



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103025354 A

(43) 申请公布日 2013.04.03

(21) 申请号	201180037505.X	A61P 1/04 (2006.01)
(22) 申请日	2011.06.02	A61P 11/06 (2006.01)
(30) 优先权数据		A61P 17/04 (2006.01)
	2010-127316 2010.06.02 JP	A61P 17/06 (2006.01)
		A61P 25/00 (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日		A61P 29/00 (2006.01)
	2013.01.30	A61P 37/02 (2006.01)
(86) PCT申请的申请数据		A61P 37/08 (2006.01)
	PCT/JP2011/062741 2011.06.02	C07K 16/28 (2006.01)
		C12Q 1/02 (2006.01)
(87) PCT申请的公布数据		C12Q 1/68 (2006.01)
	W02011/152503 JA 2011.12.08	G01N 33/53 (2006.01)
(71) 申请人	大日本住友制药株式会社	
	地址 日本大阪府大阪市	
(72) 发明人	木野孝一 甲斐敏裕 松本光广 梶川益纪 杉浦雅仁 清水绘美	
(74) 专利代理机构	中国专利代理(香港)有限公司 72001	
	代理人 郭煜 李炳爱	
(51) Int. Cl.	A61K 39/395 (2006.01)	

权利要求书 2 页 说明书 27 页
序列表 9 页 附图 12 页

(54) 发明名称

自身免疫疾病和变应性疾病的治疗药

(57) 摘要

本发明提供了自身免疫疾病或变应性疾病的预防剂或治疗剂,其含有抗-Embigin 抗体,特别是表现出细胞毒性或细胞毒性诱导活性的抗-Embigin 抗体,还提供了涉及 Th17 细胞的疾病的预防剂或治疗剂以及针对 Th17 细胞的细胞毒性剂。另外,提供了含有抗-Embigin 抗体的用于检测 Th17 细胞的试剂、使用所述试剂的方便的检测 Th17 细胞的方法、使用抗-Embigin 抗体以 Th17 细胞选择性的方式有效地递送药物等的方法、以及针对 Th17 细胞的药物递送系统。

1. 一种用于预防和 / 或治疗自身免疫病或变应性疾病的药剂, 所述药剂包含抗 -Embigin 抗体。
2. 根据权利要求 1 所述的药剂, 其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性或细胞毒性诱导活性。
3. 根据权利要求 1 所述的药剂, 其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性诱导活性。
4. 根据权利要求 3 所述的药剂, 其中所述具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体的亚类是 IgG1、IgG3 或 IgM。
5. 根据权利要求 1 所述的药剂, 其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性。
6. 根据权利要求 5 所述的药剂, 其中所述具有细胞毒性的抗 -Embigin 抗体与细胞毒性物质、化学治疗剂或放射性同位素缀合。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的药剂, 其中所述疾病与 Th17 细胞有关。
8. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的药剂, 其中所述疾病是 : 多发性硬化、银屑病、风湿病、炎性肠病、接触性超敏反应、类固醇抵抗型哮喘、慢性非传染性葡萄膜炎、慢性阻塞性肺疾病、肾小球肾炎或特应性皮炎。
9. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的药剂, 其中所述疾病是多发性硬化。
10. 一种针对 Th17 细胞的细胞毒性剂, 所述细胞毒性剂包含抗 -Embigin 抗体。
11. 根据权利要求 10 所述的药剂, 其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性或细胞毒性诱导活性。
12. 根据权利要求 10 所述的药剂, 其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性诱导活性。
13. 根据权利要求 12 所述的药剂, 其中所述具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体的亚类是 IgG1、IgG3 或 IgM。
14. 根据权利要求 10 所述的药剂, 其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性。
15. 根据权利要求 14 所述的药剂, 其中所述具有细胞毒性的抗 -Embigin 抗体与细胞毒性物质、化学治疗剂或放射性同位素缀合。
16. 一种用于将药物递送给 Th17 细胞的药物递送系统, 所述药物递送系统使用抗 -Embigin 抗体。
17. 根据权利要求 16 所述的药物递送系统, 其中所述抗 -Embigin 抗体与前述药物缀合。
18. 根据权利要求 16 或 17 所述的药物递送系统, 其中所述药物是细胞毒性物质、化学治疗剂或放射性同位素。
19. 一种用于检测 Th17 细胞的试剂, 所述试剂包含抗 -Embigin 抗体。
20. 根据权利要求 19 所述的试剂, 其中所述抗 -Embigin 抗体被荧光物质或放射性同位素所标记。
21. 一种用于检测 Th17 细胞的试剂, 所述试剂包含能够特异性地检测 Embigin 基因转录产物的核酸。
22. 一种用于检测 Th17 细胞的试剂盒, 所述试剂盒包含根据权利要求 19-21 中任一项所述的试剂。
23. 一种用于检测 Th17 细胞的方法, 所述方法包括 : 测量 Embigin 的表达。
24. 根据权利要求 23 所述的方法, 所述方法包括 : 测量 Embigin 在得自试验动物的细

胞中的表达。

25. 根据权利要求 24 或 25 所述的方法,所述方法包括:使用根据权利要求 19-21 中任一项所述的试剂,测量 Embigin 的表达。

26. Embigin 或 Embigin 基因转录产物作为标志物分子在检测 Th17 细胞中的用途。

自身免疫疾病和变应性疾病的治疗药

技术领域

[0001] 本发明涉及自身免疫疾病和变应性疾病的治疗剂。更具体地,其涉及与 Th17 细胞有关的上述疾病的治疗剂、表现出对 Th17 细胞和类似细胞的细胞毒性的药物。

背景技术

[0002] 基于它们生产的细胞因子的差异等,已经将在获得性免疫中起重要作用的辅助性 T 细胞(在下文中称作“Th 细胞”)分类为:参与细胞免疫的 Th1 细胞,和参与体液免疫的 Th2 细胞。

[0003] 但是,近年来,作为不同于 Th1 细胞和 Th2 细胞的新的 Th 细胞亚型,已经将 Th17 细胞鉴别为特异性地生产 IL-17 的 Th 细胞(非专利文件 1)。已经发现, Th17 细胞参与宽范围的自身免疫疾病(诸如多发性硬化、银屑病、风湿病、炎性肠病)和变应性疾病(诸如接触性超敏反应、特应性皮炎等)以及例如多发性硬化,已经使用动物模型发现, Th17 细胞是比常规地认为重要的 Th1 细胞更强的致病细胞(非专利文件 1、非专利文件 2、非专利文件 3、非专利文件 4)。

[0004] 因而,尽管 Th17 细胞正在作为自身免疫疾病、变应性疾病等的新靶标而引起注意,但尚未开发出选择性地作用于 Th17 细胞的药物。

[0005] 例如,已经尝试如下治疗自身免疫疾病:使用 FTY-720(芬戈莫德)等,非特异性地抑制淋巴细胞向病灶中的浸润。但是,已经报道,停药会造成立即的症状恶化(非专利文件 5),问题仍然存在。

[0006] 不同于该方案,已经报道了如下实现的在不同自身免疫病模型中的治疗效力:使用具有 ADCC 活性的抗体(抗-淋巴毒素 α 抗体),从体内消除 Th17 细胞和 Th1 细胞(专利文件 1)。但是,由于 Th1 细胞和 Th17 细胞均参与生物学防御(非专利文件 2、非专利文件 3), Th1 细胞和 Th17 细胞的非特异性作用(FTY-720)或功能抑制会过度地降低生物学防御功能。因此,已经需要特异性地作用于 Th17 细胞的药物产品,所述 Th17 细胞显示出作为自身免疫疾病的致病细胞的强作用。

[0007] 为了开发这样的药物产品,例如,在 Th17 细胞中特异性地表达的分子可以用作靶标。作为在 Th17 细胞中特异性地表达的分子,已经鉴别出 ROR γ t(它是一种细胞核受体)等(非专利文件 6),但是尚未发现 Th17 细胞特异性的细胞表面分子(非专利文件 7)。

[0008] 已知 Embigin 是一种单次跨膜蛋白,其与 CD147(Basigin)和神经丝束蛋白(neuroplastin)形成一个家族。

[0009] 已经报道, Embigin 在胚胎癌细胞(非专利文件 8)、小鼠胎儿期(早期内胚层)(非专利文件 9)、大鼠前列腺、乳腺、心、肝、肺、脑(非专利文件 10)、大鼠肌肉(非专利文件 11)、小鼠造血细胞(非专利文件 12)中表达。另外,已经报道, Embigin 在大鼠肝纤维化模型中表现出增加的表达(专利文件 2)。

[0010] 此外,已经报道 Embigin 是随着抗-CD3 抗体/抗-CD28 抗体对 CD4⁺ 细胞的刺激而变化的数千个基因之一(专利文件 3)。但是,该报道是基于被诱导分化成 Th1 细胞或 Th2

细胞的细胞与 Th0 细胞的对比,没有提供关于 Embigin 如何在某一细胞中变化的描述,也根本没有描述 Th17 细胞。

[0011] [现有技术文件]

[专利文件]

专利文件 1: W02008/063776

专利文件 2: EP-A-1811041

专利文件 3: W02005/016962

[非专利文件]

非专利文件 1: J. Exp. Med. (2005); 201:233-240

非专利文件 2: Immunological Reviews (2008); 223:87-113

非专利文件 3: J. Allergy Clin. Immunol. (2009); 123:1004-1011

非专利文件 4: Clinical and Experimental Immunology (2009); 159:109-119

非专利文件 5: Journal of Neuroimmunology 153 (2004); 108-121

非专利文件 6: Cell (2006); 126:1121-1133

非专利文件 7: Annual Review of Immunology (2008); 27:485-517

非专利文件 8: Differentiation. (1990); 45:76-83

非专利文件 9: Develop. Growth Differ. (1998); 40:277-286

非专利文件 10: Developmental Genetics (1997); 21:268-278

非专利文件 11: J. Biol. Chem. (2009); 284:8930-8939

非专利文件 12: J. Immunology (2008); 180:1719-1728。

发明内容

[0012] 本发明要解决的问题

本发明的课题是,提供自身免疫疾病和变应性疾病的治疗剂,诸如多发性硬化等的治疗剂和针对 Th17 细胞的细胞毒性剂,所述治疗剂靶向 Th17 细胞。另外,本发明的课题是,发现在 Th17 细胞中更选择性地表达的细胞表面分子,并提供用于将药物递送给 Th17 细胞的药物递送系统 (DDS)、Th17 细胞标志物和方便的检测 Th17 细胞的方法。

[0013] 解决问题的方式

发明人已经进行了深入研究,并发现, Embigin 在 Th17 细胞表面上高度表达,但是以极低的水平在其它血细胞(包括血液衍生的培养的细胞诸如 Th1 细胞、Th2 细胞、Th0 细胞、B 细胞、白细胞等)中表达。此外,他们已经发现,由于与表现出细胞毒性的药物缀合的抗 -Embigin 抗体会选择性地减少或消除 Th17 细胞,且具有诱导细胞毒性的结构的抗 -Embigin 抗体会选择性地减少或消除 Th17 细胞并表现出对自身免疫病模型动物的预防或治疗效果,因而与表现出细胞毒性的药物缀合的抗 -Embigin 抗体和具有诱导细胞毒性的结构的抗 -Embigin 抗体可用于自身免疫疾病和变应性疾病、特别是多发性硬化,这导致本发明的完成。

[0014] 另外,他们新近已经发现,由于与抗 -Embigin 抗体缀合的药物会有效地到达 Th17 细胞,因而所述抗 -Embigin 抗体可用于将药物递送给 Th17 细胞的药物递送系统中。

[0015] 此外,发明人已经进行了 Th17 细胞的深入研究,并发现,由于与在其它血细胞中

相比,Embigin 在 Th17 细胞中高度地表达,因而通过检查血细胞中 Embigin 的表达,可以方便地测定 Th17 细胞。

[0016] 因此,本发明涉及下述内容。

[0017] [1] 一种用于预防和 / 或治疗自身免疫病或变应性疾病的药剂,所述药剂包含抗 -Embigin 抗体。

[0018] [2] 根据 [1] 所述的药剂,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性或细胞毒性诱导活性。

[0019] [3] 根据 [1] 所述的药剂,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性诱导活性。

[0020] [4] 根据 [3] 所述的药剂,其中所述具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体具有诱导抗体依赖性的细胞的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或补体依赖性的细胞毒性 (CDC) 的结构。

[0021] [5] 根据 [3] 所述的药剂,其中所述具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体的亚类是 IgG1、IgG3 或 IgM。

[0022] [6] 根据 [1] 所述的药剂,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性。

[0023] [7] 根据 [6] 所述的药剂,其中所述具有细胞毒性的抗 -Embigin 抗体与细胞毒性物质、化学治疗剂或放射性同位素缀合。

[0024] [8] 根据 [1] - [7] 中任一项所述的药剂,其中所述疾病与 Th17 细胞有关。

[0025] [9] 根据 [1] - [7] 中任一项所述的药剂,其中所述疾病是:多发性硬化、银屑病、风湿病、炎性肠病、接触性超敏反应、类固醇抵抗型哮喘、慢性非传染性葡萄膜炎、慢性阻塞性肺疾病、肾小球肾炎或特应性皮炎。

[0026] [10] 根据 [1] - [7] 中任一项所述的药剂,其中所述疾病是多发性硬化。

[0027] [11] 一种针对 Th17 细胞的细胞毒性剂,所述细胞毒性剂包含抗 -Embigin 抗体。

[0028] [12] 根据 [11] 所述的药剂,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性或细胞毒性诱导活性。

[0029] [13] 根据 [11] 所述的药剂,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性诱导活性。

[0030] [14] 根据 [13] 所述的药剂,其中所述具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体具有诱导抗体依赖性的细胞的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或补体依赖性的细胞毒性 (CDC) 的结构。

[0031] [15] 根据 [13] 所述的药剂,其中所述具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体的亚类是 IgG1、IgG3 或 IgM。

[0032] [16] 根据 [11] 所述的药剂,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性。

[0033] [17] 根据 [16] 所述的药剂,其中所述具有细胞毒性的抗 -Embigin 抗体与细胞毒性物质、化学治疗剂或放射性同位素缀合。

[0034] [18] 一种用于药物递送系统 (DDS) 中的抗 -Embigin 抗体,所述药物递送系统用于将药物递送给 Th17 细胞。

[0035] [19] 根据 [18] 所述的抗体,所述抗体与前述药物缀合。

[0036] [20] 根据 [18] 或 [19] 所述的抗体,其中所述药物是细胞毒性物质、化学治疗剂或放射性同位素。

[0037] [21] 一种用于将药物递送给 Th17 细胞的药物递送系统,所述药物递送系统使用抗 -Embigin 抗体。

- [0038] [22] 根据 [21] 所述的药物递送系统,其中所述抗 -Embigin 抗体与前述药物缀合。
- [0039] [23] 根据 [21] 或 [22] 所述的药物递送系统,其中所述药物是细胞毒性物质、化学治疗剂或放射性同位素。
- [0040] [24] 一种用于检测 Th17 细胞的试剂,所述试剂包含抗 -Embigin 抗体。
- [0041] [25] 根据 [24] 所述的试剂,其中所述抗 -Embigin 抗体被荧光物质或放射性同位素所标记。
- [0042] [26] 一种用于检测 Th17 细胞的试剂,所述试剂包含能够特异性地检测 Embigin 基因转录产物的核酸。
- [0043] [27] 一种用于检测 Th17 细胞的试剂盒,所述试剂盒包含根据 [24] - [26] 中任一项所述的试剂。
- [0044] [28] 一种用于检测 Th17 细胞的方法,所述方法包括:测量 Embigin 的表达。
- [0045] [29] 根据 [28] 所述的方法,所述方法包括:测量 Embigin 在得自试验动物的细胞中的表达。
- [0046] [30] 根据 [28] 或 [29] 所述的方法,所述方法包括:使用根据 [24] - [26] 中任一项所述的试剂,测量 Embigin 的表达。
- [0047] [31] Embigin 或 Embigin 基因转录产物作为标志物分子在 Th17 细胞的检测中的用途。
- [0048] [32] 一种用于预防和 / 或治疗受试者的自身免疫病或变应性疾病的方法,所述方法包括:给所述受试者施用有效量的抗 -Embigin 抗体。
- [0049] [33] 根据 [32] 所述的方法,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性或细胞毒性诱导活性。
- [0050] [34] 根据 [32] 所述的方法,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性诱导活性。
- [0051] [35] 根据 [34] 所述的方法,其中所述具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体具有诱导抗体依赖性的细胞的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或补体依赖性的细胞毒性 (CDC) 的结构。
- [0052] [36] 根据 [34] 所述的方法,其中所述具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体的亚类是 IgG1、IgG3 或 IgM。
- [0053] [37] 根据 [32] 所述的方法,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性。
- [0054] [38] 根据 [37] 所述的方法,其中所述具有细胞毒性的抗 -Embigin 抗体与细胞毒性物质、化学治疗剂或放射性同位素缀合。
- [0055] [39] 根据 [32] - [38] 中任一项所述的方法,其中所述疾病与 Th17 细胞有关。
- [0056] [40] 根据 [32] - [38] 中任一项所述的方法,其中所述疾病是:多发性硬化、银屑病、风湿病、炎性肠病、接触性超敏反应、类固醇抵抗型哮喘、慢性非传染性葡萄膜炎、慢性阻塞性肺疾病、肾小球肾炎或特应性皮炎。
- [0057] [41] 根据 [32] - [38] 中任一项所述的方法,其中所述疾病是多发性硬化。
- [0058] [42] 一种用于在 Th17 细胞中诱导细胞损伤的方法,所述方法包括:使抗 -Embigin 抗体与所述 Th17 细胞接触。
- [0059] [43] 根据 [42] 所述的方法,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性或细胞毒性诱导活性。

[0060] [44] 根据 [42] 所述的方法,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性诱导活性。

[0061] [45] 根据 [44] 所述的方法,其中所述具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体具有诱导抗体依赖性的细胞的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或补体依赖性的细胞毒性 (CDC) 的结构。

[0062] [46] 根据 [44] 所述的方法,其中所述具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体的亚类是 IgG1、IgG3 或 IgM。

[0063] [47] 根据 [42] 所述的方法,其中所述抗 -Embigin 抗体具有细胞毒性。

[0064] [48] 根据 [47] 所述的方法,其中所述具有细胞毒性的抗 -Embigin 抗体与细胞毒性物质、化学治疗剂或放射性同位素缀合。

[0065] [49] 根据 [42] - [48] 中任一项所述的方法,所述方法包括:通过给受试者施用有效量的抗 -Embigin 抗体,使抗 -Embigin 抗体与所述受试者中的 Th17 细胞接触。

[0066] 发明效果

根据本发明,可以提供用于预防或治疗自身免疫疾病或变应性疾病的药剂以及针对 Th17 细胞的细胞毒性剂。

[0067] 此外,本发明可以提供用于将药物递送给 Th17 细胞的药物递送系统、用于检测 Th17 细胞的试剂、和 Th17 细胞的检测方法,所述检测方法可以方便地检测 Th17 细胞。

附图说明

[0068] 图 1 的图显示了通过流式细胞术评价的抗 -Embigin 抗体与表达小鼠 Embigin 的大鼠细胞和大鼠细胞的结合活性。相对于抗 -Embigin 抗体的同种型 (大鼠 IgG) 是 5 μ g/mL 浓度,并使用培养物上清液作为抗 -Embigin 抗体 (抗 -emb 抗体)。

[0069] 图 2 的图显示了通过流式细胞术评价的抗 -Embigin 抗体与表达小鼠 Embigin 的仓鼠细胞和仓鼠细胞的结合活性。同种型是 5 μ g/mL 浓度,并使用培养物上清液作为抗 -Embigin 抗体 (抗 -emb 抗体)。

[0070] 图 3 的图显示了通过蛋白质印迹法评价的、从 Th17 细胞和 Treg 细胞制备的蛋白中含有的 Embigin 的量。

[0071] 图 4 的图显示了通过 qRT-PCR 方法评价的、从 Th17 细胞、Th1 细胞、Th2 细胞、Th0 细胞和 Treg 细胞制备的总 RNA 中含有的 Embigin mRNA 的量。

[0072] 图 5 的图显示了通过流式细胞术评价的、在含有 Th17 的不同细胞的细胞膜上的 Embigin 的量。显示了当使用抗 -Embigin 抗体时的几何平均值与同种型 (大鼠 IgG) 的几何平均值之比。当发现多个峰时,显示每个值。通过抗 -小鼠 B220 抗体 (B 细胞标志物)、抗 -小鼠 CD11a 抗体 (白细胞标志物) 或抗 -小鼠 CD3 抗体 (CD3 阳性的细胞标志物) 来鉴别各细胞。

[0073] 图 6 的图显示了通过流式细胞术评价的、抗 -人 Embigin 抗体与下述细胞的结合活性:表达与小鼠 Embigin 相对应的人基因 (智人 Embigin,在下文中称作“人 Embigin”) 的小鼠细胞和小鼠细胞。相对于抗 -人 Embigin 抗体的同种型 (大鼠 IgG) 是 5 μ g/mL 浓度,并使用培养物上清液作为抗 -Embigin 抗体 (抗 -emb 抗体)。

[0074] 图 7 的图显示了通过流式细胞术评价的在人 Th17 细胞膜表面上的 Embigin 表达。同种型 (大鼠 IgG) 是 5 μ g/mL 浓度,并使用培养物上清液作为抗 -Embigin 抗体 (抗 -emb

抗体)。

[0075] 图 8 的图显示了经毒素修饰的抗 -Embigin 抗体在致病细胞中的细胞衰竭特异性的评价。

[0076] 图 9 的图显示了抗 -Embigin 抗体在致病细胞中的细胞衰竭特异性的评价。

[0077] 图 10 的图显示了通过蛋白质印迹法和使用商购可得的器官集合 (organ panel) 评价的、小鼠不同器官的小鼠 Embigin 表达量。以 1/1000 倍稀释度, 使用商购可得的兔抗 - 小鼠 Embigin 抗体。

[0078] 图 11 的图显示了抗 -Embigin 抗体 (抗 -Emb 抗体) 的施用对转移至小鼠脾的荧光标记的致病细胞的细胞数目的影响的评价。小鼠的 CFSE 标记的致病细胞是 1.5×10^7 细胞, 并使用 30 μg 或 100 μg 抗 -Embigin 抗体。使用流式细胞术检测荧光细胞的数目。在该图中, Δ 显示了每个个体的测量值。

[0079] 图 12 的图显示了抗 -Embigin 抗体在致病细胞中的细胞衰竭特异性的评价。

[0080] 图 13 的图显示了, 在用抗 -Embigin 抗体选择性地衰竭 Th17 细胞以后, 将细胞转移进小鼠中得到的多发性硬化模型的临床评分的评价。转移的细胞是 3×10^6 细胞, 并使用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗 -Embigin 抗体。评价临床评分至细胞转移后第 20 天。

[0081] 图 14 的图显示了, 在病状发作之前, 给小鼠施用抗 -Embigin 抗体对临床评分的影响的评价, 所述小鼠通过用 PLP 免疫而诱制成多发性硬化模型。PLP 与弗氏完全佐剂相混合, 并皮下地免疫 1 次。在免疫接种以后, 在第 7 天和第 14 天 (用箭头指示) 施用抗 -Embigin 抗体 (300 μg) 2 次。评价临床评分至 PLP 免疫接种以后第 18 天。

[0082] 图 15 的图显示了, 在病状发作之后, 给小鼠施用抗 -Embigin 抗体对临床评分的影响的评价, 所述小鼠通过用 PLP 免疫而诱制成多发性硬化模型。PLP 与弗氏完全佐剂相混合, 并皮下地免疫 1 次。在 PLP 免疫接种以后第 12 天, 基于临床评分, 将表现出病状的小鼠分组, 在分组当天和分组 7 天后 (用箭头指示), 施用抗 -Embigin 抗体 (100 μg) 2 次。评价临床评分至 PLP 免疫接种以后第 23 天。

具体实施方式

[0083] 下面详细地解释本发明。

[0084] 1. 在本发明中的抗 -Embigin 抗体

已知 Embigin 是一种单次跨膜蛋白, 其与 CD147 (Basigin) 和神经丝束蛋白 (neuroplastin) 形成一个家族。已知 Embigin 具有下述氨基酸序列: 例如, 人 Embigin (NCBI 数据库登录号: NP_940851, SEQ ID NO: 1)、大鼠 Embigin (NCBI 数据库登录号: NP_446171) 或小鼠 Embigin (NCBI 数据库登录号: NP_034460, SEQ ID NO: 8)。

[0085] 作为编码 Embigin 的基因 (在下文中称作“Embigin 基因”) 的核酸序列, 还已知: 例如, 人 Embigin 基因 (NCBI 数据库登录号: NM_198449, SEQ ID NO: 2) 或小鼠 Embigin 基因 (NCBI 数据库登录号: NM_010330, SEQ ID NO: 9)。

[0086] 在本说明书中的 Embigin 不仅包括这些已知序列所示的“蛋白”或“(多)肽”, 而且包括: 例如, 它们的同系物 (同系物和剪接突变体)、突变体、衍生物、成熟形式、氨基酸修饰形式等, 只要它们的生物学功能与显示人 Embigin 的特定氨基酸序列的生物学功能等效。在这里, 同系物的实例包括: 与人蛋白相对应的其它生物学物种 (诸如小鼠、大鼠等) 的

蛋白。从通过 HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>) 鉴别出的基因的碱基序列,可以推论地鉴别出它们。另外,所述突变体包括:天然存在的等位基因突变体、非天然存在的突变体、以及具有通过删除、置换、添加或插入而人工地改变的氨基酸序列的突变体。上述突变体的实例包括与无突变的蛋白或(多)肽具有至少 70%、优选地 80%、更优选地 95%、进一步更优选地 97% 的同源性的那些突变体。另外,所述氨基酸修饰形式包括:天然存在的氨基酸修饰形式和非天然存在的氨基酸修饰形式,可以具体地提及氨基酸的磷酸化形式。

[0087] 在本发明中的抗 -Embigin 抗体可以是任意的,只要它会特异性地识别 Embigin。“特异性地识别”是指特异性地结合 Embigin。具体地,它可以是能够特异性地识别 Embigin 基因的表达产物(蛋白)(在本说明书中,在下文中也称作“Embigin”)的抗体,能够识别 Embigin 的细胞外区域(SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的第 32 个至第 257 个)的抗体是优选的。

[0088] 要用于本发明中的上述抗体包括多克隆和单克隆抗体。根据重链的恒定结构域的类型,将抗体分成 5 大类:IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。在它们中,有些抗体被进一步分成亚类或同种型(例如,在 IgG 的情况下,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等)。

[0089] 所述抗体包括:人抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、Fab 片段或由 Fab 表达文库生成的片段、小抗体(也包括抗体片段)、多特异性抗体等、以及经修饰的抗体,诸如与药物缀合的抗体等。此外,也包括上述抗体的具有抗原结合性质的部分、具有增强的细胞毒性诱导活性的抗体、双特异性抗体、与蛋白融合的抗体等。

[0090] 作为要用于本发明中的抗 -Embigin 抗体,例如,可以使用商购可得的抗 -Embigin 抗体(Santa Cruz 生产,eBioscience 等生产),或它可以是使用已知方式生产的多克隆或单克隆抗体。

[0091] 作为要用于本发明中的抗 -Embigin 抗体,从哺乳动物衍生出的单克隆抗体和多克隆抗体是特别优选的。通过本领域普通技术人员已知的方法,可以生产单克隆抗体和多克隆抗体。

[0092] 从哺乳动物衍生出的单克隆抗体和多克隆抗体的实例包括:在动物血液中生产的那些,由杂交瘤生产的那些,由通过基因工程方式用含有抗体基因的表达载体转化的宿主生产的那些,由最佳抗体(其通过噬菌体展示从含有 1,000,000,000,000 种分子的庞大克隆文库中筛选出)的基因在 CHO 细胞工厂中大量生产的那些,使用生产人抗体的转基因小鼠直接生产的人抗体,等等。

[0093] 要用作敏化抗原的蛋白不受它的起源动物物种(诸如人、小鼠、大鼠等)的限制,所述敏化抗原用于得到本发明的抗 -Embigin 抗体,用于制备多克隆抗体。但是,优选地考虑与要用于细胞融合的母亲细胞的相容性来进行确定,通常,从哺乳动物衍生出的蛋白是优选的,从人类衍生出的蛋白是特别优选的。也可以是完整蛋白或蛋白的部分肽。例如,当 Embigin 是人 Embigin 时,可以使用表达人 Embigin 蛋白和人 Embigin 的细胞、人 Embigin 的部分肽等。蛋白的部分肽的实例包括蛋白的氨基(N)端片段和羧基(C)端片段。在本发明中的抗 -Embigin 抗体是指,与全长 Embigin 蛋白或其片段反应的抗体。

[0094] 例如,可以如下得到多克隆抗体。也就是说,使用下述物质免疫小动物(诸如兔等)以得到血清:天然的 Embigin 蛋白,或由微生物(诸如大肠杆菌等)表达为含有 GST 的融合

蛋白的重组 Embigin 蛋白,或其部分肽。其通过下述方法纯化,以得到多克隆抗体:例如,硫酸铵沉淀、蛋白 A、蛋白 G 柱、DEAE 离子交换色谱法、与 Embigin 蛋白或合成肽偶联的亲合柱等。

[0095] 根据例如使用杆状病毒的方法(例如, W098/46777 等)等,可以制备抗原。当所述抗原具有低免疫原性时,给它缀合具有免疫原性的大分子(诸如白蛋白等),并用于免疫接种。

[0096] 作为单克隆抗体的生产方法,根据已知方法,用敏化抗原免疫动物。作为一般的方法,将敏化抗原腹腔内地或皮下地注射给哺乳动物。具体而言,用 PBS(磷酸盐缓冲盐水)、盐水等稀释敏化抗原或在其中悬浮至足够的量,并根据需要在其中混合合适量的常规佐剂,例如,弗氏完全佐剂。乳化所述混合物,并每隔 4 - 21 天免疫哺乳动物数次。也可在以敏化抗原进行免疫接种时使用合适的载体。

[0097] 以此方式,免疫哺乳动物,证实血清中所需抗体水平的增加,从所述哺乳动物得到免疫细胞,并进行细胞融合。免疫细胞的特别优选的实例包括脾细胞。作为要与前述免疫细胞融合的其他母细胞,使用哺乳动物骨髓瘤细胞。作为骨髓瘤细胞,优选地使用各种已知的细胞系,例如, P3U1 (P3-X63Ag8U1), P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. 等人, Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. 等人, Nature (1978) 276, 269-270), F0 (de St. Groth, S. F. 等人, J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. 等人, Nature (1979) 277, 131-133) 等。

[0098] 基本上根据已知方法,例如, Kohler, Milstein 等人的方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等,可以进行前述免疫细胞和骨髓瘤细胞的细胞融合。

[0099] 更具体地,例如,在有细胞融合促进剂存在下,在常规营养培养基中,进行前述细胞融合。作为融合促进剂,使用例如聚乙二醇 (PEG)、日本血凝集病毒 (HVJ) 等,当需要时,还可以进一步加入助剂诸如二甲基亚砷等,用于提高融合效率。

[0100] 可以任选地确定要使用的免疫细胞和骨髓瘤细胞的比例。例如,使用的免疫细胞优选地是骨髓瘤细胞的 1-10 倍。作为要用于前述细胞融合的培养基,例如, RPMI1640 培养基和 MEM 培养基对于前述骨髓瘤细胞系的生长而言是优选的,也可以使用为这类细胞培养通常使用的培养基,且进一步,还可以组合地使用血清添加物诸如胎牛血清 (FCS) 等。

[0101] 就细胞融合而言,在所述培养基中将给定量的前述免疫细胞和骨髓瘤细胞混合均匀,所述培养基中通常预先加入 30-60% (w/v) 浓度的、加热至约 37°C 的 PEG 溶液(例如,约 1000-6000 的平均分子量),并混合所述混合物,以形成目标杂交瘤。然后,重复下述操作:接连地加入合适的培养基、离心混合物并除去上清液,以除去不利于杂交瘤生长的细胞融合剂等。

[0102] 除了通过用抗原免疫除了人类以外的动物来得到上述杂交瘤以外,还可以通过在体外用下述物质敏化人淋巴细胞例如,通过 EB 病毒感染而永生化的淋巴细胞,来制备生产人抗 -Embigin 抗体的细胞系:Embigin 蛋白,表达 Embigin 蛋白的细胞或其裂解物。此

外,为了稳定地维持抗体分泌能力,可以使敏化的淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞(如上所述)或从人类衍生出的具有持久的分裂潜能的骨髓瘤细胞,例如,U266 进行融合,以得到生产具有所需活性(Embigin 结合活性)的人抗体的杂交瘤。

[0103] 通过在常规选择培养基例如 HAT 培养基(含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基)中培养,确定如此得到的杂交瘤。在上述 HAT 培养基中的培养持续足以杀死除了目标杂交瘤以外的细胞(未融合的细胞)的时间(通常数天至数周)。然后,进行常规的有限稀释方法,并进行生产目标抗体的杂交瘤的筛选和单克隆。

[0104] 可以在常规培养基中传代培养如此制备的生产单克隆抗体的杂交瘤,且可以在液氮中长期保藏。为了从杂交瘤得到单克隆抗体,采用下述方法:包括根据常规方法培养杂交瘤以在其培养物上清液中得到抗体的方法,或包括将杂交瘤施用给与其相容的哺乳动物并得到在腹水流体等中的增殖的细胞的方法。前一种方法适用于得到非常纯的抗体,后一种方法适用于抗体的大规模生产。

[0105] 人抗体是指作为人衍生的抗体基因的表达产物的抗体。人抗体可以如下得到:例如,将人抗体基因基因座引入转基因的动物中,以赋予生产人衍生的抗体的能力,并将抗原施用给该动物。作为这样的转基因的动物,可以提及小鼠,能够生产人抗体的小鼠的生产方法描述在例如 W002/43478 中。

[0106] 本发明中的单克隆抗体包括由这样的重链和/或轻链组成的单克隆抗体:所述重链和/或轻链各自具有构成所述抗体的重链和/或轻链的氨基酸序列,其中一个至几个氨基酸被删除、置换或添加。通过部分地改变编码氨基酸序列的碱基序列,可以向本发明抗体的氨基酸序列中引入氨基酸的这种部分改变(删除、置换、插入、添加)。根据常规方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1984 Vol. 81, 5662-5666; Sambrook 等人, Molecular Cloning A Laboratory Manual (1989) 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press),使用已知的位点特异性的诱变,可以引入碱基序列的这种部分改变。

[0107] 在本发明中,还可以使用基因重组抗体,其被人工地改变,以降低对人的异源抗原性等,例如,嵌合(型)抗体和人源化的抗体。这些改变的抗体可以使用已知方法来生产。

[0108] 嵌合抗体是这样的免疫球蛋白分子:其特征在于,从不同的动物物种衍生出的 2 个或更多个部分的结合。通常,嵌合抗体的可变区源自非人哺乳动物的抗体(例如,小鼠单克隆抗体),且其免疫球蛋白恒定区源自人免疫球蛋白分子。优选地,选择具有低免疫原性的可变区,并与也具有低免疫原性的人恒定区相组合。优选地,所述组合也具有低免疫原性。嵌合抗体包括单价、二价或多价免疫球蛋白。单价嵌合抗体是嵌合 H 链通过二硫键与嵌合 L 链结合而形成的二聚体(HL)。二价嵌合抗体是通过至少 1 个二硫键结合的 2 个 HL 二聚体形成的四聚体(H2L2)。

[0109] 在本技术领域已经描述了嵌合抗体及其生产方法(Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne 等人, Nature 312: 643-646 (1984); Liu 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443 (1987); Sun 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 214-218 (1987); Better 等人, Science 240: 1041-1043 (1988); 和 Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。

[0110] 人源化的抗体也称作重构的人抗体,其如下得到:将非人哺乳动物(例如,小鼠)的

抗体的互补性决定区 (CDR) 移植进入抗体的互补性决定区中,用于这方面的一般的基因重组方法也是已知的 (参见 EP-A-EP125023 和 W092/19759)。通过已知方法,可以生产人源化的抗体。例如,通过 PCR 方法,从制备成在末端上具有重叠区的几种寡核苷酸,合成设计为连接小鼠抗体的 CDR 和人抗体的框架区 (FR; 框架区) 的 DNA 序列。使得到的 DNA 与编码人抗体 C 区的 DNA 相连,然后整合进表达载体中,将所述表达载体引入宿主中以允许生产,由此得到人源化的抗体 (参见 EP-A-EP239400 和 W092/19759)。作为人抗体的框架区 (其通过 CDR 相连) 选择这样的框架区: 其中互补性决定区形成良好抗原结合位点。在必要的情况下,可以置换在抗体的可变区的框架区中的氨基酸,使得重构的人抗体的互补性决定区形成适当的抗原结合位点 (Sato, K. 等人, *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)。

[0111] 对于嵌合抗体和人源化的抗体,使用了人抗体 C 区。作为人抗体 C 区,可以提及 C γ , 且可以使用例如 C γ 1、C γ 2、C γ 3 或 C γ 4。另外,为了提高抗体或其生产的稳定性,可以修饰人抗体 C 区。嵌合抗体由源自非人哺乳动物的抗体的可变区和人抗体衍生的 C 区组成,人源化的抗体由源自非人哺乳动物的抗体的互补性决定区和人抗体衍生的框架区和 C 区组成。由于在人体中的抗原性较低,它作为要用于本发明中的抗体是有益的。

[0112] 要用于本发明中的抗体可以是抗体的片段或其修饰形式,只要它可以优选地用于本发明中。抗体片段的实例包括: Fab、F(ab')₂、Fv 或单链抗体 (scFv) (其中 Fv 的 H 链 (VH) 和 L 链 (VL) 用合适的接头相连,以形成 Fv)、双体 (其中含有 VH 和 VL 的多肽二聚体通过分子间 VH-VL 相互作用而装配)、微体 (minibody) (它是一种二聚体,其中恒定区的一部分 (CH3) 与 scFv 的 H 链结合)、其它小抗体等。

[0113] 所述小抗体没有特别限制,只要它含有全长抗体 (完整抗体,例如,完整 IgG 等) 的一部分缺失的抗体片段,且具有与抗原 (Embigin 蛋白) 的结合潜力。所述抗体片段没有特别限制,只要它是全长抗体的一部分,且优选地含有重链可变区 (VH) 和 / 或轻链可变区 (VL)。

[0114] 所述单链抗体也称作“单链 Fv”,也就是说,“scFv”抗体片段,且含有抗体的 VH 和 VL 结构域,且这些结构域存在于多肽单链中。所述“Fv”片段是最小的抗体片段,且含有完全的抗原识别位点和结合位点。通常,所述“Fv”片段是二聚体 (VH-VL 二聚体),其中一个 VH 和 VL 通过非共价键强烈地相连。每个可变区的 3 个互补性决定区 (CDR) 相互作用,以在 VH-VL 二聚体的表面上形成抗原结合位点。6 个 CDR 形成一种抗体的抗原结合位点。甚至一个可变区 (或仅含有 3 个对抗原特异性的 CDR 的一半 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力低于完整结合位点的亲和力。所述 scFv 多肽另外含有在 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头,使得 scFv 可以形成抗体结合所需的结构 (Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编. Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994))。

[0115] 可以如下生产小抗体和单链抗体: 例如,用酶 (例如,木瓜蛋白酶和胃蛋白酶) 处理抗体以生成抗体片段,或构建编码这些抗体片段的基因,并将所述基因引入表达载体中以允许在合适的宿主细胞中表达 (参见,例如, Co, M. S. 等人, *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976, Better, M. 和 Horwitz, A. H. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496, Pluckthun, A. & Skerra, A. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 497-515, Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. 等人,

Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. 等人, TIBTECH (1991) 9, 132-137)。

[0116] 通过连接抗体的H链V区和L链V区,可以得到 scFv。这些区域存在于单个多肽链中。通常,Fv多肽另外含有在VH和VL之间的多肽接头,因此 scFv可以形成抗原结合所需的结构(关于 scFv的综述,参见Pluckthun“*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*”第113卷(Rosenburg和Moore编(Springer-Verlag, New York)第269-315页,1994))。所述接头没有特别限制,只要它不会抑制与其两端连接的抗体可变区的表达。

[0117] 在该 scFv中,H链V区和L链V区通过接头(优选肽接头)相连(Huston, J. S. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。在 scFv中的H链V区和L链V区可以源自上面描述为抗体的那些区域中的任一种。作为连接V区的肽接头,例如,使用由12-19个氨基酸残基组成的任意的单链肽。

[0118] 如下得到编码 scFv的DNA:使用编码前述抗体的H链或H链V区的DNA和编码其L链或L链V区的DNA作为模板,使用限定两端的引物对,通过PCR方法扩增编码那些序列的所需氨基酸序列的DNA部分,然后组合地扩增编码肽接头部分的DNA和限定使得所述接头部分的两端分别与H链和L链相连的引物对。制备出编码 scFv的DNA以后,根据常规方法,可以得到含有所述DNA的表达载体和用所述表达载体转化的宿主,并可以根据常规方法使用所述宿主得到 scFv。

[0119] 双体是指通过基因融合构建的二价抗体片段(Holliger P等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993), EP-A-404097, W093/11161等)。所述双体是由2个多肽链构成的二聚体。通常,在多肽链中,VL和VH分别通过短接头(其具有例如约5个残基)连接在同一链中,所述接头因为太短而不能彼此结合。在同一多肽链上编码的VL和VH不能形成单链可变区片段(因为它们之间的接头太短),但是会形成二聚体,因此,所述双体具有2个抗原结合位点。

[0120] sc(Fv)₂是由2个VH和2个VL组成的小抗体,所述VH和VL通过接头等连接成单链(Hudson等人, J Immunol. 方法1999; 231: 177-189)。可以如下制备 sc(Fv)₂:例如,通过接头来连接2个 scFv。

[0121] 在本发明中,作为连接抗体的可变区的接头,可以使用:可通过基因工程引入的肽接头,在合成的化合物接头中公开的接头(参见例如, Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996)等。当使用肽接头时,其长度没有特别限制,本领域普通技术人员可以根据目标适当地选择长度。所述长度通常是1-100个氨基酸,优选地3-50个氨基酸,进一步优选地5-30个氨基酸,特别优选地12-18个氨基酸(例如,15个氨基酸)。合成的化合物接头(化学交联剂)是通常用于交联肽的交联剂。其实例包括:N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二琥珀酰亚胺基辛二酸盐(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸盐(BS³)、二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸盐)(DSP)、二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸盐)(DTSSP)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸盐)(EGS)、乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸盐)(磺基-EGS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸盐(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸盐(磺基-DST)、双[2-(琥珀酰亚胺基氧基碳酸氧基)乙基]砒(BSOCOES)、双[2-(磺基琥珀酰亚胺基氧基碳酸氧基)乙基]砒(磺基-BSOCOES)等。这些交联剂是商购可得的。

[0122] 可以如下生产这些抗体的片段:以与上面相同的方式,得到其基因,表达所述基

因,并使宿主生产它们。在本申请的权利要求中的“抗体”也包括那些抗体片段。

[0123] 经修饰的抗体的实例包括与各种分子缀合的抗体,所述分子是诸如聚乙二醇(PEG)、荧光物质、放射性同位素、药物等。在本申请的权利要求中的“抗体”也包括这些经修饰的抗体。通过将化学修饰应用于得到的抗体,可以得到这样的经修饰的抗体。在本领域中已经建立了所述方法及其用途。

[0124] 具有增强的细胞毒性诱导活性的抗体的实例包括:岩藻糖-缺陷型抗体,在糖链处添加了平分型N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)的抗体,通过置换Fc区中的氨基酸而改变了对Fc γ 受体的结合活性的抗体,等。通过本领域普通技术人员已知的方法,可以生产这些具有增强的细胞毒性诱导活性的抗体。

[0125] 当将不同亚类中的抗体转化成人IgG1时,可以如下得到它:例如,从源自生产抗体的杂交瘤的cDNA中,仅分离出可变区的编码区,将所述编码区引入含有人IgG1的恒定区的载体中,例如,N5KG1-Val Lark载体(IDEc Pharmaceuticals, N5KG1(美国专利6001358))。

[0126] 双特异性抗体是识别两类抗原的抗体,其制备方法也是已知的(例如,Journal of Immunology, 1994, 152, 5368-5374)。所述抗原之一是Embigin,另一种抗原是除了Embigin以外的异源抗原。异源抗原的实例包括、但不限于免疫效应细胞的其它细胞表面抗原,例如,CD3、CD28、CD16、CD64等。

[0127] 与蛋白融合的抗体是,在所述抗体的N-端或C-端处与异源蛋白融合的抗体,其制备方法也是已知的(例如,Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281)。所述抗体仅需要是通过使异源蛋白与抗-Embigin抗体结合得到的嵌合分子。异源蛋白的实例包括、但不限于:Fc受体、细胞因子等。

[0128] 从细胞内外、和宿主,可以分离如上所述生产和表达的抗体,并均匀地纯化。通过亲和色谱法,可以分离和纯化要用于本发明中的抗体。要用于亲和色谱法的柱的实例包括蛋白A柱和蛋白G柱。要用于蛋白A柱的载体的实例包括HyperD、POROS、琼脂糖F.F.等。另外,可以使用通常用于蛋白的分离和纯化方法,且没有任何限制。

[0129] 例如,可以如下分离和纯化在本发明中使用的抗体:适当地选择和组合除了上述亲和色谱法以外的色谱法、过滤、超滤、盐析、透析等。色谱法的实例包括离子交换色谱法、疏水色谱法、凝胶过滤等。这些色谱法可以应用于HPLC(高效液相色谱法)。另外,也可以使用反相HPLC。

[0130] 2. 本发明的预防剂或治疗剂和针对Th17细胞的细胞毒性剂

发明人已经发现,由于经毒素修饰的抗-Embigin抗体和与磁性珠子缀合的抗-Embigin抗体会选择性地衰竭Th17细胞,且进一步,作为大鼠IgG2b的抗-Embigin抗体不仅选择性地减少Th17细胞,而且显示出对自身免疫病模型动物的预防或治疗效果,所以使用抗-Embigin抗体(例如,与表现出细胞毒性的药物缀合的抗-Embigin抗体,具有诱导细胞毒性的结构的抗-Embigin抗体,等)作为与Th17细胞有关的自身免疫或变应性疾病的预防剂或治疗剂,特别是多发性硬化的预防剂或治疗剂。

[0131] 因此,本发明提供了自身免疫病或变应性疾病的预防剂或治疗剂,其含有抗-Embigin抗体。

[0132] 在本发明的自身免疫病或变应性疾病的预防剂或治疗剂中含有的抗-Embigin抗

体没有特别限制,只要它是在“1. 在本发明中的抗 -Embigin 抗体”中描述的抗体。例如,可以优选地使用表现出细胞毒性的抗 -Embigin 抗体、具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体等。

[0133] “细胞毒性”的实例包括细胞杀死活性、细胞功能障碍活性和细胞生长抑制活性。在本发明中,需要存在这些活性中的至少一种。另外,所述抗 -Embigin 抗体本身可以具有细胞毒性(例如,ADCC•CDC-非依赖性的细胞凋亡诱导活性等),并优选地,可以如下使用表现出细胞毒性的药物:使它们与抗体缀合,以赋予所述抗体细胞毒性。

[0134] 表现出细胞毒性的药物的实例包括:细胞毒性物质(诸如细菌衍生的毒素等)、化学治疗剂和放射性同位素。其具体实例包括:放射性核素诸如碘(¹³¹碘:¹³¹I、¹²⁵碘:¹²⁵I)、钇(⁹⁰钇:⁹⁰Y)、铟(¹¹¹铟:¹¹¹In)、锝(^{99m}锝:^{99m}Tc)等(J.W. Goding., *Monoclonal Antibodies: principles and practice.*, 1993 ACADEMIC PRESS),细菌衍生的毒素诸如铜绿假单胞菌毒素(假单胞菌外毒素)、白喉毒素和蓖麻蛋白,化学治疗剂诸如甲氨蝶呤、丝裂霉素、卡奇霉素、皂草素等(D.J. King., *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies.*, 1998 T.J. International Ltd, M.L. Grossbard., *Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer.*, 1998 Marcel Dekker Inc, John M Lambert, *Current Opinion in Pharmacology* (2005) 第5卷, 第543-549页)等。不具有副作用且具有强细胞毒性的药物是优选的。

[0135] 在抗体和药物之间的键可以是共价键和非共价键中的任一种(例如,离子键)。例如,可以如下得到抗 -Embigin 抗体和药物的复合物:使用抗体分子中的反应基团(例如,氨基、羧基、羟基等)或配位基团,并使特定药物与抗体接触,所述药物具有能够与所述反应基团反应形成键的官能团(在细菌衍生的毒素或化学治疗剂的情况下),或具有能够与配位基团形成复合物的可离子化基团(在放射性核素的情况下),其中如果必要的话,所述反应基团可以在被具有更高反应性的基团结合以后使用,或在转化成具有更高反应性的基团以后使用。或者,还可以使用生物素-抗生物素蛋白系统来形成复合物。在本领域中已经确立了这样的结合方法(*Bioconjugate Chem.* (2010) 第21卷, 5-13, *Accounts of chemical research* (2008) 第41卷, 第1期, 98-107)。目前,已经在临床上开发了与表现出细胞毒性的药物缀合的多种IgG(*Current Opinion in Pharmacology* (2005) 第5卷, 第543-549页)。作为本发明的表现出细胞毒性的抗 -Embigin 抗体,可以提及例如这样的抗 -Embigin 抗体:它是与表现出细胞毒性的药物缀合的IgG。

[0136] 作为在本说明书中的“具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体”,可以提及特异性地识别Embigin且具有前述诱导细胞毒性的结构的抗体。如在实施例14-17中所示,具有诱导细胞毒性的结构的抗 -Embigin 抗体会选择性地消除Th17细胞,并表现出对自身免疫病动物模型的预防或治疗效果。因此,当所述抗 -Embigin 抗体是具有诱导细胞毒性的结构的抗体时,即使所述抗体本身不具有细胞毒性且未与具有所述活性的药物缀合时,所述抗体也可以表现出作为自身免疫病或变应性疾病的预防剂或治疗剂或针对Th17细胞的细胞毒性剂的功能。

[0137] 具有诱导细胞毒性的结构的抗体的具体实例包括下述的(a)-(c)。

[0138] (a)一种抗体,其具有在效应细胞存在下诱导抗体依赖性的细胞的细胞毒性(ADCC)的结构。

[0139] (b) 一种抗体,其具有诱导补体依赖性的细胞毒性 (CDC) 的结构。

[0140] (c) 一种抗体,其具有诱导抗体依赖性的细胞吞噬作用 (ADCP) 的结构。

[0141] 上述 (a) 的具有在效应细胞存在下诱导抗体依赖性的细胞的细胞毒性的结构的抗体是广泛已知的。其实例包括属于诸如下述亚类的抗体:小鼠 IgG2a 和 IgG3、人 IgG1 和 IgG3、大鼠 IgG2b 等等。

[0142] 作为这些亚类的药用抗体,利妥昔单抗(商品名 Rituxan (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.))、曲妥单抗(商品名赫赛汀 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.)) 等是已知的(参见,例如, *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10: 301-316)。

[0143] 上述 (b) 的具有诱导补体依赖性的细胞毒性的结构的抗体也是广泛已知的。其实例包括属于诸如下述亚类的抗体:小鼠 IgM、IgG2a 和 IgG3、人 IgM、IgG1 和 IgG3、大鼠 IgG2b 等等。

[0144] 抗体的 ADCC 和 CDC 活性在很大程度上取决于 IgG 的亚类,且已经澄清, IgG1 和 IgG3 在人类中具有强活性。因而,具有诱导细胞毒性的结构的人抗体的实例包括这样的抗体:所述抗体具有 IgG1 的恒定区、IgG3 的恒定区或 IgM 的恒定区。具有诱导细胞毒性的结构的人抗体的优选实例包括 IgG1 或 IgG3 亚类的 IgG 抗体和 IgM 抗体。

[0145] 可以如下检查抗体的细胞毒性诱导活性:例如,在 ADCC 活性的情况下,在有抗 -Embigin 抗体存在下温育靶细胞 (Th17 细胞和强制表达 Embigin 的细胞系) 和表达 Fc 受体的效应细胞 (NK 细胞、单核细胞等),在 CDC 活性的情况下,在有新鲜的人血清(包括补体)存在下温育靶细胞和抗体,并计数活细胞和 / 或死细胞。

[0146] 此外,本发明的“具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体”也包括:具有诱导 2 类细胞毒性活性的结构的抗体,具有增强的细胞毒性诱导活性的抗体,结合 Embigin 和除了 Embigin 以外的抗原的双特异性抗体,与蛋白融合的抗 -Embigin 抗体,等。

[0147] 具有增强的细胞毒性诱导活性的抗体的实例包括:Fc 区糖链的岩藻糖缺失的抗体,在糖链处添加了平分型 N-乙酰基葡萄糖胺 (GlcNAc) 的抗体,通过置换 Fc 区中的氨基酸而改变了对 Fc γ 受体的结合活性的抗体,等。这些操作可以使对效应细胞上的 Fc 受体的结合活性增强至 100 倍或更多。另外,当抗 -Embigin 抗体属于人 IgG2 或 IgG4 亚类时,通过前述基因重组方法,可以将恒定区改变成人 IgG1 或 IgG3 亚类。此外,可以如下赋予超过天然亚型 IgG1 和 IgG3 的 CDC 活性:制备同种型嵌合抗体,所述嵌合抗体将人 IgG3 序列的一部分掺入人 IgG1 中(综述参见 *Cancer Res.* 2008; 68: 3863-3872; *Nat. Rev. Immunol.* 2010 (如上所述))。

[0148] “与 Th17 细胞有关的疾病”是指:其中 Th17 细胞是致病细胞的疾病,其中 Th17 细胞被怀疑为致病细胞的疾病,其中 Th17 细胞会加速病状恶化的疾病,或其中 Th17 细胞具有加速病状恶化的可能性的疾病。

[0149] 与 Th17 细胞有关的疾病的实例包括:自身免疫疾病诸如多发性硬化、银屑病、风湿病、炎性肠病等、变应性疾病诸如接触性超敏反应、类固醇抵抗型哮喘、肾小球肾炎、特应性皮炎等和慢性阻塞性肺疾病 (COPD)。在文献等中已经报道了 Th17 细胞在这些疾病中的参与 (*Annu. Rev. Physiol.* (2010) 72: 495-516, *J Am Soc Nephrol* (2010) 21: 925-931)。具体地,已经使用动物模型澄清, Th17 细胞是比常规地认为重要的 Th1 细胞更强的多发性硬化致病细胞 (*J. Exp. Med.* (2005) 201; 233-240)。

[0150] 另外,由于体内的主要的 IL-17 生产细胞是 Th17 细胞,与 IL-17 有关的疾病也被包括在“与 Th17 细胞有关的疾病”中。已知,通过抑制 IL-17 生产或抑制 IL-17 的功能,可以改善诸如类风湿性关节炎、炎性肠病、银屑病、慢性非传染性葡萄膜炎等疾病 (J. Immunol. (2003) 171: 6173-6177, Inflamm Bowel Dis (2006): 2: 382-388, Sci Transl Med (2010) 2; 52ra72)。

[0151] 由于 Th1 细胞和 Th17 细胞也参与身体的防御功能,非特异性的免疫抑制或 Th1 细胞和 Th17 细胞的功能抑制可能过度地降低身体的防御功能。因此,预期本发明的治疗剂(其选择性地作用于 Th17 细胞)会实现减少的副作用。另外,由于 Th17 细胞作为自身免疫疾病的致病细胞显示出比 Th1 细胞更强的作用(这取决于疾病),本发明的治疗剂通过选择性地作用于 Th17 细胞而表现出对与 Th17 细胞有关的自身免疫疾病等的优良的作用。

[0152] 另外,发明人已经发现,与表现出细胞毒性的药物缀合的抗 -Embigin 抗体或具有诱导细胞毒性的结构的抗 -Embigin 抗体也可用作针对 Th17 细胞的细胞毒性剂,因为经皂草素修饰的抗 -Embigin 抗体和与磁性珠子缀合的抗 -Embigin 抗体会选择性地衰竭 Th17 细胞,并且大鼠 IgG2b 抗体(即是能够诱导 ADCC 和 CDC 活性的抗体的抗 -Embigin 抗体)也会选择性地衰竭 Th17 细胞。

[0153] 因此,本发明提供了针对 Th17 细胞的细胞毒性剂,其含有抗 -Embigin 抗体。

[0154] 本发明的“针对 Th17 细胞的细胞毒性剂”是会对 Th17 细胞造成细胞损伤的药物。因此,本发明的针对 Th17 细胞的细胞毒性剂的实例包括前述的表现出细胞毒性的抗 -Embigin 抗体和具有细胞毒性诱导活性的抗 -Embigin 抗体。

[0155] 本发明的针对 Th17 细胞的细胞毒性剂可以用于证实 Th17 细胞在某种病理学状况中的参与,例如,通过将所述药剂施用给各种动物疾病模型。

[0156] 迄今为止,已经主要通过 Th17 细胞转移证实了 Th17 细胞作为自身免疫疾病的致病细胞的研究。但是,它们不是使用非常纯的 Th17 细胞进行转移的研究,而是允许混合除了 Th17 细胞以外的细胞的那些研究 (J. Exp. Med. (2005) 233-240)。因此,使用本发明的针对 Th17 细胞的细胞毒性剂,可以更清楚地分析 Th17 在病理学中的参与,且本发明的药剂可用于研究多种疾病的治疗。例如,作为自身免疫病模型,可以提及实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE)-发病模型,这是一种多发性硬化模型,且可以使用通过用肽(自身抗原)诸如 PLP 或 MOG 等免疫广泛使用的小鼠和大鼠而得到的 EAE 模型 (Methods Mol Biol. 2009; 549: 157-73, Brain (2004); 127: 2201-2213),尽管不限于此。

[0157] 本发明的针对 Th17 细胞的细胞毒性剂可以另外用于预防或治疗前述的“与 Th17 细胞有关的疾病”。

[0158] 根据在下述的“5. 本发明的 Th17 细胞的检测方法”中描述的方法,通过计数 Th17 细胞的数目,可以证实本发明的针对 Th17 细胞的细胞毒性剂的效果。

[0159] 本发明的治疗剂和针对 Th17 细胞的细胞毒性剂可以含有任选的载体,例如,药学上可接受的载体,且可以以药物组合物的形式作为药物施用。

[0160] 药学上可接受的载体的实例包括、但不限于:赋形剂诸如蔗糖、淀粉等,粘合剂诸如纤维素、甲基纤维素等,崩解剂诸如淀粉、羧甲基纤维素等,润滑剂诸如硬脂酸镁、微粉硅胶等,香料诸如柠檬酸、薄荷醇等,防腐剂诸如苯甲酸钠、亚硫酸氢钠等,稳定剂诸如柠檬酸、柠檬酸钠等,悬浮液诸如甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等,分散剂诸如表面活性剂等,稀

释剂诸如水、盐水等,蜂蜡等。

[0161] 本发明的药剂可以口服地和肠胃外地施用,优选肠胃外施用。其具体实例包括注射剂型、经鼻施用剂型、经肺施用剂型、透皮施用形式等。注射剂型的实例包括静脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等,它们可以全身地或局部地施用。

[0162] 尽管本发明的药剂的剂量可以随下述因素而变化:给药目的、给药方法、给药途径、剂型、给药对象的状况(性别、年龄、体重、严重性等),当通过注射施用给成年人时,通常可以确定在下述范围内的剂量:每1kg体重0.0001 mg - 100 mg,或每位患者每次注射1 - 1000 mg、优选地5 - 50 mg。但是,本发明的药剂和/或组合物不限于这些剂量。

[0163] 另外,关于给药间隔,只要效果持续,就可以不施用下一次给药。例如,在治疗期间,给药可以是每2 - 8周1次,每几周1次,或每几个月1次,或每几年1次。

[0164] 根据已知的制药方法配制本发明的药剂,并施用。例如,它可以可以在水或其它药学上可接受的液体中的无菌溶液或悬浮液注射剂的形式使用。另外,可以如下配制它:适当地与例如药理学上可接受的载体或介质(具体地,无菌的水和盐水、乳化剂、助悬剂、表面活性剂、稳定剂、媒介物、防腐剂等)相组合,并在普遍接受的药用用途所需的单位剂型中混合。在这些制品中的活性成分的量应当设定为在标定范围内的合适体积。

[0165] 根据一般的制备用途,使用诸如注射用蒸馏水等媒介物,可以配制用于注射的无菌组合物。注射用水溶液的实例包括盐水、等张溶液,所述等张溶液包括葡萄糖和其它助剂,诸如D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇和氯化钠,且它们可以与合适的溶解助剂(例如,醇,特别是乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇)和非离子的表面活性剂(例如,聚山梨酯80TM、HCO-50)组合使用。

[0166] 油状液体的实例包括芝麻油和大豆油,它们可以与苯甲酸苄酯和苯甲醇(作为溶解助剂)组合使用。另外,可以组合地使用缓冲剂(例如,磷酸盐缓冲剂、醋酸钠缓冲剂)、安抚剂(例如,盐酸普鲁卡因)、稳定剂(例如,苯甲醇、苯酚)和抗氧化剂。制备的注射溶液通常装入合适的安瓿中。

[0167] 3. 本发明的用于药物递送系统的抗-Embigin 抗体

本发明提供了用于将药物递送给Th17细胞的药物递送系统(DDS)和可用于所述DDS的抗-Embigin抗体。

[0168] 发明人已经发现,由于与其它血细胞相比,Embigin在Th17细胞中高度地表达,且经毒素修饰的抗-Embigin抗体和与磁性珠子缀合的抗-Embigin抗体会衰竭Th17细胞,所以抗-Embigin抗体可用于将药物递送给Th17细胞的药物递送系统中。

[0169] 由于本发明的药物递送系统的抗-Embigin抗体会特异性地结合Embigin(它是Th17细胞的细胞膜表面抗原),通过使目标药物与所述抗体缀合而形成的复合物可以将所述药物递送给Th17细胞。

[0170] 抗-Embigin抗体的实例包括在“1. 在本发明中的抗-Embigin抗体”中详细描述抗体。它也可以是商购可得的抗-Embigin抗体(例如,由Santa Cruz等销售的抗-Embigin抗体)。

[0171] 所述药物没有特别限制,只要它可以与抗-Embigin抗体形成复合物。其实例包括:细胞毒性物质诸如细菌衍生的毒素等,化学治疗剂和放射性同位素。其具体实例包括在“2. 本发明的治疗剂和针对Th17细胞的细胞毒性剂”中详细描述的药物。优选的药物

是这样的药物：其没有副作用，且表现出强细胞毒性诸如细胞杀死活性、细胞生长抑制活性等。在本领域中已经确立了药物和抗体的结合方法。

[0172] 本发明的药物递送系统 (DDS) 是以施用抗 -Embigin 抗体和药物的复合物为特征的药物递送系统，且可以将目标药物递送给 Th17 细胞。

[0173] 本发明的 DDS 可以在体外和在体内施用。

[0174] 在“体外”的情况下，通过将抗 -Embigin 抗体和药物的复合物加入培养细胞或从哺乳动物收集的细胞的培养用培养基中，可以将药物递送给 Th17 细胞。

[0175] 在“体内”的情况下，通过皮下给药、静脉内给药、经渗透泵给药、经尾静脉给药等方式，给单个哺乳动物施用抗 -Embigin 抗体和药物的复合物，可以将药物递送给体内的 Th17 细胞。所述哺乳动物的实例包括人、猴、小鼠、大鼠等。

[0176] 4. 本发明的 Th17 细胞检测试剂和试剂盒

尽管已知 Th17 细胞与多种疾病有关，尚未报道 Th17 细胞 - 特异性的细胞表面分子。

[0177] 发明人已经发现，Embigin 或 Embigin 基因可用作 Th17 细胞标志物，因为 Embigin 在小鼠 Th17 细胞和人 Th17 细胞中高度地表达，且特别是在血细胞中，Th17 细胞比其它血细胞更高地表达 Embigin。

[0178] 本发明的 Th17 细胞检测试剂含有抗 -Embigin 抗体或能够特异性地检测 Embigin 基因转录产物的核酸。

[0179] 抗 -Embigin 抗体的实例包括在“1. 本发明的抗 -Embigin 抗体”中详细描述抗体。另外，所述抗 -Embigin 抗体可以用荧光物质或放射性同位素标记的经修饰的抗体。作为标记，可以使用与下述核酸中的标记类似的标记。荧光物质的实例包括：荧光胺、异硫氰酸荧光素等，放射性同位素的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等。根据常规方法，可以用荧光物质或放射性同位素标记抗体。使用被荧光标记等标记的抗 -Embigin 抗体，通过 FACS 等可以容易地检测 Th17 细胞。

[0180] 所述“能够特异性地检测 Embigin 基因转录产物的核酸”可以是任意核酸，只要它可以特异性地检测 Embigin 的 mRNA，且根据所述检测方法可以适当地选择和使用探针或引物。探针的实例包括这样的多核苷酸序列：所述序列包含 Embigin mRNA 的核酸序列的 15 个碱基或更多、优选地 18 个碱基或更多、更优选约 20 个碱基或更多、最优选地全长的连续核苷酸序列，或其互补序列。引物的实例包括包含一对 DNA 序列的多核苷酸序列，所述 DNA 序列由 15 个碱基或更多、优选地 18 个碱基或更多、更优选约 20 个碱基或更多且 100 个碱基或更少、优选地 50 个碱基或更少、更优选约 40 个碱基或更少组成，它们会提供具有下述长度的 PCR 扩增的序列：例如，100 个碱基或更多、优选地 200 个碱基或更多，且，例如，1000 个碱基或更少、优选地 500 个碱基或更少，且它们分别被包含在 Embigin mRNA 的核酸序列和其互补链序列内。

[0181] 所述核酸探针或引物可以含有其它序列（不与检测对象多核苷酸互补的核苷酸序列），只要不损害特异性检测即可。

[0182] 另外，也可以用合适的标记来标记所述核酸探针和引物，所述标记是例如放射性同位素（例如， ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等）、酶（例如， β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶、苹果酸脱氢酶等）、荧光物质（例如，荧光胺、异硫氰酸荧光素等）、发光物质（例如，鲁米诺、鲁米诺衍生物、萤光素、光泽精等）等。或者，可以另外在荧光物质附近

缀合猝灭剂（猝灭物质），后者会吸收由荧光物质（例如，FAM、VIC 等）发射的荧光能。在这样的实施方案中，当荧光物质和猝灭剂在检测反应过程中分离时，检测到荧光。

[0183] 所述核酸探针可以是 DNA、RNA 和嵌合核酸中的任一种，且是单链或双链。基于关于 Embigin 基因的核酸序列的已知信息（例如，SEQ ID NO: 2 所示的人 Embigin 基因的核酸序列），根据常规方法，并使用例如 DNA/RNA 自动合成仪，可以合成能够特异性地检测 Embigin 基因转录产物的核酸探针。

[0184] 本发明也提供了一种用于检测 Th17 细胞的试剂盒。本发明的用于 Th17 细胞检测的试剂盒含有：用于测量 Embigin 的表达的试剂。通过使用本发明的试剂盒测量 Embigin 的表达，可以方便地检测 Th17 细胞。

[0185] 本发明的试剂盒含有抗 -Embigin 抗体或能够特异性地检测 Embigin 基因转录产物的核酸，特别是前述的用于 Th17 细胞检测的试剂。

[0186] 在用于 Th17 细胞检测的试剂中含有的抗 -Embigin 抗体或核酸，通常以下述形式被包含在本发明的试剂盒中：以合适的浓度溶解在水或合适的缓冲液（例如，TE 缓冲液、PBS 等）中的其水溶液的形式，或核酸阵列的形式，其中将核酸探针固定化在固相载体上。

[0187] 本发明的试剂盒可以在它的构成中另外含有：根据 Embigin 的测量方法实施所述方法必需的其它组分。例如，当使用 RNA 印迹法或核酸阵列进行测量时，本发明的试剂盒可以另外含有印迹缓冲液、标记试剂、印迹膜等。当使用原位杂交进行测量时，本发明的试剂盒可以另外含有标记试剂、生色底物等。另外，当使用 FACS 进行测量时，所述试剂盒可以含有荧光标记的第二抗体、细胞固定剂等。

[0188] 5. 本发明的 Th17 细胞检测方法

发明人已经发现，Embigin 在鼠 Th17 细胞和人 Th17 细胞中高度地表达，且特别是在血细胞中，Embigin 在 Th17 细胞中比在其它血细胞中更高地表达，基于此，他们已经发现了使用 Embigin 的表达作为指标的 Th17 细胞检测方法。

[0189] 本发明的 Th17 细胞检测方法包括：测量 Embigin 在细胞或组织中的表达的步骤，和基于表达水平和 Th17 细胞之间的正相关来检测 Th17 细胞的步骤。根据本发明，可以比以前更容易地检测 Th17 细胞。

[0190] “Embigin 的表达”在本发明中是指，Embigin 蛋白或 Embigin 基因的表达。

[0191] 通过测量 Embigin 在细胞或组织中的表达，可以具体地执行本发明的方法。所述细胞仅需要是从试验动物得到的细胞或培养细胞，且得到的血细胞或从血细胞衍生出的培养细胞是优选的。所述组织仅需要是从试验动物得到的组织，且优选地是允许免疫染色的形式。

[0192] 本发明的方法可以应用于，例如，从试验动物（诸如人、大鼠、小鼠等）得到的细胞、组织等。

[0193] 使用前述的本发明的用于 Th17 细胞检测的试剂和根据其本身已知的方法，可以测量 Embigin 的表达。测量方法的实例包括：FACS、蛋白质印迹法、RT-PCR、RNA 印迹法、原位杂交、核酸阵列、组织染色等。

[0194] 然后，基于测量的 Embigin 的表达水平，可以检测 Th17 细胞。如在下述的实施例中所示，由于 Embigin 在 Th17 细胞中的表达水平较高，基于 Embigin 表达水平和 Th17 细胞之间的正相关，当 Embigin 的表达水平或浓度在测量对象的细胞或组织中较高时，可以判

断所述细胞是 Th17 细胞。

[0195] 迄今为止,尚未发现这样的 Th17 细胞的细胞表面分子:其能够实现使用单一分子来鉴别 Th17 细胞。但是,本发明的 Th17 细胞检测方法可以使用方便的方法诸如 FACS 等来检测 Th17 细胞。具体地,当将本发明的方法应用于血细胞或血液衍生的培养细胞时,可以容易地检测 Th17 细胞。因此,就研究涉及 Th17 细胞的自身免疫疾病和变应性疾病、检查试验动物中是否存在增加的 Th17 细胞等而言,本发明的方法是非常有用的。

实施例

[0196] 在下面,通过参照实施例解释本发明,所述实施例不应解释为限制性的。

[0197] 参照实施例 1-1. 针对小鼠 Embigin 的抗体的制备 (1)

将用于表达小鼠 Embigin 的逆转录病毒导入大鼠细胞中,以制备过表达小鼠 Embigin 的细胞。用过表达小鼠 Embigin 的细胞免疫大鼠 (Wistar, 5- 周龄, CLEA Japan, Inc.)。在免疫接种以后,得到淋巴细胞,并通过 PEG 方法与骨髓瘤细胞融合,以得到杂交瘤。

[0198] 使用用于免疫接种的过表达小鼠 Embigin 的细胞作为阳性对照细胞,使用与阳性对照细胞相同、但是仅导入载体的宿主细胞作为阴性对照细胞,通过流式细胞术,筛选生产抗 - 小鼠 Embigin 抗体的杂交瘤。

[0199] 如下通过流式细胞术来评价结合活性。

[0200] 以 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ 细胞,使用阳性对照细胞或阴性对照细胞,加入杂交瘤培养物上清液或 $5 \mu\text{g/mL}$ 的合适的大鼠 IgG,使所述混合物反应 30 min。用 FACS 缓冲液洗涤细胞 1 次,加入荧光标记的抗 - 大鼠 IgG 抗体,使所述混合物反应 30 min。反应以后,通过离心操作收集细胞,悬浮于 PBS 或 FACS 缓冲液中,并进行流式细胞术。使用的流式细胞计是流式细胞计 FC500 (Beckman Coulter)。使用前向散射和侧向散射直方图,设定对活细胞群的门控,并进行分析。

[0201] 得到仅与表达 Embigin 的阳性对照细胞强烈反应的杂交瘤 (2G21、2G23、3E64、3E66)。图 1 显示了评价结果。

[0202] 为了进一步证实反应特异性,使用过表达小鼠 Embigin 的细胞 (宿主:仓鼠细胞) 作为阳性对照细胞,并使用仅导入载体的仓鼠细胞作为阴性对照细胞,通过流式细胞术评价了 2G21 和 3E64。使用流式细胞计 FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company) 进行分析,证实了 2G21 和 3E64 仅与阳性对照细胞的强反应。图 2 显示了评价结果。

[0203] 参照实施例 1-2. 针对小鼠 Embigin 的抗体的制备 (2)

使用 96- 孔板,通过有限稀释方法,进一步对在上述参照实施例 1-1 中制备的抗 -Embigin 抗体 3E64 进行单克隆。纯化该克隆的抗体,以得到抗 -Embigin 抗体 (3E64D1)。

[0204] 另外,证实该抗体克隆为大鼠 IgG2b 抗体。已知大鼠 IgG2b 具有诱导细胞毒性的结构。

[0205] 参照实施例 2. 小鼠各种辅助性 T 细胞的制备

(1) 小鼠 Th17 细胞的制备

通过参考公开的参考文献 (Nature Immunology (2007) 第 8 卷 903-905, Nature Immunology (2007) 第 8 卷 958-966, Nature Immunology (2007) 第 8 卷 1390-1397, Nature (2007) 第 448 卷 480-484, J. Biol. Chem. (2008) 第 283 卷 17003-17008), 制备

小鼠 Th17 细胞。

[0206] 从 SJL 小鼠 (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.) 或 Rag2 KO/DO11.10 Tg 小鼠 (Taconic Farms, Inc.) 分离出脾, 并制备细胞悬浮液。用细胞过滤网 (直径 70 μm , Becton, Dickinson and Company) 过滤细胞悬浮液, 并离心 (300 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min), 除去上清液。用 ACK 溶液 (TAKARA BIO INC.) 溶血以后, 用 RPMI1640 (Nacalai Tesque) 洗涤细胞, 以制备脾细胞。当从 SJL 小鼠制备时, 使用 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec K. K.), 从洗涤过的细胞制备 CD4⁺T 细胞。

[0207] 在抗 -CD3 ϵ / 抗 -CD28 抗体固相板上培养 CD4⁺T 细胞。为了培养, 使用含有 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基 (Invitrogen), 所述培养基加入了 20 ng/mL 小鼠 IL-6、3 ng/mL 小鼠 TGF- β 1、20 ng/mL 小鼠 IL-23、10 $\mu\text{g/mL}$ 抗 - 小鼠 IFN- γ 抗体、10 $\mu\text{g/mL}$ 抗 - 小鼠 IL-4 抗体和 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗 - 小鼠 IL-2 抗体, 通过传代培养适当地维持所述细胞, 并诱导分化成 Th17 细胞。使用分化诱导了 5-14 天的 Th17 细胞进行试验。

[0208] (2) 小鼠 Treg 细胞的制备

从小鼠脾制备 CD4⁺T 细胞, 并在抗 -CD3 ϵ / 抗 -CD28 抗体固相板上培养。为了培养, 使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 所述培养基加入了 20 ng/mL 小鼠 TGF- β 1、100 IU/mL 小鼠 IL-2、100 nM 视黄酸 (全反式) 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗 - 小鼠 IL-6, 通过传代培养适当地维持所述细胞, 并诱导分化成 Treg 细胞。使用分化诱导了 5-14 天的 Treg 细胞进行试验。

[0209] (3) 小鼠 Th1 细胞的制备

从小鼠脾制备 CD4⁺T 细胞, 并在抗 -CD3 ϵ / 抗 -CD28 抗体固相板上培养。为了培养, 使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 所述培养基加入了 20 ng/mL 小鼠 IL-12 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗 - 小鼠 IL-4, 通过传代培养适当地维持所述细胞, 并诱导分化成 Th1 细胞。使用分化诱导了 5-14 天的 Th1 细胞进行试验。

[0210] (4) 小鼠 Th2 细胞的制备

从小鼠脾制备 CD4⁺T 细胞, 并在抗 -CD3 抗体 / 抗 -CD28 抗体固相板上培养。为了培养, 使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 所述培养基加入了 20 ng/mL 小鼠 IL-4、5 $\mu\text{g/mL}$ 抗 - 小鼠 IFN- γ 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 抗 - 小鼠 IL-12, 通过传代培养适当地维持所述细胞, 并诱导分化成 Th2 细胞。使用分化诱导了 5-14 天的 Th2 细胞进行试验。

[0211] (5) 小鼠 Th0 细胞的制备

关于小鼠 Th0 细胞, 从小鼠脾制备 CD4⁺T 细胞, 并在抗 -CD3 ϵ / 抗 -CD28 抗体固相板上培养。为了培养, 使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 所述培养基加入了 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗 - 小鼠 IL-4、10 $\mu\text{g/mL}$ 抗 - 小鼠 IFN- γ 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗 - 小鼠 IL-12, 通过传代培养适当地维持所述细胞, 以制备 Th0 细胞, 其用于试验。

[0212] 参照实施例 3. 针对人 Embigin 的抗体的制备

将表达人 Embigin 的逆转录病毒导入小鼠细胞中, 以制备过表达人 Embigin 的细胞。用过表达人 Embigin 的细胞免疫小鼠 (Balb/c, 5- 周龄, CLEA Japan, Inc.)。在免疫接种以后, 得到淋巴细胞, 并通过 PEG 方法与骨髓瘤细胞融合, 以得到杂交瘤。

[0213] 使用用于免疫接种的过表达人 Embigin 的细胞作为阳性对照细胞, 使用与阳性对照细胞相同、但是仅导入载体的宿主细胞作为阴性对照细胞, 通过流式细胞术, 筛选生产

抗-人 Embigin 抗体的杂交瘤。使用流式细胞计 FC500 (Beckman Coulter), 得到表现出杂交瘤阳性反应的杂交瘤 (6G1E6 和 7C4E10), 它们仅与表达 Embigin 的阳性对照细胞强烈地反应。图 6 显示了评价结果。

[0214] 参照实施例 4. 人 Th17 细胞的制备

根据公开的参考文献 PNAS (2007); 104: 17034-17039, 制备了人 Th17 细胞。

[0215] 在含有脂多糖、抗-CD3 抗体、抗-IFN- γ 抗体、抗-IL-4 抗体和抗-IL-12 抗体的培养基中, 培养从人外周血制备的记忆 CD4⁺T 细胞和单核细胞 3 天, 进一步在含有抗-CD2 抗体 / 抗-CD3 抗体 / 抗-CD28 抗体固相珠子 (Cell Activation/Expansion Kit human, Miltenyi Biotec K.K.)、IL-2、IL-1 β 、IL-6、IL-23、抗-IFN- γ 抗体、抗-IL-4 抗体和抗-IL-12 抗体的培养基中培养 3 - 20 天, 以造成分化成 Th17 细胞。

[0216] 实施例 1. 通过蛋白质印迹法评价在 Th17 细胞中的表达特异性

为了证实 Th17 细胞中的表达特异性, 通过蛋白质印迹法对比了 Treg 细胞 (它是辅助性 T 细胞之一) 和 Th17 细胞的 Embigin 表达水平。

[0217] 将 Th17 细胞和 Treg 细胞 (通过从 Rag2 KO/D011.10 Tg 小鼠或 SJL 小鼠脾细胞分化而制备) 溶解于含有 80 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 8)、2 mM CaCl₂、1% Triton X-100 和蛋白水解酶抑制剂 (CompleteTM, Boehringer Ingelheim) 的溶解缓冲液中, 并离心 (12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30 min)。使用上清液作为蛋白溶液。将所述蛋白溶液与样品缓冲液 (用于 SDS-PAGE, 2 倍浓缩, 含有 2-巯基乙醇) (Nacalai Tesque) 混合, 并在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳等量的蛋白。电泳以后, 使用 Trans-Blot SD 半干电泳转移池 (BIO-RAD), 将它转移至 Immobilon-P (Millipore)。使用转移的膜, 进行蛋白质印迹法。为了检测, 使用兔抗-Embigin 多克隆抗体 (IMGENEX) 和 HRP 标记的山羊抗-兔 Ig 抗体 (BIOSOURCE)。通过 LAS-3000 (Fujifilm), 使用 ECL Plus 蛋白质印迹法检测系统 (GE Healthcare Japan), 进行检测。

[0218] 结果显示在图 3 中。发现 Embigin 在 Treg 细胞中几乎不表达, 但是在 Th17 细胞中高度表达。

[0219] 实施例 2. 通过 qRT-PCR 方法评价在辅助性 T 细胞中的表达特异性

从 Th17 细胞、Th1 细胞、Th2 细胞、Th0 细胞和 Treg 细胞 (通过从 Rag2 KO/D011.10 Tg 小鼠脾细胞分化而制备), 并使用 TRIzol (Invitrogen), 制备总 RNA。通过 TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) 和 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 评价总 RNA 中的 Embigin mRNA 的量。通过 ABI7900 (Applied Biosystems) 进行测量, 并同时评价持家基因 36B4 的表达。在基于 36B4 表达量的修正以后, 以 Treg 细胞的表达水平作为 1, 进行计算。

[0220] 使用 Embigin 引物 (SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4) 和 36B4 引物 (SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6), 进行检测。

[0221] 结果显示在图 4 中。在小鼠辅助性 T 细胞中, 发现 Embigin 可用作 Th17 细胞的标志物, 因为它在 Th17 细胞中特别高地表达。

[0222] 实施例 3. 通过流式细胞术评价细胞膜表面蛋白的 Th17 细胞特异性

为了评价细胞膜表面蛋白在 Th17 细胞中的表达特异性, 通过流式细胞术, 用不同细胞中的表达水平进行了对比。

[0223] 从 SJL 小鼠脾细胞分化出 Th17 细胞、Treg 细胞、Th1 细胞和 Th2 细胞,制备,并进行试验。另外,还对没有经过分化诱导的脾细胞和从小鼠外周血制备的红血细胞进行了试验。

[0224] 使用生产抗 - 小鼠 Embigin 抗体的克隆 2G23、3E64 的培养物上清液,并使用荧光标记的山羊抗 - 大鼠 IgM 和 IgG 抗体 (Beckman Coulter, Inc.) 作为第二抗体,将 Embigin 染色。作为抗 - 小鼠 Embigin 抗体的阴性对照,以与在参照实施例 1 中相同的方式用大鼠 IgG (Becton, Dickinson and Company) 将细胞染色。关于小鼠脾细胞,为了鉴别 B 细胞、白细胞和 CD3 阳性细胞,用荧光标记的抗 - 小鼠 B220 抗体 (B 细胞标志物)、荧光标记的抗 - 小鼠 CD11a 抗体 (白细胞标志物) 或荧光标记的抗 - 小鼠 CD3 抗体 (CD3 阳性的细胞标志物) 将它们染色。通过流式细胞术,评价这些样品。使用的流式细胞计是 FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company)。使用前向散射和侧向散射直方图,设定对活细胞群的门控,并进行分析。在分析每种 B 细胞、白细胞、CD3 阳性细胞时,进一步设定在 B220、CD11a 和 CD3 阳性的级分中的每个门控,并进行分析。通过抗 - 小鼠 Embigin 抗体的几何平均值与同种型 (大鼠 IgG) 的几何平均值之比,对比各个样品。

[0225] 结果显示在图 5 中。尽管 Embigin 在 B 细胞、白细胞、CD3 阳性细胞、红血细胞和 Treg 细胞中的表达水平非常低,与这些细胞相比,Embigin 在 Th17 细胞的细胞膜表面上高度地表达。因而,已经发现,通过检查 Embigin 的表达,可以检测 Th17 细胞。

[0226] 实施例 4. 在人 Th17 细胞中的 Embigin 表达研究

通过流式细胞术,评价了 Embigin 在人 Th17 细胞膜表面上的表达。

[0227] 在含有 12- 肉豆蔻酸 -13- 乙酸佛波醇酯、离子霉素和 BD GolgiStop (Becton, Dickinson and Company) 的培养基中,处理从外周血分化出的人 Th17 细胞 4 小时,并用生产抗 - 人 Embigin 抗体的克隆 6G1E6、7C4E10 的培养物上清液和作为第二抗体的 PE 标记的山羊抗 - 小鼠 Ig 抗体 (Beckman Coulter, Inc.) 染色。作为抗 - 人 Embigin 抗体的阴性对照,以相同方式用小鼠 IgG (Becton, Dickinson and Company) 对细胞染色。此外,用 APC 标记的抗 - CD4 抗体对细胞染色。使用 BD Cytotfix/Cytoperm 固定 / 透化溶液试剂盒 (Becton, Dickinson and Company),对这些样品进行透化,并用 FITC 标记的抗 - 人 IL-17 抗体染色。通过流式细胞术,评价这些样品。使用的流式细胞计是 FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company)。使用前向散射和侧向散射直方图,设定对活细胞群的门控,并将 CD4⁺IL17⁺ 细胞作为 Th17 细胞进行分析。

[0228] 结果显示在图 7 中。已经发现,Embigin 在人 Th17 细胞中表达。

[0229] 实施例 5. 使用经毒素修饰的抗 - Embigin 抗体造成的小鼠 Th17 细胞的选择性衰竭 (细胞死亡)

使用致病细胞,评价了使用抗 - Embigin 抗体是否可能造成 Th17 细胞选择性衰竭 (细胞死亡)。

[0230] 通过参考 J. Exp. Med. (2005) 201; 233-240,制备了致病细胞。

[0231] 换言之,与弗氏完全佐剂一起,用 PLP 肽 (SEQ ID NO: 7) 免疫 SJL 小鼠 (5- 周龄, CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.),并在 10 天后收集淋巴结细胞。在有 PLP 和 IL-23 存在下培养 5 天以后,进一步在有 IL-23 和 IL-2 存在下培养所述细胞 3 - 5 天,以得到致病细胞。

[0232] 使用 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec K.K.), 从制备的致病细胞制备 CD4⁺T 细胞。

[0233] 通过在含有 IL-23、IL-2、抗 - 小鼠 Embigin 抗体 (2G21、3E64)、抗 - IgG、Rat、Goat-Poly、皂草素 <Rat-ZAP> (Advanced Targeting Systems) 的培养基中培养 36 小时, 进行细胞除去操作。作为对照, 使用大鼠 IgG 替代抗 - 小鼠 Embigin 抗体, 以相同方式处理所述细胞。在含有 12- 肉豆蔻酸 -13- 乙酸佛波醇酯、离子霉素和 BD GolgiStop (Becton, Dickinson and Company) 的培养基中处理反应以后的细胞 4 小时, 并用 Per-CP 标记的抗 - 小鼠 CD4 抗体 (COSMO BIO CO., LTD.)、PE 标记的抗 - 小鼠 IFN γ 抗体 (BD Biosciences) 和 Alexa488 标记的抗 - 小鼠 IL17 抗体 (BD Pharmingen) 染色。通过流式细胞术, 评价这些样品。使用的流式细胞计是 FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company)。将 CD4⁺IL17⁺ 细胞归类为 Th17 细胞, 将 CD4⁺IFN γ ⁺IL17⁻ 细胞归类为 Th1 细胞, 将 CD4⁺IFN γ ⁻IL17⁻ 细胞归类为其它细胞, 并基于对照组中的每种细胞群的测量值 (作为 100%), 评价存活细胞比率。

[0234] 结果显示在图 8 中。由于 Th17 细胞的存活细胞比率显著低于 Th1 细胞和其它细胞的比率, 已经发现, 用皂草素 (它是一类毒素) 修饰的抗 - Embigin 抗体会选择性地衰竭 Th17 细胞。

[0235] 实施例 6. 抗 - 小鼠 IgG- 缀合的磁性珠子对 Th17 细胞的选择性衰竭

使用致病细胞, 评价了使用抗 - Embigin 抗体是否可能造成 Th17 细胞选择性衰竭 (细胞死亡)。

[0236] 使用 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec K.K.), 从以与在实施例 5 相同的方式制备的致病细胞制备 CD4⁺T 细胞。

[0237] 将致病细胞和抗 - 小鼠 Embigin 抗体 (2G23 或 3E66) 在 4°C 混合 30 min, 并离心 (1000 rpm, 3 min), 以回收细胞。将抗 - 大鼠 IgG 抗体修饰的磁性珠子 (Dyna1) 加入回收的细胞中, 将它们在 4°C 混合 30 min。除去通过磁性与磁性珠子结合的细胞, 重复该操作 2 次, 并回收未与磁性珠子结合的细胞。作为对照, 使用大鼠 IgG 替代抗 - 小鼠 Embigin 抗体。作为对照, 使用没有经过细胞除去操作的细胞。

[0238] 在含有 12- 肉豆蔻酸 -13- 乙酸佛波醇酯、离子霉素和 BD GolgiStop (Becton, Dickinson and Company) 的培养基中处理这些细胞 4 小时, 并用 Per-CP 标记的抗 - 小鼠 CD4 抗体 (COSMO BIO CO., LTD.)、PE 标记的抗 - 小鼠 IFN γ 抗体 (BD Biosciences) 和 Alexa488 标记的抗 - 小鼠 IL17 抗体 (BD Pharmingen) 染色。通过流式细胞术, 评价这些样品。使用的流式细胞计是 FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company)。将 CD4⁺IL17⁺ 细胞归类为 Th17 细胞, 将 CD4⁺IFN γ ⁺IL17⁻ 细胞归类为 Th1 细胞, 将 CD4⁺IFN γ ⁻IL17⁻ 细胞归类为其它细胞, 并基于对照组中的每种细胞群的测量值 (作为 100%), 评价存活细胞比率。

[0239] 结果显示在图 9 中。由于 Th17 细胞的存活细胞比率显著低于 Th1 细胞和其它细胞的比率, 发现可以选择性地衰竭 Th17 细胞。

[0240] 实施例 7. 在小鼠组织 (组织集合) 中的 Embigin 的表达

使用每种小鼠组织蛋白印迹诸如 INSTA-Blot Mouse Tissue (IMGENEX) 等, 并与抗 - 小鼠 Embigin 抗体 (IMGENEX) 和 HRP 标记的山羊抗 - 兔 Ig 抗体 (BIOSOURCE) 反应, 以进行蛋白质印迹法。使用 ECL Plus 蛋白质印迹法检测系统 (GE Healthcare Japan) 和

LAS-3000 (Fujifilm), 进行检测。

[0241] 实施例 8. Embigin 在人 Th17 细胞以外的细胞中的表达研究

通过下述方法, 可对比 Embigin 在不同人细胞中的表达水平。

[0242] 通过 Dynabeads Regulatory CD4⁺CD25⁺ T 细胞试剂盒 (Invitrogen), 从人外周血分离出 CD4⁺CD25⁺T 细胞, 并使用 Dynabeads Human Treg Expander (Invitrogen) 放大培养, 以制备人 Treg 细胞, 对其进行试验。用生产抗 - 人 Embigin 抗体的克隆 6G1E6、7C4E10 的培养物上清液和作为第二抗体的 PE 标记的山羊抗 - 小鼠 Ig 抗体 (Beckman Coulter, Inc.) 对人 Treg 细胞染色。作为抗 - 人 Embigin 抗体的阴性对照, 以相同方式用小鼠 IgG (Becton, Dickinson and Company) 对细胞染色。通过流式细胞计 FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company), 分析这些样品。

[0243] 另外, 用生产抗 - 人 Embigin 抗体的克隆 6G1E6、7C4E10 的培养物上清液和作为第二抗体的 PE 标记的山羊抗 - 小鼠 Ig 抗体 (Beckman Coulter, Inc.), 对人外周血中的细胞染色。作为抗 - 人 Embigin 抗体的阴性对照, 以相同方式用小鼠 IgG (Becton, Dickinson and Company) 对细胞染色。通过流式细胞计 FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company), 分析这些样品。当细分析外周血中的不同细胞时, 用 APC 标记的抗 - CD4 抗体对细胞染色以鉴别 CD4 阳性细胞, 或用 APC 标记的抗 - DX5 抗体对细胞染色以鉴别 NK 细胞, 或用 APC 标记的抗 - CD11c 抗体对细胞染色以鉴别树突细胞, 或用 APC 标记的抗 - CD8 抗体对细胞染色以鉴别 CD8 阳性细胞, 或用 APC 标记的抗 - CD11b 抗体对细胞染色以鉴别巨噬细胞, 或用 APC 标记的抗 - B220 抗体对细胞染色以鉴别 B 细胞, 各自之后进行流式细胞术分析。

[0244] 实施例 9. 证实 Th17 细胞在体内的衰竭

通过在 J. Exp. Med. (2005) 201; 233-240 中描述的方法, 可以证实 Th17 细胞在体内的选择性衰竭。

[0245] 用 5- 或 6- (N- 琥珀酰亚胺基氧基羰基) - 荧光素 3', 6' - 二乙酸盐 (CFSE, DOJINDO LABORATORIES), 标记通过与在实施例 5 类似的方法制备的致病细胞。

[0246] 经由尾静脉, 将 CFSE 标记的细胞转移进小鼠中, 并施用经毒素修饰的抗 - 小鼠 Embigin 抗体。作为对照, 使用大鼠 IgG 替代经毒素修饰的抗 - 小鼠 Embigin 抗体, 以相同方式处理细胞。在 4 小时至 4 天以后, 从外周血、脾、中枢神经、淋巴组织等回收细胞。在含有 12- 肉豆蔻酸 -13- 乙酸佛波醇酯、离子霉素和 BD GolgiStop (Becton, Dickinson and Company) 的培养基中处理得到的细胞 4 小时, 并用 Per-CP 标记的抗 - 小鼠 CD4 抗体 (COSMO BIO CO., LTD.)、PE 标记的抗 - 小鼠 IFN γ 抗体 (BD Biosciences) 或 PE 标记的抗 - 小鼠 IL17 抗体 (BD Pharmingen) 染色。通过流式细胞术, 评价这些样品。设定对活细胞群和 CFSE 阳性细胞的门控, 将 CD4⁺IL17⁺ 细胞归类为 Th17 细胞, 将 CD4⁺IFN γ ⁺IL17⁻ 细胞归类为 Th1 细胞, 将 CD4⁺IFN γ ⁻IL17⁻ 细胞归类为其它细胞, 并基于对照组中的每种细胞群的测量值 (作为 100%), 评价存活细胞比率。

[0247] 实施例 10. Th17 细胞衰竭的发作抑制作用的离体证实

通过下述方法, 可以证实 Th17 细胞的选择性衰竭在自身免疫病模型中的发作抑制作用。

[0248] 以与实施例 5 相同的方式, 使用 CD4⁺T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec K. K.), 从致病细胞制备 CD4⁺T 细胞。通过在含有 IL-23、IL-2、抗 - 小鼠 Embigin 抗体 (2G21、3E64)、

抗-IgG、Rat、Goat-Poly、皂草素<Rat-ZAP> (Advanced Targeting Systems) 的培养基中培养 36 小时,进行细胞除去操作。作为对照,使用大鼠 IgG 替代抗-小鼠 Embigin 抗体。或者,通过使用在实施例 6 中的磁性珠子,也可能特异性地消除 Th17。

[0249] 通过尾静脉,以 3×10^6 细胞 / 只,将经过细胞除去操作以后的细胞施用给对照组的小鼠。随着时间观察四肢和尾巴的麻痹以及体重,并评价 EAE (实验性自身免疫性脑脊髓炎) 征状。

[0250] 实施例 11. 通过抗体施用来衰竭 Th17 细胞的发作抑制作用的证实

在自身免疫病模型中,通过下述方法,可以证实 Th17 细胞的选择性衰竭对疾病发作的抑制作用。

[0251] 以与实施例 5 相同的方式,使用 CD4⁺T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec K. K.), 从致病细胞制备 CD4⁺T 细胞。以 3×10^6 细胞 / 只,从尾静脉给小鼠施用细胞。

[0252] 在细胞转移的同时,或在发作等以后,将具有细胞衰竭能力的抗-Embigin 抗体 (例如,皂草素化的抗体、具有 ADCC 活性的抗体等) 施用给小鼠,随着时间观察四肢和尾巴的麻痹以及体重,并以此为基础评价对 EAE 发作的作用。

[0253] 或者,将诸如 PLP 或 MOG 等肽施用给广泛地使用的小鼠或大鼠以制备 EAE 模型(根据在 Methods Mol Biol. 2009; 549:157-73., Brain (2004); 127:2201-2213 中描述的方法),并在肽施用的同时,在 EAE 等发作之前,施用具有细胞衰竭能力的抗-Embigin 抗体 (例如,皂草素化的抗体、具有 ADCC 活性的抗体等),并评价对 EAE 发作的作用。

[0254] 实施例 12. Th17 细胞衰竭对复发的抑制作用的证实

由于许多自身免疫疾病表现出重复的征状恶化阶段和缓解阶段,复发的抑制对于治疗而言是重要的。

[0255] 使用例如 EAE 模型,可以证实这一点。

[0256] 在 EAE 发作以后,或在 EAE 征状消退以后,将抗-Embigin 抗体施用给在 Methods Mol Biol. 2009; 549:157-73., Brain (2004); 127:2201-2213 等中描述的 EAE 模型,并评价对复发的效力。

[0257] 实施例 13. 小鼠组织中的 Embigin 表达研究

为了研究 Embigin 在小鼠的每种组织中的表达,使用 INSTA-Blot Mouse Tissue (IMGENEX) 作为各小鼠组织蛋白印迹,使其与抗-小鼠 Embigin 抗体 (IMGENEX) 和 HRP 标记的山羊抗-兔 Ig 抗体 (BIOSOURCE) 反应,以进行蛋白质印迹法。使用 ECL Plus 蛋白质印迹法检测系统 (GE Healthcare Japan) 和 LAS-3000 (Fujifilm),进行检测。

[0258] 结果显示在图 10 中。尽管证实了 Embigin 在肌肉和脾中的表达,其表达水平非常低,没有组织强烈地表达 Embigin。因此,预期含有抗-Embigin 抗体的治疗剂会表现出对身体的每个组织更少的副作用。

[0259] 实施例 14. Th17 细胞衰竭的体内证实

根据在 J. Exp. Med. (2005) 201; 233-240 中描述的方法,在体内证实了 Th17 细胞的选择性衰竭。

[0260] 与弗氏完全佐剂一起,用 PLP 部分肽 (PLP₁₃₉₋₁₅₁, SEQ ID NO: 7) 免疫 5- 周龄雌性 SJL/J 小鼠,并在 10 天后制备淋巴结细胞。在有 PLP 和 IL-23 存在下培养 5 天以后,进一步在有 IL-23 和 IL-2 存在下培养所述细胞 3 - 5 天,以得到致病细胞。使用 CD4⁺ T 细胞分

离试剂盒 (Miltenyi Biotec K.K.), 从所述致病细胞制备 CD4⁺T 细胞。该细胞群含有 30 - 50% 的 Th17 细胞。通过用于流式细胞术的 CellTrace CFSE 细胞增殖试剂盒 (Invitrogen), 用二乙酸羧基荧光素琥珀酰亚胺基酯 (CFSE) 标记该致病细胞。将抗 - 小鼠 Embigin 抗体 (3E64D1) 施用给小鼠, 并以 1.5×10^7 细胞, 将 CFSE 标记的细胞从尾静脉施用给小鼠。作为对照, 使用大鼠 IgG2b。1 天后, 从脾得到细胞。通过流式细胞术, 评价得到的细胞。计算 CFSE 阳性细胞的数目, 将对照组中的 CFSE 阳性细胞数目 (作为 100%) 的减少, 评价为细胞衰竭率。

[0261] 结果显示在图 11 中。经证实, 抗 -Embigin 抗体的施用会以剂量依赖性的方式减少转移的 CFSE 阳性细胞的数目。该结果已经证实, 抗 -Embigin 抗体可以通过所述抗体的 ADCC 和 CDC 活性来减少 Th17 细胞的数目。已经发现, 给个体施用抗 -Embigin 抗体可以在体内减少 Th17 细胞的数目。

[0262] 实施例 15. Th17 细胞衰竭的发作抑制作用的离体证实

在自身免疫病模型中, 通过下述方法证实了 Th17 细胞的选择性衰竭的发作抑制作用。

[0263] 与弗氏完全佐剂一起, 用 PLP 部分肽 (PLP₁₃₉₋₁₅₁) 免疫 5- 周龄雌性 SJL/J 小鼠, 并在 10 天后制备淋巴结细胞。在有 PLP 和 IL-23 存在下培养 5 天以后, 进一步在有 IL-23 和 IL-2 存在下培养所述细胞 3 - 5 天, 以得到致病细胞。使用 CD4⁺T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec K.K.), 从所述致病细胞制备 CD4⁺T 细胞。通过在含有 IL-23、IL-2、抗 - 小鼠 Embigin 抗体 (3E64D1) 1 μ g/mL、抗 -IgG、Rat、Goat-Poly、皂草素 <Rat-ZAP> (Advanced Targeting Systems) 的培养基中培养 36 小时, 进行细胞除去操作。作为对照, 使用大鼠 IgG2b 替代抗 - 小鼠 Embigin 抗体。在含有 12- 肉豆蔻酸 -13- 乙酸佛波醇酯、离子霉素、BD GolgiStop (Becton, Dickinson and Company) 的培养基中处理反应以后的一部分细胞 4 小时, 并用 Per-CP 标记的抗 - 小鼠 CD4 抗体 (COSMO BIO CO., LTD.)、PE 标记的抗 - 小鼠 IFN γ 抗体 (BD Biosciences) 和 Alexa488 标记的抗 - 小鼠 IL17 抗体 (BD Pharmingen) 对细胞染色。通过流式细胞术, 评价这些样品。使用的流式细胞计是 FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company)。将 CD4⁺IL17⁺ 细胞归类为 Th17 细胞, 将 CD4⁺IFN γ ⁺IL17⁻ 细胞归类为 Th1 细胞, 并基于对照组中的每种细胞群的测量值 (作为 100%), 评价存活细胞比率。可以证实 Th17 细胞选择性的细胞衰竭。结果显示在图 12 中。

[0264] 以 3×10^6 细胞 / 只, 将在细胞除去操作以后的细胞或对照组的细胞从尾静脉转移至小鼠, 并随着时间观察四肢和尾巴的麻痹以及体重, 并以此为基础评价实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 的症状。根据下述标准, 以评分来显示症状的严重性水平。

0 : 没有症状

0.5 : 尾巴轻度麻痹

1 : 尾巴麻痹

2 : 后爪轻度麻痹

3 : 后爪中等至严重麻痹, 或前肢轻度麻痹

4 : 后爪完全麻痹, 或前肢中等至严重麻痹

5 : 四肢麻痹或处于生死攸关期

6 : 死亡

结果显示在图 13 中。通过使用抗 -Embigin 抗体对 Th17 细胞的选择性衰竭, 完全抑制

了 EAE 症状。

[0265] 实施例 16. 通过抗体施用实现的 Th17 细胞衰竭的发作抑制作用的证实

使用活动的 EAE 发作模型(它是一种自身免疫病模型),证实了抗 -Embigin 抗体的 EAE 发作抑制作用。

[0266] (1) 活动的 EAE 发作模型的制备

使用 EAE 小鼠,它是一种多发性硬化动物模型。通过 SD. Miller 等人的方法 (Curr. Protoc. Immunol. 2010; 88:15.1.1-15.1.20.) 引起 EAE。也就是说,将与弗氏完全佐剂混合的 PLP 部分肽 (PLP₁₃₉₋₁₅₁) (150 μg) 皮下地注射给 9- 周龄雌性 SJL/J 小鼠 (购自 CHARLES RIVER) 的下背部。随时间观察四肢和尾巴的麻痹以及体重,并评价 EAE 症状。EAE 症状的评分遵循实施例 15。

[0267] (2) 抗体施用和用于预防疾病发作的评价

将抗 -Embigin 抗体 (3E64D1) 悬浮于 PBS 溶液中,并以 0.3 μg/ 小鼠,静脉内地施用给在上述 (1) 中制备的小鼠。将大鼠 IgG2b 静脉内地施用给对照组。在肽致敏以后第 7 天和第 14 天进行施用,每天 1 次。随时间观察四肢和尾巴的麻痹以及体重,并评价 EAE 症状。

[0268] 结果显示在图 14 中。抗 -Embigin 抗体的施用完全抑制了 EAE 病状的发作。所述结果已经证实,抗 -Embigin 抗体可以抑制多发性硬化 (MS) 的发作。

[0269] 实施例 17. Th17 细胞衰竭对复发的抑制作用的证实

由于许多自身免疫疾病表现出重复的症状恶化阶段和缓解阶段,复发的抑制对于治疗而言是重要的。

[0270] 使用 EAE 模型证实了这一点。在 EAE 发作以后,将抗 -Embigin 抗体施用给在 Methods Mol Biol. 2009; 549:157-73., Brain (2004); 127:2201-2213 等中描述的 EAE 模型,并评价对复发的效力。使用临床评分和体重作为指标,将在肽致敏以后第 12 天表现出发作的动物分组。在肽免疫接种第 12 天分组以后马上,和在第 19 天,静脉内地施用抗 -Embigin 抗体 (3E64D1),每天 1 次。此后,评价对 EAE 症状的作用。EAE 症状的评分遵循在实施例 15 中所示的标准。

[0271] 结果显示在图 15 中。经证实,抗 -Embigin 抗体的施用会快速地降低临床评分。在对照组中没有观察到在第 23 天的恶化。该结果已经证实,抗 -Embigin 抗体会促进多发性硬化 (MS) 缓解的诱导并抑制恶化,且因此,它可以用作多发性硬化的缓解诱导剂或恶化抑制剂。

[0272] 工业实用性

根据本发明,可以提供自身免疫疾病(诸如多发性硬化等)和变应性疾病的治疗剂以及针对 Th17 细胞的细胞毒性剂。此外,本发明也可以提供可用于药物递送系统中的抗 -Embigin 抗体,所述药物递送系统可以将药物等选择性地且有效地递送给 Th17 细胞,以及 Th17 细胞标志物、用于 Th17 细胞检测的试剂和方便的 Th17 细胞检测方法。

[0273] 本申请是基于在日本提交的专利申请号 2010-127316 (提交日:2010 年 6 月 2 日),其内容全部并入本文中。

tttacaagtc cacctctcag agaagaaata atggcaaata acttttcctt ggagagtc	180
aacatatcac tgactgaaca ttctagtagt ccagtagaaa aaaatatcac tttagaaagg	240
ccttctaagt taaatctcac atgccagttc acaacatctg gggatttgaa tgcagtaaat	300
gtgacttggg aaaaagatgg tgaacaactt gagaataatt atcttgtcag tgcaacagga	360
agcaccttgt ataccaata caggttcacc atcattaata gcaaacaat gggaagttat	420
tcttgtttct ttcgagagga aaaggaacaa aggggaacat ttaatttcaa agtccctgaa	480
cttcatggga aaaacaagcc attgatctct tacgtagggg attctactgt cttgacatgt	540
aaatgtcaaa attgttttcc tttaaattgg acctggtaca gtagtaatgg gaggtaaaag	600
gttctgtttg gtgttcaaat gaataaatat gtgatcaatg gaacatatgc taacgaaaca	660
aagctgaaga taacacaact tttggaggaa gatggggaat cttactgggtg ccgtgcacta	720
ttccaattag gcgagagtga agaacacatt gagcttgtgg tgctgagcta tttggtgccc	780
ctcaaaccat ttcttgtaat agtggctgag gtgattcttt tagtggccac cattctgctt	840
tgtgaaaagt acacacaaaa gaaaaagaag cactcagatg aggggaaaga atttgagcag	900
attgaacagc tgaaatcaga tgatagcaat ggtatagaaa ataatgtccc cagcataga	960
aaaaatgagt ctctgggcca gtga	984

- <210> 3
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> embigin 引物

<400> 3	
gtacatgggt aatgaaaccg caca	24
<210> 4	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> embigin 引物	
<400> 4	
gcacaaccag ctcattctgc tc	22
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 36B4 引物	
<400> 5	
gaggaatcag atgaggatat ggga	24
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 36B4 引物	
<400> 6	
aagcaggctg acttggttgc	20

<210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PLP 肽

<400> 7

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe
 1 5 10

<210> 8
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 8

Met Arg Ser His Thr Gly Leu Arg Ala Leu Val Ala Pro Gly Tyr Pro
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Ala Ala Thr Arg Pro Asp Pro Ala Glu
 20 25 30

Gly Asp Pro Thr Asp Pro Thr Phe Thr Ser Leu Pro Val Arg Glu Glu
 35 40 45

Met Met Ala Lys Tyr Ser Asn Leu Ser Leu Lys Ser Cys Asn Ile Ser
 50 55 60

Val Thr Glu Lys Ser Asn Val Ser Val Glu Glu Asn Val Ile Leu Glu

65	70	75	80
Lys Pro Ser His Val Glu Leu Lys Cys Val Tyr Thr Ala Thr Lys Asp	85	90	95
Leu Asn Leu Met Asn Val Thr Trp Lys Lys Asp Asp Glu Pro Leu Glu	100	105	110
Thr Thr Gly Asp Phe Asn Thr Thr Lys Met Gly Asn Thr Leu Thr Ser	115	120	125
Gln Tyr Arg Phe Ile Val Phe Asn Ser Lys Gln Leu Gly Lys Tyr Ser	130	135	140
Cys Val Phe Gly Glu Lys Glu Leu Arg Gly Thr Phe Asn Ile His Val	145	150	155
Pro Lys Ala His Gly Lys Lys Lys Ser Leu Ile Ala Tyr Val Gly Asp	165	170	175
Ser Thr Val Leu Lys Cys Val Cys Gln Asp Cys Leu Pro Leu Asn Trp	180	185	190
Thr Trp Tyr Met Gly Asn Glu Thr Ala Gln Val Pro Ile Asp Ala His	195	200	205
Ser Asn Glu Lys Tyr Ile Ile Asn Gly Ser His Ala Asn Glu Thr Arg	210	215	220

tgtaatatct cagtgacgga aaagtccaat gtatcagtag aagagaacgt aatdddggaa	240
aagcdddctc atgtggaact caaatgcgtg tacacagcaa ctaaggattd gaacttgatg	300
aatgtgactt ggaagaaaga tgatgagccc cttgagacta cgggtgactt caatacaact	360
aaaatgggca acaccttaac cagtcagtac aggttcatcg ddttdaatag caaacaattg	420
ggaaaatatt ctdgtgtctt tggagaaaag gaactaagag ggaccttdaa catccacgta	480
cccaaagctc atgggaaaaa aaagtcgttg atcgcttacg tgggggattc tactgtgctg	540
aagtgtgtat gtcaagattg tcttccttda aattggactt ggtacatggg taatgaaacc	600
gcacaggttc ccattgacgc tcaactegaat gaaaagtata tcaatcaatgg tccccatgcc	660
aatgaaacaa ggctcaagat taagcatctt tggaggaag atggaggatc ctactggtgt	720
cgtgccacct tccagtdagg ggagagtgag gagcagaatg agctggttgt gctgagcttc	780
ctggtgcccc tcaagccatt tctggccata ctdgccgaag tcaatcctctt ggtggccatc	840
attdctgcttd gtgaagtgtg cacacacaag aaaaagaatg acccagatgc tgggaaagaa	900
tdtgaacaaa ttdaacagct gaaatcagat gatagcaatg gcatagaaaa caatgtcccc	960
cggtacagaa aaactgactc tgcagatcag tga	993

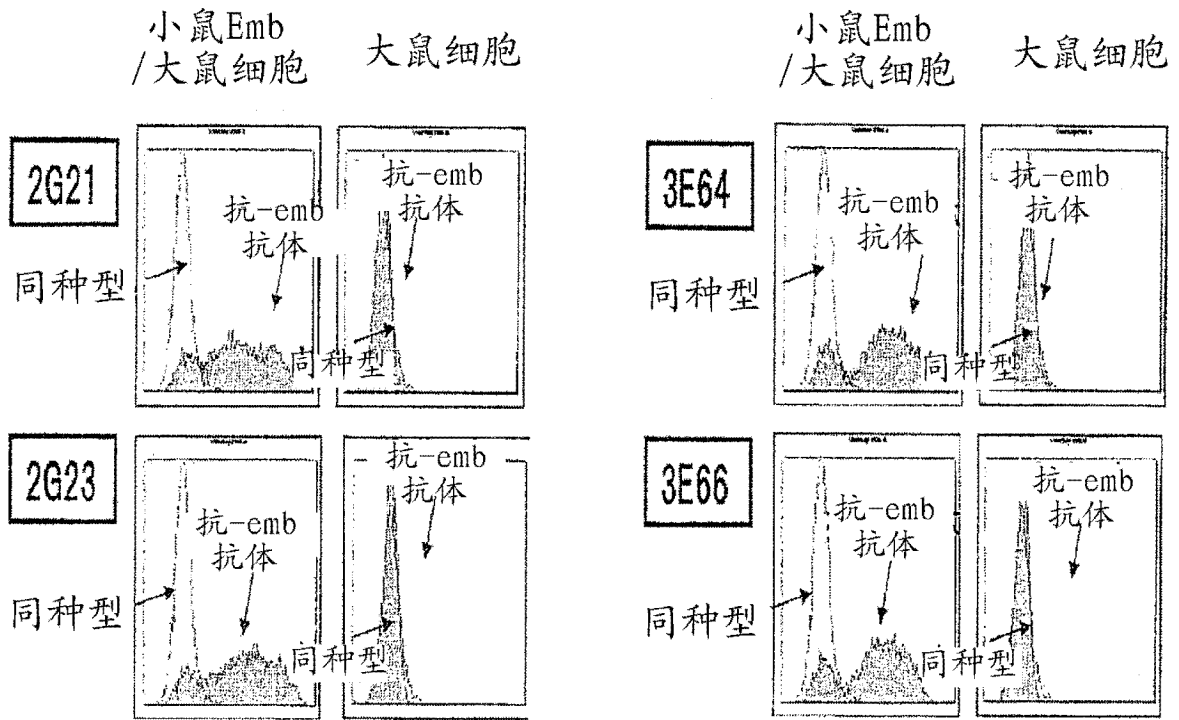


图 1

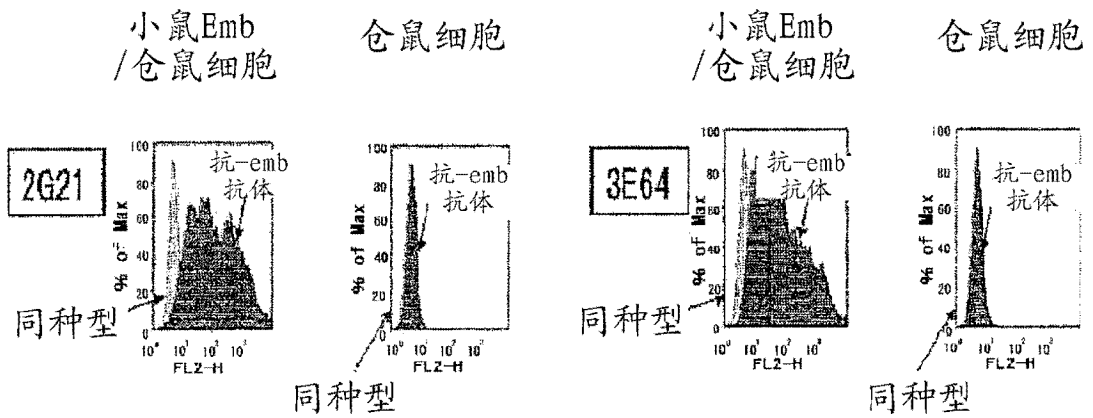


图 2



图 3

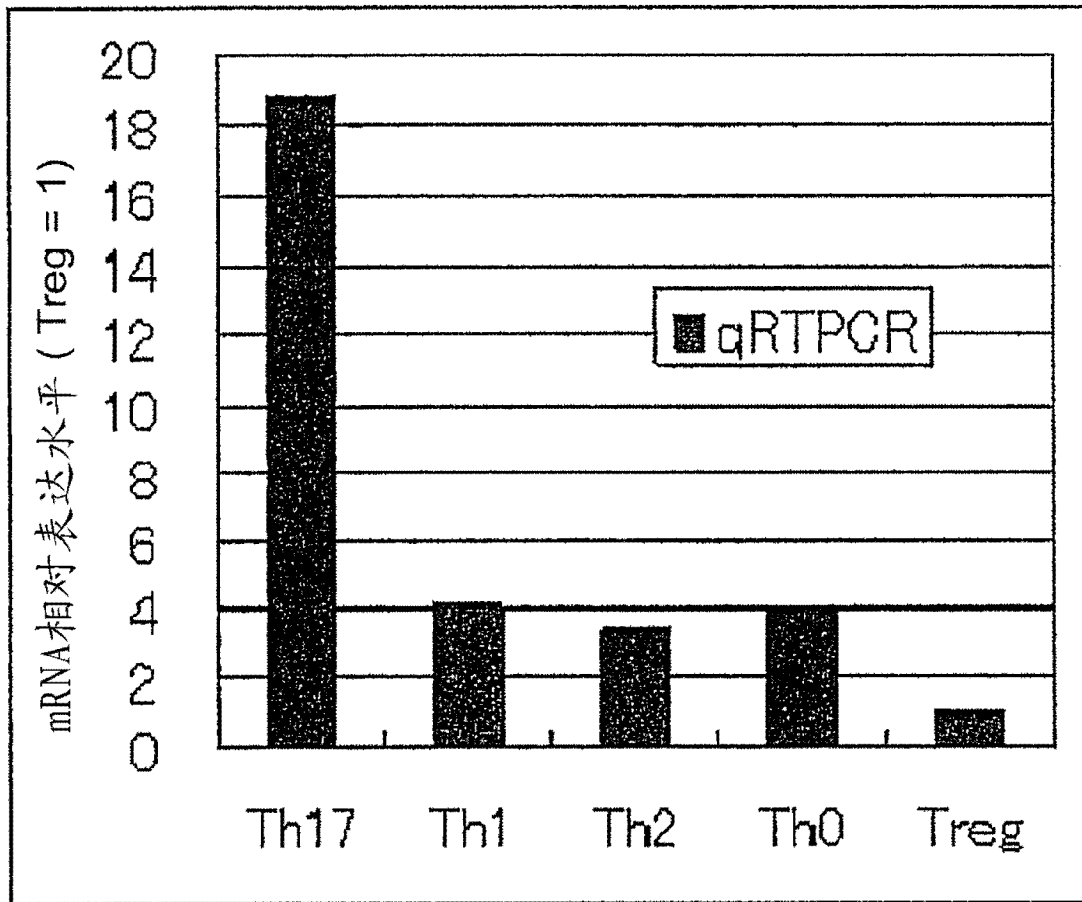
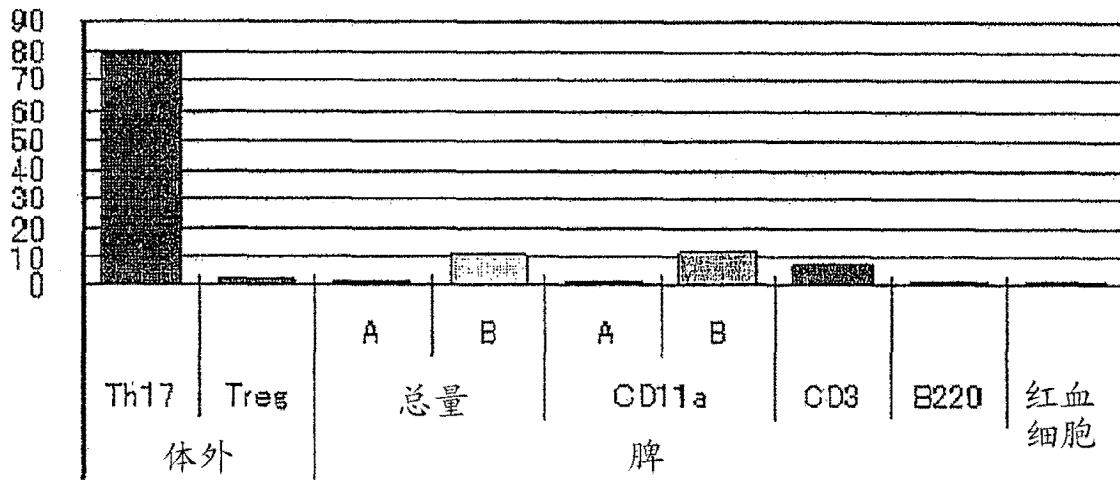


图 4

• 克隆2G23



• 克隆3E64

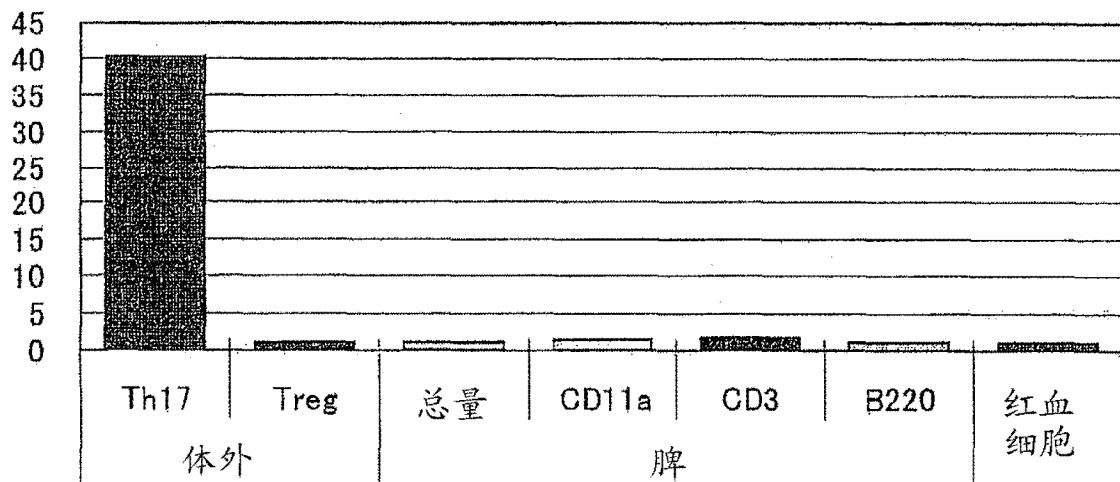


图 5

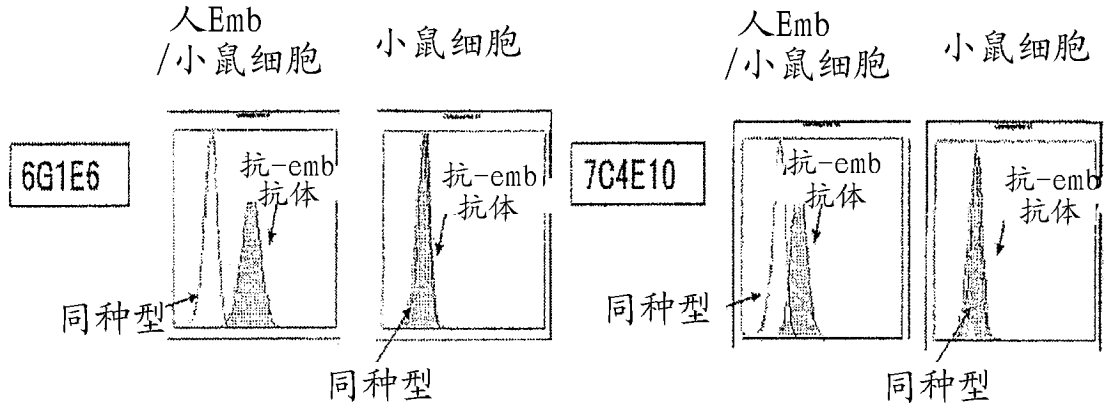


图 6

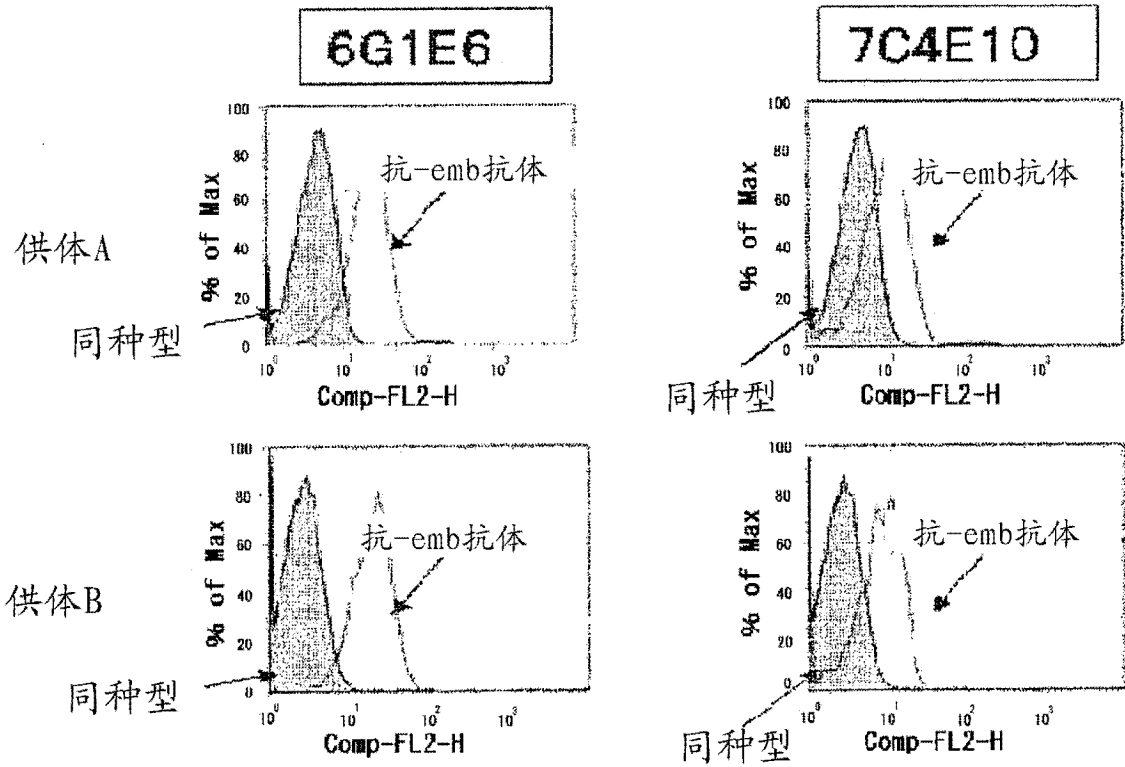


图 7

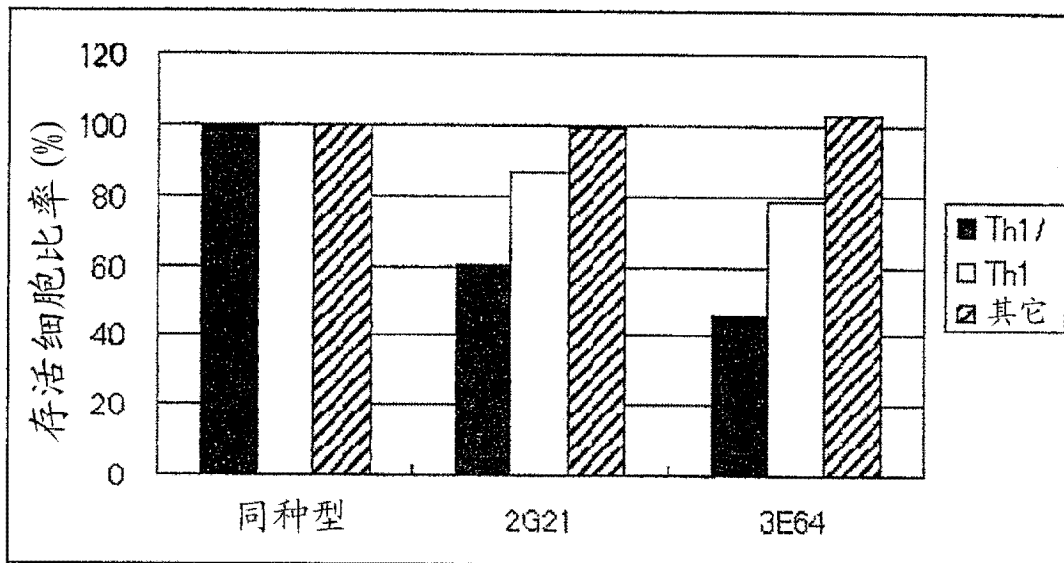


图 8

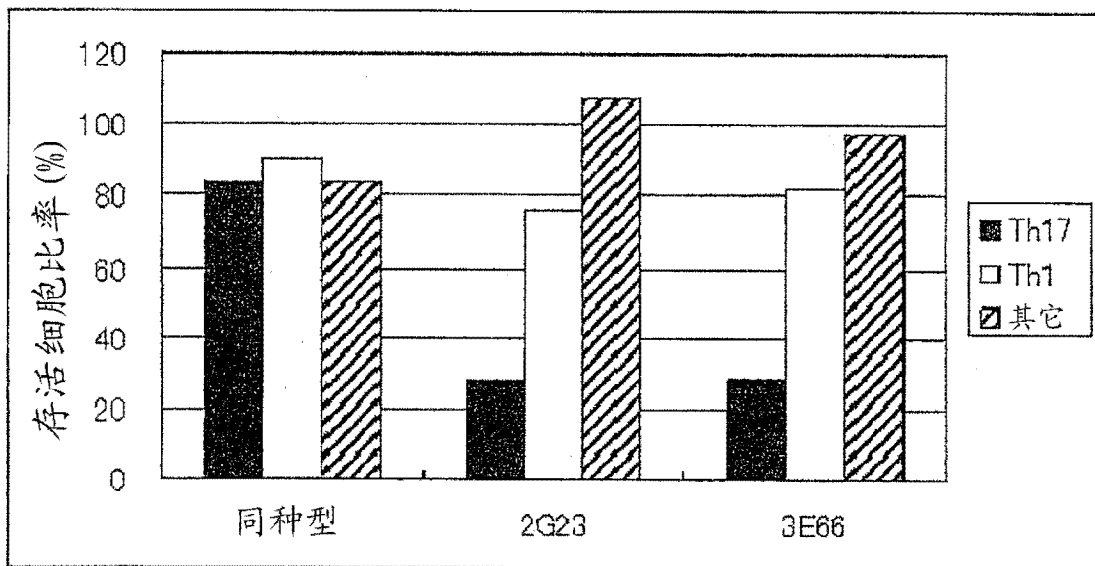


图 9

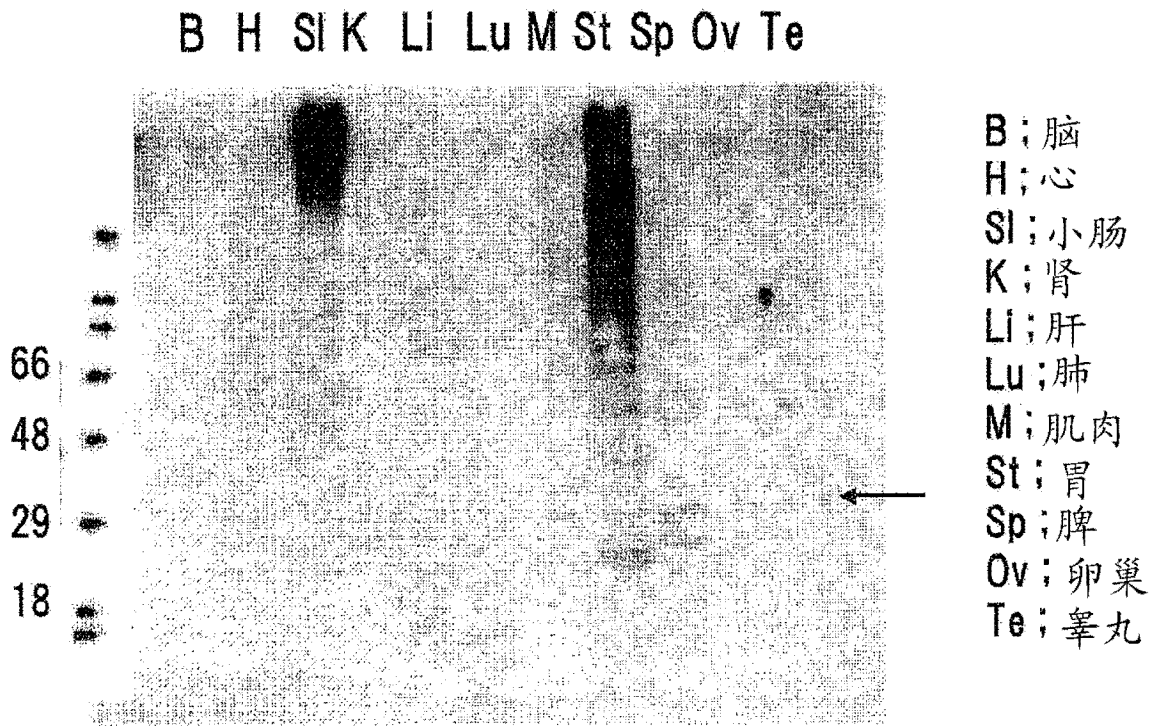


图 10

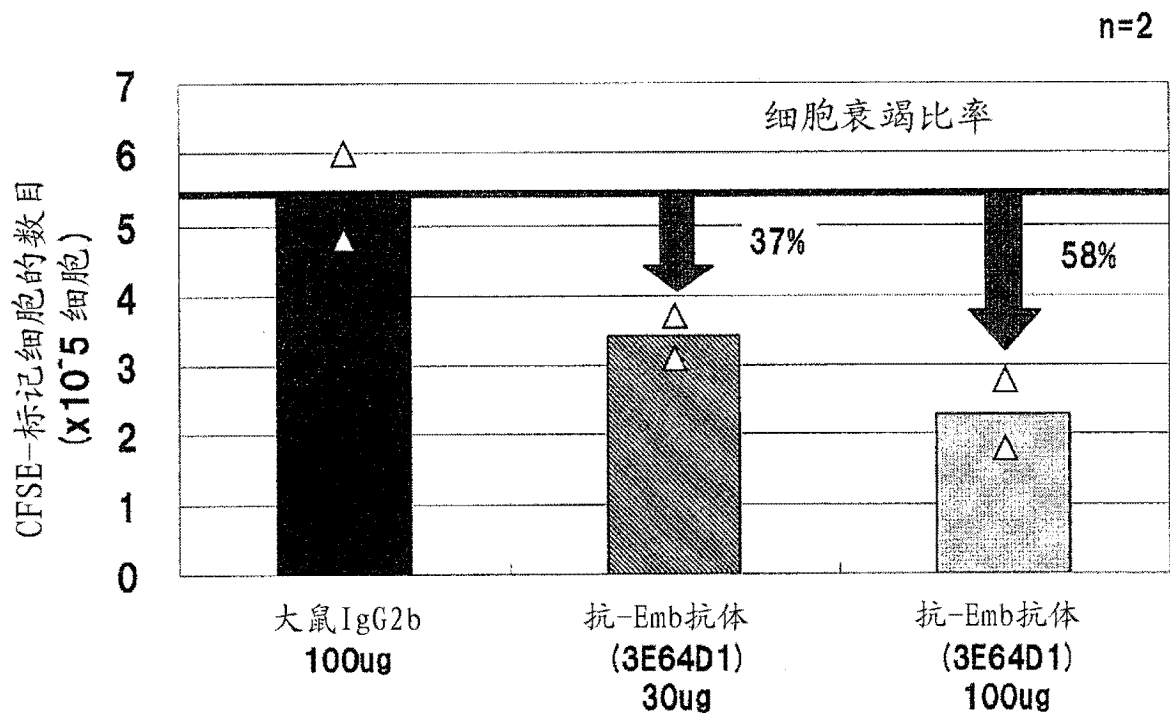


图 11

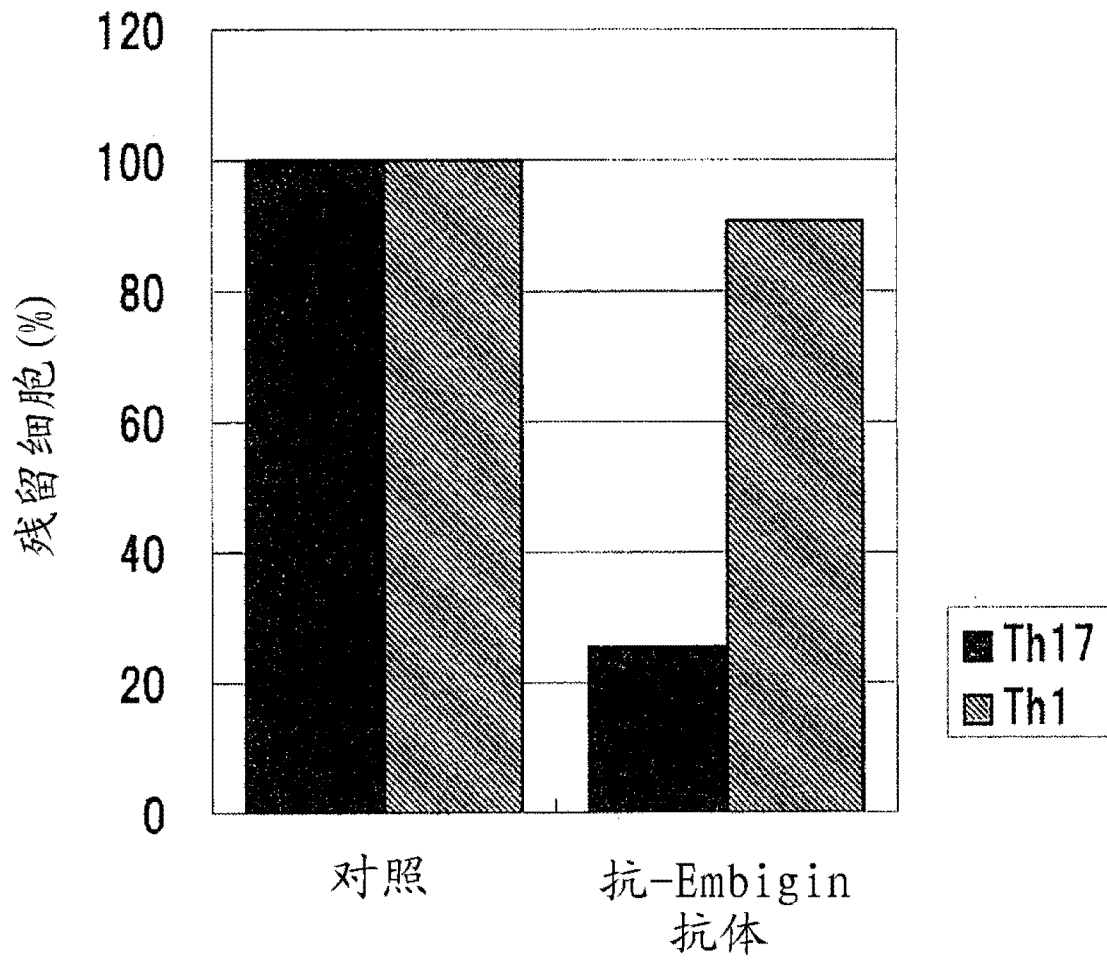


图 12

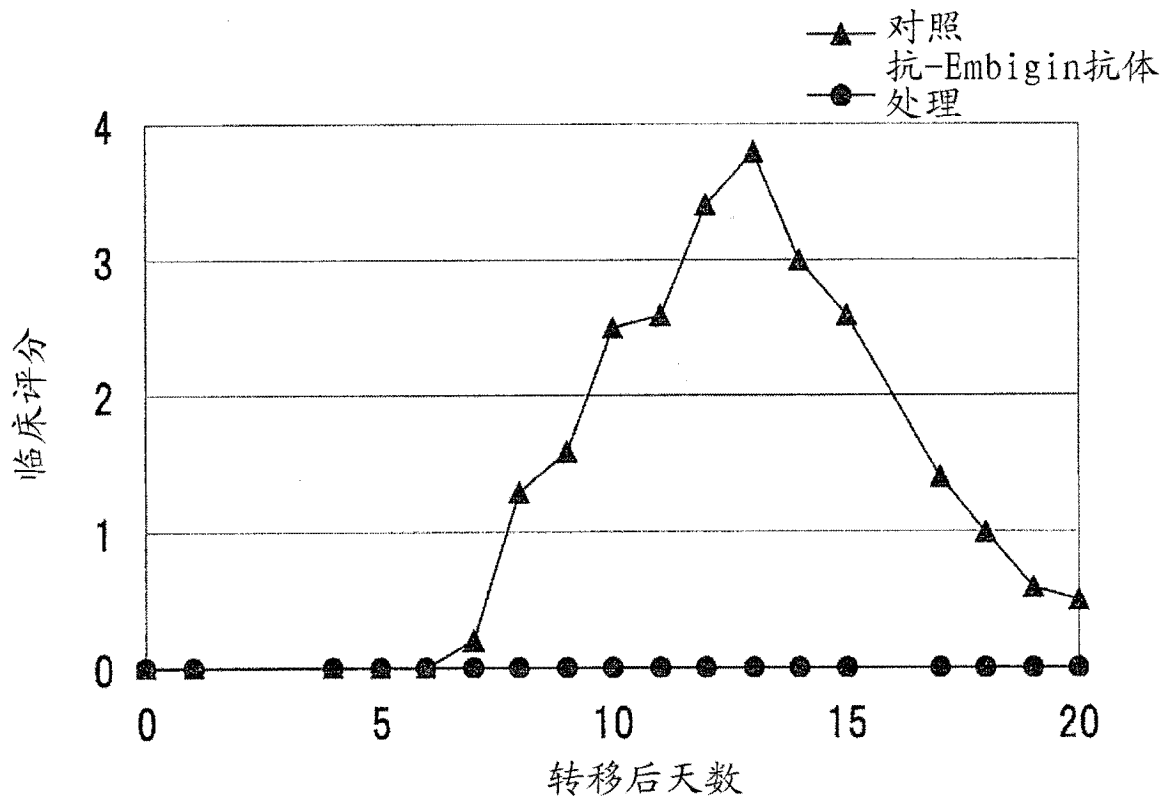


图 13

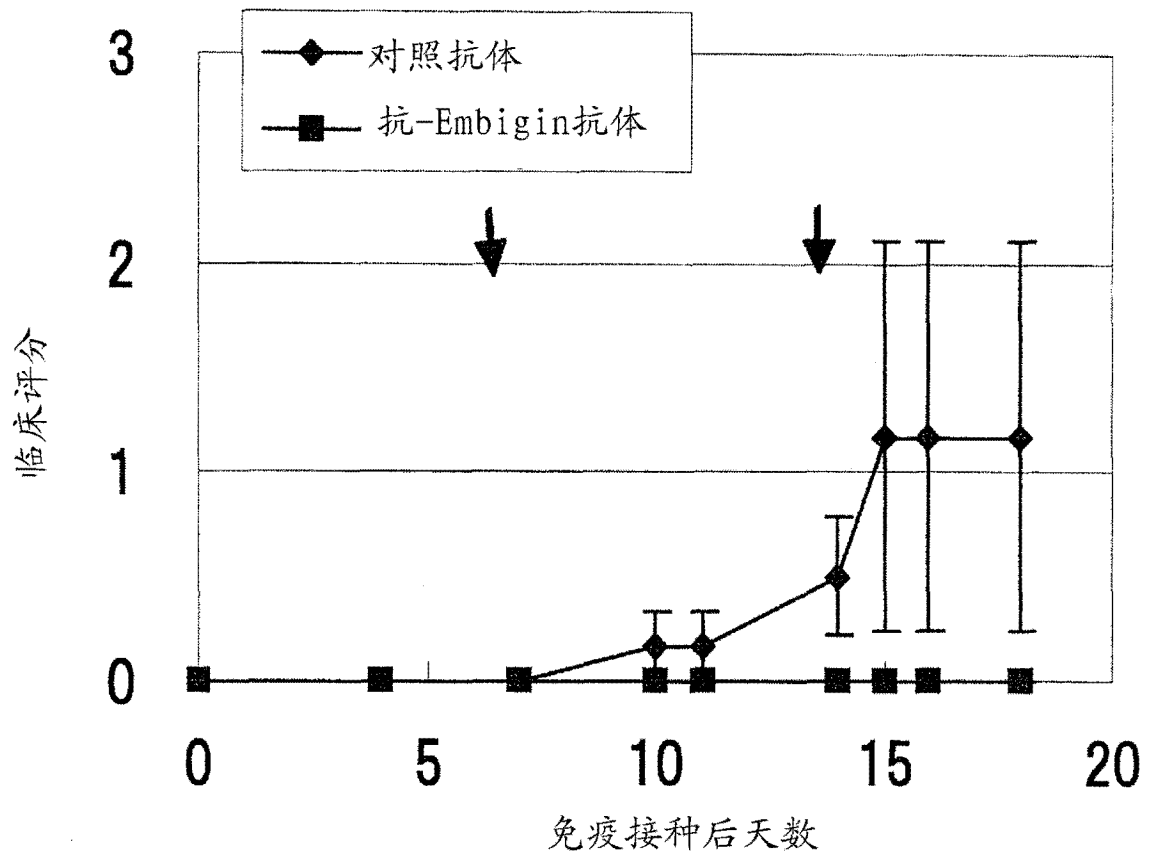


图 14

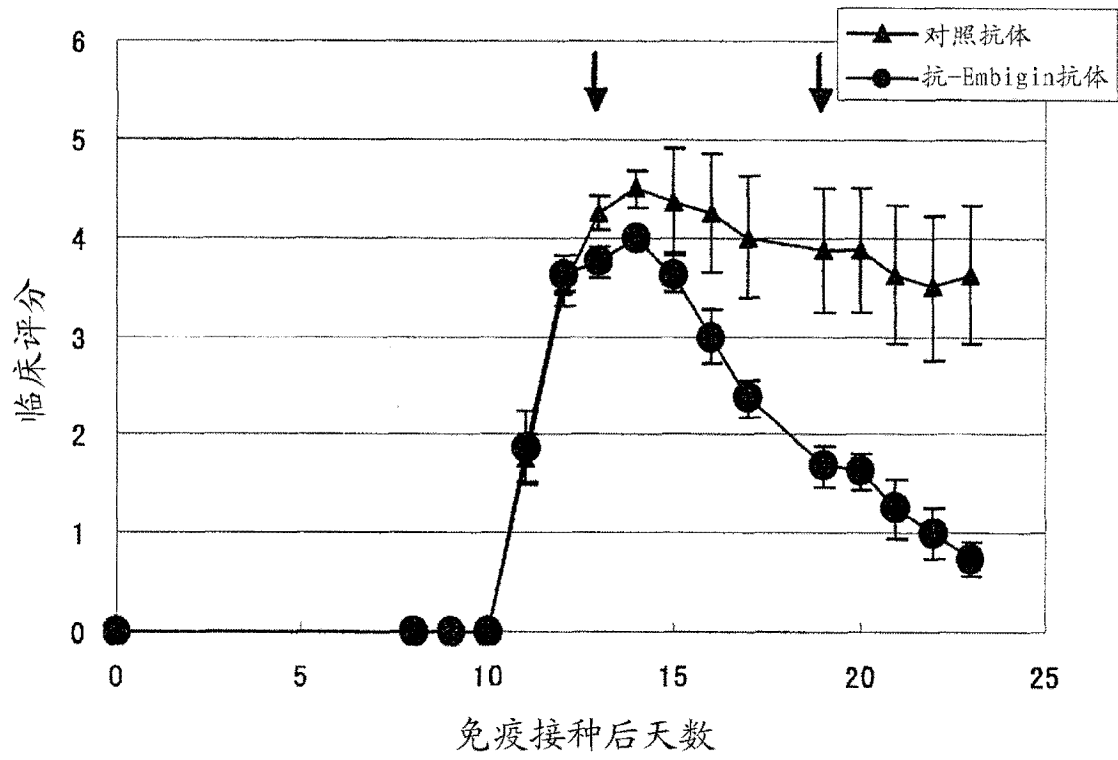


图 15

专利名称(译)	自身免疫疾病和变应性疾病的治疗药		
公开(公告)号	CN103025354A	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201180037505.X	申请日	2011-06-02
申请(专利权)人(译)	大日本住友制药株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	大日本住友制药株式会社		
[标]发明人	木野孝一 甲斐敏裕 松本光广 梶川益纪 杉浦雅仁 清水绘美		
发明人	木野孝一 甲斐敏裕 松本光广 梶川益纪 杉浦雅仁 清水绘美		
IPC分类号	A61K39/395 A61P1/04 A61P11/06 A61P17/04 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K16/28 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/39533 C12Q1/6888 G01N33/505 C07K16/2803 G01N33/6893 A61K2039/505 G01N2333/4703 A61P1/04 A61P11/06 A61P17/04 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K16/42 C07K2317/73		
代理人(译)	郭煜		
优先权	2010127316 2010-06-02 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了自身免疫疾病或变应性疾病的预防剂或治疗剂，其含有抗-Embigin抗体，特别是表现出细胞毒性或细胞毒性诱导活性的抗-Embigin抗体，还提供了涉及Th17细胞的疾病的预防剂或治疗剂以及针对Th17细胞的细胞毒性剂。另外，提供了含有抗-Embigin抗体的用于检测Th17细胞的试剂、使用所述试剂的方便的检测Th17细胞的方法、使用抗-Embigin抗体以Th17细胞选择性的方式有效地递送药物等的方法、以及针对Th17细胞的药物递送系统。

