

(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2005-524843

(P2005-524843A)

(43) 公表日 平成17年8月18日(2005.8.18)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b>	GO 1 N 33/53	P 2GO45
<b>A6 1 K 38/00</b>	GO 1 N 33/53	Q 4BO63
<b>A6 1 K 45/00</b>	A6 1 K 45/00	4CO84
<b>A6 1 P 37/06</b>	A6 1 P 37/06	
<b>A6 1 P 37/08</b>	A6 1 P 37/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-503652 (P2004-503652)	(71) 出願人	597011463
(86) (22) 出願日	平成15年5月7日 (2003.5.7)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月28日 (2004.10.28)		スイス国、4056 バーゼル、リヒトシ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/004793		ユトラーセ 35
(87) 国際公開番号	W02003/095662	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成15年11月20日 (2003.11.20)		弁理士 青山 稜
(31) 優先権主張番号	0210535.1	(74) 代理人	100067035
(32) 優先日	平成14年5月8日 (2002.5.8)		弁理士 岩崎 光隆
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100064610
			弁理士 中嶋 正二
		(74) 代理人	100072730
			弁理士 小島 一晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被覆ピンアッセイシステムを用いる、推定薬物の影響下で細胞により産生される2つのアナライトの同時検出

(57) 【要約】

細胞により発現されるアナライトの量に影響する薬物を同定する方法であって、該方法が

- 少なくとも2つのアナライトを産生させるために細胞を刺激すること、
- 候補化合物の非存在下および存在下で、マトリックスのピン上でアナライトと認識分子間の少なくとも2つの認識複合体を形成させること、
- マトリックスのピン上で検出複合体を得るために、該認識複合体を検出分子で処理すること、
- 候補化合物の非存在下および存在下で形成される検出複合体のそれぞれの量を比較すること、および
- 少なくとも1つの検出複合体の量に影響する候補化合物を選択すること、を含む。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞により発現されるアナライトの量に影響する薬物を同定する方法であって、次の段階

( a ) 刺激により少なくとも 2 つのアナライトを発現できる細胞を含む媒体を用意すること、

( b ) 該アナライトを発現させるための該細胞の刺激手段を用意すること、

( c ) 候補化合物を用意すること、

( d ) ( a ) の媒体を ( b ) の刺激手段と、刺激された細胞を含む媒体を得るのに十分な時間接触させること、および候補化合物を接触前、同時、または直後に添加するか；または候補化合物を添加しないこと、

( e ) 必要に応じて細胞を破壊すること、

( f ) 少なくとも 2 つの異なる認識分子（それぞれが、特異的結合部位で、アナライトの 1 つと結合すると知られている）を含む被覆用混合物で被覆されているピンを含むマトリックスを用意すること、

( g ) ( f ) のマトリックスのピンを ( d ) で得られた媒体と、該マトリックスのピン上での認識複合体の形成を可能とする十分な時間、接触させること（ここで、それぞれの認識複合体が、1 個のアナライトのその特異的認識分子との結合により形成される複合体である）、

( h ) 少なくとも 2 つの異なる検出分子（検出分子のそれぞれが、( g ) で形成された認識複合体の 1 つの特異的結合部位と、該アナライトのその認識分子との結合に干渉することなく、結合すると知られている）を用意すること、

( i ) ( h ) の検出分子を ( g ) で得られたマトリックスのピンと、該マトリックスのピン上での検出複合体の形成を可能とするのに十分な時間、接触させること（ここで、それぞれの検出複合体が、1 個の認識複合体のその特異的検出分子との結合により形成される複合体である）、

( j ) ( i ) において該ピン上で形成された、それぞれの検出複合体のそれぞれの量を決定すること、

( k ) 候補化合物の非存在下および存在下で形成された、検出複合体のそれぞれの量を比較すること、

( l ) ( j ) および ( k ) で決定された、形成された検出複合体の少なくとも 1 つの量に影響する薬物を選択すること、

を含む、方法。

## 【請求項 2】

該アナライトが、ヒト I L - 4、I L - 1 0、および I F N - からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

該認識分子が、ヒト I L - 4、I L - 1 0、および I F N - に対する抗体からなる群から選択される、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 4】

認識分子により認識されるものとは異なる該アナライトのエピトープを認識する該検出分子が、ヒト I L - 4、I L - 1 0、および I F N - に対する標識抗体からなる群から選択される、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

細胞により発現されるアナライトの量に影響する薬物を同定するキットであって、

( a ) 刺激により少なくとも 2 つのアナライトを発現できる細胞を含む媒体、

( b ) 該アナライトを発現させるための該細胞の刺激手段、

( c ) 必要に応じて、細胞の破壊手段、

( d ) 少なくとも 2 つの異なる認識分子（それぞれが、特異的結合部位でアナライトの 1 つと結合し、従って ( a ) のアナライトの 1 つと接触して、ピン上で認識複合体を形成す

10

20

30

40

50

ると知られている)を含む被覆用混合物で被覆されているピンを含むマトリックス、  
(e)少なくとも2つの検出分子(検出分子それぞれが、(d)により形成された認識複合体の1つの特異的結合部位と、該アナライトのその認識分子との結合に干渉することなく結合し、従って(d)により形成された認識複合体と接触して、ピン上で検出複合体を形成すると知られている)、

(f)該ピン上で形成された検出複合体の量を決定する手段、

(g)ウェルシステム(ここで、その数および形態が、(d)のマトリックスに含まれるピンに対応する)、

(h)必要に応じて、(a)の細胞により発現されたアナライトに対する校正スタンダード、

(i)必要に応じて、既知の量/濃度の(a)の細胞により発現されるアナライトを含有する対照試料、および

(j)必要に応じて、試料中の(a)の細胞により発現されるアナライトを定量または検出するための、該キットの構成要素を用いるための指示書、  
を含むキット。

【請求項6】

請求項1から4のいずれか1項に記載の方法により同定される薬物。

【請求項7】

製剤として用いるための、請求項6に記載の薬物。

【請求項8】

自己免疫関連疾患またはアレルギー疾患の処置のための医薬の製造のための、請求項2から4のいずれか1項に記載の方法により同定される薬物。

【請求項9】

請求項1から4のいずれか1項に記載の方法により同定される薬物を、少なくとも1つの医薬添加剤と共に含む、医薬組成物。

【請求項10】

自己免疫関連疾患またはアレルギー疾患を処置する方法であって、該処置が必要な対象に、請求項2から4のいずれか1項により同定される薬物を有効量投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、被覆ピンアッセイ、および媒体中の細胞により発現される複数のアナライトを検出する方法、例えば、細胞によるアナライトの発現に影響する薬物(agent)を同定する方法に関する。

【0002】

一般に、媒体中のこの種のアナライトを検出するアッセイは、該アナライトを含有する媒体を認識分子と接触させること、および必要に応じて、形成された認識複合体を検出分子とさらに接触させること、および形成された検出複合体の量を決定することにより、行われる。該接触は、該アナライトを含有するマイクロタイタープレートのウェル中で行われる。例えば、いくつかのアナライトが測定されることが望まれる場合、複雑な方法が必要となる。

我々はここで、このような複雑な方法を容易にすることを見出した。

【0003】

1つの態様において、本発明は、細胞により発現されるアナライトの量に影響する薬物を同定する方法を提供する。該方法は、次の段階:

(a)刺激により少なくとも2つのアナライトを発現できる細胞を含む媒体を用意すること、

(b)該アナライトを発現させるための該細胞の刺激手段を用意すること、

(c)候補化合物を用意すること、

10

20

30

40

50

(d) (a)の媒体を(b)の刺激手段と、刺激された細胞を含む媒体を得るのに十分な時間接触させること、および候補化合物を接触前、同時、または直後に添加するか；または候補化合物を添加しないこと、

(e) 必要に応じて細胞を破壊すること、

(f) 少なくとも2つの異なる認識分子(それぞれが、特異的結合部位で該アナライトの1つと結合すると知られている)を含む被覆用混合物で被覆されているピンを含むマトリックスを用意すること、

(g) (f)のマトリックスのピンを(d)で得られた媒体と、該マトリックスのピン上での認識複合体の形成を可能とする十分な時間、接触させること(ここで、それぞれの認識複合体が、1個のアナライトのその特異的認識分子との結合により形成される複合体である)、

(h) 少なくとも2つの異なる検出分子(検出分子のそれぞれが、(g)で形成された認識複合体の1つの特異的結合部位と、該アナライトのその認識分子との結合に干渉することなく、結合すると知られている)を用意すること、

(i) (h)の検出分子を(g)で得られたマトリックスのピンと、該マトリックスのピン上での検出複合体の形成を可能とするのに十分な時間、接触させること(ここで、それぞれの検出複合体が、1個の認識複合体のその特異的検出分子との結合により形成される複合体である)、

(j) (i)において該ピン上で形成された、それぞれの検出複合体のそれぞれの量を決定すること、

(k) 候補化合物の非存在下および存在下で形成された、検出複合体のそれぞれの量を比較すること、

(l) (j)および(k)で決定された、形成された検出複合体の少なくとも1つの量に影響する薬物を選択すること、を含む。

#### 【0004】

本発明によれば、

- 「細胞」は、媒体中で刺激により少なくとも2つのアナライトを発現できる、1以上の細胞または細胞株、好ましくは1つの細胞株を含み、

- 「アナライト」は、アッセイされるべき物質であり、

- 媒体中に溶解可能な少なくとも2つのアナライトが、単一のピンシステムを用いて同時に検出され、

- アナライトは、刺激により細胞(細胞株)によって細胞外または細胞内で発現され、

- 少なくとも2つ、例えば、2から10、好ましくは2から6、例えば、3から4つのアナライトがアッセイされる。

#### 【0005】

本発明によるアナライトは、サイトカイン、ケモカイン、(認識)受容体、抗体、およびオリゴヌクレオチドの様な、生体内現象を仲介可能なポリペプチド/オリゴペプチド/オリゴヌクレオチドを含む。

#### 【0006】

サイトカインは、BおよびTリンパ球細胞(「B細胞」および「T細胞」)、ナチュラルキラー(「NK」)細胞、抗原提示(「APC」)細胞の様な、免疫系細胞の応答を制御する一群の化合物である。該「サイトカイン」は、誘導物質(刺激物)との接触に際して、ある種の細胞集団により放出される溶解性物質であり、細胞内メディエーターとして働く。用語「サイトカイン」および「リンホカイン」は互換使用できる。該化合物の命名を単純にする試みで、1979年に開催された第2回国際リンホカインワークショップの参加者グループが、白血球の異なる集団間のコミュニケーションシグナルとして働くタンパク質の能力に基いて、命名の統一システムを展開するために用語「インターロイキン」(IL)を提唱した。サイトカインは、好ましくは、インターロイキン(好ましくは、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL

10

20

30

40

50

- 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12、IL - 13、IL - 14、IL - 15、IL - 16、IL - 17、IL - 18、IL - 19、IL - 20、IL - 21、IL - 22、IL - 23)、インターフェロン(好ましくは、IFN - 、IFN - 、IFN - )、腫瘍壊死因子(TNF分子)(例えば、TNF - 、TNF - )、トランスフォーミング成長因子TGF(TGF - ファミリー、インヒピンファミリー、DPP/VG1ファミリー、およびミューラー管阻害物質ファミリーからなるサイトカインの群から選択されるTGF - スーパーファミリーを含む)、および顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子GM - CSFを含む。サイトカインは、サイトカイン受容体を含む。「サイトカイン(スーパーファミリー)受容体」は、密接に関係する糖タンパク質細胞表面および可溶性受容体であって、WSXWSドメインを多くの場合含む、かなりの相同性を有し、かつ一般にサイトカイン受容体スーパーファミリーのメンバーとして分類される。スーパーファミリーのメンバーは、IL - 2(、および鎖)、IL - 3、IL - 4、IL - 5; IL - 6、IL - 7、IL - 9、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM - CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G - CSF)、白血病抑制因子(LIF); オンコスタチンM(OSM)の受容体、およびプロラクチン、成長ホルモン(GH)、絨毛様神経栄養因子(CNTF)の受容体も含むが、これらに限定されない。該受容体は一般に、膜貫通型タンパク質として発現されるが、それらは媒体試料の溶液中にも見出され得る。

10

#### 【0007】

ケモカインは、「インタークリン」および「SISサイトカイン」としても知られており、白血球を誘引し、そして活性化し、これにより免疫系の刺激および制御で役立つ、小分泌タンパク質(例えば、70~100アミノ酸、そして約8~10kDa)のファミリーを含む。名称「ケモカイン」は、走化性サイトカインに由来し、該タンパク質の白血球の走化性を刺激する能力を意味している。実際、ケモカインは、病理組織への炎症細胞の主な誘引物質を含む(概論として、Baggiolini et al., *Advances in Immunology*, 55:97-179 (1994)を参照)。既に同定されたケモカインは一般に、互いに20~70%のアミノ酸同一性を示し、かつ4つの高保存システイン残基を含有する。該システイン残基の最初の2つの相対位置に基づき、ケモカインはさらにサブファミリーに分類されている。ヒト染色体4に位置する遺伝子によりコード化されている、「C - X - C」または「」サブファミリーでは、該最初の2つのシステインの間に1アミノ酸が存在する。ヒト染色体17上の遺伝子によりコード化されてる、「C - C」または「」サブファミリーでは、最初の2つのシステインは隣接する。いくつかのケモカインのX線結晶構造解析およびNMR研究は、それぞれのファミリーで、1番目と3番目のシステインがジスルフィド結合を形成し、そして2番目と4番目のシステインが第2のジスルフィド結合を形成し、このことが該タンパク質の天然立体構造に強く影響することを示した。ケモカインタンパク質のファミリーは、Zlotnik et al., *Immunity* 121-27 (2000)およびSaunders et al., *DDT* 80-92 (1999)において、より詳細に記載されている。

20

30

#### 【0008】

化学誘引物質の認識受容体は、化学誘引分子と相互作用可能な受容体である。認識とは一般に、典型的に相互作用する生体分子(例えば、受容体とそのリガンド)を意味している。ケモカインは、ケモカイン受容体、そして好ましくは、ケモカイン受容体であるCXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CCR11、XCR1、CX<sub>3</sub>CR1、C5a受容体、アラキドン酸誘導体ロイコトリエンB<sub>4</sub>受容体、血小板活性化因子受容体、ホルミル - met - leu - phe受容体、好中球活性化タンパク質1受容体、インターロイキン8受容体、血小板因子4受容体、血小板塩基性タンパク質受容体、黒色腫成長刺激因子/GRO受容体を含むが、これらに限定されない。

40

#### 【0009】

本発明によるアナライトを発現させるための細胞の刺激手段は、既知のものであるか、または例えば、既知の方法に準じて見出されてもよいし、あるいは本明細書に記載される

50

ものである。刺激物質は、例えば、抗体、抗原、スーパー抗原、および化学物質を含む。細胞を破壊する方法は、既知のものであるか、または例えば、既知の方法に準じて見出されてもよい。本発明による細胞破壊は、必要に応じて、例えば、アッセイされる（検出されることが望まれる）アナライトが細胞内で発現されている場合、段階（f）を行う前に実行され得る。

#### 【0010】

本発明のピンを含むマトリックスは、ピンが設置されているマトリックスからなり、これは本明細書において「ピンシステム」とも呼ばれる。マトリックスは、好ましくはプラスチックマトリックスである。ピンは、好ましくは、プラスチックピンまたは（前処理された）ガラスピンであり、好ましくは、本発明の被覆用混合物をその表面に、例えば、直接またはリンカーを介して固定できるプラスチックピンである。認識分子を固定（安定的に）できるプラスチックまたは（前処理された）ガラス材は、既知であるか、または通常の方法に準じて用意されてもよい。ピンは便宜上、全てが同じ大きさであるべきである。ピンの長さは、全てのピンが都合よく、ウェル（例えば、マイクロタイタープレートのウェル）に、それぞれのピンが個々の区分されたウェルに、同時に浸漬される様なものでなければならない。好ましいピンの長さは、10 mm以上（例えば、10 mmから400 mm）、好ましくは、20 mmから300 mm（例えば、40 mmから200 mm）を含む。これらのピンは、該ピンを都合良く被覆することを可能とし、かつ該ピンをウェルに、例えば、0.2から2.0 mm（例えば、0.3から1.5 mm）、都合良く浸漬することを可能とする、適当な太さであるべきである。該マトリックスの大きさは、手動または（ロボット）機械のいずれかにより都合よく取り扱われ得るようなものでなければならない。該マトリックスの大きさは、例えば、所望のピンの数、およびそれらが挿入されることが意図されているウェルシステムに依存する。好ましくは、96本以上のピン（例えば、96から10000本のピン）が用いられ、例えば、都合良いピンの数は、例えば、現行の標準的マイクロタイタープレートに合うフォーマットで配置された数、例えば、96、384、または1536を含むが；標準的オリゴヌクレオチドアレイに適應させるためのピンの大きさおよびマトリックスフォーマットの小型化も選択肢である。該ピンは、それぞれのピンが、その隣接するピンから隔離されるように設置される。該ピンは、マトリックスに規則的に設置されるべきである。そのために、ウェルシステムは、ピンの数に対応するウェルの数で用意されるべきであり、ここで該ウェルは、ピンシステムのピンが該ウェルシステムに同時に、それぞれのピンが1つのウェルに個別に浸漬される態様で浸漬され得る様に、設置される。

10

20

30

#### 【0011】

本発明によると、ピンは、少なくとも2つの異なる認識分子（該認識分子のそれぞれが、特異的結合部位でアナライトの1つと結合し、その結果、認識分子と結合したアナライト（以下、「認識複合体」と呼ばれる）を形成すると知られている）を、例えば、適当な媒体中に含む、被覆用混合物で被覆されている。適当な認識分子は、例えば、抗体、（認識）受容体（例えば、（認識）受容体の抗体フラグメントを含む）；およびアナライトと結合する能力が知られている、低分子量の化合物の様な他の物質を含む。例としては、例えば、

40

- サイトカイン（サイトカイン受容体がアナライトとして用いられる場合）、または
- サイトカイン受容体（サイトカインがアナライトとして用いられる場合）、
- オリゴヌクレオチド配列（相補的配列を含有するオリゴヌクレオチドがアナライトとして用いられる場合）、

を含む。

#### 【0012】

ピンの被覆は、通常の方法に準じて実施され、そして好ましくは、ピンシステムのピンをウェルシステム（ここで、ウェルは、認識分子で被覆されているピンを含むマトリックスを得るために、適当な媒体中の少なくとも2つの認識分子の混合物で満たされている）に浸漬することにより、簡単に実施される。

50

## 【0013】

アナライトを含有するウェル中に被覆ピンを浸すと、例えば、刺激された無傷の細胞を含有するウェルに該ピンを浸漬することにより、あるいは、刺激された細胞を含有するウェルへ、細胞を含有する媒体中への細胞内アナライトの放出を可能とするために、その膜を破壊した後、該ピンを浸漬することにより、アナライトはその特異的認識分子と結合し、そして認識複合体が該ピン上で形成される。候補化合物の非存在下で、特定量の該認識複合体がピン上で形成され、アナライトの発現に影響する候補化合物の存在下で、該認識複合体の少なくとも1つが、その非存在下で形成された特定量より多いかまたは少ない量で形成される。かかる影響が本発明により見出される候補化合物は、以下、アンタゴニストもしくはアゴニスト、または本発明の(による)薬物と呼ばれる。

10

## 【0014】

刺激された細胞(故に、アナライト)を含む媒体は、好ましくは、本発明による被覆ピンの存在下で、認識複合体の形成に十分な時間、インキュベートされる。必要な時間は、予試験で決定される。段階(g)による接触は、好ましくは、段階(f)により用意されたピンシステムのピン、対応するウェルシステム(ここで、ウェルが本発明による被覆用混合物を含む媒体で満たされている)に浸漬することで、実行される。

## 【0015】

形成された該認識複合体の形態および量は、該認識複合体を検出分子、好ましくは、少なくとも2つの検出分子(それぞれが、単一の認識複合体中のアナライトの特異的結合部位と、該アナライトの認識分子との結合に干渉することなく結合すると知られている)の混合物で処理すること、従って、本発明のマトリックスのピン上で「検出複合体」を形成し、そして形成されたそれぞれの検出複合体のそれぞれの量を決定することにより、決定される。該検出複合体の形成のため、認識分子に対するアナライト中の結合部位は、検出分子の該アナライトとの結合部位と異ならなければならない、そして検出分子の認識複合体中の該アナライトとの結合は、該アナライトの認識分子との結合に干渉してはならない(すなわち、それぞれの検出複合体は、対応する認識複合体の量で形成され、言い換えれば、該検出分子は、認識分子により認識されるものとは異なる、アナライトの1つのエピトープを認識する)。適当なシステムは、見出されてもよいし、または既知のもの、例えば、「サンドイッチELISA」システム、例えば、「(抗体)-(アナライト)-(標識抗体)-サンドイッチ」でもよい。

20

30

## 【0016】

本発明の段階(i)による被覆ピンを検出分子と接触させることは、段階(g)のピンシステムを少なくとも2つのウェルシステム(ここで、ウェルは、それぞれの場合において、1つの適当な検出分子で満たされている)に浸漬することにより、または少なくとも2つの異なる適当な検出分子の混合物に浸漬することにより、行われる。検出複合体は、マトリックスのピン上で形成される。

## 【0017】

検出分子は、例えば、酵素または標識が例えば定量的に測定される標識分子、例えば、蛍光または発光標識分子を含む。適当な標識は、既知であるか、または例えば、通常の方法に準じて見出されてもよい。本発明による検出分子は、好ましくは、西洋わさびペルオキシダーゼ基質、アルカリホスファターゼ基質、発光基質、ポリメラーゼ連鎖反応溶液、ランタニドの様な時間分解蛍光基質、および必要に応じてエンハンサー液を含む。標識には、好ましくは、ランタニド、例えば、ユウロピウム、テルビウム、サマリウム、およびジスプロシウムが用いられる。適当な検出分子または検出分子の混合物についての好ましい例は、ユウロピウムで標識された、ヒトIL-4に対する抗体、サマリウムで標識された、ヒトIFN- $\gamma$ に対する抗体、テルビウムで標識された、ヒトIL-10に対する抗体、または該標識抗体の個々の混合物を含む。

40

## 【0018】

段階(j)により形成されたアナライトの量の決定は、該検出複合体を単離すること、すなわち、ウェルシステムからマトリックスシステムを単に取り出すこと、および該マト

50

リックシステムのピン上で形成された検出分子の結果を測定することにより、行われる。該測定は、一般的なアッセイ、例えば、ELISA、DELFA、およびオリゴヌクレオチド標的アッセイにおいて、本発明により形成された検出複合体の量を決定する手段を用いてなされる。好ましくは、ピン上のそれぞれのアナライトの量は、該ピンをウェルシステム（ここで、ウェルは、例えば、適当な媒体中の適当な検出成分で満たされている）に浸漬することにより検出される。適当な検出媒体は、例えば、ピン上の被覆と接触して検出複合体を形成することにより、光学または蛍光特性を変えることができる検出分子を含有している基質媒体を含む。適当な検出分子は、既知であるか、または通常の方法に準じて見出されてもよく、例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ基質、アルカリホスファターゼ基質、ルシフェラーゼ基質、時間分解蛍光基質（例えば、ランタニド標識を用いる）、およびエンハンサー液、およびポリマーゼ連鎖反応溶液を含む（例えば、検出分子が酵素の場合、酵素活性を測定し、あるいは蛍光標識の場合、適当な波長での適当な発光/蛍光測定方法（例えば、通常の方法を含む）により、標識特異的結果を測定する）。

10

**【0019】**

本発明による候補化合物は、例えば、化学ライブラリー、および天然産物ライブラリー中の低分子量化合物、および例えば、天然または合成物質ライブラリー（すなわち、化学的実体の系統的収集物）に存在するアンチセンスオリゴヌクレオチド（これらは、段階（b）による細胞でのアナライト発現の産生に対する影響が未知であり、アッセイされることが望まれている）を含む。

**【0020】**

本発明の方法により同定されるアゴニストまたはアンタゴニスト（本明細書において、「本発明の（による）薬物」とも呼ばれる）は、本発明により、細胞により発現されるアナライトの量への影響が決定された、選択された候補化合物の1つである。薬物は、アゴニストまたはアンタゴニストであってよく、例えば、（オリゴまたはポリ）ペプチド、モノクローナル抗体、低分子量化合物の様な化学物質、天然に存在する化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。本発明により同定されるアゴニストまたはアンタゴニストは、生体内でのアナライトの産生に干渉できるため、医薬的に活性な化合物および/または診断ツールとして有用である。

20

**【0021】**

少なくとも2つのアナライトが、  
- 刺激により少なくとも2つのアナライトを発現する細胞を含む媒体、  
- 検出分子の混合物を含む媒体、  
を、候補化合物の非存在下および存在下で含むウェルに単に浸漬される、単一のピンシステムで決定されるため、本発明による方法は先行技術工程と比較して有利である。

30

**【0022】**

従って、少なくとも2つ、またはそれ以上の異なるアナライトを同時に決定するために、単一のピンマトリックスが使用される。該決定工程は、例えば、第1の実施でのピンシステムとは異なる認識分子の混合物でピンが被覆されているピンシステムを用いて、該アナライトを含む同一ウェルにおいて繰り返されてもよい。これにより、決定されるアナライトの数が2倍となる。認識分子との接触と検出成分との接触との間の様な、異なる決定段階間の洗浄操作（例えば、ELISA検出方法において必要である）は、省略してもよいし、または単純化（例えば、洗浄が所望される場合、洗浄用媒体を含むウェルにピンマトリックスシステムを単に浸漬することを含む）されてもよい。

40

**【0023】**

別の態様において、本発明は、細胞により発現されるアナライトの量に影響する薬物を同定するためのキットを提供し、該キットは、

(a) 刺激により少なくとも2つのアナライトを発現できる細胞を含む媒体、

(b) 該アナライトを発現させるための該細胞の刺激手段、

(c) 必要に応じて細胞の破壊手段、

(d) 少なくとも2つの異なる認識分子（それぞれが、特異的結合部位でアナライトの1

50

つと結合し、従って、(a)のアナライトの1つと接触して、ピン上で認識複合体を形成すると知られている)を含む被覆用混合物で被覆されているピンを含むマトリックス、(e)少なくとも2つの検出分子(検出分子それぞれが、(d)により形成された認識複合体の1つの特異的結合部位と、該アナライトのその認識分子との結合に干渉することなく結合し、従って(d)により形成された認識複合体と接触して、ピン上で検出複合体を形成すると知られている)、

(f)該ピン上で形成された検出複合体の量を決定する手段、

(g)ウェルシステム(ここで、その数および形態が、(d)のマトリックスに含まれるピンに対応する)、

(h)必要に応じて、(a)の細胞により発現されるアナライトに対する校正スタンダード(例えば、校正試料)、 10

(i)必要に応じて、既知の量/濃度の(a)の細胞により発現されるアナライトを含有する対照試料、および

(j)必要に応じて、試料中の(a)の細胞により発現されるアナライトを定量または検出するための、該キットの構成要素を用いるための指示書、を含む。

#### 【0024】

本発明のキットにおいて、任意の構成要素(a)から(i)は、物質的構成要素(例えば、試験されるべき試料の適当な環境を含む)を含む。

本発明によるキットは、診断キットとしても有用である。 20

#### 【0025】

別の態様において、本発明は、例えば、自己免疫関連疾患またはアレルギー疾患での診断キットとして用いるために、本発明によるキットを提供する。

#### 【0026】

ピンシステムのピン上で形成される検出複合体の量を決定する手段は、上記の手段を含む。(a)の細胞により発現されるアナライトに対する校正スタンダード、および対照試料は、例えば、通常の方法により、または同様にして、必要に応じて用意されてもよい。

#### 【0027】

CD4+Tヘルパー細胞(Th細胞)は、適応免疫系が種々の病原体を制御するために展開する、エフェクター機序の調節に主な役割を果たす。Th細胞は、主要組織適合性クラスII(MHC-II)分子に関連して、専門の抗原提示細胞(APC)により提示される、特定の抗原ペプチドを認識する。活性化により、Th細胞は増殖し、そしてそのサイトカイン分泌パターンに基づき定義された、異なるTh細胞サブセットに分化する。Th細胞分化は、遺伝的背景、抗原量、同時刺激分子の濃度、および上記のサイトカイン環境(cytokine milieu)(ここで、免疫応答が生じる)の様な因子により決定される、多因子決定である(例えば、Coffman RL and Reiner SL, Science (1999), 284: 1283を参照)。従って、IL-12は、IL-2、IFN- $\gamma$ 、およびTNF- $\alpha$ の産生を特徴とする、Th1フェノタイプへのTh細胞の誘導(driving)に関与する。Th1細胞は、例えば、細胞介在性免疫の特徴である前炎症性応答で関与し、そしてこのためそれらは多くの感染性生物の除去のために重要である。Th2細胞は、例えば、IL-4、IL-5、およびIL-13を産生し、そしてその発生は、IL-4により誘導される。Th2細胞は、抗体介在性B細胞応答の有力なヘルパーであり、抗炎症機能を発揮する。一般に、未感作CD45RA+Th細胞は、Th1およびTh2サイトカイン共に産生可能なサブセットであるTh0フェノタイプにまず移行する。続いて、特定の抗原での刺激が繰り返され、Th0細胞が、Th1およびTh2細胞にさらに分化する。生じたTh1またはTh2細胞サブセットは、部分的には、相互サブセットにより分泌されるサイトカインの対向阻害効果のため、特定の免疫反応過程を通じて優勢なままである(例えば、O'Garra A. Immunity (1998), 8: 275を参照)。しかしながら、激化したTh1またはTh2応答は宿主に有害なものである。故に、Th1細胞は自己免疫疾患と関連する病因的免疫で関与し、Th2細胞はアレルギー疾患を仲介する。幸運なことに、たいていのヒトTh細胞 30 40 50

は、様々な組合せのTh1およびTh2サイトカインを共発現する。該Th0細胞は、病原体の除去に機能的に関与する、釣り合いのとれたTh1/Th2サイトカインを産生する一方で、最小の病因的免疫を誘導する安定的サブセットも表す。さらに、CD4+T細胞は、IL-10の存在下で、T制御(Tr1)細胞へも分化する。Tr1細胞は、高濃度のIL-10およびTGF- $\beta$ 1を産生し、Th1およびTh2応答の両方にダウンレギュレート作用を発揮する(例えば、Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, De Vries JE and Roncarolo MG, Nature (1997), 389: 737を参照)。

#### 【0028】

免疫系は、特定の刺激それぞれに最も適当な免疫応答の種類を生むために展開し、そしてさらに、危険信号がなくなると、該応答をスイッチオフするための制御機序を展開させることは、明らかである。しかしながら、該制御機序にも関わらず、病因的免疫を生じる極度のTh偏りの状況がしばしば起こり、その場合、偏ったサイトカインのエフェクター機能と拮抗し、そして/または進行中の免疫応答を非病因的免疫に戻すことができる、適切な活性物質を有することが、極めて有益である。本発明により、我々は、ヒトIL-4、IFN- $\gamma$ 、およびIL-10産生のモジュレーターを同定するための高処理スクリーニング(HTS)アッセイの基礎を見出した。これらのサイトカインは、病因的免疫状況を含む、Th細胞の分化過程および/またはエフェクター機能で重要な働きをする。IL-4産生のアンタゴニスト、例えば、特異的アンタゴニストは、アレルギー疾患を標的とするための候補であり、IFN- $\gamma$ を抑制するアンタゴニスト、例えば、特異的アンタゴニストは、自己免疫疾患の処置に有益であり、そしてIL-10産生のアゴニスト、例えば、特異的アゴニストは、免疫応答の可能性のあるダウンレギュレーターであり、かつ対応する疾病の処置および予防に有用である。

10

20

#### 【0029】

別の態様において、本発明は、本発明(ここで、  
 - アナライトは、ヒトIL-4および/またはIL-10および/またはIFN- $\gamma$ からなる群から選択され、  
 - 認識分子は、ヒトIL-4、IL-10、およびIFN- $\gamma$ に対する抗体からなる群から選択され、  
 - 該検出分子(該検出分子は、認識分子により認識されるものとは異なる、該アナライトのエピトープを認識する)は、ヒトIL-4、IL-10、およびIFN- $\gamma$ に対する標識抗体(例えば、該抗体は、ユウロピウム、テルビウム、サマリウム、およびジスプロシウムの様なランタニドにより標識される)からなる群から選択される)により細胞によって発現される、アナライトの量に影響する薬物を同定する方法を提供する。

30

#### 【0030】

本発明の薬物の特定の医薬活性、例えば、アゴニストまたはアンタゴニストは、検出されるアナライトの生物学的活性に依存し、生体内での特定のアナライトの放出により仲介される疾病での医薬活性を含む。例えば、アナライトは、サイトカイン、ケモカイン、(認識)受容体、抗体、およびオリゴヌクレオチドの様な生体内現象を仲介できるタンパク質から選択される。

40

#### 【0031】

本発明の薬物は、自己免疫関連疾患および/またはアレルギー疾患に対する治療活性を示す。

別の態様において、本発明は、  
 - 医薬として用いるための、本発明の薬物、  
 - 自己免疫関連疾患またはアレルギー疾患の処置のための医薬の製造のための、本発明の薬物、  
 を提供する。

#### 【0032】

処置のための本発明の薬物は、1以上(例えば、2以上の組合せ)、好ましくは、1つ

50

の本発明の薬物を含む。

【0033】

別の態様において、本発明は、本発明の薬物を、少なくとも1つの医薬上の添加剤、例えば、適当な担体および/または希釈剤(例えば、充填剤、結合剤、崩壊剤、流動性調節剤、滑沢剤、糖および甘味剤、芳香剤、保存剤、安定剤、湿潤剤および/または乳化剤、軟化剤、保湿剤、浸透圧を調節するための塩、および/またはバッファーを含む)と共に含む、医薬組成物を提供する。

【0034】

該組成物は、通常の方法に従い(例えば、準じて)、例えば、混合、造粒、被覆、溶解、または凍結乾燥工程により製造される。単位用量製剤は、例えば、約0.5mgから約1000mg、例えば、1mgから約500mgを含有する。

10

【0035】

さらなる態様において、本発明は、自己免疫関連疾患またはアレルギー疾患の処置方法を提供し、該処置は、該処置の必要な対象に、有効用量の本発明の薬物、例えば、あるいは本発明の医薬組成物を投与することを含む。

【0036】

処置は、処置および予防を含む。

該処置のために、適当な用量はもちろん、例えば、化学的性質および利用される本発明の薬物の薬物動力学データ、個々の宿主、投与経路、および処置される状態の性質および重症度に非常に依存するであろう。しかしながら、一般に、大型哺乳類、例えば、ヒトでの満足な結果のための、所定の1日用量は、本発明の薬物約0.01gから0.1gの範囲にあり;通常、例えば、1日最大4回に分けた用量で投与される。

20

【0037】

本発明の薬物は、任意の通常の経路、例えば、経腸(例えば、経鼻、経頬、経直腸、経口投与を含む);非経腸(例えば、静脈内、筋内、皮内投与を含む);または局所(例えば、経皮、鼻腔内、気管内投与を含む);例えば、被覆または非被覆錠剤、カプセル剤、注射用溶剤または懸濁剤(例えば、アンプル、バイアルの形)、クリーム剤、ゲル剤、軟膏、吸入用粉剤、発泡剤、チンキ剤、口紅、ドロップ剤、スプレー剤、または座剤の形で投与される。

【0038】

本発明の薬物は、医薬的に許容される塩、例えば、酸付加塩または金属塩の形;または遊離形;必要に応じて、溶媒和物の形で投与される。塩の形の本発明の薬物は、遊離形;必要に応じて、溶媒和物の形の薬物と同じ順序の活性を表す。

30

【0039】

本発明の薬物は、本発明のみ、または1以上の他の医薬的に活性な薬物との組合せによる医薬的処置に用いられる。組合せは、固定の組合せ(ここで、2以上の医薬的に活性な薬物が、同一製剤中にある);キット(ここで、別々の製剤中の2以上の医薬的に活性な薬物が、例えば、同時投与の指示のある、同一パッケージで売られている);および遊離の組合せ(ここで、医薬的に活性な薬物は、別々にパッケージされているが、同時または連続投与の指示が与えられている)を含む。

40

別の態様において、本発明は、本発明の薬物の診断/代替分子としての使用を提供する。

【0040】

図面の説明

図1は、98016T<sub>0</sub>細胞のサイトカイン産生を示す。T細胞刺激は、下記のアナライト含有媒体を産生する細胞株の調製に記載の様に、再刺激の12日後に行われる。細胞質内染色が活性化の4時間後に行われ、単細胞レベルでのサイトカイン産生特性が測定される。活性化の24時間後にELISAにより測定されたサイトカイン産生の総量は、IL-2 5.2 ng/ml、IFN- 13.7 ng/ml、IL-4 7.9 ng/ml、IL-5 0.1 ng/ml、およびIL-10 24.6 ng/mlであり、

50

これは細胞質内染色により測定されたフェノタイプと相関する。

【0041】

図2は、下記のDELFIA法による、組換えヒトサイトカインスタンダードの検出を示す。組換えヒトIL-4 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota)、IL-10 (PharMingen)、およびIFN- $\gamma$  (R&D Systems) がスタンダードとして用いられる。洗浄およびブロッキング溶液は、上記のELISA法用と同じである。全試料はトリPLICATEでアッセイされる。それぞれの点は、結果平均 $\pm$ 標準偏差を表す。3つのサイトカイン全てが、希釈剤として組織培養上清を用いる混合溶液中で検出される。これらの結果は、トリプルDELFIAが50 pg/ml未満のそれぞれのサイトカインを検出することを示す。

10

【0042】

図3は、刺激された98016 T<sub>0</sub>細胞のT細胞の連続希釈液を用いて得られた結果を示す。これらの結果は、抗CD3免疫ビーズおよび抗CD28 mAbを刺激シグナルとして用いて、得られる(黒丸)。刺激されていない細胞の上清に存在するサイトカイン濃度(白丸)は、媒体のみを含有する(細胞を含まない)ウェルで観察される濃度と、有意な差はない。T細胞刺激およびDELFIAアッセイ共に、上記の384ウェルプレートを用いて行われる。全試料はトリPLICATEでアッセイされる。それぞれの点は、結果平均 $\pm$ 標準偏差を表す。

【0043】

図4は、本発明によるアッセイでの免疫抑制剤シクロスポリンA (CsA) 量の増加のもと、刺激された98016 T<sub>0</sub>細胞のIFN- $\gamma$ 、IL-4、およびIL-10産生の特徴的用量依存性阻害を説明する。T細胞は、抗CD3免疫ビーズおよび抗CD28で24時間活性化される。全試料はトリPLICATEでアッセイされる。それぞれの点は結果平均 $\pm$ 標準偏差を表す。

20

【0044】

次の実施例では、温度は全て摂氏で与えられ、校正されていない。

実施例

実施例1

アナライト含有媒体を産生する細胞株の調製

IL-4、IFN- $\gamma$ 、およびIL-10をアナライトとして選択する。

30

アトピー性皮膚炎(AD)の患者の皮膚生検由来のヒトCD4+Th<sub>0</sub>細胞株、すなわち、細胞株98016 T<sub>0</sub>を、Carballido JM, Aversa G, Kaltoft K, Cocks BG, Punnonen J, Yssel H, Thestrup-Pedersen K and de Vries JE. J Immunol (1997), 159: 4316に記載の方法により単離する。概略、特定の皮膚プリックテストおよび血清IgE濃度によりDer p 1に対してアレルギー性であると判定したAD患者を、Der p 1でパッチチャレンジさせる。アレルゲンに曝露した24時間後、陽性皮膚反応を生じた患者からパンチ生検検体(4 mm)を採取し、4つのおよそ等しい大きさの断片にカットし、1% ヒトAB血清、および1  $\mu$ g/ml 精製Der p 1 (ALK Laboratories, Horsholm, Denmark) 含有Yssel's培地(Gibco BRL)中12ウェルプレート(Costar, Cambridge, MA)において、37 $^{\circ}$ C、8% CO<sub>2</sub>、加湿雰囲気下で培養する。該培養物に100 U/ml rhIL-2、および400 U/ml rhIL-4を、0.3 ng/ml rhIL-12 (R&D Systems, Minneapolis, MN)の存在下および非存在下で添加する。Th細胞は皮膚生検検体から遊走し、異なる培養条件下で同等の倍增時間で増殖する。関連するサイトカイン含有培地を、2、3日毎に取り替える。増殖の14日後、該細胞培養物を1  $\mu$ g/ml 精製Der p 1で再刺激し、サイトカインカクテルを添加した培養物中で再び増殖させる。該第2の培養サイクルの終わりに、5  $\times$  10<sup>7</sup>より多い細胞を、それぞれの条件から回収する。続いて、ヒトTh細胞を10% FCS含有Yssel's培地で維持し、1  $\mu$ g/ml PHA、およびフィーダー細胞の供給源として異系(50 Gy照射)末梢血単核細胞を用いて刺激を繰り返し、IL-2、およびIL-4  $\pm$  IL-12で増殖させる。CD4+細胞株98016 T<sub>0</sub>細胞を選択する。このことは、

40

50

該細胞が刺激により、FACSにより単細胞レベルで検出した細胞質内サイトカイン染色により、あるいはELISAにより決定した全集団レベルでのサイトカイン産生により判断した、Th0フェノタイプを一貫して示すためである（例えば、図1も参照）。

#### 【0045】

##### FACSおよびELISA（選択した細胞株によるサイトカイン産生の立証）

ヒト 98016 T<sub>0</sub> 細胞を再刺激の12から16日後に回収し、PBSで3回洗浄し、24ウェルプレート（Costar）において、10% FCS、5 μg/ml 抗CD3 mAb SPV-T3（5）、および1 ng/ml 12-O-テトラデカノイルホルボール-13-酢酸塩（TPA）（SIGMA, St. Louis, MO）含有Yssel's培地を用いて刺激する。単細胞中のIL-4およびIFN- $\gamma$ の細胞質内の量を、Carballido JM, Aversa G, Kaltoft K, Cocks BG, Punnonen J, Yssel H, Thestrup-Pedersen K and de Vries JE. J Immunol (1997), 159: 4316に記載の方法により決定する。概略、Th細胞を、刺激の2時間後に10 μg/ml プレフェルジンA（Epicentre Technologies, Madison, WI）で処理し、さらに2時間培養する。次に、Th細胞を回収し、2% ホルムアルデヒドで固定し、サポニンで透過処理し、そしてPEおよびFITCをそれぞれ結合した抗IL-4および抗IFN- $\gamma$  mAb（PharMingen, San Diego, CA）で染色する。Th細胞を、FACSscanフローサイトメーターおよびCellQuestソフトウェア（Becton Dickinson, San Jose, CA）を用いて解析する。総サイトカイン産生を決定するために、Th細胞を回収し、10% FCS、5 μg/ml 抗CD3 mAb SPV-T3、および1 ng/ml TPA含有Yssel's培地1 ml中で、24ウェルプレート（Costar）を用いて10<sup>6</sup>細胞/ウェルで24時間刺激する。サイトカイン産生を、次の特異的サンドイッチELISAにより測定する：Maxisorp C96ウェル免疫プレート（NUNC, Roskilde, Denmark）を、3 μg/ml 炭酸塩バッファー（SIGMA C-3041）中の特異的捕獲mAb溶液50 μl/ウェルで、室温にて一晚被覆する。被覆後、該プレートをPBS-0.05% Tween 20で洗浄し、PBS中のカゼイン加水分解物（OKOID L41）および5% Tween 20 200 μlとの1時間のインキュベーションにより、室温でブロッキングする。その後、該プレートを、25 μl/ウェルの別のT細胞上清、または特定のスタンダードと25 μl/ウェルのビオチン化mAbと共にインキュベーションする。室温で一晩インキュベーションした後、該プレートを再び洗浄し、アルカリホスファターゼ結合エクストラアビジン（SIGMA E-2636）と共に2時間インキュベーションする。読み取りを、基質として1 M ジエタノールアミンバッファー中のp-ニトロフェニルリン酸塩（SIGMA N-2640）を用いて行い、SoftMaxソフトウェア（Molecular Devices）を備え付けたSpectraMAX 340分光光度計（Molecular Devices, Sunnyvale, California）にて405~492 nmで吸光度を測定する。捕獲および検出に用いるmAbは、それぞれ、IL-4 ELISA用に8F12および3H-4であり、IFN- $\gamma$  ELISA用に43-11および45-15である。あるサイトカインの産生量を図1に示す。

#### 【0046】

##### 実施例2

##### ヒトサイトカインインヒビターについてのHTSアッセイ

##### 段階1. T細胞刺激

抗CD3 mAb SPV-T3を、製造元の指示に従い、活性化免疫ビーズマトリックス（Irvine Scientific, Santa Ana, California）100 mgと結合させる。免疫ビーズ結合抗CD3をT細胞増殖アッセイでタイトレーションし、最終濃度75 μg/ml（抗CD3 mAb 2 μg/mlに相当）で、一連の実験全てで用いる。抗CD28 mAb（PharMingen, San Diego, Californiaより市販）を5 μg/mlで用いる。98016 T<sub>0</sub>細胞の連続希釈液を、候補化合物の存在下または非存在下で、Yssel's培地中の抗CD3免疫ビーズおよび抗CD28 mAbで24時間刺激する。T細胞刺激を、384ウェル組織培養プレート（Nunc #164688）を用いて40 μlの容量で行う。

#### 【0047】

10

20

30

40

50

段階 2 . 認識分子でのピン被覆、および複合体形成

共通して用いる認識分子として、IL - 4、IL - 10、およびIFN - に対する mAb を用いる。IL - 4、IL - 10、およびIFN - DELFIA 用の被覆 mAb を、本明細書においてそれぞれ 8F12、JES3 - 12G8、および 43 - 11 と呼ぶ。サイトカイン産生を、Wallac 1420 Victor 2 多標識カウンターにおいて時間分解蛍光により決定する。

## 【0048】

ピンを被覆する目的のため、384 ウェル組織培養プレート (Nunc #164688) に合う、マトリックス (ここで、384 本のピンの位置が決まっている) のピンを、30  $\mu$ l / ウェルの炭酸塩バッファー、pH 9.6 (SIGMA C3041) 中の 2  $\mu$ g / ml mAb 8F12、2.5  $\mu$ g / ml mAb JES3 - 12G8、および 2.5  $\mu$ g / ml mAb 43 - 11 含有カクテルに、該ピンを 2 時間浸漬し、そして室温で 1 時間ブロッキングすることにより、被覆する。ブロッキングは、mAb 被覆ピンを、PBS 中のカゼイン加水分解物 (OXOID L41) および Tween 20 溶液含有 384 ウェルプレートに浸漬することで、行う。

## 【0049】

段階 3 . 検出分子との接触、およびアナライトの量の決定

ピン上で形成された検出複体の決定のため、増強ランタニド蛍光免疫アッセイ (DELFLIA) を用いる。

上記の段階 2 で記載の認識分子 mAb と競合しない、IL - 4、IL - 10、および IFN - DELFLIA 用の検出分子 mAb を用い、それぞれ 3H4 (IL - 4 用)、JES3 - 9D7 (IL - 10 用)、および 45 - 15 (IFN - 用) と呼ぶ。3H4 mAb をサマリウム (Sm) で標識し、JES3 - 9D7 mAb をテルビウム (Tb) で標識し、そして 45 - 15 mAb をユーロピウム (Eu) で標識する。ランタニド標識 mAb は、Advant-Wallac, Turku, Finland で標識され市販されている。組換えヒト IL - 4 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota)、IL - 10 (PharMingen)、および IFN - (R&D Systems) をスタンダードとして用いる。洗浄およびブロッキング溶液は、上記の ELISA 用と同じである。DELFLIA アッセイバッファー # 1244 - 111、エンハンサー液 # 1244 - 105、およびエンハンサー # C500 - 100 は、Wallac から入手する。

## 【0050】

被覆ピンシステムによる特異的アナライトの捕獲 (認識複体の形成) を、段階 2 で得たピンの、段階 1 に記載の調製した 384 ウェル組織培養プレートでのインキュベーション (T 細胞の刺激薬物および候補化合物での 24 時間の刺激) により達成する。生じたピンシステムを、新たな 384 ウェルプレート (それぞれのウェルを、30  $\mu$ l / ウェルの DELFLIA アッセイバッファー中の 3 つのランタニド標識 mAb (それぞれ最終濃度 50  $\mu$ g / ml) 含有溶液で満たす) に浸漬し、続いて該ピンを、384 ウェル組織培養プレート (Nunc #164688) (それぞれのウェルを、50  $\mu$ l / ウェルの Wallac エンハンサー液で満たす) に浸漬する。ピンマトリックスを浸す、この最後の 384 ウェル組織培養プレート (Nunc #164688) を、ユーロピウムおよびサマリウムウィンドウの時間分解蛍光測定リーダーに移し、そしてユーロピウム (IFN - ) およびサマリウム (IL - 4) 量を決定する。その後、該 384 プレートのそれぞれのウェルに、Wallac エンハンサー 15  $\mu$ l をさらに添加し、ピンマトリックスを再び浸す。最後に、該プレートをテルビウムウィンドウで読み取り、テルビウム (IL - 10) 量を決定する。

## 【0051】

## 実施例 3

ヒトサイトカインインヒビターについての HTS アッセイで決定された、既知のサイトカイン産生インヒビターによるサイトカイン産生の阻害

実施例 2 の段階 1 から 3 の方法と同様に、原理を立証するためのサイトカイン産生実験の原型インヒビターとしてシクロスポリン A (CsA) (候補化合物) を用いて行う。つ

10

20

30

40

50

まり、実施例 2 の段階 1 による T 細胞刺激を、異なる量の CsA 下、または CsA 非存在下で行い、他の段階およびサイトカイン産生の決定を、実施例 2 の段階 2 および段階 3 により行う。結果を図 4 に示す。これは、CsA による、98016 T<sub>0</sub> 細胞の IFN- $\gamma$ 、IL-4、および IL-10 産生の特徴的容量依存性阻害を説明する。これは、本発明の原理も立証する。

【図面の簡単な説明】

【0052】

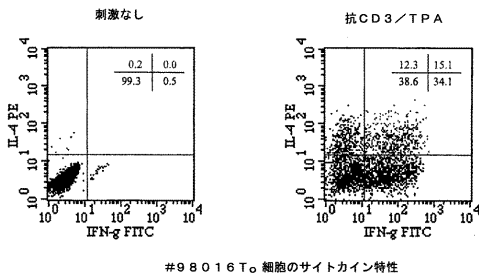
【図 1】図 1 は、98016 T<sub>0</sub> 細胞のサイトカイン産生を示す。

【図 2】図 2 は、下記の DELFIA 法による、組換えヒトサイトカインスタンダードの検出を示す。

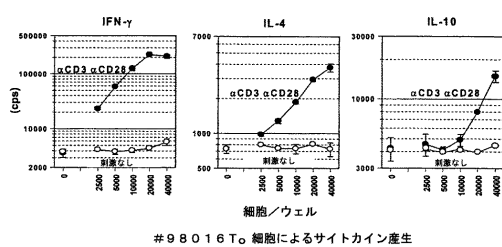
【図 3】図 3 は、刺激された 98016 T<sub>0</sub> 細胞の T 細胞の連続希釈液を用いて得られた結果を示す。

【図 4】図 4 は、本発明によるアッセイでの免疫抑制剤シクロスポリン A (CsA) 量の増加のもと、刺激された 98016 T<sub>0</sub> 細胞の IFN- $\gamma$ 、IL-4、および IL-10 産生の特徴的用量依存性阻害を説明する。

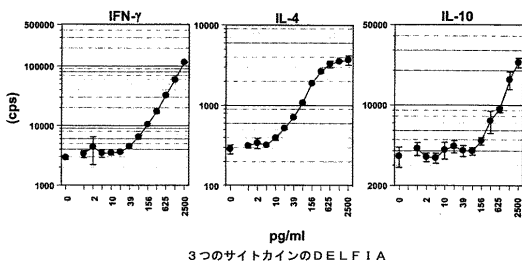
【図 1】



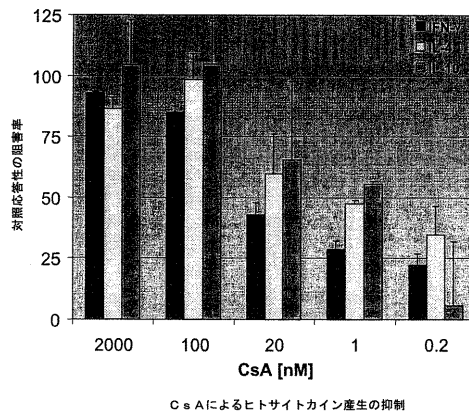
【図 3】



【図 2】



【図 4】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. Application No PCT/EP 03/04793
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/543 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 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) MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CARBALLIDO J M ET AL: "Reversal of human allergic T helper 2 responses by engagement of signaling lymphocytic activation molecule." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 1 NOV 1997, vol. 159, no. 9, 1 November 1997 (1997-11-01), pages 4316-4321, XP002265773 ISSN: 0022-1767 cited in the application page 4317, column 1, paragraph 3 --- -/--	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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
19 December 2003		20/01/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hinchliffe, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal	Application No
	PCT/EP 03/04793

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	COCKS B G ET AL: "A NOVEL RECEPTOR INVOLVED IN T-CELL ACTIVATION" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 376, 20 July 1995 (1995-07-20), pages 260-263, XPO02921878 ISSN: 0028-0836 page 261; figure 3	1-10
Y	EP 0 241 140 A (SOCKERBOLAGET AB FORMERLY KNOW) 14 October 1987 (1987-10-14) the whole document	1-10
Y	DE 41 20 139 A (BUNDESAMT FUER WEHRTECHNIK U B) 24 December 1992 (1992-12-24) page 4, column 2; figure 1	1-10
Y	CA 2 228 821 A (UNIV MANITOBA) 16 October 1999 (1999-10-16) claim 1	1-10

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No
PCT/EP 03/04793

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0241140	A	14-10-1987	AT 72705 T	15-03-1992
			DE 3776709 D1	26-03-1992
			DK 109987 A	12-09-1987
			EP 0241140 A1	14-10-1987
			JP 62218862 A	26-09-1987
			NO 870988 A	14-09-1987
DE 4120139	A	24-12-1992	DE 4120139 A1	24-12-1992
CA 2228821	A	16-10-1999	CA 2228821 A1	16-10-1999
			AU 3590899 A	08-11-1999
			WO 9954734 A1	28-10-1999
			EP 1071954 A1	31-01-2001

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 2 1
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,I  
E,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,D  
M,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LT,LU,LV,MA,MD,MK,MN,MX,NI,NO  
,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SE,SG,SK,TJ,TM,TN,TR,TT,UA,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ホセ・エメ・カルバリド・エレラ  
オーストリア、アー - 2 3 8 0 ペルヒトルツドルフ、ベルンハルト・ヴァイスガッセ 6 / 3 番

(72)発明者 ヤン・エー・デ・フリース  
オーストリア、アー - 1 1 3 0 ヴィーン、ノイエ・ヴェルト・ガッセ 1 6 / 1 番

(72)発明者 ユリアナ・クント  
オーストリア、アー - 2 3 9 1 カルテンロイトゲーベン、プロメナーデガッセ 2 9 番

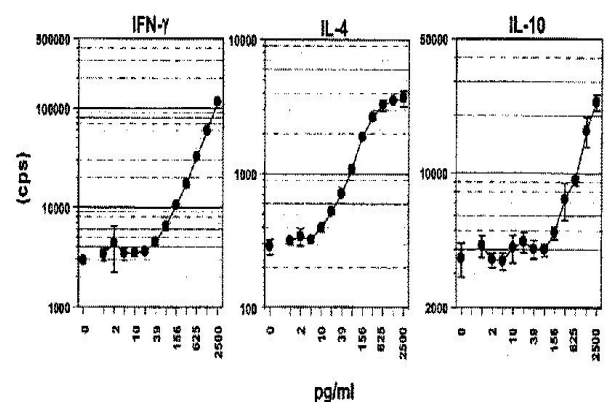
F ターム(参考) 2G045 BB20 DA36 FA11 FB03 FB07 FB12  
4B063 QA01 QA18 QQ05 QS33 QS36 QX02  
4C084 AA01 AA02 AA17 BA01 BA08 BA18 BA24 CA05 DC50 NA14  
ZB08

专利名称(译)	使用涂层测定系统同时检测由推定药物影响的细胞产生的两种分析物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005524843A</a>	公开(公告)日	2005-08-18
申请号	JP2004503652	申请日	2003-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
[标]发明人	ホセエメカルバリドエレラ ヤンエーデフリース ユリアナクント		
发明人	ホセ・エメ・カルバリド・エレラ ヤン・エー・デ・フリース ユリアナ・クント		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K45/00 A61P37/06 A61P37/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/543 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/505 G01N33/5008 G01N33/5023		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/53.Q A61K45/00 A61P37/06 A61P37/08 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/543.521 G01N33/566 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA24 4C084/CA05 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB08		
代理人(译)	小島 一晃		
优先权	2002010535 2002-05-08 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种鉴定影响细胞表达的分析物量的药物的方法，刺激细胞产生至少两种分析物，在不存在和存在候选化合物的情况下，在基质的针脚上形成分析物和识别分子之间的至少两个识别复合物，- 用检测分子处理识别复合物，以便在基质的引脚上获得检测复合物，比较在不存在和存在候选化合物时形成的每种检测复合物的量，和 - 选择影响至少一种检测复合物量的候选化合物，包括。

【図2】



3つのサイトカインのDELFIA