



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 28 033 T3** 2009.11.19

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 866 968 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 28 033.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE96/00902**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 925 215.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/016732**

(86) PCT-Anmeldetag: **03.07.1996**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **09.05.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.09.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **07.05.2003**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **06.05.2009**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.11.2009**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/68** (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

9502409 01.11.1995 SE

(73) Patentinhaber:

Biovator Technologies AB, Kallered, SE

(74) Vertreter:

**WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

Andersson, Birger, Stockholm, SE

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR IN VITRO-ANALYSE VON TOXISCHEN UND ALLERGENEN SUBSTANZEN**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro-Analyse von toxischen und allergenen Substanzen. Substanzen, die zur Verwendung als Pharmaka, Nahrungsmittelzusätze, Kosmetik- oder Hygieneprodukte und Industriechemikalien vorgesehen sind und andere Substanzen werden auf ungünstige Reaktionen getestet. Derartige Reaktionen können allergische Reaktionen, hautreizende Wirkungen und toxische Wirkungen sein.

[0002] Heute werden solche Tests in vivo an Tieren durchgeführt. Tiere sind in Züchtung und Haltung teuer. Außerdem können es einige Tests mit sich bringen, daß die Tiere leiden.

[0003] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur in vitro-Analyse der ungünstigen Wirkungen von Substanzen bereit. Die Analyse der Substanzen wird an Blutzellen aus Warmblütern durchgeführt. Es sind keine Tiere involviert, da die Substanzen an Humanzellen getestet werden, d. h. an Zellen derselben Spezies, für die sie vorgesehen sind. Einige Substanzen haben bei verschiedenen Spezies nicht immer die gleiche Wirkung, und Tests, die an Tieren durchgeführt werden, können falsche Ergebnisse liefern. Daher wird der Test vorzugsweise mit humanem Blut durchgeführt.

[0004] Das Verfahren bietet sich also für Nahrungsmittelzusätze, Kosmetik- oder Hygieneprodukte, Industriechemikalien, Medikamente und andere Substanzen, bei denen ungünstige Reaktionen vermieden werden sollen, als Alternative zu Tierversuchen an.

[0005] Eine in vitro-Beurteilung von toxischen Effekten auf das Immunsystem wurde an Splenozyten von Mäusen getestet ("In vitro evaluation of drug-induced toxic effects on the immune system as assessed by proliferative assays and cytokine production", M. Pallardy et al., Eur. Cytokine Net., Vol. 2, Nr. 3, Mai-Juni 1991, S. 201-206). Die Methode war beim Nachweis von Molekülen, die Autoimmunität und Hypersensibilität induzieren, nur wenig effektiv.

[0006] Die USP 5,439,799 beschreibt ein Verfahren, das bei der Bestimmung eines Cytokins, nämlich Neopterin, in Körperflüssigkeiten eingesetzt wird. Larsen et al. in "The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8. Inhibition of a tuberculin skin reaction by an anti-IL-8 monoclonal antibody" (J. Immunol. (United States) Aug. 15, 1995 (4), S. 2151-7, Information fehlt in der Beschreibung in der erteilten Form) beschreiben die Rolle von IL-8 bei der Tuberkulinreaktion in der Haut von Kaninchen. Keine dieser Veröffentlichungen betrifft jedoch den Test von Cytokinen, die sich beim Kontakt mit den zu testenden Substanzen bilden, um zwischen verschiedenen

Typen ungünstiger Immunreaktionen unterscheiden zu können.

[0007] Es hat sich nun herausgestellt, daß es erfindungsgemäß möglich ist, ungünstige Gewebereaktionen auf Fremdstoffe in vitro zu testen, indem man sie mit humanem Vollblut, dessen Gerinnung verhindert wird, kultiviert und das von den Humanzellen produzierte Cytokin analysiert.

[0008] Das vorliegende Verfahren bietet vor Verwendung einer Substanz und vor Exposition der Zielgruppe die Möglichkeit vorherzusagen, ob ein Risiko für ungünstige Reaktionen entzündlicher oder allergischer Art besteht.

[0009] Die Erfindung liefert einen Interpretationsschlüssel zur Beurteilung der ungünstigen Gewebereaktionen auf Fremdstoffe.

[0010] Zusammenfassung der Erfindung: Das Verfahren wird in Anspruch 1 definiert und basiert auf der in vitro-Kultivierung von Blutzellen. Die zu beurteilende Substanz wird zu der Blutkultur gegeben. Wenn die reaktiven Zellen des Bluts das Testmaterial als fremd oder schädlich erkennen, erfolgt eine Produktion entzündlicher Signalstoffe, der Cytokine. Das Blut enthält verschiedene weiße Blutzellen mit verschiedenen Funktionen in Reaktion auf Fremdstoffe. Die verschiedenen Typen entzündlicher Zellen sekretieren verschiedene Repertoires an Cytokinen. Die Muster (Profile) der sekretierten Cytokine zeigen an, welches Kompartiment des Immunsystems aktiviert wurde. Dadurch ist es auch möglich vorherzusagen, welche Art von ungünstiger Reaktion von einer Substanz zu erwarten ist, wenn sie Menschen oder Versuchstieren verabreicht wird. Einige Substanzen induzieren ein typisches Cytokinprofil, das das Immunsystem zu einer IgE-vermittelten Allergie steuert und so ein Potential dieser Substanzen anzeigt, Asthma, Heufieber und Urticaria auszulösen. Andere Substanzen induzieren ein Cytokinmuster, das das Immunsystem zu zellulärer Immunität steuert, und besitzen somit das Potential, als ungünstige Reaktion zu Kontaktekzemen zu führen. Schließlich führt eine chemische oder toxische Wirkung zu einem Cytokinmuster, das für Alarmreaktionen typisch ist, die bei Gewebsschäden und Operationen zu beobachten sind. Das Konzept, auf dem die vorliegende Erfindung basiert, besteht also darin, die Interpretation des Cytokinmusters, das eine Substanz in vitro in Blutzellen induzieren kann, zur Vorhersage zu nutzen, ob die Substanz das Potential besitzt, Allergien verschiedener Arten zu verursachen, oder allgemein ein Risiko beinhaltet, um Gewebsschäden oder toxische Effekte zu induzieren.

[0011] Wir klassifizieren ungünstige Gewebereaktionen auf Fremdstoffe wie folgt.

Klasse 0: Gewebsschaden. Unspezifische chemi-

sche, mechanische oder physikalische Schädigung.
Klasse I: Allergische Immunreaktion vom Typ I. Sie wird auch als Hypersensibilität vom Soforttyp bezeichnet und wird durch IgE-Antikörper vermittelt, die spezifisch gegen den Fremdstoff produziert werden. Es wird eine akute entzündliche Reaktion produziert, oft wird Histamin produziert und Beispiele für Symptome sind Asthma, Heufieber, Urticaria und Rhinitis. Dieser Typ erfordert es, daß die Substanz eine voll reife Immunantwort induziert, an der alle Komponenten des Immunsystems beteiligt sind. Dies wird auch als finale Stufe der Immunantwort angesehen.

Klasse IV: Entzündliche Immunreaktion vom Typ IV. Sie wird auch als Hypersensibilität vom verzögerten Typ bezeichnet und wird durch sensibilisierte T-Lymphozyten vom Typ TH-1 vermittelt, was als eine primäre Stufe der Immunantwort angesehen wird. Allergische Kontaktdermatitis ist ein Beispiel für diesen Reaktionstyp.

[0012] Klasse 0 ist unserer eigene Klassifizierung der unspezifischen Schädigung des Immunsystems. Für Klasse I und Klasse IV siehe "Immunology" von Ivan Roitt, Jonathan Brostoff und David Male, Gower Medical Publishing London – New York, 1989, Seite 19.1–19.20 und 22.1–22.10.

[0013] In der vorliegenden Arbeit wurden drei Haupttypen von Cytokinprofilen identifiziert.

Klasse 0-Typ: Sekretion von Alarmcytokinen, die die Schädigung von Bindegewebe, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen und unspezifischen entzündlichen weißen Blutzellen anzeigen. Mitglieder dieser Gruppe sind IL-1, IL-6, IL-12 und TNF.

Klasse I-Typ: Sekretion von Cytokinen eines Typs von Immunantwort von Lymphozyten und entzündlichen Zellen. Diese beinhalten Cytokine der Klasse 0 und zusätzlich IFN-gamma, Neopterin, IL-2 und IL-10. Wie aus in vivo-Untersuchungen an Tieren bekannt, sollten hier theoretisch auch IL-4 und IL-5 produziert werden, diese Substanzen sind jedoch bekanntermaßen schwer zu bestimmen und sind daher nicht routinemäßig in unseren Testprotokollen enthalten.

Klasse IV-Typ: Sekretion der Cytokine des unspezifischen Klasse 0-Typs und zusätzlich von IL-2, IL-8, IL-10 und IFN-gamma.

[0014] Eine nicht vorhersagbare Beobachtung war, daß die volle finale Immunantwort vom Klasse I-Typ zur Produktion von Neopterin führt, wohingegen die primäre Immunantwort vom Klasse IV-Typ das Immunsystem, was die Neopterinproduktion angeht, nicht stimuliert.

[0015] Für die oben aufgeführten drei Cytokingruppen sind nur bevorzugt ausgewählte Repräsentanten angegeben. Die Gruppen können andere Cytokine enthalten, die verwendet werden können, und das Patent beansprucht die Verwendung aller Stoffe, die

in "The Cytokine Facts Book", Hrsg. Callard R. E. und Gearing, A. J. H., Academic Press 1994, und zukünftigen aktualisierten Auflagen aufgeführt sind, zur Analyse und Vorhersage des Reifegrades der Reaktion, die auszulösen eine Substanz das Potential besitzt. Zur Zeit 50 Stoffe.

Interleukine

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.

Andere Cytokine (in alphabetischer Reihenfolge)

BDNF, CNTF, EGF, Epo, FGF, G-CSF, GM-CSF, I-309/TCA-3, γ IP-10, IFN α , IFN β , IFN γ , LIF, LT(TNF β), MCP-1, 2 und 3, M-CSF, MIF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, NGF, NT-3, NT-4, OSM, PBP, PBSF, PDGF, PF-4, RANTES, SCF, TGF α , TGF β , TNF α , Tpo, VEGF.

[0016] Erfindungsgemäß wird das Vorliegen einer entzündlichen Immunreaktion vom Typ IV vorzugsweise unter Verwendung von IL-8 getestet. Es hat sich herausgestellt, daß IL-8 bei Typ IV-Reaktionen in erhöhten Mengen gebildet wird und vorliegt.

[0017] Da Neopterin bei einer Typ I-Reaktion in höheren Mengen vorliegt, können insbesondere IL-8 und/oder Neopterin dazu verwendet werden, um zwischen der entzündlichen Immunreaktion vom Typ IV und der allergischen Immunreaktion vom Typ I zu unterscheiden.

[0018] Auf Grundlage des Ergebnisses des in vitro-Tests, des von der untersuchten Substanz induzierten Cytokinmusters, kann eine Vorhersage bezüglich des Potentials der Substanz getroffen werden, ungünstige Reaktionen hervorzurufen, wenn ihr Menschen oder Tiere ausgesetzt werden. Es wird Vollblut, vorzugsweise venöses Blut verwendet. Es wird verhindert, daß das Blut koaguliert. Dies kann durch die Verwendung von endotoxinfreien Heparinröhrchen erfolgen. Auch andere Verfahren können verwendet werden, beispielsweise die Zugabe von EDTA oder Citrat. Alternativ kann das Blut mit Glasgüßchen geschüttelt werden.

[0019] Die Leukozytenzahl in unverdünntem Blut liegt zwischen 3×10^9 und 7×10^9 pro Liter. Etwa 30% hiervon sind Lymphozyten und 5–10% sind Monozyten, der Rest sind polymorphonukleäre Zellen. Die Gesamtzahl der Leukozyten und das Differentialblutbild werden vor der Weiterbehandlung in einem Coulter STKS-Zellanalysator für die Hämatologie bestimmt.

[0020] Vollblut wird in einem Kulturmedium, vorzugsweise einem Gewebekulturmedium wie RPMI 1640, das mit Glutamin supplementiert ist, in Reihe

1:1–1:1000, vorzugsweise 1:2–1:100 verdünnt, Üblicherweise werden 1,5–5 mM, vorzugsweise 2 mM eingesetzt. Meistens wird das Blut 1:5, 1:10, 1:20 oder weiter 1:40, 1:80, 1:100 verdünnt.

[0021] Vorzugsweise werden Antibiotika zugesetzt, um das Wachstum von unerwünschten Mikroorganismen zu verhindern. Penicillin und Streptomycin können in Konzentrationen von 25–100 U/ml, vorzugsweise 50 U/ml zugegeben werden.

[0022] Mitogene oder Substanzen mit bekannter Wirkung auf das Immunsystem können als positive Kontrollen verwendet werden, um bessere Ergebnisse zu erhalten. Alle der bei Daniel P. Stites: *Clinical Laboratory Methods for Detection of Antigens & Antibodies*, in: *Basic and Clinical Immunology*, Lange Medical Publications, Los Altos, California, 1984, erwähnten Mitogene können verwendet werden. Phytohämagglutinin (PHA-L) wird vorzugsweise verwendet und im Medium in den Vertiefungen in einer Endkonzentration von 250 µg pro ml gelöst.

[0023] Der Test kann in jedem beliebigen Gefäß durchgeführt werden, z. B. in Teströhrchen oder vorzugsweise in den Vertiefungen von Mikrotiterplatten.

[0024] Um in vitro eine Cytokinproduktion auszulösen, ist die Zellkonzentration von entscheidender Bedeutung. Wenn der Test nur bei einer einzigen Zellkonzentration durchgeführt wird, dann können nur einige der interessierenden Cytokine optimal nachgewiesen werden. Wenn eine Reihe von Zellkonzentrationen eingesetzt wird, zeigt sich das gesamte Bild des weiter oben unter "Zusammenfassung der Erfindung" vorhergesagten Cytokinmusters.

[0025] Um die Substanzen auf ihre Wirkungen im System zu testen, werden dem Blut verschiedene Konzentrationen zugesetzt. Die höchste Konzentration der Substanz, die sich für die Zellen bei mikroskopischer Untersuchung in Gegenwart von Vitalfarbstoff, z. B. Trypanblau, als nicht toxisch erweist, wird als Anfangskonzentration verwendet. Dann wird eine Verdünnungsreihe der Substanz bis hinunter auf eine Verdünnung von wenigstens 1:1000 und vorzugsweise bis hinunter auf 1:10000, 1:100000 oder 1:1000000 hergestellt.

[0026] In Fällen, in denen die Substanz in RPMI 1640 verdünnt wird, ist Medium alleine die geeignete Kontrolle. Wenn andere Verdünnungsmittel verwendet werden, verwendet man Kontrollen des jeweiligen Verdünnungsmittels in entsprechenden Konzentrationen.

[0027] Die Gefäße werden bei 25–40°C, vorzugsweise 37°C, bei 50–95%, vorzugsweise 90% Feuchte und vorzugsweise in Gegenwart von 2–15% CO₂, vorzugsweise 5%, inkubiert. Eine zweckmäßige An-

zahl von Teströhrchen oder Mikrotiterplatten werden vorbereitet und in Abständen zum Testen aus dem Inkubator genommen. Standardmäßige Zeitabstände sind 1 Stunde bis zu 10 Tage, vorzugsweise 1 Stunde, 1 Tag, 2 Tage und 4–6 Tage.

[0028] Proliferationsassays können wie folgt durchgeführt werden. Ein Satz Platten wird dazu verwendet, um die Proliferationsaktivität der Donorzellen spontan (= Mediumkontrolle oder Kontrollen für die Lösungsmittel der Substanzen) in Reaktion auf Mitogene und in Reaktion auf Proben der Testsubstanzen bei verschiedenen Konzentrationen zu bestimmen. Dies kann wie nachfolgend beschrieben oder nach irgendeiner anderen geeigneten Methode erfolgen. Die Platten werden in Zeitabständen getestet und in jede Vertiefung in der Platte wird ein markierter Nukleinsäurevorläufer, wie ³H-Thymidin, gelöst in Medium gegeben. Die Platten werden zum Einbau von markiertem Nukleinsäurevorläufer weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann werden die Zellen mit einem Skatron-Zellerntegerät (Skatron, Lier, Norwegen) und Titertek-Papierfiltern oder mit irgendeiner anderen geeigneten Methode gesammelt. Das Ergebnis dieser Vorgehensweise ist, daß die DNA der Zellen auf dem Filterpapier hängenbleibt, wohingegen das nicht in die DNA eingebaute ³H-Thymidin durch den Filter läuft und als Abfall mit dem Waschwasser geht. Die Radioaktivität in den Filterpapieren ist also proportional zur DNA-Synthese, die während der 4 Stunden vor dem Ernteprozess erfolgt ist. Die Radioaktivität der Filterpapiere wird in einem Packard-Flüssigszintillationszähler bestimmt und der Thymidineinbau wird als Counts pro Minute (cpm) ausgedrückt. Die Radioaktivität oder irgendein anderer Marker des Vorläufers kann auch in DNA gemessen werden, die auf irgendeine andere mechanische oder chemische Weise geerntet und mit einer beliebigen zweckmäßigen Isotopenmethode oder chemischen Methode bestimmt wurde.

[0029] Cytokinassays: Ein weiterer Satz von Platten wird nach dem gleichen Muster wie in obigem "Züchtungsprotokoll" vorbereitet. Auch hier werden die Platten in verschiedenen Zeitabständen aus dem Inkubator genommen und die von den kultivierten Zellen freigesetzten Cytokine werden in den nach 10-minütiger Zentrifugation der Platten bei 650 g erhaltenen Überständen bestimmt. Die Überstände entweder sofort getestet oder bis zum Test bei –20°C aufbewahrt werden. Für die Cytokinbestimmungen können Diagnostikkits unterschiedlicher Herkunft verwendet werden. Das Patent beansprucht dieses Verfahren mit jedem verfügbaren oder neu entwickelten Test zur Cytokin-Quantifizierung, einschließlich Bioassays, Immunoassays oder chemischen oder anderen Tests.

[0030] Es wurden die Anleitungen der Hersteller befolgt. Alle diese Tests sind Enzymimmunoassays

(EIAs). Das Prinzip besteht darin, daß Mikrotiterplattenvertiefungen mit einem Cytokin-spezifischen Capture-Antikörper markiert werden. Wenn Cytokin in den in die Vertiefungen gegebenen Proben vorhanden ist, wird es durch den Boden der Vertiefung festgehalten. Um zu quantifizieren, wieviel Cytokin festgehalten wurde, wird ein zweiter, mit einem Enzym markierter Antikörper in die Vertiefungen gegeben. Die Umsetzung wird anschließend anhand der nach Zugabe eines Substrats für das Enzym gebildeten Färbung gemessen. Die Werte für die Testvertiefungen werden mit einer Eichkurve verglichen, die mittels einer Reihe bekannter Cytokinmengen erhalten wurde. Die Werte für die Kontrollvertiefungen, in denen den Zellen keine Substanz zugesetzt wurde, werden als Background für die Tests verwendet. Positive Signale werden vermerkt, wenn Werte oberhalb 2 SD der Schwankungsbreite erhalten werden.

[0031] Die Erfindung betrifft ferner einen Kit, der ein oder mehrere Reagenzien umfaßt, die die Alarmcytokine der Klasse Null und/oder die Cytokine des Klasse I-Typs und/oder die Cytokine des Klasse IV-Typs erkennen. Beispiele für solche Cytokine sind im dritten und vierten Absatz auf Seite 5 genannt. Reagenzien, die auf die Anwesenheit von Neopterin und IL-8 reagieren, sind bevorzugt.

[0032] Bei diesen Reagenzien kann es sich um Antikörper oder um andere Reagenzien handeln, die für diese Substanzen sensitiv sind. Die Reagenzien können sich auf einem Träger, beispielsweise auf einem Streifen, Titerplatten, Mikrotiterplatten, ELISA-Platten, Teströhrchen etc. befinden. Die Träger können verschiedene Größen besitzen. Bei dem Trägermaterial kann es sich um jedes beliebige feste oder halbfeste Material handeln, das die Reaktion zwischen dem Reagens und dem Cytokin nicht stört. Der Träger kann in zahlreichen verschiedenen Formen oder Zusammensetzungen vorliegen, einschließlich Mikropartikeln, Kügelchen, porösen und impermeablen Streifen und Membranen, der inneren Oberfläche der Reaktionsgefäße, beispielsweise der Teströhrchen und der Mikrotiterplatten, usw. Mikrotiterplatten und Kügelchen können aus Kunststoff, beispielsweise Styrol- oder Acrylpolymeren, oder aus Glas sein. Es kann Nitrocellulose verwendet werden, bevorzugt in Form von Filtern, Streifen oder Platten. Die Maßnahmen, um einen gewünschten Reaktionspartner an einen gewählten festen Träger zu binden, sind für den Fachmann eine Routineangelegenheit. Auch die Verwendung eines Durchflußzytometers ist möglich.

[0033] Die Erfindung wird nun mit den folgenden nicht einschränkenden Beispiele näher beschrieben.

Beispiel

[0034] Blutspender und Blutsammlung: Es wurden fünf gesunde Blutspender beiderlei Geschlechts im

Alter zwischen 25 und 55 Jahren herangezogen. Blut wird durch Venenpunktion in endotoxinfreien Heparinröhrchen (Coatech, Ljungby, Schweden) gesammelt, die 120 IU Heparin enthalten und mit 4 ml Blut gefüllt werden. Keiner der Blutspender durfte eine Krankengeschichte für Allergie oder atopisches Ekzem oder irgendein Anzeichen für eine einsetzende Krankheit irgendeiner Art haben.

[0035] Zellanalyse: Die Gesamtzahl der weißen Blutzellen und das Differentialblutbild werden mit einem Coulter STKS-Gerät bestimmt. Die fünf Spender besaßen eine Gesamtzahl an weißen Blutzellen von 9,8; 7,1; 9,8; 6,9; 5,8·10⁹/l.

[0036] Züchtungsprotokoll: Von dem Vollblut wird eine Verdünnungsreihe von 1:2, 1:3, 1:20, 1:4 und 1:10 in Gewebekulturmedium, RPMI 1640, das mit 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 U/ml Streptomycin supplementiert ist, hergestellt. In die Vertiefungen von Nunclon-Mikrotiterplatten werden 100 µl Blut gegeben. Das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA-L) (L-4144, Sigma, St Louis, USA) wird in RPMI 1640 gelöst und 50 µl der Lösung werden in die Vertiefungen gegeben, so daß eine Endkonzentration von 25 µg pro Vertiefung erreicht wird.

[0037] Um die Substanzen auf ihre Wirkungen im System zu testen, werden dem Blut verschiedene Konzentrationen zugesetzt. Die höchste Konzentration der Substanz, die sich für die Zellen bei mikroskopischer Untersuchung in Gegenwart von Vitalfarbstoff, z. B. Trypanblau, als nicht toxisch erweist, wird als Anfangskonzentration verwendet. Die folgenden Substanzen und Konzentrationen wurden verwendet: 0 = Triton X-100 in Konzentrationen von 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000
IV = NiCl₂ 100 µg, 10 µg, 1 µg, 0,1 µg, 0,01 µg und 0,001 µg pro ml
I = Milbenextrakt (1:10, 1:20, 1:40, 1:80)
Plus = PHA 25 µg pro Vertiefung (200 µl)

[0038] In Fällen, in denen die Substanz in RPMI 1640 verdünnt wird, ist Medium alleine die geeignete Kontrolle. Wenn andere Verdünnungsmittel verwendet werden, verwendet man Kontrollen des jeweiligen Verdünnungsmittels in entsprechenden Konzentrationen.

[0039] Inkubation: Die Mikrotiterplatten werden bei 37°C bei 90% Feuchte und mit 5% CO₂ inkubiert. Eine zweckmäßige Anzahl identischer Platten wird vorbereitet und in Abständen von 1 Tag, 2 Tagen und 6 Tagen zum Testen aus dem Inkubator genommen.

[0040] Proliferationsassay: Ein Satz Platten wird dazu verwendet, um die Proliferationsaktivität der Donorzellen spontan (= Mediumkontrolle oder Kontrollen für die Lösungsmittel der Substanzen) in Re-

aktion auf PHA und in Reaktion auf Proben der Testsubstanzen bei verschiedenen Konzentrationen zu bestimmen. Die höchste Substanzkonzentration, die sich für die Zellen bei mikroskopischer Untersuchung in Gegenwart von Vitalfarbstoff (z. B. Trypanblau) als nicht toxisch erweist, wird als Anfangskonzentration verwendet. Dann werden wie oben beschrieben Verdünnungsreihen hergestellt.

[0041] In jede Vertiefung in der Platte wurde 1 µCi ³H-Thymidin (Amersham International, Amersham UK; 50 Ci/mM) gelöst in 50 µl RPMI 1640 gegeben. Die Platten wurden weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit einem Skatron-Zellerntegerät (Skatron, Lier, Norwegen) und Titertek-Papierfiltern gesammelt. Das Ergebnis dieser Vorgehensweise ist, daß die DNA der Zellen auf dem Filterpapier hängenbleibt, wohingegen das nicht in die DNA eingebaute ³H-Thymidin durch den Filter läuft und als Abfall mit dem Waschwasser geht. Die Radioaktivität in den Filterpapieren ist also proportional zur DNA-Synthese, die während der 4 Stunden vor dem Ernteprozess erfolgt ist. Die Radioaktivität der Filterpapiere wird in einem Packard-Flüssigszintillationszähler bestimmt und der Thymidineinbau wird als Counts pro Minute (cpm) ausgedrückt.

[0042] Cytokinassays: Ein weiterer Satz von Platten wird nach dem gleichen Muster wie in obigem "Züchtungsprotokoll" vorbereitet. Die von den kultivierten Zellen freigesetzten Cytokine werden in den nach 10-minütiger Zentrifugation der Platten bei 650 g erhaltenen Überständen bestimmt. Die Überstände wurden entweder sofort getestet oder bis zum Test bei -20°C aufbewahrt.

[0043] Lediglich zur Information wird hier erwähnt, daß bei der Durchführung der Tests die folgenden kommerziell erhältlichen Kits und Erzeugnisse verwendet wurden.

IL-1-beta: Immunotech, Chromgenix
 IL-2: Immunotech, Chromgenix
 IL-4: R&D Systems
 Neopterin: Henning, Berlin
 IL-6: Immunotech, Chromgenix
 IL-8: Assay Res. Inc
 Interferon-gamma: Genzyme
 sCD8: T Cell Diagnostics
 sIL-2R: Immunotech
 TNF: Medgenix
 IL-10: Medgenix

[0044] Es wurden die Anleitungen der Hersteller befolgt. Alle diese Tests waren Enzymimmunoassays (EIAs). Das Prinzip besteht darin, daß Mikrotiterplattenvertiefungen mit einem Cytokin-spezifischen Capture-Antikörper markiert werden. Wenn Cytokin in den in die Vertiefungen gegebenen Proben vorhanden ist, wird es durch den Boden der Vertiefung festgehalten. Um zu quantifizieren, wieviel Cytokin fest-

gehalten wurde, wird ein zweiter, mit einem Enzym markierter Antikörper in die Vertiefungen gegeben. Die Umsetzung wird anschließend anhand der nach Zugabe eines Substrats für das Enzym gebildeten Färbung gemessen. Die Werte für die Testvertiefungen werden mit einer Eichkurve verglichen, die durch Zugabe einer Reihe bekannter Cytokinmengen erhalten wurde. Die Werte, die für die Kontrollvertiefungen erhalten wurden, denen keine Substanz zugesetzt wurde, werden als Backgroundwerte für Cytokinmengen und Proliferation verwendet, wie sie mittels Einbau von ³H-Thymidin gemessen werden. Positive Signale werden vermerkt, wenn Werte oberhalb 2 SD der Schwankungsbreite der Kontrollen erhalten werden.

[0045] Gezeigt werden die Ergebnisse der Tests von drei Substanzen mit Eigenschaften, die bereits aus praktischen klinischen Erkenntnissen bekannt waren, die aber vorher noch nicht mit dem Verfahren getestet worden waren.

- 0. Triton X-100. Hierbei handelt es sich um ein Detergens mit schädigender Wirkung für das Gewebe. Löst Zellmembranen.
- I. Staubmilben-Antigen (Soluprick, ALK Sverige AB). Dieses Präparat wird aus einem Staubmilbenextrakt hergestellt und wird klinisch verwendet, um durch intrakutane Injektion auf Allergie vom Soforttyp zu testen.
- IV. Nickelchlorid (Sigma, St Louis, USA). Dieses Metall ist bei Menschen und Versuchstieren allgemein als eine Ursache für Allergie vom verzögerten Typ bekannt (Kontaktexzem).
- Plus. Der positive Indikator für die Ansprechempfindlichkeit des Systems. Der Kalibrator war das Mitogen PHA (Sigma, St. Louis, USA).

[0046] Der höchste für jede Substanz zu irgendeinem Zeitpunkt oder bei irgendeiner Konzentration im Vergleich zur Mediumkontrolle erhaltene Wert wird in der Tabelle als Indikatorwert verwendet und auf die Mediumkontrolle bezogen, die auf einen Indexwert von 100 gesetzt wurde.

In vitro-Performance-Test - Tabelle I

Werte für 11 Cytokine und ³H-Thymidin-Proliferation. Erhalten nach Stimulierung von Blut von fünf normalen Menschen. Alle Werte beziehen sich auf die Mediumkontrolle, die auf den Wert 100 gesetzt wurde.

	IL-1	TNF	IL-6	IL-8	IL-2	sIL-2R	sCD8	IL-10	IL-4	IFN γ	Neopterin	Prolif. - Index
0	630	400	460	200	85	115	95	95	85	120	110	200
IV	1165	225	660	380	445	130	110	800	80	1220	90	1340
I	320	240	250	100	900	120	85	640	900	800	560	120
Plus	690	420	1620	780	750	1820	940	1250	820	800	440	2600

[0047] Ergebnisse: Die Ergebnisse eines Performance-Beispiels werden nachfolgend zusammenfassend gezeigt und die stimulierende Wirkung war für die verschiedenen Verbindungen ziemlich unterschiedlich.

0. Triton X-100 induzierte Proliferation. Es wurden Cytokine der unspezifischen gewebetoxischen Gruppe induziert, d. h. IL-1, IL-6 und TNF. Es ist ein positives Irritans für Gewebe.

I. Staubmilch: Induzierte keine Proliferationsreaktion. Stoffe, die in die Überstände sekretiert wurden, waren die unspezifischen entzündlichen IL-1, TNF und IL-6 und aus der Lymphozyten-Immunklasse das IL-2, IL-4, IL-10 und IFN-gamma. Außerdem das Neopterin, das für eine Induktion spezifischer Immunreaktionen eines späten reifen Stadiums typisch ist. Es existiert ein Potential für Antikörper- und IgE-Produktion.

IV. Nickelchlorid: Induzierte eine schwache Proliferationsreaktion. Die induzierten Cytokine waren die unspezifischen entzündlichen Mediatoren IL-1, IL-6, TNF und IL-8. Aus der Lymphozyten-Immunklasse wurden IFN-gamma, IL-2 und IL-10 induziert, bemerkenswerterweise aber nicht Neopterin.

Plus. PHA: Induzierte eine starke, durch Einbau von ³H-Thymidin induzierte Proliferationsreaktion, und auch Zelltypen für Cytokine wurden induziert. Die in die Überstände sekretierten Stoffe umfaßten: Cytokine vom primären entzündlichen Typ, wie IL-1, IL-6, TNF und IL-8. Cytokine der Typen, die sowohl für frühe als auch für späte spezifische Immunreaktionen typisch sind, wie Neopterin, IFN-gamma, IL-2 und IL-4 und IL-10, wurden induziert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur in vitro-Beurteilung einer potentiell allergenen oder gewebereizenden Substanz, **dadurch gekennzeichnet**, dass Blutzellen in Gegenwart der in Reihe verdünnten Substanz kultiviert werden, wobei von der höchsten Konzentration der Substanz, die für die Zellen nicht toxisch ist, eine Verdünnungsreihe hergestellt wird, die Zellproliferation gemessen wird und die Anwesenheit von Cytokinen gemessen wird, wobei:

die Anwesenheit allein von ein oder mehreren Alarmcytokinen (Klasse 0), ausgewählt aus IL-1, IL-6, IL-12 und TNF, ein Hinweis auf unspezifische Gewebeschäden oder das Vorliegen chemischer oder toxischer Effekte auf Bindegewebe, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen und unspezifische entzündliche weiße Blutzellen ist;

die Anwesenheit von ein oder mehreren Alarmcytokinen der Klasse 0, ausgewählt aus IL-1, IL-6, IL-12 und TNF, und das Vorliegen hoher Werte von IL-8 zu Neopterin ein Hinweis auf zellvermittelte T-Zell-Immunität und Hypersensibilität vom verzögerten Typ der Klasse IV wie zelluläre Immunität, verzögerte Allergie und Kontaktekzeme ist, und

die Anwesenheit von ein oder mehreren Alarmcytoki-

nen der Klasse 0, ausgewählt aus IL-1, IL-6, IL-12 und TNF, und das Vorliegen hoher Werte von Neopterin zu IL-8 ein Hinweis auf eine Immunreaktion vom Klasse I-Typ von T- und B-Lymphozyten und entzündlichen Zellen und Hypersensibilität vom Soforttyp wie Asthma, Heufieber, Urtikaria und Rhinitis ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

Cytokine vom Klasse IV-Typ, die mit zellvermittelter T-Zell-Immunität in Zusammenhang stehen, ausgewählt aus IL-2, IL-8, IL-10, IFN-gamma, IL-4, IL-5 und löslichen Produkten wie sCD8 und sIL-2R, ebenfalls gemessen werden;

Cytokine vom Klasse I-Typ und des Typs einer Immunreaktion von T- und B-Lymphozyten und entzündlichen Zellen, ausgewählt aus IFN-gamma, IL-2, IL-10, IL-4, IL-5 und löslichen Produkten wie sCD8 und sIL-2R, ebenfalls gemessen werden.

3. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1–2, dadurch gekennzeichnet, dass die zu testende Substanz in der höchsten, nicht toxischen Konzentration und in einer Verdünnungsreihe von wenigstens 1:1000 angeboten wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Verdünnungsreihe bis hinunter zu einer Verdünnung von wenigstens 1:10000 bis 1:1000000 erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass von dem Blut eine Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:1000, vorzugsweise von 1:2 bis 1:100, hergestellt wird.

6. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1–5, dadurch gekennzeichnet, dass Vollblut so behandelt wird, dass es nicht koaguliert, in vorzugsweise mit Glutamin und/oder einem Antibiotikum supplementiertem Gewebekulturmedium auf 1:2–1:100 verdünnt wird, ein markierter Nukleinsäurevorläufer zugegeben wird, die zu testende Substanz ausgehend von der höchsten Konzentration der Substanz, die für die Zellen nicht toxisch ist, vorzugsweise wie durch mikroskopische Untersuchung in Gegenwart eines Vitalfarbstoffs indiziert, bis hinunter auf 1:1000 bis 1:1000000 reihenverdünnt und in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wird, und bei 25°C–40°C inkubiert und in Zeitabständen von 1 Stunde bis zu 6 Tagen getestet wird, indem bestätigt wird, dass Proliferation erfolgt ist, vorzugsweise durch Sammeln der Zellen auf Filterpapier oder durch Ernten von Nukleinsäure durch irgendeine andere mechanische oder chemische Methode und Analysieren des markierten Nukleinsäurevorläufers, und eine Bestimmungsanalyse von Cytokinen durchgeführt wird, wobei die Anwesenheit allein von ein oder mehreren der Alarmcytokine der Klasse 0 ein Hinweis auf Gewebsschäden und chemisch-toxische Ef-

fekte ist, von ein oder mehreren Alarmcytokinen der Klasse 0 und ein oder mehreren Cytokinen vom Klasse IV-Typ aber nicht von Neopterin ein Hinweis auf Hypersensibilität vom verzögerten Typ wie zelluläre Immunität, verzögerte Allergie und Kontaktekzeme ist, und von ein oder mehreren Alarmcytokinen der Klasse 0 und wenigstens Neopterin und gegebenenfalls ein oder mehreren Cytokinen der Klasse I ein Hinweis auf Hypersensibilität vom Soforttyp wie Asthma, Heufieber und Urtikaria ist.

7. Verfahren zur in vitro-Beurteilung einer potentiell allergenen oder gewebereizenden Substanz, dadurch gekennzeichnet, dass Blutzellen in Gegenwart der in Reihe verdünnten Substanz kultiviert werden und die Anwesenheit von Neopterin analysiert wird, wobei die Anwesenheit von Neopterin ein Hinweis auf Hypersensibilität vom Soforttyp wie Asthma, Heufieber und Urticaria ist.

8. Verwendung von IL-8 und Neopterin zur Unterscheidung zwischen Klasse I- und Klasse IV-Cytokinprofilen.

9. Reagenzien-Kit zur Verwendung in dem Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1–7, dadurch gekennzeichnet, dass er umfasst: a) ein Reagens, das IL-8 erkennt, und b) ein Reagens, das Neopterin erkennt.

10. Reagenzien-Kit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Reagens von a) ein Antikörper ist, der IL-8 erkennt, und das Reagens von b) ein Antikörper ist, der Neopterin erkennt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen