(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101484461 B
(45)授权公告日 2014.09.17

(21)申请号 200780025011.3
(22)申请日 2007.08.16
(30)优先权数据
60/838,812 2006.08.18 US
60/927,377 2007.05.04 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2008.12.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2007/018048 2007.08.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2008/024242 EN 2008.02.28
(73)专利权人 阿哥斯医疗公司
地址 美国北卡罗来纳州
(72)发明人 C·尼科莱特 S·布兰德 Z·钟 H·王 J·阿尔普 S·拉姆查兰 M·L·巴罗雅
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平
(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)

(56)对比文件
US 20040110673 A1,2004.06.10, 全文.
WO 2004016284 A1,2004.02.26,
CN 1736483 A,2006.02.22,
WO 9632965 A1,1996.10.24,
US 20030219436 A1,2003.11.27, 全文.
Matthias Lechmann,et al..Role of CD83 in the Immunomodulation of Dendritic Cells.《Int Arch Allergy Immunol》.2002, 第129卷(第2期),113-118.
Bessmertny等.94 Tacrolimus and mycophenolate mofetil(MMF) GVHD Prophylaxis in allogeneic SCT(alloSCT) recipients:Altered MMF pharmacokinetics(PK) associated with AGVHD.《Biology of blood and marrow transplantation》.2003,

审查员 刘新蕾

权利要求书1页 说明书32页
序列表5页 附图10页

(54)发明名称

CD83在联合治疗中的用途

(57)摘要

本发明涉及改进的抑制和/或预防不希望有的免疫应答的方法,包括使用CD83。在某些实施方式中,对受试者共施用CD83和至少一种其它免疫抑制化合物。本发明也提供了产生致耐受性树突细胞和调节性T细胞的方法。这些细胞可以用来在体外产生用于治疗目的的另外的细胞,或它们可以用来在体内抑制和/或预防不希望有的免疫应答。本发明的方法可以用来预防或减少自身免疫疾病的严重程度,也可以用来诱导对于至少一种诸如治疗性蛋白质或移植组织的治疗性组合物的耐受性。

CN 101484461 B

1. 可溶性 CD83 联合第一免疫抑制化合物在制备用于预防、治愈或缓解自身免疫疾病、对治疗性组合物的免疫应答或移植组织的排斥的至少一种症状的药物中的用途，其中所述第一免疫抑制化合物选自环孢素、他克莫司、西罗莫司和抗 CD45RB mAb。

2. 权利要求 1 所述的用途，其中所述可溶性 CD83 和第一免疫抑制化合物用于在同一制剂中经过相同的给药途径施用，或者在不同的制剂中和 / 或经过不同的给药途径施用。

3. 权利要求 1 或 2 所述的用途，其中所述第一免疫抑制化合物是环孢素。

4. 权利要求 1 或 2 所述的用途，其中所述药物还含有第二免疫抑制化合物，其中所述第一免疫抑制化合物是西罗莫司，并且所述第二免疫抑制化合物是抗 CD45RB mAb。

5. 权利要求 1 或 2 所述的用途，其中所述药物还含有第二免疫抑制化合物，其中所述第一免疫抑制化合物是他克莫司，并且所述第二免疫抑制化合物是吗替麦考酚酯。

6. 权利要求 1 或 2 所述的用途，其中所述可溶性 CD83 和所述第一免疫抑制化合物在相隔 3 天之内施用。

7. 权利要求 1 或 2 所述的用途，其中所述可溶性 CD83 通过向受试者引入编码 CD83 的核酸来施用。

8. 权利要求 1 或 2 所述的用途，其中所述可溶性 CD83 与移植组织一起向移植患者施用，和 / 或在组织移植后向移植患者施用。

9. 权利要求 1 所述的用途，其中所述治疗性组合物是与移植组织有关的抗原。

10. 权利要求 1 或 2 所述的用途，其中所述可溶性 CD83 对从移植供体取出后的待移植组织施用。

11. 可溶性 CD83 与第一免疫抑制化合物的组合在制备用于预防、治愈或缓解移植组织的排斥的至少一种症状的药物中的用途，其中所述第一免疫抑制化合物选自环孢素、他克莫司、西罗莫司和抗 CD45RBmAb。

12. 权利要求 4 或 5 所述的用途，其中所述可溶性 CD83、所述第一免疫抑制化合物、所述第二免疫抑制化合物和所述治疗性组合物用于同时施用或用于分别施用。

13. 可溶性 CD83 与第一免疫抑制化合物的组合在制备用于处理在从移植供体取出后和在移植前的待移植组织的药物中的用途，其中所述第一免疫抑制化合物选自环孢素、他克莫司、西罗莫司和抗 CD45RB mAb。

14. 权利要求 11 所述的用途，其中所述药物还含有第二免疫抑制化合物，其中所述第一免疫抑制化合物是西罗莫司，并且所述第二免疫抑制化合物是抗 CD45RB mAb。

15. 权利要求 14 所述的用途，其中所述可溶性 CD83、所述第一免疫抑制化合物和所述第二免疫抑制化合物用于同时施用或用于分别施用。

CD83 在联合治疗中的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有 2007 年 5 月 3 日提交的美国临时申请 60/927377 和 2006 年 8 月 18 日提交的美国临时申请 60/838812 的优先权，本文明确地引入这两项申请完整的内容作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及改进的治疗受试者以抑制或预防不希望有的免疫应答的方法。本方法包括使用 CD83，并使得受试者对于治疗组合物耐受。例如，本方法可以用来预防移植组织的排斥。

背景技术

[0004] 哺乳动物的免疫系统能够对大量的外来抗原作出保护反应。遗憾的是，当涉及用于治疗用途的化合物时，包括例如，用于治疗某些障碍和疾病的移植组织、基因治疗载体和化合物（尤其是蛋白质），正是这种应答会导致困难。例如，患有血友病 B 的病人会对治疗性的凝血因子 IX 以及用来这些病人中表达凝血因子 IX 的基因转移载体产生免疫应答（见，例如，Dobryzynski 等人 (2006)Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA103 :4592-4597)。类似地，用治疗性抗体（例如，Rituxan® 和 Bexxar®）治疗的病人会产生针对这些治疗性抗体的免疫应答，这使得抗体失效，而使病人经受额外的风险。

[0005] 遗憾的是，目前预防或消除不希望有的免疫应答的治疗一般包括使用导致免疫系统全面抑制的化合物（见，例如，Janeway 等人，eds.(2001)Immunobiology(5th ed.，Garland Publishing,New York,NY) 的第 14 章）。这些治疗将病人置于未来感染的风险之中（见，例如，Gottschalk 等人 (2005)Annu.Rev.Med.56 :29-44)，并且一般具有不希望的和严重的副作用。联合不同的治疗的一些研究显示某些联合治疗实际上加重了毒性（见，例如，Andoh 等人 (1996)Transplantation 62 :311-316)。目前可用的治疗也需要长期的治疗——某些情况下（例如，组织移植），在病人的余生中进行治疗。

[0006] 也有许多其它例子，其中，需要对免疫系统的集中和有限时间的抑制，例如，治疗诸如接触性皮炎、慢性哮喘、药物变态反应和全身过敏的变应性反应和超敏反应（见，例如，Janeway 等人，eds.(2001)Immunobiology(5th ed.，Garland Publishing,New York,NY) 的第 12 章）。一般地，抑制这些应答的临床治疗也具有广泛的效应（见，Janeway 等人，同上）。另一例子为 B 细胞介导的应答。B 细胞是抗体介导的移植排斥的主要介质，也作为抗原递呈细胞发挥作用。但是，目前对于预防不希望有的 B 细胞介导的应答的不良效应的治疗仅限于使用抗 CD20 的单克隆抗体 (mAb) 进行排除，而且对于防止 B 细胞的活化和 / 或分化没有有效的治疗。其它目前使用的对于不希望有的免疫应答的治疗是使用特异性抑制剂阻断由肥大细胞产生的炎性介质的合成或效应。某些设计为诱导脱敏作用的治疗包括注射特异性抗原 ；相信这些治疗将针对变应原的免疫应答从 T_H2 型转变为 T_H1 型应答，从而产生 IgG 代替 IgE。这些治疗在许多（但不是所有）情况下已取得成功。

[0007] 许多形式的免疫由 T 细胞介导，包括淋巴细胞溶解、迟发型超敏反应 (DTH)、移植排斥和同种异体移植物排斥（见，例如，Paul(1993)Fundamental Immunology(Raven Press,New York,New York)(3rdcd.)）。T 细胞的行为受树突细胞（“DC”）的影响，树突细胞是免疫系统的专业抗原递呈细胞，并能够显著刺激 T 细胞应答（有时，本文也称其为“免疫刺激性树突细胞”）；见，例如，Banchereau 和 Schmitt，eds.(1995)Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology，Vol.2(Plenum Press，New York)；Schuler 等人 (2003)Curr.Opin.Immunol.15：138-147；美国专利申请号 10/287813)。

[0008] 在某些情况下，树突细胞也在免疫耐受中发挥重要作用。在上下文中，它们有时也被称为“致耐受性树突细胞”（见，例如，Steinman 等人 (2003)Ann.Rev.Immunol.21：685-711；Kubach 等人 (2005)Int.J.Hematol.81：197-203)。遗憾的是，树突细胞在外周血中极少，所以某些应用可能需要产生治疗量的致耐受性树突细胞的离体方法。已描述了产生免疫刺激性 DC 的方法（见，例如，美国专利号 6274378)，但这些 DC 不是致耐受性的。其它类型的细胞也在耐受性中显示作用，包括“调节性 T 细胞”（见，例如，Boehmer(2005) Nat.Immunol.6：338-344)。在啮齿类动物中的研究证明了专业的调节性（或“抑制”）T 细胞的独特的 $CD4^+CD25^+$ 群体，它们活跃并有力地防止自体反应性 T 细胞的活化和效应器功能 (Sakaguchi 等人 (1995)J.Immuno l.155：1151-1164；Takahashi 等人 (1998)Int.Immunol.10：1969-1980；Itoh 等人 (1999)J.Immunol.162：5317-5326)。这些调节性 T 细胞的消除或失活已显示导致严重的自身免疫疾病并增强对于同种异体抗原和肿瘤的免疫应答（见，Shimizu 等人 (1999)J.Immunol.163：5211-5218)。最近的研究已确认了人类的调节性 T 细胞（美国专利申请号 10/661804)。也报道了具有调节性质但不是 $CD4^+CD25^+$ T 细胞的人类 T 细胞的制备（见，美国专利申请号 10/618134)。

[0009] CD83 是来自蛋白质的免疫球蛋白（“Ig”）超家族的分子（见，例如，Zhou 等人 (1999)J.Immunol.149：735-742；见美国专利号 7169898；综述，见 Fujimoto 和 Tedder(2006)J.Med.Dent.Sci.53：86-91)。尽管 CD83 的精确功能仍然有待于确定，但已经报道了可溶性形式的 CD83 结合未成熟的和成熟的树突细胞（见 Lechmann 等人 (2001)(J.Exp.Med.194：1813-1821)。该作者也报道了这种蛋白质在体外减少成熟的树突细胞表达 CD80 和 CD83，并且它在体外抑制树突细胞刺激 T 细胞的能力（见，Lechmann 等人 (2002) Trends in Immunology 23：273-275)。其他人已报道了可溶性形式的 CD83 在体内的存在（见，例如，Hock 等人 (2002)Int.Immunol.13：959-967)。用 HSV-1 感染 DC 的研究证明病毒感染导致 CD83 的降解和 CD83mRNA 转运的抑制；这种可能的通过 HSV-1 的逃脱机制进一步支持了 CD83 在 DC 生物学中的重要性（见，例如，Kruse 等人 (2000)J.Virol.74：7127-7136.)。Kruse 等人 (2000)(J.Exp.Med.191：1581-1589) 报道，GC7(N(1)-脒基 -1，7- 二氨基庚烷）干扰 CD83 mRNA 的核胞质转运，阻止 CD83 的表面表达，并明显抑制这些 DC 对 T 淋巴细胞的活化。

[0010] CD83 是大约 45kDa 的单链糖蛋白，未成熟形式的 CD83 包括在蛋白质嵌入膜时除去的信号肽。成熟的 CD83 包括以下三个结构域：胞外域、跨膜域和胞质域（见，例如，WO 2004/046182，其正确地鉴定了胞外域)。CD83 胞外域包括由至少两个外显子编码的单 Ig 样 (V 型）域（见，例如，Zhou 等人 (1999)J.Immunol.149：735-742；GenBank ID#Z11697)，并在天然的成熟树突细胞（“mDC”）的细胞表面非常强烈地表达。

[0011] 美国专利号 5 316 920 和相应的 WO 93/21318 描述了 CD83 蛋白质（命名为“HB15”）和“编码 HB15 蛋白质或其部分（包括任一个特异性结构域、配体结合片段或免疫特异性片段）的 cDNA 序列”（第 2 栏，第 23-25 行）。该专利也讨论了“与 HB15 反应的抗体和使用抗 HB15 抗体或其它 HB15 功能拮抗剂治疗免疫障碍、疾病或综合征的方法”的用途（见摘要）。该专利进一步推测（第 3 栏，第 6-12 行），“HB15 蛋白质、它的免疫特异性片段或配体结合片段或特异性域，或其它干扰 HB15 功能的 HB15 拮抗剂，可以用来治疗性地改变或抑制免疫应答或细胞相互作用的发展或进展，或向表达 HB15 的细胞递送药物、毒素或显影剂”。

[0012] 美国专利号 5710262（已被授予专利权的美国专利号 5316920 的申请的部分继续申请）和相应的 WO 95/29236 涉及 CD83 蛋白质，并讨论了人类和小鼠的蛋白质之间的比较（第 2 栏，第 46-48 行）。这些专利和申请进一步涉及“产生人类 HB15 或 HB15 的哺乳动物同系物的方法”（第 3 栏，第 5-6 行）、抗体的产生（第 4 栏，第 35-37 行）和 HB15 抗体用来“向表达 HB15 的细胞递送药物、毒素或显影剂”的用途（第 4 栏，第 38-39 行）。

[0013] WO 97/29781 涉及“刺激体液免疫应答的方法，包括以药学可接受的载体施用 CD83 试剂和抗原，其中，CD83 刺激抗原特异性抗体的产生”（第 1 页）。该申请记载，“在优选的实施方式中，CD83 试剂为编码 CD83 的胞外域的 DNA 试剂和包含 CD83 的胞外域的 CD83 肽”（第 2 页）。该申请也讨论了 CD83 抗体抑制哺乳动物中的不希望有的抗原特异性应答的用途，并记载“这样的方法在预防或治疗自身免疫疾病以及组织或器官移植排斥中，和在治疗或预防变态反应或哮喘中是有用的”（第 3 页）。

[0014] WO 2004/046182 和相应的美国专利号 7 169 898（本文完整引入这两篇作为参考）准确地鉴定了 CD83 的胞外域，并提出“蛋白质 CD83 家族成员的可溶形式在治疗或预防由涉及树突细胞、T 细胞和 / 或 B 细胞的细胞免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或医学状况中的用途”(WO 2004/046182，第 7 页）。该 PCT 申请记载了（第 12 页）一种形式的 CD83 在不成熟和成熟的树突细胞中都诱导一种改变的表面标记表达模式。进一步，“本发明蛋白质 CD83 家族成员的可溶形式能够破坏树突细胞与 T 细胞和 / 或 B 细胞的相互作用，和 / 或抑制树突细胞 -T 细胞簇的形成”（第 14 页；见 Sénéchal 等人 (2004) Blood 103 :4207-4215)。该申请进一步公开了用 hCD83ext 处理的小鼠没有发展成与实验性自身免疫性脑炎（“EAE”）相关的典型的瘫痪（第 12 页；见 Zinser 等人 (2004) J. Exp. Med. 200 :345-351)。

[0015] 鉴于以上所述，申请人认识到，需要安全有效的治疗，该治疗可以抑制对特定组合物的免疫应答，而不产生免疫应答的全身抑制，且不导致对病人的其它伤害。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明涉及改进的抑制和 / 或预防不希望有的免疫应答的方法，该方法包括使用 CD83。在某些实施方式中，对受试者共施用 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物。本发明也提供了产生致耐受性树突细胞和调节性 T 细胞的方法。这些细胞可以用来在体外产生用于治疗目的的另外的细胞，或它们可以用来在体内抑制和 / 或预防不希望有的免疫应答。本发明的方法可以用来预防或减少自身免疫疾病的严重程度，也可以用来诱导对于至少一种诸如治疗性蛋白质或移植组织的治疗性组合物的耐受性。

附图说明

[0018] 图 1（见实施例 2）显示在 T 细胞增殖分析中，作为给从中获得细胞的小鼠施用的匙孔蟅血蓝蛋白 (KLH) 浓度的函数的 [^{3}H]- 胸苷摄取。简单地说，用 sCD83 处理动物，然后注射 KLH；28 天后，取出脾细胞，并用不同剂量的 KLH 再刺激脾细胞。对于从用 sCD83 处理的动物（菱形）以及未处理的对照动物（正方形）和用 BSA 处理的动物（三角形）获得的细胞，显示作为 KLH 浓度（μg/ml）的函数的 ^{3}H- 胸苷掺入。

[0019] 图 2 显示在 T 细胞增殖分析中，作为给从中获得细胞的小鼠施用的匙孔蟅血蓝蛋白 (KLH) 浓度的函数的 [^{3}H]- 胸苷摄取（见实施例 3）。简单地说，用 sCD83 处理动物，然后注射 KLH；10 天后，取出脾细胞，并用不同剂量的 KLH 再刺激脾细胞。对于从用 sCD83 处理的动物（菱形）以及假接种的对照动物（三角形）获得的细胞，显示作为 KLH 浓度（μg/ml）的函数的 ^{3}H- 胸苷掺入。

[0020] 图 3 显示在 T 细胞增殖分析中，作为给从中获得细胞的小鼠施用的匙孔蟅血蓝蛋白 (KLH) 浓度的函数的 [^{3}H]- 胸苷摄取（见实施例 3）。简单地说，用 sCD83 处理动物，然后注射 KLH；22 天后，取出脾细胞，并用不同剂量的 KLH 再刺激脾细胞。对于从用 sCD83 处理的动物（菱形）以及假接种的对照动物（三角形）获得的细胞，显示作为 KLH 浓度（μg/ml）的函数的 ^{3}H- 胸苷掺入。

[0021] 图 4 显示实施例 5 描述的实验的结果，证明可溶性 CD83（“sCD83”）抑制体外 B 细胞的增殖。

[0022] 图 5 显示实施例 5 描述的实验的结果，证明 sCD83 抑制移植接受体的 B 细胞的体外抗体产生。星号表示 $p<0.01$。

[0023] 图 6 显示实施例 7 描述的实验的结果，证明 sCD83 可以抑制 B 细胞对于外来抗原的同种异体抗体应答的诱导。

[0024] 图 7 显示实施例 8 描述的实验的结果，证明 sCD83 与西罗莫司 (sirolimus)（“Rapa”）和抗 CD45RB mAb 的共施用导致了移植心脏组织的长期存活。

[0025] 图 8 显示实施例 8 描述的实验的结果，证明 sCD83 与西罗莫司（“Rapa”）和抗 CD45RB mAb 的共施用抑制了移植接受体中的 DC 成熟。星号表示 $p<0.05$。

[0026] 图 9 显示实施例 8 描述的实验的结果，如同图 9 一样，证明 sCD83 与西罗莫司（“Rapa”）和抗 CD45RB mAb 的共施用抑制了移植接受体中的 DC 成熟。星号表示 $p<0.01$。

[0027] 图 10 显示实施例 8 描述的实验的结果，证明 sCD83 与西罗莫司（“Rapa”）和抗 CD45RB mAb 的共施用在移植接受体中产生了调节性 T 细胞。星号表示 $p<0.01$。

[0028] 图 11 显示实施例 9 描述的实验的结果，证明 sCD83 抑制了来自恒河猴 (cynomolgus monkeys) 的 mDC 的体外 TNF-α 产生和 mDC 活化标志物的表面表达。

[0029] 图 12 显示实施例 9 描述的实验的结果，证明 sCD83 适度抑制了体外 TNF-α 产生和单核细胞活化标志物的表面表达。

[0030] 图 13 显示实施例 9 描述的实验的结果，表明 sCD83 促进了调节性 T 细胞的产生。纵轴显示 $CD4^+$ $CD25^+$ $iFoxp3^+$ 细胞的百分比。

[0031] 图 14 显示实施例 9 描述的实验的结果，表明用可溶性 CD83 处理的树突细胞产生了数目增加的调节性 T 细胞。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明提供了使用 CD83 治疗受试者的方法。本发明的方法包括 CD83 的单独使用或与至少一种其它免疫抑制化合物的联合使用。本发明提供了单独使用 CD83 或与至少一种其它免疫抑制化合物联合使用 CD83 的方法；本发明也提供了包含 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物的组合物。本发明的方法包括使用 CD83 和至少 1、2、3、4 或 5 种或更多种免疫抑制化合物的方法。

[0034] 在某些实施方式中，本发明的方法也包括其它化合物的使用。例如，在某些实施方式中，给受试者共施用至少一种治疗性组合物与 CD83，使得受试者对于一种或多种治疗性组合物耐受。在某些实施方式中，本发明的方法包括通过给受试者共施用 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物连同至少一种治疗性组合物而使得受试者耐受。也可以使用本发明的方法（例如）来诱导对于至少一种治疗性组合物的耐受性，或来预防或减少自身免疫疾病的严重程度。治疗性组合物可以是移植的组织。因此，在某些实施方式中，本发明的方法可以用来预防组织移植的排斥。

[0035] 本发明也提供了使得受试者耐受的方法，包括在体内或体外（例如，离体）在存在 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物的条件下通过成熟作用产生致耐受性树突细胞。在某些实施方式中，致耐受性树突细胞用来产生调节性 T 细胞。本发明的致耐受性树突细胞和调节性 T 细胞可以在体内或体外产生；然后可以给受试者施用体外产生的细胞。本发明的致耐受性树突细胞和调节性 T 细胞可以是自体的或者可以来自干细胞。本发明的组合物和方法可以用于对抗原的耐受以及用于治疗或预防由免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或医学状况（例如，障碍），其中，给受试者施用有效量的 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物。

[0036] 本发明的目的随实施方式而不同。在某些实施方式中，本发明的目的包括受试者对治疗性组合物的完全耐受。在某些实施方式中，本发明的目的包括预防、治愈、减少和 / 或缓解由免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或障碍的至少一种症状。如果实现了这些目的中的至少一种，则可以认为受试者已经耐受和 / 或已经被免疫抑制（即，认为已经诱导或获得免疫耐受）。因此，本文所用的使受试者“耐受”或诱导“免疫抑制”，意思是相对于未治疗的对照或其它合适的对照（例如，如果治疗旨在预防免疫应答的发展或减轻免疫应答的严重性，则与治疗之前的症状或预期的未经治疗的症状的严重程度相比），由涉及树突细胞、B 细胞或 T 细胞的免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或障碍的至少一种症状被预防、治愈、减轻或缓解。本领域技术人员熟悉症状的检测和评估的方法的选择和应用，以及合适的对照的选择。

[0037] 因此，如果与合适的对照相比，由免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或障碍的至少一种症状减轻或缓解至少 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或 100％，则认为受试者已经耐受，和 / 或认为免疫抑制已经发生。在治疗旨在减少受试者发展自身免疫疾病的风险的实施方式中，与合适的对照相比，风险减轻或缓解至少 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或 100％；可以对受试者群体通过统计学方法进行这一评估。在治疗旨在使受试者对治疗性组合物耐受的实施方式中，与合适的对照相比，免疫应答的不希望有的功能减少至少 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或 100％。在其它实施方式中，本发明的目的包括致耐受性树突

细胞的产生；在这些实施方式中，“症状”指细胞在体内或体外的行为的参数。

[0038] 本发明的方法可用于治疗目的，因而目的在于预防、治愈或缓解由免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或障碍的至少一种症状。如果相对于合适的对照，例如与治疗之前的症状相比或者在治疗为预防性时与预期的症状的严重性相比，疾病或障碍的症状适当地减少、增加或改善至少 10％、20％、30％、40％、50％、70％、90％或更多，那么认为该症状减轻或缓解。技术人员熟悉评估症状改变的技术和标准。免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或障碍的症状对于本领域技术人员是已知的，包括：移植组织的异常的组织学；移植组织的异常的功能；在诸如诊断或移植的事件之后短暂的存活期；血液中异常地或不希望地高或低水平或数目的一种或多种指示蛋白或其它化合物，如不希望有的抗体或不希望有的细胞（例如，抗原特异性树突细胞或 T 细胞）；血液或身体其它部位中异常地或不希望地高或低水平或数目的指示细胞，例如不希望地低水平或数目的调节性 T 细胞，使得不希望有的免疫应答启动或维持。

[0039] 合适的话，可以利用体外试验，例如使用从受试者分离的细胞的混合淋巴细胞反应，来检测体内耐受性或耐受和 / 或免疫抑制。类似地，也可以在使用诸如树突细胞、T 细胞或 B 细胞的各种类型细胞的离体分析中，检测在离体的细胞中获得的耐受性或耐受和 / 或免疫抑制。如果使用离体方法检测耐受性或耐受和 / 或免疫抑制，如果与合适的对照相比，细胞对免疫刺激的应答减少至少 10％、20％、30％、40％、50％、70％、90％或更多，则认为耐受性或耐受已经出现。合适的分析直接或间接地检测免疫应答，且为本领域已知；它们包括但不限于，混合淋巴细胞反应分析、细胞毒性分析、抗体效价分析、产生 IL-10 的分析、产生 TGF-β 的分析、细胞表面标志物的评价和 Foxp3 表达的分析。

[0040] 本文所用的术语“可溶性 CD83”或“sCD83”指包含蛋白质 CD83 家族成员的胞外域的至少一部分的蛋白质分子。在某些实施方式中，可溶性 CD83 蛋白质不具有能够将所述分子锚定于细胞膜（在其中表达该蛋白质）上的氨基酸序列。例如，可溶性 CD83 蛋白质可以包括位于胞外域之外的全长、天然 CD83 蛋白质的额外的残基。本领域已知 CD83 蛋白质、核酸序列和结构。人 CD83 的核酸序列（如 GenBank 登记号 Z11697 所示）在 SEQ ID NO：1 中示出。该序列包括位点 11-628 的编码序列（包括终止密码子）和位点 11-67 的信号肽。编码成熟 CD83 肽的序列位于位点 68-625。限制性内切酶识别位点位于该序列的起始和末端（位于位点 1-6 和 1755-1760）。人 CD83 的氨基酸序列（如 GenBank 登记号 Q01151 所示，由 SEQ ID NO：1 所示的核酸序列编码）在 SEQ ID NO：2 中示出。

[0041] 已描述 CD83 的胞外域包括天然、全长蛋白质的氨基酸 20-144。CD83 的全长氨基酸序列如 SEQ ID NO：2 所示，全长 CD83 的氨基酸 20-144 如 SEQ ID NO：4 所示。编码胞外域的 CD83 核酸序列的部分如 SEQ ID NO：3 所示。参见，例如，Zhou 等人 (1992) J. Immunol. 149：735-742、GenBank 登记号 Z11697 和 SwissProt 登记号 Q01151、WO2004/046182，本文完整引入作为参考。

[0042] 在其它实施方式中，CD83 蛋白质是“膜结合的”；即，它包括蛋白质 CD83 家族成员的胞外域的至少一部分，也包括具有能够将它锚定于诸如细胞膜的膜上的氨基酸序列的蛋白质或肽。本文所用的术语“CD83”包括可溶性 CD83 和膜结合的 CD83。

[0043] 在某些实施方式中，CD83 蛋白质与 SEQ ID NO：2 和 / 或 SwissProt 登记号 Q01151 所示的人 CD83 蛋白质序列的相应部分具有至少 65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％

或更高的序列同一性。因此，术语“CD83”包括鼠 CD83 蛋白质（也称为“HB15”，见，例如，Berchtold 等人 (1999)FEBS Lett.461 :211-216)。在某些实施方式中，CD83 蛋白质包含来自天然、全长 CD83 蛋白质的至少 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、100 个或更多连续氨基酸的片段，或包含与这样的片段具有至少 65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或更高的序列同一性的氨基酸序列。一般地，本文所用的“序列同一性”是指使用周知的 BLAST 比对程序，采用适合于序列类型（即，核苷酸或氨基酸）的默认参数确定的两个序列之间的序列相同性。可选择的程序为 BLASTN 和 BLASTP ；这些程序的细节为本领域已知，且可以在 NCBI（美国国家生物技术信息中心）网站找到。

[0044] 在某些实施方式中，本文所用的“可溶性 CD83”或“sCD83”指包含蛋白质 CD83 家族成员的胞外域的至少一部分的表位，其中，例如，当向受试者施用时，所述表位刺激对其自身的免疫应答。在这样的实施方式中，对 sCD83 表位的免疫应答可以模拟本文对于 sCD83 描述的活性和效应。即，对 sCD83 表位的免疫应答可具有包含天然 CD83 的胞外域的 sCD83 的活性，或者，对 sCD83 表位的免疫应答对于被施用的受试者的效应类似于由施用包含天然 CD83 的胞外域的 sCD83 产生的效应。在这样的实施方式中，CD83 在试验中或对受试者的活性或效应可以是对表位的免疫应答的结果，或者它可以源自 CD83 本身的活性，或源自这两者。

[0045] 用于本发明的 CD83 可以是 CD83 蛋白质的二聚物或多聚物。可以通过在 CD83 蛋白质的单体形式中存在的半胱氨酸残基（例如，其存在于天然蛋白质的位点 12、27、35、100、107、129 和 163 处）之间形成二硫键，或利用连接 CD83 蛋白质的单体形式中存在的相同或不同功能部分（例如，羧基、氨基、羟基、巯基等）的双功能连接分子（例如，二胺、二羧酸化合物等），来实现二聚化或多聚化。后者也包括使用多肽连接体（例如，诸如 $-[(Gly)_xSer]_y-$（其中，x 为例如 3 或 4，y 为例如 1-5）的小极性氨基酸残基）来产生可直接通过重组技术产生的二聚结构。在某些实施方式中，用于本发明的 CD83 为同型二聚物或同型多聚物（例如，包含天然 CD83 蛋白质（即，SEQ ID NO :2) 的氨基酸残基 20-144 的 sCD83，其通过可溶性 CD83 的第五个半胱氨酸残基（即，对应于天然蛋白质的氨基酸 129 的半胱氨酸残基）之间的二硫键来连接）。

[0046] 在某些实施方式中，CD83 可以为单体 ；在这样的实施方式中，CD83 的一个或多个天然半胱氨酸残基可以被另一个氨基酸残基例如小的和 / 或极性氨基酸残基所取代。在某些实施方式中，优选地，小的和 / 或极性氨基酸残基选自丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、苏氨酸等。在 CD83 为单体的某些实施方式中，CD83 蛋白质的至少一个半胱氨酸残基已被取代，例如，对应于全长天然蛋白质的位点 129 的半胱氨酸残基被丙氨酸取代。

[0047] 在某些实施方式中，术语“可溶性 CD83”或“sCD83”也包括 CD83 胞外域的至少一部分和功能片段和衍生物的融合蛋白（见，例如，WO 2004/046182)。合适的融合蛋白包括 CD83 胞外域的至少一部分和至少一种其它肽或蛋白质，只要该融合蛋白保留本文所述的 CD83 活性即可。因此，在某些实施方式中，融合蛋白包括 CD83 胞外域的至少一部分。这样的蛋白质或肽是本领域内已知的。在某些实施方式中，包含胞外域之外的 CD83 的其它残基的蛋白质包括在术语“可溶性 CD83”中。因此，合适的衍生物包括但不限于，C- 或 N- 末端上连接有额外序列的蛋白质，例如，那些在其 C- 末端携带部分跨膜域或在其 N- 末端携带短肽（例如，Gly-Ser-Pro-Gly，其可通过用凝血酶在凝血酶位点处切割而产生，例如，作为工

程融合蛋白的产物；或由融合蛋白裂解之后的 GST 片段产生的短肽）的蛋白质。在某些实施方式中，sCD83 包括天然全长蛋白质 (SEQ ID NO：2) 的氨基酸 20-145 或由所述氨基酸组成，其包括胞外域和 C- 末端的额外的氨基酸。在其它实施方式中，sCD83 由 SEQ ID NO：2 的氨基酸 20-143 组成。

[0048] 用于本发明的 CD83 的活性可以通过本领域已知的方法来评估。如果 CD83 蛋白质通过任何合适的分析测定显示出天然全长 CD83 蛋白质的至少一种活性，则称该 CD83 蛋白质具有“CD83 活性”。如果在这样的分析中，CD83 蛋白质的活性为在相同分析中测定的天然全长 CD83 蛋白质的活性的至少 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或以上，则称该 CD83 蛋白质具有“CD83 活性”。优选地，用于本发明的 CD83 蛋白质能够结合成熟免疫刺激性树突细胞并降低这些树突细胞刺激 T 细胞增殖的能力。在某些实施方式中，例如在实施例 9 所述的试验中，CD83 抑制或减少成熟 DC 或单核细胞中的 TNF-α。这种活性可以直接或间接地评估，且可以在体内或体外测定；合适的试验在本领域内已知，包括，例如，混合淋巴细胞反应试验或“MLR”（见，例如，Kruse 等人 (2000) J. Virol. 74：7127-7136；Lechmann 等人 (2001) J. Exp. Med. 194：1813-1821）。因此，与合适的对照相比，例如，与缺乏 sCD83 时成熟免疫刺激性树突细胞与 T 细胞之间的相互作用相比，用于本发明的 CD83 蛋白质能够使成熟免疫刺激性树突细胞刺激 T 细胞增殖的能力降低至少 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％或 90％或更多。在某些实施方式中，CD83 为表位，且具有刺激免疫应答的活性。可以通过在体外试验中或给受试者施用之后鉴定响应 CD83 产生的抗 CD83 抗体来测定该活性。

[0049] 在某些实施方式中，与合适的对照相比，用于本发明的 CD83 蛋白质可以使得在成熟过程的至少一个步骤中存在可溶性 CD83 的条件下体外成熟的免疫刺激性树突细胞的 TNF-α、CD80 和 / 或 CD83 表达至少降低 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或更多（见，例如，Lechmann 等人 (2001) J. Exp. Med. 194：1813-1821、WO 2004/046182、实施例 9）。这样，可以说 CD83 已经改变了细胞表面标志物的表达，即，已经改变了处理过的细胞的免疫表型。本领域技术人员可以理解，用于分析细胞表面标志物的表达的常用技术（例如，FACS 分析）有时可以产生代表混合的细胞群体的数据，且要注意鉴别在特定的数据组中代表哪些群体。

[0050] 蛋白质 CD83 家族的其它成员可以如下获得：将包含（例如）编码胞外部分的全部或部分人 CD83 编码区的核酸与来自其它动物如哺乳动物或来自相同生物体的其它组织的各种来源的核酸（例如，基因组 DNA、cDNA 或 RNA）杂交。用于本发明的方法和组合物的 CD83 和其它蛋白质可通过任一种合适的方法产生并纯化。产生、纯化和处理各种蛋白质及其衍生物以及编码它们的核酸的方法也是本领域内已知的。见，例如，Sambrook 等人 (1989) Molecular Cloning：ALaboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.)；见，美国专利号 7169898、美国专利申请号 10/382397 和美国专利申请号 10/535522。

[0051] 在某些实施方式中，通过向受试者提供编码 CD83 蛋白质的核酸来给受试者施用 CD83。例如，可以向受试者施用包含美国专利号 7169898 的 SEQ ID NO：1 的核苷酸 58-432 的 DNA 片段或相应的 mRNA 来施用 CD83（见，例如，美国专利号 7015204）。类似地，在某些实施方式中，通过用编码 CD83 蛋白质的核酸转化宿主细胞（即，细胞）而在体外或在体内向细胞提供 CD83；转化的宿主细胞能够表达 CD83 蛋白质，从而向其它细胞及自身（即，转化

的宿主细胞）提供 CD83 蛋白质。在这样的实施方式中，合适的宿主细胞包括树突细胞。在以编码 CD83 蛋白质的核酸的形式提供 CD83 的实施方式中，术语“CD83”也可以指编码 CD83 蛋白质的核酸。可以使用包括 DNA、RNA 或合成的核酸的任一合适的核酸，只要该核酸编码 CD83 蛋白质即可。可以在合适的载体中提供核酸用来表达编码的蛋白质或蛋白质片段。产生它们的合适的载体和方法是本领域内已知的。

[0052] 本文所用的“治疗性组合物”是指用于治疗目的外源性组合物，且针对该组合物的免疫应答是不希望有的。这样，术语“治疗性组合物”包括纯的制剂（即，由单一、基本上纯的物质或化合物组成的制剂）以及多种物质或化合物的混合物。本文所用的术语“治疗目的”包括预防、治愈或减轻或缓解疾病或障碍的至少一种症状的努力。这样，“治疗目的”包括本发明的组合物和 / 或方法的治疗性和预防性的应用；因此，治疗性组合物包括用于预防由涉及 T 细胞的免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或障碍的发展的组合物。

[0053] 用于本发明的合适的治疗性组合物包括但不限于，抗体、蛋白质、“小分子”、基因治疗载体和由基因治疗载体表达的任一蛋白质、抗原、变应原、细胞（包括干细胞）和组织移植物。可以理解，这些种类不一定是互相排斥的；因此，例如，许多蛋白质是抗原，而许多抗原是蛋白质。在治疗性组合物与 CD83 共施用而受试者也没有用至少一种其它治疗性组合物或至少一种其它免疫抑制化合物治疗的实施方式中，治疗性组合物不是移植组织。在治疗性组合物与 CD83 共施用而受试者也没有用至少一种其它治疗性组合物或至少一种其它免疫抑制化合物治疗的某些实施方式中，治疗性组合物不是与移植组织有关的抗原。

[0054] 作为抗原的合适的治疗性组合物是任何可以提高针对它的免疫应答的组合物（即，受试者没有或者不会有针对它的免疫应答的任何组合物）。合适的抗原包括蛋白质和蛋白质片段，例如，希望对其具有耐受性的与自身免疫疾病相关的抗原，例如涉及或与自身免疫疾病发展相关的抗原，或者在患有自身免疫疾病的受试者体内发现其抗体的抗原。

[0055] 因此，示例性的抗原包括髓磷脂碱性蛋白（与多发性硬化的发展有关）、桥粒芯糖蛋白 -3 蛋白（认为它与寻常型天疱疮的发展有关）、促甲状腺激素 (TSH) 受体（与格雷夫斯病的发展有关）、甲状腺过氧化物酶（与桥本甲状腺炎的发展有关）、乙酰胆碱受体（与重症肌无力的发展有关）和胰岛素（与 I 型糖尿病的发展有关）。作为抗体的合适的治疗性组合物可以是任一类型的抗体或其衍生物，包括多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体或抗体的部分或片段。

[0056] 本发明的方法可以诱导耐受，甚至在免疫应答所针对或者可能针对的抗原未知时，只要本发明的方法中使用的治疗性组合物将致耐受性细胞引导至不希望有的免疫应答附近即可。因此，合适的治疗性组合物包括与希望耐受的特定组织相关的抗原，而与不希望有的免疫应答所针对或可能针对的组织之中或附近的抗原的身份无关。这样，在某些实施方式中，本发明的方法和组合物对于治疗和 / 或预防其中“决定簇扩散”已经出现或可能出现的疾病或障碍尤其有用（见，例如，Dai 等人 (2005)Cell.Mol.Immunol.2 :169-175 ;Prat 和 Antel(2005)Curr.Opin.Neurol.18 :225-230）。

[0057] 如果组成特定组织的细胞表达一种抗原，或如果在组成特定组织的细胞上或其附近（例如，在该组织的胞外基质中）发现一种抗原，那么该抗原与该组织“相关”。与特定组织“相关”的抗原的应用可以包括从组织本身分离得到的纯化形式的抗原的应用，或可以包

括抗原的原位（即，在该组织中）应用。本文所用的术语“组织”包括分散的器官（例如，肝、肾、心、肺等）以及“液体”组织（例如，血液、诸如血浆的血液成分、诸如 T 细胞的细胞等）和以上二者或二者之一的部分和子部分。

[0058] 合适的话，当用于本发明的方法时，可以选择除了使受试者耐受的能力以外缺乏生物活性的治疗性组合物。因此，例如，治疗性组合物可以仅由缺乏天然胰岛素的正常生理活性的天然胰岛素蛋白质的部分或片段组成。作为抗体的合适的治疗性组合物可以是任一类型的抗体或其衍生物，包括多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体或抗体的部分或片段。本领域技术人员能够鉴别并提供用于本发明的方法的合适的治疗性组合物。

[0059] 合适的治疗性组合物可以包含抗原或其它用于刺激耐受性的试剂，无论它们是否与希望耐受的特定组织相关，只要实现本发明的目的（例如，对移植组织的耐受性）即可。在某些实施方式中，合适的治疗性组合物包含从感兴趣的组织中分离的总 RNA 或 RNA 的一部分；这可以直接向受试者施用（见，例如，美国专利号 7 015 204），或者可以用来转导树突细胞，然后例如可以使用该树突细胞治疗受试者或在体外产生调节性 T 细胞。作为蛋白质或多肽的治疗性组合物可以以蛋白质或多肽的形式施用，或者可以通过向细胞或受试者提供编码该蛋白质或多肽的核酸来施用。因此，在某些实施方式中，治疗性组合物包含 RNA（见，例如，美国专利号 7 015 204）。在某些实施方式中，向受试者施用超过一种的治疗性组合物。

[0060] 术语“免疫抑制化合物”指一种化合物，其能够减少淋巴细胞的 T 和 / 或 B 克隆群体的大小，或能够抑制其反应性、扩增或分化。用于本发明的方法的免疫抑制化合物包括但不限于：包括环孢素（也称为“CsA”，以 Neoral ®或 Sandimmune ®销售）和他克莫司 (tacrolimus)（也称为“FK506”，以 Progra ®销售）的钙依赖磷酸酶 (calcineurin) 抑制剂、诸如吗替麦考酚酯 (mycophenolate mofetil)（也称为“MMF”，以 Cellcept ®销售）和硫唑嘌呤 (azathioprine)（以 Azasan ®或 Imuran ®销售）的嘌呤代谢抑制剂、诸如依维莫司 (everolimus)（以 Certican ®销售）和西罗莫司（也称为“雷帕霉素”或“Rapa”，以 Rapamune ®销售）的增殖抑制剂、诸如抗 CD45 和抗 CD45RB 的单克隆抗体（“mAb”）（见，例如，美国专利号 7160987）、诸如 OKT3 的针对 T 细胞的单克隆抗体、诸如巴利昔单抗 (basilixamab) 和达克珠单抗 (daclizumab) 的包括人源化抗 TaT 抗体的针对 IL-2 受体的单克隆抗体、诸如 CTLA-4-Ig1 融合蛋白的阻断 T 细胞共刺激途径的物质、能够诱导嵌合现象（即，供体和接受体免疫细胞共存，其中移植组织被认为是自身的）的物质和诸如环磷酰胺（以 Cytoxan ®销售）的非骨髓根除性 (non-myeloblative) 移植前处理药。对于免疫抑制物和其靶标的讨论，见，例如，Stepkowski(2000)Expert Rev.Mol.Med.June 21,2000：1-23。

[0061] 西罗莫司（也称为“雷帕霉素”或“Rapa”，以 Rapamune ®销售）目前用于预防 13 岁及以上年龄的肾移植病人的器官排斥。生产者建议，在使用环孢素和皮质类固醇类的方案起始时应当使用 Rapamune ®。实验模型（即，小鼠、猪和 / 或灵长类）中的研究表明西罗莫司延长了例如肾、心、皮肤、胰岛、小肠、胰管 - 十二指肠和骨髓的同种异体移植物的存活。西罗莫司逆转了大鼠中的心和肾的同种异体移植物的急性排斥，并延长了预敏化大鼠的移植物存活期。在某些研究中，西罗莫司的免疫抑制效果最多持续到终止治疗后 6 个月。西罗莫司的耐受效果是同种异体特异性的。在自身免疫疾病的啮齿动物模型中，西罗莫司

抑制与系统性红斑狼疮、胶原诱导的关节炎、自身免疫（I 型）糖尿病、自身心肌炎、实验性变应性脑脊髓炎、移植物抗宿主疾病和自身免疫性葡萄膜视网膜炎 (uveoretinitis) 相关的免疫介导的事件。

[0062] 吗替麦考酚酯（也称为“MMF”，以 Cellcept ®销售）目前用于预防接受同种异体心脏（心）或肝脏（肝）移植的病人的器官排斥。生产者建议，在使用环孢素和皮质类固醇类的同时使用 Cellcept ®。在实验动物模型中已证明吗替麦考酚酯可延长包括肾、心、肝、肠、四肢、小肠、胰岛和骨髓的同种异体移植物的存活期。也显示吗替麦考酚酯逆转犬肾模型和大鼠心脏同种异体移植模型中的进行性的急性排斥，并抑制了大鼠主动脉和心脏同种异体移植以及灵长类同种异体移植的实验模型中的增生性动脉病。也证明了吗替麦考酚酯抑制肿瘤发展，并延长鼠肿瘤移植模型的存活期。吗替麦考酚酯可以单独使用或与其它免疫抑制剂联合使用。

[0063] 他克莫司（也称为“FK506”，以 Prograf ®销售）目前用于预防接受同种异体的肝、肾或心脏移植的病人的器官排斥。他克莫司应该与肾上腺皮质类固醇同时使用。建议心脏移植接受者联合使用 Prograf ®和硫唑嘌呤或 NMF。已显示他克莫司延长了宿主的存活期和在肝、肾、心、骨髓、小肠和胰腺、肺和气管、皮肤、角膜和四肢的动物移植模型中的移植物的存活期。在动物中，已证明他克莫司抑制某些体液免疫和更大程度地抑制细胞介导的反应，如同种异体移植物的排斥、迟发型超敏反应、胶原诱导的关节炎、实验性变应性脑脊髓炎和移植物抗宿主疾病。尽管本发明不受任何化合物或其组合的作用机制限制，而且尽管他克莫司的精确作用机制未知，但认为他克莫司抑制钙依赖磷酸酶的磷酸酶活性并抑制 T 淋巴细胞的活化。

[0064] 环孢素（也称为“CsA”，例如以 Neoral ®或 Sandimmune ®销售）目前用于预防肾、肝和心的同种异体移植物的器官排斥。环孢素已经与硫唑嘌呤或皮质类固醇类联合使用，并可以与甲氨蝶呤联合用于风湿性关节炎病人。环孢素用于在疾病没有充分地响应甲氨蝶呤时治疗严重的活动性风湿性关节炎病人。环孢素也用于治疗患有严重的顽固性斑块牛皮癣的非免疫减弱的成年病人。环孢素为强效免疫抑制剂，可延长动物模型中包括皮肤、肾、肝、心、胰腺、骨髓、小肠和肺的同种异体移植物的存活期。在许多动物种类中对于各种器官，已显示环孢素抑制某些体液免疫并且更大程度地抑制细胞介导的免疫反应，例如同种异体移植物的排斥、迟发型超敏反应、实验性变应性脑脊髓炎、弗氏佐剂关节炎和移植物抗宿主疾病。尽管本发明不受任何化合物或其组合的作用机制限制，但已显示环孢素在细胞周期的 G0 期和 G1 期抑制免疫活性的淋巴细胞，并优先抑制 T 淋巴细胞。

[0065] 物质的“有效量”是指，当根据本发明的方法向受试者施用时，至少足以实现本发明的至少一个目的的量。因此，例如，当向受试者共施用 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物时，治疗性组合物的“有效量”至少足以使受试者对该治疗性组合物耐受。类似地，当共施用治疗性组合物和至少一种其它免疫抑制化合物时，CD83 的“有效量”至少足以使受试者对该治疗性组合物耐受。当与 CD83 和任选的治疗性组合物共施用时，免疫抑制化合物的“有效量”至少足以对由免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或障碍的至少一种症状产生可检测到的效应。在某些实施方式中，免疫抑制化合物的有效量至少足以诱导如本文其它地方所述的耐受性和 / 或免疫抑制。可以对受试个体显示的症状确定免疫抑制化合物的有效量，或可以根据临床研究确定有效量或从模型系统的适当研究外推有效

量。因此，例如，免疫抑制化合物的有效量包括根据利用本发明的方法在临床研究中确定的剂量范围预期对疾病或障碍的至少一种症状产生可检测的效应的量。

[0066] 可以以一种或多种施用、应用或剂量来施用有效量。合适的施用、应用和剂量将随着多种因素变化，所述因素包括但不限于：组合物的比活性、组合物的组成、受治疗的受试者的体重、年龄、健康、疾病和状况、向受试者施用组合物的途径。在某些例子中，有效量所需要的 CD83 的最小量可能由于在病人中预先存在 CD83、尤其是可溶性 CD83 而减少（见，例如，Hock 等人 (2006)(Tissue Antigens 67 :57-60)）；为了获得最佳结果，本领域技术人员能够容易地调整剂量和施用等。例如，可以向病人施用的 CD83 的范围是：下限为 0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、5、7、10、20、50、70、100、200、500 或 700mg/kg，或 1、2、5、7、10、20、50 或 100g/kg，上限为 0.05、0.1、0.5、1、2、5、7、10、20、50、70、100、200、500 或 700mg/kg 或 1、2、5、7、10、20、50、100 或 200g/kg。

[0067] 在某些实施方式中，甚至当免疫应答所针对或可能针对的抗原未知时，本发明的方法也可以诱导耐受性。因此，合适的治疗性组合物包括与希望耐受的特定组织相关的抗原，而与不希望有的免疫应答所针对或可能针对的组织中或其附近的抗原的身份无关。这样，在某些实施方式中，本发明的方法和组合物对于治疗和 / 或预防其中“决定簇扩散”已经出现或可能出现的疾病或障碍尤其有用（见，例如，Dai 等人 (2005)Cell.Mol.Immunol.2 :169-175 ;Prat 和 Antel(2005)Curr.Opin.Neurol.18 :225-230）。如果特定组织包含的细胞表达抗原，或如果在特定组织包含的细胞上或其附近（例如，在组织的胞外基质中）发现抗原，那么该抗原与该组织“相关”。

[0068] 本发明的方法提供了由共施用 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物而产生的协同效应的益处，使得联合治疗的效果大大高于由两种单独治疗相加预期的效果。此外，如果向受试者共施用 CD83 和两种或多种其它免疫抑制化合物，可以提供更大的益处。这样，本发明提供了比单独治疗效果更好的联合（或“共施用”）治疗。在某些实施方式中，联合或共施用治疗提供的益处大于每个单独治疗提供的益处的总和。在某些实施方式中，联合或共施用治疗提供的益处比单独治疗提供的益处多出至少 10％、20％、25％、30％、50％、75％、100％、200％或更多，或 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍或更多。在某些实施方式中，联合或共施用治疗提供的益处比每个单独治疗提供的益处的总和多出至少 10％、20％、25％、30％、50％、75％、100％、200％或更多，或 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍或更多。

[0069] 这种联合（或“共施用”）治疗的提高的有效性提供了本发明的治疗方法，其中，与单独使用化合物所需的剂量相比，可以使用更低剂量的化合物治疗受试者。这样，本发明使得能够使用比目前使用的更少的每种化合物进行有效治疗。换句话说，本发明提供了使用减少量的化合物治疗受试者的方法，和减少用于治疗受试者的化合物的量的方法。因此，本发明进一步提供了一种治疗，其由于使用较低的剂量因而副作用的可能性较低和 / 或副作用的严重性降低。这样的副作用包括那些使用钙依赖磷酸酶抑制剂常见的副作用（例如，肾毒性）。单独的钙依赖磷酸酶抑制剂也会产生特定的副作用，例如，环孢素治疗可见的副作用包括糖尿病、高血压、高脂血症、震颤、牙龈增生、多毛症和皮肤改变，而他克莫司治疗可见的副作用包括糖尿病发病率升高，但高脂血症、高血压、牙龈增生的发生低于环孢素治疗。吗替麦考酚酯治疗通常可见的副作用包括增加的白细胞减少症、腹泻、贫血、高血压、食管炎、胃炎和胃肠道出血的风险。

[0070] “较低剂量”指以低于按其它方式治疗受试者的剂量的剂量水平向受试者施用单独的化合物。在某些实施方式中,“较低剂量”指以低于生产者推荐的剂量水平(即,在化合物的包装说明书中推荐的剂量水平)的剂量水平向受试者施用单独的化合物。对于一些感兴趣的化合物,目前在包装说明书中推荐的剂量水平如下,仅供参考。在推荐剂量水平随治疗阶段或治疗间期而变化时(例如,用于新移植病人的剂量水平与维持剂量水平相比),本发明的方法包括如下的治疗方法:其中只在治疗或治疗间期的一个阶段内,或至少在治疗或治疗间期的一个阶段内,用较低剂量的化合物治疗病人。治疗和/或治疗间期的阶段为本领域技术人员所理解的,且包括,例如:慢性自身免疫障碍或疾病的长期维持或处理、移植前准备、移植后恢复和移植后维持。或者,治疗间期可以是诸如1天、1周、1个月或2、3、4、5或6个月或1年的一段时间,在这一时期内进行和/或评估治疗;或是一段时间,在这段时间中或之后,显示受试者已取得了某种治疗成果。

[0071] 对于他克莫司(也称为“FK506”,以Prograf®销售),生产者建议在不早于移植后6小时以0.01mg/kg/天(对于心脏移植)或0.03-0.05mg/kg/天(对于肝或肾移植)的起始剂量持续静脉点滴给药。连续输入应该持续,直至病人能够耐受经口给药时为止。

[0072] 对于西罗莫司(也称为“雷帕霉素”,以Rapamune®销售),推荐剂量随病人的免疫风险和移植后治疗的阶段而变化。对于处于低至中度免疫风险的病人,推荐联合使用Rapamune®口服溶液和片剂与环孢素和皮质类固醇类;环孢素应该在移植后2-4个月停用。对于从头开始的移植接受者,应该给予相当于3倍维持剂量的Rapamune®的负荷剂量。例如,对于肾移植病人,推荐2mg的维持剂量和6mg的负荷剂量。考虑停止环孢素的病人应该接受Rapamune®和环孢素联合治疗。移植后2-4个月,应当在超过4-8周的时间里逐渐停用环孢素,应该调整Rapamune®的剂量以在移植后的第一年获得16-24ng/mL范围内的全血波谷水平,此后目标应该是10-20ng/mL。

[0073] 对于处于高度免疫风险的病人,推荐第一年联合使用Rapamune®口服溶液和片剂与环孢素和皮质类固醇类。对于接受Rapamune®和环孢素的病人,Rapamune®治疗在移植后第一天应该以最多15mg的负荷剂量开始。从移植后第二天开始,应该给予5mg/天的起始维持剂量。环孢素的起始剂量应该是分开剂量形式的最高7mg/kg/天,随后应该调整剂量来实现目标全血波谷浓度(即,血液最低浓度)。也应该以5mg/天的最低剂量施用泼尼松。

[0074] 对于肾同种异体接受者,Rapamune®的起始剂量应该在移植后尽快施用。基于非稳态Rapamune®浓度的频繁Rapamune®剂量调整会导致剂量过高或剂量不足,所以应该仔细地进行并监测剂量调整。一旦调整维持剂量,应该使病人保持新维持剂量至少7-14天。

[0075] 对于吗替麦考酚酯(也称为“MMF”,以Cellcept®销售),生产者建议肾移植病人一天两次经口或静脉内(不低于2小时内)施用1克的剂量,每日总剂量为2克。对于3个月-18岁的儿科病人,推荐Cellcept®口服悬浮液的每日剂量为一天两次600mg/m^2(最多为2克/10ml口服悬浮液的最大剂量)。例如,可以使用体表面积相对于体重的标准表格来确定体表面积(见,例如,Sharkey等人(2001)British J.Cancer 85:23-28)。对于心脏移植病人,成年人应该通过每日两次(“b.i.d.”)在不低于2小时的时间内静脉施用1克的剂量或以3克的每日剂量每天两次经口施用1.5克的剂量来治疗。对于肝移植病人,成

年人应该通过每日两次（“b.i.d.”）在不低于 2 小时的时间内静脉施用 1 克的剂量或以 3 克的每日剂量每天两次经口施用 1.5 克的剂量来治疗。

[0076] 对于环孢素（也称为“CsA”，以 Neoral ®或 Sandimmune ®销售），生产者建议在移植前 4-12 小时或手术后给予起始口服剂量的 Neoral ®。在新移植病人中，对于肾移植病人的平均起始剂量（± 标准差）为 9(±3)mg/kg/ 天，对于肝移植病人为 8(±4)mg/kg/ 天，对于心脏移植病人为 7(±3)mg/kg/ 天。总的每日剂量分为两个相等的剂量，随后调整剂量来达到预定的环孢素血液浓度；基于病人体重的代表性剂量计划为：前 14 天以 2mg/kg/ 天开始；随后在一周内，剂量递减到 1mg/kg/ 天，进一步，在两周内递减到 0.6mg/kg/ 天，在一月内递减到 0.3mg/kg/ 天，在两月内递减到 0.15mg/kg/ 天，随后作为维持治疗。开始时，推荐用肾上腺皮质类固醇辅助治疗。

[0077] 对于风湿性关节炎的治疗，环孢素的起始剂量为 2.5mg/kg/ 天，以分开的口服剂量每日两次服用。可以继续使用水杨酸酯、非甾体抗炎药和口服皮质类固醇的其它治疗。为了在任何时候控制不良反应，剂量应该减少 25-50％。对于牛皮癣的治疗，环孢素的起始剂量为 2.5mg/kg/ 天，以分开的口服剂量每日两次服用。为了控制不良反应，应该让病人维持该剂量至少 4 周。如果 4 周后没有发现明显的临床改善，可以在 2 周期间以 0.5mg/kg/ 天增加剂量至 4mg/kg/ 天的最大剂量。为了在任何时候控制不良反应，剂量应该减少 25-50％。

[0078] 本文所用的术语“化合物”、“组合物”和“物质”，每一个都包括用于本发明的方法的任何物质（即，包括 CD83，治疗性组合物或免疫抑制化合物）。当向受试者同时施用多种物质时，或当在向受试者施用一种物质之前或之后 2、4、6、8、10、12 或 14 小时内，或 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、/0、80、90、100、150 或 200 天之内，又向受试者施用另一种物质时，称一种物质与另一种物质“共施用”和发生“共施用”。当同时施用几种物质时，这些物质可以在施用之前联合或同时分别施用。

[0079] 本发明的方法可以包括每种化合物或组合物的一次给药或施用或多次给药或施用。在进行多次施用的实施方式中，一种化合物或组合物的至少一次施用将在施用的另一种化合物或组合物的“有效窗”之内进行。在某些实施方式中，如果联合治疗（即，施用两种物质）的效果为或预期为大于或不同于分别施用时（即，在合适的对照实验中）一种或两种单独各治疗，则将第二种物质的施用视为在第一种物质的“有效窗”之内进行。在某些实施方式中，如果联合治疗（即，施用两种物质）的效果为或预期为大于或不同于分别施用时（即，在合适的对照实验中）各治疗的联合效果，则将第二种物质的施用视为在第一种物质的“有效窗”之内进行。例如，可以通过包括施用 CD83 和在 CD83 的有效窗之内施用治疗性组合物的方法，使受试者对治疗性组合物耐受；如果分别用 CD83 和治疗性组合物治疗受试者，使得施用治疗性组合物在 CD83 的有效窗之外进行，那么就不会出现这样的结果。

[0080] 在某些实施方式中，施用至少一种化合物或组合物，使得一种物质的“有效窗”和至少一种其它物质的“有效窗”存在至少一些重叠。如果联合治疗的效果为或预期为大于或不同于分别施用时（即，在合适的对照实验中）各治疗的联合效果，则认为这样的重叠已出现。在某些实施方式中，在治疗的特定过程中，另外的施用可以在一种或多种物质的有效窗之前、之中或之后进行，而在其它实施方式中，在一种或多种物质的有效窗之外没有另外的施用。在某些实施方式中，每种物质的所有施用在向受试者施用的每种其它物质的有效窗之内进行。在向受试者施用两种以上物质的实施方式中，可以在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10

或更多种其它物质的有效窗之内施用一种物质。

[0081] 本发明的方法也包括施用多于一种的治疗性组合物。因此，本发明的方法也包括施用多种治疗性组合物。治疗性组合物可以是相似或不相似的。例如，按本发明的方法向受试者施用的治疗性组合物可以包括相关抗原。因此，例如，在某些实施方式中，向受试者施用的治疗性组合物可以包含从特定组织制备的 RNA（“总组织 RNA”）。

[0082] 由于受试者可以通过 CD83 对外源性的化合物耐受，所以出于治疗目的，以下方面是重要的：至少在治疗过程中，或至少在 CD83 的有效窗之内，受试者不接触不希望对其耐受的化合物。因此，例如，受试者不应该接触肿瘤特异性抗原和包括病毒、细菌、霉菌等致病微生物。一般地，本文所用的“受试者”指需要治疗的任一动物。因此，例如，“受试者”可以是人类患者或非人类的哺乳动物患者，或可以是另一类动物患者。

[0083] 当需要预防疾病或医学状态时，可以以固定间隔（例如，大约：每两年、每年、每 6 个月、每 2-4 个月或每个月）治疗受试者。但是，在本发明的所有实施方式中，向已鉴定为患有由免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的特定疾病或障碍的受试者，或向已鉴定为可能发展为特定疾病或障碍的受试者，施用本发明的方法和组合物。例如，通过检查受试者的家族史、诸如基因测试的医学测试或测定受试者的酶或代谢物水平、或诊断患有另一种疾病或障碍，可以鉴定受试者可能发展为这样的特定疾病或障碍。例如，以这种方式，本发明的方法可以用来治疗自身免疫疾病、预防自身免疫疾病的发展或减轻受试者发展自身免疫疾病的风险。一般地，当受试者不能通过治疗来缓解或预防由免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的特定疾病或医学状况时，治疗过程终止。

[0084] 因此，本发明提供了治疗或预防由免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或医学状况的方法，其中，向受试者共施用有效量的 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物，使得实现免疫抑制。任选地，也可以施用治疗性组合物。如果施用治疗性组合物，那么在 CD83 的有效窗内向受试者施用从而使得受试者对该治疗性组合物耐受。只要能够实现这个目标，可以选择任一种形式的施用来递送 CD83 和治疗性组合物。因此，例如，可以一起并通过相同的施用形式施用 CD83 和治疗性组合物，或可以分别和 / 或通过不同的施用形式施用它们。因此，例如，CD83 可以作为蛋白质或编码 CD83 的核酸（例如，作为 mRNA 或在表达载体中）向受试者施用。

[0085] 可以采用本发明的方法治疗受到或可能受到由免疫应答的功能障碍或不希望有的功能导致的疾病或障碍影响的受试者，所述疾病或障碍例如是：变态反应、哮喘、组织移植排斥、对于长期施用的物质的免疫应答、诸如重症肌无力、多发性硬化、血管炎的自身免疫疾病、诸如局限性回肠炎 (Crohn’s disease) 或溃疡性结肠炎的慢性炎性肠病、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、诸如牛皮癣的皮肤病、类风湿性关节炎和胰岛素依赖性糖尿病和 AIDS。本发明的方法可以用来治疗受到涉及 B 细胞或 B 细胞功能的疾病或障碍影响的受试者，例如：诸如白血病的 B 细胞增多（包括多发性骨髓瘤和急性淋巴母细胞性白血病）、与 AIDS 相关的 B 细胞活性过高、中毒性休克综合征、血清病和牙周病（见，例如，Mahanonda 等人 (2002) J. Periodontal Res. 37 :177-183）。血清病是一组由对于某些药物或抗血清的不希望有的免疫应答导致的症状。即，当为了诱导被动免疫而给予受试者来自另一种动物或人类的抗血清时，可能产生血清病。在某些实施方式中，本发明的方法提供了对于涉及 B 细胞或 B 细胞功能的疾病或障碍的治疗，其中，该治疗不会导致 B 细胞消耗，即，受试者中的 B

细胞的数目和 / 或亚型的减少。

[0086] 可以单独使用本发明的组合物和方法（即，可以利用它们治疗没有接受其它治疗的受试者），或可以将它们向正在接受或已经其它治疗的受试者施用。例如，可以仅用本发明的方法和组合物治疗受到特定疾病或障碍影响的受试者，或可以用本发明的方法和组合物以及另一种通常向受到或可能受到特定疾病或障碍影响的受试者施用的处理或疗法（如常规的化学疗法或药物治疗）来治疗它们。因此，例如，本发明的方法可以进一步包括其它化合物（包括非免疫抑制化合物）的使用或共施用。因此，本发明的方法可以进一步包括其它化合物的使用或共施用，所述其它化合物包括，例如，皮质类固醇、诸如硫唑嘌呤的抗炎药和诸如甲氨蝶呤的抗代谢药。

[0087] 因此，在某些实施方式中，本发明的方法可以用来预防、治愈或缓解组织接受者中组织移植排斥的至少一种症状。在这样的实施方式中，可以用 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物或至少一种治疗性组合物来治疗移植接受者（“接受者”或受试者）。治疗性组合物可以是与移植组织相关的抗原，例如，通过对移植组织样品的裂解或匀浆化而从移植组织制备或提取的抗原。一般地，根据本发明的方法对移植接受者的治疗可包括在组织移植之前、与组织移植一起（即，同时）和 / 或在组织移植之后的治疗。在某些实施方式中，治疗性组合物是移植组织本身，因此除了引入移植组织之外，没有另外向接受者施用治疗性组合物；在这样的实施方式中，也可以施用至少一种其它免疫抑制化合物或至少一种治疗性组合物。在某些实施方式中，本发明的方法预防、治愈或缓解组织移植排斥中的所有不利症状，从而使得继续治疗移植受试者以预防排斥变得不是必需的；在这样的实施方式中，认为在受试者中已经诱导了移植耐受。

[0088] 在某些实施方式中，在取出要向接受者移植的组织前，可以处理待移植组织的供体（“移植供体”）（例如，根据本发明的方法，用 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物和任选的至少一种治疗性组合物处理）。在某些实施方式中，如本文所述向移植供体施用物质，但治疗的目标是诱导移植接受者的耐受和 / 或免疫抑制。这里，治疗性组合物也可以是与移植组织（例如，器官）相关的抗原。在某些实施方式中，可以根据本发明的方法处理移植供体和移植接受体。

[0089] 在某些实施方式中，待移植的组织可以从供体中取出并接触包含 CD83 的溶液；即，例如，在移植前，组织可以保存于包含 CD83 的溶液中和 / 或用包含 CD83 的溶液灌注。在某些实施方式中，待移植的组织可以从供体中取出并接触包含 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物的溶液；即，例如，在移植前，组织可以保存于包含 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物的溶液中和 / 或用包含 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物的溶液灌注。也可以向供体施用治疗性组合物。因此，当向移植接受者引入该组织时，将向受试者共施用在该组织中和该组织表面上的 CD83 和一种或多种其它免疫抑制化合物以及与组织有关的抗原。本文所用的“组织”包括分离的器官和 / 或特化的组织（例如，肝、肾、心、肺、皮肤、胰岛等）以及“液体”组织（例如，血液、诸如血浆的血液成分、诸如树突细胞的细胞等）；术语“组织”也包括分离的器官和“液体”组织的部分和子部分。

[0090] 为了获得对于接受者和供体最好的可能结果，本领域技术人员熟悉移植接受者和供体的评估和治疗方法。因此，本领域技术人员能够容易地评价和调整适于特定受试者的 CD83、至少一种其它免疫抑制化合物和任选的治疗性组合物的剂量和施用。从上面的讨论

可以容易地理解，本发明的方法包括许多步骤；只要能实现本发明的至少一个目标，可以以任何顺序进行这些步骤。因为本方法可包括多种化合物的多次施用，步骤也可能会出现一些重叠。

[0091] 在某些实施方式中，本发明的方法和组合物提供了对于诸如腺相关病毒（“AAV”）和源自 AAV 的载体的基因治疗载体和 / 或对于由基因治疗载体编码的基因产物的耐受。因此，例如，当向缺乏特定基因产物的受试者（例如，当受试者具有遗传缺陷而导致缺乏特定蛋白质时）施用基因治疗时，当该基因产物被引入到受试者中时，使用本发明的方法治疗受试者来预防对于基因产物的不希望有的免疫应答。优选地，用于本发明的组合物和方法的基因治疗载体与病理学无关。在某些实施方式中，本发明的组合物和方法提供了对于向受试者重复（例如，“长期地”）施用且不希望对其产生免疫应答的物质的耐受，例如，经常向患有多发性硬化的受试者施用的 β 干扰素。

[0092] 在某些实施方式中，本发明的方法和组合物提供了“致耐受性的”树突细胞（“DC”）；即，它们能够如前所述地诱导免疫耐受（即，“使受试者耐受”）。可以直接或间接地评估树突细胞的致耐受活性，且可以在体外或体内测定树突细胞的致耐受活性；合适的试验是本领域内已知的，包括，例如，在体外与 $CD4^+$ T 细胞群体温孵后产生调节性 T 细胞的能力，和 / 或可检测到的诸如 CD14 或 CD80 的细胞表面标志物表达的改变（见，例如，Steinman 等 人 (2003) Ann. Rev. Immunol. 21 ：685-711 ；Kubach 等 人 (2005) Int. J. Hematol. 81 ：197-203）。

[0093] 由本发明的致耐受性树突细胞诱导的耐受性可以在体内或离体诱导，可以是对 DC 递呈的抗原特异性的。术语“免疫抑制性”DC 在本文用来区分“正常的”或天然的 DC 与本发明的致耐受性 DC。本发明产生致耐受性 DC 的方法可以在体内或离体进行，且包括将细胞与 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物接触的步骤。无论在体内还是离体（在体外），在成熟过程中或成熟过程完成之后，将细胞与 CD83 和一种或多种其它免疫抑制化合物接触。在体外进行成熟过程的实施方式中，“接触”指在存在 CD83 和一种或多种其它免疫抑制化合物的情况下温孵细胞或在存在 CD83 和一种或多种其它免疫抑制化合物的情况下培养细胞（即，细胞可以生长并分化）。细胞可以以任何合适的方式接触 CD83 和一种或多种其它免疫抑制化合物；例如，可以将 CD83 和一种或多种其它免疫抑制化合物加到生长培养基中，或者，可能的话，可以在用编码它们的 RNA 转染之后由培养的细胞表达一种或多种 CD83 和其它免疫抑制化合物。

[0094] 在某些实施方式中，产生致耐受性 DC 的方法包括在产生方法中（例如，在最后的成熟步骤中）将不成熟 DC 与 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物接触。一般地，在这些方法中，不成熟的树突细胞可以接触在以下范围内的 CD83 ：下限为 0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、50 或 100 μg/ml 培养基，上限为 0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、50、100 或 200 μg/ml 培养基。最优选地，DC 在存在 1-10 μg/ml CD83 的情况下成熟。其它免疫抑制化合物的剂量可以由本领域技术人员容易地选择。本文所用的“不成熟 DC”指细胞如果适当地培养（如果在体外）或如果允许成熟（如果在体内），该细胞能够变为成熟的树突状细胞。因此，在某些实施方式中，本发明的方法包括在成熟过程中的至少一个步骤中将细胞与 CD83 接触，和在成熟过程中的至少一个步骤中将细胞与其它免疫抑制化合物接触；这些步骤可以是同样的步骤或可以是不同的和 / 或不重

叠的步骤。在某些实施方式中，贯穿成熟过程中的至少一个步骤的始终、在成熟过程中的一个以上的步骤中或在整个成熟过程中，细胞接触 CD83 和 / 或一种或多种其它免疫抑制化合物。

[0095] 本发明的致耐受性树突细胞也可以通过用抗原“脉冲处理”细胞或用 RNA 转导细胞而负载待递呈的抗原（见，例如，美国专利号 6 387701、美国专利号 6 670 186、美国申请号 10/362715）。本发明的方法也可以结合本领域内已知的其它方法来提供另外的优势（见，例如，美国专利号 5 831 068、美国申请号 11/246 387）。可以理解，本发明方法的步骤可以按产生预期结果的任意顺序来进行。因此，例如，可以在细胞接触 CD83 和 / 或一种或多种其它免疫抑制化合物之前或之后使细胞负载抗原。这样，本发明的方法包括通过包括在成熟过程中向细胞共施用 CD83、至少一种其它免疫抑制化合物和任选的治疗性组合物（例如，感兴趣的抗原）的方法产生致耐受性树突细胞。

[0096] 成熟的免疫刺激性树突细胞通常显示细胞表面标志物的特征性阵列。因此，成熟的免疫刺激性 DC 通常不显示或几乎不显示 CD14 的表达。另外，成熟的免疫刺激性 DC（在体内产生的天然 DC 或在体外产生的 DC）通常显示诸如表达细胞表面标志物 CD80、CD83 和 CD86 和分泌 IL-12 的特征。相反地，在某些实施方式中，由本发明的方法产生的致耐受性 DC 表达这些特征性细胞表面标志物中的至少一种的水平降低。在某些实施方式中，与合适的对照细胞（例如，天然成熟的免疫刺激性 DC 或通过体外成熟获得的成熟的免疫刺激性 DC）中同样的细胞表面标志物的表达水平相比，本发明的方法产生的致耐受性 DC 上的特定细胞表面标志物的表达水平减少了 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、97％、98％、99％或 100％或检测不到。在某些实施方式中，本发明的致耐受性 DC 显示检测不到的 CD83 的表达，和大大减少的 CD80 表达。在某些实施方式中，与合适的对照细胞相比，对于每种标志物，本发明的致耐受性 DC 显示减少至少 95％的 CD83 表达和减少至少 50％的 CD80 表达。另外，在某些实施方式中，本发明的致耐受性 DC 显示比成熟的免疫刺激性 DC 更高的 CD14 表达。可以使用本领域内已知的技术（见，例如，WO2004/046182），或按下面的实验部分所述或如下所述，产生致耐受性树突细胞和 / 或分析其功能。

[0097] 例如，使用含有 1％人血浆的标准培养基（例如，补充有谷氨酰胺 (200μg/ml，BioWhittaker，Verviers，比利时）、青霉素 / 链霉素 (20μg/ml)、10mM Hepes、pH7.5(Sigma-Aldrich) 和来自单一供体的 1％人血浆（预先通过在 56℃温孵 30 分钟而加热灭活）的 RPMI1640(BioWhittaker，Verviers，比利时））培养细胞。通过在 Ficoll-Hypaque(Amersham Pharmacia Biotech，Freiburg，德国）中沉降而从血沉棕黄层中分离人 PBMC，接种到包被有 IgG（来自 Cohn 部分的 10μg/ml γ- 球蛋白；Sigma-Aldrich）的 100mm 培养皿上，在 37℃、5％的 CO_2 中温孵。在 1 小时和 7 小时的温孵后，除去非粘附细胞部分，而粘附细胞在补充有细胞因子 GM-CSF(800U/ml) 和 IL-4(500U/ml) 的 1％人血浆培养基中进一步培养。在温孵期的第 3 天，加入新鲜的培养基（包含 400U/ml 的 GM-CSF 和 500U/ml 的 IL-4）。在第 4 或 5 天，收集非粘附细胞、计数并以 0.3-0.5 x 10^5 细胞 / 毫升的密度转移到新的培养皿中。对于最后的成熟步骤，将 TNF-α (1.25ng/ml)、GM-CSF(40U/ml)、IL-4(200U/ml)、前列腺素 E_2(0.5pg/ml；见，例如，Lechmann 等人 (2001)J.Exp.Med.194：1813-1821) 和可溶性 CD83(4μg/ml) 补充到 1％人类血浆培养基中。或者，对于最后的成熟步骤，成熟混合物包含 IL-1β、TNF-α、PGE_2 和可溶性 CD83(4μg/ml)。在第 8 天，通过

FACS 分析细胞。与正常成熟的 DC 相比，通过这种方法成熟的细胞显示 CD80（例如，从 96％到 66％）和 CD83（例如，从 96％到 30％）的细胞表面表达明显减少和 CD14 阳性细胞增多（见，例如，WO 2004/046182）。其它细胞表面标志物（例如，I 型和 II 型 MHC）的表达没有受到明显影响。在其它的实施方式中，细胞可根据上述方案成熟，但可溶性 CD83 可以在 1、2、3 或更多天后添加到成熟混合物中。

[0098] 可以以各种方式比较接触 CD83 和一种或多种其它免疫抑制化合物的树突细胞与不接触 CD83 和一种或多种其它免疫抑制化合物的树突细胞，来评价它们的致耐受和免疫刺激的性质。合适的分析是本领域内已知的（例如，MLR 分析）；其中一些也在实验部分中描述。MLR 分析的典型特征是免疫刺激性 DC 群集的形成和增殖 T 细胞。在分析的第 1 天加入可溶性 CD83 强烈地抑制典型的细胞群集的形成（见，例如，Lechmann 等人 (2001) J. Exp. Med. 194 :1813-1821）。另外，可溶性 CD83 以浓度依赖的方式抑制成熟的树突细胞刺激 T 细胞增殖的能力（见，例如，Lechmann 等人 (2001)，同上）。

[0099] 在某些实施方式中，利用致耐受性树突细胞产生调节性 T 细胞（见，例如，美国专利申请号 10/661 804）。简单地说，可由包含 $CD4^+$T 细胞和 / 或 $CD8^+$ T 细胞的群体产生调节性 T 细胞。这些 T 细胞群体可以从受试者分离或可以培养。也可以使用 T 细胞亚群，如根据细胞表面标志物分选的群体，从而使其包含特定细胞（例如，$CD4^+$ $CD25^+$ T 细胞或 $CD4^+$ $CD25^-$ T 细胞）的富集群体。然后 T 细胞与本发明的致耐受性树突细胞（即，例如在成熟过程中已经接触 sCD83 和至少一种其它免疫抑制化合物的树突细胞）一起培养或温孵。如果在体外产生调节性 T 细胞，致耐受性树突细胞与 T 细胞可以是同种异体的或同源的。在某些实施方式中，使致耐受性 DC 负载抗原（例如，用抗原脉冲处理或用编码抗原的 RNA 转染）。在这样的实施方式中，致耐受性 DC 可以向 T 细胞递呈抗原。

[0100] 在产生致耐受性 T 细胞的过程中，T 细胞可以一次或多于一次地接触致耐受性 DC 和 / 或与致耐受性 DC 一起培养。例如，T 细胞可以与 DC 一起培养数天至数周；如果需要的话，可以再补充混合培养物中的 DC。在某些实施方式中，持续培养直至已获得治疗量的调节性 T 细胞。可以使用其它培养技术和 / 或添加剂来改善获得的结果；例如，培养基也可以含有诸如 IL-2 的细胞因子。

[0101] 一般地，调节性 T 细胞分泌 IL-10 和 / 或 TGF-β（见，例如，Walsh 等人 (2004) J. Clin. Invest. 114 :1398-1403）；证明这些细胞因子分泌的分析是本领域内已知的。在某些实施方式中，调节性 T 细胞将混合淋巴细胞反应抑制至少 10％、20％、30％、40％、50％、75％、90％、95％或 100％。混合淋巴细胞反应试验是本领域内熟知的。本发明的调节性 T 细胞可以是抗原特异性的。$CD4^+$ $CD25^+$ 调节性 T 细胞一般表达包括 CD4、CD25 和 Foxp3 的特征性的细胞表面标志物；细胞表面标志物的测定是本领域内熟知的。

[0102] 术语“载体”指可以通过多核苷酸的插入或结合操作的质粒、病毒或其它本领域内已知的载体。这样的载体可以用于基因操作（即，“克隆载体”）或用于转录和 / 或翻译插入的多核苷酸（“表达载体”）。载体一般至少包含用于在细胞中增殖的复制起点和启动子。表达载体内包含控制元件，包括本文所述的表达控制元件，以促进适当的转录和翻译（例如，内含子的剪接信号、允许 mRNA 框架内翻译的基因正确阅读框的维持、终止密码子等）。本文所用的术语“控制元件”至少包括其存在能影响表达的一种或多种成分；本文所用的术语“表达控制元件”指调节与其有效连接的核酸序列的表达的一种或多种核酸序列。与核

酸序列有效连接的表达控制元件控制核酸序列的转录，和合适的话，控制核酸序列的翻译。因此，合适的话，表达控制元件可以包括启动子、增强子、转录终止子和 / 或在编码蛋白质的基因之前的起始密码子（例如，ATG）。载体也可以包括另外的成分，如前导序列和融合蛋白序列。“有效连接”是指一种排列，其中成分之间的关系允许它们以预定方式发挥功能。

[0103] “启动子”指至少足以引导转录的最小序列。合适的话，用于本发明的启动子可以是组成型的或诱导型的（见，例如，Bitter 等人 (1987)Methods in Enzymology 153：516-544）。诱导型启动子被外部的信号或试剂活化。其它启动子元件包括足以为特定细胞类型、组织或生理条件提供依赖启动子的基因表达的控制的启动子；这样的元件可以位于基因的 5′ 、3′ 或内含子区域。有用的启动子也包括“条件启动子”，其只在一定条件下是有活性的。例如，当特定试剂（例如，一种化合物）存在时，条件启动子是无活性或被抑制的，但当该试剂不存在时，它具有活性或去抑制。

[0104] 本文所用的“转染”是指向真核细胞中引入一种或多种外源性的核酸或多核苷酸。转染包括以使得由核酸或多核苷酸编码的蛋白质能够表达的方式引入。转染方法是本领域内已知的，且包括多种技术，如电穿孔、使用基于蛋白质、基于脂质和基于阳离子的核酸递送复合物的方法、病毒载体、“基因枪”递送和各种其它技术。

[0105] 在本发明的某些实施方式中，向细胞（例如，DC）中引入的多核苷酸不会遗传修饰细胞也不会稳定地保持。术语“遗传修饰”或“转化”是指包含和 / 或表达外来基因或核酸序列，其反过来修饰细胞或其后代的基因型；在某些实施方式中，细胞的表型也会改变。“遗传修饰”或“转化”也指细胞内源性核苷酸的任何添加、删除或破坏。引入的多核苷酸的稳定保持一般需要该多核苷酸含有与宿主细胞相适应的复制起点或整合到诸如染色体外复制子（例如，质粒）的细胞复制子或核染色体或线粒体染色体中。

[0106] 术语“瞬时转染”指已被转染但没有遗传修饰的细胞，所以细胞的后代不会遗传转化的遗传物质（例如，核酸或多核苷酸）。遗传物质可以是 RNA 或可以转录为 RNA，由遗传物质编码的蛋白质可以表达。这样的表达在本文中称为“瞬时表达”。正常情况下，瞬时表达不是通过将转染的遗传物质整合到染色体中实现的。

[0107] 在本发明的某些实施方式中，使用 RNA 电穿孔瞬时转染树突细胞。RNA 电穿孔的方法是本领域内熟知的。一般地，mRNA 不会变为细胞基因组的染色体或染色体外的永久部分。在本发明的范围之内也包括可以用来瞬时表达所需蛋白质的任何其它方法。本方法不涉及基因组的永久改变（即，不会导致对细胞的可遗传的遗传改变），从而避免与使用诸如逆转录病毒和腺病毒的病毒相关的缺点。

[0108] 如果需要的话，可以通过本领域技术人员已知的常规技术用 DNA 转化细胞。例如，当细胞为真核细胞时，DNA 转化方法包括，磷酸钙共沉淀、诸如微量注射的常规机械方法、电穿孔、包在脂质体中的质粒的插入和病毒载体。也可以用编码目标核酸的 DNA 序列和 / 或编码诸如本文所述的选择性表型的第二种外来 DNA 分子共转化真核细胞。另一种方法是使用诸如猿猴病毒 40(SV40) 或牛乳头瘤病毒的真核病毒载体来瞬时感染或转化真核细胞并表达蛋白质。在转化之后，可按照常规方法分离和纯化 CD83。例如，可以使用 HPLC、大小排阻色谱法、凝胶电泳法、亲和色谱法或其它纯化技术来纯化由表达宿主（例如，细菌）制备的裂解物。也可以通过使用肽合成仪（例如，AppliedBiosystems，Inc.，430A 型 (ABI，Foster City，Calif.，USA) 或类似设备）的化学合成获得基本上纯的蛋白质。也可以如本文下面

的实验部分所述制备 CD83。

[0109] 本发明的包含 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物或至少一种治疗性组合物的药物或药物组合物的制备和这些药物或药物组合物的使用可以通过普通的制药技术方法以通常的方式实现，因而容易地由本领域技术人员提供。本领域技术人员应当理解，不同形式的给药适于不同的化合物和 / 或适应症，且能够选择最合适的给药方法。例如，可以使用适于皮肤给药的制剂来局部治疗牛皮癣，而可以通过向受试者施用适于腹膜内注射的制剂来治疗系统性红斑狼疮。本领域技术人员熟悉调整化合物的剂量和给药的标准和方法，例如，对包括生化和免疫分析的常规临床和实验室检验结果的分析。合适的话，可以分别施用药物成分。

[0110] 通常，本发明的化合物与合适的药学上可接受的佐剂和 / 或载体一起加工，以提供适于各种适应症和给药途径类型的药物形式。合适的药物组合物也可以包含稳定剂和防腐剂。载体、稳定剂和佐剂的例子，见，例如，Gennaro(1995)Remington's Pharmaceutical Sciences，18th ed.(Mack Pub.Co.，Easton，PA，U.S.)。因此，可以以一定的方式制备药物，从而获得分别想要的释放速度，例如，快速释放效果 (quick floodingeffect) 或持续释放效果。

[0111] 本发明提供的治疗方法包括使用 CD83 和至少一种其它免疫抑制化合物和任选的至少一种治疗性组合物 (例如，抗原) 来诱导受试者体内耐受和 / 或免疫抑制。向受试者施用这些物质的方式包括，但不限于，常规的和生理可接受的途径，例如，经口、肺部、肠胃外 (例如，肌肉内、关节内、腹膜内、静脉内 (IV) 或皮下注射)、吸入 (通过微粉制剂或薄雾 (气雾剂))、经皮、皮内、鼻内、阴道、直肠或舌下的给药途径。这些物质 (即，CD83、至少一种其它免疫抑制化合物和任选的治疗性组合物) 可以用载体施用，且它们可以在同一制剂中和经过相同的给药途径施用，或它们可以在不同的制剂中和 / 或经过不同的给药途径施用。优选以其最佳剂量施用每种物质，以获得共施用的最佳治疗效果。例如，抗体的施用可以通过静脉注射，而 CD83 的施用可通过腹膜内注射，免疫抑制化合物的施用可通过片剂的口服给药。

[0112] 载体包括任何合适的生理溶液或分散剂等。生理溶液包括任何可接受的溶液或分散介质，如盐水或缓冲盐水。载体也可以包括抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。除非任一常规介质、载体或试剂与活性成分不相容，否则可以考虑使用它们。载体可以进一步包括一种或多种另外的化合物，包括但不限于，诸如白介素 10(IL-10) 和 TGF-β 的细胞因子。

[0113] 当给某一动物物种施用的药物组合物包含核酸时，用于本发明的核酸可以源自该物种。例如，当给人类施用包含编码 CD83 的核酸 (例如，DNA 或 RNA) 的药物组合物时，该核酸可以包含 CD83 蛋白质的人类形式的序列。用于本发明的核酸可以与增加细胞膜通透性和 / 或核酸的细胞摄取的试剂一起施用。这些试剂的例子包括，如 Antony 等人 (1999)Biochemistry 38 :10775-10784 所述的聚胺、如 Escriou 等人 (1998)Biochem.Biophys.Acta 1368 :276-288 所述的分枝聚胺、如 Guy-Caffey 等人 (1995)J.Biol.Chem.270 :31391-31396 所述的聚氨基脂、如 Feigner 等人 (1987)Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA84 :7413-7417 所述的 DOTMA 和如 Benimetskaya 等人 (1998)Nucl.Acids Res.26(23) :5310-5317 所述的阳离子卟啉类化合物。

[0114] 本发明提供的组合物、药物和治疗方法也包括根据本发明的方法制备的致耐受性DC和调节性T细胞及其诱导受试者体内耐受的用途。向受试者施用本发明的致耐受性DC和/或调节性T细胞的手段包括，但不限于，常规的和生理可接受的途径，例如，腹膜内、静脉内(IV)或皮下注射。本发明的细胞(即，由本发明的方法制备的致耐受性DC和/或调节性T细胞)可以用载体来施用。这样的载体包括任何合适的生理溶液或分散剂等，例如盐水或缓冲盐水。载体也可以包括抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。除非任一常规介质、载体或试剂与活性成分(即，致耐受性DC和/或调节性T细胞)不相容，否则可以考虑使用它们。

[0115] 本领域技术人员熟悉，参考包括宿主种类、年龄、体重和疾病状态的各种参数确定体内施用的本发明的细胞的剂量。剂量也取决于宿主内将要靶向的位置，例如，来自供体的组织的移植位置。例如，直接靶向插入组织的位点可能需要与施用于哺乳动物宿主的血流中的剂量不同的剂量。优选地选择使得施用导致有效结果的剂量，结果可通过分子分析或通过监测受试者的合适的症状来检测。剂量范围为从每次施用大约至少1 x 10^4细胞到大约至少1 x 10^9细胞。在某些实施方式中，剂量范围为从大约5 x 10^5细胞到大约5 x 10^7细胞。为了实现最大治疗效果，需要几个剂量。

[0116] 合适的话，也可以预先施用本发明的细胞。因此，例如，如果细胞用于延长移植组织的存活，则可以在移植前，例如，在移植前一周，向移植接受者施用细胞。也可以在移植的同时和之后(例如，移植后1-2周或根据临床评估认为必要时)进行施用来保证移植组织的接受或没有排斥。合适的话，治疗也可以包括本文所述的多于一种的治疗；因此，例如，对于病人的治疗过程可以包括施用sCD83和至少一种其它免疫抑制化合物，也可以包括施用致耐受性DC。

[0117] 在说明书中完整引入每件专利、专利申请、科学论文、书或书的章节和其它参考文献作为参考，引入的程度等同于特别、单独地引入每个独立的引用文献作为参考。

[0118] 下面，通过实施例更详细地描述本发明的各个方面。但是，本发明不是仅限于这些实施例说明的实施方式，而是提供了在作为整体的申请中更完整地描述的好处。

[0119] 实验部分

[0120] 一般方法：

[0121] 对于一般技术，见Current Protocols in Immunology，eds.Coico等人(Wiley，Hoboken，NJ)。

[0122] Western印迹法/考马斯蓝染色：评估sCD83的典型方法如下。对于sCD83的每个样品，用电泳缓冲液和2微升的β-巯基乙醇制备1微克的sCD83。在96度下加热样品10分钟，然后在Invitrogen 4-12％聚丙烯酰胺凝胶上电泳。凝胶或者用考马斯蓝直接染色，或者需要的话，转移至膜上。用1/1000 CD83 4B5单克隆第一抗体然后用1/20000山羊抗鼠第二抗体探测膜；使用Amersham化学发光剂显示信号。

[0123] 灵长类的混合淋巴细胞反应(“MLR”)：使用Ficoll梯度分离法从两个不同的食蟹猴的血样中分离PBMC。使用丝裂霉素C或放射处理使得刺激细胞变为非增殖的。以3 x 10^5细胞/孔的密度接种刺激细胞和应答细胞，并用滴定量的sCD83处理。在96小时时，向培养物中加入^{3}H-胸苷(1μCi/孔)。在18-20小时后收获细胞，并分析确定T细胞增殖的量。

[0124] 对于 TNF-α、CD86 和 CCR5 的染色：对于 TNF-α（细胞内）和 CD86 和 CCR5（表面）的染色如下进行。从食蟹猴获得全血样品，并与 sCD83 温孵 12 小时。用 100ng/mL LPS 和 100U/mL IFN-γ 刺激样品 6 小时。使用可商购的 Fix/Perm 试剂盒对 TNF-α 进行细胞内染色。此外，使用标准技术对 CD86 和 CCR5 进行表面染色。染色后，裂解血红细胞，并用 BD 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 分析结果。

[0125] B 细胞增殖方案：制备小鼠脾细胞的单细胞悬浮液，并使用 ACK 裂解缓冲液裂解红细胞（见，Current Protocols in Immunology，eds. Coico 等人 (Wiley，Hoboken，NJ)）。使用 CD19MACS 珠纯化 B 细胞，10^5 细胞 / 孔的纯 B 细胞与滴定量的 sCD83 预孵育 3 小时。然后使用 2μg/mL LPS 刺激 B 细胞。在 48 小时时，向培养物中加入 1μCi 的 ^{3}H- 胸苷 / 孔。在 18-20 小时后收获细胞，确定 B 细胞增殖的量。

[0126] 用于体外研究的抗体产生方案：IgM 和 IgG 的产生如下。在存在滴定浓度的 sCD83(15-90μg/mL) 的情况下，用 20μg/mL 的 LPS（诱导抗体产生）培养 $2x10^6$ B 细胞 / 孔的纯群体（来自 C57Bl/6 小鼠）。培养 72 小时之后收集上清液，并通过 ELISA 测定上清液中 IgM 和 IgG 的产生。

[0127] 同种型转换：使用以下处理中的一种来培养 2 x 10^6 B 细胞 / 孔的纯群体（来自 C57Bl/6 小鼠）：20μg/mL 的 LPS（诱导 IgG2b）；20μg/mLLPS、800U/mL IL-4 和 150U/mL IL-5（诱导 IgG1）；或 20μg/mL LPS 和 1000U/mL IFN-γ（诱导 IgG2a）。对于每种处理，一些细胞也与 60μg/mL sCD83 一起培养，其中一些以处理对照的编号命名。72 小时之后收获细胞，并通过简短的酸清洗来除去 Fc 受体结合的免疫球蛋白。然后用下面中的一种对细胞染色来分别检测表面 IgG2b、IgG1 和 IgG2a：抗 IgM-FITC 和抗 IgG2b-RPE；抗 IgM-FITC 和抗 IgG1-RPE；或抗 IgM-FITC 和抗 IgG2a-RPE。

[0128] 用于离体研究的抗体产生方案：B 细胞增殖：给予 C57Bl/6 小鼠来自 C3H 小鼠的异位的同种异体心脏移植物。然后不处理小鼠，或通过腹膜内注射 100μg 的 sCD83 的每日剂量处理小鼠。在第 8 天处死小鼠，这大致就是未处理小鼠的平均存活时间。然后从小鼠脾收获 B 细胞，10^5B 细胞 / 孔的纯群体与 2μg/mL 的 LPS 一起培养来刺激细胞（没有加入 sCD83）。培养 48 小时后，加入 ^{3}H- 胸苷，再培养另外的 18-20 小时后，收获细胞，测定 ^{3}H- 胸苷掺入。

[0129] IgM 和 IgG 的产生：给予 C57Bl/6 小鼠来自 C3H 小鼠的异位的同种异体心脏移植物。然后不处理小鼠，或通过腹膜内注射 100μg 的 sCD83 的每日剂量处理小鼠。然后在第 8 天处死小鼠，这大致就是未处理小鼠的平均存活时间。然后从接受体小鼠的脾收获 B 细胞，以 2 x 10^6 B 细胞 / 孔与 20μg/mL 的 LPS 一起培养（诱导抗体的产生，没有加入 sCD83）。培养 72 小时之后收集上清液，并通过 ELISA 测定 IgM 和 IgG 的产生。

[0130] 移植：选择小鼠系的方法和标准为本领域已知。见，例如，Wang 等人 (2003) J. Immunol. 171：3823-3836。

[0131] 实施例 1：重组可溶性 CD83 的产生

[0132] 细菌菌株和质粒：使用含有编码与 GST 融合的 CD83(sCD83) 胞外域的 cDNA 的质粒 pGEX2ThCD83ext 作为产生重组 GST-hCD83ext 的表达载体，其受 IPTG 诱导的 tac 启动子的调节（见，例如，Lechmann 等人 (2002)Protein Expression and Purification 24：445-452)。由于在 GST 和 hCD83ext 之间的连接处设计有凝血酶酶切位点，最终的 sCD83 产

物在氨基末端具有 4 个额外的氨基酸 (Gly-Ser-Pro-Gly)。

[0133] GST-sCD83 的培养：由 Alexander Steinkassere 博士惠赠的大肠杆菌 (E.coli) 生产菌株在 -80℃中冻存，通过将其在含有 50μg/mL 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 琼脂板 (5g/L NaCl、5g/L Bacto 酵母提取物、10g/L Bacto 胰蛋白胨和 15g/L Bacto 琼脂) 上划线来复苏。将平板在 37℃温孵大约 15 小时。用几个分离的单菌落接种含有 50μg/mL Amp 的 600-mL LB 培养基。然后将培养物在 200 转 / 分的 37℃旋转摇床上温孵大约 16 小时。用种子培养物 (最多 600ml) 接种含有 1-15 升工作体积的培养基 (5g/L NaCl、5g/L Bacto 酵母提取物、20g/L Bacto 胰蛋白胨和 5g/L 葡萄糖) 的生物反应器 (MBR Bioreactor AG,Wetzikon, 瑞士)。当细胞生长到指定的细胞密度 2.0±0.2 OD_{600} 时，向培养物中添加 0.5mM 的异丙基 β-D- 硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 来诱导 GST-hCD83ext 的产生。也向培养物中加入 50μL/L 的消泡剂 289(Sigma, St.Louis, MO, USA) 来防止在培养过程中产生过度的泡沫。为了通风，以 1.5vvm 用过滤除菌的空气来净化生物反应器。使用 pH 电极 (IngoldMesstechnik AG, Zurich, 瑞士)、pH 控制器 (pH-40 型，New BrunswickScientific Co., Edison, NJ, USA) 和两个蠕动泵 (Watson Marlow, Falmouth, UK) 的组合，通过加入 3N NH_4OH 或 3N H_3PO_4 将培养物的 pH 保持在 7.00±0.15。诱导后，生物反应器在 28℃和 600 ～ 650 转 / 分运行 6 小时。

[0134] sCD83 的下游处理：培养后，在 2℃以 6000×g 离心收获细胞、称重、并在 -80℃保存以备后用。一般地，从 1 升细胞密度为 8 ～ 10 OD_{600} 的培养物可以获得大约 20g 细胞湿重 (wcw) 的细胞糊状物，意味着 1g wcw 大约相当于 400 ～ 500OD_{600}- 单位。为了制备裂解物以纯化 hCD83ext，通过在磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.3) 中悬浮适量的冷冻细胞糊状物来制备 0.05g wcw/mL 的细胞悬浮液。使用带有常规尖头的超声波处理器 (Misonix, Farmingdale, NY, USA) 断续地 (0.5 秒钟开 /0.5 秒钟关) 超声处理一批 100mL 大约 20 ～ 25 OD_{600} 的细胞悬浮液 4 分钟。然后在 2℃以 15000×g 离心处理过的细胞裂解物 15 分钟以除去细胞碎片。用 0.45μm 的滤器过滤含有总的可溶性蛋白质的上清液，然后通过色谱处理来纯化蛋白质。

[0135] 为了用 GST 亲和色谱捕捉 GST-CD83 融合蛋白，将 100mL 上述制备的裂解物以 4mL/min 的流速加到 20mL GSTrap 柱 (GE Healthcare, Baie d′ Urfé, Québec, 加拿大) 上。在结合到柱上时，用 10U/mL 的凝血酶原位酶切 GST-CD83ext 融合蛋白 (即，“柱上酶切”)。为了做到这一点，通过向柱中手动注射相同体积的含有 10U/mL 凝血酶的结合缓冲液来替换结合 GST-hCD83ext 融合蛋白的 GSTrap 柱中的 PBS 结合缓冲液。酶切在室温下进行大约 2.5 小时，使用 1 倍柱体积的结合缓冲液排出主要含有被凝血酶污染的 hCD83ext 的 GSTrap 柱中的大量液体。然后使用洗脱缓冲液洗脱 GST 部分和其余的未消化的 GST-hCD83。为了维持良好的柱上酶切性能，用 1M 的 NaOH 和 6M 的盐酸胍清洗 GSTrap 柱以除去截留在柱中的各种蛋白质污染物。

[0136] 进行精制步骤 (polishing step) 来从 CD83 中除去凝血酶和其它污染蛋白质。尽管 HPLC 系统也能够用来进行这一纯化步骤，但使用装配有强阴离子交换柱 (XK16/20 中的 30mL HiTrap Q HP, GEHealthcare) 的 FPLC 系统 (AKTApurifier UPC 10, GE Healthcare) 来处理。所用的加样缓冲液和洗脱缓冲液分别为含有 50mM NaCl 的 Tris 缓冲液 (20mM, pH7.5) 和含有 1M NaCl 的 Tris 缓冲液。首先，用加样缓冲液平衡 FPLC 系统的阴离子交换柱。然后，将如上所述从 GSTrap 柱上洗脱下来的蛋白质溶液加到柱中。含有 hCD83ext 的

部分经洗脱、集中、并通过使用高压、搅拌室 (Amicon，带有 YM10 盘的 8050 型，Millipore Canada，Cambridge，Ontario，加拿大）或类似的超滤单元超滤浓缩、然后在 -20℃保存。每日进行这种产物累积，直至累积的量大到足以进行进一步除去内毒素的处理。

[0137] 对于进一步除去内毒素，利用与精制步骤同样的实验设置和方案，用阴离子交换色谱处理大约 1g 的累积的 sCD83。使用注射用水 (WFI) 来制备用于这一处理步骤的所有的缓冲液。集中含有 hCD83ext 的部分，并通过使用高压、搅拌室超滤浓缩。最后，可以使用 Mustang E 过滤器 (Pall Life Sciences，Mississauga，Ontario，加拿大）或类似的过滤单元进一步过滤 CD83 产物部分，以除去内毒素，然后过滤除菌。测定每个产物部分的内毒素。

[0138] 分析方案：用盐水溶液适当稀释培养物样品，用于使用分光光度计（DU® 520，Beckman Coulter，Fullerton，CA，USA) 测量作为 OD_{600} 的细胞密度。为了制备用于分析的细胞提取物，在 2℃以 6000×g 离心 $40OD_{600}$- 单位量（定义为 'OD_{600}×mL'）的细胞 10 分钟。将细胞沉淀物再悬浮于 3mL PBS 中，用弗氏压碎器 (Thermo Electron Corporation，USA) 破碎，然后在 2℃以 15000×g 离心 15 分钟来除去细胞碎片。也可以使用其它物理（例如，超声）或化学方法来进行细胞破碎。含有可溶性蛋白质的上清液用于进行 GST 分析和 SDS 凝胶电泳。含有不溶性蛋白质和细胞碎片的沉淀物用磷酸盐缓冲液清洗，再悬浮于 TE/SDS 缓冲液 (10mM Tris HCl，pH8.0，1mM EDTA，1% SDS) 中，并加热至 100℃ 5 分钟来溶解。分析作为不溶部分的沉淀物的蛋白质含量。

[0139] 使用 1- 氯 -2，4- 二硝基苯 (CDNB) 和谷胱甘肽在室温下测定 GST 功能。GST（和其融合蛋白）催化这两个底物之间的反应，形成可以在 340nm 检测到的偶联产物。1 个单位 (U_{GST}) 被定义为导致吸光度以 $1OD_{340}$/ 分钟增加的酶的量。体积活性（单位为 U_{GST}/mL）是比活性（单位为 U_{GST}/OD_{600}- 单位）和细胞密度（单位为 OD_{600}）的乘积。使用商业测定试剂盒 (LAL QCL-1000，Cambrex Bio Science Inc.，Walkersville，MD，USA) 测定内毒素；体积内毒素浓度（单位为 EU/mL）是内毒素比浓度（单位为 EU/mg）和蛋白质浓度（单位为 mg/mL）的乘积。使用叠加有 4％聚丙烯酰胺积层胶的 12.5％聚丙烯酰胺分离胶，在 Mini-PROTEAN® II 电泳池 (Bio-Rad，Hercules，CA) 中进行十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。加载适量的细胞提取物 ($0.12OD_{600}$- 单位的可溶和不溶的部分）和纯化产物的蛋白质样品。在 200V 的恒定电压下进行电泳大约 45 分钟。用考马斯蓝或硝酸银对凝胶染色、干燥、并扫描，以证实从处理的样品中除去了内毒素。纯化的蛋白质在 -20℃或 -80℃下在 PBS（磷酸盐缓冲液）(pH7.5) 中冷冻和保存。

[0140] 实施例 2：可溶性 CD83 在自身免疫病小鼠模型中不诱导全面的免疫抑制

[0141] 实验性自身免疫脑脊髓炎（“EAE”）作为多发性硬化的动物模型，多发性硬化是一种与系统性红斑狼疮（“SLE”）具有某些相同的病理特征的疾病，包括受影响组织的密集的自动攻击性 $CD4^+$ 淋巴细胞浸润。已有报道可溶性 CD83 可以减轻 EAE 诱导产生的麻痹（见，例如，Zinser 等人 (2004) J. Exp. Med. 200：345-351)。我们希望确定在这种小鼠疾病模型中由 CD83 诱导的免疫抑制是特异性的还是全面的免疫抑制。

[0142] 为了诱导 EAE，用一种源自髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)（中枢神经系统的髓鞘周围神经元的一种组分）的肽免疫小鼠，并用百日咳毒素免疫小鼠（见，例如，Zinser 等人 (2004) J. Exp. Med. 200：345-351)。10 天后开始，每日用可溶性 CD83(100μg) 接种

小鼠，进行 10 天。在最后一次注射可溶性 CD8328 天后，对小鼠皮下注射匙孔蟅血蓝蛋白（“KLH，”10μg/ 小鼠）。10 天后，从小鼠中取出脾细胞，并用不同剂量的 KLH 再刺激。根据 [^{3}H]- 胸苷掺入测定响应该刺激的淋巴细胞增殖。结果（图 1 所示）证明来自这些小鼠的淋巴细胞响应 KLH 而增殖，表明动物是免疫活性的，可溶性 CD83 没有诱导长期全面的免疫抑制。

[0143] 实施例 3 :CD83 有效窗的终点的表征

[0144] 评估小鼠以确定施用 CD83 后受试者对另一种施用抗原耐受的时间。通过向 CBA 小鼠每隔一天注射 10 次来施用可溶性 CD83(100μg)。11 天后，用匙孔蟅血蓝蛋白 (KLH，10μg) 免疫处理过的小鼠。10 天后，取出脾细胞，并如国际专利公开 WO 2004/046182 所述进行再刺激试验，本文引入其内容作为参考。结果（图 2 所示）证明以这种免疫间隔，受试者不会对抗原耐受。

[0145] 进行另一个类似的实验，其中，22 天后从处理过的动物中取出脾细胞，并通过再刺激试验来评估 ;这些结果类似于以上所述并在图 3 中示出。

[0146] 实施例 4 :由鼠骨髓前体细胞产生致耐受性 DC

[0147] 使用年龄为 1-4 个月的 C57/BL6 小鼠和 BALB/C 小鼠（雄性或雌性 ;Charles River，Wiga，Sulzfeld，德国）。源自骨髓的树突细胞 (“BM-DC”) 的产生如 Lutz 等人 (1999) J.Immunol.Meth.223 :77 所述。将 100U/ml 青霉素 (Sigma)、100μg/ml 链霉素 (Sigma)、2mM L- 谷氨酰胺 (Sigma)、50μg/ml ME(Sigma) 和 10％热灭活的过滤的 FCS(PAA，Colbe，德国）加到 RPMI1640(Life Technologies，Karlsruhe，德国）中。在温孵期的第 0、3、6 和 8 天使用 200U/ml GM-CSF(Prepo Tech/Tebu，Rocky Hill，N.J.)。

[0148] 如下进行同种异体 MLR 试验 :从 BALB/C 小鼠的腹股沟和间质淋巴结分离 $CD4^+$ 和 $CD8^+$T 细胞，并与至 BM-DC 制备方案的第 9 天已经处理的 BM-DC（以不同的比例）共培养 (2 x 10^5 细胞 / 孔)3 天。在 96 孔培养皿中进行培养，且培养基为补充有 100U/ml 青霉素、100pg/ml 链霉素、2mM L- 谷氨酰胺、50μg/ml ME 和 10％热灭活的过滤的 FCS 的 200 微升 RPMI 1640。用 [^{3}H]- 胸苷 (1μCi/ 孔 ;Amersham PharmaciaBiotech) 对细胞脉冲 16 小时。使用 Inotech 1H-110 收集器 (Inotech，Dottikon，瑞士）将培养上清液收集到玻璃纤维过滤器上，利用 Wallac1450 微板计数器 (Wallac，Turku，芬兰）对滤器计数。

[0149] 同种异体 MLR 试验的结果表明，在小鼠免疫刺激性树突细胞和小鼠 T 细胞之间的群簇形成被可溶性 CD83（本文指 hCD83ext) 抑制。另外，可溶性 CD83 以浓度依赖的方式抑制鼠免疫刺激性树突细胞刺激 T 细胞的能力，因此 T 细胞不响应接触 DC 而增殖。

[0150] 实施例 5 :sCD83 抑制离体的 B 细胞的增殖和功能

[0151] 如下所述，在一系列实验中测定 sCD83 对 B 细胞的影响。

[0152] sCD83 对于移植接受者离体 B 细胞增殖的影响 :将 C3H 小鼠的心脏移植到 C57BL/6 小鼠的腹腔内。移植 8 天后（此时，在未处理的小鼠中，移植物一般被排斥），处死小鼠。从接受者小鼠纯化 B 细胞，培养，并用 LPS 刺激。以每分钟计数 (cpm) 测定 ^{3}H- 胸苷掺入。结果如图 4 所示，证明 sCD83 抑制离体 B 细胞的增殖。

[0153] sCD83 对于离体 B 细胞产生抗体的影响 :将 C3H 小鼠的心脏移植到 C57BL/6 小鼠的腹腔内。移植 8 天后（此时，在未处理的小鼠中，移植物一般被排斥），处死小鼠。从接受者小鼠纯化 B 细胞，培养，并用 LPS 刺激。培养 72 小时后，收集上清液，并使用 ELISA 测定

IgM 和 IgG 的产生。结果如图 5 所示，证明 sCD83 抑制体外抗体产生。

[0154] 实施例 6 ：sCD83 与环孢素、他克莫司或 MMF 共施用提高了同种异体移植接受体中心脏移植物的存活

[0155] 按说明从供体小鼠中取出心脏并移植到接受小鼠的腹腔内（即，腹内异位心脏移植）。按说明处理接受小鼠，某些处理在移植之前开始。测定每个处理的移植组织的平均存活时间。

[0156] 使用 C57BL/6 供体小鼠和 BALB/c 接受小鼠。每个处理组的处理和移植组织的存活如表 1 所示。在这组实验中，sCD83 处理以每日腹膜内注射 100μg 的 sCD83 从第 -1 天（即，在移植前一天）开始直到第 7 天 ；然后每隔一天连续注射直到第 28 天。在这种应用中，“第 -1 天”一般指移植前一天，移植当天被称为“第 0 天”。环孢素处理是每日皮下注射亚治疗剂量 (5mg/kg/ 天）或高剂量 (15mg/kg/ 天）。他克莫司处理是每日口服 8mg/kg/ 天的亚治疗剂量，而 MMF 处理是每日口服 80mg/kg/ 天的低剂量。结果证明 sCD83 与环孢素、他克莫司或 MMF 的共施用提高了同种异体移植接受体中心脏移植物的存活。

[0157] 表 1 ：sCD83 与环孢素、他克莫司或 MMF 共施用提高了 BALB/c 接受体中 C57BL/6 心脏移植物的存活

[0158]

从 C57BL/6 移植到 BALB/c	个体存活（天）	MST（天）
未处理的	8,8,9,9	8.5±0.6
sCD83	15,15,16,17	15.8±1.0
CsA(5mg/kg,过去用过的）	9,10,10,10,10,11,11	10.1±0.3
sCD83+CsA(5mg/kg)	18,21,23,25	21.8±3.0
CsA(15mg/kg,过去用过的）	14,15,15,16,16,17	15.5±1.1
sCD83+CsA(15mg/kg)	28,35,40,41,42	37.2±5.8
他克莫司	13,14,14,15,16,18,19,21	16.3±1.0
sCD83+ 他克莫司	20,27,28,30,32,35	28.7±5.1
sCD83+MMF	20,22,23,26,27,28	24.3±3.1

[0159] 在进一步的实验中，用更短的施用过程和不同的施用路径处理移植接受体。一般如上所述处理小鼠，从 C57BL/6 供体小鼠中取出心脏并移植到 BALB/c 接受小鼠的腹腔内。从第 -1 天到第 7 天，给接受小鼠静脉内施用 100μg/ 小鼠 / 天的剂量的可溶性 CD83 和 15mg/kg/ 天的剂量的环孢素。移植组织的平均存活时间超过 100 天。

[0160] 实施例 7 ：sCD83 抑制移植接受体中的同种异体抗体的诱导

[0161] 在非组织相容的个体之间的组织移植刺激移植排斥。排斥过程可能涉及免疫应答的细胞免疫和体液免疫。移植器官的急性排斥可通过针对供体特异性同种异体抗原（即，外源性的组织相容性抗原）的抗体应答介导。或者，同种异体抗体应答可能由于细胞介导的应答促进的供体组织破坏而诱导。在每种情况下，接受体中同种异体抗体应答的出现可以通过测定能够结合源自供体的细胞的接受体血清中的抗体效价来检测，一般通过染色源自供体的脾细胞来进行。因为 sCD83 在移植实验中延长了移植物的存活时间，我们希望确定 sCD83 是否影响移植接受体中的同种异体抗体的诱导。

[0162] 在这些实验中，从移植接受体（对照处理的、sCD83 处理的和处理 - 原始个体）收集血清。从移植供体中取出脾细胞，并与移植接受体的血清一起温孵。使用对于小鼠 IgM

和 IgG 的 Fc 片段特异性的抗体选择性地监测来自同种异体抗血清的抗体与移植供体脾细胞表面的结合。该方法的优点在于不检测供体细胞（例如，在供体脾细胞群体之内的 B 细胞）被动表达的鼠抗体，因为如果 Ig 源自细胞外的来源（即，接受者的血清），则 Fc 片段是唯一可接近的；供体 B 细胞等表面的源自供体的 Ig 的 Fc 片段将埋植于 Fc 受体中或保留在细胞内，因而不可染色。使用 FACS 分析染色的细胞。

[0163] 在移植方法中，从 C3H 小鼠中取出心脏并移植到用 sCD83 处理或未处理的 C57BL/6 小鼠中。移植 8 天（未处理的小鼠通常排斥移植物（即，显示完全组织排斥）的大概时间）后，从 C57BL/6 移植接受体收集血清。然后使用接受者的血清对 C3H 供体的脾细胞染色，用对于抗 IgG 或抗 IgM 的 Fc- 片段特异性的 FITC 偶联抗体检测同种异体抗体的结合。结果显示用 sCD83 处理的移植接受体具有相当于来自天然小鼠（即，没有接受移植的小鼠）的血清中的水平的低同种异体抗体活性（即，低供体特异性 IgM 或 IgG 结合）（见图 6）。接受 C3H 心脏移植并用 sCD83 处理的 C57BL/6 小鼠具有相当于来自未移植的原始 C57BL/6 小鼠的血清的低同种异体抗体活性。相反，未处理因而排斥移植组织的移植接受体具有可检测到的、水平明显高于对照的同种异体抗体。来自未处理的移植接受体的血清也能够在对照水平之上染色源自 C3H 供体的脾细胞。这些实验证明 sCD83 抑制 B 细胞产生针对外源性抗原（例如，移植组织）的供体特异性抗体，并可防止器官排斥。实施例 8 ：sCD83 与西罗莫司和 CD45RB mAb 共施用实现了同种异体移植接受体中心脏移植的长期存活

[0164] 按说明从供体小鼠中取出心脏并移植到接受小鼠的腹腔内（即，异位移植）。按说明处理接受小鼠，某些处理在移植之前开始。监测同种异体移植的存活并如下评分：“A，”强烈跳动；“B，”搏动强度缓慢下降；“C，”搏动强度明显下降；“D，”心跳完全停止。测定每个处理的移植组织的平均存活时间。

[0165] 在第一组实验中，使用 C3H 供体小鼠和 BALB/c 接受小鼠。每个处理组的处理和移植组织的存活如表 2 所示。在这组实验中，在第 -1 天（即，移植前一天）开始 sCD83 处理并持续到第 28 天；每天向每只小鼠通过腹膜内注射施用 100μg 的 sCD83。在第 0 天（即，移植当天）开始西罗莫司处理并持续到第 14 天；每天给每只小鼠经口施用 2mg/kg 的西罗莫司。在第 0 天开始抗 CD45RB 处理并持续到第 14 天；每天给每只小鼠静脉注射 100μg 的抗 CD45RB(BioExpress，Inc.，West Lebanon，New Hampshire)。

[0166] 表 2 ：sCD83 与西罗莫司和 CD45RB mAb 共施用实现了 BALB/c 接受体中 C3H 心脏移植物的长期存活

[0167]

从 C3H 移植到 BALB/c	个体移植存活（天）	MST（天）
未处理的	8,8,8,9	8.3±0.5
西罗莫司	12,23,25,25	21.3±6.2
抗 CD45RB mAb	12,15,21	16.0±4.6
sCD83	9,9,10,12	10.0±1.4
抗 CD45RB mAB+ 西罗莫司	31,33,36	33.3±2.5
sCD83+ 西罗莫司	52,53,62	55.7±5.5
sCD83+ 抗 CD45RB mAb	35,37,38	36.7±1.5
sCD83+ 西罗莫司 + 抗 CD45RB mAB	>100(x4)	>100

[0168] 在进一步的一组实验中，将 C3H 小鼠心脏移植到 C57BL/6 小鼠的腹腔内（结果如表 3 和图 7 所示）。在不处理的情况下，在 8.5±0.6 天，通过急性细胞和体液排斥排斥心脏

移植物，其特征为血管炎、出血、血栓形成和 $CD4^+$ $CD8^+$ 细胞的浸润。在移植的组织和接受者的血液中也检测到了高水平的 IgG 和 IgM。单独用 sCD83 处理（即，从第 1 天到第 7 天，对每只小鼠每天腹膜内注射 100μg 的 sCD83，然后在第 8-16 天，每隔一天 (q.o.d.) 注射一次）减轻了急性排斥的症状，并使心脏移植存活期延长至 10.7±1.5 天；用 400μg 的 sCD83 的同样处理使心脏移植存活期加倍至 15±1.0 天。其它的治疗包括亚治疗剂量的抗 CD45RB 单克隆抗体（“mAb”）（即，从第 0 天到第 14 天，每天静脉注射 100μg/ 小鼠）或西罗莫司（即，从第 0 天到第 14 天，每天口服（“p.o.”）2mg/kg）。在这些实验中的亚治疗剂量基于等效的人类剂量。

[0169] 意想不到的是，每次注射 100μg 的较低剂量的 sCD83 与这些亚治疗剂量的抗 CD45RB mAb 或西罗莫司显示出协同效应；与 sCD83 的联合治疗进一步分别将移植物存活提高到 32±3.6 天和 39.3±4.7 天。抗 CD45RB mAb 和西罗莫司的联合治疗将移植物存活提高到 50.3±3.1 天。明显地，抗 CD45RB mAb 和西罗莫司两者与 sCD83 的联合治疗有效地防止了急性排斥，并诱导了移植物耐受，不确定存活超过 100 天 ($p<0.01$，相对于使用抗 CD45RB mAb 和西罗莫司的联合治疗）。在手术后第 100 天（“POD100”）检查来自用 sCD83、抗 CD45RB mAb 和西罗莫司联合处理（即，“三重处理”）的小鼠的移植心脏，显示没有血管病变的正常的组织学。该实验证明包括共施用 sCD83 与西罗莫司和 CD45RB mAb 的治疗诱导移植心脏组织的长期接受。

[0170] 表 3：sCD83 与西罗莫司和 CD45RB mAb 联用实现了在 C57BL/6 接受体中 C3H 心脏的长期心脏移植物存活

[0171]

从 C3H 移植到 C57BL/6	个体存活（天）	MST（天）
未处理的	8,8,9,9	8.5±0.6
西罗莫司	15,16,19	16.7±2.1
抗 CD45RB mAb	14,15,15,17	15.3±1.3
sCD83(100ug)	9,11,12	10.7±1.5
sCD83(266ug)	14,15,15	14.7±0.6
sCD83(400ug)	14,15,16	15.0±1.0
抗 CD45RB mAB+ 西罗莫司	46,50,52,53	50.3±3.1
sCD83+ 西罗莫司	34,41,43	39.3±4.7
sCD83+ 抗 CD45RB mAb	28,33,35	32.0±3.6
sCD83+ 西罗莫司 + 抗 CD45RB mAB	>100(x4)	>100

[0172] 尽管本发明不被任何特定的作用机理所限制，但一般地，C3H 组织向 BALB/c 小鼠的移植被认为是抗体介导的排斥的模型系统，而 C3H 组织向 C57BL/6 小鼠的移植被认为是 T 细胞介导的排斥的模型系统。单独用 sCD83 治疗和与其它物质共施用提高了这两个系统中的移植物存活，证明 sCD83 能够抑制由 B 细胞以及 T 细胞介导的不希望有的免疫应答。换句话说，sCD83 能够抑制从 C3H 到 BALB/c 小鼠心脏移植模型中的体液移植排斥，也能够抑制从 C3H 到 BALB/c 小鼠心脏移植模型中的急性细胞移植排斥。

[0173] 也检查了接受 sCD83、抗 CD45RB mAb 和西罗莫司三重治疗的接受小鼠，来测定这种治疗对于致耐受性 DC（即，$CD11c^+$ $MHCII^{低}$ $CD40^{低}$ $CD86^{低}$ $IL\text{-}12^-$ 细胞）和调节性 T 细胞（$CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ 细胞）的产生的影响。在手术后第 100 天检查这些小鼠时，在它们中发现数目增加的致耐受性 DC 和调节性 T 细胞（见图 8、图 9 和图 10 中所示的流式细胞实验结果）。CXCR6 标志物是不成熟 DC 特有的，而 CXCR4 和 CCR7 标志物是成熟 DC 特有的。图

9 和图 10 中的星号表示具有 $p<0.01$ 差异的结果。因此，这些结果证明，基于 sCD83 的治疗诱导致耐受性 DC 和调节性 T 细胞二者的产生。

[0174] 实施例 9 ：sCD83 抑制体外 TNF-α 产生和 mDC 活化标志物的表面表达

[0175] 我们希望检查人 sCD83 在体外对于外周血 DC、单核细胞和 T 细胞的功能性质。使用具有四色染色的 FACS 将来自食蟹猴的成熟 DC（“mDC”）鉴定为 HLA-DR 阳性、谱系阴性（即，CD3、CD20、CD14 和 CD16 阴性）和 CD11c 阳性的细胞。也监测细胞内的 TNF-α 、IL-6 和表面标志物 CD83、CD80、CD86 和 CCR5（其在活化的成熟 DC 中增加）。

[0176] 为了评估 sCD83 对于 mDC 的影响，从食蟹猴分离的 PBMC（1 x 10^6 细胞）与 sCD83 孵育过夜。用 LPS（1μg/ml）和 IFN-γ（100U/ml）刺激细胞 6 小时。使用 FACS 在 mDC 中检测细胞内 TNF-α 水平和表面标志物。代表 3 个实验之一的结果如图 11 所示，结果以阳性细胞的百分比和平均荧光单位 (MFU) 表示。结果显示，sCD83 抑制 mDC 在体外产生 TNF-α ，也抑制 mDC 活化标志物 CD83、CD86、CCR5 和 CD80 的表面表达。

[0177] 为了评估 sCD83 对于单核细胞的影响，从食蟹猴分离的 PBMC（1x10^6 细胞）与 sCD83（1 x 10^6 细胞）孵育过夜。使用 FACS 在单核细胞中检测细胞内 TNF-α 水平和表面标志物。代表 3 个实验之一的结果如图 12 所示，结果以阳性细胞的百分比和平均荧光单位 (MFU) 表示。结果显示，sCD83 适度抑制单核细胞在体外产生 TNF-α ，也抑制单核细胞活化标志物的表面表达。

[0178] 为了评估 sCD83 对于 $CD4^+$T 细胞的影响，从食蟹猴中纯化这些细胞，并在存在或不存在 sCD83 或抗 CD28mAb 的情况下，刺激这些细胞 6 天。然后对细胞染色来鉴别调节性 T 细胞（即，$CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ 细胞），并通过 FACS 分析。结果（如图 13 所示）表明 sCD83 促进调节性 T 细胞的产生。

[0179] 如下所述，也使用从食蟹猴制备的树突细胞来制备调节性 T 细胞。在存在 GM-CSF 和 IL-4 7 天的情况下，由 $CD14^+$ 单核细胞产生食蟹猴骨髓树突细胞 ；在第 3-7 天向某些培养物中加入 50ug/ml 的可溶性 CD83，在第 5-7 天加入 IL-1β 、IL-6、TNF-α 和 PGE-2 的成熟混合物。通过阴性选择分离 T 细胞（1 x 10^6/ml），并用已经用 sCD83（50μg/ml）处理或未处理的同种异体成熟树突细胞以不同的比例刺激 T 细胞。然后对细胞染色来鉴别调节性 T 细胞（即，$CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ 细胞），并通过 FACS 分析。结果（如图 14 所示）表明，用可溶性 CD83（尤其是以测试的较高的 DC:T 比例）处理的树突细胞产生数目增加的调节性 T 细胞。

[0180] 实施例 10 ：体外 B 细胞增殖和功能的 sCD83 抑制

[0181] 评估 sCD83 对于体外 B 细胞增殖的影响 ：在存在或不存在 sCD83 的情况下，用 LPS 刺激 C57BL/6B 细胞。培养 48 小时后，以每分钟的计数 (cpm) 测定 ^3H- 胸苷掺入。对结果进行评估来确定 sCD83 是否抑制体外 B 细胞增殖。

[0182] 评估 sCD83 对于 B 细胞产生 IgM 和 IgG 的影响 ：在存在或不存在 sCD83 的情况下，用 LPS 刺激 C57BL/6B 细胞。培养 72 小时后，收集上清液，并使用 ELISA 检测 IgM 和 IgG 的产生。对结果进行评估来确定 sCD83 是否抑制体外 B 细胞的抗体产生。

[0183] 实施例 11 ：致耐受性树突细胞的产生和树突细胞功能的评估

[0184] 致耐受性树突细胞可如下产生。使用含有 1％人血浆的标准培养基（例如，补充有谷氨酰胺 (200μg/ml，BioWhittaker，Verviers，比利时）、青霉素 / 链霉素 (20μg/ml)、

10mM Hepes、pH7.5(Sigma-Aldrich)和来自单一供体的1%人血浆(预先通过在56℃温孵30分钟而加热灭活)的RPMI 1640(BioWhittaker,Verviers,比利时))培养细胞。通过在Ficoll-Hypaque(Amersham Pharmacia Biotech,Freiburg,德国)中沉降从血沉棕黄层分离人PBMC,接种到包被有IgG(来自Cohn部分的10μg/ml γ-球蛋白;Sigma-Aldrich)的100mm培养皿上,并在37℃、5% CO_2 中温孵。在1小时和7小时的温孵后,除去非粘附细胞部分,而粘附细胞在补充有细胞因子GM-CSF(800U/ml)和IL-4(500U/ml)的1%人血浆培养基中进一步培养。在温孵期的第3天,加入新鲜的培养基(包含400U/ml的GM-CSF和500U/ml的IL-4)。在第4或5天,收集非粘附细胞、计数并以0.3-0.5 x 10^5 细胞/毫升的密度转移到新的培养皿中。对于最后的成熟步骤,用TNF-α(1.25ng/ml)、GM-CSF(40U/ml)、IL-4(200U/ml)、前列腺素 E_2(0.5pg/ml;见,例如,Lechmann等人(2001)J.Exp.Med.194:1813-1821)和可溶性CD83(4μg/ml)补充1%人血浆培养基。或者,对于最后的成熟步骤,成熟混合物包含IL-1β、TNF-α、PGE_2 和可溶性CD83(4μg/ml)。在第8天,通过FACS分析细胞。当与正常成熟的DC比较时,通过这种方法成熟的细胞显示CD80(例如,从96%到66%)和CD83(例如,从96%到30%)的细胞表面表达明显减少和CD14阳性细胞增多(见,例如,WO2004/046182)。其它细胞表面标志物(例如,I型和II型MHC)的表达没有受到明显影响。在其它的实施方式中,细胞根据上述方案成熟,但可溶性CD83和一种或多种其它免疫抑制化合物可以在1、2、3或更多天后添加(如上所述,分开或一起)到成熟混合物中。

[0185] 如下所述,使用同种异体混合淋巴细胞反应("MLR")试验来评估树突细胞。从血沉棕黄层分离 $CD4^+$ 和 $CD8^+$T细胞。简单地说,收集的非粘附细胞部分与神经氨酸酶(neuramidase)处理的绵羊红细胞一起温孵,通过Ficoll梯度离心收集,并在补充有来自单一AB供体的5%人血清的RPMI中培养。然后用不同比例的成熟同种异体免疫刺激性DC来刺激细胞。然后细胞与不同浓度的可溶性CD83(如WO2004/046182中描述的"hCD83ext")一起温孵,或与BSA(BioRad)一起温孵作为对照,或不进行处理。在96孔细胞培养皿中用补充有来自单一AB供体的5%人血清的RPMI共培养T细胞(2 x 10^5 细胞/孔)和DC4天。用 [^{3}H]-胸苷(1μCi/孔;Amersham Pharmacia Biotech)对细胞脉冲16小时。使用Inotech 1H-110收集器(Inotech,Dottikon,瑞士)将培养上清液收集到玻璃纤维过滤器上,利用Wallac 1450微板计数器(Wallac,Turku,芬兰)对滤器计数。

[0186] 实施例12:CD83响应各种刺激的有效窗终点的确定

[0187] 基本上按照实施例3所述,评估小鼠在施用CD83和KLH的不同间隔(即,10天、8天、6天、4天、2天、1天)后的免疫应答。定义使用KLH的再刺激不会激发免疫应答的间隔;这种间隔标志着该实验中敏感性窗口的终点。

[0188] 基本上如上所述评估受试者,但检查其它免疫刺激。这些方案用第三方皮肤移植物代替KLH抗原。其它方案在用CD83治疗的过程中和之后(在CD83治疗前一天、在CD83治疗一天之后和在CD83治疗三天之后)代替了利什曼原虫(Leishmania)感染。其它方案在用CD83治疗的过程中和之后代替了LCMV(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒)感染。

[0189] 实施例13:记忆T细胞响应CD83再活化的评估

[0190] 用LCMV感染小鼠,并在28天后注射CD83。评估外周血单核细胞(PBMC)是否存在产生IFNγ和IL-2但不杀死靶细胞的LCMV特异性记忆T细胞。

[0191] 实施例14:CD83对调节性T细胞的效应的评估

[0192] 在体外产生抗原特异性T细胞，并在存在或不存在可溶性CD83的条件下接触树突细胞。然后通过分析T细胞的增殖(CFSE)、凋亡(膜联蛋白V)、细胞因子的产生(IFN-γ和IL-10)和Foxp3的存在来评估CD83的效应；合适的分析是本领域内已知的。

[0193] 从哺乳动物分离T细胞，使得能够在体外培养和/或分析它们。根据公认的方法使用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法从红细胞和嗜中性细胞中分离PBMC。使用补充有1％胎牛血清(FBS)的改进的AIM-V(其由含有2mM谷氨酰胺、10μg/ml硫酸庆大霉素和50μg/ml链霉素的AIM-V(GIBCO)组成)洗涤细胞。根据标准技术，使用含有与柱或磁珠偶联的合适的单克隆抗体通过阴性或阳性选择富集T细胞。分析细胞的等分试样的细胞表面表型，包括CD4、CD8、CD3和CD14的表达。

[0194] 在某些例子中，以大约5 x 10^5细胞/毫升如上改进的含有5％ FBS和100U/ml重组IL-2(rIL-2)的AIM-V(补充的AIM-V)洗涤和再悬浮细胞。然后，在存在或不存在sCD83时，T细胞接触免疫刺激性或致耐受性树突细胞。

[0195] 为了刺激增殖，可添加OKT3单克隆抗体(Ortho Diagnostics)至10ng/ml的浓度。将细胞接种到24孔板(0.5毫升细胞悬浮液/孔)，并在约37℃温度下在含有5％ CO_2的湿润孵箱中培养细胞。通过测定例如^{3}H-胸苷摄取，来定量地监测T细胞响应诸如OKT3抗体的反应性组分的增殖(见，例如，Caruso等人(1997)Cytometry 27:71)。

[0196] 对于在接触树突细胞的过程中和之后由T细胞分泌的细胞因子的类型和数量的分析是机能活动的测量。可通过ELISA或ELISPOT分析检测细胞因子来测定细胞因子产生的速度和总量。见，例如，Fujihashi等人(1993)J.Immunol.Meth.160:181;Tanquay和Killion(1994)Lymphokine Cytokine Res.13:259;Parkhurst等人(1996)Immunol.157:2539。

[0197] 实施例15:对于使用用CD83产生的调节性T细胞的免疫性过继转移的评估

[0198] 用10μg的KLH免疫小鼠。在KLH免疫前一天、一天之后和3天之后施用CD83(100μg)。在KLH免疫10天之后，从这些动物制备脾细胞，并将脾细胞转移至原始的动物体内，然后用KLH免疫该动物并分析其对该抗原的免疫应答。

[0199] 实施例16:使用致耐受性DC的耐受性的过继转移

[0200] 如实施例4所述制备用包含可溶性CD83的成熟步骤制备的致耐受性DC。向不成熟的DC上加载感兴趣的抗原或编码感兴趣的抗原的核酸。将这些DC转移到受试者体内，并评估受试者对于该抗原的免疫应答。

[0201] 实施例17:可溶性CD83的共施用和移植器官

[0202] 对远系杂交的幼年食蟹猴进行肾移植，每只猴接受从另一只猴取出的肾。在移植过程中，给接受猴静脉内或腹膜内注射剂量为3-6mg/kg/天的可溶性CD83。每天一次或每天4次施用28天。对照猴接受移植器官但不接受可溶性CD83。移植手术后，监测猴的生存能力和移植器官的血液供应。

序列表

<110> 阿哥斯医疗公司 (ARGOS THERAPEUTICS, INC.)
Nicolette, Charles
Brand, Stephen
Zhong, Zhen
Wang, Hao
Arp, Jacqueline
Ramcharran, Siobhan I.
Baroja, Miren L.

<120>CD83 在联合治疗中的用途

<130>ARG042WO

<150>US 60/838,812
<151>2006-08-18

<150>US 60/927,377
<151>2007-05-03

<160>4

<170>PatentIn version 3.3

<210>1
<211>1761
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221>misc_fcature
<222>(1).(1761)
<223> 也在 GenBank 登记号 Z11697 中显示的核酸序列

<220>
<221>CDS
<222>(11)..(628)

<220>
<221>sig-peptide
<222>(11)..(67)

<400>1

```
gaattccgcc atg tcg cgc ggc ctc cag ctt ctg ctc ctg agc tgc gcc        49
           Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Leu Ser Cys Ala
           1               5                   10
tac agc ctg gct ccc gcg acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa        97
Tyr Ser Leu Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu
    15                  20                  25
gat gtg gac ttg ccc tgc acc gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac       145
Asp Val Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr
30                  35                  40                  45
acg gtc tcc tgg gtc aag tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag       193
Thr Val Ser Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu
                50                  55                  60
aca ccc cag gaa gac cac ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg       241
Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly
            65                  70                  75
caa aat ggt tct ttc gac gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag       289
Glr Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys
        80                  85                  90
atc cga aac act acc agc tgc aac tcg ggg aca tac agg tgc act ctg       337
Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu
    95                  100                 105
cag gac ccg gat ggg cag aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga       385
Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg
110                 115                 120                 125
gtg aca gga tgc cct gca cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac       433
Val Thr Gly Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr
                130                 135                 140
aga gcg gag att gtc ctg ctg ctg gct ctg gtt att ttc tac tta aca       481
Arg Ala Glu Ile Val Leu Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr
            145                 150                 155
ctc atc att ttc act tgt aag ttt gca cgg cta cag agt atc ttc cca       529
Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro
        160                 165                 170
gat ttt tct aaa gct ggc atg gaa cga gct ttt ctc cca gtt acc tcc       577
```

Asp Phe Ser Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser
175 180 185

cea aat aag cat tta ggg cta gtg act cct cac aag aca gaa ctg gta 625
Pro Asn Lys His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val
190 195 200 205

tga gcaggatttc tgcaggttct tcttcctgaa gctgaggctc aggggtgtgc 678
ctgtctgtta cactggagga gagaagaatg agcctacgct gaagatggca tcctgtgaag 738
tccttcacct cactgaaaac atctggaagg ggatcccacc ccattttctg tgggcaggcc 798
tcgaaaacca tcacatgacc acatagcatg aggccactgc tgcttctcca tggccacctt 858
ttcagcgatg tatgcagcta tctggtcaac ctcctggaca ttttttcagt catataaaag 918
ctatggtgag atgcagctgg aaaagggtct tgggaaatat gaatgccccc agctggcccg 978
tgacagactc ctgaggacag ctgtcctctt ctgcatcttg gggacatctc tttgaatttt 1038
ctgtgttttg ctgtaccagc ccagatgttt tacgtctggg agaaattgac agatcaagct 1098
gtgagacagt gggaaatatt tagcaaataa tttcctggtg tgaaggtcct gctattacta 1158
aggagtaatc tgtgtacaaa gaaataacaa gtcgatgaac tattccccag cagggtcttt 1218
tcatctggga aagacatcca taaagaagca ataaagaaga gtgccacatt tatttttata 1278
tctatatgta cttgtcaaag aaggtttgtg tttttctgct tttgaaatct gtatctgtag 1338
tgagatagca ttgtgaactg acaggcagcc tggacataga gagggagaag aagtcagaga 1398
gggtgacaag atagagagct atttaatggc cggctggaaa tgctgggctg acggtgcagt 1458
ctgggtgctc gtccacttgt cccactatct gggtgcatga tcttgagcaa gttccttctg 1518
gtgtctgctt tctccattgt aaaccacaag gctgttgcat gggctaatga agatcatata 1578
cgtgaaaatt ctttgaaaac atataaagca ctatacagat tcgaaactcc attgagtcat 1638
tatccttgct atgatgatgg tgttttgggg atgagagggt gctatccatt tctcatgttt 1698
tccattgttt gaaacaaaga aggttaccaa gaagcctttc ctgtagcctt ctgtaggaat 1758
t 1761

<210>2
<211>205
<212>PRT
<213> 智人

<400>2

Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Leu
1 5 10 15
Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp
20 25 30
Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser
35 40 45

Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln
50 55 60
Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly
65 70 75 80
Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn
85 90 95
Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro
100 105 110
Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly
115 120 125
Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu
130 135 140
Ile Val Leu Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile
145 150 155 160
Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro Asp Phe Ser
165 170 175
Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser Pro Asn Lys
180 185 190
His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val
195 200 205

<210>3
<211>375
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221>misc_feature
<222>(1)..(375)
<223> 编码人 CD83 的胞外域的核酸序列

<400>3
acgccggagg tgaaggtggc ttgctccgaa gatgtggact tgccctgcac cgccccctgg 60
gatccgcagg ttccctacac ggtctcctgg gtcaagttat tggagggtgg tgaagagagg 120
atggagacac cccaggaaga ccacctcagg ggacagcact atcatcagaa ggggcaaaat 180
ggttctttcg acgcccccaa tgaaaggccc tattccctga agatccgaaa cactaccagc 240
tgcaactcgg ggacatacag gtgcactctg caggacccgg atgggcagag aaacctaagt 300
ggcaaggtga tcttgagagt gacaggatgc cctgcacagc gtaaagaaga gacttttaag 360
aaatacagag cggag 375

<210>4
<211>125
<212>PRT
<213> 智人
<220>
<221>misc_feature
<222>(1)..(125)
<223> 人 CD83 的胞外域

<400>4

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys
1 5 10 15
Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys
20 25 30
Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His
35 40 45
Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp
50 55 60
Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser
65 70 75 80
Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln
85 90 95
Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala
100 105 110
Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu
115 120 125

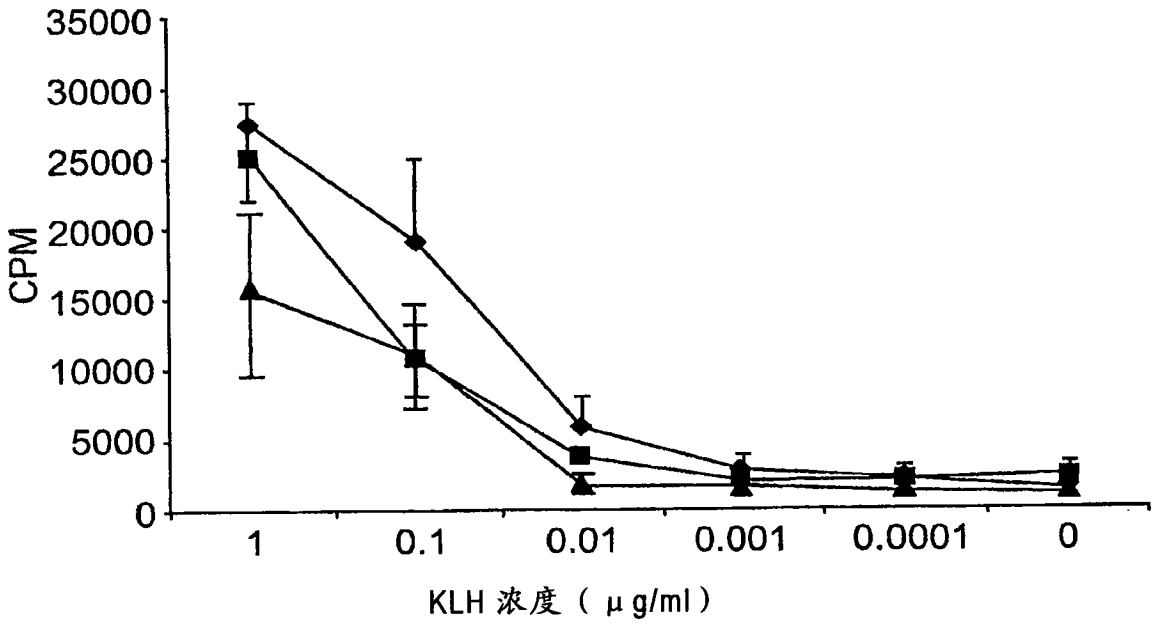

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
CPM
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0
KLH 浓度（μg/ml）

图 1

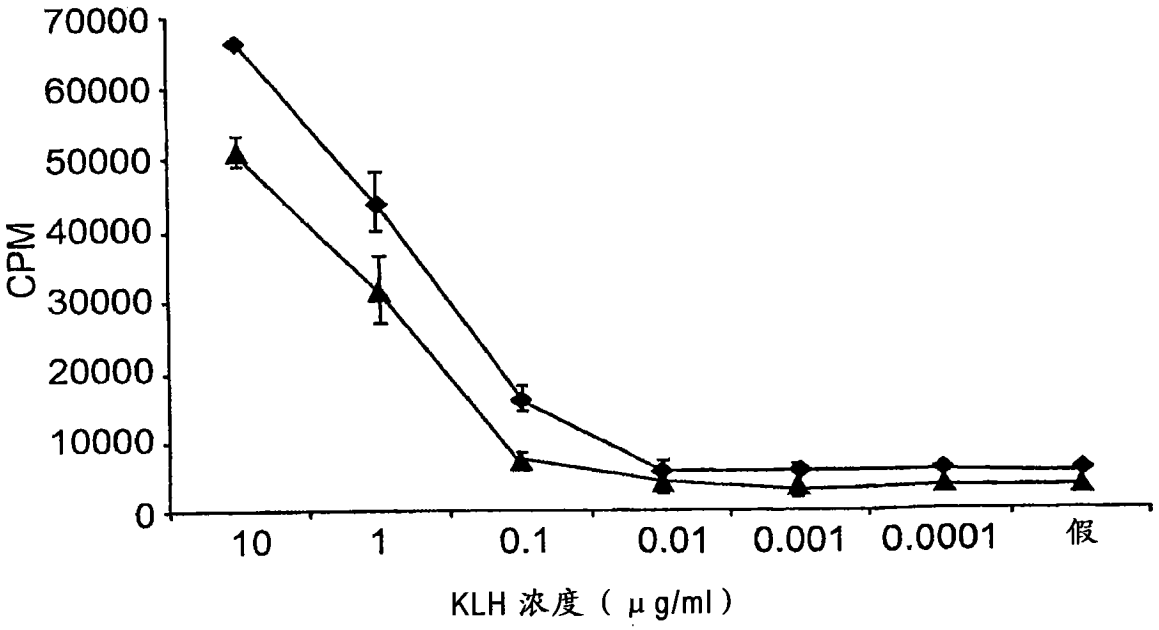

70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
CPM
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
假
KLH 浓度（μg/ml）

图 2

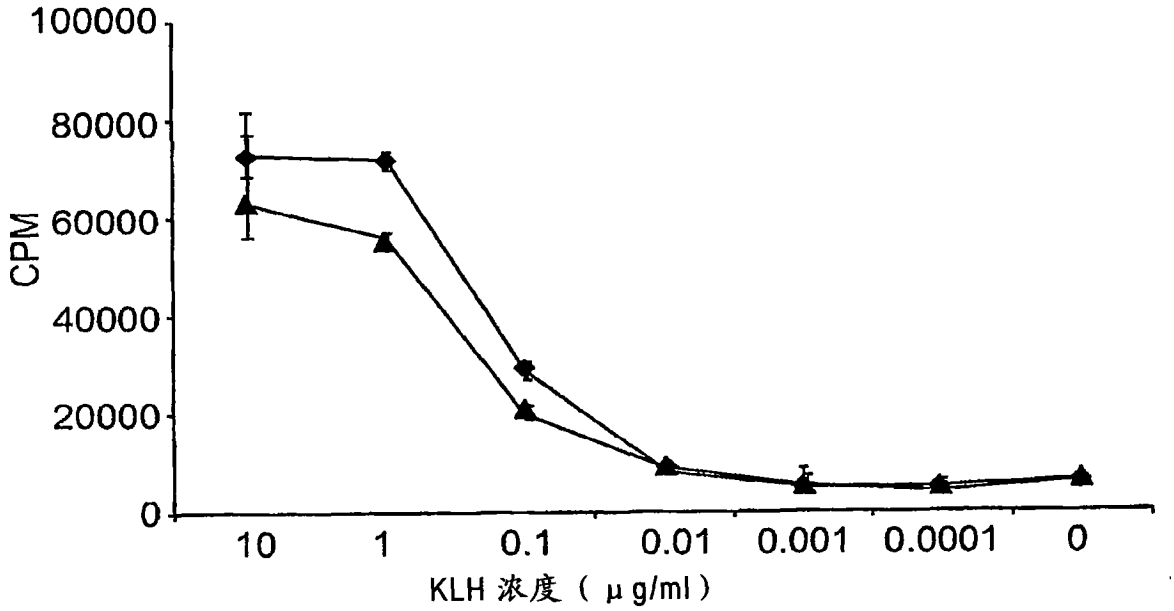

100000
80000
60000
40000
20000
0
CPM
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0
KLH 浓度（μg/ml）

图 3

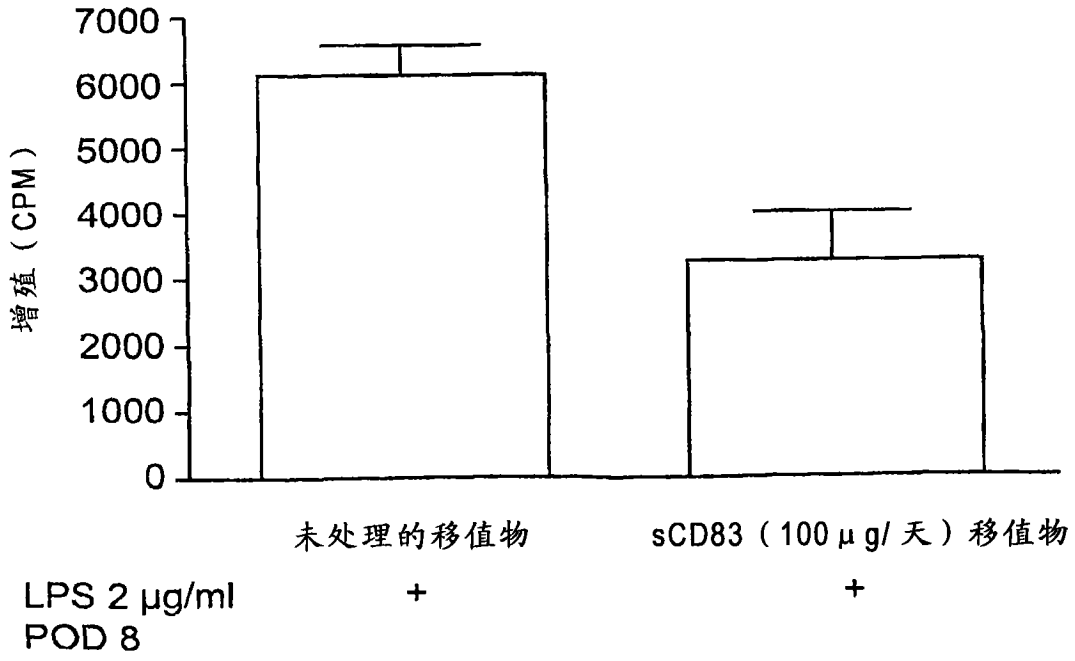

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
增殖（CPM）
未处理的移值物
sCD83（100μg/天）移值物
LPS 2 μg/ml
POD 8
+
+

图 4

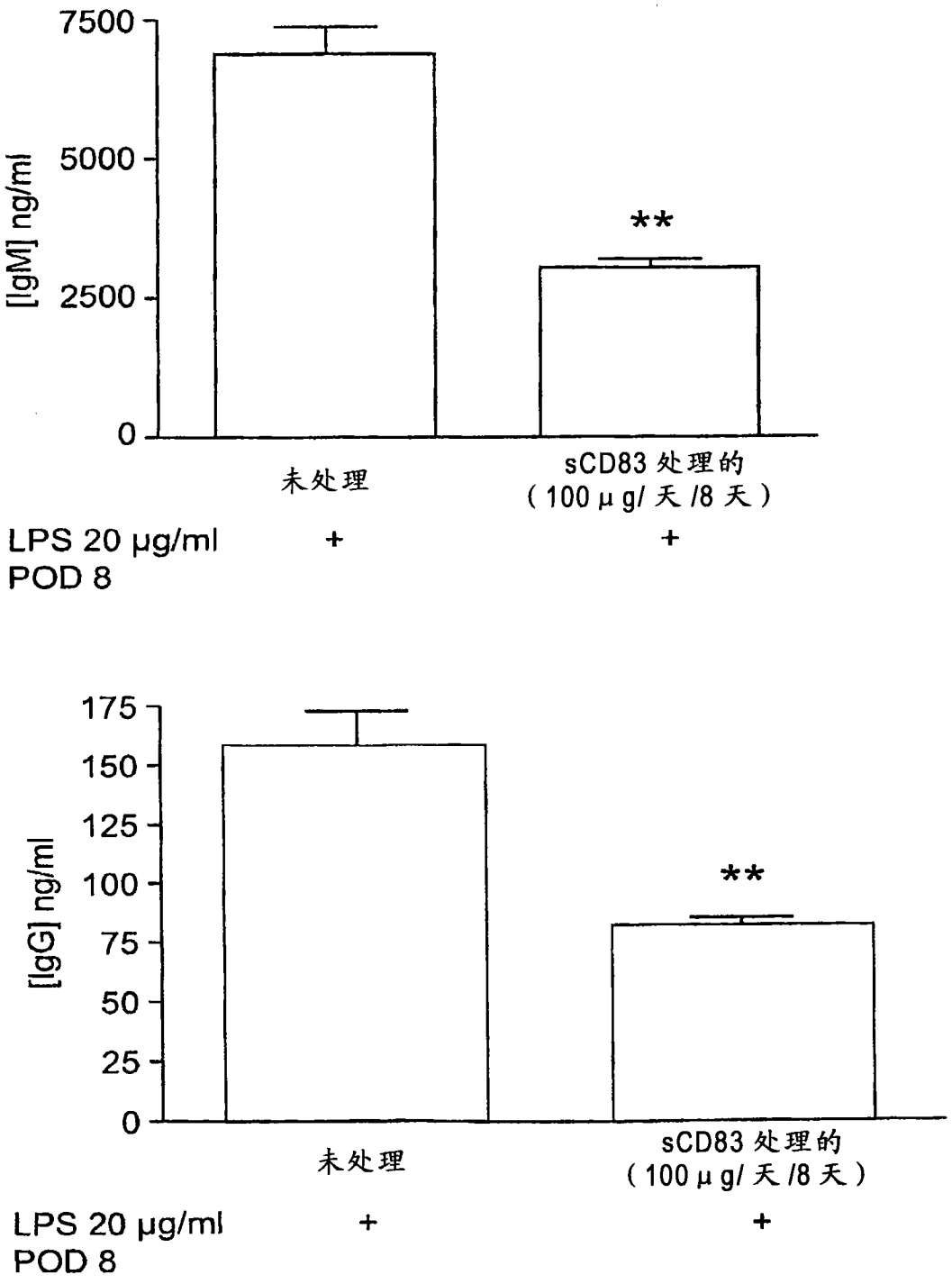

7500
5000
2500
0
[IgM] ng/ml
**
未处理
sCD83 处理的
（100 μ g/ 天 /8 天）
LPS 20 μg/ml + +
POD 8
175
150
125
100
75
50
25
0
[IgG] ng/ml
**
未处理
sCD83 处理的
（100 μ g/ 天 /8 天）
LPS 20 μg/ml + +
POD 8

图 5

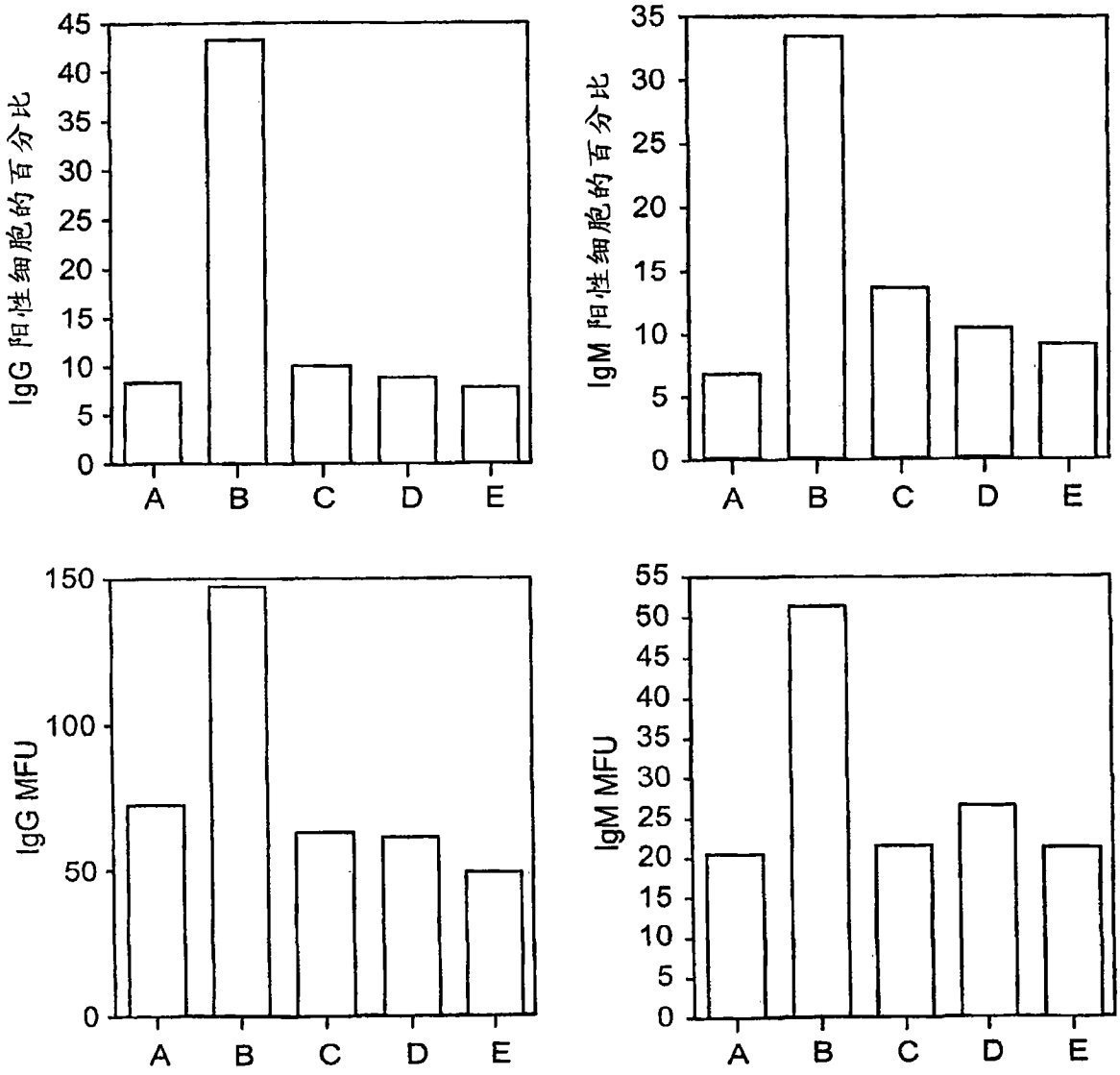


图 6

A :天然血清 B :未处理的血清 C :sCD83 处理的 (1638) D :sCD83 处理的 (1639) E :sCD83 处理的 (1640)

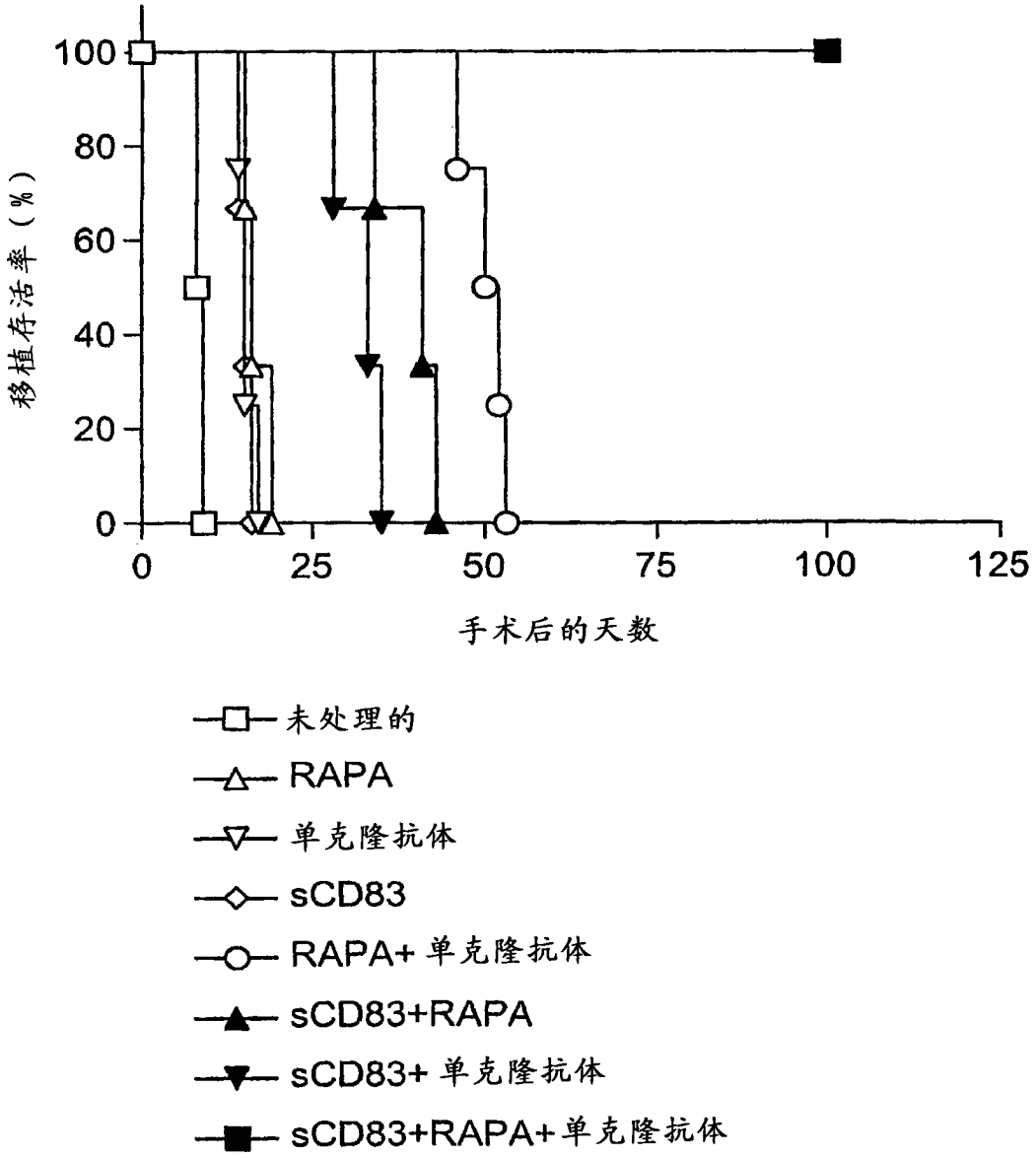

100
80
60
40
20
0
移植存活率（%）
0
25
50
75
100
125
手术后的天数
未处理的
RAPA
单克隆抗体
sCD83
RAPA+ 单克隆抗体
sCD83+RAPA
sCD83+ 单克隆抗体
sCD83+RAPA+单克隆抗体

图 7

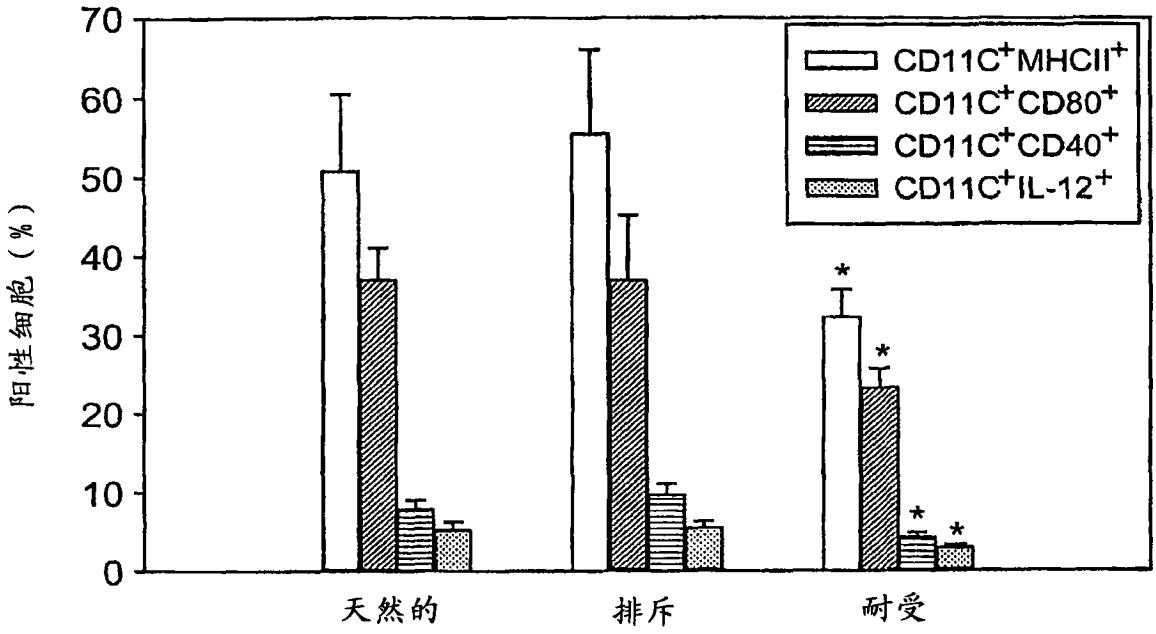

70
60
50
40
30
20
10
0
阳性细胞（%）
CD11C+MHCII+
CD11C+CD80+
CD11C+CD40+
CD11C+IL-12+
*
*
*
*
天然的
排斥
耐受

图 8

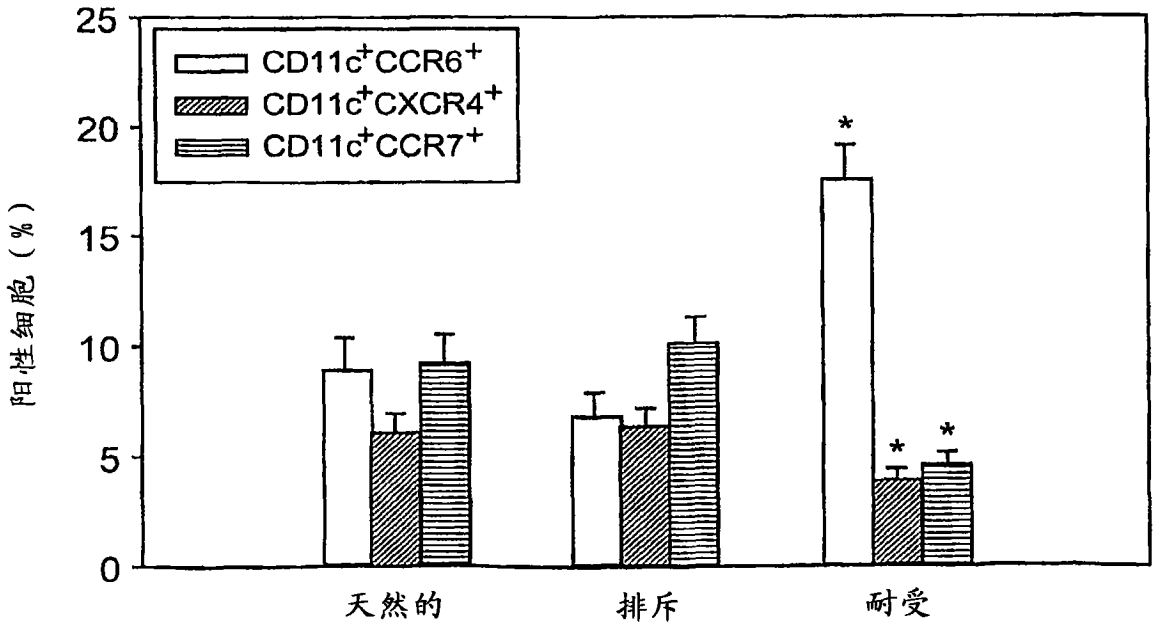

25
20
15
10
5
0
阳性细胞（%）
CD11c+CCR6+
CD11c+CXCR4+
CD11c+CCR7+
*
*
*
天然的
排斥
耐受

图 9

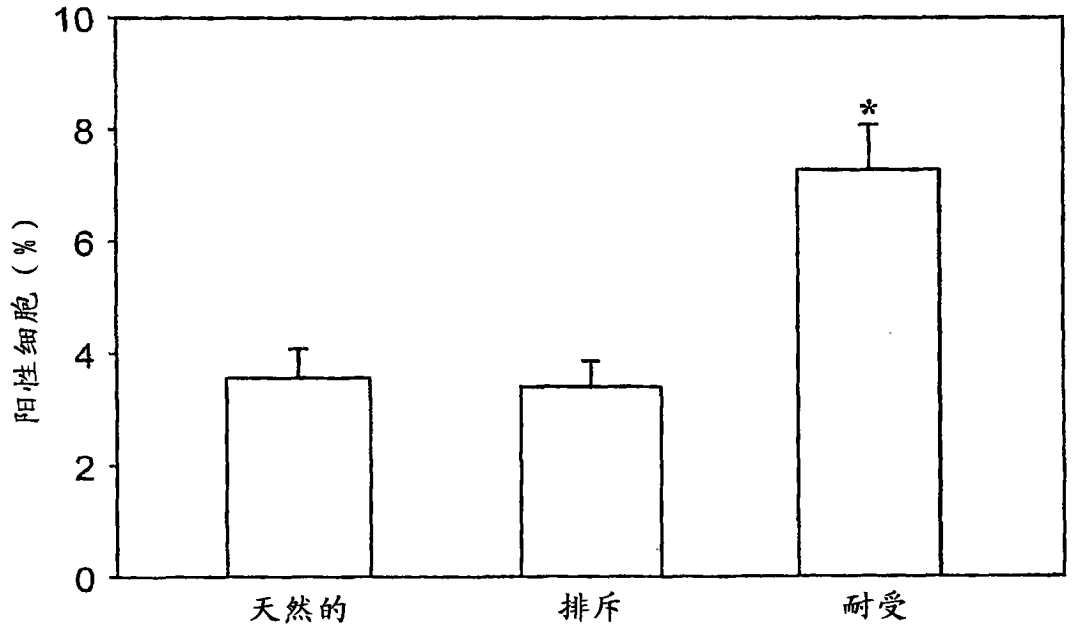
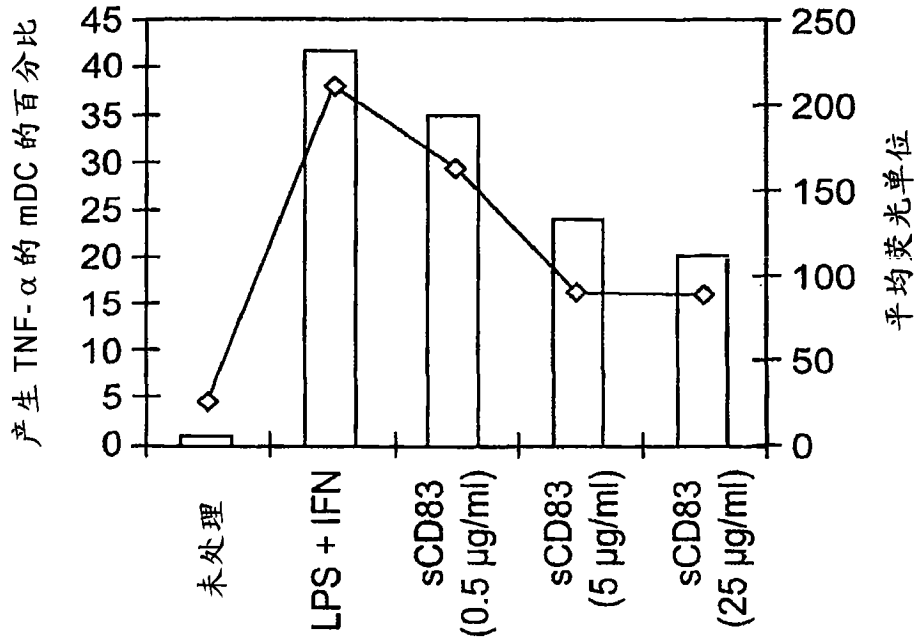


图 10


产生 TNF-α 的 mDC 的百分比
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
250
200
150
100
50
0
平均荧光单位
未处理
LPS + IFN
sCD83 (0.5 μg/ml)
sCD83 (5 μg/ml)
sCD83 (25 μg/ml)

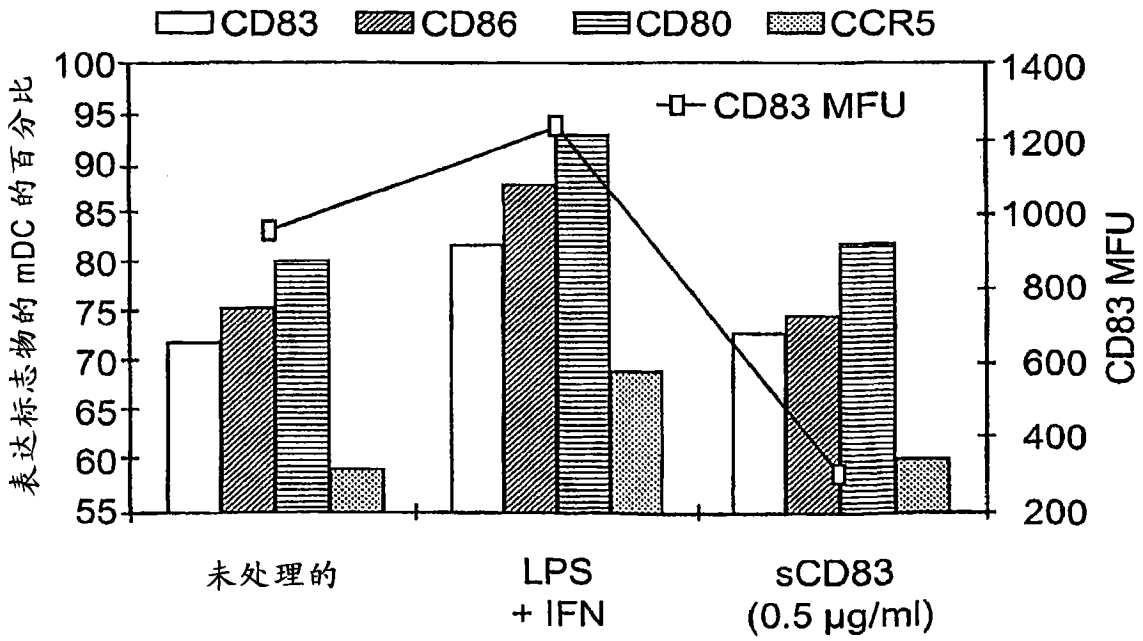

CD83
CD86
CD80
CCR5
CD83 MFU
表达标志物的 mDC 的百分比
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
1400
1200
1000
800
600
400
200
CD83 MFU
未处理的
LPS + IFN
sCD83 (0.5 μg/ml)

图 11

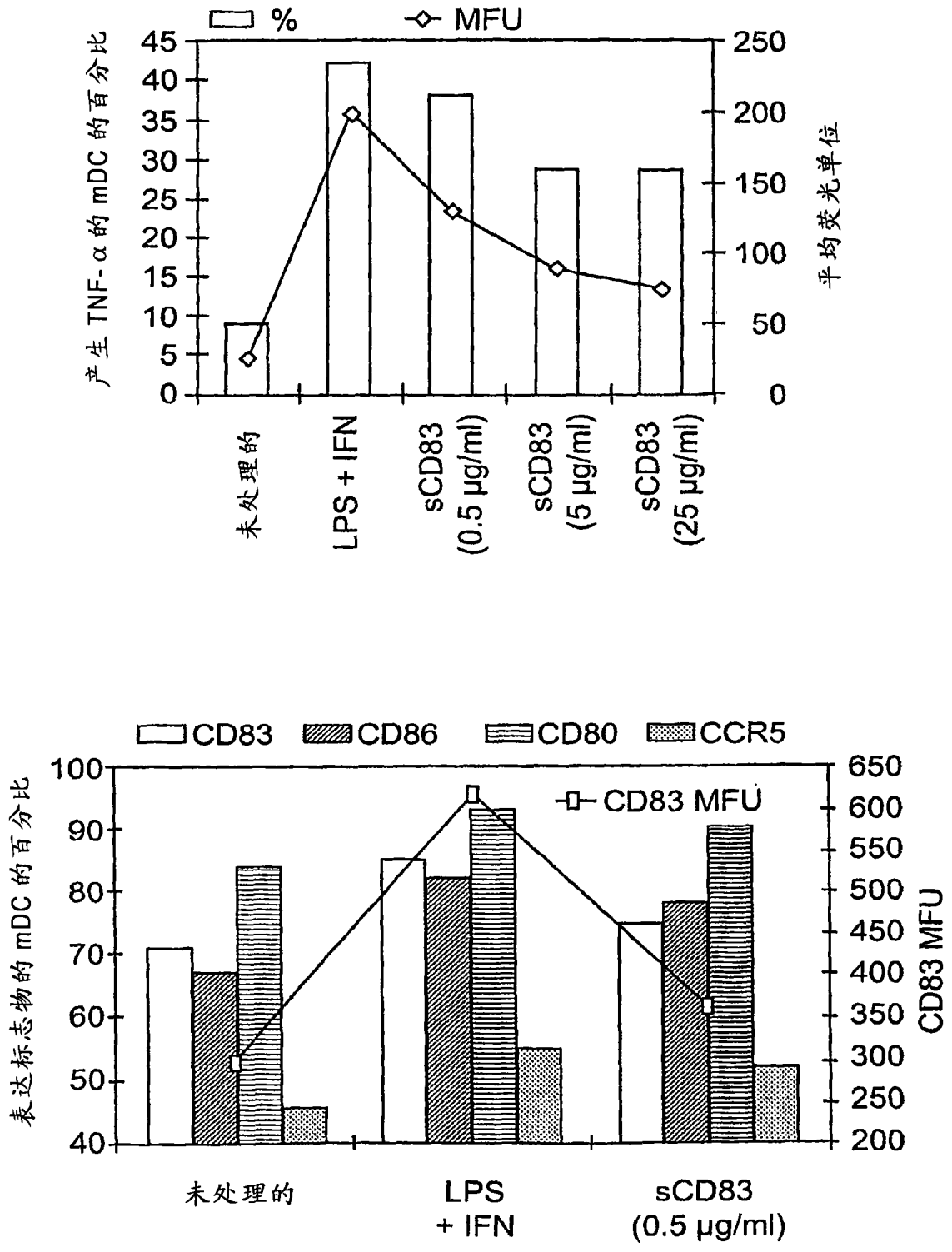

%
MFU
产生 TNF-α 的 mDC 的百分比
平均荧光单位
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
250
200
150
100
50
0
未处理的
LPS + IFN
sCD83 (0.5 μg/ml)
sCD83 (5 μg/ml)
sCD83 (25 μg/ml)
CD83
CD86
CD80
CCR5
CD83 MFU
表达标志物的 mDC 的百分比
CD83 MFU
100
90
80
70
60
50
40
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
未处理的
LPS + IFN
sCD83 (0.5 μg/ml)

图 12

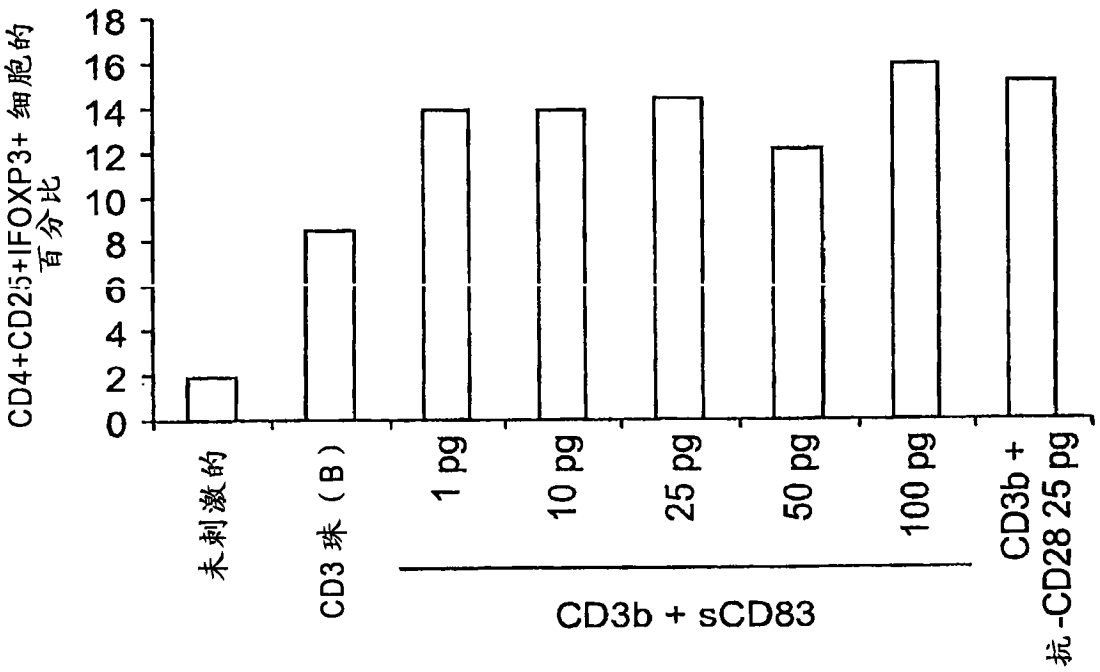

CD4+CD25+IFOXP3+ 细胞的百分比
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
未刺激的
CD3 珠（B）
1 pg
10 pg
25 pg
50 pg
100 pg
CD3b + 抗-CD28 25 pg
CD3b + sCD83

图 13

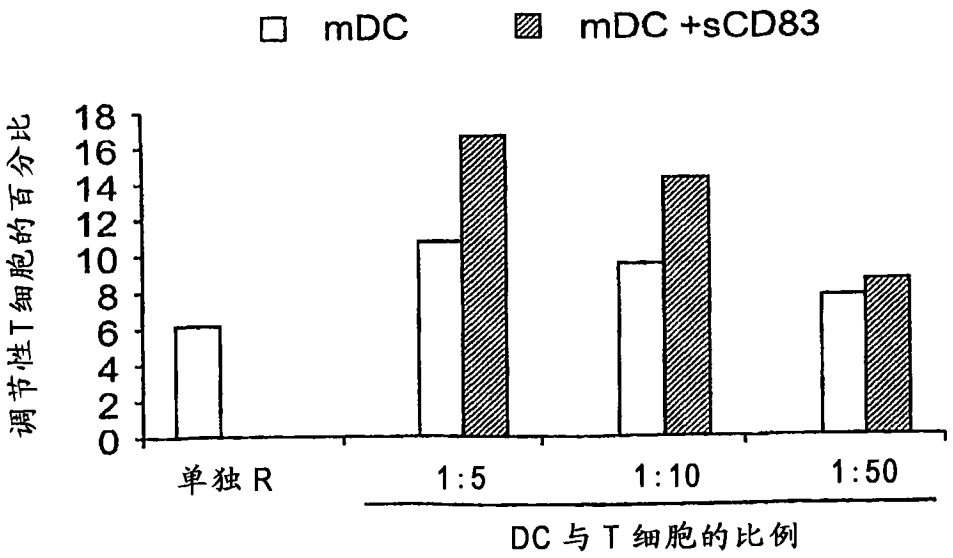

mDC
mDC +sCD83
调节性T细胞的百分比
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
单独 R
1:5
1:10
1:50
DC 与 T 细胞的比例

图 14