

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6310388号
(P6310388)

(45) 発行日 平成30年4月11日(2018.4.11)

(24) 登録日 平成30年3月23日(2018.3.23)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A Y
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

請求項の数 61 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2014-520636 (P2014-520636)	(73) 特許権者	514014883
(86) (22) 出願日	平成24年7月17日(2012.7.17)		イーペーアー ゲーエムペーハー
(65) 公表番号	特表2014-529361 (P2014-529361A)		ドイツ連邦共和国 ゲッティンゲン ルド
(43) 公表日	平成26年11月6日(2014.11.6)		ルフ-ヴィッセル-シュトラッセ 28
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/063969	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02013/011011		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成25年1月24日(2013.1.24)	(74) 代理人	100102118
審査請求日	平成27年6月17日(2015.6.17)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	61/508,943	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成23年7月18日(2011.7.18)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的細胞を可逆的に染色する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検出可能な標識を用いて、その表面に受容体分子を含む標的細胞を可逆的に染色する方法であって、

該標的細胞を含む細胞の混合物を、以下(i)(ii)(iii):

(i) 少なくとも1つの結合部位Bを含む受容体結合試薬であって、

ここで結合部位Bは該受容体分子に特異的に結合し、

ここで結合部位Bを介する該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離

速度定数(k_{off})は約 $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、

該受容体結合試薬が少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、

ここで結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zに可逆的に結合させることが可能であり、

ここで該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)が約 $10^{-7} \sim$ 約 10^{-10}M の範囲である、受容体結合試薬；

(ii) 受容体結合試薬の結合パートナーCの可逆的結合のための少なくとも2つの結合部位Zを含む、多量体化試薬であって、

ここで受容体結合試薬(i)と多量体化試薬(ii)は、該標的細胞に結合する多価結合複合体を形成し、

各多価結合複合体が、1つの多量体化試薬に結合された少なくとも2つの受容体結合試薬を含み、

10

20

該多価結合複合体が、該受容体結合試薬と比較して、増加したアビディティを提供する、多量体化試薬；および

(iii) 該多価結合複合体に結合された、または結合することができる、検出可能な標識

と接触させる段階を含み、

ここで該標的細胞は多価結合複合体の標的細胞への結合によって染色され、

ここで受容体結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合を破壊した場合、該標的細胞の染色が可逆的である、方法。

【請求項2】

結合部位Zと結合パートナーCとの間の可逆的結合の解離定数(K_d)が $10^{-2}M \sim 10^{-13}M$ の範囲である、請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

受容体結合試薬と受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})が、約 $3 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 以上の値を有する、請求項1記載の方法。

【請求項4】

染色された細胞を、前記細胞の混合物中に存在する非標的細胞から分離する段階をさらに含む、請求項1~3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

受容体結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合を破壊することによって、標的細胞から前記染色を除去する段階をさらに含む、請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項6】

多量体化試薬の除去が、染色された細胞からの受容体結合試薬の解離をもたらす、請求項4または5記載の方法。

【請求項7】

(a) 結合パートナーCがビオチンを含み、かつ多量体化試薬がビオチンに可逆的に結合するストレプトアビジン類似体もしくはアビジン類似体を含む；

(b) 結合パートナーCがストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体を含み、かつ多量体化試薬が該ビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体、もしくはアビジン類似体を含む；または

30

(c) 結合パートナーCがストレプトアビジンもしくはアビジン結合性ペプチドを含み、かつ多量体化試薬が該ストレプトアビジンもしくはアビジン結合性ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体、もしくはアビジン類似体を含む、

請求項1~6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

結合パートナーCがストレプトアビジン結合性ペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lysを含み、多量体化試薬がストレプトアビジン類似体Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷またはストレプトアビジン類似体Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、請求項7記載の方法。

40

【請求項9】

結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合が2価カチオンの存在下で起こる、請求項1~8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

結合パートナーCがカルモジュリン結合性ペプチドを含み、かつ多量体化試薬がカルモジュリンを含む；

結合パートナーCがFLAGペプチドを含み、かつ多量体化試薬がFLAGペプチドに結合する抗体を含む；または

結合パートナーCがオリゴヒスチジンタグを含み、かつ多量体化試薬がオリゴヒスチジンタグに結合する抗体を含む、

請求項9記載の方法。

50

【請求項 1 1】

結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合が金属イオンキレート化によって破壊される、請求項9または10記載の方法。

【請求項 1 2】

前記金属キレート化がEDTAまたはEGTAの添加により達成される、請求項11記載の方法。

【請求項 1 3】

多量体化試薬がストレプトアビジンもしくはアビジンの、またはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意の類似体の、オリゴマーまたはポリマーである、請求項1~12のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 4】

前記オリゴマーまたはポリマーが多糖によって架橋されている、請求項13記載の方法。

【請求項 1 5】

結合パートナーCが抗原を含み、かつ多量体化試薬が該抗原に対する抗体を含む、請求項1~14のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 6】

前記抗原がエピトープタグである、請求項15記載の方法。

【請求項 1 7】

エピトープタグが、Mycタグ(配列: EQKLISEEDL)、HAタグ(配列: YPYDVPDYA)、VSV-Gタグ(配列: YTDIEMNRLGK)、HSVタグ(配列: QPELAPEDPED)、V5タグ(配列: GKPIPNPLLGLDST)およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼからなる群より選択される、請求項16記載の方法。

【請求項 1 8】

前記抗原がタンパク質を含む、請求項15記載の方法。

【請求項 1 9】

前記タンパク質がマルトース結合性タンパク質(MBP)、キチン結合性タンパク質(CBP)およびチオレドキシンからなる群より選択される、請求項18記載の方法。

【請求項 2 0】

受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬が、抗体、2価抗体フラグメント、1価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、およびMHC分子からなる群より選択される、請求項1~19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

2価抗体フラグメントが(Fab)₂'フラグメント、または2価一本鎖Fvフラグメントである、請求項20記載の方法。

【請求項 2 2】

1価抗体フラグメントがFabフラグメント、Fvフラグメント、および一本鎖Fvフラグメント(scFv)からなる群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項 2 3】

抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子が、アプタマー、リボカリンファミリーのポリペプチドに基づく変異タンパク質、グルボディ(glubody)、アンキリン足場に基づくタンパク質、結晶性足場に基づくタンパク質、アドネクチン、およびアピマーからなる群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項 2 4】

前記接触させる段階が15 以下の温度で実施される、請求項1~23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記接触させる段階が4 以下の温度で実施される、請求項24記載の方法。

【請求項 2 6】

前記標的細胞が哺乳動物細胞である、請求項1~25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

哺乳動物細胞がリンパ球または幹細胞である、請求項26記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項28】

リンパ球がT細胞、Tヘルパー細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞である、請求項27記載の方法。

【請求項29】

T細胞がCMV特異的CD8⁺ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞および制御性T細胞の群より選択される、請求項28記載の方法。

【請求項30】

検出可能な標識が蛍光色素または磁性標識である、請求項1~29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

標的細胞が、少なくとも2つの異なる受容体結合試薬を用いて、少なくとも2つの異なる受容体分子のグループによって実質的に染色および単離され、各受容体結合試薬が、少なくとも2つの異なる受容体分子のグループの予め選択された受容体分子に特異的に結合する結合部位Bを含む、請求項1~30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

少なくとも2つの異なる受容体分子のグループの第2のまたはさらなる受容体分子に結合する受容体結合試薬が、多量体化試薬の結合部位Zによって結合され得る少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含む、請求項31記載の方法。

【請求項33】

結合部位Bを介して特異的に結合する受容体結合試薬と第2のまたはさらなる受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})が、約 $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有する、請求項32記載の方法。

【請求項34】

第2のまたはさらなる受容体分子と、該第2のまたはさらなる受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬との間の結合の解離定数(K_d)が $10^{-2} \sim 10^{-7} \text{M}$ の範囲である、請求項32または請求項33記載の方法。

【請求項35】

少なくとも1つの共通の特定の受容体の存在によって規定される細胞集団を単離するための、請求項1~34のいずれか一項記載の方法の使用。

【請求項36】

共通の特定の受容体の存在によって規定される細胞集団がリンパ球集団または幹細胞集団である、請求項35記載の使用。

【請求項37】

リンパ球集団が抗原特異的T細胞集団、Tヘルパー細胞集団、B細胞集団またはナチュラルキラー細胞集団である、請求項36記載の使用。

【請求項38】

T細胞がCMV特異的CD8⁺ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞および制御性T細胞の群より選択される、請求項37記載の使用。

【請求項39】

リンパ球集団または幹細胞集団の機能的状態を判定するための、請求項36記載の使用。

【請求項40】

インビトロ増殖のためのリンパ球集団を精製するための、請求項36記載の使用。

【請求項41】

再生療法のための幹細胞集団を精製するための、請求項36記載の使用。

【請求項42】

幹細胞集団がCD34⁺特異的集団またはNanog⁺集団である、請求項41記載の使用。

【請求項43】

精製された細胞集団が免疫応答をモジュレートするためのCD4⁺ Tヘルパー細胞である、請求項36記載の使用。

【請求項44】

10

20

30

40

50

養子移入、癌治療、細菌感染の処置、ウイルス感染、または免疫療法のためのリンパ球集団を精製するための、請求項36記載の使用。

【請求項45】

精製された細胞集団が、関連抗原に特異的なCD8⁺ T細胞、白血病関連抗原に特異的なCD8⁺ T細胞、メラノーマ関連抗原に特異的なCD8⁺ T細胞、ウイルス抗原に特異的なCD8⁺ T細胞である、請求項44記載の使用。

【請求項46】

ウイルス抗原に特異的なCD8⁺ T細胞が、サイトメガロウイルス(CMV)ホスホタンパク質65特異的なCD8⁺ T細胞またはエプスタイン・バーウイルスEBNA抗原特異的なCD8⁺ T細胞である、請求項45記載の使用。

10

【請求項47】

精製された細胞集団が、自己免疫疾患、1型糖尿病、大腸炎、アレルギーの処置に使用するためのTreg細胞である、請求項44記載の使用。

【請求項48】

自己免疫疾患が移植片対宿主病(GvHD)または移植片拒絶反応である、請求項47記載の使用。

【請求項49】

Treg細胞集団がCD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁺ Treg細胞である、請求項47または48記載の使用。

【請求項50】

精製された細胞集団がCD62L⁺ CD8⁺ 特異的なセントラルメモリーT細胞である、請求項44記載の使用。

20

【請求項51】

検出可能な標識を用いて、その表面に受容体分子を含む標的細胞を可逆的に染色するための試薬キットであって、以下(i)(ii)(iii):

(i) 該受容体分子に特異的に結合する結合部位Bを含む、少なくとも1つの受容体結合試薬であって、

ここで結合部位Bを介する該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、

該受容体結合試薬は少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、

ここで結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zによって可逆的に結合され得

30

る、ここで該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)が約 $10^{-7} \sim 10^{-10} \text{M}$ の範囲である、受容体結合試薬；

(ii) 該受容体結合試薬の結合パートナーCのための少なくとも2つの結合部位Zを含む、少なくとも1つの多量体化試薬であって、

ここで結合パートナーCと該多量体化試薬の結合部位Zは可逆的結合を形成することができる、多量体化試薬；

(iii) 受容体結合試薬(i)および/または多量体化試薬(ii)に結合された、または結合することができる、検出可能な標識

を含む、キット。

40

【請求項52】

結合パートナーCと結合部位Zとの間の結合の解離定数(K_d)が $10^{-2} \sim 10^{-13} \text{M}$ の範囲である、請求項51記載のキット。

【請求項53】

請求項1~33のいずれか一項に記載の標的細胞を可逆的に染色する方法のための、受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬の使用であって、

該受容体結合試薬が少なくとも1つの結合部位Bを含み、

ここで結合部位Bは該受容体分子に特異的に結合し、

ここで結合部位Bを介する該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、

50

ここで該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)が約 10^{-7} ~ 約 10^{-10} Mの範囲である、使用。

【請求項54】

受容体結合試薬が、抗体、2価抗体フラグメント、1価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、およびMHC分子からなる群より選択される、請求項53記載の使用。

【請求項55】

2価抗体フラグメントが $(Fab)_2$ 'フラグメント、2価一本鎖Fvフラグメント、またはダイアボディである、請求項54記載の使用。

【請求項56】

1価抗体フラグメントがFabフラグメント、Fvフラグメント、および一本鎖Fvフラグメント(scFv)からなる群より選択される、請求項54記載の使用。

【請求項57】

抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子が、アプタマー、リボカリンファミリーのポリペプチドに基づく変異タンパク質、グルボディ(glubody)、アンキリン足場に基づくタンパク質、結晶性足場に基づくタンパク質、アドネクチン、およびアピマーの群より選択される、請求項54記載の使用。

【請求項58】

検出可能な標識を用いて、その表面に受容体分子を含む標的細胞を可逆的に染色する方法であって、該標的細胞を含む細胞の混合物を、以下(i)(ii)(iii):

(i) 少なくとも2種類の受容体結合試薬であって、

各種類の受容体結合試薬が少なくとも1つの結合部位Bを含み、

ここで受容体結合試薬の種類のそれぞれの結合部位Bは該受容体分子に特異的に結合し、

ここで結合部位Bを介する各種類の受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、

各種類の受容体結合試薬が少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、

ここで各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zに可逆的に結合させることが可能であり、

ここで該各種類の受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)が約 10^{-7} ~ 約 10^{-10} Mの範囲である、受容体結合試薬；

(ii) 各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCの可逆的結合のための少なくとも1つの結合部位Zを含む多量体化試薬であって、

ここで少なくとも2種類の受容体結合試薬(i)と多量体化試薬(ii)は、該標的細胞に結合する多価結合複合体を形成し、

各多価結合複合体が、1つの多量体化試薬に結合された少なくとも1つの各種類の受容体結合試薬を含み、

該多価結合複合体が、各種類の受容体結合試薬と比較して、増加したアビディティを提供する、多量体化試薬；および

(iii) 該多価結合複合体に結合された、または結合することができる、検出可能な標識

と接触させる段階を含み、

ここで該標的細胞は多価結合複合体の標的細胞への結合によって染色され、

ここで各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合を破壊した場合、該標的細胞の染色が可逆的である、方法。

【請求項59】

結合部位Zと各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCとの間の結合の解離定数(K_d)が 10^{-2} ~ 10^{-13} Mの範囲である、請求項58記載の方法。

【請求項60】

検出可能な標識を用いて、その表面に受容体分子を含む標的細胞を可逆的に染色するた

10

20

30

40

50

めの試薬キットであって、以下(i)(ii)(iii):

(i) 該受容体分子に特異的に結合する結合部位Bを含む、少なくとも2種類の受容体結合試薬であって、

ここで結合部位Bを介する各種類の受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、

各種類の受容体結合試薬が少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、

ここで各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zによって結合され得、

ここで該各種類の受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)が約 $10^{-7} \sim 10^{-10} \text{M}$ の範囲である、受容体結合試薬；

10

(ii) 各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCのための少なくとも1つの結合部位Zを含む、少なくとも1つの多量体化試薬であって、

ここで各種類の結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zは可逆的結合を形成することができる、多量体化試薬；および

(iii) 受容体結合試薬(i)および/または多量体化試薬(ii)に結合された、または結合することができる、検出可能な標識を含む、試薬キット。

【請求項61】

結合部位Zと各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCとの間の結合の解離定数(K_d)が $10^{-2} \sim 10^{-13} \text{M}$ の範囲である、請求項60記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本発明は、2011年7月18日に米国特許商標庁に出願された米国仮特許出願第61/508,943号「標的細胞を可逆的に染色する方法」に対する優先権の恩典を主張するものであり、その内容はすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、標的細胞を可逆的に染色する方法に関する。本発明はまた、少なくとも1つの共通の特定の受容体分子の存在によって規定される標的細胞または標的細胞集団を単離する方法に関する。本発明はまた、本発明の方法を実施するために使用することができるキットを提供する。

30

【背景技術】

【0003】

発明の背景

細胞療法は、多くの疾患の治療のために非常に有効であることが証明されている。例えば、原発性免疫不全症は造血幹細胞移植(HSCT)によって治療することができ、また、一部の白血病は同種HSCTとドナーリンパ球輸注(DLI)とを組み合わせることで完全寛解に至らせることができる(Kolb, H.J. et al., Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood 76 (12), 2462-2465 (1990) (非特許文献1))。いくつかの臨床の現場では、サイトメガロウイルス(CMV)の再活性化によって引き起こされる致命的な合併症(Riddell, S.R. et al., Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. Science 257 (5067), 238-241 (1992) (非特許文献2))、または Epstein-Barr virus (EBV) が介在するリンパ増殖性疾患(Rooney, C.M. et al., Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr virus-related lymphoproliferation. Lancet 345 (8941), 9-13 (1995) (非特許文献3))に対して免疫無防備状態の患者を再構成するのに、ウイルス特異的T細胞の養子移入は非常に有効である。同様に、自己腫瘍浸潤リンパ球から誘導された、またはインビトロで培養し

40

50

くは遺伝子操作された、腫瘍抗原特異的T細胞は、治療の改善のための有望な候補である。

【0004】

これらの興味深い臨床観察にもかかわらず、臨床応用への細胞療法よりも広範な移行はまだ待機中である。これは主として、免疫療法用の細胞調製物を生成するのに用いられる手順のほとんどが非常に煩雑で、時間がかかり、かつ高価であるという事実に起因する。さらに、臨床効果を媒介することが知られている細胞集団は、通常、高純度に濃縮する必要がある。なぜならば、混入する「不要な」細胞は、(同種幹細胞移植および/またはDLI治療の際に移植片対宿主病(GvHD)を媒介するアロ反応性T細胞のように)有害な、時には生命を脅かす、副作用を媒介することがあるからである。極めて少ない数の養子移入されたT細胞は有益な臨床効果に寄与し得ることがすでに示されているので、同様のルールが副作用のない細胞集団にも当てはまるだろう。したがって、治療に適用可能な、高純度の、明確に規定された細胞調製物を提供することは、これらの有望な治療をより効果的にかつ予測可能にするだけでなく、潜在的な副作用のリスクを低下させる鍵となるだろう。

10

【0005】

表面マーカーが介在する臨床細胞精製のための現在の方法は、通常、単一のパラメータ(例えば、CD34、MHC多量体)に依存している。しかし、ほとんどの細胞集団 - エクスピボで直接誘導されたまたはインビトロ細胞培養後の細胞集団 - では、これらの細胞を他の細胞から真に分離するために異なる表面マーカーの組み合わせが必要である。例えば、天然に存在する制御性T細胞(Treg)は、同種HSCT 4の際の急性GvHD、または自己免疫疾患の発症を予防できる可能性がある、有望な細胞サブセットに相当する(Riley, J.L., June, C.H., & Blazar, B.R., Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 30 (5), 656-665 (2009) (非特許文献4); Randolph, D.A. & Fathman, C.G., Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu Rev Med* 57, 381-402 (2006) (非特許文献5))。

20

【0006】

多数の細胞によって共有されるCD4の発現のほかに、それらの高親和性IL-2受容体鎖(CD25)の構成的発現のような追加のマーカーが、不均一性をさらに絞り込むために必要とされる。しかし、CD25は、活性化されたばかりのエフェクターおよびメモリーT細胞を含む、大部分の非制御性細胞にも発現される。したがって、CD4、CD25、CD127、およびCD45RAの組み合わせのような、コンビナトリアル染色パターン(Miyara, M. et al., Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30 (6), 899-911 (2009) (非特許文献6); Hofmann, P. et al., Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 108 (13), 4260-4267 (2006) (非特許文献7))が、この臨床的に意義のあるT細胞サブセットをより正確に同定するために提起されている。

30

【0007】

すべての現在利用可能な臨床マーカーに基づく細胞分離技術は、標識された細胞集団を磁場内に保持する常磁性ビーズを利用するものである。これにより、直接標識された標的集団を使用する陽性濃縮戦略は最も高い純度を与える。しかし、数種の異なるマーカーを介する精製の組み合わせは、はっきりと区別できる最高純度の細胞集団を単離するために必要であるものの、依然として実現することが困難である。さらに、陽性選択後に、標識とビーズの両方は、通常、細胞産物上に残ったままであり、単離された細胞集団を潜在的に操作したり、その機能/生存率に、例えば受容体遮断により、マイナスの影響を与えたりする。特に臨床細胞選別に関しては、残存する細胞標識が、患者への細胞産物の適用可能性について実質的な規制上の障害を引き起こす。陽性選択の問題点を回避するために、多くの臨床細胞処理手順は、枯渇設定に変更されてきた。残念ながら、標的細胞の純度はしばしば不十分であり、また、枯渇方法は異なる抗体の複雑なカクテルを必要とすることが多く、そうした抗体の製造および適用は時間と労力を要しかつ高価である。

40

50

【 0 0 0 8 】

したがって、例えば細胞選別の後に、精製された細胞集団からのすべての受容体結合成分と染色試薬の遊離および完全除去を可能にする、細胞の精製または単離方法を提供する必要性が依然として存在する。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】 Kolb, H.J. et al., Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76 (12), 2462-2465 (1990)

10

【 非特許文献 2 】 Riddell, S.R. et al., Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257 (5067), 238-241 (1992)

【 非特許文献 3 】 Rooney, C.M. et al., Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 345 (8941), 9-13 (1995)

【 非特許文献 4 】 Riley, J.L., June, C.H., & Blazar, B.R., Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 30 (5), 656-665 (2009)

【 非特許文献 5 】 Randolph, D.A. & Fathman, C.G., Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu Rev Med* 57, 381-402 (2006)

20

【 非特許文献 6 】 Miyara, M. et al., Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30 (6), 899-911 (2009)

【 非特許文献 7 】 Hoffmann, P. et al., Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 108 (13), 4260-4267 (2006)

【 発明の概要 】

【 0 0 1 0 】

一局面において、本発明は、検出可能な標識を用いて、標的細胞を可逆的に染色する方法を提供する。該標的細胞はその表面に受容体分子を含むものであり、前記方法は、該標的細胞を含む細胞の混合物を、以下(i)(ii)(iii):

30

(i)少なくとも1つ(任意)の結合部位Bを含む受容体結合試薬であって、ここで結合部位Bは該受容体分子に特異的に結合し、ここで結合部位Bを介する該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、該受容体結合試薬が少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、ここで結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zに(可逆的に)結合させることが可能である、受容体結合試薬;

(ii)受容体結合試薬の結合パートナーCの可逆的結合のための少なくとも2つの結合部位Zを含む多量体化試薬であって、ここで受容体結合試薬(i)と多量体化試薬(ii)は該標的細胞に結合する(複数の)多価結合複合体を形成し、各多価結合複合体が、1つの多量体化試薬に結合された少なくとも2つの受容体結合試薬を含み、該多価結合複合体が、受容体結合試薬と比較して、増加したアビディティ(結合力)を提供する、多量体化試薬;および

40

(iii)該多価結合複合体に結合された、検出可能な標識と接触させる段階を含み、

ここで該標的細胞は多価結合複合体の標的細胞への結合によって染色され、ここで受容体結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合を破壊した場合、該標的細胞の染色は可逆的である。

【 0 0 1 1 】

第2の局面において、本発明は、(少なくとも1つの共通の特定の)受容体分子の存在によって規定される標的細胞集団を単離するための前記染色方法の使用を提供する。

50

【0012】

さらなる局面において、本発明は、検出可能な標識を用いて、標的細胞を可逆的に染色する(または標的細胞を単離する)ためのキットを提供する。該標的細胞はその表面に受容体分子を含むものであり、前記キットは、以下(i)(ii)(iii):

(i) 該受容体分子に特異的に結合する1つ(任意)の結合部位Bを含む、少なくとも1つの受容体結合試薬であって、ここで結合部位Bを介する該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、該受容体結合試薬は少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、ここで結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zによって(可逆的に)結合され得る、受容体結合試薬;

(ii) 該受容体結合試薬の結合パートナーCのための少なくとも2つの結合部位Zを含む、少なくとも1つの多量体化試薬であって、ここで結合パートナーCと該多量体化試薬の結合部位Zは可逆的結合を形成することができる、多量体化試薬;

(iii) 受容体結合試薬(i)および/または多量体化試薬(ii)に結合された、または結合することができる、検出可能な標識を含む。

【0013】

さらなる局面において、本発明は、標的細胞を可逆的に染色する方法のための、受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬の使用を提供し、該受容体結合試薬は少なくとも1つの結合部位Bを含み、ここで結合部位Bは該受容体分子に特異的に結合し、ここで結合部位Bを介する該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有する。

【0014】

さらなる局面において、本発明は、検出可能な標識を用いて、標的細胞を可逆的に染色する方法を提供する。該標的細胞はその表面に(少なくとも1つの)受容体分子を含むものであり、前記方法は、該標的細胞を含む細胞の混合物を、以下(i)(ii)(iii):

(i) 少なくとも2種類の受容体結合試薬であって、各種類の受容体結合試薬は少なくとも1つの結合部位Bを含み、ここで受容体結合試薬の種類のそれぞれの結合部位Bは該受容体分子に特異的に結合し、ここで結合部位Bを介する各種類の受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、各種類の受容体結合試薬は少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、ここで各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zに可逆的に結合させることが可能である、受容体結合試薬;

(ii) 各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCの可逆的結合のための少なくとも1つの結合部位Zを含む、多量体化試薬であって、ここで少なくとも2種類の受容体結合試薬(i)と多量体化試薬(ii)は該標的細胞に結合する(複数の)多価結合複合体を形成し、各多価結合複合体が、1つの多量体化試薬に結合された少なくとも1つの各種類の受容体結合試薬を含み、該多価結合複合体が、各種類の受容体結合試薬と比較して、増加したアビディティを提供する、多量体化試薬; および

(iii) 該多価結合複合体に結合された検出可能な標識と接触させる段階を含み、

ここで該標的細胞は多価結合複合体の標的細胞への結合によって染色され、ここで各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合を破壊した場合、該標的細胞の染色は可逆的である。

【0015】

さらに別の局面において、本発明は、検出可能な標識を用いて、標的細胞を可逆的に染色する(または単離する)ための試薬キットを提供する。該標的細胞はその表面に受容体分子を含むものであり、前記キットは、以下(i)(ii)(iii):

(i) 該受容体分子に特異的に結合する結合部位Bを含む、少なくとも2種類の受容体結合試薬であって、ここで結合部位Bを介する各種類の受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、各種類の受容体結合試薬

は少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、ここで各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zによって(可逆的に)結合され得る、受容体結合試薬；

(ii) 各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCのための少なくとも1つの結合部位Zを含む、少なくとも1つの多量体化試薬であって、ここで各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCと該多量体化試薬の結合部位Zは可逆的結合を形成することができる、多量体化試薬；

(iii) 受容体結合試薬(i)および/または多量体化試薬(ii)に結合された、または結合することができる、検出可能な標識を含む。

10

[本発明1001]

検出可能な標識を用いて、その表面に受容体分子を含む標的細胞を可逆的に染色する方法であって、

該標的細胞を含む細胞の混合物を、以下(i)(ii)(iii):

(i) 少なくとも1つの結合部位Bを含む受容体結合試薬であって、

ここで結合部位Bは該受容体分子に特異的に結合し、

ここで結合部位Bを介する該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、

該受容体結合試薬が少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、

ここで結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zに可逆的に結合させることが可能である、受容体結合試薬；

20

(ii) 受容体結合試薬の結合パートナーCの可逆的結合のための少なくとも2つの結合部位Zを含む、多量体化試薬であって、

ここで受容体結合試薬(i)と多量体化試薬(ii)は、該標的細胞に結合する多価結合複合体を形成し、

各多価結合複合体が、1つの多量体化試薬に結合された少なくとも2つの受容体結合試薬を含み、

該多価結合複合体が、該受容体結合試薬と比較して、増加したアビディティを提供する、多量体化試薬；および

(iii) 該多価結合複合体に結合された、または結合することができる、検出可能な標識

30

と接触させる段階を含み、

ここで該標的細胞は多価結合複合体の標的細胞への結合によって染色され、

ここで受容体結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合を破壊した場合、該標的細胞の染色が可逆的である、方法。

[本発明1002]

結合部位Zと結合パートナーCとの間の可逆的結合の解離定数(K_d)が $10^{-2} \text{M} \sim 10^{-13} \text{M}$ の範囲である、本発明1001の方法。

[本発明1003]

受容体結合試薬と受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})が、約 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $2 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $3 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $4 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $1.5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $2 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $3 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $4 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、または約 $1 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有する、本発明1001の方法。

40

[本発明1004]

受容体結合試薬と受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)が $10^{-2} \sim 10^{-10} \text{M}$ の範囲である、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

受容体結合試薬と受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)が、約 $10^{-3} \text{M} \sim 10^{-10} \text{M}$ 、約 $10^{-3} \text{M} \sim 10^{-9} \text{M}$ 、約 $10^{-3} \text{M} \sim 10^{-8} \text{M}$ 、約 $10^{-3} \text{M} \sim 10^{-7} \text{M}$ 、約 $10^{-7} \text{M} \sim 10^{-10} \text{M}$ 、または約 10

50

10^{-7} M ~ 約 10^{-9} Mの範囲である、本発明1004の方法。

[本発明1006]

染色された細胞を、前記細胞の混合物中に存在する非標的細胞から分離する段階をさらに含む、本発明1001 ~ 1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

受容体結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合を破壊することによって、標的細胞から前記染色を除去する段階をさらに含む、本発明1001 ~ 1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

多量体化試薬の除去が、染色された細胞からの受容体結合試薬の解離をもたらす、本発明1006 ~ 1007のいずれかの方法。

10

[本発明1009]

(a) 結合パートナーCがビオチンを含み、かつ多量体化試薬がビオチンに可逆的に結合するストレプトアビジン類似体もしくはアビジン類似体を含む；

(b) 結合パートナーCがストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体を含み、かつ多量体化試薬が該ビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体、もしくはアビジン類似体を含む；または

(c) 結合パートナーCがストレプトアビジンもしくはアビジン結合性ペプチドを含み、かつ多量体化試薬が該ストレプトアビジンもしくはアビジン結合性ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体、もしくはアビジン類似体を含む、本発明1001 ~ 1008のいずれかの方法。

20

[本発明1010]

結合パートナーCがストレプトアビジン結合性ペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lysを含み、多量体化試薬がストレプトアビジン類似体Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷またはストレプトアビジン類似体Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、本発明1009の方法。

[本発明1011]

結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合が2価カチオンの存在下で起こる、本発明1001 ~ 1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

結合パートナーCがカルモジュリン結合性ペプチドを含み、かつ多量体化試薬がカルモジュリンを含む；

30

結合パートナーCがFLAGペプチドを含み、かつ多量体化試薬がFLAGペプチドに結合する抗体を含む；または

結合パートナーCがオリゴヒスチジンタグを含み、かつ多量体化試薬がオリゴヒスチジンタグに結合する抗体を含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合が金属イオンキレート化によって破壊される、本発明1011または1012の方法。

[本発明1014]

前記金属キレート化がEDTAまたはEGTAの添加により達成される、本発明1013の方法。

40

[本発明1015]

多量体化試薬がストレプトアビジンもしくはアビジンの、またはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意の類似体の、オリゴマーまたはポリマーである、本発明1001 ~ 1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

前記オリゴマーまたはポリマーが多糖によって架橋されている、本発明1015の方法。

[本発明1017]

結合パートナーCが抗原を含み、かつ多量体化試薬が該抗原に対する抗体を含む、本発明1001 ~ 1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

50

前記抗原がエピトープタグである、本発明1017の方法。

[本発明1019]

エピトープタグが、Mycタグ(配列: EQKLISEEDL)、HAタグ(配列: YPYDVPDYA)、VSV-Gタグ(配列: YTDIEMNRLGK)、HSVタグ(配列: QPELAPEDPED)、V5タグ(配列: GKPIPNPLLGLDST)およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼからなる群より選択される、本発明1018の方法。

[本発明1020]

前記抗原がタンパク質を含む、本発明1017の方法。

[本発明1021]

前記タンパク質がマルトース結合性タンパク質(MBP)、キチン結合性タンパク質(CBP)およびチオレドキシンからなる群より選択される、本発明1020の方法。

10

[本発明1022]

受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬が、抗体、2価抗体フラグメント、1価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、およびMHC分子からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1023]

2価抗体フラグメントが(Fab)₂フラグメント、または2価一本鎖Fvフラグメントである、本発明1022の方法。

[本発明1024]

1価抗体フラグメントがFabフラグメント、Fvフラグメント、および一本鎖Fvフラグメント(scFv)からなる群より選択される、本発明1023の方法。

20

[本発明1025]

抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子が、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づく変異タンパク質、グルボディ(glubody)、アンキリン足場に基づくタンパク質、結晶性足場に基づくタンパク質、アドネクチン、およびアビマーからなる群より選択される、本発明1022の方法。

[本発明1026]

前記接触させる段階が15 以下の温度で実施される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1027]

前記接触させる段階が4 以下の温度で実施される、本発明1026の方法。

30

[本発明1028]

前記標的細胞が哺乳動物細胞である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1029]

哺乳動物細胞がリンパ球または幹細胞である、本発明1028の方法。

[本発明1030]

リンパ球がT細胞、Tヘルパー細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞である、本発明1029の方法。

[本発明1031]

T細胞がCMV特異的CD8+ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞および制御性T細胞の群より選択される、本発明1030の方法。

40

[本発明1032]

検出可能な標識が蛍光色素または磁性標識である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1033]

標的細胞が、少なくとも2つの異なる受容体結合試薬を用いて、少なくとも2つの異なる受容体分子のグループによって実質的に染色および単離され、各受容体結合試薬が、少なくとも2つの異なる受容体分子のグループの予め選択された受容体分子に特異的に結合する結合部位Bを含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1034]

少なくとも2つの異なる受容体分子のグループの第2のまたはさらなる受容体分子に結合する受容体結合試薬が、多量体化試薬の結合部位Zによって結合され得る少なくとも1つの

50

結合パートナーCをさらに含む、本発明1033の方法。

[本発明1035]

結合部位Bを介して特異的に結合する受容体結合試薬と第2のまたはさらなる受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})が、約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有する、本発明1034の方法。

[本発明1036]

第2のまたはさらなる受容体分子と、該第2のまたはさらなる受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬との間の結合の解離定数(K_d)が $10^{-2} \sim 10^{-7} \text{M}$ の範囲である、本発明1034または本発明1035の方法。

[本発明1037]

少なくとも1つの共通の特定の受容体の存在によって規定される細胞集団を単離するための、本発明1001～1036のいずれかの方法の使用。

[本発明1038]

共通の特定の受容体の存在によって規定される細胞集団がリンパ球集団または幹細胞集団である、本発明1037の使用。

[本発明1039]

リンパ球集団が抗原特異的T細胞集団、Tヘルパー細胞集団、B細胞集団またはナチュラルキラー細胞集団である、本発明1038の使用。

[本発明1040]

T細胞がCMV特異的CD8⁺ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞および制御性T細胞の群より選択される、本発明1039の方法。

[本発明1041]

リンパ球集団または幹細胞集団の機能的状態を判定するための、本発明1038の使用。

[本発明1042]

インビトロ増殖のためのリンパ球集団を精製するための、本発明1038の使用。

[本発明1043]

再生療法のための幹細胞集団を精製するための、本発明1038の使用。

[本発明1044]

幹細胞集団がCD34⁺特異的集団またはNanog⁺集団である、本発明1043の使用。

[本発明1045]

精製された細胞集団が免疫応答をモジュレートするためのCD4⁺ Tヘルパー細胞である、本発明1038の使用。

[本発明1046]

養子移入、癌治療、細菌感染の処置、ウイルス感染、または免疫療法のためのリンパ球集団を精製するための、本発明1038の使用。

[本発明1047]

精製された細胞集団が、関連抗原に特異的なCD8⁺ T細胞、白血病関連抗原に特異的なCD8⁺ T細胞、メラノーマ関連抗原に特異的なCD8⁺ T細胞、ウイルス抗原に特異的なCD8⁺ T細胞である、本発明1046の使用。

[本発明1048]

ウイルス抗原に特異的なCD8⁺ T細胞が、サイトメガロウイルス(CMV)ホスホプロテイン65特異的CD8⁺ T細胞またはエプスタイン・バーウイルスEBNA抗原特異的CD8⁺ T細胞である、本発明1047の使用。

[本発明1049]

精製された細胞集団が、自己免疫疾患、1型糖尿病、大腸炎、アレルギーの処置に使用するためのTreg細胞である、本発明1046の使用。

[本発明1050]

自己免疫疾患が移植片対宿主病(GvHD)または移植片拒絶反応である、本発明1049の使用。

[本発明1051]

10

20

30

40

50

Treg細胞集団がCD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁺ Treg細胞である、本発明1049または1050の使用。

[本発明1052]

精製された細胞集団がCD62L⁺ CD8⁺ 特異的セントラルメモリーT細胞である、本発明1046の使用。

[本発明1053]

検出可能な標識を用いて、その表面に受容体分子を含む標的細胞を可逆的に染色するための試薬キットであって、以下(i)(ii)(iii):

(i) 該受容体分子に特異的に結合する結合部位Bを含む、少なくとも1つの受容体結合試薬であって、

ここで結合部位Bを介する該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、

該受容体結合試薬は少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、

ここで結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zによって可逆的に結合され得る、受容体結合試薬；

(ii) 該受容体結合試薬の結合パートナーCのための少なくとも2つの結合部位Zを含む、少なくとも1つの多量体化試薬であって、

ここで結合パートナーCと該多量体化試薬の結合部位Zは可逆的結合を形成することができる、多量体化試薬；

(iii) 受容体結合試薬(i)および/または多量体化試薬(ii)に結合された、または結合することができる、検出可能な標識を含む、キット。

[本発明1054]

結合パートナーCと結合部位Zとの間の結合の解離定数(K_d)が $10^{-2} \sim 10^{-13} \text{M}$ の範囲である、本発明1053のキット。

[本発明1055]

本発明1001 ~ 1035のいずれかの標的細胞を可逆的に染色する方法のための、受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬の使用であって、

該受容体結合試薬が少なくとも1つの結合部位Bを含み、

ここで結合部位Bは該受容体分子に特異的に結合し、

ここで結合部位Bを介する該受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有する、使用。

[本発明1056]

受容体結合試薬が、抗体、2価抗体フラグメント、1価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、およびMHC分子からなる群より選択される、本発明1055の使用。

[本発明1057]

2価抗体フラグメントが(Fab)₂フラグメント、2価一本鎖Fvフラグメント、またはダイアボディである、本発明1056の使用。

[本発明1058]

1価抗体フラグメントがFabフラグメント、Fvフラグメント、および一本鎖Fvフラグメント(scFv)からなる群より選択される、本発明1057の方法。

[本発明1059]

抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子が、アプタマー、リボカリンファミリーのポリペプチドに基づく変異タンパク質、グルボディ(glubody)、アンキリン足場に基づくタンパク質、結晶性足場に基づくタンパク質、アドネクチン、およびアビマーの群より選択される、本発明1058の方法。

[本発明1060]

検出可能な標識を用いて、その表面に受容体分子を含む標的細胞を可逆的に染色する方法であって、該標的細胞を含む細胞の混合物を、以下(i)(ii)(iii):

(i) 少なくとも2種類の受容体結合試薬であって、

10

20

30

40

50

各種類の受容体結合試薬が少なくとも1つの結合部位Bを含み、
ここで受容体結合試薬の種類それぞれの結合部位Bは該受容体分子に特異的に結合し、
ここで結合部位Bを介する各種類の受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、
各種類の受容体結合試薬が少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、
ここで各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zに可逆的に結合させることが可能である、受容体結合試薬；
(ii) 各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCの可逆的結合のための少なくとも1つの結合部位Zを含む多量体化試薬であって、
ここで少なくとも2種類の受容体結合試薬(i)と多量体化試薬(ii)は、該標的細胞に結合する多価結合複合体を形成し、
各多価結合複合体が、1つの多量体化試薬に結合された少なくとも1つの各種類の受容体結合試薬を含み、
該多価結合複合体が、各種類の受容体結合試薬と比較して、増加したアビディティを提供する、多量体化試薬；および
(iii) 該多価結合複合体に結合された、または結合することができる、検出可能な標識と接触させる段階を含み、
ここで該標的細胞は多価結合複合体の標的細胞への結合によって染色され、
ここで各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合を破壊した場合、該標的細胞の染色が可逆的である、方法。

10

20

[本発明1061]

結合部位Zと各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCとの間の結合の解離定数(K_d)が $10^{-2} \sim 10^{-13} \text{M}$ の範囲である、本発明1060の方法。

[本発明1062]

検出可能な標識を用いて、その表面に受容体分子を含む標的細胞を可逆的に染色するための試薬キットであって、以下(i)(ii)(iii)：

(i) 該受容体分子に特異的に結合する結合部位Bを含む、少なくとも2種類の受容体結合試薬であって、

ここで結合部位Bを介する各種類の受容体結合試薬と該受容体分子との間の結合の解離速度定数(k_{off})は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、

各種類の受容体結合試薬が少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含み、
ここで各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCは多量体化試薬の結合部位Zによって結合され得る、受容体結合試薬；

(ii) 各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCのための少なくとも1つの結合部位Zを含む、少なくとも1つの多量体化試薬であって、

ここで各種類の結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zは可逆的結合を形成することができる、多量体化試薬；および

(iii) 受容体結合試薬(i)および/または多量体化試薬(ii)に結合された、または結合することができる、検出可能な標識を含む、試薬キット。

[本発明1063]

結合部位Zと各種類の受容体結合試薬の結合パートナーCとの間の結合の解離定数(K_d)が $10^{-2} \sim 10^{-13} \text{M}$ の範囲である、本発明1062のキット。

【図面の簡単な説明】

【0016】

本発明は、非限定的な実施例および添付の図面と併せて検討するとき、詳細な説明に関してより良く理解されるであろう。

【図1 a】図1は、(少なくとも1つの)受容体結合試薬としてFabフラグメントを用いる本発明の可逆的染色方法の原理を示す(Fabフラグメントの場合には、また、概して、本発明

30

40

50

の一態様では、受容体結合試薬は受容体分子に対する単一の結合部位をもつことができる)。図1aは、受容体結合試薬として用いられるFabフラグメントの、説明に役立つ例を示しており、ここでストレプトアビジン結合性ペプチドStrep-tag(登録商標)は受容体結合試薬の結合パートナーCである。この態様では、ストレプトアビジン結合性ペプチドはFabフラグメントに融合またはコンジュゲートされて受容体結合試薬を形成する。この例では、図1aに示すように、少なくとも1つの結合パートナーCのための結合部位Zを少なくとも2つ含む多量体化試薬は、ストレプトアビジン変異タンパク質(「Strep-Tactin(登録商標)」)である。図1aの例では、多量体化試薬は例えばフィコエリスリンなどの蛍光標識を担持する。

【図1b】図1bの例では、この場合も、Fabフラグメントは、標識として役立つ磁性ビーズに結合している多量体化試薬と共に示される。ストレプトアビジン結合性ペプチドを介するストレプトアビジン変異タンパク質とFabフラグメントとの間の多価結合複合体形成を用いる可逆的染色方法はまた、本明細書では「Fab多量体染色」とも呼ばれる。

【図1c】この可逆的Fab多量体染色方法の概略図を示す。この例では、標的細胞は血液サンプル中に存在する細胞の混合物から染色/単離される。標的細胞上に存在する細胞受容体分子への結合について約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の k_{off} 速度を有するFabフラグメントは、Strep-tag(登録商標)/Strep-Tactin(登録商標)複合体形成によって可逆的に多量体化される。標的細胞は、(図1cのステップa)に示すように、該細胞を多量体化試薬および受容体結合試薬と接触させることによって多価結合複合体で染色され、必要に応じて、例えば蛍光活性化セルソーティング(図1cのステップb)における「FACS(商標)」の商標名でも知られる)により、同族の細胞表面受容体分子を欠く他の細胞から分離される。続いて、染色/単離された標的細胞を、Strep-tag(登録商標)ペプチドと競合するStrep-Tactin(登録商標)リガンドのD-ピオチンで処理すると、多量体化試薬からのFabフラグメントの移動が起こり、それによって(図1cのステップc)に示すように)標的細胞から多量体化試薬(Strep-Tactin(登録商標)複合体)を遊離する。Strep-Tactin(登録商標)と複合体を形成していない、残存するFabフラグメントは、その高い k_{off} 速度のために合理的な時間枠内で(自然発生的に)解離し、洗浄によって標的細胞表面から完全に除去することができる(図1cのステップd))。洗浄は、各洗浄ステップ間のFabフラグメントを、Fabフラグメントと、同族の細胞表面受容体分子との間の結合の親和性解離定数(K_d)に少なくとも等しい濃度に希釈する量で行うことができる。

【図1d】図1cと同様の染色手順を示し、そこでは多量体化試薬は磁性ビーズに結合されており、そして染色/分離ステップは、磁性カラム(染色された細胞が結合される)を通して未染色細胞から染色細胞を分離することを含む。

【図2】可逆的Fab多量体染色のために必要とされる結合特性を示す。図2は、受容体分子としてのCD4へのFabフラグメントの結合について次第に増加する k_{off} 速度を有する異なる抗CD4 Fab変異タンパク質を用いる、抗CD4 Fab多量体染色のFACS分析を示す(Fabフラグメントの結合速度論の概要は表1に示される)。末梢血単核細胞(PBMC)を、2つのStrep-tag(登録商標)配列の連鎖配列(「One-STrEP-tag」という商標名で市販されている；結合パートナーC)に融合した抗CD4 Fabフラグメント(受容体結合試薬)で染色し、フィコエリスリン標識Strep-Tactin(登録商標)(Strep-Tactin PE；IBA社，Goettingen，ドイツ；結合パートナーCに対する結合部位Zを少なくとも2つ含む多量体化試薬)上に多量体化して、D-ピオチンによる処理の前(第2列)または後(第3列)に分析した。その後、標的細胞表面上に残存するFab単量体(すなわち、受容体結合試薬として用いられたFabフラグメント)を後続の洗浄ステップの後に検出して、Strep-Tactin PE単独(結合したFabフラグメントを含まない)を用いてFab単量体を除去した(第4列)。上述した細胞の可逆的染色後のFab多量体染色を再度実施して(第5列)、ピオチン除去の完了を照合検査した。さもなければ、第4列に示されるようなStrep-Tactin PE単独(結合したFabフラグメントを含まない)による残存するFab単量体の染色が妨げられ、したがって、実験の誤った結論が導かれたであろう。あるいは、細胞を、単量体のFabフラグメントと共にインキュベートし、洗浄し、続いてStrep-Tactin(登録商標)PEで染色した後に分析した(第1列、すなわち最も左側の列)。生存CD3+

10

20

30

40

50

T細胞を示す。ドットプロット中の数字はゲート内の細胞の割合を示す。

【図3】図3は、図2のFACS分析の代わりに、Fab多量体染色の可逆性のウェスタンブロット分析を示す。CD4 Fab多量体は、表1に記載されかつ図2でさらに特定された異なる抗CD4 Fab変異体とStrep-Tactin(登録商標)PE(IBA社, Goettingen, ドイツ)を用いて生成させた。PBMCを異なるCD4 Fab多量体とインキュベートし、各サンプルにおける一貫した細胞染色をフローサイトメトリーにより確認した(着色ヒストグラムと比べて実線は未染色細胞を表す)。その後、細胞をD-ピオチンで処理し、続いて洗浄した。最後に、洗浄した細胞を溶解し、可溶性(S)および不溶性(I)画分を、高度に特異的な抗Strep-tag(登録商標)抗体(StrepMAB-Classic Horse Radish Peroxidase(HRP)コンジュゲート; IBA社, Goettingen, ドイツ)を用いて、残存するFab単量体について分析した。不溶性細胞材料の一貫した量の適用を照合するために、アクチンを同時に検出したが、その際、ウサギ由来のアクチンに対する一次抗体(Santa Cruz Biotechnology社, Santa Cruz, USA)およびHRPにコンジュゲート化したウサギIg(免疫グロブリン)に対する二次抗体(Sigma社, St. Louis, USA)を使用した。

10

【発明を実施するための形態】

【0017】

発明の詳細な説明

本発明は、細胞表面に受容体分子を有する標的細胞または標的細胞集団を可逆的に染色するための方法を提供する。本発明は、米国特許第7,776,562号または国際特許出願WO 02/054065に記載される方法とは対照的に、受容体結合試薬と標的細胞の表面上の受容体分子との間に低親和性結合を与えることがそのような方法の可逆性にとって必須ではない、という知見に基づいている。むしろ、本発明では、受容体結合試薬と受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)が、低親和性、例えば約 10^{-3} ~ 約 10^{-7} Mの K_d の範囲か、または高親和性、例えば約 10^{-7} ~ 約 1×10^{-10} Mの K_d の範囲か、を意味する結合の強さにかかわらず、結合部位Bを介する受容体結合試薬と受容体分子の結合の解離が十分に速く起こる限り、標的細胞は可逆的に染色され得ることが判明した。受容体結合試薬(結合部位Bを介する)と受容体分子との間の結合の k_{off} 速度(解離速度定数とも呼ばれる)で表現すると、 k_{off} 速度は約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $2 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $3 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $4 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $1.5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $2 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $3 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $4 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $1 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 以上、または約 $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 以上である。 k_{off} 速度、 k_{on} 速度または K_d に関連して本明細書中で用いる場合の用語「約」は、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 、 $\pm 0.3\%$ 、 $\pm 0.4\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.7\%$ 、 $\pm 0.9\%$ 、 $\pm 1.0\%$ 、 $\pm 1.2\%$ 、 $\pm 1.4\%$ 、 $\pm 1.6\%$ 、 $\pm 1.8\%$ 、 $\pm 2.0\%$ 、 $\pm 2.2\%$ 、 $\pm 2.4\%$ 、 $\pm 2.6\%$ 、 $\pm 2.8\%$ 、 $\pm 3.0\%$ 、 $\pm 3.5\%$ 、 $\pm 4.0\%$ 、 $\pm 4.5\%$ 、 $\pm 5.0\%$ 、 $\pm 6.0\%$ 、 $\pm 7.0\%$ 、 $\pm 8.0\%$ 、 $\pm 9.0\%$ 、 $\pm 10.0\%$ 、 $\pm 15.0\%$ 、または $\pm 20.0\%$ の許容誤差を含むことを意味する。

20

30

【0018】

これに関連して、受容体結合試薬Lと、その受容体P、例えば細胞表面受容体分子との複合体(C)の形成は、以下の二つの状態をとるプロセス(two-state process)によって記述され得ることに留意されたい：

40



対応する解離 K_d 定数は、

$$K_d = \frac{[P][L]}{[C]}$$

として定義され、ここで[P]、[L]、および[C]は、所定の温度および圧力での受容体、受容体結合試薬(リガンド)およびそれぞれの複合体の平衡モル濃度である。解離 K_d 定数はまた、複合体の結合/形成の速度についてのon速度の定数(k_{on})(結合速度定数とも呼ばれる)と、複合体の解離についてのoff速度の定数(k_{off})(解離速度定数とも呼ばれる)の比として、下記のように表すことができる：

50

$$K_d = k_{off} / k_{on}$$

本出願では、熱力学および速度定数 K_d 、 K_a 、 k_{on} および k_{off} の値は、「標準条件」、すなわち25℃の温度および1.013バールの大気圧の下でのそれらの測定を指す。

【0019】

本発明では、上述したように、受容体結合試薬のその特異的結合部位Bを介しての受容体分子への結合の k_{off} 速度[s^{-1}]は、さらなる結合パートナーC(この結合パートナーCは本明細書で定義される多量体化試薬によって結合され得る)を有するそれぞれの受容体結合試薬による標的細胞の染色の可逆性のための決定要因であることが判明した。 k_{off} 範囲は、例えば染色されかつ任意で精製される標的細胞およびそれぞれの実験条件に応じて、ある範囲内で選択することができる。受容体結合試薬Lと受容体分子Pとの複合体(C)の半減期 $T_{1/2}$ は、 $\ln 2 / k_{off} = 0.693 / k_{off}$ ($0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ の k_{off} の場合)として表すことができることを考慮して、解離した受容体結合試薬の受容体分子への再結合が無視できるほど希釈が十分であると仮定すると、受容体結合試薬と受容体分子との複合体の濃度を半分に減少させるのに13860秒または231分または3.85時間かかる。複合体の濃度の同じ減少を達成するのに、 $1.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ の k_{off} 速度では、したがって6390秒(またはわずか106.5分または1.775時間)かかり、 $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ の k_{off} では、3465秒(または57分、すなわち1時間未満)かかり、そして $4.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ の k_{off} では、1732秒(または約28分)かかる。こうして、染色された標的細胞をサンプル中の他の細胞から分離した後および多量体化試薬と受容体結合試薬の間で形成された多価複合体を破壊した後に行われる洗浄のために、細胞受容体結合試薬は、染色される細胞の外的影響への感受性に応じて選択することができる。例えば、むしろ感受性の細胞では、例えば $4.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ を超える、かなり高い k_{off} 速度を有する受容体結合試薬を使用して、多価結合複合体を破壊した後に、受容体結合試薬のほとんどが1時間以内に除去されるようにすることができる(上で示したように、十分な希釈のため再結合効果は無視できると仮定すると、56分以内に複合体の濃度は元の濃度の25%に低減される)。より強靱な細胞の場合には、例えば $1.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ の、より低い k_{off} 速度を有する受容体結合試薬(したがって、その解離にはかなり多くの時間を要する)を使用することができる(この場合、受容体結合試薬の75%を解離して除去するのに212分つまり約3時間半が必要である)。多量体化試薬を(例えば、結合パートナーCと多量体化試薬との可逆的結合を破壊することが可能な競合剤を用いて)解離した後に、用いた受容体結合試薬を解離定数(K_d)より少なくとも10倍低い濃度に希釈するバッファー量中で、半減期 $T_{1/2}$ の少なくとも2倍の間、一定した穏やかな攪拌の下で洗浄を行うこともできる。その後、解離した受容体結合試薬は、例えば標的細胞を沈降させて、上清を廃棄することによって、除去される。別の態様では、上記の洗浄を1回または2回または数回繰り返して、受容体結合試薬をほぼ完全に除去することが可能である。これに関連して、染色した標的細胞に関して本明細書中で用いる用語「洗浄」は、染色した標的細胞を、(多価結合複合体の破壊と同時にまたは多価結合複合体の破壊の後に)十分量の洗浄バッファーと接触させ、受容体分子から受容体結合試薬を解離するのに適切な時間にわたって洗浄バッファーと共にインキュベートし、次いで、適切な手順、例えば標的細胞の沈降と上清の除去、または例えば洗浄バッファーの濾過により、洗浄バッファーから分離する(それにより、解離した受容体結合試薬を除去する)ことを意味することに留意されたい。洗浄は、通常、染色または単離される細胞の生存率もしくは状態に悪影響を及ぼさないバッファー中で実施され、すなわち、洗浄は生理学的に許容される条件下(例えば、生理学的に許容されるバッファー、適温、例えば4℃、15℃または25℃(すなわち室温)など)で行われる。適切な実験的洗浄条件は、当業者が経験的に容易に決定することができる。例えば、 k_{off} が $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ に近い比較的高い値を有し、かつ染色される細胞がより高い温度に(相対的に)非感受性である場合、洗浄は、染色細胞からの受容体結合試薬のより高速の解離を可能にするために、室温で行うことができる。あるいは、染色される細胞がより高い温度に相対的に感受性である場合、洗浄は4℃で行うことが可能であり、その結果として、受容体結合試薬の解離/除去に長い時間がかかるが、細胞の機能状態または生存率が影響を受けることはない。4℃の温度または少なくとも15℃より低い温度は、標的細胞の生理学的状態の変化

10

20

30

40

50

を防止するために、いくつかの態様において好適である。

【0020】

これに関連して、受容体結合試薬は、受容体分子に特異的に結合する(任意の)単一の結合部位Bを有してもよいし、または2つ以上の結合部位B(の各々)を介した受容体分子の結合が約 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の k_{off} の合計値を有する限り、受容体結合試薬は2つ以上のそのような結合部位Bを有してもよい、ということに留意されたい。したがって、受容体結合試薬は、1価の分子、例えば1価の抗体フラグメントまたは1価の人工結合分子(タンパク質性その他)、例えばリポカリンファミリーのポリペプチドに基づく変異タンパク質(「Anticalin(登録商標)」の別名でも知られる)であるか、または2価の分子、例えば両方の結合部位が保持されている抗体もしくはフラグメント、例えば $F(ab')_2$ フラグメントであり得る。受容体結合試薬は5量体のIgM分子とすることさえ可能であるが、ただし、全IgM分子の k_{off} 速度は $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上であることを条件とする。

10

【0021】

受容体分子への受容体結合試薬の結合についての k_{off} 速度、そして当然 k_{on} 速度も、標準的な方法、例えば表面プラズモン共鳴(SPR)によって、例えばBIAcore技術を用いて、測定することができる(SPR; Jonsson, U. et al. (1991) Biotechniques, 11, 620-627)。この測定は、当業者であれば、平均的な知識の範囲内である。通常、測定は、表面プラズモン共鳴分析により、受容体結合試薬の適切な濃度で、25℃にて実施され、その際、受容体分子はそれぞれのセンサーチップの表面に固定化される。リガンド(すなわち、受容体結合試薬)、例えばFabフラグメントは、 $\mu\text{l}/\text{分}$ の範囲の流速を用いて、(通常は予備的な特性評価から決定される推定 K_D 値付近の)さまざまな濃度でチップ上にアプライされる。

20

【0022】

説明に役立つ例として、ここでは、モノクローナル抗体13B8.2に由来するFabフラグメントへの(受容体分子として)CD4の結合の k_{off} 速度の測定について述べることにする。米国特許第7,482,000号またはBes, C., et al., J Biol Chem 278, 14265-14273 (2003)に記載されるように、 k_{off} 速度および他の速度論的パラメータは、BIAcore 2000装置(BIAcore AB, Uppsala, スウェーデン)を用いて表面プラズモン共鳴分析により25℃で測定することができる。組換えCD4は、メーカーの説明書に従って、アミンカップリング法を用いてCM5センサーチップの表面に共有結合で固定化することができる。対照基準面は、CD4の注入なしでフローセル表面の同じ化学処理を用いて調製することができる。次に、10mM HEPES (pH7.4)、3mM EDTA、150mM NaCl、および0.005%非イオン性界面活性剤P20 (BIAcore AB)を含むバッファー中の組換えFab変異体を、フローセルに5~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で注入することができ、引き続き解離段階が5mM HCl溶液による再生ステップにより起こるだろう。流速は30 $\mu\text{l}/\text{分}$ に設定することができる。すべてのセンサーグラムは対照基準面からのシグナルを減算することによって補正され得る。その後、データは、BIAevaluationバージョン3.2ソフトウェアを用いて1:1ラングミュア(Langmuir)結合等温線にグローバルにフィットさせることができる。

30

【0023】

説明に役立つ別の例として、Schlappschy, M., et al. "Functional humanization of an anti-CD30 Fab fragment for the immunotherapy of Hodgkin's lymphoma using an in vitro evolution approach" Protein Eng Des Sel 17, 847-860 (2004)による、表面プラズモン共鳴により測定される組換えCD30A抗原断片に対する抗CD30 Fabフラグメントの k_{off} 速度の測定について述べることにする。この測定はBIAcore Xシステム(BIAcore社, Uppsala, スウェーデン)で実施した。ゲル濾過により10mM酢酸ナトリウムpH3.85にバッファー交換した後、精製されたCD30Aを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、アミンカップリングキット(BIAcore社)を用いて「研究グレード」のCM5センサーチップ上に固定化して、結果的に1700応答単位(RU)の固定化を得た。精製された組換えFabフラグメントは、一連の適切な濃度でPBS/P(0.005%の界面活性剤P-20を含むPBS; BIAcore社)中にアプライした。複合体形成は5 $\mu\text{l}/\text{分}$ の連続的なバッファーの流れの下で観察した。センサーグラムは、インラインで用いられた対照ブランクチャンネルについて測定された、対応するシグナルを減算することによ

40

50

って補正した。チップは、2mlパルスの1mM NaOHを25 μ l/分の流速でアプライし、続いてPBS/Pで平衡化することにより再生した。速度論的パラメータは、この場合も、変動するベースラインを有する1:1(ラングミュア)結合モデルを用いてBIAevaluationソフトウェアV3.0(BIAcore社)により測定することができる。

【0024】

本発明の方法に戻ると、上述したように、細胞表面受容体分子に対する受容体結合試薬の親和性は低い親和性である必要はない。むしろ(実験の項をも参照のこと)、受容体結合試薬と受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)は、多価結合複合体の破壊後に、 k_{off} が染色または単離される細胞に許容される時間枠内および洗浄条件下で受容体結合試薬の除去を可能にする限り、約 $10^{-2}M \sim 10^{-8}M$ 、または約 $10^{-2}M \sim 10^{-9}M$ 、または約 $10^{-2}M \sim 0.8 \times 10^{-9}M$ 、または約 $10^{-2}M \sim 0.6 \times 10^{-9}M$ 、または約 $10^{-2}M \sim 0.4 \times 10^{-9}M$ 、または約 $10^{-2}M \sim 0.3 \times 10^{-9}M$ 、または約 $10^{-2}M \sim 0.2 \times 10^{-9}M$ 、または約 $10^{-2}M \sim 0.15 \times 10^{-9}M$ 、または約 $10^{-2}M \sim 10^{-10}M$ の範囲であり得る。一態様では、受容体結合試薬と受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)は、約 $10^{-7}M \sim 10^{-10}M$ 、または約 $10^{-7}M \sim 0.8 \times 10^{-9}M$ 、または約 $10^{-7}M \sim 0.6 \times 10^{-9}M$ 、または約 $10^{-7}M \sim 0.3 \times 10^{-9}M$ 、または $1.1 \times 10^{-7}M \sim 10^{-10}M$ 、または約 $1.1 \times 10^{-7}M \sim 0.15 \times 10^{-9}M$ 、または約 $1.1 \times 10^{-7}M \sim 0.3 \times 10^{-9}M$ 、または約 $1.1 \times 10^{-7}M \sim 0.6 \times 10^{-9}M$ 、または約 $1.1 \times 10^{-7}M \sim 0.8 \times 10^{-9}M$ の範囲であり得る。これに関連して、約 $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ までの k_{on} 速度が、抗体またはFabフラグメントなどの免疫グロブリンのそれらのそれぞれの抗原への結合について知られていることに留意されたい(例えば、以下を参照されたい: Lee et al., Mol. Biol. (2004) 340, 1073-1093, 図4ではFabフラグメントG6-23が $5.6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} 速度を有する、またはKwong et al., J. Mol. Biol. 2008 December 31; 384(5): 1143-1156もしくは国際特許出願WO 2010/017103、これは抗ヒトNKG2Dモノクローナル抗体のFabフラグメントおよびIgG1としての抗体について $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1} \sim 1.4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} 値を報告する(Kwong et al., 前掲の表1参照))。したがって、Fabフラグメントなどの受容体結合試薬が $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の受容体分子の結合の k_{on} 値および 1×10^{-10} の K_d を有すると仮定すると、 k_{off} は $5 \times 10^{-4} M$ となり、この値は、そのような抗体分子(または一般的には受容体結合試薬)を本発明の可逆的染色方法で使用するのに十分適したものにする($5 \times 10^{-4} sec^{-1}$ の k_{off} では、 $1 \times 10^{-10} M$ の K_d の親和性にもかかわらず、受容体結合試薬と受容体分子との複合体の濃度を半分に低減させるのに、わずか1386秒つまり23分かかるにすぎない)。同様に、説明に役立つさらなる例として、受容体結合試薬が $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ の受容体分子の結合の k_{on} 値および 1×10^{-9} の K_d を有する場合、 k_{off} はやはり $5 \times 10^{-4} M$ となり、これもまた、多価結合複合体の破壊後に、標的細胞からの受容体結合試薬のかなり速い解離をもたらす。これに関連して、ファージディスプレイなどの進化的方法を用いることによって、抗体フラグメントまたは例えばリポカリン変異タンパク質などの受容体結合試薬について意図的にスクリーニングすることが可能である(この点に関しては、Lee et al., 前掲も参照されたい)。したがって、必要ならば、所望の速度論的特性を有する受容体結合試薬は、アミノ酸配列が知られている出発分子から、そのような進化的方法によって得ることができる。また、本明細書に記載の方法では、受容体分子に対して低い親和性を有する受容体結合試薬を用いることが可能であり、その場合は、受容体結合試薬と受容体分子との間の結合の解離定数(K_d)が $10^{-2} \sim 10^{-7} M$ の範囲であり得る。

【0025】

前記染色方法は、染色された細胞を、サンプル/細胞の混合物中に存在する非標的細胞から分離する段階をさらに含む。この分離は、米国特許第7,776,562号または国際特許出願WO 02/054065に記載されるように実施することができ、さらに、受容体結合試薬の結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの間の結合を破壊することによって、該細胞から該染色を除去する段階を含むことができる。この結合は可逆的であるべきであり、すなわち、その結合はクレームされた方法を実施するのに適した条件下で破壊されることが可能であるべきである。結合パートナーCと結合部位Zの間の結合の解離定数(K_d)は、例えば、約 $10^{-2}M \sim 10^{-13}M$ の範囲であり得る。したがって、この可逆的結合は、例えば、約 10^{-

10

20

30

40

50

$2M \sim 約10^{-13}M$ 、または約 $10^{-5}M \sim 約10^{-13}M$ 、または約 $10^{-6}M \sim 約10^{-10}M$ 、または約 $10^{-3}M \sim 約10^{-12}M$ 、または約 $10^{-4}M \sim 約10^{-11}M$ 、または約 $10^{-5}M \sim 約10^{-10}M$ の K_D を有することができる。また、この結合の K_D は、任意の適切な手段により、例えば、蛍光タイトレーション、平衡透析、または受容体結合試薬と受容体分子の間に形成された結合の k_{off} 速度の測定に関連して上で説明した表面プラズモン共鳴により測定することができる。細胞からの多量体化試薬の染色の解離/除去は、解離した受容体結合試薬の除去と、それゆえに、先に染色された細胞からの検出可能な標識を含む全多価結合複合体の除去をもたらす。受容体結合試薬からの除去を容易にするために、添加した受容体結合試薬の濃度を、同族の受容体分子とのその相互作用の K_D を大幅に下回る濃度に至らせる、それぞれの洗浄バッファの容量が使用され得る。あるいは、洗浄をより少ない容量で数回繰り返してもよく、そして即時再結合を防止するために穏やかな攪拌が望ましいかもしれない。一態様では、洗浄バッファの容量は、受容体結合試薬の濃度を、 K_D より下に、またはより好ましくは受容体結合試薬の90%超が解離した形態(すなわち、受容体分子に結合していない形態)で存在するように K_D の10分の1より下の濃度に、またはさらに好ましくは受容体結合試薬の99%超が解離した形態で存在するように K_D の100分の1より下の濃度に、またはさらに好ましくは受容体結合試薬の99.9%超が解離した形態で存在するように K_D の1000分の1より下の濃度に低下させる容量が用いられる。

【0026】

本発明のいくつかの態様では、受容体結合試薬は、それが少なくとも1つの結合パートナーCを含むように選択され、そして多量体化試薬は、結合パートナーCに対する少なくとも2つの結合部位Z、少なくとも3つまたは少なくとも4つの結合部位Zを含む。別の態様では、2つの異なる(種類の)受容体結合試薬を用いることが可能である。これら2つの受容体結合試薬のそれぞれは、同じ受容体分子に、同じまたは異なる結合部位Bによって結合する(後者の場合には、2つの受容体結合試薬は同じ受容体分子上の異なるエピトープを認識し、それゆえに結合することが可能である)。さらに、2つの受容体結合試薬のそれぞれは、少なくとも1つの結合パートナーCを有し、そして多量体化試薬は、2つの異なる受容体結合試薬のそれぞれの結合パートナーCに対する少なくとも1つの結合部位Zを有する。例えば、2つの異なる受容体結合試薬を用いることが可能であり、両方とも同じ結合部位Bを介して同じ受容体分子に結合するが、それらは異なる結合パートナーC1およびC2を有する。例えば、一方の受容体結合試薬はヘキサ-ヒスチジンタグなどの結合パートナーC1を有することができ、他方の受容体結合試薬はFLAGタグなどの結合パートナーC2を有する。そのような場合に、多量体化試薬は結合パートナーC1に対するただ1つの結合部位(Z1)と結合パートナーC2に対するただ1つの結合部位を含むことができる。合計2つの結合部位が多量体化試薬中に存在するので、アビディティ効果(avidity effect)が依然として達成される。そうした多量体化試薬は、例えば、抗FLAG抗体のFabフラグメントおよび抗ヘキサヒスチジンタグ抗体のFabフラグメントがコンジュゲートされた生体適合性ポリマー(例えば、デキストランまたは他の多糖)であり得る(多量体化試薬の詳細な考察については下記参照)。ただ1つまたは2つまたはそれ以上の結合パートナーCを有する1つまたは2つの受容体結合試薬が本発明で使用されるかどうかに関係なく、米国特許第7,776,562号または国際特許出願WO 02/054065にも記載されるように、結合パートナーCと多量体化試薬の結合部位(複数可)Zが(多価)複合体として可逆的に多量体化してアビディティ効果を生じさせることができる限り、結合パートナーCと多量体化試薬の任意の組み合わせを選択することが可能である。

【0027】

いくつかの例示的な態様において、パートナーは以下の群から選択することができる：
 (a) 結合パートナーCはビオチンを含み、そして多量体化試薬はビオチンに可逆的に結合するストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む；
 (b) 結合パートナーCはストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体を含み、そして多量体化試薬は該ビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体、またはアビジン類似体を含む；または

(c) 結合パートナーCはストレプトアビジンまたはアビジン結合性ペプチドを含み、そして多量体化試薬は該ストレプトアビジンまたはアビジン結合性ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体、またはアビジン類似体を含む。これらの態様のいくつかにおいて、結合パートナーCはストレプトアビジン結合性ペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lysを含むことができ、そして多量体化試薬はストレプトアビジン類似体Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷またはストレプトアビジン類似体Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含み、両方とも米国特許第6,103,493号に記載されており、例えば、Strep-Tactin(登録商標)の商標名で市販されている。ストレプトアビジン結合性ペプチドは、例えば、米国特許第5,506,121号に記載される「Strep-tag(登録商標)」などの単一のペプチド、または、例えば、国際特許公開WO 02/077018に記載されるような2つ以上の個々の結合モジュールの連鎖配列を有するストレプトアビジン結合性ペプチドであり得る。

10

【0028】

他の態様では、ただ1つの結合パートナーCが用いられ、その結合パートナーCと多量体化試薬の少なくとも2つの結合部位Zとの間の結合は2価カチオンの存在下で起こる。このような態様の説明に役立つ例では、結合パートナーCはカルモジュリン結合性ペプチドを含み、そして多量体化試薬は、例えば米国特許第5,985,658号に記載されるような多量体のカルモジュリンを含む。あるいは、結合パートナーCはFLAGペプチドを含むことができ、そして多量体化試薬は、FLAGペプチド、例えば米国特許第4,851,341号に記載されるモノクローナル抗体4E11に結合するFLAGペプチド、に結合する抗体を含むことができる。説明に役立つさらに別の例では、結合パートナーCはオリゴヒスチジンタグを含み、そして多量体化試薬はオリゴヒスチジンタグに結合する抗体または遷移金属イオンを含む。すべてのこれらの結合複合体の破壊は、金属イオンキレート化、例えばカルシウムキレート化により、例えばEDTAまたはEGTAの添加により、達成することができる。カルモジュリン、4E11などの抗体、またはキレート化金属イオンもしくは遊離キレート剤は、従来の方法によって多量体化することができ、例えば、ビオチン化とストレプトアビジンもしくはアビジンまたはその多量体との複合体形成により、あるいは第1工程では本質的にNoguchi, A., Takahashi, T., Yamaguchi, T., Kitamura, K., Takakura, Y., Hashida, M. & Sezaki, H. (1992). "Preparation and properties of the immunoconjugate composed of anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin C dextran conjugate. *Bioconjugate Chemistry* 3, 132-137"に記載されるような、多糖(例:デキストラン)へのカルボキシル残基の導入、および第2工程では従来のカルボジイミド化学を用いる、カルモジュリンまたは抗体またはキレート化金属イオンまたは遊離キレート剤の第1級アミノ基を介した多糖(例:デキストラン)骨格中のカルボキシル基へのカップリングにより多量体化することができる。

20

30

【0029】

そのような態様では、結合パートナーCと多量体化試薬の少なくとも2つの結合部位Z間の結合は、金属イオンのキレート化によって破壊することができる。金属イオンキレート化は、例えば、EDTAの添加によって達成することができる。

【0030】

本発明の方法では、多量体化試薬を、ストレプトアビジンもしくはアビジンの、またはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意の類似体の、オリゴマーまたはポリマーとすることも可能である。オリゴマーまたはポリマーは多糖により架橋されてもよい。一態様では、ストレプトアビジンもしくはアビジンの、またはストレプトアビジンもしくはアビジンの類似体のオリゴマーまたはポリマーは、第1工程では本質的に"Noguchi, A., Takahashi, T., Yamaguchi, T., Kitamura, K., Takakura, Y., Hashida, M. & Sezaki, H. (1992). Preparation and properties of the immunoconjugate composed of anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin C dextran conjugate. *Bioconjugate Chemistry* 3,132-137"に記載されるように、多糖(例:デキストラン)へのカルボキシル残基の導入によって調製される。その後、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはその

40

50

類似体は、第2工程で従来のカルボジイミド化学を用いて、内部リジン残基および/または遊離N末端の第1級アミノ基を介してデキストラン骨格中のカルボキシル基にカップリングされる。しかし、ストレプトアビジンもしくはアビジンの、またはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意の類似体の、架橋されたオリゴマーまたはポリマーはまた、グルタルジアルデヒドなどの2官能性リンカーを介する架橋によって、または文献に記載された他の方法によって得ることも可能である。

【0031】

本発明の染色方法の別の態様において、結合パートナーCは抗原を含み、そして多量体化試薬は該抗原に対する抗体または抗体フラグメントを含む。抗原は例えばエピトープタグであってよい。適切なエピトープタグの例としては、限定するものではないが、ほんの数例を挙げれば、Mycタグ(配列: EQKLISEEDL)、HAタグ(配列: YPYDVPDYA)、VSV-Gタグ(配列: YTDIEMNRLGK)、HSVタグ(配列: QPELAPEDPED)、V5タグ(配列: GKPIPNPLLGLDST)またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)が挙げられる。別の態様では、結合パートナーCは、マルトース結合性タンパク質(MBP)、キチン結合性タンパク質(CBP)またはチオレドキシンを抗原として含む。これらの場合に、多量体化試薬(抗体)の少なくとも2つの結合部位Zと抗原の間に形成された複合体は、遊離の抗原、すなわち遊離ペプチド、例えばMycタグもしくはHAタグ(エピトープタグ)、または遊離タンパク質(例えば、MBPもしくはCBP)を添加することによって破壊することができる。これに関連して、FLAGタグ(配列: DYKDDDK)が結合パートナーCとして用いられ、かつ多量体化試薬がFLAGタグに結合する抗体または抗体フラグメントを含む場合には、この可逆的結合を、遊離のFLAGペプチドの添加によって破壊することも可能であることに留意されたい。

【0032】

本発明の方法では、受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬の少なくとも1つの結合部位Bは、例えば、抗体、または(Fab)₂'フラグメントもしくは2価一本鎖Fvフラグメントなどの2価抗体フラグメントであり得る。また、それは2価のタンパク質性の人工結合分子、例えば「duocalin」の別名でも知られる2量体のリポカリン変異タンパク質であってもよい。他の態様では、受容体結合試薬は単一の結合部位Bを有してもよく、すなわち1価であり得る。1価の受容体結合試薬の例としては、限定するものではないが、1価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、またはMHC分子が挙げられる。

【0033】

1価抗体フラグメントの例としては、限定するものではないが、Fabフラグメント、Fvフラグメント、および一本鎖Fvフラグメント(scFv)が挙げられる。

【0034】

受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬として使用できる、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子の例としては、限定するものではないが、以下が挙げられる: アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づく変異タンパク質、グロブディ(glubody)、アンキリン足場に基づくタンパク質、結晶性足場に基づくタンパク質、アドネクチン、アビマー、EGF様ドメイン、クリングルドメイン、フィブロネクチンI型ドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン、PANドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、Kunitz/ウシ膵臓トリプシンインヒビタードメイン、テンダミスタット、カザール型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル(P型)ドメイン、フォンウィルブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、サイログロブリンI型リピート、LDL受容体クラスAドメイン、Sushiドメイン、リンクドメイン、トロンボスポンジンI型ドメイン、免疫グロブリンドメインまたは免疫グロブリン様ドメイン(例えば、ドメイン抗体またはラクダ重鎖抗体)、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、フォンウィルブランド因子A型ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアダドメイン、F5/8 C型ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、「カッパボディ」(Kappabodies)(III. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with pr

operties of both heavy and light chain variable regions" Protein Eng 10:949-57 (1997))、「ミニボディ」(Minibodies)(Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" EMBO J 13:5303-9 (1994))、「ジャヌシン」(Janusins)(Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" EMBO J 10:3655-3659 (1991)およびTraunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" Int J Cancer Suppl 7:51-52 (1992))、ナノボディ、アドネクチン、テトラネクチン、マイクロボディ、アフィリン、アフィボディまたはアンキリン、クリスタリン、ノッティン、ユビキチン、ジンクフィンガータンパク質、自己蛍光タンパク質、アンキリンまたはアンキリンリピートタンパク質またはロイシンリッチリピートタンパク質、アビマー (Silverman, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlröth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, Nat Biotech, Dec;23(12): 1556-61, Nat Biotech.の電子出版 2005 Nov 20版); ならびにヒト受容体ドメインのファミリーのエキソンシャッフリングにより進化された多価アビマータンパク質(やはりSilverman J, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlröth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP, Nat Biotech, Dec;23(12): 1556-61, Nat. Biotechnologyの電子出版 2005 Nov 20版に記載される)。

10

【0035】

本発明の方法において、標的細胞を含有する混合物を受容体結合試薬および多量体化試薬と接触させる段階は、例えば米国特許第7,776,562号または国際特許出願WO 02/054065に記載されるように、任意の適切な温度で実施することができる。一般的には、標的細胞を含有する混合物を受容体結合試薬および多量体化試薬と接触させる段階、およびその後さらに前記試薬を除去する段階は、標的細胞の変化、例えばT細胞が染色または単離される場合はT細胞の表現型の変化、をもたらず可能性がある活性化および/またはシグナル伝達事象が実質的に発生しない、そのような温度で行うことができる。いくつかのより好ましい態様では、接触させる段階は15 以下の温度で行われるか、または4 以下の温度で行われる。

20

【0036】

本発明の方法では、標的細胞の染色または単離のために使用される共通の受容体分子を少なくとも1つ有する標的細胞は、事実上どれも用いることができる。アビディティ効果を達成するために、受容体分子は、典型的には、標的細胞の表面上に2つ以上のコピーで存在する。典型的な態様では、標的細胞は哺乳動物細胞または真核もしくは原核細胞である。同様に、標的細胞集団を規定する少なくとも1つの共通の(特定の)受容体は、上記の受容体結合試薬が誘導され得るような受容体であってもよい。例えば、受容体は、細胞集団もしくは亜集団、例えば、血液細胞、例えばリンパ球(例:T細胞、Tヘルパー細胞、例えばCD4⁺ Tヘルパー細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞)、単球、または幹細胞(例:CD34陽性末梢幹細胞、またはNanogもしくはOct-4を発現する幹細胞)の集団もしくは亜集団を規定する抗原であり得る。T細胞の例としては、CMV特異的CD8⁺ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、および制御性T細胞(Treg)などの細胞が含まれる。Tregの具体例は、CD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁻ Treg細胞であり、メモリーT細胞の具体例は、CD62L⁺ CD8⁺ 特異的セントラルメモリーT細胞である。受容体はまた、腫瘍細胞のマーカーであり得る。これに関連して、本明細書中で用いる用語「標的細胞」は、膜(脂質二重層でもよい)が外部環境から内部を分離しており、かつ生物学的存在(biological entity)の表面上に特定の受容体分子を含んでいる、すべての生物学的存在/小胞を包含することに留意されたい。そのような存在の例としては、限定するものではないが、ウイルス、リポソームおよび細胞小器官、例えばミトコンドリア、葉緑体、細胞核またはリソソームなどが挙げられる。

30

40

【0037】

いったん単離されると、標的細胞集団は、受容体結合試薬が前記受容体から実質的に完

50

全に除去されている(一般的には、例えばFACSで検出される、検出限界を下回る)ことを特徴とする。受容体結合試薬の完全な除去は、上述したように高い k_{off} 速度を有する、可逆的に多量体化された受容体結合試薬を用いることによって達成される。そうすることによって、精製方法により改変されていない機能的状態を有する標的細胞集団(共通の特定の受容体によって規定される)が提供され得る。

【0038】

標的細胞集団、または膜(脂質二重層でもよい)が外部環境から内部を分離しており、かつ表面上に共通の特定の受容体分子を含むことをさらに特徴とするその他の生物学的存在の集団が、使用した精製試薬(受容体結合試薬;多量体化試薬、標識)のその後の除去の下で本発明の方法によって精製され得るという事実は、- 標的が細胞または細胞小器官である場合にはその生理学的状態が改変されないという利点を超えて - そのような精製された生物学的存在を医薬として使用する際に精製試薬が患者に投与されないという規制上の優位性を提供する。このような場合には、FDA(米国)またはEMA(欧州)のような規制当局は、精製試薬が細胞またはリポソームである医薬と共に投与される場合よりも、前記精製試薬の生産プロセスに関して、より費用のかからない制約を要求する。したがって、例えばリポソームを精製する必要があるかつ医薬として用いる場合、そうしたリポソームのような存在(その生理学的状態を操作することはできない)を精製するための本発明の方法に関しても、明確な技術上の利点が存在する。

【0039】

染色された細胞の検出のために用いられる標識は、診断および分析方法で使用される任意の標識であり得る。好ましくは、標識は、染色または単離される細胞の特性にマイナスの影響を与えないものである。標識の例としては、蛍光標識(例えば、ほんの数例を挙げると、フィコエリスリン、アロフィコシアニン、クマリン、またはローダミン)、磁性標識、発色標識、電子スピン共鳴/電子常磁性共鳴(EPR)に適するスピン標識、または放射性標識がある。標識は受容体結合試薬および/または多量体化試薬に結合させることができる。標識は、直接標識、すなわち、上記で特定した多価結合複合体のメンバーの1つに結合された標識であり得る。そうした場合に、標識は、例えば、受容体結合試薬または多量体化試薬のいずれかに共有結合で結合(コンジュゲート化)させることが可能である(図1に示されるフィコエリスリンなどの蛍光標識を有する多量体化試薬を参照のこと)。あるいは、標識は、間接標識、すなわち、別の試薬に結合された標識であってもよく、該試薬は次には上で特定した多価結合複合体のメンバーの1つに結合することが可能である。そのような標識は多価結合複合体の形成前、形成中または形成後に添加することができる。そうした間接標識の例は、Lata et al., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 10205-10215またはHuang et al., Bioconjugate Chem. 2006, 17, 1592-1600に記載されるようなビス-、トリス-、またはテトラキス-NTA含有蛍光色素である。前記標識はオリゴヒスチジンタグに(金属キレート化を介して)非共有結合で結合することが可能である。かくして、この例では、受容体結合試薬および/または多量体化試薬がオリゴヒスチジンタグを保持することができ(例えば、CH1もしくはCLドメインのC末端に融合されたヘキサヒスチジンタグなどのオリゴヒスチジンタグを有する、受容体結合試薬としてのFabフラグメント、またはそのサブユニットの1つのN末端もしくはC末端に融合されたオリゴヒスチジンタグを有する、多量体化試薬としてのStrep-Tactin(登録商標)などのストレプトアビジン変異タンパク質が使用可能である)、それによって、Lata et al, 前掲またはHuang et al, 前掲に記載されたNTAベースの蛍光色素化合物に非共有結合で結合することが可能になる。このような非共有結合性の標識は、多価結合複合体が形成される前にその標的(受容体結合試薬および/または多量体化試薬)に必ずしも結合される必要はなく、多価結合複合体が形成される際にまたは多価結合複合体が形成された後でサンプルに添加することもできる。このような非共有結合性の標識はまた、多価結合複合体が標的細胞に結合された後で添加されてもよい。上記のNTA含有蛍光色素:オリゴヒスチジンタグ結合対の代わりに、例えばジゴキシゲニンと蛍光もしくは他の標識を有する抗ジゴキシゲニン抗体または抗体フラグメントなど、その他の特異的結合対もまた、間接標識として使用することができる。このよ

10

20

30

40

50

うな場合には、受容体結合試薬および/または多量体化試薬がジゴキシゲニンにコンジュゲート/結合され、そして所定の標識を有する抗ジゴキシゲニン抗体または抗体フラグメントが(ジゴキシゲニンを介して)多量体化試薬または受容体結合試薬に結合する。

【0040】

本発明の方法の態様において、標的細胞は少なくとも2つの異なる(予め選択された)受容体分子のグループによって染色され、必要に応じて単離される。2つ以上の共通の受容体を利用する標的細胞の単離は、各サイクルで対応する受容体結合試薬を用いることにより、逐次的に本発明の方法を実施することによって行うことができる。この場合に、同じ標識を各サイクルのために使用してもよい。あるいは、各受容体分子に異なる標識を用いる場合には、標的細胞の同時標識付けが可能である。このような逐次細胞濃縮および/または(同時)マルチパラメータ染色は、少なくとも2つの異なる受容体結合試薬を使用し、各受容体結合試薬は、少なくとも2つの異なる受容体分子のグループの予め選択された受容体分子に特異的に結合する結合部位Bを少なくとも1つ含む。例示的に言えば、少なくとも2つの異なる受容体分子は、例えばCD4⁺ CD25⁺ T制御性細胞、またはCD62L⁺ CD8⁺特異的セントラルメモリーT細胞などの、異なるCDマーカーであり得る。細胞は、例えば、CMV特異的CD8⁺ T細胞などの抗原特異的T細胞とすることができ、CMV特異的CD8⁺ T細胞は、最初にCD8⁺ T細胞を選択し、続いてHLA-B8/IE1K₁₉₉₋₂₀₇特異的CD8⁺ T細胞などのCMV特異的標的集団についての第2の染色および単離を行うことによって、単離することができる。

10

【0041】

そのような態様において、少なくとも2つの異なる受容体分子のグループの第2のまたはさらなる受容体分子に結合する受容体結合試薬は、少なくとも1つの結合パートナーCをさらに含むことができる。

20

【0042】

この第2の受容体分子の染色の場合、結合部位Bを介して特異的に結合する受容体結合試薬と第2のまたはさらなる受容体分子との間の結合の解離速度定数 k_{off} はまた、(第1の受容体分子に結合する受容体結合試薬と同様に) $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上の k_{off} 速度をもつことができる。あるいは、米国特許第7,776,562号または国際特許出願WO 02/054065に記載の方法に沿って、第2のまたはさらなる受容体分子とこの第2のまたはさらなる受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬との間の結合の解離定数(K_d)は、 $10^{-2} \sim 10^{-7} \text{M}$ の範囲であり得る。

30

【0043】

上述したように、本発明の染色方法は少なくとも1つの共通の特定の受容体分子の存在によって規定される細胞集団の単離のために使用することができる。共通の特定の受容体分子の存在によって規定される細胞集団は、例えば抗原特異的T細胞集団をはじめとする、T細胞集団であり得る。この精製された細胞集団は例えば養子移入または免疫療法のために使用することができる。

【0044】

本発明の方法はまた、T細胞集団の機能的状態の判定のために、またはインビトロ増殖のためのT細胞集団の精製のために使用することもできる。

【0045】

より詳細には、そして米国特許第7,776,562号の開示によれば、本発明の方法は、可逆的な染色手順に基づいて、標的細胞集団の、例えばT細胞集団の、機能的単離を可能にする。標的細胞、例えばT細胞、の本来の機能的状態は、同定および精製後に実質的に維持される。したがって、本発明の方法は、基礎研究および臨床応用に幅広く有益である。

40

【0046】

好ましい応用例は以下のとおりである。

【0047】

基礎研究：

例えば抗原特異的T細胞集団を含む、T細胞などのリンパ球の機能的状態の直接エクスピボ研究。インビボでのT細胞集団の機能的状態は非常に多様で、特定のインビボ条件に依

50

存することが示唆されるが、適切な研究ツールがないため、これらの面はごくわずかしが理解されていない。例えば、本明細書に記載されるFab多量体を用いて、エピトープ特異的T細胞集団を、それらの機能的状態とは無関係に同定しかつ精製することが可能である。しかし、不可逆的な試薬の結合は、その後の機能アッセイを妨害する。可逆的なT細胞染色、例えば、ストレプトアビジン結合性ペプチド/Strep-Tactin(登録商標)試薬を備えたFabフラグメントを使用する可逆的な染色は、改変されていない多様なT細胞集団の直接的機能的エクスピボ研究を可能にする技術である。

【0048】

非常に効率的なインビトロ増殖のためのT細胞集団の精製。エクスピボで得られたT細胞集団の特性評価は、多くの場合、T細胞株またはT細胞クローンへのさらなるインビトロ増殖を必要とする。

10

【0049】

Fab多量体技術を用いて、多様なT細胞集団内の単一細胞または異なる表現型の亜集団を単離することができるが、TCRへの試薬の結合はインビトロ増殖の効率を妨げる。この実験的問題は、本発明の試薬、例えばFab-Strep-tag(登録商標)/Strep-Tactin(登録商標)試薬を用いる可逆的なT細胞染色により解決される。このようなFabフラグメントは、結合パートナーCとして、国際特許公開WO 02/077018に記載されるような2つ以上の個々の結合モジュールの連鎖配列を有するストレプトアビジン結合性ペプチドを担持することができる。

【0050】

養子移入実験のためのT細胞集団の精製。免疫学的研究における多くのインビボ実験は、レシピエント動物への精製T細胞の養子移入を必要とする。移入されるT細胞集団の純度と、単離手順の間に生じる可能性がある細胞の変化は、いずれも、これらの実験系における関心事である。細胞集団の最高純度は陽性選択法によって達成されるが、同定のために用いられたマーカー(通常は抗体)は、単離された細胞の表面から除去することが困難であり、また、後続のインビボ実験の結果に干渉する可能性がある。

20

【0051】

本発明の試薬、例えばFab Strep-tag(登録商標)/Strep-Tactin(登録商標)試薬を用いる可逆的なT細胞染色は、陽性選択法とその後の選択マーカーの除去との組み合わせを可能にし、かつ養子移入実験を大幅に改善する可能性がある。

【0052】

臨床応用:

30

非常に効率的なインビトロ増殖のためのT細胞集団の精製。ヒトT細胞株またはクローン(例えば、病原体/腫瘍特異的または自己反応性T細胞)の作製は、臨床研究、診断、および免疫療法の多くの領域において必要である。インビトロ培養は、抗原特異的刺激のための条件を標準化することの困難さによってしばしば制限される。T細胞集団を精製するための改善された戦略は、マイトジェンおよび抗CD3などの抗原非依存性刺激の使用を可能にして、インビトロ増殖の効率を大いに高めることができるかもしれない。本発明によれば、例えばMHC-Strep-tag(登録商標)またはFab-Strep-tag(登録商標)試薬(受容体結合試薬として)とStrep-Tactin(登録商標)多量体化試薬を用いて、T細胞集団をエクスピボで直接単離して、試薬の解離後にインビトロで増殖させることができる。このアプローチは、試薬の結合がインビトロT細胞増殖の効率に負に干渉するような、例えば従来の不可逆的なMHC多量体試薬を用いる精製よりも、はるかに効率的であると予想される。

40

【0053】

さらなる機能解析または治療のための、インビトロ増殖された細胞株またはクローンからのT細胞集団の精製。T細胞のインビトロ増殖は、培養物への抗原提示細胞またはフィーダー細胞の添加を必要とする。さらなる機能解析のために、そして特に治療への応用(例えば養子移入)のために、これらの汚染細胞を除去することが役立つだろう。陽性選択手順(通常は最高純度をもたらす)では、選択マーカーは、それが機能アッセイまたは養子移入を妨げる可能性があるため、T細胞表面から除去可能であるべきである。T細胞がインビボ用途に使用される場合、選択マーカーは、それがアレルギー反応のような臨床的合併症

50

を引き起こす可能性のある物質を含むのであれば、さらに除去されねばならない。例えばMHC-Strep-tag(登録商標)またはFab-Strep-tag(登録商標)試薬/Strep-Tactin(登録商標)試薬を用いる、可逆的T細胞染色は、こうした基準をすべて満たしている。

【0054】

「直接養子移入」のためのT細胞集団のエキスピボ精製。T細胞集団をエキスピボで直接単離し、続いて該細胞を(さらなるインビトロ増殖なしに)レシピエントに即時移入することは、特別な臨床的関心事である。直接単離された細胞集団は、インビボ用途のために培養された細胞よりはるかに有効であると期待される。効果的な養子移入のために、つまりインビトロ培養条件へのT細胞の順応による可能性が最も高い現象のためには、極めて多数のインビトロ増殖T細胞が必要とされる。この手法に関する重要な臨床応用の一例は、[さもなければ]T細胞を枯渇した幹細胞移植時におけるEBVおよび/またはCMV特異的T細胞集団の並行する精製と養子移入であり、これは、移植患者におけるEBVおよびCMV関連悪性腫瘍の発症率を劇的に減少させる可能性が高いプロトコルである。例えば受容体結合試薬としてMHC-Strep-tag(登録商標)またはFab-Strep-tag(登録商標)を、そして多量体化試薬としてStrep-Tactin(登録商標)を用いる、可逆的T細胞染色および単離は、これらの臨床用途に非常に適した方法である。例えば、(ストレプトアビジン結合性ペプチドに融合した)MHC I分子は、ドナー血液白血球からの高純度のCMV特異的CD8+ T細胞の単離を可能にする；続いて、このような精製された細胞は、(例えば、同種幹細胞移植時に)生命を脅かすCMV疾患に罹患する免疫無防備状態の患者に導入される。これに関しては、Schmitt et al., (2011) TRANSFUSION, Volume 51, pp.591-599を参照されたい。他の例としては、精製されたTreg細胞集団が挙げられ、このTreg細胞集団は、移植片対宿主病(GvHD)もしくは移植片拒絶反応、または1型糖尿病、大腸炎もしくはアレルギーなどの自己免疫疾患を治療するための養子移入において使用される。この目的のために、Treg標的細胞集団はCD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁺ Treg細胞とすることができ、このようなTreg細胞は、例えばCD4受容体分子、CD25受容体分子またはCD45RA受容体分子に特異的に結合するFabフラグメントなどの、3種の受容体結合試薬を用いて逐次的に染色/単離される。その他の例としては、CD56受容体分子(神経細胞接着分子(NCAM)の別名でも知られる)を介するナチュラルキラー細胞の単離、またはそれぞれの細胞表面受容体分子を介する造血幹細胞、例えばCD34⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{low}、CD133⁺もしくはCkit/CD117⁺造血幹細胞の単離が挙げられる。

【0055】

機能的T細胞診断

MHC多量体技術は、抗原特異的T細胞の定量化および表現型解析を直接エキスピボで可能にする。しかし、TCRへの多量体試薬の結合は、精製された細胞の機能アッセイ(例えば、慢性ウイルス感染[HIV、CMV、EBV、HBV、HCV]、腫瘍特異的なT細胞集団)における使用を複雑にする。

【0056】

可逆的なT細胞染色および単離は、例えばFab-Strep-tag(登録商標)/Strep-Tactin(登録商標)試薬を用いることによって、多くの臨床的状況におけるT細胞の状態に関する強力な評価の機会を与える。

【0057】

本発明は、以下の実験的実施例によってさらに説明される。

【実施例】

【0058】

材料および方法

血液サンプル

新鮮なPBMCは、Biocoll分離溶液の上に遠心分離することにより、末梢血またはパフィーコートの内いずれかから取り出した。末梢血は、Institute of Medical Microbiology, Immunology and Hygiene (Technical University Munich: ミュンヘン工科大学)で健康な成人ドナーから採取し、パフィーコートは、Institute for Anesthesiology, German Heart Centre Munich(バイエルン州立およびミュンヘン工科大学)で自家血液ドナーから採取

10

20

30

40

50

した。書面によるインフォームドコンセントがドナーから得られ、また、血液サンプルの使用が地元の治験審査委員会(ミュンヘン工科大学医学部の倫理委員会)により国内法令に従って承認された。

【0059】

受容体結合試薬としてのFabフラグメントの生産(クローニング、発現、精製)

モノクローナル抗CD4抗体13B8.2に由来する可変ドメインは、米国特許第7,482,000号およびBes, C., et al., J Biol Chem 278, 14265-14273 (2003)に記載される配列を使用して、遺伝子合成により作製した。得られた可変配列を、続いて、重鎖としてヒト定常領域Ch1タイプ 1および軽鎖としてカッパをコードする配列と結合させ、そしてその重鎖を、

10

IBA社(Goettingen, ドイツ)からOne-STrEP-tagアフィニティタグとして市販されている、2つのストレプトアビジン結合性モジュールの連鎖配列:

(SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK)
とカルボキシ末端で融合させた。すべてのクローニングは、記載したFab発現に適している融合ベクターを含むStarGate(登録商標)クローニングシステム(IBA社, Goettingen, ドイツ)を用いて行った。アミノ酸置換を導入するために変異誘発PCRを適用した。クローニング後、Fab-One-STrEP-tag融合タンパク質を大腸菌(E. coli)JM83株に発現させた(Plueckthun, A. & Skerra, A. Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in Escherichia coli. Methods Enzymol 178, 497-515 (1989))。ペリプラズムへの発現の後、Fabフラグメントは、Strep-Tactin(登録商標)Superflowカラム(IBA社)を通すOne-STrEP-tag/Strep-Tactin(登録商標)アフィニティクロマトグラフィー(Schmidt, T.G. & Skerra, A. The Strep-tag(r) system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. Nat Protoc 2, 1528-1535 (2007))により精製し、該カラムからのそれぞれのFabの溶出のために用いたデスチオビオチンから透析により分離し、それによってPBS pH7.4バッファー中に移行させ、そしてPBS pH7.4中に4 で保存するか、または使用するまで凍結(-20)させた。

20

【0060】

多量体化、染色およびFACS分析

細胞の混合物中のCD4受容体分子特異的な標的細胞集団を染色するために、蛍光標識としてフィコエリスリンで標識したStrep-Tactin(登録商標)(IBA社, Goettingen, ドイツ)を多量体化試薬として、抗体13B8.2の変異体の単量体CD4結合性Fab-One-STrEPフラグメント(受容体結合試薬として機能する)と共に、後述するように使用した。FACS分析のために、 5×10^6 個のPBMCを、受容体結合試薬としてのOne-STrEP-tag(結合パートナーC)を備えたFabフラグメント(結合部位Bを含む)0.2 μ g、および多量体化試薬としてのStrep-Tactin(登録商標)PE (IBA社, Goettingen, ドイツ)0.75 μ gからなるFab多量体と、以下のプロトコルを用いてインキュベートした。さらに、FACS分離の後、多価複合体を、後述するようにビオチンの添加により、染色された細胞のそれぞれの一部において破壊した。対照抗体染色はそれぞれの抗体の同時適用により行った:抗CD4(OKT4)(eBiosciences社製, San Diego, CA, USA)。本発明の染色手順の後、続いて生/死を識別するためのヨウ化プロピジウムで細胞を染色した。

30

【0061】

受容体結合試薬と多量体化試薬で 5×10^6 個の細胞を染色するためのプロトコル

1. 0.75 μ gのStrep-Tactin PEを0.2 μ gの単量体のCD4結合性Fab-One-STrEPフラグメントと共に暗所で4、30分間インキュベートした。
2. 予め冷却した 5×10^6 個の細胞を、15ml反応チューブ内で10mlのバッファーIS(リン酸緩衝生理食塩水(PBS)pH7.4中の0.5%BSA(w/v)、ここでPBS = 8.06mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄, 137mM NaCl)を用いて洗浄し、後続の手順を妨害する、例えばD-ビオチンなどの、存在する可能性のある成分を除去した。
3. 該細胞を50 μ lのバッファーIS中に再懸濁し、染色に適した反応容器、例えば96ウェル丸底マイクロタイタープレートに移した。
4. プレインキュベートしたステップ1由来のFab-Streptamer調製物を該細胞に添加し、穏

40

50

やかなピペッティングにより十分に混合した。

5. 該混合物を暗所で4、20分間インキュベートした。
6. 該細胞を、200 μ lのバッファ-IS中で遠心分離(400xg、2分)することにより3回洗浄した。
7. 細胞はFACS分析またはFACSソーティングを行う準備ができており、FACS分析をCyAn AD P Lx(Beckman Coulter社)で実施し、FlowJoソフトウェア(TreeStar社)を用いて分析した。

【0062】

D-ビオチンを用いて 5×10^6 個の細胞から多価複合体を解離し、続いて受容体結合試薬を除去するためのプロトコル

1. 5×10^6 個の染色細胞(上記参照)を遠心分離(400xg)により回収し、1mM D-ビオチンを含む3mlのバッファ-IS中に再懸濁して、4で10分間インキュベートした。
2. 該細胞を遠心分離により沈降させて、上清を廃棄した。
3. ステップ1および2を繰り返した。
4. 該細胞を10mlのバッファ-IS中に再懸濁して、(受容体結合試薬として用いたCD4結合性Fabフラグメントを解離させるために)25で10分間インキュベートした。
5. 該細胞を遠心分離により沈降させて、上清を廃棄した。
6. ステップ4および5を3回繰り返した。

【0063】

結果

Fab多量体染色の原理

本発明の基礎は、細胞受容体に対して高い親和性($K_d < 10^{-7} \sim 10^{-10}$ M)を有する単量体のFab分子などの受容体結合試薬は、標的細胞への安定した結合のために多量体化試薬で多量体化する必要があり、かつパートナーCと多量体化試薬の結合部位Zとの相互作用の標的破壊によって細胞表面から完全に除去し得る(図1)、という驚くべき発見であった。さらに、そのような可逆的染色の重要な分子的基盤は、細胞表面受容体分子と受容体結合試薬の結合部位Bとの相互作用の親和定数 K_d ではなく、受容体分子からの受容体結合試薬の解離のoff速度である、ことが発見された。off速度は、受容体結合試薬が合理的な時間枠内で標的細胞から完全に除去され得るように、 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上である必要がある。

【0064】

親和性ではなく、off速度が可逆的Fab多量体染色を行うための不可欠なパラメータである、という重要な知見を実証するために、細胞表面受容体分子CD4に対する次の組換えFabフラグメント(受容体結合試薬として機能する)を作製した：

1) CD4結合性マウス抗体13B8.2の可変ドメインと、重鎖としてのガンマ1型の定常ヒトC H1ドメインおよびカッパ型の定常ヒト軽鎖ドメインからなる定常ドメインと、からなるFabフラグメント(米国特許第7,482,000号に記載される)。このFabは以下では13B8.2 Fabフラグメントで表される。

2) 重鎖の100位のPhe残基がAlaに変異した、変異型13B8.2 Fabフラグメント(本明細書ではCD4変異型1(F100A)とも呼ばれ、米国特許第7,482,000号の表IIではF100K-Hと呼ばれる)。

3) 軽鎖の92位のTyr残基がAlaに変異した、変異型13B8.2 Fabフラグメント(本明細書ではCD4変異型2(Y92A)とも呼ばれ、米国特許第7,482,000号の表IIIではY92-Lと呼ばれる)。

4) 重鎖の35位のHis残基がAlaに変異した、変異型13B8.2 Fabフラグメント(本明細書ではCD4変異型3(H35A)とも呼ばれ、米国特許第7,482,000号の表IIではH35-Hと呼ばれる)。

5) 軽鎖の91位のHis残基がAlaに変異した、変異型13B8.2 Fabフラグメント(本明細書ではCD4変異型4(H91A)とも呼ばれ、米国特許第7,482,000号の表IIIではH91-Lと呼ばれる)。

【0065】

これらのFabフラグメントは親和性の広範なスペクトル($12.5 \text{nM} \sim 16.9 \mu\text{M}$ の範囲の K_d 値)および次第に増加する k_{off} 速度を有する；BIAcoreにより測定された結合速度論の要約を以下の表1に示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

(表1) 固定化CD4と、CD4結合性抗体13B8.2のFabフラグメントおよび米国特許第7,482,000号およびBes, C., et al., J Biol Chem 278, 14265-14273 (2003)からの変異型Fabフラグメントとの間の結合速度論

Fabフラグメント	$k_{on}(10^4 s^{-1} M^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} s^{-1})$	$K_d (nM)$
CD4野生型(13B8.2)	$0.37 \pm 0.09^{1)}$	$1.11 \pm 0.4^{1)}$	$29.17 \pm 3.27^{1)}$
CD4変異型1(F100A)	$0,562 \pm 0.003^{2)}$	$4.75 \pm 0.05^{2)}$	$845.1 \pm 47.5^{2)}$
CD4変異型2(Y92A)	$7.27 \pm 0.2^{3)}$	$10.80 \pm 1.91^{3)}$	$14.75 \pm 2.25^{3)}$
CD4変異型3(H35A)	$0,0301 \pm 0.200^{2)}$	$18.90 \pm 0.85^{2)}$	$6279.1 \pm 4240^{2)}$
CD4変異型4(H91A)	$0,0239 \pm 0.002^{2)}$	$40.40 \pm 0.28^{2)}$	$16903.7 \pm 1900^{2)}$

1) この値は、Bes, et al.に示された3つの測定値の算術平均である；

2) Bes, et al.に示された単一の測定値；

3) 値は、Bes, et al.に示された2つの測定値の算術平均である。

【 0 0 6 7 】

結合パートナーCを導入するために、CD4結合性Fabフラグメントの重鎖を、2つのStrep-tag(登録商標)II配列のタンデム配列

(SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK

IBA社(Goettingen, ドイツ)からOne-STREP-tag配列として市販されている)に遺伝学的に融合させ、両鎖を大腸菌のペリプラズムにおいて同時に発現させた。この機能的に組み立てられたFabフラグメントは、受容体結合試薬として機能するものであり、次にStrep-Tactin(登録商標)樹脂でのアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、透析によるデスチオビオチンの除去後、続いて水溶性のフィコエリスリン標識Strep-Tactin(登録商標)[Strep-Tactin(登録商標)PE、これはOne-STREP-tag配列のための少なくとも2つ(約12)の結合部位Zを提供する多量体化試薬として機能し、フィコエリスリンは(蛍光)標識として役立つ]の存在下で多量体化した。ストレプトアビジン結合性ペプチドとストレプトアビジン変異タンパク質「Strep-Tactin(登録商標)」との間の相互作用は、競合リガンドとしてD-ビオチン(またはその誘導体、例えばジアミノビオチンまたはデスチオビオチンなど)を添加することにより、可逆的である。

【 0 0 6 8 】

染色および解離実験のために、 5×10^6 個のPBMCを、それぞれの抗CD4 Fab多量体-Strep-Tactin(登録商標)PE複合体と、または対応するFab単量体とインキュベートした(後者はStrep-Tactin(登録商標)PEと複合体を形成していない)。13B8.2野生型(wt)Fabフラグメントおよびすべての変異型は、多量体化したとき、本質的に等しく良好な染色シグナルを示し

たが、より遅い k_{off} 速度($1.11 \times 10^{-4} s^{-1}$ および $4.75 \times 10^{-4} s^{-1}$)を有する、13B8.2 wt Fabフラグメントと変異型1のみは、単量体状態でそれらの抗原に結合する能力があった(図2、第1および第2列)。多量体複合体のD-ビオチン媒介破壊(図2、第3列)とそれに続く洗浄の後で、細胞を、Strep-Tactin(登録商標)PE単独(結合したFabを含まない)の添加により、残存する表面結合型Fabフラグメントについて精査した(図2、第4列)。単量体染色実験から予想されたように、変異型2、3および4については残存するFab単量体を検出することができなかったが、野生型および変異型1変異体の残存する細胞表面結合型Fabはかなり観察された。変異型2、3および4については、Fab多量体標識付けを再度用いて、細胞を2回目に効率よく再染色することができた(図2、第5列)。このことは、細胞表面上の残留Fabフラグメントを検出する間の一貫したビオチン除去を実証する。

10

【0069】

フローサイトメトリーに基づく分析(図2)に加えて、Fab多量体の完全な除去はまた、独立した他の分析法、すなわちウェスタンブロット分析(図3)によっても評価された。図2に示した高感度のFACSの結果を裏付けて、Fabフラグメントは、変異型2、3および4については、細胞溶解後の可溶性または不溶性細胞画分のいずれにも検出されなかったが、野生型Fabフラグメントは可溶性画分中に容易に検出することができた。この実験はまた、FACSによって検出されなかったであろう内在化Fabフラグメントを検出したであろうから、染色および遊離手順の間の表面結合型受容体結合試薬の有意な内在化を除外することによって、図2に示した結果の正しい解釈を確認することができた。使用した洗浄条件下での変異型1の不完全な除去を実証するFACS実験とは対照的に、残存する変異型1は、ウェスタンブロット実験によって、おそらくウェスタンブロット法の感度が劣るため、同様に処理した細胞において検出されなかった。

20

【0070】

主な驚くべき結果は以下の通りである：それらの低い親和性(約 $6.2 \mu M$ および $16 \mu M$ の K_d)のため、Fab変異型3および4の完全な遊離は、それぞれのFabフラグメントと多量体化試薬としてのStrep-Tactin(登録商標)PEとの多価複合体の破壊後に、米国特許第7,776,562号または国際特許出願WO 02/054065の教示と一致したが、変異型2のFabフラグメントの完全な遊離は、単量体の野生型Fab分子とは対照的であり(そして変異型3および4のFabフラグメントとは類似しており)、完全に予想外であった。なぜならば、変異型2の親和性($K_d = 14.75 \pm 2.25 nM$)は、野生型($K_d = 29.17 \pm 3.27 nM$)および他のすべての変異型のそれよりも有意に高いことが判明したからである。しかしながら、変異型2は、野生型FabフラグメントおよびFab変異型1よりもかなり速いoff速度($k_{off} = 10.80 \pm 1.91 \times 10^{-4} s^{-1}$; 表1も参照)により特徴づけられ、このことは、解離速度が、表面に結合した単量体Fabフラグメントの結合安定性に支配的な影響を及ぼすのであって、親和定数ではない、ことを示している。この解釈に合致して、すべての完全に可逆的なFabフラグメント(変異型2~4)(本明細書で定義される受容体結合試薬である)は、 $0.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える速い k_{off} 速度を共有する。しかし、多価結合複合体の破壊の際に、D-ビオチン含有溶液を用いてより長く洗浄/インキュベーションを行うと、野生型FabフラグメントおよびFab変異型1(両方とも $0.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える k_{off} 速度を共有する)の結合の完全な逆転が合理的な時間枠内で可能であり、したがって、本発明による受容体結合試薬として使用することができる、ことにも留意すべきである。

30

40

【0071】

まとめると、これらのデータは、結合部位Bを介した受容体分子の結合の k_{off} 速度が $0.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超えている、多量体化された受容体結合試薬(例えばFabフラグメント)は、細胞を安定的に染色するために使用することができ、また、これらの試薬は標識された細胞の表面から生理学的条件下で完全に切り離されて除去することができる、ことを実証している。

【0072】

本明細書に例示的に説明された本発明は、本明細書に具体的に開示されていない、任意の要素(複数可)、限定(複数可)の非存在下で、適切に実施することができる。こうして、

50

例えば、用語「含む (comprising)」、「包含する (including)」、「含有する (containing)」などは、拡張的にかつ限定なしに読み取られるものとする。さらに、本明細書で用いる用語および表現は、限定の用語としてではなく、説明の用語として使用されており、また、そうした用語および表現の使用には、示された、および記載された特徴またはその一部の任意の均等物を排除する意図はなく、さまざまな改変がクレームされた本発明の範囲内で可能であることが認識される。したがって、当然のことながら、本発明は例示的な態様および任意選択の特徴によって具体的に開示されているが、本明細書に開示されてそこで具体化された本発明の改変および変更が当業者によって用いられてもよく、そのような改変および変更は本発明の範囲内であると考えられる。

【0073】

本発明は、本明細書において広範かつ一般的に説明されてきた。一般的な開示の範囲内に入る、より狭い種および垂属のグループのそれぞれもまた、本発明の一部を形成する。これには、切り取られた材料が本明細書に具体的に記載されているか否かにかかわらず、属から任意の対象物を取り除く但し書または消極的な限定を伴う本発明の一般的な説明が含まれる。

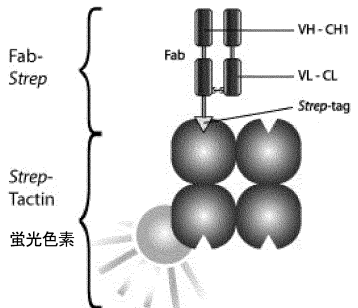
【0074】

他の態様は以下の特許請求の範囲内である。さらに、本発明の特徴または局面がマーカッシュグループによって記載されている場合、当業者であれば、本発明はそのマーカッシュグループの個々のメンバーまたはメンバーのサブグループによっても記載されることを認識するであろう。

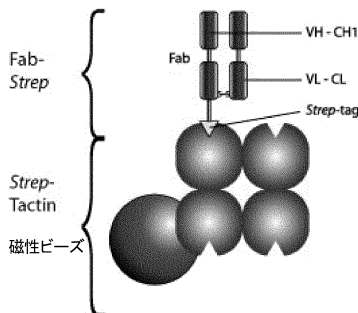
10

20

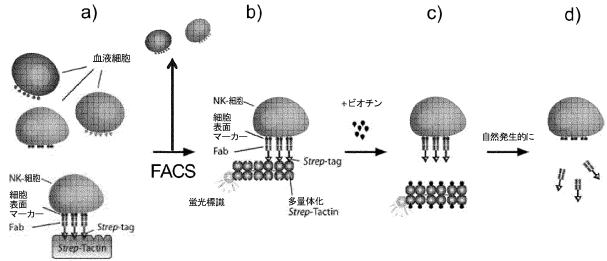
【図1a】



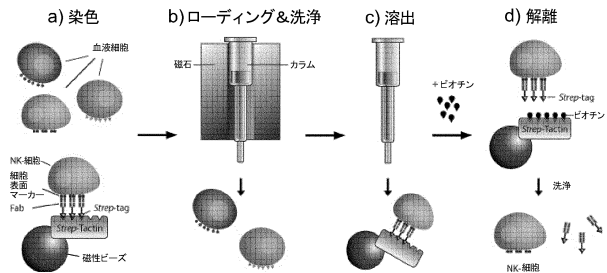
【図1b】



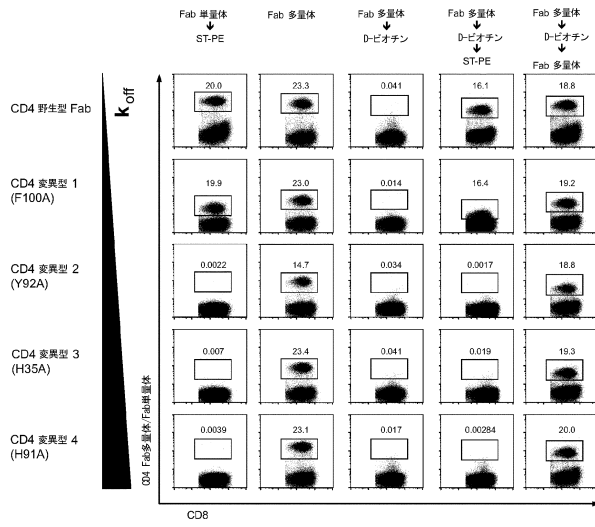
【図1c】



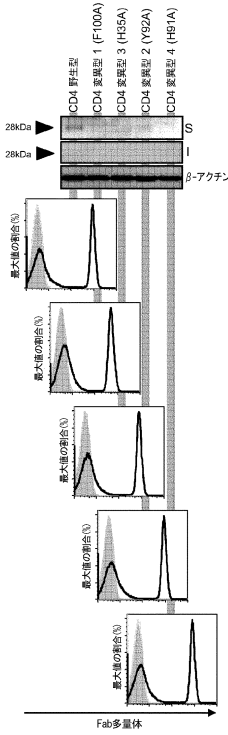
【図1d】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 配列表 】

0006310388000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 シュミット トーマス
ドイツ連邦共和国 アデレブセン タバクスヴィンケル 8
- (72)発明者 シュテムベルガー クリスティアン
ドイツ連邦共和国 ホルツキルヒェン フランツ フォン デフレッガー シュトラーセ 17
- (72)発明者 ブッシュ ダーク エイチ.
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン ハーフェルシュトラーセ 6エイ
- (72)発明者 ゲルメロート ロタール
ドイツ連邦共和国 ゲッティンゲン アム メンツェルベルク 16エイ

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特表2004-525354(JP,A)
特表2005-503151(JP,A)
特開2007-171054(JP,A)
国際公開第2008/054030(WO,A1)
EICHORN JH et al., Am J Clin Pathol., 2008年, 129, 686-696

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
C12Q 1/02
C12N 15/09

专利名称(译)	可逆染色靶细胞的方法		
公开(公告)号	JP6310388B2	公开(公告)日	2018-04-11
申请号	JP2014520636	申请日	2012-07-17
申请(专利权)人(译)	Ibea有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Ibea有限公司		
[标]发明人	シュミットトーマス シュテムベルガークリスティアン ブッシュダークエイチ ゲルメロートロターール		
发明人	シュミットトーマス シュテムベルガークリスティアン ブッシュダークエイチ ゲルメロートロターール		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/02 C12N15/09		
CPC分类号	C07K2319/00 C07K2319/22 C07K2319/74 G01N1/30 G01N33/557 G01N33/56972 A61P1/00 A61K35/14 A61K35/17 G01N2458/00 G01N33/566 G01N2333/705		
FI分类号	G01N33/48.P G01N33/53.ZNA.Y C12Q1/02 C12N15/00.A		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/508943 2011-07-18 US		
其他公开文献	JP2014529361A5 JP2014529361A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及可逆染色靶细胞的方法。本发明还涉及分离由至少一种共同特异性受体分子的存在所定义的靶细胞或靶细胞群的方法。本发明还提供了可用于实施本发明方法的试剂盒。

(19) 日本国特許庁(JP) (12) 特許公報(B2) (11) 特許番号
 特許第6310388号
 (P6310388)

(45) 発行日 平成30年4月11日(2018.4.11) (24) 登録日 平成30年3月23日(2018.3.23)

(51) Int. Cl. F I
 G 0 1 N 33/48 (2006.01) G 0 1 N 33/48 P
 G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 Z N A Y
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 61 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2014-520636 (P2014-520636)	(73) 特許権者 514014883
(86) (22) 出願日 平成24年7月17日(2012.7.17)	イーベアー ゲーエムベアー
(65) 公表番号 特表2014-529361 (P2014-529361A)	ドイツ連邦共和国 ゲットティングン ルド
(43) 公表日 平成26年11月6日(2014.11.6)	ルフーフウィッセル-シュトラッセ 28
(86) 国際出願番号 PCT/EP2012/063968	(74) 代理人 100102978
(87) 国際公開番号 W02013/011011	弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日 平成25年1月24日(2013.1.24)	(74) 代理人 100102118
審査請求日 平成27年6月17日(2015.6.17)	弁理士 香名 雅夫
(31) 優先権主張番号 61/508,943	(74) 代理人 100160923
(32) 優先日 平成23年7月18日(2011.7.18)	弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国 米国(US)	(74) 代理人 100119507
	弁理士 刑部 俊
	(74) 代理人 100142929
	弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的細胞を可逆的に染色する方法