

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-521958

(P2004-521958A)

(43) 公表日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 39/395	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/06	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-518607 (P2003-518607)	(71) 出願人	503183260 アプゲノミクス コーポレイション 台湾, タイワン 114, タイペイ, ネイフ, ジュイクアング ロード, レーン 358, ナンバー 32, 2エフ
(86) (22) 出願日	平成14年3月13日 (2002.3.13)	(74) 代理人	100072349 弁理士 八田 幹雄
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月20日 (2003.5.20)	(74) 代理人	100102912 弁理士 野上 敦
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/007498	(74) 代理人	100110995 弁理士 奈良 泰男
(87) 国際公開番号	W02003/013603	(74) 代理人	100111464 弁理士 齋藤 悦子
(87) 国際公開日	平成15年2月20日 (2003.2.20)	(74) 代理人	100114649 弁理士 宇谷 勝幸
(31) 優先権主張番号	60/310,196		
(32) 優先日	平成13年8月3日 (2001.8.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/051,497		
(32) 優先日	平成14年1月18日 (2002.1.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P-セレクトイン糖タンパク質リガンド1のモジュレーター

(57) 【要約】

T細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞の表面のP-セレクトイン糖タンパク質1(PSGL-1)に結合する化合物は、T細胞若しくはNK細胞の枯渇を誘導するおよび/またはT細胞若しくはNK細胞のアポトシスを誘導するのに使用できる。本発明の化合物及び方法は、自己免疫疾患、移植拒絶、及びアレルギー疾患などの症状における望ましくないT細胞またはNK細胞が介在する免疫応答を制御するのに使用できる。

【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 細胞が介在する免疫応答の特徴を有する症状を有するまたはこのような症状になる危険性があると診断される個体を選択し；および

T 細胞の表面上の P - セレクチン糖タンパク質リガンド - 1 (P S G L - 1) への化合物の結合は T 細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導するものである、T 細胞の表面上の P S G L - 1 に結合する化合物を、該個体に投与することにより、該個体で T 細胞が介在する免疫応答を防止または抑制することを有する、個体における T 細胞が介在する免疫応答の防止または抑制方法。

【請求項 2】

該化合物は、P S G L - 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、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

該化合物は、P S G L - 1 に特異的に結合するモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

モノクローナル抗体に結合し、T 細胞の表面上の複数の P S G L - 1 抗原の架橋を誘導する物質を投与することをさらに有する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

該方法は、T 細胞の表面上の複数の P S G L - 1 抗原の架橋を誘導することを有し、該架橋は T 細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導するものである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

自己免疫疾患を有すると診断される個体を選択することを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

同種または異種移植を受けたまたは受けることが予想される個体を選択することを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

アレルギー疾患を有すると診断される個体を選択することを有する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

T 細胞癌を有すると診断される個体を選択することを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

該 T 細胞は活性化 T 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

該 T 細胞は、C D 4 + T 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

該 T 細胞は、C D 8 + T 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

該方法は、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 細胞の数を検出し、化合物の投与後の該個体から採取した第 2 の生体試料における T 細胞の数と結果を比較することを有する、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 14】

該方法は、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 細胞の生物学的活性を検出し、化合物の投与後の該個体から採取した第 2 の生体試料における T 細胞の生物学的活性と結果を比較することを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

投与により、個体の末梢血の C D 3 + 細胞の少なくとも 20 % を減損する、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 16】

抗体またはその抗原結合断片は、抗体またはその抗原結合断片に暴露した後に個体の末梢血のCD3+細胞の少なくとも20%の死亡を誘導するものである、請求項2に記載の方法。

【請求項 17】

細胞表面上でPSGL-1を発現するT細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞を提供し；および

T細胞またはNK細胞の表面上のPSGL-1への化合物の結合はT細胞またはNK細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導するものである、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する、T細胞またはNK細胞の死亡の誘導方法。

10

【請求項 18】

該化合物は、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、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

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、請求項17に記載の方法。

【請求項 20】

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抗原の架橋を誘導する物質とモノクローナル抗体を接触させることをさらに有する、請求項19に記載の方法。

20

【請求項 21】

該方法は、T細胞またはNK細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の架橋を誘導することを有し、該架橋はT細胞またはNK細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導するものである、請求項17に記載の方法。

【請求項 22】

該T細胞は、活性化T細胞である、請求項17に記載の方法。

【請求項 23】

該T細胞は、CD4+ T細胞である、請求項17に記載の方法。

【請求項 24】

該T細胞は、CD8+ T細胞である、請求項17に記載の方法。

30

【請求項 25】

該方法は、化合物との接触後にT細胞またはNK細胞の生存率を評価することを有する、請求項17に記載の方法。

【請求項 26】

該方法は、化合物との接触後にT細胞またはNK細胞の生物学的活性を評価することを有する、請求項17に記載の方法。

【請求項 27】

細胞表面上でPSGL-1を発現する細胞を提供し；

該細胞を試験物質と接触させ；および

細胞を試験物質と接触させた後の細胞の生存率を測定することにより、該試験物質がPSGL-1機能のモジュレーターであるかどうかを決定することを有する、PSGL-1機能のモジュレーターに関するスクリーニング方法。

40

【請求項 28】

該試験物質によって誘導される細胞の死を検出することにより、該試験物質がPSGL-1機能のモジュレーターであることを決定することをさらに有する、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

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、請求項28に記載の方法。

50

【請求項 30】

該化合物は、P S G L - 1 に特異的に結合するモノクローナル抗体である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

モノクローナル抗体を、該モノクローナル抗体に結合し、T細胞の表面上の複数のP S G L - 1 抗原の架橋を誘導する物質と接触させることをさらに有する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

該方法は、細胞の表面上の複数のP S G L - 1 抗原の架橋を誘導することを有し、該架橋はT細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導するものである、請求項 28 に記載の方法

10

【請求項 33】

該T細胞は、活性化T細胞である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 34】

該T細胞は、C D 4 + T細胞である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 35】

該T細胞は、C D 8 + T細胞である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 36】

大量の試験物質を製造し、該試験物質を製薬上許容できる担体中に配合することをさらに有する、請求項 28 に記載の方法。

20

【請求項 37】

T細胞の表面上のP S G L - 1 への化合物の結合はT細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導するものである、T細胞の表面上のP S G L - 1 に結合する化合物；および自己免疫性、移植拒絶、アレルギー症状、またはT細胞癌を処置するための化合物の使用に関するインストラクションを有するキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本願は、2001年8月3日に提出された、米国仮出願第60/310,196号の優先権を主張するものであり、この内容は参考によって本明細書中に引用される。

30

【0002】

発明の分野

本発明は、免疫応答を制御するための組成物及び方法に関するものである。

【0003】

発明の背景

望ましくない免疫応答の制御は、自己免疫疾患、移植拒絶、アレルギー疾患、及びある種の癌などの病気の処置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、免疫抑制によってまたは免疫トレランスの誘導によって制御されうる。トレランスは、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。器官の移植では、T細胞は、ア

口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、またはI L - 2 に依存する増殖を阻害する、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 (r a p a m y c i n) の使用を含む。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 (s i g n a l i n g) 若しくはT細胞の共刺激 (c o - s t i m u l a t o r y) 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て拒絶の発生を抑制するのに有効であることが示された。これらの薬剤によっては、自己免疫疾患を処置するのにおよび移植片生着を長期化するのにある程度成功していることが示された。

40

50

【0004】

アポトシスは、免疫系の適当な機能及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、細胞の生存及び死に影響を与える。Fas (またはCD95、MW = 43 kD)、TNFR2 (MW = 75 kD)、CD2 (MW = 45 kD) 及びCTLA-4 (MW = 33 kD) 等のT細胞表面分子に対する抗体は、T細胞のアポトシスを誘導する (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及びTNFR2分子を使用しようとする試みは、これら2分子が免疫細胞でのみならず、肝臓等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))。

【0005】

発明の要約

本発明は、T細胞がT細胞表面抗原であるP-セレクチン糖タンパク質リガンド-1 (PSGL-1) のエンゲージメントによって枯渇されうるおよび/またはアポトシスを受けるのを誘導されうるという知見に基づくものである。T細胞の枯渇 (depletion) は、過剰な若しくは望ましくないT細胞が介在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処置に特に有効でありうる。例えば、T細胞の枯渇は、自己免疫疾患、移植拒絶、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うる。本発明は、T細胞が介在する免疫応答を防止または抑制するためのPSGL-1機能のモジュレーターの使用方法さらにはPSGL-1機能のモジュレーターに関するスクリーニング方法を包含する。

【0006】

一態様においては、本発明は、個体のT細胞が介在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、以下の段階を含む：過剰な若しくは望ましくないT細胞が介在する免疫応答の特徴を有する症状を有するとまたはこのような症状になる危険性があると診断される個体を選択し；およびT細胞の表面上のPSGL-1への化合物の結合がT細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導するものである、T細胞の表面上のPSGL-1に結合する化合物を、個体に投与することにより、個体におけるT細胞が介在する免疫応答を防止または抑制する。

【0007】

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この抗原結合断片がありうる。一例では、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は、本方法は、モノクローナル抗体に結合し、T細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の架橋を誘導する物質を投与するさらなる段階を含む。

【0008】

一実施態様においては、本方法は、架橋がT細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導す

る、T細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の架橋を誘導することを含む。

【0009】

一例では、本方法は、自己免疫疾患を有すると診断される個体を選択する段階を含む。他の例では、本方法は、同種または異種移植を受けたまたは受けることが予想される個体を選択する段階を含む。他の例では、本方法は、アレルギー疾患を有すると診断される個体を選択する段階を含む。他の例では、本方法は、T細胞癌を有すると診断される個体を選択する段階を含む。

【0010】

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

10

【0011】

一実施態様においては、本方法は、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細胞の数を検出し、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細胞の数と結果を比較する段階を有する。

【0012】

他の実施態様においては、本方法は、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細胞の生物学的活性を検出し、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細胞の生物学的活性と結果を比較する段階を有する。

【0013】

一実施態様においては、投与により、個体の末梢血のCD3+細胞の少なくとも20%を減損する。実施態様によっては、投与により、個体の末梢血のCD3+細胞の少なくとも30%、40%、50%、またはそれ以上を減損する。

20

【0014】

一実施態様においては、抗体またはその抗原結合断片は、抗体またはその抗原結合断片に暴露した後に個体の末梢血のCD3+細胞の少なくとも20%の死亡を誘導するものである。実施態様によっては、このような投与は、個体の末梢血のCD3+細胞の少なくとも30%、40%、50%、またはそれ以上の死亡を誘導するものである。細胞の死は、抗体またはその抗原結合断片に暴露された後、いずれの時間、例えば、1、2、3、4、5、6、7日、またはそれ以上の日数で測定されてもよい。

【0015】

他の態様においては、本発明は、T細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞の死の誘導方法の特徴とする。本方法は、以下の段階を含む：細胞表面上でPSGL-1を発現するT細胞またはNK細胞を提供し；およびT細胞またはNK細胞の表面上のPSGL-1への化合物の結合がT細胞またはNK細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導するものである、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、T細胞またはNK細胞を接触させる。

30

【0016】

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この抗原結合断片がありうる。一例では、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抗原の架橋を誘導する物質とモノクローナル抗体を接触させる段階を含む。

40

【0017】

一実施態様においては、本方法は、T細胞またはNK細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の架橋を誘導することを有し、該架橋はT細胞またはNK細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導する段階を包含する。

【0018】

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

【0019】

50

一実施態様においては、本方法は、化合物との接触後に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。

【0020】

一実施態様においては、本方法は、化合物との接触後にT細胞またはNK細胞の生物学的活性を評価する段階を包含する。

【0021】

他の態様においては、本発明は、PSGL-1機能のモジュレーターに関するスクリーニング方法を特徴とする。本方法は、以下の段階を含む：細胞表面上でPSGL-1を発現する細胞を提供し；細胞を試験物質と接触させ；および細胞を試験物質と接触させた後の細胞の生存率を測定することにより、試験物質がPSGL-1機能のモジュレーターであるかどうかを決定する。

10

【0022】

一実施態様においては、本方法は、試験物質によって誘導される細胞の死を検出することにより、試験物質がPSGL-1機能のモジュレーターであることを決定する段階を包含する。

【0023】

一実施態様においては、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、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は、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抗原の架橋を誘導する物質と接触させる段階を包含する。

20

【0024】

一実施態様においては、本方法は、細胞の表面上の複数のPSGL-1抗原の架橋を誘導することを有し、架橋はT細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導する段階を包含する。

【0025】

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

【0026】

一実施態様においては、本方法は、大量の試験物質を製造し、該試験物質を製薬上許容できる担体中に配合する段階を含む。

30

【0027】

他の態様においては、本発明は、T細胞の表面上のPSGL-1への化合物の結合はT細胞を死亡させるシグナル伝達経路を誘導するものである、T細胞の表面上のPSGL-1に結合する化合物；および自己免疫性、移植拒絶、アレルギー症状、またはT細胞癌を処置するための化合物の使用に関するインストラクションを有するキットを特徴とする。他の実施態様においては、上記キットは、本明細書中に記載される病気または疾患を処置するための化合物の使用に関するインストラクションを有する。

【0028】

本発明の利点としては、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細胞のアポトシスを誘導できることがある。例えば、個体への抗PSGL-1抗体の投与によって、IL-2またはTNF-E等の炎症性サイトカインのレベルの望ましくない上昇は起こらない。

40

【0029】

本発明の他の利点としては、その発現が白血球、および特にT細胞及び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がある。したがって、本明細書中に記載される化合物は、肝臓細胞等の他の細胞型の有意なレベルのアポトシスを誘導しない。生存を脅かす全身性サイトカイン応答を有意に誘導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細胞及びNK細胞（移植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

50

である。

【0030】

特記しない限り、本明細書中で使用される技術的及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。本明細書中に記載されるのと同様のまたは等価の方法及び材料が本発明の実施または試験で使用できるが、適当な方法及び材料を以下に説明する。本明細書中に記載されるすべての公報、特許出願、及び他の参考文献は、参考によって完全に本明細書中に引用される。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、記載される材料及び方法は、詳細に説明するのみであり、本発明を制限するものではない。

【0031】

本発明の他の態様及び利点は、下記詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかであろう。

【0032】

図面の簡単な説明

図1は、いつ活性化T細胞がTAB4（抗TAIPモノクローナル抗体）が介在するアポプト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。

【0033】

図2は、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及び免疫沈降の結果を示すものである。

【0034】

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

【0035】

図4は、CD4⁺、CD8⁺、及びCD4⁺8⁺、及びCD4⁻8⁻胸腺細胞でのPSGL-1抗原の発現を示すものである。

【0036】

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培養で生産されたIL-2レベルを示すものである。

【0037】

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抗体によって認識できることおよび(B)抗PSGL-1抗体でT細胞溶解産物を予め透徹（preclearing）することによって、TAB4によって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。

【0038】

図7は、Balb/cマウスから皮膚移植を受け、抗PSGL-1抗体（黒塗りのダイヤモンド）またはコントロール抗体（白抜きの四角）で処置されたC57BL/6マウスでの生存した移植片の割合（%）を示すものである。

【0039】

図8は、活性化ヒト末梢血の単核細胞を抗ヒトPSGL-1抗体で処置した後のアポプトシスを受けたT細胞の割合（%）の経時変化を示すものである。

【0040】

図9は、抗PSGL-1抗体（黒塗りの四角）またはコントロール抗体（白抜きの四角）で処置された自己免疫性肥満でない糖尿病（autoimmune non-obese diabetic）（NOD）オスマウスの糖尿病の発症率を示すものである。

【0041】

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。本明細書に記載される組成物でPSGL-1をエンゲ

10

20

30

40

50

ージメントすると、T細胞を枯渇するおよび/またはT細胞がアポプトシスを受けるのを誘導することができる。したがって、これらの化合物は、自己免疫疾患、移植拒絶、アレルギー症状、および/またはT細胞が誘導する癌等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。これらの組成物はまた、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。

【0042】

PSGL-1タンパク質

PSGL-1は、好中球、T及びBリンパ球、NK細胞、単球、樹状細胞、及び原始ヒトCD34造血前駆細胞で発現する細胞表面付着分子である。セクレチンと相互作用することにより、PSGL-1は、内皮での白血球の回転(rolling)及び炎症組織への白血球の溢出を仲介する。T細胞のE-及びP-セクレチンへのPSGL-1が仲介する結合、または移動は、異なるように調節される。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2T細胞も機能性PSGL-1を発現して、皮膚の炎症領域への移動が可能になる。

10

【0043】

PSGL-1は、特異的にシアリル化され、フコシル化され、さらに硫酸化されてP-セクレチンに結合し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末端でのグリコシル化及び硫酸化部位の異なる度合いという特徴を有するイソ型で存在する。休止抹消血T及びB細胞、リンパ細胞系およびインビトロの活性化抹消血T細胞は、同様のレベルの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を示して、P-セクレ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-セクレチン及びE-セクレチンへの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-及びP-セクレチン双方でつないで(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-セクレチンへのPSGL-1の結合は、硫酸化のための3つのチロシン残基及びグリコシル化のための1つのトレオニン残基を含む末端デカペプチドの存在に左右される。

20

30

【0044】

PSGL-1タンパク質は、組み換え方法によっておよび/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で、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で使用できる(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に対する抗体はまた既知であり、抗原の精製に使用できる(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される方法に使用できる。PSGL-1はさらに、以下に制限されないがSako et al. (1993) Cell 75: 1179; Vachino et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 21966; 及びVeldman et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 16470などの参考文献に記載される。

40

【0045】

PSGL-1の組み換え生産では、PSGL-1及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/またはチロシンホルトランスフェラーゼをコード化する核酸との同時トランスフェクション(c o -

50

transfection)を伴うかもしれない。

【0046】

抗PSGL-1抗体は、生体材料からPSGL-1抗原を単離、精製するのに使用できる。PSGL-1タンパク質を発現する細胞型、例えば、個体由来のT細胞またはT細胞系が、タンパク質源として使用されてもよい。精製されたら、タンパク質は、本明細書に記載される様々な方法で使用されうる。例えば、精製PSGL-1タンパク質は、T細胞でのPSGL-1機能のモジュレーターのインビトロスクリーニングにまたはその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できる。

【0047】

加えて、PSGL-1抗原は、セクレチン-Fc融合、例えば、P-セクレチン-Fc融合を用いて精製できる。 10

【0048】

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を生じるのに使用できる。上記したように、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るまたは固相合成方法を用いて合成できる。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できる。加えて、TAB4モノクローナル抗体等の、抗PSGL-1抗体は、PSGL-1ポリペプチド、例えば、天然の立体配置のPSGL-1ポリペプチドを精製するのに使用でき、これは次にさらなる抗PSGL-1抗体を生産するための免疫原として使用できる。 20

【0049】

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操作された抗体であってもよい。特定の抗原、例えば、PSGL-1ポリペプチドに「特異的に結合する」抗体は、サンプル中の他の分子を実質的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て、(結合の直接的な検出、ポリペプチドへの試験化合物の結合を阻害する競合分子の検出、および/またはアポトシス誘導活性に関するアッセイを用いた結合の検出によって)ポリペプチドが試験化合物に結合するかどうかを決定することによって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ものである。 30

【0050】

通常、PSGL-1ポリペプチドは、KLH等の、キャリアタンパク質にカップリングさせ、アジュバントと混合されて、宿主哺乳動物に注射されうる。次に、その動物中で生産された抗体は、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。

【0051】

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処置されうる。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、及びラットがある。免疫学的な応答を上昇させるのに使用できる様々なアジュバントは、宿主の種によって異なるが、フロイントアジュバント(完全及び不完全)、水酸化アルミニウム等の無機質ゲル、リゾレシチン等の界面活性物質、プ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、及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のアジュバントとしては、BCG(カルメット-ゲラン杆菌)及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、免疫処置された動物の血清中に含まれる抗体分子の異種集団である。 40

【0052】

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、及び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。

【0053】

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、上記したPSGL- 50

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]を参照）を用いて調製できる。

【0054】

特に、モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256:495 (1975)、及び米国特許第4,376,110号に記載されるなどの培養物での連続細胞系による抗体分子の生産を提供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]）、及び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]）によって得られる。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD等のいずれかの免疫グロブリンクラスおよびこれらのサブクラスなど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、インビトロでまたはインビボで培養されてもよい。インビボで高力価のmAbを生産できることは、特に有用な生産方法である。

10

【0055】

生産されると、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 et al.、上記に記載されるような、標準的な方法による免疫沈降分析による特異的PSGL-1認識について試験される。PSGL-1を特異的に認識し、これに特異的に結合する抗体が本発明で有用である。T細胞、例えば、CD3+細胞の表面のPSGL-1抗原に結合し、個体でのT細胞の枯渇および/またはアポトシスを誘導する抗PSGL-1抗体が特に有用である。

20

【0056】

抗体は、例えば、（例えば、自己免疫疾患、移植拒絶、アレルギー疾患、及びT細胞で誘導される癌等の症状に関連した、T細胞が介在する免疫応答等の、望ましくない免疫応答を抑制する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も使用されうる。

30

【0057】

加えて、適当な生物学的活性を有するヒト抗体分子由来の遺伝子と共に適当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」の生産を目的として開発された技術（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]）が使用できる。キメラ抗体は、マウスのモノクローナル抗体由来の可変領域及びヒトの免疫グロブリン定常領域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。

40

【0058】

または、単鎖抗体の生産を目的として記載される技術（米国特許第4,946,778号、第4,946,778号、及び第4,704,692号）を用いて、PSGL-1ポリペプチドに対する単鎖抗体、またはその断片を生産するのに適用してもよい。単鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重及び軽鎖を連結して、単鎖のポリペプチドを得ることによって形成される。

【0059】

特定のエピトープを認識し、これに結合する抗体断片は、既知の技術によって得られる。例えば、このような断片としては、以下に制限されないが、抗体分子のペプシン消化によ

50

って生産されうる F (a b ') 2 断片、および F (a b ') 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 F a b 断片がある。または、所望の特異性を有するモノクローナル F a b 断片を迅速かつ容易に同定できるように、F a b 発現ライブラリーを構築してもよい (H u s e e t a l . , S c i e n c e 2 4 6 : 1 2 7 5 [1 9 8 9]) 。

【0060】

抗体は、当該分野において既知の方法によって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してもよい (S c o t t g e n e , S c o t l a n d ; O x f o r d M o l e c u l a r , P a l o A l t o , C a l i f .) 。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 (G r e e n e t a l . , N a t u r e G e n e t i c s 7 : 1 3 [1 9 9 4] ; 及び米国特許第 5 , 5 4 5 , 8 0 6 号及び第 5 , 5 6 9 , 8 2 5 号) 。

10

【0061】

P S G L - 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

本発明はまた、以下に制限されないが、P S G L - 1 への結合する際に T 細胞の枯渇および/または T 細胞のアポトシスを誘導する化合物などの、P S G L - 1 (または P S G L - 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。P S G L - 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 P S G L - 1 の相互作用を調節する化合物および P S G L - 1 活性を調節する化合物もまた包含される。

【0062】

本発明にしたがってスクリーニングされる化合物としては、以下に制限されないが、本明細書に記載されるように、P S G L - 1 に結合して、P S G L - 1 が介在する生物学的機能を調節するペプチド、抗体及びこれの断片、ならびに他の有機化合物が挙げられる。

20

【0063】

このような化合物としては、以下に制限されないが、例えば、以下に制限されないが、ランダムペプチドライブラリーのもの ; (L a m e t a l . , N a t u r e 3 5 4 : 8 2 [1 9 9 1] ; H o u g h t e n e t a l . , N a t u r e 3 5 4 : 8 4 [1 9 9 1]) 等の、可溶性ペプチド、および 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、ホスホペプチド (以下に制限されないが、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 (r a n d o m o r p a r t i a l l y d e g e n e r a t e , d i r e c t e d p h o s p h o p e p t i d e l i b r a r i e s) を含む ; S o n g y a n g e t a l . , C e l l 7 2 : 7 6 7 [1 9 9 3]) などの、ペプチド、抗体 (以下に制限されないが、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、抗イディオタイプの、キメラまたは単鎖抗体、ならびに F A b 、 F (a b ') 2 及び F A b 発現ライブラリー断片、ならびにこれらのエピトープ結合断片を含む) 、ならびに有機または無機小分子が挙げられる。

30

【0064】

本発明にしたがってスクリーニングされうる他の分子としては、以下に制限されないが、本明細書に記載されるように、P S G L - 1 タンパク質の活性に影響を与える有機小分子がある。

40

【0065】

コンピュータモデリング及び探索技術によって、P S G L - 1 発現または活性を調節できる、化合物を同定できる、または既に同定された化合物を改善できる。このような化合物または組成物が同定されたら、活性部位または領域が同定される。このような活性部位は、具体的には、活性の天然のモジュレーターに対する結合部位であってもよい。活性部位は、例えば、ペプチドのアミノ酸配列から、核酸のヌクレオチド配列から、または関連する化合物または組成物のその天然のリガンドとの複合体の研究からなどの、当該分野において既知な方法を用いて同定できる。後者の場合では、化学的または X 線結晶方法が、その因子上のどこにモジュレーター (またはリガンド) が見出されるかを知得することによって活性部位を見出すのに使用できる。

50

【0066】

結合を変更する化合物の設計及び生成を参照しながら上記してきたが、PSGL-1タンパク質に結合して、T細胞の枯渇を引き起こすおよび/またはT細胞のアポトシスを誘導する化合物に関して、天然産物または合成化学物質、及びタンパク質等の生物学的に活性のある材料などの、既知の化合物のライブラリーをスクリーニングしてもよい。

【0067】

インビトロ系が、PSGL-1（またはPSGL-1のドメイン）と相互作用することができる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、本明細書に記載されるようにT細胞活性を調節するのに有用であり、ゆえに、自己免疫疾患、移植拒絶、アレルギー疾患、及びT細胞で誘導される癌等の症状の処置に有用である。

10

【0068】

PSGL-1に結合する化合物を同定するのに使用されるアッセイの原則は、2成分が相互作用して結合するのに、ゆえに反応混合物中で除去および/または検出されうる複合体を形成するのに十分な条件下および時間、PSGL-1（またはPSGL-1のドメイン）及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PSGL-1種は、スクリーニングアッセイの目標によって異なる。場合によっては、アッセイ系（例えば、得られた複合体の標識、単離など）で利点を得られる異種タンパク質またはポリペプチドに融合するPSGL-1のドメインに相当するペプチドを使用することが好ましく、利用できる。

【0069】

スクリーニングアッセイは、様々なように行ないうる。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を固着し、反応終了時に固相上に固着したPSGL-1/試験化合物複合体を検出することがある。このような方法の一実施態様においては、PSGL-1反応物を、固体表面に固着させてもよく、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。

20

【0070】

実際には、マイクロタイタープレートが、簡便に固相として使用されてもよい。固着した成分は、非共有または共有結合によって固定化されてもよい。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て、乾燥することによって達成されてもよい。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用いて、タンパク質を固体表面に固着させてもよい。表面は、予め調製され、貯蔵されていてもよい。

30

【0071】

アッセイを行なうために、固定化されていない成分を、固着成分を含む被覆表面に添加する。反応が終了した後、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できる。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。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、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、直接標識されてもまたは標識された抗Ig抗体で間接的に標識されてもよい）、表面上に固着した複合体を検出できる。

40

【0072】

または、反応を、液相で行なってもよく、反応産物を未反応成分から分離して、複合体を、例えば、溶液中に形成される複合体を固着するために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を、および固着した複合体を検出するために可能性のある複合体の他の成分に特異的な標識抗体を用いて、検出してもよい。

【0073】

50

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、またはPSGL-1を発現するように遺伝子操作された細胞系が使用できる。細胞によるアッセイは、本明細書に記載されるスクリーニングによって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いて同定されたら、次にこの化合物について、例えば、インビトロ若しくはインビボのT細胞のアポトシスの誘導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。

【0074】

薬剤組成物

本発明の目的が個体の免疫応答を変更するものである場合には、例えば、PSGL-1ポリペプチドに特異的に結合する抗体、小分子、または他の化合物を含む薬剤組成物がまた、本発明の態様である。好ましい例では、化合物がPSGL-1のアゴニストとして機能する。

【0075】

本発明にしたがって使用される薬剤組成物は、一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配合されうる。ゆえに、化合物ならびにこれらの生理学上許容できる塩及び溶媒和化合物は、様々な投与経路による投与を目的として配合されてもよい。

【0076】

化合物は、注射による、例えば、大量注射または連続輸注による、非経口投与を目的として配合されてもよい。注射用の配合物は、保存剤を添加して、単位服用形態 (unit dosage form) で、例えば、アンプルでまたは複数投与用容器 (multi-dose container) で提示されてもよい。組成物は、懸濁液、溶液または油性若しくは水性ベヒクルにおけるエマルジョン等の形態をとってもよく、懸濁、安定化および/または分散剤等の配合剤を含んでもよい。または、活性成分は、使用前に、適当なベヒクル、例えば、滅菌した発熱性物質なしの水で構成されるために粉末形態であってもよい。

【0077】

T細胞が介在する免疫応答を制御するおよびT細胞集団を枯渇する方法

本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにおいて詳述されたものなどの化合物は、例えば、PSGL-1ポリペプチドによって調節される生物学的な機能を調節するのにおよび/または過剰な若しくは望ましくない免疫応答、例えば、T細胞が介在する免疫応答に関連する疾患の処置に有用でありうる。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PSGL-1に結合し、T細胞の死を引き起こすシグナル伝達経路を誘導するペプチド、抗体及びこれの断片、ならびに他の有機化合物が挙げられる。本発明の方法は、必要であれば、細胞の表面のPSGL-1の架橋を誘導する架橋剤を添加することを含む。本明細書に記載される化合物は、T細胞活性の枯渇または排除が望ましい場合に使用できる。本発明の化合物で処置されうる特に有用な症状としては、自己免疫疾患、移植拒絶、アレルギー疾患、及びT細胞で誘導される癌がある。

【0078】

本明細書に記載される抗PSGL-1化合物で処置されうる症状としては、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、及び乾癬性関節炎を含む)、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 (アトピー性皮膚炎及び湿疹性皮膚炎を含む)、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、らい反転反応 (leprosy reversal reactions)、らい性結節性紅斑、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

10

20

30

40

50

、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等の移植の症例（同種または異種組織を用いた移植を含む）、アトピー性アレルギー等のアレルギー、A I D S、および白血病および/またはリンパ腫等のT細胞新生物が挙げられる。

【0079】

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できる。例えば、個体由来の生体試料から、このサンプルを、本明細書に記載される抗PSGL-1化合物と、さらに必要であれば架橋剤と共に、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細胞を強化させることによってさらには細胞集団からT細胞活性を減少するまたは排除することによって、有用でありうる。

10

【0080】

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解される。

【0081】

実施例

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

TAIP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 (ConA) 活性化Bab/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、標準的な組織培養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細胞のアポトシスを誘導しかつインビボでT細胞を枯渇することができる、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細胞のアポトシス誘導タンパク質(TAIP)と称した。

20

30

【0082】

C57BL/6J (B6) 及び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。

【0083】

TAB4ハイブリドーマの濃縮培養液上清を、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。透明な培養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。抗体を含む画分を溜め、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。

40

【0084】

実施例2：マウス脾臓細胞懸濁液の調製ならびにT細胞の活性化および強化

マウスの脾臓を、8mlのハックス液(HBSS)に浸漬し、滅菌したカバーガラスでゆ

50

るやかに細かく切り刻み、15 ml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、1 mlのRBC溶解緩衝液(0.6 M NH₄Cl、0.17 M Tris-ベース、pH 7.65)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、9 mlのHBSSで迅速に急冷した。細胞を200 × gで5分間でペレット化し、2回洗浄して、RPIM培養液に再懸濁した。混合物中の細胞の濃度及び生存率を、血球計数器(Cambridge Scientific Inc.)及びトリパンブルー排除(Trypan blue exclusion)で測定した。

【0085】

脾臓細胞を、RPIM培地で3 × 10⁶ / mlの最終濃度になるように調節し、コンカナバリンAを2 μg / 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ウェルの培養プレート(5 ml / ウェル)または10 cmの培養皿(10 ml / 皿)に移し、37 °C、5% CO₂で48時間インキュベートした。活性化T細胞を含む、活性化された脾臓細胞を、5 ml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5 ml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 °C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。

【0086】

実施例3：活性化T細胞のアポトシス

活性化T細胞(実施例2参照)を、5 ng / mlのIL-2を含むRPIM培地に5 × 10⁵ 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、コントロールIg、TAB4、または抗CD3で処理した。

【0087】

【表1】

表1

実験群	処理*
ネガティブコントロール	3 μg / ml ハムスター Ig 5 ng / ml IL-2 3 μg / ml 架橋体抗体 (抗ハムスター Ig)
TAB4	3 μg / ml TAB4 ハムスター mAb 5 ng / ml IL-2 3 μg / 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 μg / ml 抗CD3 mAb 5 ng / ml IL-2 1 μg / 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	

【0088】

18 ~ 24時間インキュベートした後、各培養物のアポトシスの程度を7-AADアポトシスアッセイを用いて測定した。処理した細胞を、FACS管(Falcon)に移

10

20

30

40

50

し、氷冷したFACS溶液(PBSにおける1%ウシ胎児血清、0.05%アジ化ナトリウム)で2回洗浄し、4で200×gでペレット化した。細胞を、 $1 \sim 2 \times 10^7$ 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。染色するために、0.1mlの再懸濁された細胞を、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で7-AADと混合した後、暗所で4で20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FACS溶液で2回洗浄し、0.5mlのFACS溶液に再懸濁して、BD LSRフローサイトメーター(Beckton Dickinson)で分析した。

【0089】

図1は、いつ活性化T細胞がTAB4(抗TAIP)が介在するアポト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。マウスの脾細胞を、Con-Aで活性化し、IL-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IgG抗体の存在下でTAB4モノクローナル抗体またはコントロールのハムスターIgGで攻撃した。TAIP架橋が低レベル(6.5%)のアポトシス細胞死を誘導できたことが1日目で明らかであった。しかしながら、TAB4で誘導されたアポトシスの程度は、2日目で17%から増加し、4日で52%でピークとなり、6日目には44%にまで減少した。コントロールのハムスターIgGは、IL-2のみを投与した培養物に比して、特異的なアポトシスT細胞死を誘導しなかった。抗CD3(ポジティブコントロールとして)は、活性化してから48時間後に38%のT細胞のアポトシスを誘導した(データ示さず)。

【0090】

実施例4：異なる組織におけるTAIP抗原の発現

細胞を氷冷したFACS溶液(PBSにおける1%ウシ胎児血清、0.05%アジ化ナトリウム)で2回洗浄し、FACS管(Falcon)で4で200×gで遠心した。細胞を、 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、FACS管(Falcon)中の再懸濁した細胞の0.1ml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、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度でTABモノクローナル抗体またはコントロールのハムスターIgを細胞に添加し、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溶液で1回洗浄した後、(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(cychrome)接合抗CD3抗体($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)、FITC接合抗ハムスターIg、及びPE接合抗CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3抗体($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)；ならびに(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、及びサイクロム接合抗CD4抗体($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)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FACS溶液で2回洗浄し、1mlのFACS溶液に再懸濁して、BD LSRフローサイトメーター(Beckton Dickinson)で分析した。

【0091】

図3及び4は、脾細胞及び胸腺細胞の様々なサブ集団でのTAIP抗原の分布をFACS分析によって示すものである。図3に示されるように、 $\text{CD}19^+$ B細胞は、表面で低いが検出可能な量のTAIPタンパク質を発現した。有意により高い量のTAIPタンパク質が、 $\text{CD}3^+$ T細胞及びNK細胞の画分で検出された。ほとんどの $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}8^+$ 、及び $\text{CD}4^+8^+$ 胸腺T細胞は、有意な量のTAIPタンパク質を発現した。これに対して、TAIPタンパク質は、 $\text{CD}4^-8^-$ 胸腺T細胞の小集団でしか発現しなかった(図4)。

【0092】

脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、胃、腎臓、脾臓、及び皮膚等の、B6及びBalb/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。4μm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で乾燥し、次の実験のために用意した。

10

20

30

40

50

【0093】

組織パラフィン切片を含む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 - 85%エタノール - 70%エタノール - PBSの連続インキュベーションからさらに最後にPBS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、TAB4または正常ハムスターIg(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、PBSで2回洗浄して、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Ig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、PBS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BCIP/NBT基質溶液で室温で30分間発色させた。切片を再度PBSで洗浄し、過剰な酵素基質を除去し、PBS-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。

10

【0094】

結果から、TAIP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た残りの組織では検出されなかったことが示された。

【0095】

実施例5:TAIP抗原の細胞表面ビオチン化および免疫沈降

20

5×10^7 RLオス1またはNIH-3T3細胞を、氷上で30分間0.5mg/mlスルホ-NHS-ビオチン(Sulfo-NHS-biotin)(Pierce)を含むPBS 1ml中で表面ビオチン化した。反応を、細胞を氷上で10分間、0.5mlのダルベッコ改変イーグル培地(Life Technologies, Inc.)でインキュベートすることによって終了した。細胞を1mlのダルベッコ改変イーグル培地で1回及び1mlのリン酸緩衝液で2回洗浄した。

【0096】

標識された細胞を、完全プロテアーゼ阻害剤カクテル(complete protease inhibitor cocktail)(Roche)を含む冷却溶解緩衝液(1% Triton X-100、20mM Tris-HCl、pH 8.0、160mM NaCl、1mM CaCl₂)中で 5.0×10^7 細胞/mlの密度で15分間溶解し、不溶材料を10,000xgで10分間ペレット化した;これら及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 μ 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 μ gのmAb TAB4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 μ 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、pH 8.5、400mM NaCl、1mM CaCl₂、1mg/ml オボアルブミン)で4回、および400mM NaClの代わりに250mMを含む、同様の洗浄緩衝液で2回洗浄した。TAB4に特異的に結合するタンパク質を、50 μ lの1xSDS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。

30

40

【0097】

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、RL 1細胞(TAIP⁺T細胞)によっては同定されたが、3T3細胞(TAI

50

P⁻ 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TAB4によって認識される抗原であることが示唆される。

【0098】

実施例6：インビボでのT細胞の枯渇

インビボでのT細胞及び他の細胞の集団へのTAB4の効果を試験するために、マウスに、300µgのTAB4またはコントロールのハムスターIgを腹腔内に注射し、4日目に、脾細胞、胸腺細胞、及び末梢血の単核細胞を全細胞計測のために及びFACSによる細胞表面マーカーの分析のために集めた。

10

【0099】

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100µlのアリコートを各アッセイに使用した。2µg/mlの最終濃度のTAB4またはコントロールのハムスター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、100µlの氷冷したFACS溶液におけるサイクロム(cychrome)接合抗CD3抗体(2µg/ml)、FITC接合抗ハムスターIg及びPE接合抗CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3抗体(2µg/ml)；ならびに(2)胸腺細胞では、100µl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、及びサイクロム接合抗CD4抗体(2µg/ml)と、反応させた。反応は、暗所で4℃で30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、1,000µl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。

20

【0100】

注射してから4日後に、末梢血の白血球(PBL)におけるCD3⁺ T細胞のパーセントは、コントロールマウスの36.7%からTAB4で処置したマウスの4.1%にまで減少した(表2)。TAB4処置により、脾細胞の全数は若干減少した。しかしながら、TAB4処置マウスでは、CD3⁺ T細胞の数が62%減少し、NK細胞の数が50%減少し、さらにCD19⁺ B細胞の全数が若干増加した。TAB4処置マウスから回収した胸腺細胞の全数は、コントロールで見られたレベルのたった48%であった(52%減少)。さらに、CD4⁺ T細胞以外では、すべての他のCD8⁺、CD4⁺CD8⁺、及び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)。

30

【0101】

【表2】

表2

脾臓					
× 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					
× 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)

【0102】

実施例7：抗T A I P抗体は、I L - 2またはT N F - の分泌を誘導しない

B a l b / c マウス (H - 2 d) に、300 μ g の T A B 4 またはコントロールのハムスター I g 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 C 3 H (H - 2 k) 脾細胞 (スティミュレーター (s t i m u l a t o r) として) を有する培養物におけるレスポンド (r e s p o n d e r) として使用した。3日後、培養物上清を集め、I L - 2 含量を E L I S A セット (P h a r M i n g e n) によって測定した。図5に示されるように、I L - 2 の生産は、コントロールマウスのものに比して T A B 4 処置マウス由来のレスポンド細胞では抑制された。I L - 2 及び T N F - a の血漿レベルもまた分析したところ、コントロール及び T A B 4 処置マウスの血清では I L - 2 (または T N F - a) のレベルに有意な差は認められなかった。I L - 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、T A B 4 等の、T A I P に特異的な抗体は、T 細胞を操作し、自己免疫疾患及び移植拒絶に関連するもの等の望ましくない T 細胞が介在する免疫応答を制御するのにインビボで使用できることが示される。

40

50

【0103】

実施例8：移植拒絶を防止するための抗TAIP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C57BL/6マウス(H-2^b)に、皮膚移植外科手術する7日前に、500μgのTAB4またはイソ型のコントロール抗体を腹腔内注射した。7日後、十分同種のミスマッチした(fully allogeneic mismatched)Balb/cjマウス(H-2^d)の皮膚の側腹部を、抗体で予め処置されたC57BL/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500μgのTAB4またはイソ型のコントロール抗体を注射した。マウスを移植片の移植後毎日モニターした。移植片の生存率(%)を図7に示す(n=8)。データから、TAB4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

【0104】

実施例9：PSGL-1としてのTAIPの同定

CD162とも称する、P-セレクトリン糖タンパク質リガンド-1(PSGL-1)は、T細胞等の、白血球で発現する主要なP-セレクトリンリガンドである(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)。その分子量及び二量体のなりやすさ等の、TAIPの生化学的な特性から、TAB4はPSGL-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)TAB4によって沈降する抗原が市販の抗PSGL-1抗体によって認識できるかどうか；および2)抗PSGL-1抗体が細胞溶解産物からTAB4を枯渇できるかどうか。

20

【0105】

RL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)を含む溶解緩衝液(1% Triton X-100、20mM Tris-HCl、pH 8.0、160mM NaCl、1mM CaCl₂)中で1.0×10⁸細胞/mlの密度で1時間溶解し、不溶材料を10,000×gで10分間ベレット化した。これら及びすべての次の段階は、4で行なわれた。5.0×10⁷細胞に相当する溶解産物を、10μgの抗PSGL-1 mAb(クローン2PH1、PharMingen, San Diego, CA)、抗TAIP mAb、TAB4、または正常ハムスター血清由来のIgGが予めのせられた20μl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、50mM Tris-HCl、pH 8.5、400mM NaCl、1mM CaCl₂、1mg/ml オポアルブミン)で4回、および400mM NaClの代わりに250mMを含む、同様の洗浄緩衝液で2回洗浄した。結合タンパク質を、40μl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PSGL-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IgG(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

40

【0106】

表面ビオチン化RLオス1 T細胞を、溶解緩衝液中で1.0×10⁸細胞/mlの密度で溶解した。細胞抽出物を、4で一晩、40μlのプロテインG-セファロースに結合した抗体20μgと共にインキュベートした。枯渇を、抗PSGL-1 mAb(2PH1)またはコントロールのラットIgGを用いて、TAB4またはコントロール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TAB4または抗PSGL-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

50

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PSGL-1抗体はT細胞溶解産物からTAIPタンパク質を枯渇できる。加えて、抗TAIP抗体(TAB4)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PSGL-1抗体によって認識されうる。

【0107】

実施例10：抗PSGL-1抗体によるヒトT細胞におけるアポプトシスの誘導

ヒトT細胞のアポプトシスにおけるPSGL-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PSGL-1が介在するアポプト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、フィットヘムアグルチニン(PHA)マイトジェンで刺激し、さらにIL-2含有培地中に展開させた。活性化T細胞を集めた後、IL-2及び架橋抗体の存在下で抗PSGL-1で攻撃した。

10

【0108】

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-Plus)(Pharmacia Biotech)を用いて異なる密度に基づいた末梢血単核細胞(PBMC)を強化した。PBMCを、1%PHA(Life Technologies, GibcoBRL)で48時間活性化した後、アッセイ期間中組換えヒトIL-2(5ng/ml)中に維持した。抗ヒトPSGL-1抗体のアポプトシス誘導能を評価するために、活性化細胞を：(1)1μg/mlの抗PSGL-1抗体クローンKPL-1(BD Pharmingen)に架橋体(cross-linker)ウサギ抗マウスIg(0.5μg/ml)(Jackson ImmunoResearch Laboratories)を加えたもの；(2)イソ型のコントロール精製マウスIgに架橋体ウサギ抗マウスIgを加えたもの；または(3)架橋体ウサギ抗マウスIg単独で、処置した。6時間処置した後、初期のアポプトシス細胞のパーセントをFACSによって測定し、抗アネクシンV(anti-Annexin V)(BD Pharmingen)及びPI(Sigma)で染色した。

20

【0109】

図8に示されるように、抗PSGL-1抗体に架橋体を加えたものを用いてPSGL-1によって引き起こされたシグナル伝達(signaling)は、PHA活性化ヒトPBMC(主にT細胞)において有意なレベルのアポプトシスを引き起こした。アポプトシス細胞のパーセントは、抗PSGL-1処置培養物において3日目の8.5%から8日目の24%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。

30

【0110】

実施例11：自己免疫疾患を処置するための抗PSGL-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)(NOD)マウスを、標準的な条件下で飼育した。突発性糖尿病(spontaneous diabetes)が約20週齢のNODマウスで発症した。実験群では、マウスに、14、15及び17週齢のマウス当たり、300μgの抗PSGL-1抗体(TAB4)を3回腹腔内投与した。同じ投与量の注射を24及び26週齢でさらに2回与えた。コントロール群には、同じ投与量のハムスターIgを与えた。マウスを、15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300mg/dl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。

40

【0111】

図9に示されるように、TAB4(抗PSGL-1)抗体処置によって、コントロールの抗体処置に比べて有意な保護が得られた。ゆえに、抗PSGL-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。

【0112】

他の実施態様

50

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、及び修飾は、下記特許請求の範囲の概念に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

いつ活性化 T 細胞が T A B 4 (抗 T A I P モノクローナル抗体) が介在するアポプト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】

T A B 4 抗体によって認識される抗原の細胞表面のビオチン化及び免疫沈降の結果を示すものである。

10

【図 3】

脾臓 C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、C D 1 9 + B 細胞、及び N K 細胞での P S G L - 1 抗原の発現を示すものである。

【図 4】

C D 4 + 、C D 8 + 、及び C D 4 + 8 + 、及び C D 4 - 8 - 胸腺細胞での P S G L - 1 抗原の発現を示すものである。

【図 5】

レスポンド (r e s p o n d e r) としての T A B 4 (またはハムスター I g) で処置された B a l b / c マウスから単離された脾臓細胞およびステイミュレーター (s t i m u l a t o r) としての H 2 ミスマッチ C 3 H 脾臓細胞を用いた混合リンパ球培養で生産された I L - 2 レベルを示すものである。

20

【図 6】

(A) T A B 4 抗体で免疫沈降したタンパク質が市販の抗 P S G L - 1 抗体によって認識できることおよび (B) 抗 P S G L - 1 抗体で T 細胞溶解産物を予め透徹 (p r e c l e a r i n g) することによって、T A B 4 によって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】

B a l b / c マウスから皮膚移植を受け、抗 P S G L - 1 抗体 (黒塗りのダイヤモンド) またはコントロール抗体 (白抜きの四角) で処置された C 5 7 B L / 6 マウスでの生存した移植片の割合 (%) を示すものである。

30

【図 8】

活性化ヒト末梢血の単核細胞を抗ヒト P S G L - 1 抗体で処置した後のアポプトシスを受けた T 細胞の割合 (%) の経時変化を示すものである。

【図 9】

抗 P S G L - 1 抗体 (黒塗りの四角) またはコントロール抗体 (白抜きの四角) で処置された自己免疫性肥満でない糖尿病 (a u t o i m m u n e n o n - o b e s e d i a b e t i c) (N O D) オスマウスの糖尿病の発症率を示すものである。

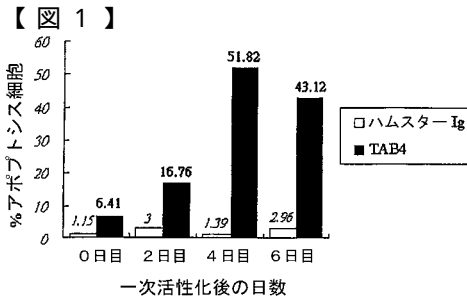


図 1

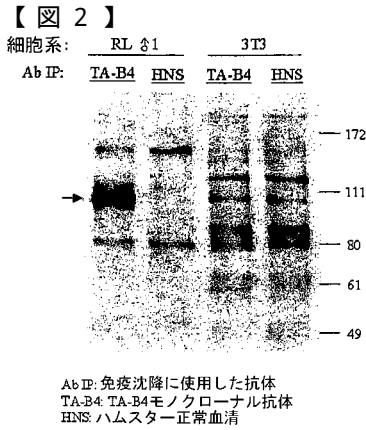


図 2

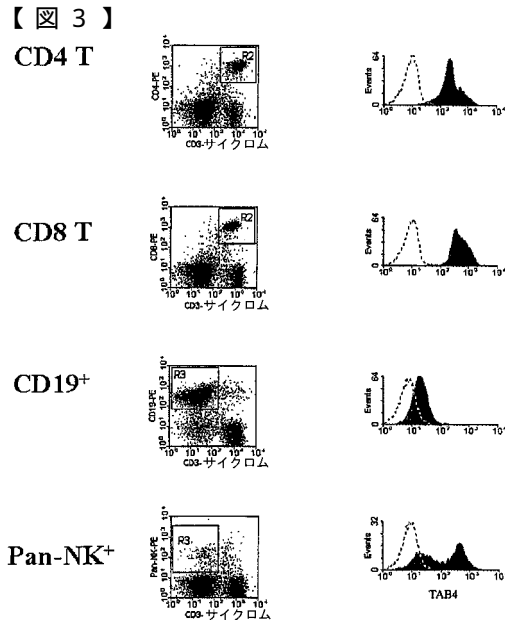


図 3

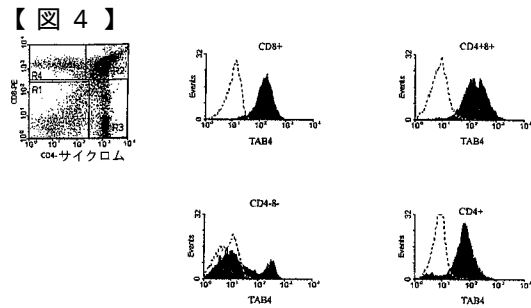


図 4

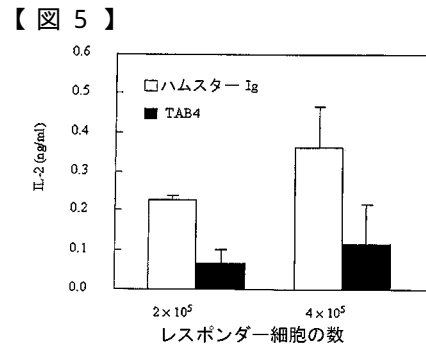


図 5

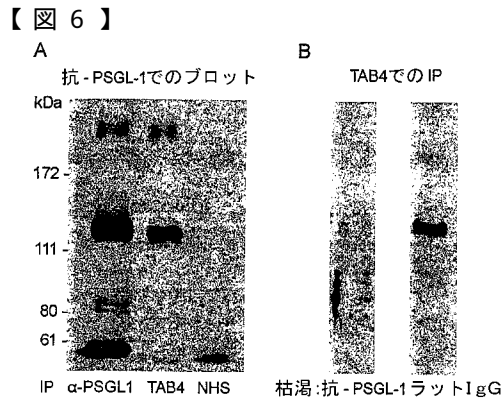


図 6

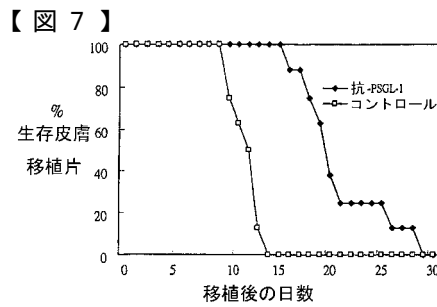


図 7

【 図 8 】

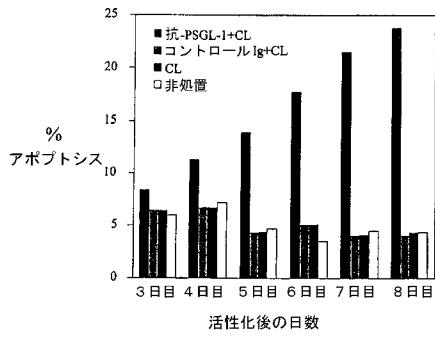


図 8

【 図 9 】

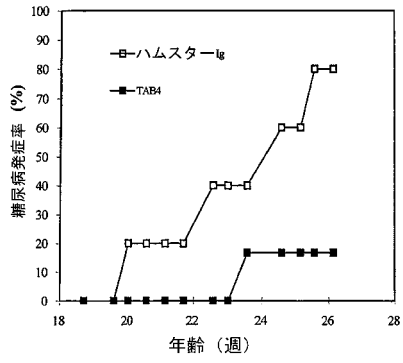


図 9

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 February 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/013603 A1

- (51) International Patent Classification: **A61K 39/395**,
C07K 16/28 Neihu, Taipei (TW); PEI-LING, Hsu [US/AU]; 7 Masters
Circle, Little Rock, AZ 72212 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/07498 (74) Agent: TSAO, Y., Rocky; Fish & Richardson P.C., 225
Franklin Street, Boston, MA 02110 (US).
- (22) International Filing Date: 13 March 2002 (13.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/310,196 3 August 2001 (03.08.2001) US
10/051,497 18 January 2002 (18.01.2002) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 10/051,497 (CON)
Filed on 18 January 2002 (18.01.2002)
- (71) Applicant (for all designated States except US): ABGE-
NOMICS CO. [CN/CN]; 21, No. 32, 1.n. 358, Juikuang
Rd., Neihu, Taipei, Taiwan 114 (TW).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): RONG-HWA, Lin
[CN/CN]; 4F, No. 9 Alley, Lane 283, Sec. 3, Roosevelt
Road, Taipei (TW); CHUNG-HSIUN, Wu [CN/CN]; 13F,
no. 6 Alley 34, Lane 123, Sec. 3, Min-Chuan East Road,
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/013603 A1

(54) Title: MODULATORS OF P-SELECTIN GLYCOPROTEIN LIGAND 1

(57) Abstract: Compounds that bind to P-Selectin Glycoprotein 1 (PSGL-1) on the surface of T cells or natural killer (NK) cells can be used to induce T cell or NK cell depletion and/or to induce T cell or NK cell apoptosis. The compounds and methods of the invention can be used to control unwanted T cell- or NK cell-mediated immune responses in conditions such as autoimmune diseases, transplant rejection, and allergic diseases.

WO 03/013603

PCT/US02/07498

MODULATORS OF P-SELECTIN GLYCOPROTEIN LIGAND 1Related Application

This application claims priority from U.S. provisional application serial
5 number 60/310,196, filed on August 3, 2001, the content of which is incorporated
herein by reference.

Field of the Invention

The invention relates to compositions and methods for controlling immune
10 responses.

Background of the Invention

The control of unwanted immune responses is a critical issue in the treatment of
diseases such as autoimmune diseases, transplant rejection, allergic diseases, and some
15 cancers. The activity of overly aggressive T cells can be controlled by
immunosuppression or by the induction of immunological tolerance. Tolerance is
defined as a state where the immune system is made unresponsive to an antigen,
whereas immunosuppression, which decreases the immune response to antigens,
usually requires the continued use of medication. In organ transplantation, T cells play
20 an essential role in the immune response to alloantigens. Current immunosuppressive
regimes commonly involve the use of corticosteroid, cyclosporin or rapamycin, which
block the transcription of IL-2, a key growth factor for T cells, or inhibit IL-2
dependent proliferation. However, a number of monoclonal antibodies which either act
as T cell-depleting agents (e.g. CD3, CD4, CD8), or as inhibitors of the cytokine
25 signaling or the co-stimulatory pathways of T cells (e.g. CD25, B7-1, B7-2, CD152,
CTLA4) have demonstrated effectiveness in reducing the incidence of rejection with
limited side effects or toxicity. Some of these agents have been shown to have some
degree of success in treating autoimmune disease and in prolonging graft survival.

Apoptosis is widely believed to be of vital importance for maintaining the
30 proper function of the immune system and a major mechanism to remove unwanted
cells (Kabelitz et al, Immunol. Today 14:338-340 (1993); Raff, Nature:356:397-399
(1992)). Various signals originating from either inside or outside a cell influence the
life and death of the cell. Antibodies against T cell surface molecules such as Fas (or

WO 03/013603

PCT/US02/07498

CD95, MW = 43 kD), TNFR2 (MW = 75 kD), CD2 (MW = 45 kD) and CTLA-4 (MW = 33 kD) to induce the apoptosis of T cells (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.* 5 156:3184-3190 (1996); Gribben et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:811-815 (1995)). Attempts to use Fas and TNFR2 molecules to control unwanted T cells have been hampered by the fact that these two molecules are expressed not only on immune cells, but also on several other important organ systems like liver. This expression pattern potentially limits the therapeutic application of these two antibodies (Ogasawara et al. 10 *Nature* 364:806-809 (1993); Pfeffer et al. *Cell*:73:457-467 (1993); Engelmann et al. *J. Biological Chemistry* 265:14497-14504 (1990)).

Summary of the Invention

The invention is based on the discovery that T cells can be depleted and/or 15 induced to undergo apoptosis by the engagement of the T cell surface antigen P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1). T cell depletion can be particularly useful for the treatment of conditions associated with an excessive or unwanted T cell-mediated immune response or excessive or unwanted T cell proliferation. For example, the depletion of T cells can cause the reduction or elimination of undesirable T cell 20 activity or proliferation associated with autoimmune diseases, transplant rejection, allergic diseases, and/or T cell-derived cancers. The invention encompasses methods of using modulators of PSGL-1 function to prevent or reduce a T cell-mediated immune response as well as methods of screening for modulators of PSGL-1 function.

In one aspect, the invention features a method of preventing or reducing a T 25 cell-mediated immune response in an individual. The method includes the following steps: selecting an individual diagnosed as having or as being at risk of acquiring a condition characterized by an excessive or unwanted T cell-mediated immune response; and administering to the individual a compound that binds to PSGL-1 on the surface of a T cell, wherein the binding of the compound to PSGL-1 on the surface of the T cell 30 induces a signal transduction pathway that results in the death of the T cell, thereby preventing or reducing a T cell-mediated immune response in the individual.

The compound used in such a method can include an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to PSGL-1. In one example, the

WO 03/013603

PCT/US02/07498

compound is a monoclonal antibody that specifically binds to PSGL-1. In one embodiment, the method includes an additional step of administering an agent that binds to the monoclonal antibody and induces the cross-linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the T cell.

5 In one embodiment, the method includes inducing the cross-linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the T cell, wherein the cross-linking induces the signal transduction pathway that results in the death of the T cell.

10 In one example, the method includes a step of selecting an individual diagnosed as having an autoimmune disease. In another example, the method includes a step of selecting an individual that has received or is expected to receive an allogeneic or xenogeneic transplant. In another example, the method includes a step of selecting an individual diagnosed as having an allergic disease. In another example, the method includes a step of selecting an individual diagnosed as having a T cell cancer.

15 In one embodiment, the T cell is an activated T cell. In one example, the T cell is a CD4+ T cell. In another example, the T cell is a CD8+ T cell.

In one embodiment, the method includes a step of detecting the number of T cells in a first biological sample taken from the individual before the administration of the compound and comparing the results with the number of T cells in a second biological sample taken from the individual after the administration of the compound.

20 In another embodiment, the method includes a step of detecting a biological activity of T cells in a first biological sample taken from the individual before the administration of the compound and comparing the results with the biological activity of T cells in a second biological sample taken from the individual after the administration of the compound.

25 In one embodiment, the administration results in the depletion of at least 20% of peripheral blood CD3+ cells in the individual. In some embodiments, the administration results in the depletion of at least 30%, 40%, 50%, or more of the peripheral blood CD3+ cells in the individual.

30 In one embodiment, the antibody or antigen binding fragment thereof induces the death of at least 20% of peripheral blood CD3+ cells in the individual after exposure to the antibody or antigen binding fragment thereof. In some embodiments, the administration induces the death of at least 30%, 40%, 50%, or more of the peripheral blood CD3+ cells in the individual. Cell death can be measured at any time,

WO 03/013603

PCT/US02/07498

e.g., one, two, three, four, five, six, seven, or more days after exposure to the antibody or antigen binding fragment thereof.

In another aspect, the invention features a method of inducing the death of a T cell or a natural killer (NK) cell. The method includes the steps of: providing a T cell or NK cell expressing PSGL-1 on its cell surface; and contacting the T cell or NK cell with a compound that binds to PSGL-1 on the surface of the T cell or NK cell, wherein the binding of the compound to PSGL-1 on the surface of the T cell or NK cell induces a signal transduction pathway that results in the death of the T cell or NK cell.

The compound used in such a method can include an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to PSGL-1. In one example, the compound is a monoclonal antibody that specifically binds to PSGL-1. In one embodiment, the method includes a step of contacting the monoclonal antibody with an agent that binds to the monoclonal antibody and induces the cross-linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the T cell or NK cell.

In one embodiment, the method includes a step of inducing the cross-linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the T cell or NK cell, wherein the cross-linking induces the signal transduction pathway that results in the death of the T cell or NK cell.

In one embodiment, the T cell is an activated T cell. In one example, the T cell is a CD4+ T cell. In another example, the T cell is a CD8+ T cell.

In one embodiment, the method includes a step of assessing the viability of the T cell or NK cell after the contacting with the compound.

In one embodiment, the method includes a step of assessing a biological activity of the T cell or NK cell after the contacting with the compound.

In another aspect, the invention features a method of screening for a modulator of PSGL-1 function. The method includes the steps of: providing a cell expressing PSGL-1 on the surface of the cell; contacting the cell with a test substance; and measuring the viability of the cell after contacting the cell with the test substance to thereby determine if the test substance is a modulator of PSGL-1 function.

In one embodiment, the method includes the step of detecting the death of the cell induced by the test substance to thereby determine that the test substance is a modulator of PSGL-1 function.

WO 03/013603

PCT/US02/07498

In one embodiment, the test substance is an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to PSGL-1. In one example, the test substance is a monoclonal antibody that specifically binds to PSGL-1. In one embodiment, the method includes the step of contacting the monoclonal antibody with an agent that binds to the monoclonal antibody and induces the cross-linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the cell.

In one embodiment, the method includes the step of inducing the cross-linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the cell, wherein the cross-linking induces the signal transduction pathway that results in the death of the cell.

In one embodiment, the T cell is an activated T cell. In one example, the T cell is a CD4+ T cell. In another example, the T cell is a CD8+ T cell.

In one embodiment, the method includes the step of manufacturing bulk quantities of the test substance and formulating the test substance in a pharmaceutically acceptable carrier.

In another aspect, the invention features a kit containing: a compound that binds to PSGL-1 on the surface of a T cell, wherein the binding of the compound to PSGL-1 on the surface of the T cell induces a signal transduction pathway that results in the death of the T cell; and instructions for use of the compound to treat autoimmunity, transplant rejection, an allergic condition, or a T cell cancer. In other embodiments, the kit includes instructions for use to treat any disease or disorder described herein.

An advantage of the invention is that it allows for the depletion of T cells and/or the induction of apoptosis in T cells without causing an associated unwanted or harmful immune response. For example, the administration of an anti-PSGL-1 antibody to an individual does not result in an unwanted elevation in the levels of inflammatory cytokines such as IL-2 or TNF- α .

Another advantage of the invention is that it allows for the targeting of a cell surface protein, PSGL-1, whose expression is largely limited to leukocytes, and in particular T cells and NK cells. Therefore, the compounds described herein do not induce significant levels of apoptosis of other cell types such as liver cells. The targeting of T cells and NK cells (an important CD3⁺ cell type involved in transplantation rejection) for selective depletion, without significantly inducing life-threatening systemic cytokine responses and damaging other organ systems, is a desired characteristic of an immunosuppressive agent.

WO 03/013603

PCT/US02/07498

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by those of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, suitable
5 methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of a conflict in terminology, the present specification will control. In addition, the described materials and methods are illustrative only and are not intended to be limiting.

10 Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and the claims.

Brief Description of the Drawings

15 Fig. 1 depicts the results of a time-course experiment that investigated when activated T cells acquire sensitivity to TAB4 (an anti-PSGL-1 monoclonal antibody)-mediated apoptotic signals.

Fig. 2 depicts the results of cell surface biotinylation and immunoprecipitation of the antigen recognized by the TAB4 antibody.

20 Fig. 3 depicts the expression of the PSGL-1 antigen on spleen CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD19⁺ B cells, and NK cells.

Fig. 4 depicts the expression of the PSGL-1 antigen on CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺8⁺, and CD4⁺8⁻ thymocytes.

25 Fig. 5 depicts the levels of IL-2 produced in mixed lymphocyte culture using spleen cells isolated from TAB4 (or hamster Ig)-treated Balb/c mice as the responders and H2-mismatched C3H spleen cells as the stimulator.

Fig. 6 depicts western blot analyses demonstrating that (A) proteins immunoprecipitated with the TAB4 antibody can be recognized by a commercially available anti-PSGL-1 antibody and (B) preclearing of T cell lysate with anti-PSGL-1 antibody can deplete the proteins recognized by the TAB4.

30 Fig. 7 depicts the percentage of surviving grafts in C57BL/6 mice that received a skin graft from Balb/c mice and were treated with an anti-PSGL-1 antibody (closed diamond) or a control antibody (open square).

WO 03/013603

PCT/US02/07498

Fig. 8 depicts the time course of the percentage of apoptotic T cells following the treatment of activated human peripheral blood mononuclear cells with an anti-human PSGL-1 antibody.

Fig. 9 depicts the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) male mice that were treated with anti-PSGL-1 antibody (closed square) or a control antibody (open square).

Detailed Description

The invention is directed to methods of modulating T cell activity by modulating the function of PSGL-1 molecules residing on the surface of a T cell. Engagement of PSGL-1 with compositions described herein can cause the depletion of T cells and/or induce T cells to undergo apoptosis. These compositions are therefore useful as therapeutic agents for controlling immune-related conditions such as autoimmune diseases, transplant rejection, allergic diseases, and/or T cell-derived cancers. The compositions are also useful in causing the depletion of T cells from any biological sample where the presence or activity of T cells is not desired.

PSGL-1 Protein

PSGL-1 is a cell surface adhesion molecule that is expressed on neutrophils, T and B-lymphocytes, NK cells, monocytes, dendritic cells, and primitive human CD34 hematopoietic progenitor cells. Through its ability to interact with selectins, PSGL-1 mediates the rolling of leukocytes on the endothelium and the extravasation of leukocytes into inflamed tissues. PSGL-1-mediated binding of T cells to E- and P-selectin, or migration, is differentially regulated. For instance, the appearance of CLA (cutaneous lymphocyte antigen) epitope is thought to be induced on T cells undergoing naïve to memory transition. Only activated helper 1 but not helper 2 T cells express functional PSGL-1 and it capable of migration into the inflamed area of the skin.

PSGL-1 is a sialomucin that must be specifically sialylated, fucosylated, and sulfated to bind P-selectin. The PSGL-1 molecule exists in isoforms characterized by different degree of glycosylation and sulfation sites at their N-termini. Resting peripheral blood T and B cells, lymphoid cell lines, and *in vitro* activated peripheral blood T cells express similar level of PGSL-1. Yet, only activated T cells display a functional form of PSGL-1 and bind avidly to P-selectin. Such activation-dependent

WO 03/013603

PCT/US02/07498

binding activity appears to be a result of differential post-translational modification, as suggested by elevated levels of alpha (1,3) fucosyltransferases activities in activated T cells. PSGL-1 isoforms also show differential affinity to L-selectin and E-selectin. For instance, human T cells exhibiting the CLA-positive isoform can tether and roll on both E- and P-selectin, while T cells expressing PSGL-1 without the CLA epitope only bind to P-selectin. Furthermore, binding of PSGL-1 to P-selectin is contingent upon the presence of the terminal decapeptide that contains three tyrosine residues for sulfation and one threonine residue for glycosylation.

A PSGL-1 protein can be prepared by recombinant methods and/or by isolating a native PSGL-1 protein from biological material. A recombinant PSGL-1 protein can be produced in prokaryotic or eukaryotic cells, either *in vitro* or *in vivo*. Nucleic acids encoding PSGL-1 can be used for recombinant production of the protein (see, e.g., GenBank[®] Accession NM_003006 for an example of a nucleic acid encoding a PSGL-1 polypeptide). Antibodies directed to PSGL-1 are also well known and can be used for purification of the antigen (see, e.g., Herron et al. (2000) Science Jun 2;288(5471):1653-56; WO 00/25808) and/or used in methods described herein. PSGL-1 is further described in references including but not limited to Sako et al. (1993) Cell 75:1179; Vachino et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:21966; and Veldman et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:16470.

For recombinant production of PSGL-1, the simultaneous expression of both PSGL-1 and its modifying alpha- (1,3) fucosyltransferase, Fuc-TVII, may be required for the functional expression of PSGL-1. In addition or alternatively, recombinant production of PSGL-1 may be accompanied by co-transfection with a nucleic acid encoding PACE for removing the propeptide and/or a nucleic acid encoding tyrosine sulfotransferase.

An anti-PSGL-1 antibody can be used to isolate and purify a PSGL-1 antigen from biological material. Any cell type expressing a PSGL-1 protein, e.g., T cells derived from an individual or a T cell line, can be used as a source of the protein. Once purified, the protein can be used in a variety of methods as described herein. For example, the purified PSGL-1 protein can be used in an *in vitro* screen of modulators of PSGL-1 function on T cells or as an immunogen to prepare antibodies directed against the protein.

WO 03/013603

PCT/US02/07498

In addition, a PSGL-1 antigen can be purified using a selectin-Fc fusion, e.g., a P-selectin-Fc fusion.

Anti-PSGL-1 Antibodies

5 PSGL-1 polypeptides (or immunogenic fragments or analogs thereof) can be used to generate antibodies useful in the methods of the invention. As described above, PSGL-1 polypeptides or peptide fragments thereof can be produced by recombinant techniques or synthesized using solid phase synthesis methods. The recombinant PSGL-1 polypeptides or a peptide fragment thereof can be used as an immunogen to
10 produce anti-PSGL-1 antibodies. In addition, an anti-PSGL-1 antibody, such as the TAB4 monoclonal antibody, can be used to purify a PSGL-1 polypeptide, e.g., a PSGL-1 polypeptide in its natural conformation, which can then be used as an immunogen to produce additional anti-PSGL-1 antibodies.

An antibody of the invention can be a monoclonal, polyclonal, or engineered
15 antibody that specifically binds to a PSGL-1 polypeptide. An antibody that "specifically binds" to a particular antigen, e.g., a PSGL-1 polypeptide, will not substantially recognize or bind to other molecules in a sample. Thus, the invention also features methods for identifying a test compound (e.g., an antibody) that binds to a polypeptide of the invention by contacting the polypeptide with a test compound and
20 determining whether the polypeptide binds to the test compound (e.g., by direct detection of the binding, detection of a competitor molecule which disrupts binding of the test compound to the polypeptide, and/or detection of binding using an assay for apoptosis-inducing activity).

In general, PSGL-1 polypeptides can be coupled to a carrier protein, such as
25 KLH, mixed with an adjuvant, and injected into a host mammal. Antibodies produced in that animal can then be purified by peptide antigen affinity chromatography.

In particular, various host animals can be immunized by injection with a PSGL-1 polypeptide or an antigenic fragment thereof. Commonly employed host animals include rabbits, mice, guinea pigs, and rats. Various adjuvants that can be used to
30 increase the immunological response depend on the host species and include Freund's adjuvant (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. Potentially useful human

WO 03/013603

PCT/US02/07498

adjuvants include BCG (bacille Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*. Polyclonal antibodies are heterogeneous populations of antibody molecules that are contained in the sera of the immunized animals.

Antibodies within the invention therefore include polyclonal antibodies and, in addition, monoclonal antibodies, humanized or chimeric antibodies, single chain antibodies, Fab fragments, F(ab')₂ fragments, and molecules produced using a Fab expression library.

Monoclonal antibodies, which are homogeneous populations of antibodies to a particular antigen, can be prepared using the PSGL-1 polypeptides described above and standard hybridoma technology (see, for example, 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]).

In particular, monoclonal antibodies can be obtained by any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture such as described in Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), and U.S. Pat. No. 4,376,110; the human B-cell hybridoma technique (Kosbor et al., *Immunology Today* 4:72 [1983]; Cole et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026 [1983]), and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 [1983]). Such antibodies can be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD and any subclass thereof. The hybridoma producing the mAb of this invention may be cultivated in vitro or in vivo. The ability to produce high titers of mAbs in vivo makes this a particularly useful method of production.

Once produced, polyclonal or monoclonal antibodies are tested for specific PSGL-1 recognition by Western blot or immunoprecipitation analysis by standard methods, for example, as described in Ausubel et al., *supra*. Antibodies that specifically recognize and bind to PSGL-1 are useful in the invention. Anti-PSGL-1 antibodies that bind to the PSGL-1 antigen on the surface of a T cell, e.g., a CD3+ cell, and induce the depletion and/or apoptosis of T cells in an individual are particularly useful.

The antibodies can be used, for example, as part of a therapeutic regime (e.g., to reduce or eliminate an undesirable immune response, such as a T cell mediated immune response, associated with conditions such as autoimmune diseases, transplant rejection,

WO 03/013603

PCT/US02/07498

allergic diseases, and T cell-derived cancers). Antibodies also can be used in a screening assay to measure the ability of a candidate compound to bind to PSGL-1.

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 [1984]; Neuberger et al., Nature 5 312:604 [1984]; Takeda et al., Nature 314:452 [1984]) by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. A chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine monoclonal 10 antibody and a human immunoglobulin constant region.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. Nos. 4,946,778, 4,946,778, and 4,704,692) can be adapted to produce single chain antibodies against a PSGL-1 polypeptide, or a fragment thereof. Single chain 15 antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fv region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide.

Antibody fragments that recognize and bind to specific epitopes can be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to F(ab')₂ fragments that can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule, and Fab fragments that can be generated by reducing the disulfide bridges of 20 F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries can be constructed (Huse et al., Science 246:1275 [1989]) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity.

Antibodies can be humanized by methods known in the art. For example, monoclonal antibodies with a desired binding specificity can be commercially 25 humanized (Scotgene, Scotland; Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.). Fully human antibodies, such as those expressed in transgenic animals are also features of the invention (Green et al., Nature Genetics 7:13 [1994]; and U.S. Pat. Nos. 5,545,806 and 5,569,825).

30 Screening Assays for Compounds that Modulate PSGL-1 Function

The invention also encompasses methods for identifying compounds that interact with PSGL-1 (or a domain of PSGL-1) including, but not limited to, compounds that induce T cell depletion and/or T cell apoptosis upon binding to PSGL-

WO 03/013603

PCT/US02/07498

1. Also included are compounds that modulate the interaction of PSGL-1 with transmembrane, extracellular, or intracellular proteins that regulate PSGL-1 activity and compounds which modulate PSGL-1 activity.

The compounds that may be screened in accordance with the invention include,
5 but are not limited to peptides, antibodies and fragments thereof, and other organic compounds that bind to PSGL-1 and modulate a biological function mediated by PSGL-1, as described herein.

Such compounds may include, but are not limited to, peptides such as, for example, soluble peptides, including but not limited to members of random peptide
10 libraries; (Lam et al., Nature 354:82 [1991]; Houghten et al., Nature 354:84 [1991]), and combinatorial chemistry-derived molecular library made of D- and/or L configuration amino acids, phosphopeptides (including, but not limited to, members of random or partially degenerate, directed phosphopeptide libraries; Songyang et al., Cell 72:767 [1993]), antibodies (including, but not limited to, polyclonal, monoclonal,
15 humanized, anti-idiotypic, chimeric or single chain antibodies, and FAb, F(ab')₂ and FAb expression library fragments, and epitope-binding fragments thereof), and small organic or inorganic molecules.

Other compounds which can be screened in accordance with the invention include but are not limited to small organic molecules that affect an activity of the
20 PSGL-1 protein, as described herein.

Computer modeling and searching technologies permit identification of compounds, or the improvement of already identified compounds, that can modulate PSGL-1 expression or activity. Having identified such a compound or composition, the active sites or regions are identified. Such active sites might typically be a binding site
25 for a natural modulator of activity. The active site can be identified using methods known in the art including, for example, from the amino acid sequences of peptides, from the nucleotide sequences of nucleic acids, or from study of complexes of the relevant compound or composition with its natural ligand. In the latter case, chemical or X-ray crystallographic methods can be used to find the active site by finding where
30 on the factor the modulator (or ligand) is found.

Although described above with reference to design and generation of compounds which could alter binding, one could also screen libraries of known compounds, including natural products or synthetic chemicals, and biologically active

WO 03/013603

PCT/US02/07498

materials, including proteins, for compounds which bind to a PSGL-1 protein and cause T cell depletion and/or induce T cell apoptosis.

In vitro systems may be designed to identify compounds capable of interacting with PSGL-1 (or a domain of PSGL-1). Compounds identified may be useful, for example, in modulating T cell activity as described herein and thus may be useful for the treatment of conditions such as autoimmune diseases, transplant rejection, allergic diseases, and T cell-derived cancers.

The principle of the assays used to identify compounds that bind to PSGL-1 involves preparing a reaction mixture of PSGL-1 (or a domain thereof) and the test compound under conditions and for a time sufficient to allow the two components to interact and bind, thus forming a complex which can be removed and/or detected in the reaction mixture. The PSGL-1 species used can vary depending upon the goal of the screening assay. In some situations it is preferable to employ a peptide corresponding to a domain of PSGL-1 fused to a heterologous protein or polypeptide that affords advantages in the assay system (e.g., labeling, isolation of the resulting complex, etc.) can be utilized.

The screening assays can be conducted in a variety of ways. For example, one method to conduct such an assay involves anchoring PSGL-1 protein, polypeptide, peptide or fusion protein or the test substance onto a solid phase and detecting PSGL-1 /test compound complexes anchored on the solid phase at the end of the reaction. In one embodiment of such a method, the PSGL-1 reactant may be anchored onto a solid surface, and the test compound, which is not anchored, may be labeled, either directly or indirectly.

In practice, microtiter plates may conveniently be utilized as the solid phase. The anchored component may be immobilized by non-covalent or covalent attachments. Non-covalent attachment may be accomplished by simply coating the solid surface with a solution of the protein and drying. Alternatively, an immobilized antibody, preferably a monoclonal antibody, specific for the protein to be immobilized may be used to anchor the protein to the solid surface. The surfaces may be prepared in advance and stored.

In order to conduct the assay, the nonimmobilized component is added to the coated surface containing the anchored component. After the reaction is complete, unreacted components are removed (e.g., by washing) under conditions such that any

WO 03/013603

PCT/US02/07498

complexes formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of complexes anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways. Where the previously non-immobilized component is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the

5 previously non-immobilized component is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; e.g., using a labeled antibody specific for the previously non-immobilized component (the antibody, in turn, may be directly labeled or indirectly labeled with a labeled anti-Ig antibody).

Alternatively, a reaction can be conducted in a liquid phase, the reaction

10 products separated from unreacted components, and complexes detected; e.g., using an immobilized antibody specific for PSGL-1 protein, polypeptide, peptide or fusion protein or the test compound to anchor any complexes formed in solution, and a labeled antibody specific for the other component of the possible complex to detect anchored complexes.

15 Alternatively, cell-based assays can be used to identify compounds that interact with PSGL-1. To this end, cell lines that express PSGL-1, or cell lines that have been genetically engineered to express PSGL-1 can be used. Cell based assays are particularly useful for evaluating the functional effects of a compound identified by a screen described herein. For example, once a compound is identified based upon its

20 ability to bind to a PSGL-1 protein, the compound can then be tested for its ability to, e.g., induce T cell apoptosis *in vitro* or *in vivo* or deplete T cells *in vitro* or *in vivo*.

Pharmaceutical Compositions

Given that an object of the present invention is to alter an immune response in

25 an individual, a pharmaceutical composition containing, for example, antibodies, small molecules, or other compounds that specifically bind PSGL-1 polypeptides are also a feature of the invention. In a preferred example, the compound functions as an agonist of PSGL-1.

Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention

30 can be formulated in a conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers or excipients. Thus, the compounds and their physiologically acceptable salts and solvates may be formulated for administration by a variety of routes of administration.

WO 03/013603

PCT/US02/07498

The compounds may be formulated for parenteral administration by injection, for example, by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, for example, in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions, or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient can be in powder form for constitution with a suitable vehicle, for example, sterile pyrogen-free water, before use.

10

WO 03/013603

PCT/US02/07498

Methods of Controlling a T Cell-Mediated Immune Response and Depleting T Cell Populations

Compounds such as those detailed in the screening assays described herein may be useful, for example, in modulating a biological function mediated by a PSGL-1 polypeptide and/or for the treatment of disorders associated an excessive or unwanted immune response, e.g., a T cell-mediated immune response. These compounds include, but are not limited to peptides, antibodies and fragments thereof, and other organic compounds that bind to PSGL-1 on the surface of a T cell and induce a signal transduction pathway that results in the death of the T cell. The methods of the invention optionally include the addition of a cross-linking agent that induces the cross-linking of PSGL-1 on the surface of a cell. The compounds described herein can be used in any instance wherein the depletion or elimination of T cell activity is desired. Particularly useful conditions that can be treated with the compounds of the invention include autoimmune diseases, transplant rejection, allergic diseases, and T cell-derived cancers.

Examples of conditions that can be treated with the anti-PSGL-1 compounds described herein include, but are not limited to, diabetes mellitus, arthritis (including rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and psoriatic arthritis), multiple sclerosis, encephalomyelitis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, autoimmune thyroiditis, dermatitis (including atopic dermatitis and eczematous dermatitis), psoriasis, Sjögren's Syndrome, Crohn's disease, aphthous ulcer, iritis, conjunctivitis, keratoconjunctivitis, type I diabetes, inflammatory bowel diseases, ulcerative colitis, asthma, allergic asthma, cutaneous lupus erythematosus, scleroderma, vaginitis, proctitis, drug eruptions, leprosy reversal reactions, erythema nodosum leprosum, autoimmune uveitis, allergic encephalomyelitis, acute necrotizing hemorrhagic encephalopathy, idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss, aplastic anemia, pure red cell anemia, idiopathic thrombocytopenia, polycondritis, Wegener's granulomatosis, chronic active hepatitis, Stevens-Johnson syndrome, idiopathic sprue, lichen planus, Graves' disease, sarcoidosis, primary biliary cirrhosis, uveitis posterior, interstitial lung fibrosis, graft-versus-host disease, cases of transplantation (including transplantation using allogeneic or xenogeneic tissues) such as bone marrow transplantation, liver transplantation, or the transplantation of any

WO 03/013603

PCT/US02/07498

organ or tissue, allergies such as atopic allergy, AIDS, and T-cell neoplasms such as leukemias and/or lymphomas.

The methods of the invention can be used to deplete T cells from a cell population, either *in vitro* or *in vivo*. For example, a biological sample derived from an individual can be depleted of T cells *in vitro* by contacting the sample with an anti-PSGL-1 compound described herein, optionally together with a cross-linking agent. This method can be useful, e.g., by allowing for the enrichment of non-T cells in a cell population as well as by reducing or eliminating T cell activity from a cell population.

The following are examples of the practice of the invention. They are not to be construed as limiting the scope of the invention in any way.

Examples

15 Example 1: Preparation of an Anti-T Cell Apoptosis Inducing Protein ("TAIP")

Monoclonal Antibody

A TAIP-specific monoclonal antibody was generated by applying the well known cell fusion methods of Kohler and Milstein ((1976) European Journal of Immunology 6:511-519) to produce a hybridoma secreting desired antibodies.

20 Antibody-producing cells from a hamster injected with Concanavalin A (Con A)-activated Balb/c spleen T cells were fused with a myeloma cell line to form an antibody secreting hybridoma. The two populations of cells were fused with polyethylene glycol, and the resulting antibody producing cells were cloned and propagated by standard tissue culture methods. One hybridoma generated according to these methods
25 secreted a monoclonal antibody, designated TAB4, that was able to induce T cell apoptosis *in vitro* and deplete T cells *in vivo*. The protein recognized by TAB4 was designated T cell apoptosis inducing protein (TAIP).

C57BL/6J (B6) and BALB/c mice were purchased from the Jackson lab (Bar Harbor, ME). Syrian hamsters were purchased from the Animal Core Facility, National
30 Taiwan University Medical College.

Concentrated culture supernatant of the TAB4 hybridoma was spun at 20,000 x g for 10 minutes and the supernatant was diluted at a 1:1 ratio with the binding buffer (0.1 M sodium acetate, pH 5.0). A protein G column (approximately 1 ml bed volume)

WO 03/013603

PCT/US02/07498

was washed three times with 3-5 ml of the binding buffer. The cleared culture supernatant was loaded to the protein G column and the flow-through was collected and reloaded to the column. The column was washed with 6-10 ml of the binding buffer and the bound antibody was eluted from the column with 5 ml of the elution buffer (0.1 M glycine-HCl, pH 2.8). Each fraction contained 1 ml of the eluted antibody and the eluted fraction was adjusted to neutral pH by mixing each 1 ml fraction with 50 microliters of 1 M Tris-HCl, pH 7.5. Fractions containing the antibody were pooled and dialyzed against 2 liters of PBS, pH 7.4 three times at three hours for each dialysis. Protein concentration in the antibody samples were determined with the procedure described by Bradford using the Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA).

Example 2: Preparation of a Mouse Spleen Cell Suspension and the Activation and Enrichment of T cells

Mouse spleen was immersed in 8 ml of Hank's balanced salt solution (HBSS), gently minced with a sterile cover slip, transferred to a 15 ml centrifuge tube (Costar), and spun at 200 x g for 5 minutes. The supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended in the residual buffer by gently tapping the wall. The contaminating red blood cells (RBC) were lysed by the addition of 1 ml of RBC lysis buffer (0.6 M NH₄Cl, 0.17 M Tris-base, pH 7.65), followed by a 2 min incubation at room temperature and rapid quenching with 9 ml of HBSS. The cells were pelleted at 200 x g for 5 minutes, washed twice and resuspended in RPMI medium. The concentration and viability of cells in the mixture were determined with a hemocytometer (Cambridge Scientific Inc.) and Trypan blue exclusion.

The spleen cells were adjusted to a final concentration of 3×10^6 /ml with RPMI medium and Concanavalin A was added to a final concentration of 2 micrograms/ml to activate the T cells. The cell suspension was transferred to a 6-well culture plate (5 ml/well) or a 10-cm culture dish (10 ml/dish) and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 48 hours before harvesting. The activated spleen cells, including activated T cells, were resuspended in 5 ml of HBSS and carefully overlaid on top of a 5 ml 55% cushion of Percoll solution in a centrifuge tube. Care was taken not to disturb the separated layers. The cells were spun at 1,900 x g for 13 minutes at 25°C without the brake. The enriched T cells were collected from the interface of the two layers, washed twice with HBSS, and were ready for experiments.

WO 03/013603

PCT/US02/07498

Example 3: Apoptosis of Activated T cells

Activated T cells (see Example 2) were resuspended to a final concentration of 5×10^5 cells/ml in RPMI medium containing 5 ng/ml of IL-2, and treated with control Ig, TAB4, or anti-CD3 according to the conditions shown in Table 1.

TABLE 1

Experiment groups	Treatment*
Negative control	3 ug/ml hamster Ig
	5 ng/ml IL-2
	3 ug/ml cross-linker antibody (anti-hamster Ig)
TAB4	3 ug/ml TAB4 hamster mAb
	5 ng/ml IL-2
	3 ug/ml cross-linker antibody (anti-hamster Ig)
Positive control	1 ug/ml anti-CD3 mAb
	5 ng/ml IL-2
	1 ug/ml cross-linker antibody (anti-mouse Ig)

*: Final concentration of the designated reagents in the medium.

After an incubation period of 18-24 hours, the extent of apoptosis in each culture was determined using the 7-AAD apoptosis assay. The treated cells were transferred to FACS tubes (Falcon), washed twice with ice-cold FACS solution (1% fetal bovine serum, 0.05% sodium azide in PBS), pelleted at $200 \times g$ at $4^\circ C$. The cells were resuspended in ice-cold FACS solution to a final concentration of $1-2 \times 10^7$ cells/ml. For staining, 0.1 ml of the resuspended cells were mixed with 7-AAD to a final concentration of 2 ug/ml and then incubated at $4^\circ C$ in the dark for 20 minutes. Finally, the stained cells were washed twice with ice-cold FACS solution, resuspended in 0.5 ml of FACS solution and analyzed with BD LSR flow cytometer (Beckton Dickison).

Fig. 1 depicts the results of a representative time-course experiment that investigated when activated T cells acquire sensitivity to TAB4 (anti-TAIP)-mediated apoptotic signals. Mouse splenocytes were activated with Con-A and maintained in IL-2 containing medium. Activated T cells were harvested, resuspended, and challenged with TAB4 monoclonal antibody or control hamster IgG in the presence of anti-hamster IgG antibody as cross-linker. The ability of TAIP cross-linking to induce low level (6.5%) of apoptotic cell death was evident on day one. However, the extent of TAB4-induced apoptosis increased from 17% on day 2, peaked at 52% on day 4, and declined to 44% on day 6. The control hamster IgG did not induce specific apoptotic T cell

WO 03/013603

PCT/US02/07498

death, as compared with the cultures that received only IL-2. Anti-CD3 (as positive control) induced apoptosis in 38% of T cell after 48 hours of activation (data not shown).

5 Example 4: Expression of the TAIP Antigen in Different Tissues

Cells were washed twice with ice-cold FACS solution (1% fetal bovine serum, 0.05% sodium azide in PBS) and spun at 200 x g at 4°C in a FACS tube (Falcon). The cells were resuspended in ice-cold FACS solution to a final concentration of 1×10^7 cells/ml and a 0.1 ml aliquot of the resuspended cells in a FACS tube (Falcon) was used for each assay. For surface staining, the TAB4 monoclonal antibody or a control hamster Ig at a final concentration of 2 ug/ml were added to the cells and the mixtures were incubated at 4°C for 30 minutes in the dark. The cells were washed once with ice-cold FACS and then stained with: (1) for spleen cells, cychrome-conjugated anti-CD3 antibody (2 ug/ml), FITC-conjugated anti-hamster Ig, and PE-conjugated anti-CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/1-A/1-E/Mac-3 antibody (2 ug/ml) in 100 ul of ice-cold FACS solution; and (2) for thymus cells, FITC-conjugated anti-hamster Ig, PE-conjugated anti-CD8, and cychrome-conjugated anti-CD4 antibodies (2 ug/ml) in 100 ul of ice-cold FACS solution. The reaction was performed at 4°C for 30 minutes in the dark. Finally, the stained cells were washed twice with ice-cold FACS solution, resuspended in 1 ml of FACS solution and analyzed with BD LSR flow cytometer (Beckton Dickison).

Figs. 3 and 4 demonstrate by FACS analysis the distribution of TAIP antigen on the various subpopulations of splenocytes and thymocytes. As shown in Fig. 3, CD19⁺ B cells expressed low but detectable amounts of TAIP proteins on the surface.

25 Significantly higher amounts of TAIP proteins were detected on CD3⁺ T cells and a fraction of NK cells. Most of the CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺8⁺ thymus T cells expressed significant amounts of TAIP proteins. In contrast, the TAIP proteins were expressed only on a small population of CD4⁺8⁺ thymus T cells (Fig. 4).

Tissues from B6 and BALB/c mice, including brain, thymus, heart, lung, liver, stomach, kidney, spleen, and skin, were collected, fixed in 10% formaldehyde overnight at room temperature, and embedded in paraffin blocks. Tissue sections, at a 4 um thickness, were prepared from the paraffin block with Leica RM2135 microtome,

WO 03/013603

PCT/US02/07498

spread in 45°C water, and laid on a coated slide. The slides were dried in 37°C and were ready for subsequent experiments.

Slides containing the tissue paraffin sections were dewaxed and dried through a xylenes-100% ethanol series according to standard protocol and were finally kept in 5 100% ethanol. The sections were rehydrated through a 100% ethanol-90% ethanol-85% ethanol-70% ethanol-PBS serial incubation according to standard protocol to a final PBS solution. The following reactions were all performed in a humidified box. Non-specific binding were blocked by incubating the tissue sections in blocking buffer (1% normal goat serum) for 1 hour at room temperature (or 4°C overnight). The 10 blocking buffer was removed and TAB4 or normal hamster Ig (1:200 dilution) was added to the sections and incubation continued for another hour at room temperature (or 4°C overnight). The sections were washed twice in PBS, for 5 minutes each, to remove the primary antibody, reacted with 1:250 diluted alkaline phosphatase-conjugated goat anti-hamster Ig, and incubated at room temperature for 1 hour. The 15 sections were again washed twice with PBS, 5 minutes each, to remove the antibody-enzyme conjugate and the color reaction was developed with BCIP/NBT substrate solution at room temperature for 30 minutes in the dark. The sections were washed again with PBS to remove excess enzyme substrate, dehydrated through the PBS-ethanol-xylenes series, and mounted for microscopy.

20 The results indicated that the TAIP proteins expression were detected only in bone marrow derived-tissues but not on the rest of the tissues tested.

Example 5: Cell Surface Biotinylation and Immunoprecipitation of the TAIP Antigen

5 × 10⁷ RL ϕ 1 or NIH-3T3 cells were surface biotinylated in 1 ml of PBS 25 containing 0.5 mg/ml Sulfo-NHS-biotin (Pierce) for 30 minutes on ice. The reaction was terminated by incubating the cells with 0.5 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Inc.) for 10 minutes on ice. Cells were washed with 1 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium once and with 1 ml of phosphate-buffered saline twice.

30 Labeled cells were lysed at a density of 5.0 × 10⁷ cells/ml in cold lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 160 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) containing complete protease inhibitor cocktail (Roche) for 15 minutes, and insoluble material was pelleted at 10,000 × g for 10 minutes; these and all subsequent steps were performed at

WO 03/013603

PCT/US02/07498

4°C. For immunoprecipitation, the lysate was preincubated for 30 minutes with 50 μ l of packed protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) to remove non-specifically binding proteins. Beads were pelleted, and aliquots of the supernatant (routinely corresponding to 5.0×10^7 cells) were incubated with 20 μ l of protein G-Sepharose preloaded with 10 μ g of mAb TAB4 or IgG from normal hamster serum. After incubation for 4 h at 4 °C, the resin was washed four times with washing buffer (0.05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 400 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mg/ml ovalbumin), twice with a similar washing buffer, containing 250 mM instead of 400 mM NaCl. Proteins specifically bound to the TAB4 were eluted with 50 μ l of 1×SDS sample buffer. Eluted proteins were separated by 8 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Millipore). Filters were analyzed for biotinylated proteins with peroxidase-conjugated Avidin (PharMingen) and developed with the Chemiluminescence reagent (NEN™ Life Science Products).

As shown in Fig. 2, a biotinylated surface protein with a molecular weight of approximately 120-kD was identified by TAB4 in RL \square 1 cells (TAIP⁺ T cells), but not in 3T3 cells (TAIP⁻ cells). In contrast, protein G sepharose coated with hamster normal serum could not retrieve this 120-kDa protein. These results suggest that this 120-kDa protein is the antigen recognized by monoclonal antibody TAB4 on the cell surface of T cells.

20

Example 6: Depletion of T Cells *in vivo*

To examine the effects of TAB4 on populations of T cells and other cells *in vivo*, mice were injected with 300 μ g of TAB4 or control hamster Ig intraperitoneally and, on day 4, splenocytes, thymocytes, and peripheral blood mononuclear cells were harvested for the total cell count and for the analyses of cell surface markers by FACS.

For FACS assays, the cells were fixed with 2% paraformaldehyde at 4°C for 20 minutes, washed twice, and resuspended in ice-cold FACS solution to a final concentration of 1×10^7 cells/ml. A 100 μ l aliquot of the resuspended cells in a FACS tube (Falcon) was used for each assay. TAB4 or control hamster Ig at a final concentration of 2 μ g/ml were added to the cells and the mixtures were incubated at 4°C for 30 minutes in the dark. The cells were washed once with ice-cold FACS and reacted with: (1) for spleen cells, cyochrome-conjugated anti-CD3 antibody (2 μ g/ml), FITC-conjugated anti-hamster Ig and PE-conjugated anti-CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-

WO 03/013603

PCT/US02/07498

NK1.1-A1.1E/Mac-3 antibody (2 ug/ml) in 100 ul of ice-cold FACS solution; and (2) for thymus cells, FITC-conjugated anti-hamster Ig, PE-conjugated anti-CD8, and cychrome-conjugated anti-CD4 antibodies (2 ug/ml) in 100 ul of ice-cold FACS solution. The reaction was performed at 4°C for 30 minutes in the dark. Finally, the
5 stained cells were washed twice with ice-cold FACS solution, resuspended in 1,000 ul of FACS solution and analyzed with BD LSR flow cytometer (Beckton Dickison).

Four days after the injection, the percentages of CD3⁺ T cells in peripheral blood leukocytes (PBL) decreased from 36.7% in control mice to 4.1% in TAB4-treated mice (Table 2). TAB4 treatment caused a slight reduction in the total number of
10 splenocytes. However, in TAB4 treated mice, there was a 62% decrease in the number of CD3⁺ T cells, a 50% decrease in the number of NK cells, and a slightly increase in the total number of CD19+ B cells. The total number of thymocytes recovered from TAB4 treated mice was only 48% of the level seen in control (52% reduced).
Moreover, except for CD4+ T cells, all other CD8+, CD4+CD8+, and CD4-CD8- T
15 cells were reduced, with CD4+CD8+ subpopulation being the most profoundly affected (64.7% reduction).

WO 03/013603

PCT/US02/07498

TABLE 2

Spleen					
x 10 ⁶	No Treatment	Normal Hamster Ig	TA-B4-treated	Depletion (%)	
Total Splenocytes	123	93.3	105	14.6	
CD3 ⁺ T cells	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	

Peripheral Blood Leukocytes					
	No Treatment	Normal Hamster Ig	TA-B4-treated	Depletion (%)	
CD3 ⁺ T cells	36.7 %	36 %	4.1%	88.8%	

Thymus					
x 10 ⁶	No Treatment	Normal Hamster Ig	TA-B4-treated	Depletion (%)	
Total Thymocytes	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	

5 (representative data from three experiments)

Example 7: Anti-TAIP Antibody does not Induce IL-2 or TNF- α Secretion

Balb/c mice (H-2d) were intraperitoneally injected with 300 micrograms of TAB4 or control hamster Ig. Splenocytes were isolated 7 days after injection, and used as responders in culture with mitomycin C-treated C3H (H-2k) splenocytes (as stimulators). Three days later, the culture supernatants were harvested and the IL-2 content was measured by ELISA set (PharMingen). As shown in Fig. 5, the IL-2 production was suppressed in responder cells derived from TAB4-treated mice as compared with that of control mice. The plasma levels of IL-2 and TNF- α were also analyzed and no significant difference was noted in the levels of IL-2 (or TNF- α) in the sera of the control and the TAB4 treated mice. Since production of IL-2 is central to the activity of T cells, the results show that a TAIP-specific antibody, such as TAB4, can be used *in vivo* to manipulate T cells and control unwanted T cell-mediated

WO 03/013603

PCT/US02/07498

immune responses such as those associated with autoimmune diseases and transplantation rejection.

Example 8: Use of an Anti-TAIP Antibody to Prevent Transplant Rejection

5 Mice (obtained from Jackson Laboratory) at 8 to 12 weeks of age were anesthetized with Acepromazin maleate (Fermenta Animal Health Co., Kansas City, MO). Prior to skin grafting, non-thymectomized recipient C57BL/6 mice (H-2^b) were injected intraperitoneally with 500 ug of TAB4 or isotype control antibodies seven days before skin transplant surgery. Seven days later, a lateral flank of skin from fully 10 allogeneic mismatched Balb/cj mice (H-2^d) was grafted on the lateral flank of the antibody pre-treated C57BL/6 mice. Seven days post transplantation, the mice were again injected with 500 ug of TAB4 or isotype control antibody. The mice were monitored every day after graft transplantation. The grafts were considered rejected when 50% donor skin was necrotic. The percent of graft survival is shown in Fig. 7 15 (n=8). The data show that TAB4 antibody treatments prolonged the survival of the allogeneic skin grafts.

Example 9: Identification of TAIP as PSGL-1

P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), also named CD162, is the main 20 P-selectin ligand expressed on leukocytes, including T cells (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). Biochemical characteristics of TAIP, such as its molecular weight and its tendency for dimerization suggested the possibility that TAB4 may be analogous to PSGL-1. To investigate the relationship between these two antigens, the 25 following were tested: 1) whether the antigen precipitated by TAB4 can be recognized by a commercially-available anti-PSGL1 antibody; and 2) whether an anti-PSGL1 antibody can deplete TAB4 from the cell lysate.

RL α 1 T cells were lysed at a density of 1.0×10^8 cells/ml in lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 160 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) containing 30 complete protease inhibitor cocktail for 1 hour, and insoluble material was pelleted at 10,000 \times g for 10 minutes. These and all subsequent steps were performed at 4°C. The lysate corresponding to 5.0×10^7 cells was incubated with 20 ul of protein G-Sepharose preloaded with 10 ug of anti-PSGL-1 mAb (clone 2PH1, PharMingen, San Diego, CA),

WO 03/013603

PCT/US02/07498

anti-TAIP mAb, TAB4, or IgG from normal hamster serum. After incubation for 4 hours at 4°C, the beads were washed five times with washing buffer (0.05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 400 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mg/ml ovalbumin), and twice with a similar washing buffer, containing 250 mM instead of 400 mM NaCl.

5 Bound proteins were eluted with 40 ul of 1×SDS sample buffer. Eluted proteins were separated by 6% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were immunoblotted with anti-PSGL-1 mAb, and revealed by peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (H+L) followed by chemiluminescence (Renaissance, NEN).

10 Surface biotinylated RL δ 1 T cells were lysed at a density of 1.0×10^8 cells/ml in lysis buffer. The cell extract was incubated with 20 ug of antibody bound to 40 ul of protein G-Sepharose at 4°C overnight. Depletions were done with anti-PSGL-1 mAb (2PH1) or control rat IgG, with TAB4 or control normal hamster serum. Depleted lysates were further subjected to do immunoprecipitation with TAB4 or anti-PSGL-1
15 mAb, respectively. Immunoprecipitates were separated on 6% SDS-polyacrylamide gel and detected by fluorography. As shown in Fig. 6, anti-PSGL-1 antibody can deplete TAIP protein from T cell lysates. In addition, proteins immunoprecipitated with anti-TAIP antibody (TAB4) can be recognized by anti-PSGL-1 antibody by western analysis.

20

Example 10: Induction of Apoptosis in Human T Cells by an anti-PSGL-1 Antibody

To determine the role played by PSGL-1 in the apoptosis of human T cells, time-course experiments were carried out to investigate when activated human T cells acquire sensitivity toward PSGL-1-mediated apoptotic signals. Human T cells were
25 stimulated with phytohemagglutinin (PHA) mitogen and further expanded in IL-2-containing medium. Activated T cells were harvested and then challenged with anti-PSGL-1 in the presence of IL-2 and cross-linking antibodies.

Human peripheral blood was taken from healthy adults, heprinized, and enriched for peripheral blood mononuclear cells (PBMC) based on differential density
30 using Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech). The PBMC were activated with 1% PHA (Life Technologies, GibcoBRL) for 48 hours and subsequently maintained in recombinant human IL-2 (5 ng/ml) through the assay period. To assess the apoptosis-inducing ability an anti-human PSGL-1 antibody, the activated cells were treated with:

WO 03/013603

PCT/US02/07498

(1) 1 ug/ml of the anti-PSGL-1 antibody clone KPL-1 (BD PharMingen) plus cross-linker rabbit anti-mouse Ig (0.5 ug/ml) (Jackson ImmunoResearch Laboratories); (2) isotype control purified mouse Ig plus cross-linker rabbit anti-mouse Ig; or (3) cross-linker rabbit anti-mouse Ig alone. After six hours of treatment, the percentage of early apoptotic cells was determined by FACS, staining with anti-Annexin V (BD PharMingen) and PI (Sigma).

As shown in Fig. 8, signaling triggered by PSGL-1 using an anti-PSGL-1 antibody plus the crosslinker triggered significant level of apoptosis in PHA-activated human PBMC (mainly T cells). The percentage of apoptotic cells increased from 8.5% on days 3 to 24% on day 8 in anti-PSGL1 treated cultures. Neither isotopic-matched control, nor the cross-linking antibodies alone, had any effect on these cells.

Example 11: Use of anti-PSGL-1 Agonist Antibody to Treat Autoimmune Disease

Non-obese diabetic (NOD) mice, a well-accepted autoimmune diabetes animal, were bred under standard conditions. Spontaneous diabetes developed in the NOD mice at the age of about 20 weeks. In the experimental group, the mice received three doses of anti-PSGL-1 antibody (TAB4) intraperitoneally at 300 µg per mouse at age of 14, 15 and 17 weeks. Two additional injections with the same dose were given at the ages of 24 and 26 weeks. The control group was given hamster Ig at the same dose. Mice were monitored for glucose uria by Medi-Test Glucose strips (Macherey-Nagel, Germany) twice every week after the age of 15 weeks. Non-fasting urine glucose levels over 300 mg/dl for two consecutive measurements were considered diabetic.

As shown in Fig. 9, TAB4 (anti-PSGL-1) antibody treatment yielded significant protection as compared with control antibody treatment. Thus an anti-PSGL-1 antibody treatment can dampen the activity of autoimmune T cells and delay the onset of type I-diabetes.

Other Embodiments

It is to be understood that, while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention. Other aspects, advantages, and modifications of the invention are within the scope of the claims set forth below.

What is claimed is:

WO 03/013603

PCT/US02/07498

1. A method of preventing or reducing a T cell-mediated immune response in an individual, the method comprising:
selecting an individual diagnosed as having or as being at risk of acquiring a condition characterized by an excessive or unwanted T cell-mediated immune response;
5 and
administering to the individual a compound that binds to P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) on the surface of a T cell, wherein the binding of the compound to PSGL-1 on the surface of the T cell induces a signal transduction pathway that results in the death of the T cell, thereby preventing or reducing a T cell-mediated
10 immune response in the individual.
2. The method of claim 1, wherein the compound is an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to PSGL-1.
- 15 3. The method of claim 1, wherein the compound is a monoclonal antibody that specifically binds to PSGL-1.
4. The method of claim 3, further comprising administering an agent that binds to the monoclonal antibody and induces the cross-linking of a plurality of PSGL-1
20 antigens on the surface of the T cell.
5. The method of claim 1, wherein the method comprises inducing the cross-linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the T cell, wherein the cross-linking induces the signal transduction pathway that results in the death of the T
25 cell.
6. The method of claim 1, comprising selecting an individual diagnosed as having an autoimmune disease.
- 30 7. The method of claim 1, comprising selecting an individual that has received or is expected to receive an allogenic or xenogenic transplant.

WO 03/013603

PCT/US02/07498

8. The method of claim 1, comprising selecting an individual diagnosed as having an allergic disease.
9. The method of claim 1, comprising selecting an individual diagnosed as
5 having a T cell cancer.
10. The method of claim 1, wherein the T cell is an activated T cell.
11. The method of claim 1, wherein the T cell is a CD4+ T cell.
10
12. The method of claim 1, wherein the T cell is a CD8+ T cell.
13. The method of claim 1, wherein the method comprises detecting the
number of T cells in a first biological sample taken from the individual before the
15 administration of the compound and comparing the results with the number of T cells in
a second biological sample taken from the individual after the administration of the
compound.
14. The method of claim 1, wherein the method comprises detecting a
20 biological activity of T cells in a first biological sample taken from the individual
before the administration of the compound and comparing the results with the
biological activity of T cells in a second biological sample taken from the individual
after the administration of the compound.
- 25 15. The method of claim 1, wherein the administration results in the depletion
of at least 20% of peripheral blood CD3+ cells in the individual.
16. The method of claim 2, wherein the antibody or antigen binding fragment
thereof induces the death of at least 20% of peripheral blood CD3+ cells in the
30 individual after exposure to the antibody or antigen binding fragment thereof.
17. A method of inducing the death of a T cell or a natural killer (NK) cell, the
method comprising:

WO 03/013603

PCT/US02/07498

providing a T cell or NK cell expressing PSGL-1 on its cell surface; and
contacting the T cell or NK cell with a compound that binds to PSGL-1 on the
surface of the T cell or NK cell, wherein the binding of the compound to PSGL-1 on
the surface of the T cell or NK cell induces a signal transduction pathway that results in
5 the death of the T cell or NK cell.

18. The method of claim 17, wherein the compound is an antibody or antigen
binding fragment thereof that specifically binds to PSGL-1.
- 10 19. The method of claim 17, wherein the compound is a monoclonal antibody
that specifically binds to PSGL-1.
20. The method of claim 19, further comprising contacting the monoclonal
antibody with an agent that binds to the monoclonal antibody and induces the cross-
15 linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the T cell or NK cell.
21. The method of claim 17, wherein the method comprises inducing the cross-
linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the T cell or NK cell,
wherein the cross-linking induces the signal transduction pathway that results in the
20 death of the T cell or NK cell.
22. The method of claim 17, wherein the cell is an activated T cell.
23. The method of claim 17, wherein the cell is a CD4⁺ T cell.
- 25 24. The method of claim 17, wherein the cell is a CD8⁺ T cell.
25. The method of claim 17, wherein the method comprises assessing the
viability of the T cell or NK cell after the contacting with the compound.
- 30 26. The method of claim 17, wherein the method comprises assessing a
biological activity of the T cell or NK cell after the contacting with the compound.

WO 03/013603

PCT/US02/07498

27. A method of screening for a modulator of PSGL-1 function, the method comprising:
providing a cell expressing PSGL-1 on the surface of the cell;
contacting the cell with a test substance; and
5 measuring the viability of the cell after contacting the cell with the test substance to thereby determine if the test substance is a modulator of PSGL-1 function.
28. The method of claim 27, further comprising detecting the death of the cell induced by the test substance to thereby determine that the test substance is a modulator
10 of PSGL-1 function.
29. The method of claim 28, wherein the test substance is an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to PSGL-1.
- 15 30. The method of claim 28, wherein the test substance is a monoclonal antibody that specifically binds to PSGL-1.
31. The method of claim 30, further comprising contacting the monoclonal antibody with an agent that binds to the monoclonal antibody and induces the cross-
20 linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the cell.
32. The method of claim 28, wherein the method comprises inducing the cross-linking of a plurality of PSGL-1 antigens on the surface of the cell, wherein the cross-linking induces the signal transduction pathway that results in the death of the cell.
25
33. The method of claim 28, wherein the cell is an activated T cell.
34. The method of claim 28, wherein the cell is a CD4⁺ T cell.
- 30 35. The method of claim 28, wherein the cell is a CD8⁺ T cell.

WO 03/013603

PCT/US02/07498

36. The method of claim 28, further comprising manufacturing bulk quantities of the test substance and formulating the test substance in a pharmaceutically acceptable carrier.

- 5 37. A kit comprising:
- a compound that binds to PSGL-1 on the surface of a T cell, wherein the binding of the compound to PSGL-1 on the surface of the T cell induces a signal transduction pathway that results in the death of the T cell; and
- instructions for use of the compound to treat autoimmunity, transplant rejection,
- 10 an allergic condition, or a T cell cancer.

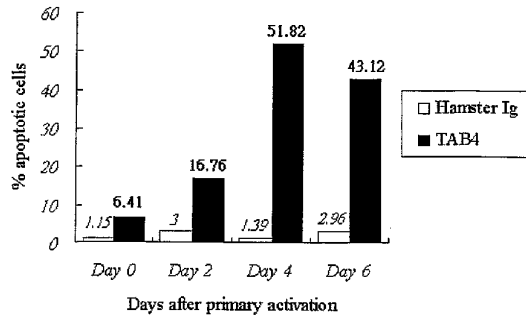
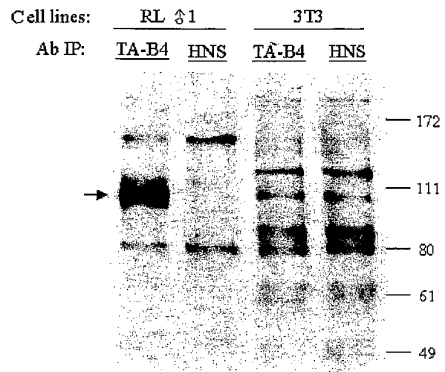


Fig. 1



Ab IP: Antibody used for immunoprecipitation
TA-B4: TA-B4 monoclonal antibody
HNS: Hamster normal serum

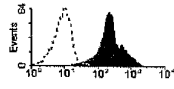
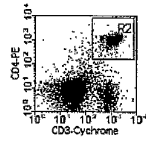
Fig. 2

WO 03/013603

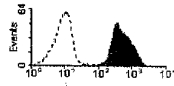
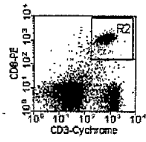
3/9

PCT/US02/07498

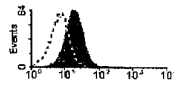
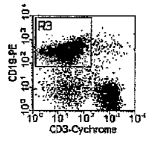
CD4 T



CD8 T



CD19⁺



Pan-NK⁺

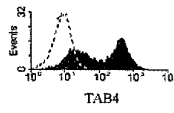
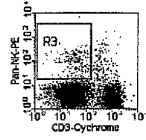


Fig. 3

WO 03/013603

4/9

PCT/US02/07498

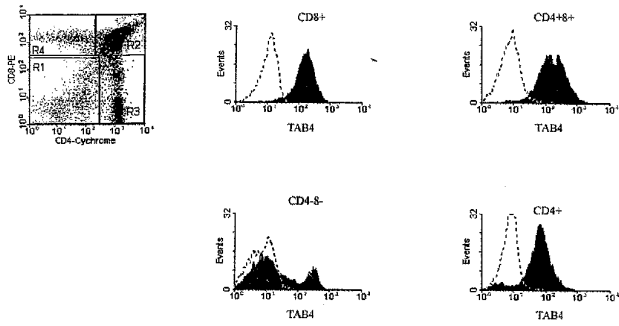


Fig. 4

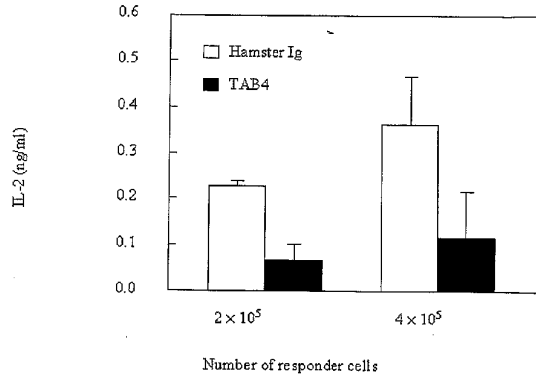


Fig. 5

WO 03/013603

6/9

PCT/US02/07498

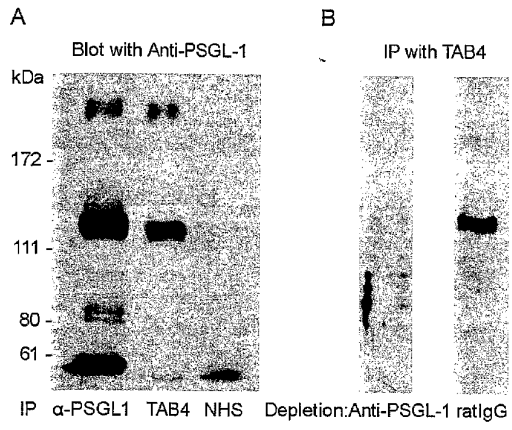


Fig. 6

WO 03/013603

7/9

PCT/US02/07498

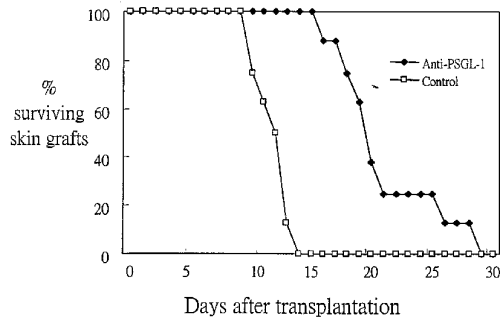


Fig. 7

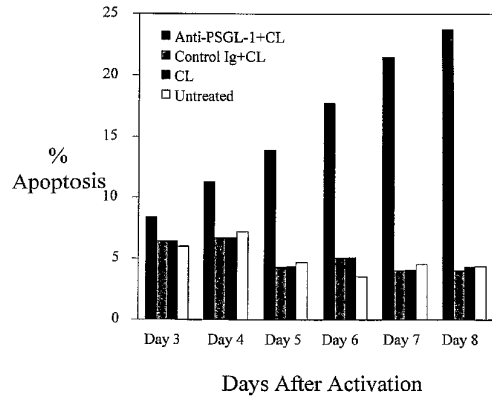


Fig. 8

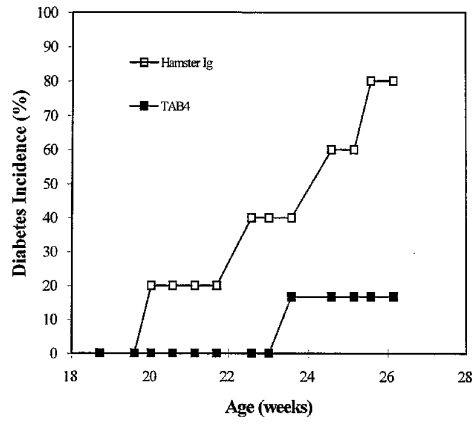


Fig. 9

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/07498		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/28 US CL : 424/130.1, 141.1, 143.1, 153.1, 173.1; 530/387.1, 388.1, 388.2, 388.22, 388.7 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/130.1, 141.1, 143.1, 153.1, 173.1; 530/387.1, 388.1, 388.2, 388.22, 388.7				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched none				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	US 6,124,267 A (MCEVER et al.) 26 September 2000, see entire document.	1-32		
Y	US 5,840,679 A (LARSEN et al.) 24 November 1998, see entire document.	1-37		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "I" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 27 June 2002 (27.06.2002)	Date of mailing of the international search report 11 JUL 2002			
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Philip Gambel Telephone No. 703-308-0196			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/07498

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
DIALOG, BIOSIS, CA, EMBASE, MEDLINE, WEST
search terms: PSGL, transplant?, graft?, t cell, t lymphocyte, cross-link

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/08	
C 1 2 Q 1/02	A 6 1 P 43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/48	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/53	Y
	G 0 1 N 33/577	B

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

(74) 代理人 100124615

弁理士 藤井 敏史

(72) 発明者 ロング - フワ, リン

台湾, タイペイ, ルーズベルト ロード, セクション 3, レーン 2 8 3, ナンバー 9 アリ
4, 4 エフ

(72) 発明者 チュング - シウン, ウ

台湾, タイペイ, ネイフ, ミン - チュアン イースト ロード, セクション 3, レーン 1 2 3
, ナンバー 6 アリ 3 4, 1 3 エフ

(72) 発明者 ペイ - リング, シュー

アメリカ合衆国, アリゾナ州 7 2 2 1 2, リトル ロック, マスターズ サークル 7

F ターム(参考) 2G045 BB01 BB10 BB14 BB20 BB46 BB50 BB51 CB01 DA31 DA36

FB03 GC12 GC15 GC22

4B063 QA18 QQ08 QR48 QR55 QS33 QS35

4C084 AA17 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB081 ZB131 ZB261

4C085 AA13 AA14 BB12 EE01 EE03

专利名称(译)	P-选择素糖蛋白配体1的调节剂		
公开(公告)号	JP2004521958A	公开(公告)日	2004-07-22
申请号	JP2003518607	申请日	2002-03-13
[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		
[标]发明人	ロングフワリン チュングシウンウ ペイリングシュー		
发明人	ロング-フワ,リン チュング-シウン,ウ ペイ-リング,シュー		
IPC分类号	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	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/06 A61P15/02 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/12 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 C07K16/28 C07K2319/30 G01N2500/10		
FI分类号	A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.121 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/48.M G01N33/50.Z G01N33/53.Y G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G045/BB01 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA31 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/GC12 2G045/GC15 2G045/GC22 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS35 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB081 4C084/ZB131 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB12 4C085/EE01 4C085/EE03		
代理人(译)	野上淳 宇谷 胜幸 藤井敏文		
优先权	60/310196 2001-08-03 US 10/051497 2002-01-18 US		
其他公开文献	JP4815101B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

与T细胞或自然杀伤(NK)细胞表面的P-选择蛋白糖蛋白1(PSGL-1)结合的化合物可用于诱导T细胞或NK细胞耗竭和/或诱导T细胞或NK细胞凋亡。本发明的化合物和方法可用于控制诸如自身免疫疾病,移植排斥和变态反应性疾病之类的不良T细胞或NK细胞介导的免疫反应。

表1

実験群	処理*
初タイプコントロール	3 μ g/ml ハムスター Ig
	5 ng/ml IL-2
	3 μ g/ml 架橋抗体 (抗ハムスター Ig)
TAB4	3 μ g/ml TAB4 ハムスター mAb
	5 ng/ml IL-2
	3 μ g/ml 架橋抗体 (抗ハムスター Ig)
ホタイプコントロール	1 μ g/ml 抗CD3 mAb
	5 ng/ml IL-2
	1 μ g/ml 架橋抗体 (抗ハムスター Ig)

*：培地中の指定された試薬の最終濃度