(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1711282 B
(45)授权公告日 2010.05.26

(21)申请号 200380102707.3

(22)申请日 2003.10.29

(30)优先权数据
60/423,090 2002.10.30 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2005.04.30

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2003/034429 2003.10.29

(87)PCT申请的公布数据
WO2004/042009 EN 2004.05.21

(73)专利权人 健泰科生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 奥斯汀·L·格尼

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 巫肖南 封新琴

(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

(56)对比文件
BENSEN J. et al.the role of IL-23 in experimental autoimmuneencephalomyelitis. FASEB Journal16 5.2002,168(5), 全文.

Oppmann B. et al..novel p19 protein engages IL-12p40 to form acytokine,IL-23,with biological activities similar as well asdistinct from IL-12.Immunity13 5.2000,168(5), 全文.

Frucht D.M..IL-23: a cytokine that acts on memory T cells.Science′s STKE114.2002,168(5), 全文.

Wiekowski M.T. et al..Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19induces multiorgan inflammation, runting, infertility, andpremature death..J. Immunol.166.2001,168(5), 全文.

Parham C. et al.A recpetor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composedof IL-12RB1 and a novel cytokine recpetor subunit ,IL-23R.J. Immunol.168.2002,168(5), 全文.

审查员 汪波莉

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 10 页

(54)发明名称

IL-17产生的抑制

(57)摘要

本发明涉及用白介素-23(IL-23)的拮抗剂来抑制T细胞产生促炎细胞因子白介素-17(IL-17)。本发明还涉及IL-23的拮抗剂在治疗炎性疾病中的用途,所述疾病的特征是存在升高水平的IL-17。IL-23的拮抗剂包括但不限于,特异性结合亚基或IL-17或IL-17受体的抗体。本发明另外涉及通过使用IL-23的激动剂来诱导IL-7的产生。

CN 1711282 B

1. 抗 IL-23 拮抗性抗体或抗 IL-23 受体拮抗性抗体在制备用于治疗哺乳动物受试者炎性疾病的药物中的用途，所述炎性疾病以白介素 -17(IL-17) 的表达升高为特征。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述哺乳动物受试者是人。

3. 权利要求 2 的用途，其中所述炎性疾病选自自身免疫性糖尿病，类风湿性脊椎炎，哮喘，系统性红斑狼疮，成人型呼吸窘迫综合征，白塞病，慢性肺炎性疾病，克隆氏病，溃疡性结肠炎，炎症性肠病 (IBD)，阿尔茨海默病，或发热。

4. 权利要求 2 的用途，其中所述炎性疾病是慢性炎性疾病。

5. 权利要求 4 的用途，其中所述慢性炎性疾病选自类风湿性关节炎 (RA)，移植物抗宿主反应，多发性硬化 (MS) 或牛皮癣。

6. 权利要求 2 的用途，其中所述炎性疾病为关节炎。

7. 权利要求 6 的用途，其中所述关节炎选自类风湿性关节炎 (RA) 或痛风性关节炎。

8. 抗 IL-23 拮抗性抗体或抗 IL-23 受体拮抗性抗体在制备用于抑制哺乳动物受试者中 T 细胞的白介素 -17(IL-17) 产生的药物中的用途。

9. 权利要求 8 的用途，其中所述哺乳动物受试者是人。

10. 抗 IL-23 激动性抗体或抗 IL-23 受体激动性抗体在制备用于诱导哺乳动物受试者中的 IL-17 产生的药物中的用途。

11. 权利要求 10 的用途，其中所述哺乳动物受试者是人。

12. 权利要求 11 的用途，其中所述人类受试者已经暴露于细菌感染。

13. 权利要求 12 的用途，其中所述人类受试者已经暴露于结核分枝杆菌的感染。

14. 权利要求 1 至 13 任一项的用途，其中所述抗体是抗体片段。

15. 权利要求 14 的用途，其中所述抗体片段选自 :Fv，Fab，Fab′ ，或 $F(ab')_2$。

16. 权利要求 1 至 13 任一项的用途，其中所述抗体是全长抗体。

17. 权利要求 1 至 13 任一项的用途，其中所述抗体是嵌合的抗体。

18. 权利要求 1 至 13 任一项的用途，其中所述抗体是人源化的抗体。

19. 权利要求 1 至 13 任一项的用途，其中所述抗体是人抗体。

20. 权利要求 2 的用途，其中所述药物与另外的治疗剂联用给药。

21. 权利要求 20 的用途，其中所述另外的治疗剂是抗炎分子。

22. 权利要求 21 的用途，其中所述抗炎分子选自 :皮质类固醇或非类固醇抗炎药 (NSAID)。

23. 鉴定用于以白介素 -17(IL-17) 的表达升高为特征的炎性疾病的抗炎制剂的方法，其包括如下步骤 :

(a) 在存在或缺无候选分子时，将活化的 T 细胞培养物与 IL-23 保温 ;

(b) 监测所述培养物中 IL-17 的水平 ;以及

(c) 如果在所述候选分子存在时的 IL-17 水平比该候选分子缺无时的 IL-17 水平低，将所述候选分子鉴定为抗炎制剂。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述候选分子是非肽小有机分子。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述候选分子是肽，多肽或抗体。

26. 权利要求 23 的方法，其中所述 T 细胞是记忆细胞。

27. 权利要求 23 的方法，其中所述 IL-17 的水平用 ELISA 监测。

IL-17 产生的抑制

背景技术

技术领域

[0001] 本发明涉及用白介素 -23 的拮抗剂 (IL-23) 来抑制 T 细胞产生促炎细胞因子白介素 -17(IL-17)。本发明还涉及 IL-23 的拮抗剂在治疗特征在于存在升高水平的 IL-17 的炎性疾病中的用途。

[0002] 相关技术描述

[0003] IL-17 是来自 T 细胞的促炎分子，其刺激上皮、内皮和成纤维细胞来生产其它的炎性细胞因子和趋化因子，包括 IL-6，IL-8，G-CSF，和 MCP-1(S.Aggarwal，A.L.Gurney，J Leukoc Biol 71,1(2002) ;Z.Yao 等，Immunity 3,811(1995) ;J.Kennedy 等，J Interferon Cytokine Res 16,611(1996) ;F.Fossiez 等，JExp Med 183,2593(1996) ;A.Linden，H.Hoshino，M.Laan，Eur Respir J 15,973(2000) ;X.Y.Cai，C.P.Gommoll，Jr.，L.Justice，S.K.Narula，J.S.Fine，Immunol Lett 62,51(1998) ;D.V.Jovanovic 等，J lmmunol 160，3513(1998) ;和 M.Laan 等，J Immunol 162,2347(1999))。

[0004] IL-17 也与其它细胞因子，包括 TNF-α 和 IL-1β 协同作用来进一步诱导趋化因子的表达 (Jovanovic 等，见上，和 M.Chabaud，F.Fossiez，J.L.Taupin，P.Miossec，J Immunol 161,409(1998))。在以下情况中发现 IL-17 水平显著提高 :类风湿性关节炎 (RA) 滑膜中 (S.Kotake 等，J Clin Invest 103,1345(1999) ;和 M.Chabaud 等，Arthritis Rheum 42,963(1999))，同种异体 (allograft) 移植排斥过程中 (M.A.Antonysamy 等，Transplant Proc 31(1999) ;M.A.Antonysamy 等，J Immunol 162,577(1999) ;C.C.Loong，C.Y.Lin，W.Y.Lui，TransplantProc 32(2000) ; 和 H.G.Hsieh，C.C.Loong，W.Y.Lui，A.Chen，C.Y.Lin，Transpl Int 14,287(2001))，和其它慢性炎性疾病，包括多发性硬化 (multiplesclerosis)(K.Kurasawa 等，Arthritis Rheum 43,2455(2000)) 和牛皮癣 (C.Albanesi 等，J Invest Dermatol 115,81(2000)，和 B.Homey 等，J Immunol164，6621(2000))。尽管 IL-17 由激活的 T 细胞产生是清楚的，以前的报告并没有提供它在以 Th1 和 Th2 为两极的 (polarized) 细胞因子图谱 (profile) 范例内的明确分类。

[0005] IL-23 是异源二聚体细胞因子，它与白介素 -12(IL-12) 共享亚基 p40，该亚基与独特的亚基 p19 结合 (B.Oppmann 等，Immunity 13,715(2000))。已经报道 IL-23 促进 T 细胞，特别是记忆 T 细胞的增殖 (D.M.Frucht，Sci STKE2002 Jan 8 :2002(114) :PE1)。近来描述转基因 p19 小鼠显示了复杂的全身性炎症 (profound systemic inflammation) 和中性白细胞增多症 (neutrophilia)(M.T.Wiekowski 等，J Immunol 166,7563(2001))。

[0006] 至今还没有建立细胞因子 IL-17 和 IL-23 的表达和生物作用之间的相关性。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明一方面涉及抑制 T 细胞产生白介素 -17 的方法，其包括用白介素 -23(IL-23) 的拮抗剂处理 T 细胞。

[0009] 本发明另一方面涉及治疗哺乳动物受试者中的炎性疾病的方法，所述疾病特征在

于白介素 17(IL-17) 的表达提高,其包括给药所述受试者有效量的白介素 -23 的拮抗剂 (IL-23)。

[0010] 本发明另一方面涉及鉴定抗炎制剂的方法,其包括如下步骤 :

[0011] (a) 在存在或缺无候选分子时,保温 (incubate)T 细胞培养物与 IL-23 ;

[0012] (b) 监测 (monitor) 所述培养物中 IL-17 的水平 ;并

[0013] (c) 如果在所述候选分子存在时 IL-17 的水平比该候选分子缺无时的 IL-17 水平低,鉴定所述候选分子为抗炎制剂。

[0014] 本发明另一方面涉及诱导在哺乳动物受试者中产生 IL-17 的方法,其包括给药所述受试者 IL-23 的激动剂。

[0015] 所有方面,拮抗剂或激动剂都优选是抗 IL-23 抗体或抗 IL-23 受体的抗体,其包括抗体片段。炎性疾病优选是慢性炎性疾病,如例如类风湿性关节炎 (RA),可导致同种异体排斥的移植物抗宿主反应,多发性硬化 (MS) 或牛皮癣。IL-17 产生的诱导通常用于患细菌感染诸如结核分枝杆菌 (Mycobacteriumtuberculosis) 感染的病人。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1 :不同细胞种类中的 IL-17 产生 (A) :从 C57/BL-6 小鼠制备单个脾细胞悬液,并通过密度梯度离心从悬浮的脾细胞分离单个核细胞 (mononuclear cell)。在存在或缺无微生物脂肽 (microbiallipopeptide)LBP(100ng/ml),LPS(100ng/ml) 或 LTA(100ng/ml) 时,培养 2×10^6 细胞 /ml 3 天,之后收集所述细胞并用 ELISA 分析 IL-17。(B) :从鼠脾细胞获得纯化的 T 细胞,之后筛选经 FACS 分选的、CD90 标记的细胞中的阳性细胞。在平板结合的抗 CD3(5μg/ml),或来自活化的树突细胞 (LPS- 处理的) 的上清存在或缺无时培养这些细胞 (1×10^6 细胞 /ml)3 天,收集培养物上清并用 ELISA 试剂盒分析 IL-17 水平。所述树突细胞来自巨噬细胞 (从脾细胞悬液作为粘附性细胞群 (adherent population) 获得),该过程是通过用 rmGM-CSF(2ng/ml) 和 rmIL-4(1000U/ml) 处理巨噬细胞 4 天,用 LPS(0.5μg/ml) 洗涤并重新活化 (re-activating) 实现的。显示 3 个独立试验的代表性 (Representative) 结果。

[0018] 图 2 :IL-23 刺激 IL-17 的产生 A. 用 100U/ml 重组 IL-2 培养从脾细胞分离的单个核细胞 (2×10^6 细胞 /ml) 并在存在或缺无各种浓度的 IL-23(0.1-1000ng/ml) 时保温 6 天。用 ELISA 测定在培养物上清累积的 IL-17 水平。B. 用定量 RT-PCR 测定应答于 IL-23 处理的 IL-17mRNA 水平变化。图中显示的 (Plotted) 是 PCR 反应 Ct(循环阈值 (cycle threshold)) 的相对变化。每个样本的数据相对于存在于每个样本中的 3- 磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)mRNA 水平取准,然后再次在样品间相对于零时间 (time zero) 未刺激状况时存在的 IL-17mRNA 水平取准。因为每个 Ct 对应一个 PCR 循环,一个 Ct 约等于 mRNA 丰度 (abundance) 变化的 2 倍。在括号中注明 5Ct 和 10Ct 变化的大致 mRNA 倍数差异。用来自 4 只小鼠的脾细胞做试验,用 x 代表单个数据点并用条型柱 (bar column) 表示 Ct 变化的均值。C. 如图 2B 的说明,用定量 RT-PCR 测量 IL-17 家族成员 IL-17F 应 IL-23 处理的 mRNA 水平变化。

[0019] 图 3 :IL-23 作用于记忆 T 细胞来刺激 IL-17 产生用 (a)CyC-CD4+PE-CD44 或 (b) CyC-CD4+PE-CD62L 对从鼠脾细胞单个细胞悬液分离的单个核细胞进行染色,并分选具有以下性质的 $CD4^+$ 细胞 :$CD44^{高}/CD62L^{低}$ 或 $CD44^{低}/CD62L^{高}$,前者是记忆表型,后者是原初表型。

在存在或缺无 IL-23（或其煮制物 (boiled prep) 作为对照）、平板结合的抗 CD3(5μg/ml) 和抗 CD28(1μg/ml) 的条件下，用 100U/ML 的重组 IL-2 培养所分选的细胞 5 天，洗涤并用抗 CD3 的抗体再刺激 (re-stimulate) 另外 24 小时。收集上清并用 ELISA 测量 IL-17 水平。

[0020] 图 4 :IL12p40 抗体阻断 IL-23 依赖性 IL-17 产生 :(A) 用 IL-23(100ng/ml) 在 37℃预保温浓度渐增加的 p40 抗体或不相关的同种型 (isotype)- 匹配的对照抗体 1 小时，然后在重组 IL-2 存在时，与从小鼠的脾分离的单个核细胞 (2×10^6 细胞 /ml) 再保温 5-6 天。收获上清并用 ELISA 测量 IL-17 水平（左边的组 (panel)）。将最适浓度的 IL-12p40 抗体或不相关的同种型匹配的 - 对照抗体与经 LPS 刺激的树突细胞 (10% v/v) 的经调节的 (conditioned) 培养基在 37℃预保温 1 小时，然后在重组 IL-2 存在时，与从小鼠的脾分离的单个核细胞 (2×10^6 细胞 /ml) 另外保温 5 天。收获上清并用 ELISA 测量 IL-17 水平（右边的图）。(B) 在存在 ConA 时培养从脾细胞分离的单个核细胞 3 天，并用 ELISA 测量上清中的 IL-17 水平，所述脾细胞来自野生型小鼠 (C57/BL6) 或缺少 IL-12 组分之一，即 $IL12a^{-/-}$(p35 敲除）或 $IL12b^{-/-}$(p40 敲除）的小鼠。

[0021] 图 5 :IL-12 对 IL-17 产生的效果。(A) :在存在纯化的 IL-23(1nM) 及指定浓度的 IL-12 时，保温从脾细胞培养物分离的单个核细胞 5 天，然后洗涤并用 ConA 再刺激另外 24 小时。用 ELISA 试剂盒测量细胞上清中的 IL-17 水平。(B) :在存在或缺无纯化的 IL-23(1nM) 时，保温从脾细胞培养物分离的单个核细胞 5 天，然后洗涤并用 ConA 再刺激另外 24 小时，所述脾细胞培养物来自野生型或缺乏 IL-12Rβ2(IL-12Rβ$2^{-/-}$ko) 的小鼠。用 ELISA 试剂盒测量细胞上清中的 IL-17 和 IFN-γ 水平。

[0022] 图 6 :IL-23p19 基因座的靶向。A :除非另外用双斜线标出的位置，按比例 (to scale) 描绘了天然的 IL-23p19 基因座（顶部），靶向型 (targeting) 构建体（中间），及正确靶向的基因座（底部），。空心方块 (Open box) 指示出编码型外显子，阴影方块代表编码所得到的信使 RNA(mRNA) 的 5′ 和 3′ 未翻译区的外显子。对 p19 基因的四个编码外显子编号。带箭头的方块指示了新霉素 (neo) 的启动子区和胸苷激酶 (thymidine kinase) (tk) 选择性盒子，标记有 EGFP 的空心方块指示了增强的绿色荧光蛋白报道基因的位置。用于克隆和臂分析的限制性位置被如下标记 :B，BamHI ;S，Sac II ;E，Eco RI ;Bg，Bgl II ; X，XhoI。用来扩增短臂的反义引物的位置用字母 P 和箭头指示。在野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 基因座中标出用 Bam HI 和 Eco RI 消化所得的限制性片段大小，并且用粗线显示用于通过 southern 印迹来检测这些片段的两个探针的位置。B 和 C :分别为用探针 I 检测的 Bam HI 消化产物和用探针 II 探测的 Eco RI 消化产物的 Southern 印迹分析。从野生型 (WT) 胚胎干 (ES) 细胞，从 ES 克隆 1c5，并从野生型、杂合的 (HET)、和敲除 (KO) 小鼠提取 DNA。在印迹左侧指明带的名称 (identity)，而在右侧给出带的大小。

[0023] 图 7 :IL-23p$19^{-/-}$ 小鼠的总血清免疫球蛋白水平。用同种型特异性 ELISA 确定 16 只野生型（实心圆）和 IL-23p$19^{-/-}$（空心圆）小鼠的免疫球蛋白同种型血清水平。在图底端指出免疫球蛋白的同种型。

[0024] 图 8 :IL-23p$19^{-/-}$ 小鼠的体液免疫反应。A-G :用卵清蛋白 (OVA) 免疫一次 (1^{st}) 和两次 (2^{nd}) 后 IgG1(A)，IgG2a(B)，IgG2b(C)，IgG3(D)，IgE(E)，和 IgA (F) 的 OVA 特异性水平。实心圆，野生型小鼠 ;空心圆，IL-23p$19^{-/-}$ 小鼠，灰色圆，IL-12p$40^{-/-}$ 小鼠。如方法和材料部分所述计算任意单位 (Arbitraryunit)。在图底端用黑色水平条和数值指出每组均值。

用星号标记小于 0.05 的统计学显著的 P 值。

[0025] 图 9 :T 非依赖性 B 细胞反应在 IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠是正常的。用 ELISA 确定用 TNP-LPS(I 型,左) 或 TNP-Ficoll(II 型,右) 免疫的小鼠的 TNP 特异性 IgM 血清水平。实心圆,野生型小鼠 ;空心圆,IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠。

[0026] 图 10 :记忆性 T 细胞功能。在第 0 日用卵清蛋白免疫野生型 (实心圆) 和 IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠 (空心圆),并在第 21 天用 TNP-OVA 攻击。在第 0,14 和 26 天收获血清,并用 ELISA 检验 TNP- 特异性 IgG1(A) 和 IgG2a(B) 的存在。对于 IgG1,使用可购买的标准品 (standard)。对于 IgG2a,如方法和材料部分所述计算任意单位。

[0027] 图 11 : 迟发型超敏 (DTH) 反应 (Delayed type hypersensitivity(DTH) reaction)。抗原特异性肿胀用足垫厚度相对于攻击前刚测定的足垫厚度的增加百分比来计算。取每组的所有六只小鼠的结果的均值,用误差条 (error bar) 代表标准偏差。将未致敏的第二个野生型组用作单独被抗原诱导的肿胀的对照。各种符号内的星号表明对应组和野生型小鼠之间的差别是统计学显著的 ($P < 0.05$)。WT,野生型 ;p19ko, IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠 ;p40ko, IL-12p40$^{-/-}$ 小鼠。

[0028] 图 12 :IL-23p19$^{-/-}$ 抗原递呈细胞的 T 细胞引发正常但产生的 IL-17 水平降低。A : balb/c T 细胞与野生型 (黑色条) 或 IL-23p19$^{-/-}$(白色条) 树突细胞的联合体外异源刺激 (allostimulation) 实验。通过 FACS 分离原初 $CD4^+$T 细胞和 $CD8^-/CD11c^+/MHC\text{-}II^+$ 细胞,并在存在或缺无细菌脂肽 (BLP) 时保温它们。保温 5 天后,确定上清中的增殖和细胞因子水平。APC,抗原递呈细胞。B :体内 T 细胞反应。分离来自用 KLH 免疫的野生型 (黑色条) 或 IL-23 p19$^{-/-}$(白色条) 小鼠的淋巴结细胞悬液,并在体外用 25μg/ml 的 KLH 再刺激。培养 5 天后测量增殖和 IL-17 水平。

[0029] 优选实施方案详细描述

[0030] A. 定义

[0031] 除非另外限定本文所用技术和科学术语与本发明领域技术人员通常理解的同义。见例如 Singleton 等, Dictionary of Microbiology and MolecularBiology 2nd ed., J.Wiley & Sons(New York, NY 1994) ;Sambrook 等, Molecular Cloning, X Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press(ColdSprings Harbor, NY 1989)。为本发明目的,如下限定如下术语。

[0032] 本文术语“拮抗剂”以最广义使用。IL-23 “拮抗剂”是无论机制如何,部分或完全阻断,抑制,中和,预防 (prevent) 或干扰 IL-23 生物活性的分子。为本发明目的,所述生物活性优选是诱导活化的 T 细胞产生 IL-17 的能力。鉴定 IL-23 的拮抗剂,例如可基于它们抑制,阻断,或逆转 IL-23 介导的、由活化 (例如记忆)T 细胞群产生 IL-17 的能力。例如可在被试化合物 (testcompound) 存在或缺无时保温活化的 T 细胞培养物与 IL-23,并例如通过 ELISA,监测细胞培养物上清的 IL-17 水平。如果 IL-17 的水平在所述被试化合物存在时比其缺无时低,那么所述被试化合物是 IL-23 的拮抗剂。或者,在用被试化合物处理前后,可用实时 RT-PCR 监测组织中的 IL-17mRNA 表达,该组织也表达 IL-23。所述被试化合物存在时 IL-17 的 mRNA 水平下降指示该化合物是 IL-23 的拮抗剂。IL-23 拮抗剂的例子包括但不限于抗天然序列的 IL-23 多肽亚基,例如 p40 亚基的中和性抗体,包含与免疫球蛋白恒定区序列融合的 IL-23 亚基的免疫粘附素 (immunoadhesin),小分子,能抑制编码天然序列的

IL-23 多肽亚基的基因的翻译和 / 或转录的反义寡核苷酸，引诱物 (decoy)，例如 IL-23 基因的遗传引诱物等。类似地，IL-23 的拮抗剂包括但不限于抗天然 IL-23 受体的亚基，例如 IL-23Rβ1 或 IL-23R 亚基的中和性抗体，包含与免疫球蛋白恒定区序列融合的 IL-23 受体亚基的免疫粘附素，小分子，能抑制编码天然序列 IL-23 受体多肽亚基的基因的翻译和 / 或转录的反义寡核苷酸，引诱物，例如 IL-23 受体基因的遗传引诱物等。

[0033] 本文术语“激动剂”以最广义使用。IL-23 的激动剂是无论机制如何，模拟天然序列 IL-23 介导的生物活性的任何分子。为本发明目的，所述生物活性优选是诱导活化的 T 细胞产生 IL-17 的能力。IL-23 的激动剂的例子包括但不限于抗亚基，例如天然 IL-23 受体的 IL-12Rβ1 或 IL-23R 亚基的激动剂抗体，肽和有机小分子。

[0034] “反义寡脱氧核苷酸”或“反义寡核苷酸”（所述术语互换使用）被限定为能以序列特异性方式抑制靶基因的转录和 / 或翻译的核酸分子。术语“反义”指的是核酸与所述靶基因的编码（“有意义 (sense)”）遗传序列互补的事实。通过沃森 - 克里克 (Watson-Crick) 碱基配对，反义寡核苷酸与新生 (nascent)mRNA 以反向平行定向 (antiparallel orientation) 杂交。通过结合靶 mRNA 模板，反义寡核苷酸阻断被编码的蛋白的成功翻译。该术语特异地包括叫做“核酶”的反义制剂 (agent)，通过加入有天然自身剪接活性的序列，它已经被设计来诱导靶 RNA 的催化裂解 (Warzocha 和 Wotowiec，" Antisensestrategy :biological utility and prospects in the treatment of hematologicalmalignancies." Leuk.Lymphom24 :267-281[1997])。

[0035] 本文术语“抗体”以最广义使用，并且特异性包括单克隆抗体（包括拮抗剂，例如中和性抗体和激动剂抗体），多克隆抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），以及抗体片段。所述单克隆抗体特异性包括“嵌合”抗体，其中部分重链和 / 或轻链与来自具体物种 (species) 或属于具体抗体种类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源，而所述链的其它部分与来自其它物种或属于其它抗体类或亚类的抗体、以及这种抗体的片段中的对应序列相同或同源，只要它们表现出了所需的生物活性（美国专利 4,816,567 ;Morrison 等，Proc. Natl.Acad.Sci.USA,81 :6851-6855[1984])。所述单克隆抗体还包括“人源化”抗体或其片段（如 Fv，Fab，Fab′，F(ab′)$_2$ 或抗体的其它抗原结合型的亚序列），其包含源自非人免疫球蛋白的最小序列。大多数情况 (For themost part)，人源化抗体是人免疫球蛋白（受者抗体），其中来自所述受者 CDR 的残基被具有理想的特异性、亲合力和载量 (capacity) 的非人物种（供者抗体）的 CDR 的残基所取代，所述非人物种诸如小鼠、大鼠或兔。有时，人免疫球蛋白 Fv FR 残基被对应的非人残基所取代。另外，人源化抗体可包含不存在于受者抗体也不存在于引入的 (imported)CDR 或框架序列发现的残基。做这些修饰来进一步改进 (refine) 抗体并使其性能 (performance) 达到最大化。通常，人源化抗体基本包含所有的至少一个、通常两个可变区，其中所有或基本所有的 CDR 区对应于那些非人免疫球蛋白的 CDR 区，并且所有或基本所有的 FR 区是那些人免疫球蛋白序列的 FR 区。所述人源化抗体也最适地包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分，其通常来自人免疫球蛋白。更多细节见 Jones 等，Nature,321 :522-525(1986) ；和 Rejchmann 等，Nature,332 :323-329(1988)。所述人源化抗体包括PRIMATIZED®抗体，其中抗体的抗原结合区源自用感兴趣的抗原免疫恒河猴 (macaque monkey) 产生的抗体。

[0036] “抗体片段”包含完整抗体的部分，优选完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段

的例子包括Fab,Fab′,F(ab′)$_2$,和Fv片段;双抗体(diabodies);线性抗体(Zapata等,Protein Erg 8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子;和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0037] 本文术语“炎性疾病”或“炎性病症(disorder)”指导致炎症的病理状态,其通常由中性粒细胞趋化作用(neutrophil chemotaxis)造成。此种疾病的例子包括炎性皮肤病(inflammatory skin disease),其包括牛皮癣和特应性皮炎(atopic dermatitis);全身性硬皮病(systemic scleroderma)和硬化(sclerosis);与炎症性肠病(inflammatory bowel disease)(IBD)(如克隆氏病(Crohn′s disease)和溃疡性结肠炎)相关的反应;缺血再灌注疾病(ischemic reperfusion disorder),其包括外科手术组织再灌注损害(surgical tissue reperfusion injury),心肌缺血性疾病(condition)如心肌梗塞,心脏停搏,心脏手术后再灌注和经皮经血管冠状动脉血管成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty)后的狭窄(constriction),中风,和腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm);继发于中风的脑水肿;颅创伤(cranial trauma),低血容量性休克;窒息;成人型呼吸窘迫综合征(adult respiratory distress syndrome);急性肺损伤;白塞病(Behcet′sdisease),皮肌炎;多发性肌炎;多发性硬化(MS);皮炎;脑膜炎;脑炎;眼色素层炎(uveitis);骨关节炎;狼疮肾炎;自身免疫性疾病如类风湿性关节炎(RA),干燥综合征(Sjorgen′s syndrome),血管炎;涉及白细胞渗出(leukocyte diapedesis)的疾病;中枢神经系统(CNS)炎症性疾病,继发于败血症(septicaemia)或创伤的多器官损伤综合征(multiple organ injury syndrome);酒精性肝炎;细菌性肺炎;抗原抗体复合体介导的疾病,其包括肾小球肾炎;脓毒病(sepsis);结节病(sarcoidosis);对组织/器官移植的免疫病理性反应;肺的炎症,其包括胸膜炎,肺泡炎,血管炎,肺炎,慢性支气管炎,支气管扩张,弥散性全细支气管炎(panbronchiolitis),超敏性肺炎(hypersensitivitypneumonitis),特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis)(IPF),和囊性纤维化等。优选的适应征包括但不限于慢性炎症,自身免疫性糖尿病(autoimmune diabetes),类风湿性关节炎(RA),类风湿性脊椎炎(rheumatoidspondylitis),痛风性关节炎(gouty arthritis),及其它关节炎疾病(arthriticcondition),多发性硬化(MS),哮喘,系统性红斑狼疮(systhemic lupuserythrematosus),成人型呼吸窘迫综合征,白塞病,牛皮癣,慢性肺炎性疾病(pulmonary inflammation disease),移植物抗宿主反应,克隆氏病,溃疡性结肠炎,炎症性肠病(IBD),阿尔茨海默病(Alzheimer′s disease),和发热(pyresis),以及涉及炎症和病症的任何疾病或紊乱。

[0038] 术语“治疗”指治疗性治疗和预防(prophylactic or preventative)的措施,其中目的是为了预防或减缓(减轻(lessen))不希望的生理改变或紊乱。为本发明目的,有益或理想的临床结果包括但不限于,症状的减轻(alleviation),疾病范围(extent of disease)的缩小(diminishment),疾病状态的稳定(即未恶化),疾病进展的迟发或减慢,疾病状态的改善或缓和(palliation),及症状缓解(remission)(无论部分或整体),而无论其可检测与否。“治疗”也指与未接受治疗时的预期存活期相比延长的存活期。需要治疗的对象包括已患所述疾病,和易于患所述疾病,或有待预防所述疾病的那些对象。

[0039] “慢性”给药指以与急性方式相对的持续方式来给予一或多种制剂,从而维持理想

效果延长的 (extended) 一段时间。

[0040] “间歇”给药不是连续无间断的治疗,而是循环的 (cyclic in nature)。

[0041] “联用”一或袭多其它治疗制剂给药包括以任何顺序同时 (共同 (concurrent)) 和连续给药。

[0042] “受试者”是脊椎动物,优选哺乳动物,更优选是人。

[0043] 本文术语“哺乳动物”指任何被分类为哺乳动物的动物,其包括但不限于人,家养 (domestic) 和饲养 (farm) 动物,和观赏动物 (zoo animal),竞技动物 (sports animal) 或宠物动物,如绵羊,狗,马,猫,母牛等。优选,本文哺乳动物是人。

[0044] “有效量”是足够实现有益或理想治疗性 (包括预防性) 结果的量。可以通过一或更多给药来给予有效量。

[0045] B. 本发明实施方式

[0046] 除非另外指出,本发明实践使用本领域内的分子生物学 (包括重组技术),微生物,细胞生物学,生物化学和免疫学的常用技术。文献中详细解释了这些技术, 如 ″ Molecular Cloning :A Laboratory Manual ″ ,2nd edition(Sambrook 等, 1989) ; ″ Oligonucleotide Synthesis ″ (M.J.Gait, ed.,1984) ; ″ Animal Cell Culture″ (R.I.Freshney, ed.,1987) ; ″ Methods inEnzymology″ (Academic Press, Inc.) ; ″ Handbook of Experimental Immunology ″ ,4thedition(D.M.Weir&C. C.Blackwell, eds., Blackwell Science Inc.,1987) ; ″ Gene TransferVectors for Mammalian Cells″ (J.M.Miller & M.P.Calos, eds.,1987) ; ″ CurrentProtocols in Molecular Biology ″ (F.M.Ausubel 等 eds.,1987) ; ″ PCR :ThePolymerase Chain Reaction ″ , (Mullis 等, eds.,1994) ; 和 ″ Current Protocols inImmunology ″ (J. E.Coligan 等, eds.,1991)。

[0047] 如前述,本发明是基于如下认识 :IL-23 诱导活化 T 细胞,特别是记忆细胞产生 IL-17,并且 IL-23 的拮抗剂能抑制此进程。因此, IL-23 的拮抗剂是治疗炎症状况的有希望的侯选药物 (promising drug candidate),所述炎症状况的特征为 IL-17 水平升高。相反,IL-23 的激动剂可用于诱导对多种感染的保护性免疫反应,包括分枝杆菌感染,如例如,结核分枝杆菌 (M.tuberculosis) 感染。

[0048] 1. 鉴定 IL-23 的拮抗剂或激动剂的筛选试验

[0049] 本发明包括鉴定 IL-23 的拮抗剂的筛选试验,所述拮抗剂具有治疗特征为存在水平升高的 IL-17 的炎症性状况的功效。本发明还包括鉴定 IL-23 的激动剂的筛选试验,所述激动剂具有刺激对感染如结核分枝杆菌感染的保护性免疫反应的功效。

[0050] 候选拮抗剂药物的筛选试验可被设计用来鉴定化合物,其与 IL-23(包括亚基或它的其它片段) 或 IL-23 受体 (包括亚基或它的其它片段) 结合或复合,或另外干预 IL-23 与其它细胞蛋白的相互作用,从而干预 IL-23 产生或起作用。本文提供的筛选试验包括适合高通量 (high-throughput) 筛选化学文库的试验,使它们特别适合鉴定小分子候选药物。通常,结合试验和活性试验是已知的。

[0051] 可以多种形式进行所述试验,其包括但不限于本领域公知的蛋白 - 蛋白结合试验,生物化学筛选试验,免疫测定,和基于细胞的试验。

[0052] 对于拮抗剂和激动剂的所有试验都是常用的,因为它们需要在一定条件下使候选

药物与 IL-23 多肽，或和 IL-23 受体多肽，或所述多肽的片段（特别是包括 IL-23 和 IL-23 受体亚基）接触足够长的时间来使这两种组分相互作用。例如，所述人 IL-23 p19 亚基是 189 个氨基酸的多肽，其序列以登录号 AF301620 可得自 EMBL 数据库 (NCBI 605580；GenBank AF301620；Oppmann 等，如上述）。IL-23 多肽亚基 p40 的序列也已知（也称为 IL-12 p40 亚基；NCBI161561）。IL-23 所结合的 IL-12Rβ1 的序列以登录号 NCBI 601604 可得。制备结合所述多肽的抗体或小分子对本领域技术人员公知。

[0053] 结合试验中，所述相互作用是结合，并且形成的复合体可被分离或在反应混合物中被检测。具体实施方案中，IL-23 或 IL-23 受体多肽或所述候选药物通过共价或非共价连接 (attachment) 被固定在固相上，例如在微量滴定板上。非共价连接通常通过用 IL-23 或 IL-23 受体多肽的溶液包被固体表面并干燥来完成。或者，可使用对待固定的 IL-23 多肽或 IL-23 受体多肽具有特异性的固定化抗体，例如单克隆抗体来将其锚定 (anchor) 到固体表面。进行所述试验是通过将可以使用检测标签来标记的未固定组分，加入到固定的组分，例如含有所述被锚定组分的被包被的表面。当所述反应完成时，例如通过洗涤来去除未反应组分，再检测锚定到固体表面的复合体。当原来未固定的组分携带检测标签时，检测到固定在表面的标签表明出现了复合。当原来未固定的组分不携带标签时，可例如通过使用特异性结合所述固定化复合体的经标记的抗体来检测所述复合。

[0054] 如果候选化合物是与 IL-23 或 IL-23 受体相互作用但不与之结合的多肽，可用已知检测蛋白 - 蛋白相互作用的方法来测定其与各自的多肽的相互作用。此试验包括传统途径，如例如交联，共免疫沉淀和用梯度或层析柱共同纯化。另外，可用基于酵母的遗传系统监测蛋白 - 蛋白相互作用，其如 Fields 及其合作者描述 (Fields 和 Song，Nature(London)，340：245-246(1989)；Chien 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，88：9578-9582(1991)) 如 Chevray 和 Nathans，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，89：5789-5793(1991) 公开。很多转录活化物 (activator)，如酵母 GAL4，其由两个物理上不连续的模块区 (physically discretemodular domain) 组成，一个作为 DNA 结合区，另一个用作转录活化区 (activation domain)。在上述文献中描述的酵母表达系统（通常指“双杂合体 (two-hybrid) 系统”）利用这个性质，并使用两个杂合蛋白 (hybrid protein)，其中之一是靶蛋白，其与 GAL4 的 DNA 结合区融合，并且另一个是候选活化蛋白，其与活化区融合。受 GAL4- 活化的启动子控制的 GAL1-lacZ 报道基因的表达依赖于经蛋白 - 蛋白相互作用的 GAL4 活性重建。包含相互作用的多肽的集落 (Colonies) 用 β - 半乳糖苷酶的 (chromogenic) 产色底物来检测。用双杂合体技术鉴定两个特异性蛋白间的蛋白 - 蛋白相互作用的完整试剂盒 (MATCHMAKER™) 从 Clontech 可购。此系统也能扩展到定位 (map) 涉及特异性蛋白相互作用的蛋白结构域并精细到 (pinpoint) 对这些相互作用关键的氨基酸残基。

[0055] 可如下测定干预 IL-23 与其它细胞内或细胞外组分，具体是 IL-17 的相互作用的化合物。通常制备包含 IL-23 和细胞内或细胞外组分（例如 IL-17）的反应混合物，在一定条件下允许两个产物相互作用足够长的时间。为测定候选化合物抑制 IL-23 和 IL-17 相互作用的能力，在被试化合物缺无和存在时进行该反应。另外，可将安慰剂加入反应混合物来作为阳性对照。既然 IL-23 已经显示诱导了 IL-17 的产生，可例如通过在被试化合物缺无和存在时测量 IL-17 的量来测定被试化合物抑制 IL-23/IL-17 相互作用的能力。如果 IL-17

的量在候选化合物存在时比在其缺无时低，那么所述候选化合物是本发明限定的 IL-23 的拮抗剂。

[0056] 基于它们抑制 IL-23 诱导 IL-17 产生的能力来鉴定的 IL-23 拮抗剂是治疗炎性疾病的候选药物，所述疾病的特征是存在水平提高的 IL-17。

[0057] 基于它们促进 IL-23 诱导 IL-17 产生的能力来鉴定的 IL-23 激动剂是候选药物，其诱发或支持对感染，如结核分枝杆菌感染的保护性免疫反应，结果治疗了传染病 (infectious disease)，如结核病。

[0058] 强调这里特异性讨论的筛选试验仅仅是为了解释。根据所筛选的候选拮抗剂种类（例如多肽，肽，非肽的小有机分子，核酸等）选择的多项其它试验对本领域技术人员公知并且同等适用本发明目的。

[0059] 2. 抗 IL-23 和抗 IL-23 受体的抗体

[0060] 具体实施方案中，IL-23 的拮抗剂或激动剂是 IL-23（例如 IL-23 亚基）的单克隆抗体，包括抗体片段。其它具体实施方案中，IL-23 的拮抗剂和激动剂包括 IL-23 受体（例如 IL-23 受体的亚基）的单克隆抗体。上面已经讨论了 IL-23，包括其亚基。IL-23 的受体包含两个亚基：IL-12Rβ1，和近来被讨论叫做 IL-23R 的亚基 (Parham 等，J. Immunol. 168：5699-5798(2002))。对任一亚基的抗体都特异地在本发明范围内。对于拮抗剂的情况，具体优选特异性结合 IL-23R 亚基的抗体，因为它们特异性阻断了 IL-23 介导的生物活性。

[0061] 生产单克隆抗体的方法本领域公知。因此，可用杂交瘤方法制备单克隆抗体，如 Kohler 和 Milstein，Nature，256：495(1975) 描述的那些。杂交瘤方法中，通常用免疫制剂免疫小鼠、豚鼠或其它合适的宿主动物，来激发 (elicit) 产生或能产生会特异性结合到免疫制剂的抗体的淋巴细胞。或者，可在体外免疫淋巴细胞。

[0062] 所述免疫制剂通常包括 IL-23 或 IL-23 受体多肽或其融合蛋白。一般来说，如果需要人源的细胞那么使用外周血淋巴细胞（" PBL"），或如果需要非人哺乳动物来源那么使用脾细胞或淋巴结细胞。然后用合适的融合制剂，如聚乙二醇将所述淋巴细胞与固定细胞系融合来形成杂交瘤细胞 [Goding，Monoclonal Antibodies：Principles and Practice，Academic Press，(1986)pp.59-103]。固定的细胞系通常是经转化的哺乳动物细胞，具体是啮齿动物、牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。所述杂交瘤细胞可能被培养在合适的培养基中，其优选包含一或更多可抑制未融合的固定化细胞的生长或存活的物质。例如如果亲代细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (guanine phosphoribosyl transferase)(HGPRT 或 HPRT)，那么杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤，氨基喋呤和胸腺嘧啶（" HAT 培养基"），所述物质防止 HGPRT- 缺陷的细胞生长。

[0063] 优选的固定细胞系是高效融合的，其支持由所选择的产生抗体的细胞稳定高水平地表达抗体，并且对培养基如 HAT 培养基敏感。更优选的固定细胞系是鼠骨髓瘤系，其例如可得自 the Salk Institute Cell Distribution Center，San Diego，California 和美国典型培养物保藏中心 (the AmericanType Culture Collection，Manassas，Virginia)。也描述了产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠 - 人异源骨髓瘤 (heteromyeloma) 细胞系 [Kozbor，J. Immunol.，133：3001(1984)；Brodeur 等，Monoclonal Antibody Production Techniques andApplications，Marcel Dekker，Inc.，New York，(1987)pp.51-63]。

[0064] 也可测定用于培养所述杂交瘤细胞的培养基中抗 IL-23 或 IL-23 受体的单克隆抗

体的存在。优选，所述杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性用免疫沉淀或体外结合试验，如放射免疫试验 (RIA) 或酶联免疫吸附试验 (ELISA) 确定。所述技术和试验本领域已知。所述单克隆抗体的结合亲合力可例如，用斯卡查德分析 (Scatchard analysis)，Munson 和 Pollard，Anal. Biochem.，107 :220(1980) 确定。

[0065] 鉴定了理想的杂交瘤细胞后，可用限制性稀释方法亚克隆所述克隆并用标准方法使其生长 [Goding，如上述]。适合此目的培养基包括，例如 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 和 RPMI-1640 培养基。或者，所述杂交瘤细胞可在体内如在哺乳动物的腹水 (ascite) 内生长。

[0066] 可用常规免疫球蛋白纯化方法从培养基或腹水分离或纯化由所述亚克隆分泌的单克隆抗体，所述方法如例如，蛋白 A- 琼脂糖凝胶 (Sepharose)，羟基磷灰石 (hydroxylapatite) 层析，凝胶电泳，透析或亲和层析。

[0067] 也用重组 DNA 方法，如美国专利 4,816,567 所述的那些来生产单克隆抗体。用常规方法可容易地分离并测序编码本发明单克隆抗体的 DNA(例如，通过使用能特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。用本发明的杂交瘤细胞作为所述 DNA 的优选来源。一旦分离，可将所述 DNA 置入表达载体，然后将其转染到不会另外产生免疫球蛋白蛋白的宿主细胞，如猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、或骨髓瘤细胞，来在重组细胞中合成单克隆抗体。也可修饰所述 DNA，例如通过用人重链和轻链恒定区的编码序列取代同源鼠序列 [美国专利 4,816,567 ;Morrison 等，如上述] 或通过使免疫球蛋白编码序列与所有的或部分的非免疫球蛋白多肽编码序列共价连接。所述非免疫球蛋白多肽可以被本发明抗体恒定区取代、或可被本发明抗体一个抗原结合位点的可变区取代来产生嵌合的二价抗体。

[0068] 所述抗体可以是单价抗体。制备单价抗体的方法本领域公知。例如，一种方法涉及重组表达免疫球蛋白轻链和被修饰的重链。通常在 Fc 区的任何点截短所述重链来避免重链交联。或者，通过相关的半胱氨酸残基被其它氨基酸残基取代或缺失来避免交联。体外方法也适合制备单价抗体。

[0069] 本发明抗 IL-23 和抗 IL-23 受体的抗体还可以是人源化抗体或人抗体。非人 (例如鼠) 抗体的人源化形式是嵌合免疫球蛋白，免疫球蛋白链或其片段 (如 Fv，Fab，Fab′，和 $F(ab')_2$ 或抗体的其它抗原 - 结合亚序列)，其包含来自非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白 (受者抗体)，其中来自受者互补决定区 (CDR) 的残基被具有所需的特异性、亲合力和载量的来自非人物种 (供者抗体) 的 CDR 残基取代，所述非人物种如小鼠、大鼠或兔。有时，所述人免疫球蛋白 Fv FR 框架残基被对应的非人残基取代。人源化抗体还可包含不在受者抗体和输入的 CDR 或框架序列发现的残基。通常，所述人源化抗体基本包含所有的至少一个、通常两个可变区，其中所有或基本所有的 CDR 区对应于那些非人免疫球蛋白的 CDR 区，并且所有或基本所有的 FR 区是那些人免疫球蛋白共有序列的 FR 区。所述人源化抗体也最适包含免疫球蛋白通常是人免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分。[Jones 等，Nature，321 :522-525(1986) ;Riechmann 等，Nature，332 :323-329(1988) ; 和 Presta，Curr. Op. Struct. Biol.，2 :593-596(1992)]。

[0070] 人源化非人抗体的方法本领域公知。通常人源化抗体具有由非人来源引入它的一或更多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入 (import)”残基，其通常取

自“输入”可变区。人源化基本用 Winter 及合作者的方法进行 [Jones 等，Nature,321：522-525(1986)；Riechmann 等，Nature.332：323-327(1988)；Verhoeyen 等，Science,239：1534-1536(1988)]，它是将啮齿动物的 CDR 或 CDR 序列取代为人抗体的对应序列。因此，此“人源化的”抗体是嵌合抗体（美国专利 4,816,567），其中基本上不足完整 (less than intact) 的人可变区已经被来自非人物种的对应序列取代。实践中，人源化抗体通常是人抗体，其中一些 CDR 残基和可能的一些 FR 残基被来自啮齿类动物抗体中类似位置 (analogous site) 的残基取代。

[0071] 也可用多种本领域公知技术生产人抗体，所述技术包括噬菌体显示文库 (phage display libraries)[Hoogenboom 和 Winter，J.Mol.Biol.,227：381(1991)；Marks 等，J.Mol.Biol.,222：581(1991)]。也可用 Cole 等和 Boerner 等的技术来制备人单克隆抗体 (Cole 等，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy，Alan R.Liss，p.77(1985) 和 Boerner 等，J.Immunol.,147(1：86-95(1991)]。同样，可通过将人免疫球蛋白基因座引入到转基因动物来生产人抗体，所述转基因动物例如内源性免疫球蛋白基因已被部分或全部失活的小鼠。攻击后观察人抗体产生，它与在人中见到的所有方面十分类似，包括基因重排 (rearrangement)，装配 (assembly) 和抗体库 (repertoire)。此方法的描述例如见美国专利 5,545,807；5,545,806；5,569,825；5,625,126；5,633,425；5,661,016，及如下科学文献：Marks 等，Bio/Technology 10,779-783(1992)；Lonberg 等，Nature 368 856-859(1994)；Morrison，Nature 368,812-13(1994)；Fishwild 等，Nature Biotechnology 14,845-51(1996)；Neuberger，Nature Biotechnology 21：826(1996)；Lonberg 和 Huszar，Intern.Rev.Immunol.13：65-93(1995)。

[0072] Mendez 等 (Nature Genetics 15：146-156(1997)) 进一步改进了技术并产生了名为“Xenomouse II”的转基因小鼠系，用抗原攻击它时会产生高亲和力的完全人抗体。通过将巨碱基 (megabase) 人重链和轻链基因座种系整合 (germ-line integration) 到如上缺失内源性 J_H 节段的小鼠中来实现它。所述 Xenomouse II 容纳 (harbor) 了 1,020kb 的人重链基因座，其包含大约 66 个 V_H 基因，完全的 D_H 和 J_H 区，以及三个不同的恒定区（μ，δ 和 χ），它还容纳了 800kb 的人 κ 基因座，其包含 32 个 Vκ 基因，Jκ 节段和 Cκ 基因。这些小鼠产生的抗体十分类似在人见到的所有方面，包括包括基因重排，装配和抗体所有组成成分。所述人抗体优选表达超过内源性抗体，因为内源性 J_H 节段的缺失避免了鼠基因座上的基因重排。

[0073] 或者，可使用噬菌体显示技术 (McCafferty 等，Nature 348,552-553(1990))，用未免疫供者的免疫球蛋白可变 (V) 区基因的所有组成成分在体外产生人抗体和抗体片段。根据此技术，将抗体 V 区基因克隆到如 M13 或 fd 的丝状噬菌体 (filamentous bacteriophage) 的主要或次要外壳蛋白 (major orminor coat protein) 基因编码框内 (in-frame)，并在噬菌体颗粒表面上显示为有功能的抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝，基于所述抗体功能性质进行选择也就选择了编码表现出那些性质的抗体的基因。因此，所述噬菌体模拟了 B 细胞的一些性质。可用多种形式进行噬菌体显示：有关它们的综述见例如 Johnson，Kevin S. 和 Chiswell，David J.，CurrentOpinion in Structural Biology 3,564-571(1993)。可用各种 V- 基因节段来源来作噬菌体显示。Clackson 等，Nature 352,624-628(1991) 分离了抗噁唑酮 (oxazolone) 抗体的多

样性阵列 (array)，所述抗体来自源自免疫小鼠脾脏的 V 基因的小随机组合文库 (random combinatorial library)。可构建来自未免疫的人供者的 V 基因的所有组成成分，并且可基本依据如 Marks 等，J.Mol.Biol.222,581-597(1991)，或 Griffith 等，EMBO J 12,725-734(1993) 所述的技术分离抗多种抗原阵列（包括自身抗原）的抗体。天然免疫反应中，抗体基因以高速 (at a high rate) 累积突变（体细胞高变 (somatic hypermutation)）。一些引入的变化会使亲和力更高，并且在随后的抗原攻击中优选使显示高亲和力的表面免疫球蛋白的 B 细胞复制并分化。可通过使用“链改组 (chain shuffling)”的技术来模拟此天然过程 (Marks 等，BiolTechnol.10,779-783[1992])。此方法中，要提高通过噬菌体显示获得的“第一 (primary)”人抗体的亲合力，可通过用从未经免疫的供者获得的 V 区基因的天然存在变体库（库）取代重链和轻链 V 区的基因。此技术可产生亲合力在 nM 范围的抗体和抗体片段。Waterhouse 等，Nucl.Acids Res.21,2265-2266(1993) 已描述了制造非常大的噬菌体抗体所有组成成分的策略。

[0074] 已经开发了产生抗体片段的多种技术。传统上通过蛋白水解消化完整抗体来得到这些片段（见例如，Morimoto 等，J.Biochem.Biophys.Methods 24:107-117(1992) 和 Brennan 等，Science 229:81(1985)）。然而现在可直接由重组细胞产生这些片段。例如，可直接从大肠杆菌回收 Fab′ -SH 片段并化学偶联来形成 $F(ab')_2$ 片段 (Carter 等，Biol Technology 10:163-167(1992))。另一个实施方案中，用亮氨酸拉链 (zipper)GCN4 形成 $F(ab')_2$，从而促进 $F(ab')_2$ 分子的装配。根据另一种方法，可直接从重组宿主细胞培养物分离 Fv，Fab 或 $F(ab')_2$ 片段。其它产生抗体片段的技术对本领域试验人员明显可知。

[0075] 本发明范围也包括由两个共价连接的抗体组成的异偶联 (Heteroconjugate) 抗体。此抗体已例如，被建议用来使免疫系统细胞靶向不需要的细胞（美国专利 4,676,980），并用来治疗 HIV 感染 (PCT 申请公开号 WO91/00360 和 WO 92/200373)。可使用任何方便的交联方法，用公知、可购的交联制剂来制备同种异型偶联抗体。

[0076] 更多涉及产生单克隆抗体的信息也见 Goding，J.W.，MonoclonalAntibodies：Principles and Practice,3rd Edition,Academic Press,Inc.,London,San Diego,1996；Liddell 和 Weeks：Antibody Technology：A ComprehensiveOverview，Bios Scientific Publishers：Oxford,UK,1995；Breitling 和 Dubel：Recombinant Antibodies,John Wiley & Sons,New York,1999；和 PhageDisplay：A Laboratory Manual,Barbas 等，editors,Cold Springs HarborLaboratory,Cold Spring Harbor,2001。

[0077] 3. 靶疾病

[0078] IL-17 涉及多种炎性疾病，包括类风湿关节炎 (RA)。RA 的主要特征之一是关节周围骨的侵蚀 (erosion)。破骨细胞在骨的重吸收中起主要作用，但破骨细胞从祖细胞形成的机制并未被完全理解。近来，Kotake 等，(J.Clin.Invest.103:1345(1999)) 报道，在共培养小鼠造血细胞和初级 (primary) 破骨细胞时白介素 17(IL-17) 可诱导破骨细胞样细胞形成。由 IL-17 诱导的破骨细胞生成 (osteoclastogenesis) 显示被环加氧酶 (cyclooxygenase)-2(COX-2) 的选择性抑制物吲哚美辛 (indomethacin) 抑制。与骨关节炎 (OA) 病人相比发现，RA 病人的滑液 (synovial fluid) 包含特别高水平的 IL-17。另外，使用免疫染色，在 RA 病人的滑膜组织但没有在 OA 病人的组织内检测出 IL-17 阳性的单个核细胞。这些发现现被解释为表明 IL-17 有助于 RA 的骨侵蚀和关节损害，因此可以是被抑制

的靶。

[0079] 与健康受试者相比，白塞病的病人已经显示 IL-17 的血清水平惊人提高。Hamzaoui 等，Scand. J. Rheumatol. 31(4) :205-10(2002)。

[0080] 在哮喘性气道 (asthmatic airway) 内已发现 IL-17 的水平提高，并且提示 IL-17 可能通过释放其它促炎介质，如 α-趋化因子来放大炎症性反应。Molet 等，J. Allergy Clin. Immunol. 108(3) :430-8(2001) ；和 Wong 等，Clin. Exp. Immunol. 125(2) :177-83(2001)。

[0081] 在患系统性红斑狼疮的病人已报道了 IL-17 水平提高。Wong 等，Lupus9(8) :589-93(2000)。

[0082] 已描述 IL-17 在牛皮癣中起作用。Homey 等，J. Immunol. 164(12) :6621-32(2000)。

[0083] 已报道 IL-17mRNA 在多发性硬化的血和 CSF 单个核细胞中被放大 (augment)。Matusevicius 等，Mult. Scler. 5(2) :101-4(1999)。

[0084] 基于这些以及诸多类似报道，抑制了 IL-23 诱导 IL-17 产生的能力从而降低了 IL-17 的水平的 IL-23 拮抗剂，是治疗多种（慢性）炎症状况和疾病的有价值的候选物。所述疾病的例子包括但不限于 :慢性炎症，自身免疫性糖尿病，类风湿性关节炎 (RA)，类风湿性脊椎炎，痛风性关节炎，及其它关节炎状况，多发性硬化 (MS)，哮喘，系统性红斑狼疮，成人型呼吸窘迫综合征，白塞病，牛皮癣，慢性肺炎性疾病，移植物抗宿主反应，克隆氏病，溃疡性结肠炎，炎症性肠病 (IBD)，阿尔茨海默病，和发热。

[0085] 已知 IL-17 是通过促进 IFN-γ 产生并因此诱导细胞介导的免疫反应来在对某些传染病，如肺结核产生保护性反应中起重要作用的。因此，IL-23 的激动剂，包括激动剂抗体，对诱导针对多种感染（如结核分枝杆菌引起的肺结核）的细胞介导的免疫反应有效，并且是治疗每年全球杀死三百万人以上的传染病的有希望的候选药物。

[0086] 4. 药物组合物

[0087] 可以以药物组合物形式给药由上文披露的筛选试验鉴定的、特异性结合 IL-23 或 IL-23 受体的抗体，以及其它 IL-23 的拮抗剂或激动剂分子，来治疗多种疾病，特别是炎性疾病或由于诱导细胞介导的免疫反应造成的疾病。

[0088] 使用抗体片段时，优选特异性结合到靶蛋白结合区的最小抑制性片段。例如，基于抗体可变区序列，可设计保持结合靶蛋白序列的能力的肽分子。可化学合成和 / 或用重组 DNA 技术生产此肽。见例如，Marasco 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，90 :7889-7893(1993)。

[0089] 也可以例如用团聚 (coacervation) 技术或界面聚合 (interfacialpolymerization)，将所述活性组分包载 (entrapped) 在制备的微胶囊 (microcapsule) 中，例如羟甲基纤维素酯 (hydroxymethylcellulose) 或明胶 - 微胶囊和聚 -(methylmethacylate) 微胶囊可分别在胶体药物传递系统（例如，脂质体，微球白蛋白 (albumin microsphere)，微乳状液 (microemulsion)，纳米颗粒 (nano-particle)，和纳米胶囊 (nanocapsule)) 或在大分子乳状液 (macroemulsion) 中。这些技术披露于 Remington′ s Pharmaceutical Sciences，如上述。

[0090] 用于体内给药的剂型 (formulation) 必须是无菌的。这可通过滤过无菌滤过膜来容易地实现。

[0091] 可以制备缓释 (Sustained-release) 制备物。缓释制备物的适当例子包括包含

抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质，该基质为成型 (shaped) 颗粒，例如膜 (film) 或微胶囊的形式。缓释基质的例子包括聚酯，水凝胶（例如，聚羟乙基甲基丙烯酸酯 (poly(2-hydroxyethyl-methacrylate))，或聚乙烯醇 (poly(vinylalcohol))，多乳酸化合物 (polylactide)（美国专利号 3,773,919），L- 谷氨酸和 γ 乙基 -L- 谷氨酸 (glutamate) 的共聚物，非降解的 (non-degradable) 乙烯 - 醋酸乙烯 (ethylene-vinyl acetate)，降解的乳酸 - 羟基乙酸 (glycolic acid) 共聚物如 LUPRON DEPOT™（注射的微球，其由乳酸 - 羟基乙酸共聚物和醋酸亮丙瑞林 (leuprolide acetate) 组成），和聚 -D-(-)-3- 羟基丁酸。尽管聚合物如乙烯 - 醋酸乙烯和乳酸 - 羟基乙酸使分子释放超过 100 天，某些水凝胶释放蛋白的时间段却较短。当被囊化的 (encapsulated) 抗体在体内长时间保持，由于在 37℃暴露于湿气 (moisture)，它们可变性或聚集，导致失去生物活性并可能改变免疫原性。根据所涉及的机制可设计稳定化的合理策略。例如，如果发现聚集机制是通过硫代 - 二硫互换 (interchange) 形成的分子间 S-S 键，那么可通过修饰巯基残基，在酸性溶液超低温冻干 (lyophilizing)，控制湿度含量，使用合适添加剂，并开发特异性聚合物基质组合物，来进行稳定化。

[0092] 本文制剂也可包含一种以上对要治疗的特定适应症必要的活性化合物，优选具有互补活性但不负面影响彼此的那些。所述分子适合以达到目的的有效量联合物存在，或可分别制剂 (formulate)，并合并或以任何顺序连续给药。

[0093] 例如，本发明 IL-23 的拮抗剂可与现在用于治疗靶疾病和状况的抗炎制剂和其它活性化合物联合给药。所述化合物包括皮质类固醇；非类固醇 (non-steroidal) 的抗炎药物 (NSAID)，如阿司匹林，布洛芬 (ibuprofen)，和 COX-2 抑制物，例如Celebrex®和Vioxx®；可改善疾病的 (disease-modifying) 抗类风湿药物 (DMARDs)，如氨甲喋呤，来氟洛米 (leflunomide)，柳氨磺吡啶 (sulfasalazine)，硫唑嘌呤 (azathioprine)，环孢菌素 (cyclosporine)，羟氯喹啉 (hydroxychloroquine)，和 D- 青霉胺；和生物反应调节物 (modifier)(BRM)，如 TNF 和 IL-1 的抑制物。

[0094] 提供如下实施例是为了阐述，而不是从任何一方面限制本发明范围。

[0095] 所有本说明书引用的专利和参考文献都全文引入作为参考。

实施例

[0096] 实施例 1

[0097] 白介素 -23(IL-23) 促进以白介素 -17(IL-17) 产生为特征的独特的 CD4T 细胞活化状态

[0098] 尽管 IL-17 由激活的 T 细胞产生是清楚的，以前的报告并没有提供它在以 Th1 和 Th2 为两极的细胞因子图谱范例内的清楚分类。此实施例描述最初的试验是为了检查应答于与 Th1 或 Th2 反应相关的信号不同的 (distinct from) 信号来表达 IL-17 的可能性。

[0099] 实验步骤

[0100] 细胞培养物 - 从 C57/BL-6 小鼠制备单个脾细胞悬液，并通过密度梯度离心从悬浮的脾细胞分离单个核细胞。在多种刺激存在或缺无时（如图说明所指的时间）用 IL-2(100 单位 /ml) 培养 2×10^6 细胞 /ml，之后收集细胞并用 ELISA(R&D Systems,Minneapolis,MN) 分析 IL-17。所述树突细胞来自巨噬细胞（从脾细胞悬液以粘附性细胞群获得），获得它

是通过用 rGM-CSF(2ng/ml) 和 rIL-4(1000 单位 /ml) 处理巨噬细胞 4 天，用 LPS(0.5μg/ml) 洗涤并重新活化。分离记忆和原初 T 细胞是如下进行：用 CyC-CD4+PE-CD44 或 CyC-CD4+PE-CD62L 染色从鼠脾细胞的单个细胞悬液分离的单个核细胞，并并分选 $CD4^+$ 细胞，$CD44^{高}/CD62L^{低}$是记忆表型或 $CD44^{低}/CD62L^{高}$是原初表型。

[0101] 体外诱导 T 细胞分化 - 用抗 CD4 的磁珠 (Miltenyi Biotech) 从野生型 C57/BL6 小鼠的脾纯化 $CD4^+$ 细胞。通过在包被了 5μg/ml 抗 CD3 和 1g/ml 抗 CD28 的抗体的平板上划线来活化纯化的 T 细胞 (2×10^6 细胞 /ml)3 天。所述培养物补充了 IL-2，并用 IL-12(20mM)+ 抗 IL4(0.5μg/ml)(为了 Th1 分化) 或 IL-23(10nM)(为产生 IL-17) 来处理。在最初的活化后，充分洗涤所述细胞培养物并用抗 CD3(1μg/ml) 再刺激另外 24 小时，之后用 ELISA 分析细胞上清中的多种被分泌的细胞因子。

[0102] IL-12p40 抗体抑制 IL-17 诱导 - 将抗 IL-12 抗体 (R&D Systems，目录号 (cat. no.)AF-419-NA) 或无关的对照抗体 (抗 FGF-8b(R&D Systems，目录号 AF-423-NA) 与 IL-23(100ng/ml) 或 LPS- 刺激的树突细胞 (10% v/v) 的条件培养基在 37℃预保温 1 小时，再与从小鼠脾分离的单个核细胞 (2×10^6 细胞 /ml) 保温另外 5-6 天。收集上清并用 ELISA 测量 IL-17 水平。

[0103] 纯化 IL-23- 鼠 IL-23- 通过在人胚胎肾细胞 (293 个细胞) 中共表达羧基末端 His- 标记的 p19 和 FLAG0 标记的 p40 来产生 IL-23 组分，并用镍亲合树脂纯化分泌的蛋白。低于 0.2 内毒素单位 / μg 的内毒素水平不可检测。

[0104] 结果

[0105] 首先，检测多种微生物产物刺激 IL-17 产生的能力。近来 Infante-Duarte 等 J Immunol 165,6107(2000) 观察到 IL-17 应答于致莱姆病 (Lyme disease) 螺旋菌 (spirochete)B.burgdorferi 的微生物脂肽反应而增加。存在多种微生物肽包括 LPS(革兰氏阴性细菌)，LTA(革兰氏阳性细菌) 或 LBP(细菌脂肽) 时，脾细胞培养物会产生 IL-17(图 1)。纯化的 T 细胞自身，或纯化的巨噬细胞自身都不产生 IL-17。在用平板结合的抗 CD3 与受体交联，并用来自活化巨噬细胞 / 树突细胞的上清处理后，纯化的 T 细胞产生的 IL-17 增加，这表明存在由这些细胞释放的未被鉴定的一或多种因子，该因子作用于 T 细胞上来促进 IL-17 产生。

[0106] 在绘图 (profile) 可能负责促进 IL-17 活性的候选分子的表达时，用实时 RT-PCR 观察到在活化的树突细胞中，IL-23 组分 p19 和 p40 的 mRNA 表达增加了 100-1000 倍 (B.Oppmann 等，Immunty 13,715(2000))(未示)，从而检查了 IL-23 的效果。

[0107] 通过在人胚胎肾细胞 (293 个细胞) 中共表达羧基末端的 His- 标签的 p19 和 FLAG- 标记的 p40 来产生鼠 IL-23 组分，并用镍亲合树脂来纯化分泌的蛋白。低于 0.2EU/μg 的内毒素水平不可检测。在存在 IL-2(100U/ml) 和 ConA(2.5μg/ml) 时，在 Th1 诱导条件下 (IL-12+ 抗 IL-4)、Th2 诱导条件下 (IL-4+ 抗 IFN-γ)，或与纯化的 IL-23(100ng/ml) 保温脾细胞培养物 3-4 天，之后洗涤所述培养物并用 ConA 再刺激另外 24 小时。用 ELISA 测量多种细胞因子的水平。低于 ELISA 试剂盒标准曲线范围的最低稀释度水平被记录为‘不可检测的 (N.D.)’。如下结果代表三个独立进行的试验。

[0108] 在 IL-12- 刺激的 Th1 诱导条件下培养脾细胞导致勉强在检测限以上的 (marginal)IL-17 生成，而在 Th2 诱导条件下 IL-17 的产生不超过对照。结果见下表 1 所

示。

[0109] 表 1

[0110]

	对照	IL-12	IL-4	IL-23
IL-17	N.D	58±82	64±91	1191±569
IL-4	50±26	396±17	3259±118	101±100
IFN-γ	341±0	2757±1016	489±502	580±813
GM-CSF	N.D.	46±13	365±516	882±169
TNF-α	N.D	174±40	214±314	205±85

[0111] 培养物中存在的 IL-23 以剂量依赖方式导致高水平 IL-17 产生的（图 2）。IL-23 也使 GM-CSF 水平高于在 Th1 诱导条件下观察到的水平。相反，IFN-γ 水平显著低于在 Th1 诱导条件得到的水平。TNF-α 水平与 Th1 条件类似。单独的 IL-12p40 不会使 IL-17 产生（数据未示）。IL-23 促进 IL-17mRNA 水平升高（图 2B）。暴露于 IL-23 六小时以内，IL-17mRNA 的水平增加数百倍，并在 IL-23 持续存在时保持升高。存在抗 IL-17 的抗体不抑制此效果，这提示 IL-17 自身对此过程 (process) 没有帮助（未示）。另外，近来鉴定的 IL-17 家族成员 IL-17F 的 mRNA，也被发现应答于 IL-23 而上调（图 2C）。

[0112] 已经报道 IL-23 促进记忆的但非原初 T 细胞的增殖 (D.M.Frucht，如上述）。因此，检查了相对于 IL-23 对记忆 T 细胞群的影响而言，IL-23 对原初 T 细胞群 IL-17 产生的影响。通过荧光活化细胞分选法 (FACS) 从脾细胞分离纯化的 $CD4^+$T 细胞。选择记忆细胞群为 $CD4^+CD44^{高}$ (R.C.Budd 等，J Immunol138，3120(1987)，或 $CD4^+CD62^{低}$ (T.M.Jung，W.M.Gallatin，I.L.Weissman，M.O.Dailey，J Immunol 141，4110(1988))，并选择原初细胞群为 $CD4^+CD44^{低}$或 $CD4^+CD62L^{高}$。如图 3 所见，IL-23 只在记忆细胞群 ($CD44^{高}$和 $CD62L^{低}$) 而不在原初细胞 ($CD44^{低}$或 $CD62L^{高}$) 中刺激 IL-17 的产生。

[0113] 存在中和型 IL-12 抗体时，IL-23 介导的 IL-17 产生被完全阻断，该中和抗体与和 IL-23 共享的 p40 亚基相互作用（图 4A，左组）。因为存在无关抗体时 IL-17 的产生无变化，所以此效果不是由于 Fc 受体连接到抗原递呈细胞上。此抗体也抑制应答与来自 LPS 刺激的树突细胞的条件培养基时观察到的 IL-17 产生诱导的＞ 50％（图 4A，右图）。缺乏 IL-12p40 组分的小鼠（品系 :B6.129S1-IL 12btmlJm) 与野生型小鼠或缺乏 IL-12p35 组分的小鼠（品系 :B6.129S1-IL12a) 相比，前者脾细胞培养物应 ConA 刺激可见 IL-17 的产生明显下降但不是完全缺无 (abrogation)（图 4B)。

[0114] 为了检测 IL-12 在 IL-17 产生中的作用，将增加量的 (0.001-1nM) 鼠 IL-12 加入包含 IL-23(1nM) 的培养物。如图 5A 所见，IL-12 以剂量依赖方式降低 IL-17 的水平。

[0115] 另外，用纯化的 IL-23 处理脾细胞，该脾细胞来自缺乏 IL-12 受体 β 链 2(IL-12Rβ2) 的小鼠 (Wu 等，J Immunol 165，6221(2000))，所述 IL-12 受体 β 链 2 为

IL-12 的特异性受体组分 (A.O.Chua, V.L.Wilkinson, D.H.Presky, U.Gubler, J Immunol 155,4286(1995))。IL-12Rβ2$^{-/-}$ 小鼠的脾细胞应 IL-23 刺激，IL-17 产生增多超过了未经刺激的对照 (图 5B)，但是该刺激并不影响 IFN-γ 水平。令人惊异的是，这些小鼠的 IL-17 背景水平与野生型小鼠相比超过 10 倍，这表明 IL-12 可能负向 (negative) 调节 IL-23 诱导的 IL-17 产生。然而，与 IL-12Rβ2 敲除小鼠相反，我们未在 IL-12p35 敲除小鼠的脾培养物观察到 IL-17 增加。此不同的原因未知，但可能与 p35 缺无时 IL-12p40 的功能改变、或遗传背景或病原体暴露不同有关。

[0116] 讨论

[0117] 总而言之，这些数据提示了 IL-23 在促进独特 T 细胞活化状态中的作用，所述 T 细胞表达 IL-17 作为效应 (effector) 细胞因子。已描述 Th1 和 Th2 作为促进细胞介导的免疫反应相对于体液的免疫反应的示例。这些反应分别提供了针对细胞内和细胞外病原体的重要防御，并且这些反应任一中的缺陷都与对具体病原体的易感性增加有关。相反，IL-23 可用来促进对病原体的获得性免疫反应，该病原体的特征为严重地依赖被认为主要用作先天免疫反应介质 (mediator) 的细胞。作为此反应的主要效应细胞因子，IL-17 能够通过诱导趋化因子产生来促进单核细胞和中性粒细胞更迅速地募集 (recruitment)。另外，对 IL-23 的反应中观察到高水平的 GM-CSF 产生，这可证明有另外的髓样细胞 (myeloid cell) 产生。由局部 IL-17 刺激的基质细胞 (stromal cell) 的 G-CSF 产生会使其进一步增加。然而，此获得性反应的特征并非仅依赖于髓样谱系 (lineage) 反应的吞噬细胞，因为已知 IL-17 促进 IL-17 诱导 ICAM，从而为进一步的 T 细胞反应提供重要的共刺激。

[0118] 近来数项研究指出了 p35 缺陷的小鼠和 p40 缺陷的小鼠之间的显著差别 (Decken 等，Infect Immun.66 :4994-5000(2002) ;Cooper 等，J Immunol.168 :1322-1327(2002) ; Elkins 等，Infection&Immunity 70 :1936-1948 ;Holscher 等，J.Immunol.167 : 6957-6966(2001))。这些研究都发现，通常在多种生物体模型 (model organism) 的免疫介导的清除 (clearance) 中缺失 p40 比缺失 p35 更有害。

[0119] IL-17 的表达与数项严重炎性疾病相关提示 IL-23 的拮抗剂可以是治疗这些疾病的有希望的候选药物。

[0120] 实施例 2

[0121] 白介素 -23(IL-23) 缺陷的小鼠

[0122] 为进一步研究 IL-23 与 IL-17 的体内关系，比较 IL-23 缺陷的小鼠和 IL-17 缺陷的动物的表型。

[0123] 实验步骤

[0124] 小鼠 :在无特殊病原体 (specific pathogen free) 条件饲养 (house) 所有小鼠。从 the Jackson laboratory(Bar Harbor, MA) 获得 IL-12p40$^{-/-}$ 小鼠，并从 CharlesRiver laboratories(San Diego, CA) 获得 C57BL/6 小鼠。

[0125] 试剂 :除非另外指出，从如下供应商购买试剂 :从 BD Pharmingen(SanDiego, CA) 获得抗体和 ELISA 试剂，从 R&D systems(Minneapolis, MN) 获得细胞因子，从 Biosearch Technologies(Novato,CA) 获得 TNP- 偶联的抗原，从 Invitrogen(Carlsbad,CA) 获得组织培养试剂。

[0126] IL23p19 缺陷的小鼠的产生。用 Genome Systems(Incyte Genomics, PaloAlto,

CA) 自基因组 BAC 文库的克隆 198a3 分离包含鼠 IL23 p19 基因座的基因组 DNA。用标准分子克隆技术，从如下 DNA 片段构建靶载体，该载体被设计为用 EGFP 报道基因来取代整个 IL23 p19 编码区：胸苷激酶选择盒；由分别在远端和近端的内源性 SacII 和 Bgl II 位点限定的 5403 碱基对的 5′ 同源性臂；用 BamHI(5′ 末端）和 AflIII(3′ 末端）从 pEGFP-1 切割的 EGFP 表达盒 (BD Clontech，Palo Alto，CA)；PGK-neo 抗性盒；和由在近端的内源性 XhoI 位点和在远端的引物 5′ -GCTTGGTGGCCCACCTATGAT-3′ (SEQ ID NO:1) 限定的 1203 个 bp 的短臂（图 6A)。将此构建体电穿孔到 129/SvEv 胚胎干 (ES) 细胞 (Huang 等，Science 259:1742(1993))，用 G418 和 Gancyclovir 选择后在 600 个克隆中的 9 个出现同源重组。为确认正确靶向所述基因座，用 southern 印迹分析 ES 细胞和动物的基因组 DNA。用 BamHI 消化之后，使膜与探针 1(用寡聚物 (oligo)5′ -AGACCCTCAAAGTTCATGAC-3′ （有义）(SEQ ID NO:2) 和 5′ -CTGACGGCGCT TTCTCTACC-3′ （反义）(SEQ ID NO:3) 通过 PCR 获得的 831bp 的基因组 DNA 片段）杂交，产生了对于野生型等位基因 7027bp 的片段和对于正确靶向的突变等位基因 11788bp 的片段。类似地，用 EcoRI 消化基因组 DNA 之后，膜与探针 2(用寡聚物 5′ -TTTTGCCAGTGGGATACACC-3′ （有义）(SEQ ID NO:4) 和 5′ -AACTGCTGGGGCTGTTACAC-3′ （反义）(SEQ ID NO:5) 通过 PCR 获得的 390bp 的基因组 DNA 片段）杂交，野生型等位基因产生了 9197bp 的片段，正确靶向的突变等位基因产生了 6211bp 的片段。将两个 ES 细胞克隆 (1c5 和 3h6) 注射到胚泡 (blastocyst)，并获得在其种系中传递了突变等位基因的嵌合动物。对于常规基因分型 (genotyping)，我们所用的基于 PCR 的方法使用了常用反义引物 (5′ -GCCTGGGCTCACTTTTTCTG-3′)(SEQ ID NO:6)，和对野生型特异的有义引物 (5′ -GCGTGAAGGGCAAGGACACC-3′)(SEQ ID NO:7) 以及敲除-特异性有义引物 (5′ -AGGGGGAGGATTGGGAAGAC-3′ (SEQ ID NO:8))。此引物三联体 (triplet) 对于野生型等位基因扩增了 210bp 的片段，并对于突变等位基因扩增了 289bp 的片段。在 Robocycler(Stratagene，La Jolla，CA) 进行 PCR，其条件如下：1 个循环，94℃，60″；35 个循环，94℃，30″，58℃，30″，72℃，60″；1 个循环，72℃，7″。

[0127] 血细胞亚型 (subset)FACS 分析：从 6-8 周龄小鼠分离脾，胸腺和淋巴结，并用标准方法制备单个细胞悬液。通过心脏穿刺取外周血并用 EDTA 处理来避免凝固，用 ACK 裂解缓冲液 (lysing buffer)(Biosource，Camarillo，CA) 裂解红细胞。所有细胞在冰上在补充了 2％的热灭活的胎牛血清的 Hanks 平衡的盐溶液 (HBSS) 中保温 30 分钟。然后用偶联了藻红蛋白，生物素或 Cychrome™ 的各种抗体以 1μg/ 百万细胞在相同的缓冲液中对细胞进行染色。使用生物素化的抗体时，用偶联了链霉抗生物素蛋白 (streptavidin) 的 PE-TR 偶联物 (Caltag，Burlingame，CA) 来检测。用相同的缓冲液洗涤两次后，用 Epics-XL 流式细胞仪 (flow cytometry) 系统 (Beckman Coulter Inc.，Fullerton，CA) 检测荧光。

[0128] 刺激同种异型 (allotypic)T 细胞：从 6-8 周龄 balb/c 小鼠的脾用两步分离法分离 CD4 和 CD62L 双阳性 T 细胞。首先，用阴性磁选择 (magneticselection)(Miltenyi，Auburn，CA) 除尽 (deplete) 其它细胞类型的 T 细胞。然后用抗 CD4 和 CD62L 的抗体标记这些细胞并在 MoFlo 分选仪 (sorter)(DakoCytomation，Fort Collins，CO) 上用 FACS 分选。用两步分离法分离均在 C57BL/6 背景中的野生型或 IL-29p19$^{-/-}$ 小鼠的树突细胞。用磁分离 (magnetic separation)(Miltenyi，Auburn，CA) 阳性选择 CD11c 阳性脾细胞后，用抗 CD11c，II 类 MHC，和 CD8 的抗体标记所述细胞。然后用 FACS，再用 MoFlo 分选仪分选

$CD11c^+/MHC\text{-}II^+/CD8^-$ 细胞。所有实验中使用的群是纯度至少 98%。为诱发同种异型刺激 (allostimulatory) 反应,在补充了青霉素-链霉素和 10%热灭活胎牛血清 (clone,Logan, UT) 的总共 200μl IMDM 中一式双份保温了 10^4 个树突细胞和 10^5 个 T 细胞。有些情况下,加入 100ng/ml 的细菌脂肽来刺激树突细胞产生细胞因子。保温 5 天后,取出 120μl 的上清来通过 ELISA 测量细胞因子,并置换为含有每孔 1μCi ^3H-胸苷的新鲜培养基。16 小时后用 Top Count 液体闪烁计数器 (liquid scintillationcounter)(Packard Instruments, Meriden,CT) 根据生产商的说明书确定胸苷掺入。

[0129] 体内 T 细胞分化 :将 75μg 的匙孔血蓝蛋白 (keyhole limpethemocyanin)(KLH) (Sigma, St.Louis, MO) 诸如每组的四只雄和四只雌的小鼠左后足垫用于免疫,其中所述匙孔血蓝蛋白在 30μlCFA(BD Biosciences, SanDiego, CA) 和 PBS1 ∶ 1 乳状液中。5 天后收获引流的 (Draining) 腹股沟 (inguinal) 和腘窝 (popliteal) 淋巴结并在补充了青霉素-链霉素,10%的热灭活胎牛血清 (Hyclone, Logan, UT),和 25μg/ml KLH 的 IMDM 中再刺激。就增殖试验而言,一式三份接种 200μl 的 5×10^5 个细胞到 96 孔板,使其增殖 112 小时,并在保温阶段的最后 18 小时每孔加入 1μCi ^3H-胸苷。用 Top Count 液体闪烁计数器 (Packard Instruments, Meriden, CT) 根据生产商的说明书确定胸苷掺入。就细胞因子分泌而言,在 48 孔板中保温 2.5×10^6 个细胞 1ml,并在 72 小时后收获上清。通过 ELISA 测定细胞因子分泌。所示数据是三个完整试验的一个代表。

[0130] 迟发型超敏反应 :在每组 6 只小鼠的腹部三个位置经皮下注射 200μg 甲基化的牛血清白蛋白 (mBSA)(Sigma,St.Louis,MO),所述血清白蛋白混合在总量为 200μl 的 CFA(BD Biosciences,San Diego,CA) 和 PBS 的 1 ∶ 1 乳状液中。在免疫后第 8 天,通过注射 20μl 5mg/ml PBS 中的 mBSA 到一个后 (rear) 足垫来攻击所述小鼠,而给予另一后足垫 20μl PBS。在攻击后 18,42,66 小时用一系列装了 7 根弹簧 (7spring-loaded) 的卡尺 (caliper) (Mitutoyo,City ofIndustry,CA) 测量足垫肿胀。通过注射了抗原和 PBS 的足垫之间的足垫厚度差别确定 DTH 反应的强弱 (magnitude)。

[0131] T 依赖性体液反应和免疫球蛋白分析 :为测量总免疫球蛋白水平,从 8 只雄的和 8 只雌的 6-9 周龄、各个基因型的未经免疫的小鼠获得血清。用 Luminex 珠试验 (Upstate, Lake Placid, NY) 测量总免疫球蛋白同种型的水平。为估计 OVA 特异性体液免疫反应,在第 0 日 (day 0) 用 CFA 中的 OVA 免疫每种基因型的 7 只小鼠 (4 只雄的和 3 只雌的),并在第 21 和 42 天用不完全福氏佐剂 (IFA)(Sigma, St.Louis, MO) 中的相同抗原对其加强免疫。为作血清分析,在免疫前和免疫后第 14,28 和 49 天通过眶后放血 (retro-orbital bleeding) 取血。以 OVA 作为俘获制剂 (capture agent) 和检测用的同种型特异性第二抗体,通过 ELISA 检测 OVA 特异性免疫球蛋白同种型。为了在 ELISA 的线性范围内,如下稀释血清样本 :对于 IgG1 为 1 ∶ 3125000,对于 IgG2a 为 1 ∶ 25000,对于 IgG2b 为 1 ∶ 625000,并且对于 IgG3, IgM, IgA 和 IgE 为 1 ∶ 1000。因为纯化的 OVA 特异性同种型不可购,用得自以前实验的 OVA-免疫小鼠的连续稀释的血清作为标准品。结果用任意单位 (arbitrary unit) 表示,其中最后放血 (last bleed) 的野生型组的均值被设为 100。为评估记忆 T 细胞对于体液反应的作用,在第 0 日用 CFA 中的 OVA 免疫任一基因型的 5-6 只小鼠的组,并在第 21 天用 IFA 中的 TNP_{11}-OVA 对其加强免疫。为作血清分析,在免疫前和免疫后第 14 和 28 天通过眶后放血来取血。通过 ELISA,用 TNP_{28}-BSA 作为俘获制剂和检测用的同种型特异性

第二抗体来检测 TNP 特异性免疫球蛋白同种型。对于 TNP- 特异性 IgG1，使用可购标准品。对于 TNP- 特异性 IgG2a，使用从以前实验中的 TNP 免疫小鼠获得的连续稀释的血清，并如上述计算结果。样本稀释度对于 IgG1 为 1 ： 31250 并且对于 IgG2a 为 1 ： 1250。

[0132] T 非依赖性体液反应：用 PBS 中的 50μg TNP_1-LPS 或 100μgTNP_{20}-AECM-Ficoll 经腹膜内免疫每个基因型的 6 只小鼠的组。10 天后收获血清，并通过 ELISA，用 TNP_{28}-BSA 作为俘获制剂和检测用的 IgM 特异性第二抗体来分析 TNP- 特异性 IgM。用 TNP 特异性 IgM 抗体作为 ELISA 的标准品：样本稀释度对于 Ficoll 为 1 ： 1280，对于 LPS 为 1 ： 5120。

[0133] 结果

[0134] 缺失 IL-23p19 基因。为确定 IL-23 的非丰余 (non-redundant) 体内效应，产生了 IL-23 缺失但能够产生 IL-12 的小鼠。构建靶向载体，其中 4 个外显子组成的 p19 完整编码区被增强的 GFP(eGFP) 报道基因和新霉素抗性盒取代 (图 6)。在两个正确靶向的 ES 细胞克隆 1c5 和 3h6 得到种系传递，并用每个染色体 3 个标记物高速同类系法 (speed congenics) 以将突变回交 (backcross) 到 C57BL/6 背景中。基于此分析，只选择来自 129 背景的遗传污染对于实验而言少于 5％的实验的小鼠。eGFP 表达的模式与内源性 p19mRNA(数据未示) 可比。

[0135] IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠无明显表型。如 IL-23/IL-12 双缺陷的 IL-12p40$^{-/-}$ 小鼠的表型那样，IL-23p1$^{-/-}$ 动物不表现任何明显表型，其出生符合孟德尔频率 (mendelian frequencies)。经组织病理检查未发现器官异常，并且进一步分析临床化学和血液参数发现野生型和敲除动物之间无差异。另外，IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠的大小和体重正常，并且两性都是完全可育的。通过流式细胞术分析胸腺细胞，脾细胞和外周血白细胞的多种细胞表面标记物表明，野生型和 IL23p 19$^{-/-}$ 动物之间无任何显著不同 (表 2)。因为已知 IL-23 作用于记忆 T 细胞，我们测定了每个亚型的记忆细胞 (CD44^{高}CD62L^{-}) 与原初 (CD62L^{+}) 细胞的比率，但野生型和 IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠之间未发现不同。在整个分析中，两个基因型之间唯一可见的不同在于树突细胞亚群略偏向 CD8^{+} 表型。在此效应不明显 (minor) 时，由于数据的紧密性 (tightness) 它具有统计学显著意义，这与近来观察到的 IL-23 对抗原递呈细胞有作用是一致的。总而言之，正常发育没有显示需要 IL-23，并且引入 eGFP 盒不会对任何所检验的细胞类型有毒性作用。

[0136] 表 2

[0137] 胸腺

[0138]		野生型		敲除		P(diff.)
[0139]	CD4+	5.7	+/- 0.5	5.5	+/- 0.0	0.504
[0140]	CD8+	3.3	+/- 0.1	3.1	+/- 0.3	0.397
[0141]	DN	25.0	+/- 4.2	17.0	+/- 8.0	0.202
[0142]	DP	65.9	+/- 3.7	74.3	+/- 8.0	0.174

[0143] 脾

[0144]		野生型		敲除		P(diff.)
[0145]	CD4+	24.3	+/- 0.8	22.5	+/ -2.7	0.342
[0146]	%naīve	69.0	+/- 1.3	67.5	+/ -2.1	0.090
[0147]	%memory	29.1	+/- 1.2	31.0	+/ -1.9	0.029
[0148]	CD8+	15.2	+/- 1.2	12.3	+/ -2.0	0.101
[0149]	%naīve	64.1	+/- 54	67.0	+/ -2.8	0.199
[0150]	%memory	18.1	+/- 1.8	18.3	+/ -1.4	0.084

[0151]		I-A(b)+/CD11c+	2.0	+/-	0.2	2.2	+/ -0.2	0.041
[0152]		%CD8+	12.8	+/-	0.9	16.3	+/ -1.7	0.000
[0153]		%CD8-	87.2	+/-	0.9	83.6	+/ -1.8	0.000
[0154]		CD19+	52.4	+/-	2.0	55.2	+/ -6.5	0.512
[0155]		B220+	52.0	+/-	2.0	55.5	+/ -5.3	0.360
[0156]		NK1.1+	3.2	+/-	0.1	2.8	+/ -0.1	0.055
[0157]	外周血		野生型			敲除		P(diff.)
[0158]		CD3+	47.9	+/-	2.6	44.9	+/- 3.6	0.053
[0159]		CD4+	28.2	+/-	2.3	26.9	+/- 2.5	0.270
[0160]		CD8+	16.5	+/-	0.8	15.6	+/- 1.7	0.150
[0161]		CD19+	43.2	+/-	3.2	45.2	+/- 3.6	0.215
[0162]		B220+	44.9	+/-	3.5	46.4	+/- 4.8	0.466
[0163]		DX5+	9.9	+/-	3.0	9.7	+/- 5.0	0.929
[0164]		CD16+	8.0	+/-	0.9	8.6	+/- 1.5	0.302
[0165]		I-A(b)+	44.0	+/-	1.9	45.4	+/- 4.9	0.428

[0166] IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠的体液免疫反应。为确定 IL-23 在产生体液免疫反应中的作用，首先测量任何基因型的 16 只小鼠血清中的所有免疫球蛋白同种型总水平。野生型和 IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠之间没有显著的统计学意义上的不同（图 7），这表明 IL-23 不是保持正常的免疫球蛋白水平必需的。另外，我们确定了 IL-23 是否参与产生针对在佐剂中递送的蛋白抗原的 T 依赖性体液反应。至此为止，用卵清蛋白 (OVA) 免疫每组 7 只小鼠，，并在两次连续免疫的每一次之后（图 8）估计前血清 (preserum) 中 OVA- 特异性免疫球蛋白同种型（都为阴性，数据未示）。初次免疫后，所有组的 OVA 特异性 IgG1，IgG2b，IgG3，和 IgE 都无显著不同。然而，初次免疫后观察到 IL-23p19$^{-/-}$ 和 IL-12p40$^{-/-}$ 动物的 OVA 特异性 IgG2a 和 IgA 水平显著下降。如预期那样，再次免疫后所有同种型的水平都急剧升高。此时，IL-23p19$^{-/-}$ 和 IL-12p40$^{-/-}$ 小鼠显示所有被检测的同种型明显下降。这两个基因型之间的不同通常并不显著，这表明内源性 IL-12 在 IL-23 缺无的体液反应中不起主要作用。

[0167] 因为体液免疫反应依赖于 B 和 T 细胞的适当功能，随后我们意图确定是什么机制使 IL-23 起刺激作用。为确定 B 细胞功能是否直接受 IL-23 缺无的影响，我们测定了 IL-23 缺陷的小鼠启动 (mount) 抗 T 非依赖性 (TI) 抗原的 B 细胞反应的能力。TI-1 抗原三硝基苯基 -(TNP-)LPS 导致经由 CD14 和 TLR4 激活 B 细胞，而 TI-2 抗原 TNP-Ficoll 通过表面 B 细胞受体簇集 (clustering) 激活 B 细胞。IL-23 p19$^{-/-}$ 小鼠启动了对两种抗原的正常 B 细胞反应（图 9），表明 IL-23 在 T 非依赖性 B 细胞反应中不起作用。另外，IL-23 p19$^{-/-}$ 小鼠的 B 细胞应 LPS，抗 IgM，和抗 CD40 在体外正常增殖，并且应 IL-4 经历正常同种型转换 (switching)（未示）。IL-23 刺激 B 细胞不使增殖或同种型转换增加（未示），因此我们得出结论 IL-23 不直接影响 B 细胞功能。

[0168] 因为体液免疫反应主要在再次免疫阶段被削弱 (compromise)，并因为 B 细胞功能在 IL-23p1$^{-/-}$ 小鼠表现正常，我们假设可能由于抗原特异性辅助性 T 细胞的低效 (inefficient) 再活化而造成此表型。为更直接说明这个问题，我们在第 0 天用 OVA 免疫了数个 5-6 只小鼠的组，之后用 TNP 偶联的 OVA 在第 14 天再次免疫。用此免疫方案 (regimen)，经由再次免疫再次活化对 OVA 特异的记忆 T 细胞，但在第二个时间点只有新的一组对 TNP 有特异性的 B 细胞被活化。因此，所述 OVA 特异性记忆 B 细胞亚型不对 TNP- 特异性免疫球蛋白的形成起作用。增强 (booster) 后 7 天，我们测定了血清中的 TNP 特异性 IgG1 和

IgG2a，并且发现两种同种型都在 IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠显著降低（图 10A，B）。此结果进一步说明了 IL-23 在 T 依赖性 B 细胞反应中的重要性。

[0169] IL-23 p19$^{-/-}$ 小鼠中的迟发型超敏 (DTH) 反应。为进一步调查记忆 CD4^{+} 细胞在 IL-23p1$^{-/-}$ 小鼠的作用，评估这些动物启动 DTH 反应的能力。DTH 反应为强 T 细胞依赖性，过去报道它在 IL-12 p40$^{-/-}$ 小鼠是缺陷的 (defective)，但在缺无 IL-12 p35 的小鼠中呈正常，这提示它们可能被 IL-23 介导。针对此问题，我们用完全福氏佐剂 (CFA) 中的甲基化 BSA(mBSA) 使野生型，IL-23p19$^{-/-}$，和 IL-12p40$^{-/-}$ 组（每组 6 只）的动物致敏，并在 7 天后通过注射 mBSA 到足垫来诱发 DTH 反应。为作非特异性肿胀的对照，我们也攻击了一组未致敏化的野生型小鼠。攻击后 18，42，和 66 小时测量特异性足垫肿胀，发现与野生型小鼠相比，特异性足垫肿胀可在 IL-12p40$^{-/-}$ 和 IL-23p1$^{-/-}$ 小鼠以类似程度被抑制（图 11）。动力学也是类似的，在 IL-12p40$^{-/-}$ 和 IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠都显示在 42 和 66 而不是 18 小时的时间点有力地减轻肿胀。因此，IL-23 是 DTH 反应的主要介质，并且 IL-23 缺陷导致记忆 CD4^{+}T 细胞反应低效。

[0170] IL-23p19$^{-/-}$ 树突细胞刺激 T 细胞的能力。为排除在 IL-23p1$^{-/-}$ 小鼠观察到的缺陷是由于 IL-23 缺陷抗原递呈细胞的低效 T 细胞引发造成的可能性，我们又观察了 IL-23 p19$^{-/-}$DC 刺激分离自 balb/c 小鼠脾的同种型原初 CD4^{+}T 细胞的能力。缺无 DC 时，这些 T 细胞既不增殖也不分泌可观察量的细胞因子（图 12A）。加入任一种基因型的 DC 使得两种基因型强 (robust) 增殖并产生 IL-2。我们已经显示 IL-23 是 IL-17 的有效 (potent) 诱导物，之后我们又用细菌脂肽诱导 DC 产生 IL-23，所述细菌脂肽是有效的 Toll- 样受体 -(TLR-)2 激动剂和产生 IL-23 的诱导物。所以这种情况下，wt DC 有力地诱导 T 细胞产生 IL-17（图 12A，底组），而用 IL-23p19$^{-/-}$DC 刺激的 T 细胞产生明显更少的 IL-17。为在更生理化的设置 (more physiological setting) 中确认这些观察数据，我们又用完全福氏佐剂 (CFA) 中的匙孔血蓝蛋白 (KLH) 免疫数个 8 只小鼠的组来诱发体内 T 细胞反应。5 天后收获引流的淋巴结细胞 (LNC) 并用 KLH 在体外再刺激。我们又观察到从 IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠收获的 LNC 产生明显更少的 IL-17（图 12B，底组）。两个基因型中的 LNC 增殖是可比的（图 12B，顶组），这表明 wt 和 IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠启动了针对所述抗原的强 T 细胞反应。因此，IL-23 缺陷不严重 (grossly) 损害树突细胞的刺激能力，但使 T 细胞产生 IL-17 减少。

[0171] 讨论

[0172] 用 IL-23p19 缺陷的小鼠评估 IL-23 的并不丰富体内功能，发现 IL-23 缺陷使 T 细胞依赖性免疫反应，如体液免疫反应和 DTH 反应减弱。

[0173] 在 IL-23p19$^{-/-}$ 小鼠观察到显著降低的体液免疫反应，它影响到所有的免疫球蛋白同种型。同样 (in parallel)，IL-12p40$^{-/-}$ 小鼠的反应被抑制到类似或稍高水平。我们的结果支持如下结论：即有效的体液反应绝对需要 IL-23，而仍需要通过使用 IL-12p35$^{-/-}$ 小鼠来确定是否 IL-23 对于 IL-12 缺无时的正常体液反应是足够的。

[0174] 总而言之，IL23p19$^{-/-}$ 小鼠的体内 T 细胞反应减弱，其明显表现为 DTH 和体液免疫反应减弱，并且在表型上类似 IL-17 缺陷的小鼠。我们的结果表明，临床给药 IL-23 或其激动剂可能有益于在免疫方案和免疫受损的病人中支持 T 细胞。

[0175] 虽然已经参考被认为是具体的实施方案描述了本发明，仍应理解本发明不限于所述实施方案。相反，本发明应包括在所附权利要求的精神和范围内的多种修改和等同替代。

[0176] 序列表

[0177] <110>Gurney,Austin

[0178] <120>IL-17 产生的抑制

[0179] <130>39766/0125

[0180] <140> 未知

[0181] <141>2003-10-30

[0182] <150>60/423,090

[0183] <151>2002-10-30

[0184] <160>8

[0185] <170>FastSEQ for Windows Version 4.0

[0186] <210>1

[0187] <211>21

[0188] <212>DNA

[0189] <213> 人工序列

[0190] <400>1

[0191] gcttggtggc ccacctatga t 21

[0192] <210>2

[0193] <211>20

[0194] <212>DNA

[0195] <213> 人工序列

[0196] <400>2

[0197] agaccctcaa agttcatgac 20

[0198] <210>3

[0199] <211>20

[0200] <212>DNA

[0201] <213> 人工序列

[0202] <400>3

[0203] ctgacggcgc tttctctacc 20

[0204] <210>4

[0205] <211>20

[0206] <212>DNA

[0207] <213> 人工序列

[0208] <400>4

[0209] ttttgccagt gggatacacc 20

[0210] <210>5

[0211] <211>20

[0212] <212>DNA

[0213] <213> 人工序列

[0214] <400>5

[0215] aactgctggg gctgttacac 20

[0216] <210>6

[0217] <211>20

[0218] <212>DNA

[0219] <213> 人工序列

[0220] <400>6

[0221] gcctgggctc acttttttctg 20

[0222] <210>7

[0223] <211>20

[0224] <212>DNA

[0225] <213> 人工序列

[0226] <400>7

[0227] gcgtgaaggg caaggacacc 20

[0228] <210>8

[0229] <211>20

[0230] <212>DNA

[0231] <213> 人工序列

[0232] <400>8

[0233] agggggagga ttgggaagac 20

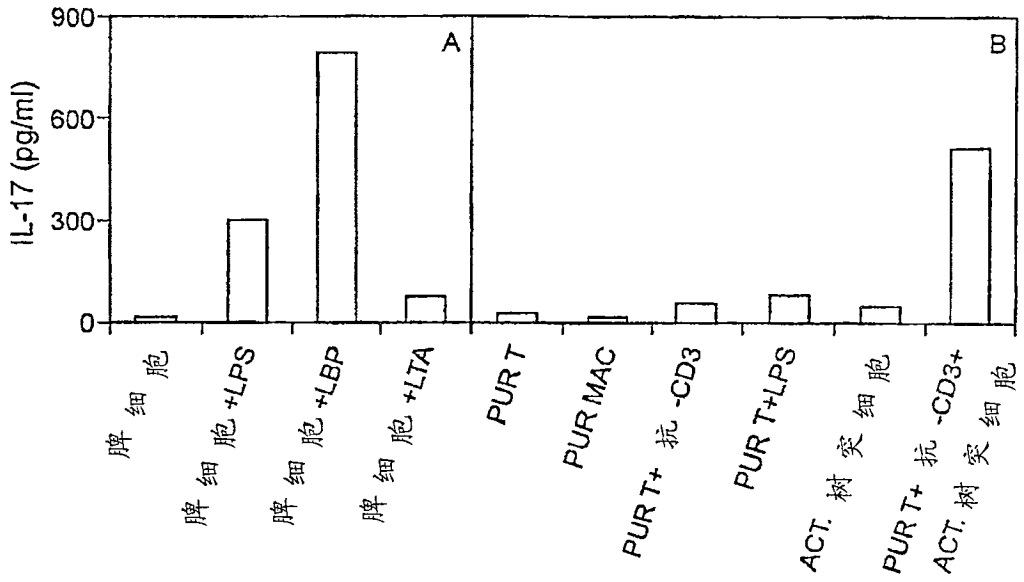

900
600
300
0
IL-17 (pg/ml)
A
B
脾细胞
脾细胞+LPS
脾细胞+LBP
脾细胞+LTA
PUR T
PUR MAC
PUR T+抗-CD3
PUR T+LPS
ACT.树突细胞
PUR T+抗-CD3+
ACT.树突细胞

图 1

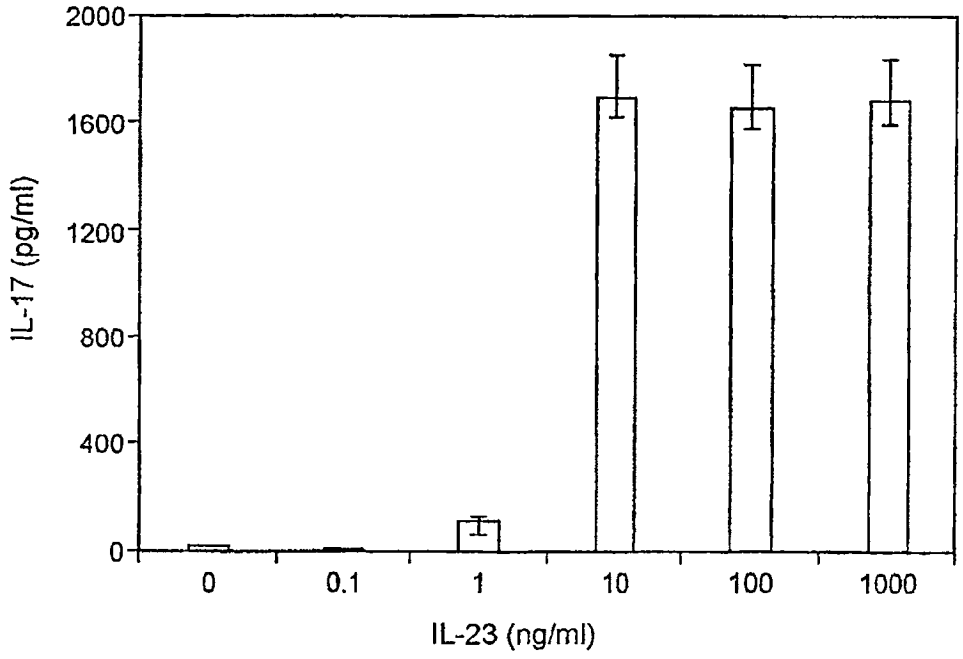

2000
1600
1200
800
400
0
IL-17 (pg/ml)
0
0.1
1
10
100
1000
IL-23 (ng/ml)

图 2A

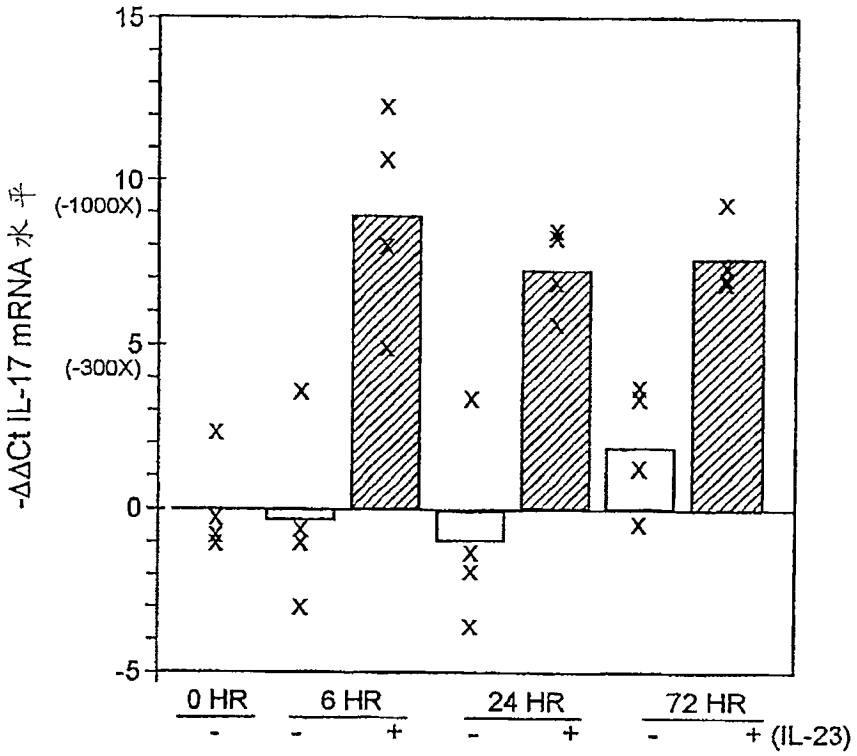

15
10
(-1000X)
5
(-300X)
0
-5
-ΔΔCt IL-17 mRNA 水平
0 HR
6 HR
24 HR
72 HR
- - + - + - + (IL-23)

图 2B

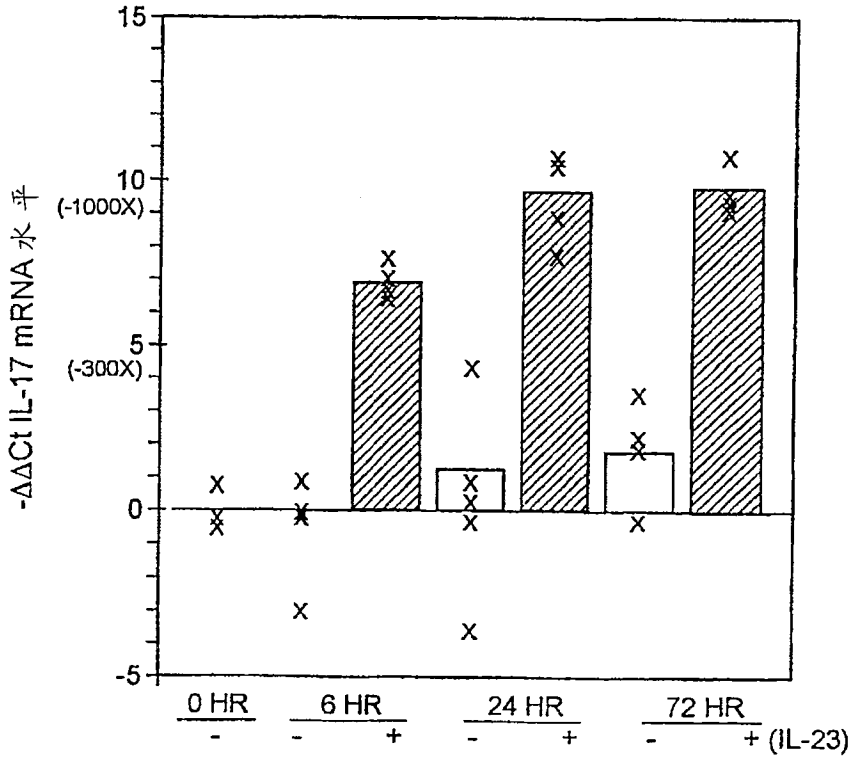

15
10
(-1000X)
5
(-300X)
0
-5
-ΔΔCt IL-17 mRNA 水平
0 HR
6 HR
24 HR
72 HR
- - + - + - + (IL-23)

图 2C

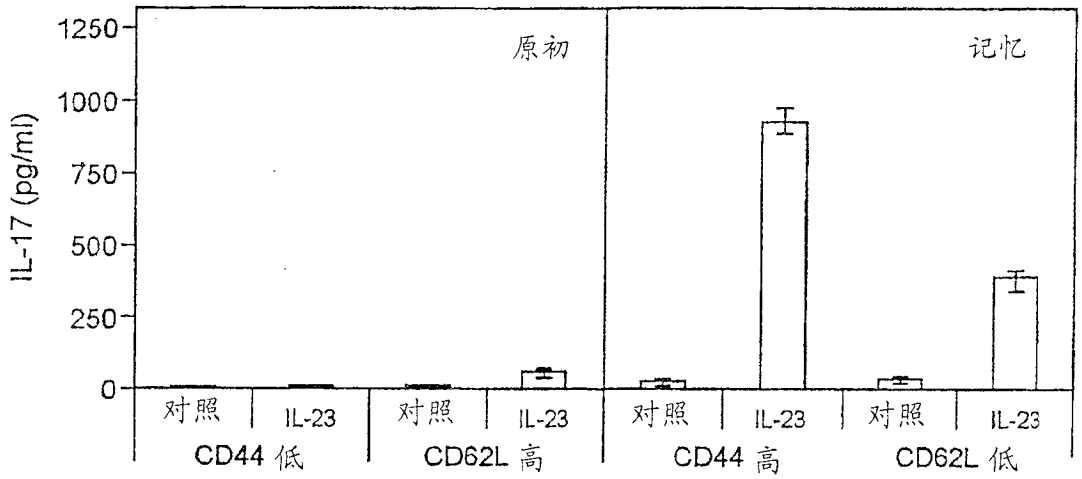

1250
1000
750
500
250
0
IL-17 (pg/ml)
原初
记忆
对照
IL-23
对照
IL-23
对照
IL-23
对照
IL-23
CD44 低
CD62L 高
CD44 高
CD62L 低

图 3

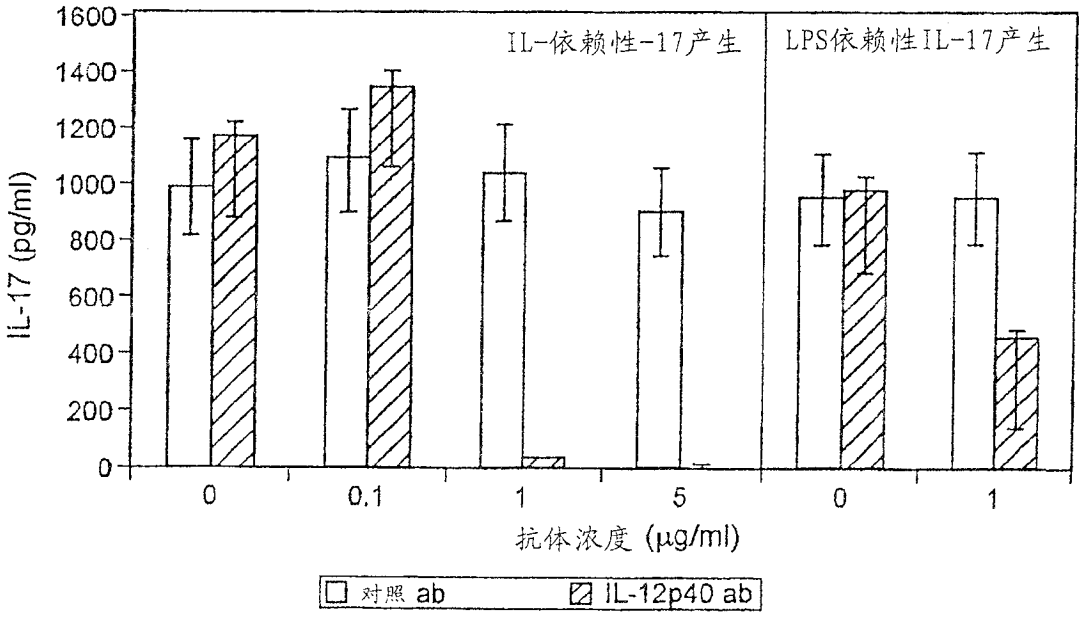

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IL-17 (pg/ml)
IL-依赖性-17产生
LPS依赖性IL-17产生
0
0.1
1
5
0
1
抗体浓度 (μg/ml)
对照 ab
IL-12p40 ab

图 4A

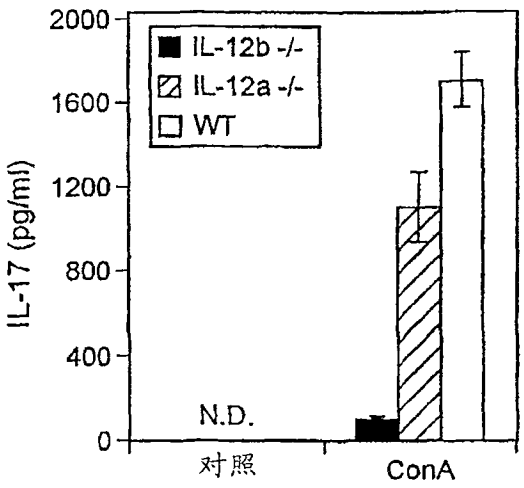

2000
1600
1200
800
400
0
IL-17 (pg/ml)
IL-12b -/-
IL-12a -/-
WT
N.D.
对照
ConA

图 4B

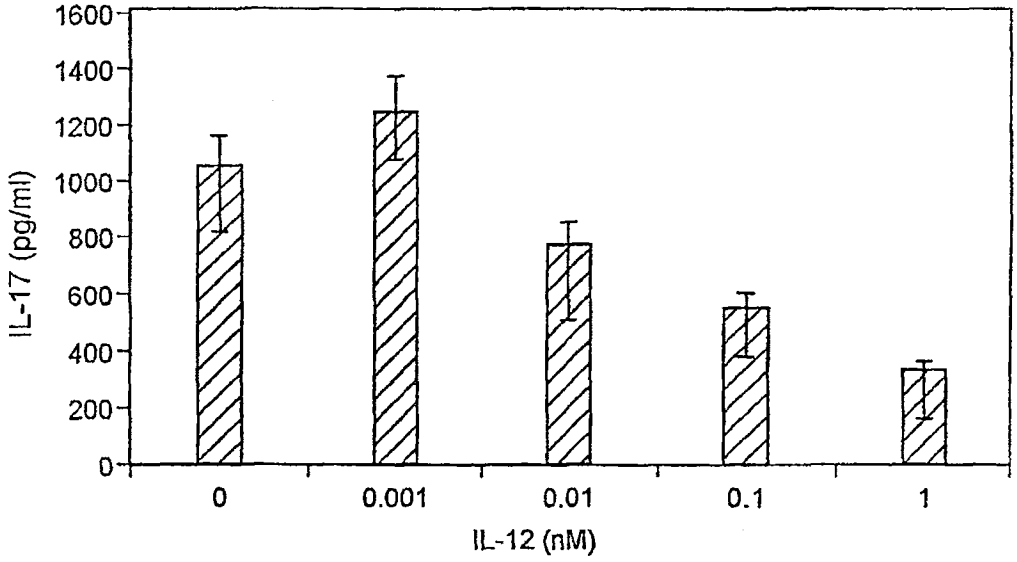

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IL-17 (pg/ml)
0
0.001
0.01
0.1
1
IL-12 (nM)

图 5A

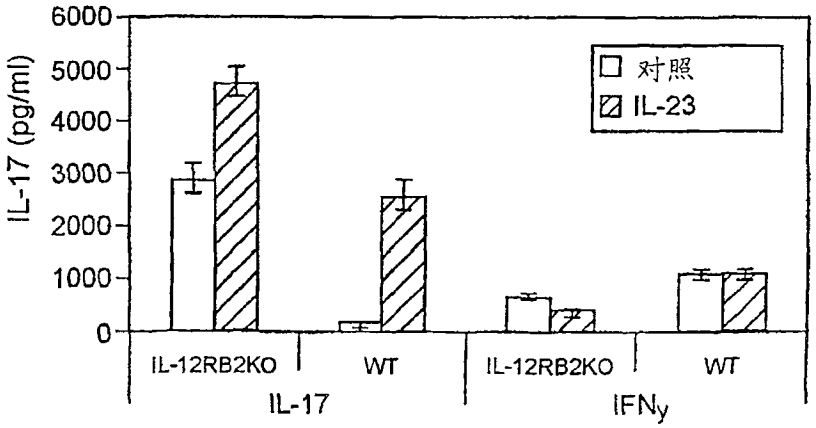

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IL-17 (pg/ml)
对照
IL-23
IL-12RB2KO
WT
IL-12RB2KO
WT
IL-17
IFNγ

图 5B

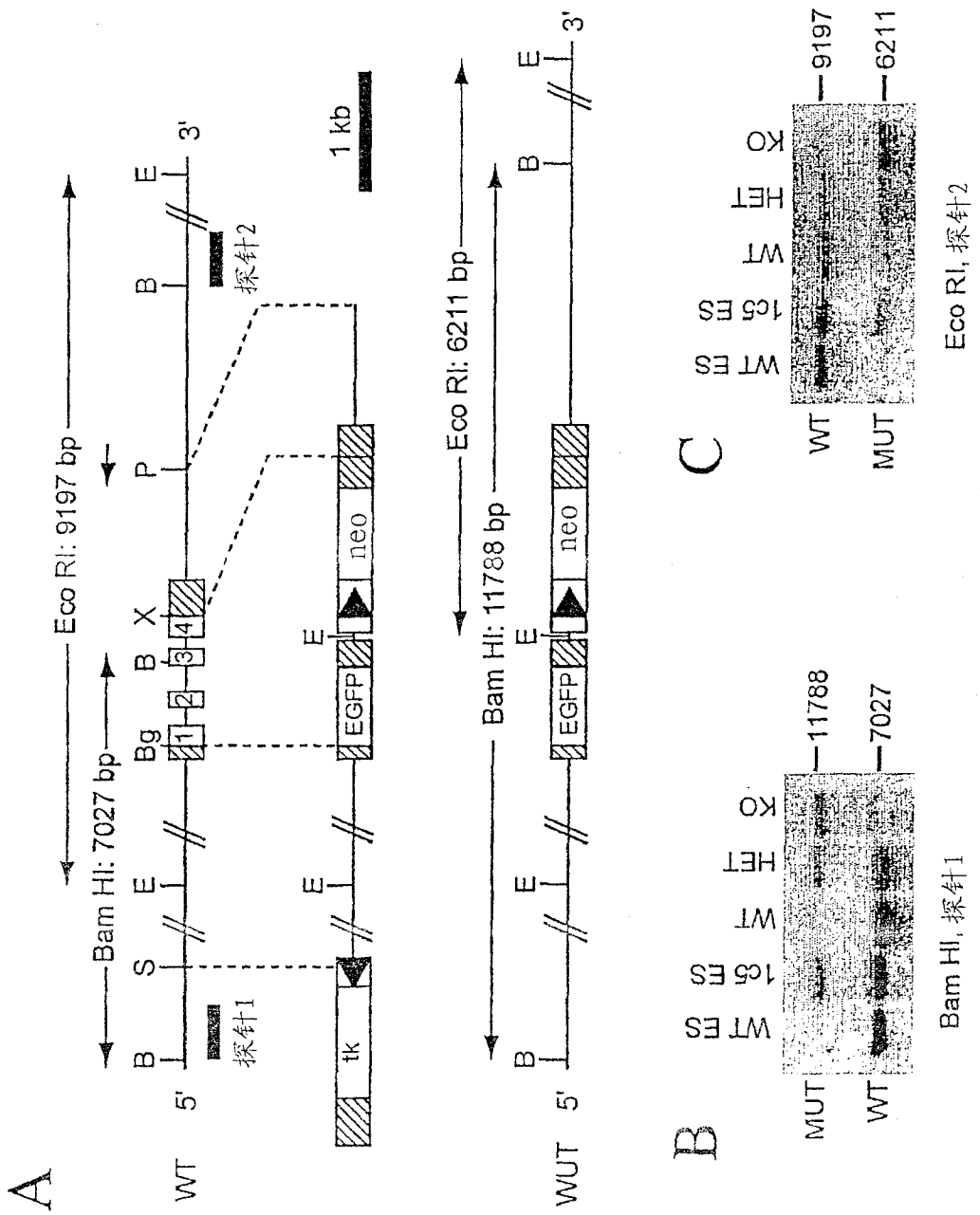

A
WT
5'
B
S
E
探针1
Bam HI: 7027 bp
Eco RI: 9197 bp
Bg
1
2
3
4
B
X
P
B
E
3'
探针2
1 kb
tk
EGFP
neo
E
E
WUT
5'
B
E
Bam HI: 11788 bp
Eco RI: 6211 bp
EGFP
neo
B
E
3'
B
MUT
WT
WT ES
165 ES
WT
HET
KO
11788
7027
Bam HI, 探针1
C
WT
MUT
WT ES
165 ES
WT
HET
KO
9197
6211
Eco RI, 探针2

图 6

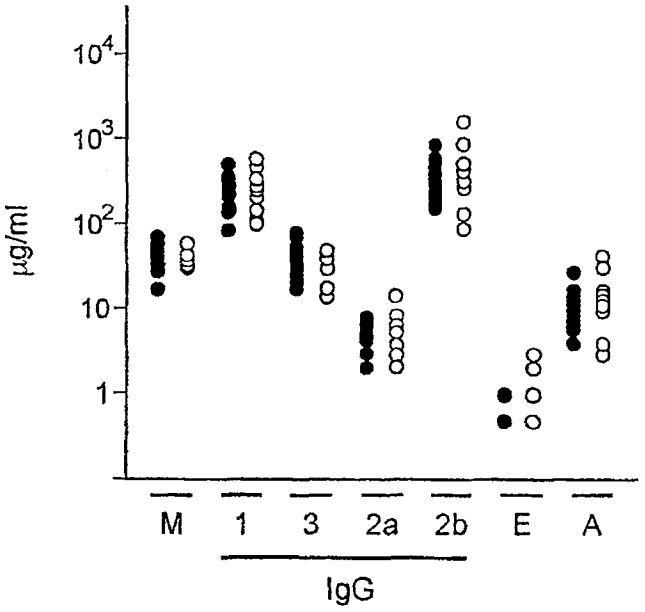

µg/ml
10^4
10^3
10^2
10
1
M
1
3
2a
2b
E
A
IgG

图 7

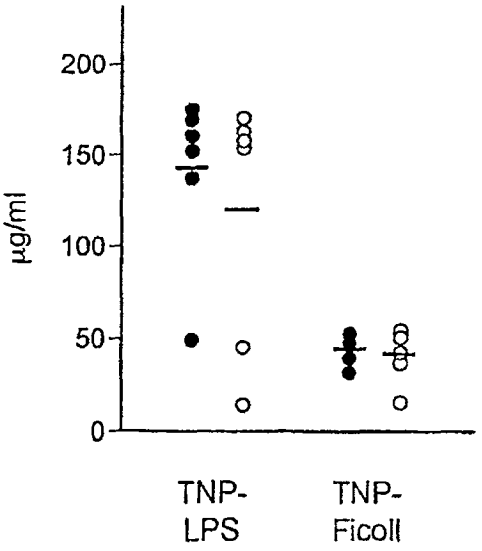

µg/ml
200
150
100
50
0
TNP-LPS
TNP-Ficoll

图 9

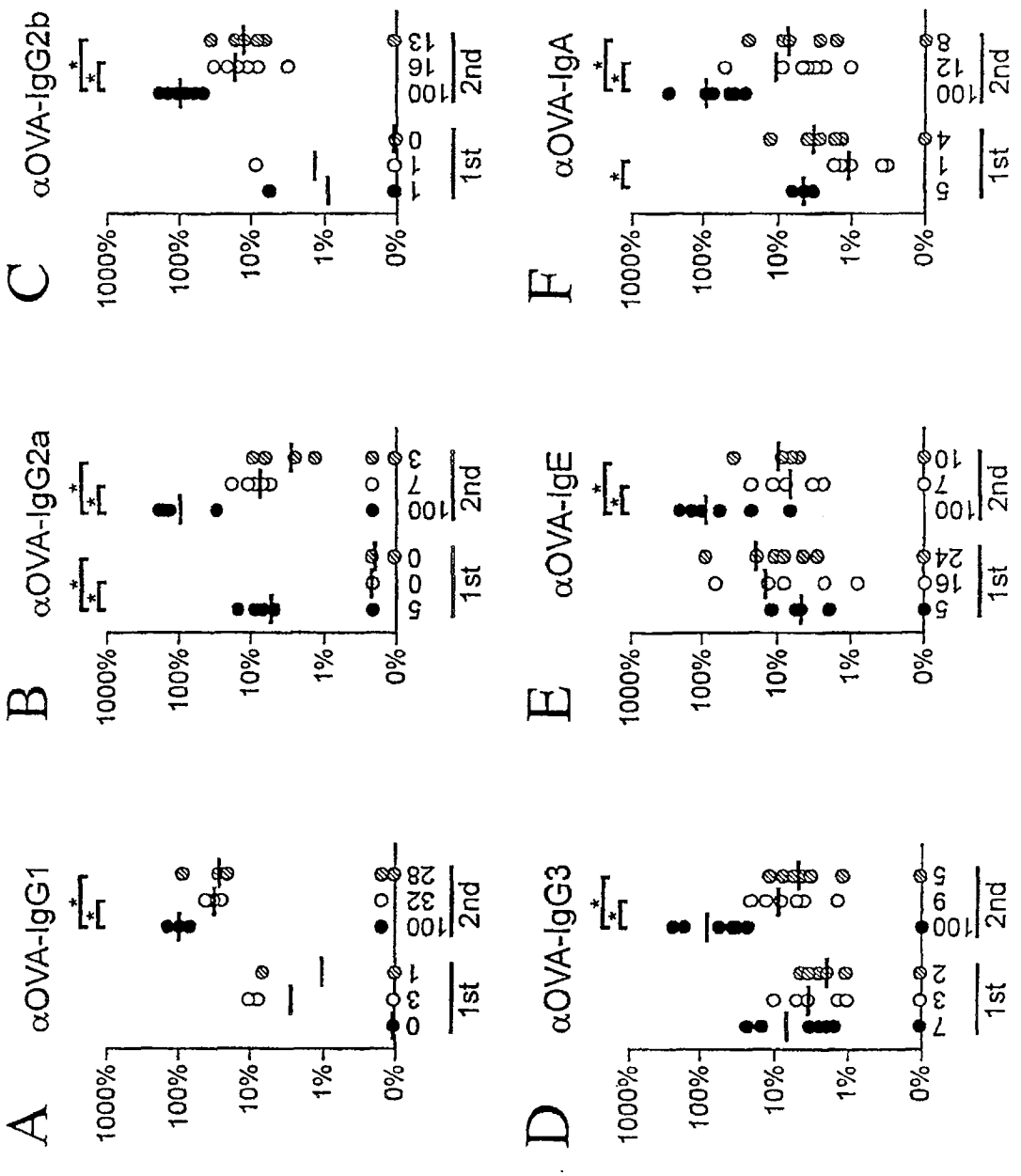

A
αOVA-IgG1
B
αOVA-IgG2a
C
αOVA-IgG2b
D
αOVA-IgG3
E
αOVA-IgE
F
αOVA-IgA
1000%
100%
10%
1%
0%
1st
2nd

图 8

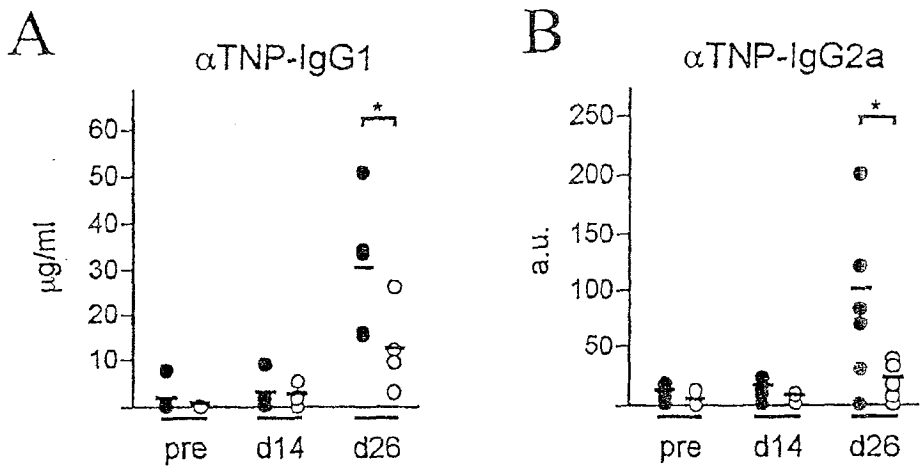

A
αTNP-IgG1
μg/ml
60
50
40
30
20
10
pre
d14
d26
B
αTNP-IgG2a
a.u.
250
200
150
100
50
pre
d14
d26

图 10

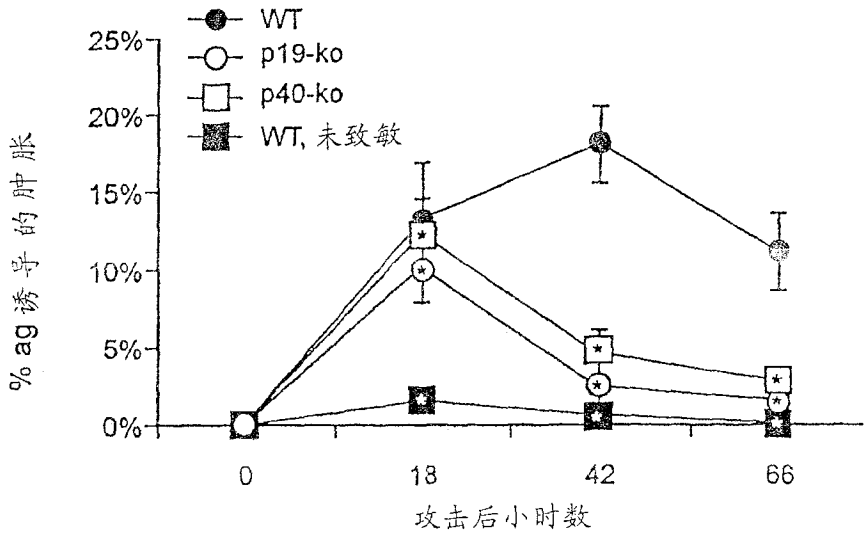

WT
p19-ko
p40-ko
WT, 未致敏
% ag 诱导的肿胀
25%
20%
15%
10%
5%
0%
0
18
42
66
攻击后小时数

图 11

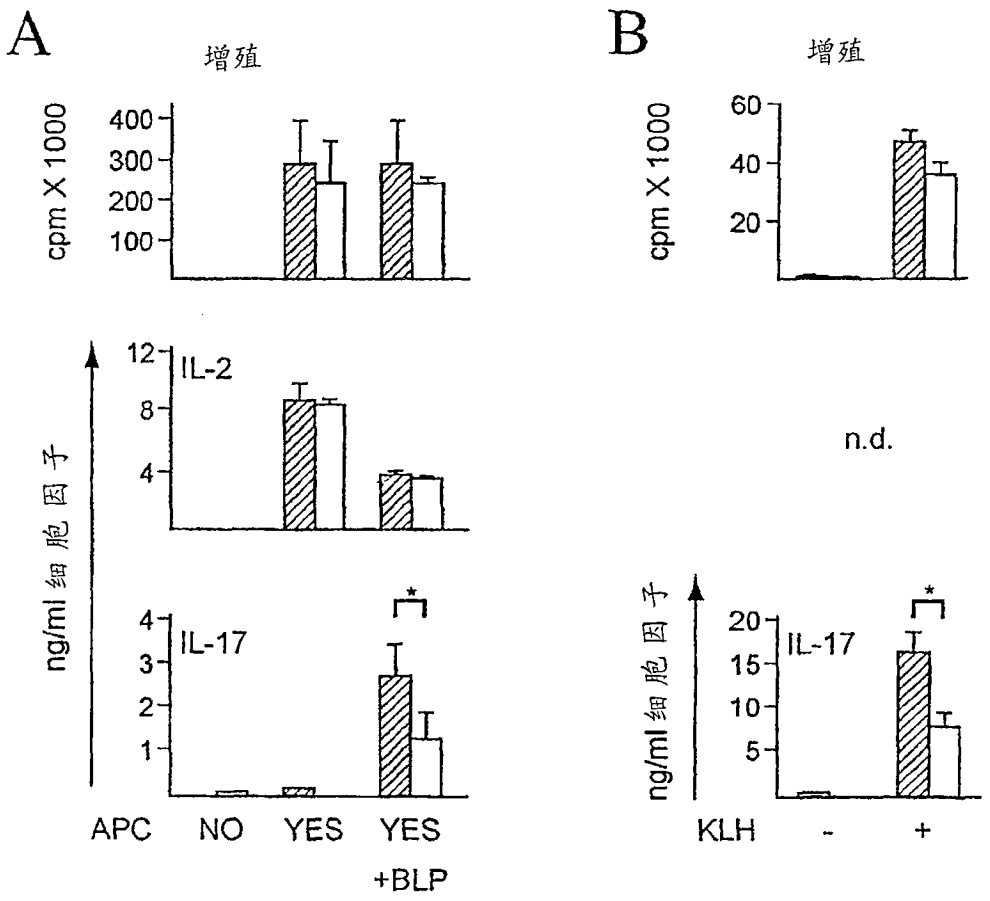

A
增殖
cpm X 1000
400
300
200
100
IL-2
12
8
4
IL-17
4
3
2
1
ng/ml 细胞因子
APC NO YES YES
+BLP
B
增殖
cpm X 1000
60
40
20
n.d.
IL-17
20
15
10
5
ng/ml 细胞因子
KLH - +

图 12