

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7675446号  
(P7675446)

(45)発行日 令和7年5月13日(2025.5.13)

(24)登録日 令和7年5月1日(2025.5.1)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	41/00 (2020.01)	A 6 1 K	41/00
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08

請求項の数 15 (全14頁)

(21)出願番号	特願2022-538264(P2022-538264)	(73)特許権者	522244458 アプロサイエンス アクチェンゲゼルシ ャフト オーストリア共和国 1 2 0 0 ウィーン 、ドレスナー シュトラーセ 8 7 / アー 2 1
(86)(22)出願日	令和2年12月23日(2020.12.23)	(74)代理人	110000855 弁理士法人浅村特許事務所
(65)公表番号	特表2023-507518(P2023-507518 A)	(72)発明者	アンケルスミット、ヘンリク ヤン オーストリア連邦、ウィーン、シュタン ベルガッセ 5 1 / 2 6
(43)公表日	令和5年2月22日(2023.2.22)	(72)発明者	ミルドナー、ミカエル オーストリア連邦、ノイレンバッハ、ヘ イニンガーガッセ 1 0
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/087757	審査官	西村 亜希子
(87)国際公開番号	WO2021/130305		
(87)国際公開日	令和3年7月1日(2021.7.1)		
審査請求日	令和5年7月20日(2023.7.20)		
(31)優先権主張番号	19219342.3		
(32)優先日	令和1年12月23日(2019.12.23)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アレルギー又はアレルギー反応を処置又は予防するための組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト又は哺乳動物の身体への少なくとも1つの食物及び/若しくは吸入アレルゲンの投与によって、又は少なくとも1つの薬物の全身投与によって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応の処置又は予防における使用のための、末梢血単核細胞(PBMC)細胞培養物の上清を含む組成物であって、前記PBMCが培養前又は培養中に電離放射線に曝される、組成物。

【請求項 2】

前記少なくとも1つのアレルゲンが生物学的又は化学的アレルゲンである、請求項1に記載の使用のための組成物。

【請求項 3】

前記生物学的アレルゲンが、動物アレルゲン、植物アレルゲン、カピアレルゲン、及び細菌アレルゲンからなる群から選択される、請求項2に記載の使用のための組成物。

【請求項 4】

前記PBMC細胞培養物が、単球、T細胞、B細胞及び/又はNK細胞を含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

前記PBMCが、細胞増殖培地、RPMI及びDMEMからなる群から選択される細胞培養培地中で培養される、請求項1~4のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

前記 P B M C が、培養前又は培養中に 1 つ又は複数のさらなるストレス誘導条件に曝される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 7】

前記ストレス誘導条件が、U V 照射、低酸素、オゾン、熱、浸透圧及び p H シフトからなる群から選択される、請求項 6 に記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

前記 P B M C が、少なくとも 1 0 G y、少なくとも 2 0 G y、少なくとも 4 0 G y、又は少なくとも 5 0 G y の線量で電離放射線に曝される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 9】

前記 P B M C が、その上清を単離する前に、少なくとも 4 時間、少なくとも 6 時間、又は少なくとも 1 2 時間培養される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 0】

前記組成物が、アレルギー反応の発症及び / 又は少なくとも 1 つのアレルゲンへの曝露の前、間及び / 又は後に投与される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 1】

前記 P B M C 細胞培養物が、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  個の P B M C / m l、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  個の P B M C / m l、又は  $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  個の P B M C / m l を含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 2】

0 . 1 ~ 5 m l の上清 / k g 体重、0 . 3 ~ 3 m l / k g 体重、0 . 5 ~ 2 m l / k g 体重、又は 0 . 8 ~ 1 . 2 m l / k g 体重がヒト又は哺乳動物の身体に投与される、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 3】

前記組成物が、吸入、局所、経口、舌下、頬側、皮下又は静脈内投与される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 4】

前記哺乳動物が、ウマ、イヌ、ネコ又はラクダである、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 1 5】

ヒト又は哺乳動物の身体への少なくとも 1 つの食物及び / 若しくは吸入アレルゲンの投与によって、又は少なくとも 1 つの薬物の全身投与によって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応の処置又は予防に使用される請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に定義される組成物の適合性を決定する方法であって、

a ) アレルゲンと接触させた哺乳動物の皮膚領域と、前記アレルゲン及び前記組成物と接触させた哺乳動物の皮膚領域とを比較する工程と、

b ) 前記領域間の差を特定する工程と、

c ) 前記組成物が前記アレルギー又はアレルギー反応の処置又は予防するのに適しているかどうかを判定する工程

とを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ヒト又は哺乳動物の身体へのアレルゲンの取込みによって引き起こされる障害を処置及び予防するための組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

アレルギーの感作期の間、プロフェッショナル抗原提示細胞は、抗原（アレルゲンと呼

10

20

30

40

50

ばれるアレルギーに関して)を貪食し、プロセッシングされた抗原をT<sub>H</sub>2リンパ球に交差提示する。これらの細胞は、インターロイキン4の放出によりアレルギー遭遇にตอบสนองし、Bリンパ球と相互作用する。活性化B細胞は、IL-4と共に、アレルギーに対するE型免疫グロブリン(IgE)を産生する。分泌されたIgEは、例えば肥満細胞上に存在するIgE特異的受容体によって結合される。これにより、これらの免疫細胞はアレルギーに感作される。再曝露は、IgE被覆免疫細胞へのアレルギーの結合をもたらす。これは、受容体架橋後、感作細胞の活性化を引き起こす。活性化肥満細胞は、細胞内顆粒からのヒスタミン、サイトカイン及び炎症促進性脂質種などの免疫メディエータの大量放出によってตอบสนองする。放出されたメディエータは、掻痒及び発赤をもたらす血管拡張、粘液分泌及び神経刺激を含む多面的効果を有する。これらの症状は、局所的又は全身的である可能性がある。

10

#### 【0003】

肥満細胞は、主に、皮膚、気道、及び胃腸管などの病原性刺激に繰り返し直面する組織に存在する。一般に、肥満細胞は、抗原/IgE複合体によって架橋されたFc受容体、補体系のタンパク質、又はToll様受容体アゴニストなどの免疫学的シグナルによって活性化される。肥満細胞は、免疫メディエータの大量放出による活性化にตอบสนองする。肥満細胞は、IgE依存性アレルギー反応における役割が最もよく知られており、脱顆粒などの肥満細胞機能を標的とすることは、アレルギー反応に関連するほとんどの有痛性症状の緩和に役立つ可能性がある。

#### 【0004】

本発明の目的は、ヒト又は哺乳動物の身体に投与されたアレルギーによって引き起こされるアレルギー反応を予防又は処置する方法及び手段を提供することである。

20

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0005】

本発明は、ヒト又は哺乳動物の身体への少なくとも1つの食物及び/若しくは吸入アレルギーの投与によって、又は少なくとも1つの薬物の全身投与によって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応の処置又は予防における使用のための、末梢血単核細胞(PBMC)細胞培養物の上清を含む組成物であって、前記PBMCが培養前又は培養中に電離放射線に曝される、組成物に関する。

30

#### 【0006】

驚くべきことに、PBMC培養物の上清を使用して、ヒト又は哺乳動物に投与される食物又は吸入アレルギーによって引き起こされるアレルギー及びアレルギー反応を処置又は予防することができることが判明した。さらに、本発明の組成物は、少なくとも1つのアレルギーの全身投与によって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応を処置又は予防するために使用することもできる。

#### 【0007】

長い間、幹細胞に基づく治療法は、様々な損傷した組織及び器官の再生のための有望なツールと考えられてきた。それ以来、細胞自体ではなく分泌因子が観察された再生効果を発揮したことを報告することによって、多くの研究がこの概念に挑戦してきた。末梢血単核細胞(PBMC)は、幹細胞とは対照的に、多様な特徴を有する細胞セクレトームの魅力的で容易に入手可能な供給源である。免疫調節効果は、好ましくは照射されたPBMCのセクレトーム(Aposec)に起因すると考えられているが、PBMC培養物の上清が、特に誘発アレルギーの場合に、アレルギー反応及びアレルギーに関して有益な効果を示すことは驚くべきことである。

40

#### 【0008】

本発明のさらなる態様は、本明細書で定義される組成物を投与する工程を含む、ヒト又は哺乳動物の身体への少なくとも1つのアレルギーの取込みによって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応を処置又は予防する方法に関する。

#### 【0009】

50

本発明の別の態様は、ヒト又は哺乳動物の身体への少なくとも1つの食物及び/若しくは吸入アレルゲンの投与によって、又は少なくとも1つの薬物の全身投与によって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応の処置又は予防に使用される本明細書で定義される組成物の適合性を決定する方法であって、

a) 哺乳動物の少なくとも2つの皮膚領域をアレルゲンと接触させる工程と、

b) 請求項1～17のいずれか一項に定義される組成物を前記皮膚領域の少なくとも1つに投与する工程であって、前記皮膚領域の少なくとも1つが前記組成物で処置されていない、工程と、

c) 前記アレルゲンと接触させた前記皮膚領域と、前記アレルゲン及び前記組成物と接触させた前記皮膚領域とを比較する工程と、

d) 前記領域間の差を特定する工程と、

e) 前記組成物が前記障害又は疾患を処置又は予防するのに適しているかどうかを判定する工程

とを含む、方法に関する。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0010】

【図1】MNCaposecが初代ヒト肥満細胞による化合物48/80及びIgE/抗IgE誘導性メディエータ放出を防止することを示す図である。初代ヒト肥満細胞の(A)化合物48/80及び(B)IgE/抗IgE刺激時に放出されたヘキサミンダーゼ(hexaminidase)によって評価した肥満細胞脱顆粒。アスタリスクは、培地対照(CellGro)と比較したAposecの $p < .05$ を示す。肥満細胞培地とは、肥満細胞を培養するためにルーチンに使用される培地(DMEM単独)を指す。

##### 【0011】

【図2】PBMCセクレトームAposecがDNFB誘導性過敏症における耳腫脹を緩和することを示す図である。DNFB再チャレンジの24時間後にマイクロメータ支援測定によって評価した耳の厚さ。Aposec対培地対照の $p < 0.05$ 。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0012】

本発明は、ヒト又は哺乳動物の身体への少なくとも1つの食物及び/若しくは吸入アレルゲンの投与によって、又は少なくとも1つの薬物の全身投与によって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応の処置又は予防における使用のための、PBMC細胞培養物の上清を含む組成物に関する。

##### 【0013】

細胞、特に哺乳動物細胞は、細胞培養培地への培養中に多数の物質を分泌することが知られている。そのようにして得られた馴化培養培地は、様々な疾患及び障害の処置及び/又は予防に使用することができる。例えば、国際公開第2010/070105号パンフレット及び国際公開第2010/079086号パンフレットは、PBMCの培養によって得られ、様々な炎症状態の処置に使用することができる馴化培養培地(「上清」)を開示している。したがって、本明細書で使用される「末梢血単核細胞(PBMC)細胞培養物の上清」とは、培養培地中でインビトロでPBMCを培養することによって得られる任意の上清を指す。培養工程の後、実質的に無細胞、好ましくは完全に無細胞の上清を得るために、培養PBMCを培養培地から除去する。PBMC培養物の上清は、PBMC及び/又は溶解されたPBMCによって産生及び分泌される物質を培養培地の成分の隣に含む。「上清」は、PBMCを培養することによって得られる馴化培養培地と互換的に使用することができる。

##### 【0014】

本発明の上清は、培養前又は培養中に電離放射線に曝されたPBMCを培養することにより得ることができる。電離放射線は、好ましくはガンマ線である。

##### 【0015】

本明細書で使用される場合、「ヒト又は哺乳動物の身体への少なくとも1つの食物及び

10

20

30

40

50

ノ若しくは吸入アレルゲンの投与によって、又は少なくとも1つの薬物の全身投与によって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応」は、ヒト又は哺乳動物の身体への食物及びノ又は吸入アレルゲンの投与によって引き起こされる任意の有害反応を指す。食物アレルゲンは、通常、ヒト又は哺乳動物の身体に経口投与される。吸入アレルゲンは、典型的には、鼻又は口から肺及び気道への吸入によって投与される。ヒト及び哺乳動物の身体を処置するために使用されるいくつかの薬物は、そのような身体に全身投与されるとアレルギー反応を引き起こし得る。そのような薬物は、ヒト又は哺乳動物の身体に経口、吸入、非経口、又は任意の他の投与経路で投与することができ、そのような身体内での薬物の全身分布をもたらす。薬物の非経口投与は、筋肉内、腹腔内、静脈内及び他の投与経路を含んでもよい。皮膚上への薬物アレルゲン又は任意の他のアレルゲンの局所投与は、全身への広がりをもたらさず、したがってヒト又は哺乳動物の身体への全身投与をもたらさない。

10

**【0016】**

ヒト又は哺乳動物の身体に投与された場合にアレルギー又はアレルギー反応を引き起こすアレルゲンには、食物アレルゲン、薬物アレルゲン、吸入アレルゲン（例えば、花粉、化学物質）、及びヒト又は哺乳動物の身体に投与ノ導入されるあらゆる種類のアレルゲンが含まれる。したがって、ヒト又は哺乳動物の身体へのアレルゲンの投与によって引き起こされる典型的なアレルギー反応には、とりわけ、アレルゲンが例えば血流に導入された場合、鼻水、呼吸困難、悪心、下痢、鼻出血、耳の問題、喘鳴、咳、又はさらにはアナフィラキシーが含まれる。

20

**【0017】**

本明細書で使用される「アレルゲン」は、典型的には肥満細胞からのヒスタミンの過剰放出をもたらす免疫グロブリンE（IgE）応答を介してヒト及びノ又は哺乳動物の身体における過敏反応を刺激することができる抗原を指す。「アレルゲン」という用語は、アレルゲンが生物由来であり、タンパク質又はポリペプチドである場合、そのような天然に存在するアレルゲンの断片がヒト又は哺乳動物の身体内でのヒスタミンの放出に関して天然に存在するアレルゲンと同様の効果を示す場合、そのような天然に存在するアレルゲンの断片も含む。

**【0018】**

本明細書で使用される「予防する」及び「予防」という用語は、本発明による上清の投与に起因するヒト及び哺乳動物の身体におけるアレルギー又はその症状の再発、発症及び発生の予防又は阻害を指す。いくつかの実施形態において、「予防する」及び「予防」は、特定のアレルゲンに対するアレルギーが発生するリスクの低減を指す。「予防」という用語は、アレルギーの発生を予防するだけでなく、その進行を阻止し、一度確立されたその結果を減少させるための対策も包含する。

30

**【0019】**

本明細書で使用される「処置」及び「処置する」という用語は、アレルギーの進行及び持続時間の減少又は阻害、アレルギーの重症度の減少又は回復、及びその1つ又は複数の症状の回復を指す。「処置」は、アレルギー又はアレルギー反応の症状の改善及びノ又は逆転も包含する。「処置」という用語は、治療的処置及び予防的対策の両方を指す。例えば、本発明の組成物及び方法による処置から利益を得る可能性がある者には、既にアレルギーを有する者及びアレルギーが予防されるべき者が含まれる。

40

**【0020】**

本発明の別の好ましい実施形態によれば、少なくとも1つのアレルゲンは、生物学的又は化学的アレルゲンである。

**【0021】**

生物学的アレルゲンには、植物、動物（例えば、昆虫類、クモ類）又は微生物（例えば、カビ、細菌）のような生物系に由来するアレルゲンが含まれる。そのようなアレルゲンは、ほとんどの場合、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドである。生物学的アレルゲンは当技術分野で周知であり、<http://www.allergen.org/>又は

50

<http://www.allergome.org/>などの様々なデータベースに開示されている。

【0022】

本発明のさらに好ましい実施形態によれば、生物学的アレルゲンは、動物アレルゲン、植物アレルゲン、カビアレルゲン、又は細菌アレルゲンからなる群から選択される。

【0023】

動物アレルゲンは、脊椎動物及び無脊椎動物の両方を含む動物に見られる1つ又は複数の化合物を含むアレルゲンである。混合アレルゲン組成物中に存在する可能性がある脊椎動物アレルゲンには、鳥アレルゲン、例えば卵アレルゲン、例えばnGal d 1オボムコイド、nGal d 2オボアルブミン、nGal d 3コンアルブミン、卵白完全アレルゲンなど、哺乳動物アレルゲン、例えば乳アレルゲン、例えばnBos d 4 - ラクトアルブミン、nBos d 5 - ラクトグロブリン、nBos d 8カゼイン、nBos dラクトフェリン、乳完全アレルゲンなど、魚アレルゲン、例えばrCyp c 1、rGad c 1、タラ完全アレルゲン、白身魚アレルゲン、ピンク魚アレルゲンなどが含まれる。混合アレルゲン組成物中に存在する可能性がある無脊椎動物アレルゲンには、甲殻類アレルゲン、例えばエビアレルゲン、例えばrPen a 1トロポミオシン、エビ完全アレルゲンなど、昆虫アレルゲン、例えば、ハチ刺傷毒液アレルゲン、スズメバチ刺傷毒液アレルゲン、蚊咬傷アレルゲンなど、などが含まれる。吸入動物アレルゲンには、ネコ又はイヌの毛及びふけ、ゴキブリのキノコ体傘部及びチリダニの排泄物が含まれる可能性がある。

【0024】

植物アレルゲンは、植物に見られる1つ又は複数の化合物を含むアレルゲンである。目的の植物アレルゲンには、小麦アレルゲン、例えば、rTri a 19 - 5グリアジン、小麦完全アレルゲン、グリアジン小麦、rTri a 14 LTPなど、キウイアレルゲン、例えば、rAct d 8 PR - 10、キウイ完全アレルゲンなど、セロリアレルゲン、例えば、rApi g 1.01 PR - 10、rPhl p 12、セロリ完全アレルゲン、プロメライン由来CCD MUXF3など、大豆アレルゲン、例えばrGly m 4 10 PR - 10、大豆完全アレルゲン、nGly m 5 - コングリシニン、nGly m 6グリシニンなど、核果アレルゲン、例えば、f419、f420、f421、f95、f242、o214 rPru p 1 PR - 10、rPru p 3 LTP、核果一次完全アレルゲン、プロメライン由来CCD MUXF3など、カラスムギアレルゲン、例えば、カラスムギ成分アレルゲン、カラスムギ完全アレルゲンなど、ゴマアレルゲン、例えばゴマ種子成分アレルゲン、ゴマ種子完全アレルゲンなどが含まれる。植物アレルゲンには花粉アレルゲンのような吸入アレルゲンも含まれる。そのようなアレルゲンには、カバノキ花粉アレルゲン(例えば、Bet v 1)、イネ科花粉アレルゲン(例えば、Phl p 1)、ライグラス及びチモシーグラスアレルゲンが含まれる可能性がある。

【0025】

アレルゲンには、天然源から単離されたアレルゲン、又は組換えで若しくは化学的に産生されたアレルゲンが含まれる。

【0026】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、PBMC細胞培養物は、単球、T細胞、B細胞及び/又はNK細胞を含む。

【0027】

本発明のさらに好ましい実施形態によれば、PBMC細胞は、細胞増殖培地、好ましくはCellGro培地、より好ましくはCellgro GMP DC培地、RPMI、DMEM、X-vivo及びUltracultureからなる群から選択される細胞培養培地中で培養される。

【0028】

PBMC細胞培養物のPBMCは、培養前又は培養中に電離放射線に曝される。これら

10

20

30

40

50

のストレス誘導条件に加えて、P B M Cはさらなるストレスに曝され得る。したがって、本発明の好ましい実施形態によれば、P B M Cは、培養前又は培養中に1つ又は複数のさらなるストレス誘導条件に曝される。

【0029】

本明細書で使用される「ストレス誘導条件下」という用語は、ストレスを受けた細胞をもたらす培養条件を指す。細胞に対するストレスを引き起こす条件には、とりわけ、熱、化学物質、放射線、低酸素、浸透圧などが含まれる。

【0030】

本発明の細胞に対するさらなるストレスは、炎症性皮膚状態、特に虚血に関連する皮膚状態を処置するのに有益な物質の発現及び分泌のさらなる増加をもたらす。

10

【0031】

本発明の好ましい実施形態によれば、ストレス誘導条件には、低酸素、オゾン、熱（例えば、P B M Cの最適培養温度、すなわち37 °Cより2 °C超、好ましくは5 °C超、より好ましくは10 °C超高い）、放射線（例えば、UV放射線、ガンマ放射線）、化学物質、浸透圧（すなわち、体液中、特に血液中で通常生じる浸透圧条件と比較して少なくとも10 %上昇している浸透圧条件）又はそれらの組合せが含まれる。

【0032】

したがって、本発明のさらに好ましい実施形態によれば、ストレス誘導条件は、UV照射、低酸素、オゾン、熱、浸透圧及びp Hシフトからなる群から選択される。

【0033】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、P M Cは、少なくとも10 Gy、好ましくは少なくとも20 Gy、より好ましくは少なくとも40 Gy、より好ましくは少なくとも50 Gyの線量で電離放射線、好ましくはガンマ線に曝される。

20

【0034】

本発明の好ましい実施形態によれば、P B M Cは、その上清を単離する前に、少なくとも4時間、好ましくは少なくとも6時間、より好ましくは少なくとも12時間培養される。

【0035】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、本発明の組成物は、アレルギー反応の発症及び/又は少なくとも1つのアレルゲンへの曝露の前、間及び/又は後に投与される。

【0036】

本発明の組成物は、アレルギー反応の異なる段階で、又は反応が起こる前でさえ投与することができる。本発明の特定の好ましい実施形態において、組成物は、ヒト又は哺乳動物の身体がアレルゲンに曝露される前に投与されてもよい。驚くべきことに、本発明の組成物は、抗原提示細胞へのアレルゲン又はその断片の取込みを防止することができることが判明した。したがって、そのような取込みが防止され得る場合、アレルゲン又はその断片は、ヒト又は哺乳動物の免疫系に提示されない。

30

【0037】

本発明の好ましい実施形態によれば、P C B M C細胞培養物は、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 個のP B M C / m l、好ましくは $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個のP B M C / m l、より好ましくは $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個のP B M C / m lを含む。

40

【0038】

P B M Cを培養することによって得られる上清の組成は、細胞培養培地1 m l当たり一定量のP B M Cを培養する場合に有利な特性を示すことが判明した。

【0039】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、0.1 ~ 5 m lの上清 / k g体重、好ましくは0.3 ~ 3 m l / k g体重、より好ましくは0.5 ~ 2 m l / k g体重、より好ましくは0.8 ~ 1.2 m l / k g体重がヒト又は哺乳動物の身体に投与される。

【0040】

本発明の組成物は、アレルギー及びアレルギー反応を処置又は予防するのに十分な量の上清を含む。上記のようにヒト又は哺乳動物の身体に体重1 k gあたりに投与される上清

50

の容量は、上清を直接指す。容量が大きすぎてヒト又は哺乳動物の身体に投与することができない場合、この容量は、例えば凍結乾燥によって減少させることができる。したがって、投与される本発明の組成物の容量は、上清について示される容量より低くてもよい。当業者は、特定の投与経路を使用してどの容量を投与することができるかを知っている。

【0041】

本発明の好ましい実施形態によれば、組成物は、吸入、局所、経口、舌下、頬側、皮下又は静脈内投与される。

【0042】

本発明の組成物は、希釈剤、安定剤、担体などの薬学的に許容される賦形剤を含んでもよい。剤形に応じて、本発明による調製物はそれぞれの成分を含む。これを調製する方法は、当業者に周知である。

【0043】

本発明による組成物の貯蔵寿命を延ばすために、上清又は完全な組成物さえも凍結乾燥させてもよい。そのような調製物を凍結乾燥する方法は、当業者に周知である。

【0044】

その使用前に、凍結乾燥調製物を水又は緩衝剤、安定剤、塩などを含む水溶液と接触させることができる。

【0045】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、哺乳動物は、ウマ、イヌ、ネコ又はラクダである。

【0046】

本発明の組成物は、あらゆる種類の哺乳動物を処置するために使用することができる。しかしながら、前述の哺乳動物が最も好ましい。

【0047】

本発明の別の態様は、上記で定義される組成物を投与する工程を含む、ヒト又は哺乳動物の身体への少なくとも1つのアレルゲンの取込みによって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応を処置又は予防する方法に関する。

【0048】

本発明のさらなる態様は、ヒト又は哺乳動物の身体への少なくとも1つのアレルゲンの取込みによって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応の処置又は予防に使用される上記で定義される組成物の適合性を決定する方法であって、

- a) 哺乳動物の少なくとも2つの皮膚領域をアレルゲンと接触させる工程と、
- b) 上記で定義される組成物を前記皮膚領域の少なくとも1つに投与する工程であって、前記皮膚領域の少なくとも1つが前記組成物で処置されていない、工程と、
- c) 前記アレルゲンと接触させた前記皮膚領域と、前記アレルゲン及び前記組成物と接触させた前記皮膚領域とを比較する工程と、
- d) 前記領域間の差を特定する工程と、
- e) 前記組成物が前記障害又は疾患を処置又は予防するのに適しているかどうかを判定する工程

とを含む、方法に関する。

【0049】

本発明の組成物が、ヒト又は哺乳動物の身体への少なくとも1つの食物及び/若しくは吸入アレルゲンの投与によって、又は少なくとも1つの薬物の全身投与によって引き起こされるアレルギー又はアレルギー反応を処置又は予防するために使用できるかどうかを試験するために、スクラッチアッセイを使用してもよい。本発明の組成物が、未処置の引っ掻き部位又は陰性対照組成物で処置された引っ掻き部位と比較して、引っ掻き部位のアレルギー反応を減少させることができる場合、本発明の組成物は、それを必要とするヒト又は哺乳動物の身体に投与することができる。

【0050】

例

10

20

30

40

50

例1：Aposecによる肥満細胞脱顆粒障害

【0051】

材料及び方法

【0052】

Aposecの製造

【0053】

PBMCのセクレトーム(「Aposec」)を、Wagner T<sub>5</sub>(Sci Rep. 2018; 8(1): 18016)に記載のように作製した。簡潔には、Ficoll - Paque PLUS(GE Healthcare、米国)支援密度勾配遠心分離によってPBMCを得て、 $2.5 \times 10^7$ 細胞/mLの濃度に調整した。その後、細胞を60 Gyのセシウム137照射(IBL 437C、Isotopen Diagnostik CIS GmbH、ドイツ)に曝し、フェノールレッドを含まないCellGenix GMP DC培地(CellGenix GmbH、ドイツ)中で $24 \pm 2$ 時間培養した。細胞及び細胞残屑を遠心分離によって除去し、上清を0.2  $\mu$ mフィルタに通した。ウイルス除去を、Theraflexメチレンブルー技術(MacPharma、フランス)を使用し、以前に記載されたように(Haider T<sub>5</sub>、Exp Neurol. 2015; 267: 230-42)、凍結乾燥粉末(25,000 Gy、Gammatro 1500、Mediscan、オーストリア)の照射によって行った。滅菌凍結乾燥物を-80でルーチンに凍結保存した。

10

【0054】

初代ヒト肥満細胞の単離及びインビトロ維持

20

【0055】

肥満細胞単離のために使用される皮膚及び皮下脂肪組織を、腹壁形成術を受けている患者から得た。皮下組織及び真皮網状層を除去し、残りの組織を小片に切断し、4で一晩酵素消化(パエニバシラス・ポリミキサ(Bacillus polymyxa)由来の2.4 U/mLディスパーゼII(Roche、スイス))に供した。表皮を除去した後、皮膚組織をコラゲナーゼI(Gibco、Thermo Fisher Scientific、米国)中、37で2時間消化した。CD117<sup>+</sup>肥満細胞を、製造業者によって示唆されるように磁気細胞選別技術(MACS System、Miltenyi Biotec、ドイツ)によって濃縮した。単離された細胞の純度を高めるために、最初の単離ランからのCD117<sup>+</sup>細胞を使用して単離手順をもう1回繰り返した。CD117<sup>+</sup>肥満細胞を、10%(vol/vol)非働化ウシ胎仔血清(Gibco)、1%(vol/vol)ペニシリン/ストレプトマイシン(Biochrom、ドイツ)及び100 ng/mLの組換えヒト幹細胞因子(PeproTech、米国)を補充したDMEM(Gibco)中で培養した。

30

【0056】

初代ヒト肥満細胞の化合物48/80誘導性脱顆粒

【0057】

初代ヒト肥満細胞を、上記のように血清及びSCFを補充した着色pH指示薬を含まない50  $\mu$ LのDMEMにおいて、平底96ウェルプレートにウェルあたり5万~10万の密度で播種した。細胞を50  $\mu$ LのAposec又は50  $\mu$ Lの培地対照(CellGenix)で一晩前処理した。翌日、細胞を100  $\mu$ LのHEPES(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸、Thermo Fisher Scientific)で慎重に洗浄し、50  $\mu$ g/mLの化合物48/80(Sigma Aldrich、米国)を含有する100  $\mu$ LのHEPESの添加によって脱顆粒を誘導した。非刺激対照については、HEPESを添加した。細胞を通常の周囲CO<sub>2</sub>と共に37で1時間インキュベートした。50  $\mu$ Lの上清を分離し、保存し、細胞を100  $\mu$ Lの0.1%トリトンX-100(Sigma Aldrich)に溶解した。

40

【0058】

初代ヒト肥満細胞のIgE/抗IgE誘導性脱顆粒

50

## 【0059】

初代ヒト肥満細胞を、上記のように血清及びSCFを補充した着色pH指示薬を含まない50 $\mu$ LのDMEMにおいて、平底96ウェルプレートにウェルあたり5万~10万の密度で播種した。細胞を50 $\mu$ LのAposec、50 $\mu$ Lの培地対照(CELL GENIX)又は50 $\mu$ LのDMEM(肥満細胞培地)で前処理し、さらに100ng/mLのヒトIgE(骨髓腫、Merck KGaA、ドイツ)で一晩刺激した。翌日、細胞を100 $\mu$ LのHEPES(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸、Thermo Fisher Scientific)で慎重に洗浄し、5 $\mu$ g/mLの抗IgE抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.、米国)を含有する100 $\mu$ LのHEPESの添加によって脱顆粒を誘導した。非刺激対照については、HEPESを添加した。細胞を通常の周囲CO<sub>2</sub>と共に37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。50 $\mu$ Lの上清を分離し、保存し、細胞を100 $\mu$ Lの0.1%トリトンX-100(Sigma Aldrich)に溶解した。

10

## 【0060】

-ヘキサミンダーゼアッセイのための試薬

## 【0061】

-ヘキサミンダーゼアッセイのための基質溶液は、8.9gのリン酸水素二ナトリウム二水和物(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)及び650mgのp-ニトロ-N-アセチル-D-グルコサミドを400mLの再蒸留水に溶解し、0.4Mクエン酸(全ての試薬がSigma Aldrich)でpHを4.5に調整することによって調製した。停止液は、3M水酸化ナトリウムを使用してpHを10.7に調整した水900mL中グリシン15.02gからなる。

20

## 【0062】

-ヘキサミンダーゼアッセイ

## 【0063】

50 $\mu$ Lの基質溶液を50 $\mu$ Lの上清及び50 $\mu$ Lのトリトン溶解細胞にそれぞれ添加し、サンプルを周囲CO<sub>2</sub>と共に37 $^{\circ}$ Cで90分間インキュベートした。75 $\mu$ Lの停止緩衝液を添加し、FLUOSTAR OPTIMAソフトウェア(バージョン1.20-0、BMG LABTECH)を使用してプレート読取りルミノメータLUMISTAR OPTIMA Reader(BMG LABTECH、オルテンベルク、ドイツ)によって405nmでの光学密度を決定した。

30

## 【0064】

データ及び統計解析

## 【0065】

放出されたヘキサミンダーゼの割合は、以下の式を使用して計算される。

## 【数1】

$$\% = \frac{2 \times \text{上清中の酵素}}{\frac{1}{2} \times \text{上清中の酵素} + 4 \times \text{細胞ライセート中の酵素}} \times 100$$

40

## 【0066】

データは、技術的反復の算術平均及び平均の標準誤差として提示されている。統計解析を、Aposec対培地対照の2つの群を比較する片側t検定によって行い、p<.05を統計的に有意とみなした。

## 【0067】

結果

## 【0068】

Aposecは強制肥満細胞脱顆粒を抑止する

## 【0069】

Aposecが肥満細胞脱顆粒を防止することができるかどうかを決定するために、肥

50

満細胞を A p o s e c 又は培地対照で前処理し、化合物 4 8 / 8 0 及び I g E / 抗 I g E で刺激した後の初代ヒト肥満細胞の -ヘキサミンダーゼ放出を評価した。A p o s e c は、培地対照と比較して、化合物 4 8 / 8 0 誘導性メディエータ放出及び I g E / 抗 I g E 誘導性メディエータ放出の両方を顕著に防止した（化合物 4 8 / 8 0 及び I g E / 抗 I g E 刺激後、それぞれ  $27.9 \pm 3.6\%$  及び  $27.3 \pm 1.1\%$  が A p o s e c で -ヘキサミンダーゼ（hexaminidase）を放出したのに対して、 $35.7 \pm 3.4\%$  及び  $36.7 \pm 3.1\%$  が対照培地でメディエータを放出した。両方とも A p o s e c 対対照の  $p < .05$ ）（図 1）。比較すると、対照培地は、肥満細胞培地と比較して肥満細胞脱顆粒に効果を示さなかった [化合物 4 8 / 8 0 及び I g E / 抗 I g E 刺激後にそれぞれ  $36.7 \pm 2.3$  及び  $36.9 \pm 1.9$  が肥満細胞培地でメディエータを放出した。（A）及び（B）における肥満細胞培地対培地対照の  $p > .05$  ]。

10

【0070】

結論

【0071】

本データは、化合物 4 8 / 8 0 及び I g E / 抗 I g E で刺激した場合、A p o s e c が初代ヒト肥満細胞によるメディエータ放出を効果的に防止することを実証している。酵素放出は化学刺激後に 20% 超減少したが、I g E / 抗 I g E 処置後の -ヘキサミンダーゼ放出は、培地対照と比較して A p o s e c で 25% 超減少した。まとめると、これらのデータは、肥満細胞脱顆粒媒介アレルギー反応を処置するための A p o s e c の使用を示唆している。

20

【0072】

例 2：インビボでの A p o s e c の適用によるアレルギー過敏症の症状の軽減

【0073】

背景

【0074】

過去数十年にわたって、アレルギー過敏症の病態に関する広範な研究が、免疫学的応答のより良い理解に寄与してきた。しかし、複雑で多面的な疾患病因が、有効な新規治療的介入の開発にとって大きな障害となっており、臨床的治療選択肢は今日まで限定されたままである。A p o s e c の強力な抗炎症効果が以前に記載されているので、A p o s e c がアレルギー過敏症関連症状を軽減する可能性を調べた。

30

【0075】

材料及び方法

【0076】

マウスモデル

【0077】

1 - フルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン（DNFB、Sigma - Aldrich）は、C 5 7 B L / 6 マウスにおいて炎症状態を誘導するアレルゲンとして機能した。オリーブ油中 0 . 2 5 %（v o l / v o l）DNFB 2 0  $\mu$  L を 0 日目及び 1 日目に投与した。耳を A p o s e c で毎日処置し、反対側の耳には 0 日目から 6 日間連続してビヒクル培地を投与した。

40

【0078】

マイクロメータによる測定

【0079】

DNFB 再チャレンジの 2 4 時間後、耳の厚さを、電子デジタルマイクロメータ（0 ~ 2 5 mm、Marathon Management Inc.、米国）を使用して評価し、耳の外側 2 / 3 の厚さを測定した。測定は四重反復で行った。

【0080】

統計解析

【0081】

GraphPad Prism 6 ソフトウェア（GraphPad Software

50

I n c . ) を使用してデータを統計的に評価した。片側の対応のある t 検定を実施して、A p o s e c と対照培地とを比較した。0 . 0 5 未満の p 値を統計学的に有意とみなした。データは、生物学的反復の算術平均及び平均の標準誤差として提示されている。

【 0 0 8 2 】

結果

【 0 0 8 3 】

A p o s e c はアレルギー誘発性組織腫脹を軽減する

【 0 0 8 4 】

マウス D N F B 誘導性過敏症を、インビボでのアレルギー反応における A p o s e c の抗炎症効果を研究するためのモデルとして使用した。免疫応答の重症度を反映する耳腫脹の程度は、D N F B 再曝露の 2 4 時間後に、培地対照と比較して A p o s e c によって著しく減少したことが見出された（ビヒクル処置耳の厚さ  $553.9 \pm 12.7 \mu\text{m}$  対 A p o s e c での  $472.4 \pm 47.3 \mu\text{m}$ 、A p o s e c 対培地対照の  $p < .05$ 。ナイーブな耳：厚さ  $355 \pm 12.7 \mu\text{m}$ ）（図 2）。

10

【 0 0 8 5 】

結論

【 0 0 8 6 】

これらのデータは、A p o s e c の適用がアレルギー再曝露後の組織腫脹を効果的に防止したことを示す。これらの所見は、A p o s e c がアレルギー反応に関連する症状を処置するための有望な候補であることを示している。

20

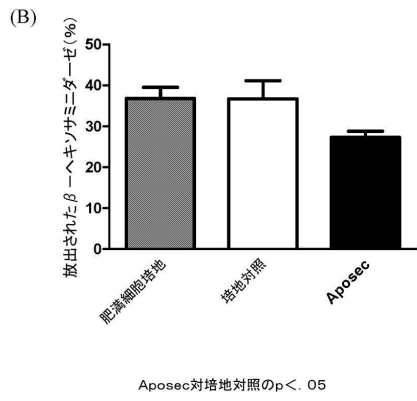
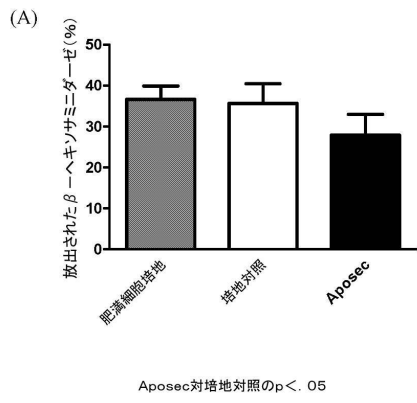
30

40

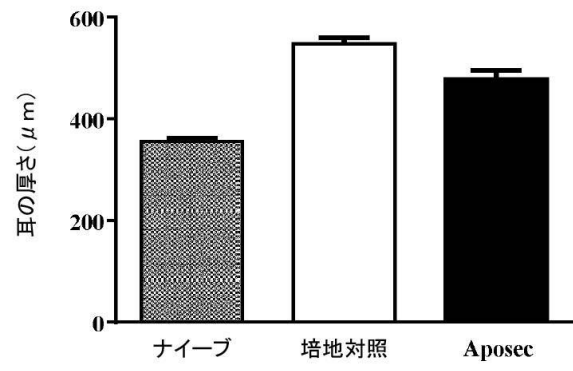
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 Eys Sci. , 2015年 , Vol.30, No.4 , pp.140-142  
European Heart Journal , 2015年 , Vol.36 , pp.676-685  
Cell Research & Therapy , 2017年 , Vol.8 , Article8  
Cell Death and Disease , 2019年09月 , Vol.10 , Article729  
Sci. Rep. , 2015年 , Vol.5 , Article16662
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)  
A 6 1 K  
A 6 1 P  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )