

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5808879号
(P5808879)

(45) 発行日 平成27年11月10日(2015.11.10)

(24) 登録日 平成27年9月18日(2015.9.18)

(51) Int.Cl.		F I
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08

請求項の数 14 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2006-526304 (P2006-526304)	(73) 特許権者	509287935
(86) (22) 出願日	平成16年9月9日(2004.9.9)		アプゲノミクス コーポラティブ ユー. エー. オランダ王国 1811シーアール アル クマール、アウデグラハト 202 Oudegracht 202, 181 1CR Alkmaar, The Ne therlands
(65) 公表番号	特表2007-533618 (P2007-533618A)	(74) 代理人	110000671
(43) 公表日	平成19年11月22日(2007.11.22)		八田国際特許業務法人
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/029520	(72) 発明者	リン, ロングーフワ 台湾, タイワン 106, タイペイ, ダー アン ディストリクト, シンシェン エス . ロード, セクション 3, レーン 5 4, ナンバー12, 7エフ
(87) 国際公開番号	W02005/027831		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成17年3月31日(2005.3.31)		
審査請求日	平成19年3月22日(2007.3.22)		
審査番号	不服2013-12628 (P2013-12628/J1)		
審査請求日	平成25年7月2日(2013.7.2)		
(31) 優先権主張番号	10/662,906		
(32) 優先日	平成15年9月15日(2003.9.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 P-セレクチン糖タンパク質リガンド1の修飾因子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

過剰な若しくは望ましくないT細胞が媒介する免疫応答を特徴とする症状を有するかまたは当該症状を発症する危険性があると診断される個体において、T細胞が媒介する免疫応答を防止または抑制するための医薬の製造における、T細胞の表面上の少なくとも二つのP-セレクチン糖タンパク質リガンド1(PSGL-1)タンパク質に結合する多量体化合物(multimeric compound)の使用であって、該多量体化合物が二つのポリペプチド鎖を含み、該ポリペプチド鎖がそれぞれ(i)PSGL-1と結合する結合ドメイン、および(ii)異種アミノ酸配列を有し、

この際、該T細胞の表面上の少なくとも二つのPSGL-1タンパク質に対する該多量体化合物の結合がT細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導し、それにより該個体においてT細胞が媒介する免疫応答を防止または抑制し、

前記結合ドメインが、P-セレクチンのPSGL-1結合ドメインもしくはそのPSGL-1結合断片、P-セレクチン細胞外ドメインもしくはそのPSGL-1結合断片、E-セレクチンのPSGL-1結合ドメインもしくはそのPSGL-1結合断片、またはE-セレクチン細胞外ドメインもしくはそのPSGL-1結合断片を含み、

前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリン重鎖定常領域を含み、

前記ポリペプチド鎖が多量体化合物を形成するよう前記異種アミノ酸配列により結合され、並びに

該化合物が抗PSGL-1抗体またはPSGL-1に結合する抗体断片ではない、多量

10

20

体化合物の使用。

【請求項 2】

該多量体化合物はホモ多量体化合物またはヘテロ多量体化合物である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

該ポリペプチド鎖は異種アミノ酸配列により該多量体化合物を形成するよう共有結合する、請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 4】

該共有結合はジスルフィド結合である、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

該医薬が、さらに異種アミノ酸配列により該多量体化合物に結合しており、該 T 細胞表面上の複数の P S G L - 1 抗原の架橋を誘起する薬剤を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

該個体が、炎症性疾患を有すると診断され、自己免疫疾患を有すると診断され、同種もしくは異種移植を受けるもしくは当該移植を受けると予定され、アレルギー疾患を有すると診断され、または T 細胞性癌を有すると診断されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7】

該 T 細胞は活性化 T 細胞である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8】

T 細胞またはナチュラルキラー (NK) 細胞の死を誘導するための医薬の製造における、T 細胞または NK 細胞の表面上の少なくとも二つの P S G L - 1 タンパク質に結合する多量体化合物の使用であって、該多量体化合物が二つのポリペプチド鎖を含み、該ポリペプチド鎖がそれぞれ (i) P S G L - 1 と結合する結合ドメイン、および (ii) 異種アミノ酸配列を有し、

この際、該 T 細胞または NK 細胞の表面上の少なくとも二つの P S G L - 1 タンパク質へ該多量体化合物が結合することにより T 細胞または NK 細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導し、

前記結合ドメインが、P - セレクチンの P S G L - 1 結合ドメインもしくはその P S G L - 1 結合断片、P - セレクチン細胞外ドメインもしくはその P S G L - 1 結合断片、E - セレクチンの P S G L - 1 結合ドメインもしくはその P S G L - 1 結合断片、または E - セレクチン細胞外ドメインもしくはその P S G L - 1 結合断片を含み、

前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリン重鎖定常領域を含み、

前記ポリペプチド鎖が多量体化合物を形成するよう前記異種アミノ酸配列により結合され、並びに

該化合物が抗 P S G L - 1 抗体または P S G L - 1 に結合する抗体断片ではない、多量体化合物の使用。

【請求項 9】

該多量体化合物はホモ多量体化合物またはヘテロ多量体化合物である、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

該ポリペプチド鎖は、異種アミノ酸配列により該多量体化合物を形成するよう共有結合する、請求項 8 または 9 に記載の使用。

【請求項 11】

該共有結合はジスルフィド結合である、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

該多量体化合物が、異種アミノ酸配列により該多量体化合物に結合しており、該 T 細胞表面上の複数の P S G L - 1 抗原の架橋を誘起する薬剤を投与するため調製される、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

活性化 T 細胞の死を誘起することを有する、請求項 8 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 4】

二つのポリペプチド鎖を含み、該ポリペプチド鎖がそれぞれ (i) P S G L - 1 と結合する結合ドメイン、および (i i) 異種アミノ酸配列を有し、T 細胞の表面上の少なくとも二つの P S G L - 1 タンパク質へ結合することにより T 細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導する、該 T 細胞の表面上の少なくとも二つの P S G L - 1 タンパク質に結合する多量体化合物；および

炎症、自己免疫、移植片拒絶、アレルギー症状、または T 細胞性癌を治療するための該多量体化合物の使用に関する説明書を有し、

この際、前記結合ドメインが、P - セレクチンの P S G L - 1 結合ドメインもしくはその P S G L - 1 結合断片、P - セレクチン細胞外ドメインもしくはその P S G L - 1 結合断片、E - セレクチンの P S G L - 1 結合ドメインもしくはその P S G L - 1 結合断片、または E - セレクチン細胞外ドメインもしくはその P S G L - 1 結合断片を含み、

前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリン重鎖定常領域を含み、

前記ポリペプチド鎖が多量体化合物を形成するよう前記異種アミノ酸配列により結合され、並びに

該化合物が抗 P S G L - 1 抗体または P S G L - 1 に結合する抗体断片ではない、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、免疫応答を制御するための組成物および方法に関するものである。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

望ましくない免疫応答の制御は、炎症性疾患、自己免疫疾患、移植片拒絶、アレルギー疾患、および T 細胞で誘導される癌 (T cell-derived cancer) などの病気の治療において重要な問題である。過度に攻撃的な T 細胞の活性は、免疫抑制によるかまたは免疫トランスの誘導によって制御されうる。トランスは、免疫系が抗原に対して応答しなくなる状態として規定されるが、抗原に対する免疫応答を抑制する免疫抑制は、一般的に、薬剤の継続使用を必要とする。臓器移植では、T 細胞はアロ抗原に対する免疫応答において不可欠な役割を果たす。現在の免疫抑制レジメは、一般的に、T 細胞の重要な増殖因子である、I L - 2 の転写を遮断するか、または I L - 2 依存性の増殖を阻害する、コルチコステロイド、シクロスポリンまたはラパマイシンの使用を包含する。しかしながら、T 細胞枯渇剤 (例えば、C D 3、C D 4、C D 8) として、またはサイトカインシグナル伝達若しくは T 細胞の共刺激 (co-stimulatory) 経路の阻害剤 (例えば、C D 2 5、B 7 - 1、B 7 - 2、C D 1 5 2、C T L A 4) としてのいずれかで作用する多くのモノクローナル抗体は、副作用または毒性を制限しつつ拒絶の発生を抑制するのに有効であることが示されている。これらの薬剤によっては、自己免疫疾患の治療および移植片生着期間の延長においてある程度成功していることが示されている。

【0 0 0 3】

アポトーシスは、免疫系の適切な機能、および望ましくない細胞を除去する主要な機構を維持するのに極めて重要であると広く考えられている (Kabelitz et al. Immunol. Today 14:338-340 (1993); Raff, Nature:356:397-399 (1992))。細胞の内側または外側から派生する様々なシグナルは、細胞の生存および死に影響を及ぼす。F a s (または、C D 9 5、M W = 4 3 k D)、T N F R 2 (M W = 7 5 k D)、C D 2 (M W = 4 5 k D) および C T L A - 4 (M W = 3 3 k D) などの T 細胞表面分子に対する抗体は、T 細胞のア

10

20

30

40

50

ポトシスを誘起する(Osborne, *Curr. Opin. Immunol.* 8:245-248 (1996); Lin et al. *J. Immunol.* 158:598-603 (1997); Zhang et al. *Nature*:377:348-350 (1995); Lai et al. *Eur. J. Immunol.* 25:3243-3248 (1995); Mollereau et al. *J. Immunol.* 156:3184-3190 (1996); Gribben et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:811-815 (1995))。望ましくないT細胞を制御するためにFasおよびTNFR2分子を使用する試みは、これら2分子が免疫細胞のみならず、肝臓などの幾つかの他の重要な器官系でも発現するという事実によって妨げられた。この発現パターンは、潜在的に、これらの2抗体の治療用途を制限する(Ogasawara et al. *Nature* 364:806-809 (1993); Pfeffer et al. *Cell*:73:457-467 (1993); Engelmann et al. *J. Biological Chemistry* 265:14497-14504 (1990))。

【0004】

10

セレクチン、インテグリンおよび免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーメンバーは、白血球および血小板と、それら自身または細胞外基質および血管内皮との相互作用において重要である、3種の主要な固着分子である(Springer, *Nature* 346:425(1990); Osborn, *Cell* 62:3 (1990); Hynes, *Cell* 69:11 (1992))。一つの細胞型上の固着分子は、しばしば異なる細胞型上に発現した他の固着分子と結合し、リガンド-受容体の対を形成する。

【0005】

セレクチン系統群は、P-セレクチン(CD62、CD62P、GMP140、およびPADGEMとしても知られている)、E-セレクチン(ELAM-1およびCD62Eとしても知られている)、およびL-セレクチン(LECAM-1、Mel-14、LAM-1、およびCD62Lとしても知られている)を含む。該セレクチン類は、高度に類似しており、120のアミノ酸N-末端レクチンドメイン(120 amino acid N-terminal domain)、EGF様ドメイン、補体調節タンパク質において認められるものと類似しているかなり多数のマルチプルショートコンセンサス反復(SCR)ドメイン、その後膜貫通ドメインおよび短い細胞質側末端で構成されている(Siegelman et al., *Science* 243:1165-1172 (1989); Laskey et al., *Cell* 56:1045-1055 (1989); Tedder et al., *J. Exp. Med.* 170:123-133 (1989); Johnson et al., *Cell* 56:1033-1044 (1989); Bevilacqua et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9238-9242 (1987), Bevilacqua et al., *Science* 243:1160-1165 (1989), Bevilacqua et al., *J. Clin. Invest.* 91:379-387 (1983), Camerini et al., *Nature* 280:496-498 (1989))。該セレクチン類は重複部分を有しているが、細胞表面の受容体に対し異なる特異性を有している(Bevilacqua et al., *J. Clin. Invest.* 91:379-387 (1993); Feize, *Current Opinion in Struct. Biol.* 3:701-710 (1993); Breg et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184:1048-1055 (1992); Foxall et al., *J. Cell Biol.* 117:895-902 (1992); Larsen et al., *J. Biol. Chem.* 267:11104-11110 (1992); Polley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6224-6228 (1991))。

20

30

【0006】

P-セレクチン、E-セレクチン、およびL-セレクチンは、炎症の間、最初の白血球-内皮細胞および血小板-白血球の固着性の相互作用を媒介する(Bevilacqua et al., 1993, 前記)。全三種のセレクチンは、活性化された内皮と白血球の初期の“ローリング”相互作用に関与することが証明されている(von Andrian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7538-7542 (1992); Ley et al., *Blood* 77:2553-2555 (1991); Abassi et al., *J. Clin. Invest.* 92:2719-2730 (1993); Dore et al., *Blood* 82:1308-1316 (1993); Jones et al., *Biophys. J.* 65:1560-1569 (1993); Mayadas et al., *Cell* 74:541-554 (1993))。活性化型血小板および内皮細胞上に発現したP-セレクチンは、ほとんどの白血球上の細胞表面タンパク質に結合する(McEver et al., *J. Biol. Chem.* 250:9799-9804 (1984))。サイトカイン-活性化型内皮細胞上(例えば、6-8時間のTNF-またはIL-1刺激の後)に発現したE-セレクチンは、ほとんどの白血球上の細胞表面タンパク質に結合する(McEver et al., *J. Clin. Invest.* 100:485-492 (1997); Bevilacqua et al., 1987, 前記; Bevilacqua et al., 1989, 前記)。ほとんどの白血球上に発現するL-セレクチンは、いくつかの内皮細胞上および他の白血球上の細胞表面タンパク質に結合す

40

50

る(Gallatin et al., Nature 304:30-34 (1983); Breg et al., Immunol. Rev. 108:5-18 (1989); Breg et al., J. Cell. Biol. 114:343-349 (1991), Hallman et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 174:236-243 (1991); Smith et al., J. Clin. Invest. 87:609-618 (1991); Spertini et al., J. Immunol. 147:2565-2573 (1991)). 全三種のセレクチンは、その発現が白血球、特にT細胞およびNK細胞に大きく制限される細胞表面タンパク質、PSGL-1に結合することが示されている。PSGL-1の翻訳後修飾が、P-セレクチン、E-セレクチン、およびL-セレクチンへの結合のために必要とされる(McEver et al., J. Clin. Invest., 1997, 前記)。

【発明の開示】

【0007】

発明の要約

本発明は、T細胞が、T細胞表面抗原P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1(PSGL-1)の関与によって枯渇されうるといふ知見および/またはアポトーシスを受けるよう誘導されうるといふ知見に基づくものである。T細胞の枯渇は、過剰な若しくは望ましくないT細胞が媒介する免疫応答または過剰な若しくは望ましくないT細胞の増殖に関連する症状の治療に特に有効でありうる。例えば、T細胞の枯渇は、炎症性疾患、自己免疫疾患、移植片拒絶、アレルギー疾患、および/またはT細胞で誘導される癌(T cell-derived cancer)に関連する望ましくないT細胞の活性または増殖の抑制または排除を生じさせうる。本発明は、PSGL-1機能の修飾因子に関するスクリーニング方法はもちろん、T細胞が媒介する免疫応答を防止または抑制するためのPSGL-1機能の修飾因子の使用方法も包含する。

【0008】

一態様においては、本発明は、個体においてT細胞が媒介する免疫応答の防止または抑制方法を特徴とする。本方法は、以下の段階を包含する：過剰な若しくは望ましくないT細胞が媒介する免疫応答を特徴とする症状を有するかまたは当該症状を発症する危険性があると診断される個体を選択すること；および該T細胞の表面上のPSGL-1への化合物の結合がT細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導し、それにより該個体におけるT細胞が媒介する免疫応答を防止または抑制する、該T細胞の表面上のPSGL-1に結合する化合物を、該個体に投与すること。

【0009】

このような方法に使用される化合物としては、PSGL-1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。一例では、該化合物は、PSGL-1に特異的に結合するモノクローナル抗体である。一実施態様において、本方法は、モノクローナル抗体に結合し、該T細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の架橋を誘起する薬剤を投与するさらなる段階を包含する。

【0010】

実施態様によっては、本方法は、T細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導する、該T細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の、架橋を誘起することを包含する。

【0011】

実施態様によっては、本方法は以下の段階を包含する：(i) 過剰な若しくは望ましくないT細胞が媒介する免疫応答を特徴とする症状を有するかまたは当該症状を発症する危険性があると診断される個体を選択すること；および
(ii) 二つのポリペプチド鎖を含み、該ポリペプチド鎖がそれぞれ(a) PSGL-1と結合する結合ドメイン、および(b) 該ポリペプチド鎖が多量体化合物(multimeric compound)を形成するよう異種アミノ酸配列により結合されている異種アミノ酸配列を有する、該T細胞の表面上の少なくとも二つのPSGL-1タンパク質に結合する該多量体化合物を、該個体に投与することを有し、この際、該T細胞の表面上の少なくとも二つのPSGL-1タンパク質へ該多量体化合物が結合することによりT細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導し、それにより該個体においてT細胞が媒介する免疫応答を防止または抑制すること。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

該多量体化合物は、ホモ多量体化合物またはヘテロ多量体化合物であってもよい。該結合ドメインは、必要に応じて、P - セレクチン細胞外ドメイン若しくはそのP S G L - 1結合断片、E - セレクチン細胞外ドメイン若しくはそのP S G L - 1結合断片、L - セレクチン細胞外ドメイン若しくはそのP S G L - 1結合断片、抗P S G L - 1抗体若しくはそのP S G L - 1結合断片、ファージディスプレイライブラリーから選択されるP S G L - 1結合ポリペプチド、または上記いずれかの組み合わせを含んでいてもよい。

【 0 0 1 3 】

実施態様によっては、該多量体化合物は、抗P S G L - 1抗体またはP S G L - 1に結合する抗体断片を含まない。

10

【 0 0 1 4 】

該異種アミノ酸配列は、必要に応じて、例えば、免疫グロブリン重鎖定常ドメインなどの細胞表面受容体結合ドメインを含んでいてもよい。実施態様によっては、該ポリペプチド鎖は、該多量体化合物を形成するよう異種アミノ酸配列により、例えば、ジスルフィド結合など、共有結合的に結合されている。

【 0 0 1 5 】

実施態様によっては、本方法は、異種アミノ酸配列により該多量体化合物に結合し、該T細胞表面上の複数のP S G L - 1抗原の架橋を誘起する薬剤を該個体へ投与する付加的な段階を含んでいてもよい。

【 0 0 1 6 】

実施態様によっては、本明細書に記載の方法は、自己免疫疾患を有すると診断された個体を選択する段階を包含する。他の例において、本方法は、炎症性疾患を有すると診断された個体を選択する段階を包含する。他の例において、本方法は、同種または異種移植を受けたかまたは当該移植を受ける予定の個体を選択する段階を包含する。他の例において、本方法は、アレルギー疾患を有すると診断された個体を選択する段階を包含する。他の例において、本方法は、T細胞性癌を有すると診断された個体を選択する段階を包含する。

20

【 0 0 1 7 】

実施態様によっては、該T細胞は活性化T細胞である。一例では、該T細胞はC D 4 + T細胞である。他の例では、T細胞はC D 8 + T細胞である。

30

【 0 0 1 8 】

実施態様によっては、本方法は、該化合物（例えば、多量体化合物）の投与前に個体から採取した第1の生体試料におけるT細胞数を検出し、化合物（例えば、多量体化合物）の投与後の個体から採取した第2の生体試料におけるT細胞数と結果を比較する段階を包含する。

【 0 0 1 9 】

実施態様によっては、本方法は、化合物（例えば、多量体化合物）の投与前に個体から採取した第1の生体試料におけるT細胞の生物活性を検出し、化合物（例えば、多量体化合物）の投与後の個体から採取した第2の生体試料におけるT細胞の生物活性と結果を比較する段階を包含する。

40

【 0 0 2 0 】

実施態様によっては、該投与により、該個体の活性化T細胞の少なくとも10%の枯渇をもたらす。実施態様によっては、該投与により、該個体の活性化T細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、またはそれ以上の枯渇をもたらす。

【 0 0 2 1 】

実施態様によっては、抗体若しくはその抗原結合断片または多量体化合物は、抗体若しくはその抗原結合断片または多量体化合物に曝した後に個体の活性化T細胞の少なくとも10%の死を誘起する。実施態様によっては、このような投与は、個体の活性化T細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、またはそれ以上の死を誘起する。細胞の死は、抗体若しくはその抗原結合断片または多量体化合物に曝された後、例えば、

50

1、2、3、4、5、6、7日、またはそれ以上の日数など、いずれの時間で測定されてもよい。

【0022】

他の態様において、本発明は、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞の死の誘起方法の特徴とする。本方法は、以下の段階を包含する：その細胞表面上においてPSGL-1を発現しているT細胞またはNK細胞を供給すること；および該T細胞またはNK細胞の表面上のPSGL-1に結合する化合物と該T細胞またはNK細胞を接触させることを有し、この際、該T細胞またはNK細胞の表面上のPSGL-1へ化合物が結合することによりT細胞またはNK細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導すること。

【0023】

このような方法に使用される化合物としては、PSGL-1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が含まれる。一例では、該化合物は、PSGL-1に特異的に結合するモノクローナル抗体である。実施態様によっては、本方法は、モノクローナル抗体に結合し、T細胞またはNK細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の架橋を誘起する薬剤とモノクローナル抗体を接触させる段階を包含する。

【0024】

一実施態様において、本方法は以下の段階を包含する：(i)その細胞表面上でPSGL-1を発現しているT細胞またはNK細胞を供給すること；および(ii)二つのポリペプチド鎖を含み、該ポリペプチド鎖がそれぞれ(a)PSGL-1と結合する結合ドメイン、および(b)該ポリペプチド鎖が多量体化合物を形成するよう異種アミノ酸配列により結合されている異種アミノ酸配列を有する、該T細胞またはNK細胞の表面上の少なくとも二つのPSGL-1タンパク質に結合する該多量体化合物と該固体を接触させることを有し、この際、該T細胞またはNK細胞の表面上の少なくとも二つのPSGL-1タンパク質へ該多量体化合物が結合することにより該T細胞またはNK細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導すること。

【0025】

該多量体化合物は、ホモ多量体化合物またはヘテロ多量体化合物であってもよい。該結合ドメインは、必要に応じて、P-セレクトリン細胞外ドメイン若しくはそのPSGL-1結合断片、E-セレクトリン細胞外ドメイン若しくはそのPSGL-1結合断片、L-セレクトリン細胞外ドメイン若しくはそのPSGL-1結合断片、抗PSGL-1抗体若しくはそのPSGL-1結合断片、ファージディスプレイライブラリーから選択されるPSGL-1結合ポリペプチド、または上記いずれかの組み合わせを含んでいてもよい。

【0026】

該異種アミノ酸配列は、必要に応じて、例えば、免疫グロブリン重鎖定常ドメインなどの細胞表面受容体結合ドメインを含んでいてもよい。実施態様によっては、該ポリペプチド鎖は、該多量体化合物を形成する異種アミノ酸配列により、例えば、ジスルフィド結合など、共有結合的に結合されている。

【0027】

実施態様によっては、本方法は、異種アミノ酸配列により該多量体化合物に結合し、該T細胞表面上の複数のPSGL-1抗原の架橋を誘起する薬剤を該個体へ投与する追加の段階を包含する。

【0028】

実施態様によっては、本方法は、該T細胞またはNK細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の架橋を誘起し、該架橋が該T細胞またはNK細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導する段階を包含する。

【0029】

本明細書に記載の方法の実施態様によっては、該T細胞は活性化T細胞である。一例では、該T細胞はCD4⁺T細胞である。他の例では、該T細胞はCD8⁺T細胞である。

【0030】

10

20

30

40

50

本明細書に記載の方法の実施態様によっては、本方法は、該化合物（例えば、多量体化合物）との接触後に該T細胞またはNK細胞の生存率を評価する段階を包含する。

【0031】

本明細書に記載の方法の実施態様によっては、本方法は、該化合物（例えば、多量体化合物）との接触後に該T細胞またはNK細胞の生物活性を評価する段階を包含する。

【0032】

実施態様によっては、本方法は、活性化T細胞の死を誘起することを包含する。

【0033】

他の態様において、本発明は、PSGL-1機能の修飾因子のスクリーニング方法の特徴とする。本方法は以下の段階を包含する：細胞表面上でPSGL-1を発現している細胞を供給すること；該細胞を試験物質と接触させること；および該細胞を試験物質と接触させた後の該細胞の生存率を測定し、該試験物質がPSGL-1機能の修飾因子であるか否か判定すること。

10

【0034】

一実施態様において、本方法は、該試験物質によって誘起される該細胞の死を検出することにより、該試験物質がPSGL-1機能の修飾因子であるか否か判定する段階を包含する。

【0035】

一実施態様において、該試験物質は、PSGL-1に特異的に結合する抗体またはこの抗原結合断片である。一例では、該試験物質は、PSGL-1に特異的に結合するモノクローナル抗体である。一実施態様において、本方法は、モノクローナル抗体を、モノクローナル抗体に結合し、細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の架橋を誘起する薬剤と接触させる段階を包含する。

20

【0036】

一実施態様において、本方法は、細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導する、該細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の、架橋を誘起する段階を包含する。

【0037】

一実施態様において、該T細胞は活性化T細胞である。一例では、該T細胞はCD4+T細胞である。他の例では、該T細胞はCD8+T細胞である。

【0038】

一実施態様において、本方法は、大量の該試験物質を製造し、該試験物質を製薬上許容できる担体に配合する段階を包含する。

30

【0039】

他の態様において、本発明は、該T細胞の表面上のPSGL-1へ化合物が結合することによりT細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導する、該T細胞の表面上のPSGL-1に結合する化合物；および炎症、自己免疫、移植片拒絶、アレルギー症状、またはT細胞性癌などの、過剰な若しくは望ましくないT細胞が媒介する免疫応答または過剰な若しくは望ましくないT細胞増殖に関連する症状を治療するための化合物の使用に関する説明書を含むキットを特徴とする。

【0040】

一実施態様において、該キットは、(i)二つのポリペプチド鎖を含み、該ポリペプチド鎖がそれぞれ(a)PSGL-1と結合する結合ドメイン、および(b)該ポリペプチド鎖が多量体化合物を形成するよう異種アミノ酸配列により結合されている異種アミノ酸配列を有し、該T細胞の表面上の少なくとも二つのPSGL-1タンパク質へ結合することによりT細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導する、該T細胞の表面上の少なくとも二つのPSGL-1タンパク質に結合する該多量体化合物；および(ii)炎症、自己免疫、移植片拒絶、アレルギー症状、またはT細胞性癌などの、過剰な若しくは望ましくないT細胞が媒介する免疫応答または過剰な若しくは望ましくないT細胞増殖に関連する症状を治療するための化合物の使用に関する説明書を含む。

40

【0041】

50

本発明の利点は、関連する望ましくないまたは有害な免疫応答を引き起こすことなく、T細胞を枯渇および/またはT細胞のアポトーシスを誘起できることである。例えば、実施態様によっては、本明細書に記載の個体への抗PSGL-1抗体または多量体化合物の投与により、IL-2またはTNF-などの炎症性サイトカインのレベルの望ましくない上昇は生じない。

【0042】

本発明の他の利点は、T細胞のアポトーシスを誘起するアゴニスト組成物の使用によりT細胞の枯渇をもたらすことである。よって、本発明は、免疫受容体を結合し、該受容体により媒介される免疫の活性化を妨げることにより作用するアンタゴニスト組成物（例えば、拮抗性抗PSGL-1抗体または拮抗性の可溶性セレクトイン断片）の使用によりもたらされる、受動的な免疫抑制よりむしろ、能動的な免疫抑制方法を提供する。

10

【0043】

本発明の他の利点は、その発現が白血球、および特にT細胞およびNK細胞にかなり限定される、細胞表面タンパク質、PSGL-1の標的化が可能であることである。したがって、本明細書中に記載の化合物は、肝臓細胞などの他の細胞型の有意なレベルのアポトーシスを誘起しない。生存を脅かす全身性サイトカイン応答を有意に誘起したりまた他の器官系に損傷を与えたりすることなく、選択的な枯渇を目的としたT細胞およびNK細胞（移植片拒絶にかかわる重要なCD3⁺細胞型）の標的化は、免疫抑制剤の望ましい特性である。

【0044】

20

特記しない限り、本明細書中で使用される技術的および科学用語はすべて、本発明が属する分野における通常の知識を有するものによって一般的に理解されるのと同様の意味を有する。本明細書中の記載と同様または等価の方法および材料が本発明の実施または試験において使用可能であるが、好適な方法および材料を以下に説明する。本明細書中に記載のすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献が、そのまま文献として引用される。専門用語の不一致がある場合には、本明細書が制御するであろう。加えて、記載の材料および方法は、例示にすぎず、本発明を何ら制限するものではない。

【0045】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

30

【0046】

図面の簡単な説明

図1は、いつ活性化T細胞が、TAB4（抗PSGL-1モノクローナル抗体）が媒介するアポトーシスシグナルに対する感受性を得るかを調べた経時的な実験の結果を示すものである。

【0047】

図2は、TAB4抗体により認識される抗原の細胞表面のビオチン化および免疫沈降の結果を示すものである。

【0048】

図3は、脾臓CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD19⁺B細胞、およびNK細胞上のPSGL-1抗原の発現を示すものである。

40

【0049】

図4は、CD4⁺、CD8⁺、およびCD4⁺8⁺、並びにCD4⁻8⁻胸腺細胞上のPSGL-1抗原の発現を示すものである。

【0050】

図5は、レスポンドー(responder)としてのTAB4（またはハムスターIg）で処置されたBalb/cマウスから単離された脾臓細胞およびスティミュレーター(stimulator)としてのH2ミスマッチC3H脾臓細胞を用いた混合リンパ球インキュベートで生産されたIL-2レベルを示すものである。

【0051】

50

図6は、(A)TAB4抗体で免疫沈降したタンパク質が市販の抗PSGL-1抗体により認識可能であることおよび(B)抗PSGL-1抗体でT細胞可溶産物を予め清澄化(preclearing)することで、TAB4により認識されたタンパク質を枯渇できることを示すウェスタンブロット分析を示すものである。

【0052】

図7は、Balb/cマウスから皮膚移植を受け、抗PSGL-1抗体(黒塗りの菱形)または対照抗体(白抜きの四角)で処置したC57BL/6マウスにおける生存した移植片の割合(%)を示すものである。

【0053】

図8は、活性化ヒト末梢血単核球を抗ヒトPSGL-1抗体で処置した後のアポトーシス性T細胞の割合(%)の経時変化を示すものである。

【0054】

図9は、抗PSGL-1抗体(黒塗りの四角)または対照抗体(白抜きの四角)で処置した自己免疫性非肥満性糖尿病(NOD)オスマウスにおける糖尿病の発症率を示すものである。

【0055】

図10は、マウスP-セレクチン、E-セレクチン、およびL-セレクチンのマウス活性化T細胞への結合を示すものである。

【0056】

図11A-11Cは、E-セレクチン(図11A)、P-セレクチン(図11B)、およびL-セレクチン(図11C)の多量体の形態(multimeric forms)によるマウス活性化T細胞のアポトーシスの誘起を示している。

【0057】

図12は、可溶性P-セレクチン-Fc融合タンパク質の架橋によるインビトロでのマウス活性化T細胞のアポトーシスの誘起を示している。

【0058】

詳細な説明

本発明は、T細胞の表面上にあるPSGL-1分子の機能を調節することによるT細胞活性の調節方法に関するものである。本明細書に記載のアゴニスト組成物とPSGL-1の結合は、T細胞の枯渇を生じさせることおよび/またはT細胞がアポトーシスを受けるのを誘起することができる。したがって、これらのアゴニスト組成物は、炎症性疾患、自己免疫疾患、移植片拒絶、アレルギー症状、および/またはT細胞が誘導する癌などの免疫が関連する症状を制御するための治療剤として有用である。該アゴニスト組成物はまた、T細胞の存在または活性が望ましくない生体試料からT細胞を枯渇させるのにも有用である。

【0059】

PSGL-1タンパク質

PSGL-1は、好中球、TおよびBリンパ球、NK細胞、単球、樹状細胞、および原始ヒトCD34造血前駆細胞で発現する細胞表面固着分子である。セレクチンと相互作用することにより、PSGL-1は、内皮での白血球のローリング(rolling)および炎症組織への白血球の溢出を仲介する。T細胞のE-およびP-セレクチンへのPSGL-1が仲介する結合、または移動は、特異的に調節される。例えば、CLA(皮膚リンパ球抗原)エピトープの出現は、記憶の移行(memory transition)に未経験である(naive)T細胞上で誘導されると考えられる。活性化ヘルパー1のみでなくヘルパー2 T細胞も機能性PSGL-1を発現して、皮膚の炎症ドメインへの移動が可能になる。

【0060】

PSGL-1は、P-セレクチンに結合するために、特異的にシアリル化され、フコシル化され、さらに硫酸化されなければならないシアロムチンである。PSGL-1分子は、そのN末端において異なる度合いのグリコシル化および硫酸化部位を特徴とするイソ型で存在する。休止抹消血TおよびB細胞、リンパ細胞系統およびインビトロの活性化抹消

10

20

30

40

50

血T細胞は、同レベルのPSGL-1を発現する。しかし、活性化T細胞のみが機能性形態のPSGL-1を示し、P-セクチンに貪欲に結合する。このような活性化依存性結合活性は、活性化T細胞でのアルファ(1,3)フコシルトランスフェラーゼの活性レベルの上昇によって示唆されるように、異なる翻訳後修飾の結果であると考えられる。PSGL-1イソ型はまた、L-セクレチンおよびE-セクレチンに対し異なる親和性を示す。例えば、CLA陽性イソ型を示すヒトT細胞はE-およびP-セクレチンの双方に繫留し(tether)、回転できるが、CLAエピトープのないPSGL-1を発現するT細胞はP-セクレチンにのみ結合する。さらに、P-セクレチンとPSGL-1の結合は、硫酸化のための3つのチロシン残基およびグリコシル化のための1つのトレオニン残基を包含する末端デカペプチドの存在を条件とする。

10

【0061】

PSGL-1タンパク質は、組み換え方法および/または生体材料からの天然のPSGL-1タンパク質を単離することによって調製できる。組み換えPSGL-1タンパク質は、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、原核または真核細胞で生産される。PSGL-1をコード化する核酸は、タンパク質の組み換え生産に使用可能である(例えば、PSGL-1ポリペプチドをコード化する核酸の一例としてGenBank™受託番号NM_003006を参照)。PSGL-1に対する抗体もまた公知であり、抗原の精製に使用可能である(例えば、Herron et al. (2000) Science Jun 2;288(5471):1653-56; WO 00/25808を参照)および/または本明細書に記載の方法に使用可能である。PSGL-1はさらに、以下に制限されるものではないが、Sako et al. (1993) Cell 75:1179; Vachino et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:21966; およびVeldman et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:16470などの参考文献に記載されている。

20

【0062】

PSGL-1の組み換え生産では、PSGL-1およびその修飾アルファ(1,3)フコシルトランスフェラーゼ、Fuc-TVII、双方の同時発現が、PSGL-1の機能発現には必要であるかもしれない。加えてまたはこれに代わり、PSGL-1の組み換え生産は、プロペプチドを除去するためのPACEをコード化する核酸および/またはチロシンスルホトランスフェラーゼをコード化する核酸との同時形質移入によりなされるかもしれない。

【0063】

抗PSGL-1抗体は、生体材料からのPSGL-1抗原の単離および精製に使用可能である。例えば、個体由来のT細胞またはT細胞系統などのPSGL-1タンパク質を発現する細胞型が、タンパク質源として使用される。精製したら、該タンパク質は本明細書に記載の様々な方法に使用される。例えば、精製PSGL-1タンパク質は、T細胞上のPSGL-1機能の修飾因子のインビトロスクリーニングにまたは該タンパク質に対する抗体を調製するための免疫原として使用可能である。

30

【0064】

抗PSGL-1抗体

PSGL-1ポリペプチド(またはその免疫原性断片または類似体)は、本発明の方法に有用な抗体の産生に使用可能である。上記の通り、PSGL-1ポリペプチドまたはそのペプチド断片は、組み換え技術によって生産でき、また固相合成方法を用いて合成可能である。組み換えPSGL-1ポリペプチドまたはそのペプチド断片は、抗PSGL-1抗体を生産するための免疫原として使用可能である。加えて、TAB4モノクローナル抗体などの抗PSGL-1抗体は、次に抗PSGL-1抗体を生産するための免疫原として使用可能な、例えば、天然構造のPSGL-1ポリペプチドなどのPSGL-1ポリペプチドを精製するのに使用可能である。

40

【0065】

本発明の抗体は、モノクローナル、ポリクローナル、またはPSGL-1ポリペプチドに特異的に結合するよう操作された抗体であってもよい。例えば、PSGL-1ポリペプチドなどの特定の抗原に「特異的に結合する」抗体は、試料中において他の分子を実質的

50

に認識または結合しないであろう。ゆえに、本発明はまた、ポリペプチドを試験化合物と接触させ、該ポリペプチドが試験化合物に結合するか否か決定することにより（例えば、該結合の直接的な検出、該ポリペプチドと該試験化合物の結合を阻害する競合分子の検出、および/またはアポトーシス誘起活性に関するアッセイを用いた結合の検出により）、本発明のポリペプチドに結合する試験化合物（例えば、抗体）を同定する方法を特徴とする。

【0066】

通常、PSGL-1ポリペプチドは、KLHなどの、担体タンパク質とカップリングさせ、アジュバントと混合し、そして宿主哺乳動物に注射されうる。次いで、該動物において生産された抗体は、ペプチド抗原アフィニティークロマトグラフィーによって精製されうる。

10

【0067】

特に、様々な宿主動物が、PSGL-1ポリペプチドまたはその抗原性断片の注射によって免疫化されうる。一般的に使用される宿主動物としては、ウサギ、マウス、モルモット、およびラットが挙げられる。免疫学的な応答の増加に使用可能な種々のアジュバントとしては、宿主の種に依存し、フロイントアジュバント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどの無機質ゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、およびジニトロフェノールが挙げられる。潜在的に有用であるヒトアジュバントとしては、BCG（カルメット-ゲラン杆菌）およびコリネバクテリウム-パルヴムがある。ポリクローナル抗体は、免疫化した動物の血清中に含まれる抗体分子の異種集団である。

20

【0068】

したがって、本発明に包含される抗体は、ポリクローナル抗体、さらにはモノクローナル抗体、ヒト化またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、およびFab発現ライブラリーを用いて生産された分子を包含する。

【0069】

特定の抗原に対する抗体の同種集団である、モノクローナル抗体は、上記のPSGL-1ポリペプチドおよび標準的なハイブリドーマ技術（例えば、Kohler et al., Nature 256:495 [1975]; Kohler et al., Eur J Immunol 6:511 [1976]; Kohler et al., Eur J Immunol 6:292 [1976]; Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y. [1981]などを参照）を用いて調製することができる。

30

【0070】

特に、モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256:495 (1975)、および米国特許第4,376,110号に記載されているようなインキュベート物での連続細胞システムによる抗体分子の生産を可能とするいずれかの技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosbor et al., Immunology Today 4:72 [1983]; Cole et al., Proc Natl Acad Sci USA 80:2026 [1983])、およびEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 [1983])により得られる。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDなどのいずれかの免疫グロブリンクラスおよびそのサブクラスを有していてもよい。本発明のmAbを生産するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボでインキュベートしてもよい。インビボにおいて高力価のmAbを生産できることは、特に有用な生産方法である。

40

【0071】

製造したら、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、ウェスタンブロットまたは、例えば、Ausubelらの上記文献に記載のような標準的な方法による免疫沈降分析により、特異的なPSGL-1認識について試験される。PSGL-1を特異的に認識し、特異的に結合する抗体が本発明において有用である。例えば、CD3+細胞などのT細胞の表面上のPSGL-1抗原に結合し、個体におけるT細胞の枯渇および/またはアポトーシスを誘起する抗PSGL-1抗体が特に有用である。

【0072】

50

該抗体は、例えば、（例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、移植片拒絶、アレルギー疾患、およびT細胞で誘導される癌などの症状に関連する、T細胞が媒介する免疫応答などの、望ましくない免疫応答を抑制または排除するための）治療レジメの一部として使用されうる。抗体はまた、候補化合物のPSGL-1への結合能を測定するためのスクリーニングアッセイに使用されうる。

【0073】

加えて、好適な生物活性を有するヒト抗体分子由来の遺伝子と共に、好適な抗原特異性を有するマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の生産のために開発された技術(Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 [1984]; Neuberger et al., Nature 312:604 [1984]; Takeda et al., Nature 314:452 [1984])が使用可能である。キメラ抗体は、マウスのモノクローナル抗体由来の可変ドメインおよびヒトの免疫グロブリン定常ドメインを有するものなどの、異なる部分が異なる動物種由来である分子である。

10

【0074】

または、単鎖抗体の生産に関して記載の技術（米国特許第4,946,778号、第4,946,778号、および第4,704,692号）が、PSGL-1ポリペプチドに対する単鎖抗体、またはその断片の生産に適用可能である。単鎖抗体は、単鎖のポリペプチドが得られるよう、アミノ酸架橋を介してFvドメインの重鎖および軽鎖を架橋することによって形成される。

【0075】

特定のエピトープを認識し、結合する抗体断片は、既知の技術により産生可能である。例えば、このような断片としては、以下に制限されるものではないが、抗体分子のペプシン消化によって生産されうるF(ab')₂断片、およびF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって得られるFab断片が挙げられる。または、所望の特異性を有するモノクローナルFab断片を迅速かつ容易に同定できるように、Fab発現ライブラリーを構築してもよい(Huse et al., Science 246:1275 [1989])。

20

【0076】

抗体は、当該分野において既知の方法によりヒト化されてもよい。例えば、所望の結合特異性を有するモノクローナル抗体を商業的にヒト化されうる(Scotgene, Scotland; Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.)。形質転換動物で発現するものなどの、十分なヒト抗体もまた本発明の態様である(Green et al., Nature Genetics 7:13 [1994]; 並びに米国特許第5,545,806号および第5,569,825号)。

30

【0077】

多量体化合物

T細胞またはNK細胞の表面上の複数のPSGL-1タンパク質に結合する多量体化合物は、該細胞におけるアポトーシスの誘起に使用されうる。該多量体化合物は少なくとも二つのポリペプチド鎖を含む。該ポリペプチド鎖はそれぞれ、(i)PSGL-1に結合する結合ドメイン、および(ii)異種アミノ酸配列を有する。

【0078】

概して、多量体化合物は、所定の細胞表面上の少なくとも二つの異なるPSGL-1タンパク質に結合する。しかしながら、多量体化合物は、3、4、5、6、7、8、9、10、12、またはそれ以上の異なるPSGL-1結合ドメインを有するよう調合され得、それにより、該多量体化合物が、所定の細胞表面上の3、4、5、6、7、8、9、10、12、またはそれ以上の異なるPSGL-1タンパク質に結合するよう誘起する。

40

【0079】

結合ドメインは、PSGL-1に結合する任意のアミノ酸配列（または、例えば、グリコシル化および/または硫酸化などの修飾を有する任意のアミノ酸配列）を有していてもよい。該結合ドメインは、天然のまたは非天然のアミノ酸配列のいずれにも対応しうる。例えば、結合ドメインは、セレクチン（例えば、P-セレクチン、E-セレクチン、またはL-セレクチン）のPSGL-1結合ドメインを含みうる。セレクチンのPSGL-1

50

結合ドメインを含むポリペプチドは、必要に応じて、(i) セレクチン(例えば、P - セレクチン、E - セレクチン、またはL - セレクチン)の細胞外ドメイン；(ii) セレクチン(例えば、P - セレクチン、E - セレクチン、またはL - セレクチン)のカルシウム依存性レクチンドメイン；または(iii) PSGL - 1への結合を媒介するセレクチン(例えば、P - セレクチン、E - セレクチン、またはL - セレクチン)の細胞外ドメインの断片を含んでいてもよい。該天然のアミノ酸配列に加えて、一つ以上のアミノ酸変化を天然のPSGL - 1結合ドメインに導入して、PSGL - 1結合機能を保持した非天然の配列を得てもよい。例えば、ポリペプチドPSGL - 1に結合しており、任意の(i) セレクチン(例えば、P - セレクチン、E - セレクチン、またはL - セレクチン)の細胞外ドメイン；(ii) セレクチン(例えば、P - セレクチン、E - セレクチン、またはL - セレクチン)のカルシウム依存性レクチンドメイン；または(iii) PSGL - 1への結合を媒介するセレクチン(例えば、P - セレクチン、E - セレクチン、またはL - セレクチン)の細胞外ドメインの断片と少なくとも80%、85%、90%、95%、または98%は同一である、アミノ酸配列を包含しうる。標準的な分子生物学的変異誘発の技術が、PSGL - 1結合ドメインをコード化する核酸配列に変化を誘起するために使用されうる。次いで、修飾された結合ドメインは、例えば、固定化PSGL - 1または細胞表面上のPSGL - 1などのPSGL - 1に対するその結合能力を評価されうる。また、結合ドメインは、抗PSGL - 1抗体若しくはファージディスプレイライブラリーから選択されるポリペプチドのPSGL - 1結合ドメイン、またはPSGL - 1と結合しており、抗PSGL - 1抗体若しくはファージディスプレイライブラリーから選択されるポリペプチドのPSGL - 1結合ドメインと少なくとも80%、85%、90%、95%、または98%は同一であるアミノ酸配列を包含しうる。

【0080】

PSGL - 1結合ドメインは、P - セレクチンのPSGL - 1結合断片に対応するアミノ酸配列を含みうる。そのようなアミノ酸配列を含む(本明細書に記載の多量体化合物の)ポリペプチド鎖の一例としては、以下の成分：(i) CD33シグナルペプチド(Met1 - Ala16)；(ii) マウスP - セレクチン(細胞外ドメインのTrp42 - Ala709)；(iii) IEGRMD(SEQ ID NO: 1)；および(iv) ヒトIgG1(Pro100 - Lys330)、を含む組換え型のマウスP - セレクチン/Fcキメラ(R&D System Minneapolis、MNより入手可能)が挙げられる。そのようなアミノ酸配列を包含するポリペプチド鎖の他の例としては、以下の成分：(i) ヒトP - セレクチン(Met1 - Ala771、細胞外ドメイン)；(ii) IEGRMD(SEQ ID NO: 1)；および(iii) ヒトIgG1(Pro100 - Lys330)、を含む組換え型のヒトP - セレクチン/Fcキメラ(R&D System Minneapolis、MNより入手可能)が挙げられる。

【0081】

PSGL - 1結合ドメインは、E - セレクチンのPSGL - 1結合断片に対応するアミノ酸配列を含みうる。そのようなアミノ酸配列を含む(本明細書に記載の多量体化合物の)ポリペプチド鎖の一例としては、以下の成分：(i) マウスE - セレクチン(Met1 - Pro557、細胞外ドメイン)；(ii) IEGRMD(SEQ ID NO: 1)；(iii) ヒトIgG1(Pro100 - Lys330)；および(iv) HHHHHH(SEQ ID NO: 2)、を含む組換え型のマウスE - セレクチン/Fcキメラ(R&D System Minneapolis、MNより入手可能)が挙げられる。そのようなアミノ酸配列を含むポリペプチド鎖の他の例としては、以下の成分：(i) ヒトE - セレクチン(Met1 - Pro556、細胞外ドメイン)；(ii) IEGRMD(SEQ ID NO: 2)；(iii) ヒトIgG1(Pro100 - Lys330)；および(iv) HHHHHH(SEQ ID NO: 2)、を含む組換え型のヒトE - セレクチン/Fcキメラ(R&D System Minneapolis、MNより入手可能)が挙げられる。

【0082】

10

20

30

40

50

PSGL-1結合ドメインは、L-セレクチンのPSGL-1結合断片に対応するアミノ酸配列を含みうる。そのようなアミノ酸配列を含む(本明細書に記載の多量体化合物の)ポリペプチド鎖の一例としては、以下の成分:(i)マウスL-セレクチン(Met1-Asn332、細胞外ドメイン);(ii)IEGRMD(SEQ ID NO:1);(iii)ヒトIgG1(Pro100-Lys330);および(iv)HHHHH(H SEQ ID NO:2)、を含む組換え型のマウスL-セレクチン/Fcキメラ(R&D System Minneapolis、MNより入手可能)が挙げられる。そのようなアミノ酸配列を含むポリペプチド鎖の他の例としては、以下の成分:(i)ヒトL-セレクチン(Met1-Asn332、細胞外ドメイン);(ii)IEGRMD(SEQ ID NO:2);(iii)ヒトIgG1(Pro100-Lys330);および(iv)HHHHHH(H SEQ ID NO:2)、を含む組換え型のヒトL-セレクチン/Fcキメラ(R&D System Minneapolis、MNより入手可能)が挙げられる。

10

【0083】

多量体化合物は、ホモ多量体化合物またはヘテロ多量体化合物として調合されうる。ホモ多量体化合物は同一のPSGL-1結合ドメインを有するポリペプチド鎖のみを含む。例えば、ホモ多量体化合物は、P-セレクチンのPSGL-1結合ドメイン断片を含むポリペプチド鎖を含みうる。ヘテロ多量体化合物は異なるPSGL-1結合ドメインを有するポリペプチド鎖を含む。例えば、ヘテロ多量体化合物は、P-セレクチンのPSGL-1結合ドメイン断片を含む第一のポリペプチド鎖およびE-セレクチンのPSGL-1結合ドメイン断片を含む第二のポリペプチド鎖を含みうる。

20

【0084】

異種アミノ酸配列は、任意のアミノ酸配列であってよい。しかしながら、本明細書に記載のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、天然のタンパク質の配列とは一致しない。異種アミノ酸配列は、該ポリペプチド鎖の結合を可能とする一つ以上のアミノ酸を含む。例えば、該一つ以上のアミノ酸は、例えば、ジスルフィド結合などにより、該ポリペプチド鎖に共有結合しうる。異種配列の一例としては、免疫グロブリン重鎖定常ドメインが挙げられる。二つのポリペプチド鎖のFcドメイン間のジスルフィド結合は、二量体化合物の形成をもたらす。

30

【0085】

該ポリペプチド鎖の結合への貢献に加えて、該異種アミノ酸配列は、例えば、細胞表面の受容体結合ドメインなどの架橋結合ドメインをも含みうる。該結合ドメインへの薬剤の結合において、該ポリペプチド鎖およびそれらが結合する細胞表面PSGL-1タンパク質の架橋が結果として生じうる。免疫グロブリン重鎖定常ドメインは、Fc受容体結合ドメインを含む。例えば、架橋体(cross-linker)は、異種アミノ酸配列の架橋結合ドメインに特異的に結合する抗体(例えば、抗Fc抗体)でありうる。

【0086】

PSGL-1機能を調節する化合物に関するスクリーニングアッセイ

本発明は、PSGL-1への結合に際しT細胞の枯渇および/またはT細胞のアポトーシスを誘起する化合物(しかし、当該化合物に限定されるものではない)を含むPSGL-1(またはPSGL-1のドメイン)と相互作用する化合物を同定する方法をも包含する。PSGL-1活性を調節する膜内外、細胞外、または細胞内タンパク質とのPSGL-1の相互作用を調節する化合物およびPSGL-1活性を調節する化合物も包含する。

40

【0087】

本発明によりスクリーニングされうる化合物としては、以下に制限されるものではないが、本明細書に記載のように、PSGL-1に結合し、PSGL-1により媒介される生物学的機能を調節する、ペプチド、抗体およびその断片、並びに他の有機化合物が挙げられる。

【0088】

このような化合物としては、以下に制限されるものではないが、例えば、以下に制限さ

50

れるものではないが、ランダムペプチドライブラリーのもの；(Lam et al., Nature 354: 82 [1991]; Houghten et al., Nature 354:84 [1991])などの、可溶性ペプチド、並びに D - および / または L - 体のアミノ酸から作製されるコンビナトリアルケミストリー由来の分子ライブラリーのもの、ホスホペプチド（以下に制限されるものではないが、ランダムまたは部分的に変性した定方向ホスホペプチドライブラリーのを包含する；Songyang et al., Cell 72:767 [1993]）、抗体（以下に制限されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、抗イディオ型、キメラまたは単鎖抗体、並びに F A b、F (a b ')₂ および F A b 発現ライブラリー断片、並びにそのエピトープ結合断片を包含する）、並びに有機または無機小分子が挙げられる。

【 0 0 8 9 】

本発明によりスクリーニングされうる他の分子としては、以下に制限されるものではないが、本明細書に記載のように、P S G L - 1 タンパク質の活性に影響を及ぼす有機小分子が挙げられる。

【 0 0 9 0 】

コンピュータモデリングおよび探索技術により、P S G L - 1 発現または活性を調節可能な、化合物の同定、または既に同定された化合物の改良が可能である。このような化合物または組成物が同定されている場合、活性部位またはドメインが同定される。一般的に、このような活性部位は、活性の天然の修飾因子に対する結合部位であってもよい。該活性部位は、例えば、ペプチドのアミノ酸配列、核酸のヌクレオチド配列、または関連する化合物若しくは組成物のその天然のリガンドとの複合体の研究などの当該分野において既知の方法を用いて同定しうる。後者の場合においては、化学的または X 線結晶方法が、その因子上のどこに修飾因子（または、リガンド）が見出されるかを知得することにより活性部位を見出すのに使用可能である。

【 0 0 9 1 】

結合を変化させうる化合物の設計および産生に関し参考文献を用い上述したが、P S G L - 1 タンパク質に結合し、T 細胞の枯渇および / または T 細胞のアポトーシスを誘起する化合物に関する、天然産物または合成化学物質を含む既知化合物およびタンパク質を含む生物活性物質のライブラリーをスクリーニングしてもよい。

【 0 0 9 2 】

インビトロ系が、P S G L - 1（または、P S G L - 1 のドメイン）と相互作用可能な化合物を同定するために設計されてもよい。同定される化合物は、例えば、本明細書に記載のように、T 細胞活性を調節するのに有用であり、ゆえに、炎症、自己免疫、移植片拒絶、アレルギー疾患、または T 細胞性癌などの過剰な若しくは望ましくない T 細胞が媒介する免疫応答または過剰な若しくは望ましくない T 細胞増殖に関連する症状の治療に有用である。

【 0 0 9 3 】

P S G L - 1 に結合する化合物の同定に使用されるアッセイの原理は、2 成分が相互作用し結合するのに十分な、従って、反応混合物中で除去および / または検出されうる複合体の形成に十分な条件および時間の下、P S G L - 1（または、そのドメイン）および試験化合物の反応混合物を調製することを包含する。使用される P S G L - 1 種は、スクリーニングアッセイの目標に基づき異なりうる。場合によっては、アッセイ系（例えば、生成する複合体の標識化、単離など）において好適な異種タンパク質またはポリペプチドに融合した P S G L - 1 のドメインに対応するペプチドを使用することが好ましい。

【 0 0 9 4 】

該スクリーニングアッセイは、様々な方法において行ないうる。例えば、このようなアッセイを行なう一つの方法としては、固相上に P S G L - 1 タンパク質、ポリペプチド、ペプチド若しくは融合タンパク質または試験化合物を固着し、反応終了時に固相上に固着した P S G L - 1 / 試験化合物複合体を検出する方法が挙げられる。このような方法の一実施態様において、P S G L - 1 反応物は、固体表面に固着されていてもよく、固着しない試験化合物を、直接的または間接的に標識してもよい。

10

20

30

40

50

【0095】

実際には、マイクロタイタープレートを、簡便に、固相として使用してもよい。固着した成分を、非共有または共有結合によって固定化してもよい。非共有結合は、固体表面をタンパク質の溶液で簡単に被覆し、乾燥することにより達成されてもよい。または、固定化されるタンパク質に特異的な、固定化抗体、好ましくはモノクローナル抗体を、固体表面へのタンパク質の固着に使用してもよい。該表面は、予め調製され、貯蔵されていてもよい。

【0096】

アッセイを行なうために、固定化されていない成分を、固着成分を包含する被覆表面に添加する。反応終了後、未反応成分を、形成された複合体が固体表面で固定化され続けるような条件下で（例えば、洗浄によって）除去する。固体表面上に固着した複合体の検出は、数多くの方法で達成しうる。事前に固定化されていない成分が予め標識されている場合には、表面に固定化された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。事前に固定化されていない成分が予め標識されていない場合には、間接的な標識を用いて；例えば、事前に固定化されていない成分に特異的な標識抗体を用いて（さらに、この抗体は、直接標識されていてもまたは標識された抗Ig抗体で間接的に標識されていてもよい）、表面上に固着した複合体を検出できる。

10

【0097】

または、反応は液相で行なってもよく、反応生成物を未反応成分から分離し、例えば、溶液中に形成される複合体を固着するための、PSGL-1タンパク質、ポリペプチド、ペプチド若しくは融合タンパク質または試験化合物に特異的な固定化抗体、および固着した複合体を検出するための可能な複合体の他の成分に特異的な標識抗体を用いて、複合体を検出してもよい。

20

【0098】

または、細胞によるアッセイを用いて、PSGL-1と相互作用する化合物を同定してもよい。この際には、PSGL-1を発現する細胞系統、またはPSGL-1を発現するように遺伝子操作された細胞系統が使用可能である。細胞によるアッセイは、本明細書に記載のスクリーニングにより同定される化合物の機能的な効果を評価するのに特に有用である。例えば、化合物がPSGL-1タンパク質への結合能に基づき同定されたら、次いで、該化合物について、例えば、インビトロ若しくはインビボのT細胞のアポトーシスの誘起能またはインビトロ若しくはインビボのT細胞の枯渇能を試験してもよい。

30

【0099】

薬剤組成物

本発明の目的が個体における免疫応答を変化させることである場合には、例えば、PSGL-1ポリペプチドに特異的に結合する、抗体、多量体化合物、小分子、または他の化合物を含む薬剤組成物も本発明の一態様である。好ましい例において、該化合物はPSGL-1のアゴニストとして機能する。

【0100】

本発明にしたがって使用される薬剤組成物は、一つ以上の生理学的に許容できる担体または賦形剤を用いて公知の方法で調合されうる。よって、該化合物並びにこれらの生理学的に許容できる塩および溶媒和化合物は、様々な投与経路による投与を目的として調合されてもよい。

40

【0101】

該化合物は、例えば、大量瞬時投与または連続輸液など注射による非経口投与用に調合してもよい。注射用の製剤形態は、保存剤を添加して、例えば、アンプルでまたはマルチドースコンテナなどの単位剤形(unit dosage form)で提供されてもよい。該組成物は、懸濁液、溶液または油性若しくは水性媒体におけるエマルジョンなどの形態をとっていてもよく、懸濁剤、安定化剤および/または分散剤などの調合剤を含んでいてもよい。あるいは、活性成分は、使用前に、例えば、無菌かつ発熱物質を含まない水など適当な媒体と共に構成される粉末形態であってもよい。

50

【 0 1 0 2 】

T細胞が媒介する免疫応答を制御する方法およびT細胞集団を枯渇する方法

本明細書に記載のスクリーニングアッセイにおいて記載したのと同様の化合物は、例えば、P S G L - 1ポリペプチドにより媒介される生物学的な機能の調節および/または過剰な若しくは望ましくない免疫応答、例えば、T細胞が媒介する免疫応答に関連する疾患の治療に有用でありうる。これらの化合物としては、以下に制限されるものではないが、T細胞の表面上のP S G L - 1に結合し、T細胞の死をもたらすシグナル伝達経路を誘導する、ペプチド、抗体およびその断片、並びに他の有機化合物が挙げられる。本発明の方法は、必要に応じて、細胞表面上のP S G L - 1の架橋を誘起する架橋剤を添加することを包含していてもよい。本明細書に記載の化合物は、T細胞活性の枯渇または排除が望ましい場合に使用可能である。本発明の化合物で治療しうる特に有用な症状としては、炎症性疾患、自己免疫疾患、移植片拒絶、アレルギー疾患、およびT細胞で誘導される癌が挙げられる。

10

【 0 1 0 3 】

本明細書に記載の抗P S G L - 1化合物で治療しうる症状としては、以下に制限されるものではないが、真性糖尿病、関節炎(リウマチ様関節炎、若年性関節リウマチ、骨関節炎、および乾癬性関節炎を包含する)、多発性硬化症、脳脊髄炎、重症筋無力症、全身性紅斑性狼瘡、自己免疫性甲状腺炎、皮膚炎(アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎を包含する)、乾癬、シェーグレン症候群、クローン病、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、I型糖尿病、炎症性腸疾患、潰瘍性結腸炎、喘息、アレルギー性喘息、皮膚性紅斑性狼瘡、強皮症、膣炎、直腸炎、薬疹、ライ反転反応(leprosy reversal reactions)、ライ性結節性紅斑、自己免疫性ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳症、特発性両側性進行性感覚神経性聴力損失、再生不良性貧血、真正赤血球性貧血、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ヴェグナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スティーヴェンズ-ジョンソン症候群、特発性スプルー、扁平苔癬、グレーブス病、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎、間質性肺線維症、移植片対宿主疾患、骨髄移植、肝臓移植またはいずれかの器官若しくは組織の移植などの移植の症例(同種または異種組織を用いた移植を包含する)、アトピー性アレルギーなどのアレルギー、A I D S、並びに白血病および/またはリンパ腫などのT細胞新生物が挙げられる。

20

【 0 1 0 4 】

本発明の方法は、インビトロまたはインビボのいずれかで、細胞集団からT細胞を枯渇するのに使用可能である。例えば、個体由来の生体試料から、該試料を、本明細書に記載される抗P S G L - 1化合物と、さらに必要に応じて架橋剤と共に、接触させることによって、インビトロでT細胞を枯渇することができる。本方法は、例えば、細胞集団中の非T細胞を強化させる点において、さらには細胞集団からT細胞活性を減少するかまたは排除する点において、有用でありうる。

30

【 0 1 0 5 】

下記は、本発明の実施例である。下記実施例は、本発明の概念を制限するものでないとして解される。

【 0 1 0 6 】

実施例1：抗T細胞アポトーシス誘導タンパク質(「T A I P」)モノクローナル抗体の調製

T A I Pに特異的なモノクローナル抗体を、所望の抗体を分泌するハイブリドーマを生産するのにKohler and Milstein ((1976) European Journal of Immunology 6:511-519)の既知の細胞融合方法を適用することによって得た。コンカナバリンA(C o n A)活性化B a b / cの脾臓T細胞を注射したハムスターからの抗体産生細胞を、ミエローマ細胞系と融合させて、抗体を分泌するハイブリドーマを形成した。これらの細胞の2集団は、ポリエチレングリコールで融合させ、得られた抗体産生細胞をクローニングして、標準的な組織インキュベート方法によって増殖させた。これらの方法にしたがって得られた一つのハイブリドーマは、インビトロでT細胞のアポトーシスを誘起しかつインビボでT細胞

40

50

を枯濁することができる、TAB4と称する、モノクローナル抗体を分泌した。TAB4によって認識されるタンパク質を、T細胞のアポトーシス誘導タンパク質(TAIP)と称した。

【0107】

C57BL/6J(B6)およびBALB/cは、Jackson lab (Bar Harbor, ME)から購入した。シリアンハムスターは、Animal Core Facility, National Taiwan University Medical Collegeから購入した。

【0108】

TAB4ハイブリドーマの濃縮インキュベート液上清を、20,000×gで10分間遠心し、上清を結合緩衝液(0.1M酢酸ナトリウム、pH5.0)で1:1の比で希釈した。プロテインGカラム(約1mlのベッドボリューム)を、3~5mlの結合緩衝液で3回洗浄した。透明なインキュベート液上清をプロテインGカラムにのせ、流動液を集め、カラムに再度のせた。カラムを6~10mlの結合緩衝液で洗浄し、結合した抗体を5mlの溶出緩衝液(0.1Mグリシン-HCl、pH2.8)でカラムから溶出させた。各画分は1mlの溶出された抗体を含み、各1mlの画分を50μlの1M Tris-HCl、pH7.5と混合することによって、溶出画分を中性のpHに調節した。抗体を包含する画分を溜め、各透析について3時間、2リットルのPBS、pH7.4で3回透析した。抗体試料中のタンパク質濃度を、Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA)を用いてBradfordによって記載された方法で測定した。

【0109】

実施例2：マウス脾臓細胞懸濁液の調製並びにT細胞の活性化および強化

マウスの脾臓を、8mlのハンクス液(HBSS)に浸漬し、滅菌したカバーガラスでゆるやかに細かく切り刻み、15mlの遠心管(Costar)に移し、さらに200×gで5分間遠心した。上清を捨て、細胞ペレットを、壁をゆるやかにたたくことによって残りの緩衝液に再懸濁した。混入した赤血球(RBC)を、1mlのRBC溶解緩衝液(0.6M NH₄Cl、0.17M Tris-ベース、pH7.65)を添加することによって溶解した後、室温で2分間インキュベートし、9mlのHBSSで迅速に急冷した。細胞を200×g、5分間でペレット化し、2回洗浄して、RPIMインキュベート液に再懸濁した。混合物中の細胞の濃度および生存率を、血球計数器(Cambridge Scientific Inc.)およびトリパンブルー排除(Trypan blue exclusion)で測定した。

【0110】

脾臓細胞を、RPIM培地で 3×10^6 /mlの最終濃度になるように調節し、コンカナバリンAを2μg/mlの最終濃度になるように加えて、T細胞を活性化した。細胞懸濁液を、集める前に、6ウェルのインキュベートプレート(5ml/ウェル)または10cmのインキュベート皿(10ml/皿)に移し、37、5% CO₂で48時間インキュベートした。活性化T細胞を包含する、活性化された脾臓細胞を、5mlのHBSSに再懸濁し、遠心管のパーコール溶液の55%クッション5mlの頂上に注意深くのせた。分離した層を乱さないように注意した。細胞を止めずに25で1,900×gで13分間遠心した。強化された(enriched)T細胞を2層の界面から集め、HBSSで2回洗浄し、実験用に用意した。

【0111】

実施例3：活性化T細胞のアポトーシス

活性化T細胞(実施例2参照)を、5ng/mlのIL-2を包含するRPIM培地に 5×10^5 細胞/mlの最終濃度になるように再懸濁し、表1に示される条件にしたがって、対照Ig、TAB4、または抗CD3で処理した。

【0112】

10

20

30

40

【表 1】

表 1

実験群	処理*
ネガティブコントロール	3 μ g/ml ハムスター Ig
	5 ng/ml IL-2
	3 μ g/ml 架橋体抗体 (抗ハムスター Ig)
TAB 4	3 μ g/ml TAB 4 ハムスター mAb
	5 ng/ml IL-2
	3 μ g/ml 架橋体抗体 (抗ハムスター Ig)
ポジティブコントロール	1 μ g/ml 抗CD3 mAb
	5 ng/ml IL-2
	1 μ g/ml 架橋体抗体 (抗ハムスター Ig)

* : 培地中の指定された試薬の最終濃度

【 0 1 1 3 】

18 ~ 24 時間インキュベートした後、各インキュベート物のアポトーシスの程度を 7 - A A D アポトーシスアッセイを用いて測定した。処理した細胞を、F A C S 管 (Falcon) に移し、氷冷した F A C S 溶液 (P B S における 1 % ウシ胎児血清、0 . 0 5 % アジ化ナトリウム) で 2 回洗浄し、4 で 2 0 0 \times g でペレット化した。細胞を、1 ~ 2 \times 1 0 ⁷ 細胞 / m l の最終濃度になるように氷冷した F A C S 溶液に再懸濁した。染色するために、0 . 1 m l の再懸濁された細胞を、2 μ g / m l の最終濃度で 7 - A A D と混合した後、暗所で 4 で 2 0 分間インキュベートした。最後に、染色された細胞を氷冷した F A C S 溶液で 2 回洗浄し、0 . 5 m l の F A C S 溶液に再懸濁して、B D L S R フローサイトメーター (Beckton Dickison) で分析した。

【 0 1 1 4 】

図 1 は、いつ活性化 T 細胞が T A B 4 (抗 T A I P) が媒介するアポトーシスシグナルに対する感受性を得るかを調べた代表的な経時的な実験の結果を示すものである。マウスの脾細胞を、C o n - A で活性化し、I L - 2 含有培地に維持した。活性化 T 細胞を集め、再懸濁し、架橋体 (cross-linker) としての抗ハムスター I g G 抗体の存在下で T A B 4 モノクローナル抗体または対照のハムスター I g G で攻撃した。T A I P 架橋が低レベル (6 . 5 %) のアポトーシス細胞死を誘起できたことが 1 日目で明らかであった。しかしながら、T A B 4 で誘起されたアポトーシスの程度は、2 日目で 1 7 % から増加し、4 日で 5 2 % でピークとなり、6 日目には 4 4 % にまで減少した。対照のハムスター I g G は、I L - 2 のみを投与したインキュベート物に比して、特異的なアポトーシス T 細胞死を誘起しなかった。抗 C D 3 (ポジティブコントロールとして) は、活性化してから 4 8 時間後に 3 8 % の T 細胞のアポトーシスを誘起した (データ示さず)。

【 0 1 1 5 】

実施例 4 : 異なる組織における T A I P 抗原の発現

細胞を氷冷した F A C S 溶液 (P B S における 1 % ウシ胎児血清、0 . 0 5 % アジ化ナトリウム) で 2 回洗浄し、F A C S 管 (Falcon) で 4 で 2 0 0 \times g で遠心した。細胞を、1 \times 1 0 ⁷ 細胞 / m l の最終濃度になるように氷冷した F A C S 溶液に再懸濁し、F A C S 管 (Falcon) 中の再懸濁した細胞の 0 . 1 m l のアリコートを各アッセイに使用した。表面を染色するために、2 μ g / m l の最終濃度で T A B モノクローナル抗体または対照のハムスター I g を細胞に添加し、混合物を暗所で 4 で 3 0 分間インキュベートした。細胞を氷冷した F A C S 溶液で 1 回洗浄した後、(1) 脾細胞では、1 0 0 μ l の氷冷した F A C S 溶液におけるサイクロム (cychrome) 接合抗 C D 3 抗体 (2 μ g / m l)、F I T C 接合抗ハムスター I g、および P E 接合抗 C D 8 / C D 4 / C D 1 9 / C D 1 1 b / p

10

20

30

40

50

a n - N K / I - A / I - E / M a c - 3 抗体 (2 μ g / m l) ; 並びに (2) 胸腺細胞では、100 μ l の氷冷した F A C S 溶液における F I T C 接合抗ハムスター I g、P E 接合抗 C D 8 抗体、およびサイクロム接合抗 C D 4 抗体 (2 μ g / m l) で、染色した。反応は、暗所で 4 で 30 分間、行なった。最後に、染色細胞を氷冷した F A C S 溶液で 2 回洗浄し、1 m l の F A C S 溶液に再懸濁して、B D L S R フローサイトメーター (B e c k t o n D i c k i s o n) で分析した。

【 0 1 1 6 】

図 3 および 4 は、脾細胞および胸腺細胞の様々なサブ集団での T A I P 抗原の分布を F A C S 分析により示すものである。図 3 に示されるように、C D 1 9 ⁺ B 細胞は、低い
10
が検出可能な量の T A I P タンパク質を表面上に発現した。有意により高い量の T A I P
タンパク質が、C D 3 ⁺ T 細胞および N K 細胞の画分で検出された。ほとんどの C D 4
⁺、C D 8 ⁺、および C D 4 ⁺ 8 ⁺ 胸腺 T 細胞は、有意な量の T A I P タンパク質を発
現した。これに対して、T A I P タンパク質は、C D 4 ⁻ 8 ⁻ 胸腺 T 細胞の小集団でし
か発現しなかった (図 4) 。

【 0 1 1 7 】

脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、胃、腎臓、脾臓、および皮膚などの、B 6 および B a l b
/ c マウスの組織を集め、室温で一晩、10%ホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン
ブロック中に包埋した。4 μ m 厚の、組織切片を、Leica RM2135 ミクロトームでパラフィン
ブロックから調製し、45 の水中に広げ、被覆スライドにのせた。スライドを 37
20
で乾燥し、次の実験のために用意した。

【 0 1 1 8 】

組織パラフィン切片を包含するスライドを脱ろうし、標準的なプロトコルにしたがって
キシレン - 100%エタノールシリーズで乾燥し、最後に100%エタノールに保持した
。切片を、標準的なプロトコルにしたがって100%エタノール - 90%エタノール - 8
5%エタノール - 70%エタノール - P B S の連続インキュベーションからさらに最後に
P B S 溶液にまでして再水和させた。以下の反応はすべて、給湿ボックスで行なった。非
特異的な結合を、組織切片を遮断緩衝液 (1% 正常ヤギ血清) 中で室温で1時間 (または
4 で一晩) インキュベートすることによって遮断した。遮断緩衝液を除き、T A B 4 また
は正常ハムスター I g (1 : 200 希釈) を切片に加えて、インキュベーションをさら
に室温で1時間 (または 4 で一晩) 続けた。切片を、各々5分間、P B S で2回洗浄し
30
て、一次抗体を除去し、1 : 250 の希釈アルカリホスファターゼ接合ヤギ抗ハムスター
I g と反応させ、室温で1時間インキュベートした。切片を、再度、各々5分間、P B S
で2回洗浄して、抗体 - 酵素接合体を除去し、着色反応を、暗所で B C I P / N B T 基質
溶液で室温で30分間発色させた。切片を再度 P B S で洗浄し、過剰な酵素基質を除去し
、P B S - エタノール - キシレンシリーズで脱水し、顕微鏡検査にのせた。

【 0 1 1 9 】

結果から、T A I P タンパク質の発現は骨髄由来組織でのみ検出され試験され、残りの
組織では検出されなかったことが示された。

【 0 1 2 0 】

実施例 5 : T A I P 抗原の細胞表面ビオチン化および免疫沈降

5 \times 10⁷ R L オス 1 または N I H - 3 T 3 細胞を、氷上で30分間 0 . 5 m g / m l
スルホ - N H S - ビオチン (S u l f o - N H S - b i o t i n) (P i e r c e) を包含する P B S 1 m l 中で表
面ビオチン化した。反応を、細胞を氷上で10分間、0 . 5 m l のダルベッコ改変イーグル
培地 (L i f e T e c h n o l o g i e s , I n c .) でインキュベートすることによって終了した。細胞を
1 m l のダルベッコ改変イーグル培地で1回および1 m l のリン酸緩衝液で2回洗浄した
。

【 0 1 2 1 】

標識された細胞を、完全プロテアーゼ阻害剤カクテル (c o m p l e t e p r o t e a s e i n h i b i t o r c o c k t a i l) (R o c h e) を包含する冷却溶解緩衝液 (1% T r i t o n X - 100、20 m
M T r i s - H C l、pH 8 . 0、160 m M N a C l、1 m M C a C l₂) 中
50

で 5.0×10^7 細胞/ml の密度で 15 分間溶解し、不溶材料を $10,000 \times g$ で 10 分間ペレット化した；これらおよびすべての次の段階は、4 で行なわれた。免疫沈降では、溶解産物を、 $50 \mu\text{l}$ の充填プロテイン G - セファロース (Amersham Pharmacia Biotech) と共に 30 分間予めインキュベートして、非特異的に結合するタンパク質を除去した。ビーズをペレット化し、上清のアリコート（定常的に 5.0×10^7 細胞に相当）を、 $10 \mu\text{g}$ の mAb TAB 4 または正常なハムスター血清由来の IgG が予めのせられた $20 \mu\text{l}$ のプロテイン G - セファロースと共にインキュベートした。4 で 4 時間インキュベートした後、樹脂を、洗浄緩衝液（ 0.05% Triton X-100、 50mM Tris-HCl、 $\text{pH} 8.5$ 、 400mM NaCl、 1mM CaCl_2 、 1mg/ml オボアルブミン）で 4 回、および 400mM NaCl の代わりに 250 10
 mM を包含する、同様の洗浄緩衝液で 2 回洗浄した。TAB 4 に特異的に結合するタンパク質を、 $50 \mu\text{l}$ の $1 \times \text{SDS}$ サンプル緩衝液で溶出した。溶出したタンパク質を、 8% SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜 (Millipore) に移した。フィルターについて、ペルオキシダーゼ接合アビジン (PharMingen) でビオチン化されたタンパク質を分析し、化学発光試薬 (NENTM Life Science Products) で発色させた。

【0122】

図 2 に示されるように、約 120kD の分子量を有するビオチン化された表面タンパク質が、RL1 細胞 (TAIP⁺ T 細胞) では TAB 4 によっては同定されたが、3T3 細胞 (TAIP⁻ T 細胞) では同定されなかった。これに対して、ハムスターの正常血清で被覆したプロテイン G セファロースは、この 120kD のタンパク質を抽出できな 20
 かった。これらの結果から、この 120kD のタンパク質は T 細胞の細胞表面でモノクローナル抗体 TAB 4 によって認識される抗原であることが示唆される。

【0123】

実施例 6：インビボでの T 細胞の枯渇

インビボでの T 細胞および他の細胞の集団への TAB 4 の効果を試験するために、マウスに、 $300 \mu\text{g}$ の TAB 4 または対照のハムスター Ig を腹腔内に注射し、4 日目に、脾細胞、胸腺細胞、および末梢血の単核細胞を全細胞計測のためにおよび FACS による細胞表面マーカーの分析のために集めた。

【0124】

FACS アッセイでは、細胞を、4 で 20 分間 2% パラホルムアルデヒドで固定し、2 回洗浄して、 1×10^7 細胞/ml の最終濃度になるように氷冷した FACS 溶液に再懸濁した。FACS 管 (Falcon) 中の再懸濁された細胞の $100 \mu\text{l}$ のアリコートを各アッセイに使用した。 $2 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度の TAB 4 または対照のハムスター Ig を細胞に添加して、混合物を暗所で 4 で 30 分間、インキュベートした。細胞を氷冷した FACS で 1 回洗浄し、(1) 脾細胞では、 $100 \mu\text{l}$ の氷冷した FACS 溶液におけるサイクロム (cyochrome) 接合抗 CD3 抗体 ($2 \mu\text{g/ml}$)、FITC 接合抗ハムスター Ig および PE 接合抗 CD8 / CD4 / CD19 / CD11b / pan-NK / I-A / I-E / Mac-3 抗体 ($2 \mu\text{g/ml}$)；並びに (2) 胸腺細胞では、 $100 \mu\text{l}$ の氷冷した FACS 溶液における FITC 接合抗ハムスター Ig、PE 接合抗 CD8 抗体、およびサイクロム接合抗 CD4 抗体 ($2 \mu\text{g/ml}$) と、反応させた。反応は、暗所で 4 で 30 40
 分間、行なった。最後に、染色した細胞を、氷冷した FACS 溶液で 2 回洗浄し、 $1,000 \mu\text{l}$ の FACS 溶液中に再懸濁して、BD LSR フローサイトメーター (Beckton Dickinson) で分析した。

【0125】

注射してから 4 日後に、末梢血の白血球 (PBL) における $\text{CD}3^+$ T 細胞のパーセントは、対照マウスの 36.7% から TAB 4 で処置したマウスの 4.1% にまで減少した (表 2)。TAB 4 処置により、脾細胞の全数は若干減少した。しかしながら、TAB 4 処置マウスでは、 $\text{CD}3^+$ T 細胞の数が 62% 減少し、NK 細胞の数が 50% 減少し、さらに $\text{CD}19^+$ B 細胞の全数が若干増加した。TAB 4 処置マウスから回収した胸腺細胞の全数は、対照で見られたレベルのたった 48% であった (52% 減少)。さらに 50

、 $CD4^+$ T細胞以外では、すべての他の $CD8^+$ 、 $CD4^+CD8^+$ 、および $CD4^-CD8^-$ T細胞は減少し、この際、 $CD4^+CD8^+$ サブ集団は最も顕著に影響を受けた(64.7%減少)。

【0126】

【表2】

表2

脾臓					
$\times 10^6$	処置なし	正常ハムスター-Ig	TAB4で処置	枯渇 (%)	
全脾細胞	123	93.3	105	14.6	
$CD3^+$ T細胞	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	

10

末梢血白血球					
	処置なし	正常ハムスター-Ig	TAB4で処置	枯渇 (%)	
$CD3^+$ T細胞	36.7 %	36 %	4.1%	88.8%	

20

胸腺					
$\times 10^6$	処置なし	正常ハムスター-Ig	TAB4で処置	枯渇 (%)	
全胸腺細胞	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	

30

(3実験からの代表的なデータ)

【0127】

実施例7：抗TAIP抗体は、IL-2またはTNF- α の分泌を誘起しない

Balb/cマウス(H-2d)に、300 μ gのTAB4または対照のハムスターIgを腹腔内に注射した。脾細胞を注射してから7日目に単離し、マイトマイシンC処置C3H(H-2k)脾細胞(ステイミュレーター(stimulator)として)を有するインキュベーター物におけるレスポナー(responder)として使用した。3日後、インキュベーター物上清を集め、IL-2含量をELISAセット(PharMingen)によって測定した。図5に示されるように、IL-2の生産は、対照マウスのもに比してTAB4処置マウス由来のレスポナー細胞では抑制された。IL-2およびTNF- α の血漿レベルもまた分析したところ、対照およびTAB4処置マウスの血清ではIL-2(またはTNF- α)のレベルに有意な差は認められなかった。IL-2の生産はT細胞の活性には重要であるので、これらの結果から、TAB4などの、TAIPに特異的な抗体は、T細胞を操作し、自己免疫疾患および移植片拒絶に関連するものなどの望ましくないT細胞が媒介する免疫応答を制御するのにインビボで使用可能であることが示される。

40

【0128】

50

実施例 8 : 移植片拒絶を防止するための抗 T A I P 抗体の使用

8 ~ 12 週齢のマウス (Jackson Laboratory から得た) に、アセプロマジンマレエート (Acepromazin maleate) (Fermenta Animal Health Co., Kansas City, MO) で麻酔をかけた。皮膚移植前に、胸腺摘除されていないレシピエント C 5 7 B L / 6 マウス (H - 2^b) に、皮膚移植外科手術する 7 日前に、500 μg の T A B 4 またはイソ型の対照抗体を腹腔内注射した。7 日後、十分同種のみスマッチした (fully allogeneic mismatched) B a 1 b / c j マウス (H - 2^d) の皮膚の側腹部を、抗体で予め処置された C 5 7 B L / 6 マウスの側腹部に移植した。移植してから 7 日目に、マウスに再度 500 μg の T A B 4 またはイソ型の対照抗体を注射した。マウスを移植片の移植後毎日モニターした。50% のドナーの皮膚が壊死したら、その移植片は拒絶されたと考えた。移植片の生存率 (%) を図 7 に示す (n = 8)。データから、T A B 4 抗体による処置は同種皮膚移植片の生存を延ばすことが示される。

10

【 0 1 2 9 】

実施例 9 : P S G L - 1 としての T A I P の同定

C D 1 6 2 とも称する、P - セレクチン糖タンパク質リガンド - 1 (P S G L - 1) は、T 細胞などの、白血球で発現する主要な P - セレクチンリガンドである (Sako et al. (1993) Cell 75:1179; Vachino et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:21966; Veldman et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:16470)。その分子量および二量体のなりやすさなどの、T A I P の生化学的な特性から、T A B 4 は P S G L - 1 に類似する可能性が示唆された。これら 2 種の抗原の関係を調べるために、以下のように試験した: 1) T A B 4 によっ

20

て沈降する抗原が市販の抗 P S G L - 1 抗体によって認識できるかどうか; および 2) 抗 P S G L - 1 抗体が細胞溶解産物から T A B 4 を枯渇できるかどうか。

【 0 1 3 0 】

R L オス 1 T 細胞を、完全プロテアーゼ阻害剤カクテル (complete protease inhibitor cocktail) を包含する溶解緩衝液 (1% Triton X - 100、20 mM Tris - HCl、pH 8.0、160 mM NaCl、1 mM CaCl₂) 中で 1.0×10^8 細胞 / ml の密度で 1 時間溶解し、不溶材料を 10,000 × g で 10 分間ペレット化した。これらおよびすべての次の段階は、4 で行なわれた。 5.0×10^7 細胞に相当する溶解産物を、10 μg の抗 P S G L - 1 mAb (クローン 2 P H 1、PharMingen, San Diego, CA)、抗 T A I P mAb、T A B 4、または正常ハムスター血清由来の I g G が予めのせられた 20 μl のプロテイン G - セファロースと共にインキュベートした。4 で 4 時間インキュベートした後、ビーズを洗浄緩衝液 (0.05% Triton X - 100、50 mM Tris - HCl、pH 8.5、400 mM NaCl、1 mM CaCl₂、1 mg / ml オポアルブミン) で 4 回、および 400 mM NaCl の代わりに 250 mM を包含する、同様の洗浄緩衝液で 2 回洗浄した。結合タンパク質を、40 μl の 1 × SDS サンプル緩衝液で溶出した。溶出したタンパク質を、6% SDS - PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に移した。膜を、抗 P S G L - 1 mAb で免疫プロットし、ペルオキシダーゼ接合ヤギ抗ラット I g G (H + L) によってさらには化学発光 (Renaissance, NEN) によって出現させた。

30

【 0 1 3 1 】

表面ビオチン化 R L オス 1 T 細胞を、溶解緩衝液中で 1.0×10^8 細胞 / ml の密度で溶解した。細胞抽出物を、4 で一晩、40 μl のプロテイン G - セファロースに結合した抗体 20 μg と共にインキュベートした。枯渇を、抗 P S G L - 1 mAb (2 P H 1) または対照のラット I g G を用いて、T A B 4 または対照の正常ハムスター血清を用いて行なった。枯渇した溶解産物について、さらに T A B 4 または抗 P S G L - 1 mAb で、それぞれ、免疫沈降を行なった。免疫沈降物を、6% SDS - ポリアクリルアミドゲルで分離し、蛍光板間接撮影によって検出した。図 6 に示されるように、抗 P S G L - 1 抗体は T 細胞溶解産物から T A I P タンパク質を枯渇できる。加えて、抗 T A I P 抗体 (T A B 4) で免疫沈降したタンパク質は、ウェスタン分析によって抗 P S G L - 1 抗体によって認識されうる。

40

50

【 0 1 3 2 】

実施例 10：抗 P S G L - 1 抗体によるヒト T 細胞におけるアポトーシスの誘起

ヒト T 細胞のアポトーシスにおける P S G L - 1 によって果たされる役割を決定するために、経時的な実験を行ない、いつ活性化ヒト T 細胞が P S G L - 1 が媒介するアポトーシスシグナルに対する感受性を得るかを調べた。ヒト T 細胞を、フィトヘムアグルチニン (P H A) マイトジェンで刺激し、さらに I L - 2 含有培地中に展開させた。活性化 T 細胞を集めた後、 I L - 2 および架橋抗体の存在下、抗 P S G L - 1 で攻撃した。

【 0 1 3 3 】

ヒトの末梢血を、健常な成人から採取し、ヘパリン化し、フィコールパックプラス (Ficoll-Paque Plus) (Pharmacia Biotech) を用いて異なる密度に基づいた末梢血単核細胞 (P B M C) を強化した。 P B M C を、 1 % P H A (Life Technologies, GibcoBRL) で 4 8 時間活性化した後、アッセイ期間中組換えヒト I L - 2 (5 n g / m l) 中に維持した。抗ヒト P S G L - 1 抗体のアポトーシス誘導能を評価するために、活性化細胞を： (1) 1 μ g / m l の抗 P S G L - 1 抗体クローン K P L - 1 (BD PharMingen) に架橋体 (cross-linker) ウサギ抗マウス I g (0 . 5 μ g / m l) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を加えたもの； (2) イソ型の対照精製マウス I g に架橋体ウサギ抗マウス I g を加えたもの；または (3) 架橋体ウサギ抗マウス I g 単独で、処置した。 6 時間処置した後、初期のアポトーシス細胞のパーセントを F A C S によって測定し、抗アネクシン V (anti-Annexin V) (BD PharMingen) および P I (Sigma) で染色した。

【 0 1 3 4 】

図 8 に示されるように、抗 P S G L - 1 抗体に架橋体を加えたものを用いて P S G L - 1 によって引き起こされたシグナル伝達 (signaling) は、 P H A 活性化ヒト P B M C (主に T 細胞) において有意なレベルのアポトーシスを引き起こした。アポトーシス細胞のパーセントは、抗 P S G L - 1 処置インキュベート物において 3 日目の 8 . 5 % から 8 日目の 2 4 % まで増加した。同位体マッチコントロール (isotopic-matched control)、または架橋抗体単独はいずれも、これらの細胞に効果がなかった。

【 0 1 3 5 】

実施例 11：自己免疫疾患を治療するための抗 P S G L - 1 アゴニスト抗体の使用

よく公認された自己免疫性糖尿病動物である、肥満でない糖尿病 (non-obese diabetic) (N O D) マウスを、標準的な条件下で飼育した。突発性糖尿病 (spontaneous diabete) が約 2 0 週齢の N O D マウスで発症した。実験群では、マウスに、 1 4、 1 5 および 1 7 週齢のマウス当たり、 3 0 0 μ g の抗 P S G L - 1 抗体 (T A B 4) を 3 回腹腔内投与した。同じ投与量の注射を 2 4 および 2 6 週齢でさらに 2 回与えた。対照群には、同じ投与量のハムスター I g を与えた。マウスを、 1 5 週齢以降毎週 2 回メディ - テストグルコースストリップ (Medi-Test Glucose strip) (Macherey-Nagel, Germany) によって尿中グルコースをモニターした。 2 回の連続した測定で 3 0 0 m g / d l を超える非空腹時尿中グルコースレベルが糖尿病と考えた。

【 0 1 3 6 】

図 9 に示されるように、 T A B 4 (抗 P S G L - 1) 抗体処置によって、対照の抗体処置に比べて有意な保護が得られた。ゆえに、抗 P S G L - 1 抗体による処置は、自己免疫 T 細胞の活性を抑制し、 I 型糖尿病の発症を遅延することができる。

【 0 1 3 7 】

実施例 12：活性化 T 細胞への P - セレクチン、 E - セレクチン、および L - セレクチンの結合

セレクチン類 (P - セレクチン、 E - セレクチン、および L - セレクチン) の活性化 T 細胞への結合活性を測定するため、 C 5 7 B L / 6 から新しく調製した脾細胞を活性化し、 2、 4、 および 6 日目に収集した。活性化されていない T 細胞 (すなわち、 0 日目に新しく調製した脾細胞) も分析した。 2 日目の試料は、 D M E M + 1 0 % F B S における、 2 μ g / m l のコンカナバリン A (C o n A) を用い、 2 日間、活性化された 3 \times 1 0 ⁶ 細胞 / m l の脾細胞を含んでいた。生細胞をフィコール濃度勾配分離

10

20

30

40

50

により単離した。Con Aを用い3日間活性化し、さらに1日、5 ng/mlのIL-2を包含するインキュベート液中に維持した細胞から4日目の試料を得た。Con Aを用い3日間活性化し、さらに3日間、5 ng/mlのIL-2を包含するインキュベート液中に維持した細胞から6日目の試料を得た。

【0138】

FACS分析により該試料をアッセイするため、0、2、4および6日目からウェル当たり 2×10^5 の細胞を、二倍段階希釈法により、 $20 \mu\text{g/ml}$ から $0.156 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲において、ヒトIgG1 (R&D System, Minneapolis, MN)のFcドメインに融合した、 $40 \mu\text{l}$ /ウェルのマウスP-セレクチン、E-セレクチン、またはL-セレクチンを用い、4にて30分間インキュベートした。該インキュベート後、細胞を、 $1 \times$ FACS can緩衝液 (Biochrom AG、Berlin社製の、カルシウムおよびマグネシウムイオンを含有しない $1 \times$ PBS並びに2% FBS)を用いて洗浄した。試料を、 $95 \mu\text{l}$ /ウェルの抗Thy1.2および第二の試薬 (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PAより入手した、Fc断片に特異的であるFITC抗ヒトIgG)を用い、 $3.25 \mu\text{g/ml}$ で、4にて30分間さらにインキュベートし、次いで、 $1 \times$ FACS can緩衝液を用いて洗浄した。

10

【0139】

FACS Calibur分析の結果を図10に示す。 $20 \mu\text{l/ml}$ において、P-セレクチンのマウス活性化T細胞への結合は徐々に増加し、2日目から4日目に最大になり6日目にはやや減少した。E-セレクチンの結合は、2日目から4日目に有意に上昇し、6日目にピークを維持した。L-セレクチンのマウス活性化T細胞への結合は明らかではなく、活性化期間、すなわち0から6日目を通じて変化しなかった。L-セレクチンでの観察結果は、L-セレクチンのそのリガンドへの明らかな低い結合能に起因したものである。同様の結果が、上記実験において、三種のセレクチンが低濃度である場合にも観察された。

20

【0140】

実施例13：多量体形態のE-セレクチンおよびP-セレクチンは活性化T細胞のアポトーシスを誘起する

96-ウェルプレート (NUNC)を、 $1 \times$ PBSにおける $20 \mu\text{l/ml}$ の抗ヒトFcIg50 μl で、4にて終夜、コーティングし、1% BSAを用い、37にて2時間ブロックし、室温にて2時間、 $50 \mu\text{l}$ のセレクチン-ヒトFc融合物 (0.063 から $5 \mu\text{g/ml}$)と共にインキュベートした。全実験段階において、各ウェルを、 $1 \times$ PBSを用い5回、徹底的に洗浄した。次いで、Con Aを用い、4日間、事前に活性化した 2×10^5 個のT細胞を、各ウェルに添加し、4にて5分間、 $200 \times g$ でのプレートの遠心分離の前に37にて5時間インキュベートした。得られた活性化T細胞を包含するペレットを、アネキシンV-ビオチン接合体と共に、室温にて15分間インキュベートし、次いで、アビジン接合体 (希釈度1:5000のSA-gal)と共に、37にてさらに30分間インキュベートした。いずれの結合反応においても、各ウェルを、アネキシンV結合緩衝液を用いて、三度洗浄した。 $110 \mu\text{l}$ のZ-緩衝混合液 (20ml のZ-緩衝液に $54 \mu\text{l}$ の2-メルカプトエタノール)および $30 \mu\text{l}$ のONPG ($0.04 \text{g}/10 \text{ml}$)を、4にて終夜インキュベートすることにより、発色が生じた。 420nm での光学密度の読みを記録した。

30

40

【0141】

Con-A活性化T細胞のセレクチン誘起アポトーシスのレベルは、ヒトIgG1のFcと融合したP-セレクチン (図11A) またはE-セレクチン (図11B) の濃度の増加 ($0.063 \mu\text{l/ml}$ から $5 \mu\text{l/ml}$) に伴い増加した。ハムスター抗体TAB4は活性化T細胞のアポトーシスを誘起し (実施例1参照)、該実験においてはポジティブコントロールとして使用した。ネガティブコントロールとしての、抗ヒトFc、ヒトIg (HIg)、およびBSAはアポトーシスを誘起しなかった。L-セレクチンが活性化T細胞には良好に結合しなかったのと同じく (実施例12)、L-セレクチン-ヒトFc

50

融合タンパク質の存在下においては、何ら顕著なアポトーシスは認められなかった(図11C)。要約すると、P-セレクトインまたはE-セレクトインのPSGL-1結合断片およびヒトFc断片を包含するプレート結合融合タンパク質(plate-bound fusion protein)は活性化T細胞のアポトーシスを誘起する。

【0142】

実施例14：可溶性P-セレクトイン-Fc融合物の架橋は活性化T細胞のアポトーシスを誘起する

マウスセレクトイン類(P-セレクトイン、E-セレクトイン、およびL-セレクトイン)は、先に詳述したとおり、ヒトIgG1のFcドメインに融合し、可溶性二量体の融合タンパク質を形成した。該可溶性セレクトインが活性化T細胞のアポトーシスを誘起しうるか否かを評価するため、プレート結合抗ヒトFc Ig(plate-bound anti-human Fc Ig)が省略されていることを除き、実施例13にて詳述の実験を実施した。可溶性形態のP-セレクトイン融合タンパク質(二量体)単独の存在下においては、無視可能かまたは低レベルの活性化T細胞のアポトーシスしか生じなかった(図12)。しかしながら、架橋体(抗ヒトFc)の添加により、該アポトーシス活性は大幅に増加し、プレート結合抗体(plate-bound antibody)の存在下において誘起されるのとほぼ同程度までに増加した。抗ヒトFc、ヒトIg(HIg)、またはBSAのいずれもアポトーシスを誘起しなかった。

【0143】

E-セレクトイン-Fc融合タンパク質の場合においても、P-セレクトイン-Fc融合タンパク質の場合と同様の結果が得られた。さらに、L-セレクトインのプレート結合体(plate-bound)(多量体の形態)の場合に得られた結果と一致して、可溶性形態のL-セレクトイン融合タンパク質は活性化T細胞のアポトーシスを誘起しなかった。

【0144】

他の実施態様

本発明を詳細な説明と合わせて説明してきたが、前記説明は詳細に説明することを意図するものであり、本発明の概念を制限するものではないと解される。本発明の他の態様、利点、および修飾は、特許請求の範囲の概念に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0145】

【図1】いつ活性化T細胞が、TAB4(抗PSGL-1モノクローナル抗体)が媒介するアポトーシスシグナルに対する感受性を得るかを調べた経時的な実験の代表的結果を示すものである。

【図2】TAB4抗体によって認識される抗原の細胞表面のビオチン化および免疫沈降の結果を示すものである。

【図3】脾臓CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD19⁺B細胞、およびNK細胞上のPSGL-1抗原の発現を示すものである。

【図4】CD4⁺、CD8⁺、およびCD4⁺8⁺、およびCD4⁻8⁻胸腺細胞上のPSGL-1抗原の発現を示すものである。

【図5】レスポンドー(responder)としてのTAB4(またはハムスターIg)で処置されたBalb/cマウスから単離された脾臓細胞およびスティミュレーター(stimulator)としてのH2ミスマッチC3H脾臓細胞を用いた混合リンパ球インキュベートで生産されたIL-2レベルを示すものである。

【図6】(A)TAB4抗体で免疫沈降したタンパク質が市販の抗PSGL-1抗体により認識可能であることおよび(B)抗PSGL-1抗体でT細胞溶解産物を予め清澄化(preclearing)することで、TAB4により認識されたタンパク質を枯渇できることを示すウェスタンブロット分析を示すものである。

【図7】Balb/cマウスから皮膚移植を受け、抗PSGL-1抗体(黒塗りの菱形)または対照抗体(白抜きの四角)で処置したC57BL/6マウスにおける生存した移植片の割合(%)を示すものである。

【図8】活性化ヒト末梢血単核細胞を抗ヒトPSGL-1抗体で処置した後のアポトーシ

10

20

30

40

50

ス性T細胞の割合(%)の経時変化を示すものである。

【図9】抗PSGL-1抗体(黒塗りの四角)または対照抗体(白抜きの四角)で処置した自己免疫性非肥満性糖尿病(NOD)オスマウスにおける糖尿病の発症率を示すものである。

【図10】マウスP-セレクチン、E-セレクチン、およびL-セレクチンのマウス活性化T細胞への結合を示すものである。

【図11】図11A-11Cは、E-セレクチン(図11A)、P-セレクチン(図11B)、およびL-セレクチン(図11C)の多量体形態(multimeric forms)によるマウス活性化T細胞のアポトーシスの誘起を示している。

【図12】可溶性P-セレクチン-Fc融合タンパク質の架橋によるインビトロでのマウス活性化T細胞のアポトーシスの誘起を示している。

10

【図1】

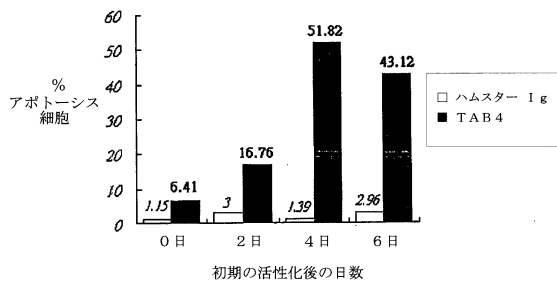
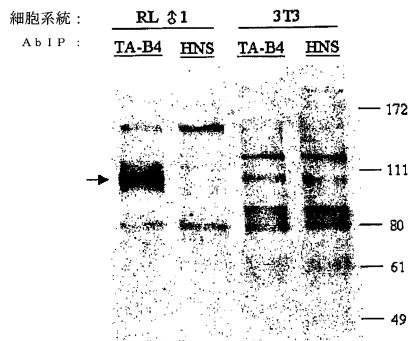


図1

【図2】



AbIP : 免疫沈降に使用した抗体
 TA-B4 : TA-B4モノクローナル抗体
 HNS : ハムスター正常血清

図2

【 図 3 】

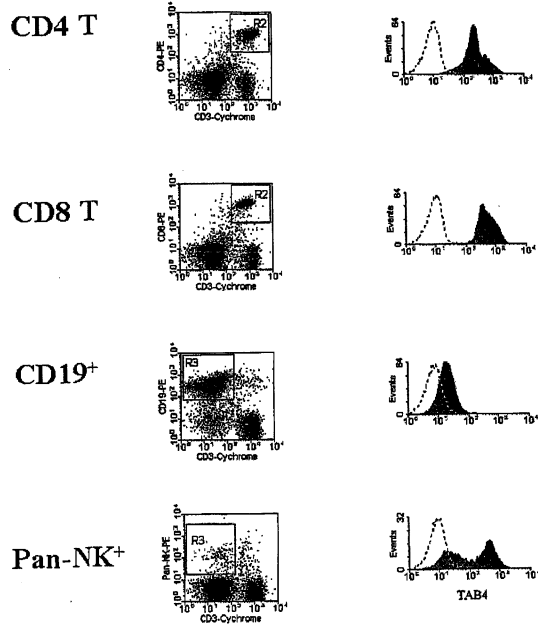


図 3

【 図 4 】

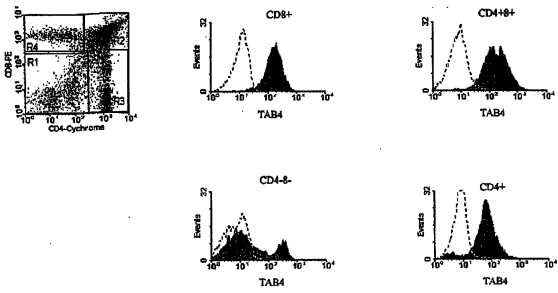


図 4

【 図 5 】

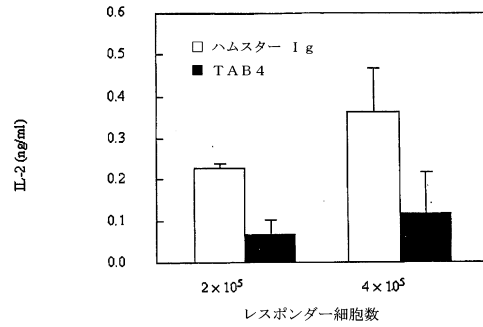


図 5

【 図 6 】

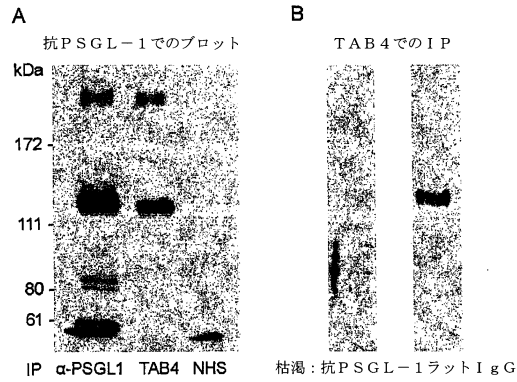


図 6

【 図 7 】

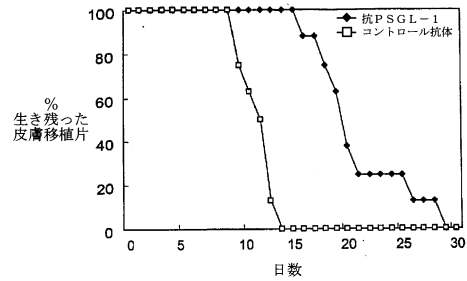


図 7

【 図 8 】

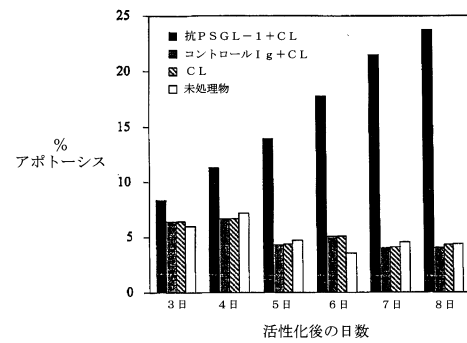


図 8

【 図 9 】

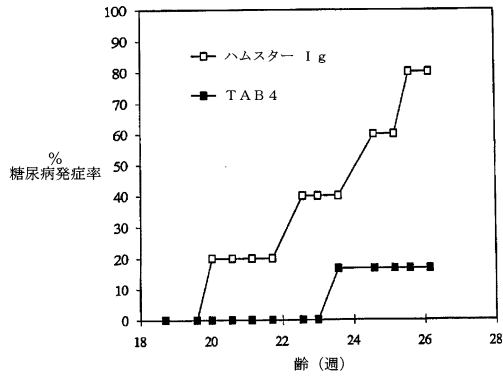


図 9

【 図 10 】

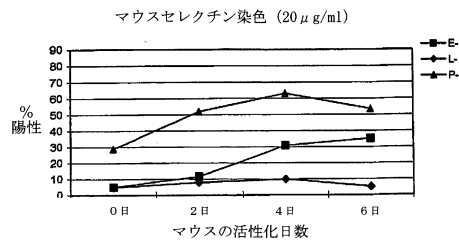


図 10

【 図 12 】

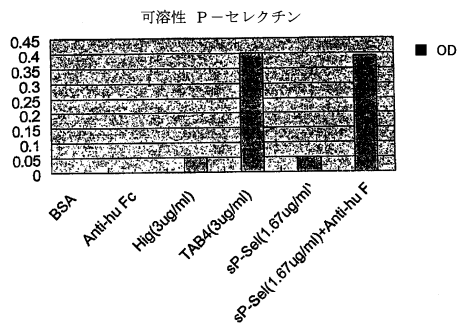


図 12

【 図 11 】

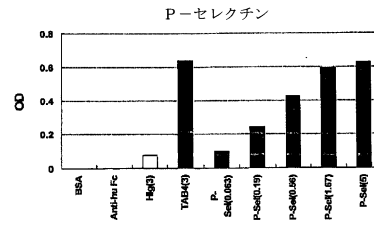


図 11 A

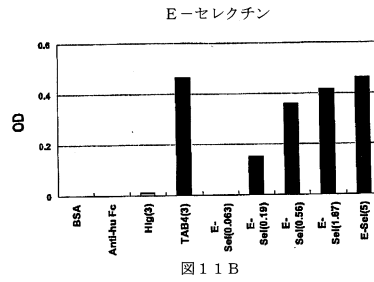


図 11 B

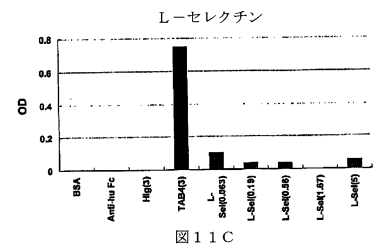


図 11 C

フロントページの続き

(72)発明者 チャン, チュン, ナン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94404, フォスターシティ, セイント クロイツクス
レーン 602

合議体

審判長 内藤 伸一

審判官 川口 裕美子

審判官 大久保 元浩

(56)参考文献 国際公開第2003/013603(WO, A1)

Chamow, S.M. et al., Immuno adhesins: principles and applications, Trends Biotechnol., 1996年 2月, Vol. 14, No. 2, P. 52-60

Dietsch, M.T. et al., Bispecific receptor globulins, novel tools for the study of cellular interactions - Preparation and characterization of an E-selectin/P-selectin bispecific receptor globulin-, J. Immunol. Methods, 1993年 6月 4日, Vol. 62, No. 1, P. 123-132

Coito, A.J. et al., Selectin-mediated interactions regulate cytokine networks and macrophage heme oxygenase-1 induction in cardiac allograft recipients, Lab. Invest., 2002年 1月, Vol. 82, No. 1, P. 61-70

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K39/00-39/44, A61K45/00

JSTPlus, JMEDPlus, JST7580

专利名称(译)	P-选择素糖蛋白配体1的调节剂		
公开(公告)号	JP5808879B2	公开(公告)日	2015-11-10
申请号	JP2006526304	申请日	2004-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	阿布基因组学公司		
申请(专利权)人(译)	阿布基因组学公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿布基因组学Koperatifu羽.尔.		
[标]发明人	リンロングフワ チャンチュンナン		
发明人	リン,ロング-フワ チャン,チュン,ナン		
IPC分类号	A61K38/00 A61P29/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08 G01N33/48 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/28 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K14/70564 C07K16/2896 C07K2317/75 C07K2319/30 G01N2800/52		
FI分类号	A61K37/02 A61P29/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08		
优先权	10/662906 2003-09-15 US		
其他公开文献	JP2007533618A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在T细胞或自然杀伤(NK)细胞表面结合P-选择蛋白糖蛋白1(PSGL-1)的多聚化合物可用于诱导T细胞或NK细胞耗竭和/或诱导T细胞或NK细胞凋亡。本发明的多聚化合物和方法可用于在诸如炎症性疾病,自身免疫疾病,移植排斥和变态反应疾病的病症中控制不需要的T细胞或NK细胞介导的免疫应答。

(21) 出願番号	特願2006-526304 (P2006-526304)	(73) 特許権者	509287935
(86) (22) 出願日	平成16年9月9日 (2004. 9. 9)		
(65) 公表番号	特表2007-533618 (P2007-533618A)		アブゲノミクス コーペラティブ ユー. エー.
(43) 公表日	平成19年11月22日 (2007. 11. 22)		オランダ王国 1811シーアール アル クマール、アウダグラハト 202
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/029520		Oudegracht 202, 181 1CR Alkmaar, The Ne therlands
(87) 国際公開番号	W02005/027831	(74) 代理人	110000671
(87) 国際公開日	平成17年3月31日 (2005. 3. 31)		八田国際特許業務法人
審査請求日	平成19年3月22日 (2007. 3. 22)	(72) 発明者	リン, ロング-フワ
審判番号	不服2013-12628 (P2013-12628/J1)		台湾, タイワン 106, タイペイ, ダー アン ディストリクト, シンシェン エス . ロード, セクション 3, レーン 5 4, ナンバー12, 7エフ
審判請求日	平成25年7月2日 (2013. 7. 2)		
(31) 優先権主張番号	10/662, 906		
(32) 優先日	平成15年9月15日 (2003. 9. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く