

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 512626

(P2003 - 512626A)

(43)公表日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	Q 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
1/68		1/68	A
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	P
33/566		33/566	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 58数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 532103(P2001 - 532103)

(86) (22)出願日 平成12年10月13日(2000.10.13)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月12日(2002.4.12)

(86)国際出願番号 PCT/DK00/00579

(87)国際公開番号 W001/029562

(87)国際公開日 平成13年4月26日(2001.4.26)

(31)優先権主張番号 PA 1999 01486

(32)優先日 平成11年10月15日(1999.10.15)

(33)優先権主張国 デンマーク(DK)

(71)出願人 ノボザイムス アクティーゼルスカプ
デンマーク国,デーコー - 2880 バグスバエ
ルト,クロシェイバイ 36

(72)発明者 ロゲン,エルビン ルオ
デンマーク国,デーコー - 2800 リュンビー
,アサベネト 14

(72)発明者 エルンスト,ステフェン
デンマーク国,デーコー - 2200 コペンハー
ゲン エン,1.テ-ホ-.,イエスベル プロ
シュマンズ ガーデ 6

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アレルゲン性の評価方法

(57)【要約】

本発明は、試験化合物のアレルゲン性又は毒性を評価する方法に関し、少なくとも二つの試験化合物を同時にスクリーニングする方法に関する。本発明はまた、本発明のために細胞タイプの特性を決定する方法、ならびに化合物の高速処理スクリーニングのための分析キットに関する。動物起源の少なくとも一つの細胞タイプの細胞培養に試験化合物を接触させ、サイトカイン応答を測定することによって、試験化合物のアレルゲン性を評価することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試験化合物のアレルゲン性をインビトロで評価する方法であって：

- 該試験化合物と実質的に非特異的な相互作用をすることができ、相互作用するとサイトカイン発現の変化によって応答することができる少なくとも一つのヒトを含めた動物起源の細胞タイプを含む所定の予め特性が決定された細胞培養を得るステップ、

- 該細胞培養に該試験化合物を接触させるステップ、

- 少なくとも一つの所定のサイトカインについて該試験化合物と実質的に非特異的な相互作用を示す細胞のサイトカイン応答を決定することによって特異的なサイトカイン・プロファイルを定めるステップ、及び

- 該サイトカイン・プロファイルを該試験化合物のアレルゲン性と関連づけるステップ、

を含む方法。

【請求項2】 少なくとも二つの試験化合物のアレルゲン性を同時にスクリーニングする方法であって：

- ある特定の細胞タイプを請求項1で定められた細胞培養の少なくとも二つの別々の区画に配置するステップ、

- 該別々の細胞培養に個々にある試験化合物を接触させるステップ、

- 該試験化合物と実質的に非特異的な相互作用を示すそれぞれの細胞のサイトカイン応答を決定することによって特異的なサイトカイン・プロファイルを定めるステップ、

- 各サイトカイン・プロファイルを試験化合物のアレルゲン性と関連づけるステップ、

を含む方法。

【請求項3】 該少なくとも一つの細胞タイプが上皮細胞であることを特徴とする請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】 該上皮細胞が呼吸道上皮細胞であることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】 該上皮細胞が胃腸管上皮細胞であることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項6】 該少なくとも一つの細胞タイプがケラチノサイトであることを特徴とする請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 該少なくとも一つの細胞タイプが樹枝状細胞であることを特徴とする請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 該少なくとも一つの細胞タイプがマクロファージであることを特徴とする請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 該少なくとも一つの細胞タイプがmast細胞であることを特徴とする請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 該少なくとも一つの細胞タイプが単球であることを特徴とする請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 該少なくとも一つの細胞タイプが内皮細胞であることを特徴とする請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 請求項1～11のいずれか1項に記載の方法であって：
- 各一つの細胞タイプを含む少なくとも二つの細胞培養を得るステップ、
- 各細胞培養に試験化合物を接触させるステップ、
- 各々該試験化合物と実質的に非特異的な相互作用を示すそれぞれの細胞培養のサイトカイン応答を決定することによって特異的なサイトカイン・プロフィールを定めるステップ、
- 該サイトカイン・プロフィールを該試験化合物のアレルゲン性と関連づけるステップ、
を含む方法。

【請求項13】 該二つの細胞タイプが共培養 (co-culture) されることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】 該二つの細胞タイプのサイトカイン応答が個々の細胞タイプの各々について決定されることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項15】 該二つの細胞タイプのサイトカイン応答が一つの応答として決定されることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項16】 該共培養の二つの細胞タイプが物理的に隔離されていることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項17】 一方の細胞タイプが上皮細胞であり、他方が樹枝状細胞であることを特徴とする請求項12～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】 一方の細胞タイプが上皮細胞であり、他方がマクロファージであることを特徴とする請求項12～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】 一方の細胞タイプが上皮細胞であり、他方がマスト細胞であることを特徴とする請求項12～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】 一方の細胞タイプが上皮細胞であり、他方が単球であることを特徴とする請求項12～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】 一方の細胞タイプが上皮細胞であり、他方が内皮細胞であることを特徴とする請求項12～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】 試験化合物の毒性をインビトロで評価する方法であって：
- 該試験化合物と実質的に非特異的な相互作用をすることができ、相互作用するとサイトカイン発現によって応答することができる、ヒトを含めた動物起源の少なくとも一つの細胞タイプを含む所定の予め特性が決定された細胞培養を得るステップ、
- 該細胞培養に該試験化合物を接触させるステップ、
- 少なくとも一つの所定のサイトカインについて該試験化合物と実質的に非特異的な相互作用を示す細胞のサイトカイン応答を決定することによって特異的サイトカイン・プロファイルを定めるステップ、及び
- 該サイトカイン・プロファイルを該試験化合物の毒性と関連づけるステップ、
を含む方法。

【請求項23】 少なくとも二つの試験化合物の毒性を同時にスクリーニングする方法であって：

- 請求項22に定められた細胞培養を少なくとも二つの別々の区画に配置するステップ、
- 該細胞培養に個々にある試験化合物を接触させるステップ、

- 該試験化合物と実質的に非特異的な相互作用を示すそれぞれの細胞のサイトカイン応答を決定することによって特異的なサイトカイン・プロフィールを定めるステップ、

- 各サイトカイン・プロフィールを試験化合物の毒性と関連づけるステップ、を含む方法。

【請求項24】 該試験化合物がタンパク質であることを特徴とする請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】 該試験化合物が糖タンパク質であることを特徴とする請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】 該試験化合物がリポタンパク質であることを特徴とする請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】 該試験化合物がタンパク脂質であることを特徴とする請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】 該試験化合物がリン脂質であることを特徴とする請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】 該試験化合物が酵素又は酵素変異体であることを特徴とする請求項24～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】 該試験化合物が酵素の製剤のためのものであることを特徴とする請求項1～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】 該試験化合物がハプテンであることを特徴とする請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】 該試験化合物が薬剤であることを特徴とする請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】 該試験化合物が化粧品化合物であることを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項34】 該試験化合物が有機溶媒であることを特徴とする請求項22～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】 該試験化合物が染料であることを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項36】 該試験化合物が金属であることを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項37】 該少なくとも一つの細胞タイプがヒトの組織から得られることを特徴とする請求項1～36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】 該少なくとも一つの細胞タイプがヒトの血液から得られることを特徴とする請求項1～36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】 該細胞外のサイトカイン応答が酵素結合免疫吸着検定法による分析によって決定されることを特徴とする請求項1～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】 該細胞内のサイトカイン応答が酵素結合免疫吸着検定法による分析によって決定されることを特徴とする請求項1～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】 該サイトカイン応答がインシトゥ (in-situ) ・ハイブリダイゼーション法によって決定されることを特徴とする請求項1～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】 該サイトカイン応答がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法による分析によって決定されることを特徴とする請求項1～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項43】 該サイトカイン応答が定量的 - PCR法による分析によって決定されることを特徴とする請求項42に記載の方法。

【請求項44】 該サイトカイン応答がインシトゥ・PCR法による分析によって決定されることを特徴とする請求項42に記載の方法。

【請求項45】 細胞内mRNAが決定されることを特徴とする請求項41～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項46】 該試験化合物との実質的に非特異的な相互作用を示す細胞に該試験化合物によって誘発される膜マーカーが決定されることを特徴とする請求項1又は22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項47】 分析される該膜マーカーがVCAM-1又はICAM-1であることを特徴とする請求項46に記載の方法。

【請求項48】 二つ以上のサイトカインについて分析が行われることを特徴とする請求項1～47のいずれか1項に記載の方法。

【請求項49】 少なくとも二つのサイトカインについて分析が行われることを特徴とする請求項48に記載の方法。

【請求項50】 少なくとも四つのサイトカインについて分析が行われることを特徴とする請求項48に記載の方法。

【請求項51】 分析されるサイトカインがインターロイキン-8、インターロイキン-6、MCP-1及びGM-CSFであることを特徴とする請求項48に記載の方法。

【請求項52】 評価されるサイトカインのレベル及び数が該試験化合物のアレルゲン性力価 (potency) と相関する因子であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項53】 評価されるサイトカインのレベル及び数が低アレルゲン性試験化合物と相関する因子であることを特徴とする請求項52に記載の方法。

【請求項54】 評価されるサイトカインのレベル及び数が高アレルゲン性試験化合物と相関する因子であることを特徴とする請求項52に記載の方法。

【請求項55】 評価されるサイトカインのレベル及び数が該試験化合物の毒性力価 (potency) と相関する因子であることを特徴とする請求項23に記載の方法。

【請求項56】 評価されるサイトカインのレベル及び数が低毒性試験化合物と相関する因子であることを特徴とする請求項55に記載の方法。

【請求項57】 評価されるサイトカインのレベル及び数が高毒性試験化合物と相関する因子であることを特徴とする請求項55に記載の方法。

【請求項58】 請求項1～57のいずれか1項に記載されているある細胞タイプのサイトカイン応答の特性を決定する方法であって：

a) 試験化合物と実質的に非特異的な相互作用をすることができ、相互作用するとサイトカイン発現の変化によって応答することができる、ヒトを含めた動物起源の一つの細胞タイプを含む所定の細胞培養を得るステップ、

b) 非特異的多価誘発物質を用いることによって該試験化合物と実質的に非特

異的な相互作用をしたときに該細胞が発現できるサイトカインを同定するステップ、

c) 該細胞培養の一部にある試験化合物を接触させ、該同定されたサイトカインのレベルを決定し、サイトカイン・プロフィールを得るステップ、

d) 動物を該試験化合物で免疫処置し、その結果として得られる動物の I g E レベルを決定するステップ、

e) 該サイトカイン・プロフィールを決定された I g E レベルと関連づけるステップ、及び

f) 高 I g E レベルの試験化合物、低 I g E レベルの試験化合物、及び中間の I g E レベルの試験化合物、が試験されるまでステップ c) - e) を反復するステップ、

を含む方法。

【請求項 59】 試験化合物のアレルゲン性又は毒性の高速処理スクリーニングのための分析キットであって：

- 少なくとも一つのヒトを含めた動物の細胞タイプを含む細胞培養、
 - 特定のサイトカインに特異性を有する少なくとも一つのモノクローナル抗体、少なくとも一つのサイトカインに特異的な mRNA 検出用のプローブ、少なくとも一組のサイトカインに特異的な mRNA 又は cDNA 検出用のプライマー、から選択されるサイトカイン決定子、
 - 少なくとも二つの区画を含む分析装置、
- を含む分析キット。

【請求項 60】 ある特定の膜マーカーに特異性を有する少なくとも一つのモノクローナル抗体、ある特定の膜マーカーに特異性を有する少なくとも一つのモノクローナル抗体、mRNA 検出用の少なくとも一つの膜マーカーに特異的なプローブ、及び mRNA 又は cDNA 検出用の少なくとも一組の膜マーカーに特異的なプライマー、を含むことを特徴とする請求項 59 に記載の分析キット。

【請求項 61】 さらにアレルゲン性標準を含むことを特徴とする請求項 59 及び 60 のいずれかに記載の分析キット。

【請求項 62】 少なくとも二つの試験化合物のアレルゲン性の高速処理ス

クリーニングのための請求項59～61のいずれか1項に定められた分析キットの使用。

【請求項63】 少なくとも10の試験化合物のアレルゲン性を同時に評価するための請求項62に記載の分析キットの使用。

【請求項64】 約100の試験化合物のアレルゲン性を同時に評価するための請求項62に記載の分析キットの使用。

【請求項65】 少なくとも二つの試験化合物の毒性の高速処理スクリーニングのための請求項60に定められた分析キットの使用。

【請求項66】 少なくとも10の試験化合物の毒性を同時に評価するための請求項65に記載の分析キットの使用。

【請求項67】 約100の試験化合物の毒性を同時に評価するための請求項65に記載の分析キットの使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、試験化合物のアレルゲン性又は毒性を評価する方法及び少なくとも二つの化合物を同時にスクリーニングする方法に関する。本発明はまた、本発明のために細胞タイプを調べる方法、ならびに化合物の高速処理スクリーニングのための分析キットに関する。

【0002】**発明の背景**

多くの化合物が動物ならびに人間にアレルギー応答又は毒性応答を誘発する。新しい化合物の開発がますます増加し、その結果としてアレルゲン性及び毒性を試験する必要があるのと歩調を合わせて、アレルゲン性及び毒性を決定する方法が開発されてきた。歴史的に見ると、利用できる適切な方法が不足している状況において、化合物の試験は動物について行われ、一部が人間について行われてきた。明らかな理由によって、アレルゲンや毒物などの化合物を試験するのに、インビボの研究をインビトロの方法に置き換えてゆくことが、一般社会からも専門家たちからも要求されている。

【0003】

アレルギー応答に関与している細胞タイプ、細胞内の要素及び分子を明らかにしようという従来の努力はこの複雑な反応の連鎖を理解するのに役立ってきた。関与している要素の一つはサイトカインである。サイトカインがいろいろな免疫応答を確立する一環としての役割を果たしていることは良く知られている。

【0004】

関与している他の因子はB及びTリンパ球である。B及びT細胞は免疫を媒介するものであるが、その機能は抗原提示細胞、例えば樹枝状細胞、のコントロールの下にある。Everson, M. P. 他 (Journal of Leukocyte Biology, Vol. 59, 1996, pp. : 494-498)は、いろいろな組織がどのように異なるT細胞サイトカイン・プロフィールの産生を誘発するかを明らかにしている。この研究は、はっきりした樹枝状細胞集団がT細胞の増殖及びサイトカイン産生を引き起こすことを示唆している。Secrist, H. 他 (J. Exp. Med. vol. 181, 1995, pp.: 1081-108

9)の研究は、アレルギー性特異的メモリーCD4+ T細胞のサイトカイン・プロファイルが抗原の量によってどのように変調させることができるかを記述している。彼らは、CD4+ T細胞が低濃度のアレルギーで刺激されたときに高レベルのサイトカイン、インターロイキン-4(IL-4)を産生し、高濃度のアレルギーで刺激されたときに低レベルのIL-4を産生するということを見出した。

【0005】

Driscoll, K. E. 他 (Environmental Health Perspectives, vol. 105, 1997, pp.: 1159-1164)は、吸入された粒子、有毒粒子など、がどのように肺上皮細胞を刺激して肺に炎症を引き起こすかを記述している。上皮細胞についてインビトロ試験が石英で刺激して行われ、mRNAレベルの増加として測定されるサイトカインMIP-2(マクロファージ炎症性タンパク質2)の増加が生じた。研究者たちは、この応答が用量(dose)に関連しているように見えると述べている。別の研究グループは、インビトロで、肺胞上皮細胞におけるMIP-2などのケモカインのmRNA発現がシリカで誘発されることを実証した。

【0006】

これまでの研究は、細胞の機構的な性質及び生ずるサイトカインのタイプを観測することによって、主としてある特定細胞集団に対する既知のアレルギーの効果に焦点を合わせてきた。

【0007】

特許出願WO99/07880号では、インビトロでヒトのアレルギー及びTリンパ球抗原を同定する方法が開示されており、ヒトのナイーブT細胞、マクロファージ/単球、不死化されたB細胞、及び試験化合物が混合され、その試験化合物がT細胞の応答を誘発するかどうか決定される。測定される応答の一つはサイトカイン応答であるとされる。

【0008】

T細胞は処理された抗原を、クローン組み換えの結果であるT細胞レセプターの相互作用によって、及び個体に依存するMHC分子のペプチドによって、認識する。こうして得られる応答は、試験化合物それ自体ではなく、その細胞が採取

された個体に関連するので、これはもちろん、ある試験化合物がアレルギーであるかどうかを評価するときの不確定性になる。したがって、一般的な試験に対するニーズが依然として存在する。

【0009】

発明の要約

本発明は、試験化合物のアレルギー性をインビトロで評価する方法であって：

- 該試験化合物と実質的に非特異的な相互作用をし、相互作用するとサイトカイン発現によって応答することができる少なくとも一つの動物、ヒトを含む、起源の細胞タイプを含むある所定の予め特性が分かっている細胞培養を得るステップ、

- 該細胞培養に該試験化合物を接触させるステップ、

- 少なくとも一つの所定のサイトカインに関して該試験化合物と実質的に非特異的な相互作用を示す細胞のサイトカイン応答を決定することによって特異的サイトカイン・プロファイルを定めるステップ、及び

- 該サイトカイン・プロファイルを該試験化合物のアレルギー性と関連させるステップ、

を含む方法に関する。

【0010】

本発明により、ある試験化合物のアレルギー性をインビトロで評価することが、該試験化合物にサイトカイン応答を誘発できる細胞を接触させ、サイトカイン応答、すなわち細胞が分泌するサイトカインのタイプ及びレベル、が試験化合物のアレルギー性に依存して異なるという研究結果に基づいて、その応答を測定し、その I g E 応答を動物で行われたアレルギー性研究と関連づけることによって可能である。本明細書の全体にわたって、アレルギー性という用語は通常の意味、すなわち、ヒトを含めた動物に I g E 応答を誘発する能力という意味を有する。

【0011】

本発明はさらに、各々が一つの細胞タイプを含む少なくとも二つの細胞培養、例えば共培養 (co-culture)、においてサイトカイン応答を決定する方法に関する。

る。

【0012】

本発明の別の様態では、上記の方法は、試験化合物と実質的に非特異的な相互作用を示す細胞において試験化合物によって誘発される膜マーカの決定に関する。

【0013】

さらに本発明は、試験化合物のアレルゲン性と毒性を決定するための総合分析を記述する。

【0014】

本発明は、動物と人間に利益をもたらすだけでなく、可能性のあるアレルゲン及び毒物の大規模スクリーニングを可能にして作業経費及び時間を最小にする。

【0015】

本発明のもう一つの様態は、少なくとも二つの試験化合物のアレルゲン性を同時にスクリーニングする方法であって：

- 上で述べたような細胞培養の少なくとも二つの別々の区画にある特定の細胞タイプを配置するステップ、
 - 別々にした細胞培養区画に、個別的に一つの試験化合物を接触させるステップ、
 - 試験化合物と実質的に非特異的な相互作用を示すそれぞれの細胞のサイトカイン応答を測定することにより特異的サイトカイン・プロフィールを明らかにするステップ、及び
 - 各サイトカイン・プロフィールをその試験化合物のアレルゲン性と関連づけるステップ、
- を含む方法である。

【0016】

本発明のさらに別の様態では、アレルゲン性に関して上述したステップに従って試験化合物の毒性を決定する方法が提供される。

【0017】

本発明のもう一つの様態は上述のような細胞タイプを特徴づける方法であって

:

a) 該試験化合物と実質的に非特異的な相互作用をし、相互作用するとサイトカイン発現によって応答することができる、ヒトを含めた動物起源の一つの細胞タイプを含む所定の細胞培養を得るステップ、

b) 非特異的な多価誘発物質を用いて該試験化合物との非特異的相互作用で該細胞培養が発現できるサイトカインを同定するステップ、

c) 該細胞培養の少なくとも一部にある試験化合物を接触させて、同定されたサイトカインのレベルを測定してサイトカイン・プロフィールを得るステップ、

、

d) 該試験化合物である動物を免疫して、それによって得られる動物の I g E レベルを決定するステップ、

e) 該サイトカイン・プロフィールを決定された I g E レベルと関連づけるステップ、

f) 高 I g E レベルの試験化合物、低 I g E レベルの試験化合物、及び中間 I g E レベルの試験化合物、が試験されるまで、ステップ c) - e) を反復するステップ、

を含む方法である。

【0018】

さらに別の様態は、試験化合物の高速処理スクリーニングのための分析キットであって：

- 少なくとも一つのヒトを含めた動物細胞タイプを含む細胞培養、
 - 特定のサイトカインに対する特異性を有する少なくとも一対のモノクローナル抗体、mRNA検出のための少なくとも一つのサイトカイン特異的プローブ、mRNA又はcDNA検出のための少なくとも一組のサイトカイン特異的プライマー、から選択されるサイトカイン決定子、及び
 - 少なくとも二つの区画を含む分析デバイス、
- を備える分析キットである。

【0019】

また、本発明のある様態は、少なくとも二つの試験化合物のアレルゲン性又は

毒性のスクリーニングのためのこの分析の利用である。

【0020】

(発明の詳細な説明)

本発明は、試験化合物のアレルゲン性を評価するインビトロ試験に関する。上述したように、試験化合物のアレルゲン性は動物研究によって評価され、そこでは試験化合物によって誘発される I g E レベルが試験化合物のアレルゲン性を表す。しかし、実際には、大量の試験化合物をスクリーニングしてアレルゲン性を調べることは困難である。動物研究によって化合物を試験することは厄介で金がかかる仕事であり、明らかな倫理的理由により実験動物の使用はできるだけ少なくすることが望ましく、これはまた動物試験に関する E U 政令とも合致する。

【0021】

本発明は、試験化合物と実質的に非特異的な相互作用をし、相互作用するとサイトカイン発現によって応答することができる細胞のサイトカイン応答は、同じ試験化合物が動物研究で誘発する I g E 応答と関連づけられるという研究結果に基づいている。

【0022】

「非特異的相互作用」という用語は、生物の免疫防御において一部の細胞は外来の物質と非特異的に相互作用するという事実を反映しており、非特異的とは他の細胞、特に T - 細胞、が誘発する個別的な応答と対比されるものである。本発明にしたがって使用される細胞は、試験化合物との単なる接触によって、又はその化合物の取り込みによって、例えば試験化合物のピノサイトーシス (pinocytosis) によって、サイトカイン応答を誘発する。したがって、相互作用とはその試験化合物がその細胞と少なくとも接触し、細胞に取り込まれる可能性もあるということを意味する。現在の文脈で「非特異的」とは試験化合物が細胞表面と結合してその試験化合物に特異的なレセプターによってその効果を及ぼすことが無いということを意味する。これは T 細胞とは異なるものであり、T 細胞は処理された抗原、例えばアレルゲン、とその T 細胞レセプターによる特異的な相互作用によって結合する。それに対し、前述のように、本発明の細胞による取り込みメカニズムは、問題の化合物に特異的なものではない。

【0023】

本発明に従って使用される細胞は、試験化合物と実質的に非特異的な相互作用をすることができるものであり、生物におけるその場所に関わりなく上皮細胞であることが好ましい。上皮細胞に共通していることは、それらが外来物質に対する生物の一次防御の一部であるということである。

【0024】

本発明のある実施の形態では、本発明の上皮細胞は呼吸道上皮細胞からとられている。呼吸道上皮細胞は空気によって運ばれてくる外部環境の成分に直接曝露され、吸入される外来物質に対する生物の一次防御の一部である。喘息やその他のアレルギー性気道疾患で苦しむ人ではしばしば上皮細胞が損傷している。

【0025】

本発明の別の実施の形態では、上皮細胞は胃腸管上皮細胞である。

さらに別の実施の形態では、該少なくとも一つの細胞タイプはケラチノサイトである。これらの細胞は表皮の主成分であり、下にある組織を防護する役割を果たしている。

【0026】

本発明の細胞培養のためのさらに別の少なくとも一つの細胞タイプは樹枝状細胞である。樹枝状細胞の生理的な役割は、抗原を捕獲、処理し、提示して、リンパ球に共同刺激分子を提供すること、及び適切なサイトカインを分泌して免疫応答を開始させることである。樹枝状細胞は試験化合物との非特異的相互作用によってサイトカイン応答を誘発できることが見出されている。

【0027】

また、通常は免疫システムのもっと個別的かつ特異的な部分の一部であると考えられている細胞、例えばマクロファージ、マスト細胞及び単球、も、非特異的サイトカイン応答を誘発する能力が用いられる場合、本発明に従って使用できる。

【0028】

マクロファージは、経口摂取によって侵入する微生物に対して食菌作用によっ

て体を防衛する。マクロファージはまた、損傷した細胞や細胞の破片を一掃するスカベンジャーとしても働く。

【0029】

さらに別の細胞グループ、内皮細胞、も本発明に従って使用できる。

本発明に従って使用される細胞タイプは動物からのものであるが、少なくとも一つの細胞タイプはヒトの組織から得られるもの又はヒトの血液細胞であることが好ましい。さらに、使用される細胞タイプは、評価される試験化合物の主なアレルギー箇所に関連あるものであることが好ましい、すなわち、肺のアレルギーの原因である疑いがある試験化合物は呼吸器の上皮細胞を用いたシステムで試験することが好ましい。

【0030】

サイトカインとは、炎症プロセスを調節する働きをし、アレルゲンを含めた抗原への応答に影響を及ぼす重要な役割を演ずる信号分子の部類である。サイトカインは炎症において免疫細胞を補充する働きをする。サイトカインは少量しか分泌されないがきわめて強力であり、レセプターを介して作用し、刺激されない細胞からは産生されない。

【0031】

本発明に従った細胞タイプによるサイトカインの産生は、外来の化合物に対する一次応答と見られる。その細胞と外来化合物が接触すると、細胞は非特異的なメカニズム、例えば非特異的なレセプター結合、によってその化合物と結合する。接触の後、細胞はその化合物を、ピノサイトーシス又は食細胞活動などによって内部に取り込む。細胞内部において酵素によるその化合物の分解がさらに進むことでサイトカインの合成と分泌が引き起こされる。動物又はヒトの体内で、分泌されたサイトカインは、T細胞やB細胞などの免疫細胞を含めたいろいろな隣接細胞に働きかけるメッセンジャー分子として作用し、それらの細胞がさらに二次応答を引き起こす。

【0032】

現在までに多種多様なサイトカインが知られているが、全てのサイトカインが全ての細胞タイプによって産生される訳ではなく、さらに特定の細胞タイプによ

って産生される全てのサイトカインがある試験化合物との非特異的な相互作用に対する応答として分泌される訳ではない。

【0033】

したがって、本発明はさらに、試験化合物のアレルゲン性の評価に関連して決定されるある所定の細胞タイプの特定のサイトカインの特性を決定する方法に関する。この方法は：

a) 試験化合物と実質的に非特異的に相互作用し、相互作用するとサイトカイン発現で応答することができるヒトを含めた動物起源の一つの細胞タイプを含む所定の細胞培養を得るステップ、

b) 非特異的多価誘発物質を用いた試験化合物との非特異的相互作用で該細胞培養によって発現されるサイトカイン(複数)を同定するステップ、

c) 該細胞培養の一部に試験化合物を接触させ、同定されたサイトカイン(複数)のレベルを測定してサイトカイン・プロフィールを得るステップ、

d) その試験化合物で動物を免疫して、その結果として得られる動物のI g Eレベルを決定するステップ、

e) 該サイトカイン・プロフィールと決定されたI g Eレベルとを関連づけるステップ、

f) 高I g Eレベルの試験化合物、低I g Eレベルの試験化合物、及び中間I g Eレベルの試験化合物、が試験されるまでステップc) - e)を反復するステップ、を含む。

【0034】

上述のように細胞タイプの特性が決定されたら、問題の細胞タイプの細胞培養を用いて本発明に従って試験化合物のアレルゲン性を評価することが可能になる。すなわち、「予め特性が決定された」という用語は、特定の細胞タイプからのサイトカイン応答とアレルゲン性評価との関連が決定されているということの意味する。

【0035】

試験化合物のアレルゲン性を評価するこの方法では一つより多くのサイトカイ

ンについて分析されることが好ましい、例えば、少なくとも二つのサイトカインについて分析されることが好ましい。本発明による方法で少なくとも四つのサイトカインについて分析されるときに、得られる予測は向上する。

【0036】

ヒトの肺組織上皮細胞に関しては、分析されるサイトカイン（複数）は、インターロイキン - 6（IL - 6）、インターロイキン - 8（IL - 8）、MCP - 1及びGM - コロニー刺激因子（GM - CSF）であることが好ましい。例えば、本発明によれば高アレルゲン性試験化合物は低レベルの分析される上記サイトカインを誘発し、低アレルゲン性試験化合物は高レベルのIL - 8とMCP - 1を誘発し、高アレルゲン性と低アレルゲン性の中間にある試験化合物では、一つ又は二つのサイトカインが高レベルで見られ、他の分析されるサイトカインのレベルは低くなる。これにより、この方法で得られるサイトカイン・プロフィールに基づいてある試験化合物のアレルゲン性を評価することが可能になる。

【0037】

分析されるサイトカインの数及びレベルが試験化合物のアレルゲン性能力に関連する因子である。

【0038】

サイトカイン・プロフィールはブール法によって、すなわち、+ / - ある一定レベルを超える存在、によって、又はレベルの直接の数値によって、定量化される。

【0039】

ヒト肺組織上皮細胞に関して、ブール法の例は表1に示されるようなものである：

【0040】

【表1】

表1

アレルギー性/ サイトカイン	IL-8	IL-6	MCP-1
高	-	-	-
やや高	+	+	-
やや低	+	+	+
低	+	-	+

【0041】

表1で、+はあるレベルを超えるサイトカインの存在を示し、-は不存在又は特定のレベルより下の存在を示す。

【0042】

本発明の目的は、細胞培養が少なくとも一つの細胞タイプを含む方法を提供することである。しかし、評価する各試験化合物に対し二つ以上の細胞タイプからのサイトカイン応答を得ることが有利である。多くの細胞タイプを用いることによって、一つの細胞タイプを用いる場合と比べて、異なる細胞タイプによって分泌されるいろいろなサイトカインによって、さらに改良された方法を得ることが可能である。二つ以上の細胞タイプを用いる方法及び分析はいろいろな仕方で構成される。

【0043】

異なる細胞タイプを含む二つの別々の細胞培養に同じ試験化合物を接触させて、各細胞培養から別々にサイトカイン応答を得ることもできる。その場合、あとでサイトカイン応答が結合させて試験化合物のアレルゲン性と関連づけることができる。

【0044】

しかし、二つ以上の細胞培養を用いる場合、培養は共培養されることが好ましい。それにより、細胞の自然環境が高度に類似したものになり、高い感度を有する結果が得られる。

【0045】

したがって、本発明のある様態では、二つの細胞タイプが共培養される。本発明による共培養は、異なる細胞タイプが同じ培地を共有する培養である。

【0046】

本発明のある好ましい実施の形態では、共培養の二つの細胞タイプは物理的に隔離される。細胞タイプは、半透膜によって隔離して、小さな分子、例えば試験化合物及び/又は試験物質、の通過を許すようにすることもできる。共培養の物理的な構成は、一つの細胞タイプを一つの区画で培養して、他方の細胞タイプは第一の区画に挿入された第二の区画で、すなわち、第一の区画の副区画で培養するという形であってもよい。

【0047】

このような共培養の構成の利点は、第二の細胞タイプに試験化合物だけでなく第一の細胞培養の細胞タイプが産生したサイトカインも作用して第二の細胞タイプからより自然なサイトカイン応答を誘発することである。

【0048】

さらに別の実施の形態では、試験化合物は膜を通過できないようにする。この実施の形態では、第二の区画の細胞培養には実際の試験化合物は作用せず、第一の細胞培養で産生されたサイトカインだけが作用する。

【0049】

さらに別の実施の形態では、試験化合物は一つの細胞タイプの培養に加えられ、その後上澄みが第二の細胞タイプの第二の培養に移される。この場合、第一の培養で産生されたサイトカインが試験化合物と一緒に第二の細胞培養に作用する。

【0050】

上記の全ての形態の培養では、試験化合物を培地に加えてから培地を細胞培養に加えてもよい。

【0051】

共培養される細胞タイプの好ましい組み合わせは、上皮細胞タイプと非上皮細胞タイプの組み合わせであり、例えば第一の細胞タイプが：呼吸器上皮細胞、胃腸上皮細胞、ケラチノサイト、から選択され、第二の細胞タイプが樹枝状細胞、

マクロファージ、マスト細胞、単球、及び内皮細胞、から選択される組み合わせである。

【0052】

したがって、本発明のある実施の形態では、第一の細胞タイプは呼吸器上皮細胞であり、第二の細胞タイプは樹枝状細胞、マクロファージ、マスト細胞、単球、及び内皮細胞、から選択される。

【0053】

ある好ましい実施の形態では、第一の細胞タイプは呼吸器上皮細胞であり、第二の細胞タイプは樹枝状細胞又はマクロファージから選択される。

【0054】

サイトカイン応答はどんな適当な方法で決定してもよく、例えば、産生されるサイトカインに対する抗体という形、又は、産生されるサイトカインをコードするcDNA又はmRNAのプライマー又はプローブという形、の決定子(determinant)を用いて決定することもできる。

【0055】

したがって、細胞外のサイトカイン応答は、分析されるサイトカインに向けられた抗体を用いて酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)による分析で決定してもよい。これにより、試験化合物との相互作用に対する応答として細胞から分泌されるサイトカインの定量的な測定が得られる。

【0056】

別の実施の形態では、細胞内サイトカイン応答が上記のようにELISAを用いて測定される。

【0057】

さらに別の実施の形態では、サイトカイン応答はインシトゥ(in-situ)・ハイブリダイゼーション法によって、好ましくは分析されるサイトカインをコードするmRNAに向けられたプローブを用いて、決定される。

【0058】

また、サイトカイン応答はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて、特に分析されるサイトカインをコードするmRNAのプライマーを用いて、決定する

こともできる。サイトカインは、市販されている方法での定量PCR法又はインシトゥPCR法による分析で決定することができる。

【0059】

インシトゥPCR法と定量PCR法の本質的な差異は、分析されるサンプルの数にある。定量的なデータを与えるためには、インシトゥPCR法はいくつかの同一の細胞培養（調べている培養を代表する）を必要とし、それぞれ異なる数のPCRサイクルを行わせて、その特定の細胞培養におけるその特定のサイトカイン/膜マーカに関するPCRの動的範囲(dynamic range)を同定する必要がある。定量PCR法は細胞培養あたり一つのサイクルを必要とする。この状況で、PCR産物の生成を時間的に追跡して定量的データを得る（ABIプリズム7700シーケンス検出システム）。

【0060】

用いる細胞タイプからのサイトカイン応答の決定に加えて、試験化合物との実質的に非特異的相互作用を示す細胞で試験化合物が誘発する膜マーカを決定すると有利である。これに関連して、膜マーカVCAM-1又はICAM-1を決定することが好ましい。

【0061】

本発明のある様態では、評価されるサイトカインのレベル及び数とその試験化合物のアレルゲン性能力と関連する因子である。本発明の目的には、評価されるサイトカインのレベル及び数が低アレルゲン性試験化合物に関連する因子であり、同様に、評価されるサイトカインのレベル及び数が高アレルゲン性試験化合物に関連する因子である。

【0062】

本発明によれば、高アレルゲン性試験化合物はサイトカイン応答を何も誘発しない、すなわち、ベースライン・サイトカイン・レベルと比べて何も誘発しないことがある。本発明のある実施の形態では、高アレルゲン性試験化合物は、本発明で記述される細胞タイプで試験される四つのサイトカインに関して何もサイトカイン応答を誘発しないことがある。別の実施の形態では、低アレルゲン性試験化合物は、少なくとも一つのサイトカイン、例えば二つの異なるサイトカイン、

のサイトカイン応答を誘発することがある。本発明のさらに別の実施の形態では、やや高い (medium high) アレルゲンは、一つのサイトカイン、例えば IL - 8、の応答を誘発することがある。しかし、分泌される絶対量は、ピコモルで測定して、低アレルゲン性分子の場合の応答よりはるかに少ないことがある。

【0063】

試験化合物のアレルゲン性を評価する方法はいろいろな試験化合物をアレルゲン性に関してスクリーニングするのに特に有用である。

【0064】

したがって、本発明は、少なくとも二つの試験化合物のアレルゲン性を同時にスクリーニングする方法であって：

- 上で述べたような細胞培養の少なくとも二つの別々の区画にある特定の細胞タイプを配置するステップ、
 - 隔離された細胞培養区画に個別的に試験化合物を接触させるステップ、
 - 試験化合物と実質的に非特異的相互作用を示すそれぞれの細胞のサイトカイン応答を測定することによって特異的なサイトカイン・プロフィールを定めるステップ、
 - 各サイトカイン・プロフィールを試験化合物のアレルゲン性と関連づけるステップ、
- を含む方法に関する。

【0065】

このスクリーニング方法は、もちろん二つより多くの試験化合物で同時に用いることが好ましい、例えば約10の試験化合物で、あるいは約100の試験化合物で同時に用いることが好ましい。このスクリーニング方法は、アレルゲン性を変更しようとしている化合物を試験するのに特に適している。

【0066】

アレルゲン性に影響するこのような試験化合物の変更は、IgE特異的エピトープにおけるタンパク質アレルゲンの突然変異によって行うことができる。これらのエピトープの場所はいくつかの方法で決定することができる、例えば、WO 92 / 10755号 (U. Lovborgによる)、Walshet 他、「J. Immunol. Method

s」 vol. 121, 1275-280, (1989)、及びSchoofs 他「J. Immunol.」 vol. 140, 611-616, (1987)、によって開示された方法で決定できる。エピトープを同定する好ましい方法はランダム・ペプチド・ライブラリーを抗体（例えば、I g E 抗体）でスクリーニングすることによるものであり、高結合配列を並べてコンセンサス配列を同定する。これらのコンセンサス配列を、さらに、アレルギー性を減少させるために突然変異させたい親タンパク質の配列及び3D構造と比較して、親タンパク質の線状及び構造エピトープを同定する。

【0067】

改良された性質を有するそのようなタンパク質変異体を探索するとき、各々が一つ以上の変化したアミノ酸が導入されている多様な突然変異株のライブラリーを確立し、改良された性質を示す変異体を選択することが有利である。この望ましい性質とは、本発明の方法における好ましいサイトカイン応答に発現されるアレルギー性の減少であろう。

【0068】

多様な突然変異株のライブラリーは、当業者には公知のいろいろな方法で確立できる (Reetz MT; Jaeger KE, Biocatalysis - from Discovery to Application Fessner WD (編), vol. 200, pp. 31-57 (1999); Stemmer, Nature, vol. 370, p. 389-391, (1994); Zhao 及び Arnold, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 94, pp. 7997-8000, (1997); 又はYano 他, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 95, pp. 5511-5515, (1998); 及びDeng SJ他, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 92(11), 4992-4996 (1995))。

【0069】

これらは「スパイク突然変異誘発」を含む（それだけに限定されないが）。これは、いくつかの位置のヌクレオチドの混合を用いて合成された一つ以上のオリゴヌクレオチド・プライマーを用いてPCR突然変異誘発を行っていくつかの位置のタンパク質配列をランダム化するものである (Lanio T, Jeltsch A, Biotechniques, vol. 25(6), 958, 962, 964-965 (1998))。各トリプレット内で用いられるオリゴヌクレオチドの混合は突然変異した遺伝子産物の対応するアミノ酸がある予め定められた分布関数の範囲内でランダム化されるようにデザインでき

る。このデザインを容易にするアルゴリズムが存在する (Jensen LJ 他、Nucleic Acids Research, Vol. 26(3), 697-702 (1998))。

【0070】

多様な遺伝子ライブラリーを作り出す別の方法は、いくつかの異なる、しかし相同な遺伝子を出発点として用いて「ファミリー・シャッフリング」を用いることである (Stemmer, Nature, vol. 370, p. 389-391, 1994)。これらの遺伝子は断片化され、断片がPCR反応の鋳型として用いられ、いくつかの親遺伝子からの配列エレメントを組み込んだハイブリッド遺伝子産物が生ずる。

【0071】

上記の参照文献で記述されているように、これらのアプローチを平行して又は直列で用いて、所望の性質、例えば低いアレルゲン性、を獲得するようにタンパク質主鎖の定方向進化を作り出すことができる。

【0072】

ある好ましい実施の形態では、次のステップを含む方法によって置換体が見出される：1)いくつかのエピトープ領域を包含する一連の置換、付加、及び/又は削除、がリストされる、2)アミノ酸配列のこれらの変化のランダム化されたサブセットを標的遺伝子に導入する、例えばランダム突然変異誘発によって導入する、ライブラリーがデザインされる、3)そのライブラリーが発現され、本発明の方法を用いて好ましい変異体を選択される。

【0073】

もっと好ましいある実施の形態では、好ましい変異体が高速フォーマットで多様なライブラリーの多くの変異体を処理できる自動化された分析システムで選択される。その場合、試験化合物は普通、タイター-プレート形態で培養できる細胞(例えば、バクテリアや酵母細胞その他)から分泌されるタンパク質である。細胞上澄みは、試験化合物の他にいくつかの他の化合物を含み、それがサイトカイン応答をベースラインとは異なるものにする可能性がある。それらは、無傷の細胞、細胞壁その他の溶解した細胞からの細胞器断片、リポ多糖体、糖タンパク質、小さな分子、等である。これらの化合物が本発明の細胞と接触することを防いで、バックグラウンド信号をできるだけ小さくするのが有利であろう。

【0074】

さらにもっと好ましい実施の形態では、少なくとも二つの分析が平行して行われる；一つは本発明の方法を用いる分析であり、他方は試験化合物に関する機能分析である。タンパク質分解酵素試験化合物の場合、機能分析はタンパク質分解酵素活性分析である。タンパク質分解酵素活性分析は、基質Suc-Ala-Ala-Pro-phe-p-ニトロアニリンを用いて測定される。タンパク質分解酵素は、ペプチドとp-ニトロアニリンの結合を引き裂いて405nmに可視の黄色の吸収を生ずる。したがって、基質とタンパク質分解酵素溶液が混合され、サンプル中のタンパク質分解酵素活性の尺度として405nmでの吸収がモニターされる。本発明のこの実施の形態の範囲は、ここで例としてあげたタンパク質分解酵素に限定されない。

【0075】

非常に好ましいある実施の形態では、この方法が、最初のラウンドのスクリーニングでヒットしたものについての追加ラウンドのスクリーニング及び/又はファミリー・シャッフリングで補われる(J. E. Nees 他、Nature Biotechnology, vol. 17, pp. 893-896 (1999))、及び/又は遺伝的手段によってアレルゲン性を減少させる他の方法との組み合わせによって補われる(例えば、WO92/10755号に開示されているようなもの)。

【0076】

試験化合物は、ヒトを含めた動物にアレルギー応答を誘発すると疑われるどんな化合物であってもよい。アレルギー応答は、吸入した化合物によって引き起こされる肺アレルギー応答や、アレルゲンと皮膚との接触によって引き起こされる皮膚アレルギー、あるいは消化されたアレルゲンによって引き起こされる胃腸のアレルギー、などどんなアレルギーであってもよい。

【0077】

したがって、試験化合物は、糖タンパク質、又はリポタンパク質、又はタンパク脂質、又はリン脂質、などどんなタンパク質であってもよい。タンパク質という用語は、ペプチド及びポリペプチドを含むものとする。

【0078】

特に、試験化合物は、グリコシル・ヒドロラーゼ、カルボヒドラーゼ、ペルオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リパーゼ、フィターゼ、多糖類リアーゼ、オキシドレダクターゼ、トランスグルタミナーゼ、及びグリコース - イソメラーゼ、などの酵素又は酵素変異体であってよく、特に次のものがあげられる：

【0079】

タンパク質分解酵素

タンパク質分解酵素（すなわち、国際生化学及び分子生物学連合（IUBMB）の勧告（1992）に従って酵素分類ナンバーE.C.3.4の下に分類される酵素）は、このグループ内のタンパク質分解酵素を含む。

【0080】

例としては、次の酵素分類（E.C.）ナンバーの下に分類されるものから選択されるタンパク質分解酵素があげられる：

【0081】

3.4.11（すなわち、いわゆるアミノペプチダーゼ）、例えば、3.4.11.5（プロリル・アミノペプチダーゼ）、3.4.11.9（X-プロ・アミノペプチダーゼ）、3.4.11.10（バクテリア・ロイシル・アミノペプチダーゼ）、3.4.11.12（好熱性アミノペプチダーゼ）、3.4.11.15（リシル・アミノペプチダーゼ）、3.4.11.17（トリプトファン・アミノペプチダーゼ）、3.4.11.18（メチオニル・アミノペプチダーゼ）、など。

【0082】

3.4.21（すなわち、いわゆるセリン・エンドペプチダーゼ）、例えば、3.4.21.1（キモトリプシン）、3.4.21.4（トリプシン）、3.4.21.25（ククミシン）、3.4.21.32（ブラキュリン）、3.4.21.48（セレピシン）、及び3.4.21.62（スプチリシン）、など。

【0083】

3.4.22（すなわち、いわゆるシステイン・エンドペプチダーゼ）、例えば、3.4.22.2（パパイン）、3.4.22.3（フィカイン）、3.4

．22．6（キモパイン）、3．4．22．7（アスクルパイン）、3．4．22．14（アクチニジン）、3．4．22．30（カリカイン）、及び3．4．22．31（アナニン）、など。

【0084】

3．4．23（すなわち、いわゆるアスパラギン酸・エンドペプチダーゼ）、例えば、3．4．23．1（ペプシンA）、3．4．23．18（アスペルギロペプシンI）、3．4．23．20（ペニシロペプシン）、及び3．4．23．25（サッカロペプシン）、など；及び

【0085】

3．4．24（すなわち、いわゆるメタロエンドペプチダーゼ）、例えば、3．4．24．28（バシロリジン）など。

【0086】

関連あるスブチリシンの例としては、スブチリシンBPN'、スブチリシン・アミロサッカリティクス（amylosacchariticus）、スブチリシン168、スブチリシン・メセンテリコペプチダーゼ、スブチリシン・カールスバーグ（Carlsberg）、スブチリシンDY、スブチリシン309、スブチリシン147、サーミターゼ（thermitase）、アクアリシン、バチルスPB92プロテアーゼ、プロティナーゼK、プロテアーゼTW7及びプロテアーゼTW3並びにバチルスPD498（WO93/24623号）。

【0087】

容易に入手できる市販されているこれらのタンパク質分解酵素の具体的な例としては、Esperase（登録商標）、Alcalase（登録商標）、Neutrase（登録商標）、Dyrazym（登録商標）、Savinase（登録商標）、Pyrase（登録商標）、膵臓トリプシン NOVO(PTN)、Bio-Feed（登録商標）Pro、Clear-Lens Pro（全ての酵素はNovo Nordisk A/Sから入手できる）などがある。

【0088】

他の市販されているタンパク質分解酵素の例としては、Gist-Brocades N. V. から市販されているMaxtase（登録商標）、Mxacal（登録商標）、Maxapem（登録商標）、Solvay et Cieから市販されているOpticlean（登録商標）、及びGenenc

or International から市販されているPurafect (登録商標) などがある。

【0089】

タンパク質分解酵素の変異体の例は次のものに開示されている、EP 130756号 (Genentech)、EP 214435号 (Henkel)、WO 87/04461号 (Amgen)、WO 87/05050号 (Genex)、EP 251446号 (Genencor)、EP 260105号 (Genencor)、Thomas 他 (1985), Nature, 318, p. 375-376、Thomas 他 (1987), J. Mol. Biol., 193, pp. 803-813、Russel 他 (1987), Nature, 328, p. 496-500、WO 88/08033号 (Amgen)、WO 89/06279号 (Novo Nordisk A/S)、WO 91/00345号 (Novo Nordisk A/S)、EP 525610号 (Solvay)、及びWO 94/02618号 (Gist-Brocades N. V.)。

【0090】

タンパク質分解酵素とその変異体の活性は、「Methods of Enzymatic Analysis」、第三版、1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 5, に記述されているように決定できる。

【0091】

リパーゼ

リパーゼ (すなわち、国際生化学及び分子生物学連合 (IUBMB) の勧告 (1992) に従って酵素分類ナンバー E.C. 3.1.1 (カルボキシル・エステル・ヒドロラーゼ) の下に分類される酵素) は、このグループ内のリパーゼを含む。

【0092】

例としては次の酵素分類 (E.C.) ナンバーの下に分類されるものから選択されるリパーゼがあげられる：

【0093】

3.1.1 (すなわち、いわゆるカルボキシル・エステル・ヒドロラーゼ)、例えば、(3.1.1.3) トリアシルグリセロール・リパーゼ、(3.1.1.4)、ホスホリパーゼA₂、など。

【0094】

リパーゼの例としては、次の微生物から得られるリパーゼが含まれる。記されている特許公開文書は参照によって本明細書に取り込まれる：

【0095】

フミコーラ (*Humicola*)、例えば、*H. ブレビスポラ* (*brevispora*)、*H. ラヌギノサ* (*lanuginosa*)、*H. ブレビス パール サーモイデア* (*brevis var. thermoidea*) 及び *H. インソレンス* (*insolens*) (US 4,810,414号)。

【0096】

シュードモナス (*Pseudomonas*)、例えば、*Ps. フラジ* (*fragi*)、*Ps. スチュツツェリ* (*stutzeri*)、*Ps. セパシア* (*cepacia*) 及び *Ps. フルオレセンス* (*fluorescens*) (WO 89/04361号) 又は *Ps. プランタリイ* (*plantarii*) 又は *Ps. グラディオリ* (*gladioli*) (US特許4,950,417号 (Solvay Enzyme)) 又は *Ps. アルカリジェネス* (*alcaligenes*) 及び *Ps. シュードアルカリジェネス* (*pseudoalcaligenes*) (EP 218 272号) 又は *Ps. メンドシナ* (*mendocina*) (WO 88/09367号; US 5,389,536号)。

【0097】

フザリウム (*Fusarium*)、例えば、*F. オキシスポルム* (*oxyporum*) (EP 130,064号) 又は *F. ソラニ ピシ* (*solani pisi*) (WO 90/09446号)。

【0098】

ムコル (*Mucor*) (*Rhizomucor* と呼ばれる)、例えば、*M. ミエヘイ* (*miehei*) (EP 238,023号)。

【0099】

クロモバクテリウム (*Chromobacterium*) (特に *C. viscosum*)。

アスペルギルス (*Aspergillus*) (特に *A. niger*)。

カンジダ (*Candida*)、例えば、*C. シリンドラセア* (*cylindracea*) (*C. rugosa* と呼ばれる) 又は *C. アンタルクティカ* (*antarctica*) (WO 88/02775号) 又は *C. アンタルクティカ* (*antarctica*) リパーゼA又はB (WO 94/01541号及びWO 89/02916号)。

【0100】

ジェオトリウム (Geotricum)、例えば、G.カンジドゥム (candidum)、(Schimada 他 (1989)、J. Biochem., 106, 383-388)。

【0101】

ペニシリウム (Penicillium)、例えば、P.カメンベルテイイ (camembertii) (Yamaguchi 他 (1991)、Gene 103, 61-67)。

【0102】

リゾプス (Rhizopus)、例えば、R.デルマール (delemar) (Hass 他 (1991)、Gene 109, 107-113)、又はR.ニベウス (niveus) (Kugimiya 他 (1992) Biosci. Biotech. Biochem 56, 716-719)又はR.オリザエ (oryzae)。

【0103】

バシラス (Bacillus) 例えば、B.スブチリス (subtilis) (Dartois 他 (1993) Biochemica et Biophysica acta 1131, 253-260)又はB.ステアロサーモフィルス (stearothermophilus) (日本64/7744992号)又はB.プミラス (pumilus) (WO 91/16422号)。

【0104】

容易に入手できる市販されているリパーゼの具体的な例としては、Lipoplase (登録商標)、Lipoplase (登録商標) Ultra、Lipozyme (登録商標)、Palatase (登録商標)、Novozym (登録商標) 435、Lecitase (登録商標) (全て Novo Nordisk A/S から市販されている) などがある。

【0105】

他のリパーゼの例としては、Genencor Int. Inc. からの Lumafast (商標)、Ps.メンドシアン (mendocian) リパーゼ; Gist Brocades/Genencor Int. Inc. からの Lipomax (商標)、Ps.シュードアルカリジェネス (pseudoalcaligenes) リパーゼ; Unilever からのフザリウム・ソラニ (Fusarium solani) リパーゼ (クチナーゼ); Solvay enzyme からのバシラス種 (Bacillus sp.) リパーゼ、などがある。その他のリパーゼも他の会社から市販されている。

【0106】

リパーゼ変異体の例は、例えば、WO 93/01285号及びWO 95/22615号に記述されている。

【0107】

リパーゼの活性は、「Methods of Enzymatic Analysis」、第三版、1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 4, に記述されているように、又はA F 9 5 / 5 G B (請求すれば Novo Nordisk A/S から入手できる) に記述されているように、決定できる。

【0108】

オキシドレダクターゼ

オキシドレダクターゼ (すなわち、国際生化学及び分子生物学連合 (I U B M B) の勧告 (1 9 9 2) に従って酵素分類ナンバー E . C . 1 (オキシドレダクターゼ) の下に分類される酵素) は、このグループ内のオキシドレダクターゼを含む。

【0109】

例としては次の酵素分類 (E . C .) ナンバーの下に分類されるものから選択されるオキシドレダクターゼがあげられる：

【0110】

グリセロール - 3 - フォスフェート デヒドロゲナーゼ NAD^+ (1 . 1 . 1 . 8)、グリセロール - 3 - フォスフェート デヒドロゲナーゼ NAD(P)^+ (1 . 1 . 1 . 9 4)、グリセロール - 3 - フォスフェート 1 - デヒドロゲナーゼ NADP (1 . 1 . 1 . 9 4)、グルコース オキシダーゼ (1 . 1 . 3 . 4)、ヘキソース オキシダーゼ (1 . 1 . 3 . 5)、カテコール オキシダーゼ (1 . 1 . 3 . 1 4)、ビリルビン オキシダーゼ (1 . 3 . 3 . 5)、アラニン デヒドロゲナーゼ (1 . 4 . 1 . 1)、グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ (1 . 4 . 1 . 2)、グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ NAD(P)^+ (1 . 4 . 1 . 3)、グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ NADP^+ (1 . 4 . 1 . 4)、L - アミノ酸 デヒドロゲナーゼ (1 . 4 . 1 . 5)、セリン デヒドロゲナーゼ (1 . 4 . 1 . 7)、バリンデヒドロゲナーゼ NADP^+ (1 . 4 . 1 . 8)、ロイシン デヒドロゲナーゼ (1 . 4 . 1 . 9)、グリシン デヒドロゲナーゼ (1 . 4 . 1 . 1 0)、L - アミノ酸 オキシダーゼ (1 . 4 . 3 . 2)、D - ア

ミノ酸 オキシダーゼ (1.4.3.3)、L-グルタミン酸 オキシダーゼ (1.4.3.11)、タンパク質-リジン 6-オキシダーゼ (1.4.3.13)、L-リジン オキシダーゼ (1.4.3.14)、L-アスパラギン酸 オキシダーゼ (1.4.3.16)、D-アミノ酸 デヒドロゲナーゼ (1.4.99.1)、タンパク質 ジスルフィド レダクターゼ (1.6.4.4)、チオレドキシソ レダクターゼ (1.6.4.5)、タンパク質 ジスルフィド レダクターゼ (グルタチオン) (1.8.4.2)、ラッカーゼ (1.10.3.2)、カタラーゼ (1.11.1.6)、ペルオキシダーゼ (1.11.1.7)、リポキシゲナーゼ (1.13.11.12)、スーパーオキシド ジスムターゼ (1.5.1.1)。

【0111】

前記グルコース・オキシダーゼは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) から得られる。

【0112】

前記ラッカーゼは、ポリポラス・ピンシタス (*Polyporus pinsitus*)、ミセリオフトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、コプリヌス・シネレウス (*Coprinus cinereus*)、リゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*)、リゾクトニア・プラクティコーラ (*Rhizoctonia praticola*)、シタリジウム・サーモフィルム (*Scytalidium thermophilum*) 及びリュス・バーニシフェラ (*Rhus vernicifera*) から得られる。

【0113】

ビリルビン・オキシダーゼは、ミロセケシウム・ベルカリア (*Myrothecium verrucaria*) から得られる。

【0114】

ペルオキシダーゼは、例えば、ダイズ、ワサビダイコン、又はコプリヌス・シネレウス (*Coprinus cinereus*) から得られる。

【0115】

タンパク質ジスルフィド・レダクターゼは、参照によって本明細書に取り込まれるDK特許出願第768/93号、265/94号及び264/94号 (Novo

Nordisk A/S)に記載されたいずれであってもよく、ウシに由来するタンパク質ジスルフィド・レダクターゼ、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus orizae*) 又はアスペルギルス/ニガー (*Aspergillus niger*) から得られるタンパク質ジスルフィド・レダクターゼ及び大腸菌から得られる D s b A 又は D s b C を含む。

【0116】

容易に入手できる市販されているオキシドレダクターゼの具体的な例としては、Gluzyme (商標) (Novo Nordisk A/S から入手できる酵素) などがある。しかし、その他のオキシドレダクターゼも他の会社から入手できる。

【0117】

オキシドレダクターゼの活性は、「Methods of Enzymatic Analysis」、第三版、1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 3, に記述されているようにして決定できる。

【0118】

カルボヒドラーゼ

カルボヒドラーゼは、特に五員環及び六員環構造の炭水化物鎖 (例えば、澱粉) を加水分解できる全ての酵素と定義される (すなわち、国際生化学及び分子生物学連合 (IUBMB) の勧告 (1992) に従って酵素分類ナンバー E . C . 3 . 2 (グリコシダーゼ) の下に分類される酵素)。

【0119】

例としては次の酵素分類 (E . C .) ナンバーの下に分類されるものから選択されるカルボヒドラーゼが含まれる：

【0120】

- アミラーゼ (3 . 2 . 1 . 1)、 - アミラーゼ (3 . 2 . 1 . 2)
、グルカン 1 , 4 - - グルコシダーゼ (3 . 2 . 1 . 3)、セルラーゼ (3 . 2 . 1 . 4)、エンド - 1 , 3 (4) - - グルカナーゼ (3 . 2 . 1 . 6)、エンド - 1 , 4 - - キシラナーゼ (3 . 2 . 1 . 8)、デキストラナーゼ (3 . 2 . 1 . 11)、キチナーゼ (3 . 2 . 1 . 14)、ポリガラクトツロナーゼ (3 . 2 . 1 . 15)、リソザイム (3 . 2 . 1 . 17)、 -

グルコシダーゼ (3.2.1.21)、 - ガラクトシダーゼ (3.2.1.22)、 - ガラクトシダーゼ (3.2.1.23)、アミロ - 1, 6 - グルコシダーゼ (3.2.1.33)、キシラン 1, 4 - - キシロシダーゼ (3.2.1.37)、グルカン エンド - 1, 3 - - D - グルコシダーゼ (3.2.1.39)、 - デキストリン エンド - 1, 6 - グルコシダーゼ (3.2.1.41)、スクロース - グルコシダーゼ (3.2.1.48)、グルカン エンド - 1, 3 - - グルコシダーゼ (3.2.1.59)、グルカン エンド - 1, 4 - - グルコシダーゼ (3.2.1.74)、グルカン エンド - 1, 6 - - グルコシダーゼ (3.2.1.75)、アラビナン エンド - 1, 5 - - アラビノシダーゼ (3.2.1.99)、ラクターゼ (3.2.1.108)、キトナーゼ (3.2.1.132)。

【0121】

関連あるカルボヒドラーゼの例としては、次のようなものがあげられる：トリコデルマ・ハルチアヌム (*Trichoderma harzianum*) から得られる - 1, 3 - グルカナーゼ；ペシロミセス (*Paecilomyces*) のある系統から得られる - 1, 6 - グルカナーゼ；バシラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) から得られる - グルカナーゼ；フミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*) から得られる - グルカナーゼ；アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) から得られる - グルカナーゼ；トリコデルマ (*Trichoderma*) のある系統から得られる - グルカナーゼ；エルスコビア・キサンスネオリティカ (*Oerskovia xanthi neolytica*) のある系統から得られる - グルカナーゼ；アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) から得られるエキソ - 1, 4 - - D - グルコシダーゼ (グルコアミラーゼ)；バシラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) から得られる - アミラーゼ；バシラス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) から得られる - アミラーゼ；バシラス・ステアロサーモフィウス (*Bacillus stearothermophilus*) から得られる - アミラーゼ；アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*) から得られる - アミラーゼ；非病原性微生物から得られる - アミラーゼ；アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) から得られる - ガラクトシダーゼ；フミコーラ・インソレンス (*Humicola*

insolens) から得られるペントサナーゼ、キシラナーゼ、セロビアーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ；トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) から得られるセルラーゼ；非病原性の糸状菌から得られるセルラーゼ；アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) から得られるペクチナーゼ、セルラーゼ、アラビナーゼ、ヘミセルラーゼ；ペニシリウム・リラシヌム (*Penicillium lilacinum*) から得られるデキストラナーゼ；非病原性の糸状菌から得られるエンド-グルカナーゼ；バシラス・アシドプリティクス (*Bacillus acidopulliticus*) から得られるプルラナーゼ；クワイベロミセス・フラギリス (*Kluyveromyces fragilis*) から得られる - ガラクトシダーゼ；トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) から得られるキシラナーゼ。

【0122】

容易に入手できる市販されているカルボヒドラーゼの具体的な例としては、次のものがあげられる：Alpha-Gal (商標)、Bio-Feed (商標) Alpha、Bio-Feed (商標) Beta、Bio-Feed (商標) Plus、Bio-Feed (商標) Plus、Novozyme (登録商標) 188、Carezyme (登録商標)、Celluclast (登録商標)、Cellusoft (登録商標)、Ceremyl (登録商標)、Citrozym (商標)、Denimax (商標)、Dezyme (商標)、Dextrozyme (商標)、Finizym (登録商標)、Fungamyl (商標)、Gamanase (商標)、Glucanex (登録商標)、Lactozym (登録商標)、Maltogenase (商標)、Pentopan (商標)、Pectinex (商標)、Promozyme (登録商標)、Pulpozyme (商標)、Novamyl (商標)、Termamyl (登録商標)、AMG (Amyloglucosidase Novo)、Maltogenase (登録商標)、Sweetzyme (登録商標)、Aquazym (登録商標) (全ての酵素がNovo Nordisk A/S から入手できる)。他のカルボヒドラーゼも他の会社から入手できる。

【0123】

リアーゼ

適当なリアーゼは、多糖リアーゼ；ペクテート・リアーゼ (4.2.2.2) 及びペクチン・リアーゼ (4.2.2.10)、例えば、WO 99/27083号に開示されているバシラス・リヘニホルミス (*Bacillus licheniformis*) から得られるもの、などである。

【0124】

イソメラーゼ

例としては、酵素分類 (E.C.) ナンバー (5.) の下に分類されるものから選択されるイソメラーゼ: 例えば、キシロース・イソメラーゼ (5.3.1.5)、があげられる。関連あるイソメラーゼの一例は、タンパク質ジスルフィド・イソメラーゼ、例えば、WO 95/01425号 (Novo Nordisk A/S) に記載されているようなもの、である。容易に入手できる市販されているイソメラーゼの具体的な一例は、Sweetzyme (登録商標) である。

【0125】

カルボヒドラーゼ又はその変異体の活性は、「Methods of Enzymatic Analysis」、第三版、1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 4, に記述されているように決定できる。

【0126】

別の実施の形態では、試験化合物は酵素の調製で用いられる安定剤などの構成成分である。特に酵素の生産に関連して、酵素産業で働く人たちの呼吸器アレルギーの危険を減らすために、できるだけアレルギー性が小さな酵素変異体が得られると有利である。したがって、試験化合物、例えば呼吸器アレルギーを引き起こす疑いがある酵素及びその変異体、を試験するときは、呼吸器上皮細胞を用いることが好ましい。

【0127】

試験化合物がそれ自体免疫原性があることもあり、又はそれはハプテンと考えられることもある。

【0128】

ある実施の形態では、試験化合物は製剤形態の何らかの化合物、例えば活性の薬剤、である。

【0129】

別の実施の形態では、試験化合物は化粧品で用いられる化合物である。

この場合、特に接触のアレルギーが問題であり、好ましい第一の細胞タイプはケラチノサイトである。

【0130】

また、試験化合物は有機溶剤、染料、又は金属であってもよい。

本発明に従って、試験化合物は検出可能なサイトカイン応答を誘発するに十分な濃度でこの目的に選ばれた細胞培養に加えられる。試験化合物の濃度は問題の試験化合物によって異なる。本発明のある実施の形態では、試験化合物の濃度は1、10又は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。別の様態では、細胞培養に加えられる試験化合物の濃度は細胞培養と共にインキュベートされる試験化合物の時間による。本発明のある実施の形態では、試験化合物のインキュベート時間は0～16時間の範囲にあり、例えば0、2、4、6又は16時間である。

【0131】

本発明の別の様態では、本発明による方法は試験化合物の毒性を評価するために用いられ：

- 該試験化合物と実質的に非特異的相互作用をし、相互作用するとサイトカイン発現で応答できる、ヒトを含めた動物起源の少なくとも一つの細胞タイプを含む所定の予め特性が決定された細胞培養を得るステップ、
- 該細胞培養に試験化合物を接触させるステップ、
- 少なくとも一つのサイトカインについて、試験化合物と実質的に非特異的相互作用を示す細胞のサイトカイン応答を測定することによって特異的サイトカイン・プロフィールを定めるステップ、及び
- 該サイトカイン・プロフィールを試験化合物の毒性と関連づけるステップ、を含む。

【0132】

試験化合物のアレルゲン性評価に関して上述したように、化合物の毒性が強いほど産生されるサイトカインのレベルが低くなるという形で、試験化合物の毒性を産生されるサイトカインのレベルと関連づけることが可能である。したがって、本発明はさらに、少なくとも二つの試験化合物の毒性を同時にスクリーニングする方法であって：

- 上で定めたような細胞培養を少なくとも二つの区画に配置するステップ、
- 該細胞培養に個々に一つの試験化合物を接触させるステップ、

- 試験化合物と実質的に非特異的相互作用を示すそれぞれの細胞のサイトカイン応答を測定することによって、特異的サイトカイン・プロフィールを定めるステップ、

- 各サイトカイン・プロフィールを試験化合物の毒性に関連づけるステップ、を含む方法に関する。

【0133】

さらに別の様態では、本発明は、高速処理スクリーニングで試験化合物のアレルゲン性又は毒性を評価する分析キットに関し、前記分析キットはキットの一部として：

- 少なくとも一つのヒトを含めた動物の細胞タイプを含む細胞培養、

- 特定のサイトカインに特異性を有する少なくとも一对のモノクローナル抗体、少なくとも一つのサイトカインに特異的なmRNA検出用のプローブ、少なくとも一組のサイトカインに特異的なmRNA又はcDNA検出用のプライマー、から選択されるサイトカイン決定子、

- 少なくとも二つの区画を含む分析装置、を含む。

【0134】

本発明の別の実施の形態では、分析キットはさらに、ある特定の膜マーカーに特異性を有する少なくとも一对のモノクローナル抗体、ある特定の膜マーカーに特異性を有する少なくとも一つのモノクローナル抗体、mRNA検出用の少なくとも一つの膜マーカーに特異的なプローブ、及びmRNA又はcDNA検出用の少なくとも一組の膜マーカーに特異的なプライマー、に関する。

【0135】

上述のように、分析キットは一つの細胞タイプ又は細胞タイプの組み合わせを含み、後者は共培養されるか、又は別々に培養される。さらに、分析キットは細胞を培養する培地を含んでもよい。当業者は、本明細書で述べる細胞を培養するのに適当な培地を容易に決定できるであろう。

【0136】

分析キットはアレルゲン性の標準を含むことが好ましい。これは、決定された

サイトカイン・プロフィールに基づいて問題の試験化合物のアレルゲン性を評価するための標準である。このアレルゲン性の標準は、分析キットに関する情報という形であってもよく、あるいは、試験化合物について得られたサイトカイン・プロフィールを既知の化合物について得られたプロフィールと関連づけるという、アレルゲン性が知られている化合物で試験化合物を同時評価するという形であってもよい。

【0137】

分析キットは、いくつかの試験化合物を同時に試験するように、例えば少なくとも二つの化合物を、さらに好ましくは少なくとも10の試験化合物を同時に、最も好ましくは約100の試験化合物のアレルゲン性を同時に評価することができるように、配置することが好ましい。

【0138】

キットは、部分に分かれたキットと考えるべきである、すなわち、キットはいくつかの異なる部分から、例えば細胞培養はある源から、決定子は別の源から、そして分析装置は第三の源から取って組み合わせられる。分析装置は適当などんな装置であってもよく、例えば、細胞をその中で培養し試験化合物をそれに接触させることができる少なくとも一つのウェルを有するプレートであってもよい。

【0139】

ある好ましい実施の形態では、分析装置は、各ウェルに少なくとも二つの区画を含み、同じウェルで二つのタイプの細胞を培養し、上述のような組み合わせからのサイトカイン応答を評価することが可能である。ある実施の形態では、細胞培養は24、48又は96ウェルの細胞培養プレート(Nunc)で行われる。細胞が物理的に接触することを許さない共培養を確立するために、一定の透過性の膜を備えた特定のインサートを用いることができる(Nunc TC インサート)。

【0140】

分析キットは、試験化合物の毒性と同様に、試験化合物のアレルゲン性を評価するのに用いることができる。

【0141】

実験

実施例において用いられる方法を以下で説明する。

方法

1. 生物学的検定法

ヒト肺上皮細胞 (BEAS-2B, ATCC # CRL-9609) が、水中 2% (vol/vol) の Ultroser G がプレコートされた培養フラスコ (NUNC) に、 1 cm^2 あたり 1500 ~ 3000 個の細胞という密度で接種され、 37°C で 2% (vol/vol) の Ultroser G を含む LHC-9 培地及び 5% の CO_2 中で培養された。

【0142】

細胞は、コンフルエンスに達する前に植え継がれた。培地は除去され、新鮮なトリプシン中の 0.5% ポリビニルピロリドン (PVP) (0.25% (wt/vol)) - EDTA (0.03% (wt/vol)) 溶液が細胞が離れるまで加えられた (通常、室温で 5 - 10 分後)。LHC-9 培地に加えられ、細胞は遠心分離によって集められ ($300 \times g$ で 15 分)、2% (vol/vol) の Ultroser G を含む LHC-9 培地に再懸濁された。最後に、細胞はプレコートされたフラスコ (NUNC) に、 1 cm^2 あたり 1500 ~ 3000 個の細胞という密度で小分けされた。

【0143】

予定した数の分析を行うのに十分な数の細胞が得られたら、細胞はトリプシン処理され、24 - ウェルの培養プレート (NUNC) に移された (ウェルあたり 1×10^5 個の細胞)。インキュベーターは 37°C で 2% (vol/vol) の Ultroser G を含む LHC-9 培地及び 5% の CO_2 中で行われた。次に、培地が除去され、2% (vol/vol) の Ultroser G 及び調べようとするタンパク質を含む新鮮な予め暖められた LHC-9 培地に置き換えられた。ネガティブ対照としてタンパク質を含まない培地も含められ、他方、 $100\ \mu\text{g}$ の大腸菌 LPS 055:B5 によって刺激された細胞がポジティブ対照と見なされた。各分析は、三重複で行われた。

【0144】

選択されたサイトカインの細胞外の発現が、ELISA (R&D Systems) によって、培養時間及びタンパク質濃度の関数として評価された。ELISA は、収集直後に細胞培地について、又は -20°C 以下で貯蔵された培地について行われ

た。検出されたサイトカイン・レベルを定量化し、かつ分析の再現性を評価するために、校正カーブが毎回含められた。

【0145】

2. ブラウン・ノルウエー・ラットの免疫処置

20の気管内免疫処置が毎週、100 μ lの0.9% (wt/vol) のNaCl (対照グループ)、又は前記のタンパク質溶液100 μ lによって行われた。各グループには10匹のラットが含まれていた。各2回目の免疫処置の一週間後、眼から血液サンプル(2ml)が採取された。血清は血液凝固、及び遠心分離によって得られた。

【0146】

3. IgE ELISA

IgE ELISAは次のものを用いて行われた：

緩衝剤と溶液：

洗浄緩衝剤	PBS、0.05% (v/v) のTween 20
ブロッキング緩衝剤	PBS、2% (wt/v) のスキムミルク粉末
希釈緩衝剤	PBS、0.05% (v/v) のTween 20、 0.5% (wt/v) のスキムミルク粉末
クエン酸緩衝剤	(0.1M、pH 5.0 - 5.2)

【0147】

CovaLink プレートの活性化：

アセトン1mlあたり塩化シアヌル10mgの新鮮なストック溶液を作る。

使用の直前に、この塩化シアヌルのストック溶液をPBSに、攪拌しながら、最終濃度1mg/mlにまで希釈する。CovaLink NH₂ プレートの各ウエルに100 μ lの希釈溶液を加え、5分間室温でインキュベートする。PBSで3回洗浄する。

【0148】

新しく調製された活性化されたプレートを50 $^{\circ}$ Cで30分間乾燥させる。各プレートを封止テープでただちに封止する。予備活性化されたプレートはプラスチック・バッグで保管すると室温で3週間貯蔵できる。

【0149】

ELISA手順：

マウスの抗ラットIgEがPBSで200×に希釈された(5 μg/ml)。100 μlが各ウエルに加えられた。プレートは一晩4℃でコートされた。

【0150】

非特異的な吸着は各ウエルを1時間200 μlのブロッキング緩衝剤と共に室温でインキュベートすることによってブロックされた。プレートは300 μlの洗浄緩衝剤で3回洗浄された。

【0151】

未知のラット血清(複数)及び既知のラットIgE溶液が希釈緩衝剤で希釈された：普通、未知の血清(複数)では10×、20×、及び40×、標準IgEでは1 μg/mlからスタートした1/2希釈、である。各ウエルに100 μlが加えられた。インキュベートは室温で1時間であった。

【0152】

結合しない物質は洗浄緩衝剤で3回洗浄して除去された。抗ラットIgE(ビオチン)は希釈緩衝剤で2000×希釈された。100 μlが各ウエルに加えられた。インキュベートは室温で1時間行われた。結合しない物質は洗浄緩衝剤で3回洗浄して除去された。

【0153】

ストレプトアビジンが希釈緩衝剤で1000×希釈された。インキュベートは室温で1時間行われた。結合しない物質は300 μlの洗浄緩衝剤で3回洗浄して除去された。

【0154】

OPD(0.6 mg/ml)とH₂O₂(0.4 μl/ml)がクエン酸緩衝剤に溶解された。100 μlが各ウエルに加えられた。インキュベートは室温で30分間行われた。

【0155】

反応は100 μlのH₂SO₄を加えることによって停止された。プレートは620 nmを基準として492 nmで読み取られた。

【0156】

実施例1

上皮細胞に誘発させることができるサイトカインの同定

この実験の組では、100 μ gのLPS（リポ多糖類）を用いて細胞を刺激した。ELISAは、2、4、6、8及び16時間後に行われた。表2は、細胞にサイトカインが誘発されたことを示し（+）、また細胞がLPSで刺激されたときに上皮細胞にサイトカインが検出されなかったことを示す（-）。

【0157】

表2

サイトカイン	細胞の応答
IL - 1	-
IL - 1	-
IL - 2	-
IL - 4	-
IL - 5	-
IL - 6	+
IL - 8	+
IFN -	-
TNF -	-
GM - CSF	+
MCP - 1	+
MIP - 1	-
RANTES	+

図1 a ~ dは、表でポジティブ（+）と記されたサイトカインについて、異なる時間的变化を示す。IL - 8とIL - 6は同様の時間的变化を示したので、IL - 8だけが示されている（図1）。

【0158】

実施例2

種々のタンパク質分解酵素の誘導体で上皮細胞に誘発されるサイトカイン・レ

ベルの評価

【0159】

スブチリシン・ファミリーからのプロテアーゼP (CDJ31: バシラス・リヘニホルミスのセリン・プロテアーゼ (E.C.3.4.21.62)) が選ばれ、いろいろなサイズの、具体的には350、750、1000、2000及び5000 Daの、ポリエチレン・グリコール (PEG) 分子で修飾された。修飾されない酵素と修飾された酵素の両方について、細胞外のサイトカイン産生能が上皮細胞分析で評価された。

【0160】

プロテアーゼによるサイトカインのタンパク質分解を防止するために、細胞培地での希釈の前にプロテアーゼはPMSF (10 mM) で阻害された。通常、PMSFは細胞に加えられる前に1000×に希釈された。この濃度で、PMSFとその加水分解産物はサイトカイン産生に何も検出できるほどの影響を及ぼさなかった。

【0161】

図2は、IL-8, IL-6及びMCP-1の典型的な時間的变化を修飾されないプロテアーゼと修飾されたプロテアーゼに関して示している。後者はP-bis-S-PEG2000によって代表している。ベースラインは対照培地に関して得られたものである。他のスブチリシン・プロテアーゼでもほとんど同一の結果が観測された (PD498: バシラス種のセリン・プロテアーゼ (E.C.3.4.21.66))。

【0162】

それぞれのサイトカイン・レベルの比較には、100 µgのタンパク質で4時間のインキュベート後に得られたレベルが選ばれた。

【0163】

実施例3

ラットで検出されたサイトカイン・レベル及びIgEレベルと酵素の修飾に用いられたPEG分子の長さの相関

ラットが修飾されないプロテアーゼ及び修飾されたプロテアーゼで気管内免疫

処置され、プロテアーゼ特異的 I g E レベルが E L I S A によって検出された。研究の全期間に検出された I g E レベルが積分され、修飾されない酵素で免疫処置されたラットで観測されたレベルに対して比較された。図 3 で、(a) は、酵素を修飾するのに用いた P E G 分子の長さが増加すると共に相対 I g E レベルが減少することを示している。I L - 8 レベル (b) は、P E G サイズの増加と共に増加することが見出されたが、他方 I L - 6 (c) 及び M C P - 1 (d) レベルはベル型の時間的变化を示した。

【 0 1 6 4 】

実施例 4

検出されたサイトカイン・レベルと修飾されない酵素について検出されたレベルと比較したラットにおける I g E レベルとの相関

実施例 3 で得られた結果を用いて、検出されたサイトカイン・レベルをラットにおける I g E レベルと直接関連づけることが可能である。

図 4 で、(a) は、修飾されない酵素と比較したときの I g E レベルの増加と共に I L - 8 レベルが減少することを示している。I L - 6 (b) 及び M C P - 1 (c) I g E レベルは修飾されない酵素と比較したときの I g E レベルで急激に増加しその後急激な減少を示した。

【 0 1 6 5 】

I g E とそれぞれのサイトカインとの相関は次のようにまとめられる：

表 3

ラットの I g E レベル (%)	I L - 8	I L - 6	M C P - 1
> 5 0	-	-	-
5 0 ~ 2 5	+	+	- (p > 0 . 0 5)
2 5 ~ 1 0	+	+	+
< 1 0	+	-	+

【 0 1 6 6 】

実施例 5

プロテアーゼ及びリポラーゼのラットにおける検出されたサイトカイン・レベ

ルとI g Eレベルの比較

バシラス種 (Bacillus sp.) からのセリン・プロテアーゼ E . C . 3 . 4 . 2 1 . 6 6 及びフミコーラ・インソレンス (Humicola lanuginosa) からのトリアセチル・グリセロール・アシルヒドロラーゼ (リパーゼ) E . C . 3 . 1 . 1 . 3 のサイトカイン・レベルが上皮細胞分析で評価された。ラットは同じプロテアーゼとリパーゼによって気管内免疫処置され、I g E レベルが E L I S A によって検出された。図5は、プロテアーゼとリパーゼの両方の規格化されたサイトカイン・レベルならびにI g E レベルを示す。

【0167】

実施例3の表3によると、プロテアーゼはリパーゼよりもアレルギー性が高いだろう。したがって、プロテアーゼで観測された全てのサイトカインの低レベルは高いI g E レベルに対応し、他方リパーゼで観測された全てのサイトカインの高いレベルは著しく低いI g E レベルに対応していた。

【図面の簡単な説明】

【図1a】

図1aは、上皮細胞をリポ多糖体 (L P S) によって所定のインキュベート時間の間刺激したときのサイトカイン応答を示す表である。

【図1b】

図1bは、上皮細胞をリポ多糖体 (L P S) によって所定のインキュベート時間の間刺激したときのサイトカイン応答を示す表である。

【図1c】

図1cは、上皮細胞をリポ多糖体 (L P S) によって所定のインキュベート時間の間刺激したときのサイトカイン応答を示す表である。

【図1d】

図1dは、上皮細胞をリポ多糖体 (L P S) によって所定のインキュベート時間の間刺激したときのサイトカイン応答を示す表である。

【図2】

図2は、タンパク質分解酵素Pがアレルギー性に関して修飾された場合のタンパク質分解酵素P修飾に対する反応としての3つの異なるサイトカインのサイト

カイン応答を示す。

【図3 a】

図3 aは、I g Eレベルの減少とタンパク質分解酵素Pを修飾するのに用いたP E Gの長さとの関係を示すグラフである。

【図3 b】

図3 bは、異なるサイトカインのサイトカイン応答とタンパク質分解酵素Pを修飾するのに用いたP E Gの長さとの関係を示すグラフである。

【図3 c】

図3 cは、異なるサイトカインのサイトカイン応答とタンパク質分解酵素Pを修飾するのに用いたP E Gの長さとの関係を示すグラフである。

【図3 d】

図3 dは、異なるサイトカインのサイトカイン応答とタンパク質分解酵素Pを修飾するのに用いたP E Gの長さとの関係を示すグラフである。

【図4 a】

図4 aは、タンパク質分解酵素Pで刺激したときの異なるサイトカインのレベルとI g Eレベルの相関を示すグラフである。

【図4 b】

図4 bは、タンパク質分解酵素Pで刺激したときの異なるサイトカインのレベルとI g Eレベルの相関を示すグラフである。

【図4 c】

図4 cは、タンパク質分解酵素Pで刺激したときの異なるサイトカインのレベルとI g Eレベルの相関を示すグラフである。

【図5】

図5は、タンパク質分解酵素とリポラーゼで刺激したときのI g Eレベルと3つの異なるサイトカインのサイトカイン応答を示すグラフである。

【図1】

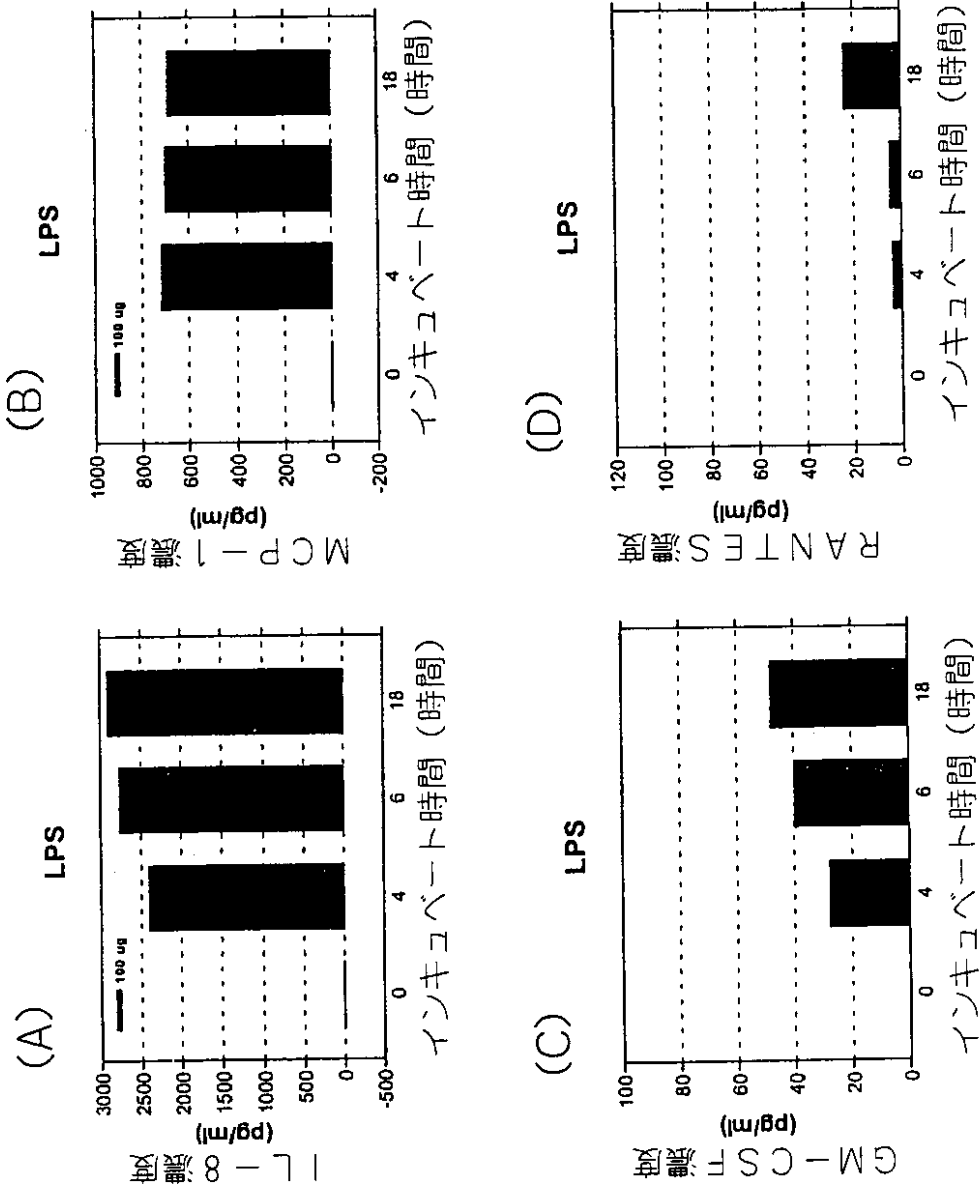


Fig. 1

【図2】

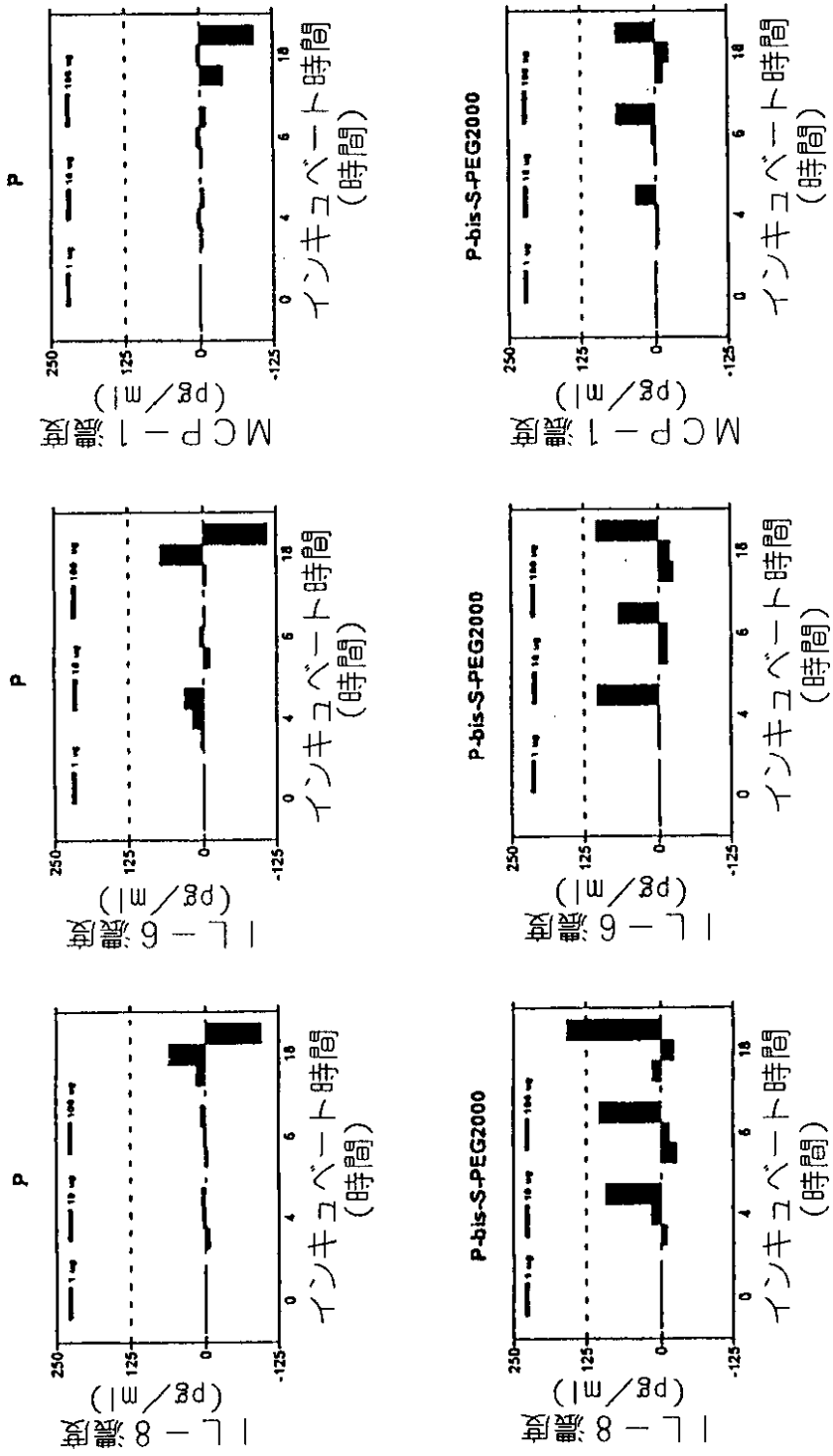


Fig. 2

【図3】

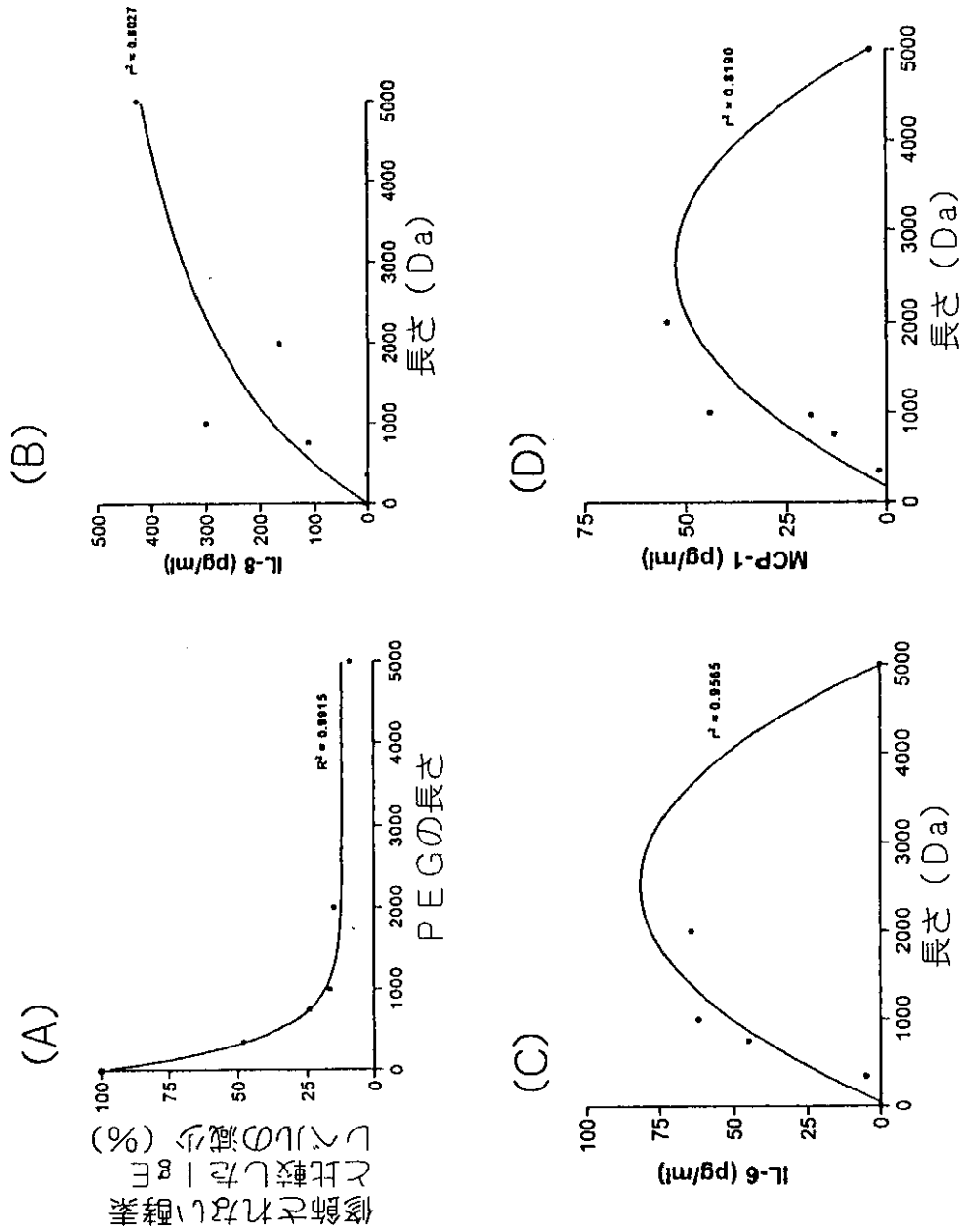


Fig. 3

【図4】

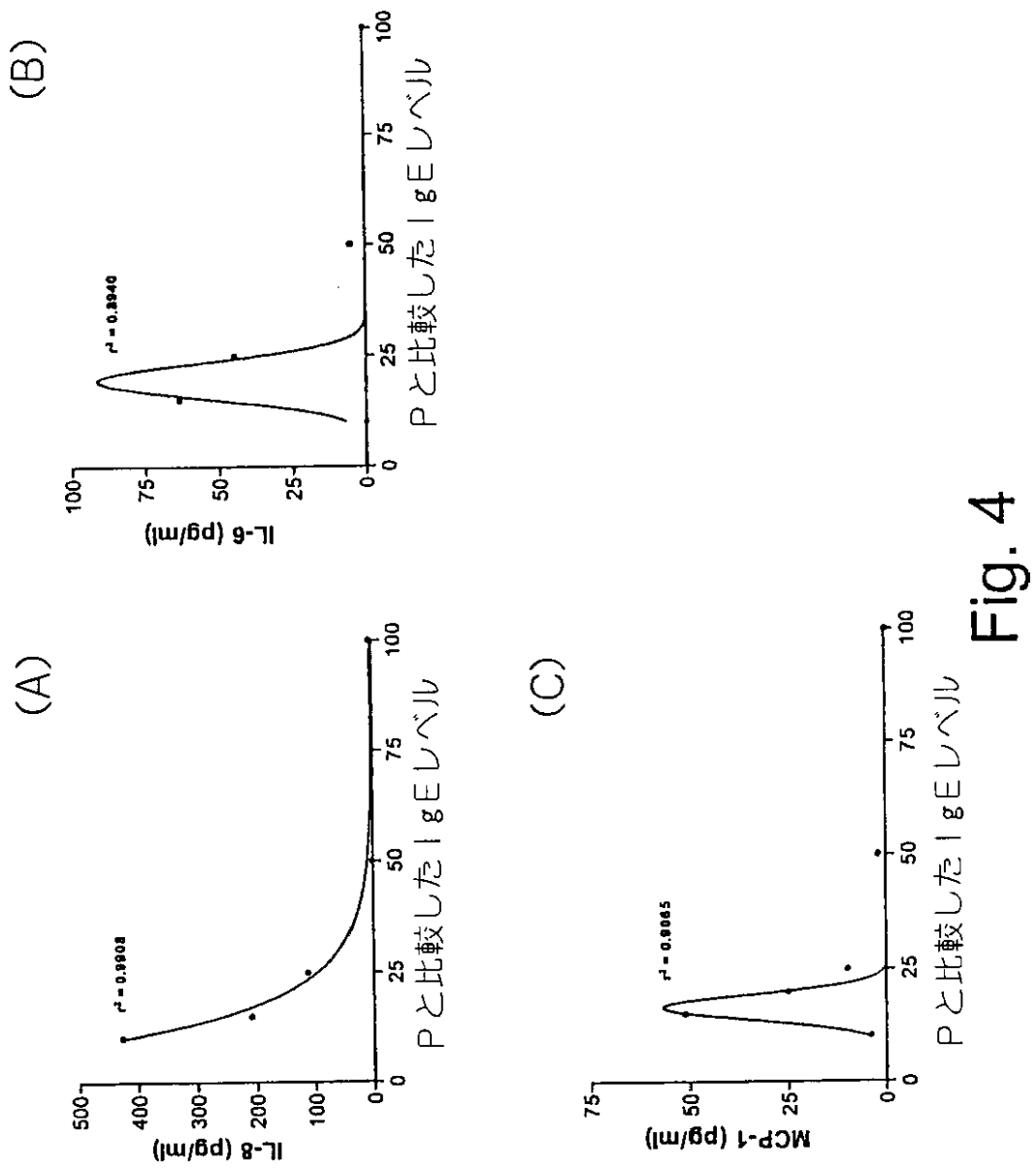


Fig. 4

【図5】

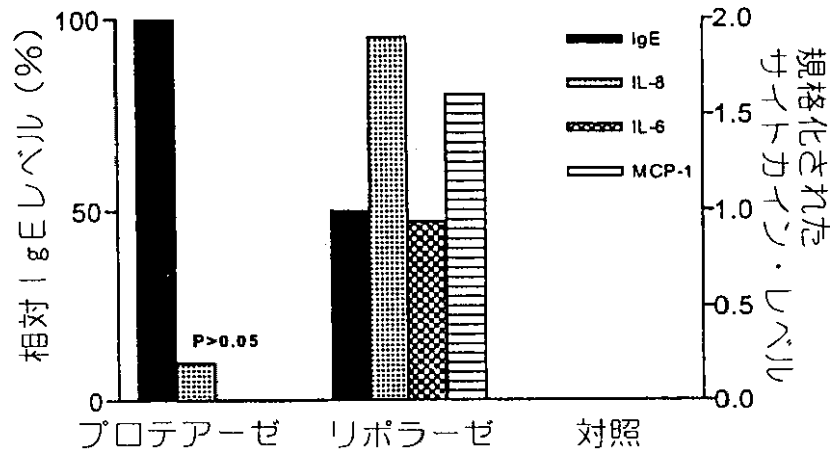


Fig. 5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 00/00579

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: G01N 33/68 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)		
IPC: G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9716732 A1 (ANDERSSON, BIRGER), 9 May 1997 (09.05.97) --	1-67
X	WO 9907880 A1 (THE RESEARCH FOUNDATION OF STATE UNIVERSITY OF NEW YORK), 18 February 1999 (18.02.99) --	1-67
X	Dialog Information Services, file 155, MEDLINE, Dialog accession no. 08487850, Medline accession no. 96128337, Corsini E et al; "In vitro keratino- cytes responses to chemical allergens"; & Bollettino chimico farmaceutico Nov 1995, 134 (10) p569-73 --	1-67
<input checked="" 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	
19 February 2001	22-02-2001	
Name and mailing address of the ISA. Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Carolina Palmcrantz/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 00/00579

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Dialog Information Services, file 73, EMBASE, Dialog accession no. 05306537, Embase accession no. 1993074622, Gueniche A. et al: "Use of human skin cell cultures for the estimation of potential skin irritants"; & Toxicology in Vitro (TOXICOL. VITRO) 1993, 7/1 (15-24)</p> <p style="text-align: center;">-- -----</p>	1-67

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

05/02/01

International application No.

PCT/DK 00/00579

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9716732 A1	09/05/97	AU 724932 B	05/10/00
		AU 6537996 A	22/05/97
		CA 2236474 A	09/05/97
		EP 0866968 A	30/09/98
		JP 2000500330 T	18/01/00
		SE 506533 C	12/01/98
		SE 9502409 A	02/05/97
		US 6046010 A	04/04/00
WO 9907880 A1	18/02/99	AU 8684298 A	01/03/99

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/577 37/00	1 0 3	G 0 1 N 33/577 37/00	B 1 0 3
(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
Fターム(参考) 2G045 AA24 BB20 CA11 CB01 CB17 DA12 DA13 DA14 DA20 DA36 DA44 DA61 DA62 DA80 DB30 FB02 FB03 4B063 QA07 QA19 QQ08 QQ21 QQ61 QQ79 QQ89 QQ96 QR08 QR32 QR42 QR48 QR55 QR62 QS25 QS33 QS34 QX01			

专利名称(译)	变应原性的评价方法		
公开(公告)号	JP2003512626A	公开(公告)日	2003-04-02
申请号	JP2001532103	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)	诺维信ACTY洛杉矶萝卜		
[标]发明人	ロゲンエルビンルオ エルンストステフェン		
发明人	ロゲン,エルビン ルオ エルンスト,ステフェン		
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		
FI分类号	G01N33/53.Q C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/50.P G01N33/566 G01N33/577.B G01N37/00.103		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB20 2G045/CA11 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA44 2G045/DA61 2G045/DA62 2G045/DA80 2G045/DB30 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA07 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01		
优先权	199901486 1999-10-15 DK		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于评估测试化合物的致敏性或毒性的方法，以及用于同时筛选至少两种测试化合物的方法。本发明还涉及表征本发明细胞类型的方法，以及用于高通量筛选化合物的分析试剂盒。可通过使测试化合物与至少一种动物来源的细胞类型的细胞培养物接触并测量细胞因子应答来评估测试化合物的变应原性。

表1

アレルギー性/ サイトカイン	IL-8	IL-6	MCP-1
高	-	-	-
やや高	+	+	-
やや低	+	+	+
低	+	-	+