



연세대학교 의과대학
세브란스병원
내과학교실

120-752 서울특별시 서대문구 성산로 250 (신촌동 134)
전화 : (02) 2228-1930, 1931
팩스 : (02) 393-6884
E-mail : medi@yuhs.ac

DEPARTMENT OF INTERNAL MEDICINE
SEVERANCE HOSPITAL
YONSEI UNIVERSITY COLLEGE OF MEDICINE
SEOUL, 120-752, KOREA

250 Seongsanejo, Seodaemun-Ku,
(134 Shinchon-Dong) Seoul 120-752 Korea
TEL : (02)-2-2228-1930, 1931
FAX : (02)-2-393-6884
E-mail : medi@yuhs.ac

May, 2nd, 2011

1. Test: Blocking effects of allergen penetration of NOSK®
2. Summary:

We certify that the intranasal filter, NOSK® can effectively block the penetration of house dust mite (84.3% reduction of house dust mite protein by protein assay method, 73% reduction of house dust mite allergen by ELISA inhibition assay) and oak pollen (95.0% reduction of oak pollen allergen by protein assay method) particles as demonstrated through using the customized airflow chamber.

Prof. Jung-Won Park, MD., PhD.

Dept. Internal Medicine, Yonsei University, College of Medicine

Seoul, Korea 120-752

Tel; 82-2-2228-1961

Fax; 82-2-2227-7932

Email; parkjw@yuhs.ac

Test Report

Test object: Intranasal filter, NOSK®

Test: Blocking effects of allergen penetration via intranasal filter, NOSK®

Materials and methods

I. Materials

Two kinds of allergenic particle were used. One is house dust mite culture media powder (HDMCM, culture media of *Dermatophagoides farinae*) that containing abundant house dust mite allergens was kindly provided by the Arthropodes of Medical Importance Resource Bank & Institute of Tropical Medicine. The second is oak tree pollen powder provided by Institute of Allergy in Yonsei University College of Medicine.

We made a customized chamber for this test. This chamber consisted of two compartments which were divided by a 72-holed acryl plate (Fig 1). We placed 36 pairs of NOSK® on the 72-holes at acryl plate. An anemometer was placed in front compartment to measure the speed of airflow. A filter paper was placed at opposite side of the rear chamber to measure the amount of penetrated allergens (Fig. 2).

II. Methods

Test for blocking effects of allergen penetration via NOSK®

1) Test procedure

For each allergenic powder, tests were conducted two times with/without NOSK® at 72-holed at acryl plate. Initially 20 g of allergenic powder was loaded at the front chamber without NOSK®. Once turned on the air blower, continuous airflow was maintained with 0.53~1.92 m/sec speed for 30 minutes. The speed of airflow of the chamber was changed as the nasal filters were fitted (0.84~1.92 m/sec without NOSK®, 0.53~0.72 m/sec with NOSK®). Filter paper at rear chamber was used to collect the penetrated particles. We extracted proteins from the filter paper and used following assays.

2) Extraction of allergens and protein assay

Each filter paper from rear chamber was incubated with 2 mL of 0.1M bicarbonate buffer solution (pH 8.0) in 50 mL tube using orbital shaker. Protein extraction was performed for 18

hours at room temperature. Finally we collected supernatants after centrifugation of the extracts (3000 rpm, 20 min) and use them in following assays. We performed Bradford protein assay (Bio-rad, CA) to measure the total protein content in the extract solution.

3) ELISA inhibition assay

96-well ELISA plate was used. We coated each well with 100 μ L of *D. farinae* crude extract in carbonate buffer (pH 9.6) (10 μ g/mL concentration) and incubated overnight at 4°C. Pooled serum of *D. farinae* sensitized patients (n=5) were incubated with serially diluted protein extract solution from the filter papers as inhibitor for 24 hours. Blocking with bovine serum albumin, we loaded inhibitor mixed sera 100 μ L in each well as primary antibody. One hour later, 1:1000 diluted anti-human IgE antibody (Vector, CA) was added and visualized with tetramethylbenzidine and microwell peroxidase substrate (KPL, USA). Optical density was read by spectrophotometer (Molecular devices, Korea) with 450 nm UV light. Finally we calculate the % of inhibition according to the added inhibitor concentration.

III. Results

1) Gross inspection

After the procedure we observed the inside of both chambers. In the front chamber we could easily find allergenic particles those could not pass through NOSK® filter (Fig. 3). On the other chamber, it was hard to find allergenic powder in gross inspection.

2) Bradford protein assay for the extractions

The protein content of house dust mites culture media in the extraction was decreased from 1,200 mg/ml to 189 mg/ml (84.3% reduction) by adapting NOSK® filters. The oak pollen protein content was decreased from 1,200 mg/ml to 60 mg/ml (95.0% reduction) (Fig. 4).

3) ELISA inhibition assay for the extractions

We observed dose-dependent increment of inhibition ratio in both settings with/without NOSK® filter. Especially at 1:1 concentration between atopic pooled serum and the extract solution from the filters with NOSK® showed 38% inhibition of specific IgE binding to *D. farinae* allergens. Its potency was same as 1:0.27 concentration of none filter condition. This result suggested that NOSK® filter could reduce penetration of house dust mite allergen by 73% compared by non-filter condition.

IV. Figures

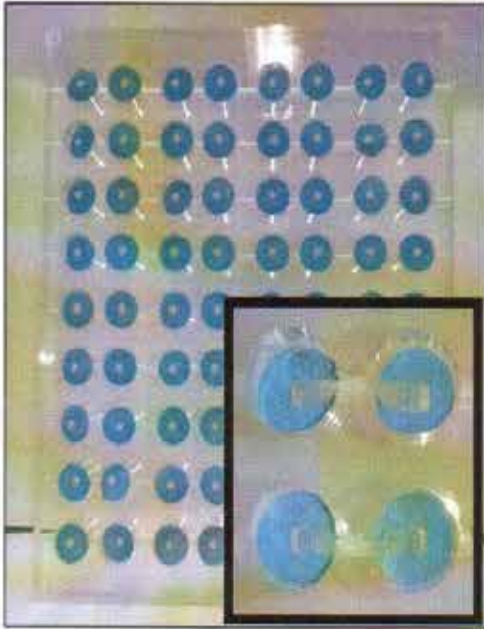


Figure 1. 72-holed acrylic plate that divide chamber to two compartments (36 pairs of NOSK® filters were placed.)

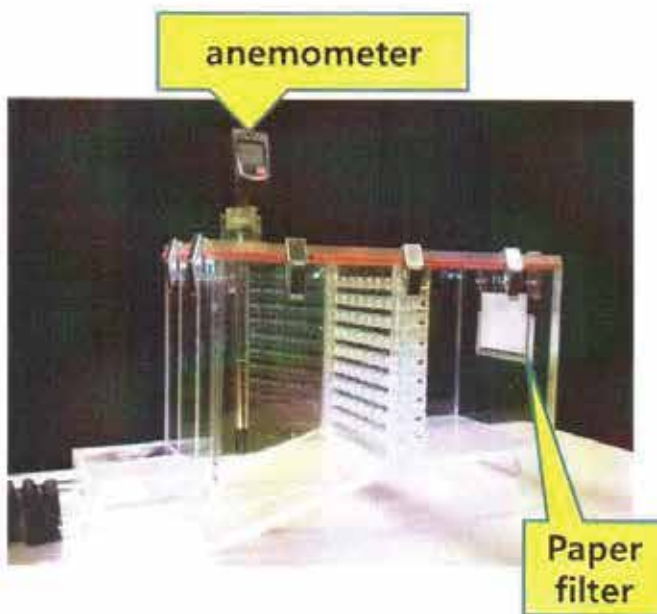


Figure 2. Customized chamber used in this experiment. An anemometer and a filter paper were placed.

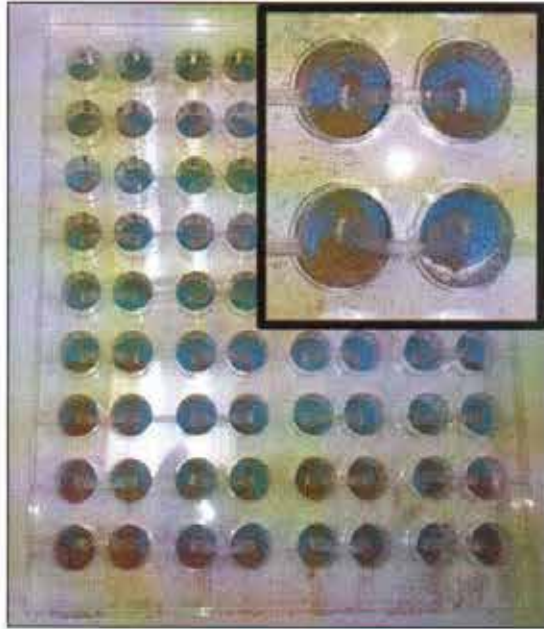


Figure 3. Gross inspection of 72-holed acrylic plate. Large amount of allergenic particles could not pass through NOSK® filters were noted.

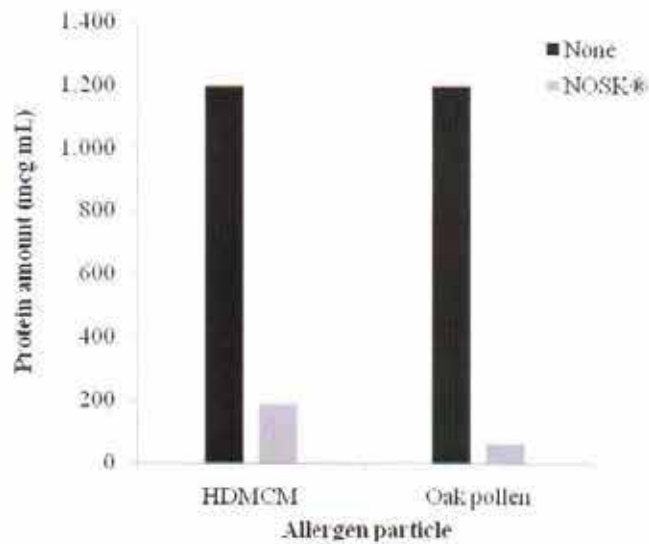


Figure 4. Total protein amounts measured by Bradford assay were remarkably decreased from the baseline in the experiments with HDMCM and oak pollen (84.3% and 95.0%), respectively. *HDMCM; house dust mite culture media particle



DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA
HOSPITAL DE EXPLORACIÓN
COLEGIO UNIVERSITARIO YONSEI DE MEDICINA

1- Test: Efectos de bloqueo por el filtro nasal Nosk, en la penetración de alérgenos.

2- Resumen:

Certificamos que el filtro intranasal Nosk®, puede bloquear con eficacia la penetración de las partículas de los ácaros del polvo doméstico (reducción del 84,3% de proteína ácaros del polvo doméstico usando el método de ensayo de proteínas; reducción del 73% del alérgeno del ácaro del polvo doméstico mediante el ensayo de inhibición por el método ELISA) y de las partículas del polen de roble (reducción del 95% del alérgeno del polen de roble por el método de ensayo de proteínas de Bradford), demostrado mediante el uso de una cámara de flujo de aire personalizada.

Objeto de la prueba: Nosk® filtro nasal

Prueba: Los efectos de bloqueo de la penetración de alérgenos con uso del filtro intranasal Nosk®

Material y métodos:

I) Materiales:

Se utilizaron dos tipos de partículas alérgicas. Una de ellas fue el ácaro del polvo doméstico en un medio de cultivo (HDMCM, medios de cultivo de Dermatophagoides Farinae), que contiene abundantes alérgenos de los ácaros del polvo, y que fue proporcionado generosamente por el banco de artrópodos del instituto de medicina tropical. El segundo es el polen del roble, proporcionado por el instituto de alergia del colegio universitario médico de Yonsei (Corea).

Nosotros hicimos un compartimento personalizado para este análisis. Este compartimento consistía en dos cámaras que se dividieron por una placa acrílica con 72 agujeros (figura 1). Colocamos 36 pares de filtros Nosk® en los 72 agujeros de la placa acrílica. Se colocó un anemómetro en el compartimento frontal para medir la velocidad del flujo del aire. Un papel de filtro se colocó en el lado opuesto de la cámara trasera para medir la cantidad de alérgenos penetrados (figura 2).

II) Métodos:

Prueba para bloquear los efectos de penetración de los alérgenos a través de Nosk®

1) Procedimiento de prueba:

Para cada polvo alérgico, se realizaron test cronometrados para el arrastre de alérgenos con y sin Nosk® en la placa acrílica con 72 agujeros. Inicialmente se cargó la cámara con 20gr de polvo alérgico, sin hacer uso de Nosk®.

Una vez encendido el ventilador de aire, se mantuvo un flujo de aire continuo de 0,53-1,92 m/seg durante 30 minutos.

La velocidad del flujo de aire de la cámara cambió cuando se colocaron los filtros nasales (0,84 a 1,92 m/seg sin Nosk® a 0,53 a 0,72 m/seg con Nosk®). El papel de filtro de la cámara posterior se utilizó para recoger las partículas penetradas. Se extrajeron las proteínas del papel de filtro y las utilizamos en los siguientes ensayos.

2) Extracción del alérgeno y ensayo de proteínas

Se incubó cada papel de filtro con 2ml de una solución 0,1M de tampón bicarbonato (pH 8,0) en un tubo de ensayo de 50 mL usando un agitador orbital. La extracción de proteínas se llevó a cabo durante 18 horas a temperatura ambiente. Finalmente se recogieron los sobrenadantes, después de la centrifugación del concentrado (3000rpm, 20 min) y los usamos en el seguimiento de los ensayos. Se realizó el ensayo de proteínas de Bradford (BioRad, CA) para medir la cantidad total de proteínas en la solución del concentrado.

3) Ensayo de inhibición método ELISA

Se utilizó un lector de microplacas para el ensayo ELISA con 96 pocillos. Se recubrió cada pocillo que contenía el extracto de *D.Farinae*, con 100µL de una solución tampón de carbonato (pH 9.6) (concentración 10 µ/mL) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los sueros agrupados de los pacientes sensibilizados a *D.Farinae* (n=5) se incubaron con la solución que contenía el extracto de proteína diluida en serie, de los papeles de filtro como inhibidor durante 24 horas. Bloqueamos con albúmina de suero bovino, y cargamos inhibidores de sueros mixtos, 100µL en cada pocillo, como anticuerpo primario. Una hora más tarde se añadió anticuerpo anti-humano de Ig E (Vector, CA) en una concentración diluida en 1:1000 y se visualizó con tetrametilbencidina, el sustrato de Peroxidasa en los micropocillos (KPL, USA). La densidad óptica se leyó con un espectrofotómetro (Molecular Devices, Corea) con luz UV 450nm. Finalmente calculamos el porcentaje de inhibición de acuerdo con la concentración de inhibidor añadido.

III) Resultados

1) Exploración macroscópica

Después del procedimiento se observó el interior de las dos cámaras. En la cámara frontal pudimos encontrar partículas alérgicas, que no pudieron pasar a través del filtro nasal Nosk® (figura 3). En la otra cámara, era difícil encontrar polvo alérgico en la exploración macroscópica.

2) Ensayo de proteínas de Bradford en las muestras

La cantidad de proteínas de los ácaros del polvo doméstico en el medio de cultivo, se redujo de 1200 mg/ml a 189 mg/ml (reducción del 84,3%), con el uso de Nosk®. El contenido de las proteínas del polen de roble, se disminuyó de 1200 mg/ml a 60 mg/ml (reducción del 95%) con el uso de Nosk®.

3) Ensayo de inhibición método ELISA para las muestras

Observamos con respecto al % de inhibición un incremento dosis-dependiente entre los dos ámbitos (con/sin Nosk). Especialmente en una concentración de 1:1 entre la mezcla mixta de sueros y la solución extraída de los filtros con Nosk®, donde se observó una inhibición del 38% en la unión de Ig E específica para los alérgenos *D.Farinae*. Su potencia fue igual a una concentración 1:0,27 con respecto a la situación sin ningún filtro. Este resultado sugiere que el filtro nasal Nosk® podría reducir la penetración del alérgeno del ácaro del polvo doméstico en un 73% en comparación con una situación sin filtro nasal.