

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102264891 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 30

(21) 申请号 200980153855. 5	<i>A61P 1/00</i> (2006. 01)
(22) 申请日 2009. 10. 26	<i>A61P 11/02</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据	<i>A61P 11/06</i> (2006. 01)
2008-281930 2008. 10. 31 JP	<i>A61P 17/00</i> (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日	<i>A61P 27/02</i> (2006. 01)
2011. 06. 28	<i>A61P 37/02</i> (2006. 01)
(86) PCT申请的申请数据	<i>A61P 37/08</i> (2006. 01)
PCT/JP2009/005625 2009. 10. 26	<i>A61P 43/00</i> (2006. 01)
(87) PCT申请的公布数据	<i>C07K 14/54</i> (2006. 01)
W02010/050167 JA 2010. 05. 06	<i>C07K 16/28</i> (2006. 01)
(71) 申请人 学校法人兵庫医科大学	<i>C12Q 1/02</i> (2006. 01)
地址 日本兵库县	<i>G01N 33/15</i> (2006. 01)
	<i>G01N 33/50</i> (2006. 01)
	<i>G01N 33/53</i> (2006. 01)

(72) 发明人 中西憲司 善本知広

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 冯雅

(51) Int. Cl.

C12N 5/07 (2006. 01)

A23K 1/16 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 45/00 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 15 页

(54) 发明名称

Th2 细胞诱导用组合物和 Th2 型疾病的治疗组合物、以及该组合物的利用

(57) 摘要

本发明提供：由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物、含有抗原和与该抗原结合的 IgE 的组合物、以及使用该复合物或该组合物的方法。通过本发明，能够将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞。另外，本发明明确了 Th2 型免疫应答的作用机制、尤其是初始 IL-4 的产生机制，因此如果使用本发明，则能够提供治疗 / 预防 Th2 型疾病的技术。

CN 102264891 A

1. 一种复合物,其特征在于:
由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成。
2. 一种组合物,其特征在于:
用于将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞;含有抗原和与该抗原结合的 IgE。
3. 一种试剂盒,其特征在于:
用于将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞;具备抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。
4. 一种将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞的方法,其特征在于包括:
第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物;
第 2 步骤,在所述复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;
第 3 步骤,将原初 T 细胞与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养。
5. 一种组合物,其特征在于:
用于生成 IL-4;含有抗原和与该抗原结合的 IgE。
6. 一种试剂盒,其特征在于:
用于生成 IL-4;具备抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。
7. 一种 IL-4 的生成方法,其特征在于包括:
第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物;
第 2 步骤,在所述复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞。
8. 根据权利要求 7 所述的生成方法,其特征在于:
还包括将原初 T 细胞与通过所述第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养的第 3 步骤。
9. 一种组合物,其特征在于:
用于生成 IgE;含有抗原和与该抗原结合的 IgE。
10. 一种试剂盒,其特征在于:
用于生成 IgE;具备抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。
11. 一种 IgE 的生成方法,其特征在于包括:
第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物;
第 2 步骤,在所述复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;
第 3 步骤,将原初 T 细胞与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养;以及
第 4 步骤,在所述抗原和抗原提呈细胞的存在下将 B 细胞与第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞一同培养。
12. 根据权利要求 11 所述的生成方法,其特征在于:
还包括在所述第 4 步骤中所生成的 IgE 的存在下培养所述抗原、所述 Th2 细胞及 B 细胞的第 5 步骤。
13. 一种组合物,其特征在于:
用于筛选针对 Th2 型疾病的治疗剂;含有抗原和与该抗原结合的 IgE。
14. 根据权利要求 13 所述的组合物,其特征在于:
所述疾病选自由花粉症、支气管哮喘、异位性皮炎、过敏性肠炎、过敏性结膜炎及过敏性鼻炎所组成的群体。
15. 一种试剂盒,其特征在于:

用于筛选针对 Th2 型疾病的治疗剂；具备抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。

16. 根据权利要求 15 所述的试剂盒，其特征在于：

所述疾病选自花粉症、支气管哮喘、异位性皮炎、过敏性肠炎、过敏性结膜炎及过敏性鼻炎所组成的群体。

17. 一种针对 Th2 型疾病的治疗剂的筛选方法，其特征在于包括：

第 1 步骤，形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物；

第 2 步骤，在所述复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞。

18. 根据权利要求 17 所述的筛选方法，其特征在于：

在候选物质的存在下或非存在下进行所述第 2 步骤，并测定第 2 步骤后的嗜碱性粒细胞的细胞表面上所提呈的 MHC-II 型分子或 CD80 分子的量。

19. 根据权利要求 17 所述的筛选方法，其特征在于：

还包括将原初 T 细胞与通过所述第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养的第 3 步骤；并且

在候选物质的存在下或非存在下进行第 2 步骤或第 3 步骤，并测定第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞的量。

20. 根据权利要求 17 所述的筛选方法，其特征在于：

还包括在所述抗原和抗原提呈细胞的存在下将 B 细胞与所述第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞一同培养而生成 IgE 的第 4 步骤；并且

在候选物质的存在下或非存在下进行所述第 2 步骤～第 4 步骤的至少 1 个步骤，并测定第 4 步骤中所生成的 IgE 的量。

21. 根据权利要求 17 所述的筛选方法，其特征在于：

还包括在所述第 4 步骤中所生成的 IgE 的存在下培养所述抗原、Th2 细胞及 B 细胞的第 5 步骤；并且

在候选物质的存在下或非存在下进行所述第 2 步骤～第 5 步骤的至少 1 个步骤，并测定第 5 步骤中所生成的 IgE 的量。

22. 根据权利要求 17 所述的筛选方法，其特征在于：

是针对 Th2 型疾病的治疗剂的筛选方法，

还包括：

将通过所述第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞投予动物而制作模型动物的步骤；

向所述模型动物投予候选物质的步骤；以及

测定被投予了所述候选物质后的模型动物中是否有针对 Th2 型疾病的改善效果的步骤。

23. 根据权利要求 17 至 22 中任一项所述的筛选方法，其特征在于：

所述疾病选自花粉症、支气管哮喘、异位性皮炎、过敏性肠炎、过敏性结膜炎及过敏性鼻炎所组成的群体。

24. 一种 Th2 型疾病的模型动物的制作方法，其特征在于包括：

第 1 步骤，形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物；

第 2 步骤，在所述复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞；以及

将在所述复合物的存在下进行培养后的嗜碱性粒细胞投予动物的步骤。

25. 根据权利要求 24 所述的制作方法，其特征在于：

所述疾病为支气管哮喘；

包括将在所述游离复合物的存在下进行培养后的嗜碱性粒细胞，经鼻投予。

26. 一种组合物，其特征在于：

用于处置 Th2 型疾病；含有清除嗜碱性粒细胞的物质或、阻碍 Fc ϵ R1 的功能的物质。

27. 根据权利要求 26 所述的组合物，其特征在于：

含有针对 Fc ϵ R1 的抗体。

28. 一种处置 Th2 型疾病的方法，其特征在于包括：

从被试验体中清除嗜碱性粒细胞的步骤；或

向被试验体投予阻碍 Fc ϵ R1 的功能的物质的步骤。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其特征在于：

包括对被试验体投予针对 Fc ϵ R1 的抗体的步骤。

Th2 细胞诱导用组合物和 Th2 型疾病的治疗组合物、以及该组合物的利用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用来诱导 Th2 细胞的组合物及该组合物的利用,尤其涉及一种用来产生引起 Th2 型免疫应答的初始 IL-4 的组合物及该组合物利用。另外,本发明涉及一种用来治疗 Th2 型疾病的组合物及该组合物的利用,尤其涉及一种用来阻断引起 Th2 型免疫应答的初始 IL-4 的产生的组合物及该组合物的利用。

背景技术

[0002] 巨噬细胞或树突状细胞在细菌侵入时,树突状细胞(DC;Dendritic cell)经由 Toll 样受体(TLR;Toll-like receptors)识别细菌,且成熟到可以表达刺激辅助分子并产生用于诱导 Th1 型免疫应答的 IL-12 和 IL-18 等。原初 T 细胞介由这些分子与巨噬细胞或树突状细胞结合,并在 IL-12 的作用下分化为 Th1 细胞。该 Th1 细胞分泌的 IFN- γ 使巨噬细胞活化,从而使吞噬、杀菌等作用活化。

[0003] 原初 T 细胞通过 IL-12 分化为 Th1 细胞,通过 IL-4 分化为 Th2 细胞。Th2 细胞与 Th1 细胞都是适应性免疫系统中的重要细胞。然而,Th2 型免疫应答的发达对先天性免疫细胞起到的作用却几乎未得到的足够认识。

[0004] 嗜碱性粒细胞和肥胖细胞是 IgE 介导性过敏性炎症中的重要效应细胞(参照非专利文献 1~4)。另外,在感染了寄生虫的宿主小鼠体内,嗜碱性粒细胞在脾脏和肝脏中的增殖以及 Th2 细胞被强力诱导(参照非专利文献 5)。这一情况显示出嗜碱性粒细胞有助于诱导和/或增强 Th2 应答。

[0005] [现有技术文献]

[0006] 非专利文献 1:Galli, S. J. Curr Opin Hematol 7:32-9(2000)

[0007] 非专利文献 2:Galli, S. J. et al. Annu Rev Immunol 23:749-86(2005)

[0008] 非专利文献 3:Kawakami, T. &Galli, S. J. Nat Rev Immunol 2:773-86(2002)

[0009] 非专利文献 4:Mukai, K. et al. Immunity 23:191-202(2005)

[0010] 非专利文献 5:Min, B. et al. J Exp Med 200:507-17(2004)

发明内容

[0011] 但是,关于为使原初 CD4⁺T 细胞分化为 Th2 细胞而需的初始 IL-4,产生该初始 IL-4 的细胞的性质尚属未知,另外,也不知晓用以产生初始 IL-4 的初期刺激是利用何种物质来进行的,因此先天免疫活性细胞分化诱导 Th2 细胞的机制尚未明确。

[0012] 本发明是鉴于所述问题研究而成的,其目的在于通过明确 Th2 型免疫应答的作用机制,尤其是通过明确初始 IL-4 的产生机制来提供一种治疗/预防 Th2 型疾病的技术。

[0013] 本发明者们发现:嗜碱性粒细胞摄取抗原,将其片段化并提呈于表面,同时产生 IL-4,在该 IL-4 的存在下识别到嗜碱性粒细胞表面所提呈的抗原肽/MHC-II 型分子复合物原初 T 细胞,被诱导为 Th2 细胞。另外还发现,当诱导为 Th2 细胞时,受到刺激的 B 细胞发

生活化,从而产生针对抗原的 IgE。通过上述的发现,本发明者等完成了本发明。即,本发明的组合物的特征在于:为了将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞,而含有嗜碱性粒细胞。本发明的组合物优选还含有抗原,更优选还含有与该抗原结合的 IgE。

[0014] 本发明的组合物可以利用在将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞的方法中。即,本发明的 Th2 细胞诱导方法的特征在于包括如下步骤:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物;第 2 步骤,在所述复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;第 3 步骤,将原初 T 细胞与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养。

[0015] 本发明的组合物的特征在于:为了生成 IL-4,而含有嗜碱性粒细胞。本发明的组合物优选还含有抗原,更优选还含有与该抗原结合的 IgE。

[0016] 本发明的组合物可以利用在生成 IL-4 的方法中。即,本发明的 IL-4 产生方法的特征在于包括如下步骤:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物;第 2 步骤,在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞。如果使用本方法,那么可以产生 IL-4、尤其是初始 IL-4(primary IL-4)。另外,本发明的 IL-4 产生方法的特征在于包括如下步骤:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物;第 2 步骤,在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;第 3 步骤,将原初 T 细胞与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养。如果使用本方法,那么可以产生 IL-4、尤其是次级 IL-4(secondary IL-4)。

[0017] 本发明的组合物的特征在于:为了生成 IgE,而含有嗜碱性粒细胞。本发明的组合物优选还含有抗原,更优选还含有与该抗原结合的 IgE。

[0018] 本发明的组合物可以利用在生成 IgE 的方法中。即,本发明的 IgE 生成方法的特征在于包括如下步骤:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物;第 2 步骤,在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;第 3 步骤,将原初 T 细胞与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养;第 4 步骤,在该抗原和抗原提呈细胞的存在下将 B 细胞与第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞一同培养。如果使用本方法,可以产生 IgE、尤其是初始 IgE(primary IgE)。另外,本发明的 IgE 生成方法的特征在于包括如下步骤:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物;第 2 步骤,在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;第 3 步骤,将原初 T 细胞与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养;第 4 步骤,在该抗原和抗原提呈细胞的存在下将 B 细胞与第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞一同培养;第 5 步骤,在第 4 步骤中所生成的 IgE 的存在下,培养该抗原、该 Th2 细胞及 B 细胞。如果使用本方法,可以产生 IgE、尤其是次级 IgE(secondary IgE)。

[0019] 本发明的组合物的特征在于:为了筛选针对 Th2 型疾病的治疗剂,而含有嗜碱性粒细胞。本发明的组合物优选还含有抗原,更优选还含有与该抗原结合的 IgE。此外,作为优选,所述 Th2 型疾病选自由花粉症、支气管哮喘、异位性皮炎、过敏性肠炎、过敏性结膜炎及过敏性鼻炎所组成的群体。

[0020] 本发明的组合物可以利用在筛选针对 Th2 型疾病的治疗剂的方法中。即,本发明的筛选方法的特征在于包括如下步骤:第 1 步骤,形成由抗原与该抗原结合的 IgE 组成的复合物;第 2 步骤,在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞。在本发明的筛选方法中,优选在候选物质的存在下或非存在下进行第 2 步骤,并测定第 2 步骤后的嗜碱性粒细胞的细胞表面上所提呈的 MHC-II 型分子或 CD80 分子的量。

[0021] 另外,本发明的筛选方法中,还包括:将形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的

复合物的第 1 步骤原初 T 细胞,与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养的第 3 步骤,并且在候选物质的存在下或非存在下进行第 2 步骤或第 3 步骤,并测定第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞的量。

[0022] 进而,本发明的筛选方法中,还包括:将形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物的第 1 步骤 B 细胞,在所述抗原和抗原提呈细胞的存在下与第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞一同培养而生成 IgE 的第 4 步骤,并且在候选物质的存在下或非存在下进行第 2 步骤~第 4 步骤的至少 1 个步骤,并测定第 4 步骤中所生成的 IgE 的量。

[0023] 进而,本发明的筛选方法中,包括:在通过用于形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 的复合物的所述第 1 步骤、第 4 步骤所生成的 IgE 的存在下,培养所述抗原、Th2 细胞及 B 细胞的第 5 步骤;并且在候选物质的存在下或非存在下进行第 2 步骤~第 5 步骤的至少 1 个步骤,并测定第 5 步骤中所生成的 IgE 的量。

[0024] 本发明的模型动物制作方法的特征在于,为了制作 Th2 型疾病的模型动物而包括:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成的复合物;第 2 步骤,在所述复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;将在所述复合物的存在下进行培养后的嗜碱性粒细胞投予动物的步骤。此外,作为优选,所述 Th2 型疾病选自花粉症、支气管哮喘、异位性皮炎、过敏性肠炎、过敏性结膜炎及过敏性鼻炎所组成的群体。以本发明的制作方法所制作的模型动物可以是支气管哮喘的模型动物,于此情况下,优选在静脉内投予在所述复合物的存在下培养后的嗜碱性粒细胞后,经鼻投予该抗原。

[0025] 以这种制作方法制作的模型动物可以用在筛选针对 Th2 型疾病的治疗剂中。即,本发明的筛选方法的特征在于,为了筛选针对 Th2 型疾病的治疗剂而包括:向动物投予通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞来制作模型动物的步骤;向该模型动物投予候选物质的步骤;以及,测定被投予了该候选物质后的模型动物中是否有针对 Th2 型疾病的改善效果的步骤。

[0026] 本发明的组合物的特征在于:为了处置 Th2 型疾病,而含有清除嗜碱性粒细胞的物质或、阻碍 Fc ϵ R1 的功能的物质。本发明的组合物优选含有针对 Fc ϵ R1 的抗体。

[0027] 本发明的方法的特征在于,为了处置 Th2 型疾病而包括:从被试验体中清除嗜碱性粒细胞的步骤或、向被试验体投予阻碍 Fc ϵ R1 的功能的物质的步骤。本发明的方法优选包括向被试验体投予针对 Fc ϵ R1 的抗体的步骤。

[0028] 另外,本发明者们发现:优选使用利用抗原-IgE 复合物而被激活的嗜碱性粒细胞;移植至正常小鼠体内的抗原-IgE 复合物诱导由内源性的嗜碱性粒细胞引起的 Th2 应答。即,本发明的复合物的特征在于:由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成。通过本发明,可以使用外周血、脾脏、骨髓等中所存在的嗜碱性粒细胞来诱导产生 IL-4。这种嗜碱性粒细胞能够在脾脏等中诱导 Th2 应答。另外,本发明的组合物的特征在于:含有抗原和与该抗原结合的 IgE。如果使用这种组合物,那么可以生成本发明的复合物,因此可以诱导 Th2 应答。进而,本发明的试剂盒的特征在于:具备抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。如果使用这种试剂盒,那么可以生成本发明的复合物,因此可以诱导 Th2 应答。

[0029] 本发明的组合物可以用在将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞的技术中。即,本发明的组合物的特征在于:为了将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞,而含有抗原和与该抗原结合的 IgE。另外,本发明的试剂盒的特征在于:为了将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞,而具备抗原、与该抗

原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。

[0030] 本发明的组合物可以用在生成 IL-4 的技术中。即,本发明的组合物的特征在于:为了生成 IL-4,而含有抗原和与该抗原结合的 IgE。另外,本发明的试剂盒的特征在于:为了生成次级 IL-4,而具备抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。

[0031] 本发明的组合物可以用在生成 IgE 的技术中。即,本发明的组合物的特征在于:为了生成 IgE,而含有抗原和与该抗原结合的 IgE。另外,本发明的试剂盒的特征在于:为了生成 IgE,而具备抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。

[0032] 本发明的组合物可以用在筛选针对 Th2 型疾病的治疗剂的技术中。即,本发明的组合物的特征在于:为了筛选针对 Th2 型疾病的治疗剂,而含有抗原和与该抗原结合的 IgE。另外,本发明的试剂盒的特征在于:为了筛选针对 Th2 型疾病的治疗剂,而具备抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。

[0033] 本发明的组合物可以用在制作 Th2 型疾病的模型动物的技术中。即,本发明的组合物的特征在于:为了制作 Th2 型疾病的模型动物,而含有抗原和与该抗原结合的 IgE。另外,本发明的试剂盒的特征在于:为了制作 Th2 型疾病的模型动物,而具备抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。

[0034] [发明的效果]

[0035] 通过本发明,可以明确 Th2 型免疫应答的作用机制、尤其是初始 IL-4 的产生机制。另外,如果使用本发明,则能够实现 Th2 细胞诱导、IL-4 生成、IgE 生成、Th2 疾病治疗剂的筛选。进而,如果使用本发明,则能够制作 Th2 型疾病的模型动物。

附图说明

[0036] 图 1(a) 是,利用流式细胞仪对由正常小鼠或感染寄生虫的小鼠制备的脾脏非 B 非 T 细胞中的 Fc ϵ R1 和 c-kit 的表达进行分析而获得的结果、以及分离 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ 细胞(嗜碱性粒细胞)的结果的图。

[0037] 图 1(b) 是表示所分离的嗜碱性粒细胞的培养上清液中的细胞因子含量的图。

[0038] 图 1(c) 是,利用 FACS(fluorescence-activated cell sorter 荧光激活细胞分选器),对于在清除了 T 细胞的小鼠的脾细胞(Δ T 脾脏)、或来自感染寄生虫的小鼠的嗜碱性粒细胞的存在下,用 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 刺激原初 T 细胞而生成的 CD4⁺T 细胞上的细胞质 IL-4 和 IFN- γ , 进行分析而获得的结果的图。

[0039] 图 1(d) 是,在清除了 T 细胞的小鼠的脾细胞(Δ T 脾脏)、或来自感染寄生虫的小鼠的嗜碱性粒细胞的存在下,用 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 刺激原初 T 细胞而生成的 CD4⁺T 细胞上的 IL-33R α 链的表达的图。

[0040] 图 2(a) 是,利用各种表面标记物对源于骨髓的经 FACS 分选的嗜碱性粒细胞和肥胖细胞、以及清除了 T 细胞的脾细胞(Δ T 脾脏)进行染色而获得的结果的图。

[0041] 图 2(b) 是,利用流式细胞仪对源于骨髓的经 FACS 分选的嗜碱性粒细胞和肥胖细胞的 MHC-II 型 (I-A) 和 Fc ϵ R1 的表达进行分析而获得的结果的图。

[0042] 图 2(c) 是,就 c-kit 和 CD203c(左)以及 CD203c⁺c-kit⁻ 细胞中的 HLA-DR(右)的表达,利用流式细胞仪,对在人类 IL-3 的存在下进行培养的 CD34⁺ 脐带血细胞进行分析而获得的结果的图。

[0043] 图 3(a) 是,对在清除了 T 细胞的小鼠脾细胞 (Δ T 脾脏)、源于骨髓的纯化嗜碱性粒细胞或肥胖细胞的存在下,用 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 刺激原初 T 细胞而生成的 CD4⁺T 细胞中的 IL-4 及 IFN- γ 的表达,利用 FACS 进行分析而获得的结果的图。为了诱导成 Th2 细胞,进一步向培养物中添加了 IL-4 (1000U/mL) (Th2 条件)。

[0044] 图 3(b) 是,对在源于骨髓的纯化嗜碱性粒细胞 (WT:野生型小鼠;G4/G4:IL-4 缺损小鼠) 或脾脏 DC 的存在下,用 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 刺激原初 T 细胞而生成的 CD4⁺T 细胞中的 IL-4 和 IFN- γ 的表达,利用 FACS 进行分析而获得的结果的图。

[0045] 图 3(c) 是,对在清除了 T 细胞的小鼠脾细胞 (Δ T 脾脏)、源于骨髓的纯化嗜碱性粒细胞的存在下,用 DNP-OVA 刺激原初 T 细胞而生成的 CD4⁺T 细胞中的 IL-4 和 IFN- γ 的表达,利用 FACS 进行分析而获得的结果的图。

[0046] 图 3(d) 是,对于在清除了 T 细胞的小鼠脾细胞 (Δ T 脾脏)、源于骨髓的纯化嗜碱性粒细胞的存在下且在抗 DNP IgE mAb 的存在下或非存在下,用 DNP-OVA (6.25 ~ 100 μ g/mL) 刺激原初 T 细胞而生成的 CD4⁺T 细胞中的 IL-4 和 IFN- γ 的表达,用 FACS 进行分析而获得的结果的图。

[0047] 图 4(a) 是,使用与 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 一同培养的嗜碱性粒细胞或肥胖细胞来免疫正常小鼠,4 天后使用完整的 OVA 蛋白质对小鼠进行静脉内激发,在激发的 2 天后利用经 OVA 激活的 APC (Δ T-脾脏) 刺激由该小鼠制备的脾脏 CD4⁺T 细胞 5 天,并利用 ELISA 对培养上清液中的 IL-4、IL-13 及 IFN- γ 的量进行测定而获得的结果的图。

[0048] 图 4(b) 是,使用与 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 一同培养的嗜碱性粒细胞来免疫正常小鼠,1 周后使用完整的 OVA 蛋白质对小鼠进行静脉内激发,利用 ELISA 对在激发当天自该小鼠回收的血清中的 OVA 特异性 IgE 抗体和 IgG1 抗体进行测定而获得的结果的图。

[0049] 图 4(c) 是,使用与 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 一同培养的嗜碱性粒细胞来免疫正常小鼠,1 周后使用完整的 OVA 蛋白质对小鼠进行静脉内激发,在激发的 2 周后利用经 OVA 激活的 APC (Δ T-脾脏) 刺激由该小鼠制备的脾脏 CD4⁺T 细胞 5 天,并利用 ELISA 对培养上清液中的 IL-4、IL-13 及 IFN- γ 的量进行测定而获得的结果的图。

[0050] 图 4(d) 是,使用与 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 一同培养的嗜碱性粒细胞来免疫正常小鼠,1 周后使用完整的 OVA 蛋白质对小鼠进行静脉内激发,在激发的 2 周后对由该小鼠制备的脾脏中的 CD4⁺CD62L^{low} IL33R α ⁺Th2 细胞的比例进行测定而获得的结果的图。

[0051] 图 4(e) 是,根据作为 IL-4 的报告基因的表达,对注入图中所示用量的 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 前后时的小鼠外周血、脾脏、骨髓中的 IL-4 产生进行确认的结果图。

[0052] 图 4(f) 是,在注入图中所示用量的 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 前后向小鼠腹腔内投予抗 Fc ϵ R1 α (MAR-1),并在注入 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 4 天后由该小鼠制备脾脏 CD4⁺T 细胞,利用经 OVA 激活的 APC (Δ T-脾脏) 刺激该脾脏 CD4⁺T 细胞 5 天,并利用 ELISA 对培养上清液中的 IL-4、IL-13 及 IFN- γ 的量进行测定而获得的结果的图。

[0053] 图 4(g) 是,在注入图中所示用量的 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 前后向小鼠腹腔内投予抗 Fc ϵ R1 α (MAR-1),并在注入 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 4 天后由该小鼠制备脾脏 CD4⁺T 细胞,利用经 OVA 激活的 APC (Δ T-脾脏) 刺激该脾脏 CD4⁺T 细胞 5 天,并利用 ELISA 对培养上清液中的 IL-4、IL-13 及 IFN- γ 的量进行测定而获得的结果的图。

[0054] 图 4(h) 是,在注入 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 4 天后,使用完整的 OVA 蛋白质对被注入

了图中所示用量的 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 的小鼠进行静脉内激发, 并利用 ELISA 对在激发当天自该小鼠回收的血清中的 OVA 特异性 IgE 抗体和 IgG1 抗体进行测定而获得的结果的图。其中, 为了减少或增加嗜碱性粒细胞的数量, 而对小鼠注入了抗 Fc ϵ R1 α (MAR-1)。

[0055] 图 4(i) 是, 在注入 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 4 天后, 使用完整的 OVA 蛋白质对被注入了图中所示用量的 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 的小鼠进行静脉内激发, 并利用 ELISA 对在激发当天自该小鼠回收的血清中的 OVA 特异性 IgE 抗体和 IgG1 抗体进行测定而获得的结果的图。其中, 为了减少或增加嗜碱性粒细胞的数量, 而对小鼠注入了 IL-3。

[0056] 图 5 是由嗜碱性粒细胞驱动的 Th2 细胞的细胞因子产生的示图; 图 5 表示了, 在清除了 T 细胞的小鼠脾细胞 (Δ T 脾脏) 的存在下, 或在来自感染了寄生虫的小鼠的嗜碱性粒细胞的存在下, 利用 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 刺激原初 T 细胞 7 天, 然后在经照射的清除了 T 细胞的小鼠脾细胞的存在下且在 IL-33 的存在或非存在下, 使用 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 激发所生成的 CD4⁺T 细胞 48 小时, 并对所回收的上清液中的各种细胞因子的产生进行实验而获得的结果。

[0057] 图 6(a) 是, 将小鼠骨髓细胞与 IL-3 一同培养 10 天, 利用流式细胞仪分析 Fc ϵ R1 和 c-kit 的表达, 接着利用 FACS Aria 对 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ (嗜碱性粒细胞) 的细胞群与 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁺ (肥胖细胞) 的细胞群进行分拣而获得的结果的图。

[0058] 图 6(b) 是利用电子显微镜观察所分拣的 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ (嗜碱性粒细胞) 和 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁺ (肥胖细胞) 的细胞群而获得的结果的图。

[0059] 图 6(c) 是, 对通过阴性分选而浓缩的人类外周血单核细胞的, 刚分选后的 (左) 以及在人类 IL-3 的存在下培养了 24 小时后 (右) 的 HLA-DR 与 CD203c 的表达进行测定而获得的结果的图。

[0060] 图 6(d) 是表示所分拣的 CD203c⁺/HLA-DR⁺ 细胞群的吉姆萨染色结果 (左: 100 \times) 和电子显微镜观察 (右) 结果的图。

[0061] 图 7 是表示嗜碱性粒细胞诱导性的抗原特异性 T 细胞增殖的图; 图 7 是, 用 OVA₃₂₃₋₃₃₉ (1 μ M), 或用抗 DNP IgE mAb 的存在下或非存在下的 DNP-OVA, 在经照射的 Δ T 脾脏或嗜碱性粒细胞的存在下刺激原初 T 细胞 4 天, 并测定最终 16 小时期间的 DNA 合成而获得的结果的图。

[0062] 图 8(a) 是, 用 OVA₃₂₃₋₃₃₉, 或用抗 DNP IgE mAb 的存在下或非存在下的 DNP-OVA, 在经照射的 Δ T 脾脏或嗜碱性粒细胞的存在下刺激原初 T 细胞 24 小时, 回收上清液, 并利用 ELISA 对 IL-4 的产生进行实验而获得的结果的图。

[0063] 图 8(b) 是, 在抗 DNP IgE mAb 的存在下或非存在下, 用 DNP-OVA 刺激源于骨髓的经 FACS 分拣的嗜碱性粒细胞或肥胖细胞 16 小时, 回收上清液, 并利用 ELISA 对 IL-4 或 IL-13 的产生进行实验而获得的结果的图。

[0064] 图 8(c) 是, 利用 RT-PCR, 对从源于骨髓的经 FACS 分拣的嗜碱性粒细胞或肥胖细胞中提取的 mRNA, 就 TLR 基因和 β -肌动蛋白的表达进行分析而获得的结果的图。

[0065] 图 8(d) 是, 利用 IL-3 和 IL-18、IL-33、LPS 或 PGN 刺激源于骨髓的经 FACS 分拣的嗜碱性粒细胞或肥胖细胞 24 小时, 回收上清液, 并利用 ELISA 对 IL-4、IL-6 或 IL-13 的产生进行实验而获得的结果的图。

[0066] 图 9(a) 是, 利用流式细胞仪, 对由腹腔内被授予了抗小鼠 Fc ϵ 1 α (MAR-1(+)) 或 PBS (MAR-1(-)) 的小鼠在最终授予的 2 天后制备的脾脏中的嗜碱性粒细胞的数量, 进行定

量而获得的结果的图。

[0067] 图 9(b) 是,利用流式细胞仪,对由腹腔内被授予了抗小鼠 $Fc \epsilon 1 \alpha$ (MAR-1(+)) 或 PBS(MAR-1(-)) 的小鼠在最终授予的 2 天后制备的肝脏中的嗜碱性粒细胞的数量,进行定量而获得的结果的图。

[0068] 图 9(c) 是,向腹腔内被授予了抗小鼠 $Fc \epsilon 1 \alpha$ (MAR-1(+)) 或 PBS(MAR-1(-)) 的小鼠,与 MAR-1 或 PBS 一起注入 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 3 天,并利用 OVA 进行腹腔内激发后,进而利用 MAR-1 或 PBS 进行处理所制备的血液中的嗜碱性粒细胞数量的定量结果图。

[0069] 图 9(d) 是,向腹腔内授予了抗小鼠 $Fc \epsilon 1 \alpha$ (MAR-1(+)) 或 PBS(MAR-1(-)) 的小鼠,与 MAR-1 或 PBS 一起注入 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 3 天,并利用 OVA 进行腹腔内激发后,进而利用 MAR-1 或 PBS 进行处理所制备的脾脏中的嗜碱性粒细胞数量的定量结果图。

[0070] 图 9(e) 是,针对来自注入了 IL-3 的小鼠的嗜碱性粒细胞的频率, $Fc \epsilon R1^+/DX5^+$ 细胞相对脾脏非 B 非 T 细胞的比例的示图。

[0071] 图 10 是,利用经抗原激活的嗜碱性粒细胞或 IgE 复合物在体内诱导 Th2/IgE 的机制的示意图。

具体实施方式

[0072] (1 :嗜碱性粒细胞及其利用)

[0073] 现已知嗜碱性粒细胞和肥胖细胞是过敏性炎症的效应细胞。此次,本发明者们发现嗜碱性粒细胞表达主要组织相容性抗原 II 型分子和 CD80 分子,并且发现嗜碱性粒细胞将抗原摄入细胞内,进而使源于抗原的肽片段以与 II 型分子结合的形态表达于细胞表面,且产生 IL-4。进而发现,如果将这种嗜碱性粒细胞移植入正常小鼠体内,那么会诱导出抗原特异性 Th2 细胞,进而如果静脉授予 OVA 溶液,那么会诱导产生 OVA 特异性 IgE ;如果经鼻授予,那么会诱导支气管哮喘。如此,本发明是基于本领域技术人员所无法容易预测的新颖见解而完成的。

[0074] 本发明的组合物的特征在于含有嗜碱性粒细胞。如上所述,本发明者们发现 :嗜碱性粒细胞摄取抗原后,将其片段化并提呈于表面,且产生 IL-4,在该 IL-4 的存在下被提呈至识别嗜碱性粒细胞表面的抗原肽 /MHC-II 型分子复合物被原初 T 细胞识别后,该原初 T 细胞分化为 Th2 细胞。还发现,当诱导出 Th2 细胞时,B 细胞会活性化,且产生针对抗原的 IgE。从而,本发明者们完成了本发明。即,本发明的组合物适于自原初 T 细胞向 Th2 细胞的诱导、IL-4 的生成、IgE 的生成等。

[0075] 为了摄取抗原且将其片段化并提呈于表面,本发明的组合物含有嗜碱性粒细胞即可,但也可以还含有靶抗原,为了进一步促进靶抗原的摄取,优选还含有与该抗原结合的 IgE。进而,为了促进需被摄入嗜碱性粒细胞内的抗原-IgE 复合物的形成,也可以向抗原连接半抗原。于此情况下,IgE 也可以是抗半抗原 IgE,在本说明书中,抗半抗原 IgE 也属于与该抗原结合的 IgE 的范畴。

[0076] 本发明所使用的优选嗜碱性粒细胞可以由各种组织制备,优选源于脾脏、脊髓等组织的嗜碱性粒细胞。由于生物体内所存在的嗜碱性粒细胞的比例非常小,所以更优选将自组织中取得的嗜碱性粒细胞在活体外培养,使之增殖并使用。本发明所使用的优选抗原是能够成为各种疾病的相关抗原(即免疫原)的蛋白质(包括肽)即可,其没有特别限定。

由于本领域技术人员充分知道引起 Th2 型疾病的抗原,所以可以基于周知技术而容易地获取本发明所使用的优选抗原。另外,获取了靶抗原(免疫原)的本领域技术人员可以基于周知技术容易地获得本发明中所优选使用的 IgE。此外,在本说明书中,“Th2 型疾病”是指因诱导出 Th2 细胞而引起的过敏性疾病,其可以与“Th2 型过敏性疾病”交换使用。作为 Th2 型疾病,可以列举花粉症、支气管哮喘、异位性皮炎、过敏性肠炎、过敏性结膜炎、过敏性鼻炎等,但并不限定是这些疾病。

[0077] “组合物”是各种成分包含在一种物质中的形态,“试剂盒”是指各种成分的至少 1 种包含在另一物质中的形态,在本说明书中,试剂盒也是组合物的一个形态。此外,术语“试剂盒”是指具备内含特定材料的容器(例如瓶(bottle)、板(plate)、试管(tube)、盘(dish)等)的包装。优选“试剂盒”中具备各材料使用方法的指示书。在本说明书中,在涉及到试剂盒的实施方式时,“具备”的状态是指内含在构成试剂盒的各容器的任一个中,但也可以将多种成分在同一容器中混合具备,或也可以具备在不同容器中。“指示书”可以书写或印刷在纸张或其他介质上,或者储存在磁带、计算机可读取的碟片(disk)或磁带(tape)、CD-ROM 等电子介质中。本发明的试剂盒也可以具备内含稀释剂、溶剂、清洗液或其他试剂的容器。进而,本发明的试剂盒也可以一并具备使用时所需的器具。

[0078] 在一个实施方式中,本发明的组合物的特征在于:是具备嗜碱性粒细胞的试剂盒。本实施方式的试剂盒优选还具备抗原,更优选还具备与该抗原结合的 IgE。

[0079] 如上所述,本发明的组合物可以用在将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞的方法中。即,本发明的 Th2 细胞诱导方法的特征在于具备:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物;第 2 步骤,在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;第 3 步骤,将原初 T 细胞与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养。

[0080] 另外,本发明的组合物可以用在生成 IL-4 的方法中。即,本发明的 IL-4 产生方法的特征在于具备:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物;第 2 步骤,在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞。如果使用本方法,那么可以产生 IL-4、尤其是初始 IL-4(primary IL-4)。另外,本发明的 IL-4 产生方法的特征在于具备:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物;第 2 步骤,在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;第 3 步骤,将原初 T 细胞与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养。如果使用本方法,那么可以产生 IL-4、尤其是次级 IL-4(secondary IL-4)。

[0081] 进而,本发明的组合物可以用在生成 IgE 的方法中。即,本发明的 IgE 生成方法的特征在于包括:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物;第 2 步骤,在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;第 3 步骤,将原初 T 细胞与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养;第 4 步骤,在该抗原和专职抗原提呈细胞的存在下,将 B 细胞与第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞一同培养。如果使用本方法,那么可以产生 IgE、尤其是初始 IgE(primary IgE)。另外,本发明的 IgE 生成方法的特征在于包括:第 1 步骤,形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物;第 2 步骤,在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞;第 3 步骤,将原初 T 细胞与通过第 2 步骤进行培养后的嗜碱性粒细胞一同培养;第 4 步骤,在该抗原和专职抗原提呈细胞的存在下,将 B 细胞与第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞一同培养而生成 IgE;第 5 步骤,在第 4 步骤中所生成的 IgE 的存在下,培养该抗原、该 Th2 细胞和 B 细胞。如果使用本方法,那么可以产生 IgE、尤其是次级 IgE(secondary IgE)。

[0082] 本发明中所培养的细胞为嗜碱性粒细胞、原初 T 细胞、Th2 细胞及 B 细胞, 这些细胞的培养次序 (培养条件) 在该领域已是周知。因此, 本领域技术人员在实施本发明时, 能够适当设计周知的培养次序。

[0083] 本发明的组合物可以良好地用于自原初 T 细胞向 Th2 细胞的诱导、IL-4 的生成、IgE 的生成等。因此, 若把使用本发明的组合物时, 自原初 T 细胞向 Th2 细胞的诱导、IL-4 的生成、IgE 的生成是否受到抑制或阻碍作为判断指标, 那么便可以筛选出针对 Th2 型疾病的治疗剂。另外, 如果使用本发明的组合物, 便可以制作 Th2 型疾病的模型动物, 如果使用该模型动物, 还可以筛选出针对 Th2 型疾病的治疗剂。

[0084] 关于 Th2 细胞因子引起的 Th2 型过敏性疾病的治疗, 目前采用的方法的目的在于对因 IgE 抗体与 Th2 细胞因子而活化的效应细胞 (肥胖细胞等) 所产生的各种化学递质进行抑制。对 Th2 细胞因子本身的产生进行抑制的 Th2 型过敏性疾病治疗药的开发尚无突破性进展。

[0085] 作为对 Th2 细胞因子本身的产生进行抑制的方法, 目前已知的有大量授予 IL-12, 或授予 IL-12 与 IL-18 的组合。IL-12 与 IL-18 的生物体内授予对各种细胞起到作用, 且诱导 IFN- γ 的产生, 所产生的 IFN- γ 发挥对细胞内寄生性病原体的感染防御作用和抗过敏性作用。但是, 由于 IL-12 与 IL-18 的组合授予会诱导 IFN- γ 的过度产生, 所以会引起过度的炎症反应, 因而肝脏毒性等副作用强, 不适合实际治疗。

[0086] 对于通过抑制自原初 CD4⁺T 细胞向 Th2 细胞的分化诱导, 以及抑制自所诱导的 Th2 细胞产生 Th2 细胞因子, 来治疗 / 预防感染症或过敏性疾病等这些 Th2 型疾病的技术而言, 大为期待的是该技术要有效且要无副作用。但是, 关于使原初 CD4⁺T 细胞发展为 Th2 细胞时所需的初始 IL-4, 产生该初始 IL-4 的细胞的性质尚属未知, 且先天免疫活性细胞对 Th2 细胞的作用机制尚不明确。

[0087] 通过本发明, 明确了引发 Th2 型免疫应答的机制。由此, 明确了用以抑制自原初 CD4⁺T 细胞向 Th2 细胞的分化诱导的医药的获得方法、或用以抑制从所诱导的 Th2 细胞产生 Th2 细胞因子的医药的获得方法。

[0088] 本发明提供一种筛选出针对 Th2 型疾病的治疗剂的方法。如上所述, 嗜碱性粒细胞摄取抗原, 且将其片段化并提呈于表面。因此, 若使候选物质存在, 而抑制或阻碍了嗜碱性粒细胞中的表面提呈, 则可以判定该候选物质对治疗 Th2 型疾病有效。

[0089] 即, 在一个实施方式中, 本发明的筛选方法的特征在于: 包括形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物的第 1 步骤以及、在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞的第 2 步骤; 在候选物质的存在下或非存在下进行第 2 步骤, 并对第 2 步骤后的嗜碱性粒细胞的细胞表面上所提呈的 MHC-II 型分子或 CD80 分子的量进行测定。对于嗜碱性粒细胞的细胞表面上所提呈的 MHC-II 型分子或 CD80 分子的量, 使用针对该些蛋白质的抗体便可以容易地测定。

[0090] 另外, 嗜碱性粒细胞摄取抗原, 且将其片段化并提呈于表面, 且产生 IL-4。原初 T 细胞在此 IL-4 的存在下识别出嗜碱性粒细胞的表面所提呈的 MHC-II 型分子 / 抗原肽复合物, 而被诱导为 Th2 细胞。因此, 若通过使候选物质存在, 而抑制或阻碍了 Th2 细胞的诱导, 便可以判定该候选物质对治疗 Th2 型疾病有效。

[0091] 即, 在一个实施方式中, 本发明的筛选方法的特征在于: 包括形成由抗原和与该抗

原结合的 IgE 作组成的复合物的第 1 步骤以及、在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞的第 2 步骤以及、将原初 T 细胞与通过第 2 步骤培养后的嗜碱性粒细胞一同培养的第 3 步骤；在候选物质的存在下或非存在下进行第 2 步骤或第 3 步骤，并测定第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞的量。所诱导的 Th2 细胞的量可以运用使用表面标记物的流式细胞仪等来容易地测定。

[0092] 此外，嗜碱性粒细胞摄取抗原，且将其片段化并提呈于表面，且产生 IL-4。原初 T 细胞在此 IL-4 的存在下识别出嗜碱性粒细胞的表面所提呈的复合物，而被诱导为 Th2 细胞，当诱导为 Th2 细胞时，B 细胞便受到 Th2 细胞的作用，而产生针对抗原的 IgE。因此，若通过使候选物质存在，而抑制或阻碍了 IgE 的产生，便可以判定该候选物质对治疗 Th2 型疾病有效。

[0093] 即，在一个实施方式中，本发明的筛选方法的特征在于：包括形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物的第 1 步骤以及、在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞的第 2 步骤以及、将原初 T 细胞与通过第 2 步骤培养后的嗜碱性粒细胞一同培养的第 3 步骤以及、在该抗原和专职抗原提呈细胞的存在下将 B 细胞与第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞一同培养而生成 IgE 的第 4 步骤；在候选物质的存在下或非存在下进行第 2 步骤～第 4 步骤中的至少 1 个步骤，并测定第 4 步骤中所生成的 IgE 的量。IgE 的量可以利用抗 IgE 抗体等而容易地测定。

[0094] 此外，所述实施方式中所测定的 IgE 是所谓的初始 IgE。如上所述，本发明还提供一种生成次级 IgE 的方法。因此，若通过使候选物质存在，而抑制或阻碍了次级 IgE 的产生，便可以判定该候选物质对治疗 Th2 型疾病有效。

[0095] 即，在一个实施方式中，本发明的筛选方法的特征在于：包括形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物的第 1 步骤以及、在该复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞的第 2 步骤以及、将原初 T 细胞与通过第 2 步骤培养后的嗜碱性粒细胞一同培养的第 3 步骤以及、在该抗原和专职抗原提呈细胞的存在下将 B 细胞与第 3 步骤中所诱导的 Th2 细胞一同培养而生成 IgE 的第 4 步骤以及、在第 4 步骤中所生成的 IgE 的存在下培养该抗原、该 Th2 细胞和 B 细胞的第 5 步骤；并且在候选物质的存在下或非存在下进行第 2 步骤～第 5 步骤中的至少 1 个步骤，并测定第 5 步骤中所生成的 IgE 的量。

[0096] 阅读了本发明的本领域技术人员可以容易地理解如下情况：如果使用后述的 Th2 型疾病的模型动物，并测定有无针对疾病的改善效果，便可以筛选出针对 Th2 型疾病的治疗剂。即，在一个实施方式中，本发明的筛选方法的特征在于：为了筛选针对 Th2 型疾病的治疗剂，而包括：在由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞的步骤；将在该复合物的存在下进行培养后的嗜碱性粒细胞投予动物而制作模型动物的步骤；对该模型动物投予候选物质的步骤；测定被投予了该候选物质后的模型动物中是否有针对 Th2 型疾病的改善效果的步骤。

[0097] 如上所述，本发明的组合物可以用在制作 Th2 型疾病的模型动物的方法中。即，本发明的模型动物制作方法的特征在于：为了制作 Th2 型疾病的模型动物而包括：在由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物的存在下培养嗜碱性粒细胞的步骤；将在该复合物的存在下进行培养后的嗜碱性粒细胞投予动物的步骤。此外，优选所述 Th2 型疾病选自自由花粉症、支气管哮喘、异位性皮炎、过敏性肠炎、过敏性结膜炎及过敏性鼻炎所组成的群。通

过本发明的制作方法所制作的模型动物可以是支气管哮喘的模型动物,于此情况下,优选经鼻投予在所述复合物的存在下进行培养后的嗜碱性粒细胞。

[0098] 本发明的模型动物的制作方法无需佐剂。针对 Th2 型疾病,至今为止已制作出大量的模型动物,但并无不使用佐剂而制作模型动物的例子。

[0099] (2:抗原-IgE 复合物及其利用)

[0100] 如上所述,此次本发明者们发现利用嗜碱性粒细胞可以诱导 Th2 应答。与此同时,发现通过将抗原-IgE 复合物移植入正常小鼠体内,可以同样地诱导 Th2 应答。具体而言,如后述实施例所示,在使用与 DNP-OVA/抗 DNP IgE 复合物一同培养的嗜碱性粒细胞进行免疫的小鼠的脾脏内,Th2 细胞迅速地被诱导。另外,在注入了 DNP-OVA/抗 DNP IgE 复合物的初次接受试验的小鼠体内,在外周血、脾脏、骨髓中初始 IL-4 的产生获得诱导,在注入了 IgE 复合物的小鼠的脾脏内,Th2 细胞迅速地被诱导。另一方面,在注入了 DNP-OVA/抗 DNP IgE 复合物的嗜碱性粒细胞枯竭小鼠(被施以 MAR-1 处理的小鼠)的脾脏内,Th2 细胞未被诱导。这些情况说明:嗜碱性粒细胞产生初始 IL-4 并接着诱导 Th2 应答,而且,由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物是致使由嗜碱性粒细胞产生初始 IL-4 的初期刺激物质。更详细而言,本发明者们的所述新颖见解为:嗜碱性粒细胞会诱导 Th2 应答,并且由 IgE 和其抗原所组成的复合物也会诱导 Th2 应答。如此,本发明是基于本领域技术人员所无法轻易预测的新颖见解而研究成的。

[0101] 即,本发明提供一种由抗原和与该抗原结合的 IgE 所组成的复合物。如果使用本发明的复合物,那么可以实现自嗜碱性粒细胞产生初始 IL-4,其结果是可以将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞,产生次级 IL-4,生成针对抗原的 IgE。进而,如果使用本发明的复合物,那么可以实现 Th2 疾病治疗剂的筛选和 Th2 型疾病模型动物的制作。

[0102] 一般而言,由于由抗原和其抗体所组成的免疫复合物可以在抗体大量存在的条件下形成,因此在生物体内可以观察到血药浓度非常高的 IgG 或 IgM。IgE 是一种免疫球蛋白,其与 IgG 和 IgM 相比,血药浓度极低。因此,关于在生物体内与抗原结合的 IgE,其已经介由其 Fc 区域而与嗜碱性粒细胞或肥大细胞发生了结合。即,在生物体内,血液中并不存在抗原-IgE 复合物,而是以抗原-IgE-细胞的复合物的形式存在,抗原-IgE-细胞的复合物与过敏性反应有关。

[0103] 本发明的复合物由抗原和与该抗原结合的 IgE 组成,该 IgE 的 Fc 区域未与细胞(例如嗜碱性粒细胞和肥大细胞)结合。就该观点而言,本发明的复合物也可以称为游离复合物。

[0104] 如此,由 IgE 和其抗原所组成的复合物在该领域中尚未被识别。此外,至今为止尚无知晓这种复合物承担了致使从嗜碱性粒细胞产生初始 IL-4 的作用,而且本领域的技术人员完全无法预料。

[0105] 此外,如上所述,为了促进需被摄入到嗜碱性粒细胞中的抗原-IgE 复合物的形成,抗原也可以与半抗原连结。于此情况下,IgE 可以是抗半抗原 IgE,在本说明书中,抗半抗原 IgE 也包括在与抗原结合的 IgE 的范畴内。

[0106] 进而,本发明提供一种用来形成所述游离复合物的组合物和试剂盒。由于本发明的组合物和试剂盒可以形成所述游离复合物,所以能够致使自嗜碱性粒细胞产生初始 IL-4,其结果是可以将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞,生成次级 IL-4,生成针对抗原的 IgE。进

而,如果使用本发明的组合物和试剂盒,那么可以实现 Th2 疾病治疗剂的筛选和 Th2 型疾病模型动物的制作。

[0107] 即,本发明的组合物和试剂盒可以是如下的组合物和试剂盒:用来致使嗜碱性粒细胞产生初始 IL-4 的组合物和试剂盒、用来将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞的组合物和试剂盒、用来生成次级 IL-4 的组合物和试剂盒、用来生成针对抗原的 IgE 的组合物和试剂盒、用来筛选 Th2 疾病治疗剂的组合物和试剂盒、以及用来制作 Th2 型疾病模型动物的组合物和试剂盒。

[0108] 本发明的组合物的特征在于含有抗原和与该抗原结合的 IgE。由于意在形成由抗原和与该抗原结合的 IgE 作组成的复合物,所以本发明的组合物优选不含能与 IgE 的 Fc 区域结合的细胞(例如嗜碱性粒细胞)。本发明的组合物所含有的抗原和 IgE 可以为复合物状态,也可以不为复合物状态。即使是非复合物状态,在组合物这种被限定的空间内存在两者的状态下向生物体提供时,组合物中的 IgE 在与生物体内的细胞结合之前与组合物中的抗原发生结合的机率非常高,其结果是可以有效地发挥本发明的效果。此外,本发明的组合物可以是独立具备抗原和与该抗原结合的 IgE 的试剂盒形态,以在限定的空间内存在两者的状态来向生物体提供即可。即,本发明的组合物只要是能够在生物体内产生 IgE-细胞的结合之前产生抗原-IgE 复合物的形态即可。

[0109] 本发明的试剂盒的特征在于:具备抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞。此外,由于意在形成所述游离复合物,所以本发明的试剂盒独立具备 IgE 与细胞即可,其形态既可以为独立具备有抗原、与该抗原结合的 IgE、嗜碱性粒细胞,也可以为独立具备嗜碱性粒细胞、以及含有抗原和与该抗原结合的 IgE 的组合物。此外,本发明的试剂盒能够在限定空间内存在抗原和与该抗原结合的 IgE 这两者的状态,来供于生物体即可,即,本发明的试剂盒是能够在生物体内发生 IgE-细胞的结合之前,使抗原-IgE 复合物得以产生的形态即可。

[0110] 此外,阅读了本说明书的本领域技术人员基于所述“嗜碱性粒细胞及其利用”栏目中所记载的内容,可容易地理解到能够实施如下方法:使用本发明的游离复合物(抗原-IgE 复合物)的将原初 T 细胞诱导为 Th2 细胞的方法、生成 IL-4 的方法、生成 IgE 的方法、筛选针对 Th2 疾病的治疗剂的方法、制作 Th2 型疾病的模型动物的方法。

[0111] (3:进一步的利用)

[0112] 如上所述,本发明者们揭示出内源性嗜碱性粒细胞的抗原提呈对于初期 Th2 应答的诱导非常重要。进而,也证实了通过清除生物体内的嗜碱性粒细胞可以阻碍 Th2 细胞的诱导。即,本发明提供一种处置 Th2 型疾病的技术。在本说明书中,术语“处置”是指减轻或消除症状,包括预防(发病前)或治疗(发病后)中的任一情况。所谓“处置 Th2 型疾病”是指抑制或阻止 Th2 细胞诱导。优选将 Th2 细胞的诱导抑制在 Th2 型疾病的症状缓解的程度,更优选将 Th2 细胞的诱导抑制在 Th2 型疾病的症状消除(即疾病治愈)的程度。

[0113] 本发明提供一种用来处置 Th2 型疾病的组合物。如上所述,能够通过从被试验体中清除嗜碱性粒细胞,来处置 Th2 型疾病。即,本发明的组合物含有清除嗜碱性粒细胞的物质即可。这种物质优选是针对 Fc ϵ R1 的抗体。另外,针对 Fc ϵ R1 的抗体是阻碍 Fc ϵ R1 的功能(例如阻碍 Fc ϵ R1 的结合)的物质。即,本发明的组合物含有阻碍 Fc ϵ R1 的功能的物质即可。本发明的组合物的形态优选是能够在血液或外周组织中清除嗜碱性粒细胞的形

态,即,优选是能够注入的形态,但不限于该形态。此外,本发明的组合物也可以以上述的试剂盒形态来提供。即,本发明提供一种用来处置 Th2 型疾病的试剂盒。无论是组合物形态还是试剂盒形态,本领域技术人员都可以适宜选择本发明的有效成分以外的其他成分。

[0114] 本发明还提供一种处置 Th2 型疾病的方法。本发明的方法可以是使用上述组合物的方法,即,本发明的方法包括从被试验体中清除嗜碱性粒细胞的步骤、或向被试验体授予阻碍 Fc ϵ R1 的功能的物质的步骤即可。本发明的方法既可以用于预防,也可以用于治疗。另外,授予形态或授予途径也没有特别限定。

[0115] 本发明并不限于上述各实施方式,可以在权利要求所示的范围内进行各种变更,适宜组合不同实施方式各自所揭示的技术方案而获得的实施方式也包括在本发明的技术范围内。

[0116] 另外,本说明书中所记载的学术文献和专利文献均作为参考而引用在本说明书中。

[0117] [实施例]

[0118] (1. 材料和方法)

[0119] (小鼠)

[0120] 自美国杰克逊实验室 (Jackson Laboratory) 购买 BALB/c 小鼠。在日本兵庫医科大学的动物设施中,在 SPF 条件下使识别 OVA₃₂₃₋₃₃₉ (D011.10) 的 α β TCR 的转基因小鼠、和 BALB/c G4 纯合性 (IL-4 缺损) 小鼠交配。全部动物实验是依据日本兵庫医科大学实验动物管理委员会 (the Institutional Animal Care Committee of Hyogo College of Medicine) 的指南而进行的。

[0121] (细胞纯化)

[0122] 依据以前的报告 (Kondo, Y. et al. Int Immunol 20, 791-800 (2008) 和 Yoshimoto, T. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 13962-6 (1999)), 制备了源于小鼠骨髓的嗜碱性粒细胞和肥胖细胞。经纯化的细胞群的纯度超过 96%。人类嗜碱性粒细胞和小鼠 CD4⁺CD62L⁺ 休眠 T 细胞的详细信息和纯化步骤如下。

[0123] (体外培养)

[0124] 在 5×10^5 个 /mL 的惯用 APC (经照射的清除了 T 细胞的 BALB/c 脾细胞)、经照射的脾脏树突状细胞、经照射的纯化嗜碱性粒细胞或纯化肥胖细胞的存在下,在 48 孔板中,利用 IL-2 (100pM)、IL-3 (20U/mL) 和 OVA₃₂₃₋₃₃₉ (1 μ M) 或 DNP-OVA (6.25 ~ 100 μ g/mL) 刺激来自 D011.10 小鼠的原初脾脏 CD4⁺CD62L⁺T 细胞 (1×10^5 个 /mL) 7 天。为了诱导 Th2 细胞,向培养物中进一步添加 IL-4 (1000U/mL)。开始引发 (prime) 后,清洗细胞,进而与 PMA (50ng/mL) 和钙离子载体 (500ng/mL) 一同培养 4 小时,对细胞胞液质的 IL-4 和 IFN- γ 进行 FACS 分析。在若干实验中,在开始引发 (prime) 后,在经照射的惯用 APC (1×10^5 个) 的存在下,在 96 孔板中,利用 IL-2 (100pM)、OVA₃₂₃₋₃₃₉ (1 μ M) 再次刺激 CD4⁺T 细胞 (1×10^5 个 /0.2mL 孔) 48 小时。回收上清液,利用 ELISA 试剂盒 (美国安迪生物科技有限公司, R&D Systems) 或 Bio-Plex system (美国伯乐生命医学产品有限公司, BioRad) 对细胞因子产生进行了试验。

[0125] (寄生虫)

[0126] 对 BALB/c 小鼠皮下注射委内瑞拉类圆线虫 (*S. venezuelensis*) 的 3 期幼虫 (5000

只),以开始完全感染。

[0127] (统计)

[0128] 数据是表示为平均 ± SEM。通过利用 GraphPad Instat Software 所实施的双样本学生 t 检验 (paired Student' s t-test),进行 2 个实验群的统计学比较。将 P 值 (< 0.05) 视为存在显著差异。

[0129] (抗体和试剂)

[0130] 在本发明者们的研究室中,将抗小鼠 IL-4(11B11) 纯化。自美国碧迪生物公司 (BD Biosciences) 购买了 PE- 抗小鼠 CD4、FITC- 抗小鼠 CD62L、FITC- 抗小鼠 I-A^d、FITC- 抗小鼠 CD40、FITC- 抗小鼠 CD80、FITC- 抗小鼠 CD86、FITC- 抗小鼠 CD11c、PE- 抗小鼠 c-kit、FITC- 抗小鼠 c-kit、FITC- 抗小鼠 DX5、FITC- 抗人类 HLA-DR、及 APC- 抗人类 CD203a。自 eBioscience 购买了 FITC- 抗小鼠 T1/ST2(DJ8)、生物素抗小鼠 Fc ε 1 α (MAR1)、链霉亲和素-PE、及链霉亲和素-APC。自美国碧迪生物公司购买了以下的 PE 标记抗人类 mAb :抗 CD3、抗 CD7、抗 CD14、抗 CD15、抗 CD16、抗 CD19、抗 CD36、抗 CD45RA 及抗 CD235a。自美国安迪生物科技有限公司购买了重组小鼠 IL-2、IL-3、IL-4 及人类 IL-3。自 MBL 购买了 IL-18。在本发明者们的研究室中纯化了重组人类 IL-33。自西格玛公司 (Sigma) 购买抗 DNP IgE mAb、OVA(V 级)、来自明尼苏达沙门氏菌 Re-595 或 E 大肠杆菌 055:B5 的 LPS、及来自金黄色葡萄球菌的 PGN。依据 Eisen, H. N. et al. J Immunol 73, 296-308(1954) 的方法制备了 OVA-DNP。

[0131] (流式细胞仪和细胞纯化)

[0132] 为了制备源于骨髓的嗜碱性粒细胞,在补充有 10% FBS(fetal bovine serum, 胎牛血清)、2-ME(50 μ M)、L- 谷氨酰胺 (2mM)、青霉素 (100U/mL) 及链霉素 (100 μ g/mL) 的 RPMI1640 中,将骨髓细胞与 IL-3(10U/mL) 一同培养 14 天,并清洗 2 次。首先,使用抗 Fc γ RII/III(10 μ g/mL) 在 4℃ 下刺激细胞 30 分钟,使用生物素抗小鼠 Fc ε R1 α (5 μ g/mL),在染色缓冲液 (PBS、1% FBS) 中且在 4℃ 下处理 1 小时。清洗 2 次后,利用链霉亲和素-APC 和 PE- 抗小鼠 c-kit 将细胞染色 30 分钟。利用 FACS Calibur(美国碧迪生物公司) 分析样本,并利用荧光细胞分选仪 (FACS Aria, 美国碧迪生物公司) 分离为 Fc ε R1⁺/c-kit⁻ 细胞 (嗜碱性粒细胞) 与 Fc ε R1⁺/c-kit⁺ 细胞 (肥胖细胞)。进而利用 FITC 标记抗体对各细胞群的剩余部分进行染色,以分析表面标记物。为了制备脾脏嗜碱性粒细胞,针对来自 BALB/c 小鼠的脾细胞,首先利用 MACS system(德国美天旎生物技术有限公司, Miltenyi Biotec) 清除 Thy1. 2⁺T 细胞和 B220⁺ 细胞,接着对剩余的细胞进行染色,利用 FACS Aria 分离为 Fc ε R1⁺/c-kit⁻ 细胞与 Fc ε R1⁺/c-kit⁺ 细胞。各细胞群的纯度超过 96%。为了制备脾脏 CD4⁺CD62L⁺ 休眠 T 细胞,且为了对细胞内细胞因子进行染色,而进行了以下步骤。

[0133] 在知情同意后,取得来自正常志愿者的人类外周血和临产的正常人的脐带血,并进行了处理。研究所的伦理委员会同意了该实验计划。通过 Fico11 密度梯度离心分离,从外周血和脐带血中分离出了单核细胞。使用针对 CD3、CD7、CD14、CD15、CD16、CD19、CD36、CD45RA 及 CD235a 的被进行了 PE 标记的抗人类单克隆 (monoclonal) 抗体的混合物以及抗 PE 微球 (德国美天旎生物技术有限公司, Miltenyi Biotec),对外周血的单核细胞进一步清除了 T 细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、自然杀伤细胞、B 细胞、血小板、树突状细胞及红细胞。使用微球,使脐带血的单核细胞富化为 CD34⁺ 细胞。将该些 CD34⁺ 前体细胞以 5 × 10⁵ 个/mL 的细胞密度接种到 12 孔板中,并在补充有 10% FBS、2-ME(50 μ M)、L- 谷氨酰胺 (0.5mM)、

青霉素 (50U/mL) 及链霉素 (50 μ g/mL) 以及人类 IL-3 (10ng/mL) 的 STEM PRO-34 无血清培养基 (美国 GIBCO) 中培养 7 天。

[0134] (电子显微镜)

[0135] 利用 2% 多聚甲醛和 1.25% 戊二醛, 将经分拣的源于小鼠骨髓的细胞 (Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ 细胞和 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁺ 细胞) 及人类细胞 (CD203c⁺HLA-DR 细胞) 固定, 利用 1% OsO₄ 进行后固定, 并包埋在 Epon 中。利用醋酸铀酰和柠檬酸铅对超薄切片进行二重染色, 并利用 JEM 1220 透射电子显微镜 (JEOL) 进行了观察。

[0136] (增殖分析)

[0137] 在 2.5×10^5 个 /mL 的惯用 APC 或经纯化的嗜碱性粒细胞的存在下, 且在针对 DNP IgE 的单克隆抗体 (10 μ g/mL) 的存在下或非存在下, 利用 IL-2 (100pM)、IL-3 (20U/mL) 及 OVA₃₂₃₋₃₃₉ (1 μ M) 或 DNP-OVA (6.25 ~ 100 μ g/mL), 在 96 孔板中刺激来自 D011.10 小鼠的初始脾细胞 CD4⁺CD62L⁺T 细胞 (5×10^4 个 /0.2mL 孔) 4 天。最后的 16 小时期间中, 通过添加 1 μ Ci 的 [³H] 胸苷测定了 DNA 合成。

[0138] (ELISA 分析)

[0139] 利用小鼠 OVA-IgE ELISA 试剂盒 (大日本住友制药股份有限公司, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) 测定了 OVA 特异性血清 IgE。利用小鼠 OVA-IgG1ELISA 试剂盒 (AKRIE-04, 日本 Shibayagi 公司) 测定了 OVA 特异性血清 IgG1。

[0140] (小鼠的体内处理)

[0141] 将源于骨髓的或经 FACS 分拣的嗜碱性粒细胞和肥胖细胞 (各 5×10^5 个 /mL) 与 IL-3 (20U/mL)、DNP-OVA (100 μ g/mL) 及抗 DNP IgE mAb (10 μ g/mL) 在 48 孔板中一同培养 16 小时。引发 (prime) 后, 将嗜碱性粒细胞或肥胖细胞 ($2.5 \sim 5 \times 10^5$ 个 / 小鼠) 经由尾静脉注射到 BALB/c 小鼠体内 (每组 5 只)。再构建的 4 天后或 1 周后, 利用 PBS 中的 OVA 蛋白质 (100 μ g) 对小鼠进行静脉内激发。在若干实验中, 对 BALB/c 小鼠 (每组 5 只) 静脉内注入 DNP-OVA (100 μ g/ 小鼠) 和抗 DNP IgE mAb (200 μ g/ 小鼠) 的混合物。注入后, 使用 FACS 随时间经过, 对作为 IL-4 的报告基因的 GFP 的表达进行了测定, 由此测定了嗜碱性粒细胞中的 IL-4 的表达。嗜碱性粒细胞的体内清除是依据 Denzel 等人的方法来进行的。通过腹腔内投予注入 5 μ g 的抗小鼠 Fc ϵ R1 α (MAR-1) 或对照仓鼠 IgG (eBioscience), 1 天 2 次共 3 天。令小鼠休息 2 天, 接着对小鼠注入 DNP-OVA 和抗 DNP IgE mAb 的混合物, 接着对该些小鼠注入 MAR-1 或仓鼠 IgG, 注入为 1 天 2 次共 3 天。在注入 DNP-OVA 和抗 DNP IgE 4 天后, 在经照射的惯用的 APC (1×10^5 个) 的存在下, 利用 IL-2 (100pM)、OVA (100 μ g/mL), 在 96 孔板中刺激脾脏 CD4⁺T 细胞 (1×10^5 细胞 /0.2mL 孔) 5 天。利用经 PVA 激活的 APC 刺激脾脏 CD4⁺T 细胞 5 天。

[0142] (TLR mRNA 的表达分析)

[0143] 使用 Trizol 试剂, 自经分拣的嗜碱性粒细胞和肥胖细胞提取总 RNA, 利用 DNaseI 进行处理, 并使用 Superscript II RT 和 oligo(dT)₁₂₋₁₈ 引物 (美国英杰生命技术有限公司, Invitrogen) 进行逆转录。全部 TLR 的阳性对照是使用自总脾脏细胞提取的 RNA。为了分析 TLR mRNA 的表达, 而通过改变标准 RT-PCR 扩增次序对 mRNA 进行了扩增。设计了特异性 TLR 引物序列和各自的退火温度。将在 95 $^{\circ}$ C 下 30 秒钟、在 55 $^{\circ}$ C 下 30 秒钟、在 72 $^{\circ}$ C 下 30 秒钟、进而在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 分钟设为一个循环, 将 cDNA 扩增 35 个循环。在 35 个循环后, 将

样本保存在 4℃ 直至分析为止。扩增后,利用 1.7% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳,并通过照射 UV 光使之可视化。

[0144] (2. 结果和考察)

[0145] 此次,本发明者们通过 IL-4 的产生和 MHC-II 型 / 肽复合物在原初 CD4⁺ 细胞上的提呈,揭示了嗜碱性粒细胞有助于体外和体内的 Th2/IgE 应答。

[0146] 首先,针对产生 Th2 细胞因子并在体外使原初 CD4⁺T 细胞发育为 Th2 细胞的脾脏嗜碱性粒细胞的能力进行了试验。关于来自初次接受试验的小鼠的非 T 细胞功能和非 B 细胞功能,虽然含有 0.20% 的 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ 细胞,但感染了委内瑞拉类圆线虫 (*Strongyloides venezuelensis*) 的小鼠与感染了寄生虫巴西日圆线虫 (*Nippostrongylus brasiliensis*) 的小鼠的报告相同,该比例显著增加 (5.84%, 图 1(a))。从初次接受试验的小鼠和感染小鼠的脾脏纯化了 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ 细胞 (嗜碱性粒细胞)。在 IL-3 的存在下培养了 24 小时的来自感染小鼠的脾脏嗜碱性粒细胞虽然产生了大量的 IL-4、IL-6 及 IL-13,但未产生 IL-12。另一方面,来自初次接受试验的小鼠的脾脏嗜碱性粒细胞应答 IL-3 而产生了少量的 IL-4、IL-6 及 IL-13。该等情况提示:感染小鼠的脾脏嗜碱性粒细胞获得了在含有 IL-2 的培养过程中大量产生 IL-4、IL-6 及 IL-13 的能力 (图 1(b))。

[0147] 在 OVA 肽 (OVA₃₂₃₋₃₃₉)、IL-2 及 IL-3 的存在下,对诱导自 OVA 特异性原初 CD4⁺T 细胞向 Th2 细胞的发育的、来自感染小鼠的嗜碱性粒细胞的能力进行了试验。另外,在 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 和 IL-2 的存在下,将原初 CD4⁺T 细胞与惯用 APC (清除了 T 细胞的脾脏细胞) 一同进行了培养。来自被委内瑞拉类圆线虫感染的小鼠的脾脏嗜碱性粒细胞具有显著的、在 IL-4 非存在下诱导自原初 CD4⁺T 细胞向 Th2 细胞的发育的能力 (图 1(c))。作为对照,如其他报告所示,惯用 APC 在 Th0 条件 (仅有 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 和 IL-2) 下未诱导 Th2 细胞的发育 (图 1(c))。经发育的 Th2 细胞表达作为 Th2 标记物的 IL-33R α (图 1(d)),在 OVA 激发时产生 Th2 细胞因子,在抗原和 IL-33 的激发时还增加了 IL-4 以外者的产生。

[0148] 为了避免 DC 潜在地夹杂于脾脏嗜碱性粒细胞中,而对经高度纯化的骨髓嗜碱性粒细胞的在体外诱导 Th2 细胞的发育的能力进行了试验 (图 6(a)、图 6(b))。首先,对 MHC-II 型分子和刺激辅助分子 CD80 及 CD86 的表达进行了试验。进而,同时对在肥胖细胞和惯用 APC 中的该些表达进行了试验 (图 2(a))。源于骨髓的嗜碱性粒细胞和惯用 APC 明显表达了 II 型分子、CD80 及 CD86,但未表达 CD11c。作为对照,肥胖细胞仅轻度表达了该些分子 (图 2(a)、图 2(b))。脾脏嗜碱性粒细胞表达 CD62L (淋巴结归巢分子)。该情况提示脾脏嗜碱性粒细胞会优先侵入淋巴组织。源于脐带血或外周血的人类嗜碱性粒细胞 (CD203c⁺/c-kit⁻) 也会表达 HLA-DR (图 2(c)、图 6(c)、图 6(d))。

[0149] 正如预计,源于骨髓的嗜碱性粒细胞与来自委内瑞拉类圆线虫感染小鼠的脾脏嗜碱性粒细胞相同,即使完全不存在专职 APC,在 Th0 条件 (OVA₃₂₃₋₃₃₉、IL-2 及 IL-3 的存在、且 IL-4 非存在) 下也具有诱导自原初 CD4⁺T 细胞向 Th2 细胞的发育的能力 (20.7%) (图 3(a))。

[0150] 对嗜碱性粒细胞如何诱导 Th2 细胞的发育的机制进行了调查。在利用 OVA₃₂₃₋₃₃₉、惯用 APC (Δ T 脾脏)、IL-2 及 IL-4 (Th2 条件下) 刺激原初 CD4⁺T 细胞的情况下,原初 CD4⁺T 细胞发育为 Th2 细胞 (19.1%) (图 3(a))。同样地,在利用 OVA₃₂₃₋₃₃₉、肥胖细胞、IL-2、IL-3 及

IL-4(Th2 条件下)刺激原初 CD4⁺T 细胞的情况下,原初 CD4⁺T 细胞发育为 Th2 细胞 (17.2%) (图 3(a))。作为对照,进一步的 IL-4 刺激(Th2 条件下)仅中等程度地增强了该嗜碱性粒细胞依赖性的 Th2 细胞的发育(25.2%,图 3(a))。进而,来自清除了 IL-4 的小鼠的嗜碱性粒细胞几乎完全消除了该 Th2 的发育(3.1%),野生型嗜碱性粒细胞虽然在 Th0 条件下将原初 CD4⁺T 细胞诱导为 Th2 细胞,但专职 APC 未诱导(图 3(b))。该等结果显示:嗜碱性粒细胞产生 IL-4,提呈 OVA 肽,并且诱导自原初 CD4⁺T 细胞向 Th2 细胞的发育。

[0151] 接着,使用 DNP-复合化 OVA(DNP-OVA)作为抗原,以代替 OVA 肽(OVA₃₂₃₋₃₃₉)。在 IL-3 和 DNP-OVA 的存在下且 IL-4 的非存在下,将 OVA 特异性原初 CD4⁺T 细胞与嗜碱性粒细胞一同培养,由此诱导获得了 OVA 特异性 Th2 细胞(图 3(c))。该等结果提示:嗜碱性粒细胞摄取初始的 OVA,将其加工为 OVA₃₂₃₋₃₃₉,与 MHC-II 型一同提呈肽片段,而具有产生 IL-4 的能力。接着,对添加抗 DNP IgE 单克隆抗体是否可上调嗜碱性粒细胞的 APC 能力进行了试验(图 3(d))。在 100 μg/ml、25 μg/ml 或者 6.2 μg/ml 的 DNP-结合 OVA 的存在下且在 10 μg/ml 的抗 DNP-IgE 单克隆抗体的存在下,将 OVA 特异性原初 CD4⁺T 细胞与嗜碱性粒细胞一同培养 7 天。培养完毕后,充分清洗细胞,并在 PMA+ 离子霉素(ionomycin)的存在下培养 4 小时后,利用 FACS 测定了细胞质内的 IL-4 与 IFN-γ 的表达。数字是在 CD4⁺T 细胞中,细胞质内具有 IL-4 或者 IFN-γ 的细胞的比例。经低用量(6.2 μg/mL)的 DNP-OVA 激活的嗜碱性粒细胞,中等程度地诱导了 Th2 细胞(3.2%)。另一方面,经高用量(100 μg/mL)的 DNP-OVA 激活的嗜碱性粒细胞显著地诱导了 Th2 细胞(11.3%)。添加抗 DNP IgE 单克隆抗体而显著地诱导了 Th2 细胞(与无抗 IgE 的情况下的 3.2%、4.2%、11.3%相比,在有抗 IgE 时为 10.5%、12.5%、16.8%;图 3(d))。因此,抗 DNP-IgE 单克隆抗体对嗜碱性粒细胞诱导性的 Th2 发育的增强效果在利用最低浓度的 DNP-OVA 来激活嗜碱性粒细胞的情况下较明显。进而,与专职 APC 相比,少数嗜碱性粒细胞在使用抗 DNP-IgE 单克隆抗体的 Th2 条件下,会诱导自原初 CD4⁺T 细胞向 Th2 细胞的发育(图 3(d))。

[0152] 接着,对抗 DNP IgE 单克隆抗体如何表现出上述上调效果进行了试验。关于在抗 DNP-IgE 的存在下经 DNP-OVA 激活的嗜碱性粒细胞,尤其在嗜碱性粒细胞经低浓度的 DNP-OVA 激活的情况下增加了对 OVA 特异性 T 细胞的增殖进行诱导的能力(图 7)。作为对照,在抗 DNP-IgE 抗体的存在下被激活的惯用 APC 未增加诱导 T 细胞增殖的能力(图 7)。进而,正如至今为止的报告所示,在抗 DNP-IgE 抗体的存在下利用 DNP-OVA 被激活时,仅嗜碱性粒细胞显著增加了产生 IL-4 的能力(图 8(a)、图 8(b))。经 DNP-OVA/抗 DNP IgE 激活的肥胖细胞虽然产生 IL-13,但未产生 IL-4(图 8(b))。进而,仅嗜碱性粒细胞在利用 IL-3、及 IL-18、IL-33、PGN 或 LPS 进行刺激的情况下,产生了 IL-4(图 8(c)、图 8(d))。

[0153] 为了对经 OVA 激活的嗜碱性粒细胞是否可在体内诱导 Th2 应答进行试验,而与 DNP-OVA/抗 DNP IgE 一同培养,由此尝试利用 OVA 肽强力激活嗜碱性粒细胞。另外,同时利用该抗原/抗体复合物对肥胖细胞进行了处理。接着,将该些嗜碱性粒细胞或肥胖细胞经由尾静脉注射到正常小鼠体内。4 天后,使用溶解在 PBS 中的完整的 OVA 蛋白质激发小鼠。激发 2 天后,制备脾脏 CD4⁺T 细胞,利用经 OVA 激活的 APC(ΔT-脾脏)刺激该些细胞,并测定培养上清液中的 IL-4、IL-13 及 IFN-γ 的含量。在该脾脏中,仅有经 OVA 激活的嗜碱性粒细胞迅速且强力地诱导了 Th2 细胞,且中等程度地诱导了 Th1 细胞(图 4(a))。接着,对利用经 OVA 激活的嗜碱性粒细胞而进行了免疫的小鼠的,在 OVA 静脉内激发时产生

IgE 和 IgG1 的能力进行了试验。不使用佐剂的该全身性的 OVA 授予在初次接受试验的小鼠体内未诱导 IgE 应答。作为对照,在用经 OVA 激活的嗜碱性粒细胞进行了引发 (prime) 的小鼠中, 应答 OVA 激发而产生了 IgE 和 IgG1 (图 4(b))。该些小鼠在脾脏内发育出 CD4⁺CD62L^{low}IL33R α ⁺Th2 细胞 (图 4(c)、图 4(d))。由于 CD62L 分子是 Th2 细胞再循环的所需标记物, 所以经 OVA 激活的嗜碱性粒细胞呈专职 APC 样态, 诱导 OVA 特异性 Th2 细胞。此外, 该 OVA 特异性 Th2 细胞有助于经 OVA 活化的 B 细胞在体内产生 IgG1 和 IgE。

[0154] 最后, 为了揭示内源性的嗜碱性粒细胞的抗原提呈对于诱导体内的初期 Th2 应答非常重要的直接证据, 而将 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 复合物注入初次接受试验的小鼠以及清除了嗜碱性粒细胞的小鼠。为了清除嗜碱性粒细胞, 而依据 Denzel 等人的方法, 向小鼠腹腔内授予针对 Fc ϵ R1 α 的抗体 (MAR-1), 1 天授予 2 次, 共授予了 3 天。在最终授予 MAR-1 (并非对照的仓鼠 IgG) 2 天后, 成功地完全清除了脾脏和肝脏的嗜碱性粒细胞 (图 9)。在注入 DNP-OVA (100 μ g) / 抗 DNP IgE (200 μ g) 后随时间经过使用 FACS 对作为 IL-4 的报告基因的 GFP 的表达进行了测定, 由此测定了嗜碱性粒细胞中的 IL-4 的表达, 结果是, 注入的 12 小时后或 24 小时后的嗜碱性粒细胞中显著产生了 IL-4。进而, 注入的 4 天后, 制备了脾脏 CD4⁺T 细胞, 利用经 OVA 激活的 APC 刺激该些细胞, 并测定培养上清液中的 IL-4、IL-13 及 IFN- γ 的含量。在将 DNP-OVA/ 抗 DNP IgE 复合物注入初次接受试验的小鼠体内 (不是清除了嗜碱性粒细胞的小鼠) 的情况下, 在脾脏中可见 Th2 细胞被迅速地诱导 (图 4(c))。

[0155] 证实了独特的专职 APC 在体外和体内均优先诱导 Th2 细胞。嗜碱性粒细胞与惯用 APC 同样地表达 MHC-II 型、CD80 及 CD86, 且进行抗原蛋白质的摄取和加工, 而与 MNHCII 型一同表达肽 (图 2(a)、图 3)。作为对照, 肥胖细胞中该等分子的表达极少 (图 2(a))。进而, 经 OVA 肽强力激活的嗜碱性粒细胞强力地诱导了自原初 CD4⁺T 细胞向 Th2 细胞的发育, 而经 OVA 激活的肥胖细胞未诱导自原初 CD4⁺T 细胞向 Th2 细胞的发育。该情况提示: 在体内, Th2 应答的诱导存在较大差异 (图 4(a))。正如至今为止的报告所示, Th2 细胞使脾脏和淋巴结中的嗜碱性粒细胞的数量显著增加, 在嗜碱性粒细胞的水平与 Th2 细胞的水平之间似乎存在正反馈调节。

[0156] 因此, 下调嗜碱性粒细胞是控制处置 Th2/IgE 应答的重要对策。IgE 也是重要的靶分子。其原因在于, IgE 会引发嗜碱性粒细胞与 Th2 细胞之间的正反馈调节。嗜碱性粒细胞一般仅被认为是生成 IL-4 并将抗原转移到进行实际的抗原提呈的树突状细胞中的细胞。嗜碱性粒细胞自身的潜在性 APC 功能的识别, 对于理解对单一过敏原的具阳性反应的患者如何利用同一抗原强力显示阳性的这一机制、如何诱发针对多种过敏原的阳性反应的这一机制, 是较为重要的。推测经多株抗体致敏的嗜碱性粒细胞摄取对应过敏原, 并提呈多个 T 细胞抗原决定基, 由此诱导多个 Th2 细胞克隆体。如果使人类脐带血细胞在含有 IL-3 的培养基中增殖后输入人类体内, 则混有嗜碱性粒细胞, 这会表达 MHC-II 型分子, 因此提示出了接受脐带血细胞输血的患者有诱导 Th2/IgE 应答的危险性。

[0157] 如以上所述, 本发明揭示了嗜碱性粒细胞是诱导优先 Th2 的免疫应答的抗原提呈细胞。另外, 揭示了通过利用各种方法控制嗜碱性粒细胞, 可以控制过敏性疾病。

[0158] 本发明者们揭示了: 嗜碱性粒细胞表达 MHC-II 型分子和 CD80/86, 在各种刺激下产生 IL-4。该情况表明嗜碱性粒细胞会诱导在专职抗原提呈细胞 (APC) 的非存在下的、自原初 CD4⁺T 细胞向 Th2 细胞的发育。

[0159] 在 IL-3 存在下且在 IL-4 非存在下与嗜碱性粒细胞、OVA 肽或 DNP-OVA 一同培养的卵白蛋白 (OVA) 特异性原初 CD4⁺ 细胞发育成了 Th2 细胞。这种嗜碱性粒细胞的 Th2 诱导作用在 IL-4 缺损嗜碱性粒细胞中完全未见。该情况提示:由经 OVA 激活的嗜碱性粒细胞所释放的 IL-4 对于 Th2 细胞的发育是必不可少的。进而,与 DNP-OVA 和抗 DNP-IgE 一同培养的嗜碱性粒细胞与仅与 DNP-OVA 一同培养的嗜碱性粒细胞相比,摄取更多的 OVA,更多地加工,因此显示出强于仅与 DNP-OVA 一同培养的嗜碱性粒细胞的 APC 活性。

[0160] 经 OVA 强力激活的嗜碱性粒细胞的静脉内投予会强力且迅速地诱导 Th2 细胞,但经 OVA 激活的肥胖细胞却未引起 Th2 细胞的诱导。在利用嗜碱性粒细胞诱导 Th2 细胞后,经 OVA 刺激的 B 细胞会产生 OVA 特异性 IgE 抗体,而 Th2 细胞会强力地促进该过程。该情况提示:通过使嗜碱性粒细胞摄取 IgE 依赖性抗原,会控制 Th2/IgE 应答的正反馈。

[0161] (3. 关于附图)

[0162] 图 1(a)~图 1(d) 中揭示了由寄生虫诱发的、脾脏嗜碱性粒细胞的抗原提呈。图 1(a) 中揭示了:从 BALB/c 小鼠、或感染委内瑞拉类圆线虫的 3 期幼虫 10 天的 BALB/c 小鼠制备的新鲜的脾脏的非 B 非 T 细胞,并利用流式细胞仪分析 Fc ϵ R1 和 c-kit 的表达而获得的结果。利用 FACS Aria,将来自感染或未感染委内瑞拉类圆线虫的小鼠的脾脏的非 B 非 T 细胞进一步分离为 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ 细胞。以数字表示 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ 细胞的比例。

[0163] 图 1(b) 中,将图 1(a) 所示的经分拣的嗜碱性粒细胞 (1 \times 10⁵ 个 /0.2mL 孔) 与 IL-3(20U/mL) 在 96 孔板中一同培养 24 小时,回收其上清液,利用 Bio-Plex 系统试验细胞因子含量,将所获得的结果,以来自每组 3 只小鼠的嗜碱性粒细胞的、通过 2 次独立实验而获得的平均 \pm SEM, 来进行了表示。

[0164] 图 1(c) 中揭示了:在 5 \times 10⁵ 个 /mL 的经照射的清除了 T 细胞的 BALB/c 脾细胞 (Δ T 脾脏)、或经照射的来自委内瑞拉类圆线虫感染小鼠的脾脏嗜碱性粒细胞 (寄生虫诱导性嗜碱性粒细胞) (无 IL-4(Th0 条件)) 的存在下,利用 IL-2(100pM)、IL-3(20U/mL) 及 OVA₃₂₃₋₃₃₉(1 μ M), 在 48 孔板中刺激来自 D011.10 的原初 CD4⁺CD62L⁺T 细胞 (1 \times 10⁵ 个 /mL) 7 天,开始引发 (prime) 后,清洗细胞,且与 PMA(50ng/mL) 和钙离子载体 (500ng/mL) 一同再次培养 4 小时,并利用 FACS 分析细胞质 IL-4 和 IFN- γ 而获得的结果。针对 CD4⁺T 细胞,以数字表示 IL-4⁺ 细胞或 IFN- γ ⁺ 细胞的比例。

[0165] 图 1(d) 揭示了,图 1(c) 中利用流式细胞仪所示的与 Δ T 脾脏或寄生虫诱导性嗜碱性粒细胞一同培养了 7 天的 CD4⁺T 细胞上的 IL-33R α 链的表达。以百分比表示 CD4⁺ 细胞中的 IL-33R α 链⁺ 细胞的比例。

[0166] 图 2(a)~图 2(c) 中揭示了嗜碱性粒细胞上的 MHC-II 型分子的表达。图 2(a) 中揭示了,利用图中所示的表面标记物对源于骨髓的经 FACS 分拣的嗜碱性粒细胞和肥胖细胞 (示于图 6)、以及清除了 T 细胞的脾细胞 (Δ T 脾脏) 进行染色而获得的结果。图中的阴影区域表示经标记物染色的细胞,白色区域表示未经染色的细胞。

[0167] 图 2(b) 中揭示了,利用流式细胞仪对源于骨髓的经 FACS 分拣的嗜碱性粒细胞和肥胖细胞分析 MHC-II 型 (I-A) 和 Fc ϵ R1 的表达而获得的结果。以百分比表示 Fc ϵ R1⁺I-A⁺ 细胞的比例。图中表示有 4 次独立实验的代表性结果。

[0168] 图 2(c) 中揭示了,利用流式细胞仪对与人类 IL-3(10ng/mL) 一同培养 7 天的 CD34⁺ 脐带血细胞分析 c-kit 和 CD203c (左)、以及 CD203c⁺c-kit⁻ 细胞中的 HLA-DR (右) 的表达

而获得的结果。图中表示有 3 次独立实验的代表性结果。

[0169] 图 3(a) ~ 图 3(d) 中揭示了源于骨髓的嗜碱性粒细胞的抗原提呈的结果。在经照射的清除 T 细胞的 BALB/c 脾细胞 (ΔT 脾脏) (5×10^5 个 / mL)、经照射的源于骨髓的纯化嗜碱性粒细胞 (WT: 野生型小鼠, G4/G4: IL-4 缺损小鼠)、肥胖细胞或脾脏 DC 的存在下, 在 48 孔板中, 在总容量为 1 mL 的培养基中刺激来自 DO11.10 小鼠的原初脾脏 $CD4^+CD62L^+$ T 细胞 (1×10^5 个 / mL) 7 天 (Th0 条件)。刺激时, 使用 IL-2 (100 pM)、IL-3 (20 U/mL) 及 OVA₃₂₃₋₃₃₉ (1 μ M) (图 3(a) 和 图 3(b))、DNP-OVA (100 μ g/mL) (图 3(c))、以及抗 DNP IgE mAb (10 μ g/mL) 的存在下或非存在下, 使用了 DNP-OVA (6.25 ~ 100 μ g/mL) (图 3(d))。为了诱导 Th2 细胞, 而向培养物中进而添加了 IL-4 (1000 U/mL) (Th2 条件)。开始引发 (prime) 后, 清洗细胞, 与 PMA (50 ng/mL) 和钙离子载体 (500 ng/mL) 一同再次培养 4 小时, 并利用 FACS 分析了细胞质内的 IL-4 和 IFN- γ 的表达。针对 $CD4^+$ T 细胞, 以数字表示 IL-4 $^+$ 细胞或 IFN- γ^+ 细胞的比例。图中表示有 3 次独立实验的代表性结果。

[0170] 图 4(a) ~ 图 4(i) 中揭示了由嗜碱性粒细胞诱导的体内的抗原特异性 Th2 应答。在图 4(a) ~ 图 4(d) 中, 是在 48 孔板中, 将源于骨髓的经 FACS 分拣的嗜碱性粒细胞或肥胖细胞 (各 5×10^5 个 / mL) 与 IL-3 (20 U/mL)、DNP-OVA (100 μ g/mL) 及抗 DNP IgE mAb (10 μ g/mL) 一同培养 16 小时。在引发 (prime) 后, 以各 2.5×10^5 个 / 小鼠, 经由尾静脉对 BALB/c 小鼠 (每组 5 只) 注射嗜碱性粒细胞或肥胖细胞。利用 OVA 蛋白质 (100 μ g / 小鼠), 经由静脉对注射 4 天后 (图 4(a)) 或 1 周后 (图 4(b) ~ 图 4(d)) 的小鼠进行激发。对对照小鼠仅注入 OVA 蛋白质 (100 μ g)。激发 (第 0 天) 后, 回收血清, 利用 ELISA 确定 OVA 特异性 IgE 抗体和 IgG1 抗体 (图 4(b))。激发 2 天后 (图 4(a)) 或 2 周后 (图 4(c)), 在经照射的 ΔT 脾脏 (2×10^5 个 / 0.2 mL 孔) 的存在下, 在 96 孔板中利用 OVA 蛋白质 (100 μ g/mL) 再次刺激来自各小鼠的脾脏 $CD4^+$ T 细胞 (2×10^5 个 / 0.2 mL 孔)。

[0171] 在图 4(e) ~ 图 4(g) 中, 是以图中所示的浓度, 对 BALB/c 小鼠 (每组 5 只) 注入 OVA-DNP 和抗 DNP IgE 抗体的混合物 (免疫复合物 I. C)。为了清除嗜碱性粒细胞, 而在投予 I. C 前后, 以 1 天 2 次, 连续 3 天向小鼠腹腔内投予 5 μ g 的抗 Fc ϵ R1 α (MAR-1)。投予 I. C 4 天后, 在经照射的 ΔT 脾脏 (2×10^5 个 / 0.2 mL 孔) 的存在下, 利用 OVA 蛋白质 (100 μ g/mL) 再次刺激来自各小鼠的脾脏 $CD4^+$ T 细胞 (2×10^5 个 / 0.2 mL 孔)。在体外刺激 5 天后, 回收上清液, 利用 ELISA 对 IL-4、IL-13 及 IFN- γ 的产生进行了试验 (图 4(a)、图 4(c)、图 4(f)、图 4(g))。以每组 5 只的平均 \pm SEM, 表示了 2 个独立实验的代表例的结果。

[0172] 在图 4(a) 中, “**”表示: 与被移植肥胖细胞并被注入了 OVA 的小鼠进行比较的学生 t 检验的结果是 $P < 0.0001$ 。在图 4(b) ~ 图 4(d) 中, “*”表示 $P < 0.01$, “†”表示 $P < 0.05$, “‡”表示 $P < 0.005$ (以上均是仅注入 OVA 的对照组进行比较)。在图 4(b) 中, 作为与清除了嗜碱性粒细胞的组进行比较的学生 t 检验的结果, “*”表示 $P = 0.191$, “†”表示 $P < 0.005$ 。

[0173] 在图 4(h) ~ 图 4(i) 中, 是以图中所示的用量对 BALB/c 小鼠 (每组 5 只) 注入了 OVA-DNP 和抗 DNP IgE 抗体的混合物 (I. C)。利用 OVA 蛋白质 (100 μ g / 小鼠), 静脉内激发被投予 I. C 4 天后的小鼠, 回收血清, 利用 ELISA 确定了 OVA 特异性 IgE 抗体和 IgG1 抗体。为了减少或增加嗜碱性粒细胞的数量, 而对小鼠注入了抗 Fc ϵ R1 α (MAR-1) 或 IL-3。作为与对照组进行比较的学生 t 检验的结果, “*”表示 $P < 0.001$, “†”表示 $P < 0.05$ 。

[0174] 图 5 中揭示了由嗜碱性粒细胞驱动的自 Th2 细胞的细胞因子产生。在 5×10^5 个/mL 的经照射的清除了 T 细胞的 BALB/c 脾细胞 (Δ T 脾脏)、或经照射的来自委内瑞拉类圆线虫感染小鼠的脾脏嗜碱性粒细胞 (寄生虫诱导性嗜碱性粒细胞) (无 IL-4(Th0 条件)) 的存在下, 利用 IL-2(100pM)、IL-3(20U/mL) 及 OVA₃₂₃₋₃₃₉(1 μ M), 在 48 孔板中刺激来自 D011. 10 的原初 CD4⁺CD62L⁺T 细胞 (1×10^5 个/mL) 7 天。开始引发 (prime) 后, 在经照射的清除了 T 细胞的 BALB/c 脾细胞 (1×10^5 个) 的存在下, 且在 IL-33(100ng/mL) 的存在或非存在下, 在 96 孔板中, 利用 IL-2(100pM)、OVA₃₂₃₋₃₃₉(1 μ M) 再次刺激 CD4⁺T 细胞 (1×10^5 个/0.2mL 孔) 48 小时。回收上清液, 利用 Bio-Plex 系统对细胞因子产生进行了试验。图中表示有 3 次独立实验的代表性结果。

[0175] 图 6(a) ~ 图 6(d) 中揭示了源于小鼠骨髓的嗜碱性粒细胞和人类外周血嗜碱性粒细胞的纯化以及免疫学性试验的结果。图 6(a) 中揭示了: 将来自 BALB/c 小鼠的骨髓细胞与 IL-3(10U/mL) 一同培养 10 天, 利用流式细胞仪分析 Fc ϵ R1 和 c-kit 的表达, 接着利用 FACS Aria 分拣为 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ (嗜碱性粒细胞) 的细胞群与 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁺ (肥胖细胞) 的细胞群而获得的结果。图中表示有所分选的细胞群中的细胞的百分比。

[0176] 图 6(b) 中揭示了利用电子显微镜观察经分拣的 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ (嗜碱性粒细胞) 和 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁺ (肥胖细胞) 的细胞群而获得的观察结果。比例尺为 1 μ m。

[0177] 图 6(c) 是: 在分选后立即对通过阴性分选所浓缩的人类外周血单核细胞 (CD3⁻、CD7⁻、CD14⁻、CD15⁻、CD16⁻、CD19⁻、CD36⁻、CD45RA⁻ 及 CD235a⁻) 的 HLA-DR 与 CD203c 的表达进行测定而获得的结果 (左); 以及对在人类 IL-3(10ng/mL) 存在下培养 24 小时后的 HLA-DR 与 CD203c 的表达进行测定而获得的结果 (右)。图中表示有 HLA-DR⁺ 细胞相对于 CD203c⁺ 细胞的细胞群百分比。

[0178] 图 6(d) 中揭示了经分拣的 CD203c⁺/HLA-DR⁺ 细胞群的吉姆萨 (Giemsa) 染色 (左: 100 \times) 下的电子显微镜观察 (右) 的结果。比例尺为 1 μ m。

[0179] 图 7 中揭示了嗜酸性粒细胞诱导性的抗原特异性 T 细胞增殖。在 IL-2(100pM)、IL-3(20U/mL) 及 OVA₃₂₃₋₃₃₉(1 μ M)、或者抗 DNP IgE mAb(10 μ g/mL) 的存在下或非存在下, 用 DNP-OVA(6.25 ~ 100 μ g/mL), 并在经照射的 Δ T 脾脏或经纯化的嗜碱性粒细胞 (2.5×10^5 个/mL) 的存在下, 在 96 孔板中对来自 D011. 10 小鼠的原初脾脏 CD4⁺CD62L⁺T 细胞 (5×10^4 个/mL) 刺激了 4 天。通过添加 1 μ Ci 的 [³H], 测定了最终 16 小时中的 DNA 合成。

[0180] 图 8(a) ~ 图 8(d) 中揭示了源于骨髓的嗜碱性粒细胞和来自肥胖细胞的 Th2 细胞因子产生。图 8(a) 中揭示了: 在 OVA₃₂₃₋₃₃₉(1 μ M)、或者抗 DNP IgEmAb(10 μ g/mL) 的存在下或非存在下, 用 DNP-OVA(100 μ g/mL), 并在经照射的 Δ T 脾脏或经纯化的嗜碱性粒细胞 (5×10^5 个/mL) 的存在下, 在 48 孔板中对来自 D011. 10 小鼠的原初脾脏 CD4⁺CD62L⁺T 细胞 (1×10^5 个/mL) 刺激 24 小时而获得的结果。

[0181] 图 8(b) 中, 在 IL-3(20U/mL)、或者抗 DNP IgE mAb(10 μ g/mL) 的存在下或非存在下, 用 DNP-OVA(100 μ g/mL), 在 96 孔板中对源于骨髓的经 FACS 分拣的嗜碱性粒细胞或肥胖细胞 (各 1×10^5 个/0.2mL 孔) 再次刺激 16 小时, 回收上清液, 并利用 ELISA 对 IL-4 或 IL-13 的产生进行了试验, 并将获得的结果以平均 \pm SEM 进行了表示。图中表示有 5 次独立实验的代表例。nd 表示未能检测到。

[0182] 图 8(c) 中揭示了利用 RT-PCR, 对自源于骨髓的经 FACS 分拣的嗜碱性粒细胞或肥

胖细胞所提取的 mRNA,分析 TLR 基因和 β -肌动蛋白的表达而获得的结果。作为 TLR mRNA 的阳性对照 (posi.),使用的是自小鼠脾脏细胞提取的 mRNA。

[0183] 图 8(d) 中,利用 IL-3(20U/mL) 和 IL-18(50ng/mL)、IL-33(100ng/mL)、LPS(1 μ g/mL) 或 PGN(10 μ g/mL),分别在 96 孔板中对源于骨髓的经 FACS 分拣的嗜碱性粒细胞或肥胖细胞(各 1×10^5 个/0.2mL 孔)再次刺激 24 小时,回收上清液,利用 ELISA 对 IL-4、IL-6 或 IL-13 的产生进行试验,将实验结果以平均 \pm SEM 表示。图中表示有 5 次独立实验的代表例。

[0184] 图 9(a)~图 9(e) 中揭示了具有抗 Fc ϵ R1 α 的嗜碱性粒细胞的清除。在图 9(a)~图 9(d) 中表示有:以 1 天 2 次,共 3 天于腹腔内授予了 5 μ g 的抗小鼠 Fc ϵ 1 α (MAR-1(+)) 或 PBS(MAR-1(-)) 的 BALB/c 小鼠的、嗜碱性粒细胞 (Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ 细胞或 Fc ϵ R1⁺/DX5⁺ 细胞) 的流式细胞记数和频率。在最终授予的 2 天后,对嗜碱性粒细胞的数量进行了定量(图 9(a):脾脏,图 9(b):肝脏)。接着,将 DNP-OVA 和抗 DNP IgE 的混合物与 MAR-1 或 PBS 一同注入小鼠体内,1 天注入 2 次,共注入了 3 天。利用 OVA 进行腹腔内激发后,在授予 I. C 4 天后,进而利用 MAR-1 或 PBS 对小鼠进行处理,每周连续处理 5 天,持续处理了 2 周。在 OVA 激发 1 周或 2 周后,对血液(图 9(c))或脾脏(图 9(d))中的嗜碱性粒细胞的数量进行了定量。

[0185] 图 9(e) 中揭示了,来自用渗透泵注入了 IL-3(0~10 μ g/体重/2 周) 的 BALB/c 小鼠的嗜碱性粒细胞 (Fc ϵ R1⁺/DX5⁺ 细胞) 的频率的代表性实验数据。图中表示有 5 次独立实验的代表例。图中以百分比表示 Fc ϵ R1⁺/c-kit⁻ 细胞或 Fc ϵ R1⁺/DX5⁺ 细胞相对于脾脏的非 B 非 T 细胞的比例。

[0186] 图 10 揭示了经抗原激活的嗜碱性粒细胞在体内的 Th2/IgE 诱导的示意图。如果将抗原 A(例如 OVA) 授予正常动物,那么首先抗原 A 会被嗜碱性粒细胞摄取(图中 1)。经 OVA 激活的嗜碱性粒细胞循环到外周淋巴器官(例如脾脏),在此对 OVA 特异性原初 CD4⁺T 细胞进行 IL-4 刺激与抗原肽/MHC-II 型刺激。接着,无需来自 DC 的辅助作用,仅通过来自嗜碱性粒细胞的抗原刺激和 IL-4 刺激,使 OVA 特异性原初 CD4⁺T 细胞分化为 Th2 细胞(即,嗜碱性粒细胞依赖性的 Th2 细胞诱导期;图中 2)。同时,授予到生物体内的 OVA 也会循环到外周淋巴器官。在此,OVA 与 OVA 特异性 B 细胞的抗原受体结合。由于经 OVA 激活的 B 细胞会刺激 OVA 特异性 Th2 细胞,所以经刺激的 Th2 细胞会产生 CD40 配体和 IL-4。所产生的 CD40 配体和 IL-4 刺激经 OVA 激活的 B 细胞,而诱导 OVA 特异性 IgE 的产生(即,Th2 依赖型的 B 细胞活化期;图中 3)。一旦产生 OVA 特异性 IgE,那么由 OVA 与抗 OVA 特异性 IgE 抗体构成的 IgE 免疫复合物会与嗜碱性粒细胞上的 Fc ϵ R1 结合(即,嗜碱性粒细胞被 IgE 致敏;图中 4)。通过被致敏的嗜碱性粒细胞的刺激,记忆 Th2 细胞受到刺激而增殖(图中 5)。进而,经 OVA 刺激的记忆 B 细胞受到记忆 Th2 细胞的刺激,而产生对 OVA 的结合亲和性高的 IgE 抗体(图中 6)。

[0187] [工业上的可利用性]

[0188] 由于本发明明确了至今为止所不明的 Th2 型免疫应答的机制、尤其是初始 IL-4 产生的作用机制,所以本发明能够较好地用于针对 Th2 型疾病的新颖治疗药、治疗方法的开发等。即,本发明可以用在以医疗领域、医药品领域为首的广泛领域中。

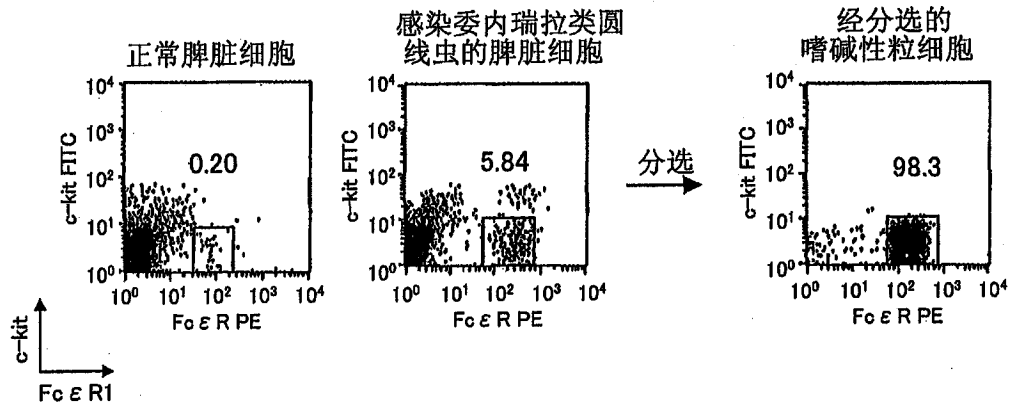


图 1(a)

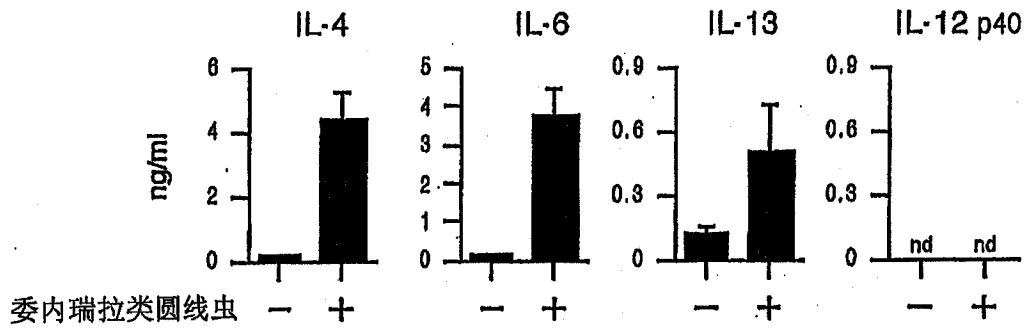


图 1(b)

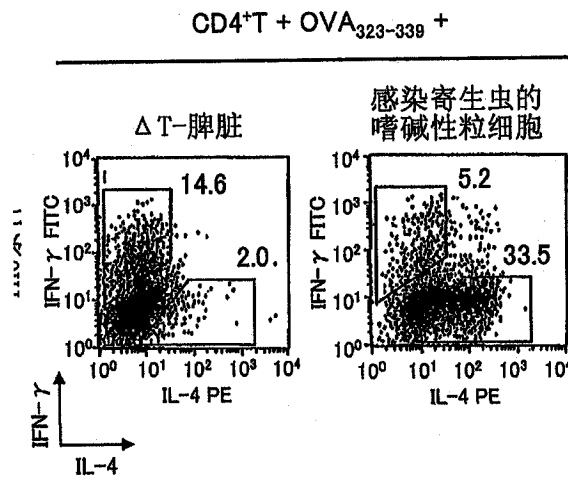
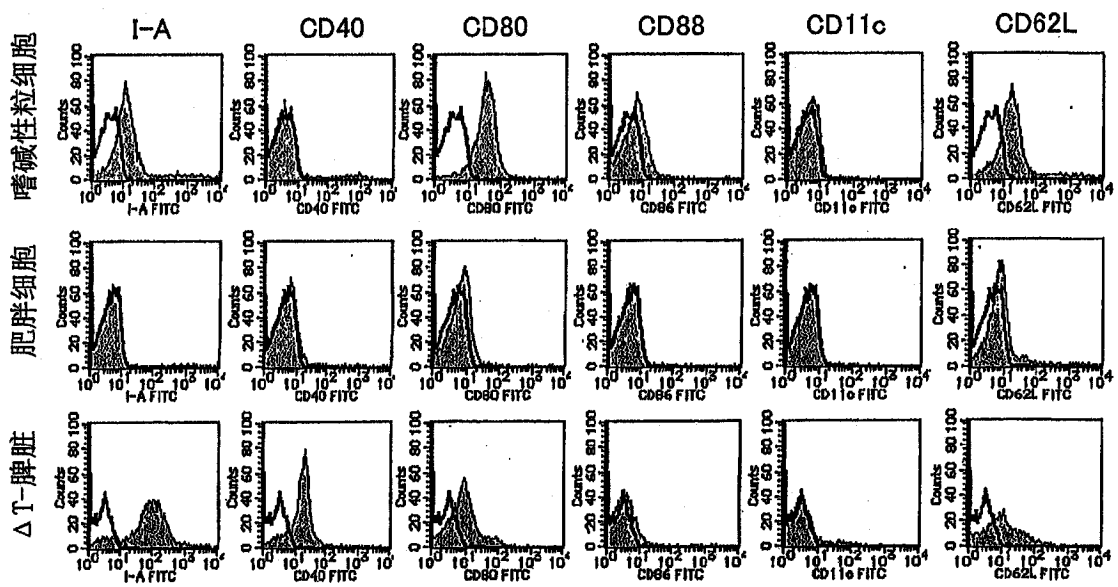
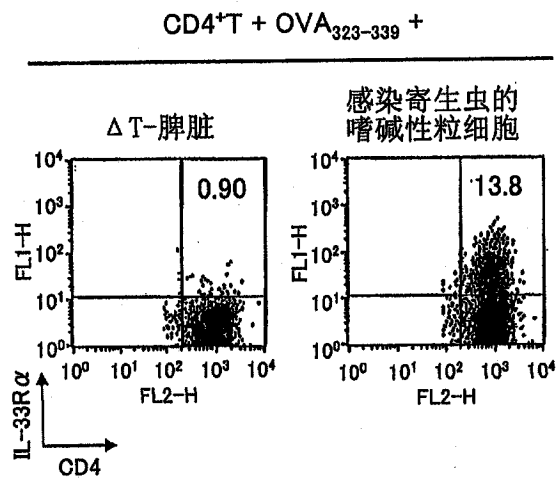


图 1(c)



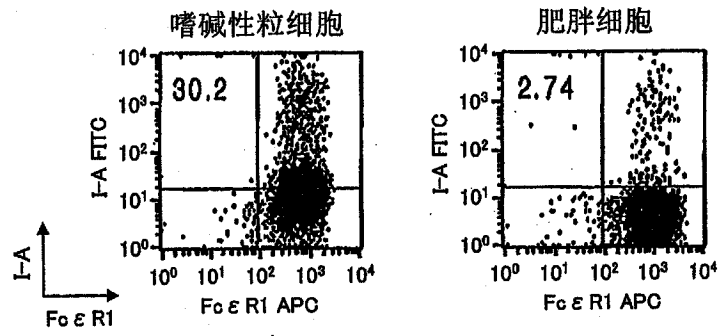


图 2(b)

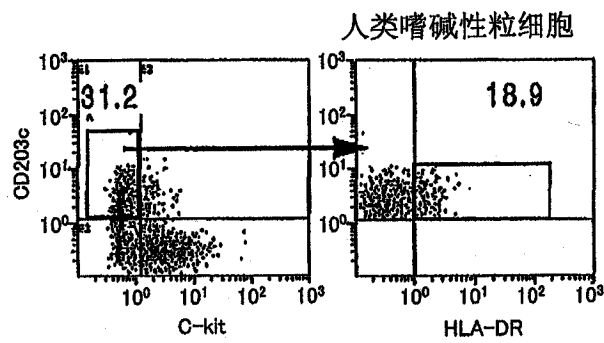


图 2(c)

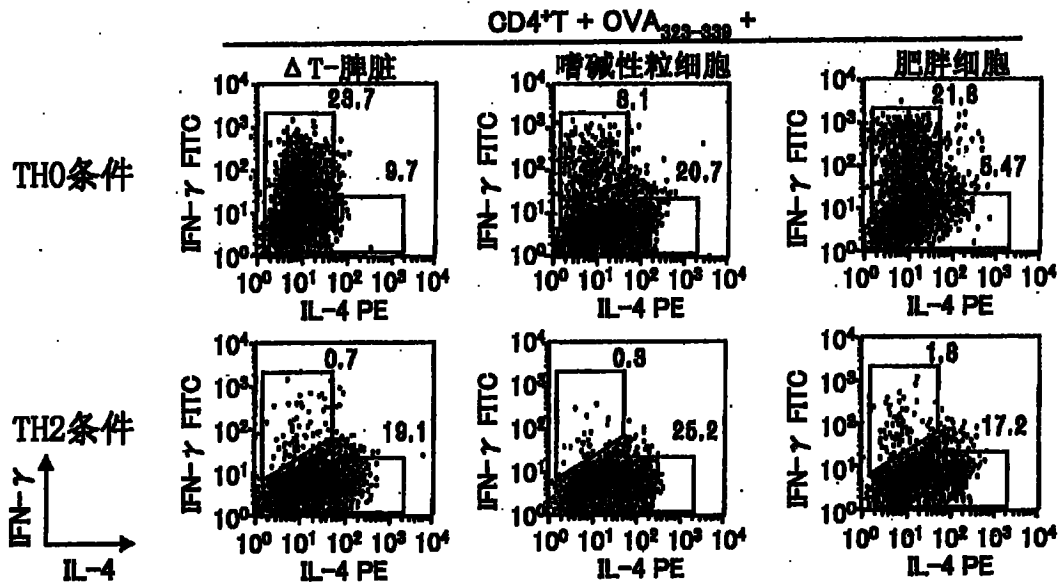


图 3(a)

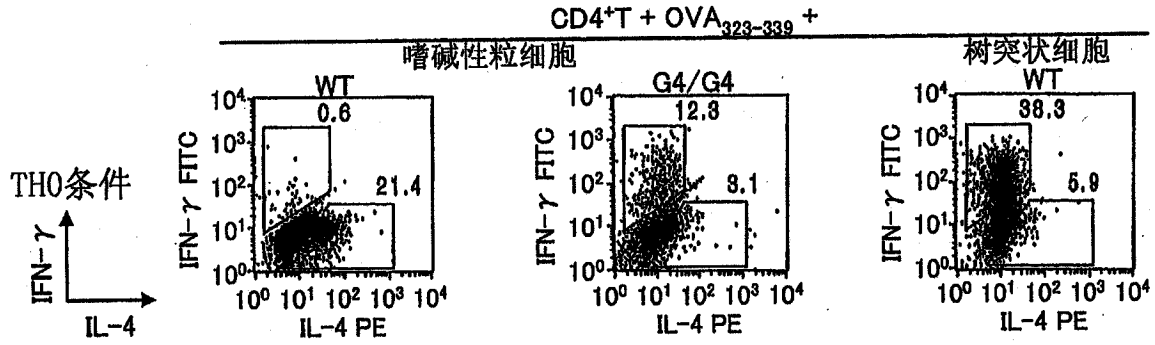


图 3(b)

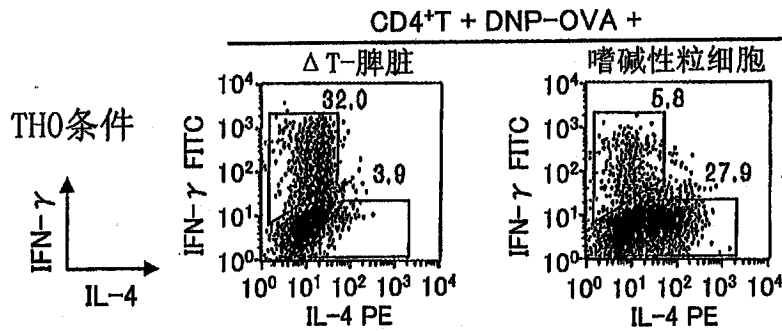


图 3(c)

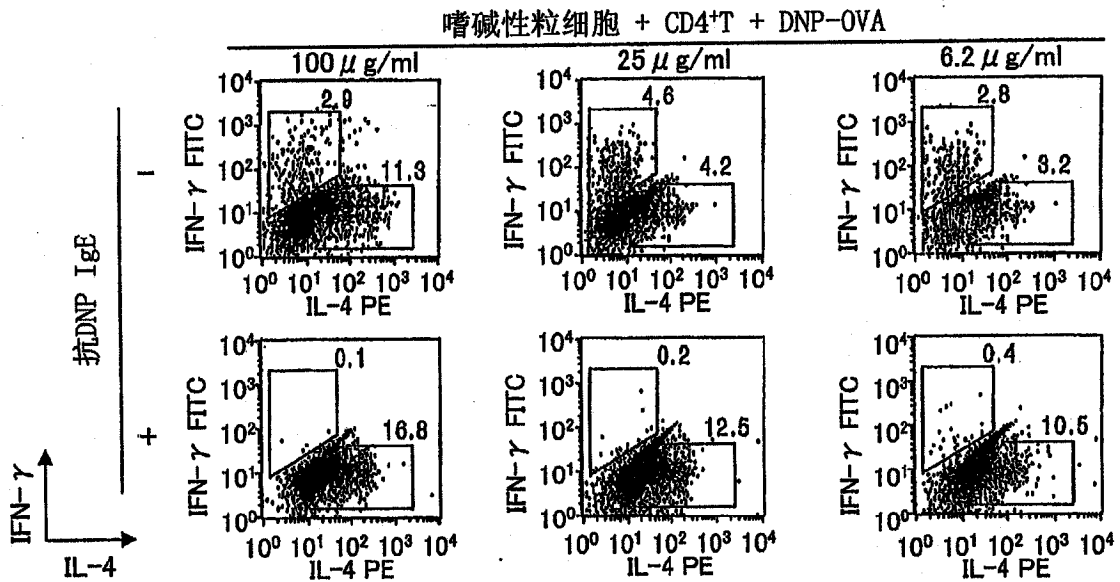


图 3(d)

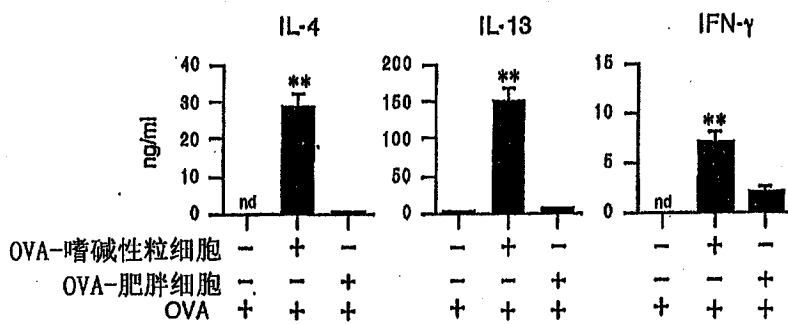


图 4(a)

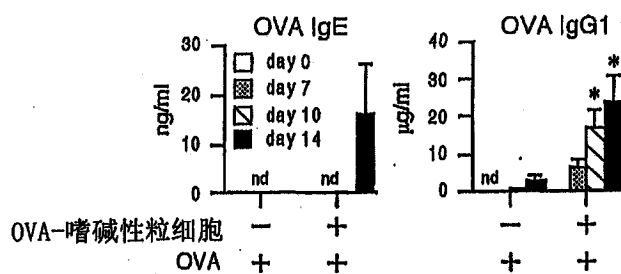


图 4(b)

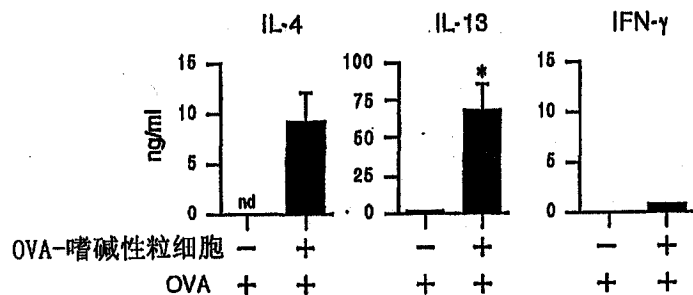


图 4(c)

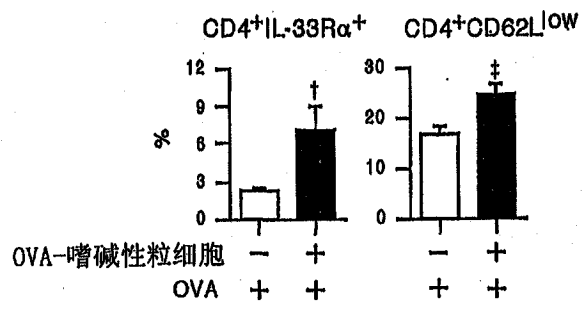


图 4(d)

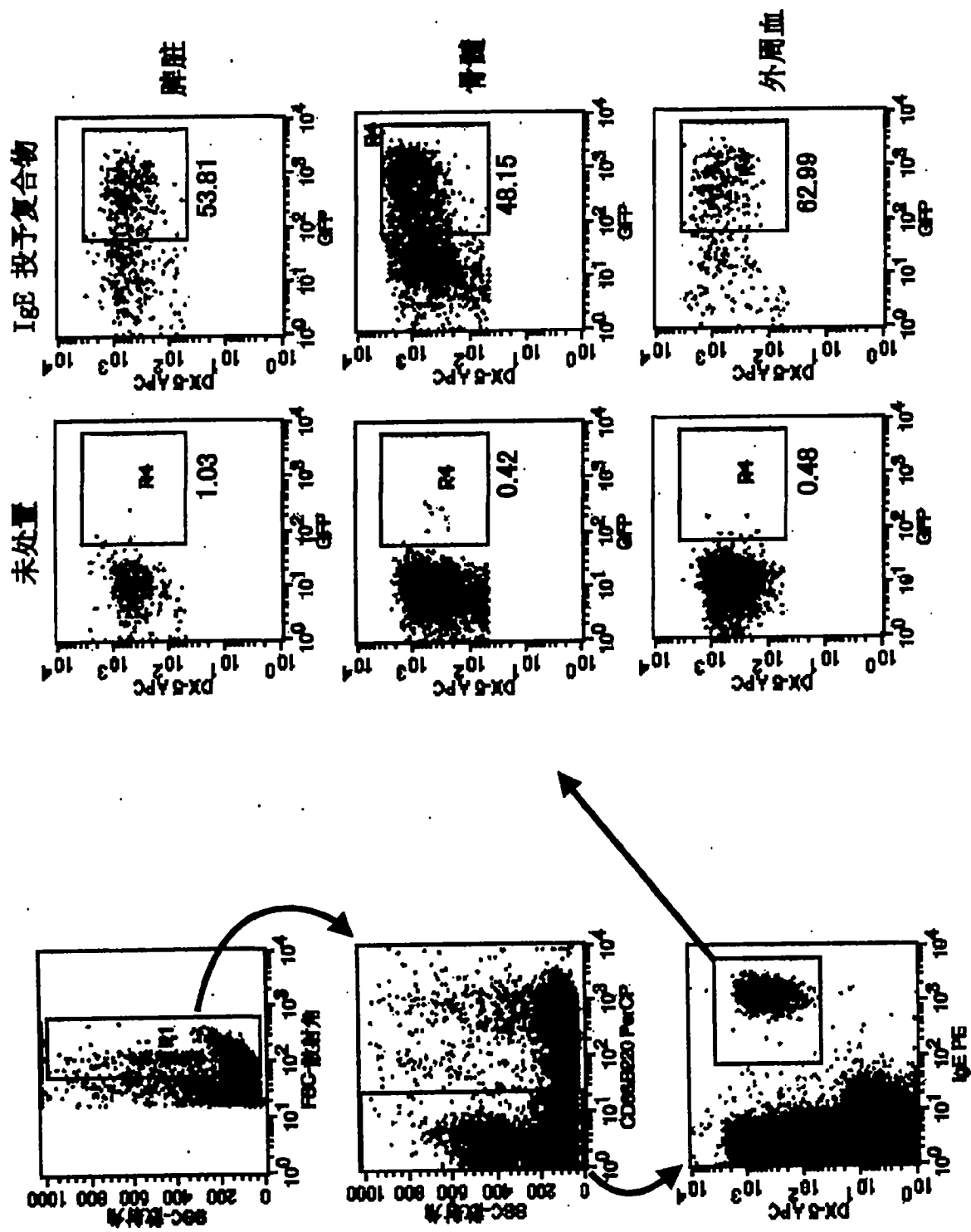


图 4(e)

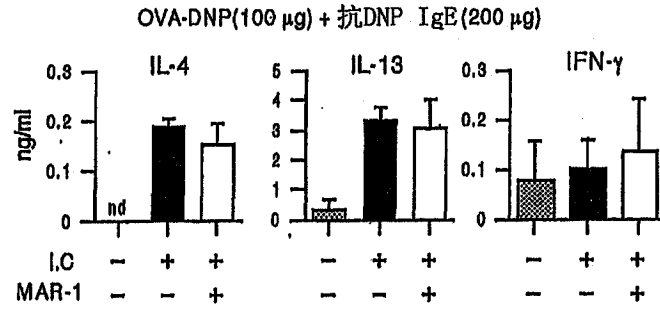


图 4(f)

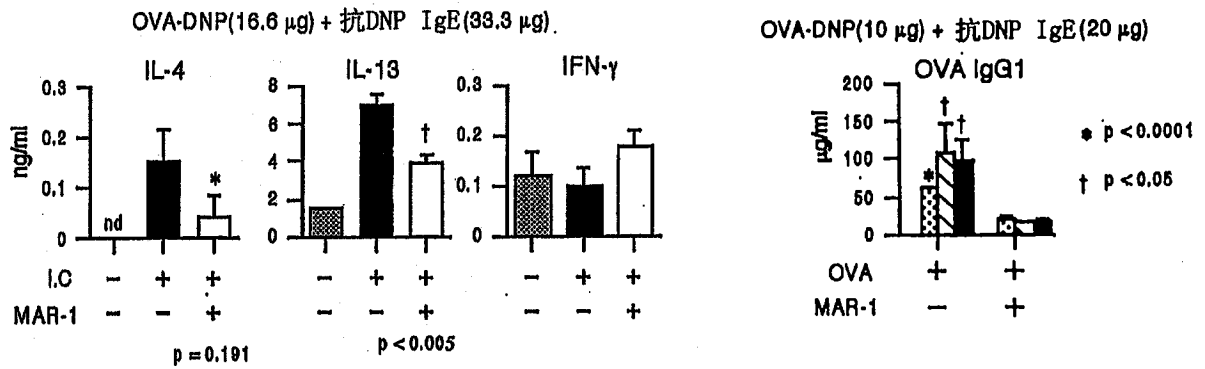


图 4(h)

图 4(g)

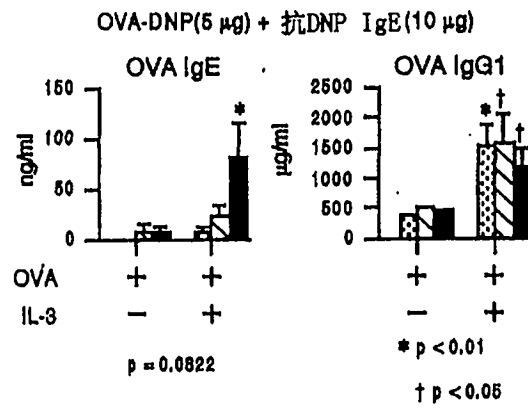


图 4(i)

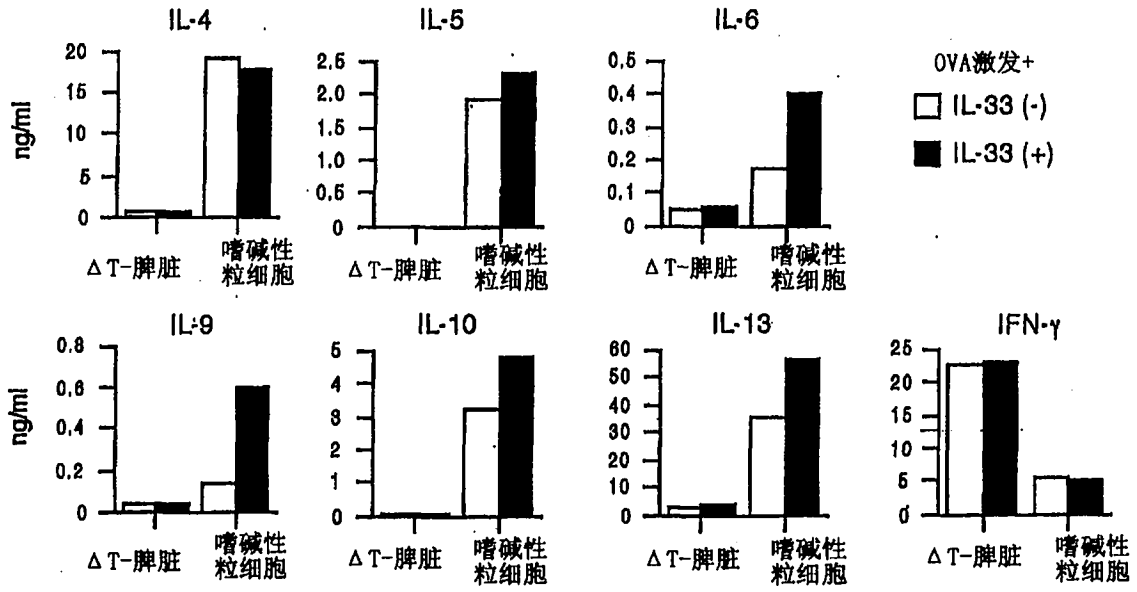


图 5

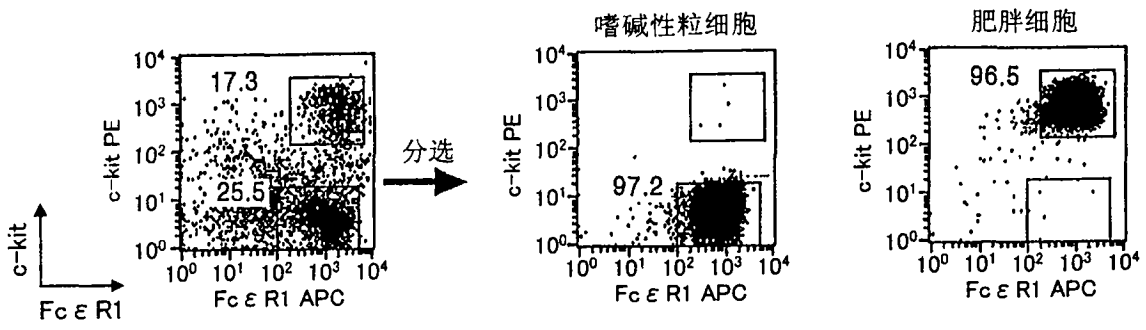


图 6(a)

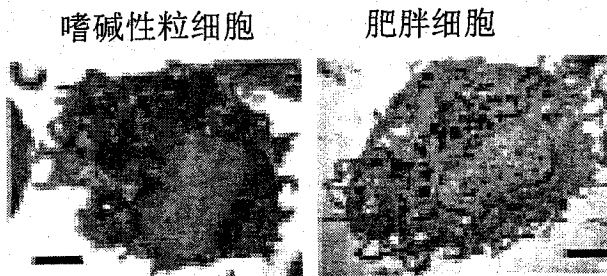


图 6(b)

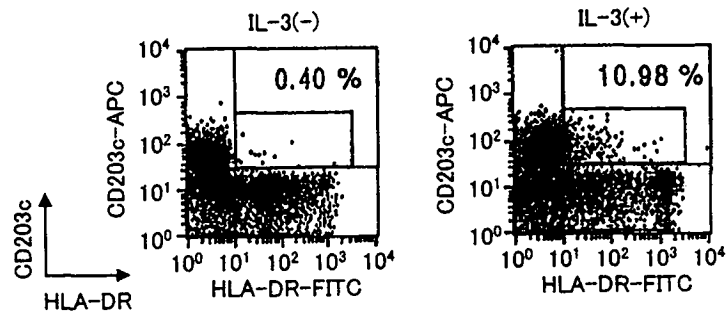


图 6(c)

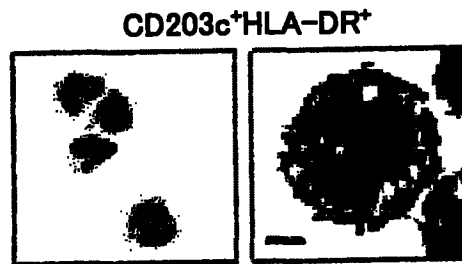


图 6(d)

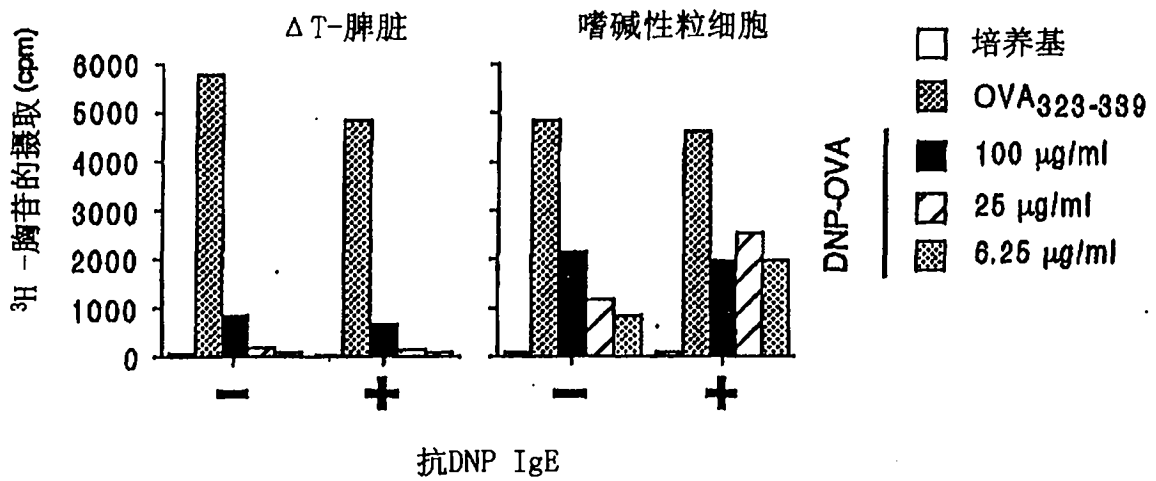


图 7

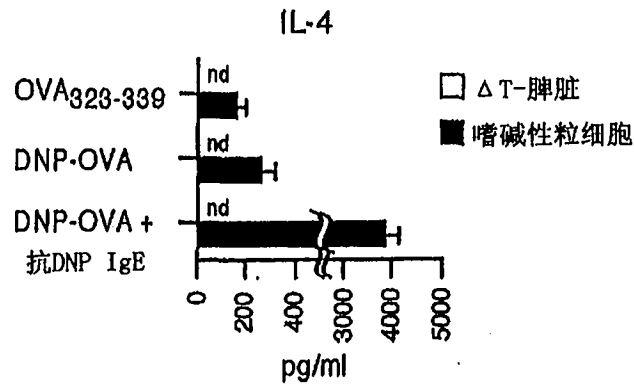


图 8(a)

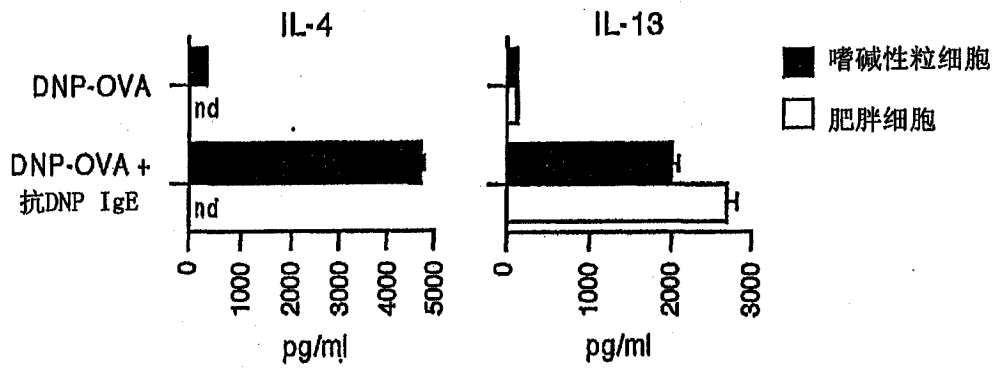


图 8(b)



图 8(c)

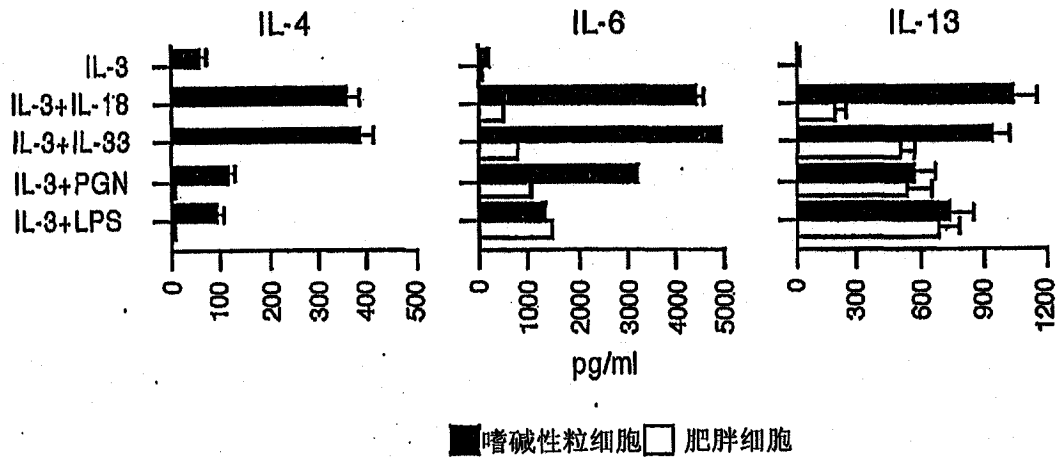


图 8(d)

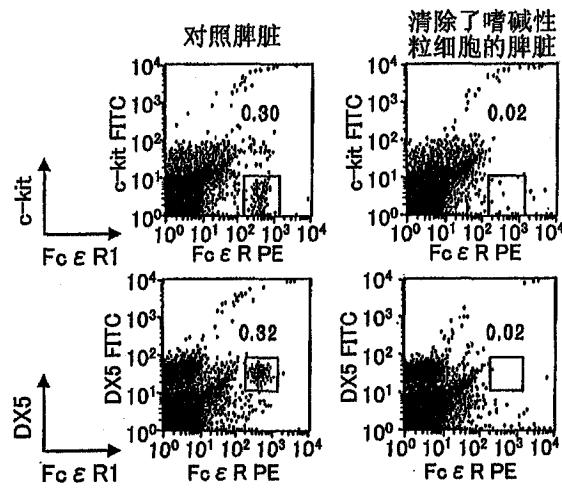


图 9(a)

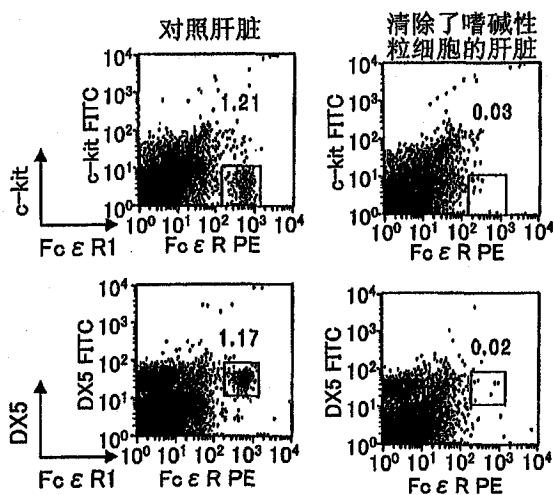


图 9(b)

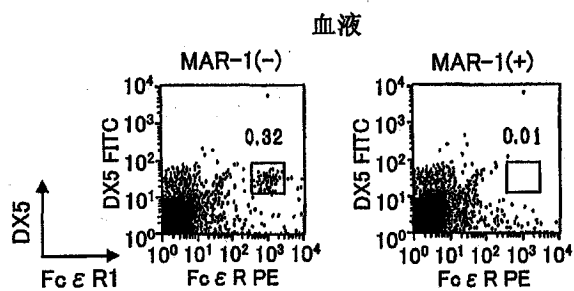


图 9(c)

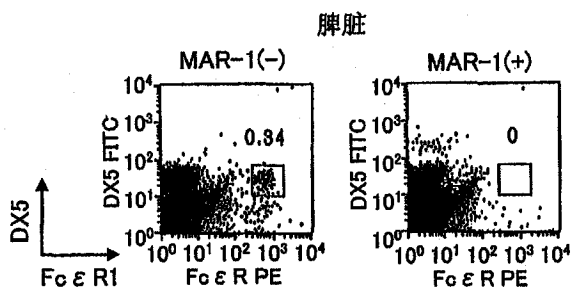


图 9(d)

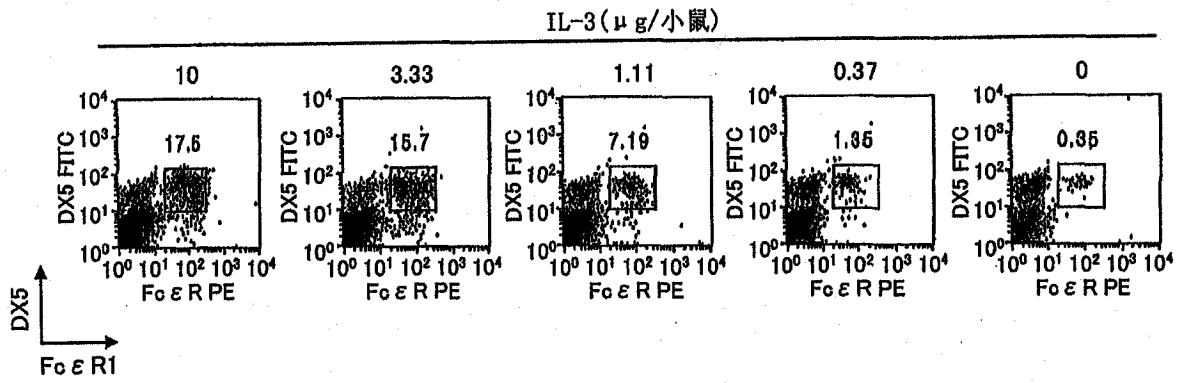


图 9(e)

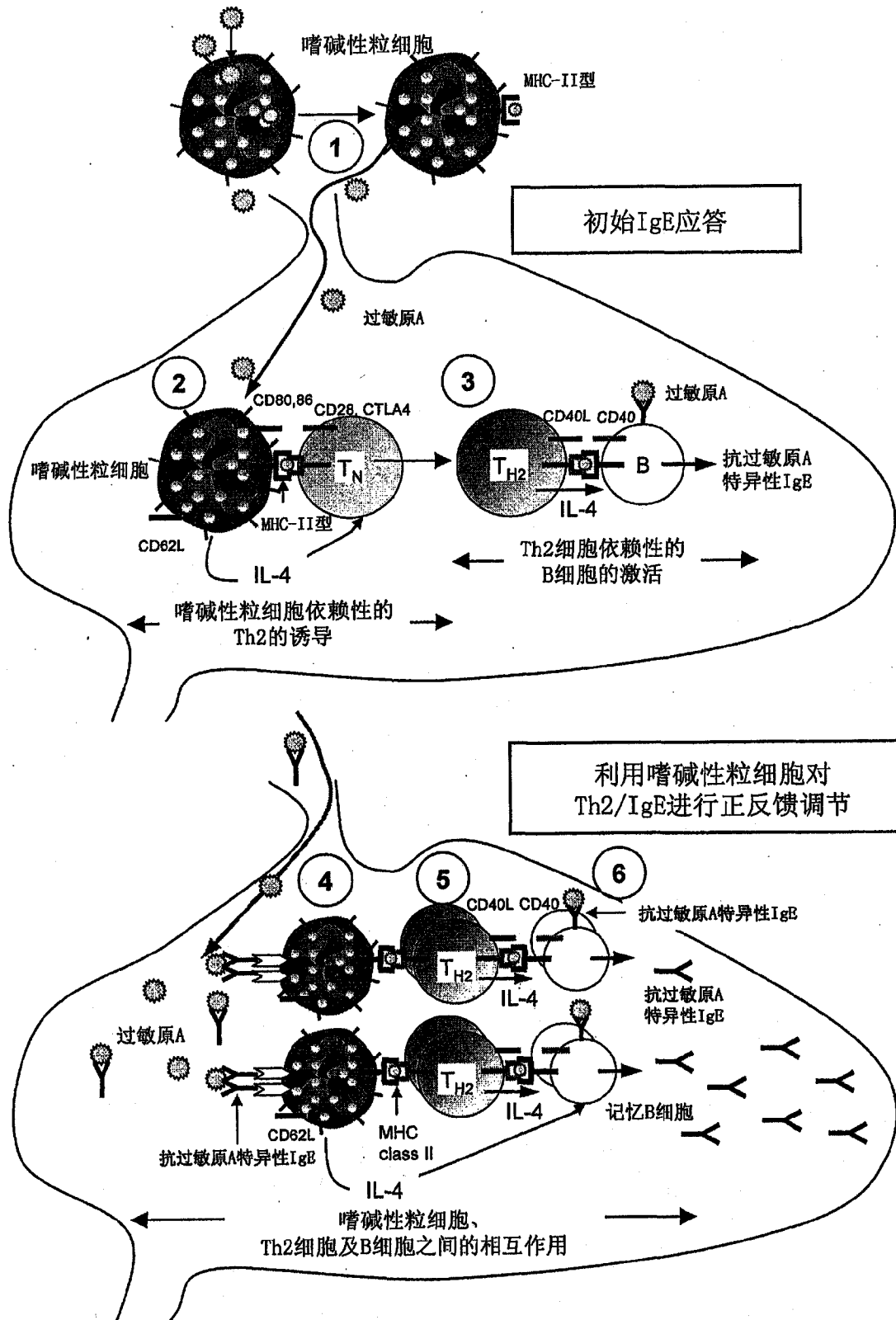


图 10

专利名称(译)	Th2细胞诱导用组合物和Th2型疾病的治疗组合物、以及该组合物的利用		
公开(公告)号	CN102264891A	公开(公告)日	2011-11-30
申请号	CN200980153855.5	申请日	2009-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人兵庫医科大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人兵庫医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人兵庫医科大学		
[标]发明人	中西憲司 善本知広		
发明人	中西憲司 善本知広		
IPC分类号	C12N5/07 A23K1/16 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/54 C07K16/28 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2800/122 A61K2039/5158 A61K47/48776 G01N33/505 A61K49/0008 G01N33/5088 A61K39/39583 G01N2800/24 A61K2039/57 C12N5/0636 C12N2502/11 G01N33/5047 A61K2039/6056 C12N5/0642 A61K47/6901 A61P1/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/02 A61K2300/00		
代理人(译)	冯雅		
优先权	2008281930 2008-10-31 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供：由抗原和与该抗原结合的IgE所组成的复合物、含有抗原和与该抗原结合的IgE的组合物、以及使用该复合物或该组合物的方法。通过本发明，能够将原初T细胞诱导为Th2细胞。另外，本发明明确了Th2型免疫应答的作用机制、尤其是初始IL-4的产生机制，因此如果使用本发明，则能够提供治疗/预防Th2型疾病的技术。