

(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2004-522725

(P2004-522725A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06	4 B 0 0 1
A 2 3 C 9/00	A 2 3 C 9/00	4 B 0 1 8
A 2 3 C 9/12	A 2 3 C 9/12	4 C 0 8 4
A 2 3 C 19/00	A 2 3 C 19/00	4 C 0 8 5
A 2 3 L 1/30	A 2 3 L 1/30	4 C 0 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-552579 (P2002-552579)	(71) 出願人	590002013
(86) (22) 出願日	平成13年12月20日 (2001.12.20)		ソシエテ デ プロデュイ ネットスル ソ
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月20日 (2003.6.20)		シエテ アノニム
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/015129		スイス国ブベイ, ピー オー ボックス
(87) 国際公開番号	W02002/051437		3 5 3
(87) 国際公開日	平成14年7月4日 (2002.7.4)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	00128438.9		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成12年12月22日 (2000.12.22)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫寛容の誘導

(57) 【要約】

本発明は、個体の細胞、詳細には免疫反応に関与する細胞のCOX-2 (シクロオキシゲナーゼ2) 活性を上昇させ、任意でIFN- γ レベルを上昇させる化合物を投与することによって個体に抗原性物質に対する寛容を誘導する方法、並びに、個体に有害な免疫反応を引き起こさせる、物質又はその抗原性部分に関する。詳細には、本発明は、このような化合物と抗原性物質又はその一部分とを含む、食物組成物又は薬剤組成物に関する。代替実施形態では、本発明は、特定の物質にアレルギー反応を起こす個体の傾向を判定するための、新規な *ex vivo* の方法にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原性物質又はその抗原性部分と、個体の細胞の C O X - 2 の活性及び / 又は I F N - レベルを増大させる少なくとも 1 つの物質とを個体に投与することによって、抗原性物質に対する寛容を誘導する方法。

【請求項 2】

前記抗原が食品材料、自己の物質、又は食物でない非自己の物質である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記食品材料が乳、卵、大豆、木の実、甲殻類、魚、肉、ゴマ、乳清、ベリー、又はリンゴ由来である請求項 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記自己の物質が、コラーゲン、インスリン、ミエリン結合タンパク質、ミエリン、アセチルコリン受容体、レンチノイド結合タンパク質、又はポリペプチドからなる群から選択される請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記食物でない非自己の物質が、花粉、チリダニ、ヨウ素、ニッケル、銅、毒液、ラテックス、洗剤、化粧品、香水、プラスター、抗生物質又は同種抗原からなる群から選択される請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記個体の細胞中の C O X - 2 活性を増大させることができ、任意で I F N - レベルを増大させることができる少なくとも 1 つの物質が、プチレート、n - 6 P U F A、セラミド、植物抽出物、又は細菌性物質からなる群から選択される、前記いずれかの請求項に記載の方法。 20

【請求項 7】

抗原性物質又はその抗原性部分と、個体の細胞中の C O X - 2 活性を増大させることができる、少なくとも 1 つの物質とを含む食物組成物又は薬剤組成物。

【請求項 8】

乳、ヨーグルト、凝乳（カード）、チーズ、発酵乳、乳ベースの発酵製品、アイスクリーム、発酵させた穀物ベースの製品、乳ベースの粉末、飲料、水ベースのゼリー、幼児用の粉ミルク、また更にはペット食品からなる群から選択される、請求項 7 に記載の食物組成物。 30

【請求項 9】

個体の細胞中の C O X - 2 レベルを増大させることができ、任意で I F N - レベルを増大させることができる少なくとも 1 つの物質が、プチレート、n - 6 P U F A、セラミド、植物抽出物、又は細菌性物質からなる群から選択される、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 10】

個体が前記組成物に含まれる抗原性物質に対する免疫反応を発生する傾向を防止するための、請求項 7 から 9 までに記載の組成物の使用。

【請求項 11】

(a) 個体から血液試料を採取すること、
 (b) リンパ球を含む試料の細胞性物質を任意で回収すること、
 (c) 試料を前記抗原性物質と接触させること、
 (d) C O X - 2 活性を決定し且つ / 又は I F N - レベルを評価すること、及び
 (e) 決定したレベルをコントロールと比較すること
 を含む、個体が所定の物質に対する有害な免疫反応を発生する傾向を判定する方法であって、C O X - 2 活性の増大及び I F N - の増大が前記物質に対する寛容の指標である上記方法。 40

【請求項 12】

寛容原性の検査対象である前記物質が、食品材料である請求項 11 に記載の方法。 50

【請求項 13】

前記食品材料が、乳、ヨーグルト、凝乳（カード）、チーズ、発酵乳、乳ベースの発酵製品、アイスクリーム、発酵させた穀物ベースの製品、乳ベースの粉末、飲料、水ベースのゼリー、幼児用の粉ミルク、又は更にはペット食品からなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、個体の細胞、詳細には免疫反応に関与する細胞の COX-2（シクロオキシゲナーゼ 2）活性を上昇させ、任意で IFN- γ レベルを上昇させる化合物を投与することによって個体に抗原性物質に対する寛容を誘導する方法、並びに、個体に有害な免疫反応を引き起こさせる、物質又はその抗原性部分に関する。具体的には、本発明は、このような化合物と抗原性物質又はその一部分とを含む、食物組成物又は薬剤組成物に関する。代替実施形態では、本発明は、特定の物質にアレルギー反応を起こす個体の傾向を判定するための、新規な *ex vivo* の方法にも関する。

10

【背景技術】

【0002】

産業社会の様々な環境因子によってもたらされる現代病の 1 つは、アレルギーである。アレルギーとは、外来作用物質に対する過剰免疫応答によって引き起こされる過敏状態であり、無数の生物の生命に影響を与え、しばしば食べてよいもの、触ってよいもの、においを嗅いでよいもの、又は生物が住んでもよい場所さえも決定する。外来作用物質に対する体の反応の程度は、軽微な炎症や不快感から、ひどい場合は死にまで及ぶ。

20

【0003】

アレルギー反応の過程で生じる臨床症状は、2 つの異なる反応の結果であり、それらはそれぞれ、初期の特異的免疫応答及び後期の炎症反応である。吸入アレルゲン例えば花粉やダニチリは、高親和性免疫グロブリン（IgE）受容体、例えば肥満細胞及び好塩基球を刺激し、ヒスタミン及びサイトカインを放出させることによって初期段階を媒介する。この初期段階は約 30 分間持続する。初期段階に肥満細胞及び好塩基球から放出されたサイトカインは次いで、鼻道及び上気道に炎症細胞を集めることによって後期段階を媒介する。好酸球、マクロファージ、リンパ球、好中球、血小板の流入が炎症サイクルを開始させる。この後期段階は、一般的に約 2 日間持続し、最初の免疫応答を増幅させ、更に多くの炎症細胞の放出を引き起こす。

30

【0004】

現在のアレルギー治療は、概して 2 つの一般的な方法に集中している。療法の 1 つは単にアレルギーの症状のみを治療するもので、抗ヒスタミン剤などの薬剤が利用されている。このような方法の欠点の 1 つは、この方法は多くの場合、対応する薬剤の反復投与を必要とし、望まない副作用が伴う可能性があることである。更に、この方法は症状を治療するだけで、過敏状態の原因である、根底にある状態は治療されない。アレルギーを治療するための別の方法は、いわゆる脱感作治療であり、これには個体に特定のアレルゲンを注入することが含まれる。それでも、治療を始めることができるようになる前に、まず患者に特異的であるアレルゲンを認識しなければならない。その後、患者に低用量のアレルゲンを繰り返し注入する。この方法は不快感を伴い、50 回もの回数、臨床医師を訪ねなければならないことがある。加えて、患者が過敏性であるアレルゲンは必ずしも特定できるわけではなく、脱感作治療は不可能となる。

40

【0005】

上記の欠点にくわえて、上の方法のいずれも、過敏状態の除去は保証しない。同様に、いずれも、過敏状態の発生に対する防御を行うことはできない。

【0006】

環境中で遭遇する作用物質、例えば花粉、繊維などに対してますます多くの人がアレルギーを発症している上に、食物アレルギーに苦しむ消費者が着実に増加している。特に、穀

50

物、木の実、又は乳は、多くの国で主食として消費されており、これらは多数の潜在的なタンパク質性アレルギーを含むので、これらに対するアレルギー反応に関して深刻な問題が生じている。

【0007】

食物アレルギーを治療するために、これまで様々な方法がとられてきた。このような方法のうちの1つは、毎日の食事からアレルギー性食品材料を排除することを狙いとしているが、この方法は厳しい食事改訂を伴い、通常は制限措置を伴い、最終的には生活の質に影響を与え且つ/又は幼い子供又は新生児に期待される成長を阻害する可能性があるので、実践するのは困難である。

【0008】

別の方法は、アレルギー性物質の源自体を改変し、その潜在的なアレルギー性を低減させることに関与する。この方法は一般的に、食品材料からアレルギー性成分を取り去ることによって成されるが、食品材料中の特定の抗原性物質(アレルギー)が知られていないことが多く、多くの場合、どの成分を選択的に除去するべきかが明確でないので、しばしば問題が引き起こされる。食物のアレルギー性を改変する別の方法は、前記食品材料を特定の方法、例えば熱によって又はタンパク質分解酵素によって、処理することである。

【0009】

この点に関していうと、米国特許第4,293,571号は、低アレルギー性組成物の調製を開示しており、タンパク質性物質を加水分解処理し、残存の加水分解されなかったタンパク質を熱処理することによって凝固させ、続いて、凝固した物質及びアレルギーを構成する可能性のあるマクロペプチドを除去するために限外濾過工程に付す。

【0010】

新生児は自分の不快感を付き添いの者に明白に伝えられず、アレルギー状態は多くの場合、顕著なアレルギー症状、例えばアトピー性皮膚炎、呼吸系及び/又は消化系の障害によってしか発見されないので、食物アレルギーで直面する問題は、新生児でよりいっそう顕著である。

【0011】

アレルギー性物質の防止には、家庭に対するいろいろな抑制、及びこのような幼児に対する特定の生活ルールが含まれ得る。しかし、その食事療法に関する主要な予防措置は、未変性タンパク質による感作を避けることである。例えば、未変性牛乳タンパク質の摂取を大幅に減少させることによって、牛乳アレルギーの発症を劇的に減らすことができることが示された。

【0012】

食事療法の選択がどうであれ、原因のタンパク質を用いて免疫系を誘発してみなければ、乳タンパク質に対する免疫寛容の成立を最終的に保証することができない。現在までは、局部(ブリックテスト)又は系統的な(DBPCFC)誘発後に幼児が特定のアレルギー応答を明示しない場合は、寛容の状態は推定によってしか確認することができなかった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

したがって、本発明の課題は、従来技術の欠点を克服し、アレルギー症状を治療又は予防する新規な方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

この課題は、抗原性物質と、個体の細胞、例えばリンパ球など特に免疫反応に関与する細胞中のCOX-2活性を上昇させ且つ/又はIFN-レベルを増大させる物質とを個体に投与することを含む、所定の抗原性物質に対する寛容を個体に誘導する方法を提供することによって解決した。

【発明を実施するための形態】

【0015】

10

20

30

40

50

COX-2は、とりわけアラキドン酸からのプロスタグランジンの合成を触媒する酵素である。他の周知のCOX-2の基質は、ジホモ-ガンマ-リノレン酸(20:3n:6)及びエイコサペンタエン酸(EPA、20:5n:3)を含み、それぞれPGE₁及びPGE₃を生成する。

【0016】

ヒトCOX-2遺伝子がクローニングされ、そのゲノムパターン、及び様々な成分、例えばcAMP、NF- κ B及びTGF- β 、IL-1又はTNF- α に対するその遺伝子発現の応答性が記載されている。

【0017】

本発明によれば、「COX-2活性を増大させる」という用語は、例えば、補助因子の量を増大させ又は前記補助因子との相互作用を向上させるか、あるいは細胞内のタンパク質の転写及び/又は翻訳を増大させ又は単に基質の量を増大させることによって、酵素活性自体を増大させることと理解するべきである。

【0018】

同様に、有害な免疫反応という用語は、個体にとって有害なすべての免疫反応、例えばアレルギー反応、自己の免疫反応、臓器拒絶などを含むと理解するものとする。

【0019】

更に、個体の細胞という用語は、COX-2を発現し、寛容原性活性に関与するすべての細胞を含むものとする。このような細胞には、特に免疫反応に関与する細胞、例えば抗原提示細胞、リンパ球、具体的にはTリンパ球、好中球、顆粒球、単球などが含まれる。

【0020】

個体に与える抗原性物質は、一般的な食品材料自体、自己の物質又は食物でない非自己の物質であり得る。このような食品材料の例は、乳、卵、大豆、ピーナッツ、甲殻類、魚、肉、ゴマ、乳清、ベリー、又はリンゴである。

【0021】

自己の物質としては、個体にとって内在性であるすべての物質、例えばコラーゲン、インスリン、ミエリン結合タンパク質、ミエリン、アセチルコリン受容体、レチノイド結合タンパク質、又は体内で合成されるポリペプチドを挙げることができる。

【0022】

食物でない非自己の物質は、個体にとって本来外来性であり、有害な免疫反応を誘発する可能性があるどんな物質でもよい。このような物質の例は、アレルギー性物質、例えば花粉、チリダニ、ヨウ素、ニッケル、銅、毒液又はラテックス、様々な洗剤、化粧品、香水、プラスター、抗生物質など薬剤、移植抗原など同種抗原である。同種抗原については、このような同種抗原、例えば臓器などの移植を受ける患者に、移植を行う前に同種抗原とCOX-2活性を増大させる物質とを投与し、患者の免疫系による移植の拒絶を減少させ又は実質的に最小限にすることができる。これは、移植片の一部、例えば移植片のそれぞれのHLA抗原及び対象の物質を含むその細胞性物質を患者に投与し、患者の免疫系に、これから移植する移植片を寛容するように教えることにより達成することができる。

【0023】

個体の細胞中のCOX-2活性を増大させる物質、特にリンパ球など免疫反応に関与する細胞は、このような効果を発揮することができるどのような物質であってもよい。このような物質は、例えばTリンパ球のアラキドン酸からのPGE₂(プロスタグランジンE₂)の合成に対する効果によって容易に確認することができ、これは、通常の酵素免疫アッセイによって検定することができる。

【0024】

好ましい実施形態によれば、個体の細胞のCOX-2活性の増大、及び任意でIFN- γ のレベルの増大にも影響を及ぼすことができるこのような物質は、プチレート、n-6多価不飽和脂肪酸(PUFA)、例えばアラキドン酸又はセラミドからなる群から選択することができる。

【0025】

10

20

30

40

50

目的物質は、別々に又は単一の製品中で一緒に、個体に与えることができる。

【0026】

このために、目的物質及び抗原性物質を、対応する投与経路に必要であり所望される担体及び賦形剤を含む、錠剤、サシェ(sachet)、溶液、カプセルなど周知のどのような薬剤組成物にも含めることができる。このような投与経路には、局在投与、経鼻投与、経口投与、静脈投与、又は腹腔内投与が含まれる。

【0027】

抗原性物質は、必要に応じて前処理することができる。例えば、有害な免疫反応に影響を与える物質全体を薬剤組成物に含める代わりに、それぞれの物質に含まれる抗原性化合物又はその一部分、例えば特定のアレルゲン性ペプチドを単離し、これらの化合物を薬剤組成物に含めることもできる。

10

【0028】

目的物質を食品材料に含めることもできる。この場合、3つの代替案が考えられうる。

【0029】

第1に、抗原性であり食物でない自己の物質又は非自己の物質を、目的物質と一緒に通常の食品材料に含める。したがって、この実施形態は、目的化合物を補充して、食品材料中に、上述のように周知の抗原を添加することを企図している。このような食品材料として、すべての液体、例えば水又は更には乳、ゼリー、菓子などが提案される。

【0030】

第2の代替案として、食品材料それ自体が抗原性物質を表す、すなわち食品材料が本質的に、潜在的なアレルゲン性物質を含むことができる。この場合、本発明に従った組成物に到達するために、食品材料に目的物質を単に添加することができる。このような食品材料として、個体がアレルギー反応を生じる可能性があるすべての食物が包含され、すべての種類のベリー、リンゴ、モモが含まれる。具体的には、穀物又は牛乳由来の食物製品は、アレルゲン性の高い化合物を含むことで知られているので、これらの食物製品は好ましい食物種を代表する。このような食物製品の例は、ヨーグルト、凝乳(カード)、チーズ、発酵乳、乳ベースの発酵製品、アイスクリーム、穀物製品例えば発酵させた穀物ベースの製品、乳ベースの粉末、飲料、水ベースのゼリー、幼児用の粉ミルク、又は更にはペット食品である。

20

【0031】

したがって、本発明は、個体の細胞、特に、例えばリンパ球、好ましくはT細胞など特に免疫反応に関与する細胞中のCOX-2活性を増大させることができ、任意でIFN- γ レベルを増大させることができる物質を単に食品材料に含めることによって、個体に所定の抗原、好ましくは潜在的なアレルゲン性食品材料に対する経口寛容を誘導する、新規で興味深い概念を提供する。

30

【0032】

したがって、本発明は、食品材料に対する個体の経口寛容を誘導する方法を教示する。このコンセプトは、食品材料に対して寛容又はアレルギーを発症しかけている新生児に特に適している。本発明の教示を適用する中で、新生児がアレルギー反応を発生しない幼児用ミルクを提供することができる。その上、新生児の免疫系はむしろ、前記牛乳タンパク質を寛容するように教えられ、その結果新生児に対応する食品材料を与える際に問題が生じなくなる。

40

【0033】

あるいは、抗原性構成成分を、所望する他のあらゆる食品材料に添加してもよい。例えば、ピーナッツ又はその関連するアレルゲン性構成成分を発酵乳製品、例えばヨーグルトに添加することでピーナッツ味のヨーグルトを提供し、目的物質を含めることで、所望する療法を提供することもできる。この方法は同様に、ベリー、リンゴなどの断片をこのような発酵乳製品に添加することにも適用される。

【0034】

本発明の組成物は、個体でアレルギーが発症し得る前にそれを撃退するのに、見事に適し

50

ていることが理解されよう。特定の理論に縛られるわけではないが、免疫系を抗原に暴露させることと同時に、前記物質に対する限度を超えた免疫反応の抑制に關与する生物学的ステップを導入することが相まって、一般的に、免疫系に、提示された特定の抗原に有害な反応を生じないように教えるものと考えられる。したがって、本発明の根底にあるコンセプトは基本的に、経口寛容の誘導に關係する個体の細胞、好ましくは免疫反応に關与する細胞の生化学/代謝を変調させることである。このコンセプトは更に、自己免疫疾患（自己の物質又は自己の抗原）及び特定の食物でない非自己の抗原に対する寛容の発生に適用することができる。

【0035】

したがって、本発明によると、個体の細胞、好ましくは免疫反応に關与する細胞のCOX-2活性、及び任意でIFN- γ レベルを増大させることができる物質と一緒に同時に提示される物質に、反応しないように免疫系に「教える」ことによって、アレルギーの発症を防止するだけでなく、既に存在するアレルギー状態を治療することも可能である。

【0036】

薬剤組成物又は食物組成物中の目的物質の量が、所望する効果をもたらすのに、すなわち、個体中の対応する細胞、好ましくはリンパ球、より好ましくはTリンパ球のCOX-2活性の増大に、及び任意で末梢組織のIFN- γ レベルの増大に影響を与え、並外れた免疫応答の誘発の対象となる外来抗原であると一度認識された抗原性物質を寛容するように、個体の免疫系に効果的に教えるのに、十分であることが理解されよう。

【0037】

別の実施形態によれば、本発明は、個体がある抗原性物質に対するアレルギー反応を発生する素質を判定する方法であって、個体から血液試料を採ることを含み、任意でそれを処理してリンパ球を含む試料の細胞性物質を回収することも可能である上記方法を、提供する。この方法は、例えばカラムで細胞を回収し、又は血液試料を培養基に移動することによって初代培養を調製し、血液中に存在する細胞を培養することによって、容易に達成できる。続くステップで、試料又は血液細胞、特にリンパ球、より具体的にはTリンパ球を抗原性物質と接触させ、次いで、試料又は細胞中のそれぞれのCOX-2活性、任意で試料中のIFN- γ 活性を定量し、前記レベルを、一般的な検量線又は好ましくは抗原性物質に暴露させていない同一試料であるコントロールと比較する。

【0038】

コントロールに比べて増大したCOX-2活性、及びIFN- γ レベルの増大から、試料を採取した個体は、前記抗原性物質に対する相当な、すなわち限度を超えた又は有害な免疫反応を引き起こすことはなく、むしろ寛容することが示唆される。逆に、本質的に低減したCOX-2活性のレベル及び本質的に低減したIFN- γ レベルからは、この個体はこの物質に対して有害な反応を生じることが示唆される。

【0039】

上記の方法は、抗原性物質を用いて個体を直接誘発させることが回避されるので、従来技術に勝る根本的な利点を有している。したがって、検査対象の患者又は個体は、その対応する傾向を評価するためにはアレルギー性症状を発症する必要がなく、そのため、前記の試験タイプに關連する危険性が低下する。更に、本発明の方法は細胞レベル又は分子レベルの測定に依存するので、この検定は、個体がアレルギー性症状を発生するかどうかを評価するのに比べて、はるかに感度が高い。別の利点は、本発明の方法は、既に若年となっている子供及び新生児でさえも、危険にさらすことなく検査することを可能にする。

【0040】

以下の実施例は、本発明をより詳細に例示するが、それに限定することはない。

【0041】

以下の物質を使用し、以下の方法を適用した。

動物

IFFA-Credo (L'Abresle、フランス) から入手したBalb/cマウスの雌をすべての実験に使用し、実験は3週齢のマウスで実施した。すべてのマウスを、

10

20

30

40

50

牛乳を含まない食餌で繁殖させ飼育した。すべての実験で、マウスの体重に応じた強制飼養 (gavage) の量を決定するために、飼料を与える日に体重を測定した。

【0042】

抗原

BLG (ウシラクトグロブリン、3×結晶化) 及びOVA (卵白アルブミン、V級) をシグマ薬品 (株) (Sigma Chemical Co.) から入手した。乳清タンパク質濃縮物 (Lacprodan 80) をDanmark Protein As (MDフーズ (MD-Foods)) から入手した。これは、酸性乳清 (acid whey) の限外濾過によって生成され、タンパク質含量は80%であった。

【0043】

統計

ANOVA単一因子試験を使用して血清 (seric) IgE応答を比較した。p < 0.05で、有意であるとした。

【実施例】

【0044】

例 1

マウスの処置

実験を開始するために、ブチレート (COX-2活性を促進する)、イブプロフェン (COX活性を阻害する)、又は生理食塩水 (コントロール) を、-3日目から4日目まで毎日、マウスに強制的に給餌及び/又は腹腔内注入した。0日目に、強制飼養によってマウスに乳清タンパク質 (体重1gあたり3mg) 又は同体積の生理食塩水を給餌した。強制飼養製品は0.3mlの生理食塩水に溶解した。各実験の4日目に、0.16mlの2% Al(OH)₃ (Superfos Biosecotr A/S、デンマーク) と混合した0.04mlの滅菌生理食塩水中の、0.08mgのBLG及び0.08mgのOVAを腹腔内に注入することによって、すべてのマウスを免疫化した。

【0045】

4日目又は26日目に、3%イソフルラン麻酔 (アボットSA (Abbott SA)) 下で心臓大動脈穿刺により血液試料を得た。頸椎脱臼による死の直後に、脾臓を取り出し、5%のFCSを補充した20mlの冷RPMIに、投与群ごとにプールした。脾臓細胞溶液をセルラーシブ (cellular sieve) (ファルコン (Falcon)) でホモジナイズし、赤血球から、Histopaque比重遠心 (シグマ) を使用して、390×g、20分間で精製した。96ウェルの平底マイクロタイタープレート (Costar) 中で、48時間、5×10⁶個/mlの細胞密度で、2mMのL-グルタミン (Seromed)、100Uペニシリン/100mgストレプトマイシン (Seromed)、10%のFCS (Biocconcept) を補充したRPMI 1640 (Biocconcept) 中で、5%のCO₂、37℃で、5、2.5、0.5、0.1mg/mLのBLG (シグマ) 又は250、50、10、2µg/mLのフィットヘマグルチニンA (Seromed) の存在下で、細胞を共培養した。培養の最後の6時間で(³H)Tdr (アマシャム (Amersham)、チューリッヒ) を加え、プレートを収集し、シンチレーション計測 (トップカウント (Top Count)、キャンベラ・パッカー (Canberra Packard)、チューリッヒ) によって分析した。(³H)Tdrの取り込みは、それぞれ3つの培養物の平均値としてcpmで表し、次いでブランクを減算した平均値をBLG濃度に対してプロットした。1mLあたり2.5mgのBLG及び1mLあたり50µgのPHAで、ブランクを減算した試験と対象の値との比として刺激指数を計算した。

【0046】

各群について特異的な増殖検定を実施した。単離した血清を-20℃で急速に凍結し、BLGに特異的なIgEを検定するまで凍結しておいた。

【0047】

例 2

10

20

30

40

50

E L I S A による特異的 I g E 抗体の測定

血清試料を、2組ずつE L I S Aによって抗B L G I g Eを検定した。手短に述べると、マイクロタイタープレート(N U N C I m m u n o p l a t e M a x i s o r p F 9 6、デンマーク)を、各ウェル100 μ lの、炭酸塩-炭酸水素塩緩衝液、pH 9.6に溶解した0.5mg/mLのB L Gを用いて、終夜4でコーティングした。次の試薬を加える前に毎回、P B S - T w (リン酸緩衝生理食塩水-ツイーン(Phosphate-Buffered Saline-Tween)0.05%)を用いて4回の洗浄ステップを実施した。プレート上の占有されていない部分を、各ウェル200 μ Lの、P B S - T w 中の0.5%フィッシュゼラチン(シグマ)を用いて、1時間R Tでブロックした。各マウスの試料の一連の希釈液(血清の3倍)を、2組ずつ検定した。血清は、検定の前にまずP B S - T w で1/20に希釈した。希釈した試料を加え、室温で1時間インキュベートした後、ペルオキシダーゼ標識ラット抗マウスI g E抗体(Harlan Sera-Lab、米国)を2時間添加し、次いでO P D 基質(シグマ)を加えた。15分室温でインキュベートした後、D y n a t e c h M R 5 0 0 E L I S A リーダー(Dynatech、Embrach-Embraport、スイス)を使用して492nmで吸光度を測定した。20匹の免疫化していない雌マウスからのプールした試料を、各プレートのネガティブコントロールとして使用した。ネガティブコントロールの2倍の吸光度を示した試料の希釈率を計算することによって、希釈率のカットオフ値を決定した。力価は、希釈率のカットオフ値の逆数のlog₁₀として表した。

【0048】

例3

サイトカインE L I S A

5 \times 10⁵個の脾臓細胞を各ウェル2.5mg/mLのB L Gで刺激し、96ウェルのマイクロタイタープレート(C o s t a r)中でサイトカイン分泌を誘導させた。48時間の刺激の後、細胞培養物の上清を回収した。サイトカインに特有のE L I S A キットE n d o g e n を使用してI F N - レベルを測定し、これは製造者の指示に従って実施した。すべてのサイトカイン試料は、2組ずつ検定した。

【0049】

例4

プロスタグランジンE₂及びインターフェロン-ガンマの測定

培養基中の、6時間又は12時間培養したリンパ球のP G E₂レベルを、酵素免疫測定法(E I A)キット(C a y m a n C h e m i c a l、)を使用して決定した。3組の試料をそれぞれ2つの希釈率で検定した。

【0050】

マウスに乳清タンパク質を給餌することによる寛容の誘導の結果、寛容化の5日後、培養物中のB L Gで刺激したリンパ球によるP G E₂及びI N F - の生成が、寛容化していないコントロールされたマウスに比べて、増大した。

【0051】

このP G E₂及びI N F - の生成は、C O X の阻害剤であるイブプロフェンを用いてマウスを処置した場合には観察されない。一方、ブチレートで処置したマウスは、ポジティブコントロールである乳清を給餌したマウスに比べて、P G E₂及びI N F - の両方の生成量が更に増大する。

【0052】

例5

増殖

マウスに乳清タンパク質を給餌することによる寛容の誘導の結果、寛容化の4日後、増殖応答指数が減少する(図3)。0.5未満の刺激指数は、マウスが寛容化されたことを示す。マウスを、C O X の阻害剤であるイブプロフェンで処置した場合、この増殖応答指数の減少は観察されない。一方、ブチレートで処置したマウスは、ポジティブコントロールである乳清を給餌したマウスに比べて、増殖応答指数が更に減少していたことを示した。

50

【0053】

寛容原を給餌してから4日後にBLGで誘発したマウスでは、寛容化後26日で、同様でよりはっきりした結果が観察された。

【0054】

例6

IgE

マウスに乳清タンパク質を給餌することによる寛容の誘導の結果、寛容化の26日後、液性抗BLG IgE力価が減少した。この減少は、寛容化していないマウスに比べて統計的に有意であった(p < 0.05)。マウスを、COXの阻害剤であるイブプロフェンで処置した場合、この液性抗BLG IgE力価の減少は観察されなかった(図2参照)。

10

【0055】

一方、ブチレートで処置したマウスは、ポジティブコントロールである乳清を給餌したマウスに比べて、液性抗BLG IgE力価が更に減少していたことを示す。この液性抗BLG IgE力価のさらなる減少は、寛容化したマウス(ポジティブコントロール)に比べて統計的に有意であった(p < 0.05)。

【図面の簡単な説明】

【0056】

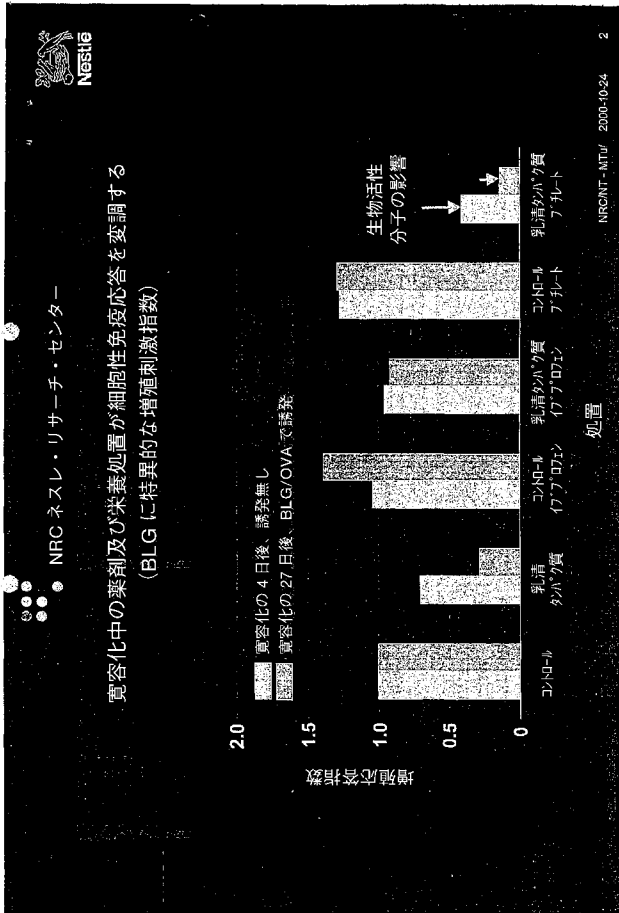
【図1】薬剤及び栄養治療による細胞性免疫応答の、寛容化中の変調を示す図である。

【図2】薬剤及び栄養治療によるBLGへの液性免疫応答の、寛容化中の変調を示す図である。

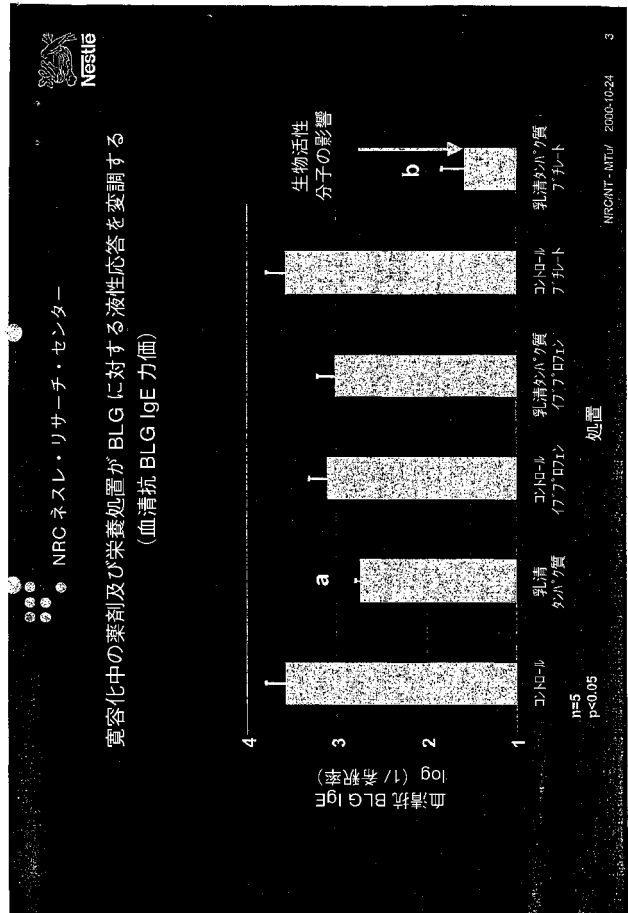
20

【図3】経口寛容を評価するための、PGE₂及びIFN- の測定値を示す図である。

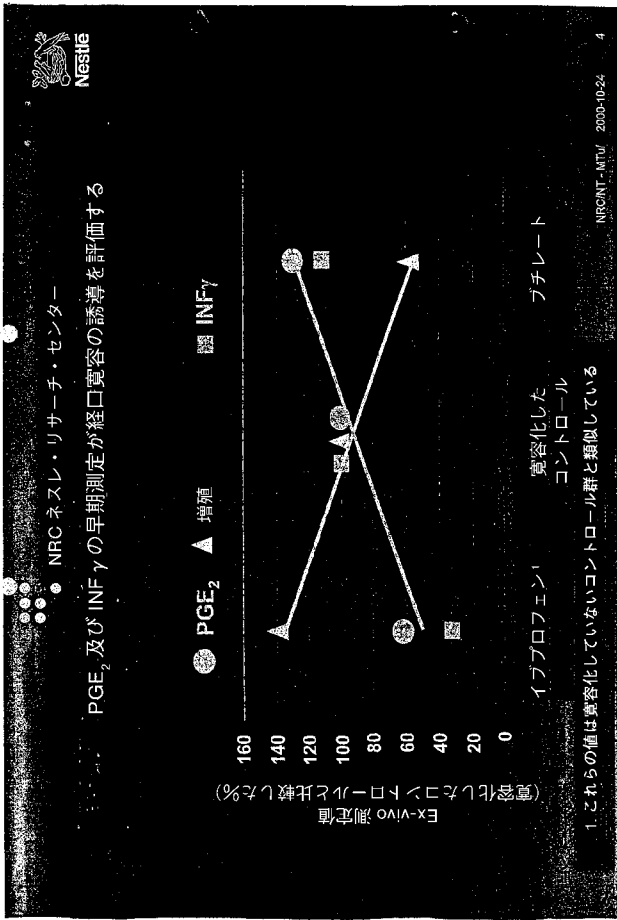
【図1】



【図2】



【図 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
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/051437 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 39/39, A61P 37/00
- (21) International Application Number: PCT/EP01/15129
- (22) International Filing Date: 20 December 2001 (20.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00128438.9 22 December 2000 (22.12.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. [CH/CH], P.O. Box 353, CH-1800 Vevey (CH).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, 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, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, 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.
- (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, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TURINI, Marco [CH/CH], Ch. du Bois-Murat, 20, CH-1066 Epalinges (CH), GERMAN, Bruce [CA/CH], Chemin du Belliard 1, CH-1095 Lutry (CH), PECQUET, Sophie [FR/CH], Chemin de Beau Val, 22, CH-1012 Lausanne (CH).

(74) Agent: STRAUS, Alexander; Bavariastr. 7, 80336 München (DE).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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 02/051437 A1

(54) Title: INDUCTION OF TOLERANCE

(57) Abstract: The present invention pertains to a method for inducing tolerance to an antigenic material in an individual by administering a compound increasing the COX-2 (cyclo-oxygenase 2) activity in the individual's cells, in particular in cells involved in an immune reaction, and optionally also increasing the IFN- γ level, and a material or antigenic parts thereof, to which the individual develops adverse immune reactions. Specifically, the present invention pertains to a food or pharmaceutical composition containing such compounds and the antigenic material or parts thereof. In an alternative embodiment, the present invention also pertains to a novel ex vivo method for determining an individual's tendency to develop an allergic reaction to a particular material.

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

Induction of tolerance

The present invention pertains to a method for inducing tolerance to an antigenic material in an individual by administering a compound increasing the COX-2 (cyclo-oxygenase 2) activity in the individual's cells, in particular in cells involved in an immune reaction, and optionally also increasing the IFN- γ level, and a material or antigenic parts thereof, to which the individual develops adverse immune reactions. Specifically, the present invention pertains to a food or pharmaceutical composition containing such compounds and the antigenic material or parts thereof. In an alternative embodiment, the present invention also pertains to a novel ex vivo method for determining an individual's tendency to develop an allergic reaction to a particular material.

One of the modern diseases brought about by different environmental factors of the industrial society is allergy. Allergy is a hypersensitive state induced by an exaggerated immune response to a foreign agent affecting the lives of millions of living beings, often dictating what may be eaten, touched, smelled or even where living beings may live. The body's reaction to the foreign agent can range from minor inflammation and discomfort to even death in severe cases.

The clinical symptoms produced in the course of allergic reactions are a result of two different reactions, an early specific immune response and a late inflammatory reaction, respectively. Inhaled allergens, such as e.g. pollens or mite dust, mediate the early phase by stimulating high affinity immunoglobulin (IgE) receptors, e.g. mast cells and basophils, which in turn release histamine and cytokines. This early phase lasts for about 30 minutes. The cytokines released during the early phase from mast cells and basophils then mediate the late phase by recruiting inflammatory cells into the nasal and upper respiratory tract passages. The influx of eosinophils, macrophages, lymphocytes, neutrophils and platelets starts the inflammatory cycle. This late phase generally lasts for up to about 2 days and amplifies the initial immune response which in

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

2

turn triggers the release of more inflammatory cells.

Current treatments of allergy generally focus on two generic approaches. One regimen merely treats the symptoms of allergy, wherein drugs, such as antihistamines, are utilized. One of the drawbacks of such methods resides in that this approach most often entails repeated doses of the corresponding drug to be administered and may involve undesirable side effects. In addition, it acts only to treat symptoms, not the underlying condition responsible for the hypersensitive condition. Another approach to treat allergy is the so-called desensitization therapy, which includes injection of specific allergens into an individual. Yet, before being able to start the treatment, the patient-specific allergens must first be recognized. Then the patient is injected repeatedly with low doses of the allergens. This approach involves discomfort and may require as many as 50 visits to a clinical practitioner. Moreover, the allergen to which the patient is hypersensitive cannot always be identified, making desensitization treatment impossible.

In addition to the drawbacks mentioned above neither of the above approaches guarantees elimination of the hypersensitive state. Likewise, neither can protect against the development of a hypersensitive state.

Apart from more and more people developing allergy to agents encountered in the environment, such as pollen, fabric etc. the number of consumers suffering from food allergy is steadily increasing. Particularly, serious problems are met with allergic reactions to cereals, nuts or milk since these products are consumed as the staple food in most countries and contain a high number of potential proteinaceous allergens.

For treating food allergy different approaches have been taken so far. One such approach aims at excluding the allergenic food material from the daily diet, which, however, proves difficult to accomplish in practice, since it requires strict diet revision, usually involving restrictive measures and may eventually affect the quality of life and/or inhibit the expected growth of young kids or newborns.

Another approach involves modifying the source of the allergenic material itself such that its allergic potential is reduced. This is generally achieved by depleting the food material of the

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

3

allergenic component, which often raises problems in that the specific antigenic substance (allergen) in the food material is frequently not known so that in most cases it is not clear which component should be selectively removed. Another way to modify the allergenicity of the food material is to treat said food material in a specific way, such as by heat or by proteolytic enzymes.

In this respect US-P-4,293,571 discloses the preparation of a hypoallergenic composition, wherein a proteinaceous material is subjected to a hydrolysis treatment, the remaining, non hydrolysed proteins are subjected to coagulation by heat treatment followed by an ultrafiltration step to eliminate the coagulated material and macropeptides that might constitute allergens.

The problems encountered with food allergy are even more prominent in newborns, since they are not able to unambiguously communicate their discomfort to the attending person so that the allergic condition is most often detected only due to noticeable allergic symptoms, such as atopic dermatitis, respiratory and/or gastrointestinal troubles.

The prevention of the allergic material may include several constraints in the household and specific living rules for these infants. However, the key precaution in their diet is to avoid sensitization by native proteins. E.g. it has been shown that by drastically reducing the ingestion of native cow's milk proteins, the incidence of cow's milk allergy could be dramatically decreased.

Whatever the dietary option, the completion of immune tolerance to the milk proteins cannot be finally ensured without challenging the immune system with the blamed proteins. Until now, the tolerance status can only be checked by extrapolation, when infants do not manifest specific allergic response, after either local (Prick tests) or systemic challenge (DBPCFC).

Consequently, the problem of the present invention is to overcome the drawbacks of the prior art and to provide a novel means to treat or prevent allergic symptoms.

The problem has been solved by providing a method for inducing tolerance to a given antigenic material in an individual, which comprises administering to an individual an antigenic material

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

4

and a substance raising the COX-2 activity in the individual's cells, in particular in cells involved in an immune reaction, such as lymphocytes, and/or increasing the IFN- γ level.

In the figures,

Fig. 1 shows the modulation of the cellular immune response by drug and nutrient treatments during tolerisation;

Fig. 2 shows a modulation of the humoral immune response to BLG by drug and nutrient treatments during tolerisation;

Fig. 3 shows measurements of PGE₂ and IFN- γ for assessing oral tolerance.

COX-2 is an enzyme catalyzing inter alia the synthesis of prostaglandins from arachidonic acid. Other known substrates for COX-2 include dihomo-gamma-linolenic acid (20:3n:6) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n:3) producing PGE₁ and PGE₃, respectively.

The human COX-2 gene has been cloned and its genomic pattern and the responsiveness of its gene expression to different elements, such as cAMP, NF- κ B and TGF- β , IL-1 or TNF- α has been described.

According to the present invention the term "increasing the COX-2 activity" is to be understood as increasing the enzymatic activity itself, such as by increasing the amount of cofactors or improving cooperation with the said cofactors, or by increasing transcription and/or translation of the protein in the cells or simply by increasing the amount of substrate.

Likewise, the term adverse immune reaction shall be understood as comprising any immune reaction detrimental to the individual, such as allergic reactions, auto-immune reactions and organ rejections.

In addition, the term cells of an individual shall comprise all cells, expressing COX-2 and which are involved in tolerogenic activities. These cells include in particular cells involved in immune reactions, such as antigen presenting cells, lymphocytes, in particular T-lymphocytes,

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

5

neutrophils, granulocytes, monocytes etc.

The antigenic material to be given to an individual may be general food material itself, self material or non-food non-self material. Examples for such food materials are milk, egg, soja, peanut, crustacean, fish, meat, sesame, whey, berries or apples.

As the self material any material endogenous to the individual may be mentioned, such as collagen, insulin, myelin binding protein, myelin, acetylcholine receptor, retinoid binding protein or polypeptides synthesized in the body.

The non-food non-self materials may be any materials originally exogeneous to individual and capable of eliciting adverse immune reactions. Examples for such materials are allergenic materials such as pollen, dust mite, iodine, nickel, copper, venoms or latex, all sorts of detergents, cosmetics, parfumes, plaster, drugs such as antibiotics, and also alloantigens such as transplantation antigens. As for alloantigens a patient, which is to receive such alloantigens, e.g. transplantants, such as organs, could be administered the alloantigen and the substance increasing the COX-2 activity before transplantation takes place, so as to reduce or essentially minimize an rejection of the transplant by the patients immune system. This may be achieved by administering parts of the transplant, such as cellular material thereof comprising the respective HLA antigens of the transplant and the objective substance to a patient so as to teach the patient's immune system to tolerize the transplant to come.

The substance for increasing the COX-2 activity in the individual's cell, in particular in cells involved in an immune reaction, such as lymphocytes may be any substance capable of performing such an effect. Those substances may be easily identified by means of their effect on the synthesis of e.g. PGE₂ (prostaglandin E₂) from arachidonic acid in T-lymphocytes, which may be assayed by common enzymatic immunoassays.

According to a preferred embodiment such a substance, capable of effecting an increased activity of COX-2 in an individual's cells and optionally also an increased level of IFN- γ may be selected from the group comprising butyrate, n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as arachidonic acid or ceramides.

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

6

The objective substance may be given to an individual separately or together in a single product.

To this end, the objective substance and the antigenic material may be included in any known pharmaceutical composition, such as tablets, sachets, solutions, capsules etc. which contain the carriers and excipients required and desirable for the corresponding route of administration. Such routes of administration include topical, nasal, oral, intravenous or intraperitoneal administration.

The antigenic material may be pretreated as desired. For instance, instead of including the entire material effecting an adverse immune reaction into the pharmaceutical composition the respective antigenic compound contained in the material, or parts thereof, such as e.g. particular allergenic peptides, may be isolated and these compounds may be included in the pharmaceutical composition.

The objective substance may also be included in a food material. In this case three alternatives are conceivable.

First, an antigenic non-food self or non-self material is included in a common food material together with the objective substance. This embodiment therefore contemplates addition of a known antigen, such as mentioned above in a food material, supplemented with an objective compound. As such food materials any liquid, such as water or even milk, jellies, sweets etc. may be proposed.

As a second alternative the food material may represent the antigenic material as such, that is, the food material inherently contains the potentially allergenic material. In this case, in order to arrive at a composition according to the present invention, the objective substance may simply be added to the food material. As such a food material any food to which an individual may develop an allergic reaction is embraced, including any kinds of berries, apples, peaches, etc.. In particular food products derived from cereals or cow's milk will represent a preferred kind of food, since these food products are known to contain highly allergenic compounds. Examples for such food products are yogurt, curd, cheese, fermented milks, milk based fermented products, ice

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

7

cream or cereal products, such as fermented cereal based products, milk based powders, drinks, water-based jellies, infant formulae or even pet food.

The present invention, therefore, provides a novel and intriguing concept for inducing oral tolerance to a given antigen, preferably to a potentially allergenic food material, in an individual by simply including into the food material a substance capable of increasing COX-2 activity in the individual's cells, in particular in cells involved in immune reactions, such as lymphocytes, preferably T-cells, and optionally capable of increasing the IFN- γ level.

Therefore, the present invention teaches a method for inducing oral tolerance to a food material in an individual. This concept is particularly suitable in newborns which are about to develop tolerance or allergy to a food material. In applying the teachings of the present invention, an infant formula may be provided to which newborns won't develop an allergic reaction. What is more, the immune system of the newborns will rather be taught to tolerate said cow's milk proteins so that no problems will arise when feeding the newborns with the corresponding food material.

Alternatively, an antigenic component may be added to any other food material desired. For example, peanuts or the relevant allergenic components thereof may be added to fermented milk products, such as a yogurt in order to provide a yogurt with peanut taste and, by including the objective substance, the desired regimen. This applies likewise to the addition of pieces of berries, apples etc to such fermented milk products.

As will be appreciated the compositions of the present invention are perfectly suited to combat the development of allergy in an individual before it may arise. Without wishing to be bound to any theory it is believed that the concurrent exposure of the immune system to the antigen together with inducing a biological step involved in suppressing an exceeding immune reaction to said material teaches the immune system in general not to adversally react to the specific antigen presented. Thus, the concept underlying the present invention basically resides in modulating the biochemistry/metabolism of an individual's cells implicated in the oral tolerance induction, preferably of cells involved in an immune reaction. This concept can be further applied to auto-immune diseases (self material or self antigen) and to tolerance development to

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

8

specific non-food, non-self antigens.

According to the present invention it is therefore possible not only to prevent the onset of allergy but also to treat an already existing allergic condition, by "teaching" the immune system not to react to a material, that is concurrently presented with a substance capable of increasing COX-2 activity in cells of an individual, preferably cells involved in an immune reaction, and optionally increasing the IFN- γ level.

It will be understood that the amount of the objective substance in the pharmaceutical or food composition will be sufficient to yield the desired effect, that is to effect an increase in activity of COX-2 in the respective cells of the individual, preferably in lymphocytes, more preferably in T-lymphocytes, and optionally effecting an increase in the IFN- γ level in peripheral tissues, such that the individual's immune system will effectively be taught to tolerate the antigenic material once recognized as a foreign antigen to which a surpassing immune response is elicited.

According to another embodiment the present invention provides a method for determining an individual's predisposition to develop an allergic reaction to an antigenic material, which comprises, taking a blood sample from an individual, which may be optionally treated to collect the cellular material of the sample comprising lymphocytes. This may easily be effected by e.g. collecting the cells via a column or by transferring the blood sample in a culture medium thus preparing a primary culture and cultivating the cells present in blood. In a subsequent step the sample or the blood cells, in particular the lymphocytes, more particular the T-lymphocytes, are contacted with the antigenic material followed by the determination of COX-2 activity in the sample or the cells, respectively, and optionally determining the level of IFN- γ in the sample, and comparing said levels with a control, which may be a general calibration curve or preferably the same sample that had not been exposed to the antigenic material.

An increased COX-2 activity, as compared to the control and also an increase in IFN- γ level will indicate that the individual, from which the sample has been taken, will not produce an substantial, i.e. exceeding or adverse immune reaction to said antigenic material, but will rather tolerate it. On the other hand, an essentially decreased level of COX-2 activity, and an essentially

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

9

decreased level of IFN- γ will indicate that the individual will develop an adverse reaction to this material.

The above method has fundamental advantages over the prior art, since a direct challenge of the individual with the antigenic material is avoided. Therefore, the patients or individuals to be tested do not need to develop allergic symptoms in order to assess their corresponding tendency, which also reduces the risks associated with said types of tests. Further, since the present method relies on measurements on the cellular and molecular levels, this assay is much more sensitive as compared to assessing, whether an individual will develop allergic symptoms. Another advantage resides in that the present methods allows to examine already young kids and even newborns, without putting them to danger.

The following examples will illustrate the invention in more detail, without limiting it thereto.

The following materials were used and methods applied:

Animals

Female Balb/c mice, obtained from IFFA-Crédó (L'Abresle, France), were used for all experiments performed on three week old mice. All mice were bred and raised on a cow's milk free diet. For all experiments, mice were weighed on the day they were fed, in order to determine the gavage amount according to their body weight.

Antigens

BLG (bovin lactoglobuline; 3 x crystallised) and OVA (ovalbumin; Grade V) were obtained from Sigma Chemical Co.. Whey protein concentrate (Lacprodan 80) was obtained from Danmark Protein AS (MD-Foods). It was produced by ultrafiltration of acid whey, and the protein content was 80%.

Statistics

Serig IgE responses were compared using ANOVA single factor tests. Significance was reached with $p < 0.05$.

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

10

Example 1**Treatment of mice**

To start the experiment the mice were forced fed and/or injected i.p. with butyrate (which promotes COX-2 activity), ibuprofen (which inhibits COX activity) or saline (control) daily from day -3 to day 4. On day 0, the mice were fed by gastric feeding whey proteins (3mg/g of body weight) or same volume of saline water. Gavage products were dissolved in 0.3 ml of saline water. At day 4 of each experiment, all mice were immunised by intra-peritoneal injection of 0.08 mg of BLG as well as 0.08 mg of OVA in 0.04 ml sterile saline mixed with 0.16 ml 2 % Al(OH)₃ (Superfos Biosecotr A/S, Denmark).

At day 4 or at day 26, blood samples were obtained from cardiac aortic puncture under 3 % Isoflurane anaesthesia (Abbott SA). Immediately after death, obtained by cervical dislocation, spleens were removed and pooled according to group of treatment in 20 ml chilled RPMI supplemented with 5% FCS. Spleen cell solutions were homogenised through a cellular sieve (Falcon) and purified from red cells using Histopaque density centrifugation (Sigma) at 390 x g for 20 min. Cells were co-cultured in 96-well flat-bottom microtitre plates (Costar), for 48 hours at a concentration of 5×10^6 cells/ml in RPMI 1640 (Bioconcept) supplemented with 2 mM L-Glutamine (Seromed), 100 U penicillin/100 mg streptomycin (Seromed), 10 % FCS (Bioconcept) at 37°C in 5% CO₂, in the presence of 5, 2.5, 0.5, or 0.1 mg/mL of BLG (Sigma) or 250, 50, 10, 2 µg/mL of phytohaemagglutinin A (Seromed). (³H)Tdr (Amersham, Zurich) was added for the final 6 hours of culture and the plates were harvested and analysed by scintillation counting (TopCount, Canberra Packard, Zurich). (³H)Tdr incorporation results were expressed in cpm, as a mean of triplicate cultures, the blank-subtracted mean was then plotted against BLG concentration. Stimulation indices were calculated as the ratio of blank-subtracted test and control values at 2.5 mg BLG/mL and 50 µg PHA/mL.

Specific proliferation assays were performed for each group. Isolated serum were rapidly frozen at -20°C, until assayed for IgE specific for BLG.

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

11

Example 2**Measurement of specific IgE antibody by ELISA**

Serum samples were assayed in duplicate for anti-BLG IgE by ELISA. Briefly, microtitre plates (NUNC Immunoplate Maxisorp F96, Denmark) were coated with 100 μ L per well of BLG 0.5 mg/mL diluted in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4°C. Four washing steps with PBS-Tw (Phosphate-Buffered Saline-Tween 0.05%) were performed before each successive reagent addition. Unoccupied sites on the plate were blocked by 200 μ L per well of 0.5% fish gelatin (Sigma) in PBS-Tw for 1 hour at RT. Serial dilutions of samples (three fold for serum) from individual mice were assayed in duplicate. Sera were first diluted 1/20 in PBS-Tw before the assay. After addition of sample dilutions and incubation for 1 hour at room temperature, a rat anti-mouse IgE peroxidase labelled antibody (Harlan Sera-Lab, USA) was added for 2 hours, followed by the OPD substrate (Sigma). Optical densities were measured at 492 nm, after 15 min of incubation at room temperature, using a Dynatech MR500 ELISA reader (Dynatech, Embrach-Embraport, Switzerland). Pooled samples from twenty non immunized female mice were used as negative controls in each plate. The cut-off dilutions were determined by calculating the dilution of the samples which gave twice the absorbance of the negative controls. Titers were expressed as the \log_{10} of the reciprocal of the cut-off dilution.

Example 3**Cytokine ELISA**

Cytokine secretions were induced in 96-well microtitre plates (Costar), where 5×10^5 spleen cells were stimulated with 2.5 mg/mL BLG per well. Cell culture supernatants were collected after a 48 hour stimulation. IFN- γ levels were measured using cytokine specific ELISA kit Endogen; which were performed according to the manufacturers' instructions. All cytokine samples were assayed in duplicate.

Example 4**Prostaglandin E₂ and interferon-gamma measurement**

PGE₂ levels in the culture media, from lymphocytes cultured for 6 hrs or 12hrs, were determined by using an enzyme immunoassay (EIA) kit (Cayman Chemical,). Triplicate samples were assayed each at two dilutions.

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

12

Inducing tolerance by feeding mice with Whey proteins resulted in an increased PGE₂ and INF- γ production by BLG-stimulated lymphocytes in culture as compared to non-tolerised controlled mice, 5 days after tolerisation.

This production of PGE₂ and INF- γ is not observed when mice are treated with ibuprofen, an inhibitor of COX. On the other hand, mice treated with butyrate exhibit a further increased production of both PGE₂ and INF- γ compared to the positive control - Whey proteins fed mice.

Example 5

Proliferation

Inducing tolerance by feeding mice with Whey proteins results in a decreased proliferative response index, 4 days post-tolerisation (Figure 3). A stimulation index below 0.5 indicates that mice have been tolerised. This decreased of proliferative response index is not observed when mice are treated with ibuprofen, an inhibitor of COX. On the other hand, mice treated with butyrate exhibited a further decreased of proliferative response index as compared to the positive control - Whey proteins fed mice.

Similar and stronger results were observed at day 26 post-tolerisation in mice that had been challenged with BLG 4 days after feeding the tolerogen.

Example 6

IgE

Inducing tolerance by feeding mice with Whey proteins resulted in a decreased of humoral anti-BLG IgE titres, 26 days post-tolerisation. This decrease was statistically significant ($p < 0.05$) as compared to non-tolerised mice. This decreased humoral anti-BLG IgE titres is not observed when mice are treated with ibuprofen, an inhibitor of COX (see fig. 2).

On the other hand, mice treated with butyrate exhibit a further decreased of humoral anti-BLG IgE titres compared to the positive control - Whey proteins fed mice. This further decrease in humoral anti-BLG IgE titres was statistically significant ($p < 0.05$) compared to tolerised mice (positive control)

WO 02/051437

PCT/EP01/15129

13

Claims

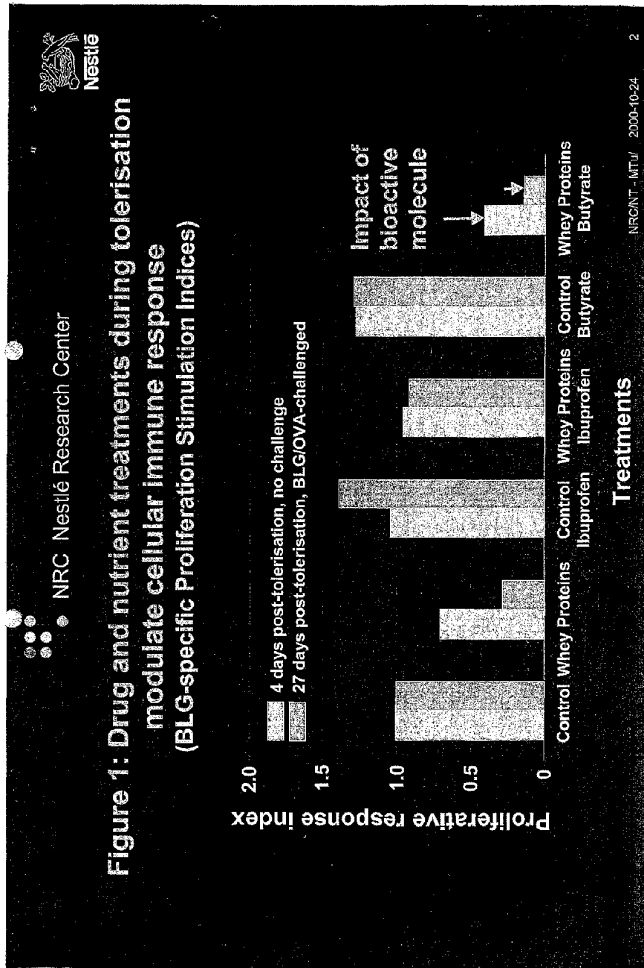
1. A method for inducing tolerance to an antigenic material by administering to an individual the antigenic material or antigenic parts thereof, and at least one substance increasing the activity of COX-2 in cells of the individual and/or increasing the level of IFN- γ .
2. The method according to claim 1, wherein the antigen is food materials, self materials, or non-food non-self materials.
3. The method according to claim 2, wherein the food material is derived from milk, egg, soja, nuts, crustacean, fish, meat, sesame, whey, berries or apples.
4. The method according to claim 2, wherein the self material is selected from the group consisting of collagen, insulin, myelin binding protein, myelin, acetylcholine receptor, retinoid binding protein or polypeptides.
5. The method of claim 2, wherein the non-food non-self material is selected from the group consisting of pollen, dust mite, iodine, nickel, copper, venoms, latex, detergents, cosmetics, perfumes, plaster, antibiotics or alloantigens.
6. The method according to any of the preceding claims, wherein the at least one substance, capable of increasing the COX-2 activity in cells of the individual and optionally the level of IFN- γ is selected from the group consisting of butyrate, n-6 PUFA, ceramides, plant extracts or bacterial materials.
7. A food or pharmaceutical composition containing an antigenic material or antigenic parts thereof and at least one substance capable of increasing the activity of COX-2 in cells of an individual.

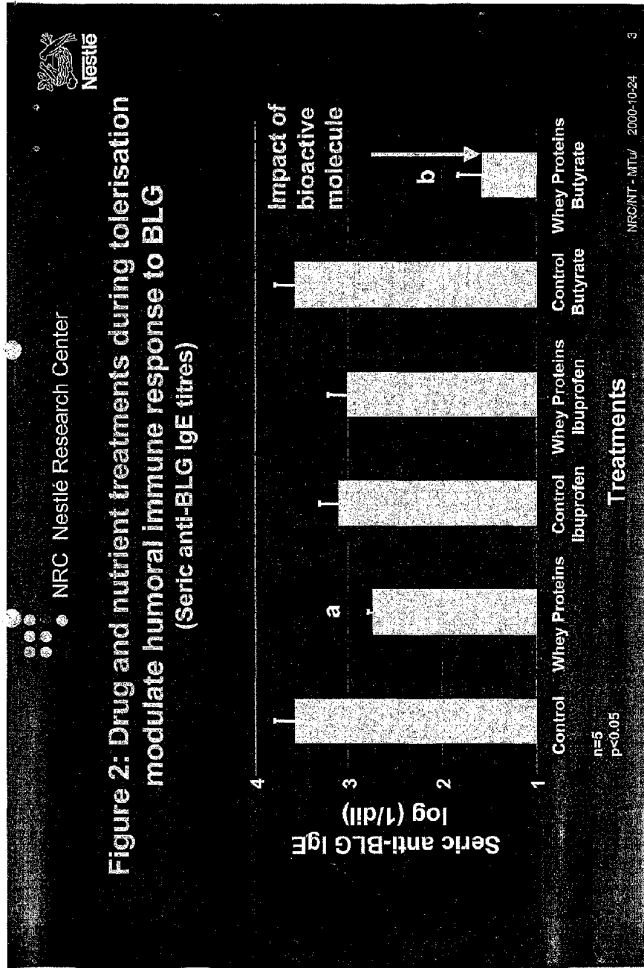
WO 02/051437

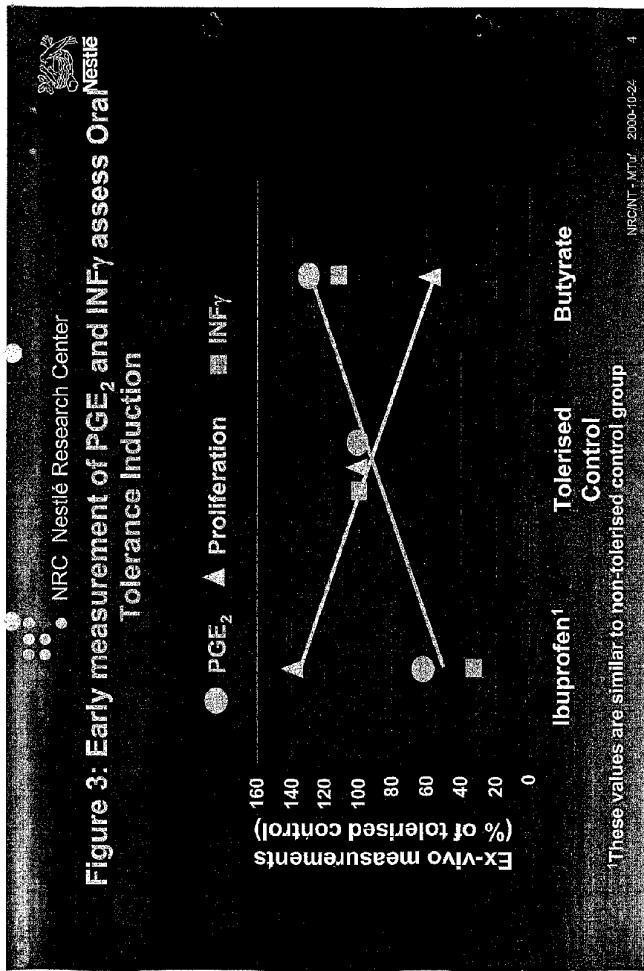
PCT/EP01/15129

14

8. The food composition according to claim 7, which is selected from the group consisting of milk, yoghurt, curd, cheese, fermented milks, milk based fermented products, ice cream, fermented cereal based products, milk based powders, drinks, water-based jellies, infant formulae or even pet food.
9. The composition according to claim 5, wherein the at least one substance capable of increasing the COX-2 level in cells of an individual and optionally the level of IFN- γ is selected from the group consisting of butyrate, n-6 PUFA, ceramides, plant extracts or bacterial materials.
10. Use of a composition according to any of the claims 7 to 9 for preventing an individual's tendency to develop immune reactions against an antigenic material contained in said composition.
11. A method for determining an individual's tendency to develop adverse immune reactions to a given material, which comprises
 - (a) taking a blood sample from an individual,
 - (b) optionally collecting the cellular material of the sample comprising lymphocytes,
 - (c) contacting the sample with the antigenic material, and
 - (d) determining the activity of COX-2, and/or evaluating the level of IFN- γ , and
 - (e) comparing the levels determined with a control,wherein an increased COX-2 activity and an increased of IFN- γ is an indication for tolerance to said material.
12. The method according to claim 11, wherein the material, that is tested for its tolerogenicity is a food material.
13. The method according to claim 11, wherein the food material is selected from the group consisting of milk, yoghurt, curd, cheese, fermented milks, milk based fermented products, ice cream, fermented cereal based products, milk based powders, drinks, water-based jellies, infant formulae or even pet food.







【手続補正書】

【提出日】平成15年8月20日(2003.8.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原性物質又はその抗原性部分と、個体の細胞のCOX-2(シクロオキシゲナーゼ2)の活性及び/又はIFN-(インターフェロン)レベルを増大させる少なくとも1つの物質とを個体に投与することによって、抗原性物質に対する寛容を誘導する方法。

【請求項2】

前記抗原が食品材料、自己の物質、又は食物でない非自己の物質である請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記食品材料が乳、卵、大豆、木の実、甲殻類、魚、肉、ゴマ、乳清、ベリー、又はリンゴ由来である請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記自己の物質が、コラーゲン、インスリン、ミエリン結合タンパク質、ミエリン、アセチルコリン受容体、レチノイド結合タンパク質、又はポリペプチドからなる群から選択される請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記食物でない非自己の物質が、花粉、チリダニ、ヨウ素、ニッケル、銅、毒液、ラテックス、洗剤、化粧品、香水、プラスター、抗生物質又は同種抗原からなる群から選択される請求項2に記載の方法。

【請求項6】

前記個体の細胞中のCOX-2活性を増大させることができ、任意でIFN-レベルを増大させることができる少なくとも1つの物質が、ブチレート、n-6PUFA(n-6多価不飽和脂肪酸)、セラミド、植物抽出物、又は細菌性物質からなる群から選択される、前記いずれかの請求項に記載の方法。

【請求項7】

前記いずれかの請求項に記載の、寛容を誘導するための方法で使用する食物組成物又は薬剤組成物であって、その組成物が抗原性物質又はその抗原性部分と、個体の細胞中のCOX-2活性を増大させることができる、少なくとも1つの物質とを含む上記食物組成物又は薬剤組成物。

【請求項8】

乳、ヨーグルト、凝乳(カード)、チーズ、発酵乳、乳ベースの発酵製品、アイスクリーム、発酵させた穀物ベースの製品、乳ベースの粉末、飲料、水ベースのゼリー、幼児用の粉ミルク、又はペット食品からなる群から選択される、請求項7に記載の食物組成物。

【請求項9】

個体の細胞中のCOX-2レベルを増大させることができ、任意でIFN-レベルを増大させることができる少なくとも1つの物質が、ブチレート、n-6PUFA、セラミド、植物抽出物、又は細菌性物質からなる群から選択される、請求項7に記載の組成物。

【請求項10】

抗原性物質又はその抗原性部分と、個体の細胞中のCOX-2活性を増大させることができる、少なくとも1つの物質とを含む薬剤組成物。

【請求項11】

乳、ヨーグルト、凝乳(カード)、チーズ、発酵乳、乳ベースの発酵製品、アイスクリーム、発酵させた穀物ベースの製品、乳ベースの粉末、飲料、水ベースのゼリー、幼児用の

粉ミルク、ペット食品からなる群から選択される、請求項 10 に記載の薬剤組成物。

【請求項 12】

個体の細胞中の COX - 2 レベルを増大させることができ、任意で IFN - レベルを増大させることができる少なくとも 1 つの物質が、プチレート、n - 6 P U F A、セラミド、植物抽出物、又は細菌性物質からなる群から選択される、請求項 10 に記載の薬剤組成物。

【請求項 13】

個体が前記組成物に含まれる抗原性物質に対する免疫反応を発生する傾向を防止するための、請求項 7 から 12 までに記載の組成物の使用。

【請求項 14】

(a) 個体から血液試料を採取すること、

(b) リンパ球を含む試料の細胞性物質を任意で回収すること、

(c) 試料を前記抗原性物質と接触させること、

(d) COX - 2 活性を決定し且つ / 又は IFN - レベルを評価すること、及び

(e) 決定したレベルをコントロールと比較すること

を含む、個体が所定の物質に対する有害な免疫反応を発生する傾向を判定する方法であって、COX - 2 活性の増大及び / 又は IFN - の増大が前記物質に対する寛容の指標である上記方法。

【請求項 15】

寛容原性の検査対象である前記物質が、食品材料である請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記食品材料が、乳、ヨーグルト、凝乳（カード）、チーズ、発酵乳、乳ベースの発酵製品、アイスクリーム、発酵させた穀物ベースの製品、乳ベースの粉末、飲料、水ベースのゼリー、幼児用の粉ミルク、又はペット食品からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/EP 01/15129										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/39 A61P37/00												
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) IPC 7 A61K												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, MPI Data, PAJ, EPO-Internal, FSTA, MEDLINE, PASCAL, LIFESCIENCES, CHEM ABS Data, CAB Data, EMBASE												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1982 LIFSCHITZ M.D.: "LLC-PK-1 CELLS DERIVED FROM PIG KIDNEYS HAVE A DEFECT IN CYCLO OXYGENASE" Database accession no. PREV198376063994 XP002170863 abstract & JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 257, no. 21, 1982, pages 12611-12615, ISSN: 0021-9258 --- -/-											
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents:												
<table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*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 (see specification)</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*Z* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*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 document 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 (see specification)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered 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	*Z* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
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 document 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 (see specification)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered 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	*Z* 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 18 April 2002	Date of mailing of the international search report 03/05/2002											
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2240, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Rempp, G											

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Initial Application No PLI/EP 01/15129
C:(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1992 CALDER P C ET AL: "THE INHIBITION OF T-LYMPHOCYTE PROLIFERATION BY FATTY ACIDS IS VIA AN EICOSANOID-INDEPENDENT MECHANISM" Database accession no. PREV199293088474 XP002170864 abstract & IMMUNOLOGY, vol. 75, no. 1, 1992, pages 108-115, ISSN: 0019-2805</p>	
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199711 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 1997-115205 XP002170865 & JP 09 002958 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD), 7 January 1997 (1997-01-07) abstract</p>	

International Application No. PCT/JP 01/45129

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 1-6 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 1-6

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Int'l Application No
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	PCT/EP 01/15129
JP 9002958	A	07-01-1997	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/16	A 2 3 L 1/30	B 4 C 0 8 7
A 6 1 K 31/185	A 6 1 K 31/16	4 C 0 8 8
A 6 1 K 31/24	A 6 1 K 31/185	4 C 2 0 6
A 6 1 K 33/18	A 6 1 K 31/24	
A 6 1 K 33/24	A 6 1 K 33/18	
A 6 1 K 33/34	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 33/34	
A 6 1 K 35/20	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/56	A 6 1 K 35/20	
A 6 1 K 35/78	A 6 1 K 35/56	
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 35/78	
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	Z
A 6 1 K 39/36	A 6 1 K 39/36	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 K 37/02	

(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 トゥリーニ、マルコ
 スイス国 エパリンジェ、シェマン デュ ボワ - ミュラ 20
 (72) 発明者 ジェルマン、ブルース
 スイス国 フォレル/ラヴォー、レジダンス ラ ベルジェリー
 (72) 発明者 ベケ、ソフィー
 スイス国 ローザンヌ、シェマン デ ポー ヴァル、22

Fターム(参考) 4B001 EC05
 4B018 MD52 MD57 MD58 MD69 MD70 MD71 MD72 MD74 ME07
 4C084 AA02 AA14 AA20 BA01 BA08 BA23 BA41 CA13 CA17 CA18
 CA38 CA41 CA45 CA47 DB34 MA02 MA52 NA05 NA14 ZB071
 4C085 AA02 BA01 BB04 BB06 BB07 BB11 CC03 CC04 CC16 CC21
 EE03 GG08
 4C086 AA01 AA02 HA01 HA09 HA10 MA02 MA04 MA52 NA05 NA14
 ZB07
 4C087 AA01 AA02 BB16 BB29 BB33 BB39 CA03 CA17 MA02 MA52
 NA05 NA14 ZB07
 4C088 AB01 AB11 AC03 BA06 MA02 MA52 NA05 NA14 ZB07
 4C206 AA01 AA02 DA04 DA12 DB03 DB42 GA01 GA06 GA21 MA02
 MA04 MA30 MA72 NA05 NA14 ZB07