

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00814212.2

[43] 公开日 2002 年 11 月 13 日

[11] 公开号 CN 1379859A

[22] 申请日 2000.10.13 [21] 申请号 00814212.2

[30] 优先权

[32] 1999.10.15 [33] DK [31] PA199901486

[86] 国际申请 PCT/DK00/00579 2000.10.13

[87] 国际公布 WO01/29562 英 2001.4.26

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.12

[71] 申请人 诺沃奇梅兹有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 E·L·罗根

S·厄斯特

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事  
务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 6 页 说明书 27 页 附图 5 页

[54] 发明名称 用于评估变应原性的方法

[57] 摘要

本发明涉及用于评估待测化合物的变应原性或毒性和用于同时筛选至少两种化合物的方法。本发明还涉及用于本发明的细胞类型的鉴定方法,以及用于化合物高通量筛选的鉴定试剂盒。通过使至少一种动物起源的细胞类型的细胞培养物接触待测化合物并测量细胞因子应答,可以评估待测化合物的变应原性。

1. 用于在体外评估待测化合物的变应原性的方法，包括下列步骤：

(a) 获得预先确定和预先鉴定的包含至少一种动物（包括人）起源细胞类型的细胞培养物，所述细胞类型能够与待测化合物发生显著的非特异性相互作用并在相互作用后以细胞因子表达的变化进行应答；

(b) 使细胞培养物接触待测化合物；

(c) 通过就至少一种预先确定的细胞因子测定展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用的细胞的细胞因子应答，来确定特定细胞因子模式；并

(d) 使细胞因子模式与待测化合物的变应原性相互关联。

2. 用于同时筛选至少两种待测化合物的变应原性的方法，包括下列步骤：

a) 在权利要求1中确定的细胞培养物的至少两个分开的区室中安排特定细胞类型；

b) 使分开的细胞培养物区室分别接触待测化合物；

c) 通过对展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用的相应细胞测定细胞因子应答来确定特定细胞因子模式；并

d) 使每种细胞因子模式与待测化合物的变应原性相互关联。

3. 权利要求1或2的方法，其中所述至少一种细胞类型是上皮细胞。

4. 权利要求3的方法，其中上皮细胞是呼吸道上皮细胞。

5. 权利要求3的方法，其中上皮细胞是胃肠道上皮细胞。

6. 权利要求1或2的方法，其中所述至少一种细胞类型是角质细胞。

7. 权利要求1或2的方法，其中所述至少一种细胞类型是树突细胞。

8. 权利要求1或2的方法，其中所述至少一种细胞类型是巨噬细胞。
9. 权利要求1或2的方法，其中所述至少一种细胞类型是肥大细胞。
10. 权利要求1或2的方法，其中所述至少一种细胞类型是单核细胞。
11. 权利要求1或2的方法，其中所述至少一种细胞类型是内皮细胞。
12. 前述任一权利要求的方法，包括下列步骤：
  - (a) 获得至少两种细胞培养物，每种包含一种细胞类型；
  - (b) 使每种细胞培养物接触待测化合物；
  - (c) 通过对各自展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用的相应细胞培养物测定细胞因子应答来确定特定细胞因子模式；并
  - (d) 使细胞因子模式与待测化合物的变应原性相互关联。
13. 权利要求12的方法，其中将两种细胞类型共培养。
14. 权利要求12的方法，其中为所述两种细胞类型分别测定其细胞因子应答。
15. 权利要求12的方法，其中所述两种细胞类型的细胞因子应答作为一种应答测定。
16. 权利要求12的方法，其中共培养物中的所述两种细胞类型在物理上是分开的。
17. 权利要求12-16任一项的方法，其中一种细胞类型是上皮细胞，另一种是树突细胞。
18. 权利要求12-16任一项的方法，其中一种细胞类型是上皮细胞，另一种是巨噬细胞。
19. 权利要求12-16任一项的方法，其中一种细胞类型是上皮细胞，另一种是肥大细胞。
20. 权利要求12-16任一项的方法，其中一种细胞类型是上皮细胞，另一种是单核细胞。

21. 权利要求12-16任一项的方法，其中一种细胞类型是上皮细胞，另一种是内皮细胞。

22. 用于在体外评估待测化合物的毒性的方法，包括：

(a) 获得预先确定和预先鉴定的包含至少一种动物（包括人）起源细胞类型的细胞培养物，所述细胞类型能够与待测化合物发生显著的非特异性相互作用并在相互作用后以细胞因子表达进行应答；并

(b) 使细胞培养物接触待测化合物；

(c) 通过就至少一种预先确定的细胞因子测定展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用的细胞的细胞因子应答，来确定特定细胞因子模式；并

(d) 使细胞因子模式与待测化合物的毒性相互关联。

23. 用于同时筛选至少两种待测化合物的毒性的方法，包括：

(a) 在至少两个分开的区室中安排权利要求22中确定的细胞培养物；

(b) 使细胞培养物各自接触待测化合物；

(c) 通过对展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用的相应细胞测定细胞因子应答来确定特定细胞因子模式；并

(d) 使每种细胞因子模式与待测化合物的毒性相互关联。

24. 权利要求1-23任一项的方法，其中待测化合物是蛋白质。

25. 权利要求1-23任一项的方法，其中待测化合物是糖蛋白。

26. 权利要求1-23任一项的方法，其中待测化合物是脂蛋白。

27. 权利要求1-23任一项的方法，其中待测化合物是蛋白脂。

28. 权利要求1-23任一项的方法，其中待测化合物是磷脂。

29. 权利要求24-28任一项的方法，其中待测化合物是酶或其变体。

30. 权利要求1-29任一项的方法，其中待测化合物用于酶配方。

31. 权利要求1-21任一项的方法，其中待测化合物是半抗原。

32. 权利要求1-31任一项的方法，其中待测化合物是药物。

33. 权利要求31的方法，其中待测化合物是化妆品化合物。

34. 权利要求22 - 23的方法，其中待测化合物是有机溶剂。
35. 权利要求31的方法，其中待测化合物是染料。
36. 权利要求31的方法，其中待测化合物是金属。
37. 上述权利要求任一项的方法，其中所述至少一种细胞类型衍生自人类组织。
38. 权利要求1 - 37的方法，其中所述至少一种细胞类型衍生自人类血液。
39. 上述权利要求任一项的方法，其中胞外细胞因子应答是通过酶联免疫吸附测定法进行分析而测定的。
40. 上述权利要求1 - 38任一项的方法，其中胞内细胞因子应答是通过酶联免疫吸附测定法进行分析而测定的。
41. 上述权利要求1 - 38任一项的方法，其中细胞因子应答是通过原位杂交技术而测定的。
42. 上述权利要求1 - 38任一项的方法，其中细胞因子应答是通过聚合酶链式反应（PCR）技术的分析而测定的。
43. 权利要求42的方法，其中细胞因子因子是通过定量PCR技术的分析而测定的。
44. 权利要求42的方法，其中细胞因子应答是通过原位PCR技术的分析而测定的。
45. 权利要求41 - 44的方法，其中测定胞内mRNA。
46. 权利要求1或22的方法，其中测定了待测化合物在展示与其发生显著的非特异性相互作用的细胞中诱导的膜标记。
47. 权利要求46的方法，其中测定的膜标记是VCAM-1或ICAM-1。
48. 上述权利要求任一项的方法，其中测定了超过一种的细胞因子。
49. 权利要求48的方法，其中测定了至少两种细胞因子。
50. 权利要求48的方法，其中测定了至少四种细胞因子。
51. 权利要求48的方法，其中所测定细胞因子是白介素-8、白介素-6、MCP-1、和GM-CSF。

52. 权利要求1的方法,其中所测定细胞因子的水平和数目是与待测化合物的变应原性效能有关的因素。

53. 权利要求52的方法,其中所测定细胞因子的水平和数目是与低变应原性待测化合物有关的因素。

54. 权利要求52的方法,其中所测定细胞因子的水平和数目是与高变应原性待测化合物有关的因素。

55. 权利要求23的方法,其中所测定细胞因子的水平和数目是与待测化合物的毒性效能有关的因素。

56. 权利要求55的方法,其中所测定细胞因子的水平和数目是与低毒性待测化合物有关的因素。

57. 权利要求55的方法,其中所测定细胞因子的水平和数目是与高毒性待测化合物有关的因素。

58. 用于鉴定上述权利要求任一项中描述的细胞类型的细胞因子应答的方法,包括:

(a) 获得预先确定的包含一种动物(包括人)起源细胞类型的细胞培养物,所述细胞类型能够与待测化合物发生显著的非特异性相互作用并在相互作用后以细胞因子表达进行应答;

(b) 使用非特异性多价诱导剂鉴定细胞培养物在与待测化合物发生非特异性相互作用后可表达的细胞因子;

(c) 使细胞培养物的一部分接触待测化合物,测定所鉴定细胞因子的水平,获得细胞因子模式;

(d) 用待测化合物免疫动物并测定动物产生的IgE水平;

(e) 使细胞因子模式与测定得到的IgE水平相互关联;并

(f) 重复步骤c-e直至至少测试了一种高IgE水平的待测化合物、一种低IgE水平的待测化合物、和一种中IgE水平的待测化合物。

59. 用于高通量筛选待测化合物的变应原性或毒性的鉴定试剂盒,包括:

(a) 包含至少一种动物(包括人)细胞类型的细胞培养物;

(b) 由至少一种对特定细胞因子具有特异性的单克隆抗体选择的

细胞因子决定簇，至少一种用于mRNA检测的细胞因子特异性探针，至少一套用于mRNA或cDNA检测的细胞因子特异性引物；

(c) 包含至少两个区室的测定装置。

60. 权利要求59的鉴定试剂盒，包括至少一种对特定膜标记具有特异性的单克隆抗体、至少一种对特定膜标记具有特异性的单克隆抗体、至少一种用于mRNA检测的膜标记特异性探针、和至少一套用于mRNA或cDNA检测的膜标记特异性引物。

61. 权利要求59和60的鉴定试剂盒，其中还包括变应原性标准物。

62. 权利要求59-61的鉴定试剂盒用于高通量筛选至少两种待测化合物的变应原性的用途。

63. 权利要求62的鉴定试剂盒的用途，用于同时评估至少10种待测化合物的变应原性。

64. 权利要求62的用途，用于同时评估大约100种待测化合物的变应原性。

65. 权利要求60的鉴定试剂盒用于高通量筛选至少两种待测化合物的毒性的用途。

66. 权利要求65的鉴定试剂盒的用途，用于同时评估至少10种待测化合物的毒性。

67. 权利要求65的用途，用于同时评估大约100种待测化合物的毒性。

## 用于评估变应原性的方法

本发明涉及用于评估待测化合物的变应原性或毒性和用于同时筛选至少两种化合物的方法。本发明还涉及在本发明中使用的细胞类型的鉴定方法，以及用于高通量筛选化合物的鉴定试剂盒。

### 发明背景

许多化合物在动物和人体内引发变应性或毒性应答。与新化合物不断增加的发展以及因此对测试它们的潜在变应原性或毒性的需要一致，已经开发了用于测定变应原性和毒性的方法。历史上，在动物上而且某种程度在人上进行化合物测试，但是缺乏有用的合格技术。出于明显原因，对于化合物（诸如变应原和毒素）的测试，公众和专业存在用体外方法取代体内研究的要求和需要。

现有技术试图揭示涉及变应性应答的细胞类型、细胞元件、和分子，从而有助于理解这个反应链的复杂性。这样的一种参与元件是细胞因子。众所周知，细胞因子作为建立不同免疫应答的一份子而发挥作用。

其它参与者包括B和T淋巴细胞。B和T细胞是免疫性的介质，然而它们的功能受到抗原呈递细胞诸如树突细胞的控制。M. P. Everson等人（*Journal of Leukocyte Biology*, 59: 494 - 498, 1996）公开了不同组织如何诱导生成不同的T细胞细胞因子模式。研究说明，不同的树突细胞群体负责诱导T细胞增殖和细胞因子生成。H. Secrist等人（*J. Exp. Med.*, 181: 1081 - 1089, 1995）进行的研究描述了抗原剂量如何调控变应原特异性记忆CD4<sup>+</sup> T细胞的细胞因子模式。他们发现，在用低浓度变应原进行刺激时，CD4<sup>+</sup> T细胞生成高水平的细胞因子白介素-4（IL-4）；而用高浓度变应原进行刺激时，生成低水平的IL-4。K. E. Driscoll等人（*Environmental Health Perspectives*, 105: 1159

- 1164, 1997) 描述了吸入微粒诸如有害微粒如何通过影响肺上皮细胞而在肺中引发炎症。在上皮细胞上进行体外测试: 用石英进行刺激, 引起细胞因子MIP-2 (巨噬细胞炎性蛋白2) 水平上升, 即测量到mRNA水平的上升。研究人员发现, 应答显得与剂量有关。另一个研究小组证明, 在体外硅石诱导趋化因子(诸如MIP-2)在肺泡上皮细胞中的mRNA表达。

现有技术的研究主要集中于已知变应原对特定细胞群体的影响, 即观察细胞的机制特性和生成的细胞因子类型。

在专利申请WO 99/07880中, 公开了用于在体外鉴定人变应原和T淋巴细胞抗原的方法, 其中将人幼稚T细胞、巨噬细胞/单核细胞、永生B细胞与待测化合物混合, 并测定待测化合物是否诱导来自T细胞的应答。测量的应答之一称为细胞因子应答。

T细胞通过T细胞受体(它是克隆重组的结果)的相互作用和MHC分子中的肽(它是个体依赖的)识别加工后的抗原。在评估待测化合物是否是变应原时, 这当然显示不确定性, 因为获得的应答与细胞起源的个体相关, 而与待测化合物本身无关。因而, 仍然存在对通用测试法的需要。

### 发明概述

本发明涉及用于在体外评估待测化合物的变应原性的方法, 包括下列步骤:

(a) 获得预先确定和预先鉴定的包含至少一种动物(包括人)起源细胞类型的细胞培养物, 它能够与待测化合物发生显著的非特异性相互作用并在相互作用后以细胞因子表达进行应答;

(b) 使细胞培养物接触待测化合物;

(c) 通过针对至少一种预先确定的细胞因子应答测定细胞的细胞因子应答来确定特定细胞因子模式, 该细胞展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用; 并

(d) 使细胞因子模式与待测化合物的变应原性相互关联。

根据细胞因子应答（即由细胞分泌的细胞因子的类型和水平）随待测化合物的变应原性而变化的发现，通过使待测化合物接触能够引发细胞因子应答的细胞并测定所述应答，然后使IgE应答与在动物中进行的变应原性研究相互关联，从而本发明有可能在体外评估待测化合物的变应原性。在本说明书的全文中，变应原性具有其普遍含义，即在动物（包括人）中引发IgE应答的能力。

本发明还涉及在至少两种细胞培养物（每种包含一种细胞类型）诸如共培养物中测定细胞因子应答的方法。

在本发明的另一个方面，上文所述方法涉及待测化合物在展示与其发生显著的非特异性相互作用的细胞中诱导的膜标记的测定。

此外，本发明还描述了用于测定待测化合物的变应原性和毒性的联合测定法。

本发明不仅将有益于动物和人类，它还将能够大规模筛选潜在的变应原和毒素，由此将操作花费和时间减到最少。

本发明的另一个方面是用于同时筛选至少两种待测化合物的变应原性的方法，包括下列步骤：

- a) 在上文确定的细胞培养物至少两个分开的区室中安排特定细胞类型；
- b) 使分开的细胞培养物区室分别接触待测化合物；
- c) 通过对展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用的相应细胞测定细胞因子应答来确定特定细胞因子模式；并
- d) 使每种细胞因子模式与待测化合物的变应原性相互关联。

在本发明的还有一个方面，提供了用于测定待测化合物的毒性的方法，遵循上文关于变应原性所述步骤。

本发明的另一个方面是鉴定上文所述细胞类型的方法，包括下列步骤：

- a) 获得预先确定的包含一种动物（包括人）起源细胞类型的细胞培养物，所述细胞类型能够与待测化合物发生显著的非特异性相互作用并在相互作用后以细胞因子表达进行应答；

b) 使用非特异性多价诱导剂鉴定细胞培养物在与待测化合物发生非特异性相互作用后可表达的细胞因子;

c) 使细胞培养物的至少一部分接触待测化合物, 测定所鉴定细胞因子的水平, 获得细胞因子模式;

d) 用待测化合物免疫动物并测定动物产生的IgE水平;

e) 使细胞因子模式与测定得到的IgE水平相互关联; 并

f) 重复步骤c - e直至至少测试了一种高IgE水平的待测化合物、一种低IgE水平的待测化合物、和一种中IgE水平的待测化合物。

另一个方面是用于高通量筛选待测化合物的鉴定试剂盒, 包括:

a) 包含至少一种动物(包括人)细胞类型的细胞培养物;

b) 由至少一对具有特定细胞因子特异性的单克隆抗体选择的细胞因子决定簇, 至少一种用于mRNA检测的细胞因子特异性探针, 至少一套用于mRNA或cDNA检测的细胞因子特异性引物;

c) 包含至少两个区室的测定装置。

还有, 本发明的一个方面是将测定法用于筛选至少两种待测化合物的变应原性或毒性的使用。

## 图

图1a-d的表显示了用脂多糖(LPS)刺激上皮细胞达预定保温时间后的细胞因子应答。

图2显示了3种不同细胞因子对蛋白酶P修饰反应的细胞因子应答, 其中蛋白酶P进行了关于变应原性的修饰。

图3a-d的图显示了与用于修饰蛋白酶P的PEG长度相关的IgE水平的降低(a), 3种不同细胞因子的细胞因子应答(b-d)。

图4a-c的图显示了在用蛋白酶P刺激后3种不同细胞因子水平与IgE水平之间的相关性。

图5的表显示了在用蛋白酶和立扑莱斯(Lipolase)刺激后的IgE水平和3种不同细胞因子的细胞因子应答。

## 发明详述

本发明涉及用于评估待测化合物的变应原性的体外测定法。如上文所述，通常在动物研究中评估待测化合物的变应原性，其中由待测化合物引起的IgE水平指示待测化合物的变应原性。然而，在实践中难以对大量待测化合物筛选变应原性。通过动物研究测试化合物的任务是乏味且昂贵的，而且出于明显的伦理原因，希望将实验动物的使用减到最少，反过来这又符合关于动物测试的EU指示。

本发明基于如下发现：能够与待测化合物发生显著的非特异性相互作用并在相互作用后以细胞因子表达进行应答的细胞，其细胞因子应答可能与所述待测化合物在动物研究中引发的IgE应答有关。

术语“非特异性相互作用”反映如下事实：生物体免疫防卫中的有些细胞与外来物质发生非特异性相互作用，非特异性与其它细胞的个别应答（特别是引发T细胞）相反。或是仅仅通过接触待测化合物，或是通过摄取待测化合物（诸如通过待测化合物的胞饮作用），依照本发明使用的细胞将引发细胞因子应答。因此，相互作用指至少使待测化合物接触细胞并可能由细胞吸收。在本文中，术语“非特异性”指待测化合物将不会结合细胞表面并通过待测化合物的特异性受体发挥作用。这与T细胞通过T细胞受体的特异性相互作用结合加工后抗原（诸如变应原）相反。正如较早提及的，本发明细胞的摄取机制对研究中的化合物不是特异性的。

依照本发明使用的、能够展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用的细胞优选上皮细胞，而不考虑在生物体中的部位。上皮细胞共有的是，它们是生物体针对外来物质的初级防卫的一部分。

在本发明的一个实施方案中，本发明的上皮细胞衍生自呼吸道上皮细胞。呼吸道上皮细胞直接暴露于外部环境的空气传播成份，而且是生物体针对吸入的外来物质的初级防卫的一部分。在患有哮喘和其它变应性呼吸道疾病的个体中，上皮细胞常常是受损的。

在本发明的另一个实施方案中，上皮细胞是胃肠道上皮细胞。

在另一个实施方案中，所述至少一种细胞类型是角质细胞。这些

细胞是表皮的主要成份，担当保护下面的组织的任务。

还有一种用于本发明细胞培养的至少一种细胞类型是树突细胞。树突细胞的生理学任务是捕获、加工、并呈递抗原，向淋巴细胞提供共刺激分子，和分泌适当的细胞因子以发动免疫应答。已经发现，树突细胞能够通过对待测化合物的非特异性相互作用而引发细胞因子应答。

同样，可依照本发明使用通常认为是免疫系统中更个体化和特异性部分的一份子的细胞，诸如巨噬细胞、肥大细胞、和单核细胞，即利用它们引发非特异性细胞因子应答的能力。

巨噬细胞通过经吞噬作用的摄食来防卫机体免于入侵的微生物。巨噬细胞还担当清道夫，清除受损细胞和细胞残骸。

还有一组细胞，即内皮细胞，可用于本发明。

虽然依照本发明使用的细胞类型可以来自任何动物，但是优选至少一种细胞类型衍生自人类组织或人类血液细胞。此外，优选所用细胞类型与所评估的待测化合物的主要变态反应定位有关，即优选在使用呼吸上皮细胞的系统中测试怀疑引起肺部变态反应的待测化合物。

细胞因子是辅助调控炎症过程并在影响针对抗原（包括变应原）的应答中扮演重要角色的一类信号分子。细胞因子有助于募集炎性免疫细胞。它们的分泌量小，但是极其有效。它们经受体发生作用，而且不由未刺激细胞生成。

本发明细胞类型的细胞因子生成可以看成是针对外来化合物的初级应答。在细胞接触外来化合物后，细胞可能通过非特异性机制结合化合物，诸如非特异性受体结合。接触后，细胞可能通过胞饮作用或吞噬作用将外来化合物内在化。在胞内对外来化合物的进一步酶促降解可触发细胞因子的合成和分泌。在动物和人体中，分泌的细胞因子可担当信号分子，影响多种毗邻细胞类型，包括免疫细胞，诸如T细胞和B细胞，它们继而触发次级应答。

至今已经知道了很多种细胞因子，然而，不是所有的细胞类型都产生所有的细胞因子，而且，不是由特定细胞类型生成的所有细胞因

子都作为针对与待测化合物的非特异性相互作用的应答而分泌。

因此，本发明还涉及用于鉴定为了评估待测化合物的变应原性而预先确定的细胞类型的特定细胞因子的方法，包括下列步骤：

a) 获得预先确定的包含一种动物（包括人）起源细胞类型的细胞培养物，所述细胞类型能够与待测化合物发生显著的非特异性相互作用并在相互作用后以细胞因子表达进行应答；

b) 使用非特异性多价诱导剂鉴定细胞培养物在与待测化合物发生非特异性相互作用后可表达的细胞因子；

c) 使细胞培养物的一部分接触待测化合物，测定所鉴定细胞因子的水平，获得细胞因子模式；

d) 用待测化合物免疫动物并测定动物产生的IgE水平；

e) 使细胞因子模式与测定得到的IgE水平相互关联；并

f) 重复步骤c - e直至至少测试了一种高IgE水平的待测化合物、一种低IgE水平的待测化合物、和一种中IgE水平的待测化合物。

一旦鉴定了上文所述的细胞类型，则有可能依照本发明将讨论中的细胞类型的细胞培养物用于评估待测化合物的变应原性。因而，术语“预先鉴定的”指为了评估变应原性已经确定了特定细胞类型的细胞因子应答。

优选的是，在评估待测化合物的变应原性的方法中测定超过一种的细胞因子，诸如测定至少两种细胞因子。当在本发明的方法中测定至少四种细胞因子时预计可获得更好结果。

关于人肺组织上皮细胞，测定的细胞因子优选白介素-6（IL-6）、白介素-8（IL-8）、MCP-1、和GM-CSF。例如，依照本发明，高变应原性待测化合物将引发低水平的上文所述细胞因子，而低变应原性待测化合物将引发高水平的IL-8和MCP-1以及低水平的IL-6。对于介于高和低变应原性之间的待测化合物，可看到一种或两种细胞因子的高水平，而测定的其它细胞因子的水平是低的。因此，根据通过本发明方法获得的细胞因子模式，有可能量化待测化合物的变应原性。

所评估的细胞因子的数目和水平是与待测化合物的变应原性效能

有关的因素。

可以通过boolean法（即是否高于某个水平，也就是+/-）或者通过水平的直接数值来量化细胞因子模式。

关于人肺组织上皮细胞，boolean法可例示如表1：

表 1

变应原性/细胞因子	IL-8	IL-6	MCP-1
高	-	-	-
中高	+	+	-
中低	+	+	+
低	+	-	+

在表1中，+表示细胞因子的存在水平超过某个水平，而-表示不存在或低于特定水平。

本发明的一个目的是提供方法，其中细胞培养物包含至少一种细胞类型。然而，可能有利的是，对于评估的每种测定化合物，由超过一种细胞类型获得细胞因子应答。通过使用超过一种细胞类型，有可能比使用一种细胞类型获得甚至更改进的方法，因为不同细胞类型分泌不同细胞因子。可以以几种方式安排使用超过一种细胞类型的方法和测定法。

可以使包含不同细胞类型的两种分开的细胞培养物接触相同待测化合物，而且可以分别由每种细胞培养物获得细胞因子模式。然后可以联合细胞因子模式并与待测化合物的变应原性相互关联。

然而，在使用超过一种细胞培养物时，优选的是培养物是共培养的。由此，在更大程度上模拟细胞的天然环境，获得的结果具有更高敏感性。

因此，在本发明的一个方面，共培养两种细胞类型。本发明的共培养物是其中不同细胞共享同一培养基的培养物。

在本发明的优选实施方案中，共培养物的两种细胞类型在物理上是分开的。可以使用允许小分子（例如待测化合物）和/或待测物质通过的半透膜将细胞类型分开。共培养物的物理设置可以是，在一个区

室中培养一种细胞类型，在插入第一个区室内的第二个区室（即第一个区室的子区室）中培养另一种细胞类型。

这种共培养设置的优点可能是第二种细胞类型不仅将受到待测化合物的影响，还将受到第一种细胞培养物的细胞类型生成的细胞因子的影响，从而诱导第二种细胞类型的更天然的细胞因子应答。

在还有一个实施方案中，可以是待测化合物不能通过膜。在如此提供的实施方案中，第二种区室中的细胞培养物受到第一种细胞培养物生成的细胞因子的影响，而不受实际的待测化合物的影响。

在另一个实施方案中，向一种细胞类型的培养物中加入待测化合物，然后将上清液转移到第二种细胞类型的第二种培养物中。在这种情况下，第一种培养物生成的细胞因子与待测化合物一起将影响第二种细胞培养物。

对于所有上述培养实施方案，可以在向细胞培养物中加入培养基之前向培养基中加入待测化合物。

共培养细胞类型的优选组合是上皮细胞类型与非上皮细胞类型，诸如这样的组合，其中第一种细胞类型选自呼吸道上皮细胞、胃肠道上皮细胞、和角质细胞，而第二种细胞类型选自树突细胞、巨噬细胞、肥大细胞、单核细胞、和内皮细胞。

因此，在本发明的一个实施方案中，第一种细胞类型是呼吸道上皮细胞，而第二种细胞类型选自树突细胞、巨噬细胞、肥大细胞、单核细胞、和内皮细胞。

在优选的实施方案中，第一种细胞类型是呼吸道上皮细胞，而第二种细胞类型选自树突细胞或巨噬细胞。

可以通过任何适用方法来测定细胞因子应答，诸如使用针对所生成细胞因子的抗体形式或针对所生成细胞因子的编码cDNA或mRNA的引物或探针形式的决定簇。

因此，可以使用针对所测定的细胞因子的抗体通过酶联免疫吸附测定法（ELISA）来测定胞外细胞因子应答。由此获得细胞应答与待测化合物的相互作用而分泌的细胞因子的定量测定。

在另一个实施方案中，通过上文所述ELISA来测量胞外细胞因子应答。

在还有一个实施方案中，通过原位杂交技术来测定细胞因子应答，优选使用针对所测定细胞因子的编码mRNA的探针。

同样，可以通过聚合酶链式反应(PCR)技术来测定细胞因子应答，特别是使用针对所测定细胞因子的编码mRNA的引物。可以通过定量PCR技术或原位PCR技术的商品化技术分析来测定细胞因子。

原位PCR与定量PCR之间的本质差异是所分析样品的数目。为了给出定量数据，原位PCR需要大量的相同细胞培养物(代表研究中的培养物)，对每个进行不同数目的PCR循环，以鉴定所述特定细胞培养物中特定细胞因子/膜标记的PCR的动态范围。定量PCR需要每种细胞培养物的一份样品。在这种情况下，随时间追踪PCR产物的发展，由此提供定量数据(ABI Prism 7700型序列检测系统)。

除了测定所用细胞类型的细胞因子应答以外，可能有利的是测定由待测化合物在展示与其发生显著的非特异性相互作用的细胞中诱导的膜标记。在这方面，优选的是测定膜标记VCAM-1或ICAM-1。

在本发明的一个方面，所评估细胞因子的水平和数目是与待测化合物的变应原性效能有关的因素。为了本发明的目的，所评估细胞因子的水平和数目是与低变应原性待测化合物有关的因素，而且所评估细胞因子的水平和数目是与高变应原性待测化合物有关的因素。

依照本发明，高变应原性待测化合物可能不引发任何细胞因子应答，即与基线细胞因子水平相比。在本发明的一个实施方案中，关于在本发明所述细胞类型中测试的四种细胞因子，高变应原性待测化合物可能不引发任何细胞因子应答。在另一个实施方案中，低变应原性待测化合物可能引发至少一种细胞因子的细胞因子应答，诸如两种不同的细胞因子。而在本发明的另一个实施方案中，中高变应原可能引发一种细胞因子的应答，诸如IL-8。然而，绝对分泌量可能远远低于低变应原性分子的应答(以pmol测量)。

待测化合物变应原性的评估方法在对多种待测化合物筛选变应原

性中特别有用。

因此，本发明涉及用于同时筛选至少两种待测化合物的变应原性的方法，包括下列步骤：

a) 在上文确定的细胞培养物的至少两个分开的区室中安排特定细胞类型；

b) 使分开的细胞培养区室分别接触待测化合物；

c) 通过对展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用的相应细胞测定细胞因子应答来确定特定细胞因子模式；并

d) 使每种细胞因子模式与待测化合物的变应原性相互关联。

筛选方法当然优选同时用于超过两种待测化合物，诸如大约10种待测化合物，或者同时用于甚至大约100种待测化合物。筛选方法特别适用于测试针对变应原性进行了修饰的化合物。

在待测化合物中影响其变应原性的这些修饰可以通过突变蛋白质变应原中的IgE特异性表位来进行。可以通过几种技术来测定这些表位的定位，诸如公开于U. Løvborg的WO 92/10755；Walshet等人，*J. Immunol. Methods*, 121: 1275 - 1280, 1989；和Schoofs等人，*J. Immunol.*, 140: 611 - 616, 1987中的技术。用于鉴定表位的优选方法是用抗体（如IgE抗体）筛选随机肽文库并比对高结合肽序列以鉴定共有序列，继而将这些共有序列与期望突变后降低变应原性的亲本蛋白质的序列和三维结构比较，以鉴定亲本蛋白质的线性和结构表位。

在搜索这种具有改进特性的蛋白质变体时，可能有利的是建立多样性突变体文库，在每一个突变体中导入一个或多个改变的氨基酸，并选择那些显示改进特性的变体。这种期望特性可以是在本发明方法中由有利细胞因子应答表达的变应原性降低。

可以通过本领域熟练技术人员知道的一套技术来建立多样性文库（M. T. Reetz和K. E. Jaeger，在W. D. Fessner编的《*Biocatalysis - from Discovery to Application*》一书中，第200卷，第31 - 57页，1999；Stemmer，*Nature*, 370: 389 - 391, 1994；Zhao和Arnold，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 7997 - 8000, 1997；Yano等人，*Proc. Natl.*

*Acad. Sci. USA*, 95: 5511 - 5515, 1998; 和S. J. Deng等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (11): 4992 - 4996, 1995)。

这些技术包括但不限于“刺状诱变 (spiked mutagenesis)”，即使用一种或多种寡核苷酸引物通过PCR诱变使蛋白质序列的某些位置随机化，所述引物是使用核苷酸混合物针对某些位置而合成 (T. Lanio和A. Jeltsch, *Biotechniques*, 25 (6): 958、962、964 - 965, 1998)。可以设计用于每个三联体的寡核苷酸混合物，使得突变型基因产物的相应氨基酸以某些预先确定的分布函数随机化。存在便于这种设计的算法 (L. J. Jensen等人, *Nucleic Acids Research*, 26 (3): 697 - 702, 1998)。

用于构建多样性基因文库的另一种方法是使用不同但同源的大量基因作为出发点的“家族改组 (family shuffling)” (Stemmer, *Nature*, 370: 389 - 391, 1994)。将这些基因片段化，并将片段作为模板用于PCR反应，产生的杂合基因产物中掺入了来自几种亲本基因的序列元件。

正如上文所述参考文献中的描述，这些方法可以平行或连续的用于生成蛋白质主链的定向进化，以获得期望特性，诸如低变应原性。

在优选的实施方案中，通过包括下列步骤的方法得到替代：1) 列出涵盖几个表位区域的一套替代、添加、和/或删除，2) 设计例如通过随机诱变将氨基酸序列的这些改变的随机化子集导入靶基因的文库，3) 表达文库，并使用本发明的方法选择优选变体。

在更优选的实施方案中，在能够以高通量形式处理多样性文库的许多变体的自动化测定系统中选择优选变体。在那种情况中，待测化合物通常是由可以滴定板形式培养的细胞 (如细菌或酵母细胞或者其它细胞) 分泌的蛋白质。除了待测化合物，细胞上清液还将包含可引起不同于基线的细胞因子应答的大量其它化合物。它们可以是完整细胞；来自细胞裂解的细胞壁或其它细胞器碎片；脂多糖；糖蛋白；小分子等。可能有利的是，防止这些化合物接触本发明的细胞，从而将背景信号降至最低。

在甚至更优选的实施方案中，平行进行至少两次测定：一次是使用本发明方法的测定法，另一次是待测化合物的功能测定法。在蛋白酶待测化合物的情况中，功能测定法可以是蛋白酶活性测定法。可以使用底物N-Suc-Ala-Ala-Pro-苯丙氨酰基-对硝基苯胺来测定蛋白酶活性。蛋白酶切割肽与对硝基苯胺之间的键，产生看得见的黄色（吸收位于405nm）。因而，混合底物与蛋白酶溶液，并以时间的函数监测405nm处的吸光率，作为样品中蛋白酶活性的量度。本发明这些实施方案的范围绝非限于蛋白酶，它只是提供一个范例。

在最优选的实施方案中，这种方法添加了额外筛选轮和/或由第一轮筛选进行家族改组（J. E. Ness等人，*Nature Biotechnology*, 17: 893 - 896, 1999），或者联合通过遗传手段降低变应原性的其它方法（诸如公开于WO 92/10755）。

待测化合物可以是怀疑在动物（包括人）体内引发变应性应答的任何化合物。变应性应答可以是任何变应性应答，诸如由吸入化合物引起的肺部变应性应答，或是由皮肤接触变应原引起的皮肤变态反应，或是甚至由消化后的变应原引起的胃肠变态反应。

因此，待测化合物可以是任何蛋白质，诸如糖蛋白、脂蛋白、蛋白脂、或磷脂。术语蛋白质意欲还包括肽和多肽。

具体而言，待测化合物可以是酶或其变体，诸如糖基水解酶、糖酶、过氧化物酶、蛋白酶、脂肪酶、植酸酶、多糖裂解酶、氧化还原酶、转谷氨酰胺酶、和葡萄糖异构酶。具体如下：

### 蛋白酶

蛋白酶（即依照国际生物化学和分子生物学联盟（IUBMB）的推荐（1992）归类在酶分类编号E. C. 3. 4下的酶）包括属于这组的蛋白酶。范例包括那些归类在下列酶分类编号（E. C.）下的蛋白酶：

3. 4. 11（即所谓的氨肽酶），包括3. 4. 11. 5（脯氨酰氨肽酶）、3. 4. 11. 9（X-pro 氨肽酶）、3. 4. 11. 10（细菌亮氨酰氨肽酶）、3. 4. 11. 12（嗜热氨肽酶）、3. 4. 11. 15（赖氨酰氨肽酶）、3. 4. 11. 17（色氨酰氨肽酶）、3. 4. 11. 18（甲硫氨酰氨肽酶）；

3.4.21 (即所谓的丝氨酸内肽酶), 包括3.4.21.1 (胰凝乳蛋白酶)、3.4.21.4 (胰蛋白酶)、3.4.21.25 (黄瓜素 (cucumisin))、3.4.21.32 (Brachyurin)、3.4.21.48 (Cerevisin)、和3.4.21.62 (枯草蛋白酶);

3.4.22 (即所谓的半胱氨酸内肽酶), 包括3.4.22.2 (木瓜蛋白酶)、3.4.22.3 (无花果蛋白酶 (Ficin))、3.4.22.6 (木瓜凝乳蛋白酶)、3.4.22.7 (萝摩蛋白酶)、3.4.22.14 (猕猴桃蛋白酶)、3.4.22.30 (番木瓜蛋白酶 (caricain))、和3.4.22.31 (Ananain);

3.4.23 (即所谓的天冬氨酸内肽酶), 包括3.4.23.1 (胃蛋白酶 A)、3.4.23.18 (Aspergillopepsin I)、3.4.23.20 (Penicillopepsin)、和3.4.23.25 (Saccharopepsin); 和

3.4.24 (即所谓的金属内肽酶), 包括3.4.24.28 (Bacillolysin)。

相关枯草蛋白酶的范例包括枯草蛋白酶BPN'、枯草蛋白酶 amylosacchariticus、枯草蛋白酶168、枯草蛋白酶肠系膜肽酶、枯草蛋白酶Carlsberg、枯草蛋白酶DY、枯草蛋白酶309、枯草蛋白酶147、thermitase、aqualysin、芽孢杆菌PB92蛋白酶、蛋白酶K、蛋白酶TW7、蛋白酶TW3、和芽孢杆菌PD498 (WO 93/24623)。

这些易于获得的商品化蛋白酶的具体范例包括Esperase®、Alcalase®、Neutrase®、Dyrazym®、Savinase®、Pyrase®、胰腺胰蛋白酶NOVO (PTN)、Bio-Feed™ Pro、Clear-Lens Pro (所有这些酶都可以由Novo Nordisk A/S获得)。

其它商品化蛋白酶的范例包括由Gist-Brocades N.V. 出售的Maxtase®、Maxacal®、Maxapem®, 由Solvay et Cie. 出售的Opticlean®, 由Genencor International出售的Purafect®。

蛋白酶变体的范例公开于EP 130.756 (Genentech)、EP 214.435 (Henkel)、WO 87/04461 (Amgen)、WO 87/05050 (Genex)、EP 251.446 (Genencor)、EP 260.105 (Genencor)、Thomas等人, *Nature*, 318: 375-376, 1985、Thomas等人, *J. Mol. Biol.*, 193: 803-813, 1987、Russel等人, *Nature*, 328: 496-500, 1987、WO 88/08028 (Genex)、

WO 88/08033 (Amgen)、WO 89/06279 (Novo Nordisk A/S)、WO 91/00345 (Novo Nordisk A/S)、EP 525.610 (Solvay)、和 WO 94/02618 (Gist-Brocades N.V.)。

可以如《Methods of Enzymatic Analysis》，第3版，1984，Verlag Chemie, Weinheim，第5卷中所述，测定蛋白酶及其变体的活性。

### 脂肪酶

脂肪酶（即依照国际生物化学和分子生物学联盟（IUBMB）的推荐（1992）归类在酶分类编号E.C. 3.1.1（羧基酯水解酶）下的酶）包括属于这组的脂肪酶。

范例包括归类在下列酶分类编号（E.C.）下的脂肪酶：

3.1.1（即所谓的羧基酯水解酶），包括3.1.1.3（甘油三酯脂肪酶）和3.1.1.4（磷脂酶A<sub>2</sub>）。

脂肪酶的范例包括由下列微生物衍生的脂肪酶。指出的专利发表物收入本文作为参考：

腐质霉属（*Humicola*），如短孢腐质霉（*H. brevispora*）、*H. lanuginosa*、*H. brevis var. thermoidea*、和 *H. insolens*（US 4,810,414）；

假单胞菌属（*Pseudomonas*），如莓实假单胞菌（*Ps. fragi*）、施氏假单胞菌（*Ps. stutzeri*）、洋葱假单胞菌（*Ps. cepacia*）、和荧光假单胞菌（*Ps. fluorescens*）（WO 89/04361），或植物假单胞菌（*Ps. plantarii*）和唐菖蒲假单胞菌（*Ps. gladioli*）（US 4,950,417, Solvay enzymes），或产碱假单胞菌（*Ps. alcaligenes*）和类产碱假单胞菌（*Ps. pseudoalcaligenes*）（EP 218 272），或门多萨假单胞菌（*Ps. mendocina*）（WO 88/09367; US 5,389,536）；

镰孢属（*Fusarium*），如尖镰孢（*F. oxysporum*）（EP 130,064）或豌豆腐皮镰孢（*F. solani pisi*）（WO 90/09446）；

毛霉属（*Mucor*），也称为根毛霉属（*Rhizomucor*），如米赫毛霉（*M. miehei*）（EP 238,023）；

色杆菌属（*Chromobacterium*），特别是粘稠色杆菌（*C. viscosum*）；

曲霉属 (*Aspergillus*)，特别是黑曲霉 (*A. niger*)；

假丝酵母属 (*Candida*)，如柱状假丝酵母 (*C. cylindracea*) 也称为皱落假丝酵母 (*C. rugosa*) 和 *C. antarctica* (WO 88/02775)，或 *C. antarctica* 脂肪酶 A 或 B (WO 94/01541 和 WO 89/02916)；

地霉 (*Geotricum*)，如白地霉 (*G. candidum*) (Schimada 等人, *J. Biochem.*, 106: 383 - 388, 1989)；

青霉属 (*Penicillium*)，如沙门柏干酪青霉 (*P. camembertii*) (Yamaguchi 等人, *Gene*, 103: 61 - 67, 1991)；

根霉属 (*Rhizopus*)，如德列马根霉 (*R. delemar*) (Hass 等人, *Gene*, 109: 107 - 113, 1991)、雪白根霉 (*R. niveus*) (Kugimiya 等人, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56: 716 - 719, 1992)、或米根霉 (*R. oryzae*)；

芽孢杆菌属 (*Bacillus*)，如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) (Dartois 等人, *Biochemica et Biophysica acta*, 1131: 253 - 260, 1993)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*) (JP 64/7744992)、或短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) (WO 91/16422)。

易于获得的商品化脂肪酶的具体范例包括 Lipolase®、Lipolase™ Ultra、Lipozyme®、Palatase®、Novozym® 435、Lecitase® (所有这些酶都可以由 Novo Nordisk A/S 获得)。

其它脂肪酶的范例是 Lumafast™，来自 Genencor 国际公司的门多萨假单胞菌 (*Ps. mendocina*) 脂肪酶；Lipomax™，来自 Gist Brocades/Genencor 国际公司的类产碱假单胞菌脂肪酶；来自 Unilever 的腐皮镰孢脂肪酶 (角质酶)；来自 Solvay enzymes 的芽孢杆菌脂肪酶。可以由其它公司获得其它脂肪酶。

脂肪酶变体的范例描述于如 WO 93/01285 和 WO 95/22615。

可以如《Methods of Enzymatic Analysis》，第3版，1984, Verlag Chemie, Weinheim, 第4卷中所述，或者如 AF 95/5 GB (可以向 Novo Nordisk A/S 索取) 中所述，测定脂肪酶的活性。

### 氧化还原酶

氧化还原酶（即依照国际生物化学和分子生物学联盟（IUBMB）的推荐（1992）归类在酶分类编号E.C. 1（氧化还原酶）下的酶）包括属于这组的氧化还原酶。

范例包括那些归类在下列酶分类编号（E.C.）下的氧化还原酶：甘油-3-磷酸脱氢酶\_NAD<sup>+</sup>（1.1.1.8）、甘油-3-磷酸脱氢酶\_NAD(P)<sup>+</sup>（1.1.1.94）、甘油-3-磷酸 1-脱氢酶\_NADP<sup>+</sup>（1.1.1.94）、葡萄糖氧化酶（1.1.3.4）、己糖氧化酶（1.1.3.5）、儿茶酚氧化酶（1.1.3.14）、胆红素氧化酶（1.3.3.5）、丙氨酸脱氢酶（1.4.1.1）、谷氨酸脱氢酶（1.4.1.2）、谷氨酸脱氢酶\_NAD(P)<sup>+</sup>（1.4.1.3）、谷氨酸脱氢酶\_NADP<sup>+</sup>（1.4.1.4）、L-氨基酸脱氢酶（1.4.1.5）、丝氨酸脱氢酶（1.4.1.7）、缬氨酸脱氢酶\_NADP<sup>+</sup>（1.4.1.8）、亮氨酸脱氢酶（1.4.1.9）、甘氨酸脱氢酶（1.4.1.10）、L-氨基酸氧化酶（1.4.3.2）、D-氨基酸氧化酶（1.4.3.3）、L-谷氨酸氧化酶（1.4.3.11）、蛋白质-赖氨酸 6-氧化酶（1.4.3.13）、L-赖氨酸氧化酶（1.4.3.14）、L-天冬氨酸氧化酶（1.4.3.16）、D-氨基酸脱氢酶（1.4.99.1）、蛋白质二硫化物还原酶（1.6.4.4）、硫氧还蛋白还原酶（1.6.4.5）、蛋白质二硫化物还原酶（谷胱甘肽）（1.8.4.2）、漆酶（1.10.3.2）、过氧化氢酶（1.11.1.6）、过氧化物酶（1.11.1.7）、脂肪加氧酶（1.13.11.12）、超氧化物歧化酶（1.15.1.1）。

所述葡萄糖氧化酶可衍生自黑曲霉。

所述漆酶可衍生自多孔菌 *Polyporus pinsitus*、*Myceliophthora thermophila*、灰盖鬼伞（*Coprinus cinereus*）、茄属丝核菌（*Rhizoctonia solani*）、*Rhizoctonia praticola*、*Scytalidium thermophilum* 和 *Rhus vernicifera*。

胆红素氧化酶可衍生自疣孢漆斑菌（*Myrothecium verrucaria*）。

过氧化物酶可衍生自如大豆、辣根、或灰盖鬼伞（*Coprinus cinereus*）。

蛋白质二硫化物还原酶可以是DK专利申请号768/93、265/94、和

264/94 (Novo Nordisk A/S) (收入本文作为参考) 之任一中提到的任何一种, 包括牛起源的蛋白质二硫化物还原酶、衍生自米曲霉或黑曲霉的蛋白质二硫化物还原酶、和衍生自大肠杆菌的DsbA或DsbC。

易于获得的商品化氧化还原酶的具体范例包括Gluzyme™ (可以由Novo Nordisk A/S获得的酶)。然而, 可以由其它公司获得其它氧化还原酶。

可以如《Methods of Enzymatic Analysis》, 第3版, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, 第3卷中所述, 测定氧化还原酶及其变体的活性。  
糖酶

糖酶可以确定为能够水解糖链 (如淀粉, 尤其是5和6元环结构) 的所有酶 (即依照国际生物化学和分子生物学联盟 (IUBMB) 的推荐 (1992) 归类在酶分类编号E.C. 3.2 (糖苷酶) 下的酶)。

范例包括归类在下列酶分类编号 (E.C.) 下的糖酶:

$\alpha$ -淀粉酶 (3.2.1.1)、 $\beta$ -淀粉酶 (3.2.1.2)、葡聚糖 1,4- $\alpha$ -葡糖苷酶 (3.2.1.3)、纤维素酶 (3.2.1.4)、内切-1,3(4)- $\beta$ -葡聚糖酶 (3.2.1.6)、内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶 (3.2.1.8)、葡聚糖酶 (3.2.1.11)、几丁质酶 (3.2.1.14)、多聚半乳糖醛酸酶 (3.2.1.15)、溶菌酶 (3.2.1.17)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶 (3.2.1.21)、 $\alpha$ -半乳糖苷酶 (3.2.1.22)、 $\beta$ -半乳糖苷酶 (3.2.1.23)、淀粉-1,6-葡萄糖苷酶 (3.2.1.33)、木聚糖 1,4- $\beta$ -木糖苷酶 (3.2.1.37)、葡聚糖内切-1,3- $\beta$ -D-葡萄糖苷酶 (3.2.1.39)、 $\alpha$ -糊精内切-1,6-葡萄糖苷酶 (3.2.1.41)、蔗糖 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (3.2.1.48)、葡聚糖内切-1,3- $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (3.2.1.59)、葡聚糖 1,4- $\beta$ -葡萄糖苷酶 (3.2.1.74)、葡聚糖内切-1,6- $\beta$ -葡萄糖苷酶 (3.2.1.75)、阿拉伯聚糖内切-1,5- $\alpha$ -阿拉伯糖苷酶 (3.2.1.99)、乳糖酶 (3.2.1.108)、几丁质聚糖酶 (chitonanase, 3.2.1.132)。

相关糖酶的范例包括衍生自 *Trichoderma harzianum* 的  $\alpha$ -1,3-葡聚糖酶; 衍生自拟青霉属 (*Paecilomyces*) 菌株的  $\alpha$ -1,6-葡聚糖酶; 衍生自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的  $\beta$ -葡聚糖酶; 衍生自

*Humicola insolens*的 $\beta$ -葡聚糖酶；衍生自黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的 $\beta$ -葡聚糖酶；衍生自木霉属 (*Trichoderma*) 菌株的 $\beta$ -葡聚糖酶；衍生自溶黄嘌呤厄氏菌 (*Oerskovia xanthineolytica*) 菌株的 $\beta$ -葡聚糖酶；衍生自黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的外切-1,4- $\alpha$ -D-葡萄糖苷酶 (葡萄糖淀粉酶)；衍生自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 $\alpha$ -淀粉酶；衍生自解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus myloliquefaciens*) 的 $\alpha$ -淀粉酶；衍生自嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的 $\alpha$ -淀粉酶；衍生自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的 $\alpha$ -淀粉酶；衍生自非致病性微生物的 $\alpha$ -淀粉酶；衍生自黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的 $\alpha$ -半乳糖苷酶；衍生自*Humicola insolens*的戊聚糖酶、木聚糖酶、纤维二糖酶、纤维素酶、半纤维素酶；衍生自*Trichoderma reesei*的纤维素酶；衍生自非致病性霉菌的纤维素酶；衍生自黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的果胶酶、纤维素酶、阿拉伯糖酶、半纤维素酶；衍生自淡紫青霉 (*Penicillium lilacinum*) 的葡聚糖酶；衍生自非致病性霉菌的内切葡聚糖酶；衍生自*Bacillus acidopullyticus*的支链淀粉酶；衍生自脆壁克鲁维氏酵母 (*Kluyveromyces fragilis*) 的 $\beta$ -半乳糖苷酶；衍生自*Trichoderma reesei*的木聚糖酶。

易于获得的商品化糖酶的具体范例包括Alpha-Gal™、Bio-Feed™ Alpha、Bio-Feed™ Beta、Bio-Feed™ Plus、Bio-Feed™ Plus、Novozyme® 188、Carezyme®、Celluclast®、Cellusoft®、Ceremyl®、Citrozym®、Denimax®、Dezyme™、Dextrozyme™、Finizym™、Fungamyl™、Gamanase™、Glucanex®、Lactozym®、Maltogenase™、Pentopan™、Pectinex™、Promozyme®、Pulpzyme™、Novamyl™、Termamyl™、AMG (淀粉葡萄糖苷酶Novo)、Maltogenase®、Sweetzyme®、Aquazym® (所有这些酶都可以由Novo Nordisk A/S获得)。可以由其它公司获得其它糖酶。

### 裂解酶

合适的裂解酶包括多糖裂解酶：果胶酸酯裂解酶 (4.2.2.2) 和果胶裂解酶 (4.2.2.10)，诸如W0 99/27083中公开的来自地衣芽孢杆菌

(*Bacillus licheniformis*) 的那些裂解酶。

### 异构酶

范例包括归类在下列酶分类编号 (E. C.) 下的异构酶: 如木糖异构酶 (5.3.1.5)。相关异构酶的范例是蛋白质二硫键异构酶, 诸如 WO 95/01425 (Novo Nordisk A/S) 中公开的那种酶。易于获得的商品化异构酶的具体范例是 Sweetzyme®。

可以如《Methods of Enzymatic Analysis》, 第3版, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, 第4卷中所述, 测定糖酶或其变体的活性。

在另一个实施方案中, 待测化合物是任何成份, 诸如用于酶配方的稳定剂。特别是关于酶生产, 感兴趣的是获得变应原性尽可能小的酶变体, 从而降低酶工业工作人员患上呼吸道变态反应的风险。因此, 在测试怀疑会引起呼吸道变态反应的待测化合物, 诸如酶及其变体时, 优选使用呼吸道上皮细胞。

待测化合物自身可能具有免疫原性, 或者认为是半抗原。

在一个实施方案中, 待测化合物是药物配方的任何化合物, 诸如活性药物。

在另一个实施方案中, 待测化合物可以是用于化妆品的化合物。在这种情况下, 具体地是接触变态反应, 而且优选的第一种细胞类型是角质细胞。

同样, 待测化合物可以是有机溶剂、染料、或金属。

依照本发明, 以足以引发可检测细胞因子应答的浓度向选择的细胞培养物中加入待测化合物。待测化合物的浓度可以随讨论中的待测化合物而变化。在本发明的一个实施方案中, 待测化合物浓度可以是 1、10、或 100  $\mu\text{g/ml}$ 。在另一个实施方案中, 向细胞培养物中加入的待测化合物浓度可依赖待测化合物与细胞培养物的保温时间。在本发明的一个实施方案中, 待测化合物的保温时间可以是 0 - 16 小时, 诸如 0、2、4、6、或 16 小时。

在本发明的另一个方面, 将本发明的方法用于评估待测化合物的毒性, 包括下列步骤:

a) 获得预先确定和预先鉴定的包含至少一种动物（包括人）起源细胞类型的细胞培养物，所述细胞类型能够与待测化合物发生显著的非特异性相互作用并在相互作用后以细胞因子表达进行应答；并

b) 使细胞培养物接触待测化合物；

c) 通过针对至少一种预先确定的细胞因子测定该细胞的细胞因子应答，由此确定特定细胞因子模式，该细胞展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用；并

d) 使细胞因子模式与待测化合物的毒性相互关联。

如上文关于待测化合物的变应原性评估所述，有可能使待测化合物的毒性与生成的细胞因子水平相互关联，因为化合物的毒性越高，生成的细胞因子水平越低。因而，本发明还涉及同时筛选至少两种待测化合物的毒性的方法，包括下列步骤：

a) 在至少两个分开的区室中安排上文确定的细胞培养；

b) 使细胞培养物分别接触待测化合物；

c) 通过对展示与待测化合物发生显著的非特异性相互作用的相应细胞测定细胞因子应答来确定特定细胞因子模式；并

d) 使每种细胞因子模式与待测化合物的毒性相互关联。

在还有一个方面，本发明涉及用于在高通量筛选中评估待测化合物的变应原性或毒性的鉴定试剂盒，其中所述鉴定试剂盒包括下列部分：

a) 包含至少一种动物（包括人）细胞类型的细胞培养物；

b) 由至少一对具有特定细胞因子特异性的单克隆抗体选择的细胞因子决定簇，至少一种用于mRNA检测的细胞因子特异性探针，至少一套用于mRNA或cDNA检测的细胞因子特异性引物；

c) 包含至少两个区室的测定装置。

在本发明的另一个实施方案中，鉴定试剂盒还涉及至少一对具有特定膜标记特异性的单克隆抗体、至少一种具有特定膜标记特异性的单克隆抗体、用于mRNA检测的至少一种膜标记特异性探针、和用于mRNA或cDNA检测的至少一套膜标记特异性引物。

如上所述，鉴定试剂盒可包含一种细胞类型或细胞类型的联合，后者或是共培养或是分开培养。此外，鉴定试剂盒可包含用于培养细胞的培养基。本领域熟练技术人员能够容易的确定适用于培养本文指定细胞的培养基。

优选的是，鉴定试剂盒包含变应原性标准，即根据所测定细胞因子模式用于评估讨论中的待测化合物的变应原性的标准。变应原性标准可以是与鉴定试剂盒有关的信息的形式，或者是将待测化合物与变应原性已知的化合物一起共评估由此将由待测化合物获得的细胞因子模式与由已知化合物获得的模式相互关联的形式。

优选将鉴定试剂盒安排用于同时测试几种待测化合物，诸如同时测试至少两种化合物，更优选至少10种待测化合物，最优选能够同时评估大约100种待测化合物的变应原性。

可以将试剂盒看成几个部分，即试剂盒可以由几个不同部分联合而成，诸如来自一种来源的细胞培养物、来自另一种来源的决定簇、和来自第三种来源的测定装置。

测定装置是任何适用装置，诸如具有至少一个孔的板，其中可以培养细胞并接触待测化合物。

在优选的实施方案中，测定装置在每个孔中包含至少两个区室，从而有可能在相同孔中共培养两种类型的细胞，并由上文所述的联合来评估细胞因子应答。在一个实施方案中，可以在24、48、或96孔细胞培养板（Nunc）中进行细胞培养。为了建立共培养，在不允许细胞发生物理接触之处，可以使用特定插入物，准确确定的通透膜（Nunc TC插入物）。

鉴定试剂盒可用于评估任何待测化合物的变应原性和任何待测化合物的毒性。

## 实验

下文描述了在实施例中使用的实验。

## 方法

## 1. 生物测定法

在用溶于水的2% (v/v) Ultrosor G预先包被的培养瓶 (Nunc) 中以1500 - 3000个细胞/cm<sup>2</sup>接种人肺上皮细胞 (BEAS-2B, ATCC # CRL-9609), 并在含2% (v/v) Ultrosor G的LHC-9培养基中于37℃、5% CO<sub>2</sub>进行培养。

在达到汇合前对细胞进行传代培养。除去培养基, 并加入新鲜的溶于0.25% (w/v) 胰蛋白酶 - 0.03% (w/v) EDTA的0.5% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 溶液, 直至细胞离壁 (通常于室温5 - 10分钟后)。加入LHC-9培养基, 通过离心 (300xg, 15min) 收集细胞, 并重悬于含2% (v/v) Ultrosor G的LHC-9培养基。最后, 以1500 - 3000个细胞/cm<sup>2</sup>将细胞分发到预先包被的培养瓶 (Nunc) 中。

当可以获得足够细胞用于进行计划数目的测定法时, 将细胞进行胰蛋白酶消化, 并以1x10<sup>5</sup>个细胞/孔转移到24孔培养板 (Nunc) 中。在含2% (v/v) Ultrosor G的LHC-9培养基中于37℃、5% CO<sub>2</sub>保温24小时。然后, 除去培养基, 并加入新鲜且预热的含2% (v/v) Ultrosor G和所研究蛋白质的LHC-9培养基。不含蛋白质的培养基作为阴性对照, 用100 μg大肠杆菌LPS 055:B5刺激的细胞作为阳性对照。每个测定法一式三份。

通过ELISA (R&D Systems) 评估选择的细胞因子的胞外表达, 作为保温时间和蛋白质浓度的函数。在收集后立即对细胞培养基进行ELISA, 或者对保存于-20℃或更低温度的培养基进行。每次都包括校准曲线, 用于量化检测的细胞因子水平, 和用于评估测定法的重复性。

## 2. 免疫Brown Norway大鼠

每周用100 μl 0.9% (w/v) NaCl (对照组) 或100 μl上文所述蛋白质稀释液进行20次气管内免疫。每组包括10只大鼠。每次在第二次免疫一周后由眼部采集血液样品 (2ml)。通过血液凝结和离心获得血清。

### 3. IgE ELISA

使用下列材料进行IgE ELISA:

缓冲液和溶液:

清洗缓冲液	PBS、0.05% (v/v) 吐温 20
封闭缓冲液	PBS、2% (w/v) 脱脂奶粉
稀释缓冲液	PBS、0.05% (v/v) 吐温 20、0.5% (w/v) 脱脂奶粉
柠檬酸盐缓冲液	(0.1M, pH5.0-5.2)

CovaLink 板的激活:

配制每ml丙酮含10mg氰尿酸氯的新鲜储液。

临使用前,一边搅拌一边向PBS中加入氰尿酸氯储液,直至稀释至终浓度1mg/ml。在CovaLink NH<sub>2</sub>板的每个孔中加入100 μl稀释液,并于室温保温5分钟。用PBS清洗3次。

将新鲜制备的激活板于50℃干燥30分钟。立即用封条密封每个板。预先激活的板可以在塑料袋中于室温保存3周。

ELISA 流程:

将小鼠抗大鼠IgE在PBS中稀释200倍(5 μg/ml)。在每个孔中加入100 μl。将板于4℃包被过夜。

通过将每个孔用200 μl封闭缓冲液于室温保温1小时来封闭非特异性吸附。将板用300 μl清洗缓冲液清洗3次。

将未知大鼠血清和已知大鼠IgE溶液在稀释缓冲液中进行稀释,通常未知血清是稀释10倍、20倍、和40倍,标准IgE由1 μg/ml开始进行1/2稀释。在每个孔中加入100 μl。于室温保温1小时。

通过用清洗缓冲液清洗3次而除去未结合物质。将抗大鼠IgE(生物素)在稀释缓冲液中稀释2000倍。在每个孔中加入100 μl。于室温保温1小时。通过用清洗缓冲液清洗3次而除去未结合物质。

将链霉亲和素在稀释缓冲液中稀释1000倍。在每个孔中加入100

$\mu\text{l}$ 。于室温保温1小时。通过用300  $\mu\text{l}$ 清洗缓冲液清洗3次而除去未结合物质。

将OPD (0.6mg/ml) 和 $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.4  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) 溶解于柠檬酸盐缓冲液。在每个孔中加入100  $\mu\text{l}$ 。于室温保温30分钟。

通过加入100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ 来终止反应。将板于492nm读数, 620nm作为参考。

实施例1: 可以在上皮细胞中诱导的细胞因子的鉴定

在这组实验中, 将100  $\mu\text{g}$  LPS (脂多糖) 用于刺激细胞。2、4、6、8、和16小时后进行ELISA。表2显示了在细胞中诱导的细胞因子(+), 还指出了在用LPS刺激细胞后在上皮细胞培养基中没有检测到的细胞因子(-)。

表 2

细胞因子	细胞应答
IL-1 $\alpha$	-
IL-1 $\beta$	-
IL-2	-
IL-4	-
IL-5	-
IL-6	+
IL-8	+
IFN- $\gamma$	-
TNF- $\alpha$	-
GM-CSF	+
MCP-1	+
MIP-1 $\beta$	-
RANTES	+

图1a-d显示了表中指出是阳性(+)的细胞因子的不同动力学。由于IL-8和IL-6展现相似动力学,因此只显示了IL-8(图1)。

实施例2:由多种蛋白酶衍生物在上皮细胞中诱导的细胞因子水平的评估

选择来自枯草蛋白酶家族的蛋白酶P(CDJ31:地衣芽孢杆菌丝氨酸蛋白酶(E.C. 3.4.21.62)),并用不同大小(具体而言是350、750、1000、2000、和5000Da)的聚乙二醇(PEG)分子进行修饰。对未修饰和已修饰的酶都在上皮细胞测定法中评估它们诱导胞外细胞因子生成的效能。

为了防止蛋白酶对细胞因子的蛋白水解作用,在细胞培养基中稀释之前,用PMSF(10mM)抑制前者。通常,在应用于细胞前,将PMSF稀释大约1000倍。在这些浓度,PMSF及其水解产物对于细胞因子生成没有可检测的影响。

图2显示了未修饰和已修饰蛋白酶的IL-8、IL-6、和MCP-1动力学。后者用P-bis-S-PEG2000表示。基线是参照对照培养基获得的。对另一种枯草蛋白酶(PD498:芽孢杆菌丝氨酸蛋白酶(E.C. 3.4.21.66))观察到几乎相同的结果。

为了比较各自的细胞因子水平,选择了与100 $\mu$ g蛋白酶保温4小时后产生的水平。

实施例3:检测到的细胞因子水平和大鼠中的IgE水平与用于酶修饰的PEG分子长度的相关性

用未修饰和已修饰蛋白酶气管内免疫大鼠,并通过ELISA检测蛋白酶特异性IgE水平。对整个研究中检测到的IgE水平进行积分,并相对于在用未修饰酶免疫的大鼠中观察到的水平进行比较。在图3中,(a)显示了相对IgE水平随用于修饰酶的PEG分子的长度增加而降低。发现,IL-8水平(b)随PEG大小的增加而增加,IL-6(c)和MCP-1(d)水平展现钟形动力学。

实施例 4: 检测到的细胞因子水平与在大鼠中检测到的相对于未修饰酶的 IgE 水平之间的关联

使用实施例3中获得的结果,有可能直接使检测到的细胞因子水平与大鼠中的IgE水平相互关联。

在图4中, (a) 显示了IL-8水平随相对于未修饰酶的IgE水平的增加而降低。相比于未修饰酶, IL-6 (b) 和MCP-1 (c) 随着相对于未修饰酶的IgE水平升高而急剧升高, 随后急剧降低。

IgE与各种细胞因子的相互关联可概述如下:

表 3

大鼠中的 IgE 水平 (%)	IL-8	IL-6	MCP-1
>50	-	-	-
50-25	+	+	- (p>0.05)
25-10	+	+	+
<10	+	-	+

实施例5: 检测到的细胞因子水平与在使用蛋白酶和立扑莱斯的大鼠中的IgE水平之间的比较

在上皮细胞测定法中评估了来自芽孢杆菌的丝氨酸蛋白酶E.C. 3.4.21.66和来自*Humicola lanuginosa*的三酰基甘油酰基水解酶(脂肪酶)E.C. 3.1.1.3的细胞因子水平。用相同蛋白酶和脂肪酶气管内免疫大鼠,并通过ELISA检测IgE水平。图5显示了经标准化的细胞因子水平,以及蛋白酶和脂肪酶的IgE水平。

根据实施例3表3中显示的结果,蛋白酶的变应原性高于脂肪酶。因此,由蛋白酶观察到的所有细胞因子的低水平符合高IgE水平,而由脂肪酶观察到的所有细胞因子的高水平符合显著较低的IgE水平。

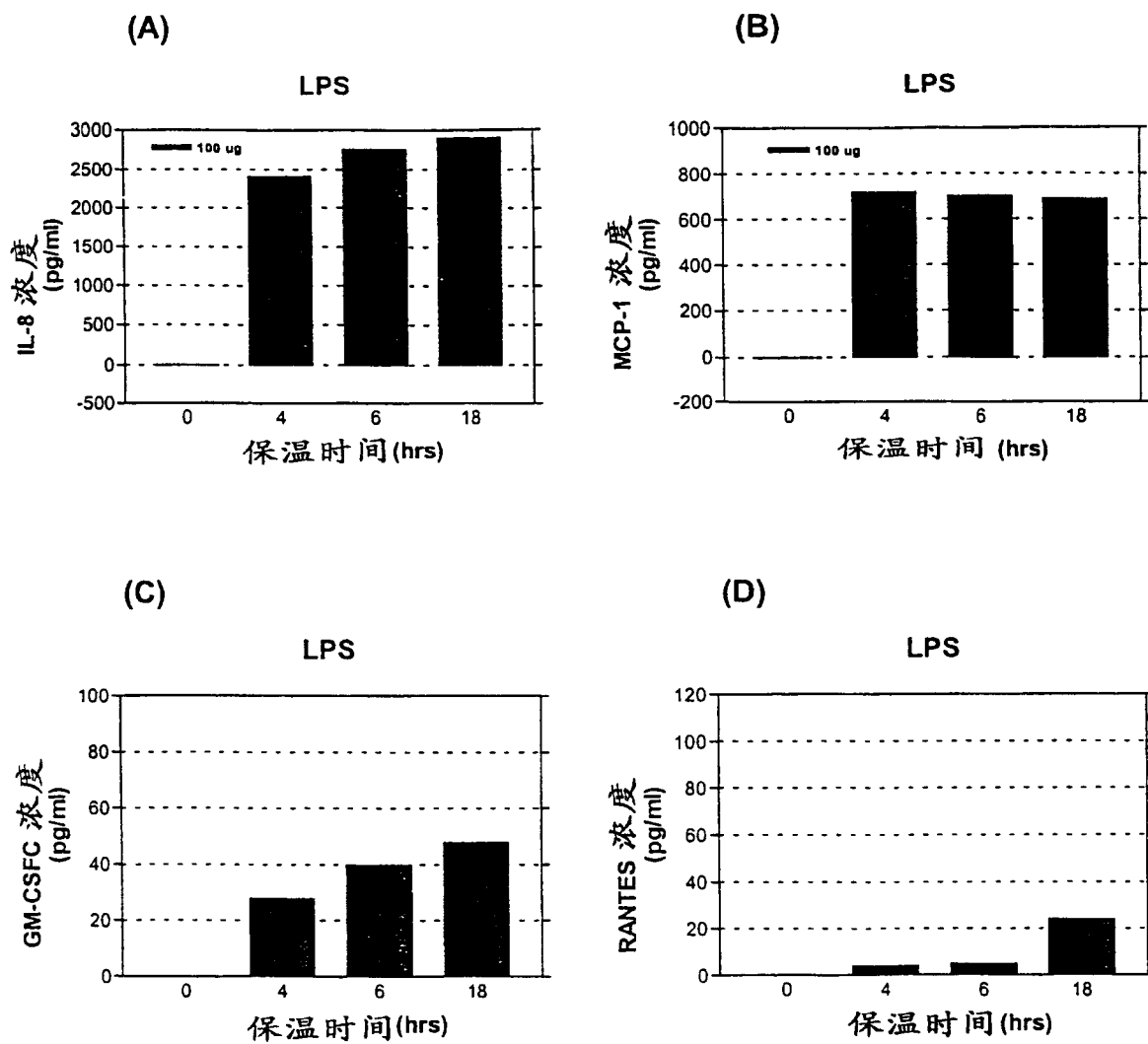


图1

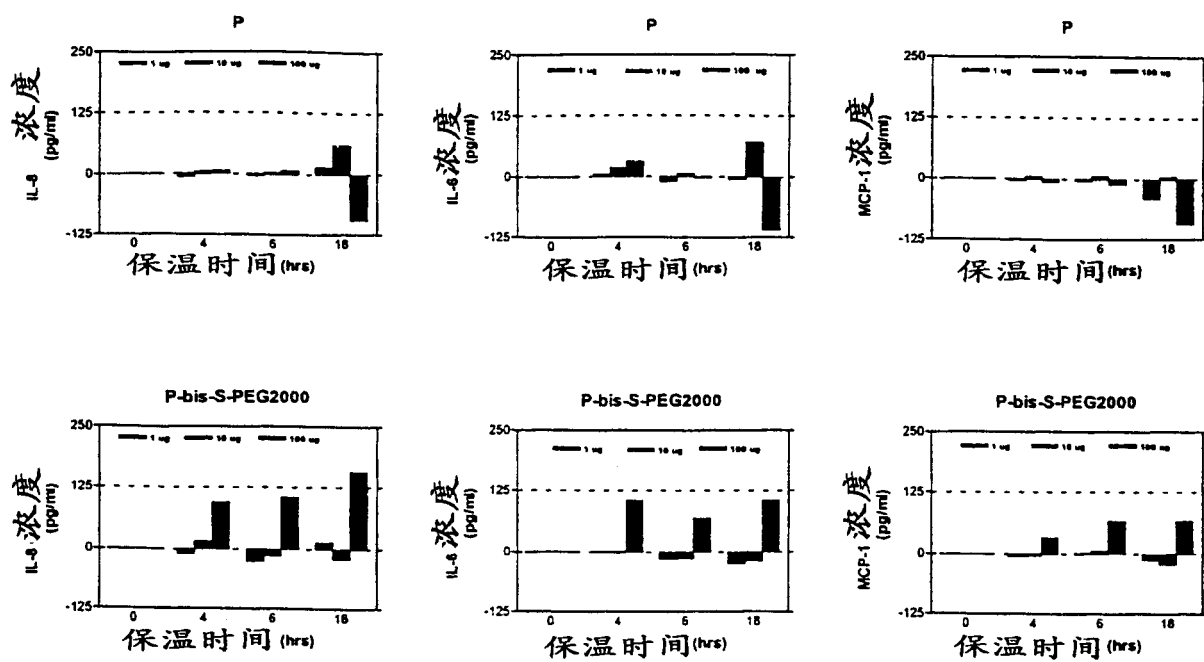


图2

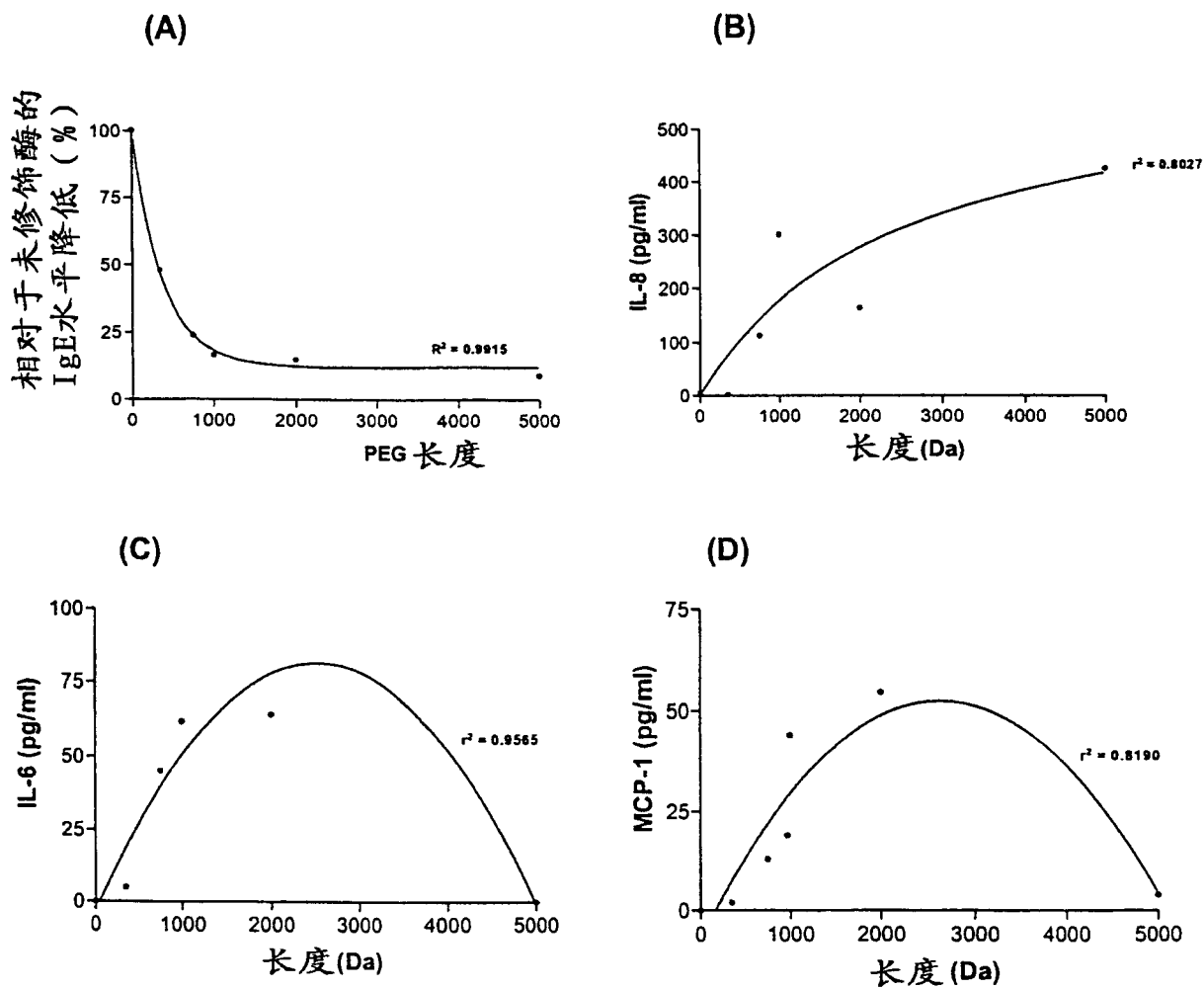


图 3

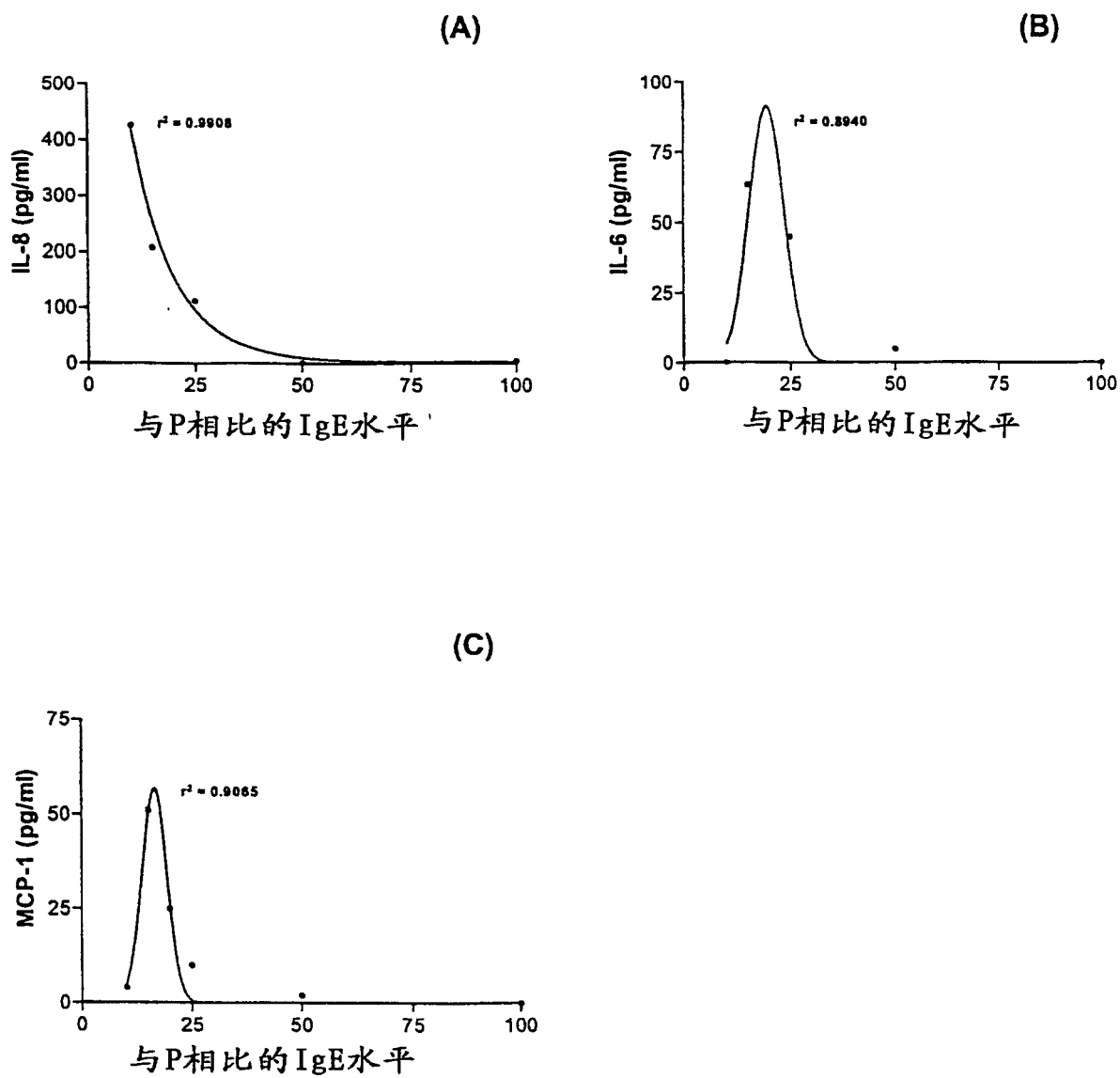


图 4

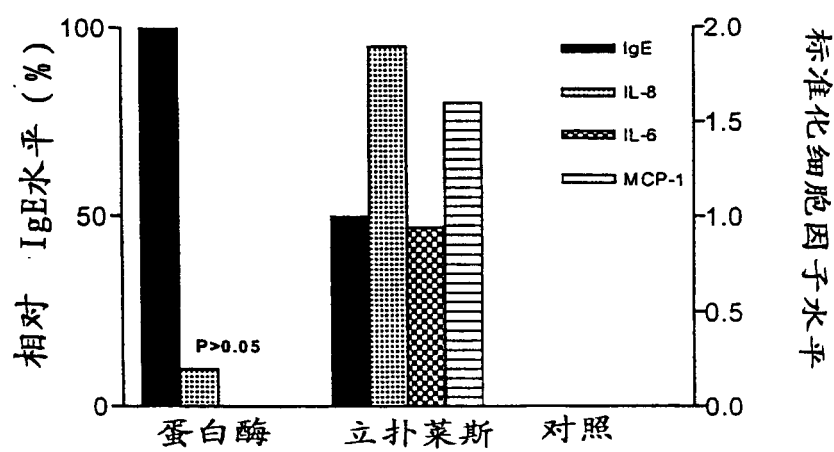


图5

专利名称(译)	用于评估变应原性的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1379859A</a>	公开(公告)日	2002-11-13
申请号	CN00814212.2	申请日	2000-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	诺沃挪第克公司		
申请(专利权)人(译)	诺沃奇梅兹有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺沃奇梅兹有限公司		
[标]发明人	EL罗根 S厄斯特		
发明人	E·L·罗根 S·厄斯特		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/6863 G01N2333/535 G01N2333/54 G01N2333/5412		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	199901486 1999-10-15 DK		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于评估待测化合物的变应原性或毒性和用于同时筛选至少两种化合物的方法。本发明还涉及用于本发明的细胞类型的鉴定方法,以及用于化合物高通量筛选的鉴定试剂盒。通过使至少一种动物起源的细胞类型的细胞培养物接触待测化合物并测量细胞因子应答,可以评估待测化合物的变应原性。

