



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201012472 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：098143964

(22)申請日：中華民國 93 (2004) 年 09 月 14 日

(51)Int. Cl. : A61K38/17 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P37/06 (2006.01)

(30)優先權：2003/09/15 美國 10/662,906

(71)申請人：台醫生物科技股份有限公司 (荷蘭) ABGENOMICS COOPERATIEF U. A. (NL)
荷蘭

(72)發明人：林榮華 LIN, RONG HWA (TW)；張重男 CHANG, CHUNG NAN (US)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：12 共 87 頁

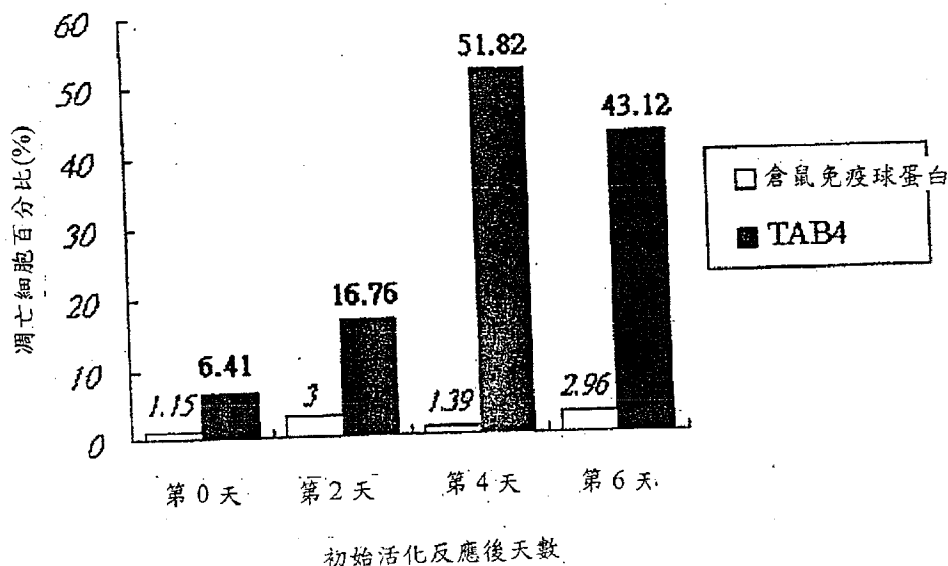
(54)名稱

P-選擇素糖蛋白配位體 1 之調節因子

MODULATORS OF P-SELECTIN GLYCOPROTEIN LIGAND 1

(57)摘要

本發明係利用能與 T 細胞或自然殺手細胞表面上之 P-選擇素糖蛋白配位體 1(P-Selectin Glycoprotein Ligand 1,PSGL-1)結合的多聚複合體化合物(multimeric compounds)來誘發 T 細胞及/或自然殺手細胞的耗盡及/或細胞凋亡機制。本發明之多聚複合體化合物及方法可在如發炎、自體免疫疾病、移植排斥與過敏性疾病等狀況下，用來控制受 T 細胞或自然殺手細胞媒介與調控之不需要的免疫反應。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201012472 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：098143964

(22)申請日：中華民國 93 (2004) 年 09 月 14 日

(51)Int. Cl. : A61K38/17 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P37/06 (2006.01)

(30)優先權：2003/09/15 美國 10/662,906

(71)申請人：台醫生物科技股份有限公司 (荷蘭) ABGENOMICS COOPERATIEF U. A. (NL)
荷蘭

(72)發明人：林榮華 LIN, RONG HWA (TW)；張重男 CHANG, CHUNG NAN (US)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：12 共 87 頁

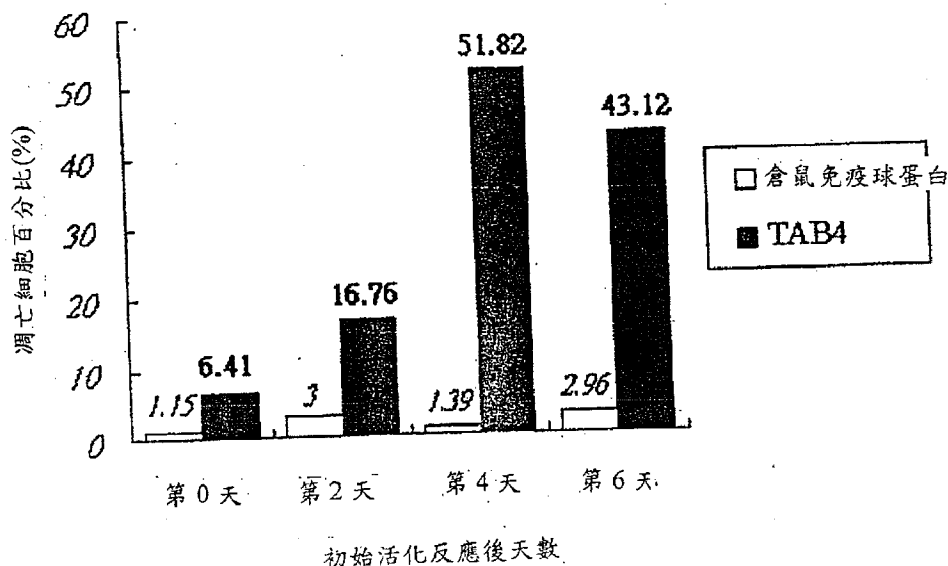
(54)名稱

P-選擇素糖蛋白配位體 1 之調節因子

MODULATORS OF P-SELECTIN GLYCOPROTEIN LIGAND 1

(57)摘要

本發明係利用能與 T 細胞或自然殺手細胞表面上之 P-選擇素糖蛋白配位體 1(P-Selectin Glycoprotein Ligand 1,PSGL-1)結合的多聚複合體化合物(multimeric compounds)來誘發 T 細胞及/或自然殺手細胞的耗盡及/或細胞凋亡機制。本發明之多聚複合體化合物及方法可在如發炎、自體免疫疾病、移植排斥與過敏性疾病等狀況下，用來控制受 T 細胞或自然殺手細胞媒介與調控之不需要的免疫反應。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於用來調控免疫反應的藥物組合物與方法。

【先前技術】

在治療如發炎、自體免疫疾病、移植排斥、過敏性疾病與 T 細胞衍化癌症等疾病的過程中，控制不需要發生的免疫反應是主要關鍵。過度侵略性的 T 細胞活性可藉由免疫抑制作用或誘發免疫耐受性 (immunological tolerance) 來加以控制。耐受性 (tolerance) 係指免疫系統對抗原不做出任何反應的狀態。可藉著持續使用藥物來降低免疫系統對抗原發生反應而達到免疫抑制作用。當進行器官移植時，T 細胞在同種異源抗體 (alloantigens) 的免疫反應中扮演著必要的角色。現今的免疫抑制治療方法大多使用皮質類固醇 (corticosteroid)、環孢靈素 (cyclosporin) 或雷帕黴素 (rapamycin) 來抑制主要的 T 細胞生長因子「介白素-2 (interleukin-2, IL-2)」的轉錄機制 (transcription)，或抑制介白素依賴型的細胞增生 (IL-2 dependent proliferation)。

細胞凋亡 (Apoptosis) 被認為具有維持適當免疫系統功能的生理作用，並且是用來除去無用或缺陷細胞的主要機制 (Kabelitz et al. Immunol. Today 14:338-340 (1993);

Raff, *Nature*:356:397-399 (1992))。來自細胞內或細胞外的各種訊號會影響細胞存活或死亡。抗體與如 Fas (或稱 CD95, 分子量 43kD)、TNFR2(分子量 75kD)、CD2(分子量 45kD)及 CTLA-4(分子量 33kD)等 T 細胞表面上的分子結合可誘使 T 細胞發生細胞凋亡反應 (Osborne, *Curr. Opin. Immunol.* 8:245-248 (1996); Lin et al. *J. Immunol.* 158:598-603 (1997); Zhang et al. *Nature*:377:348-350 (1995); Lai et al. *Eur. J. Immunol.* 25:3243-3248 (1995); Mollereau et al. *J. Immunol.* 156:3184-3190 (1996); Gribben et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:811-815 (1995))。但由於 Fas 與 TNFR2 並不僅表現在免疫細胞上, 在其他數種重要器官(如肝臟)亦表現此兩種分子, 因此無法達成藉由 Fas 與 TNFR2 分子來控制多餘 T 細胞的目的。此種表現型態限制了結合 Fas 與 TNPR2 分子之兩種抗體在治療上的應用範圍。

選擇素 (Selectins)、整合素 (integrin) 與免疫球蛋白超家族成員 (immunoglobulin (Ig) superfamily members) 這三類黏附分子 (adhesion molecule) 對白血球與血小板之間, 或白血球及血小板與細胞外基質 (extracellular matrix) 及血管內皮 (vascular endothelium) 之間的交互作用來說相當重要 (Springer, *Nature* 346:425 (1990); Osborn, *Cell* 62:3 (1990); Hynes, *Cell* 69:11 (1992))。表現在一種細胞上的黏附分子會與另一種細胞上的他種黏附分子結合而形成配位體-受體配對 (ligand-receptor pair)。

選擇素家族係由 P-選擇素(或稱 CD62、CD62P、GMP140 與 PADGEM)、E-選擇素(或稱 ELAM-1 與 CD62E)及 L-選擇素(或稱 LECAM-1、Mel-14、LAM-1 與 CD62L)所組成。上述之選擇素具有高度相似性，並皆含有一個約 120 個胺基酸的 N-端凝集素結構區(N-terminal lectin domain)、一個類內皮生長因子結構區(EGF-like domain)、以及數個與補體調節蛋白(complement regulatory protein)之多重短重複序列(multiple short consensus repeat, SCR)相似的結構區。並且在上述之結構區的後方接著一個穿膜區(transmembrane domain)與一個短的細胞質尾端(cytoplasmic tail) (Siegelman et al., Science 243:1165-1172 (1989); Lasky et al., Cell 56:1045-1055 (1989); Tedder et al., J. Exp. Med. 170:123-133 (1989); Johnson et al., Cell 56:1033-1044 (1989); Bevilacqua et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:9238-9242 (1987) , Bevilacqua et al., Science 243:1160-1165 (1989), Bevilacqua et al., J. Clin. Invest. 91:379-387 (1993), Camerini et al., Nature 280:496-498 (1989))。關於與細胞受體結合特性，這些選擇素彼此間有一些重疊但又不甚相同之專一性(Bevilacqua et al., J. Clin. Invest. 91:379-387 (1993); Feize, Current Opinion in Struct. Biol. 3:701-710 (1993); Berg et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 184:1048-1055 (1992); Foxall et al., J. Cell Biol. 117:895-902 (1992); Larsen et al., J. Biol.

Chem. 267:11104-11110 (1992); Polley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6224-6228 (1991))。

發炎時，P-選擇素、E-選擇素與 L-選擇素會調節最初之白血球與內皮細胞、及血小板與白血球之間的黏附作用(Bevilacqua et al., 1993, supra)。並經證明這三種選擇素皆參與白血球與已活化內皮細胞間的初始「滾轉」交互作用(initial "rolling" interaction) (von Andrian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7538-7542 (1991); Ley et al., Blood 77:2553-2555 (1991); Abassi et al., J. Clin. Invest. 92:2719-2730 (1993); Dore et al., Blood 82:1308-1316 (1993); Jones et al., Biophys. J. 65:1560-1569 (1993); Mayadas et al., Cell 74:541-554 (1993))。表現在活化血小板與內皮細胞上的 P-選擇素會與大部分白血球上的細胞表面蛋白結合(McEver et al., J. Biol. Chem. 250:9799-9804 (1984); Hsu-Lin et al., J. Biol. Chem. 264:8121-9126 (1984))。E-選擇素則會表現在細胞激素活化內皮細胞上，例如受腫瘤壞死因子- α (TNF- α)或介白素-2 等細胞激素刺激 6-8 小時後，內皮細胞上的 E-選擇素便會與大部分的白血球結合(McEver et al., J. Clin. Invest. 100:485-492 (1997); Bevilacqua et al., 1987, supra; Bevilacqua et al., 1989, supra)。而表現在大部分白血球上的 L-選擇素則會與一些內皮細胞或其他白血球上的細胞表面蛋白結合(Gallatin et al., Nature 304:30-34 (1983); Berg et al., Immunol. Rev. 108:5-18 (1989); Berg

et al., J. Cell. Biol. 114:343-349 (1991), Hallman et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 174:236-243 (1991); Smith et al., J. Clin. Invest. 87:609-618 (1991); Spertini et al., J. Immunol. 147:2565-2573 (1991))。並且已證實這三種選擇素都能與細胞表面蛋白「P-選擇素糖蛋白配位體 1」結合，並且 P-選擇素糖蛋白配位體 1 幾乎只表現在白血球及一些特殊 T 細胞與自然殺手細胞上。P-選擇素糖蛋白配位體 1 的轉錄後修飾 (Posttranslational modification) 對於 P-選擇素糖蛋白配位體 1 與 P-選擇素、E-選擇素與 L-選擇素的結合來說是必要條件 (McEver et al., J. Clin. Invest., 1997, supra)。

【發明內容】

本發明係有關於利用 T 細胞表面抗原「P-選擇素糖蛋白配位體 1」之結合作用來耗盡 T 細胞，及/或誘使 T 細胞走向凋亡。耗盡 T 細胞的方法對於治療那些具有過量或不需要發生的 T 細胞調控性免疫反應，或具有過量與不需要發生的 T 細胞增生現象的疾病特別有效。舉例來說，耗盡 T 細胞可降低或消除伴隨發炎、自體免疫疾病、移植排斥、過敏性疾病與/或 T 細胞衍化癌症而來之的 T 細胞活性與增生。本發明包含利用具 P-選擇素糖蛋白配位體 1 功能的調節因子來預防或降低 T 細胞調控性免疫反應的方法，以及篩選具有 P-選擇素糖蛋白配位體 1 功

能之調節因子的方法。

本發明一態樣在於提供一種預防或降低患者之 T 細胞調控性免疫反應的方法。此方法包含下列步驟：選擇一個診斷為患有或可能罹患過度或不需要的 T 細胞調控性免疫反應之病患；使此患者服用一種可與 T 細胞表面上之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的化合物。其中，此組合物與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合會誘發出一個信號傳遞路徑而造成 T 細胞死亡，進而可預防或降低患者的 T 細胞調控性免疫反應。

可用於這類治療方法中的化合物包含抗體或對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 具有專一性結合力的抗原結合片段 (antigen binding fragment)。在一些較佳實施例中，化合物可以是能與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 專一性結合的單株抗體。在一較佳實施例中，本發明方法包含使用一種能與單株抗體結合之藥劑，並使 T 細胞表面上的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之間發生交聯反應 (cross-linking)。

在一些較佳實施例中，本發明方法包含使 T 細胞表面上的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 發生交聯反應。其中，此交聯反應會誘發一會導致 T 細胞死亡的信息傳遞路徑。

在一些較佳實施例中，本發明方法包含下列步驟：(i) 選擇一個經診斷為具有或可能發生過度或不必要發生之 T 細胞調控性免疫反應的患者；(ii) 對該患者施用一

種能與 T 細胞上至少兩個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的多聚複合體化合物，其中，此多聚複合體化合物含有兩條多胜肽鏈 (polypeptide chain)，每條多胜肽鏈含有 (a) 一可與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的結合區 (binding domain)，以及 (b) 一段異種胺基酸序列 (heterologous amino acid sequence)，其中，該兩條多胜肽鏈透過異種胺基酸序列的連接而形成該多聚複合體化合物，且該多聚複合體化合物與 T 細胞表面上至少兩個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合後會誘發出一可導致 T 細胞死亡的信息傳遞路徑，以預防或降低該患者的 T 細胞調控性免疫反應。

多聚複合體化合物可為一種同多聚複合體化合物 (homo-multimeric compound) 或異多聚複合體化合物 (hetero-multimeric compound)。結合區可選擇性的含有 P-選擇素胞外結構區或其中之一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段、E-選擇素胞外結構區或其中之一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段、L-選擇素胞外結構區或其中之一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段、抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體或其 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段、選自噬菌體表現庫 (phage display library) 中的一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合多胜肽或上述片段之任意組合。

在某些較佳實施例中，多聚複合體化合物不包含抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體或一可與 P-選擇素糖蛋

白配位體 1 結合的抗體片段。

異種胺基酸序列可選擇性地包含一段細胞表面受體結合區域 (cell surface receptor binding region)，例如免疫球蛋白長鏈恆定區 (immunoglobulin heavy chain constant region)。在某些較佳實施例中，多胜肽鏈可透過異種胺基酸序列的共價連結，如雙硫鍵連結 (disulfide linked)，而形成多聚複合體化合物。

在某些較佳實施例中，本方法包含一道附加步驟，係對患者施用一種藥物，該藥物係利用異種胺基酸序列來與多聚複合體化合物結合並誘使 T 細胞表面上的數個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 發生交聯反應。

在某些較佳實施例中，本發明方法包含選擇可能罹患或已罹患自體免疫疾病之病患的步驟。在另一個實施例中，本方法包含選擇罹患發炎疾病之病患的步驟。又在另一較佳實施例中，本方法包含選擇接受或預計接受同種異體 (allogeneic) 或異種異體 (xenogeneic) 移植之病患的步驟。在另一較佳實施例中，本方法包含選擇可能患有過敏性疾病之病患的步驟。在另一較佳實施例中，本方法包含選擇一個診斷為患有 T 細胞衍化癌症之病患的步驟。

在一些較佳實施例中，T 細胞為已活化 T 細胞。在一較佳實施例中，T 細胞是 $CD4^+$ T 細胞。在另一較佳實施例中，T 細胞是 $CD8^+$ T 細胞。

在某些較佳實施例中，本方法包括偵測自第一生物

樣本的 T 細胞數量，此第一生物樣本係取自尚未服用化合物(如多聚複合體化合物)之患者身上。待同一患者使用一化合物後(如多聚複合體化合物)，再自己服用化合物之患者身上取得的第二生物樣本，並偵測第二生物樣本中的 T 細胞數量。比較第一生物樣本與第二生物樣本的偵測結果。

在某些較佳實施例中，本方法包含偵測第一生物樣本中的 T 細胞生物活性的步驟。第一生物樣本係取自於尚未服用化合物(如多聚複合體化合物)之患者身上。並將測得結果與第二生物樣品中的 T 細胞活性相比較。第二生物樣本係取自自己服用化合物(如多聚複合體化合物)之該患者身上。

在某些較佳實施例中，用藥後可使患者的已活化 T 細胞至少減少 10%。在某些較佳實施例中，用藥後可使患者的已活化 T 細胞至少減少 10%、20%、30%、40%、50%或更多。

在某些較佳實施例中，當已活化 T 細胞與抗體、抗體上的抗原結合片段或多聚複合體化合物接觸後，抗體、抗體上的抗原結合片段或多聚複合體化合物可使患者身體中至少 10%的已活化 T 細胞死亡。在某些較佳實施例中，該用藥可誘使患者身體中至少 10%、20%、30%、40%、50%或更多的已活化 T 細胞死亡。並可在任何時間偵測 T 細胞死亡現象，例如可在使用抗體、抗體上的抗原結合片段或多聚複合體化合物後

的一、二、三、四、五、六、七或更多天來偵測 T 細胞的死亡現象。

另一方面，本發明之特點在於引起 T 細胞或自然殺手細胞死亡的方法。此方法包含下列步驟：提供一種會在細胞表面上表現 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的 T 細胞或自然殺手細胞；使 T 細胞與自然殺手細胞與一種會與其細胞表面上之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的化合物接觸；其中該化合物與 T 細胞或自然殺手細胞表面上之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的結合反應會誘發出一可造成 T 細胞或自然殺手細胞死亡的訊息傳遞路徑。

本方法使用的化合物可包含抗體或該抗體中可與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的抗原結合片段。在一較佳實施例中，化合物是與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 專一性結合的單株抗體。在一較佳實施例中，本方法包含使單株抗體與一藥劑接觸的步驟，此藥劑會與單株抗體結合，並使 T 細胞或自然殺手細胞表面上的數個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 發生交聯反應。

在一較佳實施例中，本發明包含下列步驟：(i)提供一種會在細胞表面上表現 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的 T 細胞或自然殺手細胞；(ii)使該 T 細胞或自然殺手細胞與一種能在細胞表面與至少兩個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 分子結合的多聚複合體化合物接觸；其中，該多聚複合體化合物含有兩條多胜肽鏈，每條多胜肽鏈

含有(a)一可與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的結合區，以及(b)一異種胺基酸序列，其中，該兩條多胜肽鏈透過異種胺基酸序列的連結而形成該多聚複合體化合物，其中當該多聚複合體化合物與 T 細胞或自然殺手細胞表面上的兩個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 相結合時，會誘發出一可使 T 細胞或自然殺手細胞死亡的訊息傳導路徑。

該多複合體化合物可為同多聚複合體化合物或異多聚複合體化合物。結合區可選擇性的包含 P-選擇素胞外結構區或其中之一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段、E-選擇素胞外結構區或其中之一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段、L-選擇素胞外結構區或其中之一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段、抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體或其 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段、選自噬菌體表現庫中的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合多胜肽或上述片段之任意組合。

異種胺基酸序列可選擇性地含有一段細胞表面受體結合區域，例如免疫球蛋白長鏈恆定區。在某些較佳實施例中，多胜肽鏈透過異種胺基酸序列的共價連結，如雙硫鍵連結，而形成多聚複合體化合物。

在一些較佳實施例中，本方法包含一道使多聚複合體化合物與一藥劑接觸的附加步驟。此藥劑透過異種胺基酸序列與多聚複合體化合物連結，並使 T 細胞表面上數個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 發生交聯反應。

在一些較佳實施例中，本方法包括促使 T 細胞或自然殺手細胞表面上數個 P-選擇素醣蛋白配位體 1 抗原發生交聯反應的步驟。其中，此交聯反應會引發一個導致 T 細胞或自然殺手細胞死亡的訊息傳導路徑。

本發明方法之部分較佳實施例中，T 細胞是已活化 T 細胞。在一實施例中，T 細胞是 $CD4^+$ T 細胞。在另一實施例中，T 細胞是 $CD8^+$ T 細胞。

在本方法之部分較佳實施例中，本方法包含評估 T 細胞或自然殺手細胞與化合物(如，多聚複合體化合物)接觸後之細胞存活率的步驟。

在本方法之部分較佳實施例中，本方法包含評估 T 細胞或自然殺手細胞與化合物(如，多聚複合體化合物)接觸後之生物活性的步驟。

在一些較佳實施例中，本方法包括引起已活化 T 細胞的死亡。

本發明另一態樣之特點在於一種篩選 P-選擇素醣蛋白配位體 1 之調節因子的方法。此方法包括步驟：提供一種在細胞表面上表現 P-選擇素醣蛋白配位體 1 的細胞；使此細胞與一種測試物質接觸；以及測量細胞與測試物質接觸後的細胞存活率，藉此決定該測試物質是否為 P-選擇素醣蛋白配位體 1 的調節因子。

在一實施例中，本方法包含一步驟用來偵測由測試物質引起的細胞死亡現象，藉此判斷該測試物質是否為 P-選擇素醣蛋白配位體 1 的調節因子。

在一實施例中，測試物質可為抗體或該抗體之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的抗原結合片段。在一較佳實施例中，測試物質是一種與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 專一性結合的單株抗體。在一較佳實施例中，本方法包含使單株抗體與一種會與單株抗體結合的藥劑接觸，並使細胞表面上數個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 發生交聯反應。

在一實施例中，本方法包含使細胞表面上數個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗原發生交聯反應的步驟。其中，交聯反應會引發一個導致細胞死亡的訊息傳導路徑。

在一較佳實施例中，T 細胞是已活化 T 細胞。在一實施例中，T 細胞是一種 $CD4^+$ T 細胞。在另一實施例中，T 細胞是一種 $CD8^+$ T 細胞。

在一較佳實施例中，本方法包含製造大量測試物質，並將測試物質與藥學上可接受之載體 (pharmaceutically acceptable carrier) 配方成一藥劑的步驟。

本發明另一態樣之特點在於提供一種藥劑套組，其含有：一種可與 T 細胞表面之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的化合物，以及使用說明書；其中，該化合物與 T 細胞表面之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合會引發一個使 T 細胞死亡的訊息傳導路徑；使用說明書則用來說明該化合物的使用方法，解釋此化合物可用來治療具有過度或不需要的 T 細胞調控性免疫反應，或治療過度或不需要的 T 細胞增生現象，如發炎、自體免疫

疾病、移植排斥、過敏狀況或 T 細胞癌。

在一實施例中，此藥劑套組含有(i)一多聚複合體化合物，其可與 T 細胞表面上至少兩個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合，其中此多聚複合體化合物具有兩條多胜肽鏈，每條多胜肽鏈含有(a)一段能與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的結合區，以及(b)一段異種胺基酸序列。其中，多胜肽鏈係透過異種胺基酸序列的連結而形成多聚複合體化合物，並且此多聚複合體化合物與 T 細胞表面上至少兩個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的結合反應會引起使 T 細胞死亡的訊息傳導路徑。此外此藥劑套組亦含有(ii)一使用說明書，用來說明該化合物的使用方法，以及說明此藥劑套組可用來治療具有過度或不需要的 T 細胞調控性免疫反應，或用來治療過度或不需要的 T 細胞增生現象，如發炎、自體免疫疾病、移植排斥、過敏狀況或 T 細胞癌。

本發明之優點在於能引發 T 細胞耗盡或 T 細胞凋亡的現象，卻不會產生不需要或傷害性的免疫反應。例如，在某些較佳實施例中，患者使用本發明之一種抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體或一種多聚複合體化合物並不會使如介白素-2 或腫瘤壞死因子- α 等發炎細胞激素(inflammatory cytokine)的量發生不正常的升高情況。

本發明之另一優點在於使用一種可引起 T 細胞凋亡的協同性(agonistic)組合物來耗盡 T 細胞。因此，本發

明提供一種異於被動性免疫抑制之主動性免疫抑制方法，來引發主動性免疫抑制作用；該被動性免疫抑制係肇因於使用拮抗性組合物 (antagonistic composition)(例如，拮抗性抗 P-選擇素醣蛋白配位體 1 抗體或拮抗性可溶選擇素片段)利用與免疫受體結合來防止受該些受體調控的免疫活化反應。

本發明之另一優點在於僅對幾乎只表現在白血球(特別是 T 細胞或自然殺手細胞)細胞表面上的 P-選擇素醣蛋白配位體 1 發生作用。因此，本發明之化合物不會使他種細胞(例如肝細胞)發生明顯的細胞凋亡現象。在不引起致命的細胞激素反應與傷害其他器官的情況下，針對 T 細胞或自然殺手細胞(特別是參與移植排斥反應的 CD3 細胞)進行選擇性耗盡作用是免疫抑制藥劑所渴望的特性。

除非特別定義，本發明中使用之所有專業與科學性用語之意義與習知技藝者所熟悉之意義相同。同時，尚有其他方法或材料與本發明中所敘述之方法與材料相似或均等，並可作為本發明之實施或測試示範，並在下列內容中敘述之。文中所提到之所有發表文獻、專利申請案件、專利以及其他參考資料均完整併入參考。當使用術語具爭議時，以本發明之說明書為基準。此外，說明書中所敘述之方法與材料僅作為說明示範之用，並不能用來限制本發明之範圍。

本發明之其他特徵與優點將藉由下列詳細敘述與申

請專利範圍來加以說明。

【實施方式】

本發明係有關於利用調控 T 細胞表面之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的功能來調控 T 細胞活性的方法。本發明內容所敘述之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 與協同性組合物的結合，能造成 T 細胞耗盡與/或使 T 細胞走向細胞凋亡。因此協同性組合物可作為控制免疫相關症狀的治療藥劑，例如發炎、自體免疫疾病、移植排斥、過敏性疾病與/或 T 細胞衍化癌症。協同性組合物亦可用來引起任何具有過量 T 細胞數量或活性之生物樣本的 T 細胞耗盡作用。

P-選擇素糖蛋白配位體 1(PSGL-1)

P-選擇素糖蛋白配位體 1 係為一種細胞表面黏附分子，其表現在中性白血球(neutrophils)、T 淋巴細胞與 B 淋巴細胞(T and B-lymphocyte)、自然殺手細胞、單核球(monocyte)、樹突細胞(dendritic cell)與原始人類 CD34 造血前驅細胞(primitive human CD34 hematopoietic progenitor cell)上。透過 P-選擇素糖蛋白配位體 1 與選擇素的結合，使得 P-選擇素糖蛋白配位體 1 能調控白血球在內皮組織(endothelium)的滾轉運動，以及調控白血球穿透血管而進入發炎組織的行為。由 P-選擇素糖蛋白配位體 1 媒

介之 T 細胞與 E-選擇素及 P-選擇素的結合或是 T 細胞的遷移均受到差異性的調控。例如，當 T 細胞從原始狀態轉變成記憶性 T 細胞時，T 細胞表面上會表現出皮膚淋巴細胞抗原 (cutaneous lymphocyte antigen, CLA) 之抗原決定表位 (epitope)。並且，只有已活化的第一型輔助性 T 細胞能表現出有功能的 P-選擇素糖蛋白配位體 1，並能移動到皮膚上的發炎區域。而第二型輔助性 T 細胞則不具有此種功能。

P-選擇素糖蛋白配位體 1 為一種唾液酸化黏蛋白 (sialomucin)，其需經過特殊的唾液酸化 (sialylated)、海藻糖化 (fucosylated) 與硫酸化 (sulfated) 後才能與 P-選擇素結合。P-選擇素糖蛋白配位體 1 會因其蛋白鏈 N-端上之糖化程度的不同及硫化位置不同而產生數種異構物 (isoform)。靜止周邊血液 T 細胞與 B 細胞、淋巴細胞株與體外活化周邊血液 T 細胞之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的蛋白表現量大至相等。並且只有已活化的 T 細胞會表現有功能的 P-選擇素糖蛋白配位體 1，並與 P-選擇素具高親合性之結合。活化依賴性結合活性 (activation-dependent binding activity) 是不同程度之轉譯後修飾 (post-translational modification) 造成的結果，例如可藉著提高已活化 T 細胞內的 $\alpha(1,3)$ -海藻糖基轉移酶 ($\alpha(1,3)$ fucosyltransferases) 活性來改變糖化的程度。P-選擇素糖蛋白配位體 1 的異構物對 L-選擇素與 E-選擇素亦會展現不同的親和性。例如，呈現皮膚淋巴細胞抗原 (CLA)

陽性的人類 T 細胞會黏附 E-選擇素與 P-選擇素並進行滾轉。而表現 P-選擇素糖蛋白配位體 1，但不具有皮膚淋巴細胞抗原決定表位的 T 細胞則僅會與 P-選擇素結合。此外，P-選擇素糖蛋白配位體 1 與 P-選擇素的結合係決定在末端十個胺基酸胜肽 (terminal decapeptide) 上，其中包含三個硫化的酪胺酸 (tyrosine)，以及一個糖化的息寧胺酸 (threonine)。

可利用重組技術 (recombinant method) 與 / 或從生物組織中分離出天然的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 以獲取 P-選擇素糖蛋白配位體 1。並且，不論是以體內 (*in vivo*) 或體外 (*in vitro*) 的方法，均可在原核或真核細胞中製造 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之重組蛋白。係利用具有 P-選擇素糖蛋白配位體 1 基因序列的核酸序列來進行重組蛋白製造。P-選擇素糖蛋白配位體 1 之核酸序列請參考 GenBank Accession NM_003006。同時，用來辨識 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的抗體已為專業領域者所熟悉，並且該抗體可用來純化抗原以及 / 或作為文中所敘述之用途 (Herron et al. (2000) Science Jun 2;288(5471):1653-56; WO 00/25808)。亦可在 Sako 等人或其他文獻中查詢到有關 P-選擇素糖蛋白配位體 1 更進一步的詳細敘述 (1993, Cell 75:1179; Vachino et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:21966; and Veldman et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:16470)。

在 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之重組蛋白的製造過程中，P-選擇素糖蛋白配位體 1 的表現，以及 $\alpha(1,3)$ -海

藻糖基轉移酶(Fuc-TVII)對P-選擇素糖蛋白配位體1的修飾作用需同時進行，才能表現出具有功能的P-選擇素糖蛋白配位體1。並且在P-選擇素糖蛋白配位體1重組蛋白的製造過程中，可選擇共轉染(cotransfection)一段PACE核酸序列用來移除原胜肽(propeptide)，與/或共轉染一段酪胺酸硫轉移酶(tyrosine sulfotransferase)的核酸序列。

抗P-選擇素糖蛋白配位體1抗體可用來分離與純化生體組織中的P-選擇素糖蛋白配位體1。任何表現P-選擇素糖蛋白配位體1的細胞株，如從患者身上或T細胞株中得到的T細胞均為P-選擇素糖蛋白配位體1的來源。純化後的P-選擇素糖蛋白配位體1可用來進行本發明中敘述的各種實驗。例如，純化的P-選擇素糖蛋白配位體1可用來進行T細胞之P-選擇素糖蛋白配位體1功能調控因子的體外篩選試驗，或作為製備辨識P-選擇素糖蛋白配位體1之抗體的免疫原(immunogen)。

抗P-選擇素糖蛋白配位體1抗體

P-選擇素糖蛋白配位體1(或免疫原片段或其類似物)可用來產生本發明方法中的抗體。如上述方法，可利用基因重組技術或固相合成法(solid phase synthesis method)來製造P-選擇素糖蛋白配位體1或其胜肽片段。P-選擇素糖蛋白配位體1之重組多胜肽或其胜肽

片段可作為免疫原來製造出抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體。此外，抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體，如 TAB4 單株抗體，又可用來純化 P-選擇素糖蛋白配位體 1。例如可使用抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體來純化天然結構的 P-選擇素糖蛋白配位體 1，而純化後的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 又可作為產生他種抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體的免疫原。

本發明之抗體可以是單株抗體、多株抗體 (polyclonal) 或對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 具有專一性結合力的人工抗體 (engineered antibody)。對特定抗原 (如 P-選擇素糖蛋白配位體 1) 具有「專一性結合力」的抗體不會辨識測試樣品中的其他分子，亦不與之結合。因此本發明之特點在於提供數種辨識方法，用來找出可與本發明之多胜肽結合的測試化合物 (如抗體)。本發明之方法係使測試化合物與本發明之多胜肽接觸，並藉著直接測定結合力、或加入競爭分子來阻礙測試化合物與多胜肽結合，或利用細胞凋亡活性試驗來偵測分子結合力等方法來判斷測試化合物是否能與此多胜肽結合。

P-選擇素糖蛋白配位體 1 可配合如血氫蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 等載體蛋白，並與佐劑混合後，注射至哺乳動物宿主體內。隨後，此哺乳動物體內所產生的抗體可利用抗原親和層析法 (peptide antigen affinity chromatography) 來加以純化。

如有需要，可將 P-選擇素糖蛋白配位體 1 或其抗原

片段注射到各種動物體內來引起免疫反應。常用動物包括兔子、小鼠(mice)、天竺鼠(guinea pig)與大鼠(rats)。用來增加免疫反應的佐劑需配合所使用之動物種系來選擇，其包括弗氏佐劑(完全佐劑與不完全佐劑)、礦物膠(mineral gel)如氫氧化鋁(aluminum hydroxide)、界面活性劑(surface active substance)如溶血卵磷脂(或稱脫脂酸卵磷脂 lysolecithin)、普羅尼克多元醇(pluronic polyols)、聚陰離子(polyanions)、胜肽、油乳劑(oil emulsions)、血氰蛋白與二硝基酚(dinitrophenol)。可能有用的人類佐劑包括卡介疫苗(bacille Calmette-Guerin, BCG)與短小棒狀桿菌菌苗(*Corynebacterium parvum*)。多株抗體係指存在於免疫動物血清中的異種株(heterogeneous population)抗體。

本發明中的抗體包含多株抗體、單株抗體、擬人化或嵌合抗體(humanized or chimeric antibody)、單鏈抗體(single chain antibody)、Fab 片段、F(ab')₂ 片段與利用 Fab 表現庫所製造出來的產物。

單株抗體係指能辨識特定抗原的同種株抗體(homogeneous population)，其可利用上述之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 多胜肽與融合瘤技術(standard hybridoma technology)來製備(Kohler et al., Nature 256:495 [1975]; Kohler et al., Eur J Immunol 6:511 [1976]; Kohler et al., Eur J Immunol 6:292 [1976]; Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T Cell

Hybridomas, Elsevier, N.Y. [1981])。

在某些情況下，可利用培養永生性細胞株 (continuous cell line) 的製造抗體方法來獲得單株抗體，例如 Kohler 等人在期刊 Nature 256:495 (1975) 及美國專利編號 4,376,110 之案件中所敘述的人類 B 細胞融合瘤技術 (Kosbor et al., Immunology Today 4:72 [1983]; Cole et al., Proc Natl Acad Sci USA 80:2026 [1983])，及 EBV 融合瘤技術 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 [1983])。此類抗體可以是任意的免疫球蛋白種類，包括 IgG、IgE、IgM、IgA、IgD 與任何免疫球蛋白的次種類 (subclass)。本發明之製造單株抗體的融合瘤可採用體內或體外方式培養。而體內方式是更有效的高濃度單株抗體製造方法。

所得到的單株抗體或多株抗體需利用西方墨點法 (western blot) 或免疫沈澱分析法 (immunoprecipitation analysis) 來測定其對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的特異辨識力，檢測方法可參考如 Ausubel 等人之論文。

對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 具有專一性辨識力與結合力的抗體，特別是能與 T 細胞 (如 CD3⁺細胞) 表面上的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗原結合，並能引起患者體內的 T 細胞耗盡或凋亡的抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體方可為本發明使用。

上述之抗體具多種用途，例如，可用來配製醫療組

合物，以降低或消除不希望發生的免疫反應，如伴隨發炎、自體免疫疾病、移植排斥、過敏性疾病與 T 細胞衍化癌症 T 細胞而來的 T 細胞調控性免疫反應。亦可在篩選試驗中，使用上述抗體來測試待測化合物對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的結合能力。

此外，可利用剪切具有適當抗原專一性之單株抗體基因與具有適當生物活性的人類抗體基因，並將兩者結合的技術來製造出嵌合抗體 (Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 [1984]; Neuberger et al., Nature 312:604 [1984]; Takeda et al., Nature 314:452 [1984])。嵌合抗體係指一種分子各部分來自不同動物種系的分子。例如一個分子中同時具有小鼠單株抗體之可變區與人類免疫球蛋白的恆定區。

單鏈抗體製造技術 (U.S. Pat. Nos. 4,946,778, 4,946,778, and 4,704,692) 亦可用來製備抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的單鏈抗體，或其單鏈抗體片段。單鏈抗體係利用胺基酸來橋接抗體 Fv 區中的長鏈 (heavy chain) 與短鏈 (light chain) 片段以形成單鏈多肽。

辨識特定抗原決定表位之抗體片段的製備技術廣為習知技藝者所熟悉。舉例來說，可利用胃蛋白酶 (pepsin) 來分解抗體而得到 $F(ab')_2$ 片段。亦可還原 $F(ab')_2$ 片段上的雙硫鍵而得到 Fab 片段。或是利用建構 Fab 表現庫來達到簡便並快速地辨識出具有特定親和性之單株 Fab 片段的目的是。

可利用習知技術來使抗體擬人化。例如具有專一性結合力的單株抗體便可進行商業規模的擬人化修飾 (Scotgene, Scotland; Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.)。完全擬人化抗體(例如在基因轉殖動物體內表現的抗體)亦為本發明的特色之一 (Green et al., Nature Genetics 7:13 [1994]; and U.S. Pat. Nos. 5,545,806 and 5,569,825)。

多聚複合體化合物

能與 T 細胞或自然殺手細胞表面上之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 蛋白結合的多聚複合體化合物可用來引發細胞凋亡現象。多聚複合體化合物至少包含兩條多胜肽鏈。每條多胜肽鏈包含 (i) 一段能與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的結合區，以及 (ii) 一異種胺基酸序列。

概括而言，多聚複合體化合物能與特定細胞表面上至少兩個不同的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 蛋白結合。不過，多聚複合體化合物亦可經過設計，而使其具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或更多個不同的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合區，而使得此多聚複合體化合物能與特定細胞表面上 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 個或更多個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合。

結合區包含能與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的任何胺基酸序列，或是任何經過修飾的胺基酸序列，例如經過醣化或硫化修飾反應。結合區可與自然產生的

胺基酸序列或非自然產生的胺基酸序列一致。例如，結合區可包含選擇素(如 P-選擇素、E-選擇素或 L-選擇素)的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合區。包含選擇素之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合區的多胜肽鏈可選擇性地包含：(i)一段選擇素膜外區(如 P-選擇素、E-選擇素或 L-選擇素之膜外區)；(ii)一段選擇素(如 P-選擇素、E-選擇素或 L-選擇素)上的鈣離子依賴性凝集素結構區(calcium dependent lectin domain)；或是(iii)選擇素(如 P-選擇素、E-選擇素或 L-選擇素)上用來調控選擇素對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之結合能力的膜外區片段。此外，在自然產生的胺基酸序列方面，可改變自然的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合區內一個或一個以上的胺基酸來得到非自然序列，並且該非自然胺基酸序列保留其與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的功能。舉例來說，一多胜肽鏈含有一段能與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的胺基酸序列，並且此胺基酸序列與下列任一片段具有至少 80%、85%、90%、95% 或 98% 的相似度。這些任意片段包括：(i)一選擇素(如 P-選擇素、E-選擇素或 L-選擇素)的膜外區；(ii)一選擇素(如 P-選擇素、E-選擇素或 L-選擇素)的鈣依賴性凝集素結構區；或是(iii)一選擇素(如 P-選擇素、E-選擇素或 L-選擇素)上用來調控選擇素對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之結合能力的膜外區片段。一般分子生物突變技術(molecular biology mutagenesis techniques)可用來改變 P-選擇素

醣蛋白配位體 1 結合區的核酸序列。修飾後的結合區隨後可利用如固定化的 P-選擇素醣蛋白配位體 1 或是細胞表面上的 P-選擇素醣蛋白配位體 1 來測試其對 P-選擇素醣蛋白配位體 1 的結合能力。結合區亦可包含抗 P-選擇素醣蛋白配位體 1 抗體，或選自噬菌體表現庫之多胜肽上的 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合區，又或是一段能與 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合之胺基酸序列的 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合區。其中，此胺基酸序列需與一抗 P-選擇素醣蛋白配位體 1 抗體或一段選自噬菌體表現庫之多胜肽的 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合區有至少 80%、85%、90%、95% 或 98% 的相似度。

P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合區可包含一段胺基酸序列，此胺基酸序列與 P-選擇素上的 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合片段相同。以文中所敘述之多聚複合體化合物的多胜肽鏈為例，此多胜肽鏈包含一段小鼠 P-選擇素/Fc 重組嵌合體(R&D Systems, Minneapolis, MN)。此段小鼠 P-選擇素/Fc 嵌合體包含下列結構：(i)CD33 訊息胜肽片段(甲硫胺酸 1-丙胺酸 16，Met1-Ala16)；(ii)小鼠 P-選擇素(胞膜外區之色胺酸 42 至丙胺酸 709 之片段，Trp42-Ala709 of extracellular domain)；(iii)IEGRMD(SEQ ID NO:1)；以及(iv)人類免疫球蛋白 G1(脯胺酸 100-離胺酸 330，Pro100-Lys330)。另一較佳範例之多胜肽鏈則可含有人

類 P-選擇素/Fc 重組嵌合體(R&D Systems, Minneapolis, MN)。此段人類 P-選擇素/Fc 重組嵌合體含有下列結構：(i)人類 P-選擇素(胞膜外區之甲硫胺酸 1 至丙胺酸 771 之片段，Met1-Ala771)；(ii) IEGRMD (SEQ ID NO:1)；以及(iii)人類免疫球蛋白 G1(脯胺酸 100-離胺酸 330)。

P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合區可包含一段胺基酸序列，此胺基酸序列與 E-選擇素上的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段相同。以文中所敘述之多聚複合體化合物的多胜肽鏈為例，此多胜肽鏈包含一段小鼠 E-選擇素/Fc 重組嵌合體(R&D Systems, Minneapolis, MN)。此段小鼠 E-選擇素/Fc 嵌合體包含下列結構：(i)小鼠 E-選擇素(胞膜外區之甲硫胺酸 1 至脯胺酸 557 之片段，Met1-Pro557)；(ii)寡肽 IEGRMD(SEQ ID NO:1)；(iii)人類免疫球蛋白 G1(脯胺酸 100-離胺酸 330，Pro100-Lys330)；以及(iv)寡肽 HHHHHH(SEQ ID NO: 2)。另一較佳範例之多胜肽鏈則可含有人類 E-選擇素/Fc 重組嵌合體(R&D Systems, Minneapolis, MN)。此段人類 E-選擇素/Fc 重組嵌合體含有下列結構：(i)人類 E-選擇素(胞膜外區之甲硫胺酸 1 至脯胺酸 556 之片段，Met1-Pro556)；(ii)寡肽 IEGRMD (SEQ ID NO:1)；(iii)人類免疫球蛋白 G1(脯胺酸 100-離胺酸 330)；以及(iv)寡肽 HHHHHH(SEQ ID NO: 2)。

P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合區可包含一段胺基酸

序列，此胺基酸序列與 L-選擇素上的 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合片段相同。以文中所敘述之多聚複合體化合物的多胜肽鏈為例，此多胜肽鏈包含一段小鼠 L-選擇素/Fc 重組嵌合體(R&D Systems, Minneapolis, MN)。此段小鼠 L-選擇素/Fc 嵌合體包含下列結構：(i) 小鼠 L-選擇素(胞膜外區之甲硫胺酸 1 至天門冬醯酸 332 之片段，Met1-Asn332)；(ii)寡肽 IEGRMD(SEQ ID NO:1)；(iii)人類免疫球蛋白 G1(脯胺酸 100-離胺酸 330，Pro100-Lys330)；以及(iv)寡肽 HHHHHH(SEQ ID NO: 2)。另一較佳範例之多胜肽鏈則可含有人類 L-選擇素/Fc 重組嵌合體(R&D Systems, Minneapolis, MN)。此段人類 L-選擇素/Fc 重組嵌合體含有下列結構：(i)人類 L-選擇素(胞膜外區之甲硫胺酸 1 至天門冬醯酸 332 之片段，Met1-Asn332)；(ii)寡肽 IEGRMD (SEQ ID NO:1)；(iii)人類免疫球蛋白 G1(脯胺酸 100-離胺酸 330)；以及(iv)寡肽 HHHHHH(SEQ ID NO: 2)。

多聚複合體化合物可製備成同多聚複合體化合物或是異多聚複合體化合物。同多聚複合體化合物之多胜肽鏈上僅具有相同的 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合區。舉例來說，同多聚複合體化合物可含有一段與 P-選擇素之 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合區之序列相同的多胜肽鏈。異多聚複合體化合物之多胜肽鏈上則具有不同的 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合區。例如，異多聚複合體化合物之第一條多胜肽鏈具有 P-選擇素之

P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合區，而第二條多胜肽鏈上則具有 E-選擇素之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合區。

異種(heterogeneous)胺基酸序列可以是任意胺基酸序列。然而，文中所敘述之多胜肽鏈上的此段胺基酸序列不可與任何自然產生之蛋白質的序列相似。異種胺基酸序列含有一個或一個以上的胺基酸用來作為多胜肽鏈之間的連結。例如，一個或一個以上的胺基酸可透過如雙硫鍵之方式來與多胜肽鏈做共價性鍵結。例如免疫球蛋白長鏈恆定區便可作為此異種胺基酸序列。而恆定區(Fc)內的雙硫鍵可連結兩條多胜肽鏈而形成二聚體化合物(dimeric compound)。

異種胺基酸序列除了具有連結多胜肽鏈的功能以外，其序列上更可包含一段交聯分子結合區(cross-linker bind region)，如細胞表面受體結合區域。當此段交聯分子結合區與一藥劑結合後，可使多胜肽鏈與細胞表面上的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 蛋白因發生交聯反應而結合。免疫球蛋白長鏈恆定區包含 Fc 受體結合區域。而交聯分子可以是抗體，例如抗 Fc 抗體，其對異種胺基酸序列上的交聯分子結合區具有特異結合能力。

可調節 P-選擇素糖蛋白配位體 1 功能之化合物篩選試驗

本發明亦包含具有 P-選擇素糖蛋白配位體 1 (或 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之結構區)結合能力之化合物的

辨識方法。上述化合物至少包括能透過與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合而引發 T 細胞耗盡與 T 細胞凋亡現象的化合物、調控 P-選擇素糖蛋白配位體 1 與控制 P-選擇素糖蛋白配位體 1 活性之穿膜蛋白、細胞間蛋白或細胞內蛋白之結合反應的化合物，以及調控 P-選擇素糖蛋白配位體 1 活性的化合物。

根據本發明方法所篩選出來的化合物可包括胜肽、抗體或抗體之部分片段以及其他有機化合物，並且如文中所述，此類有機化合物能與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合，並能調控那些受到 P-選擇素糖蛋白配位體 1 調節的生物功能。

具有上述功能之化合物可包括胜肽，例如可溶性胜肽，其包括隨機胜肽庫中的各種胜肽分子 (Lam et al., Nature 354:82 [1991]; Houghten et al., Nature 354:84 [1991])。並且該化合物亦包括由 D-與/或 L-型之胺基酸所構成之組合化學衍生分子庫、磷酸化胜肽、抗體與有機或無機小分子 (small organic or inorganic molecules)。其中磷酸化胜肽包括來自磷酸化胜肽庫中的隨機或部分退化分子 (Songyang et al., Cell 72:767 [1993])。而抗體則包括多株抗體、單株抗體、擬人化抗體、抗獨特型抗體、嵌合體抗體或單鏈抗體、FAb、F(ab')₂、FAb 表現庫片段，以及上述各類抗體之抗原決定表位結合片段。

根據本發明方法所篩選出之其他化合物更包含有機

小分子，該些有機小分子會影響 P-選擇素糖蛋白配位體 1 蛋白的活性。

電腦模擬與資料搜尋技術可用來鑑定化合物，或是針對那些已鑑定為可調控 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之表現量或活性的化合物進行改善。當化合物或組合物經過鑑定後，便可辨識出其上的活性位置或區域。活性位置一般多為調控因子的結合區。可利用習知方法，如從胜肽的胺基酸序列或從核酸上的核酸序列，又或研究該化合物之配位體與該化合物之類似化合物或組合物所形成之複合體來辨識出活性位置。後續內容中，利用化學方法或 X 光晶體繞射法(X-ray crystallographic method)，並藉著尋找調節因子或配位體與分子的結合位置來找出化合物的活性位置。

雖然可參考上述內容來設計並製造出具有結合能力的化合物是一種方法。另一種方法是可從已知的化合物中，包括自然產物、合成化學物與包括蛋白質之生物活性物質中篩選出能與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合，並產生 T 細胞減少之現象，或引發 T 細胞之細胞凋亡現象。

可設計一種體外試驗方法來鑑定化合物是否能與 P-選擇素糖蛋白配位體 1(或 P-選擇素糖蛋白配位體 1 蛋白上的結構區)結合。經辨識的化合物可能具有調控 T 細胞活性的功能，因此亦可能適合用來治療伴隨過度或不需要發生的 T 細胞調控性免疫反應或 T 細胞過度

增生的症狀，例如發炎、自體免疫疾病、移植排斥、過敏性疾病或 T 細胞癌。

本發明之鑑定可與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合之化合物的試驗方法包括：準備一含有 P-選擇素糖蛋白配位體 1(或其結構區片段)與待測化合物的混合物，並將該混合物置於適當反應條件下反應足夠時間，以使混合物中的兩種組成物能相互作用並結合。隨後在混合物中會產生可被移除與/或偵測到的複合體。在實驗中所使用之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的種類可依照篩選試驗的目的而改變。在某些情況下，可使用一段與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之結構區序列相同的胜肽，並且此段胜肽可與另一種蛋白或多胜肽融合以達到方便實驗進行的目的，例如作為標定記號(labeling)，或是用來將產生的複合體自混合物中分離出來等目的。

此外，可採用不同方法來進行篩選試驗，例如可將 P-選擇素糖蛋白配位體 1 蛋白、多胜肽、短胜肽、融合蛋白或是帶測化合物固定在固體表面(solid phase)上，並在反應結束後，偵測留在固體表面上 P-選擇素糖蛋白配位體 1/待測化合物複合體的量。在本方法之一較佳實施例中，係將 P-選擇素糖蛋白配位體 1 固定在固體表面上，而待測化合物則不固定於固體表面上。並且該待測化合物可利用直接或間接方法來加以標記。

在較佳實施例中，可使用微量滴定盤(microtiter

plates)來作為固體表面。並且可利用非共價性連結或共價性連結的方法來使欲固定之成分固定在固體表面上。可藉著在固體表面上塗佈一層含有欲固定的蛋白質溶液，待乾燥後即可達成非共價性連結的目的。或者，使用可辨識欲固定之蛋白的固定化抗體來使該蛋白固定在固體表面上。其中所使用的固定化抗體以單株抗體為佳。而固體表面可如上述方法先行處理後儲存備用。

隨後將非固定的成分加入具有固定成分的固體表面上。待反應完全後，在反應後所產生之複合體仍可固定在固體表面的條件下，藉著如沖洗的方式來移除未反應的成分。之後可以多種方法來偵測留在固體表面上的複合體。其中非固定之成分可預先加以標記，待反應後，若在固體表面上偵測到標記訊號即表示有複合體生成。若非固定之成分無預先進行標記處理，則可使用間接標記的方法來偵測留在固體表面上的複合物，例如使用具有標記的抗體，此標記抗體對非固定成分有專一性結合力。並且此標記抗體又可利用直接標記方法，或利用已標記之抗免疫球蛋白抗體來對該抗體做間接標記。

上述之反應亦可在液相中進行，再將反應後的產物自未反應的成分中分離出來並測定複合物的生成量。例如可使用一種對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 具有專一性的固定化抗體、多胜肽、短胜肽片段、融合蛋白或

待測化合物來抓住反應液體中產生的複合體。並且使用一種對複合體中的其他成分具有專一性結合力的標記抗體來偵測複合體的量。

又或者利用細胞活性篩選法 (cell-based assay) 來篩選出能與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合的化合物。係使用會表現 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的細胞株，或使用經過基因改造後可表現出 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的細胞株來進行篩選試驗。細胞活性篩選試驗對於評估利用文中所敘述之篩選方法所得到之化合物是否具有功能性的效果特別有效。例如，根據對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之結合能力而篩選出一種化合物後，可對該化合物進行細胞活性篩選試驗來測試其功效，例如是否能在體內或體外試驗中引起 T 細胞凋亡或 T 細胞的數量耗盡。

藥學組合物

本發明之另一特色在於提供一藥學組合物來達到改變患者免疫反應的目的。此藥學組合物包含如抗體、多聚複合體化合物、小分子或對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 具有特異結合力的他種化合物等組成。在一較佳實施例中，此化合物具有 P-選擇素糖蛋白配位體 1 作用劑之功效。

本發明之藥學組合物可如傳統方法使用一或一種以上之生理可接受之載體或輔劑來配製。因此，可依不

同用藥方式的需要來製備該化合物及其生理可接受之鹽類與溶劑化物(solvate)。

本發明之化合物可製備成非胃腸性用藥的藥劑型態，例如，以快速注射或連續滴注的方式來用藥。注射用之藥劑配方可製備成如小玻璃藥水瓶之單劑型，或添加保存劑的多劑型包裝。本發明之組合物可製成懸浮溶液、油性或水性溶劑之乳劑(emulsion)。並且組合物中可含有配方劑，如懸浮劑、安定劑或分散劑。此外，活性成分可製備成粉末狀，並在使用前以適當溶劑(如滅菌水，sterile pyrogen-free water)來回溶使用。

控制 T 細胞調控性免疫反應與耗盡 T 細胞數量的方法

在上述篩選試驗中的化合物可用來調節受 P-選擇素糖蛋白配位體 1 調控的生物功能，或是用來治療因過度或不需發生之免疫反應的疾病，如 T 細胞調控性免疫反應。這些化合物包含胜肽、抗體或抗體部分片段與其他能和細胞表面之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合並誘發出可使 T 細胞死亡之訊息傳導路徑的有機化合物。本發明方法可選擇性地添加交聯劑，此交聯劑可使細胞表面上的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 發生交聯反應。文中敘述之化合物可用於各種希望降低或消除 T 細胞活性的任何癥狀。本發明之化合物對於治療如發炎、自體免疫疾病、移植排斥、過敏性疾病與 T 細胞

衍化癌症等疾病之治療效果卓越。

本發明所敘述之抗 P-選擇素醣蛋白配位體 1 化合物還可用來治療包括糖尿病(diabetes mellitus)、關節炎(arthritis)(其中包括類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)、幼年型類風濕性關節炎(juvenile rheumatoid arthritis)、骨關節炎(osteoarthritis)與乾癬性關節炎(psoriatic arthritis))、多發性硬化症(multiple sclerosis)、脊髓炎(encephalomyelitis)、重症肌無力症(myasthenia gravis)、紅斑性狼瘡(systemic lupus erythematosus)、自體免疫性甲狀腺炎(autoimmune thyroiditis)、皮膚炎(dermatitis)(包括異位性皮膚炎(atopic dermatitis)與濕疹性皮膚炎(eczematous dermatitis))、乾癬(psoriasis)、修格連氏綜合症(Sjögren's Syndrome)、克隆氏症(Crohn's disease)、口瘡性潰瘍(aphthous ulcer)、虹膜炎(iritis)、結膜炎(conjunctivitis)、角膜炎(keratoconjunctivitis)、第一型糖尿病(type I diabetes)、發炎性腸道疾病(inflammatory bowel diseases)、潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis)、氣喘(asthma)、過敏性氣喘(allergic asthma)、急性紅斑性狼瘡(cutaneous lupus erythematosus)、硬皮症(scleroderma)、陰道炎(vaginitis)、直腸炎(proctitis)、藥疹(drug eruptions)、逆轉性癩瘋病(leprosy reversal reactions)、癩瘋結節性紅斑(erythema nodosum leprosum)、自體免疫性葡萄膜炎(autoimmune

uveitis)、過敏性脊髓炎(allergic encephalomyelitis)、急性壞死出血性腦病變(acute necrotizing hemorrhagic encephalopathy)、特發性雙邊漸進式感音神經性聽障(idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss)、再生不良性貧血(aplastic anemia)、純粹紅血球性貧血(pure red cell anemia)、特發性血小板過少症(idiopathic thrombocytopenia)、軟骨炎(polychondritis)、偉格那氏肉牙腫(Wegener's granulomatosis)、慢性活動性肝炎(chronic active hepatitis)、史蒂文森-強生症候群(Stevens-Johnson syndrome)、特發性脂肪下痢(idiopathic sprue)、扁平苔癬(lichen planus)、葛瑞芙氏症(Graves' disease)、類肉瘤症(sarcoidosis)、原發性膽汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis)、後段葡萄膜炎(uveitis posterior)、間質性肺硬化(interstitial lung fibrosis)、移植物抗宿主疾病(graft-versus-host disease)、器官移植(包括使用異種異體組織或同種異體組織,如骨髓移植肝臟移植或其他組織或器官移植)、過敏(如異位性過敏)、愛滋病與 T 細胞惡性腫瘤(T-cell neoplasms)如白血病(leukemias)與/或淋巴瘤(lymphomas)。

不論是體內或體外試驗,本發明方法可耗盡細胞群中的 T 細胞數量。例如,在體外試驗中,將取自患者身上的生物樣品與本發明之抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 化合物接觸,並選擇性地搭配交聯劑來使用,可使樣

品中的 T 細胞數目減少。本發明方法亦可有效提高細胞群中的非 T 細胞數量而達到降低或消除細胞群之 T 細胞活性的效果。

下述為本發明之較佳實施例。其僅作為示範之用，不足以用來限制本發明之範圍。

較佳實施例

第 1 較佳實施例：製備抗 T 細胞凋亡誘發蛋白(TAIP)之單株抗體

可採用習知技藝者所熟悉的 Kohler 與 Milstein 之細胞融合方法(1976, European Journal of Immunology 6:511-519)來製造出會分泌指定抗體的融合瘤細胞，以製造出 T 細胞凋亡誘發蛋白專一性之單株抗體。操作方式係將以刀豆球蛋白 A 活化的 Balb/c 脾臟 T 細胞(Con A-activated Balb/c spleen T cells)注射到倉鼠體內後可獲得抗體產生細胞。將獲得的抗體產生細胞與骨髓瘤細胞株(myeloma cell line)進行細胞融合後可得到抗體分泌融合瘤(antibody secreting hybridoma)。融合方法係先以聚乙二醇(polyethylene glycol)使兩種細胞株融合後得到抗體產生細胞，並以常用的組織培養法來增殖之。根據上述方法所製造出來的融合瘤細胞可分泌出一單株抗體「TAB4」。TAB4 單株抗體可引起體外的 T 細胞凋亡，並能耗盡體內的 T 細胞數量。而可被 TAB4 抗體辨識的蛋白質即為 T 細胞凋亡誘發蛋白

(TAIP)。

實驗中使用的 C57BL/6J (B6)與 BALB/c 小鼠可購自 Jackson lab (Bar Harbor, ME)。Syrian 倉鼠可購自國立台灣大學醫學院動物中心 (Animal Core Facility, National Taiwan University Medical College)。

將 TAB4 融合瘤細胞的濃縮培養上清液 (culture supernatant) 以 $20,000\times g$ 的轉速離心 10 分鐘後，再以結合緩衝液 (binding buffer, 0.1 M 醋酸鈉, pH 5.0) 將上清液以 1:1 的比例稀釋。準備填充容積 (bed volume) 約 1ml 的 G-蛋白管柱，並以 3-5 ml 的結合緩衝液清洗 G-蛋白管柱三次後，將澄清的培養上清液注入 G-蛋白管柱中，使上清液通過管柱後流出。收集流出管柱的上清液，並將流出液再次注入管柱中。待上清液通過 G-蛋白管柱後，以 6-10 ml 的結合緩衝液清洗管柱，再以 5 ml 的洗出緩衝液 (elution buffer, 0.1 M 甘胺酸-鹽酸 (glycine-HCl), pH 2.8) 將結合在管柱上的抗體沖脫，並將含有抗體的洗脫液以每管 1 ml 的方式收集。分別於每管 1 ml 之抗體洗脫液中加入 $50\ \mu\text{l}$ 之 1M Tris-HCl (pH 7.5) 溶液，使抗體之酸鹼值到達中性。將中和後的抗體液集中後，以 2 公升之 pH 7.4 的磷酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) 透析該抗體液三次，每次 3 小時。完成透析步驟後，以 Bio-Rad 蛋白質分析法 (Bio-Rad Protein Assay, BIO-RAD, Hercules, CA) 來測定獲得之抗體樣品的蛋白質濃度。

第 2 較佳實施例：製備小鼠脾臟細胞懸浮液與 T 細胞之活化及增生

將小鼠脾臟浸泡在 8 ml 的漢克平衡鹽溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)，並以滅菌蓋玻片溫和地將小鼠脾臟切碎。隨後將小鼠脾臟碎片置入 15 ml 離心管中(Costar)，以 $200\times g$ 的轉速離心 5 分鐘。離心後，丟棄上清液，以輕敲管壁的方式將沈澱下來的細胞重新懸浮在沈澱物緩衝液(residual buffer)中。於細胞懸浮液中加入 1 ml 的紅血球溶胞緩衝液(RBC lysis buffer, 0.6M 氯化銨(NH_4Cl)、0.17M Tris-base, pH7.65)，以溶解摻雜在細胞中的紅血球。隨後將細胞懸浮液置於室溫下靜置 2 分鐘後，加入 9 ml 的漢克平衡鹽溶液快速冷卻之。以 $200\times g$ 的轉速離心 5 分鐘來沈澱胞沈後，以 RPMI 培養液沖洗沈澱細胞兩次，再將細胞重新懸浮在 RPMI 培養液中。最後以血球計數器(hemocytometer, Cambridge Scientific Inc.)與錐藍排除法(Trypan blue exclusion)來測定懸浮液中的細胞濃度與細胞存活率。

將獲得的脾臟細胞以 RPMI 培養液調整至 3×10^6 cell/ml 的細胞濃度，並在細胞懸浮液中加入刀豆球蛋白 A，使刀豆球蛋白 A 在細胞懸浮液中的濃度成為 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以活化 T 細胞。將細胞懸浮液以 5 ml/孔的用量注入 6 孔培養盤(6-well culture plate)中，或以 10 ml/盤的用量注入 10 公分培養皿(10-cm culture dish)後，置於 37°C 、5% CO_2 的環境下培養 48 小時後收取細胞。

將含有 T 細胞的已活化脾臟細胞重新懸浮在 5 ml 的漢克平衡鹽溶液後，置於離心管中，並小心地在懸浮液面上浮蓋 5 ml 之 55% 細胞分離液 (Percoll solution)。保持不擾動兩種分離液層的狀況，在 25°C 下，將細胞懸浮液以 1,900×g 的轉速連續離心 13 分鐘。離心後，可在兩種分層液體的界面間收集到 T 細胞。將收集到的 T 細胞以漢克平衡鹽溶液清洗兩次後，待後續實驗中使用。

第 3 較佳實施例：活化後 T 細胞的細胞凋亡反應

將已活化的 T 細胞(請見第二較佳實施例)重新懸浮於含有 5 ng/ml 介白素-2 的 RPMI 培養液中，並將細胞濃度調整成 5×10^5 cell/ml。隨後參照表一所示之條件，在已活化 T 細胞懸浮液中分別加入對照用免疫球蛋白(control Ig)、TAB4 抗體或抗 CD3 抗體。

表一

實驗組	處理方法*
負對照組	3 ug/ml 倉鼠免疫球蛋白 5 ng/ml 介白素-2 3 ug/ml 交連用抗體(抗倉鼠免疫球蛋白)
TAB4	3 ug/ml TAB4 倉鼠單株抗體 5 ng/ml 介白素-2 3 ug/ml 交連用抗體(抗倉鼠免疫球蛋白)

正對照組	1 ug/ml 抗 CD3 單株抗體 5 ng/ml 介白素-2 1 ug/ml 交連用抗體(抗小鼠免疫球蛋白)
*: 培養液中指定藥劑之最終濃度	

使表一中的各組細胞混合液反應 18-24 小時以後，利用 7-AAD 細胞凋亡分析法來測定每組細胞混合液中的胞凋亡程度。7-ADD 細胞凋亡分析法係將處理過的細胞移入 FACS 管(Falcon)中。隨後在磷酸緩衝溶液中加入 1%小牛血清(fetal bovine serum)與 0.05%疊氮化鈉(sodium azide)配製出溶液，再以冰冷的 FACS 溶液清洗細胞兩次後，以 200×g 的轉速，於 4℃ 下將細胞沈澱下來。獲得的細胞重新懸浮在冰冷的 FACS 溶液中，並將細胞濃度調整為 $1\sim2\times10^7$ cells/ml。將 0.1 ml 的細胞懸浮液與 7-ADD 試劑混合，使細胞懸浮液中的 7-ADD 試劑濃度成為 2 ug/ml。隨後令細胞與 7-ADD 試劑的混合液在黑暗中與 4℃ 的環境下靜置 20 分鐘以進行細胞染色反應。最後，使用冰冷的 FACS 溶液清洗染色後細胞兩次。再將染色後細胞重新懸浮在 0.5 ml FACS 溶液中，並以 BD LSR 流式細胞儀(BD LSR flow cytometer, Beckton Dickison)來分析細胞。

第 1 圖為時程實驗的結果(time-course experiment)，係顯示已活化 T 細胞對 TAB4(抗 T 細胞凋亡誘發蛋白)調控性細胞凋亡訊號的敏感性。此實驗係以刀豆素球蛋白 A (Con-A)來活化小鼠脾臟細胞，並以含有介白

素-2 的培養液來維持其活化狀態。收取已活化 T 細胞，並重新懸浮已活化 T 細胞後，在 T 細胞懸浮液中加入 TAB4 單株抗體或對照用倉鼠免疫球蛋白 G，並加入抗倉鼠免疫球蛋白 G 抗體以作為交聯分子來進行反應。於實驗第一天測得 T 細胞凋亡誘發蛋白交聯反應會引起一低程度(6.5%)之細胞凋亡的結果。然而，TAB4 誘發細胞凋亡的程度會在第二天上升至 17%，第四天上升至 52%，而在第六天下降至 44%。與僅接受介白素-2 處理的細胞比較下，對照用倉鼠免疫球蛋白 G 無法引起 T 細胞凋亡。而加入抗 CD3 抗體(正對照組)則可在 48 小時後，引起 38% 的已活化 T 細胞凋亡(未顯示數據)。

第 4 較佳實施例：各種組織之 T 細胞凋亡誘發蛋白的表現

以冰冷的 FACS 溶液(含 1% 小牛血清與 0.05% 疊氮化鈉之磷酸緩衝液)來清洗細胞兩次，並置於 FACS 管(Falcon)中，在 4°C 下，以 200×g 的轉速離心後獲得細胞。獲得的細胞重新懸浮在冰冷的 FACS 溶液中，讓細胞濃度成為 1×10^7 cell/ml。在 FACS 管中分裝 0.1 ml 的細胞懸浮液後，備用。

進行細胞表面染色係將濃度調整成 2 μ g/ml 的 TAB4 單株抗體或對照用倉鼠免疫球蛋白加入上述分裝的細胞懸浮液中，並將此混合物置於 4°C 下，在黑暗中反應

30 分鐘。將反應後的細胞以冰冷的 FACS 溶液清洗一次後，將細胞進行下列處理：(1)在 100 μ l 冰冷的 FACS 溶液中加入 cychrome 標記之抗 CD3 抗體 (2 μ g/ml)、FITC 標記之抗倉鼠免疫球蛋白與 PE 標記之抗 CD8/CD4/CD19/CD11b/ pan-NK/I-A/I-E/Mac-3 抗體 (2 μ g/ml)來進行脾臟細胞染色；(2)在 100 μ l 冰冷的 FACS 溶液中加入 FITC 標記之抗倉鼠免疫球蛋白、PE 標記之抗 CD8 抗體與 cychrome 標記之抗 CD4 抗體 (2 μ g/ml)來進行胸線細胞(thymus cell)染色。並將上述反應置於 4°C 下，於黑暗中反應 30 分鐘。最後，以冰冷的 FACS 溶液清洗染色後細胞兩次，在將染色後細胞重新懸浮於 1 ml 的 FACS 溶液中以 BD LSR 流式細胞儀(Beckton Dickison)進行結果分析。

第 3 與第 4 圖係顯示以 FACS 法來分析脾臟細胞與胸線細胞之不同次群細胞上的 T 細胞凋亡誘發蛋白抗原分佈。在第 3 圖中，CD19⁺B 細胞表面上的 T 細胞凋亡誘發蛋白含量很低，但仍可偵測到。而在自然殺手細胞與 CD3⁺T 細胞的細胞表面上則可偵測到較高含量的 T 細胞凋亡誘發蛋白。並且多數的 CD4⁺、CD8⁺與 CD4⁺8⁺胸線 T 細胞能表現大量的 T 細胞凋亡誘發蛋白。相較於第 3 圖之結果，第 4 圖則顯示 T 細胞凋亡誘發蛋白僅表現在少部分的 CD4⁻8⁻胸線 T 細胞上。

採集 B6 與 BALB/c 小鼠之腦、胸腺、心臟、肺臟、肝臟、胃、腎臟、脾臟與皮膚等各處組織。並在室溫

下，將組織樣品以 10% 的甲醛(formaldehyde)處理一個晚上以固定組織。再以石蠟將組織包埋後，置於 45℃ 下，以切片機(Leica RM2135 microtome, spread)將組織切成厚度 4 μ m 的薄片。將組織薄片置於處理過之玻片上，隨後將玻片置於 37℃ 之環境下乾燥後備用。

依標準步驟依序使用二甲苯(xylenes)來除去玻片上組織石蠟切片的石蠟，再以 100% 的乙醇來乾燥組織切片後，將含有組織的玻片保存在 10% 的乙醇中。

參考標準步驟，將組織切片依序浸泡在 100% 乙醇與含有 90% 乙醇-85% 乙醇-70% 乙醇的磷酸緩衝液中，最後使用磷酸緩衝液來使組織切片進行水相置換(rehydrate)。後續實驗均在潮濕容器中進行。係在室溫下，將組織切片以阻隔緩衝液(blocking buffer, 含 1% 正常山羊血清)浸泡一小時(或在 4℃ 下浸泡一個晚上)，以避免發生非專一性結合。移除阻隔緩衝液後，將 TAB4 抗體或正常倉鼠免疫球蛋白以 1:200 的比例稀釋後，加入組織切片中繼續在室溫下反應一小時(或在 4℃ 下反應一個晚上)。以磷酸緩衝液清洗組織切片兩次、每次 5 分鐘以移除初級抗體。再將具有鹼性磷酸酶標記之山羊抗倉鼠免疫球蛋白抗體(alkaline phosphatase-conjugated goat anti-hamster Ig)以 1:250 之比例稀釋後與組織切片在室溫下反應 1 小時。再以磷酸緩衝液清洗組織切片兩次，每次 5 分鐘以移除具有酵素標記之抗體。最後，使用 BCIP/NBT 試劑溶液與

組織切片在室溫下之黑暗環境中反應 30 分鐘後完成組織切片的呈色反應。以磷酸緩衝液洗去切面上過量的酵素反應試劑，在依序使用磷酸緩衝液、乙醇、二甲苯來除去組織切片的水分後置於顯微鏡上觀察。

結果顯示僅能在骨髓衍化組織 (bone marrow derived-tissues) 中偵測到 T 細胞凋亡誘發蛋白的表現。而在其他組織中則無法偵測到 T 細胞凋亡誘發蛋白。

第 5 較佳實施例：細胞表面生物素標記與 T 細胞凋亡誘發蛋白之免疫沈澱分析

在冰上，使 5×10^7 個 RL δ 1 細胞或 NIH-3T3 細胞與 1ml 之含有 0.5 mg/ml 硫化-琥珀硫亞胺生物素 (Sulfo-NHS-biotin, Pierce) 的磷酸緩衝液反應 30 分鐘，以使細胞表面進行生物素修飾 (biotinylated)。在冰上讓細胞與 0.5 ml 的 DMEM 培養液 (Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technologies, Inc) 反應 10 分鐘以終止生物素修飾反應。使用 1 ml 的 DMEM 培養液清洗細胞一次，再以 1 ml 的磷酸緩衝液清洗細胞兩次。

使用含有 1% Triton X-100、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、160 mM 氯化鈉 (160 mM NaCl) 與 1 mM 氯化鈣 (1 mM CaCl_2) 的冰冷溶胞緩衝液 (lysis buffer)，將細胞調整成 5.0×10^7 cell/ml 的細胞濃度，並加入蛋白酶混合抑制劑後靜置 15 分鐘以使細胞溶

解。將溶胞液(lysate)以 $10,000\times g$ 的轉速離心 10 分鐘以沈澱出溶胞液中的不溶物。上述步驟與後續步驟均在 4°C 下進行。

為了進行免疫沈澱分析，係先將溶胞液與 $50\text{ }\mu\text{l}$ 的 G 蛋白瓊脂糖凝膠粒 (protein G-Sepharose, Amersham Pharmacia Biotech) 反應 30 分鐘以移除非專一性結合蛋白。隨後離心以移除 G 蛋白瓊脂糖凝膠粒。並將獲得之上清液分成數份，每份之蛋白含量相當於 5.0×10^7 個細胞的蛋白量。將已加入 $10\text{ }\mu\text{g}$ 之 TAB4 單株抗體或正常倉鼠血清之免疫球蛋白的 $20\text{ }\mu\text{l}$ G-蛋白瓊脂糖凝膠粒與上清液在 4°C 下反應 4 小時。反應後，使用含有 0.05% Triton X-100、 50 mM Tris-HCl(pH 8.5)、 400 mM 氯化鈉、 1 mM 氯化鈣與 1 mg/ml 卵白蛋白 (ovalbumin) 的清洗緩衝液 (washing buffer) 來清洗膠粒四次後，再以氯化鈉濃度改為 250 mM 的上述清洗緩衝液來清洗膠粒兩次。以 $50\text{ }\mu\text{l}$ 之 $1\times\text{SDS}$ 樣品緩衝液 ($1\times\text{SDS}$ sample buffer) 來洗脫膠粒上與 TAB4 抗體結合的蛋白質。脫除下來的蛋白質以 8% 的 SDS 電泳膠進行解析後，再將電泳膠上的蛋白質轉移至硝化纖維薄膜上 (nitrocellulose membrane, Millipore)。隨後以過氧化酶標記之抗生物素蛋白 (peroxidase-conjugated Avidin, PharMingen) 與化學發光試劑 (Chemiluminescence reagent, NENTM Life Science Products) 來分析硝化纖維薄膜上的生物素化蛋白。

第 2 圖係顯示，TAB4 辨識出在 RL $\uparrow$ 1 細胞(T 細胞凋亡誘發蛋白表現型 T 細胞)具有一分子量約為 120 kD 的生物素化表面蛋白。而 3T3 細胞(T 細胞凋亡誘發蛋白不表現型細胞)則無。且經正常倉鼠血清處理過的 G 蛋白瓊脂糖凝膠粒無法抓到此分子量為 120 kD 的蛋白。所得結果暗示出該 120 kD 大小的蛋白質為 T 細胞表面上能被 TAB4 單株抗體所辨識的抗原。

第 6 較佳實施例：耗盡體內 T 細胞

以腹腔注射的方式來提供小鼠 300 μ g 的 TAB4 抗體或對照用倉鼠免疫球蛋白，並在注射抗體後的第四天取出該小鼠的脾臟細胞、胸線細胞與周邊血液單核細胞，計算其總細胞數量，並以 FACS 分析法來分析細胞表面上的標記蛋白(marker)，以測驗 TAB4 抗體在 T 細胞或其他細胞群種中的作用。

FACS 分析法係在 4 $^{\circ}$ C 下，將細胞以 2% 的多聚甲醛(paraformaldehyde)處理 20 分鐘來固定細胞。隨後以冰冷的 FACS 溶液清洗細胞兩次，並重新懸浮細胞並調整成 1×10^7 cells/ml 的細胞濃度。將懸浮細胞以每管 100 μ l 之體積分裝後，備用。在每管 100 μ l 之細胞中加入濃度為 2 μ g/ml 之 TAB4 抗體或對照用倉鼠免疫球蛋白，使抗體與細胞混合後置於黑暗中於 4 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘。反應後，以冰冷的 FACS 溶液清洗細胞一次後，將細胞進行下列處理：(1)在 100 μ l 冰冷的 FACS 溶液中加入 cychrome 標記之抗 CD3 抗體(2 μ g/ml)、FITC 標

記之抗倉鼠免疫球蛋白與 PE 標記之抗 CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3 抗體 (2 $\mu\text{g/ml}$) 來對脾臟細胞進行染色；(2) 在 100 μl 冰冷的 FACS 溶液中加入 FITC 標記之抗倉鼠免疫球蛋白抗體、PE 標記之抗 CD8 抗體與 cychrome 標記之抗 CD4 抗體 (2 $\mu\text{g/ml}$) 來對胸線細胞進行染色。並將上述反應置於 4°C 下，於黑暗中反應 30 分鐘。最後，以冰冷的 FACS 溶液清洗已染色的細胞兩次，再將已染色的細胞重新懸浮於 1 ml 的 FACS 溶液中以 BD LSR 流式細胞儀 (Beckton Dickison) 進行結果分析。

注射抗體四天後，TAB4 抗體處理小鼠之周邊血液白血球 (PBL) 中的 $\text{CD3}^+\text{T}$ 細胞的百分比，從正常小鼠的 36.7% 下降至 4.1% (請參考表二)。TAB4 抗體的處理僅使造成總脾臟細胞數量輕微下降。然而，在 TAB4 抗體處理的小鼠體內， $\text{CD3}^+\text{T}$ 細胞的數量減少了 62%，自然殺手細胞的數量減少了 50%，並且造成 $\text{CD19}^+\text{B}$ 細胞總數的輕微上升。而 TAB4 抗體處理小鼠體內的胸線細胞總數則僅為對照組小鼠的 48% (即表示減少了 52%)。此外，除了 $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞，其他 CD8^+ 、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 與 $\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{T}$ 細胞的數量均下降。其中以 $\text{CD8}^+\text{CD4}^+$ 之次種群作用效果最明顯 (下降了 64.7%)。

表二

脾臟

$\times 10^6$	無處理	正常倉鼠免 疫球蛋白	TA-B4-處 理後	耗盡量 (%)	
脾臟細胞 總數	123	93.3	105	14.6	
CD3 ⁺ T cells	32.8	28.4	12.4	62.2	
CD3 ⁻ CD19 ⁺	72.2	53.4	72.9	- 0.8	
CD3 ⁻ NK ⁺	3.6	2.4	1.80	50	

周邊血液白血球					
	無處理	正常倉鼠免 疫球蛋白	TA-B4-處 理後	耗盡量 (%)	
CD3 ⁺ T cells	36.7 %	36 %	4.1%	88.8%	

胸線					
$\times 10^6$	無處理	正常倉鼠免 疫球蛋白	TA-B4-處 理後	耗盡量 (%)	
胸線細胞 總數	94	229	45	52.1	
CD4 ⁺	9.3	28.4	10.9	-16.6	
CD8 ⁺	5.2	7.7	3.6	30.3	
CD4 ⁺ CD8 ⁺	73.8	182	26	64.7	
CD4 ⁻ CD8 ⁻	5.6	10.5	4.5	19.3	

(以上數據係由三次實驗所得到之代表數據)

第 7 較佳實施例：抗 T 細胞凋亡誘發蛋白之單株抗體無法誘發分泌出介白素-2 或腫瘤壞死因子- α

將 300 mg 之 TAB4 抗體或對照用倉鼠免疫球蛋白注射到 Balb/c 小鼠(H-2d)的腹腔中。於注射 7 天後，分離出該小鼠的脾臟細胞以作為反應細胞，並與用來作為刺激細胞的絲裂黴素處理過之 C3H(H-2k)脾臟細胞(mitomycin C-treated C3H (H-2k) splenocytes)共同培養。經培養三天後，收取培養上清液，並利用 ELISA 試劑組(PharMingen)來測量培養上清液中的介白素-2 含量。

第 5 圖係顯示，相較於對照組小鼠，由 TAB4 處理小鼠身上取得之反應細胞的介白素-2 表現量受到抑制。分析血漿中介白素-2 與腫瘤壞死因子- α 含量，可發現對照組小鼠與 TAB4 處理小鼠之血清中的介白素-2(或腫瘤壞死因子- α)含量沒有明顯差異。

由於製造介白素-2 是 T 細胞的活性指標。因此，結果顯示出 T 細胞凋亡誘發蛋白專一性抗體(如 TAB4)可用來控制體內的 T 細胞，並可控制不需要發生的 T 細胞調控性免疫反應，例如伴隨自體免疫疾病與移植排斥而來的免疫反應。

第 8 較佳實施例：利用抗 T 細胞凋亡誘發蛋白抗體來預防移植排斥

以乙醯丙嗪馬來酸鹽(Acepromazin maleate)(Fermenta Animal Health Co., Kansas City, MO)麻醉鼠齡約 8~12 週的小鼠(得自 Jackson Laboratory)。進行植皮手術 7 天前，尚未切除

胸腺的 C57BL/6 小鼠 (H-2^b) 先以腹腔注射方式供給 500 μ g 之 TAB4 抗體或同型 (isotype) 的對照組抗體。注射抗體 7 天後，將完全異種異體配對不吻合之 Balb/cj 小鼠 (H-2^d) 的側腹皮膚取出，並移植到注射過抗體之 C57BL/6 小鼠的側腹上。皮膚移植 7 天後，該些 C57BL/6 小鼠再次注射 500 μ g 之 TAB4 抗體或同型的對照組抗體。每日觀察該些接受皮膚移植的小鼠。若 50% 的植皮膚發生壞死情形時，則表示移植皮膚受到排斥。第 7 圖係顯示移植皮膚存活的百分比 (n=8)。圖中的數據顯示出 TAB4 抗體的治療能延長異種異體移植組織的存活時間。

第 9 較佳實施例：TAIP 經鑑定為 P-選擇素糖蛋白配位體 1

別稱 CD162 的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 是一種表現在白血球 (包括 T 細胞) 之細胞表面上的 P-選擇素配位體 (Sako et al. (1993) Cell 75:1179; Vachino et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:21966; Veldman et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:16470)。T 細胞凋亡誘發蛋白由於其分子量與傾向形成二聚體等生化特性，均暗示出 TAB4 可能是 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的類似物。為了研究兩種抗原之間的關係，係以下列步驟來進行試驗：1) 測試被 TAB4 抗體沈澱下來的抗原是否能被市售的抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體所辨識；2) 測試抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體是否能消耗掉細胞溶胞液中的 TAB4

抗體。

下列步驟均在 4°C 下進行，係以加入蛋白酶混合抑制劑的溶胞溶解液 (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 160 mM 氯化鈉, 1 mM 氯化鈣) 將 RL δ 1 T 細胞調整成 1.0×10^8 cells/ml 之細胞密度後，靜置 1 小時以使細胞溶解。隨後以 $10,000 \times g$ 轉速將溶胞液離心 10 分鐘，以去除溶胞液中的不溶物質。將每 20 μ l 的 G 蛋白瓊脂糖凝膠粒中分別預先加入 10 μ g 抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 單株抗體 (clone 2PH1, PharMingen, San Diego, CA)、抗 T 細胞凋亡誘發蛋白單株抗體、TAB4 抗體或正常倉鼠血清中的免疫球蛋白 G 後，再將相當於 5.0×10^7 個細胞之蛋白量的溶胞液加入上述含有抗體之 G 蛋白瓊脂糖凝膠粒中。使溶胞液與含有抗體之 G 蛋白瓊脂糖凝膠粒在 4°C 下反應 4 小時後，以清洗緩衝液 (0.05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 400 mM 氯化鈉, 1 mM 氯化鈣, 1 mg/ml 卵白蛋白) 洗滌 G 蛋白瓊脂糖凝膠粒五次。將清洗緩衝液中的氯化鈉調整成 250 mM 的濃度後，再清洗 G 蛋白瓊脂糖凝膠粒兩次後，以 40 μ l 之 1 $\times$ SDS 樣品緩衝液來洗脫 G 蛋白瓊脂糖凝膠粒上的蛋白質。隨後以 6% 的 SDS 電泳膠來分離洗出來的蛋白質，並將電泳膠上的蛋白質轉漬到硝化纖維薄膜上。以抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 單株抗體對薄膜上的蛋白質進行免疫墨點分析 (immunoblotted)，並以過氧化酶標記之山羊抗小鼠免

疫球蛋白 G(H+L)配合化學發光試劑(Renaissance, NEN)來使薄膜上的蛋白質顯影。

將細胞表面生物素化的 RL δ 1 T 細胞以溶胞溶解液調整成 1.0×10^8 cell/ml 的密度，並使細胞溶解。獲得的細胞萃取物(cell extract)與結合在 40 μ l G 蛋白瓊脂糖凝膠粒上的 20 μ g 抗體混合，並在 4°C 下反應一個晚上。上述反應所使用之抗體可為抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 單株抗體(2PH1)或對照用小鼠免疫球蛋白 G，亦可使用 TAB4 抗體或對照用正常倉鼠血清。經上述處理後的細胞萃取物再分別以 TAB4 抗體或抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 單株抗體來進行免疫沈澱反應。以 6%的 SDS 聚丙稀醯胺凝膠(SDS-polyacrylamide gel)來分離獲得的免疫沈澱物，並以螢光攝影(fluorography)來檢視結果。第 6 圖係顯示抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 單株抗體可去除 T 細胞萃取物中的 T 細胞凋亡誘發蛋白。此外，利用西方墨點法可發現，與抗 T 細胞凋亡誘發蛋白單株抗體(TAB4)共同免疫沈澱下來的蛋白質能被抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 單株抗體所辨識。

第 10 較佳實施例：利用抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體來誘發出人類 T 細胞之細胞凋亡反應

為瞭解 P-選擇素糖蛋白配位體 1 在人類 T 細胞的細胞凋亡機轉中扮演何種角色，因此進行一時程實驗用來研究已活化人類 T 細胞對 P-選擇素糖蛋白配位體 1 調控性的細胞凋亡訊號的敏感度。係在含有介白素-2

的培養液中加入植物血凝素分裂原 (phytohemagglutinin mitogen, PHA) 以刺激人類 T 細胞。收取已活化的 T 細胞，並以含有介白素-2 與交聯抗體的抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體來處理該些已活化的人類 T 細胞。

自健康成人體內取得人類周邊血液，將周邊血液以肝制凝素處理後，根據細胞比重不同，利用 Ficoll-Paque 試劑 (Pharmacia Biotech) 來收集周邊血液單核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)。使用濃度 1% 的植物血凝素 (Life Technologies, GibcoBRL) 來處理周邊血液單核球 48 小時後，並在整個實驗過程中，均將已活化的周邊血液單核球保存在含有重組人類介白素-2 (5 ng/ml) 的狀況下中。為了評估抗人類 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體之細胞凋亡誘發能力，以下述各種物質來處理已活化周邊血液單核球。所使用之材料為：(1) 1 μ g/ml 之抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 「KPL-1」 (BD PharMingen) 加交聯用兔子抗小鼠免疫球蛋白 (0.5 μ g/ml) (Jackson ImmunoResearch Laboratories)；(2) 純化的同型對照用小鼠免疫球蛋白加上交聯用兔子抗小鼠免疫球蛋白；或 (3) 交聯用兔子抗小鼠免疫球蛋白。當已活化周邊血液單核球經過上述三種試劑處理 6 小時後，可利用 FACS 分析法、抗膜聯蛋白-V 分析法 (anti-Annexin V, BD PharMingen) 與碘化丙啶 (PI, Sigma) 染色法來檢測早期凋亡細胞的比率。

第 8 圖係顯示利用抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體

加上交聯分子來使 P-選擇素糖蛋白配位體 1 產生訊號而誘使 PHA 活化的人類周邊血液單核球(主要為 T 細胞)發生顯著的細胞凋亡現象。在經過抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體處理的細胞中，凋亡細胞的比率從第三天的 8.5% 到第 8 天則升高至 24%。而不論是同型對照用抗體，還是僅使用交聯用抗體均不會對細胞造成任何影響。

第 11 較佳實施例：使用抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 協同性抗體來治療自體免疫疾病

以一般方式來飼養非肥胖型糖尿病(NOD)小鼠(即自體免疫糖尿病動物)。大約在鼠齡 20 週時，非肥胖型糖尿病小鼠會自發性地罹患糖尿病。在實驗組中，小鼠分別在鼠齡 14 週、15 週與 17 週時，以總共三次，每次 300 μ g 之用量，以腹腔注射方式對每隻小鼠施打 300 μ g 的抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體(TAB4 抗體)。又分別在鼠齡 24 與 26 週的時候，再給予小鼠注射相同劑量的 TAB4 抗體。而以相同劑量與相同的方式對小鼠注射倉鼠免疫球蛋白來作為對照組。並且於鼠齡 15 週以後，每週兩次，以 Medi-Test 葡萄糖試紙(Macherey-Nagel, Germany)來追蹤小鼠尿液中的葡萄糖含量。連續兩次測得非禁食之尿中葡萄糖含量高於 300 mg/dl 時，則判定該小鼠患有糖尿病。第 9 圖係顯示，相較於使用對照用抗體，使用 TAB4 抗體能產生明顯的保護效果。因此，使用抗 P-選擇素糖蛋白配位體

1 抗體能抑制自體免疫 T 細胞的活性，並延緩第 I 型糖尿病的發生。

第 12 較佳實施例：P-選擇素、E-選擇素與 L-選擇素對活化 T 細胞的結合力

為了測定選擇素(P-選擇素、E-選擇素與 L-選擇素)對已活化 T 細胞的結合能力，係從 C57BL/6 小鼠體內獲得新鮮的脾臟細胞並活化之，並收取活化過程中第 2、第 4 與第 6 天及尚未被活化的 T 細胞(剛製備好脾臟細胞時為第 0 天)來進行分析試驗。使用含有 $2\mu\text{g/ml}$ 之刀豆球蛋白 A 與 10% 小牛血清的 DMEM 培養液來培養脾臟細胞兩天後，所收取的細胞為第 2 天之細胞樣品，並存活的以 Ficoll 比重梯度分離法來分離出肝臟細胞。細胞以刀豆球蛋白 A 活化三天，再置於含有 5 ng/ml 之介白素-2 的培養液中培養一天後便可獲得第 4 天之細胞樣品。而第六天之細胞樣品係將細胞以刀豆球蛋白 A 活化三天，再置於含有 5 ng/ml 之介白素-2 的培養液中培養 3 天後而得。

接著以 FACS 分析法來檢測上述細胞樣品，係將第 0、第 2、第 4 與第 6 天之細胞樣品分別取出 2×10^5 個細胞置於不同之盤孔，隨後於每盤孔中加入體積為 $40\mu\text{l}$ 、濃度為從 $20\mu\text{g/ml}$ 連續 2 倍稀釋至 $0.156\mu\text{g/ml}$ 之小鼠 P-選擇素、E-選擇素或 L-選擇素融合蛋白(R&D Systems, Minneapolis, MN)。這些選擇素融合蛋白是小鼠選擇素與人類免疫球蛋白 G1 之 Fc 恆定區融合而形

成的。小鼠選擇素融合蛋白與細胞混合後，置於 4°C 下反應 30 分鐘。反應後，以 1×FACScan 緩衝液(去除鈣離子與鎂離子的 1×磷酸緩衝液(Biochrom AG)加上 2%小牛血清)來清洗細胞。隨後再於各孔盤中分別加入濃度為 3.25µg/ml、體積 95µl 的抗-Thy1.2 及第二試劑(FITC-抗人類免疫球蛋白 G 之恆定區片段，Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)與樣品細胞混合，並置於 4°C 下反應 30 分鐘後，以 1×FACScan 緩衝液清洗細胞。

第 10 圖係顯示 FACSCalibur 分析法的結果。當使用濃度 20µg/ml 之 P-選擇素與已活化 T 細胞反應時，P-選擇素對已活化細胞的結合力會隨著天數增加而漸漸上升，第四天的結合力最高，而到第六天時，結合力則些微下降。E-選擇素的結合力在第 2 至第 4 天大幅上升後，保持不變至第六天。L-選擇素對小鼠已活化 T 細胞的結合力則不明顯，並且在整個活化過程中均無變化，例如從第 0 天到第 6 天均無結合力的變化。此結果可能是因為 L-選擇素對其配位體具有極低的親和力的緣故。當三種選擇素使用較低濃度來進行實驗時，所得到的實驗結果與使用較高濃度之結果類似。

第 13 較佳實施例：P-選擇素、E-選擇素與 L-選擇素之多聚複合體可引起活化後 T 細胞的細胞凋亡反應

在 4°C 下，以濃度 20µg/ml、體積 50µl 的抗人類恆定區免疫球蛋白抗體來處理 96-孔盤(NUNC)一個晚上。

隨後在 37°C 下，以 1% 小牛血清蛋白 (BSA) 來對處理過的 96-孔盤進行阻隔處理 (blocking)。完成阻隔處理後，在孔盤中加入 50 μ l 的人類 Fc-選擇素融合蛋白 (濃度介於 0.063~5 μ g/ml 之間)，置於室溫下反應 2 小時。在上述所有實驗步驟中，每個盤孔均以 1 倍的磷酸緩衝液清洗五次。隨後，在每個盤孔中加入 2×10^5 個已經過刀豆球蛋白 A 活化四天後的細胞，並置於 37°C 下培養 5 小時。隨後在 4°C 下將此 96-孔盤以 200 $\times$ g 的轉速離心 5 分鐘以獲得細胞沈澱。將生物素-膜聯蛋白-V 結合物 (Annexin V-biotin conjugate) 加入含有已活化細胞的沈澱物中，置於室溫下反應 15 分鐘後，再加入卵白素結合物 (avidin conjugate) (Beta-半乳糖苷酶 (SA-beta-gal) 以 1:5000 之倍數稀釋後使用) 後置於 37°C 下繼續反應 30 分鐘。每個反應步驟完成後，係以膜聯蛋白-V 結合緩衝液清洗各個盤孔三次。最後在各盤孔中加入 110 μ l 的 Z-緩衝液混合物 (係在 20 ml Z-緩衝液中加入 54 μ l 的乙硫醇 (2-mercaptoethanol) 配製而成) 與 30 μ l 的 ONPG (0.04g/10ml) 後在 4°C 下放置一個晚上即可完成呈色反應。隨後紀錄波長 420nm 的光源來讀取結果。

已活化 T 細胞的選擇素調控性細胞凋亡程度會隨著具有人類免疫球蛋白 G1 之 Fc 區域的 P-選擇素 (第 11A 圖) 或 E-選擇素 (第 11B 圖) 之濃度提高而上升。其中選擇素的濃度使用範圍從 0.063 μ g/ml 到 5 μ g/ml。而在第一較佳實施例中，亦證明倉鼠抗體 TAB4 可引發已活

化 T 細胞的細胞凋亡現象，並可用來做為其他較佳實施例中的正對照組。而無法引發已活化 T 細胞之細胞凋亡現象的抗人類 Fc 抗體、人類免疫球蛋白與小牛血清蛋白則可用來作為其他實驗中的負對照組。人類 Fc-L-選擇素融合蛋白無法引起顯著之細胞凋亡的結果(第 11C 圖)，則與第 12 較佳實施例中 L-選擇素無法與已活化 T 細胞結合的結果相呼應。

而在此較佳實施例中的結論是，固定在孔盤上且具有 P-選擇素或 E-選擇素之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段與人類 Fc 片段的融合蛋白可引發已活化 T 細胞的細胞凋亡現象。

第 14 較佳實施例：可溶性 P-選擇素-Fc 恆定區融合蛋白的交聯反應會引起已活化 T 細胞的細胞凋亡反應

依照上述方法將小鼠選擇素(P-選擇素、E-選擇素與 L-選擇素)與人類免疫球蛋白 G1 之 Fc 區域融合以形成可溶性二聚性融合蛋白(soluble dimeric fusion protein)，進行實驗評估此可溶性選擇素是否能引起已活化 T 細胞的細胞凋亡反應，實驗設計細節參考第 13 較佳實施例中所敘述之方法，但是略去加入固定在孔盤上之抗人類 Fc 免疫球蛋白的步驟，。如第 12 圖所示，若僅加入可溶性 P-選擇素融合蛋白(二聚體)，則已活化 T 細胞發生細胞凋亡的程度極低，甚至低到可忽略的情況。然而，若添加如抗人類 Fc 之交聯分子，

則已活化 T 細胞發生細胞凋亡的現象則大幅提昇，其引起細胞凋亡程度接近內含有固定之抗體後所引發的細胞凋亡程度。而抗人類 Fc、人類免疫球蛋白(HIg)或小牛血清蛋白均不能引起已活化 T 細胞的細胞凋亡反應。

同理，E-選擇素-Fc 融合蛋白亦可得到與 P-選擇素-Fc 融合蛋白相同的結果。此外，可溶性 L-選擇素融合蛋白亦無法引發已活化 T 細胞的凋亡反應，且此結果與對已活化 T 細胞使用固定在盤孔上(多聚體)之 L-選擇素的結果一致。

其他較佳實施例

需瞭解到以上有關本發明之詳細敘述僅作為說明本發明之用，並不非用來限定本發明範圍。本發明之其他目的、優點及改良均應仍屬下述申請專利範圍所涵蓋之範圍。

【圖式簡單說明】

第 1 圖係顯示一時程實驗的結果，用來研究已活化 T 細胞對 TAB4 抗體(抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 單株抗體)調控性細胞凋亡訊號的敏感性。

第 2 圖係顯示對細胞表面進行生物素標記反應，並利用 TAB4 抗體對抗原進行免疫沈澱的結果。

第 3 圖係顯示脾臟之 $CD4^+$ T 細胞、 $CD8^+$ T 細胞、

CD19⁺ B 細胞與自然殺手細胞上的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 表現情況。

第 4 圖係顯示 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺8⁺與 CD4⁺8⁻胸線細胞上的 P-選擇素糖蛋白配位體 1 表現情況。

第 5 圖係顯示混和細胞培養中介白素-2 的表現量，其中使用經 TAB4 抗體(或倉鼠免疫球蛋白)處理之 Balb/c 小鼠的脾臟細胞來作為反應細胞，並以 H2 非配對之 C3H 脾臟細胞來作為刺激細胞。

第 6 圖係顯示西方墨點分析結果，用來說明：(A)利用 TAB4 抗體免疫沈澱下來的蛋白質能被市售的抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體辨認，以及(B)T 細胞溶胞液經過抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體前置清除處理後，溶胞液中能被 TAB4 抗體所辨識的蛋白量減少。

第 7 圖係顯示分別接受抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體(實心菱形)或對照組抗體(空心方形)處理過之 C57BL/6 小鼠在接受 Balb/c 小鼠之移植皮膚後的移植存活率。

第 8 圖係為一時程實驗，係顯示以抗人類 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體來處理已活化人類周邊血液單核球後的 T 細胞凋亡百分率。

第 9 圖係顯示自體免疫性糖尿病(或稱非肥胖性糖尿病 NOD)雄鼠的糖尿病發生率，該些雄鼠經過施打 TAB4 抗體(實心方塊)或對照組抗體(空心方塊)的處理。

第 10 圖係顯示小鼠之 P 選擇素、E-選擇素與 L-選擇素對小鼠已活化 T 細胞的結合情況。

第 11 圖係顯示利用 P-選擇素(第 11A 圖)、E-選擇素(第 11B 圖)與 L-選擇素(第 11C 圖)之多聚複合體進行小鼠已活化 T 細胞的細胞凋亡誘發反應。

第 12 圖係顯示利用可溶性 P-選擇素-Fc 恆定區融合蛋白來進行小鼠已活化 T 細胞的體外細胞凋亡誘發反應。

【主要元件符號說明】

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫)

※申請案號：98143964

※申請日期：2004年9月14日

原申請案號：93127762

※IPC 分類：

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/66 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

P-選擇素醣蛋白配位體 1 之調節因子

MODULATORS OF P-SELECTIN GLYCOPROTEIN LIGAND 1

二、中文發明摘要：

本發明係利用能與 T 細胞或自然殺手細胞表面上之 P-選擇素醣蛋白配位體 1(P-Selectin Glycoprotein Ligand 1, PSGL-1)結合的多聚複合體化合物(multimeric compounds)來誘發 T 細胞及/或自然殺手細胞的耗盡及/或細胞凋亡機制。本發明之多聚複合體化合物及方法可在如發炎、自體免疫疾病、移植排斥與過敏性等疾病等狀況下，用來控制受 T 細胞或自然殺手細胞媒介與調控之不需要的免疫反應。

三、英文發明摘要：

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

七、申請專利範圍：

1. 一種防止或降低患者之 T 細胞調控性免疫反應的方法，該方法至少包括：

選擇一病患，該病患係經診斷為患有或可能患有過度 T 細胞調控性免疫反應或不需要的 T 細胞調控性免疫反應；以及

對該患者施用一多聚複合體化合物，該多聚複合體化合物會與 T 細胞表面上至少兩個 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合，其中該多聚複合體化合物至少包括二條多胜肽鏈，該些多胜肽鏈至少包括 (i) 一結合區，與 (ii) 一異種胺基酸序列，其中，該結合區可與 P-選擇素醣蛋白配位體 1 結合，且該些多胜肽鏈透過該異種胺基酸序列的連接來形成該多聚複合體化合物，

其中該多聚複合體化合物與 T 細胞表面上至少兩個 P-選擇素醣蛋白配位體 1 的結合會誘發出一可造成 T 細胞死亡的訊息傳導路徑，藉以防止或降低該患者的 T 細胞調節性免疫反應。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該多聚複合體化合物為一同多聚複合體化合物。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該多聚複合體化合物為一異多聚複合體化合物。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該異種胺基酸序列至少包括一細胞表面受體結合區域。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該結合區至少包括一 P-選擇素胞外區或該 P-選擇素胞外區之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該結合區至少包括一 E-選擇素胞外區或該 E-選擇素胞外區之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該結合區至少包括一 L-選擇素胞外區或該 L-選擇素胞外區之 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該結合區至少包括一抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體的抗原結合區或該抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體之抗原結合區的片段。
9. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該結合區至少包括一可以結合 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之多胜肽鏈，該多胜肽鏈選自一噬菌體表現庫中。

10. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該些多胜肽鏈係藉著該異種胺基酸序列之共價連結來形成該多聚複合體化合物。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中該共價連結為一雙硫鍵連結。

12. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該異種胺基酸序列至少包括一免疫球蛋白長鏈恆定區。

13. 如申請專利範圍第 1 項所述之的方法，更至少包括對該患者施用一藥劑，該藥劑可透過該異種胺基酸來與該多聚複合體化合物結合，並引起 T 細胞表面上複數個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗原的交聯反應。

14. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其至少包含選擇一經診斷為患有一發炎疾病的患者的步驟。

15. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其至少包含選擇一經診斷為患有一自體免疫疾病之患者的步驟。

16. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其至少包含選擇一接受或預定接受一同種異體移植或一異種異體移植之患者的步驟。

17. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其至少包含選擇一經診斷為患有一過敏性疾病之患者的步驟。

18. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其至少包含選擇一經診斷為患有一 T 細胞癌症之患者的步驟。

19. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該 T 細胞為一已活化 T 細胞。

20. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其至少包括偵測一第一生物樣本之 T 細胞數量，該第一生物樣本係取自尚未使用該多聚複合體化合物之患者，並將該結果與一第二生物樣本之 T 細胞數量比較，該第二生物樣本係取自已使用該多聚複合體化合物之患者。

21. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其至少包括偵測一第一生物樣本之 T 細胞生物活性，該第一生物樣本係取自未使用該多聚複合體化合物之患者，並將該結果與一第二生物樣本之 T 細胞生物活性比較，該第二生物樣本係取自已使用該多聚複合體化合物之患者。

22. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該施用藥劑的步驟會使該患者體內已活化的 T 細胞數目減少至少

10%。

23. 一種引起 T 細胞或自然殺手細胞死亡的方法，該方法至少包括：

提供在細胞表面上表現 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的一 T 細胞或一自然殺手細胞；以及

使該 T 細胞或該自然殺手細胞與一多聚複合體化合物接觸，該多聚複合體化合物會與該 T 細胞或該自然殺手細胞表面上與至少兩個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合，其中該多聚複合體化合物至少包含二條多胜肽鏈，該些多胜肽鏈至少包括 (i) 一結合區，與 (ii) 一異種胺基酸序列，其中，該結合區會與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合，並且該些多胜肽鏈透過該異種胺基酸序列的連接來形成該多聚複合體化合物，

其中該多聚複合體化合物與該 T 細胞或該自然殺手細胞表面上之該至少兩個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合會誘發出一可造成該 T 細胞或該自然殺手細胞死亡的訊息傳遞路徑。

24. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該多聚複合體化合物為一同多聚複合體化合物。

25. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該多聚複合體化合物為一異多聚複合體化合物。

26. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該異種胺基酸序列至少包括一細胞表面受體結合區域。

27. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該結合區至少包括一 P-選擇素胞外區或該 P-選擇素胞外區之一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段。

28. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該結合區至少包括一 E-選擇素胞外區或該 E-選擇素胞外區之一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段。

29. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該結合區至少包括一 L-選擇素胞外區或該 L-選擇素胞外區之一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合片段。

30. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該結合區至少包括一 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體的抗原結合區或該抗 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗體之抗原結合區的片段。

31. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該結合區至少包括一可以結合 P-選擇素糖蛋白配位體 1 之多胜肽鏈，該多胜肽鏈選自於一噬菌體表現庫中。

32. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該些多胜肽鏈透過該異種胺基酸序列而共價連結以形成該多聚複合體化合物。

33. 如申請專利範圍第 32 項所述之方法，其中該共價連結為一雙硫鍵連結。

34. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該異種胺基酸序列至少包括一免疫球蛋白長鏈恆定區。

35. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，更至少包括使該多聚複合體化合物與一藥劑接觸，該藥劑會透過該異種胺基酸序列來與該多聚複合體化合物連接，並引起 T 細胞表面上之複數個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 抗原的交聯反應。

36. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，該方法至少包括引起該已活化 T 細胞的死亡。

37. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該方法至少包括評估該 T 細胞或該自然殺手細胞與該多聚複合體化合物接觸後的存活率。

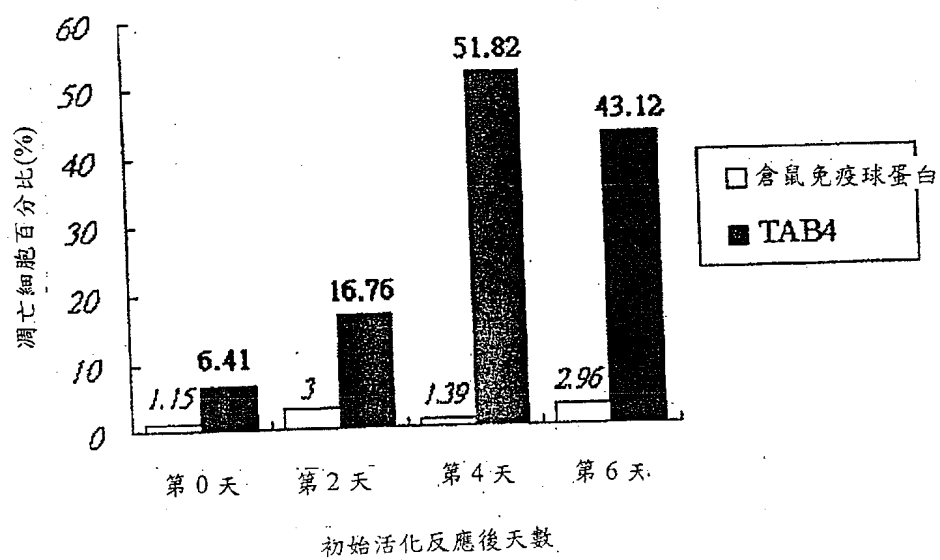
38. 如申請專利範圍第 23 項所述之方法，其中該方法至少包括評估該 T 細胞或該自然殺手細胞與該多聚複合體化合物接觸後的生物活性。

39. 一種藥劑套組，其至少包括：

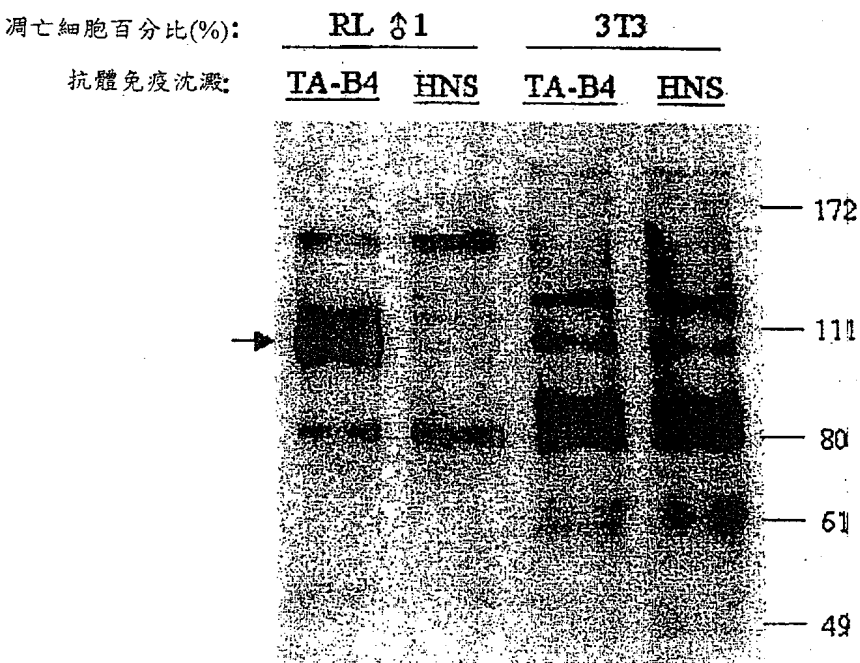
一多聚複合體化合物，其係能與一 T 細胞表面上至少兩個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合，其中該多聚複合體化合物至少包括二條多胜肽鏈，每一條該些多胜肽鏈至少包括 (i) 一結合區，與 (ii) 一異種胺基酸序列，其中該結合區會與 P-選擇素糖蛋白配位體 1 結合，該些多胜肽鏈透過該異種胺基酸序列的連結而形成該多聚複合體化合物，其中該多聚複合體化合物與該 T 細胞表面上至少兩個 P-選擇素糖蛋白配位體 1 的結合會誘發出一可造成該 T 細胞死亡的訊息傳導路徑；以及

說明書，用來說明該多聚複合體化合物可治療發炎、自體免疫疾病、移植排斥、過敏性症狀或一 T 細胞癌。

八、圖式：



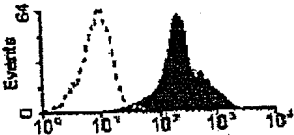
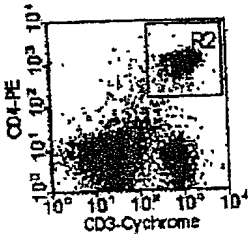
第 1 圖



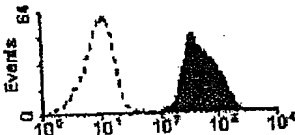
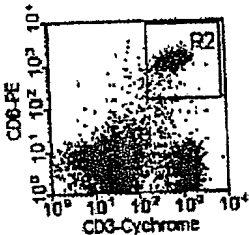
抗體免疫沈澱：係指用於免疫沈澱分析中的抗體
TA-B4: TA-B4 單株抗體
HNS: 正常倉鼠血清

第 2 圖

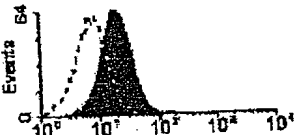
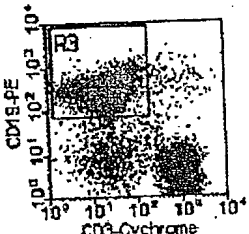
CD4 T



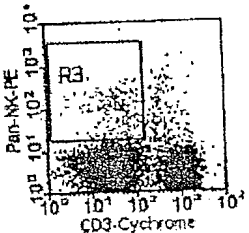
CD8 T



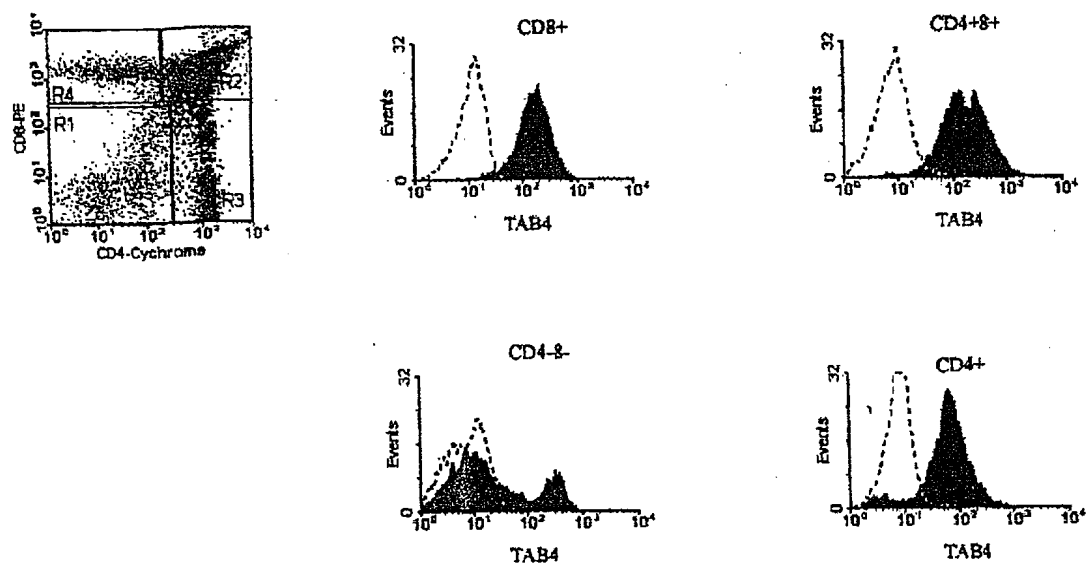
CD19⁺



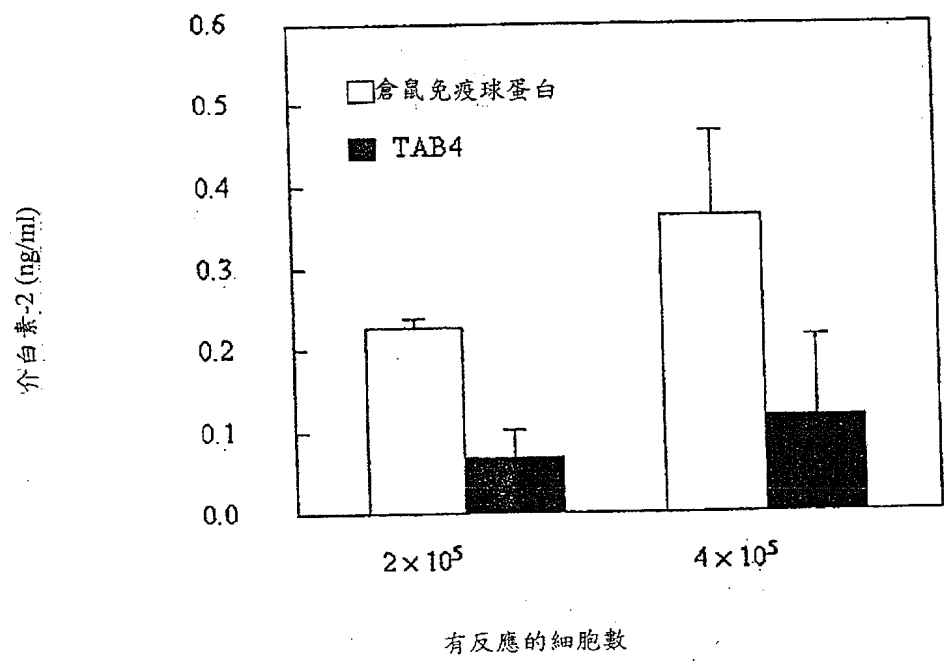
Pan-NK⁺



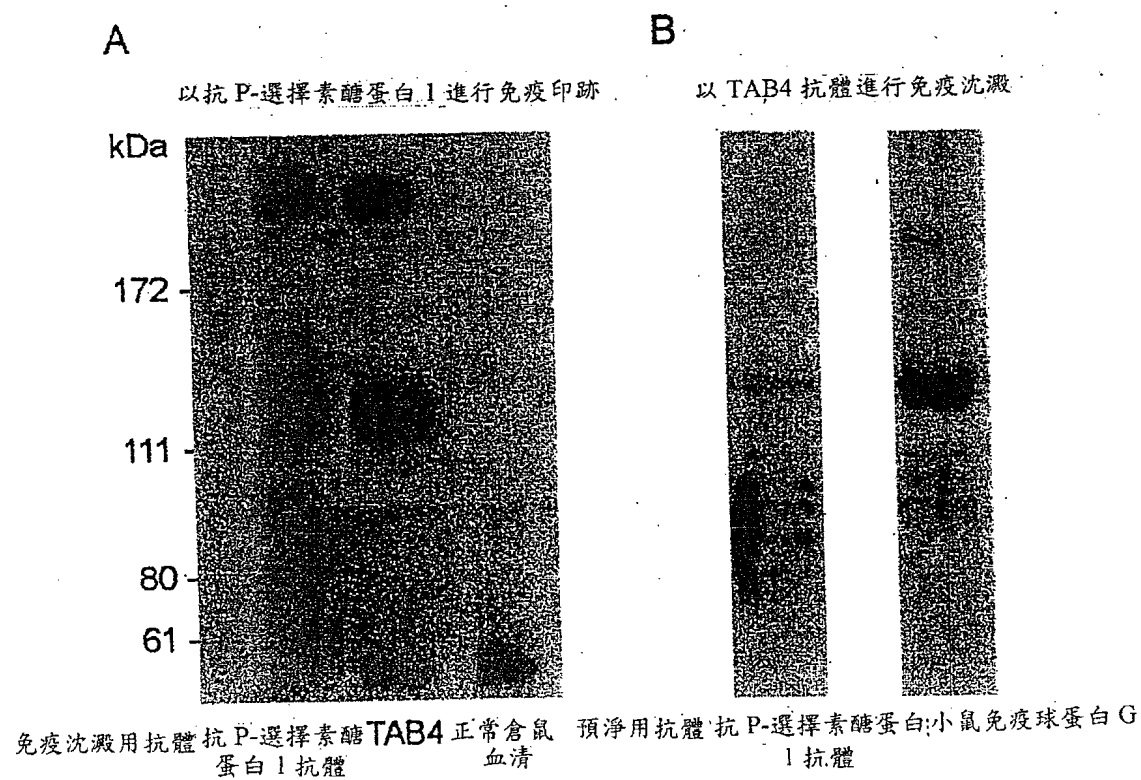
TAB4



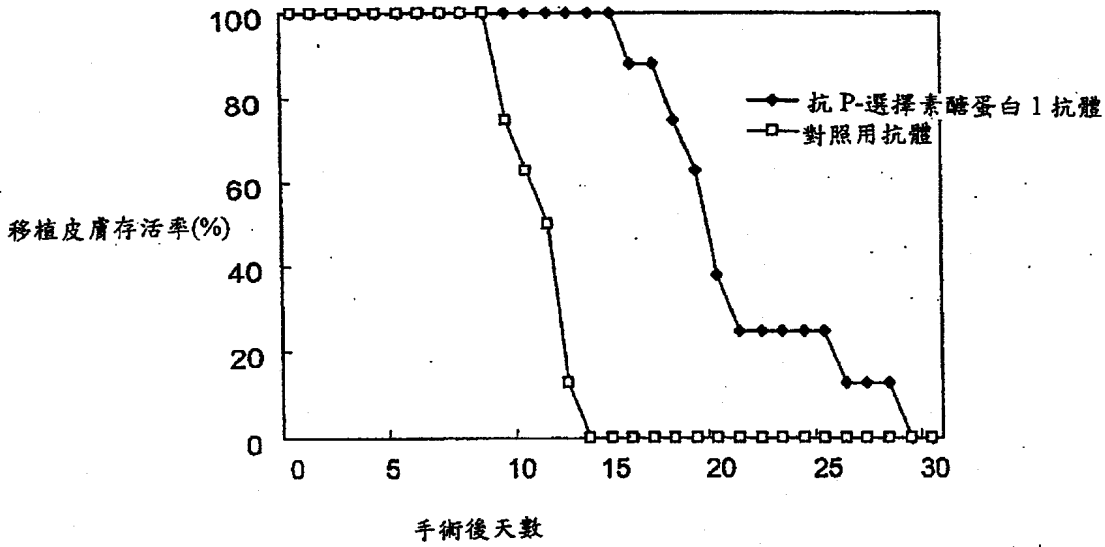
第 4 圖



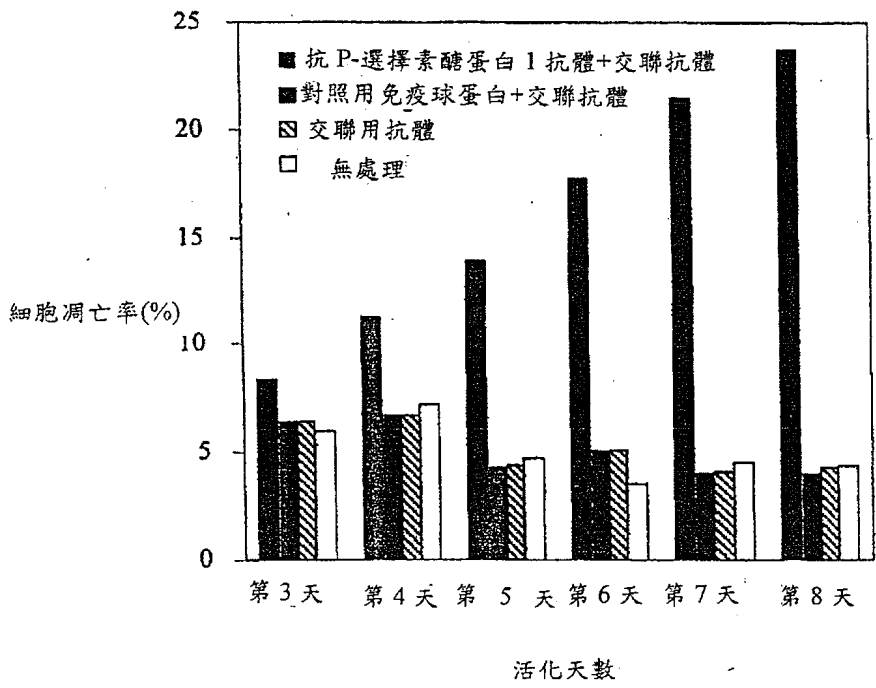
第 5 圖



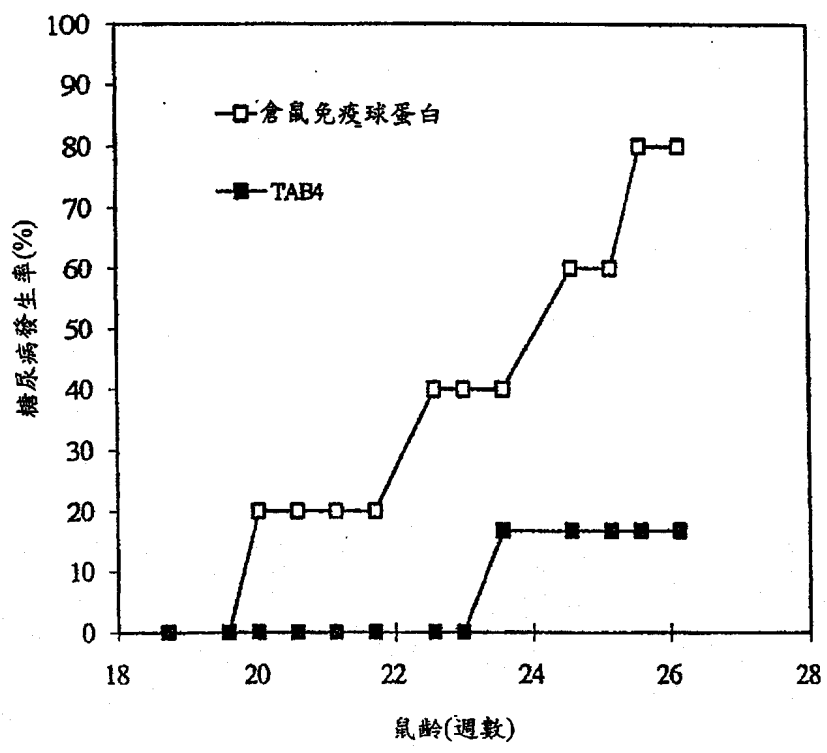
第 6 圖



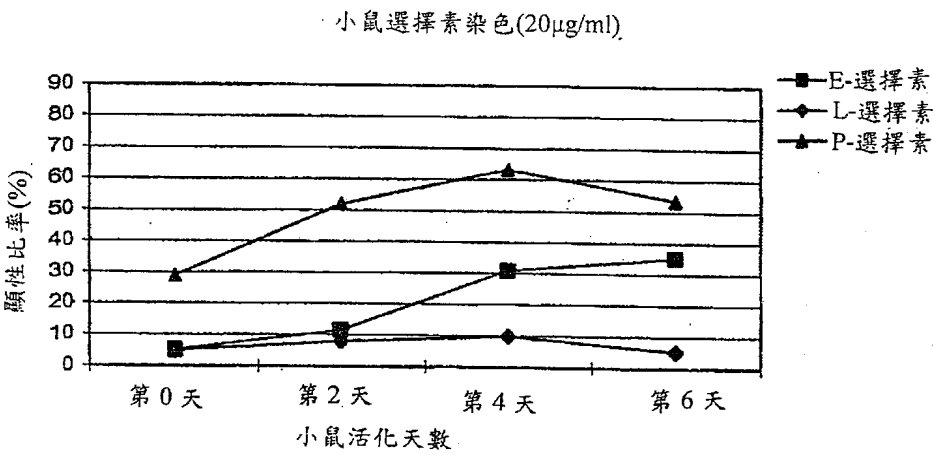
第 7 圖



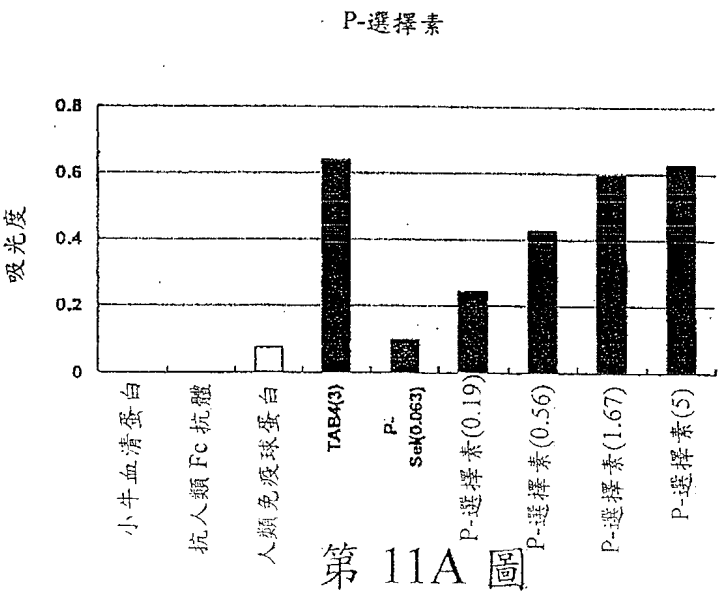
第 8 圖



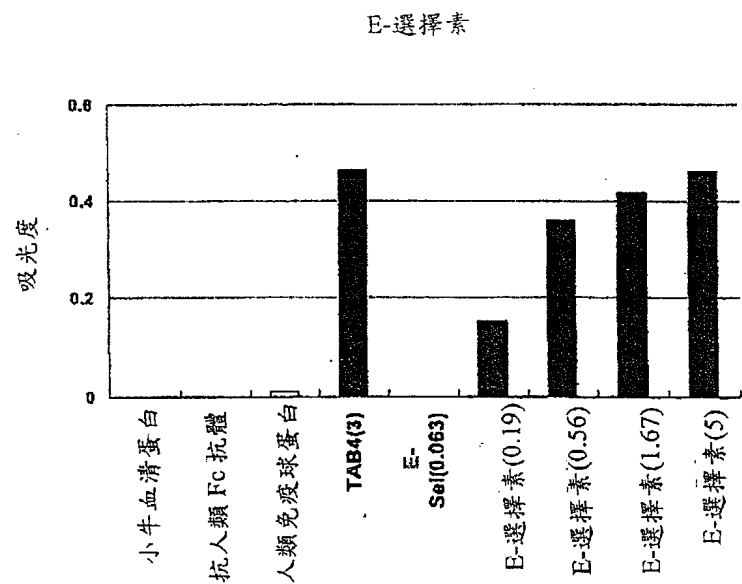
第 9 圖



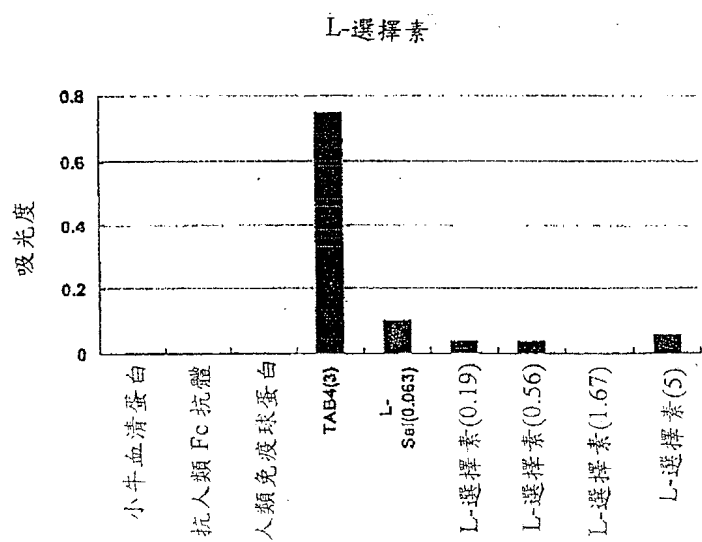
第 10 圖



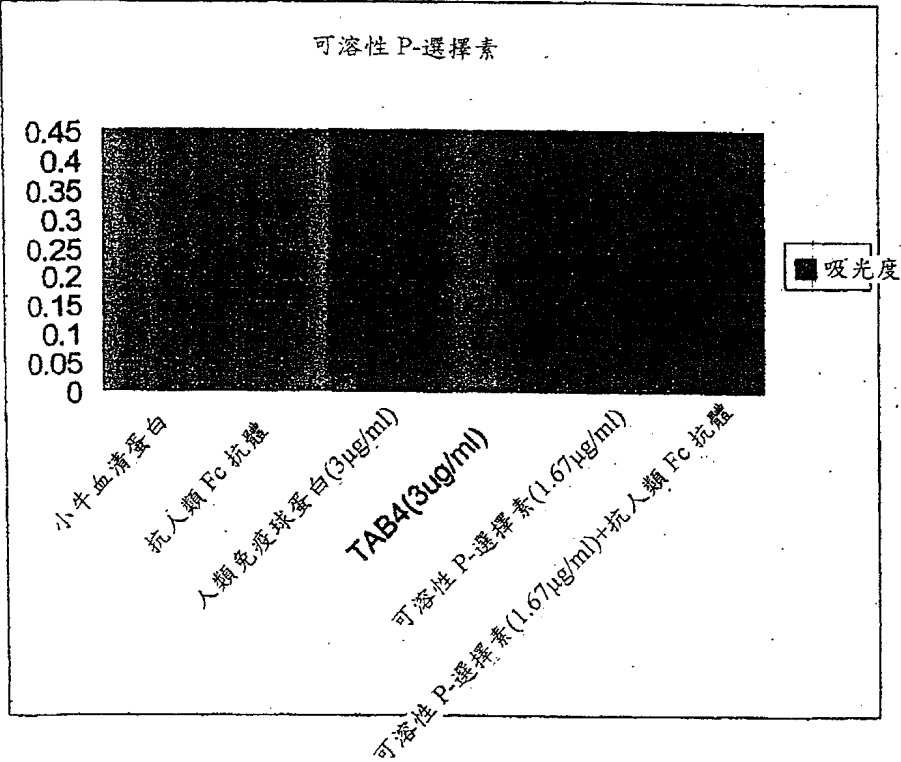
第 11A 圖



第 11B 圖



第 11C 圖



第 12 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無