(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1509327 B
(45)授权公告日 2010.10.20

(21)申请号 02809777.7

(22)申请日 2002.03.12

(30)优先权数据
01106033.2 2001.03.12 EP

(85)PCT申请进入国家阶段日
2003.11.12

(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2002/002671 2002.03.12

(87)PCT申请的公布数据
WO02/072799 EN 2002.09.19

(73)专利权人 阿戈斯治疗公司
地址 美国北卡罗来纳州

(72)发明人 杰罗尔德·许勒 D·迪克曼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 刘玥 徐雁漪

(51)Int.Cl.
*C12N 5/0783*(2010.01)
*A61K 35/14*(2006.01)
*G01N 33/50*(2006.01)
*A61P 37/06*(2006.01)
*A61P 37/04*(2006.01)

(56)对比文件
Kanegane H. 等.A novel subpopulation of CD45RA+ CD4+ T cells expressingIL-2 receptor alpha-chain (CD25) and having a functionallytransitional nature into memory cells.Int Immunol.3 12.1991,3(12),1349-1356.

审查员 徐益君

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 13 页

(54)发明名称

来自人类血液的$CD^4CD^{25}$调节性T细胞

(57)摘要

本发明提供抑制性和/或调节性人类$CD4^+CD25^+$T细胞,用于增殖该细胞的方法,及抑制性和/或调节性人类$CD4^+CD25^+$T细胞和增殖的T细胞作为调节性药剂的用途。

CN 1509327 B

1. 药物组合物，其含有抑制性和 / 或调节性的人类 $CD4^+CD25^+CTLA\text{-}4^+T$ 细胞，所述细胞对于经由其 TCR 进行的刺激而言是非增殖的，但是该无反应性状态被 IL-2 和 IL-15 部分逆转。

2. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述 T 细胞分离自人类外周血液。

3. 权利要求 2 的药物组合物，其中所述 T 细胞通过合适的单克隆抗体并采用磁分离或免疫吸附的方法分离。

4. 权利要求 1 ～ 3 中任意一项的药物组合物，其中所述 T 细胞具有调节特性。

5. 药物组合物，其含有增殖的人类 $CD4^+CD25^+CTLA\text{-}4^+T$ 细胞，所述细胞通过用于扩增权利要求 1 ～ 4 任意一项中定义的 $CD4^+CD25^+CTLA\text{-}4^+T$ 细胞的方法获得，所述方法包括用 T 细胞刺激物或抗原呈递细胞离体刺激权利要求 1 ～ 4 任意一项中定义的 T 细胞。

6. 权利要求 5 的药物组合物，其中 T 细胞刺激物为包含如下物质的组合物 ：

(a) 抗 CD3 和 / 或抗 CD28 配体 / 单克隆抗体，包括超激动抗体，

(b) $CD4^+CD25^+CTLA\text{-}4^+T$ 细胞表面的 T 细胞受体的配体 / 抗体，或 T 细胞受体组分的配体 / 抗体 ；或者

(c) 与调节性 T 细胞表面表达的 T 细胞受体结合的 MHC- 肽复合物 ；或者

(d) 佛波醇酯和钙离子载体。

7. 权利要求 5 的药物组合物，其中抗原呈递细胞选自自身、非自身或人工抗原呈递细胞。

8. 权利要求 7 的药物组合物，其中抗原呈递细胞是树突细胞。

9. 权利要求 5 ～ 8 中任意一项的药物组合物，其中 T 细胞刺激物和抗原呈递细胞与 IL-2 和 / 或 IL-5、IL-7 和 / 或 IL-9、IFN-α 和 / 或 IL-10 一起应用。

10. 权利要求 5 ～ 9 中任意一项的药物组合物，其中所述 T 细胞为固定的 $CD4^+CD25+$ 细胞。

11. 权利要求 10 的药物组合物，其中所述 T 细胞通过用多聚甲醛离体处理而获得。

12. 权利要求 1 ～ 4 或 5 ～ 11 任意一项中定义的 $CD4^+CD25^+CTLA\text{-}4^+T$ 细胞在制备调节性药物中的用途。

13. 富集的权利要求 1 ～ 4 任意一项中定义的 $CD4^+CD25^+CTLA\text{-}4^+T$ 细胞或权利要求 5 ～ 11 任意一项中定义的增殖的 $CD4^+CD25^+CTLA\text{-}4^+T$ 细胞在制备用于过继性转移治疗的药剂、用于治疗免疫性增强的疾病的药剂、或者用于预防 / 治疗移植反应的药剂中的用途。

14. 权利要求 13 的用途，其中所述免疫性增强的疾病是自身免疫性疾病。

15. 权利要求 13 的用途，其中所述移植反应是移植物抗宿主疾病或移植排斥。

# 来自人类血液的 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞

[0001] 本发明提供了抑制性和/或调节性的人类 $CD4^+CD25^+$ T 细胞，用于增殖 (expanding) 该细胞的方法，和抑制性和/或调节性人类 $CD4^+CD25^+$ T 细胞，及相应增殖 T 细胞作为调节性药剂的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 免疫自身耐受性对自身免疫性的预防和免疫内环境稳定的维持是关键性的。免疫系统识别自身和非自身的能力是由中枢和外周耐受性机制控制的。中枢耐受性包括在发育早期胸腺中自身反应 T 淋巴细胞的缺失 (Rocha, B. 和 von Boehmer, H., Science 251 :1225-1228(1991) ;Kisielow, P. 等, Nature 333 :742-746(1988))。一些外周耐受性机制已经被描述过，包括 T 细胞无反应性和忽视 (Rocha, B. 和 von Boehmer, H., Science 251 :1225-1228(1991) ;Kisielow, P. 等, Nature,333 :742-746(1988) ;Schwartz, R.H., Science 248 :1349-1356(1990) ;Miller, J.F.A.P. 和 Heath, W.R., Immunol.Rev.133 : 131-150(1993))。正在进行的、对啮齿类动物超过十年的研究提供了有力的证据，证实了“专业的 (professional)”调节/抑制 T 细胞的独特 $CD4^+CD25^+$ 群体的存在，该群体活跃地并占主导地阻止了脱离其它耐受机制的自身反应性 T 细胞的激活及效应器功能 (Sakaguchi,S. 等,J.Immunol.155 :1151-1164(1995) ;Takahashi,T. 等,Int.Immunol.10 : 1969-1980(1998) ;Itoh, M. 等, J.Immunol.162 :5317-5326(1999))。这些细胞的清除或失活会导致严重的自身免疫性疾病，并且发现也会增强对同种抗原、甚至肿瘤的免疫应答 (Sakaguchi, S. 等, J.Immunol.155 :1151-1164(1995) ;Itoh, M. 等, J.Immunol.162 : 5317-5326(1999) ;Shimizu, J. 等, J.Immunol.163 :5211-5218(1999))。最近的研究表明 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞构成一个相当同源的群体 (Thornton, A.M., Shevach, E.M., J.Immunol.164 :183-190(2000))，来源于胸腺 (Itoh, M. 等, J.Immunol.162 : 5317-5326(1999))，对经由 TCR 的刺激是自然非增殖的 (即无反应性的)，但需要通过它们的 TCR 激活，才具有抑制性，并抑制 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 细胞的增殖。然而，一旦被激活，它们的调节/抑制功能是完全抗原非特异性的，不依赖细胞因子，而依赖细胞接触 (Thornton, A.M., Shevach, E.M., J.Immunol,164 :183-190(2000))。抑制的确切机制，特别是涉及 T-T 相互作用的细胞表面和/或短距离可溶性分子，仍然需要被表征。新的体外数据表明 $CD4^+CD25^+$ T 细胞是通过抑制它们的 IL-2 产生，而抑制响应物增殖的 (Thornton, A.M., Shevach,E.M.,J.Exp.Med.188 :287-296(1998))。最近的体内研究表明 :$CD4^+CD25^+$ T 细胞的功能关键性地依赖通过 CTLA-4/CD152 分子的信号传导，该分子被发现在 $CD4^+CD25^+$ T 细胞上组成型表达 (Read, S. 等, J.Exp.Med.192 :295-302(2000) ;Salomon, B. 等, Immunity 12 : 431-440(2000) ;Takahashi, T.T. 等, J.Exp.Med.192 :303-310(2000))。

[0004] 多年来，尽管很明显，在啮齿动物中，$CD4^+CD25^+$ T 细胞群体构成了一个“专业的”调节性/抑制性 T 细胞的独特谱系，该谱系对自发性自身免疫性疾病的预防是至关重要的 (Sakaguchi, S. 等, J.Immunol,155 :1151-1164(1995))，然而迄今未知，在人类中，显示类似功能特性的 $CD4^+4T$ 细胞是否自然发生。小鼠体内这些细胞的清除和/或功能性损伤，例如通过抗 CD25 和/或抗 CTLA-A4mAb 处理动物，会诱发多种自发性自身免疫性疾病及肿瘤

的排斥。机制是这些细胞的清除/损伤消除了它们的自身反应性 T 细胞的负控制，所以这些 T 细胞变得活跃起来。如果通过过继性转移将 $CD4^+CD25^+$T 细胞输回这些动物体内，调节作用便恢复了，并且自身免疫性/肿瘤排斥也停止了。

[0005] 如上所述，迄今为止，还完全不知道在人类中，显示类似功能特性的 $CD4^+$T 细胞是否天然存在。制备具有调节特性的人类 T 细胞的方法在本领域内已为人所知，不过，$CD4^+CD25^+$T 细胞并不为人所知。如 Jonuleit，H. 等，J.Exp.Med 192：1213-1222(2000) 所述的，通过未成熟树突细胞的反复刺激，从人类原初 (naive)T 细胞中诱导调节性 T 细胞。这项工作的大部分是采用脐血的 T 细胞进行的，脐血是真正原初 T 细胞的最丰富的来源。应当指出，从早期开始，在人类血液中就可组成性地检测到 $CD4^+CD25^+$T 细胞。Jonuleit 等人的研究对象不是天然存在的群体。De Jong，P. 等，Int.Immunol.6：631-638(1994) 描述了 TGF-β1 在原初和记忆 $CD4^+$T 细胞上的作用。其显示了不同的效应，在初级活化的 $CD45RA^+CD4^+$T 细胞上显示了刺激效应。$CD45RO^+CD4^+$T 细胞或次级激活 $CD45RO^+$ 细胞的增殖被抑制。在 $CD45RA^+$T 细胞的情况中，TGF-β 导致 CD25 荧光平均数增加。此处描述的效应仅与 T 细胞的增殖相关。原初的经 TGF-β 处理的 T 细胞的调节能力未显示。

[0006] 现在，在人类血液，特别是成年健康志愿者的外周血液中令人惊讶地发现存在有 $CD4^+CD25^+$，主要是 $CD45RO^+$T 细胞（平均占 $CD4^+$T 细胞的 6％），下文简称为“$CD4^+CD25^+$T 细胞”。过去多年，具有该表型的 T 细胞（即抑制性/调节性 $CD4^+CD25^+$T 细胞）已经为人们所了解，但是它们被误认为常规记忆细胞 (Kanegane，H. 等，Int.Immunol.，3：1349-1356(1991)；Taka，K. 等，Immunol.72：15-19(1990)；Jackson，A.L. 等，Clin.Immunol.Innunopathol.54：126-133(1990))。与以前的报告相反，人类 $CD4^+CD25^+$T 细胞不是常规记忆细胞，而是调节性细胞，该调节性细胞显示的功能特性与它们的啮齿类对应物一致。例如，对 $CD4^+CD25^+$T 细胞的体内抑制活性必不可少的 CTLA-4(CD152)，是组成型表达的，并且受激后仍维持强烈的正调节。这些细胞对于经由其 TCR 进行的刺激而言，是非增殖的，但是该无反应性状态被 IL-2 和 IL-15 部分逆转。在经由异源（而非同源）成熟树突细胞或培养板结合的抗 CD3+ 抗 CD28 刺激时，$CD4^+CD25^+$T 细胞释放 IL-10，并且在共培养试验中抑制 $CD4^+$ 和 $CD8^+$T 细胞的活化与增殖。抑制作用证明和在小鼠体内一样，也不依赖 IL-10，而依赖细胞接触。对于人类耐受性的研究而言，识别调节性 $CD4^+CD25^+$T 细胞具有重要的含义，特别是在自身免疫性、移植术及癌症范围内。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了

[0009] (1) 抑制性和/或调节性人类 $CD4^+CD25^+$T 细胞；

[0010] (2) 一种增殖如上文 (1) 中所定义的 $CD4^+CD25^+$T 细胞的方法，该方法包括：以 T 细胞刺激物，或是抗原呈递细胞，于离体 (ex vivo) 和体内 (in vivo) 刺激细胞；

[0011] (3) 增殖的人类 $CD4^+CD25^+$T 细胞，可通过如上文 (2) 中所定义的方法获得，优选的是通过如上文 (2) 中定义的离体方法。

[0012] (4) 一种含有如上文 (1) 或 (3) 所定义的人类 $CD4^+CD25^+$T 细胞的药物组合物；

[0013] (5) 如上文 (1) 或 (3) 所定义的 $CD4^+CD25^+$T 细胞在制备调节性药物上的用途；

[0014] (6) 一种于离体或体内识别、监控和/或将 $CD4^+CD25^+$T 细胞从人类血液及其它组织中清除的方法，该方法包括：

[0015] (i) 利用可与 T 细胞上的 CD4、和 / 或 CD25、和 / 或 CTL-A4(CD154) 实体 (entities) 特异性结合的药剂 / 配体，优选的是抗 CD4 和 / 或抗 CD25、和 / 或抗 CTL-A4 抗体，和 / 或

[0016] (ii) 利用免疫吸附方法；和 / 或

[0017] (iii) 利用如上文 (2) 所定义的刺激物或抗原呈递细胞；

[0018] (7) 如上文 (2) 所定义的 T 细胞刺激物或抗原呈递细胞在制备一种可体内诱导调节性 $CD4^+CD25^+$T 细胞的药剂上的用途，优选的是用于制备治疗患者自身免疫性疾病的药剂；

[0019] (8) 如上文 (1) 或 (3) 所定义的 $CD4^+CD25^+$T 细胞的以下用途：

[0020] (a) 用于识别其它生长和 / 或功能性修饰 ( 抑制 / 增强 ) / 凋亡或抗凋亡因子的分析上

[0021] (b) 用于识别通过 $CD4^+CD25^+$T 细胞表达的分子上，包括识别在该细胞上的新分子，或者识别被认为具有药物活性的呈递分子，或者

[0022] (c) 用于识别调节性 $CD4^+CD25^+$T 细胞的前体细胞或后代；

[0023] (9) 上文 (1) 中富集的 $CD4^+CD25^+$T 细胞或上文 (3) 中增殖的 T 细胞在制备用于过继性转移治疗的药剂；用于治疗与免疫性增强相关、包括但不仅限于自身免疫性疾病的药剂；或者用于预防 / 治疗移植反应，如移植物抗宿主疾病和移植排斥的药剂上的用途，

[0024] (10) 用于过继性转移治疗的方法，包括：将如上文 (1) 或 (3) 所定义的富集 / 增殖的自身或非自身调节性 $CD4^+CD25^+$T 细胞注射 / 输回患者体内，以预防或治疗任何过强和 / 或致病的免疫反应，或者预防 / 治疗移植反应，如移植物抗宿主疾病和移植排斥；

[0025] (11) 一种制备具有特定要求的抗原特异性 T 细胞受体的 $CD4^+CD25^+$T 细胞的方法，包括：

[0026] (i) 采用抗原呈递细胞活化 / 刺激 / 增殖上文 (1) 的 $CD4^+CD25^+$T 细胞，优选的是未成熟或成熟树突细胞 (DC)，在体外 (in vitro) 或体内呈递该抗原；或者

[0027] (ii) 利用一种在 $CD4^+CD25^+$ 调节 T 细胞 ( 的亚型 ) 上表达的特定 T 细胞受体的配体 / 抗体，或者一种与 $CD4^+CD25^+$T 细胞 ( 的亚型 ) 上的特定 T 细胞受体结合的 MHC- 肽复合物；

[0028] (12) 通过如上文 (11) 所定义的方法，或者通过将具有希望的抗原特异性的 T 细胞受体转染进离体分离或增殖的 T 细胞获得的 $CD4^+CD25^+$T 细胞；

[0029] (13) 包括上文 (12) 的 T 细胞的药物组合物，优选的药物组合物适用于治疗与免疫性增强相关的疾病，包括但不仅限于自身免疫性疾病，移植物抗宿主疾病和移植排斥；及

[0030] (14) 特异性地结合到 T 细胞上的 CD4 和 / 或 CD25 和 / 或 CTL-A4(CD154) 实体上的药剂，包括但不仅限于配体 / 抗体，如抗 CD25 和 / 或抗 CTL-A4mAb；或者是与 $CD4^+CD25^+$T 细胞 ( 的亚型 ) 上的 T 细胞受体结合的抗体或 MHC- 肽复合物或其它配体，在制备一种用于体内 $CD4^+CD25^+$T 细胞的清除或功能性损伤的药物上的用途，用以增强免疫反应，包括通过体内 $CD4^+CD25^+$T 细胞的阻抑调节，例如增强肿瘤免疫性。

[0031] 附图简述

[0032] 图 1 显示 $CD4^+CD25^+$T 细胞表现出与 $CD4^+CD25^-$T 细胞明显不同的表型。

[0033] 图 2 显示对异源和多克隆刺激，$CD4^+CD25^+$T 细胞均无增殖 / 无反应性，通过添加 IL-2 和 / 或 IL-15 可部分逆转这一情况，但通过中和抗 IL-10 抗体则不可以。

[0034] 图 3 显示如果通过 TCR 刺激，$CD4^+CD25^+$T 细胞将以细胞接触和剂量依赖方式抑制 $CD4^+$ 和 $CD8^+$T 细胞的活化。

[0035] 图 4 显示 $CD4^+CD25^+$ 和 $CD4^+CD25^-$T 细胞的细胞因子特征不同。

[0036] 图 5 显示活化的和固定的 $CD4^+CD25^+$ 细胞仍然显示调节能力。

[0037] 发明详述

[0038] 下文将更详细地描述本发明的实施方案 (1) ～ (14)：

[0039] (A) 现在，人类 $CD4^+CD25^+$T 细胞的表型特征使得可以于离体（下文有时表示为“体外”）或体内，从人类血液和其它组织中识别、监控（如通过 FACS)、分离和清除这些细胞。可于离体采用合适的药剂接触人类血液或其它组织实现这种分离或清除。抗 CD4、抗 CD25、抗 CTL-A4(CD154) 抗体等是尤其合适的药剂。

[0040] (B) 可通过合适的 T 细胞刺激物或抗原呈递细胞（下文简称为“APCs”）的刺激，间接体外增殖 $CD4^+CD25^+$T 细胞。适用于上文 (2) 和 (6) 方法的合适的 T 细胞刺激物包括，但不仅限于含有下列物质的组合物：

[0041] (a) 抗 CD3 和 / 或抗 CD28 配体 / 单克隆抗体 (mAb)，包括超激动抗体；(b) $CD4^+CD25^+$T 细胞表面的 T 细胞受体的配体 / 抗体，或者是 T 细胞受体组分的配体 / 抗体；或 (c) 与调节性 T 细胞表面表达的 T 细胞受体结合的 MHC- 肽复合物；或 (d)PMA（及其它佛波醇酯）+ 离子霉素（或其它钙离子载体）。

[0042] 本发明的“配体”涉及所有种类的、可结合到特定分子上的化合物（包括多聚核苷酸和多肽，如细胞受体，CD25，CTL-A4 等）。优选的配体是单克隆抗体或其片断。术语“配体”和“抗体”在整篇申请中可互换使用。

[0043] 合适的 APCs 包括自身或非自身或人工抗原呈递细胞（如树突细胞（树突细胞的制备方法见例如 WO 93/20185、WO 97/29182 和 EP-A-0922 758) 等）。该 T 细胞刺激物和抗原呈递细胞可连同 IL-2 或 IL-15 或其二者的组合一起应用。除了 IL-2/IL-15，也可采用其它的细胞因子，这些细胞因子利用若干细胞因子受体共有的 γ 链（包括，但不仅限于，IL-7 和 IL-9)。此外，已知可促进其它调节细胞产生的 IFNα 和 IL-10(Groux,H. 等，Nature 389 :737-742(1997) ;Roncarolo, M.G., J.Exp.Med,193 :F5-F9(2001)) 也可促进这些细胞的产生 / 增殖。最后，其它用于多克隆或寡克隆（如通过超抗原）T 细胞刺激的方法也是可以应用的（抗 CD3 和 / 或抗 CD28 配体 / 抗原包括超激动抗体；PMA+ 离子霉素等）。可用于大量增殖的这些刺激物或抗原呈递细胞已为本领域的技术人员熟知。

[0044] (C)$CD4^+CD25^+$T 细胞的识别使得可以体内监控和增殖 $CD4^+CD25^+$T 细胞（如通过对患者施用上文定义的 T 细胞刺激物，如 IL-2+IL-15 或 IL-10+IFNα，同时加入或不加入树突细胞 / 抗原呈递细胞），以诱导调节性 T 细胞，如抵抗自身免疫性疾病。

[0045] (D) 上文 (1) 或 (3) 的 $CD4^+CD25^+$T 细胞或增殖的 $CD4^+CD25^+$T 细胞可被用于识别其它生长和 / 或功能性修饰（抑制 / 增强）/（凋亡或抗凋亡）因子，这些因子可被用于体外或体内（如刺激或清除或功能性地干扰 $CD4^+CD25^+$T 细胞）。这些 T 细胞也适合通过如下方法识别 $CD4^+CD25^+$T 细胞表达的分子，这些方法例如但不局限于 mAb 生成、蛋白质组学 (proteomics)、DNA 芯片分析、扣除杂交（尤其是 (a)“新物质”，即迄今未知的物质、分子的识别，或 (b) 如这些分子具有合适的药物靶结构，便可用其开发新的刺激性、抑制性或凋亡诱导性药物，用于体外和体内 $CD4^+CD25^+$T 细胞的“打开”或“关闭”），这些 T 细胞也适用于

识别调节性 $CD4^+CD25^+$T 细胞的前体细胞或后代。

[0046] (E) 上文 (1) 或 (3) 中的 $CD4^+CD25^+$T 细胞或增殖的 $CD4^+CD25^+$T 细胞可应用于过继性转移治疗，即将富集的 / 增殖的自身的或非自身的调节性 T 细胞注射 / 输回患者体内，以预防或治疗任何过强和 / 或致病的免疫反应，即治疗最广泛意义的自身免疫性（包括但不仅限于典型自身免疫性疾病，如红斑狼疮、风湿性关节炎、多发性硬化症、寻常型天疱疮或甲状腺炎，及发病机理中至少有一些自身免疫性特征的疾病，如白癜风、遗传过敏性皮炎、牛皮癣等）。也预防 / 治疗移植反应，如 GVHD（移植物抗宿主疾病）和移植排斥。

[0047] (F) 为了在体外或体内活化 / 刺激 / 增殖 $CD4^+CD25^+$T 细胞，而产生 / 增殖具有特定所需抗原特异性 TCR(T 细胞受体）的 $CD4^+CD25^+$T 细胞，上文 (1) 或 (3) 中的 $CD4^+CD25^+$T 细胞或增殖的 $CD4^+CD25^+$T 细胞（以及上文 (2) 中定义的增殖方法，(4) 中的药物组合物，及 (5) 和 (7) ～ (9) 中的应用）可与未成熟或成熟树突细胞 (DC)（或其它抗原呈递细胞包括人工抗原呈递细胞）联合使用，该 DC 事先采用或不采用组织或任何其它抗原（限定的或未限定的）进行脉冲 / 加载 / 补料 (pulsed/loaded/fed) 接触。限定抗原的实例是自身抗原（如寻常型天疱疮中的桥粒芯糖蛋白 3、白癜风中的 melanA 或酪氨酸酶、甲状腺炎中的甲状腺球蛋白）或外源抗原（如来源于病原体的抗原如丙肝等）或同种抗原 / 移植抗原。未限定抗原的实例是来源于组织或细胞的抗原（如以坏死或凋亡细胞、或来源于组织的 RNA、或目的细胞与树突细胞 / 抗原呈递细胞杂交的形式，或以其它将未限定抗原导入树突细胞或其它抗原呈递细胞的形式）或来源于病原体的抗原。可以采用自身或非自身 $CD4^+CD25^+$T 细胞和 / 或树突细胞。

[0048] (G) 如上文 (14) 定义的、特异性地与 T 细胞上的 CD4 和 / 或 CD25 和 / 或 CTL-A4(CD154) 实体结合的药剂，可被用于在体内清除和监控 $CD4^+CD25^+$T 细胞的清除，如通过抗 CD25 和 / 或抗 CTL-A4 mAb（未修饰的或修饰的，如与毒素结合）或通过免疫吸附（血液是流经色谱柱的，且 $CD4^+CD25^+$T 细胞是通过针对 $CD4^+CD25^+$T 细胞表面表达分子的固相结合抗体，如抗 CD25，而得以清除）以增强免疫反应，如通过体内 $CD4^+CD25^+$T 细胞的阻抑调节，例如，增强肿瘤免疫性。

[0049] (H) 在本发明的另一个优选实施方案中，上文 (3) 增殖的（即活化的）$CD4^+CD25^+$T 细胞（以及上文 (1) 和 (12) 中的 T 细胞）可以被固定。可通过采用合适的固定剂，包括但不仅限于多聚甲醛等，于离体处理（增殖的）T 细胞，以获得这种固定的 T 细胞。优选的固定方式是通过将细胞悬浮于 0.5 ～ 5% (w/w) 多聚甲醛水溶液来完成，最优选的是在大约 2% (w/w) 多聚甲醛溶液中，15min ～ 3h，最优选的是 1h，继而是适当洗涤步骤。

[0050] (I) 上文 (5) 的药物、(9) 和 (14) 的药剂、或 (10) 的方法中所采用的 $CD4^+CD25^+$T 细胞可以是自身或非自身调节性 T 细胞。在非自身调节性 T 细胞的情况中，优选的是 T 细胞以上文 (H) 提到的方法被固定。

[0051] (J) 上文 (4) 和 (13) 的药物组合物、(5) 的药物、(7)、(9) 和 (14) 的药剂，以及 (6)、(8) 和 (10) 的方法中利用的 T 细胞可进一步含有为本领域的技术人员所熟知的成分，诸如药用 / 诊断用载体、溶剂、稀释剂和添加剂。这些成分的浓度由本领域的技术人员根据相应的用途采用。

[0052] 在过去几年中，对啮齿动物中一些调节细胞类型的更好描述已经更新了抑制物或免疫调节性 T 细胞的概念，它们之间的相互关系还未被最终定义。所谓的 Tr1 和 Th3 细胞

介导旁立抑制－无需直接细胞接触－通过 IL-10 和 TGF-β 分别高水平分泌 (Groux,H. 等, Nature 389 :737-742(1997) ;Fukaura, H. 等, J.Clin.Invest.98 :70-77(1996))。迄今为止,已识别的,被最好地表征,并且显然最为重要的调节性 T 细胞群体是 $CD4^+CD25^+$T 细胞。它们天然存在于啮齿动物中 ( 在淋巴器官中代表大约 10％的 $CD4^+$ 细胞 ),以 CD25(IL-2R-α ) 的组成型表达为特征,且在维持耐受性和预防体内自身免疫性疾病方面,无疑具有十分重要的作用。令人惊讶的是,至今在人类体内尚未发现一种显示相同特性的细胞群体。此处,我们证实,在人类血液中,曾被认为可代表常规记忆 T 细胞的 $CD4^+CD25^+$T 细胞 (Kanegane, H. 等, Int.Immunol.3 :1349-1356(1991) ;Taka, K. 等, Immunol.,72 :15-19(1990) ; Jackson,A.L. 等,Clin.Immunol,Innunopathol.54 :126-133(1990)) 实际看来就是独特的 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞的准确的人类的对应物,该 T 细胞是已知的,并于啮齿动物中进行了多年的研究。我们可以从成人血液中分离出相当量的 $CD4^+CD25^+$T 细胞 ( 平均占 $CD4^+$T 细胞的 6％ ),因而可以着手具体的研究,并与 $CD4^+CD25^-$T 细胞进行比较。这证明人类细胞与鼠 $CD4^+CD25^+$ 免疫调节性 T 细胞共有关键表型和功能性的特征。最令人感兴趣且以前未识别的表型特征是 :CTLA-4 分子 (CD152) 已经由人类 $CD4^+CD25^+$T 细胞组成型表达 ( 细胞内高水平,细胞表面为低水平 ),在经由 TCR 刺激后被进一步正调节,并维持高的表面水平至少长达一周 ( 与下列文献所述的、受激后重新表达 CTLA-4,并且仅维持非常短暂时间的 $CD4^+CD25^-$T 细胞形成鲜明对比 (Thompson,C.B.,Allison,J.P.,Immunity,7 :445-450(1998) ;Chambers, C.A. 等,Immunol.Rev.153 :27-46(1996))。$CD4^+CD25^-$ 表达 CTLA-4 的模式已经证明了其与鼠 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞的关系,因为这些细胞组成型表达的 CTLA-4 是其体内抑制活性所必需的分子。(Read,S. 等,J.Exp.Med.192 :295-302(2000) ;Salomon,B. 等,Immunity, 12 :431-440(2000))。人类 $CD4^+CD25^+$T 细胞与其鼠类对应物相似,受刺激后几乎没有增殖,既不响应通过与培养板结合的抗 CD3+ 抗 CD28 的多克隆活化作用,也不响应最有效的自然免疫刺激性细胞,即成熟 ( 异源 )DC 的 ( 甚至反复性地 ) 刺激作用。当这些刺激物与高剂量的 IL-2(500U/ml) 联合使用时,如下面所引文献所述,无反应性在小鼠中被部分逆转 (Thornton,A.M.,Shevach,E.M.,J.Immunol.,164 :183-190(2000))。新的发现是高剂量的 IL-15(50-100ng/ml) 诱导相当的增殖,而且甚至较低剂量的 IL-2 和 IL-15( 分别为 10U/ml 和 10ng/ml) 的联合作用也有强烈的协同作用,并诱导有活力的增殖。这一点可能是重要的,因为对潜在的治疗应用,及为进一步更为具体的研究 ( 包括机制的和分子的 ),而针对这些细胞的克隆化而言,$CD4^+CD25^+$T 细胞的增殖都是至关重要的。令人感兴趣的是中和抗 IL-10mAb 无法促进增殖,这表明这些细胞释放 IL-10 不以自分泌方式引起无反应性。在共培养实验中,$CD4^+CD25^+$T 细胞表现出另一种关键特征,即只能经由它们自己的 TCR 活化,才以依赖接触和剂量,但不依赖细胞因子的方式抑制 $CD25^-CD4^+$ 或 $CD8^+$T 细胞的增殖。我们的离体系统还不允许我们研究该抑制作用是否如最近利用 TCR 转基因小鼠显示的完全抗原非特异性 (Thornton,A.M.,Shevach,E.M.,J.Immunol.,164 :183-190(2000))。不过,通过采用我们用于增殖这些细胞的 IL-2+IL-15 方法,研究各自的机制是可能的。

[0053] 最值得注意的是一份最近的报告显示 :具有调节特性、实质上与我们从人类血液中离体分离出的 $CD4^+CD25^+$T 细胞表型一致的 T 细胞,可通过人类原初 T 细胞与未成熟 DC 的反复刺激于体外产生 (Jonuleit, H. 等, J.Exp.Med.,192 :1213-1222(2000))。在小鼠中, $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞群体在胸腺中是持续产生的 (Itoh, M. 等, J.Immunol.162 :

5317-5326(1999)),然而,外周调节性 T 细胞的维持需要组织特异性抗原和 IL-2(25,26)的存在。基于两个补充发现 (Jonuleit, H. 等, J.Exp.Med.,192 :1213-1222(2000)),的确引人推测,通过摄取凋亡抗体,取样外周组织的未成熟 DC(Steinman, R.M. 等, J.Exp.Med.,191 :411-416(2000) ;Roncarolo, M.G. 等, J.Exp.Med.193 :F5-F9(2001)),和目前通用或组织特异性自身抗原,是迁移出的胸腺调节性 T 细胞的存活和可能的轻微增殖的原因。相信离体分离的 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞的存活可通过未成熟 DC 的相互作用被促进,并且最近报告的在体外通过未成熟 DC 从原初 T 细胞中 $CD4^+CD25^+$T 细胞的“产生”(Jonuleit, H. 等, J.Exp.Med.,192 :1213-1222(2000)) 可能更代表在初始接种体中已存在的 $CD4^+CD25^+$ 的存活的维持。也应当指出,离体分离的人类 $CD4^+CD25^+$T 细胞与同源成熟 DC 的相互作用不足以激活它们的抑制特性,而异源成熟 DC 为调节作用的有效诱导物。该观察结果再度提示可进行试验的假设。例如,相对于成熟同源 DC,未成熟 DC 能激活 $CD4^+CD25^+$T 细胞 ( 表明它们携带一些用于相互作用的特定配体),或者仅在摄取凋亡体后激活 $CD4^+CD25^+$T 细胞 (表明需要存在自身抗原 ) 吗? 此外,呈递标称回忆抗原 (nominal recall antigens) 的成熟 DC( 如流感蛋白质 / 肽 ) 于 $CD4^+CD25^-$T 细胞群体和 $CD4^+CD25^+$T 细胞群体中均刺激 T 细胞,这表明除了自身抗原以外,外源抗原的识别也可于炎性位点触发调节。

[0054] 总之,在正常人类成人的外周血液中存在着相当大群体 ( ～ 6% ) 的 $CD4^+CD25^-$T 细胞,与以前的观念相比,它们不代表常规记忆性 T 细胞,而是调节性 T 细胞,这种调节性 T 细胞与在啮齿动物中已经研究多年的 $CD4^+CD25^-$ “专业的”抑制性 / 调节性 T 细胞的独特群体相当。现在,人类 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞的识别与表征使得我们可以在多种疾病病症中对其监控,并且对理解和治疗自身免疫性,移植排斥,和癌症具有重要的意义。

[0055] 通过以下附图和实施例进一步解释本发明,不过这些附图及实施例并不对本发明构成限制 :

[0056] 附图

[0057] 图 1 :$CD4^+CD25^+$T 细胞表现出明显与 $CD4^+CD25^-$T 细胞不同的表型。通过负 MACS 分类从 PBMC 中分离出 $CD4^+$T 细胞,并产出高度纯化的未接触的 $CD4^+$T 细胞。这些细胞由抗 CD25 磁珠标记并分类。

[0058] (A) :分类得到基本上纯的 $CD25^+$T 细胞。该附图显示了从 20 次独立标准试验中得到的代表性结果。

[0059] (B) :采用如“材料与方法”中描述的方法分析 $CD4^+CD25^+$、$CD4^+CD25^-$ 和活化的 $CD4^+CD25^-$T 细胞的表型。另外,采用固定化的抗 CD3+ 可溶性抗 CD28 活化 $CD4^+CD25^-$T 细胞。活化后,细胞由抗 CD25 磁珠标记并分类。五次独立试验的结果相似。

[0060] (C) :采用抗 CTLA-4 抗体于 37℃将 $CD4^+CD25^+$ 和 $CD4^+CD25^-$T 细胞染色 2h。在固定化抗 CD3+ 可溶性抗 CD28 活化后的不同时间点,于体外进行该染色步骤。该附图显示了 4 次独立试验中的一个代表性结果。

[0061] 图 2 :$CD4^+CD25^+$T 细胞对异源和多克隆刺激均无增殖 / 无反应性,通过添加 IL-2 和 / 或 IL-15 可部分逆转,但添加中和抗 IL-10 抗体则无法逆转。

[0062] (A) :如图 1 通过 MACS 分类从成人血液中分离 $CD4^+CD25^+$ 和 $CD4^+CD25^-$T 细胞。采用不同数目的成熟异源 DC 刺激 $1\times10^5$ 个 T 细胞 /96 孔。通过 $[^3H]$Tdr 掺入测定 T 细胞 ( 一式三份培养物 ) 的增殖。6 次独立实验的结果相似。

[0063] (B):用如(A)描述的步骤处理全部$CD4^+$、$CD4^+CD25^+$和$CD4^+CD25^-$T细胞。通过[$^3$H]Tdr掺入测定三份培养物的增殖(该图显示的是5次独立实验的代表性结果)。

[0064] (C):采用来自相同供体的成熟异源DC每周接触和再刺激经MACS分类的$CD4^+CD25^+$和$CD4^+CD25^-$T细胞(DC:T细胞比例为1:20)。通过[$^3$H]Tdr掺入测定增殖($1\times10^5$个T细胞/96孔)。3次独立实验获得相似结果。

[0065] (D):采用固定化抗CD3(10μg/ml)和可溶性抗CD28(10μg/ml)[上框],或者如(A)所述的采用成熟异源DC[下框]刺激$CD4^+CD25^+$和$CD4^+CD25^-$T细胞。于培养开始时分别加入500U/ml IL-2、100ng/ml IL-15、10U/ml IL-2+1ng/ml IL-15的混合物或10μg/ml抗IL-10。培养5天后测[$^3$H]Tdr的掺入。该图显示了3次独立实验中的一次。无多克隆或异源T细胞刺激物的情况下,加入IL-2和/或IL-15,在$CD25^+$或$CD25^-$T细胞亚型中不会诱导有意义的增殖(数据未显示)。

[0066] 图3:如果由TCR刺激,$CD4^+CD25^+$T细胞将以依赖细胞接触和依赖剂量方式抑制$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的活化

[0067] (A,B):将经由MACS分类的总$CD4^+$(A)和$CD8^+$(B)T细胞($10^5$个T细胞/96孔)按图示比例加入到$CD4^+CD25^+$T细胞中,并以DC/$CD4^+$或$CD8^+$T细胞1:20的比例,采用异源DC刺激。5天后通过[$^3$H]Tdr掺入测定增殖。该图显示了5次独立实验中的一次。

[0068] (C):从相同供体(供体I)产生/分离DC和$CD4^+CD25^+$T细胞。另外,从另一供体(供体II)分离全部的$CD4^+$T细胞和$CD4^+CD25^+$T细胞。将$10^5$个全部$CD4^+$T细胞/96孔与$5\times10^3$个DC/孔一起培养(即DC:T=1:20;在DC:T=1:100时结果是可比较的,该结果未显示)。然后分别加入来自供体I和供体II的$CD4^+CD25^+$T细胞。培养5天后,通过[$^3$H]Tdr掺入测增殖。3次独立实验的代表性结果显示为三份培养的平均cpm值。

[0069] (D):采用$5\times10^3$个异源成熟DC刺激全部的$CD4^+$T细胞或$CD4^+CD25^+$T细胞($10^5$个T细胞/96孔)(DC:T=1:20)(上部两框)。另外,全部的$CD4^+$T细胞与$CD4^+CD25^+$T细胞以1:1的比例共培养($10^5$个T细胞/96孔培养板),并于10μg/ml抗IL-10、2μg/ml TGF-β、500U/ml IL-2、50ng/ml IL-15或者10U/ml IL-2与1ng/ml IL-15的混合物存在或不存在的情况下再次由异源DC以DC:T为1:20的比例进行刺激。在平行Transwell方法中,在一个Transwell室中,由异源DC(DC/T细胞比例为1:20)刺激$CD4^+CD25^+$T细胞,并将全部$CD4^+$T细胞响应物再次与异源DC一起置入孔内,DC:T比例为1:20。通过[$^3$H]Tdr掺入测培养5天后的增殖。该图显示了4次代表性实验中的一次结果。

[0070] 图4:$CD4^+CD25^+$和$CD4^+CD25^-$T细胞的不同细胞因子廓型(profiles)。

[0071] (A):采用PMA(20ng/ml)和A23187$Ca^{2+}$离子载体(500μg/ml)刺激经MACS分类的$CD4^+CD25^+$和$CD4^+CD25^-$T细胞6h。后5h加入莫能菌素(2μM)。进行CD3表面表达的染色。将细胞洗涤、固定、透化并染色,以采用FITC结合或PE结合的特异抗体检测细胞内细胞因子。该图显示了具有相似结果的5次独立实验中的一次。当T细胞由与培养板结合的抗CD3+可溶性抗CD28AB刺激时,结果是一样的(未显示)。

[0072] (B):采用与培养板结合的抗CD3+可溶性抗CD28活化$CD4^+CD25^+$和$CD4^+CD25^-$T细胞。培养48h后,通过核糖核酸酶保护分析进行RNA表达分析。

[0073] (C):通过ELISA测定上清液中的细胞因子(该图显示5次独立实验中的一次)。

[0074] 材料与方法

[0075] 培养基：将补充有1％热灭活的自身血浆、20μg/ml 艮他霉素 (Merck) 和2mM 谷氨酸盐 (Bio Whittaker) 的 RPMI1640(Bio Whittaker) 用于树突细胞 (DC) 的增殖，将补充有1％热灭活单供体人类血清、20μg/ml 艮他霉素 (Merck) 和2mM 谷氨酸 (Bio Whittaker) 的 X-VIVO-20(Bio Whittaker) 用于 T 细胞培养。

[0076] 细胞因子：所有用于该研究的细胞因子均为重组人类蛋白质。最终浓度为：GM-CSF 1,000U/ml(Leukomax™；Novartis)，IL-4800U/ml(Sandoz)，IL-2(Proleukin；Chiron Corp.) 和 IL-15(PeproTech) 以指示浓度使用；对 DC 的成熟而言，我们采用含有 IL-1β 2ng/ml(Sigma)、IL-6 1000U/ml(Sandoz)、TNF-α 10ng/ml(Bender，Vienna)、及 $PGE_2$ 1μg/ml(Sigma) 的混合物 (cocktail)。

[0077] 抗体：对免疫染色而言，应用的是抗 CD3、CD4、CD5、CD8、CD14、CD19、CD25、CD28、CD45RA、CD45RO、CD56、CD62L、CD80、CD83、CD86、CD95、CD95L、CD122、CD152、CD154、HLA-DR 的 PE- 和 FITC 结合抗体 (Ab)(均来自 BD Pharmingen)，及各自的小鼠和大鼠同种型对照。用于细胞内细胞因子染色的抗体是 FITC- 和 PE- 结合抗 IL-2(MQ1-17H12)、抗 IL-4(8D4-8)、抗 IL-10(JES3-19F1) 和抗 IFN-γ (4S，B3)，均来自 BD Pharmingen。未结合抗 IL-10(JES3-19F1)(Pharmingen) 和抗 TGF-β (R&D Systems) 被用于中和实验。抗 CD3(UCHT1) 和抗 CD28(CD28.2) 用于 T 细胞的多克隆激活。

[0078] 细胞因子分析：由异源 DC，或由 X-VIVO-20+1％血清中的与培养板结合的抗 CD3(10μg/ml)+ 可溶性抗 CD28(10μg/ml) 刺激 T 细胞。通过采用适用于人类 IL-2、IL-4、IL-10、IFN-γ 和 TGF-β (BDPharmingen) 的市售 ELISA 试剂盒对上清液进行分析的方法，于不同时间点进行细胞因子分析。对细胞内细胞因子产生而言，T 细胞由 PMA20ng/ml 和 $Ca^{2+}$ 离子载体 A23187 500μg/ml(均来自 SIGMA) 刺激 6 小时，或由培养板结合抗 CD3 和可溶性抗 CD28Ab 刺激 6 小时。于培养最后 4 小时加入 2μM 的莫能菌素 (SIGMA)。收集、洗涤、固定并皂苷透化细胞 (Fix/perm 溶液，BD Pharmingen)，并由细胞因子特异 Ab 或同种型进行染色。

[0079] 对细胞因子 mRNA 分析而言，T 细胞是由与培养板结合的抗 CD3 和可溶性抗 CD28Ab 刺激。通过核糖核酸酶保护分析模板装置 (BDPharmingen) 分析细胞。

[0080] 细胞分离和 DC 生成：如 (18,19) 所述，DC 产生自血沉棕黄层，或除去白细胞后的产物中 (均获得自 the Department of Transfusionmedicine，经健康供体同意后获得)。简言之，通过 Ficoll 密度梯度离心分离 PBMCs。通过塑料吸附分离单核细胞，并将其培养在补充有 IL-4 和 GMCSF 的 RPMI 培养基中。第 6 天，加入一种成熟混合物 (IL-1β、IL-6、$PGE_2$ 和 TNFα)。第 7 天，收获未吸附细胞，并且构成对协同分子 (CD80、CD86) 和 CD83 而言，为 ＞ 90％双阳性的成熟 DC。

[0081] 采用阴性 $CD4^+$T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotech) 从 PBMC 中分离 $CD4^+$T 细胞。采用 CD25 Microbeads(Miltenyi Biotech) 从纯的、未接触的 (untouched)$CD4^+$T 细胞中分离 $CD4^+CD25^+$T 细胞。采用阴性 $CD8^+$T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotech) 进行 $CD8^+$T 细胞的分离。纯度由 FACS 评定。

[0082] 流式细胞仪分析：为进行免疫荧光检验，将染色细胞洗涤，再采用每种 Ab 的最优稀释液于 4℃将其染色 20min。再次洗涤细胞，并通过流式细胞仪 (FACS Scan™ 和 CELLQuest™ 软件；Becton Dickinson) 分析。为进行细胞表面 CD152 表达的分析，细胞需经

恰当的抗体于37℃染色2小时。

[0083] 增殖分析：为评估不同$CD4^+$亚型的增殖，于96孔培养板中的、含有不同数目的DC或不同浓度的与培养板结合的抗CD3+可溶性抗CD28的X-VIVO-20中培养$10^5$个分类T细胞。为评估调节特性，需在96孔培养板中，采用$5\times10^3$个（有些实验中也可采用$1\times10^3$）DC培养$10^5$个$CD4^+$T细胞。加入不同浓度、已纯化的$CD4^+CD25^+$或$CD4^+CD25^-$T细胞。培养4～5天后，加入[3H]Tdr(37KBq/孔）并继续培养16h。采用液体闪烁记数器测定增殖。

[0084] Transwell实验：于24孔培养板中进行Transwell实验。采用$5\times10^3$个DC刺激$10^6$个$CD4^+$T细胞。另外，既可将$10^6$个$CD4^+CD25^+$或$CD4^+CD25^-$T细胞直接加入培养物中，也可将其置于Transwell室(Millicell,0.4μm;Millipore)中。共培养5天后，将一式三份的T细胞转移至96孔培养板中($10^5$个细胞/孔)。经[3H]Tdr 16h的脉冲标记后，采用液体闪烁计数器测定增殖。

## 实施例

[0085] 实施例1：$CD4^+CD25^+$T细胞对异源和多克隆刺激均显示增殖减少响应。

[0086] 低增殖潜力是在鼠科系统中，被很好地表征的调节$CD25^+CD4^+$T细胞的一个显著的特性(Sakaguchi S.等，J.Immunol.，155：1151-1164(1995))。为分析人类$CD4^+$亚群的增殖能力，将$CD4^+$T细胞根据其CD25的表达进行磁性分类。通过采用MACS CD4阴性选择试剂盒，并且随后进行CD25阳性选择，获得了超过95％纯度的$CD4^+CD25^+$T细胞群体（图1A)。这些细胞包括了约6％(2.8-17.2％，n＝20)的，存在于我们所研究的健康成人的血液中的外周$CD4^+$T细胞。

[0087] 成熟DC是已知的最有效的抗原呈递细胞(Bancherau，J.，Steinman，R.M.，Nature,392：245-252(1998))。然而，与$CD4^+CD25^-$T细胞（图2A,B)、或整个$CD4^+$群体（图2B)形成对比，当体外采用充分成熟异源DC刺激时，$CD4^+CD25^+$T细胞实质上不显示增殖响应。有趣的是，与整个$CD4^+$群体相比，当采用异源DC刺激时，除去了$CD25^+$T细胞的$CD4^+$群体（图2B)显示出较高的增殖。

[0088] 接着确定了$CD4^+CD25^+$T细胞是否可能仅通过成熟DC反复刺激而增殖。再刺激后，$CD25^-$T细胞的增殖响应稍微增加，然而$CD25^+$T细胞的响应仍然很低（图2C)。通过异源成熟DC激活(priming)和再刺激，在2个循环的再刺激后引起$CD25^-$群体30～50倍的增殖。相反，$CD25^+$群体无明显的增加（数据未显示）。反复刺激后，在明显缺乏凋亡或坏死的情况下，收获了与初始接种体相比绝对数目有轻微（～10％）减少的$CD4^+CD25^+$T细胞（数据未显示）。

[0089] 当这些细胞群体经由与培养板结合的抗CD3+可溶性抗CD28多克隆刺激时，$CD4^+CD25^+$T细胞的极低增殖响应也是明显的。为验证T细胞生长因子IL-2和IL-15是否能影响增殖潜力，将二者以不同剂量加入到$CD4^+CD25^+$和$CD4^+CD25^-$T细胞中，这些T细胞已经用固定化抗CD3+可溶性抗CD28（图2D，上框），或用成熟异源DC（图2D，下框）进行了刺激。一系列试验研究显示IL-2仅在高剂量(100-1000U/ml)下增强$CD25^+$T细胞的增殖。IL-15有相似的效果，也仅在50-100ng/ml的高剂量下增强$CD25^+$T细胞的增殖。当两种细胞因子混合使用时，它们具有强的协同效应，并且10U/ml IL-2加10ng/mlIL-15的剂量就足以促进$CD4^+CD25^+$T细胞的增殖。在不存在多克隆或异源T细胞刺激物的情况下，加入IL-2

和 / 或 IL-15，在 $CD25^+$ 或 $CD25^-$T 细胞亚型中不引起明显的增殖（数据未显示）。

[0090] 实施例 2：$CD4^+CD25^+$T 细胞表现出与 $CD4^+CD25^-$T 细胞明显不同的表型。

[0091] 为进一步表征 $CD25^+CD4^+$T 细胞群体，将 $CD4^+CD25^+$、$CD4^+CD25^-$ 不同表面分子的表达，与受激的 $CD4^+CD25^-$T 细胞不同表面分子的表达（图 1B）相比较。三个群体均显示 CD3 和 CD4 的同源表达。通过 FACS 分析检测不到污染细胞，如单核细胞、B 细胞、$CD8^+$T 细胞或 NK 细胞（数据未显示）。在无预先刺激时，即在离体状态下，$CD25^+$ 群体已经高水平表达细胞内，低水平表达细胞表面 CTLA-4(CD152)。离体分离的 $CD4^+CD25^+$T 细胞进一步组成型表达 CD122(IL-2Rβ 链）、HLA-DR（～ 50％），并组成 CD45RO 细胞的主要成分（～ 80％），该 CD45RO 细胞类似一种记忆 T 细胞表型。形成鲜明对比的是，离体分离的 $CD4^+CD25^-$T 细胞不表达 CTLA-4（既不在细胞内，也不在细胞表面）、CD122、或 HLA-DR，并且更多的细胞表达 CD45RA 而不是表达 CD45RO。然而在用培养板结合抗 CD3+ 可溶性抗 CD28 激活后，正如所预期的，大部分 $CD4^+CD25^-$ 优势地成为 $CD25^+$(CD25 表达水平与 $CD4^+CD25^+$T 细胞相比，约高出 1log，数据未显示），并且显示高水平的 HLA DR 和 CD122（与 $CD4^+CD25^+$T 细胞相比，也约高出 1log）。另外，如预期的，细胞内和表面 CTLA-4 均于 24 ～ 48h 内被正调节，但其后被迅速地负调节（图 1C）。当 $CD4^+CD25^+$T 细胞受激后，CTLA-4/CD152 表达的动力学显示出显著的差异。这些细胞也正调节其（已经组成型存在但水平很低）CD152 的表面表达，然而 CD152 的强表达仍保持不变超过 1 周（图 1C）。用其它一些诸如抗 CD28、CD62L、CD69、CD95、CD95L、CD154(CD40L) 的 mAb 染色，在 $CD4^+CD25^+$ 与 $CD4^+CD25^-$T 细胞之间不显示出可重现的和显著的差异。

[0092] 实施例 3：如果通过 TCR 刺激 $CD4^+CD25^+$T 细胞会以细胞接触和剂量依赖的方式抑制 $CD4^+$ 和 $CD8^+$T 细胞的活性。

[0093] 为分析 $CD25^+$T 细胞的推定的调节特性，进行了协调培养试验。在首个系列的试验中，我们从特定供体分离出了 $CD4^+$ 总群体和 $CD25^+$ 及 $CD25^-$ 片断。然后将全部的 $CD4^+$T 细胞与 $CD4^+CD25^+$ 或 $CD4^+CD25^-$T 细胞亚群体以所示比例混合，并采用异源成熟 DC 进行刺激（图 3A）。$CD4^+CD25^+$T 细胞明显抑制全部 $CD4^+$T 细胞的增殖，并且在 1 ： 1 比例时实质上阻断其增殖（cpm 表示 $CD25^+$T 细胞增殖的本底水平，见图 2A-D）。加入 $CD25^-$T 细胞替代 $CD25^+$T 细胞轻微地加强增殖（未显示）。由于 $CD4^+CD25^-$ 在多克隆（见图 1B）以及异源 DC 的刺激下，迅速表达 CD25 和 CD122，即 IL-2R 的双链（数据未显示）。这个发现表明 $CD4^+CD25^+$T 细胞亚型的抑制活性不是简单地由于通过它们的 IL-2R 对 IL-2 的消耗或被动吸收。$CD4^+CD25^+$T 细胞在全部 $CD8^+$T 细胞上发挥了抑制活性虽然负调节不够强烈（图 3B）。

[0094] 在一组进一步的试验中，确定了同源 DC 对 $CD4^+CD25^+$T 细胞的活化作用，对它们的调节特性的诱导是否足够。为此目的，将成熟 DC 和 $CD4^+CD25^+$T 细胞从相同供体（供体 I）中产生 / 分离出来。另外，从另一供体（供体 II）中分离出全部 $CD4^+$T 细胞及 $CD4^+CD25^+$T 细胞亚型。然后在缺乏（图 3C，仅为 $CD4^+$）或存在从供体 I 或供体 II 中分离出的、不同数目的 $CD4^+CD25^+$T 细胞的情况下，采用异源成熟 DC（供体 I）刺激全部 $CD4^+$T 细胞（供体 II）（图 3C）。当采用异源的、来自供体 I 的 DC 刺激时，获得自供体 II 的全部 $CD4^+$T 细胞如预期一样旺盛地增殖（图 3C，仅 $CD4^+$）。在供体 I 来源的 $CD4^+CD25^+$T 细胞存在的情况下（即与所用 DC 同源），获得自供体 II 的全部 $CD4^+$T 细胞的增殖（即同种反应性）根本不受抑制（图 3C）。然而，当加入供体 II 来源的 $CD4^+CD25^+$T 细胞（即与所用 DC 异源）会发生潜在

的抑制作用（图 3C）。抑制作用也可在有分别来源于三个不同供体的 DC、全部 $CD4^+$T 细胞、$CD4^+CD25^+$T 细胞的实验中观测到。这些数据表明为使 $CD4^+CD25^+$T 细胞发挥调节作用，需要 TCR 介导的 $CD4^+CD25^+$T 细胞激活，也表明同源 DC 不足以诱导它们的抑制活性。

[0095] 下一步，为了研究 $CD4^+CD25^+$T 细胞的调节功能是否主要通过可溶性因子介导或者需要细胞间接触，进行了 Transwell 室实验（图 3D）。如图 3D 所示，在异源 DC 存在的情况下，$CD4^+CD25^+$T 细胞几乎完全地抑制全部 $CD4^+$T 细胞的增殖。在 Transwell 室中两种群体的分离，实际上破坏了它们的抑制效应。这些观测结果提示：直接的细胞接触对于 $CD4^+CD25^+$T 细胞的抑制能力是必要的，因为 Transwell 室的半透膜允许可溶性因子自由通过，却排斥直接细胞接触。Transwell 实验也证明通过 $CD4^+CD25^+$T 细胞的 IL-2 的消耗不是造成抑制的机理。

[0096] 尽管调节性细胞和响应细胞之间的密切接触是明显需要的，但是通过 Transwell 实验既不能排除抗原呈递 DC 的定向也不能排除可溶性因子的作用。因此，与培养板结合的抗 CD3 Ab（与可溶性抗 CD28 Ab 结合）也被用作为一种不依赖抗原呈递细胞的和多克隆 T 细胞刺激物。在这种刺激下，单独的全部 $CD4^+$T 细胞显示了强的增殖。如上文所述（图 2D），$CD4^+CD25^+$T 细胞不增殖。在两种群体的共培养中，与对照相比在比例为 1 ： 1 时至少有 75％的降低（数据未显示）。这些数据提示，该调节作用不是主要通过 APC 功能的调节而发生的。细胞因子 IL-10 和 TGF-β 的中和抗体（分别对所谓的 Tr1 和 Th3 的抑制活性是关键性的 (Groux，H. 等，Nature，389：737-742(1997)；Fukaura，H. 等，J. Clin. Invest.，98：70-77(1996)）不破坏 $CD4^+CD25^+$T 细胞的调节活性，这证明这些细胞因子至少在我们着眼的分析中不扮演主要的抑制角色。以高剂量将 IL-2 和／或 IL-15 加入到共培养物中，促进了 $CD4^+CD25^+$T 细胞的增殖（见图 2D），降低了它们的抑制作用。然而，抑制活性很可能并没有被破坏，因为说明数据时必须将 $CD4^+CD25^+$T 细胞的显著增殖考虑在内。

[0097] 实施例 4：$CD4^+CD25^+$T 细胞占优势地分泌 IL-10

[0098] 为了分析并比较细胞因子特征，采用与培养板结合的抗 CD3+ 抗 CD28 激活刚刚分选的 $CD4^+CD25^+$ 和 $CD4^+CD25^-$T 细胞。然后通过 ELISA 分析上清液，并且通过核糖核酸酶保护分析研究 RNA 表达。另外，进行细胞内细胞因子染色，以测定释放一定细胞因子的细胞的百分数。如图 4 所示，$CD4^+CD25^-$T 细胞占优势地分泌 IFN-γ 和 IL-2，少量分泌 IL-10 和 IL-4，类似 Th1 样特征。另一方面，$CD4^+CD25^+$T 细胞中占优势地分泌 IL-10，并且仅分泌低水平的 IL-2、IL-4 及 IFN-γ，类似 Tr1 细胞。两种亚群体在 RNA 水平上的比较表明：与 $CD25^-$T 细胞相比，$CD25^+$T 细胞表达更多的 IL-10，较少的 IFN-γ，类似水平的 IL-2mRNA。在 $CD4^+CD25^+$T 细胞占优势地发现 IL-1 受体拮抗物 (IL-1Ra)mRNA，而显著的 IL-1βmRNA 水平仅存在于 $CD4^+CD25^-$T 细胞中。在两种细胞类型中，TGF-β 以类似的低水平表达。

[0099] 实施例 5：激活的并随后固定的 $CD4^+CD25^+$T 细胞仍然显示调节能力。

[0100] 通过所述的MACS®分选方法，从来自成人血液的全部 $CD4^+$T 细胞中分离出 $CD4^+CD25^-$ 和 $CD4^+CD25^+$T 细胞。将 $CD4^+CD25^+$T 细胞分为三份。其中一份由 10μg/ml 与培养板结合的抗 CD3 和 10μg/ml 可溶性抗 CD28 抗体活化过夜。第二天，将该部分与另一部分未活化 $CD4^+CD25^+$T 细胞用 2％甲醛固定 1 小时。第三部分不进行处理。洗涤细胞三次。

[0101] 单独的未固定 $CD4^+CD25^+$ 和 $CD4^+CD25^-$T 细胞，及每一部分的 $CD4^+CD25^+$T 细胞与 $CD4^+CD25^-$T 细胞以 1 ： 1 的比例混合后得到的混合物，均采用固定的抗 CD3 和可溶性抗 CD28

活化。5 天后，通过 [$^3$H]Tdr 掺入法测定增殖。图 5 显示的是 5 次独立实验中的一个代表，图中符号意义如下：

[0102] $CD4^+CD25^-$ 未固定的 $CD4^+CD25^-$ 细胞

[0103] $CD4^+CD25^+$ 未固定的 $CD4^+CD25^+$ 细胞

[0104] Reg.1:1 未固定的 $CD4^+CD25^+$ 与 $CD4^+CD25^-$T 细胞以 1 ： 1 混合

[0105] Reg.1:1

[0106] CD25+stim fix 活化的固定 $CD4^+CD25^+$T 细胞和未固定的 $CD4^+CD25^-$T 细胞以 1 ： 1 混合

[0107] Reg.1:1

[0108] CD25+fix 未活化的固定 $CD4^+CD25^+$T 细胞与未固定的 $CD4^+CD25^-$T 细胞以 1 ： 1 混合

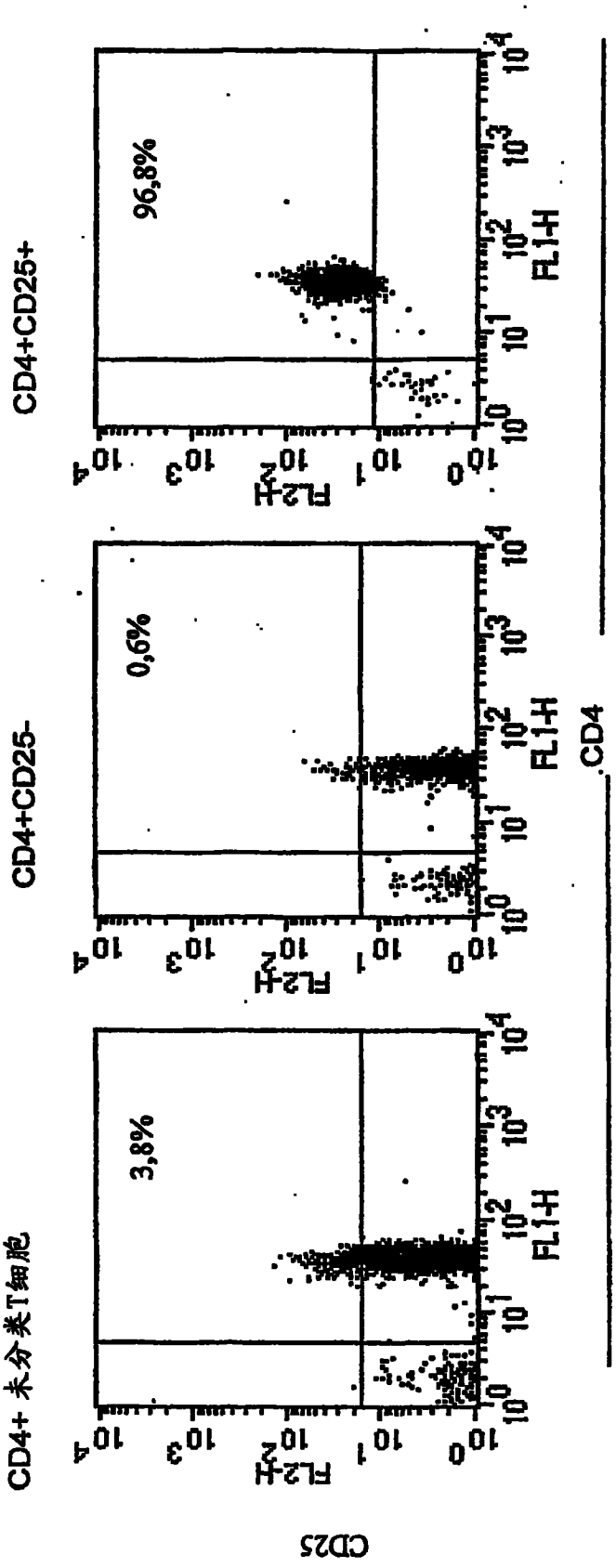



图 1A

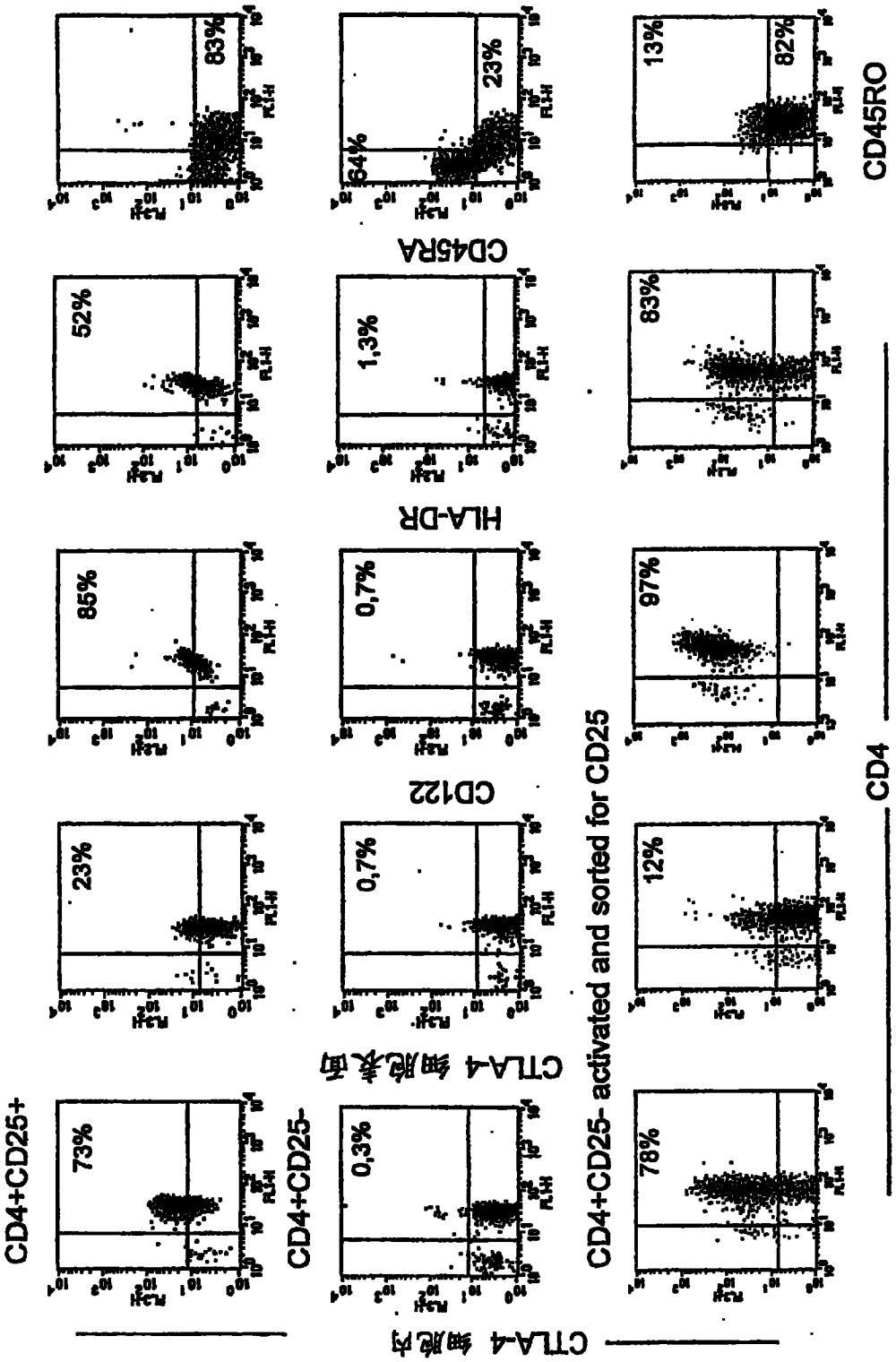

CD45RO
CD45RA
HLA-DR
CD122
CTLA-4 细胞表面
CTLA-4 细胞内
CD4
CD4+CD25- activated and sorted for CD25
CD4+CD25+
CD4+CD25-
83%
23%
84%
13%
82%
52%
1,3%
83%
85%
0,7%
97%
23%
0,7%
12%
73%
0,3%
78%

图 1B

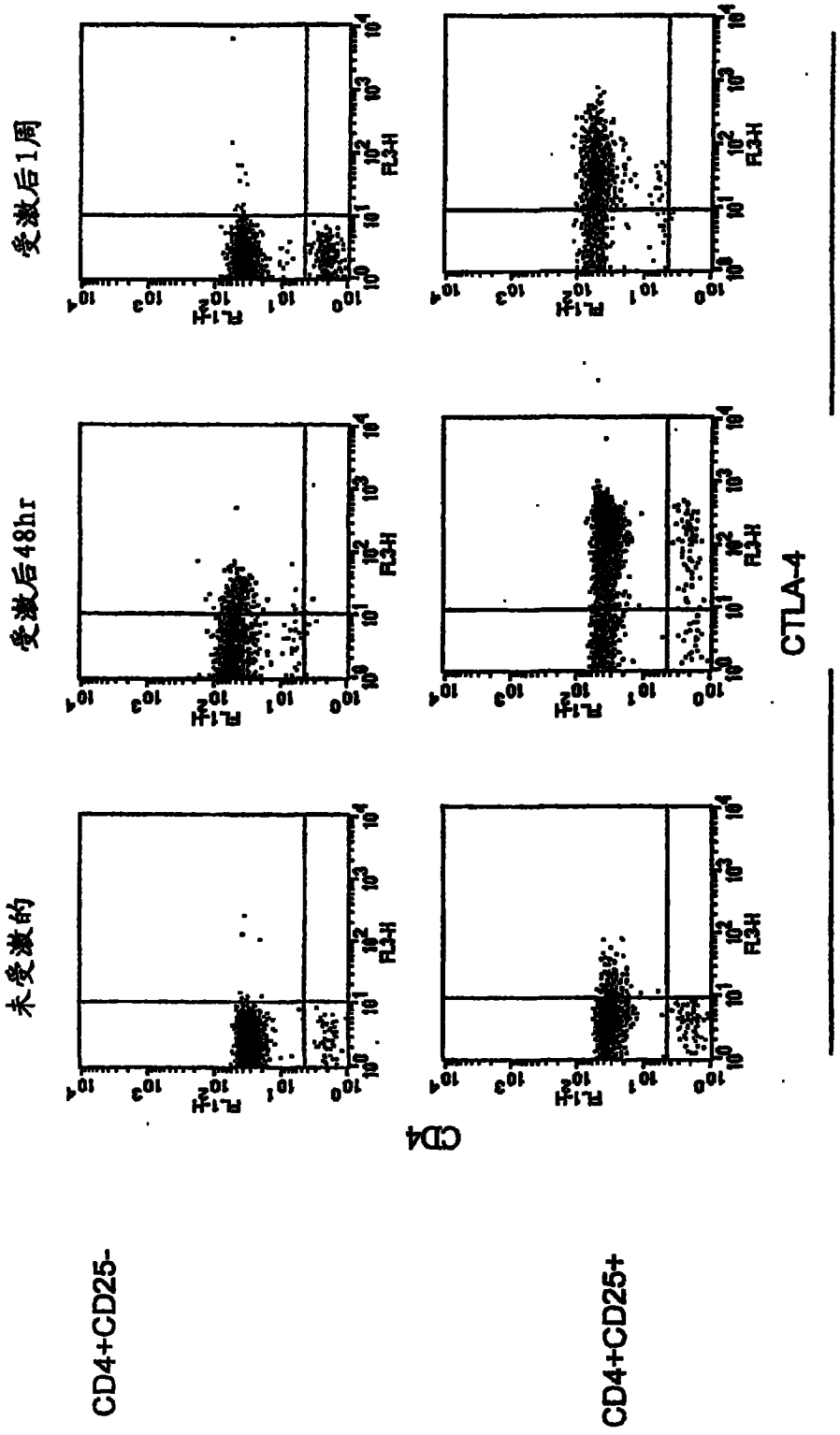



图 1C

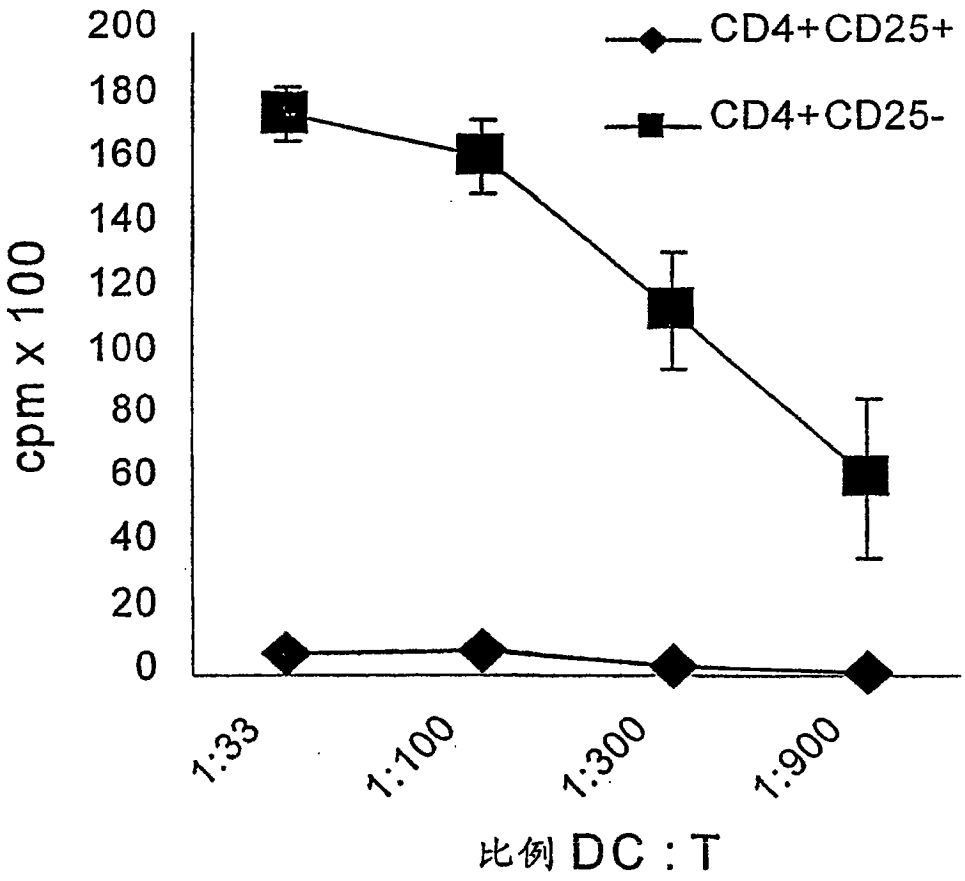

CD4+CD25+
CD4+CD25-
cpm x 100
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1:33
1:100
1:300
1:900
比例 DC : T

图 2A

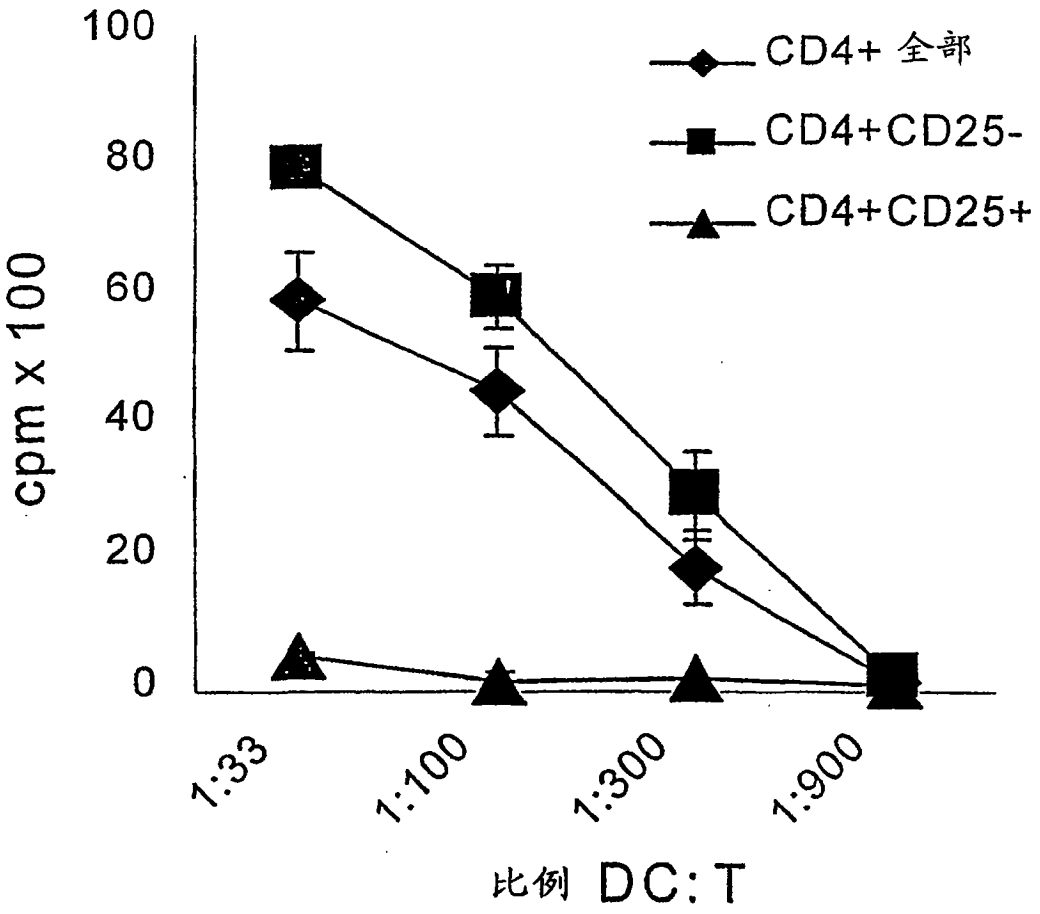

100
80
60
40
20
0
cpm x 100
CD4+ 全部
CD4+CD25-
CD4+CD25+
1:33
1:100
1:300
1:900
比例 DC:T

图 2B

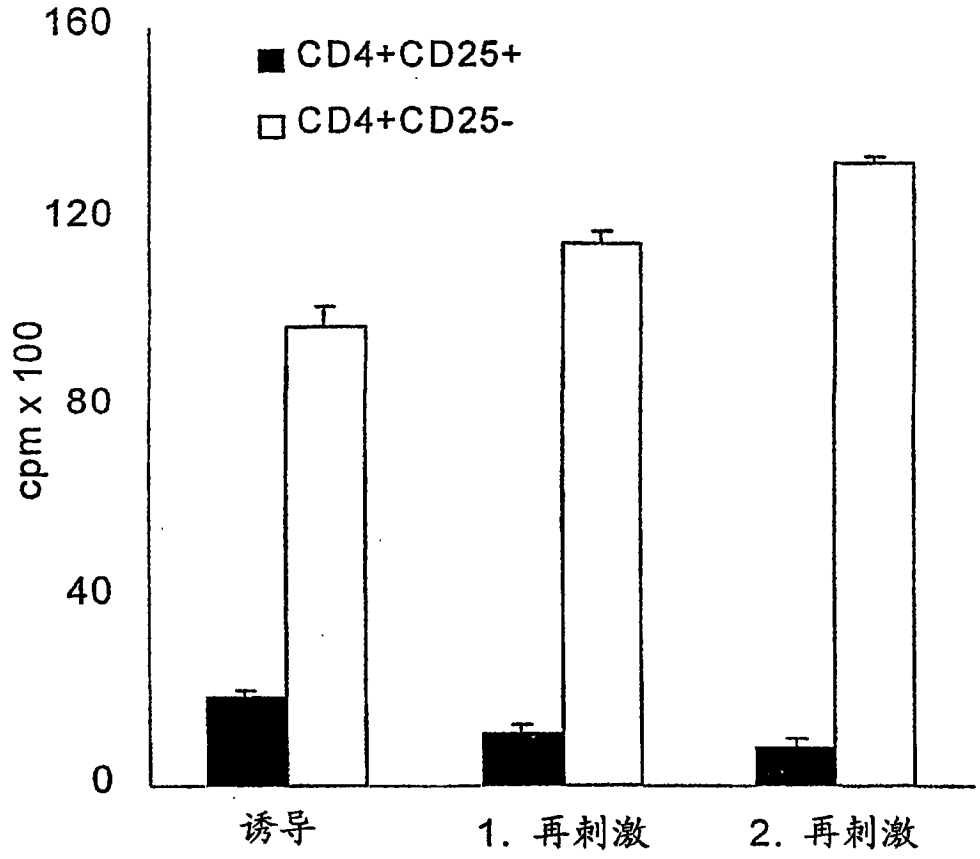



图 2C

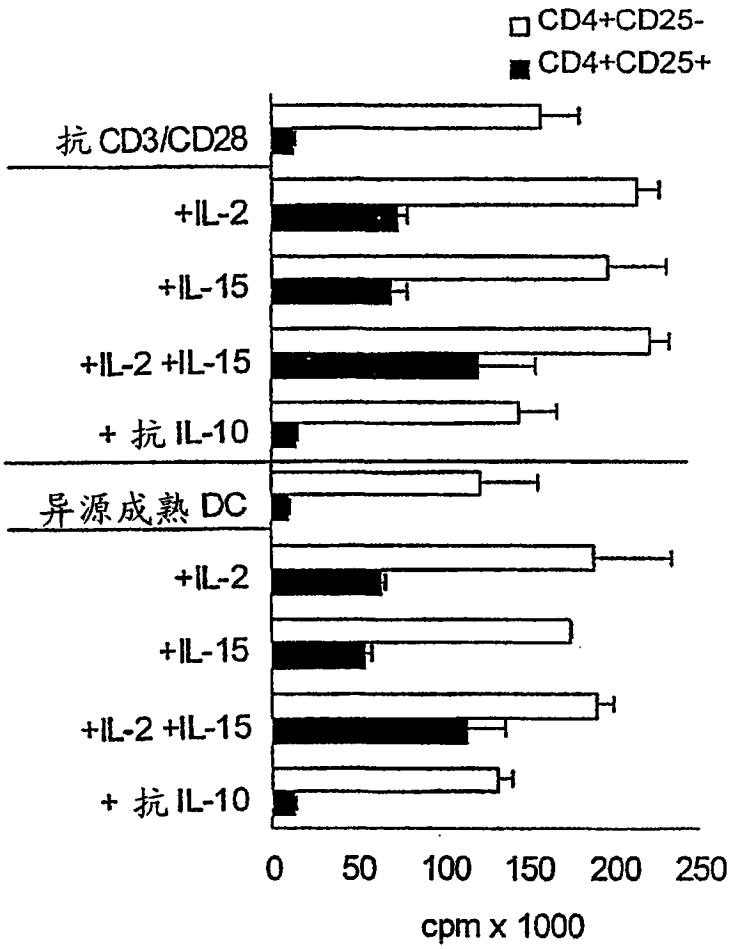

CD4+CD25-
CD4+CD25+
抗 CD3/CD28
+IL-2
+IL-15
+IL-2 +IL-15
+ 抗 IL-10
异源成熟 DC
+IL-2
+IL-15
+IL-2 +IL-15
+ 抗 IL-10
0
50
100
150
200
250
cpm x 1000

图 2D

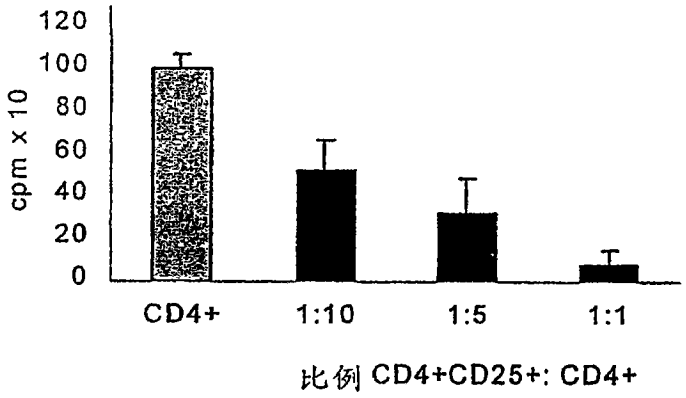

120
100
80
60
40
20
0
cpm x 10
CD4+
1:10
1:5
1:1
比例 CD4+CD25+: CD4+

图 3A

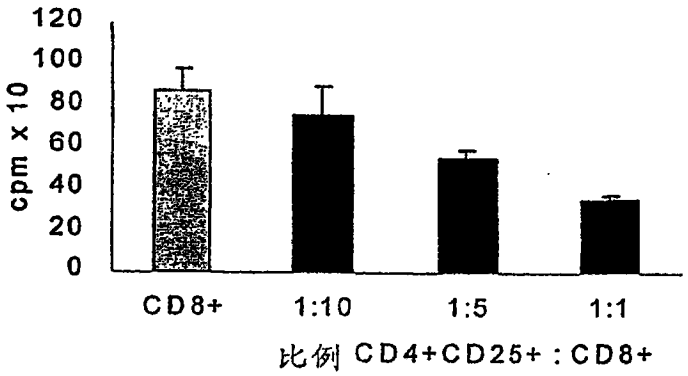

120
100
80
60
40
20
0
cpm x 10
CD8+
1:10
1:5
1:1
比例 CD4+CD25+ : CD8+

图 3B

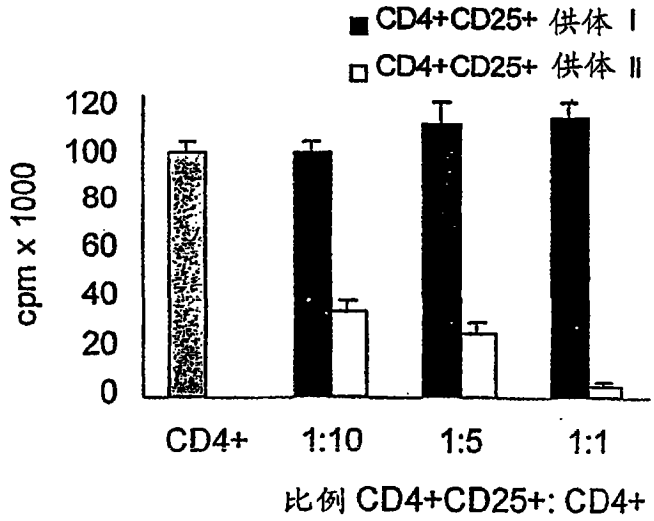

CD4+CD25+ 供体 I
CD4+CD25+ 供体 II
120
100
80
60
40
20
0
cpm x 1000
CD4+
1:10
1:5
1:1
比例 CD4+CD25+: CD4+

图 3C

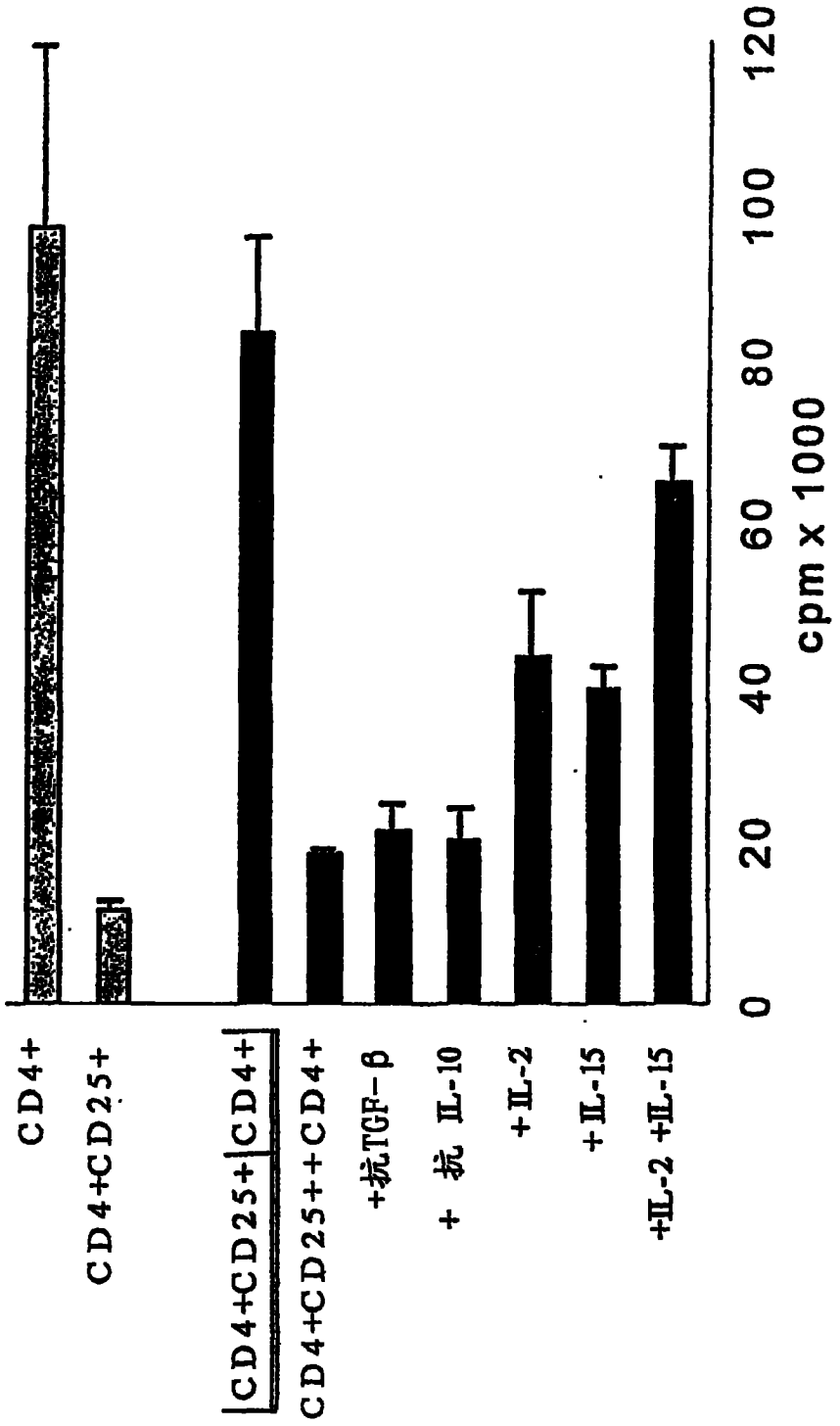

cpm x 1000
0
20
40
60
80
100
120
CD4+
CD4+CD25+
CD4+CD25+|CD4+
CD4+CD25++CD4+
+抗TGF-β
+ 抗 IL-10
+IL-2
+IL-15
+IL-2 +IL-15

图 3D

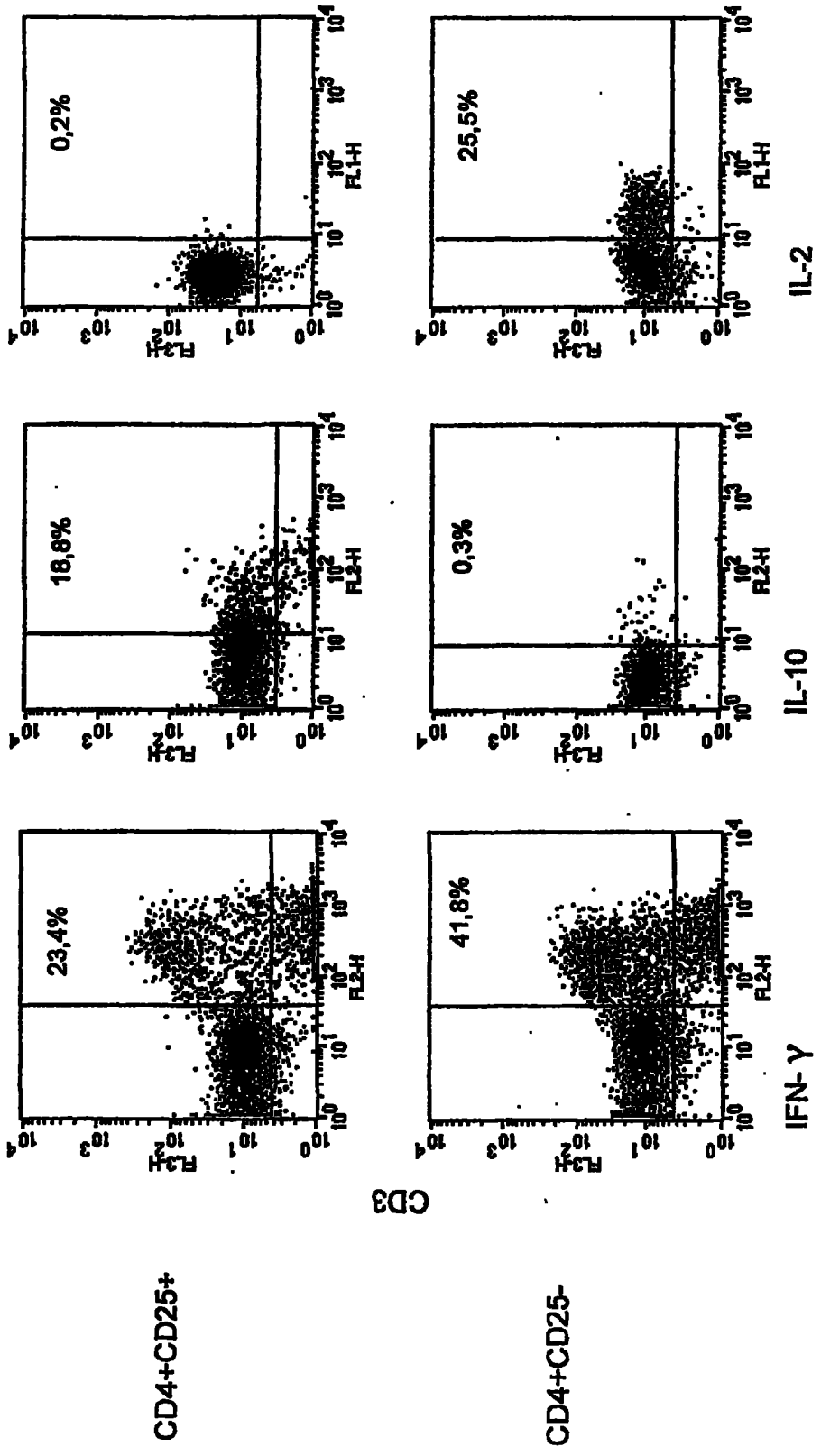

0,2%
25,5%
18,8%
0,3%
23,4%
41,8%
FL1-H
FL2-H
FL3-H
IL-2
IL-10
IFN-γ
CD3
CD4+CD25+
CD4+CD25-

图 4A

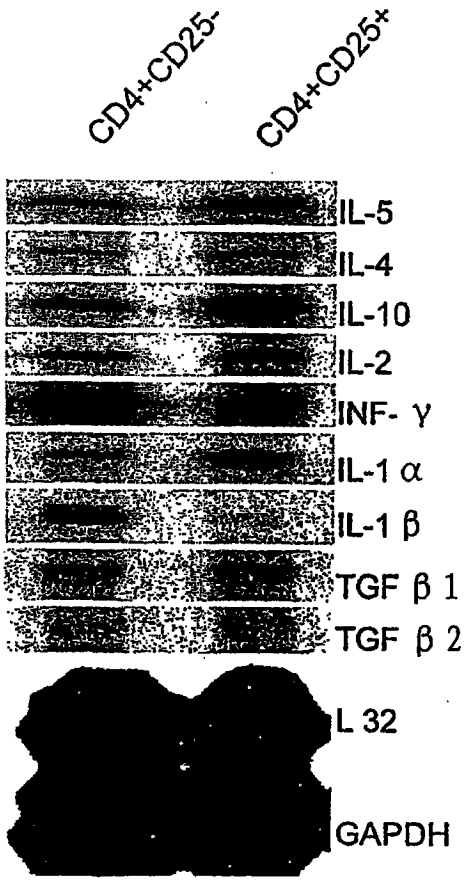

CD4+CD25-
CD4+CD25+
IL-5
IL-4
IL-10
IL-2
INF- γ
IL-1 α
IL-1 β
TGF β 1
TGF β 2
L 32
GAPDH

图 4B

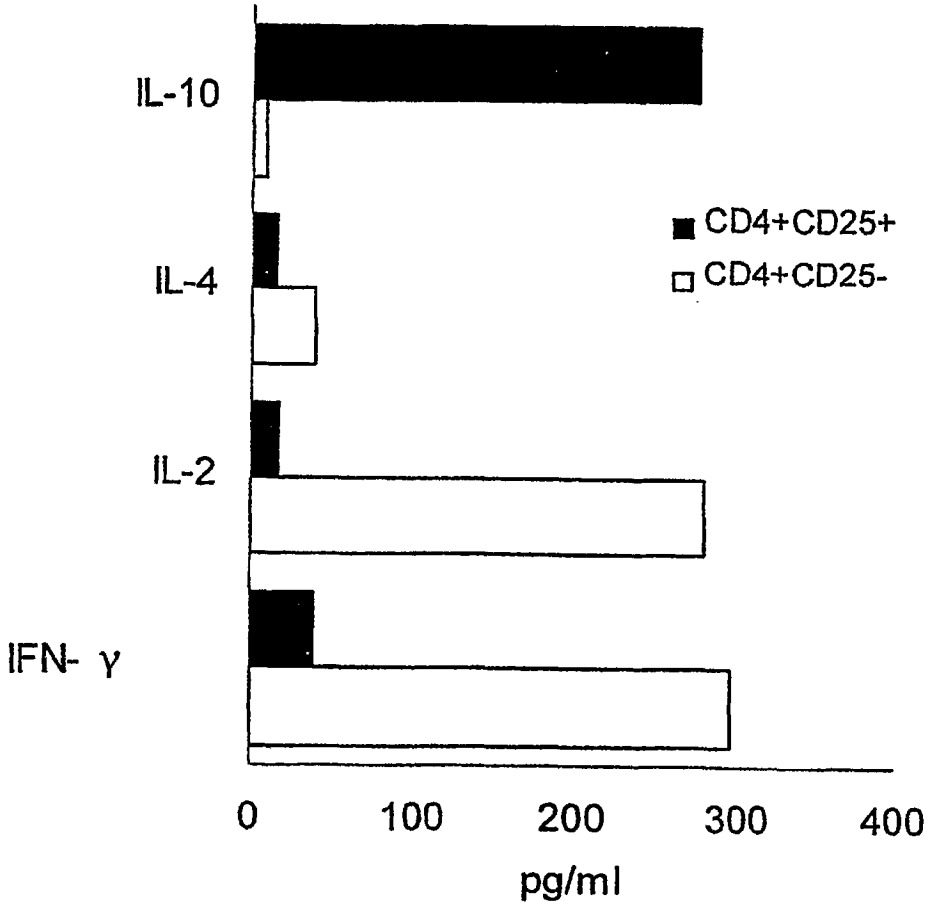



图 4C

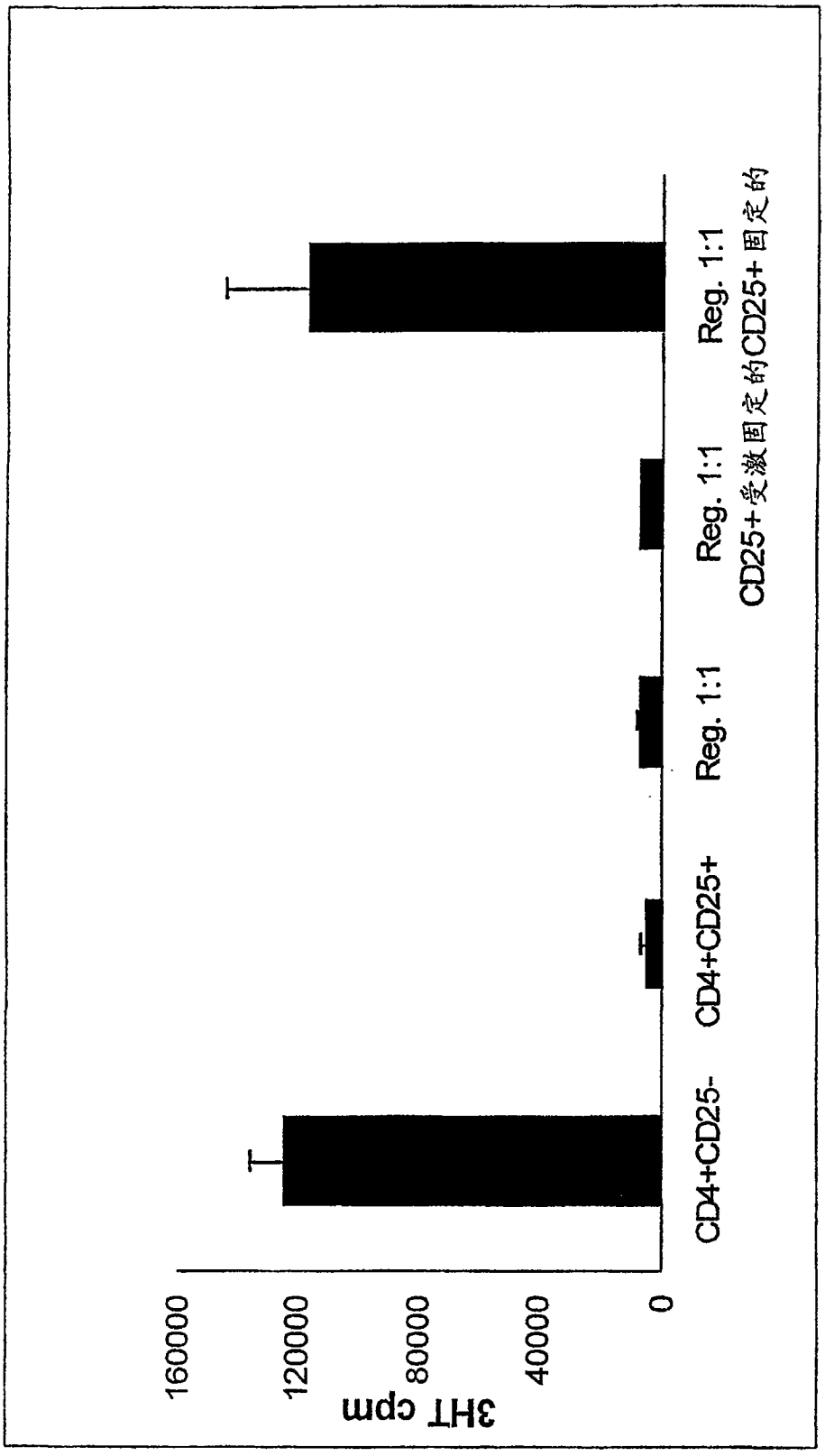

3HT cpm
160000
120000
80000
40000
0
CD4+CD25-
CD4+CD25+
Reg. 1:1
Reg. 1:1
Reg. 1:1
CD25+受激固定的CD25+固定的

图 5