

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03821574.8

[51] Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100523176C

[22] 申请日 2003.7.11 [21] 申请号 03821574.8

[30] 优先权

[32] 2002.7.12 [33] DE [31] 10231655.4

[86] 国际申请 PCT/EP2003/007551 2003.7.11

[87] 国际公布 WO2004/007701 英 2004.1.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.11

[73] 专利权人 布拉斯蒂康生物科技有限责任公司
地址 德国凯尔

[72] 发明人 B·K·F·克雷默

F·费恩德里希 M·鲁恩克

[56] 参考文献

WO0240646A 2002.5.23

POSTGRAFTING ADMINISTRATION OF
.... WOLPI I ET AL. BLOOD. UNITED
STATES, Vol. 97 No. 8. 2001

审查员 丁慧萍

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 刘玥

权利要求书 2 页 说明书 39 页 附图 20 页

[54] 发明名称

单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞及其
制备和用途

[57] 摘要

本发明涉及单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞、其制备以及它们用于产生移植物接纳的用途。本发明也涉及单克隆抗体 GM-7, 其特异性识别本发明的人移植物接纳诱导性细胞。本发明还涉及抗体 GM-7 在检测和/或选择移植物接纳诱导性细胞中的用途。

1. 用于制备单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞的方法，特征在于

- a) 从血液中分离单核细胞;
- b) 在含 M-CSF 的合适培养基中扩增所述单核细胞;
- c) 与步骤 b) 同时或在其之后在含 γ -IFN 的培养基中培养所述单核细胞; 及
- d) 通过从培养基中分离细胞收获在步骤 c) 中形成的移植物接纳诱导性细胞。

2. 根据权利要求 1 的方法，特征在于以达到除了单核细胞之外，也存在参照于分离物中细胞总数至少 10% 量的淋巴细胞的方式从血液分离单核细胞。

3. 根据权利要求 1 的方法，特征在于步骤 c) 中形成的或步骤 d) 中获得的移植物接纳诱导性细胞是通过结合由杂交瘤细胞系 DSM ACC2542 产生的抗体选择的。

4. 根据权利要求 1 的方法，特征在于在权利要求 1 步骤 c) 中形成的或步骤 d) 中获得的或者根据权利要求 3 的选择步骤获得的移植物接纳诱导性细胞中，选择在其细胞表面共表达抗原 CD3 和 CD14 的细胞。

5. 根据权利要求 1 的方法，特征在于培养基中的 M-CSF 浓度为 1 到 20 $\mu\text{g/l}$ 。

6. 根据权利要求 1 的方法，特征在于继步骤 b) 之后在含 γ -IFN 的培养基中培养所述单核细胞 24 到 72 小时，所述 γ -IFN 存在之下的培养在培养步骤 b) 开始之后的 3 到 6 天开始。

7. 根据权利要求 6 的方法，特征在于培养基中的 γ -IFN 浓度为 0.1 到 20 ng/ml 。

8. 根据权利要求 1 的方法，特征在于步骤 b) 和 c) 中的总培养时期为 4 到 8 天。

9. 根据权利要求 1 的方法，特征在于继权利要求 1 的步骤 d) 之后，或者继根据权利要求 3 或 4 的选择步骤之后，将细胞悬浮于合适的细胞培养基中或者 PBS 或 NaCl 溶液中。

10. 根据权利要求 1 的方法，特征在于将细胞悬浮于冷冻培养基中，随后进行深冷冻。

11. 根据权利要求 10 的方法, 特征在于所述冷冻培养基包含胎牛血清和 DMSO, 或包含人 AB 血清和 DMSO。

12. 根据权利要求 1 的方法, 特征在于所述单核细胞是人源的。

13. 由 1 至 12 中任一方法获得的单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞, 特征在于在所述细胞在其表面共表达抗原 CD3 和 CD14。

14. 根据权利要求 13 的移植物接纳诱导性细胞, 特征在于它们是人源的。

15. 一种细胞制品, 其包含在合适的介质中的根据权利要求 13 或 14 的移植物接纳诱导性细胞。

16. 含有由权利要求 1-12 中任一项所述的方法获得的单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞的药物组合物, 特征在于所述单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞在其表面共表达抗原 CD3 和 CD14。

17. 含有根据权利要求 13 或 14 的移植物接纳诱导性细胞或根据权利要求 15 的细胞制品的药物组合物。

18. 根据权利要求 13 或 14 的移植物接纳诱导性细胞或根据权利要求 15 的细胞制品在制备用以抑制移植物排斥反应的药物组合物中的用途。

19. 根据权利要求 13 或 14 的移植物接纳诱导性细胞或根据权利要求 15 的细胞制品在体外生产和/或增殖调节性 T 淋巴细胞中的用途。

20. 根据权利要求 19 的用途, 其中调节性 T 淋巴细胞在其细胞表面共表达抗原 CD4 和 CD25。

21. 用于生产和/或增殖调节性 T 淋巴细胞的方法, 特征在于

a) 将根据权利要求 13 或 14 的移植物接纳诱导性细胞或根据权利要求 15 的细胞制品与 T-淋巴细胞制品共培养, 且

b) 任选地自培养基中收获所述调节性 T 淋巴细胞。

22. 根据权利要求 21 的方法, 特征在于所述调节性 T 淋巴细胞在其细胞表面共表达抗原 CD4 和 CD25。

23. 根据权利要求 21 或 22 的方法, 特征在于所述调节性 T 淋巴细胞通过 FACS 分选自培养基中获得。

单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞及其制备和用途

本发明涉及单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞和其制备,以及它们在用于产生移植物接纳中的用途。

优选地,本发明涉及来源于人类单核细胞的移植物接纳诱导性细胞(以下也称之为 TAIC)。

而且本发明也涉及单克隆抗体 GM-7,其特异性地识别来源于人的本发明的移植物接纳诱导性细胞。

另外,本发明涉及抗体 GM-7 在用于检测和/或选择移植物接纳诱导性细胞中的用途。

术语“移植”在免疫学领域用于细胞、组织或器官从一个机体到另一个机体的转移。移植的需求由于人们发现,众多疾病可通过将就某一方面而言为健康的个体(即供体)的健康器官、组织或细胞转移(移植)到患有相关疾病的个体(即受体或宿主)中得以治愈而产生的。

根据供体和受体之间的关系,可区分如下类别的移植物:

1. 自体移植物:这些是在一个或同一个体中从机体一个区域移植到另一区域的组织或细胞。

2. 同源移植物:这涉及遗传上相同个体之间的转移。这些移植的实例有大鼠或小鼠的近交品系。对人而言,可在遗传上相同的(单卵)孪生之间考虑同源(同系)移植。

3. 同种异体移植物:该术语是指相同物种但遗传上不同的成员之间的移植物,例如,举例来说,从一个人类个体移植到另一个体,对于实验动物的情况,从一个近交品系移植到另一个近交品系。

4. 异种移植物:这涉及不同物种之间的转移,例如,举例来说,将猴心脏转移到人中。

通常,就排斥反应而言,自体 and 同源移植物不引起免疫学问题。然而,对于同种异体和异种移植物并非如此。此类移植物被受体的免疫系统作为异物识别,并在相对短的时间后被排斥。在同种异体/异种排斥反应的情况下,T 淋巴细胞(下文称之为 T 细胞)起着重要作用。这些细胞通过它们的主要组织相容性复合体(MHC)来识

别外源细胞。所述外来 MHC-复合体致敏受体的抗原反应性 T 细胞，随后激活的 T 细胞分别导致供体细胞或供体组织的破坏。具有不同 MHC-复合体的细胞也被称之为“MHC-相异的”。

移植同种异体或异种细胞、组织或器官必然导致这样一种情况，即两个不同个体的细胞，即 MHC-相异细胞同时存在于受体的血液之中。这种现象被称之为“嵌合状态”。微嵌合状态和大嵌合状态被加以区别。微嵌合状态是指如在输血或骨髓输注之后或在移植富含淋巴细胞的器官如小肠或肝脏之后，来自供体的细胞依然保持在 MHC-相异宿主中，但仅在少数个案中可检测的状态。术语大嵌合状态用于受体中检测到多于 5% 的细胞来源于供体的情形，随着受体血液或器官中供体细胞的相应检测，对血液和器官嵌合状态两种情况下都需要加以区分。

嵌合状态能够在某种程度上导致相对于移植物的耐受。例如，在人因白血病或淋巴瘤疾病而不得不进行供体和受体间很大程度上相符 MHC 类型的同种异体骨髓移植的情况下，在相应的骨髓剥离（myelo-ablative）调节（个体自身骨髓和来源于其中的血细胞的破坏）和随后的干细胞移植之后得以观察到“供体嵌合状态”。在这些患者中，多于 99% 的在血液中可检测到的细胞来源于供体干细胞，并且这种嵌合状态形成了相对于由该供体移植的所有器官的耐受基础。这种观察现象在随后肾、肝和肺部分供体作用的系列临床实例中得到了证实[Dey B., 等, “Outcomes of Recipients of both bone marrow and solid organ transplants: A review.” *Medicine (Baltimore)* 77, 355-369(1989)]。为产生耐受诱导，就此而论存在完全的供体嵌合状态（如同种异体受体外周血中存在多于 90% 的供体细胞所定义的）不是决定性的；相反，已发现存在一部分 5% 的供体细胞-称之为“混合”嵌合状态-足以诱导耐受[Acholonu I. N.和 Ildstad S. T.的比较研究, “The role of bone marrow transplantation and tolerance: Organ-specific and cellular grafts”, *Curr. Opin. Organ. Transplant* 4,189-196 (1999)]。

虽说这样基本上已提供了伴随骨髓移植（BMTx）的供体嵌合状态诱导耐受的证据，但迄今为止在完全 MHC-相异供体和受体群的情况下，尚无成功实施的同种异体 BMTx 的可能。这是归因于其所必

需的预调节，即受体的调节（见上文）存在三种针对受体的实质风险类型。首先是，其伴随或不伴随附加放射治疗施用的化疗剂的骨髓毒性，导致显著的发病率；其次是，尽管有在先的调节，仍存在着移植的骨髓被排斥的风险；而最后，在与移植物一起转移到宿主中的 T 细胞对宿主机体不利的情况下，存在移植物抗宿主疾病（GvHD）的风险[参见 Wolff S. N., “Hematopoietic cell transplant from volunteer unrelated or partially matched related donors: Recent developments.” *Curr. Opin. Organ. Transplant* 5,372-381 (2000)]。只要受体的免疫系统被在先调节削弱到同骨髓一起转移的 T 细胞能够在受体中引起致命排斥的程度，就发生这种疾病。

为避免上文所概括的问题，目前正致力于将受体的调节设计得尽可能微弱。然而，供体和受体间的 MHC 差异越大，就必须选择越强的调节治疗，以防止移植骨髓的排斥；这再次使移植物抗宿主疾病（GvHD）风险的增大。

迄今为止，有关为了保证供体器官的稳定耐受情形，诱导的嵌合状态必须可检测地保留在受体血液中的时间，尚未进行过详尽的研究。不过，来自小鼠模型的可信数据表明为期两周可检测的大嵌合状态已足够产生耐受[Weckerle, T.等 “Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment.” *Nat. Med.* 6,464-469 (2000)]。

开发现有免疫抑制剂的替代物以产生耐受的需求源于下述两种主要观点。一方面，迄今为止，临床上可用的免疫抑制剂尚不能防止慢性移植物排斥，而另一方面，持久服用免疫抑制剂伴有相当大的副作用，这使得患者易患病毒、细菌和真菌感染，并通过形成恶性肿瘤和心血管系统疾病尤其是心肌梗死和心机能不全，造成实质性风险[见 Wheeler, D. C.和 Steiger, J. “Evolution and Etiology of Cardiovascular Diseases in Renal Transplant Recipients ” *Transplantation* 70,41-45 (2000)]。

Munn 等已描述了巨噬细胞诱导的 T 细胞抑制，这是建立在色氨酸的选择性消除和/或细胞周围环境中一种或多种色氨酸代谢物的增加的基础上的[见 Munn 等 “Inhibition of T Cell Proliferation by

Macrophage Tryptophan Catabolism” J. Exp. Med. 189,1363-1372 (1999)]。由这种观察出发，作者提示通过改变局部细胞外色氨酸浓度，尤其是通过抑制或增强 IDO-介导的色氨酸代谢可改变 T 细胞介导的免疫反应，例如参见美国专利 6,482,416 和 6,451,840。由此，该方法仅仅是提供了另一种抗原依赖性和非特异性的针对 T 细胞的免疫抑制。

然而迫切需要的是临床上可应用的诱导供体特异性耐受的方案，即根据这种方案，宿主针对由供体转移的器官之上存在的组织抗原的免疫应答被特异性地抑制，但在这种情况下，宿主的免疫活性却得以完全保留。

通过此种方案，在中等长度期间器官需求和器官供应之间的差异将基本缩小，因为通过这种方式，很少的器官会由于急性和慢性排斥进程而损失掉。合适器官的匮乏可通过来自美国的始于 2001 年 2 月的统计表加以说明：

移植物类型	候诊名单中的患者数目
肾脏	47,996
肝脏	17,151
胰脏	1,060
胰岛细胞	185
肾-胰	2,442
肠	151
心脏	4,222
心-肺	210
肺脏	3,721
患者总数	74,800

表 1：来自“UNOS（联合国器官共享注册）全国器官移植患者候诊名单（2001 年 2 月）”的最新数据

这解释了国家及国际为建立诱导供体特异性耐受概念的极大努力。

因此本发明所基于的问题就是提供用于以下述方式影响受体生

物 T 细胞的手段，从而使它们长期耐受和/或接受有关外来细胞、组织或器官而无排斥。这些手段的组成及其制备或用途不应当造成任何伦理和/或法律问题，并且必须有可能迅速制备它们，以治疗目的所需的量且以可接受的生产成本用于预定治疗用途。

为解决这个问题，本发明提供了来自脊椎动物、尤其是来自哺乳动物、并且更优选来自人类的单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞 (TAIC)。已令人惊讶地发现，根据本发明修饰的、来自供体 (器官供体) 血液的单核细胞在术前和/或术后施用的情况下，能够保护受体生物防止其自身 T 细胞被外来 MHC-复合体激活，从而防止移植物的排斥。当作为“细胞治疗剂”用于诱导移植物耐受时，所述修饰细胞就细胞排斥、在有关患者中诱导肿瘤、特别是恶性肿瘤和移植物抗宿主疾病而言不产生或没有显著的副作用。

已令人惊讶地发现本发明的方法导致单核细胞以此种方式进行体外修饰，从而获得的细胞在注射到未进行免疫抑制的同种异体受体中后，能够防止天然存在的针对供体细胞或组织的免疫应答，并且其能够在外周血中循环至少 3 周。在施用大约 10^5 细胞/kg 体重 (BW) 之后，所得的 GM-7 阳性细胞嵌合状态 (见下文) 处于 5-20% 的范围中。这种瞬间嵌合状态诱导

a) 随后来自同一供体的器官移植的长期接纳，优选在静脉内施用所述细胞之后的 10 天之内，和

b) 在器官移植之后使用所述细胞时，与短期免疫抑制治疗联合的长期接纳。

如实施例 10 中所示，本发明细胞的免疫抑制效果与如 Munn 等 (见上文) 所观察到的通过表达色氨酸降解酶吲哚胺-2,3-双加氧酶 (diogenase) (IDO) 的巨噬细胞诱导的 T 细胞抑制无关。相反，本发明的 TAIC 一方面通过灭活同种异体反应性 T 细胞，另一方面通过在受体中诱导形成调节性 T 细胞，在受体中诱导对供体的特异性耐受，见实施例 12 和 13。

来源于单核细胞的巨噬细胞，其通过 IDO-介导的细胞周围环境中色氨酸的消除抑制 T 细胞的增殖，因此不包括在本发明之中。

附图说明

图 1: 在本发明的细胞修饰之前 (左手边图表) 及之后 (右手边图表), GM-7 对原始单核细胞的结合能力的流式细胞仪测定。x 轴表示结合细胞的数目。

图 2A: 大鼠模型中在有和无术前施用供体来源的 TAIC 的情况下进行异位心脏移植后, 心脏移植物的 Kaplan-Meier 存活曲线 (n=每组 10 只动物)。

图 2B: LEW 同种异体移植在异位移植到已在第 7 天由 10^6 LEW 衍生的 TAIC 预处理过的 DA 受体大鼠腹部后, POD (术后天数) 150 天的组织学制备物。放大倍数: 40。

图 2C: 在制备物用 I 型 LEW-MHC 特异性的单克隆抗体 I 1.69 标记之后, 来自用 10^6 LEW 衍生的 TAIC 预处理过的 DA 大鼠胸腺的组织学制备物。放大倍数: 40。

图 2D: 在注射 LEW 来源的 TAIC 之后未经免疫抑制的 4 只 DA 受体大鼠中供体来源细胞的流式细胞仪检测 (大鼠 1-3: 10^6 细胞/kg×BW; 大鼠 4: 10^4 细胞/kg×BW)。

图 3: 大鼠模型中在有和没有与开始施用 4 个周期的环孢菌素 A (CSA; 5 mg/kg×BW) 联合的供体来源的 TAIC 术后施用的异位心脏移植后, 心脏移植物的 Kaplan-Meier 存活曲线 (n=每组 6-10 只动物)。

图 4A-C: 分别在有和无供体来源的 TAIC 术前施用的异位 (A 和 C) 或原位 (B) 移植后, 心脏 (A)、肝脏 (B) 和肾脏 (C) 移植物的 Kaplan-Meier 存活曲线 (n=每组 6 只动物)。

图 4D-F: 肾脏 (D)、肝脏 (E) 和皮肤 (F) DA 移植物在异位移植到 LEW 受体大鼠中后的组织学制备物。

图 5A: 大鼠模型中在有和没有与初始施用 4 个周期的 CSA (5 mg/kg×BW) 联合的供体来源的 TAIC 术后施用的不同组合的近交品系异位心脏移植后, 心脏移植物的 Kaplan-Meier 存活曲线 (n=每组 6 只动物)。

图 5B: 在施用了不同处理的来自 LEW 供体动物的血液单核细胞 7 天后, 异位心脏移植后心脏移植物的 Kaplan-Meier 存活曲线 (n=每组 6 只动物)。

图 6A: 使用 CSA、咪唑硫嘌呤 (AZA) 和类固醇 (STE) 三重

免疫抑制在猪（“远交小种猪”）中进行原位左侧肺脏移植后，肺移植物的 Kaplan-Meier 存活曲线（ n =每组 4 只动物）。

图 6B：两只单侧左肺移植的猪（“远交小种猪”）在 POD（术后天数）41 和 55 天的胸部 X-射线图（后前方向的技术）。CSA、AZA 和类固醇的三重免疫抑制在移植后第 28 天停止。

图 7：来自个体 B（GM-7⁻：灰色柱；GM-7⁺：黑色柱）的 CD14⁺单核细胞、来自 MHC-不一致供体 A 的效应细胞以及来自供体 B 的辐照后细胞的混合淋巴细胞培养，以比较 CD14⁺/GM-7⁺和 CD14⁺/GM-7⁻细胞的抑制活性。

图 8：在两个实验中与吲哚胺-2,3-双加氧酶（IDO）抑制剂（1-MT）预温育的 PHA 刺激的淋巴细胞（PhaLy）和 TAIC（“Mo+Ly”或“Mo”）的混合淋巴细胞培养，以测定 1-MT 对 TAIC 抑制活性的影响。

图 9：单核细胞组分中 CD14⁺单核细胞和 CD2⁺淋巴细胞的量以及 TAIC 效果相同的 CD-14⁺/CD3⁺细胞的量的流式细胞仪测定，以测定在培养开始之时纯化细胞以富集单核细胞对免疫抑制性 CD-14⁺/CD3⁺细胞形成的影响。

图 10：在术后注射 TAIC 之前（左图）和之后（右图），患者血液中 GM-7 表达的流式细胞仪测定，以测定 TAIC 对体内血细胞中 GM-7 表达的影响。

发明概述

根据本发明用以制备单核细胞起源的 TAIC 的方法的主要步骤包括：

- (a) 从血液，优选从人血中分离单核细胞；
- (b) 在含巨噬细胞集落刺激因子（下文称之为 M-CSF）作为生长促进剂的合适培养基中增殖所述单核细胞；
- (c) 用 γ -干扰素（下文称之为 γ -IFN）刺激所述单核细胞；及
- (d) 从培养基中分离细胞在阶段（c）中形成的移植物接纳诱导性细胞。

根据本发明，已证明用 γ -IFN 刺激的步骤构成了 TAIC 制备中的决定性步骤（见实施例 7）。

就本发明而言，术语“TAIC”（单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞）是指由上述方法步骤（d）中获得的细胞群。该细胞群除了包含来自单核细胞的本发明有效的细胞之外，也包括淋巴细胞，见实施例 11，以及任选地来源于棕黄层的另外的细胞，比如粒细胞。TAIC 群内来源于单核细胞的细胞量参照于细胞总数优选为 50 到 90%，更优选 60 到 70%。

就本发明而言，术语“细胞总数”是指所考虑细胞群中存活细胞的量。该量可通过“锥虫蓝染料排除技术”确定，因为该染料允许通过光学手段从非存活细胞中辨别存活细胞。

本发明的 TAIC 通常可以以每千克体重 10^4 - 10^6 细胞的数量使用，优选每千克体重 10^5 细胞，以诱导移植物接纳。TAIC 施用可重复实施，在巨大 MHC 差异的情况下，优选以大约 10 天的间隔施用 3 次，其中细胞施用可在移植之前或之后进行（见下文）。此目的所必需的细胞总数可在采血后 6 到 8 天之内提供。

在动物试验和培养物中都已证明，本发明的细胞（TAIC）就恶性肿瘤形成而言是没有风险的；鉴于本发明的细胞所来源的原始单核细胞的性质，这是在任何其它方法中都不曾会预料到的结果。

如下文所阐释的那样，更多具有最优化的本发明的功效的细胞亚群可从存在于 TAIC 之中的来源于单核细胞的细胞组分中分离。

在体外培养并用 γ -IFN 刺激原始细胞（单核细胞）之后，TAIC 形成，其包含与单克隆抗体 GM-7 结合的细胞亚群，见实施例 9，所述抗体由杂交瘤细胞系 DSM ACC2542 表达。单克隆抗体 GM-7 为免疫球蛋白同型 IgG₂ 抗体，其轻链表现为 κ -同型。该抗体特有的性质在于其结合通过本发明的培养条件修饰的单核细胞的高能力，因为原始单核细胞不被其识别，也就是说，并不发生该抗体与原始细胞的结合（见实施例 9）。另外，由 20 个志愿者证明了 GM-7 不与外周血中的人类细胞结合，见图 10。

抗体通过使用本领域熟练技术人员公知的方法用来源于人类单核细胞的 TAIC 免疫小鼠制备（Davis, W. C. “Methods in Molecular Biology: Monoclonal Antibody Protocols”, New York: Humana Press Inc. Totowa, 1995）。然后通过产生该抗体的 B 细胞和来自小鼠的骨髓瘤细胞的融合制备杂交瘤细胞系。用于制备此类细胞系的方法

是现有技术中已知的 (Davis, W. C. "Methods in Molecular Biology: Monoclonal Antibody Protocols", New York: Humana Press Inc. Totowa, 1995; Kohler, G., Milstein, C. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity", Nature 256, 495-497 (1975))。产生抗体 GM-7 的杂交瘤细胞系根据布达佩斯条约的规定以编号 DSM ACC2542 保藏于 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH, Braunschweig, 德国)。保藏日 2002 年 5 月 13 日。

图 1 显示了在本发明的体外修饰之后, 通过流式细胞仪测定的 GM-7 对单核细胞的结合能力。可以看出直接由棕黄层获得的 CD14 阳性单核细胞不与抗体 GM-7 结合 (云状阴影的灰色与无阴影的抗体对照一致)。相反, 在 M-CSF 存在下培养并用 γ -IFN 刺激后, 部分单核细胞表达可被单克隆抗体 GM-7 识别的抗原。单克隆抗体 GM-7 特征被描述为同型 κ -IgG_{2a}。从而本发明的方法导致修饰的单核细胞细胞膜上抗原表达的表型模式改变 (图 1)。

单克隆抗体 GM-7 特异性地与诱导最有效的移植物接纳的细胞群结合, 即在由本发明的方法制备的那些细胞中 (见图 9)。

因此, 本发明优选的实施方案涉及能够与抗体 GM-7 结合的此类 TAIC。这些细胞随后被命名为 TAIC_{GM7}。

本发明的抗体 GM-7 因而代表了格外有效且易于操作的, 用于选择和纯化诱导移植物接纳的细胞 (TAIC) 的制剂。通过所述抗体可以利用本发明产生同源且高度有效的 TAIC 群。

根据本发明优选的实施方案, 在上文所述本发明方法的步骤 c) 中形成的、表达与抗体 GM-7 结合的抗原的移植物接纳诱导性细胞可在步骤 c) 之后直接从培养基中选择, 或者它们可根据上文提及的本发明方法的步骤 d), 通过与由杂交瘤细胞系 DSM ACC2542 产生的抗体 GM-7 结合, 在从培养基中分离细胞之后获得的细胞群中选择。

为选择本发明的 TAIC, 在允许抗体与样品中存在的移植物接纳诱导性细胞结合的条件下, 使抗体与样品接触。随后从样品中分离由所述结合反应得到的反应复合体。为了这个目的, 可在与样品接触前将抗体固定在载体材料上; 例如, 可将其结合到适用于层析目

的的基质或所谓的“磁珠”上。该操作允许从大体积样品中选择和浓缩移植物接纳诱导性细胞。

为获得移植物接纳诱导性细胞，在从样品中分离反应复合体之后，将抗体和移植物接纳诱导性细胞之间的键分离。这可通过现有技术中已知的方法实现，例如通过竞争性置换或通过用盐溶液洗涤。例如相应的方法由 Utz U.等描述(“Analysis of the T-cell Receptor repertoire of human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) Tax-specific CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes from patients with HTLV-1 associated disease: Evidence for the oligoclonal expansion” J. of Virology 1996 年 2 月, 843-851)。

而且，可利用单克隆抗体 GM-7 在患者血液和/或组织样品中体外定性和定量检测本发明的单核细胞起源的移植物接纳诱导性细胞。例如，该患者可以是待移植或已移植器官的受体。样品中指示移植物接纳诱导性细胞存在及（适用的话）数量的反应复合体的形成可通过公知的方法检测。

为检测反应复合体，例如，在本案中有可能直接用例如共价结合到抗体上的可检测分子（“标记”）与抗体 GM-7 偶联。合适的可检测分子在分子诊断学领域有大量描述，并且其中包括荧光染料如异硫氰酸荧光素或四甲基罗丹明-5-异硫氰酸盐、发光染料、放射性标记的分子和酶如过氧化物酶（参见 Lottspeich, F., Zorbas, H. “Bioanalytik”, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 1998）。

抗体的检测依赖于选择用以标记前者的分子而进行。就本发明而言，抗体 GM-7 偶联有荧光分子异硫氰酸荧光素（FITC），从而抗体的检测可通过流式细胞仪和/或荧光显微镜检实施。用 FITC 标记抗体的方法是现有技术中在本领域从业的熟练技术人员公知的。

或者，也可在两步操作中使用第二抗体检测反应复合体。在这方面，可用另一标记抗体检测反应复合体中的未标记抗体 GM-7（参见 Lottspeich, F., Zorbas, H. “Bioanalytik”, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 1998）。与直接检测本发明的抗体的结合相比，这种两步检测法要灵敏得多，因为有多个标记的第二抗体均能够与一个 GM-7 抗体结合（信号放大）。

可以利用抗体 GM-7, 例如以“监控”的形式检测由 TAIC 治疗的患者外周血中的 TAIC, 在此期间以特定的时间间隔测定外周血中的细胞数目。根据本发明, 已发现在动物试验中移植物受体外周血中由供体单核细胞制备的 TAIC 的存在与移植器官的耐受有关。从而该发现可使临床医师放弃或减小任选地逐步施用的免疫抑制剂的剂量。以前, 还不可能从临床观点提供有关患者的免疫系统是否在移植后给定的时间点表现出耐受的准确证据。

对本领域熟练技术人员显而易见的是, 有可能从同为非人脊椎动物的单核细胞, 尤其是从根据本发明修饰的灵长类动物和猪单核细胞中制备针对 TAIC 的单克隆抗体。在这方面, 相应宿主动物的免疫以及相应杂交瘤细胞系的产生如上文所述, 用于人源 TAIC 的那样实施。来自其它物种的有效 TAIC 群的产生为异种移植医学领域提供了重要的贡献。

本发明尤为优选的实施方案涉及本发明的 TAIC 亚群, 它们在其细胞表面共表达抗原 CD3 和 CD14。这些细胞随后被表述为 TAIC_{CD3+/CD14+}。此类细胞迄今未曾在现有技术中报道。单核细胞以及来源于单核细胞的已知细胞的确携带表面标志 CD14, 可是, 它们并不同时额外携带表面标志 CD3。

共表达表面抗原 CD3 和 CD14 的 TAIC 可直接从上文所述本发明方法的步骤 c) 中形成的移植物接纳诱导性细胞中选择, 也可根据上文提及的本发明方法的步骤 d) 从培养基中分离细胞之后所得的细胞群中选择, 或者备选地, 它们也可从 TAIC_{GM7} 群中选择。

另外, 根据本发明已证明 TAIC_{CD3+/CD14+} 强表达基因 Foxp3、CTLA4 和整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ (见实施例 12)。相反, 原始单核细胞不表达或者仅少量表达这些基因。因此 Foxp3、CTLA4 和整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ 基因表达的上调是 TAIC_{CD3+/CD14+} 细胞的特性。

正如实施例 12 中所讨论的那样, 以前仅对调节性 T 淋巴细胞描述过 Foxp3、CTLA4 和整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ 标志的表达。共表达表面抗原 CD4 和 CD25 的 T 淋巴细胞为调节性 T 淋巴细胞亚群, 其也被表述为“抑制细胞”。它们的功能是抑制机体的免疫应答。特别是, Foxp3 被视为特异性转录因子, 其作为调节性 T 细胞发育的控制基因起作用, 并且其被这些细胞特异性地表达。根据本发明, 优选 TAIC_{CD3+/CD14+}

细胞表达至少 1×10^{-9} 、更优选至少 5×10^{-9} 、并且在特别优选的方式中表达至少 1×10^{-8} μg Foxp3-RNA 每 μg 总 RNA。

CTLA4 同样地被视为用于检测 T 淋巴细胞，特别是 CD4/CD25 阳性 T 淋巴细胞调节功能的标志（见实施例 12 中引述的文献）。根据本发明，TAIC_{CD3+/CD14+} 细胞应当优选表达至少 5×10^{-7} 、更优选至少 3×10^{-6} 、并且在特别优选的方式中表达至少 5×10^{-6} μg CTLA4-RNA 每 μg 总 RNA。

识别上皮钙粘着蛋白的整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ 最近由 Lehmann 等在 PNAS 99, 13031-13036 页 (2002) 中描述为高度有效的调节性 T 淋巴细胞亚群的新标志，其与上皮环境相互作用。整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ -RNA 的表达根据本发明应当在 TAIC_{CD3+/CD14+} 细胞中优选至少 1×10^{-12} 、更优选至少 1×10^{-11} 、并且在特别优选的方式中至少 1×10^{-10} ，最优选至少 1×10^{-9} μg 每 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA。

如实施例 12 的表中所示，与淋巴细胞直接共培养本发明的 TAIC 导致调节性 T 淋巴细胞数目的显著升高，特别是淋巴细胞群中 CD4/CD25 双阳性细胞的数目，伴有 Foxp3、CTLA4 和整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ 强烈上调的基因表达。该实施例进一步证明如果 TAIC 与淋巴细胞间接共培养，则观察不到这种效应。

这些结果表明 TAIC 对调节性 T 淋巴细胞形成和/或增殖的刺激参与了本发明 TAIC 对移植物接纳的诱导。

实施例 13 证实了这种假设。在该实施例中，将来自实施例 3、4、5、6 和 7 的受体动物的淋巴细胞与来自各自供体动物的 TAIC 在体外温育。为诱导耐受，向动物注射与来自受体的淋巴细胞预温育的 TAIC 而不是 TAIC。以这种方式也能够诱导供体特异性耐受，然而向动物施用未与供体来源的 TAIC 共培养的受体淋巴细胞的不形成耐受。

本发明的 TAIC 可用作诸如药物制剂。由如上文所述本发明方法的步骤 d) 中获得的细胞可以直接使用。如此获得的总细胞群中约 10-50% 由淋巴细胞和粒细胞构成，它们源自于初始的单核细胞分离物（棕黄层）。在培养步骤中这些细胞支持来源于单核细胞的本发明 TAIC 的形成（见实施例 11）；如果本发明的 TAIC 用作药物制剂的话，它们不干扰耐受诱导。

不过,根据本发明另一优选的实施方案,可从由本发明方法(见上文)获得的全体 TAIC 群中分离 TAIC_{GM7} 和/或 TAIC_{CD3+/CD14+} 亚群,并可将其用于耐受诱导。

在培养基(见实施例 2)中,所述 TAIC 或者 TAIC_{GM7} 和/或 TAIC_{CD3+/CD14+} 可保存至少 48 小时而不丧失其耐受诱导性效果。

为用作药物制剂,悬浮于例如人 AB 血清(普遍适用)中的 TAIC 或者 TAIC_{GM7} 和/或 TAIC_{CD3+/CD14+} 亚群可静脉内施用作为短期运输。为在同种异体移植的情况下诱导移植接纳,可将由供体单核细胞产生的 TAIC 或者 TAIC_{GM7} 和/或 TAIC_{CD3+/CD14+} 亚群在术前或者术后注射到 MHC-相异受体中。在术前施用的情况下,TAIC 应当在手术前大约 1 周注射一到三次。在术后施用的情况下,手术和细胞单次施用之间的时期不应当长于 7 天。则本发明的 TAIC 或者 TAIC_{GM7} 和/或 TAIC_{CD3+/CD14+} 亚群能够抵制受体免疫系统针对移植物的 T 细胞应答,并在受体血液中足够长的时间段内保证长期的移植物接纳。

就来自存活个体的供体作用而言,可考虑术前静脉内注射;然而,如果所针对的是尸体供体作用(来自死尸的血液和器官),则优选术后施用本发明的 TAIC 或者 TAIC_{GM7} 和/或 TAIC_{CD3+/CD14+} 亚群。在尸体供体作用的情况下,为了器官保藏的目的,通过主动脉造管术由灌流介质冲洗供体的身体。在这种情况下,通常经由腔静脉吸出静脉血并弃掉。为获得本发明的待用 TAIC,可收集静脉血并如实施例 1 中所述进行处理。在备选方案中,在尸体供体作用的情况下,也可由来自供体脾脏的细胞(淋巴细胞和单核细胞)获得 TAIC。

在就尸体供体作用而言,对术后应用本发明的 TAIC 的情况下,移植和细胞应用之间的时间间隔可通过联合免疫抑制剂克服,以防止在移植和供应获自供体血液的 TAIC 之间的时间间隔中的急性器官排斥。在这方面,可考虑与常规免疫抑制剂例如钙调磷酸酶抑制剂如环孢菌素 A(CSA)或藤霉素或者与咪唑疏嘌呤(AZA)、霉酚酸酯、瑞帕霉素、单克隆抗体(ATG、ALG,但并非与 Dicliziumab 或 Basiliximab)或类固醇(STE)的联合治疗。受体血液中免疫抑制剂(已知的 IL-2-受体- α 单克隆抗体如 Dicliziumab 和 Basiliximab 除外)的存在一方面对所述免疫抑制剂的效果没有负面影响,另一

方面对 TAIC 的效果没有负面影响。

在这种意义上讲,已根据本发明修饰过的单核细胞起源的细胞可作为“耐受转移载体”用于任何细胞移植物(例如胰岛细胞、肝细胞、成人干细胞并用于任何其它程序化细胞类型或组织类型)及器官(例如肾脏、肝脏、心脏),只要它们与待移植细胞(器官)在遗传上相同,也就是说,它们必须来源于供体本身或者来源于其同卵孪生。TAIC 通过使移植的细胞/器官在新环境中粘附而实现其保护功能,从而使得受体免遭长期免疫抑制剂治疗的副作用之苦。

发明详述

用于本发明的方法中的起始细胞为血单核细胞。它们优选为来自人血的单核细胞。为了诱导移植物接纳的目的,细胞必须来源于移植物的供体(或他/她的同卵孪生)。例如在猴子或猪器官异种移植到人中的情况下,本发明的 TAIC 必须是来源于有关供体动物的单核细胞。

为获得单核细胞,在抗凝剂的惯常处理之后,可首先使用本领域公知的方法,优选通过离心将血液分离为血浆以及白细胞和红细胞。离心后,血浆将存在于上清之中;在其下方,存在含全部白细胞的一层。该层也被称之为棕黄层。这层之下为含红细胞的相(红细胞比容)。

就本发明的方法而言,首先分离棕黄层,并例如以公知方法通过离心对其进行分离以获得单核细胞。根据优选的方法实施方案,将棕黄层施加到淋巴细胞分离介质(Ficoll-Hypaque)中并离心(见实施例1)。实施例1描述了本发明优选的实施方案,其中通过离心分离依然包含在棕黄层中的红细胞和死细胞,而包括单核细胞在内的白细胞作为分离物存在于分离介质上。之后,可小心用移液管吸取白色单核细胞相,并且为富集分离物之中的单核细胞,重复进行离心和洗涤。在此操作过程中,单核细胞将与部分淋巴细胞一起聚集在离心容器的底部。

根据本发明方法尤为优选的实施方案,控制用于获得含单核细胞分离物的条件,从而分离物除了单核细胞之外,还含有相对于细胞总数大约 10-50%的淋巴细胞。优选地,分离物含大约 50-90%、在

特别优选的方式中含 60-70%的单核细胞，并含大约 10-50%、在特别优选的方式中 20-50%的淋巴细胞，各自都是相对于细胞总数，其中的差额将任选地由粒细胞供应。

如实施例 11 中所示，在原始单核细胞与 MCSF 和 γ -干扰素一起培养期间，淋巴细胞以相对于细胞总数 20-30%的数量存在将导致产生显著增加数量的 CD3/CD14 双阳性 TAIC，如同仅少数淋巴细胞(约 5%)存在的情形。

为制备足够量的 TAIC，首先有必要使单核细胞增殖。为此目的，可利用适于单核细胞的已知生长培养基；不过，所述培养基必须含生长因子 M-CSF（巨噬细胞集落刺激因子）。M-CSF（也称为 CSF-1）由单核细胞、成纤维细胞、淋巴细胞和内皮细胞产生。培养基中的 M-CSF 浓度可优选总计 2 到 20 $\mu\text{g/l}$ 培养基，更优选 4 到 6 $\mu\text{g/l}$ ，并且在特别优选的方式中为 5 $\mu\text{g/l}$ 。

随后或者同时，细胞必须用 γ -IFN 刺激，即在 γ -IFN 存在下培养。在含生长因子培养基中的初始增殖期持续 3 到 6 天之后进行 γ -IFN 对单核细胞的刺激。优选在起始培养后第 4 天，实施 γ -IFN 刺激，并且该刺激在培养箱条件下即于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下并在 5% CO_2 气氛中延长优选为 24 到 72 小时的一段时期，更优选 48 小时。

培养基中的 γ -IFN 浓度可为 0.1 到 20 ng/ml，优选 1 到 10 ng/ml，并且特别优选 5 ng/ml。

γ -IFN 刺激可与含生长因子的培养基中单核细胞的增殖同时开始。不过，优选如上文所指出的在初始增殖期后长达 3 到 6 天后进行刺激。细胞增殖和 γ -IFN 刺激应当总体上优选不要多于 8 天。所用的情形下均应实施 γ -IFN 处理，使它在增殖期后持续至少 24 小时、至多 72 小时，优选 48 小时。细胞增殖和刺激时期因此应当持续总计优选为 4 到 8 天。

根据本发明优选的实施方案，增殖和 γ -IFN 刺激以如实施例 2 所示方式实施，从而首先在含生长因子的培养基中增殖单核细胞，并在 3 到 6 天后向培养基中添加使培养基中达到 0.1 到 20 ng/ml、优选 1 到 10 ng/ml、并且特别优选 5 ng/ml 的浓度的 γ -IFN。

优选地，本发明的方法在其表面事先已涂覆了胎牛血清（FCS）或者备选地涂覆了人 AB 血清的培养容器中实施（见实施例 2）。FCS

涂覆可在使用前通过由 FCS 涂覆培养容器表面进行，并在数小时、特别是 4 到 72 小时、优选 12-48 小时，特别是 24 小时的相互作用阶段后，以适当的方式除去未粘附到表面的 FCS。

在培养步骤期间，在约 24 小时后细胞将沉积在培养容器的底部。由于其粘附性质，单核细胞和在此操作期间来源于单核细胞的 TAIC 将粘附在各自培养容器的底部。如果如实施例 2 中所述，在培养期间更换培养基，则首先小心除去上清，例如通过移液管吸取或倾倒，随后填充新鲜培养基。不过优选不洗涤、或者只小心洗涤粘附在底部的细胞，从而不除掉存在的任何淋巴细胞。

粘附细胞的取出可通过机械，例如通过精制的细胞刮棒或刮刀进行。

不过，根据本发明方法优选的实施方案，细胞的完全取出通过用合适的酶如用胰蛋白酶处理进行（见实施例 2）。可使胰蛋白酶溶液（0.1 到 0.025 g/l，优选 0.05 g/l）于 35℃ 到 39℃、优选于 37℃ 在 5% CO₂ 存在下对细胞作用 2 到 10 分钟。

然后以常规方式阻断酶活性，则现在可通过离心以常规方法获得自由漂浮的 TAIC。它们可立即使用，任选地悬浮在合适的介质如 PBS 之中。不过，它们也可以在营养介质中保存数天，特别是约 2 到 3 天（见实施例 2）；其中保存介质应当既不含生长因子也不含 γ -IFN。细胞可在此种营养介质中作为 TAIC 保存至少 48 小时。

为在更长的时期内贮存，可将细胞深冷冻。深冷冻活细胞的方案是现有技术中已知的，参见 Griffith M.等，（“Epithelial Cell Culture, Cornea”，in *Methods of tissue engineering*, Atala A.和 Lanza R. P., Academic Press 2002, 第 4 章，第 131-140 页）。深冷冻本发明的细胞的优选悬浮介质为含 DMSO 的 FCS。

本发明的一个实施方案，由步骤 c) 或 d) 获得的含移植物接纳诱导性细胞的细胞悬浮液可进一步就与抗体 GM-7 结合的那些细胞进行纯化，从而获得 TAIC_{GM7} 亚群。此种纯化方法在上文详细描述过。

根据本发明另一优选的实施方案，从在其细胞表面共表达抗原 CD3 和 CD14 的 TAIC 群中选择此类细胞。选择此类细胞的方法是本领域公知的。此类方法的实例有“荧光激活细胞分选”（FACS）、

“免疫磁珠分类术”及“磁激活细胞分类术”(MACS)或者所谓的“玫瑰花结法”[见 Gmelig-Meyling F.等“Simplified procedure for the separation of human T-and non-T-cells”, VoxSang. 33, 5-8(1977)].

TAIC 亚群 $\text{TAIC}_{\text{CD}3+/\text{CD}14+}$ 可直接由获自上述本发明方法步骤 c) 或 d) 的 TAIC 群进行选择, 或者由 $\text{TAIC}_{\text{GM}7}$ 亚群进行选择。进行后一种方法意味着将进行 $\text{TAIC}_{\text{CD}3+/\text{CD}14+}$ 逐步富集。

在本发明优选的实施方案中, 本发明的 TAIC 直接用于制备药物组合物, 以在体内抑制移植物排斥。

此种药物制剂可包含根据本发明的活 TAIC, 其由本发明方法的步骤 d) 获得, 悬浮于药学上可接受的载体中, 优选数量约 1×10^5 到 1×10^7 细胞/ml, 并且更优选约 1×10^6 细胞/ml 制剂。

在本发明另一优选的实施方案中, 本发明的 $\text{TAIC}_{\text{GM}7}$ 亚群细胞直接用于制备药物组合物, 以在体内抑制移植物排斥。

此种药物制剂可包含根据本发明的活 $\text{TAIC}_{\text{GM}7}$ 细胞, 其与抗体 GM-7 结合, 悬浮于药学上可接受的液相载体中, 优选数量约 1×10^6 到 1×10^8 细胞/ml, 并且更优选约 1×10^6 细胞/ml 制剂。

在本发明尤为优选的实施方案中, 本发明的 $\text{TAIC}_{\text{CD}3+/\text{CD}14+}$ 亚群细胞直接用于制备药物组合物, 以在体内抑制移植物排斥。

此种药物制剂可包含根据本发明的活 $\text{TAIC}_{\text{CD}3+/\text{CD}14+}$ 细胞, 其共表达抗原 CD3 和 CD14, 数量优选约 5×10^5 到 5×10^7 细胞/ml, 并且更优选约 5×10^6 细胞/ml 制剂。

上文所述药物制剂可包含悬浮在生理学上良好耐受的介质中的本发明的细胞。合适的介质有例如 Ringer 溶液、生理盐水或 5 到 20% 的人血清溶液等。

本发明的细胞制剂可包含由本发明方法的步骤 d) 获得的存活 TAIC。或者, 所述制剂可包含属于与抗体 GM-7 结合的 $\text{TAIC}_{\text{GM}7}$ 细胞或者在其细胞表面共表达抗原 CD3 和 CD14 的 $\text{TAIC}_{\text{CD}3+/\text{CD}14+}$ 细胞亚群的细胞。所述制剂可包含悬浮于液相载体介质中的优选至少 1×10^5 、更优选至少 5×10^5 、并且更优选至少 1×10^6 细胞/ml 数量的各种细胞。所述介质可以是细胞良好耐受的细胞培养或运输介质, 例如 5 到 20% 的人血清溶液。备选地, 制剂中的细胞可被深冷冻, 并包含在合适的贮存介质中, 例如具有 50% 人血清溶液和 10%

DMSO 的 RPMI。

最后，本发明也涉及其中本发明的移植物接纳诱导性细胞（TAIC、TAIC_{GM7} 或 TAIC_{CD3+/CD14+}）用于在体外产生或扩增调节性 T 淋巴细胞的方法。如实施例 12 中所示，TAIC 与淋巴细胞的直接体外共培养导致调节性 T 淋巴细胞特别是 CD4⁺/CD25⁺淋巴细胞的显著增殖，见 Wood 和 Sakaguchi: “Regulatory Cells in Transplantation Tolerance”，Nature Review Immunology 3, 199-210 (2003)。因此如实施例 12 所述通过直接共培养 TAIC 和淋巴细胞，有可能产生和/或扩增调节性 T 淋巴细胞特别是 CD4⁺/CD25⁺淋巴细胞。

根据本发明，直接体外培养意味着 TAIC 和淋巴细胞在直接的物理接触之下在相同培养基内共培养，就如同实施例 12 所例示的那样。

在本方法中，培养基中优选含大约相等细胞数目的悬浮在液相载体介质中的各种细胞即 TAIC 和淋巴细胞，并且分别优选至少 1×10^5 、更优选至少 5×10^5 、并且最优选至少 1×10^6 细胞/ml 的数量；所述介质可以是细胞良好耐受的细胞培养或运输介质，例如 5-20% 的人血清溶液。所述共培养优选应当在生理学条件下于大约 37℃ 进行，如在培养箱中，优选大约 3 到 5 天、更优选 4 天。

如实施例 13 中所示，移植物接纳不仅可通过向受体施用由供体单核细胞产生的 TAIC 来诱导，而且可通过向受体再施用如上文所述事先已与由供体单核细胞制备的 TAIC 在体外直接共培养的受体淋巴细胞来诱导。

根据本发明另一实施方案，通过直接共培养来自受体的淋巴细胞和来源于该移植物供体的 TAIC，可在体外由来源于移植物受体的淋巴细胞制备调节性 T 淋巴细胞。如实施例 13 中所示向受体再施用共培养的淋巴细胞将引起受体的移植物接纳。

如此制备的受体来源的调节性 T 淋巴细胞可通过本文所述的 FACS 分离（见上文），并且可用于药物制剂以防止受体的移植物排斥，其中如上文所述将细胞悬浮于药学上可接受的载体中。

本发明通过实施例进一步详细地加以举例说明。

如果未在实施例中限定，培养基的组成和所用物质如下：

1. 青霉素/链霉素溶液：

每 ml 生理氯化钠溶液 (NaCl 0.85%) 中 10,000 单位作为青霉素 G 钠盐的青霉素和 1000 μg 作为硫酸链霉素的链霉素 (Gibco Catalogue No. 15140122)。

2. 胰蛋白酶-EDTA

0.5 g 胰蛋白酶和 0.2 g EDTA (4Na) / l

3. RPMI 1640 (1 $\times$, 液体 (11875))

含 L-谷氨酰胺

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 培养基 1640 为富集制剂, 其可广泛用于哺乳动物细胞。

成分	分子量	浓度 (mg/l)	摩尔数 (nM)
无机盐 (Anorganic salts)			
硝酸钙 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	236	100.00	0.424
氯化钾 (KCl)	75	400.00	5.30
硫酸镁 (MgSO_4)	120	48.84	0.407
氯化钠 (NaCl)	58	6000.00	103.44
碳酸氢钠 (NaHCO_3)	84	2000.00	23.800
磷酸钠 (Na_2HPO_4)	142	800.00	5.63
另外的成分			
葡萄糖	180	2000.00	11.10
还原型谷胱甘肽	307	1.50	0.0032
酚红	398	5.00	0.0125
氨基酸			
L-精氨酸	174	200.00	1.10
L-天冬酰胺	132	50.00	0.379
L-天冬氨酸	133	20.00	0.150
L-二盐酸半胱氨酸	313	65.00	0.206
L-谷氨酸	147	20.00	0.136
L-谷氨酰胺	146	300.00	2.05
甘氨酸	75	10.00	0.133
L-组氨酸	155	15.00	0.0967

L-羟脯氨酸	131	20.00	0.153
L-异亮氨酸	131	50.00	0.382
L-亮氨酸	131	50.00	0.382
L-盐酸赖氨酸	146	40.00	0.219
L-甲硫氨酸	149	15.00	0.101
L-苯丙氨酸	165	15.00	0.0909
L-脯氨酸	115	20.00	0.174
L-丝氨酸	105	30.00	0.286
L-苏氨酸	119	20.00	0.168
L-色氨酸	204	5.00	0.0245
L-酪氨酸二钠盐、二水合物	261	29.00	0.110
L-缬氨酸	117	20.00	0.171
维生素			
生物素	244	0.20	0.008
D-泛酸钙	477	0.25	0.0005
胆碱盐酸盐	140	3.00	0.0214
叶酸	441	1.00	0.0022
i-肌醇	180	35.00	0.194
烟酰胺	122	1.00	0.0081
p-氨基苯甲酸 (PABA)	137	1.00	0.0072
盐酸吡哆醇	206	1.00	0.0048
核黄素	376	0.20	0.0005
盐酸硫胺素	337	1.00	0.0029
维生素 B12	1355	0.005	0.00000369

参考文献: Moore G. E., 等, J. A. M. A. 199:519 (1967)

4. PBS (Dulbecco 氏磷酸盐缓冲盐水) 参见 J. Exp. Med. 98:167 (1954):

组分	g/l
KCl	0.2

KH₂PO₄	0.2
NaCl	8.00
Na₂PHO₄	1.15

5. Ficoll-Hypaque:

淋巴细胞分离介质（蔗糖/环氧氯丙烷共聚物 Mg 400,000；密度 1.077，由泛影酸钠（Sodium diatrizoate）调整）。

6. L-谷氨酰胺

液体：29.2 mg/ml

7. 巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）

来自大肠杆菌的重组人 M-CSF；作为单体（18.5 kD）含有包括 N-末端甲硫氨酸在内的 135 个氨基酸残基；作为分子量 37 kD 的同型二聚体存在；（SIGMA Catalogue No. M 6518）

8. γ -干扰素（ γ -IFN）

来自大肠杆菌的重组人 γ -IFN；含 143 个氨基酸残基的 16.7 kD 蛋白（CHEMICON Catalogue No. IF002）

实施例 1

从全血中分离单核细胞

为避免血液凝固并且为了饲养细胞，在三腔袋装置（triple chamber bag）中将 450 ml 人全血与 63 ml 稳定液混合，该稳定液中含每升水 3.27 g 柠檬酸、26.3 g 柠檬酸三钠、25.5 g 右旋糖和 22.22 g 磷酸二氢钠。溶液 pH 为 5.6-5.8。

为分离血液组分，随后于 20℃ 以 4000 rpm 对该混合物“急速离心”7 分钟。这产生了三层内的颗粒及非颗粒组分的分层。通过使用为此目的提供的压缩机中的袋装置，则红细胞被压缩到底层袋中，血浆被压缩到上层袋中，而所谓的棕黄层保持在中层袋中，并含大约 50 ml 的体积。

然后将数量为 50 ml 的新鲜获得的棕黄层分成各 25 ml 的 2 部分，并分别层铺到事先已引入到两 50 ml Falcon 管中的 25 ml Ficoll-Hypaque 分离介质上。

所得制剂以 2500 rpm 进行 30 分钟无制动的离心。其后，任何仍

存在于棕黄层中的红细胞和死细胞位于 Ficoll 相之下,而包括单核细胞在内的白细胞在 Ficoll 中作为白色界面分离出来。

随后,通过移液管吸取小心取出包括单核细胞在内的白色界面,并与 10 ml 磷酸盐缓冲液 (PBS) 混合。

然后对该制剂进行 3 次 1800 rpm 10 分钟的制动离心,在每一次离心操作之后通过移液管吸取除去上清,并引入新鲜 PBS。

聚集在离心容器 (Falcon 管) 底部的细胞沉淀含有单核的细胞组分,即单核细胞。

为制备大鼠实验所需的单核细胞,分别从 4 只遗传上相同的供体大鼠中分离 25 ml 全血,并分别层铺到 25 ml Ficoll-Hypaque 分离介质上。然后如上文所述以相同的方式继续操作。或者,类似的 Ficoll 分离步骤也可应用于脾细胞悬浮液。

实施例 2

单核细胞的增殖和修饰

单核细胞的培养和增殖在具有如下组成的营养培养基中实施:

RPMI 1640 培养基	440 ml
胎牛血清 (FCS), 备选地 AB 血清	50 ml
青霉素/链霉素溶液	5 ml
总体积	500 ml

所述营养培养基含 2.5 µg/500 ml 的 M-CSF。

将实施例 1 中分离的单核细胞以 10⁶ 细胞的总量悬浮于 10 ml 营养培养基中,并转移到培养皿 (直径 100 mm) 中。培养皿事先已装满纯化的激活了的 FCS,且 FCS 已在装入 24 小时后倒掉,以便通过这种方式获得涂敷有 FCS 的培养皿。

培养皿覆盖有合适的盖子,并于 37℃ 在培养箱中保持 3 天。24 小时后细胞在培养皿的底部沉积。在第 2 天,用移液管吸去上清,并再次向培养皿中填充 10 ml 新鲜营养培养基。

在第 4 天,添加处于 10 ml 营养培养基中的 50 ng γ-干扰素,并再次封闭培养皿,并于 37℃ 在培养箱中再保持 48 小时。

随后, 将分别由 PBS 以 1:10 稀释的 10 ml 胰蛋白酶溶液用移液管吸取到培养皿中。将封闭的培养皿于 37℃ 在培养箱中保持 10 分钟。

其后, 用细胞刮棒将粘附于培养皿底部的细胞的分离, 从而大部分 (>90%) 细胞漂浮在上清中。

用移液管吸取全部上清 (10 ml 胰蛋白酶溶液+10 ml 培养基), 在 50 ml Falcon 管中混合, 并以 1800 rpm 离心 10 分钟。然后弃上清, 并向沉淀物 (残留的细胞沉淀) 中添加新鲜营养培养基 (见上文), 每 10^6 细胞添加 1 ml 营养物。为确定确切剂量的细胞计数的测定根据已知方法进行, 参见 Hay R. J., "Cell Quantification and Characterisation", in *Methods of Tissue Engineering*, Academic Press 2002, 第 4 章 S. 55-84。

将该细胞悬浮液离心 (1800 rpm, 10 分钟, 见上文), 并将细胞沉淀整合到 PBS 中或者为人用而整合到 NaCl (生理) 中。随后, 可直接或在 48 小时之内进行静脉内施用。

备选地, 在离心并弃去含胰蛋白酶的上清之后, 将 FCS/DMSO 作为冷冻介质添加到细胞中, 并且它们以 10 ml 的体积进行深冷冻。

冷冻介质含 95% FCS 和 5% DMSO。在每种情况下, 将大约 10^6 细胞整合到 1 ml 介质中, 并以下列步骤冷却:

于冰上 30 分钟;

在预冷的 Styropor 盒中于 -20℃ 2 小时;

在 Styropor 中于 -80℃ 24 小时;

在小管中于液氮 (N_2) 中于 -180℃ 贮存。

图 1 显示了根据流式细胞仪测定的, 在原始单核细胞培养和 γ -IFN 刺激之后单核细胞上抗原表达的表型改变。

实施例 3

移植物接纳诱导性细胞 (TAIC) 用于移植物受体免疫系统预调节的用途

TAIC 在移植前处理潜在受体的用途使得 TAIC 能够直接用于例如肝脏供体作用的临床案例中, 其中在器官移植前事先就已澄清谁将是供体而谁将接受供体器官。

对于本案, 利用由 Ono 和 Lindsey 描述的技术[参见 Ono, K.和 Lindsey, E. S. "Improved technique of heart transplantation in rats" .J.Thorac. Cardiovasc. Surg. 57, 225-229 (1969)], 在大鼠模型中对 LEW[RT1.^l] (就本发明而言称之为 "LEW") → DA[RT1.^{av1}] (就本发明而言称之为 "DA") 品系组合的雄性近交大鼠进行了异位心脏移植。在移植前第-7 天, DA 受体大鼠静脉内接受了 1 ml PBS 中的 10^6 源于 LEW 单核细胞的 TAIC。随后, 在从 LEW 大鼠品系中取出心脏 7 天后进行移植, 其被异位植入到 DA 受体动物的腹部(腹腔)。由于所用的大鼠品系是近交品系, 本发明的 TAIC 表达同移植的 LEW 心脏一样的组织抗原。

作为对照, 进行了所谓的第三品系移植。为此目的, 在第-7 天 (即在外科手术干预前第 7 天) 再次将来源于同一 LEW 供体动物的 TAIC (10^6) 静脉内注射到 DA 动物中。7 天后, 对取自 CAP[RT1.^c] (就本发明而言称之为 "CAP") 大鼠近交品系的心脏进行移植。CAP 大鼠表达单倍型 RT1.^c, 因此它们与 LEW 供体动物是完全 MHC-不一致的 (MHC-相异的)。下面, 详述了进行异位心脏移植的单独测验组 ($n=10$) :

1. LEW→DA; 未处理过;
2. LEW→DA; 10^6 LEW 来源的 TAIC, 静脉内, LEW 心脏移植前第-7 天;
3. CAP→DA; 10^6 LEW 来源的 TAIC, 静脉内, LEW 心脏移植前第-7 天;
4. CAP→DA; 未处理过;
5. LEW→LEW, 未处理过;
6. LEW→LEW, 10^6 LEW 来源的 TAIC, 静脉内, LEW 心脏移植前第-7 天。

正如可从心脏器官 Kaplan-Meier 存活曲线 (图 2A) 中看到的那样, 10 个中的 9 个 LEW 心脏为 DA 受体动物长期接纳 (>150 天), 而 CAP 第三品系心脏在 6.7 ± 0.8 天后被剧烈排斥。当未进行 TAIC 事先施用, LEW 心脏在 7.2 ± 1.0 天后也被剧烈排斥。 6.7 ± 0.8 天后在 DA 动物中刺激的免疫应答对 CAP 心脏的排斥, 与未处理过的对照组中 DA 大鼠的 CAP 心脏在 6.9 ± 1.0 天后被排斥, 在相同的时间跨度

内发生, 分别参见第3组和第4组。不论是否进行了TAIC预处理, 所有在LEW→LEW方案中同系移植的心脏长期存活(>150天)。由此可得出结论, 即TAIC不会将受体生物置于就移植物抗宿主疾病而言的风险之中。而且, 有可能从这种结果得出结论, 即在移植前1周静脉内施用 10^6 TAIC打开了诱导长期器官接纳的可能性。所诱导的耐受是供体特异性的, 因为LEW来源的TAIC对DA大鼠的相应预处理并不诱导对CAP第三品系心脏移植物的耐受。在同系LEW→LEW方案中, 额外施用TAIC既不影响受体动物的存活, 也不影响移植物的存活。

图2B显示了在异位移植到DA受体大鼠腹部之后, LEW同种异体移植物术后天数(POD)150天的组织学评价。所述受体大鼠已在移植前第-7天由 10^6 LEW来源的TAIC预处理过。移植物直至其从受体大鼠中取出(POD)150天之时依然令人满意地行使功能(强有力的心跳)。组织学制备物($\times 40$)表现出健康的心肌形态、正常的血管内皮组织、以及仅仅最低程度的单核的细胞浸润, 而没有任何急性和慢性排斥进程的迹象。

在这方面值得注意的还有供体来源的细胞(利用I型LEW-MHC分子特异性抗体I1.69通过免疫组织化学检测)能够在一年期间在DA受体大鼠胸腺中长期检测到的事实。图2C显示了于POD150天取出的由 10^6 LEW来源的TAIC预处理过的DA大鼠胸腺的组织学制备物。所述制备物由I型LEW-MHC分子特异性的单克隆抗体I1.69标记。如图所示, 施用TAIC导致胸腺建群, 在此发生供体来源的MHC抗原向成熟T细胞的呈递; 能够清楚识别可由所述抗体标记的细胞小巢(Small nest)。

实施例4

受体中供体来源的修饰单核细胞的检测

在相关DA动物中静脉内注射LEW来源的TAIC诱导的混合嵌合状态可能是根据本发明诱导的耐受的可能原因。因此进行试验, 以检查在注射LEW来源的TAIC后, 是否长期(>45天)在受体动物血液中可通过流式细胞仪检测到多于5%的细胞。流式细胞仪如现有技术中所述进行[参照Preffer F.I., "Flow cytometry" In:

Diagnostic Immunopathology, Colvin RB, Bhan AK, McCluskey, RT (编辑), Raven Press New York, 725-449 页 (1994)]。DA 受体血液中 LEW 供体细胞的检测利用特异性检测 I 型 LEW-MHC 抗原的单克隆抗体 I1.69 进行[见 Fändrich F., 等 Nature Med. 8,171-178, (2002)]。在分别施用 10^6 或 10^4 TAIC/kg $\times$ BW 之后,对实施例 3 中所述 LEW $\rightarrow$ DA 移植中的 4 例测定的受体动物外周血中的嵌合状态数据示于图 2D。

在将 LEW 来源的 TAIC 注射到未经免疫抑制的 4 只 DA 受体大鼠中 (10^6 细胞/kg $\times$ BW 注射到大鼠 1-3 中,而 10^4 细胞/kg $\times$ BW 注射到大鼠 4 中)后,大鼠 1-3 在 DA 受体血液中表现出更为长期的嵌合状态 (60-80 天),这可归因于供体来源的细胞。供体来源的细胞的检测利用 I 型 LEW-MHC 特异性抗体 I1.69 (仅与 LEW 品系大鼠 I 型 MHC 阳性细胞结合且不与 DA 品系大鼠细胞交叉反应的单克隆抗体)通过流式细胞仪测定进行。因为大约所有外周血细胞在细胞表面表达 I 型 MHC 抗原,DA 大鼠外周血中供体细胞的比例可由 I1.69 高度准确地测定。如图 20 中的图表所示,在 4 只动物的 3 只中,多于 10% 的细胞在静脉内注射 TAIC 后头 6 周内表达由 I1.69 标记的供体抗原。在注射 60 天之后,这些 DA 大鼠外周血中嵌合状态的比例基本下降,并在第 100 天彻底消失。不过,这种瞬间嵌合状态与在倍增时间后 (即 TAIC 注射后 7 天)移植的 LEW 心脏的移植物存活密切相关,尽管缺乏供体嵌合状态 (第 100 天后),也不再被排斥 (本例中的大鼠 1-3)。在另一方面,在施用 10^4 细胞/kg $\times$ BW 之后诱导的短期嵌合状态 (大鼠 4; <20 天)并不保证转移心脏的长期移植物接纳。

实施例 5

移植后施用供体来源的细胞

接下来要对尸体 (死尸) 供体作用的临床病例进行评价,以确定何种程度的 TAIC 术后施用能够诱导受体中移植器官相应的长期接纳。为此目的,在 LEW $\rightarrow$ DA 大鼠近交品系模型中进行了异位心脏移植。DA 受体大鼠以 5 mg CSA/kg $\times$ BW 的剂量在移植后第 0、1、2 和 3 天静脉内接受 4 个周期的环孢菌素 A (CSA)。在第 7 天,进

行 DA 受体大鼠尾静脉的 10^6 LEW 来源的 TAIC 静脉内施用。如下实验组作为对照 ($n=6-10$)。

1. LEW→DA; 未处理过

2. LEW→DA; CSA, $5 \text{ mg/kg} \times \text{BW}$, 静脉内, 第 0、1、2 和 3 天

3. LEW→DA; CSA, $5 \text{ mg/kg} \times \text{BW}$, 静脉内, 第 0、1、2 和 3 天

外加 10^6 LEW 来源的 TAIC, 静脉内, 第 7 天

4. LEW→DA; 10^6 LEW 来源的 TAIC, 静脉内, 第 7 天

5. CAP→DA; CSA, $5 \text{ mg/kg} \times \text{BW}$, 静脉内, 第 0、1、2 和 3 天

外加 10^6 LEW 来源的 TAIC, 静脉内, 第 7 天

如果 4 周期 CSA 的初始施用 ($5 \text{ mg/kg} \times \text{BW}$, 静脉内) 已自第 0-3 天生效的话, 在 POD (术后天数) 为 7 时, 用 10^6 LEW 来源的 TAIC 对 DA 受体大鼠进行术后静脉内处理导致长期耐受。CSA 初始施用是必要的, 因为 POD 7 天 (术后天数) 用 10^6 TAIC 单次施用的唯一处理仅在 6 例中的 1 例中防止了急性排斥。本例中所选 CSA 剂量仅具有亚治疗效果, 因为唯一性 CSA 施用不能诱导长期接纳, 即使是移植物的存活得以延长。诱导的移植物接纳是供体特异性的, 因为 LEW 来源的 TAIC 对 DA 大鼠的相应处理并不诱导针对 CAP 第三品系心脏移植物的任何耐受。

如图 3 所示, 实验组 1 的心脏在 7.0 ± 0.8 天后被剧烈排斥。组 2 的心脏被延迟在 14.4 ± 7.0 天后排斥。组 3 的心脏在 6 例中有 5 例被接纳长于 150 天。在大鼠系统中, 多于 100 天的器官接纳被视为长期接纳, 因为近交大鼠的平均生命期望仅约为 2 年。单独的 TAIC 术后施用 (10^6 细胞) 仅能够在 6 例中的 1 例中防止急性排斥, 因为心脏器官在 22.6 ± 31.6 天后停止搏动 (组 4)。具有 CAP 心脏的第三品系对照表现出诱导的移植物接纳的特异性, 因为第三品系心脏在 7.4 ± 2.2 天后再次被剧烈排斥。这些结果也证明额外施用 TAIC 不能产生任何普遍的免疫抑制, 这并不能防止对 CAP 心脏的急性排斥。

实施例 6

有关 TAIC 诱导的长期接纳的器官特异性的研究

为排除 TAIC 仅能够对心脏移植物提供抵抗由受体引导的针对供体抗原的同种异体特异性免疫应答的保护效果的可能性,在如下实验组 ($n=6$) 中在强烈排斥的 DA $\rightarrow$ LEW 大鼠近交系统中移植了下列器官:

1. DA (肾脏) $\rightarrow$ LEW; 未处理过
2. DA (肾脏) $\rightarrow$ LEW; 10^6 DA 来源的 TAIC, 静脉内, 移植前第 7 和 1 天
3. LEW (肾脏) $\rightarrow$ LEW; 未处理过
4. DA (肝脏) $\rightarrow$ LEW; 未处理过
5. DA (肝脏) $\rightarrow$ LEW; 10^6 DA 来源的 TAIC, 静脉内, 移植前第 7 和 1 天
6. LEW (肝脏) $\rightarrow$ LEW; 未处理过
7. DA (皮肤) $\rightarrow$ LEW; 未处理过
8. DA (皮肤) $\rightarrow$ LEW; 10^6 DA 来源的 TAIC, 静脉内, 移植前第 7 和 1 天
9. LEW (皮肤) $\rightarrow$ LEW; 未处理过

如图 4A-C 中说明的 Kaplan-Meier 图所示, 6 例肾脏器官中有 6 例、6 例肝脏器官中有 5 例、而 6 例皮肤移植物中有 5 例为 LEW 受体大鼠长期接纳 (>150 天)。所有同系器官移植作为技术完成而无并发症的对照, 并为供体动物不加限制地接纳 (未在存活曲线中显示)。因此, 这些试验方案也显示静脉内事先注射 2×10^6 TAIC 在多于 80% 的移植器官中诱导长期器官接纳。

然后对有或无 TAIC 事先施用而移植的上文所列肾脏、肝脏和皮肤移植物进行组织学研究。图 4D 显示了作为在移植前第 7 和 1 天给予两次 10^6 TAIC/kg 体重静脉内注射的结果, 移植肾脏的形态表明是完好的 (参见对照肾脏和 LEW $\rightarrow$ LEW 同系移植物), 反之, 在未处理过的同种异体对照组 DA $\rightarrow$ LEW 中, 可见移植物在间隙中的明显浸润 (在术后 14 天)。无 TAIC 预处理在 POD 12 天已被完全排斥的 (DA $\rightarrow$ LEW 无 TAIC) 同种异体肝脏移植物 (图 4E) 表现出类似的方式, 而事先施用 TAIC 使得肝脏移植物实质与同系移植物相比显得完全均质且完好。同种异体皮肤移植物 (DA) 也愈合而无并发症

(参照与同系 LEW 移植物的比较), 而同时移植的 CAP 第三品系移植物早在术后第 12 天就被剧烈排斥。该实施例证明了 TAIC 诱导的耐受的特异性, 因为在第 7 和 1 天由 DA 来源的 TAIC 对 LEW 受体动物进行预处理导致 DA 移植物的接纳, 而在第 0 天同时移植的 CAP 皮肤移植物被剧烈排斥 (图 4F)。

实施例 7A

有关 TAIC 诱导的长期器官接纳的单倍型特异性的研究

为了排除 TAIC 仅在所选大鼠近交品系组合 LEW→DA 中诱导长期器官接纳的可能性, 在异位心脏移植模型中研究了如下另外的近交品系组合 ($n=6$)。为此目的, 其中也使用了近交品系 BN[RT1.] (就本发明而言称之为“BN”)。

1. DA→LEW; 未处理过

2. DA→LEW; CSA, 5 mg/kg × BW, 静脉内, 第 0、1、2、3 天

外加 10^6 DA 来源的 TAIC/kg × BW, 静脉内, 术后第 7 和 10 天

3. CAP→LEW; 未处理过

4. CAP→LEW; CSA, 5 mg/kg × BW, 静脉内, 第 0、1、2、3 天

外加 10^6 CAP 来源的 TAIC/kg × BW, 静脉内, 第 7 和 10 天

5. BN→LEW; 未处理过

6. BN→LEW; CSA, 5 mg/kg × BW, 静脉内, 第 0、1、2、3 天

外加 10^6 BN 来源的 TAIC/kg × BW, 静脉内, 第 7 和 10 天

由预实验早就已知在所谓的“高效应”组合 (DA→LEW) 中, 该组合伴随着在大鼠近交模型中已知最强的排斥反应, 由 10^6 TAIC 单次术后静脉内施用不能实现长期接纳。因此试图通过施用两次增加受体动物中 TAIC 的存在。如通过图 5A 中举例说明的相应存活曲线所示, 在术后天数第 7 和 10 天给予两次的 TAIC 施用在组 2 的 6 例中的 4 例中以及实验组 4 的 6 例中的 5 例中提供了长期器官接纳。在 BN→LEW 品系组合中, 所有移植的器官长期存活而无任何急性排斥的迹象。在所有移植心脏已被长期接纳的情况下 (>150 天), 可在 TAIC 施用后的头 20-45 天期间在受体动物中检测到混合嵌合状

态。不过，受体外周血中缺乏供体细胞总是伴随着早期的器官衰竭。从这些数据，可得出结论，即 TAIC 静脉内施用只有在所述细胞诱导了至少有 21 天可检测到的混合供体嵌合状态时才导致长期器官接纳。这也证实了图 2D 所示的实验结果。

通过在第 7 和 10 天向受体动物静脉内给予 10^6 TAIC/kg 体重的术后施用，如果另外初始施用 4 周期的 CSA 的话，有可能在所有 3 种近交品系组合中在多于 80% 的情况下诱导长期耐受。

实施例 7B

有关 M-CSF 处理过的单核细胞的 γ -IFN 刺激对体内耐受的重要性的研究

为了能够更详细地表征 M-CSF 处理过的血单核细胞由 γ -干扰素额外刺激对体内耐受形成的效率，在 LEW→DA 大鼠近交模型中研究了如下试验组异位心脏移植（n=每组 6 只动物）：

1. LEW→DA; $10^6/\text{kg} \times \text{BW}$ LEW 来源的血单核细胞（未培养的单核细胞），静脉内，心脏移植前第 7 天

2. LEW→DA; $10^6/\text{kg} \times \text{BW}$ LEW 来源的血单核细胞（由 M-CSF 处理），静脉内，心脏移植前第 7 天

3. LEW→DA; $10^6/\text{kg} \times \text{BW}$ LEW 来源的血单核细胞（由 γ -IFN 刺激），静脉内，心脏移植前第 7 天

4. LEW→DA; $10^6/\text{kg} \times \text{BW}$ LEW 来源的血单核细胞（由 M-CSF 处理外加

γ -IFN 刺激），静脉内，心脏移植前第 7 天

如图 5B 的 Kaplan-Meier 存活曲线所示，在心脏移植前第 7 天静脉内施用新鲜未培养的 LEW 来源的血单核细胞，不能防止 DA 供体动物中 LEW 心脏的急性同种异体移植物排斥。该实验组的移植物平均（ $\pm$ SD）在 7.8 ± 0.8 天被排斥。然而，事先施用由 M-CSF 培养超过 6 天的单核细胞导致器官存活时间的显著延长，因为在该实验组中，平均仅在 35.0 ± 51.5 天后观察到排斥。在不含 M-CSF 的 RPMI 培养基中由 γ -IFN 单独刺激新鲜血单核细胞超过 48 小时不能防止心脏移植物的急性排斥，其平均在 7.8 ± 1.2 天后停止搏动。只有 M-CSF 处理新鲜血单核细胞超过 6 天并且由 γ -IFN 额外刺激这些细胞超过 48

小时(在第5和6天)在6例移植物的4例中导致长期器官耐受(>150天)。结果表明由 γ -IFN 额外刺激 M-CSF 处理过的单核细胞对体内耐受产生的决定性重要性。

实施例 8

有关 TAIC 诱导的长期器官接纳的物种特异性的研究

为了排除 TAIC 仅在所选的大鼠动物物种中有效诱导长期器官接纳的可能性, 以与实施例 2 中详述的方法类似的方式从供体猪中分离单核细胞起源的细胞, 其中 γ -IFN 刺激通过在 24 小时内向营养介质中添加 1000 U/10 ml 实现。随后, 在具有与人相当的排斥器官潜力的“SLA 错配小种猪”左侧肺移植模型中进行了 TAIC 抑制急性排斥的效力的研究。在本例中, 取出供体猪的左肺, 并原位移植到遗传上相异的受体猪中(也就是在从受体猪中摘除左肺后, 移植到左胸腔中)。在肺摘除之际, 同时取出 500 ml 供体血液, 用以从该猪的单核细胞制备 TAIC。

所述供体动物均具有 30-35 kg 的体重。在猪中建立了如下实验组 ($n=4$):

1. CSA, 5 g/天, 50 mg 咪唑硫嘌呤/天, 25 mg 甲基脱氢皮质甾醇/天, 总计 28 天

2. 与组 1 同, 外加 10^8 供体猪骨髓细胞 (BM) /kg $\times$ BW 受体猪, 外加受体猪的 4.5 Gy 全身辐照 (WBI)

3. 与组 1 同, 在肺移植后在术后天数第 7 和 10 天外加 10^6 来源于供体猪的 TAIC/kg $\times$ BW

如图 6A 所示, 组 1 中的肺移植排斥在终止免疫抑制后平均 50.3 ± 9.9 天发生。另一方面, 组 2 中的动物在 102.3 ± 81.0 天后排斥它们的器官。重复两次与 TAIC 治疗联合的三重免疫抑制延长器官存活至 292 ± 135.5 天, 4 只动物中有 3 只表现出其器官的长期器官接纳 (>350 天)。在组 3 的所有例子中, 可在受体血中 >21 天观察到混合供体嵌合状态, 而组 1 和 2 的动物仅表现出 6-8 天的短期嵌合状态。图 6B 显示了实验组 1 中的猪 (POD 41) 以及来自实验组 3 的 TAIC 处理过的猪 (移植后 55 天; B) 的肺移植。然而, 就环绕心脏轮廓的左胸腔壁投影而言, 透明度 (阴影) 肉眼可见的下降可视

为实验组 1 的猪中排斥的肺移植的指征,由 TAIC 处理过的动物的胸腔 x-射线图分别显示了 x-射线不醒目的肺和移植物的发现,就心脏轮廓而言给出了良好的界限。

实施例 9

抗体 GM-7 对 TAIC 的结合

单克隆抗体 GM-7 通过用如实施例 2 中所述制备的人 TAIC 免疫小鼠产生。产生该抗体的杂交瘤细胞以编号 DSM ACC2542 保藏于“Deutsche Sammlung für Mikroorganismen”。下文报道的结果证明该抗体仅与在根据本发明进行了 6 天 M-CSF 外部 (exsitu) 修饰和 2 天 γ -IFN 刺激的 CD14⁺ 细胞上表达的抗原特异性结合。

图 1 显示了通过流式细胞仪测定的 GM-7 对体外修饰之后即转变为 TAIC 之后的单核细胞的结合能力。可以看出直接由棕黄层获得的 CD14 阳性单核细胞不结合抗体 GM-7 (相应于抗体对照的灰色阴影云)。相反,在 M-CSF 中培养并由 γ -IFN 刺激后,部分单核细胞表达能够为单克隆抗体 GM-7 识别的抗原。在如实施例 2 所述培养之后,约 80% 转变后的单核细胞能够结合单克隆抗体 GM-7。

在另一实验中,在混合淋巴细胞培养物 (MLC) 中将 CD14⁺/GM-7⁺ 细胞的抑制活性与 CD14⁺/GM-7 细胞的抑制活性进行了比较。MLC 如 Kurnick, J. T. 所述实施,“Cellular Assays” in: Diagnostic Immunopathology, [Colvin R. B., Bhan A. K., McCluskey, R. U. (编辑), Raven Press, New York, 751-771 页 (1994)]。

在本实施例中,TAIC 起源于个体 B。如图 7 所示,GM-7 阳性和 GM-7 阴性 TAIC 的抑制活性之间存在显著差异。只有 GM-7 阳性组分,即在由 M-CSF 处理 6 天以及 γ -IFN 刺激 2 天之后获得的 TAIC 群对在经个体 B 的细胞刺激后个体 A 效应细胞的 T 细胞增殖活性表现出显著的抑制效果。

这些数据表明,对于临床目的,通过单克隆抗体 GM-7 的可获得性,能够从在原始单核细胞由 M-CSF 培养以及 γ -IFN 刺激之后获得的 TAIC 群中分离具有最佳抑制功能的细胞群。

实施例 10

IDO 抑制剂 1-甲基-色氨酸对 TAIC 免疫抑制活性的影响的测定
为了阐明酶吲哚胺-2,3-双加氧酶 (IDO) 抑制剂 1-甲基色氨酸 (1-MT) 是否影响在 “Mo” 和 “Mo+Ly” 实验设置中产生的 TAIC (见实施例 11) 的抑制功能, 建立了许多存在和不存在 1-MT 下的 PHA (植物凝集素) 刺激的 T 细胞的混合淋巴细胞培养物 (MLC)。

在这些混合淋巴细胞培养物中, 将 50,000 淋巴细胞和 2 μ g PHA 转移到 96 孔板的孔中, 随后为超过 144 小时的增殖周期 (表示为 “PhaLy”)。仅在不添加 PHA 的培养基中培养的淋巴细胞作为另一对照运行 (表示为 “Ly”)。

为确定不同共培养物中 PHA 刺激的淋巴细胞的增殖, 运行并研究了如下 4 种实验设置:

PhaLy+ “Mo+Ly”	PHA 刺激的淋巴细胞和 TAIC[来自根据实施例 11 的实验设置 “Mo+Ly” 的 10^5 细胞]。
PhaLy+ “Mo+Ly” +1-MT	在 2 μ mol 1-MT 存在下的 PHA 刺激的淋巴细胞和 TAIC[来自根据实施例 11 的实验设置 “Mo+Ly” 的 10^5 细胞]。
PhaLy+ “Mo”	PHA 刺激的淋巴细胞和 TAIC[来自根据实施例 11 的实验设置 “Mo” 的 10^5 细胞]。
PhaLy+ “Mo” +1-MT	在 2 μ mol 1-MT 存在下的 PHA 刺激的淋巴细胞和 TAIC[来自根据实施例 11 的实验设置 “Mo” 的 10^5 细胞]。

在 144 小时的培养之后, 所有对照或共培养物在 3 [H]-胸苷 (“脉冲”) 存在下再培养 24 小时, 之后以每分钟计数 (cpm) 测定整合的放射性标记胸苷的量, 见图 8。在这种安排下, 测定的放射活性的数量为整合到 DNA 中标记胸苷量的度量, 所以就是淋巴细胞增殖率的度量。图 8 中所报道的数值对应于 3 个实验三重测定的平均值, 每一个都标出了标准偏差。

结果证明未用 PHA 刺激的淋巴细胞 (“Ly”) 不显著增殖, 观

察到的平均放射活性为 367 cpm (见图 8)。相反, 用 2 μ g PHA 刺激导致淋巴细胞增殖率的显著提高 (“PhaLy”), 这些样品中测量到平均值为 18459 cpm 的最高整合。

如果添加的是来自实施例 11 实验设置 “Mo+Ly” 中的细胞, 则向淋巴细胞培养物中添加 TAIC 明显强烈地降低增殖率 (PhaLy + “Mo+Ly”, 测定值 1498 cpm), 而当添加来自实施例 11 实验设置 “Mo” 中的细胞时, 则不太强烈 (PhaLy+ “Mo”, 测定值 3369 cpm)。

在向含 “Mo+Ly” 及 “Mo” 的具有刺激的淋巴细胞的实验设置中添加 2 μ mol 1-甲基-色氨酸 (1-MT) 后的结果证明 1-甲基-色氨酸 (1-MT) 协同性地提高 TAIC 的抑制功能, 由此来自实验设置 “Mo+Ly” (测量值 267cpm) 的 TAIC 比来自来自实验设置 “Mo” (测量值 390 cpm) 的 TAIC 下降更为强烈。

实施例 11

单核细胞培养期间淋巴细胞对 CD3⁺/CD14⁺细胞形成的影响

通过两组不同实验设置的比较测定了单核细胞组分中存在的淋巴细胞对作为 TAIC 起作用的 CD14⁺/CD3⁺细胞的产生的影响。

对于第一组实验设置 (随后表述为 “Mo”), 单核细胞组分最初如实施例 1 所述从棕黄层的界面中取出。如实施例 2 所述, 随后将细胞转至 M-CSF 培养步骤。在培养起点后的 1 小时之内, 分别用 10 ml PBS 对粘附于组织培养瓶底部的单核细胞洗涤 5 次, 从而存在于培养物中的淋巴细胞的量降至 <5% (4.8 $\pm$ 2.4%), 而如此获得的富集单核细胞 (CD14⁺) 的量高于 90% (92 $\pm$ 5.6%)。该实验设置内另外的细胞组分为 B 淋巴细胞和粒细胞。

第二组实验设置 (随后表述为 “Mo+Ly”) 中的细胞也如实施例 1 所述从 “棕黄层” 的界面中作为单核细胞组分取出。不过, 与实验设置 “Mo” 不同, 粘附于组织培养瓶底部的细胞仅在自培养期起始 24 小时后洗涤 1 次, 如实施例 2 所述。结果获得细胞群, 其由 45 $\pm$ 5.3% CD14⁺单核细胞和 23.5 $\pm$ 8.9% CD2⁺淋巴细胞组成。如同实验设置 “Mo” 中一样, 该实验设置中也存在淋巴细胞和粒细胞。

每组实验设置总细胞群中各相应细胞类型量的测定分别通过 3 个实验设置组的流式细胞仪进行 (见图 9)。结果报道为包括标准偏

差在内的平均值。

在培养之初 (d 0=第 0 天), 既不能在实验设置 “Mo” 中也不能在实验设置 “Mo+Ly” 中测定到 $CD14^+/CD3^+$ 细胞。在为期 5 天的培养之后, 终止试验并如实施例 2 所述在从组织培养瓶底部分离细胞之后通过 FACS 分析描述细胞的特征。发现这些实验设置中 $CD14^+$ 细胞的相对量下降, 在实验设置 “Mo” 中从 92% 降至 42%, 而在实验设置 “Mo+Ly” 中从 45% 降至 28%。看来, 淋巴细胞增殖得比单核细胞更快; 实验设置 “Mo” 中淋巴细胞的相对量从 4.8% 升至 69.8%, 而在实验设置 “Mo+Ly” 中从 23.5% 升至 50.6%。在培养期间, 两种培养中均形成作为 TAIC 起作用的 $CD14^+/CD3^+$ 细胞。在这方面重要的是, 在实验设置 “Mo+Ly” 中观察到显著更高的量为 $32.0 \pm 5.3\%$ 的 $CD14^+/CD3^+$ 细胞增长, 相对于实验设置 “Mo” 中仅为 $7.2 \pm 3.2\%$ 的增长。

这些结果证明在培养之初纯化细胞以将单核细胞富集到高于 90% 的相对量对 TAIC 群中免疫抑制性 $CD14^+/CD3^+$ 细胞的产生具有负面影响, 而实施例 1 和 2 中所述方法导致显著更高的 $CD14^+/CD3^+$ 细胞产率。

实施例 12

体外共培养人类 TAIC 和同种异体淋巴细胞以产生调节性 T 细胞

为研究 TAIC 是否在受体中诱导形成调节性 T 细胞即 $CD4^+/CD25^+$ 淋巴细胞, 进行了 TAIC 和淋巴细胞若干不同的体外培养, 并分析了从中获得的调节性 T 细胞的形成。

为此目的, 供体 A 的 TAIC 在体外与供体 B 的淋巴细胞一起直接或间接共培养。在直接共培养中, 使 TAIC (供体 A 的) 与淋巴细胞 (供体 B 的) 之间直接的细胞与细胞接触成为可能, 而在间接共培养中, 一种膜 (“细胞培养插入物”, $0.4 \mu m$ 孔径, Falcon, 货号 353090) 允许培养基交换, 但抑制两细胞群的物理接触。所述直接或间接共培养优选进行 3 到 5 天, 更优选在培养箱条件下即于 $37^\circ C$ 在 $5\% CO_2$ 气氛中进行 4 天。

培养后, 在两组实验设置以及其中 TAIC 或淋巴细胞分别单独培

养的对照中测定了调节性 T 细胞 ($CD4^+/CD25^+$) 的各自数目。另外, 在其中 TAIC 单独培养的对照实验设置中, 测定了 $CD3^+/CD14^+$ 细胞的数目, 其代表了混合淋巴细胞培养物中具有最显著抑制功能的 TAIC 细胞群的组分。

在所有实验设置中, 通过 FACS 分析测定了细胞的表面抗原, 并分析了细胞总量中各相应细胞群的量。

另外, 在各相应细胞群中通过 PCR 测定了调节性 T 细胞特异性表达的三种新主导基因 (Foxp3、CTLA-4 和整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$) 的相对表达 (见表)。Foxp3 为特异性转录因子, 它被视为调节性 T 细胞发育的控制基因, 并且它被这些细胞特异性表达 [见 Hori, S. 等,

“Control of Regulatory T-cell Development by the Transcription Factor Foxp3”, *Science* **299**, 1057-1061 (2003)]。

CTLA-4 为另一因子, 它被用作为确定 $CD4^+/CD25^+$ T 细胞调节功能的标志 (见 Khattri, R. 等, “An essential role for Scurfin in $CD4^+/CD25^+$ T regulatory cells”, *Nature Immunology*, online publication, doi: 10.1038/ni909 (2003); Shimizu, J. 等 “Stimulation of $CD25^+/CD4^+$ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance”, *Nature Immunology*, online publication, doi: 10.1038/ni759 (2003); Cobbold, S. P. 等 “Regulatory T cells in the induction and maintenance of peripheral transplantation tolerance”, *Transpl. Int.* **16** (2), 66-75 (2003)]。

整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ 为整合蛋白, 它与上皮钙粘蛋白 (Catherine) 结合, 并且它可用作调节性 $CD25^+$ -T-细胞最有潜力的亚群的标志 [见 Lehmann, J. 等 “Expression of the integrin $\alpha_E\beta_T$ identifies unique subsets of $CD25^+$ as well as $CD25^-$ regulatory T cells” *PNAS* **99** (20), 13031-13036 (2002)]。

Foxp3、CTLA-4 和整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ 表达的测定利用 GAPDH 和 β -肌动蛋白两种“持家基因”作为对照通过定量 PCR 进行; 所测数值一方面彼此关联设置, 将 $CD14^+/CD3^+$ 细胞获得的数值设为 1; 另一方面, 绝对 RNA 量以 $\mu g/\mu g$ 总 RNA 表示, 以使体外测量的 TAIC 的抑制效果以及 $CD4^+/CD25^+$ 双阳性细胞的形成与各相应基因的表达率关联起来。标准方法用于定量 PCR, 它们是熟练技术人员公知的 (见

Lottspeich, F., Zorbas, H. "Bioanalytik", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 1998)。

所述表显示, 与由间接共培养或对照获得的分别为 2.38% 和 2.65% 的几乎相同的 $CD4^+/CD25^+$ 淋巴细胞量相比, 在由直接共培养获得的淋巴细胞群内, 双阳性细胞 $CD4^+/CD25^+$ 的百分比提高数倍至 8.7% 的数值。

与 $CD4^+/CD25^-$ 细胞中的表达相比, $CD4^+/CD25^+$ 亚群细胞表达最高相对量的所有测试主导基因的 mRNA (见表)。尽管 Foxp3 的表达以约 10 倍的因子增加 (37 相对于 3.75), CTLA-4 表达达到甚至更高的最大程度表达 (4699 相对于 0.376)。共培养期间 $CD4^+/CD25^+$ 细胞中第三主导基因整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ 表达的增加几乎与 CTLA-4 一样高, 因为整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ mRNA 的绝对量与在 $CD4^+/CD25^-$ 细胞中的 3.4×10^{-12} $\mu\text{g mRNA}/\mu\text{g}$ 总 RNA 相比, 在 $CD4^+/CD25^+$ 细胞中升至 1.4×10^{-9} 。

在间接共培养后, $CD4^+/CD25^+$ 亚群中 Foxp3-mRNA 的相对量总计仅为 10, 并且几乎与对照淋巴细胞表达的相对量一样低, 对照淋巴细胞表达的 Foxp3-mRNA 相对量为 15。

对照淋巴细胞表达的 CTLA-4-mRNA 相对量在 $CD4^+/CD25^+$ 群中低至 0.375 而在 $CD4^+/CD25^-$ 群中低至 0.1。

	对照				直接共培养		间接共培养	
	TAIC		淋巴细胞		淋巴细胞		淋巴细胞	
	CD14 ⁺ / CD3 ⁺	CD14 ⁺ / CD3 ⁻	CD4 ⁺ /C D25 ⁺	CD4 ⁺ /C D25 ⁻	CD4 ⁺ / CD25 ⁺	CD4 ⁺ / CD25 ⁻	CD4 ⁺ / CD25 ⁺	CD4 ⁺ / CD25 ⁻
FACS [%阳性细胞]	41	20	2.65	30.8	8.7	49	2.38	27.6
相对 Foxp3-表 达[PCR]	50	1	15	1.5	37	3.76	10	1.5
绝对 RNA-量 Foxp3	1.6×10 ⁻⁸	3.2×10 ⁻¹⁰	4.8×10 ⁻⁹	8×10 ⁻¹⁰	1.2×10 ⁻ 8	1.2×10 ⁻ 9	3.2×10 ⁻ 9	4.8×10 ⁻ 10
相对 CTLA4- 表达[PCR]	12500	1	0.375	0.1	4699	0.376		
绝对 RNA-量 CTLA4	6.5×10 ⁻⁶	5.2×10 ⁻¹⁰	1.9×10 ⁻¹⁰	5.2×10 ⁻¹⁰	2.4×10 ⁻ 6	1.9×10 ⁻ 10		
绝对 RNA-量 整合蛋白α _E β ₇	3.4×10 ⁻⁹	不可检测	1.4×10 ⁻⁹	3.4×10 ⁻¹²				

表：直接和间接共培养之后，通过参照其表面标志 CD3、CD4、CD14、CD25 而进行的总细胞量中特定细胞群量的测定，以及这些细胞群中三种基因（Foxp3、CTLA-4 和整合蛋白α_Eβ₇）相对表达和绝对 RNA 量的测定。

TAIC 细胞 CD3⁺/CD14⁺亚群中的 CTLA-4 表达与 Foxp3 表达相似，并且比所有其它细胞群显著更高。在这方面，值得注意的是 CD3⁺/CD14⁺亚群中的 CTLA-4 表达（12.500 的相对值）比仅表现出相对值为 50 的 Foxp3 表达强多倍。

在 TAIC CD14⁺/CD3⁻亚群中检测不到整合蛋白α_Eβ₇的表达，而与其它两种分析基因的表达行为类似，所述整合蛋白在 TAIC CD14⁺/CD3⁺亚群中的表达作为 μg mRNA/μg 总 RNA 绝对值测量达到最高值（3.4 × 10⁹ μg/μg 总 RNA）。

与正常淋巴细胞相比，来源于单核细胞的 TAIC 上三种淋巴细胞标志 Foxp3、CTLA-4 和整合蛋白α_Eβ₇显著增加的表达完全是未预料

到的，并且迄今为止未曾在单核细胞或来源于单核细胞的细胞中观察到。

总而言之，如上文所示的本实施例的结果证明如下：如果人们从 Foxp3、CTLA-4 和整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ 的表达水平与各自细胞的免疫调节性质有关的假设出发，这里证明 TAIC CD3⁺/CD14⁺亚群的抑制活性与这三种基因的高表达相关。当考虑到这些标志迄今仅对淋巴细胞描述过，而从未对单核细胞起源的细胞描述过时，这甚至更为令人惊讶。

还进一步显示，与间接共培养以及仅有淋巴细胞的培养相比，TAIC 与淋巴细胞的直接共培养产生显著更高量的 CD4⁺/CD25⁺淋巴细胞。这支持在 TAIC 施用后也在体内（即在患者中）形成调节性 T 细胞的假设。这些结果与已知的 CD4⁺/CD25⁺淋巴细胞免疫调节功能以及这些细胞中的 Foxp3、CTLA-4 和整合蛋白 $\alpha_E\beta_7$ mRNA 含量比间接共培养或对照淋巴细胞中的显著更高的事实一致。

实施例 13

与 TAIC 在体外共培养的淋巴细胞对移植物耐受的体内诱导

实施例 12 所示的结果和结论在体内动物实验中得到了证实。与实施例 3、4、5、6 和 7 中描述的操作不同，所选 LEW→DA 近交组合中的动物未注射 LEW 来源的 TAIC 以诱导耐受，相反，在为期 5 天的时间内，向本实施例中的动物注射来自受体的 DA 淋巴细胞，它事先与来自供体的（LEW）来源的 TAIC 直接共培养，或者它作为对照在培养基中单独培养。

在同种异体心脏移植之前接受自体共培养的 DA 淋巴细胞的动物形成供体特异性耐受，而接受天然未共培养的对照 DA 淋巴细胞的对照动物在 10 到 14 天内剧烈排斥移植的心脏。

这些结果表明供体 TAIC 和受体淋巴细胞之间细胞与细胞的物理相互作用诱导产生调节性 T 细胞，其本身能够修饰受体同系的免疫系统，从而潜在的同种异体反应性 T 细胞得以抑制，并防止了器官排斥。

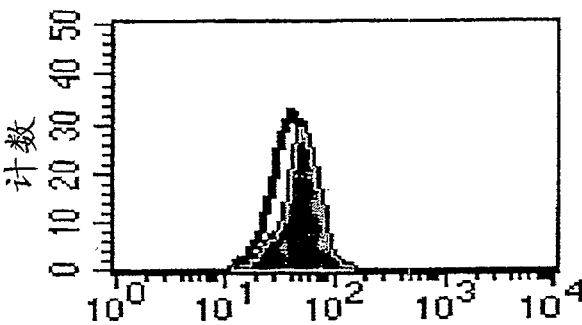


图 1A

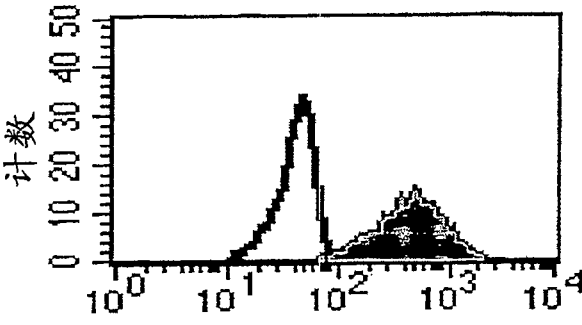


图 1B

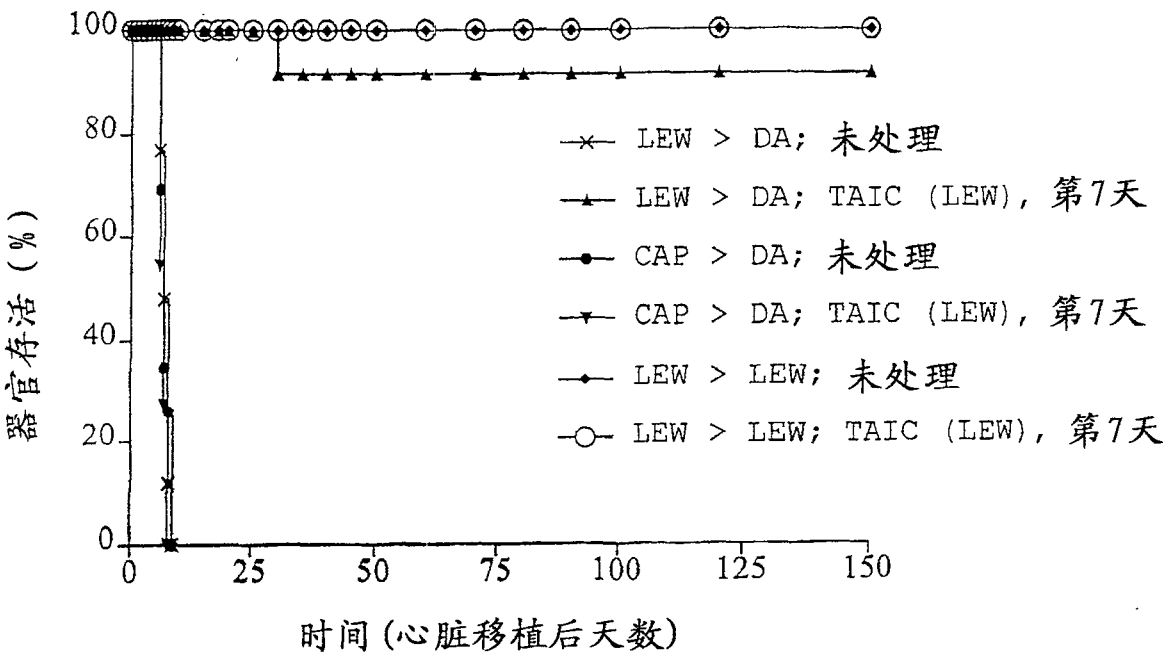


图 2A

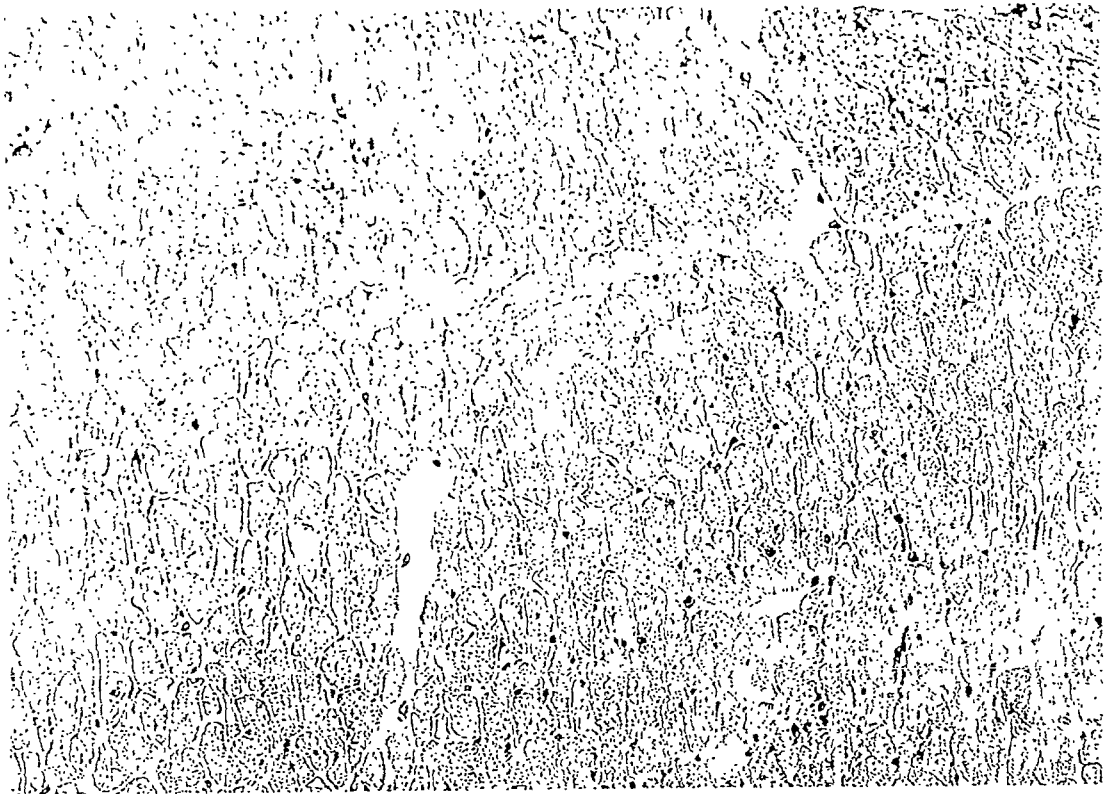


图 2B

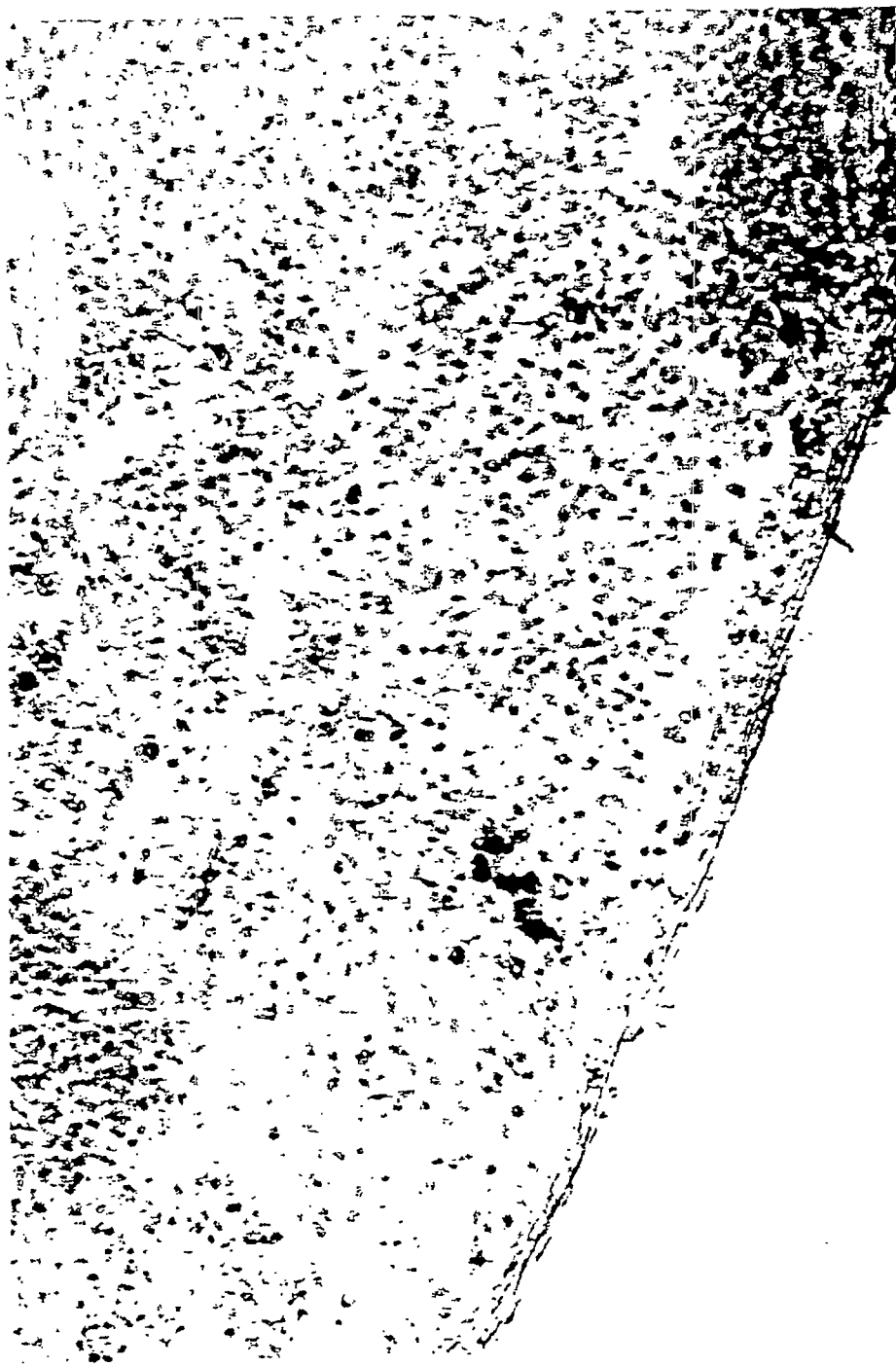


图 2C

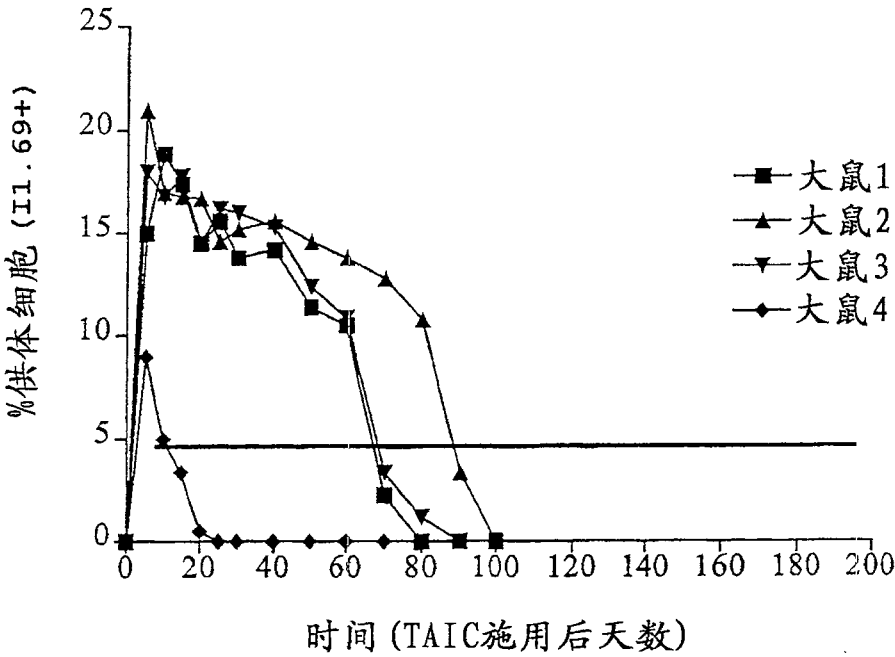


图 2D

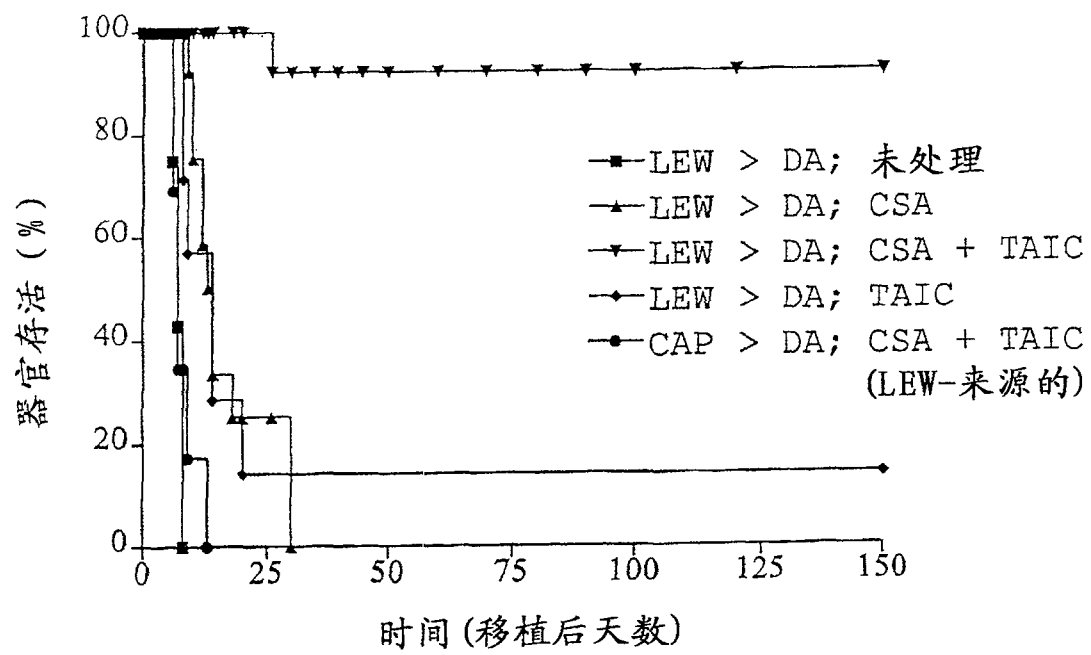


图 3

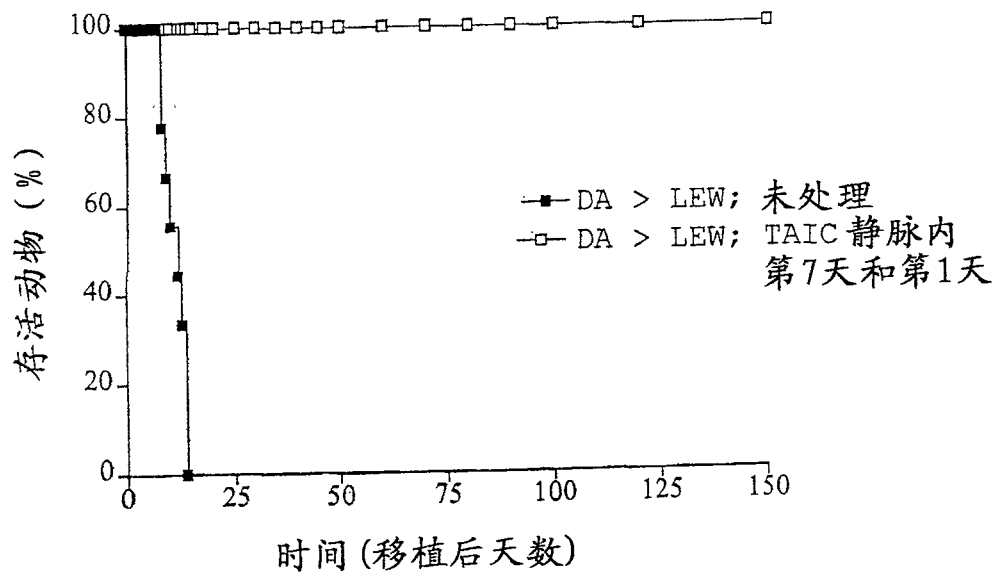


图 4A

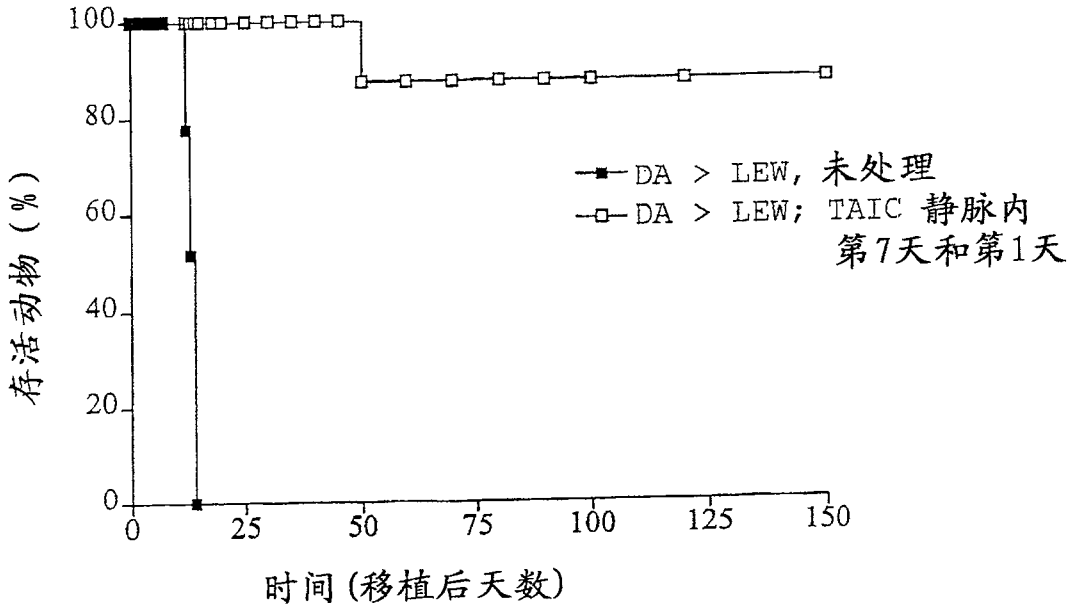


图 4B

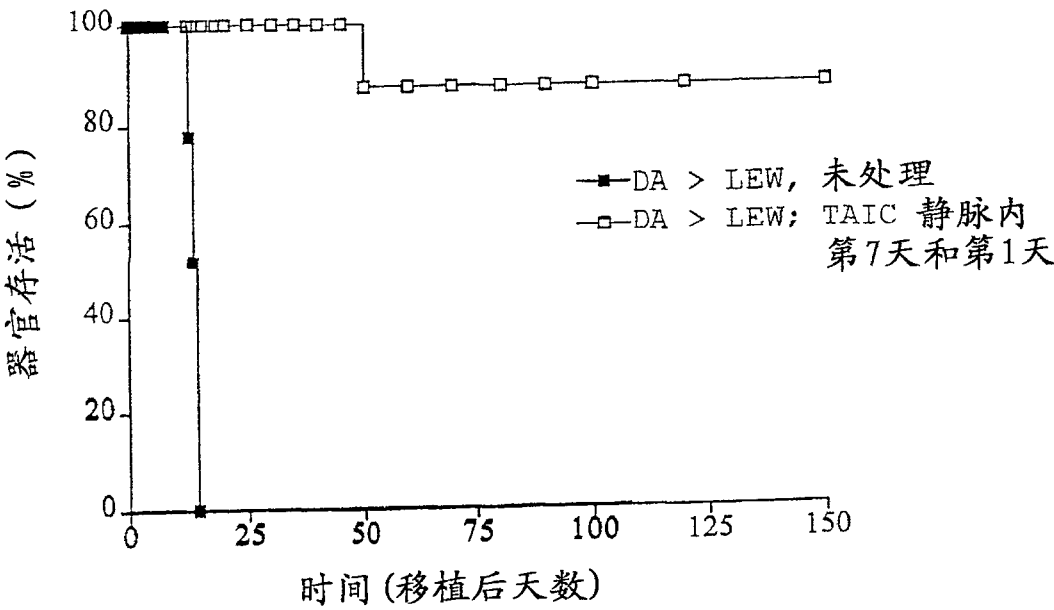
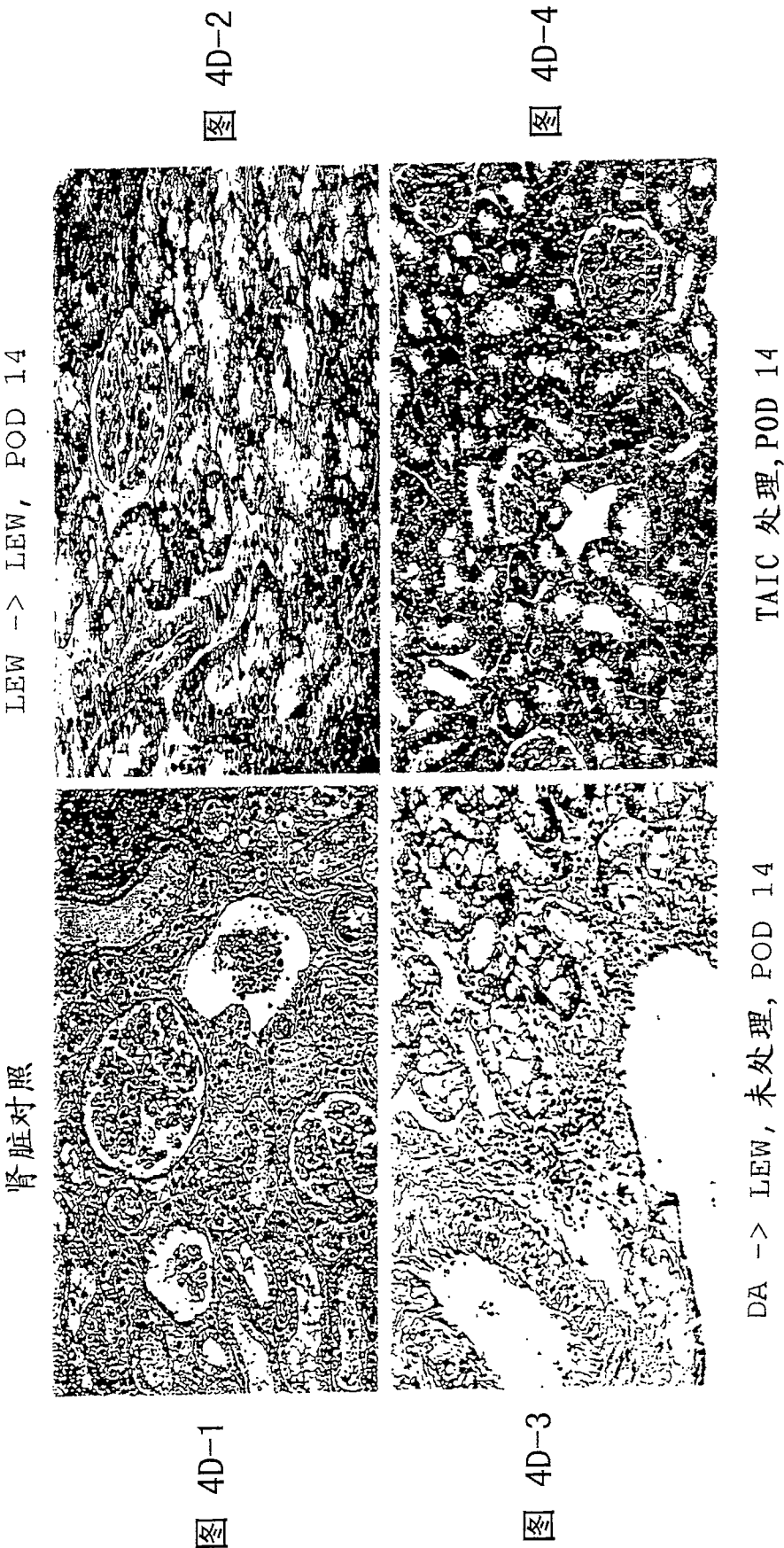


图 4C



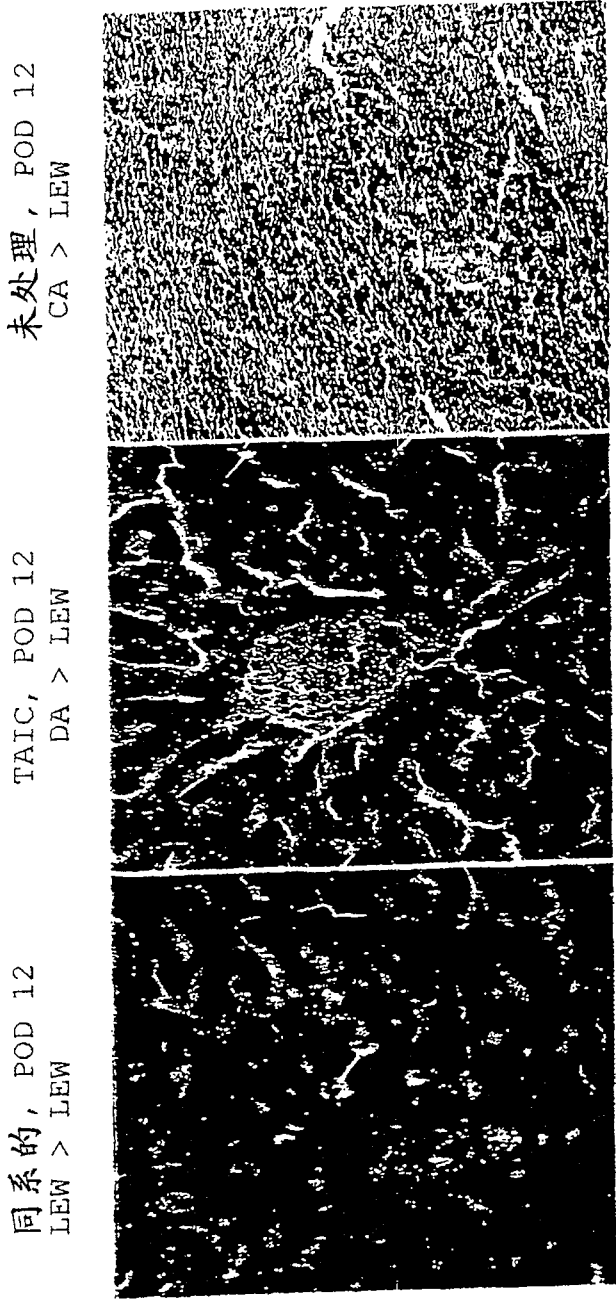


图 4E-1

图 4E-2

图 4E-3



图 4F

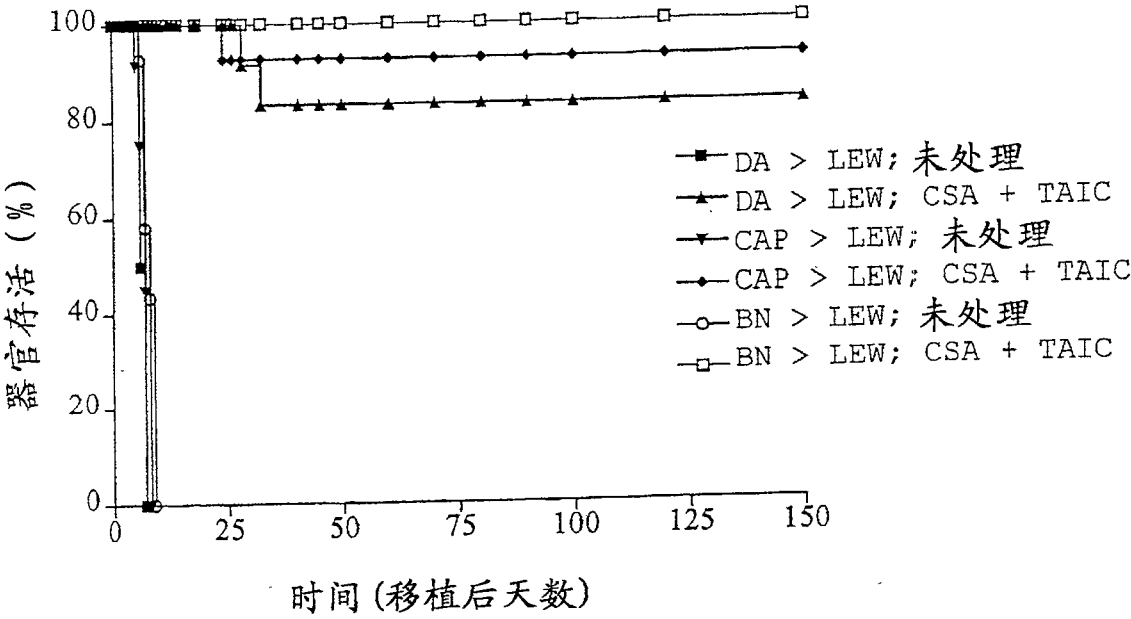


图 5A

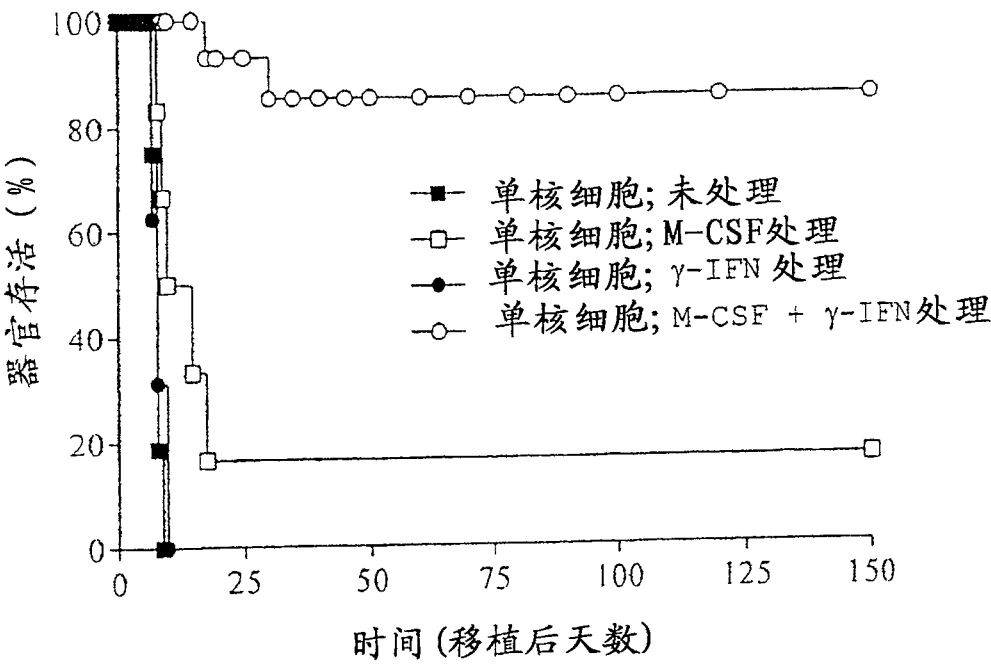


图 5B

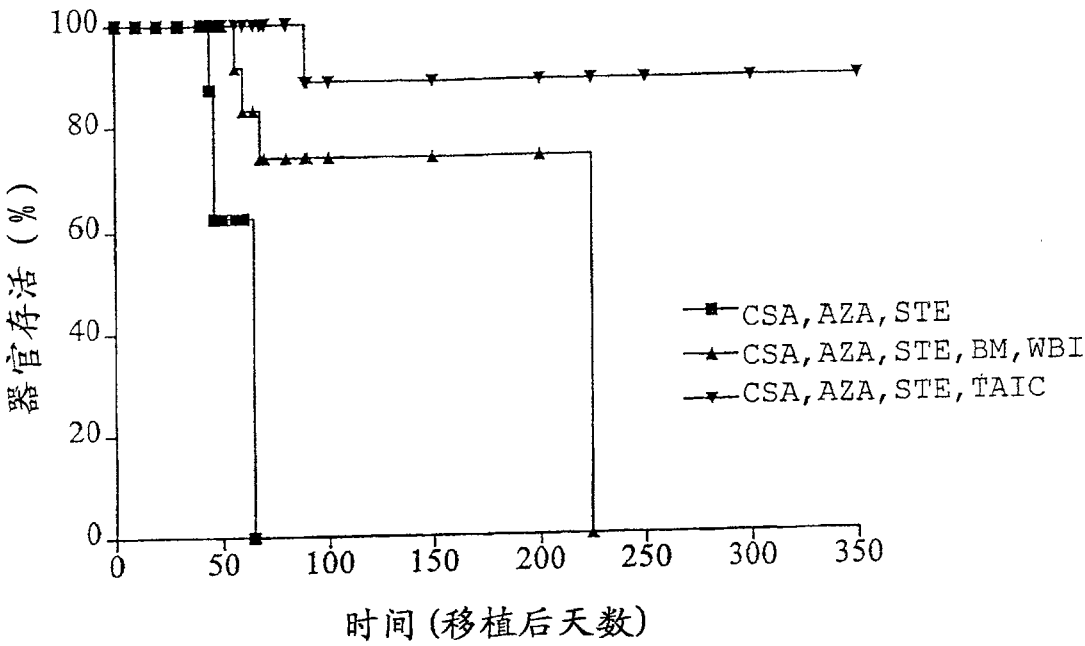


图 6A

TAIC 处理, POD 55



未处理, POD 41



图 6B-2

图 6B-1

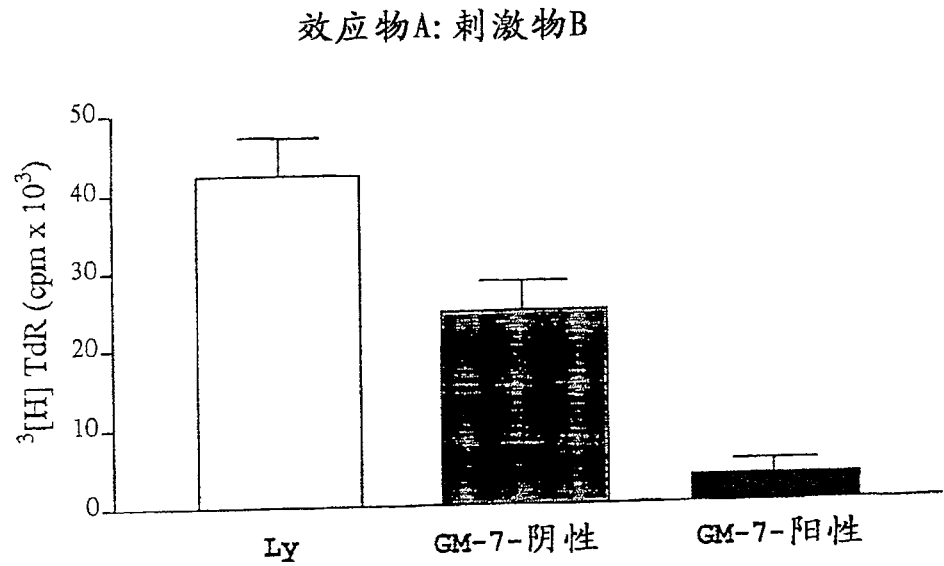


图 7

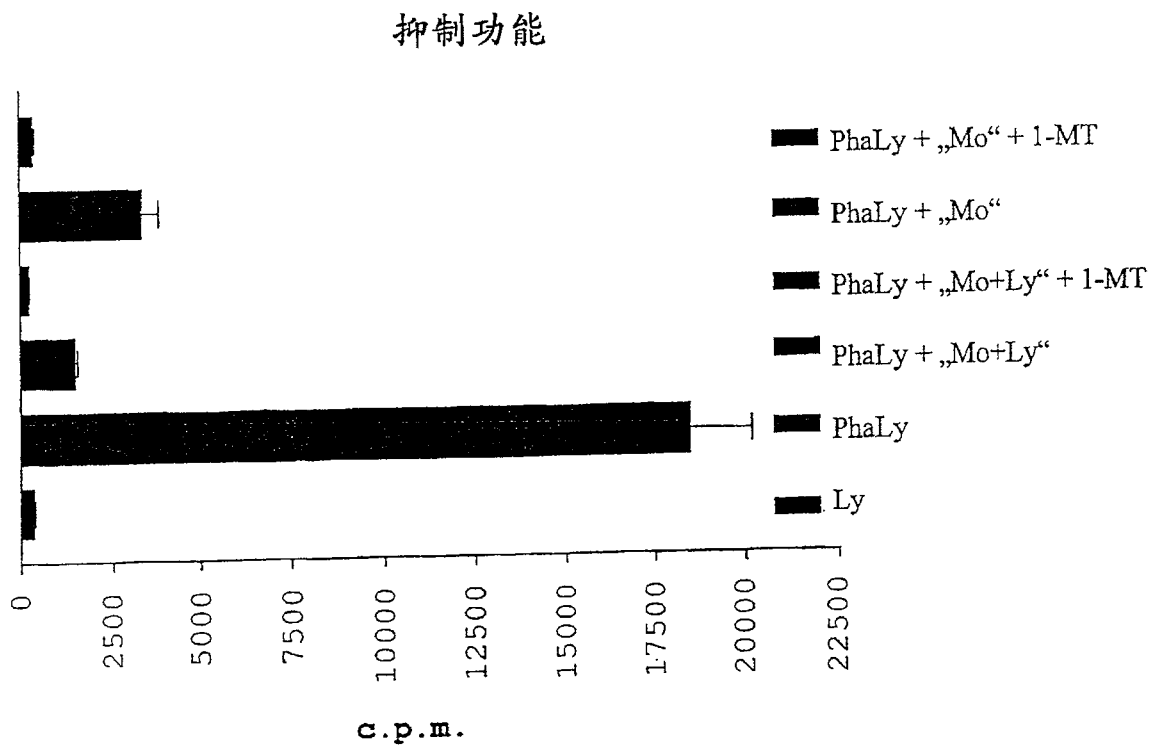


图 8

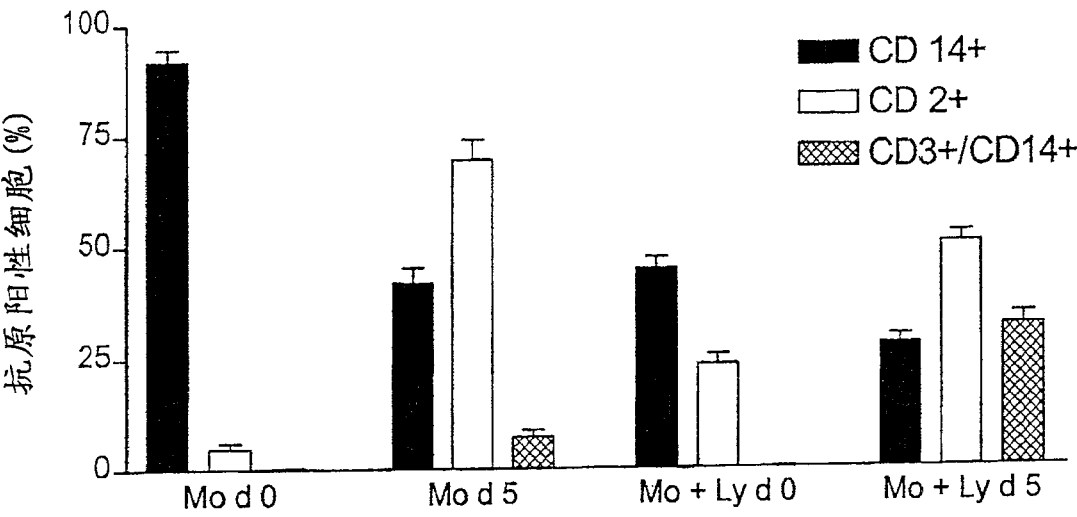


图 9

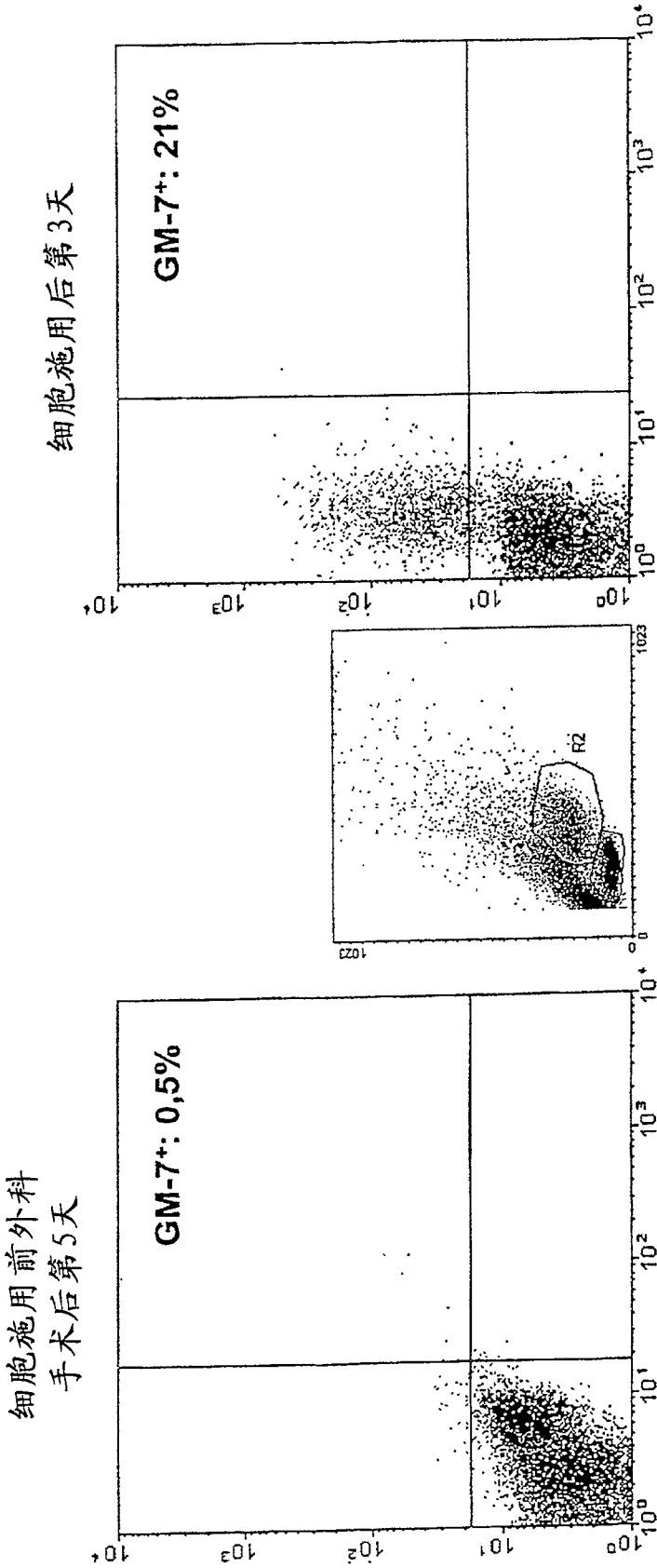


图 10A

图 10C

图 10B