



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1852730 B

(45) 授权公告日 2012.05.30

(21) 申请号 200480026602.9

(22) 申请日 2004.09.09

(30) 优先权数据

10/662,906 2003.09.15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.03.15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/029520 2004.09.09

(87) PCT申请的公布数据

W02005/027831 EN 2005.03.31

(73) 专利权人 台医生物科技合作团体

地址 荷兰阿姆斯特丹

(72) 发明人 林荣华 张重男

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 刘慧 杨青

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006.01)

(56) 对比文件

US 5840679 A, 1998.11.24, 摘要.

Sylvie Trembleau et

al. Pancreas-infiltrating Th1 cells and
diabetsdevelopinIL-12-Deficient nonobese
diabetic mice. The journal of immunology163
5. 1999, 163(5), 2960-2968.

Tadayuki Yago et al. IL-12

promotes the adhesion of NK cells
to endothelialselectins under flow
conditions. The journal of immunology161
3. 1998, 161(3), 1140-1145.

审查员 黄磊

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 10 页

(54) 发明名称

P-选择素糖蛋白配体 1 的调节剂

(57) 摘要

本发明涉及与 T 细胞或天然杀伤 (NK) 细胞的表面上的 P-选择素糖蛋白 1 (PSGL-1) 结合的多聚体化合物可用于诱导 T 细胞或 NK 细胞耗竭和 / 或用于诱导 T 细胞或者 NK 细胞的细胞程序死亡。本发明的多聚体化合物和方法可用于控制在如炎症性疾病、自身免疫疾病、移植排斥、和变应性疾病的疾病状况中的不需要的由 T 细胞或 NK 细胞介导的免疫应答。

1. 与 T 细胞表面上的至少两个 P- 选择素糖蛋白配体 1 (PSGL-1) 蛋白结合的多聚体化合物在制备用于预防或减少在被诊断为患有以过度的或不需要的由 T 细胞介导的免疫应答为特征的疾病状况、或处在患有该疾病状况的危险下的个体中的由 T 细胞介导的免疫应答的药物中的应用,所述多聚体化合物不是抗 PSGL-1 抗体,其中多聚体化合物包括两个多肽链,两个多肽链中的每个多肽链包括 (i) 与 PSGL-1 结合的结合结构域,所述结合结构域选自 P- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、E- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、以及抗 PSGL-1 抗体或其 PSGL-1 结合片段的抗原结合结构域,和 (ii) 异源氨基酸序列,其中两个多肽链通过两个异源氨基酸序列连接形成多聚体化合物,其中多聚体化合物与活化的 T 细胞表面上的至少两个 PSGL-1 蛋白的结合诱导引起活化的 T 细胞死亡的信号转导途径,从而预防或减少个体中由 T 细胞介导的免疫应答。

2. 权利要求 1 的应用,其中多聚体化合物为同型多聚体化合物。

3. 权利要求 1 的应用,其中多聚体化合物为异型多聚体化合物。

4. 权利要求 1 的应用,其中异源氨基酸序列包括细胞表面受体结合区。

5. 权利要求 1 的应用,其中两个结合结构域中的至少一个包括 P- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段。

6. 权利要求 1 的应用,其中两个结合结构域中的至少一个包括 E- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段。

7. 权利要求 1 的应用,其中两个结合结构域中的至少一个包括抗 PSGL-1 抗体的抗原结合结构域或其 PSGL-1 结合片段。

8. 权利要求 1 的应用,其中两个多肽链通过两个异源氨基酸序列共价连接形成多聚体化合物。

9. 权利要求 8 的应用,其中两个多肽链通过二硫键共价连接。

10. 权利要求 1 的应用,其中异源氨基酸序列包括免疫球蛋白重链恒定区。

11. 权利要求 1 的应用,其中多聚体化合物与至少两个 PSGL-1 蛋白结合以诱导引起 T 细胞死亡的信号转导途径另外包括通过药物与多聚体化合物结合,所述药物通过异源氨基酸序列与多聚体化合物结合并诱导 T 细胞表面上的多个 PSGL-1 抗原交联。

12. 权利要求 1 的应用,其中个体被诊断为患有炎性疾病。

13. 权利要求 1 的应用,其中个体被诊断为患有自身免疫疾病。

14. 权利要求 1 的应用,其中个体已接受或预期接受同种异型或异种移植物。

15. 权利要求 1 的应用,其中个体被诊断为患有变应性疾病。

16. 权利要求 1 的应用,其中个体被诊断为患有 T 细胞癌症。

17. 权利要求 1 的应用,进一步地其中检测在给药多聚体化合物之前在取自个体的第一生物样品中的 T 细胞数并将结果与在给药多聚体化合物之后在取自该个体的第二生物样品中的 T 细胞数相比较。

18. 权利要求 1 的应用,进一步地其中检测在给药多聚体化合物之前在取自个体的第一生物样品中的 T 细胞的生物活性并将结果与在给药多聚体化合物之后在取自该个体的第二生物样品中的 T 细胞的生物活性相比较。

19. 权利要求 1 的应用,进一步地其中给药引起个体中活化的 T 细胞的至少 10% 耗竭。

20. 与天然杀伤 (NK) 细胞的表面上的至少两个 P- 选择素糖蛋白配体 1 (PSGL-1) 蛋白

结合的多聚体化合物在制备通过在 NK 细胞的表面上提供 NK 细胞表达 PSGL-1 并使 NK 细胞接触所述制剂而诱导 NK 细胞死亡的制剂中的应用,所述多聚体化合物不是抗 PSGL-1 抗体,其中多聚体化合物包括两个多肽链,两个多肽链中的每个多肽链包括 (i) 与 PSGL-1 结合的结合结构域,所述结合结构域选自 P- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、E- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、以及抗 PSGL-1 抗体或其 PSGL-1 结合片段的抗原结合结构域,和 (ii) 异源氨基酸序列,其中两个多肽链通过两个异源氨基酸序列连接形成多聚体化合物,其中多聚体化合物与 NK 细胞的表面上的至少两个 PSGL-1 蛋白的结合诱导引起 NK 细胞死亡的信号转导途径。

21. 权利要求 20 的应用,其中多聚体化合物为同型多聚体化合物。

22. 权利要求 20 的应用,其中多聚体化合物为异型多聚体化合物。

23. 权利要求 20 的应用,其中异源氨基酸序列包括细胞表面受体结合区。

24. 权利要求 20 的应用,其中两个结合结构域中的至少一个包括 P- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段。

25. 权利要求 20 的应用,其中两个结合结构域中的至少一个包括 E- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段。

26. 权利要求 20 的应用,其中两个结合结构域中的至少一个包括抗 PSGL-1 抗体的抗原结合结构域或其片段。

27. 权利要求 20 的应用,其中两个多肽链通过两个异源氨基酸序列共价连接形成多聚体化合物。

28. 权利要求 27 的应用,其中两个多肽链通过二硫键共价连接。

29. 权利要求 20 的应用,其中异源氨基酸序列包括免疫球蛋白重链恒定区。

30. 权利要求 20 的应用,其中多聚体化合物与至少两个 PSGL-1 蛋白结合以诱导引起 NK 细胞死亡的信号转导途径另外包括使多聚体化合物接触药物,所述药物通过异源氨基酸序列与多聚体化合物结合并诱导 NK 细胞表面上的多个 PSGL-1 抗原交联。

31. 权利要求 20 的应用,进一步地其中在接触多聚体化合物之后评价 NK 细胞的生存力。

32. 权利要求 20 的应用,进一步地其中在接触多聚体化合物之后评价 NK 细胞的生物活性。

33. 试剂盒,其包括:

与 T 细胞表面上的至少两个 PSGL-1 蛋白结合的多聚体化合物,所述多聚体化合物不是抗 PSGL-1 抗体,其中多聚体化合物包括两个多肽链,两个多肽链中的每个多肽链包括 (i) 与 PSGL-1 结合的结合结构域,所述结合结构域选自 P- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、E- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、以及抗 PSGL-1 抗体或其 PSGL-1 结合片段的抗原结合结构域,和 (ii) 异源氨基酸序列,其中两个多肽链通过两个异源氨基酸序列连接形成多聚体化合物,其中多聚体化合物与 T 细胞表面上的至少两个 PSGL-1 蛋白的结合诱导引起 T 细胞死亡的信号转导途径;和

使用该化合物治疗炎症、自身免疫、移植排斥、变应性疾病状况、或 T 细胞癌症的指导说明。

P- 选择素糖蛋白配体 1 的调节剂

技术领域

[0001] 本发明涉及用于控制免疫应答的组合物和方法。

背景技术

[0002] 对不需要的免疫应答的控制疾病如炎症性疾病、自身免疫疾病、移植排斥、变应性疾病和 T 细胞由来的癌症的治疗中是关键问题。过度攻击性 T 细胞的活性可通过免疫抑制、或通过诱导免疫耐受性而得到控制。耐受性的定义是其中使得免疫系统对抗原无反应的状态，而降低对抗原的免疫应答的免疫抑制通常需要持续使用药物。在器官移植中，T 细胞在对同种抗原的免疫应答中起到重要作用。目前的免疫抑制方案通常涉及使用皮质类固醇、环孢菌素、或雷帕霉素，其阻断作为 T 细胞关键生长因子的 IL-2 的转录、或者抑制 IL-2 依赖性增殖。然而，已经有许多单克隆抗体，其或为 T 细胞耗竭剂（如 CD3、CD4、CD8），或为 T 细胞的细胞因子信号或协同刺激（co-stimulatory）通道的抑制剂（如 CD25、B7-1、B7-2、CD152、CTLA4），在减少排斥发生率中表现出有效性并且具有有限的副作用或毒性。这些药物中的一些已经在治疗自身免疫病和延长移植植物存活中表现出一定程度的成功。

[0003] 认为细胞程序死亡对于维持免疫系统的适当功能具有至关重要的重要性，并且是除去不需要的细胞的主要机制（Kabelitz 等人，*Immunol. Today* 14 :338-340(1993)；Raff, *Nature* :356 :397-399(1992)）。来源于细胞内部或外部的多种信号影响细胞的生存和死亡。抗 T 细胞表面分子的抗体如 Fas（或 CD95，MW = 43kD）、TNFR2（MW = 75kD）、CD2（MW = 45kD）和 CTLA-4（MW = 33kD）诱导 T 细胞的细胞程序死亡（Osborne, *Curr. Opin. Immunol.*, 8 :245-248(1996)；Lin 等人，*J. Immunol.*, 158 :598-603(1997)；Zhang 等人，*Nature* :377 :348-350(1995)；Lai 等人，*Eur. J. Immunol.*, 25 :3243-3248(1995)；Mollereau 等人，*J. Immunol.* 156 :3184-3190(1996)；Gribben 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*92 :811-815(1995)）。使用 Fas 和 TNFR2 分子控制不需要的 T 细胞的努力已经被这两种分子不仅在免疫细胞上表达而且在几种其它重要器官系统如肝脏上表达的事实而受到阻碍。这种表达模式潜在地限制这两种抗体的治疗应用（Ogasawara 等人，*Nature* 364 :806-809(1993)；Pfeffer 等人，*Cell* :73 :457-467(1993)；Engelmann 等人，*J. Biological Chemistry*265 :14497-14504(1990)）。

[0004] 选择素、整联蛋白和免疫球蛋白（Ig）超家族成员是对于白细胞和血小板与其自身或与胞外基质和血管内皮的相互作用来说重要的三种主要类别的粘附分子（Springer, *Nature* 346 :425(1990)；Osborn, *Cell*162 :3(1990)；Hynes, *Cell* 69 :11(1992)）。属于一种细胞类型的粘附分子经常与在不同细胞类型上表达的另一粘附分子结合，形成配体 - 受体对。

[0005] 选择素家族包括 P- 选择素（又名 CD62、CD62P、GMP140、和 PADGEM）、E- 选择素（又名 ELAM-1 和 CD62E）、和 L- 选择素（又名 LECAM-1、Me1-14、LAM-1、和 CD62L）。选择素为高度同源的，包括 120 氨基酸的氨基末端凝集素结构域，EGF 样结构域，不定数目的与在补体调节蛋白中发现的那些同源的多个短共有重复序列（shortconsensus repeat, SCR）结构

域,随后是跨膜结构域和短的胞质尾区 (Siegelman 等人, Science, 243 :1165-1172(1989) ; Lasky 等人, Cell 56 :1045-1055(1989) ;Tedder 等人, J. Exp. Med. 170 :123-133(1989) ; Johnson 等人, Cell 56 :1033-1044(1989) ;Bevilacqua 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :9238-9242(1987), Bevilacqua 等人, Science 243 :1160-1165(1989), Bevilacqua 等人, J. Clin. Invest. 91 :379-387(1993), Camerini 等人, Nature 280 :496-498(1989))。选择素与细胞表面受体有重叠,但是具有不同的特异性 (Bevilacqua 等人, J. Clin. Invest. 91 :379-387(1993) ;Feize, Current Opinion in Struct. Biol. 3 :701-710(1993) ;Berg 等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 184 :1048-1055(1992) ;Foxall 等人, J. Cell Biol. 117 :895-902(1992) ;Larsen 等人, J. Biol. Chem. 267 :11104-11110(1992) ;Polley 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :6224-6228(1991))。

[0006] P-选择素、E-选择素、和L-选择素介导炎症过程中的最初的白细胞-内皮细胞和血小板-白细胞粘附性相互作用 (Bevilacqua 等人, 1993, 同上)。已经证明所有这三种选择素都参与最初的白细胞与活化内皮的“滚动 (rolling)”相互作用 (von Andrian 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :7538-7542(1991) ;Ley 等人, Blood 77 :2553-2555(1991) ;Abassi 等人, J. Clin. Invest. 92 :2719-2730(1993) ;Dore 等人, Blood 82 :1308-1316(1993) ;Jones 等人, Biophys. J. 65 :1560-1569(1993) ;Mayadas 等人, Cell 74 :541-554(1993))。在活化的血小板和内皮细胞上表达的P-选择素结合于大多数白细胞上的细胞表面蛋白 (McEver 等人, J. Biol. Chem. 250 :9799-9804(1984) ;Hsu-Lin 等人, J. Biol. Chem. 264 :8121-9126(1984))。在由细胞因子活化的内皮细胞 (如, 在 TNF- α 或 IL-1 刺激 6-8 小时之后) 上表达的E-选择素结合于大多数白细胞上的细胞表面蛋白 (McEver 等人, J. Clin. Invest. 100 :485-492(1997) ;Bevilacqua 等人, 1987, 同上 ;Bevilacqua 等人, 1989, 同上)。在大多数白细胞上表达的L-选择素结合于一些内皮细胞和其它白细胞上的细胞表面蛋白 (Gallatin 等人, Nature 304 :30-34(1983) ;Berg 等人, Immunol. Rev. 108 :5-18(1989) ;Berg 等人, J. Cell Biol. 114 :343-349(1991), Hallman 等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 174 :236-243(1991) ;Smith 等人, J. Clin. Invest. 87 :609-618(1991) ;Spertini 等人, J. Immunol. 147 :2565-2573(1991))。所有这三种选择素已经表现出结合于细胞表面蛋白 PSGL-1, 该蛋白的表达大部分限于白细胞, 特别是 T 细胞和 NK 细胞。用于与P-选择素、E-选择素、和L-选择素结合需要 PSGL-1 的翻译后修饰 (McEver 等人, J. Clin. Invest. , 1997, 同上)。

发明内容

[0007] 本发明基于可以通过 T 细胞表面抗原 P-选择素糖蛋白配体-1 (PSGL-1) 的结合而耗竭 T 细胞和 / 或诱导 T 细胞经历细胞程序死亡的发现。T 细胞耗竭对于治疗与过度的或不需要的由 T 细胞介导的免疫应答或过度的或不需要的 T 细胞增殖有关的疾病状况的特别有用。例如, T 细胞耗竭可以减少或消除与炎性疾病、自身免疫疾病、移植排斥、变应性疾病、和 / 或 T 细胞由来的癌症有关的不希望的 T 细胞活性或增殖。本发明包括使用 PSGL-1 功能调节剂预防或减少由 T 细胞介导的免疫应答的方法以及筛选 PSGL-1 功能调节剂的方法。

[0008] 在一个方面中, 本发明的特征在于预防或减少个体中由 T 细胞介导的免疫应答的方法。该方法包括以下步骤: 选择个体, 所述个体被诊断为患有以过度的或不需要的由 T 细

胞介导的免疫应答为特征的疾病状况、或处在患有该疾病状况的危险下；和对该个体给药与 T 细胞表面上的 PSGL-1 结合的化合物，其中化合物与 T 细胞表面上的 PSGL-1 的结合诱导引起 T 细胞死亡的信号转导途径，从而预防或减少个体中由 T 细胞介导的免疫应答。

[0009] 这种方法中所用的化合物可包括与 PSGL-1 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在一个实施例中，化合物为与 PSGL-1 特异性结合的单克隆抗体。在一个实施方案中，该方法包括另外的步骤：给药这样的药物，该药物与该单克隆抗体结合并诱导 T 细胞表面上的多个 PSGL-1 抗原交联。

[0010] 在一些实施方案中，该方法包括诱导 T 细胞表面上多个 PSGL-1 抗原交联，其中交联诱导引起 T 细胞死亡的信号转导途径。

[0011] 在一些实施方案中，该方法包括以下步骤：(i) 选择个体，所述个体被诊断为患有以过度的或不需要的由 T 细胞介导的免疫应答为特征的疾病状况、或处在患有该疾病状况的危险下；和 (ii) 对该个体给药与 T 细胞表面上的至少两种 PSGL-1 蛋白结合的多聚体化合物，其中多聚体化合物包含两个多肽链，每个多肽链包括 (a) 与 PSGL-1 结合的结合结构域，和 (b) 异源氨基酸序列，其中多肽链通过异源氨基酸序列连接形成多聚体化合物，并且其中多聚体化合物与 T 细胞表面上的至少两种 PSGL-1 蛋白的结合诱导引起 T 细胞死亡的信号转导途径，从而预防或减少个体中由 T 细胞介导的免疫应答。

[0012] 多聚体化合物可为同型多聚体化合物或异型多聚体化合物。结合结构域可以选择性地包含 P- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、E- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、L- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、抗 PSGL-1 抗体或其 PSGL-1 结合片段、选自噬菌体展示库的 PSGL-1 结合多肽、或上述的任何组合。

[0013] 在某些实施方案中，多聚体化合物不包括抗 PSGL-1 抗体或与 PSGL-1 结合的抗体片段。

[0014] 异源氨基酸序列可以选择性地包含细胞表面受体结合区，如免疫球蛋白重链恒定区。在一些实施方案中，多肽链通过异源氨基酸序列共价连接（如二硫键）形成多聚体化合物。

[0015] 在某些实施方案中，该方法可以包括另外的步骤：对个体给药这样的药物，该药物通过异源氨基酸序列与多聚体化合物结合并诱导 T 细胞表面上的多个 PSGL-1 抗原交联。

[0016] 在一些实施方案中，本文中所述的方法包括选择被诊断为患有自身免疫疾病的个体的步骤。在另一个实施例中，该方法包括选择被诊断为患有炎症疾病的个体的步骤。在另一个实施例中，该方法包括选择已接受或预期接受同种异型或异种移植物的个体的步骤。在另一个实施例中，该方法包括选择被诊断为患有变应性疾病的个体的步骤。在另一个实施例中，该方法包括选择被诊断为患有 T 细胞癌症的个体的步骤。

[0017] 在一些实施方案中，T 细胞为活化的 T 细胞。在一个实施例中，T 细胞为 CD4+T 细胞。在另一个实施例中，T 细胞为 CD8+T 细胞。

[0018] 在一些实施方案中，该方法包括检测在给药化合物（如多聚体化合物）之前取自个体的第一生物样品中的 T 细胞数目并将结果与在给药化合物（如多聚体化合物）之后取自该个体的第二生物样品中的 T 细胞数目相比较的步骤。

[0019] 在一些实施方案中，该方法包括检测在给药化合物（如多聚体化合物）之前取自个体的第一生物样品中的 T 细胞的生物活性目并将结果与在给药化合物（如多聚体化合

物)之后取自该个体的第二生物样品中的 T 细胞的生物活性相比较的步骤。

[0020] 在一些实施方案中,给药引起个体中至少 10% 的活化 T 细胞耗竭。在一些实施方案中,给药引起个体中至少 10%、20%、30%、40%、50%、或更多的活化 T 细胞耗竭。

[0021] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段或多聚体化合物诱导接触所述抗体或其抗原结合片段或多聚体化合物之后的个体中至少 10% 的活化 T 细胞死亡。在一些实施方案中,给药诱导个体中至少 10%、20%、30%、40%、50%、或更多的活化 T 细胞死亡。细胞死亡可以在任何时间测量,如在接触抗体或其抗原结合片段或多聚体化合物之后的一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、或更多天之后测量。

[0022] 在另一个方面中,本发明的特征在于诱导 T 细胞或天然杀伤 (NK) 细胞死亡的方法。该方法包括的步骤为:提供在其细胞表面上表达 PSGL-1 的 T 细胞或 NK 细胞;和使 T 细胞或 NK 细胞与和 T 细胞或 NK 细胞表面上的 PSGL-1 结合的化合物接触,其中所述化合物对 T 细胞或 NK 细胞表面上的 PSGL-1 的结合诱导引起 T 细胞或 NK 细胞死亡的信号转导途径。

[0023] 这种方法种使用的化合物可包括与 PSGL-1 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在一个实施例中,化合物为与 PSGL-1 特异性结合的单克隆抗体。在一个实施方案中,该方法包括使单克隆抗体药物与和该单克隆抗体结合的药物接触并诱导 T 细胞或 NK 细胞表面上的多个 PSGL-1 抗原交联的步骤。

[0024] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:(i) 提供在其细胞表面上表达 PSGL-1 的 T 细胞或 NK 细胞;和(ii) 使 T 细胞或 NK 细胞与和 T 细胞或 NK 细胞表面上的至少两种 PSGL-1 蛋白结合的多聚体化合物接触,其中多聚体化合物包含两个多肽链,每个多肽链包括(a) 与 PSGL-1 结合的结合结构域,和(b) 异源氨基酸序列,其中多肽链通过异源氨基酸序列连接形成多聚体化合物,其中多聚体化合物与 T 细胞或 NK 细胞表面上的至少两种 PSGL-1 蛋白的结合诱导引起 T 细胞或 NK 细胞死亡的信号转导途径。

[0025] 多聚体化合物可为同型多聚体化合物或异型多聚体化合物。结合结构域可以选择性地包含 P- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、E- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、L- 选择素胞外域或其 PSGL-1 结合片段、抗 PSGL-1 抗体或其 PSGL-1 结合片段、选自噬菌体展示库的肽、或上述的任何组合。

[0026] 异源氨基酸序列可以选择性地包含细胞表面受体结合区,如免疫球蛋白重链恒定区。在一些实施方案中,多肽链通过异源氨基酸序列共价连接(如二硫键)形成多聚体化合物。

[0027] 在一些实施方案中,该方法可以包括另外的步骤:使多聚体化合物接触通过异源氨基酸序列与多聚体化合物结合并诱导 T 细胞表面上的多个 PSGL-1 抗原交联的药物。

[0028] 在一些实施方案中,该方法包括诱导 T 细胞或 NK 细胞表面上的多个 PSGL-1 抗原交联的步骤,其中交联诱导引起 T 细胞或 NK 细胞死亡的信号转导途径。

[0029] 在本文中所述方法的一些实施方案中,T 细胞为活化的 T 细胞。在一个实施例中,T 细胞为 CD4+T 细胞。在另一个实施例中,T 细胞为 CD8+T 细胞。

[0030] 在本文中所述方法的一些实施方案中,该方法包括在与化合物(如多聚体化合物)接触之后评价 T 细胞或 NK 细胞的生存力的步骤。

[0031] 在本文中所述方法的一些实施方案中,该方法包括在与化合物(如多聚体化合物)接触之后评价 T 细胞或 NK 细胞的生物活性的步骤。

[0032] 在一些实施方案中,该方法包括诱导活化的 T 细胞死亡。

[0033] 在另一个方面中,本发明的特征在于筛选 PSGL-1 功能调节剂的方法。该方法包括的步骤为:提供在细胞表面上表达 PSGL-1 的细胞;使细胞接触试验物质;和在细胞与试验物质接触之后测量细胞的生存力从而确定试验物质是否为 PSGL-1 功能调节剂。

[0034] 在一个实施方案中,该方法包括检测由试验物质诱导的细胞死亡从而测定试验物质为 PSGL-1 功能调节剂的步骤。

[0035] 在一个实施方案中,试验物质为与 PSGL-1 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在一个实施例中,试验物质为与 PSGL-1 特异性结合的单克隆抗体。在一个实施方案中,该方法包括使单克隆抗体与和单克隆抗体结合并诱导 T 细胞表面上的多个 PSGL-1 抗原交联的药物接触的步骤。

[0036] 在一个实施方案中,该方法包括诱导细胞表面上的多个 PSGL-1 抗原交联的步骤,其中交联诱导引起细胞死亡的信号转导途径。

[0037] 在一个实施方案中,T 细胞为活化的 T 细胞。在一个实施例中,T 细胞为 CD4+T 细胞。在另一个实施例中,T 细胞为 CD8+T 细胞。

[0038] 在一个实施方案中,该方法包括生产散装量 (bulk quantity) 的试验物质并将试验物质配制在可药用载体中的步骤。

[0039] 在另一个方面中,本发明的特征在于包含以下的试剂盒 (kit):与 T 细胞表面上 PSGL-1 结合的化合物,其中化合物与 T 细胞表面上的 PSGL-1 的结合诱导引起 T 细胞死亡的信号转导途径;和使用该化合物治疗与过度的或不需要的由 T 细胞介导的免疫应答或过度的或不需要的 T 细胞增殖有关的疾病状况如炎症、自身免疫、移植排斥、变应性疾病、或 T 细胞癌症的指导说明。

[0040] 在一些实施方案中,试剂盒包含:(i) 与 T 细胞表面上的至少两种 PSGL-1 蛋白结合的多聚体化合物,其中多聚体化合物包含两个多肽链,每个多肽链包括 (a) 与 PSGL-1 结合的结合结构域,和 (b) 异源氨基酸序列,其中多肽链通过异源氨基酸序列连接形成多聚体化合物,并且其中多聚体化合物与 T 细胞表面上的至少两种 PSGL-1 蛋白的结合诱导引起 T 细胞死亡的信号转导途径;和 (ii) 使用该化合物治疗与过度的或不需要的由 T 细胞介导的免疫应答或过度的或不需要的 T 细胞增殖有关的疾病状况如炎症、自身免疫、移植排斥、变应性疾病、或 T 细胞癌症的指导说明。

[0041] 本发明的优点在于其可以诱导 T 细胞耗竭和/或在 T 细胞中诱导细胞程序死亡从而不引起相关的不需要的或有害的免疫应答。例如,在一些实施方案中,对个体给药本文中所述的抗 PSGL-1 抗体或多聚体化合物不产生炎性细胞因子如 IL-2 或 TNF- α 水平的不需要的增高。

[0042] 本发明的另一个优点在于其通过使用诱导 T 细胞的细胞程序死亡的激动剂组合物引起 T 细胞耗竭。因此,本发明提供源于使用通过与免疫受体结合并防止由这种受体介导的免疫活化而起作用的拮抗性组合物(如,拮抗性抗 PSGL-1 抗体或拮抗性可溶性选择素片段)的主动免疫抑制方法而不是被动免疫抑制。

[0043] 本发明的另一个优点在于其可靶向细胞表面蛋白 PSGL-1,其表达大部分限于白细胞,特别是 T 细胞和 NK 细胞。因此,本文中所述的化合物通常不诱导其它细胞类型如肝细胞的显著性细胞程序死亡。靶向 T 细胞和 NK 细胞(在移植排斥中所涉及的重要的 CD3⁺ 细

胞类型)以选择性地耗竭而不显著诱导危及生命的系统性细胞因子应答和破坏其它器官系统是免疫抑制剂的理想特征。

[0044] 除非另外定义,本文中使用的所有的技术和科学术语都具有与本发明所属领域中技术人员通常理解的相同的含义。虽然与本文中所述方法和材料相似或等价的那些可用于本发明的实践或试验,适合的方法和材料描述如下。本文中提及的所有的出版物、专利申请、专利、和其它参考文献都被全文并入本文作为参考。在术语冲突时,以本说明书说明为准。另外所述材料和方法只是说明性的,其不是限制性的。

[0045] 从以下详细说明和权利要求可使本发明的其它特点和优点变得显而易见。

附图说明

[0046] 图 1 描述当活化的 T 细胞获得对由 TAB4(抗 PSGL-1 单克隆抗体)介导的细胞程序死亡信号的敏感性时所进行研究的时间-过程实验的结果。

[0047] 图 2 描述通过 TAB4 抗体识别的抗原的细胞表面生物素酰化和免疫沉淀的结果。

[0048] 图 3 描述 PSGL-1 抗原在脾 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、CD19⁺B 细胞、和 NK 细胞上的表达。

[0049] 图 4 描述 PSGL-1 抗原在 CD4⁺、CD8⁺、和 CD4⁺8⁺、和 CD4⁻8⁻ 胸腺细胞上的表达。

[0050] 图 5 描述在使用从用 TAB4(或仓鼠 Ig)处理的 Balb/c 小鼠种分离的脾细胞作为效应器和 H2-失配的 C3H 脾细胞作为刺激物的混合的淋巴细胞培养物中产生的 IL-2 的水平。

[0051] 图 6 描述表明 (A) 使用 TAB4 抗体进行免疫沉淀的蛋白质可以通过市售的抗 PSGL-1 抗体识别和 (B) 使用抗 PSGL-1 抗体预清除 T 细胞溶解产物可以耗竭由 TAB4 识别的蛋白的蛋白质印迹分析。

[0052] 图 7 描述接受来自 Balb/c 小鼠的皮肤移植并用抗 PSGL-1 抗体(实心的菱形)或对照抗体(空心的正方形)处理的 C57BL/6 小鼠的移植存活百分比。

[0053] 图 8 描述在用抗人 PSGL-1 抗体处理活化的人外周血液单核细胞之后细胞程序死亡的 T 细胞的百分比的时间过程。

[0054] 图 9 描述用抗 PSGL-1 抗体(实心的正方形)或对照抗体(空心的正方形)处理的自身免疫非肥胖糖尿病(NOD)雄性小鼠中的糖尿病发病率。

[0055] 图 10 描述小鼠 P-选择素、E-选择素、和 L-选择素与小鼠的活化的 T 细胞的结合。

[0056] 图 11A-11C 描述由 E-选择素(图 11A)、P-选择素(图 11B)、和 L-选择素(图 11C)的多聚体形式诱导小鼠活化的 T 细胞的细胞程序死亡。

[0057] 图 12 描述由可溶性 P-选择素-Fc 融合蛋白的交联体外诱导小鼠活化的 T 细胞的细胞程序死亡。

[0058] 发明详述

[0059] 本发明涉及通过调节存在于 T 细胞表面上的 PSGL-1 分子的功能而调节 T 细胞活性的方法。PSGL-1 与本文中所述的激动剂组合物结合可以引起 T 细胞耗竭和/或诱导 T 细胞经历细胞程序死亡。因此,这些激动剂组合物可用作控制与免疫有关的疾病状况如炎症性疾病、自身免疫疾病、移植排斥、变应性疾病、和/或 T 细胞由来的癌症的治疗剂。激动剂组合物还可用于引起 T 细胞从其中不期望存在 T 细胞或 T 细胞活性的任何生物样品中的耗

竭。

[0060] PSGL-1 蛋白

[0061] PSGL-1 为在嗜中性白细胞、T 和 B- 淋巴细胞、NK 细胞、单核细胞、树状细胞、和原 (primitive) 人 CD34 造血祖细胞上表达的细胞表面粘附分子。通过其与选择素相互作用的能力,PSGL-1 介导白细胞在内皮上的滚动和白细胞外渗进入发炎组织。由 PSGL-1 介导的 T 细胞与 E- 和 P- 选择素的结合、或迁移得到有区别地调节。例如,CLA(皮肤淋巴细胞抗原) 表位的出现被认为是由于 T 细胞经历从初始到记忆转换而诱导生成。只有活化的辅助细胞 1(helper 1) 而不是辅助细胞 2T 细胞表达功能性 PSGL-1 并且其能够迁移进入皮肤的发炎区域。

[0062] PSGL-1 为必须经过特异性唾液酸化 (sialylated)、岩藻糖化 (fucosylated)、和硫酸化以与 P- 选择素结合的唾液粘蛋白。PSGL-1 分子存在有以在它们的 N- 末端具有不同程度的糖基化和硫酸化位点为特征的同种型。静止的外周血液 T 和 B 细胞、淋巴样细胞系、和体外活化的外周血液 T 细胞表达类似水平的 PGSL-1。然而,只有活化的 T 细胞表现出 PSGL-1 的功能型并且渴望结合于 P- 选择素。这种活化依赖性的结合活性好象是有差别的翻译后修饰的结果,如活化 T 细胞中的高水平 α (1,3) 岩藻糖酰转移酶活性所暗示的。PSGL-1 同种型还对 L- 选择素和 E- 选择素表现出有差别的亲和力。例如,表现出 CLA- 阳性同种型的人 T 细胞可以粘连于 E- 和 P- 选择素并在其上面滚动,而没有 CLA 表位的表达 PSGL-1 的 T 细胞只结合于 P- 选择素。此外,PSGL-1 与 P- 选择素的结合伴随包含三个用于硫酸化的酪氨酸残基和一个用于糖基化的苏氨酸残基的末端十肽的存在而发生。

[0063] PSGL-1 蛋白可通过重组方法制备和 / 或通过从生物材料分离天然的 PSGL-1 蛋白制备。重组 PSGL-1 蛋白可以在原核细胞或真核细胞中在体外或体内产生。可将编码 PSGL-1 的核酸用于蛋白质的重组生产 (例如,编码 PSGL-1 多肽的例子参见 GenBank™ Accession NM 003006)。针对 PSGL-1 的抗体也是公知的并且可用于抗原的纯化 (参见例如,Herron 等人, (2000)Science Jun 2 ;288(5471) :1653-56 ;WO 00/25808) 和 / 或用于本文中所述方法中。PSGL-1 另外在参考文献包括但不限于 Sako 等人 (1993)Cell 75 :1179 ;Vachino 等人 (1995)J. Biol. Chem. 270 :21966 ;和 Veldman 等人 (1995)J. Biol. Chem. 270 :16470 中描述。

[0064] 对于 PSGL-1 的重组生产,PSGL-1 的功能性表达可能需要 PSGL-1 及其修饰的 α (1,3) 岩藻糖基转移酶 Fuc-TVIII 的同时表达。另外或或者,PSGL-1 的重组生产可能伴有除去前肽的编码 PACE 的核酸和 / 或编码酪氨酸磺基转移酶的核酸的共转染。

[0065] 抗 PSGL-1 抗体可用于分离和纯化得自生物材料的 PSGL-1 抗原。可将表达 PSGL-1 蛋白的任何细胞类型如得自个体或 T 细胞系的 T 细胞用作蛋白质的来源。一经纯化,该蛋白质可用于本文中所述的多种方法中。例如,纯化的 PSGL-1 蛋白可用于 T 细胞上的 PSGL-1 功能调节剂的体外筛选或作为免疫原用于制备针对该蛋白质的抗体。

[0066] 抗 PSGL-1 抗体

[0067] PSGL-1 多肽 (或其免疫原片段或类似物) 可用于生成本发明方法中使用的抗体。如上所述,可以通过重组技术生产或使用固相合成方法合成 PSGL-1 多肽或其肽片段。重组 PSGL-1 多肽或其肽片段可用作用于生产抗 PSGL-1 抗体的免疫原。另外,抗 PSGL-1 抗体如 TAB4 单克隆抗体可用于纯化 PSGL-1 多肽如天然构象的 PSGL-1 多肽,然后其可以用作免疫原以生产另外的抗 PSGL-1 抗体。

[0068] 本发明的抗体可为与 PSGL-1 多肽特异性结合的单克隆抗体、多克隆抗体、或工程抗体。与特定抗原如 PSGL-1 多肽“特异性结合”的抗体基本上不识别或结合于样品中的其它分子。因此,本发明的特征还在于通过使多肽与试验化合物接触并测定多肽是否与试验化合物结合(通过直接检测结合、检测破坏试验化合物与多肽的结合的竞争分子、和/或使用细胞程序死亡-诱导活性的试验方法检测结合),从而鉴定与本发明的多肽结合的试验化合物(如抗体)的方法。

[0069] 一般说来,可使 PSGL-1 多肽结合于载体蛋白如 KLH,与助剂混合,和注入到宿主哺乳动物中。然后可通过肽抗原亲和色谱法纯化在该动物中产生的抗体。

[0070] 特别地,不同的宿主动物可以通过注射 PSGL-1 多肽或其抗原片段免疫。通常使用的宿主动物包括兔、小鼠、豚鼠、和大鼠。可根据宿主的种类使用不同的助剂以增加免疫应答,助剂包括弗氏佐剂(弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂)、矿物凝胶剂如氢氧化铝、表面活性物质如溶血卵磷脂、普流尼克(pluronic)多元醇、聚阴离子、肽、油性乳剂、钥孔血蓝素、和二硝基酚。可能有用的人用助剂包括 BCG(卡介苗)和小棒状杆菌(*corynebacterium parvum*)。多克隆抗体为被免疫动物的血清中包含的异源抗体分子群。

[0071] 因此,本发明范围内的抗体包括多克隆抗体,另外还有,单克隆抗体、人源化抗体或嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、使用 Fab 表达文库产生的分子。

[0072] 可使用上述的 PSGL-1 多肽和标准的杂交瘤技术(参见例如 Kohler 等人, *Nature* 256:495[1975]; Kohler 等人, *Eur J Immunol* 6:511[1976]; Kohler 等人, *Eur J Immunol* 6:292[1976]; Hammerling 等人, *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N. Y. [1981]) 制备单克隆抗体,所述单克隆抗体为特定抗原的异源抗体群。

[0073] 特别地,可以通过在培养物中通过传代细胞系生产抗体分子的任何技术得到单克隆抗体,如 Kohler 等人, *Nature* 256:495(1975)、和美国专利 4,376,110; the human B-cell hybridoma technique(Kosbor 等人, *Immunology Today* 4:72[1983]; Cole 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026[1983]); 和 the EBV-hybridoma technique(Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96[1983] 中描述的。这种抗体可为任何免疫球蛋白类,包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD、及其任何亚类。产生本发明的 mAb 的杂交瘤可在体外或体内培养。在体内产生高滴度 mAb 的能力使得其成为特别有用的生产方法。

[0074] 一经产生,通过标准方法(如 Ausubel 等人,同上)所述的蛋白质印迹或免疫沉淀分析技术试验多克隆抗体或单克隆抗体的特异性 PSGL-1 识别。特异性地识别 PSGL-1 或与 PSGL-1 特异性结合的抗体可用于本发明中。与 T 细胞如 CD3+ 细胞表面上的 PSGL-1 抗原结合并且诱导个体中 T 细胞耗竭和/或 T 细胞细胞程序死亡的抗 PSGL-1 抗体特别有用。

[0075] 抗体可用作例如治疗方案的一部分(如,用于减少或消除不希望的免疫应答,如由 T 细胞介导的与疾病状况如炎症性疾病、自身免疫性疾病、移植排斥、变应性疾病和 T 细胞由来的癌症有关的免疫应答)。抗体还可用于测量候选化合物与 PSGL-1 的结合能力的筛选试验。

[0076] 另外,可使用开发用于生产“嵌合抗体”的技术(Morrison 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851[1984]; Neuberger 等人, *Nature* 312:604[1984]; Takeda 等人, *Nature* 314:452[1984]),其通过拼接得自小鼠的具有适当抗原特异性的抗体分子的基因和得自人

的具有适当生物活性的抗体分子的基因。嵌合抗体为其中不同部分来源于不同的动物的分子,如具有来源于鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些。

[0077] 或者,描述用于生产单链抗体的技术(美国专利 4,946,778、4,946,778、和 4,704,692)适合于生产针对 PSGL-1 多肽或其片段的单链抗体。通过用氨基酸桥连接 Fv 的重链片段和轻链片段产生单链多肽而形成单链抗体。

[0078] 识别并与特异性表位结合的抗体片段可通过已知的技术产生。例如,这种片段包括但不限于可以通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的 F(ab')₂ 片段、和可以通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫键产生的 Fab 片段。或者,可以构建 Fab 表达文库(Huse 等人,Science 246:1275[1989])以使得可迅速和容易地鉴定具有所需特异性的单克隆 Fab 片段。

[0079] 可以通过本领域中已知的方法将抗体人源化。例如,具有所需结合特异性的单克隆抗体可进行商业性人源化(Scotgene, Scotland;Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.)。完全人抗体如在转基因动物中表达的那些也属于本发明的特征(Green 等人,Nature Genetics 7:13[1994];和美国专利 5,545,806 和 5,569,825)。

[0080] 多聚体化合物

[0081] 与 T 细胞或 NK 细胞表面上的多个 PSGL-1 蛋白质结合的多聚体化合物可用于诱导细胞的细胞程序死亡。多聚体化合物含有至少两种多肽链。每个多肽链包含 (i) 与 PSGL-1 结合的结合结构域,和 (ii) 异源氨基酸序列。

[0082] 一般说来,多聚体化合物与给定细胞表面上的至少两种不同的 PSGL-1 蛋白质结合。然而,多聚体化合物可以配制为具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或更多个不同的 PSGL-1 结合结构域,从而引起多聚体化合物结合于给定细胞表面上的 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或更多个不同的 PSGL-1 蛋白质。

[0083] 结合结构域可以包含与 PSGL-1 结合的任何氨基酸序列(或具有修饰如糖基化和/或硫酸化的任何氨基酸序列)。结合结构域可对应于天然存在的或非天然出现的氨基酸序列。例如,结合结构域可以包含选择素(如 P-选择素、E-选择素、或 L-选择素)的 PSGL-1 结合结构域。包含选择素的 PSGL-1 结合结构域的多肽可以选择性地包括:(i) 选择素(如 P-选择素、E-选择素、或 L-选择素)的胞外域;(ii) 选择素(如 P-选择素、E-选择素、或 L-选择素)的钙依赖性凝集素结构域;或 (iii) 介导与 PSGL-1 结合的选择素(如 P-选择素、E-选择素、或 L-选择素)的胞外域的片段。除了这些天然存在的氨基酸序列之外,可将一个或多个氨基酸改变引入到天然存在的 PSGL-1 结合结构域中,产生保留 PSGL-1 结合功能的非天然存在的序列。例如,多肽可以包含与 PSGL-1 结合的氨基酸序列,并且期望与以下的任一种具有至少 80%、85%、90%、95%、或 98% 同一性:(i) 选择素(如 P-选择素、E-选择素、或 L-选择素)的胞外域;(ii) 选择素(如 P-选择素、E-选择素、或 L-选择素)的钙依赖性凝集素结构域;或 (iii) 介导与 PSGL-1 结合的选择素(如 P-选择素、E-选择素、或 L-选择素)的胞外域的片段。可使用标准分子生物学诱变技术将变化引入到编码 PSGL-1 结合结构域的核酸序列中。然后,可试验经过修饰的结合结构域与 PSGL-1 结合的能力,例如与细胞表面上的固定化 PSGL-1 或 PSGL-1 结合的能力。结合结构域也可包含抗 PSGL-1 抗体或选自噬菌体展示库的多肽的 PSGL-1 结合结构域、或与 PSGL-1 结合并且与抗 PSGL-1 抗体或选自噬菌体展示库的多肽的 PSGL-1 结合结构域具有至少 80%、85%、90%、95%、或 98% 同一性的氨基酸序列。

[0084] PSGL-1 结合结构域可以包含对应于 P- 选择素的 PSGL-1 结合片段的氨基酸序列。包含这种氨基酸序列的多肽链（本文中所述的多聚体化合物）的例子为包含以下组分的重组小鼠 P- 选择素 /Fc 嵌合体（得自 R&D Systems, Minneapolis, MN）：(i) CD33 信号肽（Met1-Ala16）；(ii) 小鼠 P- 选择素（胞外域的 Trp42-Ala709）；(iii) IEGRMD (SEQ ID NO :1)；和 (iv) 人 IgG1 (Pro100-Lys330)。包含这种氨基酸序列的多肽链的第二个例子为包含以下组分的重组人 P- 选择素 /Fc 嵌合体（得自 R&D Systems, Minneapolis, MN）：(i) 人 P- 选择素（Met1-Ala771, 胞外域）；(ii) IEGRMD (SEQ ID NO :1) 和 (iii) 人 IgG1 (Pro 100-Lys330)。

[0085] PSGL-1 结合结构域可以包含对应于 E- 选择素的 PSGL-1 结合片段的氨基酸序列。包含这种氨基酸序列的多肽链（本文中所述的多聚体化合物）的例子为包含以下组分的重组小鼠 E- 选择素 /Fc 嵌合体（得自 R&D Systems, Minneapolis, MN）：(i) 小鼠 E- 选择素（Met1-Pro 557, 胞外域）；(ii) IEGRMD (SEQ ID NO :1)；(iii) 人 IgG1 (Pro 100-Lys330)；和 (iv) HHHHHH (SEQ ID NO :2)。包含这种氨基酸序列的多肽链的第二个例子为包含以下组分的重组 E- 选择素 /Fc 嵌合体（得自 R&D Systems, Minneapolis, MN）：(i) 人 E- 选择素（Met1-Pro556, 胞外域）；(ii) IEGRMD (SEQ ID NO :2)；(iii) 人 IgG1 (Pro 100-Lys330)；和 (iv) HHHHHH (SEQ ID NO :2)。

[0086] PSGL-1 结合结构域可以包含对应于 L- 选择素的 PSGL-1 结合片段的氨基酸序列。包含这种氨基酸序列的多肽链（本文中所述的多聚体化合物）的例子为包含以下组分的重组小鼠 L- 选择素 /Fc 嵌合体（得自 R&D Systems, Minneapolis, MN）：(i) 小鼠 L- 选择素（Met1-Asn332, 胞外域）；(ii) IEGRMD (SEQ ID NO :1)；(iii) 人 IgG1 (Pro 100-Lys330)；和 (iv) HHHHHH (SEQ ID NO :2)。包含这种氨基酸序列的多肽链的第二个例子为包含以下组分的重组人 E- 选择素 /Fc 嵌合体（得自 R&D Systems, Minneapolis, MN）：(i) 人 L- 选择素（Met1-Asn332, 胞外域）；(ii) IEGRMD (SEQ ID NO :1)；(iii) 人 IgG1 (Pro 100-Lys330)；和 (iv) HHHHHH (SEQ ID NO :2)。

[0087] 多聚体化合物可以配制为同型多聚体化合物或异型多聚体化合物。同型多聚体化合物只包含具有相同 PSGL-1 结合结构域的多肽链。例如，同型多聚体化合物可以包含含有相同的 P- 选择素的 PSGL-1 结合片段的多肽链。异型多聚体化合物包含具有不同 PSGL-1 结合结构域的多肽链。例如，异型多聚体化合物可以包含第一多肽链和第二多肽链，第一多肽链包含 P- 选择素的 PSGL-1 结合片段，第二多肽链包含 E- 选择素的 PSGL-1 结合片段。

[0088] 异源氨基酸序列可为任何氨基酸序列。然而，本文中所述的多肽链的氨基酸序列不对应于天然存在的蛋白质的序列。异源氨基酸序列包含一个或多个允许多肽链连接的氨基酸。例如，一个或多个氨基酸可以通过例如二硫键共价键多肽链。异源序列的一个例子为免疫球蛋白重链恒定区。两个多肽链的 Fc 区域之间的二硫键可以导致形成二聚化合物。

[0089] 除了有助于多肽链的连接之外，异源氨基酸序列也可包含交联剂结合区，如细胞表面受体结合区。当药物结合于这种结合区时，可以产生多肽链和与多肽链结合的细胞表面 PSGL-1 蛋白质的交联。免疫球蛋白重链恒定区包含 Fc 受体结合区。交联剂可为例如与异源氨基酸序列的交联剂结合区特异性结合的抗体（如抗 Fc 抗体）。

[0090] 调节 PSGL-1 功能的化合物的筛选试验

[0091] 本发明还包括鉴定与 PSGL-1（或 PSGL-1 的结构域）相互作用的化合物的方法，所

述化合物包括但不限于当与 PSGL-1 结合时诱导 T 细胞耗竭和 / 或 T 细胞细胞程序死亡的化合物。还包括调节 PSGL-1 与跨膜的、细胞外的、或细胞内的调节 PSGL-1 活性的蛋白质的相互作用的化合物,和调节 PSGL-1 活性的化合物。

[0092] 可根据本发明进行筛选的化合物包括但不限于,如本文中所述的,与 PSGL-1 结合并调节由 PSGL-1 介导的生物学功能的肽、抗体及其片段、和其它有机化合物。

[0093] 这种化合物可包括但不限于肽,诸如例如,可溶性肽,包括但不限于随机肽库的成员 (Lam 等人, Nature 354 :82[1991] ;Houghten 等人, Nature 354 :84[1991]) ;和由 D- 和 / 或 L 构型的氨基酸、磷肽 (包括但不限于随机或部分退化的、定向的磷肽库的成员, Songyang 等人, Cell172 :767[1993]) 构成的得自组合化学的分子库 ;抗体 (包括但不限于多克隆的、单克隆的、人源化的、抗独特型、嵌合的或单链的抗体,和 FAb、F(ab')₂ 和 FAb 表达文库片段、及其表位结合片段),和有机或无机小分子。

[0094] 可以根据本发明进行筛选的其它化合物包括但不限于影响 PSGL-1 蛋白活性的有机小分子,如本文中所述的。

[0095] 计算机模拟和检索技术使得可鉴定可调节 PSGL-1 表达或活性的化合物、或可改善已经鉴定的化合物。在鉴定了这种化合物或组合物之后,鉴定活性部位或区域。这种活性部位可典型地为活性的天然调节剂的结合位点。活性部位可以使用本领域中已知的方法鉴定,例如从肽的氨基酸序列、从核酸的核苷酸序列、或从对相关化合物或组合物与其天然配体的复合物的研究。在后者的情况中,可使用化学或 X 射线结晶学方法通过寻找在哪里发现因子上的调节剂 (或配体) 发现活性部位。

[0096] 虽然前面描述了关于可以改变结合的化合物的设计和产生,但是也可以筛选已知化合物的库,包括天然产物或合成化学品、和生物学活性物质包括蛋白质,用于寻找与 PSGL-1 蛋白结合并引起 T 细胞耗竭和 / 或诱导 T 细胞细胞程序死亡的化合物。

[0097] 可以设计体外系统用于鉴定能够与 PSGL-1 (或 PSGL-1 的结构域) 相互作用的化合物。鉴定的化合物可用于例如如本文中所述的调节 T 细胞活性,并因此可用于治疗与过度的或不需要的由 T 细胞介导的免疫应答或过度的或不需要的 T 细胞增殖有关的疾病状况,如炎症、自身免疫、移植排斥、变应性疾病、或 T 细胞癌症。

[0098] 用于鉴定与 PSGL-1 结合的化合物的试验原理涉及制备 PSGL-1 (或其结构域) 与试验化合物的反应混合物,制备条件和制备时间为足以使得两种组分相互作用和结合,并从而形成可以从反应混合物中分离和 / 或进行检测的复合物。使用的 PSGL-1 物质可以根据筛选试验的目标的不同而不同。在一些情况中,优选使用与在试验系统中提供优点 (如标记、所得复合物的分离等等) 的异源蛋白质或多肽融合 PSGL-1 的结构域对应的肽。

[0099] 可以多种方式进行筛选试验。例如,进行这种试验的一种方法涉及将 PSGL-1 蛋白、多肽、肽或融合蛋白、或试验物质固定在固相上并在反应结束时检测固定在固相上的 PSGL-1/ 试验化合物复合物。在这种方法的一个实施方案中,可将 PSGL-1 反应物固定在固体表面上,和可对未固定试验化合物直接或间接地进行标记。

[0100] 在实践中,可方便地使用微量滴定板作为固相。固定的组分可通过非共价键或共价键而固定。非共价键可以通过用蛋白质的溶液简单地涂布固体表面并干燥而实现。或者,可使用对要固定的蛋白质为特异性的固定抗体,优选单克隆抗体,用于将蛋白质固定于固体表面。表面可预先制备并储存。

[0101] 为了进行试验,将未固定组分加入到包含固定组分的覆层表面。在反应完成之后,在使得形成的任何复合物保持固定在固体表面上的条件下除去未反应的组分(如通过洗涤)。对固定在固体表面上的复合物的检测可以多种方式实现。当先前未固定的组分被预先标记时,检测到固定在表面上的标记表明形成了复合物。当预先未固定的组分没有被预先标记时,可使用间接标记检测固定在表面上的复合物;例如使用对于预先未固定组分为特异性的被标记抗体(随后可直接标记抗体或使用被标记的抗 Ig 抗体间接地标记)。

[0102] 或者,反应可以在液相中进行,从未反应的组分分离反应产物并检测复合物;例如使用对 PSGL-1 蛋白、多肽、肽、或融合蛋白、或试验化合物为特异性的固定抗体固定溶液中形成的任何复合物,和使用对可能的复合物的其它组分为特异性的被标记抗体检测固定的复合物。

[0103] 或者,基于细胞的试验可用于鉴定与 PSGL-1 相互作用的化合物。为此,可使用表达 PSGL-1 的细胞系或已经经过基因工程化 (genetically engineered) 以表达 PSGL-1 的细胞系。基于细胞的试验对于评价通过本文中所述筛选鉴定的化合物的功能性作用特别有用。例如,一旦根据化合物与 PSGL-1 蛋白结合的能力鉴定了化合物,则可以试验该化合物例如在体外或体内诱导 T 细胞细胞程序死亡、或在体外或体内耗竭 T 细胞的能力。

[0104] 药学组合物

[0105] 已知本发明的目的是改变个体中的免疫应答,因此,包含例如与 PSGL-1 多肽特异性结合的抗体、多聚体化合物、小分子、或其它化合物的药学组合物也是本发明的特征。在优选的实施例中,化合物起到作为 PSGL-1 的激动剂的作用。

[0106] 可以常规的方式使用一种或多种生理学可接受的载体或赋形剂配制本发明所用的药学组合物。因此,可将化合物及其生理学可接受的盐和溶剂化物配制为用于通过多种给药途径给药。

[0107] 化合物可配制为用于通过注射进行胃肠外给药,例如通过弹丸注射或连续输注。注射用制剂可以单元剂型形式与加入的防腐剂一起存在于例如安瓿或多剂量容器中。组合物可为例如在油性或水性介质中的悬浮液、溶液、或乳剂的剂型,并且包含制剂助剂如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性组分可为粉末形式,用于在用前与适当的介质如无菌无热原的水进行配制。

[0108] 控制由 T 细胞介导的免疫应答和耗竭 T 细胞群的方法

[0109] 化合物如本文中所述的筛选试验中详述的那些可用于例如调节由 PSGL-1 多肽介导的生物功能和/或用于治疗与过度的或不需要的免疫应答如由 T 细胞介导的免疫应答相关的病症。这些化合物包括但不限于与 T 细胞表面上的 PSGL-1 结合并诱导引起 T 细胞死亡的信号转导途径的肽、抗体及其片段和其它有机化合物。本发明的方法选择性地包括加入诱导细胞表面上的 PSGL-1 交联的交联剂。本文中所述的化合物可用于其中期望耗竭或减除 T 细胞活性的任何情况。可用本发明的化合物治疗的特别有用的疾病状况包括炎症性疾病、自身免疫疾病、移植排斥、变应性疾病、和 T 细胞由来的癌症。

[0110] 可用本文中所述的抗 PSGL-1 化合物治疗的疾病状况的例子包括但不限于糖尿病、关节炎(包括类风湿性关节炎、青年类风湿性关节炎、骨关节炎、和牛皮癣关节炎)、多发性硬化、脑脊髓炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、自身免疫甲状腺炎、皮炎(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎)、银屑病、Sjögren 氏综合症、克罗恩氏病、口腔溃疡、虹膜炎、结膜炎、

角膜结膜炎、I 型糖尿病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、哮喘、变应性哮喘、皮肤红斑狼疮、硬皮病、阴道炎、直肠炎、药疹、麻疯病逆转反应、麻风结节性红斑、自身免疫眼色素层炎、变应性脑脊髓炎、急性坏死性出血性脑病 (acute necrotizing hemorrhagic encephalopathy)、特发性进行性双侧感觉神经性听力丧失 (idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss)、再生障碍性贫血、纯红细胞贫血、特发性血小板减少、多软骨炎、眶坏死性肉芽肿病、慢性活动型肝炎、Stevens-Johnson 综合征、特发性口炎性腹泻、扁平苔癣、突眼性甲状腺肿、肉状瘤病、原发性胆汁性肝硬化、后部葡萄膜炎、肺间质纤维化、移植物抗宿主病、移植的情况 (包括使用异源或异种组织的移植) 如骨髓移植、肝移植、或任何器官或组织的移植、变态反应如特应性变态反应、AIDS、和 T 细胞瘤如白血病和 / 或淋巴瘤。

[0111] 本发明的方法可用于在体外或体内从细胞群耗竭 T 细胞。例如,可通过将得自个体的生物样品接触选择性地与交联剂在一起的本文中所述的抗 PSGL-1 化合物从而在体外耗竭该样品中的 T 细胞。该方法通过,例如,使得非 T 细胞在细胞群中富集、以及通过从细胞群减少或减除 T 细胞活性而是有用的。

[0112] 以下为实践本发明的实施例。不能将它们看作是以任何方式限制本发明的范围。

[0113] 实施例

[0114] 实施例 1:

[0115] 抗 T 细胞细胞程序死亡诱导蛋白 (“TAIP”) 单克隆抗体的制备

[0116] 通过采用公知的 Kohler and Milstein 的细胞融合方法 ((1976) European Journal of Immunology, 6 :511-519) 生产分泌所需抗体的杂交瘤而产生 TAIP 特异性单克隆抗体。将得自自用伴刀豆球蛋白 A (Con A) 活化的 Balb/c 脾 T 细胞注射的仓鼠的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞系融合以形成分泌抗体的杂交瘤。用聚乙二醇将两个细胞群融合,并通过标准的组织培养方法将得到的抗体产生细胞进行克隆和繁殖。根据这些方法产生的一个杂交瘤分泌命名为 TAB4 的单克隆抗体,其能够在体外诱导 T 细胞细胞程序死亡和在体内耗竭 T 细胞。由 TAB4 识别的蛋白质命名为 T 细胞细胞程序死亡诱导蛋白 (TAIP)。

[0117] C57BL/6J (B6) 和 BALB/c 小鼠购自 Jackson 实验室 (Bar Harbor, ME)。金黄仓鼠购自 the Animal Core Facility, National Taiwan University Medical College。

[0118] 将 TAB4 杂交瘤的浓培养物上清液以 20,000xg 离心 10 分钟,并将上清液用结合缓冲液 (0.1M 乙酸钠, pH5.0) 以 1 : 1 的比进行稀释。将 G 蛋白柱 (约 1ml 柱床体积) 用 3-5ml 的结合缓冲液洗涤三次。将澄清的培养物上清液装载到 G 蛋白柱上,收集流过液 (flow-through) 并再装入柱中。将柱用 6-10ml 的结合缓冲液洗并用 5ml 的洗脱缓冲液 (0.1M 甘氨酸-HCl, pH2.8) 从柱上洗脱结合的抗体。每个级分包含 1ml 洗脱的抗体,并通过将各个 1ml 级分与 50 微升的 1M Tris-HCl (pH7.5) 混合将洗脱的级分调节到 pH 为中性。将包含抗体的级分合并并对着 2 升的 PBS (pH7.4) 透析三次,每次透析进行三小时。通过 Bradford 描述的方法使用 Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA) 测定抗体样品中的蛋白质浓度。

[0119] 实施例 2:

[0120] 小鼠脾细胞悬浮液的制备和 T 细胞的活化和富集

[0121] 将小鼠脾浸入在 8ml 的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 中,用无菌盖玻片轻轻地切碎,

转移到 15ml 离心管 (Costar) 中并以 200xg 下离心 5 分钟。弃去上清液并通过温和地敲打管壁将细胞小球再悬浮在剩余的缓冲液中。通过加入 1ml 的 RBC 溶胞缓冲液 (0.6M NH_4Cl 、0.17M Tris-base, pH7.65) 将污染的 (contaminating) 红细胞 (RBC) 进行细胞溶解, 随后在室温下培养 2 分钟并用 9ml 的 HBSS 迅速淬灭。在 200xg 下 5 分钟使细胞成为小球, 洗涤两次并再悬浮在 RPMI 介质中。使用血球计 (Cambridge Scientific Inc.) 和锥虫蓝排除法测定混合物中细胞的浓度和生存力。

[0122] 用 RPMI 介质将脾细胞调节为 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 的最终浓度并加入伴刀豆球蛋白 A 到最终浓度为 2 微克 /ml 以活化 T 细胞。将细胞悬浮液转移到 6 孔培养平板 (5ml/ 孔) 或 10-cm 培养皿 (10ml/ 皿) 中并在 37°C、5% CO_2 下培养 48 小时, 然后收获。将活化的脾细胞, 包括活化的 T 细胞, 再悬浮在 5ml 的 HBSS 中并小心地覆盖在离心管中 5ml 55% 的 Percoll 溶液层上面, 覆盖要小心不要扰动分离的层。在 25°C 下将细胞以 1,900xg 离心 13 分钟, 中间不制动。从两个层的接触面收集富集的 T 细胞, 用 HBSS 洗涤两次, 准备用于实验。

[0123] 实施例 3: 活化的 T 细胞的细胞程序死亡

[0124] 将活化的 T 细胞 (参见实施例) 再悬浮在包含 5ng/ml 的 IL-2 的 RPMI 介质中到最终浓度为 5×10^5 细胞 /ml, 并根据表 1 中所示的条件用对照 Ig-TAB4、或抗 CD3 处理。

[0125] 表 1

实验组	处理*
阴性对照	3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 仓鼠 Ig 5ng/ml IL-2 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 交联剂抗体 (抗仓鼠 Ig)
TAB4	3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TAB4 仓鼠 mAb 5ng/ml IL-2 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 交联剂抗体 (抗仓鼠 Ig)
阳性对照	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗 CD3mAb 5ng/ml IL-2 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 交联剂抗体 (抗小鼠 Ig)
*: 介质中指定试剂的最终浓度	

[0126] 在 18-24 小时的培养期之后, 使用 7-AAD 细胞程序死亡试验测定各个培养物中细胞程序死亡的程度。将处理后的细胞转移到 FACS 管 (Falcon) 中, 用冰冷的 FACS 溶液 (1% 胎牛血清、0.05% 叠氮化钠, 在 PBS 中) 洗涤两次, 在 4°C 下在 200xg 下形成小球。将细胞再悬浮在冰冷的 FACS 溶液中到最终浓度为 $1-2 \times 10^7$ 细胞 /ml。对于染色, 将 0.1ml 的再悬浮的细胞与 7-AAD 混合, 到 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的最终浓度, 然后在黑暗中以 4°C 下培养 20 分钟。最后, 将染色后的细胞用冰冷的 FACS 溶液洗涤两次, 再悬浮在 0.5ml 的 FACS 溶液中, 并用 BD LSR 流动血细胞计数器 (Beckton Dickison) 进行分析。

[0127] 图 1 描述当活化的 T 细胞获得对由 TAB4 (抗 TAIP) 介导的细胞程序死亡信号的敏感性时所研究的典型的时间 - 过程实验的结果。将小鼠脾细胞用 Con-A 活化并保持在含 IL-2 的介质中。收获活化的 T 细胞, 再悬浮, 并在作为交联剂的抗仓鼠 IgG 抗体存在下用

TAB4 单克隆抗体或对照仓鼠 IgG 处理。在第一天,TAIP 交联诱导低水平(6.5%)的细胞程序死亡的细胞死亡的能力明显。然而,由 TAB4 诱导的细胞程序死亡的程度从第 2 天的 17% 增加,在第 4 天达到峰值 52%,并在第 6 天下降到 44%。与只接受 IL-2 的培养物相比,对照仓鼠 IgG 不诱导特异性的细胞程序死亡的 T 细胞死亡。抗-CD3(作为阳性对照)在活化 48 小时之后诱导 38%的 T 细胞的细胞程序死亡(数据未示出)。

[0128] 实施例 4:TAIP 抗原在不同组织中的表达

[0129] 将细胞用冰冷的 FACS 溶液(1%胎牛血清、0.05%叠氮化钠,在 PBS 中)洗涤两次并在 4°C 下在 200xg 下在 FACS 管(Falcon)中离心。将细胞再悬浮在冰冷的 FACS 溶液中到 1×10^7 细胞/ml 的最终浓度并将 FACS 管(Falcon)中的再悬浮细胞的 0.1ml 等分样品用于各个试验。对于表面染色,将 TAB4 单克隆抗体或对照仓鼠 Ig 加入到细胞中到 $2 \mu\text{g/ml}$ 的最终浓度并将混合物在黑暗中在 4°C 下培养 30 分钟。将细胞用冰冷的 FACS 洗涤一次,然后如下染色:(1)对于脾细胞,使用在 $100 \mu\text{l}$ 冰冷的 FACS 溶液中的 cychrome- 结合的抗 CD3 抗体($2 \mu\text{g/ml}$)、FITC- 结合的抗仓鼠 Ig、和 PE- 结合的抗 CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3 抗体($2 \mu\text{g/ml}$);和(2)对于胸腺细胞,使用在 $100 \mu\text{l}$ 冰冷的 FACS 溶液中的 FITC- 结合的抗仓鼠 Ig、PE 结合的抗 CD8、和 cychrome- 结合的抗 CD4 抗体($2 \mu\text{g/ml}$)。反应在黑暗中在 4°C 下进行 30 分钟。最后,将经染色的细胞用冰冷的 FACS 溶液洗涤两次,再悬浮在 1ml 的 FACS 溶液中,并用 BD LSR 流动血细胞计数器(Beckton Dickison)进行分析。

[0130] 图 3 和 4 表示在不同的脾细胞和胸腺细胞亚群上的 TAIP 抗原分布的 FACS 分析。如图 3 所示,CD19⁺B 细胞在表面上表达低量的但是为可检测量的 TAIP 蛋白。在 CD3⁺T 细胞和一小部分 NK 细胞上检测到显著更高量的 TAIP 蛋白。大多数 CD4⁺、CD8⁺、和 CD4⁺8⁺ 胸腺 T 细胞表达大量的 TAIP 蛋白。相比之下,TAIP 蛋白只在小的 CD4⁻8⁻ 胸腺 T 细胞群上表达(图 4)。

[0131] 收集得自 B6 和 BALB/c 小鼠的组织,包括脑、胸腺、心、肺、肝脏、胃、肾、脾、和皮肤,在室温下在 10%甲醛中固定过夜,并包埋在石蜡块中。用 Leica RM2135 切片从石蜡块制备 $4 \mu\text{m}$ 厚的组织切片,在 45°C 水中分散,并置于覆膜的载玻片上。将载玻片在 37°C 干燥并备用于随后的实验。

[0132] 将包含组织石蜡切片的载玻片脱蜡并根据标准规程通过二甲苯-100%乙醇系列(series)干燥,最后保持在 100%乙醇中。将切片根据标准规程通过 100%乙醇-90%乙醇-85%乙醇-70%乙醇-PBS 系培养进行再水合化到最后的 PBS 溶液中。以下反应全部在湿润的箱中进行。通过将组织切片在封闭缓冲液(1%正常的山羊血清)中在室温下培养 1 小时(或 4°C 过夜培养)以阻止非特异性结合。除去封闭缓冲液并向切片加入 TAB4 或正常仓鼠 Ig(1:200 稀释)并继续在室温下再培养一个小时(或 4°C 下过夜培养)。将切片在 PBS 中洗涤两次,每次 5 分钟,以除去初次抗体,与 1:250 稀释的碱性磷酸酶-结合的山羊抗仓鼠 Ig 反应,并在室温下培养 1 小时。将切片再用 PBS 洗涤两次,每次 5 分钟,以除去抗体-酶结合物,并使用 BCIP/NBT 底物溶液在黑暗中在室温下进行显色反应 30 分钟。将切片再用 PBS 洗涤以除去过量的酶底物,通过 PBS-乙醇-二甲苯系列脱水,并安装用于显微镜检查。

[0133] 结果表明,只在骨髓由来的组织中检测到 TAIP 蛋白表达,而在进行试验的其余组

织上没有检测到。

[0134] 实施例 5 :TAIP 抗原的细胞表面生物素酰化和免疫沉淀

[0135] 在冰上将 5×10^7 RL♂ 或 NIH-3T3 细胞在包含 0.5mg/ml 磺基-NHS-生物素 (Pierce) 的 1ml 的 PBS 中进行表面生物素酰化 30 分钟。通过将细胞与 0.5ml 的 Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Inc.) 在冰上培养 10 分钟终止反应。将细胞用 1ml 的 Dulbecco's modified Eagle's medium 洗一次并用 1ml 的磷酸缓冲盐水洗两次。

[0136] 将标记的细胞以 5.0×10^7 细胞/ml 的密度在包含完全蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (Roche) 的冷的溶胞缓冲液 (1% Triton X-100、20mM Tris-HCl, pH8.0、160mM NaCl、1mM CaCl_2) 中细溶 15 分钟,并将不溶性物质在 10,000xg 下 10 分钟形成小球,这些步骤和所有随后的步骤都在 4°C 下进行。对于免疫沉淀,将溶胞产物与 50 μ l 填充的 (packed) G 蛋白-琼脂糖凝胶 (Amersham Pharmacia Biotech) 预培养 30 分钟以除去非特异性结合的蛋白质。使小珠 (bead) 形成小球并将上清液的等分样品 (通常相当于 5.0×10^7 细胞) 与预装载有 10 μ g 的 mAb TAB4 或得自正常仓鼠血清的 IgG 的 20 μ l 的 G 蛋白-琼脂糖凝胶进行培养。在 4°C 培养 4 小时之后,将树脂用洗涤缓冲液 (0.05% Triton X-100、50mM Tris-HCl, pH8.5、400mM NaCl、1mM CaCl_2 、1mg/ml 卵清蛋白) 洗涤四次,用包含 250mM NaCl 代替 400mM NaCl 的类似洗涤缓冲液洗涤两次。用 50 μ l 的 1×SDS 样品缓冲液洗脱特异性结合于 TAB4 的蛋白质。洗脱的蛋白质通过 8% SDS-PAGE 分离并转移到硝化纤维膜 (Millipore) 上。用过氧化物酶-结合的抗生物素蛋白 (PharMingen) 分析滤膜的生物素酰化蛋白质并使用化学发光试剂 (NEN™ Life Science Products) 显影。

[0137] 如图 2 所示,分子量约 120-kD 的生物素酰化表面蛋白质在 RL.1 细胞 (TAIP⁺T 细胞) 中被 TAB4 识别,而在 3T3 细胞 (TAIP⁻细胞) 中没有被识别。相比之下,涂有仓鼠正常血清的 G 蛋白琼脂糖凝胶不能提取这种 120-kDa 蛋白质。这些结果表明,这种 120-kDa 蛋白质为由 T 细胞的细胞表面上的单克隆抗体 TAB4 识别的抗原。

[0138] 实施例 6 :体内的 T 细胞耗竭

[0139] 为了检验 TAB4 体内对 T 细胞群和其它细胞群的作用,对小鼠腹膜内注射 300 μ g 的 TAB4 或对照仓鼠 Ig,并且在第 4 天收获脾细胞、胸腺细胞、和外周血液单核细胞,用于总细胞计数和用于通过 FACS 进行细胞表面标识物的分析。

[0140] 对于 FACS 试验,在 4°C 下用 2% 多聚甲醛将细胞固定 20 分钟,洗涤两次并再悬浮在冰冷的 FACS 溶液中到 1×10^7 细胞/ml 的最终浓度。每个试验使用在 FACS 管 (Falcon) 中的再悬浮细胞的 100 μ l 等分样品。向细胞加入 TAB4 或对照仓鼠 Ig 到 2 μ g/ml 的最终浓度并将混合物在黑暗中以 4°C 下培养 30 分钟。将细胞用冰冷的 FACS 洗涤一次并进行如下反应:(1) 对于脾细胞,使用在 100 μ l 的冰冷的 FACS 溶液中的 cychrome-结合的抗 CD3 抗体 (2 μ g/ml)、FITC-结合的抗仓鼠 Ig 和 PE-结合的抗 CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3 抗体 (2 μ g/ml);和 (2) 对于胸腺细胞,使用在 100 μ l 的冰冷的 FACS 溶液中的 FITC-结合的抗仓鼠 Ig、PE-结合的抗 CD8、和 cychrome-结合的抗 CD4 抗体 (2 μ g/ml)。反应在黑暗中以 4°C 下进行 30 分钟。最后,将经染色的细胞用冰冷的 FACS 溶液洗涤两次,再悬浮在 1,000 μ l 的 FACS 溶液中,并用 BD LSR 流式血细胞计数器 (Beckton Dickison) 进行分析。

[0141] 在注射后四天,外周血液白细胞 (PBL) 中 CD3⁺T 细胞的百分比从对照小鼠中的

36.7%减少到 TAB4⁻ 处理的小鼠中的 4.1% (表 2)。TAB4 处理引起脾细胞总数略有减少。然而在 TAB4 处理的小鼠中, CD3⁺T 细胞数目有 62% 的减少, NK 细胞的数目有 50% 的减少, CD19⁺B 细胞的总数略有增加。从 TAB4 处理的小鼠回收的胸腺细胞的总数只有对照中所观察到的水平的 48% (减少 52%)。此外,除了 CD4⁺T 细胞之外,所有其它的 CD8⁺、CD4⁺CD8⁺、和 CD4⁻CD8⁻T 细胞都减少, CD4⁺CD8⁺ 亚群受影响最深 (减少 64.7%)。

[0142] 表 2

脾				
x 10 ⁶	未处理	正常仓鼠 Ig	用 TA-B4-处理的	耗竭(%)
总脾细胞数	123	93.3	105	14.6
CD3 ⁺ T 细胞	32.8	28.4	12.4	62.2
CD3 ⁻ CD19 ⁺	72.2	53.4	72.9	-0.8
CD3 ⁻ NK ⁺	3.6	2.4	1.80	50
外周血液白细胞				
	未处理	正常仓鼠 Ig	用 TA-B4-处理的	耗竭(%)
CD3 ⁺ T 细胞	36.7%	36%	4.1%	88.8%
胸腺				
x 10 ⁶	未处理	正常仓鼠 Ig	用 TA-B4-处理的	耗竭(%)
总的胸腺细胞数	94	229	45	52.1
CD4 ⁺	9.3	28.4	10.9	-16.6
CD8 ⁺	5.2	7.7	3.6	30.3
CD4 ⁺ CD8 ⁺	73.8	182	26	64.7
CD4 ⁻ CD8 ⁻	5.6	10.5	4.5	19.3

[0143] (得自三次实验的代表性数据)

[0144] 实施例 7:抗 -TAIP 抗体不诱导 IL-2 或 TNF- α 分泌

[0145] 对 Balb/c 小鼠 (H-2d) 腹膜内注射 300 微克的 TAB4 或对照仓鼠 Ig。在注射 7 后天分离脾细胞并用作具有用丝裂霉素 C 处理的 C3H(H-2k) 脾细胞 (作为刺激物) 的培养物中的效应器。三天后,收获培养物上清液并通过 ELISA 装置 (PharMingen) 测量 IL-2 含量。如图 5 所示,与对照小鼠相比,在得自用 TAB4 处理的小鼠的效应器细胞中 IL-2 的产生受到抑制。还分析了 IL-2 和 TNF- α 的血浆水平,在对照和用 TAB4 处理的小鼠的血清中 IL-2 (或 TNF- α) 水平之间没有表现出显著差异。因为 IL-2 的产生对于 T 细胞活性是最重要的,该结果表明,TAIP 特异性抗体如 TAB4 可用于体内管理 T 细胞和控制不需要的由 T 细胞介导的免疫应答,如与自身免疫疾病和移植排斥有关的那些。

[0146] 实施例 8:抗 TAIP 抗体在预防移植排斥中的应用

[0147] 使用马来酸乙酰马嗪 (Fermenta Animal Health Co., Kansas City, MO) 将 8-12

周龄的小鼠（得自 Jackson Laboratory）麻醉。在皮肤移植之前，在皮肤移植手术前七天对未切除胸腺的接收者 C57BL/6 小鼠（H-2^b）腹膜内注射 500 μg 的 TAB4 或同种型对照抗体。七天过后，将完全异源失配的 Balb/cj 小鼠（H-2^d）侧肋部的皮肤移植到用抗体预处理的 C57BL/6 小鼠的侧肋部上。在移植后七天，再次对小鼠注射 500 μg 的 TAB4 或同种型对照抗体。在移植术之后每天监视小鼠。当 50% 的供体皮肤坏死时认为发生移植排斥。移植存活百分比如图 7 中所示（n = 8）。该数据表明，TAB4 抗体处理延长了异源皮肤移植的存活率。

[0148] 实施例 9 : 鉴定 TAIP 为 PSGL-1

[0149] P- 选择素糖蛋白配体 -1 (PSGL-1), 又名 CD162, 为在白细胞包括 T 细胞上表达的主要的 P- 选择素配体 (Sako 等人 (1993) Cell 75 :1179 ; Vachino 等人, (1995) J. Biol. Chem. 270 :21966 ; Veldman 等人 (1995) J. Biol. Chem. 270 :16470)。TAIP 的生物化学特性, 如其分子量及其二聚化趋势表明 TAB4 可能类似于 PSGL-1 的可能性。为了研究这两种抗原之间的关系, 进行了以下试验 : 1) 由 TAB4 沉淀的抗原能否被市售的抗 PSGL-1 抗体识别 ; 和 2) 抗 PSGL-1 抗体能否使 TAB4 从细胞溶胞产物耗竭。

[0150] RL ♂ T 细胞以 1.0×10^8 细胞 /ml 的密度在包含完全蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (Roche) 的溶胞缓冲液 (1% Triton X-100, 20mM Tris-HCl, pH8.0, 160mM NaCl, 1mM CaCl₂) 中胞溶 1 小时, 并将不溶性物质在 10,000xg 下处理 10 分钟形成小球, 这些步骤和所有随后的步骤都在 4°C 下进行。将相当于 5.0×10^7 细胞的溶胞产物与预装载有 10 μg 的抗 PSGL-1mAb (克隆 2PH1, PharMingen, San Diego, CA)、抗 TAIP mAb、TAB4、或得自正常仓鼠血清的 IgG 的 20 μl 的 G 蛋白 - 琼脂糖凝胶进行培养。在 4°C 培养 4 小时之后, 将小珠用洗涤缓冲液 (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH8.5, 400mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mg/ml 卵清蛋白) 洗涤五次, 并用包含 250mM NaCl 代替 400mM NaCl 的类似的洗涤缓冲液洗涤两次。结合的蛋白用 40 μl 的 1×SDS 样品缓冲液洗脱。洗脱的蛋白质通过 6% SDS-PAGE 分离并转移到硝化纤维素膜上。将膜用抗 PSGL-1mAb 进行免疫印迹并通过过氧化物酶 - 结合的山羊抗大鼠 IgG (H+L) 和随后的化学发光 (Renaissance, NEN) 显示。

[0151] 表面生物素酰化 RL ♂ T 细胞以 1.0×10^8 细胞 /ml 的密度在溶胞缓冲液中进行细胞溶解。将细胞提取物与结合于 40 μl G 蛋白 - 琼脂糖凝胶的 20 μg 抗体在 4°C 下培养过夜。用抗 PSGL-1mAb (2PH1) 或对照大鼠 IgG、用 TAB4 或对照正常仓鼠血清进行耗竭。耗竭的溶胞产物进一步经过分别与 TAB4 或抗 PSGL-1mAb 的免疫沉淀。在 6% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上分离免疫沉淀物并通过荧光照相术检测。如图 6 所示, 抗 PSGL-1 抗体可以使 TAIP 蛋白从 T 细胞溶胞产物耗竭。另外, 通过蛋白印迹分析, 用抗 TAIP 抗体 (TAB4) 进行免疫沉淀的蛋白可以被抗 PSGL-1 抗体识别。

[0152] 实施例 10 : 抗 PSGL-1 抗体诱导人 T 细胞的细胞程序死亡

[0153] 为了测定 PSGL-1 在人 T 细胞的细胞程序死亡中所起的作用, 进行了时间 - 过程实验以研究活化的人 T 细胞何时获得针对由 PSGL-1 介导的细胞程序死亡信号的敏感性。将人 T 细胞用植物凝集素 (PHA) 促细胞分裂剂刺激并进一步在包含 IL-2 的介质中扩展。收获活化的 T 细胞, 然后在 IL-2 和交联抗体的存在下用抗 PSGL-1 攻击。

[0154] 从健康的成人取得人外周血液, 肝素化处理, 并使用 Ficoll-PaquePlus (Pharmacia Biotech) 根据分化密度富集外周血液单核细胞 (PBMC)。

将 PBMC 用 1% PHA (Life Technologies, GibcoBRL) 活化 48 小时, 随后保持在重组人 IL-2 (5ng/ml) 中通过生物鉴定。为了评价细胞程序死亡诱导能力, 将活化的细胞, 抗人 PSGL-1 抗体, 用以下物质处理: (1) 1 μ g/ml 的抗 PSGL-1 抗体克隆 KPL-1 (BD Pharmingen) 加交联剂兔抗小鼠 Ig (0.5 μ g/ml) (Jackson ImmunoResearch Laboratories); (2) 同种型对照纯化的小鼠 Ig 加交联剂兔抗小鼠 Ig; 或 (3) 单独的交联剂兔抗小鼠 Ig。在处理六小时之后, 通过 FACS 测定早期细胞程序死亡的细胞的百分比, 用抗 Annexin V (BD Pharmingen) 和 PI (Sigma) 染色。

[0155] 如图 8 所示, 使用抗 PSGL-1 抗体加交联剂通过 PSGL-1 触发的信号在由 PHA 活化的人 PBMC (主要是 T 细胞) 中触发显著性水平的细胞程序死亡。在用抗 PSGL-1 处理的培养物中, 细胞程序死亡的细胞的百分比从第 3 天的 8.5% 增加到第 8 天的 24%。单独的同位素匹配对照、单独的交联抗体都对这些细胞没有任何作用。

[0156] 实施例 11: 抗 PSGL-1 激动剂抗体治疗自身免疫疾病的应用

[0157] 将公认的自身免疫糖尿病动物—非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠在标准条件下饲养。在约 20 周龄时在 NOD 小鼠中形成自发性糖尿病。在实验组中, 小鼠在 14、15 和 17 周龄时, 每只小鼠接受三次腹膜内剂量给药 300 μ g 抗 PSGL-1 抗体 (TAB4)。在 24 和 26 周龄时给予相同剂量的另外的两次注射。对照组给予相同剂量的仓鼠 Ig。在 15 周龄之后每周两次通过 Medi-Test Glucose 试条 (Macherey-Nagel, Germany) 监视小鼠的葡萄糖尿。连续两次测量超过 300mg/dl 的非禁食尿糖水平被认为是糖尿病。

[0158] 如图 9 所示, 与对照抗体处理相比, TAB4 (抗 PSGL-1) 抗体处理产生显著的保护。因此, 抗 PSGL-1 抗体处理可以阻抑自身免疫 T 细胞的活性并且延迟 I 型糖尿病发病。

[0159] 实施例 12: P- 选择素、E- 选择素、和 L- 选择素与活化的 T 细胞的结合

[0160] 为了测定选择素 (P- 选择素、E- 选择素、和 L- 选择素) 与活化 T 细胞结合的能力, 将从 C57BL/6 小鼠新制备的脾细胞活化并在第 2、4、和 6 天收获。还分析了未活化的 T 细胞 (即, 在 0 天的新制备的脾细胞)。第 2 天的样品形成 3×10^6 细胞/ml 的用在 DMEM+10% FBS 中的 2 μ g/ml 的伴刀豆球蛋白 A (Con A) 活化 2 天的脾细胞。通过 Ficol1 梯度离析分离活细胞。从用 Con A 活化 3 天并在包含 5ng/ml 的 IL-2 保持另外一天的细胞得到第 4 天的样品。从用 Con A 活化 3 天并在 5ng/ml 的 IL-2 中保持 3 天的细胞得到第 6 天的样品。

[0161] 为了通过 FACS 分析测定样品, 在 4 $^{\circ}$ C 下将第 0、2、4、和 6 天的每孔 2×10^5 个细胞细胞与 40 μ l/孔的浓度范围在 20 μ g/ml 内的小鼠 P- 选择素、E- 选择素、或 L- 选择素培养 30 分钟, 上述选择素与人 IgG1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 的 Fc 区融合并两倍连续稀释到 0.156 μ g/ml。在培养之后, 将细胞用 1 \times FACSscan 缓冲液 (不含钙和镁离子的 1 \times PBS, 得自 Biochrom AG, Berlin, 和 2% FBS) 洗。将样品在 4 $^{\circ}$ C 下与 95 μ l/孔的抗 Thy1.2 和 3.25 μ g/ml 的第二试剂 (FITC- 抗人 IgG, 其对 Fc 片段为特异性的, 购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) 另外培养 30 分钟, 然后用 1 \times FACSscan 缓冲液洗。

[0162] FACS Calibur 分析的结果如图 10 中所示。在 20 μ g/ml, P- 选择素与小鼠活化的 T 细胞的结合逐渐增加, 在第 4 天达到峰值, 并在第 6 天轻微下降。E- 选择素的结合从第 2 天到第 4 天显著上升, 然后在第 6 天保持峰值。L- 选择素与小鼠活化的 T 细胞的结合不明显, 并且不在活化期间内即第 0 天到第 6 天改变。在 L- 选择素中观察到的结果可归因于 L- 选择素与其配体的明显弱的结合亲和力。当在实验中使用更低浓度的三种选择素时也得到了

相似的结果。

[0163] 实施例 13 :多聚体形式的 E- 选择素和 P- 选择素诱导活化的 T 细胞的细胞程序死亡

[0164] 在 4°C 下对 96 孔板 (NUNC) 涂布 50 μ l 的在 1×PBS 中的 20 μ g/ml 的抗人 Fc Ig 并过夜,在 37°C 下用 1% BSA 封闭 2 小时并与 50 μ l 的选择素-人 Fc 融合体(从 0.063 到 5 μ g/ml) 在室温下培养 2 小时。在所有的实验步骤中,将各个孔用 1×PBS 彻底洗涤五次。然后将预先用 Con A 活化四天的 2×10^5 T 细胞加入到各个孔中并在将板在 4°C 下以 200xg 离心 5 分钟之前在 37°C 下培养 5 小时。将得到的包含活化的 T 细胞的小球与 Annexin V- 生物素结合物在室温下培养 15 分钟,随后在 37°C 下与抗生物素蛋白结合物(1 : 5000 稀释的 SA- β -gal) 培养另外的 30 分钟。在每个结合反应中,每个孔用 Annexin V 结合缓冲液洗涤三次。通过同时将 110 μ l 的 Z-buffer 混合物(在 20ml Z-buffer 中的 54 μ l 的 2- 巯基乙醇)和 30 μ l 的 ONPG(0.04g/10ml) 在 4°C 下培养过夜进行显色。记录在 420nm 的光密度读数。

[0165] 选择素诱导的由 Con-A 活化的 T 细胞的细胞程序死亡水平随着与人 IgG1 的 Fc 融合的 P- 选择素(图 11A) 或 E- 选择素(图 11B) 浓度的增加而增加。仓鼠抗体 TAB4 诱导活化的 T 细胞的细胞程序死亡(参见实施例 1) 并在这些试验中将其用作阳性对照。作为阴性对照,抗人 Fc、人 Ig(HIg)、和 BSA 不诱导细胞程序死亡。在 L- 选择素人 Fc 融合蛋白(图 11C) 的存在下没有检测到显著的细胞程序死亡,与 L- 选择素不能很好地与活化 T 细胞结合相符(实施例 12)。

[0166] 总之,包含 P- 选择素或 E- 选择素的 PSGL-1 结合片段和人 Fc 片段的板结合的融合蛋白诱导活化的 T 细胞的细胞程序死亡。

[0167] 实施例 14 :可溶性 P- 选择素-Fc 融合蛋白的交联诱导活化的 T 细胞的细胞程序死亡

[0168] 如上所述将小鼠选择素(P- 选择素、E- 选择素、和 L- 选择素) 融合于人 IgG1 的 Fc 区域以形成可溶性的二聚体融合蛋白。为了评价可溶性选择素是否可以诱导活化的 T 细胞的细胞程序死亡,进行如实施例 13 所详细描述的实验,不同之处在于省略了与板结合的抗人 Fc Ig。在可溶性形式的 P- 选择素融合蛋白(二聚体) 单独存在下发生微不足道的或低水平的活化的 T 细胞的细胞程序死亡(图 12)。然而,在加入交联剂(抗人 Fc) 之后,细胞程序死亡活性显著增加到与在与板结合的抗体存在下所诱导的细胞程序死亡水平最接近。抗人 Fc、人 Ig(HIg) 不能诱导细胞程序死亡,BSA 也不能诱导细胞程序死亡。

[0169] 从 E- 选择素-Fc 融合蛋白得到与从 P- 选择素-Fc 融合蛋白相似的结果。另外,与与板结合的(多聚体形式)L- 选择素得到的结果相符,可溶性形式的 L- 选择素融合蛋白不能诱导活化的 T 细胞的细胞程序死亡。

[0170] 其它实施方案

[0171] 应该理解,已经结合本发明的详细说明描述了本发明,前述描述只是用于说明而不是限制本发明的范围。本发明的其它方面、优点、和改进在权利要求的范围内。

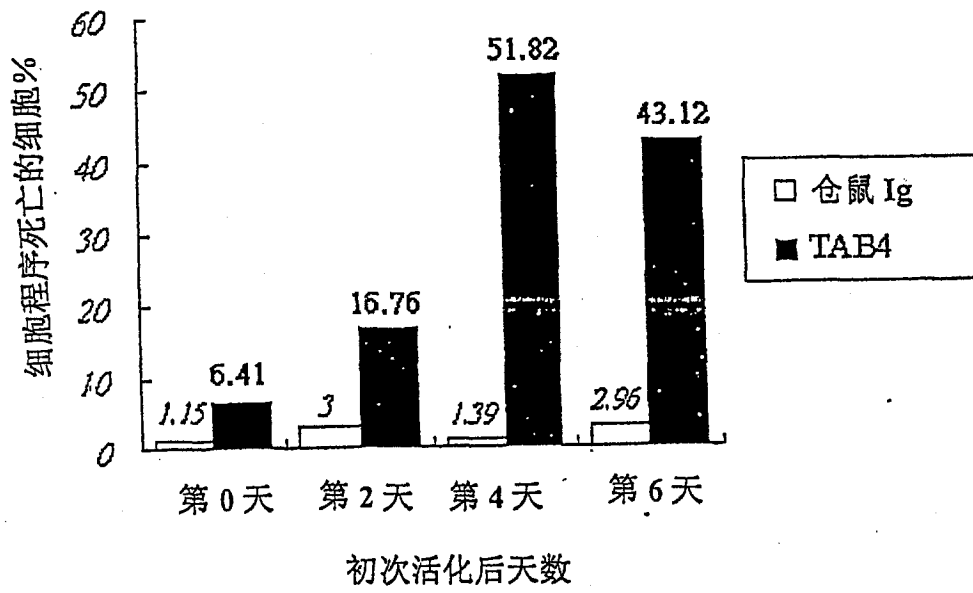
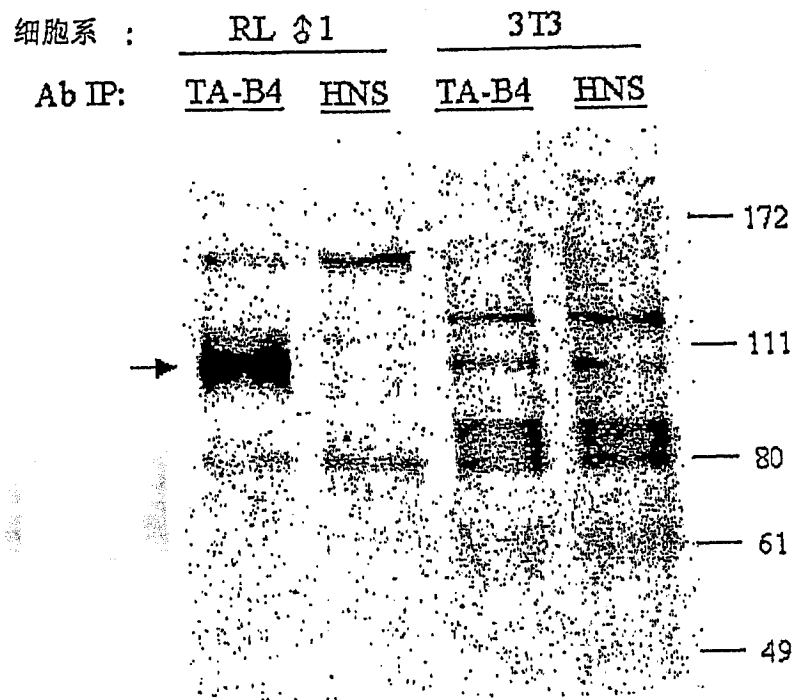


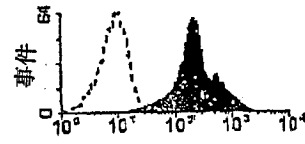
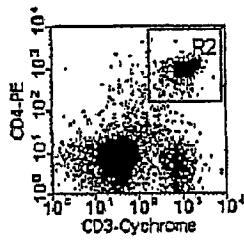
图 1



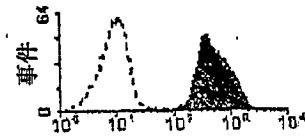
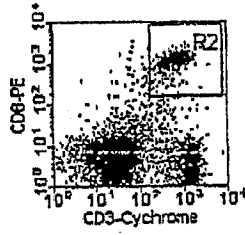
Ab IP: 用于免疫沉淀法的抗体
TA-B4: TA-B4 单克隆抗体
HNS: 仓鼠正常血清

图 2

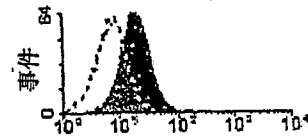
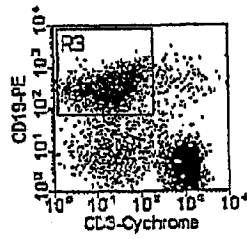
CD4 T



CD8 T



CD19+



Pan-NK+

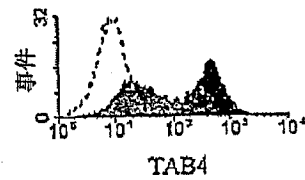
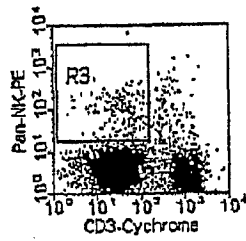


图 3

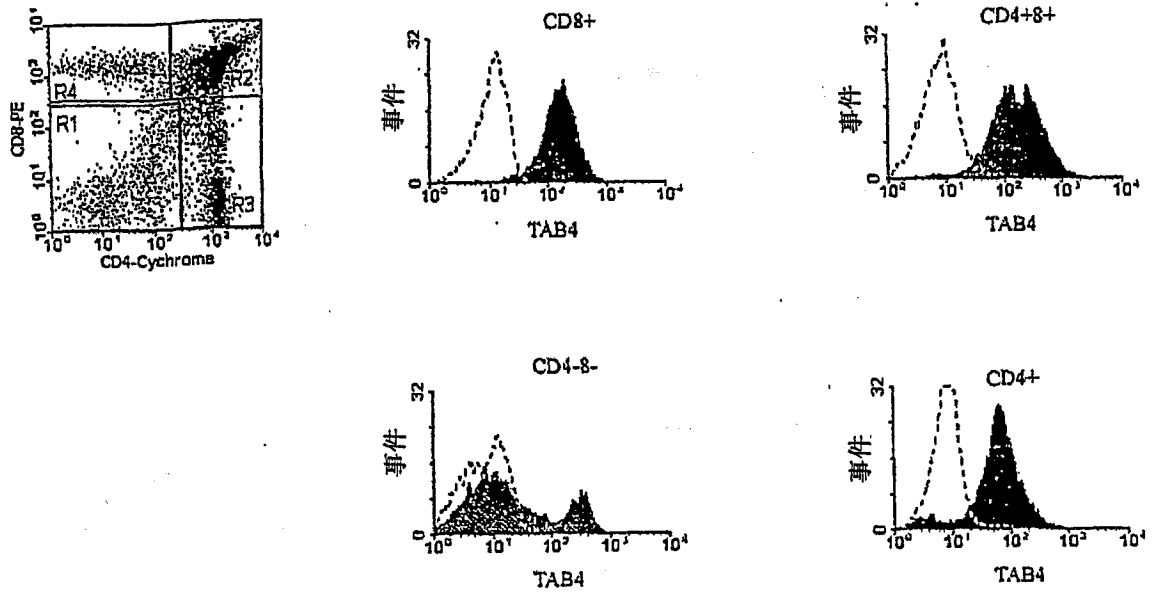


图 4

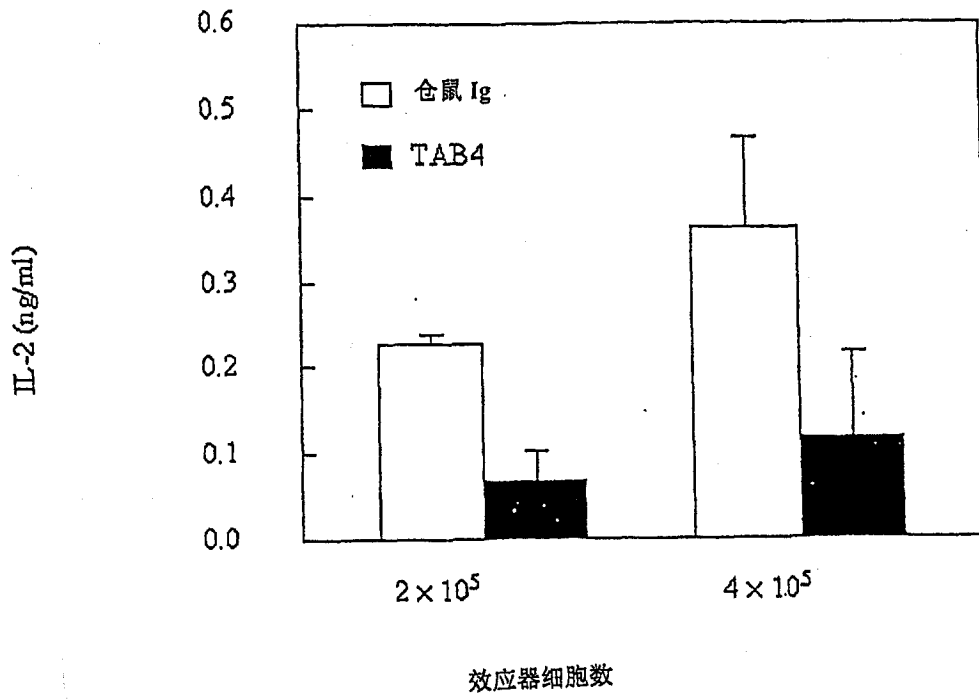


图 5

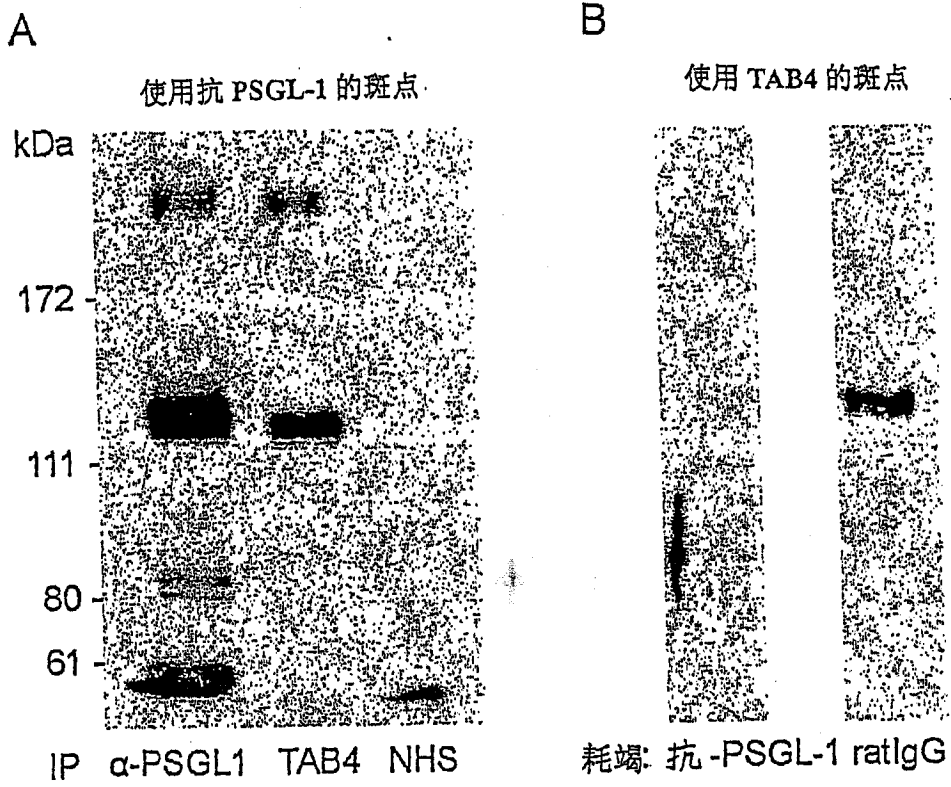


图 6

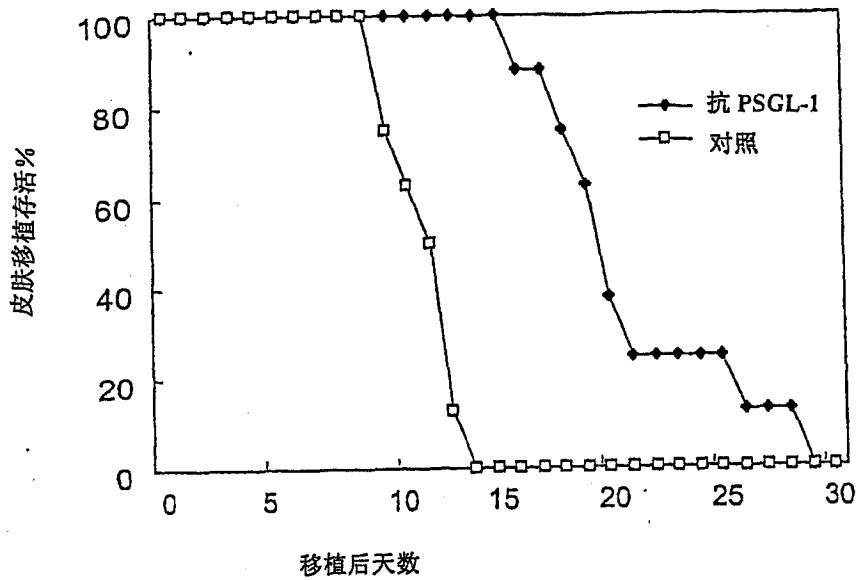


图 7

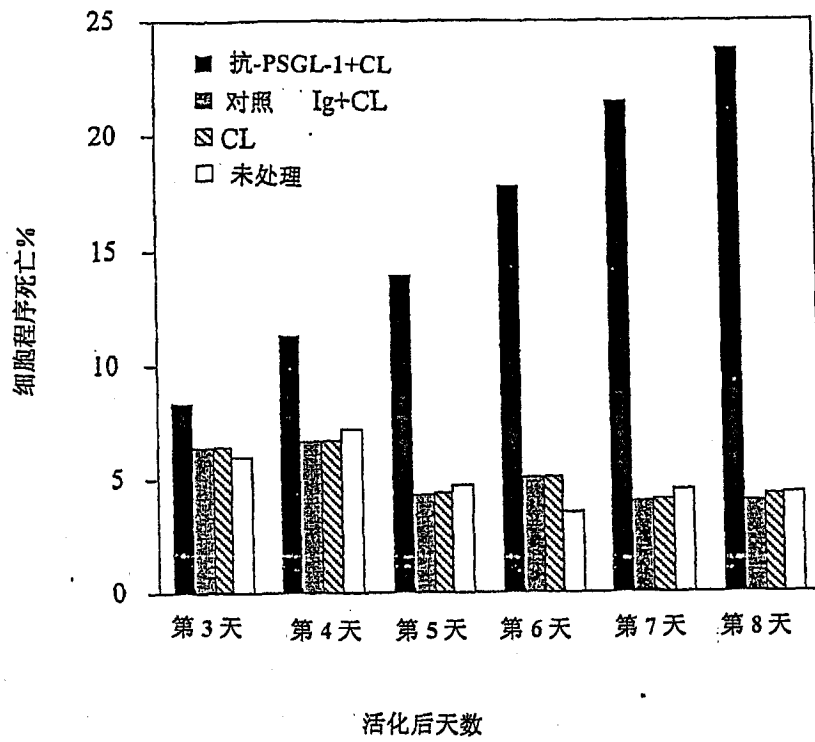


图 8

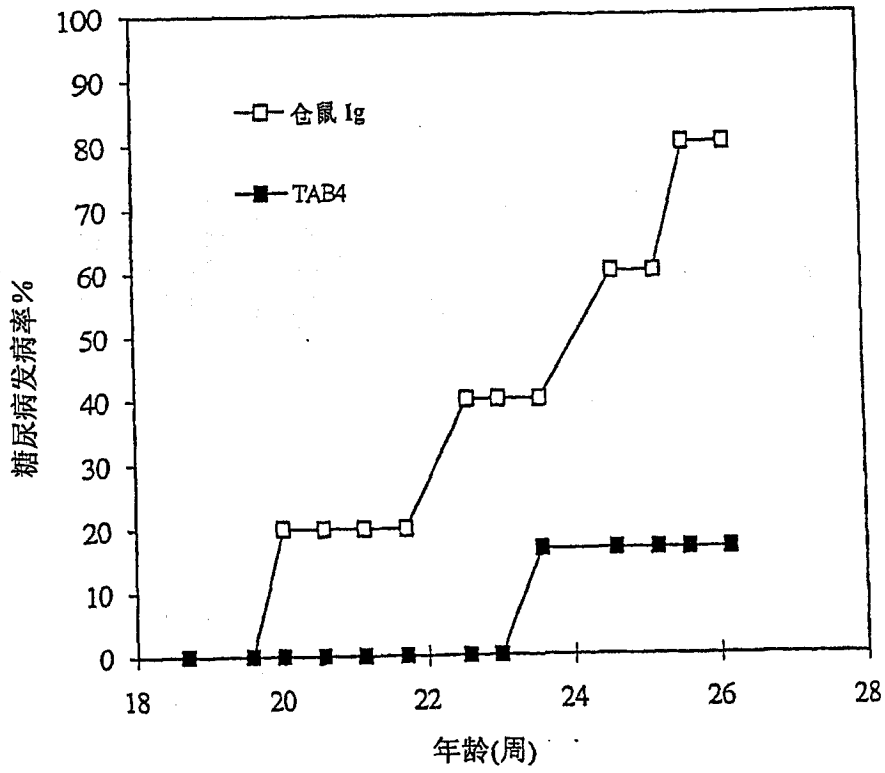


图 9

小鼠选择素染色 (20ug/ml)

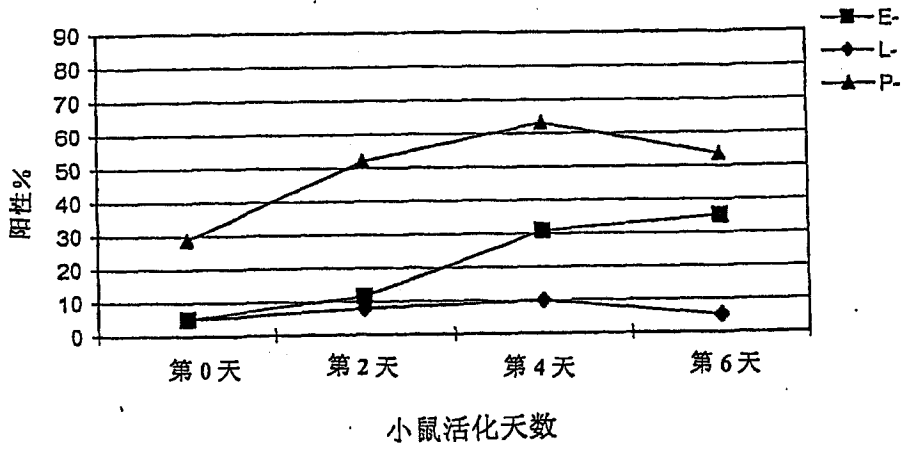


图 10

P- 选择素

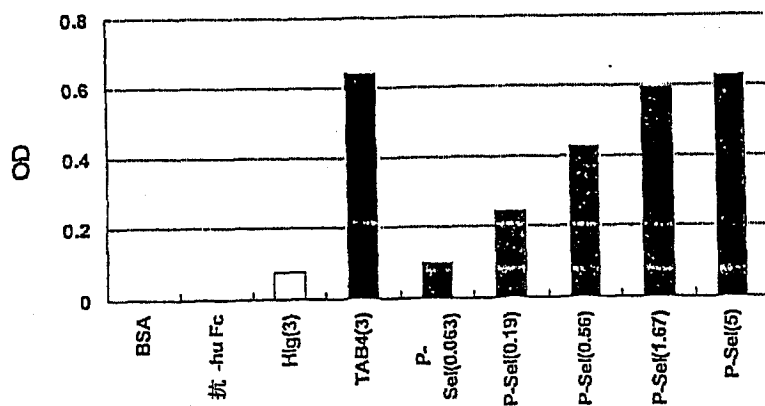


图 11A

E- 选择素

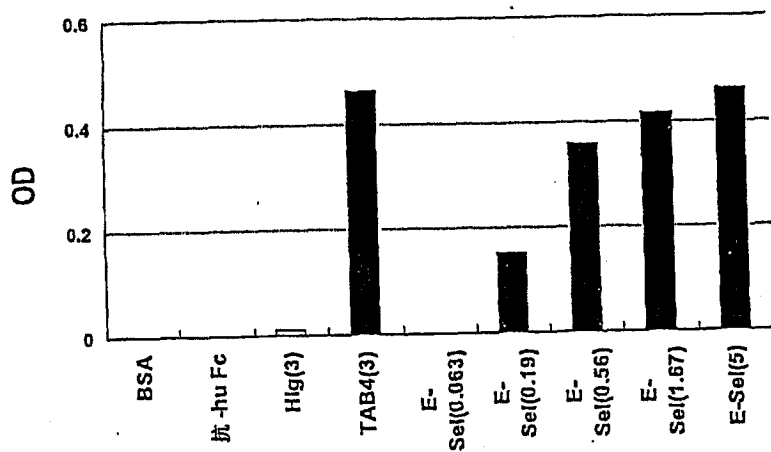


图 11B

L- 选择素

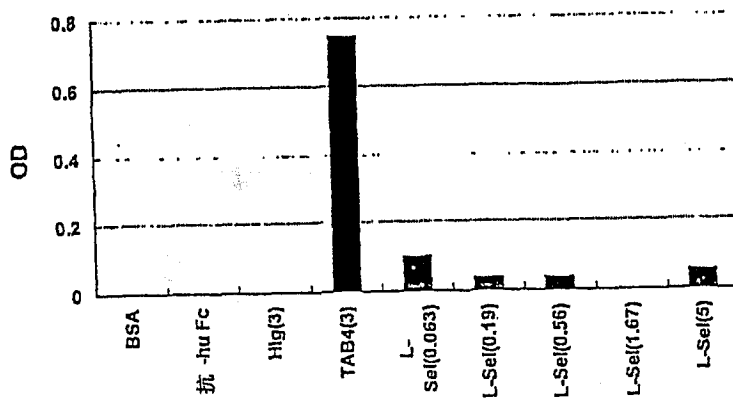


图 11C

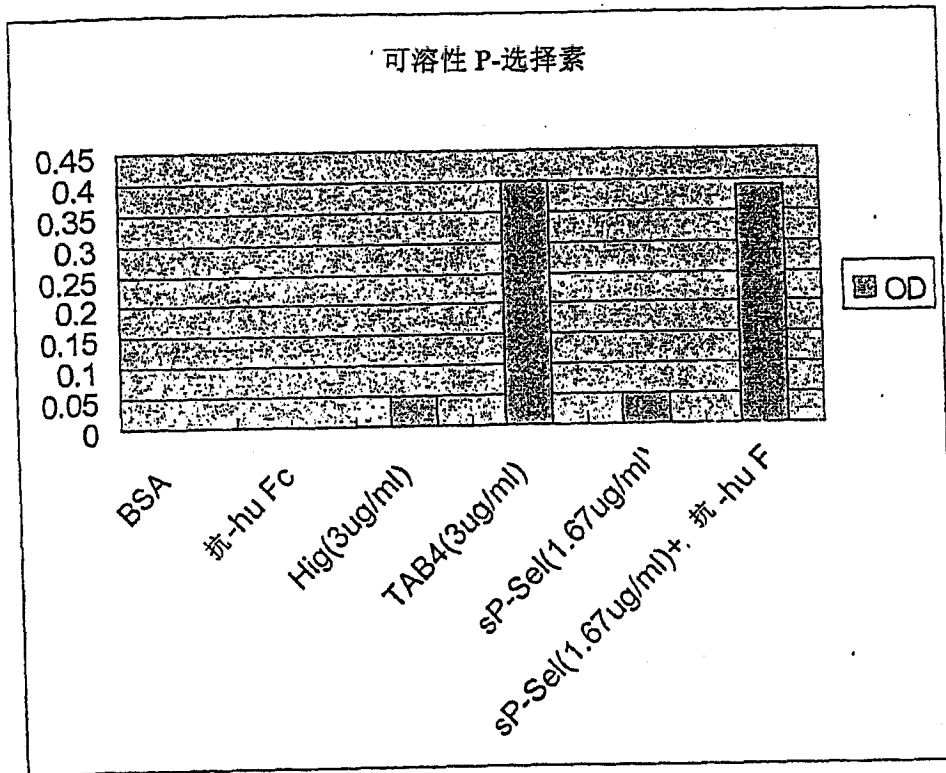


图 12

专利名称(译)	P-选择素糖蛋白配体1的调节剂		
公开(公告)号	CN1852730B	公开(公告)日	2012-05-30
申请号	CN200480026602.9	申请日	2004-09-09
申请(专利权)人(译)	台医生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	台医生物科技合作团体		
[标]发明人	林荣华 张重男		
发明人	林荣华 张重男		
IPC分类号	A61K38/17 G01N33/48 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/28 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/70564 C07K16/2896 C07K2316/95 A61K2039/505 G01N2800/52 C07K2319/30 C07K2317/75		
代理人(译)	刘慧 杨青		
审查员(译)	黄磊		
优先权	10/662906 2003-09-15 US		
其他公开文献	CN1852730A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及与T细胞或天然杀伤(NK)细胞的表面上的P-选择素糖蛋白1 (PSGL-1)结合的多聚体化合物可用于诱导T细胞或NK细胞耗竭和/或用于诱导T细胞或者NK细胞的细胞程序死亡。本发明的多聚体化合物和方法可用于控制在如炎症性疾病、自身免疫疾病、移植排斥、和变应性疾病的疾病状况中的不需要的由T细胞或NK细胞介导的免疫应答。

