



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101743473 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 19

(21) 申请号 200880021422. X

G01N 33/15(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 06. 23

G01N 33/50(2006. 01)

(30) 优先权数据

165547/2007 2007. 06. 22 JP

(56) 对比文件

WO 2007024715 A9, 2007. 03. 01,

JP 2007051980 A, 2007. 03. 01,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 12. 22

Kirk R. Schultz. Toward biomarkers for chronic graft-versus-host disease: national institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: III. Biomarker working group report.. 《Biology of Blood and Marrow Transplantation》. 2006, 第 12 卷

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2008/001625 2008. 06. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/001545 JA 2008. 12. 31

(73) 专利权人 北海道公立大学法人札幌医科大学

地址 日本北海道

Tsukasa Hori. CCL8 is a potential molecular candidate for the diagnosis of graft-versus-host disease.. 《Blood》. 2008,

(72) 发明人 堀司 小海康夫 苗代康可
堤裕幸 今井浩三

曹琦, 张雁云. 趋化因子及其受体介导的细胞迁移与移植抗宿主病. 《细胞生物学杂志》. 2006, 第 28 卷

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

代理人 杨宏军

Philip B. Sugerman. Kinetics of gene expression in murine cutaneous graft-versus-host disease. 《American Journal of Pathology》. 2004, 第 164 卷 (第 6 期),

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 37/06(2006. 01)

G01N 27/62(2006. 01)

G01N 30/72(2006. 01)

G01N 30/88(2006. 01)

审查员 毕秀华

权利要求书1页 说明书13页

序列表1页 附图16页

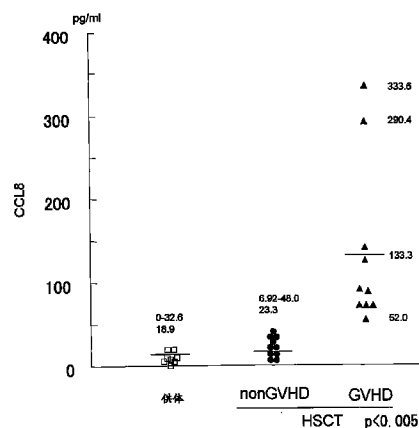
(54) 发明名称

疗方法。

移植抗宿主疾病的检查及治疗方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于检查移植抗宿主疾病的方法, 其特征在于测定取自受试者的试样中 CCL8 蛋白质的量, 并将得到的测定值作为移植抗宿主疾病的诊断或过程的指标。另外, 还公开了含有抗 CCL8 抗体的移植抗宿主疾病的诊断试剂。通过本发明方法可以诊断移植抗宿主疾病的发病及监控其过程, 特别是可以进行移植抗宿主疾病和传染病之间的鉴别诊断。进而还提供一种使用抗 CCL8 抗体的移植抗宿主疾病的治疗



1. 抗 CCL8 抗体在制备用于诊断移植物抗宿主疾病的组合物中的应用。
2. 抗 CCL8 抗体在制备用于治疗移植物抗宿主疾病的组合物中的应用。
3. 抗 CCL8 抗体在制备用于判定移植物抗宿主疾病的临床征兆的进展的组合物中的应用。
4. 抗 CCL8 抗体在制备用于判定移植物抗宿主疾病的治疗效果的组合物中的应用。

移植物抗宿主疾病的检查及治疗方法

技术领域

[0001] 本申请要求基于日本专利申请 2007-165547(2007 年 6 月 22 日申请) 的优先权, 将其内容作为参照引入本说明书。

[0002] 本发明涉及用于检查移植物抗宿主疾病的方法及试剂、以及治疗方法及治疗用药物组合物。

背景技术

[0003] 造血干细胞移植 (Hematopoietic Stem Cell Transplantation ;HSCT) 是将他人的造血干细胞移植给患者使其造血功能及免疫功能再构筑的治疗方法, 作为广泛种类的血液、肿瘤、代谢及免疫疾病的治疗方法已经确立。最近 20 年内移植后免疫抑制疗法显著进步, 但是移植物抗宿主疾病 (Graft Versus Host Disease ;GVHD) 依然是性命攸关的严重的移植后并发症。HSCT 的受血者 (患者) 的 30-80%, 尽管采用利用免疫抑制剂的预防方法, 却仍然患上 GVHD。因此, 人们期望早期诊断 GVHD 并早期开始治疗, 客观地监控治疗效果。另外, 采用目前的治疗方法有时不能痊愈, 因此人们期望开发新的治疗方法。关于 GVHD 的发病率、诊断和治疗可以参照 Sullivan 等 (Sullivan KM. Graft vs. host disease. In :Blume KG, FormanSJ, Appelbaum FR, eds. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 3rd ed. Malden, MA ;Blackwell Publishing ;2004 :635-664)。

[0004] 但是, 目前 GVHD 的诊断主要是基于皮疹、高胆红素血症、腹泻等的临床症状进行的, 不存在能够将 GVHD 与其他类似的并发症 (静脉阻塞疾病、病毒复活、与毒性相关的治疗方案等) 相区别的定性生物标志物 (biomarker)。因此, GVHD 的鉴别诊断需要脏器活检等侵入性方法。但是活检是具有侵入性且主观性的诊断方法。因此需要开发一种新方法, 不依赖于活检并且能够在初期进行准确、客观且定量的诊断, 从而对 GVHD 进行适当的治疗及改善 HSCT 的危象。

[0005] 最近蛋白质组学的进步提供了几种方法用于研究生物学液体中蛋白质的广泛表达, 鉴定疾病或病理状态中的新型生物标志物。上述方法之一为表面加强激光解析 / 电离飞行时间质谱 (SELDI-TOFMS), 这是一种高通量且高灵敏度的蛋白质组学方法, 用于从血浆等复杂组成的体液中分离蛋白质, 生成比较蛋白质谱。Petricoin 等 (Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet. 2002 ;359 :572-577) 报道了一种利用使用 SELDI 的蛋白质组学解析的卵巢癌生物标志物。在 SELDI 中将从生物学样品中得到的蛋白质选择性地结合于蛋白质芯片 (Ciphergen Biosystems, Fremont CA) 上的经化学修饰的亲和表面, 冲洗非特异结合的杂质。然后, 利用 TOF-MS 分析捕捉的蛋白质, 得到各蛋白质的分子量 (m/z) 及相对浓度 (强度) 的光谱。最近的研究成功地将该技术适用于癌症及其他疾病的诊断。

[0006] 对于 GVHD 中人体液的蛋白质组学分析, 也有相关报道。但是, 在使用人的临床试样的实验中, 不能避免受遗传背景及环境影响的假象, 这使新型生物标志物难以表达。特别是对于 HSCT 后的患者由于存在多种已有疾病、调整的养生方案以及 GVHD 预防方法等,

所以目前为止还没有基于包括蛋白质组学分析的生化方法发现有用标记的报道。例如, Kaiser 等 (Kaiser T, Kamal H, Rank A, et al. Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2004 ;104 :340-349) 报道了以尿作为材料利用蛋白质组学解析的 GVHD 标记的研究。鉴定了两种蛋白质 (白三烯; 炎症介质, 血清白蛋白; 血清中最多的蛋白质), 但没有发现 GVHD 特异蛋白质。

[0007] 在本说明书中引用的参考文献如下所述。所述文献中记载的内容均作为参照援引在本说明书中。申请人认为这些文献中的任意一篇都不构成影响本发明专利性的现有技术。

[0008] 非专利文献 1: Sullivan KM. Graft vs. host disease. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, eds. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 3rd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing; 2004 :635-664

[0009] 非专利文献 2: Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet. 2002 ;359 :572-577

[0010] 非专利文献 3: Kaiser T, Kamal H, Rank A, et al. Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2004 ;104 :340-349

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供检查移植物抗宿主疾病的方法、所述方法中使用的诊断试剂、和治疗方法及治疗用药物组合物。

[0012] 本发明人等广泛研究了在移植物抗宿主疾病发病的模型动物和对照动物之间不同地表达的蛋白质, 结果发现在移植物抗宿主疾病中 CCL8 的表达量明显上升, 进而发现移植物抗宿主疾病的临床症状发病及过程与 CCL8 表达量相关, 从而完成了本发明。

[0013] 即, 本发明提供一种用于检查移植物抗宿主疾病的方法, 其特征在于, 测定取自受试者或受试动物的试样中 CCL8 蛋白质的量, 并将得到的测定值作为移植物抗宿主疾病的诊断或过程的指标。优选移植物抗宿主疾病的诊断在移植物抗宿主疾病的临床症状发病前进行。

[0014] 在本发明的方法中, 优选使用抗 CCL8 抗体测定 CCL8 蛋白质的量。另外优选使用选自质谱法 (MS)、高效液相色谱法 (HPLC) 及双向电泳中的方法测定 CCL8 蛋白质的量。

[0015] 另外, 本发明提供一种含有抗 CCL8 抗体的移植物抗宿主疾病的诊断试剂。

[0016] 进而, 本发明提供一种选择移植物抗宿主疾病治疗药的候选物质 (candidate substance) 的方法。所述方法包括下述各步骤: 向移植物抗宿主疾病的模型动物给与试验物质, 测定取自上述模型动物的试样中 CCL8 蛋白质的量, 然后比较给与试验物质时与未给与试验物质时的 CCL8 蛋白质的量, 在给与试验物质时的 CCL8 蛋白质的量低于未给与试验物质时的 CCL8 蛋白质的量的情况下, 选择所述试验物质作为移植物抗宿主疾病治疗药的候选物质。

[0017] 本发明还提供含有抗 CCL8 抗体作为有效成分的用于治疗移植物抗宿主疾病的药物组合物。并且, 本发明提供一种治疗移植物抗宿主疾病的治疗方法, 所述方法包括向患有

移植物抗宿主疾病的受试者给与抗 CCL8 抗体。

[0018] 根据本发明可以以高可靠性诊断移植物抗宿主疾病的发病及过程,通过本发明的方法可以使现有主观的诊断变成客观且定量的更准确的诊断。进而,根据本发明可以治疗移植物抗宿主疾病,特别是治疗对现有治疗方法具有抗性的患者的移植物抗宿主疾病。

附图说明

[0019] 图 1 表示小鼠 GVHD 模型的临床症状和病理学评分的经时变化。

[0020] 图 2 表示由 GVHD 小鼠模型得到的样品的代表性的 SELDI 光谱,及各时间点的样品中 8972Da 峰的平均归一化强度 (average normalized intensity)。

[0021] 图 3 表示由给与 CsA 的小鼠模型得到的样品的代表性的 SELDI 光谱,及各时间点的样品中 8972Da 峰的平均归一化强度。

[0022] 图 4 表示由同种移植小鼠模型得到的样品的代表性的 SELDI 光谱,及各时间点的样品中 8972Da 峰的平均归一化强度。

[0023] 图 5 表示含有 8972Da 蛋白质的 HPLC 馏分的 SELDI 光谱及 2D 电泳的结果。

[0024] 图 6 表示从 8972Da 蛋白质中分离的肽的代表性的 MS/MS 光谱及鉴定的氨基酸序列。

[0025] 图 7 表示利用免疫测定的 CCL8 蛋白质的检测。

[0026] 图 8 表示人临床样品中 CCL8 蛋白质水平的经时变化。

[0027] 图 9 表示人临床样品中 CCL8 蛋白质水平的经时变化。

[0028] 图 10 表示人临床样品中 CCL8 蛋白质的检测。

[0029] 图 11 表示多个人临床样品中 CCL8 蛋白质的检测。

[0030] 图 12 表示人临床样品中 CCL8 蛋白质水平的经时变化。

[0031] 图 13 表示人临床样品中 CCL8 蛋白质水平的经时变化。

[0032] 图 14 表示给与 TLR 配体的小鼠和 GVHD 小鼠中 CCL8 的蛋白质水平。

[0033] 图 15 表示小鼠 GVHD 模型的临床症状和 CCL8 蛋白质水平的经时变化。

[0034] 图 16 表示给与了抗 CCL8 抗体的小鼠 GVHD 模型的组织染色。

[0035] 图 17 表示小鼠 GVHD 模型中抗 CCL8 抗体的治疗效果病理学评价。

具体实施方式

[0036] 本发明的特征在于通过测定受试者血液等受试试样中 CCL8 的表达量,诊断移植物抗宿主疾病并监控过程的方法。具体内容如下述实施例所示,可确认在接受了骨髓移植或脐带血移植的患者中,移植物抗宿主疾病发病患者的 CCL8 的表达量明显较高、以及移植物抗宿主疾病的临床症状的发病与 CCL8 的表达之间存在相关性。

[0037] 所谓 CCL8 为属于趋化因子家族的碱性肝素结合性分泌蛋白,也称为 MCP-2 (GenBank Accession No. NP 005614)。已知此蛋白质在单核细胞、成纤维细胞、上皮细胞等中产生,与作为受体的 CCR2, CCR3, CCR5 及 CCR11 结合。已知 CCL8 以 CD4 阳性 T 细胞、CD8 阳性 T 细胞、单核细胞、NK 细胞、嗜酸性细胞、嗜碱性细胞等作为靶细胞。一般认为移植物抗宿主疾病在造血干细胞移植后经三个阶段发病。第一阶段为预处理,包括对准备进行造血干细胞移植的宿主(患者)进行放射线照射;第二阶段为移植 T 细胞的活化、

增殖、分化；第三阶段为细胞性或炎症性效应物的出现（关于该机理，参照以下两篇综述：Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. Hematol Oncol. 2003；21：149-161.，Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. Semin Hematol. 2006；43：3-10）。在第二阶段中，为了移植 T 细胞的活化，必须进行树状细胞的抗原呈递。在该树状细胞的分化、增殖、活化中包括 CCL8 的趋化因子发挥重要作用（关于第二阶段中趋化因子的重要性参照以下文献：Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. Blood. 2005；105：4191-4199）。但是，机体内 CCL8 的作用及其在免疫系统调节中的意义尚不完全清楚。因此，本发明所发现的 CCL8 的表达与移植物抗宿主疾病的相关性的机理目前为止尚不明确。

[0038] 作为需要测定 CCL8 蛋白质量的受试试样，可以使用从受试者或受试动物中获取的体液、血液、血清及血浆等。另外，还可以使用取自受试者的组织和细胞。

[0039] 取自受试者的试样中 CCL8 蛋白质的量，可以使用抗 CCL8 抗体，采用本技术领域熟知的免疫学测定法进行测定。抗 CCL8 抗体可以为多克隆抗体或单克隆抗体。市场上销售有多种抗 CCL8 多克隆抗体及单克隆抗体，上述抗体均可用于本发明。

[0040] 或者，抗体也可以采用本技术领域熟知的方法进行制备。与 CCL8 结合的多克隆抗体可以如下得到：使用 CCL8 或其肽片段作为致敏抗原将动物免疫，从免疫后的动物中分离含有抗体的抗血清，使用 ELISA 分析、蛋白质印迹分析或放射免疫测定等本技术领域熟知的方法，确认具有所希望特异性的抗体的存在。

[0041] 与 CCL8 结合的单克隆抗体可以如下得到：根据本技术领域熟知的方法使用 CCL8 或其肽片段作为致敏抗原将动物免疫，取出所得的免疫细胞使其与骨髓瘤细胞融合，选择产生抗体的杂交瘤并进行克隆，培养该杂交瘤，由此得到。

[0042] 本发明使用的抗 CCL8 单克隆抗体中，除了由杂交瘤产生的抗体之外，还包括由用含有抗体基因的表达载体转化的转化体产生的基因重组抗体。基因重组抗体可以如下制备：由生产与 CCL8 结合的单克隆抗体的杂交瘤克隆编码抗体的 cDNA，将该 cDNA 插入表达载体中，使用该载体对动物细胞，植物细胞等进行转化，培养该转化体而制备。另外，可以将编码抗 CCL8 抗体的基因导入转基因动物，在转基因动物中产生抗 CCL8 抗体。

[0043] 为了治疗人类患者进行使用时，根据本发明的抗 CCL8 抗体优选为人型嵌合抗体 (human chimeric antibody) 或人源化抗体。人型嵌合抗体是由人之外的动物抗体的重链可变区及轻链可变区、和人抗体的重链恒定区及轻链恒定区构成的抗体。人源化抗体由来自人之外的动物的抗体的互补决定区 (CDR)、和来自人抗体的构架区 (FR) 及 C 区域构成。由于人型嵌合抗体及人源化抗体由于在人体内的抗原性降低，所以作为本发明药物组合物的有效成分有用。用于得到人型嵌合抗体及人源化抗体的一般的基因重组方法以及评价上述抗体的结合活性的方法在本技术领域是公知的。或者，也可以通过向具有人抗体基因的全部的全套抗体库的转基因动物给与 CCL8 得到抗 CCL8 人抗体。

[0044] 并且，在本发明中也可以使用抗体片段。所谓抗体片段是指虽然缺失抗 CCL8 抗体全长的一部分但仍具有对 CCL8 的结合能力的肽。作为抗体片段的例子，例如可以举出 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 等。抗体片段可以通过用酶处理抗体生成抗体片段而得到。进而，本发明的抗体片段还包括通过用连接体等连接抗 CCL8 抗体的 VL 链和 VH 链而构筑的抗体片段

及其二聚物,例如 scFv、双链抗体 (diabody)、sc(Fv)₂ 等。

[0045] 使用由此得到的抗体利用免疫学方法测定从受试者或受试动物获取的试样中的 CCL8 蛋白质。测定可以为定性测定也可以为定量测定。取自受试者的 CCL8 表达的免疫学测定例如可以使用放射免疫测定、ELISA、免疫沉淀法、免疫凝集法、蛋白质印迹法等进行。

[0046] 例如,作为典型例子可以如下进行夹心 ELISA。采集受试者的外周血调制血浆,将其加入固定有抗 CCL8 抗体的平板或芯片上培养适当时间。清洗平板或芯片除去未结合成分后,加入其它抗 CCL8 抗体。所述抗体可以通过酶、荧光色素、化学发光物质、生物素、放射性化合物等进行标记使其可以进行检测。培养适当时间后清洗平板或芯片,通过测定荧光、发光、放射活性等,检测标记。或者,也可以使抗 CCL8 抗体结合后加入二次抗体(例如羊抗小鼠抗体)增强信号。二次抗体用酶、荧光色素、化学发光物质、生物素、放射性化合物等标记使其可以进行检测。如上所述,可以测定取自受试者的血浆中 CCL8 蛋白质的量。

[0047] 其它方案中可以使用利用了凝集反应的检测方法检测 CCL8 蛋白质。在该方法中可以使用结合有抗 CCL8 抗体的载体例如胶乳粒子检测 CCL8。如果将结合有抗 CCL8 抗体的胶乳粒子与试样混合培养一定时间,若试样中含有 CCL8 则粒子发生凝集。肉眼观察该凝集的程度或者使用分光光度计进行定量,由此可以检测试样中的 CCL8。

[0048] 在其他方案中可以使用利用了表面细胞质基因组共振现象的生物传感器检测 CCL8 蛋白质。利用了表面细胞质基因组共振现象的生物传感器以表面细胞质基因组共振信号的形式对蛋白质-蛋白质间的相互作用进行监控。例如,通过使用 BIAcore (Pharmacia 制) 等生物传感器,可以检测 CCL8 蛋白质与抗 CCL8 抗体的结合。具体而言,使受试试样与固定有抗 CCL8 抗体的传感器芯片接触,能够以共振信号变化的方式检测与抗 CCL8 抗体结合的 CCL8 蛋白质。

[0049] 或者,CCL8 蛋白质也可以如实施例 2 所示使用金属螯合剂和肝素等亲和载体将受试试样进行粗精制(浓缩)后通过 MS 进行检测及定量。另外,也可以如实施例 3 所示通过 HPLC 进行检测及定量,也可以通过进行双向电泳后进行银染色来检测及定量。

[0050] 另外,本发明提供含有抗 CCL8 抗体的移植物抗宿主疾病诊断试剂。本发明的移植物抗宿主疾病诊断试剂以诊断试剂盒的形式提供。诊断试剂盒含有用于检测 CCL8 的试剂例如抗 CCL8 抗体作为有效成分。另外,该试剂盒还可以进一步含有测定所需的适当试剂类,例如缓冲液、稀释液、反应终止液、清洗液和对照样品等。

[0051] 在本发明中可以以如上所述测定的 CCL8 蛋白质的量作为指标进行移植物抗宿主疾病的检查。如果按照本发明的方法,无需目测检查或观察腹泻量,可以以 CCL8 蛋白质作为标记,客观地诊断移植物抗宿主疾病,可以监控移植物抗宿主疾病的发病及过程。本发明的检查方法对于例如移植物抗宿主疾病发病前的诊断(早期诊断)、发病的确诊、严重程度的判定、疾病过程的监控、治疗效果的判定及预后的预测有用。特别是如图 14 所示由于 CCL8 蛋白质的表达量经过由 TLR(Toll 样受体)介导的途径没有升高,所以通过使用 CCL8 蛋白质作为标记可以对移植物抗宿主疾病和细菌或病毒感染进行鉴别诊断。

[0052] 如下述实施例所示,移植物抗宿主疾病发病的患者中 CCL8 的表达量与发病前相比显著升高。实施例 8 中,骨髓移植模型小鼠呈现出 CCL8 的表达量自确认移植物抗宿主疾病临床表现两天前开始上升。进而,如图 8 及 9 所示,即使在人类患者中 CCL8 的表达量也自观察到移植物抗宿主疾病临床表现之前开始上升,这表明根据本发明的方法可以进行移

植物抗宿主疾病的早期诊断。另外,本发明的方法对治疗效果的判定也有用。如图 8 及 9 所示,通过治疗移植物抗宿主疾病临床表现得到改善,同时观察到 CCL8 的表达量下降。在治疗抗性 GVHD 中通常的甲基泼尼松龙 (methylprednisolone) 治疗无效,需要进行更加严格的治疗,由于这种治疗副作用强,所以根据本发明的方法适当地监控治疗效果边调节给药量进行处置是有益的。

[0053] 另外,如图 11 所示由于 CCL8 的表达量与移植物抗宿主疾病的严重程度及预后相关,所以根据本发明的方法可以早期发现重症患者并进行适当治疗。

[0054] 并且,本发明的方法对移植物抗宿主疾病的治疗方法的开发及改良也有用。如图 11 所示,通过检查 CCL8 的表达量可以明确具有治疗抗性 GVHD 病例的患者。对这种患者还没有确立治疗方法。因此,通过对上述病例边进行上述监控边研究同时使用多种制剂等的效果,可以期待开发适合的治疗方法。

[0055] 进而,由于对于移植物抗宿主疾病通常没有特效药,所以根据本发明以 CCL8 的表达量作为指标,可以筛选移植物抗宿主疾病治疗药的有力的候选物质。可以通过向移植物抗宿主疾病的模型动物给与试验物质,测定取自模型动物的试样中 CCL8 蛋白质的量,进行筛选。作为试验物质例如可以使用抗 CCL8 抗体。或者,试验物质也可以由各种合成或天然的化合物文库、组合文库、寡核苷酸文库、肽文库等文库中取得。另外,还可以使用由细菌、真菌类、藻类、植物、动物等天然物得到的提取物或其部分精制物作为试验物质。在给与试验物质时与未给与试验物质时相比,在 CCL8 蛋白质的量低的情况下,可以选择上述试验物质作为移植物抗宿主疾病治疗药的候选物质。即,本发明的检查方法提供开发移植物抗宿主疾病的新型治疗方法的平台。

[0056] 另外,本发明提供含有抗 CCL8 抗体作为有效成分的、用于治疗移植物抗宿主疾病的药物组合物,以及通过给与抗 CCL8 抗体治疗移植物抗宿主疾病的方法。如下述实施例 9 所示,对移植物抗宿主疾病模型动物给与抗 CCL8 抗体进行病理学评价,结果确认了炎症细胞对皮肤的表皮真皮接合部的浸润减少,毛囊及皮脂腺的障碍减轻,表明给与抗 CCL8 抗体对 GVHD 的治疗有效。

[0057] 本发明的药物组合物可以采用本领域技术人员公知的方法进行制剂化。例如可以通过适当组合药学上允许的载体或介质,具体而言为灭菌水或生理盐水、植物油、乳化剂、混悬剂、表面活性剂、稳定剂、香味剂、赋形剂、媒介物、防腐剂、粘合剂等,以通常认可的进行制药所要求的单位用量形态混合,进行制剂化。

[0058] 用于口服给药时,可以通过将本发明的提取物或化合物或其盐与本技术领域中公知的药学上允许的载体进行混合,制成片剂、丸药、糖衣剂、胶囊剂、液体制剂、凝胶剂、糖浆剂、浆液、悬浮液等。

[0059] 用于非口服给药时,可以使用本技术领域公知的药学上允许的媒介物,将本发明的提取物或化合物或其盐制成注射用制剂、喷雾给与用制剂、透皮给与用制剂等形态。

[0060] 可以通过口服给药或非口服给药将本发明的药物组合物给与患者。优选为非口服给药。作为给药途径,例如可以举出静脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、直肠内给与、经鼻给与、经肺给与、透皮给与等。作为给药量例如可以在每 1kg 体重每次给与 0.0001mg 至 1000mg 的范围内进行选择。主治医生可以根据患者的年龄、症状的严重程度、给药中的其他药物等适当选择给药途径及给药量。

[0061] 本说明书中明确引用的全部专利及参考文献的内容均作为参照引入本说明书中。

[0062] 以下通过实施例更详细地说明本发明,但本发明不限于这些实施例。

[0063] 实施例 1

[0064] 骨髓移植 (BMT)

[0065] 通过对小鼠进行异种骨髓移植诱导急性 GVHD。作为受体小鼠使用 BALB/c (H-2^d) ; 作为供体小鼠,用于异种 BMT 时使用 C57BL/6 (H-2^b),用于同种 BMT 时使用 BALB/c (H-2^d)。小鼠均为 7-12 周龄 (Sankyo Labo Service Corporation)。

[0066] 在 BMT 当日通过颈椎脱臼处死供体小鼠。冲洗股骨及胫骨的骨髓,收集供体的骨髓细胞,放入含有 2%胎牛血清/1%青霉素-链霉素的 DME 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium) 中调制单细胞悬浮液。用 RPMI1640 培养基清洗细胞,再悬浮于相同培养基中。调制骨髓细胞接种物,使其在用于异种 BMT 时 200 μ L 中含 2×10^7 个骨髓细胞,用于同种 BMT 时 100 μ L 中含 1×10^6 个骨髓细胞。

[0067] 受体 BALB/c 小鼠在 BMT 前用酸性水饲养至少 7 日,防止致死量放射线照射后的败血症。以 0.34Gy/ 分钟的比例对受体小鼠进行共计 8.5Gy 的全身照射,在 3 小时以内经尾静脉内注射供体小鼠骨髓细胞。

[0068] GVHD 的监控

[0069] 每日观察受体小鼠的 GVHD 临床表现,即体重减少、弓背姿势、皮肤红斑、脱毛及腹泻。在异种 BMT 小鼠中在移植后 7 日以内出现急性 GVHD 的临床症状,例如腹泻及褶皱状白苔 (ruffled fur),21 日以内确认到皮肤红斑及脱毛。在第 14 日与第 21 日之间出现死亡例。

[0070] 组织病理学分析

[0071] 在移植后第 7 日、第 14 日、第 21 日及第 28 日处死受体小鼠。取出皮肤、肝脏及小肠,在 10%福尔马林缓冲液中固定。将固定后的组织包埋在石蜡中制备切片,用苏木精及曙红染色,在显微镜下观察。代表脏器中的认为与 GVHD 相对应的组织学变化如下所述:皮肤 (单核细胞向表皮真皮接合部的浸润及毛囊或皮脂腺的损伤);肝脏 (单核细胞向门静脉的浸润及肝细胞坏死);及小肠 (隐窝细胞的细胞程序死亡及绒毛扩张或变平)。评分系统是分别将上脏器的阴性结果作为 0,阳性对照作为 1 (一只小鼠的最大分数为 6)。图 1 表示各时间点平均病理学评分和临床症状。该结果为 5 次独立实验的代表例。受体小鼠在移植后的全部时间点均有 GVHD 的病理学征兆,第 14 日的病理学评分最大。另外,各时间点的病理学评分与 GVHD 的临床表现一致。

[0072] 血浆样品

[0073] 在 BMT 前及 BMT 后第 7 日、第 14 日、第 21 日及第 28 日采集血液样品。使用涂布了肝素的毛细管从活小鼠的尾静脉采集血液样品,在 30 分钟以内在 10,000rpm 下离心分离 5 分钟调制血浆。用于分析之前将其于 -80℃ 下保存。

[0074] 实施例 2

[0075] SELDI 蛋白质芯片阵列分析

[0076] 向 10 μ L 各血浆样品中加入于 Tris-HCL (pH7.4) 中含有 9mol/L 尿素及 10g/L CHAPS 的 20 μ L 溶液。将混合物于 4℃ 下涡旋 15 分钟,用 Tris-HCl 将其稀释为 1 : 40。用 50mmol/L CuSO_4 活化 8 斑点固定金属亲和捕获阵列 (IMAC-30)。将稀释后的样品 (50 μ L)

加入蛋白质芯片阵列的各斑点中,在振荡器中培养 1 小时。用相同的 Tris-HCL 清洗后用水轻轻洗涤,在各斑点中加入 0.5 μ l 的饱和芥子酸 (sinapinic acid;SPA) 加 2 次,进行风干。使用 Ciphergen ProteinBiology System II 飞行时间质谱仪 (PBS II, Ciphergen Biosystems, Inc) 测定与螯合后的金属结合的蛋白质的质荷比 (m/z) 光谱。通过将在激光强度 200 及检测器灵敏度 8 的条件下得到的 65 个激光脉冲 (laser shots) 进行平均,求出数据。

[0077] SELDI-TOF 质谱的统计学分析

[0078] 编译全部的光谱,使用 Ciphergen Protein Chip Software 3.2.0. 进行数据初步分析。作为血浆样品使用 GVHD 组 (移植后第 7 日、第 14 日、第 21 日及第 28 日) 50 个样品及对照组 (BMT 前) 28 个样品共计 78 个样品。结果在 $m/z = 2k \sim 200k$ 的范围内检测到表达不同的共 169 个峰。对于这些峰通过使用 Biomarker Pattern's Software 对 2 组间进行比较,提取峰强度变化为 5 倍以上且 $p < 0.05$ 的峰,结果发现在 GVHD 组中有 10 个峰上升、9 个峰下降。

[0079] 利用 SELDI-TOF MS 得到的蛋白质谱

[0080] 对上述 2.0-200kDa 质量范围的 169 个峰进一步使用峰强度值进行分析。使用 Biomarker Pattern's Software (BPS, CiphergenBiosystems, Inc), 利用交叉验证法使用全部 169 个峰制备分类树。简单而言,在分类树中一次使用一个规则以问题的形式将数据分割为两个节点。在该实验中基于由 SELDI 蛋白表达谱鉴定的峰或簇的归一化强度水平来确定分割。即,由 SELDI 谱鉴定的各峰或簇是分类过程中的变量。继续进行分割过程直至达到末端节点且不能由数据分类进一步分割。

[0081] 使用该方法制备多个分类树,基于分类树分析选择最优秀的分类树。结果,作为在 GVHD 组中与对照组相比明显上升的峰之一,选择 8972Da 的峰。通过使用 8972Da 的峰可以对 GVHD 组和对照组进行分类使灵敏度及特异度均为 100%。

[0082] 8972Da 峰的表达例如图 2 所示。图 2A 表示在 6000-10000Da 范围内由相同个体的小鼠得到的正常对照样品 (preBMT; 移植前) 及 GVHD 样品 (移植后第 7 日、第 14 日、第 21 日及第 28 日) 的代表性 SELDI 光谱。线包围的部分表示平均质量 8972Da 的峰。确认到所述峰与正常血浆相比 GVHD 过量表达,第 7 日以后峰强度明显上升。组织评分和峰强度均在第 28 日下降。图 2B 表示各时间点样品中 8972Da 峰的平均归一化强度 (在各个点 $n = 9$)。GVHD 样品峰的平均表达明显高于对照样品 (preBMT; 移植前) 的平均表达。

[0083] CsA 给药模型

[0084] 将作为 GVHD 治疗药的环孢菌素 A (CsA) (Novartis Pharma) 用 0.9% NaCl 稀释至 1.67mg/mL。从移植后第 8 日至第 13 日对异种移植小鼠以每日 20mg/kg 的用量腹腔内给与 CsA。图 3 表示 CsA 给与例的同一个体中 8972Da 峰的推移、以及各时间点样品中 8972Da 峰的平均归一化强度 (在各个点 $n = 4$)。在 CsA 处置 GVHD 小鼠中 8972Da 的峰强度在第 7 日上升,给与 CsA 后下降。

[0085] 同种移植模型

[0086] 在使用具有从 BALB/c 小鼠移植的骨髓移植的 BALB/c 小鼠的同种移植模型中没有诱发 GVHD,并且在移植前样品和移植后样品中峰的平均表达没有显著性差异 (图 4A, B)。

[0087] 实施例 3

[0088] 蛋白质的分离

[0089] 利用免疫耗竭色谱法 (Multiple Affinity Removal Column MS-3, 4.6mm ID×50mm; Agilent) 从汇集后的血浆样品中除去量最多的三种血浆蛋白质 (白蛋白、IgG、运铁蛋白)。用缓冲液 A (Agilent) 将 50 μ L 血浆稀释至 5 倍, 注入免疫耗竭色谱柱。回收流过的馏分 (flow-through fractions), 用高效液相色谱法 (HPLC) 进一步分离。HPLC 中使用的分离柱为 Inertsil (注册商标) Ph 柱 (5 μ m, 4.6mm ID×150mm; GL Sciences)。洗脱梯度分布情况如下所述: (1) 洗脱溶剂: A 2% ACN/0.1% TFA, B 80% ACN/0.1% TFA; (2) 线性梯度: 0-100% B/50 分钟; 流速 1.0ml/分钟。

[0090] 每 30 秒收集馏分, 将 2 μ L 馏分置于 Au 芯片 (Ciphergen) 上, 用 SPA 基质处理, 用 SELDI-TOF MS 监控各馏分的组成。根据 SELDI-TOF MS 监控回收洗脱时间为 31.0-31.5 分钟 (约 38% 乙腈) 的 HPLC 馏分。在 GVHD 样品中含有大量 8972Da 蛋白质, 但在对照样品中却基本没有 (图 5A)。冷冻干燥该馏分并溶解于 200 μ L 溶解缓冲液中 (7M 尿素、2M 硫脲、50m MDTT、2% Ampholine、3% CHAPS、1% TritonX-100)。

[0091] 然后, 将如上所述浓缩后的样品用 2D 电泳进行分离。超声波处理后, 将样品溶液置于 IPG 胶条 (pH3-11, NL, 长度 11cm, AmershamBioscience) 中, 将该胶条在 30V 下再水化 10 小时。作为第一维分离的等电聚焦电泳法 (IEF) 使用 IPGphor 系统 (Amersham Bioscience) 在 20°C 下共进行 12kVhr。IEF 后将 IPG 胶条在含有 6M 尿素、2% SDS、30% 丙三醇、0.002% 溴酚蓝及 1% 二硫苏糖醇的 50mM Tris-HCL (pH8.8) 中平衡化 15 分钟, 然后在含有 2.5% 碘乙酰胺代替二硫苏糖醇的相同缓冲液中再平衡 15 分钟。使用 8-20% 梯度聚丙烯酰胺凝胶进行作为第二维分离的 SDS-PAGE, 在 40mA/ 凝胶的恒电流下进行电泳。2D 电泳后通过硝酸银染色使蛋白质可见。通过比较 GVHD 及对照样品的两个凝胶的图像, 鉴定出位于 6,500Da-12,300Da、在 GVHD 样品中高度表达的斑点 (spot) (图 5B, C)。

[0092] 蛋白质的鉴定

[0093] 将作为候补蛋白质的 8972Da 的斑点在凝胶内消化。简单而言, 用 100% ACN 及 100mM NH_4HCO_3 清洗切下的凝胶斑点, 然后真空干燥, 在 5 μ L 胰蛋白酶溶液 (50mM NH_4HCO_3 及 5mM CaCl_2 中 12.5ng/ μ L) 中于 37°C 下培养 16 小时。将得到的肽用 20 μ L 20mM NH_4HCO_3 提取一次, 用 20 μ L 的在 50% ACN 中为 5% 甲酸提取三次。将回收的提取物真空干燥至约 40 μ L, 然后用 NanoFlowHPLC-ESI-MS/MS 进行分析。使用 DiNa 系统 (KYA) 进行 HPLC, 用 Hi Qsil (注册商标) C18 色谱柱 (75 μ m ID×50mm; KYA) 分离胰蛋白酶消化后的样品。分离条件如下所述。洗脱溶剂 A: 0.1% 甲酸, 溶剂 B: 0.1% 甲酸中 70% ACN, 梯度: 0-100% B/40 分钟, 流速: 200nL/分钟。使用 QSTAR XL Q-TOF 质谱仪 (Applied Biosystems) 确定分离得到的肽的特性。使用所得的质谱数据通过 MASCOT 软件 (Matrix Science Inc.) 检索 NCBI 蛋白质数据库。

[0094] 结果, 8972Da 蛋白质的部分氨基酸序列与 CCL8 前体序列一致。从 8972Da 蛋白质分离得到的肽的代表 MS/MS 光谱示于图 6。所述肽通过 Nano LC-MS/MS 被鉴定为 CCL8 肽 68-79 (QGMSLCVDPTQK)。同样操作鉴定与理论质量相匹配的 11 种肽。如果将上述肽的序列组合, 则 CCL8 前体的氨基酸序列的 52% 被覆盖 (下划线部分)。

[0095] 1MKIYAVLLCL LLIAVPVSPE KLTGPDKAPV TCCFHVLLKLIPLRVLKSYE

[0096] 51 RINNIQCPME AVVFQTKQGM SLCVDPTQKWVSEYMEILDQ KSQILQP (序列号 1)

[0097] CCL8 前体的推定质量为 11,017Da,推定 pI 为 8.64。CCL8 前体含有 19 个氨基酸的信号肽及与其相连的 78 个氨基酸残基的成熟 CCL8 序列。成熟 CCL8 的推定质量为 8972Da,推定 pI 为 8.45,这与由 SELDI-TOF MS 及 2D-PAGE 得到的数据一致。

[0098] 实施例 4

[0099] 利用免疫测定确认 CCL8 表达

[0100] 通过使用特异性的家兔抗小鼠 CCL8 抗体的 SELDI 免疫测定,进一步确认 8972Da 标记为 CCL8。在 PS20 (Preactivated Surface) 蛋白质芯片 (Ciphergen) 的各斑点加入 0.1 μg 抗小鼠 CCL8 抗体,在加湿室中室温下培养 2 小时。用 5 μl 的 1M 乙醇胺 (pH8.0) 将残留活性部位封闭 30 分钟后,将斑点用 PBS 中的 0.5% TritonX100 清洗三次,用 PBS 清洗两次。用 PBS 将血浆样品稀释至 1 : 75,加入 PS20 芯片的抗体固定斑点中,边使用生物芯片处理器 (bioprocessor) 在室温下柔和地混合边培养 2 小时。将各斑点用 PBS 中的 0.5% TritonX100 清洗两次,用 PBS 清洗两次。用 5mM HEPES 轻柔清洗后加入 SPA 基质,使用 PBS II 蛋白芯片阅读器进行 MS 分析。结果,从 GVHD 血浆样品中检测到 CCL8,但在对照样品中基本没有检测到 (图 7)。

[0101] 实施例 5

[0102] 人类临床样品中的 CCL8 表达

[0103] 作为人临床样品,使用将从接受了骨髓移植的人类患者中得到的血浆在 PBS 中以 1 : 25 稀释得到的样品。与实施例 4 同样操作,使用 PS20 蛋白质芯片,使用抗人 CCL8 抗体,通过 SELDI 免疫测定调查人类患者中 CCL8 的表达。

[0104] 患者 1 (图 8)

[0105] 5 岁男子

[0106] 诊断:范可尼贫血 (Fanconi anemia)

[0107] 处置:非亲缘者间脐血移植 (CBSCT (UR))

[0108] 预防药:CsA+MMF

[0109] 过程:移植后第 13 日皮肤 GVHD 发病,在该日开始甲基泼尼松龙治疗 (mPSL)。在临床 GVHD 发病前移植后 10 日出现 CCL8。通过治疗这种情况暂时下降。但是,之后在 GVHD 再次发作的同时,CCL8 的表达量也再次增加。患儿暂时对治疗产生反应但最终由于治疗抗性 GVHD 而死亡。CCL8 的表达量与 GVHD 的发病及治疗效果相关。另外,陷入治疗抗性后 CCL8 不再下降。

[0110] 患者 2 (图 9)

[0111] 10 岁男子

[0112] 诊断:慢性骨髓性白血病 (CML)

[0113] 处置:非亲缘者间骨髓移植 (BMT (UR))

[0114] 预防药:FK+MTX

[0115] 过程:移植后第 19 日皮肤 GVHD 发病,从该日开始甲基泼尼松龙治疗 (mPSL)。该日 CCL8 显示出明显的增加。GVHD 一度由第二阶段转向第三阶段,但通过之后的治疗得到改善,也未见 CCL8 再次高度表达。

[0116] 患者 3 (图 10)

[0117] 3 岁女子

- [0118] 诊断:急性淋巴性白血病(ALL)
- [0119] 处置:适合同胞间骨髓移植(BMT(matched-sib.))
- [0120] 预防药:MTX
- [0121] 过程:没有GVHD发病。过程中未见CCL8高度表达。
- [0122] 患者4(图12)
- [0123] 11岁女子
- [0124] 诊断:急性淋巴性白血病(ALL)
- [0125] 处置:适合同胞间骨髓移植(MSD-BMT)
- [0126] 预防药:短期MTX
- [0127] 过程:移植后第11日GVHD发病。显示CCL8的表达增加。从该日开始CIV给与环孢菌素A。在第14日GVHD的症状改善,CCL8的表达也下降。
- [0128] 患者5(图13)
- [0129] 患有严重再生障碍性贫血的19岁女性接受了来自HLA 1抗原不匹配的父亲骨髓干细胞移植。患者接受了由150mg/m²的氟达拉滨(Flu)及120mg/kg的环磷酰胺(CY)及24mg/kg的抗胸腺细胞球蛋白(ATG)构成的移植前调节,使用他克莫司预防GVHD。移植后第10日患者出现高烧,第16日在四肢及躯体出现非定型皮疹。未出现腹泻。第20日CCL8呈现明显增加。第23日进行皮肤活检,开始甲基泼尼松龙(mPSL)治疗。在第31日GVHD症状改善,CCL8的表达也下降。
- [0130] 实施例6
- [0131] 移植物抗宿主疾病患者和正常人中的CCL8的血浆浓度定量结果
- [0132] 对正常人的血浆、及接受了造血干细胞移植的患者中移植物抗宿主疾病发病的患者及未发病的患者的血浆CCL8进行定量。结果示于图11。数值的单位为Pg/mL。接受了造血干细胞移植的患者中移植物抗宿主疾病未发病的患者的血浆CCL8浓度为6.92-48.0pg/mL平均23.3pg/mL。但是,移植物抗宿主疾病发病的患者的血浆CCL8浓度为明显高的浓度,为52.0-333.6pg/mL平均133.3pg/mL。进而,在治疗抗性GVHD的2例中显示出极高的浓度333.6pg/mL及290.4pg/mL。这两个病例对GVHD治疗具有抗性,已经死亡。正常人的血浆CCL8浓度为极低值0-32.6pg/mL,平均为18.9pg/mL。由上述结果可知,在移植物抗宿主疾病发病的患者中血浆CCL8量明显高于正常人,而且在治疗抗性GVHD的患者中血浆CCL8量极高。
- [0133] 以上结果表明人类患者的GVHD的发病及过程与CCL8的表达量之间存在显著的相关性。
- [0134] 实施例7
- [0135] 与感染症的鉴别诊断
- [0136] 测定对小鼠给与TLR配体时CCL8的表达水平。
- [0137] 雌性BALB/c(H-2^d)小鼠购自Sankyo Labo Service Corporation(Tokyo, Japan)。小鼠在实验开始时为8-10周龄。在无特别说明的情况下,试剂均购自SIGMA/ALDRICH(Tokyo, Japan)。
- [0138] 向野生型BALB/c小鼠的腹腔内注射500μl PBS,在所述PBS中含有5μg的脂多糖(LPS)(Escherichia coli)、5μg的poly(I:C)(GE Health care BioScience, Tokyo,

Japan) 及 20mg 的 D-GalN、100mg 的肽聚糖 (PGN) (staphylococcus aureus) (Invitrogen, CA, USA)、20mg 的酵母聚糖 -A (Invitrogen, CA, USA) 或 20nmol 的 CpG-ODN (Invitrogen, CA, USA)。向对照小鼠腹腔内注射 500 μ L 的 PBS。注射 4 小时后回收血浆样品。根据预实验确定 LPS、poly (I :C)、PGN、酵母聚糖 -A 或 CpG-ODN 的给药量。

[0139] 注射 4 小时后使用经肝素处理的注射器采集小鼠血浆样品, 在 30 分钟以内在 5,000rpm 下离心分离 7 分钟。进行分析之前于 -80℃ 下保存分装后的血浆。对志愿者及患者进行采血调制血浆样品, 分装, 进行分析之前于 -80℃ 下保存。

[0140] 人 CCL8 使用酶免疫分析 (ELISA) 进行测定。人 CCL8 ELISA 试剂盒购自 RayBiotech (Norcross, GA), 根据制造商的手册进行使用。在 450nm 下使用平板阅读器 (plate reader) 读取平板 (MultiskanJX, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland)。

[0141] 结果以平均 $\pm$ SE 表示。通过双侧或单侧 t 检验中的任一种进行统计学显著性分析。显著性差异设定为 $p < 0.05$ 。多重比较中适用 Bonferroni 校正。结果为一系列实验的代表数据。

[0142] 如图 14 所示, 表明通过给与 TLR 配体 CCL8 水平未上升。这表示细菌或病毒感染未引起 CCL8 的表达水平上升, 暗示以 CCL8 表达作为指标可以鉴别诊断 GVHD 和感染症。

[0143] 实施例 8

[0144] GVHD 发病前诊断

[0145] 与实施例 1 同样操作进行小鼠同种 BMT, 在第 1、3、5 及 7 日采血, 得到肝素血浆样品。使用 Mouse CCL8 ELISA 对其血浆中 CCL8 的浓度进行定量。

[0146] 另一方面, 对同种 BMT 后第 0 日至第 7 日的体重变化及第 7 日的体重减少、弓背姿势、毛皮 (coat)、皮肤、腹泻进行评分, 进行 0、1、2 三阶段评价。在体重减少方面, 将减少不足 10% 记为 0, 减少为 10- 小于 25% 记为 1 分, 减少 25% 以上记为 2 分。在弓背姿势方面, 将正常姿势记为 0, 稍稍呈现弓背姿势记为 1 分, 基本是弓背姿势时记为 2 分。在毛皮方面, 将正常情况记为 0, 毛稍稍竖起记作 1 分, 将基本不梳理毛发、全身毛竖起的情况记为 2 分。在皮肤方面, 将正常情况记为 0, 尾及足呈现硬化记为 1 分, 在有毛部位出现无毛部分时记为 2 分。在腹泻方面, 将正常情况记为 0, 稍有腹泻症状记为 1 分, 全面爆发腹泻记为 2 分。临床 GVHD 评价给出各评判标准的总分数, 最高分为 10 分。

[0147] 血浆中 CCL8 浓度的经时变化示于图 15。血浆中 CCL8 的浓度从骨髓移植后早期开始上升, 从第 5 日开始显著增加。相对于此, 至第 6 日仍未出现 GVHD 的临床表现。在临床 GVHD 评价中第 7 日约为 2.5 分, 是 GVHD 初期状态。之后, 所有小鼠在第 7 日以后 GVHD 症状进展, 第 28 日的分数为 6.3。

[0148] 根据上述结果, 一般认为血中 CCL8 蛋白质的定量对小鼠 GVHD 发病前诊断或 GVHD 早期诊断有用。

[0149] 实施例 9

[0150] 使用抗 CCL8 抗体的 GVHD 的治疗

[0151] 抗小鼠 CCL8 家兔抗体如下配制: 向家兔给与合成 CCL8 肽, 使用亲和色谱柱从所得的抗血清中精制抗 CCL8 IgG 馏分, 由此进行配制。作为对照的正常家兔抗体, 使用正常家兔血清的 IgG 馏分。

[0152] 与实施例 1 同样操作进行小鼠骨髓移植。从异种骨髓移植前一日开始连续 3 日,

通过受体小鼠尾静脉分别给与 100 μ g 抗小鼠 CCL8 家兔抗体或正常家兔抗体。对抗小鼠 CCL8 抗体（治疗组）和正常家兔抗体（对照组）各三只分别进行治疗。在骨髓移植 14 日后通过颈椎脱臼处死小鼠。取出皮肤、肝脏及小肠，在 10% 福尔马林缓冲液中固定。将固定后的组织包埋于石蜡中制备切片，用苏木精及曙红染色，在显微镜下观察认为是 GVHD 的病理学症状。评价方法如下所述：皮肤（单核细胞向表皮真皮接合部的浸润及毛囊或皮脂腺的损伤）；肝脏（单核细胞向门静脉的浸润及肝细胞坏死）；及小肠（隐窝细胞的细胞程序死亡及绒毛的扩张或变平）。以阳性（+）、阳性与阴性的中间态（+/-）、阴性（-）三阶段进行评价。

[0153] 图 16 表示皮肤组织染色结果的代表例。(a) 给与抗小鼠 CCL8 抗体，(b) 给与正常家兔抗体（对照）。作为皮肤 GVHD 症状的皮脂腺损伤（箭头）及淋巴细胞向表皮真皮接合部的浸润（箭头指示符号），在正常家兔给药组中出现，但在抗小鼠 CCL8 抗体给药组中没有确认到。

[0154] 图 17 表示使用上述评分系统的结果。仅在抗 CCL8 抗体处理小鼠中确认到炎症细胞向皮肤的表皮真皮接合部的浸润减少、毛囊及皮脂腺障碍减轻。这表明抗 CCL8 抗体处理对 GVHD 的治疗有效。

[0155] 产业上的可利用性

[0156] 本发明对移植物抗宿主疾病的诊断及过程的监控、以及治疗有用。

[0001]

序列表

<110> 北海道公立大学法人 札幌医科大学; 株式会社免疫生物研究所
 <120> 移植物抗宿主疾病的检查和治疗方法
 <130> PS12-0001
 <150> JP 2007-165547
 <151> 2007-06-22
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> 人 (homo sapiens)
 <400> 1
 Met Lys Ile Tyr Ala Val Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ile Ala Val Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Pro Glu Lys Leu Thr Gly Pro Asp Lys Ala Pro Val Thr Cys
 20 25 30
 Cys Phe His Val Leu Lys Leu Lys Ile Pro Leu Arg Val Leu Lys Ser
 35 40 45
 Tyr Glu Arg Ile Asn Asn Ile Gln Cys Pro Met Glu Ala Val Val Phe
 50 55 60
 Gln Thr Lys Gln Gly Met Ser Leu Cys Val Asp Pro Thr Gln Lys Trp
 65 70 75 80
 Val Ser Glu Tyr Met Glu Ile Leu Asp Gln Lys Ser Gln Ile Leu Gln
 85 90 95
 Pro

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 2
 Gln Gly Met Ser Leu Cys Val Asp Pro Thr Gln Lys
 1 5 10

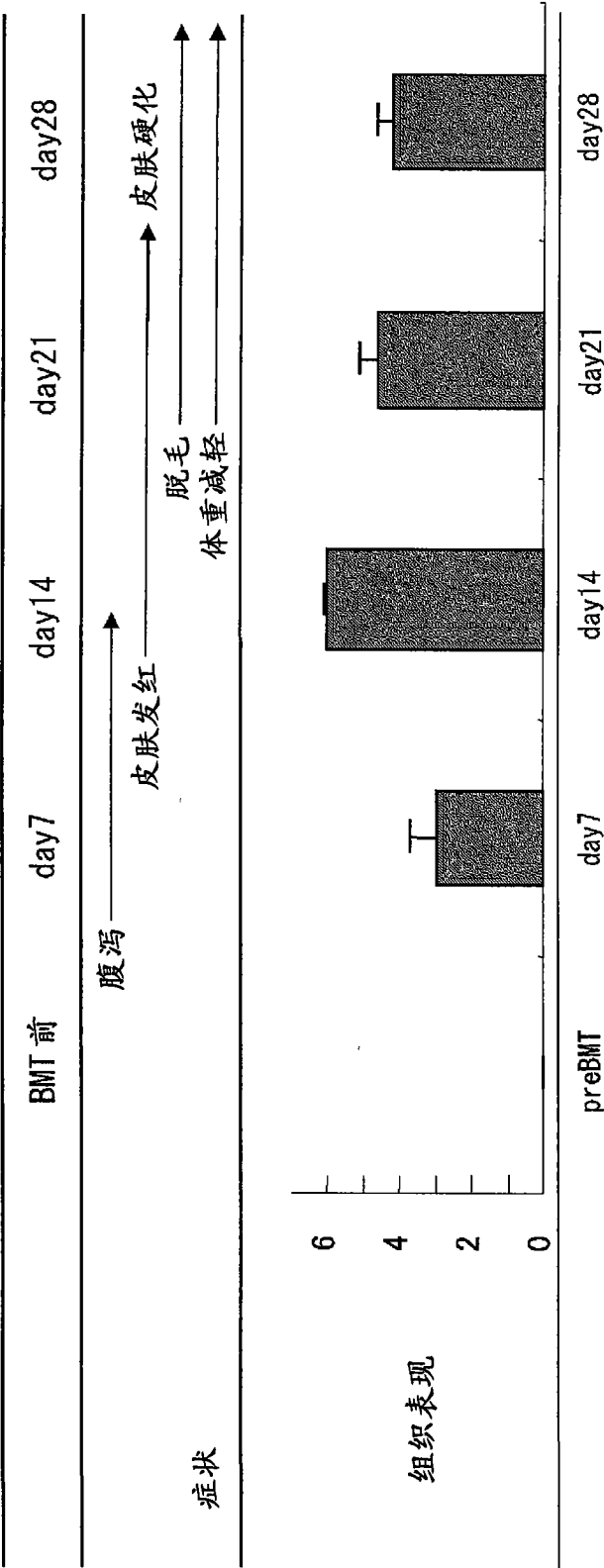


图 1

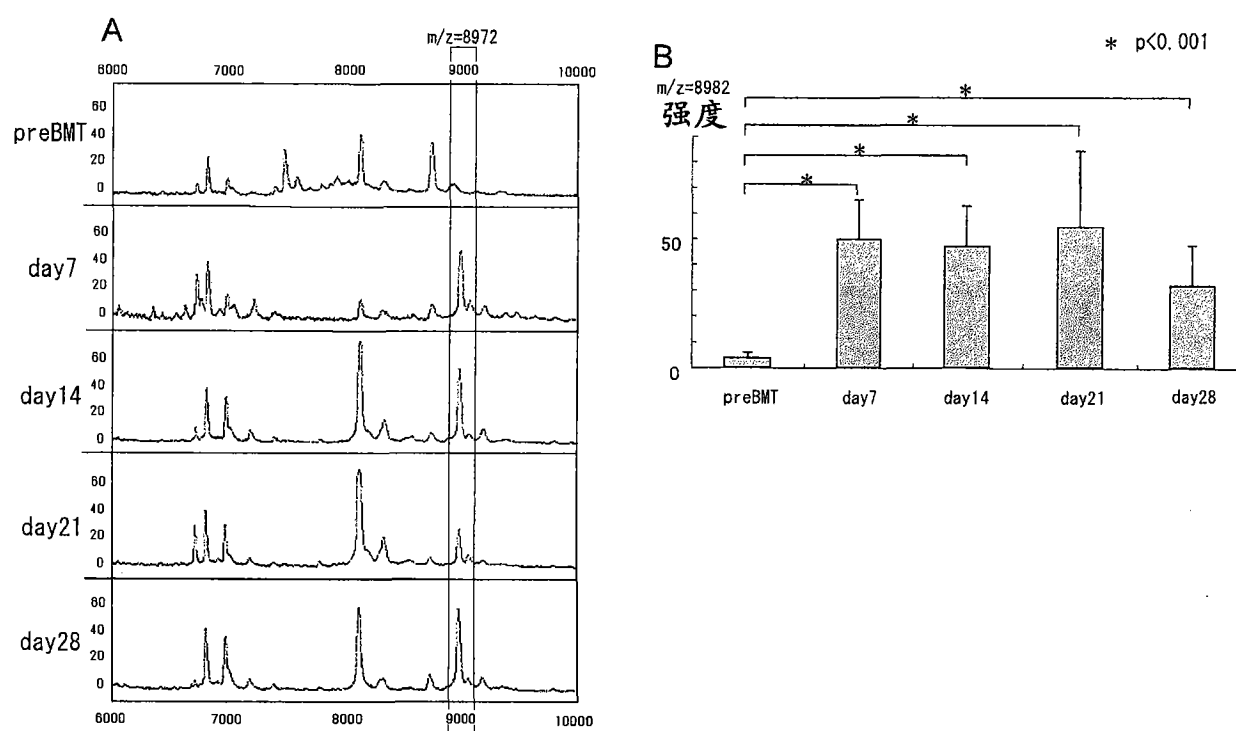


图 2

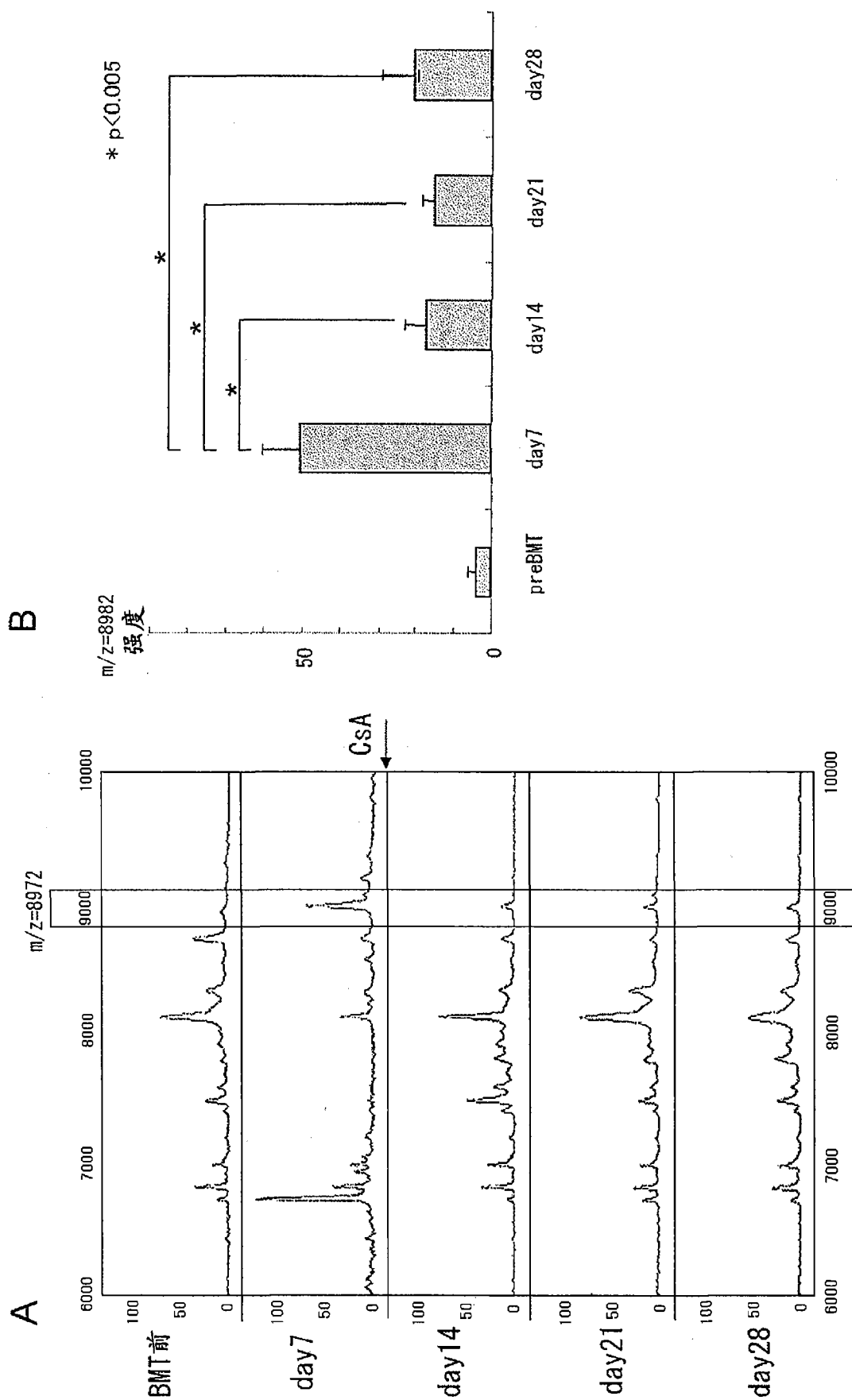


图 3

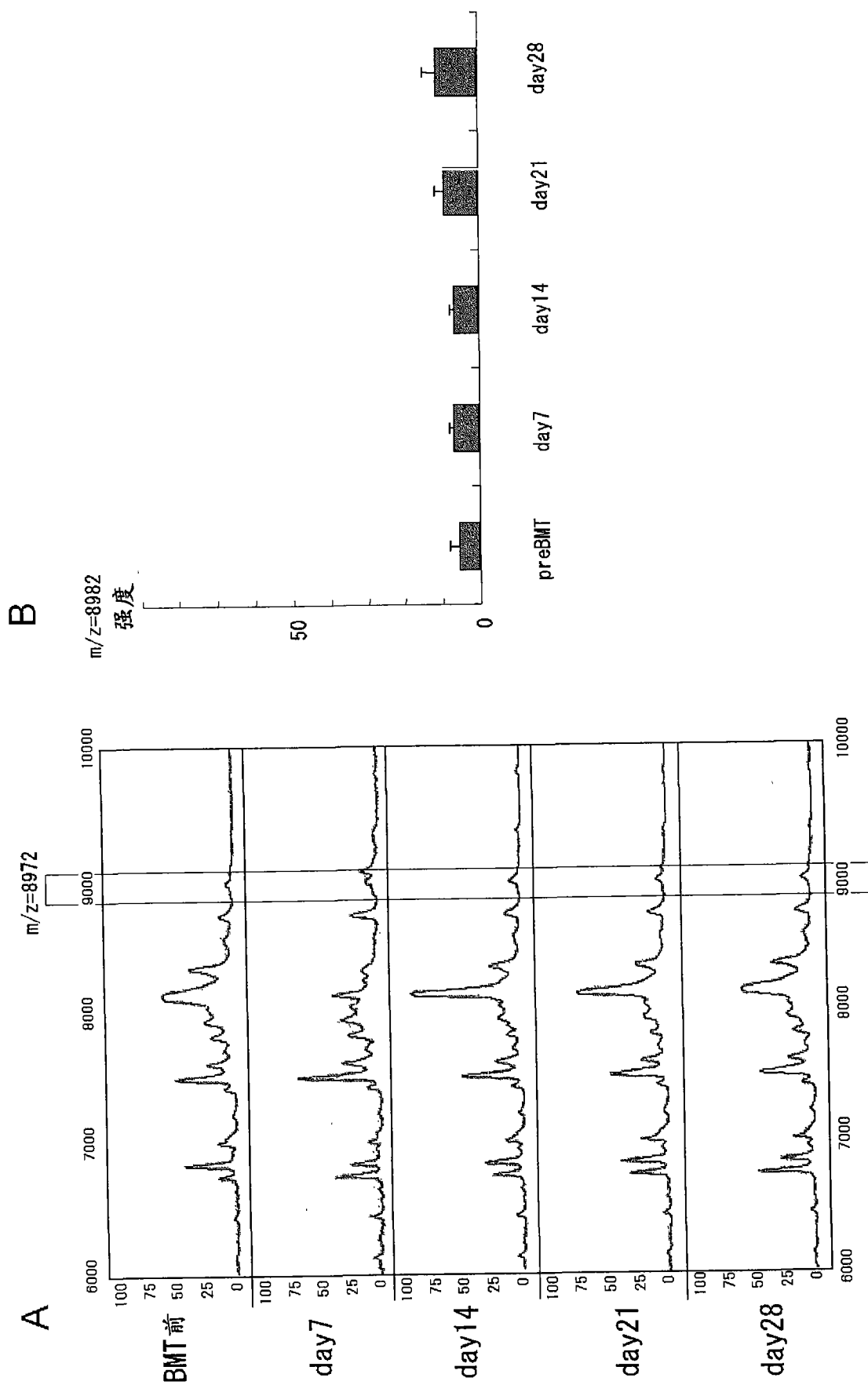


图 4

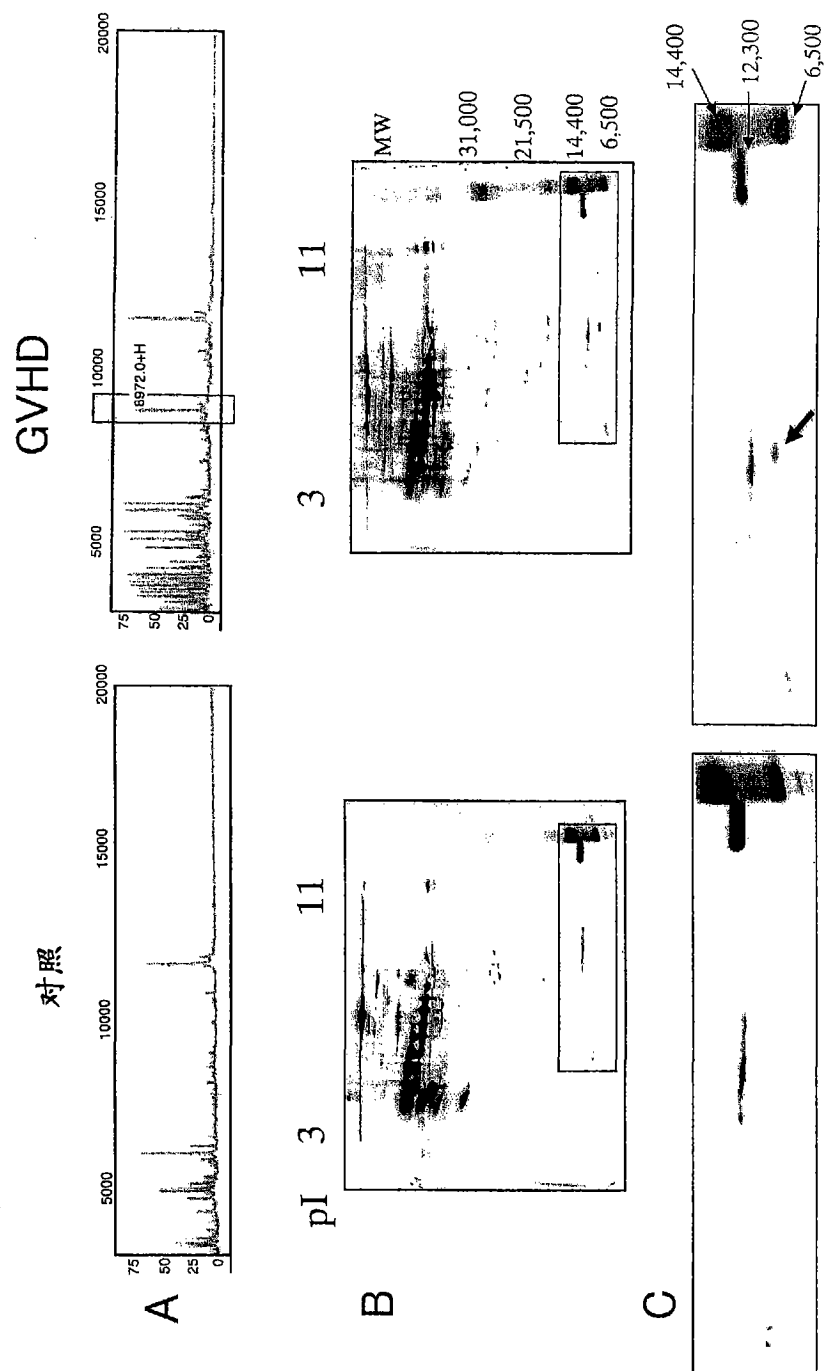


图 5

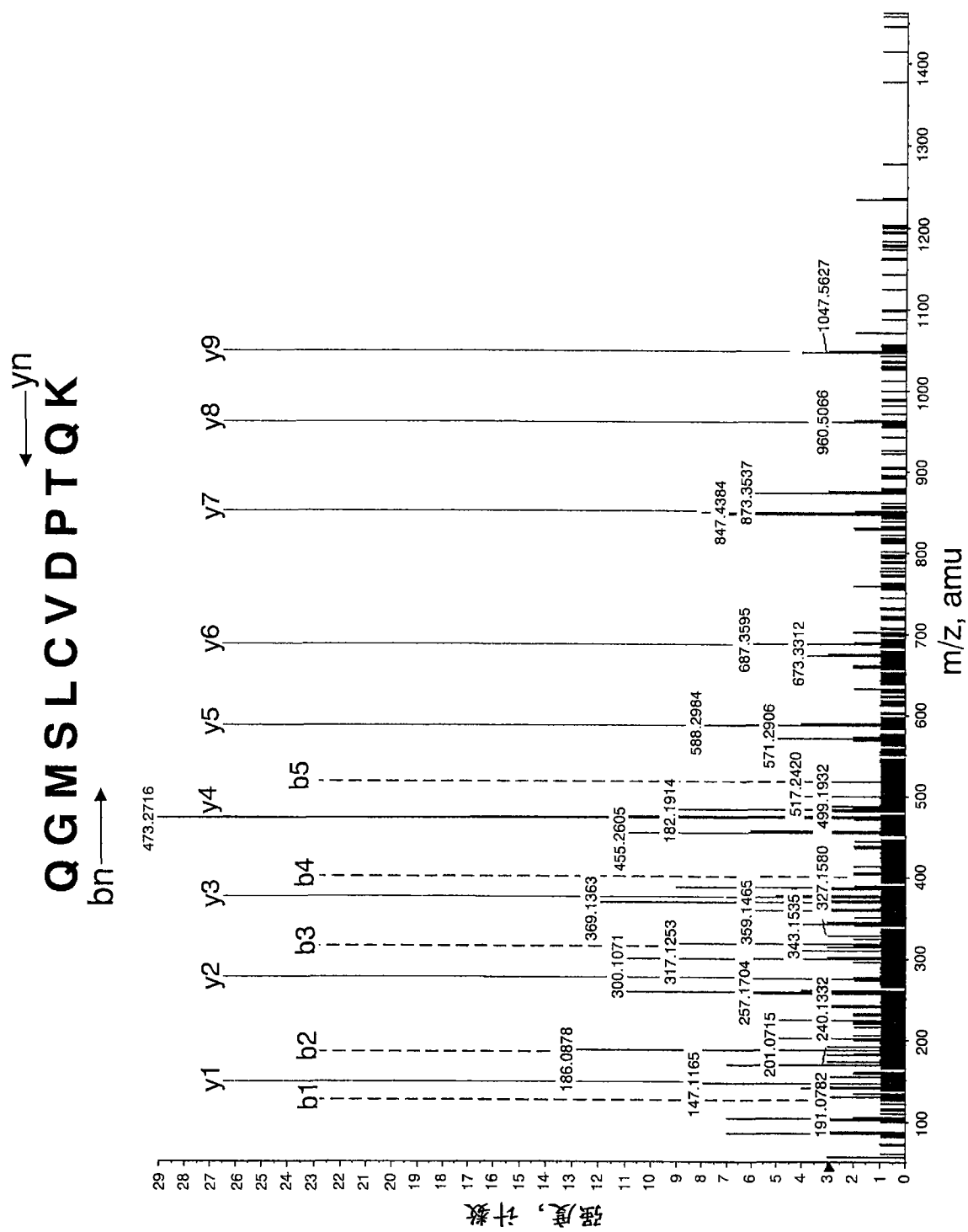


图 6

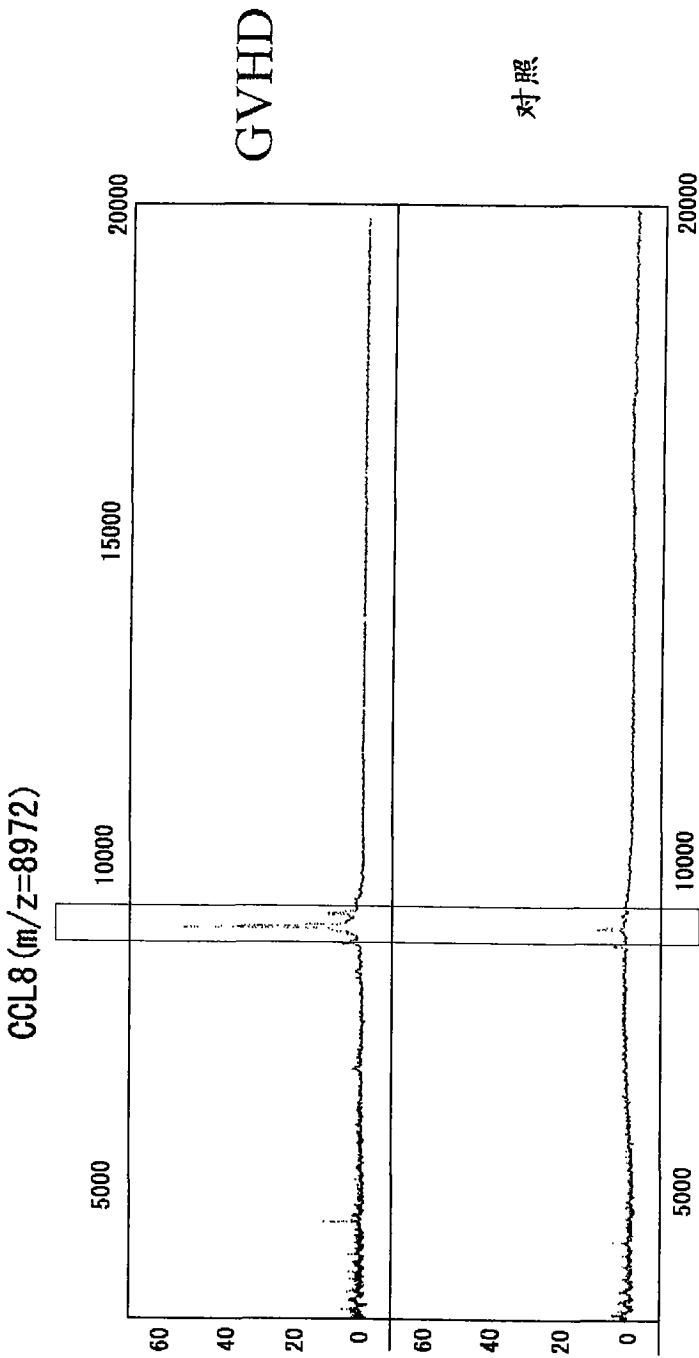


图 7

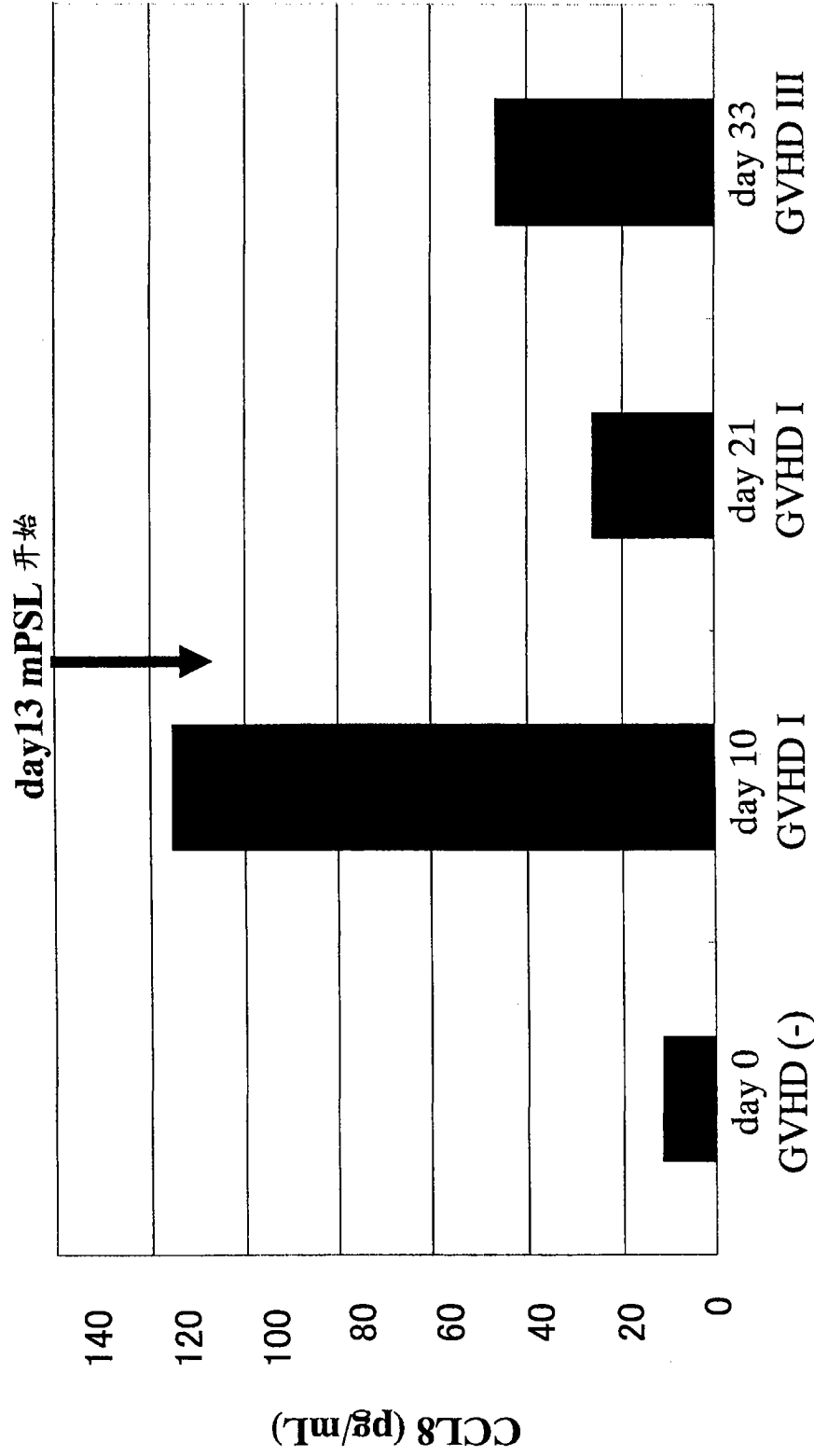


图 8

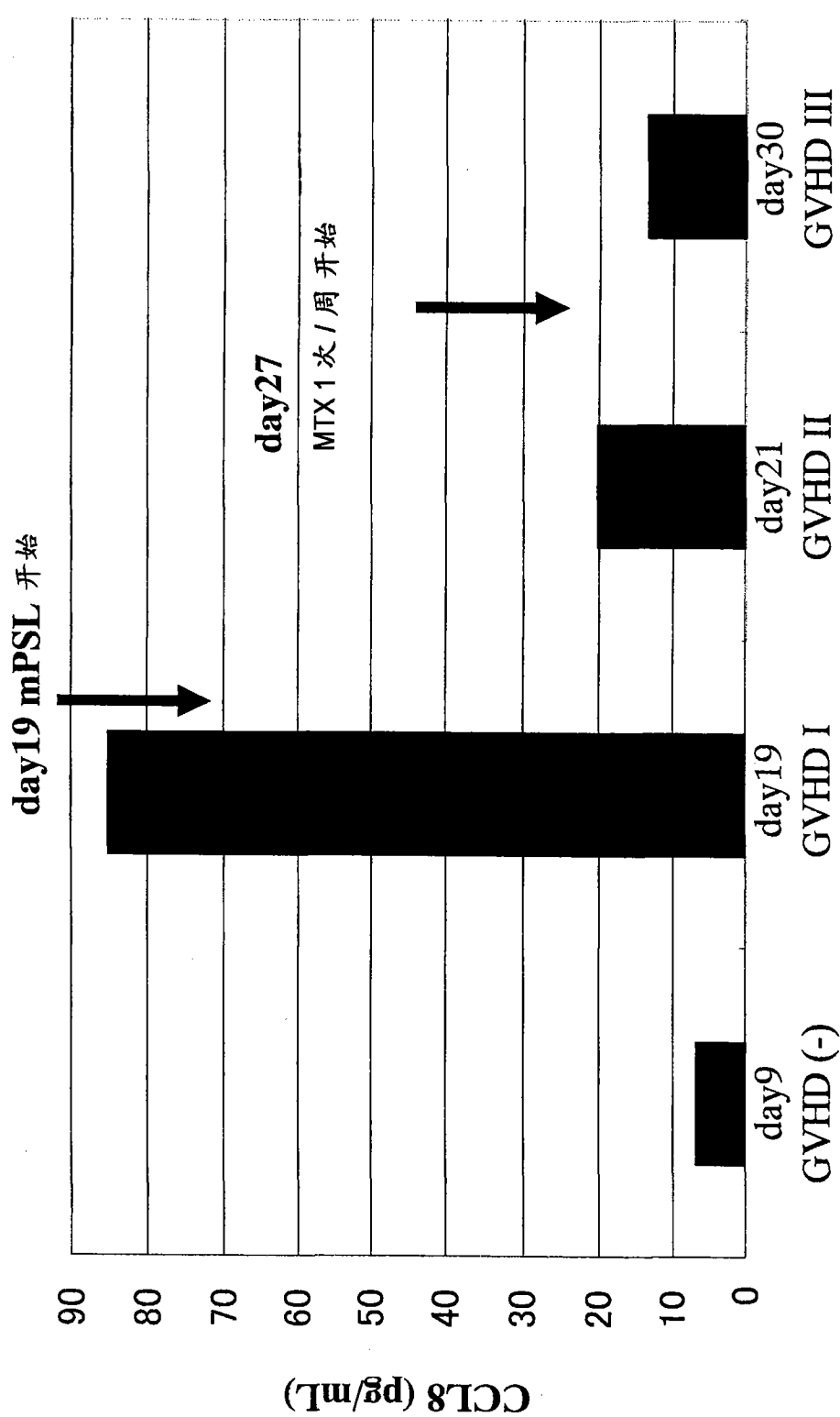


图 9

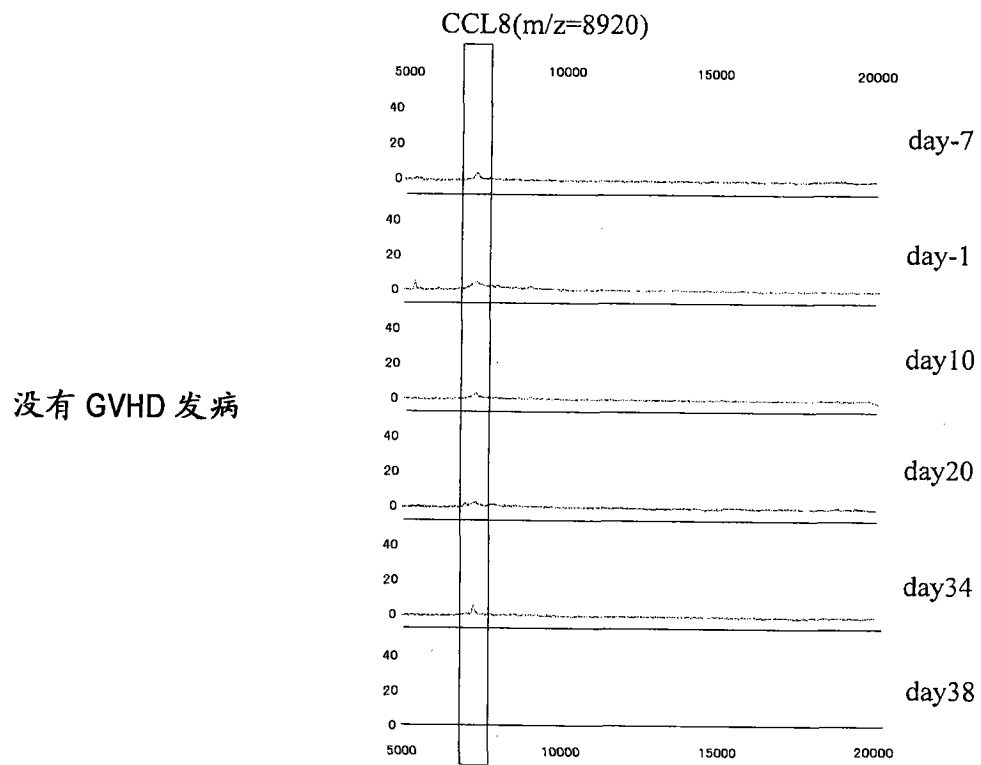


图 10

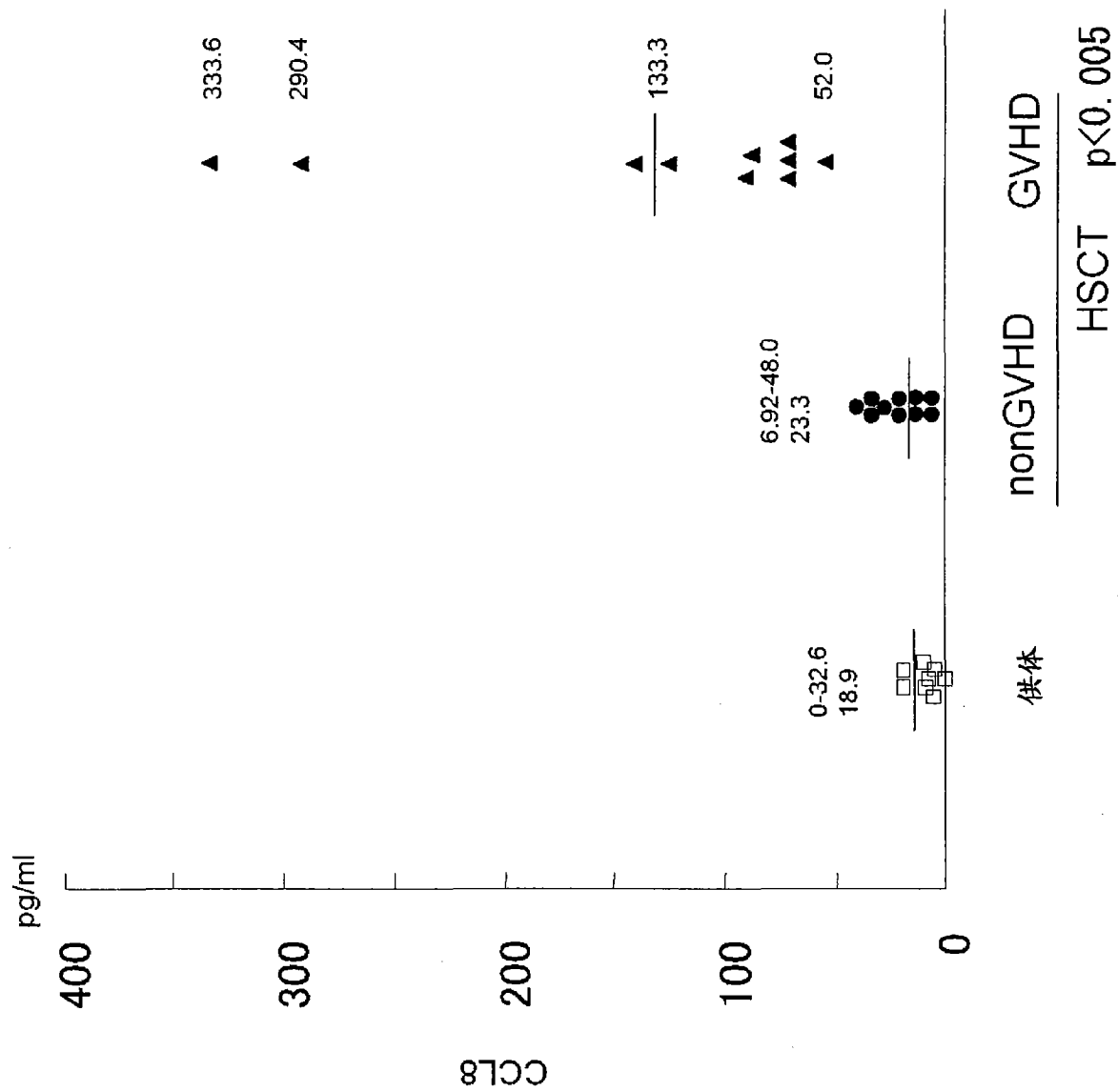


图 11

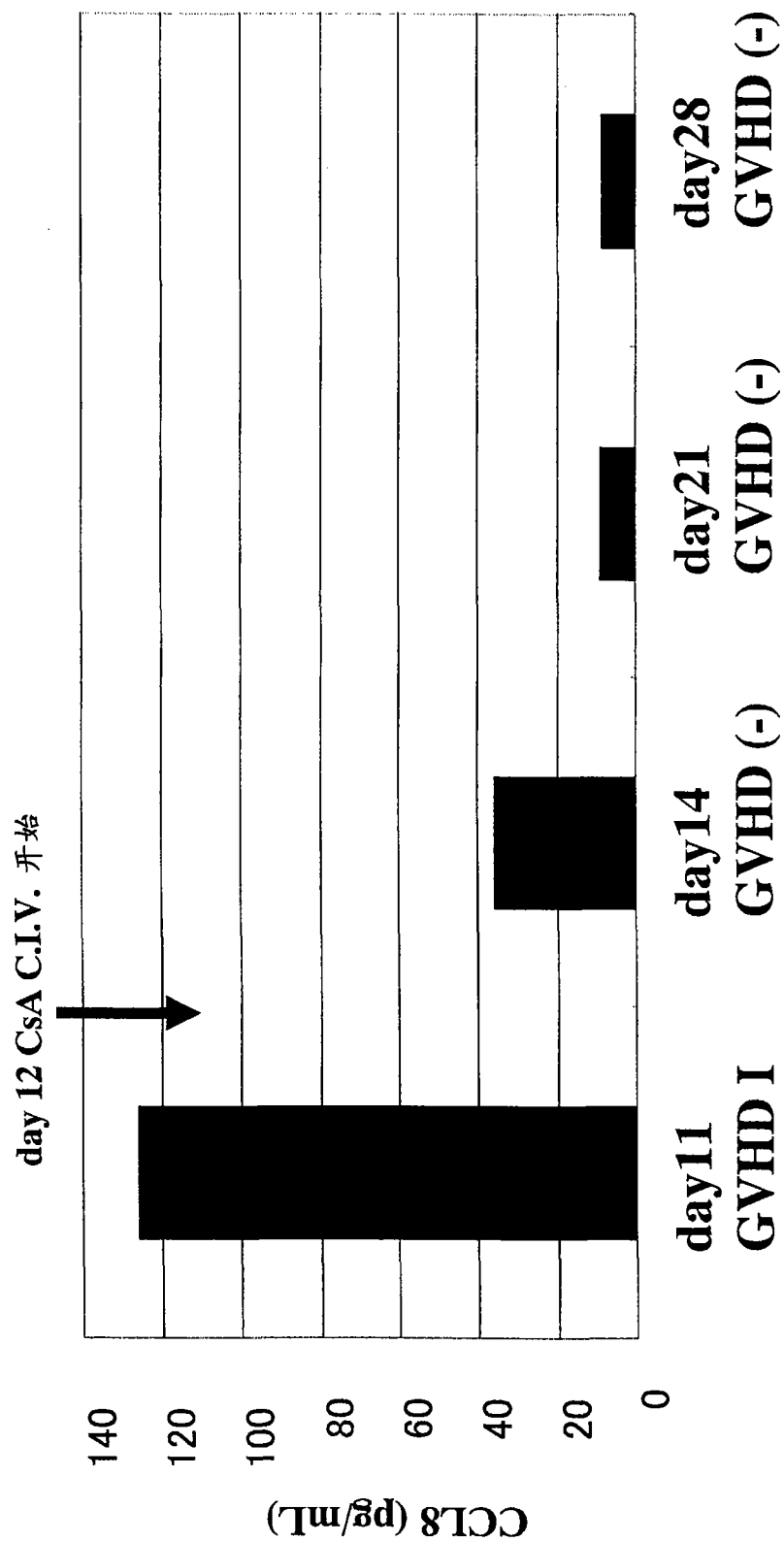


图 12

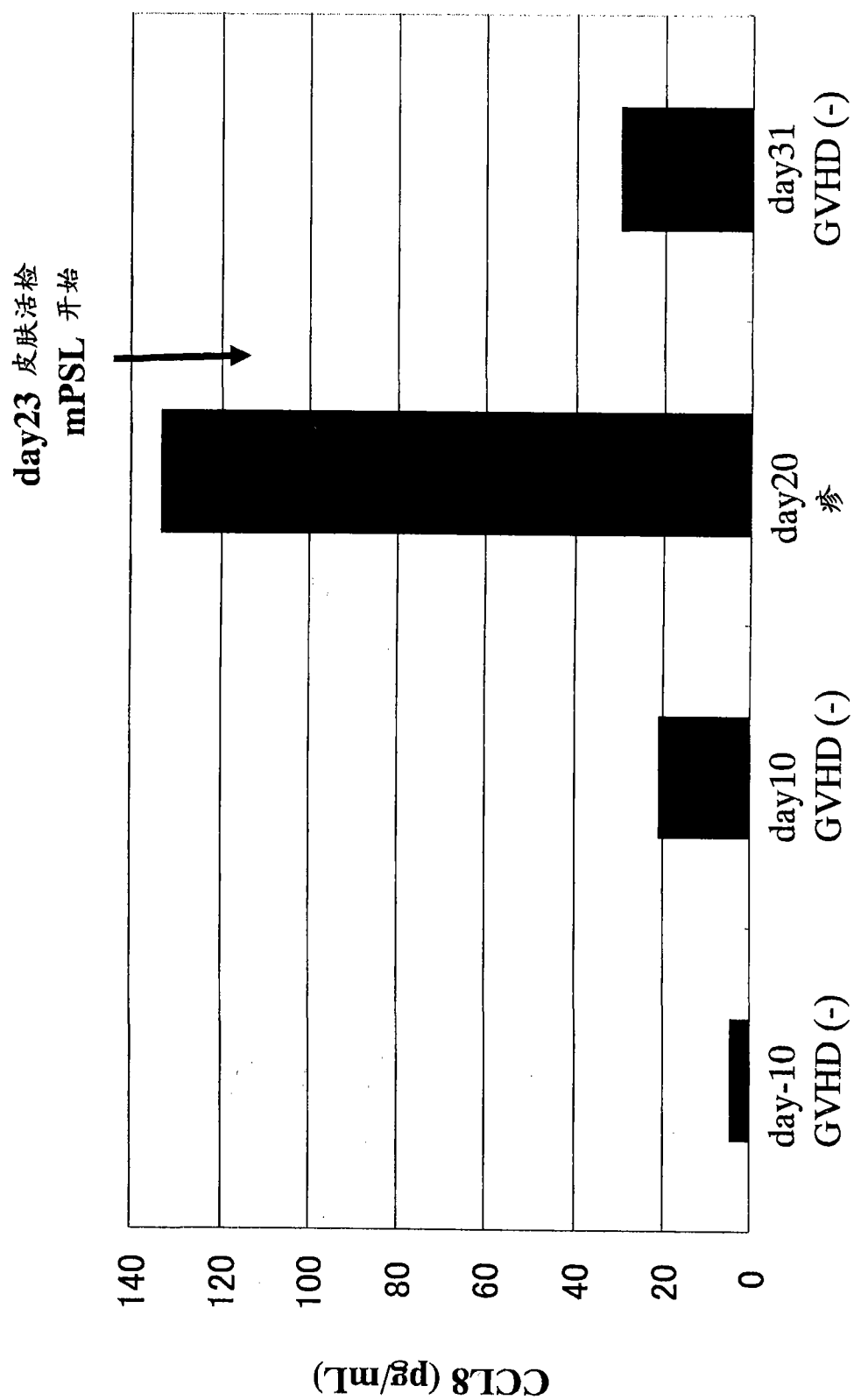


图 13

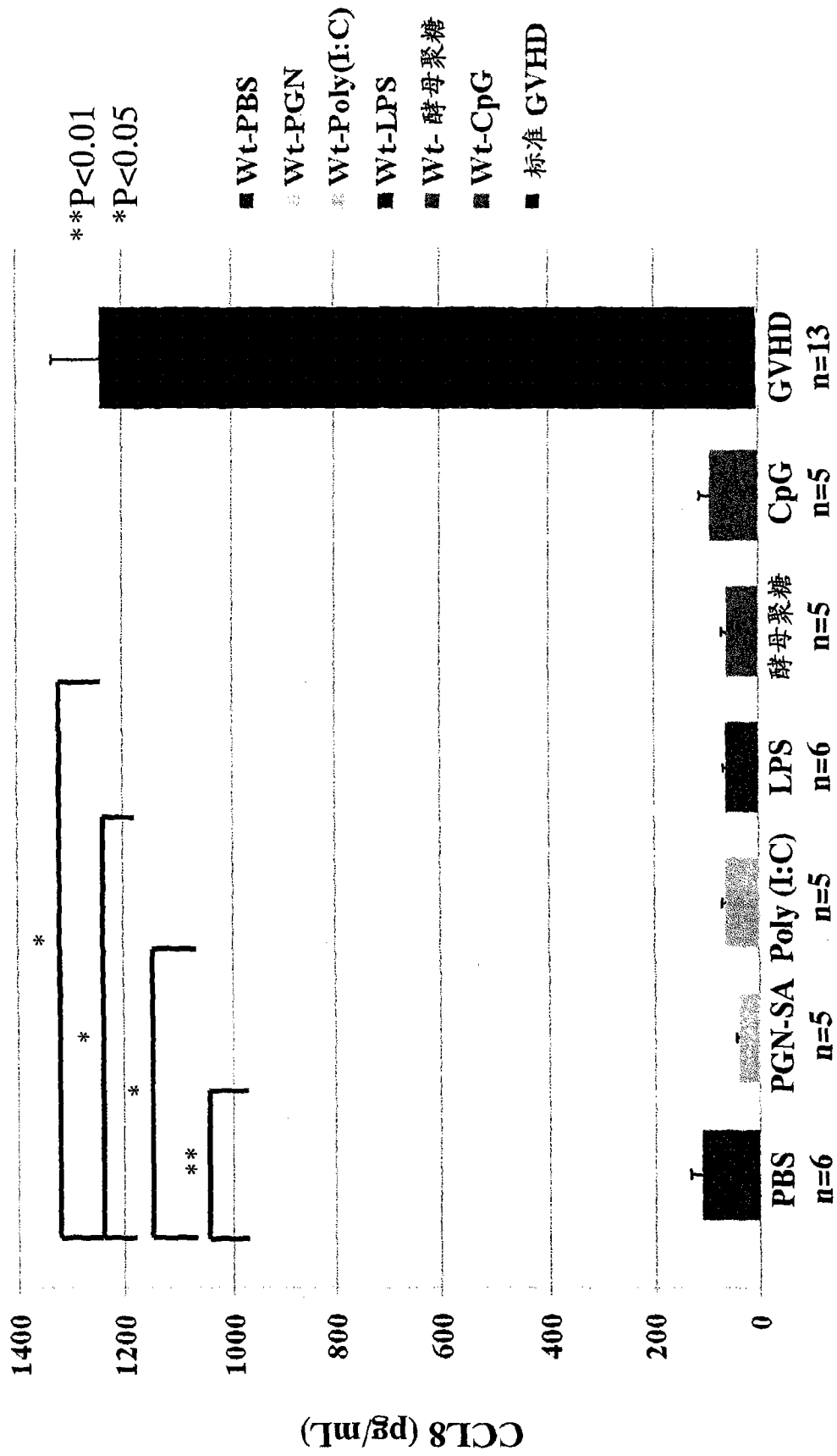


图 14

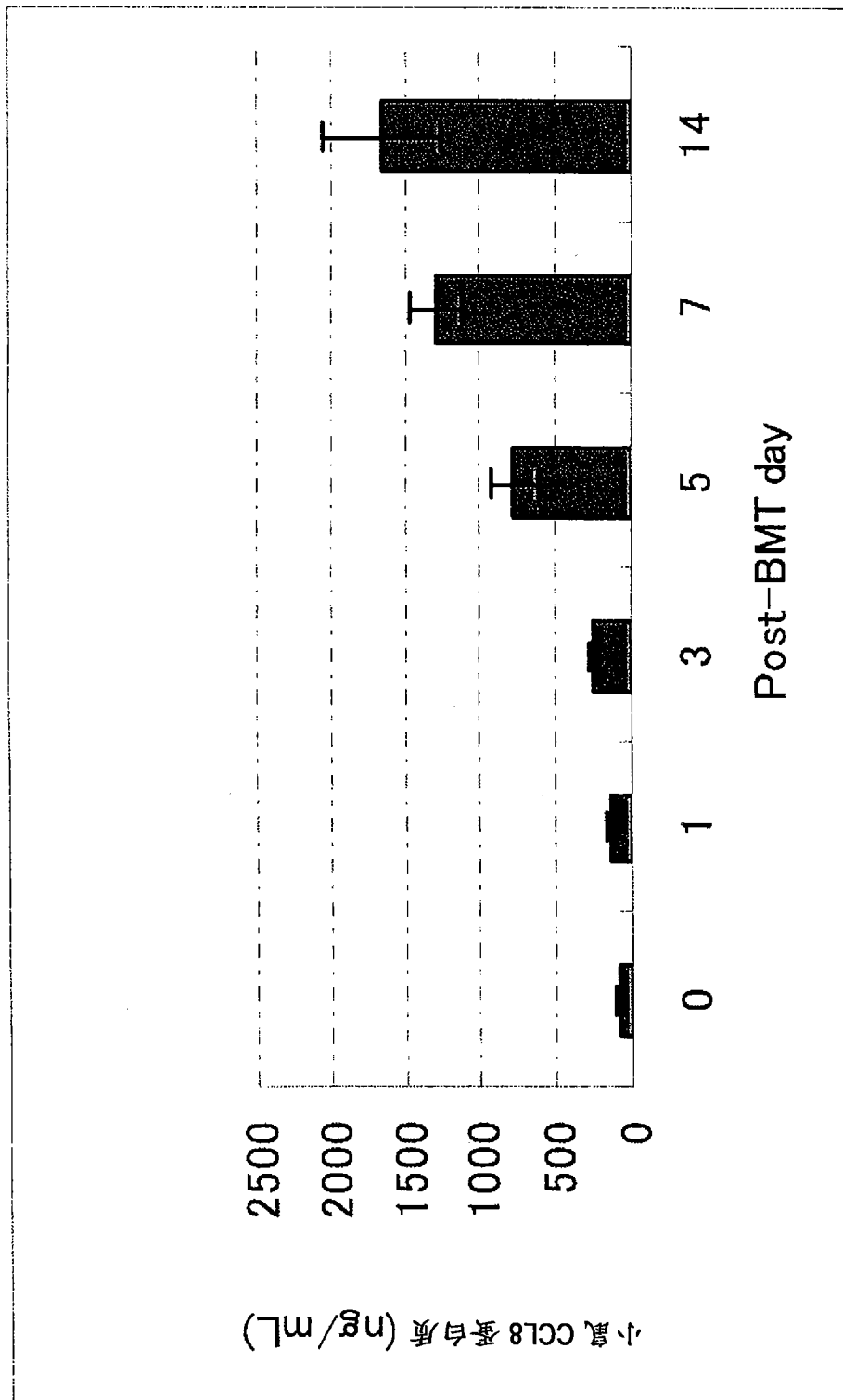


图 15

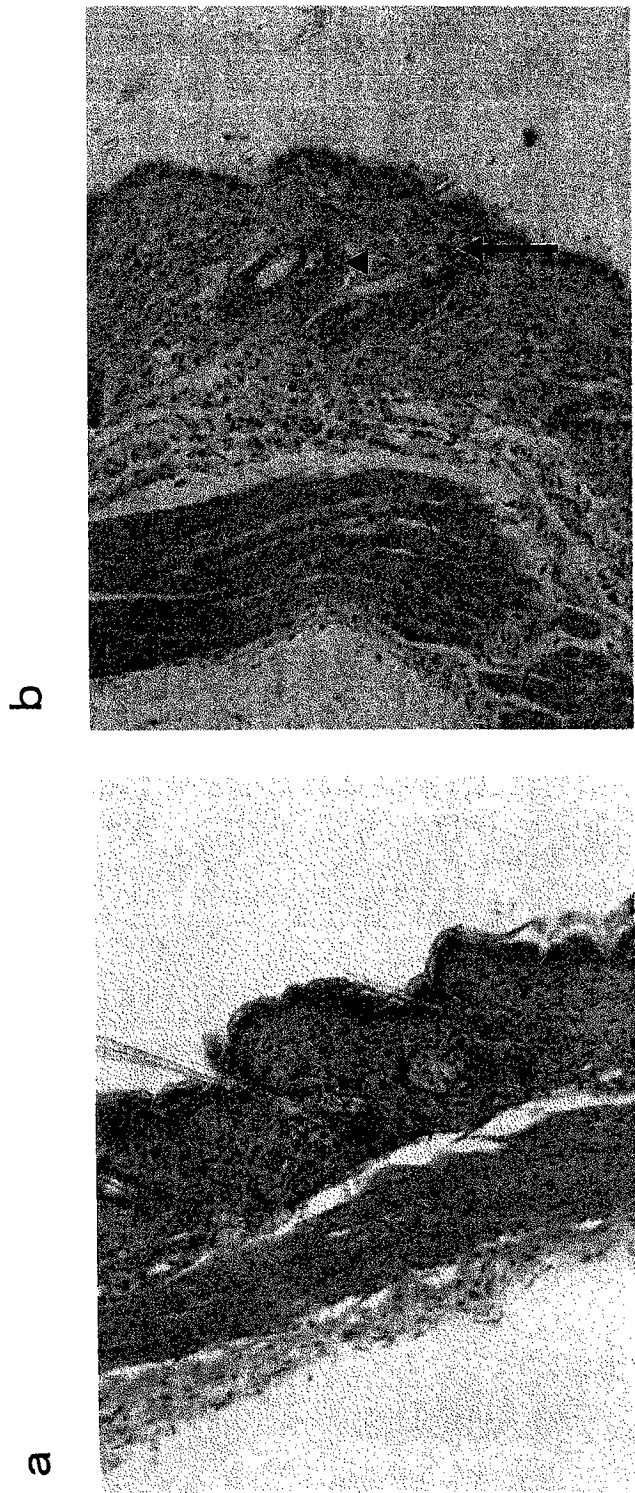


图 16

	肝脏			肠		皮肤		
	+	+/-	-	+	+/-	+	+/-	-
移植后第 14 日								
对照 IgG	3	0	0	3	0	3	0	0
抗 mCCL8 IgG	3	0	0	2	1	0	2	1

图 17