

(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2004-532994

(P2004-532994A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/53

F I

GO 1 N 33/53

Y

GO 1 N 33/53

D

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2003-507549 (P2003-507549)	(71) 出願人	502043547 ファルマシア・ダイアグノステイクス・ア ー・ペー
(86) (22) 出願日	平成14年6月24日 (2002.6.24)		
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月12日 (2003.12.12)		
(86) 国際出願番号	PCT/SE2002/001214		スウェーデン国、エス-751 82・ウ ブサラ
(87) 国際公開番号	W02003/001205	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成15年1月3日 (2003.1.3)	(74) 代理人	100113332 弁理士 一入 章夫
(31) 優先権主張番号	0102220-1	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(32) 優先日	平成13年6月25日 (2001.6.25)	(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特定の細胞タイプの量を推定するための方法

(57) 【要約】

本発明は、血液および他の生物学的材料の抽出物における特徴的なタンパク質を測定することによって特定細胞のサブタイプの量（例えば、白血球の特定サブタイプの数）を推定することに関する。白血球の特定サブタイプの数または量を知ることは、感染性疾患を含む炎症性疾患、ガン、アレルギー/喘息などの被験体の臨床診断および監視において重要である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 前記サンプルの一部を抽出すること、および

b) 前記抽出サンプルにおける細胞特異的分子(1つまたは複数)の濃度を免疫学的アッセイによって測定すること

を含む、細胞特異的分子が、特定細胞の計測数を計算するために使用される、患者サンプル中の特定細胞の量をインビトロで推定するための方法。

【請求項 2】

前記抽出が、カチオン性界面活性剤を用いるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記界面活性剤が C T A B (N - セチル - N , N , N - トリメチルアンモニウム臭化物) である、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記患者サンプルが全血である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

細胞特異的分子(1つまたは複数)が細胞内および細胞外のタンパク質(抗原)ならびに細胞表面マーカーなどである、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞特異的分子(1つまたは複数)の前記濃度がそれぞれの細胞のサブタイプの数と関連させられる、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7】

2つの細胞特異的分子が工程 b) で測定され、前記分子の濃度比が決定される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

細胞特異的分子(1つまたは複数)が、M P O (ミエロペルオキシダーゼ)、H N L (ヒト好中球リボカリン) またはラクトフェリンなどの好中球タンパク質である、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

細胞特異的分子(1つまたは複数)が E P X (好酸球タンパク質 x)、E P O (好酸球ペルオキシダーゼ) などの好酸球タンパク質である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 10】

細胞特異的分子(1つまたは複数)が B B 1 などの好塩基球タンパク質である、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

細胞特異的分子が血小板を測定するための - トロンボグロブリンなどの血小板タンパク質である、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

細胞特異的分子(1つまたは複数)が B リンパ球および C D 3 T リンパ球を測定するための C D 2 0 などの細胞表面マーカーである、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 13】

細胞特異的分子が種々のリンパ球集団を測定するための C D 4 および C D 8 などの細胞表面マーカーである、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

細胞特異的分子(1つまたは複数)が単球を測定するための C D 1 4 またはリゾチームである、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、血液および他の生物学的材料の抽出物における特徴的なタンパク質を測定することによって特定細胞のサブタイプの量（例えば、白血球の特定サブタイプの数）を推定することに関する。白血球の特定サブタイプの数または量を知ることは、感染性疾患を含む炎症性疾患、ガン、アレルギー/喘息などの被験体の臨床診断および監視において重要である。

【背景技術】

【0002】

血液および他の体液における様々な白血球の数を推定することは、医療における最も広く使用されているツールの1つである。この情報を得る従来の方法は、光学顕微鏡のもとで細胞を計数し、区別することである。この技術は、流体中の粒子数を計数するという原理、そしてサイズ、前方散乱および側方散乱などの様々な物理的パラメーターの測定、ならびに本発明者による細胞の組織学的染色に基づく細胞カウンターにおける自動化された計数によって補完される。これらの技術は、その細胞表面抗原に基づいて、または細胞の透過性処理の後における細胞内抗原の含有量に基づいて、個々の細胞を同定するために抗体が使用されるフローサイトメーターの原理に拡張されている。

10

【0003】

国際特許出願公開W000/58726には、全血中の白血球数を定量するための方法が記載されている。しかし、この方法では、白血球の異なる特定のサブタイプが数または比率に関して定量されない。

【発明の開示】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

血液および他の体液における好中球および好酸球などの様々な白血球の数を推定するための、容易に使用できる安価かつ確実な試験で、治療状況で適用可能であり、従って、医師をその即座の意思決定において助ける試験が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、例えば、CTAB（N-セチル-N,N,N-トリメチルアンモニウム臭化物）などの界面活性剤を用いた全血の抽出、続く、好中球タンパク質のMPO（ミエロペルオキシダーゼ）またはHNL（ヒト好中球リポカリン）またはラクトフェリンの特異的な免疫アッセイによる測定、あるいはEPX（好酸球タンパク質x）またはEPO（好酸球ペルオキシダーゼ）などの好酸球タンパク質の特異的な測定により、血液中に存在する好中球または好酸球の数が正確に同定されることを見出した。好中球の数を推定することは、感染症、リウマチ様疾患などの炎症性疾患の被験体の診断およびモニタリングにおいて有用であり、のみならず、好中球の減少した産生（すなわち、好中球減少症）が処置の重篤な有害作用として生じ得る医学的処置（特に、細胞増殖抑制処置）との関係においてもまた有用である。好酸球数の推定は、アレルギー疾患、慢性炎症性疾患、寄生虫疾患、ホジキン病などのある種のガンの患者では有用であり、のみならず同様に、好酸球数の上昇が原因不明の多数の疾患で生じ得るので疾患の一般的な指標としても有用である。

30

【0006】

40

最も広い意味において、本発明は、体液における任意の所与の細胞集団の数が、推定されようとする細胞集団について特徴的である分子に対する免疫アッセイが利用可能である限り、推定可能であり得るということを意味する。従って、本発明は、例えば、HIV感染患者、ガン患者、自己免疫疾患患者におけるリンパ球集団を推定することに対して採用することができ、のみならず、いくつかの細胞内タンパク質は主に未熟な細胞によって産生され、いくつかのタンパク質が主により成熟した細胞によって産生されるので、骨髄系細胞の様々な成熟化段階にある集団を推定するためにもまた採用することができる。

【0007】

従って、本発明は、量をインピトロで推定するための方法に関する。この場合、この量は、患者サンプルにおける特定の細胞サブタイプの数または比率のいずれかを示す。この方

50

法は、

a) 前記サンプルの一部を抽出すること、および

b) 前記抽出サンプルにおける細胞特異的分子(1つまたは複数)の濃度を測定することを含む。

【0008】

特定の細胞サブタイプは白血球のサブタイプであり得る。

【0009】

細胞特異的分子は、例えば、細胞外および細胞内のタンパク質または抗原、細胞表面マーカーなどであり得る。

【0010】

サンプルは、好ましくは血液または他の体液である。非常に少量のサンプル、例えば、1 μ l から 10 μ l のサンプルが抽出されるが、より大きい容量も考慮され得る。

【0011】

抽出は、好ましくは、カチオン性界面活性剤が用いられる。抽出時間は非常に短く、例えば、1分である、好ましくは、界面活性剤はCTABである。

【0012】

好ましくは、工程b)における測定は、ELISA、EIA、FEIA、RIAなどの免疫アッセイによって行われる。

【0013】

本発明の方法において、前記細胞特異的分子(1つまたは複数)の前記濃度はそれぞれの細胞タイプ(1つまたは複数)の数と相関させることができる。

【0014】

1つの実施形態において、2つの細胞特異的分子が工程b)で測定され、前記分子の濃度比が決定される。

【0015】

細胞特異的分子(1つまたは複数)は、好中球を測定するための、MPO(ミエロペルオキシダーゼ)、HNL(ヒト好中球リポカリン)またはラクトフェリンなどの好中球タンパク質であり得る。

【0016】

細胞特異的分子はまた、好酸球を測定するための、EPX(好酸球タンパク質x)、EPO(好酸球ペルオキシダーゼ)などの好酸球タンパク質であり得る。

あるいは、細胞特異的分子(1つまたは複数)は、BB1などの好塩基球タンパク質、または血小板を測定するための - トロンボグロブリンなどの血小板タンパク質である。

【0017】

別の代替法において、細胞特異的分子(1つまたは複数)は、Bリンパ球およびCD3 Tリンパ球を測定するためのCD20などの細胞表面マーカー、または種々のリンパ球集団を測定するためのCD4およびCD8などの細胞表面マーカーである。

【0018】

さらなる代替法において、細胞特異的分子(1つまたは複数)は、単球を測定するためのCD14またはリゾチームである。

【0019】

本発明は、添付された図面との組合せで下記においてより詳しく記載される。

【0020】

実験区分

ヒトの好中球タンパク質および好酸球顆粒タンパク質の単離および精製

顆粒を、Petersonら(Eur. J. Haematol.、40(1988)、415~423)により記載される手法の改変を使用して、健康な献血者から得られた顆粒球の軟膜から調製した。簡単に記載すると、赤血球を、デキストランT-500を使用して沈降させ、その後、白血球が濃縮された血漿を集めた。白血球を0.34 Mスクロースで2回洗浄し、5倍容量の0.34 Mスクロースに懸濁した。白血球を、+4 で30分

10

20

30

40

50

間、 N_2 を 750 psi の圧力で使用してキャビテーション処理した (Klempererら、*J. Cell. Biol.*、86 (1980)、21~28; Borregaardら、*J. Cell. Biol.*、97 (1983)、52~61)。キャビテーション処理物を 0.34 M スクロース / 0.17 M NaCl に懸濁し、+4 において 450 x g で 20 分間遠心分離した。

上清を +4 において 10,000 x g で 20 分間遠心分離して、顆粒を沈降させた。ミエロペルオキシダーゼ (MPO) を、Olssonら (*Scand. J. Haematol.*、9 (1972)、483~491) および Coorayら (*Vet. Immunol. Immunopathol.*、38 (1993)、261~272) に従って顆粒抽出物から精製した。最終調製物は、0.80 である吸光度比 (A430nm / A280nm) により完全に均一であった (Agner *Acta. Chem. Scand.*、12 (1958)、89~94)。

ヒト好中球のリポカリン (HNL) を、記載 (Xuら、*Scand. J. Clin. Lab. Invest.*、54 (1994)、365~379) のように精製した。HNL は、SDS-PAGE 電気泳動および銀染色により均一に精製され、この抗原は、他の好中球タンパク質の MPO、ラクトフェリン、カテプシン G、エラスターゼおよびリゾチームに対する抗体と反応しなかった。

【0021】

ラクトフェリンを、記載 (Reiter、*Int. J. Tissue React.*、5 (1983)、87~96) のように精製した。

【0022】

好酸球ペルオキシダーゼ (EPO) を、記載 (Carlssonら、*J. Immunol.*、134 (1985)、1875~1879) のように精製した、最終調製物は、1.15 である吸光度比 (A415nm / A280nm) により均一であった。

【0023】

好酸球タンパク質 (EPX) を、記載 (Petersonら、*Immunol.*、50 (1983)、19~26) のように均一に精製した。最終調製物は、SDS-PAGE 電気泳動で 1 本のバンドとして現れ、好酸球カチオン性タンパク質 (ECP)、エラスターゼ、カテプシン G、MPO および EPO に対する抗体とは反応しなかった。

【0024】

抗体の作製

ポリクローナル抗体

MPO、HNL、EPO および EPX に対する抗体を、フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバントに懸濁された合計で 50 μ g から 100 μ g の精製タンパク質をウサギに多数の部位で皮下注射することによってウサギにおいて惹起させた。抗体の特異性をアガロースでの二重免疫拡散 (Ouchterlony、*Acta Pathol. Microbiol. Scand.*、26 (1949)、507~) によって評価し、好中球および好酸球顆粒の抽出物ならびに下記の精製タンパク質に対して調べた：カテプシン G、エラスターゼ、MPO、リゾチーム、ラクトフェリン、ECP、EPX、EPO。

【0025】

モノクローナル抗体

メス Balb/c マウスを精製タンパク質で皮下に免疫化した。初回免疫刺激を、フロイント完全アジュバントと混合された 50 μ g の純粋なタンパク質を注射することによって行った。3 回の追加刺激を、PBS (リン酸塩緩衝化生理的食塩水) における約 50 μ g の純粋なタンパク質を用いて行った。脾臓細胞を、Sp2/0 ミエローマ細胞と、記載 (Galfreら、*Nature*、266 (1977)、550~552) のように融合した。細胞培養物に由来する上清を、抗原コーティングされたウエルを用いた ELISA 技術を使用して抗体についてスクリーニングした。上清中の抗体はまた、それぞれの顆粒タンパク質に対する特異性についてスクリーニングされ、BIAcore (登録商標) (B

10

20

30

40

50

I A c o r e、U p p s a l a、スウェーデン)でエピトープについてマッピングされた。ハイブリドーマをE L I S A実験およびB I A c o r e実験に従って選抜し、そしてクローン化し、拡大培養して、精製した。選択された抗体はすべてがI g G 1サブタイプであった。

【0026】

免疫アッセイ

HNLを、記載(Xuら、J . I m m u n o l . M e t h o d s、171(1994)、245~252)のように放射免疫アッセイを使用して評価した。アッセイ間およびアッセイ内の変動は10%未満であり、検出限界は4 μ g/l未満であった。

【0027】

E P Xおよびミエロペルオキシダーゼは、市販されている放射免疫アッセイ(Pharmacia Diagnostics AB、Uppsala、スウェーデン)を使用して測定された。アッセイ間およびアッセイ内の変動は10%未満であり、検出限界はそれぞれ3 μ g/l未満および8 μ g/l未満であった。

【0028】

E P Oは、記載(Nielsenら、Allergy、53(1998)、778~785)のようにPharmacia CAPシステム(登録商標)を利用する原型の免疫蛍光測定アッセイを使用して測定された。アッセイ間およびアッセイ内の変動は8%未満であり、検出限界は0.5 μ g/l未満であった。

【0029】

ラクトフェリンは、記載(Olofssonら、Scand J Haematol.、18(1977)、73~80)のように推定された。アッセイ間およびアッセイ内の変動は8%未満であり、検出限界は2 μ g/l未満であった。

【0030】

血液サンプル

患者から採血されたEDTA含有血液サンプルを大学病院(Uppsala、スウェーデン)において無作為に集めた。血液細胞の計数をCoulter STKS(Beckman Coulter, Inc.)細胞カウンターによってそれぞれのサンプルに対して行った。

【0031】

顆粒タンパク質を、CTAB(N-セチル-N,N,N-トリメチルアンモニウム臭化物)を0.05%から0.5%の最終濃度で少量の血液(1 μ lから10 μ l)に添加することによって顆粒球から抽出した。その場合、混合物は少なくとも1分間インキュベーションされ、その後、分析まで-20 で凍結保存された。

【0032】

統計学的評価

回帰分析を、統計学パッケージStatistica(Statsoft、Tulsa、アメリカ)を使用して行った。

【実施例1】

【0033】

血中好中球数の推定

本発明は、少量の血液(1 μ lから10 μ l)をCTAB(0.05%から0.5%の最終濃度)で少なくとも1分間抽出し、続いて、好中球タンパク質MPOを特異的な免疫アッセイによって測定することにより、血液中の好中球数が正確に推定されることを示す。

【0034】

図1に示されるように、抽出物におけるMPO濃度は、Coulter STKS(Beckman Coulter, Inc.)細胞カウンターにより推定されるような、抽出された血液における好中球の数に有意かつ直線的に相関した($r = 0.96$)。回帰直線の式から、原点(origo)からの偏差が最小であったことが明かである。このことは、測定が細胞特異的であることを示している。結果は、好中球の上昇した血中レベルおよ

10

20

30

40

50

び低下した血中レベルの両方を含む入院患者の混合集団 ($n = 275$) から得られた。従って、一部の患者では、急性細菌感染症のために大きく上昇したレベルを有しており、一部の患者では、白血病または細胞増殖抑制薬物処置のために重度に低下したレベルを有していた。これらの極端な場合が計算に含まれたにもかかわらず、好中球数とMPO濃度との関係は測定範囲全体にわたって直線的であった。HNLが測定されたとき、対応する相関は $r = 0.93$ であり、同様に、好中球数に対する直線的な関係が範囲全体に存在した。ラクトフェリンの測定値もまた、範囲全体にわたる直線的な関係と、 $r = 0.82$ の相関係数とを示した。

【実施例2】

【0035】

好中球集団の成熟化度の評価

MPOが好中球の一次顆粒に貯蔵され、これに対して、ラクトフェリンおよびHNLが二次顆粒に貯蔵されることが広く知られている。これは、MPOの産生が、初期の成熟化段階のとき、すなわち、骨髄芽球および前骨髄球によって主に行われ、これに対して、ラクトフェリンおよびHNLは、より後期の成熟化段階のとき、すなわち、骨髄球によって主に産生されるからである。MPOの産生は、急性感染症の際などの循環中の好中球の要求が増大することによって受ける影響がラクトフェリンおよびHNLの産生の場合よりも小さいこともまた知られている。従って、二次顆粒のいずれかの含有量とMPOとの比率により、血液中の好中球の様々な成熟化段階の相対的なサイズの推定値、および好中球の骨髄代謝回転の目安が得られる。

【0036】

抽出された全血におけるMPO濃度とラクトフェリン濃度との比率が患者間で約20倍変動し、骨髄性白血病患者が非常に大きい比率を有することが図2に示されている。

【実施例3】

【0037】

血中好酸球数の推定

本実施例では、少量の血液 ($1 \mu\text{l}$ から $10 \mu\text{l}$) をCTAB (0.05% から 0.5%) で少なくとも1分間抽出し、続いて、好酸球タンパク質EPOを特異的な免疫アッセイによって測定することにより、血液中の好酸球数が正確に推定されることが示される。

【0038】

図3に示されるように、抽出物におけるEPO濃度は、Coulter STKS (Beckman Coulter, Inc.) 細胞カウンターにより推定されるような、抽出された血液における好酸球の数に有意かつ直線的に相関した ($r = 0.95$)。回帰直線の式から、原点 (origo) からの偏差が最小であったことが明かである。このことは、測定が細胞特異的であることを示している。結果は、好酸球の上昇した血中レベルおよび低下した血中レベルの両方を含む入院患者の混合集団 ($n = 275$) から得られた。従って、一部の患者では、アレルギーおよび喘息、慢性的な炎症性疾患、ガンなどのために数が上昇しており、一部の患者では、特に急性感染症のために数が低下していた。これらの極端な場合が計算に含まれたにもかかわらず、好酸球数とEPO濃度との関係は測定範囲全体にわたって直線的であった。EPXが測定されたとき、対応する相関は $r = 0.93$ であり、同様に、好中球数に対する直線的な関係が範囲全体に存在した。

【0039】

上記の実施例1から実施例3では、好中球、好中球の種々の成熟化形態、および好酸球が記載される。しかし、本発明は、これらの細胞タイプに限定されることとして解釈すべきではない。

【0040】

例えば、好塩基球タンパク質のBB1により、好塩基球を測定することができる。

【0041】

CD20などの細胞表面マーカーにより、Bリンパ球およびCD3 T細胞を測定することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

C D 4 および C D 8 の細胞表面マーカーは、種々のリンパ球集団を測定するために使用することができる。

【 0 0 4 3 】

単球を、C D 1 4 またはリゾチームによって測定することができる。

【 0 0 4 4 】

血小板を、 α -トロンボグロブリンによって測定することができる。

【 0 0 4 5 】

比率の決定は、実施例 2 に記載されるように骨髄系細胞について、ならびにリンパ球の様々な部分集団についても特に注目される。

10

【 0 0 4 6 】

【 表 1 】

参考文献

Agner K. Crystalline myeloperoxidase. *Acta Chem Scand* 1958; 12:89-94.

Borregaard N, Heiple JM, Simons ER et al. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell. Biol.* 1983;97:52-61

Carlson MGCh, Peterson CGB, Venge P. Human eosinophil peroxidase: Purification and characterization. *J Immunol* 1985; 134:1875-9.

Cooray R, Petersson CGB, Holmberg O. Isolation and purification of bovine myeloperoxidase from neutrophil granules. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 38:261-72.

20

Galfré G, Howe SC, Milstein C et al. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 1977;266:550-552

Klemperer MS, Mikkelsen RB, Corfman DH et al. Neutrophil plasma membranes. I. High-yield purification of human neutrophil plasma membrane vesicles by nitrogen cavitation and differential centrifugation. *J Cell Biol* 1980 Jul;86(1):21-28.

Nielsen LP, Bjerke T, Christensen MB et al. Eosinophil markers in seasonal allergic rhinitis. Intranasal fluticasone propionate inhibits local and systemic increases during the pollen season. *Allergy* 1998; 53:778-85.

Olofsson T, Olsson I, Venge P et al. Serum myeloperoxidase and lactoferrin in neutropenia. *Scand J Haematol* 1977; 18(1):73-80.

30

Olsson I, Olofsson T, Odeberg H. Myeloperoxidase-mediated iodination in granulocytes. *Scand J Haematol* 1972; 9(5):483-91.

Oucterlony Ö. Antigen antibody reactions in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1949;26:507-.

Peterson CGB, Jörnvall H, Venge P. Purification and characterization of eosinophil cationic protein from normal human eosinophils. *Eur J Haematol* 1988; 40:415-23.

Peterson CGB, Venge P. Purification and characterization of a new cationic protein-eosinophil protein-X (EPX) - from granules of human eosinophils. *Immunol* 1983; 50:19-26.

Reiter B. The biological significance of lactoferrin. *Int J Tissue React* 1983; 5:87-96.

40

Xu SY, Carlson M, Engström et al. Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils. *Scand J Clin Lab Invest* 1994; 54:365-76.

Xu SY, Peterson CGB, Carlson M et al. The development of an assay for human neutrophil lipocalin (HNL) - to be used as a specific marker of neutrophil activity in vivo and vitro. *J Immunol Methods* 1994; 171:245-52.

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 7 】

【 図 1 】 界面活性剤で抽出された全血における血中好中球の数と M P O タンパク質の濃度

50

との相関を示す。

【図2】界面活性剤で抽出された全血におけるMPOとラクトフェリンとの比を示す。

【図3】界面活性剤で抽出された全血における好酸球の数とEPOタンパク質の濃度との相関を示す。

【図1】

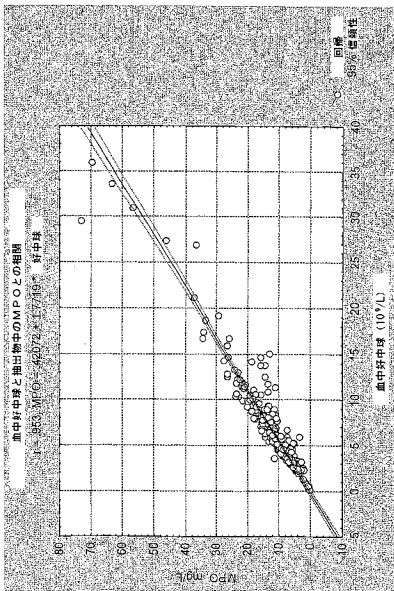


Figure 1

【図2】

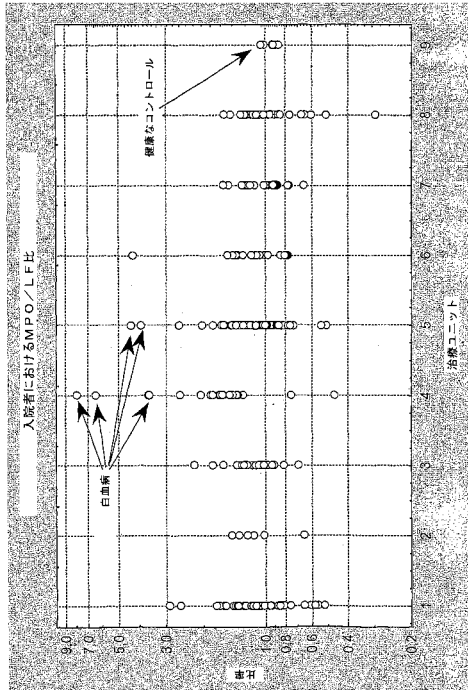


Figure 2

【 図 3 】

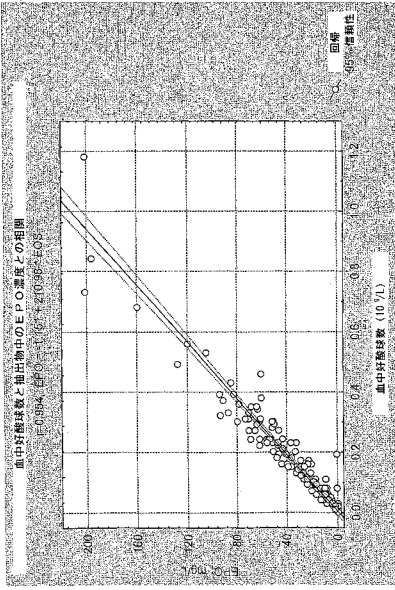


Figure 3

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/001205 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53
- (21) International Application Number: PCT/SE02/01214
- (22) International Filing Date: 24 June 2002 (24.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0102220-1 25 June 2001 (25.06.2001) SE
- (71) Applicant (for all designated States except US): PHARMACIA DIAGNOSTICS AB [SE/SE]; S-751 82 Uppsala (SE).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): VENGE, Per [SE/SE]; Skolgatan 23, S-753 12 Uppsala (SE).
- (74) Agent: LUDWIG BRANN PATENTBYRÅ AB; Box 1344, S-751 43 Uppsala (SE).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EL, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GL, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/001205 A1

(54) Title: METHOD FOR ESTIMATION OF THE AMOUNT OF SPECIFIC CELL TYPES

(57) Abstract: The present invention relates to the estimation of the amount of subtypes of specific cells, for example the number of certain subtypes of leukocytes, by measurements of unique proteins in extracts of blood and other biological material. The knowledge of the number or amount of specific subtypes of white cells is important in the clinical diagnosis and surveillance of subjects with inflammatory disease including infectious disease, cancer, allergy/asthma etc.

METHOD FOR ESTIMATION OF THE AMOUNT OF SPECIFIC CELL TYPES**Field of the invention**

The present invention relates to the estimation of the amount of subtypes of specific cells, for example the number of certain subtypes of leukocytes, by measurements of unique proteins in extracts of blood and other biological material. The knowledge of the number or amount of specific subtypes of white cells is important in the clinical diagnosis and surveillance of subjects with inflammatory disease including infectious disease, cancer, allergy/asthma etc.

Background of the invention

The estimation of the number of various leukocytes in blood and other body fluids is one of the most widely used tools in medicine. The traditional way of obtaining this information is the counting and differentiating of the cells under the light microscope. This technique is complemented by the automated counting in cell counters based on the principle of counting the number of particles in the fluid and the measurement of various physical parameters such as size, forward and side scatter, but also by histochemical staining of cells. An extension of these techniques is the flow cytometer principle in which antibodies are used to identify individual cells based on their cell surface antigens or by means of their content of intracellular antigens after permeabilisation of the cells.

In WO 00/58726 there is described a method for quantitating leukocyte count in whole blood. However, this method does not quantitate different specific subtypes of leukocytes in respect of number or ratio.

Summary of the invention

There exists a need of easy-to-use, inexpensive and reliable tests to estimate the number of various white blood cells such as neutrophils and eosinophils, in blood and other body fluids, applicable in the point-of-care situation, thus supporting the medical doctor in his/hers immediate decision-making.

The present inventor has found that the extraction of whole blood with for example detergents such as CTAB (N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide), and the subsequent measurement by specific immunoassays of the neutrophil proteins, MPO (myeloperoxidase), HNL (human neutrophil lipocalin) or lactoferrin, or the specific measurements of eosinophil proteins such as EPX (eosinophil protein x) or EPO (eosinophil peroxidase), will accurately identify the number of neutrophils or eosinophils present in the blood. The estimation of the numbers of neutrophils is useful in the diagnosis and monitoring of subjects with inflammatory diseases such as infections, rheumatoid diseases, but also in conjunction with medical treatment, in particular cytostatic treatment, where the reduced production of neutrophils i.e. neutropenia, may occur as a serious adverse effect of treatment. The estimation of eosinophil numbers is useful in patients with allergic disease, chronic inflammatory diseases, parasitic disease, certain cancers such as Hodgkin's disease, but also as a general indicator of disease, since elevated numbers of eosinophils may occur in a number of diseases for unknown reasons.

In the broadest sense the invention means that the number of any given cell population in a body fluid may be possible to estimate, given the availability of immunoassays for molecules that are unique for the cell population to be estimated. Thus, the invention could be adopted to the estimation of lymphocyte populations in e.g. patients with HIV-infections, cancer, autoimmune disease, but also for the estimation of populations at various maturation stages of myeloid cells, since some intracellular proteins are produced primarily by immature cells and other proteins primarily by more mature cells.

Thus, the invention relates to a method to in vitro estimate the amount, wherein the amount refers to either the number or ratio of specific cell subtypes in a patient sample, comprising

- a) extracting an aliquot of said sample; and
- b) measuring the concentration of cell specific molecule(s) in said extracted sample.

The specific cell subtypes may be subtypes of leukocytes.

The cell specific molecules may for example be extra- and intracellular proteins or antigens, cell surface markers etc.

The sample is preferably blood or other body fluid. A very small amount of sample is extracted, such as 1-10 μ l of sample but larger volumes might be considered.

The extraction is preferably with cationic detergent. The extraction time is very short, for example 1 minute. Preferably, the detergent is CTAB.

Preferably, the measuring in step b) is by an immunoassay, such as ELISA, EIA, FEIA, RIA.

In the method of the invention, the said concentration of said cell specific molecule(s) may be correlated with the number of the respective cell type(s).

In one embodiment, two cell specific molecules are measured in step b) and a ratio between the concentrations of said molecules is determined.

The cell specific molecule(s) may be a neutrophil protein, such as MPO (myeloperoxidase), HNL (human neutrophil lipocalin) or lactoferrin for measuring neutrophils-

The cell specific molecule may also be an eosinophil protein, such as EPX (eosinophil protein x), EPO (eosinophil peroxidase) for measuring eosinophils.

Alternatively, the cell specific molecule is/are a basophil protein, such as BB1, or a thrombocytic protein, such as β -thromboglobulin, for measuring thrombocytes.

In another alternative the cell specific molecule is/are cell surface markers such as CD20 for measuring B-lymphocytes and CD3 T-lymphocytes or CD4 and CD8 for measuring different lymphocyte populations.

In a further alternative, the cell specific molecule is/are CD14 or lysozyme for measuring monocytes.

Detailed description of the invention

The present invention will be described more closely below in association with the accompanying drawings in which

Fig. 1 shows a correlation between the number of blood neutrophils and the concentration of MPO protein in detergent extracted whole blood.

Fig. 2 shows ratio between MPO and lactoferrin in detergent extracted whole blood.

Fig. 3 shows a correlation between the number of eosinophils and the concentration of EPO protein in detergent extracted whole blood.

EXPERIMENTAL SECTION

ISOLATION AND PURIFICATION OF HUMAN NEUTROPHIL AND EOSINOPHIL GRANULE PROTEINS.

Granules were prepared from the buffy coat of granulocytes obtained from healthy blood donors using a modification of the procedure described by Peterson et al (*Eur. J. Haematol.* 40 (1988) 415-423). In brief, the red blood cells were allowed to sediment using Dextran T-500 before collection of the leukocyte rich plasma. Leucocytes were washed twice in 0,34 M Sucrose and the suspended in 5 volumes of 0,34 M Sucrose. The leukocytes were cavitated using N₂ at a pressure of 750 psi for 30 min at +4 °C (Klempner et al., *J. Cell. Biol.* 86 (1980) 21-28; and Borregaard et al., *J. Cell. Biol.* 97 (1983) 52-61). The cavitate was suspended in 0,34 M Sucrose, 0,17 M NaCl and centrifuged for 20 min at 450xg at +4 °C

The supernatant was centrifuged for 20 min at 10,000 x g at +4 °C to sediment the granules. Myeloperoxidase (MPO) was purified from granule extracts according Olsson et al (*Scand. J. Haematol.* 9 (1972) 483-491) and Cooray et al (*Vet. Immunol. Immunopathol.* 38 (1993) 261-272). The final preparation was completely homogenous according to the absorbance ratio A430 nm/A280 nm which was 0,80 (*Agner Acta. Chem. Scand.* 12 (1958) 89-94).

Human neutrophil lipocalin (HNL) was purified as described (Xu et al., *Scand J Clin Lab Invest* 54 (1994) 365-376. HNL was purified to homogeneity according SDS-PAGE electrophoresis and silver staining and the antigen did not react with antibodies against the other neutrophil proteins, MPO; Lactoferrin, Cathepsin G, Elastase and Lysozyme.

Lactoferrin was purified as described (Reiter *Int. J. Tissue React.* 5 (1983) 87-96).

Eosinophil Peroxidase (EPO) was purified as described (Carlson et al *J. Immunol.* 134 (1985) 1875-1879) and the final preparation was homogenous according to the absorbance ratio A415 nm/A280 nm that was 1,15.

Eosinophil protein (EPX) was purified to homogeneity as described (Peterson et al., *Immunol.* 50 (1983) 19-26. The final preparation appeared as one band on SDS-PAGE electrophoresis

and did not react with antibodies against eosinophil cationic protein (ECP), elastase, cathepsin G, MPO and EPO.

PRODUCTION OF ANTIBODIES

Polyclonal antibodies

Antibodies against MPO, HNL, EPO and EPX was raised in rabbits by multiple site intracutaneous injections into the rabbits of total 50-100 µg of the purified proteins suspended in Freund's complete and incomplete adjuvant. The specificity of the antibodies was evaluated by double immuno diffusion (Ouchterlony Acta Pathol. Microbiol. Scand 26 (1949) 507-) in agarose and tested against extracts of neutrophils and eosinophil granules and the following purified proteins: cathepsin G, elastase, MPO, lysozyme, lactoferrin, ECP, EPX; EPO.

Monoclonal antibodies

Female Balb/c mice were immunized subcutaneously with purified protein. Priming was done by injecting 50 µg of pure protein mixed with Freund's complete adjuvant. Three boosters were done with approximately 50 µg of pure protein in PBS (phosphate buffered saline). Spleen cells were fused as described (Galfré et al., Nature 266 (1977) 550-552) with Sp2/0 myeloma cells. Supernatants from the cell cultures were screened for antibodies using ELISA technique with antigen-coated wells. Antibodies in supernatants were also screened for specificity to respective granule protein and mapped for epitopes in BIAcore® (BIAcore, Uppsala, Sweden). Hybridomas were selected according to the ELISA and BIAcore experiments and cloned, expanded and purified. All selected antibodies were of IgG1 subtype.

Immunoassays

HNL was assessed using a radioimmunoassay as described (Xu et al., J. Immunol. Methods 171 (1994) 245-252). Inter- and intra assay variations were less than 10 % and detection limit was less than 4 µg/l.

EPX and Myeloperoxidase was measured using commercially available radioimmunoassays (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden). Inter- and intra assay variations were less than 10 % and detection limit was less than 3 and 8 µg/l, respectively

EPO was measured using a prototype immunofluorometric assay utilising the Pharmacia CAP system® as described (Nielsen et al., *Allergy* 53 (1998) 778-785. Inter- and intra assay variations were less than 8 % and detection limit was less than 0,5 µg/l.

Lactoferrin was estimated as described (Olofsson et al., *Scand J Haematol* 18 (1977) 73-80). Inter- and intra assay variations were less than 8 % and detection limit was less than 2 µg/l.

Blood samples

EDTA-containing blood samples drawn from patients were randomly collected at the University Hospital, Uppsala, Sweden. Blood cell counts were performed on each sample by means of a Coulter STKS (Beckman Coulter, Inc.) cell counter.

Granule proteins were extracted from granulocytes by means of adding CTAB (N-cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide) at a final concentration of 0.05-0.5% to a small aliquot of blood, 1-10 µl. The mixture was then incubated for at least 1 minute and then stored frozen at -20 °C before analysis.

Statistical evaluation

Regression analysis was performed using the statistical package, Statistica (Statsoft, Tulsa, USA).

Example 1: Estimation of the number of blood neutrophils:

The present invention shows that extraction of a small aliquot of blood, 1-10 µl, with CTAB, final concentration 0.05-0.5%, for at least 1 minute and subsequent measurement of the neutrophil protein MPO by means of a specific immunoassay accurately estimates the numbers of neutrophils in the blood.

As shown in figure 1, the concentration of MPO in the extract was significantly and linearly correlated ($r=0.96$) to the number of neutrophils in the extracted blood as estimated by means of a Coulter STKS (Beckman Coulter, Inc.) cell counter. From the equation of the regression line it is apparent that the deviation from origo was minimal, indicating the cell specificity of the measurement. The results were obtained from a mixed population of hospitalised patients ($n=275$) having both elevated and reduced levels of neutrophils in their blood. Thus, some patients had highly elevated levels due to acute bacterial infections and others had seriously reduced levels due to leukaemia or cytostatic drug treatment. In spite of the inclusion of these

extremes in the calculation, the relationship between number of neutrophils and the concentration of MPO was linear over the entire range measured. When HNL was measured the corresponding correlation was $r=0.93$ and also with a linear relationship to the number of neutrophils over the entire range. Lactoferrin measurement also showed a linear relationship over the entire range and a correlation coefficient of $r=0.82$.

Example 2: Estimation of the degree of maturation of the neutrophil population:

It is well known that MPO is stored in the primary granules of neutrophils, whereas lactoferrin and HNL are stored in secondary granules. This is because the production of MPO primarily takes place during the early maturation steps i.e. by myeloblasts and promyelocytes, whereas lactoferrin and HNL primarily are produced during later maturation steps i.e. by myelocytes. It is also known that production of MPO is less affected by an increased requirement of neutrophils in the circulation, such as in acute infections, than the production of lactoferrin and HNL. The ratio between the content of either of the secondary granule proteins and MPO would therefore provide us with an estimate of the relative size of the various maturation stages of neutrophils in the blood and an indication of the bone marrow turnover of neutrophils.

It is shown in fig 2 that a ratio between MPO concentration and lactoferrin concentration in extracted whole blood varies about 20-fold between patients, with myeloid leukaemia patients having the highest ratios.

Example 3: Estimation of the number of blood eosinophils:

In this example it is shown that extraction of a small aliquot of blood, 1-10 μ l, with CTAB, 0.05-0.5%, for at least 1 minute and the subsequent measurement of the eosinophil protein EPO by means of a specific immunoassay accurately estimates the numbers of eosinophils in the blood.

As shown in figure 3, the concentration of EPO in the extract was significantly and linearly correlated ($r=0.95$) to the number of eosinophils in the extracted blood as estimated by means of a Coulter STKS (Beckman Coulter, Inc.) cell counter. From the equation of the regression line it is apparent that the deviation from origo was minimal, indicating the cell specificity of the measurement. The results were obtained from a mixed population of hospitalised patients

8

(n=275) having both elevated and reduced levels of eosinophils in their blood. Thus, some patients had elevated numbers because of allergy and asthma, chronic inflammatory diseases, cancer etc. and some had reduced numbers because of, among other things, acute infections. In spite of the inclusion of these extremes in the calculation, the relationship between number of eosinophils and the concentration of EPO was linear over the entire range measured. When EPX was measured the corresponding correlation was $r=0.93$ and also with a linear relationship to the number of eosinophils over the entire range.

The above examples 1-3 describe neutrophils, different maturation forms of neutrophils, and eosinophils. However the invention is not to be construed as limited to these cell types.

For example the basophil protein BB1 may measure basophils.

Cell surface markers such as CD20 may measure B-lymphocytes and CD3 T-lymphocytes.

The cell surface markers CD4 and CD8 may be used to measure different lymphocyte populations.

Monocytes may be measured by CD14 or lysozyme.

Thrombocytes may be measured by β -tromboglobulin

Determination of ratios is especially interesting for myeloid cells as described in Example 2, but also for various subpopulations of lymphocytes.

References

- Agner K. Crystalline myeloperoxidase. *Acta Chem Scand* 1958; 12:89-94.
- Borregaard N, Heiple JM, Simons ER et al. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell. Biol.* 1983;97:52-61
- Carlson MGCh, Peterson CGB, Venge P. Human eosinophil peroxidase: Purification and characterization. *J Immunol* 1985; 134:1875-9.
- Cooray R, Petersson CGB, Holmberg O. Isolation and purification of bovine myeloperoxidase from neutrophil granules. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 38:261-72.
- Galfre G, Howe SC, Milstein C et al. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 1977;266:550-552
- Kjempner MS, Mikkelsen RB, Corfman DH et al. Neutrophil plasma membranes. I. High-yield purification of human neutrophil plasma membrane vesicles by nitrogen cavitation and differential centrifugation. et al., *J Cell Biol* 1980 Jul;86(1):21-28.
- Nielsen LP, Bjerke T, Christensen MB et al. Eosinophil markers in seasonal allergic rhinitis. Intranasal fluticasone propionate inhibits local and systemic increases during the pollen season. *Allergy* 1998; 53:778-85.
- Olofsson T, Olsson I, Venge P et al. Serum myeloperoxidase and lactoferrin in neutropenia. *Scand J Haematol* 1977; 18(1):73-80.
- Olsson I, Olofsson T, Odeberg H. Myeloperoxidase-mediated iodination in granulocytes. *Scand J Haematol* 1972; 9(5):483-91.
- Oucterlony Ö. Antigen antibody reactions in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1949;26:507-.
- Peterson CGB, Jörnvall H, Venge P. Purification and characterization of eosinophil cationic protein from normal human eosinophils. *Eur J Haematol* 1988; 40:415-23.
- Peterson CGB, Venge P. Purification and characterization of a new cationic protein-eosinophil protein-X (EPX) - from granules of human eosinophils. *Immunol* 1983; 50:19-26.
- Reiter B. The biological significance of lactoferrin. *Int J Tissue React* 1983; 5:87-96.
- Xu SY, Carlson M, Engström et al. Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils. *Scand J Clin Lab Invest* 1994; 54:365-76.
- Xu SY, Peterson CGB, Carlson M et al. The development of an assay for human neutrophil lipocalin (HNL) - to be used as a specific marker of neutrophil activity in vivo and vitro. *J Immunol Methods* 1994; 171:245-52.

CLAIMS

1. A method to in vitro estimate the amount of specific cells in a patient sample, wherein cell specific molecules are used to calculate the specific cell count number, comprising
 - a) extracting an aliquot of said sample; and
 - b) measuring the concentration of cell specific molecule(s) in said extracted sample by an immunological assay.
2. A method according to claim 1, wherein the extraction is with cationic detergent.
3. A method according to claim 2, wherein the detergent is CTAB (N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide).
4. A method according to any of the above claims, wherein the patient sample is whole blood.
5. A method according to any of the above claims, wherein the cell specific molecule(s) are intra and extra cellular proteins (antigens), cell surface markers etc.
6. A method according to any of the above claims, wherein the said concentration of said cell specific molecule(s) is correlated with the number of the subtype of the respective cells.
7. A method according to any of the claims 1-5, wherein two cell specific molecules are measured in step b) and a ratio between the concentrations of said molecules is determined.
8. A method according to any of the above claims, wherein the cell specific molecule(s) is/are a neutrophil protein, such as MPO (myeloperoxidase), HNL (human neutrophil lipocalin) or lactoferrin.

9. A method according to any of the above claims, wherein the cell specific molecule is/are an eosinophil protein, such as EPX (eosinophil protein x), EPO (eosinophil peroxidase).
10. A method according to any of the above claims, wherein the cell specific molecule is/are a basophil protein, such as BB1.
11. A method according to any of the above claims, wherein the cell specific molecule is a thrombocytic protein, such as β -thromboglobulin, for measuring thrombocytes.
12. A method according to any of the above claims, wherein the cell specific molecule is/are cell surface markers such as CD20 for measuring B-lymphocytes and CD3 T-lymphocytes.
13. A method according to any of the above claims, wherein the cell specific molecule are cell surface markers such as CD4 and CD8 for measuring different lymphocyte populations.
14. A method according to any of the above claims, wherein the cell specific molecule is/are CD14 or lysozyme for measuring monocytes.

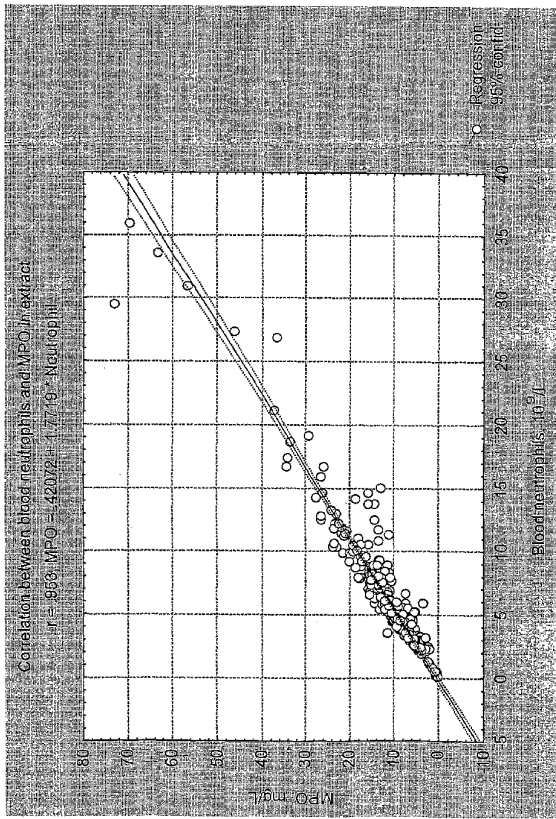


Figure 1

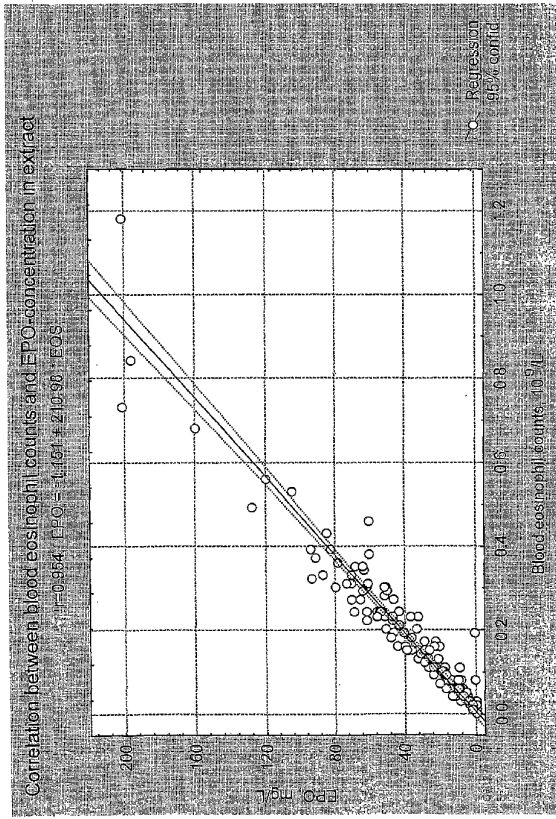


Figure 3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/01214
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: G01N 33/53 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)		
IPC7: G01N, C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI DATA, EPO-INTERNAL, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	National Library of Medicine (NLM), file Medline, Medline accession no. 11978925, Metso Tuula et al: "Cell specific markers for eosinophils and neutrophils in sputum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with respiratory conditions and healthy subjects"; & Thorax, volume 57, no. 5, May 2002, page 449 - 451, abstract --	1-14
X	Inflamm.res., Volume 48, 1999, K. Amin et al, "Eosinophils and neutrophils in biopsies from the middle ear of atopic children with otitis media with effusion", page 626 - page 631, see page 627, col.1, line 45-50; page 630, col.1, line 5 - col.2, line 21; page 631, col.1, line 3-6 --	1-14
<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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
27 Sept 2002	02-10-2002	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Lars Wallentin/ELY Telephone No. +46 8 782 25 00	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 02/01214

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	National Library of Medicine (NLM), file Medline, Medline accession no. 7584682, Karawajczyk M. et al: "The differential release of eosinophil granule proteins. Studies on patients with acute bacterial and viral infections"; & Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, volume 25, no. 8, Aug 1995, page 713 - 719, abstract --	1-14
X	National Library of Medicine (NLM), file Medline, Medline accession no. 2746138, Skubitz K M et al: "Preparation and characterization of monoclonal antibodies to human neutrophil cathepsin G, lactoferrin, eosinophil peroxidase, and eosinophil major basic protein"; & Journal of leukocyte biology, volume 46, no. 2, Aug 1989, page 109 - 118, abstract --	1-14
A	Journal of Immunological Methods, Volume 198, 1996, Thorsten Schneider et al, "Quantitation of eosinophil and neutrophil infiltration into rat lung by specific assays for eosinophil peroxidase and myeloperoxidase", page 1 - page 14, see page 2, column 2, line 9 - line 38 -- -----	1-14

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ベンエ, ペール
スウェーデン国、エス - 7 5 3 1 2 ・ ウプサラ、スコルガタン ・ 2 3

专利名称(译)	估计特定细胞类型的量的方法		
公开(公告)号	JP2004532994A	公开(公告)日	2004-10-28
申请号	JP2003507549	申请日	2002-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	关阿尔玛乳木果诊断TAKES阿为主		
申请(专利权)人(译)	法玛西亚-诊断任务则是基于		
[标]发明人	ベン工ペール		
发明人	ベン工,ペール		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N33/50 G01N33/5094 G01N33/53 G01N33/566 G01N2333/705 G01N2333/7051 G01N2333/70514 G01N2333/70517 G01N2333/7452		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/53.D		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	0102220 2001-06-25 SE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过测量血液和其他生物材料的提取物中的特征蛋白来估计特定细胞的亚型的量(例如,白细胞的特定亚型的数量)。了解白细胞特定亚型的数量或数量对于诸如传染病,癌症,过敏/哮喘等炎症疾病的受试者的临床诊断和监测是重要的。

【 图 2 】

