(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 33 475 T2** 2005.09.22

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 758 232 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 475.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/05213**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 917 184.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/029673**
(86) PCT-Anmeldetag: **01.05.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **09.11.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.02.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **08.09.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.09.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 31/365**
A61K 31/35, A61K 31/00

(30) Unionspriorität:
245282 **29.04.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The United States of America as represented by the Secretary of the Navy, Bethesda, Md., US

(72) Erfinder:
JUNE, H., Carl, Rockville, US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR MODULIERUNG DER T-ZELL-ANTWORT DURCH MANIPULATION DER TRANSDUKTION DER INTRAZELLULÄREN SIGNALE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die Induzierung der antigenspezifischen T-Zell-Antworten geht mit vielfachen Wechselwirkungen zwischen Zelloberflächenrezeptoren auf T-Zellen und Liganden auf Antigen präsentierenden Zellen (APCs) einher. Die primäre Wechselwirkung findet zwischen dem T-Zellrezeptor (TCR)/CD3-Komplex auf einer T-Zelle und einem Komplex aus einem Haupthistokompatibilitätskomplex(MHC)-Molekül und einem antigenen Peptid auf einer Antigen präsentierenden Zelle statt. Diese Wechselwirkung löst ein primäres antigenspezifisches Aktivierungssignal in der T-Zelle aus. Zusätzlich zum primären Aktivierungssignal erfordert die Induzierung der T-Zell-Antworten ein zweites kostimulatorisches Signal. Bei Abwesenheit einer richtigen Kostimulierung kann die TCR-Signalisierung einen Zustand der Anergie in der T-Zelle induzieren. Eine nachfolgende korrekte Präsentation des Antigens gegenüber einer anergischen T-Zelle kann keine richtige Antwort hervorrufen (vgl. Schwartz, R. H. (1990) Science 248: 1349).

[0002] Ein kostimulatorisches Signal kann in einer T-Zelle durch einen T-Zell-Oberflächenrezeptor wie CD28 ausgelöst werden. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass eine suboptimale polyclonale Stimulierung von T-Zellen (z. B. durch anti-CD3-Antikörper oder Phorbolester, die jeweils für ein primäres Aktivierungssignal sorgen können) durch Kreuzvernetzung von CD28 mit anti-CD28-Antikörpern verstärkt werden kann (Linsley, P. S. et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 721; Gimmi, C. D. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6575). Außerdem kann die Stimulierung von CD28 die Induzierung von Anergie in T-Zell-Clonen verhindern (Harding, F. A. (1992) Nature 356: 607–609). Natürliche Liganden für CD28 wurden auf APCs identifiziert. CD28-Liganden schließen Mitglieder der B7-Proteinfamilie wie B7-1 (CD80) und B7-2 (B70) ein (Freedman, A. S. et al. (1987) J. Immunol. 137: 3260–3267; Freeman, G. J. et al. (1989) J. Immunol. 143: 2714–2722; Freeman, G. J. et al. (1991) J. Exp. Med. 174: 625–631; Freeman, G. J. et al. (1993) Science 262: 909–911; Azuma, M. et. al. (1993) Nature 366: 76–79; Freeman, G. J. et al. (1993) J. Exp. Med. 178: 2185–2192). Es wurde gezeigt, dass zusätzlich zu CD28 Proteine der B7-Familie einen anderen, CTLA4 genannten, mit CD28 verwandten Oberflächenrezeptor auf T-Zellen binden, der ebenfalls eine Rolle bei der T-Zell-Kostimulierung spielen kann (Linsley, P. S. (1991) J. Exp. Med. 174: 561–569; Freeman, G. J. et al. (1993) Science 262: 909–911).

[0003] Die Aufklärung der Beziehung Rezeptor : Ligand zwischen CD28/CTLA4 und der B7-Proteinfamilie und die Rolle dieser Wechselwirkung bei der Kostimulierung führte zu therapeutischen Ansätzen, welche die Beeinflussung der extrazellulären Wechselwirkungen von Oberflächenrezeptoren auf T-Zellen, die kostimulatorische Moleküle binden, einbeziehen. Zum Beispiel wurde ein CTLA4Ig-Fusionsprotein, das sowohl an B7-1 als auch an B7-2 bindet und ihre Interaktion mit CD28/CTLA4 blockiert, verwendet, um die Abstoßung von allogenen und xenogenen Transplantaten zu verhindern (vgl. z. B. Turka, L. A. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11102–11105; Lenschow, D. J. et al. (1992) Science 257: 789–792). In ähnlicher Weise wurden Antikörper, die mit B7-1 und/oder B7-2 reagieren, verwendet, um die T-Zell-Proliferation und Bildung von IL-2 in vitro und die primäre Immunantwort auf Antigen in vivo zu hemmen (Hathcock K. S. et al. (1993) Science 262: 905–907, Azuma, M. et al. (1993) Nature 366: 76–79, Powers, G. D. et al. (1994) Cell. Immunol. 153: 298–311, Chen C. et al. (1994) J. Immunol. 152: 2105–2114). Zusammengenommen weisen diese Studien darauf hin, dass die T-Zell-Oberflächenrezeptoren, welche kostimulatorische Moleküle wie B7-1 und B7-2 binden, erwünschte Angriffspunkte für die Beeinflussung von Immunantworten sind.

[0004] Während die extrazellulären Wechselwirkungen zwischen CD28/CTLA4 mit ihren Liganden einigermaßen genau charakterisiert wurden, ist bezüglich der intrazellulären Ereignisse, die in einer T-Zelle nach Ligandenbindung dieser Moleküle auftreten, wenig bekannt. Man nimmt an, dass bei der T-Zell-Kostimulierung ein intrazellulärer Signaltransduktionsweg beteiligt ist, der sich von der Signalisierung durch den TCR unterscheidet, da der kostimulatorische Weg gegen die hemmenden Wirkungen von Cyclosporin A resistent ist (vgl. June, C. H. et al. (1990) Immunology Today 11: 211–216). Es wurde gezeigt, dass die Protein-Tyrosinphosphorylierung in T-Zellen nach CD28-Ligandenbindung erfolgt, und es wurde nachgewiesen, dass ein Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor, Herbimycin A, die durch CD28 induzierte Bildung von IL-2 hemmen kann (Vandenberghe, P. et al. (1992) J. Exp. Med. 175: 951–960; Lu, Y et al. (1992) J. Immunol. 149: 24–29).

[0005] Untersuchungen haben gezeigt, dass der CD28-Rezeptor mit dem Antigenrezeptor gemeinsam Signale auslösen kann, sowie Signale, die unabhängig vom Antigenrezeptor sind. Weiterhin ist der Grad der CD28-Rezeptor-Oligomerisierung eine wichtige Determinante bei der durch CD28 vermittelten Signaltransduktion (Linsley, P. S. und Ledbetter, J. A. (1993) Annu. Rev. Immunol. 11: 191 und Ledbetter, J. A. et al. (1990) Blood 75: 1531). Studien, bei denen die monoclonalen anti-CD28- und anti-CD3-Antikörper verwendet wurden, zeigen, dass Calcium-Signalisierung, Aktivierung der Phospholipase C (PLC), erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität und $p21^{ras}$-Aktivierung allesamt zu einem frühen Zeitpunkt nach der Rezeptorbesetzung auftreten (Übersicht bei June, C. H. et al. (1994) Immunol. Today 15: 321 und

Rudd, C. E. et al. (1994) Immunol. Today 15: 225). Über die Protein-Tyrosinkinasen $p72^{itk}$ und $p56^{lck}$ (August, A. und Dupont, B. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 1466 und August, A. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 91: 9347) wurde berichtet, dass sie aktiviert werden oder physikalisch sowohl mit CD28 als auch mit dem T-Zell-Antigenrezeptor assoziiert sind. Die durch CD28 vermittelten Calcium-, $p21^{ras}$- und $p70^{s6}$-Kinasesignale sind in T-Zell-Blasten deutlicher als auf ruhenden T-Zellen und sind zeitweise im Vergleich zu den Antigen-Rezeptorsignalen verzögert (Ledbetter, J. A. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 1384, Nunes, J. S. et al. (1993) Biochem. J. 293: 835, Siegel, J. N. et al. (1993) J. Immunol. 151: 4116 und Pai, S. V. et al. (1994) J. Immunol. 24: 2364). Weiterhin sind durch anti-CD28 induzierte Calciumsignale im Wesentlichen auf $CD4^+$-T-Zellen beschränkt, während sowohl $CD8^+$-T-Zellen als auch $CD4^+$-T-Zellen auf CD28-Signale reagieren (Abe, R. P et al. (1995) J. Immunol. im Druck). Zusammengenommen zeigen diese Studien, dass CD28-Signaltransduktion an mehrere Signaltransduktionskaskaden gekoppelt ist und dass die Art des Signals während der T-Zellentwicklung reguliert wird.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Diese Erfindung betrifft die Regulation der T-Zellantworten durch Beeinflussung der intrazellulären Signaltransduktion. Insbesondere die intrazellulären Signalereignisse, welche nach Kostimulierung auftreten, werden beeinflusst. Die Erfindung umfasst in-vitro-Verfahren zur Modulierung von T-Zell-Antworten durch Hemmung oder Stimulierung von einem oder mehreren intrazellulären Signalen, die aus der Ligandenbindung eines Oberflächenrezeptors auf einer T-Zelle entsteht, der ein kostimulatorisches Molekül bindet. Es wurde nun entdeckt, dass die Stimulierung des CD28-Rezeptors zur Bildung von D-3-Phosphoinositiden innerhalb einer T-Zelle führt. Außerdem wurde entdeckt, dass die Hemmung der Aktivität der Phosphatidylinosit-3-Kinase in einer T-Zelle T-Zell-Antworten wie die Bildung von Lymphokinen und zelluläre Proliferation hemmen kann. Diese Entdeckungen deuten auf eine funktionale Rolle für D-3-Phosphoinositide in einem kostimulatorischen Signaltransduktionsweg hin und stellen Phosphatidylinosit-3-Kinase als intrazelluläres Ziel für die Modulierung von T-Zell-Antworten bereit. Entsprechend können intrazelluläre Signalereignisse, bei denen D-3-Phosphoinositide beteiligt sind, moduliert werden, entweder, um ein kostimulatorisches Signal zu hemmen und dadurch das Nichtreagieren der T-Zelle zu induzieren oder um ein kostimulatorisches Signal auszulösen und dadurch eine T-Zell-Antwort hervorzurufen. Zusätzlich sind neue Durchmusterungstests zur Identifizierung von Inhibitoren oder Aktivatoren der Phosphatidylinosit-3-Kinase, die verwendet werden können, um eine T-Zell-Antwort zu hemmen oder zu stimulieren, im Umfang der Erfindung enthalten.

[0007] Ein Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Hemmung einer Antwort durch eine T-Zelle, die einen Oberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet. Diese Verfahren beziehen mit ein, dass eine T-Zelle mit einem Agens in Kontakt gebracht wird, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle hemmt. In einer Ausführungsform ist das Agens ein Inhibitor einer Phosphatidylinosit-3-Kinase wie der Pilzmetabolit Wortmannin oder das Bioflavenoid Quercetin oder Derivate oder Analoga davon (z. B. LY294002). In einer anderen Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung wird die T-Zelle mit mindestens einem zusätzlichen Agens in Kontakt gebracht, welches ein anderes intrazelluläres, mit der Kostimulierung assoziiertes Signal wie Protein-Tyrosinphosphorylierung hemmt. Zum Beispiel kann die T-Zelle sowohl mit einem Inhibitor der Phosphatidylinosit-3-Kinase als auch mit einem Inhibitor der Protein-Tyrosinkinase in Kontakt gebracht werden. Ein bevorzugter Inhibitor der Protein-Tyrosinkinase ist Herbimycin-A. Alternativ kann die Protein-Tyrosinphosphorylierung in einer T-Zelle auch durch eine Tyrosin-Phosphatase oder einen Aktivator einer Tyrosinphosphatase gehemmt werden. In dieser Ausführungsform kann die T-Zelle mit einem Inhibitor der Phosphatidylinosit-3-Kinase und mit einem Molekül, z. B. einem Antikörper, in Kontakt gebracht werden, der eine zelluläre Tyrosinphosphatase wie CD45 oder Hcph bindet und aktiviert. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens dieser Erfindung wird die T-Zelle mit einem Inhibitor einer Protein-Serinkinase oder einem Aktivator einer Serinphosphatase in Kontakt gebracht.

[0008] Die Erfindung stellt auch Verfahren zur Induzierung des Nichtreagierens gegenüber einem Antigen in einer T-Zelle durch das Auslösen eines primären antigenspezifischen Signals in einer T-Zelle bereit, während ein mit der Kostimulierung assoziiertes intrazelluläres Signal in der T-Zelle unterbunden wird. Als Folge der Unterbindung der kostimulatorischen Signaltransduktion ist die T-Zelle nicht in der Lage, ein richtiges kostimulatorisches Signal in Gegenwart des Antigens zu erhalten und das Nichtreagieren spezifisch auf das Antigen wird in der T-Zelle induziert. Um das Nichtreagieren der T-Zelle zu induzieren, wird eine antigenspezifische T-Zelle mit dem Antigen in einer zur Stimulierung eines primären Aktivierungssignals in der T-Zelle geeigneten Form zusammen mit einem Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle hemmt, in Kontakt gebracht. Zum Beispiel kann eine T-Zelle mit einem Antigen, das durch eine APC präsentiert wird, zusammen mit einem Inhibitor der Phosphatidylinosit-3-Kinase wie Wortmannin oder Quercetin oder Derivaten oder Analoga davon (z. B. LY294002) in Kontakt ge-

bracht werden. Zusätzlich können andere mit Kostimulierung assoziierte intrazelluläre Signale wie Protein-Tyrosinphosphorylierung und/oder Protein-Serinphosphorylierung in der T-Zelle gehemmt werden.

[0009] Verfahren zur Hemmung von T-Zell-Antworten und zur Induzierung des Nichtreagierens der T-Zelle sind nützlich in Situationen, in denen es wünschenswert ist, eine Immunantwort herabzuregulieren, zum Beispiel bei einem Empfänger eines Transplantats (z. B. eines Organtransplantats oder eines Knochenmarkstransplantats etc.) oder bei einem Individuum, das an einer Autoimmunerkrankung oder einer anderen mit einer abnormalen Immunantwort einhergehenden Erkrankung leidet. Ein Agens, das mit Kostimulierung assoziierte Signaltransduktion hemmt (z. B. ein Inhibitor der Inositphosphat-3-Kinase), kann einem Individuum verabreicht werden oder alternativ können T-Zellen aus dem Individuum erhalten, in vitro, wie hier beschrieben, behandelt und dem Individuum verabreicht werden.

[0010] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft in-vitro-Verfahren zur Stimulierung einer Antwort durch eine T-Zelle, die ein primäres Aktivierungssignal erhalten hat und einen Oberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet. Diese Verfahren umfassen das Inkontaktbringen der T-Zelle mit einem Agens, welches die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle stimuliert, wie ein Aktivator der Phosphatidylinosit-3-Kinase. In einer anderen Ausführungsform wird die T-Zelle mit einem Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden stimuliert, und mindestens einem zusätzlichen Agens in Kontakt gebracht, das ein anderes mit Kostimulierung assoziiertes intrazelluläres Signal wie Protein-Tyrosinphosphorylierung stimuliert. Zum Beispiel kann die T-Zelle mit einem Aktivator der Phosphatidylinosit-3-Kinase zusammen mit einem Aktivator der Protein-Tyrosinkinase wie Pervanadat in Kontakt gebracht werden. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird die T-Zelle weiterhin mit einem Agens, das eine Protein-Serinkinase aktiviert, in Kontakt gebracht. Alternativ kann ein Inhibitor einer zellulären Phosphatase wie CD45 oder Hcph in Verbindung mit einem PI3K-Aktivator verwendet werden. In wiederum einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird eine antigenspezifische T-Zellantwort durch Inkontaktbringen einer antigenspezifischen T-Zelle mit dem Antigen zusammen mit einem Agens stimuliert, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle stimuliert und dadurch sowohl ein primäres Aktivierungssignal als auch ein kostimulatorisches Signal in der T-Zelle stimuliert. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird die antigenspezifische T-Zell-Antwort weiter durch Inkontaktbringen der antigenspezifischen T-Zelle mit einem Agens oder mehreren Agenzien stimuliert, die Protein-Tyrosin- und/oder Protein-Serinkinasen aktivieren.

[0011] Verfahren zur Stimulierung von T-Zell-Antworten sind nützlich in Situationen, in denen es wünschenswert ist, eine Immunantwort hinaufzuregulieren. Zum Beispiel kann eine Antwort gegen einen Tumor in einem Tumor tragenden Individuum stimuliert werden oder es kann eine Antwort gegen ein Pathogen (z. B. ein Bakterium, ein Virus wie HIV, Pilz, Parasit etc.) in einem Individuum stimuliert werden. Zusätzlich können die Verfahren verwendet werden, um die Wirksamkeit von Impfungen zu steigern. Ein Agens, das ein intrazelluläres mit Kostimulierung assoziiertes Signal stimuliert (z. B. ein Aktivator der Inositphosphat-3-Kinase), kann einem Individuum verabreicht werden oder alternativ können T-Zellen in vitro stimuliert und dann dem Individuum verabreicht werden.

[0012] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft Durchmusterungstests zur Identifizierung von Inhibitoren oder Aktivatoren einer Phosphatidylinosit-3-Kinase. In einer Ausführungsform wird eine T-Zelle, die einen Zelloberflächenrezeptor (z. B. CD28) exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, verwendet. Um einen Inhibitor zu identifizieren, wird ein intrazellulärer Signaltransduktionsweg, der mit dem Rezeptor in der T-Zelle assoziiert ist, in Gegenwart eines zu prüfenden Agens stimuliert und ein Inhibitor wird basierend auf seiner Fähigkeit identifiziert, die Bildung von mindestens einem D-3-Phosphoinositid in einer T-Zelle zu hemmen. Um einen Aktivator zu identifizieren, wird die T-Zelle mit einem zu prüfenden Agens in Kontakt gebracht und ein Aktivator wird basierend auf seiner Fähigkeit identifiziert, die Bildung von mindestens einem D-3-Phosphoinositid in einer T-Zelle zu stimulieren.

[0013] Die Erfindung betrifft weiterhin ein neues an Tyrosin phosphoryliertes Protein von etwa 67 kDa, das mit CD28 in T-Zellen assoziiert ist, die durch CD28 stimuliert werden. Verfahren zur Hemmung der Aktivierung des Proteins oder seiner Interaktion mit CD28 oder alternativ Verfahren zur Aktivierung des 67K-Proteins oder der Stimulierung der Wechselwirkung mit CD28 werden hierin auch betrachtet.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0014] Fig. 1 ist eine grafische Darstellung der Bildung von Phosphatidylinosit(3,4,5)-Triphosphat in $CD28^+$-T-Zellen (Jurkat-Zellen) nach Stimulierung der Zellen mit Medium, einem anti-CD3-Antikörper oder einem anti-CD28-Antikörper, welche die charakteristische Kinetik der Aktivierung der Phosphatidylinosit-3-Kinase nach Stimulierung durch CD3 oder CD28 aufzeigt.

[0015] Fig. 2 ist eine grafische Darstellung der Bildung von Phosphatidylinosit(3,4,5)-Triphosphat in $CD28^+$-T-Zellen (Jurkat-Zellen) nach Stimulierung der Zellen mit CHO-Zellen, die zur Expression von

B7-1 oder B7-2 transfiziert wurden, welche die charakteristische Kinetik der Aktivierung der Phosphatidylinosit-3-Kinase nach Stimulierung durch B7-1 oder B7-2 aufzeigt.

[0016] Fig. 3 ist eine grafische Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Wortmannin (0–100 mM) auf die Bildung von Phosphatidylinosit(3,4,5)-Triphosphat in $CD28^+$-T-Zellen (Jurkat-Zellen) nach Stimulierung der Zellen mit CHO-Zellen, die zur Expression von B7-2 transfiziert wurden.

[0017] Fig. 4 ist eine grafische Darstellung der Wirkung von Wortmannin oder Herbimycin auf den durch Ligandenbindung von CD28 mit einem anti-CD28-Antikörper induzierten Calciumeintritt in T-Zellen.

[0018] Fig. 5 ist eine Serie von durchflusscytometrischen Profilen aus einem Zellkonjugat-Test, in dem Jurkat-Zellen entweder mit CHO-neo-, CHO-B7-1- oder CHO-B7-2-Zellen inkubiert wurden. Der Calciumfluss wird auf der Y-Achse und die Zellkonjugation auf der X-Achse angegeben.

[0019] Fig. 6 ist eine grafische Darstellung der Wirkung von membrangebundenem B7-1 und B7-2 in Kombination mit einem anti-CD3-Antikörper auf die Bildung von IL-2 durch gereinigte menschliche periphere T-Zellen des Blutes, die einen dosisabhängigen Anstieg der Bildung von IL-2 durch Kostimulierung mit entweder B7-1 oder B7-2 zeigt.

[0020] Fig. 7A ist eine grafische Darstellung der Wirkung der Behandlung mit Wortmannin (1 nM bis 1 mM) auf die Bildung von IL-2 durch ruhende menschliche T-Zellen 24 Stunden nach Stimulierung der Zellen mit Medien, immobilisiertem anti-CD3 + CHO-B7-1, immobilisiertem anti-CD3 + CHO-B7-2, PMA + CHO-B-7 oder PMA + CHO-B7-2.

[0021] Fig. 7B ist eine grafische Darstellung der prozentualen Inhibierung der IL-Bildung durch Wortmannin (1 bis 100 nM) durch menschliche T-Zellen, die für 24 Stunden mit einem anti-CD3-Antikörper (OKT3) zusammen mit CHO-Zellen, die B7-1, B7-2 oder B7-1 sowie B7-2 exprimieren oder T-Zellen, die mit PMA zusammen mit CHO-Zellen, die B7-1 oder B7-2 exprimieren, stimuliert wurden.

[0022] Fig. 8 ist eine grafische Darstellung der Wirkung der Vorbehandlung mit Herbimycin auf die Bildung von Phosphatidylinosit(3,4,5)-Triphosphat durch Jurkat-Zellen, die mit anti-CD28 mAk (9.3), CHO-, CHO-B7-1- oder CHO-B7-2-Zellen stimuliert wurden.

[0023] **Fig.** 9 stellt eine Dünnschichtchromatographie dar, die die Menge an Phosphatidylinosit(3,4,5)-Triphosphat, gebildet durch Jurkat-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulierung mit mAk anti-CD28 (9.3) oder CHO-B7-1(B7)-Zellen in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (–) von Herbimycin, zeigt.

[0024] **Fig.** 10A ist eine grafische Darstellung der Sekretion von IL-2 durch periphere Blut-T-Zellen, die mit PMA allein oder mit CHO-B7-1 (PMA + CHOB71), CHO-B7-2 (PMA + CHOB72), mAk 9.3 in Lösung (PMA + 9.3), mAk 9.3 auf Globuli (PMA + 9.3 Globuli), Ionomycin (PMA + Iono) oder Ionomycin und löslichem mAk 9.3 (PMA + Iono + 9.3) in Gegenwart oder Abwesenheit von Herbimycin A stimuliert wurden.

[0025] **Fig.** 10B ist eine grafische Darstellung der Sekretion von IL-2 durch periphere Blut-T-Zellen, die mit anti-CD3 (OKT3) allein oder mit CHO-B7-1 (OKT3 + CHOB71), CHO-B7-2 (OKT3 + CHOB72) oder mAk 9.3 (OKT3 + 9.3) in Gegenwart (+Iono) oder Abwesenheit von Ionomycin stimuliert wurden.

[0026] **Fig.** 11 stellt eine Autoradiographie eines Immunblots dar, der zeigt, dass ein Phosphotyrosinprotein von etwa 67 kDa mit einem anti-CD28-Antikörper koimmunpräzipitiert ist.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0027] Diese Erfindung beinhaltet in-vitro-Verfahren zur Regulation von T-Zell-Antworten durch Modulierung von intrazellulären Signalen, die in einer T-Zelle nach Kostimulierung erzeugt werden, z. B. durch Bindung eines Oberflächenrezeptors auf der T-Zelle an ein kostimulatorisches Molekül. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf die Modulierung der Bildung von D-3-Phosphoinositiden in einer T-Zelle, um ein kostimulatorisches Signal zu hemmen oder zu stimulieren, um dadurch T-Zell-Antworten zu hemmen oder zu stimulieren. Die Inhibition eines kostimulatorischen Signals durch Beeinträchtigung der mit der Kostimulierung assoziierten Signaltransduktion kann weiterhin verwendet werden, um ein Nichtreagieren der T-Zelle zu induzieren. Die Erfindung basiert, zumindest teilweise, auf der Entdeckung, dass die Stimulierung einer T-Zelle durch den CD28-Oberflächenrezeptor zur Bildung von D-3-Phosphoinositiden in einer T-Zelle führt und dass ein Inhibitor einer Phosphatidylinosit-3-Kinase (hier auch als PI3K bezeichnet) die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle nach CD28-Ligandenbindung hemmt. Die Erfindung basiert weiterhin, zumindest teilweise, auf der Entdeckung, dass die Hemmung der PI3K-Aktivität in einer T-Zelle T-Zell-Antworten wie Cytokinbildung und zelluläre Proliferation hemmt.

[0028] Entsprechend betrifft ein Aspekt der Erfindung ein Verfahren zur Inhibierung einer Antwort durch eine T-Zelle, die mit Signaltransduktion einhergeht, durch Beeinträchtigung der intrazellulären Sig-

naltransduktion. In einer Ausführungsform wird ein intrazelluläres Signal dadurch gehemmt, dass eine T-Zelle, die einen Zelloberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, mit einem Agens in Kontakt gebracht wird, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle hemmt. Mit dem Begriff „eine T-Zelle, die einen Zelloberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet" wird beabsichtigt T-Zellen zu umfassen, die CD28 und/oder CTLA4 oder andere Rezeptoren exprimieren, die in der Lage sind, ein kostimulatorisches Molekül wie B7-1, B7-2 oder andere Mitglieder der B7-Familie zu binden.

[0029] Eine „Antwort" durch eine T-Zelle beabsichtigt T-Zell-Antworten zu umfassen, die nach Auslösen eines primären Aktivierungssignals und eines kostimulatorischen Signals in der T Zelle auftritt und schließt die Lymphokinbildung (z. B. IL-2-Bildung) und T- Zell-Proliferation ein. Die Hemmung einer T-Zell-Antwort kann eine vollständige Unterdrückung der Antwort (d. h. das Fehlen einer Antwort) oder Verminderung der Stärke der Antwort (d. h. teilweise Hemmung der Antwort) sein.

[0030] Der Begriff „D-3-Phosphoinositide" beabsichtigt Derivate von Phosphatidylinosit einzuschließen, die an der D-3-Position des Inositrings phosphoryliert sind, und umfasst die Verbindungen Phosphatidylinosit(3)-monophosphat (PtdIns(3)P), Phosphatidylinosit(3,4)-diphosphat (PtdIns(3,4)P_2) und Phosphatidylinosit(3,4,5)-triphosphat (PtdIns(3,4,5)P_3).

[0031] D-3-Phosphoinositide werden intrazellulär durch die Aktivität einer Phosphatidylinosit-3-Kinase (PI3K) gebildet. PI3K ist ein Heterodimer, das aus einer 85 kDa-Untereinheit, die tyrosylphosphorylierte Proteine über ihre SH2-Domänen bindet, und einer katalytischen Untereinheit von 110 kDa zusammengesetzt ist. PI3K wurde zuerst als eine Lipidkinase identifiziert, welche die D3-Position des Inositrings von Phosphatidylinosit, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P2 phosphoryliert. Zwei neuere Studien haben gezeigt, dass PI3K tatsächlich eine Kinase mit zweifacher Spezifität ist, die sowohl Lipid- als auch Serin-Kinaseaktivitäten besitzt (Dhand, R. et al. (1994) EMBO J. 13: 522 und Carpenter, C. L. et al. (1993) Mol. Cell Biol. 13: 1657).

[0032] Entsprechend ist in einer Ausführungsform das Agens, das die Bildung eines D-3-Phosphoinositids in der T-Zelle hemmt, ein Agens, das die Aktivität einer PI3K hemmt. Bevorzugte Agenzien, welche die PI3K-Aktivität in einer T-Zelle hemmen, sind der Pilzmetabolit Wortmannin oder Derivate oder Analoga davon. Wortmannin ist ein wirksamer PI3K-Inhibitor aus T. wortmannii (Kyowa Hakko Kohyo Co. Ltd.) oder aus P. fumiculosum (Sigma). Wortmannin-Derivate oder -Analoga umfassen Verbindungen, die strukturell mit Wortmannin verwandt sind, und die Fähigkeit beibehalten haben, PI3K und T-Zell-Antworten zu hemmen. Beispiele von Wortmannin-Derivaten und -Analoga werden offengelegt bei Wiesinger, D. et al. (1974) Experientia 30: 135–136, Closse, A. et al. (1981) J. Med. Chem. 24: 1465–1471 und Baggiolini, M. et al. (1987) Exp. Cell. Res. 169: 408–418. Ein anderer Inhibitor der PI3K-Aktivität, der verwendet werden kann, ist das Bioflavenoid Quercetin oder Derivate oder Analoga davon. Quercetin-Derivate oder -Analoga umfassen Verbindungen, die strukturell mit Quercetin verwandt sind, und die Fähigkeit beibehalten haben, PI3K und T Zell-Antworten zu hemmen. Beispiele von Quercetin-Derivaten oder -Analoga werden bei Vlahos, C. J. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 5241–5284, offengelegt. Ein bevorzugtes Quercetin-Derivat, das PI3K-Aktivität hemmt, ist LY294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on, Lilly Indianapolis IN) (beschrieben bei Vlahos et al., vorstehend zitiert). Alternativ können andere Inhibitoren der PI3K, zum Beispiel diejenigen, die durch nachstehend beschriebene Verfahren identifiziert werden, verwendet werden.

[0033] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft die Hemmung einer Antwort durch eine T-Zelle durch Beeinträchtigung von zwei oder mehreren, mit Kostimulierung assoziierten intrazellulären Signalereignissen. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass CD28-Stimulierung zu Protein-Tyrosinphosphorylierung in der T-Zelle führt (vgl. z. B. Vandenberghe, P. et al. (1992) J. Exp. Med. 175: 951–960, Lu, Y et al. (1992) J. Immunol. 149 : 24–29). Entsprechend ist in einer Ausführungsform die T-Zell-Antwort durch Inkontaktbringen einer T-Zelle mit einem ersten Agens, welches die Bildung von mindestens einem D-3-Phosphoinositid in der T-Zelle hemmt, und einem zweiten Agens, das die Tyrosinphosphorylierung in der T-Zelle hemmt, gehemmt. Zum Beispiel kann die T-Zelle sowohl mit einem Agens in Kontakt gebracht werden, das PI3K-Aktivität hemmt, als auch mit einem Agens, das die Aktivität der Protein-Tyrosinkinase hemmt, gehemmt. Ein bevorzugter Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor ist ein solcher, der src-Protein-Tyrosinkinasen hemmt. In einer Ausführungsform ist der src-Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor Herbimycin A oder ein Derivat oder ein Analogon davon. Derivate oder Analoga von Herbimycin A schließen Verbindungen ein, die strukturell mit Herbimycin A verwandt sind und die Fähigkeit beibehalten haben, die Aktivität von Protein-Tyrosinkinasen zu hemmen. In einer anderen Ausführungsform ist das Agens, welches Protein-Tyrosinphosphorylierung hemmt, eine Protein-Tyrosinphosphatase oder ein Aktivator einer Protein-Tyrosinphosphatase. Durch Erhöhung der Tyrosinphosphatase-Aktivität in einer T-Zelle wird die Nettomenge der Protein-Tyrosinphosphorylierung erniedrigt. Die Protein-Tyrosinphosphatase kann eine zelluläre Protein-Tyrosinphosphatase innerhalb der T-Zelle sein, wie CD45 oder Hcph. Die Aktivität einer Zelloberflächen-Tyrosinphosphatase auf einer T-Zelle

kann durch Inkontaktbringen einer T-Zelle mit einem Molekül, das an die Phosphatase bindet und ihre Aktivität stimuliert, aktiviert werden. Zum Beispiel kann ein Antikörper, der gegen CD45 gerichtet ist, verwendet werden, um Tyrosinphosphatase-Aktivität in einer T-Zelle zu stimulieren, die CD45 auf ihrer Oberfläche exprimiert. Entsprechend ist in einer Ausführungsform das Agens, das Protein-Tyrosinphosphorylierung innerhalb der T-Zelle hemmt, ein anti-CD45-Antikörper oder ein Fragment davon, welches die Fähigkeit beibehält, die Aktivität von CD45 zu stimulieren. Beispiele von Antikörperfragmenten schließen Fab- und F(ab')2-Fragmente ein. Antikörper oder Fragmente davon können in einer stimulatorischen Form bereitgestellt werden, zum Beispiel multimerisiert oder immobilisiert, etc.

[0034] Andere intrazelluläre mit Kostimulierung assoziierte Signale können zusammen mit der Hemmung der Bildung von D-3-Phosphoinositiden gehemmt werden, um T-Zell-Antworten zu hemmen. Zum Beispiel wurde die CD28-Ligandenbindung mit erhöhter Phospholipase-C-Aktivität (vgl. z. B. Nunes, J. et al. (1993) Biochem. J. 293: 835–842) und erhöhten intrazellulären Calciumspiegeln (vgl. z. B. Ledbetter, J. A. et al. (1990) Blood 75: 1531–1539 und die Beispiele) in Verbindung gebracht. Entsprechend können T-Zellen mit sowohl einem ersten Agens in Kontakt gebracht werden, das PI3K-Aktivität hemmt, als auch einem zweiten Agens, das Phospholipase-C-Aktivität und/oder Anstiege des intrazellulären Calciumspiegels hemmt. Wie in den Beispielen gezeigt wird, hemmt der Tyrosinkinase-Inhibitor Herbimycin A auch den durch CD28 induzierten Calciumfluss in T-Zellen.

[0035] Weiterhin kann, wie in den Beispielen gezeigt wird, die Stimulierung durch CD28 zu einer gegen Herbimycin resistenten Bildung von IL-2 durch die T-Zellen führen, was nahelegt, dass im betroffenen Signaltransduktionsweg zusätzliche Proteinkinasen beteiligt sind, wie Protein-Serinkinasen. Untersuchungen haben gezeigt, dass Protein-Serinkinasen an mit CD28 assoziierten Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Siegel, J. N. et al. (1993) J. Immunol. 151: 4116–4127 und Pai, S. V. et al. (1994) J. Immunol. 24: 2364). Daher werden T Zell-Antworten in einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung durch Inkontaktbringen von T-Zellen mit einem Agens, das die Aktivität von PI3K hemmt, und einem Agens, das Serinkinasen hemmt, gehemmt. In einer anderen Ausführungsform werden solche T-Zellen weiterhin mit einem Agens in Kontakt gebracht, das Protein-Tyrosinkinasen hemmt. In wiederum einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird eine T-Zell-Antwort durch Inkontaktbringen der T-Zellen mit verschiedenen Kombinationen von Agenzien, welche die PI3K, Protein-Tyrosinkinasen, Protein-Serinkinasen und Phospholipase C-Aktivität hemmen, oder einem Agens, das Erhöhungen des intrazellulären Calciums hemmt, gehemmt.

[0036] T-Zell-Antworten können gemäß den Verfahren der Erfindung in vitro gehemmt werden. Zum Beispiel kann ein Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in einer T-Zelle hemmt, einem Individuum in einer Dosis und für eine Zeitspanne verabreicht werden, die ausreicht, um T-Zell-Antworten zu hemmen. Alternativ können T-Zellen von einem Individuum erhalten, mit dem Agens in vitro in Kontakt gebracht und dem Individuum wieder verabreicht werden. Der Begriff Individuum beabsichtigt Tiere einzuschließen, bei denen eine Immunantwort vorkommt, z. B. Säuger, einschließlich Menschen, Affen, Hunde, Katzen, Kaninchen, Ratten, Mäuse und transgene Arten davon. Individuen, in denen T-Zell-Antworten gehemmt werden können, schließen Individuen ein, bei denen es wünschenswert ist, eine Immunantwort herabzumodulieren. Die Herabregulierung beabsichtigt sowohl die teilweise als auch die vollständige Hemmung von T-Zell-Antworten wie Lymphokinbildung und T-Zell-Proliferation zu umfassen. Die Verfahren sind zum Beispiel bei einem Individuum, das an einer Autoimmunerkrankung oder einer anderen Erkrankung leidet, die mit einer abnormalen Immunantwort einhergeht, oder einem Empfänger eines Transplantats anwendbar, wie der Empfänger eines Knochenmarkstransplantats oder eines Transplantats eines anderen Organs.

[0037] In einer Ausführungsform der Erfindung wird ein kostimulatorisches Signal in einer T-Zelle gehemmt, um antigenspezifisches Nichtreagieren der T-Zelle zu induzieren. Entsprechend betrifft ein anderer Aspekt der Erfindung Verfahren zur Induzierung des Nichtreagierens von T-Zellen auf ein Antigen. Der Begriff „Nichtreagieren von T-Zellen", wie er hierin gebraucht wird, bezieht sich auf eine Verminderung oder das Fehlen einer T-Zell-Antwort (z. B. Proliferation, Lymphokinsekretion oder Induzierung von Effektorfunktionen) durch eine T-Zelle, nachdem sie einem Antigen (oder einem antigenen Anteil) ausgesetzt wurde, gegen das die T-Zelle nichtreagierend gemacht wurde. Die Begriffe „Nichtreagieren von T-Zellen" und „T-Zell-Anergie" werden hier untereinander austauschbar verwendet. Das Nichtreagieren von T-Zellen mit einem Antigen kann durch das Auslösen eines antigenspezifischen primären Aktivierungssignals in der T-Zelle (z. B. Aktivierung durch den TCR/CD3-Komplex) in Abwesenheit eines kostimulatorischen Signals induziert werden. Im Verfahren der Erfindung wird ein kostimulatorisches Signal in einer T-Zelle durch Inkontaktbringen der T-Zelle mit einem Agens, das ein intrazelluläres mit Kostimulierung assoziiertes Signal beeinträchtigt, unterbunden. Spezifisch kann das Nichtreagieren der T-Zelle auf ein Antigen durch Inkontaktbringen einer antigenspezifischen T-Zelle (d. h. eine T-Zelle, die einen TCR exprimiert, der das Antigen erkennt) mit dem Antigen in einer geeigneten Form induziert werden, um ein

primäres Aktivierungssignal in der T-Zelle in der Gegenwart eines Agens auszulösen, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle hemmt, um ein kostimulatorisches Signal zu hemmen. Das Antigen kann zum Beispiel ein Autoantigen sein, das eine Autoimmunreaktion stimuliert, oder ein Alloantigen, das die Abstoßung von transplantierten Zellen stimuliert. Vorzugsweise hemmt das Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden hemmt, die Aktivität von PI3K in der T-Zelle, so wie Wortmannin oder Quercetin oder ein Derivat oder ein Analogon davon (z. B. LY294002). Zusätzliche Agenzien, die andere intrazelluläre mit Kostimulierung assoziierte Signale hemmen (wie vorstehend diskutiert), können ebenfalls in Verbindung mit einem Agens verwendet werden, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle hemmt. Zum Beispiel kann die T-Zelle mit einem PI3K-Inhibitor zusammen mit einem Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor wie Herbimycin A in Kontakt gebracht werden.

[0038] Um ein Nichtreagieren der T-Zelle zu induzieren, wird eine antigenspezifische T-Zelle mit einem Antigen in einer Form, die geeignet ist, ein primäres Aktivierungssignal in der T Zelle anzuregen, in Kontakt gebracht, was bedeutet, dass das Antigen der T-Zelle so präsentiert wird, dass in der T-Zelle ein Signal durch den TCR/CD3-Komplex ausgelöst wird.

[0039] Zum Beispiel kann das Antigen der T-Zelle durch eine Antigen präsentierende Zelle in Verbindung mit einem MHC-Molekül präsentiert werden. Eine syngene Antigen präsentierende Zelle wie eine B-Zelle, ein Makrophage, ein Monocyt, eine dendritische Zelle, eine Langerhanszelle oder eine andere Zelle, die einer T-Zelle ein Antigen präsentieren kann, kann mit der T-Zelle in Gegenwart des Antigens inkubiert werden, so dass die Antigen präsentierende Zelle der T-Zelle das Antigen präsentiert. Alternativ kann die T-Zelle, um Anergie gegenüber Alloantigenen zu induzieren, mit einer allogenen Zelle inkubiert werden, die der T-Zelle Alloantigene präsentiert.

[0040] Um ein Nichtreagieren der T-Zelle gegenüber einem Antigen in vivo zu induzieren, wird ein Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in einer T-Zelle hemmt, einem Individuum in einer Dosis und für eine Zeitspanne verabreicht, die ausreichend ist, um ein Nichtreagieren der T-Zelle gegenüber dem Antigen zu induzieren. Nach Verabreichung des Agens werden die antigenspezifischen T-Zellen endogen mit dem Antigen in Kontakt gebracht (zum Beispiel ein Autoantigen, das von den Zellen endogen exprimiert wird). Alternativ kann das Nichtreagieren von T-Zellen gegenüber einem Antigen in vitro induziert werden. In diesem Fall werden die T-Zellen von einem Individuum erhalten, mit dem Antigen in vitro zusammen mit dem Agens in Kontakt gebracht, um antigenes Nichtreagieren zu induzieren, und dem Individuum zurückverabreicht. Zum Beispiel können T-Zellen, die von einem Empfänger eines Transplantats erhalten werden, mit allogenen Zellen eines Spenders eines Transplantats zusammen vor der Transplantation des Transplantats in den Empfänger mit einem Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositid in den T-Zellen hemmt (z. B. Wortmannin, Quercetin, LY294002), und/oder mit einem oder mehreren Agenzien, die ein oder mehrere andere intrazelluläre, mit Kostimulierung assoziierte Signale hemmen, in Kontakt gebracht werden, um ein Alloantigen-spezifisches Nichtreagieren den T-Zellen zu induzieren. Die Empfänger-T-Zellen, die gegenüber den Donorantigenen nichtreagierend gemacht wurden, werden dann in den Empfänger zurückverabreicht. Alternativ kann im Falle einer Knochenmarkstransplantation das Knochenmark, das transplantiert werden soll (einschließlich jeglicher verbliebener T-Zellen), in vitro mit den allogenen Zellen aus dem Knochenmarksempfänger zusammen mit einem Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden und/oder andere intrazelluläre mit Kostimulierung assoziierte Signale hemmt, in Kontakt gebracht werden, um ein Nichtreagieren in den Donor-T-Zellen gegenüber Alloantigenen des Empfängers zu induzieren. Diese Vorbehandlung kann durchgeführt werden, um die Graft-versus-Host-Erkrankung zu hemmen.

[0041] Die Verfahren zur Induzierung des Nichtreagierens von T-Zellen können therapeutisch in Situationen angewendet werden, bei denen es wünschenswert ist, eine Immunantwort herabzuregulieren, wie Transplantation einschließlich Organtransplantate und Knochenmarkstransplantate (wie vorstehend diskutiert) und Autoimmunerkrankungen und andere Erkrankungen, die mit einer abnormalen Immunantwort einhergehen. Beispiele für Autoimmunerkrankungen und Erkrankungen, die mit einer unzureichenden oder abnormalen Immunantwort einhergehen, umfassen rheumatoide Arthritis, juvenile rheumatoide Arthritis, psoriatische Arthritis, Allergien, Kontaktdermatitis, Psoriasis, lepröse Umkehrreaktionen, Erythema nodosum leprosum, Autoimmunuveitis, multiple Sklerose, allergische Encephalomyelitis, systemischen Lupus erythematodes, akute nekrotisierende hämorrhagische Encephalopathie, idiopathischen bilateralen progressiven sensorineuralen Hörverlust, aplastische Anämie, reine Anämie der roten Zellen, idiopathische Thrombocytopenie, Polychondritis, Skleroderma, Wegeners Granulomatosis, chronische aktive Hepatitis, Myasthenia gravis, Stevens-Johnson Syndrom, idiopathische Sprue, Lichen planus (Knötchenflechte), Morbus Crohn, Graves Ophtalmopathie, Sarcoidosis, primäre biliäre Zirrhose, primären juvenilen Diabetes, trockenes Auge einhergehend mit Sjögren Syndrom, Uveitis posterior und interstitielle Lungenfibrose.

[0042] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft die Stimulierung einer T-Zell-Antwort durch Bereitstel-

lung eines kostimulatorischen Signals für eine T-Zelle. Die Gabe eines kostimulatorischen Signals in Verbindung mit einem primären Aktivierungssignal kann eine T-Zell-Antwort hervorrufen. Im Verfahren der Erfindung wird ein kostimulatorisches Signal durch Inkontaktbringen einer T-Zelle, die ein primäres Aktivierungssignal erhalten hat, mit einem Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle stimuliert, bereitgestellt. Eine T-Zell-„Antwort" beabsichtigt die Bildung von mindestens einem Lymphokin (z. B. IL-2) durch die T-Zelle und/oder die Proliferation der T-Zelle zu umfassen. Ein primäres Aktivierungssignal kann der T-Zelle mittels Stimulierung der T-Zelle durch den TCR/CD3-Komplex gegeben werden, zum Beispiel durch anti-CD3-Antikörper oder durch einen MHC/Antigen-Komplex oder durch Verwendung eines Agens, der diese Stimulierung imitiert, zum Beispiel Phorbolester (z. B. PMA). Mit dem Begriff „Agens", wie er hier gebraucht wird, wird beabsichtigt Chemikalien oder andere pharmazeutische Verbindungen zu umfassen, die ein kostimulatorisches Signal in der T-Zelle stimulieren ohne die Notwendigkeit einer Wechselwirkung zwischen einem T-Zell-Oberflächenrezeptor und einem kostimulatorischen Molekül. Zum Beispiel kann das Agens intrazellulär wirken, um ein mit der Kostimulierung assoziiertes Signal zu stimulieren. In einer Ausführungsform ist das Agens eine nicht-proteinartige Verbindung. Da mit dem in diesem Verfahren verwendeten Agens beabsichtigt wird, den natürlichen kostimulatorischen Mechanismus von Rezeptor : Ligand zu umgehen, wird mit dem Begriff Agens nicht beabsichtigt eine Zelle einzuschließen, die den natürlichen Liganden von CD28/CTLA4 exprimiert (z. B. B7-1 und/oder B7-2 exprimierend).

[0043] Vorzugsweise wird die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle durch Inkontaktbringen der T-Zelle mit einem Aktivator von PI3K stimuliert. Aktivatoren von PI3K können zum Beispiel durch die vorstehend beschriebenen Verfahren identifiziert werden. Zusätzliche Agenzien, die eine oder mehrere andere intrazelluläre mit Kostimulierung assoziierte Signale stimulieren, können in Verbindung mit einem Aktivator der Bildung von D-3-Phosphoinositiden verwendet werden. Zum Beispiel kann die T-Zelle sowohl mit einem ersten Agens, das PI3K-Aktivität stimuliert, in Kontakt gebracht werden als auch mit einem zweiten Agens, das Protein-Tyrosinphosphorylierung innerhalb der T-Zelle stimuliert. Protein-Tyrosinphosphorylierung kann zum Beispiel durch Inkontaktbringen einer T-Zelle mit einem Aktivator von Protein-Tyrosinkinasen wie Pervanadat in der T-Zelle stimuliert werden (vgl. O'Shea, J. J. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10306–10310 und Secrist, J. P. (1993) J. Biol. Chem. 268: 5886-5893). Die T-Zelle kann auch mit einem ersten Agens in Kontakt gebracht werden, das PI3K stimuliert, und einem zweiten Agens, das Protein-Serinphosphorylierung innerhalb der T-Zelle stimuliert, zum Beispiel durch Inkontaktbringen einer T-Zelle mit einem Aktivator von Protein-Serinkinasen. In einer anderen Ausführungsform wird die T-Zelle weiterhin mit einem dritten Agens in Kontakt gebracht, das Protein-Tyrosinphosphorylierung stimuliert. Alternativ kann die T-Zelle sowohl mit einem Aktivator von PI3K als auch einem Agens, das die Aktivität einer zellulären Protein-Tyrosinphosphatase hemmt, wie CD45, in Kontakt gebracht werden, um die Nettomenge der Protein-Tyrosinphosphorylierung in der T-Zelle zu erhöhen, und/oder mit einem Agens, das die Aktivität einer zellulären Protein-Serinphosphatase hemmt. Das Verfahren umfasst auch die Stimulierung von anderen intrazellulären mit Kostimulierung einer T-Zelle assoziierten Signalen wie die Stimulierung der Aktivität von Phospholipase C und/oder Erhöhungen der intrazellulären Calciumspiegel.

[0044] Eine andere Ausführungsform der Erfindung stellt eine Zusammensetzung zur Stimulierung einer spezifischen Antwort auf ein Antigen durch eine antigenspezifische T-Zelle bereit. Um eine T-Zell-Antwort zu stimulieren, wird eine antigenspezifische T-Zelle mit einem Antigen zusammen mit einem Agens in Kontakt gebracht, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle stimuliert und dadurch ein kostimulatorisches Signal in der T-Zelle auslöst. Vorzugsweise ist das Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle stimuliert, ein Aktivator von PI3K. Die T-Zelle wird mit dem Antigen in einer für die Stimulierung eines primären Aktivierungssignals in der T-Zelle (z. B. durch den TCR/CD3-Komplex) geeigneten Form in Kontakt gebracht, wie beispielsweise in Verbindung mit einem MHC-Molekül. Eine Antigen präsentierende Zelle (z. B. eine B-Zelle, ein Makrophage, ein Monocyt, eine dendritische Zelle, eine Langerhanszelle oder eine andere Zelle, die einer T-Zelle Antigen präsentieren kann) kann mit der T-Zelle in Gegenwart des Antigens (z. B. ein lösliches Antigen) inkubiert werden. Alternativ kann eine Zelle, die ein interessierendes Antigen exprimiert, mit der T-Zelle inkubiert werden. Zum Beispiel kann eine Tumorzelle, die tumorassoziierte Antigene exprimiert, mit einer T-Zelle zusammen mit einem Agens inkubiert werden, das ein intrazelluläres kostimulatorisches Signal induziert, um eine tumorspezifische Antwort zu induzieren. Alternativ kann eine mit einem Pathogen, z. B. mit einem Virus, infizierte Zelle, die Antigene des Pathogens präsentiert, mit einer T-Zelle in Gegenwart des Agens inkubiert werden. Zusätzlich zur Stimulierung der Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle kann die T-Zelle mit einem oder mehreren anderen Agenzien in Kontakt gebracht werden, die eine oder mehrere zusätzliche intrazelluläre mit CD28-Ligandenbindung assoziierte Signale stimulieren, zum Beispiel ein Aktivator einer Protein-Tyrosinkinase wie beispielsweise Pervanadat oder ein Aktivator einer Serinkinase.

[0045] Ein Agens, das ein CD28-assoziiertes intrazelluläres Signal in T-Zellen stimuliert, z. B. ein Aktivator von PI3K, kann einem Individuum in vivo verabreicht werden oder alternativ kann eine T-Zelle von einem Individuum erhalten, in vitro stimuliert und dem Individuum zurückverabreicht werden. Die Verfahren zur Stimulierung von T-Zell-Antworten sind in therapeutischen Situationen nützlich, in denen es wünschenswert ist, eine Immunantwort hinaufzuregulieren (z. B. eine Antwort zu induzieren oder eine vorhandene Antwort zu verstärken). Zum Beispiel kann das Verfahren verwendet werden, um eine T-Zell-Antwort gegen tumorassoziierte Antigene zu verstärken. Tumorzellen von einem Individuum exprimieren typischerweise tumorassoziierte Antigene, aber sie können unfähig sein, ein kostimulatorisches Signal in T-Zellen zu stimulieren (z. B. wegen des Fehlens der Expression von kostimulatorischen Molekülen). Daher können Tumorzellen mit T-Zellen aus einem Individuum mit einem Agens, das D-3-Phosphoinositide in den T-Zellen stimuliert, in Kontakt gebracht werden, um ein kostimulatorisches Signal in der T-Zelle anzuregen. Alternativ können T-Zellen, wie hier beschrieben, dazu stimuliert werden, ein Reagieren gegenüber pathogenen Agenzien wie Viren (z. B. das menschliche Immunschwächevirus), Bakterien, Parasiten und Pilzen zu induzieren oder zu verstärken. Zusätzlich kann die Wirksamkeit von Impfstoffen gegen solche pathogenen Agenzien verstärkt werden. Zum Beispiel kann ein Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in den T-Zellen stimuliert, einem Individuum, das mit einem pathogenen Agens infiziert ist, verabreicht werden oder es kann mit einem Impfstoff gemeinsam verabreicht werden, um die Reaktivität der T-Zellen gegen Antigene des Impfstoffs zu verstärken. Alternativ können T-Zellen in vitro mit Antigen präsentierenden Zellen, die ein Antigen bzw. Antigene aus einem pathogenen Agens exprimieren, zusammen mit einem Agens kultiviert werden, das ein intrazelluläres mit Kostimulierung assoziiertes Signal stimuliert (z. B. ein Aktivator der PI3K).

[0046] Eine andere Anwendung des Verfahrens zur Stimulierung von T-Zell-Antworten betrifft Patienten, die eine beeinträchtigte Signaltransduktion durch CD28 und/oder einem oder mehreren anderen mit Kostimulierung assoziierten Zelloberflächenmolekülen (z. B. CTLA4) aufweisen. Zum Beispiel wurde von einem Patienten mit idiopathischer Thrombocytopenie berichtet, der eine defekte durch CD28 vermittelte Signaltransduktion aufwies, die vermutlich auf einem kongenitalen Defekt beruht (vgl. Perez-Blas, M. et al. (1991) Clin. Exp. Immunol. 85: 424–428). In Patienten mit defekter Fähigkeit zur Signalisierung über CD28, kann es möglich sein, den Defekt zu umgehen und die von CD28 abhängige T-Zell-Aktivierung durch Inkontaktbringen von T-Zellen aus dem Patienten mit einem oder mehreren Agenzien, die intrazelluläre Signale stimulieren, die nach normaler CD28-Ligandenbindung erzeugt werden, wiederherzustellen. Zum Beispiel kann ein Patient mit einem Defekt, der zu verminderter oder fehlender Bildung von D-3-Phosphoinositiden nach CD28- Ligandenbindung führt, durch Inkontaktbringen von T-Zellen aus dem Patienten mit einem Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle stimuliert, behandelt werden.

[0047] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft Durchmusterungstests zur Identifizierung von Inhibitoren und Aktivatoren von PI3K, die dann verwendet werden können, um T-Zell-Antworten zu hemmen beziehungsweise zu stimulieren. PI3K ist ein Heterodimer, das aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit besteht. Zwei Formen des Enzyms, die vorzugsweise PtdIns(4,5)P_2 als Substrat verwenden und durch Wortmannin hemmbar sind, wurden beschrieben (vgl. Otsu, M. et al. (1991) Cell 65: 91–104, Hu, P. et al. (1993) Mol. Cell. Biol. 13: 7677–7688 und Hiles, I. D. et al. (1992) Cell 70: 419). Eine andere Form des Enzyms, die vorzugsweise PtdIns als Substrat verwendet und nicht durch Wortmannin hemmbar ist, wurde ebenfalls beschrieben (vgl. Stephens, L. et al. (1994) Curr. Biol. 4: 203–214). Es wird anerkannt werden, dass die Identifizierung von spezifischen Inhibitoren oder Aktivatoren von PI3K für die geeignete(n) intrazelluläre(n) Formen) von PI3K, die bei kostimulatorischen Signalen beteiligt ist/sind, spezifisch sein müssen, um unerwünschte oder nachteilige Nebenwirkungen zu vermeiden. Daher werden Agenzien bevorzugt, die spezifisch (eine) Formen) der PI3K, die an der Kostimulierung beteiligt ist/sind (z. B. eine Form, die auch durch Wortmannin hemmbar ist), hemmen oder aktivieren.

[0048] In einer Ausführungsform basiert ein Durchmusterungstest der Erfindung auf der Fähigkeit eines Inhibitors oder Aktivators einer PI3K, die Bildung von mindestens einem D-3-Phosphoinositid in einer T-Zelle (vorzugsweise PtdIns(3,4,5)P_3) zu hemmen beziehungsweise zu stimulieren. Um einen Inhibitor von PI3K zu identifizieren, wird eine T-Zelle durch einen Zelloberflächenrezeptor, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, (d. h. eine T-Zelle, die ein kostimulatorisches Signal erhalten hat) in Gegenwart und in Abwesenheit einer zu prüfenden Substanz stimuliert. Vorzugsweise wird im Test eine T-Zelle verwendet, die CD28 exprimiert. Alternativ kann eine T-Zelle verwendet werden, die CTLA4 exprimiert. Ein kostimulatorisches Signal kann in der T-Zelle durch Inkontaktbringen der T-Zelle mit einem Liganden für CD28 oder CTLA4 stimuliert werden. Vorzugsweise ist der Ligand eher ein physiologischer Ligand wie membrangebundenes B7-1 oder B7-2 als Antikörper, die gegen den T-Zell-Oberflächenrezeptor gerichtet sind. Eine Zelle, die natürlicherweise B7-1 und/oder B7-2 exprimiert, kann verwendet werden oder stärker bevorzugt wird eine Zelle (z. B. eine CHO-Zelle) ver-

wendet, die so transfiziert ist, dass sie ein kostimulatorisches Molekül exprimiert. In Gegenwart eines Inhibitors der PI3K führt die Stimulierung einer T-Zelle durch einen Oberflächenrezeptor, der ein kostimulatorisches Molekül (z. B. CD28) bindet, zu verminderter Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle im Vergleich zur Stimulierung in Abwesenheit des Inhibitors. Die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T Zelle kann durch ein beliebiges geeignetes, in der Fachwelt bekanntes Verfahren gemessen werden. Zum Beispiel kann die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (wie in den Beispielen beschrieben) gemessen werden. Alternativ kann die Bildung von D-3-Phosphoinositiden durch Dünnschichtchromatographie bestimmt werden, z. B. wie bei Okada, T. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 3563–3567 beschrieben. D-3-Phosphoinositide, deren intrazelluläre Bildung bestimmt werden kann, umfassen PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P_2 und PtdIns(3,4,5)P_3.

[0049] Vorzugsweise wird die Bildung von PtdIns(3,4,5)P_3 in der T-Zelle in Gegenwart oder in Abwesenheit von der zu prüfenden Substanz nachgewiesen.

[0050] Um einen Aktivator einer PI3K zu identifizieren, wird eine T-Zelle, die einen Zelloberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, mit einer zu prüfenden Substanz in Kontakt gebracht. Ein Aktivator von PI3K wird basierend auf seiner Fähigkeit, die Bildung von mindestens einem D-3-Phosphoinositid in einer T-Zelle (vorzugsweise PtdIns(3,4,5)P_3) zu stimulieren, identifiziert. Daher ist die Menge eines D-3-Phosphoinositids in der T-Zelle in Gegenwart eines PI3K-Aktivators im Vergleich zur Menge des D-3-Phosphoinositid in der T-Zelle in Abwesenheit der Substanz erhöht. Die Bildung von D-3-Phosphoinositiden (z. B. PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P_2 und/oder PtdIns(3,4,5)P_3) in der T-Zelle kann mit Standardverfahren wie Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie oder Dünnschichtchromatographie, wie vorstehend diskutiert, untersucht werden.

[0051] In einer anderen Ausführungsform der Durchmusterungstests der Erfindung wird die Fähigkeit einer Substanz, die Aktivität der aus einer Zelle isolierten PI3K direkt zu inhibieren oder zu stimulieren, untersucht und dann wird eine Substanz, die als Inhibitor oder als Aktivator der PI3K identifiziert wurde, mit einer T-Zelle in Kontakt gebracht, um die Fähigkeit der Substanz, eine T-Zell-Antwort zu hemmen oder zu stimulieren, zu bestimmen. Zum Beispiel wird eine isolierte PI3K mit einem Substrat (z. B. PtdIns(4,5)P_2) in Gegenwart eines radioaktiv markierten Phosphatdonors und der zu prüfenden Substanz inkubiert. Ein Inhibitor der Kinaseaktivität der PI3K wird eine reduzierte Phosphorylierung des Substrates (im Vergleich zur Phosphorylierung in Abwesenheit des Inhibitors) hervorrufen, während ein Aktivator eine erhöhte Phosphorylierung des Substrates hervorrufen wird (im Vergleich zur Phosphorylierung in Abwesenheit des Aktivators). Ein Inhibitor oder Aktivator, der so in vitro identifiziert wurde, wird dann mit der T-Zelle in Kontakt gebracht, um die Fähigkeit des Inhibitors oder Aktivators eine T-Zell-Antwort (z. B. die Bildung von IL-2) zu hemmen bzw. zu stimulieren, zu bestimmen.

[0052] Die Erfindung betrifft weiterhin ein Phosphotyrosin-Protein von etwa 67 kDa, das mit CD28 in Jurkat-Zellen und peripheren Blutzellen, wie in den Beispielen beschrieben, assoziiert ist. Dieses neue Protein, 67 K genannt, scheint unterschiedlich zur itk/emt-Proteinkinase, lck und PI3K zu sein und ist höchstwahrscheinlich an einem mit CD28 assoziierten Signaltransduktionsweg beteiligt. In einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung wird der CD28-Signaltransduktionsweg, an dem 67 K beteiligt ist, durch Unterbindung der Aktivierung von 67 K, zum Beispiel durch Unterbindung seiner Phosphorylierung, gehemmt. Alternativ wird der mit 67 K assoziierte Signaltransduktionsweg durch Hemmung der Wechselwirkung zwischen 67 K und CD28 gehemmt. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird der mit 67 K assoziierte Signaltransduktionsweg durch Aktivierung der 67 K oder durch Stimulierung der Wechselwirkung zwischen 67 K und CD28 stimuliert. Aktivierung oder Hemmung des Signaltransduktionsweges unter Beteiligung der 67 K kann mit einer beliebigen der vorstehend beschriebenen Ausführungsformen durchgeführt werden, was zur Unterbindung von T-Zell-Antworten oder alternativ zur Stimulierung von T-Zell-Antworten führt.

Andere Ausführungsformen

[0053] Andere Zelltypen zusätzlich zu T-Zellen, die CD28 auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden beschrieben. Diese Zelltypen umfassen Plasmazellen (vgl. Kozbor, D. et al. (1987) J. Immunol. 138: 4128–4132) und Mastzellen aus dem Knochenmark. Stimulierung von anderen $CD28^+$-Zelltypen durch CD28 kann ebenfalls zur Bildung von D-3-Phosphoinositiden in den T-Zellen und zur Erzeugung von spezifischen Zell-Antworten führen. Hemmung oder Aktivierung der Bildung von D-3-Phosphoinositiden in diesen Zellen durch die hier beschriebenen Verfahren können ebenfalls nützlich für die Hemmung oder Stimulierung von Antworten durch andere $CD28^+$-Zelltypen sein.

[0054] Diese Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele weiter verbildlicht, die jedoch nicht als einschränkend aufgefasst werden sollten. Der Inhalt von allen Referenzen, Patenten und veröffentlichten Patentanmeldungen, die innerhalb dieser Anmeldung zitiert werden, wird hiermit durch Bezugnahme eingebunden.

BEISPIEL 1: Ligandenbindung von CD28 stimuliert die Bildung von D-3-Phosphoinositiden

[0055] In diesem Beispiel wurde die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in $CD28^+$-Jurkat-Zellen nach Stimulierung der Jurkat-Zellen durch CD28 oder CD3 untersucht. Jurkat-Zellen wurden mit trägerfreiem [^{32}P]-Orthophosphat ([^{32}Pi]) wie folgt markiert: Jurkat-Zellen wurden dreimal in phosphatfreiem Medium (DMEM/RPMI) gewaschen und für 10 Minuten bei 37°C zwischen den Waschschritten inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml phosphatfreiem Medium, enthaltend 20 mM HEPES, pH 7,4, und 5% dialysiertem fötalem Kälberserum (über Nacht gegen physiologische Salzlösung dialysiert) resuspendiert. Trägerfreies [^{32}Pi] wurde zu den Zellen gegeben (1 mCi/10 ml Zellen) und die Zellen wurden für 4 bis 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Markierung wurden die Zellen dreimal mit phosphatfreiem Medium gewaschen und in RPMI 1640-Medium mit 20 mM HEPES resuspendiert.

[0056] In verschiedenen Experimenten wurden Aliquots von [^{32}Pi]markierten Jurkat-Zellen (0,15 ml, 2 × 10^7 Zellen) stimuliert mit Medium allein, einem anti-CD3 Antikörper (G19-4), einem anti-CD28 Antikörper (9.3), nicht transfizierten CHO-Zellen oder CHO-Zellen, die transfiziert wurden, um einen CD28-Liganden zu exprimieren, entweder menschliches B7-1 (CHO-B7-1) oder B7-2 (CHO-B7-2). [erhalten von Dr. G. Freeman und Dr. L. Nadler; CHO-Zellen wurden mittels Standardverfahren mit einem rekombinanten Expressionsvektor transfiziert, enthaltend eine DNA, die menschliches B7-1 codiert, deren Sequenz offengelegt wird bei Freeman, G. J. et al. (1989) J. Immunol. 142: 2714–2722, oder eine cDNA, die menschliches B7-2 codiert, deren Sequenz offengelegt wird bei Freeman, G. J. et al. (1993) Science 262: 909–911]. Für die Stimulierung mit CHO-Zellen wurden Jurkat-Zellen mit 10^7 CHO-Zellen inkubiert und der Zellkontakt wurde durch Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit in einer Mikrofuge für 5 Sekunden erreicht. Nach verschiedenen Zeitspannen nach Stimulierung (im Bereich zwischen 1 und 25 Minuten) wurden die Zellen lysiert und Phospholipide wurden extrahiert, desacetyliert und durch Anionenaustausch-HPLC getrennt, grundsätzlich wie bei Ward, S. G. et al. (1992) J. Immunol. 22: 45 beschrieben, mit Modifikationen, wie nachstehend beschrieben.

[0057] Die Inkubationen wurden durch Zugabe von 750 ml $CHCl_3$/Methanol/Wasser (32,6%/65,3%/2,1% Vol./Vol./Vol.) beendet. Sobald die Zellreaktionen unterdrückt waren, wurden die Proben während der nachfolgenden Extraktionen auf Eis gehalten. Die Phasen wurden durch Zugabe von 725 ml $CHCl_3$ (enthaltend 10 mg Folch-Lipide, z. B. von Sigma, Katalog-Nr. B1502) und 172 ml 2,4 M HCl, 5 mM Tetrabutylammoniumsulfat zu jeder Probe getrennt. Die Proben wurden auf einem Vortex-Gerät geschüttelt und für 5 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die untere Phase wurde entfernt und in ein Gefäß mit ½ Volumen 1 M HCl, 25 mM Na_2EDTA, pH 7,0, 5 mM Tetrabutylammoniumsulfat gegeben. Die Proben wurden erneut zentrifugiert, um die Phasen zu trennen, die untere Phase wurde entfernt und in ein sauberes Gefäß überführt und die Probe wurde im Vakuum eingetrocknet. Die Proben wurden durch Zugabe von 1 ml Methylaminreagenz (40% in Wasser/Methanol/n-Butanol 4 : 4 : 1 Vol./Vol./Vol.), Schütteln auf einem Vortex-Gerät und Inkubation bei 53°C für 40 Minuten desacyliert. Die Proben wurden auf Eis gelagert und im Vakuum getrocknet. Die Proben wurden in 0,5 ml sterilem destillierten Wasser resuspendiert und auf dem Vortex-Gerät vermischt. Die Proben wurden zweimal mit 0,7 ml n-Butanol : 40–60% Petroleumether/Ameisensäureethylester (20 : 4 : 1 Vol./Vol./Vol.) extrahiert. Die untere wässrige Phase wurde im Vakuum getrocknet und vor der HPLC-Analyse bei –70°C aufbewahrt.

[0058] HPLC wurde unter Verwendung eines Gradienten basierend auf den Puffern A (Wasser)/B [1,25 M $(NH_4)_2HPO_4$] (mit H_3PO_4 bei 25°C auf pH 3,8 eingestellt) und einer Partisphere SAX-Säule (im Handel bei Whatman bezogen) durchgeführt. Desacetylierte Phospholipidproben wurden in 0,1 ml destilliertem Wasser resuspendiert und auf die Säule injiziert. Mit dem Eluat wurde ein Canberra Packard A-500 Flo-One on-line beta-Radiodetektor bestückt, wobei es mit drei Teilen Flo-Scint N-Scintillationsmischung vermischt wurde und die Ergebnisse wurden mit dem Flo-One-Datenprogramm (Radiomatic, USA) analysiert. Eluierte Peaks wurden mit den Retentionszeiten von Standards, die aus [^{3}H]PtdIns, [^{3}H]PtdIns(4)P und [^{3}H]PtdIns(4,5)P_2 (im Handel bei Amersham International bezogen) hergestellt wurden, verglichen. Die Standards [^{32}P]PtdIns(3)P, [^{32}P]PtdIns(3,4)P_2 und [^{32}P]PtdIns(3,4,5)P_3 wurden durch Inkubation isolierter Phosphatidylinosit-3-Kinase mit PtdIns (im Handel bei Sigma bezogen), wie bei Ward, S. G. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 23862 beschrieben, hergestellt.

[0059] Die Bildung von PtdIns(3,4,5)P_3 in Jurkat-Zellen nach Stimulierung mit anti-CD3- oder anti-CD28-Antikörpern für 1–5 Minuten wird in **Fig. 1** gezeigt. Die Ergebnisse zeigen, dass während die Stimulierung durch entweder CD3 oder CD28 die Bildung von PtdIns(3,4,5)P_3 induziert, die Induktionskinetiken für die beiden Wege unterschiedlich sind. Nach CD3-Stimulierung erhöht sich die PI3K-Aktivierung (durch die Bildung von PtdIns (3,4,5)P_3 bestimmt) frühzeitig (d. h. innerhalb von 2 Minuten) und ist vorrübergehend (d. h. sie geht innerhalb von 5 Minuten auf die Basislinie zurück). Im Gegensatz dazu ist die durch CD28-Stimulierung induzierte PI3K-Aktivierung im Vergleich zur CD3-Stimulierung verzögert (d. h. sie ist erst nach 5 Minuten oder später ma-

ximal) und bleibt länger bestehen als die durch CD3-Stimulierung induzierte. Diese Ergebnisse zeigen an, dass unterschiedliche Mechanismen bei der PI3K-Aktivierung beteiligt sind, die durch Bindung von entweder CD3 oder CD28 vermittelt wird.

[0060] Die Bildung von PtdIns(3,4,5)P_3 in Jurkat-Zellen nach Stimulierung mit CHO-B7-1- oder CHO-B7-2-Zellen für 0–20 Minuten wird in Fig. 2 gezeigt. Die Ergebnisse zeigen an, dass die Stimulierung von CD28 mit entweder B7-1 oder B7-2 eine wirksame Aktivierung von PI3K induziert (bestimmt durch die Bildung von PtdIns(3,4,5)P_3). Die Kinetik der Induktion ist leicht unterschiedlich für die beiden CD28-Liganden: B7-1 stimuliert die Aktivierung früher als B7-2, obwohl beide auf der gleichen Höhe eine Sättigung erreichen. Die Stimulierung der Bildung von PtdIns(3,4,5)P_3 durch entweder B7-1 oder B7-2 ist sehr stark und anhaltend (d. h. sie dauert mehr als 20 Minuten an).

[0061] Dieses Beispiel zeigt, dass die Stimulierung von T-Zellen durch CD28 entweder durch seine natürlichen Liganden B7-1 und B7-2 oder durch einen anti-CD28-Antikörper die Bildung von D-3-Phosphoinositiden innerhalb von T-Zellen induziert, was die Aktivierung von PI3K nach CD28-Ligierung zeigt. Zusätzlich zeigt dieses Beispiel, dass CD28 B7-1 und B7-2 als physiologische Liganden gemeinsam benutzt, da Jurkat-Zellen $CD28^+$ aber $CTLA4^-$ sind und nicht dazu induziert werden können CTLA4 zu exprimieren (wie in Lindsten, T. (1993) J. Immunol. 151: 3489–3499, gezeigt wird). Daher wird CTLA4 offensichtlich für die durch B7 induzierte Signaltransduktion nicht benötigt und sowohl B7-1 als auch B7-2 sind physiologische Liganden für CD28.

BEISPIEL 2: Ein Phosphatidylinosit-3-Kinase-Inhibitor kann die durch CD28-Ligandenbindung induzierte Bildung von D-3-Phosphoinositiden hemmen

[0062] In diesem Beispiel wurde die Wirkung eines Inhibitors der Phosphatidylinosit-3-Kinase auf die durch CD28 vermittelte Bildung von D-3-Phosphoinositiden in Jurkat-Zellen untersucht. Jurkat-Zellen wurden mit Orthophosphat markiert und mit CHO-Zellen stimuliert, die zur Expression von B7-2 transfiziert wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben. Zusätzlich wurden die Zellen während der Stimulierung in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen (0–100 mM) des Pilzmetabolits Wortmannin inkubiert, der ein Inhibitor der Phosphatidylinosit-3-Kinase ist. Wortmannin wurde im Handel bei Sigma Chemical Co. bezogen und als 10 mM Lösung in DMSO bei –40°C gelagert. Es wurde unmittelbar vor der Zugabe zu Zellen in Kultur in Medium verdünnt. Nach der Stimulierung in Gegenwart oder Abwesenheit von Wortmannin wurde die Menge des in den Zellen gebildeten PtdIns(3,4,5)P_3 mittels HPLC gemessen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Ergebnisse werden in Fig. 3 gezeigt, in der die Menge an PtdIns(3,4,5)P_3, welches in mit Wortmannin behandelten Jurkat-Zellen nach Stimulierung mit CHO-B7-2 nachgewiesen wird, grafisch als Prozentsatz der Menge an PtdIns(3,4,5)P_3 aufgetragen ist, die in unbehandelten, mit CHO-B7-2 stimulierten Jurkat-Zellen nachgewiesen wird. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung von Jurkat-Zellen mit steigenden Konzentrationen von Wortmannin die Menge der D-3-Phosphoinositide, die in den Zellen nach Ligandenbindung von CD28 mit B7-2 gebildet werden, verringert. Entsprechend zeigt dieses Beispiel, dass die intrazelluläre Erzeugung von D-3-Phosphoinositiden als Ergebnis der Stimulierung von T-Zellen durch CD28 durch die Hemmung der Aktivität der Phosphatidylinosit-3-Kinase innerhalb der T-Zellen inhibiert werden kann.

BEISPIEL 3: Wirkung von pharmakologischen Inhibitoren auf den durch CD28 vermittelten Calciumfluss

[0063] In diesem Beispiel wurde die Wirkung von pharmakologischen Inhibitoren auf den durch anti-CD28-Antikörper induzierten Calciumfluss in Jurkat-Zellen untersucht. Die untersuchten pharmakologischen Inhibitoren waren Wortmannin, das die Aktivität von PI3K inhibiert, und Herbimycin A, das die Aktivität von Protein-Tyrosinkinasen inhibiert. Jurkat-Zellen wurden mit einem anti-CD28-Antikörper entweder nur in Medium oder in Gegenwart von Wortmannin oder Herbimycin A stimuliert und die mittlere Calciumkonzentration (nM) in den Zellen wurde über mehrere Minuten hinweg nach Stimulierung gemessen. Wie in Fig. 4 dargestellt wird, war Herbimycin A dazu fähig, den durch CD28-Antikörper induzierten Calciumfluss zu hemmen. Im Gegensatz dazu war Wortmannin nicht in der Lage, den durch CD28-Antikörper induzierten Calciumfluss zu hemmen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Wirkungen von Wortmannin auf T-Zellen nicht durch die Beeinträchtigung des Calciumflusses vermittelt werden. In Anbetracht der Ergebnisse, die nachstehend in Beispiel 5 beschrieben werden, die zeigen, dass Wortmannin die Kostimulierung, gemessen anhand der Bildung von IL-2, durch B7-1 oder B7-2 hemmt, zeigen diese Daten weiterhin, dass die Messung von durch CD28 induzierter Calciumerhöhung wahrscheinlich ein irreführendes Kriterium zur Beurteilung von Verbindungen ist, die spezifisch ein Nichtreagieren von T Zellen (d. h. Anergie) oder Kostimulierung induzieren.

BEISPIEL 4: Induktion des Calciumflusses durch natürliche CD28-Liganden

[0064] In diesem Beispiel wurde die Adhäsion von CHO-B7-1 oder CHO-B7-2 an Jurkat-Zellen und die Induktion der Calcium-Mobilisierung in Jurkat-Zellen als Antwort auf die Stimulierung mit CHO-B7-1 und CHO-B7-2 untersucht. Ein durchflusscytometrischer

Calcium-Konjugat-Test, wie bei Abe, R. et al. (1992) J. Exp. Med. 176: 459–468 beschrieben, wurde verwendet. Im Zell-Konjugat-Test werden die T-Zellen mit der Calcium-sensitiven Fluoreszenzsonde Indo-1 (die blaue und grüne Signale erzeugt) beladen. CHO-Zellen, die mit einem Kontrollplasmid (CHO-neo) transfiziert wurden, oder CHO-Zellen, die so transfiziert wurden, dass sie B7-1 oder B7-2 exprimieren, werden mit dem Nachweisfarbstoff DilC22(3) (welcher rote Signale erzeugt; im Handel bei Molecular Probes bezogen) beladen. Konjugate aus Jurkat-Zellen und CHO-Zellen werden mittels Durchflusscytometrie analysiert. Konjugate, bestehend aus T-Zellen und CHO-Zellen, können durch Kanalisierung („gating") auf rote Signale und Calciumspiegel in den T-Zellen können durch Kanalisierung auf blaue und grüne Signale gemessen werden. Die Ergebnisse werden als Serie von Zwei-Parameter-Punktdiagrammen, gezeigt in Fig. 5, dargestellt. Calcium (Indo-1-Anteil) ist auf der Y Achse und Zellkonjugate (roter Nachweisfarbstoff) ist auf der X-Achse aufgetragen. Zellen im oberen rechten Quadranten repräsentieren Jurkat-Zellen mit hohen Calciumspiegeln, die mit CHO-Zellen konjugiert sind. Zellen im unteren rechten Quadranten repräsentieren Jurkat-Zellen mit normalem Calciumspiegeln, die mit CHO-Zellen konjugiert sind. Zellen in den oberen und unteren linken Quadranten repräsentieren nicht-konjugierte Jurkat-Zellen mit hohen beziehungsweise niedrigen Calciumspiegeln.

[0065] Die Daten weisen darauf hin, dass sowohl B7-1 als auch B7-2 die Adhäsion an Jurkat-Zellen vermitteln kann. Beide Liganden sind jedoch schwache Auslöser erhöhter Calcium-Mobilisierung. Daher sind B7-1 und B7-2 viel effizienter bezüglich der Induzierung der PI3K-Aktivierung (vgl. Beispiel 1) als bezüglich der Calcium-Mobilisierung. Im Gegensatz dazu sind anti-CD28-Antikörper in der Lage, sowohl PI3K-Aktivierung (vgl. Beispiel 1) als auch Calciumfluss (vgl. Beispiel 3) zu stimulieren. Daher scheint es Unterschiede bei den intrazellulären Signalen zu geben, die durch CD28-Ligandenbindung erzeugt werden, abhängig davon, ob natürliche Liganden (z. B. B7-1 oder B7-2) oder Antikörper für die Stimulierung verwendet werden. Es wurde zuvor beschrieben (Nunes, J. et al. (1993) Int. Immunol. 5: 311–315), dass CD28-Antikörper vielfältige und unterschiedliche Wirkungen auf biochemische Aspekte der T-Zell-Signaltransduktion und -Aktivierung (z. B. IL-2-Bildung) haben können. Diese Beobachtungen weisen weiterhin darauf hin, dass es nicht möglich war, die biochemischen Wirkungen von natürlichen Liganden von CD28 (d. h. membrangebundenes B7-1 und B7-2) auf die Bildung von D-3-Metaboliten, wie hierin beschrieben, basierend auf Extrapolierung aus vorhergehenden Ergebnissen mit CD28-Antikörper vorherzusagen.

BEISPIEL 5: Ein Phosphatidylinosit-3-Kinaseinhibitor kann die durch CD28-Ligandenbindung induzierte Bildung von Interleukin-2 hemmen

[0066] In diesem Beispiel wurde die Wirkung eines Inhibitors der Phosphatidylinosit-3-Kinase auf die von CD28 abhängige Bildung von Interleukin-2 durch T-Zellen untersucht. In einer ersten Serie von Experimenten wurde die Wirkung der T-Zell-Stimulierung durch CD28 in Verbindung mit Stimulierung durch CD3 auf die Bildung von IL-2 in Abwesenheit von Wortmannin untersucht. Hochgereinigte menschliche periphere Blut-T-Zellen wurden für 24 Stunden mit einem immobilisierten anti-CD3-Antikörper (OKT3) allein oder zusammen mit entweder einem anti-CD28-Antikörper (9.3) oder mit Mitomycin-C behandelten CHO-Zellen inkubiert, die entweder untransfiziert oder zur Expression von B7-1 oder B7-2 transfiziert waren. Steigende Zahlen von CHO-Zellen wurden geprüft ($0{,}5 \times 10^6$ bis 4×10^6). Nach Züchtung für 24 Stunden wurden die Kulturüberstände mittels ELISA mit Standardverfahren auf die Bildung von IL-2 geprüft. Wie in Fig. 6 gezeigt wird, bildeten Zellen, die nur mit Medium, nur mit OKT3 oder mit OKT3 zusammen mit untransfizierten CHO-Zellen inkubiert wurden, kein IL-2. Im Gegensatz dazu stimulierte die Züchtung der Zellen mit OKT3 zusammen mit CHO-Zellen, die B7-1 oder B7-1 exprimieren, die Bildung von IL-2 in einer dosisabhängigen Art und Weise. Die Züchtung mit OKT3- und 9.3-Antikörpern stimulierte auch die Bildung von IL-2. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Ligandenbindung von CD28 wie durch B7-1- oder B7-2-Stimulierung ein kostimulatorisches Signal für die Bildung von Lymphokinen vermittelt.

[0067] In einer nächsten Serie von Experimenten wurden ruhende menschliche T-Zellen stimuliert mit entweder: 1) immobilisiertem OKT3 + CHO-B7-1, 2) immobilisiertem OKT3 + CHO-B7-2, 3) immobilisiertem OKT3 + CHO-B7-1 + B7-2, 4) PMA + CHO-B7-1 oder 5) PMA + B7-2. Stimulierung von T-Zellen wurde nur in Medium oder in Medium durchgeführt, das Wortmannin in Konzentrationen zwischen 1 nM und 1 mM enthielt. 24 Stunden nach der Züchtung wurden die Überstände mittels ELISA auf die Bildung von IL-2 geprüft. Die Ergebnisse werden in den Fig. 7A und Fig. 7B gezeigt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Wortmannin die Bildung von IL-2, die entweder durch B7-1 oder B7-2 in Verbindung mit Stimulierung mit CD3 stimuliert wird, hemmen kann. Die durch Wortmannin vermittelte Hemmung der Bildung von IL-2 war dosisabhängig. Der ID_{50}-Wert für die Hemmung der durch B7-2 vermittelten Stimulierung war etwa 10 nM. Der ID_{50}-Wert für die Hemmung der durch B7-1 vermittelten Stimulierung lag zwischen 10 nM und 100 nM. Diese Dosen von Wortmannin sind im Allgemeinen für die Zellen nicht toxisch und hemmen die Bildung von IL-2 nicht durch einen unspezifischen Mechanismus, wie durch die Tatsache offen-

bar wird, dass die durch PMA zusammen mit membrangebundenem B7-1 oder B7-2 stimulierte Bildung von IL-2 durch Wortmannin in so hohen Konzentrationen wie 1 mM nicht gehemmt wird. Dieses Beispiel zeigt, dass die Aktivierung von T-Zellen, beurteilt aufgrund der Bildung von IL-2 als Antwort auf die Stimulierung durch den TCR/CD3-Komplex und CD28, durch die Behandlung der T-Zelle mit einem Agens, das die Aktivität von Phosphatidylinosit-3-Kinase innerhalb der T-Zelle hemmt, gehemmt werden kann.

BEISPIEL 6: Unterschiedliche Wirkung von Herbimycin auf die Aktivierung der PI3K von mit anti-CD28 oder den natürlichen Liganden von CD28 stimulierten Jurkat-Zellen

[0068] Um die Möglichkeiten der Aktivierung der PI3-Kinase zu untersuchen, wurden Jurkat-T-Zellen (20×10^6 Zellen) mit anti-CD28 mAk 9.3 (10 µg) oder mit CHO-Zellen, die B7-1 oder B7-2 exprimieren (10×10^6 Zellen), stimuliert. Die Zellen wurden mit ^{32}P-Orthophosphat, wie in Beispiel 1 beschrieben, markiert und entweder in Trägerverdünnungslösung enthaltendem Medium oder in 3 µM Herbimycin A vorinkubiert. Nach 5 Minuten wurden die Zellen zur Lyse gebracht und PI3-Kinase durch Messung von PtdIns(3,4,5)P_3 mittels HPLC, wie in Beispiel 1 beschrieben, untersucht.

[0069] Die Ergebnisse werden in Fig. 8 dargestellt. Die durch den 9.3-Antikörper stimulierte Bildung von PtdIns(3,4,5)P_3 durch Jurkat-Zellen wurde durch Vorbehandlung mit Herbimycin verhindert. Unerwarterweise wurde die durch B7-1 und B7-2 induzierte Aktivierung der PI3-Kinase, die durch die Bildung von PtdIns(3,4,5)P_3 gemessen wurde, resistent gegen die Vorbehandlung mit Herbimycin. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein von Herbimycin unabhängiger Weg für die Aktivierung von PI3-Kinase durch CD28 existiert, und da für Herbimycin gezeigt wurde, dass es eine Vielzahl von Kinasen der src-Familie hemmen kann, dass CD28 die PI3-Kinase unabhängig von der src-Familie der Protein-Tyrosinkinasen aktivieren kann.

[0070] Um diesen Widerspruch weiter zu untersuchen, wurden 20×10^6 Jurkat-Zellen mit dem mAk 9.3 (10 µg) oder mit 10×10^6 CHO-B7-1-Zellen stimuliert. Die Zellen wurden entweder mit 3 µM Herbimycin A oder in Trägerlösung vorinkubiert. Der CD28-mAk wurde weiter mit Ziege-anti-Maus IgG kreuzvernetzt und die Zellen wurden nach 5 bis 10 Minuten lysiert. Die Aktivierung der PI3-Kinase wurde durch Dünnschichtchromatographie unter Verwendung eines in vitro-Lipid-Kinasetests, wie bei Ward, S. G. et al. (1995) Eur. J. Immunol. 25: 526–532 beschrieben, untersucht.

[0071] Die Ergebnisse werden in **Fig.** 9 dargestellt. Sowohl der mAk anti-CD28 als auch CHO-B7-Zellen induzierten PI3-Kinase-Aktivität, wie aus dem Vergleich der Kontrollspuren mit den Spuren 10 Minuten mAk 9.3 und 5 Minuten B7 offensichtlich wird. Wieder wurden die polaren Kinaseprodukte von PI durch Herbimycin nach Stimulierung mit mAk 9.3 gehemmt und waren nach Stimulierung mit B7 resistent gegen Herbimycin.

[0072] Daher verhindert Herbimycin die Aktivierung von PI3K in Jurkat-Zellen, die mit anti-CD28 stimuliert wurden, nicht jedoch in Jurkat-Zellen, die mit CHO-B7-1- oder CHO-B7-2-Zellen stimuliert wurden, was auf die Existenz eines von Herbimycin unabhängigen Wegs zur Aktivierung der PI3-Kinase durch CD28 hinweist.

BEISPIEL 7: Unterschiedliche Wirkung von Herbimycin auf die Sekretion von IL-2 durch T-Zellen

[0073] Um die Signaltransduktionswege, die an der CD28-Rezeptorligandenbindung beteiligt sind, weiter zu bestimmen, wurden CD28$^+$ T-Zellen (hergestellt durch negative Auswahl von peripheren Blut-T-Zellen) über Nacht in verschiedenen Konzentrationen von Herbimycin (von 0,1 bis 3 µM) gezüchtet und mit 3 ng/ml PMA oder mit 1 µg/ml mAk 9.3 in Lösung, mit mAk 9.3 beschichteten Globuli, 0,08 µg/ml Ionomycin, CHO-B7-1 oder mit CHO-B7-2-Zellen stimuliert. Die Überstände wurden nach 24 Stunden geerntet und mittels ELISA auf den IL-2-Gehalt untersucht.

[0074] Die Ergebnisse werden in **Fig.** 10, Teil A dargestellt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die durch PMA mit mAk 9.3 induzierte Sekretion von IL-2 sensitiv gegenüber Herbimycin mit einem ID_{50}-Wert von etwa 0,2 µM war. In ähnlicher Weise war die durch PMA und CHO-B7-1-Zellen induzierte Sekretion von IL-2 auch gegenüber Herbimycin sensitiv. Im Gegensatz dazu war die Sekretion von IL-2 ziemlich resistent mit einem ID_{50}-Wert von > 3 µM, wenn die Zellen mit PMA und Ionomycin stimuliert wurden. Um den Mechanismus der Hemmung durch Herbimycin weiter zu prüfen, wurden die Zellen auch in Gegenwart oder Abwesenheit von Ionomycin stimuliert. Die Sekretion von IL-2 in Zellen, die mit PMA und Ionomycin und mAk 9.3 stimuliert wurden, wird ziemlich resistent gegenüber Herbimycin, sogar bei 3 µM Herbimycin A.

[0075] Um diesen Befund der gegenüber Herbimycin sensitiven und resistenten Sekretion von IL-2 weiter zu prüfen, wurden T-Zellen mit dem auf Globuli immobilisierten CD3-Antikörper OKT3 mit entweder CHO-B7-1- oder CHO-B7-2-Zellen oder mit mAk 9.3 in Gegenwart oder Abwesenheit von Ionomycin stimuliert. Die Überstände wurden nach 24 Stunden gesammelt und die Menge an IL-2 mittels ELISA bestimmt.

[0076] Die Ergebnisse werden in **Fig.** 10, Teil B dar-

gestellt. Im Gegensatz zur Sekretion von IL-2, die aus der Stimulierung von T-Zellen mit PMA und B7-1 oder B7-2 resultiert, für die gefunden wurde, dass sie sensitiv gegenüber Herbimycin war, wurde für die Sekretion von IL-2 gefunden, dass sie ziemlich resistent gegen Herbimycin war, wenn PMA durch anti-CD3 ersetzt wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass CD28 die gegen Herbimycin resistente Sekretion von IL-2 abhängig vom Kontext des Signals auslösen kann. Wenn die T Zellen in einer Art und Weise aktiviert wurden, die keine Calciumsignale auslösen (d. h. PMA mit anti-CD28), dann war die Sekretion von IL-2 sensitiv gegenüber Herbimycin. Im Gegensatz dazu war das Signal resistent gegenüber Herbimycin, wenn T-Zellen in Gegenwart eines Calciumsignals (d. h. PMA mit Ionomycin und B7 oder anti-CD28) aktiviert wurden. Das weist darauf hin, dass entweder CD28 kein essentielles Signal benötigt, das von für Herbimycin sensitive Tyrosinkinasen geliefert wird oder alternativ, dass ein Calciumsignal in Lage sein kann, die Notwendigkeit für eine essentielle Tyrosinkinase-Kaskade zu umgehen, die durch CD 28 ausgelöst wird.

BEISPIEL 8: Identifizierung eines mit CD28 assoziierten 67 kDa-Tyrosylphosphoproteins

[0077] Bis heute sind die einzigen Proteine, von denen berichtet wurde, dass sie eine physikalische Assoziation mit CD28 zeigen, die PI3-Kinase (Truitt, K. E. et al. (1994) J. Exp. Med. 179: 1071–1076) und die lck-Kinase aus der src-Familie (August, A. und Dupont, B. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 1466–1473). Um die durch CD28 vermittelte Signaltransduktion weiter zu untersuchen, wurde eine Suche nach Proteinen, die physikalisch mit CD28 assoziiert sind, in Jurkat-Zellen und in T-Zellen initiiert. Die Zellen wurden mit mAk 9.3 für verschiedene Zeiten stimuliert, in NP-40-Detergenz lysiert und die Immunpräzipitation von CD28 wurde mit dem Staphylokokkenprotein A durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden gewaschen, eluiert und durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen getrennt. Nach dem Transfer wurden Immunblots unter Verwendung eines mit Meerrettichperoxidase gekoppelten anti-Phosphotyrosin Ak 4G10 angefertigt. An Tyrosin phosphorylierte Proteine wurden mittels Chemilumineszenz unter Verwendung von ECL identifiziert.

[0078] Die Ergebnisse werden in **Fig.** 11 gezeigt, die eine Autoradiographie eines Immunblots darstellt. Eine Bande mit einem relativen Laufverhalten von ~67 kDa wurde in den CD28-Immunpräzipitationen identifiziert. Diese Bande, die dem Phosphoprotein entspricht, erscheint schnell nach der Stimulierung mit CD28, innerhalb 3 Minuten, in Jurkat-Zellen. Ein ähnliches oder identisches Protein wurde in T-Zell-Blasten identifiziert. Dieses Protein scheint nicht die itk/emt Proteinkinase zu sein, da Antikörper gegen itk in CD28-Immunpräzipitaten itk nicht in Erscheinung treten lassen. Weiterhin ist das Molekulargewicht dieses mit CD28 assoziierten Proteins nicht übereinstimmend mit lck oder PI3-Kinase. Daher ist dies ein neues mit CD28 assoziiertes Protein.

[0079] Daher zeigen die Ergebnisse, dass ein neues Phosphotyrosinprotein von etwa 67 kDa in Jurkat-Zellen und in T-Zell-Blasten, die durch CD28 stimuliert werden, mit CD28 assoziiert ist.

ÄQUIVALENTE

[0080] Der Fachmann wird viele Äquivalente zu den spezifischen Ausführungsformen der hier beschriebenen Erfindung erkennen oder in der Lage sein, diese unter Verwendung von nicht mehr als Routineexperimenten zu bestätigen. Es wird beabsichtigt, solche Äquivalente mit den folgenden Ansprüchen zu umfassen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung einer Antwort durch eine T-Zelle, die einen Zelloberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle in vitro mit einem intrazellulären Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle hemmt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, weiterhin umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle mit einem zweiten Agens, das die Protein-Tyrosinphosphorylierung in der T-Zelle hemmt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das zweite Agens ein Inhibitor einer Protein-Tyrosinkinase ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Inhibitor einer Protein-Tyrosinkinase Herbimycin A oder ein Derivat oder Analogon davon ist.

5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das zweite Agens eine Tyrosinphosphatase oder ein Aktivator einer Tyrosinphosphatase ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Tyrosinphosphatase eine zelluläre Tyrosinphosphatase ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die zelluläre Tyrosinphosphatase CD45 oder Hcph ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das zweite Agens ein Molekül ist, das CD45 bindet und aktiviert.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das zweite Agens ein anti-CD45-Antikörper oder ein Fragment davon ist.

10. Verfahren zur Induzierung eines Nichtreagierens gegenüber einem Antigen in einer T-Zelle, die

einen Zelloberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle in vitro mit einem Antigen und einem intrazellulären Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle hemmt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das Agens ein Inhibitor der Phosphatidylinosit-3-Kinase ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Inhibitor der Phosphatidylinosit-3-Kinase ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wortmannin, Quercetin und LY294002 und Derivaten oder Analoga davon.

13. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Antigen ein Alloantigen oder ein Autoantigen ist.

14. Verfahren zur Stimulierung einer Antwort durch eine T-Zelle, die ein primäres Aktivierungssignal erhalten hat und einen Oberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle in vitro mit einem intrazellulären Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der Zelle stimuliert.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Agens ein Aktivator der Phosphatidylinosit-3-Kinase ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, 14 oder 15, wobei die Antwort durch die T-Zelle die Bildung von zumindest einem Lymphokin umfasst.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Lymphokin Interleukin-2 ist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder 14 bis 17, wobei die Antwort der T-Zelle Proliferation umfasst.

19. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, weiterhin umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle mit einem zweiten Agens, das Protein-Tyrosinphosphorylierung in der T-Zelle stimuliert.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das zweite Agens ein Aktivator einer Protein-Tyrosinkinase oder ein Inhibitor einer zellulären Tyrosinphosphatase ist.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die zelluläre Tyrosinphosphatase CD45 ist.

22. Verfahren zur Stimulierung einer Antwort gegen ein Antigen durch eine T-Zelle, die einen Zelloberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle in vitro mit dem Antigen und einem intrazellulären Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in der T-Zelle stimuliert.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Agens ein Aktivator der Phosphatidylinosit-3-Kinase ist.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, wobei das Antigen ein Tumor-assoziiertes Antigen ist.

25. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, wobei das Antigen von einem Pathogen stammt, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Bakterium, einem Virus, einem Pilz und einem Parasiten.

26. Verfahren zur Identifizierung eines Inhibitors der Phosphatidylinosit-3-Kinase, umfassend:
(a) in vitro Bereitstellen einer T-Zelle die einen Rezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet;
(b) Stimulieren eines intrazellulären Signaltransduktionswegs in der T-Zelle, assoziiert mit Ligieren des Rezeptors in Gegenwart eines zu testenden Agens; und
(c) Bestimmen der Menge von zumindest einem in der T-Zelle gebildeten D-3-Phosphoinositid,
wobei eine reduzierte Menge von zumindest einem D-3-Phosphoinositid, das in der T-Zelle in Gegenwart des Agens gebildet wird, relativ zu einer Menge, die in der T-Zelle in Abwesenheit des Agens gebildet wird, anzeigt, dass das Agens ein Inhibitor einer Phosphatidylinosit-3-Kinase ist.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei der Rezeptor CD28 ist.

28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, wobei die T-Zelle mit einem Liganden von CD28 in Kontakt gebracht wird.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei der Ligand von CD28 eine membrangebundene Form eines B-Lymphocyten-Aktivierungsantigens ist, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus B7-1 und B7-2.

30. Verfahren zur Identifizierung eines Aktivators der Phosphatidylinosit-3-Kinase, umfassend:
(a) Inkontaktbringen in vitro einer T-Zelle, die einen Rezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, mit einem zu testenden Agens; und
(b) Bestimmen der Menge von zumindest einem D-3-Phosphoinositid, wobei eine erhöhte Menge von zumindest einem in der Gegenwart des Agens in der T-Zelle gebildeten D-3-Phosphoinositid relativ zu einer Menge, die in der T-Zelle in Abwesenheit des Agens gebildet wird, anzeigt, dass das Agens ein Aktivator der Phophatidylinosit-3-Kinase ist.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 30, wobei die Bildung von zumindest einem D-3-Phosphoinositid in der T-Zelle durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie gemessen wird.

32. Verwendung eines intrazellulären Agens, das die Aktivität der Phosphatidylinosit-3-Kinase in einer T-Zelle hemmt, die einen Zelloberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, weiterhin einschließend ein zweites Agens, das wie in den Ansprüchen 2 bis 9 definiert ist, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung einer Antwort durch die T-Zelle, wobei dadurch eine Immunantwort herunterreguliert wird.

33. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das Agens wie in Anspruch 11 oder 12 definiert ist.

34. Verwendung eines intrazellulären Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in einer T-Zelle stimuliert, die ein primäres Aktivierungssignal erhalten hat und einen Oberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Stimulierung einer Antwort durch die T-Zelle, wobei dadurch eine Immunantwort hinaufreguliert wird.

35. Verwendung nach Anspruch 34, wobei das Agens ein Aktivator der Phosphatidylinosit-3-Kinase ist.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 32, 34 oder 35, wobei die Antwort durch die T-Zelle so ist wie in einem der Ansprüche 16 bis 18 definiert.

37. Verwendung nach Anspruch 34 oder 35, weiterhin einschließend ein zweites Agens, das wie in einem der Ansprüche 19 bis 21 definiert ist, für die Herstellung eines Arzneimittels.

38. Verwendung eines Antigens und eines intrazellulären Agens, das die Bildung von D-3-Phosphoinositiden in einer T-Zelle stimuliert, die einen Zelloberflächenrezeptor exprimiert, der ein kostimulatorisches Molekül bindet, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Stimulierung einer Antwort gegen ein Antigen durch die T-Zelle, wobei dadurch eine Immunantwort hinaufreguliert wird.

39. Verwendung nach Anspruch 38, wobei das Agens oder Antigen wie in einem der Ansprüche 11 bis 13 definiert ist.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, weiterhin umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle mit, oder die Verwendung nach Anspruch 33, weiterhin umfassend für die Herstellung eines Arzneimittels, ein zweites/einem zweiten Agens, das die Protein-Tyrosinphosphorylierung in der T-Zelle hemmt.

41. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 10 bis 13, weiterhin umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle mit, oder die Verwendung nach Anspruch 32 oder 33, weiterhin umfassend für die Herstellung eines Arzneimittels, ein zweites/einem zweiten Agens, das die Protein-Serinphosphorylierung in der T-Zelle hemmt.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, 40 oder 41, weiterhin umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle mit, oder die Verwendung nach einem der Ansprüche 32, 40 oder 41, weiterhin umfassend für die Herstellung eines Arzneimittels, ein drittes/einem dritten Agens, das die Protein-Serinphosphorylierung in der T-Zelle hemmt.

43. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 25, weiterhin umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle mit, oder die Verwendung nach Anspruch 38 oder 39, weiterhin umfassend für die Herstellung eines Arzneimittels, ein zweites/einem zweiten Agens, das die Protein-Tyrosinphosphorylierung in der T-Zelle stimuliert.

44. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 25, weiterhin umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle mit, oder die Verwendung nach einem der Ansprüche 34 bis 39, weiterhin umfassend für die Herstellung eines Arzneimittels, ein zweites/einem zweiten Agens, das die Protein-Serinphosphorylierung in der T-Zelle stimuliert.

45. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 21 oder 43, weiterhin umfassend das Inkontaktbringen der T-Zelle mit, oder die Verwendung nach Anspruch 37 oder 43, weiterhin umfassend für die Herstellung eines Arzneimittels, ein drittes/einem dritten Agens, das die Protein-Serinphosphorylierung in der T-Zelle stimuliert.

46. Isoliertes Protein mit etwa 67 kDa, das mit CD28 aus einer lysierten T-Zelle oder Jurkat-Zelle innerhalb von ungefähr drei Minuten nach Stimulierung durch den 9.3 mAb immunpräzipitiert werden kann.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

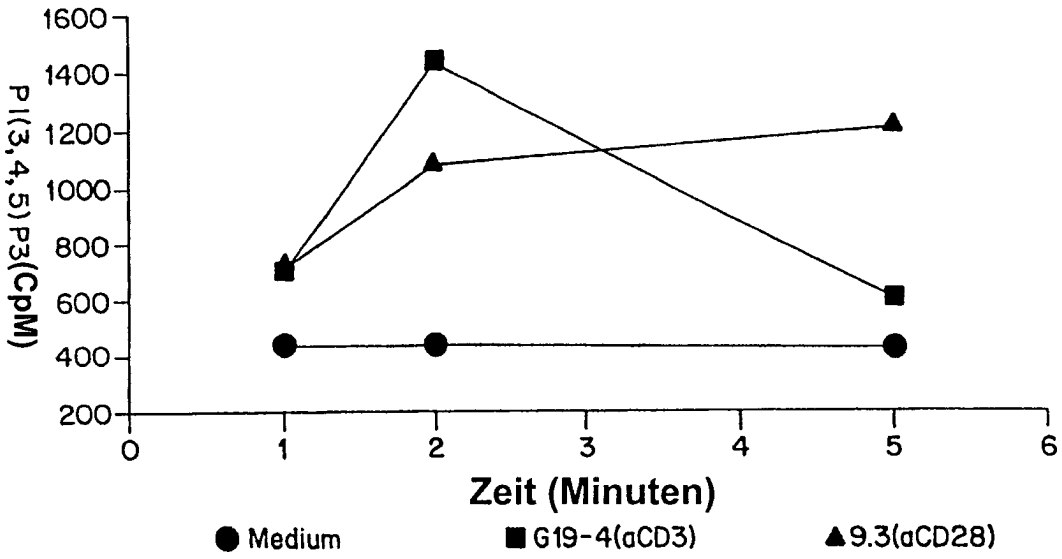


FIG. 2

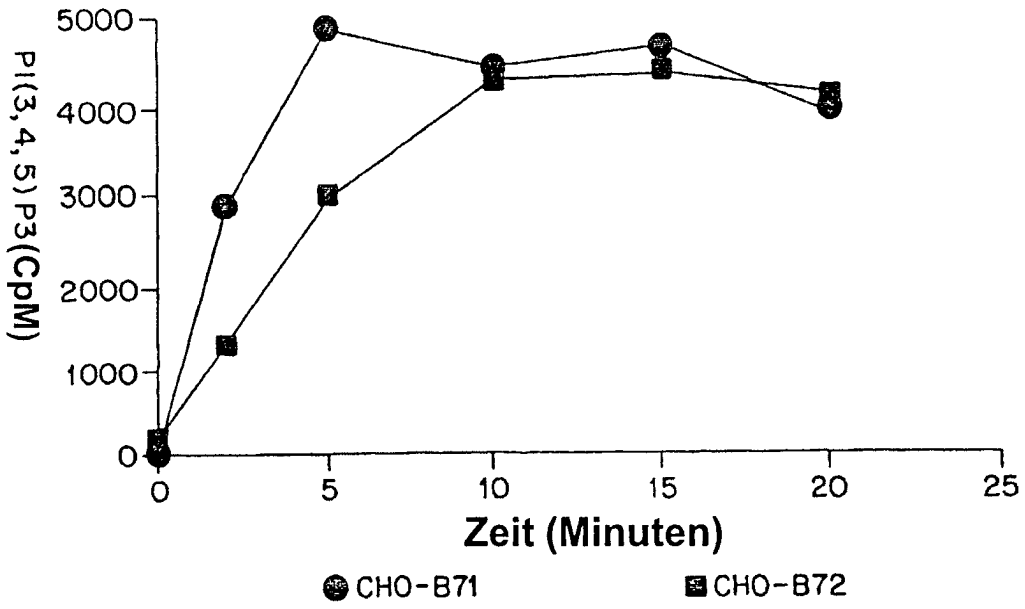

5000
4000
3000
2000
1000
0
PI(3,4,5)P3(CpM)
0
5
10
15
20
25
Zeit (Minuten)
CHO-B71
CHO-B72

FIG. 3

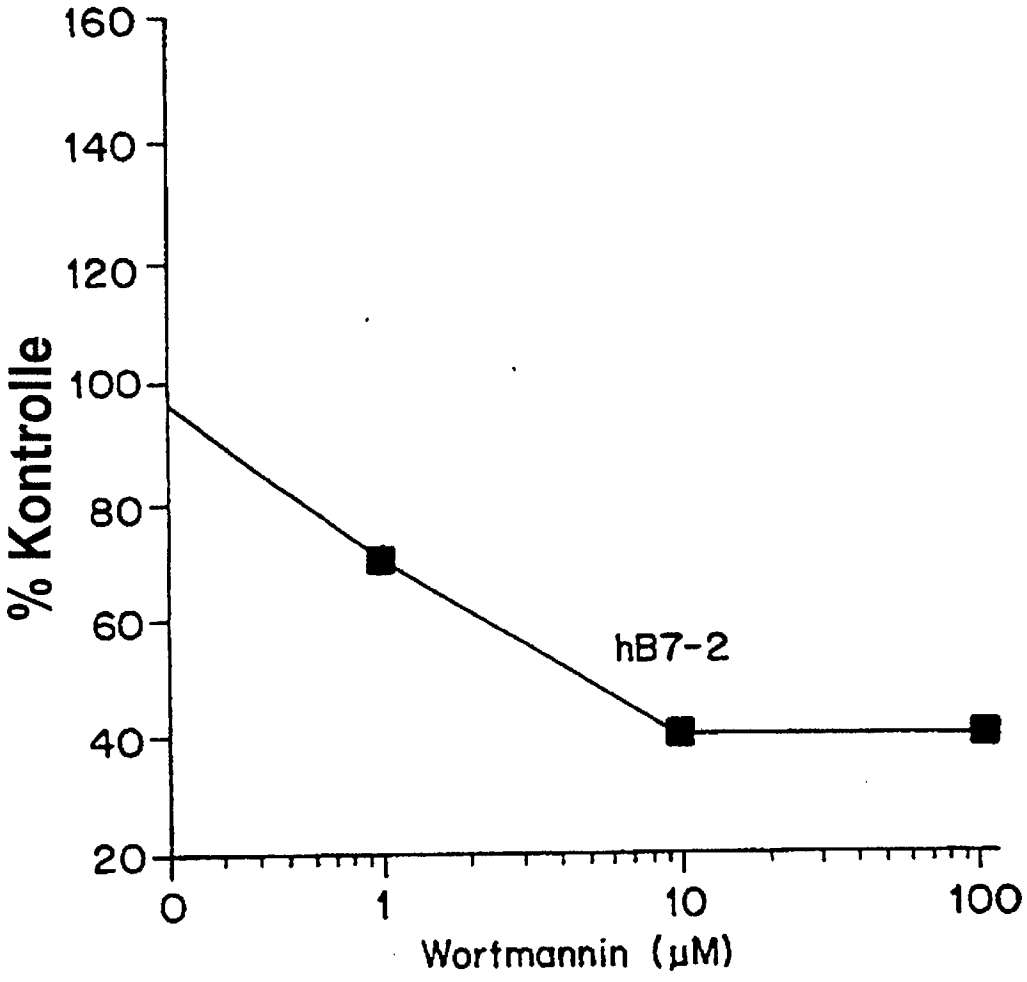

160
140
120
100
80
60
40
20
% Kontrolle
hB7-2
0
1
10
100
Wortmannin (µM)

FIG. 4

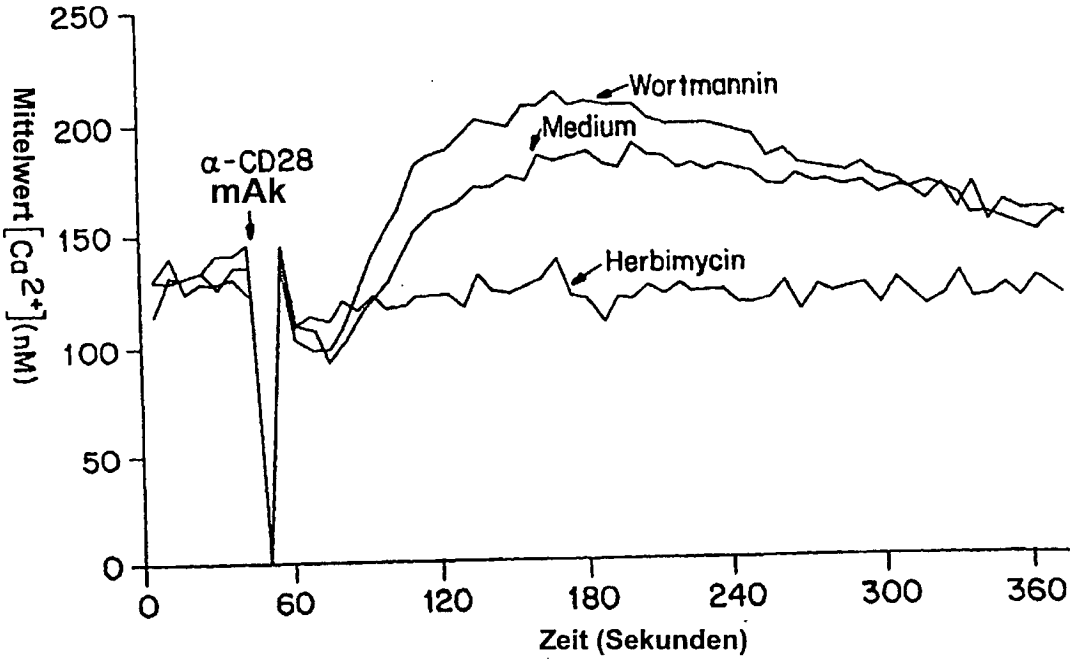

250
200
150
100
50
0
Mittelwert [Ca2+] (nM)
α-CD28
mAk
Wortmannin
Medium
Herbimycin
0
60
120
180
240
300
360
Zeit (Sekunden)

FIG. 5

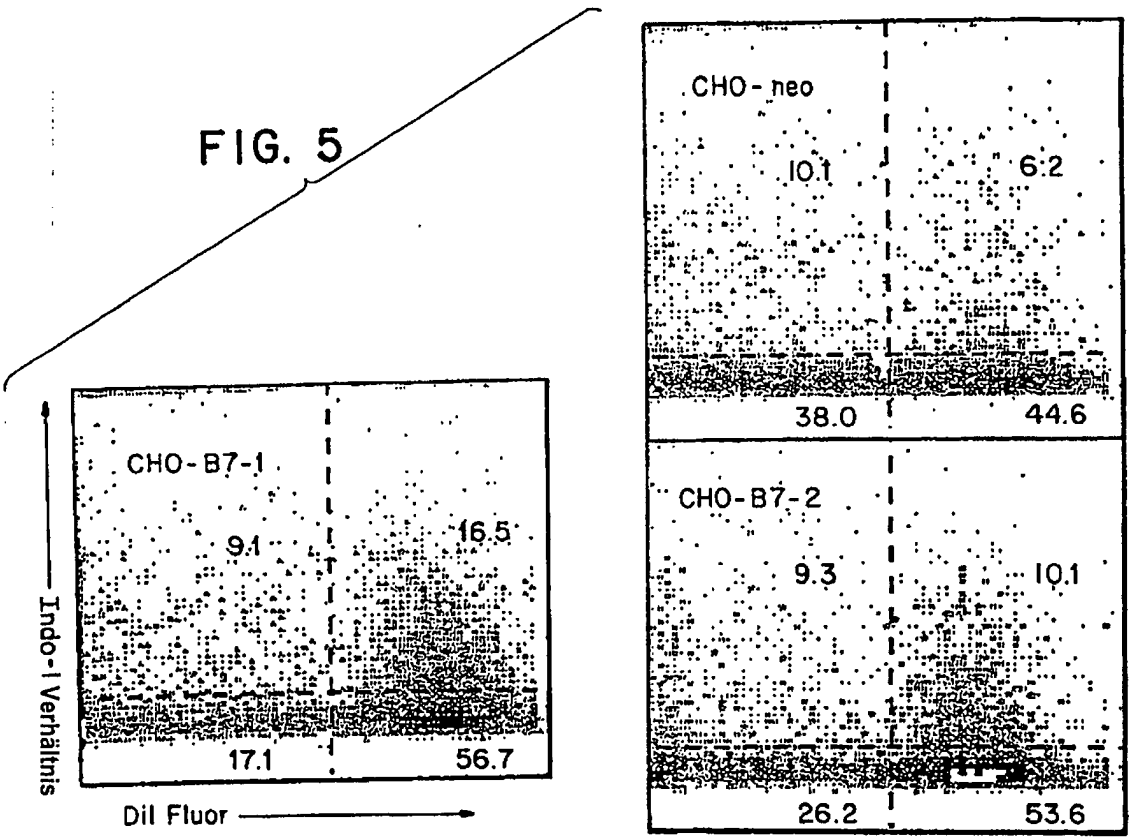

CHO-B7-1
9.1
16.5
17.1
56.7
Indo-1 Verhältnis
Dil Fluor
CHO-neo
10.1
6.2
38.0
44.6
CHO-B7-2
9.3
10.1
26.2
53.6

FIG. 6

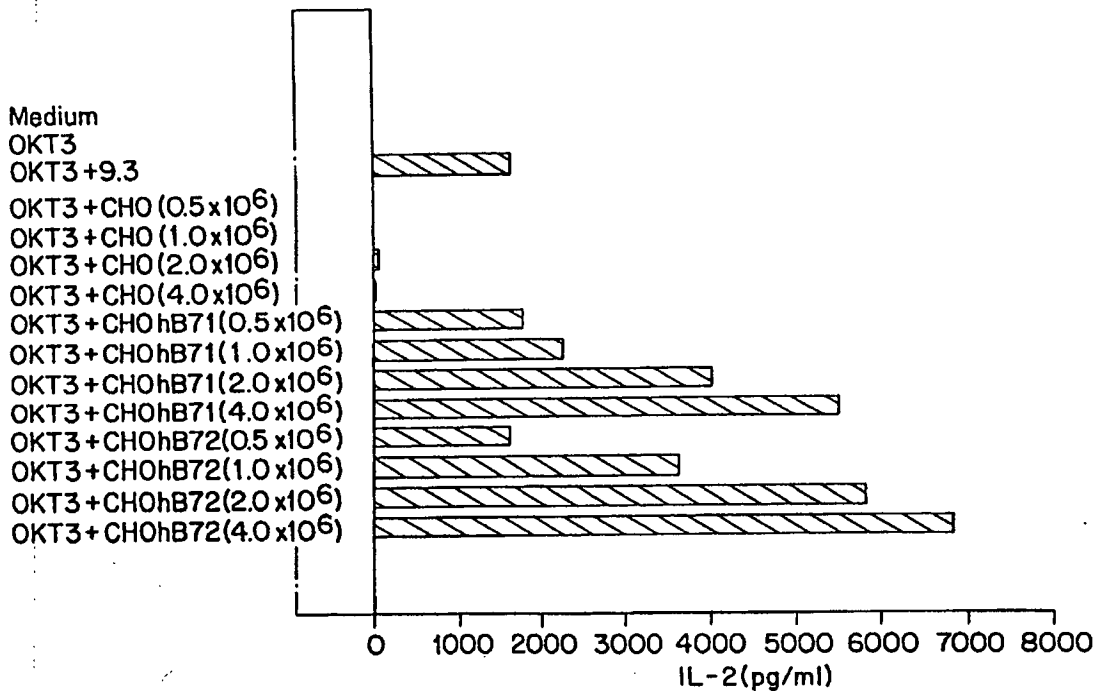

Medium
OKT3
OKT3+9.3
OKT3+CHO(0.5x10^6)
OKT3+CHO(1.0x10^6)
OKT3+CHO(2.0x10^6)
OKT3+CHO(4.0x10^6)
OKT3+CHOhB71(0.5x10^6)
OKT3+CHOhB71(1.0x10^6)
OKT3+CHOhB71(2.0x10^6)
OKT3+CHOhB71(4.0x10^6)
OKT3+CHOhB72(0.5x10^6)
OKT3+CHOhB72(1.0x10^6)
OKT3+CHOhB72(2.0x10^6)
OKT3+CHOhB72(4.0x10^6)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
IL-2(pg/ml)

FIG. 7A

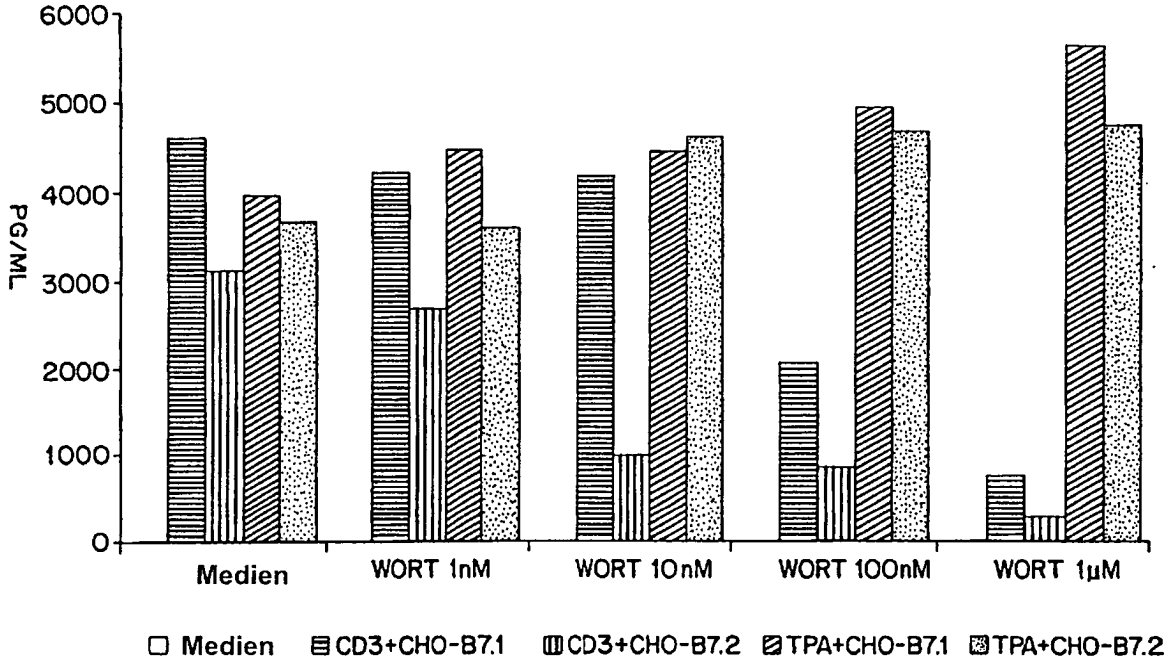

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
PG/ML
Medien
WORT 1nM
WORT 10nM
WORT 100nM
WORT 1µM
Medien
CD3+CHO-B7.1
CD3+CHO-B7.2
TPA+CHO-B7.1
TPA+CHO-B7.2

FIG. 7B

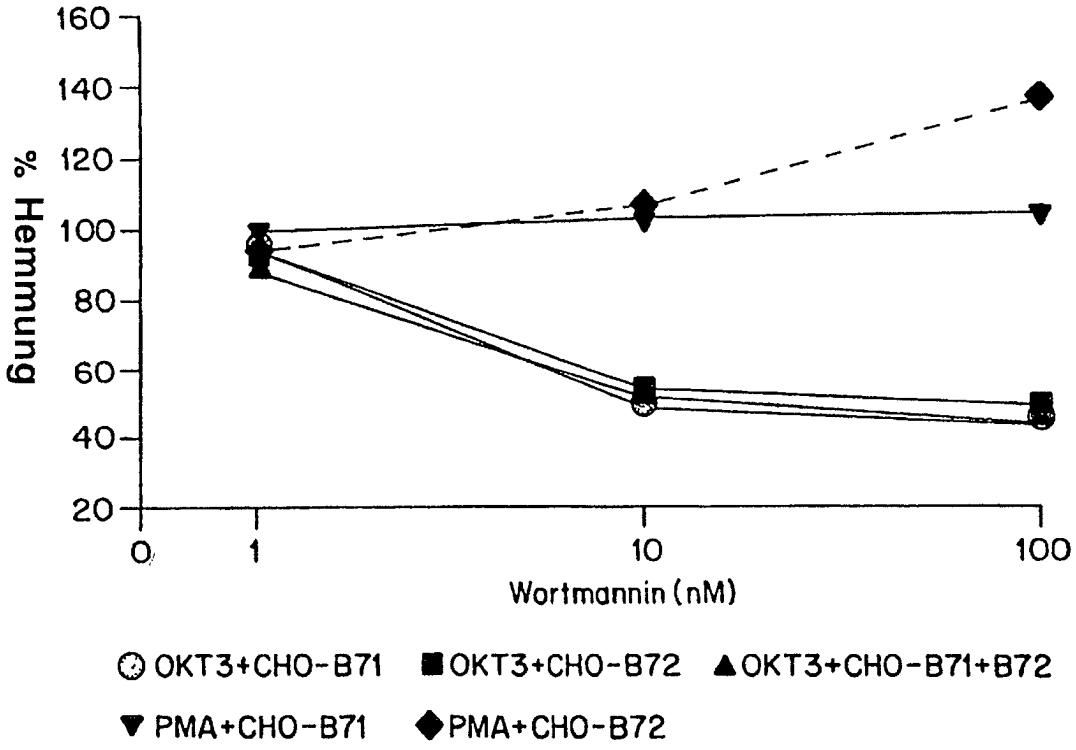
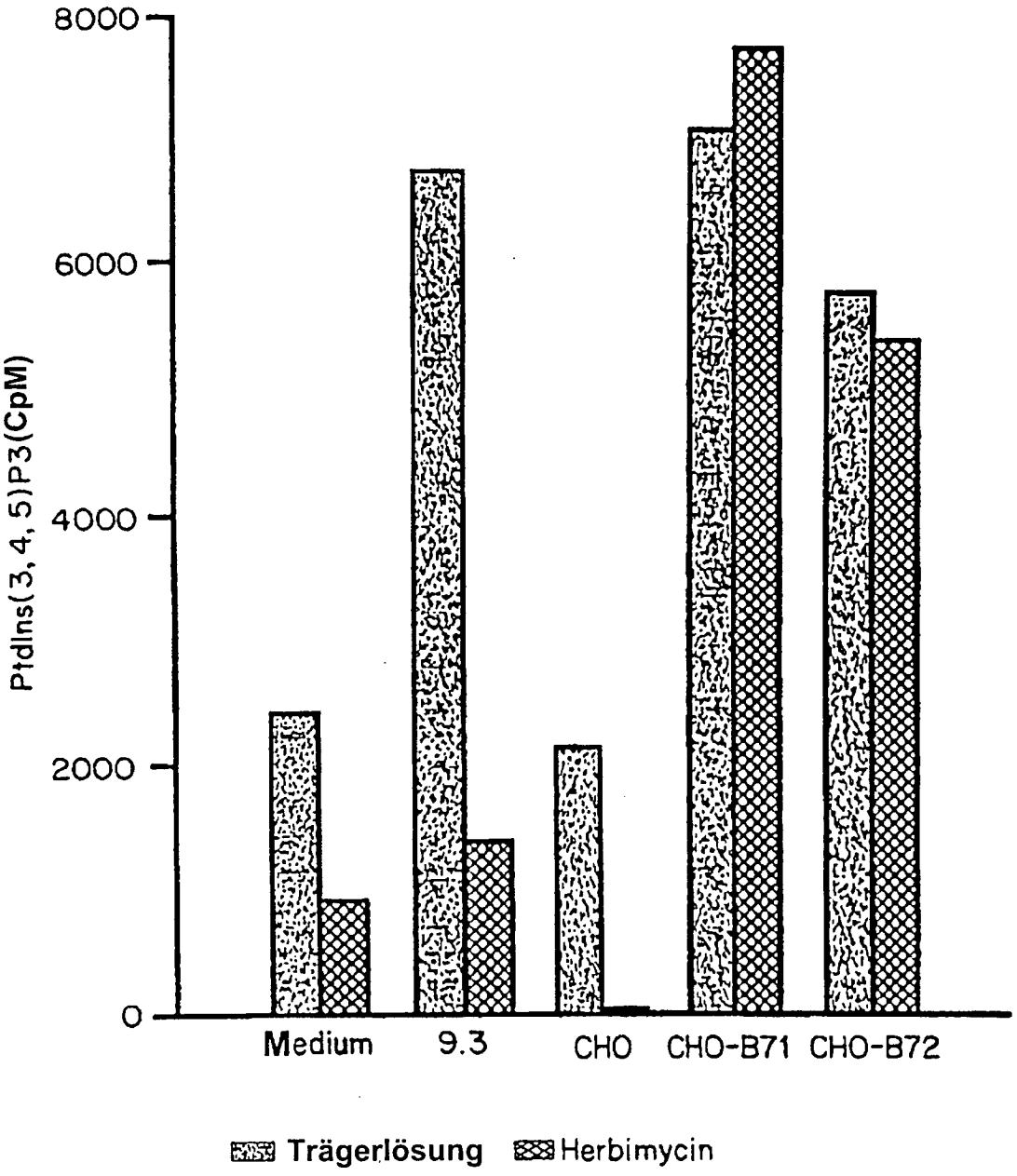

160
140
120
100
80
60
40
20
% Hemmung
0
1
10
100
Wortmannin (nM)
OKT3+CHO-B71
OKT3+CHO-B72
OKT3+CHO-B71+B72
PMA+CHO-B71
PMA+CHO-B72

FIG. 8


8000
6000
4000
2000
0
PtdIns(3,4,5)P3(CpM)
Medium
9.3
CHO
CHO-B71
CHO-B72
Trägerlösung
Herbimycin