

(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2011-505858

(P2011-505858A)

(43) 公表日 平成23年3月3日(2011.3.3)

| | | |
|-------------------------|-----------------|-------------|
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 | 2 G 0 4 5 |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A | 4 B 0 6 3 |
| G O 1 N 33/68 (2006.01) | G O 1 N 33/68 | |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 P | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2010-538735 (P2010-538735)
 (86) (22) 出願日 平成20年12月18日 (2008.12.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年8月17日 (2010.8.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/067931
 (87) 国際公開番号 W02009/077602
 (87) 国際公開日 平成21年6月25日 (2009.6.25)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2007/064144
 (32) 優先日 平成19年12月18日 (2007.12.18)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 0802020-8
 (32) 優先日 平成20年9月23日 (2008.9.23)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(71) 出願人 510169402
 バイオヴェーター・テクノロジーズ・アク
 チボラグ
 スウェーデン国 103 95 ストック
 ホルム, ビー・オー・ボックス 7710
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

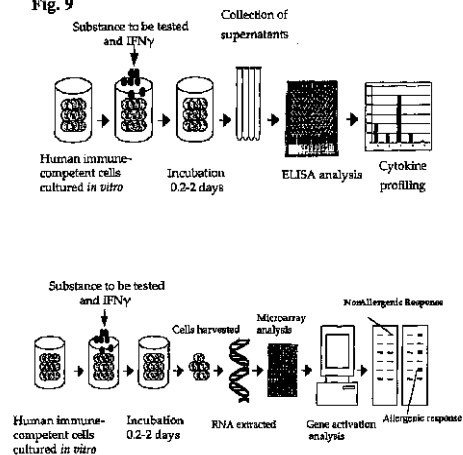
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善されたアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、潜在的アレルギー性物質の *in vitro* 予測のための方法であって、その場合単球および/またはマクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株を、該物質およびインターフェロン- γ の存在下で培養し、それによりサイトカインおよび/またはネオプテリンの産生が増加され、それを測定するという前記方法に関する。アレルギー反応は、G1P2、OASL、IFIT1、TRIM22、IFI44L、MXI、RSAD2、IFIT3、IFITM1、IFIT2、C33.28HERV-Hタンパク質mRNA、IFITM3、XK、GPR15、MT1G、MT1B; MT1A、ADFP、IL8、MT1E、MT1F、MT1H、SLC30A1、SERPINB2、CD83、TncRNAより選択される、アップレギュレートもしくはダウンレギュレートされる遺伝子を測定する、またはそれらの発現産物が測定される、ことにより見積もられてよい。本発明はまた、インターフェロン- γ 、ならびにサイトカイン、好ましくはIL-8およびネオプテリンを各々認識する試薬、ならびに/またはアップレギュレートもしくはダ

Fig. 9



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

潜在的アレルギー性物質の *in vitro* 予測のための方法であって、単球および/またはマクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株を、該物質およびインターフェロン - の存在下で培養し、サイトカインおよび/またはネオプテリンの放出を測定し、サイトカインおよび/またはネオプテリンの放出の増加が、該物質がアレルギー性であることを示すことを特徴とする、前記方法。

【請求項 2】

ネオプテリンの放出を測定することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

IL - 1、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 8、IL - 10、IL - 12、TNF - および IFN - より選択される 1 つまたはそれより多くのサイトカインの存在または増加が、Tリンパ球およびBリンパ球ならびに炎症細胞による I 型即時的過敏症の反応の指標であり、即時型過敏症、例えば喘息、花粉症、蕁麻疹および鼻炎の指標である、またはクラス IV の細胞性 T 細胞免疫の指標であり、遅延型過敏症、例えば細胞免疫、遅延型アレルギー、および接触性湿疹の指標であることを特徴とする、請求項 1 - 2 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 4】

ネオプテリンを I 型の即時的過敏症の反応の指標として測定する、請求項 1 - 3 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 5】

ネオプテリンの存在を分析し、それによるネオプテリンの存在が即時型過敏症、例えば喘息、花粉症、および蕁麻疹の指標であることを特徴とする、請求項 1 - 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

IL - 8 およびネオプテリンの分析を使用して、クラス I およびクラス IV 間のサイトカインプロファイルを区別することを特徴とする、請求項 1 - 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

潜在的アレルギー性物質の *in vitro* 予測のための方法であって、単球および/またはマクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株を、該物質およびインターフェロン - の存在下で培養することを特徴とし、G1P2、OASL、IFIT1、TRIM22、IFI44L、MXI、RSAD2、IFIT3、IFITM1、IFIT2、SPR、GNB2、C33.28HERV-Hタンパク質mRNA、IFITM3、XK、GPR15、MT1G、MT1B; MT1A、ADFP、IL8、MT1E、MT1F、MT1H、SLC30A1、SERPINB2、CD83、TncRNAより選択される遺伝子のうちアップレギュレートもしくはダウンレギュレートされる遺伝子またはそれらの発現産物を測定することにより前記物質のアレルギー性を見積もることを特徴とする、前記方法。

30

【請求項 8】

G1P2、OASL、IFIT1、TRIM22、IFI44L、MXI、RSAD2、IFIT3、IFITM1、IFIT2の1つまたはそれより多くの発現が、I型アレルギーを示し; C33.28HERV-Hタンパク質mRNA、IFITM3、XK、GPR15の1つまたはそれより多くがI型/IV型のハプテンを示し、そして、MT1G、MT1B; MT1A、ADFP、IL8、MT1E、MT1F、XK、IFITM3、MT1H、SLC30A1、SERPINB2、GNB2、MTIB、CD83、TncRNAの遺伝子の1つまたはそれより多くが、IV型アレルギーを示すことを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

RNA、DNA、アミノ酸、ペプチド、またはタンパク質を測定することを特徴とする、請求項 7 - 8 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 10】

試験する物質がタンパク質であることを特徴とする、請求項 1 - 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

インターフェロン - を、試験する物質の添加の前に、同時に、または後に加えることを特徴とする、請求項 1 - 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

単球、マクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株に毒性でない、最も高い濃度の物質を使用することを特徴とする、請求項 1 - 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

試験する物質は、細胞に毒性でない最も高い濃度の物質から段階希釈することを特徴とする、請求項 1 - 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

細胞株が、MonoMac - 6、THP - 1、MUTZ - 3、WBC 264 - 9C および AML - 193 から成る群より選択されることを特徴とする、請求項 1 - 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

インターフェロン - 、ならびに単球および/またはマクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株より選択される試験細胞を包含することを特徴とする、請求項 1 - 14 のいずれかに記載の方法を実施するための試薬キット。

【請求項 16】

サイトカイン、好ましくは IL - 8 およびネオプテリンを各々認識する試薬、ならびに/またはサイトカイン遺伝子もしくはアップレギュレートされる遺伝子を認識する試薬をさらに包含する、請求項 15 に記載の試薬キット。

【請求項 17】

試薬が、GIP2、OASL、IFIT1、TRIM22、IFI44L、MXI、RSAD2、IFIT3、IFITM1、IFIT2、SPR、GNB2、XK、IFITM3、C33.28HERV - Hタンパク質mRNA、IFITM3、XK、GPR15、MT1G、MT1B; MT1A、ADFP、IL8、MT1E、MT1F、MT1H、SLC30A1、SERPINB2、CD83、CD86、TncRNA のいずれかの発現時に産生される産生物を認識することを特徴とする、請求項 15 または 16 に記載の試薬キット。

【請求項 18】

細胞株が、MonoMac - 6、THP - 1、MUTZ - 3、WBC 264 - 9C および AML - 193 から成る群より選択される、請求項 15 - 17 のいずれかに記載の試薬キット。

【請求項 19】

細胞株を培養するために適する細胞培養培地、抗生物質、ポジティブコントロール、ネガティブコントロール、培養プレートもしくはフラスコ、および/または請求項 1 - 14 のいずれかに従っての方法を記載する説明書をさらに含有する、請求項 15 - 18 のいずれかに記載の試薬キット。

【請求項 20】

細胞株が、MonoMac - 6、THP - 1、MUTZ - 3、WBC 264 - 9C および AML - 193 から成る群より選択されることを特徴とする、請求項 1 - 14 のいずれかに記載の方法における、細胞株の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、潜在的アレルゲン性物質の in vitro 予測のための、改善されたサイトカインプロファイルアッセイ (Cytokine Profile Assay; CPA) および遺伝子活性化プロファ

10

20

30

40

50

イルアッセイ (Gene Activation Profile Assay; G A P A) に関し、その場合単球および/またはマクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株を、該物質およびインターフェロン - の存在下で培養すると、サイトカインおよび/またはネオプテリンの産生が増加され、それを測定する。サイトカインの存在はまた、サイトカイン関連遺伝子、またはアップレギュレートされる遺伝子を本発明に従って測定することにより見積もられてもよい。

【 0 0 0 2 】

本発明はまた、本アッセイを行うための試薬キット、および本アッセイにおけるある種の細胞株の使用にも関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

本サイトカインプロファイルアッセイ (C P A) は、物質のアレルゲン性のリスクおよび有害効果の予測を可能にする、in vitro試験である。医薬剤、食品添加物、化粧品、衛生用品、工業用化学物質としての使用を意図される物質、およびその他の物質を、アレルギー反応およびその他の有害反応 (そのような反応は、皮膚刺激性の効果および毒性効果であってよい) を誘発するそれらの潜在的リスクについて分析する。

【 0 0 0 4 】

物質の分析は、ヒトの単球および/またはマクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株において行う。物質は、ヒト細胞、すなわち物質の使用が意図される種と同じ種由来の細胞で試験するため、動物は関与しない。物質によっては異なる種で同じ効果を持たない可能性があり、動物で行われる試験は誤った結果を与える可能性がある。それ故本試験は好ましくはヒト細胞を用いて行う。

【 0 0 0 5 】

今日商業的に使用されている試験はin vivo動物試験であり、倫理的側面の理由で、現在使用されている動物試験に代わり得るin vitroの方法の発見が大いに求められている。アレルギー反応はそれに悩まされている人にとって本当に深刻となり得るため、例えば医薬品、化粧品、食品の産業界から、できるだけ早期段階でこれらの物質を同定することができるが大いに求められている。

【 0 0 0 6 】

免疫系における毒性効果のin vitro評価が、マウス由来脾細胞において試験されている (“ 増殖アッセイおよびサイトカイン産生により評価した場合の、免疫系における薬剤誘発性毒性効果のin vitro評価 ”、M. Pallardy et al. Eur. Cytokine Net., Vol. 2 No 3, May-June 1991, pp. 201-206)。この方法は、自己免疫および過敏症を誘発する分子を検出するにはあまり有効ではない。

【 0 0 0 7 】

以前の研究は、ヒト血液細胞により産生されるネオプテリンおよびインターロイキン - 8 (I L - 8) は、アレルゲン性物質を同定するための信頼できるシグナル分子であるとしてよいを示した。スウェーデン特許第 5 0 6 5 3 3 号 (W O 9 7 / 1 6 7 3 2) を導いたこの仮説は、ヒトアレルゲンおよびTリンパ球抗原の同定のためのin vitroの方法へと方向づけた。in vitroの培養ヒト細胞を試験する物質に暴露させ、過感受性に関連する応答を測定する。アレルギー反応との公知の関連性のある物質で細胞を刺激すると、ある種の細胞からの物質、主にサイトカインの放出を開始することが示された。この特許によりカバーされる方法は、サイトカインプロファイルアッセイ (C P A) と命名された。この試験の概念は、アレルゲン性物質はネオプテリンおよびI L - 8の産生という特定のパターンを誘発し、培養ヒト末梢血単核細胞 (P B M C) の上清中で測定することができる、というものである。サイトカインのプロファイルの分析は、I型またはIV型のアレルギー反応が存在するかどうか、すなわち刺激性反応があるかまたはまったく反応がないかどうかを特定することになる。

【 0 0 0 8 】

C P A のさらなる確認試験は、リファレンスの系としてのヒト単球細胞株の好ましい使用を導いている。またこの方法は、I型アレルギーを誘発することが知られているタンバ

10

20

30

40

50

ク質を同定するために最も適するように思われた。

【0009】

この方法は後に、PCT/SE2006/050336において、潜在のアレルゲン性物質または組織刺激性物質によりアップレギュレートされる遺伝子を測定することにより精密化された。この方法は、遺伝子活性化プロファイルアッセイ、すなわちGAPAと呼ばれる。GAPAはまた、アレルギーまたは組織刺激性のin vitro分析のための1つまたはそれより多くの遺伝子由来の発現産生物の使用も考慮している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】スウェーデン特許第506 533号(WO97/16732)

【特許文献2】PCT/SE2006/050336

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】“増殖アッセイおよびサイトカイン産生により評価した場合の、免疫系における薬剤誘発性毒性効果のin vitro評価”、M. Pallardy et al. Eur. Cytokine Net., Vol. 2 No 3, May-June 1991, pp. 201-206

【発明の概要】

【0012】

単球および/またはマクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株を、潜在のアレルゲン性物質およびインターフェロン- γ の存在下で培養すると、過敏性との公知の関連性を有する被験物質の存在下で、サイトカインおよび/またはネオプテリンの産生が増加することが、今回判明した。この効果は、潜在のアレルゲン性物質およびインターフェロン- γ の各々の存在下で細胞を培養した場合と比較して、相乗的であるようにさえ見える。

【0013】

本発明は、潜在のアレルゲン性物質のin vitro予測のためのサイトカインプロファイルアッセイ(CPA)に関し、その場合単球および/またはマクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株を、該物質およびインターフェロン- γ の存在下で培養すると、サイトカインおよび/またはネオプテリンの産生が増加され、それを測定する。サイトカインの存在はまた、サイトカイン遺伝子、または本発明に従ってのアップレギュレートされる遺伝子を測定することにより見積もられてもよい。

【0014】

さらなる側面において本発明は、潜在のアレルゲン性物質のin vitro予測のための遺伝子活性化プロファイルアッセイ(GAPA)に関し、その場合単球および/またはマクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株を、該物質およびインターフェロン- γ の存在下で培養し、その場合該物質のアレルゲン性は、G1P2、OASL、IFIT1、TRIM22、IFI44L、MXI、RSAD2、IFIT3、IFITM1、IFIT2、SPR、GNB2、C33.28HERV-Hタンパク質mRNA、IFITM3、XK、GPR15、MT1G、MT1B; MT1A、ADFP、IL8、MT1E、MT1F、MT1H、SLC30A1、SERPINB2、CD83、CD86、TncRNAより選択されるアップレギュレートもしくはダウンレギュレートされる遺伝子を測定する、またはそれらの発現産生物が測定される、ことにより見積もられる。

【0015】

本発明はまた、インターフェロン- γ 、ならびにサイトカイン、好ましくはIL-8およびネオプテリンを各々認識する試薬、ならびに/またはサイトカイン遺伝子もしくはアップレギュレートされる遺伝子を認識する試薬、例えばプローブ、そして所望によりさらなる部分、例えば試験細胞、すなわちMonoMac-6、THP-1、MUTZ-3、WBC264-9CおよびAML-193から成る群より選択される細胞株、細胞株を培養するために適する細胞培養培地、抗生物質、ポジティブコントロール、ネガティブコントロール、培養プレートもしくはフラスコ、および/または実施する方法を記載する説明

10

20

30

40

50

書を含有する、上の方法を実施するための試薬キットに関する。

【0016】

さらなる態様において本発明は、本発明に従っての方法における単球および/またはマクロファージおよび/または骨髄単球系細胞株の使用に関する。本発明に従っての方法において使用するために現在意図される細胞株は、以下に記載するように MonoMac-6、THP-1、MUTZ-3、WBC264-9C および AML-193 である。

【0017】

当該方法は、食品添加物、化粧品または衛生用品、医薬品、工業用化学物質、薬剤、および有害反応を避けたいその他の物質のための、動物試験に代わるものとして提供するものである。

10

【0018】

本発明を以下の図により説明する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】 MonoMac-6 細胞を、24時間、カバノキ天然アレルゲンの Bet v 1、およびヒト血清アルブミン(HSA)にて0.2から20 μg/mlで刺激した。用量応答曲線を図に示す。物質は刺激の間、細胞培養培地中の IFN-γ で(黒丸)、または IFN-γ を含まずに(白丸)刺激された。細胞は RPMI+10% FCS 中で培養した。各点は3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。

【図2】 A タンパク質アレルゲンに対する細胞のネオプテリン応答における IFN-γ

20

の効果。MM6細胞を、24時間、IFN-γ (100 U/ml)の存在下()または IFN-γ の不在下()で、アレルゲンタンパク質の Bet v 1 または Ara h 2、ならびにコントロール物質にて刺激した。アレルゲンは0.24から20 μg/mlの範囲の濃度で試験した。用量応答を破線で示す。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。MonoMac-6細胞は10% FCSを補充した RPMI 中で培養した。 B 考慮すべきアレルゲン性のないタンパク質に対する細胞のネオプテリン応答における IFN-γ の効果。MM6細胞を、24時間、IFN-γ (100 U/ml)の存在下()または IFN-γ の不在下()で、タンパク質の HSA、パレイショレクチンまたはゼラチンにて刺激した。タンパク質は0.24から20 μg/mlの範囲の濃度で試験した。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の

30

【図3】 A 細胞のネオプテリンレベルは、タンパク質アレルゲンに対して用量依存の様式で増加した。 MonoMac-6細胞を、24時間、IFN-γ (100 U/ml)の

存在下、アレルゲンタンパク質の -アミラーゼアスペルギウス、Ara h 2、Alt a 1、または Ph 1 p 1、ならびにコントロール物質(HSA)にて刺激した。アレルゲンは0.7から60 μg/mlの範囲の濃度で試験した。用量応答は破線で示す。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。MonoMac-6細胞は10% FCSを補充した RPMI 中で培養した。 B 細胞の

40

ネオプテリンレベルは、タンパク質アレルゲンに対して用量依存の様式で増加した。 MM6細胞を、IFN-γ の存在下、24時間、アレルゲンタンパク質の Cor a 8、Amb a 1、またはコントロール物質のレンズマメレクチン(LCA)にて刺激した。タンパク質は0.7から60 μg/mlの範囲の濃度で試験した。用量応答を破線で示す。各棒グラフは3回の培養内の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。MonoMac-6細胞は10% FCSを補充した RPMI 中で培養した。 C アレル

ゲン性である潜在性の低いタンパク質による刺激における、細胞の弱いネオプテリン応答。 MM6細胞を、IFN-γ の存在下、24時間、タンパク質のターマミル(Termamyli)またはダイズレクチンにて刺激した。タンパク質は2.2から180 μg/mlの範囲の濃度で試験した。用量応答を破線で示す。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の

培養内の標準偏差をエラーバーで示す。 MonoMac-6細胞は10% FCSを補充し

50

た RPMI 中で培養した。

【図 4 - 1】A 化学物質アレルゲンに対する細胞のネオプテリン応答における INF - の効果。MM6 細胞を、24 時間、INF - (100 U/ml) の存在下()または INF - の不在下()で、呼吸器感作(HCPT、TMA もしくは MDI) または皮膚感作(DNCB)に関連する化学物質にて刺激した。試験濃度は($\mu\text{g}/\text{ml}$)で示す。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。MonoMac-6 細胞は10% FCS を補充した RPMI 中で培養した。コントロールとして Bet v 1 および HSA を含めた。B 皮膚感作に関連する化学物質による刺激における細胞のネオプテリン応答。MM6 細胞を、INF - の存在下、24 時間、皮膚感作に関連する化学物質にて刺激した。試験濃度は $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示す。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。MonoMac-6 細胞は10% FCS を補充した RPMI 中で培養した。

【図 4 - 2】C 皮膚感作または皮膚刺激性に関連する化学物質による刺激における細胞のネオプテリン応答。MM6 細胞を、INF - の存在下、24 時間、皮膚感作または皮膚刺激性に関連する化学物質にて刺激した。試験濃度は $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、またはグリセロールに関してはパーセントで示す。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。MonoMac-6 細胞は10% FCS を補充した RPMI 中で培養した。D 刺激性に関連する化学物質による刺激における細胞のネオプテリン応答。MM6 細胞を、INF - の存在下、24 時間、刺激性に関連する化学物質にて刺激した。試験濃度は $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示す。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。MonoMac-6 細胞は10% FCS を補充した RPMI 中で培養した。

【図 5】A MonoMac-6 細胞を、RPMI + 10% FCS 中で、24 時間、天然ピーナッツアレルゲンの Ara h 2 (1 ml 当たり 20 および 6.6 マイクログラム) ならびにヒト血清アルブミン(HSA; 1 ml 当たり 6.6 マイクログラム)にて刺激した。物質は刺激の間、細胞培養液中の IFN - で刺激された。各実験には、非刺激細胞を含むウェルの数が含まれ、結果をまたグラフで示す。各実験について結果は3回の培養の平均として示す。3回の標準偏差をバーで示す。B MonoMac-6 細胞を、血清不含培地 Panserin 4 1 1 中で、24 時間、天然ピーナッツアレルゲンの Ara h 2 (1 ml 当たり 20 および 6.6 マイクログラム) ならびにヒト血清アルブミン(HSA; 1 ml 当たり 6.6 マイクログラム)にて刺激した。物質は刺激の間、細胞培養液中の IFN - で刺激された。各実験には、非刺激細胞を含むウェルの数が含まれ、結果をまたグラフで示す。各実験について結果は3回の培養の平均として示す。3回の標準偏差をバーで示す。C MonoMac-6 細胞を、血清不含培地 Panserin 4 1 1 中で、48 時間、天然ピーナッツアレルゲンの Ara h 2 (1 ml 当たり 20 および 6.6 マイクログラム) ならびにヒト血清アルブミン(HSA; 1 ml 当たり 6.6 マイクログラム)にて刺激した。物質は刺激の間、細胞培養液中の IFN - で刺激された。各実験には、非刺激細胞を含むウェルの数が含まれ、結果をまたグラフで示す。各実験について結果は3回の培養の平均として示す。3回の標準偏差をバーで示す。

【図 6 - 1】A 細胞のネオプテリンレベルは、血清不含培地中で培養した細胞においてタンパク質アレルゲンに対して用量依存の様式で増加した。Panserin 細胞培養培地中で培養した MM6 細胞を、24 時間、INF - (100 U/ml) の存在下、アレルゲンタンパク質の Ara h 2、Cor a 8、Alt a 1、または Ph 1 p 1、ならびにコントロール物質(HSA)にて刺激した。アレルゲンは 0.7 から 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の濃度で試験した。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。B 細胞のネオプテリンレベルは、血清不含培地中で培養した細胞においてタンパク質アレルゲンに対して用量依存の様式で増加した。Panserin 細胞培養培地中で培養した MM6 細胞を、24 時間、INF - (100 U/ml) の存在下、アレルゲンタンパク質の Ara h 2 または Amb a 1、ならびに非アレルゲン性のゼラチンまたはコントロール物質(HSA)にて刺激した。各棒グラフは3回の培養の

10

20

30

40

50

平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。

【図6-2】C細胞のネオプテリンレベルは、血清不含培地中で培養した細胞においてタンパク質アレルゲンに対して用量依存の様式で増加した。Panserin細胞培養培地中で培養したMM6細胞を、24時間、INF- (100 U/ml)の存在下、アレルゲンタンパク質のAra h 2、Gal d 2 (卵白アルブミン)またはGal d 3 (コンアルブミン)、ならびに非アレルゲン性のインスリンまたはコントロール物質(HSA)にて刺激した。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。Dアレルゲン性である潜在性の低いタンパク質による刺激における細胞の弱いネオプテリン応答。Panserin細胞培養培地中で培養したMM6細胞を、INF-

10

【図7】A細胞のネオプテリンレベルは、血清不含培地中で培養した細胞においてタンパク質アレルゲンに対して用量依存の様式で増加した。Panserin細胞培養培地中で培養したMM6細胞を、48時間、INF- (100 U/ml)の存在下、アレルゲンタンパク質のAra h 2、Cor a 8、Alt a 1またはPh1 p 1、ならびにコントロール物質(HSA)にて刺激した。アレルゲンは0.7から60 µg/mlの範囲の濃度で試験した。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。B細胞のネオプテリンレベルは、血清不含培地中で培養した細胞

20

においてタンパク質アレルゲンに対して用量依存の様式で増加した。Panserin細胞培養培地中で培養したMM6細胞を、48時間、INF- (100 U/ml)の存在下、アレルゲンタンパク質のAra h 2、Amb a 1、-アミラーゼアスペルギルス、またはGal d 2、ならびにコントロール物質のゼラチン、パレイショレクチン、またはHSAにて刺激した。各棒グラフは3回の培養の平均を表す。3回の培養内の標準偏差をエラーバーで示す。C細胞のネオプテリンレベルは、血清不含培地中で培養した細胞においてタンパク質アレルゲンに対して用量依存の様式で増加した。Panserin細胞培養培地中で培養したMM6細胞を、48時間、INF- (100 U/ml)の存在下、アレルゲンタンパク質のAra h 2、Gal d 2 (卵白アルブミン)、Gal d 3 (コンアルブミン)にて、またはコントロール物質(HSA)もしくはインスリンにて

30

【図8】細胞を、24時間、タンパク質アレルゲンのAra h 2およびLPS、ならびにHSAに、異なる試験濃度で暴露させた。細胞は10% FCSを補充したRPMI中で培養する。

【図9】サイトカインプロファイルアッセイおよび遺伝子活性化プロファイルアッセイの典型的な態様の、主な手順ステップの全体像。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明に従っての方法は、潜在的アレルゲン性物質のin vitro予測のためのものである。

40

単球および/もしくはマクロファージおよび/もしくは骨髄単球系細胞株、または単球、マクロファージおよび/もしくは骨髄性単球に由来を持つその他の均等な細胞株を、該物質およびインターフェロン- の存在下で培養すると、それによりサイトカインおよび/またはネオプテリンの産生が増加され、それを測定する。試験する物質およびインターフェロン- は、合わせて混合して加えても、または同時に加えてもよい。あるいは試験する物質を、インターフェロン- の前に加えてもよいし、またはその逆であってもよい。

【0021】

インターフェロン- を添加すると、特にネオプテリンの産生が増加されることが判明した。

50

ネオプテリン(6-D-エリスロトリヒドロキシプロピル-プテリン)は、プテリジン生合成の鍵となる酵素であるGTP-シクロヒドロラーゼIによりグアノシン三リン酸(GTP)から生合成される、低分子量の物質である。in vivoではヒトの単球/マクロファージにより、そしてin vitroではいくつかの骨髄単球系細胞株(例えばTHP-1およびMM6)により形成され、放出される。ネオプテリンの産生は、細胞免疫系の活性化の段階を反映する。インターフェロン-(IFN-)は、活性化されたTリンパ球(特にいわゆるTH-1型細胞)により主に産生され、ネオプテリンの産生を有意に誘発する唯一のサイトカインとして認識されている。in vivoにおけるネオプテリン形成のレベルは、単球/マクロファージにおけるIFN-の影響と相関する。

【0022】

出願者らの以前の研究は、細胞がアレルゲン抽出物(I型に関連するアレルゲン)で刺激されると、ネオプテリンの放出が特異的にアップレギュレートされることを示した。

IL-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、TNF-およびIFN-より選択される1つまたはそれより多くのサイトカインの存在は、クラスIVの細胞性T細胞免疫、すなわち遅延型過敏症、例えば細胞免疫、遅延型アレルギー、および接触性湿疹の指標である。

【0023】

IL-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、TNF-およびIFN-より選択される1つまたはそれより多くのサイトカインの存在、ならびに/または高レベルのネオプテリンの存在は、Tリンパ球およびBリンパ球ならびに炎症細胞によるクラスI免疫反応型、すなわち即時型過敏症、例えば喘息、花粉症、蕁麻疹および鼻炎の指標である。

【0024】

本方法は、図9に全体像を示したように実施してよい。手短にはヒト細胞は96ウェルプレートで培養する。被験物質およびIFN-を細胞に加える。細胞は、例えば少なくとも5時間、例えば5から48時間、例えば12から36時間、特に20から24時間インキュベーションする。上清を分析する。これは上清を集め、それを96ウェルELISAプレートに移すことにより行ってよい。次にサイトカインの産生を測定する。これは、サイトカインそれ自体を測定することにより行ってよい。1つの態様に従って、上清中のサイトカインのELISA分析を行う。特にネオプテリンを測定する。その後試験結果を評価する。各物質毎に用量応答曲線を作成してよい。アレルギー反応はまた、アップレギュレートされたまたはダウンレギュレートされた遺伝子を検出することにより：細胞から抽出されたRNAまたはDNAの測定により、すなわち遺伝子活性化プロファイルを決定することにより測定してもよい。

【0025】

さらなる態様に従って、IL-2、IL-8、IL-10、IFN-ガンマ、IL-4、IL-5、および可溶性産生物、例えばsCD8およびsIL-2Rより選択される、細胞性T細胞免疫に関連付けられるクラスIV型のサイトカインをまた測定する。

【0026】

なおもう1つの態様に従って、IFN-、IL-2、IL-10、IL-4、IL-5、および可溶性産生物、例えばsCD8およびsIL-2Rより選択される、クラスI型、すなわちTリンパ球およびBリンパ球ならびに炎症細胞による免疫反応型のサイトカインもまた測定する。

【0027】

本発明に従って、以下：GIP2、OASL、IFIT1、TRIM22、IFI44L、MXI、RSAD2、IFIT3、IFITM1、IFIT2、SPR、GNB2、C33.28HERV-Hタンパク質mRNA、IFITM3、XK、GPR15、MT1G、MT1B；MT1A、ADFP、IL8、MT1E、MT1F、MH1H、SLC30A1、SERPINB2、CD83、TncRNAより選択されるアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる遺伝子、またはそれらの発現産生物を測定することに

10

20

30

40

50

よりアレルギー反応を見積もることもまた可能である。全体として、GIP2、OASL、IFIT1、TRIM22、IFI44L、MXI、RSAD2、IFIT3、IFITM1、IFIT2の1つまたはそれより多くの発現が、I型アレルギーを示し；SPR、GNB2、XK、IFITM3の1つまたはそれより多くが、非アレルギーを示し；、C33.28HERV-Hタンパク質mRNA、IFITM3、XK、GPR15の1つまたはそれより多くがI型/IV型のハプテンを示し、そして、MT1G、MT1B；MT1A、ADFP、IL8、MT1E、MT1F、XK、IFITM3、MT1H、SLC30A1、SERPINB2、GNB2、MTIB、CD83、TncRNAの遺伝子の1つまたはそれより多くが、IV型アレルギーを示す。

【0028】

本発明者らは、外来物質に対する有害な組織の応答を以下のように分類した。

クラスI：アレルギー性免疫反応I型。これは即時型過敏症とも命名されており、外来物質に対して特異的に産生されるIgE抗体により仲介される。急性炎症反応が起こり、しばしばヒスタミンが産生され、症状の例として、喘息、花粉症、蕁麻疹、および鼻炎がある。この形は、その物質が、免疫系のすべての成分が参加する完全に成熟した免疫反応を誘発できることを必要とする。この型はまた、最終ステップの免疫反応とみなされている。

【0029】

クラスIV：炎症性免疫反応IV型。これは遅延型過敏症とも命名されており、感作Tリンパ球TH-1型により仲介され、最初のステップの型の免疫反応とみなされている。アレルギー性接触性皮膚炎はこの型の反応の一例である。

【0030】

クラスIおよびクラスIVに関しては、Ivan Roitt, Jonathan Brostoff およびDavid Maleによる "Immunology", Gower Medical Publishing London-New York, 1989, ページ19.1-19.20および22.1-22.10を参照のこと。同文献を参照として援用する。

【0031】

サイトカインプロファイルの3つの主要な型を同定した。

クラス0型：結合組織、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、非特異的炎症性白血球細胞に傷害を示す警告サイトカインの分泌。このグループのメンバーはIL-1、IL-6、IL-12、およびTNFである。

【0032】

クラスI型：リンパ球および炎症細胞からの免疫反応型のサイトカインの分泌。これらにはクラス0のサイトカイン、そして加えてIFN-ガンマ、ネオプテリン、IL-2およびIL-10を含む。理論的には動物のin vivo試験で知られているように、IL-4およびIL-5もまたここに組み入れるべきであるが、これらの物質は決定するのが難しいことで有名であり、したがって著者らの試験プロトコールにルーチンには含めない。

【0033】

クラスIV型：クラス0の非特異的型のサイトカイン、そして加えてIL-2、IL-8、IL-10およびIFN-ガンマの分泌。

完全な最終型の免疫反応であるクラスIはネオプテリンの産生を促進するが、一方クラスIVの初期型免疫反応は、ネオプテリン産生に対する限り免疫系を刺激することはない。

【0034】

上に列記したサイトカインは、単に好ましく選択された代表的なメンバーであるに過ぎない。加えてその他のサイトカインも同様に使用してよく、本特許は、The Cytokine Facts Book、Callard R.E. およびGearing, A.J.H.編、Academic Press 1994(本明細書により参照として援用する)に列記されたすべての物質の分析の使用、および物質が惹起の潜在性を有する反応の成熟度のグレードを予測するための将来アップデートされる諸事についても主張する。

【0035】

10

20

30

40

50

インターロイキンの例は、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12、IL - 13、IL - 14、IL - 15である。その他のサイトカインの例は(アルファベット順に)BDNF、CNTF、EGF、Epo、FGF、G-CSF、GM-CSF、I-309/TCA-3、yIP-10、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、LIF、LT(TNF α)、MCP-1、2および3、M-CSF、MIF、MIP-1、MIP-1 β 、MIP-2、NGF、NT-3、NT-4、OSM、PBP、PBSF、PDGF、PF-4、RANTES、SCF、TGF β 、TGF α 、TNF α 、Tpo、VEGFである。
【0036】

本発明に従って、炎症性免疫反応IV型の存在は、好ましくはIL-8を使用することにより分析する。IV型の反応時に、IL-8が展開され、上昇したレベルで存在することが判明した。

10

【0037】

I型反応が間もなく起こるという場合、ネオプテリンはより高い量で存在するため、IL-8および/またはネオプテリンは、炎症性免疫反応IV型のおよびアレルギー性免疫反応I型との間を区別するために、特に使用することができる。

【0038】

In vitro試験の結果、すなわち調査下の物質により誘発されるサイトカインのパターンに基づいて、ヒトまたは動物がその物質に暴露された時に、有害な反応を引き起こすその物質の潜在性に関して予測を行う。

20

【0039】

望まない微生物の増殖を防ぐため、抗生物質を加えてよい。ペニシリンおよびストレプトマイシンは、25-100U/mlの濃度で加えてよい。

マイトジェン、または免疫系における公知の効果を有する物質を、より良い結果を得るためにポジティブコントロールとして使用することができる。Daniel P. Stites: Clinical Laboratory Methods for Detection of Antigens & Antibodies in Basic and Clinical Immunology, Large Medical Publication, Los Altos California, 1984に述べられているような、あらゆるマイトジェンを使用してよい。この参考文献を本記述において参照として援用する。好ましくは植物性血球凝集素(PHA-L)を使用し、1ml当たり250 μ gのウェルの最終濃度となるように、適切な培地中に溶解させる。

30

【0040】

培地は、細胞、特にヒト細胞およびヒト血液由来細胞の培養に使用されるいかなる培地でもよい。RPMI 1640は適切な培地の一例である。培地はまた血清不含培地、例えばPanserin 411でもよい。

【0041】

試験は試験管内、または好ましくはマイクロタイタープレートのウェル内で行うことができる。

本発明の1つの態様に従って、単球、マクロファージ、および/または骨髄単球系細胞株に毒性でない最も高い濃度の物質を段階希釈してよい。

【0042】

40

免疫系における効果について試験する物質に関しては、異なる濃度を細胞に加え、約37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションする。例えば生体染色、例えばトリパンブルー、ヨウ化プロピジウムの存在下での顕微鏡観察、またはあらゆるその他の生存判別試験により示された、細胞に毒性でない最も高い濃度の物質を、出発濃度として使用してよい。その後物質の段階希釈を行う。物質をRPMI 1640中に希釈する場合、適当なコントロールは培地のみである。他の希釈液を使用する場合、対応する濃度の適当な希釈液のコントロールを使用する。

【0043】

本発明の1つの態様において、試験する物質はタンパク質である。試験する物質が潜在的アレルギーである場合、試験する潜在的アレルギーは、アレルギーの原料から単離され

50

たか、またはリコンビナントにより産生されたかのいずれかの、抽出物の成分（1つまたは複数）として、または純粋な天然の形で試験することができる。

【0044】

サイトカインアッセイ

プレートは様々な時間間隔でインキュベーターから取り出し、培養細胞から放出されるサイトカインを上清中で測定する。上清は直ちに試験するか、または試験まで - 20 で保存することができる。サイトカインの判定に関しては様々な由来の診断キットを使用する。本特許は本方法に関して、バイオアッセイ、イムノアッセイ、または化学的アッセイ、またはその他のアッセイを含む、サイトカインの定量に使用するあらゆる利用可能な試験または新たに構成された試験を使用することを主張する。

10

【0045】

製造元の指示は以下のとおりである。これら試験はすべて酵素免疫測定法（EIA：s）である。原理は、マイクロタイタープレートのウェルを、サイトカインを特異的に捕獲する抗体で標識することである。サイトカインがウェルに添加されたサンプル中に存在していれば、サイトカインはウェルの底に捕獲される。捕獲されたサイトカインの量を定量するため、酵素で標識された第二抗体をウェルに加えてよい。反応はその後、酵素の基質を加えた後の発色として測定してよい。試験ウェルの値を、一連の公知の量のサイトカインから得られる標準曲線と比較してよい。用量応答曲線を各物質について作成してよい。

【0046】

本発明はまた、クラスI型のサイトカイン、および/またはクラスIVのサイトカインを認識する1つまたはそれより多くの試薬を包含するキットに関わる。そのようなサイトカインの例は、本記述において述べたものである。ネオプテリンおよびIL-8の存在に反応する試薬が好ましい。

20

【0047】

これら試薬は、これらの物質に対して感受性がある抗体またはその他の試薬であってよい。試薬は、キャリアー(carrier) 例えば条片(strip)、タイタープレート、マイクロタイタープレート、ELISAプレート、試験管などにより支持されていてよい。キャリアーは異なるサイズであってよい。キャリアーの材料は、試薬とサイトカイン間の反応を妨げることのないあらゆる固体または半固体であってよい。キャリアーは、マイクロ粒子、ビーズ、多孔質および不透過性の条片およびメンブレン、反応容器 例えば試験管およびマイクロタイタープレートの内側表面を含む、多様な形および組成をとることができる。マイクロタイタープレートおよびビーズは、プラスチック、例えばスチレンポリマーもしくはアクリルポリマー、またはガラスであってよい。ニトロセルロースは、好ましくはフィルター、条片、またはディスクの形で使用することができる。所望の反応相手を選択された固体支持体に結合させる手段は、当業者のルーチンの技術の問題となる。フローサイトメーターを使用することもまた可能である。

30

【0048】

以下の市販キット（製造元を併記）を使用してよい：

IL-1ベータ：Immunotech; Chromgenix

IL-2：Immunotech; Chromgenix

IL-4：R&D Systems

ネオプテリン：Henning Berlin, IBL-Hamburg Neopterin ELISA

IL-6：Immunotech, Chromgenix

IL-8：Assay Res. Inc

インターフェロン-ガンマ：Genzyme

sCD8：T Cell Diagnostics

SIL-2R：Immunotech

TNF：Medgenix

IL-10：Medgenix

製造元の指示は以下のとおりである。これら試験はすべて酵素免疫測定法（EIA：s

40

50

)である。原理は、マイクロタイタープレートのウェルを、サイトカインを特異的に捕獲する抗体で標識することである。サイトカインがウェルに添加されるサンプル中に存在していれば、サイトカインはウェルの底に捕獲されることになる。捕獲されたサイトカインの量を定量するため、酵素で標識された第二抗体をウェルに加える。その後反応は、酵素の基質を加えた後の発色として測定する。試験ウェルの値を、一連の公知の量のサイトカインを加えることにより得られた標準曲線と比較する。物質を加えていないコントロールウェルから得られた値を、サイトカインのレベルのバックグラウンド値として使用する。

【0049】

遺伝子活性化アッセイ

アップレギュレートまたはダウンレギュレートされる遺伝子の検出は、PCT/SE2006/050336に記載された通りに行ってもよい。細胞表面に発現される遺伝子産物を持つ遺伝子に関しては、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーションをFACSにより検出することもまた可能である。

10

【0050】

試薬キット

本発明はさらに、本発明に従っての方法において使用するための試薬キットに関し、試薬キットが、インターフェロン-、ならびにサイトカインのIL-8およびネオプテリンを認識する試薬、ならびに/またはアップレギュレートされるもしくはダウンレギュレートされる遺伝子を認識する試薬、例えばプローブを包含することを特徴とする。

【0051】

試薬キットはしたがって、GIP2、OASL、IFIT1、TRIM22、IFI44L、MXI、RSAD2、IFIT3、IFITM1、IFIT2、SPR、GNB2、XK、IFITM3、C33.28HERV-Hタンパク質mRNA、IFITM3、XK、GPR15、MT1G、MT1B;MT1A、ADFP、IL8、MT1E、MT1F、MH1H、SLC30A1、SERPINB2、CD83、TncRNAのいずれかの発現時に産生される産物を認識するプローブを包含してよい。そのようなプローブはDNAもしくはRNAのプローブ、またはFACSによる分析で使用するための試験細胞の細胞表面上に表示される発現産物に特異的に結合する蛍光標識分子であってよい。

20

【0052】

試薬キットはさらにまた、単球、および/またはマクロファージ、および/または骨髄単球系細胞株より選択される試験細胞を包含してよい。

30

本明細書および以下の請求項を通して、文脈で別に要求していなければ、“包含する”、またはその変形の例えば“包含すること”という単語は、記述された成分または成分の群を含むことを意味するが、それ以外のあらゆる成分または成分の群を除外することを意味するものではないことと理解されたい。

【0053】

本明細書で述べたすべての公開文献を、本明細書により参照として援用する。今度は本発明を以下の非限定的実施例により記載することにする。

【実施例】

【0054】

本発明のいくつかの態様を示す以下の実験により、本発明をさらに説明する。与えられた実施例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではなく、添付の請求項の範囲がそれに当たる。

40

【0055】

材料および方法

「細胞培養」

骨髄単球系細胞株のMonoMac-6(DSMZより入手、アクセション番号ACC124、Prof. H.W.L. Ziegler-Heitbrock, Inst. For Immunology, University of Munich, Munich)は細胞培養フラスコ(Corning)中で培養した。細胞は、20mM HEPESおよびL-グルタミンを含有し、10%加熱不活化ウシ胎児血清(Gibco BRL)、ペニ

50

シリン (100 U/mL; Sigma-Aldrich)、ストレプトマイシン (100 µg/mL; Sigma-Aldrich)、ピルビン酸ナトリウム (1.0 mM; Gibco BRL)、ヒトインスリン (9 µg/mL; Gibco BRL) および非必須アミノ酸 (Gibco BRL) を補充した RPMI 1640 培地 (Gibco BRL) 中で培養するか、またはペニシリン (100 U/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL) を補充した Panserin 411 (Pan Biotech) 中で培養した。

【0056】

急性単球性白血病細胞株 THP-1 (ATCC、USA、アクセシオン番号 TIB-202) は、10 mM HEPES (Gibco BRL) を含む RPMI 1640 培地中で培養した。4 mM L-グルタミン (Gibco BRL)、1.5 g/L 炭酸水素ナトリウム、4.5 g/L グルコース (Gibco BRL)、1.0 mM ピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL)、0.05 mM 2-メルカプトエタノール (Gibco BRL)、10% ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco BRL)、100 U/mL ペニシリン、および 100 µg/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を添加。

10

【0057】

本発明における使用を意図されるその他の細胞株は、WBC 264-9C (ATCC アクセシオン番号 HB-8902)、AML-193 (DSMZ アクセシオン番号 ACC 594)、MUTZ-3 (DSMZ アクセシオン番号 ACC 295) である。これら細胞株に関する適切な培養条件の情報は、各々 ATCC および DSMZ より入手可能である。

【0058】

細胞は刺激する前日におよそ 1:3 に分けた。刺激の手順は 3 ステップで行った。最初のステップでは、被験物質を最終濃度の 2 倍となるように、細胞培養培地で予め希釈した。さらにインターフェロン- γ (IFN- γ) (100 U, Prepro Tech) を、被験物質で細胞を刺激する間、24 または 48 時間、細胞培養培地中に加えた。その後トリパンブルー色素排除試験により細胞数を決定し、別に指摘がなければ細胞を最終試験濃度の 2 倍 (2×10^6 細胞/mL) に希釈し、96 ウェル組織培養プレート (Corning) の 1 ウェル当たり 100 µL の細胞懸濁液を加えた。最後に 100 µL の予め希釈しておいた被験物質を組織培養プレートに加えた (3 回培養)。各細胞培養プレートに、カバノキ抽出物より精製されたタンパク質 (Bet v 1; Phadia) をポジティブコントロールとして、そして HSA をネガティブコントロールとして加えた。刺激される細胞は、37 °C、5% CO₂ で、24 または 48 時間培養した。細胞懸濁液を新しい細胞培養プレートに移し、分析するまで -20 °C で保存した。その後細胞懸濁液を、製造元の指示に従って ELISA (IBL-Hamburg) によりネオプテリンの存在について分析した。

20

30

【0059】

「被験物質」

ヘキサクロロ白金酸アンモニウム (HCPt) (Sigma Aldrich CAS No. 16919-58-7)、トリメリット酸無水物 (TMA) (Sigma Aldrich CAS No. 552-30-7)、ジフェニルメタンジイソシアネート (MDI) (Sigma Aldrich, CAS No. 101-68-8)、2,4 ジニトロクロロベンゼン (Sigma Aldrich, CAS No. 97-00-7)、没食子酸プロピル (PLG) (Sigma Aldrich, CAS No. 121-79-9)、イソオイゲノール (Sigma Aldrich, CAS No. 97-54-1)、ベンゾカイン (Sigma Aldrich, CAS No. 94-09-7)、ペニシリン G (Sigma Aldrich, CAS No. 69-57-8)、硫酸ニッケル (Sigma Aldrich, CAS No. 10101-97-0)、サリチル酸メチル (Sigma Aldrich, CAS No. 119-36-8)、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) (Sigma Aldrich, CAS No. 151-21-3)、グリセロール (Sigma Aldrich, CAS No. 56-81-5)、サリチル酸 (SA) (Sigma Aldrich, CAS No. 69-72-7)、p-アミノ安息香酸 (PABA) (Sigma Aldrich, CAS No. 150-13-0)、コウジカビ由来アルファ-アミラーゼ (Sigma Aldrich, CAS No. 9001-19-8)、ヒトアルブミン (Sigma Aldrich, CAS No. 70024-90-7)、リポキシゲナーゼ (ダイズ種子) (Sigma Aldrich, L7395L)、インスリン (Gibco BRL)、ターマミル (Sigma Aldrich, CAS No. 9000-85-5)、トロポミオシン (脊椎動物) (Sigma Aldrich, CAS No. 9067-56-5)、アルファ-アミラーゼ (ヒト唾液) (Sigma Aldrich, C

40

50

AS No.9000-90-2)、レクチン：ラッカセイレクチン(PNA)(ピーナッツ)(Medicago, 05-0116)、レクチン：ダイズ(大豆)(Medicago, 05-0117)、レクチン：バレイショ(ジャガイモ)(Sigma Aldrich, L4266)、D-リボース1,5-ジホスフェートカルボキシラーゼ(RUBISCO)(Sigma Aldrich, CAS No.9027-23-0)、ゼラチン(Sigma Aldrich, CAS No.9000-70-8)、レクチン：レンズマメ(LCA/LCH)(レンズ)(Medicago, 05-0104)、LALスタンダード(コントロールスタンダードエンドトキシン(CSE))(Endosafe KTA)、およびリポ多糖(LPS)(Sigma Aldrich, L3880-100MG)。Phadia製の天然成分：Art v 1(Mugworth)、Ara h 2(ピーナッツ)、Bet v 1(カバノキ)、Cor a 8(LTP、ヘーゼルナッツ)、Alt a 1(アルテルナリア属)、Phl p 1(Thimothy)、Amb a 1(ブタクサ)、Gal d 2(卵白アルブミン、卵白)、およびGal d 3(コンアルブミン、卵白)。試験濃度は図に示す。使用した試験濃度は、以前に行なわれた最適化実験のデータに基づいて選択した。細胞生存率は80%以下であってはならない。

10

20

30

40

50

【0060】

「細胞生存率：ヨウ化プロピジウム(PI)染色による測定、およびフローサイトメトリーによる分析」

細胞生存率のモニタリングは各実験において、0.4%トリパンブルー(1:1)による染色、および血球計算器を使用しての細胞カウントにより行った：死細胞はトリパンブルーで染色される。生存細胞% = 生細胞数 × 100 / 総細胞数。(以前の最適化調査における) 相応の試験濃度を見出すため、細胞生存率をヨウ化プロピジウム(PI)染色およびフローサイトメトリー分析を使用して決定した。細胞は、1mlの氷冷PBS(SVA)中に再懸濁し、300gで5分間遠心し、その後8μl PI染色溶液(Becton Dickinson)を補充した0.2mlの氷冷PBS中に懸濁した。その後細胞をFACS試験管に移し、1時間以内のFACSスキャンフローサイトメーターおよびCellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)による分析まで、暗所にて氷上に保存した。死細胞のコントロールは、非誘発コントロール細胞を液体窒素中で凍結と解凍を3回繰り返すことにより作成した。各サンプルから50,000細胞の細胞数について分析した。光散乱の特徴に基づき、電子ゲート(RI)を使用して、細胞の残骸に由来するシグナルを除外した。死細胞数を算出するための電子ゲートは、凍結/解凍したコントロール細胞を使用して設定した。

【0061】

結果

「IFN- γ の存在はBet v 1およびAra h 2により誘発されるネオプテリンのレベルを有意に増加したが、コントロール物質で刺激された細胞ではレベルは増加しなかった。」

RPMI + 10% FCS中で培養したMM6細胞の、天然タンパク質アレルゲンによる刺激は、およそ5nmol/lのネオプテリンのレベルを誘発する。IFN- γ による同時刺激が、タンパク質アレルゲンによる誘発で産生されるネオプテリンレベルを有意に増加することができるかどうかを決定するため、細胞は刺激の間、IFN- γ (100U/ml)の存在する場合、および存在しない場合で刺激された。MonoMac-6細胞は、24時間、1ml当たり 1×10^6 細胞の細胞濃度とした(図1)。IFN- γ の存在下のBet v 1 (2.2 - 20μg/ml)は、Bet v 1のみで刺激された細胞で得られたネオプテリン産生と比較して、ネオプテリン産生の3倍の増加を誘発した。IFN- γ 存在下、コントロール物質HSA (2.2 - 20μg/ml)に暴露された細胞は、ネオプテリン産生を1倍未満の変化でしか増加しなかった。加えて、天然アレルゲンAra h 2 (20μg/ml)による刺激も、Ara h 2のみによる細胞と比較して、IFN- γ 存在下でネオプテリン産生の3倍の増加を示した(図2a)。Bet v 1およびIFN- γ 、またはAra h 2およびIFN- γ による同時刺激は、用量応答の様式でのネオプテリン産生を示した。HSA、バレイショレクチンまたはゼラチン(アレルゲン性がほとんどないと考えられる物質)と組み合わせたIFN- γ による刺激は、バックグラウンドレベルを上回るいかなるネオプテリン産生も誘発しなかった

(図 2 b)。タンパク質アレルゲンによる刺激時の細胞生存率は、IFN- のみで刺激された細胞、または培地のみの中で培養した細胞(データは示していない)と比較して、(すべての試験濃度で)変化しなかった。

【0062】

「ネオプテリンレベルはタンパク質アレルゲンに対して、用量依存の様式で増加した。

次に同時刺激物質としてIFN- を使用して最適化したCPA試験のプロトコールを、タンパク質アレルゲン(図 3 aおよび図 3 b)、またはアレルゲン潜在性のより低い、もしくはアレルゲン潜在性のないタンパク質(図 3 bおよび図 3 c)をカバーする拡大した試験パネルを使用して、さらに評価した。タンパク質アレルゲンは、相応の試験濃度を見出すことを目的とするより早期のパイロット調査(データは示していない)に基づいて、0.2 - 180 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の濃度で試験した。すべてのアレルゲン物質は用量依存の様式で増加したネオプテリン産生を誘発した(8被験物質中8被験物質)。低いアレルゲン性のまたはアレルゲン性にほとんど関連しないタンパク質、例えばHSA、ターマミル、またはダイズレクチンは、バックグラウンドレベル(非刺激細胞)を上回るネオプテリンを誘発することはなかった。ダイズレクチンは、6.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のAra h 2に対する細胞応答に匹敵するネオプテリン応答を、180 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試験濃度で得た。6.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試験濃度のダイズレクチンは、コントロール細胞(非刺激細胞またはHSA(6.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)により刺激された細胞)のレベルを上回る、いかなるネオプテリンの応答も誘発しなかった。

【0063】

低分子化学物質は、過敏症反応、主に皮膚または呼吸器の感作を誘発すると思われる物質のもう1つの群である。これらの物質群に対してネオプテリン応答が存在するかどうかを見出すため、試験パネルを拡大して、各化学物質群、ならびに刺激性を誘発するが感作は誘発しないことが知られている化学物質から、いくつかの代表的物質を含めた(図 4 a - d)。最初に、感作物質の各カテゴリーからの1つの被験物質(DNCB 強い皮膚感作物質、およびHCPt 強い呼吸器感作物質)による刺激時の、ネオプテリン放出におけるIFN- の効果を評価した(図 4 a)。結果は、IFN- の存在下または不在下のいずれにおいても、試験した化学物質はバックグラウンドレベル(非刺激細胞またはHSAにより刺激された細胞)を上回るいかなるネオプテリンの放出も誘発しなかった。公知の皮膚または呼吸器の化学系の感作性物質または刺激性物質のさらなる評価(最も高濃度では生細胞のおよそ80%を有する、5つの異なる濃度で試験した)では、試験した15物質中2物質が、バックグラウンドレベルを上回るネオプテリン応答を誘発した(図 4 b:ベンゾカイン(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)および図 4 d:フェノール(15 $\mu\text{g}/\text{ml}$))。実験は少なくとも2回同じ結果が得られるまで繰り返した。

【0064】

「試験プロトコールのさらなる最適化:血清不含培地における細胞培養。」

動物由来成分を含まないより標準化された試験プロトコールを得るためには、細胞は好ましくは血清(FCSまたはFBS)を含まない培地中で培養すべきである。それ故MM6を血清不含細胞培養培地(Panserin)に適應させ、各々異なる細胞濃度(表1)または異なる時間ポイント(24時間もしくは48時間)(表1、図 5 b - c)でタンパク質アレルゲンに対して応答するその能力を評価した。表1においては細胞の濃度の影響を決定した。1 \times 10⁶細胞/ml(Panserin中で培養した細胞)でわずかにより高いネオプテリン応答が得られたため、その細胞濃度を本明細書で報告するさらなる研究のために選択した。というのは血清タンパク質を含まないことで、高い細胞生存率を確実にするためより高い細胞密度を必要とすると思われるためである。しかし0.5 \times 10⁶細胞/mlの細胞濃度もなお考慮に値する。10%FCSを含むRPMI中(図 5 a)、またはPanserin中(図 5 b)で培養した細胞を(IFN- の存在下)Ara h 2(20または6.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)またはHSA(6.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で24時間刺激した。24時間でアレルゲンに誘発されたネオプテリンレベルは、ウシ胎児血清の存在下または不在下で培養さ

れた細胞に関して、コントロールタンパク質により誘発されたものとは明らかに区別される。実験は9回(図5 a)または5回(図5 b)繰り返し行った。48時間で類似する結果に達した(図5 c)(実験は7回繰り返し行った。)これらの所見は、24時間または48時間で、血清不含培地で培養された細胞は、細胞をRPMI中で24時間培養した場合に達するレベルと比較して、類似したようにネオプテリン放出により応答することを示す。さらなる被験物質(タンパク質アレルゲン)についても、血清不含試験プロトコールにて試験した。7つのタンパク質アレルゲン、および考慮され得るアレルゲン潜在性のない4つのタンパク質を、24時間(図6 a - d)または48時間(図7 a - c)、異なる濃度で試験した。24時間および48時間の双方で、タンパク質アレルゲンは、10% FCSを補充したRPMI中で培養された細胞に認められたものと類似する、用量応答の様式でのネオプテリン応答を誘発した。しかしPanserin中では、24時間のタンパク質アレルゲンによる刺激でのネオプテリンレベルは、同じタイムポイントで血清含有培地中で培養された細胞に認められる値より幾分低い。しかし48時間では、タンパク質アレルゲンへの応答のネオプテリンレベルは増加し、24時間刺激された血清培養細胞に認められたレベルと類似する。

10

20

30

40

50

【0065】

「RPMI対Panserinの評価：アッセイ内およびアッセイ間の精度の統計評価」

アッセイ内およびアッセイ間の精度を、1つの天然アレルゲンタンパク質(Ara h 2; 20および6.6マイクログラム/ml)、および非アレルゲンタンパク質(HSA; 6.6マイクログラム/ml)に関して評価した。各実験においてこれら2つの物質を、被験物質による刺激の間、各細胞培養プレートに入れた。アッセイ間の統計評価用には、各実験の1つの代表的なプレートの結果を使用した。結果を表2 a - cに示す。細胞は、RPMI + 10% FCS中またはPanserin 4 1 1中で培養し、被験物質は刺激の間、細胞培養培地中のIFN- γ で刺激された。各実験において物質は、各濃度毎に3回の培養で刺激された。アッセイ内(3回内)およびアッセイ間の精度を表に示す。各実験の3回の平均の、平均および標準偏差を、3回内およびアッセイ間の変動係数(CV)と同様に示す。

【0066】

Ara h 2およびHSA、ならびにすべての被験物質により刺激された細胞のデータの外れ値は、CVが20%である場合、CVが3倍より良くなる場合、そして標準偏差が1.5 nmol/lネオプテリンより大きい場合と定義した。各実験には非刺激細胞を含むウェルの数が含まれ、その結果もまた表2 a - cに示す。24時間刺激の実験においては、非刺激細胞を含むウェル間での外れ値の定義に関して、同じ基準を使用した。細胞を48時間刺激した実験においては、それらの値が残りの値と異なる場合、16の値から1または2の値を除外した。統計処理はExcelソフトウェアにて行った。細胞をRPMI + 10% FCS中で24時間刺激した場合(表2 a)、アッセイ内CVはHSAによる刺激で10.3%であり、Ara h 2タンパク質による刺激ではそれよりさらに低かった。アッセイ間CVはより高かった(20.8%および33.3%の間)。

【0067】

Panserin 4 1 1中24時間の刺激(表2 b)でもまた、アッセイ内CVはアッセイ間の14.2% - 21.4%よりずっと低かった(7.0% - 16.7%)。アッセイ内CVは、細胞をRPMI + 10% FCS中で培養した値と類似していた。アッセイ間CVは、血清不含培地であるPanserin 4 1 1中で幾分低かったが、しかし誘発されたネオプテリンのレベルもまた、FCS不在下ではより低かった。HSAによる刺激でのネオプテリンのレベルは、非刺激細胞における自発的ネオプテリン産生と類似していた。さらにPanserin 4 1 1中48時間の刺激(表2 c)では、アッセイ内ならびにアッセイ間のCVは、Ara h 2による刺激でより高かった。HSAによる刺激では、アッセイ内のCVは48時間と比較して24時間でわずかに低く、アッセイ間CVは24時間および48時間で類似していた。非刺激細胞によるウェル内の自発的ネオプテリン産生は、48時間インキュベーション後と比較して24時間ではずっと高いばらつきを示した。

【0068】

「THP-1細胞においてタンパク質アレルゲンに対してネオプテリンレベルは増加された。」

単球由来の別の細胞株が、タンパク質アレルゲンに対してMM6の用量応答と同じ細胞応答を示すかどうかを明らかにする目的で、THP-1細胞株(Tsuchiya et al., 1980)を、Ara h 2、LPS、およびHSAを含むミニパネルの被験物質にて24時間刺激した(図8)。細胞は、10%FCSを補充したRPMI中で培養した。THP-1はこれらの物質に対して、MM6細胞で認められたものと類似するネオプテリンレベルにて応答した。用量応答は、LPSおよびAra h 2に関して認められたが、HSAでは認められなかった(バックグラウンドレベルを超えなかった)。本発明における使用を意図されるさらなる細胞株として、MUTZ-3、WBC264-9C、およびAML-193がある。

【0069】

表1. 血清不含培地(Panserin)中で培養した細胞に関する試験プロトコルの最適化: 動態学および細胞濃度。MM6細胞をPanserin培地に適応させ、 0.5 または 1.0×10^6 細胞/mlで24または48時間、Ara h 2にて刺激した。ネオプテリンレベルを表に示す。

【0070】

【表1】

| 24時間 | 濃度 | 0.5×10^6 | 1.0×10^6 |
|------------|-----|-------------------|-------------------|
| Ara h 2 | 20 | 11,1 | 13,9 |
| Ara h 2 | 6,6 | 11,1 | 11,0 |
| 非刺激 n = 12 | 0 | 5,4 | 4,6 |
| 非刺激 標準偏差 | | 0,8 | 0,5 |
| 非刺激 CV | | 15,5 | 10,8 |

48時間

| 濃度 | 0.5×10^6 | 1.0×10^6 | |
|------------|-------------------|-------------------|-------------|
| Ara h 2 | 20 | 30,1 | 29,6 |
| Ara h 2 | 6,6 | 26,7 | 24,6 |
| 非刺激 n = 11 | 0 | 12,32 | 10,54 |
| 非刺激 標準偏差 | | 1,9 | 1,3 |
| 非刺激 CV | | 15,8 | 12,3 |

【0071】

表2a. MonoMac6細胞を、24時間、天然ピーナッツアレルゲンであるAra h 2(20および6.6マイクログラム/ml)およびヒト血清アルブミン(HSA; 6.6マイクログラム/ml)で刺激した。物質は刺激の間、細胞培養培地中のIFN- γ で刺激された。細胞はRPMI+10%FCS中で培養した。各実験(アッセイ)において、物質は各濃度毎に3回の培養にて刺激された。アッセイ内(3回内)およびアッセイ間の精度を表に示す。各実験の3回の平均の、平均および標準偏差を、3回内およびアッセイ間の変動係数(CV)と同様に示す。各実験には非刺激細胞を含むウェルの数が含まれ、その結果もまた表に示す。

【0072】

10

20

30

40

【表 2 a】

| 統計分析 | 非刺激細胞 | HSA | Ara h 2 20 µg/ml | Ara h 2 6.6 µg/ml |
|--------------|--------|--------|---------------------|----------------------|
| V(x') | 2.5 | 1.9 | 48.0 | 29.0 |
| 平均の平均 | 7.1 | 5.0 | 20.7 | 16.2 |
| 平均の標準偏差 | 1.6 | 1.5 | 6.9 | 5.4 |
| アッセイ内 CV (%) | 13.8 % | 10.3 % | 6.9 % | 6.5 % |
| アッセイ間 CV (%) | 20.8 % | 27.1 % | 33.3 % | 32.9 % |
| 全体の CV (%) | 25.0 % | 25.0 % | 34 % | 33.5 % |

非刺激細胞, n = 10
 HSA (6,6 µg/ml), n = 6
 Ara h 2 (20 µg/ml), n = 9
 Ara h 2 (6.6 µg/ml), n = 7

10

【0073】

表 2 b . MonoMac 6 細胞を、24 時間、天然ピーナツアレルギーである Ara h 2 (20 および 6.6 マイクログラム/ml) およびヒト血清アルブミン (HSA ; 6.6 マイクログラム/ml) で刺激した。物質は刺激の間、細胞培養培地中の IFN- γ で刺激された。細胞は血清不含培地である Panserin 4 1 1 中で培養した。各実験 (アッセイ) において、物質は各濃度毎に 3 回の培養にて刺激された。アッセイ内 (3 回内) およびアッセイ間の精度を表に示す。各実験の 3 回の平均の、平均および標準偏差を、3 回内およびアッセイ間の変動係数 (CV) と同様に示す。各実験には非刺激細胞を含むウェルの数が含まれ、その結果もまた表に示す。

20

【0074】

【表 2 b】

| 統計分析 | 非刺激細胞 n = 13 | HSA n = 8 | Ara h 2 20 µg/ml n = 7 | Ara h 2 6.6 µg/ml n = 7 |
|--------------|-----------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|
| V(x') | 1,9 | 1,6 | 4,1 | 2,2 |
| 平均の平均 | 6,3 | 5,4 | 12,0 | 9,7 |
| 平均の標準偏差 | 1,4 | 1,3 | 2,0 | 1,5 |
| アッセイ内 CV (%) | 13,7 | 16,7 | 7,0 | 10,4 |
| アッセイ間 CV (%) | 20,4 | 21,4 | 16,5 | 14,2 |
| 全体の CV (%) | 24,6 | 27,1 | 17,9 | 17,6 |

非刺激細胞, n = 13
 HSA (6,6 µg/ml), n = 6
 Ara h 2 (20 µg/ml), n = 7
 Ara h 2 (6.6 µg/ml), n = 7

30

【0075】

表 2 c . MonoMac 6 細胞を、48 時間、天然ピーナツアレルギーである Ara h 2 (20 および 6.6 マイクログラム/ml) およびヒト血清アルブミン (HSA ; 6.6 マイクログラム/ml) で刺激した。物質は刺激の間、細胞培養培地中の IFN- γ で刺激された。細胞は血清不含培地 Panserin 4 1 1 中で培養した。各実験 (アッセイ) において、物質は各濃度毎に 3 回の培養にて刺激された。アッセイ内 (3 回内) およびアッセイ間の精度を表に示す。各実験の 3 回の平均の平均および標準偏差を、3 回内およびアッセイ間の変動係数 (CV) と同様に示す。各実験には非刺激細胞を含むウェルの数が含まれ、その結果もまた表に示す。

40

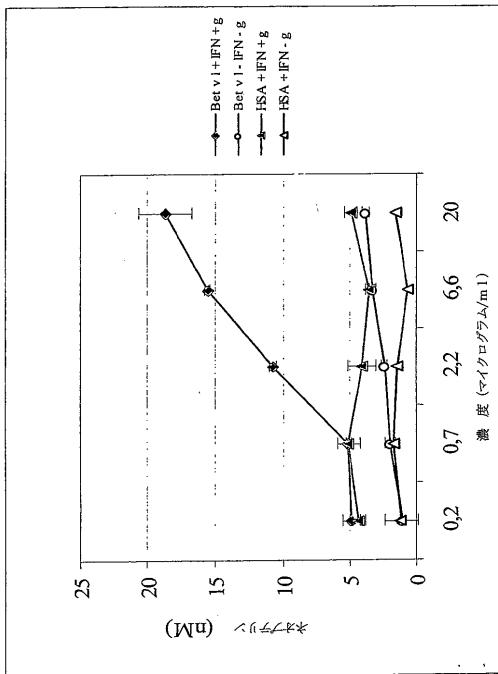
【0076】

【表 2 c】

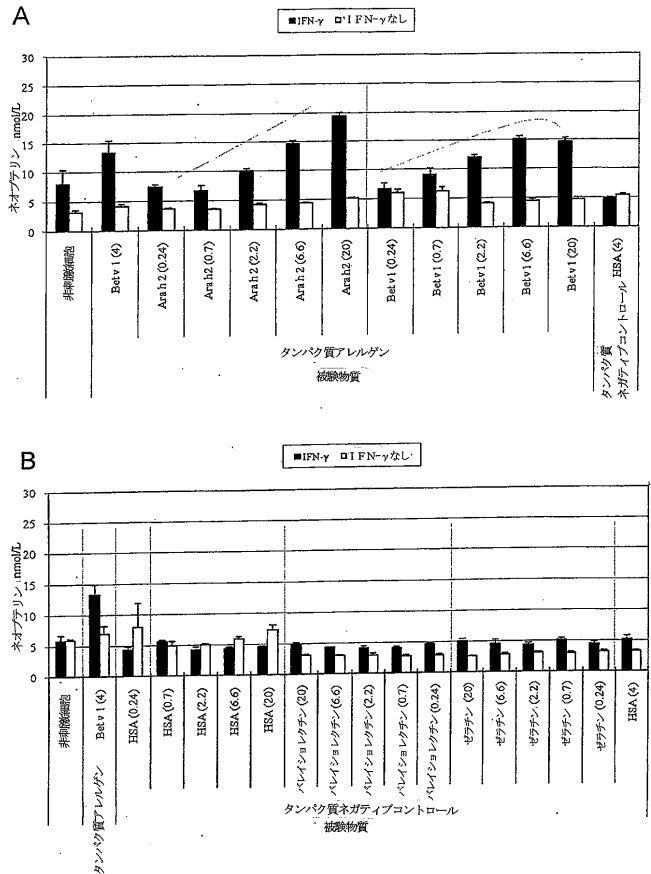
| 統計分析 | 非刺激細胞 n = 7 | HSA n = 6 | Ara h 2 20 µg/ml n = 7 | Ara h 2 6.6 µg/ml n = 8 |
|--------------|----------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|
| V(x') | 4,9 | 6,0 | 35,7 | 28,9 |
| 平均の平均 | 10,5 | 9,9 | 25,3 | 19,6 |
| 平均の標準偏差 | 2,2 | 2,4 | 6,0 | 5,4 |
| アッセイ内 CV (%) | 23,9 | 9,6 | 17,8 | 17,3 |
| アッセイ間 CV (%) | 16,1 | 23,9 | 21,8 | 25,5 |
| 全体の CV (%) | 28,8 | 25,8 | 27,7 | 30,8 |

非刺激細胞、 n = 7
 HSA (6,6 µg/ml), n = 6
 Ara h 2 (20 µg/ml), n = 7
 Ara h 2 (6.6 µg/ml), n = 8

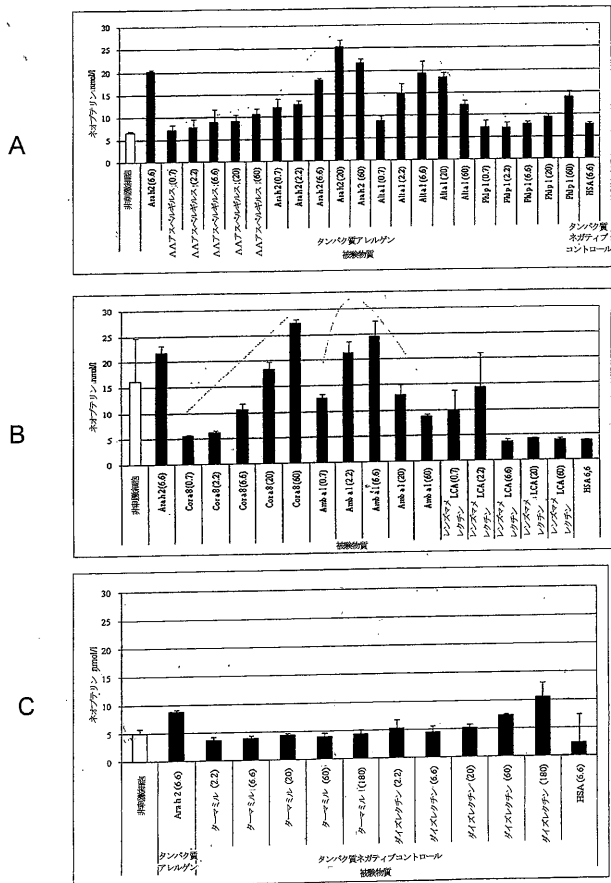
【図 1】



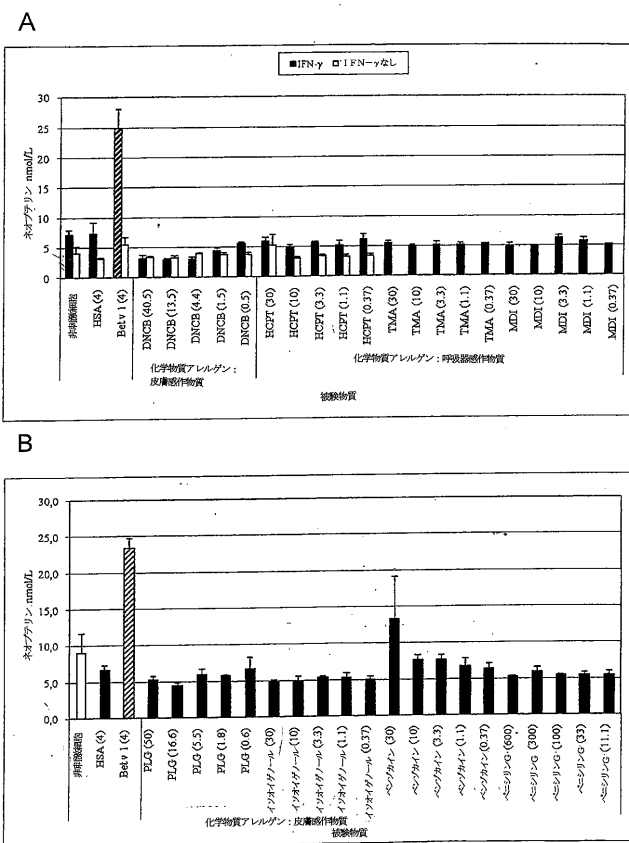
【図 2】



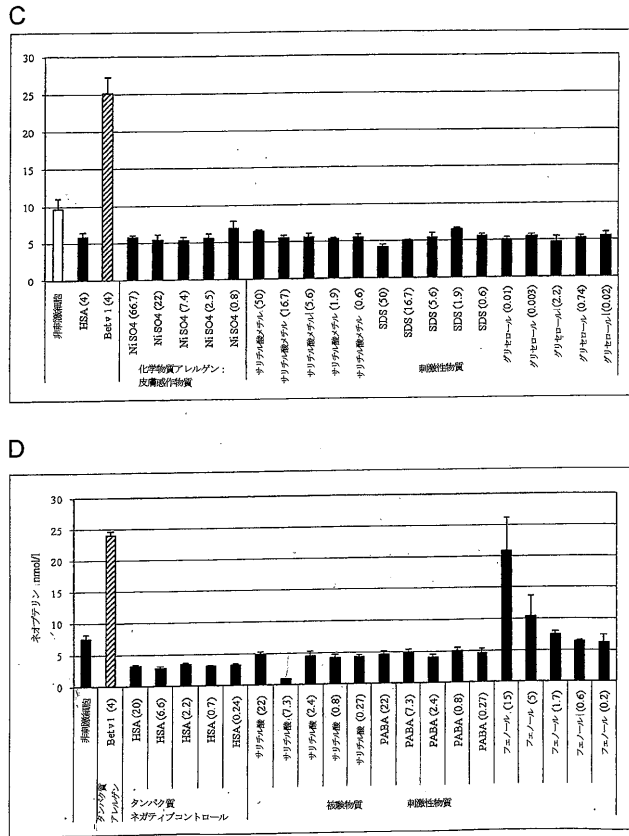
【図3】



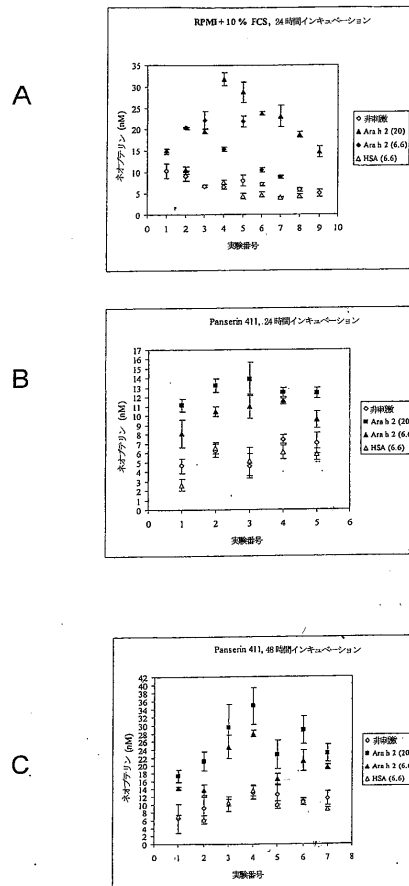
【図4-1】



【図4-2】

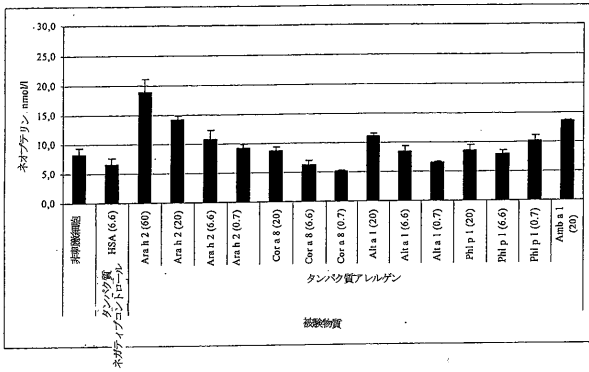


【図5】

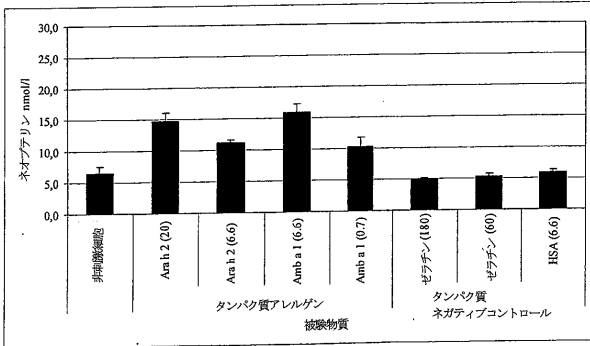


【 図 6 - 1 】

A

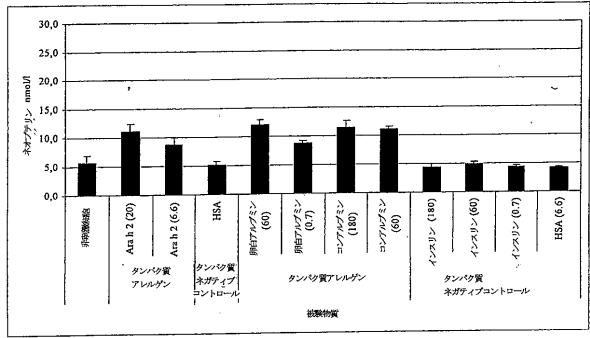


B

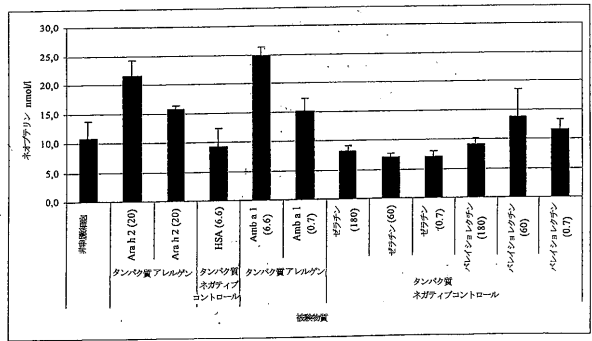


【 図 6 - 2 】

C

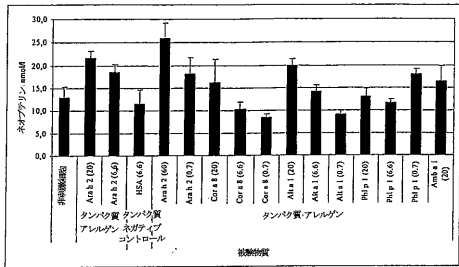


D

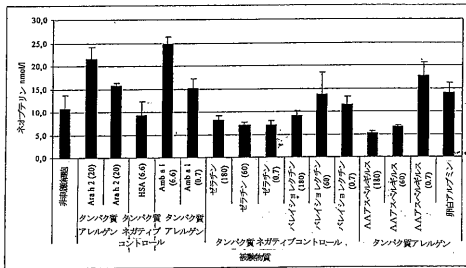


【 図 7 】

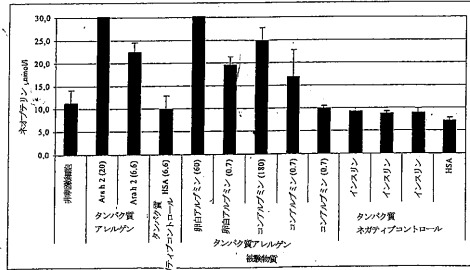
A



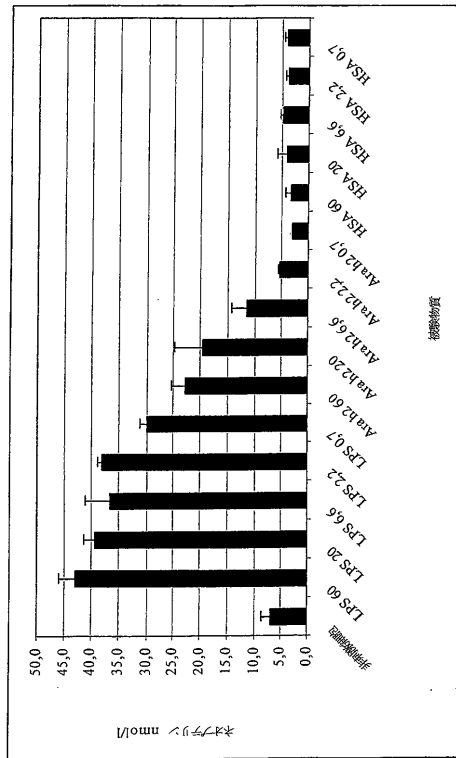
B



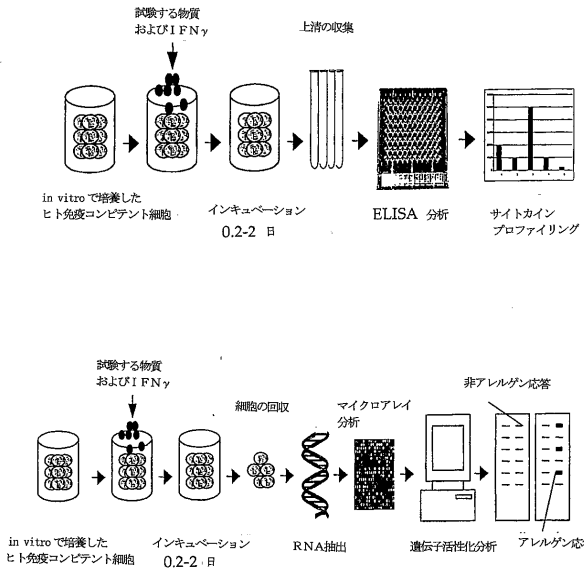
C



【 図 8 】



【 図 9 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/067931

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 G01N33/68 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | DJEU J Y ET AL: "INTERFERON-GAMMA-INDUCED ALTERATIONS OF MONOCYTE SUSCEPTIBILITY TO LYSIS BY AUTOLOGOUS LYMPHOKINE-ACTIVATED KILLER LAK CELLS" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 42, no. 3, 1988, pages 449-454, XP002521503 ISSN: 0020-7136 RESULTS: Effect of various cytokines on susceptibility of monocytes to LAK lysis --- -/-- | 15, 19 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. |
| * Special categories of cited documents : | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier 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 27 March 2009 | | Date of mailing of the international search report 16/04/2009 |
| 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 Mauhin, Viviane |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2008/067931

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | KIM SANGWON ET AL: "Effects of interferon-gamma and lipopolysaccharide on macrophage iron metabolism are mediated by nitric oxide-induced degradation of iron regulatory protein 2" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 9, 3 March 2000 (2000-03-03), pages 6220-6226, XP002521504 ISSN: 0021-9258 RESULTS: LPS/IFN-gamma Activates IRP-1 but Decreases RNA Binding of IRP-2 and Its Protein Levels ----- | 15,19 |
| X | WERNER-FELMAYER G ET AL: "NEOPTERIN FORMATION AND TRYPTOPHAN DEGRADATION BY A HUMAN MYELOMONOCYTIC CELL LINE THP-1 UPON CYTOKINE TREATMENT" CANCER RESEARCH, vol. 50, no. 10, 1990, pages 2863-2867, XP002521505 ISSN: 0008-5472 MATERIALS AND METHODS: Cell Culture ----- | 15,19 |
| A | WIRLEITNER BARBARA ET AL: "Monocyte-derived dendritic cells release neopterin." JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, vol. 72, no. 6, December 2002 (2002-12), pages 1148-1153, XP002477263 ISSN: 0741-5400 ----- | |
| A | WO 97/16732 A (ANDERSSON BIRGER [SE]) 9 May 1997 (1997-05-09) cited in the application ----- | |
| A | WO 2007/032743 A (BIOVATOR TECHNOLOGIES AB [SE]; CEDERBRANT KARIN [SE]; LUNGGREN HANNA []) 22 March 2007 (2007-03-22) cited in the application ----- | |
| A | WO 01/29562 A (NOVOZYMES AS [DK]) 26 April 2001 (2001-04-26) ----- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/067931

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9716732 A | 09-05-1997 | AT 239918 T | 15-05-2003 |
| | | AU 724932 B2 | 05-10-2000 |
| | | AU 6537996 A | 22-05-1997 |
| | | CA 2236474 A1 | 09-05-1997 |
| | | DE 69628033 D1 | 12-06-2003 |
| | | DE 69628033 T2 | 22-04-2004 |
| | | DK 866968 T3 | 01-09-2003 |
| | | EP 0866968 A1 | 30-09-1998 |
| | | ES 2198496 T3 | 01-02-2004 |
| | | JP 2000500330 T | 18-01-2000 |
| | | SE 506533 C2 | 12-01-1998 |
| | | SE 9502409 A | 02-05-1997 |
| | | US 6046010 A | 04-04-2000 |
| | | WO 2007032743 A | 22-03-2007 |
| CA 2621966 A1 | 22-03-2007 | | |
| EP 1943523 A2 | 16-07-2008 | | |
| NO 20080944 B | 29-04-2008 | | |
| WO 0129562 A | 26-04-2001 | AU 782044 B2 | 30-06-2005 |
| | | AU 7772900 A | 30-04-2001 |
| | | CA 2384141 A1 | 26-04-2001 |
| | | CN 1379859 A | 13-11-2002 |
| | | EP 1224468 A1 | 24-07-2002 |
| | | JP 2003512626 T | 02-04-2003 |

 フロントページの続き

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

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(72)発明者 マットソン, カリン

スウェーデン国 1 9 2 7 4 ソレントゥナ, ヨルトランド 4 6

(72)発明者 ドメイカ, クリスティーナ

スウェーデン国 7 5 5 9 2 ウプサラ, ラビー・ソルサター 3 3

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA36

4B063 QA05 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR36 QR42
QR50 QR55 QR62 QR66 QR77 QS34 QS36 QS39 QX02

【要約の続き】

ウンレギュレートされる遺伝子を認識する試薬、例えばプローブを包含する、本方法において使用するための試薬キットに関する。

【選択図】 図9

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 改进的分析 | | |
| 公开(公告)号 | JP2011505858A | 公开(公告)日 | 2011-03-03 |
| 申请号 | JP2010538735 | 申请日 | 2008-12-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 生物Weserblick之三技术激活Boragu | | |
| 申请(专利权)人(译) | 生物Weserblick之三技术Akuchiboragu | | |
| [标]发明人 | マツソンカリン ドメイカクリスティーナ | | |
| 发明人 | マツソン,カリン ドメイカ,クリスティーナ | | |
| IPC分类号 | C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N33/5047 C12Q1/6883 C12Q2600/142 C12Q2600/158 G01N33/6863 G01N33/6869 G01N2333/525 G01N2333/54 | | |
| FI分类号 | C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/68 G01N33/53.P | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA25 2G045/DA36 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 | | |
| 代理人(译) | 小林 泰 千叶昭夫 中滨 明子 | | |
| 优先权 | PCT/EP2007/064144 2007-12-18 WO 0802020 2008-09-23 SE | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了一种潜在的致敏物质的体外预测的方法，该情况下的单核细胞和/或巨噬细胞和/或骨髓单核细胞系，在所述物质和干扰素-γ的存在下培养，由此增加和测量细胞因子和/或新蝶呤的产生。过敏反应，G1P2, OASL, IFIT1, TRIM22, IFI44L, MXI, RSAD2, IFIT3, IFITM1, IFIT2, C33.28HERV-H蛋白mRNA的, IFITM3, XK, GPR15, MT1G, MT1B; MT1A, ADFP, IL8, MT1E, MT1F, MT1H, SLC30A1, SERPINB2, CD83, TncRNA选自，用于测量上调或下调的基因或其表达产物进行测定，可以通过进行估计。本发明还包括干扰素-γ，以及细胞因子，优选为IL-8，和每个识别试剂新蝶呤，和/或上调或试剂识别被下调的基因，例如探针，所述用于该方法的试剂盒。9系统技术领域

