

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-506983

(P2007-506983A)

(43) 公表日 平成19年3月22日(2007.3.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 Z N A K	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	2 G O 5 4
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	4 B O 2 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-528285 (P2006-528285)  
 (86) (22) 出願日 平成16年9月24日 (2004. 9. 24)  
 (85) 翻訳文提出日 平成18年5月10日 (2006. 5. 10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/031614  
 (87) 国際公開番号 W02005/031308  
 (87) 国際公開日 平成17年4月7日 (2005. 4. 7)  
 (31) 優先権主張番号 60/506, 434  
 (32) 優先日 平成15年9月26日 (2003. 9. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

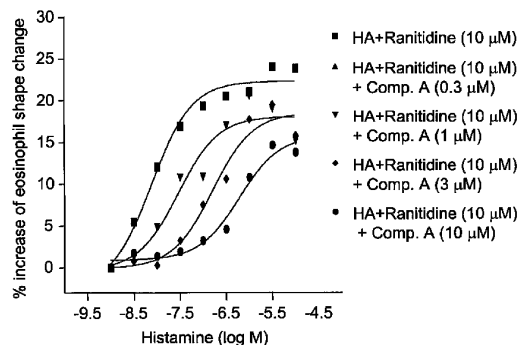
(71) 出願人 390033008  
 ジヤンセン・ファーマシューチカ・ナーム  
 ローゼ・フェンノートシャツプ  
 JANSSEN PHARMACEUTI  
 CA NAAMLOZE VENNOOT  
 SCHAP  
 ベルギー・ビー-2340-ビールセ・ト  
 ウルンホウトセバーク30  
 (74) 代理人 100060782  
 弁理士 小田島 平吉  
 (72) 発明者 カールゾン, ラース  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9203  
 7サンディエゴ・ファングレン336

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全血においてヒスタミンH<sub>4</sub>受容体により媒介される作用を分析すること

(57) 【要約】

好酸球形態変化、細胞骨格変化、接着分子アップレギュレーションもしくはカルシウムフラックスのような、ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体により媒介される作用を検出するために全血を分析するアッセイ方法が記述される。そのような方法は、臨床および診断用途において有用である。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 供給源からの全血をヒスタミンH<sub>4</sub>受容体アンタゴニストで処理し、処理サンプルを生成せしめること；

処理サンプルにヒスタミンおよび特異的ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体アゴニストから選択されるアッセイ試薬を加え、アッセイサンプルを生成せしめること；および

ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体により媒介される作用を検出するためにアッセイサンプルを分析すること

を含んでなる段階により全血の処理サンプルに対して研究アッセイ ( i n v e s t i g a t i v e a s s a y ) を行うこと

を含んでなるヒスタミンH<sub>4</sub>受容体により媒介される作用のアッセイ方法。

10

## 【請求項 2】

請求項 1 記載の方法において、該加える段階が、処理サンプルにヒスタミンH<sub>2</sub>受容体アンタゴニストを加えることをさらに含んでなる方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法において、該分析することの前に：

インキュベーション反応を促進する温度および時間でアッセイサンプルをインキュベーションすること；および

インキュベーション反応を停止させ、そしてアッセイサンプルを固定剤で固定することをさらに含んでなる方法。

20

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法において、該分析することが、アッセイサンプルにおける赤血球を溶解することおよびフローサイトメトリーを用いて好酸球形態変化を検出することを含んでなる方法。

## 【請求項 5】

請求項 3 に記載の方法において、該分析することが、アッセイサンプルに染色試薬を加えることおよびフローサイトメトリーを用いて接着分子アップレギュレーションを検出することを含んでなる方法。

## 【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法において、該染色試薬が蛍光色素標識およびフィコエリトリン ( p h y c o e r y t h e r i n e ) コンジュゲート抗CD11bおよび抗CD54抗体から選択される方法。

30

## 【請求項 7】

請求項 3 に記載の方法において、該分析することが、フローサイトメトリーを用いて細胞内遊離カルシウムのレベルをモニターすることを含んでなる方法。

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法において、全血をフッ素化剤で処理することをさらに含んでなり、そしてさらに細胞内遊離カルシウムのレベルの該モニタリングが蛍光の変化を測定することを含んでなる方法。

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法において、該分析することが、アッセイサンプルを蛍光色素で染色することを含んでなる方法。

40

## 【請求項 10】

請求項 3 に記載の方法において、該分析することが、蛍光顕微鏡を用いて細胞骨格変化を観察することを含んでなる方法。

## 【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法において、該分析することの前にアッセイサンプルを蛍光色素で染色することをさらに含んでなる方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法において、供給源が臨床研究におけるヒト被験体であり、そして

50

該方法が：

(b) 未処理のサンプルにアッセイ試薬を加え、コントロールサンプルを生成せしめること；および

ヒスタミンにより媒介される作用を検出するためにコントロールサンプルを分析すること

を含んでなる段階により供給源からの全血の未処理のサンプルにコントロールアッセイを行うこと；ならびに

(c) 処理サンプルへの研究アッセイの結果をコントロールサンプルへのコントロールアッセイの結果と比較すること

をさらに含んでなる方法。

10

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法において、研究アッセイ (a) の該加える段階が、処理サンプルにヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストを加えることをさらに含んでなり、そしてコントロールアッセイ (b) の該加える段階が、未処理のサンプルに該ヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストを加えることをさらに含んでなる方法。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の方法において、該処理する段階が、投与処方計画に従ってヒト被験体にヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体アンタゴニストを投与することを含んでなり、そしてコントロールサンプルへの該アッセイが、該処理することの前行われる方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法において、処理サンプルを一定期間ごとに提供するために投与スケジュールの間に選択された時間間隔でヒト被験体から全血を採取すること、および処理サンプルの各々に該研究アッセイを行うことをさらに含んでなる方法。

20

【請求項 16】

請求項 1 に記載の方法において、供給源が、ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体活性により媒介される疑いがある疾患もしくは病状の診断を受けているヒト患者である方法。

【請求項 17】

(a) 未処理のサンプルにヒスタミンおよび特異的ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体アゴニストから選択されるアッセイ試薬を加え、コントロールサンプルを生成せしめること；および

ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体により媒介される作用を検出するためにコントロールサンプルを分析すること

30

を含んでなる段階により任意のヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体アンタゴニストで未処理の供給源からの全血のサンプルにコントロールアッセイを行うこと

を含んでなるヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体により媒介される作用をアッセイする方法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の方法において、該加える段階が、未処理のサンプルにヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストを加えることをさらに含んでなる方法。

【請求項 19】

請求項 17 に記載の方法において、該分析することが好酸球形態変化、細胞骨格変化、接着分子アップレギュレーションもしくはカルシウムフラックスを検出することを含んでなる方法。

40

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法において、

(b) 供給源からの全血をヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体アンタゴニストで処理して、処理サンプルを生成せしめること；

処理サンプルにヒスタミンおよび特異的ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体アゴニストから選択されるアッセイ試薬を加え、アッセイサンプルを生成せしめること；および

ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体により媒介される作用を検出するためにアッセイサンプルを分析すること

を含んでなる段階により全血の処理サンプルに研究アッセイを行うこと；ならびに

50

(c) コントロールサンプルのコントロールアッセイの結果を処理サンプルの研究アッセイの結果と比較すること  
をさらに含んでなる方法。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の方法において、コントロールアッセイ (a) の該加える段階が、処理サンプルにヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストを加えることをさらに含んでなり、そして研究アッセイ (b) の該加える段階が、未処理のサンプルに該ヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストを加えることをさらに含んでなる方法。

【請求項 22】

請求項 20 に記載の方法において、全血の該処理がインビボで行われる方法。

10

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法において、該供給源が哺乳類である方法。

【請求項 24】

請求項 22 に記載の方法において、該供給源がヒトである方法。

【発明の詳細な説明】

【先行出願へのクロスリファレンス】

【0001】

本願は、2003年9月26日に出願された米国仮出願第60/506,434号の優先権の利益を請求する。

【0002】

本発明は、ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体により媒介される好酸球形態変化を検出するかもしくは測定するために全血をアッセイする方法に関する。本発明はまた、細胞骨格変化、接着分子アップレギュレーションもしくはカルシウムフラックス応答のような、全血におけるヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体により媒介される他の作用を検出するかもしくは測定するアッセイにも関する。そのような方法は、製薬学的研究および開発において、例えば臨床試験において患者もしくは被験体に投与するヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体モジュレーターの作用をモニターするバイオマーカーアッセイとして有用である。

20

【背景技術】

【0003】

エオタキシンおよび他のケモカイン受容体アンタゴニストを調べるある種の全血アッセイは報告されている。例えば、非特許文献1を参照。また、非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4も参照。しかしながら、ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体により媒介される作用の全血アッセイの必要性がある。

30

【0004】

ヒスタミンは、体内の異なる生理系の調節において重要な役割を果たす生体アミンである。ヒスタミンは、マスト細胞、好塩基球、エンテロクロマフィン様細胞およびニューロンのような、特定の細胞タイプにおいてヒスチジン脱炭酸反応により L-ヒスチジンから合成される。ヒスタミンの多様な生物学的作用は、異なるヒスタミン受容体を介して媒介され、それらは全て G タンパク質共役受容体 (GPCR) である。

【0005】

4種の異なるヒスタミン受容体、すなわち、H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub> および H<sub>4</sub> 受容体が同定されている (非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9；非特許文献10)。最近同定されたヒスタミン受容体ファミリーの新規メンバー、H<sub>4</sub> 受容体は、他のヒスタミン受容体と低い相同性を有する。ヒスタミン受容体ファミリーにおけるその最も近いメンバーは H<sub>3</sub> 受容体であり、それは H<sub>4</sub> 受容体と 35% のみのアミノ酸相同性を共有する。H<sub>4</sub> 受容体の薬理学的特性は、H<sub>4</sub> 受容体でトランスフェクションした細胞を用いて研究されている (非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9；非特許文献10)。H<sub>1</sub> および H<sub>2</sub> 受容体特異的リガンドは、H<sub>4</sub> 受容体に結合しない。対照的に、クロベンプロピット (clobenpropit)、イメチット (imetit)、R- -メチルヒスタミンおよびチオペラミドのような

40

50

、ある種のH<sub>3</sub>受容体アゴニストおよびアンタゴニストは、H<sub>4</sub>受容体と様々な程度の交差反応性を示す。最近、H<sub>3</sub>もしくはH<sub>4</sub>受容体に特異的なアンタゴニストが作製されている。例えば、非特許文献11；非特許文献12；および特許文献1を参照。そのような化合物は、H<sub>3</sub>およびH<sub>4</sub>受容体の生物学的役割を分析する有益な手段として役立つことができる。

#### 【0006】

4種のヒスタミン受容体はそれらの発現プロフィールにおいて異なり、そしてそれらは異なる生物学的作用を媒介する。H<sub>1</sub>受容体は、平滑筋収縮、血管拡張および感覚神経活性化を包含する、アレルギー反応の症状を媒介する。H<sub>2</sub>受容体は、胃における胃酸分泌を高める。そしてH<sub>3</sub>受容体は、ニューロンによるヒスタミンおよび神経伝達物質の放出を調節する（非特許文献13）。H<sub>4</sub>受容体の発現は、造血系の細胞、特にマスト細胞、好塩基球および好酸球に限定される（非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8；非特許文献10）。

10

#### 【0007】

H<sub>4</sub>受容体は、マスト細胞走化性を媒介することが見出されている（非特許文献14）。好酸球へのヒスタミンの走化性作用もまた、初期の研究において示唆されている（非特許文献15）。最近、ヒスタミンに向かう好酸球走化性は、チオペラミドにより阻止されることが見出され、従って、H<sub>4</sub>受容体により媒介されることが示唆された（非特許文献16）。

20

#### 【0008】

好酸球は通常は組織に、特に呼吸器系および腸系にそして子宮に存在する骨髄由来の顆粒球性白血球である。血流における好酸球数は比較的lowく、そして組織に向かう好酸球遊走の制御は接着分子およびケモカインに起因している（非特許文献17；非特許文献18）。好酸球は後期アレルギー反応における重要なエフェクター細胞であり、そしてそれらはアレルギー性疾患の病因に関与している（非特許文献19）。好酸球の活性化は、気道上皮損傷および喘息における気管支過敏性の発症をもたらすと考えられる有毒な顆粒タンパク質の放出をもたらす。

【特許文献1】国際公開第WO 02/072548号明細書

【非特許文献1】Bryan et al., 2002, "Responses of leukocytes to chemokines in whole blood and their antagonism by novel CC-chemokine receptor 3 antagonists," Am. J. Respir. Crit. Care Med., 165, 1602-1609

30

【非特許文献2】Menzies-Gow et al., 2002, "Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers," J. Immunol., 169, 2712-2718

40

【非特許文献3】Heinemann et al., 2000, "Basophil responses to chemokines are regulated by both sequential and cooperative receptor signaling," J. Immunol., 165, 7224-7233

【非特許文献4】Penido et al., 2001, "LPS induces eosinophil migration via CCR3 signaling through a mechanism independent of RANTES and eotaxin," Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 25, 707-716

50

- 【非特許文献5】Oda et al., 2000, "Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes," *J. Biol. Chem.*, 275, 36781 - 36786
- 【非特許文献6】Liu et al., 2001, "Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H4) expressed in bone marrow," *Mol. Pharmacol.*, 59, 420 - 426
- 【非特許文献7】Liu et al., 2001, "Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H4 receptors reveals substantial pharmacological species variation," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299, 121 - 130 10
- 【非特許文献8】Morse et al., 2001, "Cloning and characterization of a novel human histamine receptor," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 296, 1058 - 1066
- 【非特許文献9】Nguyen et al., 2001, "Discovery of a novel member of the histamine receptor family," *Mol. Pharmacol.*, 59, 427 - 433 20
- 【非特許文献10】Zhu et al., 2001, "Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor," *Mol. Pharmacol.*, 59, 434 - 441
- 【非特許文献11】Shah et al., 2002, "Novel human histamine H3 receptor antagonists," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12, 3309 - 3312
- 【非特許文献12】Jablonski et al., 2003, "The first potent and selective non-imidazole human histamine H4 receptor antagonists," *J. Med. Chem.*, 46(19), 3957 - 3960 30
- 【非特許文献13】Hill et al., 1997, "International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors," *Pharmacol. Rev.*, 49, 253 - 278
- 【非特許文献14】Hofstra et al., 2003, "Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305, 1212 - 1221 40
- 【非特許文献15】Clark et al., 1975, "The selective eosinophil chemotactic activity of histamine," *J. Exp. Med.*, 142, 1462 - 1476
- 【非特許文献16】O'Reilly et al., 2002, "Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils - role in eosinophil chemotaxis," *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 22, 431 - 448
- 【非特許文献17】Lukacs, 2001, "Role of chemokines in the pathogenesis of asthma," *Nat. Rev.* 50

Immunol., 1, 108 - 116

【非特許文献18】Tachimoto et al., 2002, "Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophil adhesion and migration," Int. Arch. Allergy Immunol., 128, 18 - 20

【非特許文献19】Bousquet et al., 1990, "Eosinophilic inflammation in asthma," N. Engl. J. Med., 323, 1033 - 1039

【発明の開示】

【0009】

[発明の要約]

ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体が、以下に説明するように細胞形態変化および接着分子アップレギュレーションとともに好酸球走化性を媒介することを確定したことにより、今や、全血ヒスタミンアッセイが開発された。

【0010】

従って、一つの一般的な態様として、本発明は、供給源からの全血をヒスタミンH<sub>4</sub>受容体アンタゴニストで処理し、処理サンプルを生成せしめること；処理サンプルにヒスタミンおよび特異的ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体アゴニストから選択されるアッセイ試薬を加え、アッセイサンプルを生成せしめること；およびヒスタミンH<sub>4</sub>受容体により媒介される作用を検出するためにアッセイサンプルを分析することを含んでなる段階により全血の処理サンプルに研究アッセイ(investigative assay)を行うことを含んでなる、ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体により媒介される作用をアッセイする方法に関する。別の一般的な態様として、本発明は、未処理のサンプルにヒスタミンおよび特異的ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体アゴニストから選択されるアッセイ試薬を加え、コントロールサンプルを生成せしめること；およびヒスタミンH<sub>4</sub>受容体により媒介される作用を検出するためにコントロールサンプルを分析することを含んでなる段階により任意のヒスタミンH<sub>4</sub>受容体アンタゴニストで未処理の全血のサンプルにコントロールアッセイを行うことを含んでなる、ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体により媒介される作用をアッセイする方法に関する。好ましい態様として、コントロールアッセイおよび研究アッセイを比較目的のために組み合わせる。

【0011】

本発明のアッセイの利点、ならびに実例となる態様および別の特徴は、添付の図面と併せて理解される以下の詳細な記述から明らかである。

【0012】

図面に示す実験結果は、以下の詳細な記述においてさらに説明され、それは本発明のアッセイの実例となるそして好ましい態様ならびにバックグラウンド実験を説明する。

【0013】

[本発明の詳細な記述およびその好ましい態様]

マスト細胞はヒスタミンの主要な生産者であり、そしてマスト細胞および好酸球は両方ともアレルギー反応における既知のエフェクター細胞であるので、ヒスタミンを介した好酸球の漸増におけるマスト細胞の役割を以下に記述する実験を行うことにより調べた。以下に説明するように、好酸球は細胞形態を変化すること、接着分子のアップレギュレーションおよび走化性においてヒスタミンに応答する。H<sub>4</sub>受容体特異的アンタゴニストを用いて、全てのこれらの応答が好酸球上に発現されるH<sub>4</sub>受容体により媒介されることを決定した。

【0014】

バックグラウンド実験

材料

ヒト細胞系HMC-1、HL60.15および一次HUVEC細胞は、American Type Culture Collection(Rockville, MD)か

10

20

30

40

50

ら購入した。RNeasyキットは、Qiagen (Valencia, CA) からであった。RT反応キットおよびExpressHyb溶液は、Invitrogen (Carlsbad, CA) からであった。H<sub>3</sub>受容体特異的アンタゴニストの化合物BならびにH<sub>4</sub>受容体特異的アンタゴニストの化合物Aは合成し(WO 01/74815およびWO 02/072548を参照、これらの開示は、本明細書に引用することにより組み込まれる)、そしてそれらのヒスタミン受容体特異性は以前に記述された(Shah et al., 2002, 上記; Jablonowski et al., 2003, 上記)。全てのケモカインおよびサイトカインは、R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。全ての抗体は、BD Pharmingen (San Diego, CA) から購入した。全ての他の試薬は、Sigma (St. Louis, MO) から購入した。ヒスタミン、イメチット、クロベンプロピットおよび全ての他の試薬は、Sigma (St. Louis, MO) から購入した。

10

#### 【0015】

##### 異なるヒト造血細胞タイプの精製

好酸球および好中球は、健康な志願者から集めた血液サンプルから精製した。簡潔に言えば、ヘパリン添加全血の遠心分離により多血小板血漿を除いた。好中球および好酸球で濃縮される多形核白血球(PMNL)を不連続血漿-パーコール勾配(密度1.082 g/ml)上で2000 rpmで20分間の遠心分離により末梢血単核細胞(PBMC)から分離した。PMNLにおける赤血球細胞は、低張ショック溶解により除いた。PMNLをヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)で染色し、そして分別細胞計数を行った。好酸球計数は、全PMNL数の2~10%の間であった。ヒト好中球は、磁気細胞分離系(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)からのAutoMACS)において抗CD16コンジュゲートマイクロビーズを用いて正の選択によりPMNLから精製した。PMNLを0.5%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するPBSにおいて抗CD16コンジュゲートマイクロビーズとインキュベーションし、それらは好中球に選択的に結合する。好中球は、AutoMACS系において磁場に細胞懸濁液を通すことにより精製された。好酸球は、負の選択によりPMNLから精製した。PMNLを0.5%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するPBSにおいて抗CD16、抗CD3、抗CD19および抗CD14コンジュゲートマイクロビーズのカクテルとインキュベーションし、それらはPMNL懸濁液におけるそれぞれ好中球、T細胞、B細胞および単球に選択的に結合する。好酸球は、AutoMACS系においてマイクロビーズに結合した細胞を除くことにより精製され、H&E染色によれば>97.5%の純度の好酸球集団をもたらした。精製された好酸球をバッファー(10 mM Ca<sup>2+</sup> およびMg<sup>2+</sup>、10 mM HEPES、10 mM グルコースおよび0.1% BSAを含有するPBS、pH 7.2~7.4)において1回洗浄し、そして実験にすぐに使用した。

20

30

#### 【0016】

ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞は、PBMCから精製した。ヒトPBMCを不連続血漿-パーコール勾配(密度1.082 g/ml)上でPMNLから分離した。PBMCにおけるCD4<sup>+</sup>T細胞は、AutoMACS系において抗CD4コンジュゲートマイクロビーズを用いて正の選択により精製した。CD4<sup>+</sup>T細胞をT細胞分化のためにサイトカインもしくは抗体の存在下で固定化抗CD3(培養プレートをPBS中5 μg/mlの抗CD3で一晩被覆し、そして次に使用前にPBSで2回すすいだ)および2 μg/mlの可溶性抗CD28で7日間刺激した。I型ヘルパーT細胞分化のためには、10 ng/mlのヒトIL-12および10 μg/mlの抗IL-4を培養培地に加えた。II型ヘルパーT細胞分化のためには、10 ng/mlのヒトIL-4ならびに10 μg/mlの抗IL-12および抗IFN-γを培養培地に加えた。ヒトIL-2をT細胞刺激の4日目に20 U/mlで培養物に加えた。7日目のT細胞をRNA調製用に集めた。I型もしくはII型ヘルパーT細胞は、それぞれ、IFN-γもしくはIL-4のそれらの生産を特徴とした。7日の分化後のエフェクター細胞タイプを確かめるために、T細胞のアリコートで固定化抗CD3で一晩再刺激し、そして細胞上清をELISAによりIL-4もしくはIFN-γに

40

50

ついて試験した。

【0017】

P B M CにおけるC D 8<sup>+</sup> T細胞は、A u t o M A C S系において抗C D 8コンジュゲートマイクロビーズを用いて正の選択により精製した。精製されたC D 8<sup>+</sup> T細胞をR P M I 1 6 4 0培地において固定化抗C D 3および抗C D 2 8で一晩刺激した。一晩活性化後の細胞をR N A調製用に採取した。

【0018】

P B M Cにおける単球は、A u t o M A C S系において抗C D 1 4コンジュゲートマイクロビーズを用いて正の選択により精製した。樹状細胞は、未成熟樹状細胞表現型に到達するように精製された単球を5 0 0 U / m lのI L - 4および8 0 0 U / m lのG M - C S Fの存在下で1 0日間培養することにより血液単球から生成せしめた。次に、未成熟樹状細胞を1 0 0 U / m lのT N F -  $\alpha$ で2 4 h処理して細胞を成熟樹状細胞表現型に導いた。成熟樹状細胞をR N A調製に使用した。

【0019】

ヒト好酸球細胞系の分化

ヒトH L 6 0 . 1 5細胞系を1 0 %のF C Sを含有するR P M I 1 6 4 0培地において培養し、そして細胞を0 . 5  $\mu$  Mの酪酸および1 0 n g / m lのI L - 5で2日間処理することにより好酸球に分化させた。

【0020】

H<sub>4</sub>およびH<sub>3</sub>受容体R N A発現の検出

精製されたヒト細胞からR N e a s yキット(Q i a g e n)を用いて全R N Aを抽出し、そしてR T反応キット(I n v i t r o g e n)を用いてc D N Aに逆転写した。H<sub>4</sub>受容体R N Aは、ヒトH<sub>4</sub>受容体特異的プライマー5' - A T G C C A G A T A C T A A T A G C A C Aおよび5' - C A G T C G G T C A G T A T C T T C Tを用いてR T - P C Rにより検出した。H<sub>4</sub>受容体の増幅P C Rバンドは1 1 7 0 b pである。H<sub>3</sub>受容体R N Aは、ヒトH<sub>3</sub>受容体特異的プライマー5' - A T G G A G C G C G C G C C G C C G A C G G Gおよび5' - A T G A A G A A G A A A A C A T G T C T Gを用いることにより検出した。H<sub>3</sub>受容体の増幅P C Rバンドは1 1 2 0 b pである。

【0021】

フローサイトメトリーを用いた好酸球形態変化の測定

好酸球形態変化応答を調べるためにヒトP M N Lサンプルを使用した。P M N Lを上記のように調製し、そして細胞をアッセイバッファー(1 0 m M C a<sup>2+</sup>およびM g<sup>2+</sup>、1 0 m M H E P E S、1 0 m Mグルコースおよび0 . 1 % B S Aを含有するP B S、p H 7 . 2 ~ 7 . 4)に再懸濁した。細胞のアリコート(8 0  $\mu$  lのアッセイバッファー中5 x 1 0<sup>5</sup>のP M N L)を室温でヒスタミン受容体アナログ(ジフェンヒドラミン、ラニチジン、チオペラミド、化合物AもしくはH<sub>3</sub>受容体アンタゴニスト)で1 0分間前処理した後に1 0 0  $\mu$  lの最終容量で1 . 2 m lのポリプロピレンクラスターチューブ(C o s t a r , C a m b r i d g e , M A)においてヒスタミンもしくはケモカインを加えた。チューブを3 7 °Cの水浴に1 0分間(もしくは示すとおり)置き、その後でそれらを氷水浴に移し、そして2 5 0  $\mu$  lのよく冷えた固定剤(P B S中2 %のパラホルムアルデヒド)を加えて反応を停止させ、そして細胞形態変化を維持した。細胞形態変化は、フローサイトメーター(B e c t o n D i c k i n s o n , M o u n t a i n V i e w , C A)で分析した。P M N Lにおける好酸球は、好中球のものと比較してそれらの高い自己蛍光に基づいてゲーティングした(g a t e d)。細胞形態変化は、前方散乱シグナルにおいてモニターした。P M N Lにおける好酸球および好中球を同定するために、細胞を氷上で飽和濃度のF I T Cコンジュゲート抗C C R 3もしくは抗C D 1 6抗体(これらは、それぞれ、好酸球もしくは好中球に特異的である)で3 0分間染色した。抗体染色後のサンプルをフローサイトメトリーにおいて分析した。

【0022】

接着分子の細胞表面発現の検出

10

20

30

40

50

接着分子の細胞表面発現を調べるために精製された好酸球を使用した。好酸球を  $10\text{ mM Ca}^{2+}$  および  $10\text{ mM Mg}^{2+}$ 、 $10\text{ mM HEPES}$ 、 $10\text{ mM}$  グルコースおよび  $0.1\%$  BSA を含有する PBS、 $\text{pH } 7.2 \sim 7.4$  に再懸濁した。細胞のアリコート ( $5 \times 10^5$  の PMNL) をヒスタミン受容体アナログ (上記のとおり) で  $10$  分間前処理した後に  $100\ \mu\text{l}$  の最終容量で  $1.2\text{ ml}$  のポリプロピレンクラスターチューブ (Costar, Cambridge, MA) においてヒスタミンもしくはケモカインを加えた。チューブを  $37^\circ\text{C}$  の水浴に  $10$  分間 (もしくは示すとおり) 置き、その後でそれらを氷水浴に移し、そして  $250\ \mu\text{l}$  のよく冷えた固定剤 (PBS 中  $0.5\%$  のパラホルムアルデヒド) を加えた。次に、サンプルを飽和濃度の FITC もしくはフィコエリトリン (phycoerythrine) コンジュゲート抗 CD11a、抗 CD11b もしくは抗 CD54 抗体のいずれかと氷上で  $30$  分間インキュベーションし、洗浄し、そして次にフローサイトメトリーにより分析した。

10

#### 【0023】

##### インビトロ走化性アッセイ

$5\ \mu\text{m}$  の細孔サイズを有するトランスウェル (Costar, Cambridge MA) を  $100\ \mu\text{l}$  の  $100\text{ ng/ml}$  ヒトフィブロネクチン (Sigma) で室温で  $2\text{ h}$  被覆した。過剰のフィブロネクチンの除去後に、 $0.5\%$  の BSA および異なる濃度のヒスタミン ( $0.01 \sim 100\ \mu\text{M}$ ) を含有する  $600\ \mu\text{l}$  の RPMI-1640 培地を下側のチャンバーに加えた。好酸球 ( $2 \times 10^5$  / ウェル) を上側のチャンバーに加えた。ヒスタミン受容体アナログ (ジフェンヒドラミン、ラニチジン、チオペラミド、化合物 A もしくは化合物 B) を上側および下側の両方のチャンバーに  $10\ \mu\text{M}$  の最終濃度になるようにもしくは図の説明文に記載するような他の濃度で加えた。プレートを  $37^\circ\text{C}$  で  $2\text{ h}$  インキュベーションし、そしてフローサイトメーターを用いて下側のチャンバーに遊走する細胞の数を  $1$  分間計数した。

20

#### 【0024】

##### 統計

実験データは、独立したサンプルの数 ( $n$ ) から平均  $\pm$  標準偏差 (SD) として示される。IC<sub>50</sub> もしくは EC<sub>50</sub> 値は、GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Philadelphia, USA) を用いて非線形回帰分析により濃度 - 作用曲線から計算した。統計的有意性 ( $P$ ) は、スチューデント T 検定により決定した。

30

#### 【0025】

結果：好酸球は H<sub>4</sub> 受容体を発現するが、H<sub>3</sub> 受容体を発現しない。

#### 【0026】

異なる精製されたヒト造血細胞タイプおよび細胞系における H<sub>4</sub> 受容体の発現を調べた。有意なレベルの H<sub>4</sub> 受容体 mRNA が、RT-PCR により好酸球および樹状細胞において検出された (図 1A)。好酸球における H<sub>4</sub> 受容体発現と対照的に、H<sub>3</sub> 受容体はこれらの細胞において検出されなかった (図 1B)。H<sub>4</sub> 受容体のわずかな発現は CD4<sup>+</sup> Th1 および Th2 エフェクター細胞において見出されたが、好中球、単球および活性化 CD8<sup>+</sup> T 細胞では検出されなかった (図 1A)。H<sub>4</sub> 受容体発現はまた、好酸球前駆細胞系 HL60.15 においても検出され、そしてその発現は、細胞を好酸球に分化するように IL-5 により誘導した場合に有意に増加された。ヒト HMC-1 マスト細胞系は、検出可能なレベルの H<sub>4</sub> 受容体を発現した。

40

#### 【0027】

結果：H<sub>4</sub> 受容体は好酸球形態変化を媒介する。

#### 【0028】

ゲーティング (gated) 自己蛍光前方散乱 (GAFS) アッセイとして知られている、フローサイトメトリーによる好酸球細胞形態変化の分析は、化学誘引物質により誘導される細胞形態変化の定量的測定を可能にする (Sabroe et al., 1999, "Differential regulation of eosinophil

50

chemokine signaling via CCR3 and non-CCR3 pathways," J. Immunol., 162, 2946-2955)。好中球および好酸球で濃縮された多形核白血球(PMNL)をヒト血液サンプルから調製し、そしてヒスタミンへのこれらの細胞の応答を調べた。好酸球は高レベルの自己蛍光を有し、そしてフローサイトメトリーにより好中球から区別することができた(図2A)。図2Aに示すように、高レベルの自己蛍光を有するPMNLにおける細胞集団はCCR3<sup>+</sup>好酸球で非常に濃縮され、一方、低い自己蛍光を有する集団は主としてCD16<sup>+</sup>好中球からなった。1 μMのヒスタミンは、好酸球に有意な細胞形態変化を誘導したが、好中球には影響がなかった(図2Bおよび2C)。

10

**【0029】**

ヒスタミンは、ヒスタミン処理後早くも1分でフローサイトメトリーにより検出することができる好酸球への迅速なそして一時的な細胞形態変化を誘導し、5分で最大限に変化し、そして40分後に元の細胞形態に徐々に戻った(図3A)。経時的なヒスタミン作用の消失は、細胞上清におけるヒスタミン活性の喪失のためではなかった。これらの細胞上清は、新たに調製した好酸球に通常の細胞形態変化を依然として引き起こすことができた(図3B)。好酸球形態変化は、ヒスタミンを除いた場合に維持されなかった。図3Bに示すように、ヒスタミンで5分間処理し、続いて洗浄した好酸球は、細胞形態変化を全く保持しなかった。しかしながら、これらの細胞は、ヒスタミンで再処理した場合に形態変化応答を依然として完全に再び開始することができた(図3B)。対照的に、ヒスタミンと60分インキュベーション後の好酸球は、元の細胞形態に戻っただけでなく、ヒスタミン再刺激へのそれらの応答も失った。これらの細胞は、それらをヒスタミンがないように洗浄した後に再刺激した場合でさえヒスタミンにもはや応答しなかった(図3B)。

20

**【0030】**

好酸球形態変化は、濃度依存的にヒスタミンにより誘導された(図3C)。好酸球への最大形態変化のためのヒスタミンの最適濃度は、~1 μMであった。この形態変化は、ヒスタミン濃度が1 μMより高い場合に目立たなくなり、そして100 μMのヒスタミンで形態変化は見出されなかった。好酸球形態変化へのヒスタミンのEC<sub>50</sub>は44 nMであり、一方、ケモカインのエオタキシン、エオタキシン-2およびMCP-3のEC<sub>50</sub>は、それぞれ、17 pM、21 pMおよび202 pMであった(図3D)。

30

**【0031】**

好酸球形態変化を媒介することにおけるヒスタミンとケモカインとの間の可能な相乗効果を調べた。ヒスタミンおよびケモカインのMCP-3の両方の滴定ならびに好酸球形態変化へのそれらの組み合わせた効果をモニターした(図3E)。ヒスタミンもしくはMCP-3のいずれかが次善濃度範囲である場合に部分的相加効果が示された。この効果はヒスタミンもしくはMCP-3濃度依存的であり、そしてそれらがそれらの最大有効用量に達する場合にさらなる増大は見出されなかった。同様の相加効果はまた、ヒスタミンを好酸球形態変化研究においてエオタキシン-2と組み合わせた場合にも認められた。

**【0032】**

好酸球形態変化に関与するヒスタミン受容体を決定するために特異的ヒスタミン受容体リガンドを使用した。10 μMでH<sub>4</sub>受容体特異的アンタゴニストの化合物AおよびH<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>受容体アンタゴニストのチオペラミドは、ヒスタミンによって誘導される好酸球形態変化を完全に阻止した(図4A)。対照的に、H<sub>3</sub>受容体アンタゴニストの化合物B、H<sub>1</sub>受容体アンタゴニストのジフェンヒドラミンおよびH<sub>2</sub>受容体アンタゴニストのラニチジンは、いかなる阻害効果も示さなかった(図4A)。1 μMのヒスタミンによって誘導される好酸球形態変化を阻止することにおける化合物AおよびチオペラミドのIC<sub>50</sub>は、それぞれ、270 nMおよび128 nMであり、一方、H<sub>3</sub>受容体特異的アンタゴニストは、30 μMまで効果がなかった(図4B)。H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>受容体アゴニストのイメチットおよびH<sub>4</sub>受容体特異的アゴニストのクロベンプロピットは、好酸球における部分的形態変化を引き起こすことにおいてヒスタミン作用を模倣することができた(図4C)。

40

50

従って、ヒスタミンによって誘導される好酸球形態変化は、 $H_4$  受容体により媒介されるように思われた。

【0033】

結果：ヒスタミンは $H_4$  受容体を介して細胞表面接着分子をアップレギュレーションする。

【0034】

好酸球細胞表面上の接着分子発現へのヒスタミンの作用を、特異的抗体を用いてフローサイトメトリーにおいて調べた。好酸球上のCD11b/CD18 (Mac-1) およびCD54 (ICAM-1) の細胞表面発現は、濃度依存的にヒスタミンにより誘導された (図5A)。CD11b/CD18 およびCD54の最大のアップレギュレーションのための最適ヒスタミン濃度は、10分の刺激で10 $\mu$ Mであった。興味深いことに、CD11b/CD18のような2-インテグリンの別のメンバー、CD11a/CD18 (LFA-1) の発現は、ヒスタミンにより誘導されなかった (図5A)。接着分子の細胞表面発現の増加は、10分のヒスタミン処理で認められた (図5Aおよび5B)。一時的な形態変化応答と異なり、細胞表面接着分子の増加は、ヒスタミンと60分のインキュベーション後に維持された (図5B)。

10

【0035】

好酸球上の接着分子アップレギュレーションに関与するヒスタミン受容体を異なる特異的ヒスタミン受容体アンタゴニストを用いて調べた。図5Cに示すように、10 $\mu$ Mの化合物Aもしくはチオペラミドはいずれも、CD11b/CD18 およびCD54発現のアップレギュレーションをなくした。対照的に、ジフェンヒドラミン、ラニチジンおよび $H_3$  受容体アンタゴニストの化合物Bは全て、好酸球上の接着分子のアップレギュレーションを阻止することにおいて効果がなかった。

20

【0036】

結果：ヒスタミンは $H_4$  受容体を介して好酸球走化性を媒介する。

【0037】

好酸球へのヒスタミンの走化性作用を精製されたヒト血液好酸球を用いて調べた。インビトロ走化性研究をトランスウェル系において行った。ヒスタミンは、83nMの $EC_{50}$ で濃度依存的に好酸球遊走を誘導した (図6Aおよび6B)。好酸球への最大走化性作用は、1 $\mu$ Mのヒスタミンで得られた (図6A)。ケモカインのエオタキシン-2およびMCP-3を比較のために同じアッセイにおいて用いた。好酸球走化性へのケモカインのエオタキシン-2およびMCP-3の $EC_{50}$ は、それぞれ、1.9nMおよび43nMであった (図6B)。ヒスタミン濃度勾配の崩壊は好酸球遊走を完全になくしたので、好酸球へのヒスタミン作用は走化性であったが、ケモキネシスではなかった。

30

【0038】

好酸球走化性へのヒスタミンとケモカインとの間の可能な相乗効果を調べた。ケモカインのエオタキシン-2およびMCP-3の滴定を次善濃度のヒスタミンの存在下もしくは不在下で行い、そして好酸球走化性への効果を調べた。図6Cに示すように、0.5 $\mu$ Mのヒスタミンの添加は、エオタキシン-2およびMCP-3により誘導される好酸球の走化性を高めた。

40

【0039】

好酸球走化性に関与するヒスタミン受容体を決定するためにヒスタミン受容体アンタゴニストを使用した。10 $\mu$ Mでチオペラミドおよび化合物Aはヒスタミンによって誘導される好酸球走化性を完全に阻害し、一方、ジフェンヒドラミン、ラニチジンもしくは $H_3$  受容体アンタゴニストの阻害効果は最小であった (図6D)。化合物Aおよびチオペラミドは両方とも、それぞれ、86nMおよび519nMの $IC_{50}$ で、1 $\mu$ Mのヒスタミンによって誘導される好酸球走化性を阻止することにおいて濃度依存的効果を示した (図6E)。これらの結果は、ヒスタミンによって誘導される好酸球走化性が $H_4$  受容体により媒介されることを示唆する。

【0040】

50

### 実験結果の説明

上記に示すように、好酸球はH<sub>4</sub>受容体を発現したが、H<sub>3</sub>受容体を発現しなかった。H<sub>4</sub>受容体はまた、樹状細胞において有意なレベルでそしてCD4<sup>+</sup>エフェクターT細胞において低いレベルで発現された。他の報告(Morse et al., 2001, 上記; Zhu et al., 2001, 上記; Oda et al., 2000, 上記)と異なり、好中球および単球においてH<sub>4</sub>受容体RNAメッセージを検出することはできなかった。

#### 【0041】

好酸球、マスト細胞、好塩基球および樹状細胞におけるH<sub>4</sub>受容体の発現は、アレルギー反応にヒスタミンおよびH<sub>4</sub>受容体が関与している可能性を示唆する。典型的なアレルギー反応の確立は、2つの異なる段階：アレルギー感作段階およびアレルギー反応段階を伴う。アレルギー感作段階の間に、樹状細胞は抗原を獲得し、そしてT細胞活性化のためにドレーニング(drainage)リンパ節に移動する。マスト細胞から放出されるヒスタミンは、H<sub>4</sub>受容体を介して樹状細胞機能に影響を及ぼし、そしてT細胞活性化に影響を与えることができる。アレルギー攻撃の段階で、アレルギーへのマスト細胞の暴露は、マスト細胞脱顆粒およびヒスタミンの放出をもたらす。ヒスタミンは、アレルギー反応の部位でマスト細胞の蓄積を増大し、そして後期応答として好酸球を漸増することができる。ヒスタミンH<sub>1</sub>およびH<sub>2</sub>受容体は、I型およびII型ヘルパーT細胞上で異なって発現され、そしてそれらはT細胞エフェクター機能の調節において役割を果たすことが以前に示されている(Jutel et al., 2001, "Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors," Nature, 413, 420-425)。H<sub>4</sub>受容体は、アレルギー反応の複雑なプロセスに関する別のヒスタミン受容体であることが可能である。

#### 【0042】

上記の実験の結果は、ヒスタミンが好酸球の化学誘引物質であることを示す。好酸球は、細胞形態変化、細胞表面上の接着分子のアップレギュレーションならびに走化性でヒスタミンに応答する。H<sub>4</sub>受容体特異的アンタゴニストを用いて、好酸球へのこれらのヒスタミン作用の全てがH<sub>4</sub>受容体により媒介されたことをこれらの結果は示す。走化性は化学誘引物質勾配のより高い方への指向性細胞運動であり、そして細胞極性の樹立、従って、指向性シグナルに向かう細胞形態変化を必要とする。好酸球形態変化を測定するためにGAFSアッセイを用いて、ヒスタミンが濃度依存的に好酸球における迅速な形態変化を誘導することを示した。イメチットはH<sub>3</sub>およびH<sub>4</sub>受容体の両方のアゴニストであることが既知であり、一方、クロベンプロピットはH<sub>4</sub>受容体のアゴニストしかしH<sub>3</sub>受容体のアンタゴニストとして作用する(Oda et al., 2000, "Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes," J. Biol. Chem., 275, 36781-36786; Liu et al., 2001, "Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H<sub>4</sub>) expressed in bone marrow," Mol. Pharmacol., 59, 420-426; Liu et al., 2001, "Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H<sub>4</sub> receptors reveals substantial pharmacological species variation," J. Pharmacol. Exp. Ther., 299, 121-130; Morse et al., 2001, "Cloning and characterization of a novel human histamine receptor," J. Pharmacol. Exp. Ther., 296, 1058-1066 Morse et al., 2001;

Zhu et al., 2001, "Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor," *Mol. Pharmacol.*, 59, 434-441)。我々の研究において、イメチットおよびクロベンプロピットは両方ともアゴニストとして働き、そして好酸球形態変化を誘導することにおいてヒスタミン作用を模倣した。この結果は、ヒスタミンにより誘導される好酸球形態変化がH<sub>4</sub>受容体により媒介されることをさらに裏付ける。

#### 【0043】

ヒスタミンへの好酸球形態変化応答は、迅速であるが一時的であった。形態変化は、ヒスタミンとの1分のインキュベーション後に認められ、そして5分で最大応答に達した。ヒスタミンの除去は、好酸球形態変化を即座になくした。ヒスタミンへの短い暴露後に、好酸球はヒスタミン再刺激の際に形態変化応答を依然として完全に再び開始することができた。しかしながら、この好酸球形態変化応答は、高濃度(>100 μM)のもしくは長期間(>40分)にわたるヒスタミンとのインキュベーション後に消失した。これらの好酸球は脱感作されるように思われ、そして再刺激の際にヒスタミンにもはや応答しなかった。受容体内在化は、エオタキシンへの好酸球応答の脱感作を説明すると報告されている(Zimmermann et al., 2003, "Receptor internalization is required for eotaxin-induced responses in human eosinophils," *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111, 97-105)。ヒスタミンもまた、H<sub>4</sub>受容体の内在化を誘導することが示されている(Nguyen et al., 2001, "Discovery of a novel member of the histamine receptor family," *Mol. Pharmacol.*, 59, 427-433)。我々がここで認めたヒスタミンへの好酸球応答の脱感作もまた、H<sub>4</sub>受容体内在化の結果であることは可能である。

#### 【0044】

白血球化学誘引物質は、循環血液におけるそして微小血管内皮細胞における細胞間の協調的な一連の接着性相互作用を開始することが知られている。白血球遊走の段階は、接着、伸展、血管内皮細胞の漏出、および組織への浸潤を含んでなる(Springer, 1994, "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm," *Cell*, 76, 301-314)。細胞表面上の接着分子のアップレギュレーションは、細胞遊走のプロセスにおける細胞伸展および漏出に必須である。CD11b/CD18(Mac-1)およびCD54(ICAM-1)の細胞表面発現は、H<sub>4</sub>受容体を介してヒスタミンによりアップレギュレーションされたことを結果は示す。このアップレギュレーションは10分以内に起こり、そしておそらくタンパク質合成と無関係である。一時的な形態変化応答と異なり、細胞表面上の接着分子アップレギュレーションは、はるかに長期間にわたって(60分まで)保持された。CD11a/CD18(LFA-1)発現レベルはヒスタミンにより誘導されなかったが、ICAM-1、ICAM-2およびICAM-3のようなそのリガンドへのアビディティの変化を除外することはできない。

#### 【0045】

ヒスタミンに向かう好酸球走化性を媒介することにおけるH<sub>4</sub>受容体の作用をトランスウエルインピトロ系において示した。好酸球へのヒスタミン作用は走化性であったが、ケモキネシスではなかった。他の典型的な好酸球ケモカインと比較して、ヒスタミンは比較的弱い走化性因子である。好酸球形態変化および走化性応答を引き起こすことにおけるヒスタミンの有効濃度は、エオタキシン-2およびMCP-3のようなケモカインにより誘導されるものより高い。さらに、血清におけるヒスタミン半減期は非常に短く(約1分)、そしてその血清濃度は標準状態において1 nMの範囲であり、そして全身性アレルギー反応において10 nMに達することができるだけである(Church et al.,

10

20

30

40

50

1993, 5.6章, "Mast cell and basophil function," Allergy (Hogate et al., eds.), Raven Press Ltd., New York)。測定した場合の好酸球走化性についてのヒスタミンのEC<sub>50</sub>は83nMであることを考慮すると、血流中のヒスタミンが好酸球遊走を引き起こすことができるとは考えにくい。しかしながら、組織におけるヒスタミン濃度は、特にマスト細胞脱顆粒が起こっている領域において、はるかに高いレベルに達することができる。組織において放出されるヒスタミンは、ヘパリン硫酸と複合体を形成してその半減期を延長し、そしてヒスタミン濃度勾配の樹立のために細胞外マトリックスと相互作用することができる。好酸球は、インビボ系の異なる区画を通るそれらの遊走経路において異なる走化性因子に依存することが可能である。ヒスタミンは、好酸球をそれらが血液循環から出た後に漸増するために組織においてその直接的走化性作用を及ぼすことができる。好酸球走化性応答を媒介することにおける他のケモカインとヒスタミンとの可能な協調効果を調べると、相加効果は認められたが、ヒスタミンとケモカインとの間の相乗効果は認められなかった。

10

20

30

#### 【0046】

アレルギー反応では、大量のヒスタミンがアレルゲン暴露の部位で局所的にマスト細胞から放出される。好酸球浸潤が後期応答として次に起こり、そしてこれらの細胞はアレルギーの発症において主要な役割を果たす。アレルギー反応の部位でのマスト細胞、好塩基球および好酸球の蓄積数は、疾患重症度と相関することが多い(Bousquet et al., 1990, "Eosinophilic inflammation in asthma," N. Engl. J. Med., 323, 1033-1039; Macfarlane et al., 2000, "Basophils, eosinophils and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin," J. Allergy Clin. Immunol., 105, 99-107)。ここでの結果は、アレルギー反応の部位に特定の炎症細胞タイプを漸増することにおけるヒスタミンの役割を立証する。好酸球は、慢性アレルギー性疾患における重要な関与するものの一つである。細胞形態変化および接着分子のアップレギュレーションのようなH<sub>4</sub>受容体により媒介される好酸球応答は、全血において検出することができ、従って、H<sub>4</sub>受容体アンタゴニストの動物もしくは臨床研究、H<sub>4</sub>受容体を介して媒介される疾患および病状を調べるかまたは特定の実験的もしくは市販の薬剤が特定の患者を処置することにおいて有用である可能性があるかどうかを決定するための予後もしくは診断試験におけるバイオマーカーとして役立つことができる。そのような疾患および病状には、アレルギー性気道疾患および以下(その開示は、本明細書に引用することにより組み込まれる): 国際公開第WO 02/072548号および第WO 02/056871号; ならびに米国特許出願公開第US 2003-0133931号および第US 2004-0058934号に記述されているものが含まれる。

#### 【0047】

従って、本発明は、上記の要約に記述するような全血をアッセイする一般法に関する。そのようなアッセイにおいて、血液サンプルは、アッセイの前に任意の希釈または他の操作もしくは調製の必要なしに直接都合よく使用することができる。血液サンプルにおける試験中のもしくは市販の薬剤化合物の濃度は維持されることができ、そしてH<sub>4</sub>受容体機能を阻止すること、阻害することもしくは調節することにおけるそれらの効果をエクスピボで都合よくモニターすることができる。

40

#### 【0048】

コントロールサンプルとして、全血は、動物、例えば動物モデルの被験体、またはヒト、例えば臨床試験の被験体もしくはヒスタミンH<sub>4</sub>受容体活性により媒介されると考えられる疾患もしくは病状を有する患者のような供給源から入手することができる。アッセイサンプルには、例えばH<sub>4</sub>受容体アンタゴニストを投与することによる被験体のインビボ

50

投与もしくはエキスピボでの血液への直接添加によって、H<sub>4</sub> 受容体アンタゴニストでその血液が処理されている動物もしくはヒトからサンプルが得られる。典型的な動物には、マウス、ラット、モルモット、イヌおよびヒツジのような哺乳類が包含される。

## 【0049】

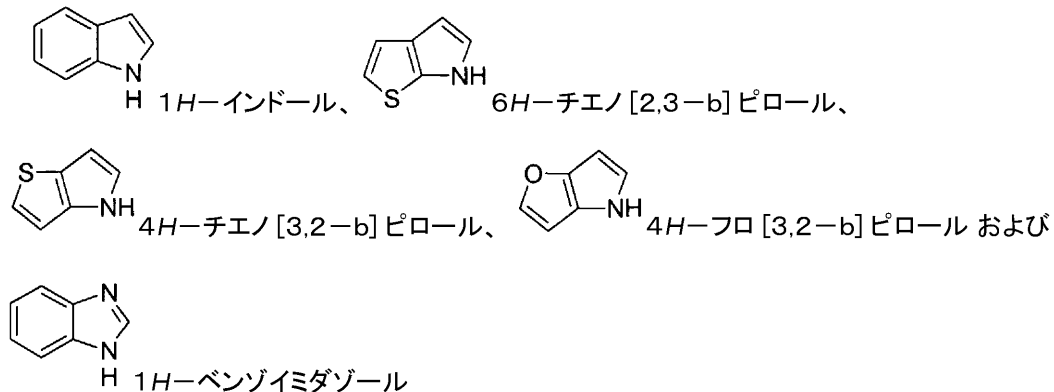
それらの効能についてアッセイすることができる典型的なH<sub>4</sub> 受容体アンタゴニストには、以下（その開示は、本明細書に引用することにより組み込まれる）：国際公開第WO 02/072548号および第WO 02/056871号；ならびに米国特許出願公開第US 2003-0133931号および第US 2004-0058934号に記述されているものが包含される。

## 【0050】

H<sub>4</sub> 受容体アンタゴニストの追加の例には、以下の頭部基もしくは部分：

## 【0051】

## 【化1】



## 【0052】

に基づく一般クラスのメンバーが包含される。そのようなH<sub>4</sub> 受容体アンタゴニストの特定の例には、以下の化合物が包含される：

- (5-クロロ-7-メチル-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン；
- (2-クロロ-3-メチル-4H-チエノ[3,2-B]ピロール-5-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン；
- (5-クロロ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン；
- (2,3-ジメチル-4H-チエノ[3,2-B]ピロール-5-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン；
- (2,3-ジクロロ-4H-チエノ[3,2-B]ピロール-5-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン；
- (7-メチル-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン；
- (7-アミノ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン；
- (5-プロモ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン；
- (5,7-ジクロロ-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン；
- (5-クロロ-1H-インドール-2-イル)-ピペラジン-1-イル-メタノン；
- (2,3-ジクロロ-6H-チエノ[2,3-B]ピロール-5-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-メタノン；
- (5-メチル-1H-インドール-2-イル)-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)

10

20

30

40

50

- メタノン ;
- ( 4 , 5 - ジクロロ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - ( 5 - トリフルオロメチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - フルオロ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 , 7 - ジフルオロ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - アミノ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - ヒドロキシ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - ( 3 - メチル - 4 H - チエノ [ 3 , 2 - B ] ピロール - 5 - イル ) - メタノン ;
- ( 7 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - [ 4 - ( 2 - ヒドロキシ - エチル ) - ピペラジン - 1 - イル ] - メタノン ;
- ( 2 - クロロ - 6 H - チエノ [ 2 , 3 - B ] ピロール - 5 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - フルオロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 3 , 4 - ジメチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 , 6 - ジフルオロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 , 7 - ジメチル - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 2 - クロロ - 3 - メチル - 4 H - チエノ [ 3 , 2 - B ] ピロール - 5 - イル ) - ピペラジン - 1 - イル - メタノン ;
- ( 4 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 6 - ヒドロキシ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( ( R ) - 3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( ( S ) - 3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 4 - プロモ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 2 - クロロ - 4 H - チエノ [ 3 , 2 - B ] ピロール - 5 - イル ) - ( 4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル ) - ( 3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル ) - メタノン ;
- ( 5 - フルオロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル ) - ピペラジン - 1 - イル - メタ

10

20

30

40

50

ノン；

(7 - アミノ - 1 H - インドール - 2 - イル) - ピペラジン - 1 - イル - メタノン；

(4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - (5 - ニトロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - メタノン；

(7 - ヒドロキシ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

(6 - クロロ - 5 - フルオロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

(7 - プロモ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

(2 - クロロ - 6 H - チエノ [ 2 , 3 - B ] ピロール - 5 - イル) - ピペラジン - 1 - イル - メタノン；

(3 - プロモ - 4 H - チエノ [ 3 , 2 - B ] ピロール - 5 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

(3 - メチル - 4 H - チエノ [ 3 , 2 - B ] ピロール - 5 - イル) - ピペラジン - 1 - イル - メタノン；

(4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - (6 H - チエノ [ 2 , 3 - B ] ピロール - 5 - イル) - メタノン；

(5 - クロロ - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - ピペラジン - 1 - イル - メタノン；

1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - カルボン酸 (8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [ 3 . 2 . 1 ] オクト - 3 - イル) - アミド；

(5 - プロモ - ベンゾフラン - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

(1 H - インドール - 2 - イル) - (3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

(1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

(6 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

(4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - (4 H - チエノ [ 3 , 2 - B ] ピロール - 5 - イル) - メタノン；

(1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタンチオン；

(4 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - ピペラジン - 1 - イル - メタノン；

(2 , 3 - ジメチル - 4 H - フロ [ 3 , 2 - B ] ピロール - 5 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

[ 5 - (3 - メトキシ - フェニル) - 1 H - インドール - 2 - イル ] - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

(4 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - (3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

(3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - (3 - メチル - 4 H - チエノ [ 3 , 2 - B ] ピロール - 5 - イル) - メタノン；

(2 - クロロ - 6 H - チエノ [ 2 , 3 - B ] ピロール - 5 - イル) - (ヘキサヒドロ - ピロロ [ 1 , 2 - A ] ピラジン - 2 - イル) - メタノン；

(6 - プロモ - 1 H - インドール - 2 - イル) - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン；

5 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - カルボン酸 (8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [ 3 . 2 . 1 ] オクト - 3 - イル) - アミド；および

(3 - プロモ - 4 H - チエノ [ 3 , 2 - B ] ピロール - 5 - イル) - (3 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - メタノン。

10

20

30

40

50

## 【0053】

他の適当なアンタゴニストは、当該技術分野において既知であるかもしくは利用できるようになる他の化合物から選択することができる。

## 【0054】

アッセイする血液サンプルにアッセイ試薬としてヒスタミン(4-(2-アミノ-エチル)イミダゾール、これは適当な形態で、例えば塩酸塩もしくはリン酸塩として使用することができる)またはイメチットもしくはクロベンプロピットのような特異的ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体アゴニストを加える。他の適当なアゴニスト化合物は、当該技術分野において既知であるかもしくは利用できるようになるものから選択することができる。

## 【0055】

アッセイ試薬の添加後に、アッセイサンプルを約室温~約40 および約1~60分の時間のような適当なインキュベーション温度および時間で反応させる。例えば、インキュベーションは、約37 の温度および約10分の時間で実施することができる。インキュベーション後に、反応を例えばよく冷えた水浴でクエンチする。反応の停止後に、サンプルをPBS中2%のパラホルムアルデヒドのような適当な固定剤で固定する。

## 【0056】

好酸球形態変化の検出を容易にするために、アッセイサンプルの赤血球を例えばQiagenもしくはOptilyseのような低張溶解溶液で溶解する。細胞形態変化を分析するために、FACScanフローサイトメーターのような、自己蛍光分析器もしくはフローサイトメーターを用いることができる。

## 【0057】

あるいはまた、ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体により媒介される他の作用を分析することができる。例えば、細胞内カルシウムフラックス、接着分子アップレギュレーションもしくは細胞骨格変化を検出することができる。

## 【0058】

本発明のアッセイの実例となる態様を以下の実施例に記述する。

## 【実施例】

## 【0059】

[実施例1Aおよび1B]フローサイトメトリーを用いた好酸球形態変化の測定

[実施例1A]

出発物質は、上記の実験に記述するようにして得た。好酸球形態変化応答を調べるためにヒト全血サンプルを使用した。健康なドナーから集めたヒト血液サンプルを抗凝血剤として3.8%のクエン酸3ナトリウム(もしくは他の抗凝血剤)で処理し、そして300rpmで遠心分離した。サンプルを1時間以内に実験に使用した。80μlの全血のアリコートヒスタミン受容体アナログ(H<sub>1</sub>受容体アンタゴニストのジフェンヒドラミン、H<sub>2</sub>アンタゴニストのラニチジン、H<sub>4</sub>受容体アンタゴニストのチオペラミドおよび化合物A、ならびにH<sub>3</sub>受容体アンタゴニストの化合物Bのような)で10分間前処理した後に100μlの最終容量で1.2mlのポリプロピレンクラスターチューブ(Costar, Cambridge, MA)においてヒスタミンもしくはケモカインを加えた。チューブを37 の水浴に10分間置き、その後でそれらを氷水浴に移し、そして250μlのよく冷えた固定剤(PBS中2%のパラホルムアルデヒドもしくは他の固定剤)を加えて反応を停止させ、そして細胞形態変化を維持した。赤血球を3mlのQiagen溶解溶液(Qiagen, Valencia, CA)で4 で10分間溶解した。白血球を2000rpmで5分間の遠心分離により回収し、10mM Ca<sup>2+</sup> およびMg<sup>2+</sup>、10mM HEPES、10mMグルコースおよび0.1% BSAを含有するPBS(図10および11について)もしくは0.5% BSAおよび2mM EDTAを含有するPBS(他の図について)のいずれかで1回洗浄し、そして次に同じバッファーに再懸濁した。細胞形態変化をFACScanフローサイトメーター(Becton Dickinson, Mountain View, CA)上で分析した。好酸球を好中球と比較してそれらの高い自己蛍光に基づいてゲーティングし、そして形態変化を前方散乱シグナル

10

20

30

40

50

においてモニターした。データは、1500の高蛍光性好酸球イベントについて得られた。結果は、非刺激細胞と比較したFSCのパーセンテージ増加として表される。得られた結果を以下の表IおよびIIに提供し、それらはまたそれぞれ図7および図8にも対応する。

【0060】

【表1】

表I

Geo 平均	ヒスタミン 濃度	ヒスタミン ( $\mu\text{M}$ )	エオタキシン2 (nM)
	100	295.8	269.3
	10	265.0	346.0
	1	263.3	284.7
	0.1	271.3	227.7
	0.01	239.8	233.4
	0	226.1	225.5
Geo 平均	ヒスタミン 濃度	ヒスタミン ( $\mu\text{M}$ )	ヒスタミン ( $\mu\text{M}$ ) +化合物 A (10 $\mu\text{M}$ )
	10	303.0	267.3
	1	321.9	270.9
	0.1	327.7	272.1
	0.00	272.8	268.1

10

20

【0061】

30

【表 2】  
表 II

% 変化	ヒスタミン濃度	ヒスタミン (uM)	エオタキシン2 (nM)
		100	30.8
	10	17.2	53.4
	1	16.4	26.3
	0.1	20.0	1.0
	0.01	6.1	3.5
	0	0.0	0.0

% 変化	ヒスタミン濃度	ヒスタミン (uM)	ヒスタミン (uM) + 化合物 A (10 uM)
		10	11.1
	1	18.0	1.1
	0.1	20.1	1.5
	0	0.0	0.0

10

20

## 【0062】

好酸球は、さらなる分析用にこれらの細胞のゲーティングを可能にするそれらの明確な高レベルの自己蛍光により血液サンプル中の他の白血球から区別することができた。図7に示されるように、ヒスタミンによって誘導される好酸球形態変化の程度は、ヒスタミン濃度に依存した。有意な好酸球形態変化は、 $\sim 0.1 \mu\text{M}$ のヒスタミンで検出された。ケモカインのエオタキシン-2は、アッセイにおける陽性コントロールとして用いた。 $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ のヒスタミンにより誘導される好酸球形態変化は、化合物Aにより阻止された(図8)。

30

## 【0063】

## [実施例1B]

この実施例において、出発物質は、実施例1Aに記述するようにして得た。好酸球形態変化応答を調べるためにヒト全血サンプルを使用した。健康なドナーから集めたヒト血液サンプルを抗凝固剤として3.8%のクエン酸3ナトリウム(もしくは他の抗凝固剤)で処理し、そして300rpmで遠心分離した。サンプルを1時間以内に実験に使用した。80 $\mu\text{l}$ の全血のアリコートにヒスタミン受容体アナログ( $\text{H}_1$ 受容体アンタゴニストのジフェンヒドラミン、 $\text{H}_2$ アンタゴニストのラニチジン、 $\text{H}_4$ 受容体アンタゴニストのチオペラミドおよび化合物A、ならびに $\text{H}_3$ 受容体アンタゴニストの化合物Bのような)で5分間前処理した後に100 $\mu\text{l}$ の最終容量で1.2mlのポリプロピレンクラスターチューブ(Costar, Cambridge, MA)においてヒスタミンもしくはケモカインを加えた。チューブを37 $^{\circ}\text{C}$ の水浴に5分間置き、その後でそれらを氷水浴に移し、そして150 $\mu\text{l}$ のよく冷えた固定剤(PBS中2%のパラホルムアルデヒドもしくは他の固定剤)を加えて反応を停止させ、そして細胞形態変化を維持した。赤血球を3mlのQiagen溶解溶液(Qiagen, Valencia, CA)で4 $^{\circ}\text{C}$ で10分間溶解した。白血球を2000rpmで5分間の遠心分離により回収し、10mM  $\text{Ca}^{2+}$  および10mM  $\text{Mg}^{2+}$ 、10mM HEPES、10mM グルコースおよび0.1% BSAを含む

40

50

有するPBS（図10および11について）もしくは0.5% BSAおよび2mM EDTAを含有するPBS（他の図について）のいずれかで1回洗浄し、そして次に同じバッファーに再懸濁した。細胞形態変化をFACSscanフローサイトメーター（Beckton Dickinson, Mountain View, CA）上で分析した。好酸球を好中球と比較してそれらの高い自己蛍光に基づいてゲーティングし、そして形態変化を前方散乱シグナルにおいてモニターした。データは、1500の高蛍光性好酸球イベントについて得られた。結果は、非刺激細胞と比較したFSCのパーセンテージ増加として表される。

#### 【0064】

図10に示されるように、ヒスタミンでの処理の際に認められる好酸球形態変化は、H<sub>2</sub>受容体アンタゴニスト、ラニチジンの添加により増加され、従って、H<sub>4</sub>受容体依存的形態変化応答を分離した（resolving）。このH<sub>4</sub>受容体依存的作用は、用量依存的にその後の化合物Aでの処理により相殺された（図11）。

10

#### 【0065】

[実施例2] ヒスタミンにより媒介される接着分子アップレギュレーションの検出

この実施例は、接着分子の細胞表面発現を調べるためにヒト全血を使用することができる方法を記述する。健康なドナーから集めたヒト血液サンプルを抗凝血剤として3.8%のクエン酸3ナトリウムで処理し、そして全血サンプルを1時間以内に実験に使用する。80μlの全血のアリコートにヒスタミン受容体アナログ（ジフェンヒドラミン、ラニチジン、チオペラミド、化合物A、およびH<sub>3</sub>受容体アンタゴニストの化合物B）で10分間前処理した後に100μlの最終容量で1.2mlのポリプロピレンクラスターチューブ（Costar, Cambridge, MA）においてヒスタミンを加える。チューブを約10分間約37（室温のようなより低い温度を用いる場合には、インキュベーション時間は必要に応じて10分より長い）のような、インキュベーションに適切な温度および時間で水浴中に置き、その後でそれらを氷水浴に移し、そして250μlのよく冷えた固定剤（PBS中2%のパラホルムアルデヒド）を加えて反応を停止させ、そして接着分子のアップレギュレーションを維持する。次に、サンプルを飽和濃度の蛍光色素標識（例えばFITCもしくはフィコエリトリンコンジュゲート）抗CD11bもしくは抗CD54抗体のいずれかと氷上で30分間インキュベーションし、洗浄し、そして次にフローサイトメトリーにより分析する。

20

30

#### 【0066】

[実施例3] ヒスタミンにより媒介されるカルシウムフラックスの検出

この実施例は、H<sub>4</sub>受容体に結合するヒスタミンにより誘導される、ヒト全血サンプル中の好酸球における細胞内カルシウムフラックス応答をフローサイトメトリーにより測定することができる方法を説明する。血液細胞にプロベネシド（2.5μM）およびPluronic F-127（0.02%）の存在下でfluo-3アセトキシメチルエステル（2μM）もしくは別の適当な蛍光色素を20分間負荷し、そしてカルシウム（1.8μM）およびマグネシウム（1μM）で5分間平衡化する。全血サンプルをヒスタミン受容体アナログ（ジフェンヒドラミン、ラニチジン、チオペラミド、化合物Aおよび化合物B）で10分間前処理する。血液サンプルにおけるヒスタミンの添加後すぐに、細胞内遊離カルシウムのレベルをフローサイトメトリーにより蛍光の変化としてモニターする。

40

#### 【0067】

[実施例4] 全血サンプルにおけるヒスタミンにより媒介される細胞骨格変化の検出

好酸球におけるヒスタミンにより誘導される細胞形態変化は、アクチン重合による細胞骨格再構成の結果である。健康なドナーから集めたヒト血液サンプルを抗凝血剤として3.8%のクエン酸3ナトリウムで処理し、そして全血サンプルを1時間以内に実験に使用する。全血のアリコートにヒスタミン受容体アナログ（ジフェンヒドラミン、ラニチジン、チオペラミド、化合物Aおよび化合物B）で10分間前処理した後にヒスタミンを加える。細胞骨格変化をよく冷えた固定剤（PBS中2%のホルムアルデヒド）で固定し、そして次にローダミンを結合したファロイジン（1:40）で暗所において30分間染色す

50

る。細胞をPBSで数回洗浄し、その後で蛍光顕微鏡分析用にマイクロスライドにおいて標本にする。

【0068】

[実施例5] 臨床試験におけるバイオマーカーとしての全血におけるヒスタミンにより媒介される好酸球形態変化

臨床試験における志願者に臨床プロトコルに従ってH<sub>4</sub>受容体化合物(アンタゴニスト)を与える。インビボでH<sub>4</sub>受容体により媒介される作用を阻止することにおける化合物の効果を全血形態変化アッセイにおいて試験する。化合物を投与した個体から集めた血液サンプルを抗凝血剤として3.8%のクエン酸3ナトリウムで処理し、そして全血サンプルを1時間以内に実験に使用する。ヒスタミンを100μlの最終容量で1.2mlのポリプロピレンクラスターチューブ(Costar, Cambridge, MA)において80μlの全血のアリコートに加える。チューブを37℃の水浴に10分間(もしくは適切なように)置き、その後でそれらを氷水浴に移し、そして250μlのよく冷えた固定剤(PBS中2%のパラホルムアルデヒド)を加えて反応を停止させ、そして細胞形態変化を維持する。赤血球を3mlのQiagen溶解溶液(Qiagen, Valencia, CA)もしくは別の適当な低張溶解溶液で4℃で10分間溶解する。白血球を2000rpmで5分間の遠心分離により回収し、0.5% BSAおよび2mM EDTAを含有するPBSで1回洗浄し、そして次に同じバッファーに再懸濁する。細胞形態変化をFACSscanフローサイトメーター(Becton Dickinson, Mount Airy, NC)上で分析する。好酸球を好中球と比較してそれらの高い自己蛍光に基づいてゲーティングし、そして形態変化を前方散乱シグナルにおいてモニターする。

10

20

【0069】

本発明は実例となる実施例および好ましい態様に関連して上記に詳細に記述されているが、本発明の範囲は先の記述によってではなく、特許法の原則の下で適切に解釈されるような添付の請求項により定義されることを当業者は理解する。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1A-1B】 H<sub>4</sub>受容体発現が好酸球および樹状細胞に限定されることを説明する結果を示す。図1Aおよび1Bでは、H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>もしくはH<sub>4</sub>受容体でトランスフェクションしたヒトSK-N-MC細胞をヒスタミン受容体検出の特異性のコントロールとして使用した。RNAサンプルにおけるG3PDH mRNAをPCR反応におけるコントロールとして特異的プライマーで増幅した。

30

【図1A】異なる精製された細胞タイプおよび細胞系におけるH<sub>4</sub>受容体mRNAのRT-PCR検出。異なる細胞タイプからの全RNAを逆転写し、そしてPCRの鋳型として使用した(25PCRサイクルをH<sub>4</sub>受容体の増幅のために行った)。

【図1B】ヒト好酸球はH<sub>4</sub>受容体を発現するが、H<sub>3</sub>受容体を発現しない。特異的プライマーを用いてRT-PCRによりヒト好酸球におけるH<sub>3</sub>もしくはH<sub>4</sub>受容体mRNAを検出した。25PCRサイクルをH<sub>4</sub>受容体の増幅のために行った。

【図2A-2E】ヒスタミンが好酸球形態変化を誘導することを示す結果を説明する。

40

【図2A】好酸球(R1)が、高レベルの自己蛍光を有する細胞へのゲーティングによりヒトPMNLにおける好中球(R2)から区別されることを示すフローサイトメトリー分析。

【図2B】R1群としてゲーティングされる、高い自己蛍光を有する細胞集団の大部分がCCR3<sup>+</sup>好酸球であることを示すフローサイトメトリー分析。

【図2C】R2群としてゲーティングされる、低い自己蛍光を有する細胞集団の大部分がCD16<sup>+</sup>好中球であることを示すフローサイトメトリー分析。

【図2D】好酸球上でヒスタミンによって誘導される細胞形態変化。ヒトPMNLを1μMのヒスタミンで10分間処理し、そして細胞形態の変化をフローサイトメトリーによりモニターした。ヒト好酸球を好中球の自己蛍光から区別されるようなそれらの自己蛍光に

50

基づいてフローサイトメトリー分析においてゲーティングした（図 2 A および 2 B を参照）。ヒスタミンで処理したサンプルにおける細胞サイズを未処理のコントロールサンプルのものと比較した。前方散乱シグナル（FSC）における細胞サイズの平均を示す。

【図 2 E】好中球上ではヒスタミンによって誘導される細胞形態変化はない。ヒト PMNL を  $1 \mu\text{M}$  のヒスタミンで 10 分間処理し、そして細胞形態の変化をフローサイトメトリーによりモニターした。ヒト好中球を好酸球の自己蛍光から区別されるようなそれらの自己蛍光に基づいてフローサイトメトリー分析においてゲーティングした（図 2 A および 2 B を参照）。ヒスタミンで処理したサンプルにおける細胞サイズを未処理のコントロールサンプルのものと比較した。前方散乱シグナル（FSC）における細胞サイズの平均を示す。

10

【図 3 A - 3 E】好酸球形態変化を引き起こすことにおけるヒスタミンの反応速度論および効能を示す結果を表す。

【図 3 A】結果は、ヒスタミンによって誘導される好酸球形態変化の反応速度論を示す。ヒト PMNL を  $1 \mu\text{M}$  のヒスタミンで処理し、そして異なる時間点での好酸球細胞形態の変化をフローサイトメトリーにより調べた。細胞形態変化のパーセンテージは、未処理のサンプルのものからの増加に基づいて計算した。データは、平均  $\pm$  SD、 $n = 3$  である。

【図 3 B】異なる条件下でのヒスタミンへのヒト好酸球の形態変化応答を調べた。データは、平均  $\pm$  SD、 $n = 3$  である。

【図 3 C】ヒト好酸球形態変化へのヒスタミン作用の滴定およびケモカインとの比較の結果を示す。ヒト PMNL を異なる濃度のヒスタミンもしくはケモカイン（エオタキシン - 2 もしくは MCP - 3）で 10 分間処理した。好酸球形態変化をフローサイトメトリーによりモニターした。データは、平均  $\pm$  SD、 $n = 2$  である。

20

【図 3 D】好酸球形態変化へのヒスタミンおよびケモカインの  $EC_{50}$  値の決定の結果を示す。ヒト PMNL を異なる濃度のヒスタミンもしくはケモカイン（エオタキシン、エオタキシン - 2 および MCP - 3）で処理した。好酸球形態変化をフローサイトメトリーによりモニターした。示すデータは、5 回の反復実験の代表である。 $EC_{50}$  値は、Graph Pad Prism プログラムで計算した。

【図 3 E】ヒスタミンが、ケモカイン MCP - 3 と組み合わせた場合に好酸球形態変化を増大することを示す結果を説明する。ヒト PMNL をケモカインの MCP - 3 の組み合わせにおいてヒスタミンで 10 分間処理した。好酸球形態変化をフローサイトメトリーによりモニターした。示すデータは、4 回の反復実験の代表である。

30

【図 4 A - 4 C】ヒスタミンによって誘導される好酸球形態変化は、 $H_4$  受容体により媒介されることを示す結果を表す。

【図 4 A】ヒスタミンによって誘導される好酸球形態変化は、 $H_4$  受容体アンタゴニストの（5 - クロロ - 1 H - インドール - 2 - イル） - （4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル） - メタノン（化合物 A）、 $H_3$  /  $H_4$  受容体アンタゴニストのチオペラミドにより阻止されたが、 $H_1$ 、 $H_2$  もしくは  $H_3$  受容体アンタゴニストにより阻止されなかった。研究に使用する  $H_1$ 、 $H_2$  および  $H_3$  受容体アンタゴニストは、それぞれ、ジフェンヒドラミン、ラニチジンおよび（7 - メチル - 2 - [4 - （3 - ピペリジン - 1 - イル - プロポキシ） - フェニル] - イミダゾ [1, 2 - a] ピリジン）（化合物 B）であった。ヒト PMNL を  $10 \mu\text{M}$  の異なるヒスタミン受容体アンタゴニストで前処理し、続いて  $1 \mu\text{M}$  のヒスタミンで 10 分間処理した。好酸球形態変化をフローサイトメトリーによりモニターした。細胞形態変化のパーセンテージは、未処理のサンプルのものからの増加に基づいて計算した。示すデータは、3 回の反復実験の代表である。データは、平均  $\pm$  SD および  $n = 3$  である。サンプルとヒスタミンのみのコントロールとの間の違いの統計的有意性（P 値）は、スチューデント T 検定により決定した。

40

【図 4 B】ヒスタミンによって誘導される好酸球形態変化への化合物 A、チオペラミドおよび  $H_3$  受容体アンタゴニスト（化合物 B）の  $IC_{50}$  値の決定。ヒト PMNL を異なるアンタゴニストで 10 分間前処理した後に  $1 \mu\text{M}$  のヒスタミンで細胞形態変化を誘導した。好酸球形態変化をフローサイトメトリーによりモニターした。阻害のパーセンテージは

50

、 $1 \mu\text{M}$ のヒスタミンのみで処理したサンプルと比較した形態変化の減少に基づいて計算した。示すデータは、4回の反復実験の代表である。IC<sub>50</sub>値は、GraphPad Prismプログラムで計算した。

【図4C】ヒト好酸球形態変化へのヒスタミン、H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>受容体アゴニストのイメチットおよびH<sub>4</sub>受容体アンタゴニストのクロベンプロピットの濃度依存的な作用。

【図5A-5C】好酸球上のヒスタミン誘導性接着分子発現がH<sub>4</sub>受容体により媒介されることを示す結果を表す。

【図5A】好酸球上の接着分子CD11b/CD18およびCD54の細胞表面発現は、ヒスタミンによりアップレギュレーションされた。ヒトPMNLを37で異なる濃度のヒスタミンもしくはケモカインのエオタキシン-2で10分間処理した。細胞サンプルをパラホルムアルデヒドで固定し、そしてCD11b、CD11aもしくはCD54に特異的なFITCコンジュゲート抗体で染色した。好酸球上の接着分子の発現をフローサイトメトリーによりモニターした。アップレギュレーションのパーセンテージは、未処理のサンプルの発現レベルからの増加に基づいて計算した。

10

【図5B】好酸球上の接着分子アップレギュレーションの反応速度論。ヒトPMNLを37で $1 \mu\text{M}$ のヒスタミンもしくは $1 \text{nM}$ のケモカインのエオタキシン-2で10分もしくは60分間処理した。細胞サンプルをパラホルムアルデヒドで固定し、そしてCD11bもしくはCD54に特異的なFITCコンジュゲート抗体で染色した。データは、平均±SDおよびn=3である。

【図5C】好酸球上のヒスタミンによって誘導される接着分子アップレギュレーションは、H<sub>4</sub>受容体アンタゴニストの化合物AおよびH<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>受容体アンタゴニストのチオペラミドにより阻止されたが、H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>もしくはH<sub>3</sub>受容体アンタゴニストにより阻止されなかった。研究に使用するH<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>およびH<sub>3</sub>受容体アンタゴニストは、それぞれ、ジフェンヒドラミン、ラニチジンおよび化合物Bであった。ヒトPMNLを $10 \mu\text{M}$ の異なるヒスタミン受容体アンタゴニストで10分間前処理し、続いて37で $1 \mu\text{M}$ のヒスタミンで10分間処理した。細胞サンプルをパラホルムアルデヒドで固定し、そしてCD11bもしくはCD54に特異的なFITCコンジュゲート抗体で染色した。データは、平均±SDおよびn=3である。サンプルとヒスタミンのみのコントロールとの間の違いの統計的有意性(P値)は、スチューデントT検定により決定した。

20

【図6A-6E】ヒスタミンによって誘導されるヒト好酸球走化性は、H<sub>4</sub>受容体により媒介されることを示す結果を表す。

30

【図6A】ヒト好酸球走化性へのヒスタミン作用の滴定。異なる濃度のヒスタミンに向かう精製されたヒト好酸球の走化性をトランスウェル系において調べた。ヒト好酸球をトランスウェルに置き、そしてヒスタミンを下側のチャンバーにおいて加えた。2時間のインキュベーション後に下側のチャンバーに遊走した好酸球をフローサイトメトリーにより1分間計数した。示すデータは、3回の反復実験の代表である。データは、平均±SDおよびn=3である。サンプルと未処理のコントロールとの間の違いの統計的有意性(P値)は、スチューデントT検定により決定した。

【図6B】好酸球走化性へのヒスタミンおよびケモカインのEC<sub>50</sub>値の決定。ヒト好酸球走化性をヒスタミンまたはケモカインのエオタキシン-2もしくはMCP-3の滴定で調べた。示すデータは、2回の反復実験の代表である。データは、平均±SDおよびn=3である。EC<sub>50</sub>値は、GraphPad Prismプログラムで計算した。

40

【図6C】ヒスタミンは、ケモカインによって誘導される好酸球走化性を高めた。異なる濃度のケモカイン、エオタキシン-2もしくはMCP-3により誘導される好酸球走化性へのヒスタミン( $0.5 \mu\text{M}$ )の効果を調べた。示すデータは、3回の反復実験の代表である。データは、平均±SDおよびn=3である。統計的有意性(P値)は、スチューデントT検定により決定した。

【図6D】ヒスタミンによって誘導される好酸球走化性は、H<sub>4</sub>受容体アンタゴニストの化合物AおよびH<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>受容体アンタゴニストのチオペラミドにより阻止されたが、H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>もしくはH<sub>3</sub>受容体アンタゴニストにより阻止されなかった。研究に使用するH

50

1、H<sub>2</sub> および H<sub>3</sub> 受容体アンタゴニストは、それぞれ、ジフェンヒドラミン、ラニチジンおよび化合物 B であった。10 μM のヒスタミンを下側のチャンバーにおいて加え、一方、10 μM の異なるヒスタミン受容体アンタゴニストを両方のチャンバーにおいて加えた。示すデータは、4 回の反復実験の代表である。データは、平均 ± S D および n = 3 である。統計的有意性 (P 値) は、スチューデント T 検定により決定した。

【図 6 E】好酸球走化性アッセイにおける H<sub>4</sub> 受容体アンタゴニストの化合物 A およびチオペラミドの IC<sub>50</sub> 値の決定。1 μM のヒスタミンを下側のチャンバーにおいて加え、一方、異なる濃度の化合物 A もしくはチオペラミドを両方のチャンバーにおいて加えた。阻害のパーセンテージは、1 μM のヒスタミンのみで処理したサンプルと比較した遊走細胞数の減少に基づいて計算した。示すデータは、4 回の反復実験の代表である。データは、平均 ± S D および n = 3 である。

【図 7】ヒスタミンおよびエオタキシン 2 は、全血 G A F S アッセイにおいてヒト好酸球形態変化を誘導することを示す結果を表す。

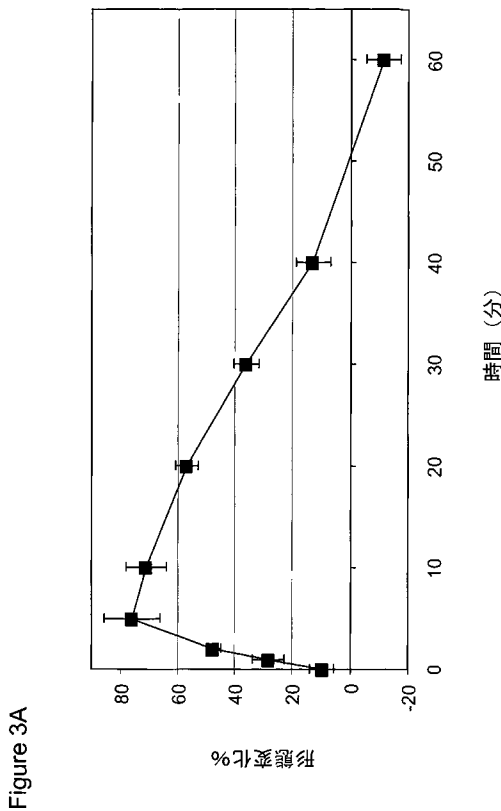
【図 8】ヒスタミン H<sub>4</sub> 受容体 (H<sub>4</sub>R) アンタゴニストは、ヒスタミンによって誘導される形態変化を阻止することを示す結果を表す。

【図 9 A - 9 B】2 つの市販されている H<sub>4</sub>R アゴニスト、イメチットおよびクロベンプロピットは、好酸球形態変化を誘導することにおいてヒスタミンを模倣することを示す全血形態変化アッセイの結果を表す。

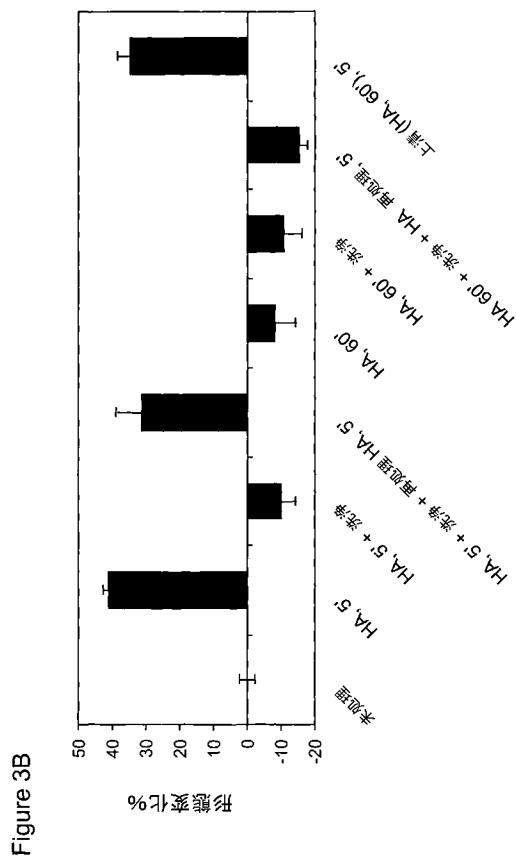
【図 10】ヒスタミンおよび H<sub>2</sub> アンタゴニスト、ラニチジンの両方での全血サンプルの処理による H<sub>4</sub> 特異的形態変化応答の分離を示す。

【図 11】増加する濃度の化合物 A は、ヒスタミンおよびラニチジンの両方での全血サンプルの共処理により分離される H<sub>4</sub> 特異的形態変化応答を用量依存的に阻害することを示す。

【図 3 A】



【図 3 B】



【 図 3 C 】

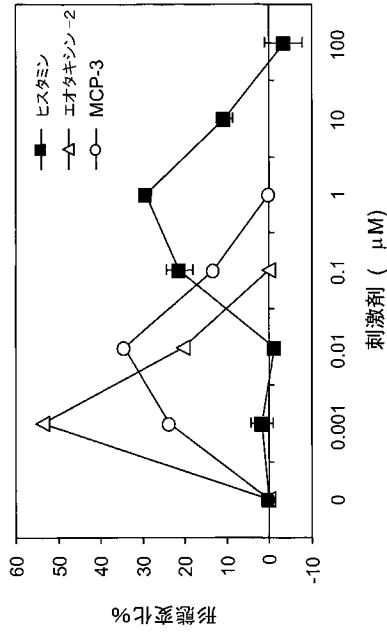


Figure 3C

【 図 3 D 】

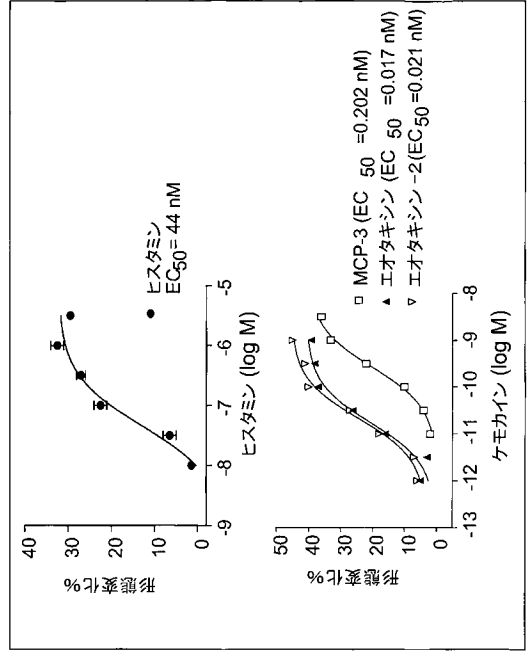


Figure 3D

【 図 3 E 】

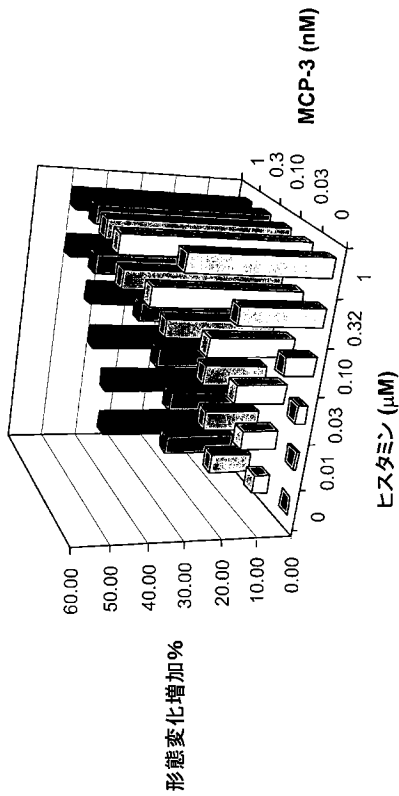


Figure 3E

【 図 4 A 】

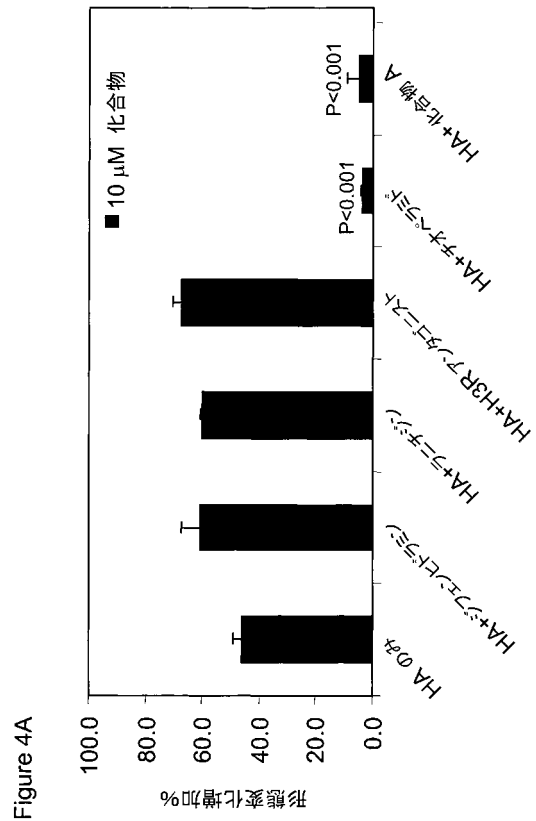


Figure 4A

【 図 4 B 】

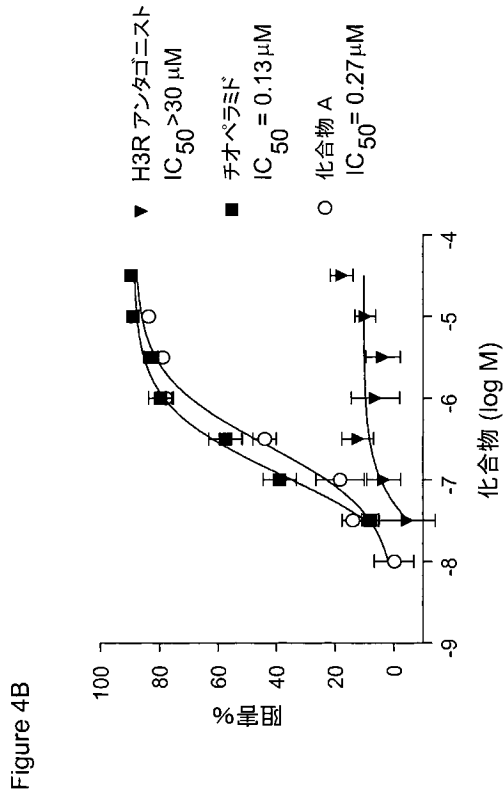


Figure 4B

【 図 4 C 】

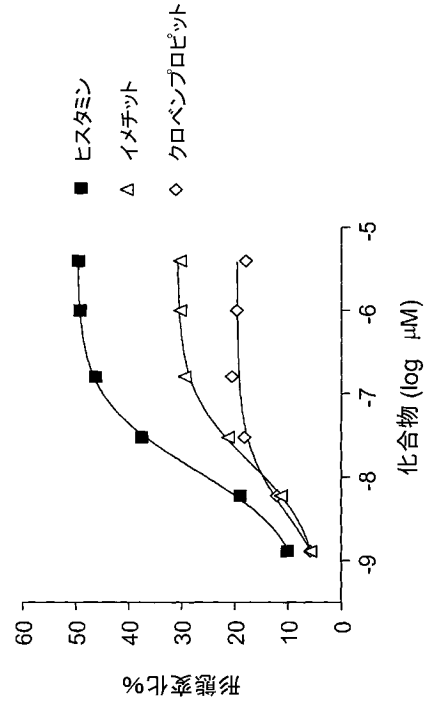


Figure 4C

【 図 5 A 】

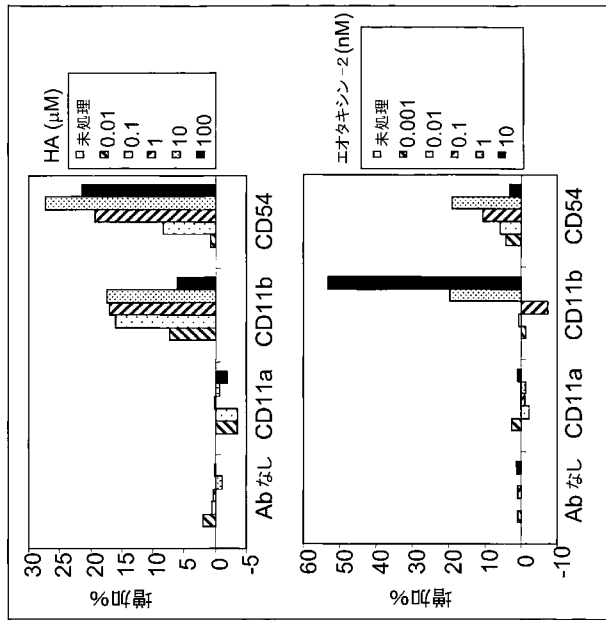


Figure 5A

【 図 5 B 】

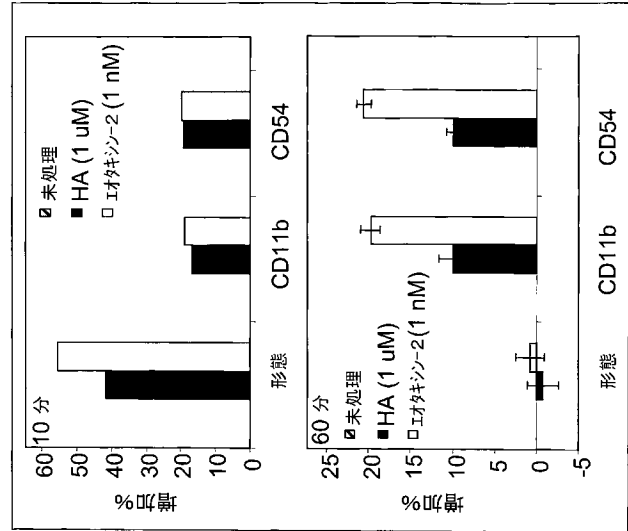


Figure 5B

【 図 5 C 】

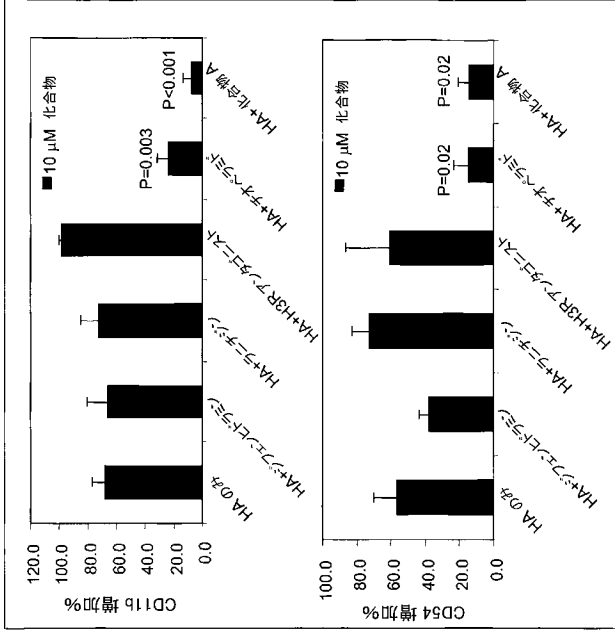


Figure 5C

【 図 6 A 】

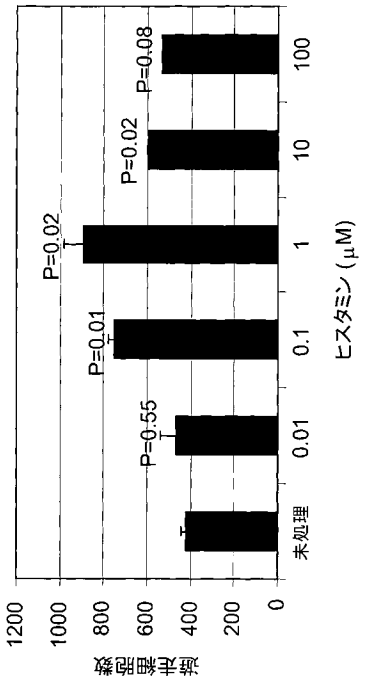


Figure 6A

【 図 6 B 】

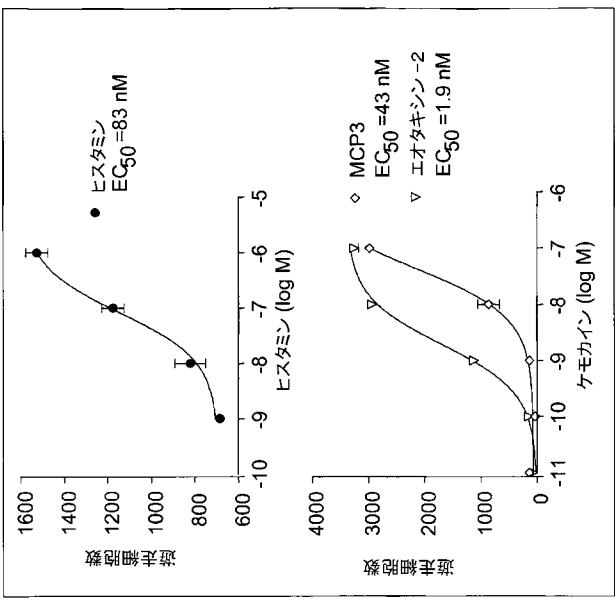


Figure 6B

【 図 6 C 】

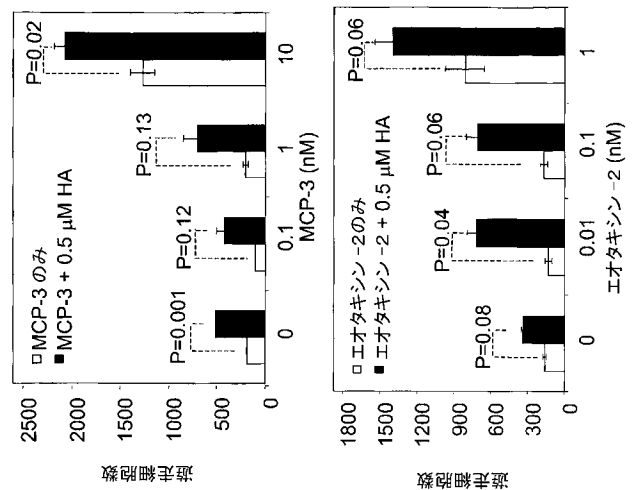


Figure 6C

【 図 6 D 】

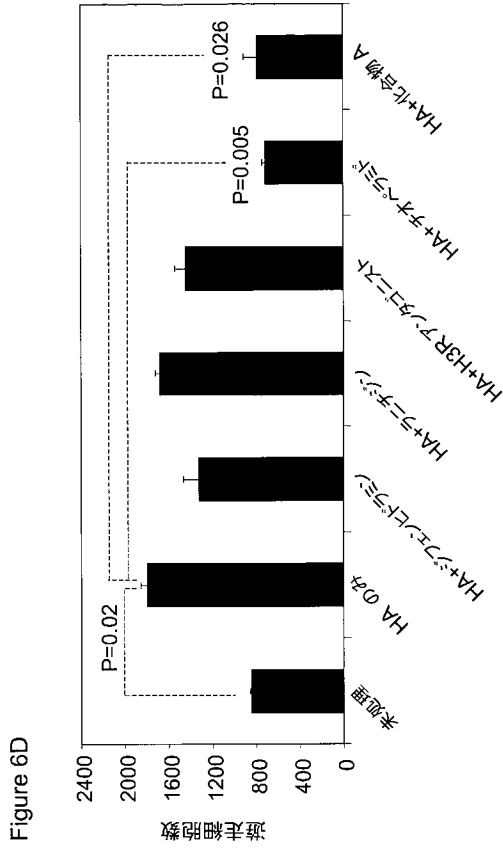


Figure 6D

【 図 7 】

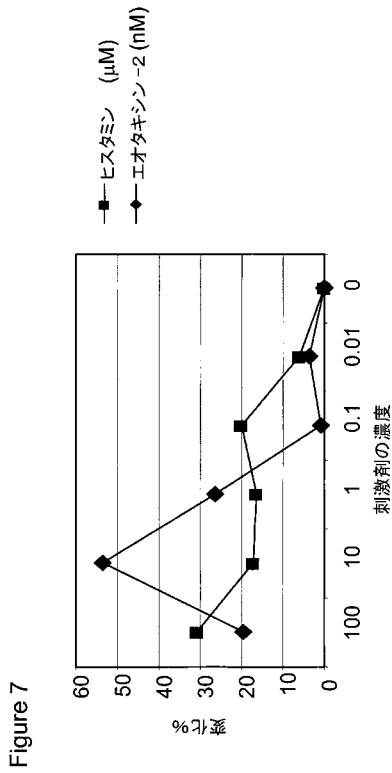


Figure 7

【 図 6 E 】

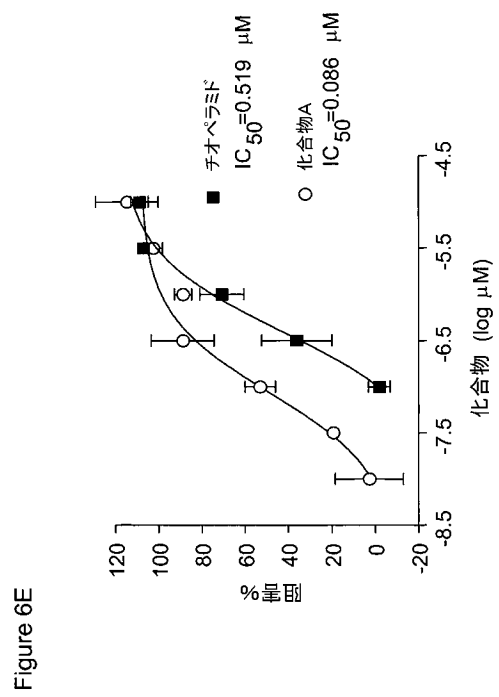


Figure 6E

【 図 8 】

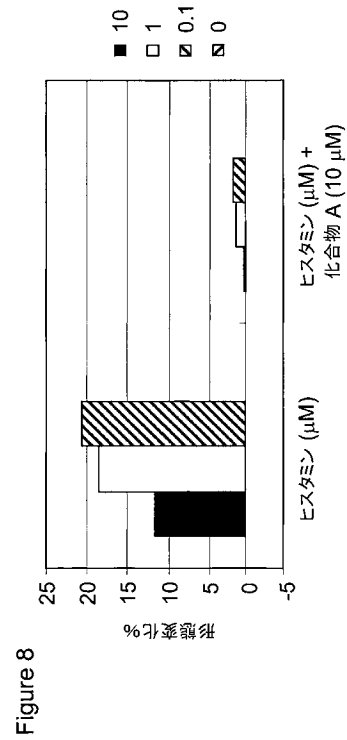


Figure 8

【 図 9 A 】

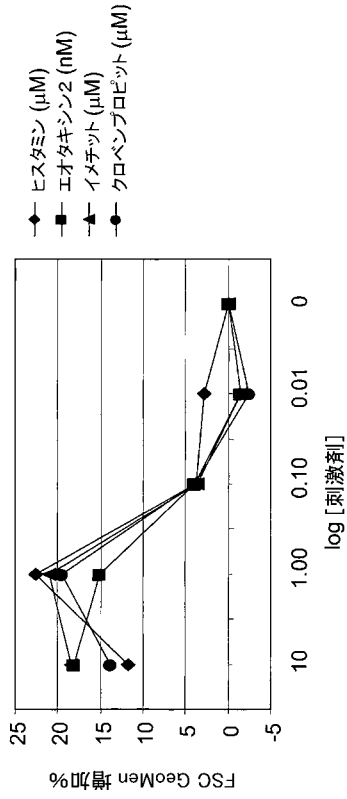


Figure 9A

【 図 9 B 】

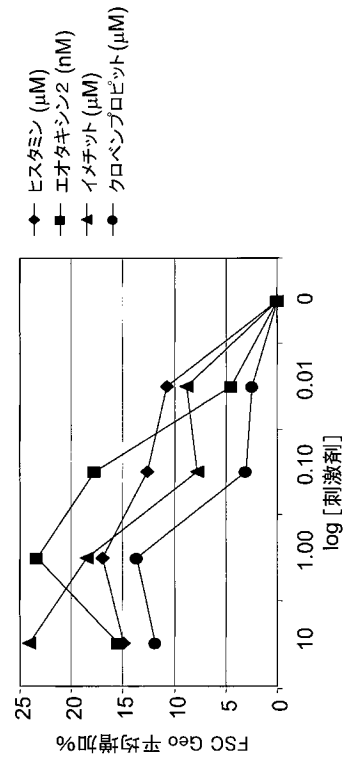


Figure 9B

【 図 1 0 】

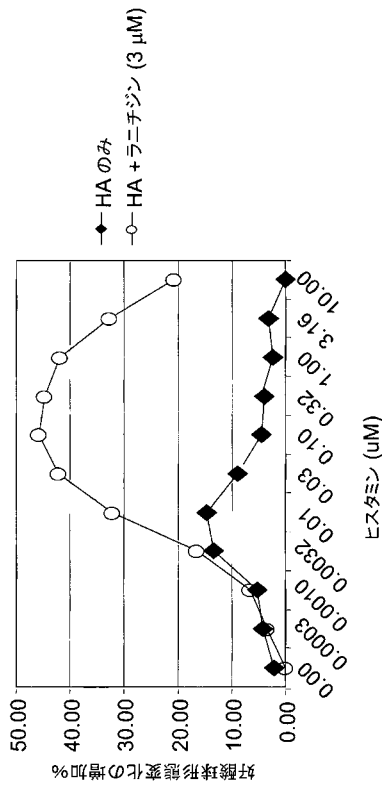


Figure 10

【 図 1 1 】

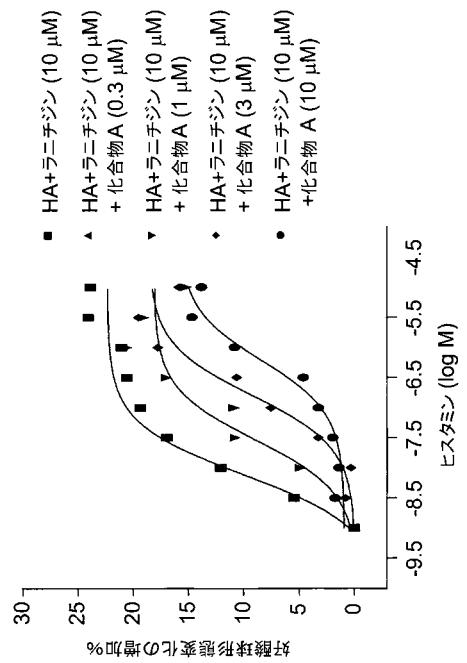


Figure 11

【 図 1 A 】

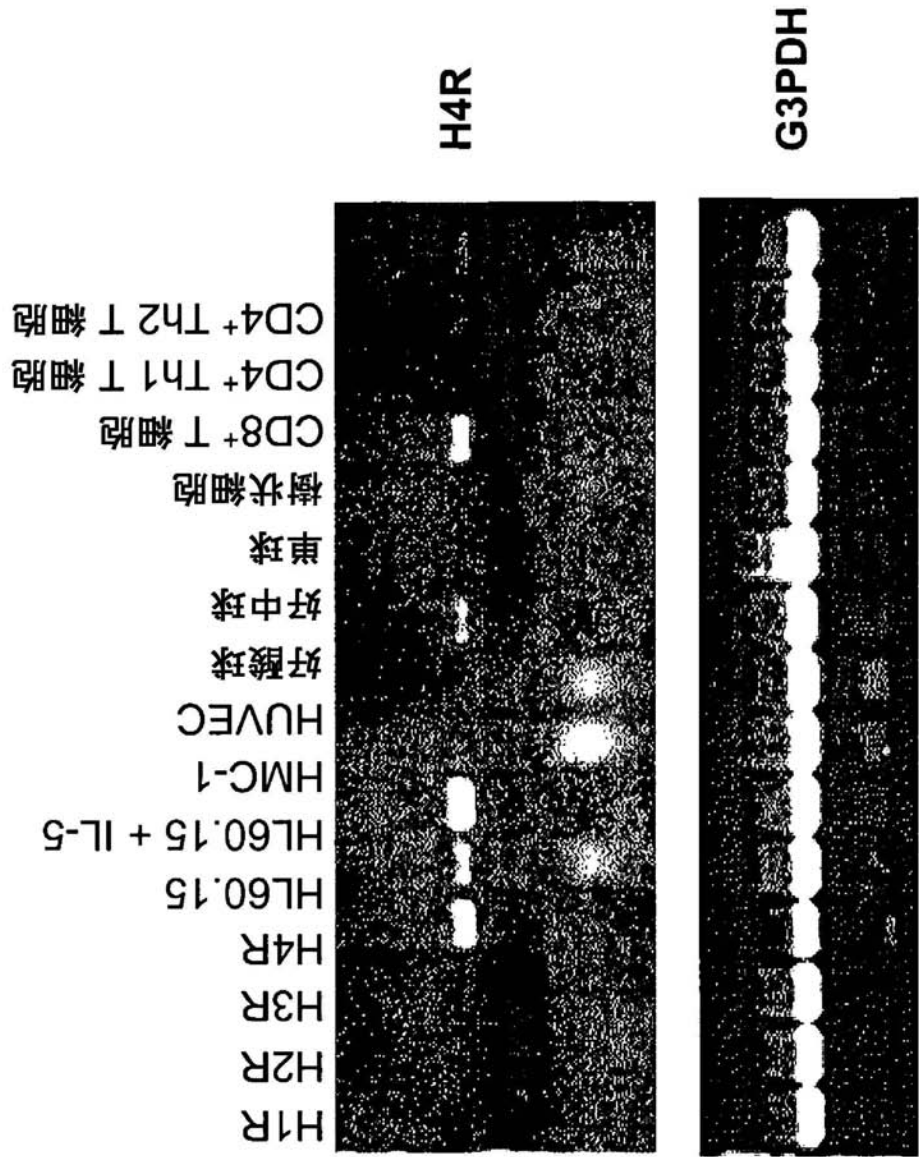


Figure 1A

【 図 1 B 】

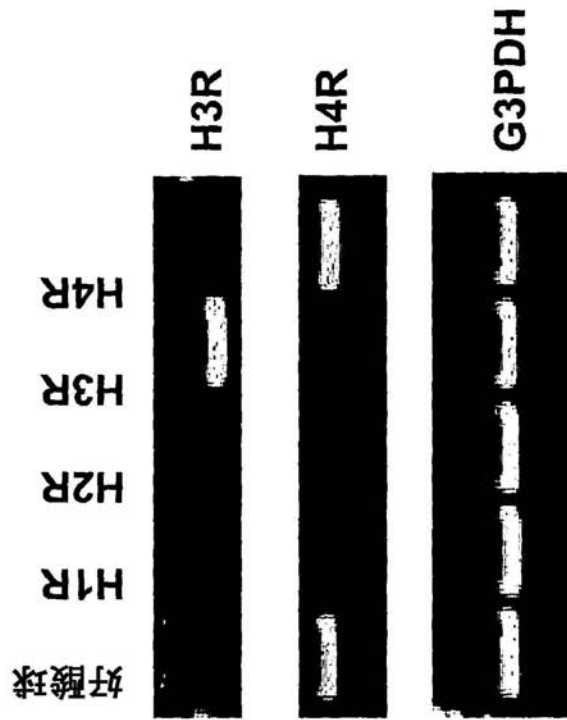


Figure 1B

【 図 2 A 】

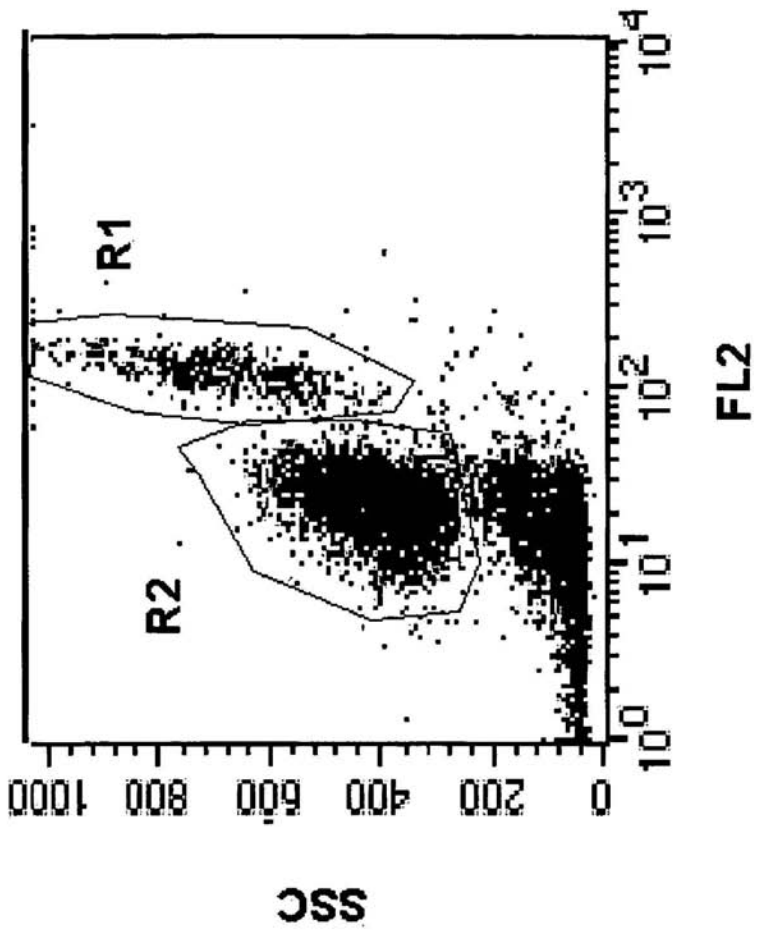


Figure 2A

【 図 2 B 】

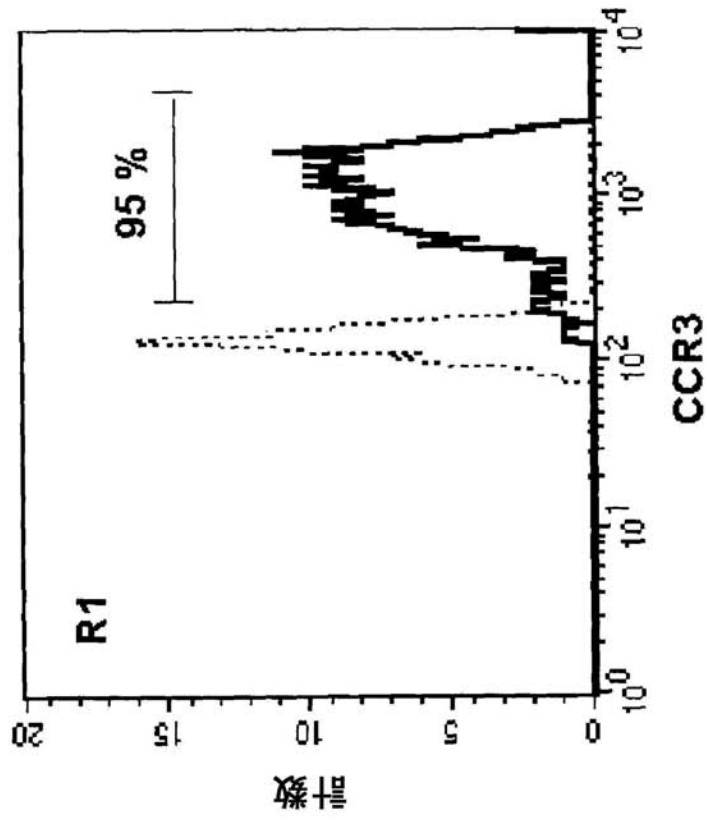


Figure 2B

【 図 2 C 】

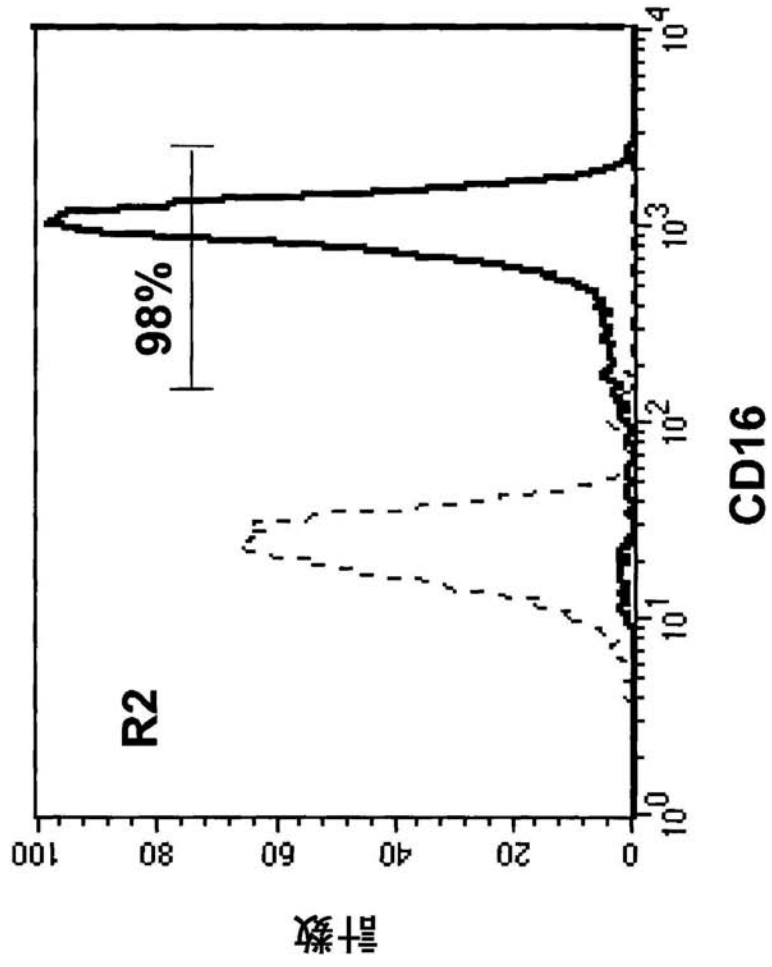


Figure 2C

【 図 2 D 】

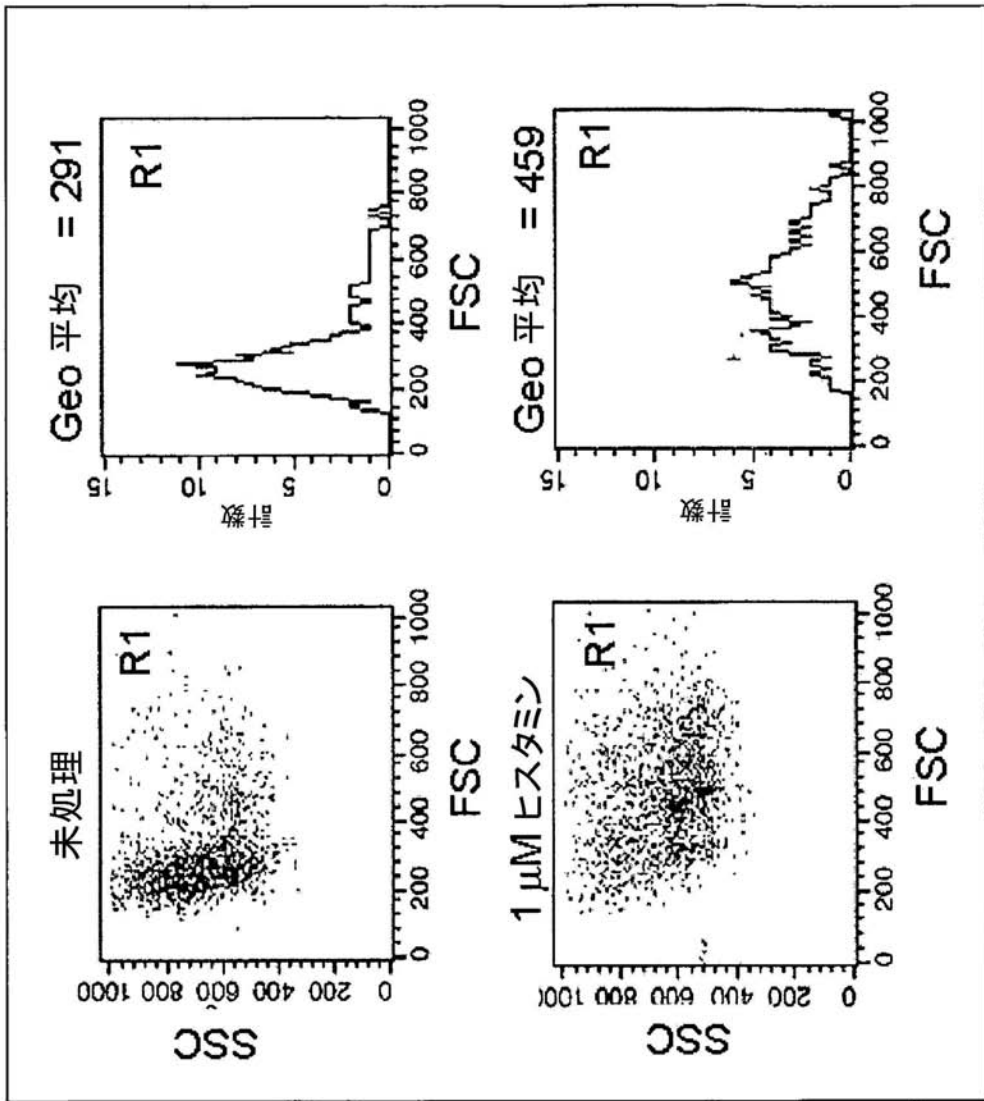


Figure 2D

【 図 2 E 】

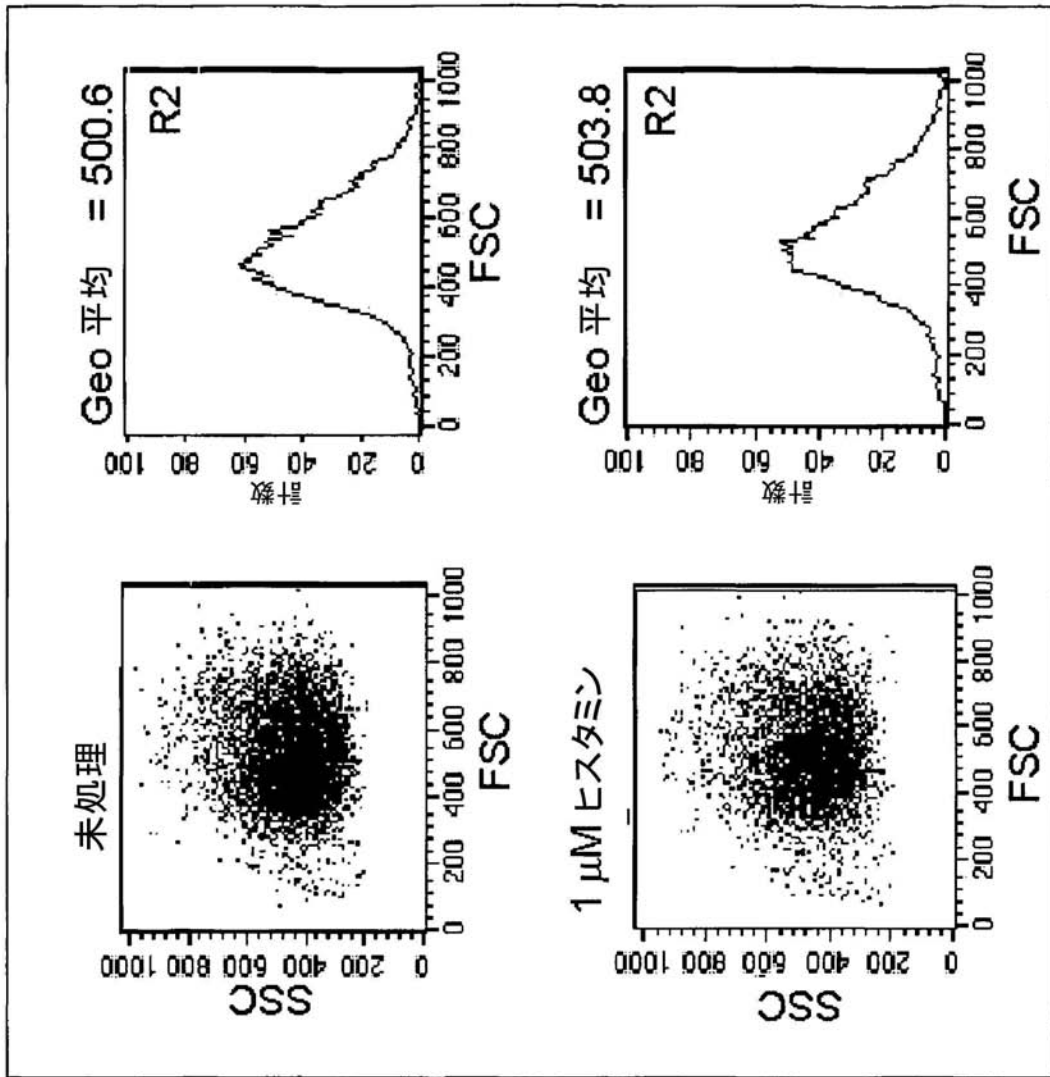


Figure 2E

【 配列表 】

[2007506983000001.xml](#)

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/31614
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : G01N 33/567 US CL : 435/7.2, 7.21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.2, 7.21 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, STN		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/0133931 A1 (THURMOND et al.) 17 July 2003 (17.07.2003), see entire document.	1-24
A	GANTNER et al. Histamine H4 and H2 Receptors Control Histamine-Induced Interleukin-16 Release from Human CD8+ T Cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2002, Vol. 303, No. 1, pages 300-307, see entire document.	1-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 06 October 2005 (06.10.2005)		Date of mailing of the international search report 04 NOV 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Christopher R. Tate</i> Christopher R. Tate Telephone No. 571-272-1600

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

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

(72) 発明者 リュング, ウエイ - ピング  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サンディエゴ・ブルベイカーコート 1 2 7 0 7

(72) 発明者 リング, ピング  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 6 サンディエゴ・カルストンウェイ 1 0 7 4 1

(72) 発明者 サーモンド, ロビン  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 0 7 サンディエゴ・グイゾトストリート 1 4 6 5

F ターム(参考) 2G045 AA05 AA40 BA13 BB22 BB24 CA12 CA15 CA25 DA71 FA14  
 FA37 FB03 FB12 FB16 GA03 GB05 GC11 GC15 JA01  
 2G054 AA07 AB04 AB10 BB08 BB12 CA21 CE02 EA03 GA04 GB10  
 JA02  
 4B024 AA11 BA63 CA01 CA04 CA09 HA14

专利名称(译)	分析全血中组胺H4受体介导的作用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007506983A</a>	公开(公告)日	2007-03-22
申请号	JP2006528285	申请日	2004-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	Jiyansen杉机郁吃喀-Namuroze和非日元纸币施家伙翻牌		
[标]发明人	カールソンラース リユングウエイピング リングピング サーモンドロビン		
发明人	カールソン,ラース リユング,ウエイ-ピング リング,ピング サーモンド,ロビン		
IPC分类号	G01N33/49 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543 G01N21/78 C12N15/09 G01N G01N33/566 G01N33/567		
CPC分类号	G01N33/566 G01N2500/04		
FI分类号	G01N33/49.ZNA.K G01N33/53.K G01N33/536.D G01N33/543.597 G01N21/78.C C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA05 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/CA12 2G045/CA15 2G045/CA25 2G045/DA71 2G045/FA14 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/FB16 2G045/GA03 2G045/GB05 2G045/GC11 2G045/GC15 2G045/JA01 2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/AB10 2G054/BB08 2G054/BB12 2G054/CA21 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB10 2G054/JA02 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA14		
优先权	60/506434 2003-09-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于分析全血以检测由组胺H4受体介导的作用的测定方法，例如嗜酸性粒细胞形状改变，细胞骨架改变，粘附分子上调或钙通量被描述。这些方法可用于临床和诊断应用。

