

(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2016-522899

(P2016-522899A)

(43) 公表日 平成28年8月4日(2016.8.4)

(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	K 2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	K 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2016-512373 (P2016-512373)	(71) 出願人	509237767
(86) (22) 出願日	平成26年5月7日 (2014.5.7)		ナショナル ユニバーシティー オブ ア
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月4日 (2015.11.4)		イルランド, ゴールウェイ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/059397		アイルランド国 ゴールウェイ, ユニバ
(87) 国際公開番号	W02014/180933		ーシティー ロード
(87) 国際公開日	平成26年11月13日 (2014.11.13)	(74) 代理人	100114775
(31) 優先権主張番号	1308271.4		弁理士 高岡 亮一
(32) 優先日	平成25年5月8日 (2013.5.8)	(74) 代理人	100121511
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 小田 直
		(74) 代理人	100202751
			弁理士 岩堀 明代
		(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 半自動化全血免疫効力アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、単核を阻害して、T細胞活性化を誘発することにおいて培養幹細胞と生物学的製剤の効力を定量化するための、迅速な、半自動化全血アッセイに関する。そのようなアッセイによって、個々の患者のための治療用幹細胞製品の抗炎症効力の定量化が可能になる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

全血免疫効力アッセイであって、

- (1) ヘパリン化チューブに患者から血液サンプルを加えるステップと、
- (2) 培地で前記血液サンプルを 1 / 5 と 1 / 20 の間で希釈し、次いで前記血液サンプルに L P S、プレフェルディン A を加えるステップと、
- (3) 前記ヘパリン化チューブ中の処理した前記血液サンプル中の細胞上の表面分子に対する抗体の混合物を加えるステップと、
- (4) ホルムアルデヒドを加えて、室温でインキュベートするステップと、
- (5) 遠心分離によって前記細胞を濃縮するステップと、
- (6) 上清を捨てて、ペレットにサポニンを加えるステップと、
- (7) P E 標識抗体を、透過性を付与した前記細胞に加えるステップと、
- (8) 前記細胞を濃縮するステップと、
- (9) フローサイトメトリーによって前記細胞を分析するステップを含む全血免疫効力アッセイ。

10

【請求項 2】

ステップ (2) において前記血液サンプルが 1 / 10 で希釈される、請求項 1 に記載のアッセイ。

【請求項 3】

前記 L P S が 0 . 5 と 20 n g / m L の間の濃度で加えられる、請求項 1 または 2 に記載のアッセイ。

20

【請求項 4】

前記 L P S が 2 n g / m L の濃度で、濃度を加えられる、請求項 3 に記載のアッセイ。

【請求項 5】

プレフェルディン A が 0 . 75 と 3 . 1 μ g / m L の間の濃度で加えられる、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 6】

前記プレフェルディン A が 0 . 6 μ g / m L の濃度で加えられる、請求項 5 に記載のアッセイ。

【請求項 7】

ステップ (2) において前記血液サンプルが 1 / 10 で希釈される、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のアッセイ。

30

【請求項 8】

ホルムアルデヒドの追加に続いて、前記血液サンプルが室温で暗所にて約 10 分間インキュベートされる、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 9】

ステップ (7) において前記 P E 標識抗体がおそらく T N F - P E または I L - 1 2 - P E から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 10】

ステップ (7) でのインキュベーションに続いて、前記細胞が 400 μ L のリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を加えることによって洗浄され、次いで前記細胞が遠心分離によって濃縮される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載のアッセイ。

40

【請求項 11】

単球または T 細胞上の表面分子に対する前記蛍光標識抗体が C D 4 5、C D 1 4、C D 3 および C D 8 から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 12】

新規の免疫抑制化合物を特定する方法であって、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法によって、試験化合物を分析することを含む方法。

【請求項 13】

実施例または添付の図面を参照して、本明細書に実質的に記述される請求項 1 ~ 12 の

50

いずれかに記載の全血免疫効力アッセイ。

【請求項 14】

実施例または添付の図面を参照して、本明細書に実質的に記述される新規の免疫抑制化合物を特定する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、単核を阻害して、T細胞活性化を誘発することにおいて培養幹細胞と生物学的製剤の効力を定量化するための、迅速な、半自動化全血アッセイに関する。そのようなアッセイによって、個々の患者のための治療用幹細胞製品の抗炎症効力の定量化が可能になる。

10

【背景技術】

【0002】

幹細胞生物学は、胃腸疾患、免疫疾患および心臓疾患を含む広範囲にわたる疾患標的のための臨床と商業的な活動領域に進展してきた。培養幹細胞の直ちに適用できる治療特性は接触依存性および可溶性メディエーターを介して、その細胞のまわりの細胞挙動を調節する培養幹細胞の能力であることは、今や明白である。このパラクリン、または「栄養」作用は、心筋梗塞、虚血肢、皮膚潰瘍、骨関節症、炎症性腸疾患（IBD）、多発性硬化症および関節リウマチなどの一般的な炎症状態および自己免疫性状態を治療するために、培養幹細胞生成物の使用のための基礎を形成する、強力な抗炎症性特性および免疫抑制特性を含む。間葉系幹（または間質）細胞（MSC）は、トランスレーショナル研究者および医療企業にとって主要な焦点であった。この優先傾向は、MSCが種々の利用可能な組織（骨髄、脂肪、胎盤、臍帯、歯肉）から培養でき、大量培養への拡張に適しており、かつ *in vitro* および *in vivo* で強力な抗炎症性効果を媒介することを確信して示してきたという事実から生じている。

20

【0003】

幹細胞部門における商業的開発は、過去6年で劇的に増加し、治療用幹細胞、特に、在庫があつてすぐに入手可能な培養拡張MSCは、いまや、有効性において著しい可変性の可能性がある商品を代表している。さらに、効力/有効性アッセイの必要性は、ほぼ間違いなく幹細胞治療用製品の承認の必要性になる。これは、単核およびT細胞抑制のための培養拡張したヒトMSCの効力が組織原基、ドナーと継代数に依存し、および個々の被検体によって変化するからである。このように、医療供給者が幹細胞治療に関して最大のリスクベネフィットバランスを有する患者を選択する、ならびに各患者に対して最適製品を選択する明確な必要性が存在する。

30

【0004】

単核は、骨髄中の骨髄単球性幹細胞から発達する。単球は血液に入り、数日間循環し、次いで組織内に移動する。組織において、単球はさらにマクロファージに成熟する。単核は、炎症性反応において重要な役割を果たしている。単球は、CD13、CD14、CD15、CD16、CD64、CD11（bとc）およびHLA-DRに対して陽性である。

40

【0005】

T細胞は、免疫応答において大きな役割を果たす、リンパ球の一部であり、かつ適応免疫のコアにある。T細胞は、炎症が組織破壊と関連している疾患において有害になり得る。T細胞は、CD2、CD3、CD5、CD7、TCR CD45RA（ナイーブ）およびCD45Ro（記憶）に対して陽性である。

【0006】

炎症性疾患および免疫介在性疾患のためのMSCの治療特性は、単核/マクロファージおよびT細胞活性化に対するそれらの調節効果と関連している。そのような疾患において、最もよく報告された抗炎症効果は、インターロイキン10（IL-10）などの抗炎症性サイトカインを産生する単球/マクロファージの「再プログラム化」と、インターフェ

50

ロン (IFN) およびインターロイキン17 (IL-17) などの炎症誘発性サイトカインの産生に關与しているT細胞サブセットの活性化の抑制とがある。それらから利するところが最も高そうな患者に個々のMSC製品を合わせる良好な技法は、生み出されていない。個々の患者への治療を最適化する(個別化医療と呼ばれることが多い、医療へのアプローチの一つ)必要性が明らかに存在する。

【0007】

Jiaoら, Methods Mol Biol 2011, 677, 221-31は、IL-10に基づくMSC-CMおよびMSC-Lyの効力に関するアッセイを記述している。

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

このように、本発明の一目的は、自動化、フローサイトメトリーを用いた、MSC抗炎症効力についてのヒト全血アッセイを開発することである。さらなる目的は、約24時間以内に効力を発することができるMSC抗炎症効力についてのアッセイを開発することである。また、このアッセイは信頼性が高くなければならない。そのようなアッセイは、有望なレシピエントの血球を採取し、ポテンシャルドナー同種MSCのどのバッチが、患者の単核およびT細胞を阻害することにおいて最も強力かを判定する。

【0009】

このように、本発明のさらなる目的は、刺激されたヒト単核のMSC再プログラム化を定量化するためのアッセイを開発することである。別の目的は、ヒトT細胞活性化のMSC抑制を定量化するためのアッセイを開発することである。特に、ヒト骨髓間葉系間質細胞(hBM MSC)の効力を判定するためのアッセイを提供することが目的の一つである。

20

【0010】

本発明のさらなる目的は、免疫調節化合物を特定するために用いることができるアッセイを提供することである。これは、化合物を96ウェルプレートに滴定し、化合物の段階的な量での存在下で血液活性化を行い、次いでどの化合物が血球に対して免疫調節効果があるかを判定することによって行うことができる。

【課題を解決するための手段】

30

【0011】

本発明によれば、以下を含む全血免疫効力アッセイが提供される。

- (1) ヘパリン化チューブに患者から血液サンプルを採取するステップと、
- (2) 培地で血液サンプルを1/5と1/20の間で希釈し、次いで該血液サンプルにLPS、プレフェルディンAを加えるステップと、
- (3) ヘパリン化チューブ中の処理した血液サンプル中の細胞上の表面分子に対する抗体の混合物を加えるステップと、
- (4) ホルムアルデヒドを加えて、室温でインキュベートするステップと、
- (5) 遠心分離によって細胞を濃縮するステップと、
- (6) 上清を捨てて、ペレットにサポニンを加えるステップと、
- (7) PE標識抗体を、透過性を付与した細胞に加えるステップと、
- (8) 細胞を濃縮するステップと、
- (9) フローサイトメトリーによって細胞を分析するステップ。

40

【0012】

好ましくは、ステップ(2)において血液サンプルは、1/10で希釈される。ステップ(2)において処理した血液は、4時間と36時間の間でインキュベートされてもよい。

【0013】

LPSは、0.5と20ng/mLの濃度で加えることができ、2ng/mLの濃度が好ましい。プレフェルディンAは、0.75と3.1μg/mLの濃度で加える

50

ことができ、 $0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度が好ましい。ステップ(3)において、血液サンプルは、暗所にて約10分間インキュベートしてもよい。

【0014】

ステップ(4)で用いるホルムアルデヒドは、Beckman Coulter 参照番号A07803からのIntraprepキットの一部である試薬1であってもよい。ホルムアルデヒドまたは試薬1の追加に続いて、血液サンプルは、室温で暗所にて約10分間インキュベートしてもよい。ステップ(6)で用いられるサポニンは、Beckman Coulter 参照番号A07803からのIntraprepキットの一部である試薬2であってもよい。これは、細胞の透過性付与をもたらす。

【0015】

ステップ(7)においてPE標識抗体は、TNF-PEまたはIL-12-PEであってもよい。細胞は、抗体とともに暗所にて約10分間インキュベートしてもよい。

【0016】

ステップ(7)でのインキュベーションに続いて、細胞は、 $400 \mu\text{L}$ リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加えることによって洗浄し、次いで細胞は遠心分離によって濃縮してよい。次いで、洗浄ステップを繰り返し、次いで細胞をPBSに再懸濁させてよい。血液サンプルは、TNF- の判定の場合は6時間、IL-12の判定の場合は24時間、インキュベートしてよい。インキュベーション温度は、 $5\% \text{CO}_2$ 下で、 37°C であってもよい。

【0017】

単核上の表面分子に対する蛍光標識抗体は、CD45およびCD14から選択されてよい。T細胞を調べるために、CD3およびCD8への抗体の組み合わせを用いてよい。

【0018】

血液サンプルは、抗体とともに室温で暗所にて10分間、インキュベートしてよい。試薬1とのインキュベーションは、室温で暗所にて10分間であってもよい。

【0019】

ステップ(6)において細胞は、 20°C で、 1500rpm で、5分間遠心分離させてよい。細胞は、TNF-PEとともに、室温で暗所にて15分間インキュベートしてよい。ステップ(9)において細胞の濃縮は、 20°C で、 1500rpm で、5分間であってもよい。

【0020】

フローサイトメトリーは、光散乱と蛍光シグナルの組み合わせによって単球の同定またはゲーティングを可能にし、ゲーティングされた単球上で細胞内TNF- またはIL-12が測定される。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】LPSの異なる用量で6時間刺激された、ヒト末梢血のゲーティングされた単球のTNF- の細胞内染色を示す。これは、LPS用量を $0.5 \sim 20 \text{ng}/\text{mL}$ に増加すると、単球の大部分が細胞質内TNF- を発現し、約 $5 \text{ng}/\text{mL}$ のLPSで最大に達したことを示す。

【図2】 $2 \text{ng}/\text{mL}$ のLPSで6時間、刺激した単球によるTNF- の発現に対する、同種MSCの数を増やして添加する効果を示す。図に示すように、MSC細胞には、TNF- 発現の用量依存的抑制がある。

【図3A】異なる血液ドナーについての異なるMSC供給源の異なる効力を示す。

【図3B】異なる血液ドナーについての異なるMSC供給源の異なる効力を示す。

【図3C】異なる血液ドナーについての異なるMSC供給源の異なる効力を示す。

【図3D】異なる血液ドナーについての異なるMSC供給源の異なる効力を示す。

【図4A】異なる血液ドナーが異なるMSCに対して異なって反応することを示す。

【図4B】異なる血液ドナーが異なるMSCに対して異なって反応することを示す。

【図5】MSC対単球の固定比率による平均効力が固定されたことを示す。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明の自動化アッセイは、単球およびT細胞の両活性化についてのMSCの免疫調節特性の定量化を可能にする。モニターした細胞の集団は、用いた蛍光標識モノクローナル抗体の組み合わせに依存する。採用したプロトコルは、完全に自動化した方法で動作することができるように開発されたものである。このため、最初の全血細胞培養は、96ウェルマイクロタイタープレート形式の1mL培養容器を用いて、Perkin-Elmer Janusロボットワークステーションで開始する。4時間の培養に続いて、細胞は、自動化96ウェルプレートC6サンプル収集モジュールを固定したB-D Accuri C6フローサイトメーター上での染色および分析のために、第2の96ウェルプレートに移す。この自動化アッセイ形式は、MSCによる実行に成功した。細胞を加えることによる単球またはT細胞の活性化への効果を調べることに加えて、このアッセイを用いて、可溶性化合物の免疫調節特性のスクリーニングを行うこともできる。

10

【0023】

このアッセイは、迅速なターンアラウンド、自動化アッセイを行うために開発された。アッセイは、ロボットで実施されることができる。結果は、6時間以内に得られることができる。TNF産生は、単核が放出する最も急速なサイトカインであり、約24時間要するIL-10よりも速い。

【0024】

本発明の方法では、プレフェルジンAは、グリコシル化を遮断して、サイトカインの分泌を阻止するために細胞に加えられるので、サイトカインは上清中に見つからない。そのような戦略の利点は、定義された亜集団の間でサイトカイン分泌細胞の頻度が直接定量化できるということである。

20

【0025】

また、このアッセイを用いて、T細胞活性化を判定することができる。同様に、このアッセイは、自動化することができ、6時間のターンアラウンドで、ゲーティングされたCD8+T細胞によるIFN産生を検査する。このように、本発明のアッセイを用いて、追加した細胞と生物活性化合物の単球およびT細胞に対する効果を調べることができる。

【実施例】

【0026】

アッセイプロトコル

1. 細胞の活性:

ヘパリン化チューブに血液を採取する。

血液を50 μ L、LPSを1ng/mL、プレフェルジンAを0.6 μ g/mLおよびRPMI-1640培地(Sigma#R0883)を加え、最終量を500 μ Lにする。他の血液希釈の場合、加える血液量を変える。これは、血液50 μ Lを500 μ Lで最終希釈する、すなわち1/10になる。他の希釈(例えば1:20)は、例えば、血液量を25 μ Lに減らすが、最終量を500 μ Lのままにしておくことによって、行うことができる。

30

【0027】

LPS供給源:(InvivoGen#tlrl-3pelps)他の濃度:0.5、2、5、10および20(n g / m L)を試験した。

40

【0028】

プレフェルジンA(eBioscience#00-4506-51)最終濃度0.6 μ g/mL。0.75、1.12、1.5、2.25および3.1(μ g/mL)も試験した。

【0029】

次いで、処理した血液を、37 $^{\circ}$ Cで、5%CO₂下で、TNF- α の場合は6時間、IL-12の場合は24時間インキュベートする。4時間と8時間のインキュベーションも試験した。

50

【0030】

2. 細胞内染色 (Beckman Coulter IntraPrepキット# A07803)

1) 96ディープウェルプレート中の処理した血液サンプルに、単球によって発現した表面分子に対する蛍光標識抗体の混合物を加える (CD45 PerCpCy5.5 eBioscience #45-9459-42およびCD14APC eBioscience #17-0149-42)。

2) 室温で暗所にて10分間、インキュベートする。

3) 試薬1を60 μ L加える。室温で暗所にて10分間、インキュベートする。

4) PBS 1Xを300 μ L加え、細胞を20で、1500rpmで、5分間、濃縮する。

5) 上清を捨てる。

6) 試薬2を50 μ L加える。

7) 希釈した (通常は、約1/100最終濃度。正確な希釈は抗体のバッチによって決まる) TNF-PE (カタログ12-7349 eBioscience) を加える。IL-12-PE抗体 (カタログ12-7235 eBioscience) との24時間のインキュベーション後、IL-12が検出される。室温で暗所にて15分間、インキュベートする。

8) PBS 1Xを600 μ L加え、細胞を20で、1500rpmで、5分間、濃縮する。

9) 上清を捨てる。

10) 900 μ LのPBS 1Xで洗浄を繰り返す。

11) FACS緩衝液60 μ Lに再懸濁させる。

12) ACCURIFローサイトメーターでサンプルを得る。この機械は、血液などの複合混合物中の細胞の定義された亜集団上の光散乱および蛍光シグナルを測定する。フローサイトメリーを使用することにより、単球またはCD8+T細胞などの細胞のゲーティングされた亜集団によるサイトカイン産生を定量化することが可能になる。

【0031】

血液を抗凝固剤に溶解させることは、重要である。ヘパリンは、抗凝固剤として好ましい。クエン酸塩およびEDTAはカルシウムをキレート化するので、使用することができない。最適には、血液は1/10で希釈することが必要である。我々は、1/2、1/5、1/10、1/20および1/30の希釈範囲にわたって試験した。希釈が不十分な場合、試験は上手くいかない。希釈が多すぎると、分析するのに十分な細胞がない。

【0032】

上手くいくLPS濃度範囲は、広い(0.1~100ng/mL)。用量/反応曲線の指数部上にある約1ng/mLを用いることによって、試験は、添加した細胞または可溶性化合物による阻害に反応する。LPSが多くなると、活性化を阻害するのがより難しくなる。

【0033】

図3は、異なるMSC供給源が種々の血液ドナーに対して異なる効力を有するようになることを示す。例えば、MSC Aは、血液1および2を阻害するが、血液3および4をそれほど阻害しない。このように、本発明のアッセイによって、患者がMSC治療に対してどのように反応するかを予測することができる。図4は、異なる血液ドナーが異なるMSCに対して異なって作用し、そのためドナー2からの血液は、A由来のMSCによって阻害されるが、B、CおよびD由来のMSCによってそれほど阻害されないことを示す。このように、本アッセイによって、各患者のための異なるMSCドナーの効率を比較することができる。図5は、MSC対単球の比率がOrbsenから購入したMSCの「効力」に基づいて固定された、測定される平均効力を示す。このグラフは、hBM MSCの存在下で、単球TNF-の発現が減少することを示す。

【0034】

10

20

30

40

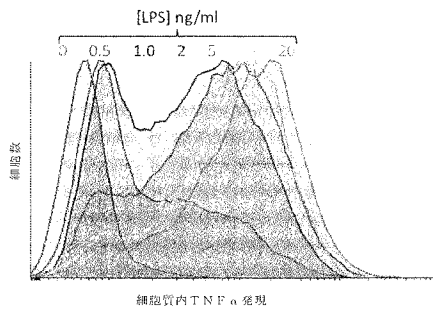
50

本発明を参照して、本明細書で用いる場合、語句「含む／含んでいる」および語句「有する／含んでいる」を用いて、記述した特徴、整数、ステップまたは成分の存在を特定するが、1または複数の他の特徴、整数、ステップ、成分またはその群の存在または追加を妨げない。

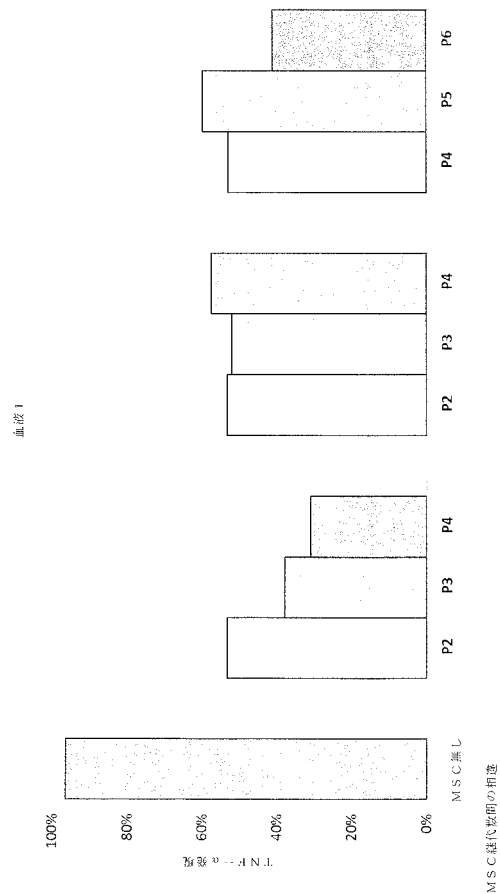
【0035】

明確にするために、別々の実施形態と関連して記述されている本発明のいくつかの特徴は、単一の実施形態の組み合わせでも提供されることができると認識される。反対に、短縮して、単一の実施形態と関連して記述されている本発明の種々の特徴は別々に、または任意の適切な副組み合わせでも提供されることができると認識される。

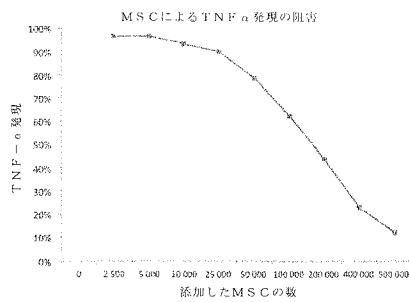
【図1】



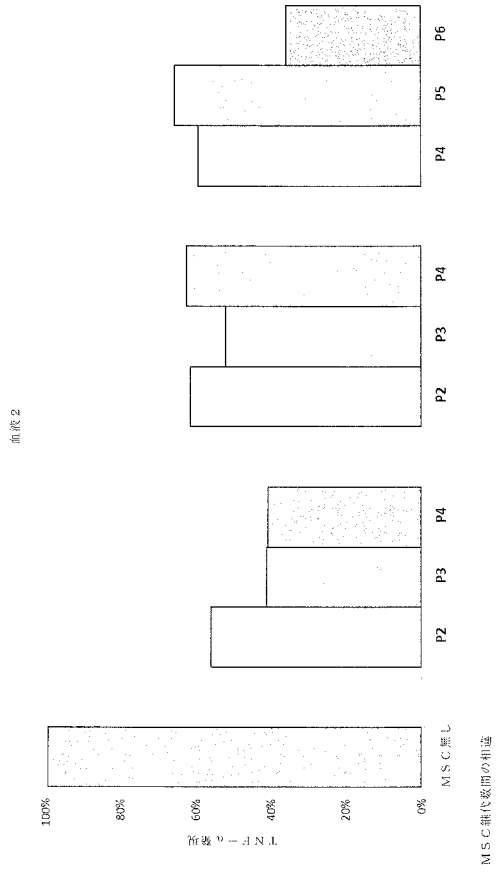
【図3A】



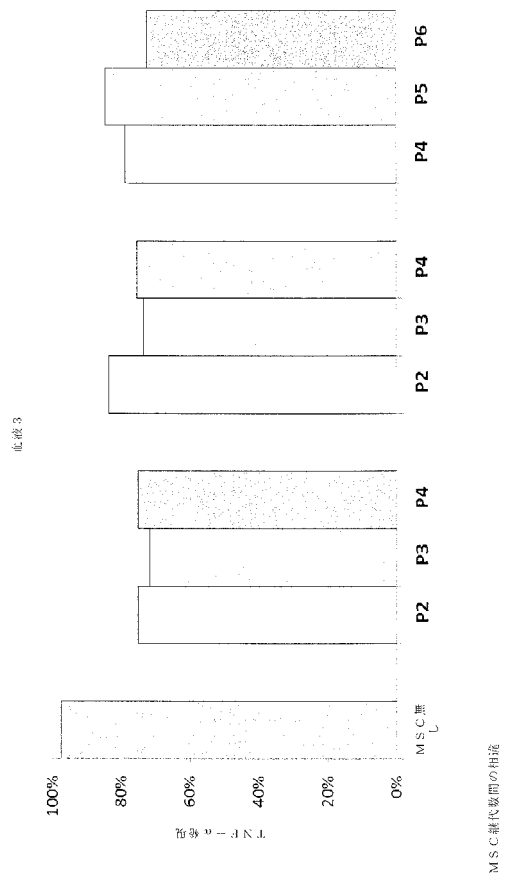
【図2】



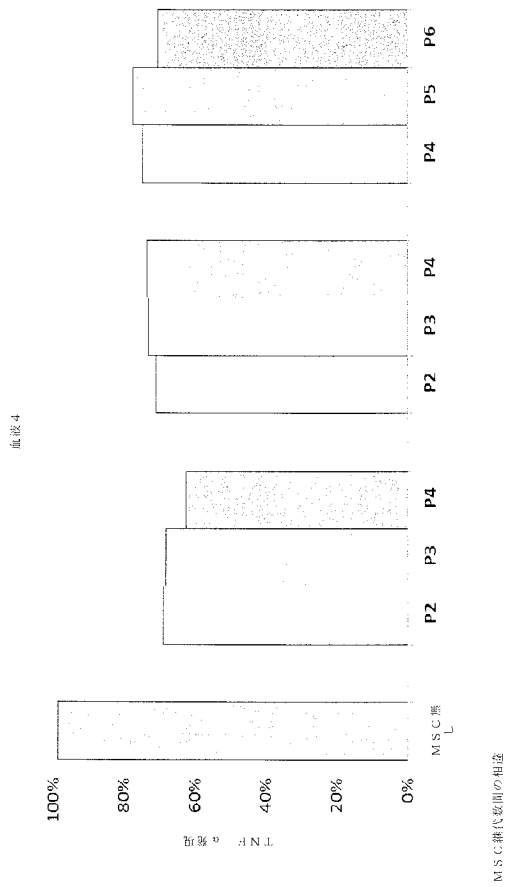
【図 3 B】



【図 3 C】



【図 3 D】

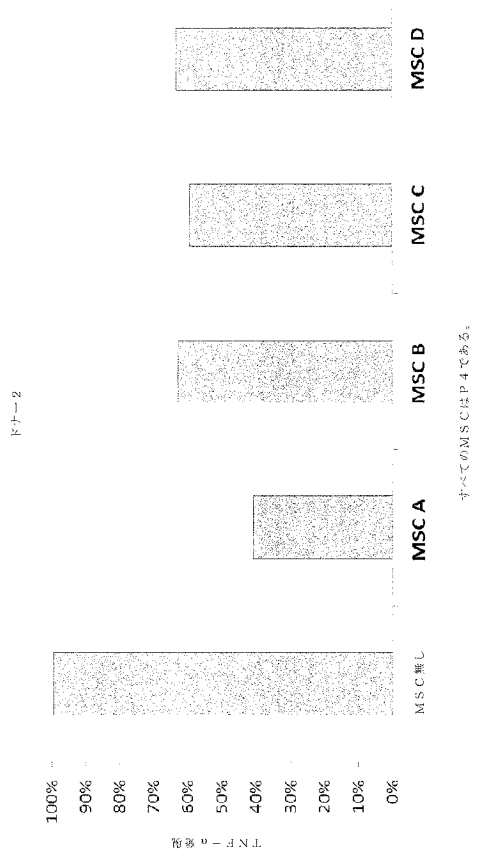


【図 4 A】

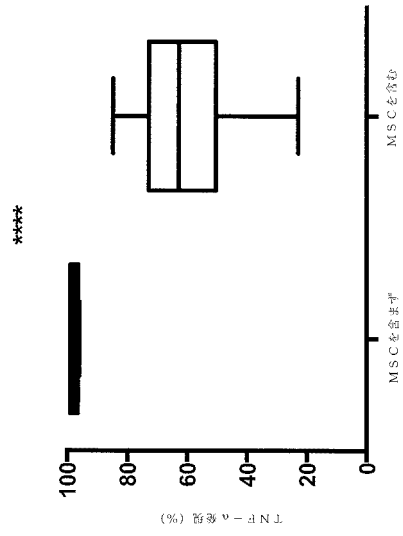


すべてのMSCはP4である。

【 図 4 B 】



【 図 5 】



hBM MSC存在下における単球TNF-αの発現の低下

**** p<0.0001 マン・ホイットニーの検定

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/059397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 G01N33/53 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/17657 A1 (BECTON DICKINSON CO [US]; WILLMANN KERSTIN [US]; DUNNE JOHN F [US]) 30 March 2000 (2000-03-30) pg 25, l 10-pg 42, l 15; cl 1-6, 15, 17-18; Fig 2E, Fig 2H, Fig 5.	1-14
X	US 2001/006789 A1 (MAINO VERNON C [US] ET AL) 5 July 2001 (2001-07-05) par 0007-0011;0048-0051; cl 1,7,13-16.	1,8-14
X	WO 2004/104164 A2 (BECKMAN COULTER INC [US]) 2 December 2004 (2004-12-02) pg 5, l 5-pg 6, l 9; pg 11, l 12-15.	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 August 2014		13/08/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Motrescu-Hateley, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/059397

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0017657	A1	30-03-2000	
		AT 266204 T	15-05-2004
		DE 69917051 D1	09-06-2004
		DE 69917051 T2	02-09-2004
		EP 1116037 A1	18-07-2001
		JP 4450998 B2	14-04-2010
		JP 2002525606 A	13-08-2002
		US 6495333 B1	17-12-2002
		WO 0017657 A1	30-03-2000

US 2001006789	A1	05-07-2001	NONE

WO 2004104164	A2	02-12-2004	
		EP 1623007 A2	08-02-2006
		JP 2007503593 A	22-02-2007
		US 2004229368 A1	18-11-2004
		WO 2004104164 A2	02-12-2004

フロントページの続き

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

(72)発明者 セレディグ, ルホドゥリ

アイルランド国, ゴールウェイ, ダンガン, コリブ ビレッジ, エヌユーアイ ゴールウェイ, 1
- 1027 バイオサイエンスーズ, ナショナル センター フォア バイオメディカル エンジニアリング サイエンス ルーム

(72)発明者 リベイロ, アンドレイア

アイルランド国, ゴールウェイ, ダンガン, コリブ ビレッジ, エヌユーアイ ゴールウェイ, 1
- 1027 バイオサイエンスーズ, ナショナル センター フォア バイオメディカル エンジニアリング サイエンス ルーム

Fターム(参考) 2G045 AA02 AA40 BA13 BB03 BB41 BB60 CA25 FA37 FB03 JA20
4B063 QA18 QQ03 QQ36 QR43 QR66 QS33 QS39 QX01

专利名称(译)	半自动化全血免疫效力测定		
公开(公告)号	JP2016522899A	公开(公告)日	2016-08-04
申请号	JP2016512373	申请日	2014-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	爱尔兰国立大学, 戈尔韦		
申请(专利权)人(译)	爱尔兰国立高威大学		
[标]发明人	セレディグルホドゥリ リベイロアンドレイア		
发明人	セレディグ, ルホドゥリ リベイロ, アンドレイア		
IPC分类号	G01N33/49 G01N33/53 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N15/1459 G01N33/5073 G01N33/5094 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/49.K G01N33/53.K C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/BB41 2G045/BB60 2G045/CA25 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/JA20 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ36 4B063/QR43 4B063/QR66 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	2013008271 2013-05-08 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于量化培养的干细胞和生物制品抑制单核和诱导T细胞活化的功效的快速，半自动化全血测定法。这种测定允许定量治疗干细胞产物对个体患者的抗炎功效。【选择图】无

【図 2】

