

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02011/152503**

発行日 平成25年8月1日(2013.8.1)

(43) 国際公開日 **平成23年12月8日(2011.12.8)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 Z N A C	4 B O 2 4
<b>A 6 1 P 37/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 25/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	4 C O 8 5
<b>A 6 1 P 17/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/02	4 H O 4 5
<b>A 6 1 P 1/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2012-518457 (P2012-518457)	(71) 出願人	000002912 大日本住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/062741	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(22) 国際出願日	平成23年6月2日(2011.6.2)	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(31) 優先権主張番号	特願2010-127316 (P2010-127316)	(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
(32) 優先日	平成22年6月2日(2010.6.2)	(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100122688 弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743 弁理士 村田 美由紀
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患またはアレルギー疾患の治療剤

## (57) 【要約】

本発明は、抗Embigin抗体、特に細胞障害活性または細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体を含有する、自己免疫疾患またはアレルギー疾患の予防・治療剤、Th17細胞が関与する疾患の予防・治療剤、Th17細胞に対する細胞障害剤を提供する。また、抗Embigin抗体を含有する、Th17細胞を検出するための剤、それをを用いたTh17細胞の簡便な判定方法、抗Embigin抗体を用いて薬剤等をTh17細胞に選択的且つ効率よく到達させる方法、Th17細胞へのドラッグデリバリーシステムが提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

抗Embigin抗体を含有する自己免疫疾患またはアレルギー疾患の予防および/または治療剤。

**【請求項 2】**

抗Embigin抗体が、細胞障害活性または細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である請求項 1 記載の剤。

**【請求項 3】**

抗Embigin抗体が、細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である請求項 1 記載の剤。

**【請求項 4】**

細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体のサブクラスがIgG1、IgG3またはIgMである請求項 3 記載の剤。

**【請求項 5】**

抗Embigin抗体が、細胞障害活性を有する抗Embigin抗体である請求項 1 記載の剤。

**【請求項 6】**

細胞障害活性を有する抗Embigin抗体が、細胞障害性物質、化学療法剤または放射性同位体と結合した抗体である請求項 5 記載の剤。

**【請求項 7】**

疾患が、Th17細胞が関連する疾患である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の剤。

**【請求項 8】**

疾患が、多発性硬化症、乾癬、リウマチ、炎症性大腸炎、接触性過敏症、ステロイド抵抗性喘息、慢性非感染性ぶどう膜炎、慢性閉塞性肺疾患、糸球体腎炎またはアトピー性皮膚炎である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の剤。

**【請求項 9】**

疾患が多発性硬化症である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の剤。

**【請求項 10】**

抗Embigin抗体を含有するTh17細胞に対する細胞障害剤。

**【請求項 11】**

抗Embigin抗体が、細胞障害活性または細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である請求項 10 記載の剤。

**【請求項 12】**

抗Embigin抗体が、細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である請求項 10 記載の剤。

**【請求項 13】**

細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体のサブクラスがIgG1、IgG3またはIgMである請求項 12 記載の剤。

**【請求項 14】**

抗Embigin抗体が、細胞障害活性を有する抗Embigin抗体である請求項 10 記載の剤。

**【請求項 15】**

細胞障害活性を有する抗Embigin抗体が、細胞障害性物質、化学療法剤または放射性同位体と結合した抗体である請求項 14 記載の剤。

**【請求項 16】**

抗Embigin抗体を用いることを特徴とする、薬剤をTh17細胞に到達させるドラッグデリバリーシステム。

**【請求項 17】**

抗Embigin抗体が前記薬剤と結合した抗体である請求項 16 記載のドラッグデリバリーシステム。

**【請求項 18】**

薬剤が細胞障害性物質、化学療法剤または放射性同位体である請求項 16 または 17 記載のドラッグデリバリーシステム。

10

20

30

40

50

- 【請求項 19】  
抗Embigin抗体を含有するTh17細胞判定用試薬。
- 【請求項 20】  
抗Embigin抗体が蛍光物質または放射性同位体で標識されている請求項 19 記載の試薬。
- 【請求項 21】  
Embigin遺伝子転写産物を特異的に検出し得る核酸を含有するTh17細胞判定用試薬。
- 【請求項 22】  
請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項記載の試薬を含有する、Th17細胞判定用キット。
- 【請求項 23】  
Embiginの発現を測定することを特徴とする、Th17細胞判定方法。 10
- 【請求項 24】  
被検動物より採取された細胞のEmbiginの発現を測定する請求項 23 記載の方法。
- 【請求項 25】  
請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項記載の試薬を用いてEmbiginの発現を測定する請求項 24 または 25 記載の方法。
- 【請求項 26】  
Th17細胞の判定における、マーカー分子としてのEmbiginまたはEmbigin遺伝子転写産物の使用。
- 【発明の詳細な説明】 20
- 【技術分野】
- 【0001】  
本発明は、自己免疫疾患やアレルギー疾患の治療剤に関する。詳しくは、Th17細胞が関連する上記疾患の治療剤、Th17細胞に対して細胞障害活性を有する薬剤等に関する。
- 【背景技術】
- 【0002】  
獲得免疫の中心的役割を担うヘルパーT細胞（以下、「Th細胞」と称す。）は、産生するサイトカインの違いなどから、細胞性免疫に關与するTh1細胞と液性免疫に關与するTh2細胞とに分類されていた。
- しかしながら、近年、Th1細胞およびTh2細胞と異なる新たなTh細胞のサブセットとして、IL-17を特異的に産生するTh細胞としてTh17細胞が同定された（非特許文献1）。このTh17細胞は、多発性硬化症、乾癬、リウマチ、炎症性大腸炎をはじめとした広範囲の自己免疫疾患や、接触性過敏症やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患に關与することが明らかにされ、例えば、多発性硬化症では、動物モデルを用いて、従来重要と考えられていたTh1細胞よりもTh17細胞がより強い病原性細胞であることが判明している（非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4）。
- このようにTh17細胞は、新たな自己免疫疾患やアレルギー疾患等のターゲットとして注目されているが、Th17細胞選択的に作用する医薬はまだ開発されていない。
- 【0003】  
例えばFTY-720（フィンゴリモド）などを用いて、病変へのリンパ球浸潤を非特異的に抑制することによって自己免疫疾患を治療する試みが行われている。しかしながら、投薬の中断によってただちに症状が悪化することが報告されており（非特許文献5）、課題が依然としてある。
- また、このアプローチと異なり、Th17細胞およびTh1細胞の両方を、ADCC活性を有する抗体（抗リンフォトキシン抗体）を用いて体内から除去することで、種々の自己免疫疾患モデルで治療効果を示すことが報告されている（特許文献1）。しかしながら、Th1細胞、Th17細胞はともに生体防御にも關与していることから（非特許文献2、非特許文献3）、非特異的な作用（FTY-720）あるいはTh1細胞とTh17細胞の両方の機能を阻害することは生体防御機能を過剰に低下させることにつながりかねない。従って、自己免疫疾患の病原性細胞として強い作用を示すTh17細胞に特異的に作用する医薬品が望まれている。 40
- 50

## 【 0 0 0 4 】

そのような医薬品の開発をするには、例えば、Th17細胞特異的に発現している分子をターゲットとすることが考えられる。Th17細胞に特異的に発現する分子としては、これまでに核内受容体であるROR  $\gamma$  tなどが同定されているが（非特許文献6）、Th17細胞特異的な細胞表面分子は見出されていない（非特許文献7）。

## 【 0 0 0 5 】

ところで、Embiginは、CD147(Basigin)、neuroplastinとファミリーをなす1回膜貫通タンパク質として知られている。

Embiginは、胚性癌腫細胞（非特許文献8）、マウス胎児期（初期内胚葉）（非特許文献9）、ラット前立腺・乳腺・心・肝・肺・脳（非特許文献10）、ラット筋肉（非特許文献11）、マウス血球系細胞（非特許文献12）での発現が報告されている。また、Embiginは、ラット肝繊維症モデルで発現が上昇することが報告されている（特許文献2）。

10

## 【 0 0 0 6 】

また、Embiginは、CD4<sup>+</sup>細胞を抗CD3抗体/抗CD28抗体で刺激した際に変動する数千個の遺伝子の一つとして報告されている（特許文献3）。しかしながらこの報告は、Th1細胞またはTh2細胞に分化誘導した細胞とTh0細胞を用いた比較であり、Embiginがどの細胞でどのような変動をしたかについては記載がなく、またTh17細胞に関しても全く記載がない。

## 【 先行技術文献 】

20

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 7 】

【特許文献1】国際公開第2008/063776号

【特許文献2】欧州特許出願公開第1811041号

【特許文献3】国際公開第2005/016962号

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 8 】

【非特許文献1】J. Exp. Med. (2005);201:233-240

【非特許文献2】Immunological Reviews (2008);223:87-113

【非特許文献3】J. Allergy Clin. Immunol. (2009);123:1004-1011

30

【非特許文献4】Clinical and Experimental Immunology (2009);159:109-119

【非特許文献5】Journal of Neuroimmunology 153 (2004);108-121

【非特許文献6】Cell (2006);126:1121-1133

【非特許文献7】Annual Review of Immunology (2008);27:485-517

【非特許文献8】Differentiation. (1990);45:76-83

【非特許文献9】Develop. Growth Differ. (1998);40:277-286

【非特許文献10】Developmental Genetics (1997);21:268-278

【非特許文献11】J. Biol. Chem. (2009);284:8930-8939

【非特許文献12】J. Immunology (2008);180:1719-1728

## 【 発明の概要 】

40

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明の課題は、Th17細胞をターゲットとした、多発性硬化症治療剤などの自己免疫疾患やアレルギー疾患の治療剤やTh17細胞に対する細胞障害剤を提供することにある。また、本発明の課題は、Th17細胞により選択的に発現する細胞表面分子を見出し、Th17細胞に薬剤を到達させるためのドラッグデリバリーシステム（DDS）、Th17細胞のマーカーおよびTh17細胞の簡便な判定方法を提供することにある。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 0 】

本発明者らは、鋭意研究した結果、Embiginは、Th17細胞表面には高発現し、その一方

50

でTh1細胞、Th2細胞、Th0細胞、B細胞や白血球細胞などの血液由来培養細胞を含む他の血液細胞における発現量は極めて少ないことを見出した。そして、細胞障害活性を有する薬剤を結合した抗Embigin抗体がTh17細胞を選択的に減少あるいは除去すること、および細胞障害活性を誘導する構造を有する抗Embigin抗体が、Th17細胞を選択的に減少あるいは除去し、且つ自己免疫疾患モデル動物に対して予防および治療効果を示すことから、細胞障害活性を有する薬剤を結合した抗Embigin抗体や細胞障害活性を誘導する構造を有する抗Embigin抗体が自己免疫疾患やアレルギー疾患、特に多発性硬化症に有用であることを見出して本発明を完成させた。

また、抗Embigin抗体に結合させた薬剤がTh17細胞に効率良く到達することから、抗Embigin抗体がTh17細胞に薬剤を到達させるドラッグデリバリーシステムに有用であることを新たに発見した。

更に、本発明者らは、Th17細胞について鋭意研究を行った結果、Th17細胞には他の血液細胞よりもEmbiginが高発現していることから、血液細胞のEmbiginの発現を調べることでよりTh17細胞を簡便に判定できることを見出した。

#### 【 0 0 1 1 】

即ち、本発明は以下に関する。

[ 1 ] 抗Embigin抗体を含有する自己免疫疾患またはアレルギー疾患の予防および/または治療剤。

[ 2 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害活性または細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である [ 1 ] 記載の剤。

[ 3 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である [ 1 ] 記載の剤。

[ 4 ] 細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体が、抗体依存性細胞障害活性 ( A D C C ) および/または補体依存性細胞障害作用 ( C D C ) を誘導する構造を有する抗体である [ 3 ] 記載の剤。

[ 5 ] 細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体のサブクラスがIgG1、IgG3またはIgMである [ 3 ] 記載の剤。

[ 6 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害活性を有する抗Embigin抗体である [ 1 ] 記載の剤。

[ 7 ] 細胞障害活性を有する抗Embigin抗体が、細胞障害性物質、化学療法剤または放射性同位体と結合した抗体である [ 6 ] 記載の剤。

[ 8 ] 疾患が、Th17細胞が関連する疾患である [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれかに記載の剤。

[ 9 ] 疾患が、多発性硬化症、乾癬、リウマチ、炎症性大腸炎、接触性過敏症、ステロイド抵抗性喘息、慢性非感染性ぶどう膜炎、慢性閉塞性肺疾患、糸球体腎炎またはアトピー性皮膚炎である [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれかに記載の剤。

[ 1 0 ] 疾患が多発性硬化症である [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれかに記載の剤。

[ 1 1 ] 抗Embigin抗体を含有するTh17細胞に対する細胞障害剤。

[ 1 2 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害活性または細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である [ 1 1 ] 記載の剤。

[ 1 3 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である [ 1 1 ] 記載の剤。

[ 1 4 ] 細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体が、抗体依存性細胞障害活性 ( A D C C ) および/または補体依存性細胞障害作用 ( C D C ) を誘導する構造を有する抗体である [ 1 3 ] 記載の剤。

[ 1 5 ] 細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体のサブクラスがIgG1、IgG3またはIgMである [ 1 3 ] 記載の剤。

[ 1 6 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害活性を有する抗Embigin抗体である [ 1 1 ] 記載の剤。

[ 1 7 ] 細胞障害活性を有する抗Embigin抗体が、細胞障害性物質、化学療法剤または放射性同位体と結合した抗体である [ 1 6 ] 記載の剤。

[ 1 8 ] Th17細胞に薬剤が到達されるように用いられることを特徴とする、ドラッグデリ

10

20

30

40

50

バリーシステム (DDS) 用抗Embigin抗体。

[ 1 9 ] 前記薬剤と結合した抗体である [ 1 8 ] 記載の抗体。

[ 2 0 ] 薬剤が細胞障害性物質、化学療法剤または放射性同位体である [ 1 8 ] または [ 1 9 ] 記載の抗体。

[ 2 1 ] 抗Embigin抗体を用いることを特徴とする、薬剤をTh17細胞に到達させるドラッグデリバリーシステム。

[ 2 2 ] 抗Embigin抗体が前記薬剤と結合した抗体である [ 2 1 ] 記載のドラッグデリバリーシステム。

[ 2 3 ] 薬剤が細胞障害性物質、化学療法剤または放射性同位体である [ 2 1 ] または [ 2 2 ] 記載のドラッグデリバリーシステム。

[ 2 4 ] 抗Embigin抗体を含有するTh17細胞判定用試薬。

[ 2 5 ] 抗Embigin抗体が蛍光物質または放射性同位体で標識されている [ 2 4 ] 記載の試薬。

[ 2 6 ] Embigin遺伝子転写産物を特異的に検出し得る核酸を含有するTh17細胞判定用試薬。

[ 2 7 ] [ 2 4 ] ~ [ 2 6 ] のいずれかに記載の試薬を含有する、Th17細胞判定用キット。

[ 2 8 ] Embiginの発現を測定することを特徴とする、Th17細胞判定方法。

[ 2 9 ] 被検動物より採取された細胞のEmbiginの発現を測定する [ 2 8 ] 記載の方法。

[ 3 0 ] [ 2 4 ] ~ [ 2 6 ] のいずれかに記載の試薬を用いてEmbiginの発現を測定する [ 2 8 ] または [ 2 9 ] 記載の方法。

[ 3 1 ] Th17細胞の判定における、マーカー分子としてのEmbiginまたはEmbigin遺伝子転写産物の使用。

[ 3 2 ] 対象に有効量の抗Embigin抗体を投与することを含む、該対象における自己免疫疾患またはアレルギー疾患を予防および / または治療する方法。

[ 3 3 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害活性または細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である [ 3 2 ] 記載の方法。

[ 3 4 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である [ 3 2 ] 記載の方法。

[ 3 5 ] 細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体が、抗体依存性細胞障害活性 ( A D C C ) および / または補体依存性細胞障害作用 ( C D C ) を誘導する構造を有する抗体である [ 3 4 ] 記載の方法。

[ 3 6 ] 細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体のサブクラスがIgG1、IgG3またはIgMである [ 3 4 ] 記載の方法。

[ 3 7 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害活性を有する抗Embigin抗体である [ 3 2 ] 記載の方法。

[ 3 8 ] 細胞障害活性を有する抗Embigin抗体が、細胞障害性物質、化学療法剤または放射性同位体と結合した抗体である [ 3 7 ] 記載の方法。

[ 3 9 ] 疾患が、Th17細胞が関連する疾患である [ 3 2 ] ~ [ 3 8 ] のいずれかに記載の方法。

[ 4 0 ] 疾患が、多発性硬化症、乾癬、リウマチ、炎症性大腸炎、接触性過敏症、ステロイド抵抗性喘息、慢性非感染性ぶどう膜炎、慢性閉塞性肺疾患、糸球体腎炎またはアトピー性皮膚炎である [ 3 2 ] ~ [ 3 8 ] のいずれかに記載の方法。

[ 4 1 ] 疾患が多発性硬化症である [ 3 2 ] ~ [ 3 8 ] のいずれかに記載の方法。

[ 4 2 ] Th17細胞に抗Embigin抗体を接触させることを含む、Th17細胞に細胞障害を誘導する方法。

[ 4 3 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害活性または細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である [ 4 2 ] 記載の方法。

[ 4 4 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体である [ 4 2 ] 記載の方法。

10

20

30

40

50

[ 4 5 ] 細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体が、抗体依存性細胞障害活性 ( A D C C ) および / または補体依存性細胞障害作用 ( C D C ) を誘導する構造を有する抗体である [ 4 4 ] 記載の方法。

[ 4 6 ] 細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体のサブクラスがIgG1、IgG3またはIgMである [ 4 4 ] 記載の方法。

[ 4 7 ] 抗Embigin抗体が、細胞障害活性を有する抗Embigin抗体である [ 4 2 ] 記載の方法。

[ 4 8 ] 細胞障害活性を有する抗Embigin抗体が、細胞障害性物質、化学療法剤または放射性同位体と結合した抗体である [ 4 7 ] 記載の方法。

[ 4 9 ] 対象に有効量の抗Embigin抗体を投与することにより、対象中のTh17細胞に抗Embigin抗体を接触させる、[ 4 2 ] ~ [ 4 8 ] のいずれかに記載の方法。 10

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明により、自己免疫疾患またはアレルギー疾患の予防および治療剤、並びにTh17細胞に対する細胞障害剤を提供することができる。

更に、本発明により、Th17細胞に薬剤を到達させるためのドラッグデリバリーシステム、簡便にTh17細胞を判定することができるTh17細胞判定用試薬やTh17細胞判定方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】マウスEmbigin発現ラット細胞およびラット細胞に対する抗Embigin抗体の結合活性をフローサイトメトリーにより評価した図である。抗Embigin抗体に対するIsotype(rat IgG)は5 µg/mL濃度で、抗Embigin抗体(抗emb抗体)は、培養上清を使用した。 20

【図 2】マウスEmbigin発現ハムスター細胞およびハムスター細胞に対する抗Embigin抗体の結合活性をフローサイトメトリーにより評価した図である。Isotypeは5 µg/mL濃度で、抗Embigin抗体(抗emb抗体)は、培養上清を使用した。

【図 3】Th17細胞およびTreg細胞より調製したタンパク質に含まれるEmbigin量をウェスタンブロッティングにより評価した図である。

【図 4】Th17細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th0細胞およびTreg細胞より調製したtotal RNA中におけるEmbigin mRNA量をqRT-PCR法により評価した図である。 30

【図 5】Th17を含む各種細胞における細胞膜上のEmbigin量をフローサイトメトリーで評価した図である。Isotype(rat IgG)におけるgeo mean値に対する抗Embigin抗体使用時のgeo mean値の比率を示した。複数のピークが認められた場合は、それぞれの値を示した。抗マウスB220抗体(B細胞マーカー)、抗マウスCD11a抗体(白血球マーカー)または抗マウスCD3抗体(CD3陽性細胞マーカー)で、各細胞を同定した。

【図 6】マウスEmbiginに対応するヒト遺伝子(Homo sapiens Embigin。以下、「ヒトEmbigin」と称す。)発現マウス細胞およびマウス細胞に対する抗ヒトEmbigin抗体の結合活性をフローサイトメトリーにより評価した図である。抗ヒトEmbigin抗体に対するIsotype(rat IgG)は5 µg/mL濃度で、抗Embigin抗体(抗emb抗体)は、培養上清を使用した。

【図 7】ヒトTh17細胞膜表面のEmbigin発現をフローサイトメトリーにより評価した図である。Isotype(rat IgG)は5 µg/mL濃度で、抗Embigin抗体(抗emb抗体)は、培養上清を使用した。 40

【図 8】病原性細胞におけるトキシン修飾抗Embigin抗体の細胞除去特異性を評価した図である。

【図 9】病原性細胞における抗Embigin抗体の細胞除去特異性を評価した図である。

【図 10】市販の臓器パネルを使用して、マウスの種々の臓器のマウスEmbigin発現量をウェスタンブロッティングにより評価した図である。市販のウサギ抗マウスEmbigin抗体は1000分の1倍希釈で使用した。

【図 11】マウスに移入した蛍光ラベルした病原性細胞のマウスの脾臓における細胞数に及ぼす抗Embigin抗体(抗Emb抗体)投与の効果を評価した図である。CFSEで標識したマウ 50

スの病原性細胞は $1.5 \times 10^7$  cells、抗Embigin抗体は30  $\mu$ gあるいは100  $\mu$ g使用した。蛍光細胞数の検出はフローサイトメトリーを使用した。図中、 $\square$  は各個体の測定値を示す。

【図12】病原性細胞における抗Embigin抗体の細胞除去特異性を評価した図である。

【図13】抗Embigin抗体でTh17細胞を選択的に除去した細胞をマウスに移入して、多発性硬化症モデルの病態スコアを評価した図である。移入細胞は $3 \times 10^6$  cells、抗Embigin抗体は1  $\mu$ g/mL使用した。病態スコアは細胞移入後20日まで評価した。

【図14】PLPを免疫して多発性硬化症モデルを誘発したマウスに、病態発症前に抗Embigin抗体を投与して、病態スコアへの影響を評価した図である。PLPはフロイント完全アジュバントと混ぜて皮下に1回投与した。抗Embigin抗体は300  $\mu$ gを免疫後7日目と14日目（矢印で示す）に2回投与した。病態スコアはPLP免疫後18日まで評価した。

【図15】PLPを免疫して多発性硬化症モデルを誘発したマウスに、病態発症後に抗Embigin抗体を投与して、病態スコアへの影響を評価した図である。PLPはフロイント完全アジュバントと混ぜて皮下に1回投与した。病態を発症したマウスはPLP免疫12日目に、病態スコアを基準に群分けを行い、群分け日と群分け7日後（矢印で示す）に2回、抗Embigin抗体を100  $\mu$ g投与した。病態スコアはPLP免疫後23日まで評価した。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0015】

#### 1. 本発明における抗Embigin抗体

Embiginは、CD147(Basigin)やneuropilinとファミリーをなす1回膜貫通タンパク質である。Embiginは、例えば、ヒトEmbigin (NCBIデータベース アクセッション番号: NP\_940851、配列番号1)、ラットEmbigin (同アクセッション番号: NP\_446171) やマウスEmbigin (同アクセッション番号: NP\_034460、配列番号8) のアミノ酸配列が知られている。

また、Embiginをコードする遺伝子（以下、「Embigin遺伝子」と称す。）の核酸配列についても、例えば、ヒトEmbigin遺伝子（同アクセッション番号: NM\_198449、配列番号2）やマウスEmbigin遺伝子（同アクセッション番号: NM\_010330、配列番号9）が知られている。

本明細書におけるEmbiginとは、これらの公知の配列で示される「タンパク質」または「(ポリ)ペプチド」だけでなく、例えば、ヒトEmbiginを示す特定のアミノ酸配列と生物学的機能が同等であることを限度として、その同族体（ホモログやスプライスバリエーション）、変異体、誘導体、成熟体およびアミノ酸修飾体などが包含される。ここでホモログとしては、ヒトのタンパク質に対応するマウスやラットなど他生物種のタンパク質が例示でき、これらはHomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>) により同定された遺伝子の塩基配列から演繹的に同定することができる。また変異体には、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、および人為的に欠失、置換、付加または挿入されることによって改変されたアミノ酸配列を有する変異体が包含される。なお、上記変異体としては、変異のないタンパク質または(ポリ)ペプチドと、少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97%相同なものを挙げることができる。またアミノ酸修飾体には、天然に存在するアミノ酸修飾体、天然に存在しないアミノ酸修飾体が包含され、具体的にはアミノ酸のリン酸化体が挙げられる。

【0016】

本発明における抗Embigin抗体は、Embiginを特異的に認識する抗体であればよい。「特異的に認識する」とは、Embiginに特異的に結合することを意味する。具体的には、Embigin遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「Embigin」ともいう）を特異的に認識することのできる抗体であればよく、Embiginの細胞外領域（配列番号1で示されるアミノ酸配列の第32～第257番目）を認識することのできる抗体が好ましい。

本発明で用いられる上記抗体には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体が含まれる。重鎖の定常ドメインのタイプに依存して、抗体は、5つの主要なクラス: IgA、I

g D、I g E、I g G、またはI g Mに分けられる。これらのうちのいくらかは、さらにサブクラスまたはイソタイプ（例えばI g Gの場合、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4など）に分けられる。

抗体にはヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、またはF a bフラグメントやF a b発現ライブラリーによって生成されるフラグメント、低分子化抗体（抗体断片も含む）、多特異性抗体等、さらに薬剤と結合した抗体などの抗体修飾物が含まれる。さらに、抗原結合性を有する上記抗体の一部、細胞障害誘導活性が増強された抗体、二種特異性抗体、タンパク質と融合させた抗体等も包含される。

#### 【0017】

本発明で使用される抗Embigin抗体は、例えば市販の抗Embigin抗体（サンタクルーズ社製、eBioscience社製など）を使用することもできるし、公知の手段を用いて製造されるポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってもよい。

本発明で使用される抗Embigin抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は当業者に公知の方法によって作製することができる。

哺乳動物由来のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体としては、動物の血中に産生されるもの、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるもの、ファージディスプレイにより1兆個の分子からなる莫大なクローンライブラリーから最適抗体がスクリーニングされ、その遺伝子をCHO細胞工場で大量生産されるもの、もしくは、ヒトの抗体を生産するトランスジェニックマウスを使い、直接ヒト抗体が得られるものなどが挙げられる。

#### 【0018】

ポリクローナル抗体の作製のために本発明の抗Embigin抗体取得の感作抗原として使用されるタンパク質は、ヒト、マウス、ラットなど、その由来となる動物種に制限されない。しかし細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択することが好ましく、一般的には、哺乳動物由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。また、完全なタンパク質あるいはタンパク質の部分ペプチドであってもよい。例えば、EmbiginがヒトEmbiginの場合、ヒトEmbiginタンパク質やヒトEmbiginを発現する細胞、ヒトEmbiginの部分ペプチドなどを用いることができる。タンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、タンパク質のアミノ（N）末端断片やカルボキシ（C）末端断片が挙げられる。本発明における抗Embigin抗体とは、Embiginタンパク質の全長または断片に反応する抗体を意味する。

例えば、ポリクローナル抗体は、次のようにして得ることができる。すなわち、天然のEmbiginタンパク質、あるいはG S Tとの融合タンパク質として大腸菌等の微生物において発現させたりコンビナントEmbiginタンパク質、またはその部分ペプチドを、ウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、D E A Eイオン交換クロマトグラフィー、Embiginタンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製する。

抗原の調製は、例えば、バキュロウイルスを用いた方法（例えば、国際公開第W O 9 8 / 4 6 7 7 7号など）などに準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

#### 【0019】

モノクローナル抗体の製造方法としては、公知の方法にしたがって、感作抗原を動物に免疫する。一般的な方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をP B S（Phosphate-Buffered Saline）や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4 - 2 1日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付すが、好ましい免疫細胞としては、特に

10

20

30

40

50

脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローム細胞を用いる。このミエローム細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P 3 U 1 ( P 3 - X 6 3 A g 8 U 1 )、P 3 ( P 3 x 6 3 A g 8 . 6 5 3 ) ( J. Immunol. ( 1979 ) 123, 1548-1550 )、P 3 x 6 3 A g 8 U . 1 ( Current Topics in Microbiology and Immunology ( 1978 ) 81, 1-7 )、N S - 1 ( Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. ( 1976 ) 6, 511-519 )、M P C - 1 1 ( Margulies, D. H. et al., Cell ( 1976 ) 8, 405-415 )、S P 2 / 0 ( Shulman, M. et al., Nature ( 1978 ) 276, 269-270 )、F O ( de St. G roth, S. F. et al., J. Immunol. Methods ( 1980 ) 35, 1-21 )、S 1 9 4 ( Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. ( 1978 ) 148, 313-323 )、R 2 1 0 ( Galfre, G. et al., Nature ( 1979 ) 277, 131-133 ) 等が好適に使用される。

10

前記免疫細胞とミエローム細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケラーとミルステインらの方法 ( Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. ( 1981 ) 73, 3-46 ) 等に準じて行うことができる。

#### 【 0 0 2 0 】

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール ( P E G )、センダイウイルス ( H V J ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローム細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローム細胞に対して免疫細胞を 1 - 10 倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローム細胞株の増殖に好適な R P M I 1 6 4 0 培養液、M E M 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 ( F C S ) 等の血清補液を併用することもできる。

20

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローム細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め 37 程度に加温した P E G 溶液 ( 例えば平均分子量 1 0 0 0 - 6 0 0 0 程度 ) を通常 3 0 - 6 0 % ( w / v ) の濃度で添加し、混合することによって目的とするハイブリドーマを形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えば E B ウィルスに感染し不死化したヒトリンパ球を *in vitro* で Embigin タンパク質、Embigin タンパク質発現細胞またはその溶解物で感作することにより、ヒト抗 Embigin 抗体産生細胞株を作製することもできる。また、抗体分泌能を安定に持続させるために、感作リンパ球を上記と同様のマウスミエローム細胞やヒト由来の永久分裂能を有するミエローム細胞、例えば U 2 6 6 と融合させ、所望の活性 ( Embigin 結合活性 ) を有するヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる。

30

#### 【 0 0 2 1 】

このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば H A T 培養液 ( ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液 ) で培養することにより選択される。上記 H A T 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 ( 非融合細胞 ) が死滅するのに十分な時間 ( 通常、数日 ~ 数週間 ) 継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングを行う。

40

#### 【 0 0 2 2 】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

50

## 【 0 0 2 3 】

ヒト抗体は、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意味する。ヒト抗体は、例えば、ヒト抗体遺伝子座を導入し、ヒト由来抗体を産生する能力を有するトランスジェニック動物に抗原を投与することにより得ることができる。該トランスジェニック動物としてマウスが挙げられ、ヒト抗体を産生し得るマウスの作出方法は、例えば、国際公開W O 0 2 / 4 3 4 7 8号に記載されている。

本発明におけるモノクローナル抗体には、抗体を構成する重鎖および/または軽鎖の各々のアミノ酸配列において一若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する重鎖および/または軽鎖からなるモノクローナル抗体も包含される。本発明による抗体のアミノ酸配列中への、このようなアミノ酸の部分的改変（欠失、置換、挿入、付加）は、そのアミノ酸配列をコードする塩基配列を部分的に改変することにより導入することができる。この塩基配列の部分的改変は、既知の部位特異的変異導入法（Site specific mutagenesis）を用いて常法により導入することができる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1984 Vol.81, 5662-5666; Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual (1989) Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press）。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（型）抗体、ヒト化抗体も使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

## 【 0 0 2 4 】

キメラ型抗体は、異なる動物種に由来する2以上の部分の結合によって特徴づけられる免疫グロブリン分子である。一般に、キメラ型抗体の可変領域は、ヒト以外の哺乳類抗体（例えばマウスモノクローナル抗体）に由来し、その免疫グロブリン定常領域は、ヒト免疫グロブリン分子に由来する。好ましくは、低免疫原性を持つ可変領域を選択し、それを、やはり低免疫原性を持つヒト定常領域と組み合わせる。そして、その組み合わせもまた、低い免疫原性を持つことが好ましい。キメラ型抗体には、一価、二価または多価免疫グロブリンが含まれる。一価のキメラ型抗体は、ジスルフィド橋を介してキメラL鎖と結合したキメラH鎖によって形成される二量体（HL）である。二価のキメラ型抗体は、少なくとも1つのジスルフィド橋を介して結合した2つのHL二量体によって形成される四量体（H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>）である。

キメラ型抗体およびそれらの製造方法は、当該技術分野で既に記述されている（Morrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984) ; Boulianne et al., Nature 312:643-646 (1984) ; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443 (1987) ; Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:214-218 (1987) ; Better et al., Science 240:1041-1043 (1988) ; およびHarlowとLane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory (1988) ) 。

## 【 0 0 2 5 】

ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 1 2 5 0 2 3号明細書、国際公開第W O 9 2 / 1 9 7 5 9号参照）。ヒト化抗体の製造方法としては、公知の方法を用いて行うことができる。例えば、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（FR ; framework region）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 2 3 9 4 0 0号明細書、国際公開第W O 9 2 / 1 9 7 5 9号参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

キメラ抗体、ヒト化抗体には、ヒト抗体C領域が使用される。ヒト抗体C領域としては、C<sub>1</sub>が挙げられ、例えば、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>またはC<sub>4</sub>を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明に使用される抗体として有用である。

#### 【0026】

本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、FvまたはFvのH鎖(VH)とL鎖(VL)を適当なリンカーで連結させてFvを形成させた一本鎖抗体(scFv)、VHとVLを含むポリペプチドの二量体で分子間VH-VL相互作用により会合したダイアボディ、scFvのH鎖に定常領域の一部(CH3)が結合したものの二量体であるミニボディ、その他の低分子化抗体等が挙げられる。

低分子化抗体は、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部が欠損している抗体断片を含み、抗原(Embiginタンパク質)への結合能を有していれば特に限定されない。抗体断片は、全長抗体の一部であれば特に限定されないが、重鎖可変領域(VH)またはノおよび軽鎖可変領域(VL)を含んでいることが好ましい。

#### 【0027】

一本鎖抗体とは、「単鎖Fv」すなわち「scFv」抗体フラグメントとも呼ばれ、抗体のVHおよびVLドメインを含有し、これらのドメインはポリペプチド単鎖に存在する。「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。一般的に「Fv」断片は1つのVHおよびVLが非共有結合により強く連結されたダイマー(VH-VLダイマー)である。各可変領域の3つの相補鎖決定領域(complementarity determining region; CDR)が相互作用し、VH-VLダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6つのCDRが抗体に抗原結合部位を付与している。しかしながら、1つの可変領域(または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)であっても、全結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、結合する能力を有する。scFvポリペプチドは、scFvが抗体結合のための所望の構造を形成できるように、VHとVLドメインとの間にポリペプチドリッカーを更に含んでいる(Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994))。

#### 【0028】

低分子化抗体や一本鎖抗体は、例えば、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & 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, Roussaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照)ことにより、製造することができる。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、FvポリペプチドはさらにVHおよびVLの間にポリペプチドリッカーを含んでおり、これによりscFvは、抗原結合のために必要な構造を形成することができる(scFvの総説については、Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol.113 (Rosenberg and Moore ed (Springer-Verlag, New York) pp.269-315, 1994)を参照)。リンカーは、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に限定されない。

このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリッカーを介して連結される(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1

10

20

30

40

50

988) 85, 5879-5883)。s c F vにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12 - 19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

s c F vをコードするDNAは、前記抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。また、一旦s c F vをコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、s c F vを得ることができる。

#### 【0029】

ダイアボディは、遺伝子融合により構築された二価(bivalent)の抗体断片を指す(Ho lliger P et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)、欧州特許出願公開第404097号明細書、国際公開第W093/11161号等)。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、通常、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中でVLおよびVHが、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため単鎖可変領域フラグメントを形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。

s c (F v) 2は、2つのVHおよび2つのVLをリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である(Hudson et al., J Immunol. Methods 1999; 231: 177-189)。s c (F v) 2は、例えば、2つのs c F vをリンカーで結ぶことによって作製できる。

#### 【0030】

本発明において、抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、または合成化合物リンカー(例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996参照)に開示されるリンカー等を用いることができる。ペプチドリンカーを用いる場合、その長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、通常、1~100アミノ酸、好ましくは3~50アミノ酸、更に好ましくは5~30アミノ酸、特に好ましくは12~18アミノ酸(例えば、15アミノ酸)である。合成化学物リンカー(化学架橋剤)は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS<sup>3</sup>)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(DTSSP)、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ-EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホ-DST)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOSES)、ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOSES)などであり、これらの架橋剤は市販されている。

#### 【0031】

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体修飾物としては、ポリエチレングリコール(PEG)、蛍光物質、放射性同位体、薬剤等の各種分子と結合した抗体を挙げることもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてす

10

20

30

40

50

に確立されている。

【0032】

細胞障害誘導活性が増強された抗体としては、例えば、フコースが欠損した抗体、糖鎖にバイセクティング(bisecting) N - アセチルグルコサミン(GlcNAc)が付加した抗体、Fc領域のアミノ酸を置換することによりFc受容体との結合活性を変化させた抗体などを挙げることができる。これら細胞障害誘導活性が増強された抗体は当業者に公知の方法で作製することができる。

異なるサブクラスの抗体をヒトIgG1に変換する場合、例えば抗体産生ハイブリドーマ由来のcDNAから可変領域のコード領域だけを単離し、ヒトIgG1の定常領域を含むベクター、例えばN5KG1-VaI Larkベクター (IDEC Pharmaceuticals, N5KG1 (US patent 6001358)) に導入することにより作製することができる。

10

【0033】

二種特異性抗体は、二種の抗原を認識する抗体のことであり、その作製方法も公知である(例えば、Journal of Immunology, 1994, 152, 5368-5374)。抗原の1つがEmbiginであり、他方がEmbigin以外の異種の抗原であればよい。異種の抗原としては、免疫系のエフェクタ細胞の他の細胞表面抗原、例えば、CD3、CD28、CD16、CD64などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0034】

タンパク質と融合させた抗体は、抗体のN末端あるいはC末端に異種タンパク質が融合した抗体であり、その作製方法も公知である(例えば、Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281)。抗Embigin抗体に異種タンパク質を結合させたキメラ分子であれば良い。異種タンパク質としては、例えば、Fc受容体、サイトカインなどが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0035】

前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し、均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F.等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

30

例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC (High performance liquid chromatography) に適用し得る。また、逆相HPLCを用いてもよい。

【0036】

2. 本発明の予防・治療剤およびTh17細胞に対する細胞障害剤

本発明者らは、トキシン修飾された抗Embigin抗体や磁気ビーズを結合させた抗Embigin抗体が、Th17細胞を選択的に除去すること、さらに、ラットIgG2bである抗Embigin抗体がTh17細胞を選択的に減少させるだけでなく、自己免疫疾患モデル動物に対して予防および治療効果を示すことから、抗Embigin抗体、例えば細胞障害活性を有する薬剤を結合した抗Embigin抗体や細胞障害活性を誘導する構造を有する抗Embigin抗体等は、Th17細胞が関連する自己免疫またはアレルギー疾患の予防および治療剤、特に多発性硬化症の予防および治療剤として利用可能であることを見出した。

40

従って、本発明は、抗Embigin抗体を含有する自己免疫疾患またはアレルギー疾患の予防および治療剤を提供する。

【0037】

本発明の自己免疫疾患またはアレルギー疾患予防・治療剤に含有される抗Embigin抗体

50

は、「1. 本発明における抗Embigin抗体」に記載した抗体であれば特に限定されないが、例えば、細胞障害活性を有する抗Embigin抗体や細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体等を好ましく用いることができる。

「細胞障害活性」としては、例えば、殺細胞活性、細胞機能障害活性または細胞増殖抑制活性が挙げられる。本発明ではこれらの活性のうち少なくとも1つの活性を有していればよい。また、抗Embigin抗体自体が細胞障害活性（例えば、ADCC・CDC非依存的なアポトーシス誘導活性など）を有していてもよいが、好ましくは、抗体に細胞障害活性を付与するため、細胞障害活性を有する薬剤を抗体に結合させて用いることができる。

【0038】

また、細胞障害活性を有する薬剤としては、例えば、細菌由来トキシン等の細胞障害性物質、化学療法剤や放射性同位体を挙げることができる。具体的には、ヨード ( $^{131}\text{I}$  Iodine:  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  Iodine:  $^{125}\text{I}$ )、イットリウム ( $^{90}\text{Y}$  Yttrium:  $^{90}\text{Y}$ )、インジウム ( $^{111}\text{In}$  Indium:  $^{111}\text{In}$ )、テクネチウム ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$  Technetium:  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) 等の放射核種 (J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: principles and practice, 1993 ACADEMIC PRESS)、緑膿菌毒素 (Pseudomonas exotoxin)、ジフテリアトキシン (diphtheria toxin)、リシン (Ricin) のような細菌由来毒素、およびメトトレキサート (Methotrexate)、マイトマイシン (mitomycin)、カリキアマイシン (Calicheamicin)、サポリン (saporin) などの化学療法剤 (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) vol.5, p543-549) 等が挙げられるが、副作用がなく、細胞障害活性の強い薬剤が好ましい。

抗体と薬剤の結合は共有または非共有結合（例えばイオン結合）のいずれでもよい。例えば、抗体分子中の反応性基（例えばアミノ基、カルボキシル基、水酸基等）または配位性基を利用し、必要に応じてより反応性の高い基を結合するかまたは反応性基に変換した後、該反応性基と反応して結合を形成しうる官能基（細菌由来毒素、化学療法剤の場合）または該配位性基との間で錯体を形成しうるイオン性基（放射性核種の場合）をもつ薬剤と抗体とを接触させることによって、抗Embigin抗体と薬剤の複合体を得ることができる。あるいは複合体の形成に際してビオチン - アビジン系の利用も可能である。これらの結合方法はこの分野においてすでに確立されている (Bioconjugate Chem. (2010) vol.21, 5-13, Accounts of chemical research (2008) vol.41, No.1, 98-107)。現在、細胞障害活性を有する薬剤と結合したIgGは複数臨床開発されており (Current Opinion in Pharmacology (2005) vol.5, p543-549)、本発明の細胞障害活性を有する抗Embigin抗体としては、例えば、細胞障害活性を有する薬剤と結合したIgGである抗Embigin抗体が挙げられる。

【0039】

本明細書における「細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体」としては、例えば、Embiginを特異的に認識し、且つ上述した細胞障害活性を誘導する構造を有する抗体が挙げられる。実施例14~17に示すように、細胞障害活性を誘導する構造を有する抗Embigin抗体は、Th17細胞を選択的に除去し、且つ自己免疫疾患動物モデルに対して予防および治療効果を示すことから、抗Embigin抗体が、細胞障害活性を誘導する構造を有する抗体である場合、抗体自体に細胞障害活性がなく、当該活性を有する薬剤と結合していなくても、抗体単独で自己免疫疾患またはアレルギー疾患の予防・治療剤またはTh17細胞に対する細胞障害剤としての機能を発揮することができる。

【0040】

細胞障害活性を誘導する構造を有する抗体としては、具体的には、次の(a)~(c)が挙げられる。

10

20

30

40

50

(a) エフェクタ細胞の存在下で抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) を誘導する構造を有する抗体。

(b) 補体依存性細胞障害作用 (CDC) を誘導する構造を有する抗体。

(c) 抗体依存性細胞介在性ファゴサイトーシス (ADCP) を誘導する構造を有する抗体。

#### 【0041】

上記 (a) のエフェクタ細胞の存在下で抗体依存性細胞障害活性を誘導する構造を有する抗体は広く知られており、例えば、マウス IgG2a および IgG3、ヒト IgG1 および IgG3、ラット IgG2b などのサブクラスに属する抗体などが挙げられる。

これらのサブクラスの医療用抗体としてはリツキシマブ (商品名リツキサン (中外製薬株式会社)) やトラスツズマブ (商品名ハーセプチン (中外製薬株式会社)) などが知られている (例えば、Nat. Rev. Immunol. 2010;10:301-316 を参照)。

上記 (b) の補体依存性細胞障害作用を誘導する構造を有する抗体も広く知られており、例えば、マウス IgM、IgG2a および IgG3、ヒト IgM、IgG1 および IgG3、ラット IgG2b などのサブクラスに属する抗体などが挙げられる。

抗体による ADCC および CDC 活性は IgG のサブクラスに大きく依存し、ヒトでは IgG1 と IgG3 が強い活性を持つことが明らかになっている。従って、細胞障害活性を誘導する構造を有するヒト抗体として、例えば、IgG1 の定常領域、IgG3 の定常領域、または IgM の定常領域を有する抗体が挙げられる。好ましくは、細胞障害活性を誘導する構造を有するヒト抗体としては、IgG1 もしくは IgG3 サブクラスの IgG 抗体、または IgM 抗体が挙げられる。

抗体の細胞障害誘導活性は、例えば ADCC 活性の場合、標的細胞 (Th17 細胞や Embigin を強制発現させた細胞株) と Fc 受容体を発現するエフェクタ細胞 (NK 細胞や単球など) とを抗 Embigin 抗体存在下でインキュベートし、また CDC 活性の場合、標的細胞と抗体とを新鮮ヒト血清 (補体を含む) 存在下でインキュベートし、生細胞数および / または死細胞数を測定することにより、調べることができる。

#### 【0042】

更に、本発明の「細胞障害誘導活性を有する抗 Embigin 抗体」には、2 種類の細胞障害活性を誘導する構造を有する抗体、または細胞障害誘導活性が増強された抗体、Embigin と Embigin 以外の抗原に結合する二種特異性抗体、タンパク質と融合した抗 Embigin 抗体等も含まれる。

細胞障害誘導活性が増強された抗体としては、上記した、Fc 領域糖鎖のフコースが欠損した抗体、該糖鎖にバイセクティング (bisecting) N - アセチルグルコサミン (GlcNAc) が付加した抗体、Fc 領域のアミノ酸を置換することにより Fc 受容体との結合活性を変化させた抗体などを挙げることができる。これらの操作により、エフェクタ細胞上の Fc 受容体との結合活性を 100 倍以上増強することができる。また、抗 Embigin 抗体がヒト IgG2 や IgG4 サブクラスに属する場合、上述の遺伝子組換え手法により、定常領域をヒト IgG1 もしくは IgG3 サブクラスに変換することができる。さらに、ヒト IgG1 にヒト IgG3 の配列の一部を取り込ませたイソタイプキメラ抗体を作製することにより、天然型サブタイプの IgG1 や IgG3 を凌ぐ CDC 活性を付与することができる (Cancer Res. 2008;68:3863-3872; Nat. Rev. Immunol. 2010 (上述) に総説)。

#### 【0043】

「Th17 細胞が関連する疾患」とは、Th17 細胞が病原性細胞である疾患、Th17 細胞が病原細胞として疑われている疾患、Th17 細胞が病態悪化を促進させる疾患、または Th17 細胞が病態悪化を促進する可能性がある疾患のことを意味する。

Th17 細胞が関連する疾患としては、例えば、多発性硬化症、乾癬、リウマチや炎症性大腸炎などの自己免疫疾患、接触性過敏症、ステロイド抵抗性喘息、糸球体腎炎やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を挙げることができ、これらの疾患への Th17 細胞の関与は文献等で既に報告されている (Annu. Rev. Physiol. (2010) 72:495-516、J Am Soc Nephrol (2010) 21: 925-931)。特に、多発性硬化症では、動

10

20

30

40

50

物モデルを用いて従来重要と考えられていたTh1細胞よりもTh17細胞の方がより強い病原性細胞であることが示されている (J. Exp. Med. (2005) 201;233-240)。

また、生体におけるIL-17の主要な産生細胞はTh17細胞であることから、IL-17が関連する疾患も「Th17細胞が関連する疾患」に含まれる。関節リウマチ、炎症性大腸炎、乾癬、慢性非感染性ぶどう膜炎などの疾患については、IL-17の産生を抑制又はIL-17の機能を阻害することにより疾患が改善されることが公知である (J. Immunol. (2003) 171: 6173-6177、Inflamm Bowel Dis (2006):2:382-388、Sci Transl Med (2010) 2; 52ra72)。

#### 【0044】

Th1細胞とTh17細胞はともに生体防御にも関与していることから、非特異的な免疫抑制あるいはTh1細胞とTh17細胞の両方の機能を阻害することは生体防御機能を過剰に低下させることにつながりかねない。従って、Th17細胞に選択的に作用する本発明の治療剤は副作用が少ないことが期待される。また、疾患によっては、Th17細胞はTh1細胞よりも自己免疫疾患の病原性細胞として強い作用を示すため、本発明の治療剤はTh17細胞に選択的に作用することにより、Th17細胞が関与する自己免疫疾患等に対して優れた効果を示す。

#### 【0045】

また、本発明者らは、サポリン修飾された抗Embigin抗体や磁気ビーズを結合させた抗Embigin抗体が、Th17細胞を選択的に除去すること、またラットIgG2b抗体、すなわちADCおよびCDC活性を誘導し得る抗体である抗Embigin抗体もTh17細胞を選択的に除去することから、細胞障害活性を有する薬剤を結合した抗Embigin抗体、または細胞障害活性を誘導する構造を有する抗Embigin抗体は、Th17細胞に対する細胞障害剤としても利用可能であることを見出した。

従って、本発明は、抗Embigin抗体を含有するTh17細胞に対する細胞障害剤を提供する。

本発明の「Th17細胞に対する細胞障害剤」とは、Th17細胞に対して細胞障害を引き起こす薬剤である。したがって、本発明のTh17細胞に対する細胞障害剤としては、例えば、上述の細胞障害活性を有する抗Embigin抗体や細胞障害誘導活性を有する抗Embigin抗体が挙げられる。

#### 【0046】

本発明のTh17細胞に対する細胞障害剤は、例えば、種々の動物病態モデルに本発明の剤を投与すればTh17細胞の病態への関与を確認することができる。

これまで、Th17細胞の自己免疫疾患における病原細胞としての研究は、主にTh17細胞を移入して検証されてきた。しかしながら高純度のTh17細胞を移入に用いた検討ではなく、Th17細胞以外の細胞が混入した検討であった (J. Exp. Med. (2005) 233-240)。したがって、本発明のTh17細胞に対する細胞障害剤を用いることで、Th17の病態への関与をより明確に解析することが可能になるため、本発明の剤は種々の疾患治療の研究に有用である。例えば、自己免疫疾患モデルとして、多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 発症モデルが挙げられ、汎用されているマウスやラットに自己抗原であるPLPあるいはMOG等のペプチド投与によって発症させたEAEモデルを使用することができる (Methods Mol Biol. 2009;549:157-73、Brain (2004) ;127:2201-2213)、これらに限定されるわけではない。

本発明のTh17細胞に対する細胞障害剤は、さらに、上述の「Th17細胞が関連する疾患」の予防および治療にも用いることができる。

本発明のTh17細胞に対する細胞障害剤は、後述の「5. 本発明のTh17細胞判定方法」に記載の方法でTh17細胞数を調べることにより、効果を確認することができる。

#### 【0047】

本発明の治療剤やTh17細胞に対する細胞障害剤は、任意の担体、例えば医薬上許容される担体を含むことができ、医薬組成物の形態で医薬として適用され得る。

医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル等の滑剤、クエン酸、メントール等の芳香剤、安息香

10

20

30

40

50

酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリド等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水等の希釈剤、ベースワックス等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

#### 【0048】

本発明の剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。

#### 【0049】

本発明の剤の投与量は、投与の目的、投与方法、投与経路、剤形、投与対象者の状況（性別、年齢、体重、重篤度など）によって異なるが、成人に注射により投与する場合、通常、一回につき体重1 kgあたり0.0001 mg～100 mgの範囲、あるいは患者あたり1～1000 mg、好ましくは5～50 mgの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の剤および/または組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

また、投与間隔としては、その効果が続く限り次の投与は行わずともよい。例えば、治療期間中は2～8週間に1回投与される、または、数週間もしくは数ヶ月に1回、数年に一回の頻度でよい場合もある。

#### 【0050】

本発明の剤は、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行う。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤の注射剤の形で使用できる。また、例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、ベヒクル、防腐剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常製の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80TM、HCO-50と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

#### 【0051】

### 3. 本発明のドラッグデリバリーシステム用抗Embigin抗体

本発明は、Th17細胞に薬剤を到達させるドラッグデリバリーシステム（DDS）および該DDSに有用な抗Embigin抗体を提供する。

本発明者らは、Th17細胞は他の血液細胞に比べてEmbiginが高発現しており、トキシン修飾された抗Embigin抗体や磁気ビーズを結合させた抗Embigin抗体がTh17細胞を除去するため、抗Embigin抗体がTh17細胞に薬剤を到達させるドラッグデリバリーシステムに利用可能であることを見出した。

#### 【0052】

本発明のドラッグデリバリーシステム用抗Embigin抗体は、Th17細胞の細胞膜表面抗原であるEmbiginに特異的に結合するため、目的の薬剤と該抗体を結合させて複合体を形成することによって該薬剤をTh17細胞に送達させることができる。

抗Embigin抗体としては、例えば、「1. 本発明における抗Embigin抗体」に詳述されて

10

20

30

40

50

いる抗体を挙げる事ができ、市販の抗Embigin抗体（例えば、サンタクルーズ社が販売する抗Embigin抗体など）であってもよい。

薬剤は、抗Embigin抗体と複合体を形成することができる薬剤であればよく、特に限定されない。例えば、細菌由来トキシン等の細胞障害性物質、化学療法剤や放射性同位体を挙げる事ができ、具体的には、「2. 本発明の治療剤及びTh17細胞に対する細胞障害剤」に詳述されている薬剤が挙げられる。薬剤は、副作用がなく、殺細胞活性や細胞増殖抑制活性などの細胞障害活性の強い薬剤が好ましい。薬剤と抗体の結合方法はこの分野においてすでに確立されている。

#### 【0053】

本発明のドラッグデリバリーシステム（DDS）は、抗Embigin抗体と薬剤の複合体を投与することを特徴とするドラッグデリバリーシステムであり、目的の薬剤をTh17細胞に到達させることができる。

本発明のDDSは、*in vitro*や*in vivo*で適用することができる。

*in vitro*の場合は、培養細胞や哺乳動物から採取された細胞を培養する培地に、抗Embigin抗体と薬剤の複合体を添加することにより、Th17細胞に該薬剤を到達させることができる。

また、*in vivo*の場合は、抗Embigin抗体と薬剤の複合体を哺乳動物個体へ皮下投与、静脈投与、浸透圧ポンプによる投与、尾静脈投与などすることにより、生体内のTh17細胞に該薬剤を到達させることができる。哺乳動物としては、ヒト、サル、マウスやラット等を挙げる事ができる。

#### 【0054】

### 4. 本発明のTh17細胞判定用試薬およびキット

Th17細胞は様々な疾患との関連が知られているが、Th17細胞特異的な細胞表面分子はまだ報告されていない。

本発明者らは、EmbiginがマウスTh17細胞およびヒトTh17細胞に高発現しており、特に血液細胞においては、Th17細胞は他の血液細胞に比べてEmbiginを高発現していることから、EmbiginまたはEmbigin遺伝子がTh17細胞のマーカーとして利用可能であることを見出した。

本発明のTh17細胞判定用試薬には、抗Embigin抗体またはEmbigin遺伝子転写産物を特異的に検出し得る核酸が含有される。

抗Embigin抗体としては、例えば、「1. 本発明における抗Embigin抗体」に詳述されている抗体を挙げる事ができる。また、抗Embigin抗体は、蛍光物質または放射性同位体で標識された抗体修飾物であってもよい。標識剤としては後述する核酸と同様のものを使用でき、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等が挙げられ、放射性同位体としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 等が挙げられる。蛍光物質または放射性同位体による抗体の標識は、定法に従って行うことができる。蛍光標識体等で標識された抗Embigin抗体を用いれば、FACS等で容易にTh17細胞を検出することができる。

「Embigin遺伝子転写産物を特異的に検出し得る核酸」は、EmbiginのmRNAを特異的に検出可能な核酸であればよく、検出法に応じてプローブまたはプライマーを適宜選択して用いることができる。例えば、プローブの場合、Embigin mRNAの核酸配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチド配列を挙げる事が出来る。また、プライマーの場合、Embigin mRNAの核酸配列およびその相補鎖配列の各々に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上で、100塩基以下、好ましくは50塩基以下、より好ましくは約40塩基以下の一对のDNA配列であって、それらの配列によりPCR増幅される配列長が、例えば100塩基以上、好ましくは200塩基以上で、例えば1000塩基以下、好ましくは500塩基以下であるDNA配列を含むポリヌクレオチド配列を挙げる事が出来る。

核酸プローブまたはプライマーは、特異的検出に支障を生じない範囲で付加的配列（検

10

20

30

40

50

出対象のポリヌクレオチドと相補的でないヌクレオチド配列)を含んでいてもよい。

また、核酸プローブもしくはプライマーは、適当な標識剤、例えば、放射性同位元素(例： $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 等)、酵素(例： $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等)、蛍光物質(例：フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等)、発光物質(例：ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等)などで標識されていてもよい。あるいは、蛍光物質(例：FAM、VIC等)の近傍に該蛍光物質の発する蛍光エネルギーを吸収するクエンチャー(消光物質)がさらに結合されていてもよい。かかる実施態様においては、検出反応の際に蛍光物質とクエンチャーとが分離して蛍光が検出される。

核酸プローブは、DNA、RNA、キメラ核酸のいずれであってもよく、また、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。Embigin遺伝子の核酸配列に関する公知情報(例えば配列番号2に示されるヒトEmbigin遺伝子の核酸配列)に基づいて、例えばDNA/RNA自動合成機を用いて、常法に従って、Embigin遺伝子転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブを合成することができる。

#### 【0055】

本発明は、Th17細胞を判定するためのキットも提供する。本発明のTh17細胞判定用キットには、Embiginの発現を測定するための試薬が含まれる。本発明のキットを用いてEmbiginの発現を測定することにより、Th17細胞を簡便に判定することができる。

本発明のキットは、抗Embigin抗体またはEmbigin遺伝子転写産物を特異的に検出し得る核酸、具体的には上述のTh17細胞判定用試薬を含む。

Th17細胞判定用試薬に含有される抗Embigin抗体または核酸は、通常、水もしくは適当な緩衝液(例：TEバッファー、PBSなど)中に適当な濃度となるように溶解された水溶液の態様で、或いは該核酸プローブが固相担体上に固定された核酸アレイの態様で、本発明のキットに含まれる。

本発明のキットは、Embiginの測定方法に応じて、当該方法の実施に必要な他の成分を構成としてさらに含んでいてもよい。例えば、ノザンプロットティングや核酸アレイを測定に用いる場合には、本発明のキットは、プロットティング緩衝液、標識化試薬、プロットティング膜等をさらに含むことができる。本発明のキットは、in situハイブリダイゼーションを測定に用いる場合には、標識化試薬、発色基質等をさらに含むことができる。また、FACSを測定に用いる場合には、蛍光標識2次抗体、細胞固定液等を含むことができる。

#### 【0056】

##### 5. 本発明のTh17細胞判定方法

本発明者らは、EmbiginがマウスTh17細胞およびヒトTh17細胞に高発現しており、特に血液細胞においては、Th17細胞は他の血液細胞に比べてEmbiginが高発現していることから、Embiginの発現を指標とするTh17細胞判定方法を見出した。

本発明のTh17細胞判定方法は、細胞または組織におけるEmbiginの発現を測定する工程、および該発現レベルとTh17細胞との間の正の相関に基づきTh17細胞を判定する工程を含む。本発明により、従来よりも容易にTh17細胞を判定することができる。

#### 【0057】

本発明における「Embiginの発現」とは、Embiginのタンパク質発現またはEmbigin遺伝子発現を意味する。

本発明の方法は、具体的には、細胞または組織におけるEmbiginの発現を測定することにより行うことができる。細胞は、被検動物から採取された細胞または培養細胞であればよく、採取された血液細胞または血液細胞由来の培養細胞が望ましい。組織は、被検動物から採取された組織であればよく、免疫染色ができる形態が望ましい。

本発明の方法は、例えばヒト、ラットやマウスなどの被検動物から採取された細胞や組織等に適用することができる。

#### 【0058】

Embiginの発現は、上述の本発明のTh17細胞判定用試薬を用いて、自体公知の方法により測定することが出来る。該測定方法としては、例えば、FACS、ウェスタンプロットティン

10

20

30

40

50

グ、RT-PCR、ノザンプロットティング、in situハイブリダイゼーション、核酸アレイ、組織染色等を挙げることができる。

【0059】

次に、測定されたEmbiginの発現レベルに基づいて、Th17細胞を判定することができる。後述の実施例に示すように、Th17細胞においてはEmbiginの発現レベルが高いため、Embiginの発現レベルとTh17細胞との間の正の相関に基づき、測定対象の細胞または組織のEmbiginの発現レベルまたは濃度が高い場合には、Th17細胞であると判断することができる。

【0060】

これまで、単一の分子でTh17細胞を同定できるようなTh17細胞の細胞表面分子は見出されていなかった。しかしながら、本発明のTh17細胞判定方法は、FACS等の簡便な方法を用いてTh17細胞を判定することができる。特に、血液細胞や血液由来培養細胞に本発明の方法を適用すれば、Th17細胞を容易に判定することができる。したがって、本発明の方法は、Th17細胞が関与する自己免疫疾患やアレルギー疾患の研究や、被検動物におけるTh17細胞の増加の有無の検査等に極めて有用である。

【実施例】

【0061】

以下に本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例になんら限定されるものではない。

【0062】

参考例1-1 マウスEmbiginに対する抗体作製(1)

マウスEmbigin発現用レトロウイルスをラット細胞に導入し、マウスEmbigin過剰発現細胞を作製した。マウスEmbigin過剰発現細胞をラット(Wistar、5週齢、日本クレア社)に免疫した。免疫後リンパ球を採取し、ミエローマ細胞とPEG法にて融合し、ハイブリドーマを得た。

抗マウスEmbigin抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、陽性コントロール細胞として免疫に用いたマウスEmbigin過剰発現細胞を、陰性コントロール細胞として陽性コントロール細胞と同じ宿主細胞にベクターのみを導入した細胞を用いて、フローサイトメトリーにて行った。

フローサイトメトリーによる結合活性の評価は、次のように行った。

陽性コントロール細胞あるいは陰性コントロール細胞を $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 細胞用いて、ハイブリドーマ培養上清または適当なrat IgGを $5 \mu\text{g/mL}$ で添加し、30分間反応させた。細胞をFACSバッファーにて1回洗浄し、蛍光標識抗ラットIgG抗体を添加し、30分間反応させた。反応後、遠心操作にて細胞を回収し、PBSあるいはFACSバッファーに懸濁し、フローサイトメトリーに供した。フローサイトメーターは、フローサイトメーターFC500(Beckman Coulter社)を用いた。前方散乱光(forward scatter)および側方散乱光(side scatter)のヒストグラムにて生細胞集団にゲートを設定し、解析を行った。

Embiginを発現する陽性コントロール細胞のみに強く反応するハイブリドーマ2G21、2G23、3E64、3E66を取得した。図1に評価の結果を記載した。

2G21、3E64については、さらに反応特異性を確認するため、ハムスター細胞を宿主としてマウスEmbiginを過剰発現させた細胞を陽性コントロール細胞、ベクターのみを導入したハムスター細胞を陰性コントロール細胞として、フローサイトメトリーにて評価した。解析はフローサイトメーターFACS Calibur(ベクトンディッキンソン社)にて行い、2G21、3E64ともに陽性コントロール細胞のみに強く反応することを確認した。図2に評価の結果を記載した。

参考例1-2 マウスEmbiginに対する抗体作製(2)

上記の参考例1-1で作製した抗Embigin抗体3E64については、96穴プレートを用いた限界希釈法で、さらにシングルクローン化を行った。このクローンの抗体を精製して抗Embigin抗体(3E64D1)とした。

また、この抗体クローンがラットIgG2b抗体であることを確認した。ラットIgG2bは、細

10

20

30

40

50

胞障害活性を誘導する構造を有することが知られている。

【0063】

参考例2 マウス各種ヘルパーT細胞の調製

(1) マウスTh17細胞の調製

マウスTh17細胞の調製は、公表文献(Nature Immunology (2007) Vol.8 903-905、Nature Immunology (2007) Vol.8 958-966、Nature Immunology (2007) Vol.8 1390-1397、Nature (2007) Vol.448 480-484、J. Biol. Chem. (2008) Vol.283 17003-17008)を参考に行った。

SJLマウス(日本チャールズリバー社)あるいはRag2 KO/DO11.10 Tgマウス(タコニック社)から脾臓を摘出し、細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液をセルストレイナー(直径70 μm、ベクトンディッキンソン社)でろ過し、遠心(300×g、4、5 min)後、上清を除いた。ACK溶液(タカラバイオ社)にて溶血した後、RPMI1640(ナカライテスク社)で細胞を洗浄し、脾細胞を調製した。SJLマウスより調製した場合、洗浄した細胞から、CD4<sup>+</sup> T cell IIアイソレーションキット(ミルテニー社)にてCD4<sup>+</sup>T細胞を調製した。

CD4<sup>+</sup>T細胞を、抗CD3 /抗CD28抗体固相化プレートにて培養した。培養は、20 ng/mL Mouse IL-6、3 ng/mL Mouse TGF- $\beta$ 1、20 ng/mL Mouse IL-23、10 μg/mL Anti-Mouse IFN-

抗体、10 μg/mL Anti-mouse IL-4抗体および10 μg/mL Anti-mouse IL-2抗体を添加した10%牛胎児血清含有IMDM培地(インビトロジェン社)を使用し、適宜継代維持しTh17細胞へ分化誘導した。5~14日間分化誘導したTh17細胞を試験に使用した。

【0064】

(2) マウスTreg細胞の調製

マウスの脾臓よりCD4<sup>+</sup>T細胞を調製し、抗CD3 /抗CD28抗体固相化プレートにて培養した。培養は、20 ng/mL Mouse TGF- $\beta$ 1、100 IU/mL Mouse IL-2、100 nMレチノイン酸(all-trans)および10 μg/mL Anti-Mouse IL-6を添加した10%牛胎児血清含有RPMI1640培地を使用し、適宜継代維持しTreg細胞へ分化誘導した。5~14日間分化誘導したTreg細胞を試験に使用した。

【0065】

(3) マウスTh1細胞の調製

マウスの脾臓よりCD4<sup>+</sup>T細胞を調製し、抗CD3 /抗CD28抗体固相化プレートにて培養した。培養は、20 ng/mL Mouse IL-12および10 μg/mL Anti-mouse IL-4を添加した10%牛胎児血清含有RPMI1640培地を使用し、適宜継代維持しTh1細胞へ分化誘導した。5~14日間分化誘導したTh1細胞を試験に使用した。

【0066】

(4) マウスTh2細胞の調製

マウスの脾臓よりCD4<sup>+</sup>T細胞を調製し、抗CD3抗体/抗CD28抗体固相化プレートにて培養した。培養は、20 ng/mL Mouse IL-4、5 μg/mL Anti-Mouse IFN- $\gamma$  および5 μg/mL Anti-Mouse IL-12を添加した10%牛胎児血清含有RPMI1640培地を使用し、適宜継代維持しTh2細胞へ分化誘導した。5~14日間分化誘導したTh2細胞を試験に使用した。

【0067】

(5) マウスTh0細胞の調製

マウスTh0細胞は、マウスの脾臓よりCD4<sup>+</sup>T細胞を調製し、抗CD3 /抗CD28抗体固相化プレートにて培養した。培養は、10 μg/mL Anti-Mouse IL-4、10 μg/mL Anti-Mouse IFN- $\gamma$  および10 μg/mL Anti-Mouse IL-12を添加した10%牛胎児血清含有RPMI1640培地を使用し、適宜継代維持してTh0細胞を調製し、試験に使用した。

【0068】

参考例3 ヒトEmbiginに対する抗体作製

ヒトEmbigin発現レトロウイルスをマウス細胞に導入し、ヒトEmbigin過剰発現細胞を作製した。ヒトEmbigin過剰発現細胞をマウス(Balb/c、5週齢、日本クレア社)に免疫した。免疫後リンパ球を採取し、ミエローマ細胞とPEG法にて融合し、ハイブリドーマを得た。

。

10

20

30

40

50

抗ヒトEmbigin抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、陽性コントロール細胞として免疫に用いたヒトEmbigin過剰発現細胞を、陰性コントロール細胞として陽性コントロール細胞と同じ宿主細胞にベクターのみを導入した細胞を用いて、フローサイトメトリーにて行った。フローサイトメーターFC500 (Beckman Coulter社)を用いて行い、Embiginを発現する陽性コントロール細胞のみに強く反応するハイブリドーマ陽性反応を検出したハイブリドーマ6G1E6、7C4E10を取得した。図6に評価の結果を記載した。

【0069】

#### 参考例4 ヒトTh17細胞の調製

ヒトTh17細胞の調製は、公表文献PNAS (2007) ;104: 17034-17039をもとに行った。

ヒト末梢血より調製したメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞および単球を、リボ多糖、抗CD3抗体、抗IFN- $\gamma$ 抗体、抗IL-4抗体、抗IL-12抗体を含む培地で3日間培養した後、抗CD2抗体/抗CD3抗体/抗CD28抗体固相化ビーズ(Cell Activation/Expansion Kit human、ミルテニー社)、IL-2、IL-1、IL-6、IL-23、抗IFN- $\gamma$ 抗体、抗IL-4抗体および抗IL-12抗体を含む培地で更に3~20日間培養し、Th17細胞に分化させた。

【0070】

#### 実施例1 ウェスタンブロッティングによるTh17細胞での発現特異性の評価

Th17細胞での発現特異性を確認するため、ヘルパーT細胞の一つであるTreg細胞とTh17細胞のEmbigin発現量の比較をウェスタンブロッティングにより行った。

Rag2 KO/DO11.10TgマウスあるいはSJLマウス脾細胞より分化・調製したTh17細胞、Treg細胞を80 mM NaCl、50 mM Tris-HCl(pH 8)、2 mM CaCl<sub>2</sub>、1% Triton X-100およびタンパク質分解酵素阻害剤(Complete<sup>TM</sup>、ペーリンガーインゲルハイム社)を含む可溶性バッファーにて溶解し、遠心(12000 rpm、4分、30分)を行った後、上清をタンパク質溶液とした。タンパク質溶液を試料緩衝液(SDS-PAGE用、2倍濃縮、2-メルカプトエタノール含有)(ナカライテスク社)と混合した後、等量のタンパク質を10% SDS-ポリアクリルアミドゲルに泳動した。電気泳動後、Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell(BIO-RAD社)を用いてイモビロン-P(Millipore社)へ転写した。転写した膜を用いて、ウェスタンブロッティングを行った。検出には、ウサギ抗Embiginポリクローナル抗体(IMGEX社)、HRP標識ヤギ抗ウサギIg抗体(パイオソース社)を用いた。検出は、ECL Plus Western Blotting Detection System(GEヘルスケア・ジャパン社)を用いて、LAS-3000(富士フイルム社)にて行った。

図3に結果を示した。Treg細胞ではEmbiginがほとんど発現していないが、Th17細胞ではEmbiginが高発現していることが判明した。

【0071】

#### 実施例2 qRT-PCR法によるヘルパーT細胞での発現特異性の評価

Rag2 KO/DO11.10Tgマウス脾細胞より分化・調製したTh17細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th0細胞、Treg細胞よりTRIzol(インビトロジェン社)を用いてtotal RNAを調製した。Total RNA中のEmbigin mRNA量をTaqMan Reverse Transcription Reagents(アプライドバイオシステム社)およびPower SYBR Green PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ社)を用いて評価した。測定は、ABI7900(アプライドバイオシステムズ社)で行い、ハウスキーピング遺伝子36B4の発現についても同時に評価し、36B4発現量で補正した後、Treg細胞での発現量を1として算出した。

検出は、Embiginのプライマー(配列番号3および配列番号4)、および36B4のプライマー(配列番号5および配列番号6)を用いて行った。

結果を図4に示した。マウスヘルパーT細胞のうち、Th17細胞で特にEmbiginが高発現しているため、EmbiginがTh17細胞のマーカーとして有用であることが判明した。

【0072】

#### 実施例3 フローサイトメトリーによる細胞膜表面タンパク質におけるTh17細胞特異性の評価

細胞膜表面タンパク質のTh17細胞での発現特異性を評価するため、フローサイトメトリーを用いて各種細胞との発現量の比較を行った。

10

20

30

40

50

Th17細胞、Treg細胞、Th1細胞、Th2細胞をSJLマウス脾細胞より分化させ、調製し、試験に供した。また、分化誘導していない脾細胞およびマウス末梢血から調製した赤血球についても試験に供した。

Embiginは、抗マウスEmbigin抗体産生クローン2G23、3E64の培養上清および2次抗体として蛍光標識ヤギ抗ラットIgMおよびIgG抗体（ベックマンコールター社）を用いて染色した。抗マウスEmbigin抗体の陰性コントロールとしてrat IgG(ベクトンディッキンソン社)を用いて、参考例1と同様に染色した。さらに、マウス脾細胞については、B細胞、白血球、CD3陽性細胞を同定するため、蛍光標識抗マウスB220抗体(B細胞マーカー)、蛍光標識抗マウスCD11a抗体(白血球マーカー)または蛍光標識抗マウスCD3抗体(CD3陽性細胞マーカー)で染色した。これらのサンプルをフローサイトメトリーにて評価した。フローサイトメーターは、FACS Calibur(ベクトンディッキンソン社)を用いた。前方散乱光および側方散乱光のヒストグラムにて生細胞集団にゲートを設定し、解析を行った。B細胞、白血球細胞、CD3陽性細胞の各々での解析の際は、それぞれB220、CD11a、CD3陽性画分でさらにゲートを設定し、解析した。各サンプル間の比較は、Isotype(rat IgG)におけるgeo mean値に対する抗マウスEmbigin抗体使用時のgeo mean値の比率で行った。

結果を図5に示した。B細胞、白血球細胞、CD3陽性細胞、赤血球、Treg細胞におけるEmbiginの発現量は極めて少ないが、Th17細胞はこれらの細胞と比較すると、細胞膜表面上にEmbiginが高発現しているため、Embiginの発現を調べることによりTh17細胞を判定することが可能であることが判明した。

【0073】

#### 実施例4 ヒトTh17細胞におけるEmbigin発現検討

ヒトTh17細胞膜表面でのEmbigin発現をフローサイトメトリーで評価した。

末梢血より分化させたヒトTh17細胞を、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate、イオノマイシンおよびBD GolgiStop(ベクトンディッキンソン社)を含む培地で4時間処置した後、抗ヒトEmbigin抗体産生クローン6G1E6、7C4E10の培養上清および2次抗体としてPE標識ヤギ抗マウスIg抗体（ベックマンコールター社）を用いて染色した。抗ヒトEmbigin抗体の陰性コントロールとしてマウスIgG(ベクトンディッキンソン社)を用いて、同様に染色した。さらにAPC標識抗CD4抗体を用いて染色した。これらのサンプルを、BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution kit(ベクトンディッキンソン社)を用いてパーミライゼーション(permeabilization)を施し、FITC標識抗ヒトIL-17抗体を用いて染色した。これらのサンプルをフローサイトメトリーにて評価した。フローサイトメーターは、FACS Calibur(ベクトンディッキンソン社)を用いた。前方散乱光および側方散乱光のヒストグラムにて生細胞集団にゲートを設定した後、CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>細胞をTh17細胞として、Th17細胞を解析した。

結果を図7に示した。ヒトTh17細胞にEmbiginが発現していることが判明した。

【0074】

#### 実施例5 トキシン修飾抗Embigin抗体を用いたマウスTh17細胞の選択的除去(細胞死)

抗Embigin抗体を用いて、Th17細胞選択的な除去(細胞死)が可能かどうかについて病原性細胞を用いて評価した。

病原性細胞の調製は、J. Exp. Med. (2005) 201; 233-240を参考にして行った。

すなわちSJLマウス(5週齢、日本チャールズリバー社)にPLPペプチド(配列番号7)をフロイント完全アジュバントとともに免疫し、10日後にリンパ節細胞を採取した。PLPおよびIL-23存在下で5日間培養後、IL-23およびIL-2存在下で更に3-5日間培養し、病原性細胞とした。

調製した病原性細胞よりCD4<sup>+</sup>T cellアイソレーションキット(ミルテニー社)を用いてCD4<sup>+</sup>T細胞を調製した。

IL-23、IL-2、抗マウスEmbigin抗体(2G21、3E64)、Anti-IgG, Rat, Goat-Poly, Saporin <Rat-ZAP> (Advanced Targeting Systems社)を含む培地で36時間培養し、細胞除去反応を行った。コントロールとして、抗マウスEmbigin抗体の代わりにラットIgGを用いて同様に処置した。反応後の細胞を、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate、イオノマイシン、BD

GolgiStop(ベクトンディッキンソン社)を含む培地で4時間処置した後、Per-CP標識抗マウスCD4抗体(コスモバイオ社)、PE標識抗マウスIFN $\gamma$ 抗体(BDバイオサイエンス社)、Alexa488標識抗マウスIL17抗体(BDファーマンジェン社)を用いて細胞を染色した。これらのサンプルをフローサイトメトリーにて評価した。フローサイトメーターは、FACS Calibur(ベクトンディッキンソン社)を用いた。CD4 $^{+}$ IL17 $^{+}$ 細胞をTh17細胞、CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$  $^{+}$ IL17 $^{-}$ 細胞をTh1細胞、CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$  $^{-}$ IL17 $^{-}$ 細胞をその他(other)として分類し、コントロール群における各々の細胞集団の測定値を100%として残存細胞率を評価した。

結果を図8に示した。Th1細胞やその他の細胞の残存細胞率に比べてTh17細胞の残存細胞率が顕著に減少していることから、トキシンの1種であるsaporinで修飾した抗Embigin抗体がTh17細胞を選択的に除去することが判明した。

10

【0075】

#### 実施例6 抗マウスIgG結合磁気ビーズによるTh17細胞の選択的除去

抗Embigin抗体を用いて、Th17細胞選択的な除去(細胞死)が可能かについて病原性細胞を用いて評価した。

実施例5と同様の方法で調製した病原性細胞よりCD4 $^{+}$ T cellアイソレーションキット(ミルテニー社)を用いてCD4 $^{+}$ T細胞を調製した。

病原性細胞および抗マウスEmbigin抗体(2G23あるいは3E66)を、4℃で30分間混合した後、遠心(1000rpm、3分)により細胞を回収した。回収した細胞に抗ラットIgG抗体修飾磁気ビーズ(Dynal社)を添加し、4℃で30分間混合した。磁石によって磁気ビーズと結合した細胞を除去する操作を2度繰り返し、磁気ビーズに結合しなかった細胞を回収した。対照として抗マウスEmbigin抗体の代わりにラットIgGを用いた。また、コントロールは、細胞除去操作を実施していない細胞を設定した。

20

この細胞をPhorbol 12-Myristate 13-Acetate、イオノマイシン、BD GolgiStop(ベクトンディッキンソン社)を含む培地で4時間処置した後、Per-CP標識抗マウスCD4抗体(コスモバイオ社)、PE標識抗マウスIFN $\gamma$ 抗体(BDバイオサイエンス社)、Alexa488標識抗マウスIL17抗体(BDファーマンジェン社)を用いて細胞を染色した。これらのサンプルをフローサイトメトリーにて評価した。フローサイトメーターは、FACS Calibur(ベクトンディッキンソン社)を用いた。CD4 $^{+}$ IL17 $^{+}$ 細胞をTh17細胞、CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$  $^{+}$ IL17 $^{-}$ 細胞をTh1細胞、CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$  $^{-}$ IL17 $^{-}$ 細胞をその他(other)として分類し、コントロール群における各々の細胞集団の測定値を100%として残存細胞率を評価した。

30

結果を図9に示した。Th1細胞やその他の細胞の残存細胞率に比べてTh17細胞の残存細胞率が顕著に減少していることから、Th17細胞が選択的に除去されていることが判明した。

【0076】

#### 実施例7 マウス組織におけるEmbigin発現(組織パネル)

INSTA-Blot Mouse Tissue(IMGENEX社)等のマウス各組織タンパク質プロットを用い、これに抗マウスEmbigin抗体(IMGENEX社)およびHRP標識ヤギ抗ウサギIg抗体(バイオソース社)を反応させてウェスタンブロッティングを行う。検出は、ECL Plus Western Blotting Detection System(GEヘルスケア・ジャパン社)を用いて、LAS-3000(富士フイルム社)にて行う。

40

【0077】

#### 実施例8 ヒトTh17細胞以外でのEmbigin発現の検討

各種ヒト細胞でのEmbigin発現量の比較は、下記の方法で可能である。

ヒトTreg細胞は、ヒト末梢血より、Dynabeads Regulatory CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T Cell Kit(インビトロジェン社)にてCD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T細胞を分離し、Dynabeads Human Treg Expander(インビトロジェン社)を用いて拡大培養して調製し、試験に供する。このヒトTreg細胞を、抗ヒトEmbigin抗体産生クローン6G1E6、7C4E10の培養上清および2次抗体としてPE標識ヤギ抗マウスIg抗体(ベックマンコールター社)を用いて染色する。抗ヒトEmbigin抗体の陰性コントロールとしてマウスIgG(ベクトンディッキンソン社)を用いて、同様に染色する。これらのサンプルをフローサイトメーターFACS Calibur(ベクトンディッキンソン社)にて解析する。

50

また、ヒト末梢血中の細胞は、抗ヒトEmbigin抗体産生クローン6G1E6、7C4E10の培養上清および2次抗体としてPE標識ヤギ抗マウスIg抗体（ベックマンコールター社）を用いて染色する。抗ヒトEmbigin抗体の陰性コントロールとしてマウスIgG（ベクトンディッキンソン社）を用いて、同様に染色する。これらのサンプルをフローサイトメーターFACS Calibur（ベクトンディッキンソン社）にて解析する。末梢血中の各種細胞について、サブ解析する場合は、CD4陽性細胞を同定するためにAPC標識抗CD4抗体で、あるいはNK細胞を同定するためにAPC標識抗DX5抗体で、あるいは樹上細胞を同定するためにAPC標識抗CD11c抗体で、あるいはCD8陽性細胞を同定するためにAPC標識抗CD8抗体で、あるいはマクロファージを同定するためにAPC標識抗CD11b抗体で、あるいはB細胞を同定するためにAPC標識抗B220抗体で、それぞれ染色した後、フローサイトメトリーにて解析する。

10

【0078】

#### 実施例9 *in vivo*におけるTh17細胞除去の確認

*In vivo*におけるTh17細胞選択的除去については、J. Exp. Med. (2005) 201; 233-240に記載されている方法に従って確認することができる。

実施例5と同様の方法で調製した病原性細胞を5- or 6- (N-Succinimidylloxycarbonyl)-fluorescein 3',6'-diacetate (CFSE、同仁化学社)で標識する。

CFSE標識した細胞をマウスに尾静脈より移入した後、トキシン修飾抗マウスEmbigin抗体を投与する。コントロールとして、トキシン修飾抗マウスEmbigin抗体の代わりにラットIgGを用いて同様に処置する。4時間～4日後に、末梢血、脾臓、中枢神経、リンパ組織などより細胞を採取する。採取した細胞を、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate、イオノマイシン、BD GolgiStop（ベクトンディッキンソン社）を含む培地で4時間処置した後、Per-CP標識抗マウスCD4抗体（コスモバイオ社）、PE標識抗マウスIFN $\gamma$ 抗体（BDバイオサイエンス社）あるいはPE標識抗マウスIL17抗体（BDファージン社）を用いて細胞を染色する。これらのサンプルをフローサイトメトリーにて評価する。生細胞集団、CFSE陽性細胞でゲート設定した後、CD4 $^{+}$ IL17 $^{+}$ 細胞をTh17細胞、CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$  $^{+}$ IL17 $^{-}$ 細胞をTh1細胞、CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$  $^{-}$ IL17 $^{-}$ 細胞をその他（other）として分類し、コントロール群における各々の細胞集団の測定値を100%として残存細胞率を評価する。

20

【0079】

#### 実施例10 *ex vivo*でのTh17細胞除去による発症抑制作用の確認

自己免疫疾患モデルにおいて、Th17細胞選択的除去による発症抑制作用は下記に示す方法で確認できる。

30

実施例5と同様に、病原性細胞よりCD4 $^{+}$ T cellアイソレーションキット（ミルテニー社）を用いてCD4 $^{+}$ T細胞を調製する。IL-23、IL-2、抗マウスEmbigin抗体（2G21、3E64）、Anti-IgG, Rat, Goat-Poly, Saporin <Rat-ZAP> (Advanced Targeting Systems社)を含む培地で36時間培養し、細胞除去反応を行う。なお、コントロールとして抗マウスEmbigin抗体の代わりにラットIgGを用いる。あるいは、実施例6のように磁気ビーズを用いてTh17を特異的に除去することでも可能である。

細胞除去操作を行った細胞を、コントロール群が $3 \times 10^6$  cell/headとなるようにマウスに尾静脈より投与し、経時的に四肢や尾の麻痺、体重を観察しEAE（実験的自己免疫性脳脊髄炎）症状を評価する。

40

【0080】

#### 実施例11 抗体投与によるTh17細胞除去による発症抑制作用の確認

自己免疫疾患モデルにおいて、Th17細胞選択的除去による発症抑制作用は下記に示す方法で確認できる。

実施例5と同様に病原性細胞よりCD4 $^{+}$ T cellアイソレーションキット（ミルテニー社）を用いてCD4 $^{+}$ T細胞を調製する。この細胞を $3 \times 10^6$  cell/headとなるようにマウスに尾静脈より投与する。

細胞除去能を有する抗Embigin抗体（例えばsaporin化抗体、ADCC活性保有抗体など）を、細胞移入と同時にあるいは発症後などにマウスに投与し、経時的に四肢や尾の麻痺、体重を観察しEAE発症に対する作用を評価する。

50

あるいは、Methods Mol Biol. 2009;549:157-73.、Brain (2004) ;127:2201-2213に記載の方法に準じて、汎用されているマウス・ラットにPLPあるいはMOG等のペプチドを投与してEAEモデルを作製し、細胞除去能を有する抗Embigin抗体(例えばsaporin化抗体、ADCC活性保有抗体など)を、ペプチド投与と同時、EAE発症前などに投与し、EAE発症に対する作用を評価する。

#### 【0081】

##### 実施例12 Th17細胞除去による再発抑制作用の確認

自己免疫疾患の多くが、症状が増悪する時期と小康状態の時期を繰り返すことから、再発を抑制することが治療を行ううえで重要になってくる。

この点について、例えばEAEモデルを用いて確認できる。

Methods Mol Biol. 2009;549:157-73.、Brain (2004) ;127:2201-2213などに記載されているEAEモデルにおいて、EAE発症後あるいは、EAE症状が治まった後に抗Embigin抗体を投与し、再発に対する影響を評価する。

#### 【0082】

##### 実施例13 マウス組織におけるEmbigin発現検討

マウスの各組織におけるEmbiginの発現を検討するために、マウス各組織タンパク質ブロットとしてINSTA-Blot Mouse Tissue(IMGENEX社)を用い、これに抗マウスEmbigin抗体(IMGENEX社)およびHRP標識ヤギ抗ウサギIg抗体(パイオソース)を反応させてウェスタンブロットティングを行った。検出は、ECL Plus Western Blotting Detection System(GEヘルスケア・ジャパン)を用いて、LAS-3000(富士フイルム社)にて行った。

結果を図10に示した。筋肉と脾臓でEmbiginの発現が確認されたが、その発現量は非常に少なく、Embiginを強く発現している組織はなかった。そのため、抗Embigin抗体を含有する治療剤は、生体の各組織への副作用が少ないことが期待される。

#### 【0083】

##### 実施例14 in vivoにおけるTh17細胞除去の確認

In vivoにおけるTh17細胞選択的除去については、J. Exp. Med. (2005) 201; 233-240に記載されている方法に従って確認した。

5週齢雌性SJL/JマウスにPLP部分ペプチド(PLP<sub>139-151</sub>、配列番号7)をフロイント完全アジュバントとともに免疫し、10日後にリンパ節細胞を調製した。PLPおよびIL-23存在下で5日間培養後、IL-23およびIL-2存在下で更に3-5日間培養し、この細胞を病原性細胞とした。この病原性細胞よりCD4<sup>+</sup> T cellアイソレーションキット(ミルテニー社)を用いてCD4<sup>+</sup>T細胞を調製した。この細胞集団にはTh17細胞が30~50%含まれている。この病原性細胞をCellTrace CFSE Cell Proliferation Kit for flow cytometry(インビトロジェン社)でcarboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(CFSE)標識した。抗マウスEmbigin抗体(3E64D1)をマウスに投与した後、CFSE標識した細胞1.5 x 10<sup>7</sup> cellをマウスに尾静脈より移入した。コントロールとして、ラットIgG2bを用いた。1日後に、脾臓より細胞を採取した。採取した細胞をフローサイトメトリーにて評価した。CFSE陽性細胞数を計算し、コントロール群におけるCFSE陽性細胞数を100%として、減少分を細胞除去率として評価した。

結果を図11に示した。抗Embigin抗体投与により、移入したCFSE陽性細胞数が用量依存的に減少することが確認できた。この結果により、抗Embigin抗体は抗体のADCCおよびCDC活性によりTh17細胞数を減少させることが可能であることがわかった。抗Embigin抗体を個体に投与することにより、in vivoでTh17細胞数を減らすことが可能であることが判明した。

#### 【0084】

##### 実施例15 Ex vivoでのTh17細胞除去による発症抑制作用の確認

自己免疫疾患モデルにおいて、Th17細胞選択的除去による発症抑制作用を下記に示す方法で確認した。

5週齢雌性SJL/JマウスにPLP部分ペプチド(PLP<sub>139-151</sub>)をフロイント完全アジュバントとともに免疫し、10日後にリンパ節細胞を調製した。PLPおよびIL-23存在下で5日間培

10

20

30

40

50

養後、IL-23およびIL-2存在下で更に3-5日間培養し、病原性細胞とした。この病原性細胞よりCD4<sup>+</sup> T cellアイソレーションキット(ミルテニー社)を用いてCD4<sup>+</sup>T細胞を調製した。IL-23、IL-2、抗マウスEmbigin抗体(3E64D1)1 μg/mL、Anti-IgG, Rat, Goat-Poly, Saporin <Rat-ZAP> (Advanced Targeting Systems社)を含む培地で36時間培養し、細胞除去反応を行った。なお、コントロールとして抗マウスEmbigin抗体の代わりにラットIgG2bを用いた。反応後の細胞の一部をPhorbol 12-Myristate 13-Acetate、イオノマイシン、BD GolgiStop(ベクトンディッキンソン社)を含む培地で4時間処置した後、Per-CP標識抗マウスCD4抗体(コスモバイオ社)、PE標識抗マウスIFN 抗体(BDバイオサイエンス社)、Alexa488標識抗マウスIL17抗体(BDファーマーミンジェン社)を用いて細胞を染色した。これらのサンプルをフローサイトメトリーにて評価した。フローサイトメーターは、FACS Calibur(ベクトンディッキンソン社)を用いた。CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>細胞をTh17細胞、CD4<sup>+</sup>IFN<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>細胞をTh1細胞として分類し、コントロール群における各々の細胞集団の測定値を100%として残存細胞率を評価した。Th17細胞選択的な細胞除去が確認できた。結果は図12に示した。

10

細胞除去操作を行った細胞、またはコントロール群の細胞を3 x 10<sup>6</sup> cell/headとなるようにマウスに尾静脈より投与し、経時的に四肢や尾の麻痺、体重を観察し実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)症状を評価した。症状の重篤さの程度は次の基準に従いスコアで表示した。

- 0 : 無症状
- 0.5 : 尾の軽い麻痺
- 1 : 尾の麻痺
- 2 : 軽度の後肢の麻痺
- 3 : 中程度から強度の後肢の麻痺、あるいは軽度の前肢の麻痺
- 4 : 完全な後肢の麻痺、あるいは中程度から強度の前肢の麻痺
- 5 : 四肢の麻痺あるいは死線期にある
- 6 : 死亡

20

結果は図13に示す。抗Embigin抗体を用いてTh17細胞を選択的に細胞除去することにより、EAE症状は完全に抑制された。

【0085】

#### 実施例16 抗体投与によるTh17細胞除去による発症抑制作用の確認

自己免疫疾患モデルであるactive EAE発症モデルを用いて、抗Embigin抗体のEAE発症抑制作用を確認した。

30

##### (1) active EAE発症モデルの作製

多発性硬化症の動物モデルであるEAEマウスを用いた。EAEの惹起はSD, Millerらの方法(Curr. Protoc. Immunol. 2010; 88:15.1.1-15.1.20.)に従った。すなわち、9週齢の雌性SJL/Jマウス(チャールズリパーより購入)の背後部皮下にフロイント完全アジュバントに混和したPLP部分ペプチド(PLP<sub>139-151</sub>)150 μgを注射した。経時的に四肢や尾の麻痺、体重を観察しEAE症状を評価した。EAE症状のスコアは実施例15に従った。

【0086】

##### (2) 抗体の投与および発症予防評価

抗Embigin抗体(3E64D1)をPBS溶液に懸濁し、上記(1)にて作製したマウス1匹あたり0.3 μgを静脈内投与した。対照群にはrat IgG2bを静脈内投与した。投与はペプチド感作後、7日目と14日目に1日1回実施した。経時的に四肢や尾の麻痺、体重の観察を続け、EAE症状を評価した。

40

結果は図14に示した。抗Embigin抗体投与により、EAE病態の発症は完全に抑制された。この結果から、抗Embigin抗体により、多発性硬化症(MS)の発症を抑制できることが判明した。

【0087】

#### 実施例17 Th17細胞除去による再発抑制作用の確認

自己免疫疾患の多くが、症状が増悪する時期と小康状態の時期を繰り返すことから、再発を抑制することが治療を行ううえで重要になってくる。

50

この点について、EAEモデルを用いて確認した。Methods Mol Biol. 2009;549:157-73.、Brain (2004) ;127:2201-2213などに記載されているEAEモデルにおいて、EAE発症後に抗Embigin抗体を投与し、再発に対する影響を評価した。ペプチド感作後12日目に発症した個体について病態スコアと体重を指標に群分けを行った。抗Embigin抗体(3E64D1)は群分け直後のペプチド感作12日目と19日目に1日1回静脈内投与した。その後、EAE症状に対する作用を評価した。EAE症状のスコアは実施例15に示した基準に従った。

結果は図15に示した。抗Embigin抗体投与により、病態スコアが速やかに低下することが確認された。また、コントロールの23日目で認められるような再燃は認められなかった。この結果から、抗Embigin抗体は多発性硬化症(MS)の寛解導入を促進し、再燃を抑制するため、多発性硬化症の寛解導入剤や再燃抑制剤として用いることができることが判明した。

10

【産業上の利用可能性】

【0088】

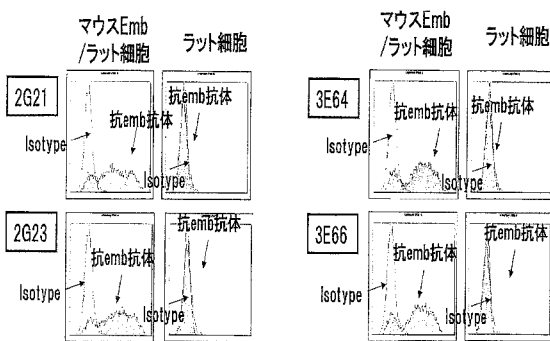
本発明により、多発性硬化症などの自己免疫疾患やアレルギー疾患の治療剤およびTh17細胞に対する細胞障害剤を提供することができる。更に、本発明は、薬剤等をTh17細胞に選択的且つ効率よく到達させることができるドラッグデリバリーシステムに有用な抗Embigin抗体、Th17細胞のマーカー、Th17細胞判定用試薬、簡便なTh17細胞判定方法も提供することができる。

【0089】

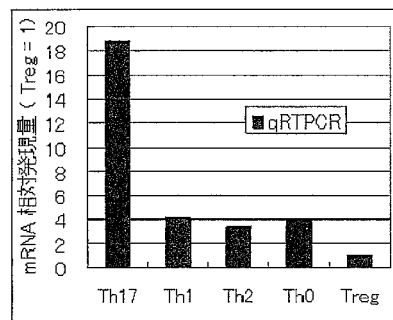
本出願は、日本で出願された特願2010-127316(出願日:2010年6月2日)を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

20

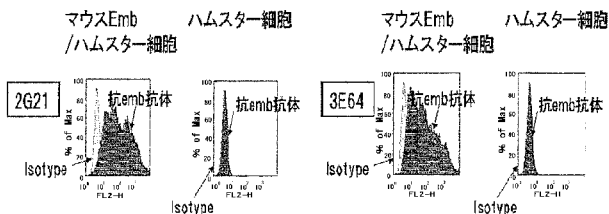
【図1】



【図4】

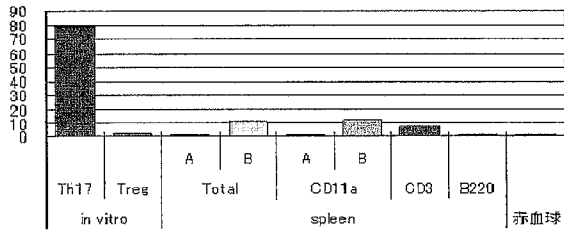


【図2】

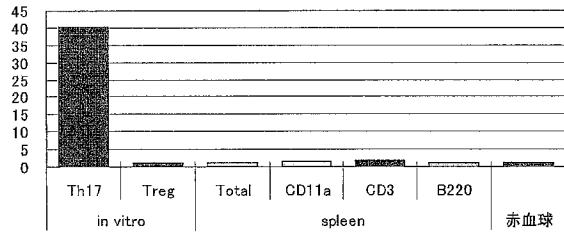


【 図 5 】

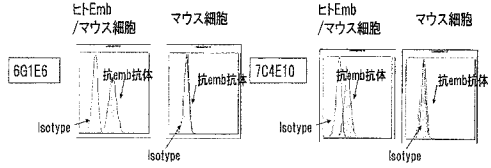
・クローン 2G23



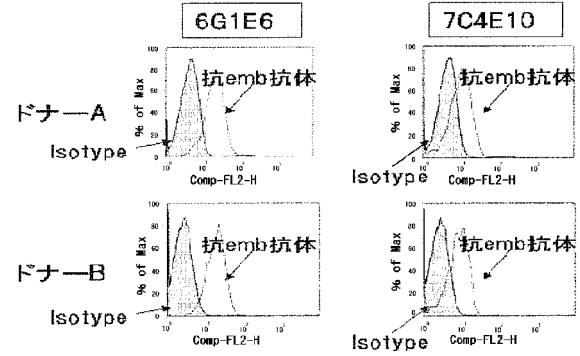
・クローン 3E64



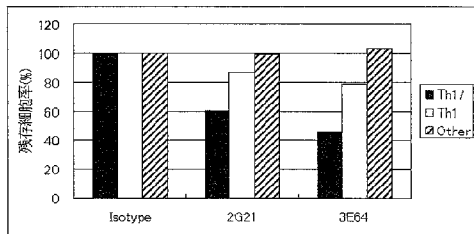
【 図 6 】



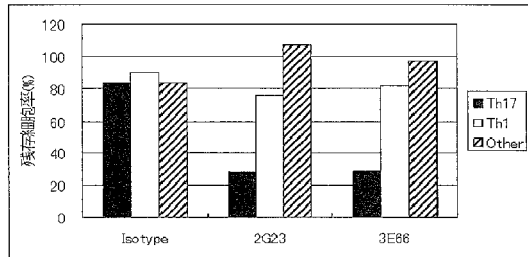
【 図 7 】



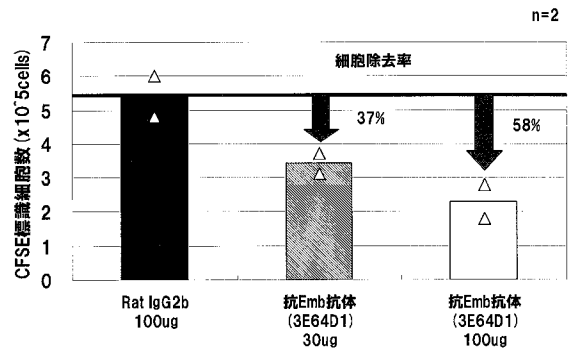
【 図 8 】



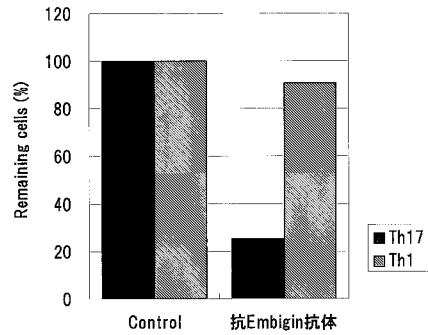
【 図 9 】



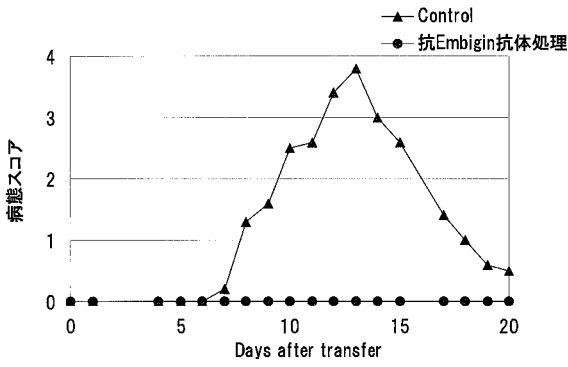
【 図 1 1 】



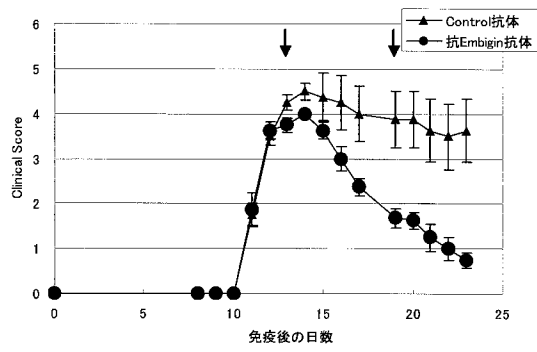
【 図 1 2 】



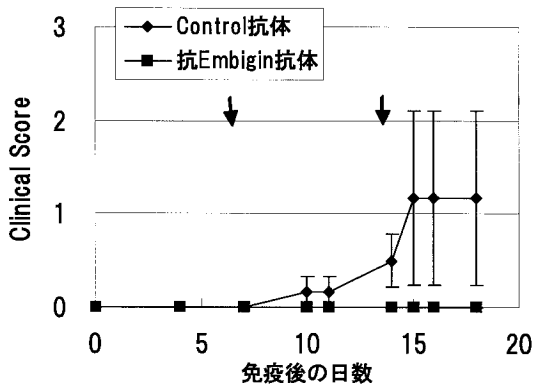
【 図 1 3 】



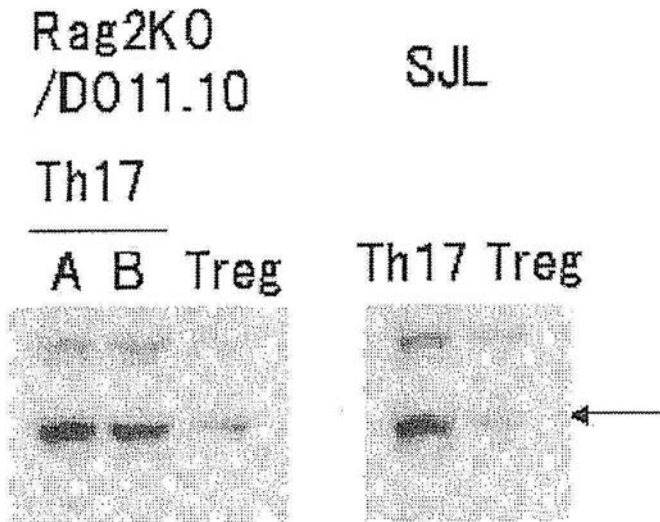
【 図 1 5 】



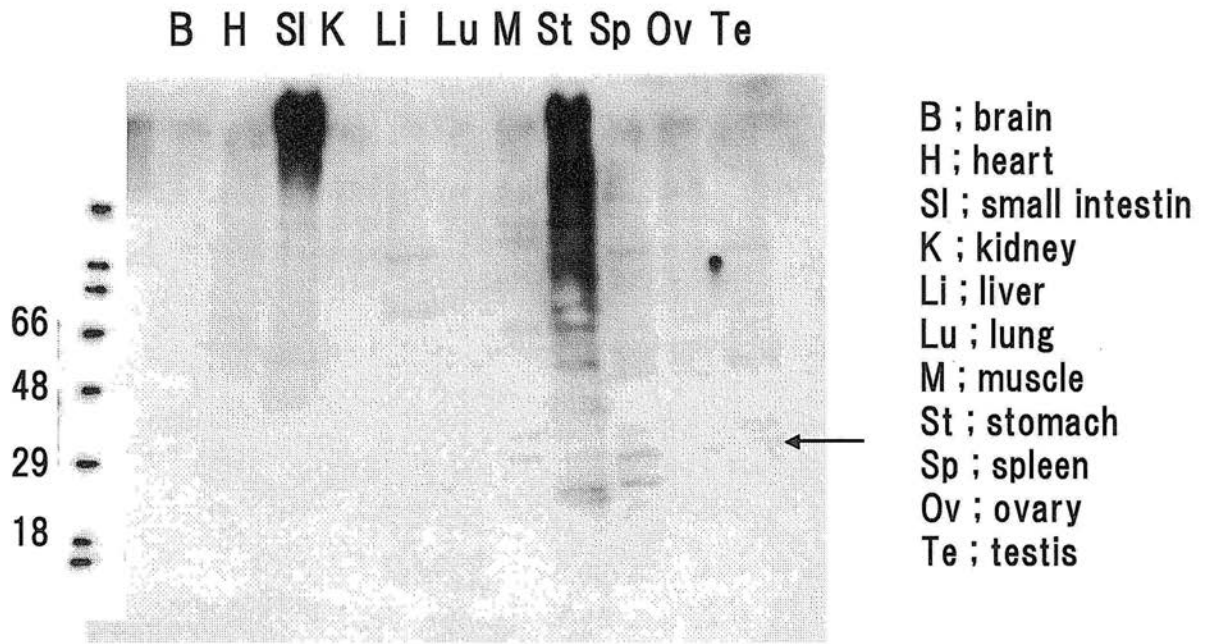
【 図 1 4 】



【 図 3 】



【 図 1 0 】



【 配 列 表 】

2011152503000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/062741
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/016962 A2 (GENENTECH INC.), 24 February 2005 (24.02.2005), entire text; particularly, example 1; SEQ NO. 4424; page 5, line 21 to page 6, line 22 & EP 1654278 A2 & US 2007/184444 A1 & EP 2014675 A1 & US 2010/034817 A1 & EP 2182006 A2 & WO 2005/019258 A2	1-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 June, 2011 (24.06.11)		Date of mailing of the international search report 05 July, 2011 (05.07.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/062741

**Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
(International Patent Classification (IPC))

A61K39/395(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i,  
A61P17/04(2006.01)i, A61P17/06(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i,  
A61P29/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i,  
C07K16/28(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i,  
G01N33/53(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national  
classification and IPC)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/062741									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 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											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMBDplus/JST7580 (JDreamI), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
A	WO 2005/016962 A2 (GENENTECH INC) 2005.02.24, 全文、特に、EXAMPLE 1, SEQ NO. 4424, 5頁21行~6頁22行 & EP 1654278 A2 & US 2007/184444 A1 & EP 2014675 A1 & US 2010/034817 A1 & EP 2182006 A2 & WO 2005/019258 A2	1-26									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 24.06.2011		国際調査報告の発送日 05.07.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 関景輔	4C 3842								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/062741

## 発明の属する分野の分類

A61K39/395(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i, A61P17/04(2006.01)i,  
A61P17/06(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i,  
A61P37/08(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i,  
G01N33/53(2006.01)i

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
	C 1 2 Q 1/02	
	G 0 1 N 33/53 D	
	G 0 1 N 33/53 Q	
	C 0 7 K 16/28	
	C 1 2 N 15/00 A	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 木野 孝一

大阪府大阪市福島区海老江1丁目5番51号 大日本住友製薬株式会社内

(72)発明者 甲斐 敏裕

大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 大日本住友製薬株式会社内

(72)発明者 松本 光広

大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 大日本住友製薬株式会社内

(72)発明者 梶川 益紀

長野県駒ヶ根市赤穂15番地502 株式会社ACTGen内

(72)発明者 杉浦 雅仁

長野県駒ヶ根市赤穂15番地502 株式会社ACTGen内

(72)発明者 清水 絵美

長野県駒ヶ根市赤穂15番地502 株式会社ACTGen内

Fターム(参考) 4B024 AA12 BA63 CA02 HA12

4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ52 QR08 QR32 QR55 QR62 QR66 QS25  
QS34 QX01

4C085 AA13 AA14 AA25 BB36 BB37 CC02 DD33 DD63 DD88 EE01

GG02 GG03 GG04 GG06 GG08 GG10

4H045 BA70 BA71 BA72 CA42 DA75 EA22 EA54 FA72

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に

係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于自身免疫疾病或过敏性疾病的治疗剂		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2011152503A1</a>	公开(公告)日	2013-08-01
申请号	JP2012518457	申请日	2011-06-02
申请(专利权)人(译)	大日本住友制药有限公司		
[标]发明人	木野孝一 甲斐敏裕 松本光広 梶川益紀 杉浦雅仁 清水絵美		
发明人	木野 孝一 甲斐 敏裕 松本 光広 梶川 益紀 杉浦 雅仁 清水 絵美		
IPC分类号	A61K39/395 A61P37/02 A61P25/00 A61P17/06 A61P1/04 A61P29/00 A61P11/06 A61P17/04 A61P37/08 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53 C07K16/28 C12N15/09		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P11/06 A61P17/04 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K16/2803 G01N33/505 G01N2333/4703 A61K39/39533 C07K16/42 C07K2317/73 C12Q1/6888 G01N33/6893		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.C A61K39/395.D A61K39/395 A61P37/02 A61P25/00 A61P17/06 A61P1/04 A61P29/00.101 A61P11/06 A61P17/04 A61P37/08 A61K39/395.L A61K39/395.N C12Q1/68.A C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/53.Q C07K16/28 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/CC02 4C085/DD33 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA54 4H045/FA72		
代理人(译)	高岛肇 山本健二 当麻 博文		
优先权	2010127316 2010-06-02 JP		
其他公开文献	JPWO2011152503A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明包含抗-Embigin抗体，特别是具有细胞毒性或诱导细胞毒性作用的抗-Embigin抗体，自身免疫性疾病或过敏性疾病的预防/治疗剂，涉及Th17细胞的疾病的预防/治疗剂，提供了用于Th17细胞的细胞毒剂。此外，包含抗-Embigin抗体，用于检测Th17细胞的试剂，使用其来确定Th17细胞的简单方法，使用抗-Embigin抗体选择性地且有效地到达Th17细胞的药物等的方法。，提供了向Th17细胞的药物递送系统。

発行日 平成25年8月1日(2013.8.1)

(43) 国際公開日 平成23年12月8日(2011.12.8)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A C	4 B O 2 4
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	4 C O 8 5
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 H O 4 5
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2012-518457 (P2012-518457)	(71) 出願人	000002912
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/062741		大日本住友製薬株式会社
(22) 国際出願日	平成23年6月2日(2011.6.2)		大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号
(31) 優先権主張番号	特願2010-127316 (P2010-127316)	(74) 代理人	100080791
(32) 優先日	平成22年6月2日(2010.6.2)		弁理士 高島 一
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629
			弁理士 鎌田 光直
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100122688
			弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743
			弁理士 村田 美由紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患またはアレルギー疾患の治療剤