

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6362543号
(P6362543)

(45) 発行日 平成30年7月25日(2018.7.25)

(24) 登録日 平成30年7月6日(2018.7.6)

| | | |
|---------------------------------|----------------|---------|
| (51) Int.Cl. | F I | |
| C 1 2 N 5/07 (2010.01) | C 1 2 N 5/07 | |
| G O 1 N 33/543 (2006.01) | G O 1 N 33/543 | 5 1 1 N |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 | Z N A Y |
| B O 1 J 20/281 (2006.01) | B O 1 J 20/281 | R |
| B O 1 J 20/285 (2006.01) | B O 1 J 20/285 | T |
| 請求項の数 31 (全 49 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2014-558137 (P2014-558137)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月25日 (2013.2.25)
 (65) 公表番号 特表2015-512621 (P2015-512621A)
 (43) 公表日 平成27年4月30日 (2015.4.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/053650
 (87) 国際公開番号 W02013/124474
 (87) 国際公開日 平成25年8月29日 (2013.8.29)
 審査請求日 平成28年2月24日 (2016.2.24)
 (31) 優先権主張番号 61/602,150
 (32) 優先日 平成24年2月23日 (2012.2.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 514214106
 ジュノ セラピューティクス ゲーエムベ
 ーハー
 ドイツ連邦共和国 ゲットティングェン ルド
 ルフ-ヴィセル-シュトラッセ 28
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (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】 細胞および他の複雑な生物学的材料のクロマトグラフィーによる単離

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的細胞を単離する方法であって、該標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、該方法は、

該標的細胞を含むサンプルを提供する工程、

一価の結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬を提供する工程であって、該レセプター結合試薬は、一価の抗体断片、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子、アプタマー、およびMHC分子の群から選択され、

該レセプター結合試薬に含まれる一価の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に特異的に結合することができ、

該レセプター分子への該レセプター結合試薬の結合に関する K_D が、 $10^{-3} \sim 10^{-7} M$ の範囲内であり、

該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、工程、および

該サンプルを好適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、該固定相は、非磁性材料または非磁化性材料であり、該固定相上には親和性試薬が固定化されており、該親和性試薬は、結合部位Zを含み、該結合部位Zは、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと可逆的結合を形成し、かつ該レセプター結合試薬の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に結合し、それにより、該固定相上に該標的細胞が可逆的に固定化される、工程

を含む、方法。

【請求項 2】

親和性試薬が、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合することができる2つ以上の結合部位Zを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

固定相上に競合試薬をロードする工程をさらに含み、競合試薬は、親和性試薬の結合部位Zに競合的に結合して、レセプター結合試薬のパートナーCと親和性試薬の結合部位Zとの結合を破壊することができ、それにより、親和性試薬からレセプター結合試薬を除去する、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

標的細胞を含むサンプルを固定相に適用する前に、レセプター結合試薬が、固定相上に固定化される、請求項1~3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

サンプルが、標的細胞とさらなる細胞との混合物を含み、該さらなる細胞は、その細胞表面上に前記レセプター分子を欠き、かつ、該方法は、該さらなる細胞から該標的細胞を分離する工程を含む、請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

クロマトグラフィーが、カラムクロマトグラフィーまたは平面クロマトグラフィーである、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

サンプルを形成する工程をさらに含み、
該サンプルを形成する工程は、
標的細胞を含む供給源サンプルを提供すること、および
該供給源サンプルにレセプター結合試薬を加えること
を含む、請求項1~3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

供給源サンプルが、複数の標的細胞を含むと予想され、かつ該供給源サンプルは、複数のレセプター結合試薬と接触され、予想される数の標的細胞に対して過剰量のレセプター結合試薬が提供される、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

サンプルが、流体であるかまたは流体を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

サンプルが、体液を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

体液が、血液または血液成分である、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

サンプルをクロマトグラフィーにかける工程が、該サンプルをクロマトグラフィーカラムの固定相に通させることおよび該固定相を流体移動相で洗浄することを含み、該流体移動相は、レセプター結合試薬を少なくとも本質的に欠く、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

サンプルをクロマトグラフィーにかける工程が、クロマトグラフィーマトリックスから標的細胞を溶出することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

標的細胞を回収する工程をさらに含み、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

レセプター結合試薬の結合パートナーCと親和性試薬の結合部位Zとの可逆的結合が、 $10^{-2} \sim 10^{-13} \text{M}$ の範囲内の解離定数 (K_D) を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 16】

固定相が、セルロース膜、プラスチック膜、多糖ゲル、ポリアクリルアミドゲル、アガロースゲル、多糖グラフトシリカ、ポリビニルピロリドングラフトシリカ、ポリエチレン

10

20

30

40

50

オキシドグラフトシリカ、ポリ(2-ヒドロキシエチルアスパルトアミド)シリカ、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)グラフトシリカ、スチレン-ジビニルベンゼンゲル、アクリレートまたはアクリルアミドとジオールとのコポリマー、多糖とN,N'-メチレンビスアクリルアミドとのコポリマー、およびそれらのいずれか2つ以上の組み合わせのうちの一つを含むかまたはそれらのうちの一つからなる、請求項1記載の方法。

【請求項17】

固定相が、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスおよび/またはゲル濾過マトリックスであり、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスおよび/またはゲル濾過マトリックスが、モノリシックなマトリックス、粒状のマトリックス、または平面のマトリックスを含むかまたはそれらのいずれかからなる、請求項1記載の方法。

10

【請求項18】

粒状のマトリックスが、5 μ m~200 μ mまたは5 μ m~600 μ mまたは5 μ m~1500 μ mの平均粒径を有する、請求項17記載の方法。

【請求項19】

固定相が、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスおよび/またはゲル濾過マトリックスであり、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスおよび/またはゲル濾過マトリックスが、0~500nmの平均ポアサイズを有する、請求項1記載の方法。

【請求項20】

レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCが、ビオチン、ビオチンアナログ、ストレプトアビジン結合ペプチド、およびアビジン結合ペプチドのうちの一つを含み、かつ親和性試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、アビジンムテイン、またはそれらの混合物を含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項21】

標的細胞が、哺乳動物細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項22】

標的細胞が、細胞核を有する細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項23】

標的細胞が、白血球または幹細胞である、請求項22記載の方法。

【請求項24】

白血球が、リンパ球である、請求項23記載の方法。

30

【請求項25】

標的細胞を単離するための部品のキットであって、該標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、該キットは、

(a) 一価の結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬であって、該レセプター結合試薬は、一価の抗体断片、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子、アプタマー、およびMHC分子の群から選択され、該レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、標的細胞表面のレセプター分子に特異的に結合することができ、該レセプター分子への該レセプター結合試薬の結合に関する K_D が、10⁻³~10⁻⁷Mの範囲内であり、かつ該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、多量体化試薬上の結合部位Zに可逆的に結合することができる、レセプター結合試薬;および

40

(b) 細胞分離に適した固定相であって、該固定相は、ゲル濾過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスによって定義され、該アフィニティークロマトグラフィーマトリックスまたは該ゲル濾過およびアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合することができる結合部位Zを有する親和性試薬を含む、固定相を備える、キット。

【請求項26】

固定相が、クロマトグラフィーカラムに含まれるか、または平面固定相である、請求項25記載の部品のキット。

【請求項27】

50

サンプル中の他の成分からの細胞分離/標的細胞分離に適した第2固定相を備え、該第2固定相は、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスによって定義され、該アフィニティークロマトグラフィーマトリックス上には親和性試薬が固定化されており、該親和性試薬は、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに特異的に結合することができる結合部位Zを含む、請求項25または26記載の部品のキット。

【請求項28】

第2固定相が、クロマトグラフィーカラムに含まれるか、または平面固定相である、請求項27記載の部品のキット。

【請求項29】

一価の抗体断片が、Fab断片、Fv断片、または一本鎖Fv断片である、請求項1記載の方法

10

【請求項30】

免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子が、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリン骨格に基づくタンパク質、結晶骨格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、請求項1記載の方法。

【請求項31】

固定相を使用するクロマトグラフィーを介して標的細胞を単離するためのレセプター結合試薬および/または親和性試薬の使用であって、該固定相は、非磁性材料または非磁性材料であり、該標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、

20

該レセプター結合試薬は、一価の抗体断片、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子、アプタマー、およびMHC分子の群から選択され、

該レセプター結合試薬は、結合部位Bおよび結合パートナーCを含み、該レセプター結合試薬の結合部位は、該標的細胞のレセプター分子に特異的に結合することができ、該レセプター分子への該レセプター結合試薬の結合に関する K_D が、 $10^{-3} \sim 10^{-7} M$ の範囲内であり、

および該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、該親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2012年2月23日に米国特許商標庁に出願された米国特許仮出願第61/602,150号"Chromatographic Isolation Of Cells And Other Complex Biological Materials"に対する優先権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、特にカラムクロマトグラフィー、例えば、アフィニティークロマトグラフィーまたはゲル浸透クロマトグラフィーによる、標的細胞または異なる(複雑な)生物学的材料のクロマトグラフィーによる単離に関する。本発明は、標的細胞の表面上に位置するレセプター分子に結合するレセプター結合試薬を使用する。本明細書において開示される方法は、(痕跡を残さない(traceless))細胞アフィニティークロマトグラフィー技術(CATCH)としても説明され得る。本発明は、概して、生物材料、例えば、細胞、細胞小器官、ウイルスなどを、痕跡を残さずに単離するための新規方法を提供する。本発明は、細胞および他の複雑な生物学的材料を単離するための装置にも関する。

40

【背景技術】

【0003】

発明の背景

所望の細胞型の純粋かつ機能的な細胞集団の単離は、種々の治療的、診断的、および生

50

物工学的な用途において欠くことができない。

【0004】

Bonnafous et al, J. Immunol. Methods. 1983 Mar 11;58 (1-2) :93-107 (非特許文献1)には、共有結合を介して固定化されたリガンドを意味する、切断可能な水銀-硫黄結合を介して固定化されたリガンドを用いた細胞アフィニティークロマトグラフィーが記載されている。この方法では、Bonnafousらは、第1級アミノ基を有するトリスアクリルビーズに有機水銀化合物マーサリルを結合体化している。Bonnafousらによると、チオール化されたリガンドは、切断可能なHg-S結合を介してこのマトリックス上に共有結合的に固定化することができる。細胞分離の2つのモデル研究が、Bonnafousらによって報告されている：(i) N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオネートでチオール化され、マーサリル-トリスアクリル上に固定化されたコンカナバリンA; Con A-マーサリル-トリスアクリルに結合したマウス胸腺細胞が、細胞生存能を保つ手短なチオール処理によって支持体から溶出された；(ii) S-アセチル-メルカプトコハク酸無水物で改変され、マーサリル-トリスアクリル上に固定化された抗ジニトロフェニル抗体；トリニトロベンゼンスルホン酸で予め標識しておいたヒツジ赤血球が、この支持体に結合し、溶血なしにチオール処理によって回収された。

10

【0005】

この文脈において、クロマトグラフィーが、低分子量分子とタンパク質を含む高分子量分子との分離について十分に確立された手法であることに注意する。この手法は、所望の細胞型、例えば、イムノリガンドに特異的な固定化されたリガンドを使用する細胞分離、特に、アフィニティークロマトグラフィーの形態での細胞分離にも適用されている。例として、種々のT細胞サブセットが、モノクローナル免疫グロブリンで標識し、ウサギ抗マウスIgGと共有結合的に結合したポリアクリルアミドビーズを含むカラムにロードすることによって、分離されている (Braun, R., et al, Journal of Immunological Methods (1982) 54, 251-258 (非特許文献2))。さらなる例として、ホースグラム (Dolichos biflorus) 凝集素に共有結合的に結合体化されたSepharose 6MBを使用するレクチンアフィニティークラムクロマトグラフィーが、健常な白血球から白血病細胞を分離するために使用されている (Ohba, H., et al, Cancer Letters (2002) 184, 207-214 (非特許文献3))。

20

【0006】

細胞は、通常、タンパク質よりも大きいので、細胞は、タンパク質とは対照的に、従来のクロマトグラフィー吸着剤のビーズのポアにほとんど入らない。大きなポアを有する吸着剤を使用しても、拡散限界に起因して、この分離現象は著しく打開されない。他方で、タンパク質だけがアクセス可能なポアの内部の表面積は、通常、タンパク質と細胞の両方がアクセス可能な表面積を大きく上回る。ゆえに、細胞用の親和性マトリックスを生成するためにタンパク質性のまたは他のレセプター結合リガンドを固定化するために従来のクロマトグラフィー吸着剤を使用するには、無駄な大過剰のレセプター結合リガンドの使用が必要である。なぜなら、そのほとんどが、通常、細胞がアクセスできないポアまたは空隙に固定化されてしまうからである。特異的なレセプター結合試薬は、高価であることが多く、所望のスケールで生成されることが困難であることが多く、それにより、この局面は深刻に考慮すべき事項になっている。ゆえに、モノリシックな吸着剤をクリオゲル (cryogels) の形態で使用することが、細胞のアフィニティークロマトグラフィーにおける代替手法として提案されている (例えば、Dainiak, M.B., et al., Adv. Biochem. Engin./ Biotechnol. (2007), 106, 101-127 (非特許文献4)を参照のこと)。しかしながら、モノリシックな吸着剤は珍しいので、所望の吸着剤は、モノリシックなカラムの形で商業的に入手可能でない可能性がある。さらに、アフィニティークロマトグラフィーの場合、一般に、これらの細胞から所望の細胞を溶出するために使用された競合化合物を除去する必要性が残る。したがって、細胞生存能に関するモノリシックな吸着剤の潜在的な利点は、アフィニティークロマトグラフィーカラムから細胞を溶出するために使用された化合物を除去するために必要なさらなる手順によって逆転され得る。

30

40

50

【 0 0 0 7 】

現在使用されている最も重要な細胞単離方法は、磁石支援 (magnet-assisted) 細胞選別 (MACS) および蛍光支援 (fluorescence-assisted) 細胞選別 (FACS (商標)) である。典型的には、抗体に結合されているフルオロフォアが細胞を標識するために使用されているフローサイトメトリーによる細胞選別は、細胞を個別に解析する。細胞は、細胞選別装置を使用して超高圧下において高速で分離される。FACS (商標) 技術では、マーカーセットによって定義される細胞の1工程での単離が、異なるフルオロフォアを有する対応する抗体セットを適用することによって可能になる。したがって、この方法は、信頼性が高いが、長い時間および莫大なコストがかかり、面倒な方法である。特に、非常に大きな多様な細胞集団、例えば、 1×10^{10} 個の細胞を含むアフエレーシス産物からの選択の場合、

10

フローサイトメーターの非常に長い選別時間は、適切な選択プロセスにとって許容できるものではない。FACS (商標) の別の欠点は、複雑かつ干渉されやすいフローサイトメーターを、治療用の細胞産物の単離に必要なGMP環境にとても適応させられないという点である。さらに、細胞選択手順中にかかる圧力のせいで、細胞のエフェクター機能が損なわれる可能性がある。

【 0 0 0 8 】

細胞の磁石支援単離は、研究用途および治療用途で広く使用されているシステムである。単離される細胞の収率および純度は、FACS (商標) 技術と比べて中程度であるが、この選択手順は、ロバストであり、高度な自動化を必要としない。磁石支援単離の主要な欠点は、単離された細胞上の磁気ビーズを含む染色試薬が残存し、そのせいで、単離された細胞

20

集団のエフェクター機能が損なわれることがある点である。さらに、単離された細胞上にこれらの磁性試薬が残っているせいで、連続したポジティブ選択プロセスは不可能である。連続したポジティブ選択手順は、マーカーセットによって定義される細胞集団の選択にとって必須である。磁性標識または蛍光標識を利用しつつも細胞単離を著しく向上させたものが、例えば、国際特許出願W002/054065 (特許文献1) および米国特許第7,776,562号 (特許文献2) に記載されているStreptamer (登録商標) 技術であり、この技術では、細胞の表面上に位置するレセプターに対して低親和性結合を示すレセプター結合試薬が、細胞の可逆的染色および単離に使用されている。磁性ネガティブ選択と組み合わせた現在使用されている単一ポジティブ選択 (関心対象の一つの細胞集団を除くすべての細胞集団の除去を目指している) とは対照的に、各選択後に低親和性レセプター結合試薬の除去を

30

伴うStreptamer (登録商標) 技術を使用する連続したポジティブ選択は、非常に高い純度および収率の細胞集団をもたらす。

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、細胞を単離するための公知の技術、例えば、記載したようなFACS (商標) およびMACS技術の欠点を克服する方法および装置を提供することである。例えば、本発明は、研究目的、診断目的、および特に治療目的で、複雑な細胞集団、例えば、制御性T細胞またはセントラルメモリーT細胞を単離するための連続したポジティブ細胞選択を特に可能にする、迅速かつ効率的で穏やかな細胞選択手順を提供することを目指している。理想的には、この新規方法および装置は、細胞よりも他の複雑な生物学的材料の単離にも好適であるべきである。

40

【 0 0 1 0 】

この目的は、独立請求項の主題、とりわけ、独立請求項に列挙されているような方法、使用、および配置によって解決される。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 1 】

【 特許文献 1 】 国際特許出願W002/054065

【 特許文献 2 】 米国特許第7,776,562号

【 非特許文献 】

【 0 0 1 2 】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Bonafous et al, J. Immunol. Methods. 1983 Mar 11;58(1-2):93-107

【非特許文献2】Braun, R., et al, Journal of Immunological Methods (1982) 54, 251-258

【非特許文献3】Ohba, H., et al, Cancer Letters (2002) 184, 207-214

【非特許文献4】Dainiak, M.B., et al., Adv. Biochem. Engin./ Biotechnol. (2007), 106, 101-127

【発明の概要】

【0013】

発明の要旨

10

本発明は、表面上に公知のレセプター分子を有する所望の細胞を単離するための、方法、キット、配置、試薬の組み合わせ、およびクロマトグラフィー固定相の使用を提供し、表面上にそのようなレセプターを欠く他の細胞からのそのような細胞の分離を含む。

【0014】

第1の局面によると、本発明は、標的細胞を単離する方法を提供し、前記標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、前記方法は、

標的細胞を含むサンプルを提供する工程、

結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬を提供する工程であって、レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に特異的に結合することができ、結合部位Bを介したレセプター結合試薬とレセプター分子との結合に対する解離定数 (K_D) は、低親和性であるか、または結合部位Bを介したレセプター結合試薬とレセプター分子との結合に対する解離速度定数 (k_{off}) は、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、工程、および

20

サンプルを最適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、前記固定相上には親和性試薬が固定化されており、前記親和性試薬は、結合部位Zを含み、前記結合部位Zは、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと可逆的結合を形成し、前記レセプター結合試薬の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に結合し、それにより、標的細胞が固定相上に可逆的に固定化される、工程を含む。

30

【0015】

第2の局面によると、本発明は、標的細胞を単離する方法を提供し、前記標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、前記方法は、

サンプルを提供する工程であって、前記サンプルは、標的細胞およびレセプター結合試薬を含み、前記レセプター結合試薬は、結合部位Bおよび結合パートナーCを含み、レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、レセプター分子に特異的に結合することができる、工程、および

サンプルを最適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、前記固定相は、ゲル濾過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであり、前記ゲル濾過および/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、親和性試薬を含み、前記親和性試薬は、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに特異的に結合する結合部位Zを含み、それにより、標的細胞が単離される、工程を含む。

40

【0016】

第3の局面によると、本発明は、サンプルから標的細胞をクロマトグラフィー的に単離する方法を提供し、前記標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、前記方法は、

標的細胞を含むサンプルを提供する工程、

結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬を提供する工程であって、レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に特異

50

的に結合することができ、

レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、工程、および

サンプルを好適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、前記固定相上には親和性試薬が固定化されており、

前記親和性試薬は、結合部位Zを含み、前記結合部位Zは、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと可逆的結合を形成し、レセプター結合試薬の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に結合し、それにより、標的細胞が固定相上に可逆的に固定化される、工程、

親和性試薬の結合部位Zに特異的に結合する結合部位を含む競合試薬を提供する工程；

競合試薬を第1固定相上にロードする工程であって、それにより、(複数の)レセプター結合試薬とレセプター分子と親和性試薬との間に形成された非共有結合的な可逆的複合体が破壊される、工程；

第1固定相の溶出液から溶出サンプルを回収する工程であって、前記溶出サンプルは、標的細胞を含む、工程；

溶出サンプルを好適な第2固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、前記第2固定相は、ゲル濾過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであり、前記ゲル濾過および/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに特異的に結合する結合部位Zを有する親和性試薬を含む、工程、ならびに

溶出サンプルを第2クロマトグラフィーカラムに通す工程を含む。

【0017】

第4の局面によると、本発明は、固定相を使用するクロマトグラフィーを介して標的細胞を単離するためのレセプター結合試薬および/または親和性試薬の使用を提供し、前記標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、レセプター結合試薬は、結合部位Bおよび結合パートナーCを含み、レセプター結合試薬の結合部位は、標的細胞のレセプター分子に特異的に結合することができ、結合部位Bを介したレセプター結合試薬とレセプター分子との結合に対する解離定数(KD)は、低親和性であるか、または結合部位Bを介したレセプター結合試薬とレセプター分子との結合に対する解離速度定数(koff)は、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる。

【0018】

第5の局面によると、本発明は、クロマトグラフィーを介して標的細胞を単離するための、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン(アナログ)、アビジン、およびアビジンアナログのうちの一つの使用を提供し、前記クロマトグラフィーは、ゲル濾過クロマトグラフィーである。

【0019】

第6の局面によると、本発明は、細胞核を含む細胞を分離するための、セルロース膜、プラスチック膜、多糖ゲル、ポリアクリルアミドゲル、アガロースゲル、多糖グラフトシリカ、ポリビニルピロリドングラフトシリカ、ポリエチレンオキシドグラフトシリカ、ポリ(2-ヒドロキシエチルアスパルトアミド)シリカ、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)グラフトシリカ、スチレン-ジビニルベンゼンゲル、アクリレートまたはアクリルアミドとジオールとのコポリマー、多糖とN,N'-メチレンビスアクリルアミドとのコポリマー、およびそれらのいずれか2つ以上の組み合わせのうちの一つのクロマトグラフィーマトリックスの使用を提供する。

【0020】

第7の局面によると、本発明は、クロマトグラフィー用の第1および第2固定相の配置を提供し、

第1固定相は、細胞分離に適しており、第1固定相は、アフィニティークロマトグラフィ

10

20

30

40

50

マトリックスによって定義され、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックス上には親和性試薬が固定化されており、前記親和性試薬は、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合することができる少なくとも一つの結合部位Zを有し、

第2固定相は、他の成分からの標的細胞の分離に適しており、第2固定相は、ゲル濾過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであり、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスまたはゲル濾過およびアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、レセプター結合試薬に含まれる前記結合パートナーCに特異的に結合する結合部位Zを有する親和性試薬を含む。いくつかの態様において、第1固定相および第2固定相に含まれる/第1固定相および第2固定相上に固定化される親和性試薬は、同一である。いくつかの態様において、第1固定相および第2固定相に含まれる/第1固定相および第2固定相上に固定化される親和性試薬は、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、またはアビジンムテインである。

【0021】

第8の局面によると、本発明は、標的細胞を単離するためのキットを提供し、前記標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、前記キットは、

(a) 結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬であって、前記レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、標的細胞表面のレセプター分子に特異的に結合することができる、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、多量体化試薬上の結合部位Zに可逆的に結合することができる、レセプター結合試薬;および

(b) 細胞分離に適した固定相であって、前記固定相は、ゲル濾過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスによって定義され、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスまたはゲル濾過およびアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合することができる結合部位Zを有する親和性試薬を含む、固定相を備える。

【0022】

第9の局面によると、本発明は、標的細胞を単離する方法を提供し、前記標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、前記方法は、

標的細胞を含むサンプルを提供する工程、

一価の結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬を提供する工程であって、前記レセプター結合試薬は、一価の抗体断片、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子、アプタマー、およびMHC分子の群から選択され、レセプター結合試薬に含まれる一価の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に特異的に結合することができる、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、工程、および

サンプルを最適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、前記固定相上には親和性試薬が固定化されており、前記親和性試薬は、結合部位Zを含み、前記結合部位Zは、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと可逆的結合を形成し、レセプター結合試薬の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に結合し、それにより、標的細胞が固定相上に可逆的に固定化される、工程を含む。

【0023】

第10の局面によると、本発明は、標的細胞を精製するための装置を提供し、前記装置は、クロマトグラフィー用の第1および第2固定相の少なくとも一つの配置を備える。この配置の第1固定相は、細胞分離に適しており、前記第1固定相は、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスであり、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックス上には親和性試薬が固定化されており、前記親和性試薬は、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合することができる少なくとも一つの結合部位Zを有する。第2固定相は、細胞分離に適しており、前記第2固定相は、ゲル濾過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスである。前記アフィニティークロマ

トグラフィーマトリックスまたはゲル濾過およびアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、レセプター結合試薬に含まれる前記結合パートナーCに特異的に結合する結合部位Zを有する親和性試薬を含む。

【0024】

第11の局面によると、本発明は、標的細胞表面上の所望のレセプター分子の組換え発現について標的細胞をスクリーニングする方法を提供し、前記所望のレセプター分子は、標的細胞表面上に発現され、前記方法は、

サンプルを提供する工程であって、前記サンプルは、所望の標的レセプターの組換え発現の可能性がある標的細胞を含む、工程、

結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬を提供する工程であって、レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、標的細胞表面上の所望のレセプター分子に特異的に結合することができ、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、工程、および

サンプルを好適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、前記固定相上には親和性試薬が固定化されており、前記親和性試薬は、結合部位Zを含み、前記結合部位Zは、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと可逆的結合を形成し、レセプター結合試薬の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に結合し、それにより、標的細胞が固定相上に可逆的に固定化される、工程を含む。

[本発明1001]

標的細胞を単離する方法であって、該標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、該方法は、

該標的細胞を含むサンプルを提供する工程、

結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬を提供する工程であって、該レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に特異的に結合することができ、該結合部位Bを介したレセプター結合試薬と該レセプター分子との結合に対する解離定数 (K_D) は、低親和性であるか、または該結合部位Bを介したレセプター結合試薬と該レセプター分子との結合に対する解離速度定数 (k_{off}) は、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、工程、および

該サンプルを好適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、該固定相上には親和性試薬が固定化されており、

該親和性試薬は、結合部位Zを含み、該結合部位Zは、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと可逆的結合を形成し、かつ該レセプター結合試薬の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に結合し、それにより、固定相上に該標的細胞が可逆的に固定化される、工程

を含む、方法。

[本発明1002]

親和性試薬が、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合することができる2つ以上の結合部位Zを含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

固定相上に競合試薬をロードする工程をさらに含み、競合作用物質は、レセプター結合試薬のパートナーCと親和性試薬の結合部位Zとの結合を破壊することができ、それにより、レセプター結合作用物質に取って代わる、本発明1001の方法。

[本発明1004]

競合試薬が、親和性試薬の結合部位Zに競合的に結合することができる、本発明1003の方法。

[本発明1005]

標的細胞を含むサンプルを固定相に適用する前に、レセプター結合試薬が、固定相上に固定化される、本発明1001~1004のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

[本発明1006]

サンプルが、標的細胞とさらなる細胞との混合物を含み、該さらなる細胞は、その細胞表面上に前記レセプター分子を欠き、かつ、該方法は、該さらなる細胞から該標的細胞を分離する工程を含む、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

レセプター結合試薬とレセプター分子との低親和性の相互作用が、約 10^{-3} ～約 10^{-7} Mの範囲内の K_D を有する、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

標的細胞を単離する方法であって、該標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、該方法は、

サンプルを提供する工程であって、該サンプルは、標的細胞およびレセプター結合試薬を含み、

該レセプター結合試薬は、結合部位Bおよび結合パートナーCを含み、該レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、該レセプター分子に特異的に結合することができる、工程、および

該サンプルを好適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、該固定相は、ゲル濾過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであり、該ゲル濾過および/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、親和性試薬を含み、該親和性試薬は、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに特異的に結合する結合部位Zを含み、それにより、該標的細胞が単離される、工程を含む、方法。

[本発明1009]

クロマトグラフィーが、カラムクロマトグラフィーまたは平面クロマトグラフィーである、本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

サンプルをクロマトグラフィーにかける工程が、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCが、それに特異的に結合する固定相の親和性試薬の結合部位Zと複合体を形成することを可能にし、それにより、該レセプター結合試薬が該固定相上に固定化されることを含む、本発明1008の方法。

[本発明1011]

レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCが、親和性試薬の結合部位Zに特異的に結合することができ、該親和性試薬は、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに特異的に結合することができる2つ以上の結合部位Zを含む、本発明1008または1010の方法。

[本発明1012]

アフィニティークロマトグラフィーマトリックスおよび/またはゲル濾過マトリックス上に親和性試薬が共有結合的に固定化されている、本発明1010または1011の方法。

[本発明1013]

サンプルが、競合試薬をさらに含み、該競合試薬は、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに特異的に結合する親和性試薬の結合部位Zに結合し、それにより、固定相上に該競合試薬が固定化される、本発明1008～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

サンプルを形成する工程をさらに含み、該サンプルを形成する工程は、標的細胞を含む供給源サンプルを提供すること、および該供給源サンプルにレセプター結合試薬を加えることを含む、本発明1001～1004のいずれかの方法。

[本発明1015]

供給源サンプルが、複数の標的細胞を含むと予想され、かつ該供給源サンプルは、複数のレセプター結合試薬と接触され、予想される数の標的細胞に対して過剰量のレセプター

10

20

30

40

50

結合試薬が提供される、本発明1014の方法。

[本発明1016]

サンプルが、流体であるかまたは流体を含む、本発明1001～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

サンプルが、体液を含む、本発明1001～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

体液が、血液または血液成分である、本発明1017の方法。

[本発明1019]

サンプルをクロマトグラフィーにかける工程が、該サンプルをクロマトグラフィーカラムの固定相に通させることおよび該固定相を流体移動相で洗浄することを含み、該流体移動相は、レセプター結合試薬を少なくとも本質的に欠く、本発明1001～1018のいずれかの方法。

10

[本発明1020]

サンプルをクロマトグラフィーにかける工程が、クロマトグラフィーマトリックスから標的細胞を溶出することを含む、本発明1001～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

標的細胞を回収する工程をさらに含む、本発明1020の方法。

[本発明1022]

サンプルから標的細胞をクロマトグラフィー的に単離する方法であって、該標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、該方法は、

20

該標的細胞を含むサンプルを提供する工程、

結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬を提供する工程であって、該レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に特異的に結合することができ、

該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、工程、および

該サンプルを好適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、該固定相上には親和性試薬が固定化されており、

該親和性試薬は、結合部位Zを含み、該結合部位Zは、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと可逆的結合を形成し、かつ該レセプター結合試薬の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に結合し、それにより、該標的細胞が該固定相上に可逆的に固定化される、工程、

30

該親和性試薬の結合部位Zに特異的に結合する結合部位を含む競合試薬を提供する工程；
該競合試薬を第1固定相上にロードする工程であって、

それにより、(複数の)レセプター結合試薬と該レセプター分子と該親和性試薬との間に形成される非共有結合的な可逆的複合体が破壊される、工程；

該第1固定相の溶出液から溶出サンプルを回収する工程であって、該溶出サンプルは、該標的細胞を含む、工程；

該溶出サンプルを好適な第2固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、該第2固定相は、ゲル濾過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであり、該ゲル濾過および/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに特異的に結合する結合部位Zを有する親和性試薬を含む、工程、ならびに

40

該溶出サンプルを第2クロマトグラフィーカラムに通す工程を含む、方法。

[本発明1023]

第2固定相であるアフィニティークロマトグラフィーマトリックスおよび/またはゲル濾過マトリックス上に親和性試薬が固定化されている、本発明1022の方法。

[本発明1024]

溶出サンプルを第2固定相に通す工程が、競合試薬が親和性試薬の結合部位Zと複合体を

50

形成することを可能にすることにより、該競合試薬が第2クロマトグラフィーカラムの固定相上に固定化される工程を含む、本発明1022または1023の方法。

[本発明1025]

第1および第2固定相の各々が、カラムに含まれているか、または平面固定相である、本発明1022～1024のいずれかの方法。

[本発明1026]

レセプター結合試薬の結合部位Bとレセプター分子との結合が、約 10^{-2} M～約 10^{-10} Mの範囲内の解離定数 (K_D) を有する、本発明1022～1025のいずれかの方法。

[本発明1027]

結合部位Bを介したレセプター結合試薬とレセプター分子との結合に対する解離定数 (K_D) が、低親和性であるか、または結合部位Bを介したレセプター結合試薬とレセプター分子との結合に対する解離速度定数 (k_{off}) が、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有する、本発明1026の方法。

[本発明1028]

レセプター結合試薬の結合パートナーCと親和性試薬の結合部位Zとの可逆的結合が、約 10^{-2} ～約 10^{-13} Mの範囲内の解離定数 (K_D) を有する、本発明1001～1027のいずれかの方法。

[本発明1029]

固定相が、非磁性材料または非磁化性材料である、本発明1001～1028のいずれかの方法。

[本発明1030]

固定相が、セルロース膜、プラスチック膜、多糖ゲル、ポリアクリルアミドゲル、アガロースゲル、多糖グラフトシリカ、ポリビニルピロリドングラフトシリカ、ポリエチレンオキシドグラフトシリカ、ポリ(2-ヒドロキシエチルアスパルトアミド)シリカ、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)グラフトシリカ、スチレン-ジビニルベンゼンゲル、アクリレートまたはアクリルアミドとジオールとのコポリマー、多糖とN,N'-メチレンビスアクリルアミドとのコポリマー、およびそれらのいずれか2つ以上の組み合わせのうちの一つを含むかまたはそれらのうちの一つからなる、本発明1029の方法。

[本発明1031]

アフィニティークロマトグラフィーマトリックスおよび/またはゲル濾過マトリックスが、モノリシックなマトリックス、粒状のマトリックス、または平面のマトリックスを含むかまたはそれらのいずれかからなる、本発明1001～1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

粒状のマトリックスが、約 $5 \mu\text{m}$ ～約 $200 \mu\text{m}$ または約 $5 \mu\text{m}$ ～ $600 \mu\text{m}$ または約 $5 \mu\text{m}$ ～ $1500 \mu\text{m}$ の平均粒径を有する、本発明1031の方法。

[本発明1033]

アフィニティークロマトグラフィーマトリックスおよび/またはゲル濾過マトリックスが、0～約 500nm の平均ポアサイズを有する、本発明1001～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

レセプター結合試薬が、免疫グロブリン、免疫グロブリンの機能的断片、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子、アプタマー、およびMHC分子の群から選択される、本発明1001～1033のいずれかの方法。

[本発明1035]

レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCが、ビオチン、ビオチンアナログ、ストレプトアビジン結合ペプチド、およびアビジン結合ペプチドのうちの一つを含み、かつ親和性試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、アビジンムテイン、またはそれらの混合物を含む、本発明1001～1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

標的細胞が、哺乳動物細胞である、本発明1001～1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

10

20

30

40

50

標的細胞が、細胞核を有する細胞である、本発明1001～1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

標的細胞が、白血球または幹細胞である、本発明1037の方法。

[本発明1039]

白血球が、リンパ球である、本発明1038の方法。

[本発明1040]

固定相を使用するクロマトグラフィーを介して標的細胞を単離するためのレセプター結合試薬および/または親和性試薬の使用であって、該標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、該レセプター結合試薬は、結合部位Bおよび結合パートナーCを含み、該レセプター結合試薬の結合部位は、該標的細胞のレセプター分子に特異的に結合することができ、該結合部位Bを介したレセプター結合試薬と該レセプター分子との結合に対する解離定数 (K_D) は、低親和性であるか、または該結合部位Bを介したレセプター結合試薬と該レセプター分子との結合に対する解離速度定数 (k_{off}) は、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し、かつ該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、該親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、使用。

10

[本発明1041]

親和性試薬が、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合する2つ以上の結合部位Zを含む、本発明1040の使用。

[本発明1042]

レセプター結合試薬が、免疫グロブリン、免疫グロブリンの機能的断片、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子、アダマー、およびMHC分子のうちの一つである、本発明1040または1041の使用。

20

[本発明1043]

レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーが、ビオチン、ビオチンアナログ、ストレプトアビジン結合ペプチド、およびアビジン結合ペプチドのうちの一つを含み、かつ親和性試薬が、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンアナログ、アビジン、およびアビジンアナログのうちの一つを含む、本発明1040～1042のいずれかの使用。

[本発明1044]

クロマトグラフィーを介して標的細胞を単離するためのストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、アビジンムテイン、またはそれらの混合物の使用であって、該クロマトグラフィーは、ゲル濾過クロマトグラフィーである、使用。

30

[本発明1045]

クロマトグラフィーが、カラムクロマトグラフィーまたは平面クロマトグラフィーである、本発明1044の使用。

[本発明1046]

ゲル濾過クロマトグラフィーが、その上にストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、アビジンムテイン、またはそれらの混合物が固定化されている固定相で行われる、本発明1044または1045の使用。

[本発明1047]

標的細胞が、細胞核を有する細胞である、本発明1044～1046のいずれかの使用。

40

[本発明1048]

細胞核を有する細胞が、リンパ球である、本発明1047の使用。

[本発明1049]

細胞核を含む細胞を分離するための、セルロース膜、プラスチック膜、多糖ゲル、ポリアクリルアミドゲル、アガロースゲル、多糖グラフトシリカ、ポリビニルピロリドングラフトシリカ、ポリエチレンオキシドグラフトシリカ、ポリ(2-ヒドロキシエチルアスパルトアミド)シリカ、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)グラフトシリカ、スチレン-ジビニルベンゼンゲル、アクリレートまたはアクリルアミドとジオールとのコポリマー、多糖とN,N'-メチレンビスアクリルアミドとのコポリマー、およびそれらのいずれか2つ以上の組み合わせのうちの一つのクロマトグラフィーマトリックスの使用。

50

[本発明1050]細胞核を含む細胞が、リンパ球である、本発明1049の使用。[本発明1051]多糖とN,N'-メチレンビスアクリルアミドとのコポリマーが、Sephacryl（登録商標）である、本発明1049または1050の使用。[本発明1052]多糖ゲルが、Sephacryl（登録商標）である、本発明1049または1050の使用。[本発明1053]アガロースゲルが、Sephadex（登録商標）などの架橋デキストランゲルである、本発明1049または1050の使用。[本発明1054]アクリレートとジオールとのコポリマーが、Toyopearl（登録商標）である、本発明1049または1050の使用。[本発明1055]ポリアクリルアミドゲルが、Fractogel（登録商標）およびBio-Gel（登録商標）の一つである、本発明1049または1050の使用。[本発明1056]クロマトグラフィーゲルが、カラムに含まれている、本発明1049～1055のいずれかの使用。[本発明1057]カラムが、カートリッジである、本発明1056の使用。[本発明1058]クロマトグラフィー用の第1および第2固定相の配置であって、該第1固定相は、細胞分離に適しており、該第1固定相は、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスによって定義され、該アフィニティークロマトグラフィーマトリックス上には親和性試薬が固定化されており、該親和性試薬は、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合することができる少なくとも一つの結合部位Zを有し、該第2固定相は、細胞分離に適しており、該第2固定相は、ゲル濾過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであり、該アフィニティークロマトグラフィーマトリックスまたは該ゲル濾過およびアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに特異的に結合する結合部位Zを有する親和性試薬を含む、配置。[本発明1059]少なくとも、第1固定相のアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上に固定化された親和性試薬が、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合することができる2つ以上の結合部位Zを含む、本発明1058の配置。[本発明1060]第1および第2固定相の各々が、クロマトグラフィーカラムに含まれるか、または平面固定相である、本発明1058または1059の配置。[本発明1061]複数の第1および第2固定相を含む、本発明1058～1060のいずれかの配置。[本発明1062]標的細胞を単離するための部品のキットであって、該標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、該キットは、(a) 結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬であって、該レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、標的細胞表面のレセプター分子に特異的に結合することができる、かつ該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、多量体化試薬上の結合部位Zに可逆的に結合することができる、レセプター結合試薬;および(b) 細胞分離に適した固定相であって、該固定相は、ゲル濾過マトリックスおよび/また

10

20

30

40

50

はアフィニティークロマトグラフィーマトリックスによって定義され、該アフィニティークロマトグラフィーマトリックスまたは該ゲル濾過およびアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合することができる結合部位Zを有する親和性試薬を含む、固定相を備える、キット。

[本発明1063]

固定相が、クロマトグラフィーカラムに含まれるか、または平面固定相である、本発明1062の部品のキット。

[本発明1064]

サンプル中の他の成分からの細胞分離/標的細胞分離に適した第2固定相を備え、該第2固定相は、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスによって定義され、該アフィニティークロマトグラフィーマトリックス上には親和性試薬が固定化されており、該親和性試薬は、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに特異的に結合することができる結合部位Zを含む、本発明1062または1063の部品のキット。

[本発明1065]

第2固定相が、クロマトグラフィーカラムに含まれるか、または平面固定相である、本発明1064の部品のキット。

[本発明1066]

標的細胞を単離する方法であって、該標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、該方法は、

該標的細胞を含むサンプルを提供する工程、

一価の結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬を提供する工程であって、該レセプター結合試薬は、一価の抗体断片、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子、アプタマー、およびMHC分子の群から選択され、

該レセプター結合試薬に含まれる一価の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に特異的に結合することができ、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、工程、および

該サンプルを好適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、該固定相上には親和性試薬が固定化されており、該親和性試薬は、結合部位Zを含み、該結合部位Zは、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと可逆的結合を形成し、かつ該レセプター結合試薬の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に結合し、それにより、該固定相上に該標的細胞が可逆的に固定化される、工程を含む、方法。

[本発明1067]

一価の抗体断片が、Fab断片、Fv断片、または一本鎖Fv断片である、本発明1066の方法。

[本発明1068]

免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子が、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリン骨格に基づくタンパク質、結晶骨格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1066の方法。

[本発明1069]

固定相を使用するクロマトグラフィーを介して標的細胞を単離するためのレセプター結合試薬および/または親和性試薬の使用であって、該標的細胞は、標的細胞表面上にレセプター分子を有し、

該レセプター結合試薬は、一価の抗体断片、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子、アプタマー、およびMHC分子の群から選択され、

該レセプター結合試薬は、結合部位Bおよび結合パートナーCを含み、該レセプター結合試薬の結合部位は、該標的細胞のレセプター分子に特異的に結合することができ、

該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、該親和性試薬の結合部位Zに可逆的

10

20

30

40

50

に結合することができる、使用。

[本発明1070]

標的細胞を精製するための装置であって、本発明1058～1061において定義されたクロマトグラフィー用の第1および第2固定相の少なくとも一つの配置を備える、装置。

[本発明1071]

直列で流体連結されている第1および第2固定相の複数の配置をさらに備える、本発明1070の装置。

[本発明1072]

クロマトグラフィー用の第1および第2固定相の第1配置の第1固定相に流体連結されているサンプル入口を備える、本発明1071の装置。

10

[本発明1073]

精製された標的細胞用のサンプル出口を備え、該サンプル出口は、クロマトグラフィー用の第1および第2固定相の少なくとも一つの配置の最後の配置の第2固定相に流体連結されている、本発明1072の装置。

[本発明1074]

クロマトグラフィー用の第1および第2固定相の配置の第1固定相の少なくとも一つに流体連結されている競合試薬容器を備える、本発明1070～1073のいずれかの装置。

[本発明1075]

標的細胞表面上の所望のレセプター分子の組換え発現についての標的細胞のスクリーニング方法であって、ここで該所望のレセプター分子は、標的細胞表面上に発現され、該方法は、

20

サンプルを提供する工程であって、該サンプルは、該所望の標的レセプターの組換え発現の可能性がある標的細胞を含む、工程、

結合部位Bおよび結合パートナーCを含むレセプター結合試薬を提供する工程であって、該レセプター結合試薬に含まれる結合部位Bは、標的細胞表面上の該所望のレセプター分子に特異的に結合することができ、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに可逆的に結合することができる、工程、および

該サンプルを好適な固定相でのクロマトグラフィーにかける工程であって、該固定相上には親和性試薬が固定化されており、

該親和性試薬は、結合部位Zを含み、該結合部位Zは、該レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと可逆的結合を形成し、かつ該レセプター結合試薬の結合部位Bは、標的細胞表面上のレセプター分子に結合し、それにより、固定相上に該標的細胞が可逆的に固定化される、工程

30

を含む、方法。

[本発明1076]

所望のレセプター分子が、標的細胞にとって内因性または外来性である、本発明1075のスクリーニング方法。

[本発明1077]

標的細胞が、所望のレセプター分子をコードする核酸でトランスフェクトされている、本発明1075または1076のスクリーニング方法。

40

【図面の簡単な説明】

【0025】

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されるとき、詳細な説明を参照するとよりよく理解されるだろう。それらの図は、本発明の方法の態様を図示している。理論に拘束されることを望むものではないが、それらの図は、基礎をなす分離機構に関する結論を含む。それらの結論は、単に例証目的で与えられるものであって、どのようにして達成可能な驚くべき分離が分子レベルで想定され得るかを可視化するのに働くだけである。

【0026】

【図1】図1は、標的細胞表面上にレセプター分子(4)を有する標的細胞(2)を単離す

50

る方法の態様を表している（標的細胞が少なくとも一つの共通の特異的なレセプター分子（4）の存在によって定義されることを意味している）。標的細胞を含むサンプルは、レセプター分子（4）を欠くが、その代わりに、表面上に異なるレセプター分子（44）を有する、さらなる細胞（22）も含み得る。レセプター結合試薬（1）が、例えば、標的細胞を含むサンプル中に提供される。レセプター結合試薬（1）は、レセプター分子（4）に特異的に結合する結合部位B（3）を有する。レセプター結合試薬（1）は、親和性試薬（8）の結合部位Z（6）に特異的かつ可逆的に結合し得る結合パートナーC（5）も含む。いくつかの態様において、レセプター結合試薬は、一価の結合部位Bを有し得、一価の抗体断片（例えば、Fab断片、一本鎖Fv断片、またはFv断片）もしくは免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子、アダプター、またはMHC分子であり得る。この文脈において、本発明において使用される親和性試薬は、結合パートナーCによって結合され得る2つ以上の結合部位Zも有し得、それにより、レセプター結合試薬の多量体化が提供されることに注意する。したがって、本明細書において使用されるこの親和性試薬は、多量体化試薬でもあり得る。前記親和性試薬は、例えば、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、アビジンムテイン、またはそれらの混合物であり得る。さらに、異なる親和性試薬に結合された異なるクロマトグラフィーマトリックスが、分離用の多成分系を形成するカラム内で層にされ得る。レセプター結合試薬（1）および標的細胞（2）を含むサンプルが、親和性試薬（8）が固定化されているクロマトグラフィーマトリックス（19）と接触される。親和性試薬（8）は、レセプター結合試薬（1）に含まれる結合パートナーC（5）に特異的に結合する複数の結合部位Z（6）を有する。レセプター結合試薬（1）は、結合パートナーCを介して、親和性試薬（8）上の結合部位Z（6）に結合し、それにより、親和性試薬の一つまたは複数の結合部位Zおよびレセプター結合試薬の結合部位Zによって形成される複合体を介して標的細胞（2）がクロマトグラフィーマトリックス（19）上に固定化される。結果として、サンプルから標的細胞（2）が枯渇し、ゆえに、標的細胞（2）は、レセプター結合試薬（1）を含むサンプル中の他の成分から分離される。この文脈において、レセプター結合試薬（1）は、単離されるべき標的細胞を含むサンプル中に含まれ得るか、またはレセプター結合試薬（1）は、標的細胞を含むサンプルが加えられる前にクロマトグラフィーマトリックス（19）上に固定化された多量体化試薬（8）に結合するために前記マトリックスに加えられ得ることに注意する（この点において実験の項も参照のこと）。カートリッジが、そのようなアフィニティークロマトグラフィーマトリックス（19）で満たされ、アフィニティークロマトグラフィーによって標的細胞を単離するために使用されるとき、そのようなカートリッジは、本明細書において「選択カートリッジ」とも称される。この点において、このクロマトグラフィー方法が、カラムクロマトグラフィーまたは平面クロマトグラフィーとして行われ得ることに注意する。

【図2】図2は、標的細胞表面上にレセプター分子（4）を有する標的細胞（2）を単離する方法のさらなる態様を表している。図2に図示されている方法は、それだけで、または図1に図示されたような方法と併用して、行われ得る（後者の場合、図2の方法は、図1に表された方法の後に行われる）。図2の方法において使用されるサンプルは、標的細胞（2）、レセプター結合試薬（1）、および競合試薬（7）を含む。レセプター結合試薬（1）は、レセプター分子（4）に特異的に結合し得る結合部位B（3）を有する。レセプター結合試薬（1）は、親和性試薬（8）上の結合部位Z（6）に特異的に結合し得る結合パートナーC（5）も含む（親和性試薬（8）は、図1に示された親和性/多量体化試薬（8）と同一であり得る）。親和性試薬（8）は、レセプター結合試薬（1）に含まれる結合パートナーC（5）に特異的に結合することができる複数の結合部位Z（6）を有する。また、競合試薬（7）は、親和性試薬（8）上の結合部位（6）に結合することができる結合部位（9）を有する。競合試薬（7）全体が、結合部位（9）を形成する場合もあり得る。競合試薬全体が結合部位（9）を形成する場合に対する例として、競合試薬（7）は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインに対して親和性を有するビオチンまたはビオチン誘導体であり得、レセプター結合試薬（1）の結合パートナーC（5）は、レセプター結合試薬（1）に融合されているストレプトアビジン結合ペプチドであり得る。競合試薬（7）とレ

10

20

30

40

50

セプター結合試薬(1)の両方が、親和性試薬(8)に含まれる複数の結合部位Z(6)のうちの一つの結合部位(6)に結合する。それにより、競合試薬(7)およびレセプター結合試薬(1)は、クロマトグラフィーマトリックス(19)上に固定化される。結果として、サンプル細胞を含むサンプルから、競合試薬(7)およびレセプター結合試薬(1)が枯渇する。競合試薬(7)とレセプター結合試薬(1)の両方が、クロマトグラフィーマトリックス(19)上に含まれる親和性試薬に結合するので、標的細胞(2)は、前記クロマトグラフィーマトリックスに結合されず、例えば、前記クロマトグラフィーマトリックスを固定相として使用しているカラムを通過するだろう。カートリッジが、そのようなクロマトグラフィーマトリックス(19)で満たされ、標的細胞(の集団)を含むサンプルの反応体の枯渇/除去のために使用されるとき、そのようなカートリッジは、本明細書において「
10 除去カートリッジ」とも称される。この点において、このクロマトグラフィー方法が、カラムクロマトグラフィーまたは平面クロマトグラフィーとして行われ得ることに注意する。

【図3】図3は、核を含む標的細胞(2)を分離/単離する方法の態様を示している。標的細胞(2)、ならびに任意で、例えば、レセプター結合試薬(1)および競合試薬(7)を含むサンプルが提供される。前記サンプルは、多糖ゲル、ポリアクリルアミドゲル、アガロースゲル、多糖グラフトシリカ、ポリビニルピロリドングラフトシリカ、ポリエチレンオキシドグラフトシリカ、ポリ(2-ヒドロキシエチルアスパルトアミド)シリカ、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)グラフトシリカ、スチレン-ジビニルベンゼンゲル、アクリレートまたはアクリルアミドとジオールとのコポリマー、多糖とN,N'-メチレンビスアクリルアミドとのコポリマー、およびそれらのいずれか2つ以上の組み合わせからなる群より選択されるクロマトグラフィーマトリックスを使用するマトリックスから選択されるゲル濾過マトリックス(19)を含むクロマトグラフィーカラムにロードされる。前記サンプルが、ゲル濾過マトリックス(19)を通過すると、レセプター結合試薬(1)および競合試薬(7)は、より長くカラム上に残留する。これらの試薬は、例えば、ゲル濾過マトリックスのポアに入り得、標的細胞(2)は、より早くクロマトグラフィーカラムから溶出し、さらなる使用のために回収され得る。
20

【図4】図4は、標的細胞表面上の少なくとも一つの共通の特異的なレセプター分子(4)の存在によって定義される標的細胞(2)を単離する方法のさらなる態様を表している。この方法では、第1クロマトグラフィーカラム(選択カートリッジ)および第2クロマトグラフィーカラム(除去カートリッジ)が使用される。とりわけ、レセプター分子(4)を有する標的細胞(2)および表面上に異なるレセプター分子(44)を有するさらなる細胞(22)を含むサンプルが提供される。前記サンプルは、レセプター分子(4)に特異的に結合する結合部位B(3)を有するレセプター結合試薬(1)も含む。レセプター結合試薬(1)は、親和性試薬(8)上の結合部位Z(6)に特異的に結合する結合パートナーC(5)も含む。前記サンプルは、アフィニティークロマトグラフィーマトリックス(29)の形態の好適な固定相を有する第1クロマトグラフィーカラムにロードされ、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックス(29)上には親和性試薬(8)が固定化されている。複数のレセプター結合試薬(1)と親和性(多量体化)試薬(8)と標的細胞(2)との間に非共有結合的な可逆的複合体が形成されるが、さらなる細胞(22)との間には、非共有結合的な可逆的複合体は形成されない。前記さらなる細胞は、自発的にまたはクロマトグラフィーカラムの洗浄の後に第1クロマトグラフィーカラムを通過する(随意的洗浄工程は図4に示されていない)。次いで、競合試薬(7)が、クロマトグラフィーカラムにロードされる。前記競合試薬(7)は、親和性試薬(8)の結合部位Z(6)に結合することができる結合部位(9)を有する(または結合部位を構成する)。複数の競合試薬(7)が存在し、その一部は、親和性試薬(8)と複合体を形成し、それにより、クロマトグラフィーマトリックス(29)上に固定化される。この競合的結合の結果として、レセプター結合試薬(1)に含まれる結合パートナーC(5)の結合部位Zへの結合が破壊される。そうすることによって、レセプター結合試薬は、クロマトグラフィーマトリックス(29)から放出され、ゆえに、レセプター結合試薬(1)と親和性試薬(8)と標的細胞(2)との間で形成
30
40
50

された非共有結合的な可逆的複合体も分解する。標的細胞(2)、競合試薬(7)、およびレセプター結合試薬(1)を含む、第1クロマトグラフィーカラムの溶出液からの溶出サンプルが、回収される。溶出サンプルは、アフィニティークロマトグラフィーマトリックス(19)であって同時にゲル浸透マトリックスとして作用し得る好適な固定相を有する第2クロマトグラフィーカラムにロードされる。アフィニティークロマトグラフィーマトリックス(19)上には、親和性試薬(8)が固定化されている。親和性試薬(8)は、例えば、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、アビジンムテイン、またはそれらの混合物であり得る。レセプター結合試薬(1)および競合試薬(7)は、親和性試薬(8)上の結合部位Z(6)に結合し、それにより、クロマトグラフィーマトリックス(19)上に固定化される。結果として、単離される標的細胞を含む溶出サンプルから、レセプター結合試薬(1)および競合試薬(7)が枯渇する。この時点で、遊離または任意の反応体である標的細胞は、さらなる使用のため、例えば、診断的用途(例えば、さらなるFACS(商標)選別)または任意の細胞ベースの治療的用途のための状態となる。

10

【図5】図5は、末梢血単核球(PBMC)からCD8+細胞を濃縮するための実験の結果を示している。この実験は、親和性試薬としてのStrep-tactin(登録商標)と結合したSephadex-50樹脂を含み、かつ結合パートナーCとしてストレプトアビジン結合ペプチドを有する一価のレセプター結合試薬としてCD8結合Fab断片を使用する、2つのカラムにおいて行った。図解B~Dは、本発明の方法に従った単離の結果を示しており、図解E~Gは、陰性対照に対する結果を示している。

【図6】図6aおよび図6bは両方とも、選択カートリッジおよび除去カートリッジの少なくとも一つの連続的な配置を使用して細胞を単離するための本発明の装置の様子の模式図である。図6aの装置10は、標的細胞のクロマトグラフィーによる単離において使用される液相(サンプル緩衝液、洗浄緩衝液、溶離剤)の流れを制御する、蠕動ポンプ102および様々なバルブ(例えば、磁気バルブ)を備える。前記蠕動ポンプおよびバルブは、マイクロプロセッサによって制御される(図示せず)。装置10の個別のレザバーおよびカートリッジは、管400を介して各々に流体連結されている。装置10は、精製されるべき標的細胞を含むサンプル(例えば、血液または他の体細胞)を含むサンプルレザバー116に、そのような管400であるサンプル入口を介して流体連結されている緩衝液レザバー114を備える。次いで、親和性試薬が固定化されたアフィニティークロマトグラフィーマトリックスの形態の、図3で説明されたような好適な固定相を含む第1の選択カートリッジ104に、好適な緩衝液に含まれる細胞サンプルが適用される。前記選択カートリッジでは、第1の種類の共通の特異的なレセプター分子を有する標的細胞が、前記第1の種類のレセプター分子に特異的に結合するレセプター結合試薬によって固定化される。第1の種類のレセプター分子を有しない細胞は、前記カラムを通過し、廃棄物レザバー112を介して廃棄される。次いで、溶出緩衝液レザバー110内に貯蔵された溶離剤(本明細書において説明される競合作用物質)を、前記カラムに適用することにより、親和性試薬とレセプター結合試薬との間に形成された可逆的結合が破壊され、ゆえに、標的細胞が溶出される。次いで、標的細胞を含む溶出液を、図3で説明されたように親和性試薬が存在する第2固定相を含む除去カートリッジ106に適用する。この親和性試薬は、レセプター結合試薬および競合試薬を捕捉/固定化する一方で、精製された標的細胞は、このカラムを通過し、選択カートリッジ204および除去カートリッジ206の第2配置に誘導される。標的細胞は、この第2配置では、上で説明したように第2の種類の共通の特異的なレセプター分子を介して精製され、前記第2の種類のレセプター分子を表面上に有しない細胞は、この選択カートリッジを通過し、第2の廃棄物レザバー212を介して廃棄される。図6aでは、選択カートリッジおよび除去カートリッジの第2の連続的な配置の選択カートリッジ204に流体連結されている溶出緩衝液レザバー110は、選択カートリッジ104に連結されたレザバーに対するさらなるレザバーとして描かれている。しかしながら、同じ競合試薬が使用される場合、装置10は、複数の「カートリッジ配置」の各々の選択カートリッジに流体連結されているただ一つの溶出緩衝液レザバーを備え得る。最後に、除去カートリッジ206は、単離された標的細胞を回収するためのサンプル出口214に流体連結されている。図6bの装置は、各々が選択カート

20

30

40

50

リッジおよび除去カートリッジからなる3つの連続的に連結された「カートリッジ配置」を備える類似の設計を有する。図6bの装置は、4、15 または25 などの一定温度を維持するための温度制御素子も備える。

【図7】図7a~7cは、末梢血単核球（PBMC）CD8+細胞からヒトCD8+細胞を濃縮するためのさらなる実験の結果を示しており、図7aは、PBMCの開始サンプルを示しており、図7bは、CD8+細胞陰性洗浄画分を示しており、図7cは、CD8+陽性溶出液画分を示している。

【図8】図8a~8cは、全血からヒトCD8+細胞を濃縮するための実験の結果を示しており、図8aは、開始全血サンプルを示しており、図8bは、CD8+細胞陰性洗浄画分を示しており、図8cは、CD8+陽性溶出液画分を示している。

【図9】図9a~9cは、脾細胞からマウスCD4+細胞を濃縮するための実験の結果を示しており、図9aは、脾細胞の開始サンプルを示しており、図9bは、CD4+細胞陰性洗浄画分を示しており、図9cは、CD4+陽性溶出液画分を示している。

【図10】図10a~10cは、末梢血単核球（PBMC）からヒトCD4+細胞を濃縮するための実験の結果を示しており、図10aは、PBMCの開始サンプルを示しており、図10bは、CD4+細胞陰性洗浄画分を示しており、図10cは、CD4+陽性溶出液画分を示している。

【図11】図11a~11cは、全血からヒトCD4+細胞を濃縮するための実験の結果を示しており、図11aは、開始全血サンプルを示しており、図11bは、CD4+細胞陰性洗浄画分を示しており、図11cは、CD4+陽性溶出液画分を示している。

【発明を実施するための形態】

【0027】

発明の詳細な説明

本発明は、細胞および他の生物学的実体、例えば、細胞小器官、ウイルス、リポソームなどの流体クロマトグラフィー分離を行う方法および装置を提供する（ゆえに、以下における標的細胞に対する言及には、他のすべての生物学的実体に対する言及も含まれる）。標的細胞または標的細胞の集団は、例えば、種々の異なる細胞または細胞集団を含み得るサンプルから単離される。表面上に少なくとも一つの共通のレセプター分子を有する実質的に任意の前記標的細胞は、サンプルに含まれる他の成分から分離され得る。本明細書において記載されるようなアフィニティークロマトグラフィーに対して下記で論じられるようなアビディティー効果を達成するために、レセプター分子は、典型的には、標的細胞の表面上に2コピー以上で存在する。本明細書において使用される用語「（標的）細胞」は、膜（脂質二重層も含み得る）がその内部と外部環境（周囲の環境）とを隔て、生物学的実体/小胞の表面上に1種または複数種の特定のレセプター分子を含む、すべての生物学的実体/小胞を包含する。これは、標的細胞/生物学的実体/小胞または標的細胞の集団が、その表面上に少なくとも一つの共通の特定のレセプター分子が存在していることによって定義されることを意味している。本明細書において使用される「単離」は、標的細胞が、標的細胞を単離するためのサンプルの含有率（濃度）と比べて、本発明の方法の結果として得られるサンプル中で濃縮されていることを意味する。これは、標的細胞が、例えば、サンプル中の全細胞量の約0.1%というおおよその含有率から、本発明の方法によって回収されたサンプル中の約10%以上または20%以上、30%以上、40%以上にまで、サンプル中で濃縮され得ることを意味している。「単離された」は、得られたサンプルが、本質的に唯一の種類（細胞集団）として標的細胞を含むこと、例えば、標的細胞が、サンプル中に存在する細胞の75%超または80%超または85%超または90%超または95%超または97%超または99%超であることも意味する。「単離された」は、標的細胞を含むサンプルが、本発明の単離/精製方法が行われた後に、反応体（例えば、本明細書において定義されるようなレセプター結合試薬または競合試薬）を欠くことも含む。用語「単離」は、サンプル中の標的細胞の不存在の存在の検出も含む。したがって、標的細胞の単離は、分析的または調製的な目的で（例えば、標的細胞集団の存在の検出のためだけでなく、サンプル中に存在する細胞の定量または細胞ベースの治療に向けた大規模な細胞の単離のためにも）使用され得る。分析的な目的には、診断的用途、ならびに、例えば、特定のレセプター分子、例えば、Gタンパク質共役レセプター（GPCR）または他の任意の生理的に関連

10

20

30

40

50

性のあるレセプター（例えば、インスリンレセプター）が、選択された宿主細胞において組換え的に発現されているか否かのスクリーニング目的で本発明の単離方法が使用される基礎研究における用途が含まれる（下記も参照のこと）。

【0028】

いくつかの態様において、細胞は、原核細胞、例えば、細菌細胞であり得る。細胞は、いくつかの態様において、古細菌であり得る。細胞は、いくつかの態様において、ウイルスまたは細胞小器官、例えば、ミトコンドリア、葉緑体、ミクロソーム、リソソーム、ゴルジ装置、もしくは核であり得る。いくつかの態様において、細胞は、真核細胞、例えば、植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、原生動物、または動物細胞であり得る。標的細胞は、いくつかの態様において、細胞核を含む。いくつかの態様において、標的細胞は、げっ歯類種の細胞、または両生類、例えば、カエル、ヒキガエル、サンショウウオ、もしくはイモリなどを含む、平滑筋細胞を含む哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞の例としては、血液細胞、精液細胞、または組織細胞、例えば肝細胞、または幹細胞、例えば、好適な起源に由来するCD34陽性末梢幹細胞またはNanogもしくはOct-4を発現している幹細胞が挙げられるが、これらに限定されない。血液細胞は、例えば、白血球または赤血球であり得る。白血球は、例えば、好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球、マクロファージ、または樹状細胞であり得る。それぞれのリンパ球は、例えば、単なるいくつかの例証となる例として述べるが、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（メモリーT細胞の例証となる例は、CD62L⁺CD8⁺の特定のセントラルメモリーT細胞である）または制御性T細胞（Tregの例証となる例は、CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺Treg細胞である）、ヘルパーT細胞、例えば、CD4⁺ヘルパーT細胞を含むT細胞、B細胞、またはナチュラルキラー細胞であり得る。

【0029】

標的細胞集団、または上で述べたような、膜（脂質二重層でもあり得る）がその内部と外部環境とを隔てており、表面上に共通の特異的なレセプター分子を含むことをさらに特徴とする、生物学的実体の他の任意の集団が、使用された任意の精製試薬（レセプター結合試薬；競合試薬、親和性/多量体化試薬）のその後の除去において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生理学的状態が変化しないという利点以外に、そのような精製された生物学的実体を医薬として使用している間に患者に精製試薬が投与されないという規制上の利点を提供する。そのような場合において、FDA（米国）またはEMA（欧州）のような規制当局により、前記精製試薬の生成プロセスに関して要求される制約は、細胞またはリポソームである医薬とともに精製試薬が投与される場合よりも費用がかからない。ゆえに、例えば、リポソームが、精製されなければならない、かつ医薬として使用される場合、そのようなリポソームに対するように生理学的状態を操作してはならない実体を精製するための本発明の方法には、明らかな技術的利点が存在する。

【0030】

哺乳動物の例としては、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、リス、ハムスター、ハリネズミ、ネコ、カモノハシ、アメリカナキウサギ、アルマジロ、イヌ、キツネザル、ヤギ、ブタ、オボッサム、ウマ、ゾウ、コウモリ、ウッドチャック、オランウータン、アカゲザル、ウーリーモンキー、マカク、チンパンジー、タマリン（ワタボウシタマリン（*Saguinus oedipus*））、マーモセット、およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない。その細胞は、例えば、組織、例えば、器官またはその一部の細胞であり得る。それぞれの器官の例としては、副腎組織、骨、血液、膀胱、脳、軟骨、結腸、眼、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、神経、卵巣、膵臓、前立腺、皮膚、小腸、脾臓、胃、精巣、胸腺、腫瘍、脈管組織もしくは子宮組織、または結合組織が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、細胞は、幹細胞である。

【0031】

標的細胞が単離されるサンプルは、任意の起源であり得る。そのサンプルは、例えば、限定されないが、ヒト、動物、植物、細菌、真菌、または原生動物に由来し得る。したが

10

20

30

40

50

って、限定されないが、土壌サンプル、大気サンプル、環境サンプル、細胞培養サンプル、骨髄サンプル、降雨サンプル、降下物サンプル、下水サンプル、地下水サンプル、侵食サンプル、考古学サンプル、食品サンプル、血液サンプル（全血を含む）、血清サンプル、血漿サンプル、尿サンプル、便サンプル、精液サンプル、リンパ液サンプル、脳脊髄液サンプル、鼻咽頭洗浄サンプル、痰サンプル、口腔スワブサンプル、咽頭スワブサンプル、鼻腔スワブサンプル、気管支肺胞洗浄サンプル、気管支分泌サンプル、乳サンプル、羊水サンプル、生検サンプル、癌サンプル、腫瘍サンプル、組織サンプル、細胞サンプル、細胞培養サンプル、細胞溶解産物サンプル、ウイルス培養サンプル、爪サンプル、毛サンプル、皮膚サンプル、法医学サンプル、感染サンプル、院内感染サンプル、宇宙サンプル、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるサンプルのいずれか。所望であれば、それぞれのサンプルは、任意の程度にまで前処理されていてもよい。例証となる例として、組織サンプルは、本発明に係る方法において使用する前に、消化、ホモジナイズ、または遠心分離されていてもよい。別の例証となる例において、血液などの体液のサンプルは、血液細胞の標準的な単離によって得られ得る。本明細書において記載される単離方法が、基礎研究において使用される場合、そのサンプルは、インビトロ細胞培養実験の細胞であり得る。そのサンプルは、典型的には、流体、例えば、溶液または分散液の形態で調製されているだろう。

10

【0032】

通常、本発明に係るクロマトグラフィー方法は、流体クロマトグラフィー、典型的には、液体クロマトグラフィーである。このクロマトグラフィーは、単離されるべき細胞を含む流体サンプルが、クロマトグラフィーマトリックスを含むカラムの一端に例えば重力流またはポンプによって適用され、その流体サンプルがそのカラムの他端からそのカラムを出るというフロースルーモードで行われ得る（この点において実施例1~7を参照のこと）。さらに、クロマトグラフィーは、単離されるべき細胞を含む流体サンプルが、例えば、ピペットチップの内部に充填されたクロマトグラフィーマトリックスを含むカラムの一端に、ピペットによって適用され、その流体サンプルが、そのクロマトグラフィーマトリックス/ピペットチップに入り、そしてカラムの他端から出るという、「アップアンドダウン（up and down）」モードで行われ得る（この点において実施例8~10を参照のこと）。あるいは、クロマトグラフィーは、クロマトグラフィー材料（固定相）を、細胞を含むサンプルと、例えば、振盪しながら、回転させながら、または繰り返し接触させながらインキュベートし、そしてその流体サンプルを、例えばピペットを用いて、取り出すというバッチモードでも行われ得る。その材料が細胞のクロマトグラフィーによる単離に適している限り、任意の材料が、本発明の文脈におけるクロマトグラフィーマトリックスとして使用され得る。好適なクロマトグラフィー材料は、少なくとも本質的に無害であり、すなわち、細胞単離および/または細胞分離のための所望の条件下の充填されたクロマトグラフィーカラムにおいて使用されるとき、細胞生存能（または生物学的実体の生存能もしくは安定性）に対して有害でない。本発明において使用されるようなクロマトグラフィーマトリックスは、予め定義された場所、典型的には、予め定義された位置に残るのに対し、分離されるサンプルおよびそれに含まれる成分の場所は、変化する。したがって、固定相とは、移動相が（フロースルーによってまたはバッチモードで）流れて、液相に含まれる（溶解または分散されている）成分が固定相と液相とに分配されるクロマトグラフシステムの一部であるという当業者の標準の理解と一致して、クロマトグラフィーマトリックスは、「固定相」である。したがって、用語「クロマトグラフィーマトリックス」および「固定相」は、本明細書において相互交換可能に使用される。この点において、液体サンプルに加えらるる自由に移動できる磁気ビーズなどの粒子は、サンプルと混合され、次いで、例えば、それらのビーズを一時的に適所に保持しつつ（例えば、外部の磁性物質または遠心分離によって）、上清（液体）を廃棄することによってそのサンプルから除去されるものであるが、本明細書において使用される固定相ではないことに注意する。したがって、そのような（磁気）ビーズが、そのようなビーズ上への標的細胞の固定化（標的細胞とレセプター結合試薬と親和性/多量体化試薬との間に形成される複合体を介した固定化）の

20

30

40

50

ために標的細胞を含むサンプルに加えられ、次いで、例えば、それらのビーズを一時的に適所に保持し、上清を廃棄することによって、ビーズがサンプルから分離される方法は、本発明の方法ではない。

【0033】

典型的には、それぞれのクロマトグラフィーマトリックスは、固相または半固相の形態を有するのに対し、単離/分離されるべき標的細胞を含むサンプルは、流体相である。同様に、クロマトグラフィー分離を行うために使用される移動相は、流体相である。クロマトグラフィーマトリックスは、粒状の材料（任意の好適なサイズおよび形状の粒状の材料）、または紙基材もしくは膜を含むモノリシックなクロマトグラフィー材料であり得る（実施例の項を参照のこと）。したがって、本クロマトグラフィーは、カラムクロマトグラフィーと平面クロマトグラフィーの両方であり得る。標準的なクロマトグラフィーカラムに加えて、PhyNexus, Inc. San Jose, CA, U.S.A. から入手可能なPhyTip（登録商標）カラムなどの二方向の流れを可能にするカラムまたはピペットチップが、本明細書において記載されるような細胞のカラムベース/フロースルーモードベースのクロマトグラフィー分離に使用され得る。したがって、ピペットチップまたは二方向の流れを可能にするカラムもまた、本明細書において使用される用語「クロマトグラフィーカラム」に包含される。粒状のマトリックス材料を使用する場合、その粒状のマトリックス材料は、例えば、約5 μm ~ 約200 μmまたは約5 μm ~ 約400 μmまたは約5 μm ~ 約600 μmの平均粒径を有し得る。下記で詳細に説明されるように、クロマトグラフィーマトリックスは、例えば、ポリマー樹脂または金属酸化物または半金属酸化物であり得るか、またはそれらを含み得る。平面クロマトグラフィーが使用される場合、マトリックス材料は、平面クロマトグラフィーに適した任意の材料、例えば、従来のセルロース系膜もしくは有機ポリマー系膜（例えば、ペーパー膜（paper membrane）、ニトロセルロース膜、またはポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜）またはシリカコートされたガラスプレートであり得る。一つの態様において、クロマトグラフィーマトリックス/固定相は、非磁性材料または非磁化性材料である。

【0034】

当技術分野において使用されており、本発明においても好適な非磁性または非磁化性クロマトグラフィー固定相には、誘導体化シリカまたは架橋ゲルが含まれる。架橋ゲル（典型的にはビーズの形態で製造される）は、天然ポリマー、すなわち、自然界に存在するポリマークラスに基づき得る。例えば、クロマトグラフィー固定相が基づく天然ポリマーは、多糖である。それぞれの多糖は、通常、架橋されている。多糖マトリックスの例は、アガロースゲル（例えば、Superflow（商標）アガロースまたはSepharose（登録商標）材料、例えば、種々のビーズサイズおよびポアサイズで商業的に入手可能なSuperflow（商標）Sepharose（登録商標））または架橋デキストランのゲルである。例証となるさらなる例は、両方ともGE Healthcareから入手可能なSephadex（登録商標）またはSuperdex（登録商標）として商業的に入手可能な、デキストランが共有結合的に結合されている粒状の架橋アガロースマトリックス（様々なビーズサイズであり、様々なポアサイズを有する）である。そのようなクロマトグラフィー材料の例証となる別の例は、GE Healthcareから種々のビーズサイズおよびポアサイズで入手可能なSephacryl（登録商標）である。

【0035】

架橋ゲルは、合成ポリマー、すなわち、自然界に存在しないポリマークラスにも基づき得る。通常、細胞分離用のクロマトグラフィー固定相が基づくそのような合成ポリマーは、極性モノマー単位を有するポリマーであり、ゆえにそのポリマーは、本質的に極性である。そのような極性ポリマーは、親水性である。親水性（「水を好む」）分子は、疎油性（「脂肪を嫌う」）とも呼ばれるものであり、水分子と双極子相互作用を形成し得る部分を含む。疎水性（「水を嫌う」）分子は、親油性とも呼ばれるものであり、水と分離する傾向を有する。

【0036】

好適な合成ポリマーの例証となる例は、ポリアクリルアミド、スチレン-ジビニルベン

10

20

30

40

50

ゼンゲル、およびアクリレートとジオールまたはアクリルアミドとジオールとのコポリマーである。例証となる例は、Fractogel（登録商標）として商業的に入手可能なポリメタクリレートゲルである。さらなる例は、Toyopearl（登録商標）として商業的に入手可能なエチレングリコールとメタアクリレートとのコポリマーである。いくつかの態様において、クロマトグラフィー固定相には、天然および合成ポリマー成分、例えば、多糖とアガロースまたは多糖とN,N'-メチレンビスアクリルアミドとの複合マトリックスまたは複合物またはコポリマー、例えば、ポリアクリルアミド/アガロース複合物も含まれ得る。デキストランとN,N'-メチレンビスアクリルアミドとのコポリマーの例証となる例は、上述のSephacryl（登録商標）シリーズの材料である。誘導体化シリカには、合成または天然ポリマーに結合されたシリカ粒子が含まれ得る。そのような態様の例としては、多糖グラフトシリカ、ポリビニルピロリドングラフトシリカ、ポリエチレンオキシドグラフトシリカ、ポリ(2-ヒドロキシエチルアスパルトアミド)シリカ、およびポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)グラフトシリカが挙げられるが、これらに限定されない。

【0037】

本発明において使用されるクロマトグラフィーマトリックスは、いくつかの態様において、例えば、本明細書において記載されるような除去カートリッジにおいて使用されるとき、ゲル濾過（サイズ排除としても公知である）マトリックスである。ゲル濾過は、それが、分離されるべき細胞と少なくとも本質的に相互作用を起こさないように設計されるという特性を特徴とし得る。ゆえに、ゲル濾過マトリックスは、本明細書において定義されるような細胞または他の生物学的実体の、概してそのサイズに基づく分離を可能にする。それぞれのクロマトグラフィーマトリックスは、典型的には、上で述べたような粒状の多孔性材料である。クロマトグラフィーマトリックスは、ある特定の排除限界を有し得、その限界は、典型的には、その分子量を超えると分子がポアに入ることから完全に排除される分子量に関して定義される。サイズ排除限界を定義するそれぞれの分子量は、単離されるべき標的細胞（または生物学的実体）の分子量に対応する分子量よりも小さい分子量であるように選択され得る。そのような態様において、標的細胞は、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスのポアに入ることが妨げられる。同様に、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスである固定相は、選択された標的細胞のサイズよりも小さいサイズであるポアを有し得る。例証的な態様において、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスおよび/またはゲル濾過マトリックスは、0～約500nmの平均ポアサイズを有する。

【0038】

レセプター結合分子または競合試薬などの、サンプル中に存在する他の成分は、ポアの排除限界より小さいサイズを有し得、これは、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスのポアに入ることができる。ポアの容積に部分的にまたは完全に入ることができるそのような成分のうち、ポアの容積によりアクセスできないより大きな分子が、通常、初めに溶出するのに対し、最も小さい分子が、最後に溶出する。いくつかの態様において、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスの排除限界は、標的細胞の最大幅より小さくなるように選択される。ゆえに、ポアの容積にアクセス可能な成分は、通常、標的細胞よりも長い時間、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスの中に/上に残留するだろう。したがって、標的細胞は、サンプルの他の物質/成分から別々にクロマトグラフィーカラムの溶出液中に回収され得る。ゆえに、レセプター結合試薬、またはあてはまる場合、競合試薬などの成分は、標的細胞よりも遅い時点において、ゲル濾過マトリックスから溶出する。ゲル浸透マトリックスが、結合部位、例えば、サンプル中に存在するレセプター結合試薬および/または競合試薬などの試薬に結合することができる結合部位Zを含む親和性試薬（通常、そのマトリックス上に共有結合的に結合されている）を含む場合、この分離の効果は、さらに高まるだろう。レセプター結合試薬および/または競合試薬は、親和性試薬の結合部位Zに結合し、それにより、ゲル浸透マトリックス上に固定化される。この方法は、通常、本発明において使用されるような除去カートリッジにおいて行われ、いくつかの態様では、本発明に係る方法、組み合わせ、およびキットは、そのようなゲル濾過マト

10

20

30

40

50

リックスを含むおよび/または使用する。それぞれの方法において、細胞は、サイズに基づいてしかるべく分離される。

【0039】

本発明において使用されるクロマトグラフィーマトリックスは、磁氣的に引き付け可能な (magnetically attractable) 物質、例えば、1種または複数種の磁氣的に引き付け可能な粒子または磁性流体も含み得る。それぞれの磁氣的に引き付け可能な粒子は、標的細胞に結合することができる結合部位を有する多量体化試薬または親和性試薬を含み得る。磁氣的に引き付け可能な粒子には、反磁性、強磁性、常磁性、または超常磁性の材料が含まれ得る。超常磁性の材料は、永久磁化を生じることなく、誘導された磁場によって磁場に反応する。酸化鉄に基づく磁気粒子は、例えば、DynaI BiotechからDynabeads (登録商標) として、Miltenyi Biotecから磁気MicroBeadsとして、CPG Inc.から磁気多孔性ガラスビーズとして、ならびに様々な他の供給源、例えば、少し例を挙げれば、Roche Applied Science、BIOCLON、BioSource International Inc.、micromod、AMBION、Merck、Bangs Laboratories、Polysciences、またはNovagen Inc.から商業的に入手可能である。超常磁性のCoおよびFeCoならびに強磁性のCoナノ結晶に基づく磁性ナノ粒子は、例えば、Hutten, A. et al.によって報告されている (J. Biotech. (2004), 112, 47-63)。しかしながら、いくつかの態様において、本発明において使用されるクロマトグラフィーマトリックスは、磁氣的に引き付け可能でないかなる物質も有しない。

10

【0040】

標的細胞を単離する方法のいくつかの態様において、クロマトグラフィーマトリックスは、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスとして使用される。アフィニティークロマトグラフィーマトリックス自体は、選択された標的に特異的に結合することができる永久に結合された (通常、共有結合的に結合された) 部分を含む。例えば、従来のアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、特定の所与の標的に結合する抗体を含み得る。あるいは、固定化金属キレートアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) のために使用されるクロマトグラフィーマトリックスは、金属イオンとタンパク質のある特定の露出側鎖との間に配位結合を形成することができるキレート配位子作用物質、例えば、三座イミノ二酢酸、または例えばオリゴヒスチジンタグで修飾される。したがって、当技術分野において、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、一般に、それ自身が、単離されるべき分析物または標的に特異的に結合することができるように設計される。例えば、下記で詳細に説明されるような「選択カートリッジ」において、クロマトグラフィーマトリックスを使用する本発明では、アフィニティークロマトグラフィーマトリックス自体は、単離されるべき標的細胞に特異的に結合することができるように設計されない。むしろ、そのような態様では、本発明において使用されるアフィニティークロマトグラフィーマトリックス (固定相) は、本発明においてやはり使用されるレセプター結合試薬に特異的に結合することができる少なくとも一つまたは複数の結合部位Zを有する親和性試薬を含む。レセプター結合試薬を親和性/多量体化試薬と接触させるとき、レセプター結合試薬の結合パートナーCおよび親和性/多量体化試薬の一つまたは複数の結合部位Zを介した可逆的複合体が形成される。したがって、この複合体の形成は、リガンドとそれぞれの結合パートナーとの非共有結合的な相互作用に依存し、ゆえに、Bonnafousら、前出に記載されているような切断可能な共有結合の使用と本質的に異なる。レセプター結合試薬と親和性試薬との複合体が、結合部位および結合パートナーCを介して形成されるとき、アビディティ効果をもたらすのに十分に高い表面密度でアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にその親和性試薬が存在する/提供される限り、その親和性試薬は、結合パートナーCと可逆的結合を形成することができる一つの結合部位Zを含むことが、通常、十分である。しかしながら、親和性試薬が、結合パートナーCに対して2つ以上の結合部位Zを含むことも可能である。形成された非共有結合的に結合している複合体において、(少なくとも2コピーの)レセプター分子を有する標的細胞がサンプル中に存在し、特定のレセプター分子に結合することができる一つまたは複数の結合部位Bを有するレセプター結合試薬と接触される場合、2つ以上のレセプター結合試薬が、アビディティ

20

30

40

50

ー効果が起き得るように互いに近くに配置された状態でアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上に固定化される。したがって、これらの態様において、米国特許第7,776,562号、米国特許第8,298,782号、または国際特許出願W002/054065に記載されているものに類似した、アフィニティークロマトグラフィーマトリックス上に標的細胞を可逆的に固定化することを可能にするためのアビディティー（多量体化）効果が、起き得る。親和性試薬（これはその後、多量体化作用物質としても作用し得る）の結合部位Zとレセプター結合試薬の結合パートナーCとの結合は、競合作用物質の添加によって破壊され得るので、その後、標的細胞は、レセプター結合試薬が標的細胞から完全に解離する穏やかな条件下において溶出され得、それにより、レセプター結合試薬が標的細胞の機能状態に影響することが回避される。したがって、このアフィニティークロマトグラフィー方法を介した標的細胞のこの単離は、共通の特定のレセプター分子によって定義される標的細胞集団の機能状態を変化させずに、標的細胞集団（または本明細書において記載される他の任意の生物学的実体）の単離/精製を可能にするという利点を有するだけではない。むしろ、この方法は、細胞精製のために磁気ビーズを使用する必要性を完全に無くし、それにより、任意のさらなる細胞操作を単純化し、本明細書において記載されるような標的細胞の単離の自動化への道を開くという追加の利点も有する。

10

【0041】

本発明に係る方法の他の態様において、親和性試薬が固定化されたクロマトグラフィーマトリックスが使用される。その親和性試薬は、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに結合することができる（下記を参照のこと）。そのようなクロマトグラフィーマトリックスは、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスであり得る。それは、親和性試薬と結合しているゲル濾過マトリックスでもあり得る。そのクロマトグラフィーマトリックスは、いくつかの態様において、クロマトグラフィーカラムに含められており、例えば、そのカラムの中に充填されている。固定化された親和性試薬を用いることによって、クロマトグラフィーマトリックスは、レセプター結合試薬の移動相を枯渇させ得る。同様に、クロマトグラフィーマトリックスと接触したサンプル、例えば、そのマトリックスで充填されたカラム上にロードされたサンプルから、レセプター結合試薬が枯渇し得る。本発明に係る一つの方法において、レセプター結合試薬は、それぞれの固定相、すなわち、クロマトグラフィーマトリックスと接触されるサンプルに含まれる。

20

【0042】

標的細胞を含むサンプルを適用した後、クロマトグラフィーマトリックス（アフィニティークロマトグラフィーのために使用されているか、またはゲル浸透のために使用されているかに関係なく）は、続いて、そのクロマトグラフィーマトリックス上に固定化されなかった任意の物質を除去するために、移動相、例えば、水性媒体、例えば、緩衝液で洗浄され得る。上に記載された非共有結合複合体の形成は、標的細胞をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上に固定化し、その複合体の解離は、例えば、条件を変更することによって、誘導され得る。そのような条件の変更は、例えば、水性移動相のイオン強度の変更または温度の変更であり得る。いくつかの態様において、レセプターとレセプター結合試薬と親和性試薬との間の可逆的な非共有結合複合体の解離を誘導するために、競合試薬が使用される。その競合試薬は、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCに対する親和性試薬の結合部位を占有または遮断することによって、親和性試薬と会合することができる。親和性試薬に対して特に高親和性を有する競合試薬を使用することによって、または標的細胞およびレセプター結合試薬のうちの少なくとも一方に対して過剰量の競合試薬を使用することによって（この場合、競合試薬は、レセプター結合試薬の結合パートナーCよりも親和性試薬の結合部位Zに対して低い親和性を有し得る）、レセプター結合試薬と多量体化試薬との間の非共有結合が破壊され得る。標的細胞は、クロマトグラフィーマトリックス、例えば、クロマトグラフィーマトリックスが充填されたカラムから溶出される。その溶出液が回収され、それにより、標的細胞が回収される。

30

40

【0043】

いくつかの態様において、標的細胞を含むかまたは含むと疑われ、アフィニティークロ

50

マトグラフィーマトリックス上に標的細胞および親和性試薬を含む上に記載された非共有結合複合体を形成させるためにレセプター結合試薬が加えられた、供給源サンプルが使用される。例証となる例として、血液サンプル（例えば、全血サンプル）またはリンパサンプルが、そのような供給源サンプルを定義し得る（実施例の項を参照のこと）。血液またはリンパ液に存在する所望の標的細胞に対する結合部位を有するレセプター結合試薬がそれぞれ選択され得る。そのレセプター結合試薬、任意で、ある緩衝液もまた、血液サンプルまたはリンパサンプルに加えられ得る。使用される緩衝液は、クロマトグラフィーマトリックスを平衡化するために使用され、その後の洗浄のために使用される緩衝液と少なくとも本質的に同一であり得る。続いて、そのサンプルは、クロマトグラフィーカラムにロードされ得る。このクロマトグラフィーカラムでは、レセプター結合試薬に結合し得る親和性試薬がそのマトリックス上に固定化されていることがある。あるいは、レセプター結合試薬は、標的細胞のサンプルをアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに適用する前に、そのアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にすでに固定化されていることがある。サンプル、例えば、血液またはリンパサンプルが、任意でレセプター結合試薬とともに、クロマトグラフィーカラム上に完全にロードされた後、クロマトグラフィーマトリックスが、移動相で洗浄され得る。次いで、クロマトグラフィーマトリックスの洗浄のために使用される緩衝液中に含まれ得る競合試薬が、クロマトグラフィーカラムにロードされ得る。続いて、そのクロマトグラフィーマトリックスは、移動相で洗浄され得る。標的細胞の溶出は、光学検出デバイスなどの標準的な検出手法を用いてモニターされ得る。次いで、標的細胞が回収され得る。したがって、そのような溶出液は、レセプター結合試薬および/または競合試薬を含み得る。

10

20

【0044】

そのような標的細胞の溶出液をさらに精製することができるために、クロマトグラフィーマトリックス（例えば、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックス）は、親和性試薬、例えば、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーBおよび/または競合試薬に特異的に結合することができる結合部位Zを有する、クロマトグラフィーマトリックス上に固定化される分子を含み得る。

【0045】

したがって、上記と一致して、本明細書において使用されるサイズ排除クロマトグラフィーマトリックス上には親和性試薬が固定化されていてもよい。それぞれのクロマトグラフィーマトリックスは、サイズおよび/または形状に従って物質を分離することもできるので、それは、混合モードのクロマトグラフィーマトリックスとして扱われ得る。したがって、その親和性試薬がレセプター結合試薬とマッチしない態様では、そのようなサイズ排除クロマトグラフィーマトリックス上に固定化された親和性試薬が、選択されたレセプター結合試薬と複合体を形成できない結合部位を有する点において、その混合モードのクロマトグラフィーマトリックスは、なおもサイズ排除クロマトグラフィーマトリックスとして使用され得る。固定化された親和性試薬が、選択されたレセプター結合試薬と複合体を形成する能力を有する結合部位を有する態様では、その親和性試薬は、クロマトグラフィーマトリックス上に標的細胞を可逆的に固定化するのに働き得る。

30

【0046】

クロマトグラフィーにおいて移動相として使用される流体相は、標的細胞の生物学的活性を保存するに適した任意の流体であり得る。典型的には、その流体は、液体である。いくつかの態様において、それぞれの液体は、水、例えば、水溶液の形態であるかまたはそれを含む。さらなる成分が、それぞれの水溶液に含まれてもよく、例えば、その中に溶解または懸濁されてもよい。例証となる例として、水溶液は、1種または複数種の緩衝化合物を含み得る。数多くの緩衝化合物が、当技術分野において使用され、本明細書において記載される様々なプロセスを行うために使用され得る。緩衝液の例としては、リン酸塩の溶液、例えば、リン酸緩衝食塩水（PBS）、炭酸塩、コハク酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、バルピツール酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、フタル酸塩、マレイン酸塩、カコジル酸塩、ホウ酸塩、N-(2-アセトアミド)-2-アミノ-エタンスルホン酸塩（ACES

40

50

とも呼ばれる)、N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPESとも呼ばれる)、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジン-プロパンスルホン酸(HEPPSとも呼ばれる)、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPESとも呼ばれる)、(2-[トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]-1-エタンスルホン酸(TESとも呼ばれる)、2-シクロヘキシルアミノ-エタンスルホン酸(CHESとも呼ばれる)、およびN-(2-アセトアミド)-イミノ二酢酸塩(ADAとも呼ばれる)の溶液が挙げられるが、これらに限定されない。任意の対イオンが、これらの塩において使用され得;アンモニウム、ナトリウム、およびカリウムが、例証となる例として働き得る。緩衝液のさらなる例としては、少し例を挙げれば、トリ-エタノールアミン、ジエタノールアミン、両性イオン緩衝液、例えば、ベタイン、エチルアミン、トリエチルアミン、グリシン、グリシルグリシン、ヒスチジン、トリス-(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRISとも呼ばれる)、ビス-(2-ヒドロキシエチル)-イミノ-トリス(ヒドロキシメチル)-メタン(BIS-TRISとも呼ばれる)、およびN-[トリス(ヒドロキシメチル)-メチル]-グリシン(TRICINEとも呼ばれる)が挙げられるが、これらに限定されない。緩衝液は、単離されるべき標的細胞を安定化する成分、例えば、タンパク質、例えば、(血清)アルブミン、成長因子、微量元素などをさらに含み得る。好適な移動相の選択は、当業者の知識の範囲内であり、経験的に行われ得る。

【0047】

WO2013/011011として公開されている同時係属中の国際特許出願PCT/EP2012/063969(その全内容が、すべての目的のために参照により本明細書に組み入れられる)と一致して、レセプター結合試薬と標的細胞上のレセプター分子との結合の強度は、レセプター結合試薬を介した親和性試薬への標的細胞の結合の可逆性にとって必須でなくてよい。むしろ、結合部位Bを介したレセプター結合試薬とレセプター分子との結合に対する解離定数(K_D)が、低親和性、例えば、約 10^{-3} ~約 10^{-7} Mの K_D の範囲内であるか、または高親和性、例えば、約 10^{-7} ~約 1×10^{-10} Mの K_D の範囲内であることを意味する、結合の強度に関係なく、結合部位Bを介したレセプター結合試薬とレセプター分子との結合の解離が十分に速く起きる限り、標的細胞は、可逆的に染色され得る。この点において、結合部位Bを介したレセプター結合試薬とレセプター分子との結合に対する解離速度定数(k_{off})は、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有し得る(この解離速度定数は、レセプター結合試薬の結合部位Bと標的細胞の表面上のレセプター分子との間に形成される複合体の解離反応を特徴付ける定数である)。レセプター結合試薬の結合部位Bと標的細胞の表面上のレセプター分子との間の会合反応に対する会合速度定数(k_{on})は、任意の値を有し得る。レセプター分子とレセプター結合試薬との間の十分に可逆的な結合を保証するために、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上、例えば、約 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $1.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $2.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $3 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $3.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $4 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $7.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 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 $2.5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $3 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $4 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 、約 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $7.5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $1 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $5 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $1 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 以上、または約 $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有する結合平衡の k_{off} 値を選択することが有益である。用語「約」は、 k_{off} 速度、 k_{on} 速度、または K_D (下記を参照のこと)に関して本明細書において使用されるとき、 $\pm 15.0\%$ 、 $\pm 10.0\%$ 、 $\pm 8.0\%$ 、 $\pm 9.0\%$ 、 $\pm 7.0\%$ 、 $\pm 6.0\%$ 、 $\pm 5.0\%$ 、 $\pm 4.5\%$ 、 $\pm 4.0\%$ 、 $\pm 3.5\%$ 、 $\pm 3.0\%$ 、 $\pm 2.8\%$ 、 $\pm 2.6\%$ 、 $\pm 2.4\%$ 、 $\pm 2.2\%$ 、 $\pm 2.0\%$ 、 $\pm 1.8\%$ 、 $\pm 1.6\%$ 、 $\pm 1.4\%$ 、 $\pm 1.2\%$ 、 $\pm 1.0\%$ 、 $\pm 0.9\%$ 、 $\pm 0.8\%$ 、 $\pm 0.7\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.4\%$ 、 $\pm 0.3\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、または $\pm 0.01\%$ を含む $\pm 20.0\%$ の許容誤差を含むと意味される。ここで、本明細書において使用される動態学および熱力学的な定数の値は、大気圧、すなわち、1.013バールおよび室温、すなわち、25 °Cの条件について言及していることに注意する。

【0048】

レセプター結合試薬が、「A」の符号で表され、標的細胞の表面上のレセプターが、「B

10

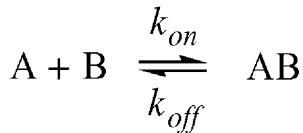
20

30

40

50

」の符号で表され、レセプター結合試薬とレセプターとの複合体が、「AB」の符号で表される場合、レセプター結合試薬とレセプターとの二分子相互作用は、



と記述される二状態プロセスによって記載され得る。このプロセスの対応する解離 K_d 定数は、

$$K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]}$$

10

として定義される。これらの式において、 $[A]$ 、 $[B]$ 、および $[AB]$ は、所与の温度および所与の圧力における、レセプター、レセプター結合試薬（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、会合速度定数とも呼ばれる複合体の会合/形成の速さについての会合速度の定数（ k_{on} ）と、解離速度定数とも呼ばれる複合体の解離についての解離速度の定数（ k_{off} ）との比として

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

で表現され得る。この点において、解離定数 K_d は、平衡に達した状態を定義することに注意する。しかしながら、平衡は、クロマトグラフィー分離の条件下において生じない可能性がある。これは、いくつかの態様において、可逆的結合が、本発明の文脈において $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上であり得る、すなわち、助数詞（ sec^{-1} ）で少なくとも $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ と等しいあり得ると判定し得るのが、解離定数 K_d ではなく解離速度の定数（ k_{off} ）である理由を説明し得る。

20

【0049】

いくつかの態様において、レセプター結合試薬は、レセプター分子に特異的に結合することができる単一（一価）の結合部位Bを有する。いくつかの態様において、レセプター結合試薬は、レセプター分子に結合することができる少なくとも2つ（すなわち、3、4、または5個の同一の結合部位Bを含む複数の結合部位B）を有する。これらの任意の態様において、結合部位B（の各々）を介したレセプター分子の結合は、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上の k_{off} 値を有し得る。したがって、レセプター結合試薬は、一価であり得るか（例えば、一価の抗体断片または一価の人工的な結合分子（タンパク質性またはその他）、例えば、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン（Anticalin（登録商標）としても公知である）、または二価の分子、例えば、抗体、または両方の結合部位が保持されている断片、例えば、 $F(ab')_2$ 断片であり得る。いくつかの態様において、 k_{off} 速度が、 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上であれば、レセプター分子は、多価の分子、例えば、五量体のIgE分子であってもよい。

30

【0050】

本発明のいくつかの態様において、本明細書において記載される可逆的な細胞アフィニティークロマトグラフィー技術を介した生物学的材料の（痕跡を残さない）単離を提供するのは、分子レベルでは、少なくとも結合部位Bを介したレセプター結合試薬と標的細胞上のレセプター分子との結合の（ $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上の） k_{off} 速度ではない。むしろ、および例えば、米国特許第7,776,562号または国際特許出願W002/054065に記載されているように、固定化された親和性試薬によって媒介されるアビディティー効果を伴った、レセプター分子と結合レセプター結合試薬の結合部位Bとの低親和性結合が、痕跡を残さずに標的細胞を可逆的に単離することを可能にする。これらの態様において、親和性試薬の2つ以上の結合部位Zと少なくとも2つのレセプター結合試薬の結合パートナーCとの複合体が形成され得、それにより、可逆的な固定化およびその後のアフィニティークロマトグラフィーマトリックスからの標的細胞の溶出が可能になる（結合パートナーCと結合部位Zとの間に形成された結合（複合体）を破壊し、標的細胞からレセプター結合試薬を解離させる、競合作用物質の添加を介して）。上で述べたように、そのような低い結合親和性は、結合

40

50

部位Bおよび標的細胞表面上のレセプター分子を介したレセプター結合試薬の結合に対する約 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ~ 約 $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ の範囲内の解離定数 (K_D) を特徴とし得る。

【0051】

本発明に係る方法は、いくつかの態様において、細胞分離において以前より使用されている試薬をサンプルから枯渇させるために使用され得る。レセプター結合試薬および競合作用物質は、例えば、上に記載されたような選択カートリッジの形のアフィニティークロマトグラフィー法の溶出液中に含まれて存在し得る。本発明に係る方法を使用するとき、そのような試薬は、少なくとも本質的に、サンプル、例えば、細胞集団から除去され得、これには、完全な除去が含まれる。例証となる例として、上で定義されたようなレセプター結合試薬は、例えば、FACSまたはウエスタンブロットの検出限界未満のレベルにまで、サンプルから枯渇され得る。競合試薬は、アフィニティークロマトグラフィービーズなどの親和性精製媒体から標的細胞を溶出するために使用されている可能性がある。この競合試薬は、親和性試薬の結合部位Zに特異的に結合することができる結合部位を有する。そのような態様において、本発明のそれぞれの方法は、レセプター結合試薬および競合試薬の除去を含むそれらの枯渇において役立ち得る。

10

【0052】

いくつかの態様において、標的細胞を単離する方法は、2つの精製工程を含み得、その工程のうちの第2工程、すなわち、「除去カートリッジ」におけるレセプター結合試薬および/または競合試薬の除去だけが、本発明に従って行われる。第1工程は、米国特許第7,776,562号、米国特許第8,298,782号、または国際特許出願W002/054065に記載されているような標的細胞を単離する方法であり得る。次いで、そのようなサンプルに対して、本発明に係る「除去方法」が行われることにより、標的細胞サンプルから、さらに他の細胞ならびにレセプター結合試薬および競合試薬が枯渇され得る。同様に、米国特許第7,776,562号、米国特許第8,298,782号、または国際特許出願W002/054065に従って第1工程において得られたサンプルは、親和性試薬が固定化されていない未改変のクロマトグラフィーマトリックスを使用する、上で説明したようなゲル浸透クロマトグラフィーにも供され得る。第1単離工程は、細胞単離のための他の任意の公知の従来技術法、例えば、米国特許第6,022,951号の実施例11に記載されている方法であることも可能であり、次いで、その単離された細胞は、本発明の除去カートリッジにおいて行われるような精製方法に供される。

20

【0053】

標的細胞表面（または生物学的実体のアクセス可能な表面）上に位置するレセプター分子は、本発明に係る方法におけるクロマトグラフィー分離プロセス中に細胞表面に共有結合的にまたは非共有結合的に結合されたまま残存する限り、任意の分子であってよい。そのレセプター分子は、レセプター結合試薬が対象とし得る分子である。いくつかの態様において、レセプターは、ペプチドまたはタンパク質、例えば、膜レセプタータンパク質である。いくつかの態様において、レセプターは、脂質、多糖、または核酸である。タンパク質であるレセプターは、表在性膜タンパク質または内在性膜タンパク質であり得る。そのタンパク質は、いくつかの態様において、膜にまたがる一つまたは複数のドメインを有し得る。いくつかの例証となる例として、膜貫通ドメインを有する膜タンパク質は、Gタンパク質共役レセプター、例えば、匂い分子レセプター、ロドプシンレセプター、ロドプシンフェロモンレセプター、ペプチドホルモンレセプター、味覚レセプター、GABAレセプター、オピエートレセプター、セロトニンレセプター、 Ca^{2+} レセプター、メラノプシン、神経伝達物質レセプター、例えば、アセチルコリン、ニコチン、アドレナリン、ノルエピネフリン、カテコールアミン、L-DOPA-、ドーパミン、およびセロトニン（生体アミン、エンドルフィン/エンケファリン）神経ペプチドレセプターを含む、リガンド開口型、電圧開口型、または機械的開口型レセプター、レセプターキナーゼ、例えば、セリン/トレオニンキナーゼ、チロシンキナーゼ、ポリリン/チャネル、例えば、塩素イオンチャネル、カリウムチャネル、ナトリウムチャネル、OMPタンパク質、ABCトランスポーター（ATP結合カセットトランスポーター）、例えば、アミノ酸トランスポーター、Na-グルコーストランスポーター、 Na^+ /ヨウ化物トランスポーター、イオントランスポーター、例えば

30

40

50

、集光性複合体、シトクロムcオキシダーゼ、ATPアーゼNa/K、H/K、Ca、細胞接着レセプター、例えば、メタロプロテアーゼ、インテグリン、またはカテリン (catherin) であり得る。

【 0 0 5 4 】

いくつかの態様において、レセプター分子は、所望の細胞集団または亜集団、例えば、血液細胞、例えば、リンパ球 (例えば、T細胞、ヘルパーT細胞、例えば、CD4⁺ ヘルパーT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、例えば、CD34陽性末梢幹細胞またはNanogもしくはOct-4を発現している幹細胞の集団または亜集団を定義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) などの細胞が挙げられる。Tregの例証となる例は、CD4⁺ CD25⁺ CD45RA Treg細胞であり、メモリーT細胞の例証となる例は、CD62L⁺ CD8⁺ の特定のセントラルメモリーT細胞である。レセプターは、腫瘍細胞に対するマーカーでもあり得る。

【 0 0 5 5 】

上で示されたように、レセプター結合試薬は、レセプター分子に結合することができる結合部位Bに加えて、結合パートナーCを有する。この結合パートナーCは、親和性試薬の結合部位Zに結合することができ、多量体化試薬は、結合パートナーCに対する一つまたは複数の結合部位を有する。レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと親和性試薬の結合部位Zとの間に形成される非共有結合は、本発明の方法が行われる条件下において破壊可能であるかまたは可逆的である限り、任意の所望の強度および親和性であり得る。レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと親和性試薬の結合部位Zとの間の結合の解離定数 (K_D) は、約 $10^{-2}M$ ~ 約 $10^{-13}M$ の範囲内の値を有し得る。したがって、この可逆的結合は、例えば、約 $10^{-2}M$ ~ 約 $10^{-13}M$ または約 $10^{-3}M$ ~ 約 $10^{-12}M$ または約 $10^{-4}M$ ~ 約 $10^{-11}M$ または約 $10^{-5}M$ ~ 約 $10^{-10}M$ の K_D を有し得る。この結合の K_D 、ならびにレセプター結合試薬の結合部位Bとレセプター分子との間に形成される結合の K_D 、 k_{off} 、および k_{on} 速度は、任意の好適な手段、例えば、蛍光滴定、平衡透析、または表面プラズモン共鳴によって測定され得る。レセプター分子結合試薬は、2つ、3つ、またはそれ以上を含む少なくとも一つの第2の結合パートナーCを含み得、親和性試薬は、レセプター分子結合試薬に含まれる結合パートナーに対する少なくとも2つ、例えば、3、4、5、6、7、8つまたはそれ以上の結合部位を含み得る。米国特許第7,776,562号、米国特許第8,298,782号、または国際特許出願WO2002/054065に記載されているように、結合パートナーCおよび親和性作用物質の結合部位Zが、(多価)複合体において可逆的に結合または多量体化することができ、それによりアビディティー効果を引き起こす限り、結合パートナーCと一つまたは複数の対応する結合部位Zを有する親和性作用物質との任意の組み合わせが選択され得る。

【 0 0 5 6 】

レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーは、例えば、炭化水素系 (ポリマーを含む) であり得、窒素、リン、硫黄、炭素、ハロゲン、または擬ハロゲン基を含み得る。その結合パートナーは、アルコール、有機酸、無機酸、アミン、ホスフィン、チオール、ジスルフィド、アルカン、アミノ酸、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、脂質、糖、オリゴ糖、または多糖であり得る。さらなる例として、その結合パートナーは、カチオン、アニオン、ポリカチオン、ポリアニオン、ポリカチオン、電解質、高分子電解質、カーボンナノチューブ、またはカーボンナノフォームでもあり得る。一般に、そのような結合パートナーは、他の物質よりも多量体化試薬の結合部位に対して高い親和性を有する。それぞれの結合パートナーの例としては、クラウンエーテル、免疫グロブリン、その断片、および抗体様の機能を有するタンパク質性結合分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 7 】

いくつかの態様において、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、ビオチンを含み、親和性試薬は、ビオチンに可逆的に結合するストレプトアビジンアナログまたはアビジンアナログを含む。いくつかの態様において、レセプター結合試薬に含まれる結

10

20

30

40

50

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アナログを含み、親和性試薬は、それぞれのビオチンアナログ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アナログ、またはアビジンアナログを含む。いくつかの態様において、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、ストレプトアビジンまたはアビジン結合ペプチドを含み、親和性試薬は、それぞれのストレプトアビジンまたはアビジン結合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アナログ、またはアビジンアナログを含む。

【0058】

いくつかの態様において、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーは、ストレプトアビジン結合ペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lysを含み得、親和性試薬は、ストレプトアビジンムテイン（アナログ）Val44-Thr45-Ala46-Arg47またはストレプトアビジンムテイン（アナログ）Ile44-Gly45-Ala46-Arg47を含み得、この両方が、例えば、米国特許第6,103,493号に記載されており、商標Strep-Tactin（登録商標）として商業的に入手可能である。ストレプトアビジン結合ペプチドは、例えば、単一のペプチド、例えば、米国特許第5,506,121号に記載されている「Strep-tag（登録商標）」、または国際特許公報WO02/077018もしくは米国特許第7,981,632号に記載されているように2つ以上の個別の結合モジュールの連続配置を有するストレプトアビジン結合ペプチドであり得る。

【0059】

いくつかの態様において、レセプター結合試薬の結合パートナーCは、親和性タグとして当業者に公知の部分を含む。そのような態様において、親和性試薬は、親和性タグに結合すると公知である対応する結合パートナー、例えば、抗体または抗体断片を含む。公知の親和性タグの例証となるいくつかの例として、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーとしては、ジニトロフェノールまたはジゴキシゲニン、オリゴヒスチジン、ポリヒスチジン、免疫グロブリンDメイン、マルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、キチン結合タンパク質（CBP）もしくはチオレドキシニン、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、FLAG'-ペプチド、HA-タグ（配列:Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala）、VSV-G-タグ（配列:Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys）、HSV-タグ（配列:Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp）、T7エピトープ（Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly）、マルトース結合タンパク質（MBP）、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Dの配列Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-AspのHSVエピトープ、転写因子c-mycの配列Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leuの「myc」エピトープ、V5-タグ（配列:Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr）、あるいはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）が挙げられ得る。そのような態様において、親和性試薬の一つまたは複数の結合部位の間に形成される複合体、この場合、抗体または抗体断片および抗原は、遊離抗原、すなわち、遊離ペプチド（エピトープタグ）または遊離タンパク質（例えば、MBPまたはCBP）を加えることによって、競合的に破壊され得る。親和性タグは、オリゴヌクレオチドタグでもあり得る。そのようなオリゴヌクレオチドタグは、例えば、親和性試薬に連結されているまたはそれに含まれている相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするように使用され得る。

【0060】

好適な結合パートナーのさらなる例としては、レクチン、プロテインA、プロテインG、金属、金属イオン、ニトリロ三酢酸誘導体（NTA）、RGD-モチーフ、デキストラン、ポリエチレンジイミン（PEI）、レドックスポリマー、糖タンパク質、アプタマー、色素、アミロース、マルトース、セルロース、キチン、グルタチオン、カルモジュリン、ゼラチン、ポリミキシン、ヘパリン、NAD、NADP、リジン、アルギニン、ベンズアミジン、ポリU、またはオリゴ-dTが挙げられるが、これらに限定されない。Concavalin Aなどのレクチンは、多糖類およびグリコシル化されたタンパク質に結合すると公知である。色素の例証となる例は、NADH依存性酵素に特異的に結合する、Cibacron blue F3G-A（CB）またはRed HE-3Bなどのトリアジン色素である。Green Aは、CoAタンパク質、ヒト血清アルブミン、およびデヒドロゲナーゼに結合する。色素である7-アミノアクチノマイシンDおよび4',6-ジア

10

20

30

40

50

ミジノ-2-フェニルインドールは、DNAに結合する。金属、例えば、Ni、Cd、Zn、CoまたはCuのカチオンは、典型的には、ヘキサヒスチジンまたはHis-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cysタグ（MATタグ）を含むオリゴヒスチジン含有配列などの親和性タグ、およびN-メタクリロイル-(L)-システインメチルエステルに結合するために使用される。

【0061】

いくつかの態様において、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと親和性試薬の一つまたは複数の結合部位との間の結合は、二価、三価、または四価のカチオンの存在下において生じる。この点において、いくつかの態様において、その親和性/多量体化試薬は、典型的には、好適なキレート剤によって保持、例えば、錯化される、二価、三価、または四価のカチオンを含む。レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーは、そのような態様において、例えば、錯体、二価、三価、または四価のカチオンを含む部分を含み得る。それぞれの金属キレート剤の例としては、エチレンジアミン、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、エチレングリコール四酢酸（EGTA）、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）、N,N-ビス（カルボキシメチル）グリシン（ニトリロ三酢酸、NTAとも呼ばれる）、1,2-ビス（o-アミノフェノキシ）エタン-N,N,N',N'-四酢酸（BAPTA）、2,3-ジメルカプト-1-プロパノール（ジメルカプロール）、ポルフィン、およびヘムが挙げられるが、これらに限定されない。例として、EDTAは、ほとんどの一価、二価、三価、および四価の金属イオン、例えば、銀（ Ag^+ ）、カルシウム（ Ca^{2+} ）、マンガン（ Mn^{2+} ）、銅（ Cu^{2+} ）、鉄（ Fe^{2+} ）、コバルト（ Co^{3+} ）、およびジルコニウム（ Zr^{4+} ）と錯体を形成する一方で、BAPTAは、 Ca^{2+} に特異的である。例証となる例として、当技術分野において使用される標準的な方法は、オリゴヒスチジntagと、キレート剤のニトリロ三酢酸（NTA）によって提供される銅（ Cu^{2+} ）、ニッケル（ Ni^{2+} ）、コバルト（ Co^{2+} ）、または亜鉛（ Zn^{2+} ）イオンとの間の錯体の形成である。

【0062】

いくつかの態様において、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、カルモジュリン結合ペプチドを含み、親和性試薬は、例えば、米国特許第5,985,658号に記載されているような多量体カルモジュリンを含む。いくつかの態様において、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、FLAGペプチドを含み、親和性試薬は、FLAGペプチド、例えば、米国特許第4,851,341号に記載されているような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。一つの態様において、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCは、オリゴヒスチジntagを含み、親和性試薬は、オリゴヒスチジntagに結合する抗体または遷移金属イオンを含む。これらの結合しているすべての錯体の破壊は、金属イオンのキレート化、例えば、カルシウムキレート化、例えば、EDTAまたはEGTAの添加によって、達成され得る（前出）。カルモジュリン、4E11などの抗体、またはキレート化された金属イオンもしくは遊離キレート剤は、第1工程における、従来の方法、例えば、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはそれらの多量体とのビオチン化および錯体形成、あるいは本質的にNoguchi, A, et al. Bioconjugate Chemistry (1992) 3, 132-137に記載されているような、多糖、例えば、デキストランへのカルボキシル残基の導入、および第2工程における、従来のカルボジイミド化学を使用した、多糖、例えば、デキストラン骨格におけるカルボキシル基への第1級アミノ基を介したカルモジュリンまたは抗体またはキレート化された金属イオンまたは遊離キレート剤の連結によって、多量体化され得る。そのような態様において、レセプター結合試薬に含まれる結合パートナーCと多量体化試薬の一つまたは複数の結合部位Zとの間の結合は、金属イオンのキレート化によって破壊され得る。その金属キレート化は、例えば、EGTAまたはEDTAの添加によって達成され得る。

【0063】

いくつかの態様において、親和性試薬は、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意のアナログのオリゴマーあるいはポリマーである。結合部位Zは、アビジンまたはストレプトアビジンに結合する天然のビオチンである。それぞれのオリゴマーまたはポリマーは、多糖によって架橋され得る。一つの態様に

10

20

30

40

50

において、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンのアナログのオリゴマーあるいはポリマーは、第1工程における、本質的にNoguchi, A, et al, Bioconjugate Chemistry (1992) 3, 132-137に記載されているような、多糖、例えば、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。次いで、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはそれらのアナログは、第2工程において、従来のカルボジイミド化学を使用した、デキストラン骨格におけるカルボキシル基への内部のリジン残基および/または自由なN末端の第1級アミノ基を介して連結され得る。それでもなお、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意のアナログの架橋されたオリゴマーあるいはポリマーは、リンカーとして働く二官能性分子、例えば、グルタルジアルデヒドを介した架橋、または当技術分野において報告されている他の方法によっても得られ得る。

10

【0064】

本発明の方法において、レセプター分子に特異的に結合するレセプター分子結合試薬の一つまたは複数の結合部位は、例えば、抗体、その断片、および抗体様の機能を有するタンパク質性結合分子であり得る。(組換え)抗体断片の例は、Fab断片、Fv断片、一本鎖Fv断片(scFv)、二価の抗体断片、例えば、(Fab)₂'-断片、ダイアボディ、トリアボディ(triabodies)(Iliades, P., et al, FEBS Lett (1997) 409, 437-441)、デカボディ(decabodies)(Stone, E., et al, Journal of Immunological Methods (2007) 318, 88-94)、および他のドメイン抗体(Holt, L.J., et al, Trends Biotechnol. (2003), 21, 11, 484-490)である。いくつかの態様において、レセプター分子結合試薬の一つまたは複数の結合部位は、二価のタンパク質性の人工的な結合分子、例えば、「デュオカリン(duocalin)」としても公知である二量体リボカリンムテインであり得る。いくつかの態様において、レセプター結合試薬は、単一の第2結合部位を有し得、すなわち、一価であり得る。一価のレセプター結合試薬の例としては、一価の抗体断片、抗体様の結合特性を有するタンパク質性結合分子、またはMHC分子が挙げられるが、これらに限定されない。一価の抗体断片の例としては、Fab断片、Fv断片、および二価の一本鎖Fv断片を含む一本鎖Fv断片(scFv)が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0065】

上で述べたように、抗体様の機能を有するタンパク質性結合分子の例は、リボカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテインである(例えば、WO03/029462, Beste et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96, 1898-1903を参照のこと)。リボカリン、例えば、ピリン結合タンパク質、ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リボカリン、ヒトアポリボタンパク質D、またはヒト涙リボカリンは、所与の標的に結合するように改変され得る天然のリガンド結合部位を有する。レセプター分子に特異的に結合するレセプター結合試薬として使用され得る、抗体様の結合特性を有するタンパク質性結合分子のさらなる例としては、いわゆるグルボディ(glubodies)(例えば、国際特許出願WO96/23879を参照のこと)、アンキリン骨格(Mosavi, L.K., et al, Protein Science (2004) 13, 6, 1435-1448)または結晶骨格(crystalline scaffold)(例えば、国際特許出願WO01/04144)に基づくタンパク質、Skerra, J. Mol. Recognit. (2000) 13, 167-187に記載されているタンパク質、アドネクチン(AdNectins)、テトラネクチン、およびアビマー(avimers)が挙げられるが、これらに限定されない。ヒトレセプタードメインのファミリーのエキソンシャフリングによって進化された多価のアビマータンパク質を含むアビマーは、いくつかの細胞表面レセプターにおいて複数の一続きのドメインとして存在するいわゆるADドメインを含む(Silverman, J., et al, Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-1561)。ヒトフィブロネクチンのドメインに由来するアドネクチンは、標的への免疫グロブリン様の結合のために操作され得る3つのループを含む(Gill, D.S. & Damle, N.K., Current Opinion in Biotechnology (2006) 17, 653-658)。同様に、それぞれのヒトホモ三量体タンパク質に由来するテトラネクチンは、所望の結合のために操作され得るC型レクチンドメインにループ領域を含む(同書)。タンパク質リガンドとして作用し得るペプチドは、側鎖が炭素原子ではなくアミド窒素に連結されているという点でペプチドとは異なるオリゴ

30

40

50

(N-アルキル)グリシンである。ペプチドは、典型的には、プロテアーゼおよび他の修飾酵素に対して抵抗性であり、ペプチドよりも一層高い細胞透過性を有し得る(例えば、Kwon, Y.-U., and Kodadek, T., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 1508-1509を参照のこと)。

【0066】

好適なタンパク質性結合分子のなおもさらなる例は、EGF様ドメイン、Krigle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(tendamistat)、Kazal型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、Trefoil(P型)ドメイン、フォン・ビルブランド因子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、チログロブリンI型リピート、LDL-レセプタークラスAドメイン、Sushiドメイン、Link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もしく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・ビルブランド因子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、F5/8C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、「カッパーボディ(Kappabodies)」(Ill. et al, Protein Eng (1997) 10, 949-57を参照のこと)、いわゆる「ミニボディ(minibody)」(Martin et al, EMBO J (1994) 13, 5303-5309)、ダイアボディ(Holliger et al, PNAS USA (1993) 90, 6444-6448を参照のこと)、いわゆる「Janusis」(Traunecker et al, EMBO J (1991) 10, 3655-3659またはTraunecker et al, Int J Cancer (1992) Suppl 7, 51-52を参照のこと)、ナノボディ(nanobody)、マイクロボディ、アフィリン(affilin)、アフィボディ(affibody)、ノッチン(knottin)、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、またはロイシン-リッチリピートタンパク質である。抗体様の機能を有する核酸分子の例は、アプタマーである。アプタマーは、規定の3次元モチーフに折り畳まれ、所与の標的構造に対して高親和性を示す。

【0067】

本明細書において使用される用語「核酸分子」とは、任意の可能な立体配置、例えば、一本鎖、二本鎖、またはそれらの組み合わせの任意の核酸のことを指す。核酸には、例えば、DNA分子、RNA分子、ヌクレオチドアナログまたは核酸化学を使用して生成されるDNAまたはRNAのアナログ、ロックト(locked)核酸分子(LNA)、PNA分子(前出)、およびtecto-RNA分子(例えば、Liu, B., et al, J. Am. Chem. Soc. (2004) 126, 4076-4077)が含まれる。PNA分子は、例えば、DNAまたはRNAに存在するホスホジエステル骨格が、アミノ末端およびカルボキシ末端を含む短い脂肪族部分の反復単位によって置換されていて、オリゴマーまたはポリマーにおいてアミド結合を形成する、擬ペプチド骨格を有する合成核酸アナログである。LNA分子は、フラノース環をN型の立体配置でロックしてそれぞれの分子により高い二重鎖安定性およびヌクレアーゼ抵抗性を提供するメチレン架橋をC4'とO2'との間に有する改変されたRNA骨格を有する。PNA分子とは異なり、LNA分子は、帯電した骨格を有する。DNAまたはRNAは、ゲノム起源または合成起源であり得、一本鎖または二本鎖であり得る。そのような核酸は、例えば、mRNA、cRNA、合成RNA、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、DNAとRNAとのコポリマー、オリゴヌクレオチドなどであり得る。それぞれの核酸は、非天然ヌクレオチドアナログをさらに含み得、および/または親和性タグもしくは標識に連結され得る。

【0068】

本発明に係る方法は、標的細胞の生存能が少なくとも本質的に損なわれない任意の温度において行われ得る。少なくとも本質的に有害でない、不利益でない、または少なくとも本質的に生存能を損なわない条件についての言及が本明細書において行われるとき、完全な生存能を有した状態で回収され得る標的細胞のパーセンテージが少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%を含む少なくと

10

20

30

40

50

も70%である条件が、言及されている。いくつかの態様において、本発明に係る方法は、約20 以下、例えば、約14 以下、約9 以下、または約6 以下の温度で行われる。単離されるべき標的細胞に応じて、好適な温度範囲は、標的細胞を含むために水性媒体が使用される場合、例えば、約2 ~ 約40 、約3 ~ 約35 、または約4 ~ 約30 を含む約2 ~ 約45 であり得る。いくつかの態様において、本発明に係る方法は、一定の温度値、または選択された温度値 \pm 約5 、 \pm 約4 、 \pm 約3 、 \pm 約2 、 \pm 約1 、もしくは \pm 約0.5 で行われる。その温度は、例えば、約5 、約10 、約15 、約20 、または約25 の値を有するように選択され得る。いくつかの態様において、その温度は、本発明に係る方法の最中に変更され、すなわち、上昇されるか、低下されるか、またはそれらの組み合わせによって変動される。その温度は、例えば、上で定義されたような範囲内、例えば、約2 ~ 約40 の範囲内または約3 ~ 約35 の範囲内で変更され得る。当業者は、細胞の性質および単離条件を考慮して、好適な温度を経験的に決定することができる。例えば、癌細胞などの温度非感受性細胞は、室温または37 などの高温でさえ単離され得る。

【0069】

本方法は、例えば、上で詳述されたような方法を行うために設計された部品のキットを使用しても行われ得る。キットは、上で定義されたようなレセプター結合試薬を備え得る。キットは、例えば、レセプター結合試薬、例えば、溶液の形のレセプター結合試薬で満たされた容器を備え得る。そのキットは、カラムに（予め）充填されていてもよい上で定義されたようなクロマトグラフィーマトリックス、例えば、カートリッジも備え得る。そのようなクロマトグラフィーマトリックスおよび/または容器に付随して、いくつかの態様では、本発明に係る方法を行うためのキットの使用法についての指示書の形態の警告が提供される。

【0070】

本発明は、クロマトグラフィーを介して標的細胞を単離するための、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン（アナログ）、アビジン、アビジンムテイン（アナログ）、またはそれらの混合物の使用も提供し、そのクロマトグラフィーは、ゲル濾過クロマトグラフィーである。この目的のために、態様、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、アビジンムテイン、またはこれらのいずれかの混合物、例えば、ストレプトアビジンとストレプトアビジンムテインの両方の混合物が、親和性試薬として、本明細書において開示されるような「除去カートリッジ」の固定相上に固定化される。本明細書において使用される用語「ストレプトアビジン」は、野生型ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、およびストレプトアビジン様ポリペプチドを含む。同様に、本明細書において使用される用語「アビジン」は、野生型アビジン、ならびにアビジンのムテイン、例えば、より中性のpIを示し、天然のアビジンに対する代替物として利用可能な、改変されたアルギニンを含む脱グリコシル化されたアビジンである、ニュートラアビジン（neutravidin）を含む。脱グリコシル化された中性の形態のアビジンには、例えば、Sigma-Aldrichを通じて入手可能な「Extravidin」またはThermo ScientificもしくはInvitrogenから入手可能な「NeutrAvidin」などの商業的に入手可能な形態が含まれる。

【0071】

野生型ストレプトアビジン（wt-ストレプトアビジン）として、Argarana et al, Nucleic Acids Res. 14 (1986) 1871-1882によって開示されたアミノ酸配列が、参照される。ストレプトアビジンムテインは、一つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、または付加によって野生型ストレプトアビジンの配列と区別され、wt-ストレプトアビジンの結合特性を保持する、ポリペプチドである。ストレプトアビジン様ポリペプチドおよびストレプトアビジンムテインは、野生型ストレプトアビジンと本質的に免疫学的に等価であり、特に、wt-ストレプトアビジンと同じまたは異なる親和性でピオチン、ピオチン誘導体、またはピオチンアナログに結合することができる、ポリペプチドである。ストレプトアビジン様ポリペプチドまたはストレプトアビジンムテインは、野生型ストレプトアビジンの一部ではないアミノ酸を含み得るか、または野生型ストレプトアビジンの一部だけを含み得る

。宿主は、宿主が産生するポリペプチドを野生型ストレプトアビジンの構造に変換するために必要な酵素を有しないので、ストレプトアビジン様のポリペプチドは、野生型ストレプトアビジンと同一でないポリペプチドでもある。用語「ストレプトアビジン」は、ストレプトアビジン四量体およびストレプトアビジン二量体、特に、ストレプトアビジンホモ四量体、ストレプトアビジンホモ二量体、ストレプトアビジンヘテロ四量体、およびストレプトアビジンヘテロ二量体も含む。各サブユニットは、通常、ビオチンもしくはビオチンアナログまたはストレプトアビジン結合ペプチドに対する結合部位を有する。ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインの例は、例えば、WO86/02077、DE19641876 A1、米国特許第6,022,951号、WO98/40396、またはWO96/24606において言及されている。

【0072】

好ましい態様において、ゲル濾過クロマトグラフィーであるクロマトグラフィーを介して標的細胞を単離するために使用されるストレプトアビジンムテインは、米国特許第6,103,493号およびDE19641876.3に記載されているストレプトアビジンムテインである。これらのストレプトアビジンムテインは、野生型ストレプトアビジンのアミノ酸配列に基づいてアミノ酸44～53位の領域内に少なくとも一つの変異を有する。N末端は野生型ストレプトアビジンのアミノ酸10～16の領域から開始し、C末端は野生型ストレプトアビジンのアミノ酸133～142の領域で終結する、最小のストレプトアビジンのムテインが好ましい。そのような好ましいストレプトアビジンムテインの例は、44位にGluの代わりに疎水性脂肪族アミノ酸、45位に任意のアミノ酸、46位に疎水性脂肪族アミノ酸、または/および47位にValの代わりに塩基性アミノ酸を有する。ストレプトアビジンムテインは、ムテインVal 44-Thr45-Ala46-Arg47またはストレプトアビジンムテイン（アナログ）Ile44-Gly45-Ala46-Arg47であり得、これらの両方ともが、例えば、米国特許第6,103,493号に記載されており、商標Strep-Tactin（登録商標）として商業的に入手可能である。

【0073】

本発明は、標的細胞を精製するための装置も提供し、その装置は、細胞を選択するためのクロマトグラフィーカラム（選択カートリッジ）および標的細胞を単離または染色するための試薬を除去するための第2クロマトグラフィーカラム（除去カートリッジ）を意味する、上で説明したようなクロマトグラフィー用の第1および第2固定相の少なくとも一つの配置を備える。そのような2工程の単離手順を行うことにより、次の所望の用途または選択サイクルに直接供することができる標的細胞が得られる。FACSおよびMACS選択とは対照的に、本発明のクロマトグラフィー選択方法では、2つの選択サイクルの間に洗浄および遠心分離などのさらなる手順は必要なく、細胞は、レセプター結合試薬または磁気ビーズなどの結合された単離試薬によって機能的に損なわれない。ゆえに、本発明は、信頼性が高く、構築しやすく、なおも標的細胞精製にとって有効な装置を初めて提供する。

【0074】

上記と一致して、本発明の請求項の装置は、直列で流体連結されている第1および第2固定相（クロマトグラフィーカラム）の複数の配置を備え得る。その装置は、クロマトグラフィー用の第1および第2固定相の第1配置の第1固定相に流体連結されているサンプル入口を備え得る。その装置は、精製された標的細胞用のサンプル出口も備え得、そのサンプル出口は、クロマトグラフィー用の第1および第2固定相の少なくとも一つの配置の最後の配置の第2固定相に流体連結されている。その装置は、クロマトグラフィー用の第1および第2固定相の配置の第1固定相の少なくとも一つに流体連結されている競合試薬容器も備え得る。

【0075】

当業者が、本発明の開示から容易に理解するように、本明細書において記載される対応する例示的な態様と実質的に同じ機能を果たすまたは実質的に同じ結果をもたらす、現存するまたは後に開発される他の物質組成物、手段、使用、方法、または工程も、本発明に従って同様に使用され得る。

【実施例】

【0076】

実験実施例

本実施例では、細胞表面マーカーに対する組換え的に生成されたFab断片を、レセプター結合試薬として使用する。そのFab断片は、大腸菌 (E.coli) または他の宿主において組換え的に発現され、結合パートナーCとしてストレプトアビジン結合ペプチドを含む。四量体ストレプトアビジンまたは四量体ストレプトアビジンムテインが、一つまたは複数の結合部位Zを提供する。Fab断片は、ストレプトアビジンに結合され、そのストレプトアビジン自体は、ビーズに共有結合的に連結されている。これらのビーズを、そのFab断片が結合できる細胞外タンパク質 (レセプター分子) を有する細胞の垂集団を含む細胞懸濁液のアフィニティーカラムクロマトグラフィーのために使用する。結合しなかった細胞は、この「選択カートリッジ」において洗い流される一方で、結合した細胞は、続いて、Fab断片 (レセプター結合試薬として作用する) のストレプトアビジン結合ペプチドとストレプトアビジンムテインとの結合を破壊するビオチン含有緩衝液によって溶出される。結果として、細胞と結合したFab断片が、カラムから放出され、アビディティー効果がなくなることに起因して、Fab断片は標的細胞から解離する。ここで、その懸濁液は、ストレプトアビジンと共有結合的に結合した別のゲル (クロマトグラフィー) マトリックスを使用する第2のカラムクロマトグラフィー (除去カートリッジ) によって、残留Fab断片およびビオチンから精製され得、それにより、細胞は空隙容量に溶出し、Fab断片およびビオチンはクロマトグラフィーマトリックス上に定量的に結合する。ここで、それらの細胞は、同様の方法で、異なるFab断片または他の任意のレセプター結合試薬を使用するさらなる精製サイクルにかけられ得る。Fab断片を有するカラム (選択カートリッジ) ならびにFab断片およびビオチン除去用のその後のカラム (除去カートリッジ) は、カラムを次々と直線的に単純に並べることによって連続した様式で組み合わせられ得る。そうすることによって、磁気ビーズを欠くかまたはいかなる手作業による中断 (manual interference) もない、標的細胞の迅速かつ容易なコスト効率の高い精製を可能にする、図6に示されているような自動化された細胞精製システムが、本発明によって提供され得る。

【0077】

この手順により、例えば、CD4 + 精製から開始した後、CD8 + 画分からのCD25 + 精製による、T細胞の連続精製が可能になり、下に示されるような高度に濃縮された制御性T細胞の画分がもたらされる。当然のことながら、異なるFab断片を使用するさらなる精製サイクルも可能である。

【0078】

ヒト血液からのCD8 + T細胞の単離 (典型的な1工程精製)

材料および方法

標準的な手順でPCMBを単離するためにヒト血液を使用した。

【0079】

実施例1: カラムクロマトグラフィーを介したCD8 + 細胞の1工程精製

Sephadex G50 (Sigma) を、固定相として使用し、CNBr法を用いてStrep-tactin (登録商標) (組換えストレプトアビジン変種, IBA GmbH, Germany) と共有結合的に結合した。Sephadex G50の50%懸濁液は、共有結合的に結合した70マイクログラムのStrep-tactin (登録商標) /mlビーズ懸濁液を含んだ。Strep-tactin (登録商標) は、レセプター結合試薬および標的細胞を含むサンプルを加える前に親和性マトリックスに固定化された親和性試薬として働いた。重鎖がカルボキシ末端で2つのストレプトアビジン結合モジュールの連続配置 (SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK), IBA GmbH, Göttingen, Germanyから商業的に入手可能 (カタログ番号: 6-8003) と融合されたCD8 + 結合Fab断片を、(一価の) レセプター結合試薬として使用し、ストレプトアビジン結合ペプチドは、結合パートナーCとして働いた。

【0080】

Fab断片とCD8 + 標的細胞とを結合させるために、Strep-tactin (登録商標) を含む2 mlのSephadex G50の懸濁液を、10マイクログラムのCD8 + 結合Fab断片と4 で20分間インキュベートした。次いで、その懸濁液を、底部に90マイクロメートルのフリットを含むブラ

スチックミニカラム (Mobitec, Göttingen, Germany) に満たした。したがって、このカラムは、本明細書において定義されるような選択カートリッジとして作用する。そのカラムを、0.5%ウシ血清アルブミンを含むPBS (リン酸緩衝食塩水) (PBSA緩衝液) で平衡化することにより、1 mlの床体積を得た。次いで、サンプルをそのアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに通すために、1 mlのPBSA中のPCMB由来の500万個の細胞をそのカラムにロードした。次いで、そのカラムを12 mlのPBSAで洗浄した。洗浄緩衝液を回収し、3000gで6分間遠心分離して、カラムから洗浄された細胞をペレットにした (ペレット1)。その後、レセプター結合作用物質および多量体化作用物質を介してカラム上に可逆的に固定化されたCD8+細胞を溶出するために、競合試薬として0.1ミリモルのBiotin (Sigma) を含む6 mlのPBSAをそのカラムに加えた。ビオチンを含む画分を回収し、上記のように遠心分離して、細胞をペレットにした (ペレット2)。

10

【0081】

両方の画分からのペレットを、解析のために1 mlのPBSA緩衝液に再懸濁した。

【0082】

ペレット1は、約390万個の細胞を含み、ペレット2は、70万個の細胞を含んだ。

【0083】

FACS解析 (データ示さず) は、ペレット1と比較して、出発物質からCD8+細胞が大きく激減しており (およそ70%)、ペレット2は、68%純度のCD8+細胞を示すことを示した。したがって、CD8+標的細胞は、可逆的な固定化/アフィニティークロマトグラフィーを介して単離され得る。

20

【0084】

この結果は、PBMCからのCD8+細胞の濃縮についての以下の実験によって確かめられ、その実験の結果は、図5に示されている。2本のカラムにおいて濃縮が行われ、その両方のカラムが、上で説明したようにStrep-Tactin (登録商標) と結合したSephadex-50樹脂を含んだ。第1のカラム (選択カートリッジ) (図解B~D) に、上に記載されたIBA GmbHから商業的に入手可能なCD8結合Fab断片をロードした。第2のカラム (図解E~G) は、この選択カートリッジに対する陰性対照として働き (選択カートリッジの後に配置される「第2カラム」である除去カートリッジと混同してはならない)、それには、このCD8結合Fab断片をロードしなかった。したがって、第1のカラムは、CD8-Fab特異的な細胞濃縮を示すはずであるのに対し、第2のカラム (陰性対照) は、示さないはずである。濃縮を測定するために、PBMC中のCD8+T細胞の細胞集団を、選択手順を開始する前に測定した (図5、図解A、CD8+T細胞18.4%、右上の四半分)。第1のカラム上にPBMC画分を供した後、減速されなかった細胞のフロースルーを測定する (図解B、CD8+T細胞6.3%)。12.1% (18.4%~6.3%) または66%のCD8+T細胞が、そのカラムに結合した。次いで、これらの細胞は、Strep-タグ/Strep-tactin (登録商標) 相互作用を破壊するビオチン緩衝液を加えることおよびその後の洗浄工程によって、特異的に溶出されることができた (図解C+D、CD8+T細胞47%および62.2%)。対照的に、フロースルー画分 (図解E、CD8+T細胞17.0%) および溶出画分 (図解FおよびG) 中のCD8+T細胞集団は、選択手順前に測定されたもの (図解A) と有意に異ならないので、第2のカラムにおいてCD8+T細胞の濃縮は見られなかった (図解D-E-F-G)。適用された細胞のおよそ1%の差異は、そのカラム上に非特異的に結合した細胞を説明し、供されたPBMCの95%がカラムを通過することを示している。

30

40

【0085】

実施例2: CD8+細胞からのビオチンおよびFabの除去

ビオチン溶出後の細胞 (6 mlの緩衝液) を、Strep-Tactin (登録商標) (IBA GmbH, Göttingen, Germany) が300 nmolビオチン/mlの結合能で共有結合的に付着されたSuperflow (商標) Sepharose (登録商標) ビーズのカラム (6 mlの床体積) に直接通したことを除いては上に記載されたように、CD8+細胞を単離した。そのSuperflow (商標) Sepharose (登録商標) ビーズは、標的細胞を単離/濃縮するためのゲル浸透マトリックスとして働く一方で、そのビーズ上に固定化されたStrep-Tactin (登録商標) は、ストレプトアビジン結合ペプチドを備えるCD8+Fab断片とビオチンの両方に対して結合親和性を有する。し

50

たがって、Strep-Tactin (登録商標) は、ビオチンおよびCD8 + Fab断片に対する親和性/除去試薬として働いた。Superflowビーズで満たされたこの第2カラム (除去カートリッジとして作用した) の溶出液 (6 ml) を回収した。

【0086】

ビオチンおよびFab断片は、ウエスタンブロッティングを用いるビオチンアッセイおよびFab断片アッセイを使用したとき、標的細胞を含む溶出液中で検出可能でなかった (結果示さず)。類似の実験を、FITC標識ビオチン (Sigma) および蛍光標識CD8 + Fab (IBA GmbH) を用いて行った。この最終的な溶出液が、Fab断片またはビオチンを含まなかったという事実は、高感度の蛍光計を用いて測定したとき、確かめられた。したがって、ビオチンおよびFabが、完全に除去されたのに対し、Superflow (商標) /Strep-Tactin (登録商標) クロマトグラフィー後の溶出液は、95% ~ 100%のCD8 + 細胞を含み、細胞の明らかな損失は見られないことが見出された。

10

【0087】

実施例3: 「リニアフロー (linear flow)」クロマトグラフィーにおける連続精製

実験2に記載されたような最終的な画分は、ビオチンおよびFab (この両方もが、Strep-Tactin (登録商標) 上のFab結合部位を遮断することによって、その後の精製手順を妨げ得る) を含まなかったため、精製されたCD8 + 細胞は、例えば、CD25 + Fab断片 (または単離されたCD8 + 標的細胞の表面上に存在する他の任意のレセプター分子) を使用する、別の精製サイクルに進むことができる。そのようなT細胞の連続精製は、例えば、図6aまたは図6bに描かれている装置を使用して行うことができる。

20

【0088】

実施例4: 平面マトリックス (Strep-Tactin (登録商標) でコーティングされたニトロセルロース膜) におけるクロマトグラフィーによる細胞の精製

この実験では、実施例1および2において細胞を精製するために使用された (「3次元」) カラムクロマトグラフィーマトリックス (Strep-Tactin (登録商標) でコーティングされたビーズ) を、Strep-Tactin (登録商標) でコーティングされた平面マトリックスで置き換えた。

実験手順:

1) ニトロセルロース膜へのStrep-Tactin (登録商標) の非共有結合的付着およびCD8 + T細胞の精製

30

その膜へのStrep-Tactin (登録商標) の非共有結合的付着のために、ニトロセルロース膜片 (24cm², Whatman, UK) をペトリ皿に置き、10 mlのPBS中の4mgのStrep-tactin (登録商標) (IBA GmbH) とともに10分間インキュベートし、次いで、20 mlのPBSで5回洗浄した。次いで、5マイクログラムのCD8 + Fab断片 (カタログ番号: 6-8003-005, IBA GmbH, Gottingen, 前出) を5 mlのPBSに加え、4 で5分間インキュベートした。次いで、FACS緩衝液 (PBS pH7.4中の0.5% BSA (w/v)) 中の500万個の細胞 (PBMC) を加え、4 で10分間インキュベートした。次いで、その膜を、10 mlのFACS緩衝液で5回洗浄し、洗浄画分をFACS解析のために回収した。次いで、その膜を、1 mmolのビオチンを含む10 mlのFACS緩衝液中で5分間インキュベートした。得られた画分を、FACS解析のために回収した。

【0089】

40

このFACS解析は、ビオチン含有画分が、CD8 + T細胞に関して99.1% 純粋であることを示した。CD8 + 細胞の収率は、出発物質に対して約1.5% だった。したがって、この実験は、標的細胞が、「バッチ様」様式で平面クロマトグラフィーを使用することにより、効率的に単離され得ることを示している。

【0090】

実施例5: Superflow (商標) Agaroseを用いるカラムクロマトグラフィーを介したヒトCD8 + 細胞の1工程精製

3 mlのSuperflow Strep-Tactin (登録商標) (300ナノモルのビオチン結合, IBA GmbH, Gottingen, Germany) をミニカラム (Mobitec, Gottingen, Germany) 上にロードした。そのカラムを緩衝液 (PBS + 0.5% ウシ血清アルブミン, 「FACS緩衝液」) で平衡化し、

50

次いで、CD8に対する12マイクログラムのFab（カタログ番号:6-8003, IBA GmbH, Gottingen）とともに予めインキュベートしておいたヒト血液由来のPBMC（0.2 mlのFACS緩衝液中1000万個の細胞）をロードした（上で述べたように、このFab断片の重鎖は、カルボキシ末端で、2つのストレプトアビジン結合モジュール

SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK

の連続配置と融合された。このカラムは、本明細書において定義されるような選択カートリッジとして作用する。このカラムを、重力流により12 mlのFACS緩衝液で洗浄し、次いで、1 mMピオチンを含む12 mlのFACS緩衝液を用いて溶出を行った。

【0091】

そのFACS緩衝液の洗浄画分（12 ml）は、7.98%のCD8+細胞を含んだ開始画分（A）に対して1.77%のCD8+細胞しか含まなかったため、77.8%のCD8+細胞が、カラムで減速された。ピオチン含有緩衝液画分（B、12 ml）による溶出は、98.5%の純度で、およそ65%の結合したCD8+細胞をもたらした。この実験もまた、CD8+標的細胞が、商業的に入手可能なクロマトグラフィーマトリックスを使用する本明細書において記載されるような可逆的な固定化/アフィニティークロマトグラフィーを介して単離され得ることを示す。

【0092】

実施例6:カラムクロマトグラフィーを介したヒトCD8+細胞の1工程精製

10 µgの抗CD8Fab断片（カタログ番号:6-8003, IBA GmbH, Gottingen）で機能付与された500 µlのStrep-Tactin（登録商標）-アガロース（Superflow（商標）Agaroseと比べて排除サイズが小さい架橋アガロースをAgarose Beads Technologies, Madrid, Spainから入手した）ビーズ樹脂から調製されたカラムを使用することによって、ヒトCD8+細胞を、密度勾配（Ficoll）精製されたPBMCから単離した。この目的のために、2つのストレプトアビジン結合モジュール

SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK

の連続配置を重鎖のC末端に有するFab断片を、細胞精製の前に、1000 µlのFab含有洗浄緩衝液（PBS+0.5%ウシ血清アルブミン）をカラムの上に300 µl/分の速度でポンピングすることによって、Strep-Tactin（登録商標）-アガロースマトリックス上にロード（固定化）した。標的細胞を精製するために、 1×10^8 個の調製されたばかりのPBMC（2 mlの洗浄緩衝液中）を、300 µl/分の流速で蠕動ポンプを用いてカラム上に自動的にロードした。

続いて、合計7 mlの洗浄緩衝液による2 ml/分の速度での反復洗浄サイクル（4×）によって、未結合（CD8陰性）の細胞をカラムから除去した。最後に、5 mlの100 µM D-ピオチン溶液を加え（ $V=600 \mu\text{l}/\text{分}$ ）、5 mlの洗浄緩衝液によって2 ml/分で溶出することによって、結合した細胞を親和性マトリックスから除去することによってカラムからCD8+標的細胞を溶出した。得られたCD8陽性および陰性画分をフローサイトメトリーによって解析した。CD8+標的細胞は、80%の収率および88%の純度で精製された。開始画分、陰性画分、および陽性画分のそれぞれのドットプロット、ならびに代表的な選択の対応する純度および収率を図7に示す。

【0093】

実施例7:全血からのカラムクロマトグラフィーを介したヒトCD8+細胞の1工程精製

30 µgの抗CD8Fab断片（カタログ番号:6-8003, IBA GmbH, Gottingen）で機能付与された1200 µlのStrep-Tactin（登録商標）-アガロース（Superflow（商標）アガロースと比べて排除サイズが小さい架橋アガロースをAgarose Beads Technologies Madrid, Spainから入手した）ビーズ樹脂から調製されたカラムを使用することによって、ヒトCD8+細胞を全血から精製した。この目的のために、2つのストレプトアビジン結合モジュール

SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK

の連続配置を重鎖のC末端に有するFab断片を、細胞精製の前に、1500 µlのFab断片含有洗浄緩衝液（PBS+0.5%ウシ血清アルブミン）をカラムの上に300 µl/分の速度でポンピングすることによって、Strep-Tactin（登録商標）-アガロースマトリックス上に固定化した。標的細胞を精製するために、10 mlの採取したばかりの全血（洗浄緩衝液で1:1希釈したもの）を、300 µl/分の流速で蠕動ポンプを用いてカラム上に自動的にロードした。続

10

20

30

40

50

いて、合計13 mlの洗浄緩衝液による2 ml/分の速度での反復洗浄サイクル(4×)によって、未結合(CD8陰性)の細胞をカラムから除去した。最後に、10 mlの100 μM D-ビオチン溶液を加え(V=600 μl/分)、10 mlの洗浄緩衝液によって2 ml/分で溶出することによって、結合した細胞を親和性マトリックスから除去することによってカラムからCD8+ 標的細胞を溶出した。得られたCD8陽性および陰性画分をフローサイトメトリーによって解析した。CD8+ 標的細胞は、80%の収率および88%の純度で精製された。開始画分、陰性画分、および陽性画分のそれぞれのドットプロット、ならびに代表的な選択の対応する純度および収率を図8に示す。

【0094】

実施例8:脾細胞からのマウスCD4+ 細胞のピペットベースの1工程精製

2 μgの抗CD4Fab断片で機能付与された80 μlのStrep-Tactin(登録商標)-アガロースビーズ樹脂(Superflow(商標)アガロースと比べて排除サイズが小さい架橋アガロースをAgarose Beads Technologies, Madrid, Spainから入手した)をロードされたピペットチップを使用することによって、CD4+ 細胞を、脾細胞から単離した。そのピペットチップは、Phynexus Inc., USAによって、アガロース材料で満たされた。2つのストレプトアビジン結合モジュール

SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK

の連続配置を重鎖のC末端に有する使用されたFab断片は、CD4結合抗体GK1.5(Dialynas D P et al., Immunol Rev. 1983;74:29-56, GenBank Entryカップー軽鎖:M84148.1GenBank Entry重鎖:M84149.1)の野生型可変ドメインを含んだ。細胞精製の前に、Streptactin(登録商標)-アガロースマトリックス上へのFab断片のロード/固定化が、手持ち式の電子ピペットを用いて400 μlのFab断片含有洗浄緩衝液(PBS+0.5%ウシ血清アルブミン)を300 μl/分の速度でアガロースクロマトグラフィーマトリックス上にピペッティングすることによって、行われた。標的細胞を精製するために、 1×10^7 個のマウス脾細胞(0.5 mlの洗浄緩衝液中)を、300 μl/分の速度でピペットを使用して3回繰り返されるサンプルの上下サイクルによって、チップ内に存在するクロマトグラフィーマトリックス上に適用した。細胞を含む緩衝液を上下に動かすこの「バッチ様」クロマトグラフィー手順は、クロマトグラフィーマトリックス上に細胞を固定化するために流動ベースの方法を使用する手順と等価である。続いて、1 mlの洗浄緩衝液によって2 ml/分の速度で3回繰り返し洗浄することによって(洗浄緩衝液を上下にピペッティングすることによって)未結合(CD4陰性)の細胞をチップから除去した。最後に、1 mlの100 μM D-ビオチン溶液を加え(V=600 μl/分)、2 ml(2×1 ml)の洗浄緩衝液によって流速2 ml/分で溶出することによって、結合した細胞を親和性マトリックスから除去することによってチップからCD4+ 標的細胞を溶出した。得られたCD4陽性および陰性画分をフローサイトメトリーによって解析した。CD8+ 標的細胞は、95%の収率および85%の純度で精製された。開始画分、陰性画分、および陽性画分のそれぞれのドットプロット、ならびに代表的な選択の対応する純度および収率を図9に示す。

【0095】

実施例9:カラムクロマトグラフィーを介したヒトCD4+ 細胞の1工程精製

2 μgの抗CD4Fab断片で機能付与された80 μlのStrep-Tactin(登録商標)-アガロース(Superflow(商標)Agaroseと比べて排除サイズが小さい架橋アガロースをAgarose Beads Technologies, Madrid, Spainから入手した)ビーズ樹脂をロードされたピペットチップを使用することによって、ヒトCD4+ 細胞を、密度勾配(Ficoll)精製されたPBMCから単離した。使用されたCD4Fab断片は、米国特許第7,482,000号およびBes, C, et al. J Biol Chem 278, 14265-14273(2003)に記載されている13B8.2Fab断片の変異体だった。「m13B8.2」と呼ばれる変異体Fab断片は、米国特許第7,482,000号に記載されているように、CD4結合マウス抗体13B8.2の可変ドメイン、ならびに重鎖に対してはガンマ1タイプ(type gamma1)の定常ヒトCH1ドメインおよびカップータイプの定常ヒト軽鎖ドメインからなる定常ドメインを有する。m13B8.2における13B8.2Fab断片の可変ドメインと比べて、軽鎖の91位のHis残基(SEQ ID NO: 2における93位)は、Alaに変異しており、重鎖の53位のArg

10

20

30

40

50

残基 (SEQ ID NO: 1における55位) は、Alaに変異している。さらに、Fab断片m13B8.2は、2つのストレプトアビジン結合モジュール SAWSHPQFEK(GGGG)₂GGSAWSHPQFEK

の連続配置を重鎖のC末端に有する。そのFab断片を、細胞精製の前に手持ち式の電子ピペットを用いて200 µlのFab断片含有洗浄緩衝液を300 µl/分の速度でピペッティングすることによって、Strep-Tactin (登録商標) -アガロースマトリックス上に固定化した。標的細胞を選択するために、 1×10^7 個の調製したばかりのPBMC (0.5 mlの洗浄緩衝液中) (PBS + 0.5% ウシ血清アルブミン) を、300 µl/分の速度でピペットを使用して3回繰り返されるサンプルの上下サイクルによって、チップ内に存在するクロマトグラフィーマトリックス上に自動的に適用した。続いて、1 mlの洗浄緩衝液によって2 ml/分の速度で3回繰り返し洗浄することによって (洗浄緩衝液を上下にピペッティングすることによって)、未結合 (CD4陰性) の細胞をチップから除去した。最後に、1 mlの100 µM D-ビオチン溶液を加え (V = 600 µl/分)、2 ml (2 × 1 ml) の洗浄緩衝液によって2 ml/分の流速で溶出することによって、結合した細胞を親和性マトリックスから除去することによってチップからCD4+ 標的細胞を溶出した。得られたCD4陽性および陰性画分をフローサイトメトリーによって解析した。CD4+ 標的細胞は、90%の収率および99%の純度で精製された。開始画分、陰性画分、および陽性画分のそれぞれのドットプロット、ならびに代表的な選択の対応する純度および収率を図10に示す。

【 0 0 9 6 】

実施例10: 全血からのヒトCD4+ 細胞のピペットベースの1工程精製

0.5 µgの抗CD4Fab断片で機能付与された80 µlのStrep-Tactin (登録商標) -アガロース (Superflow (商標) Agaroseと比べて排除サイズが小さい架橋アガロースをAgarose Beads Technologies, Madrid, Spainから入手した) ビーズ樹脂をロードされたピペットチップを使用することによって、CD4+ 細胞を全血から単離した。実施例9において使用されたCD4結合Fab断片m13B8.2を、実施例10でも使用した。そのFab断片を、細胞単離の前に手持ち式の電子ピペットを用いて200 µlのFab含有洗浄緩衝液を300 µl/分の速度でピペッティングすることによって、Strep-Tactin (登録商標) -アガロースマトリックス上に固定化した。標的細胞を単離するために、2 mlの採取したばかりの全血 (洗浄緩衝液で1:1希釈したもの) (PBS + 0.5% ウシ血清アルブミン) を、300 µl/分の速度でピペットを使用して3回繰り返される上下サイクルによって、チップ内に存在するクロマトグラフィーマトリックス上に自動的に適用した。続いて、1 mlの洗浄緩衝液によって2 ml/分の速度で5回繰り返し洗浄することによって (上下にピペッティングすることによって) 未結合 (CD4陰性) の細胞をチップから除去した。最後に、1 mlの100 µM D-ビオチン溶液を加え (V = 600 µl/分)、2 ml (2 × 1 ml) の洗浄緩衝液によって2 ml/分で溶出することによって、結合した細胞を親和性マトリックスから除去することによってチップからCD4+ 標的細胞を溶出した。得られたCD4陽性および陰性画分をフローサイトメトリーによって解析した。CD4+ 標的細胞は、88%の収率および70%の純度で精製された。開始画分、陰性画分、および陽性画分のそれぞれのドットプロット、ならびに代表的な選択の対応する純度および収率を図11に示す。

【 0 0 9 7 】

この文脈において、実施例4~11において得られた標的細胞、溶離剤としてのビオチン、およびそれぞれのレセプター結合試薬としてのFab断片のさらなる精製またはさらなる使用は、実施例2に記載されたように「除去カートリッジ」を用いて標的細胞サンプルから除去され得ることに注意する。

【 0 0 9 8 】

本明細書における以前に公開された文書の一覧または記述は、その文書が当技術分野の状況の一部であるかまたは共通の一般知識であるという承認と必ずしも解釈されるべきでない。

【 0 0 9 9 】

本明細書において例証的に記載される本発明は、本明細書において明確に開示されていない任意のエレメント、限定の非存在下においても適切に実施され得る。したがって、例えば、用語「含む (comprising)」、「含む (including)」、「含む (containing)」などは、制限なく拡張的に読み取られるものとする。さらに、本明細書において使用される用語および表現は、限定ではなく説明の用語として使用されており、示されるおよび記載される特徴またはその一部の任意の等価物を除外するような用語および表現の使用を意図しておらず、主張される本発明の範囲内で様々な改変が可能であることが認識される。したがって、本発明は、例示的な態様および随意の特徴によって明確に開示されているが、本明細書において開示され具体化される本発明の改変およびバリエーションは、当業者によって用いられ (resorted) 得、そのような改変およびバリエーションは、本発明の範囲内であるとみなされると理解されるべきである。

10

【0100】

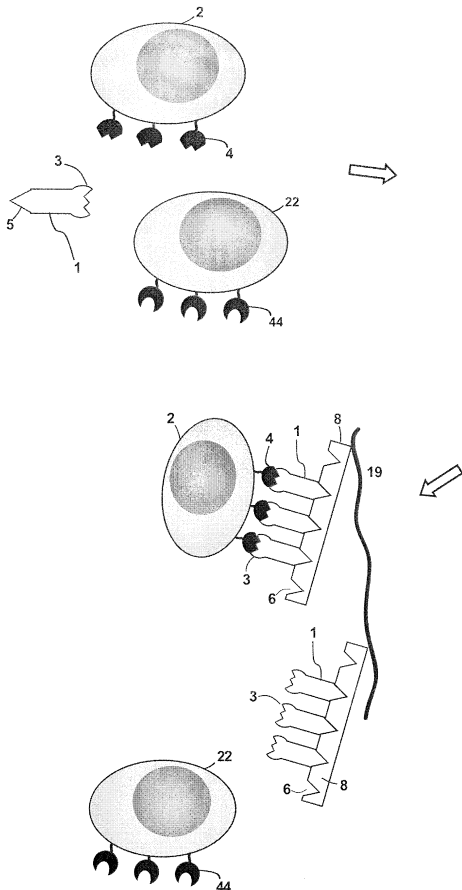
本発明は、本明細書において広く一般的に説明されてきた。その一般的な開示の範囲内に含まれるより狭い種類および亜属の分類の各々も、本発明の一部を形成する。これは、削除される材料が本明細書において明確に列挙されているか否かに関係なく、その属から任意の主題を除去する条件またはネガティブな限定を伴う、本発明の一般的な説明を含む。

【0101】

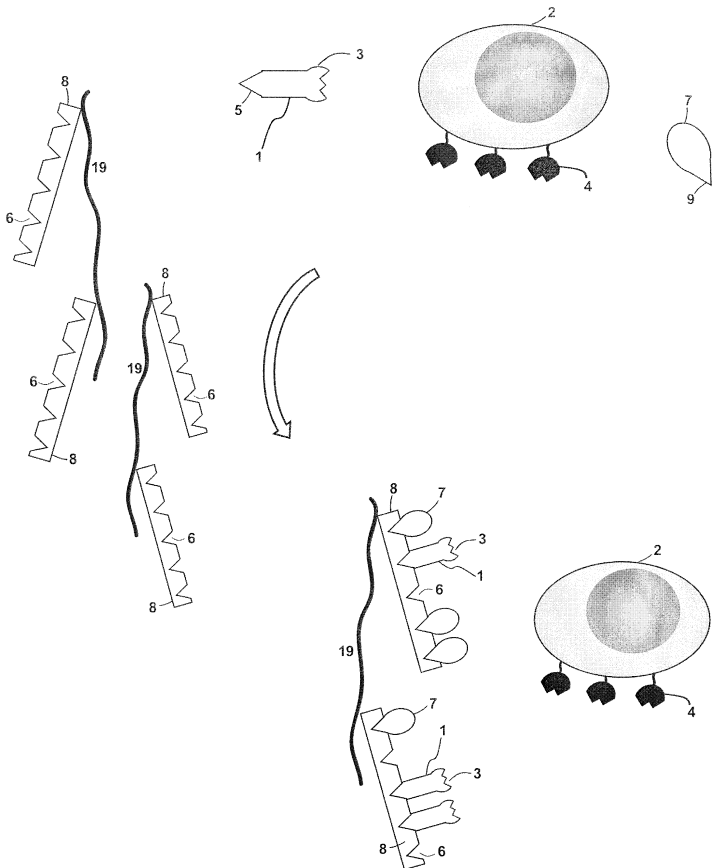
他の態様は、以下の請求項の範囲内である。さらに、本発明の特徴または局面が、マーカッシュ群に関して記載される場合、当業者は、本発明が、そのマーカッシュ群の任意の個別のメンバーまたはメンバーの亜群に関して記載されていることを認識するだろう。

20

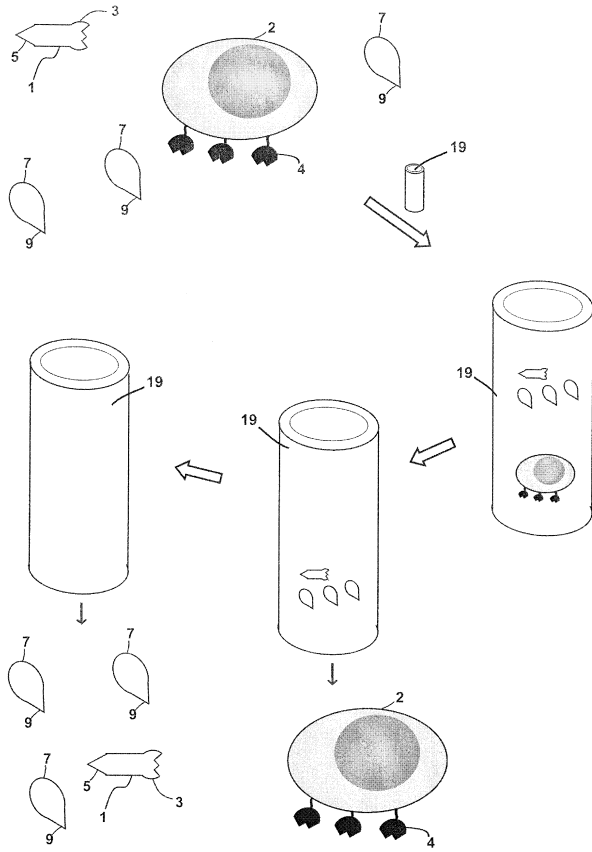
【図1】



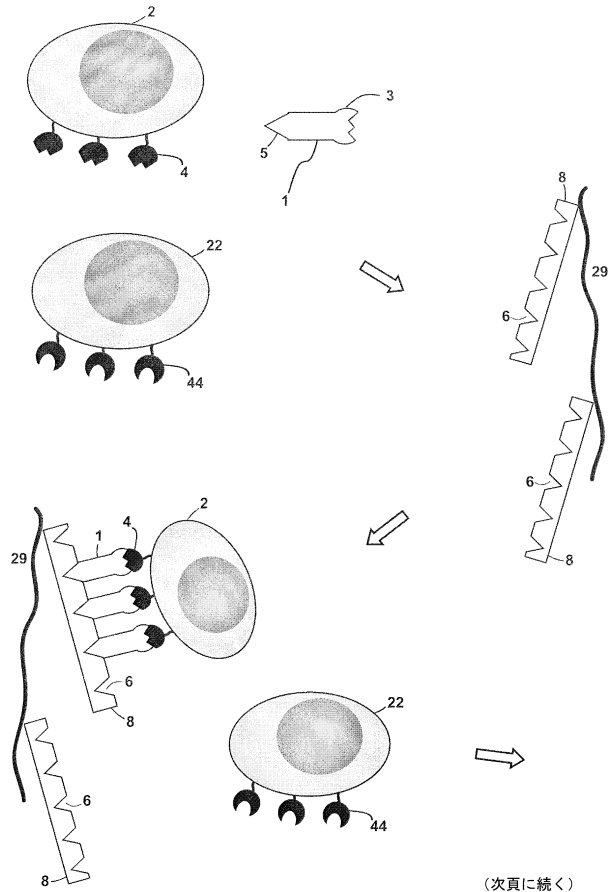
【図2】



【図3】

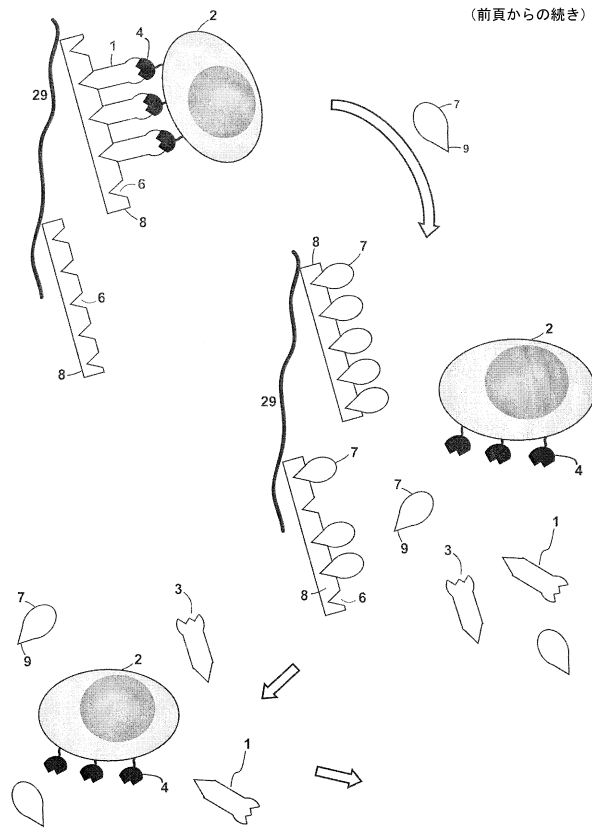


【図4-1】



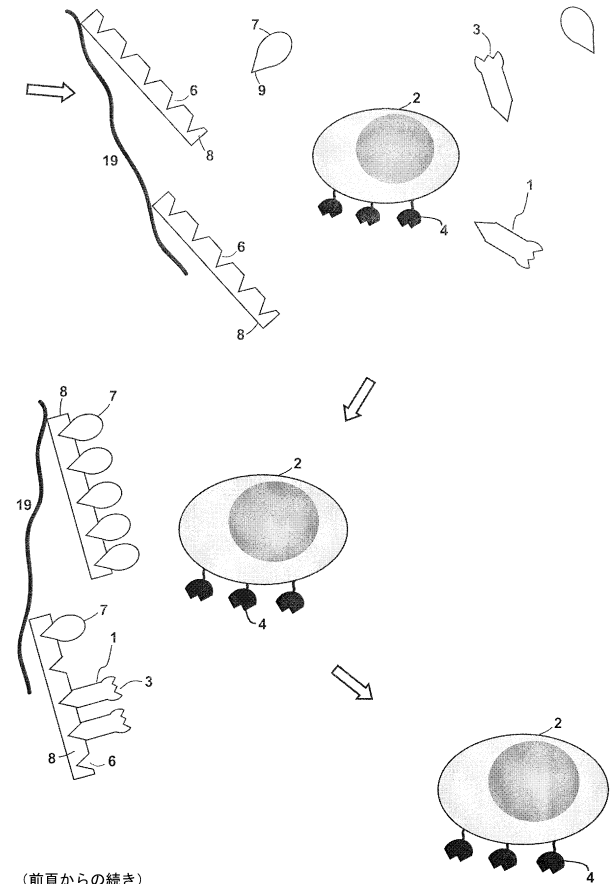
(次頁に続く)

【図4-2】



(次頁に続く)

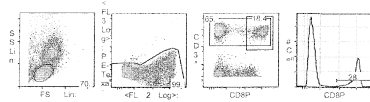
【図4-3】



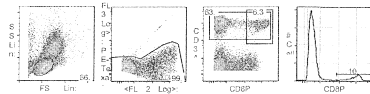
(前頁からの続き)

【図5】

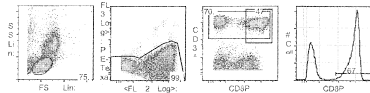
A. 選択前



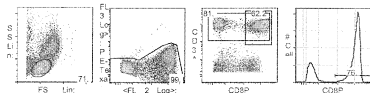
B. 洗浄通過画分



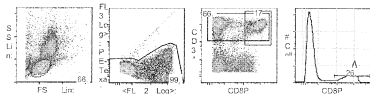
C. 1.D-ビオチンでの溶出直後の画分



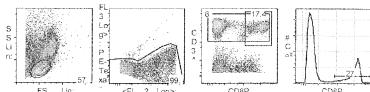
D. 2.D-ビオチンおよびそれに続く洗浄の後の溶出画分



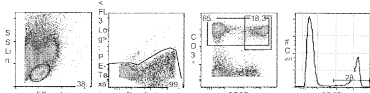
E. 洗浄通過画分



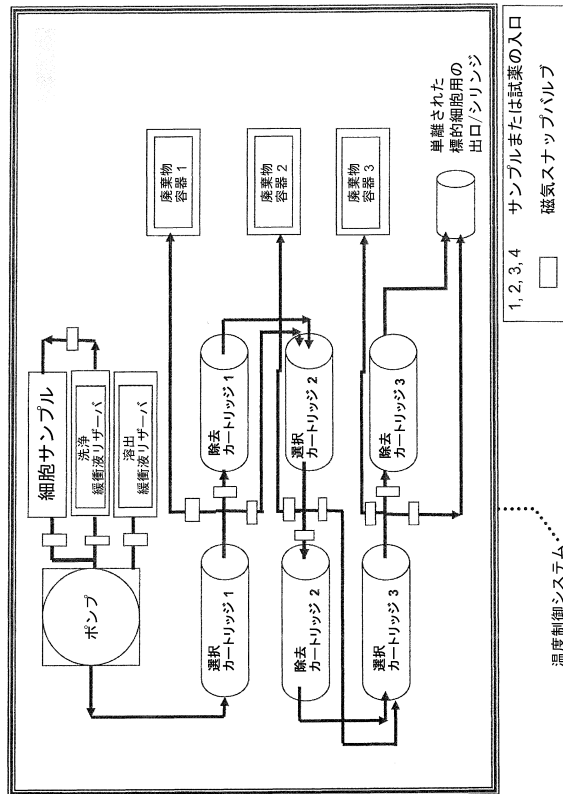
F. 1.D-ビオチンでの溶出直後の画分



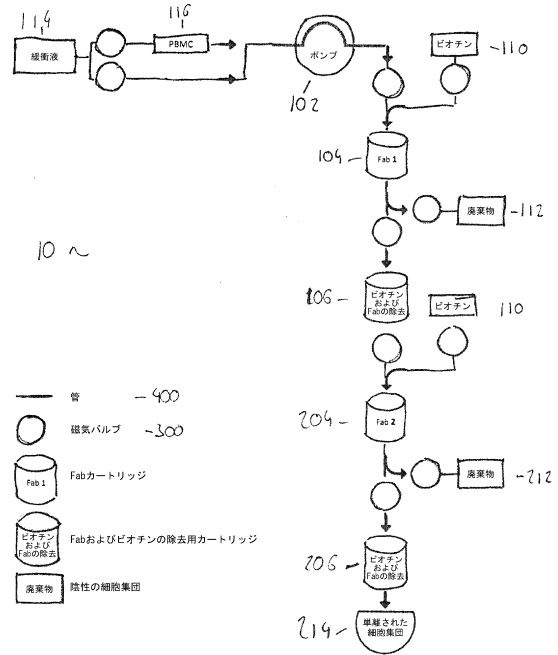
G. 2.D-ビオチンおよびそれに続く洗浄の後の溶出画分



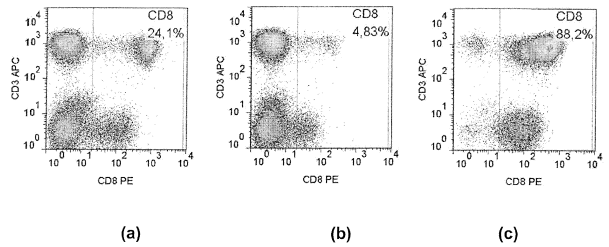
【図6b】



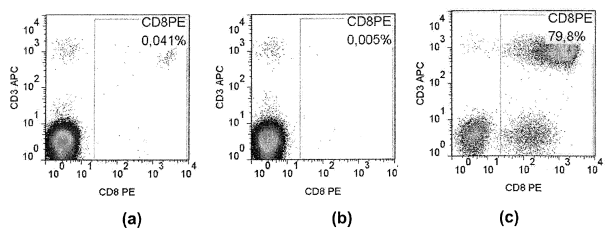
【図6a】



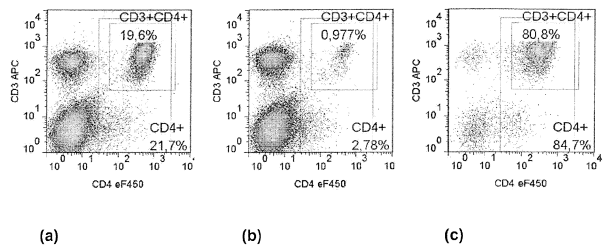
【図7】



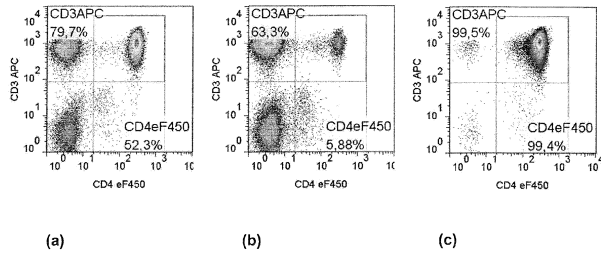
【図8】



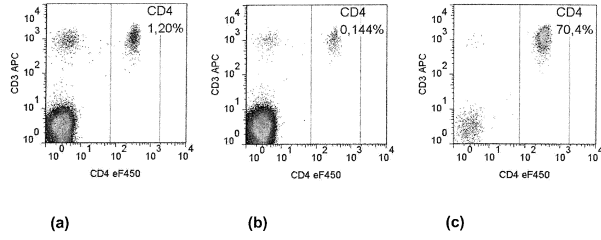
【図9】



【 図 10 】



【 図 11 】



【 配列表 】

0006362543000001.app

フロントページの続き

| | | | | |
|--------------------------|--|----------------|--|---|
| (51) Int.Cl. | | F I | | |
| G 0 1 N 33/548 (2006.01) | | B 0 1 J 20/281 | | G |
| G 0 1 N 33/545 (2006.01) | | G 0 1 N 33/548 | | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | | G 0 1 N 33/53 | | U |
| C 1 2 Q 1/04 (2006.01) | | G 0 1 N 33/545 | | Z |
| C 1 2 M 1/00 (2006.01) | | C 1 2 N 5/10 | | |
| | | C 1 2 Q 1/04 | | |
| | | C 1 2 M 1/00 | | Z |

(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 スタッドラー ハーバート
ドイツ連邦共和国 ニーメタール ハードフェルド 2 2

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 米国特許出願公開第2008/0255004 (US, A1)
特表2009-531062 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 0 0

C 1 2 M 1 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

W P I D S / W P I X (S T N)

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 色谱分离细胞和其他复杂的生物材料 | | |
| 公开(公告)号 | JP6362543B2 | 公开(公告)日 | 2018-07-25 |
| 申请号 | JP2014558137 | 申请日 | 2013-02-25 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 舞台细胞治疗門EM为主硬 | | |
| [标]发明人 | スタッドラーハーバート | | |
| 发明人 | スタッドラー ハーバート | | |
| IPC分类号 | C12N5/07 G01N33/543 G01N33/53 B01J20/281 B01J20/285 G01N33/548 G01N33/545 C12N5/10 C12Q1/04 C12M1/00 | | |
| CPC分类号 | G01N1/405 G01N33/54306 G01N33/56966 G01N33/56972 G01N2333/7051 G01N2333/70517 | | |
| FI分类号 | C12N5/07 G01N33/543.511.N G01N33/53.ZNA.Y B01J20/281.R B01J20/285.T B01J20/281.G G01N33/548 G01N33/53.U G01N33/545.Z C12N5/10 C12Q1/04 C12M1/00.Z | | |
| 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 | | |
| 审查员(译) | 太田雄三 | | |
| 优先权 | 61/602150 2012-02-23 US | | |
| 其他公开文献 | JP2015512621A5 JP2015512621A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及靶细胞或其他复杂生物材料的色谱分离，特别是通过柱色谱，例如亲和色谱或凝胶渗透色谱。本发明使用受体结合试剂，其结合位于靶细胞表面的受体分子。本发明一般提供一种分离生物材料如细胞，细胞器，病毒等而不留痕迹的新方法。本发明还涉及用于分离细胞和其他复杂生物材料的装置。

| | | |
|--|------------------------------|--|
| (19) 日本国特許庁(JP) | (12) 特許公報(B2) | (11) 特許番号 特許第6362543号 (P6362543) |
| (45) 発行日 平成30年7月25日(2018.7.25) | (24) 登録日 平成30年7月6日(2018.7.6) | |
| (51) Int. Cl. | F 1 | |
| C 1 2 N 5/07 (2010.01) | C 1 2 N 5/07 | |
| G O 1 N 33/543 (2006.01) | G O 1 N 33/543 | 5 1 1 N |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 | Z N A Y |
| B O 1 J 20/281 (2006.01) | B O 1 J 20/281 | R |
| B O 1 J 20/285 (2006.01) | B O 1 J 20/285 | T |
| | 請求項の数 31 | (全 49 頁) 最終頁に続く |
| (21) 出願番号 特願2014-558137(P2014-558137) | (73) 特許権者 514214106 | |
| (22) 出願日 平成25年2月25日(2013.2.25) | ジュノ セラピューティクス ゲームベ | |
| (65) 公表番号 特表2015-512621(P2015-512621A) | ーハー | |
| (43) 公表日 平成27年4月30日(2015.4.30) | ドイツ連邦共和国 ゲッチンゲン ルド | |
| (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/053650 | ルフ-ワイセル-シュトラーセ 28 | |
| (87) 国際公開番号 W02013/124474 | (74) 代理人 100102978 | |
| (87) 国際公開日 平成25年8月29日(2013.8.29) | 弁理士 清水 初志 | |
| 審査請求日 平成28年2月24日(2016.2.24) | (74) 代理人 100102118 | |
| (31) 優先権主張番号 61/602,150 | 弁理士 香名 雅夫 | |
| (32) 優先日 平成24年2月23日(2012.2.23) | (74) 代理人 100160923 | |
| (33) 優先権主張国 米国(US) | 弁理士 山口 裕孝 | |
| 前置審査 | (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】 細胞および他の複雑な生物学的材料のクロマトグラフィーによる単離 | | |