



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 18 302 T2** 2007.11.15

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 390 474 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 18 302.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR02/01586**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 740 789.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/092793**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.05.2002**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **21.11.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.02.2004**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **21.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.11.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 5/06** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**A61K 35/14** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**0106231 11.05.2001 FR**

(73) Patentinhaber:

**Institut National de la Santé et de la Recherche  
Médicale (INSERM), Paris, FR**

(74) Vertreter:

**PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR,  
80801 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**GROUX, Herve, F-06410 Biot, FR; COTTREZ,  
Francoise, F-06410 Biot, FR; WAKKACH,  
Abdelilah, F-06100 Nice, FR**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR GEWINNUNG ANTIGENSPEZIFISCHER TR1-REGULATORISCHER LYMPHO-  
ZYTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft die Gewinnung von regulatorischen T CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, die zur Prophylaxe und zur Behandlung von Autoimmun- und Entzündungserkrankungen nützlich sind.

**[0002]** Autoimmunerkrankungen sind die Folge einer Deregulierung des Immunsystems, die sich als unerwünschte Immunantwort des Organismus gegen seine eigenen Antigene zeigt.

**[0003]** Es wurde versucht, die Antigene bei der Entstehung dieser pathologischen Zustände oder die für diese Antigene spezifischen, aggressiven T-Zellen zu manipulieren, die erhaltenen Ergebnisse waren jedoch wegen der fehlenden Kenntnis aller, an dem betreffenden pathologischen Zustand beteiligter Antigene sehr eingeschränkt. Die oben genannten Autoantigene oder die für Entzündungs- oder Autoimmunerkrankungen verantwortlichen Antigene sind nämlich nicht immer bekannt oder von Individuum zu Individuum verschieden. Die derzeit bei diesen Erkrankungen verwendeten Behandlungen sind entweder palliative Behandlungen (Insulin bei Diabetes, Antihistamin bei allergischen Erkrankungen) oder systemische Behandlungen mit Schmerztabletten (AINS) und/oder Immunsuppressoren (Glykokortikoide, Cyclosporin, Antikörper, ...). Es besteht klar der Bedarf nach einer wirksamen immunsupprimierenden Behandlung, die jedoch auf das angegriffene Organ oder noch genauer auf den hyperaktiven Bereich des Immunsystems beschränkt ist.

**[0004]** Unter den zahlreichen Stoffen, die an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind, wurden die T CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, auch als T-Helfer-Lymphozyten (T-Helfer) bezeichnet, genannt. Es werden zwei Haupttypen von T-Helfer-Lymphozyten unterschieden: die Th1-Lymphozyten, die an der Entwicklung der zellulären Immunantwort beteiligt sind, produzieren entzündungsfördernde Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2) und Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und üben eine aktivierende Wirkung auf Makrophagen aus; die Th2-Lymphozyten, die Zytokine wie die Interleukine IL-4 IL-6, IL-10 und IL-13 produzieren, begünstigen die Antikörpersekretion.

**[0005]** Neuere Arbeiten, an denen einer der Erfinder beteiligt war, haben eine neue Kategorie regulatorischer T-Zellen hergestellt, deren Proliferation durch die Aktivierung von T CD4<sup>+</sup>-Zellen in Gegenwart von Interleukin 10 (IL-10) induziert wird und die als Tr1-Lymphozyten bezeichnet wurden (PCT-Anmeldung WO 97/42324). Die Weiterverfolgung dieser Arbeiten hat die Isolierung und Charakterisierung einer neuen Subpopulation regulatorischer T-Zellen, die als Tr1-Lymphozyten bezeichnet wurden, ermöglicht (GROUX et al., Nature, 389, 737-742, 1997). Diese Lymphozyten-Subpopulation wurde durch wiederholte Aktivierung von T CD4<sup>+</sup>-Zellen in Gegenwart eines Antigens und Interleukin 10 (IL-10) erhalten. Wenn sie wiederholt durch das für ihre Induktion verwendete Antigen stimuliert werden, proliferieren die Tr1-Zellen nur wenig, produzieren stark erhöhte Mengen an IL-10, erhebliche Mengen an TGF- $\beta$  (Tumorstromafaktor  $\beta$ ), sehr kleine Mengen an IL-2 und kein IL-4. Wenn die aktivierten Tr1-Zellen in Gegenwart von anderen T CD4<sup>+</sup>-Zellen kultiviert werden, unterdrücken sie deren Proliferation als Reaktion auf ein Antigen; dieser Effekt durch die Tr1-Lymphozyten resultiert in der Sekretion von Zytokinen, insbesondere von IL-10, wobei diese nicht direkt auf die T CD4<sup>+</sup>-Zellen wirken; er kann somit erhalten werden, ohne dass das für die Proliferation dieser Zellen verantwortliche Antigen gekannt wird. Dies stellt einen erheblichen Vorteil bei Autoimmunerkrankungen dar, bei denen folglich eine Behandlung ohne das Erfordernis einer exakten Kenntnis des Antigens, gegen das die pathogenen Zellen gerichtet sind, angestrebt wird.

**[0006]** In einem Versuchsmodell der Crohn-Erkrankung bei einer Maus, in der die entzündungsfördernden Zellen gegen symbiotische Bakterien der Darmflora gerichtet sind, wurde auch beobachtet, dass die Verabreichung von gegen Ovalbumin gerichteten Tr1-Zellen an die Tiere, zusammen mit der Verabreichung von Ovalbumin in der Nahrung, eine Prophylaxe für das Auftreten einer chronischen Darmentzündung erlaubt.

**[0007]** Zum anderen haben die Erfinder in neueren Arbeiten zu verschiedenen Tiermodellen der Crohn-Erkrankung, der Multiplen Sklerose oder einer Transplantatreaktion gegen den Empfänger gezeigt, dass die hemmenden Tr1-Zellen nicht nur eine Prophylaxe, sondern auch eine Heilung der verschiedenen pathologischen Zustände bereitstellen können. Es wurde unter anderem beobachtet, dass die Tr1-Zellen spezifisch und stark in die verschiedenen Entzündungsorte migrieren. Diese Eigenschaft der Tr1-Zellen stellt einen weiteren Vorteil bei der Verwendung dieser Zellen als Vektor für entzündungshemmende Moleküle an die Orte starker Entzündungen dar. Die aus T-Zellen eines Patienten erhaltenen Tr1-Zellen können somit potentiell in einer Zelltherapie zur Regulation der Immunantwort bei diesem Patienten eingesetzt werden. Sie sind auch insbesondere zur Prophylaxe oder Pflege von nicht nur den oben genannten Autoimmun- und Entzündungserkrankungen, sondern auch von allen anderen pathologischen Zuständen, die durch eine abweichende Entzündungsreaktion gekennzeichnet sind, wie beispielsweise Diabetes, Psoriasis, Arteriosklerose, rheumatoide Polyarthrit oder Asthma von Nutzen; sie sind auch zur Behandlung von Transplantatabstoßung oder Transplan-

tatreaktionen gegen den Empfänger nützlich.

**[0008]** Das Verfahren zur Gewinnung von Tr1-Lymphozyten, das in der oben angegebenen Veröffentlichung von GROUX et al. beschrieben ist, erfordert die wiederholte Stimulation der T-Zellen mit dem Antigen in Gegenwart von IL-10. Dieses Verfahren ist schwer durchführbar und lässt kein schnelles Erhalten einer Population von Tr1-Lymphozyten, die für eine therapeutische Behandlung nützlich sind, aus dem Patienten zu.

**[0009]** Verschiedene Gruppen haben von der Beteiligung der verschiedenen costimulatorischen Moleküle an der Gewinnung von Zellen mit ähnlichen Eigenschaften wie Tr1-Zellen, insbesondere bezogen auf die Produktion von IL-10, berichtet; die potentiell an der Stimulation beteiligten Moleküle sind sehr verschieden und die berichteten Effekte scheinen mitunter widersprüchlich zu sein.

**[0010]** BLEIJS et al. (Eur. J. Immunol., 29, 2248, 1999) haben auch beobachtet, dass die Costimulation durch die Wechselwirkung zwischen LFA-1 und ICAM-1, ICAM-2 oder ICAM-3 eine erhebliche Produktion von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierender Faktor), von IFN- $\gamma$  und IL-10 durch die mit einem anti-CD3-Antikörper stimulierten T-Lymphozyten induziert. Die Produktion von IL-10 ist insbesondere während der Costimulation durch die Wechselwirkung zwischen LFA-1 und ICAM-1 erheblich. BULLENS et al. (Int. Immunol. 13, 181-191, 2001) berichten, dass die Costimulation durch CD58 die Produktion von IL-10 und IFN- $\gamma$  durch die durch einen anti-CD3-Antikörper stimulierten T-Zellen induziert. DONG et al. (Nat. Med., 5, 1365, 1999) haben ein costimulatorisches Molekül, das mit der B-7-Familie verwandt ist und als B7-H1 bezeichnet wird, beschrieben, das bevorzugt die Sekretion von TL-10 induziert.

**[0011]** VAN GOOL et al. (Eur. J. Immunol., 29, 2367, 1999) haben beobachtet, dass die Aktivierung von T-Zellen durch ein Alloantigen in Gegenwart eines Antikörpers, der die Wechselwirkungen zwischen CD80 und CD28 oder zwischen CD86 und CD28 und zwischen CD40 und CD40L blockiert, eine Antigen-spezifische Anergie in Verbindung mit einer verminderten Produktion von IFN- $\gamma$  und einer erhöhten Produktion von IL-10 induziert.

**[0012]** CHABOT et al. (J. Immunol., 162, 6819, 1999) berichten, dass die Produktion von IL-10, die durch die Wechselwirkung von mikroglialen Zellen mit T-Lymphozyten induziert wird, durch die Blockierung von CD40/CD40L, B7/CTLA-4 oder B7/CD28, oder von CD23 vermindert wird.

**[0013]** JONULEIT et al. (J. Exp. Med., 192, 1112, 2000) beschreiben die Produktion von regulatorischen T-Zellen aus reifen dendritischen Zellen (CD83<sup>-</sup>).

**[0014]** Die Erfinder haben jetzt ein neues Verfahren entwickelt, das die schnelle Gewinnung von Antigen-spezifischen Tr1-Lymphozyten, in einer höheren Menge als von einer durch die Aktivierung von T CD4<sup>+</sup>-Zellen in Gegenwart von IL-10 erhaltenen Zelle erlaubt. Sie haben nämlich festgestellt, dass die T CD4<sup>+</sup>-Zellkultur in Gegenwart eines primären Antigens und Antigen-präsentierenden Zellen, die ein Klasse-II-HLA-Molekül und das humane LFA-3-(CD58-) Molekül exprimieren, aber keines der costimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H1, CD40, CD23 und ICAM-1 (CD54) exprimieren, die Differenzierung der für das Antigen spezifischen Tr1-Zellen induziert.

**[0015]** Das LFA-3-Molekül ist der Ligand des CD2-Rezeptors der T-Lymphozyten. Es wurden zwei Formen von LFA-3 beschrieben: eine transmembrane Form (WALNER et al., J. Exp. Med. 166, 923-932, 1987; PCT-Anmeldung WO 88/09826) und eine als „an PI gekoppeltes LFA3“ bezeichnete Form, die über ein Phosphatidylinositol enthaltendes Glykolipid-Intermediat in der Zellmembran verankert ist (PCT-Anmeldung WO 90/02181).

**[0016]** Die vorliegende Erfindung hat die Aufgabe, die Verwendung von künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen, die ein Molekül des Klasse-II-HLA-Systems und ein humanes LFA-3-Molekül exprimieren und keines der costimulatorischen Moleküle B7-1, B7-2, B7-H1, CD40, CD23 oder ICAM-1 (CD54) exprimieren, um Antigen-spezifische, regulatorische Tr1-Lymphozyten zu erhalten, bereitzustellen.

**[0017]** Als Antigen-spezifische, regulatorische Tr1-Lymphozyten werden Zellen definiert, die, nach der wiederholten Stimulation durch das Antigen, die folgenden Eigenschaften besitzen:

- sie produzieren eine erhöhte Menge an IL-10, und zwar eine Menge von gleich oder größer als  $3 \times 10^3$  pg/10<sup>6</sup> Zellen und allgemein  $5 \times 10^3$  bis  $20 \times 10^3$  pg IL-10 pro 10<sup>6</sup> Zellen;
- sie produzieren eine Menge an IL-2 von gleich oder kleiner als 50 pg/10<sup>6</sup> Zellen; wobei das Verhältnis der von diesen Zellen produzierten IL-10/IL-2 kleiner als 50/1, allgemein kleiner als 100/1 bis 500/1 ist;

- sie produzieren eine Menge an IL-4 von gleich oder kleiner als  $50 \text{ pg}/10^6$  Zellen; wobei das Verhältnis der von diesen Zelle produzierten IL-10/IL-4 kleiner als 300/1, allgemein kleiner als 500/1 bis 10000/1 ist;
- die Proliferation der durch ein Antigen in Gegenwart von Tr1-Zellen stimulierten T CD4<sup>+</sup>-Zellen ist mindestens um das 2-fache, allgemein mindestens um das 2- bis 100-fache reduziert.

**[0018]** Die vorliegende Erfindung hat insbesondere die Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung von Antigen-spezifischen, regulatorischen Tr1-Lymphozyten aus den Lymphozyten eines Patienten bereitzustellen, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es umfasst:

- die in vitro-Aktivierung der Lymphozyten in Gegenwart des gewählten Antigens, das von künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen, wie sie vorher definiert wurden, präsentiert wird;
- die Gewinnung, aus den Lymphozyten, einer Population von aktivierten T CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, die mindestens 10 %, vorzugsweise mindestens 50 % und ganz besonders bevorzugt mindestens 80 % für das Antigen spezifische Tr1-Lymphozyten umfassen.

**[0019]** Die künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen, die für die vorliegende Erfindung nützlich sind, können in vorteilhafter Weise durch Co-Transfektion von tierischen Zellen, die keines der oben angegeben costimulatorischen Moleküle exprimieren, mit einer Nukleinsäuresequenz, die für die  $\alpha$ -Kette eines Klasse-II-HLA-Moleküls codiert und einer Nukleinsäuresequenz, die für die  $\beta$ -Kette eines Klasse-II-HLA-Moleküls codiert und einer Nukleinsäuresequenz, die für irgendeine der beiden Formen von LFA-3 codiert, erhalten werden. Falls gewünscht, können die Zellen auch mit einer Nukleinsäuresequenz transfiziert sein, die für das Antigen, gegen das die Spezifität der Tr1-Lymphozyten induziert werden soll, codiert. Die Nukleinsäuresequenzen können aus verschiedenen Nukleinsäuremolekülen stammen oder 2 oder mehrere von diesen können auch aus dem gleichen Nukleinsäuremolekül stammen.

**[0020]** Die tierischen Zellen, die für die Gewinnung der künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen verwendet werden können, können autologe oder heterologe, Zellen menschlichen Ursprungs oder auch Zellen xenogenen Ursprungs; insbesondere Zellen von Säugern sein. Es können auch kürzlich isolierte Primärkulturen verwendet werden; allgemein werden vorzugsweise etablierte Zelllinien verwendet, die sehr homogen sind und über mehrere Generationen proliferieren können.

**[0021]** Dies können beispielsweise Fibroblasten, Keratinozyten, Nierentubuluszellen, Schwannzellen, Myoblasten, Endothelzellen, usw. sein.

**[0022]** Das in den künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen exprimierte MHC-Klasse-II-Molekül wird aus verschiedenen humanen HLA-2-Molekülen ausgewählt, die entsprechend des Klasse-II-HLA-Typs des Patienten, aus dem die T CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten stammen, und der für die Tr1-Zellen angestrebten Verwendung bereitstehen.

**[0023]** Allgemein werden künstliche Antigen-präsentierende Zellen, die ein auch von dem Patienten exprimiertes HLA-2-Molekül exprimieren, verwendet; es kann jedoch auch ein HLA-2-Molekül, das sich von den von dem Patienten exprimierten Zellen unterscheidet, ausgewählt werden; dies kann zum Beispiel, wenn eine Produktion von Tr1-Zellen zur Verwendung bei der Prophylaxe von Transplantatabstoßung gewünscht wird, ein von den Transplantatzellen exprimiertes HLA-2-Molekül sein; in diesem Fall ist das HLA-2-Molekül das Antigen, gegen das die erhaltenen Tr1-Zellen gerichtet werden.

**[0024]** Das im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Antigen wird entsprechend der Verwendung ausgewählt, für die die Antigen-spezifischen Tr1-Zellen, die produziert werden sollen, bestimmt sind. Dies kann ein mit einem pathologischen Entzündungs- oder Autoimmunerkrankung assoziiertes Antigen sein; es kann aber auch ein Antigen sein, das mit keinem bestimmten pathologischen Zustand in Verbindung steht, jedoch angewendet werden kann, wenn eine Aktivierung der Tr1-Zellen zur Bekämpfung einer unerwünschten Immunantwort gewünscht wird.

**[0025]** Die Beladung der künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen mit dem Antigen kann auf herkömmliche Weise durch Co-Inkubation der Zellen mit dem Antigen durchgeführt werden. Dieses kann in nativer Form vorliegen und für die Antigen-präsentierenden Zellen vorbereitet sein; es kann auch in Form eines oder mehrerer antigenen Peptide, die direkt über die von den Zellen exprimierten HLA-2-Moleküle befestigt werden, vorliegen. Alternativ dazu kann das Antigen durch die künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden, wenn diese vorher mit einer dafür codierenden Nukleinsäuresequenz transfiziert wurden.

**[0026]** In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die in vitro-Aktivierung der Lymphozyten direkt durch aus

dem Patienten stammende PMBCs (mononukleäre periphere Blutzellen) erfolgen. Sie kann auch durch vorher aus den PMBCs gereinigten T CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten erfolgen.

**[0027]** Die Aktivierung der Lymphozyten kann durch eine 2- bis 10-tägige, vorzugsweise 6- bis 8-tägige, Co-Kultur der Lymphozyten in Gegenwart der künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen, die oben beschrieben wurden und mit dem ausgewählten Antigen beladen sind, erfolgen.

**[0028]** Am Ende dieser Kultivierungszeit werden durch die Expression des Markers CD4<sup>+</sup> und durch einen oder mehrere Aktivierungsmarker wie CD25 CD69, CD45RO, usw. aktivierte T CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten ausgewählt.

**[0029]** Am Ende dieser Kultivierungszeit wird eine Zellpopulation erhalten, in der die Tr1-Lymphozyten mindestens 10 % und allgemein zwischen 50 und 80 % der aktivierten, Antigen-spezifischen T-Lymphozyten ausmachen.

**[0030]** Um diese Population noch mehr an Tr1-Lymphozyten anzureichern, kann die Stimulation unter den oben definierten Bedingungen wiederholt werden.

**[0031]** Es wird somit eine Population aktivierter T CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten erhalten werden, die mindestens 30 % und allgemein zwischen 60 und 90 % Tr1-Lymphozyten unter den Antigen-spezifischen T-Zellen umfassen.

**[0032]** Es können auch Klone von Tr1-Lymphozyten aus dieser Population isoliert werden. Die Klone können anhand des charakteristischen Profils der Tr1-Lymphozyten bezüglich der Zytokinproduktion, wie es oben definiert ist, leicht identifiziert werden.

**[0033]** Die Expansion der Klone kann in einem Nährmedium, das keine für das Wachstum spezifischen Faktoren, wie IL-4 und IL-2 enthält, durchgeführt werden. Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Verwendung von mit anti-CD3-Antikörpern und CD28 gekoppelten Kügelchen als Stimulationsmittel.

**[0034]** Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Tr1-Zellen weisen alle Eigenschaften der durch Aktivierung von T CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten in Gegenwart von IL-10 erhaltenen Tr1-Zellen auf und haben somit die gleiche Verwendung wie diese in der Regulation der Immunantwort.

**[0035]** Die vorliegende Erfindung hat auch die Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die zur Behandlung von Entzündungs- und/oder Autoimmunerkrankungen bestimmt ist, bereitzustellen, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es die Herstellung von Antigen-spezifischen Tr1-Lymphozyten für ein erfindungsgemäßes Verfahren und die Konditionierung der Tr1-Lymphozyten in einer für die Verabreichung an einen Patienten geeignete Form umfasst.

**[0036]** Die Erfindung wird mit Hilfe der folgenden weiteren Beschreibung unter Bezugnahme auf die nicht einschränkenden Beispiele, die das erfindungsgemäße Verfahren veranschaulichen, besser verstanden werden.

#### Beispiel 1: Herstellung von Tr-Lymphozyten

##### Isolierung von T CD4<sup>+</sup>-Zellen

**[0037]** Mononukleäre periphere Zellen (PMBC) werden mittels Ficoll-Hypaque-Zentrifugation erhalten.

**[0038]** Die T CD4<sup>+</sup>-Zellen werden durch Elimination der nicht-CD4<sup>+</sup>-Zellen unter Verwenden von anti-CD8- (L5333-), anti-CD11b- (OKM1-) und anti-CD20- (2H7-) Antikörpern gemäß dem folgenden Protokoll erhalten. Die Zellen werden 20 Minuten lang bei 4°C mit an Antikörpern gesättigten Konzentrationen inkubiert. Nach dem Waschen werden DYNABEADS-Kügelchen (DYNAL, Oslo, Norwegen) mit einem Verhältnis von Kügelchen zu Target-Zellen von 1:1 dazugegeben und 1 Stunde lang bei 4°C inkubiert. Die nicht-CD4<sup>+</sup>-Zellen tragenden Kügelchen werden durch Anlegen eines Magnetfeldes eliminiert. Die Analyse der restlichen Zellen mittels Durchflusszytometrie zeigt, dass diese 90 bis 95 T CD4<sup>+</sup>-Zellen umfassen.

##### Gewinnung der künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen

**[0039]** Murine Fibroblasten-L-Zellen (ATCC CCL-1) wurden mit den für LFA-3 und ein Klasse-II-HLA-Molekül codierenden Aminosäuresequenzen co-transfiziert.

## Erhalt einer für LFA-3 codierenden cDNA

**[0040]** Eine für LFA-3 codierende cDNA wurde aus einer vollständigen cDNA-Bibliothek humaner mononukleärer peripherer Zellen durch Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwenden eines als 5'-LFA-3 bezeichneten Templats, das der Sequenz der Nukleotide 13 bis 33 der für das humane LFA-3 (GENBANK-Zugangsnummer X06296) codierenden Sequenz entspricht und (5') mit einer KpnI-Stelle flankiert ist, und eines als 3'-LFA-3 bezeichneten Templats, das der Sequenz der Nukleotide 708-728 der für das humane LFA-3 codierenden Sequenz entspricht und (5') mit einer NotI-Stelle flankiert ist, hergestellt.

## Erhalt der für DR1 codierenden cDNA

**[0041]** Eine für die alpha-Kette von DR1 codierende cDNA wurde aus einer vollständigen cDNA-Bibliothek von humanen mononukleären peripheren Zellen von einem DR1<sup>+</sup>-Spender durch Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwenden der als DR1A5' und DR1A3' bezeichneten Template, die entsprechend die Sequenz der Nukleotide 151 bis 176 und die Sequenz der Nukleotide 769 bis 792 der für die alpha-Kette von DR1 codierenden Sequenz (GENBANK-Zugangsnummer K01171) umfassen, erhalten. Eine für die beta-Kette von DR1 codierende cDNA wurde auf die gleiche Weise unter Verwenden der DR1B5' und DR1B3' bezeichneten Template, die entsprechend die Sequenz der Nukleotide 52 bis 74 und 850 bis 923 der für die beta-Kette von DR1 codierenden Sequenz (GENBANK-Zugangsnummer NM002124) umfassen, erhalten.

## Transfektion der Zellen

**[0042]** Jede der erhaltenen cDNAs wurde, an der TA-Stelle, in einen pcDNA 3.1/hygro-Vektor (INVITROGEN) kloniert. Die erhaltenen Vektoren wurden zur Co-Transfektion der L-Zellen mittels Elektroporation verwendet.

**[0043]** Die stabilen Transfektanten wurden mittels Durchflusszytometrie (FACSVantage SE, BECTON DICKINSON) sortiert, wobei die Zellen mit Hilfe eines anti-LFA-3- (1C3-) Antikörpers und eines anti-DR- (L243-) Antikörpers markiert worden waren. Die zugleich LFA-3 und DR exprimierenden Zellen werden zurückgehalten und in ein F12-Kulturmedium (LIFE TECHNOLOGIES), das mit 10 % fötalem Kälberserum (BOEHRINGER) ergänzt und mit Penicillin und Streptomycin versetzt worden war, überführt.

**[0044]** Die Antigen-präsentierenden Zellen, die LFA-3 und DR1 co-exprimieren, wurden auch, wie oben beschrieben ist, durch Co-Transfektion von P815-Zellen (ATCC-TIB64) hergestellt.

**[0045]** Als Kontrolle wurden auch die nicht-transfizierten L- oder P815-Zellen oder die durch Transfektion von L- oder P815-Zellen erhaltenen Zellen, die nur das DR1-Molekül exprimieren, verwendet.

## Gewinnung von Tr-Lymphozyten

**[0046]** Die, wie oben beschrieben, isolierten T CD4<sup>+</sup>-Zellen aus PBMCs eines nicht-DR1-Spenders werden mit  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in YSSEL-Medium (YSSEL et al., J. Immunol. Methods, 72, 219-227, 1984) suspendiert.

**[0047]** Die Zellsuspension wird auf einer Kulturplatte mit 24 Vertiefungen mit 1 ml pro Vertiefung verteilt. Transfizierte L-DRI-LFA-3-Zellen oder transfizierte L-DR1-Zellen, die, wie oben beschrieben ist, erhalten wurden, oder B-EBV-DR1<sup>+</sup>-Lymphoblastoidzellen als Kontrolle werden bestrahlt (60 Gy) und mit  $5 \times 10^5$  Zellen/ml zu jeder Vertiefung gegeben.

**[0048]** Nach der Inkubation für 7 Tage werden die Zellen geerntet und in PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe von anti-CD4- (RPA-T4-) und anti-CD25- (M-A251-) Antikörpern markiert. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen werden mittels Durchflusszytometrie sortiert und mit 1 Zelle/Vertiefung auf einer Platte mit 96 Vertiefungen in YSSEL-Medium kloniert. Die Expansion der Klone wird in Gegenwart von IL-2 und IL-4 nach der bei SPITS und YSSEL (J. Immunol. Methods, 9, 416-421, 1996) beschriebenen Technik durchgeführt. Nach der Expansion der Klone werden die verschiedenen Klone wiederholt mit B-EBV-DR1<sup>+</sup>-Lymphoblastoidzellen stimuliert. 48 Stunden nach der Stimulation wird der Zellüberstand rückgewonnen und das Profil der Produktion der Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$  als Reaktion auf diese Stimulation durch Dosierung dieser Zytokine mittels ELISA nach dem bei ABRAMS et al. beschriebenen Protokoll (Curr. Protocols Immunol., 13, S. 6.1-6-15, 1995) durchgeführt.

**[0049]** Die in der Tabelle I unten angegebenen Ergebnisse zeigen die Produktion der Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$  von Tr1-Zellen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 10 Klonen) von 2 verschiedenen Spendern.

Tabelle I

Zelle	Spender 1		Spender 2	
	IL-10 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
L-DR1	326 $\pm$ 40	13372 $\pm$ 1500	3657 $\pm$ 324	9638 $\pm$ 63
L-DR1-LFA-3	2315 $\pm$ 183	19403 $\pm$ 975	6402 $\pm$ 272	914 $\pm$ 322
B-EBV DR1 <sup>+</sup>	<40	16005 $\pm$ 123	174 $\pm$ 59	4930 $\pm$ 685

**[0050]** In einer anderen Versuchsreihe werden die aus PBMCs eines DR1<sup>+</sup>-Spenders isolierten T CD4<sup>+</sup>-Zellen, wie oben beschrieben ist, mit Antigen-präsentierenden Zellen, die das DR1-Molekül und das LFA-3-Molekül exprimieren, gemischt.

**[0051]** Ein primäres Antigen (HA-Peptid 307-319, das einem Fragment des Viruscapsidantigens Haemophilus influenzae entspricht) wird mit 50  $\mu$ g/ml zu der Zellmischung gegeben.

**[0052]** Nach der 3-tägigen Inkubation werden die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen mittels Durchflusszytometrie sortiert und, wie oben beschrieben ist, kloniert.

**[0053]** Nach der Expansion der Klone werden die verschiedenen Klone wiederholt mit B-EBV-Lymphoblastoidzellen, die mit dem HA-Peptid (10  $\mu$ M) beladen waren, stimuliert. 48 Stunden nach der Stimulation wurde der Zellüberstand rückgewonnen und das Profil der Produktion der Zytokine IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$  als Reaktion auf diese Stimulation durch Dosierung dieser Zytokine mittels ELISA nach dem bei ABRAMS und Mitarbeitern beschriebenen Protokoll durchgeführt.

**[0054]** Der Hauptanteil (ungefähr 70 %) der isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Klone zeigen das Profil der Zytokinproduktion der Tr1-Zellen.

**[0055]** Die Profile der Zytokinproduktion von 9 dieser Tr1-Klone sind in der Tabelle II unten angegeben.

Tabelle II

Klon	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
HA-1A12	<20	<40	12358	521
HA-1B6	<20	<40	11897	497
HA-1C9	<20	<40	14598	1369
HA-1E5	<20	<40	13549	314
HA-1E7	40	<40	11697	876
HA-1F2	<20	<40	10597	1057
HA-2B6	<20	<40	17891	697
HA-2D5	32	<40	16589	503
HA-2F2	<20	<40	17803	873

**[0056]** Die Klone der Tr1-Zellen, die das gleiche Profil der Zytokinproduktion aufweisen, wurden auch unter Verwenden der P815-DR1-LFA-3-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen erhalten, was zeigt, dass die Gewinnung von Tr1-Zellen nicht an die Eigenschaften der Zelllinien, aus der die Antigen-präsentierenden Zellen erhalten wurden, gebunden ist.

Beispiel 2: Immunregulatorische Eigenschaften der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Tr1-Lymphozyten

**[0057]** Die immunregulatorischen Eigenschaften der Antigen-spezifischen Tr1-Zellen wurden wie folgt untersucht:

Von einem DR1<sup>+</sup>-Spender stammende, humane T CD4<sup>+</sup>-Zellen ( $1 \times 10^6$ /ml) werden in Gegenwart von HA-Peptid 307-319 (50 µM) und Tetanus-Anatoxin (TT: 50 µg/ml) durch bestrahlte (60 Gy), syngene Monozyten ( $1 \times 10^6$ /ml) stimuliert.

**[0058]** Parallel dazu wurde der gleiche Versuch durch Zugabe von Zellen ( $2 \times 10^5$ /ml) eines HA-spezifischen Tr1-Klons, der, wie oben beschrieben ist, erhalten wurde, allein oder in Gegenwart eines gegen den Rezeptor von IL-10 (anti-IL-10R, 10 µg/ml) gerichteten Antikörpers, eines anti-TGF-β-Antikörpers (20 µg/ml) oder einer Mischung aus den beiden Antikörpern, durchgeführt.

**[0059]** Nach 5 Tagen wird die Proliferation der T CD4<sup>+</sup>-Zellen durch Messung des Einbaus von <sup>3</sup>H-Thymidin bestimmt.

**[0060]** Die für 3 HA-spezifische Tr1-Klone erhaltenen Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) gezeigt.

Beschreibung der [Fig. 1](#):

Ordinate: Proliferation (eingebautes <sup>3</sup>H-Thymidin, in cpm).

Abszisse:

Medium: nicht-stimulierte T CD4<sup>+</sup>-Zellen;

TT+ HA-Peptid: durch das HA-Peptid 307-319 und Tetanus-Anatoxin stimulierte T CD4<sup>+</sup>-Zellen;

+HA-spezifische Tr1: durch das HA-Peptid 307-319 und Tetanus-Anatoxin, in Gegenwart von HA-Antigen-spezifischen Tr1-Zellen, stimulierte T CD4<sup>+</sup>-Zellen;

+anti-IL-10R: durch das HA-Peptid 307-319 und Tetanus-Anatoxin, in Gegenwart von HA-Antigen- und anti-IL-10R-Antikörper-spezifischen Tr1-Zellen, stimulierte T CD4<sup>+</sup>-Zellen;

+anti-TGF-β: durch das HA-Peptid 307-319 und Tetanus-Anatoxin, in Gegenwart von HA-Antigen- und anti-TGF-β-Antikörper-spezifischen Tr1-Zellen, stimulierte T CD4<sup>+</sup>-Zellen;

+anti-IL-10R+ anti-TGF-β: durch das HA-Peptid 307-319 und Tetanus-Anatoxin, in Gegenwart von HA-Antigen- und für eine Mischung aus anti-IL-10R-Antikörpern und anti-TGF-β-Antikörpern spezifischen Tr1-Zellen, stimulierte T CD4<sup>+</sup>-Zellen;

**[0061]** Die Ergebnisse zeigen, dass die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Tr1-Lymphozyten die Proliferation von Antigen-spezifischen T CD4<sup>+</sup>-Zellen beachtlich senken. Diese hemmende Wirkung kann nur sehr gering durch anti-IL-10R-Antikörper oder anti-TGF-β-Antikörper gesenkt werden und wird durch eine Mischung aus den beiden Antikörpern zum Teil aufgehoben.

### Patentansprüche

1. Verwendung von künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen, die ein Molekül des HLA-Klasse-II-Systems und ein menschliches LFA-3-Molekül und keines der costimulatorischen Moleküle B7-1, B7-2, B7-H1, CDE40, CD23 oder ICAM-1 exprimieren, um Antigen-spezifische regulatorische Tr1-Lymphozyten zu erhalten.

2. Verfahren zur Herstellung von Antigen-spezifischen regulatorischen Tr1-Lymphozyten aus den Lymphozyten eines Patienten, dadurch gekennzeichnet, dass es umfasst:

- die in vitro Aktivierung der Lymphozyten in Gegenwart des gewählten Antigens, das von künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen nach Anspruch 1 präsentiert wird;
- die Gewinnung aus den Lymphozyten einer Population von aktivierten T CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, die mindestens 10 % auf das gewählte Antigen spezifische Tr1-Lymphozyten umfassen.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen durch Cotransfektion von Säugerzellen, die aus Fibroblasten, Keratinozyten, Nierentubuluszellen, Schwannzellen, Myoblasten, Endothelzellen gewählt sind, mit einer Nukleinsäuresequenz, die die α-Kette eines Klasse-II-HLA-Moleküls codiert, einer Nukleinsäuresequenz, die die β-Kette eines Klasse-II-HLA-Moleküls codiert, und mit einer Nukleinsäuresequenz, die menschliches LFA-3 codiert.



4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die in vitro Aktivierung der Lymphozyten durch Cokultur der Lymphozyten und der Antigen-präsentierenden Zellen in Gegenwart des gewählten Antigens erfolgt.

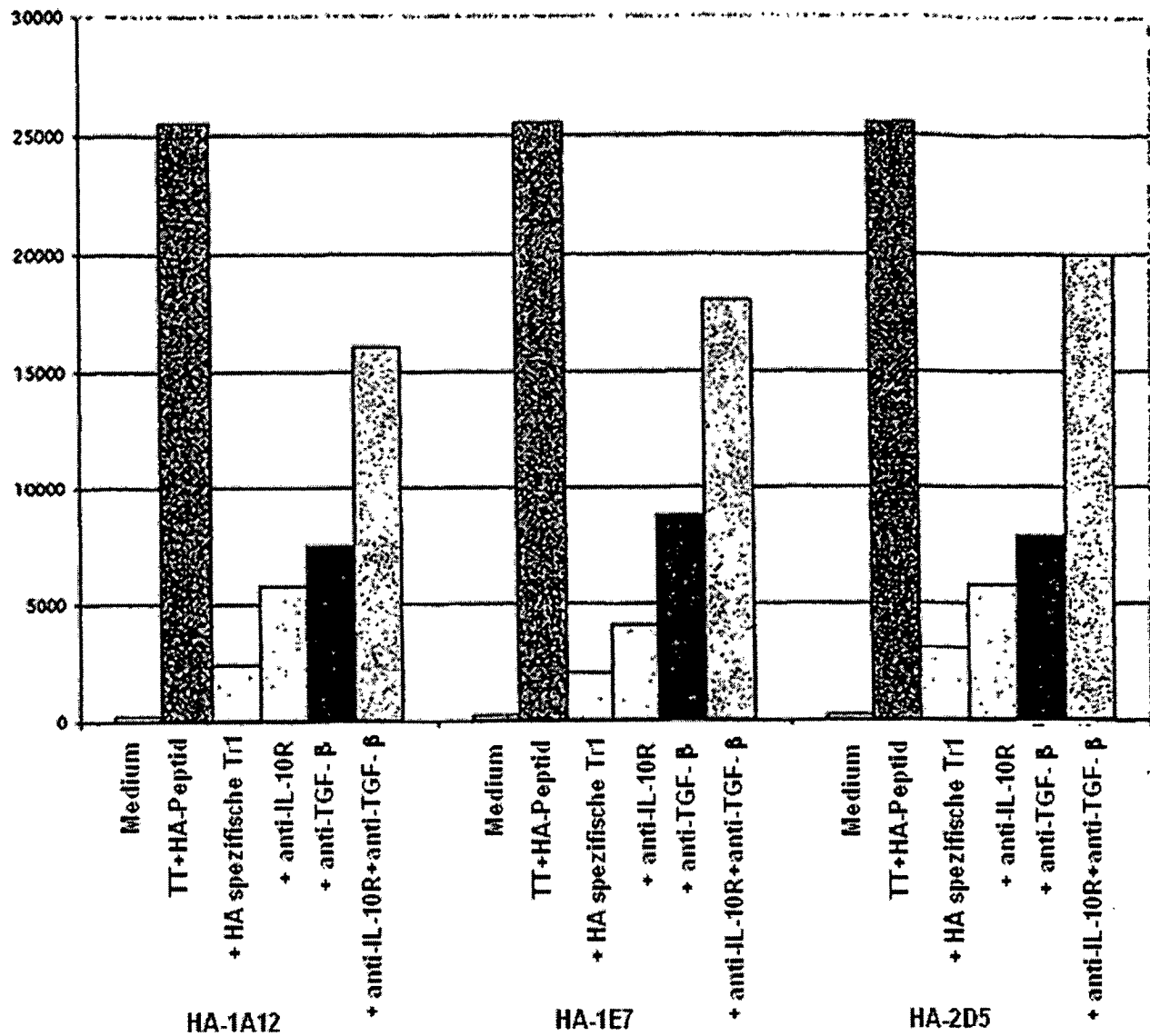
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es die Wiederholung des Aktivierungsschrittes in vitro der CD4+ T Lymphozyten in Gegenwart des gewählten Antigens und die Gewinnung einer Zellpopulation, umfassend mindestens 30 % auf das Antigen spezifische Tr1-Lymphozyten, umfasst.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es ferner die Isolierung und Expansion von Klonen von Tr1-Lymphozyten aus der gewonnenen Zellpopulation umfasst.

7. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die zur Behandlung von entzündlichen und/oder autoimmunen Erkrankungen bestimmt ist, dadurch gekennzeichnet, dass es die Herstellung von Antigen-spezifischen Tr1-Lymphozyten durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6 und die Konditionierung der Tr1-Lymphozyten zu einer Formulierung, die zu ihrer Verabreichung an einen Patienten geeignet ist, umfasst.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



Figur 1