



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **91004** (13) **C2**
(51) **МПК (2009)**
A61K 38/17
A61P 37/00
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЗАПОБІГАННЯ АБО ЗНИЖЕННЯ ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ Т-КЛІТИНАМИ ІМУННОЇ РЕАКЦІЇ

1

2

(21) a200604170
(22) 09.09.2004
(24) 25.06.2010
(86) PCT/US2004/029520, 09.09.2004
(31) 10/662,906
(32) 15.09.2003
(33) US
(46) 25.06.2010, Бюл.№ 12, 2010 р.
(72) ЛІН РОНГ-ХУА, ТУ, ЧАНГ ЧУНГ НАН, US/US
(73) АБДЖЕНОМІКС КООПЕРАТІЕФ У.А., NL
(56) US A 5840679, 24.11.1998.
WO A 9740154, 30.10.1997.
US A 6117977, 12.09.2000.
TREMBLEAU S. ET AL: 'Pancreas-Infiltrating Th1 Cells and Diabetes Develop in IL-12-Deficient Nonobese Diabetic Mice.' J IMMUNOL. vol. 163, no. 5, 01 September 1999, pages 2960 - 2968, XP002992248.
YAGO T. ET AL: 'IL-12 Promotes the Adhesion of NK Cells to Endothelial Selectins Under Flow Conditions.' J IMMUNOL. vol. 161, no. 3, August 1998, pages 1140 - 1145, XP002992249.
KUNZENDORF U ET AL: "T cells bind to the endothelial adhesion molecule GMP-140 (P-selectin)." TRANSPLANTATION NOV 1993, vol. 56, no. 5, November 1993 (1993-11), pages 1213-1217, XP002528704 ISSN: 0041-1337.
DAMLE N K ET AL: "GMP-140 (P-SELECTIN/CD62) BINDS TO CHRONICALLY STIMULATED BUT NOT RESTING CD4+ T LYMPHOCYTES AND REGULATES THEIR PRODUCTION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 22, no. 7, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 1789-1793, XP000655066 ISSN: 0014-2980.
(57) 1. Спосіб запобігання або зниження опосередкованої Т-клітинами імунної реакції в організмі суб'єкта, який включає відбір суб'єкта, у якого діагностовано стан, або який має ризик набуття стану, що характеризується надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією, і введення суб'єктові димерної сполуки, яка зв'язується з Р-селектин лігандом 1 глікопротеїну (PSGL-1) на поверхні Т-клітини, причому димерна сполука включає домен зв'язування Р-селектину

або Е-селектину, що зв'язується з PSGL-1, злитий з гетерологічною амінокислотою послідовність, яка відповідає Fc області IgG1 людини.
2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що домен зв'язування включає позаклітинний домен Р-селектину або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент.
3. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що домен зв'язування включає позаклітинний домен Е-селектину або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент.
4. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що домен зв'язування Р-селектину або Е-селектину злитий з гетерологічною амінокислотою послідовністю ковалентним зв'язком.
5. Спосіб за п.4, який **відрізняється** тим, що ковалентний зв'язок є дисульфідним зв'язком.
6. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що додатково включає введення суб'єктові агента, який зв'язується з димерною сполукою через гетерологічну амінокислотну послідовність і викликає зшивання певної кількості антигенів PSGL-1 на поверхні Т-клітини.
7. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що суб'єкт, у якого діагностовано стан, або який має ризик набуття стану, що характеризується надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією, являє собою суб'єкт, у якого діагностовано запальну хворобу.
8. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що суб'єкт, у якого діагностовано стан, або який має ризик набуття стану, що характеризується надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією, являє собою суб'єкт, у якого діагностовано автоімунну хворобу.
9. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що суб'єкт, у якого діагностовано стан, або який має ризик набуття стану, що характеризується надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією, являє собою суб'єкт, якому було пересаджено або очікується пересадження аlogenного або ксеногенного трансплантата.
10. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що суб'єкт, у якого діагностовано стан, або який має ризик набуття стану, що характеризується надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами

(13) **C2**
(11) **91004**
(19) **UA**

імунною реакцією, являє собою суб'єкт, у якого було діагностовано алергічну хворобу.

11. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що суб'єкт, у якого діагностовано стан, або який має ризик набуття стану, що характеризується надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією, являє собою суб'єкт, у якого було діагностовано Т-клітинний рак.

12. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що Т-клітина є активованою Т-клітиною.

13. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що додатково включає виявлення кількості Т-клітин у першому біологічному зразку, взятому у суб'єкта, перед введенням димерної сполуки, і порівняння результатів з кількістю Т-клітин у другому біологічному зразку, взятому у суб'єкта після введення димерної сполуки.

14. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що додатково включає виявлення біологічної активності Т-клітин у першому біологічному зразку, взятому у суб'єкта, перед введенням димерної сполуки, і порівняння результатів з біологічною активністю Т-клітин у другому біологічному зразку, взятому у суб'єкта після введення димерної сполуки.

15. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що введення забезпечує виснаження принаймні 10% активованих Т-клітин в організмі суб'єкта.

16. Спосіб викликання смерті Т-клітини або природної клітини-кілера (NK), де спосіб включає забезпечення Т-клітини або NK-клітини, яка експресує Р-селектин ліганду-1 глікопротеїну (PSGL-1) на поверхні клітини, і контакт Т-клітини або NK-клітини з димерною сполукою, яка зв'язується з PSGL-1 на поверхні Т-клітини або NK-клітини, причому димерна сполука включає домен зв'язування Р-селектину або Е-селектину, який зв'язується з PSGL-1, злитий з гетерологічною амінокислотою послідовність, яка відповідає Fc області IgG1 людини.

17. Спосіб за п.16, який **відрізняється** тим, що домен зв'язування включає позаклітинний домен Р-селектину або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент.

18. Спосіб за п.16, який **відрізняється** тим, що домен зв'язування включає позаклітинний домен Е-селектину або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент.

19. Спосіб за п.16, який **відрізняється** тим, що домен зв'язування Р-селектину або Е-селектину злитий з гетерологічною амінокислотою послідовністю ковалентним зв'язком.

20. Спосіб за п.19, який **відрізняється** тим, що ковалентний зв'язок є дисульфідним зв'язком.

21. Спосіб за п.16, який **відрізняється** тим, що додатково включає контакт димерної сполука з агентом, який зв'язується з димерною сполукою через гетерологічну амінокислотну послідовність і викликає зшивання певної кількості антигенів PSGL-1 на поверхні Т-клітини.

22. Спосіб за п.16, який **відрізняється** тим, що Т-клітина або NK-клітина являє собою активовану Т-клітину.

23. Комплект, який включає димерну сполуку, яка зв'язується з Р-селектин лігандом 1 глікопротеїну (PSGL-1) на поверхні Т-клітини, причому димерна сполука включає домен зв'язування Р-селектину або Е-селектину, який зв'язується з PSGL-1, злитий з гетерологічною амінокислотою послідовністю, яка відповідає Fc області IgG1 людини, та інструкцію застосування димерної сполуки для лікування стану, який асоціюється з надлишковою або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією, або надлишковою або небажаною Т-клітинною проліферацією, де стан вибраний з групи, що включає запалення, аутоімунність, відторгнення трансплантатів, алергічний стан та Т-клітинний рак.

Винахід стосується композиції та способів контролювання імунних реакцій.

Контроль над небажаними імунними реакціями є ключовим питанням у лікуванні таких хвороб, як запальні хвороби, аутоімунні хвороби, відторгнення трансплантатів, алергічні хвороби та Т-клітинний рак. Активність надмірно агресивних Т-клітин контролюють імуносупресією або викликанням імунологічної толерантності. Толерантність визначають як стан, у якому імунна система стає несприйнятливою до антигену, тоді як імуносупресія, яка знижує імунну реакцію на антигени, зазвичай вимагає постійного застосування лікарських засобів. При трансплантації органів Т-клітини відіграють суттєву роль в імунній реакції на алоантигени. Існуючі імунодепресивні режими зазвичай включають застосування кортикостероїду, циклоспорину або рапаміцину, які блокують транскрипцію IL-2, ключового фактора росту для Т-клітин, або інгібують IL-2-залежну проліферацію. Однак багато моноклональних антитіл, які або діють як аген-

ти, що виснажують Т-клітини (наприклад, CD3, CD4, CD8), або як інгібітори сигналу цитокіну або шляхи активізації Т-клітин (наприклад, CD25, B7-1, B7-2, CD152, CTLA4), продемонстрували ефективність у зниженні кількості випадків відторгнення з обмеженими побічними ефектами або токсичністю. Деякі з цих агентів продемонстрували певний ступінь успішності у лікуванні аутоімунної хвороби та подовженні виживаності трансплантатів.

Існує поширена думка, що апоптоз має життєво важливе значення для підтримання належної функції імунної системи і є головним механізмом видалення небажаних клітин (Kabelitz et al. Immunol. Today 14:338-340 (1993); Raff, Nature: 356:397-399 (1992)). Різні сигнали, які походять або з клітини, або з-поза її меж, впливають на життя та смерть клітини. Антитіла проти молекул поверхні Т-клітин, такі як Fas (або CD95, молекулярна маса =43кДа), TNFR2 (молекулярна маса =75кДа), CD2 (молекулярна маса =45кДа) та

CTLA-4 (молекулярна маса ≈ 33 кДа) викликають апоптоз Т-клітин (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)). Спроби застосування молекул Fas та TNFR2 для контролю над небажаними Т-клітинами утруднювалися тим, що ці дві молекули експресуються не лише на імунних клітинах, але й на кількох інших важливих системах органів, таких як печінка. Ця модель експресії потенційно обмежує терапевтичне застосування цих двох антитіл (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)).

Члени надродини селектинів, інтегринів та імуноглобуліну (Ig) є трьома основними класами адгезійних молекул, які є важливими для взаємодії лейкоцитів та тромбоцитів або між собою, або з позаклітинним матриксом та судинним ендотелієм (Springer, Nature 346:425 (1990); Osborn, Cell 62:3 (1990); Hynes, Cell 69:11 (1992)). Адгезійна молекула на одному типі клітин часто зв'язується з іншою адгезійною молекулою, яка експресується на іншому типі клітин, утворюючи пару ліганд-рецептор.

Родина селектинів складається з Р-селектину (також відомого як CD62, CD62P, GMP140 та PADGEM), Е-селектину (також відомого як ELAM-1 та CD62E) і L-селектину (також відомого як LECAM-1, Mel-14, LAM-1 та CD62L). Селектини є високогомологічними, складаються з N-кінцевого лектинового домену з 120 амінокислот та EGF-подібного домену, мінливої кількості доменів короткого консенсусного повтору (SCR), гомологічних тим, які містяться у комплементарних регуляторних білках, за якими йдуть трансмембранний домен та короткий цитоплазматичний хвіст (Siegelman et al., Science 243:1165-1172 (1989); Lasky et al., Cell 56:1045-1055 (1989); Tedder et al., J. Exp. Med. 170:123-133 (1989); Johnson et al., Cell 56:1033-1044 (1989); Bevilacqua et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:9238-9242 (1987); Bevilacqua et al., Science 243:1160-1165 (1989); Bevilacqua et al., J. Clin. Invest. 91:379-387 (1993); Camerini et al., Nature 280:496-498 (1989)). Селектини мають чітку специфічність до рецепторів поверхні клітин, яка частково збігається і специфічністю інших селектинів (Bevilacqua et al., J. Clin. Invest. 91:379-387 (1993); Feize, Current Opinion in Struct. Biol. 3:701-710 (1993); Berg et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 184:1048-1055 (1992); Foxall et al., J. Cell Biol. 117:895-902 (1992); Larsen et al., J. Biol. Chem. 267:11104-11110 (1992); Polley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6224-6228 (1991)).

Р-селектин, Е-селектин та L-селектин опосередковують першу адгезивну взаємодію лейкоцит-ендотеліальна клітина та тромбоцит-лейкоцит під час запалення (Bevilacqua et al., 1993, supra). Було виявлено, що всі три селектини беруть участь у первісній взаємодії лейкоцитів з активованим ендотелієм з прокочуванням уздовж нього ("rolling") (von Andrian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

88:7538-7542 (1991); Ley et al., Blood 77:2553-2555 (1991); Abassi et al., J. Clin. Invest. 92:2719-2730 (1993); Dore et al., Blood 82:1308-1316 (1993); Jones et al., Biophys. J. 65:1560-1569 (1993); Mayadas et al., Cell 74:541-554 (1993)). Р-селектин, який експресується на активованих тромбоцитах та ендотеліальних клітинах, зв'язується з білками поверхні клітин на більшості лейкоцитів (McEver et al., J. Biol. Chem. 250:9799-9804 (1984); Hsu-Lin et al., J. Biol. Chem. 264:8121-9126 (1984)). Е-селектин, який експресується у цитокін-активованих ендотеліальних клітинах (наприклад, після стимуляції TNF-альфа або IL-1 протягом 6-8 годин), зв'язується з білками поверхні клітин на більшості лейкоцитів (McEver et al., J. Clin. Invest. 100:485-492 (1997); Bevilacqua et al., 1987, supra; Bevilacqua et al., 1989, supra). L-селектин, який експресується на більшості лейкоцитів, зв'язується з білками поверхні клітин на деяких ендотеліальних клітинах і на інших лейкоцитах (Gallatin et al., Nature 304:30-34 (1983); Berg et al., Immunol. Rev. 108:5-18 (1989); Berg et al., J. Cell. Biol. 114:343-349 (1991); Hallman et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 174:236-243 (1991); Smith et al., J. Clin. Invest. 87:609-618 (1991); Spertini et al., J. Immunol. 147:2565-2573 (1991)). Усі три селектини продемонстрували зв'язування з білком поверхні клітин, PSGL-1, експресія якого значною мірою обмежується лейкоцитами, зокрема, Т-клітинами та NK-клітинами. Посттрансляційні модифікації PSGL-1 вимагаються для зв'язування з Р-селектином, Е-селектином та L-селектином (McEver et al., J. Clin. Invest., 1997, supra).

В основу винаходу покладено виявлення того, що Т-клітини можуть бути виснажені і/або піддані апоптозові через застосування антигену поверхні Т-клітин Р-селектин ліганду-1 глікопротеїну (PSGL-1). Виснаження Т-клітин, зокрема, може бути корисним для лікування станів, пов'язаних з надмірною чи небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією або надмірною чи небажаною проліферацією Т-клітин. Наприклад, виснаження Т-клітин може викликати зниження або усунення небажаної активності або проліферації Т-клітин, пов'язаних із запальними хворобами, аутоімунними хворобами, відторгненням трансплантатів, алергічними хворобами та/або Т-клітинним раком. Винахід охоплює способи застосування модуляторів функції PSGL-1 для запобігання або зниження опосередкованої Т-клітинами імунної реакції, а також способів відбору модуляторів функції PSGL-1.

В одному аспекті винахід стосується способу запобігання або зниження опосередкованої Т-клітинами імунної реакції в організмі суб'єкта. Спосіб включає такі етапи: відбір суб'єкта, у якого діагностовано або який є підданим ризикові виникнення стану, який характеризується надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією; і введення суб'єктові сполуки, яка зв'язується з PSGL-1 на поверхні Т-клітини, причому зв'язування сполуки з PSGL-1 на поверхні Т-клітини викликає шлях трансдукції сигналу, який в результаті призводить до смерті Т-клітини, таким

чином, запобігаючи або знижуючи опосередковану Т-клітинами імунну реакцію в організмі суб'єкта.

Сполука, яку застосовують згідно з цим способом, може включати антитіло або фрагмент його зв'язування з антигеном, що специфічно зв'язується з PSGL-1. В одному прикладі сполука є моноклональним антитілом, яке специфічно зв'язується з PSGL-1. В одному варіанті втілення спосіб включає додатковий етап введення агента, який зв'язується з моноклональним антитілом і викликає зшивання певної кількості антигенів PSGL-1 на поверхні Т-клітини.

У деяких варіантах втілення спосіб включає викликання зшивання певної кількості антигенів PSGL-1 на поверхні Т-клітини, причому зшивання викликає шлях трансдукції сигналу, який в результаті призводить до смерті Т-клітини.

У деяких варіантах втілення спосіб включає такі етапи: (i) відбір суб'єкта, у якого діагностовано або який є підданим ризикові виникнення стану, який характеризується надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією; і (ii) введення суб'єктові мультимерної сполуки, яка зв'язується з принаймні двома білками PSGL-1 на поверхні Т-клітини, причому мультимерна сполука містить два поліпептидні ланцюги, кожен з поліпептидних ланцюгів включає (a) домен зв'язування, який зв'язується з PSGL-1, і (b) гетерологічну амінокислотну послідовність, у якій поліпептидні ланцюги є зв'язаними через гетерологічну амінокислотну послідовність для утворення мультимерної сполуки, і зв'язування мультимерної сполуки з принаймні двома білками PSGL-1 на поверхні Т-клітини викликає шлях трансдукції сигналу, який у результаті призводить до смерті Т-клітини, таким чином, запобігаючи або знижуючи опосередковану Т-клітинами імунну реакцію в організмі суб'єкта.

Мультимерна сполука може бути гомомультимерною сполукою або гетеромультимерною сполукою. Домен зв'язування необов'язково може містити позаклітинний домен Р-Селектину або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент, позаклітинний домен Е-Селектину або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент, позаклітинний домен L-Селектину або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент, антитіло проти PSGL-1 або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент, PSGL-1-зв'язувальний поліпептид, вибраний з бібліотек фагів, або комбінацію з будь-яких із них.

У деяких варіантах втілення мультимерна сполука не включає антитіло проти PSGL-1 або фрагмент антитіла, який зв'язується з PSGL-1.

Гетерологічна амінокислотна послідовність необов'язково може містити ділянку зв'язування з рецептором поверхні клітин, наприклад, постійну ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну. У деяких варіантах втілення поліпептидні ланцюги є ковалентно зв'язаними, наприклад, дисульфідно зв'язаними, через гетерологічну амінокислотну послідовність для утворення мультимерної сполуки.

У деяких варіантах втілення спосіб може включати додатковий етап введення суб'єктові агента, який зв'язується з мультимерною сполукою через гетерологічну амінокислотну послідовність і

викликає зшивання певної кількості антигенів PSGL-1 на поверхні Т-клітини.

У деяких варіантах втілення описаний авторами спосіб включає етап відбору суб'єкта, у якого діагностовано аутоімунну хворобу. В іншому прикладі спосіб включає етап відбору суб'єкта, у якого діагностовано запальну хворобу. В іншому прикладі спосіб включає етап відбору суб'єкта, який отримав або який має отримати ксеногенний трансплантат. В іншому прикладі спосіб включає етап відбору суб'єкта, у якого діагностовано алергічну хворобу. В іншому прикладі спосіб включає етап відбору суб'єкта, у якого діагностовано Т-клітинний рак.

У деяких варіантах втілення Т-клітина є активованою Т-клітиною. В одному прикладі Т-клітина є CD4+ Т-клітиною. В іншому прикладі Т-клітина є CD8+ Т-клітиною.

У деяких варіантах втілення спосіб включає етап виявлення кількості Т-клітин у першому біологічному зразку, взятому в суб'єкта до введення сполуки (наприклад, мультимерної сполуки), і порівняння результатів з кількістю Т-клітин у другому біологічному зразку, взятому в суб'єкта після введення сполуки (наприклад, мультимерної сполуки).

У деяких варіантах втілення спосіб включає етап виявлення біологічної активності Т-клітин у першому біологічному зразку, взятому в суб'єкта до введення сполуки (наприклад, мультимерної сполуки), і порівняння результатів з біологічною активністю Т-клітин у другому біологічному зразку, взятому в суб'єкта після введення сполуки (наприклад, мультимерної сполуки).

У деяких варіантах втілення введення в результаті забезпечує виснаження принаймні 10% активованих Т-клітин в організмі суб'єкта. У деяких варіантах втілення введення в результаті забезпечує виснаження принаймні 10%, 20%, 30%, 40%, 50% або більшої кількості активованих Т-клітин в організмі суб'єкта.

У деяких варіантах втілення антитіло або фрагмент його зв'язування з антигеном або мультимерна сполука викликає смерть принаймні 10% активованих Т-клітин в організмі суб'єкта після піддавання дії антитіла або фрагмента його зв'язування з антигеном або мультимерної сполуки. У деяких варіантах втілення введення викликає смерть принаймні 10%, 20%, 30%, 40%, 50% або більшої кількості активованих Т-клітин в організмі суб'єкта. Смерть клітин може бути виміряна у будь-який час, наприклад, через один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім або більше днів після піддавання дії антитіла або фрагмента його зв'язування з антигеном або мультимерної сполуки.

В іншому аспекті винахід стосується способу викликання смерті Т-клітини або природної клітини-кілера (NK). Спосіб включає етапи: забезпечення Т-клітини або NK-клітини, яка експресує PSGL-1 на поверхні клітини; і контакту Т-клітини або NK-клітини зі сполукою, яка зв'язується з PSGL-1 на поверхні Т-клітини або NK-клітини, причому зв'язування сполуки з PSGL-1 на поверхні Т-клітини або NK-клітини викликає шлях трансдукції сигналу, який в результаті призводить до смерті Т-клітини або NK-клітини.

Сполука, яку застосовують згідно з цим способом, може включати антитіло або фрагмент його зв'язування з антигеном, що специфічно зв'язується з PSGL-1. В одному прикладі сполука є моноклональним антитілом, яке специфічно зв'язується з PSGL-1. В одному варіанті втілення спосіб включає етап контакту моноклонального антитіла з агентом, який зв'язується з моноклональним антитілом і викликає зшивання певної кількості антигенів PSGL-1 на поверхні Т-клітини або NK-клітини.

В одному варіанті втілення спосіб включає такі етапи: (i) забезпечення Т-клітини або NK-клітини, яка експресує PSGL-1 на поверхні клітини; і (ii) контакту Т-клітини або NK-клітини з мультимерною сполукою, яка зв'язується з принаймні двома білками PSGL-1 на поверхні Т-клітини або NK-клітини, причому мультимерна сполука містить два поліпептидні ланцюги, кожен з поліпептидних ланцюгів включає (a) домен зв'язування, який зв'язується з PSGL-1, та (b) гетерологічну амінокислотну послідовність, у якій поліпептидні ланцюги є зв'язаними через гетерологічну амінокислотну послідовність для утворення мультимерної сполуки, причому зв'язування мультимерної сполуки з принаймні двома білками PSGL-1 на поверхні Т-клітини або NK-клітини викликає шлях трансдукції сигналу, який в результаті призводить до смерті Т-клітини або NK-клітини.

Мультимерна сполука може бути гомомультимерною сполукою або гетеромультимерною сполукою. Домен зв'язування необов'язково може містити позаклітинний домен Р-Селектину або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент, позаклітинний домен Е-Селектину або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент, позаклітинний домен L-Селектину або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент, антитіло проти PSGL-1 або його PSGL-1-зв'язувальний фрагмент, пептид, вибраний з бібліотеки фагів, або комбінацію з будь-яких із них.

Гетерологічна амінокислотна послідовність необов'язково може містити ділянку зв'язування з рецептором поверхні клітин, наприклад, постійну ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну. У деяких варіантах втілення поліпептидні ланцюги є ковалентно зв'язаними, наприклад, дисульфідно зв'язаними, через гетерологічну амінокислотну послідовність для утворення мультимерної сполуки.

У деяких варіантах втілення спосіб включає додатковий етап контакту мультимерної сполуки з агентом, який зв'язується з мультимерною сполукою через гетерологічну амінокислотну послідовність і викликає зшивання певної кількості антигенів PSGL-1 на поверхні Т-клітини.

У деяких варіантах втілення спосіб включає етап викликання зшивання певної кількості антигенів PSGL-1 на поверхні Т-клітини або NK-клітини, причому зшивання викликає шлях трансдукції сигналу, який в результаті призводить до смерті Т-клітини або NK-клітини.

У деяких варіантах втілення описаних авторами способів Т-клітина є активованою Т-клітиною. В одному прикладі Т-клітина є CD4⁺ Т-клітиною. В іншому прикладі Т-клітина є CD8⁺ Т-клітиною.

У деяких варіантах втілення описаних авторами способів спосіб включає етап визначення жит-

тєздатності Т-клітини або NK-клітини після контакту зі сполукою (наприклад, мультимерною сполукою).

У деяких варіантах втілення описаних авторами способів спосіб включає етап визначення біологічної активності Т-клітини або NK-клітини після контакту зі сполукою (наприклад, мультимерною сполукою).

У деяких варіантах втілення спосіб включає викликання смерті активованої Т-клітини.

В іншому аспекті винахід стосується способу відбору модулятора функції PSGL-1. Спосіб включає етапи: забезпечення клітини, яка експресує PSGL-1 на поверхні клітини; контакту клітини з випробуваною речовиною; і вимірювання життєздатності клітини після контакту клітини з випробуваною речовиною для того, щоб визначити, чи є випробувана речовина модулятором функції PSGL-1.

В одному варіанті втілення спосіб включає етап виявлення смерті клітини, викликаній випробуваною речовиною, для визначення того, що випробувана речовина є модулятором функції PSGL-1.

В одному варіанті втілення випробувана речовина є антитілом або фрагментом його зв'язування з антигеном, що специфічно зв'язується з PSGL-1. В одному прикладі випробувана речовина є моноклональним антитілом, яке специфічно зв'язується з PSGL-1. В одному варіанті втілення спосіб включає етап контакту моноклонального антитіла з агентом, який зв'язується з моноклональним антитілом і викликає зшивання певної кількості антигенів PSGL-1 на поверхні клітини.

В одному варіанті втілення спосіб включає етап викликання зшивання певної кількості антигенів PSGL-1 на поверхні клітини, причому зшивання викликає шлях трансдукції сигналу, який в результаті призводить до смерті клітини.

В одному варіанті втілення Т-клітина є активованою Т-клітиною. В одному прикладі Т-клітина є CD4⁺ Т-клітиною. В іншому прикладі Т-клітина є CD8⁺ Т-клітиною.

В одному варіанті втілення спосіб включає етап одержання масової кількості випробуваної речовини і рецептування випробуваної речовини у фармацевтично прийнятний носій.

В іншому аспекті винахід стосується комплексу, який включає: сполуку, яка зв'язується з PSGL-1 на поверхні Т-клітини, причому зв'язування сполуки з PSGL-1 на поверхні Т-клітини викликає шлях трансдукції сигналу, який в результаті призводить до смерті Т-клітини; та інструкцію з застосування сполуки для лікування стану, пов'язаного з надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією або надмірною або небажаною проліферацією Т-клітин, такою як запалення, аутоімунність, відторгнення трансплантатів, алергічний стан або Т-клітинний рак.

В одному варіанті втілення комплект включає: (i) мультимерну сполуку, яка зв'язується з принаймні двома білками PSGL-1 на поверхні Т-клітини, причому мультимерна сполука містить два поліпептидні ланцюги, кожен з поліпептидних ланцюгів включає (a) домен зв'язування, який зв'язується з

PSGL-1, та (b) гетерогічну амінокислотну послідовність, у якій поліпептидні ланцюги є зв'язаними через гетерологічну амінокислотну послідовність для утворення мультимерної сполуки, причому зв'язування мультимерної сполуки з принаймні двома білками PSGL-1 на поверхні Т-клітини викликає шлях трансдукції сигналу, який в результаті призводить до смерті Т-клітини; та (ii) інструкцію з застосування сполуки для лікування стану, пов'язаного з надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією або надмірною або небажаною проліферацією Т-клітин, такою як запалення, аутоімунність, відторгнення трансплантатів, алергічний стан або Т-клітинний рак.

Перевага винаходу полягає в тому, що він може викликати виснаження Т-клітин та/або викликання апоптозу в Т-клітинах без викликання пов'язаної з ним небажаної або шкідливої імунної реакції. Наприклад, у деяких варіантах втілення введення суб'єктові антитіла проти PSGL-1 або описаної авторами мультимерної сполуки не призводить до небажаного підвищення рівня запальних цитокінів, таких як IL-2 або TNF-альфа.

Іншою перевагою винаходу є те, що він викликає виснаження Т-клітин через застосування агоністичних композицій, які викликають апоптоз Т-клітин. Відповідно, винахід забезпечує активні імунодепресивні способи, а не пасивну імуносупресію, яка є результатом застосування антагоністичної композиції (наприклад, антагоністичні антитіла проти PSGL-1 або антагоністичні розчинні фрагменти селектину), які діють шляхом зв'язування імунних рецепторів і запобігання імунній активації, опосередкованої такими рецепторами.

Іншою перевагою винаходу є те, що він дозволяє спрямування білка поверхні клітин, PSGL-1, експресія якого значною мірою обмежується лейкоцитами, зокрема, Т-клітинами та NK-клітинами. Таким чином, описані авторами сполуки в цілому не викликають значного рівня апоптозу інших типів клітин, таких як клітини печінки. спрямування Т-клітин та NEC-клітин (важливий тип клітин CD3⁺, який бере участь у відторгненні трансплантатів) для вибіркового виснаження, без суттєвого викликання небезпечних для життя системних реакцій на цитокіни та шкоди для інших систем органів, є корисною характеристикою імунодепресивного агента.

Якщо немає іншого визначення, всі вжиті авторами технічні та наукові терміни мають значення, загальноприйняті серед спеціалістів у галузі, до якої належить цей винахід. Хоча для практичного втілення та випробування винаходу застосовують способи та матеріали, подібні або еквівалентні описаним авторами, прийнятні способи та матеріали описуються нижче. Усі публікації, патентні заявки, патенти та інші згадані авторами джерела є включеними шляхом посилання в їх повному обсязі. У разі невідповідності термінології переважну силу має даний опис. Крім того, описані матеріали та способи представлено лише для пояснення, і вони не є обмежувальними.

Інші особливості та переваги винаходу стануть зрозумілими з представлених нижче детального опису та формули винаходу.

Короткий опис фігур

Фіг.1 показує результати експерименту зі змінами в часі, в якому досліджували, коли активовані Т-клітини набувають чутливості до опосередкованих TAB4 (моноклональним антитілом проти PSGL-1) апоптозних сигналів.

Фіг.2 показує результати біотинілування поверхні клітин та імунореципітації антигену, розпізнаного антитілом TAB4.

Фіг.3 показує експресію антигену PSGL-1 на CD4⁺ Т-клітинах, CD8⁺ Т-клітинах, CD 19⁺ В-клітинах та NK-клітинах селезінки.

Фіг.4 показує експресію антигену PSGL-1 на тимокитах CD4⁺, CD8⁺ та CD4⁺8⁺ і CD4T.

Фіг.5 показує рівень IL-2, одержаний у змішаній культурі лімфоцитів з застосуванням клітин селезінки, взятих з організму мишей Balb/c, які отримували TAB4 (або Ig хом'яка), як респондерів та H2-неузгоджених клітин селезінки C3H як стимулятора.

Фіг.6 показує аналізи вестерн-блотингу, які демонструють, що (A) білки, піддані імунореципітації антитілом TAB4, можуть бути розпізнані за допомогою антитіла серійного виробництва проти PSGL-1, і (B) попереднє очищення лізату Т-клітин антитілом проти PSGL-1 може виснажувати білки, розпізнані TAB4.

Фіг.7 показує відсоток збережених трансплантатів у мишей C57BL/6, яким було пересаджено шкірний трансплантат від мишей Balb/c і які отримували антитіло проти PSGL-1 (зафарбовані ромби) або контрольне антитіло (незафарбовані квадрати).

Фіг.8 показує зміну в часі відсотка апоптозних Т-клітин після обробки активованих моноклеарів периферичної крові людини антитілом PSGL-1 проти людини.

Фіг.9 показує показники захворюваності на діабет у аутоімунних самців миші з діабетом без ожиріння (NOD), які отримували антитіло проти PSGL-1 (зафарбовані квадрати) або контрольне антитіло (незафарбовані квадрати).

Фіг.10 показує зв'язування Р-селектину, Е-селектину та L-селектину миші з активованими Т-клітинами миші.

Фіг.11A-11C показують викликання апоптозу активованих Т-клітин миші мультимерними формами Е-селектину (Фіг.11A), Р-селектину (Фіг.11B) та L-селектину (Фіг.11C).

Фіг.12 показує викликання апоптозу активованих Т-клітин миші *in vitro* шляхом зшивання розчинного злитого білка Р-селектин-Fc.

Винахід стосується способу модулювання активності Т-клітин шляхом модулювання функції молекул PSGL-1, які перебувають на поверхні Т-клітини. Описаний авторами контакт PSGL-1 з композиціями агоністів може спричинити виснаження Т-клітин і/або викликати апоптоз Т-клітин. Ці композиції агоністів, таким чином, є корисними як терапевтичні агенти для контролю над пов'язаними з імунітетом хворобами, такими як запальні хвороби, аутоімунні хвороби, відторгнення трансп-

лантатів, алергічні хвороби та/або Т-клітинний рак. Композиції агоністів також застосовують для очищення від Т-клітин будь-якого біологічного зразка, в якому присутність або активність Т-клітин є небажаною.

Білок PSGL-1

PSGL-1 є адгезійною молекулою поверхні клітин, яка експресується на нейтрофілах, Т- та В-лімфоцитах, NK-клітинах, моноцитах, дендритних клітинах та примітивних людських гематопоетичних прогеніторних клітинах CD34. Завдяки його здатності до взаємодії з селектинами, PSGL-1 опосередковує прокочування лейкоцитів по ендотелію та екстравазацію лейкоцитів у запалені тканини. Диференційовано регулюють PSGL-1-опосередковане зв'язування Т-клітин з Е- та Р-селектином або міграцію. Наприклад, появу епітопу CLA (шкірного лімфоцитарного антигену) вважають викликану на Т-клітинах, які зазнають переходу від наївних клітин до клітин пам'яті. Лише активовані хелперні 1, але не хелперні 2 Т-клітини експресують функціональний PSGL-1 і є здатними до міграції у запалену ділянку шкіри.

PSGL-1 є сіаломуцином, який повинен бути специфічно сіалізований, фукозилований і сульфатований для зв'язування з Р-селектином. Молекула PSGL-1 існує в ізоформах, які характеризуються місцями з різним ступенем глікозилювання та сульфатування на їх N-кінцях. Спочиваючі Т- та В-клітини периферичної крові, лінії лімфоїдних клітин та *in vitro* активовані Т-клітини периферичної крові експресують подібний рівень PSGL-1. Однак лише активовані Т-клітини мають функціональну форму PSGL-1 і активно зв'язуються з Р-селектином. Очевидно, така залежна від активації зв'язувальна активність є результатом диференційної посттрансляційної модифікації, про що свідчить підвищений рівень активності альфа (1,3) фукозилтрансфераз в активованих Т-клітинах. Ізоформи PSGL-1 також виявляють диференційну афінність до L-селектину та Е-селектину. Наприклад, людські Т-клітини, які мають CLA-позитивну ізоформу, можуть прив'язуватися й прокочуватися по Е- та Р-селектину, тоді, як Т-клітини, які експресують PSGL-1 без епітопу CLA лише зв'язуються з Р-селектином. Крім того, зв'язування PSGL-1 з Р-селектином залежить від присутності кінцевого декапептиду, який містить три тирозинові залишки для сульфатування і один треоніновий залишок для глікозилювання.

Білок PSGL-1 одержують рекомбінантними способами і/або шляхом відокремлення природного білка PSGL-1 від біологічного матеріалу. Рекомбінантний білок PSGL-1 може вироблятися у прокаріотних або еукаріотних клітинах, *in vitro* або *in vivo*. Нуклеїнові кислоти, які кодують PSGL-1, застосовують для рекомбінантного вироблення білка (див., наприклад, GenBank™ Accession NM_003006 для прикладу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид PSGL-1). Антитіла, спрямовані на PSGL-1, також є загальновідомими і можуть бути застосовані для очищення антигену (див., наприклад, Herron et al. (2000) Science Jun 2;288(5471): 1653-56; WO 00/25808) і/або застосовані згідно з описаними авторами способами.

PSGL-1 також описано у джерелах, до яких, крім інших, належать Sako et al. (1993) Cell 75:1179; Vachino et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:21966; i Veldman et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:16470.

Для рекомбінантного вироблення PSGL-1 може вимагатися одночасна експресія PSGL-1 та його модифікуючої альфа (1,3) фукозилтрансферази, Fuc-TVII, для функціональної експресії PSGL-1. Додатково або як альтернативний варіант, рекомбінантне вироблення PSGL-1 може супроводжуватися котрансфекцією нуклеїновою кислотою, яка кодує PACE, для видалення пропептиду та/або нуклеїнової кислоти, що кодує тирозин сульфотрансферазу.

Антитіло проти PSGL-1 застосовують для виділення та очищення антигену PSGL-1 від біологічного матеріалу. Будь-який тип клітин, який експресує білок PSGL-1, наприклад, Т-клітини, взяті з організму або лінії Т-клітин, може бути застосований як джерело білка. Відразу після очищення білок застосовують у різних описаних авторами способах. Наприклад, очищений білок PSGL-1 може бути застосований в *in vitro* відборі модулаторів функції PSGL-1 на Т-клітинах або як імуноген для одержання антитіл, спрямованих проти білка.

Антитіла проти PSGL-1

Поліпептиди PSGL-1 (або їх імуногенні фрагменти або аналоги) можуть бути застосовані для вироблення антитіл, які застосовують у способах згідно з винаходом. Як описано вище, поліпептиди PSGL-1 або їх пептидні фрагменти одержують рекомбінантними способами або синтезують, застосовуючи способи синтезу на твердій фазі. Рекомбінантні поліпептиди PSGL-1 або їх пептидні фрагменти застосовують як імуноген для вироблення антитіл проти PSGL-1. Крім того, антитіло проти PSGL-1, таке як моноклональне антитіло TAB4, застосовують для очищення поліпептиду PSGL-1, наприклад, поліпептиду PSGL-1 в його природній конформації, який потім може бути застосований як імуноген для вироблення додаткових антитіл проти PSGL-1.

Антитіло згідно з винаходом може бути моноклональним, поліклональним або одержаним шляхом інженерії антитілом, яке специфічно зв'язується з поліпептидом PSGL-1. Антитіло, яке "специфічно зв'язується" з конкретним антигеном, наприклад, поліпептидом PSGL-1, значною мірою не розпізнає і не зв'язується з іншими молекулами у зразку. Таким чином, винахід також стосується способів визначення випробуваної сполуки (наприклад, антитіла), що зв'язується з поліпептидом згідно з винаходом, шляхом контакту поліпептиду з випробуваною сполукою та визначення того, чи зв'язується поліпептид з випробуваною сполукою (наприклад, шляхом прямого виявлення зв'язування, виявлення молекули-конкурента, яка розриває зв'язування випробуваної сполуки з поліпептидом, та/або виявлення зв'язування з застосуванням аналізу активності щодо викликання апоптозу).

Взагалі, поліпептиди PSGL-1 можуть зв'язуватися з білком-носієм, таким як KLH, змішуватися з ад'ювантом і вводитися шляхом ін'єкції в організм ссавця-хазяїна. Антитіла, вироблені в організмі

цієї тварини, після цього очищують шляхом афінної хроматографії з пептидним антигеном.

Зокрема, імунізують різних тварин-хазяїв шляхом ін'єкції поліпептиду PSGL-1 або його антигенного фрагмента. Тваринами-хазяями, які зазвичай використовують, є кролі, миші, морські свинки та щури. Різні ад'юванти, які застосовують для підвищення імунологічної реакції, залежать від виду хазяїна, і до них належать ад'ювант Фройнда (повний і неповний), мінеральні гелі, такі як гідроксид алюмінію, поверхнево-активні речовини, такі як лізолецитин, плукоронік-поліолі, поліаніони, пептиди, олійні емульсії, гемоціанін лімфи равлика та динітрофенол. До потенційно корисних людських ад'ювантів належать BCG (бацила Calmette-Guerin) та *Corynebacterium parvum*. Поліклональними антитілами є гетерогенні популяції молекул антитіл, які містяться у сироватці імунізованих тварин.

Таким чином, до антитіл, які охоплюються обсягом винаходу, належать поліклональні антитіла, а також моноклональні антитіла, "олюднені" або химерні антитіла, однокланцюгові антитіла, фрагменти Fab, фрагменти F(ab')₂ та молекули, які одержують, застосовуючи бібліотеку експресії Fab.

Моноклональні антитіла, які є гомогенними популяціями антитіл до конкретного антигену, одержують, застосовуючи вищеписані поліпептиди PSGL-1 та стандартну гібридомну технологію (див., наприклад, 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]).

Зокрема, моноклональні антитіла одержують способом, який забезпечує вироблення молекул антитіла безперервними клітинними лініями у культурі, як описано у публікації Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), та Патенті США №4,376,110; за допомогою В-клітинної гібридомі людини (Kosbor et al., *Immunology Today* 4:72 [1983]; Cole et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026 [1983]) та EBV-гібридами (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96 [1983]). Такі антитіла можуть належати до будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи IgG, IgM, IgE, IgA, IgD та будь-який його підклас. Гібридому, яка виробляє mAb згідно з цим винаходом, культивують *in vitro* або *in vivo*. Здатність до створення високих титрів mAbs *in vivo* робить цей спосіб вироблення особливо корисним.

Відразу після вироблення поліклональні або моноклональні антитіла випробують на специфічне розпізнання PSGL-1 шляхом вестерн-блотингу або імунопреципітації, які здійснюють стандартними способами, наприклад, як описано вище у публікації Ausubel et al. Згідно з винаходом, застосовують антитіла, які специфічно розпізнають і зв'язуються з PSGL-1. Особливо корисними є антитіла проти PSGL-1, які зв'язуються з антигеном PSGL-1 на поверхні Т-клітини, наприклад, CD3+ клітина, і викликають виснаження та/або апоптоз Т-клітин в організмі суб'єкта.

Антитіла застосовують, наприклад, у межах терапевтичного режиму (наприклад, для зниження

або уникнення небажаної імунної реакції, такої як опосередкована Т-клітинами імунна реакція, пов'язана з такими станами, як запальні хвороби, ауто-імунні хвороби, відторгнення трансплантатів, алергічні хвороби та Т-клітинний рак). Антитіла також можуть бути застосовані в аналізі з відбором для вимірювання здатності випробуваної сполуки до зв'язування з PSGL-1.

Крім того, застосовують технології, розроблені для вироблення "химерних антитіл" (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]) шляхом зрощування генів з молекули антитіла миші з відповідною специфічністю до антигену разом з генами з молекули антитіла людини з відповідною біологічною активністю. Химерне антитіло є молекулою, в якій різні частини є взятими з різних видів тварин, наприклад, тих, які мають мінливу ділянку з моноклонального антитіла гризунів та постійну ділянку імуноглобуліну людини.

В альтернативному варіанті технології, описані для вироблення однокланцюгового антитіла (Патенти США №№4,946,778, 4,946,778 та 4,704,692), можуть бути пристосовані для вироблення однокланцюгового антитіла проти поліпептиду PSGL-1 або його фрагмента. Одно кланцюгові антитіла утворюють шляхом зв'язування важко- та легкокланцюгових фрагментів ділянки Fv через амінокислотний місток, в результаті чого одержують однокланцюговий поліпептид.

Фрагменти антитіла, які розпізнають і зв'язуються зі специфічними епітопами, можуть бути вироблені відомими способами. Наприклад, до таких фрагментів, крім інших, належать фрагменти F(ab')₂, які можуть бути одержані шляхом розщеплення пепсином молекули антитіла, та фрагменти Fab, які можуть бути утворені шляхом відновлення дисульфідних містків фрагментів F(ab')₂. В альтернативному варіанті можуть бути побудовані бібліотеки експресії Fab (Huse et al., *Science* 246:1275 [1989]), які дозволяють швидко й легко ідентифікувати моноклональні фрагменти Fab з потрібною специфічністю.

Антитіла олюднують відомими спеціалістами способами. Наприклад, моноклональні антитіла з потрібною специфічністю зв'язування можуть бути олюднені на промисловому рівні (Scotgene, Scotland; Oxford Molecular, Palo Alto, Calif). Повністю людські антитіла, на зразок тих, які експресуються у трансгенних тваринах, також є особливостями винаходу (Green et al., *Nature Genetics* 7:13 [1994]; і патенти США №№5,545,806 та 5,569,825).

Мультимерні сполуки

Мультимерні сполуки, які зв'язуються з багатьма з білків PSGL-1 на поверхні Т-клітини або NK-клітини, застосовують для викликання апоптозу у клітині. Мультимерна сполука містить принаймні два поліпептидні ланцюги. Кожен з поліпептидних ланцюгів містить (i) домен зв'язування, який зв'язується з PSGL-1, та (ii) гетерологічну амінокислотну послідовність.

Взагалі, мультимерна сполука зв'язується з принаймні двома різними білками PSGL-1 на поверхні даної клітини. Однак може бути створена

мульतिмерна сполука, яка має 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 або більше окремих доменів зв'язування PSGL-1, що змушує мультимерну сполуку зв'язуватися з 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 або більшою кількістю різних білків PSGL-1 на поверхні даної клітини.

Домен зв'язування може містити будь-яку амінокислотну послідовність (або будь-яку амінокислотну послідовність з модифікацією, наприклад, глікозилюванням та/або сульфатуванням), який зв'язується з PSGL-1. Домен зв'язування може відповідати природній або неприродній амінокислотній послідовності. Наприклад, домен зв'язування може містити домен зв'язування PSGL-1 селектину (наприклад, Р-селектину, Е-селектину або L-селектину). Поліпептид, який містить домен зв'язування PSGL-1 селектину необов'язково може включати: (i) позаклітинний домен селектину (наприклад, Р-селектину, Е-селектину або L-селектину); (ii) кальцій-залежний лектин-зв'язувальний домен селектину (наприклад, Р-селектину, Е-селектину або L-селектину); або (iii) фрагмент позаклітинного домену селектину (наприклад, Р-селектину, Е-селектину або L-селектину), який опосередковує зв'язування з PSGL-1. Додатково до цих природних амінокислотних послідовностей, можливими є одна або кілька амінокислотних змін у природному домені зв'язування PSGL-1, що в результаті дає неприродну послідовність, яка зберігає функцію PSGL-1-зв'язування. Наприклад, поліпептид може містити амінокислотну послідовність, яка зв'язується з PSGL-1 і є принаймні на 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичним будь-якому з доменів, до яких належать: (i) позаклітинний домен селектину (наприклад, Р-селектину, Е-селектину або L-селектину); (ii) кальцій-залежний лектин-зв'язувальний домен селектину (наприклад, Р-селектину, Е-селектину або L-селектину); або (iii) фрагмент позаклітинного домену селектину (наприклад, Р-селектину, Е-селектину або L-селектину), який опосередковує зв'язування з PSGL-1. Для внесення змін у нуклеїновокислотній послідовності, яка кодує домен зв'язування PSGL-1, застосовують стандартні способи мутагенезу у молекулярній біології. Модифіковані домени зв'язування в такому разі піддають випробуванню на здатність до зв'язування з PSGL-1, наприклад, іммобілізованим PSGL-1 або PSGL-1 на поверхні клітини. Домен зв'язування також може містити домен зв'язування PSGL-1 антитіла проти PSGL-1 або поліпептид, вибраний з бібліотеки фагів, або амінокислотну послідовність, яка зв'язується з PSGL-1 і є принаймні на 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичною доменів зв'язування PSGL-1 антитіла проти PSGL-1 або поліпептиду, вибраного з бібліотеки фагів.

Домен зв'язування PSGL-1 може містити амінокислотну послідовність, яка відповідає PSGL-1-зв'язувальному фрагментові Р-селектину. Прикладом поліпептидного ланцюга (описаної авторами мультимерної сполуки), який містить таку амінокислотну послідовність, є рекомбінантна химера мишачий Р-селектин/Fc (від R&D Systems, Minneapolis, MN), що містить такі компоненти: (i)

CD33 сигнальний пептид (Met1-Ala16); (ii) мишачий Р-селектин (Trp42-Ala709 позаклітинного домену); (iii) IEGRMD (SEQ ID NO:1); та (iv) людський IgG1 (Pro100-Lys330). Другим прикладом поліпептидного ланцюга, який містить таку амінокислотну послідовність, є рекомбінантна химера людський Р-селектин/Fc (від R&D Systems, Minneapolis, MN), що містить такі компоненти: (i) людський Р-селектин (Met1-Ala771, позаклітинний домен); (ii) IEGRMD (SEQ ID NO:1); і (iii) людський IgG1 (Pro100-Lys330).

Домен зв'язування PSGL-1 може містити амінокислотну послідовність, яка відповідає PSGL-1-зв'язувальному фрагментові Е-селектину. Прикладом поліпептидного ланцюга (описаної авторами мультимерної сполуки), що містить таку амінокислотну послідовність, є рекомбінантна химера мишачий Е-селектин/Fc (від R&D Systems, Minneapolis, MN), що містить такі компоненти: (i) мишачий Е-селектин (Met1-Pro557, позаклітинний домен); (ii) IEGRMD (SEQ ID NO:1); (iii) Human IgG1 (Pro100-Lys330); і (iv) НННННН (SEQ ID NO:2). Другим прикладом поліпептидного ланцюга, який містить таку амінокислотну послідовність, є рекомбінантна химера людський Е-селектин/Fc (від R&D Systems, Minneapolis, MN), що містить такі компоненти: (i) людський Е-селектин (Met1-Pro556, позаклітинний домен); (ii) IEGRMD (SEQ ID NO:2); (iii) людський IgG1 (Pro100-Lys330); і (iv) НННННН (SEQ ID NO:2).

Домен зв'язування PSGL-1 може містити амінокислотну послідовність, яка відповідає PSGL-1-зв'язувальному фрагментові L-селектину. Прикладом поліпептидного ланцюга (описаної авторами мультимерної сполуки), що містить таку амінокислотну послідовність, є рекомбінантна химера L-селектин/Fc (від R&D Systems, Minneapolis, MN), що містить такі компоненти: (i) мишачий L-селектин (Met1-Asn332, позаклітинний домен); (ii) IEGRMD (SEQ ID NO:1); (iii) Human IgG1 (Pro100-Lys330); і (iv) НННННН (SEQ ID NO:2). Другим прикладом поліпептидного ланцюга, який містить таку амінокислотну послідовність, є рекомбінантна химера L-селектин/Fc (від R&D Systems, Minneapolis, MN), що містить такі компоненти: (i) людський L-селектин (Met1-Asn332, позаклітинний домен); (ii) IEGRMD (SEQ ID NO:1); (iii) людський IgG1 (Pro100-Lys330); і (iv) НННННН (SEQ ID NO:2).

Мультимерна сполука може бути утворена як гомомультимерна сполука або гетеромультимерна сполука. Гомомультимерна сполука містить лише поліпептидні ланцюги, які мають ідентичні домени зв'язування PSGL-1. Наприклад, гомомультимерна сполука може містити поліпептидні ланцюги, які містять ідентичні PSGL-1-зв'язувальні фрагменти Р-селектину. Гетеромультимерна сполука містить поліпептидні ланцюги, які мають різні домени зв'язування PSGL-1. Наприклад, гетеромультимерна сполука може містити перший поліпептидний ланцюг, який містить PSGL-1-зв'язувальний фрагмент Р-селектину та другий поліпептидний ланцюг, який містить PSGL-1-зв'язувальний фрагмент Е-селектину.

Гетерологічна амінокислотна послідовність може бути будь-якою амінокислотною послідовністю

тю. Однак амінокислотна послідовність описаних авторами поліпептидних ланцюгів не відповідає послідовності природного білка. Гетерологічна амінокислотна послідовність містить одну або кілька амінокислот, які дозволяють зв'язування поліпептидних ланцюгів. Наприклад, одна або кілька амінокислот можуть ковалентно зв'язувати, наприклад, через дисульфідний зв'язок, поліпептидні ланцюги. Одним прикладом гетерологічної послідовності є постійна ділянка важкого ланцюга імуноглобуліну. Дисульфідне зв'язування між Fc ділянками двох поліпептидних ланцюгів в результаті може забезпечувати утворення димерної сполуки.

Крім участі у зв'язуванні поліпептидних ланцюгів, гетерологічна амінокислотна послідовність також може містити ділянку зшивання, наприклад, ділянку зв'язування з рецептором поверхні клітин. В результаті зв'язування агента з такою ділянкою зв'язування може виникати зшивання поліпептидних ланцюгів та білків PSGL-1 поверхні клітин, з якими вони зв'язуються. Постійна ділянка важкого ланцюга імуноглобуліну містить ділянку зв'язування Fc рецептора. Крос-лінкером може бути, наприклад, антитіло (наприклад, антитіло проти Fc), яке специфічно зв'язується з ділянкою зшивання гетерологічної амінокислотної послідовності.

Аналізи з відбором сполук, які модулюють функцію PSGL-1

Винахід також охоплює способи розпізнання сполук, які взаємодіють з PSGL-1 (або доменом PSGL-1), включаючи, крім інших, сполуки, які викликають виснаження Т-клітин та/або апоптоз Т-клітин після зв'язування з PSGL-1. Також він охоплює сполуки, які модулюють взаємодію PSGL-1 з трансмембранними, позаклітинними або внутрішньоклітинними білками, які регулюють активність PSGL-1, та сполуками, які модулюють активність PSGL-1.

До сполук, які можуть бути відібрані згідно з винаходом, належать, крім інших, пептиди, антитіла та їх фрагменти та інші органічні сполуки, які зв'язуються з PSGL-1 і модулюють біологічну функцію, опосередковану PSGL-1, як описано авторами.

До таких сполук можуть належати, крім інших, пептиди, такі як, наприклад, розчинні пептиди, включаючи, крім інших, ті, які належать до бібліотек випадкових пептидів; (Lam et al., *Nature* 354:82 [1991]; Houghten et al., *Nature* 354:84 [1991]), і комбінаторної одержаної хімічним шляхом молекулярної бібліотеки, яка складається з амінокислот D- та/або L-конфігурації, фосфопептидів (включаючи, крім інших, ті, які належать до бібліотек випадково або частково дегенерованих, спрямованих фосфопептидів; Songyang et al., *Cell* 72:767 [1993]), антитіла (включаючи, крім інших, поліклональні, моноклональні, олюднені, антиідіотипічні, химерні або одноланцюгові антитіла і бібліотеку експресії Fab-, F(ab')₂- та Fab-фрагментів та їх фрагменти, які зв'язуються з епітопами) і малі органічні або неорганічні молекули.

До інших сполук, які можуть бути відібрані згідно з винаходом, належать, крім інших, малі органічні молекули, які впливають на активність білка PSGL-1, як описано авторами.

Технології комп'ютерного моделювання та пошуку дозволяють ідентифікувати сполуки або поліпшити вже ідентифіковані сполуки, які можуть модулювати експресію або активність PSGL-1. Після ідентифікації такої сполуки або композиції ідентифікують активні місця або ділянки. Такі активні місця зазвичай є місцями зв'язування для природного модулятора активності. Активне місце ідентифікують, застосовуючи відомі спеціалістам способи, включаючи, наприклад, визначення з-поміж амінокислотних послідовностей пептидів, нуклеотидних послідовностей нуклеїнових кислот, або на основі дослідження комплексів відповідної сполуки або композиції з її природним лігандом. В останньому разі застосовують хімічні або рентгеновські кристалографічні способи для пошуку активного місця шляхом визначення місцезнаходження на факторі модулятора (або ліганду).

Хоча вищеописане стосувалося проектування та вироблення сполук, які можуть змінювати зв'язування, також є можливим відбір серед бібліотек відомих сполук, включаючи природні продукти або синтетичні хімічні речовини та біологічно активні матеріали, включаючи білки, на наявність сполук, які зв'язуються з білком PSGL-1 і спричиняють виснаження Т-клітин і/або викликають апоптоз Т-клітин.

In vitro системи можуть бути призначені для ідентифікації сполук, здатних взаємодіяти з PSGL-1 (або доменом PSGL-1). Ідентифіковані сполуки можуть бути корисними, наприклад, для модулювання активності Т-клітин, як описано авторами, і, таким чином, можуть бути корисними для лікування станів, пов'язаних з надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією або надмірною або небажаною проліферацією Т-клітин, такою як запалення, аутоімунність, відторгнення трансплантатів, алергічний стан або Т-клітинний рак.

Принцип аналізів, застосованих для ідентифікації сполук, які зв'язуються з PSGL-1, включає приготування реакційної суміші PSGL-1 (або його домену) та випробуваної сполуки в умовах і протягом часу, які є достатніми для взаємодії і зв'язування двох компонентів, таким чином, утворюючи комплекс, який може бути видалений і/або виявлений у реакційній суміші. Види PSGL-1 можуть бути різними, залежно від мети аналізу з відбором. У деяких ситуаціях перевагу віддають застосуванню пептиду, який відповідає доменові PSGL-1, злитому з гетерологічним білком або поліпептидом, що дозволяє скористатися перевагами в аналітичній системі (наприклад, міченням, виділенням утвореного в результаті комплексу і т. ін.).

Аналізи з відбором здійснюють різними шляхами. Наприклад, один спосіб здійснення такого аналізу включає заякорювання білка PSGL-1, поліпептиду, пептиду або злитого білка або випробуваної речовини на твердій фазі і виявлення комплексів PSGL-/ випробуваної сполуки, заякорених на твердій фазі наприкінці реакції. В одному варіанті втілення такого способу реагент PSGL-1 може бути заякорений на твердій поверхні, і випробувану сполуку, яка не є заякороною, прямо або непрямо мітять.

На практиці зручним є застосування мікротитрувальних планшетів як твердої фази. Заякорений компонент іммобілізують шляхом нековалентного або ковалентного зв'язування. Нековалентне зв'язування здійснюють шляхом простого вкривання твердої поверхні розчином білка та висушування. В альтернативному варіанті застосовують іммобілізоване антитіло, краще - моноклональне антитіло, специфічне до білка, який має бути іммобілізований, для заякорювання білка на твердій поверхні. Поверхні підготовляють заздалегідь і зберігають.

Для здійснення аналізу неіммобілізований компонент додають до вкритої поверхні, що містить заякорений компонент. Після завершення реакції непрореаговані компоненти видаляють (наприклад, шляхом промивання) в умовах, за яких будь-які утворені комплекси залишаються іммобілізованими на твердій поверхні. Виявлення комплексів, заякорених на твердій поверхні, здійснюють різними способами. Якщо попередньо не іммобілізований компонент є попередньо міченим, виявлення мітки, іммобілізованої на поверхні, означає, що утворилися комплекси. Якщо попередньо не іммобілізований компонент не є попередньо міченим, застосовують непряму мітку для виявлення комплексів, заякорених на поверхні; наприклад, застосовуючи мічене антитіло, специфічне до попередньо не іммобілізованого компонента (антитіло, в свою чергу, може бути прямо мічене або непрямо мічене міченим антитілом проти Ig).

В альтернативному варіанті реакцію здійснюють у рідкій фазі, продукти реакції відокремлюють від непрореагованих компонентів і виявляють комплекси; наприклад, застосовуючи іммобілізоване антитіло, специфічне до білка PSGL-1, поліпептиду, пептиду або злитого білка або випробуваної сполуки для заякорювання будь-яких комплексів, утворених у розчині, та мічене антитіло, специфічне до іншого компонента можливого комплексу, для виявлення заякорених комплексів.

В альтернативному варіанті застосовують аналізи на основі клітин для ідентифікації сполук, які взаємодіють з PSGL-1. Для цього застосовують лінії клітин, які експресують PSGL-1, або лінії клітин, піддані генній інженерії для експресії PSGL-1. Аналізи на основі клітин є особливо корисними для оцінки функціонального впливу сполуки, ідентифікованої шляхом описаного авторами відбору. Наприклад, відразу після ідентифікації сполуки на основі її здатності до зв'язування з білком PSGL-1 сполуку випробують на її здатність, наприклад, до викликання апоптозу Т-клітин *in vitro* або *in vivo* або виснаження Т-клітин *in vitro* або *in vivo*.

Фармацевтичні композиції

Якщо метою даного винаходу є зміна імунної реакції в організмі суб'єкта, фармацевтична композиція, яка містить, наприклад, антитіла, мультимерні сполуки, малі молекули або інші сполуки, які специфічно зв'язуються з поліпептидами PSGL-1, також є особливістю винаходу. В оптимальному прикладі сполука функціонує як агоніст PSGL-1.

Фармацевтичні композиції для застосування згідно з даним винаходом рецептують традицій-

ним шляхом, застосовуючи один або кілька фізіологічно прийнятних носіїв або наповнювачів. Таким чином, сполуки та їх фізіологічно прийнятні солі та сольвати рецептують для введення різними шляхами.

Сполуки рецептують для парентерального введення шляхом ін'єкції, наприклад, шляхом болюсної ін'єкції або безперервного вливання. Композиції для ін'єкцій можуть існувати у формі дозованих одиниць, наприклад, в ампулах або багатодозових вмістищах, з додаванням консерванта. Композиції можуть бути у формі суспензій, розчинів або емульсій в олійних або водних носіях і можуть містити агенти, які застосовують при рецептуванні, такі як суспендуючі агенти, стабілізатори та/або диспергатори. В альтернативному варіанті активний інгредієнт може бути у формі порошку для змішування перед застосуванням з відповідним носієм, наприклад, стерильною водою без пірогену.

Способи контролювання опосередкованої Т-клітинами імунної реакції та виснаження популяцій Т-клітин

Сполуки на зразок тих, які є детально описаними у зв'язку з відбором, можуть бути корисними, наприклад, при модулюванні біологічної функції, опосередкованої поліпептидом PSGL-1, та/або для лікування порушень, пов'язаних з надмірною або небажаною імунною реакцією, наприклад, опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією. До цих сполук належать, крім інших, пептиди, антитіла та їх фрагменти, а також інші органічні сполуки, які зв'язуються з PSGL-1 на поверхні Т-клітин і викликають шлях трансдукції сигналу, який в результаті призводить до смерті Т-клітини. Способи згідно з винаходом необов'язково включають додавання агента зшивання, який викликає зшивання PSGL-1 на поверхні клітини. Описані авторами сполуки можуть застосовуватись у будь-якому разі, коли вимагається виснаження або усунення активності Т-клітини. До станів, для лікування яких особливо придатними є сполуки згідно з винаходом, належать запальні хвороби, аутоімунні хвороби, відторгнення трансплантатів, алергічні хвороби та Т-клітинний рак.

Прикладами станів, які піддають лікуванню з застосуванням описаних авторами сполук проти PSGL-1, належать, крім інших, цукровий діабет, артрит (включаючи ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, остеоартрит та псоріатичний артрит; розсіяний склероз, енцефаломієліт, злоякісна міастенія, системний еритематозний вовчак, аутоімунний тиреоїдит, дерматит (включаючи atopічний дерматит та екзематозний дерматит), псоріаз, синдром Шегрена, хвороба Крона, афтозна виразка, запалення райдужної оболонки ока, кон'юнктивіт, кератокон'юнктивіт, діабет I типу, запальні хвороби кишечника, виразковий коліт, астма, алергічна астма, шкірний еритематозний вовчак, склеродерма, вагініт, проктит, медикаментозні висипи, лепрозні зворотні реакції, erythema nodosum leprosum, аутоімунний увеїт, алергічний енцефаломієліт, гостра некротизуюча геморагічна енцефалопатія, ідіопатична двостороння прогресуюча нейросенсорна втрата слуху, апластична

анемія, справжня еритроцитарна анемія, ідіопатична тромбоцитопенія, поліхондрит, гранулематоз Вегенера, хронічний активний гепатит, синдром Стівенса-Джонсона, ідіопатичні трофічні афти, плоский лишай, базедова хвороба, саркоїдоз, первинний біліарний цироз печінки, задній увеїт, інтерстиціальний фіброз легенів, реакція "трансплантат проти хазяїна", випадки трансплантації (включаючи трансплантацію з застосуванням алогенних або ксеногенних тканин), такі як трансплантація кісткового мозку, трансплантація печінки або трансплантація будь-якого органа або тканини, різні види алергії, такі як atopічна алергія, СНІД та Т-клітинні новоутворення, такі як лейкої та/або лімфоми.

Способи згідно з винаходом застосовують для виведення Т-клітин з популяції клітин, *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, біологічний зразок, взятий з організму суб'єкта, може бути звільнений від Т-клітин *in vitro* шляхом контакту зразка з описаною авторами сполукою проти PSGL-1, необов'язково разом з агентом зшивання. Цей спосіб може бути корисним, якщо зважати, наприклад, на збільшення клітин, які не є Т-клітинами, у популяції клітин, а також шляхом зниження або усунення активності Т-клітин у популяції клітин.

Далі представлено приклади практичного втілення винаходу. Вони не повинні тлумачитись як такі, що якимось чином обмежують обсяг винаходу.

Приклади

Приклад 1: Одержання моноклонального антитіла проти білка, який викликає апоптоз Т-клітин ("TAIP")

TAIP-специфічне моноклональне антитіло одержували шляхом застосування загальновідомих способів злиття клітин за Колером та Мільштайном (Kohler and Milstein ((1976) *European Journal of Immunology* 6:511-519)) для одержання гібридом, яка секретує потрібні антитіла. Клітини, які виробляють антитіло, взяті у хом'яка, якому шляхом ін'єкції вводили активовані конканаваліном А (Con A) Т-клітини Balb/c селезінки, зливали з лінією клітин мієломи для утворення антитіла, яке секретує гібридому. Дві популяції клітин зливали з поліетиленгліколем, і одержані в результаті клітини, які виробляють антитіло, клонували і розмножували стандартними способами з застосуванням тканинної культури. Одна гібридома, вироблена згідно з цими способами, секретувала моноклональне антитіло під назвою TAB4, яке було здатне викликати апоптоз Т-клітин *in vitro* і вищажувати Т-клітини *in vivo*. Білок, який розпізнавався антитілом TAB4, визначали як білок, який викликає апоптоз Т-клітин (TAIP).

Мишей C57BL/6J (B6) та BALB/c придбавали у Jackson lab (Bar Harbor, ME). Сирійських хом'яків придбавали у Animal Core Facility, Медичний коледж національного університету Тайваню (National Taiwan University Medical College).

Концентрований супернатант культури гібридом TAB4 центрифугували у кількості 20000 x г протягом 10 хвилин і супернатант розводили у співвідношенні 1:1 зв'язувальним буфером (0,1M

ацетату натрію, pH5,0). Колонку з G-білком (об'єм шару приблизно 1мл) тричі промивали 3-5мл зв'язувального буфера. Очищений супернатант культури подавали на колонку з G-білком і проточну рідину збирали і знову подавали на колонку. Колонку промивали 6-10мл зв'язувального буфера і зв'язане антитіло елюювали з колонки за допомогою 5мл елююючого буфера (0,1M гліцину-HCl, pH2,8). Кожна фракція містила 1мл елююваного антитіла, і елюювану фракцію доводили до нейтрального рівня pH шляхом змішування кожного 1мл фракції з 50 мікролітрами 1M Tris-HCl, pH7,5. Фракції, які містили антитіло, об'єднували і тричі діалізували 2 літрами PBS, pH7,4 по три години на кожен діаліз. Концентрацію білка у зразках антитіла визначали за допомогою процедури, описаної Бредфордом (Bradford), застосовуючи аналіз білка Bio-Rad (BIO-RAD, Hercules, CA).

Приклад 2: Одержання суспензії клітин селезінки мишей і активація та збагачення Т-клітин

Селезінку мишей занурювали у 8мл збалансованого соляного розчину Хенка (HBSS), злегка подрібнювали стерильним покривним склом, переносили у 15мл центрифугувальну пробірку (Costar) і центрифугували у кількості 200 x г протягом 5 хвилин. Супернатант зливали і осад з клітинами ресуспендували у залишковому буфері шляхом легкого обстукування стінок. Забруднюючі еритроцити (RBC) піддавали лізисові шляхом додавання 1мл лізисного буфера для RBC (0,6M NH₄Cl, 0,17M Tris-основи, pH7,65), після чого здійснювали 2-хвилинну інкубацію при кімнатній температурі і швидке гасіння 9мл HBSS. Клітини осаджували у кількості 200 x г протягом 5 хвилин, двічі промивали і ресуспендували у середовищі RPMI. Концентрацію і життєздатність клітин у суміші визначали за допомогою гемоцитометра (Cambridge Scientific Inc.) та виключення трипанового синього.

Клітини селезінки доводили до кінцевої концентрації 3×10^6 /мл за допомогою середовища RPMI і додавали конканавалін А до кінцевої концентрації 2 мікрограма/мл для активації Т-клітин. Суспензію клітин переносили до 6-лункового планшета (5мл/лунку) або 10-сантиметрові чашки для культивування (10мл/чашку) і інкубували при 37°C, 5% CO₂, протягом 48 годин перед збиранням. Активовані клітини селезінки, включаючи активовані Т-клітини, ресуспендували у 5мл HBSS і обережно переносили на 5-мілілітровий шар підкладки з 55% розчину Перколл у центрифугувальній пробірці. При цьому намагалися не порушити відокремлені шари. Клітини безперервно центрифугували у кількості 1900 x г протягом 13 хвилин при 25°C. Збагачені Т-клітини збирали з контактної поверхні між двома шарами, двічі промивали HBSS, і після цього вони були готовими до експериментів.

Приклад 3: Апоптоз активованих Т-клітин

Активовані Т-клітини (див. Приклад 2) ресуспендували до кінцевої концентрації 5×10^3 клітин/мл у середовищі RPMI, яке містило 5нг/мл IL-2, і обробляли контрольним Ig, TAB4 або анти-CD3 згідно з умовами, показаними у Таблиці 1.

Таблиця 1

Експериментальні групи	Обробка *
Негативний контроль	3мкг/мл Ig хом'яка 5нг/мл IL-2 3мкг/мл крос-лінкерного антитіла (Ig проти хом'яка)
TAB4	3мкг/мл TAB4 mAb хом'яка 5нг/мл IL-2 3мкг/мл крос-лінкерного антитіла (Ig проти хом'яка)
Позитивний контроль	1мкг/мл анти-CD3 mAb 5нг/мл IL-2 1мкг/мл крос-лінкер антитіла (Ig проти миші)

*: Кінцева концентрація зазначених реагентів у середовищі.

Після періоду інкубації, який триває 18-24 годин, визначали ступінь апоптозу в кожній культурі, застосовуючи аналіз апоптозу 7-AAD. Оброблені клітини переносили у пробірки FACS (Falcon), двічі промивали крижаним розчином FACS (1% ембріональної телячої сироватки, 0,05% азида натрію у PBS), осаджували у кількості 200 х г при 4°C. Клітини ресуспендували у крижаному розчині FACS до кінцевої концентрації 1-2×10⁶ клітин/мл. Для забарвлення 0,1мл ресуспендованих клітин змішували з 7-AAD до кінцевої концентрації 2мкг/мл, а потім інкубували при 4°C у темряві протягом 20 хвилин. І нарешті, забарвлені клітини двічі промивали крижаним розчином FACS, ресуспендували у 0,5мл розчину FACS і аналізували шляхом проточної цитометрії на BD LSR (Beckton Dickison).

Фіг.1 показує результати репрезентативного експерименту з змінами у часі, в якому досліджували, коли активовані Т-клітини набувають чутливості до опосередкованих TAB4 (анти-TAIP) апоптотичних сигналів. Спленоцити мишей активували Con-A і тримали у середовищі, яке містило IL-2. Активовані Т-клітини збирали, ресуспендували, і перевіряли на імунність моноклональним антитілом TAB4 або контрольним IgG хом'яка у присутності антитіла проти IgG хом'яка як крос-лінкера. Здатність зшивання TAIP до викликання низького рівня (6,5%) апоптотичної смерті клітин виявлялася у перший день. Однак ступінь викликаного TAB4 апоптозу збільшувався з 17% на 2-й день, досягав піку 52% на 4-й день і знижувався до 44% на 6-й день. Контрольний IgG хом'яка не викликав специфічної апоптотичної смерті Т-клітин, порівняно з культурами, які отримували лише IL-2. Ahth-CD3 (як позитивний контроль) викликав апоптоз у 38% Т-клітин через 48 годин активації (дані не показано).

Приклад 4: Експресія антигену TAIP у різних тканинах

Клітини двічі промивали крижаним розчином FACS (1% ембріональної телячої сироватки, 0,05% азида натрію у PBS) і центрифугували у кількості

200 х г при 4°C у пробірці FACS (Falcon). Клітини ресуспендували у крижаному розчині FACS до кінцевої концентрації 1 х 10⁶ клітин/мл і аліквоту 0,1мл ресуспендованих клітин у пробірці FACS (Falcon) застосовували для кожного аналізу. Для поверхневого забарвлення до клітин додавали моноклональне антитіло TAB4 або контрольний Ig хом'яка у кінцевій концентрації 2мкг/мл і суміші інкубували при 4°C протягом 30 хвилин у темряві. Клітини промивали один раз крижаним FACS, а потім забарвлювали: (1) для клітин селезінки - цихром-кон'югованим антитілом проти CD3 (2мкг/мл), FITC-кон'югованим Ig проти хом'яка та PE-кон'югованим антитілом проти CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3 (2мкг/мл) у 100мкл крижаного розчину FACS; і (2) для клітин виличкової залози -FITC-кон'югованим Ig проти хом'яка, PE-кон'югованим анти-CD8 та цихром-кон'югованим анти-CD4 антитілами (2мкг/мл) у 100 мкл крижаного розчину FACS. Реакцію здійснювали при 4°C протягом 30 хвилин у темряві. І нарешті, забарвлені клітини двічі промивали крижаним розчином FACS, ресуспендували в 1мл розчину FACS і піддавали аналізу шляхом проточної цитометрії на BD LSR (Beckton Dickison).

Фіг.3 та 4 демонструють через аналіз FACS розподіл антигену TAIP на різних субпопуляціях спленоцитів та тимокитів. Як показано на Фіг.3, клітини CD19⁺ В експресували низьку, але таку, що піддається виявленню, кількість білків TAIP на поверхні. Значну вищу кількість білків TAIP виявляли на CD3⁺ Т-клітинах та фракції NK-клітин. Більшість Т-клітин виличкової залози CD4⁺, CD8⁺ та CD4⁺CD8⁺ експресували значну кількість білків TAIP. Натомість, білки TAIP експресувалися лише на невеликій популяції Т-клітин CD4⁺CD8⁺ виличкової залози (Фіг.4).

Тканини з мишей B6 та BALB/c, включаючи головний мозок, виличкову залозу, серце, легені, печінку, шлунок, нирки, селезінку та шкіру, збирали, фіксували у 10% формальдегіді до наступного дня при кімнатній температурі і включали у парафінові блоки. Зрізи тканин по 4 мкм завтовшки, брали з парафінових блоків за допомогою мікротому Leica RM2135, поширювали у 45°C воді і клали на предметне скло. Скельця висушували при 37°C, і після цього вони були готові до наступних експериментів.

Скельця, які містили зрізи тканини у парафіні, депарафінізували і висушували серіями ксилол-100% етанол згідно зі стандартним протоколом і, нарешті, тримали у 100% етанолі. Зрізи піддавали регідратації шляхом серійних інкубацій в 100% етанолі-90% етанолі-85% етанолі-70% етанолі-PBS згідно зі стандартним протоколом до кінцевого розчину у PBS. Усі представлені нижче реакції здійснювали у зволоженій камері. Неспецифічне зв'язування блокували шляхом інкубації зрізів тканин у блокуючому буфері (1% нормальної сироватки кози) протягом 1 години при кімнатній температурі (або 4°C до наступного дня). Блокуючий буфер видаляли і до зрізів додавали TAB4 або нормальний Ig хом'яка (розведення 1:200) і інкубацію продовжували ще протягом години при кімнат-

ній температурі (або 4°C до наступного дня). Зрізи двічі промивали у PBS, кожен по 5 хвилин, для видалення первинного антитіла, піддавали реакції з розведеним 1:250 кон'югованим з лужною фосфатазою Ig кози проти хом'яка і інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Зрізи знову двічі промивали PBS, по 5 хвилин кожен, для видалення кон'югату антитіло-фермент і кольорову реакцію проявляли субстратним розчином BCIP/NBT при кімнатній температурі протягом 30 хвилин у темряві. Зрізи знову промивали PBS для видалення надлишкового ферментного субстрату, дегідрували серіями PBS-етанол-ксилол і закріплювали на склі для мікроскопії.

Результати показували, що експресія білків TAIP виявлялася лише у тканинах, які походили від кісткового мозку, але не на решті випробуваних тканин.

Приклад 5: Біотинілування поверхні клітини та імунопреципітація антигену TAIP

Клітини 5×10^7 RL δ 1 або NIH-3T3 піддавали біотинілуванню поверхні в 1мл PBS, який містив 0,5мг/мл сульфо-NHS-біотину (Pierce) протягом 30 хвилин на льоду. Реакцію припиняли шляхом інкубації клітин з 0,5мл модифікованого Дульбекко середовища Ігла (Life Technologies, Inc.) протягом 10 хвилин на льоду. Клітини один раз промивали 1мл модифікованого Дульбекко середовища Ігла і двічі - 1мл фосфатно-буферного розсолу.

Мічені клітини піддавали лізисові при густині $5,0 \times 10^7$ клітин/мл у холодному лізисному буфері (1% Triton X-100, 20mM Tris-HCl, pH8,0, 160mM NaCl, 1mM CaCl₂), який містив повний коктейль інгібітора протеази (Roche) протягом 15 хвилин і нерозчинний матеріал осаджували у кількості 10000 x г протягом 10 хвилин; ці та всі наступні етапи здійснювали при 4°C. Для імунопреципітації лізат попередньо інкубували протягом 30 хвилин з 50мкл G-білка-сефарози (Amersham Pharmacia Biotech) для видалення білків, які неспецифічно зв'язуються. Кульки осаджували і аліквоти супернатанту (які зазвичай відповідають $5,0 \times 10^7$ клітин) інкубували з 20мкл G-білка-сефарози з попереднім введенням 10мкг mAb TAB4 або IgG з нормальної сироватки хом'яка. Після інкубації протягом 4год. при 4°C смолу промивали чотири рази промивальним буфером (0,05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH8,5, 400mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1мг/мл яєчного альбуміну), двічі - подібним промивальним буфером, який містив 250mM замість 400mM NaCl. Білки, специфічно зв'язані з TAB4, елюювали з 50мкл 1xSDS буфера для зразка. Елюйовані білки відокремлювали за допомогою 8% SDS-PAGE і переносили на нітроцелюлозну мембрану (Millipore). Фільтри піддавали аналізу на біотиніловані білки кон'югованим з пероксидазою авідином (PharMingen) і проявляли хемілюмінесцентним реагентом (NEN™ Life Science Products).

Як показано на Фіг.2, біотинілований поверхневий білок з молекулярною масою приблизно 120кДа ідентифікували за допомогою TAB4 у клі-

тинах RL δ 1 (клітини TAIP⁺ T-), але не у клітинах 3T3 (клітини TAIP⁻). Натомість G-білок-сефароза, вкрита нормальною сироваткою хом'яка, не може відшукувати цей 120-кДа білок. Ці результати свідчать, що цей 120-кДа білок є антигеном, розпізнаним моноклональним антитілом TAB4 на поверхні Т-клітин.

Приклад 6: Виснаження Т-клітин *in vivo*

Для дослідження впливу TAB4 на популяцію Т-клітин та інших клітин *in vivo* мишам шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції вводили 300мкг TAB4 контрольного Ig хом'яка і на 4-й день спленоцити, тимоцити та мононуклеари периферичної крові збирали для підрахунку загальної кількості клітин і для аналізів маркерів поверхні клітин за допомогою FACS.

Для аналізів FACS клітини фіксували 2% параформальдегідом при 4°C протягом 20 хвилин, двічі промивали і ресуспендували у крижаному розчині FACS до кінцевої концентрації 1×10^7 клітин/мл. Для кожного аналізу застосовували аліквоту 100мкл ресуспендованих клітин у пробірці FACS (Falcon). До клітин додавали TAB4 або контрольний Ig хом'яка у кінцевій концентрації 2мкг/мл і суміші інкубували при 4°C протягом 30 хвилин у темряві. Клітини промивали один раз крижаним FACS і піддавали реакції: (1) для клітин селезінки - з цихром-кон'югованим антитілом проти CD3 (2мкг/мл), FITC-кон'югованим Ig проти хом'яка та PE-кон'югованим антитілом проти CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3 (2мкг/мл) у 100мкл крижаного розчину FACS; і (2) для клітин вилочкової залози - з FITC-кон'югованим Ig проти хом'яка, PE-кон'югованим анти-CD8 та цихром-кон'югованим анти-CD4 антитілами (2мкг/мл) у 100мкл крижаного розчину FACS. Реакцію здійснювали при 4°C протягом 30 хвилин у темряві. І нарешті, забарвлені клітини двічі промивали крижаним розчином FACS, ресуспендували у 1000мкл розчину FACS і піддавали аналізу шляхом проточної цитометрії на BD LSR (Beckton Dickison).

Через чотири дні після ін'єкції відсоток CD3⁺ Т-клітин у лейкоцитах периферичної крові (PBL) знизився з 36,7% у контрольних мишей до 4,1% у мишей, які отримували TAB4 (Таблиця 2). Обробка TAB4 викликала невелике зниження загальної кількості спленоцитів. Однак у мишей, які отримували TAB4, спостерігали 62% зниження у кількості CD3⁺ Т-клітин, 50% зниження у кількості NK-клітин і невелике підвищення загальної кількості CD19⁺ В клітин. Загальна кількість тимоцитів, взятих у мишей, які отримували TAB4, становила лише 48% від рівня, який спостерігали у контрольних тварин (зниження на 52%). Крім того, за винятком CD4⁺ Т-клітин, всі інші CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ та CD4⁺CD8⁻ Т-клітини знижувалися, причому субпопуляція CD4⁺CD8⁺ зазнала найбільш серйозного впливу (зниження на 64,7%).

Таблиця 2

Селезінка				
$\times 10^b$	Без обробки	Нормальний Ig хом'яка	Обробка ТА-В4	Виснаження (%)
Загальні спленоцити	123	93,3	105	14,6
CD3 ⁺ Т-клітини	32,8	28,4	12,4	62,2
CD3 ⁺ CD19 ⁺	72,2	53,4	72,9	-0,8
CD ⁺ NK ⁺	3,6	2,4	1,80	50
Лейкоцити периферичної крові				
	Без обробки	Нормальний Ig хом'яка	Обробка ТА-В4	Виснаження (%)
CD3 ⁺ Т-клітини	36,7%	36%	4,1%	88,8%
Вилочкова залоза				
$\times 10^b$	Без обробки	Нормальний Ig хом'яка	Обробка ТА-В4	Виснаження (%)
Загальні тимоцити	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

(репрезентативні дані трьох експериментів)

Приклад 7: Антитіло проти ТАІР не викликає секреції IL-2 або TNF-альфа

Мишам Balb/c (H-2d) здійснювали внутрішньочеревинну ін'єкцію 300 мікрограмів TAB4 або контрольного Ig хом'яка. Спленоцити виділяли через 7 днів після ін'єкції і використовували як респондери у культурі з обробленими мітоміцином С СЗН (H-2k) спленоцитами (як стимуляторами). Через три дні супернатанти культур збирали і вимірювали вміст IL-2 за допомогою ELISA (PharMingen). Як показано на Фіг.5, вироблення IL-2 пригнічувалося у клітинах-респондерах, які брали у мишей, які отримували TAB4, порівняно з контрольними мишами. Рівень у плазмі IL-2 та TNF-альфа також піддавали аналізу, і значних розбіжностей у рівні IL-2 (або TNF-альфа) у сироватці контрольних мишей та мишей, які отримували TAB4, не помічали. Оскільки вироблення IL-2 є ключовим чинником активності Т-клітин, результати показують, що специфічне до ТАІР антитіло, таке як TAB4, може бути застосоване *in vivo* для маніпулювання Т-клітинами та контролю над небажаними опосередкованими Т-клітинами імунними реакціями, такими як ті, що є пов'язаними з аутоімунними хворобами та відторгненням трансплантатів.

Приклад 8: Застосування антитіла проти ТАІР для запобігання відторгненню трансплантатів

Мишей (придбаних у Jackson Laboratory) віком від 8 до 12 тижнів анестезували ацетпромазин малеатом (Fermenta Animal Health Co., Kansas City, MO). Перед пересадженням шкірного трансплантата мишам-реципієнтам C57BL/6 (H-2^b), у яких не було видалено вилочкову залозу, робили внутрішньочеревинну ін'єкцію 500мкг TAB4 або ізотипних контрольних антитіл за сім днів до хірургічної операції з пересадження шкіри. Через сім днів шкіру з бочка повністю алогенних невідповідних мишей Balb/cj (H-2^d) пересаджували на бочок мишей C57BL/6, яким попередньо вводили антитіло. Через сім днів після трансплантації мишам знову шляхом ін'єкції вводили 500мкг TAB4 або ізотипно-

го контрольного антитіла. Мишей спостерігали щодня після трансплантації. Трансплантати вважали відторгненими, якщо 50% донорської шкіри були змертвілими. Відсоток виживаності трансплантатів показано на Фіг.7 (n=8). Дані показують, що введення антитіла TAB4 збільшувало виживаність алогенних шкірних трансплантатів.

Приклад 9: Ідентифікація ТАІР як PSGL-1

P-селектин ліганд-1 глікопротеїну (PSGL-1), також відомий під назвою CD162, є основним лігандом P-селектину, який експресується на лейкоцитах, включаючи Т-клітини (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). Біохімічні характеристики ТАІР, такі як його молекулярна маса та його схильність до димеризації, вказували на ймовірність того, що TAB4 може бути аналогічним PSGL-1. Для того, щоб дослідити зв'язок між цими двома антигенами, з'ясували: 1) чи може антиген, осаджений за допомогою TAB4, бути розпізнаний антитілом проти PSGL1 серійного виробництва; і 2) чи може антитіло проти PSGL1 вивести TAB4 з лізату клітин.

RL⁺ Т-клітини піддавали лізису при густині 1.0×10^8 клітин/мл у лізисному буфері (1% Triton X-100, 20mM Tris-HCl, pH8,0, 160mM NaCl, 1mM CaCl₂), який містив повний коктейль інгібітора протеази, протягом 1 години і нерозчинний матеріал осаджували у кількості 10000 x г протягом 10 хвилин. Ці та всі наступні етапи здійснювали при 4°C. Лізат, який відповідав 5.0×10^7 клітин, інкубували з 20мкл G-білка-сефарози з попереднім введенням 10мкг анти-PSGL-I mAb (клон 2PH1, PharMingen, San Diego, CA), анти-ТАІР mAb, TAB4 або IgG з нормальної сироватки хом'яка. Після інкубації протягом 4 годин при 4°C кульки промивали п'ять разів промивальним буфером (0,05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH8,5, 400mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1мг/мл яєчного альбуміну) і двічі - подібним промивальним буфером, який містив 250mM замість 400mM NaCl. Зв'язані білки елюювали з 40мкл

1xSDS буфера для зразка. Елюйовані білки відокремлювали за допомогою 6% SDS-PAGE і перенесли на нітроцелюлозну мембрану. Мембрани піддавали імуноблотингові з застосуванням анти-PSGL-1 mAb і виявляли за допомогою пероксидаза-кон'югованим IgG кози проти щура (H+L) з наступною хемілюмінесценцією (Renaissance, NEN).

Поверхневі біотинізовані RL δ 1 Т-клітини піддавали лізисові при густині $1,0 \times 10^8$ клітин/мл у лізисному буфері. Екстракт клітин інкубували 20 мкг антитіла, зв'язаного з 40 мкг G-білка-сефарози при 4°C до наступного дня. Виснаження здійснювали, застосовуючи анти-PSGL-1 mAb (2PH1) або контрольний IgG щура, з TAB4 або контрольною сироваткою нормального хом'яка. Виснажені лізати далі піддавали імунопреципітації з застосуванням TAB4 або анти-PSGL-1 mAb, відповідно. Імунопреципітати відокремлювали на 6% SDS-поліакриламідному гелі і виявляли шляхом флюорографії. Як показано на Фіг.6, антитіло проти PSGL-1 може виводити TAIP білок з лізатів Т-клітин. Крім того, білки, піддані імунопреципітації з застосуванням антитіла проти TAIP (TAB4), можуть бути розпізнані антитілом проти PSGL-1 шляхом вестерн-блот-аналізу.

Приклад 10: Викликання апоптозу у людських Т-клітинах антитілом проти PSGL-1

Для визначення ролі, яку відіграє PSGL-1 в апоптозі людських Т-клітин, здійснювали експерименти зі змінами у часі, щоб дослідити, коли активовані людські Т-клітини набувають чутливості до PSGL-1-опосередкованих апоптозних сигналів. Людські Т-клітини стимулювали мітогеном фітогемаглютиніну (PHA) і далі поширювали у середовищі, яке містило IL-2. Активовані Т-клітини збирали, а потім перевіряли на імунність за допомогою анти-PSGL-1 у присутності IL-2 та зшиваючих анти-тіл.

Людську периферичну кров брали у здорових дорослих людей, гепаринізували і збагачували на мононуклеари периферичної крові (PBMC) на основі диференційної густини з застосуванням Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech). PBMC активували 1% PHA (Life Technologies, GibcoBRL) протягом 48 годин і після цього тримали у рекомбінантному людському IL-2 (5нг/мл) протягом періоду аналізу. Для оцінки здатності до викликання апоптозу антитіла PSGL-1 проти людини активовані клітини обробляли: (1) 1мкг/мл клона антитіла проти PSGL-1 KPL-1 (BD PharMingen) та крос-лінкерним Ig кроля проти миші (0,5мкг/мл) (Jackson ImmunoResearch Laboratories); (2) ізотипним контрольним очищеним Ig миші та крос-лінкерним Ig кроля проти миші; або (3) лише крос-лінкерним Ig кроля проти миші. Після шести годин обробки визначали відсоток ранніх апоптозних клітин шляхом FACS, з забарвленням анти-Annexin V (BD PharMingen) та PI (Sigma).

Як показано на Фіг.8, сигнал, викликаний PSGL-1 з застосуванням антитіла проти PSGL-1 та крос-лінкера викликав значний рівень апоптозу у PHA-активованих людських PBMC (здебільшого Т-клітинах). Відсоток апоптозних клітин збільшувався з 8,5% на 3-й день до 24% на 8-й день в оброблених анти-PSGL-1 культурах. Ні ізотопний узо-

джений контроль, ні саме лише зшивання антитіла не мали жодного впливу на ці клітини.

Приклад 11: Застосування антитіла проти агоніста PSGL-1 для лікування аутоімунної хвороби

Мишей з діабетом без ожиріння (NOD), ретельно відібраних тварин з аутоімунним діабетом, розводили у стандартних умовах. Спонтанний діабет розвивався у NOD-мишей у віці приблизно 20 тижнів. В експериментальній групі мишам внутрішньочеревинно вводили три дози антитіла проти PSGL-1 (TAB4) у кількості 300мкг на мишу у віці 14, 15 та 17 тижнів. Дві додаткові ін'єкції однакової дози вводили у віці 24 та 26 тижнів. Контрольній групі вводили Ig хом'яка в такій самій дозі. Мишей спостерігали на рівень глюкозурію за допомогою Medi-Test Glucose (Macherey-Nagel, Німеччина) двічі на тиждень по досягненню віку 15 тижнів. Рівень глюкози у сечі після їди понад 300 мг/дл для двох послідовних вимірювань вважали діабетичним.

Як показано на Фіг.9, введення антитіла TAB4 (анти-PSGL-1) забезпечувало значний захист порівняно з введенням контрольного антитіла. Таким чином, введення антитіла проти PSGL-1 може послабити активність аутоімунних Т-клітин і затримати початок діабету I типу.

Приклад 12: Зв'язування Р-Селектину, Е-Селектину та L-Селектину з активованими Т-клітинами

Для визначення здатності селектинів (Р-Селектину, Е-Селектину та L-Селектину) до зв'язування з активованими Т-клітинами щойно підготовлені спленоцити мишей C57BL/6 активували і збирали на 2, 4 та 6-й дні. Неактивовані Т-клітини (тобто, щойно підготовлені спленоцити на 0-й день) також піддавали аналізу. Зразок на 2-й день включав 3×10^6 клітин/мл спленоцитів, які активували 2мкг/мл конканаваліну А (Con A) у DMEM+10% FBS протягом 2 днів. Живі клітини відокремлювали за допомогою Ficoll градієнта. Зразок на 4-й день одержували з клітин, які активували Con A протягом 3 днів, і тримали у середовищі, яке містило 5нг/мл IL-2, протягом ще одного дня. Зразок на 6-й день одержували з клітин, які активували Con A протягом 3 днів, і тримали у 5нг/мл IL-2 протягом 3 днів.

Для оцінки зразків шляхом аналізу FACS 2×10^5 клітин на лунку, взятих на 0, 2, 4 та 6-й дні, інкубували при 4°C протягом 30 хвилин з 40мкл/лунку Р-Селектину, Е-Селектину або L-Селектину мишей, злитого з Fc-ділянкою людського IgG1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) у концентрації від 20мкг/мл з дворазовим серійним розведенням до 0,156мкг/мл. Після інкубації клітини промивали буфером їх FACSscan (1 x PBS без іонів кальцію та магнію від Biochrom AG, Berlin і 2% FBS). Зразки далі інкубували при 4°C протягом 30 хвилин з 95мкл/лунку анти-Thy1.2 та вторинним реагентом (FITC-IgG проти людини, який є специфічним до фрагмента Fc, який отримували від Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) у кількості 3,25мкг/мл, а потім промивали буфером їх FACSscan.

Результати аналізу FACSCalibur показано на Фіг.10. При 20мкг/мл зв'язування Р-селектину з

активованими Т-клітинами миші поступово підвищувалося, досягало піку на 4-й день і дещо знижувалося на 6-й день. Зв'язування Е-селектину значно зросло з 2-го по 4-й дні, а потім залишалося на піковому рівні на 6-й день. Зв'язування L-селектину з активованими Т-клітинами мишей не виявлялося і не змінювалося протягом періоду активації, тобто, з 0 по 6-й дні. Результати, які спостерігали з L-Селектином, могли бути зумовлені явною низькою афінністю зв'язування L-селектину з його лігандом. Подібні результати також одержували, коли в експериментах застосовували нижчі концентрації трьох селектинів.

Приклад 13: Мультимерні форми Е-Селектину та Р-Селектину викликають апоптоз активованих Т-клітин

96-лунковий планшет (NUNC) вкривали 50мкл Fc Ig проти людини у кількості 20мкг/мл у 1хPBS при 4°C до наступного дня, блокували за допомогою 1% BSA при 37°C протягом 2 годин і інкубували з 50мкл злитого селектину-людського Fc (від 0,063 до 5мкг/мл) при кімнатній температурі протягом 2 годин. На всіх етапах експерименту кожен лунку п'ять разів ретельно промивали 1хPBS. Потім у кожен лунку додавали 2×10^5 попередньо активованих Con A протягом чотирьох днів Т-клітин і інкубували при 37°C протягом 5 годин перед центрифугуванням планшетів у кількості 200 x г протягом 5 хвилин при 4°C. Утворений в результаті осад, який містив активовані Т-клітини, інкубували з кон'югатом Annexin V-біотин при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, а потім авідиновим кон'югатом (SA-beta-gal при розведенні 1:5000) ще протягом 30 хвилин при 37°C. При кожній реакції зв'язування кожен лунку тричі промивали зв'язувальним буфером Annexin V. Кольорового проявлення досягали шляхом інкубації 110мкл суміші Z-буфера (54мкл 2-меркаптоетанолу у 20мл Z-буфера) і 30мкл ONPG (0,04г/10мл) при 4°C до наступного дня. Записували показники оптичної густини при 420nm.

Рівень викликаного селектином апоптозу активованих Con-A Т-клітин зростав зі збільшенням концентрації (з 0,063мкг/мл до 5мкг/мл) Р-селектину (Фіг.11А) або Е-селектину (Фіг.11В), злитого з Fc людського IgG1. Антитіло TAB4 хом'яка викликає апоптоз активованих Т-клітин (див. Приклад 1), і його у цих експериментах застосову-

вали як позитивний контроль Як негативний контроль, Fc проти людини, людський Ig (Hlg) та BSA не викликали апоптозу. Значного апоптозу не виявляли у присутності злитого білка L-селектину та людського Fc (Фіг.11С), що відповідало нездатності L-селектину до належного зв'язування з активованими Т-клітинами (Приклад 12).

Отже, зв'язаний на планшеті злитий білок, який містив PSGL-1-зв'язувальний фрагмент Р-селектину або Е-селектин та фрагмент людського Fc, викликав апоптоз активованих Т-клітин

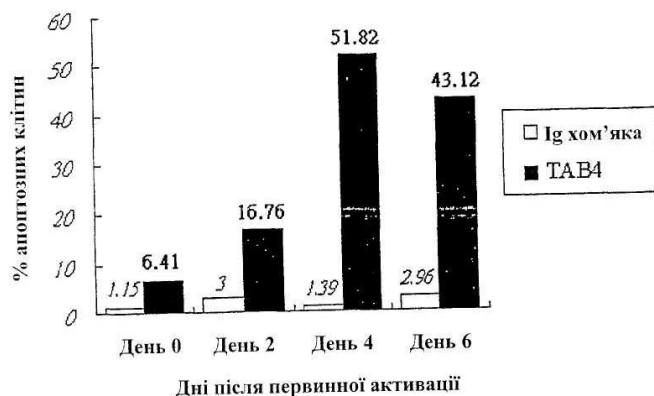
Приклад 14. Зшивання розчинного злитого білка Р-Селектин-Fc викликає апоптоз активованих Т-клітин

Селектини мишей (Р-Селектин, Е-Селектин та L-Селектин) зливали з Fc ділянкою людського IgG1, як детально описано вище, для утворення розчинних димерних злитих білків. Для того, щоб визначити, чи можуть розчинні селектини викликати апоптоз активованих Т-клітин, здійснювали експеримент, як детально описано у Прикладі 13, за винятком того, що при цьому не використовували зв'язаний на планшеті Fc Ig проти людини Незначний або низький рівень апоптозу активованих Т-клітин спостерігали у присутності лише розчинної форми злитого білка Р-селектину (димеру) (Фіг.12). Однак після додавання крос-лінкера (Fc-дроти людини) апоптозна активність суттєво зростала до приблизно апоптозного рівня, викликаного присутністю зв'язаного на планшеті антитіла, ні Fc проти людини, ні людський Ig (Hlg), ні BSA не викликали апоптоз.

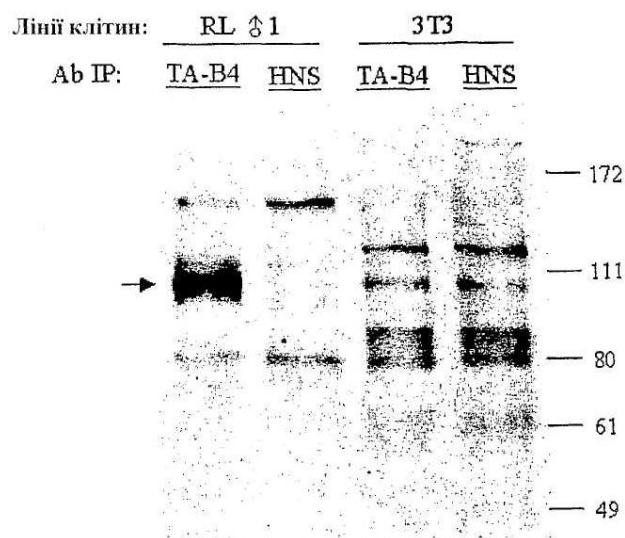
Для злитого білка Е-селектин-Fc одержували результати, подібні до тих, які отримували для злитого білка Р-селектин-Fc. Крім того, згідно з результатами, одержаними для зв'язаного на планшеті (мультимерної форми) L-селектину, розчинна форма злитого білка L-селектину не викликала апоптозу активованих Т-клітин.

Інші варіанти втілення

Слід розуміти, що хоча винахід було описано у зв'язку з його детальним описом, представлений вище опис пояснює, але не обмежує обсягу винаходу Інші аспекти, переваги та модифікації винаходу охоплюються обсягом представленої нижче формули.

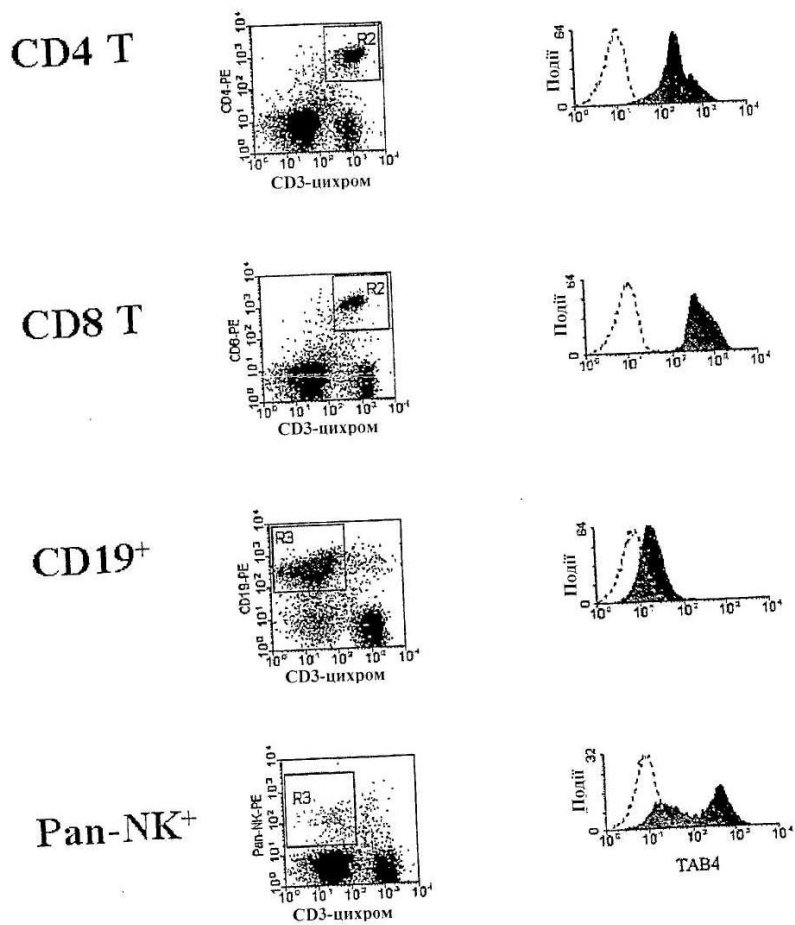


ФІГ. 1

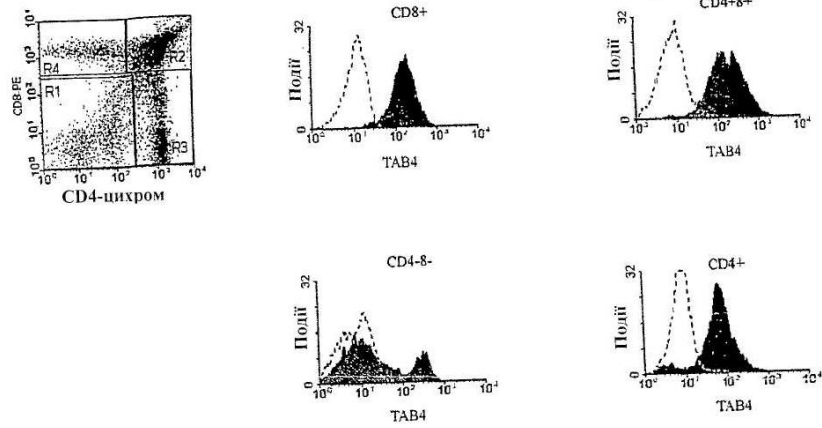


Ab IP: антитіло, яке застосовують для імунопреципітації
 TA-B4: моноклональне антитіло TA-B4
 HNS: нормальна сироватка хом'яка

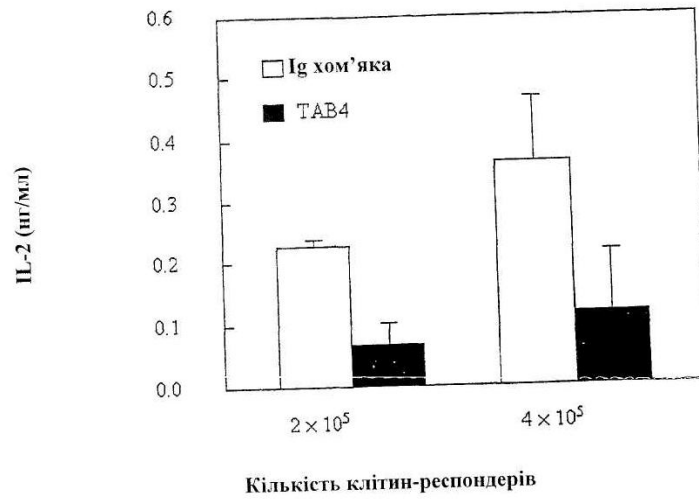
ФІГ. 2



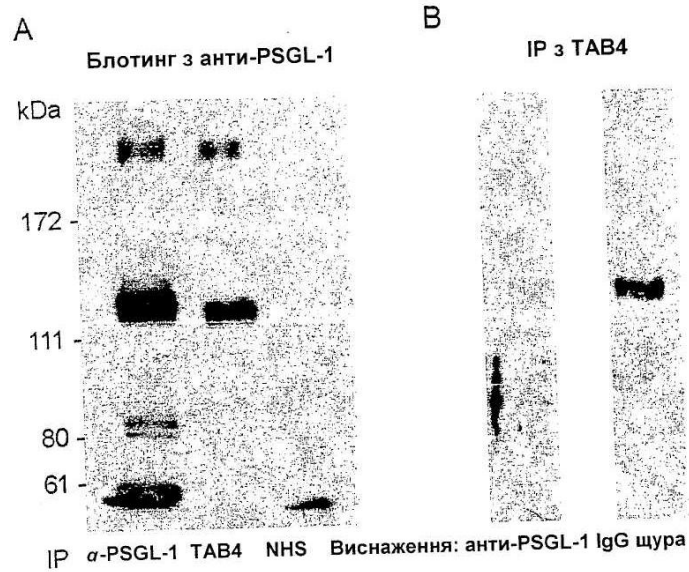
ФІГ. 3



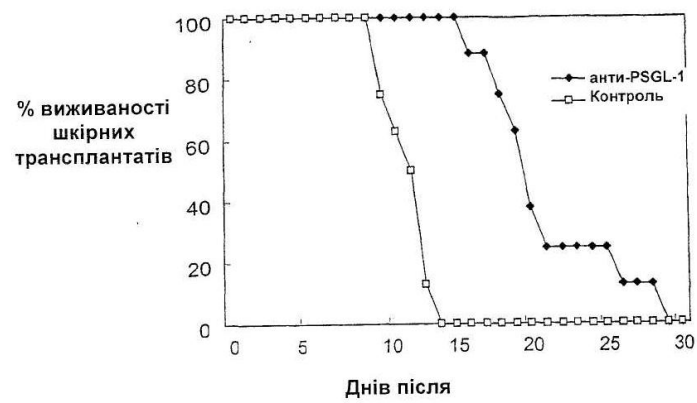
ФІГ. 4



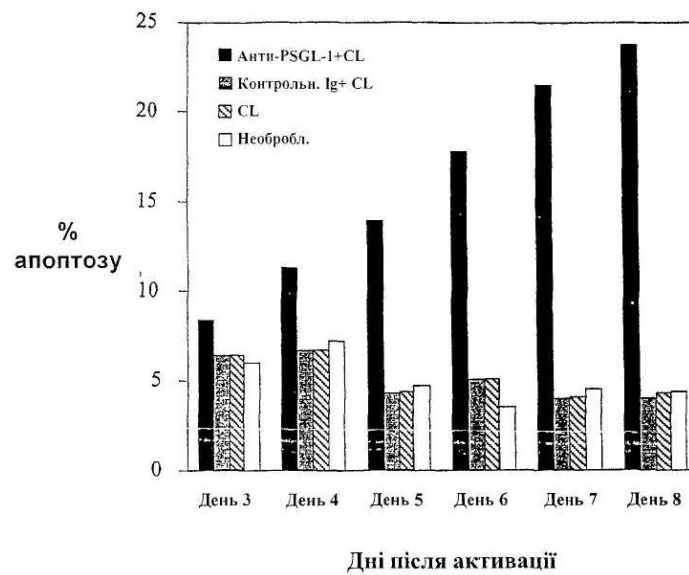
ФІГ. 5



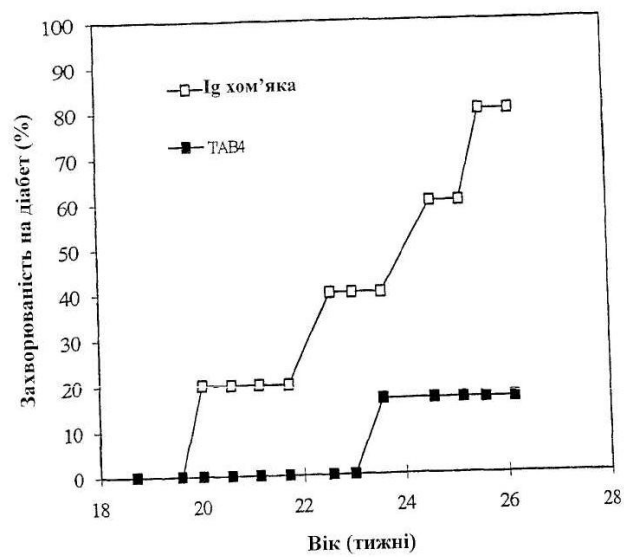
ФІГ. 6



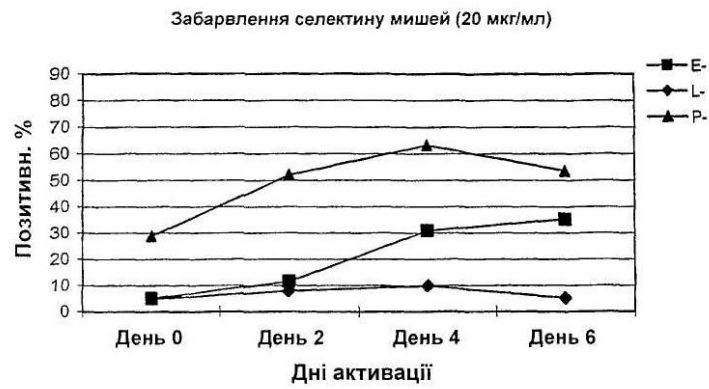
ФІГ. 7



ФІГ. 8

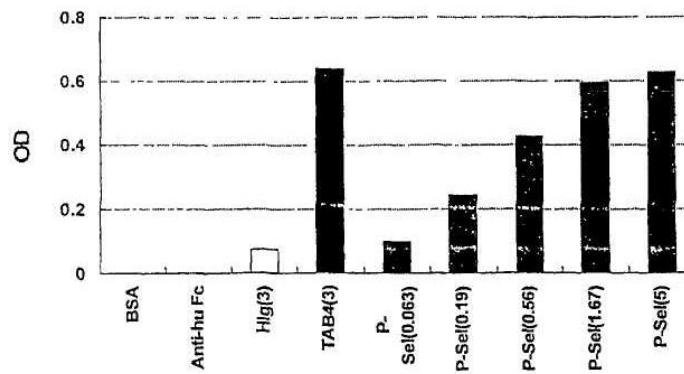


ФІГ. 9



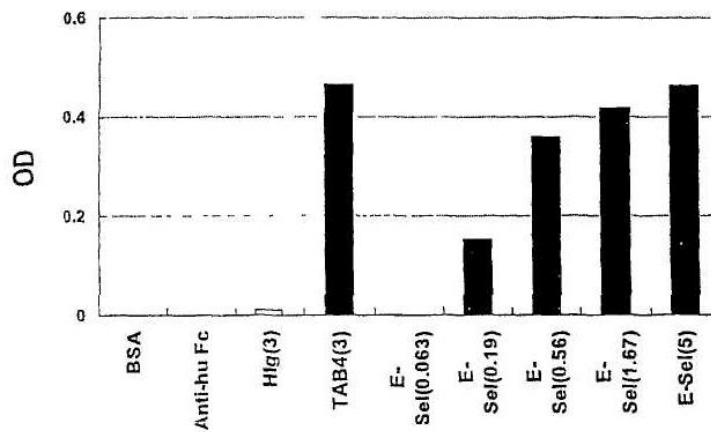
ФІГ. 10

Р-селектин



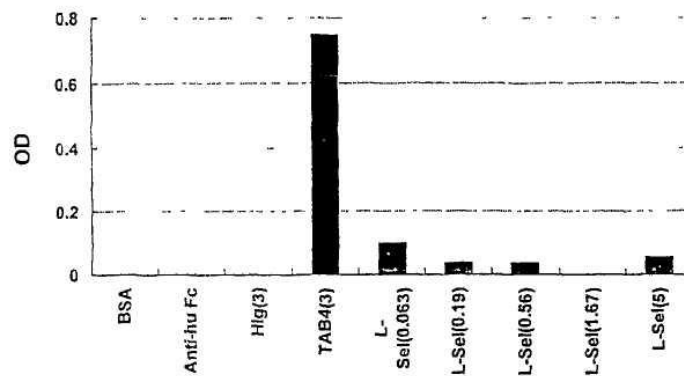
ФІГ. 11А

Е-селектин

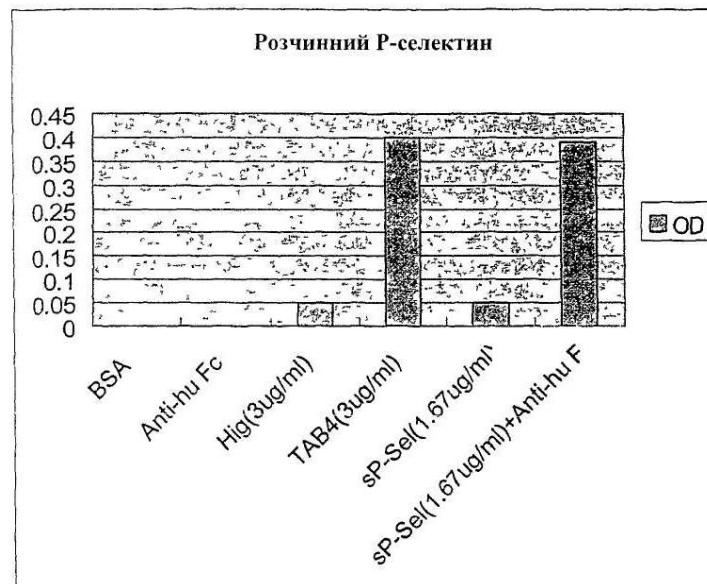


ФІГ. 11В

L-селектин



ФІГ. 11С



ФІГ. 12