“同类系移植”指将细胞或器官从供体转移到受体, 此处受体与供体除单遗传位点外有相同的遗传学特性。

[0041] 文中所述细胞“扩增”或“扩增的”指从初始细胞群增加特定细胞型 (们) 的数量, 此处的细胞群可以或不需为单一性的。用于扩增的初始细胞不必与所得扩增细胞相同。例

如,被扩增的细胞可以经由初始细胞群间接体内或体外生长分化而的。本术语不包括用于鉴定细胞分化潜能的有限稀释分析法。

[0042] 文中所述细胞“功能的”指能运作的细胞或是保有特殊细胞型相关常规功能或活性的细胞,该功能可用定义的功能分析法(们)鉴定。例如,“有功能的GMP细胞”指能最终分化为粒细胞和巨噬细胞的祖细胞,此处所指终端分化的细胞有正常的粒细胞和巨噬细胞的功能。

[0043] “移植物对抗宿主反应”或“GVH”或“GVHD”指当不同的MHC类淋巴细胞被引入宿主时,引起的淋巴细胞对抗宿主的细胞学反应。

[0044] “粒细胞/巨噬细胞祖细胞”或“GMP”指一种细胞,该细胞衍生于常见髓系祖细胞、有能生成粒细胞和巨噬细胞的特性,但是一般不能生成红系髓系细胞或巨核髓系细胞。

[0045] “分离的”指从至少另一种产物、化合物或组合物中分离出的产物、化合物或组合物,不论是自然产生或合成而的,所得产物、化合物或组合物为其自然态。

[0046] “造血干细胞”或“HSC”为克隆性的、能自我更新的多能细胞,该细胞能最终分化成造血体系所有的细胞型,包括B细胞T细胞、NK细胞、淋巴树突细胞、髓系树突细胞、粒细胞、巨噬细胞、巨核细胞和红细胞。与造血系统其他细胞相同,HSC也有一套特定的细胞标记来区别鉴定。

[0047] “标记表型”指细胞上决定其表型(例如分化状态和/或细胞型)的特征性标记和抗原。这可用免疫表型来鉴定,即用抗体来识别细胞表面抗原。抗体可为单克隆或多克隆抗体,但一般选用与其他细胞标记交叉反应最小的抗体。众所周知特定细胞分化或细胞表面标记对于衍生出该细胞的动物物种是独特的,然而其他细胞标记可能常见于不同物种中。尽管物种结构不同(例如氨基酸序列),定义物种间等效细胞型的标记为相同的识别标记。细胞标记包括细胞表面分子(特定情况也称为细胞分化(Cell differentiation, CD)标记)和基因表达标记。基因表达标记是用于指示细胞型或分化状态的表达基因。部分地,尽管基因表达谱可能包括非细胞表面分子,它们反映了细胞表面标记。

[0048] “巨核细胞/红系祖细胞(Megakaryocyte/erythroid progenitor cell)”或“MEP”指从常见髓系祖细胞衍生出的细胞,其特性为产生红细胞和巨核细胞的能力,但一般不产生粒细胞、巨噬细胞或髓系树突细胞。

[0049] “错配的同种异体的”指衍生或起源于相同物种或为相同物种的成员,该物种有非相同的主要组织复合物(Major histocompatibility complex, MHC)抗原(即蛋白质),该抗原一般是用本领域标准分析法鉴定的(例如定义多种MHC抗原的血清学和分子学分析)。“部分错配”指所测成员间(一般指供体和受体间)MHC抗原型部分相配。例如,“半数错配”指两成员间所测MHC抗原有50%的不同。“全部”或“完全”错配指两成员间所测MHC抗原全部不同。

[0050] “清髓性的(Myeloablative)”或“清髓”指损坏或摧毁造血系统,一般用细胞毒试剂或辐射疗法进行。清髓包括完全清髓,指用高剂量细胞毒试剂或全身辐射来摧毁造血系统。清髓也包括用非清髓性条件造成的不完全清髓状态。因此,非清髓性条件指不完全摧毁患者造血系统的疗法。

[0051] “自我更新”指细胞能分裂生成至少一个与母细胞有相同特性(例如,自我更新)子细胞的能力。第二个子细胞可能形成特殊的分化途径。例如,自我更新造血干细胞分裂

形成一个子干细胞和另一个向髓系或淋巴系分化的子细胞。常见祖细胞一般会失去自我更新能力,而细胞分裂产生两个子细胞,它们表现出更为分化的(即限制性的)表型。

[0052] 细胞“分选”指基于物理特性或所含标记进行的细胞分离(如用测向散射(Side scatter, SSC)和前向散射(Forward scatter, FSC)分选或用标记的抗体进行荧光激活细胞分类(Fluorescence activation cell sorting, FACS)),或是基于所含细胞标记进行的细胞分析,例如不分选的FACS。

[0053] “超纯细胞群”指有特殊细胞标记特征和分化潜能的细胞群,至少约50%、优选至少约75-80%、更优选至少约85-90%、以及最优选至少约95%的细胞组成总细胞群。因此,“超纯细胞群”指在所设计的分析条件下,没有特殊细胞标记特征和分化潜能的细胞占细胞群的比例少于约50%、优选少于约20-25%、更优选少于约10-15%、以及最优选少于约5%。

[0054] “目标物”或“患者”可相互替换,除特别说明外,一般指哺乳动物例如人类和非人灵长类动物,也可指兔子、大鼠、小鼠、山羊、猪和其他哺乳类物种。

[0055] “同源的(Syngeneic)”指衍生或起源于相同物种,或为相同物种的成员,此处相同物种指遗传相同,尤其是指抗原或免疫反应相同。包括有相配MHC型的同卵双胞胎。因此“同源移植”指从供体转移细胞或器官到受体,该受体与供体遗传相同。

[0056] “异种的(Xenogeneic)”指衍生或起源于不同物种,或为不同物种的成员,例如人类和啮齿类、人和猪、人和黑猩猩等。“异种移植”指从供体转移细胞或器官到受体,该受体与供体属于不同物种。

[0057] 6.2 提高造血干细胞移植物的移植

[0058] 本发明公开内容描述了辅助干细胞移植的方法、组合物和试剂盒。一方面,本文提供了提高所需患者HSC移植的方法,包括施用(MP)细胞。如本文首次说明,MP细胞提高多种HSC移植,因此提高了接受HSC移植的患者生存率,尤其是在细胞计数及/或HLA错配为亚优化情况下的HSC移植。

[0059] 造血干细胞为多能干细胞,能自我更新并且具有在许可条件下生成造血系统所有细胞型的特性。HSC自我更新指HSC细胞分裂产生至少一个与HSC一样具有自我更新和分化潜能的子细胞的能力;也即,细胞分裂产生额外的HSC。自我更新为造血系统补给提供了连续的非分化干细胞来源。用于鉴定HSC的标记表型为在本领域常见表型。对于人类HSC,细胞标记表型优选为 $CD34^+CD38^-CD90(Thy1)^+Lin^-$ 。对于小鼠HSC,细胞标记表型例证为 $Sca-1^+CD90^+$ (见例证, Spangrude, G. J. 等人, *Science* 1:661-673(1988))或 $c-kit^+Thy1^0Lin^-Sca-1^+$ (见, Uchida, N. 等人, *J. Clin. Invest.* 101(5):961-966(1998))。替代HSC标记如乙醛脱氢酶(见 Storms 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci.* 96:9118-23(1999)、AC133(见 Yin 等人, *Blood* 90:5002-12(1997)和CD150(SLAM)(见 Kiel *Cell* 2005, 121(7)1109-21)有时也可便利使用。

[0060] HSC生成常见淋系或髓系祖细胞(MP)。如本文所用,常见髓系祖细胞指能分化成任一髓系终端分化细胞的细胞群。髓系祖细胞包括常见髓系祖细胞(CMP),指自我更新有限或非自我更新的细胞群,但是它们能进行细胞分裂形成粒/巨噬祖细胞(GMP)和巨核/红系祖细胞(MEP)。非自我更新细胞指细胞分裂产生子细胞,然而所有子细胞都没有母细胞型的分化潜能,而反之产生分化了的子细胞。用于鉴别CMP的标记表型包括本

领域通常所知的表型。对于鼠源 CMP 细胞,细胞群的特异性标记表型为  $c\text{-Kit}^{\text{high}}(\text{CD117})\text{CD16}^{\text{low}}\text{CD34}^{\text{low}}\text{Sca-1}^{\text{neg}}\text{Lin}^{\text{neg}}$  和更为特异性的标记表型  $\text{Fc}\gamma\text{R}^{\text{lo}}\text{IL-7R}\alpha^{\text{neg}}(\text{CD127})$ 。鼠 CMP 细胞群也特异性缺少某些标记的表达,包括 B220、CD4、CD8、CD3、Ter119、Gr-1 和 Mac-1。对于人源 CMP 细胞,细胞群的特性为  $\text{CD34}^+\text{CD38}^+$  以及更为特异性的标记表型  $\text{CD123}^+(\text{IL-3R}\alpha)\text{CD45RA}^{\text{neg}}$ 。人 CMP 细胞群也特异性缺少一些细胞标记,包括 CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56 和 CD235a。对多种髓性祖细胞标记表型的描述都有记载,例如 U. S. Patent Nos. 6, 465, 247 和 6, 761, 883; Akashi, Nature 404 :193-197 (2000) 和 Manz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (18) :11872-7 (2002); 所有出版物在此全文引用作为参考。

[0061] 另一髓系常见祖细胞为粒/巨噬祖细胞 (GMP)。该祖细胞群的细胞特征为其产生粒细胞 (例如嗜碱细胞、嗜曙红细胞和嗜中性粒细胞) 和巨噬细胞的能力。与其他常见祖细胞相似, GMP 细胞缺少自我更新能力。鼠 GMP 细胞特征性标记表型为  $c\text{-Kit}^{\text{hi}}(\text{CD117})\text{Sca-1}^{\text{neg}}\text{Fc}\gamma\text{R}^{\text{hi}}(\text{CD16})\text{IL-7R}\gamma^{\text{neg}}\text{CD34}^{\text{pos}}$ 。鼠 GMP 细胞也缺少某些标记表达, 如 B220、Ter119、CD4、CD8、CD3、Gr-1、Mac-1 和 CD90。人 GMP 细胞的特征性标记表型为  $\text{CD34}^+\text{CD38}^+\text{CD123}^+\text{CD45RA}^+$ 。人 GMP 细胞群也特征性的缺少标记 CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56 和 CD235a。

[0062] 从 CMP 细胞衍生的巨核/红系祖细胞 (MEP) 其特征为分化成常见巨核祖细胞和红系祖细胞的能力。成熟巨核细胞为多倍体细胞, 是形成血小板的先驱细胞, 此发育过程由血小板生成素调节。红细胞由常见红系祖细胞生成, 该过程由促红细胞生成素调节, 最终分化成成熟的血细胞。鼠 MEP 特征性细胞标记表型为  $c\text{-Kit}^{\text{hi}}$  和  $\text{IL-7R}^{\text{neg}}$ , 并进一步由  $\text{FcR}^{\text{lo}}$  和  $\text{CD34}^{\text{low}}$  特异位。鼠 MEP 细胞群也特异性的缺少标记 B220、Ter119、CD4、CD8、CD3、Gr-1 和 CD90。另一小鼠 MEP 标记表型例证为  $c\text{-kit}^{\text{high}}\text{Sca-1}^{\text{neg}}\text{Lin}^{\text{neg/low}}\text{CD16}^{\text{low}}\text{CD34}^{\text{low}}$ 。人 MEP 细胞特征性标记表型为  $\text{CD34}^+\text{CD38}^+\text{CD123}^{\text{neg}}\text{CD45RA}^{\text{neg}}$ 。人 MEP 细胞群也特征性缺少标记 CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56 和 CD235a。

[0063] 髓系中被进一步限定的祖细胞为粒祖细胞、巨噬祖细胞、巨核祖细胞和红系祖细胞。粒祖细胞特征为具有分化成终端分化粒细胞的能力, 包括嗜曙红细胞、嗜碱细胞和嗜中性粒细胞。粒祖细胞一般不分化成髓系其他细胞。巨核祖细胞 (Megakaryocyte progenitor cell, MKP) 特征为能分化成终端分化巨核细胞, 但不能分化成髓系其他细胞 (见例证 WO2004/024875)。

[0064] 可从多种来源获得 HSC 和 MP 细胞, 包括骨髓、周边血、脐带血和其它已知收集造血和髓系祖细胞的来源, 包括肝脏尤其是胎儿肝脏。周边和脐带血富含 HSC 和 MP 细胞。细胞用本领域已知或常用方法获得。例如, 准备骨髓细胞的方法在 Sutherland 等人, Bone Marrow Processing and Purging: A Practical Guide (Gee, A. P. ed.), CRC Press Inc. (1991) 中有所描述。HSC 和 MP 细胞也可用适当的扩增和分化技术从原始干细胞资源获得, 例如胚胎干细胞 (Thomson 等人, Science 282 :1145 (1998)) 和生殖细胞 (Shambloott 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :13726 (1998))。

[0065] 如本文所述, HSC 和 MP 细胞可衍生于任何有造血系统的动物物种。优选地, 合适的动物为哺乳动物, 包括 (仅为例证但不限于) 啮齿动物、兔子、犬、猫、猪、马、牛、灵长类动物 (例如, 人) 等。

[0066] 某些实施方案中, 用到扩增的干细胞群。可在含细胞因子混合物的不同培养液中

扩增干细胞。扩增的干细胞群不受任何细胞起源机制或理论的限制,并可体外培养细胞生长,因此可提高细胞 CD34 抗原表达或结合。在本领域有已知的干细胞扩增技术,包括 U. S. Pat. No. 6, 326, 198、U. S. Pat. No. 6, 338, 942 ;U. S. Pat. No. 6, 335, 195,在此全文引用作为参考。

[0067] 某些实施方案中,用到扩增的 MP 群。可在含细胞因子混合物的不同培养液中扩增 MP 细胞。扩增的 MP 细胞群不受任何细胞起源机制或理论的限制,并可体外培养细胞生长,因此可提高细胞 CD34 抗原表达或结合。在本领域有已知的 MP 细胞扩增技术,例如包括待发明专利 U. S. Patent App. Ser. No. 11/259, 592 (标题为扩增髓系细胞群的方法及其相关应用)和 U. S. Patent No :6, 967, 029,在此全文引用作为参考。

[0068] 本发明可用于自体或同种异体 HSC 移植。因此,在某一实施方案中,提供了通过使用 MP 细胞提高自体 HSC 移植的方法,如本文所述,该 MP 细胞对于 HSC 移植或患者可为自体或异体的。在其他实施方案中,提供了通过使用 MP 细胞提高异体 HSC 移植的方法,如本文所述,该 MP 细胞对于 HSC 移植或宿主可为自体或异体的。因此,本发明确定了所述方法中使用的 HSC 和 MP 细胞相对于 HSC 移植物的 MHC 和移植患者来说,可为完全匹配的细胞、部分错配异体细胞和 / 或完全错配异体细胞,它们可来自于有关联的供体(通常为有相同亲本等位基因的兄弟姐妹)或不相关供体。

[0069] HSC 和 MP 细胞可被进一步筛选和纯化(包括正筛选和负筛选),以获得超纯细胞群。一方面,用荧光激活细胞分类(Fluorescenceactivated cell sorting, FACS)(也作流式细胞术)分选和分析不同细胞群。带有 HSC 和 MP 细胞群特异性细胞标记的细胞被与细胞标记相结合的抗体(或一般来说抗体混合物)标识。识别不同标记的每一抗体都有与可检测的分子相结合,尤其是荧光染料,该染料能与偶连在其他抗体上的荧光染料相区别。标记或“染色”的细胞流通过激发荧光的光源,检测到的细胞发射谱可决定某一特殊标记抗体的存在。通过检测同时发生的不同荧光(在本领域也作多色荧光细胞分选),携带不同标记组的细胞可从群中其他细胞中被鉴别和分离出来。其他 FACS 参数,包括(仅为例证并不局限于)测向散射(SSC)、前向散射(FSC)和活体染色(例如,碘化吡啶染色),可通过大小和存活性来筛选细胞。HSC 和祖细胞的 FACS 分选和分析描述在 U. S. Patent Nos. 5, 137, 809、5, 750, 397、5, 840, 580 ;6, 465, 249 ;Manz, M. G. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA99 :11872-11877(2002) ;和 Akashi, K. 等人, Nature404(6774) :193-197(2000))及其他文献中。关于荧光激活细胞分选的一般性指导描述在,如, Shapiro, H. M., PracticalFlowCytometry, 4<sup>th</sup>Ed., Wiley-Liss(2003) 和 Ormerod, M. G., FlowCytometry :A Practical Approach, 3<sup>rd</sup>Ed., Oxford UniversityPress(2000)。

[0070] 已知细胞纯化的方法也包括本文所述的组合法。典型的组合措施包括有效移除多余细胞及细胞物质的初始步骤,例如白细胞去除术。第二步包括用抗体结合底物的免疫吸附法分离表达一个或多个祖细胞群常见标记的细胞。例如,携带抗 CD34 抗体的磁珠可结合并捕获通常表达 CD34 抗原的 HSC、CMP 和 GMP 细胞。另一额外步骤提供对不同细胞型更高的分辨率(例如用识别一套特异性细胞标记的抗体进行 FACS 分选),该步骤可用于获得超纯目标细胞群。另一联合方法可包括用携带抗 CD34 的磁珠进行初步分离,而后用 FACS 进一步纯化。

[0071] 根据特殊目的的常规程序将用实证决定治疗效果所需细胞量。一般来讲,为治疗

目的使用的细胞需达到药理有效剂量。“药理有效量”或“药理有效剂量”指足以产生所要病理效果的剂量或是能得到所要结果的剂量,特别是指患者的移植或存活。不论症状是否得到改善,治疗效果也包括暂停或减缓疾病或失调进程。如上所说,药理有效剂量也可用于和细胞结合的治疗复合物,这在下文有所描述。

[0072] 干细胞移植物的功能可随患者的年龄、体重和健康状态及适应症的性质和严重程度变动。HSC 的适用剂量根据这些条件变动。

[0073] 为得到成功的干细胞移植,优化的 HSC 移植物需要达到一个细胞 /kg 患者的阈值。根据已出版资料和最近的临床研究结论,优化的 HSC 移植物一般应含至少约  $1.0 \times 10^6$  个 CD34+ 细胞每 kg/ 患者、至少约  $2.0 \times 10^6$  个 CD34+ 细胞每 kg/ 患者、优选的至少约  $3.0 \times 10^6$  个 CD34+ 细胞每 kg/ 患者、更优选的至少约  $4.0 \times 10^6$  个 CD34+ 细胞每 kg/ 患者以及最优选的大于  $5.0 \times 10^6$  个 CD34+ 细胞每 kg/ 患者。例证见 Olivieri, A. 等人 (1998) *Haematologica*, 83 :329-337 ;Mavroudis, D. 等人 (1996) *Blood*, Vo. 88, No. 8 (October 15) ;pp3223-3229 ;Singhal, S. 等人 (2000) *Bone Marrow Transplantation*, 26, 489-96 ;Bittencourt, H. 等人 (2002) *Blood*, Vol. 99, No. 8 (April 15) ;2726-2733)。

[0074] 优化方面,主体方法和组合物被用于少于优化 HSC 剂量的移植物,例如用本领域已知方法决定的、导致低于中间疗效的剂量。在某些实施案例中,使用 MP 细胞提高亚优化剂量造血干细胞的移植。在某些实施案例中,结合使用 MP 细胞和亚优化剂量造血干细胞可提高患者生存率。该方法中,对患者使用结合 MP 的亚优化移植物可整体改善有效治疗。

[0075] 因此,一方面本发明所用方法结合使用 MP 移植物和亚优化的 HSC 移植物,一般来讲亚优化的 HSC 移植物包括少于约  $5.0 \times 10^6$  个 CD34+ 细胞每 kg/ 患者、更特异的是少于约  $4.0 \times 10^6$  个 CD34+ 细胞每 kg/ 患者、优选少于约  $3.0 \times 10^6$  个 CD34+ 细胞每 kg/ 患者、更优选少于约  $2.0 \times 10^6$  个 CD34+ 细胞每 kg/ 患者或是最优选少于约  $1.0 \times 10^6$  个 CD34+ 细胞每 kg/ 患者。

[0076] 一单位脐带血指从单个胚胎和脐带中收集的血。脐带血中的有核细胞数是变化的。此外,一单位脐带血中的有核细胞数在冷冻和解冻的过程中可能会减少。因此,使用 HSC 时,应注意单位血中的有核细胞数是在解冻之前或之后计量的。在某些实施方案中,亚优化移植物包括少于两单位的脐带血。在某些实施方案中,亚优化移植物包括一单位的脐带血。

[0077] 在某些实施方案中,亚优化移植物功效取决于给患者施用的每 kg 患者体重的个有核细胞 (Nucleated cell, NC)。在一个实施方案中,注入的亚优化 UCB 移植物约为  $4 \times 10^7$  个有核细胞 /kg 患者。在一个实施方案中,亚优化 UCB 移植物为少于  $3 \times 10^7$  个有核细胞 /kg 患者、优选的为少于约  $3.5 \times 10^7$  个有核细胞 /kg 患者。在一个实施方案中,注入的亚优化 UCB 移植物约为 2 或  $2.5 \times 10^7$  个有核细胞 /kg 患者。

[0078] 源自骨髓或周边血的优化 HSC 移植物细胞计数阈值一般比 UCB 移植物大一个数量级。在一个实施案例中,从上述来源所得用于注入的亚优化移植物约为  $5 \times 10^8$  个有核细胞 /kg 患者。在一个实施案例中,亚优化移植物少于 4 或  $4.5 \times 10^8$  个有核细胞 /kg 患者,而优选量少于约  $4.1 \times 10^8$  个有核细胞 /kg 患者。在一个实施案例中,亚优化移植物少于约 3 或  $3.5 \times 10^8$  个有核细胞 /kg 患者。

[0079] 在某些实施方案中,亚优化移植物功效取决于向患者施用的有效 CD34<sup>+</sup> 细胞数。在

一个实施方案中,注入的亚优化 UCB 移植物少于约  $5 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 /kg 患者。在一个实施方案中,注入的亚优化 UCB 移植物少于约  $3.5$  至  $4.5 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 /kg 患者,而优选的少于约  $4 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 /kg 患者。在一个实施方案中,注入的亚优化 UCB 移植物少于约  $3 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 /kg 患者。

[0080] 源自骨髓或周边血的优化 HSC 移植物细胞计数阈值一般约比 UCB 移植物大一个数量级。在一个实施案例中,来自上述资源用于注入的亚优化移植物少于约  $5 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 /kg 患者。在一个实施案例中,用于注入的亚优化移植物少于约  $4 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 /kg 患者,而优选的少于约  $3 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 /kg 患者。在一个实施方案中,注入的亚优化移植物少于约 2 或  $1 \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞 /kg 患者。

[0081] 在某些实施方案中,亚优化移植物的功效取决于 MHC 错配数,例如,亚优化移植物可来自部分或完全错配的异体供体。在某些实施方案中,相对于患者亚优化移植物至少在一个 MHC 连锁位点有错配。在一个实施方案中,亚优化移植物对一个或多个抗原有错配。在一个实施方案中,亚优化移植物至少对两个抗原有 MHC 错配。该抗原们可在相同的或不同的 MHC 连锁位点。

[0082] 用本领域已知标准试验来决定 MHC 错配程度。例如,人类有至少 6 种主要的 MHC 基因分类,它们对移植生物学有重要作用。HLA-A、HLA-B、HLA-C 编码 HLA I 型蛋白,而 HLA-DR、HLA-DQ 和 HLA-DP 编码 HLA II 型蛋白。两组中的所有基因都有高度的多态性,例如在人类群体中有很多 HLA 等位基因或变化,而且不同组间的个体差异与对抗移植细胞的免疫反应强度相关。检测 MHC 相配性的标准方法是检查 HLA-B 和 HLA-DR 或 HLA-A、HLA-B 和 HLA-DR 组的等位基因。因此,两组 HLA 测试 4 个 MHC 抗原或优选为三组 HLA 测试 6 个 MHC 抗原。

[0083] 血清学 MHC 测试中,将对抗各种 HLA 抗原的抗体与目标物(例如供体)的细胞反应,用以决定与抗体反应的特定 MHC 抗原是否存在。将结果与其他目标物(例如受体)的反应特性相比较。将抗体与细胞一起孵育以检测抗体与 MHC 抗原的反应,然后加入补充物诱导细胞裂解(也即淋巴细胞毒实验)。根据反应的细胞裂解量来检测和评定反应(Mickelson, E. 和 Petersdorf, E. W., Hematopoietic Cell Transplantation, Thomas, E. D. 等人 eds., pg28-37, Blackwell Scientific, Malden, MA (1999)。其它以细胞为基础的分析包括使用标记抗体的流式细胞术或酶联免疫反应(Enzyme linked immunoassays, ELISA)。

[0084] 检测 MHC 类型的分子方法一般为使用合成探针和 / 或引物来检测编码 HLA 蛋白的特殊基因序列。合成寡核苷酸可用作杂交探针来检测特定 HLA 类型的限制性片断长度多态性(Vaughn, R. W., Methods in Molecular Biology :MHC Protocols 210 :45-60 (2002))。或者可用引物扩增 HLA 序列(例如通过多聚酶链反应或连接链反应),所得产物可进一步用 DNA 测序、限制性片断多肽分析(Restriction fragment polymorphism analysis, RFLP)检测或通过与序列特异性寡核苷酸引物(Sequence specific oligonucleotide primer, SSOP)杂交来检测(Petersdorf, E. W. 等人, Blood 92(10) :3515-20 (1998); Morishima, Y. 等人, Blood 99(11) :4200-6 (2002); 和 Middleton, D. 和 Williams, F., Methods in Molecular Biology :MHC Protocols 210 :67-112 (2002))。

[0085] 尽管可用上述方法测定亚优化移植物,本公开内容不局限于这些方法。本领域技术人员知道其他替代方法。例如,可用下述方法测定亚优化移植物:成细胞克隆数、粒-巨

嗜成细胞克隆数、突发成单位红细胞数或成单位粒细胞红细胞单核细胞巨噬细胞克隆数，可收集、解冻或施用这些细胞。

[0086] 一般来讲，为医疗目的使用 MP 细胞时，细胞需达到药理有效剂量。“药理有效量”或“药理有效剂量”指足以产生所要求病理效果的剂量，或是能得到所要求结果的剂量（尤其是治疗失调或疾病的情况），包括减少或消除失调或疾病的一种或多种症状表现。不论是否得到改善，治疗效果也包括暂停或延缓疾病或失调的进程。

[0087] 可根据特定目的的常用程序来决定达到治疗效果所需 MP 细胞量。MP 细胞的用量可随患者的年龄、体重和健康状态以及适应症的性质和严重程度变动。此外，MP 细胞的用量可随干细胞移植变动，但是一般来讲，MP 细胞用量为可提高 HSC 移植的剂量。某些实施案例中，MP 细胞用量为提高患者存活率的剂量。

[0088] 在某些实施案例中，注入 MP 细胞数可从约  $1 \times 10^5$  变动到约  $1 \times 10^9$  个细胞/kg、更优选的是从约  $1 \times 10^6$  个变动到约  $1 \times 10^8$  个细胞/kg、而最优选的是约  $1 \times 10^7$  个细胞/kg 体重或在必要情况下更多。

[0089] 用本领域常用方法将细胞移植入患者。优选操作方式为静脉注射。如上所述，会结合考虑性别、年龄、体重、疾病或失调类型、失调状态、所需细胞数占细胞群的百分比（例如细胞群的纯度）以及达到疗效所需细胞数等综合因素来决定移入的细胞数。

[0090] 细胞可一次注入，或在所定足以产生疗效的时间内连续注入。当用连续注入治疗时，可用不同细胞群。如下所述，可用药学适用载体将细胞注入患者。一般包括如缓冲盐水（例如磷酸缓冲液）、补充的基本细胞培养基，或是本领域已知其他培养基。在某些实施案例中，MP 细胞可与干细胞移植同时或是在其之前或之后使用。

[0091] 用髓系祖细胞提高造血干细胞移植的方法可用于治疗多种失调。在某些实施方案中，该失调与疾病或骨髓治疗引起的造血系统残缺有关。如本文所用，“治疗”指疗效性的或预防性的处理，或对疾病、失调或不适情况的抑制方法。治疗包括在病发之前、和/或有临床表现或疾病及状况其他表现之后，以合适的形式施用目标细胞，以减轻疾病严重性、暂缓疾病进程或消除疾病。疾病预防包括延长或拖延失调或疾病发生的症状，优选对失调有较高易感性的目标物。

[0092] 本公开内容进一步提供了在实体器官、细胞或组织移植领域中，用 MP 细胞提高造血干细胞移植的方法。例如（但不局限于），本公开内容进一步提供了用 MP 细胞提高造血干细胞移植在心、肺肝、肾、胰岛细胞、皮肤、内分泌器官或胰腺移植上的应用。

[0093] 6.3 辅佐疗法 (Adjunctive Treatments)

[0094] 多种辅佐疗法可与本文所述方法合用。一方面，辅佐疗法包括抗真菌制剂、抗菌制剂、抗病毒制剂以及其他。

[0095] 一方面，辅佐使用的制剂为抗真菌制剂。真菌感染是骨髓治疗和 HSCT 移植的重要问题。通常延缓移植的受体和形成 GVHD 的患者有很高的真菌感染几率。真菌感染有很多种，包括念珠菌感染 (candidiasis)（例如：克鲁斯念珠菌感染 (candida krusei)、光滑念珠菌感染 (candida glabrata)、白念珠菌感染 (candidaalbicans)、热带念珠菌感染 (candida tropicalis)、曲霉菌感染 (aspergillosis)（例如：烟曲霉感染 (aspergillus fumigatus)、黄曲霉感染 (aspergillus flavus)、毛霉菌感染 (mucormycosis)（例如：根瘤菌感染 (rhizobium arrhizus)、伞枝犁头霉感染 (absidiacorymbifera)、微小根毛

菌感染 (rhizomucor pusillus)、隐球菌感染 (cryptococcosis)、荚膜组织胞浆菌感染 (histoplasma capsulatum) 和球孢子菌感染 (coccidioides immitis)。

[0096] 用于辅佐使用的抗真菌制剂一般为全身性抗真菌制剂。其中一种有用的此类抗真菌制剂为多烯大环内酯类抗生素两性霉素 B (amphotericin B)。两性霉素 B 常见于多种配方, 包括与脱氧胆酸盐组成复合物; 与胆甾硫酸酯形成胶体悬液; 用于由大豆卵磷脂、胆固醇和双硬脂磷脂酰甘油组成的脂质体胶囊中, 或是用于其它本领域已知配方中。

[0097] 另一抗真菌制剂是氟胞嘧啶 (flucytosine), 一种氟化的嘧啶。真菌导致的氟胞嘧啶脱氨基化可产生 5- 氟尿嘧啶 (5-fluorouracil), 它是抗代谢物和 DNA 合成的抑制物。通常氟胞嘧啶用于对抗隐球菌 (cryptococcus) 和念球菌。尽管可单独使用, 氟胞嘧啶一般与两性霉素 B 结合使用。

[0098] 咪唑和三唑代表了广大的唑类抗真菌制剂。据信咪唑和三唑抑制甾醇 14- $\alpha$ - 脱甲基酶, 导致麦角甾醇合成受损而且干扰给予细胞膜的活性 (例如电子传递)。基于咪唑的抗真菌剂可有效对抗特定类型的念球菌, 例如白念球菌、光滑念球菌和新型念球菌。咪唑抗真菌剂用于全身施用的例证包括酮康唑 (ketoconazole)、异草康唑 (itraconazole)、氟康唑 (fluconazole)、益康唑 (econazole)、伏立康唑 (voriconazole) 和四康唑 (tercanazole)。

[0099] 除了真菌感染, 中性粒细胞减少症的患者也易受多种细菌病原体感染。接受清髓治疗和 HSCT 移植的患者很易感染革兰氏阳性菌 (例如链球菌 (streptococcus) 和金黄色葡萄球菌 (staphylococcus aureus)) 和革兰氏阴性菌 (例如大肠杆菌 (E. coli.) 和绿脓杆菌 (pseudomonas aeruginosa))。败血症是常发生病症。此外, 延缓的移植和对抗包膜细菌 (例如肺炎链球菌 (streptococcus pneumoniae) 或流感嗜血杆菌 (haemophilus influenzae)) 免疫应答的失调会增高 GVHD 移植患者的发病率。

[0100] 可用适于特异细菌病原体的已知抗生素进行辅佐抗细菌治疗。包括广谱抗生素和更为针对性的抗细菌化合物。适于扩增的髓系细胞的多种抗细菌制剂包括 (仅为例证并不局限于) 喹诺酮 (quinolone) 和氟喹诺酮 (fluoroquinolone)、 $\beta$ - 内酰胺抗生素 ( $\beta$ -lactam antibiotic)、氨基葡萄糖苷 (aminoglycoside)、四环素 (tetracycline)、大环内酯 (macrolide) 和各种协同肌 (cogener) 等。喹诺酮化合物包括环丙沙星 (ciprofloxacin)、氧氟沙星 (ofloxacin)、施帕沙星 (sparfloxacin)、洛美沙星 (lomefloxacin) 和莫西沙星 (moxifloxacin)。 $\beta$ - 内酰胺抗生素包括青霉素 (penicillin) (例如青霉素 G、青霉素 V)、氨苄西林 (ampicillin)、羧苄青霉素 (carbenicillin)、甲氧西林 (methicillin)、碳青霉烯 (carbapenem) 和先锋霉素 (cephalosporin) (例如头孢噻吩 (cephalothin)、头孢孟多 (cefamandole)、头孢克洛 (cefaclor)、头孢尼西 (cefonicid)、头孢替坦 (cefotetan)、头孢噻肟 (cefatoxime)、头孢他啶 (ceftazidime)、头孢唑肟 (ceftizoxime) 和头孢吡肟 (cefepime))。氨基葡萄糖苷包括新霉素 (neomycin)、链霉素 (streptomycin)、卡那霉素 (kanamycin)、庆大霉素 (gentamicin)、妥布霉素 (tobramycin)、阿米卡星 (amikacin) 和奈替米星 (netilmicin)。大环内酯类包括红霉素 (erythromycin)、克拉霉素 (clarithromycin) 和阿奇霉素 (azithromycin)。其他抗生素被本领域技术人员所熟知。

[0101] 病毒感染也是清髓或 HSCT 患者面对的问题。一般来讲来清髓治疗引起的免疫

系统损坏增高了病毒感染的风险。许多感染源自潜在于血清阳性患者或血清阳性供体细胞中病毒的活化。常见病毒包括巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、带状疱疹病毒-6、eb 病毒、腺病毒以及其他。作为细胞注入的辅助物,所选抗病毒化合物为适用于患者所感染病毒的药物。有效抗病毒化合物包括(仅为例证但不局限于):阿昔洛韦(acyclovir)、西多福韦(cidofovir)、更昔洛韦(ganciclovir)、疱疹净(idoxuridine)、喷昔洛韦(penciclovir)、缬更昔洛韦(valganciclovir)、伐昔洛韦(valacyclovir)、阿糖腺苷(vidarabine)、金刚烷胺(amantadine)、金刚乙胺(rimantadine)、扎那米韦(zanamivir)、福米韦生(fomivirsen)、咪喹莫特(imiquimod)和利巴韦林(ribavirin)。针对反转录病毒的治疗物包括核苷类逆转录酶抑制剂(例如齐多夫定(zidovudine)、去羟肌苷(didanosine)、司他夫定(stavudine)、扎西他滨(zalcitabine)、拉米韦定(lamivudine)、非核苷类逆转录酶抑制剂(例如奈韦拉平(nevirapine)、依法韦仑(efavirenz)、第仑韦定(delvirudine)和蛋白酶抑制剂(例如服妥美(saquinavir)、印地那韦(indinavir)、利托那韦(ritonavir)、那非那韦(nelfinavir)、安泼那韦(amprenavir)和洛匹那韦(lopinavir))。

[0102] 抗真菌、抗细菌和抗病毒制剂可用作预防药以减少感染的发生或疾病的表症。尤其是用于预防免疫抑制患者常见的真菌感染,以及血清阳性患者或血清移植供体的病毒感染。因此,用于治疗实施方案包括 HSC、MP 细胞和抗真菌、抗细菌、或抗病毒化合物的组合成份。

[0103] 在进一步的实施方案中,附加使用的制剂为提高终端分化髓系细胞(尤其是粒细胞、巨噬细胞、巨核细胞和红细胞)分化和动员的细胞因子或生长因子。可用细胞因子 C-CSF 和 GM-CSF 提高粒细胞发育。G-CSF 可有效提高 HSCT 移植和中性粒细胞生成。在另一个实施案例中,细胞因子或生长因子为促血小板生成素。使用 TPO 可提高移植祖细胞的植入,并促进巨核细胞和血小板的发育(Fox, N 等人, J. Clin. Invest. 110 :389-394(2002); Akahori, H. 等人, StemCells14(6) :678-689(1996))。

[0104] 如本领域技术人员所熟知的,多种载体、赋形剂和施用方法可用于附加治疗。代表性的制剂技术记载于 interalia, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(1995) 和 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3<sup>rd</sup> Ed, Kibbe, A. H. ed., Washington DC, American Pharmaceutical Association(2000); 在此全文引用作为参考。

[0105] 药物组合物一般包括药学适用载体和药学有效剂量化合物、或其混合物、或其盐物质。药学组合物可被制成粉剂、粒剂、溶液、悬浮液、气雾剂、固形剂、丸剂、片剂、胶囊剂、凝胶剂、局部软膏、栓剂、透皮贴剂和其他本领域已知制剂。

[0106] 本文所用“药学适用载体”包括本领域药剂学技术人员所知的任一标准药用载体。因此,化合物自身(例如药学适用盐类)或作为结合物可用作制药时的药用稀释剂;例如,生理盐水、磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer saline, PBS)、乙醇水溶液、或是葡萄糖溶液、甘露醇溶液、葡聚糖溶液、丙二醇溶液、油液(例如:植物油、动物油、合成油等)、微晶纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸钙、明胶、聚山梨酸酯 80 或类似物质、或和适当的赋形剂用作固体制剂。

[0107] 药学组合物进一步包括一种或多种缓冲液(例如中性缓冲盐水或磷酸缓冲盐

水)、碳水化合物(例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖)、甘露醇、蛋白、多肽或氨基酸(如甘氨酸)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠、二丁基羟基甲苯、丁基羟基茴香醚等)、制菌剂、螯合剂(例如 EDTA 或谷胱甘肽)、适应受者血液的等渗、低渗或弱高渗溶质、悬浮液、增稠剂、防腐剂、调味剂、甜味剂和合适的赋色化合物。

[0108] 本领域技术人员所知的任何适用载体都可用于组合物,载体类型一般取决于施用方法。治疗组合物可做成制剂用于任何合适的施用途径,例如包括口服、经鼻入、粘膜用、直肠用、阴道用、局部用、静脉用、腹腔用、皮内用、皮下用和通过肌肉施用。

[0109] 本文所述药物组合物可置于单剂量或多剂量容器,例如密封安瓶或药瓶。该容器一般密封以保证无菌和药剂使用的稳定性。一般来讲,如上所述,制剂可在油或水载体中作为悬液、溶液或乳液保存。又或者,药物组合物可在冻干状态下储存,只需在使用前加入灭菌液体载体。

[0110] 对宿主的施用量根据施用物质、施用目的(如预防或治疗)、宿主状态、施用方法、施用次数、施用间隔等决定。本领域技术人员可依经验决定施用量并根据疗效程度调节。用于决定合适剂量的因素包括(但不限于)目标物大小和体重、年龄和性别、症状严重度、疾病状态、制剂传送法、制剂半衰期和制剂效率。所考虑的疾病状态包括急性还是慢性、复发还是缓解期以及疾病进程。

[0111] 本领域技术人员熟知达到有效治疗的剂量或施用时间。例如,可用细胞培养或其他体外分析决定初始有效量。可用动物模型做剂量试验来产生循环浓度或组织浓度,包括细胞培养分析决定的  $IC_{50}$ 。

#### [0112] 6.4 试剂盒

[0113] 本文描述方法可辅以试剂盒来提高 HSC 移植。试剂盒可包括(但不限于)HSC、MP 细胞(包括扩增或分离的细胞)和/或附加治疗化合物、分离或扩增 HSC 和 MP 的方法、对患者用药的方法或它们的任意组合。更优化的试剂盒可包括任何或所有药学适用载体、病理学适用载体、使用指导、容器、施用容器、抗体或它们的任意组合。试剂盒一般带有标记,包括任何书写或记录材料,这些材料可为电子的或计算机识别形式(例如磁盘、光盘、闪存或磁带),用来提供使用指导或其他实际盒内容物的使用信息。

#### [0114] 7. 实施例

[0115] 以下实施例会为本发明技术方面提供更好的理解,但不应在任何方面限制本发明的范围。

##### [0116] 7.1 实施例 1:实验方法

[0117] 从小鼠中制备 HSC 或 MP 细胞。为获得鼠骨髓细胞,无痛处死动物并清除股骨/胫骨肌肉。用研钵碾碎骨头,用尼龙膜过滤骨髓,而后 1200RPM 离心 5 分钟。用 1ml ACK 溶液(0.3M  $NH_4Cl$ 、0.2M  $KHCO_3$ 、MiliQ 过滤水)在冰上重悬细胞 3-4 分,而后用标记培养液(含 2% FCS 和 2mM EDTA 不含钙、镁和酚红的 HANKs 生理盐水)灌注清洗。用标记培养液离心、过滤和重悬细胞,加入小鼠 IgG(1:50 稀释 1mg/ml 储藏液, Sigma, St Louis MO)。冰育细胞 10-15 分,而后与  $10 \mu l$ /小鼠体积 CD117 微珠混合(Miltenyi Biotech, Auburn CA),标记培养液终体积为  $100 \mu l$ /小鼠。冰育细胞 25 分钟。以终体积约 1ml/小鼠的标记培养液清洗和重悬细胞,用尼龙膜过滤。根据生产商指导手册富集设置,用 AutoMACs(Miltenyi, Auburn, CA)富集细胞。用约  $1 \times 10^8$  细胞/ml 标记培养液重悬细胞,加入合适浓度的下列联

合抗体 (eBioscience, San Diego, CA) :Sca-1 别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC)、c-kit R-藻红蛋白-花青7串 (Phycoerythrin-cyanine7tandem, PE-Cy7)、Thy-1.1 异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC)、谱系 (CD3、CD4、CD5、CD8、B220、mac-1、Gr-1 和 Ter119)R-藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE)。冰育细胞 25 分钟,用标记培养液清洗、离心和重悬细胞。加入碘化吡啶 (Propidium iodide, PI) 去除死细胞。用 FACS 分离小鼠 KTLS-HSC、c-kit<sup>high</sup>Thy<sup>low</sup>Sca-1<sup>pos</sup>lineage<sup>neg</sup> 或 MPc-kit<sup>high</sup>Thy<sup>neg</sup>Sca-1<sup>neg</sup>lineage<sup>neg/low</sup>。

[0118] 细胞培养和扩增。从 AKR 小鼠中分选 Lin<sup>neg/low</sup>KTLS-HSC (H2Kk), 铺入 500  $\mu$  l/ 孔无血清培养液, 该培养液含细胞因子和成长因子并结合 c-KitL、FL、TPO 和 IL-6 (X-Vivo15 基质 (Cambrex Bioscience, MD); 青霉素-链霉素 (100x)、glutamax (100x)、2-巯基乙醇 ( $5 \times 10^{-5}$ M)、c-KitL (50ng/ml)、FL (30ng/ml)、TPO (5ng/ml) 和 IL-6 (10ng/ml) (Biosource, Camarillo, CA 和 R&D Systems, Minneapolis, MN)。细胞铺入约 10,000 细胞/孔的 24 孔板。培养 7 天细胞以获得 MPc (培养衍生 MP)。在第 2 和第 4 天给细胞换液 (500ul/孔), 用新鲜培养液替换孔中一半培养液。第五天, 加入 1ml 新鲜培养液并将细胞移入 6 孔板。在第 7 天, 收集细胞并移取三小份用作分析。

[0119] 标记扩增细胞群中小鼠 HSC: 移取孔中细胞, 清洗并转移到锥形 FACS 管, 用血球计数。1100rpm 离心细胞 5 分钟, 移除上清。加入 50ul 封闭抗体 (大鼠 IgG 和小鼠 IgG1 :50), 孵育 10 分钟, 加入 50-100ul 合适浓度的下列抗体 (eBioscience, San Diego, CA) :Sca-1 别藻蓝蛋白 (APC)、Thy-1.1 异硫氰酸荧光素 (FITC)、c-kit 藻红蛋白-花青 7 串 (PE-Cy7)、B220、Mac-1、GR-1R-藻红蛋白 (PE)。冰育 25 分钟, 用含 PI 的标记培养液清洗、离心和重悬细胞。用 FACS 分析细胞 HSC。

[0120] 标记培养扩增细胞群中髓系祖细胞: 用上述标记 HSC 细胞的相同方法准备细胞。用 50ul 封闭抗体 (大鼠 IgG 和小鼠 IgG1 :50) 孵育, 每管加入 50-100ul 谱系-生物素 (Ter119、Gr-1、B220), 冰上放置 20 分。用 2-3ml SM 清洗细胞, 离心, 然后用 50-100ul 合适浓度的下列抗体重悬细胞: Streptavidin Cascade Blue (Molecular Probes, Eugene, OR)、c-kit 藻红蛋白-花青 7 串 (PE-Cy7)、Sca-1 别藻蓝蛋白 (APC)、CD34 异硫氰酸荧光素 (FITC)、2.4G2 (Fc  $\gamma$  R) R-藻红蛋白 (eBioscience, San Diego, CA)。用 FACS 分析细胞 MP (CMP、GMP、MEP)。

[0121] 为成熟祖细胞亚群标记培养扩增细胞: 用上述方法处理细胞。用封闭抗体孵育, 用 50-100ul 抗体液重悬细胞: CD3 藻红蛋白-青 7 串 (PE-Cy7)、B220 太平洋蓝、Gr-1R-藻红蛋白 (PE) 和 Mac-1 别藻蓝蛋白 (APC) (eBioscience, San Diego, CA)。冰上孵育 25 分, 用上述方法进行 FACS 分析。

[0122] 扫描重构小鼠检测供体细胞。室温收集约 10-15 滴血至 0.5ml 含 5mM EDTA 的 PBS 中, 用其扫描 HSC 和 / 或 MP 移植的小鼠检测供体细胞群。加入 1ml 含 2% 右旋糖苷-500 的 PBS, 混合, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30-45 分。多数红细胞被沉积。将上清移入一新管, 离心收集细胞 (5 分, 1000rpm), 用 1.0ml 1X ACK (0.3M NH<sub>4</sub>Cl, 0.2M KHC0<sub>3</sub>, MilliQ 过滤水) 在冰上裂解剩余红细胞 5-6 分。清洗, 而后 1200rpm 离心 5 分。如果沉淀物仍为红色, 重复清洗。用 50ul/管大鼠 IgG 和小鼠 IgG (各为 1:50) 在冰上封闭细胞 10 到 15 分钟。加入合适浓度的生物素标识 Mac-1 和 GR-1 (eBioscience, San Deigo, CA), 在暗处冰育 20 分。清洗细胞, 1200rpm 离心 5 分。对同源或 MUD 移植物 (C57B6/Ka, CD45.1; C57B16/Ka CD45.2 或 129) 加入合适

浓度下例抗体, Streptavidin Cascade Blue (Molecular Probes, Eugene, OR)、CD45.1 别藻蓝蛋白 (APC)、CD45.2 异硫氰酸荧光素 (FITC)、B220R- 藻红蛋白菁串 (PE-Cy7) 和 CD3、CD4、CD8R- 藻红蛋白 (PE) (eBioscience, San Diego, CA)。向异体移植物 (C57B6/Ka、H2Kb; Balb/b、H2Kd) 加入合适浓度的下列抗体 Streptavidin Cascade Blue (Molecular Probes, Eugene, OR)、CD3 别藻蓝蛋白 (APC)、H2Kb 异硫氰酸荧光素 (FITC)、B220R- 藻红蛋白菁串 (PE-Cy7) 和 H2KdR- 藻红蛋白 (PE) (eBioscience, San Diego, CA)。向培养的异体 MP (C57B6/Ka、CD45.1; 129、CD45.2; AKR、H2Kk) MUD 移植物加入合适浓度的下列抗体 CD45.2 生物素 (eBioscience, San Diego, CA)。清洗后, 加入合适浓度的下列抗体: StreptavidinR- 藻红蛋白串 (PE-Cy5)、CD45.1 别藻蓝蛋白 (APC)、H2Kk 异硫氰酸荧光素 (FITC)、Mac-1 和 Gr-1R- 藻红蛋白菁串 (PE-Cy7)、B220 太平洋蓝和 CD3R- 藻红蛋白 (PE) (eBioscience, San Diego, CA)。冰育 25 分钟, 清洗, 离心, 用含 P I 的 SM 重悬细胞。用 FACS 分析细胞。

[0123] 冷冻培养衍生 MP: 以 2 千万细胞 /ml 的浓度冷冻细胞。准备含 85% FCS 和 15% DMSO 的冷冻培养液。计数和清洗培育衍生 MP 细胞。1100RPM 离心。以 1 千万细胞 /ml 的浓度重悬细胞。缓慢滴加等体积 DMSO 冷冻液, 轻柔混合试管。按 1ml 每瓶分装细胞。在 -80°C 过夜冷冻细胞。第二天移入液氮长期保存。

[0124] 7.2 实施例 2: 用纯化的髓系祖细胞联合亚优化剂量 HSC 提高存活率

[0125] 该研究用于决定 MP 细胞能否提高特定案例的存活率, 在这些案例中为给 100% 受体鼠提供辐射保护, 所用的 HSC 细胞不足。该研究调查了 MP 细胞能否提高纯化的 HSC 同源移植后的恢复 (图 3)、相配非相关供体 (MUD) 纯化 HSC 移植后的恢复 (图 4) 或是完全错配异体移植后的恢复 (图 5)。各项研究中, HSC 和 MP 衍生于相同供体。

[0126] 从小鼠骨髓 (BM) 中准备 HSC, 从 C57B1/6KA 小鼠 (H-2b、CD90.1、CD45.2) 中分选 Lin<sup>neg</sup>KTLS-HSCs。图 1 表示从 C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.2) 分选 KTLS HSC 的分选门。全骨髓和 c-kit 富集后的门剖面都有标示。用该门参数分选的 HSC 用于移植实验。

[0127] 从小鼠骨髓 (BM) 准备 MP, 从 C57B1/6KA 小鼠 (H-2b、CD90.1、CD45.2) 分选。图 2 表示从 C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.2) 分选 MP 的门。全骨髓分选和 c-kit 富集后的门剖面都有标示。用该门参数分选的 MP 用于移植实验。

[0128] 在第 0 天对宿主鼠、C57B1/Ka (H-2b、CD90.1、CD45.1)、129 (H-2b、CD45.2) 或 Balb/c (H-2d、CD45.2) 进行分次剂量致死辐射 (总共 9-11Gy, 铯源)。分选的 HSC 和 MP 按所需剂量混合, 在眼球后注射入受体动物。监控动物存活率和供体嵌合性。

[0129] 图 3 表示同源移植模型存活率资料。50KTLSC57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.2) HSC 可被单独移植或与 100,000C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.2) MP 混合移植入 C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.1) 宿主。图 3 表示加入 MP 可提高 HSC 移植存活率。

[0130] 图 4 表示同种异体 (相配非相关供体) 移植模型的存活率资料。100 (图 4A) 或 250 (图 4B) KTLS C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.2、H2b) HSC 可单独移植或和 200,000C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.2、H2b) MP 一起移入 129 (CD45.1、H2b) 宿主。图 4 表示加入 MP 可提高 100 和 250 两个干细胞剂量的 HSC 移植存活率。

[0131] 图 5 表示同种异体 (完全错配) 移植模型的存活率资料。500 (图 5A) 或 2000 (图 5B) KTLS C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.2、H2b) HSC 可单独移植或和 200,000C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.2、H2b) MP 一起移入 Balb/c (CD45.1、H2b) 宿主。图 5 表示加入 MP 可提高 500 和 2000

两个干细胞剂量的 HSC 移植存活率。

[0132] 图 6 概述三种移植模型的存活率和嵌合性资料（同源、相配非相关供体和错配异体）。

[0133] 在所有三种模型中（同源、MUD 和错配异体），与 HSC 单独移植相比，结合 MP 的亚优化剂量 HSC 可提高存活率。

[0134] 7.3 实施例 3 结合使用异体培养衍生的髓系祖细胞可提高亚优化剂量 HSC 的存活率

[0135] 本研究用于决定当 HSC 低于辐射防护剂量时，加入异体培养 - 衍生 MP 是否能提高相配非相关供体 (MUD) HSC 移植的存活率。

[0136] 从小鼠骨髓 (BM) 制备 HSC，从 AKR 小鼠 (H-2k、CD90.1、CD45.2) 分选  $Lin^{neg/low}$  KTLS-HSCs。将分选的细胞铺入含 c-KitL、FL、TPO 和 IL-6 的无血清培养基。培育细胞 7 天。培育期后收集细胞，用 FACS 分析 MP (CMP/GMP/MEP) 和 HSC 含量，然后冷冻。图 8 表示对 AKR (Thy-1.1、CD45.2、H2k) 培育衍生的 MP 的分析。

[0137] 图 7 表示移植当天从小鼠 C57B1/Ka (H-2b、CD90.1、CD45.1) 分选  $Lin^{neg}$  KTLS-HSC。分选 AKR KTLS HSC 并按所述方法培育 7 天。培育期后分析和冷冻细胞。根据培养液中 c-kit<sup>+</sup> 细胞数计算移植所用细胞量。

[0138] 在第 0 天对宿主鼠 129 (H-2b、CD90.2、CD45.2) 进行分次剂量致死辐射（总共 11.5Gy，铯源）。解冻培育细胞，用 FACS 再分析存活率，以及 MP (CMP/GMP/MEP) 和 HSC 含量。用分选分析计算总细胞数和 HSC 及 MP 细胞数。用于注入小鼠的细胞为非标记细胞。培育衍生的 MP 与所需 HSC 量一起用后眼球注射移植入条件宿主。

[0139] 图 9 表示移植模型的存活资料，相配非相关供体 KTLS HSC 与完全错配异体培育衍生的 MP 共同移植入该模型。100KTLSC57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.1、H2b) HSC 被单独移植或与 500,000c-kit<sup>+</sup> AKR (Thy-1.1、CD45.2、H2k) 培育衍生的 MP (MPc) 一起移植入 129 (CD45.2、H2d) 宿主。向 HSC 移植植物中加入 MPc 可提高存活率。相对于单独使用相同剂量的 HSC 或 MPc，两者结合的移植有更高的存活率。

[0140] 该模型中，相对于 HSC 或 MP 单独移植，异体 (MUD) HSC 和第三方异体培育衍生的 MP 共同移植可提高存活率（图 9）。

[0141] 图 10 表示移植模型的存活率数据，MHC 相配非相关供体 HSC 与从 2MHC 错配供体衍生的 MP 细胞被共同移植入此模型。50 异体 HSC (Ba1b/b、H-2b) 被单独移植或与 1 或 2 百万混合异体培育衍生的 MP (FVB、H-2q ; AKR、H2k) 共同移植入致死辐射宿主 (C57B1/Ka、H-2b)。与 HSC 单独移植相比，加入 MP 细胞的 HSC 移植有更高的存活率。相对于 HSC 或 MP 细胞单独移植，HSC 和 MP 细胞共同移植可提高存活率。

[0142] 前述本发明特殊实施案例用于说明和解释。并不限制本发明于确切的公开形式，显而易见，可在上述技术上进行很多调节和变动。所选用和描述的实施案例是为了最好的解释本发明的原理和其特殊应用，因此能使本领域其他技术人员最有效地利用本发明，而且多种实施案例的多种调节方法是之可适用于所需特殊应用情况。

[0143] 所有的专利、专利应用、出版物和本文引用的参考文献在此原文引用作为参考，每一出版物或专利应用都是特殊的，都单独引用作为参考。

c-kit富集的骨髓

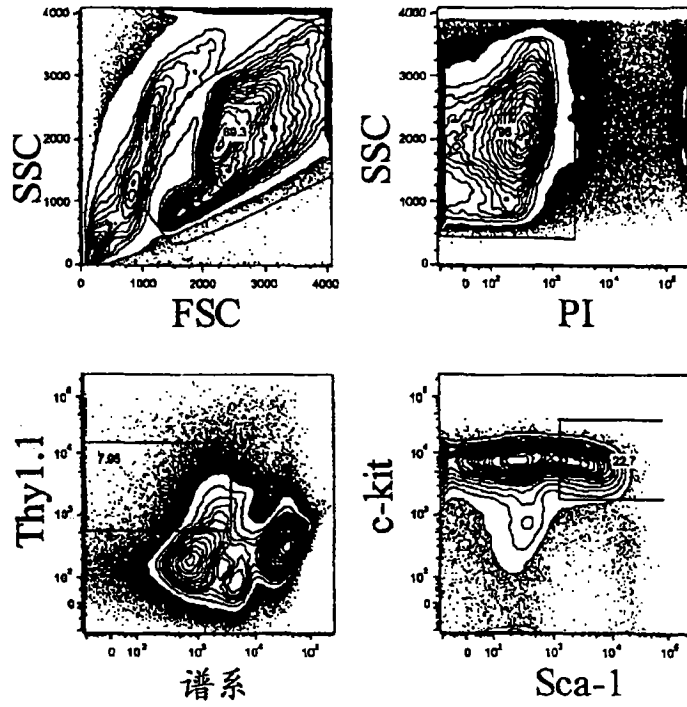


图 1B

全骨髓

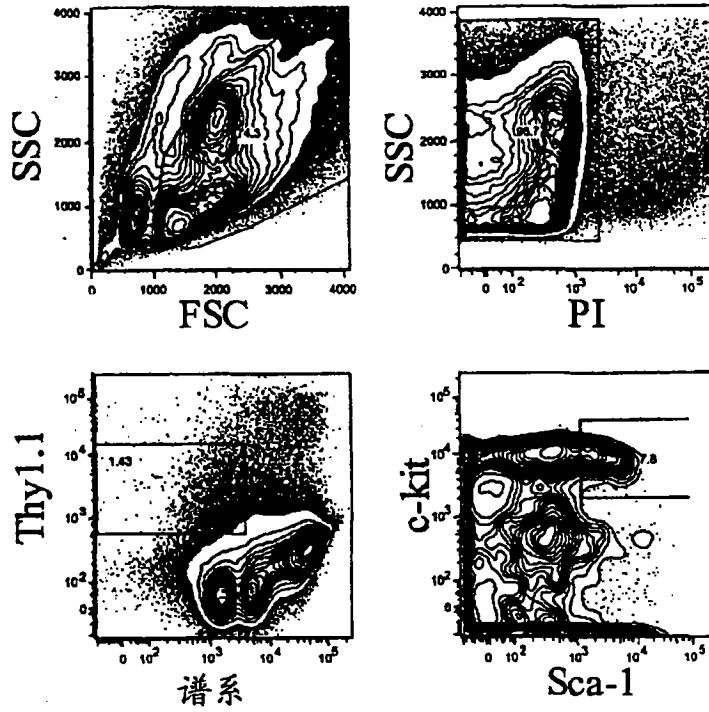


图1A

c-kit富集的骨髓

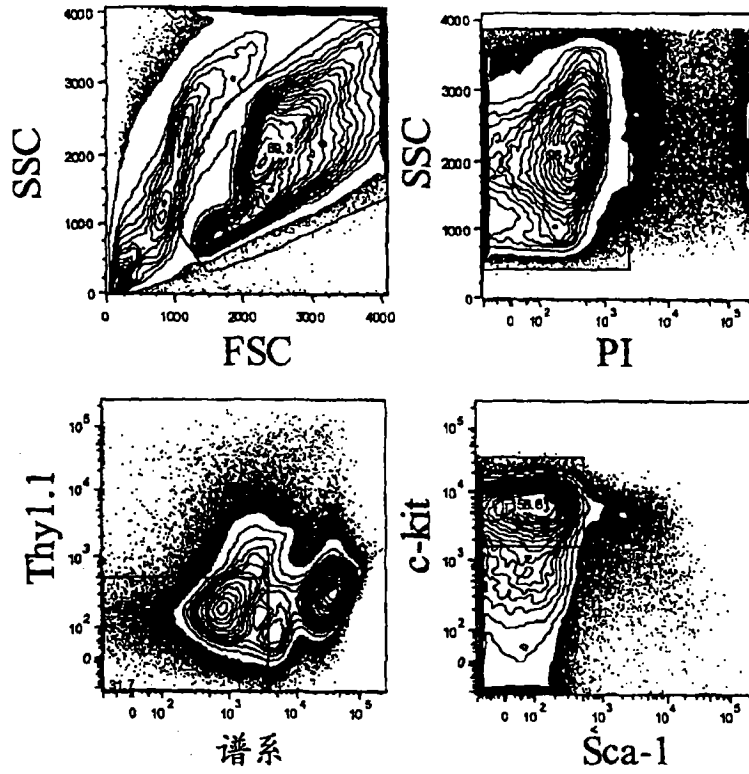


图 2B

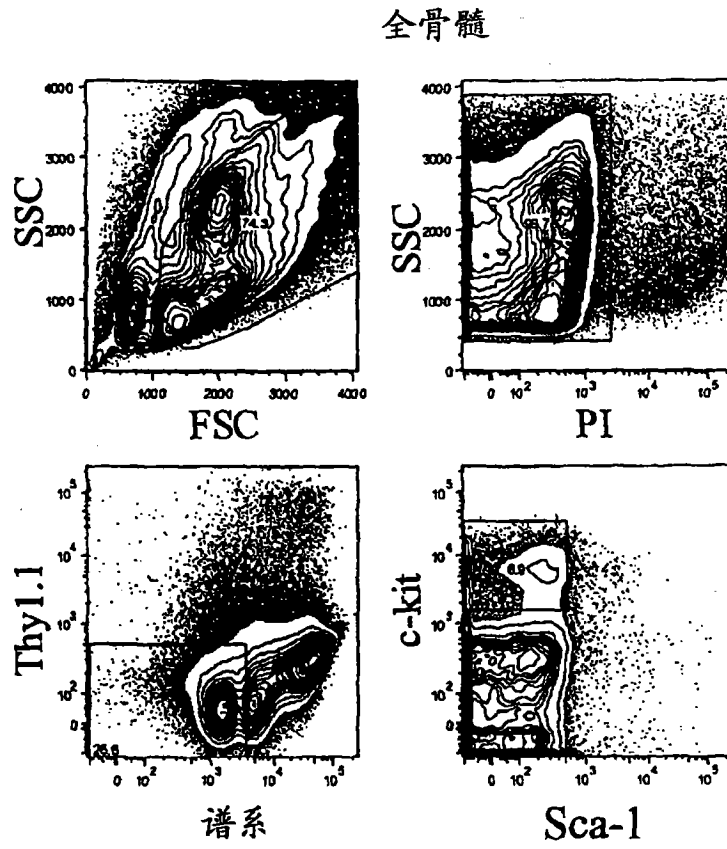


图 2A

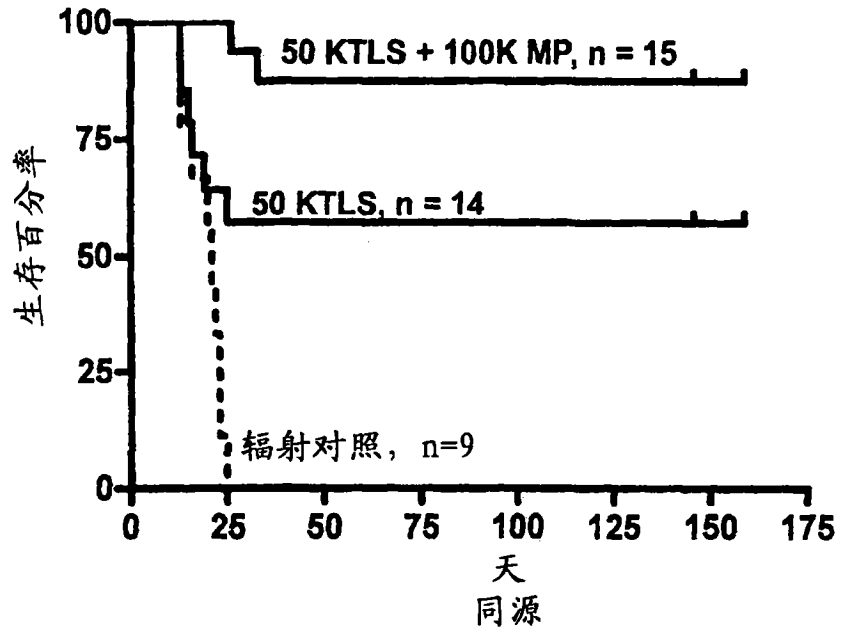


图 3

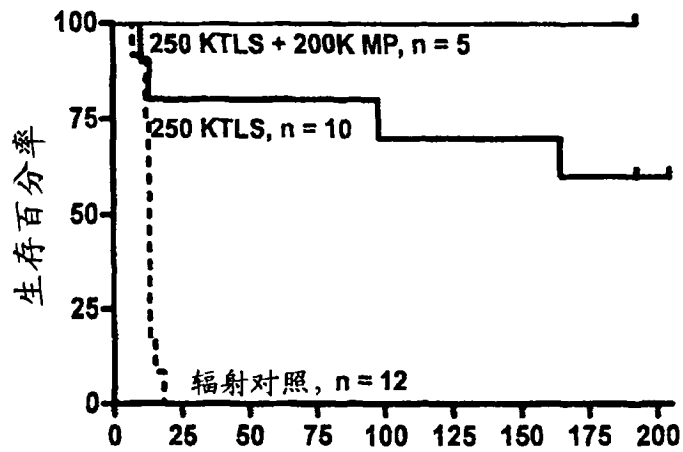


图 4B

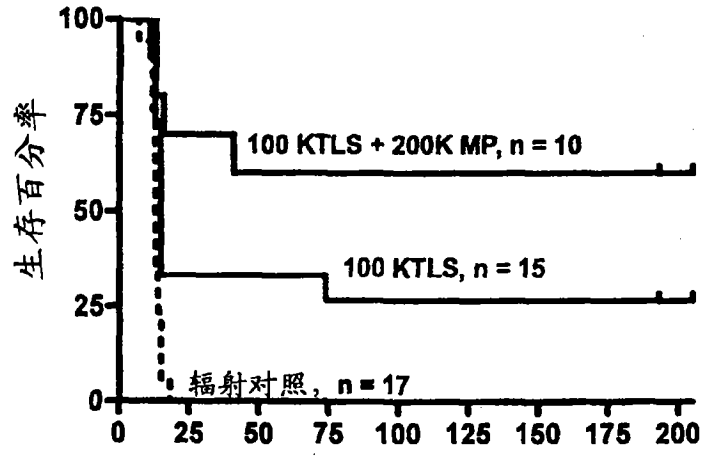


图 4A

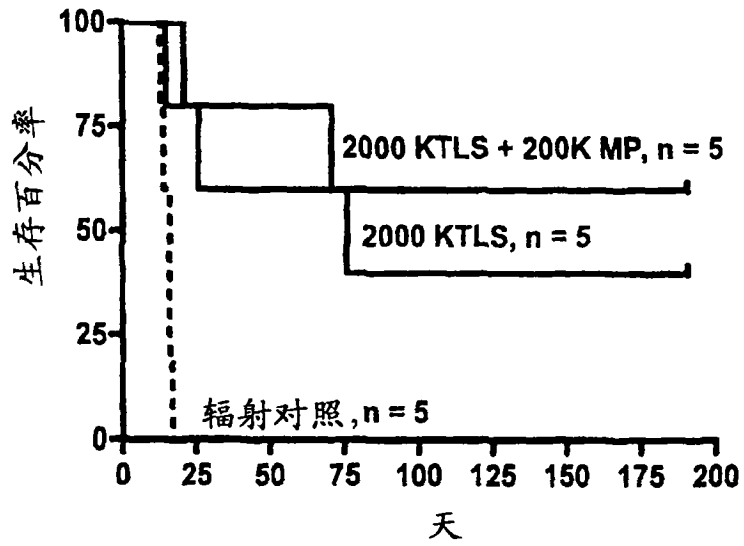


图 5B

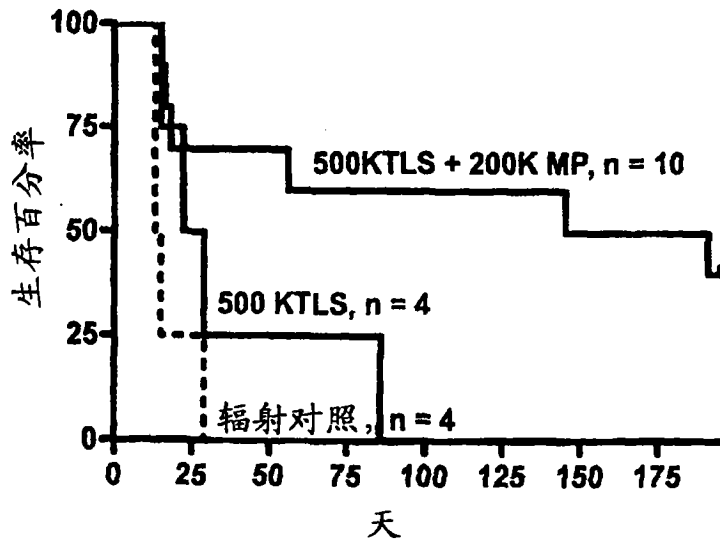


图5A

	细胞剂量	生存%	长期嵌合性
同源的	50 KTLS n = 14	57 %	≤ 94 %
	50 KTLS + 100K MP n = 15	87 %	≤ 92 %
同种异体	100 KTLS n = 15	26 %	≤ 68 %
	100 KTLS + 200K MP n = 10	60 %	≤ 93 %
匹配的 未处理的	250 KTLS n = 10	60 %	≤ 80 %
	250 KTLS + 200K MP n = 5	100 %	≤ 81 %
同种异体 C57/B6→Ba1b/c	500 KTLS n = 5	0 %	N/A
	500 KTLS + 200K MP n = 10	40 %	≤ 89 %
	1000 KTLS n = 5	0 %	N/A
	1000 KTLS + 200K MP n = 5	20 %	≤ 0.13 %
	2000 KTLS n = 5	40 %	≤ 95 %
	2000 KTLS + 200K MP n = 5	60 %	≤ 93 %

图6

第二分类

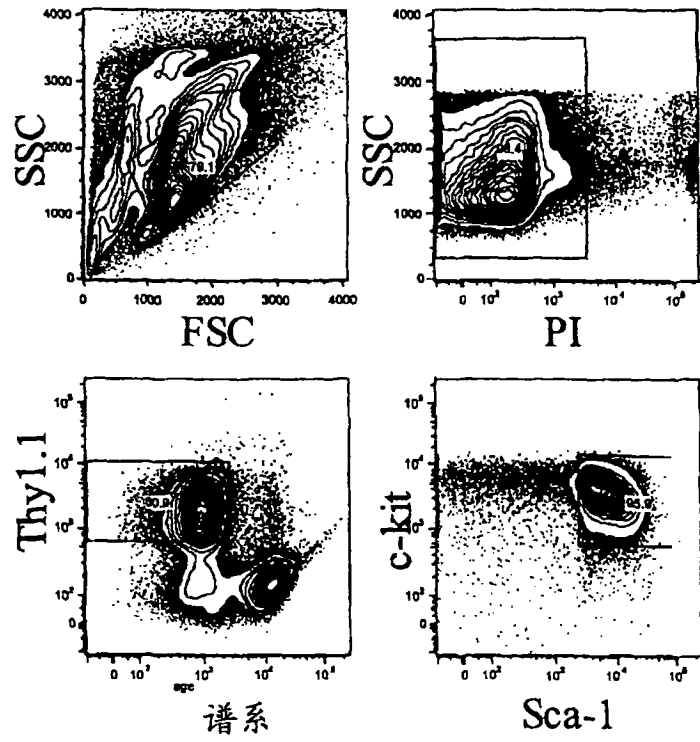


图 7B

第一分类

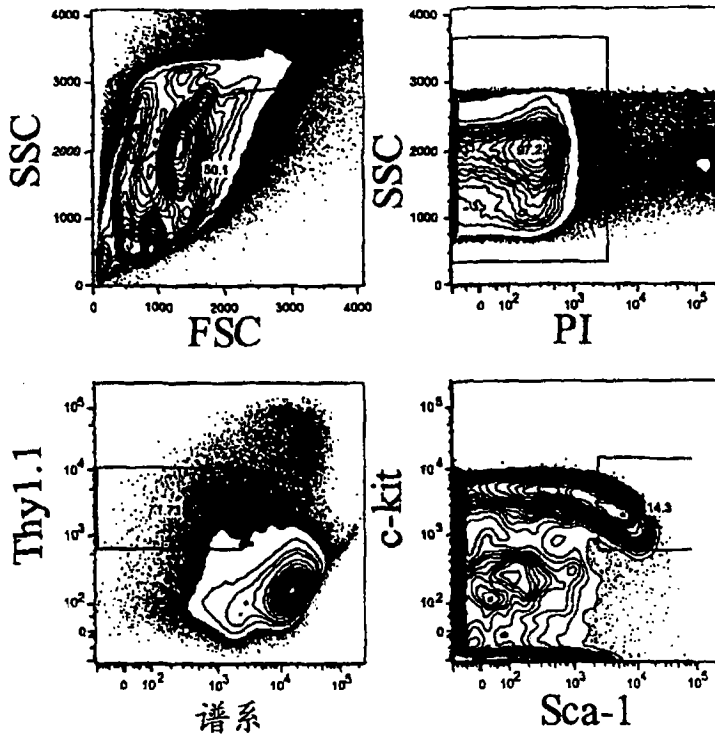


图 7A

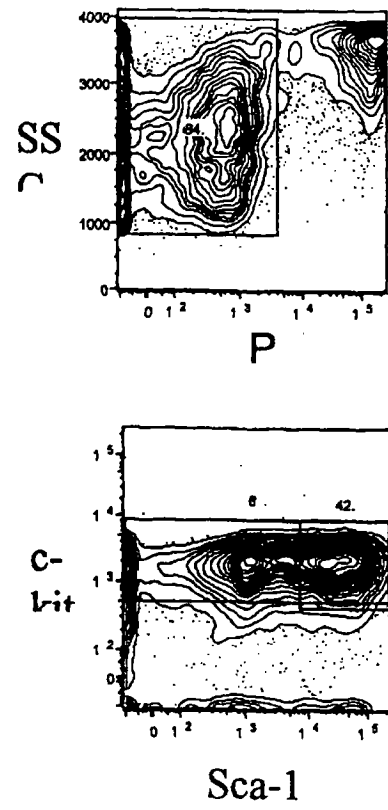
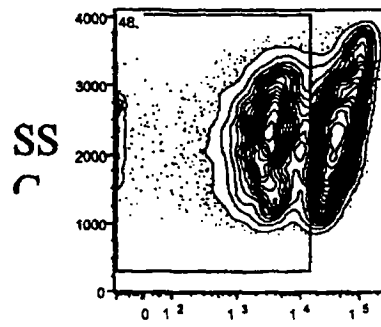
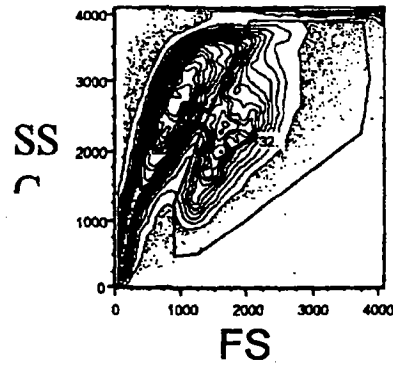


图 8B



谱系

图 8A

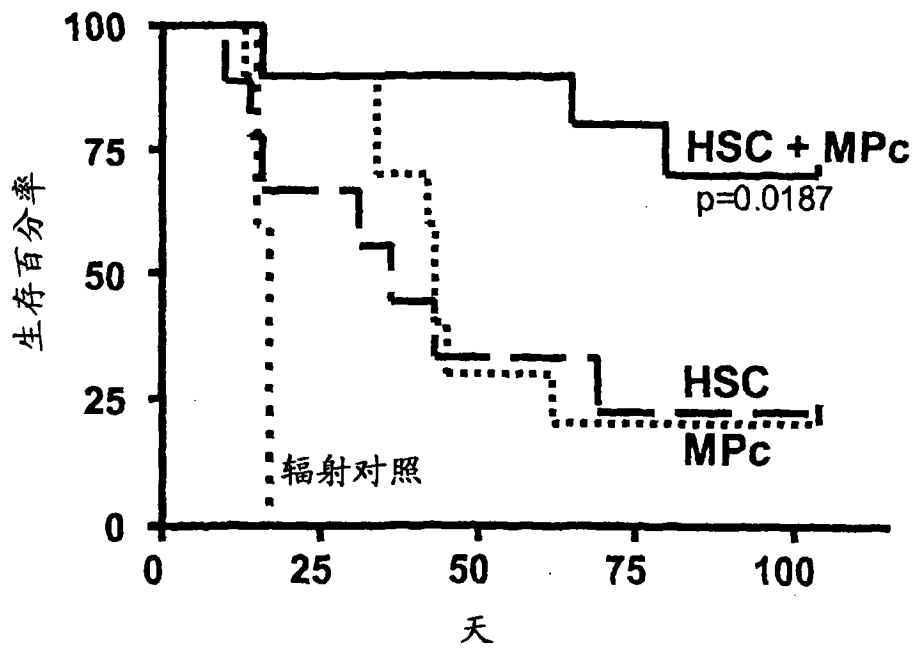


图9

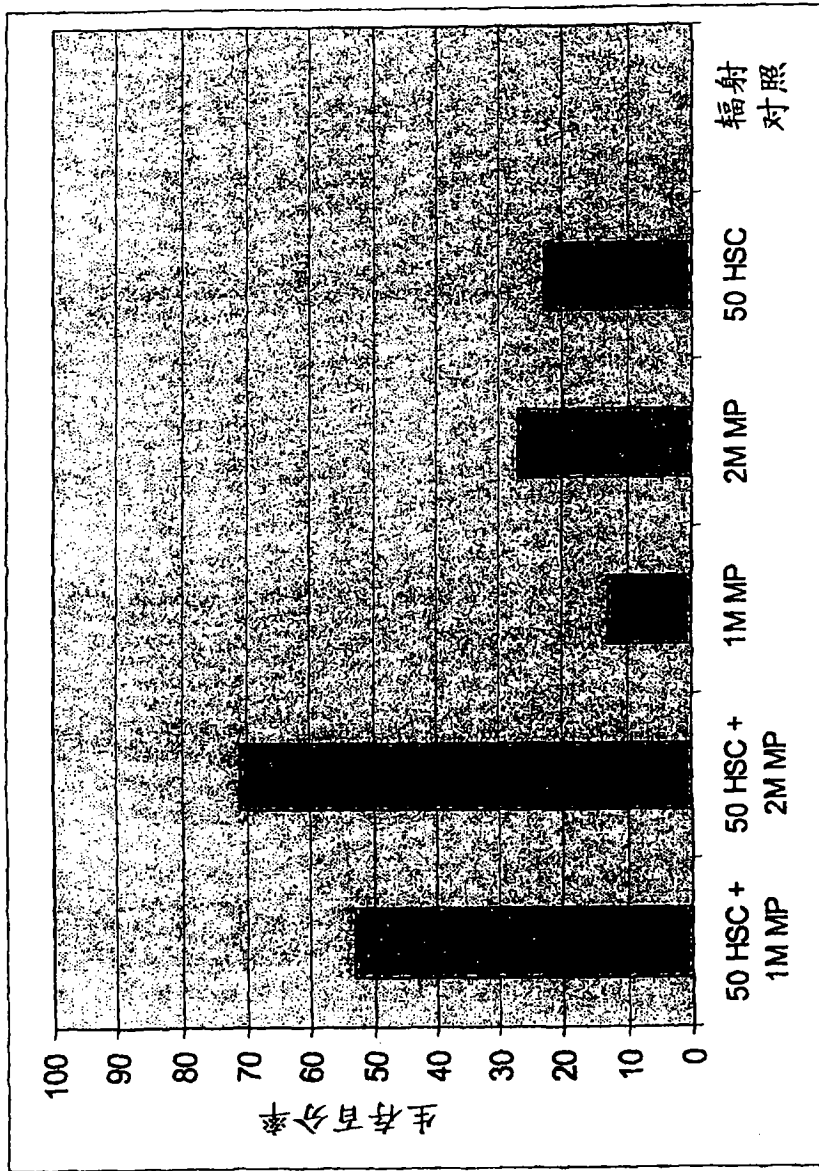


图 10