



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112074277 A

(43) 申请公布日 2020.12.11

(21) 申请号 201980013250.X

(22) 申请日 2019.02.22

(30) 优先权数据

62/634,377 2018.02.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.08.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/019137 2019.02.22

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/165197 EN 2019.08.29

(71) 申请人 杜克大学医学中心

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 M·L·马克特

(74) 专利代理机构 余姚德盛专利代理事务所

(普通合伙) 33239

代理人 周积德

(51) Int.Cl.

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/26 (2015.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61K 35/34 (2015.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

A61K 38/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

C12Q 1/6881 (2018.01)

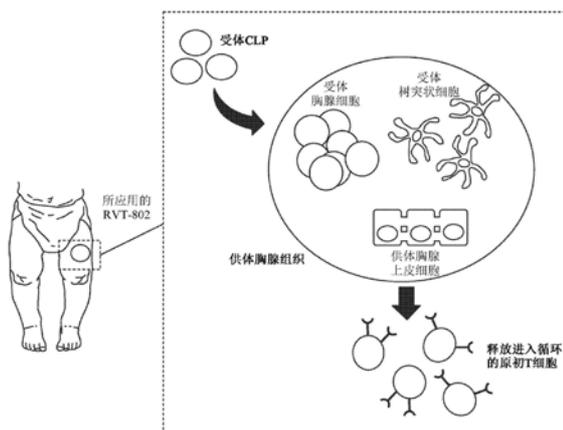
权利要求书8页 说明书62页 附图38页

(54) 发明名称

经培养的胸腺组织移植促进对同种异体实体器官移植物的供体特异性耐受性

(57) 摘要

用于促进对实体器官移植受体的供体特异性耐受性和免疫活性的方法和组合物,所述方法通过在需要实体器官移植的受体中移植同种异体实体器官来进行并且进一步包括在接受来自供体的实体器官的受体中通过外科手术植入组织工程化的同种异体经培养的出生后胸腺组织产品。



1. 一种用于在需要实体器官移植的受体中促进对获自死亡供体的同种异体实体器官移植物的供体特异性耐受性的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 取出所述受体的胸腺;

(b) 用包括一种或多种免疫抑制剂的诱导免疫抑制方案治疗所述受体,以耗尽所述受体的T细胞和/或抑制所述受体的T细胞排斥移植的实体器官;

(c) 提供来自死亡供体的合适的实体人体器官和胸腺;

(d) 将所述实体人体器官移植到所述受体中;

(e) 用维持性免疫抑制方案治疗所述受体;

(f) 提供同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,其中从所述实体器官供体的合适的胸腺组织中获得所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品;其中对所述供体胸腺组织进行长达21天的预处理方案,以产生同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品;进一步地,其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理,以产生部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片;其中所述部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对细胞角蛋白(CK)(使用抗体AE1/AE3)呈阳性的区域、至少一个赫氏小体(Hassallbody)的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在;以及

(g) 在预处理方案的12到21天后,将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品植入所述受体中,其中所述胸腺组织切片的剂量为约1,000-20,000mm<sup>2</sup>胸腺组织表面积/m<sup>2</sup>受体身体表面积,并且进一步地,其中所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受体中诱导胸腺生成和耐受性。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中通过外科手术取出所述受体的胸腺。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中通过机器人手术取出所述受体的胸腺。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中通过胸腔镜手术取出所述受体的胸腺。

5. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括以下步骤:冷冻保存来自所述死亡供体的外周血单核细胞,以备将来在混合淋巴细胞反应中使用,以证明细胞耐受性。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中在按照步骤(g)植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后,使用来自所述受体的外周血单核细胞和来自所述供体的冷冻保存的外周血单核细胞进行所述混合淋巴细胞反应,以证明细胞耐受性。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中在植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后约6个月到12个月,用来自所述受体的外周血单核细胞和来自所述供体的冷冻保存的外周血单核细胞进行所述混合淋巴细胞反应,以证明细胞耐受性。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中在原初T细胞构成所述受体中总T细胞的约10%之后,用来自所述受体的外周血单核细胞和来自所述供体的冷冻保存的外周血单核细胞进行所述混合淋巴细胞反应,以证明细胞耐受性。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中在植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后12个月内,所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受试者中诱导胸腺生成。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述供体胸腺在采集之日表明>50%的区域对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性、存在赫氏小体、CK14以花边图案染色并且>90%的核是完

整的。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中通过体液免疫的发展和不存在针对供体MHC的供体反应性抗体来确定体液耐受性。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述诱导免疫抑制方案包括选自由以下组成的组的免疫抑制剂:糖皮质激素、抗胸腺细胞球蛋白(兔)、抗胸腺细胞球蛋白(马)和阿仑单抗。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二免疫抑制方案包括施用糖皮质激素。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述糖皮质激素包括甲基泼尼松龙琥珀酸钠。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中在植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后,以不超过4mg/kg/天的剂量静脉内施用所述甲基泼尼松龙琥珀酸钠。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二免疫抑制方案包括施用糖皮质激素加他克莫司或环孢霉素,并进一步施用吗替麦考酚酯、吗替麦考酚酯等效物或硫唑嘌呤。

17. 根据权利要求1所述的方法,其中所述实体器官是整个器官的一部分。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述实体器官移植是心脏移植、肾脏移植、肝脏移植、肺移植、心脏/肺移植、胰腺移植、肠移植、胃移植、腹壁移植、颅面移植、头皮移植、阴茎移植、子宫移植、单侧或双侧上肢移植、单侧血管化复合同种异体移植或其组合。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述实体器官移植是心脏移植。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述实体器官移植是小儿心脏移植。

21. 根据权利要求18所述的方法,其中所述实体器官移植是成人心脏移植。

22. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括在移植所述实体器官之前,评估所述受体的HLA I类或HLA II类群体反应性抗体(“PRA”)评分。

23. 根据权利要求1所述的方法,其中具有HLA抗体的受体与潜在的供体交叉匹配。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中具有HLA抗体的受体虚拟地与UNET交叉匹配。

25. 根据权利要求22所述的方法,其中如果记录了PRA评分>20%的虚拟交叉匹配,则所述方法将进一步包括以下步骤:在所述受体进行实体器官移植时在手术室中进行血浆置换。

26. 根据权利要求22所述的方法,其中如果记录了PRA评分>70%的虚拟交叉匹配,则所述方法将进一步包括以下步骤:执行实际的预期供体交叉匹配,并在所述受体进行实体器官移植时在手术室中进行血浆置换。

27. 根据权利要求1所述的方法,其中所述实体器官是HLA错配的。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中通过在所述供体和所述受体中对HLA等位基因HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1进行分型来确定HLA错配。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中HLA错配包括HLA等位基因HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1中的至少一个等位基因在所述供体和所述受体之间不同。

30. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的一部分通过外科手术植入所述受体的股四头肌大腿肌肉中。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源

的产品的剩余部分冷冻保存在液氮中,以备将来移植到所述受体中。

32. 根据权利要求1所述的方法,其中所述预处理方案持续约12天到约21天。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述预处理方案持续约12天。

34. 根据权利要求32所述的方法,其中所述预处理方案持续约13天。

35. 根据权利要求32所述的方法,其中所述预处理方案持续约14天。

36. 根据权利要求32所述的方法,其中所述预处理方案持续约15天。

37. 根据权利要求32所述的方法,其中所述预处理方案持续约16天。

38. 根据权利要求32所述的方法,其中所述预处理方案持续约17天。

39. 根据权利要求32所述的方法,其中所述预处理方案持续约18天。

40. 根据权利要求32所述的方法,其中所述预处理方案持续约19天。

41. 根据权利要求32所述的方法,其中所述预处理方案持续约20天。

42. 根据权利要求32所述的方法,其中所述预处理方案持续约21天。

43. 根据权利要求12所述的方法,其中所述诱导免疫抑制方案包括兔来源的抗胸腺细胞球蛋白。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中以约1.5mg/kg/天的剂量静脉内施用所述兔来源的抗胸腺细胞球蛋白,持续约3天到7天。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中通过静脉内施用以约15mg/kg/天的剂量每天施用所述抗胸腺细胞球蛋白,持续3-14天。

46. 根据权利要求12所述的方法,其中所述诱导免疫抑制方案包括阿仑单抗。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中以约0.25mg/kg的剂量向体重小于35kg的受体静脉内施用所述阿仑单抗,持续4天。

48. 根据权利要求46所述的方法,其中以约3到20mg的剂量向体重超过35kg的受体静脉内施用所述阿仑单抗,持续4天。

49. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二免疫抑制方案包括一种或多种选自以下组成的组的免疫抑制剂:钙调神经磷酸酶抑制剂和肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂或硫唑嘌呤。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述免疫抑制剂是钙调神经磷酸酶抑制剂。

51. 根据权利要求49所述的方法,其中所述免疫抑制剂是肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂是吗替麦考酚酯。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中口服或静脉内施用所述吗替麦考酚酯。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中以约15到约25mg/kg的剂量每天两次到三次施用所述吗替麦考酚酯。

55. 根据权利要求49所述的方法,其中所述肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂是麦考酚酸。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中以约25到约50mg/kg的剂量按每天2个或3个剂量施用所述麦考酚酸。

57. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二免疫抑制方案进一步包括糖皮质激素,所述糖皮质激素选自甲基泼尼松龙、泼尼松和泼尼松龙组成的组。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中以递减的剂量施用所述糖皮质激素,并将所述剂量保持在4mg/kg/天或低于4mg/kg/天。

59. 根据权利要求49所述的方法,其中所述钙调神经磷酸酶抑制剂是他克莫司。

60. 根据权利要求49所述的方法,其中所述钙调神经磷酸酶抑制剂是环孢霉素A。

61. 根据权利要求1所述的方法,其中在原初T细胞达到总T细胞的10%之后,舍弃所述第二免疫抑制方案中的所述一种或多种免疫抑制剂的施用。

62. 根据权利要求1所述的方法,其中在植入后2到12个月对所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品进行活检,以通过免疫化学评估胸腺生成的证据。

63. 一种同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,其用于植入接受实体器官移植物的受试者中,所述产品通过以下来制备:从供体获得合适的胸腺组织,其中对所述供体胸腺组织进行长达21天的预处理方案;进一步地,其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理,以产生部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片;其中在采集后第5天和第9天之间,所述供体胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在;回收所述部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片,作为同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品。

64. 根据权利要求63所述的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,其中所述胸腺在采集之日表明>50%的区域对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性、存在赫氏小体、CK14以花边图案染色并且>90%的核是完整的。

65. 将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品保持在液氮中并冷冻保存,以备将来使用。

66. 一种冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,其通过包括以下步骤的方法制备:

(a) 从供体获得合适的胸腺组织;

(b) 对以下HLA等位基因进行分型:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1;

(c) 对所述胸腺组织进行长达12天的预处理方案;其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理,以产生部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片;进一步地,其中在完成所述预处理方案后,所述供体胸腺组织切片在第5天到第9天显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在;

(d) 采集所述部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片,作为同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产物;

(e) 在液氮中冷冻保存所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品;以及

(f) 将所述在液氮中冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品保存在冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品库中。

67. 根据权利要求66所述的冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,其中所述胸腺在采集之日表明>50%的区域对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性、存在赫氏小体、CK14以花边图案染色并且>90%的核是完整的。

68. 一种用于在需要实体器官移植的人类受体中促进对获自活人供体的同种异体实体器官移植物的供体特异性耐受性的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 取出所述受体的胸腺；

(b) 用包括一种或多种免疫抑制剂的诱导免疫抑制方案治疗所述受体，以耗尽所述受体的T细胞和/或抑制所述受体的T细胞排斥移植的实体器官；

(c) 提供来自活人供体的合适的实体器官；

(d) 将所述实体器官移植到所述受体中；

(e) 用维持性免疫抑制方案治疗所述受体；

(f) 提供冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品，其保存在冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品库中；其中所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品是由来自胸腺供体的胸腺组织加工得到的，所述胸腺供体表达与所述实体器官移植物中不存在的所述受体中的HLA等位基因相匹配的HLA等位基因；其中对所述供体胸腺组织进行长达12天的预处理方案；进一步地，其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理，以产生部分T细胞耗竭的胸腺组织切片，其中在完成所述预处理方案后，所述胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在；

(g) 解冻所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品；以及

(h) 将所述解冻的冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品植入所述受体中，其中所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的剂量为约1,000-20,000mm<sup>2</sup>胸腺组织表面积/m<sup>2</sup>受体身体表面积，并且进一步地，其中所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受体中诱导胸腺生成和耐受性。

69. 根据权利要求68所述的方法，其中HLA匹配允许第二区中等位基因的氨基酸序列发生微小变化。

70. 根据权利要求68所述的方法，其中HLA匹配允许第二区中的HLA-DP等位基因错配。

71. 根据权利要求68所述的方法，其中将约一半所述解冻的冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品移植到所述受体中，并将其余的冷冻保存以备将来使用。

72. 根据权利要求68所述的方法，其中在移植所述实体器官后约一个月或更长时间进行步骤(h)。

73. 一种用于在需要实体器官移植的人类受体中促进对获自死亡的人供体的同种异体实体器官移植物的供体特异性耐受性的方法，所述方法包括以下步骤：

(a) 取出所述受体的胸腺；

(b) 用包括一种或多种免疫抑制剂的诱导免疫抑制方案治疗所述受体，以耗尽所述受体的T细胞和/或抑制所述受体的T细胞排斥移植的实体器官；

(c) 提供来自活人供体的合适的实体器官；

(d) 将所述实体器官移植到所述受体中；

(e) 用维持性免疫抑制方案治疗所述受体；

(f) 提供冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品，其保存在冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品库中；其中所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品是由来自胸腺供体的胸腺组织加工得到的，所述胸腺供体表达与所述实体器官移植物中不存在的所述受体中的HLA等位基因相匹配的HLA等位基

因;其中对所述供体胸腺组织进行长达12天的预处理方案;进一步地,其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理,以产生部分T细胞耗竭的胸腺组织切片,其中在完成所述预处理方案后,所述胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在;

(g) 解冻所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品;以及

(h) 将所述解冻的冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品植入所述受体中,其中所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的剂量为约1,000-20,000mm<sup>2</sup>胸腺组织表面积/m<sup>2</sup>受体身体表面积,并且进一步地,其中所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受体中诱导胸腺生成和耐受性。

74. 根据权利要求68或73所述的方法,其中所述胸腺在采集之日表明>50%的区域对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性、存在赫氏小体、CK14以花边图案染色并且>90%的核是完整的。

75. 根据权利要求68或73所述的方法,其中通过外科手术取出所述受体的胸腺。

76. 根据权利要求68或73所述的方法,其中通过机器人手术取出所述受体的胸腺。

77. 根据权利要求68或73所述的方法,其中通过胸腔镜手术取出所述受体的胸腺。

78. 根据权利要求68或73所述的方法,其进一步包括以下步骤:冷冻保存来自所述死亡供体的外周血单核细胞,以备将来在混合淋巴细胞反应中使用,以证明细胞耐受性。

79. 根据权利要求78所述的方法,其中在按照步骤(h)植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后约2个月到约12个月,用来自所述受体的外周血单核细胞进行所述混合淋巴细胞反应,以证明耐受性。

80. 根据权利要求78所述的方法,其中在植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后约6个月到12个月,用来自所述受体的原初T细胞进行所述混合淋巴细胞反应,以证明耐受性。

81. 根据权利要求78所述的方法,其中在原初T细胞构成总T细胞的约10%之后,用来自所述受体的外周血单核细胞进行所述混合淋巴细胞反应,以证明耐受性。

82. 根据权利要求68或73所述的方法,其中在植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后约2个月到约12个月,所述植入的胸腺组织切片在所述受试者中诱导胸腺生成,如通过对所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品进行活检所确定的。

83. 根据权利要求68或73所述的方法,其中通过用来自所述死亡供体的冷冻保存的外周血单核细胞和来自所述受体的外周血单核细胞进行的混合淋巴细胞反应来确定耐受性的发展。

84. 根据权利要求68或73所述的方法,其中通过体液免疫的发展和不存在供体反应性抗体来确定体液耐受性。

85. 根据权利要求68或73所述的方法,其中所述诱导免疫抑制方案包括选自由以下组成的组的免疫抑制剂:糖皮质激素、抗胸腺细胞球蛋白(兔)、抗胸腺细胞球蛋白(马)和阿仑单抗。

86. 根据权利要求68、73或74所述的方法,其中所述第二免疫抑制方案包括施用糖皮质激素。

87. 根据权利要求86所述的方法,其中所述糖皮质激素包括甲基泼尼松龙。
88. 根据权利要求87所述的方法,其中所述糖皮质激素是甲基泼尼松龙琥珀酸钠。
89. 根据权利要求88所述的方法,其中在植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后,以不超过4mg/kg/天的剂量静脉内施用所述甲基泼尼松龙琥珀酸钠。
90. 根据权利要求68或73所述的方法,其中所述实体器官是整个器官的一部分。
91. 根据权利要求68或73所述的方法,其中所述实体器官移植是心脏移植、肾脏移植、肝脏移植、肺移植、心脏/肺移植、胰腺移植、肠移植、胃移植、腹壁移植、颅面移植、头皮移植、阴茎移植、子宫移植、单侧或双侧上肢移植、单侧血管化复合同种异体移植或其组合。
92. 根据权利要求91所述的方法,其中所述实体器官移植是心脏移植。
93. 根据权利要求92所述的方法,其中所述实体器官移植是小儿心脏移植。
94. 根据权利要求92所述的方法,其中所述实体器官移植是成人心脏移植。
95. 根据权利要求68或73所述的方法,其进一步包括在移植所述实体器官之前,评估所述受体的HLA I类或HLA II类群体反应性抗体(“PRA”)评分。
96. 根据权利要求68或73所述的方法,其中具有HLA抗体的受体与潜在的供体交叉匹配。
97. 根据权利要求96所述的方法,其中具有HLA抗体的受体虚拟地与UNET交叉匹配。
98. 根据权利要求95所述的方法,其中如果记录了PRA评分>20%的虚拟交叉匹配,则所述方法将进一步包括以下步骤:在所述受体进行实体器官移植时在手术室中进行血浆置换。
99. 根据权利要求95所述的方法,其中如果记录了PRA评分>70%的虚拟交叉匹配,则所述方法将进一步包括以下步骤:执行实际的预期供体交叉匹配,并在所述受体进行实体器官移植时在手术室中进行血浆置换。
100. 根据权利要求68、73或74所述的方法,其中所述实体器官是HLA错配的。
101. 根据权利要求100所述的方法,其中通过在所述供体和所述受体中对HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1进行分型来确定HLA错配。
102. 根据权利要求101所述的方法,其中HLA错配包括HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1中的至少一个在所述供体和所述受体之间不同。
103. 根据权利要求68或73所述的方法,其中将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的一部分通过外科手术植入所述受体的股四头肌大腿肌肉中。
104. 根据权利要求103所述的方法,其中将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的剩余部分冷冻保存在液氮中,以备将来在所述受体中移植。
105. 根据权利要求1所述的方法,其中所述预处理方案持续长达12天。
106. 根据权利要求68、73或74所述的方法,其中所述维持性免疫抑制方案包括一种或多种选自以下组成的组的免疫抑制剂:钙调神经磷酸酶抑制剂、肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂和硫唑嘌呤。
107. 根据权利要求106所述的方法,其中所述诱导免疫抑制方案包括兔来源的抗胸腺

细胞球蛋白。

108. 根据权利要求107所述的方法,其中以约1.5mg/kg的剂量静脉内施用所述兔来源的抗胸腺细胞球蛋白,持续约3天到约7天。

109. 根据权利要求108所述的方法,其中以约15mg/kg/天的剂量施用所述抗胸腺细胞球蛋白,持续三天到十四天。

110. 根据权利要求85所述的方法,其中所述诱导免疫抑制方案包括阿仑单抗。

111. 根据权利要求110所述的方法,其中以约0.25mg/kg/天的剂量向体重小于35kg的受体静脉内施用所述阿仑单抗,持续4天。

112. 根据权利要求110所述的方法,其中以3到20mg/天的剂量向体重小于35kg的受体静脉内施用所述阿仑单抗,直至淋巴细胞耗竭。

113. 根据权利要求106所述的方法,其中所述免疫抑制剂是硫唑嘌呤。

114. 根据权利要求113所述的方法,其中从在手术室中施用开始,以2mg到4mg/kg/天的剂量静脉内施用或通过口服施用所述硫唑嘌呤。

115. 根据权利要求106所述的方法,其中所述肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂是吗替麦考酚酯。

116. 根据权利要求115所述的方法,其中口服或静脉内施用所述吗替麦考酚酯。

117. 根据权利要求116所述的方法,其中对于儿童以约15到约25mg/kg/剂的剂量每天两次施用所述吗替麦考酚酯,或对于成年人以约1500mg的剂量每天两次口服或静脉内施用所述吗替麦考酚酯,并针对WBC>3500进行了调整。

118. 根据权利要求106所述的方法,其中所述肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂是麦考酚酸。

119. 根据权利要求118所述的方法,其中对于儿童以约400mg/m<sup>2</sup>/剂的剂量每天两次施用所述麦考酚酸,最大剂量为720mg;或对于BSA为1.19到1.59m<sup>2</sup>,每天两次,每次约540mg;或对于BSA>1.58m<sup>2</sup>,每天两次,每次约720mg。

120. 根据权利要求68或73所述的方法,其中所述第二免疫抑制方案进一步包括糖皮质激素,所述糖皮质激素选自由甲基泼尼松龙、泼尼松和泼尼松龙组成的组。

121. 根据权利要求120所述的方法,其中以递减的剂量施用所述糖皮质激素。

122. 根据权利要求106所述的方法,其中所述钙调神经磷酸酶抑制剂是他克莫司。

123. 根据权利要求106所述的方法,其中所述钙调神经磷酸酶抑制剂是环孢霉素A。

124. 根据权利要求68或63所述的方法,其中在原初T细胞达到总T细胞的10%之后,舍弃所述第二免疫抑制方案的施用。

## 经培养的胸腺组织移植促进对同种异体实体器官移植物的供体特异性耐受性

### 技术领域

[0001] 用于在接受来自供体的同种异体实体器官移植物的受体中促进对同种异体实体器官移植物的供体特异性耐受性的方法和组合物。

### 背景技术

[0002] 器官移植需要从供体制备并采集人实体器官,然后移植到受体中。实体器官移植的主要问题是受体对供体不耐受。受体T细胞将排斥器官,而受体B细胞将对器官产生抗体,从而导致器官最终衰竭。实体器官移植的精髓是发展出受体对移植的人体器官的耐受性。据估计,美国每年要进行36,000多例器官移植,并且欧洲和其它主要国家的器官移植数量更多。进一步估计,在美国等待器官移植的患者超过120,000。对健康器官的需求大大超过了合适器官的供应。在2018年,鉴定了约10,000名捐助者。参见<https://optn.transplant.hrsa.gov>。

[0003] 移植排斥是实体器官移植中的重大挑战。T细胞和B细胞的移植排斥都会导致器官功能的严重并发症,或甚至导致移植失败。例如,心脏移植的5年移植存活率为77.7%,肾脏移植为78.6%,肝脏移植为72.8%并且肺移植为53.4%。通常,已经通过供体和受体的主要组织相容性复合物(MHC)抗原匹配以及通过避免对受体组织类型具有抗体的受体来部分解决了此问题。此外,使用免疫抑制方案来管理移植排斥背后的免疫学反应也得到了改善。但是,尚未实现耐受性,并且许多器官的平均存活期仅为10年。

[0004] 在植入手术之前和期间保持器官生存力是第二个重大挑战。器官的取出、储存和移植可能会深刻影响器官的内部结构和功能,并且会显著影响移植完成后延迟或阻止正常器官功能恢复的程度。

[0005] 实体人体器官可以被有效保存的时间段因器官而异,肾脏为24-36小时,胰腺为12-18小时,肝脏为8-12小时并且心肺为4-6小时。参见<https://unos.org/transplantation/matching-organs>。

[0006] 器官损伤主要由于局部缺血和体温过低而发生,但也可能与离体或植入过程中器官的再灌注有关。

[0007] 用于器官保存的技术(包含离体灌注)在本领域中是已知的,并且用于使器官损伤最小化并促进最佳的移植物存活和功能。

[0008] 已经成为移植手术主题的主要实体器官包含肾脏、肝脏、心脏和肺。在成功地移植这些实体器官方面取得了不同程度的成功。主要的可变性在于用于干扰免疫介导的移植排斥的技术。经验表明,没有一种单一的免疫抑制剂或技术可用于涉及实体器官移植的所有环境。限制因素通常在于与每种单独的免疫抑制剂有关的毒性。与给定的免疫抑制剂有关的毒性可能经常会阻碍移植的实体器官或其它器官(如肾脏)的正常功能,当使用钙调神经磷酸酶抑制剂预防排斥反应时,这些器官可能会衰竭。

[0009] 与通常用于防止实体器官移植物中的移植排斥的已知免疫抑制剂相关的毒性缺

点提出了寻找新的方法来预防实体器官移植物的移植排斥的需要。

[0010] 区分自身和非自身抗原的能力是免疫反应的关键。这种判别导致自身耐受性。当失去自身耐受性时,就会产生自身免疫。在移植手术中存在未满足的需要以诱导对实体器官移植物的耐受性。

### 发明内容

[0011] 实现供体特异性免疫耐受仍然是移植中的最终免疫学目标。当前大多数方法集中于通过耗尽(例如阿仑单抗、胸腺球蛋白等)或抑制(例如钙调神经磷酸酶抑制剂、巴利昔单抗等)来控制外周成熟供体反应性T细胞,而不靶向胸腺中的同种反应性T细胞的产生。然而,即使免疫抑制药物和新的免疫调节方案取得了巨大进步,移植耐受性仍未得到一致的实现。

[0012] 本发明人已经表明,通过在切除胸腺的受体中植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品(在本文中也称为“CTT”或“RVT-802”),以缩短移植后免疫抑制剂的使用时间,从而防止移植器官的排斥,可以实现对实体器官移植物的耐受性。取出受体的胸腺并替换同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,可以重建实体器官受体的免疫系统,并对受体自身以及所移植的同种异体实体器官产生耐受性。

[0013] 通过同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的的外科手术插入引起的耐受性诱导类似于造血干细胞移植中由供体树突状细胞(“DC”)引起的耐受性诱导(Sharabi Y& Sachs DH,1989,“非致死性预处理方案诱导的混合嵌合和永久特异性移植耐受性(Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen)”《实验医学杂志(J Exp Med)》169(2):493-502; Manilay JO,Pearson DA,Sergio JJ,Swenson KG和Sykes M,1998,“用非清髓性预处理方案制备的混合骨髓嵌合体中同种异体反应性T细胞的胸腺内缺失(Intrathymic deletion of alloreactive T cells in mixed bone marrow chimeras prepared with a nonmyeloablative conditioning regimen)”《移植(Transplantation)》66(1):96-102)。移植生物学研究中心(TBRC,波士顿,马萨诸塞州)进行的一系列研究表明了胸腺在耐受性诱导中的关键作用(Yamada K等人,1997,“胸腺在微型猪移植耐受中的作用I.胸腺对快速稳定诱导对I类错配型肾脏同种异体移植物的耐受性的要求(Role of the thymus in transplantation tolerance in miniature swine.I.Requirement of the thymus for rapid and stable induction of tolerance to class I-mismatched renal allografts)”《实验医学杂志》186(4):497-506)并在大型动物模型中测试了具有耐受性诱导的胸腺移植(Yamada K等人,2000,“微型猪的胸腺移植II.通过将复合胸腺移植到切除胸腺的受体中来诱导耐受性(Thymic transplantation in miniature swine.II.Induction of tolerance by transplantation of composite thymokidneys to thymectomized recipients)”《免疫学杂志(J Immunol)》164(6):3079-3086;5;Yamada K等人,2003,“微型猪的胸腺移植:III.通过完全跨过与主要组织相容性复合物错配的障碍物移植复合胸腺肾来诱导耐受性(Thymic transplantation in miniature swine:III.Induction of tolerance by transplantation of composite thymokidneys across fully major histocompatibility complex-mismatched barriers)”《移植》76(3):530-536;Nobori S

等人,2006,“胸腺的再生和成人胸腺移植物诱导的耐受性(Thymic rejuvenation and the induction of tolerance by adult thymic grafts)”《美国科学院院报(Proc Natl Acad Sci U S A)》103(50):19081-19086。在他们的一系列研究中,该小组成功地使用了II类匹配/I类错配的供体(胸腺和肾脏或心脏)作为胸腺复合组织(胸腺肾和胸腺心脏),其中12天的环孢霉素(“CsA”)用于移植耐受性的诱导。他们声称未血管化胸腺在模型中不诱导耐受。然而,更准确地说,未经培养的非血管化胸腺不能长期移植。正如他们所指出的那样,未经培养的胸腺的移植失败可能是由于同种免疫力以外的缺血性损伤所致(Yamada K等人,2000)。在不使用异种移植的情况下,这种在移植前产生血管化胸腺以诱导耐受性的优雅概念很难转化为临床。(本节引用了Kwan J等人将于2019年提交出版的“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性(Cultured Thymus Transplantation Promotes Donor-specific Tolerance to Allogeneic Heart Transplants)”)。

[0014] 可以通过培养系统以及T细胞耗竭来克服非血管化胸腺移植的局限性。保留TEC的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品(CTT)的实验性移植已成功用于治疗患先天性无胸腺症的儿科患者(Markert ML、Devlin BH、McCarthy EA,2010,“胸腺移植(Thymus transplantation)”《临床免疫学(Clin Immunol.)》,135(2):236-46;Markert ML等人,2004,“具有免疫抑制的出生后胸腺移植用于治疗DiGeorge综合征(Postnatal thymus transplantation with immunosuppression as treatment for DiGeorge syndrome)”《血液学(Blood)》104(8):2574-2581;Markert ML等人,1999,“完全DiGeorge综合征中的胸腺组织移植(Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome)”《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》341(16):1180-1189 27)。

[0015] 在该参考文献中,DiGeorge综合征被定义为在心脏、胸腺和甲状旁腺中存在可变缺陷的病症。大约1%的DiGeorge综合征婴儿患无力症,因此没有T细胞可抵抗感染。据说这些婴儿患有完全DiGeorge综合征。符合完全DiGeorge综合征、22q11.2缺失综合征、CHARGE、糖尿病母亲的婴儿以及无症状或具有遗传缺陷的婴儿标准的儿童分为4个亚组。在所有四个组中,患无胸腺的婴儿仅占很小的一组,可能占携带诊断(如22q11.2缺失综合征的诊断)的儿童总数的1%。

[0016] 通过同种异体移植物活检和外围存在受体原初T细胞已经证实了胸腺生成(thymopoiesis)(Markert ML,2010;Markert ML等人,2008,“使用同种异体移植物活检评估胸腺移植后的胸腺生成(Use of allograft biopsies to assess thymopoiesis after thymus transplantation)”《免疫学杂志》180(9):6354-6364;Markert ML等人,2007,“对54名患有完全DiGeorge异常的患者进行的胸腺移植方案的回顾:44次连续移植的结果(Review of 54patients with complete DiGeorge anomaly enrolled in protocols for thymus transplantation:outcome of 44consecutive transplants)”《血液学》109(10):4539-454728)。对接受研究性CTT治疗的儿童的研究显示,混合淋巴细胞反应对供体MHC有耐受性(Chinn IK、Devlin BH、Li YJ和Markert ML,2008,“完全DiGeorge异常中对同种异体胸腺移植物的长期耐受性(Long-term tolerance to allogeneic thymus transplants in complete DiGeorge anomaly)”《临床免疫学》126(3):277-281)。此外,CTT移植后,患先天性无胸腺症的婴儿能够控制感染,如爱泼斯坦巴尔病毒(Markert ML,2014,“胸腺移植”《斯蒂姆免疫缺陷(Stiehm’s Immune Deficiencies)》,编辑者Sullivan

KE和Stiehm ER(学术出版社),第1版,第1059-1067页;Isakovic K、Smith SB和Waksman BH,1965,“植入来自耐受供体的胸腺的经胸腺切除的辐照大鼠的免疫耐受性(Immunologic Tolerance in Thymectomized,Irradiated Rats Grafted with Thymus from Tolerant Donors)”《科学(Science)》148(3675):1333-1335)。根据患先天性无胸腺症的患者的一些数据,可以确定在通过外科手术插入受体中后,表达实体器官供体的MHC的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品将对自身和供体均产生耐受性,同时产生可以保护受体免受感染的功能性T细胞。

[0017] 胸腺和胸腺细胞的教育。(本节引用了Kwan J等人将于2019年提交出版的“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”)。

[0018] 胸腺通常定位在心脏顶部。胸腺为T细胞发育提供了必要的微环境,并且对于建立和维持适应性免疫系统至关重要(Boehm T和Takahama Y,2014,“胸腺发育和T淋巴细胞的选择(Thymic Development and Selection of T Lymphocytes)”海德堡:施普林格出版社)。在出生后的发育过程中,胸腺会教育造血干细胞从骨髓迁移到胸腺。祖干细胞定植于胸腺,从而形成胸腺细胞。此后,胸腺细胞经历一系列成熟步骤。这通过胸腺细胞上出现的许多可观察到的细胞表面标志物的表达来证明。

[0019] T细胞对于保护身体免受感染至关重要。在正常运作的胸腺中发育的T细胞会发育出多种多样的T细胞受体(通常是细胞表面上的蛋白质),这使成熟的T细胞能够抵抗多种感染。在这种教育过程中,胸腺会指示发育中的T细胞不要攻击人体的正常蛋白质,如胰岛素或甲状旁腺激素(二者调节血液中的葡萄糖和钙的水平)。这些指示是在自身免疫调节基因(“AIRE基因”)的影响下进行的。

[0020] 简要地,教育过程发生在正常运行的胸腺中。胸腺中的胸腺细胞是由骨髓干细胞形成的,被定位在胸腺内的胸腺上皮细胞(TEC)和树突状细胞(DC)教育不要攻击受体的主要组织相容性复合物(MHC)蛋白(抗原),如HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1抗原。HLA抗原具有2种蛋白质,可将自身肽保留在凹槽中。自身肽可以来自甲状腺蛋白或胰岛素肽或体内表达的几乎任何其它蛋白。在胸腺中发育的胸腺细胞形成由两个跨膜的蛋白质组成的T细胞受体(TCR)。TCR在T细胞的细胞表面上表达。每个T细胞表达其独特TCR的许多拷贝。如果TCR与树突状细胞上的自身肽:MHC结合过于紧密,则树突状细胞会提供信号,使T细胞发生凋亡并死亡。这种机制阻止了对自身产生自身免疫。TEC还可以向胸腺细胞提供信号,表明它们结合过于紧密。最后,DC可以从TEC捕获膜的一部分,并将TEC自身肽:MHC呈递给发育中的胸腺细胞。如果胸腺细胞结合得太紧,则DC会发送信号,使胸腺细胞发生凋亡并死亡。通过这些机制,离开胸腺的T细胞不会自身反应。离开胸腺的T细胞变化很大,并且可以识别感染,但其不会攻击人体的蛋白质。

[0021] 胸腺的两个主要成分是上皮细胞和以下列方式在胸腺中产生的胸腺细胞。源自骨髓干细胞的细胞(常见的淋巴祖细胞(“CLP”))迁移到胸腺。CLP响应由胸腺上皮细胞和内皮细胞产生的信号(趋化因子)而进入胸腺。在胸腺中,CLP分化为胸腺细胞并增殖。胸腺细胞形成在细胞表面上表达的独特的T细胞受体(“TCR”)。胸腺细胞还开始表达T细胞分子CD3、CD4和CD8。大量的T细胞形成,从而使得细胞能够在受体的整个生命中对感染做出反应。混合淋巴细胞反应显示,用经培养的胸腺组织(RVT-802)治疗的儿童中的受体T细胞对胸腺供体的MHC有耐受性。

[0022] 自身反应性受体胸腺细胞在离开胸腺之前被删除。这是通过受体胸腺细胞与迁移到胸腺中的受体DC的相互作用而发生的。在与DC结合过于紧密的受体胸腺细胞中诱导细胞凋亡,以保护人体免受自身免疫性疾病的侵害。该过程完成后,胸腺细胞离开胸腺。新的循环性T细胞(即“原初”T细胞)表达标志物CD45RA和CD62L。流式细胞仪和光谱分型已显示出多样化的T细胞库的发展。这些受体T细胞具有多种TCR库,并响应于有丝分裂原而正常增殖。其可以保护受体免受感染,而不会对自身产生自反应性。

[0023] 同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品。

[0024] 已显示,同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品可用于治疗由先天性无胸腺症引起的T细胞免疫缺陷(原发性免疫缺陷)。由无胸腺引起的T细胞免疫缺陷与阻碍功能性胸腺发展的先天性疾病有关,如与22q11.2缺失和CHARGE(缺损、心脏病、鼻孔闭锁、生长或智力低下、生殖器发育不全和耳朵异常或耳聋)相关的完全DiGeorge异常(cDGA)、与chd7(染色质结构域-解旋酶-DNA结合蛋白7)基因和缺乏叉头盒蛋白N1(FOXP1)的无胸腺患者中的突变相关的综合征。先天性无胸腺症是一种罕见的致命疾病,目前尚无利用经监管批准的药品进行的药物治疗选择。如果不及时治疗,并且不对儿童的免疫系统进行治疗性重建,则由于先天性无胸腺症所引起的主要免疫缺陷是致命的,几乎所有婴儿都在两岁之前死亡,多数是由于严重感染而死亡。

[0025] 同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品是组织工程化的产品。基于本说明书和实例中的公开内容,预期CTT可用于在接受移植的实体器官的受体中发展耐受性。

[0026] 如在本说明书和实例中更充分描述的,在无胸腺患者中通过外科手术施用同种异体的经培养的出生后胸腺组织来源的产品(例如,“RVT-802”)会导致一系列事件,从而导致功能性免疫系统的发展。将同种异体的经培养的出生后胸腺组织来源的产品(例如,RVT-802)通过外科手术放置在受体中后,T细胞由供体TEC和受体DC教育。供体TEC与受体DC结合,使得能够耐受作为经培养的胸腺组织切片而被植入的供体胸腺组织。这与正常胸腺中的耐受性诱导相同。如本说明书中所述,受体TEC与受体DC结合导致对自身的耐受性。

[0027] 临床上已经表明,由于受体抵抗感染的能力,这种复杂的过程可导致接受同种异体的经培养的出生后胸腺组织来源的产品(例如,RVT-802)的先天无胸腺患者的存活率>70%(Markert ML、Devlin BH、Alexieff MJ、Li J、McCarthy EA、Gupton SE等人,2007,“对54名患有完全DiGeorge异常的患者进行的胸腺移植方案的回顾:44次连续移植的结果”《血液学》,109(10):4539-47;Markert ML、Devlin BH、McCarthy EA.“胸腺移植”2010,《临床免疫学》,135(2):236-46)。受体能够控制在CTT之前可能致命的病毒感染,如爱泼斯坦-巴尔病毒。(Chinn IK、Devlin BH、Li YJ和Markert ML,2008)。

[0028] 实体器官移植中的耐受性诱导结合CTT移植的概述

[0029] 根据本说明书的描述、附图、实例和权利要求,发明人已经证明,CTT在大鼠心脏移植模型中诱导供体特异性耐受性。本文报道的实验使用了可比较的CTT移植方法,所述方法已在患有先天性无胸腺症的受试者(如受cDGA困扰的受试者)中临床使用。通过外科手术放置CTT之前,cDGA婴儿基本上没有原初T细胞。通过外科手术放置CTT之前,这些婴儿在手术后约6个月发育出原初T细胞。(Markert M等人,2004,“具有免疫抑制的出生后胸腺移植用于治疗DiGeorge综合征”《血液学》104(8):2574-2581;Markert ML、Devlin BH和McCarthy EA,2010,“胸腺移植”《临床免疫学》135(2):236-246)。在大鼠模型中诱导耐受性的研究基

于对1993年至2017年患有完全DiGeorge异常的无胸腺婴儿移植同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品 (CTT) 的研究的结果。在患有先天性无胸腺症的婴儿中通过外科手术放置CTT的报道研究获得了良好的结果。已发表的结果表明,在这种致命的情况下,总体存活率为71% (61/86) (中值为11.7年,范围为1.2年到25年) (Markert, ML等人, 2010)。移植的经培养的胸腺组织的活检已在免疫组织化学上证明了胸腺生成 (Markert, ML等人, 2008)。流式细胞仪和光谱分型已显示出多样化的T细胞库的发展。混合淋巴细胞反应显示,受体T细胞对胸腺供体的抗原呈递细胞有耐受性 (Chinn IK、Devlin BH、Li YJ和Markert ML, 2008)。

[0030] 重要的是,CTT的受体能够控制在CTT之前可能致命的病毒感染,如爱泼斯坦-巴尔病毒 (Markert, ML, 2014, “胸腺移植”《斯蒂姆免疫缺陷》,编辑者Sullivan KE和Stiehm ER (学术出版社),第1版,第1059-1067页)。基于显示出对不匹配的胸腺MHC抗原的耐受性的这些人类数据,针对CTT在大鼠心脏移植模型中诱导供体特异性耐受性的能力,使用临床上使用的相同方法评估了CTT在大鼠模型中的移植。这些研究表明,将不匹配的的心脏与表达心脏供体的MHC I类和II类抗原的供体CTT一起移植 (通过最初用抗CD5耗尽T细胞并用环孢素进行免疫抑制) 会诱导对供体心脏的抗原的耐受性,同时保留对其它MHC抗原的同种异体反应性。

[0031] 本发明证实了供体胸腺与实体器官的共移植,作为针对受体中移植的实体器官的耐受性诱导的方法。将从该手术中受益最大的患者群体是需要心脏移植的婴儿。由于存在出生后胸腺组织,并且可以从死婴中取出胸腺组织,并且从接受心脏移植的婴儿中常规取出受体胸腺,因此除了经培养的胸腺组织移植 (CTT) 外,无需进行另外的手术将该方法转移至临床。

[0032] 同种异体的经培养的出生后胸腺组织来源的产品的制备的概述

[0033] 将同种异体的经培养的出生后胸腺组织来源的产品制备、培养并储存长达21天,并且在植入当天,将其放置在单独的无菌杯中以运输到手术室,如本文中更详细描述。

[0034] 在现行的良好生产规范 (“cGMP”) (例如,由美国食品药品监督管理局 (“FDA”) 建立的cGMP) 下对CTT (经培养的胸腺组织) 进行无菌处理和培养,以产生部分T细胞耗竭的胸腺组织切片。通过下文详细描述的预处理过程,CTT与天然胸腺有所区别。CTT会影响植入后胸腺中T细胞发育的正常正选择和负选择过程,从而使T细胞对供体胸腺和供体实体器官移植以及受体组织均耐受。另外,这些T细胞可以在受体主要组织相容性 (MHC) 蛋白的背景下识别外源抗原,从而抵抗感染。

[0035] 施用途径是按下文所述的方式通过外科手术植入CTT。单次施用通常为每m<sup>2</sup>受体身体表面积 (“BSA”) 1,000到20,000mm<sup>2</sup> CTT。所述表面积是所有经培养的组织切片的所有表面积的总和。在单次施用的外科手术中植入单个CTT切片。

[0036] 在无胸腺患者中通过外科手术植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品会导致一系列事件,从而导致功能性免疫系统的发展。(Markert ML、2007;Markert ML等人, 2010;Markert ML、Devlin BH、McCarthy EA. 第84章“胸腺重建 (Thymic reconstitution)”2013.在以下文献中:编辑者Fleisher TA、Shearer WT、Schroeder HW、Frew AJ、Wey和CM《临床免疫学》(第四版) 伦敦;第1032-8页)。

[0037] 受体的骨髓CLP迁移到供体胸腺移植物中。供体胸腺移植物提供了微环境,其中受

体胸腺细胞形成了能够识别病原体的广泛的TCR。

[0038] 受体DC迁移至供体胸腺会耗尽自身反应性受体胸腺细胞,在新的T细胞离开胸腺并进入循环后,所述自身反应性受体胸腺细胞会攻击受体的组织。遗传受体的原初T细胞在施用后约5-12个月出现在循环系统中。这些受体T细胞具有多种TCR库,并响应于有丝分裂原而正常增殖。其可以保护受体免受感染,而不会对自身产生自反应性。

[0039] 受体的骨髓CLP迁移到胸腺同种异体移植中,并在此发展成受体T细胞。已经迁移至供体胸腺的受体DC的负选择导致对受体MHC抗原的耐受性。在移植后约2-3个月内对移植的经培养的胸腺组织进行活检,观察到胸腺生成的免疫组织化学证据。胸腺生成反映了T细胞防御和控制感染以及预防自身免疫性疾病的能力。

[0040] 在移植后5-12个月的循环中检测到原初T细胞,从而产生防御和控制感染以及预防自身免疫性疾病的能力。

[0041] 发明人首先证明了经培养的胸腺组织的植入对于治疗由先天性无胸腺症引起的原发性免疫缺陷是有益的,所述先天性无胸腺症与如完全DiGeorge异常(cDGA)或叉头盒蛋白N1(FOXP1)缺乏等病症相关。本文的发明人发现,培养后用正常的胸腺组织(例如CTT和RVT-802)替换有缺陷的胸腺组织还可以消除在移植的实体器官受体中观察到的耐受性缺乏。

[0042] 通过放置经培养的胸腺组织来治疗先天性无胸腺症的基础的非临床和临床工作导致人们认识到,在患者中放置CTT(例如,RVT-802)可能会对移植的实体器官产生耐受性。具体地说,如果在植入表达供体器官的MHC的CTT之前首先对患者进行胸腺切除术和免疫抑制,则CTT的放置将重建免疫系统并诱导对供体器官的耐受性。

[0043] 对与胸腺的细胞成分相关的某些标志物的表达和分布的测量建立了离体后的表型。本说明书和实例中描述的培养条件支持在无胸腺受试者中放置CTT后观察体内胸腺生成。

[0044] 重要的是,在通过外科手术将CTT放置于无胸腺受体中后,原初T细胞的发育以及广泛的TCR可变区的存在提供了明确的证据证明胸腺组织的培养可以促进功能性内源性T细胞群体的发展。另外,在培养过程中在胸腺组织中注意到关键调节基因和结构基因的表达。通过外科手术插入CTT后3-5个月可首次检测到循环性原初(CD45RA+CD62L+) T细胞。在患有完全DiGeorge异常的患者的治疗中已注意到这些观察结果(Markert ML,2010; Markert ML.2013)。

[0045] 文献中描述的用于胸腺组织植入的非临床数据与移植同种异体经培养的出生后胸腺组织的强大临床功效相一致,并支持其在人类中的使用。(Markert ML、Watson TJ、Kaplan I、Hale LP、Haynes BF,1997,“器官培养过程中的人胸腺微环境(The human thymic microenvironment during organ culture)”《临床免疫学与免疫病理学(Clin Immunol Immunopathol.)》一月;82(1):26-36;Hong R、Schulte-Wissermann H、Jarrett-Toth E、Horowitz SD、Manning DD,1979,“经培养的胸腺碎片的移植II.裸鼠中的结果(Transplantation of cultured thymic fragments.II.Results in nude mice)”《实验医学杂志》,149(2):398-415。Li B、Li J、Hsieh CS、Hale LP、Li YJ、Devlin BH、Markert ML,2009,“用于移植的经培养的胸腺组织的表征,着重于甲状腺组织特异性基因的异位表达(Characterization of cultured thymus tissue used for transplantation with

emphasis on promiscuous expression of thyroid tissue-specific genes)”《免疫研究 (Immunol Res.)》2009;44(1-3):71-83;Li B、Li J、Devlin BH、Markert ML,2011,“出生后人胸腺移植后的胸腺微环境重建 (Thymic microenvironment reconstitution after postnatal human thymus transplantation)”《临床免疫学》,九月;140(3):244-59)。

[0046] 完全DiGeorge异常患者的三个腺体有缺陷,所述腺体发育在幼胚的颈部、心脏、胸腺和甲状旁腺中。通常,心脏和胸腺会进入胸部,而调节钙水平的甲状旁腺则留在颈部。用CTT治疗cDGA受试者可导致两岁时的存活率为75%,而未经治疗的受试者的存活率为6%(未发表的数据)。在文献中,儿童通常在没有治疗的情况下两年内死亡。(Markert等人,2010)。值得注意的是,CTT植入不会影响必须单独管理的心脏和甲状旁腺的问题。

[0047] 本公开的第一方面提供了同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在受体中的外科手术放置,以在免疫学正常是受体中诱导对实体器官移植物的耐受性。此类方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:取出具有免疫能力的受体的胸腺,然后用诱导免疫抑制方案耗尽所述受体的T细胞,所述诱导免疫抑制方案包括一种或多种免疫抑制剂,如一种或多种抗体和/或一种或多种钙调神经磷酸酶抑制剂。以治疗有效量施用所述诱导免疫抑制方案,从而耗尽受试者中的成熟T细胞和/或抑制所述受体的T细胞排斥移植的实体器官。从死亡供体获得合适的实体人体器官和胸腺,并将所述实体器官移植到所述受体中。施用维持性免疫抑制方案,持续一段时间,以抑制移植排斥。对来自所述死亡供体的胸腺进行长达21天的预处理方案,以在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理,以产生部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片,从而包括所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品。所述部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体(Hassall body)的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在。然后将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品通过外科手术放置在所述受体中,通常放置在大腿的四头肌中。所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品使所述受体能够在植入后发育出原初T细胞。所有发育中的新T细胞都是遗传受体,并且对受体和供体均耐受。胸腺组织切片的剂量为约1,000-20,000mm<sup>2</sup>胸腺组织表面积/m<sup>2</sup>受体身体表面积。植入后,所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受试者中诱导胸腺生成和耐受性。

[0048] 以心脏移植为例,所述供体将是死亡的供体。在取出心脏的同时将胸腺从供体中取出。立即进行心脏移植,并进行诱导免疫抑制,以减少T细胞数量并抑制剩余的受体T细胞,从而防止其攻击所述供体心脏。处理所述供体胸腺以形成人同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,经过至少12天到约21天的预处理,所述产品可用于植入以诱导耐受性。作为预防措施,经过预处理后,可以将大约一半的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品冷冻保存,因此,如果以后出现心脏排斥问题,需要施用大剂量的类固醇或其它免疫抑制剂来治疗所述排斥,并且非常高剂量的类固醇会损害所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,则可以在控制住所述排斥反应后,植入冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品。

[0049] 重要的是,在植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后,即使存在感染也可以维持免疫耐受性。使用如共刺激性阻断等其它方法,病毒感染可导致耐受性丧失,因为大约三分之一的CD8<sup>+</sup>T细胞具有同种异体反应性。当激活免疫系统以抵抗感染时,所述

同种异体反应性CD8<sup>+</sup> T细胞开始排斥所述实体器官移植物。相反,当使用被加工成同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的胸腺组织诱导耐受性时,所有针对供体的潜在同种异体反应性T细胞都会通过负选择过程被删除。

[0050] 在一个实施例中,所述供体胸腺组织与所述受体中不存在的所述供体器官中的HLA等位基因相匹配。所有发育中的新T细胞都是遗传受体,并且对受体和供体均耐受。

[0051] 本公开的第二方面提供了一种用于在需要实体器官移植的受体中促进对获自死亡供体的同种异体实体器官移植物的供体特异性耐受性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0052] (a) 取出所述受体的胸腺;

[0053] (b) 用包括一种或多种免疫抑制剂的诱导免疫抑制方案治疗所述受体,以耗尽所述受体的T细胞和/或抑制所述受体的T细胞排斥移植的实体器官;

[0054] (c) 提供来自死亡供体的合适的实体人体器官和胸腺;

[0055] (d) 将所述实体人体器官移植到所述受体中;

[0056] (e) 用维持性免疫抑制方案治疗所述受体;

[0057] (f) 提供同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,其中从所述实体器官供体的合适的胸腺组织中获得所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品;其中对所述供体胸腺组织进行长达21天的预处理方案,以产生同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品;进一步地,其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理,以产生部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片;其中所述部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对细胞角蛋白(CK)(使用抗体AE1/AE3)呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在;以及

[0058] (g) 在预处理方案的12到21天后,将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品植入所述受体中,其中所述胸腺组织切片的剂量为约1,000-20,000mm<sup>2</sup>胸腺组织表面积/m<sup>2</sup>受体身体表面积,并且进一步地,其中所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受体中诱导胸腺生成和耐受性。

[0059] 在一个实施例中,提供了一种在需要死亡供体心脏的受体中促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性的方法。所述方法包括以下步骤:

[0060] (a) 从死亡供体获得合适的人心脏进行移植;

[0061] (b) 在获得心脏同时取出死亡供体的胸腺,

[0062] 用于预处理成同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品;其中所述供体胸腺与所述供体移植器官中的HLA等位基因相匹配;

[0063] (c) 用包括一种或多种免疫抑制剂的诱导免疫抑制方案治疗所述受体以耗尽和/或抑制所述受体的T细胞,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括在麻醉诱导时和再灌注后施用的糖皮质激素;

[0064] (d) 将所述心脏移植到所述受体中;

[0065] (e) 用包括一种或多种免疫抑制剂的维持性免疫抑制方案治疗所述受体,持续一段足以防止或抑制所述心脏的移植排斥的时间,所述一种或多种免疫抑制剂选自由以下组成的组:钙调神经磷酸酶抑制剂、肌昔单磷酸脱氢酶抑制剂和抗胸腺细胞球蛋白;

[0066] (f) 在第12天和第21天之间,提供同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,

其中从所述供体胸腺组织中获得所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品；其中对所述供体胸腺组织进行约12天到约21天的预处理方案，以产生同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品；进一步地，其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理，以产生部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片；其中所述部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在；

[0067] (g) 将一部分所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品植入所述受体中，其中所述胸腺组织切片的剂量为约1,000-20,000mm<sup>2</sup>胸腺组织表面积/m<sup>2</sup>受体身体表面积，并且进一步地，其中所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受体中诱导胸腺生成和耐受性；以及

[0068] (h) 将一部分所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品冷冻保存，以备在发生以下事件时在所述受体中使用：出现早期排斥反应，需要高剂量的类固醇，所述高剂量的类固醇会损害在步骤(g)中植入的所述一部分同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品。

[0069] 在一个实施例中，提供了一种在需要死亡供体心脏的受体中促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性的方法。所述方法包括以下步骤：

[0070] (a) 从死亡供体获得合适的实体人心脏进行移植；

[0071] (b) 在获得心脏同时取出死亡供体的胸腺，用于预处理成同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品；其中所述供体胸腺与所述供体移植器官中的HLA等位基因相匹配；

[0072] (c) 用包括一种或多种免疫抑制剂的诱导免疫抑制方案治疗所述受体以耗尽和/或抑制所述受体的T细胞，其中所述一种或多种免疫抑制剂包括在麻醉诱导时和再灌注后施用的糖皮质激素；

[0073] (d) 通过外科手术取出受体的心脏和胸腺；

[0074] (e) 将所述供体人心脏移植到所述受体中；

[0075] (f) 用包括一种或多种免疫抑制剂的维持性免疫抑制方案治疗所述受体，持续一段足以防止或抑制所述心脏的移植排斥的时间，所述一种或多种免疫抑制剂选自以下组成的组：钙调神经磷酸酶抑制剂、肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂和抗胸腺细胞球蛋白；

[0076] 其中，如果所述受体的术后状况过于不稳定以至于无法舍弃糖皮质激素并且不能安全地将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品植入所述受体中，则将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品冷冻保存以在随后所述受体稳定的时间处进行植入，其中对所述供体胸腺组织进行约12天到约21天的预处理方案，以产生同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品；进一步地，其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理，以产生部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片；其中所述部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在；

[0077] (h) 在所述患者稳定后，将一部分所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品植入所述受体中，其中所述胸腺组织切片的剂量为约1,000-20,000mm<sup>2</sup>胸腺组织表面

积/ $m^2$ 受体身体表面积,并且进一步地,其中所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受体中诱导胸腺生成和耐受性;以及

[0078] (i) 将一部分所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品冷冻保存,以备在发生以下事件时在所述受体中使用:出现排斥反应,需要高剂量的类固醇,所述高剂量的类固醇会损害在步骤(h)中植入的所述一部分同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品。

[0079] 本公开的第三方面提供了一种用于在需要实体器官移植的人类受体中促进对获自活人供体的同种异体实体器官移植物的供体特异性耐受性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0080] (a) 取出所述受体的胸腺;

[0081] (b) 用包括一种或多种免疫抑制剂的诱导免疫抑制方案治疗所述受体,以耗尽所述受体的T细胞和/或抑制所述受体的T细胞排斥移植的实体器官;

[0082] (c) 提供来自活人供体的合适的实体器官;

[0083] (d) 将所述实体器官移植到所述受体中;

[0084] (e) 用维持性免疫抑制方案治疗所述受体;

[0085] (f) 提供冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,其保存在冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品库中;其中所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品是由来自胸腺供体的胸腺组织加工得到的,所述胸腺供体表达与所述实体器官移植中不存在的所述受体中的HLA等位基因相匹配的HLA等位基因;其中对所述供体胸腺组织进行长达12天的预处理方案;进一步地,其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理,以产生部分T细胞耗竭的胸腺组织切片,其中在完成所述预处理方案后,所述胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在;

[0086] (g) 解冻所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品;以及

[0087] (h) 将所述解冻的冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品植入所述受体中,其中所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的剂量为约1,000-20,000 $mm^2$ 胸腺组织表面积/ $m^2$ 受体身体表面积,并且进一步地,其中所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受体中诱导胸腺生成和耐受性。

[0088] 本公开的第四方面提供了一种用于在需要实体器官移植的人类受体中促进对获自死亡的人供体的同种异体实体器官移植物的供体特异性耐受性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0089] (a) 取出所述受体的胸腺;

[0090] (b) 用包括一种或多种免疫抑制剂的诱导免疫抑制方案治疗所述受体,以耗尽所述受体的T细胞和/或抑制所述受体的T细胞排斥移植的实体器官;

[0091] (c) 提供来自活人供体的合适的实体器官;

[0092] (d) 将所述实体器官移植到所述受体中;

[0093] (e) 用维持性免疫抑制方案治疗所述受体;

[0094] (f) 提供冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,其保存在冷

冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品库中；其中所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品是由来自胸腺供体的胸腺组织加工得到的，所述胸腺供体表达与所述实体器官移植物中不存在的所述受体中的HLA等位基因相匹配的HLA等位基因；其中对所述供体胸腺组织进行长达12天的预处理方案；进一步地，其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理，以产生部分T细胞耗竭的胸腺组织切片，其中在完成所述预处理方案后，所述胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在；

[0095] (g) 解冻所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品；以及

[0096] (h) 将所述解冻的冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品植入所述受体中，其中所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的剂量为约1,000-20,000mm<sup>2</sup>胸腺组织表面积/m<sup>2</sup>受体身体表面积，并且进一步地，其中所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受体中诱导胸腺生成和耐受性。

[0097] 在本公开的第二至第四方面的一个实施例中，根据权利要求63所述的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品，其中所述胸腺在采集之日表明>50%的区域对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性、存在赫氏小体、CK14以花边图案染色并且>90%的核是完整的。

[0098] 本公开的第五方面提供了一种同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品，其用于植入接受实体器官移植物的受试者中，所述产品通过以下来制备：从供体获得合适的胸腺组织，其中对所述供体胸腺组织进行长达21天的预处理方案；进一步地，其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理，以产生部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片；其中在采集后第5天和第9天之间，所述供体胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在；回收所述部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片，作为同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品。

[0099] 在一个实施例中，所述胸腺在采集之日表明>50%的区域对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性、存在赫氏小体、CK14以花边图案染色并且>90%的核是完整的。

[0100] 在本发明的第五方面的一个实施例中，将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品冷冻保存。

[0101] 在一个实施例中，将所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品保持在液氮中，以备将来使用。

[0102] 在另一个实施例中，将所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品保持在冷冻保存的组织库中。

[0103] 在一个实施例中，所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品是由来自供体的合适的胸腺组织制备的，所述供体包括与所述实体器官移植物中不存在的拟议受体中的HLA等位基因相匹配的HLA等位基因。

[0104] 在一个实施例中，所述HLA等位基因是：HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1。

[0105] 本公开的第六方面是一种冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的

产品,其通过包括以下步骤的方法制备:

[0106] (a) 从供体获得合适的胸腺组织;

[0107] (b) 对以下HLA等位基因进行分型:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1;

[0108] (c) 对所述胸腺组织进行长达12天的预处理方案;其中用于所述供体胸腺组织的所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理,以产生部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片;进一步地,其中在完成所述预处理方案后,所述供体胸腺组织切片在第5天到第9天显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在;

[0109] (d) 采集所述部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片,作为同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产物;

[0110] (e) 在液氮中冷冻保存所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品;以及

[0111] (f) 将所述在液氮中冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品保存在冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品库中。

[0112] 在一个实施例中,所述胸腺在采集之日表明>50%的区域对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性、存在赫氏小体、CK14以花边图案染色并且>90%的核是完整的。

[0113] 在一个实施例中,保存液氮中的所述冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,以供所述受体将来使用。

[0114] 本公开的第七方面提供了一种制备供体胸腺以移植到受赠受试者中的方法。此类方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:将所述供体胸腺培养长达约5天、长达约6天、长达约7天、长达约8天、长达约9天、长达约10天、长达约11天、长达约12天、长达约13天、长达约14天、长达约15天、长达约16天、长达约17天、长达约18天、长达约19天、长达约20天或长达约21天,然后通过外科手术将所述经培养的胸腺组织放置在所述受体中,如本文进一步所述。在约6天和约12天之间的培养期导致良好的功能。为了成功地移植冷冻保存的胸腺组织,通常将组织培养约6天到约12天,然后冷冻保存。

[0115] 本发明的第八方面提供了一种同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品(CTT;RVT-802),其用于植入接受实体器官移植物的受试者中,所述实体器官移植物通过对来自合适供体的胸腺组织进行长达21天的预处理方案的方法制造;其中用于所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理,以产生部分T细胞耗竭的胸腺组织切片,其中所述胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在。

[0116] 在第八方面的一个实施例中,所述供体胸腺在采集之日表明>50%的区域对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性、存在赫氏小体、CK14以花边图案染色并且>90%的核是完整的。

[0117] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,通过外科手术获得受体的胸腺。

[0118] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,通过机器人手术获得受体的胸腺。

[0119] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,通过胸腔镜手术获得受体的胸腺。

[0120] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,所述实体器官是整个器官的一部

分。

[0121] 在一个实施例中,第一至第四方面的方法进一步包括以下步骤:冷冻保存来自所述死亡供体的外周血单核细胞,以备将来在混合淋巴细胞反应中使用,以证明细胞耐受性。

[0122] 在一个实施例中,在按照本说明书中CTT的植入程序植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后,使用来自所述受体的外周血单核细胞和来自所述供体的冷冻保存的外周血单核细胞进行所述混合淋巴细胞反应,以证明细胞耐受性。

[0123] 在一个实施例中,在植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后约6个月到12个月,用来自所述受体的外周血单核细胞和来自所述供体的冷冻保存的外周血单核细胞进行所述混合淋巴细胞反应,以证明细胞耐受性。

[0124] 在一个实施例中,在原初T细胞构成所述受体中总T细胞的约10%之后,用来自所述受体的外周血单核细胞和来自所述供体的冷冻保存的外周血单核细胞进行所述混合淋巴细胞反应,以证明细胞耐受性。

[0125] 在第一至第四方面的一个实施例中,在植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品后12个月内,所述植入的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品在所述受试者中诱导胸腺生成。

[0126] 在第一至第四方面的一个实施例中,通过用来自所述死亡供体的冷冻保存的外周血单核细胞和来自所述受体的原初T细胞进行的混合淋巴细胞反应来确定耐受性的发展。

[0127] 在第一至第四方面的一个实施例中,通过体液免疫的发展和不存在供体反应性抗体来确定体液耐受性。

[0128] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,所述实体器官移植物是心脏移植物、肾脏移植物、肝脏移植物、肺移植物、心脏/肺移植物、胰腺移植物、肠移植物、胃移植物、腹壁移植物、颅面移植物、头皮移植物、阴茎移植物、子宫移植物、单侧或双侧上肢移植物、单侧血管化复合同种异体移植物或其组合。

[0129] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,所述方法进一步包括在移植所述实体器官之前,评估所述受体的HLA I类或HLA II类群体反应性抗体(“PRA”)评分。

[0130] 在一个实施例中,所述实体器官移植物是心脏移植物。

[0131] 在一个实施例中,所述实体器官移植物是小儿心脏移植物。

[0132] 在一个实施例中,所述实体器官移植物是成人心脏移植物。

[0133] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,所述方法进一步包括在移植所述实体器官之前,评估所述受体的HLA I类或HLA II类群体反应性抗体(“PRA”)评分。

[0134] 在一个实施例中,具有HLA抗体的受体与潜在的供体交叉匹配。

[0135] 在一个实施例中,具有HLA抗体的受体虚拟地与UNET交叉匹配。

[0136] 在另外的实施例中,如果记录了PRA评分>20%的虚拟交叉匹配,则所述方法将进一步包括以下步骤:在所述受体进行实体器官移植时在手术室中进行血浆置换。

[0137] 在另外的实施例中,如果记录了PRA评分>70%的虚拟交叉匹配,则所述方法将进一步包括以下步骤:执行实际的预期供体交叉匹配,并在所述受体进行实体器官移植时在手术室中进行血浆置换。通常,由于成功率低,在这种情况下不进行移植。

[0138] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,所述方法进一步包括以下步骤:通过与UNET虚拟地交叉匹配来评估具有HLA抗体的受体。

[0139] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,所述方法进一步包括:如果HLA群体反应性抗体的评分>20%,则在所述受体进行实体器官移植时在手术室中进行血浆置换。

[0140] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,所述方法进一步包括:如果HLA群体反应性抗体的评分>70%,则执行实际的预期供体交叉匹配,并在所述受体进行实体器官移植时在手术室中进行血浆置换。

[0141] 在一个实施例中,例如对于与生命有关的供体和受体的肾脏移植物、部分肝脏移植物和部分肠移植物,所述实体器官是HLA匹配的。

[0142] 在另一个实施例中,所述实体器官是HLA错配的。

[0143] 在一个实施例中,所述实体器官是HLA匹配的。在另一个实施例中,通过在所述供体和所述受体中对以下HLA等位基因进行分型来确定HLA匹配:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1。

[0144] 在一个实施例中,所述实体器官移植物是ABO相容的。

[0145] 在另一个实施例中,所述实体器官是HLA错配的。在一个实施例中,通过在所述供体和所述受体中对HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1进行分型来确定HLA错配。

[0146] 在一个实施例中,将经培养的胸腺组织切片通过外科手术植入所述受试者的股四头肌大腿肌肉中。

[0147] 在一个实施例中,将经培养的胸腺组织切片通过外科手术植入所述受试者体内除股四头肌以外的区域中。

[0148] 在一个实施例中,将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的一部分通过外科手术植入所述受体的股四头肌大腿肌肉中。

[0149] 在另一个实施例中,其中将所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的剩余部分冷冻保存在液氮中,以备将来移植。

[0150] 在一个实施例中,所述预处理方案持续约12天到约21天。

[0151] 在一个实施例中,所述供体胸腺组织的预处理期为约5天到约21天、或约5天、或约6天、或约7天、或约8天、或约9天、或约10天、或约11天、或约12天、或约13天、或约14天、或约15天、或约16天、或约17天、或约18天、或约19天、或约20天或约21天。

[0152] 本领域普通技术人员将理解,本领域已知许多潜在的诱导免疫抑制方案和维持性免疫抑制方案,并且本领域技术人员可以选择合适的诱导免疫抑制剂和维持性免疫抑制剂,而不会造成过多负担。以下示例性的诱导免疫抑制方案和维持性免疫抑制方案是本发明的第一至第四方面的方法的实践实例,并支持所要求保护的发明。

[0153] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,所述诱导免疫抑制方案包括选自由以下组成的组的诱导免疫抑制剂:糖皮质激素、抗胸腺细胞球蛋白(兔)、抗胸腺细胞球蛋白(马)和阿仑单抗。

[0154] 在另一个实施例中,所述ATG是抗胸腺细胞球蛋白(兔)。

[0155] 在一个实施例中,所述诱导免疫抑制方案包括施用糖皮质激素。在一个实施例中,所述糖皮质激素包括甲基泼尼松龙。在另一个实施例中,所述糖皮质激素是甲基泼尼松龙琥珀酸钠。在另外的实施例中,以不超过4mg/kg/天的剂量静脉内施用所述甲基泼尼松龙琥珀酸钠。

[0156] 在一个实施例中,所述诱导免疫抑制方案包括兔来源的抗胸腺细胞球蛋白。在另一个实施例中,以约1.5mg/kg的剂量静脉内施用所述兔来源的抗胸腺细胞球蛋白。在另外的实施例中,每天施用所述抗胸腺细胞球蛋白,持续四天。在另一个实施例中,所述ATG是马来源的ATG。

[0157] 在一个实施例中,所述诱导免疫抑制方案包括巴利昔单抗。在另一个实施例中,向体重小于35kg的受体静脉施用10mg巴利昔单抗。在另一个实施例中,以20mg的剂量向体重超过35kg的受体静脉内施用巴利昔单抗。

[0158] 在本公开的第一至第四方面的实施例中,第二免疫抑制方案包括一种或多种选自由以下组成的组的免疫抑制剂:糖皮质激素、钙调神经磷酸酶抑制剂、肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂、硫唑嘌呤和抗胸腺细胞球蛋白(“ATG”)。

[0159] 在一个实施例中,所述维持性免疫抑制方案的免疫抑制剂是抗胸腺细胞球蛋白(ATG)。

[0160] 在一个实施例中,从在手术室中施用开始,以约1.5mg/kg的剂量静脉内施用所述ATG,持续3-14天的时间段。

[0161] 在一个实施例中,通过静脉内施用以约15mg/kg/天的剂量每天施用所述抗胸腺细胞球蛋白,持续3-14天。

[0162] 在一个实施例中,所述第一免疫抑制方案包括阿仑单抗。

[0163] 在一个实施例中,以约0.25mg/kg的剂量向体重小于35kg的受体静脉内施用所述阿仑单抗,持续4天。在另一个实施例中,以约3到20mg的剂量向体重超过35kg的受体静脉内施用所述阿仑单抗,持续4天。

[0164] 在一个实施例中,所述第二免疫抑制方案包括一种或多种选自由以下组成的组的免疫抑制剂:钙调神经磷酸酶抑制剂和肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂或硫唑嘌呤。

[0165] 在一个实施例中,所述维持性免疫抑制方案的免疫抑制剂是钙调神经磷酸酶抑制剂。

[0166] 在一个实施例中,所述维持性免疫抑制方案的免疫抑制剂是肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂。

[0167] 在一个实施例中,所述免疫抑制方案包括肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂,例如,吗替麦考酚酯。在一个实施例中,以约15到约25mg/kg的剂量静脉内施用所述吗替麦考酚酯。在一些实施例中,每天两次或三次静脉内施用所述吗替麦考酚酯。

[0168] 在另一个实施例中,肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂是麦考酚酸。在另一个实施例中,以约25到约50mg/kg的剂量按2个或3个分开的剂量施用所述麦考酚酸。

[0169] 在一个实施例中,以约400mg/m<sup>2</sup>/剂的剂量每天两次向儿童施用所述麦考酚酸,最大剂量为720mg;或对于BSA为1.19到1.59m<sup>2</sup>,每天两次,每次约540mg;或对于BSA>1.58m<sup>2</sup>,每天两次,每次约720mg。

[0170] 在一个实施例中,以约15到约25mg/kg/剂的剂量每天两次向儿童施用所述吗替麦考酚酯,或以约1500mg的剂量每天两次向成年人口服或静脉内施用所述吗替麦考酚酯,并针对WBC>3500进行了调整。

[0171] 在本公开的第一至第四方面的一个实施例中,所述第二免疫抑制方案可以进一步包括糖皮质激素,所述糖皮质激素选自由甲基泼尼松龙、泼尼松和泼尼松龙组成的组。在一

个实施例中,所述糖皮质激素的剂量保持低于4mg/kg/天。

[0172] 在一个实施例中,如本公开中其它地方所述,以递减的剂量施用所述糖皮质激素。

[0173] 在本公开的第一至第四方面的另一个实施例中,所述钙调神经磷酸酶抑制剂是他克莫司。在另一个实施例中,所述钙调神经磷酸酶抑制剂是环孢霉素A。

[0174] 在本公开的第一至第四方面的另一个实施例中,在原初T细胞达到总T细胞的10%之后,舍弃所述第二免疫抑制方案的施用。在又一个实施例中,在移植同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品之后,舍弃所述第二免疫抑制方案。

## 附图说明

[0175] 为了更完整地理解本文所公开的原理和其优点,参考结合附图进行的以下描述,在附图中:

[0176] 图1示出了在先天性无胸腺症中施用免疫重建后,同种异体的经培养的出生后胸腺组织来源的产品(例如,CTT、RVT-802)的作用机理示意图。

[0177] 图2示出了如实例1的其它地方所述的用于在大鼠中重建免疫系统的步骤的示意图,所述步骤通过在免疫正常的Lewis大鼠中取出胸腺、施用抗体杀死受体大鼠的T细胞、将来自供体大鼠的经培养的新生大鼠胸腺组织移植到受体大鼠中、施用免疫抑制剂持续约4个月并评估受体大鼠中的T细胞发育来重建免疫系统。值得注意的是,治疗组中的所有大鼠在停用环孢霉素之前都具有超过10%的原初T细胞。

[0178] 图3示出了实例1的两只实验受体大鼠(右侧的上升线)与未接受胸腺组织植入物的两只对照大鼠(基线处的粗线)的原初T细胞的发育。

[0179] 图4示出了用于从供体采集胸腺、将供体胸腺组织的薄片培养长达21天并将经培养的胸腺组织植入受体的股四头肌中的制造过程的示意图。

[0180] 图5A示出了示意图,所述示意图示出了用于表征测试的胸腺组织的切片,如在[00520]节中所讨论的。图5B是在用于培养胸腺的组织培养皿中的手术海绵上的纤维素滤膜上的胸腺组织切片的图。

[0181] 图6A-H描绘了从供体采集胸腺后的第5天、第9天、第12天和第21天,来自大量(MFG-056)经培养的胸腺组织的胸腺组织切片的组织学测试。在第5天(图6A,6B)、第9天(图6C,6D)、第12天(图6E,6F)和第21天(图6G,6H)分别示出了苏木精和曙红染色的切片(左图)及其与抗细胞角蛋白抗体AE1/AE3的混合物的相应反应性(右图;棕色表示正反应性)。每个图片左下方的标尺表示100 $\mu$ m。具有H&E的图片示出了T细胞随时间的耗竭。图6E和6F主要是上皮细胞。囊下皮质上皮的凝结发生在胸腺细胞随时间耗竭的情况下。在胸腺的髓质区域也会发生类似的凝结。杜克大学病理学系医学博士哲学博士Laura P.Hale摄。

[0182] 图7A和B分别以5mm(图9A)和100 $\mu$ m(图7B)的比例描绘了时程的第0天的胸腺组织切片的组织学。这示出了第0天的低倍(标尺5mm)和高倍(标尺100 $\mu$ m)的胸腺和胸腺细胞。这是正常的胸腺。此时,皮质和髓质都具有大量的胸腺细胞,其中深蓝色的核有助于组织的整体深蓝色外观。杜克大学病理学系医学博士哲学博士Laura P.Hale摄。

[0183] 图8A和8B是来自H&E染色载玻片的图像,其分别以5mm(图8A)和100 $\mu$ m(图8B)的比例描绘了时程的第5天的胸腺组织切片的组织学。胸腺细胞耗竭的进展导致组织出现更多的嗜酸性粒细胞(粉红色)。杜克大学病理学系医学博士哲学博士Laura P.Hale摄。

[0184] 图9A和B.H&E染色分别以5mm(图9A)和100 $\mu$ m(图9B)的比例描绘了时程的第12天的胸腺组织切片的组织学。我们看到胸腺细胞的进行性耗竭。较高的放大倍数显示出许多缺乏核的嗜酸性细胞体,这些嗜酸性细胞体可诊断已经经历了核溶解(核的溶解)的坏死细胞。预计此时在培养中出现这种程度的坏死。杜克大学病理学系医学博士哲学博士Laura P.Hale摄。

[0185] 图10A和10B.H&E染色分别以5mm(图10A)和100 $\mu$ m(图10B)的比例描绘了时程的第21天的胸腺组织切片的组织学。注意保留了组织的整体结构,在图10B中包含了含有大量赫氏小体的囊下皮质、皮质区和髓质区。较小的深色细胞大部分是尚未经历溶核解的坏死胸腺细胞。杜克大学病理学系医学博士哲学博士Laura P.Hale摄。

[0186] 图11A-E描绘了用抗细胞角蛋白抗体(AE1/AE3)的混合物进行免疫染色的代表性胸腺切片。图11A.第0天;图11B.第5天;图11C.第9天;图11D.第12天;以及图11E.第21天。随着培养的进行,胸腺上皮网络的结构保持完整。标尺表示400 $\mu$ m。杜克大学病理学系医学博士哲学博士Laura P.Hale摄。

[0187] 图12A和12B描绘了暴露于10X PBS的强制降解条件后的胸腺组织载玻片的组织学。图12A描绘了暴露于强制降解条件后第9天的皮质。图12B描绘了暴露于强制降解条件后第21天的皮质。在图12A中,蓝色的涂片是从细胞释放的DNA。尽管可以鉴定出具有完整核的小细胞灶,但大多数细胞显示出降解的迹象。杜克大学病理学系医学博士哲学博士Laura P.Hale摄。

[0188] 图13描绘了临床样品MLM247的H&E染色的组织学切片。这是培养的第0天。标尺是200 $\mu$ m。这是来自第0天的冷冻切片。由于已冷冻,因此该组织看起来与第0天的石蜡包埋的福尔马林固定组织不同。杜克大学病理学系医学博士哲学博士Laura P.Hale摄。

[0189] 图14.临床样品MLM219的冷冻切片,即H&E染色的组织学切片。这是一个冷冻切片,因此该组织看起来与上文培养和展示的石蜡包埋的福尔马林固定组织不同。然而,胸腺细胞耗竭的重要组织学特征和TEC强大的生存力已得到很好的体现。杜克大学病理学系医学博士哲学博士Laura P.Hale摄。

[0190] 图15是新鲜采集的胸腺组织的照片。

[0191] 图16是描述如实例5中所示的在大鼠肾囊下的CTT的采集、培养、移植和移植活检的示意图。

[0192] 图17A-D呈现了如实例中5所述的从3日龄的F1(LW $\times$ DA)大鼠中采集胸腺组织的照片,所述胸腺组织被切成四块(图17A)。如实例5中所述,在37 $^{\circ}$ C的CO<sub>2</sub>恒温箱中在带有胸腺器官培养基的无菌混合纤维素酯滤膜上培养了5-7天的胸腺片的照片(图17B)。图17C是被移植到LW大鼠的肾囊下的CTT的照片。图17D是在移植后6个月采集的胸腺移植物的照片。箭头指示肾囊下的CTT。

[0193] 图18A-D是描绘新鲜胸腺组织(顶部框架)和CTT(底部框架)在100x放大倍数下的组织学外观的照片。图18A示出了如实例5中所述的H&E染色的新鲜胸腺组织(顶部框架)和培养5天的CTT(底部框架)中的髓质分化的比较。图18B示出了如实例5中所述的当进行细胞角蛋白染色时可在培养5天的CTT(底部框架)中观察到的典型花边图案,以及新鲜胸腺组织(顶部框架)的典型花边图案。图18C示出了当进行Ki-67染色时,新鲜的胸腺组织(顶部框架)和CTT耗竭的T细胞(底部框架)。图18D示出了CD3染色的新鲜胸腺组织(顶部框架)和培

养了5天然后进行CD3染色的CTT胸腺组织(底部框架)。CD3染色的CTT(图18D,底部框架)中记录的棕色染色可能表示某些活细胞以及尚未从组织中洗出的死亡T细胞的碎屑。

[0194] 图19A-D是描绘新鲜胸腺组织(顶部框架)和CTT(底部框架)在600x放大倍数下的组织学外观的照片。图19A示出了如实例5中所述的H&E染色的新鲜胸腺组织(顶部框架)和培养5天的CTT(底部框架)中的髓质分化的比较。图19B示出了如实例5中所述的当进行细胞角蛋白染色时可在培养5天的CTT(底部框架)中观察到的典型花边图案,以及新鲜胸腺组织(顶部框架)的典型花边图案。图19C示出了当进行Ki-67染色时,新鲜的胸腺组织(顶部框架)和CTT耗竭的T细胞(底部框架)。图19D示出了DC3染色的新鲜胸腺组织(顶部框架)和培养了5天然后进行CD3染色的CTT胸腺组织(底部框架)。CD3染色的CTT(图19D,底部框架)中记录的棕色染色可能表示某些活细胞以及尚未从组织中洗出的死亡T细胞的碎屑。

[0195] 图20是实例5中报道的实验的实验设计示意图。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0196] 图21显示,在CTT移植后在右下象限中看到了重新繁殖的受体型T细胞。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0197] 图22A和B示出了在移植后8.5个月移出的胸腺,其示出呈阳性的细胞角蛋白染色(图22A)以及与天然胸腺相似的T细胞染色(图22B)。原始放大倍数 $\times 400$ 。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0198] 图23示出了与未移植CTT的对照动物相比,循环性CD4和CD8 T细胞数量显著增加的图。该图还显示,与未接受经培养的胸腺组织移植(CTTT)的对照组相比,CTTT组中的原初CD4和原初CD8 T细胞数量显著增加,并且与未接受经培养的胸腺组织移植(CTT)的对照组相比,CTT组中的CD4和CD8新近胸腺迁出细胞(RTE)的数量显著增加。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0199] 图24示出了对在第180天移出的移植的CTT的免疫组织学分析,所述分析示出了肾囊下的正常胸腺组织学(图24A的右手侧)。图24B示出了在H&E上的移出的移植物。示出了用于存活T细胞(CD3)、T细胞增殖(Ki67)和细胞角蛋白(通过兔多克隆抗体检测)的菌株。在细胞角蛋白染色的图片中,观察到带花边的图案,TEC上有赫氏小体形成(箭头)。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0200] 图25示出了在具有CTT(实心三角形,蓝线)和不具有CTT(倒置三角形,红线)移植物的情况下,胸腺切除术和免疫抑制后,接受DA心脏移植的LW大鼠的存活百分比。具有CTTT的LW大鼠是耐受的;没有CTTT的LW大鼠是免疫缺陷的,因此不会排斥DA心脏。对照示出了LW未经处理的大鼠中的DA心脏移植物的完全排斥(空心方块)。LW对照动物也没有排斥LW心脏移植物(带水平线的空心圆)( $n=9$ )。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、

Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0201] 图26A和26B是来自移植有CTT的动物(26A)和未移植CTT的动物(26B)的移植的同种异体移植体(DA心脏)的照片,所述照片示出了单核细胞浸润,图26C中没有描绘2004年国际心肺移植协会(ISHLT)的排斥迹象(蓝色实心圆和红色实心三角形)。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0202] 图27是在具有CTT的LW大鼠(其具有免疫能力并排斥宫颈同种异体BN心脏)和未插入CTT的对照LW动物(由于胸腺缺乏而无法免疫并且不能排斥宫颈BN心脏)以及BN对照(LW大鼠拒绝宫颈BN心脏)和同基因对照(LW大鼠不拒绝宫颈LW心脏)中,颈部百分比动物存活率形式的BN心脏移植体存活率与移植体存活天数之间的关系图。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0203] 图28A和28B分别是插入(图28A)和未插入(图28B)CTT的BN心脏组织在第11天和第46天的照片。这些图片是图27和29中的数据的基础。由于耐受性,图28A中的心脏未被排斥。由于胸腺缺乏所导致的免疫缺陷,图28B中的心脏未被排斥。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0204] 图29示出了宫颈BN心脏的排斥等级。放入LW大鼠中的同基因LW心脏(空心圆)未被排斥。放入LW大鼠中的BN心脏(实心圆)被排斥。放在接受了CTT的LW大鼠中的BN心脏被排斥(实心方块)。放在未接受CTT的LW大鼠中的BN心脏在2只大鼠中被微弱排斥(阴影三角形),而未被其它三只大鼠排斥。这些数据表明,即使具有CTT的大鼠接受了DA心脏(图26C)作为CTTT表达的DA,其也能够强烈排斥第3方的心脏。没有CTT的大鼠是免疫缺陷的,因此既不排斥DA心脏(图26C)也不排斥BN心脏。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0205] 图30A和30B分别是与LW和DA心脏相比,接受或未接受CTT插入的大鼠BN心脏的照片。在图30A中,在去除免疫抑制并移植了BN心脏之后,由于所有的炎症,BN心脏被迅速排斥并且因此非常大。LW心脏大小正常,用于心脏通过身体泵送血液。DA心脏很小,因为其放置在腹部,不需要泵送血液。在图30B中,大鼠是免疫缺陷的,并且在去除免疫抑制后无法排斥心脏BN或DA心脏。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0206] 图31A-B是来自插入和未插入CTT的大鼠以及BN对照和同基因对照大鼠的离体宫颈BN心脏的排斥等级的图。图31A描绘了初次腹部DA心脏同种异体移植体中炎性细胞的定量。同基因对照显示,LW大鼠不排斥LW心脏。DA对照显示,LW大鼠确实排斥DA心脏。由于耐受性,CTT组不会排斥DA心脏。由于胸腺缺乏所导致的免疫缺陷,没有CTT组的组不会排斥DA心脏。图31B描绘了在二次宫颈BN心脏同种异体移植体中炎性细胞的定量。同基因对照显示,LW大鼠不排斥LW心脏。BN对照显示,LW大鼠确实排斥BN心脏。CTT组由于其具有免疫能力

而排斥BN心脏。由于胸腺缺乏所导致的免疫缺陷,没有CTT的组不会排斥BN心脏。图31C示出了在宫颈BN心脏排斥时与天然LW心脏一起从LW受体采集的DA和BN心脏大鼠。右下图示出了BN心脏中导致其排斥的T细胞(棕色)。图31D示出了来自未插入CTT的对照动物的LW心脏、DA心脏和BN心脏中的T细胞浸润。由于动物是免疫缺陷的,因此不存在T细胞浸润。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0207] 图32:CTTT后的体液耐受性。图32A示出了通过T细胞流式交叉匹配测量的移植后供体特异性同种抗体(抗DA抗体和抗BN抗体)的代表性直方图。左上图(DA对照)示出了接受异位腹部DA心脏移植后正常LW大鼠中抗DA抗体的发展(粗线)。中上图显示,在接受了CTTT的LW大鼠中缺乏抗DA抗体;这指示了耐受性。右上图显示,没有CTTT的LW大鼠无反应;这反映了胸腺切除和T细胞耗竭后未收到供体胸腺的大鼠的免疫缺陷。左下图示出了由接受宫颈BN心脏的正常LW大鼠形成的正常抗BN抗体。中下图示出了接受颈椎BN心脏移植后,具有CTTT的LW大鼠对BN的正常反应,这示出了免疫能力和排斥第3方的能力。右下图显示,接受了颈椎BN心脏移植后,没有CTTT的LW大鼠对BN无反应,这显示免疫能力低下和缺乏排斥第3方的能力。图32B示出了在初次DA心脏移植后抗DA抗体的水平。具有来自LWxDA胸腺供体的CTTT的LW大鼠在DA心脏移植后不产生抗DA抗体,因为这些大鼠耐受DA。没有CTTT的LW大鼠在DA心脏移植后不产生抗DA抗体,因为这些大鼠具有免疫缺陷。图32C示出了在二次宫颈BN心脏移植后抗BN抗体的水平。具有来自LWxDA供体的CTTT的LW大鼠产生针对BN的抗体,这显示出针对第3方的免疫能力。没有CTTT的LW大鼠不产生针对BN的抗体,这显示出免疫能力不足。该图取自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0208] 图33.在培养12天后冷冻保存非人类灵长类动物的经培养的胸腺组织。最上面一行是采集时(A)、培养的第6天(B)、培养的第12天(C)和培养12天后的细胞角蛋白,然后进行35天的低温保存,然后解冻以拍摄照片(D)。D中的细胞角蛋白(AE1/AE3)与C中的细胞角蛋白相似。第二行示出了相同时间点的CK14染色。H中的CK14与图片G中的CK14非常相似。第三行示出了CD3染色,随着时间的流逝,预期存活的T细胞会丢失。图片L与图片K相似,只有很少的T细胞。第四行示出了增殖性T细胞的Ki-67染色。由于T细胞主要都死亡了,因此在第6天不存在Ki-67染色。该图显示了冷冻保存非人类灵长类胸腺的能力,其类似于如何将经培养的胸腺组织冷冻保存给患者。

## 具体实施方式

[0209] 本文提供的标题、标题和子标题不应被解释为限制本公开的各个方面。因此,通过整体参考说明书,更完整地定义了在下文中定义的术语。本文所引用的所有参考文献均通过引用整体并入。

[0210] 除非另外定义,否则本文所使用的科学术语和技术术语应该具有与本领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。此外,除非上下文另外要求,否则单数术语应该包含复数含义,并且复数术语应该包含单数含义。在本申请中,除非另外说明,否则“或者”的使

用是指“和/或”。在多个从属权利要求的上下文中，“或”的使用仅是指替代方案中的一个以上的独立于先前的权利要求或从属的权利要求。

[0211] 还应注意的是，如在本说明书和所附权利要求中所使用，单数形式“一/一个(a/an)”和“所述(the)”以及任何词语的任何单数使用均包含复数指示物，除非明确和确切地限于一个指示物。如本文所用，术语“包含”和其语法变型旨在是非限制性的，使得列表中项目的叙述不排除可以替换或添加到所列项目的其它相似的项目。

[0212] 参考以下定义，最清楚地理解本发明：

[0213] 本文使用的术语“约”是指大约、在某一范围内、大致上或周围。当结合数值范围使用时，术语“约”通过扩展所阐述的数值以上和以下的界限来修改该范围。通常，术语“约”在本文中用于通过 $\pm 10\%$ 的方差来修改高于和低于所述值的数值。如本文所使用的，术语约是指数值，包含例如整数、分数和百分比，无论是否明确指出。术语约通常是指本领域普通技术人员认为等同于所述值(例如，具有相同的功能或结果)的数值范围(例如，所述范围的 $\pm 5\%$ 到 $10\%$ )。当如至少和约等术语在数值或范围列表之前时，这些术语修改列表中提供的所有值或范围。在一些情况下，术语约可以包含四舍五入到最接近的有效数字的数值。

[0214] 如本文所使用的，术语“动物”包含但不限于人类和非人类脊椎动物，如野生动物、家养动物和农场动物。该动物也可以被称为“受试者”。

[0215] 如本文所使用的，“生物相容性”是指当植入哺乳动物中时不会在哺乳动物中引起不良反应的任何材料。

[0216] “慢性移植排斥”通常在植入后数月至数年之内发生在人类中，即使存在对急性排斥的成功免疫抑制也是如此。纤维化是所有类型器官移植物的慢性排斥的常见因素。

[0217] 如本文中所使用的，术语“包括(comprising)”(和任何形式的包括，如“comprise”、“comprises”和“comprised”)、“具有(having)”(和任何形式的具有，如“have”和“has”)、“包含(including)”(以及任何形式的包含，如“includes”和“include”)或“含有(containing)”(以及任何形式的含有，如“contains”和“contain”)是包容性的或开放性的，并且不排除其它未列举的元素或方法步骤。另外，与术语“包括”结合使用的术语也被理解为能够与术语“由……组成”或“基本上由……组成”结合使用。

[0218] 如本文所使用的，“移植物”是指通常被植入个体中以替代、纠正或以其它方式克服缺陷的组织或器官。所述组织或器官可以由起源于同一个体的细胞组成；该移植物在本文中通过以下可互换的术语指代：“自体移植物(autograft、autologous transplant、autologous implant和autologous graft)”。来自同一物种的遗传差异个体的移植物在本文中通过以下可互换的术语指代：“同种异体移植物(allograft、allogeneic transplant、allogeneic implant和allogeneic graft)”。从个体到其同卵双胞胎的移植物在本文中称为“同基因移植物(isograft、syngeneic transplant、syngeneic implant或syngeneic graft)”。“异种移植物(xenograft、xenogeneic transplant或xenogeneic implant)”是指从一个个体到不同物种的另一个体的移植物。

[0219] 如本文所使用的，术语“HLA匹配”是指供体受体对，其中在供体和受体之间没有任何HLA抗原错配。在本发明的方法中的HLA匹配包括：HLA等位基因：HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1。

[0220] 如本文所使用的，术语“HLA错配”是指供体和受体HLA抗原中的匹配，通常关于

HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1,其中供体和受体之间发生HLA错配。在一些情况下,一个单倍型是匹配的,而另一个是错配的。这种情况经常在活着的或死亡的捐献者的器官中发现。相对于HLA匹配对,供体-受体对中的HLA错配导致移植排斥的风险增加。

[0221] 作为前述定义的背景,HLA抗原对应于“人白细胞抗原”,其是在细胞表面上表达的蛋白质分子,所述蛋白质分子赋予这些细胞独特的抗原同一性。这些抗原也被称为“主要组织相容性复合抗原”。因此,MHC或HLA抗原是被T细胞识别为“自身”或“非自身”的靶分子。如果HLA抗原与免疫效应细胞来自相同的造血干细胞来源,则将其视为“自身”。如果HLA抗原来自造血重建细胞的另一种来源,则将其视为“非自身”。

[0222] 识别出了两类主要的HLA抗原:HLA I类和HLA II类。HLA I类抗原(人类中的A、B和C)使每个细胞都可识别为“自身”。HLA II类抗原(人类中的DRB1、DPB1、DPA1、DQB1和DQA1)参与淋巴细胞和抗原呈递细胞之间的反应。这两类HLA抗原均被认为是移植器官排斥的靶标。

[0223] HLA基因聚集在人类染色体6p21位。该基因簇编码六个经典的移植HLA基因。6p21的片段还编码基因,这些基因编码的蛋白质在免疫系统调节以及其它基本分子和细胞过程中具有重要作用。整个簇的大小约为3.6Mb,带有至少224个基因位点。作为聚集的结果,出现了某些“单倍型”(单个染色体上存在的等位基因组)。从一个亲本继承的单倍型往往作为群体继承。从每个亲本继承的等位基因集形成一个单倍型,其中一些等位基因往往缔合在一起。HLA匹配用于识别受体的单倍型,并帮助确定合适的匹配供体。某些单倍型比其它单倍型更为普遍,并且在不同种族和族裔群体中的发生频率有所不同。

[0224] 如本文所使用的,短语“对其有需要”意指受试者已经被鉴定为需要特定的方法或治疗。在一些实施例中,可以通过任何诊断方式进行鉴定。在本文所述的任何方法和治疗中,受试者可能是有需要的。

[0225] 如本文所使用的,短语“从X到Y的整数”表示包含端点的任何整数。例如,短语“从X到Y的整数”表示1、2、3、4或5。

[0226] 如本文所使用的,术语“哺乳动物”是指啮齿动物(即,小鼠、大鼠或豚鼠)、猴子、猫、狗、牛、马、猪或人类。在一些实施例中,所述哺乳动物是人。

[0227] 如本文所使用的,术语“器官”是指在生物体内执行特定功能或功能组的实体血管化器官。术语器官包含但不限于心脏、肺、肾脏、肝脏、胰腺、皮肤、子宫、骨骼、软骨、小肠或大肠、膀胱、大脑、乳腺、血管、食道、输卵管、胆囊、卵巢、胰腺、前列腺、胎盘、脊髓、上肢和下肢、脾脏、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、输尿管、尿道、子宫。

[0228] 如本文所使用的,术语“预防(prevent、preventing和prevention)”是指对可能最终表现出疾病、病症或病状的至少一种症状但尚未表现出所述症状的个体施用治疗,以减少所述个体在给定时间内发展出所述疾病、病症或病状的所述症状的机会。这种减少可以反映为例如患者的疾病、病症或病状的至少一种症状延迟发作。

[0229] 如本文所使用的,可互换使用的术语“受试者”、“个体”或“患者”是指任何动物,包含哺乳动物(如小鼠、大鼠、其它啮齿动物、兔、狗、猫、猪、牛、绵羊、马)或灵长类动物(如人类)。

[0230] 如本文所使用的,短语“治疗有效量”是引起研究人员、兽医、医生或其它临床医生

在组织、系统、动物、个体或人类中寻求的生物学或医学反应的活性化合物或药剂的量。治疗效果取决于所治疗的疾病或所期望的生物学效果。因此，治疗效果可以是减轻与疾病相关的症状的严重性和/或抑制疾病的进展(部分或完全)、或改善治疗、治愈、预防或消除疾病或副作用。可以基于受试者的年龄、健康状况、体型和性别来确定引起治疗反应所需的量。还可以基于监测受试者对治疗的反应来确定最佳量。

[0231] 如本文所使用的，术语“组织”是指人或动物中的任何类型的组织，并且包含但不限于血管组织、皮肤组织、肝脏组织、胰腺组织、神经组织、泌尿生殖器组织、胃肠道组织、骨骼组织(包含骨骼和软骨)、脂肪组织、结缔组织(包含肌腱和韧带)、羊膜组织、绒毛膜组织、硬脑膜、心包膜、肌肉组织、腺体组织、面部组织、眼科组织。

[0232] 在本公开的上下文中，“组织库”是指储存在液氮下的低温保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的长期保存。建立同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品库的一般指南可从《工业指南(Guidance for Industry)》中获得。当前的良好组织规范(CGTP)和对人体细胞、组织以及基于细胞和组织的产品(HCT/Ps)制造商的附加要求，请访问<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Tissue/UCM285223.pdf>。

[0233] “组织工程化”是指离体产生组织用于组织置换或重建的过程。组织工程化是“再生医学”的一个实例，其涵盖通过掺入细胞、基因或其它生物构件使用生物工程材料和技术来修复或替换组织和器官的方法。

[0234] 术语“移植排斥”涵盖急性和慢性移植排斥。“急性排斥”是当移植的组织在免疫学上是异物时，组织移植受体的免疫系统进行的排斥。急性排斥的特征在于受体的免疫细胞对移植组织的浸润，所述免疫细胞执行其效应子功能并破坏移植组织。急性排斥的发作很快，通常在移植手术后几周内发生在人类中。通常，可以用雷帕霉素、环孢霉素A、抗CD40L单克隆抗体等免疫抑制药物抑制或阻止急性排斥。

[0235] 如本文所使用的，术语“治疗”意指治疗性和预防性措施，其中目的是减慢(减轻)不期望的生理状况、病症或疾病或获得有益的或期望的临床结果。例如，有益的或期望的临床结果包含但不限于：症状的缓解；病情、病症或疾病程度的减轻；病情、病症或疾病状态的稳定(即不恶化)；病情、病症或疾病的发作延迟或发展减缓；病情、病症或疾病状态的改善或缓解(无论是部分还是全部)(无论是可检测的还是不可检测的)；至少一个可测量物理参数的改善(患者不一定能分辨出)；或病情、病症或疾病的增强或改善。

[0236] 如本文所述，除非另外说明，否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应被理解为包含所述范围内的任何整数的值，以及在适当时包含其分数(如，整数的十分之一和百分之一)。范围是近似值，并且可能相差超过一个整数。

[0237] 用国际单位制(SI)接受的形式表示单位、前缀和符号。数值范围包括定义该范围的数字。考虑到有效数字和与测量相关的误差，测量值应被理解为近似值。

[0238] 还应理解的是，为清楚起见，在单独的实施例的上下文中描述的本文所述的某些特征也可以在单个实施例中以组合形式提供。相反，为简洁起见，在单个实施例的上下文中描述的各种特征也可以单独提供或以任何合适的子组合形式提供。

[0239] 供体胸腺组织的采集。

[0240] 在捐献者家人的知情同意下，可以在出生后心脏手术期间获得供体胸腺组织。可

能需要取出一些胸腺以露出手术部位。因此,由于外科手术的性質,在出生后心脏手术中,可以在心脏手术期间取出一部分胸腺。

[0241] 在出生后心脏手术期间,可以在外科手术过程中丢弃一部分胸腺组织。对于所有心脏外科手术,无论是否筛查胸腺以进行移植,外科医生都将已取出的胸腺组织放入无菌容器中。

[0242] 用于患有完全DiGeorge综合症的婴儿的胸腺组织移植的胸腺组织供体是年龄在九个月以下的婴儿。如本文所述,通过处理和培养废弃的胸腺组织来制造原料药同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品。

[0243] 可以在采集胸腺之前或之后获得在经培养的胸腺组织移植中使用胸腺的同意。然而,允许在进行旁路手术之前从婴儿那里获得血液的同意是必须的,并且始终在手术前获得。该血液样品用于供体筛选。

[0244] 将废弃的胸腺组织放入无菌容器中。根据FDA的组织移植指南,对捐赠者和捐赠者的生母进行常规测试。本文所述的外科手术过程中不需要进行组织类型匹配,但是在某些情况下执行这种组织类型匹配。

[0245] 可立即处理组织或将其冷藏过夜以用于第二天处理。如果将胸腺组织储存过夜,则将组织无菌地添加到足以完全覆盖原始容器中的胸腺组织的胸腺器官培养基(下文所述的“TOM”培养基)中。将装有胸腺的容器放在冰箱中,直到准备好第二天处理。

[0246] 胸腺组织的预处理的概述

[0247] 预处理方案从经培养的胸腺组织切片中耗尽供体胸腺细胞。根据体外数据(免疫组织化学),如使用细胞角蛋白抗体所评估的,介于12天与21天之间的培养时间段可以保留上皮网络。优选在37°C下在5%CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。

[0248] 为了成功地培养,优选将胸腺组织切片并放在Millipore®纤维素或等效滤膜上,并置于组织培养皿中的手术海绵上。所述培养基包括胸腺器官培养基(TOM),并且每天更换一次。

[0249] 通过病理学评估受体上的胸腺。同一性测试必须显示出>50%的对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性的区域。效力测试必须显示出赫氏小体;其也必须显示出具有花边图案的CK14染色。生存力测试必须显示出切片中观察到的>90%的完整核。组织的批次批准发放在第5天和第9天之间的一天(包含端值)完成,并通过病理学进行。针对同一性,第5天和第9天之间的组织上的区域必须对角蛋白AE1/AE3呈阳性。针对效力,第5天和第9天之间的经培养的胸腺组织必须显示出散布在各处的细胞角蛋白CK14染色,并且必须鉴定出至少一个赫氏小体。针对生存力,第5天和第9天之间的经培养的胸腺组织必须显示出完整的核。

[0250] 在一个实施例中,将胸腺组织切片预处理约12天,然后冷冻保存。在另一个实施例中,将所有胸腺组织切片预处理约12天,然后将约一半胸腺组织切片植入受体中,并将剩余的胸腺组织切片冷冻保存以备将来使用。

[0251] 在采集的24小时内,将胸腺切成薄片。将切片培养12-21天。如下所述,这种培养过程会耗尽存活的供体T细胞,并最终使通过外科手术植入的组织切片能够重建无胸腺受试者的免疫系统,尽管其潜在的T细胞水平可能较低,但具有免疫学意义。

[0252] 如下所述的培养过程以以下方式显著改变了供体胸腺组织和其中包含的组成细胞的生物学特性,以优化CTT切片的有效治疗特性。

[0253] 培养过程确保以适合于通过外科手术植入受试者体内的方式获得具有先决生物学特征的培养细胞/组织的确定组成,以使其能够重建受试者的免疫系统。

[0254] 培养过程导致胸腺细胞的损失以及供体胸腺组织切片中胸腺上皮细胞和其它基质细胞的相对富集。

[0255] 培养过程进一步导致胸腺细胞耗竭并维持TECs,以使受体的免疫系统重建,并使受体对供体胸腺中的HLA抗原产生耐受性。

[0256] 总的来说,制造过程被设计成从供体胸腺组织中耗尽胸腺细胞并保留胸腺基质(胸腺上皮细胞和成纤维细胞)的功能结构。

[0257] 在一个实施例中,经过处理的供体胸腺组织是经工程植入的胸腺组织产品,其能够在外科植入手术之后在需要其的受试者中诱导对胸腺组织类型(HLA抗原)的耐受性。

[0258] 为了保持切片的胸腺组织的活力,将胸腺切片放置在Millipore纤维素滤膜上,并将手术海绵插入含有培养基的组织培养皿中。从供体采集之日到植入日(第12天到第21天),每天都更换每个组织培养皿中的培养基。

[0259] 供体胸腺组织的培养耗尽了这种处理过的组织中的胸腺细胞,这使移植物抗宿主疾病(“GvHD”)的风险最小化,所述疾病在胸腺切除术后严重免疫缺陷的受试者中可能是很大的问题。

[0260] 在培养的最初几天中,许多胸腺细胞从组织切片中“掉出”到培养基中,并且在培养基更换过程中被丢弃。随着在培养期间继续培养,供体胸腺细胞继续死亡,但其细胞残余物保留在CTT切片内。

[0261] 不受理论的束缚,据推测,这些无活力的胸腺细胞及其缺乏细胞核的残存物的存在对于组织工程化产品的预期功能很重要,因为它们有助于保留胸腺上皮细胞三维网络中的开放口袋,所述开放口袋对于接受治疗后的受体骨髓干细胞的进入是必不可少的。Markert,1999年的患者DIG003的经验证明了“空间”对于使骨髓干细胞进入的重要性(请参阅下文参考清单)。前述参考文献中描述的患者在CTT移植后35天接受了非常大剂量的类固醇(40mg/kg/天x甲基泼尼松龙3天),这导致胸腺细胞凋亡和上皮细胞凝集。没有原初T细胞出现,并且患者死于感染。尸检时,插入的胸腺为一团活的立方上皮,在上皮细胞之间没有空间供胸腺细胞进入。

[0262] 在培养期间,进行HLA分型以查看患者(受体)和供体组织是否共享任何HLA等位基因。在受体中进行抗HLA抗体测试,以确定受体是否具有针对胸腺中的HLA抗原的任何抗体。如果受体具有针对供体MHC的抗体,则将寻求另一种胸腺。根据FDA指导文件“工业指南”检查供体以及供体的母亲是否感染。《确定人体细胞、组织以及基于细胞和组织的产品(HCT/Ps)的供体的资格》和最新的指导文件。根据联邦法规(CFR)1271小节D“当前的良好组织规范”对组织进行无菌处理。

[0263] 在回顾批记录并进行QC测试之后,将组织从生产中批准发放出来并提供给手术团队进行移植,如前所述,将组织通过外科手术植入受体中。

[0264] 在下文以及在本说明书中阐述的实例中更完全描述的过程中产生经培养的胸腺组织。

[0265] 总之,所采集的胸腺组织的培养过程以以下方式显著改变了供体组织和其中所包含的组成细胞的生物学特性:供体胸腺细胞的损失以及胸腺上皮细胞和其它基质细胞的富

集,以及供体胸腺细胞的耗竭改变了组织的生理功能(例如,细胞因子和生长因子的分泌)及其结构特性。

[0266] 在培养的最初几天中,许多胸腺细胞从组织切片中“掉出”到培养基中,并且在培养基更换过程中被丢弃。

[0267] 与从供体获得的来源或原材料相比,在制造过程中发生的操纵导致最终产品中所含细胞的总体和组织学外观发生变化。

[0268] 由于在组织上和组织内的残留血液,在培养的最初几天中胸腺组织呈现红色。参见例如图15。

[0269] 在第5到第9天之间观察到存活的组织,减去在第1天明显的血液污染。

[0270] 在剩余的培养天数中,随着胸腺细胞的耗竭,组织的深度减小。免疫组织化学证明了组织中胸腺细胞密度的降低,并在下文进行了详细描述。

[0271] 在采集丢弃的胸腺组织后的第0天,组织中充满了活的胸腺细胞,所述胸腺细胞包埋在含有胸腺上皮细胞和成纤维细胞的基质中。AE1/AE3和CK14染色证实了细胞角蛋白(CK)阳性胸腺上皮细胞的存在,这是正常胸腺的特征。胸腺上皮细胞形成具有花边的三维网络,其精细过程环绕邻近的胸腺细胞。

[0272] 在培养过程中,如下所述培养胸腺切片。大量的胸腺细胞被洗出组织,尤其是在开始的3天内。这种耗竭最早可在第2天通过H&E染色在组织学上鉴定出来,H&E染色显示胸腺细胞密度降低,特别是在髓质区域。保留在组织中的大多数胸腺细胞显示出与凋亡和/或坏死相一致的核变化,或显示出核溶解(核完全丧失)。许多这些死的胸腺细胞及其细胞残留物仍然存在于整个胸腺组织中,并被认为可以防止上皮细胞之间的空间完全塌陷。

[0273] 在外部区域中(如在囊下皮质)中,胸腺细胞的丢失导致上皮细胞网络崩溃,可以看到一些上皮凝结。这些浓缩的囊下皮质上皮细胞可以形成几层细胞层厚度的线性阵列,其可以增加切片的机械强度。一些髓上皮细胞也可能凝结形成连续的上皮细胞斑块。

[0274] 随着培养的进行,胸腺细胞的死亡继续,组织中保留有坏死的胸腺细胞碎片。在培养的大约第7天到第19天之间,髓质和囊下皮质上皮的进一步凝结微乎其微。

[0275] 在使用AE1/AE3染色的每个胸腺的培养后期,仍然可以观察到具有类似于正常胸腺的上皮结构的区域。对于培养时间较长的组织,皮质和髓质的上皮结构仍然可以很容易地辨别;例如,赫氏小体仍留在髓质区域中。然而,与正常胸腺相比,在第0天之后的时间点,胸腺细胞耗竭程度会导致H&E的总体组织学外观发生实质性变化。

[0276] 胸腺组织的详细培养。

[0277] 制备同种异体经培养的胸腺组织来源的产品的一般程序是,如前所述,从接受心脏手术的9个月以下的婴儿中以废弃组织的形式获得患有完全DiGeorge综合征的婴儿的胸腺组织。对于实体器官移植,将从不超过50岁的个体获得废弃的胸腺。胸腺组织的使用将取决于其是否符合本说明书中规定的使用标准。

[0278] 在cGMP条件下对胸腺组织进行无菌处理和培养,以产生部分T细胞耗竭的胸腺组织切片。

[0279] 经培养的胸腺组织(CTT)的制造由以下一般步骤组成:接收和处理传入的胸腺组织、切片、培养、更换培养基、计算剂量、包装并将胸腺运输到手术室。另外,对传入的胸腺组织进行可接受性测试和过程测试,并对胸腺组织切片进行批准发放测试。

[0280] 在一个实施例中,胸腺组织切片过程需要使用无菌的一次性剪刀和镊子切除一块胸腺组织。操作员用镊子和剪刀取下胸腺的囊,然后将其放在盘子的盖子上,以便稍后处理。

[0281] 使用镊子将一块胸腺组织放置在一次性组织切片机中。将切片机的顶部(例如,Stadie-Riggs手动切片机(赛默飞世尔科技(Thomas Scientific),Swedesboro,NJ))放在切片机的中间部分并拧紧到位。操作员将刀片穿过组织片切下一片。切片约0.5到1mm厚。切割完每片切片后,将切片器的顶部移开,然后用镊子将组织切片转移到预先润湿的无菌Millipore滤膜上。滤膜已预先用TOM润湿。约50-90%的滤膜空间被填充,而组织切片没有重叠。

[0282] 通常,在切片开始时从组织上切下三个加工中的碎片,所有这些碎片大约为3x3 mm。发送一份进行组织学检查,并保留两份。胸腺切片时,胸腺细胞自由地流入培养基。

[0283] 在一个实施例中,将滤膜和胸腺切片转移至在组织培养皿中用TOM饱和的明胶手术海绵中。每个海绵放置有两个滤膜,每个组织培养皿使用2个海绵。重复切片胸腺的过程,直到准备了所需数量的切片为止。培养皿上标有操作编号、培养皿编号和ISBT条形码标签。将完成的培养皿置于37°C,5%CO<sub>2</sub>的加湿培养箱中。

[0284] 组织工程化的原料药包括胸腺组织切片,将其置于培养基中的培养皿中培养12到21天,如下所述。组织工程化的药品包括转移到药品容器中的胸腺组织切片。没有进行从原料药中生产药品的其它处理;对生产药品的原料药的唯一处理是将切片转移到防漏容器中,并进行相应的培养基更换。

[0285] 在以下段落中更具体地阐述了胸腺组织切片的培养。

[0286] 在一个实施例中,从手术室获得胸腺组织,其作为来自9个月大并接受心脏手术的婴儿的废弃组织。然后,由手术团队将组织放入带有螺旋盖顶部的无菌标本杯中,并在环境条件下运输到GMP设施进行处理。装有胸腺的无菌标本容器上标有捐赠者的姓名和病历号,包含条形码。供体筛选组为胸腺提供唯一的标识符(对胸腺连续编号)和唯一的病历号。为了制造,每个组织都有一个操作号和唯一的标签。所有标识符都记录在“机密的胸腺捐赠者表”上,该表与批处理记录分开保存,并且保密。

[0287] 在一个实施例中,原料药容器封闭系统可以是具有盖的细胞培养皿。将一片胸腺组织放置在滤膜上,将两个滤膜放置在培养皿中的胸腺器官培养基中的每个明胶海绵上。在每个培养皿中放置四片,并将培养皿保存在培养箱中,每天更换培养基,直至准备好批准发放。

[0288] 在一个实施例中,培养皿可以获自康宁(Corning)。培养皿可以是无菌的无热原的Falcon<sup>®</sup> 100mm聚苯乙烯细胞培养皿(产品#353003)。通过真空气体等离子体处理清洁培养皿,并通过伽马射线辐照灭菌。培养皿的尺寸为89.43mm O.D. x 19.18mm。

[0289] 在示例性实施例中,Surgifoam<sup>®</sup>海绵可以由爱惜康(Ethicon)制造,并且满足USP可吸收明胶海绵的要求。合适的海绵是无菌的、不溶于水的、可延展的、可吸收猪明胶的海绵,旨在用于止血。混合纤维素酯滤膜的说明性实例由Millipore制造(product#SMWP 02500)。25mm亲水膜的孔径为5.0µm。其由醋酸纤维素和硝酸纤维素的生物惰性混合物制成。使用前,将滤膜用环氧乙烷灭菌。

[0290] 在将供体胸腺批准发放并接收到加工实验室中之后,将胸腺切成片,将其放在无菌滤纸上,所述滤纸放置在无菌培养皿中的手术海绵上。如果未立即处理该组织,则如下所述,在从供体采集后在2-8℃下将其保存在胸腺器官培养基(TOM)中长达24小时,然后开始处理。TOM由Ham的F-12培养基、HEPES缓冲液、L-谷氨酰胺和热灭活的胎牛血清(FBS)组成。

[0291] 在一个实施例中,在ISO 7制造洁净室中的生物安全柜(BSC)的ISO 5空间中进行处理。在任何时候,BSC都只处理单个胸腺中的大量胸腺组织。使用前必须清洁BSC。通过目测检查胸腺的外观并称重。然后将胸腺放在TOM中的150-mm组织培养皿中。用无菌的一次性镊子和剪刀取出胸腺的囊。取组织片进行测试并作为保留样品。通过组织学测试传入的胸腺组织的同一性。捐献者资格也得到确认。在收到组织学结果和所有供体筛选结果之前,将继续进行处理。

[0292] 供体筛选的接受标准是必须满足所有供体资格要求。根据21CFR 1271,需要进行供体筛查,以保护胸腺组织移植受体的安全。这种筛选使疾病从供体传播到受体的风险降到最低。

[0293] 使用无菌的一次性剪刀和镊子,切下一块组织。使用镊子将一块组织放置在一次性组织切片机中。如前所述,将切片机的顶部放在切片机的中间部位并拧紧到位。操作员将刀片穿过组织片切下一片。切片约0.5到1mm厚。切割完每片切片后,将切片器的顶部移开,然后用镊子将组织切片转移到预先润湿的无菌Millipore<sup>®</sup>滤膜上。滤膜已预先用TOM润湿。约50-90%的滤膜空间被填充,而组织切片没有重叠。将滤膜和胸腺切片转移至在组织培养皿中用TOM饱和的明胶手术海绵中。

[0294] 胸腺器官培养基(TOM)

[0295] 该培养基由被批准用于人类的成分制成,只要这些试剂可用,该成分就不会引起过敏反应。

[0296] 必须跟踪所有试剂,使得如果出现任何问题,则可以在移植后鉴定所有成分。

[0297] 由于担心克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob Disease),必须使用美国材料制造胎牛血清(FBS)。使用前,必须将每个批次的信息发送给FDA。

[0298] 正常成年人具有针对FBS的天然抗体(针对半乳糖 $\alpha$ -1,3半乳糖(Gal- $\alpha$ -1-3Gal)的抗体),所述抗体已被测试为IgM异血凝素,而患有DiGeorge综合征的免疫缺陷儿童没有这些抗体。Parker W, Yu PB, Holzkecht ZE, Lundberg K, Buckley RH, Platt JL, 1997, “‘天然’抗体在免疫缺陷受试者中的特异性和功能: B细胞谱系的线索和发育(Specificity and function of ‘natural’ antibodies in immunodeficient subjects: Clues to B cell lineage and development)”《临床免疫学杂志(J Clin Immunol.)》17: 311-321)。

[0299] 在使用前,必须测试培养基的细菌、真菌和支原体污染。

[0300] 在一个实施例中,使用以下材料制备TOM:

[0301] HAMS F12, Gibco#11765-054(或案例11765-062), 500ml瓶或等效来源。HEPES, Gibco#15630-080或等效物, 1M溶液, 100ml瓶。最终浓度为25mM。

[0302] L-谷氨酰胺, Gibco#25030-081或等效来源, (库存200mM)。

[0303] 胎牛血清, Gibco, #16140(热灭活的)或#10082-147(热灭活的,已认证的)。

[0304] 在一个实施例中,可以按以下方式使用作为HI的FBS:

- [0305] 必须在56℃下将FBS热灭活30分钟。
- [0306] 为了减少培养基污染的可能性,必须将培养基分成等分试样,并且等分试样不得使用超过一次。
- [0307] 可以将剩余的FBS等分试样以25ml等分试样的形式冷冻(-20℃)储存,以供研究使用。
- [0308] 在一个实施例中,可以按以下方式制备TOM。
- [0309] 过夜解冻冰箱中的胎儿牛血清,或者在37℃下频繁轻柔地解冻。
- [0310] 如果使用非热灭活的胎牛血清,则在56℃下热灭活30分钟。
- [0311] 如果一次制备4升,则将所有培养基组分一起放入4升烧瓶中,以中速在磁力搅拌板上用搅拌棒搅拌3-5分钟(不起泡沫)。
- [0312] 使用0.2微米的过滤单元进行灭菌。
- [0313] 在一个实施例中,可以按以下方式对TOM制剂进行灭菌。将1升TOM分配到一升烧瓶中。在一次性无菌量筒中测量80ml TOM。将80ml TOM倒入150ml康宁滤膜灭菌装置中。将室内真空装置连接到滤膜上,并按照制造商的说明对滤膜进行灭菌。从容器中取出滤膜并丢弃。用无菌盖(随设备提供)盖上收集瓶。用TOM批号进行标记。测试一份等分试样的厌氧细菌培养;真菌培养、其它;和支原体培养。测试一份等分试样的内毒素。将所有TOM等分试样存放在-20℃冷冻机中。
- [0314] 在以下情况下可以批准发放TOM培养基以供使用:对于测试稀释20倍的样品,LAL结果必须等于或小于2EU/ml;对于测试稀释10倍的样品,LAL结果必须等于或小于1EU/ml;所有培养结果必须对生长不利。
- [0315] 必须使用BSC来过滤和分配培养基。
- [0316] 在批准发放之前,测试TOM的无菌性和内毒素。在满足14-天无菌测试接受标准之前,不会批准发放TOM用于培养供体胸腺。制备完毕后,将TOM在-20℃下保存直至解冻,这时可在冰箱中保存长达两周。
- [0317] 在一个实施例中,可以例如使用BacT/ALERT培养系统进行14天无菌测试。BacT/ALERT(北卡罗来纳州达勒姆市的BioMerieux)是可商购的培养系统,可用于使用自动化微生物检测系统测试样品。
- [0318] 将所有过程内和原料药培养物孵育14天,或者如果产物变为阳性则立即报告。对于阳性测试,可以识别一个或多个生物体并确定其抗生素敏感性。在第1天、第7天和批准发放当天,将装有用于有氧生长的培养基的培养瓶和装有用于无氧生长的培养基的瓶子与待测样品一起孵育。将所有瓶子在35-37℃下孵育14天。
- [0319] FBS可以从生命科技公司(Life Technologies)的GIBCO品牌获得。FBS是通过无菌且经过验证的过程制备的。FBS符合USDA对屠宰场动物、可追溯性和原产国的要求。所有胎儿血液均来自通过验尸前和验尸后经过兽医检查的健康母体中的胎儿。所有FBS均可按收集日期和位置进行追溯。在美国收集和加工的FBS来自USDA批准和检查的屠宰场。美国被USDA认可为无口蹄疫和牛瘟的国家。为了使供应商合格,使用前必须测试FBS的pH、渗透压、内毒素、总蛋白和同一性
- [0320] 将完成的培养皿置于37℃,5%CO<sub>2</sub>的加湿培养箱中。每一批胸腺组织都存储在单独的培养箱中。将胸腺切片放入培养箱后,进行颗粒采样和人员监控。

[0321] 对胸腺切片进行长达21天的培养,并且在培养期间每天更换培养基。这些胸腺切片被认为是原料药。在培养期间,许多胸腺细胞从胸腺组织切片中洗出,或者胸腺细胞经历凋亡,同时保留了胸腺基质。所有制造步骤均使用无菌的一次性设备和用品进行。用移液管从培养皿中吸出培养基,并汇集到无菌收集容器中进行过程内测试。然后将十(10) mL新鲜的胸腺器官培养基以漂洗的方式轻轻地分配给每个培养皿上的组织切片。培养基更换完成后,如有必要,从合并的培养基中取样以进行无菌和组织学检查。完成颗粒采样和人员监控并执行生产线清理。

[0322] 每天更换培养基。

[0323] 将切片培养长达21天。

[0324] 进行过程内测试以提供对过程和产品质量的洞察,并帮助确保最终药品的安全性和质量。

[0325] 过程内测试

[0326] 在第1天和第7天收集样品用于无菌过程内测试。在第7天收集样品用于支原体过程内测试。在第5天和第9天之间收集样品用于过程内组织学测试。在批准发放前一天确定剂量。在批准发放当天测试革兰氏染色、BacT、支原体和内毒素。

[0327] 革兰氏染色是一种细菌学实验室技术,其用于将细菌物种区分为革兰氏阳性和革兰氏阴性两类。在来自培养皿的混合废培养基上测试革兰氏染色。该方法使用染色技术根据细胞壁的物理特性确定分类。该方法用于进行初步的形态学鉴定或确定临床标本中是否存在大量细菌。可以手动进行染色,也可以使用自动染色机进行染色。已经证明两种不同的染色方法并没有显示出会影响培养结果的定性差异。

[0328] 在第5-9天进行的组织学测试包含:(1)在第5-9天确定对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域散布在整个组织中;(2)在显微镜下识别出至少1个赫氏小体;(3)组织切片的CK14染色散布在整个胸腺组织中;以及(4)在显微镜下观察到完整核。

[0329] 赫氏小体和完整核的存在以及成功的CK14染色指示已经培养出正常健康的胸腺组织。

[0330] 培养时间是重要的过程参数。如上所述,培养进行长达21天。

[0331] 在培养的第5天、第9天、第12天和第21天进行胸腺样品的测试,以确认在培养的第5和第9天之间产生的组织学结果是否代表在培养的第12和第21天之间产生的组织学测试结果。基于病理学家对实例中所讨论的样品的观察结果,组织切片在第5天的组织学外观反映了在随后的每个时间点(第9天、第12天和第21天)观察到的组织学外观。这证实了在第5天到第9天之间执行批准发放测试。

[0332] 对任何一个切片的组织学检查证实了关于整个批次的可接受性的结论。胸腺中任何一个切片的相关特征都反映了整个胸腺的特征,这支持继续使用单个组织切片进行组织学测试。

[0333] 如图12A和12B所示的强制降解测试证明,经培养的胸腺组织产品不容易降解并且对冷冻/解冻以及渗透压变化最敏感。在强制降解过程中测试的其它条件显示对经培养的胸腺组织产品几乎没有影响。

[0334] 胸腺产品原料药的控制

[0335] 传入的胸腺组织产品的接受标准包含下表1中鉴定的测试。

[0336] 表1.传入的胸腺组织

属性	测试日	测试参数	接受标准
<b>过程步骤：传入的胸腺组织</b>			
安全性	第 0 天	供体筛选	符合 21 CFR 1271 的捐献者资格要求
[0337] 同一性	第 0 天	目视检查	<ul style="list-style-type: none"> <li>容器完好</li> <li>标签准确</li> <li>粉红色至暗红色，可能存在黑色痕迹</li> </ul>
	第 0 天	组织学	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 50%的区域对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性</li> <li>鉴定出赫氏小体</li> <li>CK14 染色具有花边图案</li> <li>在切片中观察到&gt; 90%的完整核</li> </ul>
质量	第 0 天	重量	≥ 3 克

[0338] 缩写:CK,细胞角蛋白;EU,内毒素单位;USP,美国药典。在获得所有供体筛选结果之前,先处理胸腺组织。

[0339] 通常,重量的接受标准大于或等于3克。这是可接受的最小胸腺重量,以确保有足够的材料可用于正确配量最终产品。接受标准基于处理胸腺组织的经验。

[0340] 下表2中鉴定了过程内测试的接受标准。

[0341] 表2.过程内测试:

属性	测试日	测试参数	接受标准
<b>过程步骤：原料药过程内测试</b>			
安全性	第 1 天	无菌	没有生长
[0342] 安全性	第 7 天	无菌	没有生长
	第 7 天	支原体	支原体的存在呈阴性
效力	第 5-9 天	组织学	<ul style="list-style-type: none"> <li>在第 5-9 天散布在整个组织中的对角蛋白 AE1/AE3 呈阳性的区域</li> <li>鉴定出至少 1 个赫氏小体</li> <li>CK14 染色散布于整个组织中</li> <li>观察到完整核</li> </ul>

[0343] 下表3中鉴定了经培养的胸腺组织原料药测试的接受标准。

[0344] 表3.经培养的胸腺组织原料药测试

属性	测试日	测试参数	接受标准
<b>过程步骤：原料药批准发放测试</b>			
外观	批准发放日	目视检查	<ul style="list-style-type: none"> <li>没有篡改或损坏容器的证据</li> <li>黄色至棕色切片，厚度和形状各异</li> </ul>
[0345] 同一性	第 5-9 天	组织学	在第 1 天和 midpoint (第 5-9 天) 通过组织学确认胸腺组织的同一性。
	批准发放日	条形码	条形码用于在整个处理过程中跟踪组织，并在批准发放时确认条形码。
强度	批准发放前一天	剂量	1000 – 20,000 mm <sup>2</sup> 胸腺组织/m <sup>2</sup> 受体身体表面积
安全性	批准发放日	内毒素 (USP <85>)	<5 EU/kg 体重/小时
	批准发放日	无菌	没有生长
	批准发放日	支原体	支原体的存在呈阴性
	批准发放日	革兰氏染色	阴性

[0346] 同一性的接受标准是,在第1天和中点(第5-9天)通过组织学确认胸腺组织的同一性。条形码用于在整个处理过程中跟踪组织,并在批准发放时确认条形码以验证产品的正确同一性。

[0347] 免疫化学组织学

[0348] 组织学方法是医院用于所有组织类型的标准方法,如本领域技术人员已知的。

[0349] 将产品样品固定在10%福尔马林中,并运送到实验室。为了保护患者的隐私,在容器上标有编码的标识符而不是患者的名字,以及病历号。进入病理科后,将为标本分配唯一的病理学登录号并进行条形码处理。随后的块、载玻片和文书均带有该病理登录号的条形码。

[0350] 在实验室中接收标本之后,对福尔马林固定的组织进行粗略检查,并且准备了材料的书面粗略描述,其将成为最终报告的一部分。然后通过标准方法在自动化处理器上处理福尔马林固定的组织并将其包埋在石蜡块中。从石蜡块上切下切片,并由ASCP认证的组织技术人员进行以下染色:

[0351] 苏木精和曙红。

[0352] 细胞角蛋白AE1/AE3免疫组织化学。

[0353] 细胞角蛋白14免疫组织化学。

[0354] CD3免疫组织化学。

[0355] Ki-67免疫组织化学。

[0356] 在进行前述免疫组织化学测试期间,还测试并检查了适当的对照载玻片。所有对照载玻片和内部对照均显示出预期的免疫反应模式。当作为效力测试的一部分测试样品时,传入的胸腺样品还可以充当已经培养5-9天的组织切片的对照。传入的胸腺样品外观是典型的胸腺样品,然后在培养过程中在组织切片上发生变化,然后在培养5-9天后对其进行测试。培养5-9天后,样品必须显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在。

[0357] 载玻片由经解剖病理学认证的病理学家解释,所述病理学家在胸腺组织的组织学评估中具有额外的经验。最终报告由病理学家批准发放,并且所述报告记录结果。

[0358] 下表4中鉴定了经培养的胸腺组织原料药测试的接受标准。

[0359] 表4. 经培养的胸腺组织原料药批准发放测试

过程步骤: 药品批准发放测试			
[0360]	同一性	批准发放日	目视检查
		第 5-9 天	组织学
		批准发放日	条形码
			<ul style="list-style-type: none"> <li>没有篡改或损坏容器的证据</li> <li>黄色至棕色切片, 厚度和形状各异, 粘附在圆形白色滤纸上</li> </ul>
			在第 1 天和中点 (第 5-9 天) 通过组织学确认胸腺组织的同一性。
			条形码用于在整个处理过程中跟踪组织, 并在批准发放时确认条形码。

[0361] 经培养的胸腺组织必须不含微生物。在第1天和第7天进行的无菌测试中,微生物不应生长。在第7天的测试中,支原体应为阴性。无菌测试应为革兰氏染色阴性。

[0362] 使用包含无菌技术的适当控制来保持产品无菌;采用培训计划并验证操作人员的资格;利用适当的洁净室鉴定程序;采用既定的清洁培养基填充程序,并使用即用型灭菌设

备或使用经过验证的灭菌周期进行灭菌的设备。

[0363] 目视检查处理过的胸腺组织的容器是否损坏。组织切片通常显示出黄色至红棕色的外观,厚度和形状各异。

[0364] 在第1天和中点(第5-9天)通过组织学确认胸腺组织的同一性。

[0365] 条形码用于在整个处理过程中跟踪组织,并在批准发放时确认条形码。

[0366] 剂量(面积)为1,000-20,000mm<sup>2</sup>胸腺组织/m<sup>2</sup>受体身体表面积。剂量由批准发放到手术室的切片的表面积控制,以适合患者的身体表面积。

[0367] 可接受的剂量范围被定义为每m<sup>2</sup>受体身体表面积(BSA)1,000-20,000mm<sup>2</sup>胸腺组织。通过使用软件分析(PAX-it图像分析软件)的照片确定胸腺组织的面积。是根据患者的身高(厘米)和体重(公斤)确定BSA。使用DuBois和DuBois公式计算BSA:

[0368]  $BSA = 0.007184 \times [\text{身高 (cm)}]^{0.725} \times [\text{体重 (kg)}]^{0.425}$ 。

[0369] 测试经培养的胸腺组织的内毒素。规格 $\leq 5\text{EU/kg体重/小时}$ 。

[0370] 可以例如通过使用Endosafe PTS系统进行内毒素测试。与Endosafe PTS一起使用的试剂盒使用呈色动力学鲎试剂(LAL)测试。每个试剂盒均含有精确量的LAL试剂、显色底物和对照标准内毒素。将测试样品吸移到四个样品容器中。仪器在两个通道(样品通道)中抽取带有LAL试剂的样品并将其混合,在另外两个通道(加样通道)中与LAL试剂和阳性产品对照混合。将样品孵育,然后与显色底物合并。混合后,测量孔的光密度,并将其与仪器中存档的标准曲线进行比较。仪器测量每个通道中的反应时间。使用反应时间的对数与内毒素标准浓度的对数,构建每批药筒特有的存档标准曲线。通过使用反应时间从标准曲线内插来计算样品和峰值。该测试符合美国药典(USP)的要求。

[0371] 可以按下方式进行支原体的测试。在第7天从板中取出合并的培养基的样品,并在产品批准发放前进行测试。

[0372] 如果在制造过程中出现阳性培养事件,则将丢弃该批次并且将不对其进行管理。如果临床产品施用后出现阳性培养事件,则患者的主治医师和赞助者将适当地治疗患者。阳性培养需要鉴定污染生物的物种并确定其抗生素敏感性。如果有指示,主治医师将对胸腺受体进行抗生素治疗。

[0373] 该药品在使用前经历类似的目视检查和组织学测试。

[0374] 在将胸腺组织切片培养了长达21天之后,将切片转移到药品容器中以运输到手术室。在手术室中接收到切片后,将其插入到受体患者的大腿肌肉中

[0375] 容器应完好无损,并且胸腺组织切片应显示为黄色至红棕色组织切片,厚度和形状各异。肉眼检查组织切片以确认满足这些接受标准。

[0376] 同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的冷冻保存和解冻

[0377] 可以按下方式进行同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的冷冻保存。

[0378] 一种冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,其通过包括以下步骤的方法制备:

[0379] (a) 从供体获得合适的胸腺组织;

[0380] (b) 对以下HLA等位基因进行分型:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1;

[0381] (c) 对所述胸腺组织进行长达12天的预处理方案;其中用于所述供体胸腺组织的

所述预处理方案包括在胸腺器官培养基中对所述供体胸腺组织进行无菌处理,以产生部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片;进一步地,其中在完成所述预处理方案后,所述供体胸腺组织切片在第5天到第9天显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、至少一个赫氏小体的存在、散布在整个组织中的CK14染色以及完整核的存在;

[0382] (d) 采集所述部分T细胞耗竭的供体胸腺组织切片,作为同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产物;

[0383] (e) 在液氮中冷冻保存所述同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品;以及

[0384] (f) 将所述在液氮中冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品保存在冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品库中。在一个实施例中,根据权利要求66所述的冷冻保存的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品,其中所述胸腺在采集之日表明>50%的区域对具有花边染色图案的角蛋白呈阳性、存在赫氏小体、CK14以花边图案染色并且>90%的核是完整的。

[0385] 在一个实施例中,将供体胸腺切片并将其分成大致相等的两个部分,将每个带有纤维素滤膜的切片置于单独的冷冻管(Nunc管)中。将滤膜对折以将其插入管中。在室温下加入约1到约1.5ml的冷冻培养基[无菌过滤的90%热灭活的胎牛血清(FBS)和10%二甲亚砜(DMSO)],以覆盖组织。将冷冻管的无菌盖更换到管上。将所有试管放入室温下的Biocision Cool Cell或等效容器中。CoolCell中的所有空插槽都应填充有装有1ml冷冻培养基的试管。将试管在-80℃的冰箱中放置过夜。可替代地,将每个组织加滤膜放入5ml CryoELITE组织瓶(惠顿(Wheaton))中。在室温下放入3到5ml冷冻培养基,以覆盖组织。放入聚苯乙烯泡沫塑料盒中,并将其放入-80℃冰箱中过夜。然后将小瓶转移到液氮冷冻机的气相中。可替代地,可以使用受控速率的冷冻器以将冷冻管的温度升至液氮温度。

[0386] 为了恢复组织,从液氮冷冻机中取出冷冻管或CryoELITE组织瓶。在37℃水浴中以涡旋运动快速解冻小瓶中的胸腺片。该试管喷有70%的乙醇,然后将其放入生物安全柜(BSC)。使用镊子从Nunc冷冻管或CryoELITE组织瓶中取出胸腺组织和滤膜。将组织和滤膜放在含有20ml 4℃TOM的50ml锥形管中。每个含有20ml 4℃TOM的50ml锥形管中最多可放置5个滤膜。立即将带有组织的5个滤膜转移到装有20ml 4℃TOM培养基的新鲜锥形管中,并在4℃下放置15分钟。重复洗涤3次。将组织保持在4℃下,将每片转移到带有5ml 4℃TOM的120ml Starplex容器中。将所有容器放入装有冷藏袋的温度可控的容器中,送入手术室。将装有组织的Starplex容器送入手术室。将滤膜上的组织转移到无菌区,并放入约2ml无菌盐水的组织培养皿中。擦洗护士通过用镊子刮擦或拉动从滤纸上去除组织。擦洗护士将无定形的组织放回滤纸上。将具有大约4个滤膜的组织培养皿以及组织转移到手术部位,在此处外科医生可以轻松地获得组织。将组织放置在股四头肌中,方法与CTT(RVT-802)类似。Cryo-CTT与CTT相似之处在于部分T细胞被耗竭,胸腺组织切片显示出散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域、切片含有至少一个赫氏小体、CK14染色散布在整个组织中以及完整核的存在。

[0387] CTT移植

[0388] 在一个实施例中,将来自供体的不匹配的胸腺组织切片培养12-21天。在实体器官移植的当天,通常在诱导麻醉时施用类固醇。对于心脏或肺移植,应在进行实体器官移植时通过外科手术切除受体的胸腺。对于其它器官移植,可以在移植之前或移植当天进行胸腺

切除术。胸腺切除术可以是外科手术、胸腔镜手术或机器人手术。在再灌注后的手术结束时,在3到7天之内接受马抗胸腺细胞球蛋白(例如,兔抗胸腺细胞球蛋白)之前,会给受体更多的类固醇以杀死受体中大部分残留的T细胞(和NK细胞),或在4天内施用阿仑单抗以杀死T细胞、B细胞和NK细胞。然后开始施用免疫抑制剂(如环孢霉素或他克莫司)和麦考酚酯,直到T细胞发育并显示出超过10%的原初T细胞。原初T细胞可能需要6到12个月的时间才能增加到这个数目。将经培养的胸腺组织加工为实体器官供体的胸腺。在12到21天之间,可以将一半的CTT植入四肢肌肉中。另一半胸腺将被冷冻保存,以备将来使用。免疫抑制方案将抑制任何剩余的T细胞,直到植入受体中的经培养的胸腺组织切片释放出原初T细胞且所述受体符合舍弃维持免疫抑制方案的标准为止。(需要10%以上的原初T细胞才能舍弃免疫抑制)。

[0389] 胸腺切除术方案

[0390] 将患者带到手术室,并通过气管导管将其置于全身麻醉下。

[0391] 以无菌方式将胸部和腹部准备好并披上。

[0392] 通过约4cm的皮肤切口对患者进行完全胸骨切开术。

[0393] 进入两个胸膜腔以确保完整切除。

[0394] 膈神经在两侧均可见,并且注意不要使其受损。

[0395] 识别出胸腺并仔细地将其与肺的胸膜解剖结构切开,从下角开始并一直延伸到上角。

[0396] 执行完整的胸腺切除术。

[0397] 在纵隔内实现止血。

[0398] 胸管放置。始终将一根胸管插入(纵隔中)。如果在手术期间进入单个胸膜腔,则胸管从纵隔处继续进入该胸膜腔。如果进入两个胸膜腔,则以类似的方式使用第二根胸管,从纵隔处到另一个胸膜腔。

[0399] 引流管尺寸。#15Blake引流管用于2岁以下的婴儿。#19Blake引流管用于2岁及以上的儿童。

[0400] 胸骨闭合:在新生儿或婴儿中,使用0-Ticron缝合线闭合胸骨。大约1-2岁时,使用#1胸骨线。大约2-5岁时,使用#4胸骨线。

[0401] 用连续的可吸收缝合线闭合筋膜、皮下组织和皮肤。

[0402] 皮肤伤口真空装置放置在胸骨上。

[0403] 患者在手术室中拔管。

[0404] 对海绵、器械和针进行计数,并且在手术结束时必须正确。

[0405] 同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的的外科手术植入。

[0406] 同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品应根据以下说明植入。将胸腺组织植入大腿需要健康的肌肉组织床。

[0407] 准备植入手术

[0408] 应当针对每个个体患者计算计划移植的同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的最大剂量和最小剂量。在施用前正确识别预期的受体。

[0409] 在层流通风橱内的无菌条件下,将培养基中手术海绵上的滤纸上的组织切片从组织培养皿中取出,放入装有20ml培养基的120ml无菌杯中,包装以保持无菌,并运送到手术

室或包装后装运。在准备使用之前,不要从各个容器中取出组织切片。验证产品的到期日期和时间。

[0410] 始终使用严格的无菌技术处理同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品(组织切片)。检查每个容器是否有泄漏或损坏的迹象。如果有污染迹象,请勿使用。在无菌区域外,从运输箱中打开取出同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的容器。从外袋中取出装有聚丙烯容器的机架。准备就绪后,在无菌区域外但与无菌准备工作台相邻的团队将打开并从每个容器中取下盖子,一次一个。然后,无菌区域外的团队成员在不接触无菌区域的情况下将他/她的手臂延伸到无菌区域上,从而保存每个打开的容器。

[0411] 无菌区域的团队成员将使用一对镊子从容器中取出带有其滤纸的单个组织切片,并将其放置在无菌准备工作台上的无菌组织培养皿中,所述培养皿含有约2ml不含防腐剂的盐水。从四个容器中取出四个带有滤纸的组织切片,放在一个无菌组织培养皿中,该培养皿在无菌区团队成员面前的无菌区上。然后,无菌区域的团队成员使用无菌镊子使用两对镊子将组织切片从滤纸上剥离,其中一对镊子将滤膜固定在原位,另一对镊子将组织拉出或将组织刮成一堆。然后将从每张滤纸上去除的组织放在滤纸中间的一堆中的滤纸上。然后将无菌组织培养皿转移至无菌区。然后,在外科医生植入前4个切片时,将以相同的方式处理下一组四个同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品容器。当外科医生完成前四片的植入后,将下一个装有4个组织的培养皿放入手术区域,并将最初的组织培养皿返回到无菌区团队成员面前的无菌区,以装载第3组四个组织切片。继续此循环,直到所有期望的组织都被植入为止。开始时不要转移所有组织切片,以避免手术室中的空气污染。

[0412] 外科手术

[0413] 步骤1. 皮肤开口。

[0414] 全身麻醉诱导后,在大腿前部隔室之一上做一个垂直的皮肤切口(通常长约5cm)。注意:切口的大小以及植入过程中使用一条腿或两条腿取决于患者的体型、计划的移植组织量以及患者的肌肉质量。如果可以将全部或大部分组织植入到一只腿中,则仅应使用一只腿。

[0415] 步骤2. 打开筋膜以露出前区的肌肉。

[0416] 步骤3. 肌肉扩散和植入。

[0417] 使用扁头钳或类似的器械沿着股四头肌的天然沟分开肌肉。应在不切割肌肉组织的情况下植入同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的单个胸腺切片。将单独的组织切片沿天然沟放在股四头肌内间隔大约1cm,深度大约1cm的“口袋”中。根据患者的体型,外科医生可以沿每个沟将约6-7个切片放入6至7个口袋中。根据每个滤膜上组织的质量,可以在植入之前将同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品切片切成两半。应将完全覆盖了滤纸的厚组织切片切成两半,以使每个组织的血管化最佳。在每个前区内植入尽可能多的所需组织,直至达到最大计划剂量。

[0418] 步骤4. 肌肉闭合。

[0419] 用单根缝合线在植入胸腺组织的部位上闭合肌肉,以防止肌肉重新张开和移植物从肌肉中掉出。在闭合切口之前,请确保植入的组织被肌肉组织完全覆盖,没有裸露的胸腺组织。

[0420] 步骤5. 对于每个同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品的组织切片,重复

步骤3-4,直到最大预期剂量。

[0421] 步骤6. 切口闭合。

[0422] 确认止血。用两层可吸收的缝合线闭合皮肤切口,并应用标准敷料,如伤口闭合带或皮肤胶。保持筋膜开放,以便为肌肉腔肿胀留出空间。可以使用闭塞敷料来防止污染。

[0423] 术后外科/医疗管理。

[0424] 根据需要使用温和的止痛药。监视感染或裂开的迹象。

[0425] 如果供体是与肺、肾、肠或部分肝脏有关的活体供体,则该实体器官供体的胸腺的一部分可能足以进行培养和植入。需要满足上文列出的采集日的病理学标准和第5天到第9天的病理学标准。

[0426] 可从第3方供体获得冷冻保存的胸腺组织。然而,第3方供体必须表达实体器官供体未表达的所有受体HLA等位基因。这包含HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DQA1、HLA-DPB1、HLA-DPA1。如果错配是“允许的”,则HLA-DP等位基因的错配是可以接受的。在其它等位基因中,允许较小的错配,例如,HLA-A\*01:02进入携带HLA-A\*01:01的受体,换句话说,第二个字段(在冒号之后)可以不同,第一个字段(在冒号之前)必须相同。

[0427] 人心脏移植手术

[0428] 基于许多标准来确定受试者的资格,所述标准包含:尽管目前有最大的支持疗法,但不进行心脏移植会具有不良的12至24个月预后;如UNOS标准所定义的,具有先天性或后天性心脏病,无法茁壮成长;在药物治疗难以治疗的先天性或获得性心脏病中出现晚期心力衰竭的症状;血液动力学异常或肺血管阻力增加;无法手术的结构性心脏病;不适合药物或设备疗法的症状性心律不齐或运动耐力差。

[0429] 评估了心脏移植手术的许多绝对和相对禁忌症,包含例如:可逆性肾功能不全,除非受试者是心脏/肾脏移植的候选者;不可逆性肝脏疾病,除非可以进行心脏/肝脏移植;不可逆性肺功能障碍,使用非常规的机械呼吸机支持(即高频呼吸机,CMV的最大设置)或固定的肺动脉高压(TPG>15),除非受试者是心肺移植的候选者;伴有微血管疾病的糖尿病;或活动性不受控的癫痫发作。

[0430] 其它禁忌症包含心脏移植后限制长期存活和康复的其它疾病;药物滥用、病态肥胖、恶性肿瘤;活动性精神障碍;以及其它原因,如已记录的用药非顺从。

[0431] 相对禁忌症包含活动性感染;认知功能障碍;血管通路不足和明显的同种致敏作用。

[0432] 还考虑了供体和受体的组织相容性管理。针对受体可能会响应“致敏事件”(如先前的输血或使用旁路/血液产品或同种异体移植材料的大手术)而形成的预先形成的HLA抗体,评估患者的群体反应性抗体(“PRA”)。

[0433] 评估接受者的过敏前史,例如:以前的输血;次数、日期;以前的手术;以前的怀孕;免疫史和IVIg施用(带日期)。

[0434] 具有过高的I类或II类HLAPRA的患者或经历重复移植的患者可以作为脱敏策略的候选者。具体策略将针对潜在受体进行个性化处理,并且可能包含血浆置换、IVIg、利妥昔单抗和/或硼替佐米的使用。重要的抗体是在1:16稀释后仍然存在的抗体。

[0435] 预先致敏的患者可能需要与潜在供体的实际预期交叉匹配。有HLA抗体史的患者在考虑移植时将在UNET中进行虚拟交叉匹配。

- [0436] 预先致敏的患者可能需要通过以下一般准则与潜在供体进行实际的预期交叉匹配。有HLA抗体史的所有患者在考虑捐献时都将在UNET中进行虚拟交叉匹配。
- [0437] 如果cPRA<20%:UNET中的虚拟交叉匹配,则不需要额外的措施;进行常规回顾性供体交叉匹配和常规免疫抑制。
- [0438] 如果cPRA>20%:UNET中的虚拟交叉匹配,则受体在移植时在手术室(“OR”)中接受血浆置换。
- [0439] 如果cPRA>70%:虚拟交叉匹配,则在时间允许的情况下考虑获得实际的预期供体交叉匹配;在OR中进行血浆置换。考虑在OR中放置修补导管,以便在手术后继续进行修补。
- [0440] 正在进行的抗体减少干预是通过供体交叉匹配、DSA程序和临床程序来确定的。
- [0441] 对于所有预先致敏的患者,将在移植后的前两周内将血液用于供体特异性抗体,并按照临床指示进行重复。至少在移植后每6个月对所有移植后患者进行DSA常规检查,如果有临床问题,则需要进行常规检查。
- [0442] 在移植前和移植后均遵循标准的血液制品输注方案。
- [0443] 免疫抑制管理
- [0444] 基于待移植的实体器官来确定免疫抑制管理。
- [0445] 小儿心脏移植
- [0446] 所有患者将根据其临床情况和危险因素接受巴利昔单抗或抗胸腺细胞球蛋白的诱导治疗。将在移植前确定所使用的诱导治疗的类型(第一免疫抑制方案药物治疗)。
- [0447] 在一个实施例中,移植前/诱导治疗通常包括以下药物的施用:
- [0448] 在手术室之前静脉内施用25mg/kg的吗替麦考酚酯(**CellCept®**)。
- [0449] 在诱导时静脉内施用10mg/kg甲基泼尼松龙(最大剂量500mg)。
- [0450] 在释放x-钳位时静脉内施用10mg/kg甲基泼尼松龙(最大剂量500mg)。
- [0451] 在释放x-钳位时静脉内施用1.5mg/kg ATG(抗胸腺细胞球蛋白)。
- [0452] 可替代地使用巴西利昔单抗(**Simulect®**),按受体的重量配量。
- [0453] <35kg时,在释放x-钳位时施用10mg,4天后施用第2剂量。
- [0454] >35kg时,在释放x-钳位时施用20mg,4天后施用第2剂量。
- [0455] 在一个实施例中,用于心脏和CTT移植物候选者的移植前诱导免疫抑制治疗可以包括:
- [0456] 巴西昔单抗(**Simulect®**)-(如果不能施用ATG)。
- [0457] 配量:
- [0458] <35kg时:初始剂量:在麻醉诱导时通过麻醉术前静脉内施用10mg(稳定并施用甲基泼尼松龙后)。
- [0459] 第二剂量:在移植后4天静脉内施用10mg;如果发生并发症(包含严重的超敏反应或移植物丢失),则保持第二剂量
- [0460] >35kg时:初始剂量:在稳定时在麻醉诱导时通过麻醉术前静脉注射20mg。
- [0461] 第二剂量:在移植后4天静脉内施用20mg;如果发生并发症(包含严重的超敏反应或移植物丢失),则保持第二剂量。
- [0462] 施用:在20-30分钟内进行静脉内输注。1-11岁半衰期儿童:9.5天,12-16岁青少

年:9.1天,成人:7.2天。

[0463] 在一个实施例中,可以根据以下心脏移植受试者的配量方案施用抗胸腺细胞球蛋白(ATG,兔来源, **Thymoglobulin®**):

[0464] 基于淋巴细胞计数以及标志物和血小板计数,1.5mg/kg/天,持续3到7天。在第二剂类固醇之后,在器官再灌注后在释放交叉钳时施用第一剂量(术中)。

[0465] 基于上述参数,每天持续进行,将通过移植MD确定。

[0466] 施用:对于第一剂量,在6小时内缓慢进行静脉内输注,耐受后可以在4小时内施用后续剂量。

[0467] 在一个实施例中,除了用于CPB/泵的例行术前/术中甲基泼尼松龙外,患者还可以接受一剂10mg/kg(最大剂量500mg)静脉内甲基泼尼松龙(SoluMedrol),其在麻醉诱导时通过麻醉在巴利昔单抗之前施用,然后在再灌注时施用10mg/kg第二剂量(最大500mg)(在ATG之前)。

[0468] 术后维持性免疫抑制(维持性免疫抑制方案)

[0469] 在一个实施例中,移植后免疫抑制包括:

[0470] 每天静脉内施用1.5mg/kg ATG(**Thymoglobulin®**),共5-7剂。

[0471] 如果WBC<2,000或血小板计数<50,000,则保持。

[0472] 如果WBC为2,000-3,000或血小板计数为50,000-75,000,则使用1/2剂量。

[0473] 每12小时静脉内施用/口服施用15-25mg/kg麦考酚酯。

[0474] 调节GI不耐受或白细胞减少症/中性粒细胞减少症。

[0475] 如果GI不耐受,则可以替代硫唑嘌呤。

[0476] 如果GI不耐受,则可以替代麦考酚酸(**Myfortic®**)。

[0477] 他克莫司在tx后24-48小时开始,这取决于肾功能和口服耐受性。

[0478] 起始剂量为每12小时口服施用~0.05mg,并基于水平进行调整。

[0479] 前6个月,~10-15;6个月-3年,8-12;>3年,4-8。

[0480] 如果需要静脉内药物治疗或对他克莫司不耐受,则可以替代环孢霉素。

[0481] 每8小时静脉内施用5mg/kg甲基泼尼松龙x 6剂(最大剂量125mg)。

[0482] 然后,以1mg/kg/剂每12小时静脉内施用/口服施用(最大30mg/剂)。

[0483] 基于活检结果,在接下来的2-3个月内舍弃。

[0484] 在一个实施例中,可以施用他克莫司(FK506, **Prograf®**)。通常的剂型包含0.5mg/ml的静脉内溶液以及0.5mg、1mg和5mg每胶囊的口服胶囊。

[0485] 当受体为PO/NG/SL时,每12小时施用~0.05mg/kg/剂的起始剂量(最大5mg/剂),如果肾功能可接受,则通常在术后约24小时开始。

[0486] 每天监测他克莫司低谷水平,直至达到治疗剂量。如有必要,可增加为每8小时施用一次,以达到治疗性低谷水平。如果药物是舌下给药,则将胶囊内容物撒在舌头下(可能导致更高的水平)。口服和舌下剂量不同。通常,有必要通过舌下给药施用药约1/2的口服剂量。

[0487] 可以在最后一次给药后10-14小时(如果每8小时施用,则为7-9小时)基于通过质谱法测量的血清全血水平来施用他克莫司剂量。

[0488] 在管理患者的他克莫司水平时,应考虑肾和肝功能、药物不良反应、感染和排斥反应史。如果患者的临床状况良好,如果水平在期望范围内的 $\pm 1$ 范围内,则无需进行剂量调整。在这些情况下,决定权取决于主治移植医师。

[0489] 在一个实施例中,向不能耐受他克莫司的患者施用环孢霉素。起始剂量:每12小时口服2mg/kg/剂。如果无法达到治疗水平(尤其是婴幼儿),则将给药频率将增加到每8小时一次。

[0490] 常规剂量基于在最后一次给药后10-14小时(如果每8小时施用,则为7-9小时),通过质谱法测量的以下血清全血水平。

[0491] 在管理患者的环孢霉素水平时,应考虑肾和肝功能、药物不良反应、感染和排斥反应史。如果患者的临床状况良好,如果水平在期望范围内的 $\pm 10-20$ 范围内,则无需进行剂量调整。在这些情况下,决定权取决于移植主治医师。应该尽一切努力在图表中记录患者的目标环孢素水平。静脉注射剂量通常等于口服剂量的1/3。

[0492] 在一个实施例中,可以施用吗替麦考酚酯(**Cellcept®**) (200mg/ml, 250mg或500mg片剂):

[0493] 以两个分开的剂量开始30-50mg/kg/天(儿童最大剂量为2g/天,成人为3g/天)。

[0494] IV剂量=PO剂量。

[0495] 不需要治疗药物监测,但是如果担心毒性,可以进行监测。

[0496] 麦考酚酯可引起骨髓抑制和中性粒细胞减少症。

[0497] 当ANC<500或WBC<1000时,可以保持剂量;在降低ANC(<1000)或WBC(<3000)的情况下,可能需要减少剂量。在实践中,Cellcept的剂量为500mg=Myfortic(麦考酚酯)360mg。

[0498] 在一个实施例中,根据以下剂量参数,可以施用麦考酚酯(**Myfortic®**剂型180mg片剂,360mg片剂)代替吗替麦考酚酯:

[0499] 开始延迟释放的片剂:每天两次400mg/m<sup>2</sup>/剂;最大剂量:720mg或BSA1.19-1.58m<sup>2</sup>时:每天两次,每次540mg,BSA>1.58m<sup>2</sup>时:每天两次,每次720mg。

[0500] 无静脉注射或混悬液可用。如果需要静脉注射或混悬液,则将药物转换为Cellcept。(Cellcept 500mg=Myfortic 360mg)。麦考酚酯可能引起与吗替麦考酚酯相同的骨髓抑制。

[0501] 在一个实施例中,如果不能耐受吗替麦考酚酯,则可以按以下方式施用硫唑嘌呤:

[0502] 开始2-4mg/kg/天,每天一次

[0503] 硫唑嘌呤引起骨髓抑制,并且基于WBC/ANC,可能需要降低剂量。静脉注射剂量等于口服剂量。

[0504] 在一个实施例中,类固醇可以作为甲基泼尼松龙(**Solu-Medrol®**)、泼尼松或泼尼松龙施用。

[0505] 术中开始使用静脉注射类固醇(作为诱导免疫抑制疗法),并且每8小时以静脉内5mg/kg/剂(最大125mg/剂) x 6剂的剂量在手术后继续进行。

[0506] 此后口服类固醇可以作为泼尼松片或泼尼松龙混悬液以3mg/ml开始。如果移植受体不能耐受口服免疫抑制治疗方案,则继续静脉注射甲基泼尼松龙。如果受体可以耐受口服药物,则转换为口服治疗。类固醇的示例性剂量范围是:

- [0507] 0-10kg,以2mg/kg/天开始,BID分开施用,每2天舍弃一次,保持每天6mg
- [0508] 0-30kg,以2mg/kg/天开始,BID分开施用(最大单剂量为30mg,见下文),以5mg/天每两天舍弃一次,然后保持每天10mg。
- [0509] >30kg,30mg BID x 4剂,25mg BID x 4剂,20mg BID x 4剂,15mg BID x 4剂,10mg BID x 4剂,然后开始每天15mg,以进一步由移植心脏病专家舍弃
- [0510] 基于活检结果,在移植后的第一个月内继续舍弃类固醇。如果出现排斥反应,则将由移植心脏病专家决定重新使用类固醇,并根据进一步的活检结果和患者的临床状况无限期继续使用类固醇。
- [0511] 第二免疫抑制方案中的其它药物包含以下:
- [0512] 西罗莫司(**Rapamune®**) (0.5mg、1mg、2mg胶囊):在诊断为同种异体冠状动脉血管病后或由移植心脏病专家临床指示后开始。
- [0513] 起始剂量:每天一次1mg/m<sup>2</sup>(最大剂量:3mg),如果难以达到足够的水平,则分为2个日剂量。
- [0514] 治疗水平目标是4-8,如果在两种药物上,则接受较低的他克莫司水平(相同的4-8范围)。
- [0515] 如果每12小时给药一次,则在最后一次给药后23-25小时或在最后一次给药后11-13小时得出低谷水平。
- [0516] 当开始西罗莫司时,终止麦考酚酯(**Cellcept®**, **Myfortic®**)、硫唑嘌呤。
- [0517] 开始新诺明(Bactrim)预防:可引起麻烦的口腔溃疡,并延迟伤口愈合。
- [0518] 普伐他汀(**Pravachol®**)-用于青少年/大龄儿童和患有CAV的患者
- [0519] 开始以每天一次0.2mg/kg/天的剂量施用(呈片剂形式,每天晚上可服用1/4、1/2或至多1-2片。
- [0520] 随着体重变化滴定剂量(最大剂量20mg/天)。
- [0521] 每8周监视一次LFT,CK。
- [0522] 如果出现关节或肌肉疼痛,则停止使用药物。
- [0523] 更昔洛韦IV-如果受体或供体为CMV IgG阳性,则用于预防CMV。
- [0524] 诱导治疗:每12小时静脉注射5mg/kg x 7-14天。
- [0525] 维持性治疗:每天静脉注射5mg/kg。
- [0526] 监测WBC和肾功能。
- [0527] 当可耐受时,过渡至口服缬更昔洛韦。
- [0528] 缬更昔洛韦(**Valcyte®**)-用于在所有CMV+受体或供体中预防CMV。
- [0529] 450mg片剂或50mg/ml混悬液。
- [0530] 4个月-16年:每日总口服剂量(mg)=[7x BSA x Cr清除率]。
- [0531] >16年:每天口服900mg。
- [0532] 在每次访问时监测CMV PCR。
- [0533] 甲氧苄啶-磺胺甲基噁唑(**Bactrim®**, **Septra®**):
- [0534] 单强度片剂80mg/400mg,双倍强度片剂160mg/800mg,混悬液每5ml为40mg/200mg。

- [0535] 为了预防PCP/Toxo,在出院前也开始口服。
- [0536] 1个月-12年:5-10mg/kg/天,TMP,BID分开施用,每周3次连续几天。
- [0537] >12年:每天口服80-160mg TMP或每周3次口服160mg TMP。
- [0538] 如本领域普通技术人员已知的,监测可能增加或降低他克莫司和环孢素水平的药物。
- [0539] 还监测与他克莫司和环孢霉素具有协同肾毒性的药物。
- [0540] 急性移植排斥的治疗
- [0541] 在一个实施例中,在注意到移植排斥的情况下按以下方式治疗受试者。
- [0542] 在一个实施例中,如果移植受体为0,1R级而无血流动力学损害:不需要治疗并且可以考虑舍弃类固醇。
- [0543] 如果患者表现出2R级细胞排斥而没有血流动力学损害,则遵循以下治疗方案:
- [0544] 优化维持性免疫抑制。
- [0545] 静脉内施用甲基泼尼松龙,15mg/kg/天x 3天(最大1000mg),可以分开每12小时给药一次或每24小时一次性施用。
- [0546] 在1到2周内重复活检,对于难治性细胞排斥,重复甲基泼尼松龙和任选的**Thymoglobulin®**。
- [0547] 如果排斥得到解决,则在1个月后(排斥后6周)重复活检,如果成功治疗了排斥反应,则恢复先前定义的活检方案。
- [0548] 对于难治性细胞排斥,重复甲基泼尼松龙并考虑胸腺球蛋白。
- [0549] 如果患者表现出2R级细胞排斥而没有血流动力学损害或表现出更高等级的排斥。
- [0550] 以更高的水平优化免疫抑制(10-15)。
- [0551] 静脉内施用甲基泼尼松龙,15mg/kg/天x 3天(最大1000mg)。
- [0552] 施用胸腺球蛋白。
- [0553] 如果有证据表明或担心抗体介导的排斥,则进行血浆置换。
- [0554] 如果患者在有或没有血流动力学损害的情况下表现出抗体介导的排斥:
- [0555] 静脉内施用甲基泼尼松龙,15mg/kg/天x 3天(最大1000mg)。
- [0556] 执行血浆置换x 5次(每天或隔天一次)。
- [0557] 每月静脉内施用IVIg,1-2gm/kg x 6个月。
- [0558] 移植物功能障碍或血液动力学损害的证据需要针对细胞排斥和抗体介导的排斥进行活检(当患者稳定时),包含C4d染色。在等待活检结果的同时开始甲基泼尼松龙(SoluMedrol),考虑开始胸腺球蛋白和血浆置换。
- [0559] 将3R级活检或血液动力学损害视为高等级的排斥反应。
- [0560] 静脉注射甲基泼尼松龙(SoluMedrol),15mg/kg/天x 3天(最大1000mg)。考虑强心药(inotrope)治疗、胸腺球蛋白;和/或血浆置换。
- [0561] 有或没有血液动力学损害的抗体介导的排斥。诊断:在外周血清样品中存在供体特异性抗体的情况下,鉴定心肌组织中的C4d沉积。针对AMR考虑类固醇、ATG提取法。
- [0562] 肾脏和胰腺免疫抑制管理
- [0563] 用于肾脏和胰腺移植手术的示例性诱导免疫抑制方案和维持性免疫抑制方案如下所示。在一个实施例中,移植受体接受贝拉西普作为维持性治疗,作为第二免疫抑制方案

的一部分。当受体是爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) Ig+, 无 DSA (供体特异性同种抗体) 时, 通常采用该方案; 不论绝对或计算的群体反应性抗体 (PRA) 如何, 移植均涉及负交叉匹配, 并且受体的年龄小于 70 岁, BMI  $\leq$  35。另外的考虑因素包含受体耐受诱导的能力 (如果受体不耐受, 则以其它方式接受胸腺球蛋白)。受体应该不具有特发性局灶性节段性肾小球硬化病 (FSGS) 的病史, 并且以前没有进行过非肾脏实体器官移植。该方案仅适用于肾脏移植。

[0564] 在一个实施例中, 所述诱导免疫抑制方案包括术中静脉内施用 500mg 甲基泼尼松龙。在三个小时内 (施用类固醇后 2 小时) 通过静脉输注施用 30mg 阿仑单抗。在之前的药物施用后, 施用贝拉西普 10mg/kg (TBW) (四舍五入至最接近的 12.5mg)。

[0565] 在一个实施例中, 维持性免疫抑制方案包括在 POD 4 时和第 2 周、第 4 周、第 8 周和第 12 周结束时的贝拉西普 10mg/kg TBW; 然后每月 5mg/kg (四舍五入至 12.5mg)。每天施用 2mg 西罗莫司, 2 周后达到第一低谷水平 (目标 8-10ng/ml)。通常不需要类固醇维持治疗。

[0566] 在受体不是贝拉西普候选者的低风险肾移植的实施例中, 诱导免疫抑制方案可以不包括诱导免疫抑制方案, 即, 诱导免疫抑制方案是任选的。维持性免疫抑制方案可以包括每 12 小时施用 1000mg 麦考酚酸和每 12 小时以 0.1mg/kg/天的剂量施用他克莫司 (最多 5mg)。

[0567] 在一个实施例中, 当受体是高风险的并且 ATG 禁忌的、体弱、年龄 > 70 并且具有近期感染和近期癌症活性的证据时, 诱导免疫抑制剂可以包括 20mg 巴利昔单抗, 以在手术室中并在术后 (POD) 第 4 天开始。维持性免疫抑制方案可以包括每 12 小时 1000mg 麦考酚酸和每 12 小时 0.1mg/kg/天的他克莫司 (最多 5mg), 类固醇剂量逐渐减少。

[0568] 在涉及高风险肾移植或肾脏和胰腺移植物的实施例中, 考虑以下参数。具有历史峰值 PRA > 30、历史供体特异性抗体 (DSA, 不考虑绝对或计算的 PRA) 的受体, 因推测的免疫学原因而导致早期移植丢失的第 2 次移植、第 3 次或更多次移植, 小儿整群 (成人) 受体, 应用肾脏/胰腺, 如果是 DGF 高危或高危活检, 则单独使用胰腺。在这种移植中, 诱导免疫抑制方案 (诱导疗法) 可以包括从手术室开始的胸腺球蛋白 1.5mg/kg IBW (四舍五入至最接近的 25mg) x 4 剂。

[0569] 在一个实施例中, 在受体具有零 PRA, 无自身免疫疾病和高 BMI 的情况下, 诱导免疫抑制方案可以包括从手术室开始的胸腺球蛋白 1.5mg/kg IBW (四舍五入至最接近的 25mg) x 4 剂。第二免疫抑制方案 (维持性治疗) 可以包括逐渐减少类固醇剂量, 如 OR 中的 500mg, 240mg POD 1、125mg POD 2、125mg POD 3、90mg POD 4, 以及从 POD 4 开始每 12 小时 1000mg 麦考酚酸和每 12 小时 0.1mg/kg/天的他克莫司 (最多 5mg)。

[0570] 在肾脏移植后进行胰腺移植的实施例中, 诱导免疫抑制方案可以包括从手术室开始的胸腺球蛋白 1.5mg/kg IBW (四舍五入至最接近的 25mg) x 4 剂。第二免疫抑制方案可以包括类固醇逐渐减少至最低每天 5mg, 从 POD 4 开始每 12 小时施用 1000mg 麦考酚酸和每 12 小时以 0.8mg/kg/天的剂量施用他克莫司 (最多 4mg)。

[0571] 对于涉及施用麦考酚酸的所有免疫抑制方案, 可以基于对患者和移植因素的评估来选择初始剂量。

[0572] 成人心脏移植免疫抑制管理

[0573] 在一个实施例中, 通常施用诱导免疫抑制方案。当诱导治疗的风险被认为超过了这种治疗的益处时, 可能会出现例外情况 (即, 诱导免疫抑制方案是可选的)。

[0574] 在一个实施例中, 当施用诱导免疫抑制方案时, 所述方案可以包括 Simulect® (巴

利昔单抗):在再灌注(交叉钳移除)后在OR中静脉内施用20mg,并在手术后第4天重复。在接受诱导免疫抑制治疗的患者中,应在术后48小时开始第二免疫抑制方案中施用的钙调神经磷酸酶抑制剂(CNI),但根据患者的肾脏状况可能会进一步延迟。可以在围手术期内施用类固醇,通常在全身麻醉诱导时静脉内施用500mg甲基泼尼松龙,并在再灌注(交叉钳移除)前静脉内施用500mg。

[0575] 在一个实施例中,所述维持性免疫抑制方案(手术后维持性免疫抑制治疗),所述方案可以包括类固醇,例如,每8小时静脉注射125mg甲基泼尼松龙x 3剂(再灌注后8小时开始),然后是泼尼松:从术后第2天开始每天两次0.5mg/kg;剂量以每2天每天两次,每次5mg减至每天两次,每次10mg(或每天20mg),并维持此剂量至移植后30天。第二免疫抑制方案还可以包括钙调神经磷酸酶抑制剂(CNI),例如,他克莫司/FK506/**Prograf®**(优选药剂):每12小时口服1mg。将剂量滴定至10-15ng/ml的低谷目标水平。在5剂钙调神经磷酸酶抑制剂后,进行典型的剂量调整,以建立稳态;最初监测CNI的每日水平,以评估CNI毒性。

[0576] 在替代性实施例中,每12小时以100mg(1.5到5mg/kg)的剂量通过口服施用环孢素/CyA/**Neoral®**。通常将剂量滴定至33ng/ml的低谷目标水平。维持性免疫抑制方案还可以包括抗增殖剂,如口服1,000到1,500mg吗替麦考酚酯(**Cellcept®**),并调整剂量以维持WBC计数>3,000。可替代地,抗增殖剂可以是麦考酚酯(**Myfortic®**)360mg-720mg,每天口服施用两次,并调整剂量以维持WBC计数>3,000。在另一个实施例中,抗增殖剂是硫唑嘌呤(**Imuran®**),其以每天2mg/kg的剂量口服施用,并调整剂量以维持WBC计数>3,000。

[0577] 在一个实施例中,维持性免疫抑制方案可以包括以每天2mg的剂量口服施用的西罗莫司(**Rapamune®**)(TOR-I)。通常将剂量滴定以维持4-12µg/ml的低谷。

[0578] 在一个实施例中,维持性免疫抑制方案可以包括逐渐减少类固醇的剂量,例如,第1个月,将降低剂量至每天口服15.0mg;第2个月,将剂量降低至每天口服12.5mg;第3个月,将剂量降低至每天口服10.0mg;第4个月,将剂量降低至每天口服7.5mg;第5个月,将剂量降低至每天口服5.0mg;第6个月,将剂量降低至每天口服2.5mg。≥ ISHLT 1R级且具有心肌细胞坏死迹象时,应重新评估类固醇锥度。在改善组织学排斥指标后可以恢复锥度。

[0579] 在一个实施例中,维持性免疫抑制方案可以包括以下另外的/辅助剂:甲氨蝶呤(MTX),每周两次以2.5到5mg施用,用于细胞介导的排斥。对于大于等于1R/2级的3次或更多次连续活检或对于2R/3A级的2次连续活检,应考虑使用MTX。

[0580] 成人肝脏和肠道免疫抑制管理

[0581] 在一个实施例中,可以在没有任何诱导免疫抑制方案的情况下进行没有肾功能障碍的肝移植,即,这种诱导免疫抑制方案是任选的。维持性免疫抑制方案可以包括,每12小时施用1g麦考酚酯以及每12小时施用2-3mg他克莫司,逐渐减少类固醇的剂量。典型的逐渐减少的类固醇剂量为:术中静脉注射500mg甲基泼尼松龙;术后6小时静脉注射一次甲基泼尼松龙250mg;POD 1时静脉注射一次甲基泼尼松龙180mg;POD 2时静脉注射一次甲基泼尼松龙90mg;POD 3时静脉注射一次甲基泼尼松龙60mg;POD 4时静脉注射一次甲基泼尼松龙30mg;POD 5-14每日口服20mg泼尼松;每2周减少2.5mg。在一个实施例中,可以在前2周中以每天20mg的量施用泼尼松龙的递减剂量;2-4周每天17.5mg;4-6周每天15mg;6-8周每天

12.5mg;8-10周每天10mg;10-12周每天7.5mg;12-14周每天5mg;14-16周内每天2.5mg。停在第16周。在某些情况下,将泼尼松龙舍弃至每天5mg,并保持一年。

[0582] 在一个实施例中,在存在需要HD或CVVHD/F的术前功能障碍的情况下进行保留肾脏的肝移植。在另一个实施例中,在存在术后肾功能不全的情况下进行保留肾脏的肝移植,其中POD 0-1时的血清肌酐水平 $>2\text{mg/dL}$ 。

[0583] 在一个实施例中,诱导免疫抑制方案包括每48小时胸腺球蛋白 $1.5\text{mg/kg}$ (四舍五入至最接近的 $25\text{mg}$ ),共4剂。在一个实施例中,针对全血细胞减少症或中性粒细胞减少症减少剂量。如果WBC计数为2-3或血小板为30-50,则使用 $1/2$ 剂量。如果 $\text{WBC}<2$ 或血小板 $<30$ ,则保持剂量。

[0584] 在一个实施例中,当指示术前用药时,可在ATG输注之前30-60分钟进行术前用药,VT或口服施用 $650\text{mg}$ 对乙酰氨基酚、 $25-50\text{mg}$ 苯海拉明;以及静脉注射 $40\text{mg}$ 甲基泼尼松龙(或可以使用上述锥度)。

[0585] 在一个实施例中,所述移植物是肠移植物或多内脏移植物(如肝移植物、肠移植物、胰腺移植物),其中所述受体具有高免疫学风险( $\text{PRA}>0$ 、先前怀孕或移植过离体小肠),或者其中免疫风险低但感染风险高,诱导免疫抑制方案可以包括如上所述的术前用药,并且也可能包括胸腺球蛋白 $1.5\text{mg/kg}$ (四舍五入至最近的 $25\text{mg}$ ,每24小时施用,总计 $6\text{mg/kg}$ )以及POD 0和4中的 $20\text{mg}$ 巴利昔单抗。维持性免疫抑制方案可以包括上述逐渐减少类固醇的剂量以及每12小时 $1\text{g}$ 麦考酚酯和每12小时 $1\text{mg}$  SL他克莫司(目标 $12-16\text{mg/ml}$ )。

[0586] 在某些实施例中,在患者接受吗替麦考酚酯(Cellcept)治疗时,他克莫司的施用剂量应达到5-8(肝脏)或12-17(肠、肝脏-肠)的目标水平。如果患者正在参加药物研究试验、出现排斥反应、肾功能不全或年龄增长,则可能会改变目标。

[0587] 在某些施用了吗替麦考酚酯(MMF,Cellcept)的实施例中,成人的标准剂量是每12小时 $1,000\text{mg}$ 。患有全血细胞减少症或中性粒细胞减少症的患者可按照以下规定减少剂量:WBC 2-3或血小板30-50:考虑施用 $1/2$ 剂量;对于 $\text{WBC}<2$ 或血小板 $<30$ ;考虑保持剂量。

[0588] 在某些涉及急性肝同种异体移植排斥治疗的实施例中,可以进行以下治疗:每天静脉注射甲基泼尼松龙 $500\text{mg}$ ,共3剂。如果肝功能检查未改善,则可以再加两次剂量(总共5剂,每天静脉注射 $500\text{mg}$ ),并在POD 3前夕或POD 4早晨进行重复的肝活组织检查。

[0589] 在某些实施例中,用SoluMedrol®或Thymoglobulin®治疗的先前CMV IgG为阴性的患者应在治疗开始时重新检查CMV IgG。

[0590] 肺移植物中的免疫抑制管理

[0591] 在某些实施例中,肺植入物中的免疫抑制管理遵循以下诱导和维持性免疫抑制方案。诱导免疫抑制方案可以遵循先前描述的诱导免疫抑制方案。维持性免疫抑制方案可以包括以下内容:

[0592] 钙调神经磷酸酶抑制剂:每12小时施用他克莫司,调整剂量以维持低谷他克莫司水平。参见下表5。

[0593] 表5:他克莫司的低谷水平

自移植以来的时间	临床因素	目标低谷
第 1 年	年轻, 高排斥风险, 肾功能正常	12-15 ng/ml
第 1 年	≥ 65 岁和/或 CKD	8-12 ng/ml
1-3 年	年轻, 复发排斥, 肾功能正常	10-14 ng/ml
1-3 年	2-3 期 CKD	8-10 ng/ml
1-3 年	3-4 期 CKD	6-8 ng/ml
> 3 年	2-3 期 CKD	6-8 ng/ml
> 3 年	4 期 CKD	6 ng/ml
施用坎帕斯 (Campath) 后		8 ng/ml 或更低, 取决于肾脏功能。

[0595] 每12小时施用环孢霉素,并调整剂量,以维持根据下表6的低谷CyA水平。

[0596] 表6:环孢霉素的低谷水平

自移植以来的时间	临床因素	目标低谷
第 1 年	年轻, 高排斥风险, 肾功能正常	250-300 ng/ml
第 1 年	≥ 65 岁和/或 CKD	150-200 ng/ml
1-3 年	年轻, 复发排斥, 肾功能正常	250-300 ng/ml
1-3 年	2-3 期 CKD	150-200 ng/ml
1-3 年	3-4 期 CKD	100- 150 ng/ml
> 3 年	2-3 期 CKD	100-150 ng/ml
> 3 年	4 期 CKD	75-125 ng/ml
施用坎帕斯 (Campath) 后		150 ng/ml 或更低, 取决于肾脏功能。

[0598] 移植后0-3个月的类固醇递减剂量,每天口服施用20mg;移植后3-6个月,每天口服施用15mg;移植后6-9个月,每天口服施用10mg;移植后>9个月,每天口服施用5mg。

[0599] 可以每天口服施用2mg/kg的硫唑嘌呤。重要的是要确保开始前正常的TMPT酶水平并遵循LFT/CBC。如果观察到白细胞减少症,则可以考虑调整剂量。

[0600] 可以以每天两次,每次1,000mg的常规剂量施用吗替麦考酚酯。心脏和肺移植的常规剂量为每天口服施用1,500mg。应遵循CBC,并且如果观察到白细胞减少症,则应考虑调整剂量。

[0601] 由于对吻合口裂开的担忧,西罗莫司通常在移植后的前3个月是禁止的。如果施用西罗莫司,则通常每天通过口服施用1mg,这根据低谷水平进行调整。例如,作为第3种药剂施用或保留CNI时,目标低谷为4-8ng/ml;作为CNI替代方案时,低谷水平为10-15ng/ml。

[0602] 实例

[0603] 实例1:胸腺内变异性研究。

[0604] 研究胸腺内变异性以确定来自胸腺的一部分的组织学测试结果是否可以被认为是同一胸腺的任何其它部分的组织学测试结果的代表。该测试的结果用于确定在常规批准发放测试和过程验证测试中应测试多少个样品。

[0605] 建立了组织学接受标准,如前所述,包含以下方面的评估:在第5-9天散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域;鉴定出至少1个赫氏小体;CK14染色散布在整个组织中;以及观察到完整核。

[0606] 对于这项研究,以定向方式将三个胸腺切片,并跟踪每个胸腺内的切片的位置。将切片在6孔板中培养,以追踪每个切片。如图5A所示进行切片。

[0607] 对于研究中的每个胸腺,切片专用于以下每个时间点进行分析:基线(第0天)、第5

天、第9天、第12天和第21天。

[0608] 针对每个胸腺在每个时间点培养5-11个切片。按照上述方法培养切片,每天更换培养基。将切片提交病理实验室进行H&E染色,并分析其同一性、效力和生存力。这项研究中的所有切片均符合上述组织学测试的批准发放接受标准,即:在第5-9天散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域;鉴定出至少1个赫氏小体;CK14染色散布在整个组织中;以及观察到完整核。

[0609] 除了评估每个切片是否满足批准发放接受标准外,病理学家还对每个H&E和AE1/AE3载玻片进行了更详细的综述。经培养的胸腺组织批次MFG-056的某些载玻片的图像显示在图6A-H中。注意到以下观察结果。

[0610] 源自相同供体胸腺的所有切片在每个时间点均满足接受标准。在不同的切片中,皮质区域彼此相似,并且髓质区域彼此相似。但是,观察到切片之间皮质和髓质的相对比例存在不同。

[0611] 作为培养时间的函数,源自相同胸腺的不同切片之间观察到的差异主要与坏死的量有关,主要是胸腺细胞的坏死量(随着培养时间的增加而增加)和残余胸腺细胞的数量(随着培养时间的增加而减少)。

[0612] 基于这些观察结果,来自胸腺的任何一个切片都代表整个胸腺。另外,组织切片在第5天的组织学外观反映了在随后的每个时间点(第9天、第12天和第21天)观察到的组织学外观。

[0613] 实例2:整个胸腺的时程研究。

[0614] 对于这项研究,按照SOP将五个胸腺切片并培养。在切片的当天,准备第一个切片、中间的切片和最后的切片用于免疫组织化学。将每个胸腺的其余部分切片并在6孔板中培养。将每个胸腺运用到以下时间点之一:基线(第0天)、第5天、第9天、第12天和第21天。参见图7中的第0天的胸腺切片,图8中的第5天的切片,图9中的第12天的切片以及图10中的第21天的切片。

[0615] 来自每个胸腺的切片的总数为21到62个切片。按照上述程序培养切片,每天更换培养基。将切片提交病理实验室进行H&E染色,并分析其同一性、效力和生存力。这项研究中的所有切片均符合组织学测试的批准发放接受标准,即:在第5-9天散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域;鉴定出至少1个赫氏小体;CK14染色散布在整个组织中;以及观察到完整核。

[0616] 除了评估每个切片是否满足批准发放接受标准外,病理学家还对每个H&E和AE1/AE3载玻片进行了更详细的综述。注意到以下观察结果。

[0617] 如上所述,来自相同供体胸腺的并且在相同时间点测试的所有切片都类似地满足该时间点的接受标准,皮质和髓质的相对量、残余胸腺细胞和/或坏死有所不同。

[0618] 注意到的差异是胸腺皮质相对于髓质的相对大小、形状、相对含量,坏死的数量,胸腺上皮的凝结和残余胸腺细胞的数量。

[0619] 另外,在不同时间点测试的来自不同供体的批次也在质量上彼此相似。观察到的差异与坏死的量(随着培养时间的增加而增加)和残余胸腺细胞的数量(随着培养时间的增加而减少)有关。

[0620] 对任何一个切片的组织学检查得出关于整个批次的可接受性的相同结论。基于这

些观察结果,来自胸腺的任何一个切片的相关特征都反映了整个胸腺的特征。另外,组织切片在第5天的组织学外观反映了在随后的每个时间点(第9天、第12天和第21天)观察到的组织学外观,但在随后的时间点观察到更多的坏死。图11是一个很好的例子,示出了从第0天到第21天,通过抗体AE1/AE3评估的上皮网络的相似性。

[0621] 实例3:胸腺组织的强制降解研究。

[0622] 在这项研究中,对胸腺组织切片进行处理以产生被认为是降解的或不能存活的组织切片。三个胸腺用于这些实验。从每个胸腺获取对样品。测试了表7中给出的处理条件。

[0623] 表7:强制降解处理条件

条件	处理的持续时间
对照	无处理
热冲击, 55°C	4 小时
冻结/解冻, -20°C	4 小时
室温, 20-24°C (在 BSC 中进行培养)	24 小时
[0624] 脱水 (在不存在培养基的情况下培养)	24 小时
	48 小时
营养耗竭 (在生理盐水中进行培养)	24 小时
	48 小时
渗透压变化 (在 10X PBS 中进行培养)	24 小时
DMSO 暴露 (在含 1% DMSO 的 TOM 中进行培养)	24 小时

[0625] 将装有切片的10cm培养皿放入Ziploc袋中,并置于55°C水浴中,即可完成热冲击。板放置在支撑物上并且没有被浸没。通过将10cm培养皿置于-20°C的冰箱中4小时,然后在环境中解冻来完成冷冻/解冻。

[0626] 在培养的第5天和第9天测试样品的组织学。在第21天也对一些样品进行了测试。这项研究中的所有切片均符合组织学测试的批准发放接受标准,即:在第5-9天散布在整个组织中的对角蛋白AE1/AE3呈阳性的区域;鉴定出至少1个赫氏小体;CK14染色散布在整个组织中;以及观察到完整核。

[0627] 除了评估每个切片是否满足批准发放接受标准外,病理学家还对每个载玻片进行了更详细的综述。注意到以下观察结果。

[0628] 暴露于冷冻/解冻或暴露于10X PBS的样品显示出最多的坏死,但是一些细胞仍然看起来完整并且满足生存力的组织学标准。有关暴露于10X PBS的实例,请参见图12。

[0629] 保持在室温下、经过脱水、在生理盐水或1%DMSO中孵育或经受热冲击的切片显示出较少的组织学变化。

[0630] 对于对样品,病理学家注意到以下观察结果。

[0631] 随着胸腺组织的培养,胸腺细胞逐渐丢失。但是,由于无法募集吞噬细胞来清除死亡细胞,这些死亡细胞可能会在培养的胸腺中长期存在。经历凋亡性细胞死亡的细胞核最初会凝结,并用苏木精染料染色更深(蓝色)。当这些细胞耗尽能量但不被吞噬时,其会失去膜的完整性并坏死。核溶解(核在坏死细胞中的溶解)通常在体内2-3天之内发生,但在胸腺培养过程中似乎发生得更慢。因此,在胸腺细胞核已经经历了核溶解的坏死细胞碎片中发现大片嗜酸性(粉红色)区域的情况并不少见。与活细胞相比,一些死亡的胸腺细胞保留了其核,其边缘参差不齐并且染色特性改变。

[0632] 随着胸腺细胞从组织中耗竭,胸腺上皮细胞变得更加可见。三维胸腺上皮(TE)网络通常通过连接的上皮细胞和/或(看似)分散的TE细胞的浅色和花边排列方式展示出来,这些连接在所检查的区域中不明显。由于在培养过程中胸腺细胞丢失,三维网络收缩。这导致残留的上皮细胞凝结,从而使囊下皮质上皮细胞层变厚,而髓样TE细胞变得更紧密地堆积。存活的TE细胞的核通常呈椭圆形,大于胸腺细胞的核,并具有由苏木精(蓝色)染色以及一个或多个核仁勾勒出的清晰界定的核膜。这些TE核通常看起来是“开放的”,这意味着其不会被苏木精染成深色。这符合它们是活的且具有代谢活性的解释,因为活性染色质(“常染色质”)不能结合苏木精染料。在许多TE细胞中核糖体(核糖体合成的位点)的存在进一步证实了它们是活的并具有代谢活性。来自第5天、第12天和第21天的对照切片的典型组织学外观分别如图8、9和10中所示。

[0633] 对于包含室温、脱水、1%DMSO和热冲击的处理条件,病理学家指出切片的外观与对照的外观没有显著差异。对于经过热冲击的样品,病理学家指出,热处理可能通过凝结阻止进一步降解的蛋白质来“固定”细胞。热处理已被用作包含胸腺在内的组织的固定剂。

[0634] 图12A和12B描绘了暴露于强制降解条件后的胸腺组织载玻片的组织学。图10描绘了对照胸腺组织切片在第21天的组织学外观。

[0635] 在这些时间点处,强制降解组织的总体组织学外观相似,但是在第21天残留的胸腺细胞较少(图12B)。图12B中的箭头表示了髓质区域中的代表性赫氏小体。代表性的表现出存活的胸腺上皮细胞由图12A和12B中的箭头指示。图12B中所示的皮质区域几乎完全由第21天的坏死淋巴细胞组成。左下角的标尺表示100 $\mu\text{m}$ 。

[0636] 实例4:胸腺组织的原料药批次分析

[0637] 下表8中示出了10批胸腺组织的批次分析数据。

[0638] 表8

批次	生产年份	传入的胸腺组织的重量 (g)	给予患者的最终剂量 (mm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )	对 RVT-802 执行的测试 <sup>a</sup>					
				外观 <sup>b</sup>	组织学 <sup>c</sup>	内毒素	无菌性 <sup>d</sup>	支原体 <sup>d</sup>	革兰氏染色
MLM428	2016	4.97	8,034	合格	合格	< 0.500 EU/mL	没有生长	没有生长	阴性
MLM434	2016	7.48	9,110	合格	合格	< 0.500 EU/mL	没有生长	没有生长	阴性
MLM435	2016	27.74	7,104	合格	合格	< 0.500 EU/mL	没有生长	没有生长	阴性
MLM437	2016	8.99	9,884	合格	合格	< 0.500 EU/mL	没有生长	没有生长	阴性
[0639] MLM438	2017	10.68	19,134	合格	合格	< 0.500 EU/mL	没有生长	没有生长	阴性
MLM444	2017	10.51	19,402	合格	合格	< 0.500 EU/mL	没有生长	没有生长	阴性
MLM447	2017	5.95	8,459	合格	合格	< 0.500 EU/mL	没有生长	没有生长	阴性
MLM449	2017	7.81	9,260	合格	合格	< 0.500 EU/mL	没有生长	没有生长	阴性
MLM450	2017	12.99	17,128	合格	合格	< 0.500 EU/mL	没有生长	没有生长	阴性
MLM452	2017	7.61	16,802	合格	合格	< 0.500 EU/mL	没有生长	没有生长	阴性

[0640] 关键:

[0641] (a) 根据制造时的规格对这些批次进行了测试。该表中列出的原料药测试结果也代表最终的药品测试结果。

[0642] (b) 外观规格无任何篡改或损坏容器的证据。

[0643] (c) 使用组织学测定法来鉴定同一性和效力。组织学规格 (在5-9天之间进行了测试) 如下:

[0644] (d) 对角蛋白呈阳性的区域散布在整个组织中。

[0645] i. 鉴定出至少1个赫氏小体

[0646] ii. CK14染色散布在整个组织中

[0647] iii. 观察到完整核

[0648] iv. 在第1天、第7天和第14天收集无菌样品和支原体样品。

[0649] 使用56个临床胸腺的数据,用于胸腺内变异性、胸腺间变异性和时程测试的8个胸腺以及经过强制降解的3个胸腺来产生当前的对照文库。库中的强制降解样品 (阴性对照) 是通过暴露于冷冻/解冻或10X PBS而降解的样品。完整的数据集导致14个不同的集群。所有强制降解样品均聚合在一起,并且没有临床样品或特征样品与强制降解样品聚合。

[0650] 实例5。

[0651] 实例5的整体实验设计如图20所示。呈现了外科手术和治疗方案的示意图。该图和下面的大部分文字来自准备提交发表的手稿:Kwun J、Li J、Rouse DC、Park J、Farris AB、Turek JW、Knechtle SJ、Kirk AD、Markert ML“经培养的胸腺移植促进对同种异体心脏移植物的供体特异性耐受性”。

[0652] 实验设计的示意图描绘了通过外科手术插入CTT诱导的原初T细胞重构、胸腺生成

和供体特异性耐受性。在心脏移植和手术插入CTT之前,对所有Lewis (LW) 大鼠进行胸腺切除术并通过抗CD5 mAb清除T细胞。将F1 (LWxDA) 大鼠的CTT和DA大鼠的心脏移植到经胸腺切除的LW受体中。通过渗透泵进行移植后,施用环孢霉素 (CsA),持续四个月。CsA停用后2至3个月,将第三方BN心脏移植到颈部。对照大鼠经历相同的程序,不同的是它们没有接受手术插入的CTT

[0653] 实例5证明,如下所述,植入免疫功能不全的大鼠模型中的CTT可以诱导对移植的实体器官的耐受性。进行了单倍体匹配的F1 (Lewis x Dark Agouti, LWxDA), 将CTT (如下所述培养) 以及血管化的错配DA心脏移植到Lewis大鼠中。

[0654] 在移植CTT之前,将受体的胸腺切除并去除T细胞。

[0655] 从心脏移植当天开始,施用环孢菌素4个月。对照组未接受CTT移植。停止免疫抑制后两个月,移植了CTT的受体的外周血中重新繁殖出原初CD4 (CD62L+CD45RC+) T细胞;对照大鼠则没有(图23)。即使在发育出新近胸腺迁出细胞CD4 (CD90+CD45RC+) T细胞之后,移植了CTT的受体也没有排斥DA心脏同种异体移植植物(图23)。由于缺乏功能性T细胞,对照没有排斥DA移植植物(图23)。

[0656] 为了证实供体特异性的无反应性,在最初错配的DA心脏移植后的第180天,移植了MHC错配的Brown Norway (BN) 心脏。接受CTT移植植物F1 (LWxDA) 的LW大鼠迅速排斥第三方BN心脏(平均排斥时间10天;n=5)(图27)。对照未排斥第三方心脏(n=5)。CTT的受体能够产生针对第三方BN供体的抗体,但不能针对DA胸腺供体产生抗体,这表明了体液供体特异性耐受性(图32A)。尸检时移植的CTT的免疫组织化学显示出功能性胸腺组织(图24)。综上所述,给予Lewis大鼠的F1 (LWxDA) CTTT导致对供体胸腺中表达的同种异体DA MHC的特异性耐受,从而导致撤消所有免疫抑制后DA心脏移植仍长期存活。

[0657] 材料和方法。

[0658] 动物模型

[0659] 在该实例5中,如下所述,从3日龄的F1 (Lewis x Dark Agouti大鼠幼崽) 采集并培养同种异体CTT(图17A和17B), 然后将其植入经胸腺切除的Lewis (RT-1<sup>l</sup>) 受体大鼠中,方式与先前所述的治疗患无胸腺cDGA的人类婴儿的方式相当。(Markert, ML等人,2008;Market, ML等人,2010)。

[0660] Lewis (RT-11) 和BN (RT-1n) 大鼠购自Charles River。DA (RT-1av1) 大鼠购自Envigo。F1 (LEW/DA;RT-11/av1) 由实验动物资源设施的杜克育种核心部的规程工作人员繁殖。Lewis受体接受了胸腺切除术,如以下文献所述:Rendell VR、Giamberardino C、Li J、Markert ML和Brennan TV,2014,“在成年大鼠中进行无创气管插管的完全胸腺切除术(Complete thymectomy in adult rats with non-invasive endotracheal intubation)”《可视实验杂志(J Vis Exp)》(94)。

[0661] 简而言之,用钝钳分离颌下腺和胸骨舌骨肌,以使覆盖气管的组织暴露。在胸骨柄中切一个1到1.5cm的切口。使用一个7cm的手摇式牵开器牵开胸骨柄和两半胸骨舌骨肌,以露出胸腺。用钝钳钳住胸腺并拔出。用3至4-0条单丝缝合线闭合胸骨的切口。将两滴2.5mg/ml布比卡因滴在切口上,并用三个或四个9-mm伤口夹闭合皮肤外层。

[0662] 所有经胸腺切除的大鼠均维持含有复方新诺明 (Septra) (PMI Nutrition International, LLC) 的饮食。为了在体内诱导T细胞耗竭,在胸腺切除术后第0天、第5天和

第10天腹腔内施用1mg抗CD5 mAb (OX19;BioXCell,NH),并从心脏移植的第0天(心脏移植物和CTTT的时间点)开始到4个月施用0.25mg/kg/d的环孢霉素泵进行抑制。所有大鼠的使用和维护均遵循Duke机构动物研究伦理委员会的指导方针和依从性。

[0663] 体外胸腺培养和CTT

[0664] 无菌采集三天大的新生F1 (LEW/DA) 大鼠幼崽的胸腺,沿纵向自然接缝切成四片,并转移到带有TOM培养基的组织培养皿中的无菌硝化纤维素滤膜(MF-Millipore, Millipore Sigma)上(图17B)。在含5%CO<sub>2</sub>的CO<sub>2</sub>培养箱中于37°C下培养胸腺组织,持续期望的时间长度(5到7天)。每天更换培养基。胸腺器官培养基(TOM)由以下组成:HAMS F12(生命科技公司),86.5%;Hepes(生命科技公司),25mM;L-谷氨酰胺(生命科技公司),2mM;胎牛血清(生命科技公司),10%;以及Pen-strep(生命科技公司),1x。移植当天,用新鲜培养基冲洗胸腺片,并用一根安全的缝合线(10-0单丝)将其移植到Lewis大鼠的肾囊下。参见图17C。所有操作均在无菌条件下在生物安全柜中进行。

[0665] 腹部和宫颈的心脏移植

[0666] 将完全MHC错配的DA (RT-1<sup>av1</sup>) 供体心脏移植到经胸腺切除的Lewis (RT-1<sup>l</sup>) 受体中。使用以下文献中描述的方法的改良技术进行腹部心脏移植:Schmid C、Binder J、Heemann U和Tilney NL,1994,“在大鼠中成功进行异位心脏移植 (Successful heterotopic heart transplantation in rat)”《显微外科手术 (Microsurgery)》15(4): 279-281。

[0667] 简而言之,在Euro-Collins溶液中短暂的冷缺血后,将供体心脏移植到受体的腹腔中。使用连续的9/0不可吸收单丝缝合线,将供体肺动脉和主动脉与受体下腔静脉和降主动脉吻合,其端侧为流入和流出血管以用于循环。通过渗透泵(型号2ML4,Alzet)施用环孢霉素A (CsA)。受体在胸腺移植后使用渗透泵接受环孢素 (CsA),大约2.5mg/kg/天。胸腺移植后4个月,当试验组的原初T细胞超过10%时,CsA被终止。将泵无菌装载,并通过外科手术皮下插入受体的背部中部区域。每月更换渗透泵,持续4个月。对于将完全MHC错配的BN (RT-1<sup>n</sup>) 第三方心脏移植到带有DA心脏的Lewis受体上,以改进的方式使用Heron等人所描述的宫颈血管化心脏移植方法 (Heron I.,1971,“用于在兔和大鼠中进行宫颈心脏移植的技术 (A technique for accessory cervical heart transplantation in rabbits and rats)”《病理微生物学学报 (Acta Pathol Microbiol Scand)》A 79(4):366-372)。

[0668] 在6到7个月时,将第3方BN心脏移植到颈部。简而言之,通过从上颌到剑突的纵向切口,将第三方心脏移植到宫颈区域的右侧。将供体肺动脉和颈外静脉端到端吻合,并通过套囊技术将主动脉吻合到右颈总动脉。通过每日触诊监测移植物,并随后在处死时通过剖腹术证实移植物。在排斥(停止跳动)当天或指定时间点处死动物。

[0669] 流式细胞仪分析和监测DSA

[0670] 从颅腔静脉获得外周血,并用抗体染色。为了分析原初和新近胸腺迁出细胞,使用了以下的组合:抗大鼠CD3 APC (BD Biosciences);抗大鼠CD4 APC-Cy7 (Biolegend);抗大鼠CD8a V450 (BD);抗大鼠CD45 PE-Cy7 (BD);抗大鼠CD45RC-PE (BD);抗大鼠CD62L FITC (BD);和抗大鼠CD90 BV 510 (Biolegend)。为了评估T细胞、B细胞和NK细胞的百分比,使用了以下的组合:抗大鼠TCR FITC (BD);抗大鼠CD4 APC-Cy7 (Biolegend);抗大鼠CD8aV450 (BD);抗大鼠CD45 PE-Cy7 (BD);抗大鼠CD45RA PE (Invitrogen);抗大鼠NKR-P1A-APC

(Invitrogen)。为了区分宿主与供体,使用了以下的组合:抗大鼠TCR APC (Biolegend)、抗大鼠CD45 PE-Cy7 (BD);MHC I类RT1Aa (圣克鲁斯生物技术 (Santa Cruz Biotechnology))。还针对非偶联的MHC I类RT1Aa使用了山羊抗小鼠IgG二抗 (Invitrogen)。通过连续收集的受体血清样品与DA供体或BN第三方大鼠的流式交叉匹配,评估供体特异性同种抗体 (DSA)。将FITC缀合的泛大鼠免疫球蛋白抗体添加至样品中,并在洗涤后进行孵育。用APC缀合的抗CD3将T细胞染色。在LSR fortessa (Beckman Coulter) 上分析样品。

#### [0671] 尸体剖检

[0672] 当测试组排斥宫颈BN心脏时,在CTTT后8个月在尸体剖检时评估胸腺移植物和所有心脏。如所预测的,不表达DA MHC的受体来源的T细胞出现在胸腺移植受体的外周血中 (图21)。

#### [0673] 组织学、免疫组织化学 (IHC) 和形态学分析

[0674] 将来自肾囊下面的所有经培养的胸腺和CTTT样品冷冻在OCT (最佳切割复合物; Tissue Tek) 中。对照胸腺组织取自新生至5日龄的幼鼠。对四到五毫米的切片进行CD3 (多克隆; Dako) 染色、Ki-67 (克隆: SP6; Thermo) 染色、CK (多克隆; Invitrogen) 染色。使用Olympus DP-70数码相机系统的Olympus Vanox AH-3显微镜获得IHC图像。移出的心脏从心室中层至基底进行连续切片 (5 $\mu$ m)。进行H&E染色以进行常规检查并对排斥进行排级。用多克隆抗CD3 (Dako) 染色评估了移植物浸润性T细胞。用Aperio ScanScope XT (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA) 扫描整个移植物的载玻片。

#### [0675] 统计分析

[0676] 通过GraphPad Prism (GraphPad Software 7.0, San Diego, CA) 分析实验结果。移植物存活差异的对数秩检验和学生t检验或Mann-Whitney U检验用于其它数据。所有数据均以平均值 $\pm$ SD表示。 $p$ 的值小于0.05被认为具有统计学意义。

#### [0677] 结果

[0678] 组织学分析 (图18C和18D (放大100x) 和图19C和19D (放大600x)) 显示,培养后胸腺中Ki67+细胞、CD3+细胞减少,类似于培养用于患者的胸腺组织后的变化 (Markert ML等人, 2008) “使用同种异体移植物活检评估胸腺移植后的胸腺生成”《免疫学杂志》180 (9) :6354-6364)。与经培养的人类胸腺相同,基于细胞角蛋白 (CK) 染色,胸腺上皮细胞 (TEC) 网络在大鼠的经培养的胸腺组织中得以保存 (图18B (放大100x) 和图19B (放大600x))。

[0679] 如所预测的,不表达DA MHC的受体来源的T细胞出现在胸腺移植受体的外周血中 (图21)。CTT移植后,在第26天、第55天、第97天和第253天,在图21的右下象限中看到了不断重新繁殖的受体型T细胞。

#### [0680] 移植的同种异体胸腺组织的免疫组织化学分析。

[0681] 图23描述了在T细胞耗竭以及胸腺和心脏移植之后循环性T细胞的重新繁殖。所有动物在T细胞耗竭后均显示循环性T细胞的显著减少。插入了CTT的心脏同种异体移植受体 (蓝色/虚线) 显示循环性T细胞逐渐重新繁殖。没有插入CTT的动物也表现出一定程度的循环性T细胞 (红色/虚线)。然而,在插入了CTT的动物中,原初和新近胸腺迁出细胞CD4和CD8 T细胞显著增加 ( $p < 0.01$ ), 而对照动物则没有显示循环性原初或RTE CD4和CD8 T细胞。

[0682] 在移植后8.5个月移出的胸腺显示出呈阳性的细胞角蛋白染色 (图22A) 以及与天然胸腺相似的T细胞染色 (图22B)。原始放大倍数 $\times 400$ 。

[0683] 插入了CTT的动物显示,外周血中的原初(CD62L+CD45RC+) CD4和CD8T细胞以及新近胸腺迁出(RTE) T细胞的重新繁殖显著增加,而没有胸腺移植物的对照组显示出低水平的循环性原初CD4和CD8 T细胞并且未显示循环型RTE CD4和CD8 T细胞(图23)。移植前各组之间的总循环性CD3 T细胞数量无明显差异。如预期的那样,与未移植CTT的对照动物相比,具有CTT移植物的LW受体显示循环性CD4和CD8 T细胞的数量显著增加(图23)。

[0684] 图24中描绘了在第180天,在心脏同种异体移植受体的受体中,在肾囊下植入的经培养的胸腺组织。

[0685] 组织学示出了与肾脏组织分开的不同结构(原始放大倍数,x20)。植入的经培养胸腺组织显示出正常的胸腺结构(H&E)、存活的T细胞(CD3)、T细胞增殖(Ki67)和赫氏小体的形成(黑色箭头),在上皮细胞上带有花边图案(细胞角蛋白),这证实了胸腺的生存力与胸腺生成(图24B)。原始放大倍数,x 200。(数据表示为平均值±SD;每组n=8-9只动物;学生t检验,\*P<0.05;\*\*P<0.01;\*\*\*P<0.001,\*\*\*\*P<0.0001;NS,不显著(p>0.05))。

[0686] 另外,在第180天移出的CTT的免疫组织学分析显示出正常的胸腺组织学、存活的T细胞(CD3)、T细胞增殖(Ki67)和CK的花边图案,以及通过外科手术插入CTT在TEC上形成赫氏小体(箭头)(图24B)。这些观察结果证实了在接受同种异体心脏移植的动物中,移植的胸腺的生存力和功能(胸腺生成)。

[0687] 综上所述,移植有CTT的大鼠在心脏同种异体移植受体中显示出胸腺生成和原初T细胞发育。

[0688] 预期由于在CTT中表达DA和LW的T细胞发育,因此与DA供体反应的T细胞不会发育。

[0689] 评估DA心脏的排斥证据。图25显示,具有DA心脏移植植物并且未经任何免疫抑制处理的LW大鼠在10天内排斥DA心脏移植(DA对照,空心方块)。然而,即使在发展了RTE(CD90<sup>+</sup>CD45RC<sup>+</sup>) T细胞之后,具有通过外科手术插入的CTT的LW受体也没有排斥(不停止搏动)DA心脏同种异体移植植物(n=8,实心三角形)。出乎意料的是,没有插入CTT的LW对照动物也没有排斥DA心脏移植植物(n=9,上下颠倒的实心三角形)。两组在整个研究期间(第180天)均表现出良好的搏动质量。由于连续的移植植物搏动并不一定意味着没有排斥反应,因此在停止免疫抑制后两个月(即,在第3方BN宫颈心脏移植之前)处死两只受体大鼠,以确认没有排斥反应。两只动物的心脏同种异体移植植物(DA心脏)均显示出最小的单核细胞浸润(图26A,插入了CTT;图26B,没有插入CTT),没有2004年国际心肺移植协会(ISHLT)分级的排斥迹象(图26C)。

[0690] Kaplan-Meier存活曲线(图25)显示,与具有DA心脏移植植物且没有免疫抑制的LW大鼠(DA对照)相比,有或没有CTT的动物和同基因对照(将LW心脏移植到LW大鼠中)的移植植物存活显著延长。从有或没有CTT的动物中移出的移植植物在第180天时的代表性扫描图像显示在图26A和26B中。图像改编自整个载玻片扫描。

[0691] ISHLT分级显示,来自具有CTT的受体与没有CTT的受体的心脏同种异体移植植物的排斥等级之间没有差异(每组n=3-4)(图26C)。Mann-Whiney U检验,\*P<0.05;NS,不显著(p>0.05)。

[0692] 基于CTTT后原初T细胞的重建,我们认为具有CTT的动物丧失了其供体反应性T细胞库,而没有胸腺移植的动物并未完全重构其T细胞群(一般的低反应性)。

[0693] 对第三方血管化心脏移植的同种异体反应性

[0694] 为了证实与一般的低反应性相反实现了供体特异性的无反应性(耐受性),在DA心脏移植后6至7个月(第180天到第210天)在两组动物中均进行了另外的完全MHC失配的BN心脏移植。

[0695] 插入有CTT的LW大鼠(实心三角形,图27)迅速排斥(停止搏动)第三方BN心脏( $n=5$ ,中值存活时间(MST)= $10\pm 1.0$ 天)。然而,未插入CTT的对照LW动物并未排斥第三方心脏( $n=6$ , $MST\leq 38.5\pm 8.9$ 天),这可能是由于缺乏任何同种异体反应性T细胞所致。

[0696] 由于缺乏对第三方心脏的排斥,组织学分析证实,插入了CTT的动物(倒置的实心三角形,图27)显示出心脏同种异体移植物中单核细胞浸润的增加(图28A),而未插入CTT的动物显示出原始的BN心脏同种异体移植物(图28B)。具有CTT的受体迅速排斥BN心脏( $MST=10\pm 1.0$ 天)(实心正方形,图29),而没有CTT的受体并未排斥第三方BN心脏(虚线三角形,图29)。BN对照(实心圆,图29)显示LW大鼠排斥BN心脏。同基因对照(空心圆,图29)显示LW大鼠缺乏对LW心脏的排斥。Kaplan-Meier存活曲线(图27)显示了移植物存活的显著差异。移出的BN心脏移植物在排斥时或移植后46天的代表性扫描图像分别显示在图28A和28B中。来自插入了CTT的动物的BN心脏移植物显示出严重的单核细胞浸润(图28A),而来自未插入CTT的动物的BN心脏移植物并未显示出排斥迹象(图28B)。图像改编自整个载玻片扫描。

[0697] 与同基因对照或未插入CTT的大鼠相比,来自插入了CTT的大鼠(实心正方形,图29)的移出的BN心脏的组织学分析(ISHLT分级)显示3R级排斥出,炎性细胞浸润显著增加(阴影三角形,图29)。与没有CTT的动物的BN心脏相比,ISHLT分级显示,具有CTT的动物的BN心脏的排斥分级显著更高(每组 $n=3-5$ )。Mann-Whiney U检验,\* $P<0.05$ ;\*\* $P<0.01$ ;NS,不显著( $p>0.05$ )。

[0698] 还应注意的是,插入了CTT的受体的宫颈BN心脏大大增大了(图30A),而腹部DA心脏比天然心脏小(图30A)。与具有CTT的受体的BN心脏相比,未插入CTT的受体的BN心脏的大小没有增加(图30B)。

[0699] 第三方心脏中的选择性T细胞浸润,但在共享CTT的DA MHC的DA心脏中没有。

[0700] 在这个大鼠心脏移植模型中,使用两种常规方式来定义移植排斥:心脏搏动/停止测量和ISHLT人类分级系统。前者对低等级的排斥不敏感,而后者对高等级的排斥不敏感。结果,在第180天时在三只大鼠的DA心脏中测量了炎性细胞浸润,并在7-8个月处死时在5只大鼠的BN心脏中测量了炎性细胞浸润。因此,在第180天时在三只大鼠的DA心脏中测量了炎性细胞浸润,并在7-8个月处死时在5只大鼠的BN心脏中测量了炎性细胞浸润。

[0701] 用T细胞耗竭、外科手术插入CTT和施用CsA治疗四个月的大鼠在T细胞重新繁殖后未显示DA心脏中炎性细胞浸润的水平增加(图31A)。与具有CTT的大鼠或没有CTT的大鼠相比,DA对照移植物(在无免疫抑制的LW大鼠中)显示DA心脏中免疫细胞的移植物浸润显著增加。插入有CTT的动物在第三方心脏同种异体移植物(BN心脏)中显示出大量炎性细胞浸润(图31B)。与没有CTT的动物的BN移植物相比,BN对照移植物(在无免疫抑制的LW大鼠中)和具有CTT的受体的BN移植物显示出明显升高的炎性细胞浸润。未插入CTT的大鼠由于免疫功能低下,在BN心脏中未见浸润(图31B,阴影三角形)。

[0702] 用免疫组织化学评估T细胞浸润,并证实了在插入了CTT的动物的BN(右图,图31C)心脏中存在选择性T细胞浸润而在DA(中图,图31C)心脏中不存在选择性T细胞浸润,并且在未插入CTT的动物的两个心脏中均缺乏T细胞浸润(图31D)。在BN心脏排斥时,用天然心脏采

集来自DA大鼠和BN大鼠的心脏同种异体移植物。总体而言,在插入了CTT的受体中,天然心脏和DA心脏(POD 196)未显示T细胞显著增加,而BN心脏(POD14)显示出大量T细胞。图像改编自整个载玻片扫描。每组总共3-5只动物被分析;学生t检验,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; NS,不显著( $p > 0.05$ )。

[0703] 这些数据证实,对于接受CTT的组,T细胞浸润仅发生在第三方BN移植物中,而不发生在与所移植的胸腺共享MHC的(DA)移植物中,这可能是由于缺乏针对(DA心脏)供体抗原的T细胞库(通过负选择)。

[0704] 胸腺移植后针对供体抗原的体液反应

[0705] 评估抗供体抗体的反应,以确定在经胸腺切除的LW大鼠中注意到的同种异体T细胞无反应以及随后的LWxDA移植和CTT的手术插入是否与针对供体DA MHC的体液耐受性相关。收集连续收集的受体血清样品,并将其与DA大鼠和BN大鼠的PBMC进行流式交叉匹配。情况下接受DA心脏移植物或BN心脏移植物的无免疫抑制的动物产生了针对其供体(分别为DA或BN)的抗体。如图32A所示,具有同基因心脏同种异体移植物的动物不产生针对DA或BN MHC的抗体(左栏的水平阴影峰,DA在顶部,BN在底部)。通过T细胞流式交叉匹配测量的移植后供体特异性同种抗体(抗DA抗体和抗BN抗体)的代表性直方图显示在图32A中。具有或不具有CTT的受体并未产生任何针对DA抗原的抗体(图32A的顶部行,中间和右手栏),而具有CTT的动物能够产生针对BN抗原的抗体(底部行,中间图,图32A)。来自未进行免疫抑制的DA心脏移植受体的血清样品和来自未进行免疫抑制的BN心脏移植LW受体的血清样品分别用作抗DA抗体(顶部行,左图,粗线)或抗BN抗体(底部行,左图,虚线)的阳性对照(DA对照和BN对照)。

[0706] 有趣的是,与T细胞低反应性类似,在具有或不具有CTT的动物中未检测到抗DA Ab(图32B)。在插入了CTT的LWxDA动物中很容易检测到抗BN Ab,但在未插入CTT的动物中却没有检测到, $p < 0.01$ (图32C)。没有CTT的动物通常是免疫缺陷的。具有CTT的动物对DA具有特定的耐受性。

[0707] 综上所述,胸腺共移植导致对供体胸腺中表达的同种异体DA MHC的特异性耐受性,因此通过防止供体特异性抗DA T细胞库的发展以及防止供体(DA)特异性体液反应,DA心脏移植物长期存活。通过对第三方BN心脏的快速排斥以及针对BN供体细胞的同种抗体反应,在这些大鼠中证明了免疫能力。

[0708] 可以从DiGeorge异常患者的临床经验中得出对上述治疗的进一步支持。

[0709] 患者1是出生时患有完全DiGeorge异常的儿童。所述患者出生时没有T细胞。患者1的主要问题是严重的甲状旁腺功能低下,从而导致因低钙血症而多次住院治疗。患者1在同一天接受了经培养的胸腺组织移植物(CTT)和亲本甲状旁腺移植物。在一项小型临床试验中,另外三名患者接受了胸腺加亲本甲状旁腺。患者1在生命的4个月内接受了两个移植物。尽管患者1没有T细胞,但按照方案在移植前向患者1施用了RATGAM以进行免疫抑制。并未给予其它免疫抑制。患者1出现了原初T细胞和正常增殖性T细胞对有丝分裂原的反应。在试验中所有同时接受胸腺和甲状旁腺的四名患者的甲状旁腺激素水平正常。患者1是唯一能够长期(10年)停止补钙的受试者。在其它三名患者中,一名患者在一年前死于肺部疾病,另外两名患有完全DiGeorge异常的患者必须在大约一年后恢复补钙。患者1是唯一在所有时间点对亲本甲状旁腺供体具有阴性混合淋巴细胞反应(MLR)的受试者。从第一个测定开始,其

它三名受试者的MLR呈阳性。

[0710] 患者1维持甲状旁腺功能的可能解释是,患者1的甲状旁腺供体具有与受体II类等位基因(下图中的浅灰色阴影)或胸腺供体II类等位基因(下表中的深灰色阴影)相匹配的HLA-II类等位基因。

[0711] 患者1中的干细胞在胸腺中发育成胸腺细胞。

[0712] 来自患者1的树突状细胞迁移至胸腺并删除与患者1DC上的MHC紧密结合的T细胞。存在对浅灰色阴影的等位基因的耐受性。参见表9。

[0713] 胸腺供体的胸腺上皮细胞也删除与其紧密结合的胸腺细胞(深灰色阴影)。这是对深灰色等位基因耐受的机制。

[0714] 表9

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DQA1	HLA-DPB1
患者 1	24:02	08:01	07:02	03:01	02:01	nt	04:01
	02:01	44:05	02:02	16:01	05:02	nt	04:02
[0715] 甲状旁腺供体	02:01	44:05	02:02	16:01	05:02/05	01:02	04:02
	24:01	<b>35:03</b>	<b>04:01</b>	<b>11:04</b>	03:01/19	05:05/09	<b>04:02</b>
胸腺供体	02:01	44:03	02:02	<b>11:01</b>	03:01	05:05/09	<b>04:01</b>
	32:01	40:02	14:03	04:05	03:03	03:02/03	02:01

[0716] 值得注意的是,可以看到甲状旁腺供体中有一个HLA-B等位基因和一个HLA-C等位基因与受体或胸腺供体都不匹配。我们不明白为什么不排斥甲状旁腺。但是,经过10年后,给儿童接种了活麻疹/腮腺炎/风疹疫苗。甲状旁腺功能在两周内被破坏,患者1恢复补钙。

[0717] 我们得出结论,活疫苗激活了患者1中的CD8 T细胞。三分之一的CD8 T细胞具有固有的同种异体反应性。同种反应性CD8 T细胞将对甲状旁腺供体中错配的HLA-B和C等位基因发生反应(表中放大粗体的HLA-B和HLA-C等位基因)。

[0718] 利用来自该患者的数据,很明显,需要匹配I类和II类两者以诱导长期耐受性。另外,从甲状旁腺供体与胸腺供体之间的DRB1和DPB1中的第2区错配(粗斜体)可以看出,第2区错配可以是允许的,并且可以形成耐受性。具体地说,这些第2区错配并未导致移植物功能的丧失;这些错配是允许的。该儿童的T细胞数量和功能以及正常的免疫球蛋白水平都很高。然而,由于亲本甲状旁腺被排斥,患者1仍然需要补钙。

[0719] 前述实施例和优点仅是示例性的,并且不应被解释为限制本发明。本教导可以容易地应用于其它类型的设备、实验和外科手术。而且,本发明的实施例的描述旨在是说明性的而非限制权利要求书的范围。对于本领域技术人员而言,许多替代、修改和变化将是显而易见的。

[0720] 应理解,虽然已经结合本发明的具体实施方式对本发明进行了描述,但前面的描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其它方面、优点以及修改都处于以下权利要求的范围内。

[0721] 本申请中讨论的参考文献,出于其预期目的通过引用整体并入本文,基于其上下文是清楚的。

[0722] 本文所引用的所有专利、专利申请和出版物均通过引用整体并入本文。这些出版物的公开内容通过引用到本申请中整体并入本文。

[0723] 本文所引用的每个和所有专利、专利申请、出版物和登录号的公开内容均通过引

用整体并入本文。

[0724] 尽管已经参照各个实施例公开了本公开,但是显而易见的是,在不偏离本公开的真实精神和范围的情况下,所属领域的其他技术人员可以设计出其它实施例和这些实施例的变体。所附权利要求旨在被理解为包含所有这类实施例以及等同变体。

[0725] 前述书面说明书被认为足以使本领域技术人员能够实践实施例。前述描述和实例详述了某些实施例并描述了发明人设想的最佳模式。然而,应当理解,无论前述内容在文本中的详细程度如何,实施例可以以多种方式实践,并且应该根据所附权利要求和其任何等同物来解释。

[0726] 参考文献

[0727] Ahonen,P.,1985,“自身免疫性多内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良 (APECED):常染色体隐性遗传 (Autoimmune polyendocrinopathy-candidosis-ectodermal dystrophy (APECED):autosomal recessive inheritance)”《临床遗传学 (Clinical Genetics)》,27:535-542 Ahonen,P.等人,1987,“患有自身免疫性I型多腺疾病并有肾上腺皮质衰竭和卵巢衰竭风险的患者的肾上腺和甾体细胞抗体 (Adrenal and steroidal cell antibodies in patients with autoimmune polyglandular disease type I and risk of adrenocortical and ovarian failure)”《临床内分泌学与代谢杂志 (J.Clin.Endocrinology and Metabolism)》,64:494-500。

[0728] Ahonen,P.等人,1987,“患有自身免疫性I型多腺疾病并有肾上腺皮质衰竭和卵巢衰竭风险的患者的肾上腺和甾体细胞抗体 (Adrenal and steroidal cell antibodies in patients with autoimmune polyglandular disease type I and risk of adrenocortical and ovarian failure)”《临床内分泌学与代谢杂志》,64:494-500。

[0729] Ahonen,P.等人,1988,《临床内分泌学与代谢杂志》,66,1152-1157。

[0730] Ahonen,P.等人,1990,“一系列68名患者的自身免疫性多内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良 (APECED) 的临床变化 (Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68patients)”《新英格兰医学杂志》322:1829-1836。

[0731] Arulanantham,K.等人,1979,“家族性念珠菌病内分泌病综合征中免疫调节缺陷的证据 (Evidence for Defective Immunoregulation in the Syndrome of Familial Candidiasis Endocrinopathy)”《新英格兰医学杂志》300:164-168。

[0732] Blizzard,R.M.和Kyle M.,1963,“对艾迪生氏病中肾上腺抗原和抗体的研究 (Studies of the Adrenal Antigens and Antibodies in Addison's Disease)”《临床研究杂志 (J.Clin.Invest.)》42:1653-1660 Boehm T,Takahama Y.2014.“胸腺发育和T淋巴细胞的选择”海德堡:施普林格出版社。

[0733] Boehm T,Takahama Y.2014.“胸腺发育和T淋巴细胞的选择”海德堡:施普林格出版社。

[0734] CFR标题21;1271人体细胞、组织以及基于细胞和组织的产品。

[0735] Chinn I,Devlin B,Li YJ等人,2008.“完全DiGeorge异常中对同种异体胸腺移植物的长期耐受性”《临床免疫学》126 (3):277-281。

[0736] Heron I.,1971,“用于在兔和大鼠中进行宫颈心脏移植的技术”《病理微生物学学

报》A 79(4):366-372。

[0737] Hong R、Schulte-Wissermann H、Jarrett-Toth E、Horowitz SD、Manning DD,“经培养的胸腺碎片的移植II.裸鼠中的结果”《实验医学杂志》149(2):398-415。

[0738] Li B、Li J、Hsieh CS、Hale LP、Li YJ、Devlin BH、Markert ML.2009,“用于移植的经培养的胸腺组织的表征,着重于甲状腺组织特异性基因的异位表达”2009,《免疫研究》2009,44(1-3):71-83。

[0739] Li B、Li J、Devlin BH、Markert ML.2011,“出生后人胸腺移植后的胸腺微环境重建”《临床免疫学》九月;140(3):244-59。

[0740] Krohn,K.等人,1992,“通过分子克隆将与艾迪生氏病相关的自身抗原鉴定为类固醇17 $\alpha$ -羟化酶(Identification by molecular cloning of an autoantigen associated with Addison's disease as steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase)”《柳叶刀(Lancet)》339:770-773。

[0741] Markert ML、Kostyu DD、Ward FE、McLaughlin TM、Watson TJ、Buckley RH、Schiff SE、Ungerleider RM、Gaynor JW、Oldham KT、Mahaffey SM、Ballow M、Driscoll DA、Hale LP、Haynes BF. “移植部分HLA匹配的出生后胸腺后成功形成嵌合的人胸腺同种异体移植物(Successful formation of a chimeric human thymus allograft following transplantation of partially HLA-matched postnatal thymus)”1997,《免疫学杂志》,158:998-1005。

[0742] Markert ML、Boeck A、Hale LP、Kloster AL、McLaughlin TM、Batchvarova MN等人,“完全DiGeorge综合征中的胸腺组织移植”1999,《新英格兰医学杂志》341(16):1180-9。

[0743] Markert ML等人,2004,“具有免疫抑制的出生后胸腺移植用于治疗DiGeorge综合征”《血液学》104(8):2574-2581。

[0744] Markert ML、Devlin BH、Alexieff MJ、Li J、McCarthy EA、Gupton SE等人,“对54名患有完全DiGeorge异常的患者进行的胸腺移植方案的回顾:44次连续移植的结果”2007,《血液学》,109(10):4539-47。

[0745] Markert ML等人,2008,“使用同种异体移植物活检评估胸腺移植后的胸腺生成”《免疫学杂志》180(9):6354-6364。

[0746] Markert ML、Devlin BH、McCarthy EA,2010,“胸腺移植”《临床免疫学》,135(2):236-46。

[0747] Markert ML、Devlin BH、McCarthy EA.第84章“胸腺重建”2013.在以下文献中:编辑者Fleisher TA、Shearer WT、Schroeder HW、Frew AJ、Wey和CM《临床免疫学》(第四版)伦敦第1032-8页。

[0748] Markert ML.2014. “胸腺移植”《斯蒂姆免疫缺陷》,编辑者Sullivan KE和Stiehm ER(学术出版社),第1版,第1059-1067页。

[0749] Markert ML、Watson TJ、Kaplan I、Hale LP、Haynes BF,“器官培养过程中的人胸腺微环境”1997,《临床免疫学与免疫病理学》,一月;82(1):26-36。

[0750] Neufeld,M.等人,1981,“与不同的多腺体自身免疫性(PGA)综合征相关的两种类型的自身免疫性艾迪生氏病(Two types of autoimmune Addison's disease associated with different polyglandular autoimmune (PGA) syndromes)”《医学(Medicine)》60:

355-362。

[0751] Parker W、Yu PB、Holzknecht ZE、Lundberg K、Buckley RH、Platt JL,“‘天然’抗体在免疫缺陷受试者中的特异性和功能:B细胞谱系的线索和发育”1997,《临床免疫学杂志》,17:311-321。

[0752] Perheentupa J.,2002,《北美内分泌和代谢诊所 (Endocrinol.Metab.Clin.North Am.)》31:295-320 Rota IA和Dhalla F.“FOXN1缺乏重症联合免疫缺陷病 (FOXN1 deficiency nude severe combined immunodeficiency)”《罕见病杂志 (Orphanet Journal of Rare Diseases.)》2017;12:6。

[0753] Rendell VR、Giamberardino C、Li J、Markert ML和Brennan TV,2014,“在成年大鼠中进行无创气管插管的完全胸腺切除术”《可视实验杂志》(94)。

[0754] Schmid C、Binder J、Heemann U和Tilney NL,1994,“在大鼠中成功进行异位心脏移植”《显微外科手术》15(4):279-281。

[0755] Schoenecker JG、Hauck RK、Mercer MC、Parker W、Lawson J,2000,“手术期间暴露于局部牛凝血酶会引起对异种碳水化合物半乳糖 $\alpha$ 1-3半乳糖的反应 (Exposure to topical bovine thrombin during surgery elicits a response against the xenogeneic carbohydrate galactose $\alpha$ 1-3Galactose)”《临床免疫学杂志》,20:434-444。

[0756] Uibo R.等人,1994,“在I型和II型自身免疫性多腺体疾病和孤立的艾迪生氏病中针对细胞色素P450酶P450scc、P450c17和P450c21的自身抗体 (Autoantibodies to cytochrome P450 enzymes P450scc,P450c17,and P450c21 in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease)”《临床内分泌学与代谢杂志》78:323-328。

[0757] Zlotogora,J.等人,1992,“伊朗犹太人中的I型多腺体自身免疫综合征 (Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews)”《医学遗传学杂志 (J.Med.Genet)》,29,824-826。

[0758] 缩写

[0759] AIRE:自身免疫调节基因。

[0760] Ab:抗体。

[0761] Ag:抗原。

[0762] APC:抗原呈递细胞。

[0763] ATG:胸腺球蛋白。

[0764] b.i.d.:每天两次

[0765] BMI:体重指数

[0766] BSA:身体表面积。

[0767] BSC:生物安全柜。

[0768] cDGA:完全DiGeorge异常。

[0769] CFR:联邦法规代码。

[0770] CK:细胞角蛋白。

[0771] CNI:钙调神经磷酸酶抑制剂。

[0772] CTT:同种异体经培养的出生后胸腺组织来源的产品。

- [0773] CVVHD/F:连续的静脉-静脉血液透析滤过。
- [0774] DC:树突状细胞。
- [0775] DSA:供体特异性抗体。
- [0776] DGF:延迟的移植功能
- [0777] EBV:爱泼斯坦巴尔病毒。
- [0778] EU:内毒素单位。
- [0779] FBS:胎牛血清。
- [0780] FDA:食品和药物管理局。
- [0781] FSGS:局灶性节段性肾小球硬化病。
- [0782] H&E:苏木精和曙红。
- [0783] HD:血液透析。
- [0784] HEPES:N-2-羟乙基哌嗪N'-2-乙烷磺酸。
- [0785] HI:HI-热失活。
- [0786] HIP:腹膜内。
- [0787] HIV:人免疫缺陷病毒。
- [0788] IBW:理想体重。
- [0789] IDDM:胰岛素依赖性糖尿病。
- [0790] ISHLT:国际心肺移植学会。
- [0791] ISO:国际标准化组织。
- [0792] LAL:美洲鲎试剂。
- [0793] mAb:单克隆抗体。
- [0794] MHC:主要组织相容性复合物。
- [0795] MST:平均存活时间。
- [0796] PBMC:外周血单核细胞。
- [0797] PBS:磷酸盐缓冲盐水。
- [0798] POD:手术后的天数。
- [0799] PRA:群体反应性抗体。
- [0800] SL:舌下。
- [0801] TBW:总体重
- [0802] TC:组织培养。
- [0803] Tfh:T滤泡辅助细胞。
- [0804] TOM:胸腺器官培养基。
- [0805] USP:美国药典。

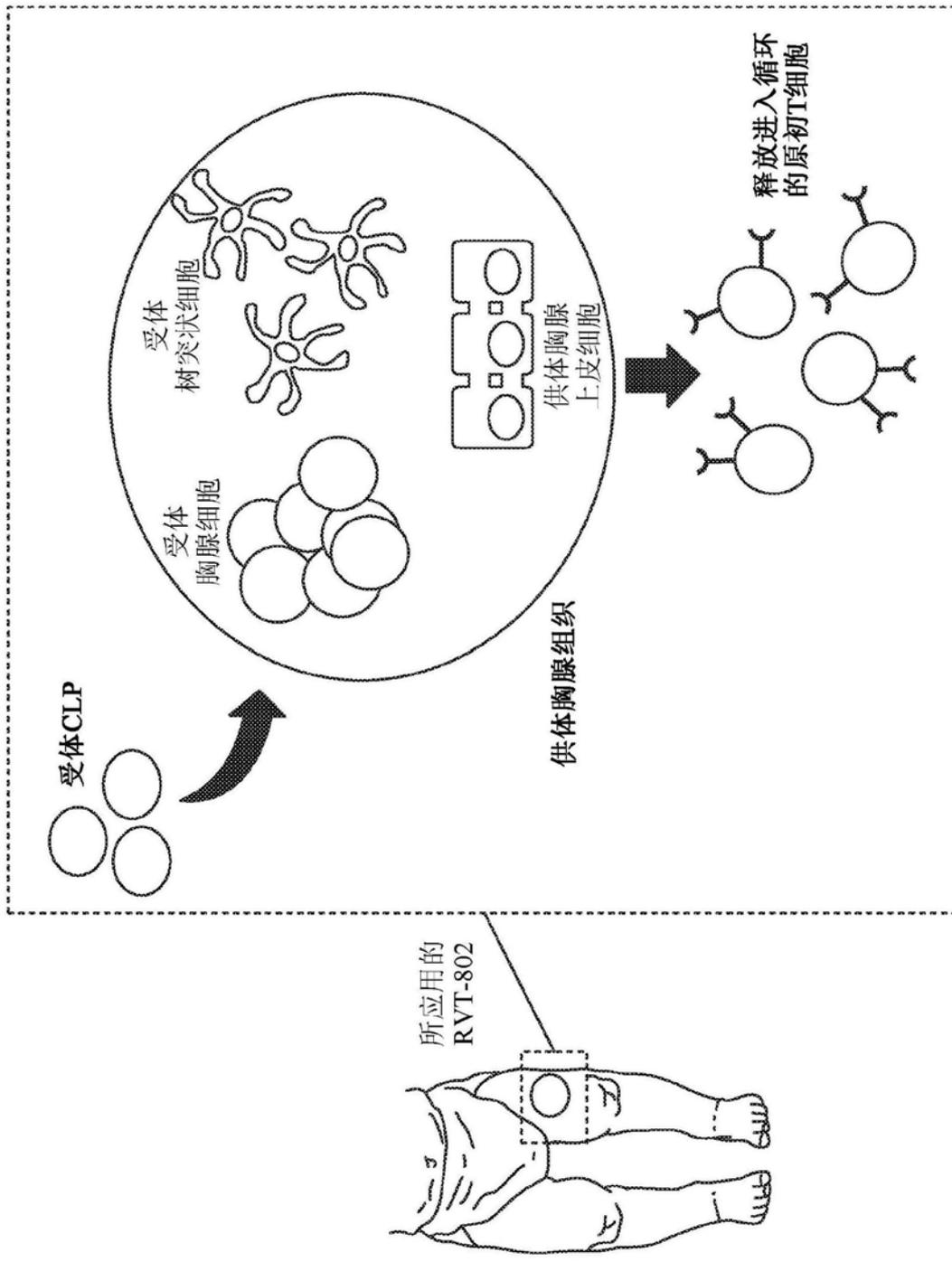


图1

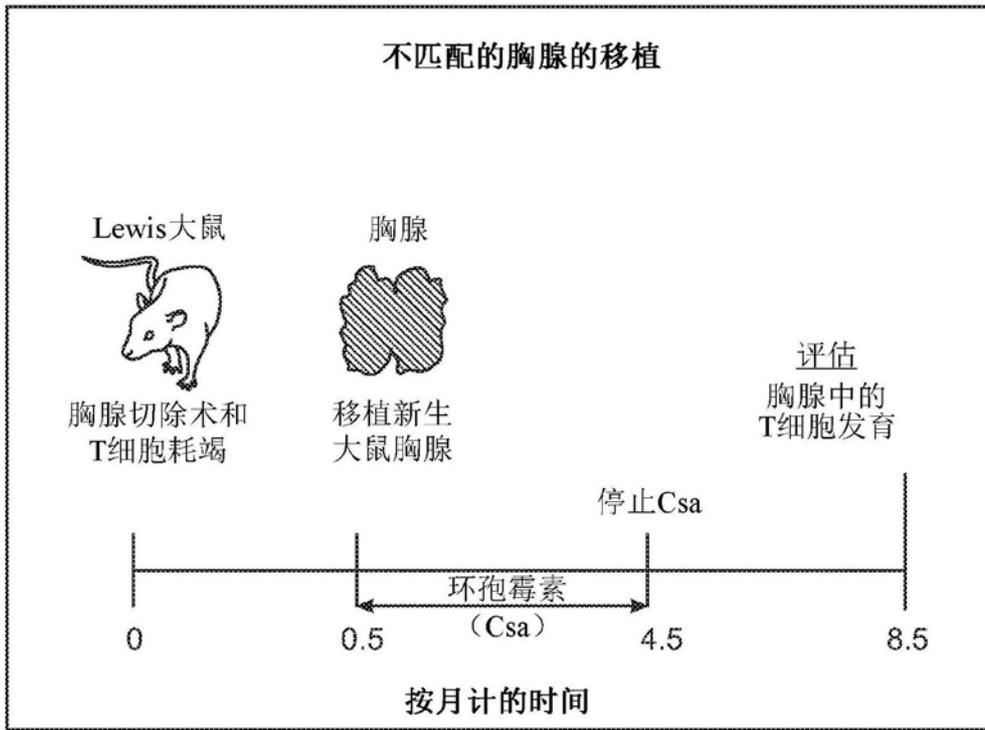


图2

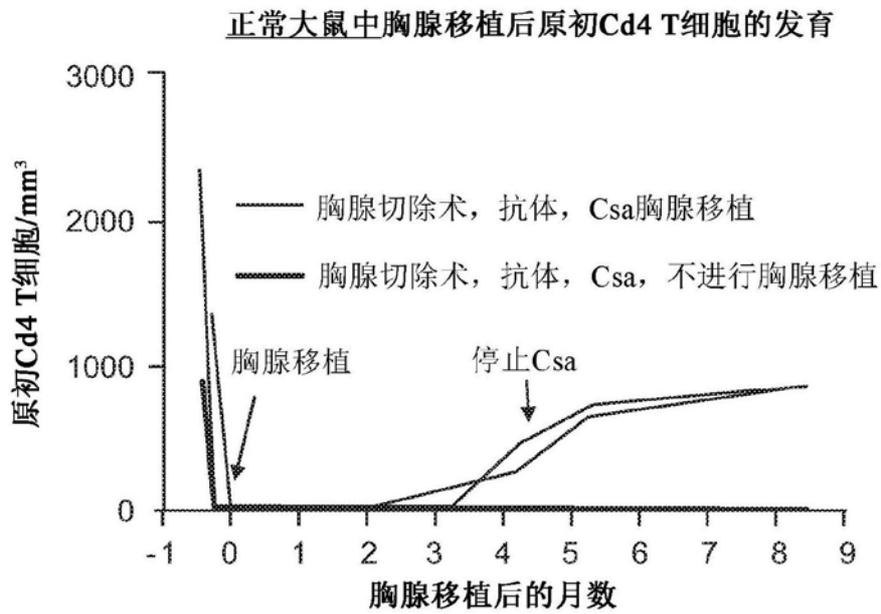


图3

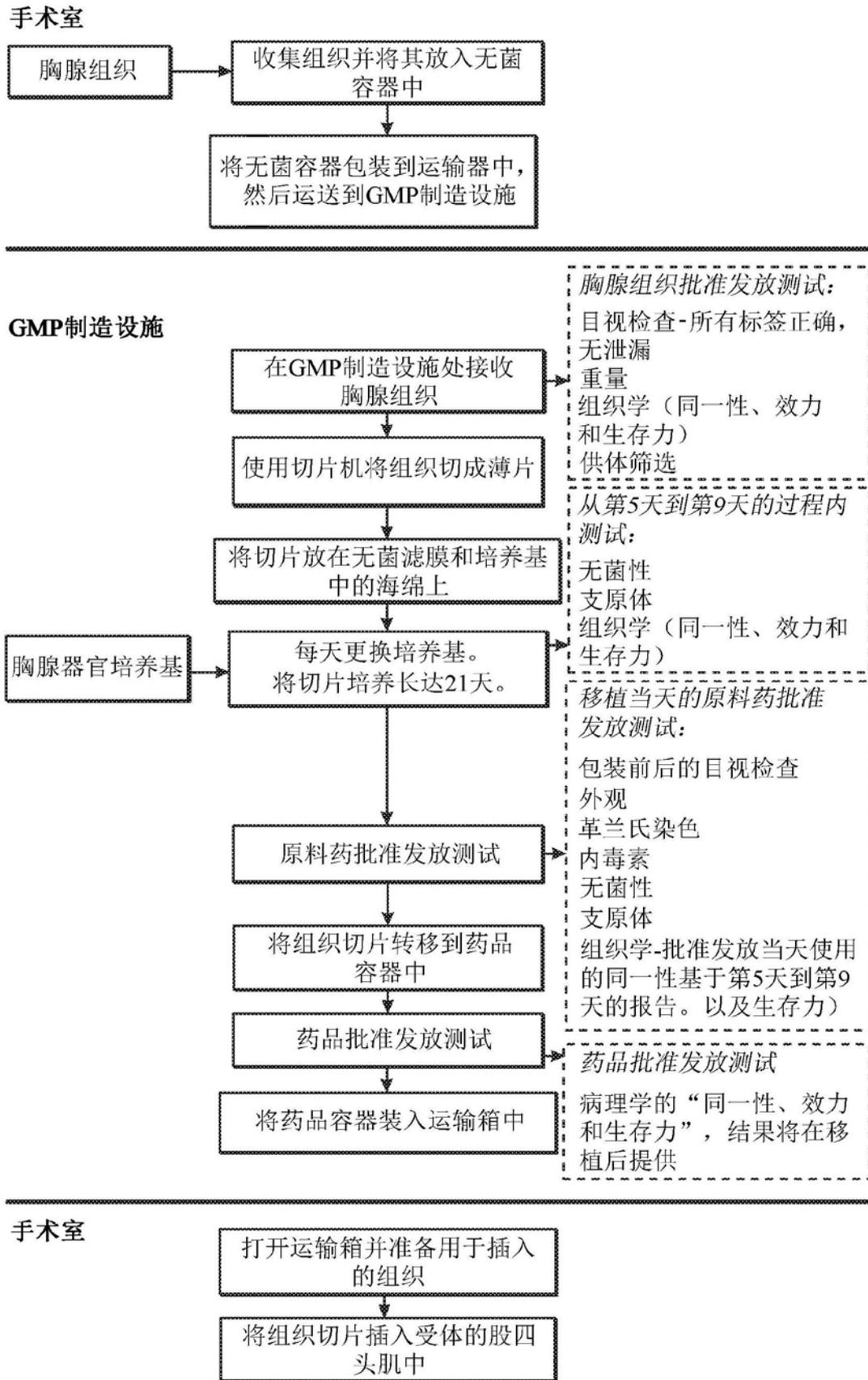


图4

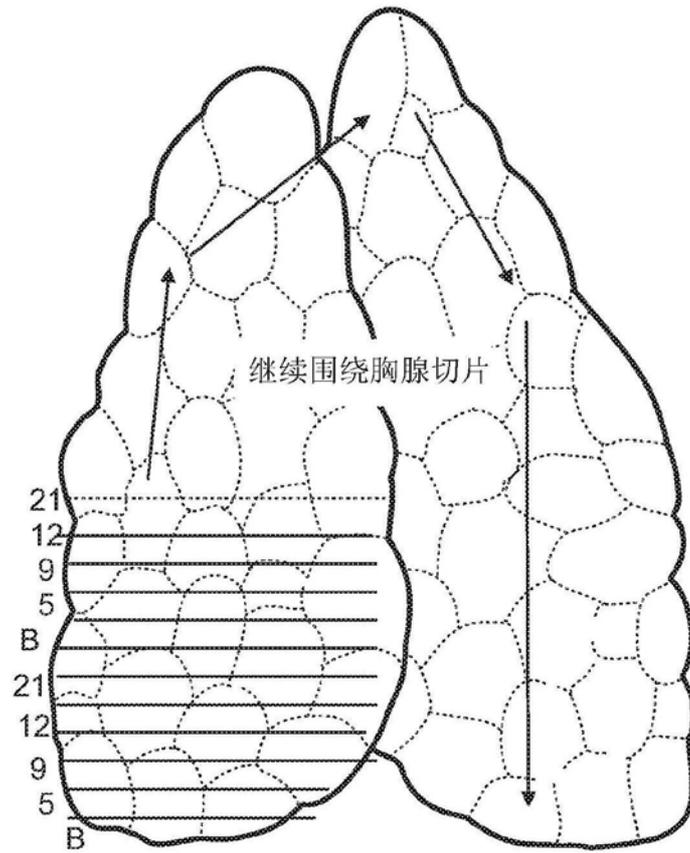


图5A

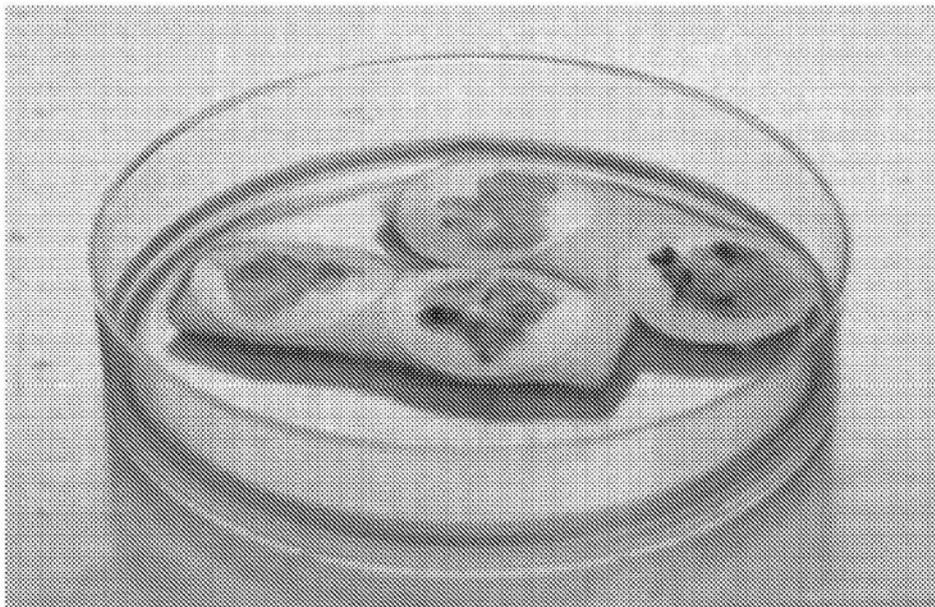


图5B

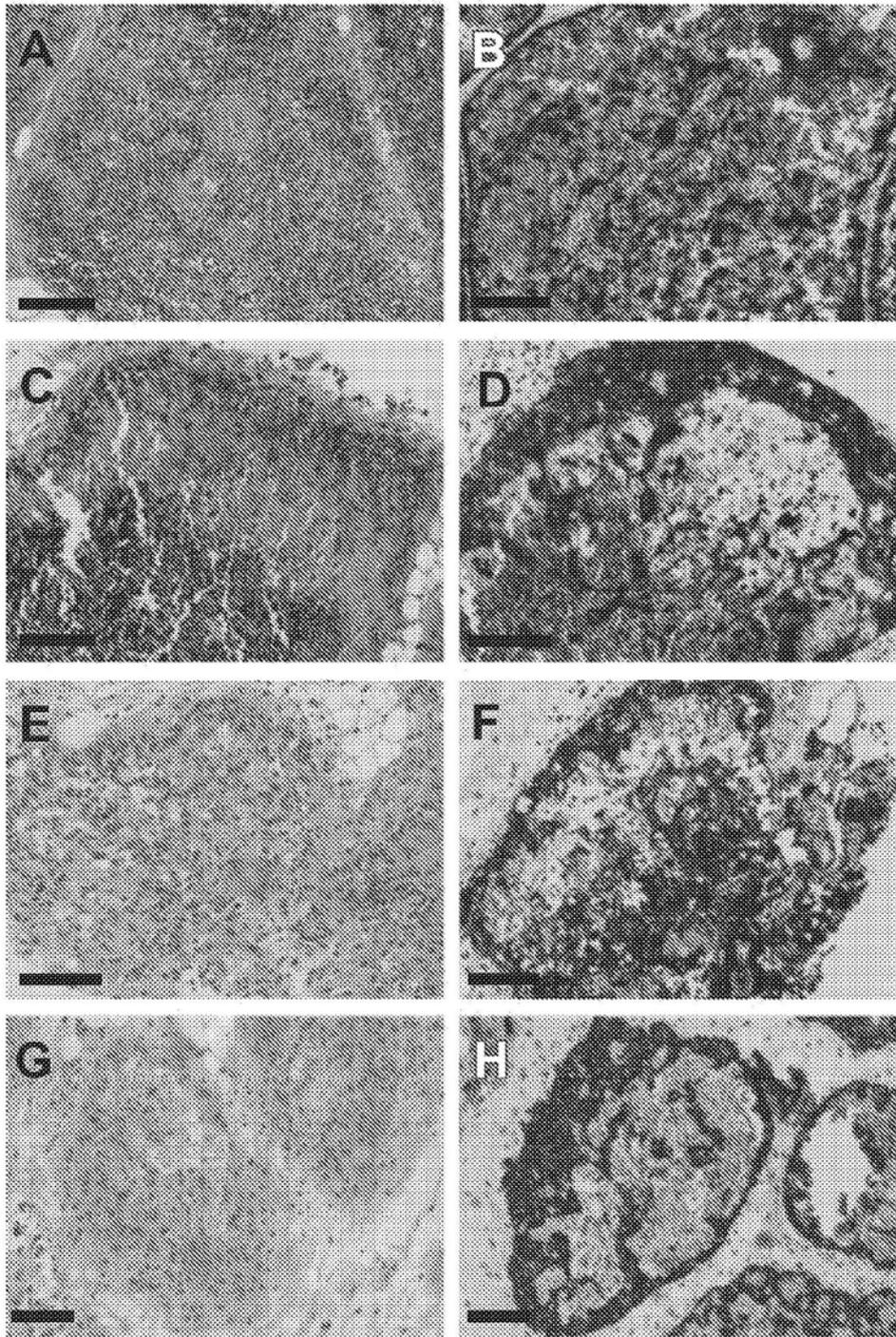


图6

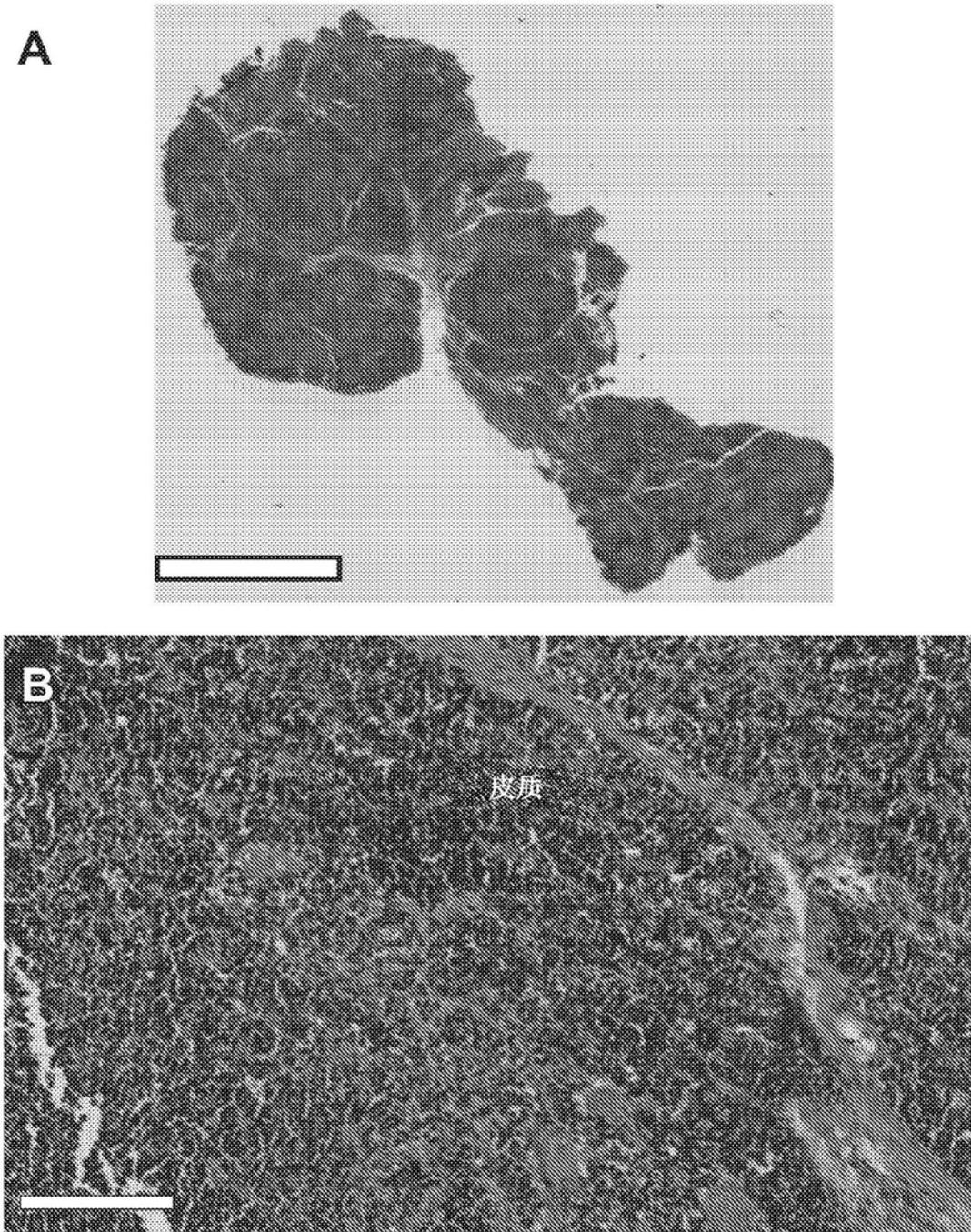


图7

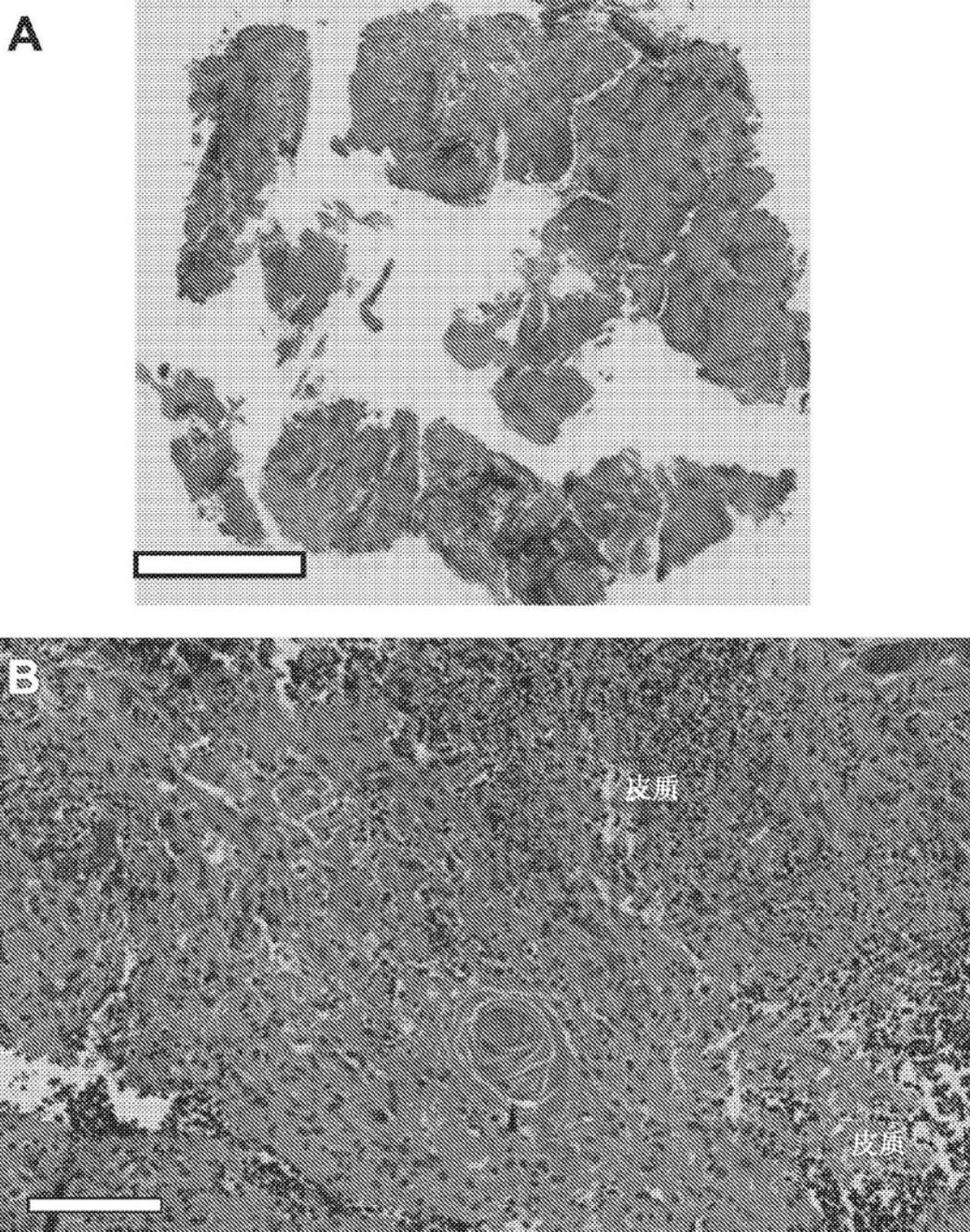


图8

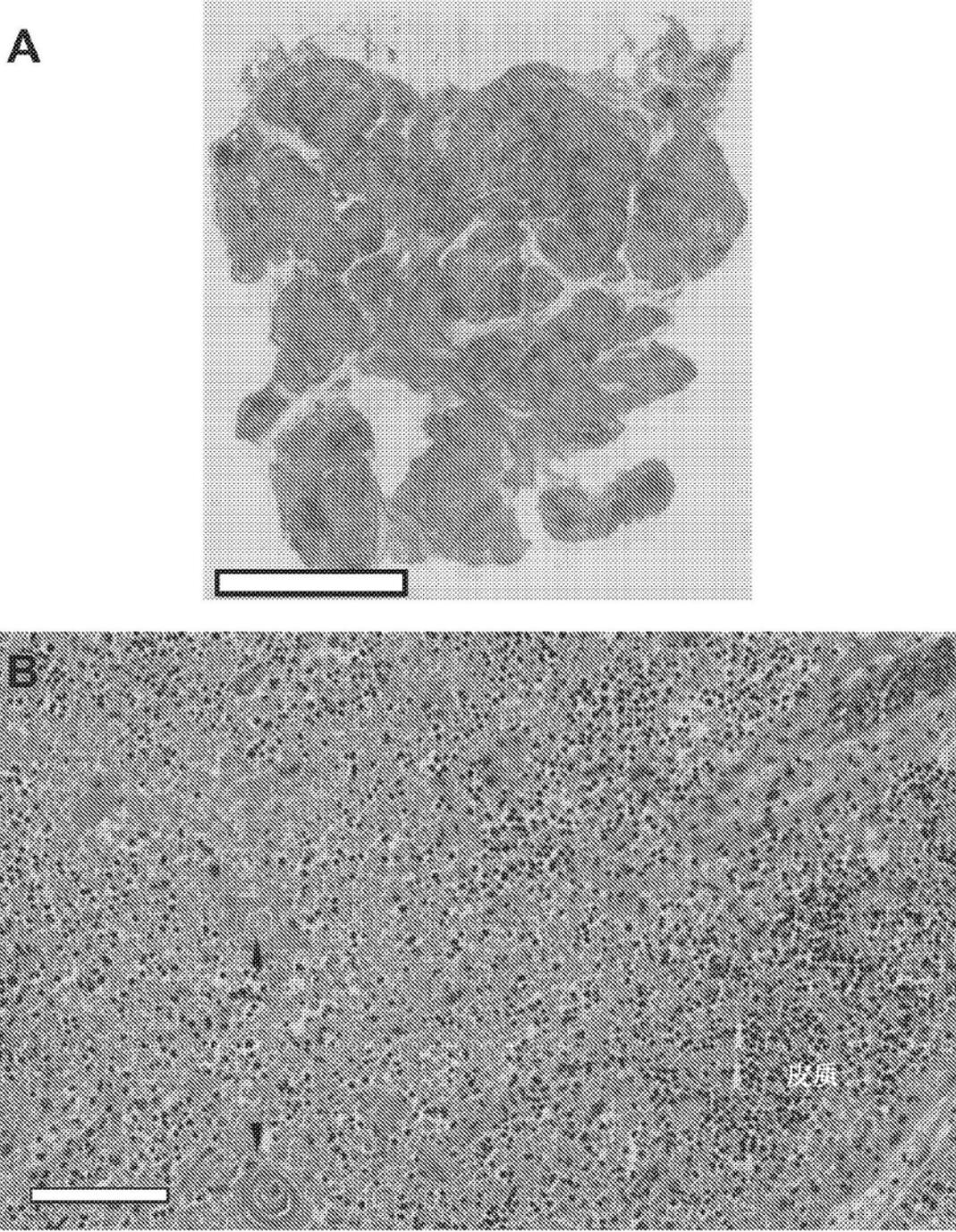


图9

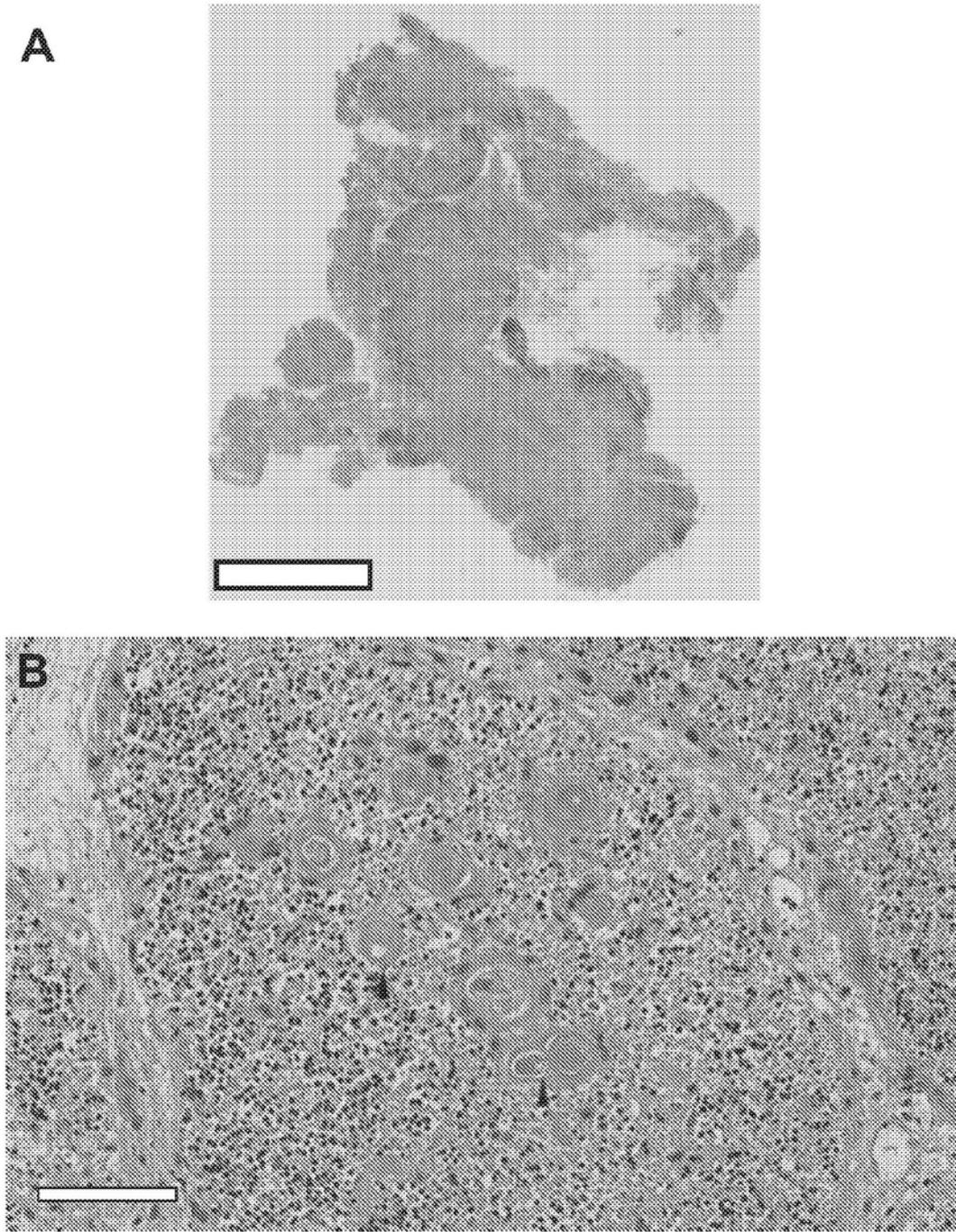


图10

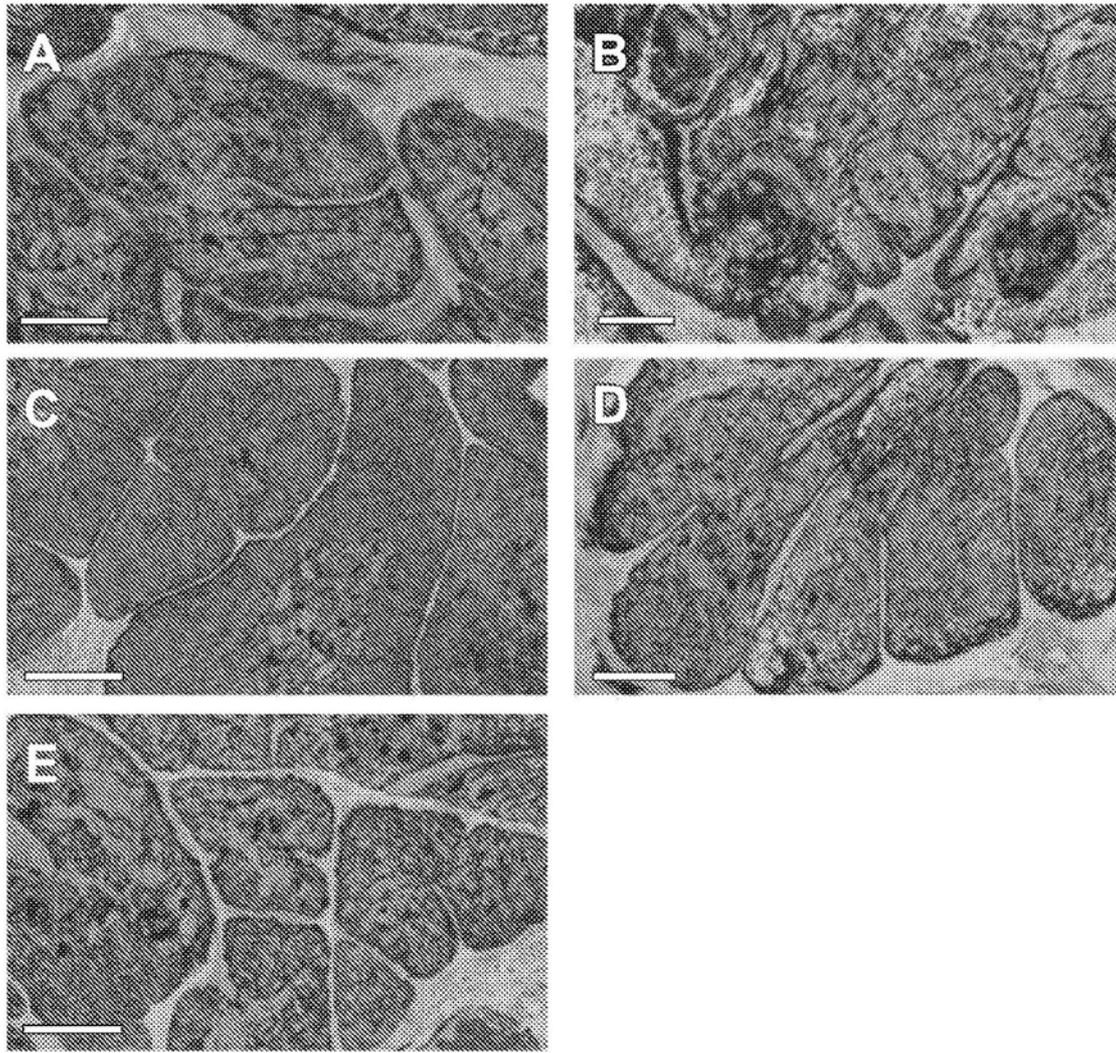


图11

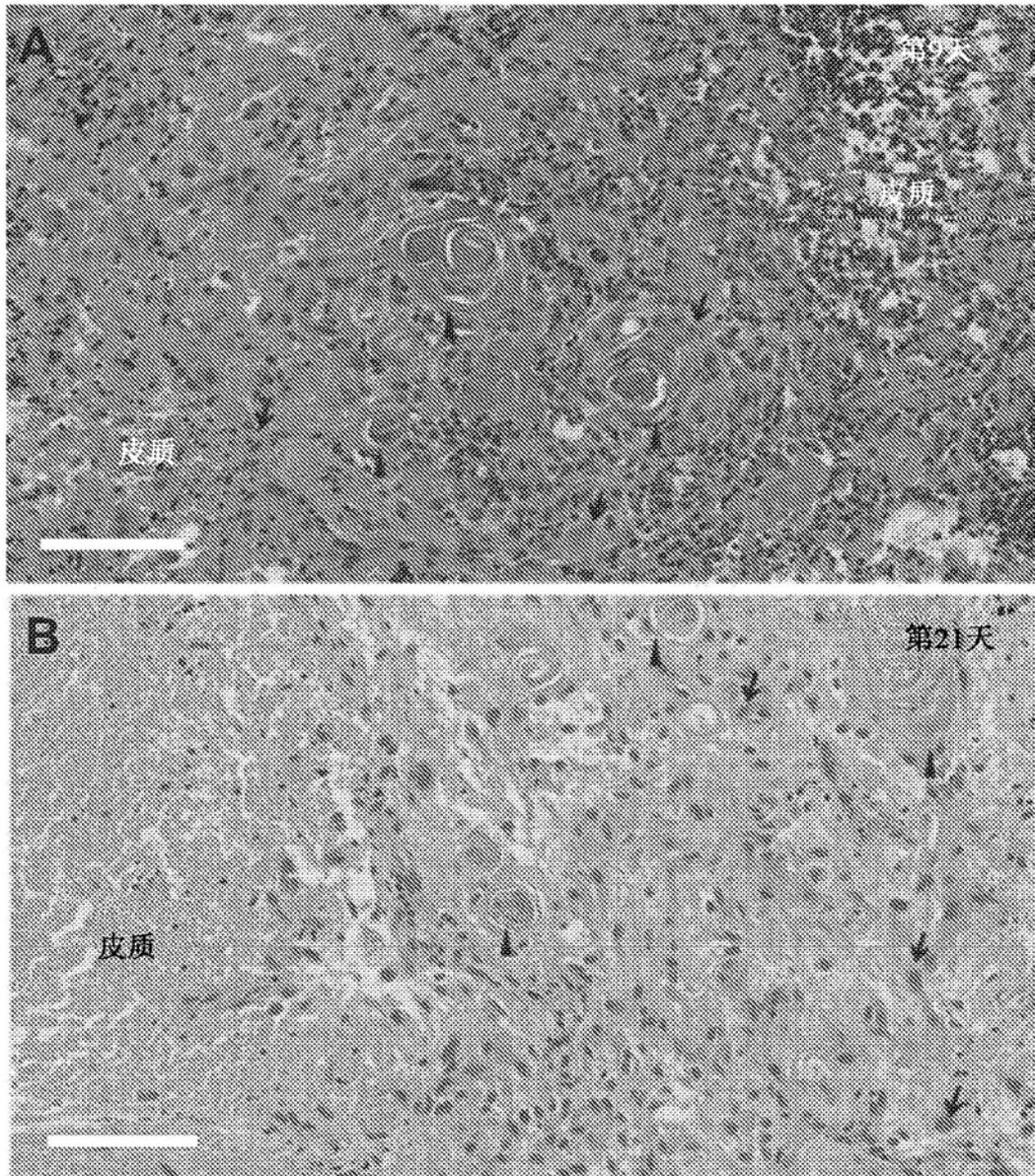


图12

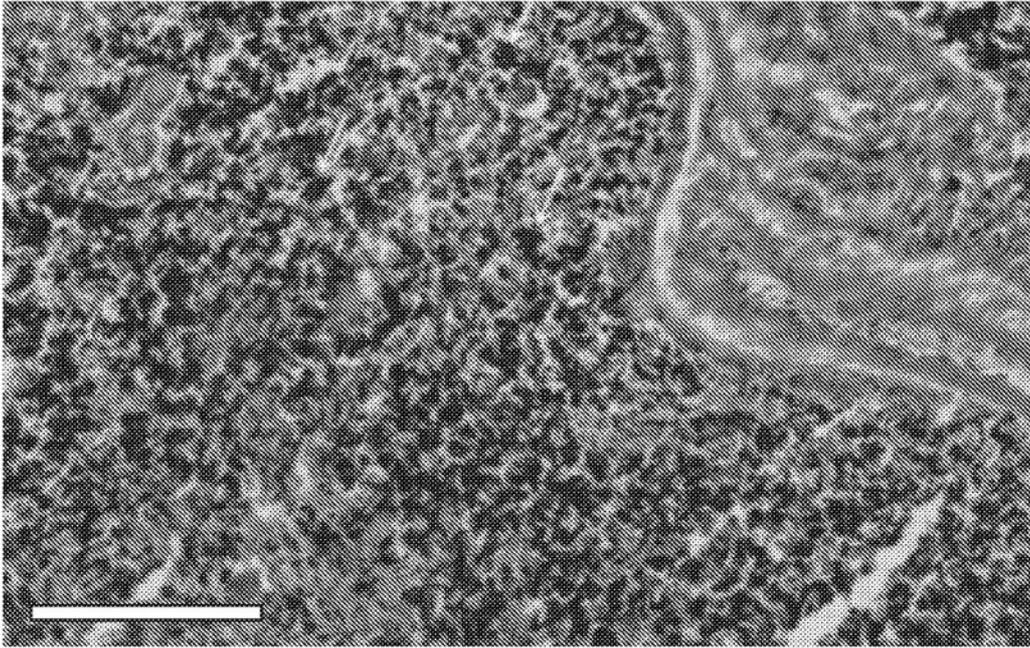


图13

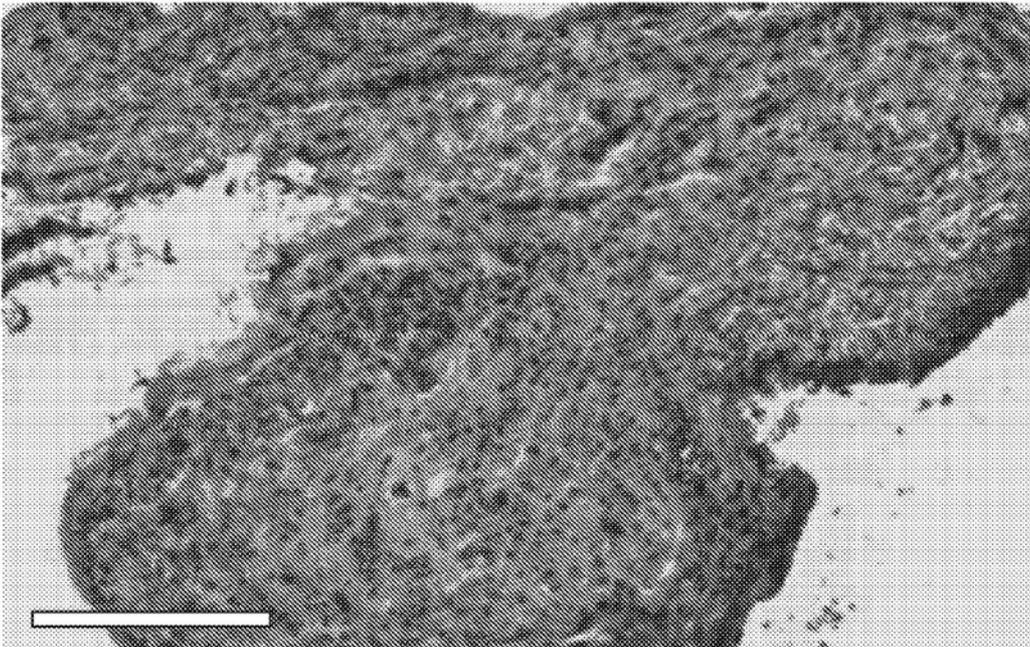


图14

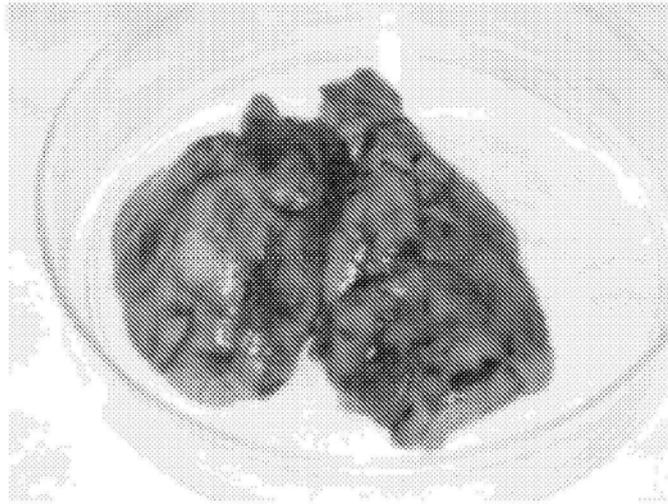


图15

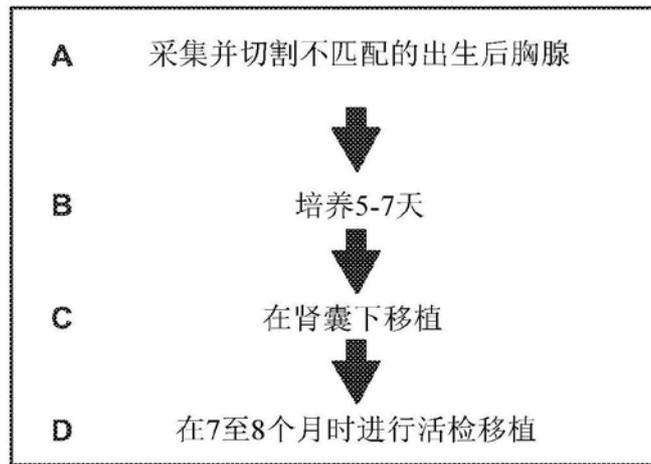


图16

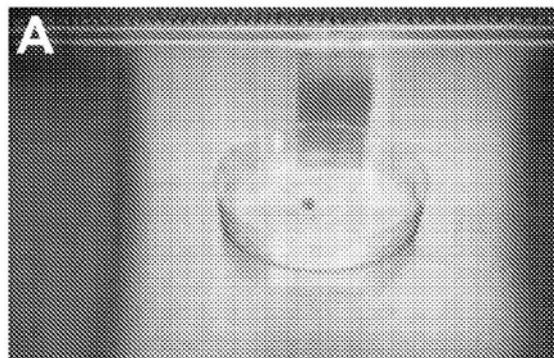


图17A

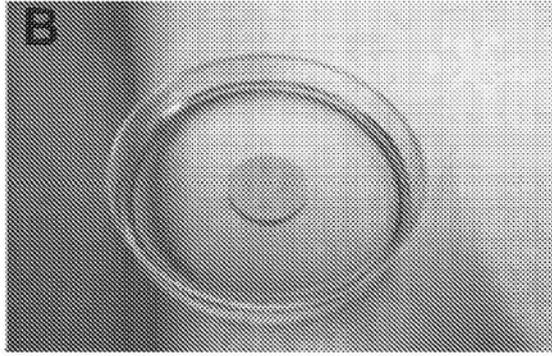


图17B



图17C



图17D

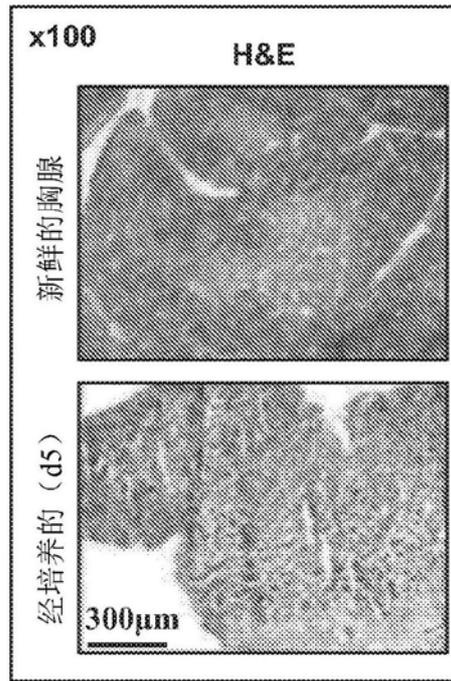


图18A

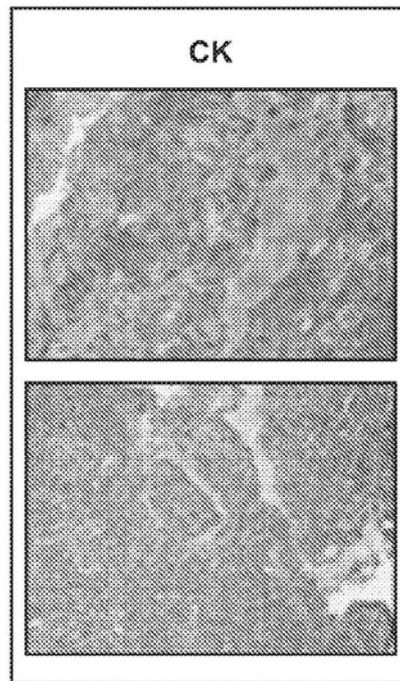


图18B

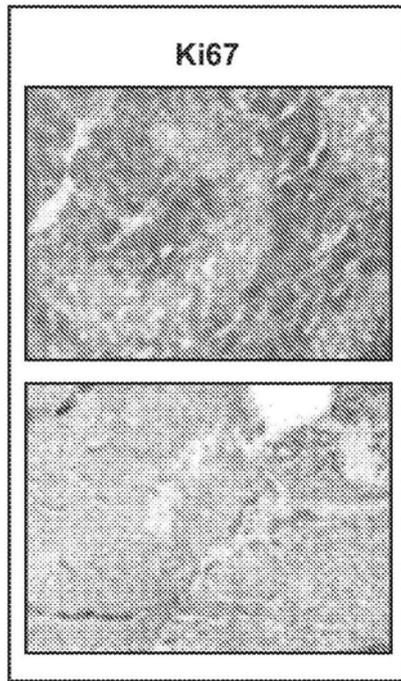


图18C

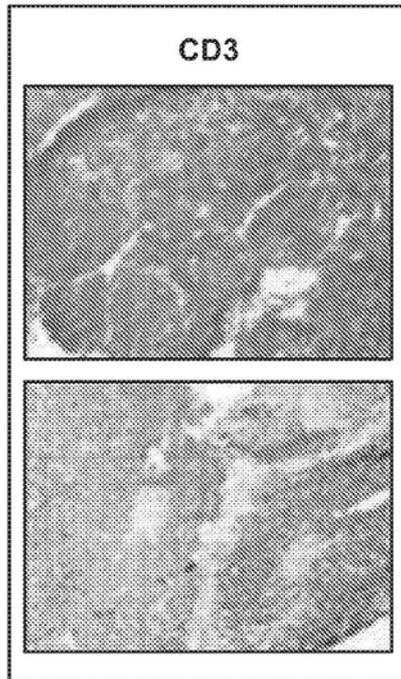


图18D

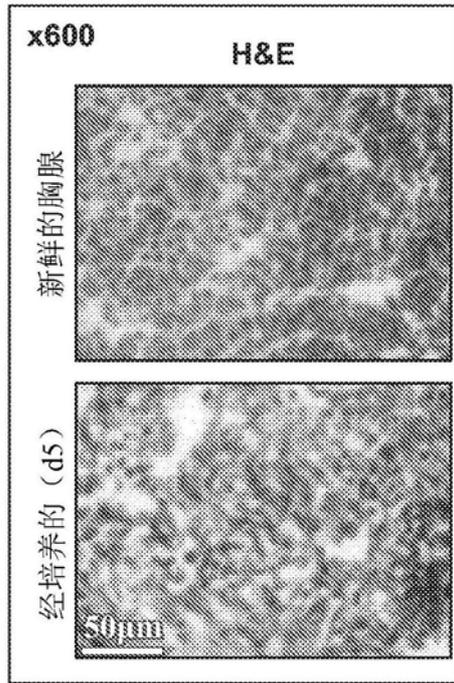


图19A

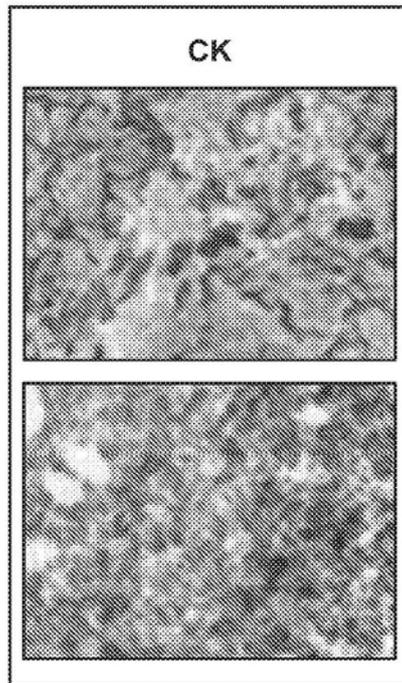


图19B

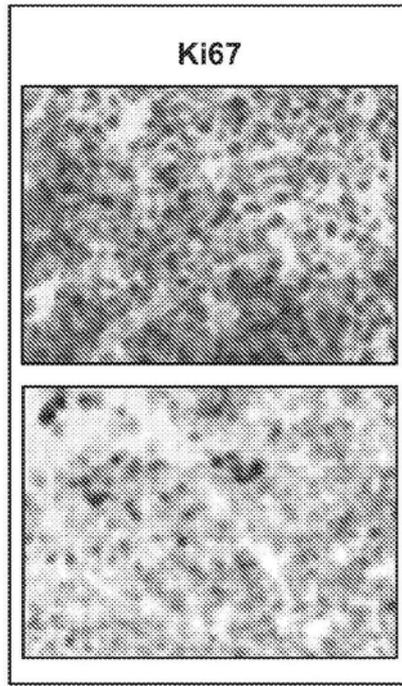


图19C

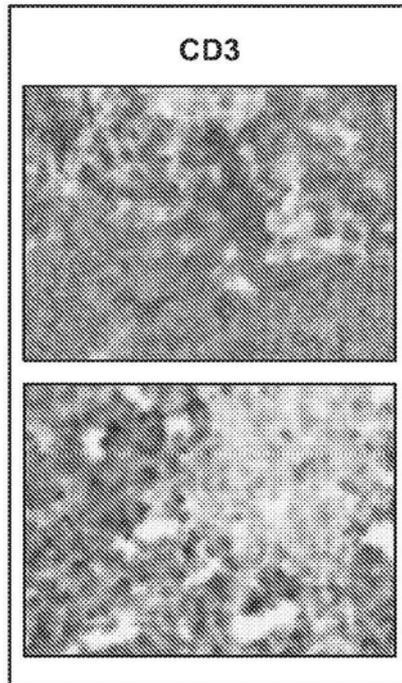


图19D

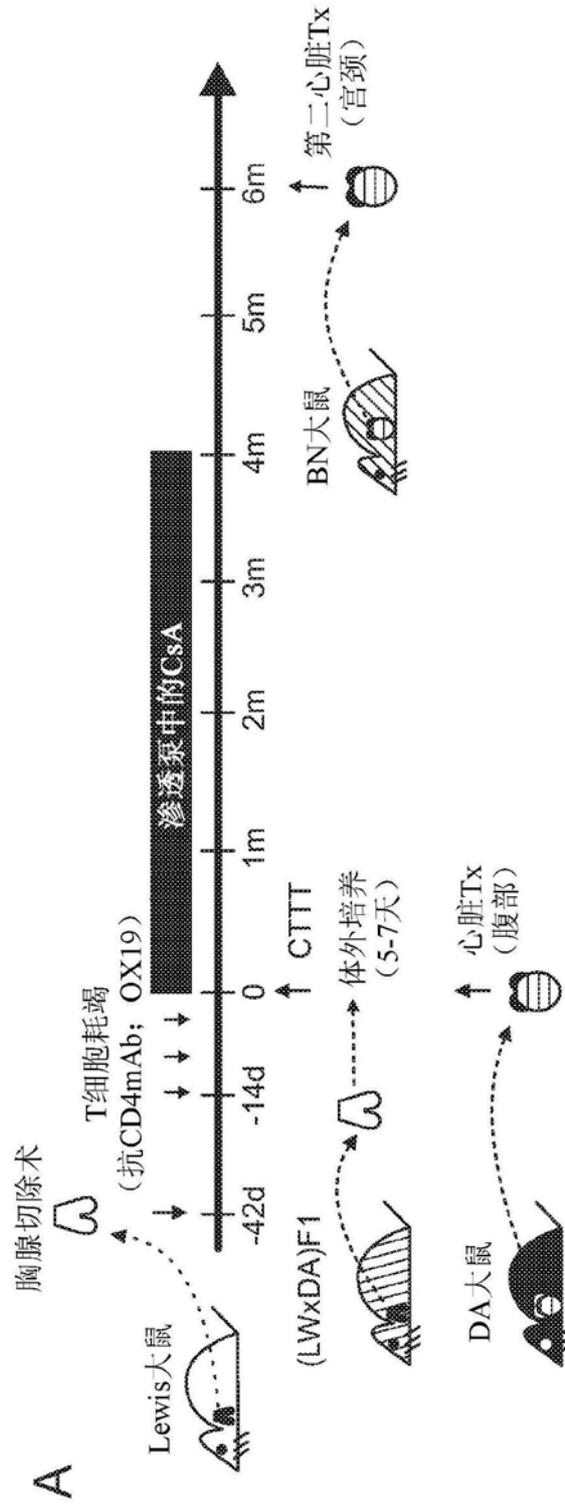


图20

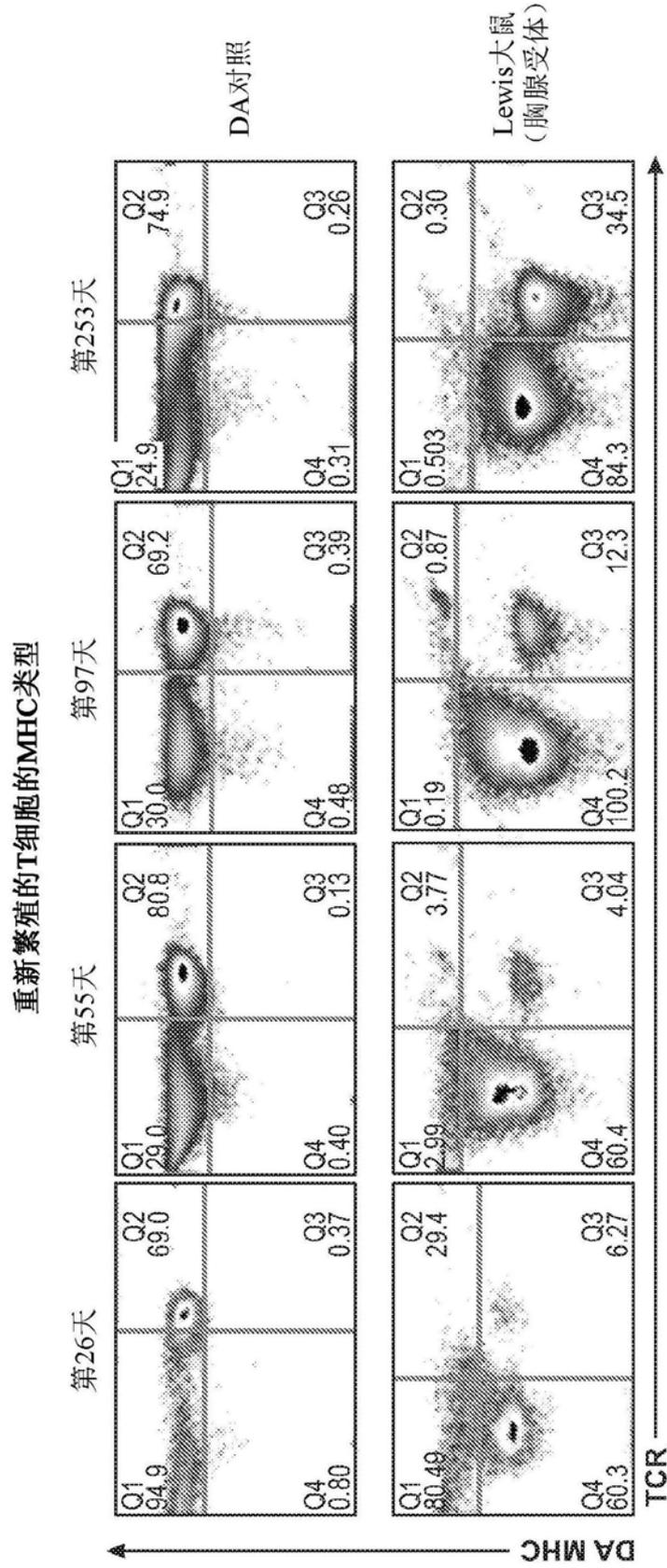


图21

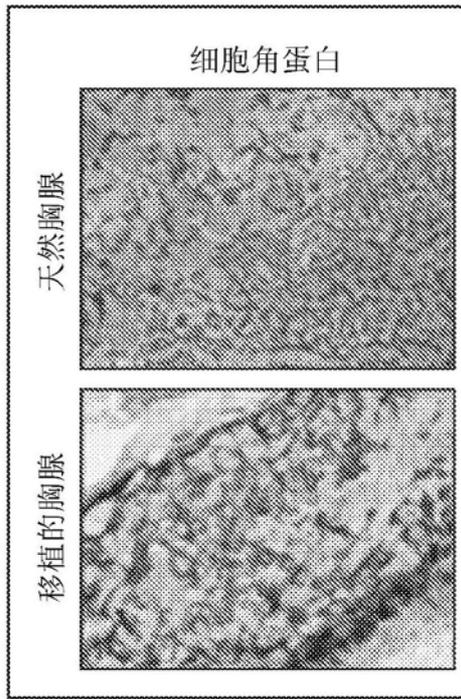


图22A

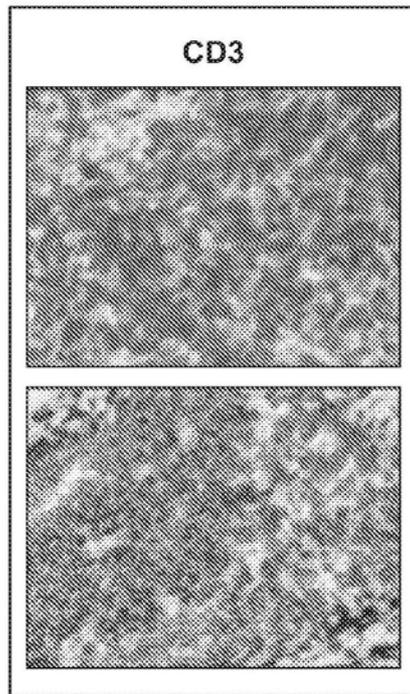


图22B

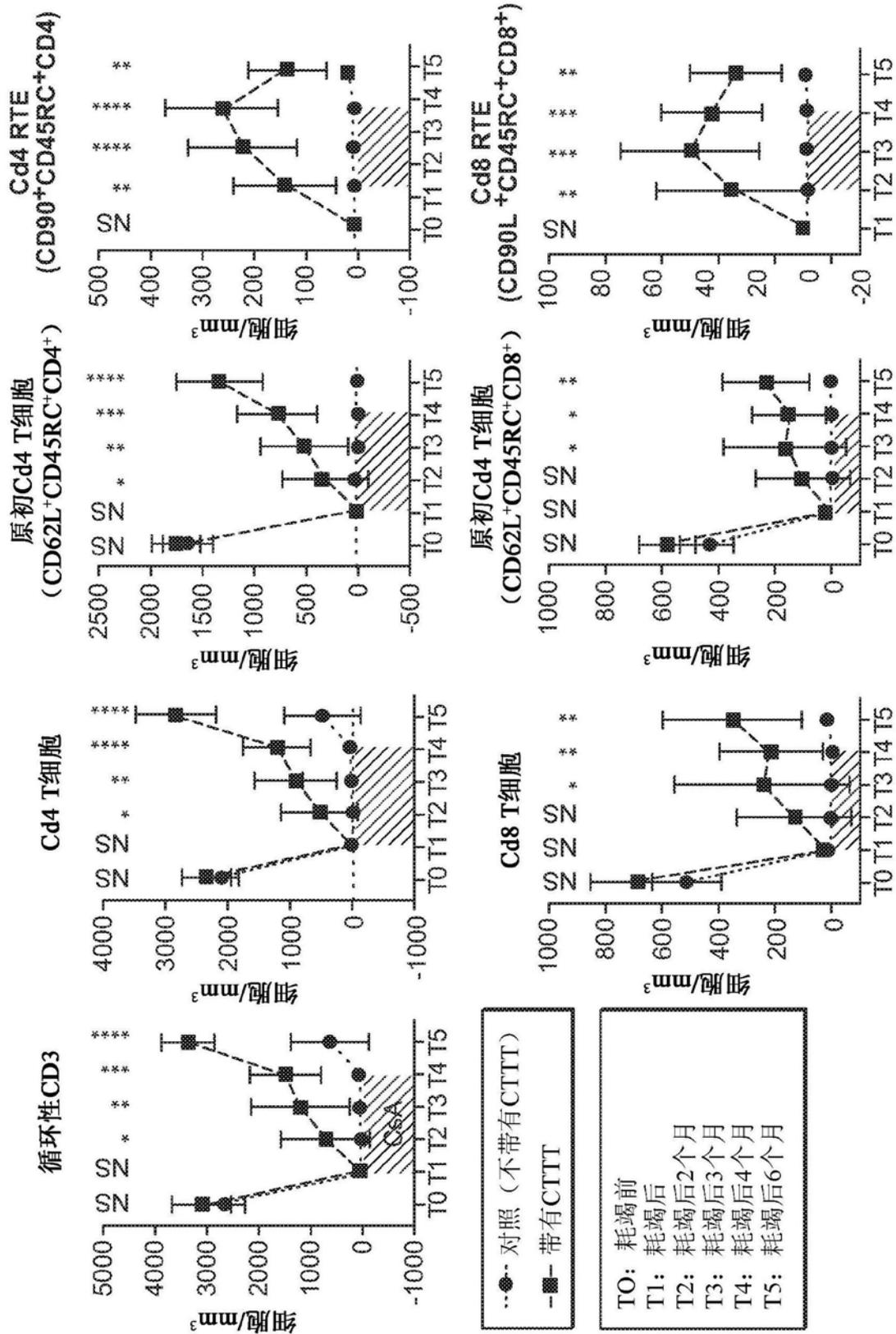


图23

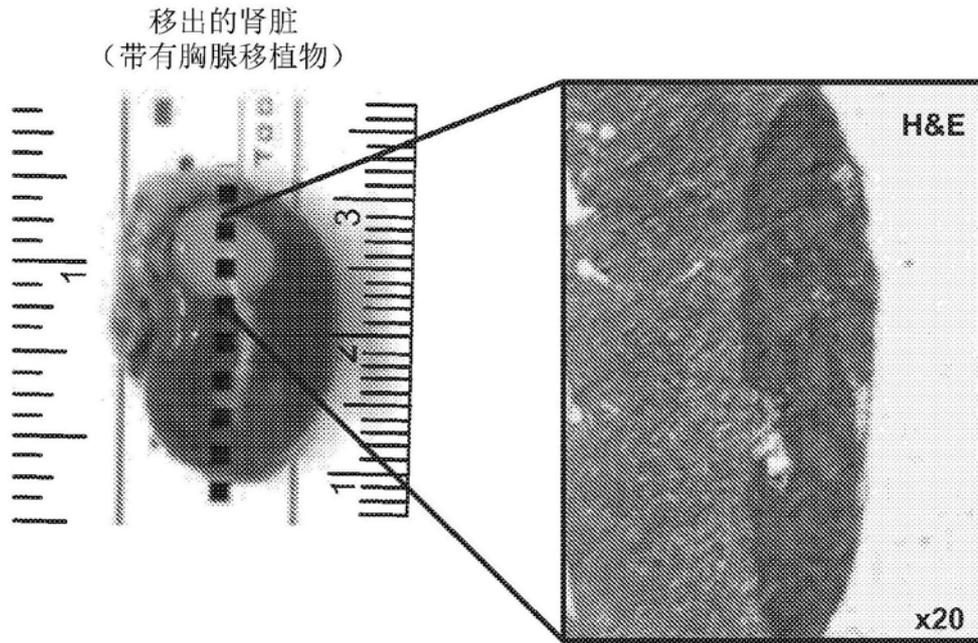


图24A

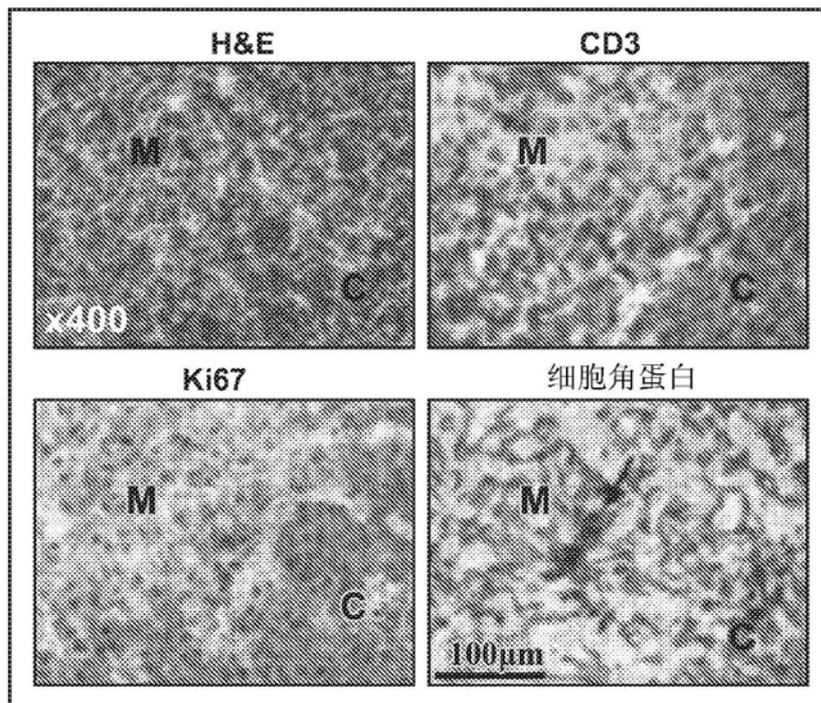


图24B

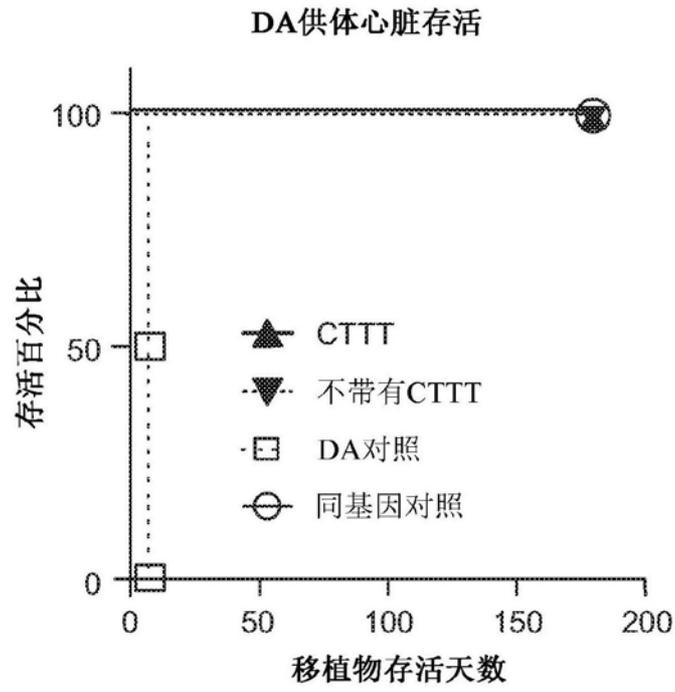


图25

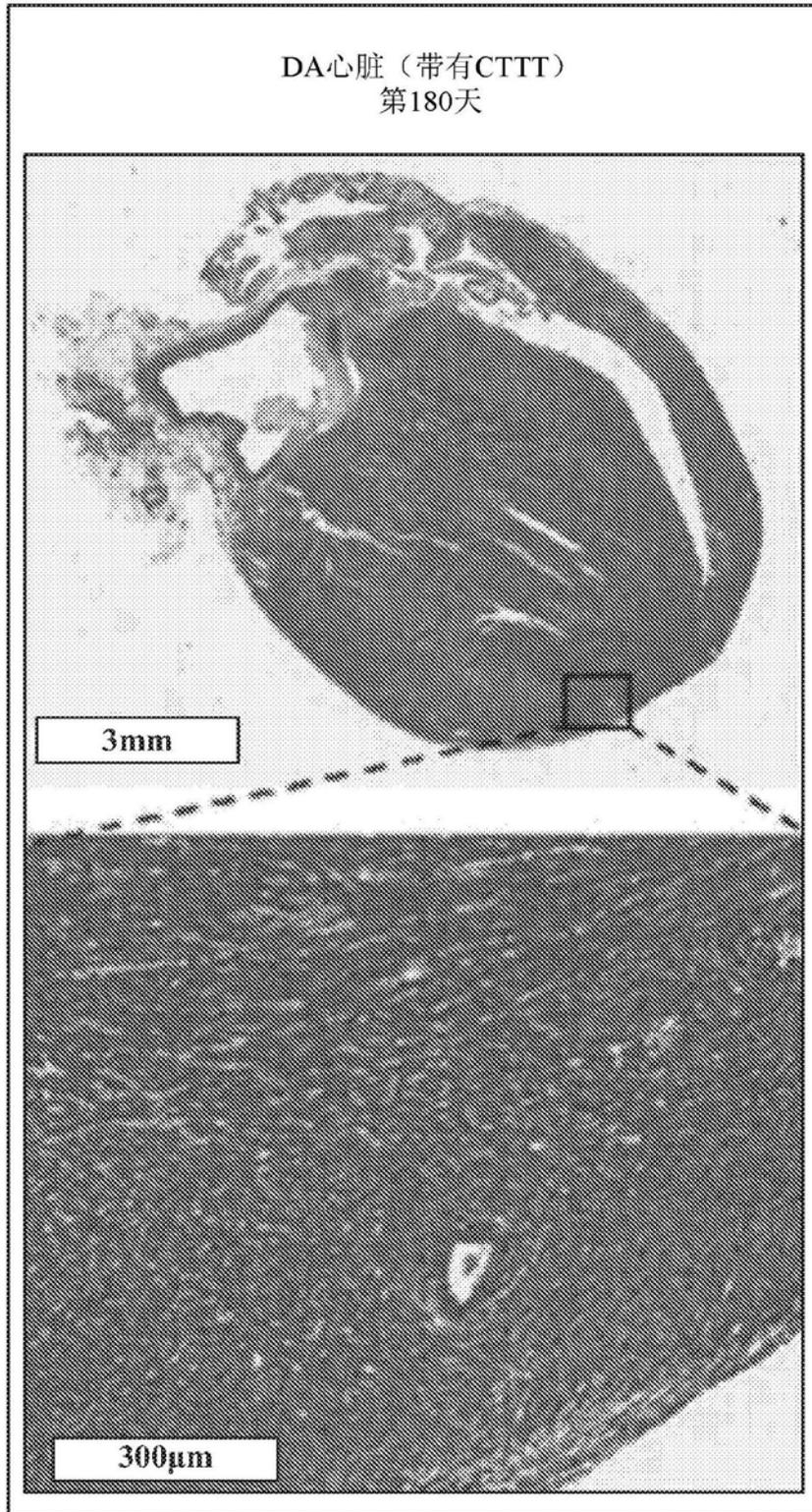


图26A

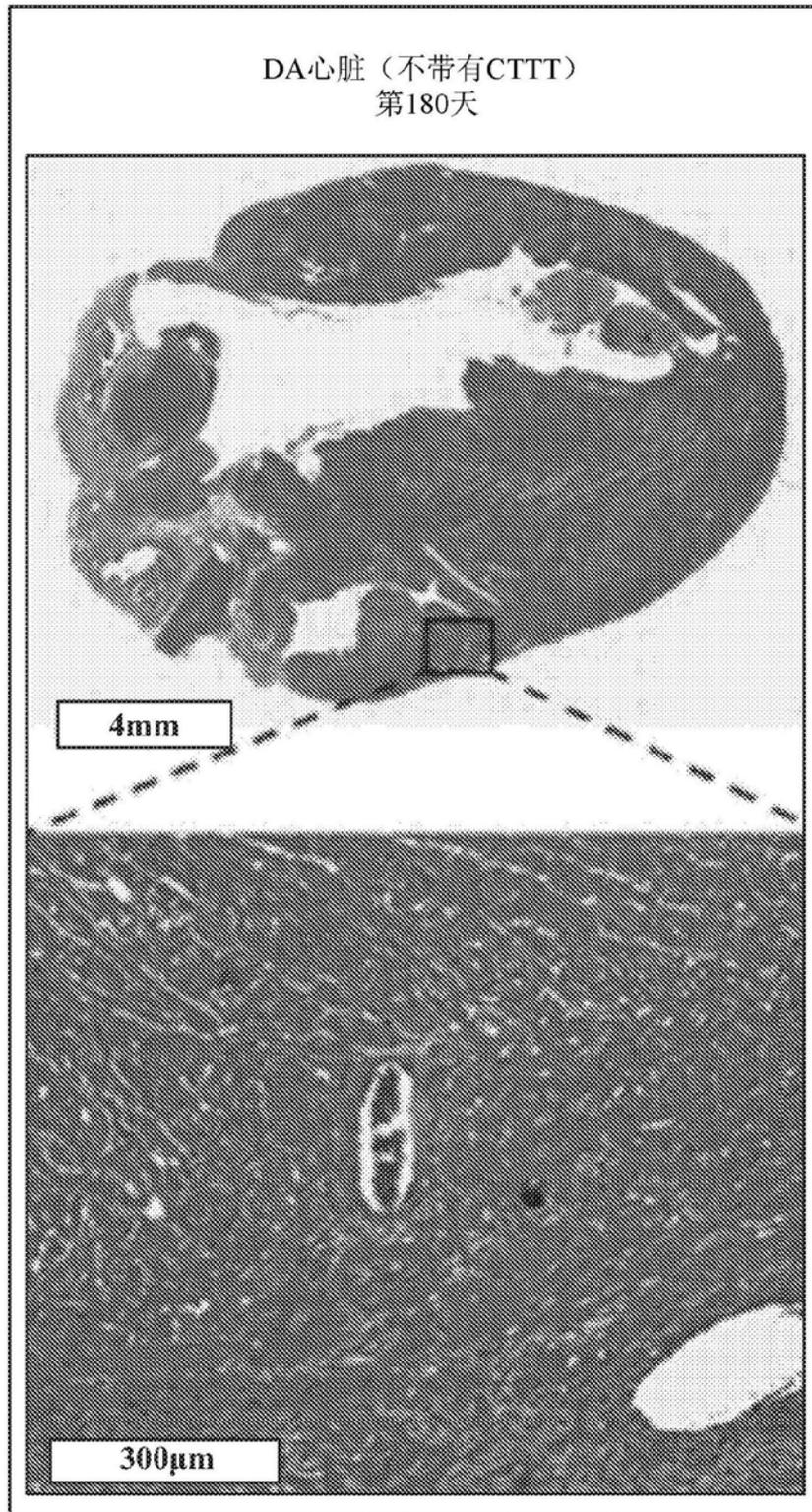


图26B

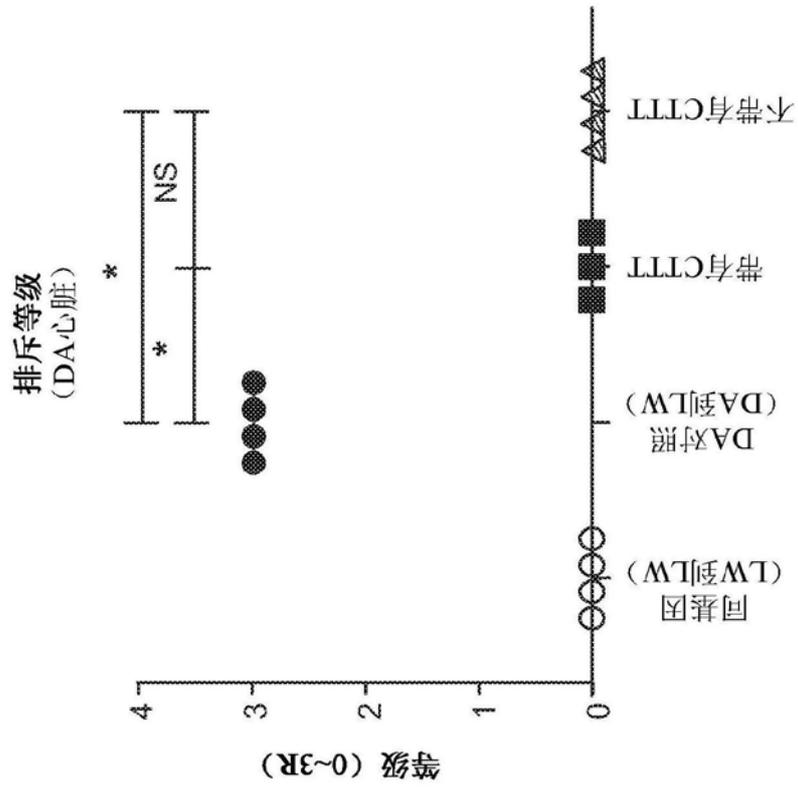


图26C

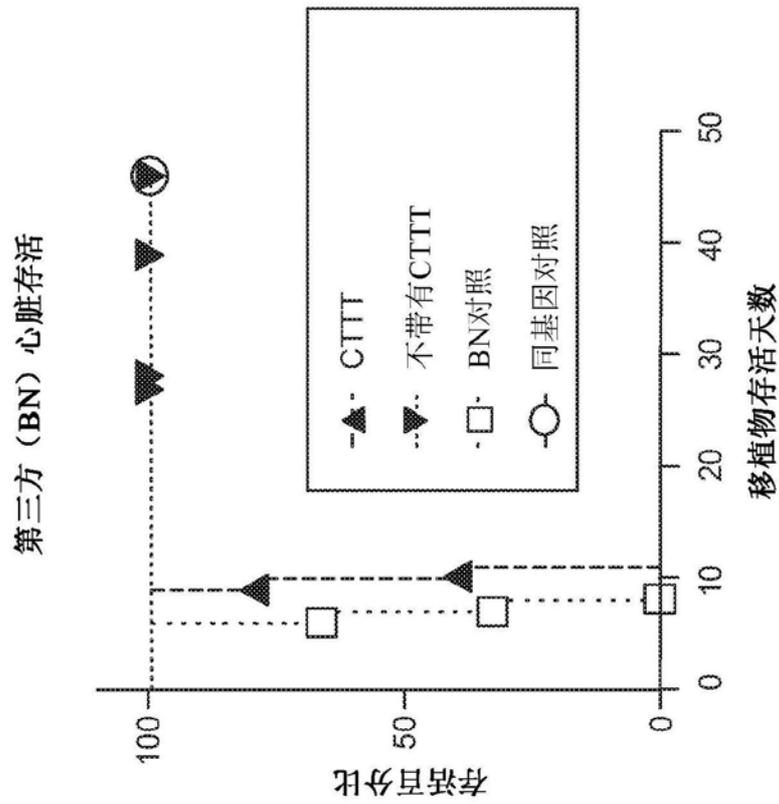


图27

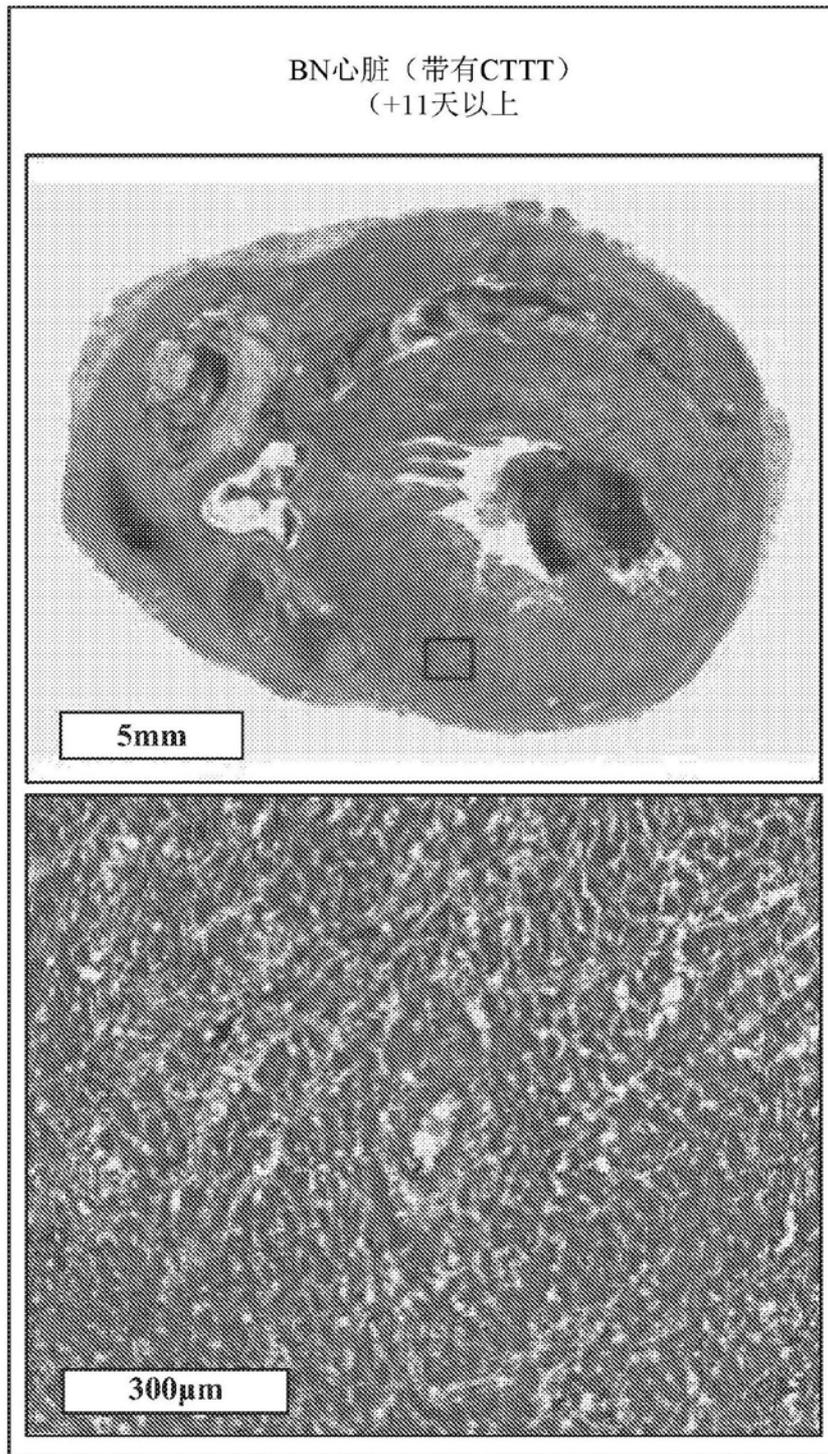


图28A

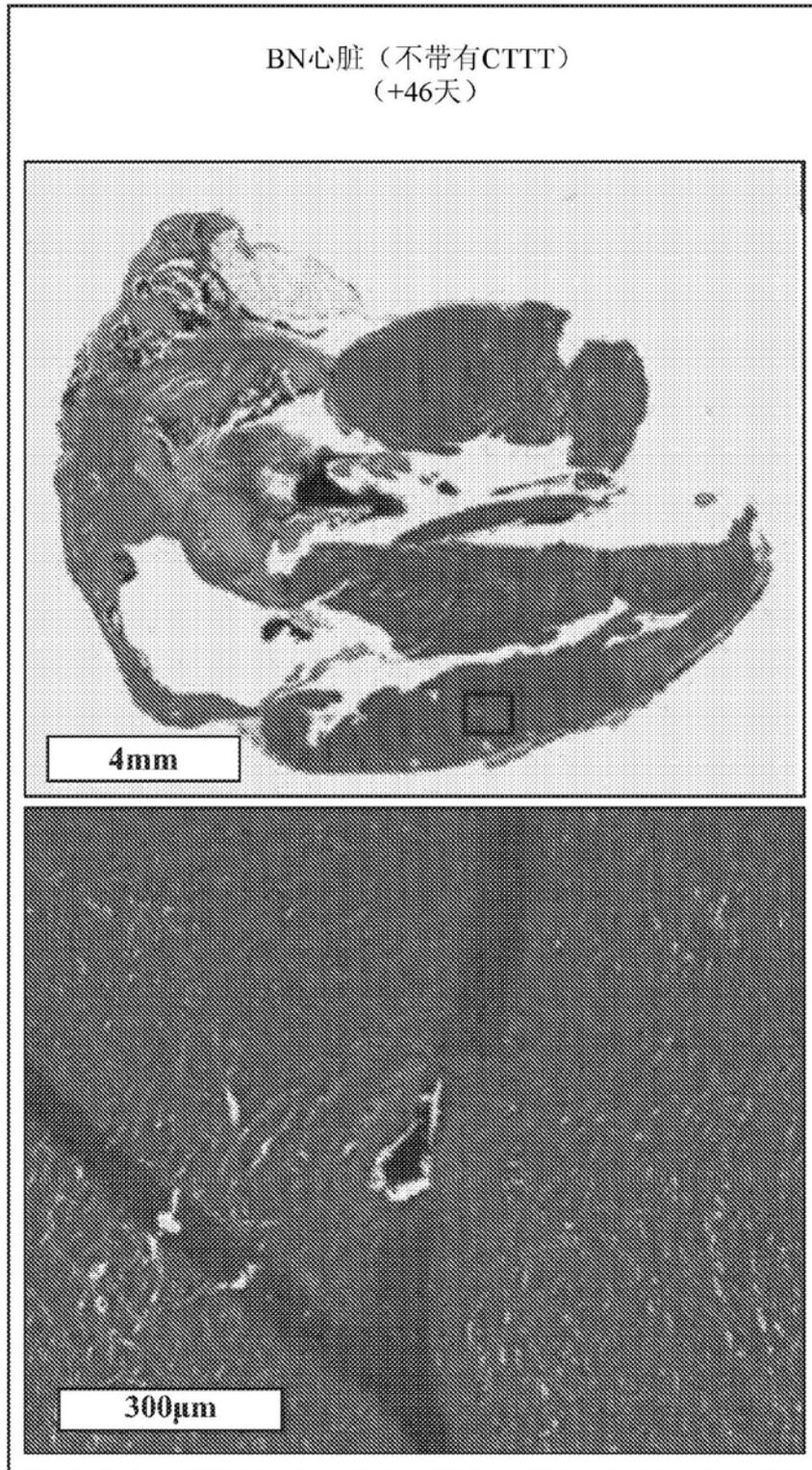


图28B



带有CTTT

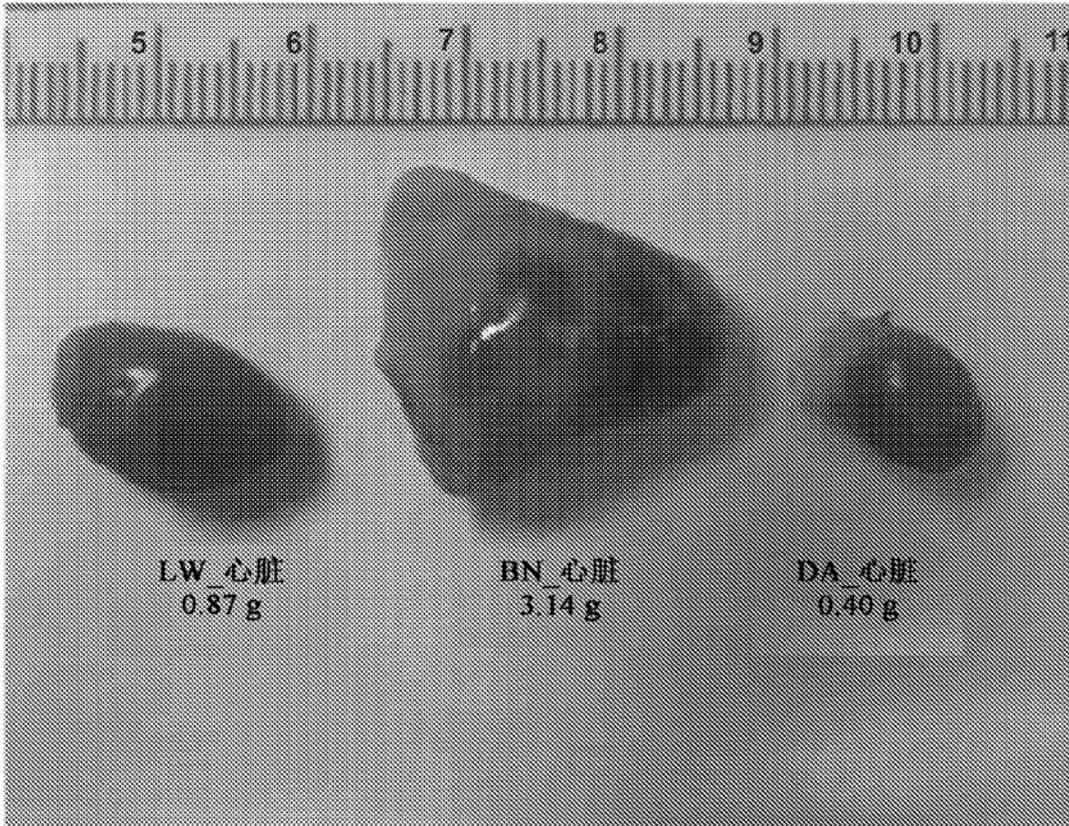


图30A

不带有CTTT

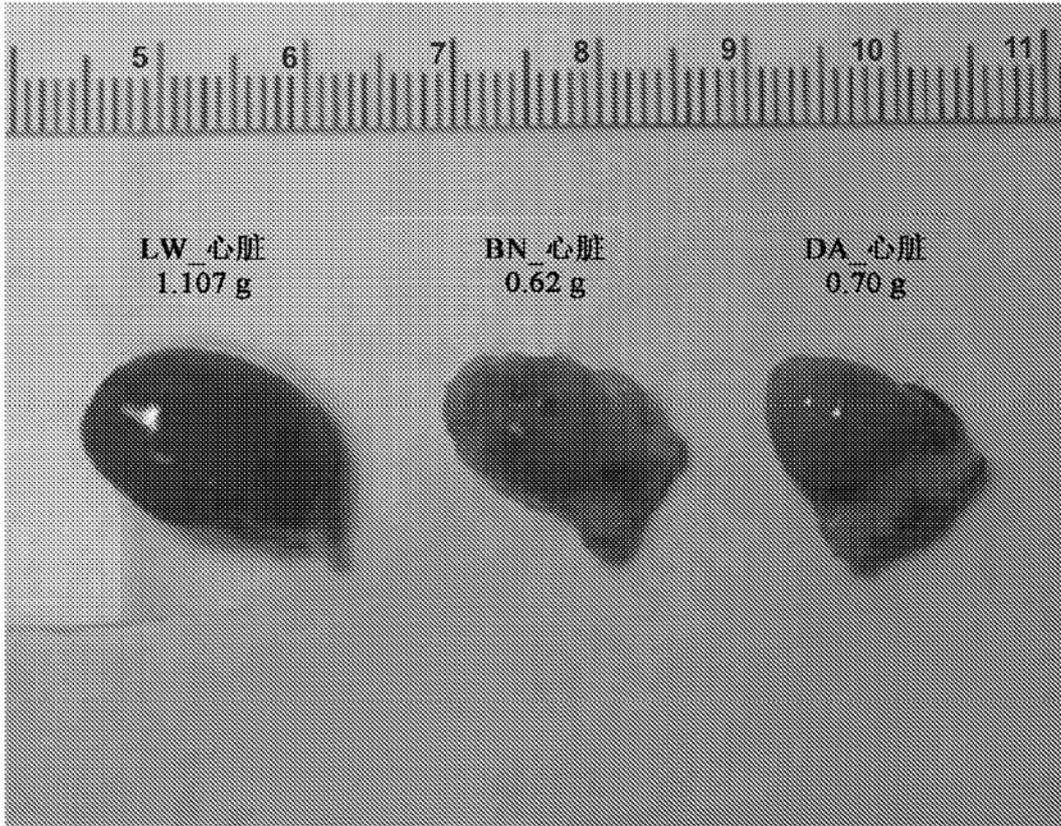


图30B

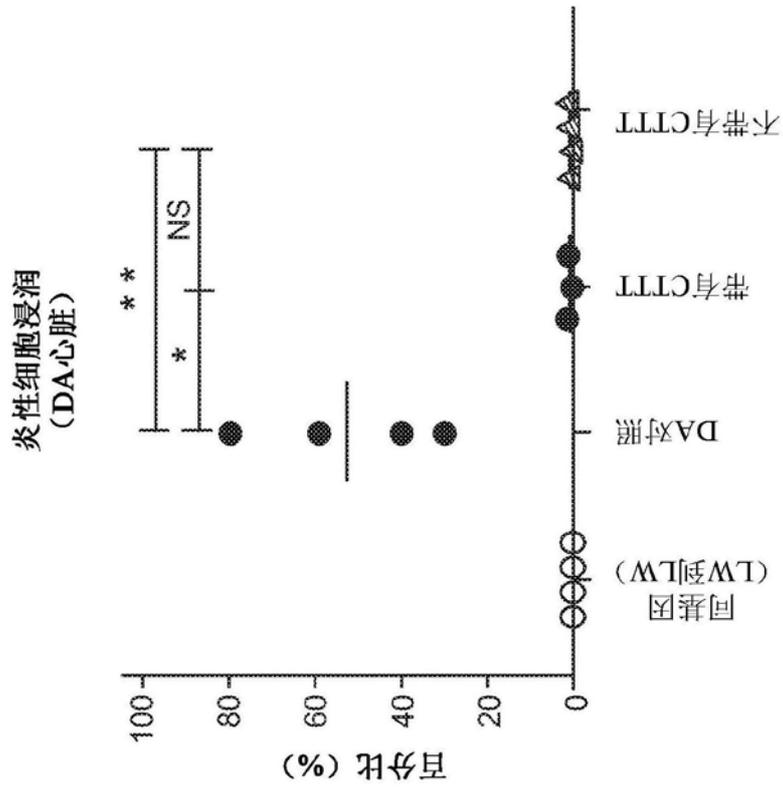


图31A

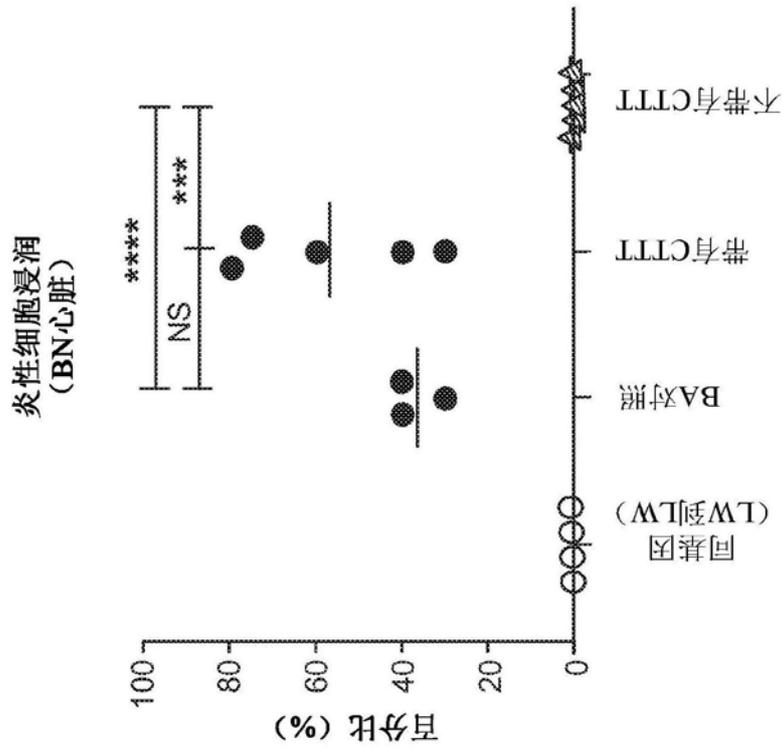


图31B

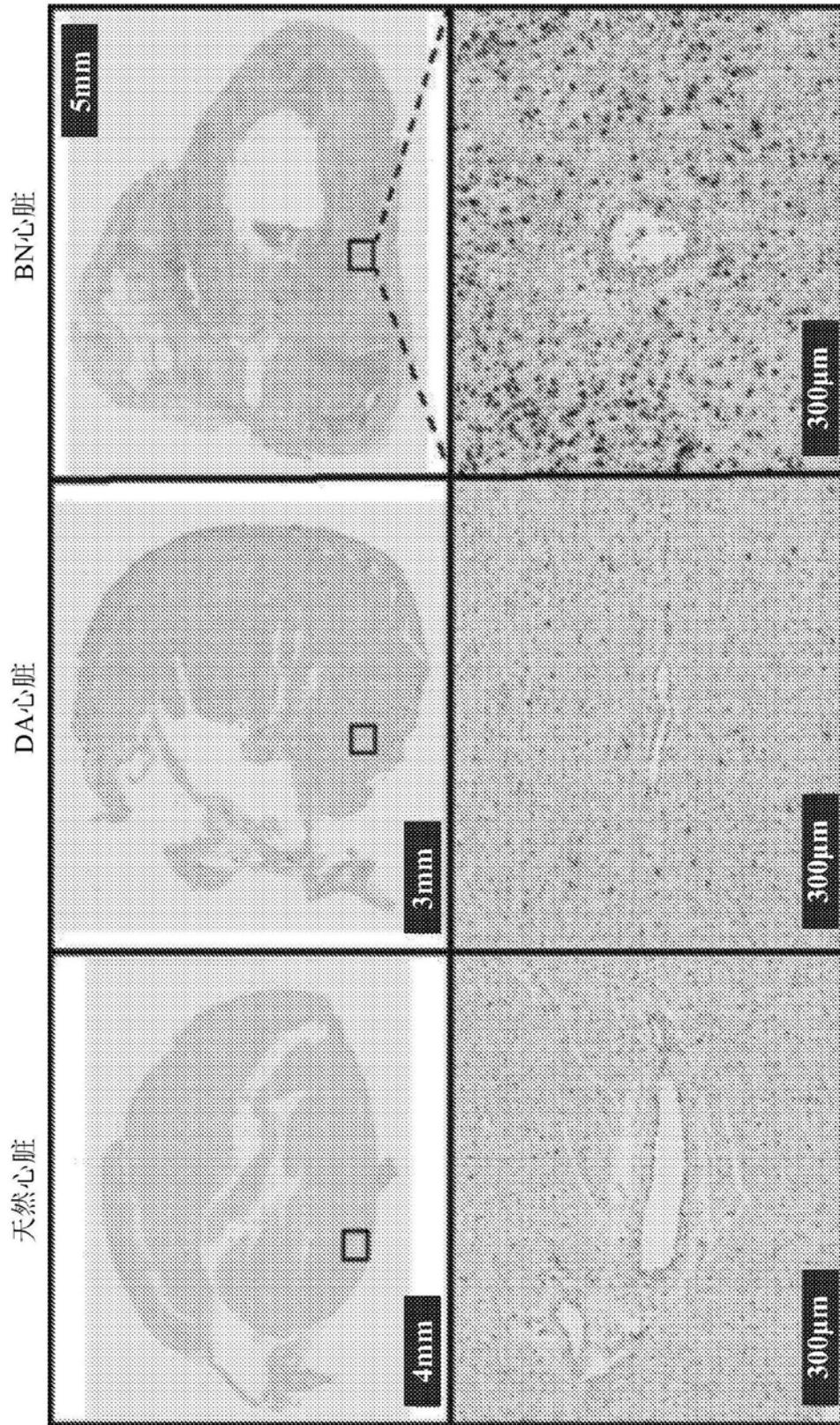
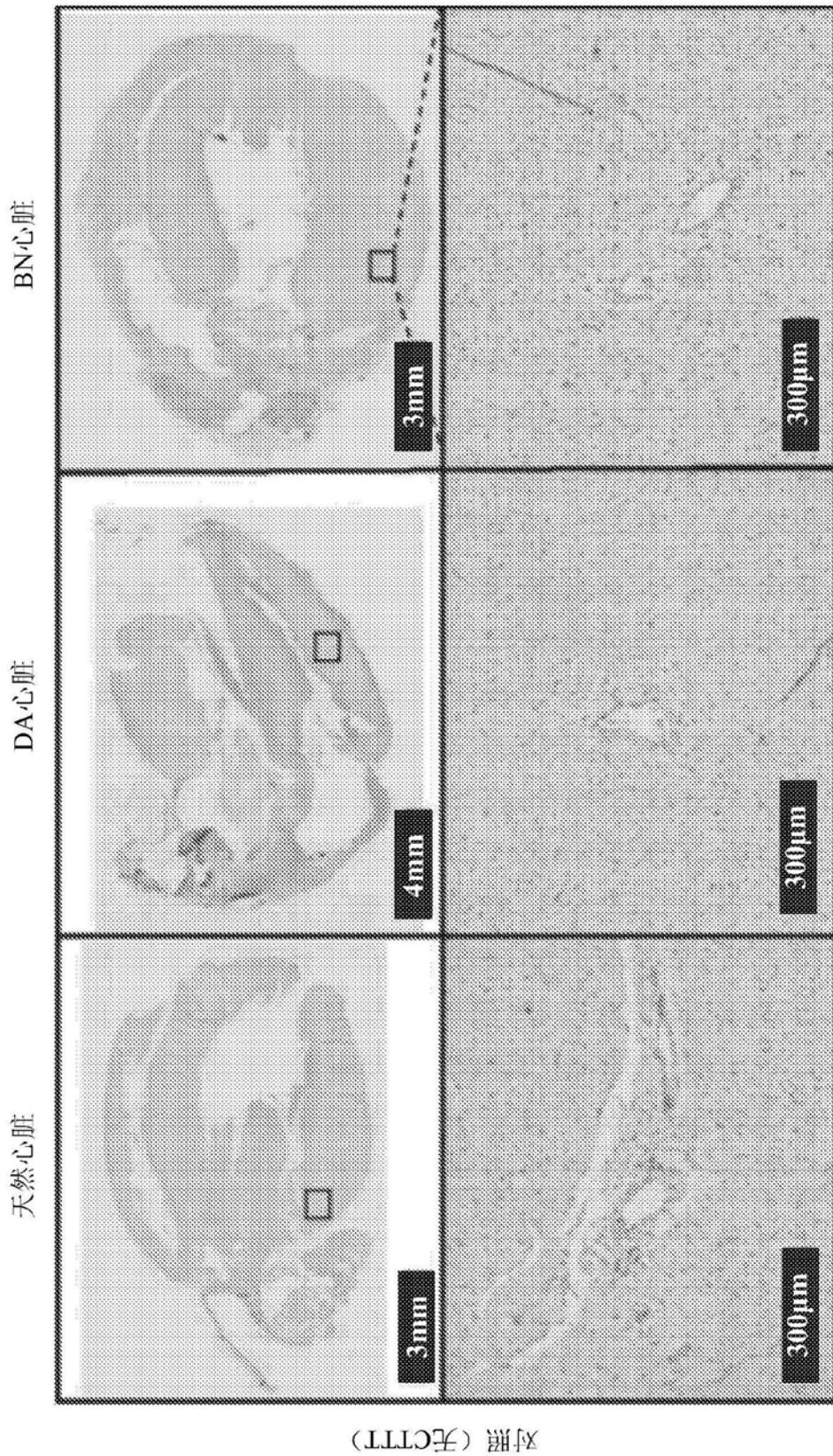


图31C



对照 (无CTT)

图31D

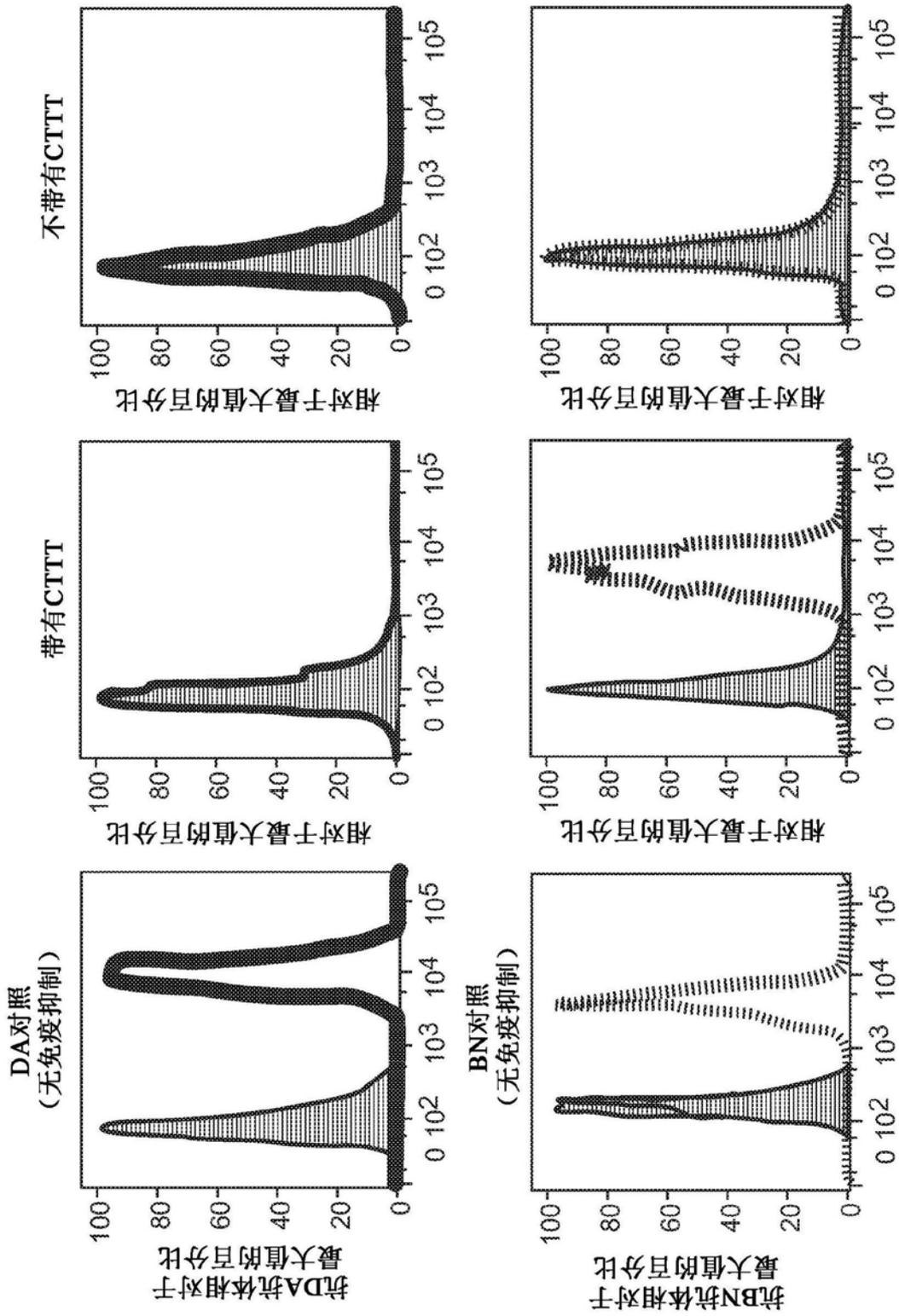


图32A

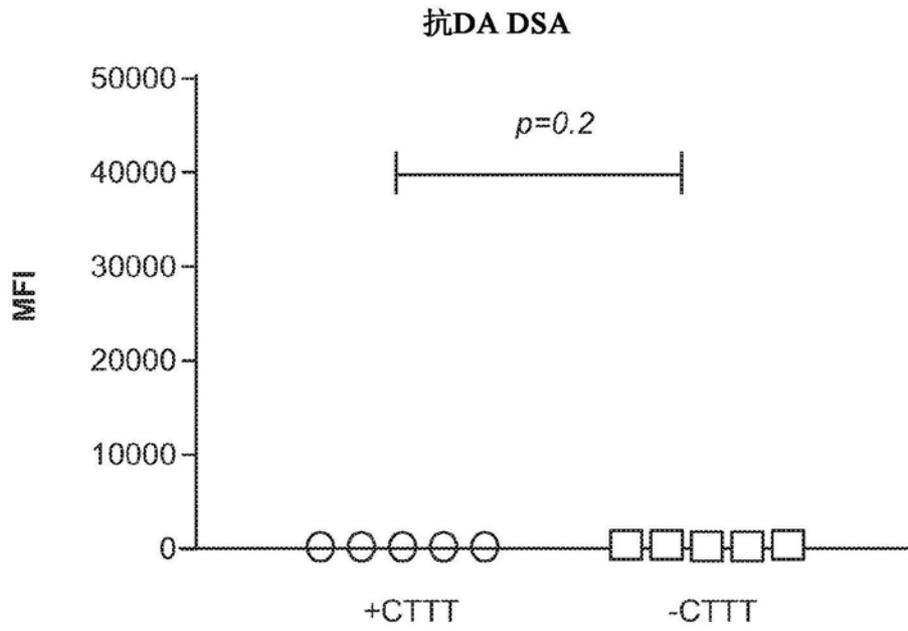


图32B

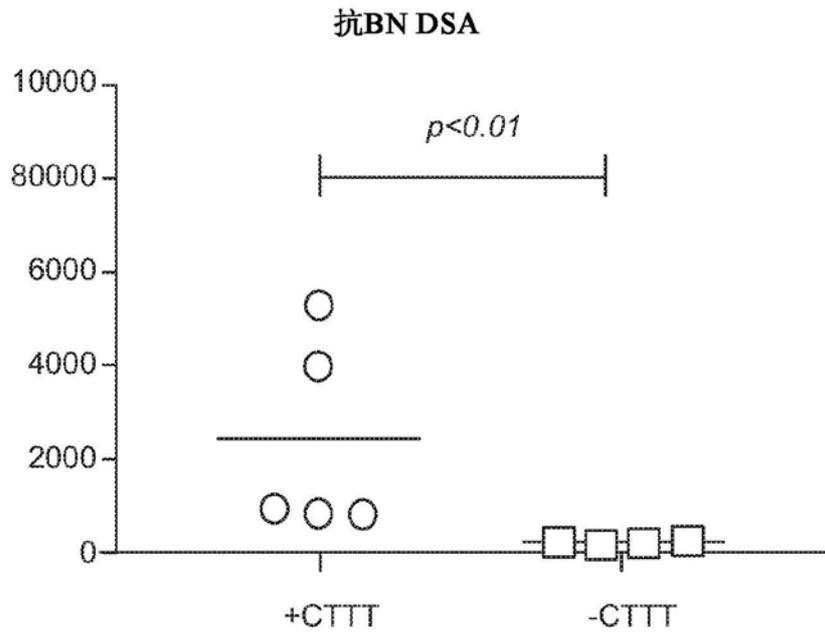


图32C

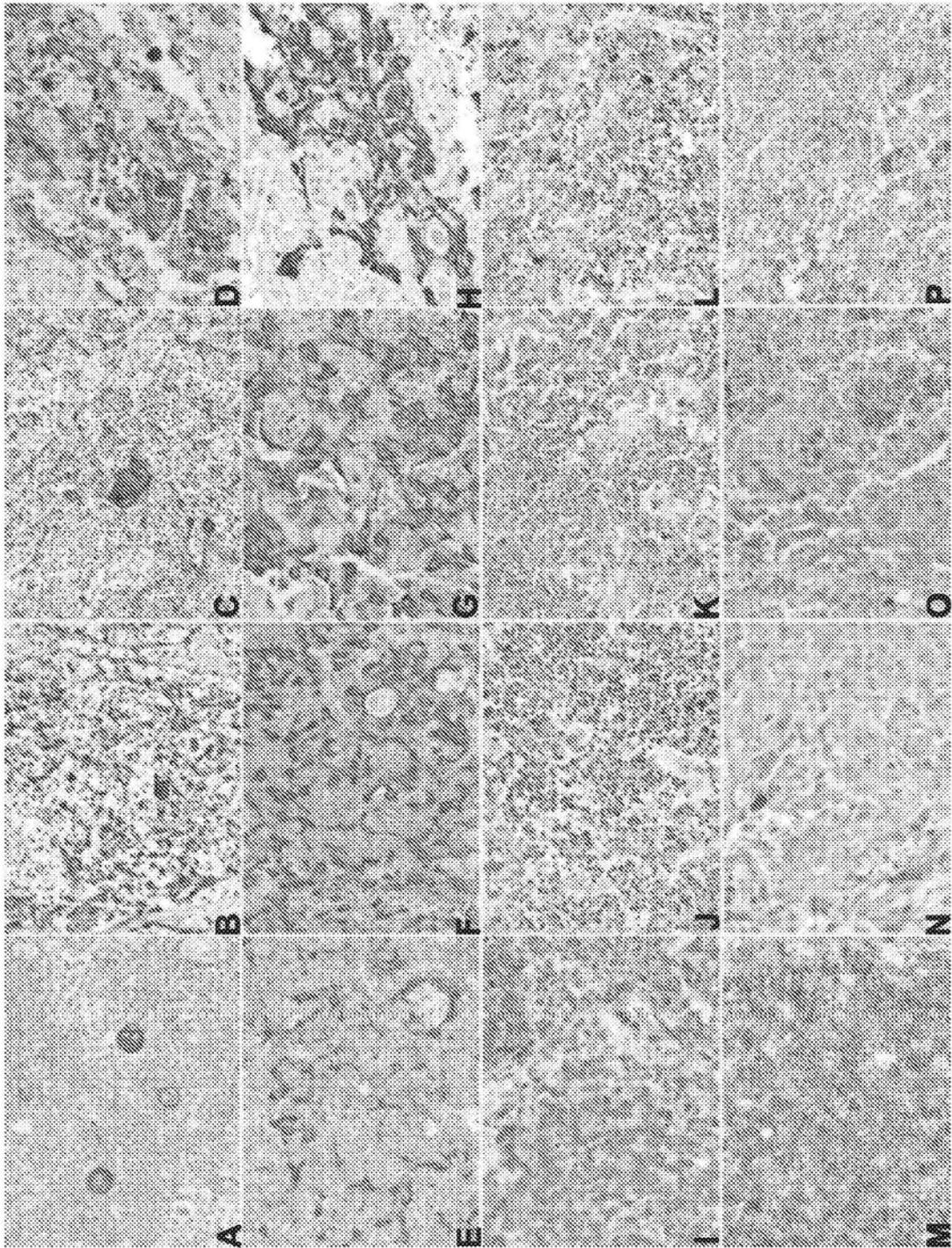


图33