



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112601531 A

(43) 申请公布日 2021.04.02

(21) 申请号 201980054666.6

(22) 申请日 2019.06.21

(30) 优先权数据

2018-119001 2018.06.22 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.02.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/024753 2019.06.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/245038 JA 2019.12.26

(71) 申请人 顺天生化股份有限公司

地址 日本东京都

(72) 发明人 内田浩一郎 竹田和由 奥村康

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/686 (2006.01)

C12Q 1/6876 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

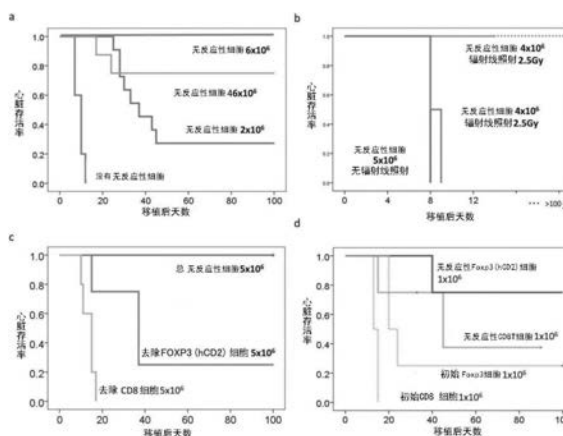
权利要求书4页 说明书43页 附图5页

(54) 发明名称

使用具有复合状态的细胞混合物诱导免疫耐受的抗体、以及所诱导的淋巴细胞、以及使用所诱导的淋巴细胞的细胞治疗剂和治疗法

(57) 摘要

本发明提供用于抗原特异性的免疫耐受或免疫抑制的药物组合物。本发明提供包含CD4阳性无反应性T细胞、及CD8阳性无反应性T细胞的药物组合物。在一些实施方式中,无反应性T细胞是通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抗体而诱导的。在特定的实施方式中,药物组合物可以还包含调节T细胞(例如,FOXP3阳性CD4阳性CD25阳性T细胞)。



1. 一种药物组合物,其包含:
CD4阳性无反应性T细胞、及
CD8阳性无反应性T细胞。
2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中,所述无反应性T细胞是通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子而诱导的。
3. 根据权利要求2所述的药物组合物,其中,所述抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。
4. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中,所述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。
5. 根据权利要求4所述的药物组合物,其中,所述抗体的变体为抗原结合片段。
6. 根据权利要求4所述的药物组合物,其中,所述细胞表面分子的变体为融合蛋白。
7. 根据权利要求3~6中任一项所述的药物组合物,其中,所述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。
8. 根据权利要求7所述的药物组合物,其中,所述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普或贝拉西普。
9. 根据权利要求1~8中任一项所述的药物组合物,其还包含调节T细胞。
10. 根据权利要求1~9中任一项所述的药物组合物,其中,所述调节T细胞为FOXP3阳性CD4阳性CD25阳性。
11. 一种药物组合物,其包含通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子而诱导了无反应性的细胞,该组合物包含CD8阳性细胞,该组合物还包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种以上。
12. 根据权利要求5所述的药物组合物,其包含FOXP3阳性细胞、CD4阳性细胞和CD8阳性细胞的全部。
13. 根据权利要求11或12所述的药物组合物,其中,所述CD8阳性细胞为CD44阳性。
14. 根据权利要求11或12所述的药物组合物,其中,所述CD8阳性细胞为CD45RA阴性且CD45RO阳性。
15. 根据权利要求11~14中任一项所述的药物组合物,其中,所述FOXP3阳性细胞为CD4阳性。
16. 根据权利要求11~15中任一项所述的药物组合物,其中,所述FOXP3阳性细胞为CD25阳性。
17. 根据权利要求1~16中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为用于抗原特异性的免疫耐受或免疫抑制的药物组合物。
18. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中,所述抗体包括抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的组合。
19. 根据权利要求2~18中任一项所述的药物组合物,其中,所述细胞是通过如下步骤而被诱导的细胞,
所述步骤中,将所述抑制因子、源自待检体的细胞、以及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合。

20. 一种药物组合物,其用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,所述药物组合物包含权利要求1~19中任一项所述的组合物。

21. 根据权利要求20所述的药物组合物,其中,所述疾病、障碍或状态选自移植免疫排斥反应、变态反应、自身免疫疾病、移植物抗宿主疾病、由iPS细胞或ES细胞和源自这些细胞的细胞、组织或器官的移植引起的免疫排斥反应组成的组。

22. 根据权利要求21所述的药物组合物,其特征在于,所述移植免疫排斥反应通过移植肾脏、肝脏、心脏、皮肤、肺、胰腺、食道、胃、小肠、大肠、神经、血液、包括免疫系统细胞在内的血细胞、骨、软骨、血管、角膜、眼球或骨髓而产生。

23. 根据权利要求20~22中任一项所述的药物组合物,其中,所述含有抗原的物质为细胞。

24. 一种制造包含细胞的药物的方法,该方法包括如下工序:

(A) 将能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子、源自待检体的细胞、及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合的工序;

(B) 确认通过该混合而得到的细胞产物包含CD8阳性细胞的工序;以及

(C) 确认该细胞产物包含FOXP3阳性和CD4阳性中的至少1种细胞的工序。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中,所述抑制因子选自小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中,所述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述抗体的变体为抗原结合片段。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述细胞表面分子的变体为融合蛋白。

29. 根据权利要求25~28中任一项所述的方法,其中,所述抑制因子选自抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中,所述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普或贝拉西普。

31. 根据权利要求17所述的方法,其中,所述细胞产物中的CD8阳性细胞的存在以及FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的存在表明所述细胞产物能够作为药物使用。

32. 根据权利要求24~31中任一项所述的方法,其中,所述药物用于处置或预防由于源自所述待检体的抗原或并非源自所述待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态。

33. 根据权利要求24~32中任一项所述的方法,其中,所述工序(B)包括通过抗CD8抗体而检测CD8;所述工序(C)包括通过抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体而检测FOXP3和CD4中的至少1种。

34. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述检测通过FACS来实施。

35. 一种管理包含细胞的药物的品质的方法,其中,所述药物用于处置或预防由于源自待检体的细胞所表达的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或

状态,该方法包括如下工序:

(A) 确认该细胞包含CD8阳性细胞的工序;及

(B) 确认该细胞包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的工序。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中,所述工序(A)包括通过抗CD8抗体而检测CD8;所述工序(B)包括通过抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体而检测FOXP3和CD4中的至少1种。

37. 根据权利要求36所述的方法,其特征在于,所述检测通过FACS、蛋白质印迹或PCR来实施。

38. 一种组合物,其为用于制造权利要求1~23中任一项所述的药物组合物的、包含抑制因子的组合物,该抑制因子是能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子。

39. 根据权利要求38所述的组合物,其中,所述抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。

40. 根据权利要求39所述的组合物,其中,所述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。

41. 根据权利要求40所述的组合物,其中,所述抗体的变体为抗原结合片段。

42. 根据权利要求40所述的组合物,其中,所述细胞表面分子的变体为融合蛋白。

43. 根据权利要求39~42中任一项所述的组合物,其中,所述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。

44. 根据权利要求43所述的组合物,其中,所述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普或贝拉西普。

45. 一种试剂盒,其用于制造包含细胞混合物的药物,该试剂盒包括:

(A) 能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子;

(B) 用于检测CD8的单元;及

(C) 用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元。

46. 根据权利要求45所述的试剂盒,其中,所述抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。

47. 根据权利要求46所述的试剂盒,其中,所述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中,所述抗体的变体为抗原结合片段。

49. 根据权利要求47所述的方法,其中,所述细胞表面分子的变体为融合蛋白。

50. 根据权利要求46~49中任一项所述的试剂盒或方法,其中,所述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。

52. 根据权利要求51所述的试剂盒或方法,其中,所述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普或贝拉西普。

53. 根据权利要求45~52中任一项所述的试剂盒,其中,所述细胞混合物中的CD8阳性细胞的存在以及FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的存在表明所述细胞混合物能够作为药物使用。

54. 根据权利要求45~53中任一项所述的试剂盒,其中,所述药物用于处置或预防由于源自所述待检体的抗原或并非源自所述待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态。

55. 一种试剂盒,其用于管理包含细胞的药物的品质,其中,所述药物用于处置或预防由于源自待检体的细胞所表达的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,该试剂盒包括:

(A) 用于检测CD8的单元;及

(B) 用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元。

56. 根据权利要求45~55中任一项所述的试剂盒,其中,所述用于检测CD8的单元包含抗CD8抗体,用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元包含抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体。

57. 根据权利要求56所述的试剂盒,其特征在于,所述检测通过FACS、蛋白质印迹或PCR来进行。

使用具有复合状态的细胞混合物诱导免疫耐受的抗体、以及 所诱导的淋巴细胞、以及使用所诱导的淋巴细胞的细胞治疗 剂和治疗法

技术领域

[0001] 本发明涉及关于免疫耐受的新技术。更具体而言,本发明涉及包含无反应性T细胞的药物组合物、该药物组合物的制造、及该药物组合物的品质管理。

背景技术

[0002] 肝脏移植已被广泛用作对晚期肝衰竭患者的最终疗法。每年在日本境外有20000以上的病例,在日本有超过500的病例。

[0003] 移植是针对晚期的肾脏、心脏、肝脏、胰腺的器官衰竭所选择的主要处置方法之一,尽管近些年在移植排斥反应的处置方面取得了显著进步,但大部分移植在没有免疫抑制方案的情况下最终会被排斥。对于依赖于连续药物疗法的目前的免疫抑制方案而言,药物不仅抑制明显针对移植的反应,还抑制所有的免疫反应,因此使器官移植患者更容易产生对于传染病、癌症的敏感性的增加。

[0004] 尽管再生医疗也引起了关注,但即使使用诱导多能干细胞(iPS细胞)等,只要最终不是自体细胞就可能发生免疫排斥反应,因此免疫耐受的技术受到关注。

[0005] 作为该诱导免疫耐受的技术,有诱导T细胞的抗原特异性免疫无应答(无反应性)。具体而言,报道了:向器官移植患者直接给予抑制抗原呈递细胞上的CD80/CD86与未活化(初始)T细胞上的CD28的相互作用的抗体,从而在生物体内诱导供体抗原特异性无反应性的技术(专利文献1);通过在相同抗体的存在下对受体细胞和经辐射线照射的供体细胞进行共培养,从而在体外诱导供体抗原特异性无反应性细胞并返回至受体的技术(专利文献2、专利文献3和非专利文献1~3)。

[0006] 非专利文献1中报道了:在体外诱导供体抗原特异性无反应性细胞并返回至受体的技术中,即使去除CD8阳性细胞,也几乎不影响免疫抑制。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本特表2002-504120号公报

[0010] 专利文献2:日本特表2007-131598号公报

[0011] 专利文献3:日本特表2016-520081号公报

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献1:Satoru Todo et al.Hepatorogy,64(vol.2)、632-643(2016)

[0014] 非专利文献2:Teraoka S,Koyama I,Bashuda H,Uchida K,Tonsho M,et al.(2017) J Transplant Res 2(1)p1-8

[0015] 非专利文献3:Bashuda H et al.,J.Clin.Invest.115:1896-1902(2005)。

发明内容

[0016] 用于解决问题的方案

[0017] 本发明人等首次发现:即使使用抑制CD80/CD86与CD28的相互作用的抗体等抑制因子而诱导了T细胞的无反应性,诱导了无反应性的T细胞的混合物中不存在CD8阳性细胞的情况与存在CD8阳性细胞的情况相比,诱导免疫耐受的能力显著降低。本发明人等发现,CD8阳性细胞对诱导免疫耐受而言发挥了重要作用。

[0018] 因此,本发明提供以下方案。

[0019] (1) 一种药物组合物,其包含CD4阳性无反应性T细胞、及CD8阳性无反应性T细胞。

[0020] (2) 根据上述项目所述的药物组合物,其中,前述无反应性T细胞通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子而诱导。

[0021] (3) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。

[0022] (4) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。

[0023] (5) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述抗体的变体为抗原结合片段。

[0024] (6) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述细胞表面分子的变体为融合蛋白。

[0025] (7) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。

[0026] (8) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(abatacept)或贝拉西普(belatacept)。

[0027] (9) 根据项目1~8中任一项所述的药物组合物,其还包含调节T细胞。

[0028] (10) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述调节T细胞为FOXP3阳性CD4阳性CD25阳性。

[0029] (11) 一种药物组合物,其包含通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子而诱导了无反应性的细胞,该组合物包含CD8阳性细胞,该组合物还包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种以上。

[0030] (12) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其包含FOXP3阳性细胞、CD4阳性细胞和CD8阳性细胞的全部。

[0031] (13) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述CD8阳性细胞为CD44阳性。

[0032] (14) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述CD8阳性细胞为CD45RA阴性且CD45RO阳性。

[0033] (15) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述FOXP3阳性细胞为CD4阳性。

[0034] (16) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述FOXP3阳性细胞为CD25阳性。

[0035] (17) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述药物组合物为用于抗原特异性的免疫耐受或免疫抑制的药物组合物。

[0036] (18) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述抗体包括抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的组合。

[0037] (19) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述细胞是通过如下步骤而被诱导的细胞,所述步骤中,将前述抑制因子、源自待检体的细胞、以及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合。

[0038] (20) 一种药物组合物,其用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,其包含上述项目中任一项所述的组合物。

[0039] (21) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述疾病、障碍或状态选自由移植免疫排斥反应、变态反应、自身免疫疾病、移植物抗宿主疾病、由iPS细胞或ES细胞和源自这些细胞的细胞、组织或器官的移植引起的免疫排斥反应组成的组。

[0040] (22) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其特征在于,前述移植免疫排斥反应通过移植肾脏、肝脏、心脏、皮肤、肺、胰腺、食道、胃、小肠、大肠、神经、血液、包括免疫系统细胞在内的血细胞、骨、软骨、血管、角膜、眼球或骨髓而产生。

[0041] (23) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,前述含有抗原的物质为细胞。

[0042] (24) 一种制造包含细胞的药物的方法,该方法包括如下工序:

[0043] (A) 将能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子、源自待检体的细胞、及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合的工序;

[0044] (B) 确认通过该混合而得到的细胞产物包含CD8阳性细胞的工序;以及

[0045] (C) 确认该细胞产物包含FOXP3阳性和CD4阳性中的至少1种细胞的工序。

[0046] (25) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。

[0047] (26) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。

[0048] (27) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述抗体的变体为抗原结合片段。

[0049] (28) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述细胞表面分子的变体为融合蛋白。

[0050] (29) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。

[0051] (30) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(abatacept)或贝拉西普(belatacept)。

[0052] (31) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述细胞产物中的CD8阳性细胞的存在以及FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的存在表明前述细胞产物能够作为药物使用。

[0053] (32) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述药物用于处置或预防由于源自前述待检体的抗原或并非源自前述待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态。

[0054] (33) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述工序(B)包括通过抗CD8抗体而检测CD8;前述工序(C)包括通过抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体而检测FOXP3和CD4中的至少1种。

[0055] (34) 根据上述项目中任一项所述的方法,其特征在于,前述检测通过FACS来实施。

[0056] (35) 一种管理包含细胞的药物的品质的方法,其中,所述药物用于处置或预防由于源自待检体的细胞所表达的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,该方法包括如下工序:(A) 确认该细胞包含CD8阳性细胞的工序;及(B) 确认该细胞包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的工序。

[0057] (36) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述工序(A)包括通过抗CD8抗体而检测CD8;前述工序(B)包括通过抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体而检测FOXP3和CD4中的至少1种。

[0058] (37) 根据上述项目中任一项所述的方法,其特征在于,前述检测通过FACS、蛋白质印迹或PCR来实施。

[0059] (38) 一种组合物,其为用于制造上述项目中任一项所述的药物组合物的、包含抑制因子的组合物,该抑制因子是能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子。

[0060] (39) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。

[0061] (40) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。

[0062] (41) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述抗体的变体为抗原结合片段。

[0063] (42) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述细胞表面分子的变体为融合蛋白。

[0064] (43) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。

[0065] (44) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(abatacept)或贝拉西普(belatacept)。

[0066] (45) 一种试剂盒,其用于制造包含细胞混合物的药物,该试剂盒包括:(A) 能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子;(B) 用于检测CD8的单元;及(C) 用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元。

[0067] (46) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其中,前述抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。

[0068] (47) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其中,前述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。

[0069] (48) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述抗体的变体为抗原结合片段。

[0070] (49) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述细胞表面分子的变体为融合蛋白。

[0071] (50) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒或方法,其中,前述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。

[0072] (52) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒或方法,其中,前述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(abatacept)或贝拉西普(belatacept)。

[0073] (53) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其中,前述细胞混合物中的CD8阳性细胞的存在以及FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的存在表明前述细胞混合物能够作为药物使用。

[0074] (54) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其中,前述药物用于处置或预防由于源自前述待检体的抗原或并非源自前述待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态。

[0075] (55) 一种试剂盒,其用于管理包含细胞的药物的品质,其中,所述药物用于处置或预防由于源自待检体的细胞所表达的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,该试剂盒包括:(A) 用于检测CD8的单元;和(B) 用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元。

[0076] (56) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其中,前述用于检测CD8的单元包含抗CD8抗体,用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元包含抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体。

[0077] (57) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其特征在于,前述检测通过FACS、蛋白质印迹或PCR来进行。

[0078] (B1) 一种药物组合物,其用于与CD4阳性无反应性细胞一起使用来诱发免疫耐受,其包含CD8阳性无反应性T细胞。

[0079] (B2) 根据项目B1所述的药物组合物,其还包含上述项目1~57或其它项目中任一项所示的1个或多个特征。

[0080] (C1) 一种药物组合物,其用于与CD8阳性无反应性细胞一起使用来诱发免疫耐受,其包含CD4阳性无反应性T细胞。

[0081] (C2) 根据项目B1所述的药物组合物,其还包含上述项目1~57或其它项目中任一项所示的1个或多个特征。

[0082] (D1) 一种处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态的方法,所述方法包括如下工序:以有效量向该待检体给予CD4阳性无反应性T细胞及CD8阳性无反应性T细胞的工序。

[0083] (D2) 根据上述项目所述的方法,其中,前述无反应性T细胞是通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抗体而诱导的。

[0084] (D3) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。

[0085] (D4) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。

- [0086] (D5) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述抗体的变体为抗原结合片段。
- [0087] (D6) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述细胞表面分子的变体为融合蛋白。
- [0088] (D7) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。
- [0089] (D8) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(abatacept)或贝拉西普(belatacept)。
- [0090] (D9) 根据项目1~8中任一项所述的药物组合物,其还包括给予调节T细胞的工序。
- [0091] (D10) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述调节T细胞为FOXP3阳性CD4阳性CD25阳性。
- [0092] (D11) 一种处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态的方法,该方法包括如下工序:以有效量向该待检体给予通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子而诱导了无反应性的细胞的工序,该诱导了无反应性的细胞包含CD8阳性细胞,该诱导了无反应性的细胞还包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种以上。
- [0093] (D12) 根据上述项目中任一项所述的方法,其包含FOXP3阳性细胞、CD4阳性细胞和CD8阳性细胞的全部。
- [0094] (D13) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述CD8阳性细胞为CD44阳性。
- [0095] (D14) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述CD8阳性细胞为CD45RA阴性且CD45RO阳性。
- [0096] (D15) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述FOXP3阳性细胞为CD4阳性。
- [0097] (D16) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述FOXP3阳性细胞为CD25阳性。
- [0098] (D17) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述诱导了无反应性的细胞诱发抗原特异性的免疫耐受或免疫抑制。
- [0099] (D18) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述抗体包括抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的组合。
- [0100] (D19) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述细胞是通过如下步骤而被诱导的细胞,所述步骤中,将前述抑制因子、源自待检体的细胞、以及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合。
- [0101] (D20) 一种用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态的方法,所述方法包含上述项目中任一项所述的组合物。
- [0102] (D21) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述疾病、障碍或状态选自由移植免疫排斥反应、变态反应、自身免疫疾病、移植物抗宿主疾病、由iPS细胞或ES细胞和源自这些细胞的细胞、组织或器官的移植引起的免疫排斥反应组成的组。
- [0103] (D22) 根据上述项目中任一项所述的方法,其特征在于,前述移植免疫排斥反应通过移植肾脏、肝脏、心脏、皮肤、肺、胰腺、食道、胃、小肠、大肠、神经、血液、包括免疫系统细胞在内的血细胞、骨、软骨、血管、角膜、眼球或骨髓而产生。

- [0104] (D23) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述含有抗原的物质为细胞。
- [0105] (E1) 一种CD4阳性无反应性T细胞和CD8阳性无反应性T细胞在制造用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态的药物中的应用。
- [0106] (E2) 根据上述项目所述的应用,其中,前述无反应性T细胞是通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抗体而诱导的。
- [0107] (E3) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。
- [0108] (E4) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。
- [0109] (E5) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述抗体的变体为抗原结合片段。
- [0110] (E6) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述细胞表面分子的变体为融合蛋白。
- [0111] (E7) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。
- [0112] (E8) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(abatacept)或贝拉西普(belatacept)。
- [0113] (E9) 根据项目1~8中任一项所述的应用,其中,前述CD4阳性无反应性T细胞和CD8阳性无反应性T细胞还包含调节T细胞。
- [0114] (E10) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述调节T细胞为FOXP3阳性CD4阳性CD25阳性。
- [0115] (E11) 一种诱导了无反应性的细胞在制造用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态的药物中的应用,所述细胞是通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子而诱导无反应性的,该诱导了无反应性的细胞包含CD8阳性细胞,该诱导了无反应性的细胞包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种以上。
- [0116] (E12) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述诱导了无反应性的细胞包含FOXP3阳性细胞、CD4阳性细胞和CD8阳性细胞的全部。
- [0117] (E13) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述CD8阳性细胞为CD44阳性。
- [0118] (E14) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述CD8阳性细胞为CD45RA阴性且CD45RO阳性。
- [0119] (E15) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述FOXP3阳性细胞为CD4阳性。
- [0120] (E16) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述FOXP3阳性细胞为CD25阳性。
- [0121] (E17) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述诱导了无反应性的细胞诱发抗原特异性的免疫耐受或免疫抑制。
- [0122] (E18) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述抗体包括抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的组合。
- [0123] (E19) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述诱导了无反应性的细胞是通

过如下步骤而被诱导的细胞,所述步骤中,将前述抑制因子、源自待检体的细胞、以及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合。

[0124] (E20) 一种包含上述项目中任一项所述的组合物在用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态中的应用。

[0125] (E21) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述疾病、障碍或状态选自移植免疫排斥反应、变态反应、自身免疫疾病、移植物抗宿主疾病、由iPS细胞或ES细胞和源自这些细胞的细胞、组织或器官的移植引起的免疫排斥反应组成的组。

[0126] (E22) 根据上述项目中任一项所述的应用,其特征在于,前述移植免疫排斥反应通过移植肾脏、肝脏、心脏、皮肤、肺、胰腺、食道、胃、小肠、大肠、神经、血液、包括免疫系统细胞在内的血细胞、骨、软骨、血管、角膜、眼球或骨髓而产生。

[0127] (E23) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述含有抗原的物质为细胞。

[0128] (F1) 一种CD4阳性无反应性T细胞和CD8阳性无反应性T细胞的细胞混合物,其用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态。

[0129] (F2) 根据上述项目所述的细胞混合物,其中,前述无反应性T细胞是通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抗体而诱导的。

[0130] (F3) 根据上述项目中任一项所述的细胞混合物,其中,前述抑制因子选自小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。

[0131] (F4) 根据上述项目中任一项所述的细胞混合物,其中,前述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。

[0132] (F5) 根据上述项目中任一项所述的细胞混合物,其中,前述抗体的变体为抗原结合片段。

[0133] (F6) 根据上述项目中任一项所述的细胞混合物,其中,前述细胞表面分子的变体为融合蛋白。

[0134] (F7) 根据上述项目中任一项所述的细胞混合物,其中,前述抑制因子选自抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。

[0135] (F8) 根据上述项目中任一项所述的细胞混合物,其中,前述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(abatacept)或贝拉西普(belatacept)。

[0136] (F9) 根据项目1~8中任一项所述的细胞混合物,其还包含调节T细胞。

[0137] (F10) 根据上述项目中任一项所述的细胞混合物,其中,前述调节T细胞为FOXP3阳性CD4阳性CD25阳性。

[0138] (F11) 一种诱导了无反应性的细胞,其是通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子而诱导无反应性的,其用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,该诱导了无反应性的细胞包含CD8阳性细胞,该诱导了无反应性的细胞包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种以上。

[0139] (F12) 根据上述项目中任一项所述的诱导了无反应性的细胞,其包含FOXP3阳性细胞、CD4阳性细胞和CD8阳性细胞的全部。

[0140] (F13) 根据上述项目中任一项所述的诱导了无反应性的细胞,其中,前述CD8阳性细胞为CD44阳性。

[0141] (F14) 根据上述项目中任一项所述的诱导了无反应性的细胞,其中,前述CD8阳性细胞为CD45RA阴性且CD45RO阳性。

[0142] (F15) 根据上述项目中任一项所述的诱导了无反应性的细胞,其中,前述FOXP3阳性细胞为CD4阳性。

[0143] (F16) 根据上述项目中任一项所述的应用,其中,前述FOXP3阳性细胞为CD25阳性。

[0144] (F17) 根据上述项目中任一项所述的诱导了无反应性的细胞,其诱发抗原特异性的免疫耐受或免疫抑制。

[0145] (F18) 根据上述项目中任一项所述的诱导了无反应性的细胞,其中,前述抗体包括抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的组合。

[0146] (F19) 根据上述项目中任一项所述的诱导了无反应性的细胞,其中,前述诱导了无反应性的细胞是通过如下步骤而被诱导的细胞,所述步骤中,将前述抑制因子、源自待检体的细胞、以及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合。

[0147] (F20) 一种诱导了无反应性的细胞,其用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,其包含上述项目中任一项所述的组合物。

[0148] (F21) 根据上述项目中任一项所述的诱导了无反应性的细胞,其中,前述疾病、障碍或状态选自由移植免疫排斥反应、变态反应、自身免疫疾病、移植物抗宿主疾病、由iPS细胞或ES细胞和源自这些细胞的细胞、组织或器官的移植引起的免疫排斥反应组成的组。

[0149] (F22) 根据上述项目中任一项所述的诱导了无反应性的细胞,其特征在于,前述移植免疫排斥反应通过移植肾脏、肝脏、心脏、皮肤、肺、胰腺、食道、胃、小肠、大肠、神经、血液、包括免疫系统细胞在内的血细胞、骨、软骨、血管、角膜、眼球或骨髓而产生。

[0150] (F23) 根据上述项目中任一项所述的诱导了无反应性的细胞,其中,前述含有抗原的物质为细胞。

[0151] 本发明还提供以下方案。

[0152] (G1) 一种药物组合物,其包含:CD4阳性无反应性T细胞、及

[0153] CD8阳性无反应性T细胞。

[0154] (G2) 根据上述项目所述的组合物,其中,前述无反应性T细胞是通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抗体而诱导的。

[0155] (G3) 根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其还包含调节T细胞。

[0156] (G4) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述调节T细胞为FOXP3阳性CD4阳性CD25阳性。

[0157] (G5) 一种组合物,其为包含通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抗体而诱导了无反应性的细胞的药物组合物,该组合物包含CD8阳性细胞,该组合物还包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种以上。

[0158] (G6) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,包含FOXP3阳性细胞、CD4阳性细胞和CD8阳性细胞的全部。

- [0159] (G7) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述CD8阳性细胞为CD44阳性。
- [0160] (G8) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述FOXP3阳性细胞为CD4阳性。
- [0161] (G9) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述FOXP3阳性细胞为CD25阳性。
- [0162] (G10) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述药物组合物用于抗原特异性的免疫耐受或免疫抑制。
- [0163] (G11) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述抗体包括抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的组合。
- [0164] (G12) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述细胞是通过如下步骤而被诱导的细胞,所述步骤中,将前述抗体、源自待检体的细胞、及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合。
- [0165] (G13) 一种药物组合物,其用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,其包含项目G1~G12中任一项所述的组合物。
- [0166] (G14) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述疾病、障碍或状态选自由移植免疫排斥反应、变态反应、自身免疫疾病、移植物抗宿主疾病、由iPS细胞或ES细胞和源自这些细胞的细胞、组织或器官的移植引起的免疫排斥反应组成的组。
- [0167] (G15) 根据项目G14所述的组合物,其特征在于,前述移植免疫排斥反应通过移植肾脏、肝脏、心脏、皮肤、肺、胰腺、食道、胃、小肠、大肠、神经、血液、包括免疫系统细胞在内的血细胞、骨、软骨、血管、角膜、眼球或骨髓而产生。
- [0168] (G16) 根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,前述含有抗原的物质为细胞。
- [0169] (G17) 抑制制造包含细胞的药物的方法,该方法包括如下工序:
- [0170] (A) 将能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抗体、源自待检体的细胞、及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合的工序;
- [0171] (B) 确认通过该混合而得到的细胞产物包含CD8阳性细胞的工序;以及
- [0172] (C) 确认该细胞产物包含FOXP3阳性和CD4阳性中的至少1种细胞的工序。
- [0173] (G18) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述细胞产物中的CD8阳性细胞的存在以及FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的存在表明前述细胞产物能够作为药物使用。
- [0174] (G19) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述药物用于处置或预防由于源自前述待检体的抗原或并非源自前述待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态。
- [0175] (G20) 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,前述工序(B) 包括通过抗CD8抗体而检测CD8;前述工序(C) 包括通过抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体而检测FOXP3和CD4中的至少1种。
- [0176] (G21) 根据上述项目中任一项所述的方法,其特征在于,前述检测通过FACS来实施。
- [0177] (G22) 一种管理包含细胞的药物的品质的方法,其中,所述药物用于处置或预防由于源自待检体的细胞所表达的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、

障碍或状态,该方法包括如下工序:

[0178] (A) 确认该细胞包含CD8阳性细胞的工序;及

[0179] (B) 确认该细胞包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的工序。

[0180] (G23) 根据项目G22所述的方法,其中,前述工序(A)包括通过抗CD8抗体而检测CD8,前述工序(B)包括通过抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体来检测FOXP3和CD4中的至少1种。

[0181] (G24) 根据上述项目中任一项所述的方法,其特征在于,前述检测通过FACS、蛋白质印迹或PCR来实施。

[0182] (G25) 一种试剂盒,其用于制造包含细胞混合物的药物,该试剂盒包括:

[0183] (A) 能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抗体;

[0184] (B) 用于检测CD8的单元;及

[0185] (C) 用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元。

[0186] (G25A) 一种试剂盒,其用于管理包含细胞混合物的药物的品质,该试剂盒包含:

[0187] (A) 用于检测CD8的单元;及

[0188] (B) 用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元。

[0189] (G26) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其中,前述细胞混合物中的CD8阳性细胞的存在以及FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的存在表明前述细胞混合物能够作为药物使用。

[0190] (G27) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其中,前述药物用于处置或预防由于源自前述待检体的抗原或并非源自前述待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态。

[0191] (项目G27A) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其中,前述药物是利用免疫耐受来进行处置或预防的。

[0192] (G28) 一种试剂盒,其用于管理包含细胞的药物的品质,所述药物用于处置或预防由于源自待检体的细胞所表达的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,该试剂盒包括:

[0193] (A) 用于检测CD8的单元;及

[0194] (B) 用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元。

[0195] (G29) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其中,前述用于检测CD8的单元包含抗CD8抗体,用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元包含抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体。

[0196] (G30) 根据上述项目中任一项所述的试剂盒,其特征在于,前述检测通过FACS、蛋白质印迹或PCR来进行。

[0197] 本发明中,上述一个或多个特征除了明确示出的组合之外,可有意识地进一步组合来提供。本领域技术人员若根据需要阅读理解以下详细的说明,则可认识到本发明的进一步的实施方式和优点。

[0198] 发明的效果

[0199] 本发明的组合物包含CD4阳性无反应性T细胞和CD8阳性无反应性T细胞,具有比不包含CD8阳性无反应性T细胞者更高的免疫耐受诱导能力。另外,在用于诱导免疫耐受的药

物的制造中,可以以CD8阳性细胞作为指标来管理药物的品质。

附图说明

[0200] 图1是示出鉴定用于诱发免疫耐受所需的成分的功能丧失试验(loss of function assay)的结果。(i) 无反应性细胞的生成:从C57BL6(以下简记为B6)小鼠和BALB/c小鼠中摘取脾脏,得到脾细胞(淋巴细胞)。然后,对成为刺激物的BALB/c脾细胞照射辐射线(γ 射线)30Gy后,以1:1与B6来源脾细胞混合,添加抗CD80抗体和抗CD86抗体以使各自的最终浓度为10 μ g/mL,在适合的体积的培养液中在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂恒温箱中开始进行培养。在培养开始后第7天通过离心分离去除培养液后,在与培养开始时相同的条件下重新添加包含BALB/c来源的辐射线照射脾细胞和抗CD80抗体/抗CD86抗体的培养液。在培养第14天回收细胞而得到无反应性细胞。(ii) 各细胞表型的筛选:使PE荧光标记抗CD8抗体与得到的无反应性细胞反应后,通过使用了抗PE磁珠的自动磁性细胞分离装置(auto-MACS),将细胞筛选为CD8阳性和CD8阴性。另外,使用PE荧光标记CD19抗体进行同样的操作,将细胞筛选为CD19阳性和CD19阴性。进而,为了能够通过细胞表面抗原的表达而识别表达FOXP3的调节T细胞(regT细胞),使用以应答细胞同时表达FoxP3和人CD2的方式进行了基因改造的B6来源小鼠,通过使用了PE荧光标记抗人CD2抗体和抗PE磁珠的auto-MACS,筛选为人CD2阳性细胞(FoxP3表达regT细胞)和人CD2阴性细胞,用于免疫反应抑制能力试验。(iii) 免疫反应抑制能力试验:将新采集的B6小鼠来源的脾细胞用作效应器,另外,将新采集的BALB/c小鼠的脾细胞用作刺激物,在96孔板的各孔中以200 μ L的体积制作以1:1的比率包含各细胞的混合培养物(每孔的各细胞数为 1×10^5 个)。以应答B6脾细胞的细胞数相对于该混合培养物的比率为1、1/2、1/4、1/8或1/16的方式,添加未进行任何筛选的总无反应性细胞(图1a)、仅有无反应性CD8阳性细胞的细胞群体或去除了无反应性CD8阳性细胞的剩余的细胞群体(图1b)、仅有regT细胞的细胞群体或去除了regT细胞的剩余的细胞群体(图1c)、或仅有CD19阳性细胞(B细胞)的细胞群体或去除了B细胞的剩余的细胞群体(图1d),在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂恒温箱中进行培养。在培养开始第4天添加³H-胸苷,在培养开始第5天(添加³H-胸苷的16~20小时后)回收培养细胞,利用闪烁计数器测定了³H-胸苷摄取量。各图中,“初始”(naive)是仅有效应器的孔,“同种异体”(allo)是仅有效应器和刺激物的孔,将“初始”的³H-胸苷摄取量的平均值设为1而制作了图。

[0201] 图2是示出基于CD80/86阻断的抑制功能获得试验的结果。利用与实施例1同样的方法,对于分别从野生型B6小鼠和以同时表达FoxP3和人CD2的方式进行了基因改造的B6来源小鼠获得的脾细胞,进行基于BALB/c来源的辐射线照射脾细胞和抗CD80抗体/抗CD86抗体的处理,得到无反应性细胞。使从野生型B6小鼠和以同时表达FoxP3和人CD2的方式进行了基因改造的B6来源小鼠获得的无刺激的初始脾细胞与该无反应性细胞一起分别与PE荧光标记抗小鼠CD8抗体或PE荧光标记抗人CD2抗体反应。然后,通过使用了抗PE磁珠的auto-MACS,将细胞筛选为CD8阳性和CD8阴性,或筛选为人CD2阳性和人CD2阴性。将筛选后的各细胞添加至实施例1中记载的96孔板上的混合培养体系中,调查了其免疫抑制能力。各图中,“初始”(i更准确地表示Trema(上的点为2个)。本说明书中同样。)是仅有效应器的孔,“同种异体”为仅有效应器和刺激物的孔,将“初始”的³H-胸苷摄取量的平均值设为1而制作了图。

[0202] 图3示出通过使用小鼠的实验来确认诱导无反应性后的纯化细胞在移植后是否具

有耐受诱导能力的结果。利用与实施例1同样的方法,对于野生型B6小鼠和以同时表达FoxP3和人CD2的方式进行了基因改造的B6来源小鼠的脾细胞,进行基于BALB/c来源的辐射线照射脾细胞和抗CD80抗体/抗CD86抗体的处理,得到无反应性细胞。从得到的无反应性细胞(总无反应性细胞)中,利用与实施例1同样的方法筛选了CD8阳性细胞、CD4阳性细胞或人CD2阳性细胞。对于野生型B6小鼠,在照射2Gy的辐射线(γ 射线)3天后移植BALB/c小鼠的心脏,刚移植后(或与心脏移植为同一天)从尾静脉给予初始B6脾细胞或得到的无反应性细胞,观察了心脏的排斥。各组以5只以上进行实验。图3a示出:未移植无反应性细胞的情况或给予 2×10^6 个、 4×10^6 个或 6×10^6 个总无反应性细胞时的心脏移植小鼠的累积存活率。图3b示出辐射线照射对受体小鼠的效果。分别对受体小鼠施予无辐射线照射+总无反应性细胞 5×10^6 个、对受体小鼠施予2.5Gy辐射线照射+初始B6脾细胞 4×10^6 个、或对受体小鼠施予2.5Gy辐射线照射+总无反应性细胞 4×10^6 个的处置,追踪了之后的小鼠的存活率。图3c和图3d示出给予各种纯化细胞群体时的心脏移植小鼠的存活率。

[0203] 图4示出源自人PBMC的无反应性细胞的能力。(i) 无反应性细胞的生成:从4位志愿者(2人作为刺激物、2人作为效应器)的人外周血中分离单核细胞(PBMC),对刺激物PBMC照射辐射线(γ 射线)30Gy,以1:1与应答PBMC进行混合。向混合的PBMC中添加抗人CD80抗体和抗人CD86抗体以使最终浓度分别为 $10\mu\text{g/mL}$,在适合的体积的培养液中以 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 恒温箱中开始进行培养。在培养开始后第7天通过离心分离去除培养液后,在与培养开始时相同的条件下添加包含辐射线照射刺激物PBMC和抗CD80抗体/抗CD86抗体的培养液。在培养第14天回收细胞,通过离心分离洗去培养液,得到无反应性细胞。(ii) 各细胞表型的筛选:通过PE荧光标记小鼠抗人CD25抗体、FITC荧光标记小鼠抗人CD4抗体、APC荧光标记小鼠抗人CD8抗体使得到的无反应性细胞染色后,使用JSAN细胞分选仪(Bay bioscience Co.,Ltd.)而将各细胞纯化。(iii) 免疫反应抑制能力试验:将新采集的同一志愿者的PBMC用作效应器、刺激物,在96孔板的各孔中以 $200\mu\text{L}$ 的体积制作以1:1的比率包含各细胞的混合培养物(每孔的各细胞数为 2×10^5 个)。以应答PBMC的细胞数相对于该混合培养物的比率为1/2、1/4、1/8或1/16的方式添加总无反应性细胞,在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 恒温箱中进行培养(图4a)。图4b中,相对于上述混合培养物添加将CD25阳性细胞纯化而得的细胞群体(CD25+)、将CD4阳性CD25阳性regT细胞纯化而得的细胞群体(CD4+CD25+)、或加入了纯化的CD4阳性CD25阳性regT细胞和纯化的CD8阳性细胞的细胞群体(CD25+/CD8+),使应答PBMC的细胞数的比率各自为1/2。图4c中,相对于上述混合培养物添加将CD4阳性细胞纯化而得的细胞群体、将CD4阴性细胞纯化而得的细胞群体、或总无反应性细胞,使应答PBMC的细胞数的比率为1/2、1/4、1/8或1/16,对免疫抑制能力进行了比较。各图中,“初始”为仅有应答的孔,“同种异体”为仅有效应器和刺激物的孔,将“初始”的 ^3H -胸苷摄取量的平均值设为1而制作了图。

[0204] 图5是示出基于无反应性细胞的免疫抑制具有抗原特异性的图。该图示出在抗CD80/86抗体的存在下用Balb/C小鼠脾细胞刺激后的B6小鼠来源的无反应性细胞注入到B6小鼠后的心脏的存活率。100%抑制所移植的BALB/c小鼠的心脏的排斥,且在100天后心脏仍存活,与此相对地,作为异体(第三方)的CBA小鼠的心脏在移植后迅速引起排斥反应,在约50天时显示出被100%排斥。

[0205] 图6示出无反应性细胞与初始细胞相比更迅速地与供体(刺激物)细胞结合、从而抑制了初始细胞的反应和增殖的情况。利用与实施例1同样的方法,对于从B6小鼠获得的脾

细胞,进行基于BALB/c来源的辐射线照射脾细胞和抗CD80抗体/抗CD86抗体的处理,得到无反应性细胞。在该实验中,使用从以稳定表达荧光色素GFP的方式进行了基因改造的B6小鼠中新获得的脾细胞用作效应器。在12孔板内,在分别包含 1×10^6 个/ml的上述应答B6脾细胞和刺激物(供体)BALB/c脾细胞的4ml的混合培养体系中添加上述无反应性细胞,以使与应答B6脾细胞的比率为1/2,在37℃、5%CO₂恒温箱中进行培养。从培养开始1天后至3天后为止经时地观察孔板,拍摄了照片。

[0206] 图7示出在无反应性细胞中发挥免疫抑制能力(无反应性诱导能力)的细胞为CD44阳性的情况。利用与实施例1同样的方法,对于从B6小鼠获得的脾细胞,进行基于BALB/c来源的辐射线照射脾细胞和抗CD80抗体/抗CD86抗体的处理,得到无反应性细胞。通过PE荧光标记抗小鼠CD8抗体、PE荧光标记抗小鼠CD4抗体以及APC荧光标记抗小鼠CD44抗体将该无反应性细胞染色后,使用JSAN细胞分选仪制作去除了CD8阳性CD44阴性细胞或CD4阳性CD44阴性细胞的细胞群体,将该细胞群体或总无反应性细胞添加至混合培养体系中,以使与应答B6脾细胞的比率为1/2、1/4、1/8或1/16(图7a)。进而,使用JSAN细胞分选仪制作将CD8阳性CD44阳性细胞或CD4阳性CD44阳性细胞纯化而得的细胞群体,并添加至混合培养体系中,以使与应答B6脾细胞的比率为1/2、1/4或1/8(图7b)。图7c示出通过FACS调查无反应性细胞的表型的结果。

具体实施方式

[0207] 以下示出最佳方式并对本发明进行说明。在整个本说明书中,单数形式的表现只要没有特别声明,则应理解为还包括其复数形式的概念。因此,单数形式的冠词(例如,英语的情况为“a”,“an”,“the”等)只要没有特别声明,则应理解为还包括其复数形式的概念。另外,本说明书中使用的术语只要没有特别声明,则应理解为以该领域中通常使用的含义来使用。因此,除非另有定义,否则本说明书中使用的全部专业术语和科学技术术语具有与本发明所属领域的本领域技术人员的通常理解相同的含义。如有冲突,则以本说明书(包括定义)为准。

[0208] (术语的定义)

[0209] 本说明书中,“约”是指在本说明书中使用的情况下的、之后连续的数值的 $\pm 10\%$ 。

[0210] 本说明书中,“免疫耐受”是指:未显示出对特定抗原的特异性免疫反应、或特异性免疫反应得到抑制的状态。免疫耐受可以定义为免疫细胞(特别是T细胞)未显示出对特定抗原的特异性免疫反应、或特异性免疫反应得到抑制的状态;以及人未显示出对特定抗原的特异性免疫反应、或特异性免疫反应得到抑制的状态中的两者或任一者。通过诱发免疫耐受,从而能够对免疫排斥反应进行处置,或能够对变态反应进行治疗,因此受到了注目。本说明书中,“无反应性”是指:在由抗原呈递细胞呈递抗原时不输入共刺激,从而即使下一次在具有共刺激条件下被刺激也无法发生反应的状态。因此,本说明书中,“无反应性细胞”是指:产生了免疫耐受的(无免疫应答的)细胞,“无反应性T细胞”是产生了免疫耐受的(无免疫应答的)T细胞,除了未被活化之外,还包括再次遇到相同的抗原时无反应的T细胞。需要说明的是,本说明书中,“诱导免疫耐受的PBMC(或T细胞)”与“无反应性的PBMC(或T细胞)”含义相同。是否为无反应性细胞例如可以通过确认CD44阳性来进行确认,但不限于此。

[0211] 本说明书中,“待检体”包括驯养动物(例如,牛、绵羊、猫、狗、马)、灵长类(例如,人和猴子等非人灵长类)、兔子、以及啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。在特定的实施方式中,待检体为人。

[0212] 本说明书中,“试剂”、“剂”或“因子”(在英语中均相当于agent)在广义上可以互换使用,只要能够实现预期目标,就可以是任何物质或其它元素(例如,光、辐射能、热、电等能量)。作为这样的物质,例如可列举出蛋白质、多肽、寡肽、肽、多核苷酸、寡核苷酸、核苷酸、核酸(例如包括cDNA、基因组DNA那样的DNA、mRNA那样的RNA)、多糖、寡糖、脂质、有机小分子(例如,激素、配体、信息传递物质、其它有机小分子化合物、通过组合化学合成的分子、能用作药物的小分子(例如,小分子配体等)等)、它们的复合分子,但不限于这些。

[0213] 本说明书中,“抑制因子”是指:能够抑制特定作用(例如,相互作用、信号传递等)的所有种类的小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖等。虽不希望被特定的理论约束,但本发明中,通过阻断细胞表面的CD80和/或CD86与CD28的相互作用,抑制CD28共刺激信号,从而诱导T细胞无反应性。本发明中,用于阻断CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。在一个方案中,上述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。在另一个方案中,上述抗体的变体为抗原结合片段。在另一个方案中,上述细胞表面分子的变体为融合蛋白。在另一个方案中,上述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。在另一个方案中,上述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(abatacept)或贝拉西普(belatacept)。另外,还可以设想,也可以与间接抑制上述相互作用的因子(例如,信号传递的上游或下游的信号的抑制因子)组合来使用。

[0214] 本说明书中,广义的“抗体”是指能与抗原上的特定表位特异性结合的分子或其群体。本说明书中的广义的“抗体”可以是全长抗体(即,具有Fc部分的抗体),还可以是欠缺Fc部分的抗体。欠缺Fc部分的抗体只要能与目标抗原结合即可,作为这样的抗体,例如可列举出Fab抗体、 $F(ab')_2$ 抗体、Fab'抗体、Fv抗体、scFv抗体等,但不限于这些。抗体可以是任意类型的抗体,即,可以是该领域中公知的免疫球蛋白。在示例性的实施方式中,抗体是同种型IgA、IgD、IgE、IgG、或IgM类的抗体。在示例性的实施方式中,本说明书中记载的抗体包含1个或多个 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和/或 μ 重链。在示例性的实施方式中,本说明书中记载的抗体包含1个或多个 κ 或轻链。示例性的形态中,抗体为IgG抗体,是4个人亚类:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4中的1个。另外,作为设想在本发明中使用的抗体,可列举出:骆驼科动物来源的抗体(例如,VHH抗体)、鲨鱼来源的抗体(例如,单链抗体)、肽体(peptibody)、纳米抗体(nanobody、单域抗体)、微抗体(minibody)、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双链抗体(diabody)、三链抗体(triobody)、四链抗体(tetrabody)、串联二价抗体-scFv、串联三价抗体-scFv)等,这些在该领域中是公知的。例如参照Kortt等人、Biomol Eng. 2001 18卷:95~108页、(2001年)和Todorovska等人、J Immunol Methods. 248卷:47~66页、(2001年)等。另外,抗体包括抗体修饰物或抗体非修饰物。抗体修饰物可以是抗体与例如聚乙二醇等各种分子结合而成者。抗体修饰物可以通过使用公知的方法对抗体实施化学修饰而获得。对于人工制得的抗体和抗体的各种修饰/改造方法,也参照生化学(2016)第88卷第3号380~385页。

[0215] 本说明书中狭义的“抗体”是指能与抗原上的特定表位特异性结合的免疫球蛋白

或其群体,将其变体称为“抗体的变体”。本说明书中的狭义的“抗体”可以是全长抗体(即,具有Fc部分的抗体),本说明书中的“抗体的变体”可以是上述抗体的欠缺Fc部分的变体。因此,本说明书中狭义的抗体还可以称为全长抗体,抗体的变体还可以称为全长抗体的变体。欠缺Fc部分的变体只要能与目标抗原结合即可,作为这样的变体,例如可列举出Fab抗体、F(ab')₂抗体、Fab'抗体、Fv抗体、scFv抗体等,但不限于这些。另外,抗体的变体包括抗体修饰物或抗体非修饰物。抗体修饰物可以是抗体与例如聚乙二醇等各种分子结合而成者。抗体修饰物可以通过使用公知的方法对抗体实施化学修饰而获得。

[0216] 本发明的一个实施方式中,例如,为了诱导抗原特异性多克隆抗体的产生,可以通过对哺乳类(例如,大鼠、小鼠、兔子、牛、猴等)、鸟类等给予包含目标抗原的免疫原而生成“多克隆抗体”。免疫原的给予中,可以注入1种以上的免疫剂、及根据期望的佐剂。佐剂还可用于增强免疫应答,还可以包含弗氏佐剂(完全或不完全)、矿物凝胶(氢氧化铝等)、或表面活性物质(溶血卵磷脂等)等。免疫方案在本技术领域中公知的,有时根据所选择的宿主生物,通过诱发免疫应答的任意的方法来实施(蛋白质实验手册,羊土社(2003):86-91.)。

[0217] 本发明的一个实施方式中,“单克隆抗体”包括如下情况:除了少量具有能自然发生的突变的抗体之外,构成群体的每个抗体为实质上对应于单一表位的相同抗体。或者,除了少量具有能自然发生的突变的抗体之外,构成群体的每个抗体可以是实质上相同的抗体。单克隆抗体具有高度特异性,与典型地包含对应于不同表位的不同抗体那样的通常的多克隆抗体和/或典型地包含对应于相同表位的不同抗体那样的通常的多克隆抗体不同。除了其特异性之外,单克隆抗体的有用之处在于,可以由不被其它免疫球蛋白污染的杂交瘤培养而合成。“单克隆”这样的描述可以示出实质上由均匀的抗体群体获得这一特征,但并不意味着必须利用特定的方法生产抗体。例如,单克隆抗体可以通过与“Kohler G, Milstein C., Nature. 1975 Aug 7; 256 (5517): 495-497.”中公开的杂交瘤法同样的方法来制作。或者,单克隆抗体还可以通过与美国专利第4816567号中记载那样的重组法同样的方法来制作。或者,单克隆抗体可以使用与“Clackson et al., Nature. 1991 Aug 15; 352 (6336): 624-628.”、或“Marks et al., J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222 (3): 581-597.”中记载那样的技术同样的方法从噬菌体抗体文库中分离。或者,还可以通过“蛋白质实验手册,羊土社(2003):92-96.”中记载的方法来制作。

[0218] 本发明的一个实施方式中,“嵌合抗体”例如是将异种生物之间的抗体的可变区与抗体的恒定区连接而成的,能够通过基因重组技术而构建。小鼠-人嵌合抗体例如可以利用“Roguska et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1; 91 (3): 969-973.”中记载的方法来制作。用于制作小鼠-人嵌合抗体的基本的方法例如为:使经克隆化的cDNA中存在的小鼠前导序列和可变区序列与在哺乳类细胞表达载体中已经存在的编码人抗体恒定区的序列连接。或者,还可以使经克隆化的cDNA中存在的小鼠前导序列和可变区序列与编码人抗体恒定区的序列连接后,与哺乳类细胞表达载体连接。人抗体恒定区的片段可以是任意的人抗体的H链恒定区和人抗体的L链恒定区的片段,例如对于人H链,可以列举出:C γ 1、C γ 2、C γ 3或C γ 4,对于L链,可以列举出:C λ 或C κ 。

[0219] 本发明的一个实施方式中,“人源化抗体”例如是具有源自非人物种的1个以上的CDR、和人免疫球蛋白来源的框架区(FR)、进而人免疫球蛋白来源的恒定区并且与期望的抗原结合的抗体。抗体的人源化可以通过使用本技术领域中公知的各种方法来实施(Almagro

et al., Front Biosci. 2008 Jan 1; 13: 1619-1633.)。例如可列举出: CDR绘图 (Ozaki et al., Blood. 1999 Jun 1; 93 (11): 3922-3930.)、Re-surfacing (Roguska et al., Proc Natl Acad Sci US A. 1994 Feb 1; 91 (3): 969-973.)、或FR shuffle (Damschroder et al., Mol Immunol. 2007 Apr; 44 (11): 3049-3060. Epub 2007 Jan 22.)等。为了修饰 (优选为改善) 抗原结合, 可以将人FR区域的氨基酸残基置换成来自CDR供体抗体的对应的残基。该FR置换可以通过本技术领域中公知的方法来实现 (Riechmann et al., Nature. 1988 Mar 24; 332 (6162): 323-327.)。例如, 可以通过CDR与FR残基的相互作用的模拟来鉴定对于抗原结合重要的FR残基。或者, 可以通过序列比较来鉴定特定位置处的异常的FR残基。

[0220] 本发明的一个实施方式中, “人抗体” 例如是包含构成抗体的重链的可变区和恒定区、轻链的可变区和恒定区的区域源自编码人免疫球蛋白的基因的抗体。作为主要的制作方法, 有: 人抗体制作作用转基因小鼠法、噬菌体展示法等。人抗体制作作用转基因小鼠法中, 若在基因敲除了内源性Ig的小鼠中导入功能性的人的Ig基因, 则代替小鼠抗体而产生具有多样化的抗原结合能力的人抗体。若进一步对该小鼠进行免疫, 则可以利用现有的杂交瘤法获得人单克隆抗体。例如可以利用“Lonberg et al., Int Rev Immunol. 1995; 13 (1): 65-93.”中记载的方法来制作。噬菌体展示法典型的是, 在作为大肠杆菌病毒之一的M13、T7等纤维状噬菌体的外壳蛋白 (g3p、g10p等) 的N末端侧使不失去噬菌体的感染性的外源基因作为融合蛋白表达的系统。例如可以利用“Vaughan et al., Nat Biotechnol. 1996 Mar; 14 (3): 309-314.”中记载的方法来制作。

[0221] 本说明书中, “源自待检体的细胞” 是指: 由给予了本发明的组合物的待检体得到的细胞或由该待检体得到的细胞的细胞。本说明书中, “源自待检体的抗原” 是指: 产生免疫应答的待检体本身所生成的抗原、例如具有自身免疫疾病的待检体中的成为自身免疫疾病的原因的待检体本身所生成的抗原。本说明书中, “并非源自待检体的抗原” 是指: 能够产生免疫应答的外源抗原。本说明书中, “并非源自待检体” 的“含有抗原的物质 (antigen-containing material)” 是指含有并非源自待检体的抗原的任意的物质或物质的集合物, 例如可列举出表达了并非源自待检体的抗原的细胞、细胞群体、组织等。

[0222] 本说明书中, “移植免疫排斥反应” 是指: 接受了器官、组织或细胞的移植的待检体中, 待检体的免疫系统对所移植的器官、组织或细胞进行攻击、损伤或破坏。

[0223] 本说明书中, “变态反应” 是指: 针对并非源自待检体的抗原发生过度的免疫应答的状态。引起变态反应的并非源自待检体的抗原也被称为变应原, 例如可列举出: 螨抗原、蛋白抗原、乳抗原、小麦抗原、花生抗原、大豆抗原、荞麦抗原、芝麻抗原、米抗原、甲壳类抗原、猕猴桃抗原、苹果抗原、香蕉抗原、桃子抗原、西红柿抗原、金枪鱼抗原、鲑鱼抗原、鲭鱼抗原、牛肉抗原、鸡肉抗原、猪肉抗原、猫皮屑抗原、昆虫抗原、花粉抗原、狗皮屑抗原、真菌抗原、细菌抗原、胶乳、半抗原和金属等, 但不限于这些。

[0224] 本说明书中, “自身免疫疾病” 是指: 免疫系统对自身的细胞、组织或器官进行不希望的免疫应答的任意的疾病。作为自身免疫疾病, 例如可列举出: 类风湿性关节炎、多发性硬化症、1型糖尿病、炎症性肠病 (例如, 克罗恩病或溃疡性结肠炎)、系统性红斑狼疮、牛皮癣、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、斑秃、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、乳糜泻、干燥综合征、风湿热、胃炎、自身免疫性萎缩性胃炎、自身免疫性肝炎、胰腺炎、卵巢炎、精巢炎、葡萄膜炎、晶状体诱发性葡萄膜炎、重症肌无力、原发性粘液水肿、恶性贫血、自身免疫性溶血

性贫血、艾迪生氏病、硬皮病、肺出血肾炎综合征、肾炎(例如,肾小球肾炎)、牛皮癣、寻常型天疱疮、类天疱疮、交感性眼炎、特发性血小板减少型紫癜、特发性白细胞减少症、韦格纳肉芽肿病和多发性/皮炎,但不限于这些。

[0225] 本说明书中,“移植物抗宿主疾病”是指:所移植的器官、组织或细胞通过免疫应答而对接受了移植的待检体的细胞、组织或器官进行攻击、损伤或破坏。

[0226] 本说明书中,“由iPS细胞或ES细胞或源自这些细胞的细胞、组织或器官的移植引起的免疫排斥反应”是指:由于iPS细胞或ES细胞所具有的抗原、或源自iPS细胞或ES细胞的细胞、组织或器官所具有的抗原而产生的免疫排斥反应。

[0227] (优选的实施方式)

[0228] 以下记载优选的实施方式的说明,但该实施方式是本发明的示例,应理解为本发明的范围不限于这样优选的实施方式。应理解为本领域技术人员参考以下那样的优选的实施例而能够容易地进行在本发明的范围内的改变、变更等。对于这些实施方式,本领域技术人员可以适宜参考本说明书中的记载来组合任意的实施方式。另外,可理解的是:本发明的以下的实施方式可以单独使用或将这些组合使用。

[0229] (药物以及治疗和预防)

[0230] 本发明人等证实了:即使使用抑制CD80/CD86与CD28的相互作用的抑制因子而诱导了T细胞的无反应性,在包含诱导了无反应性的T细胞的混合物中不存在CD8阳性细胞的情况下,诱导免疫耐受的能力也降低。该结果与报道了即使去除CD8阳性细胞也可能几乎不影响免疫抑制的非专利文献4相反,是意料之外的。

[0231] 在一个方式中,本发明提供包含CD4阳性无反应性T细胞、及CD8阳性无反应性T细胞的药物组合物。这样的药物组合物可以用于抗原特异性的免疫耐受或免疫抑制。该无反应性T细胞可以通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子而诱导。这样的抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。在一个方案中,上述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。在另一个方案中,上述抗体的变体为抗原结合片段。在另一个方案中,上述细胞表面分子的变体为融合蛋白。在另一个方案中,上述抑制因子选自由抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。在另一个方案中,上述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(abatacept)或贝拉西普(belatacept)。

[0232] 在一些实施方式中,CD80和/或CD86由抗原呈递细胞表达,CD28由T细胞表达。

[0233] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物可以进一步包含调节T细胞、例如FOXP3阳性CD4阳性CD25阳性T细胞。这样的调节T细胞并不直接参与对特定抗原不显示特异性免疫反应的“免疫耐受”,也不是必须成分,但为了能够抑制免疫应答,在优选的实施方式中,本发明的组合物可以还包含调节T细胞。

[0234] 在本发明的另一个方案中,本发明提供一种组合物,其为包含通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子而诱导了无反应性的细胞的药物组合物,该组合物包含CD8阳性细胞,该组合物还包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种以上。这样的药物组合物可以用于抗原特异性的免疫耐受或免疫抑制。在特定的实施方式中,本发明的组合物还可以包含FOXP3阳性细胞、CD4阳性细胞和CD8阳性细胞的全部。

[0235] 本发明人证实了:诱导了无反应性的CD8阳性细胞和CD4阳性细胞(也称为CD8阳性

无反应性细胞和CD4阳性无反应性细胞)中包含大量CD44阳性的细胞。因此,在一些实施方式中,CD8阳性细胞和/或CD4阳性细胞可以是CD44阳性。另外,为了确认无反应性细胞的生成,除了CD44之外还可以使用CD45RA/CD45RO。例如,在一个方案中,CD8阳性细胞和/或CD4阳性细胞为CD45RA阴性且CD45RO阳性。

[0236] 在一些实施方式中,FOXP3阳性细胞可以是CD4阳性和/或CD25阳性。本发明的组合物优选进一步包含调节T细胞,调节T细胞是FOXP3阳性,进而可以是CD4阳性和/或CD25阳性。

[0237] 在一些实施方式中,能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子选自由小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。在一个方案中,上述蛋白质为抗体或其变体、或为细胞表面分子或其变体。在另一个方案中,上述抗体的变体为抗原结合片段。在另一个方案中,上述细胞表面分子的变体为融合蛋白。在另一个方案中,上述抑制因子选自抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。在另一个方案中,上述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(abatacept)或贝拉西普(belatacept)。在一些实施方式中,CD80和/或CD86由抗原呈递细胞表达,CD28由T细胞表达。在特定的实施方式中,能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抑制因子可以是抗CD80抗体和/或抗CD86抗体或CTLA4-Ig融合蛋白。作为设想在本发明中使用的抑制因子,如上所述可列举出CTLA4-Ig融合蛋白。就与抗原呈递细胞上的CD80/CD86的结合而言,CTLA4-Ig融合蛋白与T细胞上的作为共刺激受体的CD28竞争,其结果,发挥抑制T细胞的活化的作用。本发明中,作为上述CTLA4-Ig融合蛋白,假定阿巴西普(abatacept)(Orencia(注册商标))、贝拉西普(belatacept)或Maxy-4。贝拉西普(belatacept)含有2个显著增大与CD80和CD86的结合亲和力的氨基酸置换(L104E和A29Y)(参照Davies JK等人、Cell Transplant. (2012);21(9):2047~61、Adams AB等人、J Immunol. (2016)197(6):2045~50)。另外,作为可期待与CTLA4-Ig融合蛋白同样的效果的抑制因子,还可列举出CD28-Ig融合蛋白(Peach RJ等人、J Exp Med. (1994)180(6):2049~2058)。本发明的抑制因子也可以以核酸的形态使用。列举出一个例子,也可设想:通过腺病毒载体等将编码CTLA4-Ig融合蛋白的核酸导入细胞中来表达。例如参照Jin YZ等人、Transplant Proc. (2003);35(8):3156~9。

[0238] 在一些实施方式中,无反应性细胞可以通过如下步骤而被诱导的细胞,所述步骤中,将抗体等抑制因子、源自待检体的细胞、及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合。含有抗原的物质可以是细胞,为了防止该细胞的增殖和活化,可以进行辐射线照射。

[0239] 在特定的实施方式中,可以提供用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态的药物组合物,其包含本发明的组合物。作为由于源自待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,例如可列举出移植免疫排斥反应、变态反应、自身免疫疾病、移植物抗宿主疾病、由iPS细胞或ES细胞和源自这些细胞的细胞、组织或器官的移植引起的免疫排斥反应等需要免疫耐受的疾病、障碍或状态,但限定于这些。

[0240] 在一些实施方式中,移植免疫排斥反应的特征在于,通过移植肾脏、肝脏、心脏、皮肤、肺、胰腺、食道、胃、小肠、大肠、神经、血液、包括免疫系统细胞在内的血细胞、骨、软骨、

血管、角膜、眼球或骨髓而产生。

[0241] 在本发明所针对的对象疾病等为移植免疫排斥反应的实施方式中,无反应性细胞可以通过将抗体等抑制因子、源自受体的细胞(PBMC或脾细胞)、及源自供体的抗原或源自供体的含有抗原的物质混合而诱导。源自供体的含有抗原的物质可以是PBMC、脾细胞或所移植的器官来源的细胞等。

[0242] 在本发明所针对的对象疾病等为变态反应的实施方式中,无反应性细胞可以通过将抗体等抑制因子、源自待检体的细胞(PBMC或脾细胞)、及引起变态反应的并非源自待检体的抗原混合而诱导。

[0243] 在本发明所针对的对象疾病等为自身免疫疾病的实施方式中,无反应性细胞可以通过将抗体等抑制因子、源自待检体的细胞(PBMC或脾细胞)、及成为自身免疫疾病的原因的待检体来源的抗原混合而诱导。

[0244] 在本发明所针对的对象疾病等为移植物抗宿主疾病的实施方式中,无反应性细胞可以通过将抗体等抑制因子、提供移植片的供体的PBMC或脾细胞、及源自受体的抗原或含有该抗原的物质混合而诱导。源自受体的含有抗原的物质可以是PBMC、脾细胞或移植器官的部位的周边的细胞或源自其的细胞等。

[0245] 在本发明所针对的对象疾病等为由iPS细胞或ES细胞和源自这些细胞的细胞、组织或器官的移植引起的免疫排斥反应的实施方式中,无反应性细胞可以通过将抗体等抑制因子、源自待检体的细胞(PBMC或脾细胞)、及由iPS细胞或ES细胞分化的移植中使用的细胞混合而诱导。

[0246] 以下示出基于本发明的疾病等的治疗例,但不限于以下。

[0247] (变态反应和自身免疫疾病)

[0248] 关于变态反应和自身免疫疾病,利用常规方法将从患者的外周血得到的巨噬细胞分化为抗原呈递能力高的树状细胞(巨噬细胞来源树状细胞),向照射辐射线(γ 射线)后的该细胞呈递变态反应、自身免疫疾病中的成为过度反应的原因的抗原,与从相同的患者外周血得到的T细胞群在抗CD80抗体和/或抗CD86抗体或CTLA4-Ig融合蛋白等适合的抑制因子的存在下共培养1~2周,得到成为变态反应、自身免疫疾病的原因的抗原特异性无反应性细胞。通过向患者给予该无反应性细胞,从而诱导针对成为变态反应、自身免疫疾病原因的抗原的、特异性的免疫耐受,用于预防和治疗变态反应和自身免疫疾病。根据是预防性疗法还是治疗、进而症状的轻重等各种条件,给予次数也可以是多次。

[0249] (移植物抗宿主疾病)

[0250] 对于移植物抗宿主疾病而言,与针对移植免疫排斥反应的治疗相对照地,将提供移植片的供体的PBMC或T细胞等能成为移植物抗宿主疾病的原因的细胞、与经辐射线(γ 射线)照射的宿主来源的PBMC或除此以外的细胞在抗CD80抗体和/或抗CD86抗体或CTLA4-Ig融合蛋白等适合的抑制因子的存在下共培养1~2周,得到宿主特异性无反应性细胞。通过向宿主给予该无反应性细胞,抑制由成为移植物抗宿主疾病的原因的移植片导致的对宿主的反应(诱导免疫耐受),从而预防和治疗移植物抗宿主疾病。根据是预防性疗法还是治疗、进而所移植的组织、其大小、症状的轻重等各种条件,给予次数也可以是多次。

[0251] (由iPS细胞或ES细胞和源自这些细胞的细胞、组织或器官的移植引起的免疫排斥反应)

[0252] 对于在使用了iPS细胞或ES细胞的治疗中的应用,对由iPS细胞或ES细胞分化的移植中使用的细胞或树状细胞照射辐射线(γ 射线),将该细胞与接受移植的患者的PBMC或T细胞群在抗CD80抗体和/或抗CD86抗体或CTLA4-Ig融合蛋白等适合的抑制因子的存在下共培养1~2周,得到针对由iPS细胞或ES细胞分化的细胞特异性的无反应性细胞。通过向宿主给予该无反应性细胞,从而诱导针对源自iPS细胞或ES细胞的移植的细胞、组织、和器官特异性的免疫耐受,预防和治疗对它们的排斥反应。根据是预防性疗法还是治疗、进而所移植的组织、其大小、症状的轻重的各种条件,给予次数也可以是多次。

[0253] (药物的制造方法)

[0254] 在本发明的另一个方案中,本发明提供制造包含细胞的药物的方法,该方法包括如下工序:(A)将能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抗体等抑制因子、源自待检体的细胞、及源自该待检体的抗原或并非源自该待检体的抗原或含有该抗原的物质进行混合的工序;(B)确认通过该混合而得到的细胞产物包含CD8阳性细胞的工序;以及(C)确认该细胞产物包含FOXP3阳性和CD4阳性中的至少1种细胞的工序。本发明人等发现:在诱导了无反应性的T细胞的混合物中包含CD8阳性细胞对于发挥充分的免疫抑制能力是重要的。因此,在包含诱导了无反应性的T细胞的药物的制造中,确保包含CD8阳性细胞是重要的。如此制造的药物可以用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自待检体的抗原而产生的待检体中的疾病、障碍或状态。若是生成CD8阳性细胞那样的抑制因子,则可以使用任意的抑制因子。

[0255] 在一些实施方式中,细胞产物中的CD8阳性细胞的存在以及FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的存在表明细胞产物能够作为药物使用。

[0256] 上述工序(B)中,为了对包含CD8阳性细胞的情况进行确认,可使用抗CD8抗体而检测CD8。上述工序(C)中,为了对包含FOXP3阳性和CD4阳性中的至少1种细胞进行确认,可使用抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体而检测FOXP3和CD4中的至少1种。作为用于检测的具体方法,可列举出流式细胞仪(FACS)、蛋白质印迹、RNA的检测等,但不限于这些。优选地,用于检测的具体方法为FACS。RNA的检测可利用PCR等该领域中公知的方法来进行。尽管FOXP3在细胞内表达,但在将细胞固定后进行渗透处理而能将细胞内染色,同样地可以利用FACS等方法进行检测。作为用于该方法的适合的市售的制品,可列举出eBioscienceTM Human Regulatory T Cell Staining Kit#3(cat#88-8995-40)、eBioscienceTM Mouse Regulatory T Cell Staining Kit#1(cat#88-8111-40)、eBioscienceTM Human/Non-Human Primate Regulatory T Cell Staining Kit#1(cat#88-4999-40)以及eBioscienceTM Human Regulatory T Cell Whole Blood Staining Kit(cat#88-8996-40)等。

[0257] (品质管理方法)

[0258] 在另一个方案中,本发明提供细胞制剂(含细胞药物)的品质管理方法。更详细而言,本发明提供管理包含细胞的药物的品质的方法,所述药物用于处置或预防由于源自待检体的细胞所表达的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态,该方法包括如下工序:(A)确认该细胞包含CD8阳性细胞的工序;及(B)确认该细胞包含FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的工序。对于用于处置或预防由于源自待检体的细胞所表达的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态的包含细胞的药物,为了维持恒定的品质(充分的免疫耐受),重要的一点在于对在包含

这样的细胞的药物中是否包含CD8阳性细胞进行管理。

[0259] 上述工序(A)中,为了确认包含CD8阳性细胞的情况,可使用抗CD8抗体而检测CD8。上述工序(B)中,为了对包含FOXP3阳性和CD4阳性中的至少1种细胞的情况进行确认,可使用抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体而检测FOXP3和CD4中的至少1种。作为用于检测的具体手段,可列举出FACS、蛋白质印迹和PCR等,但不限于于这些。尽管FOXP3在细胞内表达,但在将细胞固定后进行渗透处理而能将细胞内染色,同样地可以利用FACS等方法进行检测。

[0260] 以下示出本发明的细胞制剂的制造和品质管理的方法的典型的一个例子。

[0261] (包含无反应性T细胞的细胞制剂的制造和品质管理)

[0262] 1.生物来源原料及其对应状况

[0263] 在一个实施方式中,无反应性T细胞的制造工序中,使用符合表1所述的生物来源原料基准的生物来源原料。

[0264] 无反应性T细胞的给予可在对受体实施来自供体的器官移植(例如,肝脏移植)后进行。供体器官(例如,肝脏)中以未去除病毒的状态包含作为自体无反应性T细胞的材料供体来源单核细胞,供体器官(例如,肝脏)在包含供体来源单核细胞的状态下被移植至受体。因此,可认为用作自体来源的无反应性T细胞的材料、供体来源单核细胞不属于生物来源原料。

[0265] [表1]

[0266] 表1生物来源原料一览表

[0267]

名称	含有其的生物来源原料		生物来源原料基准对应状况
	成分名称	动物种属	
抗 CD80 抗体	细胞来源成分	中国仓鼠 (异种)	计划选择通过依据 ICH-Q5A 和 ICH-Q5D 验证了品质和安全性的工序中制造的抗体
抗 CD86 抗体	细胞来源成分	中国仓鼠 (异种)	计划选择通过依据 ICH-Q5A 和 ICH-Q5D 验证了品质和安全性的工序中制造的抗体
ALyS505N-0	人血清白蛋白	人 (同种)	选择药物 (血浆级分制剂)
AIM-V	人血清白蛋白	人 (同种)	选择符合生物来源原料基准的材料 *详细情况记载于原药等登记簿中
人血清白蛋白	人血清白蛋白	人 (同种)	选择药物 (血浆级分制剂)

[0268] 贝拉西普 (belatacept) (例如,可以从Bristol-Myers Squibb、New York、NY获得)

[0269] 2.细胞制剂的制法

[0270] 在一个实施方式中,可以如下所示制造细胞制剂。以下示例的各种数值等为代表例,本领域技术人员可以进行适宜变更地进行细胞制剂的制造。

[0271] 1) 在给予前19天左右,在医疗机构对供体实施血液成分分离,对供体血液成分分离产物照射30Gy的辐射线,在丧失细胞增殖能力后,输送至实施细胞加工的细胞培养加工

设施。

[0272] 2) 收到供体血液成分分离产物后,在细胞培养加工设施利用密度梯度离心法分离、回收供体单核细胞,然后分成2份进行冷冻,在 $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ 下保管。

[0273] 3) 在给予前14天左右,在医疗机构对受体实施血液成分分离,将受体血液成分分离产物输送至实施细胞加工的细胞培养加工设施。

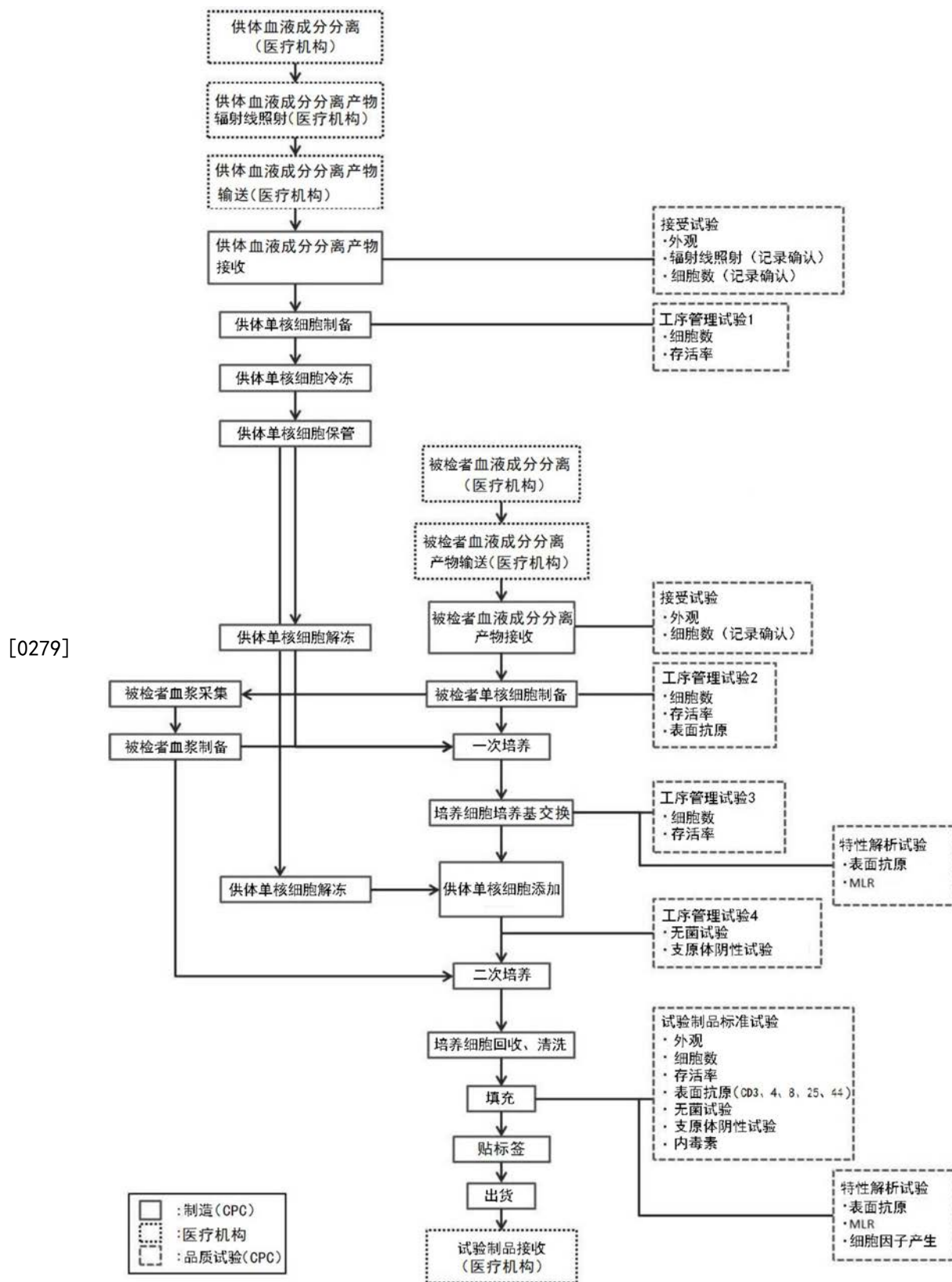
[0274] 4) 收到受体血液成分分离产物后,在细胞培养加工设施利用密度梯度离心法分离、回收受体单核细胞,与解冻的供体单核细胞以及抗CD80抗体和抗CD86抗体或CTLA4-Ig融合蛋白等抑制因子进行共培养。

[0275] 5) 在给予前7天左右进行培养基交换。回收培养了7天的中间制品,与解冻的供体单核细胞以及抗CD80抗体和抗CD86抗体或CTLA4-Ig融合蛋白等抑制因子进行共培养。

[0276] 6) 在给予当天利用密度梯度离心法回收细胞加工物,然后进行清洗,填充于生理盐水中。

[0277] 7) 输送到医疗机构,在医疗机构向受体给予。

[0278] (制造和品质试验流程的代表例)



[0280] 3. 工序内管理试验

[0281] 在一个实施方式中,制造工序内,可以实施表2中记载的工序内管理试验。以下示例的各种数值等、步骤为代表例,本领域技术人员可以适宜变更地实施工序内管理试验。

[0282] [表2]

[0283] 表2工序内管理试验一览表

试验种类	试验项目	时机
[0284] 工序内管理试验	细胞数	工序内管理试验 1, 2, 3
	活细胞比率	工序内管理试验 1, 2, 3
	无菌试验	工序内管理试验 1, 2, 4
	支原体试验	工序内管理试验 4

[0285] 4. 标准试验、特性解析试验

[0286] 在一个实施方式中,可以使用最终制品来进行表3中记载的标准试验。表3示例的步骤为代表例,本领域技术人员可以适宜变更地实施标准试验、特性解析试验。例如,作为其变形例,可以列举出实施例8中示例的标准。在给予诱导性抑制性T细胞时结果不清楚的情况下,可以参考工序内管理试验的结果,来判断临床试验制品的出货。

[0287] 另外,可以使用制造工序内的细胞、最终制品来进行表3中记载的特性解析试验。

[0288] [表3]

[0289] 表3最终制品标准试验一览表

项目	试验项目	标准值
外观	外观试验	微黄白色~淡黄色的细胞悬浮液
[0290] 细胞表面标记物	CD3 ⁺ 细胞比率	≥ 50%
	CD3 ⁺ 细胞中的 CD8 ⁺ CD44 ⁺ 细胞比率	≥ 10%
	CD3 ⁺ 细胞中的 CD4 ⁺ CD25 ⁺ 细胞比率	≥ 5%
安全性	无菌试验	未观察到微生物的发育
	内毒素	<0.25EU/mL
	支原体阴性试验	阴性
含量	细胞数	≥ 1 × 10 ⁹ 细胞
	活细胞比率	≥ 70%

[0291] 对于上述临床试验制品标准试验、特性解析试验,如本说明书中记载所述,临床试验制品标准试验可以包括外观、细胞数、活细胞率、细胞表面标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、CD44、CD45RA/CD45RO)、制造工序来源杂质(供体来源细胞、培养基成分、抗CD80抗体、抗CD86抗体、细胞冷冻保护液成分、比重分离液成分)、病毒阴性试验、无菌试验、支原体阴性试验、和内毒素。作为药效试验,可以包括基于使用了培养细胞的混合淋巴细胞反应(MLR)的细胞因子产生或氩摄入试验。对于细胞表型的基准值,例如,CD3阳性细胞比率代表性地可以以表中的50%以上作为基准值,或者例如可以是30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上,或者可以是它们之间的数值(可以以1%、0.5%刻度等来设定)。CD3阳性细胞中的CD8阳性CD44阳性细胞比率代表性地可以以表中的10%以上作为基准值,或者例如可以是1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上等。也可以不设定CD3阳性细胞中的CD4阳性CD44阳性细胞比率,或者例如可以将1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、

10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上等设定为基准值。也可以不设定CD3阳性细胞中的CD8阳性CD45RA阴性细胞比率,或者例如可以将1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上等设定为基准值。也可以不设定CD3阳性细胞中的CD8阳性CD45RA阴性CD45RO阳性细胞比率,或者例如可以将1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上等设定为基准值。也可以不设定CD3阳性细胞中的CD4阳性CD45RA阴性CD45RO阳性细胞比率,或者例如可以将1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上等设定为基准值。CD3阳性细胞中的CD4阳性CD25细胞比率代表性地可以以表中的5%以上作为基准值,或者例如可以是1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上等。细胞数可以代表性地采用 1×10^9 个以上作为基准,或者例如可以是 1×10^8 个以上、 5×10^8 个以上、 1×10^9 个以上、 2×10^9 个以上、 3×10^9 个以上等。活细胞率可以代表性地采用70%以上作为基准,或者还可以采用50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上等作为基准。

[0292] (最终制品的组成)

[0293] 举出一个例子,最终制品由下述表中记载的构成物构成。这些标准本领域技术人员也可以通过适宜变更来改变组成而构成再生医疗等制品。

[0294] [表3-1]

[0295] 表组成一览

[0296]	构成物	组成
	自体来源无反应性细胞	1×10^9 个以上
	生理盐水	100mL
	人血清白蛋白	1%

[0297] 对于标准试验、特性解析试验,本领域技术人员可以适宜参考本说明书中记载的技术事项并根据需要进行变更来具体地加以实施。

[0298] 5.再生医疗等制品的给予方法

[0299] 在一个实施方式中,在器官移植14天后进行一次给予。对于给予方法、其期间等,本领域技术人员可以适宜参考本说明书中记载的技术事项并根据需要进行变更来具体地加以实施。

[0300] (试剂盒)

[0301] 在另一个方案中,本发明提供用于制造细胞制剂的试剂盒。进而在另一个方案中,本发明提供用于细胞制剂的品质管理的试剂盒。详细而言、本发明提供用于制造包含细胞混合物的药物的试剂盒,该试剂盒包含:(A)能够抑制CD80和/或CD86与CD28的相互作用的抗体等抑制因子;(B)用于检测CD8的单元;及(C)用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元。

[0302] 在一些实施方式中,细胞混合物中的CD8阳性细胞的存在以及FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞的存在表明细胞混合物能够作为药物使用。

[0303] 利用本发明的试剂盒制造的包含细胞混合物的药物包含：诱导了无反应性的CD8阳性T细胞、及FOXP3阳性细胞和CD4阳性细胞中的至少1种细胞，可以用于处置或预防由于源自待检体的抗原或并非源自待检体的抗原而产生的待检体中的疾病、障碍或状态。

[0304] 在另一个方案中，提供用于管理包含细胞的药物的品质的试剂盒，所述药物用于处置或预防由于源自待检体的细胞所表达的抗原或并非源自该待检体的抗原而产生的该待检体的疾病、障碍或状态，该试剂盒包含：(A) 用于检测CD8的单元；及(B) 用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元。在一些实施方式中，用于检测CD8的单元包含抗CD8抗体，用于检测FOXP3和CD4中的至少1种的单元包含抗FOXP3抗体和抗CD4抗体中的至少1种抗体。检测例如可以通过FACS、蛋白质印迹、PCR等来进行。

[0305] (自体来源调节T细胞制造步骤)

[0306] 以下对自体来源调节T细胞的典型的制造方法进行说明。

[0307] 事先确认

[0308] 在一个实施方式中，事先确认可以如下方式进行。以下示例的各种数值、试剂、步骤等为代表例，本领域技术人员可以适宜变更地进行事先确认的制造。

[0309] 实施供体和患者的传染病筛查，对于供体，确认HBs抗原、HCV抗体、HIV-1/2、HTLV-1抗体全部为阴性。

[0310] 1. 供体淋巴细胞的分离(在无菌下进行)代表例

[0311] 在一个实施方式中，供体淋巴细胞的分离可以如下方式制造。以下示例的各种数值、试剂、步骤等为代表例，本领域技术人员可以适宜变更地进行供体淋巴细胞的分离。

[0312] • 利用血液成分分离将供体淋巴细胞采集至回收袋，对该回收袋照射辐射线。

[0313] • 将前述的经辐射线照射的外周血单核细胞放入装有适量的Ficoll-Paque PREMIUM(GE Healthcare#17-5442-02) 或Lymphocyte separation Solution(Nacalai Tesque#20828) 等(例如，20mL) 的离心管中，以860G在22℃下进行20分钟离心分离(将离心分离机的加速器设定为慢，将制动器设定为慢)。

[0314] • 废弃上清液，将包含淋巴细胞层的细胞悬浮液移至另一离心管(例如，50mL离心管2根)中。

[0315] • 在装有细胞悬浮液的离心管中追加生理盐水(例如，总液量至50mL为止的适量)，用注射器(例如，带有18G注射针的50mL注射器)或移液管重复进行抽吸排出，使其充分混合。

[0316] • 以500G在22℃下进行10分钟离心分离(也可以将离心分离机的加速器设定为快，将制动器设定为快)。

[0317] • 废弃上清液，再次追加生理盐水(例如，总液量至50mL为止的适量)，用移液管将细胞团块重复抽吸排出，使其充分混合。

[0318] • 以500G在22℃下进行5分钟离心分离(也可以将离心分离机的加速器设定为快，将制动器设定为快)。

[0319] • 废弃上清液。

[0320] • 将包含预先由供体采集的血浆的ALyS505N-0培养液(细胞科学研究所(CSTI) 1020P10))加入细胞团块中(例如，总液量至31mL为止的适量)，用移液管重复进行抽吸排出，使其充分混合。

[0321] • 用注射器(例如,带有18G注射针的1mL注射器)或移液管取出适量(例如,0.3mL),确认细胞数和活细胞数。

[0322] 2. 供体淋巴细胞的冷冻保存(在无菌下进行)

[0323] 在一个实施方式中,供体淋巴细胞的冷冻保存可以如下方式进行。以下示例的各种数值、试剂、步骤等为代表例,本领域技术人员可以适宜变更地进行供体淋巴细胞的冷冻保存。

[0324] • 在无菌下将冷冻袋(例如,Frozen bag F-050 25mL冷冻袋Nipro Corporation 89-101)开封,在标签上填写必要事项(日期、制造编号、供体名)。

[0325] • 用注射器(例如,带有18G注射针的30mL注射器)取出细胞悬浮液,放入冷冻袋中。

[0326] • 将ACD液(Terumo Corporation TP-A05ACD、例如,相对于细胞悬浮液15mL为2mL)加入装有细胞悬浮液的冷冻袋中,夹持于在4℃下冷却的保冷剂中冷却10分钟左右。

[0327] • 使用注射器(例如,带有18G注射针的20mL注射器),将在4℃下冷却的CP-1(极东制药工业株式会社551-27202-4细胞冷冻保护液CP-1)例如,8.5mL)用1分半钟左右的时间加入冷冻袋中。此时,缓慢地搅拌冷冻袋。

[0328] • 使用注射器,排空冷冻袋及其端口内的所有空气。

[0329] • 使用塑管封口机将冷冻袋密封,首先在4℃下冷却约5~10分钟,然后在-80℃的冰室中保管。

[0330] 3. 供体淋巴细胞的解冻(在无菌下进行)

[0331] 在一个实施方式中,供体淋巴细胞的解冻可以如下方式进行。以下示例的各种数值、试剂、步骤等为代表例,本领域技术人员可以适宜变更地进行供体淋巴细胞的解冻。

[0332] • 将经保存的供体细胞的冷冻袋在例如37℃恒温槽中解冻。之后的操作优选在无菌下进行。

[0333] • 使用注射器(例如,带有18G注射针的50mL注射器),从经解冻的冷冻袋中取出细胞悬浮液,移至离心管(例如,50mL离心管2根各12.5mL)中。

[0334] • 在装有细胞悬浮液的离心管中追加例如5%白蛋白液(Nihon Pharmaceutical Co.,Ltd,123146364献血白蛋白5%静脉注射12.5g/250mL)(例如,相对于细胞悬浮液12.5mL为37.5mL),使其充分混合。然后,静置约5分钟。

[0335] • 例如,以600G在22℃下进行10分钟离心分离(例如,优选将离心分离机的加速器设定为快,将制动器设定为慢)。

[0336] • 温和地废弃上清液,在细胞团块中加入清洗用的含白蛋白生理盐水(例如,由5%白蛋白液25mL和生理盐水19mL制作)等适宜的液体使其悬浮。

[0337] • 例如,以600G在22℃下进行10分钟离心分离(例如,优选将离心分离机的加速器设定为快,将制动器设定为慢)。

[0338] • 温和地废弃上清液,在细胞团块中加入ALyS505N培养液(例如,相对于50mL离心管为10mL)使其悬浮。

[0339] • 在装有ALyS505N-0培养液或与其同等液体的培养袋(例如,Nipro Corporation 87598Nipro medium ALyS505NB10)中,分别以例如最终浓度10μg/mL加入抗人CD80抗体(例如,m2D10.4;Cat.No.16-0809-85,eBioscience公司)和抗人CD86抗体(例如,IT2.2;

Cat.No.16-0869-85、eBioscience公司)(或加入CTLA4-Ig融合蛋白(例如,贝拉西普(belatacept))等同等的抑制因子)、在该培养袋中用注射器(例如,带有18G注射针的20mL注射器)注入上述的细胞悬浮液而进行加入。一个例子中,培养袋中的总液量约为840mL。

[0340] 4. 患者淋巴细胞的分离~一次培养开始(在无菌下进行)

[0341] 在一个实施方式中,患者淋巴细胞的分离可以如下方式进行。以下示例的各种数值、试剂、步骤等为代表例,本领域技术人员可以适宜变更地进行患者淋巴细胞的分离。

[0342] • 对于从患者采集的血浆,在恒温槽中例如以56℃加热30分钟预先进行灭活。将不直接使用者冷冻保存。

[0343] • 将从患者采集的外周血放入装有适量的适合的介质例如Ficoll-Paque(例如,20mL)的离心管中,例如,以860G在22℃下进行20分钟离心分离(例如,优选为将离心分离机的加速器设定为慢,将制动器设定为慢)。

[0344] • 废弃上清液,将包含淋巴细胞层的细胞悬浮液移至另一离心管(例如,50mL离心管2根)中。

[0345] • 在装有细胞悬浮液的离心管中追加生理盐水(例如,总液量至50mL为止的适量),用移液管重复进行抽吸排出,使其充分混合。

[0346] • 例如,以500G在22℃下进行10分钟离心分离(也可以将离心分离机的加速器设定为快,将制动器设定为快)。

[0347] • 废弃上清液,再次追加生理盐水(例如,总液量至50mL为止的适量),用移液管将细胞团块重复抽吸排出,使其充分混合。

[0348] • 例如,以500G在22℃下进行5分钟离心分离(也可以将离心分离机的加速器设定为快,将制动器设定为快)。

[0349] • 废弃上清液,在细胞团块中加入例如ALyS505N-0培养液(例如,10mL)使其悬浮,制作细胞悬浮液(例如,追加ALyS505N-0培养液至总计20mL为止)。此处,取出0.5mL左右的细胞悬浮液,确认细胞数、活细胞数和表面抗原的表达。

[0350] • 在于“3. 供体淋巴细胞的解冻”中制作的ALyS505N-0培养液中装入了供体细胞和抗体等抑制因子的培养袋中追加患者来源的灭活血浆。

[0351] • 在该培养袋中,用注射器(例如,带有18G注射针的20mL注射器)注入上述患者来源细胞悬浮液而进行加入,使用塑管封口机将培养袋密封。一个例子中,培养袋中的总液量约为1000mL。

[0352] • 在37℃恒温箱内例如培养1周。

[0353] 5-1. 培养基交换(例如,第1周,优选在无菌下进行)

[0354] 在一个实施方式中,培养基交换可以如下方式进行。以下示例的各种数值、试剂、步骤等为代表例,本领域技术人员可以适宜变更地进行培养基交换。

[0355] • 从恒温箱中取出培养袋,将内容物分注于离心管(例如,225mL离心管4根)中。

[0356] • 例如,以600G在22℃下进行10分钟离心分离(例如,优选地,也可以将离心分离机的加速器设定为快,将制动器设定为快)。

[0357] • 温和地废弃上清液,在细胞团块中加入例如ALyS505N-0培养液使其悬浮,制作细胞悬浮液(例如,追加ALyS505N-0培养液总计至20mL为止)。此处,取出0.3mL左右的细胞悬浮液,确认细胞数和活细胞数。

[0358] • 例如,在装有ALyS505N-0培养液的培养袋中,用注射器(例如,带有18G注射针的20mL注射器)注入细胞悬浮液而进行加入。

[0359] • 分别将抗人CD80抗体(例如,2D10.4)稀释液和抗人CD86抗体(例如,IT2.2)稀释液例如以最终浓度成为10 μ g/mL的方式(或可以使用CTLA4-Ig融合蛋白(例如贝拉西普(belatacept))等抑制因子)用注射器(例如,带有18G注射针的20mL注射器)注入培养袋中而进行加入。

[0360] 5-2. 供体淋巴细胞的解冻/抗原再刺激~二次培养开始(例如,第1周,在无菌下进行)

[0361] 在一个实施方式中,供体淋巴细胞的解冻/抗原再刺激~二次培养开始可以如下方式进行。以下示例的各种数值、试剂、步骤等为代表例,本领域技术人员可以适宜变更地进行供体淋巴细胞的解冻/抗原再刺激~二次培养开始。

[0362] • 将经保存的供体细胞的冷冻袋和患者来源的灭活血浆在例如37℃恒温槽中解冻。之后的操作优选在无菌下进行。

[0363] • 使用注射器(例如,带有18G注射针的50mL注射器),从经解冻的冷冻袋中取出供体细胞悬浮液,移至离心管(例如,50mL离心管2根)中。

[0364] • 在装有供体细胞悬浮液的离心管中追加5%白蛋白液(例如,对于2根50mL离心管,总计约50mL),使其充分混合。然后,静置约5分钟。

[0365] • 例如,以600G在22℃下进行10分钟离心分离(离心分离机的加速器设定为快、制动器设定为慢)。

[0366] • 温和地废弃上清液,在细胞团块中加入清洗用的含白蛋白生理盐水(例如,由5%白蛋白液25mL和生理盐水19mL制作)使其悬浮。

[0367] • 例如,以600G在22℃下进行10分钟离心分离(离心分离机的加速器设定为快、制动器设定为慢)。

[0368] • 温和地废弃上清液,在细胞团块中加入例如ALyS505N-0培养液(例如,相对于50mL离心管为10mL)使其悬浮。

[0369] • 在于“3. 供体淋巴细胞的解冻”中制作的ALyS505N培养液中加入了患者细胞和抗体等抑制因子的培养袋中,用注射器(例如,带有18G注射针的20mL注射器)注入解冻的患者来源的灭活血浆(例如,10mL)而进行加入,进而,在该培养袋中用注射器(例如,带有18G注射针的20mL注射器)注入上述的细胞悬浮液而进行加入。一个例子中,培养袋中的总液量约为1000mL。

[0370] • 使用塑管封口机将培养袋密封。

[0371] • 在37℃恒温箱内例如培养1周。

[0372] 6. 二次培养中的检测(培养细胞取出试验)

[0373] 在一个实施方式中,二次培养中的检测可以如下方式进行。以下示例的各种数值、试剂、步骤等为代表例,本领域技术人员可以适宜变更地进行二次培养中的检测。

[0374] • 代表性地,从二次培养开始第3天(培养总计第10天)从培养袋中取出少量的培养液,对支原体污染等进行检测。

[0375] 7. 培养淋巴细胞的回收/填充(在无菌下进行)

[0376] 在一个实施方式中,培养淋巴细胞的回收/填充可以如下方式进行。以下示例的各

种数值、试剂、步骤等为代表例,本领域技术人员可以适宜变更地进行培养淋巴细胞的回收/填充。

[0377] • 例如,从二次培养开始第7天(培养总计第14天)从恒温箱中取出培养袋,将内容物分注于离心管(例如,225mL离心管4根)中。

[0378] • 例如,以600G在22℃下进行10分钟离心分离(也可以将离心分离机的加速器设定为快,将制动器设定为快)。

[0379] • 温和地废弃上清液,在细胞团块中加入生理盐水使其悬浮。

[0380] • 例如,以600G在22℃下进行10分钟离心分离(例如,优选地,也可以将离心分离机的加速器设定为快,将制动器设定为快)。

[0381] • 温和地废弃上清液,在细胞团块中加入生理盐水(例如,10mL)使其悬浮,制作细胞悬浮液。

[0382] • 将细胞悬浮液温和地加入装有适量的Ficoll-Paque(例如,20mL)的离心管(例如,50mL离心管)中进行层叠。

[0383] • 例如,以860G在22℃下进行20分钟离心分离(将离心分离机的加速器设定为慢,将制动器设定为慢)。

[0384] • 废弃上清液,将包含淋巴细胞层的细胞悬浮液移至另一离心管(例如,50mL离心管)中。

[0385] • 在装有细胞悬浮液的离心管中追加生理盐水(例如,总液量至50mL为止的适量),用注射器(例如,带有18G注射针的50mL注射器)重复进行抽吸排出,使其充分混合。

[0386] • 例如,以500G在22℃下进行10分钟离心分离(也可以将离心分离机的加速器设定为快,将制动器设定为快)。

[0387] • 将上清液保留5mL左右,其余废弃,用移液管重复进行抽吸排出,使其充分混合。

[0388] • 追加生理盐水(例如,总液量至50mL为止的适量),用注射器(例如,带有18G注射针的50mL注射器)重复进行抽吸排出,使其充分混合(a)。

[0389] • 例如,以500G在22℃下进行5分钟离心分离(也可以将离心分离机的加速器设定为快,将制动器设定为快)(b)。

[0390] • 将上清液保留5mL左右,其余废弃,用移液管重复进行抽吸排出,使其充分混合(c)。

[0391] • 将上述(a)、(b)和(c)进一步重复2次。

[0392] • 将最后的离心分离后的上清液取出适量(例如,4mL),供于无菌检测和支原体检测。

[0393] • 再次加入生理盐水使其悬浮,将细胞悬浮液移至最终的容器(例如,100mL生理盐水的瓶)中。取出适量(例如,4mL),确认最终产物的细胞数、活细胞数、表面抗原的表达和内毒素的含量。

[0394] 8. 二次包装

[0395] 在一个实施方式中,二次包装可以如下方式进行。以下示例的各种数值、试剂、步骤等为代表例,本领域技术人员可以适宜变更地进行二次包装。

[0396] • 代表性地,基于适合的基准(代表性的是NUHCPC-M-12-ATREG)在标签上输入印刷被检者ID、制造编号、使用期限,将标签粘贴于容器上。

[0397] • 基于适合的基准(代表性的是NUHCPC-PMF-ATREG14)制订“用法/用量/效能或效果以及使用上的注意或操作上的注意”。

[0398] • 将试验物和“用法/用量/效能或效果以及使用上的注意或操作上的注意”收纳于带有夹子的塑料袋中。

[0399] • 放入移送容器中并保管于监视单元内直至出货为止。

[0400] (附注)

[0401] 本说明书中,“或”在可以采用文章中所列举的事项的“至少1个以上“时使用。”或者”也是同样。本说明书中明确记为“2个值的范围内”的情况,该范围还包括2个值本身。

[0402] 对于本说明书中引用的科学文献、专利、专利申请等参考文献,将其整体以与各自具体记载的内容相同程度地作为参考引入本说明书中。

[0403] 以上为了容易理解本发明而示出优选的实施方式进行了说明。以下基于实施例对本发明进行说明,但上述的说明和以下的实施例仅出于示例的目的而提供,并非出于限定本发明的目的而提供。因此,本发明的范围不限定于本说明书中具体记载的实施方式或实施例,仅受权利要求书限定。

[0404] 实施例

[0405] 以下基于实施例对本发明进行更具体地说明。但是,本发明不限定于这些实施例。需要说明的是,在整个本说明书中,所引用的全部文献通过引用直接并入本申请中。

[0406] (实施例1:功能丧失试验)

[0407] 本实施例中,为了鉴定诱发免疫耐受所需的成分而进行了功能丧失试验。以下进行说明。

[0408] (材料和方法)

[0409] (无反应性细胞的生成)

[0410] 依据文献中已经记载的方法进行实验(1-3)。简而言之,从C57BL6(以下记作B6)小鼠和BALB/c小鼠(CLEA Japan, Inc.、CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.等)中摘取脾脏,使红细胞溶血而得到脾细胞(淋巴细胞)后,以成为 4×10^6 个细胞/ml的方式用包含10%灭活胎牛血清(FCS)(SIGMA#172012-500ML Lot 11D257或biosera#FB-1380/500Lot.015BS482)的RPMI1640培养基(Sigma;R8758-500MK)进行调整。对成为刺激物的BALB/c脾细胞照射辐射线(γ 射线)30Gy后,以1:1与B6脾细胞进行混合,添加eBioscience公司制仓鼠抗小鼠CD80抗体(16-10A1)(Cat.No.16-0801-82)和大鼠抗小鼠CD86抗体(GL1)(Cat.No.14-0862-82)使各自的最终浓度为10 μ g/mL,在12孔板(Corning、#3513)(1-2.5mL)、6孔板(Corning、Cat.No.3516)(3~6mL)、6cm培养皿(Greiner CELLSTAR(注册商标)dish,Cat.No.628160)(3~6mL)或10cm培养皿(Corning、Cat.No.430167)(10~15mL)中在37℃、5%CO₂恒温箱中培养14天。在培养开始后第7天通过离心分离去除培养液后,在与培养开始时相同的条件下新添加包含BALB/c来源的辐射线照射脾细胞和抗CD80抗体/抗CD86抗体的培养液。在14天后回收细胞,得到无反应性细胞。

[0411] 在一部分实验中,使PE荧光标记抗小鼠CD8抗体(53-6.7;eBioscience、#12-0081-85)与无反应性细胞反应后,通过使用了抗PE磁珠(Miltenyi Biotec#1300-10-639)的auto-MACS(Miltenyi Biotec),将细胞筛选为CD8阳性和CD8阴性。另外,使用PE荧光标记CD19抗体(1D3;eBioscience、#12-0193-85)进行同样的操作,将细胞筛选为CD19阳性和

CD19阴性。将这些细胞用于免疫反应抑制能力试验。进而,在一部分实验中,为了通过细胞表面抗原的表达能识别表达FOXP3的调节T细胞(regT细胞),使用以使应答细胞同时表达FoxP3和人CD2的方式进行了基因改造的B6来源小鼠(4),通过使用了PE荧光标记抗人CD2抗体(RPA-2.10;eBioscience、#12-0029-42)和抗PE磁珠的auto-MACS,筛选为人CD2阳性细胞(FoxP3表达regT细胞)和人CD2阴性细胞,用于免疫反应抑制能力试验。

[0412] (免疫反应抑制能力的评价)

[0413] 依据文献中已经记载的方法进行实验(3)。简而言之,将无反应性细胞从与应答B6脾细胞的比率为1/2调整为1/16后,添加至96孔板(Corning公司制、Cat.No.3799)上的使用了新采集的B6小鼠和BALB/c小鼠的脾细胞的以 1×10^6 个细胞/mL的1:1混合培养物(最终200 μ L/孔,4个孔)中,在37℃、5%CO₂恒温箱中进行培养(每个孔中,B6小鼠和BALB/c小鼠的脾细胞分别为 1×10^5 细胞、无反应性细胞为 1×10^5 细胞的1/2~1/16的细胞数)。在培养开始第4天添加³H-胸苷(10 μ L),在培养开始第5天(添加³H-胸苷的16~20小时后)通过Cell Harvester(Molecular Devices)回收培养细胞,利用闪烁计数器测定了³H-胸苷摄取量。将初始的B6淋巴细胞的无刺激下的³H-胸苷摄取量设为1而制作图,进行了比较研究。

[0414] (结果)

[0415] 将结果示于图1。值表示将无刺激状态(初始)的³H-胸苷摄取量的平均值设为1而计算出的值。如图1a所示,未进行任何筛选的完全B6脾脏培养细胞在抗CD80/86抗体的存在下与刺激BALB/c脾细胞一起培养(以下称为“抗体/刺激物处理”)后,确认了具有抑制新鲜的(初始)B6脾细胞与BALB/c脾细胞的反应的效果。可预测该诱导了无反应性的总培养细胞(细胞混合物)除了无反应性CD8阳性细胞、无反应性CD4阳性细胞、调节T细胞(regT细胞)之外还包含其它细胞(CD19阳性B细胞)。

[0416] 使用从该抗体/刺激物处理后的细胞混合物中将CD8阳性细胞(几乎为CD44阳性的无反应性CD8阳性细胞)纯化后的试样进行了实验,结果可知:即使是仅有无反应性CD8阳性细胞的细胞群体也具有抑制效果(黑色),去除了无反应性CD8阳性细胞的剩余的细胞群体无抑制效果(灰色)(图1b)。

[0417] 进而,如图1c所示,从抗体/刺激物处理后的细胞混合物中将人CD2阳性细胞=regT细胞纯化后,即使是仅有regT细胞的细胞群体也具有抑制效果(黑色)、以及去除了regT细胞的剩余的细胞群体也具有同样的抑制效果(灰色)。

[0418] 另一方面,如图1d所示,从抗体/刺激物处理后的细胞混合物中将CD19阳性细胞(B细胞)纯化的情况下,仅有B细胞的细胞群体无抑制效果(黑色),但去除了B细胞的剩余的细胞群体具有抑制效果(灰色)。

[0419] 由此,若不存在CD8阳性细胞,则免疫反应的抑制=免疫耐受的诱导显著减少,即使仅单独使用CD8阳性细胞,也显示出较强的免疫耐受诱导,因此可理解,CD8阳性细胞是诱导有效的免疫耐受所必须的细胞。因此,可理解的是:在制造免疫耐受诱导细胞制品时,确认CD8阳性细胞的有无在品质管理上是重要的。

[0420] 经纯化的FOXP3阳性细胞群体和不存在FOXP3阳性细胞的细胞群体均观察到同样的抑制作用,这与CD8阳性细胞具有诱导免疫耐受的能力的情况并不矛盾。另外,也与作为调节T细胞而广为人知的FOXP3阳性细胞具有免疫抑制能力的情况一致。因此认为:抗体/刺激物处理后的总无反应性细胞中,对于诱导免疫耐受有效的细胞与无反应性CD8阳性细胞

同为FOXP3阳性细胞,该混合物可最有效地诱导免疫耐受。

[0421] 由对CD19进行筛选的实验可知,CD19阳性细胞(B细胞)不具有抑制效果,可理解的是不需要CD19阳性细胞。

[0422] (实施例2:基于CD80/86阻断的抑制功能获得试验)

[0423] 本实施例中,确认了CD8阳性T细胞的免疫耐受诱导能力(免疫排斥抑制能力)是通过基于抗体/刺激物处理的无反应性诱导而实现的,而且对FOXP3阳性T细胞中也进行了同样的实验。

[0424] (材料和方法)

[0425] 利用与实施例1同样的方法,对于分别从野生型B6小鼠和以同时表达FoxP3和人CD2的方式进行了基因改造的B6来源小鼠获得的脾细胞进行抗体/刺激物处理,得到无反应性细胞。使该无反应性细胞、以及从野生型B6小鼠和以同时表达FoxP3和人CD2的方式进行了基因改造的B6来源小鼠获得的无刺激的初始脾细胞,分别与PE荧光标记抗小鼠CD8抗体或PE荧光标记抗人CD2抗体反应。然后,通过使用了抗PE磁珠的auto-MACS将细胞筛选为CD8阳性和CD8阴性,或筛选为人CD2阳性和人CD2阴性。将筛选的各细胞添加至96孔板上的混合培养体系中,调查了其免疫抑制能力。

[0426] (结果)

[0427] 将结果示于图2。

[0428] 如图2a(值表示将无刺激状态(初始)的³H-胸苷摄取量的平均值设为1而计算出的值。)所示,表明:无反应性CD8阳性细胞具有抑制效果(黑色)以及从无刺激的初始脾细胞中分离的CD8阳性细胞不具有抑制效果(灰色)。进而如图2b所示,抗体/刺激物处理后的regT细胞(黑色)也发挥免疫抑制能力,其抑制能力比无刺激的初始的regT细胞(灰色)强。

[0429] 由这些结果可知:CD8阳性细胞诱发免疫耐受(抑制免疫反应)时,需要在抗CD80/86抗体的存在下使用刺激BALB/c脾细胞的刺激来诱导无反应性,同样的情况也出现在regT细胞发挥更强力的免疫抑制功能时。即,表明通过抗体/刺激物处理而诱导的无反应性CD8阳性细胞和regT细胞具有强力的免疫耐受诱导能力。

[0430] (实施例3:纯化无反应性细胞的移植后的耐受诱导能力)

[0431] 本实施例中,对诱导无反应性后的纯化细胞在移植后是否具有耐受诱导能力进行了确认。

[0432] (材料和方法)

[0433] 利用与实施例1同样的方法,由野生型B6小鼠和以同时表达FoxP3和人CD2的方式进行了基因改造的B6来源小鼠的脾细胞,通过在抗CD80/86抗体的存在下与刺激BALB/c脾细胞的共培养而得到无反应性细胞。进而,在一部分实验中,从得到的无反应性细胞(总无反应性细胞)中,利用与实施例1同样的方法筛选了CD8阳性细胞、CD4阳性细胞或人CD2阳性细胞。对野生型B6小鼠,在照射2Gy的辐射线(γ射线)的3天后移植了BALB/c小鼠的心脏,刚移植后(或与心脏移植为同一天)从尾静脉给予初始B6脾细胞或得到的无反应性细胞,观察了心脏的排斥。各组以5只以上进行实验。

[0434] (结果)

[0435] 图3示出其结果。如图3a所示,未移植无反应性细胞的情况,移植的心脏在约2周为止全部病例被排斥。相对于此,在总无反应性细胞给予组中,依赖于给予的细胞数而使心脏

的存活率得到改善,在注入 6×10^6 个的总无反应性细胞时,即使在判定为对移植的心脏诱导了耐受的100天之后,在全部小鼠中移植的心脏均存活。如图3b所示,仅在对受体小鼠照射辐射线后注入了无反应性细胞的情况下观察到该耐受诱导,无辐射线照射地给予了无反应性细胞的情况、将初始细胞注入至辐射线照射小鼠的情况完全观察不到该耐受诱导。向辐射线照射小鼠给予从无反应性细胞中去除了人CD2阳性细胞(FoxP3表达regT细胞)或无反应性CD8阳性细胞的细胞群体的情况下,未观察到如注入总无反应性细胞时的、100天后移植的心脏100%存活的情况,耐受诱导能力显著降低,证实了总无反应性细胞(无反应性细胞混合物)的给予具有优越性(图3c)。另外,在给予纯化的初始CD8阳性T细胞时,在全部小鼠中移植的心脏被排斥,而注入了无反应性CD8阳性T细胞时40%的接受给予的小鼠中诱导了耐受(图3d)。进而,在注入了初始人CD2阳性细胞(FoxP3表达regT细胞)的情况下虽然存在诱导了耐受的小鼠,但给予了无反应性人CD2阳性细胞(FoxP3表达regT细胞)者更有效地诱导了耐受(图3d)。因此,与单独给予无反应性CD8、CD4、FoxP3阳性细胞各自的情况相比,无反应性细胞混合物的给予更有效地抑制对所移植的心脏的排斥反应,进而表明,通过对受体进行辐射线照射等而引起骨髓抑制,可更有效地诱导耐受。

[0436] 该结果与实施例1并无矛盾,该结果并没有否定如下可能性:即使是单独给予经纯化的无反应性CD8、CD4、FoxP3阳性细胞、初始FoxP3阳性细胞的情况,若其细胞数较多,则显示出与无反应性细胞混合物的注入同等的对移植的心脏的排斥反应的抑制(耐受诱导=移植心脏存活100天以上)。另外,在该实验中使用了经基因改造的小鼠,因此可以通过细胞表面的人CD2的表达而在细胞存活的状态下将Foxp3表达细胞=抑制性T细胞纯化,但通常无法用存活的细胞检测细胞内的Foxp3的表达。已知:使用CD25阳性CD4阳性T细胞作为替代物的情况,与抑制性T细胞相比包含大量活化的CD4阳性T细胞,其免疫抑制功能弱。另外,由于Foxp3阳性抑制性T细胞少,因此无反应性表达Foxp3的抑制性细胞的纯化非常困难。实际上,为了获得图3d所示的 1×10^6 个的人CD2表达细胞=FoxP3表达细胞,需要 1×10^7 个以上的总无反应性细胞。因此,此处所示的结果表明混合物更实用且有效。

[0437] (实施例4:源自人PBMC的无反应性细胞的能力)

[0438] 接着,本实施例中,对于源自人PBMC的无反应性细胞的能力进行评价。

[0439] (材料和方法)

[0440] (无反应性细胞的生成)

[0441] 依据文献中已经记载的方法进行实验(5-8)。使用Promo cell公司制Lymphocyte separation Media(Cat.No.C-44010)或Ficoll-Paque PREMIUM(GE Healthcare#17-5442-02)或Lymphocyte separation Solution(Nacalai Tesque#20828)等,从4位志愿者(2人作为刺激物、2人作为效应器)的人外周血中分离单核细胞(PBMC),用添加了2%人AB型血清(库)的Biowest公司制ALyS505N-0培养基(细胞科学研究所(CSTI)1020P10)调整至为 4×10^6 个细胞/ml。对刺激PBMC照射辐射线(γ 射线)30Gy,以1:1与应答PBMC进行混合。在上述混合的PBMC中添加eBioscience公司制小鼠抗人CD80抗体(2D10.4)(Cat.No.16-0809-85)和小鼠抗人CD86抗体(IT2.2)(Cat.No.16-0869-85)以使最终浓度分别为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$,用12孔板(Corning、#3513)、6孔板(Corning、Cat.No.3516)、6cm培养皿(Greiner CELLSTAR(注册商标)dish,Cat.No.628160)、或10cm培养皿(Corning、Cat.No.430167),在 37°C 、5% CO_2 恒温箱中开始进行培养。在培养开始后第7天通过离心分离去除培养液后,在与培养开始时相

同的条件下添加包含辐射线照射刺激物PBMC和抗CD80抗体/抗CD86抗体的培养液。在培养第14天回收细胞而通过离心分离洗去培养液,得到无反应性细胞。在一部分实验中,使用PE荧光标记小鼠抗人CD25抗体(BC96;eBioscience#12-0259-42)、FITC荧光标记小鼠抗人CD4抗体(RPA-T4;eBioscience#11-0049-42)、APC荧光标记小鼠抗人CD8抗体(RPA-T8;eBioscience#17-0088-42)将无反应性细胞染色后,使用JSAN细胞分选仪(Bay bioscience Co.,Ltd.)将各细胞纯化并添加至混合培养体系中。

[0442] (免疫反应抑制能力的评价)

[0443] 将得到的无反应性细胞从与应答PBMC的比率为1/2调整为1/16后,添加至使用了新采集的同一志愿者的PBMC的96孔板(Corning公司制、Cat.No.3799)上的以各 2×10^5 个/200 μ L/孔的4个孔的混合培养体系中,在37℃、5%CO₂恒温箱中进行培养。在培养开始第4天添加³H-胸苷(10 μ L),在培养开始第5天(添加³H-胸苷的16~20小时后)通过Cell Harvester(Molecular Devices)回收培养细胞,利用闪烁计数器测定了³H-胸苷摄取量。将初始应答PBMC的无刺激下的³H-胸苷摄取量设为1而制作图,进行了比较研究。

[0444] (结果)

[0445] 将结果示于图4。

[0446] 图4a示出“抗体/刺激物处理后的总无反应性细胞”的用量依赖性的免疫反应抑制能力。证实了抗体/刺激物处理后的总无反应性细胞的比率越高,抑制效果越高。

[0447] 图4b是:从左起第3位的柱状图起向右,依次使用对抗体/刺激物处理后的总无反应性细胞进行分选而得的将包含CD8阳性CD44阳性无反应性细胞和regT细胞的CD25阳性细胞纯化而得的细胞群体(灰色)、将CD4阳性CD25阳性regT细胞纯化而得的细胞群体(纵纹)、进而在纯化的CD4阳性CD25阳性regT细胞加入了纯化的CD8阳性细胞的细胞群体(黑色),对免疫抑制能力进行了比较。此处所示的结果证实了:regT细胞在单独使用时不具有免疫抑制能力,通过与CD8阳性T细胞共存而发挥免疫抑制能力。

[0448] 图4c是:将抗体/刺激物处理后的总无反应性细胞筛选为CD4阳性细胞(灰色)和CD4阴性细胞(斜线),与该总无反应性细胞(黑色)进行免疫抑制能力的比较。值表示将无刺激状态(初始)的³H-胸苷摄取量的平均值设为1而计算出的值。CD4阳性细胞中包含regT细胞,CD4阴性细胞中包含CD8阳性细胞。CD4阳性细胞及CD4阴性细胞均显示出免疫抑制。

[0449] 由图4b中regT细胞单独时无法发挥免疫抑制能力的结果及在与CD8阳性细胞的共存下regT细胞发挥了免疫抑制能力的结果,启示出:为了发挥regT细胞的充分的免疫抑制能力,需要存在CD8阳性细胞或除regT细胞以外的CD4阳性细胞。可以认为,CD4阴性细胞的免疫抑制能力源自其中包含的无反应性CD8阳性T细胞。

[0450] (实施例5:示出抗原特异性抑制的实验)

[0451] 本实验中,对抗体/刺激物处理后的总无反应性细胞的供体特异性耐受诱导进行了确认。

[0452] (材料和方法)

[0453] 利用与实施例1同样的方法,在抗CD80/86抗体的存在下用源自BALB/c小鼠(H-2^b)的脾细胞刺激由野生型B6小鼠(H-2^b)得到的脾细胞,进行培养而得到无反应性细胞。在照射2Gy的辐射线3天后对移植了BALB/c小鼠或CBA小鼠(H-2^k)的心脏的野生型B6小鼠从尾静脉给予 5×10^6 个该无反应性细胞,观察了心脏的排斥。

[0454] (结果)

[0455] 如图5所示,向B6小鼠注入在抗CD80/86抗体的存在下用Balb/C小鼠脾细胞刺激而得的B6小鼠来源的无反应性细胞时,100%抑制所移植的BALB/c小鼠的心脏的排斥,在100天后心脏也得以存活、即诱导了耐受。相对于此作为第三方的CBA小鼠的心脏在移植后迅速引发了排斥反应,在约50天发生100%排斥。

[0456] 由以上结果示出:在抗CD80/86抗体的存在下与抗原反应而得的宿主来源的淋巴细胞具有该抗原特异性的免疫反应的抑制能力。

[0457] (实施例6:基于无反应性细胞的选择性早期粘附的初始细胞的免疫反应抑制)

[0458] 本实验中,确认了:由于无反应性细胞比初始细胞更迅速地与供体(刺激)细胞结合,因此抑制了初始细胞的反应和增殖。

[0459] (材料和方法)

[0460] 利用与实施例1同样的方法,对于从B6小鼠获得的脾细胞,在抗CD80/86抗体的存在下用BALB/c小鼠来源的脾细胞进行刺激而得到无反应性细胞。在该实验中,将从以稳定表达荧光色素GFP的方式进行了基因改造的B6小鼠新获得的脾细胞用作效应器。在12孔板(Corning公司制、Cat.No.3799)内,向包含各 1×10^6 个/ml的上述的应答B6脾细胞和刺激(供体)BALB/c脾细胞的4ml的混合培养体系中添加上述无反应性细胞,以使与应答B6脾细胞的比率为1/2,在37℃、5%CO₂恒温箱中进行培养。从1天后至3天后为止经时地观察孔板,拍摄了照片。

[0461] (结果)

[0462] 图6示出照片的代表性图像。仅最下排的添加了无反应性细胞的培养体系中自培养1天后开始形成细胞的块(团簇),在仅具有初始细胞和供体细胞的(从上面起第2排)的体系中未观察到细胞的块。因此,可推测出无反应性细胞可能以BALB/c来源的细胞为中心而形成了细胞块。在培养2天以后,初始B6脾细胞也开始形成细胞块,同时在该部位荧光变强。可认为这是由粘附于BALB/c脾细胞并发生反应的、发出荧光的初始细胞增加所致的,在初始细胞单独培养的上排及添加了无反应性细胞的培养体系中未观察到这样的荧光的增强。因此,启示出通过添加无反应性细胞而抑制了初始细胞的增殖反应。由该结果启示出:无反应性细胞比初始细胞更迅速地粘附于供体细胞,抑制初始细胞对供体细胞的识别(粘附),由此抑制了初始细胞的反应=增殖。

[0463] (实施例7:发挥免疫抑制能力(无反应性诱导能力)的细胞的属性)

[0464] 在本实验中进行了无反应性细胞中发挥免疫抑制能力(无反应性诱导能力)的细胞为CD44阳性的确认实验。

[0465] (材料和方法)

[0466] 利用与实施例1同样的方法,在抗CD80/86抗体存在下用BALB/c细胞刺激由野生型B6小鼠得到的脾细胞而得到无反应性细胞。用APC荧光标记抗小鼠CD8抗体(53-6.7; eBioscience#17-0081-82或BioLegend;#100730)、PerCP/Cy5.5荧光标记抗小鼠CD4抗体(RM4-5; eBioscience#45-0042-82或GK1.5; BioLegend;#100434)以及APC/Cy7荧光标记抗小鼠CD44抗体(BioLegend;#1003028)将该无反应性细胞染色后,使用JSAN细胞分选仪(Bay bioscience Co.,Ltd.)将CD8阳性CD44阴性细胞或CD4阳性CD44阴性细胞去除后,添加至混合培养体系中。进而,还进行了使用JSAN细胞分选仪将CD8阳性CD44阳性细胞或CD4阳性

CD44阳性细胞纯化并添加至混合培养体系中的实验。

[0467] (结果)

[0468] 如图7a所示,即使从无反应性细胞中去除CD8阳性CD44阴性细胞或CD4阳性CD44阴性细胞,与添加总无反应性细胞的情况同样地,可观察到抑制新混合培养体系中的作为应答细胞的初始B6脾细胞的增殖。由该结果启表明:CD44阴性细胞不具有免疫抑制作用即无反应性诱导能力。进而如图7b所示,表明纯化的CD8阳性CD44阳性细胞或CD4阳性CD44阳性细胞即使单独使用也具有免疫抑制能力,确认了:到目前为止的实施例中所示的无反应性CD8阳性细胞或无反应性CD4阳性细胞的免疫抑制是由CD44阳性细胞所发挥的。

[0469] 另外,同时,通过FACS调查了无反应性细胞的表型,结果如图7c所示,在无反应性CD8阳性T细胞中具有较强免疫抑制功能的无反应性CD44阳性细胞为16.61%、在无反应性CD4阳性T细胞中具有较强免疫抑制功能的无反应性CD44阳性细胞为31.01%。

[0470] (实施例8:使用了各种抑制因子的免疫耐受的诱发)

[0471] 本实施例中,示出:即使使用各种抑制因子也能够诱发免疫耐受。

[0472] (无反应性细胞的生成)

[0473] 基本上,依据实施例1中记载的方法和依据文献中已经记载的方法进行实验(1~3)。对于受体PBMC和供体PBMC,分别使用从人外周血新鲜分离者或将在-80℃下冷冻保存者迅速解冻来使用,这些细胞均用包含自体血浆或10%灭活胎牛血清(FCS)(SIGMA#172012-500ML Lot 11D257或biosera#FB-1380/500Lot.015BS482)的RPMI1640培养基(Sigma; R8758-500MK)调整至 4×10^6 个细胞/mL。预先对供体PBMC照射20Gy辐射线。以1:1混合这些受体PBMC和供体PBMC,在该混合物中添加抑制因子(例如,抗CD80抗体/抗CD86抗体时分别以最终浓度10μg/ml来添加,贝拉西普(belatacept)(或阿巴西普(abatacept))时分别以最终浓度10μg/ml~40μg/ml来添加)。在6cm培养皿(Greiner CELLSTAR(注册商标)dish, Cat.No.628160)(培养体积3~6mL)或10cm培养皿(Corning、Cat.No.430167)(培养体积10~15mL)中在37℃、5%CO₂恒温箱中进行7天培养(培养开始时的细胞密度为 4×10^6 个细胞/mL)。

[0474] 在培养开始后第7天通过离心分离回收培养的受体PBMC,用上述的培养基调整至 4×10^6 个细胞/mL。在该培养的受体PBMC中,以细胞数比成为2:1的方式添加新制备的经照射的供体PBMC,进而还添加抑制因子(例如,抗CD80抗体/抗CD86抗体时分别以最终浓度5μg/ml~10μg/ml来添加;贝拉西普(belatacept)(或阿巴西普(abatacept))时以最终浓度10μg/ml~40μg/ml来添加)。在与上述相同的条件下进行7天培养(细胞密度: 4×10^6 个细胞/mL)。

[0475] (免疫反应抑制能力的评价)

[0476] 从培养开始起第14天通过离心分离回收诱导细胞,基本上依据文献中已经记载的方法进行淋巴细胞混合试验(3)。在37℃、5%CO₂恒温箱中共培养细胞悬浮物。在共培养开始第4天添加³H-胸苷(10μl),在共培养开始第5天(添加³H-胸苷的16~20小时后)去除培养液中的³H-胸苷,测定³H-胸苷摄取量,能够确认免疫反应抑制能力。

[0477] (实施例9:细胞制剂的品质管理)

[0478] 对于细胞制剂的制法,参照上述的实施例1~7中的记载。对于依据实施例制造的细胞制剂,进行如下品质管理。

[0479] 应满足的品质标准的代表例如下所述。

[0480] [表4]

[0481] 最终制品的品质标准

[0482]

		临床试验时的发货		
项目		试验项目	试验法	暂定标准值
确认试验	外观	外观试验	目视	微黄白色~淡黄色的细胞悬浮液
	细胞表型	CD3 阳性细胞比率	FCM	≥ 50%
		CD3 阳性细胞中的 CD8 阳性CD44 阳性细胞比率	FCM	≥ 5%
		CD3 阳性细胞中的 CD4 阳性CD44 阳性细胞比率	FCM	≥ 5%
		CD3 阳性细胞中的 CD4 阳性CD25 阳性细胞比率	FCM	≥ 5%
纯度试验		CD45 阳性细胞比率	FCM	≥ 95%
安全性		无菌试验	日本药典法	未观察到微生物的发育
		内毒素	日本药典法	< 0. 25EU/ml
		支原体	日本药典法	阴性
细胞数		细胞数	血细胞计数板	1x10 ⁸ ~ 30x10 ⁸ 细胞
活细胞比率		活细胞比率	台盼蓝法	≥ 70%

[0483] (细胞制剂的品质管理试验)

[0484] 根据本说明书中记载的方法,例如,为了调查依据实施例1~7的记载生成的无反应性细胞是否符合最终制品的品质标准,实施以下的试验。

[0485] • 外观

[0486] 通过目视对悬浮于生理盐水中的无反应性细胞的外观进行调查。符合品质标准的悬浮液应由微黄白色~淡黄色的细胞构成。

[0487] • 细胞表型和无反应性细胞的纯度

[0488] 为了利用流式细胞仪对无反应性细胞的各表型进行调查,例如使用以下的抗体,通过多重染色进行解析:

[0489] CD3:FITC荧光标记抗人CD3抗体 (UCHT1;eBioscience#11-0038-42) 或Pacific

Blue荧光标记抗人CD3抗体 (UCHT1;Invitrogen#CD0328)

[0490] CD4:PE荧光标记抗人CD4抗体 (RPA-T4;eBioscience#25-0049-42)

[0491] CD8:APC荧光标记抗人CD8抗体 (RPA-T8;eBioscience#17-0088-42)

[0492] CD25:PerCP荧光标记抗人CD25抗体 (MEM-181;eBioscience#A15802)

[0493] CD44:PE-Cy7荧光标记抗人CD44抗体 (IM7;eBioscience#25-0441-82)

[0494] CD45:亮紫荧光标记抗人CD45抗体 (HI30;BioLegend#304032)

[0495] CD45RA:FITC荧光标记抗CD45RA抗体 (ALB11;Beckman Coulter A07786) 或PE荧光标记抗CD45RA抗体 (ALB11;Beckman Coulter IM1834U)

[0496] CD45RO:ECD荧光标记抗CD45RO抗体 (UCHL1;Beckman Coulter IM2712U) 或PE荧光标记抗CD45RO抗体 (UCHL1;Beckman Coulter A07787) 或APC荧光标记抗CD45RO抗体 (UCHL1;Bay biosciences 20-0457)

[0497] 步骤

[0498] CD3阳性细胞比率、活细胞中的CD45阳性细胞比率、CD3阳性细胞中的CD8阳性CD44阳性细胞比率、CD3阳性细胞中的CD4阳性CD44阳性细胞比率、CD3阳性细胞中的CD8阳性CD45RA阴性细胞比率、CD3阳性细胞中的CD8阳性CD45RA阴性CD45RO阳性细胞比率、CD3阳性细胞中的CD4阳性CD45RA阴性CD45RO阳性细胞比率和CD3阳性细胞中的CD4阳性CD25阳性细胞比率

[0499] 使悬浮于生理盐水中的无反应性细胞与上述抗体反应后,使用Zombie NIR Fixable Viability Kit (BioLgened#423106) 将死细胞染色。对于该经多重荧光染色的细胞,在FACS Verse (BD Bioscience公司) 中确定全部活细胞中的CD3阳性细胞的比率。

[0500] 符合品质标准的无反应性细胞应该是50%以上的细胞为CD3阳性者。同时,基于荧光,确定活细胞中的CD45阳性细胞的比率、存活的全部CD3阳性细胞中的CD8阳性CD44阳性细胞的比率、CD4阳性CD44阳性细胞的比率、CD8阳性CD45RA阴性细胞的比率、CD8阳性CD45RA阴性CD45RO阳性细胞的比率、CD4阳性CD45RA阴性CD45RO阳性细胞的比率、CD4阳性CD25阳性细胞的比率。

[0501] 符合品质标准的无反应性细胞应该是活细胞的95%以上的细胞为CD45阳性,不含大量的红细胞、血小板等杂质。进而,符合品质标准的无反应性细胞应该是CD3阳性细胞群体中的5%以上为CD8阳性CD44阳性、5%以上为CD4阳性CD44阳性、5%以上为CD8阳性CD45RA阴性、5%以上为CD8阳性CD45RA阴性CD45RO阳性、5%以上为CD4阳性CD45RA阴性CD45RO阳性、以及5%以上为CD4阳性CD25阳性的细胞。

[0502] • 安全性

[0503] 基本上,依据日本药典或对应的各国的药典的记载来进行试验。以下对示例性的实施方式进行了说明。

[0504] 无菌试验法

[0505] 将无反应性细胞悬浮液轻轻地离心分离,将该上清液供于无菌试验。作为日本药典中的代表性的无菌试验之一的直接法中,将上清液接种于大豆/酪蛋白/消化培养基或液态巯基乙酸培养基中,分别以30~35℃或20~25℃培养14天以上。然后,在培养期间对培养物观察数次。另一作为代表性的无菌试验的膜滤器法中,用无菌稀释液(例如,1g/L的肉制或酪蛋白制蛋白胨溶液(pH7.1±0.2))稀释上清液,将稀释后的上清液移至膜滤器上进行

过滤。然后将该膜滤器分别放入上述2种培养基中培养14天以上。符合品质标准的制品中,在培养期间和最后一天在培养基中不存在肉眼可见的微生物的增殖。

[0506] 内毒素试验法

[0507] 用生理盐水适宜稀释无反应性细胞悬浮液,制成pH6.0~8.0。然后,与裂解试剂混合,将裂解试剂的凝胶形成作为指标(凝胶化法)、或将裂解试剂的凝胶化过程中的浊度变化作为指标(比浊法)或将合成基质因水解而显色作为指标(比色法),定量地求出试样中的内毒素浓度。根据需要,进行对裂解试剂的显示灵敏度进行确认的预试验。符合品质标准的制品中,内毒素浓度必须低于0.25EU/mL。

[0508] 支原体阴性试验

[0509] 将培养液、或无反应性细胞悬浮液轻轻地离心分离,将该上清液供于支原体阴性试验。作为日本药典中的代表性的支原体阴性试验之一的培养法中,将试样接种于琼脂平板培养基中,在包含5~10%的二氧化碳的氮气中,在适合的湿度下以35~37℃培养14天以上,或者将试样接种于装有液体培养基的容器中,以35~37℃进行培养,在观察到液体培养基变色时、或从培养开始起每隔一定时间从液体培养物中取出等分试样,接种于新的琼脂平板培养基中继续进行培养。然后,在第7天和第14天,使用倍率100倍以上的显微镜以全部琼脂平板培养基为对象调查了支原体集落的有无。另一作为代表性的支原体阴性试验的、使用指标细胞的DNA染色法中,典型的是使用作为指标细胞的Vero细胞和指定的支原体菌株。该方法中,将指标细胞接种于压有盖玻片的培养培养皿等中,在包含5%二氧化碳的空气中,在35~38℃下增殖一天。然后添加试样(培养液或上清液),在同样的条件下继续培养3~6天。将盖玻片上的培养细胞固定后,通过双苯甲亚胺等染色剂进行DNA荧光染色,利用荧光显微镜(倍率400~600倍或其以上的倍率)进行镜检,与阴性(非接种)对照和支原体阳性对照进行比较的同时在存在0.5%以上的以包围细胞核的方式具有微小核外荧光斑点的细胞的情况下,判断为支原体阳性。符合品质标准的制品应为支原体阴性。

[0510] • 细胞数

[0511] 对于悬浮于生理盐水中的无反应性细胞,使用血细胞计数器在显微镜下或利用自动细胞计数器测定细胞数。符合品质标准的、适于给予的无反应性细胞的数量为 $1 \times 10^8 \sim 30 \times 10^8$ 个(例如,100mL生理盐水中),在低于该范围的情况下,应适宜追加细胞。

[0512] • 活细胞率

[0513] 将悬浮于生理盐水中的无反应性细胞与0.3~0.5%台盼蓝染色液(例如,商品目录#35525-02、Nacalai Tesque)混合,使用血细胞计数器在显微镜下或利用自动细胞计数器测定活细胞数。符合品质标准的制品应该是70%以上的细胞为活细胞者。

[0514] (考察)

[0515] 由上的结果证明,本发明的组合物:

[0516] 1) 由于是以CD44阳性CD8阳性T细胞和CD44阳性CD4阳性T细胞为核心的免疫抑制细胞的群体、混合物,因此可较强地发挥其性能。

[0517] 2) 启示出该细胞群体同时含有FoxP3阳性的regT细胞,但该regT细胞的抑制能力在抗CD80/86抗体的存在下的抗原刺激这样的诱导无反应性的培养体系中被增强,以及在CD44阳性CD8阳性细胞、CD44阳性CD4阳性细胞的存在下可更强地发挥其抑制能力。

[0518] 3) 在抗CD80/86存在下与抗原反应而被选择、达到了抗原特异性的无反应性CD8阳

性细胞和无反应性CD4阳性细胞比初始细胞更早地识别并覆盖抗原是免疫抑制的一个机制。该结果是在以往的免疫排斥抑制实验中未得到证实的、非常重要的见解。

[0519] 这些见解在用于抑制免疫排斥的细胞制剂的品质管理中可能会成为重要的确认点。

[0520] 表4中所示的最终制品的标准为代表例,细胞表型等基准值可以进行适宜地变更,作为其变形例,可以列举出表3中记载的例子。

[0521] 参考文献

[0522] 在实施例等中,以下的参考文献被作为基本技术进行了参照,并不认为这些文献构成了本发明的现有技术。将这些内容作为参考而引入。

[0523] 1.Bashuda H,Kimikawa M,Seino K,Kato Y,Ono F,Shimizu A,et al.Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates.The Journal of clinical investigation.2005;115(7):1896-902.

[0524] 2.Bashuda H,Shimizu A,Uchiyama M,Okumura K.Prolongation of renal allograft survival by anergic cells:advantages and limitations.Clin Transplant.2010;24Suppl 22:6-10.

[0525] 3.Luo Z,Gotoh M,Grochowicki T,Tanaka T,Kimura F,Kawashima H,et al.Anergic T cells generated in vitro suppress rejection response to islet allografts.Transplantation.2000;69(10):2144-8.

[0526] 4.Miyao T,Floess S,Setoguchi R,Luche H,Fehling HJ,Waldmann H,et al.Plasticity of Foxp3(+)T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells.Immunity.2012;36(2):262-75.

[0527] 5.Davies JK,Barbon CM,Voskertchian A,Nadler LM,Guinan EC.Ex vivo alloanergization with belatacept:a strategy to selectively modulate alloresponses after transplantation.Cell transplantation.2012;21(9):2047-61.

[0528] 6.Davies JK,Gribben JG,Brennan LL,Yuk D,Nadler LM,Guinan EC.Outcome of alloanergized haploidentical bone marrow transplantation after ex vivo costimulatory blockade:results of 2phase 1studies.Blood.2008;112(6):2232-41.

[0529] 7.Davies JK,Nadler LM,Guinan EC.Expansion of allospecific regulatory T cells after anergized,mismatched bone marrow transplantation.Science translational medicine.2009;1(1):1ra3.

[0530] 8.Davies JK,Yuk D,Nadler LM,Guinan EC.Induction of alloanergy in human donor T cells without loss of pathogen or tumor immunity.Transplantation.2008;86(6):854-64.

[0531] (附注)

[0532] 如上,使用本发明的优选的实施方式示例出了本发明,但可理解的是本发明仅通过权利要求书解释其范围。可理解的是,对于本说明书中引用的专利、专利申请和其它文献,其内容本身以与本说明书中具体记载的内容同样内容的方式作为参考引用至本说明书中。本申请主张日本专利申请特愿2018-119001(2018年6月22日申请)的优先权的利益,可

理解的是,该申请的内容(可以是全部)作为参考引入本申请中。另外,日本专利申请特愿2018-118996和特愿2018-119003(均为2018年6月22日申请)以及对这些主张优先权的国际申请的内容的一部分或全文作为参考引入本说明书中

[0533] 产业上的可利用性

[0534] 本发明提供包含诱导了特定抗原特异性免疫耐受的细胞的药物组合物。提供能用于与基于这样的技术的制剂等相关的产业(制药)中的技术。

图1a

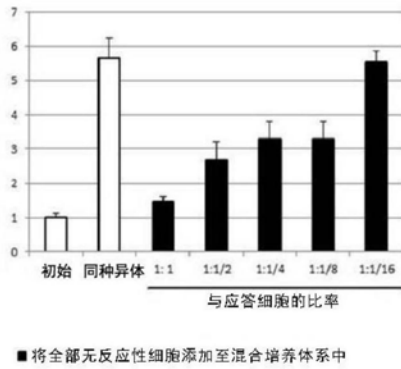


图1b

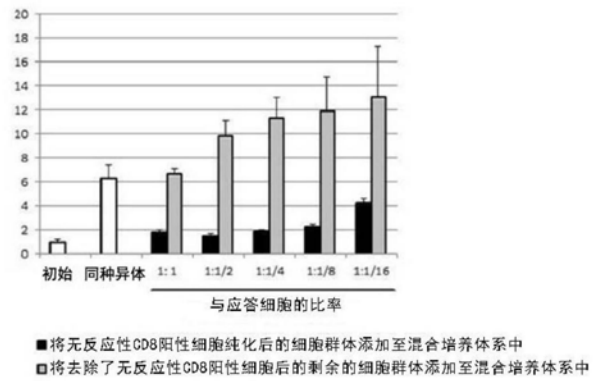


图1c

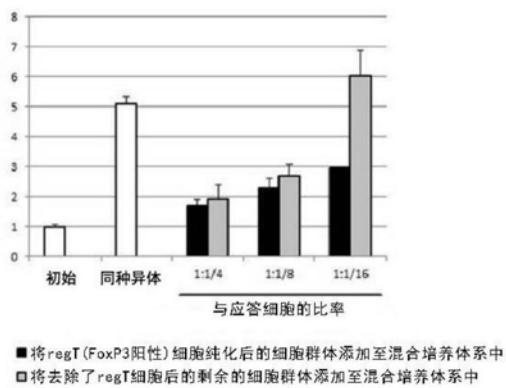


图1d

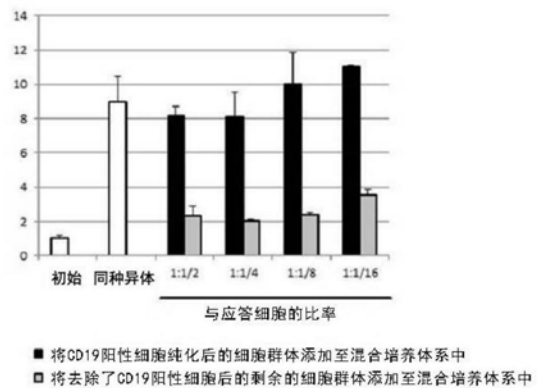


图1

图2a

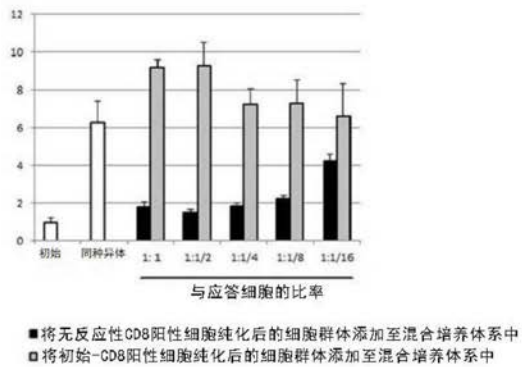


图2b

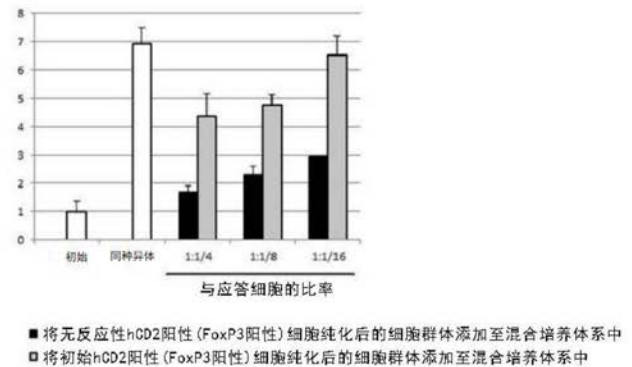


图2

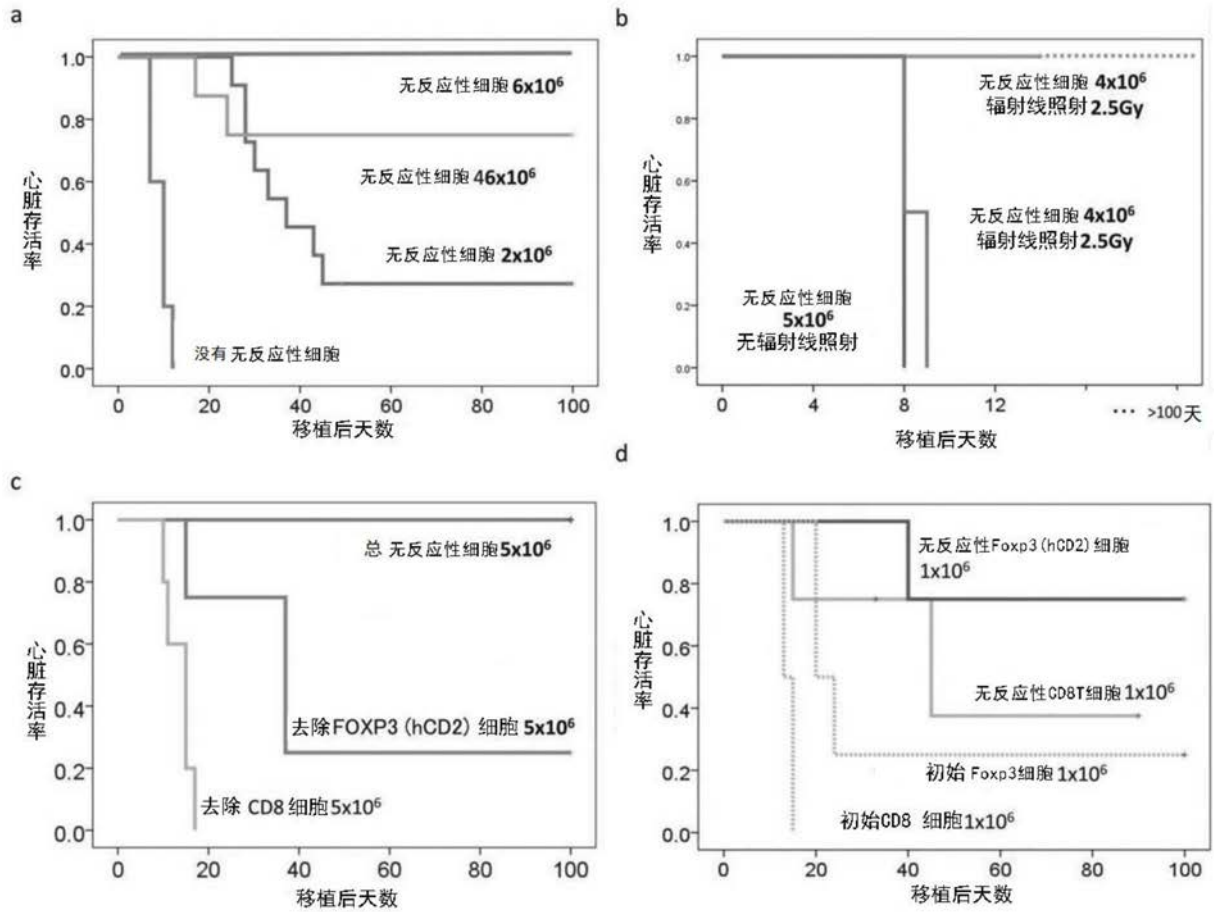


图3

图4a

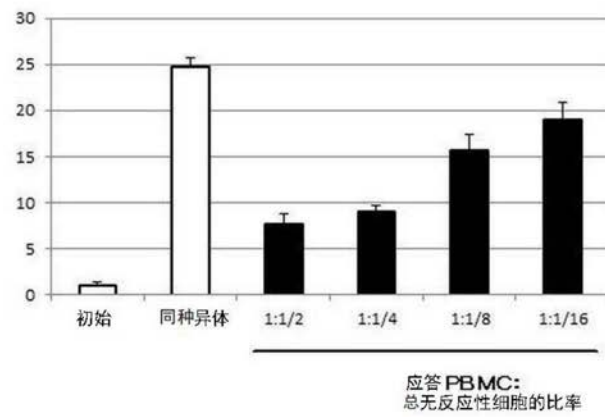


图4b

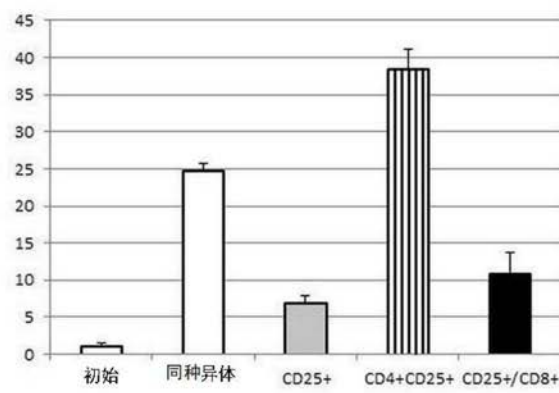
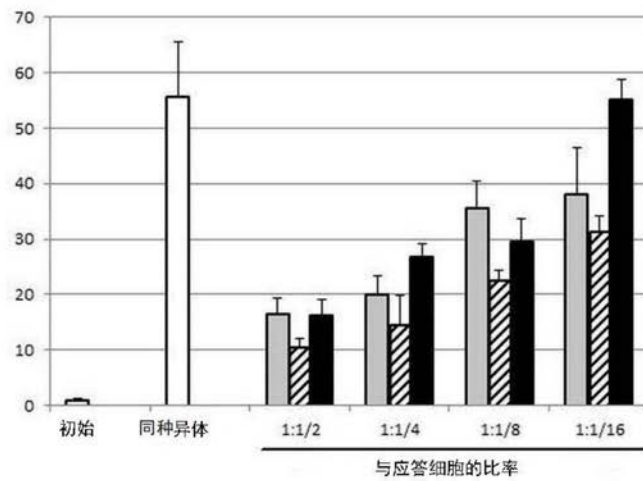


图4c



- 将CD4阳性细胞纯化后的细胞群体添加至混合培养体系中
- ▨ 将CD4阴性细胞纯化后的细胞群体添加至混合培养体系中
- 将总无反应性细胞添加至混合培养体系中

图4

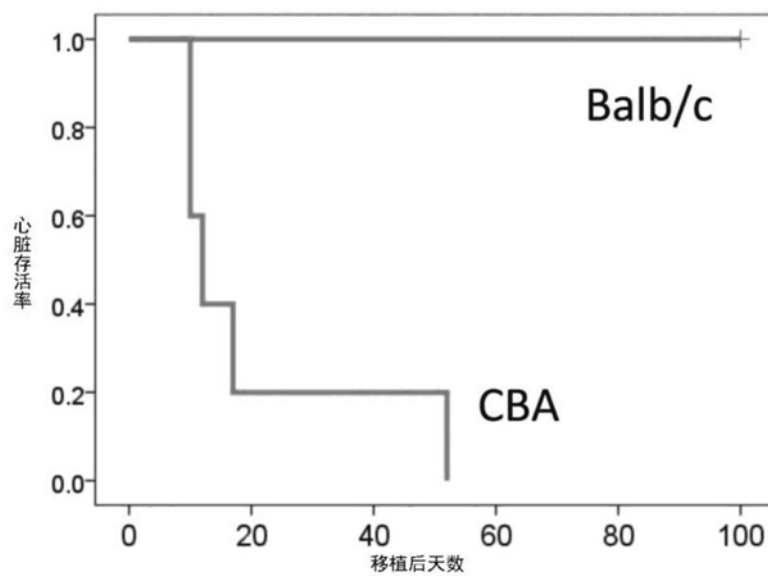


图5

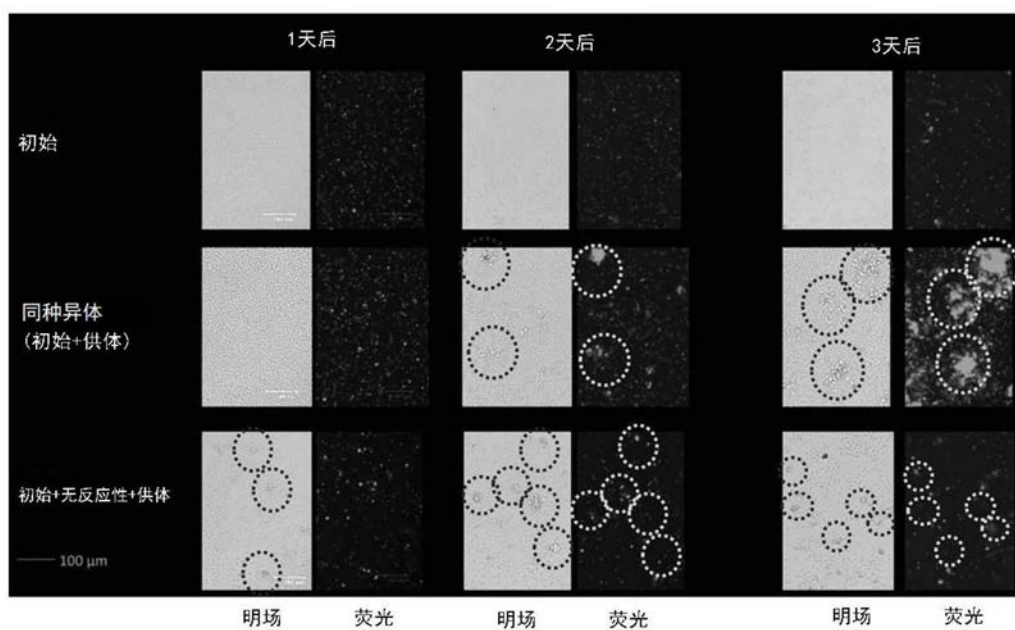
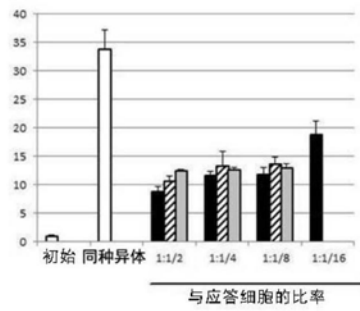


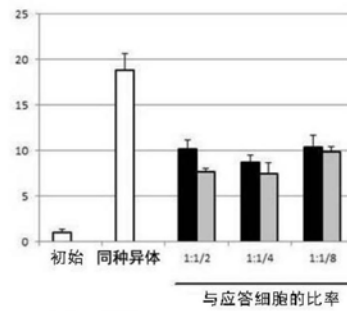
图6

图 7a



■ 将全部无反应性细胞添加至混合培养体系中
▨ 将去除了CD8阳性CD44阴性细胞的细胞群体添加至混合培养体系中
□ 将去除了CD4阳性CD44阴性细胞的细胞群体添加至混合培养体系中

图 7b



■ 将CD8阳性CD44阳性细胞纯化后的细胞群体添加至混合培养体系中
□ 将CD4阳性CD44阳性细胞纯化后的细胞群体添加至混合培养体系中

图 7c

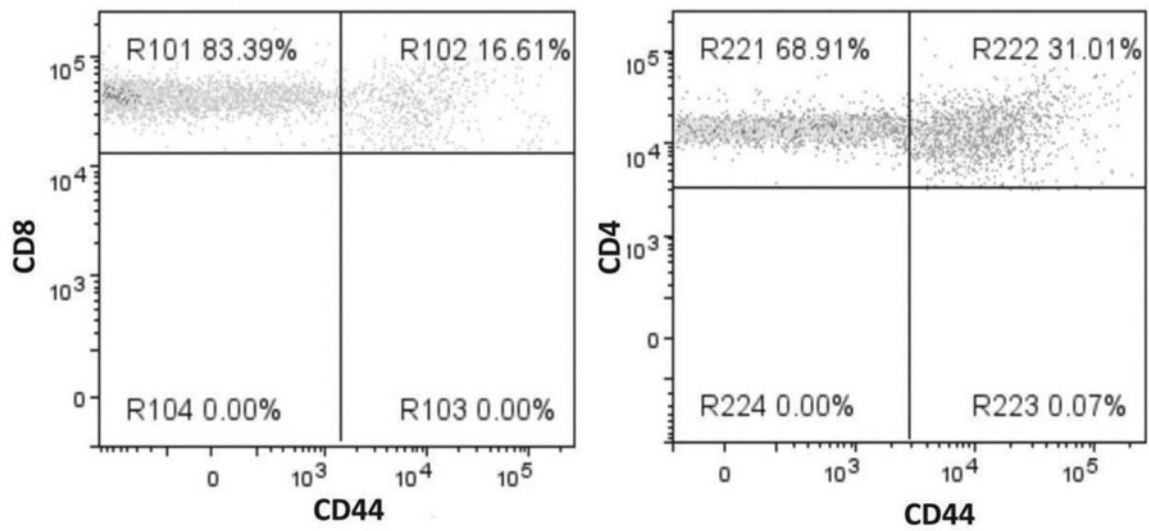


图 7