

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-529631

(P2004-529631A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	E 2 G O 4 5
A 6 1 K 35/14	A 6 1 K 35/14	Z 4 B O 6 3
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 7
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/15	Z
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-571855 (P2002-571855)	(71) 出願人	503071185 シューラー, ジェロルド
(86) (22) 出願日	平成14年3月12日 (2002. 3. 12)		ドイツ連邦共和国 9 1 0 8 0 スパルド ルフ, アム ベイルチェンバーグ 2 5
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月11日 (2003. 9. 11)	(71) 出願人	503431699
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/002671		メリックス バイオサイエンス インコー ポレイテッド
(87) 国際公開番号	W02002/072799		アメリカ合衆国 ノースキャロライナ州 2 7 7 0 4, ダーハム, テクノロジー ド ライブ 4 2 3 3
(87) 国際公開日	平成14年9月19日 (2002. 9. 19)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	01106033.2	(74) 代理人	100095360 弁理士 片山 英二
(32) 優先日	平成13年3月12日 (2001. 3. 12)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト血液由来のCD4 + CD25 + 調節T細胞

(57) 【要約】

【課題】

【解決手段】

本発明は、抑制性および/または調節性ヒトCD4⁺CD25⁺T細胞、該細胞を増殖させる方法、ならびに該抑制性および/または調節性ヒトCD4⁺CD25⁺T細胞および該増殖させたT細胞の調節剤としての使用を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抑制性および/または調節性ヒトCD4⁺CD25⁺T細胞。

【請求項 2】

ヒト末梢血から好ましくは適切なモノクローナル抗体によって、および磁性分離または免疫吸着法を用いて単離しうる、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 3】

CTL A - 4⁺であり、かつ調節特性を有する、請求項 1 または 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

T細胞刺激剤または抗原提示細胞を用いて細胞を *ex vivo* および *in vivo* で刺激することを含んでなる、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の CD4⁺CD25⁺T細胞を増殖させる方法。 10

【請求項 5】

該 T 細胞刺激剤が

(a) スーパーアゴニスト性抗体を含む、抗 CD3 および/または抗 CD28 リガンド/モノクローナル抗体、

(b) CD4⁺CD25⁺T細胞表面上の T細胞受容体に対する、または T細胞受容体成分に対するリガンド/抗体；または

(c) 調節 T細胞の表面に発現された T細胞受容体に結合する MHC - ペプチド複合体；または 20

(d) ホルポールエステルおよびカルシウムイオノフォア；

を含む組成物である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

該抗原提示細胞が自己、非自己、人工抗原提示細胞、等から選択される、好ましくは該抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

該 T細胞刺激剤および該抗原提示細胞が IL - 2 および/または IL - 5、IL - 7 および/または IL - 9、IFN - および/または IL - 10 と共に用いられる、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載の方法によって得られる、増殖させたヒト CD4⁺CD25⁺T細胞。 30

【請求項 9】

好ましくはパラホルムアルデヒドで *ex vivo* 処理することによって得られる、固定された CD4⁺CD25⁺細胞である、請求項 8 に記載の増殖させたヒト CD4⁺CD25⁺T細胞。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 3、8 または 9 のいずれかに記載のヒト CD4⁺CD25⁺T細胞を含む医薬組成物。

【請求項 11】

規制医薬品を調製するための、請求項 1 ~ 3、8 または 9 のいずれかに記載の CD4⁺CD25⁺T細胞の使用。 40

【請求項 12】

CD4⁺CD25⁺T細胞をヒトの血液または他の組織から *ex vivo* または *in vivo* で同定し、モニターしおよび/または除去する方法であって、

(i) T細胞上の CD4、および/または CD25、および/または CTL - A4 (CD154) 分子 (*entities*) と特異的に結合する作用物質/リガンド、好ましくは抗 CD4、および/または抗 CD25、および/または抗 CTL - A4 抗体を用いる；および/または

(ii) 免疫吸着法を用いる；および/または 50

(i i i) 請求項 4 ~ 7 に記載の刺激剤または抗原提示細胞を用いる ;
 ことを含む該方法。

【請求項 13】

調節性 $CD4^+CD25^+$ T 細胞を *in vivo* で誘導する作用物質を調製するための、
 好ましくは患者の自己免疫疾患を治療するための作用物質を調製するための、請求項 5 ~
 7 に記載の T 細胞刺激剤または抗原提示細胞の使用。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 3、8 または 9 のいずれかに記載の $CD4^+CD25^+$ T 細胞の :

(a) 他の増殖および / または機能的修飾性 (抑制性 / 促進性) / アポトーシス性または
 抗アポトーシス性因子の同定を可能とするようなアッセイにおける

10

(b) $CD4^+CD25^+$ T 細胞上の新規分子の同定を含む、 $CD4^+CD25^+$ T 細胞に
 よって発現される分子を同定するため、または製薬的に活性とみなされる分子を提示して
 いるかどうかを同定するため、または

(c) 調節性 $CD4^+CD25^+$ T 細胞の前駆体細胞または子孫を同定するため、
 の使用。

【請求項 15】

養子免疫伝達療法のための作用物質、自己免疫疾患を含むがそれらだけに限定されない、
 免疫性が増大した疾患を治療するための作用物質、または移植片対宿主病、移植片拒絶、
 等の移植反応を阻止 / 治療する作用物質を調製するための、請求項 1 ~ 3 に記載の富化さ
 れた $CD4^+CD25^+$ T 細胞、または請求項 8 に記載の増殖させた T 細胞、または請求項
 9 に記載の固定化された T 細胞の使用。

20

【請求項 16】

養子免疫伝達療法のための方法であって、強すぎる、および / または病原性の免疫反応を
 阻止または治療するため、または移植片対宿主病および移植片拒絶、等の移植反応を阻止
 / 治療するために、請求項 1 ~ 3、8 または 9 のいずれかに記載の富化 / 増殖させた自己
 または非自己の調節性 $CD4^+CD25^+$ T 細胞を患者に注射 / 注入することを含む、該養
 子免疫伝達療法の方法。

【請求項 17】

特定の所望の抗原特異的 T 細胞受容体を用いて $CD4^+CD25^+$ T 細胞を調製する方法で
 あって、

30

(i) 抗原提示細胞、好ましくは該抗原を提示する未成熟または成熟樹状細胞 (DC)
 を用いて請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の $CD4^+CD25^+$ T 細胞を *in vitro* ま
 たは *in vivo* で活性化し / 刺激し / 増殖させる ; または、

(i i) $CD4^+CD25^+$ 調節 T 細胞 (のサブセット) 上に発現される特定の T 細胞受
 容体に対するリガンド / 抗体、または $CD4^+CD25^+$ T 細胞 (のサブセット) 上の特定
 の T 細胞受容体に結合する MHC - ペプチド複合体を用いる ;

ことを含む該方法。

【請求項 18】

該抗原提示細胞が組織または任意の規定されたもしくは規定されない抗原をパルスされ /
 負荷され / 供給され、ここで :

40

(i) 該規定された抗原が、好ましくは自己抗原 (尋常性天疱瘡の場合にはデスマグレイ
 ン 3 ; 白斑の場合にはメラニン A またはチロシナーゼ ; 甲状腺炎の場合にはサイログロブリン
 を含むが、それらだけに限定されない)、外来抗原 (C 型肝炎のような病原体由来抗原
 を含む)、または同種異系抗原 / 移植抗原であり、かつ

(i i) 該規定されない抗原が、好ましくは組織または細胞由来抗原 (壊死性またはアポ
 トーシス性細胞、または組織由来 RNA、または興味のある細胞と樹状細胞 / 抗原提示細
 胞とのハイブリッドの形態、規定されない抗原の樹状細胞もしくは他の抗原提示細胞への
 デリバリーという他の形態を含むが、それらだけに限定されない) または病原体由来抗原
 である、

請求項 17 に記載の方法。

50

【請求項 19】

特定の所望の抗原特異的 T 細胞受容体を有し、かつ請求項 17 または 18 の方法によって、または所望の抗原特異性を有する T 細胞受容体を単離された又は増殖させた T 細胞に *ex vivo* でトランスフェクションすることによって得られる、 $CD4^+CD25^+$ T 細胞。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の T 細胞を含む医薬組成物であって、好ましくは該医薬組成物が自己免疫疾患、移植片対宿主病および移植片拒絶を含むがそれらだけに限定されない、免疫性が増大した疾患を治療するのに適する、該医薬組成物。

【請求項 21】

抗 CD 25 および / または抗 CTL - A 4 モノクローナル抗体等のリガンド / 抗体、 $CD4^+CD25^+$ T 細胞 (のサブセット) 上の T 細胞受容体と結合する抗体または MHC - ペプチド複合体または他のリガンドを含むが、それらだけに限定されない T 細胞上の CD 4、および / または CD 25 および / または CTL - A 4 (CD 154) 分子 (*entities*) と特異的に結合する作用物質の、例えば腫瘍免疫を高めるための $CD4^+CD25^+$ T 細胞による *in vivo* 弱体化調節を含む免疫応答を増強するために $CD4^+CD25^+$ T 細胞を *in vivo* で除去する又はその機能を損傷させる薬剤を調製するための使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、抑制性および / または調節性ヒト $CD4^+CD25^+$ T 細胞、該細胞を増殖させる方法、ならびに該抑制性および / または調節性ヒト $CD4^+CD25^+$ T 細胞および対応する増殖させた T 細胞の調節剤としての使用を提供する。

【背景技術】

【0002】

免疫学的自己寛容は、自己免疫の阻止および免疫ホメオスタシスの維持にとって重大である。免疫系が自己と非自己を識別する能力は、中枢および末梢寛容の作用機構によって制御されている。中枢寛容は、発生の初期段階において胸腺中の自己反応性リンパ球の除去をもたらす (Rocha, B. および von Boehmer, H., *Science* 251: 1225 - 1228 (1991); Kisielow, P. ら, *Nature* 333: 742 - 746 (1988))。T 細胞アネルギーおよび非認識を含む、末梢寛容のいくつかの作用機構が記載されている (Rocha, B. および von Boehmer, H., *Science* 251: 1225 - 1228 (1991); Kisielow, P. ら, *Nature* 333: 742 - 746 (1988); Schwartz, R. H., *Science* 248: 1349 - 1356 (1990); Miller, J. F. A. P. および Heath, W. R., *Immunol. Rev.* 133: 131 - 150 (1993))。齧歯類を用いて 10 年以上続けられた研究により、他の寛容作用機構から逃れた自己反応性 T 細胞の活性化およびエフェクター機能の両方を活性かつ優勢に阻止する「プロフェッショナルな」調節 / 抑制 T 細胞というユニークな $CD4^+CD25^+$ 集団が存在するという確かな証拠が提供された (Sakaguchi, S. ら, *J. Immunol.* 155: 1151 - 1164 (1995); Takahashi, T. ら, *Int. Immunol.* 10: 1969 - 1980 (1998); Ito, M. ら, *J. Immunol.* 162: 5317 - 5326 (1999))。これらの細胞の排除または不活性化は、重篤な自己免疫疾患をもたらし、また同種異系抗原およびさらには腫瘍に対する免疫応答を増大させることが見出された (Sakaguchi, S. ら, *J. Immunol.* 155: 1151 - 1164 (1995); Ito, M. ら, *J. Immunol.* 162: 5317 - 5326 (1999); Shimizu, J. ら, *J. Immunol.* 163: 5211 - 5218 (1999))。最近の研究では、 $CD4^+CD25^+$ 調節 T 細胞がかなり相同な集団を構成すること (Thort

30

40

50

on, A. M., Shevach, E. M., J. Immunol. 164: 183 - 190 (2000)、胸腺に由来すること (Itoh, M.ら, J. Immunol. 162: 5317 - 5326 (1999))、本来的にはTCRによる刺激に対して非増殖性 (すなわち、アネルギー性) であるが、抑制性となることおよびCD4⁺またはCD8⁺T細胞の増殖を抑制するためにはTCRを介した活性化が必要であることを明らかにした。しかし、いったん活性化されると、それらの調節/抑制機能は完全に抗原非特異的であり、サイトカイン非依存的で、かつ細胞接触依存的であった (Thornton, A. M., Shevach, E. M., J. Immunol. 164: 183 - 190 (2000))。正確な抑制作用機構、特にT-T相互作用に関与する細胞表面および/または近傍の可溶性分子の抑制は、今後の特定を待たなければならない。新しいin vitroのデータによれば、CD4⁺CD25⁺T細胞がレスポンダーのIL-2産生を抑制することによってレスポンダーの増殖を抑制することが示唆されている (Thornton, A. M., Shevach, E. M., J. Exp. Med. 188: 287 - 296 (1998))。最近のin vivo研究によれば、CD4⁺CD25⁺T細胞の機能は、CD4⁺CD25⁺T細胞上に構成的に発現されることが見出されたCTLA-4/CD152分子を介したシグナル伝達に決定的に依存していることが示唆されている (Read, S.ら, J. Exp. Med. 192: 295 - 302 (2000); Salomon, B.ら, Immunity 12: 431 - 440 (2000); Takahashi, T. T.ら, J. Exp. Med. 192: 303 - 310 (2000))。

10

20

30

40

50

【0003】

齧歯類においてはCD4⁺CD25⁺T細胞集団が、自然発生性自己免疫疾患の阻止に極めて重大である「プロフェッショナルな」調節/抑制T細胞のユニークな系統を構成することが何年も前から明らかであったが (Sakaguchi, S.ら, J. Immunol. 155: 1151 - 1164 (1995))、類似の機能特性を示すCD4⁺4T細胞がヒトにおいて本来的に存在するかどうかは今日でも知られていない。マウスを例えば抗CD25および/または抗CTLA-A4モノクローナル抗体 (mAb) で処理する等によって、マウス中のこれらの細胞をin vivoで除去し、および/またはその機能を損傷すると、種々の自然発生性自己免疫疾患が誘導され、かつ腫瘍の拒絶が誘導される。この作用機構は、これらの細胞の除去/機能損傷により、自己反応性T細胞に対するそれらの負の制御が除去され、その結果これら自己反応性T細胞が活性化する、というものである。養子免疫伝達によってCD4⁺CD25⁺T細胞をこれらの動物に戻してやると、調節が回復され、また自己免疫/腫瘍拒絶が停止する。

【0004】

上記のように、類似の機能特性を示すCD4⁺T細胞がヒトにおいて本来的に存在するかどうかは今日まで全く知られていない。CD4⁺CD25⁺T細胞ではないが、調節特性を有するヒトT細胞の調製は当技術分野で公知である。例えば、Jonuleit, H.ら, J. Exp. Med. 192: 1213 - 1222 (2000)には、未成熟樹状細胞を用いた反復刺激により、ヒト未処置T細胞から調節T細胞が誘導されることが記載されている。この研究の殆どは、真に未処置のT細胞の最も豊富な供給源である臍帯血由来のT細胞を用いて実施された。CD4⁺CD25⁺T細胞は初期の時点からヒト血液中に構成的に検出可能である、ということに注目すべきである。Jonuleitらの対象は本来的に存在する集団ではない。De Jong, P.ら, Int. Immunol. 6: 631 - 638 (1994)は、未処置のCD4⁺T細胞および記憶CD4⁺T細胞に対するTGF- β 1の作用を記載している。一次活性化CD45RA⁺CD4⁺T細胞に対する刺激作用とともに差動作用が示される。CD45RO⁺CD4⁺T細胞または二次刺激化CD45RO⁺細胞の増殖は抑制される。CD45RA⁺T細胞の場合は、TGF- β はCD25の蛍光の平均値の増大をもたらす。この文献に記載されている作用は、T細胞の増殖にのみ関連するものである。未処置のTGF- β で処理したT細胞の調節能は示されていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

驚くべきことに、 $CD4^+CD25^+$ 、主として $CD45RO^+$ T細胞($CD4^+$ T細胞の平均6%) (以下、単に" $CD4^+CD25^+$ T細胞"という)はヒト血液中、特に成人の健康なボランティアの末梢血に存在する。過去において、この表現型を示すT細胞(すなわち、抑制性/調節性 $CD4^+CD25^+$ T細胞)は数年前から知られていたが、従来の記憶細胞であると誤って解釈されていた(Kanegane, H.ら, Int. Immunol. 3: 1349-1356 (1991); Taka, K.ら, Immunol. 72: 15-19 (1990); Jackson, A. L.ら, Clin. Immunol. Immunopathol. 54: 126-133 (1990))。以前の報告とは対照的に、ヒト $CD4^+CD25^+$ T細胞は従来の記憶細胞ではなく、むしろそれら細胞の齧歯類対応物と同一の機能特性を示す調節細胞である。例えば、 $CD4^+CD25^+$ T細胞の*in vivo*抑制活性に必須のCTLA-4($CD152$)は構成的に発現され、そして刺激後、強くアップレギュレーションされたままであった。 $CD4^+CD25^+$ T細胞は、それらのTCRを介した刺激に対して非増殖性であったが、アネルギー状態はIL-2およびIL-15によって部分的にくつがえされた。同種であるが同系ではない成熟樹状細胞またはプレート結合抗CD3および抗CD28で刺激すると、 $CD4^+CD25^+$ T細胞はIL-10を放出した。また、共培養実験においては、 $CD4^+CD25^+$ T細胞は $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞の活性化および増殖を抑制した。抑制はIL-10に依存しないこと、かつマウスにおけるように接触依存性であることが実証された。調節性 $CD4^+CD25^+$ T細胞の同定は、ヒトにおける寛容の研究のために、特に自己免疫、移植および癌に関連して重大な意味を有する。

10

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、以下のものを提供する：

- (1) 抑制性および/または調節性ヒト $CD4^+CD25^+$ T細胞；
- (2) T細胞刺激剤または抗原提示細胞を用いて細胞を*ex vivo*および*in vivo*で刺激することを含んでなる、上記(1)に記載の $CD4^+CD25^+$ T細胞を増殖させる方法；
- (3) 上記(2)に記載の方法、好ましくは上記(2)に記載の*ex vivo*法によって得られる、増殖させたヒト $CD4^+CD25^+$ T細胞；
- (4) 上記(1)または(3)に記載のヒト $CD4^+CD25^+$ T細胞を含む医薬組成物；
- (5) 規制医薬品を調製するための、上記(1)または(3)に記載のヒト $CD4^+CD25^+$ T細胞の使用；
- (6) $CD4^+CD25^+$ T細胞をヒトの血液または他の組織から*ex vivo*または*in vivo*で同定し、モニターし、および/または除去する方法であって、
 - (i) T細胞上のCD4、および/またはCD25、および/またはCTLA-4($CD154$)分子(antigenes)と特異的に結合する作用物質/リガンド、好ましくは抗CD4、および/または抗CD25、および/または抗CTLA-4抗体を用いる；
 - (ii) 免疫吸着法を用いる；および/または
 - (iii) 上記(2)に記載の刺激剤または抗原提示細胞を用いる；
 ことを含む該方法；
- (7) 調節性 $CD4^+CD25^+$ T細胞を*in vivo*で誘導する作用物質を調製するための、好ましくは患者の自己免疫疾患を治療するための作用物質を調製するための、上記(2)に記載のT細胞刺激剤または抗原提示細胞の使用；
- (8) 上記(1)または(3)に記載の $CD4^+CD25^+$ T細胞の、
 - (a) 他の増殖および/または機能的修飾(抑制する/促進する)/アポトーシス性または抗アポトーシス性因子の同定を可能とするようなアッセイにおける
 - (b) $CD4^+CD25^+$ T細胞上の新規分子の同定を含む、 $CD4^+CD25^+$ T細胞に

30

40

50

よって発現される分子を同定するため、または製薬的に活性とみなされる分子を提示しているかどうかを同定するため、または

(c) 調節性 $CD4^+CD25^+$ T細胞の前駆体細胞または子孫を同定するため、の使用；

(9) 養子免疫伝達療法のための作用物質、自己免疫疾患を含むがそれらだけに限定されない、免疫性が増大した疾患を治療するための作用物質、または移植片対宿主病および移植片拒絶、等の移植反応を阻止/治療する作用物質を調製するための、上記(1)に記載の富化された $CD4^+CD25^+$ T細胞、または上記(3)に記載の増殖させたT細胞、または請求項9に記載の固定化されたT細胞の使用；

(10) 養子免疫伝達療法の方法であって、強すぎる、および/または病原性の免疫反応を阻止または治療するため、または移植片対宿主病および移植片拒絶、等の移植反応を阻止/治療するために、上記(1)または(3)に記載の富化/増殖させた自己または非自己の調節性 $CD4^+CD25^+$ T細胞を患者に注射/注入することを含む、該養子免疫伝達療法の方法； 10

(11) 特定の所望の抗原特異的T細胞受容体を用いて $CD4^+CD25^+$ T細胞を調製する方法であって、

(i) 抗原提示細胞、好ましくは該抗原を提示する未成熟または成熟樹状細胞(DC)を用いて上記(1)に記載の $CD4^+CD25^+$ T細胞を *in vitro* または *in vivo* で活性化し/刺激し/増殖させる；または、

(ii) $CD4^+CD25^+$ 調節T細胞(のサブセット)上に発現される特定のT細胞受容体に対するリガンド/抗体、または $CD4^+CD25^+$ T細胞(のサブセット)上の特定のT細胞受容体に結合するMHC-ペプチド複合体を用いる； 20
ことを含む該方法；

(12) 上記(11)に記載の方法によって、または所望の抗原特異性を有するT細胞受容体を単離された又は増殖させたT細胞に *ex vivo* でトランスフェクションすることによって得られる $CD4^+CD25^+$ T細胞；

(13) 上記(12)に記載のT細胞を含む医薬組成物であって、好ましくは該医薬組成物が自己免疫疾患、移植片対宿主病および移植片拒絶を含むがそれらだけに限定されない、免疫性が増大した疾患を治療するのに適する、該医薬組成物；および

(14) 抗 $CD25$ および/または抗CTL-A4モノクローナル抗体等のリガンド/抗体、 $CD4^+CD25^+$ T細胞(のサブセット)上のT細胞受容体と結合する抗体またはMHC-ペプチド複合体または他のリガンドを含むが、それらだけに限定されないT細胞上の $CD4$ および/または $CD25$ および/またはCTL-A4($CD154$)分子(*entitites*)と特異的に結合する作用物質の、例えば腫瘍免疫を高めるための $CD4^+CD25^+$ T細胞による *in vivo* 弱体化調節を含む免疫応答を増強するために $CD4^+CD25^+$ T細胞を *in vivo* で除去する又はその機能を損傷させる薬剤を調製するための使用。 30

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明の実施形態(1)から(14)を以下に詳細に説明する： 40

(A) ヒト $CD4^+CD25^+$ T細胞の表現型的特定により、ヒトの血液または他の組織からこれらの細胞を *ex vivo* (以下、時々「*in vitro*」という)または *in vivo* で同定し、モニターし(例えば、FACSによって)、単離および除去することが可能となる。この単離または除去は、ヒトの血液または他の組織を適切な作用物質と *ex vivo* で接触させることによって達成しうる。適切な作用物質とは、特に抗 $CD4$ 、抗 $CD25$ 、抗CTL-A4($CD154$)抗体等である。

【0008】

(B) $CD4^+CD25^+$ T細胞は、適切なT細胞刺激剤または抗原提示細胞(以下、「APC」と略す)で処理することによって該細胞を刺激することにより、*ex vivo* で増殖させることができる。上記(2)および(6)に記載の方法に適した適切なT細胞刺 50

激剤としては、以下のものを含む組成物が挙げられる；

(a) スーパーアゴニスト性抗体を含む、抗CD3および/または抗CD28リガンド/モノクローナル抗体(mAb)、

(b) CD4⁺CD25⁺T細胞表面上のT細胞受容体に対する、またはT細胞受容体成分に対するリガンド/抗体；または

(c) 調節T細胞の表面に発現されたT細胞受容体に結合するMHC-ペプチド複合体；または

(d) PMA(および他のホルボールエステル)+イオノマイシン(または他のカルシウムイオノフォア)。

【0009】

本発明に用いる「リガンド」または「リガンド類」という用語は、特定の分子(ポリヌクレオチド、および細胞受容体、CD25、CTL-A4、等のポリペプチドを含む)の結合可能なあらゆる種類の化合物に関する。好ましいリガンドは、モノクローナル抗体またはそのフラグメントである。「リガンド」および「抗体」という用語は、本出願明細書を通して相互交換可能に用いられる。

10

【0010】

適切なAPCとしては、自己または非自己または人工の抗原提示細胞(例えば、樹状細胞(樹状細胞の調整については、例えば、WO93/20185、WO97/29182およびEP-A-0922758参照)等)が含まれる。該T細胞刺激剤および抗原提示細胞は、IL-2またはIL-15またはそれらの組み合わせと共に用いることができる。IL-2/IL-15の代わりに、いくつかのサイトカイン受容体に共通した鎖を用いる他のサイトカイン(IL-7およびIL-9を含むが、これらだけに限定されない)も使用可能である。さらに、他の調節細胞の生成を促進することが知られているIFNおよびIL-10(Groux, H.ら, Nature 389:737-742(1997); Roncarolo, M.G., J. Exp. Med. 193:F5-F9(2001))もまたこれらの細胞の生成/増殖を促進する。最後に、ポリクローナルなまたはオリゴクローナルな(例えば、スーパー抗原による)T細胞刺激のための他の方法もまた適用可能である(スーパーアゴニスト性抗体を含む抗CD3および/または抗CD28リガンド/抗原; PMA+イオノマイシン; 等)。これらの刺激剤または抗原提示細胞は、当業者にとって周知の量で増殖に使用することができる。

20

30

【0011】

(C) CD4⁺CD25⁺T細胞の同定は、例えば、自己免疫疾患と対抗するために調節T細胞を誘導するため、CD4⁺CD25⁺T細胞をin vivoでモニターし、増殖させる(例えば、IL-2+IL-15、IL-10+IFN等の上記T細胞刺激剤を樹状細胞/抗原提示細胞と共に又は単独で患者に投与することによって)ことも可能とする。

【0012】

(D) 上記(1)または(3)に記載のCD4⁺CD25⁺T細胞または増殖させたCD4⁺CD25⁺T細胞は、in vitroまたはin vivoで(例えば、CD4⁺CD25⁺T細胞を刺激する、または除去する、またはその機能を妨げるために)用いることができる他の増殖および/または機能的修飾(抑制性/促進性)/(アポトーシス性または抗アポトーシス性)因子を同定しうるアッセイに用いることができる。これらのT細胞は、CD4⁺CD25⁺T細胞によって発現される分子を、mAb生成、プロテオミクス、DNAチップ分析、差引きハイブリダイゼーション等の方法による同定にも適する。(特に、(a)「新規な」、すなわち、これまで知られていない分子の同定、または(b)これらの分子が、CD4⁺CD25⁺T細胞をin vitroおよびin vivoで「スイッチオン」または「スイッチオフ」するための新規な刺激性、抑制性またはアポトーシス誘導性薬剤を開発するにあたって、適切な医薬標的構造であるかどうかの同定。)また、これらのT細胞は、調節性CD4⁺CD25⁺T細胞の前駆体細胞または子孫を同定するためにも適している。

40

【0013】

50

(E) 上記(1)または(3)に記載のCD4⁺CD25⁺T細胞または増殖させたCD4⁺CD25⁺T細胞は、養子免疫伝達療法に用いることができる。すなわち、あまりに強い、および/または病原性の免疫応答を阻止または治療するために、すなわち最も広い意味における自己免疫(エリテマトーデス、慢性間接リウマチ、多発硬化、尋常性天疱瘡、甲状腺炎、等の古典的自己免疫疾患、ならびに白斑、アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、等の病因に少なくとも何らかの自己免疫的側面を含むが、それらだけに限定されない)を治療するために、富化した/増殖させた自己または非自己の調節T細胞を患者に注射/注入するのである。また、これはGVHD(移植片対宿主病)および移植片拒絶、等の移植反応を阻止/治療するためにも行われるものである。

【0014】

(F) 上記(1)または(3)に記載のCD4⁺CD25⁺T細胞または増殖させたCD4⁺CD25⁺T細胞[ならびに上記(2)に記載の増殖方法、上記(4)に記載の医薬組成物、および上記(5)および(7)から(9)に記載の使用]は、CD4⁺CD25⁺T細胞を*in vitro*または*in vivo*で活性化する/刺激する/増殖させるために、特定の所望の抗原特異的TCR(T細胞受容体)を有するCD4⁺CD25⁺T細胞を生成し/増殖させるため、熟樹状細胞(DC)(または人工細胞を含む他の抗原提示細胞)と共に用いることができる。該樹状細胞または他の抗原提示細胞は、組織または(規定された、もしくは規定されていない)他の任意の抗原をパルスされ/負荷され/供給されるか、またはされない。規定された抗原の例としては、自己抗原(例えば、尋常性天疱瘡の場合にはデスマグレイン(*desmoglein*)3;白斑の場合にはメラニンAまたはチロシナーゼ;甲状腺炎の場合にはサイログロブリン)または外来抗原(例えば、C型肝炎のような病原体由来抗原を含む)、または同種異系抗原/移植抗原が含まれる。規定されていない抗原としては、組織または細胞由来抗原(例えば、壊死性またはアポトーシス性細胞、または組織由来RNA、または興味のある細胞と樹状細胞/抗原提示細胞とのハイブリッド形態、または規定されない抗原の樹状細胞もしくは他の抗原提示細胞への送達という他の形態)または病原体由来抗原が含まれる。自己または非自己CD4⁺CD25⁺T細胞および/または樹状細胞を用いる。

【0015】

(G) 上記(14)に記載のT細胞上のCD4および/またはCD25および/またはCTL-A4(CD154)分子(*entities*)と特異的に結合する作用物質は、免疫応答、例えば、CD4⁺CD25⁺T細胞による、腫瘍免疫を高めるための*in vivo*弱体化調節を増大させるために、例えば、抗CD25および/または抗CTL-A4 mAb(未改変の、またはトキシンとコンジュゲート化する等の改変されたmAb)によって、または免疫吸着法によって(血液をカラムに通し、そしてCD4⁺CD25⁺T細胞は該細胞の表面上に発現される分子に対する固相結合抗体、例えば、CD25によって除去される)、CD4⁺CD25⁺T細胞を*in vivo*で除去するため、およびその除去をモニターするために用いることができる。

【0016】

(H) 本発明の別の好ましい実施形態においては、上記(3)に記載の増殖させた(すなわち、活性化された)CD4⁺CD25⁺T細胞(ならびに上記(1)および(12)に記載のT細胞)は固定することができる。そのような固定化T細胞は、(増殖させた)T細胞を適切な固定剤(パラホルムアルデヒドを含むが、それだけに限定されない)を用いて*ex vivo*処理することによって得ることができる。好ましくは、固定化は細胞を0.5から5%(w/w)パラホルムアルデヒド水溶液、最も好ましくは約2%(w/w)パラホルムアルデヒド水溶液に15分から3時間、最も好ましくは1時間懸濁し、その後適切な洗浄工程を実施することによって達成される。

【0017】

(I) 上記(5)に記載の薬剤、上記(9)および(14)に記載の作用物質、または上記(10)に記載の方法において使用されるCD4⁺CD25⁺T細胞は、自己または非自己調節T細胞であることができる。非自己調節T細胞の場合、該T細胞は上記(H)に記

10

20

30

40

50

載するように固定化されることが好ましい。

【0018】

(J) 上記(4)および(13)に記載の医薬組成物、上記(5)に記載の薬剤、上記(7)、(9)および(14)に記載の作用物質、および上記(6)、(8)および(10)に記載の方法に用いられるT細胞は、当業者に公知の薬学上/診断上適切な担体、溶剤、希釈剤および添加剤、等のさらなる成分を含んでもよい。これらの成分の濃度は、当業者によってそれぞれの目的に合わせて適切に選択される。

【0019】

過去2~3年の間に齧歯類における数個の調節細胞種(これらの相互関係はまだ最終的に明らかにされていない)がさらに報告されたことにより、サプレッサーまたは免疫調節T細胞という概念は再生した。いわゆるTr1およびTh3細胞は、直接的な細胞接触を必要とせずに、高レベルのIL-10およびTGF- β をそれぞれ分泌することによってパイスタンダー抑制を介在する(Groux, H.ら, Nature 389:737-742(1997); Fukaura, H.ら, J. Clin. Invest. 98:70-77(1996))。調節T細胞集団のうち、これまでに最もよく特定され、そして最も重要と思われる集団のうち、同定された集団はCD4⁺CD25⁺T細胞である。この細胞は齧歯類に本来的に存在し(リンパ器官におけるCD4⁺細胞の約10%に相当する)、CD25(IL-2R β)の構成発現によって特定され、そしてin vivoにおける寛容の維持および自己免疫疾患の防止に決定的に重要であることが明らかである。驚くべきことに、ヒトにおける等価の特性を示す細胞集団は今日まで報告がない。ここに我々は、従来記憶T細胞に相当すると考えられていたヒト血液中のCD4⁺CD25⁺T細胞が(Kanegane, H.ら, Int. Immunol. 3:1349-1356(1991); Taka, K.ら, Immunol. 72:15-19(1990); Jackson, A.L.ら, Clin. Immunol. Immunopathol. 54:126-133(1990))、実は、齧歯類において長年にわたって知られ、かつ研究されてきた固有のCD4⁺CD25⁺調節T細胞のヒトにおける対応物であると思われることを示した。我々は、成人血液からかなりの量(CD4⁺細胞の平均6%)のCD4⁺CD25⁺T細胞を単離することができ、詳細な研究およびCD4⁺CD25⁺T細胞との比較を行うことができた。その結果、ヒトCD4⁺CD25⁺T細胞はマウスCD4⁺CD25⁺免疫調節T細胞と重大な表現型および機能的特徴を共有することが判明した。最も興味深く、以前には同定されなかった表現型的特徴は、CTLA-4分子(CD152)がヒトCD4⁺CD25⁺T細胞によってすでに構成的に発現されており(細胞内では高レベルで、表面では低レベルで)、TCRを介した刺激後、さらにアップレギュレーションされ、そしてその後少なくとも1週間は表面で高レベルを維持したことであった(これは、刺激後、de novoにおいてCTLA-4を発現したが、その発現はごく一過性であったCD4⁺CD25⁺T細胞とはっきりとした対照をなす)(Thompson, C.B., Allison, J.P., Immunity, 7:445-450(1998); Chambers, C.A.ら, Immunol. Rev. 153:27-46(1996))。CD4⁺CD25⁺によるCTLA-4の発現パターンは、マウスCD4⁺CD25⁺調節T細胞との関係をすでに裏付けるものであった。なぜなら、後者の細胞はそのin vivo抑制活性に必須の分子としてCTLA-4を構成的に発現するからである(Read, S.ら, J. Exp. Med. 192:295-302(2000); Salomon, B.ら, Immunity, 12:431-440(2000))。マウス対応物と同様に、ヒトCD4⁺CD25⁺T細胞も、プレート結合抗CD3および抗CD28によってポリクローナルな活性化に対しても、その後の最も有効な本来的な免疫刺激細胞、すなわち成熟(同種異系)DCを用いて刺激しても(反復してさえも)、刺激に際してほとんど増殖を示さなかった。これらの刺激を高用量のIL-2(500 U/ml)と組み合わせた場合、マウスについて記載されているようにアネルギーが部分的にくつがえされた(Thorton, A.M., Shevach, E.M., J. Immunol. 164:183-190(2000))。高用量のIL-15(50-100

ng/ml)が匹敵する増殖を誘導したこと、およびIL-2およびIL-5を組み合わせた場合の作用は低用量(それぞれ10 U/mlおよび10 ng/ml)でも強力な相乗作用を有し、活発な増殖を誘導した、という新たな発見があった。CD4⁺CD25⁺T細胞の増殖は、潜在的な治療の適用および更に詳細な研究(作用機構および分子的研究を含む)のためのこれらの細胞のクローニングに不可欠であるため、上記の発見が重要であることが判明するであろう。興味深いのは、中和性抗IL-10 mAbが増殖を促進しなかったことで、これらの細胞によるIL-10放出が自己分泌様式においてアレルギーを引き起こしていないことが示された。共培養実験において、CD4⁺CD25⁺T細胞は別の重要な特徴を示した。すなわち、これらの細胞は自身のTCRを介して活性化された後のみ、接触および用量依存的で、かつサイトカイン非依存的に、CD25⁻CD4⁺またはCD8⁺T細胞の増殖を抑制した。我々のex vivo系では、この抑制が最近TCRトランスジェニックマウスを用いて示されたように(Thornton, A. M., Shevach, E. M., J. Immunol. 164: 183-190 (2000))、完全に抗原非特異的なものかどうか調べることはできなかった。しかし、これらの細胞を増殖させるための我々のIL-2+IL-15アプローチを用いれば、個々の作用機構研究は可能であろう。

注目すべきことは、我々がヒト血液からex vivoで単離したCD4⁺CD25⁺T細胞と実質的に同一の調節特性および表現型を有するT細胞が、未成熟DCを用いてヒトの未処置T細胞を反復刺激することによってin vitroで作製できると示した最近の報告である(Jonuleit, H.ら, J. Exp. Med. 192: 1213-1222 (2000))。マウスにおいては、CD4⁺CD25⁺調節T細胞集団は胸腺でたえず作られているが(Ito, M.ら, J. Immunol. 162: 5317-5326 (1999))、末梢における調節T細胞の維持には組織特異抗原およびIL-2の存在が必要である(25, 26)。2つの他の発見(Jonuleit, H.ら, J. Exp. Med. 192: 1213-1222 (2000))に基づいて、アポトーシス性抗体の摂取を介して末梢組織をサンプリングした未成熟DC(Steinman, R. M.ら, J. Exp. Med. 191: 411-416 (2000); Roncarolo, M. G., J. Exp. Med. 193: F5-F9 (2001))および最近の普遍的又は組織特異的な自己抗原が、胸腺調節T細胞の移動における生存およびおそらく増殖程度がわずかであることの原因であると確かに推測しがちである。Ex vivoで単離されたCD4⁺CD25⁺調節T細胞の生存は未成熟DCとの相互作用によって促進されうると思われる。また、最近報告された、未成熟DCによる未処置T細胞からのCD4⁺CD25⁺T細胞のin vitro「生成」は(Jonuleit, H.ら, J. Exp. Med. 192: 1213-1222 (2000))、むしろ最初の接種物中にあらかじめ存在しているCD4⁺CD25⁺が持続的に生存していることを表すものと思われる。同種異系の成熟DCは調節の有効なインデューサーであったが、ex vivoで単離されたヒトCD4⁺CD25⁺T細胞と同遺伝子型成熟DCとの相互作用は、それらの抑制特性を活性化するには不十分であることが見出されたことにもまた注目すべきである。この観察は、検証可能な仮説を再度示唆する。例えば、成熟同系DCに対して未成熟な同系DCはCD4⁺CD25⁺T細胞を活性化するか(それらが相互作用のための何らかの特異的リガンドを担持することを示唆する)、または上記DCはアポトーシス体の摂取後のみ、その活性化を行うか(自己抗原の提示が必要であることを示唆する)?さらに、ごくわずかのリコール抗原(例:インフルエンザタンパク質/ペプチド)を提示する成熟DCは、CD4⁺CD25⁺T細胞集団およびCD4⁺CD25⁺T細胞集団の両方でT細胞を刺激できるか(自己抗原の他に外来抗原の認識も炎症部位において調節の引き金をひきうることを示唆する)。

【0020】

要約すれば、健康なヒト成人の末梢血中に、かなり大きい集団(約6%)のCD4⁺CD25⁺T細胞が存在することが示された。以前に考えられていたのとは対照的に、これらの細胞は従来の記憶T細胞ではなく、齧歯類において多年にわたって研究されてきたCD

10

20

30

40

50

$CD4^+CD25^-$ 「プロフェッショナル」抑制/調節T細胞のユニークな集団と同等な調節T細胞である。ヒト $CD4^+CD25^+$ 調節T細胞の同定および特定は、種々の病態におけるそれらのモニタリングを可能とし、そして自己免疫、移植片拒絶、および癌を理解し、治療するうえで重大な意味がある。

【0021】

本発明を以下の図および実施例によってさらに詳しく説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【0022】

図

図1： $CD4^+CD25^+$ T細胞は、 $CD4^+CD25^-$ T細胞に対して明確な表現型的相違を示す。陰性MACSソーティングによってPBMCから $CD4^+$ T細胞を単離し、高度に精製された未処置 $CD4^+$ T細胞を得た。これらの細胞を抗 $CD25$ 磁性ビーズで標識し、ソーティングした。

(A)：ソーティングにより実質的に純粋な $CD25^+$ T細胞が得られた。20回の独立した、標準化された実験の代表的な結果を示す。

(B)： $CD4^+CD25^+$ 、 $CD4^+CD25^-$ および活性化 $CD4^+CD25^-$ T細胞の表現型を「材料および方法」の項に記載するように分析した。さらに、固定化抗 $CD3$ +可溶性抗 $CD28$ を用いて $CD4^+CD25^-$ T細胞を活性化した。活性化後、細胞を抗 $CD25$ 磁性ビーズで標識し、ソーティングした。5つの独立した実験で、結果は類似していた。

(C)：抗CTLA-4抗体を用いて $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-$ T細胞を37で2時間染色した。染色はex vivoで、そして固定化抗 $CD3$ +可溶性抗 $CD28$ を用いた活性化の後の異なる時点で実施した。4つの独立した実験の代表的結果を示す。

【0023】

図2： $CD4^+CD25^+$ T細胞は、同種異系刺激およびポリクローナルな刺激の両方に対して非増殖性/アネルギー性である。これはIL-2および/またはIL-15の添加によって部分的にくつがえされるが、中和性抗IL-10抗体によってはくつがえされない。

(A)： $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-$ T細胞を図1に示すMACSソーティングによって成人血液から単離した。T細胞 1×10^5 個/96ウエルを異なる数の成熟同種異系DCで刺激した。T細胞の増殖(3つの培養物)を $[^3H]$ Tdr取り込みによって測定した。6つの独立した実験において結果は類似していた。

(B)：全 $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-$ T細胞を上記(A)に記載するように処理した。3つの培養物における増殖を $[^3H]$ Tdr取り込みによって測定した(5つの独立した実験の代表的結果)。

(C)：MACSソーティングを行った $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-$ T細胞をプライミングし、同一ドナー由来の成熟同種異系DCで毎週再刺激した(DC:T細胞比は1:20)。増殖(T細胞 1×10^5 個/96ウエル)を $[^3H]$ Tdr取り込みによって測定した。3つの独立した実験において類似の結果が得られた。

(D)：固定化抗 $CD3$ ($10 \mu g/ml$)および可溶性抗 $CD28$ ($10 \mu g/ml$)を用いて(上のパネル)、または成熟同種異系DCを用いて上記(A)に記載するように(下のパネル)、 $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-$ T細胞を刺激した。500U/mlのIL-2、100ng/mlのIL-15、10U/mlのIL-2+1ng/mlのIL-15の混合物、または $10 \mu g/ml$ の抗IL-10を培養開始時に添加した。培養開始の5日後に $[^3H]$ Tdr取り込みを測定した。3つの独立した実験のうち1つを示す。ポリクローナルなまたは同種異系T細胞刺激物の不存在下でのIL-2および/またはIL-5の添加は、 $CD25^+$ または $CD25^-$ T細胞サブセットにおいて著しい増殖を誘導しなかった(データはここに示していない)。

【0024】

図3：TCRによって刺激された場合、CD4⁺CD25⁺T細胞はCD4⁺およびCD8⁺T細胞の活性化を細胞接触および用量依存的に抑制する。

(A, B)：MACSソーティングを行った全CD4⁺(A)およびCD8⁺(B)T細胞(1×10⁵個/96ウエル)を図に示した比でCD4⁺CD25⁺T細胞に添加し、そしてDC対CD4⁺またはCD8⁺T細胞の比を1:20として同種異系DCで刺激した。5日後に[³H]Tdr取り込みによって増殖を測定した。5つの独立した実験のうち1つを示す。

(C)：同一ドナー(ドナーI)からDCおよびCD4⁺CD25⁺T細胞を生成させ/単離した。さらに、別のドナー(ドナーII)から全CD4⁺T細胞およびCD4⁺CD25⁺T細胞を単離した。全CD4⁺T細胞10⁵個/96ウエルをDC細胞5×10³個/ウエルと共に培養した(すなわち、DC:T比=1:20;結果はDC:T比が1:100の場合(データはここに示していない)に匹敵した)。次に、ドナーIおよびドナーII由来のCD4⁺CD25⁺T細胞をそれぞれ添加した。培養開始から5日後に[³H]Tdr取り込みによって増殖を測定した。3つの独立した実験の代表的な結果を示す。

(D)：全CD4⁺T細胞またはCD4⁺CD25⁺T細胞(T細胞10⁵個/96ウエル)を5×10³個の同種異系成熟DCで刺激した(DC:T比=1:20)(上の2つのパネル)。さらに、全CD4⁺T細胞を1:1の比でCD4⁺CD25⁺T細胞と共に共培養し(T細胞10⁵個/96ウエルのそれぞれ)、そして10μg/mlの抗IL-10、2μg/mlのTGF-β、500U/mlのIL-2、50ng/mlのIL-15、または10U/mlのIL-2と1ng/mlのIL-15との混合物の存在下または不存在下で、DC:T比を1:20として同種異系DCを用いて再度刺激した。平行して行ったTranswellアプローチでは、同種異系DCを用いてTranswellチェンバー内でCD4⁺CD25⁺T細胞を刺激し(DC/T細胞比は1:20)、そして全CD4⁺T細胞レスポンダーを同種異系DCと共にDC:T比=1:20で再度ウエルに入れた。培養開始から5日後に[³H]Tdr取り込みによって増殖を測定した。4つの代表的実験のうち1つを示す。

【0025】

図4：CD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞の異なるサイトカインプロフィール。

(A)：MACSソーティングを行ったCD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞をPMA(20ng/ml)およびA23187Ca²⁺イオノフォア(500μg/ml)で6時間刺激した。最後の5時間の間、モネンシン(Monensin)(2μM)を添加した。CD3表面発現の染色を実施した。細胞を洗浄し、固定し、透過性とし、そして細胞内サイトカインの検出のためFITC-またはPE-結合特定抗体を用いて染色した。類似の結果が得られた5つの独立した実験のうち1つを示す。結果は、T細胞をプレート結合抗CD3+可溶性抗CD28ABで刺激した場合(データはここに示していない)と同じであった。

(B)：CD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞をプレート結合抗CD3+可溶性抗CD28で活性化した。培養開始48時間後に、RNaseプロテクションアッセイによりRNA発現の分析を実施した。

(C)：上清中のサイトカインをELISAによって測定した(5つの独立した実験のうち1つを示す)。

【0026】

材料および方法

培養培地：1%熱不活化自己血漿、20μg/mlゲンタマイシン(Merck)および2mMグルタミン(BioWhittaker)を補充したRPMI 1640(BioWhittaker)を樹状細胞(DC)の作製に用いた;1%熱不活化単一ドナーヒト血清、20μg/mlゲンタマイシン(Merck)および2mMグルタミン(BioWhittaker)を補充したX-VIVO-20(BioWhittaker)をT細胞培養に用いた。

10

20

30

40

50

サイトカイン：この実験に用いた全てのサイトカインは組み換えヒトタンパク質であった。最終濃度は、GM-CSF 1,000 U/ml (LeukomaxTM; Novartis)、IL-4 800 U/ml (Sandoz)であった。IL-2 (Proleukin; Chiron Corp.)およびIL-15 (Peprotech)は、指示した濃度で使用した。DCを成熟させるため、我々はIL-1 2 ng/ml (Sigma); IL-6 1000 U/ml (Sandoz); TNF- 10 ng/ml (Bender, Vienna)およびPGE₂ 1 μg/ml (Sigma)からなるカクテルを用いた。

抗体：免疫染色のため、CD3、CD4、CD5、CD8、CD14、CD19、CD25、CD28、CD45RA、CD45RO、CD56、CD62L、CD80、CD83、CD86、CD95、CD95L、CD122、CD152、CD154、HLA-DRに対するPE-およびFITC-結合抗体(Ab)(すべてBD Pharmingen製)、ならびにそれぞれのマウスおよびラットイソタイプ対照を用いた。細胞内サイトカイン染色に用いたAbは、FITC-およびPE-結合抗IL-2 (MQ1-17H12)、抗IL-4 (8D4-8)、抗IL-10 (JES3-19F1)および抗IFN- (4S.B3)(すべてBD Pharmingen製)であった。未結合抗IL-10 (JES3-19F1)(Pharmingen)および抗TGF- (R&D Systems)を中和実験に使用し、抗CD3 (UCHT1)および抗CD28 (CD28.2)をT細胞のポリクローナルな活性化に用いた。

サイトカインアッセイ：X-VIVO-20+1%血清中で、T細胞を同種異系DCまたはプレート結合抗CD3 (10 μg/ml)+可溶性抗CD28 (10 μg/ml)で刺激した。ヒトIL-2、IL-4、IL-10、IFN- およびTGF- 用の市販のELISAキット(BD Pharmingen)を用いた上清の分析によって、異なる時点で、サイトカイン分析を実施した。細胞内サイトカイン産生を分析するため、T細胞をPMA (20 ng/ml)およびCa²⁺イオノフォアA23187 (500 μg/ml)(ともにSigma製)で6時間、またはプレート結合抗CD3および可溶性抗CD28 Abで6時間刺激した。培養の最後の5時間の間、モネンシン2 μM (Sigma)を添加した。細胞を回収し、洗浄し、固定し、サポニンで透過性とし(Fix/perme溶液、BD Pharmingen)、そしてサイトカイン特異的Abまたはイソタイプで染色した。サイトカインmRNA分析のためには、T細胞をプレート結合抗CD3および可溶性抗CD28 Abで刺激した。RNaseプロテクションアッセイテンプレートセット(BD Pharmingen)によって細胞を分析した。

細胞単離およびDC作製：DCは、軟膜または白血球採血物(両方ともDepartment of Transfusion Medicineより入手。インフォームドコンセントが与えられた後に健常なドナーから得たもの)から文献に記載されているように作製した(18、19)。すなわち、フィコール密度勾配遠心分離によりPBMCを単離した。プラスチック接着によって単球を単離し、そしてIL-4およびGM-CSFを補充したRPMI培地で培養した。6日目に成熟カクテル(IL-1、IL-6、PGE₂ およびTNF)を添加した。7日目に非接着性細胞を回収し、共刺激分子(CD80、CD86およびCD83)について90%以上二重陽性である成熟DCを構成した。

陰性CD4⁺T細胞単離セット(Miltenyi Biotech)を用いてPBMCからCD4⁺T細胞を単離した。CD25マイクロビーズ(Miltenyi Biotech)を用いて、純粋な未処置CD4⁺T細胞からCD4⁺CD25⁺T細胞を単離した。CD8⁺T細胞の単離は、陰性CD8⁺T細胞単離セット(Miltenyi Biotech)を用いて実施した。FACSによって純度を評価した。

フローサイトメトリー分析：免疫蛍光染色のため、細胞を洗浄し、各抗体の最適希釈物を20分間4 で染色した。細胞を再度洗浄し、フローサイトメトリーで分析した(FACS ScanTM CELLQuestTMソフトウェア：Becton Dickinson)。細胞表面CD152発現の分析のため、細胞を適切な抗体を2時間37 で染色した。

増殖アッセイ：異なるCD4⁺サブタイプの増殖を評価するため、ソーティングしたT細胞10⁵個をX-VIVO-20中で異なる数のDCと共に、または異なる濃度のプレート結合抗CD3+可溶性抗CD28と共に、96ウエルプレートを用いてインキュベートした。調節特性を評価するためには、10⁵個のバルクCD4⁺T細胞を96ウエルプレート中で5×10³個（いくつかの実験では1×10³個）のDCと共に培養した。精製CD4⁺CD25⁺またはCD4⁺CD25⁻T細胞を異なる濃度で添加した。4-5日培養した後、[³H]Tdr（37KBq/ウエル）を添加し、さらに16時間培養した。液体シンチレーションカウンターを用いて増殖を測定した。

Transwell実験：24ウエルプレートを用いてTranswell実験を実施した。10⁶個のバルクCD4⁺T細胞を5×10³個のDCで刺激した。さらに、10⁶個のCD4⁺CD25⁺またはCD4⁺CD25⁻T細胞を培養物に直接添加するか、またはTranswellチェンバー（Millicell, 0.4µm: Millipore）に入れた。5日間培養後、T細胞を96ウエルプレート3枚に移した（10⁵個/ウエル）。[³H]Tdrで16時間パルスした後、液体シンチレーションカウンターを用いて増殖を測定した。

10

【実施例】

【0027】

実施例1：CD4⁺CD25⁺T細胞は、同種異系およびポリクローナルな刺激の両方に対して増殖応答が低い。

増殖可能性が低いことは、マウス系において十分特定された調節性CD4⁺CD25⁺T細胞に高度に特徴的である（Sakaguchi, S.ら, J. Immunol., 155: 1151-1164 (1995)）。ヒトCD4⁺亜集団の増殖能を分析するため、CD4⁺T細胞をCD25の発現について磁性によりソーティングした。MACS CD4陰性選択キットを用い、その後でCD25について陽性選択を用いることによって、CD4⁺CD25⁺T細胞の95%以上純粋な集団を得た（図1A）。これらの細胞は、我々が試験した健常な成人の血液中の末梢CD4⁺T細胞の約6%（2.8-17.2%, n=20）を構成していた。

20

成熟DCは最も強力な抗原提示細胞として知られている（Banchereau, J., Steinman, R.M., Nature 392: 245-252 (1998)）。しかし、CD4⁺CD25⁺T細胞は十分成熟した同種異系DCでin vitroで刺激された場合、増殖応答を実質的にまったく示さなかった。これはCD4⁺CD25⁻T細胞（図2A、B）または全CD4⁺集団（図2B）とはっきりとした対照をなした。興味深いことに、CD25⁺T細胞を枯渇させたCD4⁺集団は、同種異系DCで刺激された場合、全CD4⁺集団よりも高い増殖を示した（図2B）。

30

次に、CD4⁺CD25⁺T細胞は成熟DCで反復刺激した場合にのみ増殖するのかどうかを確認した。再刺激後、CD25⁻T細胞の増殖応答は幾分増大したが、CD25⁺T細胞の応答は非常に低いままであった（図2C）。同種異系成熟DCによるプライミングおよび再刺激は、再刺激の2ラウンド終了後にCD25⁻集団の30から50倍の増大をもたらした。対照的に、CD25⁺集団には著しい増大は見られなかった（データはここに示していない）。最初の接種物と比較すると絶対数が軽度（約10%）に低下したCD4⁺CD25⁺T細胞が、反復刺激後に、著しいアポトーシスまたは壊死が明らかに存在しない状態で回収された（データはここに示していない）。

40

CD4⁺CD25⁺T細胞の増殖応答が非常に低いことは、これらの細胞集団をプレート結合抗CD3+可溶性抗CD28でポリクローナルに刺激した場合にも明らかであった（図2D）。T細胞増殖因子であるIL-2およびIL-15が増殖可能性に影響を及ぼすかどうかを試験するため、種々の用量をCD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞に添加し、これらの細胞を固定化抗CD3+可溶性抗CD28（図2D、上のパネル）または成熟同種異系DC（図2D、下のパネル）で刺激した。一連の予備実験は、高用量（100-1000 U/ml）の場合にのみIL-2がCD25⁺T細胞の増殖を促進することを明らかにした。IL-15は、50-100 ng/mlという非常に高い用量

50

でのみ類似の効果を有した。これらのサイトカインを混合した場合、それらは強い相乗効果を有し、 10 U/ml のIL-2および 10 ng/ml のIL-15という用量が $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞の増殖を促進するに十分であった。ポリクローナルまたは同種異系T細胞刺激がない状態でIL-2および/またはIL-15を添加しても、 $\text{CD}25^+$ または $\text{CD}25^-$ T細胞サブセットの顕著な増殖は誘導されなかった（データはここに示していない）。

【0028】

実施例2： $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞は、 $\text{CD}4^+\text{CD}25^-$ T細胞に対して明確な表現型的相違を示す。

$\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞集団をさらに特定するため、 $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ および $\text{CD}4^+\text{CD}25^-$ 上の種々の表面分子の発現を、刺激した $\text{CD}4^+\text{CD}25^-$ T細胞上の分子の発現と比較した（図1B）。3つの集団の全てがCD3およびCD4の相同発現を示した。FACS分析の結果、単球、B細胞、 $\text{CD}8^+$ T細胞またはNK細胞等の細胞の混入は全く見られなかった（データはここに示していない）。予め刺激しない場合、すなわち*ex vivo*で $\text{CD}25^+$ 集団はすでに細胞内で高レベルにおよび細胞表面CTLA-4（CD152）で低レベルに発現していた。*Ex vivo*で単離された $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞はさらにCD122（IL-2R鎖）およびHLA-DR（約50%）を構成的に発現し、そして主として（約80%）記憶T細胞表現型に類似した $\text{CD}45\text{RO}$ 細胞から成っていた。きわめて対照的に、*ex vivo*で単離された $\text{CD}4^+\text{CD}25^-$ T細胞は、CTLA-4（細胞内にも表面上にも）、CD122またはHLA-DRを発現せず、 $\text{CD}45\text{RO}$ よりも $\text{CD}45\text{RA}$ を発現する細胞の方が多かった。しかし、プレート結合抗CD3+可溶性抗CD28で活性化した後、ほとんどの $\text{CD}4^+\text{CD}25^-$ は強く $\text{CD}25^+$ となり（ $\text{CD}25$ の発現レベルは $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞と比較して約1対数分だけ高かった）、そして予想通り、高レベルのHLA-DRおよびCD122を示した（ここでも $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞と比較して約1対数分だけ高かった）。さらに、細胞内および表面CTLA-4の両者は、24-48時間以内にアップレギュレーションされたが、予想通りその後急速にダウンレギュレーションされた（図1C）。CTLA-4/CD152発現の速度論は、 $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞が刺激された場合は顕著に異なることが判明した。これらの細胞もまた（わずかとはいえ構成的にすでに存在している）CD152表面発現をアップレギュレーションし、CD152の発現は、強度に1週間以上にわたって一定を保たれた（図1C）。抗CD28、CD62L、CD69、CD95、CD95L、CD154（CD40L）等のいくつかの他のmAbを用いた染色では、 $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ と $\text{CD}4^+\text{CD}25^-$ T細胞との間で再現性はなく、著しい相違も明らかにされなかった。

【0029】

実施例3： $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞は、TCRを介して刺激された場合、 $\text{CD}4^+$ および $\text{CD}8^+$ T細胞の活性化を細胞接触依存的および用量依存的に抑制する。

$\text{CD}25^+$ T細胞の推定上の調節特性を分析するため、共培養実験を実施した。最初の1連の試験で、我々は特定のドナーから全 $\text{CD}4^+$ 集団ならびに $\text{CD}25^+$ および $\text{CD}25^-$ 画分を単離した。次に、全 $\text{CD}4^+$ T細胞を $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ または $\text{CD}4^+\text{CD}25^-$ T細胞亜集団と指示された比で混合し、同種異系成熟DCで刺激した（図3A）。 $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞は全 $\text{CD}4^+$ T細胞の増殖を著しい程度に抑制し、そして1:1の比では増殖を実質的にブロックした（cpmは $\text{CD}25^+$ T細胞増殖のバックグラウンドレベルを表す；図2A-D参照）。 $\text{CD}25^+$ T細胞の代わりに $\text{CD}25^-$ T細胞を添加すると、増殖がわずかに増大した（データはここに示していない）。 $\text{CD}4^+\text{CD}25^-$ はポリクローナルに（図1B参照）または同種異系DCによって（データはここに示していない）刺激されると迅速に $\text{CD}25$ および $\text{CD}122$ （すなわち、IL-2Rの両方の鎖）を発現するので、この所見は $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞サブセットの抑制活性が単にIL-2の消費またはIL-2Rを介したその受動的吸着によるものではないことを示した。 $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ T細胞はまた、ダウンレギュレーションの強さはより小さいが、全 $\text{CD}8^+$ T

細胞に対して抑制活性を發揮した(図3B)。

さらなる1組の実験において、同遺伝子型DCによるCD4⁺CD25⁺T細胞の活性化は、それらの調節特性の誘導によって十分かどうかを確認した。この目的のため、同一ドナー(ドナーI)から成熟DCおよびCD4⁺CD25⁺T細胞を生成させ/単離した。さらに、別のドナー(ドナーII)から全CD4⁺T細胞およびCD4⁺CD25⁺T細胞サブセットを単離した。次に、全CD4⁺T細胞(ドナーII)を、ドナーIまたはドナーIIから単離した種々の数のCD4⁺CD25⁺T細胞の不存在下(図3C、CD4⁺のみ)または存在下で、同種異系成熟DC(ドナーI)で刺激した(図3C)。ドナーII由来の全CD4⁺T細胞は、同種異系のドナーI由来DCで刺激した場合、予想通り活発に増殖した(図3C、CD4⁺のみ)。ドナーI由来CD4⁺CD25⁺T細胞(すなわち、用いたDCに対して同遺伝子型)の存在下では、全ドナーII由来CD4⁺T細胞の増殖(すなわち、同種反応性)は全く抑制されなかった(図3C)。しかし、ドナーII由来CD4⁺CD25⁺T細胞(すなわち、用いたDCに対して同種異系)が添加されると強度の抑制が起こった(図3C)。DC、全CD4⁺T細胞およびCD4⁺CD25⁺T細胞が3人の異なるドナーに由来する実験においても、抑制が観察された。これらのデータは、CD4⁺CD25⁺T細胞のTCR媒介性活性化は、それらの細胞に調節機能を發揮させるために必要であること、および同遺伝子型DCはCD4⁺CD25⁺T細胞の抑制活性を誘導するには不十分であることを示した。

次に、Transwellチェンバー実験を実施して、CD4⁺CD25⁺T細胞の調節機能が主として可溶性因子によって媒介されるかどうか、また細胞-細胞接触を必要とするかどうかを調べた(図3D)。図3Dに示すように、CD4⁺CD25⁺T細胞は同種異系DCの存在下で全CD4⁺T細胞の増殖をほぼ完全に抑制する。Transwellチェンバーを用いた上記2つの集団の分離は、CD4⁺CD25⁺T細胞の抑制作用を実質的に排除した。これらの観察は、CD4⁺CD25⁺T細胞の抑制能にとって直接的な細胞接触が必須であることを示唆した。なぜなら、Transwellチェンバーの半透過膜は可溶性因子は自由に通過できるが、直接的な細胞接触は回避されるからである。またTranswell実験により、CD4⁺CD25⁺T細胞によるIL-2の消費は抑制に關与する作用機構ではないことが確認された。

【0030】

調節細胞と応答細胞の間の密接な相互作用が必要であることは自明であるにもかかわらず、抗原提示DCのターゲティングも可溶性因子の役割もTranswell実験によって排除されなかった。したがって、プレート結合抗CD3Ab(と可溶性抗CD28Abとの組み合わせ)もまた、抗原提示細胞非依存性およびポリクローナル性T細胞刺激物として用いられた。これで刺激すると、全CD4⁺T細胞のみが強い増殖を示した。上記のように(図2D)、CD4⁺CD25⁺T細胞は増殖しなかった。両集団の共培養においては、比が1:1の場合、対照と比較して少なくとも75%の低下が見られた(データはここに示していない)。これらのデータは、主として調節はAPC機能の調節を介して起こるのではないことを示唆していた。サイトカインIL-10およびTGF- β (それぞれいわゆるTr1およびTh3の抑制活性にとって決定的)(Groux, H.ら, Nature 389:737-742(1997); Fukaura, H.ら, J. Clin. Invest., 98:70-77(1996))に対する中和抗体は、CD4⁺CD25⁺T細胞の調節活性を排除しなかった。このことは、これらのサイトカインが少なくとも我々が実施したアッセイの中では何ら重要な抑制的役割を果たしていないことを示している。共培養物にCD4⁺CD25⁺T細胞の増殖を促進する高用量でIL-2および/またはIL-15を添加すると(図2D参照)、それらの細胞の抑制作用が低下した。しかし、抑制活性は排除されなかったように思われる。データを解釈する際には、CD4⁺CD25⁺T細胞の著しい程度の増殖を考慮に入れなければならないからである(図3D)。

【0031】

実施例4: CD4⁺CD25⁺T細胞はIL-10を優勢に分泌する。

10

20

30

40

50

サイトカインプロファイルを分析し、比較するため、新たにソーティングしたCD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞をプレート結合抗CD3+抗CD28で活性化した。次に上清をELISAによって分析し、そしてRNA発現をRNaseプロテクションアッセイによって分析した。さらに、細胞内サイトカインの染色を実施して、特定のサイトカインを放出する細胞の百分率を測定した。図4に示すように、CD4⁺CD25⁻T細胞はIFN- γ およびIL-2を優勢に分泌し、IL-10およびIL-4はほとんど分泌せず、Th1様プロファイルに似ていた。他方、CD4⁺CD25⁺T細胞はIL-10を優勢に産生し、IL-2、IL-4およびIFN- γ は低レベルで産生するのみであり、Tr1細胞に類似していた。RNAレベルにおける両亜集団の比較は、CD25⁻T細胞と比較してCD25⁺T細胞がより多いIL-10、より少ないIFN- γ および類似したレベルのIL-2 mRNAを発現することを明らかにした。IL-1受容体アンタゴニスト(IL-1Ra) mRNAはCD4⁺CD25⁺T細胞中に優勢に見出されたが、他方、著しいレベルのIL-1 mRNAはCD4⁺CD25⁻T細胞にのみ存在した。TGF- β は、両方の細胞種において類似の低レベルで発現されていた。

10

【0032】

実施例5：活性化し、その後固定したCD4⁺CD25⁺T細胞はなお調節能を示す。MACSTMソーティングによって、成人血液由来の全CD4⁺T細胞からCD4⁺CD25⁻およびCD4⁺CD25⁺T細胞を単離した。CD4⁺CD25⁺T細胞を3つの部分に分割した。1つの画分は10 μ g/mlのプレート結合抗CD3抗体+10 μ g/mlの可溶性抗CD28抗体を用いて一晩活性化した。翌日、この画分および非活性化CD4⁺CD25⁺T細胞の1部を2%ホルムアルデヒドで1時間固定した。3つ目の画分は未処理のままにした。細胞を3回洗浄した。

20

未固定CD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞を単独で、ならびにCD4⁺CD25⁻T細胞と1:1の比で混合したCD4⁺CD25⁺T細胞の各画分を固定化抗CD3および可溶性抗CD28で活性化した。5日後、[³H]Tdr取り込みによって増殖を測定した。5つの独立した実験のうち代表的なものを図5に示す。図中、記号は以下のものを表す：

CD4 ⁺ CD25 ⁻	未固定CD4 ⁺ CD25 ⁻ 細胞	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	未固定CD4 ⁺ CD25 ⁺ 細胞	
Reg. 1:1	未固定CD4 ⁺ CD25 ⁺ およびCD4 ⁺ CD25 ⁻ T細胞、比1:	30
1		
Reg. 1:1		
CD25+stim fix	活性化、固定化CD4 ⁺ CD25 ⁺ T細胞および未固定CD4 ⁺ CD25 ⁻ T細胞、比1:1	
Reg. 1:1		
CD25+fix	非活性化、固定化CD4 ⁺ CD25 ⁺ T細胞および未固定CD4 ⁺ CD25 ⁻ T細胞、比1:1	

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】CD4⁺CD25⁻T細胞と比較した、CD4⁺CD25⁺T細胞が明確な表現型的相違を示すことを示す。

40

【図2】CD4⁺CD25⁺T細胞が同種異系およびポリクローナルな刺激の両方に対して非増殖性/アネルギー性であることを示す。これはIL-2および/またはIL-15の添加によって部分的にくつがえされるが、中和性抗IL-10抗体によってはくつがえされない。

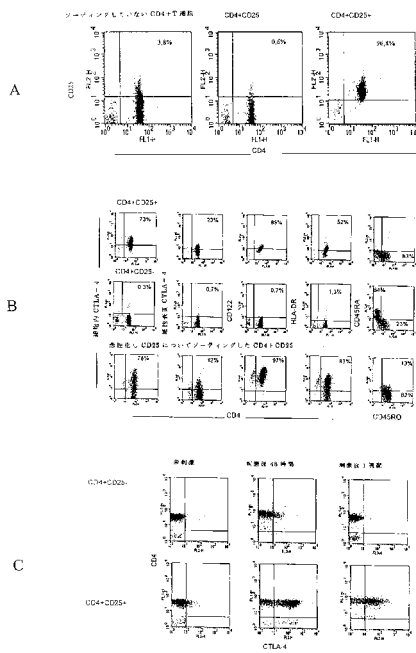
【図3】TCRを介して刺激された場合、CD4⁺CD25⁺T細胞がCD4⁺およびCD8⁺T細胞の活性化を細胞接触および用量依存的に抑制することを示す。

【図4】CD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞のサイトカインプロファイルが異なることを示す。

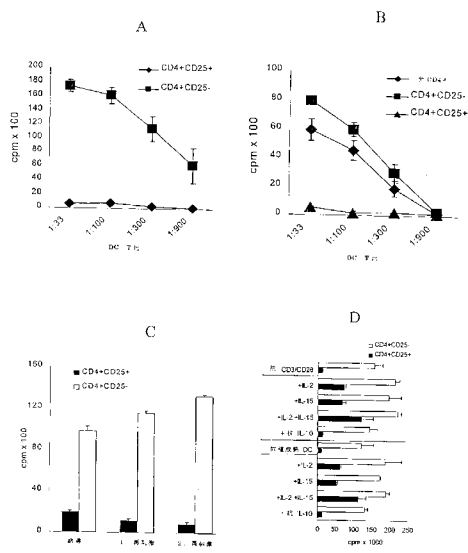
【図5】活性化され、固定されたCD4⁺CD25⁺細胞がなお調節能を有することを示す

50

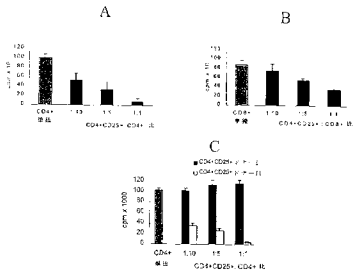
【図 1】



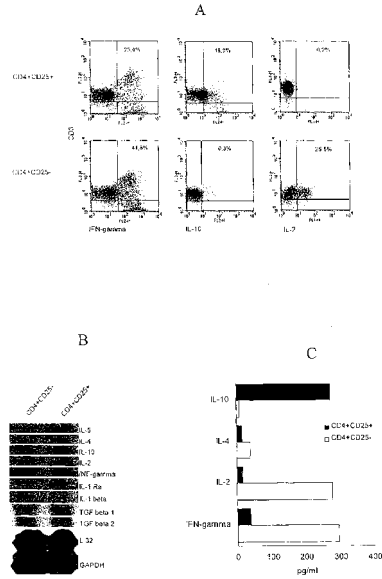
【図 2】



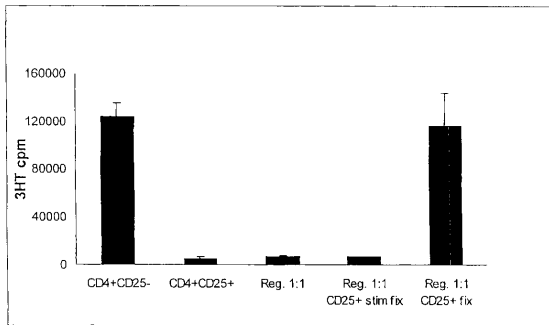
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/072799 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 5/06, A61K 35/14, G01N 33/50, A61P 37/06, 37/04
- (21) International Application Number: PCT/EP02/02671
- (22) International Filing Date: 12 March 2002 (12.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01106033.2 12 March 2001 (12.03.2001) EP
- (71) Applicant and
(72) Inventor: SCHULER, Gerold [DE/DE]; Am Veichenberg 25, 91080 Spardorf (DE).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): DIECKMANN, Detlef [DE/DE]; Leipziger Str. 16, 91080 Uttenreuth (DE).
- (74) Agents: HELBING, Jörg et al.; Von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LL, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BE, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/072799 A1

(54) Title: CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS FROM HUMAN BLOOD

(57) Abstract: The present invention provides suppressive and/or regulative human CD4+CD25+ T cells, a method for expanding same, and the use of the suppressive and/or regulative human CD4+CD25+ T cells and the expanded T cells as regulatory agent.

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells from Human Blood

5 The present invention provides suppressive and/or regulative human CD4⁺CD25⁺ T cells, a method for expanding same, and the use of the suppressive and/or regulative human CD4⁺CD25⁺ T cells and of the corresponding expanded T cells as regulatory agent.

10 Background of the Invention

Immunological self-tolerance is critical for the prevention of autoimmunity and maintenance of immune homeostasis. The ability of the immune system to discriminate between self and non-self is controlled by mechanisms of central and peripheral tolerance. Central tolerance involves
15 deletion of self-reactive T lymphocytes in the thymus at an early stage of development (Rocha, B. and von Boehmer, H., *Science* 251:1225-1228 (1991); Kisielow, P. et al., *Nature* 333:742-746 (1988)). Several mechanisms of peripheral tolerance have been described, including T cell anergy and ignorance (Rocha, B. and von Boehmer, H., *Science* 251:1225-1228 (1991); Kisielow, P. et al., *Nature*, 333:742-746 (1988); Schwartz, R. H., *Science* 248:1349-1356 (1990); Miller, J. F. A. P. and Heath, W. R., *Immunol. Rev.* 133:131-150 (1993)). Studies ongoing for
20 more than a decade in rodents have provided firm evidence for the existence of a unique CD4⁺CD25⁺ population of "professional" regulatory/suppressor T cells that actively and dominantly prevent both the activation
25 as well as the effector function of autoreactive T cells that have escaped other mechanisms of tolerance (Sakaguchi, S. et al., *J. Immunol.* 155:1151-1164 (1995); Takahashi, T. et al., *Int. Immunol.* 10:1969-1980 (1998); Itoh, M. et al., *J. Immunol.* 162:5317-5326 (1999)). The
30 elimination or inactivation of these cells resulted in severe autoimmune disease, and was also found to enhance immune responses to alloantigens and even tumors (Sakaguchi, S. et al., *J. Immunol.* 155:1151-1164

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

2

(1995); Itoh, M. et al., J. Immunol. 162:5317-5326 (1999); Shimizu, J. et al., J. Immunol. 163:5211-5218 (1999)). Recent studies revealed that the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells constitute a rather homogenous population (Thornton, A. M., Shevach, E. M., J. Immunol. 164:183-190 (2000)), are derived from the thymus (Itoh, M. et al., J. Immunol. 162:5317-5326 (1999)), are naturally non-proliferative (i.e. anergic) to stimulation via the TCR, but require activation via their TCR to become suppressive and to inhibit the proliferation of CD4⁺ or CD8⁺ T cells. Once activated, however, their regulatory/suppressor function was completely antigen-nonspecific, cytokine-independent yet cell contact dependent (Thornton, A. M., Shevach, E. M., J. Immunol. 164:183-190 (2000)). The exact mechanisms of suppression, notably the cell surface and/or short-range soluble molecules involved in the T-T interaction, have yet to be characterized. New *in vitro* data suggest that the CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit the proliferation of responders by inhibiting their IL-2 production (Thornton, A. M., Shevach, E. M., J. Exp. Med. 188:287-296 (1998)). Recent *in vivo* studies suggest that the function of CD4⁺CD25⁺ T cells is crucially dependent on signaling via the CTLA-4/CD152 molecule which was found to be constitutively expressed on CD4⁺CD25⁺ T cells (Read, S. et al., J. Exp. Med. 192:295-302 (2000); Salomon, B. et al., Immunity 12:431-440 (2000); Takahashi, T. T. et al., J. Exp. Med. 192:303-310 (2000)).

Although it has been evident for years that in rodents the CD4⁺CD25⁺ T cell population constitutes a unique lineage of "professional" regulatory/suppressor T cells which are crucial for the prevention of spontaneous autoimmune disease (Sakaguchi, S. et al., J. Immunol. 155:1151-1164 (1995)), it is unknown to date, whether CD4⁺4T cells exhibiting similar functional properties are naturally occurring in man. The removal and/or functional impairment of these cells *in vivo* in mice e.g. by anti-CD25 and/or anti-CTLA-A4 mAb treatment of animals induces various spontaneous autoimmune diseases AND rejection of tumors. The mechanism is that removal/impairment of these cells removes their

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

3

negative control of autoreactive T cells so that these T cells become active. If one gives back the CD4⁺CD25⁺ T cells by adoptive transfer into these animals regulation is restored and autoimmunity/tumor rejection is stopped.

5

As set forth above, it is totally unknown to date whether CD4⁺ T cells exhibiting similar functional properties are naturally present in man. The preparation of human T cells with regulatory properties, which are, however, no CD4⁺CD25⁺ T cells is known in the art. E. g. Jonuleit, H. et al., *J. Exp. Med.* 192:1213-1222 (2000) describe the induction of regulatory T cells from human naïve T cells by repetitive stimulation with immature dendritic cells. Most of this work was done with T cells from cord blood which is the richest source of truly naïve T cells. It is to be noted that CD4⁺CD25⁺ T cells are constitutively detectable in the human blood from early time points on. The subject of Jonuleit et al. is not a naturally occurring population. De Jong, P. et al., *Int. Immunol.* 6:631-638 (1994) describe the effect of TGF-β1 on naïve and memory CD4⁺ T cells. A differential effect is shown, with stimulatory effect on primarily activated CD45 RO⁺ CD4⁺ T cells. Proliferation of CD45 RO⁺ CD4⁺ T cells or secondary stimulated CD45 RO⁺ cells is suppressed. In the case of CD45 RA⁺ T cells TGF-β leads to an increased mean of fluorescence of CD25. The effects described here solely relate to proliferation of T cells. A regulatory capacity of naïve TGF-β treated T cells is not shown.

25 Surprisingly it was now found that CD4⁺CD25⁺, primarily CD45RO⁺ T cells (mean 6% of CD4⁺ T cells), hereinafter shortly referred to as "CD4⁺CD25⁺ T cells", are present in human blood, in particular the peripheral blood of adult healthy volunteers. In the past T cells exhibiting the phenotype (i.e., suppressive/regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells) have been known for years
30 but they were misinterpreted to be conventional memory cells (Kanegane, H. et al., *Int. Immunol.*, 3:1349-1356 (1991); Taka, K. et al., *Immunol.* 72:15-19 (1990); Jackson, A. L. et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.*

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

4
54:126-133 (1990)). In contrast to previous reports the human
CD4⁺CD25⁺ T cells are not conventional memory cells but rather
regulatory cells exhibiting functional properties identical to their rodent
counterparts. CTLA-4 (CD152), for example, which is essential for the *in*
5 *vivo* suppressive activity of CD4⁺CD25⁺ T cells, was constitutively
expressed, and remained strongly upregulated after stimulation. The cells
were non-proliferative to stimulation via their TCR, but the anergic state
was partially reversed by IL-2 and IL-15. Upon stimulation with allogeneic
(but not syngeneic) mature dendritic cells or plate-bound anti CD3 + anti-
10 CD28 the CD4⁺CD25⁺ T cells released IL-10, and in coculture experiments
suppressed the activation and proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells.
Suppression proved IL-10 independent, yet contact dependent as in the
mouse. The identification of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells has important
implications for the study of tolerance in man, notably in the context of
15 autoimmunity, transplantation, and cancer.

Summary of the Invention

- 20 The present invention provides
- (1) suppressive and/or regulative human CD4⁺CD25⁺ T cells;
 - (2) a method for expanding CD4⁺CD25⁺ T cells as defined in (1) above,
which method comprises stimulating the cells with a T cell stimulating
agent or with antigen-presenting cells *ex vivo* and *in vivo*;
 - 25 (3) expanded human CD4⁺ CD25⁺ T cells obtainable by the method as
defined in (2) above, preferably by the *ex vivo* method defined in (2)
above;
 - (4) a pharmaceutical composition comprising the human CD4⁺ CD25⁺ T
cells as defined in (1) or (3) above;
 - 30 (5) use of CD4⁺ CD25⁺ T cells as defined in (1) or (3) above for preparing
a regulatory medicament;

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

5

- (6) a method to identify, monitor and/or remove CD4⁺CD25⁺ T cells from human blood and other tissues *ex vivo* or *in vivo*, which method comprises
- (i) utilizing agents/ligands specifically binding to the CD4, and/or CD25, and/or CTL-A4 (CD154) entities on the T cells, preferably anti-CD4 and/or
5 anti-CD25, and/or anti-CTL-A4 antibodies, and/or
 - (ii) utilizing immunoadsorption methods; and/or
 - (iii) utilizing a stimulating agent or antigen presenting cells as defined in (2) above;
- (7) use of a T cell stimulating agent or antigen presenting cells as defined
10 in (2) above for preparing an agent to induce regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo*, preferably for preparing an agent for treating autoimmune diseases in a patient;
- (8) use of CD4⁺CD25⁺ T cells as defined in (1) or (3) above
- (a) in assays that will allow to identify other growth and/or functionally
15 modifying (inhibitory/enhancing)/apoptotic or anti-apoptotic factors
 - (b) for identifying molecules expressed by the CD4⁺CD25⁺ T cells including identification of novel molecules on said cells, or if presenting molecules which are deemed pharmaceutically active, or
 - (c) for identifying precursor cells or progeny of the regulatory CD4⁺CD25⁺
20 T cells;
- (9) use of the enriched CD4⁺CD25⁺ T cells of (1) above or the expanded T cells of (3) above for preparing an agent for adoptive transfer therapy, an agent for treating diseases with enhanced immunity including but not limited to autoimmune diseases, or an agent for preventing/treating
25 transplantation reactions such as graft versus host disease and graft rejections;
- (10) method for adoptive transfer therapy which comprises injecting/infusing back into the patients enriched/expanded autologous or non-autologous regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells as defined in (1) or (3)
30 above to prevent or treat any immune reactions that are too strong and/or pathogenic, or to prevent/treat transplantation reactions such as graft versus host disease and graft rejections;

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

6

(11) a method for preparing CD4⁺CD25⁺ T cells with a particular desired antigen-specific T cell receptor which comprises

(i) activating/stimulating/expanding the CD4⁺CD25⁺ T cells according to (1) above with antigen presenting cells, preferably immature or mature dendritic cells (DC), presenting said antigen *in vitro* or *in vivo*; or

(ii) utilizing a ligand/antibody to a particular T cell receptor expressed on (subsets of) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, or a MHC-peptide complex binding to a particular T cell receptor on (subsets of) CD4⁺CD25⁺ T cells;

(12) CD4⁺CD25⁺ T cells obtainable by the method as defined in (11) above, or by transfection of a T cell receptor of desired antigen specificity into *ex vivo* isolated or expanded T cells;

(13) pharmaceutical composition comprising the T cells of (12) above, preferably said pharmaceutical composition being suitable to treat diseases with enhanced immunity including, but not limited to, autoimmune diseases, graft versus host disease and graft rejections; and

(14) use of agents specifically binding to the CD4 and/or CD25 and/or CTL-A4 (CD154) entities on the T cells, including but not limited to ligands/antibodies, such as anti-CD25 and/or anti-CTL-A4 mAb, or antibodies or MHC-peptide complexes or other ligands binding to T cell receptors on (subsets of) CD4⁺CD25⁺ T cells for preparing a medicament for removal or functional impairment of CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo* in order to enhance immune responses, including dampen regulation by CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo*, for example, to enhance tumor immunity.

25 **Short Description of the Figures**

Figure 1 shows that CD4⁺CD25⁺ T cells exhibit distinct phenotypical differences as compared to CD4⁺CD25⁻ T cells.

Figure 2 shows that CD4⁺CD25⁺ T cells are nonproliferative/anergic to both allogeneic and polyclonal stimulation, which is partially reversed by the addition of IL-2 and/or IL-15, but not by neutralizing anti IL-10 antibodies.

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

7
Figure 3 shows that CD4⁺CD25⁺ T cells, if stimulated via the TCR, suppress the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in a cell contact- and dose-dependent manner.

5 Figure 4 shows that the cytokine profiles of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells are different.

Figure 5 shows that activated and fixated CD4⁺CD25⁺ cells still exhibit regulatory capacity.

Detailed Description of the Invention

10 The embodiments (1) to (14) of the invention are hereinafter described in more detail:

(A) The phenotypical characterization of the human CD4⁺CD25⁺ T cells now allows the identification, monitoring (e.g. by FACS), isolation and removal of these cells from human blood and other tissues *ex vivo* (hereinafter occasionally referred to as "*in vitro*") or *in vivo*. This isolation
15 or removal can be achieved by contacting the human blood or other tissues with suitable agents *ex vivo*. Suitable agents are in particular anti-CD4, anti-CD25, anti-CTL-A4 (CD154) antibodies, etc.

20 (B) The CD4⁺CD25⁺ T cells can be expanded *ex vivo* by stimulation of the cells by treatment with suitable T cell stimulating agents or with antigen presenting cells (hereinafter shortly referred to as "APCs"). Suitable T cell stimulating agents suitable for the methods of (2) and (6) above include, but are not limited to, compositions comprising

25 (a) anti-CD3 and/or anti-CD28 ligands/monoclonal antibodies (mAb) including superagonistic antibodies; (b) a ligand/antibody to T cell receptors on the surface of CD4⁺CD25⁺ T cells or to T cell receptor components; or

30 (c) MHC-peptide complexes binding to the T cell receptors expressed on the surface of regulatory T cells; or

(d) PMA (as well as other phorbol ester) + Ionomycin (or other calcium ionophores).

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

8

"Ligand" or "ligands" in accordance with the present invention relates to all kinds of compounds capable of binding to specific molecules (including polynucleotides and polypeptides such as cell receptors, CD25, CTL-A4, etc.). A preferred ligand is a monoclonal antibody or a fragment thereof.

5 The terms "ligand" and "antibody" are used interchangeable throughout the application text.

Suitable APCs include autologous or non-autologous or artificial antigen-presenting cells (e.g. dendritic cells (for the preparation of dendritic cells see e.g. WO 93/20185, WO 97/29182 and EP-A-0 922 758), etc.). Said T

10 cell stimulating agents and antigen-presenting cells can be used together with IL-2 or IL-15 or a combination thereof. Instead of IL-2/IL-15, other cytokines that use the gamma chain common to several cytokine receptors can also be used (including, but not restricted to, IL-7 and IL-9).
15 Furthermore, IFN alpha and IL-10, which are known to promote the generation of other regulatory cells (Groux, H. et al., Nature 389:737-742 (1997); Roncarolo, M.G., J. Exp. Med. 193:F5-F9 (2001)) also promote the generation/expansion of these cells. Finally, other methods for polyclonal or oligoclonal (e.g. by superantigens) T cell stimulation are also

20 applicable (anti-CD3 and/or anti-CD28 ligands/antigens including superagonistic antibodies; PMA + ionomycin; etc.). These stimulating agents or antigen presenting cells may be used for the expansion in amounts well-known for a person skilled in the art.
25 (C) The identification of the CD4⁺CD25⁺ T cells also allows to monitor and expand CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo* (e.g. by administering the T cells stimulating agents defined above, such as IL-2 + IL-15 or IL-10 + IFN α to patients, with or without the dendritic cells/antigen presenting cells) to induce regulatory T cells e.g. to fight autoimmune diseases.

30 (D) The CD4⁺CD25⁺ T cells or expanded CD4⁺CD25⁺ T cells of (1) or (3) above can be used in assays that will allow to identify other growth and/or

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

9

functionally modifying (inhibitory/enhancing)/(apoptotic or anti-apoptotic) factors that can be used *in vitro* or *in vivo* (e.g. to stimulate or to remove or functionally disturb the CD4⁺CD25⁺ T cells). These T cells are also suitable for identifying molecules expressed by the CD4⁺CD25⁺ T cells by methods such as but not restricted to mAb generation, proteomics, DNA chip analysis, subtractive hybridization (in particular (a) identification of "novel", i.e., hitherto unknown, molecules, or (b) if these molecules are suitable pharmaceutical target structures, to therewith develop novel stimulating, inhibiting or apoptosis-inducing medicaments, for "switching on" or "switching off" of CD4⁺CD25⁺ T cells *in vitro* and *in vivo*) and for identifying precursor cells or progeny of the regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells.

(E) The CD4⁺CD25⁺ T cells or expanded CD4⁺CD25⁺ T cells of (1) or (3) above can be used in adoptive transfer therapy, i.e. inject/ infuse back into the patients enriched/expanded autologous or non-autologous regulatory T cells to prevent or treat any immune reactions that are too strong and/or pathogenic, i.e. to treat autoimmunity in its broadest sense (including but not limited to classical autoimmune diseases such as lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, pemphigus vulgaris or thyreoiditis as well as diseases that have at least some autoimmune aspect in their pathogenesis such as vitiligo, atopic dermatitis, psoriasis vulgaris, etc.). Also to prevent/treat transplantation reactions such as GVHD (graft versus host disease) and graft rejections.

(F) The CD4⁺CD25⁺ T cells or expanded CD4⁺CD25⁺ T cells of (1) or (3) above (as well as the expansion method defined in (2) above, the pharmaceutical composition of (4) above and the use of (5) and (7) to (9) above can be used in conjunction with immature or mature dendritic cells (DC) (or other antigen presenting cells including artificial ones) that are or are not pulsed/loaded/fed with tissue or any other antigen (defined or undefined) in order to activate/stimulate/expand the CD4⁺CD25⁺ T cells *in vitro* or *in vivo*, to generate/expand CD4⁺CD25⁺ T cells with a particular

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

10

desired antigen-specific TCR (T cell receptor). Examples of defined antigens are autoantigens (e.g. desmoglein 3 in the case of pemphigus vulgaris, melanA or tyrosinase in case of vitiligo; thyroglobulin in case of thyroiditis) or foreign antigens (e.g. pathogen-derived antigens such as Hepatitis C, etc.) or alloantigens/transplantation antigens. Examples of undefined antigens are tissue or cell-derived antigens (eg in the form of necrotic or apoptotic cells or tissue derived RNA or hybrids between cells of interest and dendritic cells/antigen presenting cells or other forms of delivery of undefined antigens into dendritic cells or other antigen presenting cells) or pathogen-derived antigens. Autologous or non-autologous CD4⁺CD25⁺ T cells and/or dendritic cells can be used.

(G) The agents specifically binding to the CD4 and/or CD25 and/or CTL-A4 (CD154) entities on the T cells as defined in (14) above can be used to remove and to monitor removal of CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo* e.g. by anti-CD25 and/or anti-CTL-A4 mAb (unmodified or modified e.g. conjugated to toxins) or by immunoadsorption (blood is flowing through columns and CD4⁺CD25⁺ T cells are removed by solid phase-bound antibodies directed to molecules expressed on the surface of CD4⁺CD25⁺ T cells e.g. anti-CD25) in order to enhance immune responses, e.g. dampen regulation by CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo*, for example, to enhance tumor immunity.

(H) In another preferred embodiment of the invention the expanded (i.e. activated) CD4⁺CD25⁺ T cells of (3) above (and also the T cells of (1) and (12) above) may be fixated. Such fixated T cells can be obtained by *ex vivo* treatment of the (expanded) T cells with a suitable fixation agent including, but not limited to, paraformaldehyde, etc. Preferably the fixation is performed by suspending the cells in a 0.5 to 5% (w/w) aqueous paraformaldehyde solution, most preferably in an about 2% (w/w) paraformaldehyde solution, for 15 min to 3 h, most preferably for 1 h, followed by appropriate washing steps.

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

11

(I) The CD4⁺CD25⁺ T cells utilized in the medicament of (5) above in the agents of (9) and (14) above, or the method of (10) above can be autologous or non-autologous regulatory T cells. In case of non-autologous regulatory T cells it is preferred that the T cells are fixated as mentioned in (H) above.

(J) The pharmaceutical composition of (4) and (13) above, the medicament of (5) above, the agents of (7), (9) and (14) above and the T cells utilized in the methods of (6), (8) and (10) above may contain further ingredients such as pharmaceutically/diagnostically suitable carriers, solvents, diluents and additives known to the person skilled in the art. The concentration of these ingredients are to be adapted for respective purpose by the person skilled in the art.

The concept of suppressor or immunoregulatory T cells has been revitalized during the past few years by the better delineation of several regulatory cell types in rodents, the mutual relationship of which is not yet finally defined. The so-called Tr1 and Th3 cells mediate bystander suppression - without need for direct cell contact - by the secretion of high levels of IL-10 and TGF- β , respectively (Groux, H. et al., Nature 389:737-742 (1997); Fukaura, H. et al., J. Clin. Invest. 98:70-77 (1996)). The best characterized and apparently most important regulatory T cell population identified so far are the CD4⁺CD25⁺ T cells. They occur naturally in rodents (representing about 10% of CD4⁺ cells in lymphoid organs), are characterized by constitutive expression of CD25 (IL-2R-alpha), and are clearly of crucial importance for maintaining tolerance and preventing autoimmune disease *in vivo*. Surprisingly, a cell population exhibiting equivalent properties has not been described in humans to date. Here we have demonstrated, that the CD4⁺CD25⁺ T cells in human blood that previously had been considered to represent conventional memory T cells (Kanegane, H. et al., Int. Immunol. 3:1349-1356 (1991); Taka, K. et al., Immunol., 72:15-19 (1990); Jackson, A. L. et al., Clin. Immunol.

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

12

Innopathol. 54:126-133 (1990)) in fact appear to be the exact human counterpart of the unique CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that have been known and studied for many years in rodents. We were able to isolate the CD4⁺CD25⁺ T cells from adult blood in sizeable quantities (average 6% of CD4⁺ T cells) so that a detailed study and comparison to CD4⁺CD25⁻ T cells could be undertaken. It turned out that the human cells share the key phenotypical and functional features with the murine CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells. The most interesting and previously unidentified phenotypical feature was that the CTLA-4 molecule (CD152) was already constitutively expressed (at high levels intracellularly, and at low levels at the surface) by the human CD4⁺CD25⁺ T cells, was further upregulated after stimulation via the TCR and maintained at high surface levels for at least a week thereafter (in sharp contrast to CD4⁺CD25⁻ T cells that expressed CTLA-4 de novo upon stimulation, and only very transiently as described (Thompson, C. B., Allison, J. P., *Immunity*, 7:445-450 (1998); Chambers, C. A. et al., *Immunol. Rev.* 153:27-46 (1996)). The expression pattern of CTLA-4 by CD4⁺CD25⁻ already supported their relationship to the murine CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells as these cells constitutively express CTLA-4 as a molecule essential for their *in vivo* suppressive activity (Read, S. et al., *J. Exp. Med.* 192:295-302 (2000); Salomon, B. et al., *Immunity*, 12:431-440 (2000)). Like their murine counterparts the human CD4⁺CD25⁺ T cells showed almost no proliferation upon stimulation, neither in response to polyclonal activation by plate-bound anti CD3 + anti CD28 nor following (even repetitive) stimulation with the most potent natural immunostimulatory cells, i.e. mature (allogeneic) DC. When these stimuli were combined with high doses of IL-2 (500 U/ml) anergy was partially reversed as described in the mouse (Thornton, A. M., Shevach, E. M., *J. Immunol.*, 164:183-190 (2000)). A novel finding was that IL-15 at high doses (50-100ng/ml) induced comparable proliferation, and that the combined action of IL-2 and IL-15 even at lower doses (10 U/ml and 10 ng/ml, respectively) had a strong synergistic action and induced vigorous proliferation. This might prove important, as expansion of

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

13

CD4⁺CD25⁺ T cells is vital for potential therapeutic applications and cloning of these cells for further more detailed studies (including mechanistic and molecular ones). Of interest was that neutralizing anti IL-10 mAb failed to promote proliferation indicating that the release of IL-10 by these cells was not causing anergy in an autocrine fashion. In coculture experiments the CD4⁺CD25⁺ T cells displayed another key feature in that they suppressed yet only upon activation via their own TCR the proliferation of CD25⁻CD4⁺ or CD8⁺ T cells in a contact- and dose-dependent, yet cytokine-independent manner. Our *ex vivo* system has not allowed us to investigate whether the suppression is completely antigen-nonspecific as has recently been shown in the mouse by taking advantage of TCR transgenic mice (Thornton, A. M., Shevach, E. M., J. Immunol., 164:183-190 (2000)). Respective mechanistic studies might be possible, however, by employing our IL-2 + IL-15 approach for the expansion of these cells.

It is most remarkable that a recent report has shown that T cells with regulatory properties and a phenotype virtually identical to the CD4⁺CD25⁺ T cells we have isolated *ex vivo* from human blood can be generated *in vitro* by repetitive stimulation of human naive T cells with immature DC (Jonuleit, H. et al., J. Exp. Med., 192:1213-1222 (2000)). In the mouse CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell populations are continuously generated in the thymus (Itoh, M. et al., J. Immunol. 162:5317-5326 (1999)), yet the maintenance of regulatory T cells in the periphery requires the presence of tissue-specific antigens and IL-2 (25, 26). Based on the two supplementary findings (Jonuleit, H. et al., J. Exp. Med., 192:1213-1222 (2000)) it is certainly tempting to speculate, that immature DC that have sampled peripheral tissues via the uptake of apoptotic antibodies (Steinman, R. M. et al., J. Exp. Med., 191:411-416 (2000); Roncarolo, M. G. et al., J. Exp. Med. 193:F5-F9 (2001)), and present universal or tissue-specific autoantigens, are responsible for the survival and possibly slight proliferation of thymic regulatory T cell emigrants. It is believed that the survival of the *ex vivo* isolated

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

14

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells can be promoted by interaction with immature DC, and that the recently reported „generation“ of CD4⁺CD25⁺ T cells from naïve T cells by immature DC *in vitro* (Jonuleit, H. et al., J. Exp. Med., 192:1213-1222 (2000)) possibly rather represents maintenance of survival of preexisting CD4⁺CD25⁺ in the initial inoculum. It is also of note that it was found that interaction of *ex vivo* isolated human CD4⁺CD25⁺ T cells with syngeneic mature DC was insufficient to activate their suppressive properties while allogeneic mature DC were potent inducers of regulation. This observation again suggests testable hypotheses. For example, will immature in contrast to mature syngeneic DC activate CD4⁺CD25⁺ T cells (suggesting that they carry some specific ligand for interaction), or will they do so only after ingestion of apoptotic bodies (suggesting that presentation of autoantigens is required)? Furthermore, can mature DC that present nominal recall antigens (e.g. influenza proteins/peptides) stimulate T cells both in the CD4⁺CD25⁻ T cell population and the CD4⁺CD25⁺ T suggesting that besides autoantigens also the recognition of foreign antigens could trigger regulation at inflammatory sites.

In summary, it was shown that a sizeable population (~ 6%) of CD4⁺CD25⁻ T cells exists in the peripheral blood of normal human adults that in contrast to previous belief do not represent conventional memory but rather regulatory T cells equivalent to the unique population of CD4⁺CD25⁻ "professional" suppressor/regulatory T cells that have been studied for years in rodents. The identification and characterization of the human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells will now allow for their monitoring in various disease states, and has important implications for understanding and treating autoimmunity, graft rejection, and cancer.

The invention is further explained by the following figures and examples which, however, are not intended to limit the invention:

Figures

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

15

Figure 1: CD4⁺CD25⁺ T Cells exhibits distinct phenotypical differences to CD4⁺CD25⁻ T Cells. CD4⁺ T cells were isolated from PBMC by negative MACS sorting, yielding highly purified untouched CD4⁺ T cells. These cells were labeled with anti CD25 magnetic beads and sorted.

5 (A): Sorting resulted in virtually pure CD25⁺ T cells. A representative result out of 20 independent standardized experiments is shown.

(B): The phenotype of CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ and activated CD4⁺CD25⁻ T cells was analyzed as described in Materials & Methods. In addition, CD4⁺CD25⁻ T cells were activated with immobilized anti CD3 + soluble anti
10 CD28. After activation cells were labeled with anti CD25 magnetic beads and sorted. Results were similar in 5 independent experiments.

(C): CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were stained with anti CTLA-4 antibody at 37°C for 2-h. Staining was performed *ex vivo* and at different time points after activation with immobilized anti CD3 + soluble anti
15 CD28. One representative result of 4 independent experiments is shown.

Figure 2: CD4⁺CD25⁺ T cells are nonproliferative/anergic to both allogeneic and polyclonal stimulation, which is partially reversed by the addition of IL-2 and/or IL-15, but not by neutralizing anti IL-10 antibodies.

20 (A): CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were isolated from adult blood by MACS sorting as in Fig. 1. 1×10^5 T cells/96 well were stimulated with different numbers of mature allogeneic DC. Proliferation of T cells (triplicate cultures) was determined by [³H]Tdr incorporation. Results were similar in 6 independent experiments.

25 (B): Whole CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were treated as described in (A). Proliferation in triplicate cultures was determined by [³H]Tdr incorporation (representative result of 5 independent experiments).

(C): MACS sorted CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were primed and
30 restimulated every week with mature allogeneic DC from the same donor (DC:T cell ratio of 1:20). Proliferation (1×10^5 T cells/96 well) was

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

16

determined by [³H]Tdr incorporation. Similar results were obtained in 3 independent experiments.

(D): CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were stimulated with immobilized anti CD3 (10µg/ml) and soluble anti CD28 (10µg/ml) [upper panels] or with mature allogeneic DC [lower panels] as described in (A). 500 U/ml IL-2, 100 ng/ml IL-15, a mixture of 10 U/ml IL-2 + 1 ng/ml IL-15 or 10 µg/ml anti IL-10 were added at the onset of culture. [³H]Tdr incorporation was measured after 5 days of culture. One of 3 independent experiments is shown. The addition of IL-2 and/or IL-15 in the absence of a polyclonal or allogeneic T cell stimulus did not induce significant proliferation in the CD25⁺ or CD25⁻ T cell subset (data not shown).

Figure 3: CD4⁺CD25⁺ T Cells if stimulated via the TCR suppress the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T Cells in a cell contact- and dose-dependent manner.

(A, B): MACS sorted total CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells (10⁵ T cells/ 96 well) were added to CD4⁺CD25⁺ T cells at the ratios indicated, and stimulated with allogeneic DC at a DC/CD4⁺ or CD8⁺ T cells ratio of 1:20. Proliferation was determined by [³H]Tdr incorporation after 5 days. One of 5 independent experiments is shown.

(C): DC and CD4⁺CD25⁺ T cells were generated/ isolated from the same donor (donor I). In addition, whole CD4⁺ T cells and CD4⁺ CD25⁺ T cells were isolated from another donor (donor II). 10⁵ whole CD4⁺ T cells/96 well were cultured with 5 x 10³ DC/well (i.e. DC:T ratio = 1:20; results were comparable at a DC:T ratio of 1:100, not shown). CD4⁺CD25⁺ T cells from donor I and donor II were then added, respectively. Proliferation was determined by [³H]Tdr incorporation after 5 days of culture. Results representative of 3 independent experiments are shown as mean cpm of triplicate cultures.

(D): Whole CD4⁺ T cells or CD4⁺CD25⁺ T cells were (10⁵ T cells/ 96 well) stimulated with 5 x 10³ allogeneic mature DC (DC:T ratio = 1: 20) (upper 2 panels). In addition, whole CD4⁺ T cells were cocultured with

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

17

CD4⁺CD25⁺ T cells at a ratio of 1:1 (10⁵ T cells/ 96 well each) and stimulated with allogeneic DC again at a DC:T ratio of 1: 20 in the presence or absence of 10 µg/ml anti IL-10, 2µg/ml TGF-beta, 500 U/ml IL-2, 50 ng/ml IL-15 or a mixture of 10 U/ml IL-2, 1 ng/ml IL-15. In a parallel Transwell approach the CD4⁺CD25⁺ T cells were stimulated with allogeneic DC (DC/ T cell ratio of 1:20) in a Transwell chamber, and whole CD4⁺ T cell responders were put into the well together with allogeneic DC again at a DC:T ratio of 1:20. Proliferation after 5 days of culture was determined by [³H]Tdr incorporation. One of four representative experiments is shown.

Figure 4: Different cytokine profiles of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells.

(A): MACS sorted CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were stimulated with PMA (20 ng/ml) and A23187 Ca²⁺ ionophore (500 µg/ml) for 6 h. Monensin (2µM) was added for the last 5 h. Staining of CD3 surface expression was performed. Cells were washed, fixed, permeabilised and stained for detection of intracellular cytokines using FITC- or PE-conjugated specific antibodies. One of 5 independent experiments with similar results is shown. Results were identical when T cells were stimulated with platebound anti-CD3 + soluble anti-CD28 AB (not shown).

(B): CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were activated with platebound anti CD3 + soluble anti CD28. After 48 h of culture analysis of RNA expression was performed by RNase Protection assay.

(C): Cytokines in the supernatant were measured by ELISA (one of 5 independent experiments is shown).

Material and Methods

Culture Medium: RPMI 1640 (Bio Whittaker) supplemented with 1% heat-inactivated autologous plasma, 20µg/ml gentamicin (Merck) and 2 mM glutamine (Bio Whittaker) was used for the generation of dendritic cells (DC), X-VIVO-20 (Bio Whittaker) supplemented with 1% heat-inactivated

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

18

single donor human serum, 20µg/ml gentamicin (Merck) and 2 mM glutamine (Bio Whittaker) for T cell culture.

Cytokines: All cytokines used in this study were recombinant human proteins. Final concentrations were: GM-CSF 1,000 U/ml (Leukomax™; Novartis), IL-4 800 U/ml (Sandoz), IL-2 (Proleukin; Chiron Corp.) and IL-15 (PeproTech) were used at the concentrations indicated; for DC maturation we used a cocktail consisting of IL-1β 2 ng/ml (Sigma); IL-6 1000 U/ml (Sandoz); TNF-α 10 ng/ml (Bender, Vienna), and PGE₂ 1µg/ml (Sigma).

10 Antibodies: For immunostaining PE- and FITC- conjugated Antibodies (Ab) (all from BD Pharmingen) against CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD19, CD25, CD28, CD45 RA, CD45 RO, CD56, CD62L, CD80, CD83, CD86, CD95, CD95L, CD122, CD152, CD154, HLA-DR, and respective mouse and rat isotype controls were employed. Ab used for intracellular cytokine staining were FITC- and PE-conjugated anti IL-2 (MQ1-17H12), anti IL-4 (8D4-8), anti IL-10 (JES3-19F1) and anti IFN-γ (4S.B3), all from BD Pharmingen. Unconjugated anti IL-10 (JES3-19F1) (Pharmingen) and anti TGF-β (R&D Systems) were used for neutralization experiments, anti CD3 (UCHT1) and anti CD28 (CD28.2) for polyclonal activation of T cells.

20 Cytokine Assays: T cells were stimulated with allogeneic DC or with platebound anti CD3 (10µg/ml) + soluble anti CD28 (10µg/ml) in X-VIVO-20 + 1% serum. Cytokine analysis was performed at different time points by analysis of supernatants with commercially available ELISA kits for human IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ and TGF-β (BD Pharmingen). For analysis of intracellular cytokine production T cells were either stimulated with PMA 20 ng/ml and Ca²⁺ ionophore A23187 500 µg/ml (both from SIGMA) for 6 hours or with platebound anti-CD3 and soluble anti-CD28 Ab for 6 hours. Monensin, 2µM (SIGMA) was added for the last 4 hours of culture. Cells were collected, washed, fixed and saponine permeabilized (Fix/perm solution, BD Pharmingen) and stained with cytokine specific Ab or isotype.

WO 02/072799

19

PCT/EP02/02671

For cytokine mRNA analysis T cells were stimulated with platebound anti CD3 and soluble anti CD28 Ab. Cells were analyzed by RNase Protection assay template sets (BD Pharmingen).

Cell isolation and DC Generation: DC were generated from buffy coats or leukapheresis products (both obtained from the Department of Transfusion medicine from healthy donors after informed consent was given) as described (18,19). In brief, PBMCs were isolated by Ficoll density gradient centrifugation. Monocytes were isolated by plastic adherence and cultured in RPMI Medium, supplemented with IL-4 and GM-CSF. At day 6 a maturation cocktail (IL-1 β , IL-6, PGE₂ and TNF α) was added. At day 7 nonadherent cells were harvested and constituted mature DC that were > 90 % double positive for costimulatory molecules (CD80, CD86) and CD83.

CD4⁺ T cells were isolated from PBMC with a negative CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotech). CD4⁺CD25⁺ T cells were isolated from the pure, untouched CD4⁺ T cells using CD25 Microbeads (Miltenyi Biotech). Isolation of CD8⁺ T cells was performed using a negative CD8⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotech). Purity was assessed by FACS.

Flow Cytometric Analysis: For immunofluorescence staining cells were washed, stained for 20 min at 4°C with optimal dilution of each Ab. Cells were washed again and analyzed by flow cytometry (FACS ScanTM and CELLQuestTM software; Becton Dickinson). For analysis of cell surface CD152 expression, cells were stained with the appropriate antibody for 2 hours at 37°C.

Proliferation Assays: To assess proliferation of different CD4⁺ subtypes 10⁵ sorted T cells were incubated in X-VIVO-20 with different numbers of DC or different concentrations of platebound anti CD3 + soluble anti CD28 in 96-well plates. For assessment of regulatory properties 10⁵ bulk CD4⁺ T cells were cultured with 5 x10³ (in some experiments also with 1 x10³) DC in 96-well plates. Purified CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁻ T cells were added at different concentrations. After 4 - 5 days of culture [3H]Tdr (37 KBq/well)

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

20

was added for additional 16 h. Proliferation was measured using a liquid scintillation counter.

Transwell Experiments: Transwell experiments were performed in 24-well plates. 10^6 bulk $CD4^+$ T cells were stimulated with 5×10^3 DC. In addition, 10^6 $CD4^+CD25^+$ or $CD4^+CD25^-$ T cells were either added directly to the culture or were placed in Transwell chambers (Millicell, $0,4\mu m$; Millipore). After 5 days of coculture T cells were transferred to 96-well plates (10^5 cells/well) in triplicates. Proliferation was measured after 16 h pulse with [3H]Tdr using a liquid scintillation counter.

10

Examples

Example 1: $CD4^+CD25^+$ T cells show a reduced proliferative response to both allogeneic and polyclonal stimulation.

A low proliferative potential is highly characteristic of the well characterized regulatory $CD25^+CD4^+$ T cells in the murine system (Sakaguchi S. et al., J. Immunol., 155:1151-1164 (1995)). To analyze the proliferative capacity of human $CD4^+$ subpopulations $CD4^+$ T cells were magnetically sorted for their expression of CD25. By using a MACS CD4 negative selection kit and afterwards a positive selection for CD25 a more than 95% pure population of $CD4^+CD25^+$ T cells was obtained (Fig. 1A). These cells comprised around 6% (2,8 - 17,2%, n = 20) of peripheral $CD4^+$ T cells in the blood of the healthy adults we studied.

Mature DC are known as the most powerful antigen presenting cells (Bancherou, J., Steinman, R. M., Nature, 392:245-252 (1998)). Nevertheless, the $CD4^+CD25^+$ T cells exhibited virtually no proliferative response when stimulated *in vitro* with fully mature allogeneic DC in sharp contrast to the $CD4^+CD25^-$ T cells (Fig. 2A, B) or the whole $CD4^+$ population (Fig. 2B). Interestingly, the $CD4^+$ population depleted of $CD25^+$ T cells showed a higher proliferation when stimulated with allogeneic DC compared to the whole $CD4^+$ population (Fig. 2B).

It was next determined whether the $CD4^+CD25^+$ T cells would possibly only proliferate upon repetitive stimulation by mature DC. After

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

21

restimulation the proliferative response of CD25⁻ T cells increased somewhat, whereas the response of CD25⁺ T cells remained very low (Fig. 2C). Priming and restimulation by allogeneic mature DC resulted in a 30- to 50-fold expansion of the CD25⁻ population after two rounds of

5 restimulation. In contrast, there was no significant increase of the CD25⁺ population (data not shown). A slightly (~10%) decreased absolute number of CD4⁺CD25⁺ T cells was harvested as compared to the initial inoculum after the repetitive stimulation in the apparent absence of significant apoptosis or necrosis (data not shown).

10 The exceedingly low proliferative response of CD4⁺CD25⁺ T cells was also apparent when these cell populations were polyclonally stimulated with platebound anti CD3 + soluble anti CD28 (Fig. 2D). To test whether the T cell growth factors IL-2 and IL-15 could affect the proliferative potential various doses were added to CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells that were

15 stimulated either with immobilized anti CD3 + soluble anti CD28 (Fig. 2D, upper panels) or with mature allogeneic DC (Fig. 2D, lower panels). A series of pilot experiments revealed that IL-2 enhanced the proliferation of CD25⁺ T cells only at high doses (100-1000 U/ml). IL-15 had a similar effect, again only at very high doses of 50-100 ng/ml. When both

20 cytokines were mixed, they had strong synergistic effects and doses of 10 U/ml IL-2 plus 10ng/ml IL-15 were sufficient to promote the proliferation of CD4⁺CD25⁺ T cells. The addition of IL-2 and/or IL-15 in the absence of a polyclonal or allogeneic T cell stimulus did not induce significant proliferation in the CD25⁺ or CD25⁻ T cell subset (data not shown).

25 Example 2: CD4⁺CD25⁺ T Cells exhibit distinct phenotypical differences to CD4⁺CD25⁻ T Cells.

To further characterize the CD25⁺CD4⁺ T cell population, the expression of various surface molecules on CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ was compared with

30 that on stimulated CD4⁺CD25⁻ T cells (Fig. 1B). All three populations showed homogenous expression of CD3 and CD4. No contaminating cells such as monocytes, B cells, CD8⁺ T cells or NK cells could be observed by

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

22

FACS analysis (data not shown). Without prior stimulation, i.e. *ex vivo* the CD25⁺ population already expressed high levels of intracellular, and low levels of cell surface CTLA-4 (CD152). *Ex vivo* isolated CD4⁺CD25⁺ T cells furthermore constitutively expressed CD122 (IL-2R beta chain), HLA-DR (5 (~ 50%) and consisted primarily (~ 80%) of CD45RO cells resembling a memory T cell phenotype. In sharp contrast, the *ex vivo* isolated CD4⁺CD25⁻ T cells did not express CTLA-4 (neither intracellularly nor on the surface), CD122, or HLA-DR, and more cells expressed CD45RA rather than CD45RO. Following activation with plate bound anti-CD3 + soluble anti-CD28, however, most CD4⁺CD25⁻ became strongly CD25⁺ (the level of CD25 expression was about 1 log higher, compared to the CD4⁺CD25⁺ T cells, data not shown), and displayed high levels of HLA DR and CD122 (again about 1 log higher compared to CD4⁺CD25⁺ T cells) as to be expected. In addition, both intracellular and surface CTLA-4 was upregulated within 24–48 h yet quickly downregulated thereafter (Fig. 1C) as expected. The kinetics of CTLA-4/CD152 expression proved strikingly different when CD4⁺CD25⁺ T cells were stimulated. These cells also upregulated their (constitutively already present albeit low) CD152 surface expression, yet the strong expression of CD152 remained constant for a period of more than 1 week (Fig. 1C). Staining with several other mAb such as anti CD28, CD62L, CD69, CD95, CD95L, CD154 (CD40L) did not reveal reproducible and significant differences between CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells.

25 Examples 3: CD4⁺CD25⁺ T Cells If stimulated via the TCR suppress the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T Cells in a cell contact- and dose-dependent manner.

To analyze the putative regulatory properties of CD25⁺ T cells coculture experiments were performed. In a first series of tests we isolated from a particular donor both the total CD4⁺ population and the CD25⁺ and CD25⁻ fractions. Whole CD4⁺ T cells were then mixed with CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁻ T cell subpopulations at indicated ratios, and stimulated with

WO 02/072799

23

PCT/EP02/02671

allogeneic mature DC (Fig. 3A). CD4⁺CD25⁺ T cells significantly inhibited the proliferation of whole CD4⁺ T cells, and at a 1:1 ratio virtually blocked it (cpm then represented the background levels of CD25⁺ T cell proliferation, see Fig. 2A-D). The addition of CD25⁻ T cells instead of CD25⁺ T cells slightly enhanced proliferation (not shown). As CD4⁺CD25⁻ rapidly expressed CD25 and CD122, i.e. both chains of the IL-2R, upon polyclonal (see Fig. 1B) as well stimulation by allogeneic DC (data not shown) this finding indicated that the suppressive activity of the CD4⁺CD25⁺ T cell subset was not simply due to consumption or passive adsorption of IL-2 via their IL-2R. CD4⁺CD25⁺ T cells exerted also a suppressive activity on whole CD8⁺ T cells albeit downregulation was less intense (Fig. 3B).

In a further set of experiments it was determined whether activation of CD4⁺CD25⁺ T cells by syngeneic DC was sufficient for induction of their regulatory properties. To this end mature DC and CD4⁺CD25⁺ T cells were generated/isolated from the same donor (donor I). In addition, whole CD4⁺ T cells as well as the CD4⁺CD25⁺ T cell subset were isolated from another donor (donor II). The whole CD4⁺ T cells (donor II) were then stimulated with allogeneic mature DC (donor I) in the absence (Fig. 3C, CD4⁺ only) or presence of various numbers of CD4⁺CD25⁺ T cells isolated from either donor I or donor II (Fig. 3C). Whole CD4⁺ T cells from donor II proliferated vigorously as expected when stimulated with allogeneic, donor I-derived DC (Fig. 3C, CD4⁺ only). In the presence of donor I-derived CD4⁺CD25⁺ T cells (i.e. syngeneic to the DC used) the proliferation (i.e. alloreactivity) of whole donor II-derived CD4⁺ T cells was not suppressed at all (Fig. 3C). Potent suppression occurred, however, when donor II-derived CD4⁺CD25⁺ T cells (i.e. allogeneic to the DC used) were added (Fig. 3C). Suppression was also observed in experiments where DC, whole CD4⁺ T cells, and CD4⁺CD25⁺ T cells were derived from three different donors. These data indicated that TCR-mediated activation of CD4⁺CD25⁺ T cells was required to let them exert their regulatory function, and that syngeneic DC were insufficient to induce their suppressive activity.

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

24

Next, Transwell chamber experiments were performed to investigate, whether the regulatory function of the CD4⁺CD25⁺ T cells was mediated primarily by soluble factors or required cell-cell contact (Fig. 3D). As shown in Fig. 3D the CD4⁺CD25⁺ T cells suppress proliferation of whole CD4⁺ T cells almost completely in the presence of allogeneic DC. Separation of the two populations in Transwell chambers virtually abolished their suppressive effect. These observations suggested that direct cell contact is essential for the inhibitory capacity of CD4⁺CD25⁺ T cells, as the semipermeable membrane of Transwell chambers allows free passage of soluble factors, but excludes direct cell contact. The Transwell experiments also confirmed that consumption of IL-2 by CD4⁺CD25⁺ T cells was not the mechanism responsible for suppression.

Despite the obvious requirement for close interaction between regulatory and responding cells neither a targeting of the antigen-presenting DC or a role of soluble factors was excluded by the Transwell experiments. Therefore, a plate-bound anti-CD3 Ab (in combination with soluble anti CD28 Ab) was also employed as an antigen presenting cell-independent and polyclonal T cell stimulus. Whole CD4⁺ T cells alone showed strong proliferation upon this stimulation. As mentioned above (Fig. 2D) CD4⁺CD25⁺ T cells did not proliferate. In coculture of both populations, there was at least a 75% reduction at a 1:1 ratio compared to control (data not shown). These data suggested, that regulation does not primarily occur via modulation of APC function. Neutralizing antibodies to the cytokines IL-10 and TGF- β (critical for the suppressive activities of the so-called Tr1 and Th3, respectively (Groux, H. et al., *Nature*, 389:737-742 (1997); Fukaura, H. et al., *J. Clin. Invest.*, 98:70-77 (1996)) did not abolish the regulatory activity of the CD4⁺CD25⁺ T cells demonstrating that these cytokines played no major suppressive role at least in the assays we looked at. The addition of IL-2 and/or IL-15 to cocultures at the high doses that promote the proliferation of CD4⁺CD25⁺ T cells (see Fig.

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

25

2D) reduced their inhibitory effects. The suppressive activity was, however, likely not abolished as the significant proliferation of the CD4⁺CD25⁺ T cells has to be taken into account when interpreting the data (Fig. 3D)

5

Example 4: CD4⁺CD25⁺ T Cells predominantly secrete IL-10.

To analyze and compare the cytokine profiles freshly sorted CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were activated with plate-bound anti CD3 + anti CD28. Supernatants were then analyzed by ELISA, and RNA expression was studied by RNase protection assays. In addition, intracellular cytokine staining was performed to determine the percentage of cells releasing a certain cytokine. As shown in Fig. 4 CD4⁺CD25⁻ T cells predominantly secreted IFN- γ and IL-2, with little secretion of IL-10 and IL-4, resembling a Th1 like profile. CD4⁺CD25⁺ T cells on the other hand predominantly produced IL-10 and only low levels of IL-2, IL-4 and IFN- γ , resembling Tr1 cells. Comparison of both subpopulations at the RNA level revealed, that CD25⁺ T cells express more IL-10, less IFN- γ and similar levels of IL-2 mRNA compared to CD25⁻ T cells. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) mRNA was found predominantly in CD4⁺CD25⁺ T cells, while significant IL-1 β mRNA levels were only present in CD4⁺CD25⁻ T cells. TGF- β was expressed at similarly low levels in both cell types.

Example 5: Activated and afterwards fixated CD4⁺CD25⁺ T cells still exhibit regulatory capacity.

CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells were isolated from whole CD4⁺ T cells from adult blood by MACS[®] sorting as described. CD4⁺CD25⁺ T cells were divided into three parts. One fraction was activated with 10 μ g/ml platebound anti-CD3 and 10 μ g/ml soluble anti-CD28 antibodies overnight. Next day this fraction and one part of the non activated CD4⁺CD25⁺ T cells were fixed with 2% formaldehyde for 1 hour. The third part was left untreated. Cells were washed three times.

Unfixed CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells alone and CD4⁺CD25⁺ T cells

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

26

of each fraction, mixed at a 1:1 ratio with CD4⁺CD25⁻ T cells, were activated with immobilized anti-CD3 and soluble anti-CD28. After 5 days proliferation was measured by [³H]Tdr incorporation. A representative of 5 independent experiments is shown in Fig. 5 where the symbols represent the following:

CD4⁺CD25⁻ unfixed CD4⁺CD25⁻ cells
CD4⁺CD25⁺ unfixed CD4⁺CD25⁺ cells
Reg. 1:1 unfixed CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells at a 1:1 ratio
10 Reg.1:1
CD25+ stim fix activated fixed CD4⁺CD25⁺ T cells and unfixed
CD4⁺CD25⁻ T cells at a 1:1 ratio
Reg.1:1
CD25+ fix non activated fixed CD4⁺CD25⁺ T cells and unfixed
15 CD4⁺CD25⁻ T cells at a 1:1 ratio

WO 02/072799

27

PCT/EP02/02671

CLAIMS

1. Suppressive and/or regulative human CD4⁺CD25⁺ T cells.
- 5 2. The T cells according to claim 1 which are isolatable from human peripheral blood, preferably by suitable monoclonal antibodies and using magnetic separation or immunoadsorption methods.
3. The cells according to claim 1 or 2 which are CTLA-4⁺ and possess
10 regulatory properties.
4. A method for expanding CD4⁺CD25⁺ T cells as defined in any one of claims 1 to 3, which method comprises stimulating the cells with a T cell stimulating agent or with antigen-presenting cells *ex vivo* and *in vivo*.
15
5. The method of claim 4, wherein the T cell stimulating agent is a composition comprising
 - (a) anti-CD3 and/or anti-CD28 ligands/monoclonal antibodies, including superagonistic antibodies,
 - 20 (b) a ligand/antibody to T cell receptors on the surface of CD4⁺CD25⁺ T cells or to T cell receptor components; or
 - (c) MHC-peptide complexes binding to the T cell receptors expressed on the surface of regulatory T cells; or
 - (d) a phorbol ester and a calcium ionophor.
25
6. The method of claim 4 wherein the antigen-presenting cells are selected from autologous, non-autologous, artificial antigen-presenting cells, etc., preferably the antigen presenting cells are dendritic cells.
- 30 7. The method according to any one of claims 4 to 6, wherein the T cell stimulating agent and antigen-presenting cells are used together with IL2 and/or IL-5, IL-7 and/or IL-9, IFN- α and/or IL-10.

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

28

8. Expanded human CD4⁺ CD25⁺ T cells obtainable by the method according to any one of claims 4 to 7.
- 5 9. The expanded human CD4⁺CD25⁺ T cells of claim 8 which are fixated CD4⁺CD25⁺ cells, preferably obtainable by *ex vivo* treatment with paraformaldehyde.
- 10 10. A pharmaceutical composition comprising the human CD4⁺CD25⁺ T cells according to any one of claims 1 to 3, 8 or 9.
11. Use of CD4⁺CD25⁺ T cells according to any one of claims 1 to 3, 8 or 9 for preparing a regulatory medicament.
- 15 12. A method to identify, monitor and/or remove CD4⁺CD25⁺ T cells from human blood and other tissues *ex vivo* or *in vivo*, which method comprises (i) utilizing agents/ligands specifically binding to the CD4, and/or CD25, and/or CTL-A4 (CD154) entities on the T cells, preferably anti-CD4 and/or anti-CD25, and/or anti-CTL-A4 antibodies, and/or
- 20 (ii) utilizing immunoadsorption methods; and/or (iii) utilizing a stimulating agent or antigen presenting cells as defined in claims 4 to 7.
13. Use of a T cell stimulating agent or antigen presenting cells as defined in claims 5 to 7 for preparing an agent to induce regulatory CD4⁺CD25⁺ T
- 25 cells *in vivo*, preferably for preparing an agent for treating autoimmune diseases in a patient.
14. Use of CD4⁺CD25⁺ T cells according to any one of claims 1 to 3, 8 or 9
- 30 (a) in assays that will allow to identify other growth and/or functionally modifying (inhibitory/enhancing)/apoptotic or anti-apoptotic factors

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

29

(b) for identifying molecules expressed by the CD4⁺CD2⁺ T cells including identification of novel molecules on said cells, or if presenting molecules which are deemed pharmaceutically active, or

(c) for identifying precursor cells or progeny of the regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells.

15. Use of the enriched CD4⁺CD25⁺ T cells of claims 1 to 3 or the expanded T cells of claim 8, or the fixated T cells of claim 9 for preparing an agent for adoptive transfer therapy, an agent for treating diseases with enhanced immunity including but not limited to autoimmune diseases, or an agent for preventing/treating transplantation reactions such as graft versus host disease, graft rejections, etc.

16. A method for adoptive transfer therapy which comprises injecting/infusing back into the patients enriched/expanded autologous or non-autologous regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells according to any one of claims 1 to 3, 8 or 9 to prevent or treat any immune reactions that are too strong and/or pathogenic, or to prevent/treat transplantation reactions such as graft versus host disease and graft rejections.

17. A method for preparing CD4⁺CD25⁺ T cells with a particular desired antigen-specific T cell receptor which comprises

(i) activating/stimulating/expanding the CD4⁺CD25⁺ T cells according to any one of claims 1 to 3 with antigen presenting cells, preferably immature or mature dendritic cells (DC), presenting said antigen *in vitro* or *in vivo*; or

(ii) utilizing a ligand/antibody to a particular T cell receptor expressed on (subsets of) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, or a MHC-peptide complex binding to a particular T cell receptor on (subsets of) CD4⁺CD25⁺ T cells.

30

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

30

18. The method of claim 17, wherein the antigen-presenting cells are pulsed/loaded/fed with tissue or any defined or undefined antigens, wherein

5 (i) the defined antigens preferably are autoantigens (including, but not limited to, desmoglein 3 in the case of pemphigus vulgaris, melanA or tyrosinase in case of vitiligo; thyreoglobulin in case of thyreoiditis), foreign antigens (including pathogen-derived antigens such as Hepatitis C), or alloantigens/transplantation antigens, and

10 (ii) the undefined antigens preferably are tissue or cell-derived antigens (including, but not limited to, antigens which are in the form of necrotic or apoptotic cells or tissue derived RNA or hybrids between cells of interest and dendritic cells/antigen presenting cells, other forms of delivery of undefined antigens into dendritic cells or other antigen presenting cells) or pathogen-derived antigens.

15

19. CD4⁺CD25⁺ T cells having a particular desired antigen-specific T cell receptor and being obtainable by the method of claim 17 or 18, or by transfection of a T cell receptor of desired antigen specificity into *ex vivo* isolated or expanded T cells.

20

20. Pharmaceutical composition comprising the T cells of claim 19, preferably said pharmaceutical composition being suitable to treat diseases with enhanced immunity including, but not limited to, autoimmune diseases, graft versus host disease and graft rejections.

25

21. Use of agents specifically binding to the CD4 and/or CD25 and/or CTL-A4 (CD154) entities on the T cells, including but not limited to ligands/antibodies, such as anti-CD25 and/or anti-CTL-A4 mAb, or antibodies or MHC-peptide complexes or other ligands binding to T cell receptors on (subsets of) CD4⁺CD25⁺ T cells for preparing a medicament for removal or functional impairment of CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo* in order

30

WO 02/072799

PCT/EP02/02671

31

to enhance immune responses, including dampen regulation by CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo*, for example, to enhance tumor immunity.

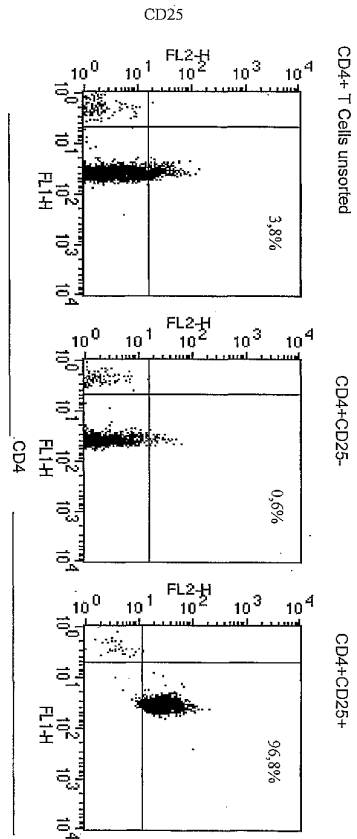


Fig. 1A

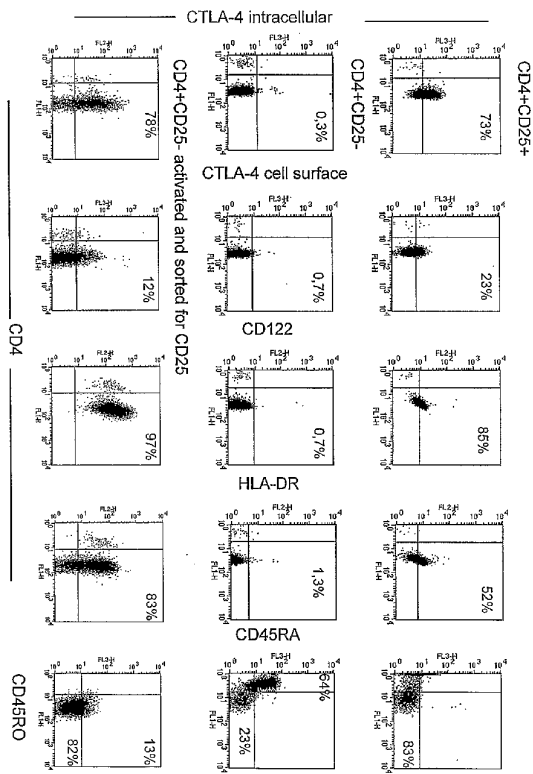


Fig. 1B

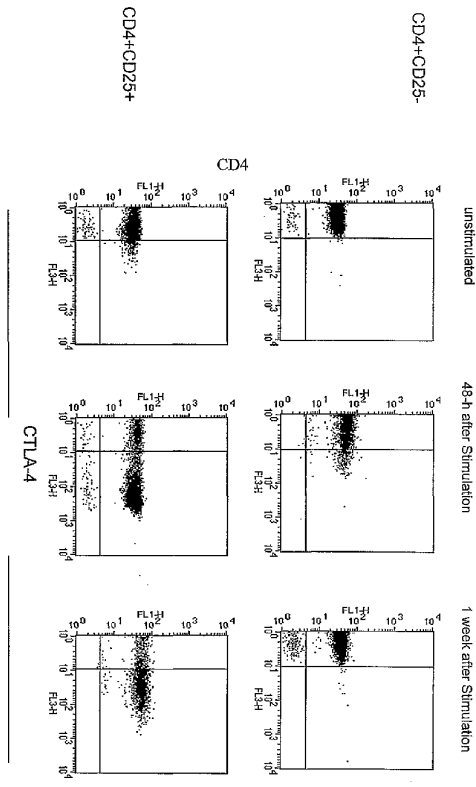


Fig. 1C

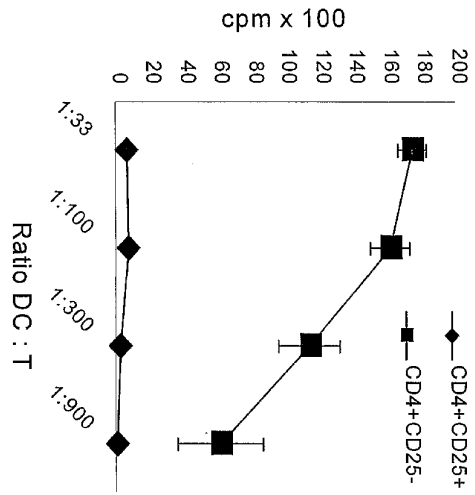


Fig. 2A

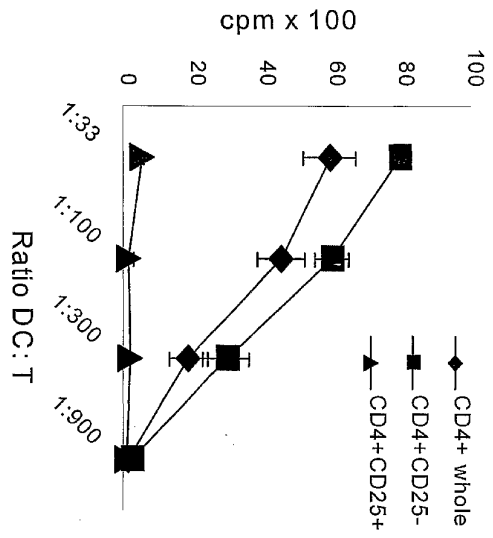


Fig. 2B

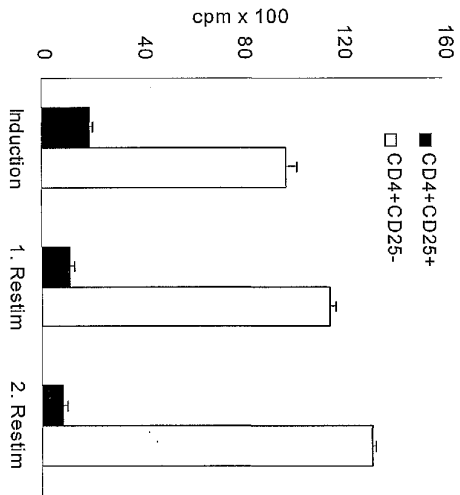
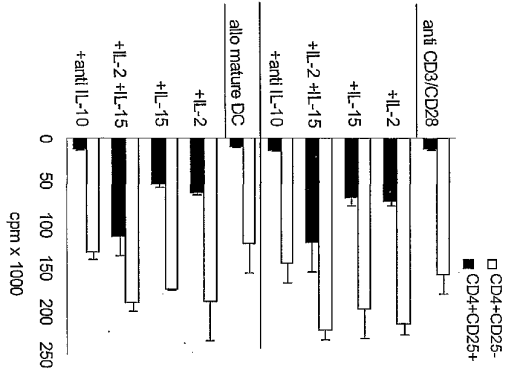


Fig. 2C

Fig. 2D



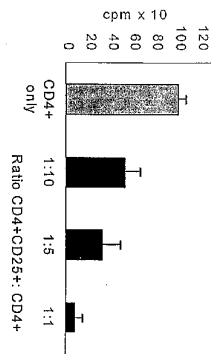


Fig. 3A

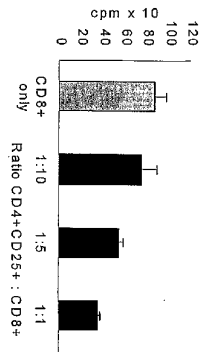


Fig. 3B

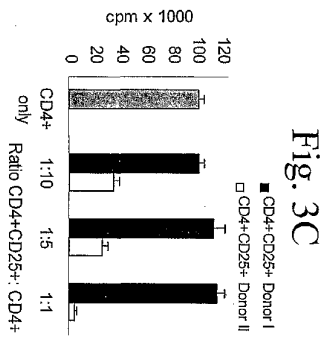


Fig. 3C

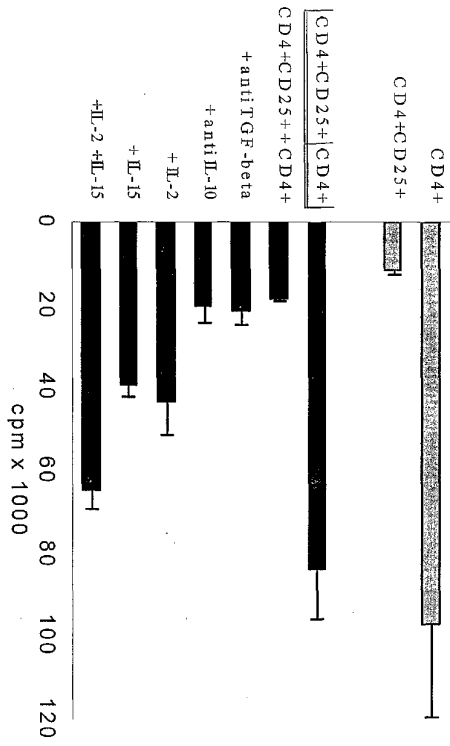


Fig. 3D

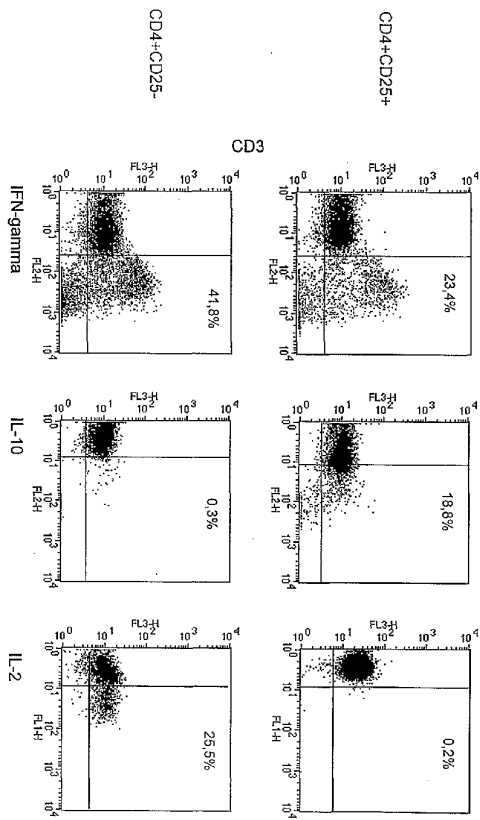


Fig. 4A

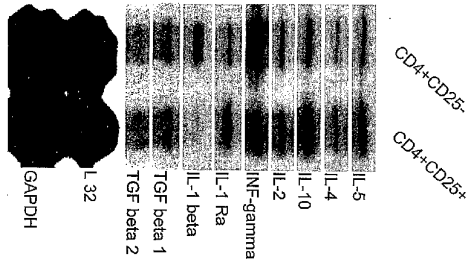


Fig. 4B

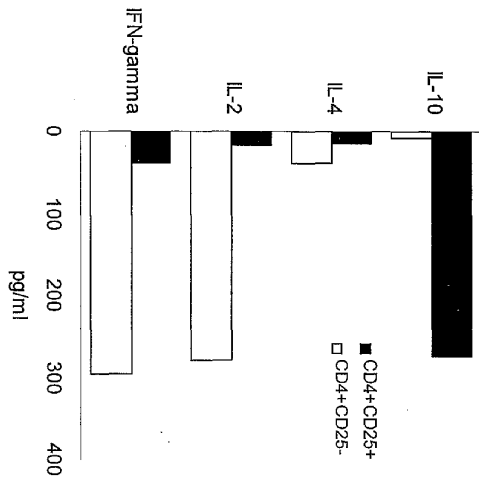


Fig. 4C

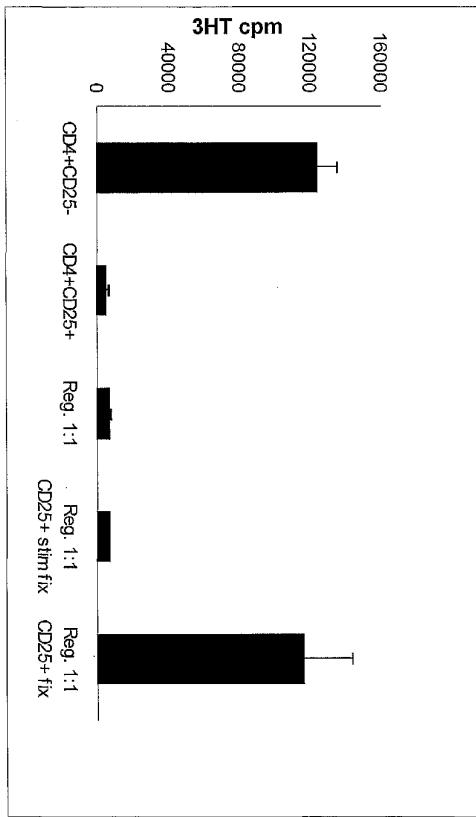


Fig.5

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/02671
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/06 A61K35/14 G01N33/50 A61P37/06 A61P37/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C12N G01N A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, CANCERLIT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JONULEIT H: ET AL.: "Induction of interleukin-10 producing nonproliferative CD4+ cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J. EXP. MED., vol. 192, no. 9, 2000, pages 1213-1222, XP002174069	1-4,6,8
Y	* see abstract, page 1214 left col., page 1219 right col. and page 1220 last paragraph *	1-21
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
25 July 2002	31/07/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5816 Patentian 2 NL - 2200 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Merckling, V	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter- al Application No
 PCT/EP 02/02671

C:(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 42856 A (NISHIDA TOMOMI ; SCHEPENS EYE RES INST (US); TAYLOR ANDREW W (US)) 27 July 2000 (2000-07-27)	1-20
Y	* see claims 1-10, pages 8-9 and 14, page 23 lines 14-16, page 29 lines 15-16 *	1-21
X	DE JONG R. ET AL.: "Differential effect of TGF-beta1 on the activation of human naive and memory CD4+ T lymphocytes." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 6, no. 4, 1994, pages 631-638, XP000604735 * see abstract, tables 1-3 and page 632 right col. *	1-5,7,8,12
X	WO 98 56417 A (KNECHTLE STUART J ; KIRK ALAN D (US); US NAVY (US); HARLAN DAVID M) 17 December 1998 (1998-12-17)	13
Y	* see claims 1-2 and page 5 *	1-21
Y	TAKAHASHI T. ET AL.: "Immunologic self-tolerance maintained by CD4+CD25+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J. EXP. MED., vol. 192, no. 2, 2000, pages 303-309, XP002174070 * see abstract and page 307 last paragraph *	1-21
Y	SHIMIZU J. ET AL.: "Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity." J. IMMUNOL., vol. 163, no. 10, 1999, pages 5211-5218, XP002174071 * see abstract, page 5216 right col., page 5217 last paragraph *	21
X	WO 93 02108 A (IDEC PHARMA CORP) 4 February 1993 (1993-02-04) * see claims 53,55 and 58 *	21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/EP 02/02671
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 4-7, 12, 14, 16-18 and 20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

 International Application No
 PCT/EP 02/02671

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0042856	A	27-07-2000	AU 3212900 A	07-08-2000
			EP 1150570 A1	07-11-2001
			WO 0042856 A1	27-07-2000
			US 2002090724 A1	11-07-2002
WO 9856417	A	17-12-1998	AU 735592 B2	12-07-2001
			AU 7494098 A	11-12-1998
			AU 7956798 A	30-12-1998
			BG 103948 A	31-07-2000
			BR 9809641 A	11-07-2000
			CN 1261284 T	26-07-2000
			EE 9900528 A	15-06-2000
			EP 0980259 A1	23-02-2000
			EP 1009432 A1	21-06-2000
			HU 0003392 A2	28-08-2001
			JP 2002504120 T	05-02-2002
			JP 2002500648 T	08-01-2002
			NO 995617 A	17-01-2000
			NZ 500974 A	29-06-2001
			PL 336994 A1	31-07-2000
			SK 156099 A3	12-06-2000
			TR 9902817 T2	21-09-2000
			WO 9852606 A1	26-11-1998
			WO 9856417 A1	17-12-1998
			WO 9302108	A
AU 673499 B2	14-11-1996			
AU 2425592 A	23-02-1993			
BG 62656 B1	28-04-2000			
BG 98411 A	28-02-1995			
BR 9206313 A	11-04-1995			
CA 2114015 A1	04-02-1993			
CZ 9400149 A3	13-07-1994			
CZ 289472 B6	16-01-2002			
EP 0605442 A1	13-07-1994			
FI 940336 A	10-03-1994			
HU 70272 A2	28-09-1995			
HU 211881 B3	28-12-1995			
IE 922437 A1	27-01-1993			
JP 3048640 B2	05-06-2000			
JP 6509708 T	02-11-1994			
KR 137806 B1	30-04-1998			
MX 9204374 A1	01-03-1993			
NO 940219 A	25-03-1994			
NZ 243706 A	26-08-1994			
OA 9879 A	15-09-1994			
PT 100735 A, B	29-10-1993			
RO 116404 B1	30-01-2001			
RU 2170256 C2	10-07-2001			
SG 67924 A1	19-10-1999			
SK 8894 A3	07-09-1994			
TW 393489 B	11-06-2000			
WO 9302108 A1	04-02-1993			
US 5658570 A	19-08-1997			
US 5756096 A	26-05-1998			
US 5750105 A	12-05-1998			
US 5681722 A	28-10-1997			
US 5693780 A	02-12-1997			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/02671

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9302108	A	US 6136310 A ZA 9205615 A	24-10-2000 28-04-1993

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	K
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/53	Y

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100093676

弁理士 小林 純子

(72)発明者 シューラー, ジェロルド

ドイツ連邦共和国 9 1 0 8 0 スパルドルフ, アム ベイルチェンバーク 2 5

(72)発明者 ディックマン, デトレフ

ドイツ連邦共和国 9 1 0 8 0 ウッテンルース, ライプジガー シュトラーセ 1 6

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CA18 CA25 CB01 FB03

4B063 QA18 QQ03 QQ08 QQ96 QS33

4B065 AA93 BA30 BD50 CA44

4C087 AA01 AA02 AA04 BB63 MA66 NA14 ZB07 ZB26 ZC78

专利名称(译)	来自人血液的CD4 + CD25 +调节性T细胞		
公开(公告)号	JP2004529631A	公开(公告)日	2004-09-30
申请号	JP2002571855	申请日	2002-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	舒勒Jero场 SCHULER格罗尔德		
申请(专利权)人(译)	舒勒, 格罗尔德 Merikkusu BioScience公司		
[标]发明人	シューラージェロルド ディックマンデトレフ		
发明人	シューラー,ジェロルド ディックマン,デトレフ		
IPC分类号	A61K35/12 A61K35/17 A61P37/00 A61P37/04 A61P37/06 C12N5/0783 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N5/06 A61K35/14		
CPC分类号	A61K35/17 A61K2035/122 A61K2035/124 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 C12N5/0636 C12N2500/14 C12N2501/01 C12N2501/23 C12N2501/51 C12N2501/515 G01N33/5002 G01N33/505 G01N2333/70596		
FI分类号	C12N5/00.E A61K35/14.Z A61P37/00 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.K G01N33/50.Z G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CA18 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/FB03 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ96 4B063/QS33 4B065/AA93 4B065/BA30 4B065/BD50 4B065/CA44 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA04 4C087/BB63 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB07 4C087/ZB26 4C087/ZC78		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 小林顺子		
优先权	2001106033 2001-03-12 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[问题] [解决方案] 本发明提供抑制性和/或调节性人CD4+CD25+T细胞, 使细胞扩增的方法以及抑制性和/或调节性人CD4+CD25+T细胞。 并利用扩增的T细胞作为调节剂。

【 図 1 】

