

(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2009-544014

(P2009-544014A)

(43) 公表日 平成21年12月10日(2009.12.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-519654 (P2009-519654)	(71) 出願人	504403150
(86) (22) 出願日	平成19年7月11日 (2007.7.11)		トレリス バイオサイエンス、インク。
(85) 翻訳文提出日	平成21年3月6日 (2009.3.6)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/073293		80 サウス サン フランシスコ コー
(87) 国際公開番号	W02008/008858		ポレート ドライヴ 2-B
(87) 国際公開日	平成20年1月17日 (2008.1.17)	(74) 代理人	100120293
(31) 優先権主張番号	60/830, 507		弁理士 長谷川 智子
(32) 優先日	平成18年7月12日 (2006.7.12)	(74) 代理人	100110973
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 長谷川 洋
(31) 優先権主張番号	60/839, 174	(72) 発明者	カウヴァー、ローレンス、エム。
(32) 優先日	平成18年8月21日 (2006.8.21)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 941
(33) 優先権主張国	米国 (US)		09 サン フランシスコ グリーン ス
(31) 優先権主張番号	60/848, 112		トリート #7A 1438
(32) 優先日	平成18年9月29日 (2006.9.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セルスポット・アプリケーション

(57) 【要約】

CellspotTMアッセイ法の多数の応用が説明される。これらの応用としては、内在性膜タンパク質プローブへの拡大、細菌細胞からの分泌への拡大、親和性が向上した抗体の同定、分泌レベルが増加したクローンの同定、及びまれな有効抗体を同定するための超並列スクリーニングの使用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

タンパク質の機能領域と免疫反応性を示す抗体を同定する方法であって、前記タンパク質の少なくとも 5 つの各フラグメントによる免疫から得られた各細胞によって分泌された抗体の前記機能への効果を検査することを含み、

ここで、前記細胞は、

前記タンパク質を少なくとも 5 つのフラグメントに断片化することと；

前記各フラグメントを免疫原性増強成分と結合させることと；

前記各結合フラグメントで 1 以上の被験体を免疫することと；

前記 1 以上の被験体から抗体産生細胞を回収することと；

個々の回収された細胞を、前記各フラグメント及び完全なタンパク質とは免疫反応性を示すが、残りのフラグメントとは免疫反応性を示さない抗体について検査することと；並びに、

前記抗体を産生する細胞を選択し、必要に応じて、前記細胞によって分泌される抗体を、前記タンパク質の前記機能への効果について検査することによって得られる、方法。

【請求項 2】

細菌細胞からの少なくとも 1 つの分泌タンパク質の存在又は非存在を検出する方法であって、

前記タンパク質に結合する捕獲試薬を必要に応じて含有する捕獲表面の表面上における、前記タンパク質に特異的な試薬と結合した微粒子ラベルの存在又は非存在を顕微鏡により観察することを含み、

ここで、前記捕獲表面は、単一細胞から増殖したマイクロコロニーとして細菌細胞を支持する多孔性膜の下に設置されており、前記膜は、低分子及びタンパク質を通過させることができるが、細菌細胞を通過させることができない孔を備える、方法。

【請求項 3】

前記捕獲表面が、捕獲試薬が結合したヒドロゲルで必要に応じて誘導体化された核エッチング膜表面を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの分泌タンパク質が、少なくとも軽鎖の変領域及び少なくとも重鎖の変領域を発現するように改変された細菌によって産生される抗体又はそのフラグメントである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

各々が前記変領域を発現するように改変された単一細胞に由来する多数のマイクロコロニーを用い、前記単一細胞が、前記細菌にトランスフェクトしたときに少なくとも 10 の異なる軽鎖変領域及び少なくとも 10 の異なる重鎖変領域を産生させるヌクレオチド配列で細菌細胞の培養物を処理することによって得られる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

CellSpotTM アッセイにおいて、膜結合タンパク質のエピトープを検出試薬として用いる方法であって、

相補性部分に対する結合パートナーを含む細胞内領域を備える前記タンパク質を必要に応じて宿主細胞中で発現させることと；

前記宿主細胞を破壊することと；及び、

前記結合パートナーと、微粒子ラベルと関連付けられている相補性部分との間の相互作用によって、前記タンパク質を微粒子ラベルに結合させることを含む方法。

【請求項 7】

前記タンパク質を、無細胞系で産生し、界面活性剤の存在下で回収する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記結合パートナーが前記膜結合タンパク質と異種である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

前記結合パートナーが、ヒスチジntag、フラグ (F L A G) エピトープ、又は自己不活化基質に相補的な酵素である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

分泌タンパク質の検出試薬として膜結合タンパク質を用いる方法であって、
前記膜結合タンパク質を所望のレベル産生する細胞を含む捕獲表面を調製することと；
検出する分泌タンパク質で前記表面を処理することと；及び、
前記膜結合タンパク質を前記レベルで産生する細胞と相互作用する任意の分泌タンパク質を検出することを含み、
それにより、前記タンパク質を前記レベルで産生する細胞と相互作用する分泌タンパク質を、前記膜結合タンパク質と相互作用する分泌タンパク質として同定し、
ここで、前記分泌タンパク質は、前記タンパク質の産生が少ない細胞が存在する場合、当該細胞と相互作用しないか又は相互作用が小さい、方法。

10

【請求項 11】

前記相互作用が、結合であるか、又は、固定及び染色による細胞内抗原の露出に基づく細胞内シグナル伝達を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

第 2 の細胞種を前記捕獲表面に含み、前記第 2 の細胞種が前記膜結合タンパク質をほとんど発現しないか又は全く発現せず、前記第 2 の細胞種が前記第 1 の細胞種から識別可能である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

20 個以下の細胞を要するアッセイ法に適用するための、ヒト末梢血細胞を不死化する方法であって、前記細胞にエプスタインバーウイルスを感染させること、及び、20 個以下の子孫細胞が得られた後に前記細胞を回収することを含む方法。

20

【請求項 14】

前記アッセイ方法が Cell SpotTM 法である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

結合パートナーに対して高い親和性を有するタンパク質を同定する方法であって、
前記タンパク質に対する結合パートナーを一連の漸減する濃度でその表面上に含む一連の捕獲表面を前記タンパク質で処理することと；
前記各表面へのタンパク質の結合を検出し、それにより、低い結合パートナー濃度で前記表面に結合し続けるタンパク質を、前記結合パートナーに対して高い親和性を有するタンパク質として同定することを含む方法。

30

【請求項 16】

分泌タンパク質の所望の分泌レベル及び / 又は所望の特異性を有する細胞を同定する方法であって、

必要に応じて多孔性膜上で支持された状態で、多数の個々の単一細胞又は個々のマイクロコロニーを播種することと；

前記細胞からの分泌タンパク質を、膜が存在する場合にはその下に設置された下層の捕獲表面と接触させ、前記分泌タンパク質が前記捕獲表面上に捕獲することと；

前記捕獲表面を露出させるために、存在する場合には前記膜を取り除くことと；

40

前記捕獲表面から非結合タンパク質を除去することと；

前記捕獲表面を、前記タンパク質に特異的な結合パートナー及びシグナル伝達部分を含む、1 つ以上のラベルで処理することと；

前記捕獲表面を顕微鏡により検査して、前記ラベルによって放出されるシグナルの大きさ及び / 又は強度及び / 又は性質を判定することを含み、

ここで、より大きい又はより強いシグナル伝達領域が、前記タンパク質を高レベルで分泌する細胞を示し、かつ、

前記タンパク質に特異的なラベルと関連するシグナルが優勢であることが、所望の特異性のタンパク質を分泌する細胞であることを示す、方法。

【請求項 17】

50

前記タンパク質が前記細胞に感染するウイルスに含まれ、それにより前記ウイルスに感染する細胞の割合の判定が可能になる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

分泌タンパク質をコードする DNA が挿入されることにより所望のタンパク質の高発現レベルをもたらされる挿入部位を同定する方法であって、

前記所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、細胞群又はマイクロコロニー群の DNA 内の多数の挿入部位に挿入することと；

トランスフェクトされた各細胞又は各マイクロコロニーのコードされたタンパク質の分泌割合を個別に評価することと；及び、

前記タンパク質の分泌レベルを、由来する細胞又はマイクロコロニーと関連させ、高レベルの分泌をもたらす細胞又はマイクロコロニーを同定し、前記挿入部位の同定を可能にすることを含む、方法。

10

【請求項 19】

少なくとも 1 つのタンパク質の所望の分泌レベルを有する個々の細胞を同定する方法であって、

(a) 1 個以上の細胞をビン (b i n) の中で培養し、前記細胞を所望の細胞群のレベルまで増やすことと；

(b) 前記細胞の培養物の一部を必要に応じて取り置くことと；

(c) 前記細胞を前記ビンの底部に定着させることと；

(d) 前記細胞がタンパク質を分泌するのに十分な時間培養することと；

20

(e) 分泌タンパク質をそれぞれの個々の細胞のフットプリントとして残して、前記細胞を前記ビンから除去することと；及び、

(f) 前記フットプリントを標識化して、各フットプリント中のタンパク質の量を判定することと；

それにより、タンパク質を所望のレベルで分泌する個々の細胞を含むビンを同定し、タンパク質を所望のレベルで分泌する個々の細胞を同定することを含む方法。

【請求項 20】

各ラベルが、1 つ以上の蛍光色素、及び特定のタンパク質と結合する検出試薬を含む微粒子として供給される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

30

多数の分泌タンパク質が、多数の微粒子ラベルの亜集団によって標識化され、各亜集団が、前記微粒子と結合した異なる検出試薬及び異なる割合の蛍光色素を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

ステップ (b) において前記培養物の一部分を取り置くこと、並びに、

前記取り置かれた部分の個々の単一細胞を多孔性膜上に播種することと；

前記細胞からの分泌タンパク質を、前記膜の下に設置された下層の捕獲表面と接触させ、前記分泌タンパク質を前記捕獲表面上に捕獲させることと；

前記膜を除去して前記捕獲表面を露出させることと；

非結合タンパク質を前記捕獲表面から除去することと；

40

前記タンパク質との結合パートナー及びシグナル伝達部分を含むラベルで前記捕獲表面を処理することと；

前記捕獲表面を顕微鏡により検査して、前記ラベルによって放出されるシグナルの大きさ又は強度を判定し、より大きい又はより強いシグナル伝達エリアが、前記タンパク質の高レベルの放出を有する細胞を示すことを含む方法によって各々の細胞を評価して前記細胞の高レベルでタンパク質を分泌する能力を評価することを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

更に、所望の細胞群を得るために個々の細胞を培養することと；

前記細胞群を複製サンプルに分割することと；並びに

50

前記細胞を所望のレベルの子孫細胞に増やすために1個以上の細胞を培養することと；
前記子孫細胞の複製サンプルをピンに添加することと；
前記子孫細胞を前記ピンの底面に定着させることと；
前記子孫細胞がタンパク質を分泌するのに十分な時間培養することと；
分泌タンパク質を各個別の細胞のフットプリントとして残して、前記子孫細胞を前記ピンから除去することと；及び、

各フットプリント中のタンパク質の量を判定するために前記フットプリントを標識化することによって前記サンプルを検査することを含み、

ここで、タンパク質を所望のレベルで分泌する細胞を保持するピンを同定することで、前記子孫細胞が前記タンパク質を分泌することを確認する、請求項22に記載の方法。

10

【請求項24】

1つ以上の結合パートナーと結合する能力についてコンビナトリアルライブラリーを解析する方法であって、

捕獲表面上の特定の位置に前記コンビナトリアルライブラリーの各メンバーを提示することと；

前記ライブラリーの前記メンバーを検査する、少なくとも結合パートナーの標識化形態で前記捕獲表面を処理することと；及び、

顕微鏡検出を用いて、各位置における前記標識化結合パートナーの存在若しくは非存在を検出することと；

20

ここで、前記ラベルはマルチカラービーズであり、あるいは、

前記コンビナトリアルライブラリーの各メンバーに特徴的なラベルを提供することと；

前記所望の結合パートナーを含む捕獲表面を提供することと；

前記捕獲表面を前記ライブラリーの前記メンバーのミクスチャーで処理することと；及び、

結合する任意の標識化メンバーを顕微鏡で検出することを含む方法。

【請求項25】

前記処理が、それぞれが特徴的なラベルを有する多数の結合パートナーを用いて行われる、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記コンビナトリアルライブラリーの前記メンバーが分泌タンパク質である、請求項25に記載の方法。

30

【請求項27】

多重特異性イムノグロブリンを分泌するために不死化する細胞を同定する方法であって、

脾臓、リンパ節、粘膜関連リンパ組織若しくは末梢血液由来の個々のB細胞、又は抗体若しくは抗体様結合物質を発現するその他の細胞を、2種類以上の抗原と結合する抗体の分泌について、前記各B細胞又は前記B細胞から分泌される抗体を、第1の抗原を含む第1の微粒子ラベル、前記第1とは異なる第2の抗原を含む第2の微粒子ラベル、及び必要に応じて前記第1及び第2の抗原とは異なる追加の抗原を含む追加の微粒子ラベルで処理することによって検査することと；

40

顕微鏡により前記細胞と関連付けられた前記第1、第2、及び任意の追加の微粒子ラベルの数を判定することと；及び、

ほぼ同数の前記第1、第2、及び任意の追加のラベルと関連付けられた細胞を、前記イムノグロブリンを分泌するために不死化する細胞として同定することを含む方法。

【請求項28】

前記各細胞が膜上で支持され、分泌抗体が前記膜の下のサンプル表面において収集される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記膜が、前記細胞を前記膜に固定するためのマトリックスを更に含む、請求項28に記載の方法。

50

【請求項 30】

前記マトリックスが、抗原及びエピトープと独立した形でイムノグロブリンと結合する微粒子ラベルを含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

アッセイ前又は所望のイムノグロブリンを分泌すると同定された後に前記抗体産生細胞を不死化することを更に含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

多重特異性イムノグロブリン又はその多重免疫特異性フラグメントを分泌する細胞を同定する方法であって、

分泌イムノグロブリンを通過させ、前記イムノグロブリンに対する捕獲試薬を必要に応じて含むサンプル表面を覆う膜の上に細胞に提供することと；

前記細胞を含む前記膜を取り除くことと；

前記サンプル表面を、識別可能な微粒子ラベルで各々標識化される多数の抗原でプローブすることと；

2 種類以上の抗原と結合する前記表面上の位置を選択することと；

同定された前記表面上の前記選択された位置を、前記膜上の細胞の位置と相関させることと；及び、

多重特異性イムノグロブリン又はその多重免疫特異性フラグメントを分泌する細胞を同定することを含む方法。

【請求項 33】

所望の糖鎖付加を有するイムノグロブリン又はイムノグロブリンのフラグメントを分泌する細胞を同定する方法であって、

イムノグロブリンに対する捕獲試薬を必要に応じて含むサンプル表面上で分泌抗体の捕獲を可能な状態で細胞を提供することと；

前記サンプル表面を、いくつかが望ましい糖鎖付加と結合し、いくつかは望ましくない糖鎖付加と結合し、それぞれが識別可能な微粒子ラベルで標識化された多数のレクチンでプローブすることと；

所望の糖鎖付加と反応するレクチンと結合するが、望ましくない糖鎖付加と反応するレクチンとは結合しない抗体を分泌する細胞を選択することと；及び、

所望の糖鎖付加を有するイムノグロブリン又はイムノグロブリンのフラグメントを分泌する細胞を同定することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分泌タンパク質を含むアッセイの効率を高めるための、顕微鏡観察を用いた、単一細胞のアッセイ又は単一若しくは複数の細胞の多重アッセイに関連する方法及び組成物に関する。より具体的には、本発明は、実験技術の改善、抗体の相対的親和性の判定、所望の特性に関する細胞群の解析、及び細菌系への E L I S p o t 技術の応用に関する。

【背景技術】

【0002】

2005年5月19日に公開された国際公開公報 W O 2 0 0 5 / 0 4 5 3 9 6 号は、慣用の E L I S p o t アッセイを、単一細胞のプロファイリンや、例えば、所望の特異性を有するイムノグロブリン等の所望のタンパク質を分泌する細胞の改良された同定法に適応させるため、該方法の多重化フォームを使用した本発明者らの研究について記載している。本 P C T 出願に記載された E L I S p o t の適応は、C e l l S p o t ^{T M} アッセイと呼ばれる。E L I S p o t システムにおいて、一般的にはマイクロタイタープレートである表面は、一般的には分泌されるサイトカイン等に対する抗体である捕獲試薬でコーティングされる。タンパク質を分泌することが疑われる細胞を、分泌が起こるために十分な時間ウェル内で培養する。細胞をウェルから洗い流した後、捕獲抗体に結合した分泌タンバ

10

20

30

40

50

ク質を検出する。

【0003】

上述のPCT公開公報は、単一の捕獲試薬ではなく、異なる分泌タンパク質に対する多様な捕獲試薬を捕獲表面上で使用し、かつ、顕微鏡で個々に検出可能な固有に標識化された微粒子を利用して個々のタンパク質を識別することによって、当該アッセイが多重化される仕組みを記載している。単一の捕獲試薬を用いる場合であっても、イムノグロブリン等の共に捕獲されるタンパク質を産生する細胞の中から識別するために、固有に標識化された微粒子を使用することができる。更に、上述のPCT公開公報は、個々の細胞からの分泌フットプリントと関連づけられた微粒子ラベル数を観察することによって、個々の細胞からの分泌タンパク質を検出し、個々の細胞の分泌レベルを評価することを記載している。本公開公報において更に開示されているように、アッセイを実施できるように分泌タンパク質の捕獲後に取り除くことが可能となっている膜の上に細胞を支持することができ、所望のフットプリントが得られた場合、所望のフットプリントを有する個々の細胞を回収、及び培養することができる。次いで、分泌細胞の位置を、捕獲表面上のフットプリントの位置と関連付け、それにより、所望の細胞の培養及び更なる研究が可能となる。

10

【0004】

国際公開公報WO2005/045396号に記載されているものと比較してラージスケールの検査に対する多少異なるアプローチが最近公開された：Love, J. C., et al., Nature Biotech. (2006) 24: 703 - 707。該アプローチは、マイクロリソグラフィ技術に基づいて、ハイブリドーマ細胞を入れる微小なウェルを作成し、それにより96ウェルプレートのELISA形式を小型化することにより得られる。

20

【0005】

実際には、この形式において細胞はクローン性ではない。記載されているとおり、ウェルの50~75%が1~3個の細胞を有し、選択された50ウェルのうち、わずか17ウェルがサブクローニング後に陽性と確認されており、クローン性がないことと整合している。このアプローチは、クローン性を確実にするために細胞密度を十分に下げた場合には実用的でない。更に、細胞の複製物がないため、選択された細胞は、失わないように増殖させなければならない。これと対照的に、上記参照のPCT公開公報で記載されるCellSpotTMアッセイは、クローン性を保証する2~3桁高い密度で利用できる。更に、上述のCellSpotTMアッセイは、上清をサンプリングする必要がないため結果を得るのにより時間がかからず、かつ、マイクロリソグラフィウェルの複製サンプルよりも再現性が高い。

30

【発明の概要】

【0006】

本出願は、これらの技術に関する新たな応用及び改善を記載するものである。

【0007】

一の態様において、本発明は、標的タンパク質の特定の所望エピトープと免疫反応性を示す抗体を得る方法に関する。該特定のエピトープに対する抗体は、所望の機能的効果を目的として得ようとするものでもよい。例えば、レセプタータンパク質等に対して作製された抗体が、該レセプターに結合することができるが、その活性を阻害しないという事例が知られている。そのような事例において、全長タンパク質を用いた免疫によって作製された抗体は、活性を阻害するために適切なエピトープに結合しない。これは恐らく標的領域が十分に免疫原性でないためである。本発明の方法は、多様な候補抗体を複数の特性で迅速にスクリーニングする機会を提供するため、抗体を作製するために、例えば、破傷風トキソイド若しくはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)又はその他の免疫原性をブーストする成分に結合させることによって免疫原性を高めた複数の個別のタンパク質フラグメントを用いることができる。それにより、標的タンパク質の任意の領域に対する抗体を作製することができる。従って、例えば、レセプタータンパク質を5、10、15

40

50

、又は20以上の個々のペプチドフラグメントに分割して、それぞれを免疫原性増強物質と結合し、免疫に使用してもよい。その後、標的タンパク質の各領域と免疫反応性を示す抗体を分泌する細胞を同定するために、本発明の技術を使用することができる。当該フラグメント及び完全なタンパク質との反応性の基準を満たし、残りのフラグメントとの反応性の基準を満たさない抗体を分泌すると同定された細胞は、その後、当該標的について所望の機能的活性を検査することができる。本発明の方法を使用することにより、標準的なハイブリドーマスクリーニングと比較して、数桁高い効率でイムノグロブリン分泌細胞をスクリーニングすることができ、このことが本アプローチを実用的なものとしている。

【0008】

別の態様において、本発明は、細菌によって分泌され、ペリプラズムに分泌され、又は別の方法で細胞から放出されるタンパク質を、顕微鏡技術を使用した画像化が可能な状態で表面上に捕獲できるように、細菌を培養する方法に関する。既に開示されているような真核細胞に適した標準的な培養技術に細菌を使用しても成功しない。本発明の方法においては、大腸菌のような好気性細菌を、単一細胞から生じる個別のコロニーを得られるように十分に希釈して、多孔性膜上で培養する。膜の孔は、細菌細胞の通過を防止するには十分に小さいが、タンパク質及び低分子が通過するには十分な大きさであるため、該膜の下から栄養素を供給することができ、分泌タンパク質も同様に膜を通過することができる。膜の下には、画像化のための捕獲表面が配置される。該捕獲表面は、下から供給される栄養素を通過させることができる。該捕獲表面の重要な特徴は、その上に捕獲試薬を結合可能な平坦な表面を備えていることである。例としては、核飛跡でエッチングされたポリカーボネートである。したがって、微粒子ラベルは、それらが捕獲表面と結合していない場合には、より繊維状の膜で生じるように捕捉表面に微粒子ラベルがはまり込むことがないため、適切な時間で洗い流されるが、結合している場合には、表面のみに留まって顕微鏡観察における単一焦点面をもたらす。細菌に栄養素を簡便に供給する方法として、寒天培地を捕獲表面の下に設置してもよい。捕獲表面は、所望により、検出する分泌タンパク質に対する捕獲試薬も含む。大腸菌の場合、捕獲表面での分泌タンパク質の捕獲及び検出に十分な漏出がペリプラズムから起こり、この漏出は微視的な大きさのコロニーからさえも起こる。タンパク質放出の他の方法には、細胞のウイルス的若しくは化学的溶解、出芽ウイルスに結合したタンパク質又は細胞内包物の単純な漏出が含まれる。哺乳動物細胞からのウイルス放出も同様に検出可能である。

【0009】

多くの状況において、検体中に存在するウイルス粒子の数を定量化することは重要である。1つのアプローチは、ウイルス抗原に対する抗体によるELISAアッセイを使用することである。そのようなアッセイは、しばしば少ないウイルス量を測定するには高すぎるノイズレベルを有し、かつ、感染性の生存ウイルスとダメージを受けた又は不完全なウイルス粒子とを区別しない。最も信頼性が高く高感度なアッセイはブランクアッセイで、当該アッセイでは、感受性細胞叢が検体に曝露され、感染性ウイルス粒子の数がブランク形成単位(pfu)の数として定量化される。しかし、典型的なpfu判定は、(最初に感染した細胞の溶解後又はウイルスの出芽後)ウイルスの増殖及び周囲の細胞への感染の繰り返しを必要とする。それにより、結果として得られた細胞残屑が直接見えるようになり、又は免疫組織化学法で検出可能な十分なウイルスタンパク質が存在するようになる。CellSpotTMアッセイは、当該細胞叢を支持する膜と共に又は該膜を含むことなく、(溶解又は出芽のいずれかによる)ウイルス産生及び細胞からの放出に対する高感度アッセイを提供するものである。

【0010】

CellSpotTMシステムは、重鎖及び軽鎖の所望の組み合わせのスクリーニングにも特に有用である。これらは大腸菌によって容易に産生され、ペリプラズム内で構築される。10、20、50、又は100の軽鎖をコードする配列のセット、および10、20、50、又は100の重鎖をコードする配列のセットを細菌群に導入することにより、それぞれの数の産物としてその数の重鎖及び軽鎖のアセンブリの組み合わせが構築可能

10

20

30

40

50

である。本システムを使用して個々のマイクロコロニーをモニタリング可能であるように、これらの組み合わせを評価して十分な細胞をスクリーニングすることが可能である。

【0011】

本方法の一つの応用においては、大腸菌を、ヒトFabフラグメントの重鎖及び軽鎖部分を発現するように改変し、かつ、多孔性膜の役割を果たすニトロセルロース膜上で個々の細胞希釈レベルで培養する。下方に設置された捕獲表面は、例えば、抗ヒトヤギポリクローナル抗体を捕獲試薬として含む。栄養供給寒天は、栄養素が通過できるよう十分に多孔性である捕獲表面の下に設置される。単一の細菌が小さなコロニーに成長するための十分な時間が経過し、Fabタンパク質がペリプラズムに分泌され、次いで培地に漏出し、更に支持膜を通過して捕獲表面に漏出した後、アセンブリの支持膜及び栄養素供給部は取り除かれ、捕獲表面は捕獲されたFabユニットを検出するために微粒子ラベルで処理される。前述のように、複数の異なる色のラベルを使用する。この場合、第1の色（例えば、赤）は、所望のFabタンパク質に特異的な抗原と結合した微粒子ラベルに関連づけられ、かつ、異なる色の微粒子ラベル（例えば、緑、紫、オレンジ）は、所望のFabが結合しない他の抗原と結合している。画像化は、高及び低倍率の両方、並びに両方の色チャンネルで可能である。

10

【0012】

低解像度下（1.6x）では、30で一晚培養後、直径0.1~1mmのコロニー分泌フットプリントが観察され、高倍率画像（40x）では、個々の粒子を両方の色チャンネルに分解可能である。赤ラベルが多数を占めることは、所望の特異性を有するFabタンパク質が当該細胞により分泌されることを示す。

20

【0013】

別の態様において、本発明は、分泌抗体又はその他の分泌タンパク質用の検出試薬として、膜結合タンパク質のエピトープを用いる方法に関する。いくつかの場合において、該膜結合タンパク質は、検出ピーズに結合した可溶性試薬として使用するために十分な細胞外部位を有する。あるいは、十分な細胞外部位が表面に露出している場合、まだ生存している間に、分泌タンパク質の捕獲試薬として直接用いることができる。捕獲後、該細胞を固定、染色し、分泌タンパク質に適した、単純に結合させること又はシグナル伝達経路を刺激することを含む微粒子ラベルにより標識化することができる。

30

【0014】

別のアプローチにおいて、膜結合タンパク質が細胞破壊に耐えうる場合、遊離膜結合タンパク質は、例えば、細胞内領域上のエピトープに対する捕獲抗体等の細胞内領域に対する結合のパートナーと相補的な前記微粒子ラベル上の部分によって微粒子ラベルに結合することができる。このようなエピトープの存在を確実にするため、付加的な細胞内部分を遺伝的にタンパク質に融合させることができ、該不可部分は、微粒子ラベル上の捕獲試薬（すなわち、前記結合パートナーに補完的な部分）と適合させることができる。これらの付加的な細胞内領域には、例えば、ヒスチジンタグ、フラグ（FLAG）ラベル、又は微粒子ラベルへの共有結合のための適合自己不活化基質を有する酵素を含むことができる。そのような融合タグの1つは、例えば、市販のCovalys SnapTagシステムであり、このシステムでの補完的部分は、結合パートナーを構成する酵素の自己不活化基質である。上述のように、細胞内延長部位に対応する捕獲試薬を微粒子ラベルに結合し、その対応するパートナーと結合させることによって膜結合タンパク質と微粒子ラベルとの結合が達成される。天然の細胞内領域が相補的部分の相手となる場合、異種融合タグを付加する必要はない。

40

【0015】

膜結合タンパク質は、翻訳後修飾が必要ないと仮定すれば、宿主細胞内での組み換え産生の代わりに、適正な界面活性剤の存在下、無細胞系で産生してもよい。真核又は原核細胞と関連する、単離された膜結合リボソームを、適切なtRNA、ATP、及びアミノ酸と混合し、必要に応じて融合タグを含む膜結合タンパク質をコードするmRNAを添加することによって合成が行われる。得られたタンパク質は、その後、界面活性剤によって可

50

溶化され、上述のように微粒子ラベルに結合することができる。

【0016】

上述のように、膜結合タンパク質が細胞破壊に耐えられない場合、上述の細菌性又は真核性のいずれでもよい分泌細胞の領域のアウトプットをスキャンするためのタンパク質検出リガンドとして当該タンパク質を使用する上で生じる問題を解決するために、別のアプローチを使用してもよい。いくつかの例において、2つの捕獲細胞群が捕獲表面に供給される。1群は、膜結合タンパク質を高レベルで発現し、もう一群は低レベルで発現し又は全く発現しない。第1群及び第2群は重なって染色され、生存していても、死滅していてもよい。細胞は、例えば、メタノール/ホルムアルデヒド等で固定されていてもよい。染色は、例えば、1群をDNA挿入蛍光色素又はその他の任意の染色剤とインキュベートすることによって達成される。同様の手順を、もう一方の細胞群の染色に用いることができるが、異なる色の色素を用いる。その後、染色された細胞は、例えば、ELISpot又はCellSpotTMタイプのアッセイアセンブリの捕獲表面に加えられる。

10

【0017】

一の態様において、適切な希釈濃度で支持膜上に培養されたタンパク質分泌細胞は、その下に設置された捕獲表面上に重ねられ、イムノグロブリン等の所望のタンパク質の分泌に十分な時間インキュベートされる。タンパク質分泌細胞を支持する膜を取り除いた後、非結合分泌タンパク質を捕獲表面から洗い流し、分泌タンパク質に対する結合パートナーと結合した適切な検出ラベルで捕獲表面を処理する。膜結合リガンドを高レベルで発現しない第2群ではない、膜結合リガンドを発現する細胞群と、該検出ラベルとの関連は、膜結合リガンドを産生しない細胞群に関連付けられた色ではなく、膜結合リガンドを産生する細胞群によって生成される色とラベルとの関連を観察することによって確認することができる。観察視野よりも細胞の直径が小さいため、単一の分泌細胞又はマイクロコロニーの分泌タンパク質「フットプリント」中に、両タイプの複数の細胞が存在しうる。適切な画像レジストレーションによって、支持膜上の分泌細胞の位置を、捕獲表面上の反応性細胞の位置と関連付けてもよい。

20

【0018】

あるいは、2つの表面上に複製されたタンパク質分泌細胞を有する別のウェル内で2つの細胞群を使用することもできる。他の検出法において、分泌タンパク質の結合を可視化するために細胞内シグナル伝達を使用することができる。本実施の形態において、捕獲表面は生存細胞で覆われ、分泌のために適切な時間が経過後、捕獲表面は除去され細胞を固定するように処理される。その後、固定された細胞は透過性にされ、細胞内シグナル伝達の結果により適切に染色される。

30

【0019】

更に別の態様において、本発明は、上記PCT公開公報に記載されているCellSpotTMシステムの改善に関する。これらの改善のいくつかは、重ねた膜上でフットプリントを生成した細胞に相関させて、捕獲表面上のフットプリントの位置を確認すること（すなわち、改善された画像レジストレーション）に関する。細胞を含む膜は、フットプリントが解析される前に移動させる必要があるため、一通り解析が終われば該膜を捕獲表面に対して再配置して、適切な細胞を更なる研究のために採取することができるようにする必要がある。いくつかの独立した改善によって、より正確な再配置が可能となる。これらには、1)細胞が置かれる膜をその上に保持するマイクロプレートキャリアの底面に貼り付けられたグリッドを導入し、粘性の細胞固定化培地によって生じる可変性の光学収差を補うこと、2)フットプリント表面から膜を取り除く前に、記録可能なパターンを提供するために細胞と共に細胞含有膜上に比較的大きな蛍光粒子（直径5~10µm）を散在させ、これらのランドマークピースの局所形状を一致させることで詳細な画像レジストレーションを可能にすること、3)改善された細胞固定化培地、Mebiol（登録商標）Gel、及び4)ピペットによる垂直方向のアクセスを可能にするために、細胞膜を保持するステージを顕微鏡の下から水平方向にスライドさせる手段が含まれる。Mebiol（登録商標）Gelは、分子レベルで微細なメッシュ構造を有し、低温では液体だが、温め

40

50

るとゲル状になる特性を有する親油性合成ポリマーである。M e b i o l (登録商標) G e l は、市販されている。分泌タンパク質を C e l l S p o t^{T M} アッセイにより解析している間、細胞を M e b i o l 中で増殖させることができることから、更なるソフトウェアの向上によって、起源となる単一前駆細胞でマイクロコロニーの中心を登録することができる。

【0020】

本発明の別の態様は、肉眼で見える培養物が得られる前にヒト末梢血細胞を回収することによって、ヒト末梢血細胞を不死化するための改良法であり、特に、本発明の C e l l S p o t^{T M} 法に応用する状態でそれらを提供するための改良法である。イムノグロブリンを分泌する不死化細胞を提供する標準的な方法は、抗体分泌細胞と腫瘍細胞株とを融合させることによるハイブリドーマの産生である。あるいは、アメリカヤマゴボウのような非特異的マイトジェンで刺激することにより、抗体分泌を増強させることができる。本発明の方法は、細胞にエプスタインバーウイルス (E B V) を感染させること、及び、わずか 10 ~ 20 のコピーが得られた後に細胞を回収することを含む。本方法の利点は、一時的でも、全ての休止 B リンパ球のかなりの割合が、増殖し、イムノグロブリンを分泌するよう誘導できることである。C e l l S p o t^{T M} 法は非常に感度が高いため、解析前、E B V 形質転換の後わずかな分割数だけを要し、これにより、十分なイムノグロブリン分泌細胞が得られる。本方法の 1 つの応用において、10 ~ 1, 000 の親細胞のグループを E B V で形質転換し、10 ~ 20 のコピーが得られるまで培養する。得られた細胞群を 2 つに分割し、そのうちの一方は所望のイムノグロブリンの産生について解析し、もう一方は保存する。解析用の細胞が、所望のイムノグロブリンを分泌する細胞が存在する証拠を示す場合、保存用の細胞は、イムノグロブリンを十分に分泌する個々のメンバーを同定するための材料として使用することができる。解析用の細胞が、所望の分泌特性を有する細胞を包含する証拠を示さない場合、保存用細胞をそれ以上取り扱う必要はない。

10

20

【0021】

本発明の更に別の態様は、所望の抗原に対して高い親和性を有する抗体の同定を可能にする。上述において参照した C e l l S p o t^{T M} に関するこれまでに公開された記載において、単一細胞アッセイを提供し、様々な特異性の微粒子ラベル - 1 つのラベルはイムノグロブリンと広く反応するタンパク質と結合し、かつ、それに対する抗体の特異性が望まれる抗原と結合する他の微粒子ラベルから色で識別可能である - を利用することによって、細胞数及び全体的なタンパク質濃度を標準化する方法が開示されている。これらの方法は、特定の C e l l S p o t^{T M} に存在する異なる量のイムノグロブリンを補正することができるが、個々の抗体 / 抗原の組み合わせの結合親和性と結合活性 - すなわち結合パートナー間の多様な相互作用によって増強された結合 - とを識別できなかった。多数の抗原コピーが各粒子上に提示されるため、結合活性の影響は微粒子ラベルに関連した特有のものである。

30

【0022】

本発明においては、捕獲表面上の捕獲試薬の適切なスペーシングによって結合活性がコントロールされる。希釈され、かつスペーシングされた捕獲試薬の密度を変化させることにより、非常に低い捕獲試薬密度であっても、捕獲試薬が分泌抗体と結合する能力を維持することから、高親和性クローンを低親和性のものから識別することができる。本方式で決定された親和性は、B i a c o r e (登録商標) 又はその他の高精度の方法を使用した評価と相関する。前記方法は、特に C e l l S p o t^{T M} 法を使用して簡便に行われるが、これは必要条件ではなく、捕獲表面にタンパク質を加える任意の手段、例えば、表面をタンパク質溶液で処理すること等でも十分である。更に、前述の方法は、イムノグロブリンを例に用いて説明しているが、任意の結合パートナーの相互作用を本方式で調査することができる。従って、各種融合タグの相補的部分に対する親和性のような既知の標準と比較することで、例えば、リガンドのそのレセプターに対する親和性を本方式で決定することができる。別の応用において、ヌクレオチド配列のホモロジーを少なくとも定性的に決定することができる。

40

50

【0023】

更に別の実施態様において、本発明は、例えば、所望のタンパク質の高発現レベルをもたらす位置への挿入等において、所望のタンパク質を高レベルで分泌する細胞を同定するためのCell SpotTM法の使用に関する。ここで記載する方法においては、所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を細胞群にランダムにクローニングし、それぞれ個別の細胞又はそのクローン子孫の分泌レベルについて評価する。これまでに開示されているように、分泌レベルは、発現タンパク質に対する、単一細胞のフットプリントの強度及び/又は直径によって容易に判定することができる。Cell SpotTMアッセイはハイスループットな特性をもつことから、多くの挿入部位を効率的に評価することができ、最も分泌能が高い細胞を回収及び培養することができ、製造用細胞株の選定において有用である。回収細胞中の挿入部位は遺伝的解析によって決定することも可能であり、これによって、その後の特に好ましい部位への直接的ターゲティングが可能となる。

10

【0024】

異なる成長培地の配合の分泌レベルへの効果を評価するため、及び単純に分泌レベルそれ自体を評価するために本方法が用いられてよい。同様に、クローン性増殖を使用して発現の安定性がモニタリングされる。よって、時間に応じて判定が行われる。

【0025】

本発明の別の態様は、1つ以上のタンパク質を高レベルに分泌する、又は正しい特異性のタンパク質を分泌する細胞を、「ビンニング(binning)」と呼ばれるプロセスによって同定するための効率的な方法に関する。本プロセスにおいては、個々のフットプリントを識別し、個々の細胞と関連付けるために十分な大きさ及び形状の「ピン」の中に、各個別の細胞によって残された分泌タンパク質のフットプリントを、その内部に含まれる多数の個々の細胞と対比しながら評価することによって、所望の分泌特性について多数の細胞を同時に検査する。多数の個々の細胞を同時に評価することによって、高い分泌能を有する又は適切な細胞を数多く含有するコレクションを、本発明の方法によって個々に同定するそのような細胞の材料として使用することができる。

20

【0026】

従来技術の方法で複数の細胞からのシグナルをプールすると、その細胞からのシグナルが希釈されるために好ましい異常値の存在が隠されてしまう。慣用法において、このような平均化効果を回避するための唯一の方法は、解析の前に細胞をクローン化することである。Cell SpotTMは、単一細胞からの分泌タンパク質を読み取る感度を有することから、単一細胞の分解能で多クローン性のピンを評価でき、従って好ましい細胞を含有するごく少量のピンについて、手間及び時間のかかるクローニングステップを行う必要がない。

30

【0027】

上述の全ての方法において、Cell SpotTM法は、解析前の限界希釈クローニングに基づく慣用法と比較して、検査可能な細胞数を数桁増加させるのに有用であり、従って、特に好ましい特性を有する分泌タンパク質をもたらす希少な細胞の選択が可能となる。

【0028】

別の態様において、本発明は、コンビナトリアルライブラリー（低分子化合物又はより大きな生物由来物質からなる）のメンバーの非常に少量をスクリーニングする方法であって、ライブラリーのメンバーを捕獲表面に加えること、及び、該表面を検出可能な形態の所望の結合パートナーで処理することを備える方法に関する。所望の結合パートナーは、例えば、抗体、組み換えによって作成された細胞表面レセプター、レセプターリガンド等であってよい。アレイ上のそれぞれ個々の位置を照合することができるため、潜在的な結合パートナーへのライブラリーの個々のメンバーの結合能を判定することができる。

40

【0029】

あるいは、捕獲表面は、表面の照合に使用される特有のラベルでそれぞれ標識化された所望の結合パートナー及びコンビナトリアルライブラリーの多数のメンバーを含んでいて

50

もよい。

【0030】

更に別の態様において、本発明は、取り込まれ又は内在化された物質が有する挿入色素によって生成された核の蛍光発光を評価することによって、エンドサイトーシスを検出する方法に関する。

【0031】

抗体の結合物質として抗体を使用した、顕微鏡レベルの量の検体を多重プロービングする利点がここで例示される。その他の組み換えタンパク質及びペプチドにも同じ利点が当てはまる。更に、スポットティング、固体表面上での *in situ* 合成、又は（例えば、コンビナトリアルケミストリーのスプリットレジニアプローチから）大きなビーズを表面に置くことにより固体表面上に配列される合成化合物にも同じ利点が当てはまる。

【0032】

本発明の更に他の態様は、多重特異性イムノグロブリン又はその免疫特異的フラグメントを分泌するために不死化される細胞を同定するため、及び多重特異性イムノグロブリン又はその免疫特異的フラグメントを分泌する一般的な細胞を同定するために、Cell SpotTM法を用いる。Cell SpotTM技術は、所望の、好ましくはヒトの糖鎖付加パターンを有するイムノグロブリン又はそれらの免疫特異的フラグメントを分泌する細胞を同定するために用いてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】(A)本発明のCell SpotTM法を使用して生成されたフットプリントの強度及び直径を測定することによる、単一細胞の分泌レベルを測定した結果を示す。(B)3桁多い数の細胞について、これらの結果と肉眼的技法を使用した確証的データとの比較を示す。

【図2】Cell SpotTMの強度及び直径の大きさに基づいて選択された、市販の細胞株及びそれらの高生産性サブクロンの集団中の、個々の細胞における分泌レベルの分布を示す。

【図3】(A)高親和性抗体を選別するための本発明の方法による結果を示し、検出可能なCell SpotTMをもたらす細胞の割合は、捕獲試薬濃度の低下と共に減少し、その減少は親和性が低いクローンでより著しい。あるいは、Cell SpotTM中のイムノグロブリンの量を標準化することによって相対的親和性を推定することができる（全シグナルは、内因性の親和性/結合活性及び存在する全Igにより生成するため）。(B)別の市販の方法と、本順位序列化方法に基づいた結果との比較を示す。

【図4】レセプタータンパク質の全ての露出部分に対する抗体の作成に使用されたフラグメントの図であり、図中、丸で囲んだペプチドは、それらに対する少なくとも1つの特異的抗体が同定されたものを表す。

【図5】図4のレセプタータンパク質のフラグメントから作成された複数のペプチドのそれぞれに対して特異的であると検出された抗体産生細胞の数を示す三次元グラフである。9つのプローブに対して、全部で2百万個の細胞を同時にスクリーニングした。

【図6】細菌細胞に対してCell SpotTM解析を実施する際に用いた装置を表す図であり、図中、ペリプラズムから漏出するタンパク質用の捕獲表面を提供する小さい孔(SP)の膜の上に設置された、大きな孔の膜(LP)上に細胞が支持され、前記小さい孔の膜は寒天培地層の上に設置されている。

【図7】(A)図6の装置を使用して実施したCell SpotTMアッセイの結果の低倍率画像である。(B)2つのカラーチャネルのうちの1つで画像化された、個々の検出粒子の高倍率画像である。

【図8】(A)TIをその表面に提示する細胞によって捕獲された抗TI抗体の2.5倍画像である。(B)同5倍の画像である。

【図9A】本明細書で説明するピンギング技術で得られる一般的な結果を示す。

【図9B】本明細書で説明するピンギング技術で得られる一般的な結果を示す。

10

20

30

40

50

【図 9 C】本明細書で説明するビニング技術で得られる一般的な結果を示す。

【図 9 D】本明細書で説明するビニング技術で得られる一般的な結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0034】

本発明は、例示を目的として、抗体又はイムノグロブリンを使用して説明する。当該技術分野において十分に理解されるように、語句「抗体」には、全長 I g G 及びその他のクラスの抗体だけでなく、一本鎖形態、例えば、ラクダ抗体及びニワトリ抗体が含まれる。「抗体」は、免疫反応性フラグメント、例えば、F a b、一本鎖 F v 等の改変体を含む。キメラ抗体、ヒト化抗体、及びそれらの各種置換も該定義内で発明されている。従って、本明細書で用いられる「抗体」又は「イムノグロブリン」は、特異的な結合特性を示す多様な種類を示す総称である。

10

【0035】

例示のために抗体を使用するが、本発明の方法は抗体に限定されるものでなく、組み換えタンパク質及びペプチドを含む種々の結合物質の任意のファミリー、又はコンビナトリアルケミストリーライブラリーに適用されうる。

【0036】

本出願は、国際公開公報 W O 2 0 0 5 / 0 4 5 3 9 6 号で記載された、C e l l S p o t^{T M} アッセイの応用における多くの改善点について記載する。便宜上 C e l l S p o t^{T M} 法を以下で説明し、本明細書で記載される全てのアッセイに共通するステップを繰り返し説明することなく、C e l l S p o t^{T M} 法という省略表現を単純に使用できるようにする。

20

【0037】

C e l l S p o t^{T M} 法においては、顕微鏡スケールでの陽性又は陰性の検査結果の空間的位置を判定可能にする捕獲表面が提供される。従って、該方法は、分散位置において、表面とマイクロ反応混合物との相互作用によって生成された捕獲表面上の「スポット」を顕微鏡により検査することを含む。捕獲表面は、捕獲試薬で処理してもよく、又は単純な吸着を用いてもよい。C e l l S p o t^{T M} 法は検出する化合物又は組成物の材料が ~ 5 0 - 1 0 0 ミクロンの大きさに制限されるように実施する。本方法の好ましい応用において、検出する化合物は分泌タンパク質であり、そのタンパク質を分泌する細胞の空間的配置をコントロールして空間的配置を得る。分泌タンパク質はイムノグロブリンであることが多いが、C e l l S p o t^{T M} アッセイはこれらに限定されるものではない。任意の分泌タンパク質、又はペプチドを C e l l S p o t^{T M} アッセイに用いてもよい。

30

【0038】

本発明の方法における好ましい検出試薬は、参照として本明細書に組み込まれる上述で引用した国際公開公報 W O 2 0 0 5 / 0 4 5 3 9 6 号、及び米国特許第 6 , 6 4 2 , 0 6 2 号で詳しく記載されている「マルチカラービーズ (m u l t i h u e d b e a d s) 」である。簡単に説明すると、マルチカラービーズは微粒子又は「ビーズ」であり、一般的には直径が 5 0 ~ 1 , 0 0 0 n m であり、好ましくは 1 0 0 ~ 3 0 0 n m の範囲であり、任意の材料で構成されているが、一般にはラテックス又はその他のポリマーで構成される。微粒子支持体に結合しているのは、所望の分析物、例えば、分泌タンパク質等と特異的に相互作用する試薬、及び特徴付ける色である。この色は、2 つ以上のシグナル生成部分を微粒子に提供することによって得られ、それぞれから放出されるシグナルは個別に判定可能であり、粒子に結合したシグナル生成部分の量の割合で色を判定する。一般に、シグナル生成部分は、独特の発光極大を有し、かつ、個別に判定可能な蛍光色素である。蛍光色素の割合を変化させることにより、複数の亜集団のそれぞれのビーズ上に特徴的な色を得ることができる。従って、そのようなビーズを使用することによって、独自の特徴的な色及び特異的な結合試薬を有する各亜集団、多数の分析物を同時に判定してもよい。あるいは、単一の分析物のみを検出することも可能である。

40

【0039】

C e l l S p o t^{T M} 法は、個々の細胞に関連した分泌タンパク質の個々のフットプリ

50

ントを生成する。大きな細胞群の中から所望の分泌レベルを有する個々の細胞を同定するために、本発明の方法の1つの応用は、「ピンング」-すなわち、複数の個々の分泌フットプリントを同時に検査することを利用する。本方法において、1つ以上の細胞、一般的には1、10、又は50以上の個々の細胞が「ピン」に添加される。ここで当該ピンは、顕微鏡により評価可能で、かつ、上述のマルチカラービーズで標識化後、100~5,000個の細胞の個々のフットプリントが、それらのフットプリントに関連したスポットの輝度によって個々に識別される直径を備え、一般的にはマイクロタイタープレートウェルであるが、通常は、一般的に平らである底面を有する任意の容器である。「ピン」の大きさは、ピンの全底面が迅速に調査でき、個々の細胞のフットプリントが識別されうるようなものである必要がある。その後、所望の検査細胞群を得るために、適当な細胞群、一般的には5~10分割又は数千個の細胞群を得るために最初に添加された細胞を培養する。細胞は自然に底に沈み、分泌フットプリントが底面で捕獲される。必要ならば、評価するタンパク質に適した捕獲試薬が底面に供給されていてもよい。例えば、抗体分泌を測定するのであれば、通常イムノグロブリンの定常領域と反応するプロテインAのような試薬を用いてもよい。その後、ピンから細胞が除去され、次いで残されたフットプリントは、上述のマルチカラービーズで標識化することによって解析される。このようにして、格別に輝度の高いフットプリントを有する複数の細胞を含有するピンを、所望の分泌レベルを有する個々の細胞を得るための更なる同定における細胞源として使用することができる。

10

【0040】

一の実施形態において、フットプリントを解析する前に細胞群の一部を移動させ、その後(残りの細胞評価から、高い産生能を有する細胞が存在すると判定された場合)この一部は、ピンの残りの細胞の中から個々の細胞を更に同定するために、限界希釈法、又は個々の細胞若しくはマイクロコロニーとして膜上にプレーティングする方法のいずれかによって、更なる検査の材料として用いられる。

20

【0041】

所望の分泌レベルを有する単一の細胞が同定されれば、それを培養することもでき、結果として得られるクローン性細胞群は、同じCell SpotTM方式での複製検査用に適当な部分に分割し、該クローン性細胞群の安定性を確認する。

【0042】

図9A~9Dは、前述のピンング法において複数の分泌細胞の同時アッセイから得られる典型的な結果を示す。図9Aは、上述のようにアッセイされた各種の個々のピンから得られた結果を合成した写真を示す。いくつかのピンが高分泌レベルの細胞を高い割合で含有するが、他はそれほどでないことが明らかである。

30

【0043】

図9Bは、ピン由来の個々の細胞を支持膜に置いた結果であり、高、中、及び低産生細胞から得られたフットプリントを示す。

【0044】

図9Cは、クローン性細胞群を得るように培養した、個々に同定された細胞のクローン性子孫細胞のピンをアッセイすることにより得られた結果を示す。図からわかるように、高産生親細胞は、レプリケート全体にわたって一貫して複数の高産生子孫細胞を産生するが、中及び低産生細胞は親細胞と同様のパターンを有する子孫細胞を与える。図9Cのグラフは、Cell SpotTMアッセイを使用して約100個の細胞のコレクションについて測定した分泌レベルと、バルク上清を使用して得られた結果との相関関係を示す。

40

【0045】

図9Dは、個々の細胞間の分泌レベルの分布を示す。バルク上清から得られた分泌レベルをボックス内に示しており、細胞集群の中から高又は低強度の細胞が確認される頻度とよく相関している。

【0046】

Cell SpotTM法のいくつかの応用において、イムノグロブリン又はそのフラグメントは特に重要である。例えば、2つ以上の抗原と結合する能力を有する単一のイムノ

50

グロブリンを同定することが望ましいことが多い。そのような「多重特異性」抗体は、2つ以上、例えば、3、4、又は5つの異なる抗原と結合してよい。そのような抗体は、例えば、レセプターの対立遺伝子多型等に結合し、又は、HER2及びHER3のようなレセプターに関連する抗体の能力を高めることで、治療薬の分野において特に有用である。そのようなイムノグロブリンはまた、複数のサイトカインと結合してよく、2種類以上のサイトカインが同一のレセプターに結合する場合に役に立つかもしれない。例えば、サイトカインCCL3、CCL5、CCL7、及びCCL13は全てCCR1レセプター並びにCCR2及びCCR5レセプターのいずれか1つに結合する。従って、例えば、CCR1レセプターは複数のサイトカインを認識することから、同じ結合スペクトルを有する抗体を見つけることが望ましいかもしれない。不連続性エピトープ、例えば、イオンチャネル等のヘテロダイマーの両方のサブユニット部分から形成されるものと結合することも望ましい場合が多い。ヒト及び临床上応用できる可能性があるモノクローナル抗体の評価に用いられる動物モデル（例えば、霊長類又はげっ歯類）由来の同種タンパク質上の同一エピトープと結合する抗体を提供することも有用である。ヒト及びモデル動物の「同じ」タンパク質を認識する抗体は、臨床用の候補物質の代用として、又は臨床用の候補物質そのものとして多重特異性抗体を用いた動物モデルにおける毒性及び有効性研究を可能とする。

10

20

30

40

50

【0047】

このような多重特異性イムノグロブリンを分泌する細胞の同定へのCellSpotTMの応用において2つの基本的なアプローチが用いられる。1つのアプローチでは、げっ歯類、ウサギ等、又はヒトボランティア等の免疫モデルから単離された細胞を、多数の抗原を含有する多数のラベルを用いて、CellSpotTMで用いられる微粒子ラベルと個々に接触させる。その後、顕微鏡を使用して細胞と関連づけられた複数の微粒子ラベル数を判定する。ほぼ同数の2つ以上の抗原特異的ラベルと関連づけられた細胞を、所望のイムノグロブリンを分泌するために不死化する細胞として同定する。

【0048】

本発明の重要な実施形態において、各細胞は膜上で支持され、当該膜は細胞を保持するマトリックスを必要に応じて更に含有していてもよく、以下で更に説明するように、抗体は膜を通過して捕獲表面に分泌される。

【0049】

イムノグロブリン上の糖鎖付加パターンが、細胞殺傷(ADCC)効果及び薬物動態の両方に影響を与えることが知られている。従って、例えば、ヒトの治療に使用するための抗体を調製する際、これらの抗体の糖鎖付加パターンがヒトのパターンと可能な限り近いことを確保することが重要である。特に、ヒト抗体において糖鎖付加部分にフコースを含有することは望ましくない。本発明の一の態様において、適切な糖鎖付加パターンを備える抗体を分泌する細胞を、CellSpotTMアッセイを用いて同定することができる。捕獲表面上のある位置において又は単一細胞と関連づけて、最大20~50個の個別の微粒子ラベルを容易に検出することができるため、これらの細胞を同定するために、個々の炭水化物部分と結合するレクチンを含有する微粒子ラベルを使用することができる。複数のレクチンは、例えば、キアゲンから実際に市販されており、ここでレクチンは顕微鏡スライド上に配置されている。

【0050】

本発明の方法において、個々のレクチンは、異なる色の微粒子ラベルと関連づけられており、これらの標識化レクチンは分泌抗体の評価に使用される。前述の方法を、所望の特異性を有する抗体を分泌し通常非ヒト細胞株である組み換え細胞株にあわせて適用する。その後適切な糖鎖付加を有する抗体を分泌すると同定され得る個々の細胞を得るために、突然変異生成が必要であってもよい。所望の糖鎖付加パターンを保持していることは、培養槽内で使用するために細胞株をスケールアップしている間も容易にモニタリングできる(>10¹²倍の増殖が一般的であり、好ましい表現型が喪失することが多い)。

【0051】

従って、第二の実施形態において、所望の抗体を分泌する細胞は、イムノグロブリンが膜を通過して捕獲表面に分泌することが可能な膜の上で支持される。所望であれば、捕獲表面は、非特異的イムノグロブリン捕獲試薬を含んでいてもよい。捕獲表面上の抗体の位置は、膜上の分泌細胞の位置と対応する。その後、捕獲表面は、微粒子に結合した様々なレクチンに対応する各種の色を備える多様なレクチン含有微粒子ラベルでプローブされる。その後、各分泌抗体と関連する標識化レクチンのパターンは容易に決定することができる。一般に、標識化レクチンのコレクションは、望ましい糖及び望ましくない糖の両方に結合するレクチンを含むことになる。十分な糖鎖付加パターンに近づくために必要な異なるレクチンはわずか5又は6種類であるため、検出分解能は十分にこの目的に必要な程度の範囲内である。その後、望ましい炭水化物部分と結合し、望ましくない炭水化物部分とは結合していないレクチンに関連づけられた抗体は、表面上の位置で選択され、次いで適切な突然変異細胞と関連付けられる。その後、この細胞は、所望の糖鎖付加を有する抗体を産生するために増殖させることができる。

10

20

30

40

50

【0052】

多重特異性を有する抗体を分泌する、一般的には組み換え細胞若しくはハイブリドーマ又はその他の不死化細胞ではあるがこれらに限定されない細胞を同定するために、同様のシステムを使用し、分泌イムノグロブリン又はフラグメントを捕獲表面へ通過させる膜の上に細胞を個別に又はマイクロコロニーとして支持するような同様の形式を用いることができる。この場合、微粒子ラベルは多様な抗原又はエピトープを含有し、各々が微粒子ラベルによって生成された特定の色と関連づけられている。多数の当該ラベルが検出された膜上での位置は多重特異性イムノグロブリン又はフラグメントを分泌する細胞と関連づけられるように同定される。よって、2、3、4、5個又はそれ以上の抗原又はエピトープと結合する抗体を同定することができる。

【0053】

本発明の各種態様は、具体的に以下を含む：

- ・タンパク質の機能領域と免疫反応性を示す抗体を得る方法であって、当該タンパク質を少なくとも5個のフラグメントに断片化することと；
- 各々の前記フラグメントを免疫原性増強成分と結合させることと；
- 1以上の被験体を、各々の前記結合フラグメントで免疫することと；
- 該被験体から抗体産生細胞を回収することと；
- 個々の回収された細胞を、各々の免疫フラグメント及び完全なタンパク質と免疫反応性を示すが、残りのフラグメントとは免疫反応性を示さない抗体について検査することと；
- 当該抗体を産生する細胞を選択することを含む方法、並びに
- ・細菌細胞によって分泌される少なくとも1種類のタンパク質の存在又は非存在を検出する方法であって、
- 低分子及びタンパク質を通過させるが、細菌細胞を通過させない孔を備える多孔性膜上の単一細胞から得られる多数のマイクロコロニーを、前記少なくとも1種類のタンパク質が分泌される条件下で培養することと；
- 分泌される任意のタンパク質を前記多孔性膜の下に配置された捕獲表面に向けて孔を通過させることと、
- ここで、前記捕獲表面は、少なくとも1種類の所望のタンパク質と結合している捕獲試薬で必要に応じて処理されていてもよく；
- 多孔性膜を取り除くことと；
- 少なくとも1種類の分泌タンパク質と反応する試薬と結合した微粒子ラベルで捕獲表面を処理することと；
- 非結合ラベルを除去することと；及び
- 前記少なくとも1種類の分泌タンパク質の存在又は非存在を示す、任意の結合ラベルの存在又は非存在を顕微鏡により検出することを含む方法。
- ・CellSpotTMアッセイの改良方法であって、ここで前記改良が、
- a) その底面にグリッドが貼り付けられた、アッセイのための細胞が置かれる膜を保持す

るマイクロプレートキャリアの使用；

b) 散在性の直径5～10 μ の蛍光粒子を含有する、アッセイのために細胞が置かれる膜の使用；

c) アッセイのために細胞が置かれる膜上の細胞の固定化培地としてのM e b i o l^{T M}ゲルの使用；

d) ピペットによる垂直方向のアクセスを可能にするように、アッセイのために細胞が置かれる膜を保持するステージを顕微鏡の下から水平方向にスライドさせるための手段の使用、からなる群から選択される方法。

・分泌レベルに対する培地の組成物の効果を評価する方法であって、

C e l l S p o t^{T M}アッセイを使用して、前記培地の存在下、個々の細胞又はマイクロコロニーの分泌レベルを測定することと、

異なる組成の培地の存在下、同一のアッセイにより得られ、測定されたレベルと、前記レベルを比較することを含む方法。

・単一細胞によって分泌されたタンパク質の期間及び量をモニタリングする方法であって、

各々の細胞に対してC e l l S p o t^{T M}アッセイを時間に応じて実施することを含む方法。

・各物質のエンドサイトーシスの受けやすさを測定する方法であって、

D N A挿入色素と結合した検査物質を提供することと、

前記標識化検査物質で1つ以上の細胞を処理することと、

前記細胞の核内部における前記D N A挿入色素の存在、非存在、又は量を検出することを含む方法。一の実施形態において、各々異なる挿入色素で標識化された多様な物質を、前記細胞を処理する際に用いる。

【0054】

以下の実施例は、本発明を説明するために示されるものであり、限定するものではない。

【実施例】

【0055】

(実施例1) 分泌レベルの決定

イムノグロブリンを分泌するハイブリドーマ細胞をA T C Cから入手し、抗イムノグロブリンでコーティングされた下層のポリスチレン表面と接触する、0.4 μ mの孔を有する膜の上に置いた。細胞を1.2%のメチルセルロースに懸濁し、細胞を固定させるため、プレートを軽く遠心した。分泌されたI g Gは、膜を通過してコーティングされたポリスチレン表面上に漏出した。細胞を含有する膜を、捕獲表面から取り外し可能なプラスチックホルダー上で支持した。このホルダーは、C o s t a r (登録商標)から入手したT r a n s w e l l (登録商標)器具を改良したもので、膜を捕獲表面と接触させるように特別なホルダーがデザインされた。

【0056】

2時間インキュベーション後、膜を取り除き、下層のポリスチレン表面を検出用粒子とインキュベートし、洗浄した後、低倍率及び高倍率顕微鏡の両方でスキャンした。結果を図1Aに示した。高分泌及び低分泌レベルの細胞の対照的なパターンを示している。各「スポット」は、それぞれにおける単一細胞を表す。スポットの強度及び直径を定量化し、分泌測定基準を構築するために使用した。これらの分泌レベルは、図1Aに示したフットプリントを得るために使用したハイブリドーマ細胞の上清サンプルから個々に肉眼的に測定した分泌レベルと相関性があった。図1Bに示すように、2つの測定基準の間には良好な相関がある。

【0057】

この方法は、トランスフェクトされた細胞のライブラリーに適用してもよく、ここでコーディングD N Aの染色体内への組込み部位は、最終的な分泌レベルに影響を与える。従って、多数のランダムな組込みを効率的に調査することが可能である。

10

20

30

40

50

【0058】

(実施例2) 高分泌クローンの選択

細胞株 ATCC 60525 を、実施例1の方法を使用して10,000個の個別の細胞アッセイに分離した。3つの単一の細胞をピックアップし、サブクローンとして培養した。このサブクローンに対して実施例1の Cell SpotTM アッセイを再び行い、各サブクローンについて1,000個の細胞を解析した。

【0059】

図2に示すように、分泌レベルの分布は、3個の選択したサブクローン親細胞のメンバーで高分泌レベルにシフトし、肉眼的な上清解析で測定したところ、最も高い分泌細胞については全体として9倍の改善がもたらされた。

10

【0060】

同じ手法を、分泌レベルが様々な任意の細胞集団、例えば、形質転換 CHO 細胞のライブラリーに適用することができる。分泌タンパク質の DNA がゲノム内のどこに組み込まれるかによって発現レベルは変化する。より確実に高分泌細胞を同定するために、細胞は、標準的な96ウェルマイクロプレートの1ウェルにつき100個の親細胞の「ピン」に分割することができる。細胞を複製プレートに移した後に Cell SpotTM フットプリントが解析される。次に、1つの親細胞に由来すると思われる、多数の高分泌細胞を含むウェルを改変 Transwell 上へ取り出し、Cell Spotの結果の解析によって判定されたそれらの分泌レベルに基づいて単一細胞をピックアップする。

【0061】

20

ランダムな挿入部位をもつ大きなライブラリーをこの方式で容易にスクリーニングすることができる。著しく高い分泌量を示すクローンの染色体組込み部位は、挿入遺伝子及びそれに隣接する DNA の DNA 配列を決定することによって判定することができる。次に、部位特異的遺伝子組み換えを用いて、新たな発現タンパク質の遺伝子を当該部位へ定方向に挿入することができる。トランスフェクトされた遺伝子が部位特異的リコンビナーゼ、例えば、Cre-Lox 又は frt システムの認識配列を含む場合は、将来のトランスフェクションに利用可能な当該認識配列を残して、発現遺伝子を切り出すことができる。

【0062】

(実施例3) 親和性の判定

Biacore (登録商標) の市販機器を使用した方法によって、3つのハイブリドーマ細胞株が、同一の抗原に対する様々な親和性の抗体を分泌すると判定された。捕獲表面上に様々な濃度の捕獲抗体を使用して実施例1に準じて各細胞株を解析した。図3Aに示すように、クローンはインプット細胞の頻度が異なり、それらの既定の親和性に従って検出可能な抗体を産生した。

30

【0063】

一定の濃度の捕獲抗体を表面に配置し、高い表面抗体濃度で観察されたスポットの数をカウントし、図3AのグラフのY軸に示すようにそのスポットの数に1.00の値を割り当てる(100%)ことによってアッセイを行った。次に、表面上の捕獲抗体を複製ウェル内で段階的に希釈し、各希釈についてスポットの数を観察した。その後、この数の1.00の値が割り当てられた濃度において観察された数に対する割合を、図3AのY軸としてプロットした。

40

【0064】

ここで示されるように、低親和性のクローンにおいて、捕獲抗体の濃度が > 250 ng/ml の場合にのみスポットが検出された。中等度の親和性のクローンでは、捕獲抗体のコーティング濃度が 63 ng/ml を超える場合にスポットが検出でき、高親和性クローンでは、表面にプレートされた捕獲抗体の濃度が 8 ng/ml を下回るまでスポットはゼロまで減少しなかった。捕獲試薬濃度が低下するに従い生じたスポットレベルの減少は、結合活性作用の低下を反映している。

【0065】

図3Bは、親和性によりクローンを順位付けするための異なるアプローチを示す。この

50

例において、Cell SpotTMは、抗原結合ビーズ及び抗イムノグロブリンと結合したビーズの両方でプローブされた。未加工のシグナル(Cell SpotTMあたりの結合抗原ビーズ数)は、捕獲された分泌抗体の量及び抗体の抗原に対する内因性親和性(又は結合活性)の両方に比例するため、抗Igビーズに対する抗原ビーズの割合が、捕獲抗体の存在量を標準化させる。図3Bに、標準的なBiacoreTM親和性アッセイの結果との比較を示す。相対的親和性について信頼できる指標としてレシオメトリックを構築する良好な相関関係を示している。

【0066】

(実施例4)膜レセプターのフラグメントに対する抗体の調製

図4は、レセプタータンパク質の細胞外ドメイン及び抗体産生に使用したフラグメントの位置の図を示す。表示された領域はイムノゲン(KLH)に結合され、マウスを免疫するのに使用した。脾臓細胞を採取し、実施例1に記載したCell SpotTM技術に従って個別に解析した。ほぼ全てのペプチドにおいて、少なくとも1つの細胞が該免疫ペプチドと反応する抗体を分泌することが観察された。ペプチドの70%(22のうちの16)では、これらの抗体は、レセプター上の近傍のペプチドとの比較において、該免疫ペプチドに特異的であった。図5は、抗体はイムノゲンとして使用されたフラグメントにのみ結合する、抗体は完全なタンパク質に結合する、及び、抗体は関連する完全なタンパク質と結合しない、という免疫フラグメントに対する特異性を示す3つの基準を満たした抗体を分泌する細胞の頻度を、バーの高さで表している。ペプチドのいくつかにおいては、多くの細胞がこれらの3つの基準を満たす抗体を分泌したが、他においては、全部で~2百万個のスクリーニングされた細胞のうち一部の細胞のみが同定された。この方法で、たとえタンパク質の異なる領域が、その免疫原性において著しく異なっていたとしても、その異なる領域を標的とする抗体の機能的実用性を評価することができる。

【0067】

(実施例5)内在性膜蛋白抗原

その細胞内末端でヘマグルチニンタグと融合された内在性膜蛋白、TR1を発現する細胞を、標準的な培地で培養した。およそ5百万~1千万個の細胞を、界面活性剤を使用してトリス緩衝食塩水中で30分間可溶化した。適当な界面活性剤には、好ましい選択肢としてCHAPSが含まれ、他にn-オクチル-D-グルコピラノシド、n-デシル-D-マンノピラノシド、及びn-ドデシル-D-マルトピラノシドが含まれる。TR1に対する第1世代抗体を使用して、ウエスタンブロットで可溶化を確認した。タグに対するウサギポリクローナル抗体を、シッフ塩基化学を使用して蛍光粒子に共有結合させた。可溶化後、不溶性物質を遠心分離で除去した。無関係な抗体(抗hIgG)と結合させたビーズを上清に20分間添加した後、遠心分離して非特異的結合物質を除去した。上清を40µlの抗HAビーズと混合し、穏やかに混合しながら4で4時間インキュベートした。これらのビーズを遠心分離し、可溶化バッファーで3回洗浄した。次にビーズを可溶化バッファーに再懸濁し、実施例1に記載したCell SpotTMのプローブとして使用した。陽性のシグナルは第1世代の抗TR1抗体を分泌するハイブリドーマ細胞に見られたが、対照のハイブリドーマ株では見られなかった。

【0068】

(実施例6)細菌由来の分泌フットプリント

図6は、遺伝子的に改変された大腸菌を、それらが分泌するイムノグロブリンについて特徴付ける本実施例で使用した装置の図である。示されるように、細胞は、小さなコロニーに増殖することができる、ニトロセルロース膜上に置かれたマイクロコロニーである。

【0069】

この最上層の膜は、明確にわかる穴、例えば、核孔エッチング(nuclear pore etching)によって開けられた穴を有する数マイクロメートルの厚さの、平坦なプラスチック膜で構成され、捕獲表面の上に設置される。「核孔」プロセスにおいて、照射によって小さな穴が作られた後、化学エッチングによって拡大される。本実施例における捕獲表面は、表面の1%を占める直径500nmの穴を有するポリエステルである

。捕獲用膜は、捕獲試薬を固定化するより多くの部位を提供するため、カルボキシ - デキストラン層で被覆してもよい。次に、図7Aに示すようにIg分泌細胞が解析される。ここで、細菌を含有する最上層の膜は捕獲用膜の上に置かれ、続いてこれが寒天培地層の上に置かれる。捕獲用膜に結合した捕獲抗体は、抗イムノグロブリン抗体であり；ビーズは特異的抗原で標識化されて、捕獲用膜上に作成されたCell Spotをプローブするために用いられる。図7Bに示すように、個々のマイクロコロニーは強いCell Spotをもたらし、これは結合しているビーズの種類を判定するそれぞれのカラーチャネルにおいて高倍率で検査することができる。よってCell SpotTMアッセイが哺乳類細胞から細菌細胞まで幅広く適用できる。

【0070】

従って、ペリプラズム領域から組み換えによって産生されたイムノグロブリンが迅速な検出に十分な漏出することが示され；よって、検出するのに十分なイムノグロブリンを放出させるために細胞に浸透圧をかける必要がない。

【0071】

このシステムは、ランダムに構築されたイムノグロブリンライブラリーのスクリーニングに特に有用である。当該応用において、重鎖及び軽鎖の両方を発現する細胞を選択するためにベクター上の2つの選択可能なマーカーを使用しながら、大腸菌培養物を100種類の重鎖及び100種類の軽鎖の発現プラスミドでトランスフェクトする。次に、分泌抗体を上述に従って解析する。タンパク質の任意の組み換えライブラリーに同じ方法を適用することができる。

【0072】

(実施例7)細胞分解能でのウイルスブランクアッセイ

Cell SpotTM形式で行ったように、捕獲表面上の放出物質の捕獲を行うため、ウイルスによる感染が疑われる、又は感染したことが分かっている細胞を、必要に応じて膜上に、広げる。この場合、捕獲表面に、ウイルスタンパク質に特異的な抗体を備える。次に、溶解又は出芽のいずれかによって細胞から放出されたウイルス粒子は細胞の領域で捕獲され、個別の色の微粒子担体で標識化される。例えば株の種類等に関する検出及び分類の信頼性を高めるために、複数の捕獲抗体を使用してもよい。単一細胞のみから放出されたウイルスを検出することができる。本方法によって、大きな細胞叢を容易にスクリーニングすることができる。

【0073】

(実施例8)ピニングによる高分泌細胞の同定

20の不死化された抗体分泌細胞のサンプルをマイクロタイタープレートのウェル内に加え、2,000個の細胞から成る集団になるまで培養する。次に、培養物の半分を取り分けておき、残りの1,000個の細胞は定着させ、抗体を捕獲するためにプロテインAでコーティングされたウェルの底面に抗体を分泌させる。その後細胞を洗い流し、所望の抗体と免疫反応性を示す抗原と結合したマルチカラービーズを使用して、分泌抗体のフットプリントを照合する。マルチカラービーズは蛍光色素で標識化され、個々のフットプリントとして検出用広視野顕微鏡で検出される。その後、著しい数の明るい蛍光を発するフットプリントの存在についてピンを評価する。

【0074】

次に、著しい数の明るい蛍光を発するフットプリントを含有するそれらのピンについて取り分けた方を、個々の細胞の更なる評価のための材料として使用する。その後、取り分けた方の培養物に存在する細胞を、個々のフットプリントを評価するために、個々の細胞が回収可能な膜上に置くことによってCell SpotTMアッセイで検査する。

【0075】

次に、回収された高分泌細胞を培養し、それらの子孫群に対してピニング技術を使用して複製判定を行うことで、高分泌レベルの維持が保証される。

【0076】

(実施例9)指標細胞層上での抗体の捕獲

10

20

30

40

50

TIタンパク質をその表面に提示する生きた3T12-TI-線維芽細胞の単層を細胞捕獲表面として調製する。

【0077】

その後表面を覆う膜上にTIで免疫されたマウス由来の不死化脾臓細胞を置き、次いで分泌を促す。その後膜を除去し、TI-線維芽細胞捕獲細胞を固定し、蛍光タグ付き抗Ig抗体を使用して捕獲抗体を染色する。固定によって内部抗原の露出も起こるため、例えば、細胞内リン酸化反応を検出してもよい。典型的な結果を、2.5x及び5xの倍率で図8A及び図8Bに示す。ここで示されるように、TIを提示する細胞は、十分な捕獲表面試薬を形成する。

【0078】

(実施例10)抗体内部化アッセイ

エンドサイトーシスによる、抗体及び結合したタンパク質の細胞内への取り込みを刺激する抗体を作成することが有用な場合がある。例えば、当該内在化は、細胞表面における有害なタンパク質の量を減少させるかもしれない、又は細胞の内部への薬の送達に有用であるかもしれない。DNA挿入色素と抗体を結合させることにより、細胞DNAと相互作用した場合にのみ色素が蛍光を発するようになるため、複合体の内在化を高感度で測定できるようになる。候補ターゲティング抗体のライブラリーは色素捕獲ドメインと融合している(例えば、ピオチン-色素複合体と結合するアビジン、又はアルブミン結合色素に結合するアルブミン結合タンパク質)。候補物質を発現する細胞は、必要に応じて誘導体化され、分泌抗体の色素捕獲ドメインに結合する色素の存在下で指標細胞層を提供する表面にさらされる。指標細胞内への取り込みは、挿入色素がDNAと結合した時の核蛍光によって評価する。

【0079】

(実施例11)その他の足場

抗体が唯一の結合物質の多様な集団ではない。その他のタンパク質ファミリーも、抗体の相補性決定領域に類似する容易に改変可能なループを含む。具体例としてグルタチオントランスフェラーゼが挙げられる。特定のループを突然変異させると、「glubodies」というランダム化ライブラリーが得られ、Napoliitano, et al., Chem. Biol (1996) 3(5): 359-367に開示されるように、そのメンバーは低分子リガンドに対する結合プロファイルにかなりの多様性を示す。

【0080】

組み換えタンパク質に加えて、本発明は組み換え小ペプチドにも適用することができる。国際公開第01/81375号に記載されるように、トリ脾臓ペプチド(aPP)は、フォールディングによって堅固な構造をつくる36アミノ酸長のペプチドであり、融点は65である。溶媒露出残基の変化は、フォールディングしたペプチドの安定性に著しい影響を与えない。aPPをつなぎとなるもの、例えば、抗体のFc領域に融合させると、CellSpotTM法を使用したaPPパリアントのランダム化ライブラリーのスクリーニングが容易になる。

【0081】

より一般的にはCellSpotTMの多重解析技術を使用して、リガンドの任意のアレイをスクリーニングすることができる。例えば、米国特許第5,744,305号に記載されているように、コンビナトリアルケミストリーライブラリーを平面上で合成することができる。この方法において、光感受性保護基の放出をコントロールするためのバイナリーマスクを作成するためにフォトリソグラフィが用いられる。検出感度を高めるためにCellSpotTMアプローチを使用すると、スポットのサイズを小さくすることができる。更に、標的タンパク質のファミリーに対するリガンドの特異性を評価することができる。あるいは、切断可能なリンカーを用いて、ビーズ上で化合物を合成することができる。ビーズからの化合物の放出及び表面上での捕獲により、抗体の分布と同じ方法でプローブ可能な結合パートナーの分布を生成する。抗体を産生した細胞を回収するかわりに、化合物を産生したビーズを回収する。

10

20

30

40

50

【 図 1 】

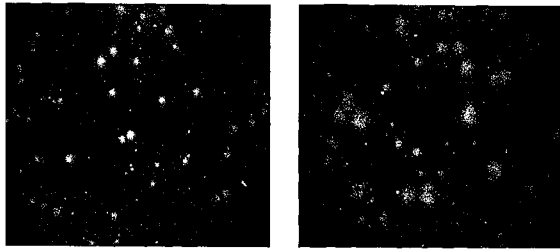


図 1A

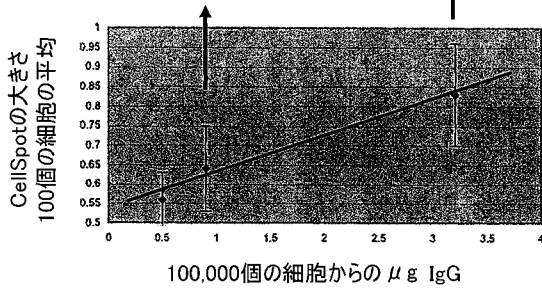
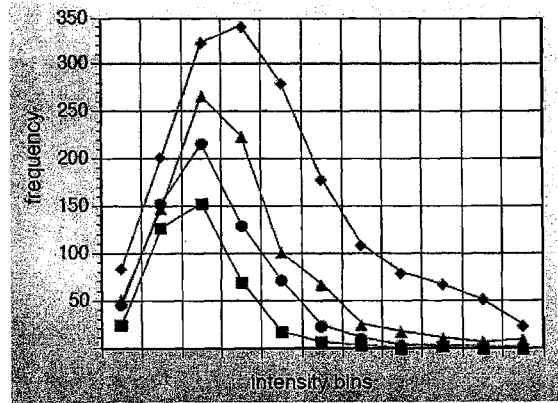


図 1B

【 図 2 】



■ ATCC 6025-parental (2pg/c/d)
 ● Subclone 1 (8pg/c/d)
 ▲ Subclone 2 (12pg/c/d)
 ◆ Subclone 3 (17pg/c/d)

frequency : 頻度

intensity bins: ピンの強度

ATCC6025-parental (2pg/c/d)

: ATCC6025 親細胞 (2pg/c/d)

Subclone 1 (8pg/c/d) : サブクローン1 (8pg/c/d)

Subclone 2 (12pg/c/d) : サブクローン2 (12pg/c/d)

Subclone 3 (17pg/c/d) : サブクローン3 (17pg/c/d)

【 図 3 】

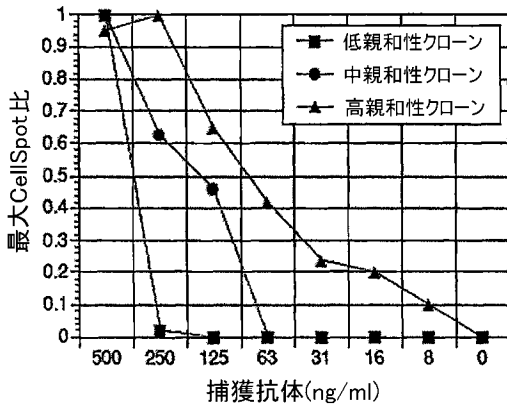


図 3A

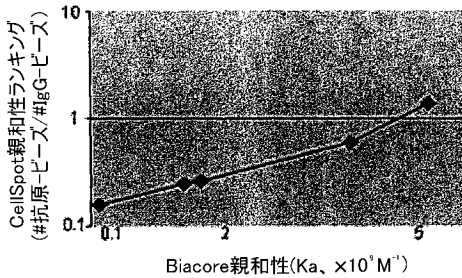
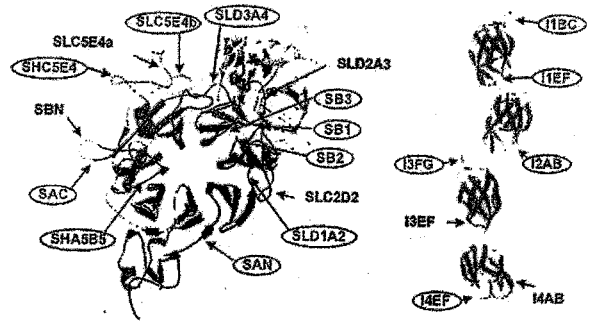
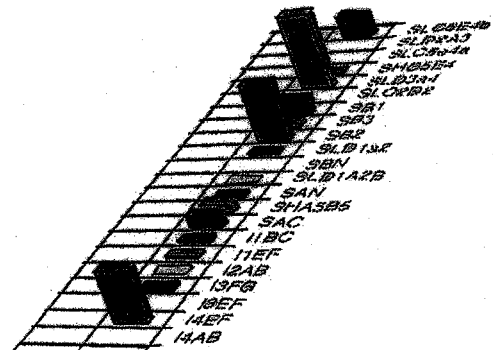


図 3B

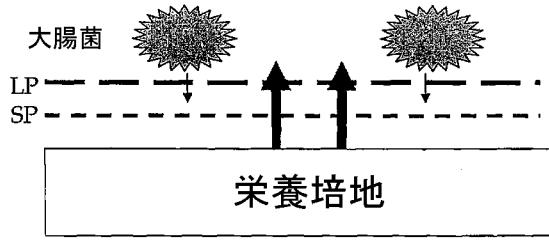
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 8 】

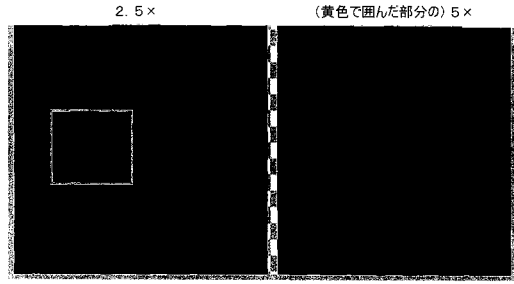


図8A

図8B

【 図 7 】

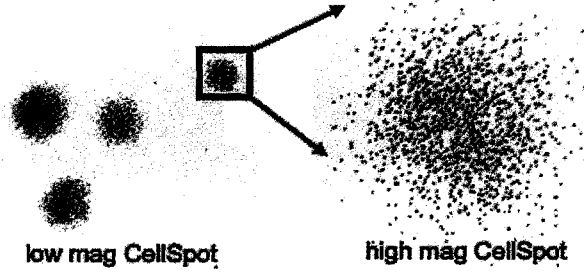


図7A

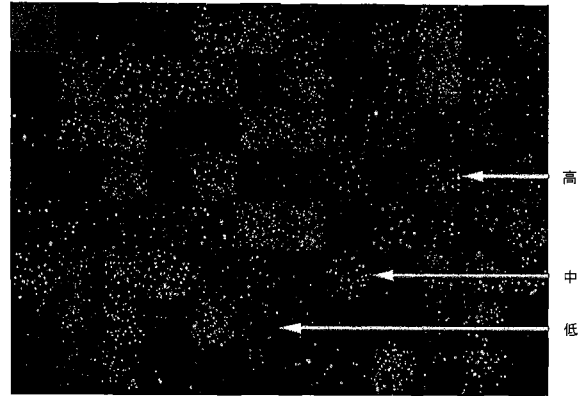
図7B

図7A Low mag CellSpot: 低倍率CellSpot

図7B High mag CellSpot: 高倍率CellSpot

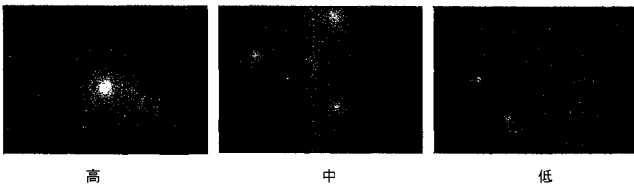
【 図 9 A 】

ステップ1: 好ましい多クローン性ピンの同定



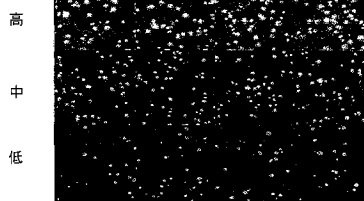
【 図 9 B 】

ステップ2: 単一細胞クローニング用に好ましいピンの取り出し



【 図 9 C 】

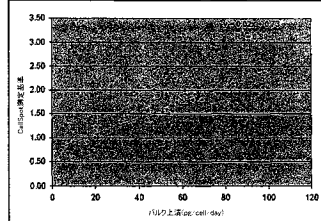
ステップ3: クローン性子孫細胞の性能特性の確認(複製フェル)



CellSpot測定基準(〜100個の細胞について測定)は、バルク上清解析(〜100,000個の細胞について測定)と相関する

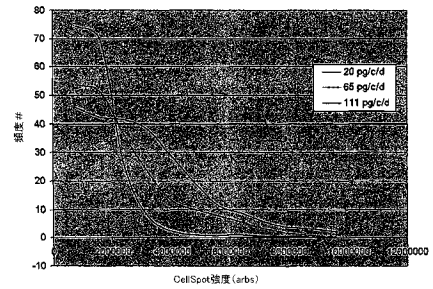
$$y=0.02x+0.73$$

$$R^2=0.89$$



【 図 9 D 】

CellSpot™測定基準は集団統計値を定量化し、それにより安定性のモニタリングが可能となる(様々なレベルでの分泌細胞の頻度)



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/73293
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/53(2006.01),33/543(2006.01),33/558(2006.01),33/577(2006.01) USPC: 435/7.2,7.24,7.32,7.94,7.95 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) U.S. : 435/7.2, 7.24, 7.32, 7.94, 7.95 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 practicable, search terms used) EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/045396 A2 (TRELLIS BIOSCIENCES, INC.) 19 May 2005 (19.05.2005), see entire document.	1-33
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 31 August 2008 (31.08.2008)		Date of mailing of the international search report 07 OCT 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer JAMES L. GRUN Telephone No. 571-272-1600

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/547 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 9 7	
C 4 0 B 30/04 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 2 5 E	
	G 0 1 N 33/547	
	G 0 1 N 33/53 Y	
	C 4 0 B 30/04	

(31) 優先権主張番号 60/911,483

(32) 優先日 平成19年4月12日(2007.4.12)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B063 QA05 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR56 QR69 QR77 QS12 QS24
 QS32 QS36
 4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 BA06 CA25 CA46

专利名称(译)	细胞斑点应用		
公开(公告)号	JP2009544014A	公开(公告)日	2009-12-10
申请号	JP2009519654	申请日	2007-07-11
申请(专利权)人(译)	网格生物科学, 油墨.		
[标]发明人	カウヴァーローレンスエム		
发明人	カウヴァー、ローレンス、エム.		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C12N5/06 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/547 C40B30/04		
CPC分类号	C07K16/00 G01N33/5005 G01N33/56966 G01N33/56972 G01N33/6842 G01N33/6845 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.N C12Q1/02 C12N5/00.E G01N33/531.A G01N33/53.D G01N33/543.597 G01N33/543.525.E G01N33/547 G01N33/53.Y C40B30/04		
F-TERM分类号	4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS32 4B063/QS36 4B065/AA90X 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA06 4B065/CA25 4B065/CA46		
代理人(译)	长谷川智子 长谷川 洋		
优先权	60/830507 2006-07-12 US 60/839174 2006-08-21 US 60/848112 2006-09-29 US 60/911483 2007-04-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 描述了CellSpot™ 测定的许多应用。这些应用包括扩展到完整的膜蛋白探针, 扩展到细菌细胞分泌, 鉴定具有增加的亲和力的抗体, 鉴定具有增加的分泌水平的克隆, 以及鉴定罕见的有效抗体使用大规模平行筛选。

(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2009-544014 P2009-544014 (43) 公表日 平成21年12月10日(2009.12.1)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考) 4B063 4B065
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 N	
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	
C12N 5/06 (2006.01)	C12N 5/00 E	
G01N 33/531 (2006.01)	G01N 33/531 A	
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/53 D	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続	
(21) 出願番号 特願2009-519654 (P2009-519654)	(71) 出願人 504403150	
(86) (22) 出願日 平成19年7月11日(2007.7.11)	トレリス バイオサイエンス、インク、	
(85) 翻訳文提出日 平成21年3月6日(2009.3.6)	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94 (
(86) 国際出願番号 PCT/US2007/073293	80 サウス サン フランシスコ コー	
(87) 国際公開番号 W02008/008958	ポレート ドライブ 2-B	
(87) 国際公開日 平成20年1月17日(2008.1.17)	(74) 代理人 100120283	
(31) 優先権主張番号 60/830,507	弁理士 長谷川 智子	
(32) 優先日 平成18年7月12日(2006.7.12)	(74) 代理人 100110973	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 長谷川 洋	
(31) 優先権主張番号 60/839,174	(72) 発明者 カウヴァー、ローレンス、エム、	
(32) 優先日 平成18年8月21日(2006.8.21)	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94 (
(33) 優先権主張国 米国 (US)	09 サン フランシスコ グリーン ;	
(31) 優先権主張番号 60/848,112	トリート #7A 1438	
(32) 優先日 平成18年9月29日(2006.9.29)		
(33) 優先権主張国 米国 (US)		

最終頁に続く