

(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2013-524209

(P2013-524209A)

(43) 公表日 平成25年6月17日(2013.6.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	Q 2GO45
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	4BO63
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/58 (2006.01)	GO 1 N 33/58	Z
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-502523 (P2013-502523)	(71) 出願人	512252423 ブロー、カーズティン
(86) (22) 出願日	平成23年3月29日 (2011. 3. 29)		スウェーデン国 エス - 311 36
(85) 翻訳文提出日	平成24年11月27日 (2012.11.27)		ファルケンベルイ、ヴァルベルグスヴェーゲン 21
(86) 国際出願番号	PCT/SE2011/000057	(71) 出願人	512252434
(87) 国際公開番号	W02011/133082		パウアー、ブリジット
(87) 国際公開日	平成23年10月27日 (2011.10.27)		スウェーデン国 エス - 414 78
(31) 優先権主張番号	61/341, 355		イエーテボリ、カップランドスガータン 144
(32) 優先日	平成22年3月29日 (2010. 3. 29)	(71) 出願人	512252445
(33) 優先権主張国	米国 (US)		エリクソン、マリカ
			スウェーデン国 エス - 416 55
			イエーテボリ、イスケラーレリデン 10エー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化合物の感作性をスクリーニングするための方法

(57) 【要約】

化合物の感作性をスクリーニングするための方法が提供される。この方法はケラチノサイト又はこれら細胞の重要な特徴を共有する細胞に基づいているが、他の成分、たとえば、タンパク質も使用することが可能である。この方法は、アレルギー性接触皮膚炎 (ACD)、薬物過敏症反応 (DHR) 及び自己免疫疾患を含むが、これらに限定されないいくつかの状態のために重要である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

感作性について化合物をスクリーニングするための方法であって、

- a) 試験される化合物を選択された範囲の希釈度まで希釈する工程；
 - b) 選択された量の前記化合物の希釈物を、集密まで増殖させたケラチノサイト細胞の層に添加する工程；
 - c) 前記ケラチノサイト細胞と化合物希釈物とを一緒にインキュベートする工程；
 - d) 前記ケラチノサイト細胞を調べてケラチノサイト小疱形成応答を決定する工程；
 - e) 前記ケラチノサイト小疱形成応答を定量化する工程；及び
 - f) 前記ケラチノサイト小疱形成応答を用いて前記化合物の感作性を決定する工程
- を含む上記方法。

10

【請求項 2】

前記ケラチノサイト小疱形成応答が、標準感作物質との比較を用いた小疱形成までの時間、ケラチノサイト細胞がインキュベーション後に小疱を産生した前記化合物の濃度、高濃度の前記化合物での小疱の大きさ、高濃度の前記化合物での小疱の数、並びにノ又は小疱における放出されたタンパク質及びノ若しくはそのネオエピトープの量というパラメータを用いて決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記標準感作物質が、オキサゾロン、1 - クロロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン、m B B r、d B B r、グリオキサール、ホルムアルデヒド及び - ヘキシル桂皮アルデヒドからなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記ケラチノサイト小疱形成応答が、S D S - P A G E 及びノ又はウェスタンブロットによる放出されたタンパク質及びノ又はそのネオエピトープの量と種類の決定、膜プローブを使用する放出された小疱の量の測定、表面プラズモン共鳴の決定、水晶振動子マイクロバランス技術、小疱の放出に関して報告する工学的に操作された蛍光システム、蛍光エネルギー移動現象を示す蛍光標識化技法、絶対小疱数を計測するフローサイトメトリーシステム、細胞形態及び小疱放出を分析するハイスループットスクリーニング、小疱形成応答を分析するマイクロフルイディクス、小疱及びノ又は細胞により放出される特定のタンパク質及びノ又はそのネオエピトープの量を定量化する捕獲システム、光学顕微鏡を使用して及びノ又は小疱形成応答を示す細胞を含有する必要な障壁特徴及び侵入特徴を示すインビトロ上皮組織を使用してケラチノサイト小疱形成応答を決定するケラチノサイト細胞の検査、からなる群から選択される方法により定量化される、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 5】

前記ケラチノサイト小疱形成応答が、S D S - P A G E 及びノ又はウェスタンブロットによる放出されたタンパク質及びノ又はそのネオエピトープの量と種類の決定、膜プローブを使用する放出された小疱の量の測定、小疱及びノ又は細胞により放出される特定のタンパク質及びノ又はそのネオエピトープの量を定量化する捕獲システム、光学顕微鏡を使用してケラチノサイト小疱形成応答を決定するケラチノサイト細胞の検査からなる群から選択される方法により定量化される、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 6】

前記小疱形成応答が、溶液蛍光を用いて溶液中の小疱膜の量を測定することにより、水性媒体中では非蛍光性であるが膜内に挿入されると強い蛍光性になる膜プローブを用いて定量化される、請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記膜プローブが F M 1 - 4 3 である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記小疱形成応答が、小疱及びノ又はケラチノサイト細胞により放出されるタンパク質及びノ又はそのネオエピトープの量を S D S - P A G E 及びノ又はウェスタンブロットを

50

通じて決定することにより定量化される、請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記放出されるタンパク質及び/又はそのネオエピトープが、ケラチン 5、ケラチン 14、ケラチン 1、ケラチン 10、ケラチン 8、ケラチン 18、グルコース - 6 - ホスファターゼイソメラーゼ、移行型小胞体 ATPアーゼ、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、カルモジュリン、インボーチン 5、ケラチン 6 (A、B 及び C)、スタスミン、トランスゲリン - 2、14 - 3 - 3 タンパク質シグマ、カルレティキュリン、エンドプラスミン、ヒートショックプロテイン 90、アクチンベータ、アクチンガンマ、アルファアクチニン、コフィリン 1、エズリン、フィブロネクチン、ミオシン 1c、プラスチン 2、プラスチン 3、チューブリンベータ 2C、アネキシン 2、ペルオキシレドキシニン 1、SSA/Rオリボ核タンパク質、アルファエノラーゼ、並びにペプチジルプロリルシス - トランスイソメラーゼ A からなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

前記放出されるタンパク質及び/又はそのネオエピトープが、ケラチン 5 及びケラチン 14 を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

インキュベーション後、ケラチノサイト細胞の層から液体を吸引する工程、インキュベーション期間中に離昇した可能性のある小胞をケラチノサイト細胞から分離する工程、小胞を溶解する工程、及び全タンパク質濃度を測定することにより小胞形成応答を定量化する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 12】

小胞が、遠心分離を用いてケラチノサイト細胞から分離される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記小胞形成応答が、アレルギー性接触皮膚炎、薬物誘導過敏症応答、化学的に誘導された喘息、食物アレルギーからなる群から選択される病気、及び/又は化合物との上皮接触を通じて引き起こされることのある他の病気についての予測的インビトロ試験として利用される、請求項 1 から 12 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記小胞形成応答を用い、関連するヒト上皮細胞を使用して薬物誘導過敏症反応を引き起こす純粋形態、又は混合物、製剤及び溶液での化合物のリスクを計測する、請求項 1 から 12 までのいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 15】

前記化合物の感作性を用いて、アレルギー性接触皮膚炎におけるリスクを評価する、請求項 1 から 12 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の自己免疫疾患を引き起こす能力を決定する、請求項 1 から 12 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の小胞形成を阻害する能力を決定する、請求項 1 から 12 までのいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の薬物誘導過敏症を引き起こす能力を評価する、請求項 1 から 12 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

感作性について化合物をスクリーニングするためのケラチノサイト細胞の使用。

【請求項 20】

前記化合物の感作性を用いて、前記化合物のアレルギー性接触皮膚炎を引き起こす能力を決定する、請求項 19 に記載の使用。

50

【請求項 2 1】

前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の自己免疫疾患を引き起こす能力を決定する、請求項 1 9 に記載の使用。

【請求項 2 2】

前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の薬物誘導過敏症を引き起こす能力を決定する、請求項 1 9 に記載の使用。

【請求項 2 3】

前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の食物アレルギーを引き起こす能力を決定する、請求項 1 9 に記載の使用。

【請求項 2 4】

化合物との上皮接触により引き起こされることがある状態に対する感作潜在力について化合物、混合物、製剤、及び溶液をインビトロスクリーニングするための製品であって、

- a) 標準化された濃度の試験物質；
- b) ケラチノサイト細胞培養物；及び
- c) 少なくとも 1 つの標準感作物質

を含む、上記製品。

【請求項 2 5】

前記製品が、アレルギー性接触皮膚炎、自己免疫疾患、薬物誘導過敏症反応、食物アレルギー、及び自己中毒のリスクからなる群から選択される状態についてスクリーニングする、請求項 2 5 に記載の製品。

【請求項 2 6】

感作性について化合物、混合物、製剤又は溶液をスクリーニングするためのキットであって、

- a) 少なくとも 1 つのケラチノサイト細胞培養物；
- b) 前記少なくとも 1 つのケラチノサイト細胞培養物を集密的増殖まで増殖するための手段；
- c) 前記化合物、混合物、溶液の製剤を選択された範囲の希釈度まで希釈するための手段；
- d) 前記少なくとも 1 つのケラチノサイト細胞培養物を増殖するための手段及び希釈するための手段を使用するための使用説明書

を含む、上記キット。

【請求項 2 7】

少なくとも 1 つの標準感作物質をさらに含む、請求項 2 6 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は一般的には免疫学に関する。さらに具体的には、本発明は化合物の感作性をスクリーニングするための方法に関する。本方法は、アレルギー性接触皮膚炎（ACD）、薬物過敏症反応（DHR）及び自己免疫疾患を含むがこれらに限定されない、いくつかの状態にとって重要である。

【背景技術】**【0002】**

皮膚は、自己と非自己間の主要な障壁であり、脱水、並びに、たとえば、微生物、化学物質及び紫外線への曝露の有害な効果から我々を保護している。皮膚は我々の周囲の化合物から保護できないことがあり、そうすると、とりわけ、刺激性接触皮膚炎（ICD）又はアレルギー性接触皮膚炎（ACD）を生じることがある。ACDは恒久的な特異的免疫性過敏症反応であり、ICDは非免疫学的局所的炎症反応である。ACDは西洋世界の人口の15～20%を冒し、ヒトに見出されるなかで最も蔓延している形態の免疫毒性である。ACDは一般的職業病なので、かなりの心理社会的及び社会経済的影響がある。

【0003】

A C Dは皮膚障壁に入りこむ小分子（ハプテン）により引き起こされる。個人が感作されると、今日では治療法はないが、障害を起こす化合物及びいかなる交差反応化合物も避けなければならなくなる。ニッケル、保存料及び芳香剤などの普通に存在するアレルゲンのせいでこれを実行するのは非常に困難になりうる。A C Dを引き起こす可能性のある化合物の増え続ける一覧表には、現在、4000を超える物質が含まれる。化合物の感作性を予想するためには、O E C D承認の現在のベンチマーク試験は、マウス局所リンパ節試験（L L N A）である（局所リンパ節アッセイ及び相対効力の評価：バリデーションの状況。Basketter D A、Gerberick F、Kimber I. Contact Dermatitis. 2007 Aug; 57(2): 70~5）。しかし、E U指令によれば、化粧品及びトイレット成分のインビボ試験の禁止は、2013年から実施されることになっている。したがって、このベンチマーク試験に取って代わることができる代替法の必要性が存在する。

10

【0004】

皮膚は重層化された組織であり、最外側層は表皮と呼ばれている。表皮は、今度は、死んだ層（角質層、S C）と生きた表皮に細分することが可能である。表皮は主に（約95%）ケラチノサイトで構成されている。これらには、特殊化した抗原提示細胞（ランゲルハンス細胞）、メルケル細胞及びメラニン細胞が分散している。ケラチノサイトの名称の由来はケラチンと呼ばれるその大量のI型及びII型の間径フィラメントである。これらの構造タンパク質が、基本的に、表皮（及び上皮）に高い引っ張り強度を与えている。上皮組織は、細胞型と発生段階に応じて、異なった対のケラチンを発現する。重層上皮の基底層のケラチノサイトは、主にケラチン5/ケラチン14（K5/K14）対を発現し、そのタンパク質含有量の最大35%はK5及びK14である。この対は基底層においてはK1/K10対で置き換えられ、この対は完全に分化したケラチノサイトの全細胞含有量の約80~85%も占めている。要約すると、表皮は主にケラチノサイトで構成されており、これは今度は、非常に高含有量のケラチンを有する。

20

【0005】

ケラチンは不溶性フィラメントの束を形成して細胞内骨格を与える。基底層の細胞（表皮中唯一の有糸分裂層）がアポトーシスを受けると（正常な増殖調節の一部として）、そうでなければアミロイド斑を形成すると考えられる不溶性ケラチンを処理する機序が準備を整えている。このようにアポトーシスを受ける基底ケラチノサイトは、アポトーシス小胞において細胞残遺物と共にケラチンを一掃する。皮膚では、これらはケラチン小体と呼ばれる。ケラチン小体は基底膜から抜け落ち、次に樹状細胞により貪食される。

30

【0006】

A C Dは、T細胞により媒介されることが明らかにされている。T細胞媒介は、リンパ節におけるナイーブT細胞へのペプチドのM H C（主要組織適合性複合体）拘束及び提示を通じて生じる。M H C分子はペプチドを8~10アミノ酸（M H CクラスI）、又は9~25アミノ酸（M H CクラスII）の桁で提示するために、したがって、ハプテン自体は、T細胞媒介免疫応答を保証するには小さすぎる。それよりむしろ、Landssteiner及びJacobsonにより早くも1935年に発表された影響力の強い論文では、感作の重要なステップは、自己を非自己に変える担体タンパク質へのハプテンの共有結合を通じた完全アレルゲンの形成であると提案されている。既知のハプテンの一覧表を調べてみると、共通の特徴、すなわち、ハプテンは典型的には小型で（1000Da）、疎水性であり（log P 2）、求電子性基を含有することが多いことが明らかになる。したがって、自己を非自己に変える共有結合は、主に、ハプテン上の求電子性基とタンパク質の求核部分との間の反応として想定される。代わりに、1つ（単座）ではなく2つの反応基（二座）を含有するハプテンの場合、2つの自己タンパク質の架橋結合も起こりえる。求電子性部分含有しない一見無害な化合物もアレルゲン性になりえる。これらの化合物は、身体外で自己酸化され若しくは光酸化され（プレハプテン）又は皮膚で代謝され（プロハプテン）、強力なハプテンを形成することができると提案されてきた。

40

50

【0007】

現在認められた説は、化合物は以下のステップを経てA C Dを引き起こす。すなわち、化合物は表皮に侵入し、そこでタンパク質にコンジュゲートする。皮膚に存在する樹状細胞によるハプテン化されたタンパク質の取込み/プロセッシング。これまで焦点は表皮のランゲルハンス細胞に合わされていたが、最近では皮膚樹状細胞のほうが関心を集めてきている。それに続く、ランゲルハンス細胞のハプテン誘導成熟及び遊走。成熟ランゲルハンス細胞は、流入領域リンパ節においてナイーブT細胞にMHCクラスI又はII拘束された(ハプテンの性質に応じて)ハプテン化されたペプチドを提示する。ヘルパーT細胞(T_H)及び/又は細胞傷害性T細胞(T_C)は増殖し、循環に入る。罹患した人は今や感作されている。

10

次に前記ハプテンに遭遇すると、アレルギーが誘発される。アレルギー症候群を回避する唯一の方法は、今後、前記ハプテン及びいかなる交差反応化合物も避けることである。

【0008】

上記のように、感作における重要なステップは、このように自己を非自己に変える担体タンパク質へのハプテンの共有結合を通じた完全アレルゲンの形成であると提案されている。感作を解読するためには、ハプテン化されたタンパク質を、全背景のプロテオームに対して分子精度で抜きだし、最後には標的タンパク質(単数又は複数)及びハプテン化の正確な位置を同定する必要がある。これはこれまで実現されたことがない。

【0009】

薬物過敏症反応(DHR)は主要な問題であり、DHRの背後にある機序は完全には分かっていない。DHRは、すべての薬物有害反応のほぼ3分の1を表し、重篤になることがあり、入院加療が必要となることがあり、薬物処方の変更を必要とする。7%を超える人口が関係しているので、これは重要な公衆衛生問題である。DHRは、不運にも予想不可能であり、前向き臨床研究は実施するのが極めて困難である。動物モデル(ラット、モルモット、ネコ、イヌ)の使用は、化合物のDHRを引き起こす可能性を試験するほとんど唯一の方法である。

20

【0010】

しかし、DHRは動物でも予測不可能であるために、ある種の動物モデルがヒトにおける効果を正しく予測するのかがどうかを前もって入手し知るのは困難である。化合物の感作性(すなわち、皮膚接触を通じて適応免疫応答を誘導する能力)を予測するために、現在のベンチマーク試験はOECD承認LLNAである。EU指令によれば、化粧品及びトイレットリー成分のインビボ試験の禁止は、2013年から実施されることになっている。不運にも、免疫系がハプテンによりどのようにして誘発されるのかについての分子理解なしでは、LLNAに安全に取って代わることが可能なインビトロ又はインシリコ(コンピュータ)モデルは存在しえない。動物に取って代わるためには、複雑な生物学的背景で起きている多数のステップをインビトロで再現しなければならなくなる。主に細胞生物学者及び免疫学者によるEU指令主導のSENS-it-iveでは、多数の研究グループがLLNAのインビトロ代替物に向けて取り組んでいる。彼らのワークパッケージは、以前に発表された報告、すなわち、世界的ゲノム解析、免疫蛍光アッセイ、等に類似する戦略の連続体/拡張を詳しく述べている。化粧品、トイレットリー及び香水産業(COLIPA)の欧州事業者団体は、類似の専門委員会及び戦略を有している。これらの試みすべての共通の欠点は、主要なハプテン標的を発現しない不適切な細胞型が使用されてきたことである。先行技術において細胞試験でケラチノサイトが存在していた場合、ケラチノサイトは大部分、炎症シグナルを提供していると見なされてきた。

30

40

【0011】

A C Dの背後で支配しているプロセスを詳細に理解する代わりに、インビトロ代替物を作り出すことに向けられた主要な努力はすべてが、これまでのところ、表皮の抗原提示細胞に焦点を合わせてきた(樹状細胞及び皮膚感作:有害性同定における生物学的役割及び使用。Ryan CA、Kimber I、Basketter DA、Pallardy M、Gildea LA、Gerberick GF. Toxicol Appl

50

Pharmacol. 2007 Jun 15; 221(3): 384~94)。これは認められた説と一致していた(上記参照)。本発明は、これが焦点を合わせるには不適切な細胞型であることを明らかにすることになる。

【0012】

他の大きな欠点は、読出しが均一ではなく、生細胞においてはリアルタイムで行われたことがないことである。典型的な試験は、細胞ライセートにおけるRT-PCR及び/又は免疫蛍光アッセイを使用する。しかし、ELISA試験は完了するのに2日かかり、ハプテン濃度及び時点の調査/最適化を妨げる可能性がある。時間がかかる、数多くの洗浄及び(抗体)処理ステップも、実験の人為的結果及びエラーを招くことがある。ホールセルアッセイは、実験の人為的結果を招くことなく、迅速な測定を可能にする。さらに、ハイスループットスクリーンでは、資源を要求し費用がかかるかなりの量の特定の抗体を使用しなければならず、実際、抗体を得るための動物の使用が必要になる。本発明のスクリーニング法は、いわゆる生細胞の小胞形成に基づいており、抗体を使用することなくリアルタイムでの読出しを提供し、ハイスループットな形態でのスケールアップを直接受け入れやすい。

10

【0013】

細胞ベースの試験での他の以前の試みでは、標準化された濃度のハプテンを使用する代わりに、>80%の細胞(樹状細胞/細胞系)生存率をもたらす濃度のハプテンを使用することが標準法であった。これは、細胞毒性効果を回避するために行われる。これは、不適切な細胞型の使用に加えて2つの大きな欠点を招く結果になる。第一に、感作化は、多数のケラチノサイト死滅が膜小胞の駆逐を引き起こすことと関係がある。したがって、高生存率を保つことに基づく細胞アッセイは、誤った結果をもたらすことになる。本発明の試験方法は、代わりに、免疫系が、大量の潜在性エピトープ及びネオエピトープ(別々にプロセッシングされる及び/又はハプテン化される)に曝露される身体中で起こるプロセスに基づいている。第二に、感作化のために、物質を互いに比較することが非常に困難/不可能になる。すべてが異なった濃度であり及び/又は異なった時点である(多くの以前の細胞ベースの試験のように)ならば、物質Aの応答を対照物質と標準化する又はAを物質Bと比較することもほぼ不可能である。本試験方法は、標準化された濃度の試験物質を使用し、直接の比較及び標準化を可能にする。これらの点は、段階的応答を得るのに不可欠な特長である(下記参照)。

20

30

【0014】

要約すれば、現在まで、インビトロ細胞ベースのプロセスにおいて感作過程を正確に再現することが可能であったことはない。インビトロ試験に対する現在の試みは身体で起こっているプロセスに基づいていない。しかし、本明細書には、感作化中に身体で起こる実際の機序についての知見に基づく、化合物の感作潜在力についての予測的細胞ベースインビトロ試験が提供される。ヒトケラチノサイトは試験の土台として使用され、小胞形成応答は化合物が生ケラチノサイトに添加されるときに測定される。小胞形成応答(類別及び測定された出力、等を用いて)を使用して、異なる化合物、混合物、製剤及び溶液との上皮接触により引き起こされるDHR、自己免疫疾患及び他の状態のリスクを測定することも可能である。

40

【発明の概要】

【0015】

本発明の目的は、アレルギー性接触皮膚炎(ACD)におけるケラチノサイトの役割についての知識を使用してACDについて化合物をスクリーニングする新しい方法を創り出すことである。

【0016】

別の目的は、ケラチノサイト並びにケラチン及び他のタンパク質の分析を使用してACDについて化合物をスクリーニングすることである。

【0017】

別の目的は、ACDについてスクリーニングするインビトロ試験において小胞という概

50

念を使用することである。

【0018】

別の目的は、ACDについて異なる化合物をスクリーニングするための製品及びキットを提供することである。

【0019】

別の目的は、感作化及び/又は自己免疫疾患の発生を防ぐために、小疱形成応答を阻害する異なる化合物をスクリーニングするための製品及びキットを提供することである。

【0020】

別の目的は、薬物製剤への曝露後の小疱の放出を防ぐために、小疱形成応答を阻害する異なる化合物をスクリーニングするための製品及びキットを提供することである。

10

【0021】

別の目的は、本発明を使用して、上皮細胞との接触（経口、目、吸入を通じて、等）を通じて罹るアレルギーにおけるリスク評価のために化合物をスクリーニングすることである。

【0022】

別の目的は、本発明を使用して、薬物誘導過敏症及び自己免疫疾患におけるリスク評価のために化合物をスクリーニングすることである。

【0023】

別の目的は、本発明を使用して、小疱形成応答を阻害する可能性について化合物をスクリーニングすることである。

20

【0024】

本発明の別の目的は、本発明を使用して見出される、小疱形成を阻害する分子（すなわち、阻害剤）を使用することである。

【0025】

本発明の別の目的は、前記同定された阻害剤の構造類似物を使用することである。

【0026】

本発明の別の目的は、感作性について化合物をスクリーニングするための方法であって、

a) 試験される化合物を選択された範囲の希釈度まで希釈する工程；

b) 選択された量の前記化合物の希釈物を集密まで増殖させたケラチノサイト細胞の層に添加する工程；

30

c) 前記ケラチノサイト細胞と化合物希釈物とを一緒にインキュベートする工程；

d) 前記ケラチノサイト細胞を調べてケラチノサイト小疱形成応答を決定する工程；

e) 前記ケラチノサイト小疱形成応答を定量化する工程；及び

f) 前記ケラチノサイト小疱形成応答を用いて前記化合物の感作性を決定する工程を含む上記方法を提供することである。

【0027】

前記方法は、ケラチノサイト小疱形成応答が、標準感作物質との比較を用いた小疱形成までの時間、ケラチノサイト細胞がインキュベーション後に小疱を産生した化合物の濃度、高濃度の化合物での小疱の大きさ、高濃度の化合物での小疱の数並びに/又は小疱における放出されたタンパク質及び/若しくはそのネオエピトープの量というパラメータを用いて決定されることをさらに含んでいてもよい。

40

【0028】

前記方法は、標準感作物質が、オキサゾロン、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン、mBBR、dBBR、グリオキサール、ホルムアルデヒド及び -ヘキシル桂皮アルデヒドからなる群から選択されることをさらに含んでいてもよい。

【0029】

前記方法は、ケラチノサイト小疱形成応答が、SDS-PAGE及び/又はウェスタンブロットによる放出されたタンパク質及び/又はそのネオエピトープの量と種類の決定、膜プローブを使用する放出された小疱の量の測定、表面プラズモン共鳴の決定、水晶振動

50

子マイクロバランス技術、小疱の放出に関して報告する工学的に操作された蛍光システム、蛍光エネルギー移動現象を示す蛍光標識化技法、絶対小疱数を計測するフローサイトメトリーシステム、細胞形態及び小疱放出を分析するハイスループットスクリーニング、小疱形成応答を分析するマイクロフルイデクス、小疱及び/又は細胞により放出される特定のタンパク質及び/又はそのネオエpiteーブの量を定量化する捕獲システム、光学顕微鏡を使用して及び/又は小疱形成応答を示す細胞を含有する必要な障壁特徴及び侵入特徴を示すインピトロ上皮組織を使用してケラチノサイト小疱形成応答を決定するケラチノサイト細胞の検査、からなる群から選択される方法により定量化されることをさらに含んでいてもよい。

【0030】

前記方法は、小疱形成応答が、溶液蛍光を用いて溶液中の小疱膜の量を測定することにより、水性媒体中では非蛍光性であるが膜内に挿入されると強い蛍光性になる膜プローブ（たとえば、FM 1-43）を用いて定量化されることをさらに含んでいてもよい。

【0031】

前記方法は、小疱形成応答が、小疱及び/又はケラチノサイト細胞により放出されるタンパク質及び/又はそのネオエpiteーブの量をSDS-PAGE及び/又はウェスタンブロットを通じて決定することにより定量化されることをさらに含んでいてもよい。

【0032】

前記方法は、小疱及び/又はケラチノサイトにより放出されるタンパク質及び/又はそのネオエpiteーブが、ケラチン5、ケラチン14、ケラチン1、ケラチン10、ケラチン8、ケラチン18、グルコース-6-ホスファターゼイソメラーゼ、移行型小胞体ATPアーゼ、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、カルモジュリン、インポーチン5、ケラチン6（A、B及びC）、スタスミン、トランスゲリン-2、14-3-3タンパク質シグマ、カルレチキュリン、エンドプラスミン、ヒートショックプロテイン90、アクチンベータ、アクチンガンマ、アルファアクチニン、コフィリン1、エズリン、フィブロネクチン、ミオシン1c、プラスチン2、プラスチン3、チューブリンベータ2C、アネキシン2、ペルオキシレドキシシン1、SSA/Rオリボ核タンパク質、アルファエノラーゼ、並びにペプチジルプロリルシス-トランスイソメラーゼAからなる群から選択されることをさらに含んでいてもよい。

【0033】

小疱形成応答を定量化するために、前記方法は、インキュベーション後、ケラチノサイト細胞の層から液体を吸引する、インキュベーション期間中に離昇した可能性のある小疱をケラチノサイト細胞から分離する（たとえば、遠心分離を用いて）、小疱を溶解する、及び全タンパク質濃度を測定することにより小疱形成応答を定量化することをさらに含んでいてもよい。

【0034】

前記方法は、アレルギー性接触皮膚炎、薬物誘導過敏症応答、化学的に誘導された喘息、食物アレルギーからなる群から選択される病気、及び/又は化合物との上皮接触を通じて引き起こされることのある他の病気についての予測的インピトロ試験として小疱形成応答が利用されることをさらに含んでいてもよい。

【0035】

前記方法は、小疱形成応答を用い、関連するヒト上皮細胞を使用して薬物誘導過敏症反応を引き起こす純粋形態、又は混合物、製剤及び溶液中の化合物のリスクを計測することをさらに含んでいてもよい。

【0036】

前記方法は、前記化合物の感作性を用いて、アレルギー性接触皮膚炎におけるリスクを評価することをさらに含んでいてもよい。

【0037】

前記方法は、前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の自己免疫疾患を引き起こす能力を決定することをさらに含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0038】

前記方法は、前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の小疱形成を阻害する能力を決定することをさらに含んでいてもよい。

【0039】

前記方法は、前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の薬物誘導過敏症を引き起こす能力を評価することをさらに含んでいてもよい。

【0040】

本発明の別の目的は、感作性について化合物をスクリーニングするためにケラチノサイト細胞を使用することである。

【0041】

このスクリーニングは、前記化合物の感作性を用いて、前記化合物のアレルギー性接触皮膚炎を引き起こす能力を決定することをさらに含んでいてもよい。

【0042】

このスクリーニングは、前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の自己免疫疾患を引き起こす能力を決定することをさらに含んでいてもよい。

【0043】

このスクリーニングは、前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の薬物誘導過敏症を引き起こす能力を決定することをさらに含んでいてもよい。

【0044】

このスクリーニングは、前記化合物の感作性を用いて、前記化合物の食物アレルギーを引き起こす能力を決定することをさらに含んでいてもよい。

【0045】

本発明の別の目的は、化合物との上皮接触により引き起こされることがある状態に対する感作潜在力について化合物、混合物、製剤、及び溶液をインビトロスクリーニングするための製品であって、

- a) 標準化された濃度の試験物質；
 - b) ケラチノサイト細胞培養物；及び
 - c) 少なくとも1つの標準感作物質
- を含む、上記製品を提供することである。

【0046】

この製品は、前記製品が、アレルギー性接触皮膚炎、自己免疫疾患、薬物誘導過敏症反応、食物アレルギー、及び自己中毒のリスクからなる群から選択される状態についてスクリーニングすることをさらに含んでいてもよい。

【0047】

本発明の別の目的は、感作性について化合物、混合物、製剤又は溶液をスクリーニングするためのキットであって、

- a) 少なくとも1つのケラチノサイト細胞培養物；
 - b) 前記少なくとも1つのケラチノサイト細胞培養物を集密的増殖まで増殖するための手段；
 - c) 前記化合物、混合物、溶液の製剤を選択された範囲の希釈度まで希釈するための手段；
 - d) 前記少なくとも1つのケラチノサイト細胞培養物を増殖するための手段及び希釈するための手段を使用するための使用説明書
- を含む上記キットを提供することである。

【0048】

前記キットは、少なくとも1つの標準感作物質をさらに含んでいてもよい。

【0049】

本発明の他の目的及び利点は読者には明らかになり、これらの目的及び利点は本発明の範囲内であることは意図されている。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

【 図 1 】 図 1 A は、感作物質が皮膚と接触すると何が起こるかに関する本明細書の知見を図示する概略図である。図 1 B は、ケラチノサイトがインビトロにおいて感作物質 / 試験化合物に曝露されるとケラチノサイトにより示される小疱形成応答を図示する概略図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 5 1 】

定義

本明細書で使用されるように、用語「ケラチノサイト」又は「ケラチノサイト細胞」は、始原ヒトケラチノサイト、又は他の哺乳動物由来のケラチノサイトを意味するように意図されている。前記用語は、成人始原ヒト表皮ケラチノサイト (H E K a) 若しくは新生児始原ヒト表皮ケラチノサイト (H E K n) などの始原、不死化及び幹細胞培養系又は H a C a T などの H E K n 特徴を有する細胞系をさらに含んでいてもよい。

10

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用されるように、用語「ケラチン (単数又は複数) 」は、皮膚、毛髪及び爪の重要な構造成分のうちの 1 つである線維状構造タンパク質のケラチンタンパク質ファミリーを意味するように意図されている。前記用語は、特定のケラチンサブタイプのケラチン 1、5、8、10、14 及び 18 を意味するように主として意図されているが、これらに限定されない。

20

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用されるように、用語「ハプテン」は、ヒト人体において内在性巨大分子、たとえば、タンパク質と免疫原性複合体を形成し、適応免疫系を活性化することができる生体異物化合物を意味するように意図されている。一般的に、前記用語は、皮膚障壁を破り、そこでタンパク質と反応したときに、たとえば、接触アレルギーを引き起こすことができる生体異物化合物のことであるが、たとえば、皮下に、静脈内に、経口的に、しかし、これらに限定されない他の入口経路を有する化合物のことでもありえる。

30

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用されるように、用語「ハプテン化」は、ハプテンと巨大分子、たとえば、タンパク質間の反応及び複合体形成を意味するように意図されており、「ハプテン化されたタンパク質」は、形成されたハプテン - タンパク質複合体、すなわち、ハプテンに結合しているタンパク質を意味するように意図されている。

40

【 0 0 5 5 】

本明細書で使用されるように、用語「ハプテン化部位」又は「ハプテン化位置」は、ハプテンが反応する特定のタンパク質の特定のアミノ酸、すなわち、タンパク質上のハプテンの正確な位置を意味するように意図されている。

【 0 0 5 6 】

本明細書で使用されるように、用語「小疱」又は「小疱形成」は、膜小胞の形成及び細胞からの放出を意味するように意図されている。小疱形成は膜突起が形成されるプロセスである。小疱は、細胞の細胞膜で形成される突起であり、この突起は最終的に細胞から周囲の培地中に解離する又は出芽する。小疱は一般的には球状性質であり、径が約 1 μm から約 100 μm の細胞膜二重層からなる。用語「ケラチノサイト小疱形成応答」は、特に、ケラチノサイト又はすでに記載されているケラチノサイト型の細胞からの膜脂質小胞の細胞駆逐を意味するように意図されている。

40

【 0 0 5 7 】

明細書で使用されるように、用語「感作」は、個人が、たとえば、接触アレルギー化合物、すなわち、巨大分子と免疫原性複合体を形成することにより、適応免疫系を活性化するハプテンに曝露される免疫過程を意味するように意図されている。

【 0 0 5 8 】

明細書で使用されるように、用語「誘発」は、個人が感作される化合物の再曝露による、又は任意の交差反応性化合物の曝露による個人の皮膚炎症反応を意味するように意図さ

50

れている。

【 0 0 5 9 】

明細書で使用されるように、用語「タンパク質誘導体化」は、化合物（たとえば、ハプテン）がタンパク質に結合する事象を意味するように意図されている。

【 0 0 6 0 】

明細書で使用されるように、用語「アレルギー性接触皮膚炎（ACD）」は、個人が感作される接触アレルゲン（ハプテン）、又は任意の交差反応性化合物に再曝露されたときに個人が発症する皮膚免疫学的過敏性反応の臨床症状を意味するように意図されている。

【 0 0 6 1 】

明細書で使用されるように、用語「薬物過敏症反応（DHR）」又は「タンパク質薬物誘導過敏症反応」は、薬物がハプテンとして作用し、内在性のタンパク質と共有結合して感作を、その後の再曝露では誘発を引き起こす、薬物への免疫媒介反応を意味するように意図されている。

10

【 0 0 6 2 】

明細書で使用されるように、用語「自己免疫疾患」は、免疫応答が、通常、身体中に存在している内在性物質、成分及び組織に対して反応する疾患を意味するように意図されている。これには、関節炎リウマチ、SLE（全身性エリテマトーデス）、シェーグレン症候群（SS）、I型糖尿病及び乾癬などの疾患を含むことになるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 3 】

明細書で使用されるように、用語「標準感作物質」は、接触アレルギーを引き起こすことが知られている化合物を意味するように意図されている。これには、アレルギー試験のための標準パッチ試験シリーズに通常、存在する化合物、たとえば、ホルムアルデヒド、芳香混合物、及びパラベンを含むことになるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 6 4 】

明細書で使用されるように、用語「集密」は、細胞による細胞培養皿又はフラスコ又は別の材料の完全な又はほとんど完全な（少なくともほぼ50～60%の被覆度）被覆を意味するように意図されている。

【 0 0 6 5 】

明細書で使用されるように、用語「潜在性エピトープ」又は「ネオエピトープ」は、ハプテン化されたペプチド及びタンパク質、並びに/又は通常ならばプロセッシングされていたと考えられるようにはプロセッシングされていないタンパク質及びペプチド、並びに/又は架橋したタンパク質を意味するように意図されている。したがって、これらのエピトープは通常、免疫系から隠されている。

30

【 0 0 6 6 】

明細書で使用されるように、用語「エピトープ拡大」は、支配的なエピトープとは異なり、それとは非交差反応性のエピトープへの免疫応答の発展を意味するように意図されている。

【 0 0 6 7 】

通説とは反対に、本発明者らは、驚くべきことに、ヒトACDでは、ケラチノサイトが感作過程において決定的に重要な役割を果たしていることを発見した。ヒト皮膚の進化的防御システムは、大きな寄生生物、ウイルス及び微生物に向けられている。しかし、このために、反応性ハプテンの基底ケラチノサイトまでの下向及びその中への侵入を可能にする理想的重層化した生理化学的特性が生じることを明らかにすることが可能である。さらに、他のタンパク質に加えて、重要な標的はケラチンであり、具体的には、ヒト皮膚エクサープトにおけるケラチン5及び14（K5及びK14）であることが見出されている。特に、K5のアミノ酸システイン54（C54）は、ヒト組織及び始原ヒトケラチノサイトにおけるチオール反応性ハプテンの標的として同定されている。この残基は、デスモラキンのC末端テールと決定的に重要な非共有接触をし、それによって、デスモソーム（細胞-細胞）及びヘミデスモソーム（細胞-基底膜）を通じて細胞をその周囲と固定化

40

50

するアミノ酸のストレッチに位置している。近くの残基が変更されると、ケラチン - デスマブラキン相互作用を実質的に減らし、それによって、細胞 - 細胞及び細胞 - マトリックス相互作用を減らして、ホームレス細胞を生じることが明らかにされている。上皮細胞がその周囲との接触を失うならば、増殖調節過程の準備が整って誤った植民地化を防ぐ。したがって、ホームレス上皮細胞はアノキス、すなわち、「家がない」ことにより引き起こされるアポトーシスが運命付けられる。アポトーシス中、膜小胞、いわゆる「小疱」が細胞表面上に出現することがある。次に、細胞は、アポトーシス小体と呼ばれるさらに小さな断片に分解する。その後、食細胞が、炎症反応を引き起こすことなくアポトーシス小体を貪食する。小疱形成は一般的現象であり、アポトーシスに加えて、不運動性胚割球において、及びいくつかの細胞遊走事象において、たとえば、細胞分裂の細胞質分裂段階中に小疱形成が起きる。

10

【0068】

ヒトケラチノサイトに関する研究を通じて、ハプテンはケラチン（及び他のタンパク質）を共有結合的に修飾すること、並びにmBBR（モノプロモビマン）などのチオール反応性ハプテンがK5のC54を修飾することを明らかにすることができる。さらに、ヒトケラチノサイトに関する研究を通じて、ハプテンは、タンパク質中の異なる求核基に対して向けられるが、小疱形成を引き起こし、したがって潜在性エピトープ及びネオエピトープ（たとえば、ハプテン化されたペプチド及びタンパク質、並びにノ又は通常ならばプロセシングされていたと考えられるようには処理されていないタンパク質及びペプチド）を放出することが明らかにされている。ウェスタンブロット実験を通じて、大部分アミン指向のハプテンオキサゾン及び大部分アルギニン反応性ハプテングリオキサル由来の小疱もK5及びK14を含有することが明らかにされる。さらに、刺激物質（たとえば、ドデシル硫酸ナトリウム、SDS）及び非アレルギー性化合物（たとえば、ノナン酸）は小疱形成を開始しないことも明らかにされている。前記の説は実験動物（マウス）由来の血清でELISA実験を実施することによりインビボ背景では妥当であることが明らかにされる。感作化合物に（皮膚接触を介して）曝露されていた動物由来の血清では、K14に対する抗体が検出された。さらに、一部の感作化合物（dBBR（ジプロモビマン）を含むが、これに限定されない）と接触すると、血清アミロイドP成分（SAP）などの急性期タンパク質のレベルが増加することが見出された。通常、SAPの血漿濃度は炎症に呼応して増加する。慢性炎症は、自然免疫防御のせいで、自己攻撃（自己毒性）をもたらすことがあることは知られている。SAPのレベルが増加することは、アルツハイマー病などの自己毒性疾患においては一般的特長である。

20

30

【0069】

文献に基づけば、共有結合的修飾は、十中八九、ホームレス上皮細胞による誤った植民地化を防ぐ短絡防御機序である。要約すると、ハプテンは基底層まで侵入して降り、基底ケラチノサイトに入り、K5及びK14（及び他のそれほど豊富ではないタンパク質）と反応し、こうして小疱形成を引き起こし、ケラチン小体（すなわち、他の細胞残遺物の中でもハプテン化された、すなわち、ケラチンの他に他のタンパク質を含む非自己タンパク質を含有する小疱）を形成し、これは基底膜の下に落ちて、そこでそのネオ及びノ又は潜在性エピトープは抗原提示細胞（樹状細胞）により貪食される。このように、この過程により、免疫系は大量の潜在性エピトープに曝露され、さらにそのタンパク質の一部はハプテン化される、すなわち、非自己になる。ハプテン化は、ネオエピトープが曝露されるようにタンパク質のプロセシングにも影響を与えうる。これらの面のすべてがおそらく個人を感作する一因である。エキソソームを含むが、これに限定されないもっと小さな小疱も感作の一因になることは排除されない。おそらく角質層と基底層の両方において、ハプテンが再びケラチン、ケラチン由来ペプチド及びノ又は他のタンパク質を誘導体化すると、誘発が起こる。当然のことながら、他のタンパク質も誘導体化されることがあるが、しかし、ケラチノサイトは表皮において細胞の約95%を構成しており、ケラチンは完全に分化したケラチノサイト中の全細胞タンパク質の80%を構成している。注目すべきは、K5はK1などの他のII型ケラチンと相同であり、K14はK10などの他のI型ケラ

40

50

チンと相同である点である。したがって、化合物が基底上層においてK 1及びK 10と反応する誘発期には、相同エピトープが産生される。したがって、感作においても誘発においても、ケラチンが誘導体化されるので、身体は大量の高度に相同な/同一の再発エピトープにさらされることになる。

【0070】

さらに、本研究から生じるのが、化合物への上皮曝露による再発エピトープという説である。すべての重層化扁平上皮基底細胞は標的タンパク質を極めて大量に発現する（細胞含有量の最大35%）。上皮細胞は身体全体の構造体の腔及び表面を裏打ちしており、多くの腺も表皮組織から形成される。たとえば、K 5抗体は、気管支（呼吸器上皮細胞）、頸部、精巣上体、食道、上咽喉、口腔粘膜、前立腺、唾液腺、膀胱、扁桃腺中の扁平上皮細胞、膺及び外陰部/肛門皮膚などの組織中の細胞を染色する。肺中のマクロファージも染色される。ヒト角膜上皮もK 5では染色する。K 14（及びK 15）はK 5と一組で発現されるので、K 14もこれらの組織及び細胞中に存在する。単純上皮細胞は相同なK 8/K 18対を発現するという事実と組み合わせると、したがってその結果は、身体中への化合物の進入経路とは無関係に、同一の又は高度に相同なエピトープに遭遇する一般的機序を示している。したがって、小疱形成応答の分析に他の上皮細胞及び上皮組織を使用するのは本発明の範囲内である。

10

【0071】

したがって、小疱形成応答は、たとえば、ACD、DHR、しかし化学的に誘導される喘息も含み、化合物との上皮接触を通じて引き起こされることがある他の病気も排除しない様々な病気の予測的インビトロ試験として利用することが可能である。身体中への化合物の進入経路とは無関係に、同一の又は高度に相同なエピトープに遭遇するという知見（K 5/K 14及びK 8/K 18により例証される）は、他の意味を有する。したがって、化合物との上皮接触（たとえば、皮膚を介して）のせいで基底ケラチノサイトが死滅し、小疱を放出すると、ケラチン（及び他のタンパク質）に対する自己抗体（及びおそらく記憶T細胞）が産生され、個人はこの時点で感作されている。薬物などの別の無関係な化合物が摂取される/吸入される/又は他の方法で上皮組織と接触する場合、前記化合物は基底上皮細胞と反応することがあり、小疱形成も引き起こすことがある。個人がすでにそれに対する自己抗体を有するのと同じエピトープが再び小疱において放出される。次に、前記タンパク質エピトープに対する循環している記憶T細胞及び/又は自己抗体が動員されて、薬物過敏症反応（DHR）が観察される。このように、一部のDHR（固定薬疹を含むが、これに限定されない）では、化合物が上皮細胞とどのようにして相互作用をするのかに関して、同じ機序が機能している可能性が高い。前記応答は大部分、放出された自己タンパク質に対して向けることが可能であるので、これらの知見は、個人が問題の薬物に以前一度も曝露されなかったことがない場合でも、DHRを観察することができる理由を説明している。この仮説も、薬物誘導過敏症反応においては基底ケラチノサイトが標的にされるという知見によって実証される（薬物反応における皮膚の基底細胞と反応性の循環する抗体の発生率。T van Joost, Acta Dermatovener (Stockholm) 54: 183~188, 1974)。

20

30

【0072】

したがって、小疱形成応答は、関連のあるヒト上皮細胞を使用して薬物誘導過敏症反応（DHR）を引き起こす化合物（純粋な形、混合物、製剤、溶液中、等）のリスクも計測することが可能である。このように、本明細書に提示される発明は、上皮接触による薬物有害反応についての予測的スクリーニングの大きな前進を表している。

40

【0073】

さらに、本発明者らは、ハプテン化により、他の方法では免疫系に到達できない潜在性エピトープ、及び/又は別々にプロセッシングされているネオエピトープが放出されることを明らかにしている。これは、接触アレルギーについてのみならず、自己免疫疾患における自己寛容の違反に関して緊急な意味を有する。この仮説は、マウス血清中のK 14に対する自己抗体についての我々の知見により裏付けられている。すなわち、

50

E L I S A は、ハプテン化されたタンパク質に対する抗体ではなく、タンパク質それ自体に向かう抗体を測定する。たとえ実験が、倫理的な理由で、マウスで実施されるにしても、ヒトも感作物質に皮膚接触すると自己抗体を発生させる可能性は高い。小疱形成が煽動され自己寛容が違反される（すなわち、K 5 及び K 1 4 に対する寛容の違反、上記の他のタンパク質に対する寛容の違反、相同性を通じたエピトープ拡大、リボ核タンパク質のような他のアポトーシス残渣の放出、等）と、身体内で多くの過程が起こりうる。

【 0 0 7 4 】

これらの自己免疫疾患の例には、S L E（全身性エリテマトーデス）；リウマチ（R A）；シェーグレン症候群（S S）；及びI型糖尿病が含まれるが、他の自己免疫疾患を排除しない。とりわけ、これらの疾患（及び他の自己免疫疾患）中、ケラチンに対する自己抗体は文献において報告されてきた。その上、ケラチノサイトは、アトピー性皮膚炎に罹った患者由来の血清中に見出される自己抗体の標的である。したがって、小疱形成応答に関するこの知見を使用すれば、自己寛容の違反を引き起こす化合物、混合物、溶液及び他の製剤の能力を測定し、したがって自己免疫疾患を予防することも可能である。これは新しい知見であり、新しい説なので、この詳細な理解を提供する試験法は現在存在しない。

10

【 0 0 7 5 】

グリシン豊富な細胞壁タンパク質（G R P）は、自己免疫障害における一般的標的である、ケラチン及び他の自己タンパク質（たとえば、エプスタイン・バーウイルス由来核抗原 - 1（E B N A - 1）、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質及び線維性コラーゲン）と高い相同性を有する偏在性食物タンパク質である。G R P 及びペプチド特異的T細胞クローン由来のペプチドエピトープに対する抗体は、自己免疫障害（R A、S L E、乾癬性関節炎 P s A、慢性特発性蕁麻疹 C I U）、C P I（慢性パルボウイルス B 1 9 感染）並びに食物アレルギー（穀類、魚、果実及び野菜）に罹った患者由来の血清中に見出すことができる。しかし、正常な対象はこれらの免疫応答を示さない（「グリシン豊富な細胞壁タンパク質は、自己免疫障害及び食物アレルギー障害において特異的抗原標的として作用する」。C . L u n a r d i , e t . a l . , I n t e r n a t i o n a l I m m u n o l o g y , V o l . 1 2 , N o . 5 , p p 6 4 7 ~ 6 5 7）。

20

【 0 0 7 6 】

さらに、血清から精製された抗 G R P ペプチド抗体は E B N A - 1 並びにケラチン、コラーゲン及びアクチンなどの自己抗原を特異的に認識した。したがって、植物、ウイルス及びヒト由来の明らかに多岐にわたるタンパク質間で共通（相同性）配列を通じた抗原拡大が、自己免疫疾患の他に食物アレルギーの原因である可能性がある。重要なことは、これが、G R P からではなく、上皮曝露による感作分子（ハプテン）の作用を通じて小疱に放出されるケラチン及び他のタンパク質からのエピトープ拡大の例になることは極めて考えうることである。したがって、本発明を使用すれば、たとえば、食物アレルギーに関連する問題に取り組むために小疱形成応答を研究することも可能である。

30

【 0 0 7 7 】

化合物が上皮及び上皮細胞に遭遇すると起こることが、たとえば、上記の小疱形成応答を生じること、を分子理解したおかげで、

40

アレルギー性接触皮膚炎におけるその感作潜在力

上皮接触により引き起こされる他の病気

自己寛容の違反を引き起こす、すなわち、自己免疫疾患の危険を冒すリスク

D H R を引き起こすリスク

食物アレルギーを引き起こすリスク

自己毒性のリスク

について、たとえば、化合物、混合物、製剤、及び溶液をインビトロスクリーニングするための製品を開発することが可能になった。

【 0 0 7 8 】

さらに、本発明により、他の物質（これ以降、阻害剤と呼ばれる）を、たとえば混合物、製剤、及び溶液に添加することにより小疱形成応答の阻害をスクリーニングするための

50

手段として小疱形成応答を使用することが可能になる。次に、これらの阻害剤（又は見出された阻害剤の重要な相互作用を再現する化合物）は、感作及び本出願の別の場所で言及されている感作の負の下流効果を防ぐために、製剤、溶液、混合物、等における添加剤として潜在的には使用することが可能である。これは、本発明のように、インビボ事象を再現する細胞ベースの試験においてのみ可能である。本発明のこれらの適用すべてが、新しい分子理解を通して可能になり、したがって、以前の技術では提供することができない適用を表す。

【0079】

皮膚などの上皮組織との接触により起こる反応を研究するために、本発明者らは、臭素原子の置換に先立って非蛍光性であるケージ化されたハプテン（プロモビマン）を配置した。免疫学的問題を引き起こすことがある有害な化合物は、アレルギー性接触皮膚炎などの疾患では「ハプテン」と呼ばれていることに注目すべきである。しかし、用語「ハプテン」の使用は、化合物との上皮接触を通じて生じうる他のあらゆる状態を排除すると解釈されるべきではない。それどころか、本発明は、新しい化合物、混合物、溶液及び他の製剤が自己免疫疾患、DHR、等を引き起こすリスクを計測するための手段としての小疱形成応答の使用も含む。

10

【0080】

プロモビマンの解放は、好ましくは、生理的pHで強力な求核種であるチオール（システイン）と一緒に起こる。多くの、大部分ではないにしても、臨床ハプテンがチオール反応性であるために、チオールに対する優先反応性は有利である。ペプチド及びタンパク質中のその他の主要なハプテン反応性部分は、求核性アミノ基（タンパク質のアミノ末端を構成するリシンのNH₂基及び-NH₂基）である。感作及び上皮免疫毒性の背後にある詳細な分子機序を解明に向けて大きく前進するために、反応基なし（synBim）、1個の反応基（mBBR）又は2個の反応基（dBBR）を有する一連のビマンが配置された。

20

【0081】

第一ステップは、前記分子が皮膚（角質層）に接触することである。前記反応性分子の多くが角質層で反応するが、これは、実験ではヒト皮膚エクサープト及びケージ化された（mBBR及びdBBR）ハプテンを用いて見ることができるものである。

30

【0082】

しかし、前記分子のかなりの割合が、表皮の基底上層までさらに下に侵入するが、濾胞経路も生体異物を皮膚内に運び入れるのに重要である。前記侵入は、角質層の酸性pH（前記分子はpHが低いときのほうがゆっくり反応する）のせいであり、利用可能な基の多くは反応が終わっているからでもある可能性がある。基底上層では、細胞の角質化が基底細胞の周りに厚く比較的浸透性の外膜を作るために、ハプテンはなかなか細胞に侵入できない。したがって、ハプテンは下の基底層まで侵入する。ここでは、細胞膜ははるかに薄くより流動性であり、したがって前記分子は基底細胞に入ることができる。ヒト皮膚エクサープトを用いた実験により、角質層に加えて、基底層の細胞はケージ化されたハプテンであるdBBR及びmBBRにより標識されていることが明らかにされている。

40

【0083】

第二のステップは、前記分子が基底細胞に入ることである。細胞外環境は酸化性であるために、細胞外システインは大部分ジスルフィドまで酸化される。

【0084】

しかし、還元された細胞内環境において、ハプテンは反応する相手の還元されたチオールを見出す。細胞内部に入ると、化合物は利用可能な（すなわち、立体障害型ではない）還元されたシステイン（チオール基）と反応することになる。このステップでは、前記標識された細胞は基底ケラチノサイトであることが実証されている。さらに、ハプテンが反応するシステインのうちの一つは、K5のシステイン54（C54）であることが確かめられた。ナノスプレー源を備えたLTQ-FT-ICR質量分析計を使用して、チオール反応性ハプテンmBBRは、無傷の全層ヒト皮膚において、生きたヒトケラチノサイトが

50

m B B r に曝露された場合には、K 5 の C 5 4 を修飾することが見出された。C 5 4 での激しい反応の理由の1つは、おそらく、細胞膜内部でのその高い有効濃度である。その上皮完全性に二重安全装置を備えておくのは生物の生命では非常に重要であり、K I F の束形成は、C 5 4 を含有するペプチドストレッチの高い有効局所濃度を保証し、細胞のその周囲への強い溶着を確実にする。一次配列において近いアミノ酸は、したがって、類似する高い有効濃度で入ってくる化合物の物理的範囲内にも位置している。アミン反応性化合物及びアルギニン反応性化合物により引き起こされる小疱形成をこの角度から見ると、残基 K 7 1 及び R 7 2 が一次配列における最も近い候補である。

【0085】

第三ステップは、この残基 (C 5 4) が、デスモソームの完全性を維持するのに非常に重要であることがデスモプラキンとのその相互作用を通して明らかにされている K 5 のストレッチ内に位置していることである。易感染性細胞 - 細胞 (及び / 又は細胞 - マトリックス) 接触を有する上皮細胞がアポトーシス (「アノイクス」) を受けることは知られている。感作化合物との接触の結果である小疱形成は、天然に起こるアポトーシスと少なくともいくつかの機序を共有していると思われる。基底ケラチノサイトは、不溶性ケラチン中間径フィラメント (K I F) の最大 35% からなる。基底ケラチノサイトは時折アポトーシスを受けるので、不溶性ケラチン残渣の廃物除去の機序は進化してきた。身体では、アポトーシス基底細胞は、その残遺物を、かなりの程度 K 5 及び K 1 4 からなることが明らかにされているいわゆる「ケラチン小体」に詰め込む。細胞からケラチン小体は突出する。したがって、ケラチノサイトが感作化合物に曝露されると、天然に起こるアポトーシスの背後の機序のうち少なくとも一部が起こり、K I F (及び他の細胞残遺物) が小疱に詰め込まれる。したがって、このステップは、ハプテン化が細胞を誘発して小疱を産生させる (図 1) ことであるが、これはビマンへのケラチノサイト曝露後の蛍光性ビマン含有小疱のインビトロ作製により明らかにされている。非反応性非アレルギー性物質である s y n B i m を細胞に添加した場合には、これは起こらなかった。したがって、オキサゾロン、ホルムアルデヒド、C D N B (1 - クロロ 2, 4 ジニトロベンゼン)、グリオキサール、等などの非蛍光性臨床的関連ハプテンは小疱形成応答を誘発する。オキサゾロン (主にアミン反応性) 及びグリオキサール (主にアルギニン反応性) の添加から生じる小疱もケラチンを含有する。

【0086】

S D S - P A G E 実験では、チオール、アミン、及びアルギニン反応性感作物質は同じタンパク質を含有する小疱を生じることが明らかにされた。このステップでは、したがって、ハプテンをケラチノサイトに添加することにより、その細胞内位置並びに / 又はハプテン化された / 別にプロセシングされたペプチド及びタンパク質からなるネオエピトープを通じて、通常は免疫系から隠されている高量の潜在性エピトープの駆除を誘導することが明らかにされた。小疱は、言及されたケラチン以外にも他のタンパク質、たとえば、グルコース - 6 - ホスファターゼイソメラーゼ、移行型小胞体 A T P アーゼ、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、カルモジュリン、インポーチン 5、ケラチン 6 (A、B 及び C)、スタスミン、トランスゲリン - 2、14 - 3 - 3 タンパク質シグマ、カルレティキュリン、エンドプラスミン、ヒートショックプロテイン 90、アクチンベータ、アクチンガンマ、アルファアクチニン、コフィリン 1、エズリン、フィブロネクチン、ミオシン 1 c、プラスチン 2、プラスチン 3、チュープリンベータ 2 C、アネキシン 2、ペルオキシレドキシシン 1、S S A / R o r i 核タンパク質、アルファエノラーゼ、及びペプチジルプロリルシス - トランスイソメラーゼ A を含有することも、ナノスプレー源を備えた L T Q - F T - I C R 質量分析計を使用して明らかにされた。さらに、ネオエピトープ (ハプテン - タンパク質コンジュゲート) は排出される (小疱中の C 5 4 - ハプテンコンジュゲートを立証することにより例証される) ことが見出された。感作化合物は他のタンパク質も修飾すること、S D S ゲル上の蛍光バンドにより視覚化されるように、これらのタンパク質は小疱に放出されることも明らかにされた。ネオエピトープ概念は、二座ハプテン (たとえば、d B B r) は、たとえば、ケラチン間の架橋結合を引き起こすという結果によりさ

らに実証される。

【0087】

ネオエピトープの形成に加えて、架橋結合から、変更されたタンパク質高次構造ノプロセシング/クリアランスなどの他の問題が生じる。この説に一致して、一部の感作化合物（グリオキサール、CDNB（1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン）及びdBBr（ジプロモビマン）を含むが、これらに限定されない）により、血清アミロイドP成分（SAP）などの急性期タンパク質のレベルが増加することが分かる。通常、SAPの血漿濃度は炎症に呼応して増加する。したがって、一部の感作分子は永久的炎症応答を煽動する可能性がある。SAPはタンパク質分解に高度に抵抗性であり、その結合はアミロイド線維を安定化し、インビトロでのその形成を増強し、全身性アミロイドーシス、自己免疫疾患及びアルツハイマー病におけるその病原性蓄積及び/又はインビボでの持続の一因となる。慢性炎症は、自然免疫防御のせいで自己攻撃（自己毒性）をもたらすことがあることは知られており、アルツハイマー病における炎症の際立った役割はますます関心を集めている。SAPは血液脳関門を通過することがあることも示唆されており、これは直接的に神経細胞傷害性である。SAPは、ヒト皮膚においてケラチン小体に、他にもインビトロでは単離されたKIF凝集体に結合することが分かっている。

10

【0088】

さらに、SLE中の抗SAP抗体の量は疾病活性と相関している。SAPも尿中に見出すことが可能である。一部の感作物質に曝露されているが、他の物（オキサゾロンを含むが、これに限定されない）には曝露されていないマウスの血清でSAPの量が増加するという知見は、追加の診断用インビトロ特長として利用することが可能である。

20

【0089】

ハプテン（mBBr、dBBr、CDNB、オキサゾロン及びグリオキサールを含むが、他のものを排除しない）に局所的に曝露されたマウスは、その血清中において抗核抗体（ANA）のレベルを増加させていたことも明らかにされた。上方調節されたレベルのANAは、一般に、様々な自己免疫疾患、すなわち、SLE、RA、SSのマーカーとして使用されている。

【0090】

第四ステップは、身体においては、ケラチン小体は基底膜の下に降りてくることが明らかにされたことである。ケラチン小体は抗原提示細胞により食べ尽くされることは明らかにされている。真皮では、これらは主に真皮樹状細胞である。ランゲルハンス細胞などの表皮抗原提示細胞も、当然のことながら、これらの細胞残遺物に曝露され、これらの細胞も十中八九、感作過程の一部である。したがって、このステップでは、ネオ及び潜在性エピトープは抗原提示細胞により食べ尽くされる。ケラチンが放出され抗原として機能することを実証するため、皮膚接触を通じてハプテンに曝露されたマウスにおいて、ケラチンに対して自己抗体のELISA捕獲が実施された。その結果により、ハプテンはケラチンを免疫系に曝露させること、及びそのタンパク質断片は、それに対してマウスが自己抗体を発現するので、抗原性であることが示されている。このことは、小疱に見出された他のそれほど豊富ではないタンパク質（たとえば、スタスミン及びカルモジュリン）は感作物質と接触すると身体内に放出されることも実証している。

30

40

【0091】

これらのステップは、システインよりも他のアミノ酸と優先的に反応するハプテンにも当てはまる。これは、ハプテンのパネルをヒトケラチノサイトに添加することにより明らかにされ、細胞応答を視覚化した。ハプテンは、媒体（DMSO）とは反対に、小疱形成を煽動する。synBimなどの非アレルギー性化合物、又はノナン酸は、小疱形成を誘導しない。刺激化合物のSDSは小疱形成を引き起こさず、代わりに、細胞はSDSに曝露されると「溶解する」ように思われる。

【0092】

小疱はケラチンと他のタンパク質を含有する。小疱形成は身体でも起こる一般的応答であることは、単座又は多座である同じ求核種と異なる反応機序を通じて反応する多様な求

50

核種（アミノ酸）に向けられる感作化合物に曝露されたマウスにおいてK 1 4に対する自己抗体を捕獲することにより実証されてきた。細胞への化合物の添加に先立って、活性化ステップ（たとえば、第1相解毒酵素による活性化）を含むことにより、プロハプテンは反応型（単数又は複数）の転換されることが可能であることが想定されている。プレハプテンは、身体の外で活性化されるために、「従来の」ハプテンに類似する形で機能する。

【0093】

これらのステップ1～4が感作を確立する。これらの発見に基づくインビトロ試験は本明細書の発明の中核である。

【0094】

したがって、いくつかの実験を通して、ヒト組織におけるハプテンの卓越した標的はケラチノサイトであることが見出された。表皮が約95%のケラチノサイト又はその残遺物（角質細胞）からなるにしても、ケラチノサイトの役割は見過ごされてきたことは驚きである。皮膚の重層性のせいで、ハプテンは、大量（細胞の全タンパク質含有量の最大35%）のケラチン5及び14（K5及びK14）を含有する基底ケラチノサイトに到達することが可能である。

10

【0095】

このように、本発明は、たとえば、ACDに対する感作物質である化合物に晒されたケラチノサイトは小疱を産生し、これらの小疱は、免疫を確立するのに重要な役割を果たしているケラチンなどのタンパク質を含有しているという発見に基づいている。小疱に見出される他のそれほど豊富ではないタンパク質（たとえば、スタスミン及びカルモジュリン）も、感作物質に接触すると体内にも放出される。したがって、標準感作物質との比較を用いた、小疱形成までの時間などの小疱形成の異なる面の測定、インキュベーション後にケラチノサイト細胞が小疱を産生する化合物の濃度、高濃度の化合物での小疱の大きさ、高濃度の化合物での小疱の数、小疱中のK5及びK14などの放出されたタンパク質の量は、本発明の基礎である。小疱は、当技術分野で公知である遠心分離、超遠心分離及び蛍光標識細胞ソーティングを通じて分離することが可能である。本発明において使用される細胞は、たとえば、マルチウェルプレートにおいて、細胞培養皿上で、試験管で、フラスコで、顕微鏡用スライドガラス上で及びバイオリクターで培養することが可能である。

20

【0096】

重層扁平上皮における基底細胞は極めて大量に、細胞含有量の最大25～35%、K5及びK14を発現する。したがって、感作及び誘発が、摂取を通じて、目接触、吸入を通じて、等などの身体中への物質の進入経路とは無関係である病気においても、記載されている機序（ステップ1から4まで、上記参照）が関与している可能性がある。したがって、化合物がケラチノサイトの小疱形成を引き起こす場合、問題の化合物がACDに加えて他の状態も誘導することがあるという高リスクが存在する。したがって、本発明の小疱形成応答は、化合物との上皮接触により引き起こされることがある他の状態の予測的試験としても利用することが可能である。これらの状態には、化学的に誘導される喘息が含まれるが、他の病気を排除しない。

30

【0097】

さらに、体内への化合物の進入経路に関係なく、同一の又は高度に相同なエピトープに遭遇するという知見（K5/K14及びK8/K18により例証される）には他の意味もある。この例は、小疱形成応答も重要である可能性があるDHRである。したがって、本発明の別の目的は、小疱形成応答を用いて、薬物誘導過敏症反応（DHR）を引き起こす化合物（純粋な形、混合物、製剤、溶液中、等）のリスクを計測することである。このように、本発明は、上皮接触による薬物有害反応についての予測的スクリーニングの大きな前進を表している。前記試験を使用して、これらの効果と関連付けて小疱形成応答の阻害剤についてスクリーニングすることも可能である。まず、仮の阻害剤が、インビトロ試験において、感作物質についてと同じ方法で細胞に添加される。極度の、強い、中程度の及び弱い感作物質と同じタイムスケール又は濃度では小疱は形成されないはずである。仮

40

50

の阻害剤がこの第一ステップを通過する、つまり、小疱形成応答が記録されない場合、阻害剤は次のステップに移される。次のステップは、細胞を異なる強度の感作物質を用いるインビトロ試験において前記阻害剤と一緒にインキュベートすることである。小疱形成応答は評価され、感作物質それ自体から生じた小疱形成応答と比較される。阻害剤は、それが小疱形成応答を減少させる又は完全に妨げる場合には、成功であると見なされる。

【0098】

したがって、小疱形成が煽動され、免疫学的閾値を通過すると、自己寛容が違反されることが提案される。これらの寛容違反には、K5、K14及び、放出されたタンパク質と他の自己タンパク質間（たとえば、K5とK8間及びK14とK18間）の相同性を通じたエピトープ拡大を含むいくつかの標的が含まれる。したがって、本明細書に提示される本発明は小疱形成応答を用いて、自己寛容の違反を引き起こし、したがって、自己免疫疾患を煽動する化合物、混合物、溶液及び他の製剤の能力を測定することが可能である。前記試験を使用して、これらの効果と関連付けて小疱形成応答の阻害剤についてスクリーニングすることも可能である。

10

【0099】

したがって、感作化合物は、一般に、ケラチノサイトを促進して小疱を産生させると結論付けることができる。これは、最終的には感作（ACD）；及び/若しくは自己免疫疾患；及び/若しくは他のアレルギーをもたらし；並びに/又はDHRに対して個人を抗原刺激する記号論理的連鎖の事象における重要な関門に相当する。それぞれの場合の特定の結果は、個人の免疫系及びその環境要因に依存する可能性がある。規制問題を反映する段階的予測的インビトロ試験の開発を可能にしたいいくつかの実行可能なパラメータが同定されている。その上、混合物、溶液、製剤、等は、化合物の組合せ効果をその特定の調製物において試験するために希釈/溶解後に使用することが可能である。どの感作化合物が放出されるのかとは無関係に同じエピトープが放出されるので、法律制定前には考えられていなかった相加的及び潜在的には相乗的すらある効果が存在する。消費者製品の大部分が同じ製剤中（たとえば、香水、洗髪剤、化粧水、等中）に多くの感作化合物を含有するので、これには化合物の試験方法及び安全限界の評価方法に関して大きな意味がある。

20

【0100】

マウスLLNA、すなわち、間もなく時代遅れになることになるACDに対するOEC D承認試験の1つの重要な特長は、それが化合物を極度に、強力に、中程度に、弱い又は非アレルギー性に分類する段階的読取りを与えることである。類別は、化合物の法的取り扱い及び分類に免疫毒性学的基礎を与える。これは、本発明の細胞ベースのインビトロ試験において取り組む特長である。段階的読取りを可能にするのに十分なダイナミックレンジを与える応答の混合が使用される。

30

【0101】

この例には、異なる濃度のハプテンにおいて、ハプテン添加後のどの時点で小疱形成が起きるのか；どの濃度で小疱形成は起きるのか（固定された時点）；濃度x及び時間yにおいて何個の小疱が周囲の培地中に放出されるのか；が含まれる（しかし、他の変数を排除しない）。標準化は、たとえば、ノナン酸又は類似の化合物などの非アレルギー性及び非刺激物質を用いた処置を受けたマウスとの比較を通じて与えられることになる。対照試料はどんな試験化合物にも晒されたことがない。細胞は、ヒト始原ケラチノサイト、ケラチノサイト由来の細胞系又は必要な小疱形成応答を共有する他の上皮細胞であってよい。測定されるパラメータは、組み合わせられたシグナルが段階的読取りを与えることになる行列を形成することになる。

40

【0102】

LLNAに存在するが、他の細胞ベースの試みでは見落とされてきた別の重要な特長は、キャリブレーション（及び再現性）という特長である。典型的には、HCA（ヘリックス桂皮アルデヒド）を使用して、応答を校正し、試験手順の状態の検査をする。HCAキャリブレーション実験は、典型的には、時には年間を通じて含まれる。本発明の試験では、特定の信頼できる応答を与えることが知られている制御された物質を添加することに

50

よりキャリブレーションは与えられることになり、例には、オキサゾロン、1 - クロロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン、m B B r、及びH C Aが含まれるが、他の物質を排除しない。このキャリブレーションは試験が行われるたびに実行することが可能である。これは、p H測定ごとに前にp H電極が較正されることに類似している。したがって、本発明の試験は、実際に、間もなく時代遅れになるL L N Aよりすぐれたキャリブレーションを与えることになる。

【 0 1 0 3 】

すでに言及されたように、本明細書に提示される本発明には、始原ヒトケラチノサイト、他の哺乳動物由来のケラチノサイト及び前記細胞の特徴（すなわち、有害な化合物と接触すると小疱形成する）を共有する他の関連する哺乳動物上皮細胞が含まれる。本発明には、前記細胞の特徴（すなわち、有害な化合物と接触すると小疱形成する）を共有する細胞系も含まれる。本発明には、ケラチン及び/又はその変異体を発現する他の細胞/細胞系も含まれる。本発明には、重層組織まで分化したケラチノサイトの使用も含まれる。前記ケラチン及びその他のタンパク質の化学修飾は極めて意味深い事象であり、これらのタンパク質又はその変異体又はこれらのタンパク質に基づく配列を有するペプチドが、化合物、混合物、溶液又は製剤の感作力を計測する手段を提供することができると考えられる。すなわち、試験は潜在的には細胞なしでも設定することができ、関連するタンパク質/ペプチドと問題の化合物（単数又は複数）間の反応を直接測定することができる。

【 0 1 0 4 】

細胞ベースのアッセイの出力基準（新しい化合物（純粋な形、混合物、溶液及び他の製剤で）が細胞に添加されるときの小疱形成応答）は、

i . S D S - P A G E 及びウェスタンブロットを通じた放出されるタンパク質（たとえば、K 5 及びK 1 4 又は他のタンパク質）の量。

i i . デジタルカメラに連結した光学顕微鏡を使用する放出された小疱の大きさ及び量。

i i i . 膜プローブ、たとえば、F M 1 - 4 3 (M o l e c u l a r P r o b e s) を使用する放出された小疱の量。このプローブは水性媒体中では非蛍光性であり、細胞膜（又は小疱膜）に挿入されると、強い蛍光性になる。蛍光量はハプテンに強度と相関する、すなわち、ハプテンが強力であるほど、蛍光も高くなる。

i v . 蛍光標識細胞ソーティングを使用する放出された小疱の大きさ及び量。小疱は大きさにより分別され、それに続いて、その含有量はS D S - P A G E 及び/又はウェスタンブロットを使用して分析することができる。

v . 絶対小疱数を計測し小疱の大きさを測定するフローサイトメトリー法、たとえば、G u a v a P e r s o n a l C e l l A n a l y s i s - 9 6 (P C A - 9 6) S y s t e m (M i l l i p o r e) 。

v i . ラボオンチップ。「ラボオンチップ」又は「マイクロ流体デバイス」は、最も一般的には、光学顕微鏡に適しているが、ポリジメチルシロキサン（P D M S ）に限定されない透明の材料からなるデバイスである。前記デバイスは、大きさがわずかミリメートルから数平方センチメートルである。前記用語は、実デバイスに連結されているポンプ及びバルブのような機械的流量調節器又は流量計及び粘度計のようなセンサーのこともある。前記デバイス内部にはマイクロメーターサイズのチャンバー及びチャンネルがあり、これらは、細胞培養、細胞ソーティング及び1個、又は数個の細胞を異なる化合物に曝露するなどのいくつかの実験室ステップを統合する機能を有する。1個、又は数個の細胞から出現する小疱の数及び時間スケールの他にも大きさはこの方法を用いて評価される。

v i i . ハイスループットスクリーニング。この方法は、撮像デバイス及びタンパク質分析と組み合わせて（しかしこれらに限定されない）、ロボットスクリーニングアッセイを使用する多数の化合物の急速インピトロスクリーニングのために使用される。H T S では、多くの化合物は、好ましくは、細胞上で並行して試験され同時にスクリーニングされる。画像分析は、小疱数、小疱の大きさ及び標識された細胞成分の蛍光強度などの多くの異なるパラメータについて画像から数値データを生み出すことができる。

v i i i . 小疱の放出に関して報告する工学的に操作された蛍光システム。K 5 - G F P

10

20

30

40

50

(緑色蛍光タンパク質又はたとえば、蛍光性である類似のタンパク質)形質転換細胞(たとえば、正常なヒト表皮ケラチノサイト(HEKn)又は必要なHEKn特徴を共有する細胞系)が使用される。試験化合物が添加されると、それが感作物質である場合、その化合物は小胞形成をもたらし、K5は小胞内に放出されるために、小胞は蛍光性になり培地中の蛍光を定量化することができる。他のタンパク質構築物、たとえば、K14-GFP構築物も使用することが可能である。

ix.たとえば、互いの又は、たとえば、デスモブラキン若しくは近接空間接触している他のタンパク質との蛍光エネルギー移動現象を示す蛍光K5及びK14構築物などの蛍光標識法を使用して、小胞中へのタンパク質の放出に関して報告してもよい。デスモブラキンとK5が空間的に離れている場合は、蛍光エネルギー移動(FRET)現象はもはや示されない。

x.たとえば、K14及びK5に対する抗体又は結合物質に基づく捕獲システム(たとえば、ELISA)を使用して、細胞により周囲の培地に放出される特定のタンパク質の量を定量化することもできる。

xi.水晶振動子マイクロバランス法

xii.たとえば、捕獲試薬として小胞中のタンパク質に対する抗体を使用する表面プラズモン共鳴。

xiii.細胞は、アポトーシスのタイムスケールと両立するタイムスケールで小胞形成を放出するために、及び小胞放出細胞はアポトーシス細胞と少なくともいくつかの特長を共有していると思われるために、アポトーシスを測定するのに使用される標識及びキット(たとえば、アネキシンV又はカスパーゼキット)を使用して、たとえば、免疫蛍光及びフローサイトメトリーを用いて小胞形成応答を測定することもできる。

xiv.細胞(たとえば、HEKn細胞又はHEKn特徴を有する細胞系)は半透過性支持体上で増殖させることが可能であり、その小胞及び/又は小胞内容物は、「フロースルー」を使用することにより収穫することができる。例には、Transwell(登録商標) Permeable Supports(Corning Life Sciences)を使用することが含まれるが、これに限定されない。試験される化合物(純粋な形、混合物、溶液及び他の製剤で)が表面に添加され、フロースルーが収集され、放出されたタンパク質の量(すなわち、細胞からの小胞形成応答)が測定される。類似する形で、支持体マトリックスは細胞を増殖させるためにも使用することが可能である。

xv.必要な障壁特徴及び透過特徴を示すインビトロ上皮組織であって、小胞形成応答を示す細胞を含有する上記インビトロ上皮組織を分析において使用することが可能である。試験される化合物(純粋な形、混合物、溶液及び他の製剤で)が組織の表面に添加され、フロースルーが収集され、放出されたタンパク質の量(すなわち、組織中の細胞からの小胞形成応答)が測定される。

【0105】

本発明の追加の態様は、感作性について化合物又はその混合物、製剤、及び溶液をスクリーニングするためのキットであって、

i)1つ又は複数のケラチノサイト細胞培養物

ii)前記1つ又は複数のケラチノサイト細胞培養物を集密まで増殖させるための手段

iii)試験する前記化合物を選択された範囲の希釈度まで希釈する手段

iv)本明細書に記載される方法のうちのいずれかに従ってii)及びiii)における前記手段を使用するための使用説明書

を含む上記キットを包含する。

【0106】

さらに、前記キットは上記の1つ又は複数の標準感作物質を含みうる。

【0107】

さらに、前記キットは、たとえば、試験される前記化合物を選択された範囲の希釈度まで希釈するための手段及びケラチノサイト培養物を集密まで増殖させるための手段、又は特定の試薬の使用手段の使用を開示する説明資料を含みうる。前記説明資料は、電子書式

10

20

30

40

50

で（たとえば、コンピュータディスク若しくはコンパクトディスク）書かれてもよいし、又は視覚的（たとえば、ビデオフィルム）でもよい。前記キットは、前記キットの設計目的である特定の適用を促進するための追加の成分を含んでいてもよい。したがって、たとえば、前記キットは、特定の開示された方法の実行のために常用されている緩衝剤、増殖培地、補助剤及び他の試薬を含むことが可能である。そのようなキット及び適切な内容物は当業者には周知である。

【0108】

前記キットは、本明細書に記載されるケラチノサイト小疱形成応答を評価するための手段を、1つ又は複数の別々に包装された試薬として、少なくとも1つのアッセイに十分な量で、他にもそれを使用するための別々の使用説明書をさらに含みうる。

10

【0109】

前記包装された試薬の使用のための使用説明書も典型的には含まれる。そのような使用説明書は、典型的には、試薬濃度並びに/又は混合される試薬と化合物の相対量、試薬/試料混合物の維持期間、温度、緩衝条件及び同等の物などの少なくとも1つの試験方法パラメータを説明する具体的表現を含む。

【0110】

前記キットは、箱、袋、サッチェル、プラスチック製容器（たとえば、成型プラスチック又は他の透明包装）、ラッパー（たとえば、密封された若しくは密封可能なプラスチック、紙、又は金属製ラッパー）、或いは他の容器などのキャリア手段をさらに含み得る。

20

【0111】

いくつかの例では、キット成分は、箱又は他の容器などの1つの包装単位であって、1つ又は複数のキット成分を入れることができる仕切りを有しうる上記包装単位に封入されることになる。他の例では、キットは、1つ又は複数の容器、たとえば、バイアル、管、及び、たとえば、試験される1つ又は複数の生体試料を保持することができる同等の物を含む。

【0112】

他のキット実施形態は、たとえば、生体試料を取り扱う、収集する及び/又は処理するのに有用でありうる注射器、綿棒、又はゴム手袋を含む。キットは、随意に、たとえば、点滴器、注射器、及び同等の物を含む、生体試料をある場所から別の場所に移動させるのに有用な道具も含有しうる。さらに、前記キットは、使用済みの又はもはや必要ではない物（たとえば、対象試料、等）を破棄するための処分手段を含んでいてもよい。そのような処分手段は、制限なく、プラスチック、金属又は他の不透過性袋、箱若しくは容器などの廃棄物質からの漏れを含有することができる容器を含むことが可能である。

30

【0113】

キット成分は、ケラチノサイト細胞培養物若しくは培地補助剤のためのドライアイス又は冷却しておくべき成分、たとえば、増殖培地のための氷嚢などの、異なる貯蔵及び輸送温度に必要な包装をさらに含みうる。

【実施例】

【0114】

(例1)

A C Dにおけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング。光学顕微鏡を使用する分析

40

細胞培養

正常なヒト表皮ケラチノサイト (HEKn、Cascade Biologics、Portland、OR、USA) は、60 μ M の $CaCl_2$ 、抗生物質ゲンタマイシン/アンホテリシン及び1% (v/v) ヒトケラチノサイト増殖補助剤 (HKGS; Cascade Biologics) を補充されたフェノールレッド無しのEpilifeケラチノサイト培地 (Cascade Biologics) において維持された。代わりに、200 μ M の $CaCl_2$ を含有し、HKGS (1% (v/v)) を補充された、抗生物質のないMedium 154 が使用される。細胞は、加湿された5% CO_2 インキュベ

50

ターにおいて37℃で増殖させた。補充された培地中の成分の最終濃度は、ウシ下垂体抽出物、0.2% v/v；ウシインスリン、5 mg/mL；ヒドロコルチゾン、0.18 mg/mL；ウシトランスフェリン、5 mg/mL；ヒト表皮増殖因子、0.2 ng/mL；随意に、ゲンタマイシン、10 µg/mL、及びアンホテリシンB、0.25 µg/mLであった。試薬はすべて、Cascade Biologics、Portland、OR、USAから入手した。ケラチノサイトは、第5又は第6継代で実験に使用された。

【0115】

スクリーニング

継代6のHEKn細胞は分割され、1% (v/v) ヒトケラチノサイト増殖補助剤 (HKGS； Cascade Biologics、抗生物質添加なし) を補充されたmedium 154 (Cascade Biologics) 中18500細胞/mlまで再懸濁された。細胞懸濁液 (0.5 ml) は24ウェルプレート (Nunc Multidishes Nunclon、Sigma Aldrich、Stockholm、Sweden) の各ウェルに添加され、5% CO₂、37℃でインキュベートされた。培地は、細胞が培養密度になるまで、HKGSを補充された新鮮な154培地 (抗生物質添加なし) で1日おきに交換された。

10

【0116】

試験される化合物 (たとえば、mBBR、SDS、CDNB、ノナン酸、HCA、オキサゾロンはSigma Aldrichから購入し、qBBR、dBBR、グリオキサール及びホルムアルデヒドはMerck-Schuchardt、Darmstadt、Germanyから入手した) はDMSO (Sigma Aldrich、Stockholm、Sweden) 中、最終濃度の50 mM、5 mM及び0.5 mMまで希釈された。これらの保存液は、実験が実施されるたびに新たに調製された。

20

【0117】

代わりに、混合物、溶液、製剤、等は、DMSO中における希釈/溶解後に使用することができる (その特定の調製物における化合物の組合せ効果を試験するため)。同じエピトープが放出されるために、法律制定前は考えられなかった相加効果が存在する。

【0118】

1) 実験を開始する直前の細胞調製：細胞培養プレート中の培地は、HKGS (1% (v/v) ヒトケラチノサイト増殖補助剤 (HKGS； Cascade Biologics)) を補充された250 µlの新鮮なMedium 154 (Cascade Biologics) に置き換えられ、細胞は5% CO₂、37℃で保管される。

30

【0119】

2) 培地中での試験化合物の調製：245 µlのMedium 154は0.5 mlのマイクロチューブに添加され、37℃まで予熱された (水浴)。5 µlの化合物の保存液は、予熱された培地を含有するマイクロチューブに添加された。次に、これらの溶液は直ちに24ウェルプレートの細胞に添加された。

【0120】

3) マイクロチューブ中の溶液 (すなわち、250 µl培地+試験化合物) は各プレートに添加された。したがって、試験における各化合物の最終濃度は、0.5 mM、0.05 mM、及び0.005 mMであった。細胞と試験化合物を含有するプレートは5% CO₂、37℃で24時間インキュベートされた。

40

【0121】

4 A) 各ウェルは、デジタルカメラに連結された光学顕微鏡 (Nikon TE300 倒立顕微鏡) を用いて調べられて、小疱形成応答を決定した。所定の時点 (1.5； 2.5； 24時間) での産生された小疱の量は、盲検試験 (すなわち、小疱を計測する顕微鏡使用者は、各ウェルにどの化合物が添加されているのかに関する知識はまったくない) での目視検査を通じて評価された。測定されたパラメータは：

小疱形成までの時間

極度の感作物質 (オキサゾロンを含む)

50

オキサゾロン 1.5 時間

強い感作物質 (d B B r、m B B r、C D N B を含む)

m B B r 2.5 時間

C D N B 2.4 時間

細胞が 2.4 時間後に小胞を産生した濃度

極度の感作物質 (オキサゾロンを含む)

0.5 mM、0.05 mM

強い感作物質 (d B B r、m B B r、C D N B を含む)

0.5 mM (d B B r は 0.05 mM でも)

中程度の感作物質 (グリオキサルを含む)

0.5 mM

弱い感作物質 (H C A を含む)

試験された濃度では小胞形成なし

小胞の量 (時間 2.4 時及び濃度 0.5 mM で)

極度の感作物質 (オキサゾロンを含む)

高量の小胞 (+ + +)

強い感作物質 (d B B r、m B B r、C D N B を含む)

中程度量の小胞 (+ +)

中程度の感作物質 (グリオキサルを含む)

低量の小胞 (+)

弱い感作物質 (H C A を含む)

小胞は検出されない

である。

【 0 1 2 2 】

これらの 3 種のエンドポイントを使用して、化合物の感作潜在力の収集分析が行われた。オキサゾロンは極度の感作物質であり、m B B R 及び C D N B は強い感作物質であり、グリオキサルは中程度の感作物質であることが見出され、H C A は試験された濃度では小胞形成を誘導しなかった。これらの結果は L L N A 実験とよく相関しており、前記方法が化合物の感作性を決定するためによく機能することを実証していた。

【 0 1 2 3 】

(例 2)

A C D におけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング。蛍光色素による分析

この例は、ハプテン誘導「小胞形成」の差、すなわち、ハプテンの強度を定量化するための蛍光の測定のために、試験化合物の添加の 2.4 時間後 (オキサゾロンにより例証される)、 $3 \times 90 \mu\text{l}$ は 2.4 ウェルプレートの各ウェル (濃度 0.5 mM、0.05 mM、及び 0.005 mM) から 9.6 ウェルプレート (Nunc、F96 multisorp) に移されたこと以外は、例 1 に述べられる通りに実施された。10 μl (最終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の色素 FM 1 - 43 (T3163、Molecular Probes、Invitrogen AB、Stockholm、Sweden) が各ウェルに添加された。プレートは暗所で 2 分間インキュベートされ、蛍光は、励起 510 nm 及び発光 626 nm のプレートリーダー (SpectraMax M2、Molecular Devices、Gotenborgs Termometerfabrik、Goteborg、Sweden) において検出された。

【 0 1 2 4 】

色素 FM 1 - 43 は水性溶媒中では実質的に非蛍光性であるが、細胞膜 (又は小胞膜) 中に挿入されると強い蛍光性になるので、この色素を使用して溶液中の小胞膜の量を測定することが可能である。したがって、蛍光はハプテンの強度と相関しており、すなわち、ハプテンが強いほど、それだけ多くの小胞が周囲の培地に放出され、その培地中の蛍光はそれだけ高くなった。

10

20

30

40

50

【0125】

(例3)

ACDにおけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング。放出されたタンパク質の分析

SDS-PAGE及びウェスタンブロットを通じて放出されたタンパク質(たとえば、K5及びK14)の量を観察することにより、小疱形成応答の定量化も行われた。小疱は例4に記載される通りに収集され溶解された。SDS-PAGE:試料は、XT Sample Buffer 4X(BioRad、Hercules、CA、USA)及びmilli-Q水を用いて希釈された(小疱:プロットングでは46µg、30µl及びSDS-PAGEでは29.2µg、40µl。K14及びK5:0.2µg、5µl)。1µlのDTT(2M)が各試料に添加され、続いてゲル上に適用する前に96で2分間加熱する。電気泳動プログラム:200V、400mA、50W、50分。MOPSLランニング緩衝液。ゲルは固定され、蛍光について走査され(励起480nm、発光530nm)及びクーマシー染色された(Bio-Safe(商標)Coomassie、BioRad、Hercules、CA、USA)。次に、ゲルはタンパク質の定量的測定のために使用された。ウェスタンブロット:固定されていないゲルはポリビニルジフルオリド膜(PVDF Ready-gel Blotting Sandwiches、7x8.5cm、BioRad、Hercules、CA、USA)上にプロットされた。プロットングプログラム:70V、400mA、50W、30分。トランスファー緩衝液。Novex XCell II(商標)Blot Module(E19051、Novex、San Diego、CA、USA)。プロットは、プロッキング緩衝液(50mMのTris-HCl pH8、0.2M NaCl、3%の脱脂粉乳)、抗体希釈緩衝液で1:5000に希釈された始原ケラチン5又はケラチン14モルモット抗ヒトポリクローナル抗体(Lifespan Biosciences Inc、Seattle、US)、並びに抗体希釈緩衝液中1:2000に希釈されたペルオキシダーゼウサギ抗モルモットIgG(H+L)二次抗体(Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)中でインキュベートされた。プロットは各ステップ間に洗浄緩衝液(50mMのTris-HCl pH8、0.2M NaCl、0.05%のTween-20)で3x10分間洗浄され、DAB及び過酸化尿素(SIGMAFAST(商標)3,3'-ジアミノベンジジンタレット、Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Munich、Germany)で現像された。ペルオキシダーゼ-DAB反応は、ミリ-Q水で洗浄することにより消光された。

10

20

30

【0126】

プロットの現像後、分析により、K5及び/又はK14がSDS-PAGEゲル上に存在するかどうかを示された。

【0127】

(例4)

小疱の収集

小疱の収集を改善し、死んだ非粘着性細胞による汚染を回避するために、この手順に従った。この手順により、小疱形成応答を測定するのに使用することができる試料が得られる。

40

【0128】

細胞

細胞(HEKn)は、75cm²フラスコにおいて開始密度約1.8x10⁵細胞/cm²で増殖され、細胞が70~80%培養密度に到達するまで培養された(上記の通り)。

【0129】

試験化合物

mBBr、dBBr、qBBr(Sigma Aldrich)及びオキサゾロン(Sigma Aldrich)の50mM保存液は、DMSO中で調製され、グリオキサ-

50

ル (Sigma Aldrich) はダルベッコPBS (Ca、Mgなし; PAA Laboratories、Linz、Austria) 中、79mMで調製された。インキュベーション前に、試薬は5mLのHEPES緩衝液 (140mM NaCl、20mM HEPES、5mM KCl、1mM MgCl₂、0.06mM CaCl₂、10mM D-Glucose) 中、そのそれぞれの濃度 (mBBR、dBBR 0.05mM; qBBR、グリオキサール、オキサゾロン 0.5mM) まで希釈された。

【0130】

試験化合物を用いたインキュベーション

細胞層はHEPES緩衝液を用いて洗浄され、5%CO₂加湿インキュベーター (Thermo Forma、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) 中、37℃で24時間、試薬液と一緒にインキュベートされた。

10

【0131】

小胞の調製

インキュベーション培地は細胞層から吸引され、500×g、室温で5分間遠心分離されて、インキュベーション期間中に離昇した可能性のある細胞から小胞を分離した。このステップは、小胞から死んだ非粘着性細胞を分離する。小胞は上清中に存在し、細胞はペレット化された。

【0132】

小胞溶液の更なる使用

上清中の小胞は、エタノール、ドライアイス及び37℃の水浴を使用して4×凍結融解サイクルを用いて溶解された。前記ライセートは濃縮され、5kDa MWCO 4mlのAgilent Spin Concentrators for Proteins (Agilent Technologies、Santa Clara、CA、USA) 中で脱塩された。全タンパク質濃度は、Pierce BCA Protein Assayを用いて決定された。濃縮物は、前記タンパク質の分析が実施されるまで-20℃で保存された (例3に記載される方法に従って)。

20

【0133】

(例5)

ACDにおけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング。蛍光標識細胞ソーティングによる分析

30

この例では、試験手順は例1にある通りに実施され、小胞の収集は例4にある通りに実施された。次に、小胞の大きさと量は、ソーティング機能のあるフローサイトメーター (FACSAria、BD、Biosciences) を使用して分析された。次に、小胞は大きさに従って分別され、各小胞が計測された。ビーズは大きさの標準として使用することが可能である。

【0134】

小胞溶液のさらなる使用

収集され小胞は溶解され、例3に記載されるタンパク質含有量に関して分析された。

【0135】

(例6)

ACDにおけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング。フローサイトメトリーを使用する分析

40

このスクリーニングは、例5にある通りに実施された。小胞の数はフローサイトメーター (たとえば、Guava Personal Cell Analysis-96 (PCA-96) System、Millipore) において計測された。小胞の大きさは、サイズ標準ビーズを使用して評価することが可能である。

【0136】

(例7)

ラボオンチップを使用する、ACDにおけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング

50

細胞培養

細胞 (HEKn) は、 75 cm^2 フラスコにおいて開始密度約 1.8×10^5 細胞 / cm^2 で増殖され、細胞が 70 ~ 80 % 培養密度に到達するまで培養された (上記の通り)。

【0137】

ラボオンチップ

継代 6 の HEKn 細胞は分割され、1% (v/v) ヒトケラチノサイト増殖補助剤 (HKGS; Cascade Biologics、抗生物質添加なし) を補充された medium 154 (Cascade Biologics) 中 1.85×10^6 細胞 / ml まで再懸濁された。細胞懸濁液 (0.5 ml) は、たとえば、ポリジメチルシロキサン (PDMS) からなるが、これに限定されないマイクロ流体デバイスに添加され、5% CO_2 、37 °C でインキュベートされた。培地は、細胞が培養密度になるまで、HKGS を補充された新鮮な 154 培地 (抗生物質添加なし) で、前記デバイスを洗い流すことにより 1 日おきに交換された。

10

【0138】

スクリーニング

mBBR、dBBR、qBBR (Sigma Aldrich) 及びオキサゾロン (Sigma Aldrich) の保存液 (たとえば、50 mM) は、DMSO 中で調製され、グリオキサール (Sigma Aldrich) はダルベッコ PBS (Ca、Mg なし; PAA Laboratories, Linz, Austria) 中、79 mM で調製された。インキュベーション前に、試薬は 5 mL の HEPES 緩衝液 (140 mM NaCl、20 mM HEPES、5 mM KCl、1 mM MgCl_2 、0.06 mM CaCl_2 、10 mM D-Glucose) 中、そのそれぞれの濃度 (mBBR、dBBR 0.05 mM; qBBR、グリオキサール、オキサゾロン 0.5 mM) まで希釈された。

20

【0139】

試験化合物を用いたインキュベーション

マイクロ流体デバイスは光学顕微鏡試料台上に載せられ、透過光及び蛍光撮像 (たとえば、Nikon TE300 倒立顕微鏡) を可能にした。顕微鏡試料台は好ましくは自動化され、同一チップ上のいくつかの化合物の自動調査を可能にした。前記デバイスは、37 °C、5% CO_2 加湿インキュベーターにおいて封入される必要がある。前記細胞を含有する前記デバイスは、純粋な HEPES 緩衝液で洗い流された。その後、前記流れは試験溶液に交換され、試薬液と一緒にインキュベートされた。

30

【0140】

小胞をモニターする

細胞は連続して (たとえば、20 分毎に) モニターされ、試験溶液への曝露中に撮像された。小胞形成開始までの時間は、上記の通りにモニターされた。しかし、小胞の大きさと形状も、顕微鏡に接続されたデジタルカメラにより記録された。同時に、放出された小胞はマイクロ流体透析により収集され、マイクロチューブに収集された。

40

【0141】

マイクロチューブは遠心分離されて (例 2 に記載された通りに)、インキュベーション期間中に離昇した可能性のある細胞から小胞を分離した。

【0142】

小胞溶液のさらなる使用

収集され小胞は溶解され、例 3 に記載されるタンパク質含有量に関して分析された。

【0143】

(例 8)

ハイスループットスクリーニングを使用する、ACD におけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング

細胞培養

50

細胞 (HEKn) は、 75 cm^2 フラスコにおいて開始密度約 1.8×10^5 細胞 / cm^2 で増殖され、細胞が 70 ~ 80 % 培養密度に到達するまで培養された (上記の通り)。

【0144】

スクリーニング

継代 6 の HEKn 細胞は分割され、1% (v/v) ヒトケラチノサイト増殖補助剤 (HKGS; Cascade Biologics、抗生物質添加なし) を補充された medium 154 (Cascade Biologics) 中 18500 細胞 / ml まで再懸濁された。細胞懸濁液 (0.5 ml) はいくつかの 24 ウェルプレート (Nunc Multidishes Nunclon、Sigma Aldrich、Stockholm、Sweden) の各ウェルに添加され、5% CO_2 、37 °C でインキュベートされた。培地は、細胞が培養密度になるまで、HKGS を補充された新鮮な 154 培地 (抗生物質添加なし) で 1 日おきに交換された。

【0145】

mBBR、dBBR、qBBR (Sigma Aldrich) 及びオキサゾロン (Sigma Aldrich) の保存液 (たとえば、50 mM) は、DMSO 中で調製され、グリオキサル (Sigma Aldrich) はダルベッコ PBS (Ca、Mg なし; PAA Laboratories、Linz、Austria) 中、79 mM で調製された。インキュベーション前に、試薬は 5 mL の HEPES 緩衝液 (140 mM NaCl、20 mM HEPES、5 mM KCl、1 mM MgCl_2 、0.06 mM CaCl_2 、10 mM D-Glucose) 中、そのそれぞれの濃度 (mBBR、dBBR 0.05 mM; qBBR、グリオキサル、オキサゾロン 0.5 mM) まで希釈され、例 1 に記載されるとおりに細胞に添加された。

【0146】

前記ウェルは、好ましくは、プレート搭載ロボット、たとえば、ハミルトンプレート搭載ロボット付きのオリンパス Scan R を備えた HCS デバイスに載せられた。細胞形態と小胞の両方が、異なる濃度の多数の試験化合物についてモニターされることになる。

【0147】

小胞溶液のさらなる使用

収集され小胞は溶解され、例 3 に記載されるタンパク質含有量に関して分析された。

【0148】

(例 9)

工学的に操作された蛍光システムを使用する、ACD におけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング

ケラチノサイトは、標準手順に従ってケラチン 5 及びケラチン 14 にカップリングされた緑色蛍光タンパク質を発現するように形質転換された。次に、代わりにこれらの工学的に操作された細胞を使用して、例 1 及び 4 にある通りに試験は実施された。次に、小胞の量は、GFP を検出するプレートリーダー (Spectramax、Molecular Devices Inc、Sunnyvale、CA、USA) において分析された。

【0149】

(例 10)

ACD におけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング。捕獲システムを使用する分析 (ELISA)

スクリーニングは、例 1 に記載される通りに実施された。小胞は、例 4 に従って分離され、溶解された。次に、小胞含有量、たとえば、K14 の量は、サンドイッチ ELISA システムを使用して分析された。

【0150】

コーティング

ヒト抗 K14 捕獲抗体 (Lifespan Biosciences、Seattle、WA、US) は PBS に希釈された (1 対 500)。50 μl の溶液が 96 ウェルプレ

10

20

30

40

50

ートのウェルに添加された。プレートはパラフィンで覆われ、湿室において、4 で一晩インキュベートされた。

【0151】

ランニング

各ウェルは吸引され、300 μ lの洗浄緩衝液 (TRIS、0.05% TWEEN) で合計3回洗浄された。最後の洗浄後、残っている洗浄緩衝液は、プレートを清潔な紙タオルに倒立させることにより取り除かれた。150 μ lのブロッキング溶液 (0.5% BSA、0.05M TRIS、pH7.4) が各ウェルに添加され、前記プレートは室温 (RT) で1時間インキュベートされた。洗浄ステップは、以前に記載された通りに4回実施された。

10

【0152】

小疱内容物は試料緩衝液 (0.05M TRIS、0.015M NaCl、pH7.4) に1対100、1対5、1対5、1対5で希釈され、50 μ l/ウェルはプレートに3通りに添加された。ヒトK14 (Genway Biotech, San Diego, CA) は正の対照として使用され、プレートにおいて1対400から1対6400までの試料緩衝液での連続希釈により、2通りに調製された。プレートは室温で1時間インキュベートされた。洗浄ステップは、上に記載される通りに4回実施された。

【0153】

ヒト抗K14抗体 (Lifespan Biosciences, Seattle, WA, US) は適切に希釈され (1対3000)、50 μ lが各ウェルに添加され、プレートは室温で30分から1時間インキュベートされた。洗浄ステップは、上に記載される通りに4回実施された。

20

【0154】

ビオチン化された検出抗体 (マウスIgG、IgM、IgA F(ab)2断片に対するヤギポリクローナル、Abcam, Cambridge, MA, USA) は、試料緩衝液に1/1500で希釈され、50 μ lが各ウェルに添加された。プレートは37 で2時間インキュベートされた。洗浄ステップは、以前に記載された通りに4回実施された。

【0155】

ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼは試料緩衝液に1対2000で希釈され、50 μ lが各ウェルに添加され、プレートはRTで1時間インキュベートされた。洗浄ステップは、上に記載される通りに4回実施された。

30

【0156】

1mMのABTS溶液は、70mMのクエン酸緩衝液 (pH4.2) 中で調製され、光から保護された (使用まで)。10 μ lのH₂O₂ (30%) が10mlのABTS溶液に添加された。H₂O₂の添加後直ちに、100 μ lの前記溶液がプレートの各ウェルに添加された。プレートは光から保護され、30分から最長1時間までインキュベートされた。その後、吸光度がプレートリーダー (Spectramax, Molecular Devices Inc, Sunnyvale, CA, USA) において405nmで測定された。放出された小疱が多いほど、この方法により検出されるK14もそれだけ多くなる。

40

【0157】

(例11)

ACDにおけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング。アポトーシスを測定することによる分析

スクリーニングは、例1に記載される通りに実施された。アポトーシス細胞を検出するために、ApoptoTECT Annexin V-FITCキット (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) が、マニュアルの使用説明書に従って使用された。細胞は、フローサイトメトリー又は蛍光顕微鏡により分析された。アポトーシス細胞の量が多いほど、それだけアレルゲン/感作化合物は強かった。

【0158】

50

(例12)

半透性支持体上で増殖させた細胞を使用する、ACDにおけるリスク評価のための化合物のインビトロスクリーニング

ケラチノサイトは、細胞が代わりに半透性支持体(0.4~8µmポアサイズのTranswell(登録商標)Permeable Supports、Corning Life Science)上で増殖されること以外は、例1に記載される通りに増殖させた。スクリーニングは、例1に従って実施された。フロースルーは標準ピペットを用いて収集され、例3に記載される通りに放出されるタンパク質(たとえば、K5及びK14)に関して分析された。

【0159】

10

(例13)

DHRを引き起こす化合物の能力を試験する

細胞培養

正常なヒト表皮ケラチノサイト(HEKn、Cascade Biologics、Portland、OR、USA)は、60µMのCaCl₂、抗生物質ゲンタマイシン/アンホテリシン及び1%(v/v)ヒトケラチノサイト増殖補助剤(HKGS; Cascade Biologics)を補充されたフェノールレッド無しのEpiLifeケラチノサイト培地(Cascade Biologics)において維持された。代わりに、200µMのCaCl₂を含有し、HKGS(1%(v/v))を補充された、抗生物質のないMedium154が使用された。細胞は、加湿された5%CO₂インキュベーターにおいて37で増殖させた。補充された培地中の成分の最終濃度は、ウシ下垂体抽出物、0.2%v/v;ウシインスリン、5mg/mL;ヒドロコルチゾン、0.18mg/mL;ウシトランスフェリン、5mg/mL;ヒト表皮増殖因子、0.2ng/mL;随意に、ゲンタマイシン、10µg/mL、及びアンホテリシンB、0.25µg/mLである。試薬はすべて、Cascade Biologics、Portland、OR、USAから入手した。ケラチノサイトは、第6継代で実験に使用された。

20

【0160】

スクリーニング

継代6のHEKn細胞は分割され、1%(v/v)ヒトケラチノサイト増殖補助剤(HKGS; Cascade Biologics、抗生物質添加なし)を補充されたmedium154(Cascade Biologics)中18500細胞/mlまで再懸濁された。細胞懸濁液(0.5ml)は24ウェルプレート(Nunc Multidishes Nunc lon)の各ウェルに添加され、5%CO₂、37でインキュベートされた。培地は、細胞が培養密度になるまで、HKGSを補充された新鮮な154培地(抗生物質添加なし)で1日おきに交換された。

30

【0161】

試験される薬物候補は、DMSO(Sigma Aldrich)中、最終濃度の50mM、5mM及び0.5mMまで希釈された。これらの保存液は、実験が実施されるたびに新たに調製された。

【0162】

40

1)実験を開始する直前の細胞調製:細胞培養プレート中の培地は、HKGS(1%(v/v)ヒトケラチノサイト増殖補助剤(HKGS; Cascade Biologics))を補充された250µlの新鮮なMedium154(Cascade Biologics)で置き換えられ、細胞は5%CO₂、37で保管された。

【0163】

2)培地中での試験化合物の調製:245µlのMedium154は0.5mlのマイクロチューブ(Eppendorf、Sigma Aldrich、Stockholm、Sweden)に添加され、37まで予熱された(水浴)。5µlの薬物候補の保存液は、予熱された培地を含有するマイクロチューブに添加された。次に、これらの溶液は直ちに24ウェルプレートの細胞に添加された。

50

【0164】

3) マイクロチューブ中の溶液(すなわち、250 µl 培地 + 試験化合物)は各プレートに添加された。したがって、試験における各化合物の最終濃度は、0.5 mM、0.05 mM、及び0.005 mMであった。細胞と試験化合物を含有するプレートは5% CO₂、37℃で24時間インキュベートされた。

【0165】

4A) 各ウェルは光学顕微鏡(Nikon TE300 倒立顕微鏡)を用いて調べられて、小疱形成応答を決定した。所定の時点(1.5; 2.5; 24時間)での産生された小疱の量は、盲検試験(すなわち、小疱を計測する顕微鏡使用者は、各ウェルにどの化合物が添加されているのかに関する知識はまったくない)での目視検査を通じて評価された。測定されたパラメータは：

小疱形成までの時間

極度の感作物質 1.5時間から

強い感作物質 2.5時間 ~ 24時間

細胞が24時間後に小疱を産生した濃度

極度の感作物質 0.005 mM

強い感作物質 0.05 mM

中程度の感作物質 0.5 mM

弱い感作物質は試験された濃度では小疱形成なし

小疱の量(時間24時及び濃度0.5 mMで)

極度の感作物質：高量の小疱(+++)

強い感作物質：中程度量の小疱(++)

中程度の感作物質：低量の小疱(+)

弱い感作物質：小疱は検出されない

である。

【0166】

これら3種のエンドポイントを使用して、化合物の感作潜在力(すなわち、感作する及び/又はDHRを誘発する能力)の収集分析が行われた。

【0167】

4B) 薬物候補の添加の24時間後、薬物誘導「小疱形成」の差、すなわち、化合物の強度を定量化するための蛍光の測定のために、3×90 µlは24ウェルプレートの各ウェル(濃度0.5 mM、0.05 mM、及び0.005 mM)から96ウェルプレート(Nunc、F96 multisorp)に移された。10 µl(最終濃度5 µg/ml)の色素FM 1-43(T3163、Molecular Probes)が各ウェルに添加された。プレートは暗所で2分間インキュベートされ、蛍光は、励起510 nm及び発光626 nmのプレートリーダー(SpectraMax M2、Molecular Devices)において検出された。色素FM 1-43は水性溶媒中では実質的に非蛍光性であるが、細胞膜(又は小疱膜)中に挿入されると強い蛍光性になるので、この色素を使用して溶液中の小疱膜の量を測定することが可能である。したがって、蛍光は化合物の強度と相関しており、その場合、すなわち、化合物が強いほど、それだけ多くの小疱が周囲の培地に放出され(すなわち、薬物候補の作用を通じてそれだけ多くのエピトープが放出された)、その培地中の蛍光はそれだけ高くなった。

【0168】

(例14)

他の上皮細胞を使用してDHRを引き起こす化合物の能力を試験する

細胞培養

ヒト食道上皮細胞(HEEC、Sciencell Research Laboratories、Carlsbad、CA、USA)、つまり、DHRに関連する上皮細胞は、上皮細胞培地-2(EpiCM-2、Sciencell Research Laboratories、Carlsbad、CA、USA)において維持された。細胞は

10

20

30

40

50

、加湿された5%CO₂インキュベーターにおいて37℃で増殖させた。試薬はすべて、Cascade Biologics、Portland、OR、USAから入手した。

【0169】

スクリーニング

HEEC細胞は分割され、EpiCM-2中18500細胞/mlまで再懸濁された。細胞懸濁液(0.5ml)は24ウェルプレート(Nunc Multidishes Nunc lon)の各ウェルに添加され、5%CO₂、37℃でインキュベートされた。培地は、細胞が培養密度になるまで、1日おきに交換された。

【0170】

試験される薬物候補は、DMSO(Sigma Aldrich)中、最終濃度の50mM、5mM及び0.5mMまで希釈された。これらの保存液は、実験が実施されるたびに新たに調製された。

10

【0171】

1) 実験を開始する直前の細胞調製：細胞培養プレート中の培地は、250µlの新鮮なEpiCM-2で置き換えられ、細胞は5%CO₂、37℃で保管された。

【0172】

2) 培地中での試験化合物の調製：245µlのEpiCM-2は0.5mlのマイクロチューブ(Eppendorf、Sigma Aldrich、Stockholm、Sweden)に添加され、37℃まで予熱された(水浴)。5µlの薬物候補の保存液は、予熱された培地を含有するマイクロチューブに添加された。次に、これらの溶液は直ちに24ウェルプレートの細胞に添加された。

20

【0173】

3) マイクロチューブ中の溶液(すなわち、250µl培地+試験化合物)は各プレートに添加された。したがって、試験における各化合物の最終濃度は、0.5mM、0.05mM、及び0.005mMであった。細胞と試験化合物を含有するプレートは5%CO₂、37℃で24時間インキュベートされた。

【0174】

4A) 各ウェルは光学顕微鏡(Nikon TE300倒立顕微鏡)を用いて調べられて、小疱形成応答を決定した。所定の時点(1.5; 2.5; 24時間)での産生された小疱の量は、盲検試験(すなわち、小疱を計測する顕微鏡使用者は、各ウェルにどの化合物が添加されているのかに関する知識はまったくない)での目視検査を通じて評価された。測定されたパラメータは：

30

小疱形成までの時間

細胞が24時間後に小疱を産生した濃度

小疱の量

である。

【0175】

これら3種のエンドポイントを使用して、化合物の感作潜在力(すなわち、感作する及び/又はDHRを誘発する能力)の収集分析が行われた。

【0176】

4B) 薬物候補の添加の24時間後、薬物誘導「小疱形成」の差、すなわち、化合物の強度を定量化するための蛍光の測定のために、3x90µlは24ウェルプレートの各ウェル(濃度0.5mM、0.05mM、及び0.005mM)から96ウェルプレート(Nunc、F96 multisorp)に移された。10µl(最終濃度5µg/ml)の色素FM 1-43(T3163、Molecular Probes)が各ウェルに添加された。プレートは暗所で2分間インキュベートされ、蛍光は、励起510nm及び発光626nmのプレートリーダー(SpectraMax M2、Molecular Devices)において検出された。色素FM 1-43は水性溶媒中では実質的に非蛍光性であったが、細胞膜(又は小疱膜)中に挿入されると強い蛍光性になるので、この色素を使用して溶液中の小疱膜の量を測定することが可能である。したがって、蛍光

40

50

は化合物の強度と相関しており、その場合、すなわち、化合物が強いほど、それだけ多くの小疱が周囲の培地に放出され（すなわち、薬物候補の作用を通じてそれだけ多くのエピトープが放出された）、その培地中の蛍光はそれだけ高くなった。

【0177】

収集分析は、化合物の感作潜在力（すなわち、感作する及び／又はDHRを誘発する能力）についての情報を与える。

【0178】

（例15）

自己免疫疾患を引き起こす化合物の能力を試験する

細胞培養

正常なヒト表皮ケラチノサイト（HEKn、Cascade Biologics、Portland、OR、USA）は、60 μ MのCaCl₂、抗生物質ゲンタマイシン／アンホテリシン及び1%（v/v）ヒトケラチノサイト増殖補助剤（HKGS；Cascade Biologics）を補充されたフェノールレッド無しのEpilifeケラチノサイト培地（Cascade Biologics）において維持された。代わりに、200 μ MのCaCl₂を含有し、HKGS（1%（v/v））を補充された、抗生物質のないMedium154が使用された。細胞は、加湿された5%CO₂インキュベーターにおいて37 で増殖させた。補充された培地中の成分の最終濃度は、ウシ下垂体抽出物、0.2% v/v；ウシインスリン、5 mg/mL；ヒドロコルチゾン、0.18 mg/mL；ウシトランスフェリン、5 mg/mL；ヒト表皮増殖因子、0.2 ng/mL；随意に、ゲンタマイシン、10 μ g/mL、及びアンホテリシンB、0.25 μ g/mLである。試薬はすべて、Cascade Biologics、Portland、OR、USAから入手した。ケラチノサイトは、第6継代で実験に使用された。

【0179】

スクリーニング

継代6のHEKn細胞は分割され、1%（v/v）ヒトケラチノサイト増殖補助剤（HKGS；Cascade Biologics、抗生物質添加なし）を補充されたmedium154（Cascade Biologics）中18500細胞/mLまで再懸濁された。細胞懸濁液（0.5 mL）は24ウェルプレート（Nunc Multidishes Nunclon）の各ウェルに添加され、5%CO₂、37 でインキュベートされた。培地は、細胞が培養密度になるまで、HKGSを補充された新鮮な154培地（抗生物質添加なし）で1日おきに交換された。

【0180】

試験される化合物は、DMSO（Sigma Aldrich）中、最終濃度の50 mM、5 mM及び0.5 mMまで希釈された。これらの保存液は、実験が実施されるたびに新たに調製された。

【0181】

1）実験を開始する直前の細胞調製：細胞培養プレート中の培地は、HKGS（1%（v/v）ヒトケラチノサイト増殖補助剤（HKGS；Cascade Biologics））を補充された250 μ lの新鮮なMedium154（Cascade Biologics）で置き換えられ、細胞は5%CO₂、37 で保管された。

【0182】

2）培地中での試験化合物の調製：245 μ lのMedium154は0.5 mLのマイクロチューブ（Eppendorf）に添加され、37 まで予熱された（水浴）。5 μ lの試験化合物の保存液は、予熱された培地を含有するマイクロチューブに添加された。次に、これらの溶液は直ちに24ウェルプレートの細胞に添加された。

【0183】

3）マイクロチューブ中の溶液（すなわち、250 μ l培地＋試験化合物）は各プレートに添加された。したがって、試験における各化合物の最終濃度は、0.5 mM、0.05 mM、及び0.005 mMであった。細胞と試験化合物を含有するプレートは5%CO

10

20

30

40

50

2、37 で24時間インキュベートされた。

【0184】

4A)各ウェルは光学顕微鏡(Nikon TE300倒立顕微鏡)を用いて調べられて、小疱形成応答を決定した。所定の時点(1.5;2.5;24時間)での産生された小疱の量は、盲検試験(すなわち、小疱を計測する顕微鏡使用者は、各ウェルにどの化合物が添加されているのかに関する知識はまったくない)での目視検査を通じて評価された。測定されたパラメータは：

小疱形成までの時間：小疱形成を引き起こし、したがって上皮接触すると潜在的に自己免疫疾患を引き起こすことができる化合物：

1.5時間から非常に可能性が高い

強い可能性がある：2.5時間～24時間

細胞が24時間後に小疱を産生した濃度：上皮接触すると潜在的に自己免疫疾患を引き起こす可能性が非常に高い化合物：

強い可能性がある：0.05mM

中程度の可能性がある：0.5mM

弱い感作物質は試験された濃度では小疱形成する可能性は弱い

小疱の量(時間24時及び濃度0.5mMで)

極度に可能性が高い：高量の小疱(+++)

強い可能性がある：中程度量の小疱(++)

中程度の可能性がある：低量の小疱(+)

可能性は弱い：小疱は検出されない

である。

【0185】

これら3種のエンドポイントを使用して、自己免疫疾患を引き起こすことに関する化合物の効力の収集分析が行われた。

【0186】

4B)試験化合物の添加の24時間後、「小疱形成」の差、すなわち、化合物の強度を定量化するための蛍光の測定のために、3×90μlは24ウェルプレートの各ウェル(濃度0.5mM、0.05mM、及び0.005mM)から96ウェルプレート(Nunc、F96 multisorp)に移された。10μl(最終濃度5μg/ml)の色素FM 1-43(T3163、Molecular Probes)が各ウェルに添加された。プレートは暗所で2分間インキュベートされ、蛍光は、励起510nm及び発光626nmのプレートリーダー(SpectraMax M2、Molecular Devices)で検出された。

【0187】

色素FM 1-43は水性溶媒中では実質的に非蛍光性であるが、細胞膜(又は小疱膜)中に挿入されると強い蛍光性になるので、この色素を使用して溶液中の小疱膜の量を測定することが可能である。したがって、蛍光は化合物の強度と相関しており、その場合、すなわち、化合物が強いほど、それだけ多くの小疱が周囲の培地に放出され(すなわち、試験化合物の作用を通じてそれだけ多くの自己エピトープが放出された)、その培地中の蛍光はそれだけ高くなった。

【0188】

(例16)

化合物の阻害(小疱形成に関して)能力を試験する

阻害効果についてスクリーニングされる化合物(これ以降、阻害剤と呼ばれる)は、その最終用途(すなわち、通常、ケラチノサイト(又は同等の物)に小疱を産生させると考えられる化合物と一緒に混合物、溶液、製剤において使用するため)に関して適切な連続希釈においてDMSO中に溶解された。

【0189】

細胞培養

正常なヒト表皮ケラチノサイト (HEKn、Cascade Biologics、Portland、OR、USA) は、 $60 \mu\text{M}$ の CaCl_2 、抗生物質ゲンタマイシン/アンホテリシン及び 1% (v/v) ヒトケラチノサイト増殖補助剤 (HKGS; Cascade Biologics) を補充されたフェノールレッド無しの Epilife ケラチノサイト培地 (Cascade Biologics) において維持された。代わりに、 $200 \mu\text{M}$ の CaCl_2 を含有し、HKGS (1% (v/v)) を補充された、抗生物質のない Medium 154 が使用された。細胞は、加湿された $5\% \text{CO}_2$ インキュベーターにおいて 37°C で増殖させた。補充された培地中の成分の最終濃度は、ウシ下垂体抽出物、 0.2% v/v; ウシインスリン、 5mg/mL ; ヒドロコルチゾン、 0.18mg/mL ; ウシトランスフェリン、 5mg/mL ; ヒト表皮増殖因子、 0.2ng/mL ; 随意に、ゲンタマイシン、 $10 \mu\text{g/mL}$ 、及びアンホテリシン B、 $0.25 \mu\text{g/mL}$ である。試薬はすべて、Cascade Biologics、Portland、OR、USA から入手した。ケラチノサイトは、第 5 又は第 6 継代で実験に使用された。

【0190】

スクリーニング

継代 6 の HEKn 細胞は分割され、 1% (v/v) ヒトケラチノサイト増殖補助剤 (HKGS; Cascade Biologics、抗生物質添加なし) を補充された medium 154 (Cascade Biologics) 中 1.85×10^6 細胞/mL まで再懸濁された。細胞懸濁液 (0.5mL) は 24 ウェルプレート (Nunc Multidishes Nunclon) の各ウェルに添加され、 $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C でインキュベートされた。培地は、細胞が培養密度になるまで、HKGS を補充された新鮮な 154 培地 (抗生物質添加なし) で 1 日おきに交換された。

【0191】

オキサゾロン (すなわち、小疱を引き起こしていたが、薬物/シャンプー/香水/皿洗い機液体/等中に含めたい化合物。(ここではオキサゾロンにより例証されているが、使用を通じて上皮接触する任意の種類の製剤又は混合物中の任意の化合物でもよい)) は、DMSO (DMSO 及びオキサゾロンは Sigma Aldrich 社製) 中、最終濃度の 100mM 、 10mM 及び 1mM まで希釈された。その阻害効果についてスクリーニングされる化合物 (これ以降阻害剤と呼ばれる) は、その最終用途 (すなわち、通常、ケラチノサイト (又は同等の物) に小疱を産生させると考えられる化合物と一緒に混合物、溶液、製剤で使用するため) に関して適切な連続希釈 ($0.1 \mu\text{M}$ から 10M) においてハプテンとして同じ溶液中に溶解された。これらの保存液は、実験が実施されるたびに新たに調製される。

【0192】

1) 実験を開始する直前の細胞調製: 細胞培養プレート中の培地は、HKGS (1% (v/v) ヒトケラチノサイト増殖補助剤 (HKGS; Cascade Biologics)) を補充された $250 \mu\text{l}$ の新鮮な Medium 154 (Cascade Biologics) で置き換えられ、細胞は $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C で保管された。

【0193】

2) 培地中での試験混合物 (ハプテンと阻害剤) の調製: $245 \mu\text{l}$ の Medium 154 は 0.5mL のマイクロチューブ (Eppendorf) に添加され、 37°C まで予熱された (水浴)。 $5 \mu\text{l}$ の保存液は、予熱された培地を含有するマイクロチューブに添加された。次に、これらの溶液は直ちに 24 ウェルプレートの細胞に添加された。

【0194】

3) マイクロチューブ中の溶液 (すなわち、 $250 \mu\text{l}$ 培地 + 試験化合物) は各プレートに添加された。したがって、試験における各化合物の最終濃度は、 0.5mM 、 0.05mM 、及び 0.005mM であった。細胞と試験化合物を含有するプレートは $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C で 24 時間インキュベートされた。

【0195】

4 A) 各ウェルは、デジタルカメラに連結された光学顕微鏡 (Nikon TE300

10

20

30

40

50

倒立顕微鏡)を用いて調べられて、小疱形成応答を決定した。所定の時点(1.5; 2.5; 24時間)での産生された小疱の量は、盲検試験(すなわち、小疱を計測する顕微鏡使用者は、各ウェルにどの化合物が添加されているのかに関する知識はまったくない)での目視検査を通じて評価された。測定されたパラメータは:

阻害剤なしでの小疱形成までの時間: オキサゾロン 1.5時間

阻害剤は、オキサゾロン(又は新しい試験化合物)が細胞に添加されると、ケラチノサイトが小疱を産生するのを停止するはずである。

細胞が24時間後に小疱を産生した濃度

オキサゾロン 0.5 mM、0.05 mM

【0196】

弱い感作物質及び非感作物質は、0.5 mM、0.05 mM、及び0.005 mMでは小疱形成しないので、阻害剤を添加することによって、同様に小疱形成しないはずである。

小疱の量(時間24時及び濃度0.5 mM):

極度の感作物質(オキサゾロンのような)は高量の小疱(+++)を与える

【0197】

弱い感作物質及び非感作物質は、0.5 mM、0.05 mM、及び0.005 mMでは小疱形成しないので、阻害剤は同様に、時間24時及び濃度0.5 mMでは小疱形成をしないはずである。

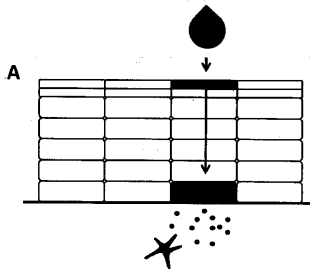
【0198】

これらの3種のエンドポイントを使用して、化合物の阻害潜在力の収集分析が行われる。試験化合物が添加されると小疱形成応答を阻害するのに効率的である化合物は、阻害剤と呼ばれる。次に、その阻害剤(又は類似物)は、溶液、混合物、製剤、等中の試験化合物と一緒に使用して、アレルギー性接触皮膚炎/自己免疫疾患/DHR/化学的に誘導される喘息、等を引き起こすリスクを最小限に抑えることが可能である。

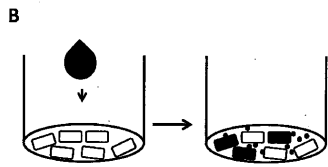
10

20

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/SE2011/000057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAPPINEN ET AL: "Rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) as a model for chemically induced skin irritation testing", TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 208, no. 3, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 233-241, XP005118643, ISSN: 0041-008X, DOI: DOI:10.1016/J.TAAP.2005.02.014 the whole document ----- -/--	1-27
<input checked="" 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 *E* earlier document 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
7 June 2011		24/06/2011
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 Bayer, Martin

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/SE2011/000057

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>STRAFACE ELISABETTA ET AL: "Cultured cells as a model system for the study of UV-induced cytotoxicity", JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B BIOLOGY, vol. 63, no. 1-3, October 2001 (2001-10), pages 52-60, XP002640154, ISSN: 1011-1344 the whole document</p> <p>-----</p>	24-27
T	<p>BAUER B ET AL: "Modification and expulsion of keratins by human epidermal keratinocytes upon hapten exposure in vitro", CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY 20110516 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY USA LNKD-DOI:10.1021/TX200030Y, vol. 24, no. 5, 16 May 2011 (2011-05-16), pages 737-743, XP002640155, ISSN: 0893-228X the whole document</p> <p>-----</p>	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 27/447 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	G 0 1 N 27/26	3 1 5 Z
	C 1 2 Q 1/02	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 512252456
 ステンフェルト、アンナ - レナ
 スウェーデン国 エス - 4 1 3 1 5 イェーテボリ、ユングマンズガータン 1 9 ビー

(71) 出願人 512252467
 アンデルソン、ソフィア
 スウェーデン国 エス - 4 1 2 7 1 イェーテボリ、プレストゴルドセンゲン 1 0

(74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所

(72) 発明者 ブロー、カースティン
 スウェーデン国 エス - 3 1 1 3 6 ファルケンベルイ、ヴァルベルグスヴェーゲン 2 1

(72) 発明者 バウアー、ブリジット
 スウェーデン国 エス - 4 1 4 7 8 イェーテボリ、カップランドスガータン 1 4 4

(72) 発明者 エリクソン、マリカ
 スウェーデン国 エス - 4 1 6 5 5 イェーテボリ、イスケラーレリデン 1 0 エー

(72) 発明者 ステンフェルト、アンナ - レナ
 スウェーデン国 エス - 4 1 3 1 5 イェーテボリ、ユングマンズガータン 1 9 ビー

(72) 発明者 アンデルソン、ソフィア
 スウェーデン国 エス - 4 1 2 7 1 イェーテボリ、プレストゴルドセンゲン 1 0

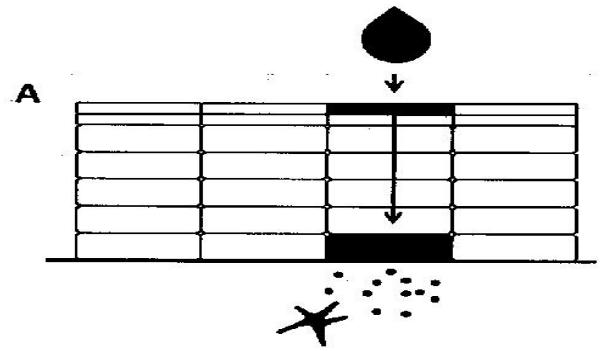
F ターム(参考) 2G045 AA24 BB20 CB01 CB09 DA36 FA11 FA34 FB03 FB12
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QQ91 QQ96 QR48 QR51 QR77
 QS24 QS28 QS33 QX01

专利名称(译)	筛选化合物敏化的方法		
公开(公告)号	JP2013524209A	公开(公告)日	2013-06-17
申请号	JP2013502523	申请日	2011-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	鲍尔碧姬 爱立信玛丽卡 斯登认为安娜莉娜 安德森索菲亚		
申请(专利权)人(译)	吹, 克斯廷 鲍尔, 碧姬 爱立信, 玛丽卡 斯登认为, 安娜 - 莱娜 安德森, 索菲亚		
[标]发明人	ブローカーステイン バウアーブリジット エリクソンマリカ ステンフェルトアンナレナ アンデルソンソフィア		
发明人	ブロー、カーズテイン バウアー、ブリジット エリクソン、マリカ ステンフェルト、アンナ - レナ アンデルソン、ソフィア		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/58 G01N33/15 G01N27/447 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/5044		
FI分类号	G01N33/50.Q G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/58.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N27/26.315.Z C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB09 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA34 2G045/ /FB03 2G045/FB12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/ /QX01		
优先权	61/341355 2010-03-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了筛选化合物敏化的方法。尽管该方法基于角蛋白或具有这些细胞重要特征的细胞，但也可以使用其他组分，例如蛋白质。该方法对于许多病症是重要的，包括但不限于过敏性接触性皮炎（ACD），药物过敏反应（DHR）和自身免疫疾病。

【 ☒ 1 A 】



【 ☒ 1 B 】