

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-528574

(P2004-528574A)

(43) 公表日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

GO 1 N 33/53

C 1 2 P 21/08

C 1 2 Q 1/02

GO 1 N 33/566

F I

GO 1 N 33/53

C 1 2 P 21/08

C 1 2 Q 1/02

GO 1 N 33/566

テーマコード (参考)

4 B O 6 3

4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 134 頁)

(21) 出願番号 特願2003-500287 (P2003-500287)  
 (86) (22) 出願日 平成14年5月28日 (2002.5.28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年11月26日 (2003.11.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/016783  
 (87) 国際公開番号 W02002/097122  
 (87) 国際公開日 平成14年12月5日 (2002.12.5)  
 (31) 優先権主張番号 60/293,822  
 (32) 優先日 平成13年5月26日 (2001.5.26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

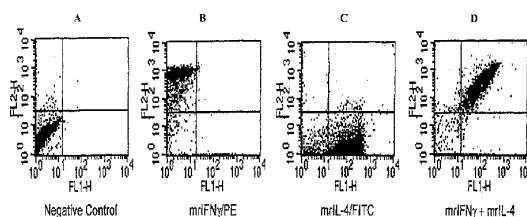
(71) 出願人 503433741  
 ワン セル システムズ インコーポレイ  
 テッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ  
 ンブリッジ インマン ストリート 1 O  
 O  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100108774  
 弁理士 橋本 一憲  
 (74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カプセル化細胞によるタンパク質の分泌法

## (57) 【要約】

本発明は、マイクロドロップにカプセル化した細胞から分泌されるタンパク質を解析する方法を提供する。マイクロドロップは、従来の製剤と比較しマトリックス分子に対するビオチンの比率を減じたビオチン化マトリックス分子と共に製剤化される。比率の低減は検出感度の改良に有利であり、これにより複数の分泌タンパク質および/または複数の細胞表面マーカーの同時検出が可能となる。本発明はさらに、特にIgMアイソタイプからスイッチしたIgGアイソタイプ抗体を単離する方法を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

マトリックス成分分子、マトリックス成分分子に結合した第1ビオチン分子、細胞により分泌される分子に対する親和性を有する第2ビオチン分子に結合した捕獲分子、ならびに第1および第2ビオチン分子に結合するストレプトアビジンを含み、第1ビオチン分子とマトリックス成分分子のモル比がモルマトリックス成分分子あたり0.85モル未満ビオチンであるマイクロドロップに細胞をカプセル化し、分子が細胞から分泌され捕獲分子に結合することによりマイクロドロップ内に保持されることと、分泌分子を検出することとを含む、分泌タンパク質を解析する方法。

10

## 【請求項 2】

モル比が0.01～0.2である、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

モル比が0.02～0.2である、請求項1記載の方法。

## 【請求項 4】

マイクロドロップ内の第1ビオチン分子の濃度が42マイクロモルまたはそれ以下である、請求項1記載の方法。

## 【請求項 5】

カプセル化段階においてマイクロドロップに複数の細胞をカプセル化する、請求項1記載の方法。

20

## 【請求項 6】

カプセル化段階においてマイクロドロップに単一の細胞をカプセル化する、請求項1記載の方法。

## 【請求項 7】

分泌分子がタンパク質、ホルモン、および炭水化物である、請求項1記載の方法。

## 【請求項 8】

分泌分子がタンパク質である、請求項1記載の方法。

## 【請求項 9】

ストレプトアビジンと捕獲分子を細胞と同時にマイクロドロップにカプセル化する、請求項1記載の方法。

30

## 【請求項 10】

カプセル化段階後にストレプトアビジンと捕獲分子をマイクロドロップに組み込む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 11】

マイクロドロップが第2分泌分子に対する親和性を有する第2捕獲分子をさらに含み、第2捕獲分子が第2ビオチン分子のさらなるコピーに結合する、請求項1記載の方法。

## 【請求項 12】

細胞が第2分子を分泌する、請求項11記載の方法。

## 【請求項 13】

マイクロドロップを分泌分子に対する特異的親和性を有する検出試薬と接触させ、検出試薬の分泌分子への結合を検出することにより検出段階を行う、請求項1記載の方法。

40

## 【請求項 14】

細胞がT細胞またはB細胞であり、検出試薬がT細胞またはB細胞に特異的に結合する抗原である、請求項13記載の方法。

## 【請求項 15】

検出試薬が標識してある、請求項13記載の方法。

## 【請求項 16】

分泌分子に結合した標識検出試薬のシグナルがマイクロドロップ内の分泌分子のコピー数に比例する、請求項15記載の方法。

## 【請求項 17】

50

検出試薬が蛍光標識してある、請求項13記載の方法。

【請求項18】

検出試薬が二次検出試薬により検出される産物を生成する酵素で標識される、請求項13記載の方法。

【請求項19】

マイクロドロップを分泌分子に対する特異的親和性を有する第1検出試薬および第2分泌分子に対する特異的親和性を有する第2検出試薬と接触させることにより検出段階を行い、第1および第2検出試薬が異なる方法で標識される、請求項13記載の方法。

【請求項20】

細胞が第3分泌分子を分泌し、マイクロドロップが第3分泌分子に対する親和性を有する第3捕獲分子をさらに含み、第3捕獲分子が第2ビオチン分子のさらなるコピーに結合し、マイクロドロップを分泌分子、第2分泌分子、第3分泌分子、および細胞表面マーカーのそれぞれに対する特異的親和性を有する第1、第2、第3、および第4検出試薬と接触させることをさらに含み、検出段階で分泌タンパク質、第2分泌タンパク質、第3分泌タンパク質、および細胞表面マーカーを検出する、請求項12記載の方法。

【請求項21】

マイクロドロップを分泌分子に対する親和性を有する第1検出試薬および細胞表面マーカーに対する親和性を有する第2検出試薬と接触させることにより検出段階を行い、第1および第2検出試薬が異なる方法で標識される、請求項13記載の方法。

【請求項22】

検出試薬と捕獲分子が分泌分子の異なるエピトープに特異的に結合する、請求項21記載の方法。

【請求項23】

2つ以上の分泌分子および/または表面マーカーを同時に検出する、請求項13記載の方法。

【請求項24】

検出段階をフローサイトメトリーにより行う、請求項1記載の方法。

【請求項25】

検出段階を顕微鏡観察により行う、請求項1記載の方法。

【請求項26】

マトリックス成分がアガロースである、請求項1記載の方法。

【請求項27】

分泌タンパク質が抗体である、請求項3記載の方法。

【請求項28】

分泌タンパク質がIgGアイソタイプの抗体であり、捕獲分子がIgGアイソタイプに対して特異的な抗体である、請求項3記載の方法。

【請求項29】

分泌タンパク質がサイトカインである、請求項3記載の方法。

【請求項30】

細胞を誘導して分泌分子の分泌を促すことをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項31】

カプセル化段階後に誘導を行う、請求項30記載の方法。

【請求項32】

カプセル化段階前に誘導を行う、請求項30記載の方法。

【請求項33】

細胞が分泌タンパク質をコードする核酸セグメントを含むベクターを含み、セグメントが分泌タンパク質の発現をもたらす1つまたはそれ以上のDNA制御セグメントに機能的に結合している、請求項8記載の方法。

【請求項34】

分泌タンパク質が細胞によって自然に分泌される、請求項30記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 35】

解析段階をフローサイトメトリーにより行う、請求項1記載の方法。

## 【請求項 36】

解析段階を顕微鏡観察により行う、請求項1記載の方法。

## 【請求項 37】

検出段階後に細胞を増殖させ細胞株を作製することをさらに含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 38】

細胞が患者から採取された、請求項37記載の方法。

## 【請求項 39】

細胞が細胞障害性T細胞である、請求項38記載の方法。

10

## 【請求項 40】

細胞の増殖により生じた細胞集団を患者に導入することをさらに含む、請求項37記載の方法。

## 【請求項 41】

細胞が幹細胞である、請求項37記載の方法。

## 【請求項 42】

患者が自己免疫疾患を罹患し、細胞がTh2細胞である、請求項37記載の方法。

## 【請求項 43】

細胞がインスリンを分泌する膵島細胞であり、患者が臨床症状を発症する前の前駆期にある、請求項37記載の方法。

20

## 【請求項 44】

増殖段階中に細胞をIL-10で処理することをさらに含む、請求項43記載の方法。

## 【請求項 45】

蛍光標識検出試薬の分泌分子および/または表面マーカーへの特異的結合によって生じる蛍光シグナルに基づき、セルソーターを用いて他の細胞から細胞を分離することをさらに含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 46】

細胞が第1および第2タンパク質を分泌し、マトリックスが第1および第2タンパク質のそれぞれに対する親和性を有する第1および第2捕獲分子を含み、解析段階が、細胞を第1および第2タンパク質に特異的に結合する第1および第2検出試薬と接触させ、第1および第2分泌タンパク質に結合した第1および第2検出試薬のシグナルから第1および第2タンパク質を検出することを含む、請求項8記載の方法。

30

## 【請求項 47】

細胞集団をマイクロドロップにカプセル化することと、  
第1マーカーが分泌タンパク質であり第2マーカーが細胞表面タンパク質または第2分泌タンパク質であるが、細胞を第1マーカーに対する第1検出試薬および第2マーカーに対する第2検出試薬と接触させることと、  
第1マーカーと第2マーカーの両方を有する細胞を検出することと  
を含む、細胞集団を解析する方法。

## 【請求項 48】

少なくともいくつかのマイクロドロップが単一細胞をカプセル化する、請求項47記載の方法。

40

## 【請求項 49】

パーコール、ポリショ糖、ジアトリゾエートナトリウム、またはイオジキサノール勾配により、細胞カプセル化マイクロドロップを非占有マイクロドロップから分離することをさらに含む、請求項47記載の方法。

## 【請求項 50】

固相支持体に吸着した細胞カプセル化マイクロドロップのアレイを作製することをさらに含む、走査型蛍光、比色、または化学発光検出器を用いて検出を行う、請求項47記載の方法。

50

## 【請求項 5 1】

物理的回収により固相支持体から目的のマイクロドロップを回収することをさらに含む、請求項50記載の方法。

## 【請求項 5 2】

顕微操作により物理的回収を行う、請求項51記載の方法。

## 【請求項 5 3】

細胞カプセル化マイクロドロップを薬剤と接触させることをさらに含み、検出により薬剤が分泌タンパク質のレベルに影響を及ぼすか否かが示される、請求項47記載の方法。

## 【請求項 5 4】

カプセル化段階前に細胞を薬剤と接触させ分泌を促進することをさらに含む、請求項47記載の方法。 10

## 【請求項 5 5】

カプセル化細胞が患者由来の細胞集団であり、薬剤が患者由来の別の細胞集団である、請求項47記載の方法。

## 【請求項 5 6】

細胞の亜集団が蛍光標識抗体の細胞表面マーカーへの結合および蛍光シグナルの検出により単離される、請求項47記載の方法。

## 【請求項 5 7】

細胞集団が患者から採取され、第1および第2マーカーの両方を有する細胞の存在が患者の免疫状態を示す、請求項47記載の方法。 20

## 【請求項 5 8】

第1および第2マーカーを有する細胞を増殖させ、増殖した細胞を患者に投与することをさらに含む、請求項47記載の方法。

## 【請求項 5 9】

細胞が抗原特異的T細胞である、請求項47記載の方法。

## 【請求項 6 0】

第1および第2マーカーがIL-4、IL-10、IFN、およびTNF からなる群より選択される、請求項47記載の方法。

## 【請求項 6 1】

特定の第1および第2タンパク質がIL-10およびIL-12からなる群より選択される、請求項47記載の方法。 30

## 【請求項 6 2】

同定する細胞がTh1細胞である、請求項47記載の方法。

## 【請求項 6 3】

同定する細胞がTh2細胞である、請求項47記載の方法。

## 【請求項 6 4】

第2マーカーがT細胞分化の細胞表面マーカーである、請求項47記載の方法。

## 【請求項 6 5】

マーカーの1つがCD4である、請求項47記載の方法。

## 【請求項 6 6】

マーカーの1つがCD8である、請求項47記載の方法。 40

## 【請求項 6 7】

マトリックス成分分子、マトリックス成分分子に結合した第1ビオチン分子、少なくとも1つの種類の分泌タンパク質のエピトープに対する親和性を有し、第2ビオチン分子に結合した少なくとも第1の捕獲分子、ならびに第1および第2ビオチン分子を結合するストレプトアビジンを含むマイクロドロップにタンパク質を発現する細胞集団をカプセル化し、それによりタンパク質が細胞から分泌されると第1捕獲分子に対する親和性を有するタンパク質がマイクロドロップ内に捕獲されることと、  
マイクロドロップ内の分泌タンパク質を解析することと  
を含む、細胞集団を解析する方法。 50

## 【請求項 68】

解析段階をフローサイトメトリーまたは顕微鏡観察により行う、請求項67記載の方法。

## 【請求項 69】

少なくともいくつかのマイクロドロップが単一細胞をカプセル化する、請求項67記載の方法。

## 【請求項 70】

細胞が同じタンパク質を様々なレベルで分泌し、解析段階においてそのレベルを比較する、請求項67記載の方法。

## 【請求項 71】

細胞が様々なタンパク質を分泌し、解析段階において特定のタンパク質を分泌する細胞を検出する、請求項67記載の方法。 10

## 【請求項 72】

細胞集団を患者から採取し、解析により細胞障害性T細胞の亜集団を同定し、その細胞亜集団を含まない細胞集団を患者に再導入することをさらに含む、請求項67記載の方法。

## 【請求項 73】

患者が自己免疫疾患、移植片対宿主病、または宿主対移植片病を罹患するかまたは罹患しやすい、請求項67記載の方法。

## 【請求項 74】

再導入段階前に、細胞亜集団を含まない細胞集団をIL-10で処理することをさらに含む、請求項67記載の方法。 20

## 【請求項 75】

マイクロドロップがマトリックス成分分子、マトリックス成分分子に結合した第1ビオチン分子、細胞により分泌されるタンパク質に対する親和性を有する第2ビオチン分子に結合した捕獲分子、ならびに第1および第2ビオチン分子に結合するストレプトアビジンを含み、第1ビオチン分子とマトリックス成分分子のモル比がモルマトリックス成分分子あたり0.85モル未満ビオチンである、細胞カプセル化マイクロドロップの集団。

## 【請求項 76】

モル比が0.02～0.2である、請求項75記載の集団。

## 【請求項 77】

モル比が0.01～0.2である、請求項75記載の集団。 30

## 【請求項 78】

ビオチン濃度が42 Mを超えない、請求項75記載の集団。

## 【請求項 79】

少なくともいくつかのマイクロドロップが単一細胞をカプセル化する、請求項75記載の集団。

## 【請求項 80】

マトリックス成分分子と第1ビオチン分子のモル比がモルアガロースあたり0.05～0.2モルビオチンである、請求項75記載の集団。

## 【請求項 81】

ビオチンとアガロースのモル比がモルアガロースあたり0.85モル未満ビオチンと改良した、ビオチン化アガロースを含むマイクロドロップにカプセル化された細胞により分泌されるタンパク質を解析する方法。 40

## 【請求項 82】

モル比が0.01～0.2である、請求項81記載の方法。

## 【請求項 83】

マトリックス成分分子、マトリックス成分分子に結合した $\text{Ni}^{2+}$ NTA、細胞により分泌される分子に対する親和性を有する6xヒスチジンタグに結合した捕獲分子を含むマイクロドロップに細胞をカプセル化し、分子が細胞から分泌され捕獲分子に結合することによりマイクロドロップ内に保持されることと、細胞を分泌分子に特異的に結合する検出試薬内で接触させることと 50

を含む、分泌タンパク質を解析する方法。

【請求項 8 4】

ビオチンに結合したマトリックス成分分子、 $\text{Ni}^{2+}$ に結合したストレプトアビジン、および細胞により分泌される分子に対する親和性を有する 6xヒスチジンタグに結合した捕獲分子を含むマイクロドロップに細胞をカプセル化し、分子が細胞から分泌され捕獲分子に結合することによりマイクロドロップ内に保持されることと、

細胞を分泌分子に結合する検出試薬内で接触させることと

を含む、分泌タンパク質を解析する方法。

【請求項 8 5】

IgMアイソタイプの抗体を分泌する細胞の集団を1つまたはそれ以上の細胞がIgGアイソタイプへのアイソタイプスイッチを起こし得る条件下で培養することと、

IgGアイソタイプの抗体に特異的な捕獲試薬を含むマイクロドロップに細胞集団をカプセル化し、それによってIgGアイソタイプの抗体を分泌する細胞を含むマイクロドロップが細胞内で分泌されたIgGアイソタイプの抗体を捕獲することと、

IgGアイソタイプの抗体を分泌する細胞を含む1つまたはそれ以上のマイクロドロップを検出することと

を含む、IgGアイソタイプの抗体を調製する方法。

【請求項 8 6】

細胞をアイソタイプスイッチを促進する薬剤の存在下で培養する、請求項85記載の方法。

【請求項 8 7】

捕獲試薬がIgGアイソタイプに対する抗体である、請求項85記載の方法。

【請求項 8 8】

検出がマイクロドロップを捕獲された抗体に捕獲試薬と異なる部位で特異的に結合する検出試薬と接触させることを含む、請求項85記載の方法。

【請求項 8 9】

検出試薬が抗イディオタイプ抗体である、請求項85記載の方法。

【請求項 9 0】

抗イディオタイプ抗体が蛍光標識してある、請求項85記載の方法。

【請求項 9 1】

IgG抗体を分泌する細胞を捕獲したマイクロドロップを単離することをさらに含む、請求項85記載の方法。

【請求項 9 2】

細胞集団をマイクロドロップにカプセル化して少なくともいくつかのマイクロドロップが複数の細胞をカプセル化し、1つまたはそれ以上の細胞がIgG抗体を分泌する複数の細胞を捕獲したマイクロドロップを単離する、請求項85記載の方法。

【請求項 9 3】

複数の細胞を単離することをさらに含む、請求項85記載の方法。

【請求項 9 4】

少なくともいくつかのマイクロドロップが複数の細胞のうちの1つをカプセル化する条件下で複数の細胞をマイクロドロップにカプセル化し、マイクロドロップがIgGアイソタイプの抗体に特異的な捕獲試薬を含み、IgGアイソタイプの抗体を分泌する細胞を含むマイクロドロップがマイクロドロップ内に分泌抗体を捕獲することと、

IgGアイソタイプの抗体を分泌する細胞を含む1つまたはそれ以上のマイクロドロップを検出することと

をさらに含む、請求項93記載の方法。

【請求項 9 5】

捕獲分子がIgGアイソタイプの分泌抗体に特異的に結合する抗原分子である、請求項85記載の方法。

【請求項 9 6】

(a) 占有マイクロドロップあたり第1の平均細胞数比率で、マイクロドロップに細胞集団

10

20

30

40

50

をカプセル化することと、

(b) カプセル化細胞をスクリーニングし、望ましい性質を有する細胞をカプセル化するマイクロドロップの第1亜集団を同定することと、

(c) スクリーニング段階で得られたマイクロドロップから細胞を単離することと、

(d) 占有マイクロドロップあたりの第1比率よりも低い第2の平均細胞数比率で、スクリーニング段階で得られた細胞をカプセル化することと、

(e) カプセル化細胞をスクリーニングし、望ましい性質を有する細胞をカプセル化するマイクロドロップの第2亜集団を同定することと

を含む、望ましい性質を有する亜集団を求めて細胞集団をスクリーニングする方法。

【請求項97】

10

占有マイクロドロップあたりさらなる比率の平均細胞数で段階(c)~(d)を繰り返し、マイクロドロップのさらなる亜集団を単離することをさらに含む、請求項96記載の方法。

【請求項98】

第2亜集団から単一細胞をカプセル化するマイクロドロップを単離することをさらに含む、請求項96記載の方法。

【請求項99】

望ましい性質を有する細胞の亜集団が本方法を実施する以前の細胞集団の0.01%未満である、請求項96記載の方法。

【請求項100】

ビオチンに結合したマトリックス成分分子で構成され、ビオチンとマトリックス分子のモル比がモルマトリックス成分分子あたり0.85モル未満ビオチンである、マイクロドロップを作製するキット。

20

【請求項101】

モル比がモルマトリックス成分分子あたり0.01~0.2モルビオチンである、請求項100記載のキット。

【請求項102】

マイクロドロップ内の第1ビオチン分子の濃度が42マイクロモルまたはそれ以下である、請求項100記載のキット。

【請求項103】

マトリックス分子がアガロースである、請求項100記載のキット。

30

【請求項104】

マイクロドロップを作製するキットの使用説明書をさらに含む、請求項100記載のキット。

【請求項105】

ストレプトアビジンおよび第2ビオチンに結合した捕獲分子、分泌タンパク質と細胞表面マーカーの両方に対するレポーター分子、ならびにアッセイ法の対照試薬をさらに含む、請求項100記載のキット。

【請求項106】

ビオチン化マトリックス分子と、

IgG抗体のアイソタイプ領域に特異的に結合する捕獲分子と、

捕獲分子と異なる部位でIgG抗体に特異的に結合する検出分子と

を含む、IgGアイソタイプの抗体を検出するキット。

40

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、あらゆる目的のために完全に参照として組み入れられる、2001年5月26日に出願した米国特許出願第60/293,822号から優先権を得るものである。

【0002】

背景

50



ゲルマイクロドロップ (GMD) 分泌アッセイ法は、ビオチン化マトリックスに細胞をカプセル化し、細胞の分泌分子を捕獲して蛍光マーカーで検出することを含む (17~34)。栄養分、抗体、もしくは核酸プローブがマイクロドロップ内に拡散するのを妨げることなく、または分泌産物の拡散を妨げることなく、小さなマイクロドロップ (例えば、直径 < 50  $\mu\text{m}$ ) により細胞周囲に明確な微小環境が創出される点で、本技術は他のカプセル化方法とは異なる。さらに、フローサイトメトリーを用いてマイクロドロップを容易に解析し、亜集団を検出することが可能である。各マイクロドロップ調製品を占有する細胞数はカプセル化に用いた細胞数に依存し、単一細胞カプセル化ではポアソン統計により近似される (19)。最初に0個または1個の細胞を含む可能性の高いマイクロドロップを得るため、2千万個のマイクロドロップに100万~150万個の細胞をカプセル化する実験手順が開発されたが、それによるとおよそ5~10%が単一細胞で占有される。エマルジョンを一時的に冷却することにより、ドロップがゲル化する。一度ゲル化すると、マイクロドロップは物理的にははっきりと識別でき、かつ頑強であり、低速の遠心分離により油性から水性媒体に取り出し得る。マイクロドロップアガロースマトリックスは透過性の半固形支持体であるため、カプセル化細胞に免疫化学的方法を行うことが可能である。

10

#### 【発明の開示】

#### 【0003】

##### 特許請求された発明の概要

本発明は、分泌タンパク質の解析方法を提供する。この方法は細胞をマイクロドロップにカプセル化することを伴い、マイクロドロップはマトリックス成分分子、マトリックス成分分子に結合した第1ビオチン分子、細胞により分泌される分子に対する親和性を有する第2ビオチン分子に結合した捕獲分子、ならびに第1および第2二次ビオチン分子に結合するストレプトアビジンを含み、第1ビオチン分子とマトリックス成分分子のモル比は、モルマトリックス成分分子あたり0.85未満、好ましくは0.01~0.2、選択的には0.02~0.2モルビオチンである。分子は細胞から分泌され捕獲分子に結合することにより、マイクロドロップ内に保持される。次に、この分泌分子を検出する。方法によっては、マイクロドロップ内の第1ビオチン分子の濃度は42マイクロモルまたはそれ以下である。

20

#### 【0004】

ある方法では、カプセル化段階で複数の細胞をマイクロドロップにカプセル化する。ある方法では、カプセル化段階で単一の細胞をマイクロドロップにカプセル化する。ある方法では、分泌分子は、タンパク質、ホルモン、または炭水化物である。ある方法では、ストレプトアビジンと捕獲分子を、細胞と同時にマイクロドロップにカプセル化する。ある方法では、カプセル化段階の後に、ストレプトアビジンと捕獲分子をマイクロドロップに組み込む。ある方法では、マイクロドロップは、第2分泌分子に対する親和性を有する第2捕獲分子を含み、第2捕獲分子は第2ビオチン分子のさらなるコピーに結合させてある。ある方法では、細胞は第2分子を分泌する。ある方法では、検出段階は、マイクロドロップを分泌分子に対する親和性を有する検出試薬と接触させ、検出試薬の分泌タンパク質への結合を検出することにより行う。ある方法では、検出試薬を標識化する。ある方法では、分泌分子に結合した標識検出試薬のシグナルは、マイクロドロップ内の分泌タンパク質のコピー数に比例する。ある方法では、検出段階は、マイクロドロップを分泌分子に対する特異的親和性を有する第1検出試薬および第2分泌分子に対する特異的親和性を有する第2検出試薬に接触させることによって行われ、第1および第2検出試薬は異なる方法で標識化しておく。ある方法では細胞は第3分泌分子を分泌し、マイクロドロップは第3分泌分子に対する親和性を有する第3捕獲分子をさらに含み、第3捕獲分子は第2ビオチン分子のさらなるコピーに結合させてあり、方法はマイクロドロップを分泌分子、第2分泌分子、第3分泌分子、および細胞表面マーカーそれぞれに対する特異的親和性を有する第1、第2、第3、および第4検出試薬と接触させることを含み、検出段階で分泌タンパク質、第2分泌タンパク質、第3分泌タンパク質、および細胞表面マーカーを検出する。ある方法では、検出段階は、マイクロドロップを分泌分子に対する親和性を有する第1検出試薬および細胞表面マーカーに対する親和性を有する第2検出試薬に接触させることにより行われ、第1および第

30

40

50

2検出試薬は異なる方法で標識化しておく。ある方法では、検出試薬と捕獲分子は分泌分子の異なるエピトープに結合する。ある方法では、マトリックス成分はアガロースである。ある方法では、分泌タンパク質は抗体である。ある方法では、分泌タンパク質はIgGアイソタイプの抗体であり、捕獲分子はIgGアイソタイプに特異的な抗体である。ある方法では、分泌タンパク質はサイトカインである。ある方法は、細胞が分泌分子を分泌するように誘導することをさらに含む。ある方法では、カプセル化段階の後に誘導を行う。ある方法では、カプセル化段階の前に誘導を行う。

**【0005】**

ある方法では、細胞は分泌タンパク質をコードする核酸セグメントを含むベクターを含み、セグメントは分泌タンパク質の発現をもたらす1つまたはそれ以上のDNA制御セグメントに機能的に結合させてある。ある方法では、分泌タンパク質は細胞によって自然に分泌される。ある方法では、検出段階の後に、細胞を増殖させて細胞株を作製する段階をさらに含む。ある方法では、細胞は患者から採取する。ある方法では、細胞は細胞障害性T細胞である。ある方法では、細胞を増殖させて得られた細胞集団を患者に導入することをさらに含む。ある方法では、細胞は幹細胞である。ある方法では、患者は自己免疫疾患を罹患し、細胞はTh2細胞である。ある方法では、細胞はインスリンを分泌する膵島細胞であり、患者は臨床症状発症前の前駆期にある。ある方法では、増殖段階中に細胞をIL-10で処理することをさらに含む。ある方法では、蛍光標識検出試薬の分泌分子への結合によって生じる蛍光シグナルに基づき、セルソーターを用いて細胞を他の細胞から分離することをさらに含む。ある方法では、細胞は第1および第2タンパク質を分泌し、マトリックスは第1および第2タンパク質それぞれに対する親和性を有する第1および第2捕獲分子を含み、解析段階は、細胞を第1および第2分泌タンパク質に結合する第1および第2検出試薬と接触させること、ならびに一次および二次分泌タンパク質に結合した一次および二次検出試薬のシグナルから第1および第2タンパク質を検出することを含む。

10

20

**【0006】**

本発明は、細胞集団を解析する方法を提供する。このような方法は、細胞集団をマイクロドロップにカプセル化することを伴う。細胞を第1マーカーに対する第1検出試薬、第2マーカーに対する第2検出試薬と接触させるが、第1マーカーは分泌タンパク質であり、第2マーカーは細胞表面タンパク質または第2分泌タンパク質である。第1マーカーおよび第2マーカーの両方を有する細胞を検出する。ある方法では、少なくともいくつかのマイクロドロップが単一細胞をカプセル化する。ある方法では、パーコール、ポリショ糖、ジアトリゾエートナトリウム(sodium diatrizoate)、またはイオジキサノール勾配により、細胞カプセル化マイクロドロップを非占有のマイクロドロップから分離することをさらに含む。ある方法では、固相支持体に吸着した細胞カプセル化マイクロドロップのアレイを作製し、走査型蛍光、比色、化学発光検出器を用いて検出することをさらに含む。ある方法では、細胞カプセル化マイクロドロップを薬剤と接触させ、薬剤が分泌タンパク質のレベルに影響を及ぼすか否かが検出によって示されることをさらに含む。

30

**【0007】**

ある方法では、カプセル化細胞は患者由来の細胞集団であり、薬剤は患者由来の別の細胞集団である。ある方法では、蛍光標識抗体の細胞表面マーカーへの結合、および蛍光シグナルの検出により細胞の亜集団を単離する。ある方法では患者から細胞集団を採取し、第1および第2マーカーの両方を有する細胞の存在により患者の免疫状態を表す。ある方法では、細胞は抗原特異的T細胞である。ある方法では、第1および第2マーカーは、IL-4、IL-10、IFN $\gamma$ 、およびTNF $\alpha$  からなる群より選択される。ある方法では、特定の第1および第2タンパク質はIL-10およびIL-12からなる群より選択される。ある方法では、同定する細胞はTh1細胞である。ある方法では同定する細胞はTh2細胞である。ある方法では、第2マーカーはT細胞分化の細胞表面マーカーである。ある方法では、マーカーの1つはCD4またはCD8である。

40

**【0008】**

本発明はさらに、細胞集団を解析する方法を提供する。このような方法は、マトリックス

50

成分分子、マトリックス成分分子に結合した第1ビオチン分子、少なくとも1つの種類の分泌タンパク質のエピトープに対する親和性を有し、第2ビオチン分子に結合した少なくとも第1の捕獲分子、ならびに第1および第2ビオチン分子を結合するストレプトアビジンを含むマイクロドロップにタンパク質を発現する細胞の集団をカプセル化し、これによりタンパク質が細胞から分泌されると第1捕獲分子に対する親和性を有するタンパク質がマイクロドロップ内に捕獲されることと、マイクロドロップ内の分泌タンパク質を解析することを伴う。ある方法では、少なくともいくつかのマイクロドロップが単一細胞をカプセル化する。ある方法では、細胞は同じタンパク質を様々なレベルで分泌し、解析段階でそのレベルを比較する。ある方法では、細胞は様々なタンパク質を分泌し、解析段階で特定のタンパク質を分泌する細胞を検出する。ある方法では、患者から細胞集団を採取し、解析により細胞障害性T細胞の亜集団を同定するが、この方法にはさらにその細胞亜集団を含まない細胞集団を患者に再導入することをさらに含む。ある方法では、患者は自己免疫疾患、移植片対宿主病、または宿主対移植片病を罹患するかまたは罹患しやすい。ある方法では、再導入段階の前に、細胞亜集団を含まない細胞集団をIL-10で処理することをさらに含む。

10

**【0009】**

本発明はさらに細胞カプセル化マイクロドロップの集団を提供し、マイクロドロップはマトリックス成分分子、マトリックス成分分子に結合した第1ビオチン分子、細胞により分泌されるタンパク質に対する親和性を有する第2ビオチン分子に結合した捕獲分子、ならびに第1および第2ビオチン分子に結合するストレプトアビジンを含み、第1ビオチン分子とマトリックス分子のモル比は、モルマトリックス成分分子あたり0.85未満、好ましくは0.01~0.2、選択的には0.02~0.2モルビオチンである。集団によっては、少なくともいくつかのマイクロドロップが単一細胞をカプセル化する。

20

**【0010】**

本発明は、ビオチン化アガロースを含むマイクロドロップにカプセル化される細胞によって分泌されるタンパク質を解析する方法において、ビオチンとアガロースのモル比をモルアガロースあたり0.85未満、好ましくは0.01~0.2、選択的には0.02~0.2モルビオチンとする改良を提供する。

**【0011】**

本発明はさらに、分泌タンパク質を解析する方法を提供する。方法は、マトリックス成分分子、マトリックス成分分子に結合した $Ni^{2+}$ NTA、細胞により分泌される分子に対する親和性を有する6xヒスチジンタグに結合した捕獲分子を含むマイクロドロップに細胞をカプセル化し、分子が細胞から分泌されると捕獲分子に結合することによりマイクロドロップ内に保持されることと、細胞を分泌分子に結合する検出試薬と接触させることを伴う。

30

**【0012】**

本方法では、分泌タンパク質を解析する方法をさらに提供する。方法は、ビオチンに結合したマトリックス成分分子、 $Ni^{2+}$ に結合したストレプトアビジン、および細胞により分泌される分子に対する親和性を有する6xヒスチジンタグに結合した捕獲分子を含むマイクロドロップに細胞をカプセル化し、分子が細胞から分泌されると捕獲分子に結合することによりマイクロドロップ内に保持されることと、細胞を分泌分子に結合する検出試薬と接触させることを伴う。

40

**【0013】**

本発明はさらに、IgGアイソタイプの抗体を調製する方法を提供する。方法は、1つまたはそれ以上の細胞がIgGアイソタイプへのアイソタイプスイッチを起こし得る条件下でIgMアイソタイプの抗体を分泌する細胞の集団を培養することと、IgGアイソタイプの抗体に特異的な捕獲試薬を含むマイクロドロップに細胞集団をカプセル化し、それによりIgGアイソタイプの抗体を分泌する細胞を含むマイクロドロップが細胞内で分泌されたIgGアイソタイプの抗体を捕獲することと、IgGアイソタイプの抗体を分泌する細胞を含む1つまたはそれ以上のマイクロドロップを検出することを伴う。

**【0014】**

50

ある方法では、アイソタイプスイッチを促進する薬剤の存在下で細胞を培養する。ある方法では、捕獲試薬はIgGアイソタイプに対する抗体である。ある方法では、検出は、マイクロドロップを捕獲試薬とは別の部位で捕獲された抗体に結合する検出試薬と接触させることを含む。ある方法では、検出試薬は抗イディオタイプ抗体である。ある方法では、抗イディオタイプ抗体を蛍光標識する。ある方法では、IgG抗体を分泌する細胞を捕獲したマイクロドロップを単離することをさらに含む。ある方法では、細胞集団をマイクロドロップにカプセル化して少なくともいくつかのマイクロドロップが複数の細胞をカプセル化し、この方法ではそのうちの1つまたはそれ以上がIgG抗体を分泌する複数の細胞を捕獲したマイクロドロップを単離する。ある方法では、その複数細胞を単離することをさらに含む。ある方法では、少なくともいくつかのマイクロドロップがその複数細胞のうちの1つをカプセル化する条件下でマイクロドロップに複数の細胞をカプセル化し、マイクロドロップはIgGアイソタイプの抗体に対して特異的な捕獲試薬を含み、これによりIgGアイソタイプの抗体を分泌する細胞を含むマイクロドロップがマイクロドロップ内に分泌抗体を捕獲することと、IgGアイソタイプの抗体を分泌する細胞を含む1つまたはそれ以上のマイクロドロップを検出することをさらに含む。

10

#### 【0015】

本発明は、望ましい性質を有する亜集団について細胞集団をスクリーニングする方法をさらに提供する。このような方法は、(a) 占有マイクロドロップあたり第1の平均細胞数比率で、マイクロドロップに細胞集団をカプセル化し、(b) カプセル化細胞をスクリーニングし、望ましい性質を有する細胞をカプセル化するマイクロドロップの第1亜集団を同定し、(c) スクリーニング段階で得られたマイクロドロップから細胞を単離し、(d) 占有マイクロドロップあたり第1比率よりも低い第2の平均細胞数比率で、スクリーニング段階で得られた細胞をカプセル化し、(e) カプセル化細胞をスクリーニングし、望ましい性質を有する細胞をカプセル化するマイクロドロップの第2亜集団を同定することを伴う。

20

#### 【0016】

ある方法では、占有マイクロドロップあたりさらなる比率の平均細胞数で段階(c)～(e)を繰り返し、さらなるマイクロドロップの亜集団を単離することをさらに含む。

#### 【0017】

ある方法では、第2亜集団から単一細胞をカプセル化するマイクロドロップを単離することをさらに含む。ある方法では、望ましい性質を有する細胞の亜集団は、本方法を行う以前の細胞集団の0.01%未満である。

30

#### 【0018】

本発明は、マイクロドロップを作製するキットをさらに提供する。このようなキットは、モルマトリックス成分分子あたり0.85未満、好ましくは0.01～0.2、選択的には0.02～0.2モルビオチンのモル比でビオチンに結合したマトリックス成分分子を含む。あるキットでは、マトリックス分子はアガロースである。あるキットはさらに、マイクロドロップを作製するキットの使用説明書を含む。あるキットはさらに、ストレプトアビジンと第2ビオチン分子に結合した捕獲分子を含む。

#### 【0019】

定義

40

抗体もしくは他の結合薬剤と抗原間の特異的結合または親和性は、少なくとも $10^6 \text{ M}^{-1}$ の結合親和性を意味する。好ましい結合薬剤は少なくとも約 $10^7 \text{ M}^{-1}$ の親和性、好ましくは $10^8 \text{ M}^{-1} \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、または $10^{12} \text{ M}^{-1}$ の親和性で結合する。エピトープという用語は、抗体に特異的に結合可能な抗原決定基を意味する。エピトープは通常アミノ酸や糖側鎖等の化学的に活性な表面分子群からなり、通常特異的な三次元構造特性および特異的な電荷特性を有する。高次構造的エピトープと非高次構造的エピトープは、前者のみへの結合が変性溶媒の存在下で失われる点で区別される。

#### 【0020】

捕獲分子は、抗体はまたは細胞によって分泌されるポリペプチドに対して特異的親和性を有する他の分子である。

50

## 【0021】

接着分子および架橋分子という用語は、捕獲分子とマトリックス間の結合成分を記すために用いる。接着分子を捕獲分子とマトリックス分子に結合させ、架橋分子が両接着分子に特異的に結合すると両接着分子間に架橋が形成され、それにより捕獲分子がマトリックスに結合することになる。

## 【0022】

細胞表面マーカーには、CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11(a)、CD11(b)、CD11(c)、CD18、CD44、CD45R、CD59、MHC I、MHC II、およびMHC III、癌胎児性抗原、増殖因子受容体（例えば、FGFR、PDGFR、EGF、NGFR、およびVEGF）、サブスタンスK受容体、アンギオテンシン受容体、およびアドレナリン受容体、セロトニン受容体、およびPAF受容体等のGタンパク質受容体（Gilman、Ann. Rev. Biochem. 56:625-649 (1987)を参照のこと）、イオンチャネル（例えば、カルシウム、ナトリウム、カリウムチャネル）、ムスカリン受容体、アセチルコリン受容体、GABA受容体、グルタミン酸受容体、およびドーパミン受容体（Harpold、米国特許第5,401,629号および米国特許第5,436,128号を参照のこと）、ならびに接着分子（Springer、Nature 346:425-433 (1990)；Osborn、Cell 62:3 (1990)；Hynes、Cell 69:11 (1992)を参照のこと）が含まれる。

10

## 【0023】

CDマーカーは、細胞系譜および細胞亜系譜の決定に広く用いられている。例えば、T細胞はCD3の発現により同定される。成熟T細胞はT4サブセットに属してよく、その場合このT細胞はCD4を発現する。同様に、他の細胞集団および細胞亜集団にもマーカーが存在する。細胞系譜の中で、分化および活性化の様々な段階において細胞を区別することは有益である。分化状態は、リンパ性および骨髄性悪性疾患の診断解析および造血系の研究に特に有用である。例としては、未処置のまたは抗原を経験した細胞のマーカー（特にCD45アイソフォーム）、B系譜急性リンパ芽球性白血病を含むB系譜前駆体に見られるCALLA（CD9）等の分子が含まれる。活性化状態は、細胞機能の研究において特に興味深い。活性化マーカーには、CD25（IL-2受容体の成分）等の増殖因子受容体ならびにCD69およびCD98等のその細胞機能が十分に理解されていない分子が含まれる。

20

## 【0024】

目的とする分泌タンパク質には、例えばIL-1～IL-18といったインターロイキン、腫瘍壊死因子 および 、インターフェロン 、 および 、トランスフォーミング増殖因子 および （TGF- およびTGF- ）、コロニー刺激因子（CSF）、腫瘍壊死因子、および顆粒球単球コロニー刺激因子（GM-CSF）等のサイトカインおよびケモカイン（Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research（Aggawalら編、Blackwell Scientific、Boston、MA 1991）を参照のこと）、ホルモン、酵素、抗体、ならびに細胞内メッセンジャーが含まれる。実質的には、いかなるタンパク質も、適切なシグナル配列への融合操作により分泌され得る。

30

## 【0025】

実施例で用いるセルバイオゲル（CelBioGel）-1、セルバイオゲル-2、およびセルバイオゲル-3という名の3種類のセルバイオゲルは、ビオチンとアガロースのモル比がそれぞれ1:1、0.2:1、0.04:1であり、これはこのような比率が計算され得る実験誤差の範囲内である（+/-10%）。マトリックス内のビオチンの総濃度は、42 μMを超えるべきではない。

40

## 【0026】

文脈から明らかでない限りは、「スクリーニング」についての言及は「選択」を含む。

## 【0027】

詳細な説明

1. 概要

本発明は、マイクロドロップにカプセル化した細胞から分泌される分子を解析する改良法を提供する。これらの方法は、一部には、分泌分子の検出感度がマトリックス分子のビオチン化の程度に依存するという結果、ならびにアガロースに対するビオチンのモル比を0.85未満にしておよび/またはビオチン最終濃度を42 μM未満にして感度が改良されるとい

50

う結果に基づくが、 $42\mu\text{M}$ とはセルバイオゲル-2に含まれるビオチン含量に等しい（以下に定義するように）。例えば、モルアガロースあたり約 $0.01\sim 0.2$ モルビオチン、選択的には $0.02\sim 0.2$ モルビオチンの比率にすることによって、 $1:1$ の比率にした場合と比較して検出感度が $10\sim 100$ 倍に改良される（実施例2を参照のこと）。

#### 【0028】

本発明を実施するにあたり機構の理解は必要ではないが、改良は、ビオチンに結合した捕獲分子の分布がマイクロドロップ容量の全体にわたってより均一であること、およびストレプトアビジン架橋の形成によってより多くの遊離の捕獲部位が得られることに一部起因すると考えられる。本発明者らは、低いビオチン比率にすることで、アガロース内の遊離の捕獲部位はより多く存在すると考えている。なぜなら、ストレプトアビジンはビオチン 10 に対する4つの有効な結合部位を有し、マトリックスに存在するビオチン分子による飽和度が低くなるからである。したがって、マトリックス内で低いビオチン比率にすることで、ビオチン化捕獲抗体の結合部位がより多く得られることになる。（ビオチン分子数の低減がいかに捕獲部位を増加させるか。）

#### 【0029】

本発明はまた、カプセル化細胞から分泌されるタンパク質を解析する方法を提供する。上記の改良ゲルマトリックス比率は、このような方法には必須ではないものの都合がよい。この新規の方法は、分泌タンパク質および第2分泌タンパク質か細胞表面マーカーのどちらかの少なくとも1つの他のマーカーを同じ細胞から検出することを含む。同じ細胞において複数のマーカーを検出する能力により、細胞の分化状態の指標が提供され得る。この 20 情報は、細胞集団を特徴づける際に特に有用である。例えば、リンパ球集団内のある組み合わせのマーカーを有する細胞の存在により、患者の免疫状態が示され得る。本アッセイ法を用いて患者から抗原特異的クローンを作製し、インビトロで自己免疫疾患を研究し、免疫状態をモニターし、免疫療法に使用し得るT細胞株を作製することが可能となる。本方法は、低レベルの分泌タンパク質（例えば $1\text{ fg}$ ）を検出し、機能的で生存している形態の希な分泌細胞（例えば、集団の $0.1\%$ または $0.0001\%$ 未満存在する）を単離する点で有利である。

#### 【0030】

##### 11. 捕獲ウェブ

解析する細胞は、ゲルマイクロドロップ（マイクロドロップ）内の捕獲ウェブにカプセル化されている（図1に示すように）。捕獲ウェブは、ゲルを形成する複数コピーのマトリックス分子、およびゲル内に固定化された複数コピーの分泌タンパク質に対する捕獲分子を含む。ある方法では、捕獲分子は架橋により固定化する。例えば、架橋は、マトリックス分子および捕獲分子にそれぞれ結合した第1および第2接着分子、ならびに第1および第2接着分子の互いに対して結合する架橋分子により形成され得る。架橋により、捕獲分子がマトリックスに効率的に固着される。ある方法では、第1および第2接着分子は両方ともビオチンであり、架橋分子はストレプトアビジンまたはアビジンである。これらの方法では、マトリックス分子に結合させたビオチン分子を第1ビオチン分子と呼称し、捕獲分子に結合させたビオチン分子を第2ビオチン分子と呼称する。

#### 【0031】

マトリックス分子は熱すれば液状で存在し、冷却すればゲルとして凝固する。アガロースは、このようなマトリックス分子の例である。アガロースは、（1-3）および（1-4）交互結合を有する多糖鎖の混合物である。様々な品質等級のアガロースが入手可能であるが、低融点アガロース（タイプIX）が好ましい。アルギネート、カラゲナン、またはポリ 40 アクリルアミドもアガロースの代わりに使用できる。

#### 【0032】

ストレプトアビジン（またはアビジン）およびビオチンの代わりに、それぞれタンパク質および小分子の他の組み合わせも使用できる。例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼをグルタチオンと共に、マルトース結合タンパク質をマルトースと共に使用することが 50 できる。互いに相互親和性を有する、コンビナトリアルライブラリー由来の合成タンパク

質および小分子の組み合わせも使用可能である。

#### 【0033】

さらなる変法では、NTA（ニトリロ三酢酸）-Ni<sup>2+</sup>および捕獲分子に結合させた6Xヒスチジンタグで形成される架橋を介して、捕獲分子をマトリックス分子に結合させる。NTA-Ni<sup>2+</sup>は、マトリックス分子に化学的に結合してある。Ni-NTA-アガロースマトリックスは、キアゲン（Qiagen）から市販されている。Ni<sup>2+</sup>は、6Xヒスチジンと強力な非共有結合を形成する。6Xヒスチジンタグも化学的結合により捕獲分子に結合させ得るが、より典型的には融合タンパク質としてタンパク質捕獲分子内と共に合成する。またさらなる変法では、マトリックス分子に結合したビオチン、Ni<sup>2+</sup>に結合したストレプトアビジン（またはアビジン）、および捕獲分子に結合した6Xヒスチジンタグで形成される架橋を介して、捕獲分子をマトリックス分子に結合させる。ストレプトアビジンはビオチンに結合し、Ni<sup>2+</sup>は6Xヒスチジンタグに結合する。この場合もやはり、このような方法は、6Xヒスチジンタグを融合タンパク質として捕獲分子に結合できる利点を有する。

10

#### 【0034】

上述のように、ビオチンを捕獲分子とマトリックス間の架橋の一部として用いる場合、マトリックス分子とビオチンの比率がその後の検出感度に影響を及ぼす。ビオチン分子とマトリックス分子のモル比は、好ましくはモルマトリックス分子あたり0.01~0.2モルビオチンの範囲、選択的にはモルマトリックス分子あたり0.02~0.2モルビオチンである（比率が測定され得る実験誤差、典型的には約+/-10%の範囲内である）。後者の比率は、アガロース1グラムあたりおよそ0.16~1.6マイクロモルの比率に等しい。比率は、NMRまたはピアス（Pierce）から市販されているキットを用いて測定できる。アガロースとビオチン間の様々な比率によるビオチン化アガロースの調製品は、市販されている。ドロップ形成前にビオチン化アガロースを通常のアガロースと混合することにより、比率を減少させることが可能である。または、ビオチンをアガロースに結合させる際に、ビオチンとアガロースの比率を調節することができる。一般に、マトリックス分子を接着分子および1つまたはそれ以上のさらなる分子に結合させる上記の他の架橋形成では、マトリックス分子とマトリックス分子に結合させた接着分子の比率は、アガロースとビオチンで定めた比率と同じである。

20

#### 【0035】

分泌分子を捕獲する架橋の成分には捕獲分子も含まれるが、一般に、これらはマトリックス分子と混合して細胞と同時にマイクロドロップに組み込むことも可能であり、マイクロドロップを形成した後には外から供給することも可能である。

30

#### 【0036】

アガロースまたは他のマトリックス分子から形成されるマイクロドロップにより、生物学的存在の周囲に明確な微小環境が提供される。ゲルは拡散を妨げず、フローサイトメトリーを用いた多数の個々のマイクロドロップの解析、および蛍光活性化セルソーター（FACS（商標））または自動画像読み取りおよび顕微操作による目的のマイクロドロップの回収が可能になる。単一細胞のカプセル化では、各マイクロドロップを占有する細胞数はポアソン統計により近似され、限界希釈クローニング法またはペトリ皿接種法と類似している。各マイクロドロップが0個または1個の初期細胞を含む可能性の高い調製品を得るためには、約5~10%のマイクロドロップが占有されるべきである。より高い処理量を望むのであれば、より多くの細胞をカプセル化工程に使用すべきであり、それにより最初のスクリーニングでは複数の細胞が占有することになる。次に、スクリーニングの結果得られたマイクロドロップの亜集団の細胞をマイクロドロップあたりより少ない平均数でカプセル化し、スクリーニングを繰り返す（本アプローチの実施例として、IgG抗体の単離の考察を参照のこと）。液化したビオチン化アガロース（または他のマトリックス分子）中に存在する細胞を過剰の疎水性液体に分散させることにより、エマルジョンを形成し、マイクロドロップを調製する。エマルジョンを一時的に冷却することにより、ゲル化する。一度ゲル化すると、マイクロドロップは物理的にはっきりと識別でき、かつ頑強であり、低速の遠心分離により油性から水性媒体に取り出し得る。または、液化したゲルと実体の混合液を

40

50

インクジェットプリンターのプリントヘッドのような振動ノズルに通すことによって、マイクロドロップを形成することができる。マイクロドロップ形成装置、セルシス (Cell Sys) 100 (商標) マイクロドロップメーカー (Microdrop Maker) は、高精度モーターに連結した特別設計の乳化機器であり、ワンセルシステムズ社 (One Cell Systems, Inc.) から入手できる。回転速度、界面活性剤の種類と量、およびエマルジョンの粘性を変えることにより、例えば2~200  $\mu\text{m}$ のマイクロドロップを調製することができる。現在ワンセルシステムズ社から入手できるマイクロドロップメーカーは、多数のマイクロドロップ (例えば $10^7$ ) を作製するのに効果的であり、この数は単一占有の必要条件を満たすのにおよそ100万個の生物学的存在を必要とする。より少なくても十分な調製品をカプセル化するには、マイクロカプセル化の手順を縮小化することが可能である場合もある。ボルテックスすることも可能である。これは、生物学的存在が少数のみ存在する一部の臨床応用に有用である。

10

#### 【0037】

どのような種類の細胞も、マイクロドロップにカプセル化することが可能である。例えば、細胞は初代細胞培養でも細胞株でもよい。細胞は、患者の試験試料、天然源 (例えば、海水または土壌)、または遺伝子操作実験 (例えば、組換えタンパク質を発現するベクターで形質転換する) から得ることができる。ベクターにより、組換えタンパク質の発現および分泌を調節するプロモーター、エンハンサー、およびシグナル配列等の調節配列が提供される。選択的には、使用するプロモーターは、メタロチオネインプロモーターやアラビノースプロモーター等のように誘導性である。遺伝子操作により作製される細胞集団には、非関連タンパク質をコードする核酸で形質転換した細胞、および同じタンパク質の様々な変種を表す核酸で形質転換した細胞が含まれる。変種は、天然 (例えば、対立遺伝子または種) であっても誘導によるものであってもよい。変種は、米国特許第5,830,721号、米国特許第5,811,238号、米国特許第5,605,793号に記載されるようなDNAシャッフリング技術により作製可能である。細胞は、抗体を分泌するハイブリドーマ、抗体を分泌する天然のB細胞、または抗体をコードする遺伝子で形質転換しそのため抗体を分泌するようになった細胞であってもよい。細胞は、ヒト、ウマ、ヒツジ、マウス、ウシ、ヤギ、およびブタ等の哺乳動物、植物、細菌、または菌類由来の細胞であってもよい。細胞の種類には、初代細胞、リンパ球、単球、マクロファージ、樹状細胞、軟骨細胞、脾細胞、細胞、および幹細胞が含まれる。特定のリンパ球集団を含む多くの種類の細胞が、オールセルズ社 (AllCells, LLC) (カリフォルニア州フォスターシティ) から入手可能である。

20

30

#### 【0038】

融解したアガロースに細胞と同時にストレプトアビジンと捕獲試薬を添加することにより、細胞のカプセル化以前に捕獲ウェブを構築することができる。または、細胞のカプセル化を手順の第1段階として行い、捕獲ウェブの成分は後から添加することもできる。マイクロドロップが形成されてから、残りの捕獲ウェブを構築する。例えば、捕獲分子をマトリックスに結合する架橋の一部としてビオチンを用いる場合、捕獲ウェブのさらなる成分の1つは検出するタンパク質に対する親和性を有するビオチン化捕獲分子である。捕獲分子に結合させたビオチン分子は、マトリックス分子に結合させたビオチン分子と区別するために、第2ビオチン分子と呼称する。捕獲ウェブの他のさらなる成分は、ストレプトアビジンまたはアビジンである。この成分は、カプセル化する以前に捕獲抗体および細胞と共に添加することができ、マトリックスに結合した第1ビオチン分子と捕獲分子に結合した第2ビオチン分子間に架橋を形成する。さらなる成分は、拡散によりマイクロドロップに導入することができる。すなわち、マイクロドロップを含む培地にこれらの成分を導入すると、成分がマイクロドロップ内に拡散する。典型的には、ストレプトアビジンまたはアビジンをまず始めに導入し、その後ビオチン化捕獲分子を導入する。非結合の捕獲分子は、洗浄して除去することができる。先に論じたように、アガロースに対するビオチンの比率を低くすることは、捕獲分子がマイクロドロップの全体にわたって均一に拡散するのに都合がよい。マトリックス分子と捕獲分子間に他の種類の架橋を用いる場合にも、同様の原理が当てはまる。例えば、6xヒスチジン 捕獲分子を結合するのにNTA- $\text{Ni}^{2+}$ を用いる

40

50



場合、NTA-Ni<sup>2+</sup>を有するように改変したマトリックス分子を用いてマイクロドロップを形成し、6xヒスチジンタグに結合した捕獲分子を完成したマイクロドロップに拡散させる。

【0039】

### III. 捕獲分子および検出試薬

本発明の様々な方法で、捕獲分子と検出試薬の両方を使用する。捕獲分子と検出試薬の両方が、タンパク質または検出する他の分子に対する親和性を有するように設計する（特に明らかにしない限り、分泌タンパク質の検出に適用できる方法は、炭水化物やホルモン等の他の分泌分子にも適用できる）。捕獲分子は、マイクロドロップ内で捕獲ウェブの一部であり、分泌タンパク質をマイクロドロップ内に固着する点で、検出試薬と区別される。それに対して検出試薬は、典型的に、タンパク質が分泌され捕獲ウェブ内で捕獲分子に固着されてから導入する。検出試薬がマイクロドロップ内に拡散し、捕獲分子に結合した分泌タンパク質に結合することによって、分泌タンパク質の検出が可能となる。

10

【0040】

捕獲分子と検出試薬の性質は、解析する分泌タンパク質に依存する。例えば分泌タンパク質がサイトカインである場合、捕獲分子と検出試薬は両方ともサイトカインに結合する抗体であってよい。捕獲分子と検出試薬は、サイトカイン上の異なるエピトープに結合する抗体であることが好ましく、それにより捕獲分子と検出試薬が同時に結合できる。例えば分泌タンパク質が抗体である場合、捕獲分子は抗イディオタイプ抗体または抗体に対する抗原であってよい。一般に、捕獲分子と検出試薬は、検出する分泌タンパク質に対する特異的親和性を有する任意の分子であってよい。捕獲分子と検出試薬は、例えば天然のリガンド、合成分子、または抗体であってよい。多数の分泌タンパク質および細胞表面マーカーに対する抗体が、BD/ファーマーミンゲン（BD/Pharmingen）、ベックマンコールター（Beckman Coulter）、パイオソース（Biosource）、およびR & Dシステムズ（R & D Systems）から市販されている。抗体は、蛍光標識またはビオチン標識された形態で市販されていることも多い。

20

【0041】

ある方法では、2つ以上の分泌タンパク質を対象とし、複数の捕獲分子と検出試薬を用いる。例えば2つの分泌タンパク質を検出するのであれば、それぞれの分泌タンパク質に対する2つの異なる捕獲分子を第2ビオチン分子に結合させ、ゲルマイクロドロップに導入することができる。2つの分泌タンパク質分子は、マイクロドロップ内でそれぞれの捕獲分子に結合する。次に、2つの分泌タンパク質に特異的な2つの検出試薬を用いて、分泌タンパク質を検出する。これらの原理は、n個の捕獲分子とn個の検出試薬を用いたn個の分泌タンパク質の同時検出に拡張し得る。

30

【0042】

ある方法では、分泌タンパク質を細胞表面マーカーとの組み合わせで検出する。このようなマーカーの例には、リンパ球性マーカー、CD4、CD8、ならびに増殖因子受容体、およびイオンチャネルが含まれる。このような方法においては、分泌タンパク質には前述のように捕獲分子と検出試薬が必要である。しかし、細胞表面上の細胞表面マーカーは、捕獲ウェブへの結合を必要としない。したがって、細胞表面マーカーの保持には捕獲分子を必要としない。細胞表面マーカーは、細胞表面マーカーに特異的な検出試薬を用いて検出する。

40

【0043】

典型的に、検出試薬は標識するか、または検出試薬に結合する二次検出試薬を介して間接的に標識する。このような標識は、中でも蛍光、同位体、磁性、および常磁性であってよい。蛍光標識の例には、PI、FITC、PE、PC5（PE-Cy5）、ECD（PE-Texas Red）、およびCy-クロム（Cy-Chrome）（R-PE）が含まれ、630 nm、525 nm、575 nm、675 nm、610 nm、および650 nmのバンドパスフィルタで測定できる。ある方法では、検出試薬を酵素で標識し、マイクロドロップが酵素の基質を含み、この基質は処理されて蛍光発生産物を生じる。ある方法では、検出試薬からのシグナルを二次標識を用いて増幅する。例えば、フルオレセインで標識した一次検出試薬をウサギ抗フルオレセインIgG（アキュレートケミカル &

50

サイエンティフィック (Accurate Chemical & Scientific) ) と 15 ~ 30 分間インキュベートできる。PBS緩衝液で洗浄した後、マイクロドロップをFITCまたはフィコエリトリン標識ヤギ抗ウサギ抗体 (シグマ (Sigma)、ミズーリ州セントルイス) と 15 ~ 30 分間インキュベートする。2つ以上の検出試薬を用いる場合には、異なる検出試薬を異なる方法で標識する (例えば、異なるフルオロフォアを用いる)。捕獲に用いる分子は、典型的には標識しない (捕獲ウェブに結合させる働きをするビオチン分子以外)。

#### 【0044】

ある方法では、タンパク質の分泌を促進するために細胞を誘導する。例えば、組換えタンパク質を操作して、誘導性プロモーターから発現させることができる。誘導薬剤を供給することにより、タンパク質の分泌が開始または増加する。誘導は、細胞をマイクロドロップにカプセル化する前に行っても後に行ってもよい。

10

#### 【0045】

#### IV. アッセイ法

細胞集団をビオチン化マイクロドロップにカプセル化することにより、アッセイ法を行う。次に、1つまたはそれ以上の分泌タンパク質を保持する捕獲ウェブを、マイクロドロップ内に構築する。マイクロドロップを一定期間培地中で培養し、タンパク質の分泌が行われるようにする。この期間は、典型的には30分~48時間である。ある方法では、この期間は24時間、12時間、6時間、または1時間未満である。一般に、インキュベーション時間を長くすると、分泌タンパク質は増加しシグナルは強くなる。しかし、ある一定期間を過ぎると、捕獲ウェブの捕獲分子がすべて分泌タンパク質で飽和し、さらなる分泌タンパク質はマイクロドロップから単に漏出し、より強いシグナルは得られない。ある方法では、インキュベーション時間は、最も高い分泌速度でカプセル化細胞から分泌されるタンパク質がマイクロドロップ内のすべてまたはほとんどの捕獲分子を占有し、より低い分泌レベルでカプセル化細胞から分泌されるタンパク質がマイクロドロップ内のより少ない捕獲分子を比例的に占有するほど十分に長い。これらの状況では、集団内の様々な細胞によるシグナル強度は、細胞の分泌レベルにほぼ比例する。MNCのような低い分泌レベルを有する一部の細胞では、クロストークまたは非結合タンパク質の隣接細胞への漏出は決して見られない。高い分泌速度を有するトランスフェクトされた細胞では、分泌時間を調整してクロストークを調節することができる。特定の細胞株では分泌速度は比較的一定であるため、ひとたび分泌速度を決定すれば、クロストークを避ける分泌アッセイ法の最適時間を決定することができる。

20

30

#### 【0046】

上記方法の変法では、細胞を含むマイクロドロップを、細胞を含む未処理のマクロドロップ対照集団との比較において、インキュベーション期間前および/または期間中に薬剤または候補薬である薬剤で処理する。処理細胞と未処理細胞との比較により、対象とするタンパク質の分泌レベルが異なることが示されれば、薬剤または候補薬がこのタンパク質の分泌レベルに影響を及ぼすと結論づけることができる。この情報は、候補薬剤の活性を明らかにする上で、または効果的であることがすでに知られている薬剤の機構を決定する上で、有用となり得る。

#### 【0047】

上記方法の他の変法においては、患者に移植する以前に、細胞を他の細胞、または増殖因子もしくはサイトカインにより刺激または抑制する。例えば、IL-10で処理することにより、望ましくない炎症反応を抑制することが可能である (国際公開公報第97/42324号を参照のこと)。

40

#### 【0048】

インキュベーションして分泌を可能にした後、1つまたはそれ以上の検出試薬を添加するが、1つは検出する分泌タンパク質用であるか、または1つは検出する細胞表面マーカー用である。検出試薬は、特異的親和性を有し、その対象でありウェブに捕獲されているタンパク質に結合する。検出試薬が結合してシグナルが発生した後、このシグナルを様々なアプローチで検出することができる。1つの単純なアプローチでは、マイクロドロップを顕

50

微鏡用スライドやペトリ皿のようなガラスまたはプラスチック表面上に沈着させる。マイクロドロップは支持体に接着し、アレイ型式に並べて解析を容易にすることが可能となる。次に、顕微鏡下で、マイクロドロップをいくつかの異なる標識のうちの1つについて個々に調べることができる。検出は、分泌分子の蛍光、化学発光、および色によって行うことができる。デジタル画像システムにより、ますますより高い解像度で細胞活性を調べることが可能となった。付加価値のあるソフトウェアで推進される自動化顕微鏡を用いるシステムは、現在一般的な研究手段である。これらのシステムは、蛍光画像を取得して保存する能力、画像強調、校正と許容限界（識別）オプション、およびシステムの自動化と装置制御を含む多くの共通機能を共有している。顕微鏡画像は、画素と呼ばれるマトリクス状の小さな範囲にデジタル化される。各画素における光度の測定値を保存し、加工して強調した画像を作成する。画像解析システムは、画像強調に用いられる加工の種類と得られる解像度のレベルに特徴を示す。共焦点レーザー走査顕微鏡およびレーザースキャニングサイトメーター（オンコシス（Oncosis）およびコンピュサイト（Compucyte））等の他のレーザーを用いる機器もそうであるが、例えば、メタサイト（MetaCyte）の単純なスキャニングイメージシステムが挙げられる。オンコシスの機器では、特異的タンパク質を分泌する細胞の破壊を必要とする応用に（例えば、分泌タンパク質が癌特異的タンパク質である場合）、オンコシスが独占するフォトシス（Photosis）（商標）レーザー活性化色素を用いることができる。目的の細胞は、顕微操作により回収可能である。

10

#### 【0049】

他の方法では、フローサイトメーターを用いてマイクロドロップを解析する。このような機器は、標識マイクロドロップの数と未標識マイクロドロップの数をカウントする。異なる方法で標識した2つの検出試薬を用いる場合、フローサイトメーターにより、第1標識のみを有するマイクロドロップ、第2標識のみを有するマイクロドロップ、両標識を有するマイクロドロップ、およびどちらの標識もされていないマイクロドロップをカウントすることができる。さらに多くの標識を使用する方法では、マイクロドロップのさらなる分類を識別することが可能である。存在する標識の種類により、分泌されるタンパク質の種類とレベルが示される。サイトコンプ（Cyto-Comp）（商標）試薬キットやサイトトロール（Cyto-Trol）（商標）コントロール細胞（control cell）（ベックマンコールター）等の色補正キットを用いて、スペクトルの重複に合わせて色補正を調整することができる。サイトコンプ（商標）は4セットの2色試薬からなり、多色解析に合わせて色補正を調整する。

20

30

#### 【0050】

選択的には、細胞を蛍光標識するのであれば、フローサイトメトリ解析の後にソーティングすることにより、顕微鏡観察、細胞株の作製、またはDNA単離等のさらなる解析に使用可能なカプセル化細胞の様々な集団を作製することができる。FACSにより、1つまたはそれ以上の特定の分泌タンパク質の存在、または1つまたはそれ以上の特定の分泌タンパク質の分泌レベルの程度等の明確な性質を有する個々の細胞が分離される。次に、さらなる解析（例えば、細胞のDNA調製品を解析する、または細胞株を作製する）のためにこれらの細胞を増殖させる。ある方法では、治療の目的のため、望ましい性質を有する細胞を患者に導入する。

#### 【0051】

選択的には、透析不可能なポリビニルピロリドン（PVP）でコーティングしたパーコール（シリカ粒子（直径15～30 nm））、ジアトリゾエートナトリウムを付加したポリショ糖（フィコール）、またはイオジキサノール（安息香酸のヨウ化誘導体）勾配遠心分離法を用いて、細胞占有マイクロドロップのほとんど（>95%）を回収しつつ、調製品から非占有マイクロドロップの大部分を除去することが可能である。マイクロドロップは、アガロース等の溶解したマトリックス分子に細胞を分散させ、次に過剰の疎水性液体中でエマルジョンを形成させることにより調製する。本方法は、稀な分泌細胞、低いレベルで分泌する細胞、および稀な細胞亜集団の解析に特に有用である。

40

#### 【0052】

一部の方法では、検出装置の焦点を望ましい細胞集団を含むマイクロドロップの亜集団に

50

焦点を合わせるゲーティング法を用いる。例えば、前方散乱または側方散乱を用いて、非占有マイクロドロップから占有マイクロドロップを識別することが可能である。次に、占有マイクロドロップにさらにゲートを設定し、蛍光標識検出試薬の結合した特定の表面マーカーを有する細胞の亜集団を検出することができる。ゲートを設定した細胞の亜集団は、続いて、表面マーカーとは異なる方法で標識をした特定の分泌タンパク質の存在について解析することができる。

#### 【0053】

一部の方法では、シグナル増幅のために、検出試薬の間接検出を使用する。例えば、検出試薬が抗体である場合、対象とするIgアイソタイプに対する標識抗体を用いて検出試薬を検出できる。他の方法では、増幅カスケードを使用する。例えば、チラミドシグナル増幅 (Tyramide Signal Amplification) (商標) (TSA) 技術が米国特許第5,731,158号および米国特許第5,583,001号に記載されており、キットはパーキンエルマー (Perkin Elmer) から入手可能である。本アプローチを検出に用いる場合、捕獲された分泌分子に結合する一次検出試薬は分子、通常は西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識した抗体である。HRPを用いて、HRP標識検出試薬を結合するマイクロドロップ内で、標識チラミドの沈着および結合を触媒する。次には、チラミド上の標識が、典型的には蛍光標識してありチラミド上の標識に対する親和性を有する二次検出試薬の結合部位として働く。

10

#### 【0054】

### V. 応用

#### 1. 分泌レベル

20

上記方法は、同じタンパク質を分泌する細胞の混合集団を解析して、規定のレベルでタンパク質を分泌する1個またはそれ以上の個々の細胞を同定するのに特に有用である。ある方法では、規定のレベルを超えてタンパク質を分泌する細胞の同定と回収に関心がある。ある方法では、集団の中で最大の分泌速度を有する1つまたはそれ以上の細胞の同定に関心がある。これらの方法は、増殖因子、サイトカイン、抗体、ホルモン、または他の分泌分子の分泌について、生物学的存在を解析するのに有用である。本方法は、遺伝子操作により細胞に導入した構築物によってコードされるタンパク質を分泌する形質転換細胞を解析するのにも有用である。本方法は、ハイブリドーマまたは他の樹立細胞株由来のタンパク質の分泌レベルを解析するのにも有用である。目的のタンパク質を分泌する、または目的のタンパク質を高レベルで分泌する単離細胞を用いて、目的タンパク質の産生のために細胞株を増殖させることが可能である。本方法は、抗原特異的T細胞およびB細胞の集団を単離したり、目的のタンパク質を分泌する細胞を同定するのにも有用である。

30

#### 【0055】

#### 2. 異なるタンパク質を分泌する細胞

本方法は、集団内の細胞が異なるタンパク質を分泌する細胞の混合集団を解析するのにも有用である。このような方法における目的は、特定のタンパク質または目的のタンパク質を分泌する1つまたはそれ以上の細胞を単離することである。これは、タンパク質または目的のタンパク質に特異的な捕獲分子と検出試薬を用いることで達成される。さらに、解析する最初の細胞集団は、初代培養または異なるタンパク質をコードする構築物を導入した形質転換細胞であってよい。このような方法により単離した細胞は、さらなる解析にかけることができる。例えば、このような細胞を占有する組換え構築物を配列決定し、目的のタンパク質をコードするDNAコード配列を特徴づけることができる。

40

#### 【0056】

#### 3. 複数マーカーの同時解析

ある方法では、集団内の同じ細胞で複数のマーカーを検出する。例えば、同じ細胞から分泌される2つ (またはそれ以上) のタンパク質の存在を検出することができ、または同じ細胞から1つまたはそれ以上の分泌タンパク質と1つまたはそれ以上の細胞表面マーカーの存在を検出することができる。このような方法により、集団に存在する異なる細胞種のヒストグラムを作成することができる。この様式で個々の細胞を特徴づける能力により、細胞の分化パターンを解析するのに有用な情報と臨床診断に有用な情報が提供される。例え

50

ば、免疫系のある疾患は、リンパ球によるある分子の分泌および／またはリンパ球である細胞マーカーの発現を特徴とする。特定の組み合わせの分子を分泌する細胞および／またはある細胞マーカーを有する細胞の同定は、患者に発症する免疫不全を同定するのに役立つ。

【0057】

#### 4. 診断、研究、および治療法

ある方法では、診断または免疫療法の効果をモニターする目的で、患者から細胞集団を採取する。細胞集団はリンパ球であることが多いが、全血、精液、唾液、涙、尿、糞便物質、汗、頬側塗沫標本、体毛、リンパ節、腫瘍、および骨髓試料等の組織または体液から得てもよい。ある方法では、治療目的で、患者から細胞を採取する。このような方法では、望ましい性質（例えば、病原に対する抗体の分泌、増殖因子、サイトカイン、またはホルモンの分泌、望ましい免疫応答への関与）を有する細胞の亜集団を同定することが目的である。例えば免疫療法のために、望ましい細胞種を単離し、改変し、刺激し、増幅させてから、患者に再導入することができる。

10

【0058】

患者からの特定の細胞集団の単離がインビトロでの増殖および／または他の操作の目的で適しているいくつかの例は、以下のとおりである。細胞性自己免疫疾患（多発性硬化症、糖尿病、関節リウマチ）の患者から、自己抗原特異的Th2細胞を採取することができる。これらの細胞に特徴的なサイトカインおよび細胞表面マーカーを以下に示す。細胞をエキソピボで増殖させ、回復を強めるために、または寛解を長引かせるためにそれらを採取した患者に再注入する。CD8細胞表面マーカーの発現により、感染症患者または癌患者から自己抗原特異的細胞障害性T細胞（CTL）を単離することが可能である。CTLは、感染微生物や癌上の1つまたはそれ以上の抗原に対して特異的である。CTLをエキソピボで増殖させ、ワクチン（例えば、抗癌、抗細胞内細菌感染（結核）、または抗寄生虫病（マラリア、リーシュマニア））を作製する。別の応用では、患者の膵島の細胞をスクリーニングし、インスリンを分泌する細胞を同定する。これらの細胞をインビトロで増殖させ、1型糖尿病を防ぎ進行を遅らせる手段として患者に再導入する。本方法は、一部の膵島細胞が患者に残存し単離と増殖のために使用可能な、疾患の発症以前の前期に実施可能である。または、健康なドナーから細胞を採取し、HLA抗原が適合しおよび／または免疫抑制療法を施した糖尿病患者に移植することができる。別の方法では、遺伝子の欠損または他の欠損を伴う患者の細胞をスクリーニングし、重要な生物活性分子に関して分泌欠損を有する細胞のサブセットを同定する。これらの細胞は、細胞をカプセル化するマイクロドロップを生理活性分子に対して特異的な検出試薬と接触させた際の、シグナルの欠除から識別することができる。適切な転写調節下で生体分子の分泌を促進する遺伝子を細胞に導入し、細胞を増殖させて患者に再注入する。別の方法では、多分化能を有する自己の幹細胞を患者から単離し、インビトロで望ましい細胞系譜（例えば、心臓、皮膚、神経細胞）に分化させ、患者に再導入して様々な疾患（例えば、心筋梗塞、皮膚の火傷、損傷した神経）を治療する。多分化能を有する幹細胞は、CD34マーカーおよび／またはCD38、CD33、CD45RA、およびCD71の欠除により識別できる。

20

30

【0059】

#### 5. サイトカインアッセイ法

サイトカインは、疾患の病因と治療の両方に重要な役割を果たす。インターフェロン、インターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子、およびインターロイキン2を含む数多くのこれらのタンパク質が臨床での使用に認可されており、治療に対する患者の反応を予測するためにはT細胞の機能的状態の診断が必須である。免疫系誘発への応答を達成するために必要である分裂促進因子または抗原による活性化により、サイトカインの分泌、受容体の上方制御、細胞の増殖、およびエフェクター機能（7～12）の発達というカスケードが生じる。様々なサイトカインが、他のサイトカインを含む様々な刺激からのシグナルに応答して、免疫系に存在する細胞から放出される。成熟T細胞は独特な組み合わせのこれらの制御分子を産生することによって抗原刺激に応答し、これらの反応の機能的な結果はサ

40

50

イトカインの分泌パターンに依存する(13~16)。サイトカインの分泌は、細胞の分化および機能的活性の重要なマーカーとして、基礎研究と臨床研究の両方において広く用いられている。細胞表面マーカーと合わせたサイトカインの分泌パターンにより、患者の免疫応答の種類、強度、および柔軟性についての重要な情報が提供される。

#### 【0060】

本方法は、選択的には個々の細胞の細胞表面マーカーと組み合わせて、サイトカインの分泌パターンを検出するのに特に有用である。応用には、移植の前後における患者の免疫状態のモニタリング、ワクチン接種後のTリンパ球の抗原特異的反応の測定、癌、自己免疫疾患、細菌感染、およびAIDS(1~6)等のウイルス感染の治療の有効性の評価、および薬剤の免疫毒性(7、8)の測定、ならびに表面発現と組み合わせた分泌特性に基づく単一の生存T細胞の回収が含まれる。本方法の利点には、(1) 高感度(1~10 ng/ml培養液またはマイクロドロップあたり1.25~12.5 fgの分泌サイトカインレベルが、日常的な検出の範囲内である)、(2) 定量的検出、(3) 単一細胞の解析、(4) サイトカインと細胞表面マーカーの同時解析、および(5) 生細胞の回収が含まれる。

10

#### 【0061】

##### (a) Th1細胞とTh2細胞の識別

例示的な診断アッセイ法は、Th1細胞種とTh2細胞種の同定と回収である。不均一な集団からTh1細胞またはTh2細胞を同定し単離するため、刺激した細胞をカプセル化し、細胞表面抗原の発現とサイトカインの分泌を同時に検出する。活性化Th1細胞は、CD3、CD4(ヘルパー細胞特異的)、およびCD69(活性化細胞特異的)を発現し、IFN $\gamma$ を分泌し、IL-4を分泌しない二重陽性細胞(CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-4<sup>-</sup>細胞)として同定される。類似の表現型(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>)を発現するが、IL-4を分泌しIFN $\gamma$ を分泌しない細胞(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>-</sup>IL-4<sup>+</sup>細胞)は、Th2細胞として同定される。多色フローサイトメトリー解析は、蛍光色素標識抗体：抗CD4/Cy-クロム(またはCD4/ECD)、抗CD69/PC5、抗IFN $\gamma$ /FITC、および抗IL-4/PEの組み合わせを用いて実施する。Th1細胞とTh2細胞は、選択的にFACSによってソーティングし増殖させる。分裂促進因子または抗原刺激した末梢血単核細胞からできるだけ迅速にTh1およびTh2亜集団を同定し単離する能力は、臨床医にとって有用である。これらの研究を利用して、1.) 患者の免疫状態を評価し、2.) T細胞クローンを拡大して、自己免疫疾患においてインビトロの標的に対する細胞を同定し、または3.) インビトロで腫瘍細胞を死滅させるようにプログラムし、拡大し、ドナーで治療に用い得る細胞障害性T細胞クローンを作製する。最適な刺激条件を用いてTh1細胞およびTh2細胞の両方を刺激することが可能であり、その結果、同じ単核細胞集団で48時間以内にIL-4とIFN $\gamma$ の両方の分泌を同時に検出することができる。

20

30

#### 【0062】

##### (b) 様々な刺激で活性化した後の、ヒト単球およびCD34+細胞のサイトカイン分泌特性と細胞表面発現特性の解析

単球および樹状細胞は、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、およびIFN $\gamma$ を含む様々なサイトカインの主要供給源である(65、67、68)。各種抗原で刺激された後、これらの細胞は生得反応および適応反応の両方に関与する。血液中では、循環しているMNC(単球およびB細胞等)の様々なサブセットが抗原提示細胞として機能し、特異的および制御性受容体リガンド相互作用ならびに可溶性サイトカイン相互作用を介してT細胞と直接連結できる。この細胞集団により産生されるサイトカインは、多くの病態において重要な制御的役割を担う。例えば、単球による炎症促進性サイトカインTNF $\alpha$ およびIL-1の産生増加は、感染性ショックに関与するとされている(67、69、70)。単球により放出されるサイトカインが全身的および局所的に高濃度であると、T細胞を含む他の細胞にカスケード効果を生じる可能性があり、結果として病理学的なサイトカインの不均衡が起こるが、これがこの病態の特徴である(67、68、71)。リポ多糖(LPS)および他の微生物産物に応答してヒト単球から産生されるサイトカインの測定値は、敗血症で起こる現象を解析するのに用いられるインビトロのモデルである(72)。

40

#### 【0063】

50

本方法を用いて、サイトカインの分泌および細胞表面抗原の発現を同定することにより、刺激に対する単一の生存単球の反応を測定できる。対象とする単球特性の例には、a) CD3/PC5、CD4/ECD、CD69/PE発現、およびTNF /FITC分泌、ならびにb) CD3/PC5、CD4/ECD、CD69/PE発現、およびIL-1 /FITC分泌が含まれる。

【0064】

(c) 間質細胞を含まない液体懸濁培養液で増殖したCD34<sup>+</sup>ヒト細胞のインビトロ分化の解析

造血系の原始細胞は、すべて既知である多くの種類の成熟血液細胞を産生する能力を特徴とする。末梢血では、CD34<sup>+</sup>細胞の大部分はCD38<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、およびCD71<sup>+</sup>を発現せず、したがってCD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD33<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD71<sup>-</sup>表現型を示す。これらの細胞は、特異的表現型特性の獲得または喪失およびサイトカインの分泌を特徴とする段階で分化する(56、73、74)。分化後では、ほとんどのCD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>細胞が顆粒球系細胞系譜のものであるのに対して、CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD71<sup>+</sup>細胞は赤血球系細胞系譜のものである。CD33抗原は単球および骨髄性前駆体の特徴的なマーカーであり、CD38はT細胞とB細胞で主に発現される。マイクロドロップ分泌アッセイ法を用いて、CD34<sup>+</sup>細胞のインビトロでの分化と増殖を個々の細胞ベースでモニターすることができる。この様式で分化をモニターすることにより、望ましい経路に沿った分化を導き、および/またはその結果望ましい速度で分化する培養条件を工夫することが可能となる。モニタリングは、患者に再度導入する目的で患者から採取したヒト造血細胞を、エキソビボで増殖させる培養条件を規定するのに有用である。

10

20

【0065】

(d) 複数パラメータ解析

いくつかの捕獲抗体をゲルマトリックスに結合することが可能であり、リンパ球亜集団の細胞表面マーカーと単球/マクロファージ/樹状細胞マーカーと共に単一の単核試料を解析し、Tリンパ球亜集団(ヘルパーT細胞または細胞障害性T細胞)、Th1細胞もしくはTh2細胞、ナチュラルキラー細胞、B細胞、単球/マクロファージ、または樹状細胞に基づいてソーティングすることができる。分泌に対する2つの捕獲抗体と2つの細胞表面マーカーを用いて、リンパ球または単球にゲートを設定し、単一レーザーによりリンホカイン分泌リンパ球または単球の亜集団を単離することができる。複数のタンデムレーザーを用いて、単一の単核末梢血試料で複数パラメータ解析を得ることが可能であり、複数のソーティ

30

【0066】

6. 稀なIgGスイッチ変種の単離

癌、心臓および自己免疫疾患、ならびに移植片拒絶反応を含む種々の疾患に関する抗体製品が入手可能である。残念なことに、研究と臨床に用いるために作製される多くのハイブリドーマはIgMサブクラスのものであり、このサブクラスは5量体構造でありプロテインAおよびプロテインGに対する親和性を欠くことから、一般に最も利用価値がないと考えられている。このためIgM抗体の精製および修飾は困難であり、Fab断片を作製するための酵素消化もほとんど不可能である。

【0067】

ハイブリドーマは細胞株に依存した極めて変動しやすい頻度で自発的にIgM産生からIgG産生にクラススイッチするが、一般に1:10<sup>6</sup>というスイッチ頻度は稀である(1、7)。IgG1変種またはよりよくはIgG2変種といったさらに都合のよいアイソタイプに対して、アイソタイプ産生を偏らせる多くの手順が考案されているが、これらの方法は多くのスクリーニングサイクルを伴い非常に時間を要し手間がかかる。これらの手順のいくつかは、様々なアジュバントの使用または刺激因子もしくはリンホカインの同時注入、抗原投与量の変更または追加免疫の反復(過剰免疫)(1、4~6)を含むが、合理的にスクリーニングされ得る細胞数と比較してスイッチ頻度が低いことから上記方法は依然として信頼できない。

40

【0068】

好ましくは上記の組成物必要条件に合致するマイクロドロップの使用により、十分な数の

50

細胞をスクリーニングして稀なIgGアイソタイプスイッチ変種を単離する手段が提供される。IgMアイソタイプの抗体を分泌する細胞の混合集団を、増殖培地のみ、または様々なB細胞変異源/刺激物質(精製組換え抗原、リポ多糖(LPS)、レチノイン酸)および/またはサイトカイン(rmIL-4、rmIFN )の存在下のどちらかで、一部の細胞でアイソタイプスイッチが起こるのに十分な期間(例えば7日間)増殖させる。アイソタイプスイッチ率を増加させるために、さらにマウス胸腺細胞支持細胞層を用いる場合もある。

【0069】

次に、細胞集団をマイクロドロップにカプセル化する。マイクロドロップは図1に示すマトリックスと同じ種類のマトリックスを含むことが可能であり、好ましくは上記のピオチンとマトリックス分子の好ましいモル比に一致するが必ずしもその必要はなく、捕獲分子はIgGアイソタイプ特異的抗体である。典型的には、捕獲分子は抗体である。捕獲分子はすべてのIgGサブタイプに特異的であってもよいし、IgG1、IgG2、IgG2a、IgG3、およびIgG4等の特定のサブタイプに特異的であってもよい。捕獲試薬に特異的なIgGアイソタイプ抗体を分泌する少なくとも1つの細胞で占有されるマイクロドロップでは、分泌抗体がマイクロドロップに結合する。IgMアイソタイプ特異的抗体を分泌する細胞で占有されるマイクロドロップでは、分泌抗体はマイクロドロップ内に捕獲されない。抗体を分泌するのに十分な時間、例えば1~12時間、マイクロドロップをインキュベートした後、検出試薬をマイクロドロップ内に拡散させる。典型的には、検出試薬は捕獲分子とは異なる部位で捕獲された分泌抗体に結合する。典型的には、検出試薬は、捕獲された目的のIgGアイソタイプの分泌抗体に対する抗体である。通常は、検出試薬は例えば蛍光で標識し、これによりIgG抗体を分泌する細胞で占有されるマイクロドロップの検出が可能となる。これらのマイクロドロップは、FACSまたは上記の他の方法により、他のマイクロドロップから分離することができる。次に、単離したマイクロドロップから細胞を回収することができる。この選択方法により、0.0001%程度しかないIgG分泌細胞の亜集団の検出と単離が可能となる。上記方法の変法では、抗体を分泌する細胞を、ほとんどの占有マイクロドロップが複数の細胞により占有される条件下でカプセル化する。解析は、前述と同様に行う。各マイクロドロップにカプセル化される複数の細胞のうちいずれか1つがIgG抗体を分泌する場合、このマイクロドロップは陽性と判断される。このようなマイクロドロップから回収した細胞は、次に少なくとももう一度、カプセル化とスクリーニングのサイクルを繰り返す。次のカプセル化サイクルではマイクロドロップに対する細胞の平均比率を下げて行い、最終的には、スクリーニングの最終ラウンドでほとんどの占有マイクロドロップが単一細胞をカプセル化するようにする。このような反復法により、より多くの細胞集団をスクリーニングすることが可能となる。

【0070】

さらなる変法では、ウェルあたり約1,000個の細胞までという一定量の細胞をマイクロタイターウェルに分配する。次に、計量棒アッセイ法を用いて、ウェルから回収した上清をIgGアイソタイプの抗体について試験する。計量棒アッセイ法により陽性シグナルを示すウェルの細胞のみをカプセル化し、マイクロドロップ法を用いてスクリーニングする。

【0071】

#### 7. マイクロドロップ検出法と他の方法との比較

表面発現と分泌特性の両方により、目的のT細胞を同定する幅広い市販のアッセイ法を以下に説明する。それぞれのアプローチは特定の応用に対する利点を有し、いくつかは使用が簡便で、利用価値があり、比較的安価である。提案するマイクロドロップ型式は、マイクロカプセル化技術、フローサイトメトリー、および入手可能な抗体試薬に依存する。他の方法と対照的に、マイクロドロップ分泌アッセイ法では、目的のサイトカインを分泌する単一細胞の小さな亜集団を検出すること、および表面発現と分泌特性を同時にアッセイすることが可能である。本技術はほとんどのELISA法の種類とフローサイトメトリーアッセイ法の手順と適合し、さらに免疫療法に関する調査や研究で使用するために機能的に活性のある細胞の集団を回収することが可能である。

【0072】

10

20

30

40

50



サイトカインを検出し定量する上清アッセイ法

生体液および組織培養上清中の可溶性サイトカインを定量するいくつかの方法が開発されているが、それぞれの技術には少なくとも1つの重要な制限がある。これらのアプローチは単一細胞ベースではないため、目的のサイトカインを分泌する細胞サブセットの情報が提供されない。

【0073】

バイオアッセイ法

バイオアッセイ法はサイトカインの存在下での特殊化した細胞株の増殖に依存し、最も感度の低いアプローチである。比較的単純でよく特徴が調べられているが、これらの型式は再現性がなく、特異性の低さからあるサイトカイン（IL- およびIL-1 等）の間ではサイトカインの区別ができないことが多い。さらに、これらのアッセイ法は半定量的であるのみで、場合によっては生体試料中の阻害剤の存在によりサイトカインレベルが過小評価される（35）。

10

【0074】

ELISA法

特有の高い特異性と感度から、ELISA型式は可溶性サイトカインおよびケモカインを検出し定量するためにますます使用されてきているが、その使用は1度のアッセイで単一のサイトカインを測定するだけに制限される。酵素を介するシグナル増幅を用いるため、サンドイッチELISA法では、生理的に相当する（例えば、 $> 5 \sim 10$  pg/ml）濃度の特異的サイトカインまたはケモカインを測定することが可能である（36）。本アプローチの感度は、ユーロピウム標識抗体（Ab）（37）と細胞培養捕獲ELISA法（2、38）を用いる非競合免疫測定法（dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay）（DELFLIA）等の新しいアプローチの開発に伴って上昇している。

20

【0075】

フローメトリックス（FlowMetrix）（商標）システム

フローメトリックス（商標）システム（ルミネックス（Luminex）、テキサス州オースティン）では、従来の免疫吸収アッセイ法に緑色蛍光レポーター色素と共に固相支持体としてビーズを用い、その後フローサイトメトリー解析を行う。個々のビーズセットをフローサイトメトリーで分離することができるため、多くのアッセイを同時に行うことができ、少量（ $100 \sim 200 \mu\text{l}$ ）の細胞培養上清または生体液で複数検体の定量が可能である（39）。フローメトリックス（商標）技術では細胞集団全体の平均分泌量を測定するのみであり、生細胞の亜集団を選択して回収する目的で多様な細胞集団をスクリーニングするためには有用ではない。単一検体を検出する上ではフローメトリックスシステムの感度はELISAに匹敵するが（ピコグラム）、複数解析を行う場合には感度はナノグラムレベルまで低下する（39）。

30

【0076】

特異的サイトカイン核酸プローブを用いたインサイチューハイブリダイゼーション法およびサイトカインmRNA発現アッセイ法（RT-PCR法）

インサイチューハイブリダイゼーションまたはRT-PCRは、発現によって生物活性のあるタンパク質の翻訳/分泌が明らかに示されるわけではないが、サイトカイン遺伝子を発現している細胞を同定するのに有用な技術である（40）。細胞内の特異的サイトカインメッセージの発現をアッセイして定量するメッセージ増幅表現型分類検査法（Message Amplification Phenotyping）（MAPPING）も最近開発された（41）。MAPPING解析法は、細胞からRNAを単離するために微細な手順を使用し、その後全細胞RNAをcDNAに逆転写し、PCRによりサイトカイン特異的DNA断片を酵素的に増幅する。本技術により、インサイチューハイブリダイゼーションのような個々のサイトカインアッセイ法に必要な複雑さや時間を要せずに、細胞内に存在するmRNAの全体的なパターンを同時に決定することが可能となる。ノーザン解析法およびリボヌクレアーゼ保護アッセイ法を用いても、限られた数のサイトカインを同時に検出することが可能である（42）。しかし、RT-PCR法やインサイチューハイブリダイゼーション法では、アッセイは定量的ではなく、死細胞で行うため、自然のサイト

40

50

カインの分泌を直接測定するものではない。

【0077】

単一細胞サイトカインアッセイ法

リンパ球の機能的不均一性の理解の重要性から、単一細胞アッセイ法への関心が高まってきた。現法には、ELISPOT法、限界希釈解析法、逆溶血ブランクアッセイ法、免疫組織化学法、および単一細胞PCR法が含まれる(41、43)。これらの方法により個々の細胞によるサイトカイン分泌を解析することが可能であるが、時間を要し手間がかかるため、大きな細胞集団のハイスループットスクリーニングには適さず、解析後に目的の単一生細胞を回収することは不可能である。

【0078】

細胞内サイトカイン染色法

最近になって、特異的抗サイトカインモノクローナルAbによる細胞内染色に、混合細胞集団中の個々のサイトカイン産生細胞の複数パラメータフローサイトメトリー解析が有用になってきた(3、6~8、11、44~48)。高品質の試薬およびキット、ならびに細胞表面および細胞内抗原を同時検出する最適化した手順書が、市販されている(ベクトンディッキンソン(Becton Dickinson)/ファーマンジェン、およびR&Dシステムズ等)。通常、染色前に様々な刺激により細胞をインビトロで活性化する。フローサイトメトリー法は、蛍光色素標識抗体を用いた細胞内サイトカインおよび細胞表面マーカーの直接検出に基づく。細胞調製法には、固定法、透過処理法、およびサイトカインを細胞内に保持するためにモネンシンまたはプレフェルジン等の薬剤で処理することによりサイトカイン分泌を中断する方法が含まれる。複数パラメータフローサイトメトリーによって重要な細胞内機能的マーカーを解析する能力により、臨床研究に独特の利点が提供される。しかし、アッセイ手順により細胞が死細胞となるため、機能的分泌の測定および研究や治療応用のためにFACSを用いて目的細胞を回収し増殖することは不可能である。

【0079】

アフィニティマトリックス技術

特異的タンパク質の分泌に基づき、細胞を同定し単離する2つの新しいアプローチが最近開発された。どちらも、生細胞の表面に結合された分泌産物に特異的な人工アフィニティマトリックスを用いる。1つめのアプローチは、細胞表面タンパク質をビオチン化し、ストレプトアビジンおよびビオチン化捕獲Abと共にインキュベートすることによる。分泌産物の漏出を防ぐため、インキュベーション段階は予熱したゼラチンを含む低透過性の培地で行う。陽性細胞のフローサイトメトリー検出に、蛍光色素標識抗体染色法を用いる(49、50)。2つめのより直接的なアプローチは、ミルテニーバイオテック(Miltenyi Biotec)(カリフォルニア州オーバーン)で開発されたもので、共通のリンパ球表面マーカーCD45に対して作られたAb-Ab複合体を用いる(49~54)。分泌後、蛍光色素標識抗サイトカイン抗体で細胞を標識し、抗蛍光色素抗体(抗FITCまたは抗PE Ab)でコーティングした磁気マイクロビーズと共にインキュベートしてから検出する。陽性細胞は、磁気マイクロビーズとのインキュベーション前にフローサイトメトリーにより解析することができるか、またはMACSカラムを用いて濃縮することができる(52~54)。細胞表面マーカーの同時染色(Ab-Ab複合体で封鎖されるCD45以外)も可能である。

【0080】

他の方法と比較し、細胞アフィニティマトリックス技術は、分泌産物に基づいた多数の個々の細胞の解析とソーティングが可能である。生細胞の単離に成功したことが報告されているが、細胞上に構築されたアフィニティマトリックスが機能と生存度に及ぼす影響は懸念するところである。さらに、個々の細胞により分泌される産物の量、および同時に検出され得る細胞表面マーカーの数は限られている。その上、分泌レベルを推定することは困難である。このアッセイ形式を用いると、アフィニティマトリックスに結合した分泌産物の量は標識前に細胞表面に発現された受容体の数に依存することになる。アフィニティマトリックス内の結合部位の濃度が低いとすぐに飽和してしまい、分泌の低い細胞と分泌の高い細胞を識別することはほぼ不可能である。

## 【 0 0 8 1 】

現行のサイトカイン検出法の比較を表1に示す。

## 【 0 0 8 2 】

(表1) サイトカイン検出に関するアッセイ法の特性の比較

特性	バイオアッセイ法	ELISA 法	ビーズを用いるシステム	RNA 検出法	ELISPOT 法	細胞内 サイトカイン 染色法	アフィニティー マトリックス 技術	GMD アッセイ 型式
特異性	なし	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり
検出レベル	低い	5-10 pg/ml	0 pg/mlまたは 0-40 ng/ml	高い	中程度	未検	未検	-10 ng/ml または 25-12.5 fg/GMD
定量性	半定量的	あり	あり	なし	なし	なし	なし	あり
単一細胞解析	なし	なし	なし	可能	あり	あり	あり	あり
サイトカインと 細胞表面 マーカーの 同時検出	なし	なし	なし	なし	なし	あり	あり、しかし 分泌サイト カインは 1つのみ	あり
生細胞の検出	なし	なし	なし	なし	なし	なし	あり	あり

10

## 【 0 0 8 3 】

## 8. キット

本発明では、マイクロドロップを作製するキットについてさらに説明する。キットは、モルマトリックス成分分子あたり0.85未満、好ましくは0.01～0.2モルビオチンのモル比で、ビオチンに結合したマトリックス分子（典型的にはアガロース）を含む。キットは、ストレプトアビジン、第2ビオチン分子に結合した捕獲分子、およびまたは検出分子を含んでもよい。キットは典型的に、キットの使用法を提供するラベルも含む。上記のようなIgGスイッチ変種を検出するためのキットも提供する。このようなキットは、好ましくは上記のモル比であるが必ずしもその必要はないビオチン化マトリックス分子、捕獲分子と検出分子、および選択的には標識化を指示する使用説明書を含む。ラベルという用語は、製造、輸送、販売、もしくは使用中のいかなる時でもキットに添付されるか、または別の方法でキットに付随する書面または記録による任意の資料を意味する。例えば、ラベルという用語は、広告印刷物およびパンフレット、包装材料、使用説明書、オーディオもしくはビデオカセットテープ、コンピューター・ディスク、ならびにキットに直接記された文書を包括する。

20

30

## 【 0 0 8 4 】

## 実施例

## 1. 材料および方法

## 細胞および培養条件

## 1) トランスフェクト細胞株

本発明者らは、以下のとおりにリポソームによる手順を用いて（Lipofectin（登録商標）、ライフテクノロジーズ（Life Technologies））、hrIL-4を分泌する安定的なトランスフェクトCHO細胞株（CHO hrIL-4）を作製し：PCRによりhrIL-4遺伝子配列を増幅しpIRESneoベクター（クロンテック（Clontech））にこの配列を挿入して、hrIL-4遺伝子を含むプラスミドを構築した。pIRESベクターは脳心筋炎ウイルス（ECMV）の減弱した配列内リポソーム進入部位（IRES）を含むが、この部位によって1つのメッセンジャーRNAから2つの読み枠の翻訳が可能となる。トランスフェクションの手順およびクローニングは、メーカーの推奨するように実施した。CHO IL-4細胞株は、1週間に2回、トリプシン処理した細胞を1:10に分配し、5%の透析済みFBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むMEM培地で維持した。

40

## 【 0 0 8 5 】

## 2) 抗原特異的T細胞株

抗原特異的マウスT細胞株を作製するため、Balb/c雌マウスに合成ペプチドM1081（マサチ

50

ューセツジェネラルホスピタル（マサチューセツ州ボストン）、N. Rosenthal氏による分与、配列：

CGMYCAYTIPGMGGNSLM

分子量1,860)を免疫した。心臓の発達に關与するタンパク質、E1TF2Aの一部であるこのペプチドを担体として用いたKLHに結合し、4週間おきに1年間、動物の腹腔内に注入した。無菌的に摘出した脾臓および腸間膜のリンパ節から単一細胞懸濁液を調製するため、シリジブランジャーを用いてペトリ皿の中で70µm細胞ろ過器により器官をバラバラにした。次に、10%ウシ胎仔血清（FBS、ハイクロン（HyClone）、ユタ州ローガン）、HEPES、抗生物質（ペニシリンおよびストレプトマイシン、ギブコBRL（GibcoBRL）、ニューヨーク州グランドアイランド）、および $5 \times 10^{-5}$ Mの2-メルカプトエタノール（2-ME、シグマ、ミズーリ州セントルイス）を含むDMEM（ギブコBRL）に単一細胞懸濁液を再懸濁した。赤血球を溶解するため、溶解緩衝液（シグマ）で細胞懸濁液を処理し、5% FBSを含むハンクス平衡塩類溶液（HBSS、ギブコ）で2回洗浄した。トリパンプルー（TB、シグマ）排除アッセイ法により、血球計算板チャンバーで細胞生死判別試験とカウントを行った。自己支持細胞としての用途のため、一定量の脾細胞を凍結した（-70℃）。Londei, M.ら、1991（55）によって記載される従来の手順に従い、mLN細胞を用いて抗原特異的T細胞株を作製し、マイトマイシンCで処理した自己支持細胞およびmrIL-2の存在下で、隔週ごとに特異的抗原で再刺激することにより培養液中で維持した。

10

20

【0086】

### 3) マウス脾細胞

未処置のBalb/c雌マウスから無菌的に脾臓を摘出し、上記のように単一細胞懸濁液を調製した。完全培地で細胞濃度を $1.5 \times 10^6$ /mlに調整し、24ウェルプレートの3ウェルそれぞれに2 ml（ $3 \times 10^6$ 細胞）ずつ添加した。残りの細胞は、一定分量に分けて凍結した。細胞を刺激するため、ConA（5µg/ml）またはPHA（5µg/ml）のどちらかを実験ウェルに添加し、ピペッティングにより混合した。完全培地のみの細胞を陰性対照として使用した。マイクロドロップサイトカイン分泌アッセイ法を行う前に、5% CO<sub>2</sub>存在下で37℃で24時間インキュベートした。

【0087】

### 4) ヒストパーク（Histopaque）1077-1（シグマ）技術を用いて、健康なドナーから新鮮なヒトPBMCを単離した

30

単離した細胞（ $3 \times 10^6$ ml）は、PHA（5µg/ml）の存在下または非存在下で、RPMI-1640+10% FBS（透析済み）で5% CO<sub>2</sub>のもと37℃で24時間培養した。

【0088】

### 免疫試薬

マイクロドロップ分泌アッセイ形式において捕獲抗体およびレポーター抗体として使用するため、マウスサイトカインおよび精製組換えサイトカイン（mrIFN、mrIL-2、mrIL-4、mrIL-6）に対するビオチン化および蛍光色素標識（FITCまたはPE）モノクローナル抗体、PE標識抗マウスCD3、ならびにFcγRII/III受容体に対して作製した抗体（Fcブロック（Fc Block）（商標））をファーミンジェン社（PharMingen Inc.）（カリフォルニア州サンディエゴ）から入手した。hrIL-4抗体対もファーミンジェン社から入手した。マイトマイシンC、ConA、およびPHAは、シグマ（ミズーリ州セントルイス）から入手した。抗ヒトCD3/PE-Cy5 Abおよび抗ヒトCD4/ECD Abは、イムノテック（Immunotech）（ベックマンコーポレート、フロリダ州マイアミ）から入手した。抗ヒトCD69/FITC、抗ヒトIFNγ/PE、ビオチン化抗ヒトIFNγ、および精製rh IFNγは、BD/ファーミンジェン（カリフォルニア州サンディエゴ）から入手した。

40

【0089】

### ゲルマイクロドロップの作製

異なる量のビオチンとセルミックス（CeIMix）（商標）200エマルジョンマトリックス（ワンセルシステムズ社、マサチューセツ州ケンブリッジ）を含む2つのビオチン化アガロ

50

ースカプセル化マトリックス、セルバイオゲル (CelBioGel) (商標) -1またはセルバイオゲル (商標) -2を用いて、マイクロドロップを調製した。1バッチ分  $20 \times 10^6$  個のマイクロドロップを調製するため、 $400 \mu\text{l}$  量のアガロースを電子レンジで75秒間加熱し、10%ブルロニック酸 (シグマ)  $25 \mu\text{l}$  を界面活性剤として添加した。検量線の作成に使用する非占有マイクロドロップを作製するため、完全培地  $100 \mu\text{l}$  をアガロース / 界面活性剤混合液に添加した。ボルテックスし、37 で3分間平衡化した後、ガラスのシンチレーションバイアル中の37 に予熱したセルミックス (商標)  $200 \mu\text{l}$  エマルジョンマトリックス  $15 \text{ ml}$  に、この混合液を1滴ずつ添加した。このバイアルをセルシス (商標)  $100 \mu\text{l}$  マイクロドロップメーカー (ワンセルシステムズ社) に取り付け、混合液を以下のように乳化した: 室温 (RT) にて  $2,100 \text{ rpm}$  で1分間、氷浴中にて  $2,100 \text{ rpm}$  で1分間、氷浴中にて  $1,100 \text{ rpm}$  で10分間。650 gで10分間遠心分離することにより油を除去し、その後HBSS  $10 \text{ ml}$  を加えて450 gで5分間遠心分離することにより2回洗浄した。

#### 【0090】

##### 単一細胞のカプセル化

血球計算板チャンバーで細胞数をカウントし、トリパンブルー排除アッセイ法により生存度を算出した後、活発に増殖している培養液の細胞を  $1 \times 10^7 / \text{ml}$  の濃度で完全培地に再懸濁した。馴化培地を作製するため、細胞培養液の上清を遠心分離し ( $800 \text{ g}$  で5分間)、細胞残屑を除去した。続いて、完全培地  $100 \mu\text{l}$  中に  $1 \times 10^6$  個の細胞をアガロース / 界面活性剤混合液に添加し、上記のようにマイクロドロップを形成した。占有マイクロドロップの数を増加させるため、一部の実験では、上記のカプセル化手順の前に、それぞれ  $1 \times 10^6$  の細胞を含む2試料分のセルバイオゲル (商標) -2をセルミックス (商標)  $15 \text{ ml}$  に再懸濁した。

#### 【0091】

##### 複数細胞のカプセル化

カプセル化する前に、細胞を2枚の  $75 \text{ cm}^2$  フラスコまたは2枚の12ウェルプレート ( $2 \text{ ml}$  / ウェル) で5日間培養する。プールした細胞 (総数は  $2 \times 10^6$  を超える) をカウントし、増殖培地  $200 \mu\text{l}$  または  $300 \mu\text{l}$  に再懸濁する。2試料分の融解したセルバイオゲル  $500 \mu\text{l}$  を10%ブルロニックF-68溶液 (シグマ アルドリッチ) (Sigma-Aldrich) と共にボルテックスし、37 で3分間平衡化して、次にそれぞれを細胞懸濁液  $100 \sim 150 \mu\text{l}$  と混合する。これらの混合液を予熱したセルミックス (商標)  $15 \text{ ml}$  に添加して、蓋をしてから勢いよく10回振り、エマルジョンを形成する。次に、このバイアルをセルシス100 (商標) マイクロドロップメーカー (ワンセルシステムズ社) に取り付ける。直径の大きなマイクロドロップを作製するためには、乳化に  $1,800 \text{ rpm}$  および  $1,000 \text{ rpm}$  の速度を使用する。作製したマイクロドロップをDPBSで2回洗浄して油を除去し、 $70 \mu\text{m}$  細胞ろ過器でろ過し、血球計算板チャンバーでカウントする。

#### 【0092】

##### アガロースマトリックスにおける捕獲抗体の固定化

次にHBSS+2% FBSでマイクロドロップを洗浄し、この懸濁液をDMEM+5% FBS  $8 \text{ ml}$  中でストレプトアビジン ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) と共に室温で15分間インキュベートすることにより、架橋を構築した。HBSS+2% FBSで洗浄した後、マイクロドロップをDMEM+5% FBS  $4 \text{ ml}$  に再懸濁し、同量の捕獲試薬 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のビオチン化抗サイトカイン抗体) を添加して最終濃度を  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  とした。続いて、試料を室温で15分間インキュベートした。マイクロドロップ懸濁液をHBSS+2% FBSで再度洗浄し、非結合の捕獲抗体を除去した。

#### 【0093】

##### サイトカイン分泌インキュベーションおよび蛍光標識

次に、カプセル化細胞を予熱した (37) 完全培地  $30 \text{ ml}$  に再懸濁し、5%  $\text{CO}_2$  のもと37 で3.5時間または18時間インキュベートし、サイトカインの分泌を可能にした。分泌インキュベーション後、マイクロドロップ懸濁液をHBSS+2% FBSで洗浄し、続いてDMEM+5% FBS  $4 \text{ ml}$  に再懸濁した。マイクロドロップ懸濁液に、蛍光色素標識抗サイトカイン抗体 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む同量のDMEM+5% FBSを添加した。死細胞を識別するため、最終濃度  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  のヨウ化プロピジウム (PI、モレキュラープローブ (Molecular Probes、オレゴン州ユー

ジーン)を添加した。室温で20分間インキュベートした後、試料を洗浄し、フローサイトメトリー解析するため専用チューブに移した。

#### 【0094】

##### 細胞表面染色

レポーターAbで分泌サイトカインを標識した後、PE標識抗CD3モノクローナルAbでCD3細胞表面受容体を染色した。Fc受容体を介する非特異的な免疫蛍光染色を低減させるため、カプセル化細胞をHBSS+2% FBS 1 mlに再懸濁し、Fcブロック(商標)1 $\mu$ gと共に4で15分間インキュベートした。次に、試料を洗浄し、抗CD3/PE抗体5 $\mu$ gを含むHBSS+2% FBS 1 ml中で4にて30分間インキュベートすることにより、PE標識抗CD3モノクローナル抗体で染色した。HBSS+2% FBSで洗浄した後、試料をフローサイトメトリーにより解析した。

10

#### 【0095】

##### アッセイ法の対照

蛍光Abで染色した分泌試料に加え、4つの別々のアッセイ対照を調製した。a) 非染色対照(細胞の自己蛍光を検出するため):細胞のカプセル化後、マイクロドロップの一定量を直接保存した。b) 捕獲なしの対照(免疫試薬のアガロースマトリックスまたは細胞表面への非特異的結合によるバックグラウンドの蛍光を検出するため):捕獲Abの結合段階を省略する以外は、マイクロドロップの一定量を通常どおりに加工した。c) 陽性対照(試薬が適切に働くことを保証するため):捕獲抗体を添加した後かつ分泌インキュベーション前に、一定量のマイクロドロップを分取し、精製サイトカインとインキュベートした。およびd) アイソタイプ対照(蛍光標識検出抗体の非特異的結合が起こるか否かを検出するため):分泌インキュベーション段階後に一定量のマイクロドロップを分取し、検出抗体として同様に標識した関連アイソタイプ対照抗体と共にインキュベートした。

20

#### 【0096】

##### マイクロドロップ上清アッセイ法

従来のELISA法の変法として、本発明者らはまた、サイトカイン検量線により検出レベルを算定する細胞を用いるマイクロドロップ上清アッセイ法(Flowmetrix(商標)(ルミネックス、テキサス州オースティン)システムに類似)を開発した。分泌アッセイ手順の一定量のマイクロドロップ懸濁液を、精製サイトカインと共にインキュベートする代わりに培養上清(直接、または1:10もしくは1:100の比率で新鮮培地で希釈した後)と共にインキュベートする以外は、陽性対照のように(上記)処理した。細胞なしのマイクロドロップで作成した検量線から、平均蛍光強度および上清希釈係数に基づいて上清中の相対的なサイトカイン濃度を決定した。本アッセイ型式を用いて、分泌アッセイ法を行った日と同じ日に回収した培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。

30

#### 【0097】

##### マイクロドロップの大きさがアッセイ法の再現性に及ぼす影響

マイクロドロップは乳化工程を経て作製されるが、その大きさはガウス分布を示す:微粒子の大部分(~76%)は、平均値の両側において標準偏差の範囲内に入る。より小さいマイクロドロップは非占有マイクロドロップである傾向があるため、占有マイクロドロップの中では大きさの分布はより小さくなる。サイトカイン分泌アッセイ法では、再現性は、マイクロドロップあたりの捕獲部位数および分泌時間中に個々の細胞から分泌されるサイトカイン量に対する依存度よりも微粒子の大きさの変動に対する依存度の方が低い。

40

#### 【0098】

##### アッセイクロストークの可能性

「クロストーク」(分泌細胞で占有されるマイクロドロップからの分泌産物の漏出)により、マイクロドロップに偽陽性を生じる可能性があり、これは上清アッセイ法を用いて判断することができる。これは、細胞(ハイブリドーマまたはトランスフェクト細胞等)がマトリックスに結合した捕獲抗体より過剰にタンパク質を分泌する状態に対する懸念事項である。適切な分泌時間を選択することにより、クロストークを実質的に排除することが可能である。例えば、マイクロドロップ分泌アッセイ法を行い、バイオプロセス応用のためにタンパク質分泌量の高いCHOおよびハイブリドーマ細胞を単離する場合、15~30分と

50

いうことが多いがシグナルがバックグラウンドを超え次第、かつ抗体結合部位が飽和する以前に、細胞をソーティングすることができる。サイトカインを分泌する細胞の亜集団をアッセイする状態では、通常はサイトカインレベルは低く平均マイクロドロップの捕獲容量よりも低いため、「クロストーク」は理論上の懸念事項にとどまる。捕獲部位数が分泌サイトカインの量よりも過剰であることを保証するため、分泌の定量的解析や実験間での比較を行うことも可能である。

#### 【0099】

##### 顕微鏡観察

カプセル化細胞は、位相差対物レンズを装備したニコン (Nicon) ECLIPSE E600 蛍光顕微鏡を用いて可視化した。トリパンブルー染色後の細胞生存度を、顕微鏡によって調べた。フローサイトメトリー解析の前に、480/30 nm 励起フィルタと 535/40 nm バリアフィルタのセットを用いて、FITC 染色されたマイクロドロップを調べた。546/10 nm 励起フィルタと 590 nm バリアフィルタを用いて試料を調べることにより、PI 処理した細胞および PE 染色した細胞の赤色蛍光を検出した。試料は、400x または 1000x どちらかの倍率によって観察した。蛍光顕微鏡を用いて、カプセル化細胞の生存度を測定し、分泌細胞を含む陽性染色されたマイクロドロップを同定した。捕獲なしの対照でバックグラウンドの蛍光が低いことおよび陽性対照で強い蛍光が得られることから、アッセイ法が適切に行われたことが示された。

10

#### 【0100】

##### 密度勾配分離法

非占有マイクロドロップと占有マイクロドロップの分離は、例えば DPBS 中の 5%、6%、7%、および 8% パーコール (シグマ #P1644) の段階的な密度勾配でマイクロドロップを遠心分離することにより達成される。ルアーロックチップとナイロンコックの付いた 10 cc シリンジ (B-D) 内で、4つの濃度それぞれ 1.5 ml からなる勾配を無菌的に調製する。マイクロドロップ懸濁液 2 ml を勾配に上層し、上部をパラフィルムで覆う。シリンジアッセンブリーを 50 ml 遠心管 (コーニング (Corning)) に挿入し、アッセンブリーを 18~22 °C にて 400xg で 20 分間遠心分離する。6% パーコールの層に非占有マイクロドロップが含まれるので、これを廃棄する。底の 3 ml、すなわち 7~8% パーコールを回収することで、主に (~90%) 細胞を占有するマイクロドロップの回収物が得られる。2倍量の緩衝液でマイクロドロップを 2 回洗浄し 400xg で遠心分離することにより、パーコールを除去する。

20

30

#### 【0101】

##### フローサイトメトリー

ファックスキャン (FACScan) (ベクトンディッキンソン、カリフォルニア州サンノゼ) またはエピックスエリート (EPICS Elite) (商標) (ベックマンコールター、フロリダ州マイアミ) を用いて、マイクロドロップ試料を解析した。どちらもワンセルシステムズで入手可能である。蛍光色素標識した (FITC または PE) 検出試薬および PI 標識した死細胞を、アルゴンレーザーの 488 nm スペクトル線で励起した。緑色 (FITC) および赤色 (PE または PI) 蛍光を、それぞれ 525 nm、575 nm、および 630 nm のロングパスフィルタで収集した。統計分析には、エピックスエリート 4.02 ソフトウェア (ベックマンコールター) を用いた。非占有マイクロドロップの蛍光強度を測定するため (検量線)、それぞれの試料について 20,000 個の結果を得た。占有マイクロドロップでは非占有マイクロドロップに比較して光散乱特性が増加し、前方および直角光散乱のプロットで識別された。光散乱を用いて、占有マイクロドロップを非占有マイクロドロップから容易に分離し、非占有マイクロドロップはスクリーンから消えるまで前方散乱閾値または弁別値を増加することによりデータ収集から削除した。2つまたはそれ以上の細胞で占有されるマイクロドロップは、FS の増大から、単一細胞で占有されるマイクロドロップと識別した。データ収集と解析のため、単一の生 (PI 陰性) 細胞で占有されるマイクロドロップのみにゲートを設定した。この亜集団を同定するため、二次元パラメータドットプロット (PI 対 FS) を用いた。次に、対照と分泌サンプルで、このマイクロドロップ亜集団を緑色 (FITC) または赤色 (PE) 蛍光について解析した。負の対照よりも高い蛍光は、サイトカイン分泌細胞を表す。補正設

40

50

定のため、FITCもしくはPE標識検出試薬またはPIのみで染色した試料を流し、各試料におけるスペクトルの重複をコンピューターで減算した。試料は毎秒およそ600個の速度で流し、少なくともゲートを設定した10,000個の結果を収集した。

#### 【0102】

蛍光活性化セルソーティング (FACS)

100  $\mu$ mノズルを装備したエピックスエリート (商標) を用いて、サイトカイン分泌細胞をソーティングした。単一のPI陰性 (生) 細胞で占有されるマイクロドロップ垂集団の蛍光を解析した。陽性蛍光を生じるマイクロドロップにゲートを設定し、毎秒600~800個の速度でソーティングした。25%の馴化培地を含む増殖培地で満たした15 mlチューブに、陽性マイクロドロップを回収した。

10

#### 【0103】

ソーティング後の生細胞の回収および増殖

ソーティング手順中に収集した陽性マイクロドロップを、25%馴化培地および1 U/ml (トランスフェクトCHO細胞用) または3 U/mlアガラーゼ (ニューイングランドバイオラボ (New England Biolabs)、マサチューセッツ州ビバリー) を含む増殖培地に入れ、5% CO<sub>2</sub>のもと37 °Cで7~10日間インキュベートした。抗原特異的リンパ球を回収するため、アガラーゼ (3 U/ml) およびmrIL-2 (10 ng/ml) 存在下で18時間インキュベートした後、特異的Ag (10  $\mu$ g/ml)、mrIL-2 (10 ng/ml)、およびマイトマイシンCで処理した自己支持細胞をソーティングした細胞と1:1の比率で希釈して添加し、フラスコをインキュベーターに戻した。細胞生存度および増殖は、トリパンブルー染色後に顕微鏡を用いて血球計算板チャンバーでカウントすることにより、1日おきに測定した。

20

#### 【0104】

マイクロドロップのプラスチックまたはガラス表面への結合

マイクロドロップの無菌未コーティングポリスチレン表面 (B-Dファルコン (B-D Falcon) ペトリ皿、#351008または#1006) への結合は、ビオチンが共有結合したアガロース (例えばセルバイオゲル (商標) -1) からマイクロドロップを調製することにより達成される。細胞を含むマイクロドロップの大部分が単一細胞で占有される手順に従い、マイクロドロップを調製する。パーコール勾配で得られる占有マイクロドロップを、タンパク質なしの組織培養緩衝液、ダルベッコリン酸緩衝食塩水 (DPBS) またはハンス平衡塩類溶液 (HBSS) で2回洗浄する。緩衝液を含むペトリ皿にマイクロドロップを添加し、室温のもと水平面で静置しておく。結合は15分以内に完了するが、これはアガロース表面のポリスチレンの官能基へのおそらく水素結合を介した結合による結果であると考えられ、結合段階過程で緩衝液中にタンパク質が存在する場合に限りこの結合はブロックされる。マイクロドロップが結合していないペトリ皿上の部位のブロッキングは、5%ウシ胎仔血清のような血清を添加することにより達成される。ブロッキングは5分以内に完了し、これにより固相支持体ネットワークがマイクロドロップ内のみで構築されプレート表面では構築されないことが保証される。続くすべての段階のタンパク質、培地、およびインキュベーション条件は、結合を妨げずまた逆戻りさせない。

30

#### 【0105】

抗体分泌のための細胞および培養条件

B型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg) に特異的なmIgM を分泌するハイブリドーマ細胞株CRL-8018、およびヒツジ赤血球に特異的なmIgG3を分泌するハイブリドーマ細胞株TIB-114 (どちらもATCCから入手) を実験に使用した。CRL-8018ハイブリドーマ細胞は、20% FBS (ギブコラボ (Gibco Lab.)) を補充したイスコフ改変ダルベッコ培地で培養した。TIB-114ハイブリドーマ細胞株には、10% FBS (ギブコBRLプロダクツ (Gibco BRL Products)) を補充したDMEMを用いた。どちらのハイブリドーマ培養液も、2 mM L-グルタミン (ライフテクノロジーズ) およびPen/Strep (ペニシリン1 U/ml / ストレプトマイシン 1  $\mu$ g/ml、ライフテクノロジーズ) をさらに含む。培養液は週に2回新鮮培地を添加するかまたは交換することにより、加湿インキュベーターで5% CO<sub>2</sub>のもと37 °Cで、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  細胞/mlの密度で維持した。

40

50



## 【0106】

マイクロドロップのアイソタイプ特異的検出および単離アッセイ法

マウスIgMを分泌するハイブリドーマCRL-8018とマウスIgG3を分泌するハイブリドーマTIB-114の人工的な混合液を実験に使用した。まず、CRL-8018細胞をTIB-114増殖培地 (DMEM+10% FBS) で7日間培養し、アイソストリップ (IsoStrip) (商標) (ロシュダイアグノスティクス社 (Roche Diagnostics Corp.)) を用いて上清を調べることにより、mIgM分泌レベルを測定した。次にCRL-8018細胞にTIB-114細胞を0.1%、0.01%、または0.001%の割合で添加し、 $2 \times 10^6$ 、 $25 \times 10^6$ 、または $50 \times 10^6$ 細胞をカプセル化した後にマイクロドロップを用いる濃縮を行った。少なくとも1つのIgG分泌細胞を含む全マイクロドロップを以下のようにソーティングしてプールし、5 U/mlアガラーゼを補充したDMEM+10% FBSで5% CO<sub>2</sub>のもと37 °Cで5日間培養した。

10

## 【0107】

クラススイッチの誘導

CRL-8018細胞株を用いて、インビトロでクラススイッチを起こす回数を増加させる方法を検討し評価した。細胞を $1 \times 10^4$ /mlで75 cm<sup>2</sup>フラスコまたは12ウェルプレートにプレーティングし、

組換えHBsAg (1 µg/ml) とrhIL-4 (10 ng/ml) ;

組換えHBsAg (1 µg/ml) とrmIFN (10 ng/ml) ;

LPS (1 µg/ml) とrmIL-4 (10 ng/ml) ;

LPS (1 µg/ml) とrmIFN (10 ng/ml) ;

25 nM、50 nM、または100 nMのレンチニン酸

を補充した完全増殖培地で7日間インキュベートした。

20

## 【0108】

7日間インキュベートした後、アイソストリップ (商標) を用いてメーカーの説明に従い、培養上清をIgMおよび/またはIgG産生について調べた。

## 【0109】

連続サブライニング (sequential sublining) 法によるインビトロで誘導されたスイッチ率の測定

CRL-8018細胞を上記のような分裂促進因子/増殖因子を補充した増殖培地に再懸濁し、1,000細胞/mlの密度で96ウェルプレート10枚にプレーティングした。細胞を、加湿インキュベーターで5% CO<sub>2</sub>のもと37 °Cで5日間培養した。細胞培養上清を回収し、アイソタイプ特異的ELISAを行った。簡単に説明すると、20mM NaHCO<sub>3</sub> (シグマ アルドリッチ) に溶解した10 µg/プレートの精製ヤギ抗マウスIgG (ジャクソンイムノケミカルズ (Jackson Immunochemicals)) により50 µl/ウェルで96ウェル可動性アッセイプレートを予めコーティングしておき、4 °Cで一晩インキュベートし、次にカルシウムとマグネシウムを含まないダルベッコリン酸緩衝食塩水/0.2% ツィーン (Tween) 20 (DPBS-/ツィーン) (シグマ アルドリッチ) で3回洗浄した。非特異的タンパク質結合部位を、200 µl/ウェルのPBS+1% BSAを用いて室温 (RT) で2時間ブロッキングした。

30

## 【0110】

各培養上清100 µlを回収し、抗IgGコーティングしたプレートに入れて室温で2時間インキュベートした。アッセイプレートをDPBS-/ツィーンで3回洗浄し、PBS/ツィーンで1:100に希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG (ジャクソンイムノケミカルズ) 50 µlを各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを再度洗浄し、TMB基質溶液 (シグマ アルドリッチ) 100 µlにより発色させた。0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (シグマ アルドリッチ) で反応を停止し、EI<sub>x</sub>800 ELISAプレートリーダー (バイオテックインスツルメント社 (Bio-TEK Instruments, Inc.)) により405 nmでプレートを測定した。上記の方法を5回実施し、スイッチ率を測定した。

40

## 【0111】

マイクロドロップアイソタイプ捕獲および単離アッセイ法による自発的スイッチ率ならびにインビトロで刺激されたスイッチ率の測定

50

アイソタイプスイッチ率が低いため、大きな細胞集団の解析が必要となる。そのため本発明者らは、改変したマイクロドロップカプセル化手順を用いて、IgM分泌ハイブリドーマ細胞の中から自発的またはインビトロで誘導された稀なIgGアイソタイプスイッチ変種を単離した。上清中のIgG濃度が $< 0.1 \mu\text{g/ml}$ であった場合は、まず複数細胞をカプセル化し、その後単一細胞をカプセル化した。すべての場合において、インビトロ誘導後に上清中の分泌IgG濃度が $> 0.1 \mu\text{g/ml}$ であった場合は、陽性細胞の小さな亜集団を識別しソーティングするのに単一細胞のカプセル化1回で十分であった。

#### 【0112】

融解した2試料分のセルバイオゲル-3（商標）500  $\mu\text{l}$ を10%プルロニックF-68溶液（シグマ アルドリッチ）と共にボルテックスし、37 で3分間平衡化してから、それぞれを増殖培地100~200  $\mu\text{l}$ 中の少なくとも $2 \times 10^6$ ハイブリドーマ細胞と混合した。これらの混合液を予熱したセルミックス（商標）15 mlに添加し、蓋をして10回激しく浸透してエマルジョンを形成した。次にバイアルをセルシス 100（商標）マイクロドロップメーカー（ワンセルシステムズ社）に取り付け、室温にて1,800 rpmで1分間、次に0 にて1,800 rpmで1分間、引き続いて0 にて1,000 rpmで6分間エマルジョンを混合した。マイクロドロップをDPBSで3回洗浄して油を除去し、最終濃度10  $\mu\text{g/ml}$ のストレプトアビジン（シグマ アルドリッチ）を含むDPBS 7 ml中で室温にて10分間インキュベートした。

10

#### 【0113】

ストレプトアビジンと共にインキュベートした後、マイクロドロップをDPBS- 15mlに再懸濁して1,500 rpmで5分間遠心分離することにより3回洗浄し、次に10  $\mu\text{g/ml}$ ビオチン化ヤギ抗マウスIgGと共に10分間インキュベートした。再度マイクロドロップをDPBS-で3回洗浄し（上記のように）、予熱した増殖培地20 mlに再懸濁し、カプセル化細胞から抗体が分泌されるように37 で2時間インキュベートした。インキュベーション後、1,500 rpmで5分間遠心分離してマイクロドロップをペレット化し、冷DPBS-に再懸濁し、10  $\mu\text{g/ml}$  FITC標識ヤギ抗マウスIgG特異的抗体（ジャクソンイムノケミカルズ）で標識した。マイクロドロップをHBSSで2回洗浄し、増殖培地2 mlに再懸濁し、コールターエピックスエリートを用いてソーティングし；対照を基準にして高度に陽性のマイクロドロップのみをソーティングするようにゲートを設定した。

20

#### 【0114】

マイクロドロップアイソタイプ捕獲および単離アッセイ法により自発的スイッチ率およびインビトロで誘導されたスイッチ率を測定するため、CRL-8018ハイブリドーマ細胞を、増殖培地のみまたは上記のような刺激物質の存在下で $1 \times 10^4$ 細胞/mlの密度で75  $\text{cm}^2$ フラスコ2枚または12ウェルプレート（2 ml/ml）2枚にプレーティングした。細胞を、加湿インキュベーターで37 、5%  $\text{CO}_2$ 下で5日間培養した。細胞培養上清を回収し、アイソスティップ（IsoStip）（商標）またはELISAを用いるマウスアイソタイピングキット（ザイメッド社（Zymed Inc.））を用いてIgMおよび/またはIgG産生を調べた。IgG産生について陽性であった75  $\text{cm}^2$ フラスコおよびウェルの全細胞をプールして増殖培地100~200  $\mu\text{l}$ に再懸濁し、マイクロドロップにカプセル化した。次に、複数占有マイクロドロップを用いて、アイソタイプ捕獲および単離濃縮の1ラウンド目を上記のように行った。ソーティングした細胞を5日間培養して増殖させた後、単一細胞占有マイクロドロップを用いてアッセイの2ラウンド目を行った。FACSで単離した後、IgG分泌細胞を1細胞/ウェルで96ウェルプレートにプレーティングした。プレートを37 、5%  $\text{CO}_2$ 下で14日間インキュベートした後、上清ELISAにより回収したクローン数を算出した。

30

40

#### 【0115】

マイクロドロップアイソタイプ捕獲および単離アッセイ法の対照の作製  
非染色の対照を用いて、カプセル化細胞の自己蛍光を測定した。各実験について、マイクロドロップ懸濁液の1試料分で捕獲（ビオチン化）抗IgGとのインキュベーションを省略し、陰性（捕獲なしまたはNOC）対照を作製した。陽性対照としては、1試料分のマイクロドロップ懸濁液を最終濃度1  $\mu\text{g/ml}$ の精製マウスIgG（シグマ）と共にインキュベートし、検出Abで染色した。

50

## 【0116】

## 蛍光活性化セルソーティング

細胞のソーティングは、100  $\mu$ m フローノズルを装備したエピックスエリート（商標）（コールター社（Coulter Corp.））を用いて行った。アルゴンレーザーの488 nm スペクトル線で、FITC 標識検出試薬を励起した。緑色（FITC）蛍光は、525 nm の長域帯（long pass filter）フィルタで収集した。統計分析には、エピックスエリート 4.02 ソフトウェアを使用した。まず、前方および直角光散乱を増強させることにより、占有マイクロドロップを非占有マイクロドロップから識別した。占有マイクロドロップの光散乱特性を非占有マイクロドロップから容易に分離し、非占有マイクロドロップはスクリーンから消えるまで前方散乱閾値または弁別値を増加することによりデータ収集から削除した。手順の第1段階で IgG スイッチ変種を濃縮するため、全占有マイクロドロップを確保し、少なくとも1つの陽性細胞を有するマイクロドロップをソーティングしプールして培養した。濃縮の第2段階では、異なる前方散乱特性により単一占有マイクロドロップを複数占有マイクロドロップから識別し、ゲートを設定して、陽性の IgG スイッチ細胞を含む単一占有マイクロドロップのみにゲートを設定してソーティングした。試料は毎秒およそ600個の速度で流し、ゲートを設定した50,000個またはそれ以上の結果を収集した。死細胞では側方散乱が増加し前方散乱が低いため、この亜集団をゲートから外すことが可能である。単一占有マイクロドロップにゲートを設定し、対照と分泌試料の両方の緑色蛍光を解析した。陰性対照よりも高い FITC 蛍光は、抗体分泌細胞を表す。最も蛍光の強い占有マイクロドロップの亜集団にゲートを設定し、1時間あたり少なくとも $10^6$  マイクロドロップの速度でソーティングした。およそ50,000個までの結果を収集した。

10

20

## 【0117】

## マイクロドロップカプセル化およびソーティング後の細胞の回収ならびに増殖

1段階めの濃縮後にソーティングしたマイクロドロップを増殖培地1 ml にプールし、12ウェルプレートの1ウェルでインキュベートした。2段階めの濃縮過程後、ソーティングした単一占有マイクロドロップの濃度を増殖培地に再懸濁して10細胞/ml に調整し、細胞を96ウェルプレートに沈着させた（1細胞/100  $\mu$ l /ウェル）。マイクロドロップから細胞を放出させるため、5 U/ml のアガラゼ（ニューイングランドバイオラボ社）を培地に添加した。この日常的な手順は、細胞生存度に影響を及ぼさなかった。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下で一晩インキュベートした後、新鮮培地1 ml または100  $\mu$ l を各ウェルに添加し、明らかに細胞増殖が検出できるまでインキュベートし続けた。増殖している全ハイブリドーマクローンの上清でELISAを行い、最も多量の抗体を産生するクローンを選択し、15 ml 培養フラスコで増殖させた。

30

## 【0118】

## 結果

## 1. ビオチンとアガロースの比率の測定

既知重量のビオチン化アガロースを、認識できるNMRパターンを生じる既知質量の標準物質と併用することにより、NMRでビオチンとアガロースの比率を測定することが可能である。NMRサービスは、商業ベースで利用可能である（例えば、NMRアナリシスアンドコンサルティング（NMR Analysis and Consulting）、イリノイ州ジケータ）。標準物質としては、フタル酸水素カリウム（KHP）が適している。NMRスペクトルの周波数は、ppmスケールで表される。シグナル強度は、H原子放射シグナルの数に比例する。KHPシグナルは、7.7~7.9 ppmの範囲を超えて積分され得る。ビオチンは多くのNMRシグナルを発生する。カルボキシル基に隣接した2つの水素による2.40 ppmでのシグナルが、解析に適している。ビオチン化アガロース中に存在するビオチンのパーセンテージ質量は、以下の式から測定できる。

40

$$A_{\text{ビオチン}} / A_{\text{KHP}} \times 4/2 \times 244.3/204.2 \times W_{\text{KHP}} / W_{\text{試料}} \times 100$$

## 【0119】

AはNMRピークの面積の表し、4はKHPピークを生じるHの数であり、2はビオチンピークのHの数であり、244.3はビオチンの分子量、204はKHPの分子量である。相対的な質量をビオ

50

チンの分子量244.3およびアガロースの分子量120,000それぞれで割ることによって、重量によるパーセンテージをモルパーセンテージに変換することが可能である。例えば、セルバイオゲル-1は、0.00225 gピオチンに対して1 gアガロースの質量比を示したが、これは0.83 mmolアガロースに対して0.92 mmolピオチンのモル比、またはモルアガロースあたり1.1モルピオチンに相当する。

#### 【0120】

または、イミュノピュアハーバ (ImmunoPureHABA) キット (ピラス) を用いて、ピオチンとアガロースの比率を測定できる。キットは、HABA (2-[4' ヒドロキシアゾベンゼン]安息香酸) と形成された複合体からアビジンを転移することにより、ピオチンを検出する。転移により500 nmで測定するHAB-アビジン溶液の吸光度が減少するが、これはピオチン濃度に比例する。 10

#### 【0121】

キットを用いて、セルバイオゲル-1で吸光度を測定した。HABA-アビジン溶液 (0.9 ml) の吸光度は0.924であった。セルバイオゲル (10 mg/ml) 0.1 mlを添加した後のHABA-アビジン溶液の吸光度は、0.532であった。セルバイオゲルに存在するピオチン量は、以下の式 (ピラスによる) により計算した。

$$1.) D_{A500} = (0.9 \times 0.924) - 0.532 = 0.299$$

$$2.) \text{ピオチン化アガロース} \text{ mmol / ml} = 10 / 120000 = 8.33 \times 10^{-5}$$

$$3.) \text{ピオチン} \mu \text{mol / ml 反応混合液} = DA500 / \text{吸収係数} = 0.299 / 34 = 8.8 \times 10^{-3}$$

$$4.) \text{ピオチン mol / ピオチン化アガロース mol} = 8.8 \times 10^{-3} \times (10) \times (1) : 8.33 \times 10^{-5} \times 1000 (\mu \text{mol / mmol}) = 1.056 \quad 20$$

#### 【0122】

これは、NMRで測定した値の5%許容誤差内に入る。

#### 【0123】

### 2. ピオチン化マトリックスの比較

本実施例では、ピオチンとアガロースのモル比が $\pm 10\%$ 実験許容誤差内で1:1、0.2:1、および0.04:1であるセルバイオゲル (商標) -1、セルバイオゲル-2、およびセルバイオゲル-3と呼称する3種類のピオチン化アガロースを比較した。アッセイ感度を測定するため、ならびにピオチン化捕獲抗体および蛍光色素標識レポーター抗体の最適濃度を決定するため、セルバイオゲル-1またはセルバイオゲル-2のどちらかを用いて、連続希釈したmrIL-4、mrIL-6、mrIFN、およびhrIL-4中で、細胞なしのマイクロドロップを2% FBSを添加したD MEM 4 ml中の10 g/mlストレプトアビジン (シグマ) と共に回転板上で室温で15分間インキュベートし、細胞を添加しないこと以外は上記と同様に分泌アッセイ法を行った。2% FBSを添加したHBSS (すべての洗浄に用いた) で洗浄し、過剰のストレプトアビジンを除去した。次に非占有マイクロドロップ調製品を培地4 ml中のピオチン化捕獲抗体 (5 g/ml) と共に回転板上で室温で15分間インキュベートし、洗浄して非結合の試薬を除去した。この調製品の一定分量 (8x105マイクロドロップ) を様々に希釈した精製サイトカイン (100 ng/ml ~ 1 ng/ml) と共に、回転板上で37 °Cで30分間インキュベートした。2% FBSを添加したHBSS中でインキュベートした非占有マイクロドロップを、陰性対照とした。洗浄操作の後、すべての試料を蛍光色素標識レポーター抗体 (5 g/ml) と共に回転板上で室温で15分間インキュベートし、洗浄後、それぞれ別のチューブに移して単一色フローサイトメトリ解析を行った。平均蛍光強度は、単一マイクロドロップに捕獲されたサイトカイン濃度に比例する。 30 40

#### 【0124】

サイトカイン濃度に対応するマイクロドロップの平均蛍光 (陰性対照のバックグラウンド蛍光値を減算した後) をプロットすることにより、マイクロドロップあたり検出可能なサイトカイン平均量の検量線を作成した。検量線から、蛍光シグナルを発する (陰性対照を上回る) サイトカインの最低濃度を決定した。PE標識抗体で標識したmrIFN を検出する1つの代表的な検量線を、図2に示す。mrIFN の検量線を作成するのに用いた平均蛍光を、表2にまとめた。セルバイオゲル-1およびセルバイオゲル-2から作製した非占有マイクロ 50

ドロップで測定した平均蛍光レベルは、サイトカイン濃度と相関し、反応は試験した濃度の範囲（1 ng/ml ~ 100 ng/ml）を超えて直線的であった。セルバイオゲル-2の方がより高い感度を示した。両方のアガロースマトリックスを用いたところ、バックグラウンド（陰性対照）を超えて検出可能なサイトカインの最低濃度であるアッセイ法のエンドポイントは > 100 ~ 10 ng/ml と異なり、セルバイオゲル-1を用いた場合は > 125 fg/マイクロドロップでありセルバイオゲル-2を用いた場合は 12.5 fg/マイクロドロップであった。

#### 【0125】

（表2）捕獲抗体およびレポーター抗体で標識した非占有マイクロドロップを用いた、フローサイトメトリーによる溶液中でのサイトカイン検出レベル

サイトカイン	検出Abの蛍光色素標識	カプセル化マトリックス	サイトカイン濃度に対応する平均蛍光						検出レベル	
			100 (ng/ml)	50 (ng/ml)	10 (ng/ml)	5 (ng/ml)	1 (ng/ml)	0 (ng/ml)	ng/ml	fg/ マイクロ ドロップ
mrIFN $\gamma$	FITC	CelBioGel™-1	0.473	0.267	0.229	0.17	0.12	0.1	>100	>125
mrIFN $\gamma$	FITC	CelBioGel™-2	43.86	20.36	2.53	1.7	1.21	1.62	10	12.5

10

#### 【0126】

本発明者らは、セルバイオゲル-2を用いて作製した1つの40  $\mu$ mマイクロドロップは（ $\sim 3 \times 10^{-8}$  ml量）、平均してビオチン  $6 \times 10^8$  分子を含むと推定する。マイクロドロップにストレプトアビジン（ $3 \times 10^7$  分子/マイクロドロップ）をロードすると、20  $\mu$ g量中の全ビオチン化捕獲抗体（ $\sim 1 \times 10^7$  分子/マイクロドロップ）がアガロースマトリックスに結合する。本発明者らの実験では、長時間（18時間）インキュベートしても、個々の単一細胞は少量のサイトカインしか分泌しなかった（平均して、1.8 ~ 35 fg/細胞/マイクロドロップ）。本発明者らが試験したサイトカインの分子量は、mrIFN が  $\sim 17$  kDa、mrIL-4が  $\sim 14$  kDa、およびmrIL-6が  $\sim 21.7$  kDaである。アボガドロ数を用いた計算によると、1 fgのIL-6は  $\sim 3 \times 10^4$  分子を含む。分析物と検出物（detector）の比率が1:1であると仮定すると、個々のマイクロドロップ内の全結合部位（アガロースマトリックス内に固定化されたビオチン化抗体分子）を飽和するには、平均して少なくとも333.3フェムトグラムの分泌サイトカインが必要であり、これは初期細胞を用いた本発明者らの実験で検出した分泌レベル（平均して、18時間のインキュベーション後で1.8 ~ 35 fg/細胞/マイクロドロップ）より過剰である。報告されている、個々の細胞により分泌されるサイトカインのレベルは（1時間あたり0.2 ~ 8 fg/細胞のGM-CSF、または18時間あたり144 fg/細胞のGM-CSF）（7）通常低く、従って、本発明者らのアッセイ条件を用いて捕獲部位が飽和するとは考えられない。分泌アッセイ法を行う際に同様の条件を用いれば、占有マイクロドロップの蛍光強度は分泌インキュベーション時間に単一細胞から分泌されたサイトカインの量を反映するはずであり、検量線を用いて量を概算することによりサイトカイン分泌の相対的レベルを測定することができる。

20

30

#### 【0127】

高レベルのmIgG1（> 20  $\mu$ g/ml）を分泌するトランスフェクトCHO細胞を用いて、セルバイオゲル、セルバイオゲル-2、およびセルバイオゲル-3がマイクロドロップ分泌アッセイ法の検出限界に及ぼす影響についても調べた。フローサイトメトリーの結果を表3に示す。セルバイオゲル-2とセルバイオゲル-3で同様の割合の分泌細胞が検出されたが（およそ99.5%）、平均FITC蛍光強度（MFI）はセルバイオゲル-3の方が有意に高く（144.91対38.67）、セルバイオゲル-3を用いた方がアッセイ検出限界がより高いことが示された。3種類のセルバイオゲルのうち、セルバイオゲル-1が最も感度が低かった。分泌細胞の81.24%のみが検出されたに過ぎなかった。さらに、MFIも低かった（10.63）。

40

#### 【0128】

（表3）mIgG1を分泌するトランスフェクトCHO細胞および異なる種類のセルバイオゲル（商標）（セルバイオゲル-1（商標）、セルバイオゲル-2（商標）、およびセルバイオゲル-3（商標））を用いて行ったマイクロドロップ分泌アッセイ法のフローサイトメトリーの

50

## 結果

<u>試料</u>	セルバイオゲル-1		セルバイオゲル-2		セルバイオゲル-3	
	% 陽性	MFI	% 陽性	MFI	% 陽性	MFI
陰性対照	----	1.29	----	1.61	----	2.83
陽性対照	----	79.35	----	291.1	----	450.8
分泌15分	81.25%	10.63	99.5%	38.67	99.6%	144.91

10

## 【0129】

低分泌活性 ( $<1\mu\text{g/ml}$ ) を有するトランスフェクトNS0細胞を用いて、同様の実験を行った。フローサイトメトリーの結果を表4に示す。セルバイオゲル-3を用いた方が検出限界が高かった。セルバイオゲル-2と比較して、セルバイオゲル-3を用いた方が、検出される分泌細胞の割合および平均蛍光強度はおよそ3倍高かった。

20

## 【0130】

(表4) トランスフェクトNS0細胞および異なる種類のセルバイオゲル(セルバイオゲル-2およびセルバイオゲル-3)を用いて行ったマイクロドロップ分泌アッセイ法のフローサイトメトリーの結果

<u>試料</u>	<u>セルバイオゲル-2</u>		<u>セルバイオゲル-3</u>	
	% 陽性	MFI	% 陽性	MFI
陰性対照	----	0.918	----	1.04
陽性対照	----	24.7	----	63.3
<u>分泌1時間</u>	7.8%	1.3	23%	3.26

30

40

## 【0131】

## 3. hrIL-4分泌トランスフェクトCHO細胞の検出

分泌アッセイ法を最適化するため、まず、mlあたり約200 ngのhrIL-4を再現性よく分泌することが知られているトランスフェクトCHO細胞株を用いた。75%コンフルエントになるまで3日間細胞を培養した後、 $1 \times 10^6$ 細胞およびセルバイオゲル-1を用いてマイクロドロップ

50

サイトカイン分泌アッセイ法を行った。2時間インキュベートした後では、顕微鏡観察から、大部分の占有マイクロドロップが飽和していること、および非占有のマイクロドロップに明るいFITC蛍光が見えることが明らかとなり、アッセイの「クロストーク」が示唆された（飽和した結合部位を上回る分泌サイトカインの拡散）。したがって、1時間のインキュベーションでアッセイ法を行った。（5つのうちの）1つの代表的な実験のヒストグラムを図3に示す。非染色の試料と比較すると（パネル1）、陰性（「捕獲なし」）対照（パネル2）では、FITC標識検出抗体と共にインキュベートした結果、非特異的結合による低いバックグラウンドの蛍光が生じた（0.34）。陽性対照のマイクロドロップでは（25 ng/mlのhrIL-4、マーカーC、パネル3）、有意に高い蛍光を示した（11.6）。試料を1時間インキュベートした後、FS対SSCドットプロットを用いて単一細胞に占有されるマイクロドロップの亜集団にゲートを設定し（ゲートA、ドットプロット4）、さらなるデータ収集のためにこれらを含めた。次に、FITC蛍光を用いて、生（PI陰性）細胞（ゲートB、ドットプロット5）を識別した。相当する陰性対照の値を減算して、陽性マイクロドロップの割合と平均蛍光の両方を決定した。パネル5のマーカーCの下に示されるように、カプセル化細胞集団の26%が様々な量のIL-4を分泌していた。実験前にトリパンブルー染色により評価した細胞生存度およびフローサイトメトリーでPI染色により評価した細胞生存度は高く（98%）、カプセル化によっても分泌アッセイ手順によっても影響を受けなかった。結果から、トランスフェクト細胞を用いた場合に予想されるようにサイトカインレベルが高ければ、短い（1時間）分泌インキュベーション後でも陽性マイクロドロップを容易に検出できることが示された。

10

20

#### 【0132】

#### 4. 活性化マウス抗原特異的T細胞株におけるサイトカイン分泌細胞の検出

次に、抗原特異的細胞株によって産生される3つの異なるサイトカインを検出した。大量培養で48時間細胞を培養した後、マイクロドロップアッセイ形式を用いて上清を調べ（マイクロドロップ上清対照）、細胞によって分泌されるサイトカインの相対的な量をIFNは～30 ng/ml、IL-4は～5 ng/ml、およびIL-6は～15ng/mlと測定した。トリパンブルー染色で評価した細胞生存度は、72%～80%であった。細胞生存度が減少したのは、おそらく活性化によってアポトーシスが引き起こされたため、および試料中にマイトマイシンC処理した死（または死につつある）支持細胞が存在したためである。マイクロドロップ分泌アッセイ法およびフローサイトメトリーを用いて、3.5時間および18時間インキュベートした後、それぞれ個々のサイトカインを分泌している細胞の割合と細胞あたり分泌されるサイトカインの平均的な量に相当する平均蛍光強度を測定した。

30

#### 【0133】

短い（3.5時間）インキュベーション後に、それぞれのサイトカインを分泌する細胞の亜集団（1.26% IFN、3.32% IL-4、および1.38% IL-6）を検出した。サイトカインの検量線の平均蛍光値から推定すると、個々の細胞によって分泌されるサイトカインの平均相対レベルをIFNは～12.5 fg/ml、IL-4は～1.8 fg/ml、およびIL-6は～2.0 fg/mlと各々測定された。インキュベーション時間を18時間に延ばした後では、サイトカインを分泌する細胞の頻度は以下のように増加した：IFN（1.26%から18.5%）、IL-4（3.32%から20.87%）、およびIL-6（1.38%から15.55%）。平均蛍光、それ故に分泌サイトカインの平均相対量も有意に増加した（各々IFN：～12.5 fgから35 fg、およびIL-4：～1.8 fgから3.6 fg）。インキュベーション時間を延ばした後ではIL-6分泌細胞の頻度は1.38%から15.55%まで増加したが、サイトカイン分泌の相対的レベルでの増加は有意ではなかった（～2.0 fg/マイクロドロップ対～2.4 fg/マイクロドロップ）。90%のFITC陽性占有マイクロドロップがPI陰性であったことから、アッセイ手順を通して細胞生存度が高いことが示された。3.5時間および18時間インキュベーションした後にIL-4を検出する1つの代表的な実験によるヒストグラムを図4に示し、IFN、IL-4、およびIL-6亜集団の測定した頻度を表5に示す。

40

#### 【0134】

（表5）マイクロドロップ分泌アッセイ形式を用いた、活性化抗原特異的T細胞によるサ

50

## サイトカイン分泌のフローサイトメトリー解析

検出された サイトカイン	サイトカイン分泌細胞の頻度 (% 陽性細胞)	
	3.5 時間分泌インキュベーション	18 時間分泌インキュベーション
<b>mrIFN<math>\gamma</math></b>	<b>1.26%</b>	<b>18.5%</b>
<b>mrIL-4</b>	<b>3.32%</b>	<b>20.87%</b>
<b>mrIL-6</b>	<b>1.38%</b>	<b>15.55%</b>

10

## 【0135】

## 5. 活性化マウス末処置脾細胞からのIFN およびIL-6分泌細胞の検出

初代培養では活性化細胞の頻度が低く、サイトカインの分泌レベルが元々低いことが予想されるため、マイクロドロップ分泌アッセイ法を行う前に、末処置のマウス脾細胞をインビトロでConAまたはPHAのどちらかで24時間刺激した。どちらの分裂促進因子を用いても、結果は基本的に同じであった。マイクロドロップ上清対照の解析により、24時間培養後、脾細胞は平均して $\sim 20$  ng/mlのIFN および $\sim 10$  ng/mlのIL-6を分泌することが示された。カプセル化の前後でトリパンブルー排除アッセイ法により細胞生存度を測定したが、高かった ( $> 98\%$ )。捕獲抗体とインキュベートし、カプセル化細胞を3.5時間および18時間インキュベートした後に、試料をFITC標識抗マウスIFN AbまたはPE標識抗マウスIL-6 Ab (どちらも最終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ ) のどちらかで染色した。

20

## 【0136】

3.5時間インキュベートした後では、サイトカイン分泌細胞の亜集団はフローサイトメトリーによって検出されなかったが、インキュベーションを18時間に延ばした後では、IFN およびIL-6分泌細胞のどちらも識別された。予想どおり、抗原特異的細胞株およびトランスフェクト細胞と比較し、陽性細胞の頻度および陽性マイクロドロップの平均蛍光は、どちらのサイトカインについても低かった。刺激した末処置脾細胞のこの不均一な集団において、4.72%のIFN 分泌細胞の亜集団および4.43%のIL-6分泌細胞の亜集団を検出した。検量線から対応する平均蛍光値を推定すると、個々の細胞から分泌されるサイトカインの平均量を各々IFN は $\sim 11.5$  fg/マイクロドロップ、およびIL-6は $\sim 2$  fg/マイクロドロップと測定した。PI染色のフローサイトメトリー解析により、実験を通して細胞生存度が高いことが ( $> 98\%$ ) 示された。

30

## 【0137】

## 6. 分泌サイトカインと細胞表面マーカーの同時検出

次に、マウス抗原特異的T細胞において、分泌されたIFN とCD3表面発現を同時に検出する実験を行った。マイトマイシンC処理した自己支持細胞およびmrIL-2の存在下で細胞をM1081ペプチドで再刺激し、材料および方法に記したように2日間培養を維持した。実験を行う前の細胞生存度は $\sim 74\%$ であった。マイクロドロップ分泌アッセイ法を行うため、カプセル化後に細胞を18時間インキュベートした。2色フローサイトメトリーを用いて、単一生 (PI陰性) 細胞によって占有されるマイクロドロップにゲートを設定し (R1ゲート、パネルA)、FITC (FL-1) およびPE (FL-2) 蛍光を測定することにより、IFN を分泌しているCD3<sup>+</sup>細胞の亜集団を識別した (図5)。

40

## 【0138】

「捕獲なし」(陰性)対照において、2つの亜集団が検出された (パネルB): CD3<sup>+</sup>細胞 (左上象限の45.9%) およびCD3<sup>-</sup>細胞 (左下象限の53.88%); どちらもバックグラウンドのFITC蛍光は低かった (それぞれ、1.49および2.56)。しかし、分泌試料では (パネルC)、14.8%のCD3<sup>+</sup>活性化抗原特異的細胞の亜集団が検出された (右上象限の二重陽性細胞)。29.4%のCD3<sup>+</sup>細胞はIFN を分泌しなかった (左上象限の単一陽性細胞)。IFN 分泌細胞は、CD3<sup>-</sup>細胞亜集団の中からも検出された (右下象限の5.4%)。これらの細胞の

50



多くは、おそらくBリンパ球、NK細胞、またはマイトマイシンC処理した自己支持細胞に由来するマクロファージおよび樹状細胞であった。IFN を分泌しなかった二重陰性細胞（49.7% CD3<sup>+</sup>細胞）は、左下象限に位置した。

【0139】

#### 7. サイトカイン分泌細胞の回収および増殖

hrIL-4を分泌するトランスフェクトCHO細胞およびIFN を分泌する活性化マウス抗原特異的細胞を、FACSにより回収した。hrIL-4を分泌する単一生CHO細胞に占有される高蛍光のマクロドロップの亜集団（5%）をソーティングした後、アガラーゼ処理（1 U/ml）によりマクロドロップから細胞を放出し、24ウェルプレートで48時間インキュベートした。マイクロドロップから放出した細胞は、ウェルの底に接着し、単層として増殖した。細胞を25 cm<sup>2</sup>培養フラスコに移してコンフルエントになるまで培養し、2週間後、マイクロドロップ分泌アッセイ法により再度スクリーニングした。次に、IFN を分泌する活性化マウス抗原特異的細胞の亜集団（18.5%）をソーティングした。50,438個の陽性マイクロドロップ（サイトカイン分泌単一生細胞によって占有されるマイクロドロップ）が収集された。ソーティングした後、カプセル化細胞をプールし、mrIL-2（10 ng/ml）およびアガラーゼ（3 U/ml）を含む培地で18時間インキュベートしたが、この時大部分の細胞がマイクロドロップから放出された。馴化培地（3:1の比率で）と混合し、10 μg/mlの抗原（M1081ペプチド）、マイトマイシンC処理した自己支持細胞（1:1）、およびmrIL-2（10 μg/ml）を補充した完全培地（5 ml）を添加した後、フラスコをインキュベーターに戻し、再刺激するまでさらに6日間インキュベートした。トリパンブルー染色と血球計算板チャンバーでの

10

20

【0140】

#### 8. 2色フローサイトメトリーを用いた非占有マイクロドロップにおけるmrIFN およびmrIL-4の同時検出

ビオチン化抗IFN Abおよび抗IL-4 Ab（どちらも最終濃度5 μg/ml）の混合液で標識した後、マイクロドロップを精製サイトカイン：mrIFN（100 ng/ml）およびmrIL-4（25 ng/ml）の混合液と共にインキュベートした。陰性（「捕獲なし」）対照では（図6、パネルA）、FL-1（FITC）とFL-2（PE）のどちらにおいてもバックグラウンドの蛍光は非常に低く；大部分のマイクロドロップ（99%）は二重陰性であり、左下象限に位置した。mrIFN（パネルB）またはmrIL-4（パネルC）を個々に検出した場合（抗IFN /PEのみまたは抗IL-4 /FITCのみでインキュベートした、どちらも5 μg/ml）、高いFL-2（541.48）またはFL-1（155.06）蛍光を示す陽性マイクロドロップが、それぞれ左上象限または右下象限に位置した。両サイトカインを同時に検出した場合（蛍光色素標識Abの混合液と共にインキュベートした、どちらも5 μg/ml）、84%のマイクロドロップが、平均蛍光189.5（FL-1）および636（FL-2）を有する二重陽性であった（パネルD、ドットプロットの右上象限）。同時に検出した分泌サイトカインのレベルは個々に測定したレベルと同様であり、このことから、マイクロドロップイムノアッセイ法を用いてアッセイの感度を損なうことなく、個々のカプセル化細胞から分泌される1つまたはそれ以上のサイトカインを検出できることが示された。

30

40

【0141】

#### 9. 4色フローサイトメトリーを用いた複数の細胞表面マーカーと分泌サイトカインの同時検出

本発明者らは、カプセル化ヒトPMBC（未刺激およびPHAにより刺激した）を用いて、4時間インキュベートした後に、CD3、CD4、およびCD69細胞表面発現ならびにIFN 分泌の検出に成功した。4色解析はエピックスエリート（コールター社）を用いて行った。蛍光色素標識試料は、アルゴンレーザーの488 nmスペクトル線で励起した。免疫表現型とIFN 分泌によりリンパ球の亜集団を同定するため、まず、前方散乱対側方散乱によりリンパ球を同定した。次に、ゲートを設定したリンパ球集団内の細胞で、CD3およびCD4蛍光を検出した。CD69発現を用いて活性化細胞（FITC）を同定し、抗IFN 抗体を用いてサイトカイン

50

分泌細胞 (PE) を同定した。本実験のヒストグラムにより、マイクロドロップアッセイ型式と4色フローサイトメトリーを用いて、ヒトPMBCをPHAによりインビトロ刺激した後、明確なリンパ球亜集団において表面マーカーと分泌サイトカインを同時に検出できることが示される (図7)。

#### 【0142】

リンパ球に占有されるマイクロドロップの亜集団を、二次元パラメータドットプロット (SSC対FS、図7のヒストグラム1-Aおよび1-B) を用いて同定した。予想どおり、分裂促進因子刺激したリンパ球で前方散乱の増加が観察できる。予想どおり、未刺激のPBMC試料 (32.8%、図7、ヒストグラム3-A、象限C2) と刺激したPBMC試料 (37.8%、図7、ヒストグラム3-B、象限C2) の両方でCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞の亜集団が同定できたが、CD69発現は刺激したリンパ球の集団においてのみ検出可能であった。未刺激対照のバックグラウンドレベル (図7、ヒストグラム2-A、1.3%マーカーE) を減算した後、平均FITC蛍光102.3を有するCD69を発現している79.6%のリンパ球亜集団を同定した (図7、ヒストグラム2-B、マーカーE)。

10

#### 【0143】

さらに、IFN $\gamma$  を分泌している、刺激したリンパ球の9.6%の亜集団を同定した (10.9% - 1.3% = 9.6%、図7、ヒストグラム4-Aおよび4-B、マーカーI)。

#### 【0144】

トリパンブルー排除アッセイ法により測定されるように、カプセル化手順もマイクロドロップ分泌アッセイ法も細胞の生存度に影響を及ぼさなかった。

#### 【0145】

20

10. 酵素結合免疫測定型式、TSAシグナル増幅試薬、およびフローサイトメトリーを用いた、個々の細胞により放出される分泌産物の検出

HRP標識検出抗体およびTSAによりシグナルは少なくとも10倍増幅され、これによりpg/mlレベルの検出が可能になる。この感度は、サイトカイン分泌細胞を検出する際に特に有用である。それは、これらの制御因子の多くが一過性に少量発現されるからである。提案したアプローチが実行可能であることを実証するため、非占有マイクロドロップ (セルパイオゲル-3) を用いて、上清中の様々な量の精製マウスIgG1を検出した。マイクロドロップをストレプトアビジン (50  $\mu$ g/ml) と共に室温で15分間インキュベートし、HBSSで3回洗浄した。次に、10  $\mu$ g/ml濃度のビオチン化ヤギ抗マウスIgG1 (H+L) と共に、室温で15分間インキュベートした。マイクロドロップをHBSSで3回洗浄した後、様々な濃度の精製マウスIgG1 (1.0  $\mu$ g/ml、0.01  $\mu$ g/ml、および0.001  $\mu$ g/ml) と共に室温で20分間インキュベートし、その後再度HBSSで3回洗浄した。検出抗体 (HRP標識ヤギ抗マウスIgG1、Fc断片特異的) を、1:200の最終希釈ですべての試料に添加した。室温で20分間インキュベートした後、HBSSで3回洗浄し、FITC標識TSA試薬を1:200の最終希釈で添加した。室温で10分間インキュベートした後、マイクロドロップをHBSSで3回洗浄し、すべての試料を3つの対照: 1) 非染色マイクロドロップ、2) TSA試薬のみ、および3) 陰性 (捕獲Abなし) 対照と共にフローサイトメトリーで解析した。本実験の結果から、分泌産物の細胞外検出に提案のマイクロドロップアッセイ法が実際に使用可能であることが示されるが、これを図8に示す。3つの対照すべてにおいて、低いバックグラウンドの蛍光が見られた (それぞれ1.27、2.87、および4.6)。1  $\mu$ g/mlおよび0.01 mg/mlのmIgG1ではそれぞれ224.78および93.14のMFIを生じ、さらに0.001  $\mu$ g/ml (1 ng/ml) 濃度のmIgG1でもやはり明らかに検出可能であった (MFI 31.98)。

30

40

#### 【0146】

11. 連続サブライニング法による、CRL-8018ハイブリドーマ細胞におけるインビトロで誘導されたIgGアイソタイプスイッチ率の検出

材料および方法に示したように、CRL-8018ハイブリドーマ細胞株を用いて実験を行った。CRL-8018細胞株では、インビトロでの最も効率的な条件は、a) mIgG1およびmIgG2bへのスイッチを誘導するレンチノイン酸 (100 nM)、またはb) mIgG1へのスイッチを誘導するmIL-4 (10 ng/ml) と組み合わせた精製抗原 (HBsAg 1  $\mu$ g/ml) であると決定した。材料および方法に示したのと同様に、連続サブライニングを行った。1 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞を100 nMレンチノイ

50

ン酸を補充した増殖培地 200 ml に懸濁し ( $5 \times 10^3$  細胞/ml)、1,000 細胞/ウェルの密度で 96 ウェルプレート 10 枚にプレーティングした (0.2 ml/ウェル)。5% CO<sub>2</sub> の存在下で 37 で 5 日間インキュベートした後、細胞培養上清で mIgG アイソタイプ特異的 ELISA を行った。2 つの陽性ウェルの細胞を、100 細胞/ウェルの密度で 96 ウェルプレートにプレーティングした (25 枚)。上記の手順を、1,000 細胞/ウェル、100 細胞/ウェル、10 細胞/ウェル、および 1 細胞/ウェルで 5 ラウンド行った。1 つの代表的な実験の結果を、表 6 に示す。10 枚の 96 ウェルプレートに 1,000 細胞/ウェルの密度で細胞をプレーティングした後では、6 ウェル (6%) が mIgG について低い陽性であることが上清 ELISA から示された。このことから、アイソタイプスイッチ率が  $\sim 0.0006\%$  であることが示唆される。このアッセイ法では、mIgG アイソタイプ特異的 ELISA を行うのに、約 2 ヶ月という期間、110 枚のプレート、および 10,560 の上清が必要とされる。

10

## 【0147】

(表 6) レチノイン酸 (100 nM) でインビトロ誘導した後の、連続サブライニング法による CRL-8018 ハイブリドーマ細胞株における mIgG スwitch 変種の検出

プレーティング密度	1,000 細胞/ウェル	100 細胞/ウェル	10 細胞/ウェル	1 細胞/ウェル
mIgG 陽性ウェル	6	298	564	2188
% 陽性 <sup>a</sup>	0.6%	12.4%	23.5%	91.2%

20

<sup>a</sup> 1,000 細胞/ウェルでプレーティングした 960 ウェル、およびより低い密度でプレーティングした 2,400 ウェルのパーセント

## 【0148】

人工的な細胞混合液において小さな亜集団を検出する、マイクロドロップアイソタイプ捕獲および単離アッセイ法の結果

IgG3 分泌 TIB-114 ハイブリドーマ細胞を添加した IgM 分泌 CRL-8018 ハイブリドーマ細胞株での実験に、連続的な (2 段階) マイクロドロップアイソタイプ捕獲および単離アッセイ法を用いた。CRL-8018 細胞を  $1 \times 10^4$  /ml で 75 cm<sup>2</sup> フラスコ 6 枚にプレーティングして (DMEM+10% FBS 25 ml/フラスコ) 7 日間培養した後、細胞を回収して 0.1% (実験 1)、0.01% (実験 2)、および 0.001% (実験 3) の TIB-114 細胞と混合した。セルバイオゲル-3 を用いて、細胞混合液: 実験 1 では  $2 \times 10^6$  細胞 (単一細胞カプセル化)、実験 2 では  $25 \times 10^6$  細胞、および実験 3 では  $50 \times 10^6$  細胞 (どちらも複数細胞カプセル化) をカプセル化した。材料および方法に記したのと同様に、実験 1 ではマイクロドロップアイソタイプ捕獲および単離を 1 ラウンド行い、実験 2 および 3 では 2 段階のアッセイ型式を用いた。材料および方法に記したように、単離した細胞は培養して増殖させ、上清はアイソストリップ (商標) 計量棒により解析した。実験 2 および 3 では、1 ラウンド目のソーティング後に回収した細胞の上清中に mIgM と mIgG3 の両方が検出された。しかし、続く 2 ラウンド目のソーティング後では、mIgG3 とわずかに微量の mIgGM が検出された。実験 1 の 0.1% の IgG3 分泌ハイブリドーマを添加した  $1 \times 10^6$  IgM 分泌細胞の単一細胞カプセル化では、FACS により mIgG3 分泌細胞のみが単離された。実験結果を表 7 にまとめる。

30

40

## 【0149】

(表 7) mIgM 分泌ハイブリドーマ細胞株と混合した mIgG3 分泌ハイブリドーマ細胞の小さな亜集団を検出する、マイクロドロップアイソタイプ捕獲および単離アッセイ法の結果

mIgM 分泌 ハイブリドーマ 中の mIgG3 分泌細胞の割合	カプセル化細胞 の総数	GMD あたり の細胞平均数	FACS 1ラウンド目		単一占有 GMD による FACS の連続的2ラウンド目	
			検出された %陽性 マイクロ ドロップ		検出された %陽性 マイクロ ドロップ	
実験 1 (0.1%)	1x10 <sup>6</sup>	1.0	0.1%	112.45	—	—
実験 2 (0.01%)	25x10 <sup>6</sup>	3.2	0.47%	146.24	25.7%	151.8
実験 3 (0.001%)	50x10 <sup>6</sup>	7.5	0.03%	132.4	13.4%	137.52

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 0 】

マイクロドロップアイソタイプ捕獲および単離アッセイ法による自発的スイッチ率ならびにインビトロで誘導されたスイッチ率の測定

マイクロドロップを用いるアッセイ型式を用いて、IgM分泌CRL-8018ハイブリドーマ細胞株の集団から、インビトロで誘導されたアイソタイプスイッチ変種および自発的アイソタイプ変種を単離した。それぞれの実験条件で5回行ったうちの1つの代表的な実験結果を表8に示す。実験の1ラウンド目では、自発的なアイソタイプスイッチ率を測定した。材料および方法に記したように、2試料分のセルバイオゲル-3と1試料分のセルミックス（商標）15 mlを用いて、75x10<sup>6</sup> ハイブリドーマ細胞をカプセル化した。およそ60%のマイクロドロップが占有され、占有マイクロドロップあたり平均9細胞であった。次にmIgGアイソタイプ捕獲アッセイ法を行い、陽性細胞に占有されるマイクロドロップ（0.02%）をFACSにより単離した。カプセル化されている細胞数に基づき、推定アイソタイプスイッチ率を0.0013%と算出した。マイクロドロップを12ウェルプレートの1ウェルに分取し、5 U/mlアガラーゼを含む増殖培地1 mlで一晩インキュベートした。一晩インキュベートした後では、活発に分裂する細胞の大部分はマイクロドロップから脱していた。新鮮培地1 mlをウェルに添加し、細胞をさらに5日間インキュベートした。マイクロドロップアイソタイプ検出および単離アッセイ法の2ラウンド目は、単一細胞カプセル化条件により1x10<sup>6</sup>細胞をカプセル化して行った。24.6%の占有マイクロドロップが、mIgG分泌細胞を含んでいた。最も高い蛍光を有するマイクロドロップの亜集団（3.5%）をFACSにより単離した。5 U/mlアガラーゼの存在下で一晩インキュベートした後、ソーティングした細胞を完全培地に再懸濁し、1細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート10枚にプレーティングすることによりクローニングした。2週間後、上清mIgGアイソタイプELISA法により、試験した960ウェルのうち785（81.7%）が陽性であると評価された。

## 【 0 1 5 1 】

インビトロで誘導したアイソタイプスイッチの検出を実証するため、CRL-8018ハイブリドーマ細胞を100 nMレチノイン酸を含む完全培地で5日間培養した。アイソタイプスイッチした細胞の存在は、0.1 μg/mlの検出限界を有するアイソストリップ（商標）により決定した。0.1 μg/ml 未満のmIgGを含むウェルについては、複数細胞カプセル化を行った。0.1 μg/ml を超えるmIgGを含むウェルについては、従来の単一細胞カプセル化を行った。25x10<sup>6</sup>細胞を用いた複数細胞カプセル化では、～55%のマイクロドロップが占有され、平均細胞数2.5細胞/マイクロドロップであった。0.09%の陽性マイクロドロップが検出され、単離した細胞は2ラウンド目のカプセル化に供した。36.4%の陽性マイクロドロップが検出され、最も高い平均蛍光を示す亜集団（2.9%）を単離した。単一細胞カプセル化では、mIgG陽性ウェルの2x10<sup>6</sup>細胞を用いた。CeIMix。

## 【 0 1 5 2 】

(表8) mIgGスイッチしたmIgM分泌CRL-8018ハイブリドーマ細胞の小さな亜集団を検出してソーティングする、マイクロドロップアイソタイプ捕獲および単離アッセイ法のフローサイトメトリーの結果

	カプセル化細胞の総数	GMDあたりの細胞平均数	FACSによるmIgG分泌細胞の検出				
			FACS 1ラウンド目 (全陽性 GMDをソーティングした)		単一占有 GMDによるFACSの連続的2ラウンド目		
			検出された%陽性マイクロドロップ	FITC MFI	検出された%陽性マイクロドロップ	FITC MFI	ソーティングしたGMD MFI(%陽性)
自発的なアイソタイプスイッチ	75x10 <sup>6</sup>	9.0	0.02%	8.25	24.6%	12.7	83.4 (3.5%)
インビトロで誘導したアイソタイプスイッチ (100 nM レチノイン酸)	25x10 <sup>6</sup> mIgG >0.1 µg/ml	2.5	0.09%	17.93	36.4%	11.3	75.2 (2.9%)
	2x10 <sup>6</sup> mIgG <0.1 µg/ml	1	0.15%	320.65	—	—	—

10

## 【0153】

20

マイクロドロップを用いるアッセイ法によって単離したアイソタイプスイッチした細胞の抗原特異性の決定

マイクロドロップを用いるアッセイ型式により単離したアイソタイプスイッチした細胞の抗原特異性を実証するため、上清ELISAを用いるマウスMonoAb IDキット(ザイメッドラボラトリーズ(Zymed Laboratories))を用いた。96ウェルプレートにHBsAg(10 µg/ml)でコーティングした後、メーカーの推奨するように手順を実施し、抗原特異的抗体のアイソタイプサブクラス:mIgG1(α鎖特異的)、mIgG2a(α<sub>2a</sub>鎖特異的)、mIgG2b(α<sub>2b</sub>鎖特異的)、mIgG3(α<sub>3</sub>鎖特異的)、mIgA(α鎖特異的)、mIgM(μ鎖特異的)、マウス 軽鎖特異的、およびマウス 軽鎖特異的を決定した。完全培地で培養したCRL-8018ハイブリドーマ細胞の上清、およびレチノイン酸(100 nM)によりインビトロで誘導した後に単離したスイッチ細胞の上清を試験したところ、それぞれヒトB型肝炎表面抗原(HBsAg)に特異的なmIgM(α鎖特異的)およびmIgG1が検出された。これにより、アイソタイプスイッチ変種が元のハイブリドーマ細胞株と同様の抗原特異性を有することが実証された。

30

## 【0154】

参考文献

- [208] 1. Opal, Chest, 117(4):1162-1172. 2000.
- [209] 2. Bakhet, Clin Diag Lab Immunol, 6(3):415-419. 1999.
- [210] 3. Lin, . Betaseron. In: Characterization of Biotechnology Pharmaceutical Products. Brown,et al. (eds), Dev Biol Stand. Basel, Karger, 96:97-104. 1998.
- [211] 4. Baiter, Science, 286:205-206. 1995.
- [212] 5. Clerici J Clin Invest, 91:759-765. 1993.
- [213] 6. Klein AIDS, 11:1111-1118. 1997.
- [214] 7. Collins Cytometry, 33:249-255. 1998. 10
- [215] 8. Van den Berg, Transpl Int, 11(suppl 1):S318-S321. 1998.
- [216] 9. Smith, Immunol Rev, 51:337-357. 1980.
- [217] 10. Abbas, Nature, 383:787-793. 1996.
- [218] 11. Maino, Clinical Immunol Newsletter, 16(6):95-98. 1996.
- [219] 12. Paul, Cell, 76:241-251. 1994.
- [220] 13. Mosmann J Immunol, 136:2348-2357. 1986.
- [221] 14. Mosmann, Immunol Today, 17:138-146. 1996. 20
- [222] 15. Powrie, Immunol Today, 14:270-274. 1993.
- [223] 16. Sher, A. and Coffman, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. Ann Rev Immunol, 10:385-394. 1992.
- [224] 17. Weaver, J.C. Gel microdroplets for microbial measurement and screening: basic principles. Biotech. and Bioengr. Symp. 17:185-195, 1986.
- [225] 18. Weaver, J.C., Williams, G.B., Klivanov, A. and Demain, A.L. Gel microdrops: rapid detection and enumeration of individual microorganisms by their metabolic activity. Bio/Technology, 6:1084-1089. 1988. 30

- [226] 19. Weaver, J.C., Bliss, J.G., Harrison, G.I., et al. In *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, Academic Press: San Diego, 2(3): 234-247. 1991.
- [227] 20. Powell, K.T. and Weaver, J.C. Gel microdroplets and flow cytometry: rapid determination of antibody secretion by individual cells within a cell population. *Bio/Technology*, 8:333-337. 1990.
- [228] 21. Weaver, *Nature Medicine*, 3(5):583-584. 1997.
- [229] 22. Gray J. *Immunol Methods*, 182:155-163. 1995.
- [230] 23. Akselband, 34<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Microbiology, Worcester, Massachusetts, October 1999, 26-28. 10
- [231] 24. Goguen, *Nature*, 363:189-90. 1993.
- [232] 25. Nguyen, *Cytometry*, 21:111-119, 1995.
- [233] 26. Ryan, J. *Clin. Microbiol.*, 33:1720-26, 1995.
- [234] 27. Weaver, In *Flow cytometry applications in animal cell culture*, Eds. Al-Rubeai and Emery, Marcel Dekker, New York, NY, 39-62, 1995.
- [235] 28. Kenny, *Bio/Technology*, 13:787-790, 1995.
- [236] 29. Gift, *Nat. Biotech.*, 14:884-887, 1996. 20
- [237] 30. Trnovsky *Am. J. Hum. Genetics*, 59, 4, A135, 1996.
- [238] 31. Ferrante Susceptibility testing and screening using a gel microdrop (GMD) based assay. Society for Industrial Microbiology, Northeast Branch, March 1997.
- [239] 32. Weaver In *ASM Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> edition, Eds. Demain AL and Davis JE, Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, pp. 114-118, 1999.
- [240] 33. Gift, *Cytometry* 39:243-249, 2000. 30
- [241] 34. Hammill *Cytotechnology*, 34:27-37. 2000.
- [242] 35. Wadhwa In: *Cytokines. A Practical Approach*. pp.309-330. F. R. Balkwill (ed), IRL PRESS at Oxford University Press. Oxford, NY. 1991.
- [243] 36. Crowther, *Methods Mol Biol*, 42:1-223. 1995.
- [244] 37. Ogata, A *J Immunol Methods*, 148:15-21. 1992.
- [245] 38. Shankar, ELISA. *J Immunol*, 18(4):371-388. 1997.
- [246] 39. Carson, *J Immunol Methods*, 227:41-52. 1999.
- [247] 40. Naylor, In: *Cytokines. A Practical Approach*. pp.31-50. F.R.Balkwill (ed), IRL PRESS at Oxford University Press. Oxford, NY. 1991. 40
- [248] 41. Brenner, In: *Cytokines. A Practical Approach*. pp.51-59. F.R.Balkwill (ed), IRL PRESS at Oxford University Press. Oxford, NY. 1991.

- [249] 42. Naylor, In: Balkwill R.F. (ed). Cytokines. A Practical Approach. Oxford Univ. Press, Oxford, p.35. 1995.
- [250] 43. Carter, Curr Opin Immunol, 9:177-182. 1997.
- [251] 44. Maino, Cytometry, 34:207-215. 1998.
- [252] 45. SuniJ Immunol Methods, 212:89-98. 1998.
- [253] 46. Openshaw J Exp Med, 182:1357-1367. 1995.
- [254] 47. Jung, J Immunol Methods, 159:197-207. 1993.
- [255] 48. Prussin, J Immunol Methods, 188:117-128. 1995. 10
- [256] 49. Manz, Immunology, 92:1921-1925. 1995.
- [257] 50. Holmes, J Immunol Methods, 230:141-147. 1999.
- [258] 51. Brosterhus, Eur J Immunol, 29:4053-4059. 1999.
- [259] 52. Scheffold, Eur Cytokine Netw, 9 (suppl 3): 5-11. 1998.
- [260] 53. Akdis, Immunol Methods, 182:251-261. 1995.
- [261] 54. Akdi, Eur J Immunol, 27:2351-2357. 1997.
- [262] 55. Londei, In: Cytokines. A Practical Approach. pp.151-169. F.R.Balkwill (ed), IRL PRESS at Oxford University Press, Oxford, NY. 1991. 20
- [263] 56. BrosterhusEur J Immunol, 29(12):4053-4059. 1999.
- [264] 57. Waldrop, J Immunol, 161(10):5284-5295. 1998.
- [265] 58. Zandstra Proc Natl Acad Sci USA, 94:4698-4703. 1997.
- [266] 59. Petzer, J Exp Med, 183:2551-2558. 1996.
- [267] 60. Perfetto Cytometry, 30:1-9. 1997.
- [268] 61. WaldropJ Clin Invest, 99:1739-1741. 1997.
- [269] 62. Maino Cytometry, 20:127-133. 1995. 30
- [270] 63. Sedar, J Exp Med, 176:1091-1098. 1992.
- [271] 64. Hsiech, Proc Natl Acad Sci USA, 89:6065-6069. 1992.
- [272] 65. Hsiech Proc Natl Acad Sci USA, 90:10188-10192. 1993.
- [273] 67. Dinarello. J Exp Med, 163:1433-1450. 1986.
- [274] 68. Dinarello, C.A. Biology of interleukin 1. FASEB J 2:108-115. 1988.
- [275] 69. Okusawa J Clin Invest, 81:1162-1172. 1998.
- [276] 70. Hesse, Surg Gynecol Obstet, 166:147-153. 1988.
- [277] 71. Moser, J Clin Invest, 83:444-455. 1989. 40
- [278] 72. Allison, In Aggarwal. B., Puri, K.K. (eds). Human cytokines: their role in disease and therapy. Blackwell Science, pp. 689-713. 1995.
- [279] 73. Eaves, Blood, 80:67a. 1992.



- [280] 74. Ogawa, Blood, 81:2844-2853. 1993.
- [281] 75. Mercken J Immunol Methods, 138:173-180. 1991.
- [282] 76. Boot, J Immunol Methods, 106:195-202. 1988.
- [283] 77. Muller, J Immunol, 131(2):877-881. 1983.
- [284] 78. Kenney, J Immunol Methods. Jul 26;121(2):157-66. 1989
- [285] 79. Borrebaeck, Trends Biotechnol 1986, 4, 147.
- [286] 80. Stavnezer, J. Science, 228:984-985. 2000.
- [287] 81. Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual. (eds. Harlow E., Lane D.) Cold Spring Harbor Laboratory, pp242 1988. 10
- [288] 82. Spira, Clin Exp Immunol. 105(3):436-42. 1996
- [289] 83. Spira, Methods of Hybridoma Formation (eds. Bartal A.H., Hirshaut Y) Humana Press, pp 385-391. 1987.
- [290] 84. Pluschke, Eur J Immunol. 17(3):413-6. 1987
- [291] 86. Weave, Nature Medicine. 3(5):583-585, 1997.
- [292] 87. Powell Bio/Technology, 8:333-337, 1990. 20
- [293] 88. Kenny,. Bio/Technology, 13:787-790, 1995.
- [294] 89. Weaver, In Methods: a companion to methods in enzymology, Academic Press, San Diego, 2(3):234-247, 1991.
- [295] 90. Weaver, In Flow cytometry applications in animal cell culture, Eds. Al-Rubeai and Emery, Marcel Dekker, New York, NY, 39-62, 1995.
- [296] 91. Gray J. Imm. Meth., 182:155-163, 1995.
- [297] 92. Hammill, Cytotechnology, 34:27-37. 2000.
- [298] 93. Lin, M. and Chen, Y. B cell differentiation. II. Isotype potential of a single B cell. Cell Immunol, 150:343-352. 1993. 30

# 【 0 1 5 5 】

上記で引用した刊行物および特許出願はすべて、個々の刊行物または特許出願が詳細にかつ個別に参照として組み入れられることが示されるがごとく、すべての目的のために同程度で完全に参照として組み入れられる。明確に理解できるように説明と実施例により本発明をある程度詳細に記述したが、いくつかの変更および修正を添付の特許請求の範囲内で実行できることは明らかであると思われる。文脈から明らかでない限り、本出願で記載した本発明の原理、工程、特徴、および態様を相互にすべての組み合わせで使用できることは明らかである。 40

## 【 図面の簡単な説明 】

# 【 0 1 5 6 】

【 図 1 】 マイクロドロップ内に分泌タンパク質を保持するための捕獲ウェブ。

【 図 2 】 非占有GMDを用いて作成したmrIFN 検量線。非占有GMDは、セルバイオゲル（商標）-2から調製した。ストレプトアビジンとビオチン化抗IFN Abで処理した後、濃度を低くしていったmrIFN と共にインキュベートした。PE標識抗IFN Abで標識した後、アガロースマトリックスに結合したサイトカインを蛍光により検出した。

【 図 3 】 hrIL-4でトランスフェクションしたCHO細胞を用いたGMDサイトカイン分泌アッセイ法。1時間の分泌インキュベーションにより、GMD分泌アッセイ法を行った。フローサイトメトリー・ヒストグラム1、2、および3は、それぞれ非染色、陰性（または「捕獲なし」 50

」) 対照、および陽性対照を表す。単一細胞に占有されるGMDにゲートを設定した(ヒストグラム4、ゲートA)。データ収集で生(PI陰性)細胞を選択し(ヒストグラム4、ゲートB)、FITC蛍光について解析した(ヒストグラム5)。マーカーCの下に陽性GMDが同定された(ヒストグラム6)。

【図4】活性化抗原特異的T細胞によるIL-4分泌のフローサイトメトリー解析。黒線のヒストグラムは、「捕獲なし」を示す(陽性(陰性対照よりも高い)FITC蛍光を有するGMDを同定するため、陰性対照マーカーM1を設定した)。青線のヒストグラムは、陽性対照を示す(mrIL-4 10 ng/ml)。3.5時間インキュベーションした後では3.2%の陽性GMDが検出され(赤線のヒストグラム)、18時間インキュベーションした後では20.87%の陽性GMDが検出された(緑線のヒストグラム)。平均FITC蛍光の比例的な増加により、検出した細胞によるサイトカイン分泌が増加したことが示される。

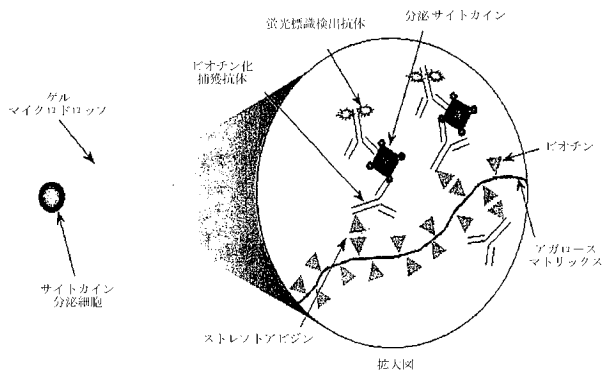
【図5】CD3陽性IFN 分泌細胞の同時検出。マイトマイシンC処理した自己支持細胞およびmrIL-2の存在下で抗原によりインビトロで刺激した後、 $1 \times 10^6$ カプセル化細胞でGMD I IFN 分泌アッセイを行った。フローサイトメトリー解析の前に、細胞をFcBlock(商標)およびPE標識マウス抗CD3 Ab(10  $\mu$ g/ml)と共にインキュベートした。FSCとSSCにより、非占有GMDと占有GMDを識別した(パネルA)。生(PI陰性)細胞に占有されるGMDのみを、データ収集に含めた(R1ゲート、パネルA)。陰性対照とIFN 分泌試料(どちらも抗IFN /FITC(FL-1) Abおよび抗CD3 /PE(FL-2) Abで染色)のドットプロットを、それぞれパネルBとパネルCに示す。

【図6】非占有GMDおよびフローサイトメトリーを用いたmrIFN およびmrIL-4の同時検出。セルバイオゲルを用いて非占有GMDを作製した。2色フローサイトメトリーにより、mrIFN (100 ng/ml)、mrIL-4(25 ng/ml)、または両サイトカインの混合液を検出した。ドットプロットにより、陰性対照(パネルA)、マウス抗IFN /PEとインキュベートした試料(パネルB)、マウス抗IL-4/FITCとインキュベートした試料(パネルC)、および両Abの混合液とインキュベートした試料(パネルD)のFL-1(FITC)対FL-2(PE)の結果を示す。

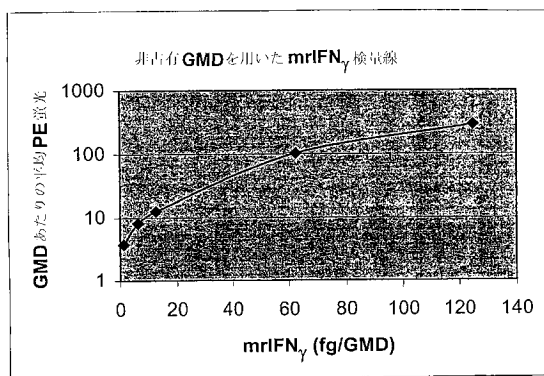
【図7】4色フローサイトメトリーを用いた、新たに単離してカプセル化したヒトPBMCによるCD3、CD4、およびCD69細胞表面発現とIFN 分泌の同時検出。未刺激、またはPHA(5  $\mu$ g/ml)によりインビトロで24時間刺激したヒトPBMCを、セルバイオゲル-R<sup>-1</sup>にカプセル化した。4色フローサイトメトリーを用いて、免疫表現型とIFN 分泌によりリンパ球のサブセットを同定した。陰性対照として用いた未刺激細胞の、試験したすべてのパラメータについての代表的なヒストグラムを1~4Aに示す。未刺激リンパ球および刺激したリンパ球のどちらにも、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞が同定された(3-Aおよび3-B)。さらに、未刺激対照のバックグラウンド(1.3%、2-A、マーカーEの下、および1.3%、4-A、マーカーIの下)を減算し、CD69を発現している刺激したリンパ球の79.6%の亜集団(2-B、マーカーEの下)、およびIFN を分泌している刺激したリンパ球の9.6%の亜集団(4-B、マーカーIの下)が同定された。

【図8】非占有GMD(CBG-3)、ビオチンおよびHRP標識ヤギ抗マウスIgG1、ならびにTSAを用いたmIgG1の検出。

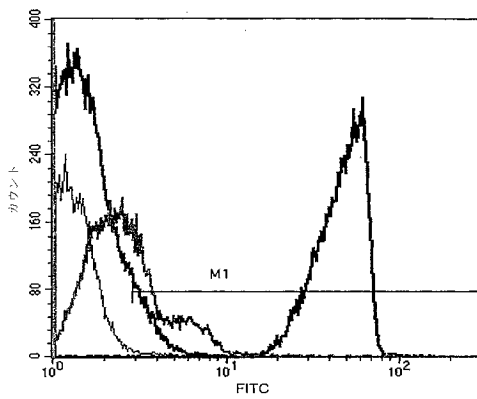
【図 1】



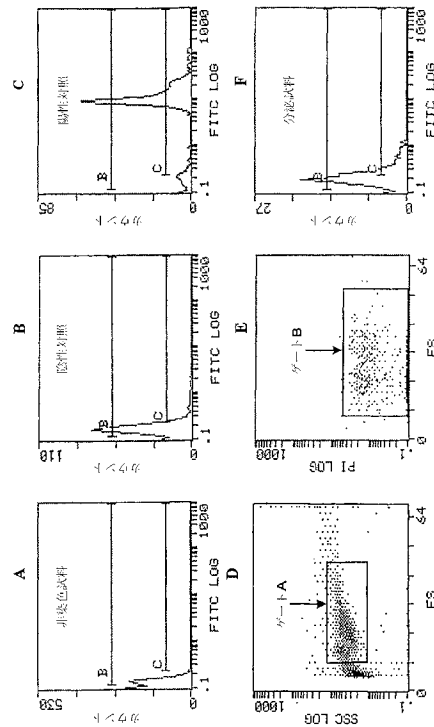
【図 2】



【図 4】



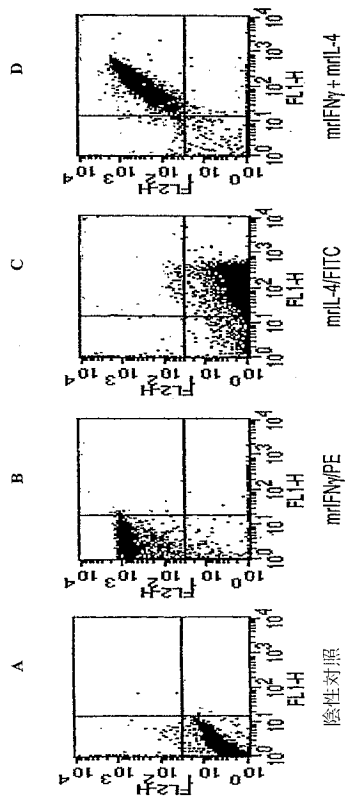
【図 3】



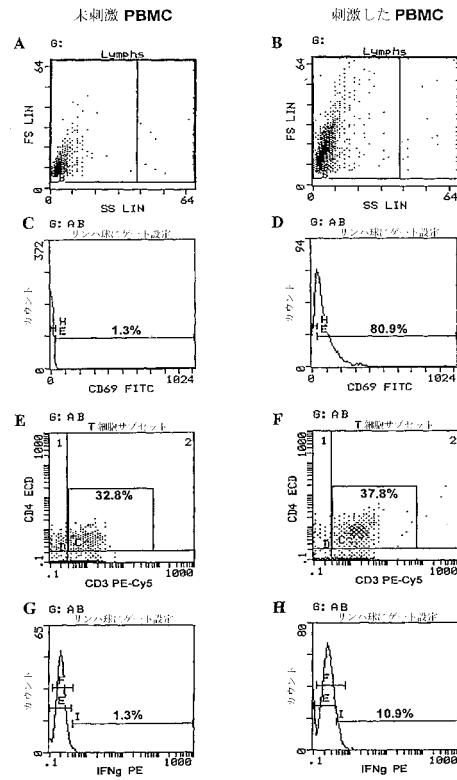
【図 5】



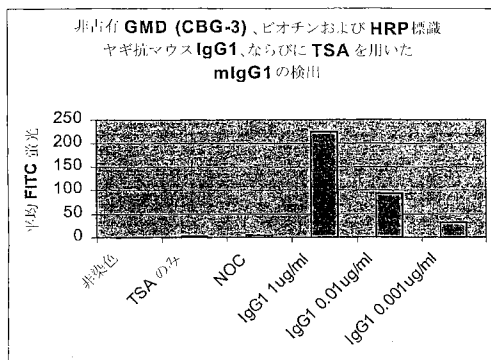
【図 6】



【図 7】



【図 8】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/097122 A1

(51) International Patent Classification: C12Q 1/02, 1/24

(74) Agents: LIEBESCHUETZ, Joe et al.; Townsend and Townsend and Crew LLP, 8th floor, Two Embarcadero Center, San Francisco, CA 94111 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/16783

(22) International Filing Date: 28 May 2002 (28.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/293,822 26 May 2001 (26.05.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ONE CELL SYSTEMS, INC. [US/US]; 100 Inman Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): JESPERSEN, Diana [US/US]; Neuronix, Inc., 1 Great Valley Parkway, Suite 20, Malvern, PA 19355-1975 (US). AKSEL-BAND, Yevgenia [US/US]; 181 Lake Shore Road, Apt. 2, Brighton, MA 02135 (US). MCGRATH, Patricia [US/US]; 39 Inman Street, Cambridge, MA 02139 (US). TRNOVSKY, Jan [US/US]; 57 Walden Avenue, Sangus, MA 01906 (US). MOEN, Phillip, T., Jr. [US/US]; 114 Granite Street, Foxborough, MA 02035 (US).

Declaration under Rule 4.17:

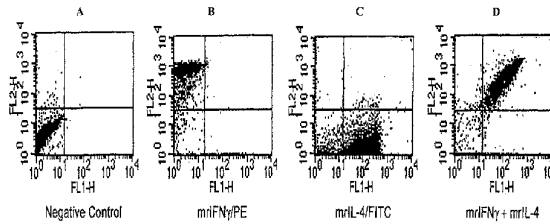
— of inventorship (Rule 4.17(c)) for US only

Published:

with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SECRETION OF PROTEINS BY ENCAPSULATED CELLS



(57) Abstract: The invention provides methods of analyzing a secreted protein from a cell encapsulated in a microdrop. The microdrop is formulated with biotinylated matrix molecules at a reduced ratio of biotin to matrix molecules compared with previous formulations. The reduced ratio is advantageous for improving the resolution of detection and allows simultaneous detection of multiple secreted proteins and/or multiple cell surface markers. The invention further provides inter alia methods of isolating IgG isotype antibodies that have switched from IgM isotype.

WO 02/097122 A1

WO 02/097122

PCT/US02/16783

**Secretion of proteins by encapsulated cells****[01]** CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

**[02]** The present application derives priority from USSN 60/293,822 filed May 26, 2001, which is incorporated by reference in its entirety for all purposes.

**[03]** BACKGROUND

**[04]** The gel microdrop (GMD) secretion assay involves encapsulating cells in a biotinylated matrix, followed by capture and detection of cell-secreted molecules with fluorescent markers (17-34). This technology differs from other encapsulation methods in that the small size of the microdrop (e.g., <50  $\mu\text{m}$  diameter) creates a defined microenvironment around the cell without impeding diffusion of nutrients, antibodies, or nucleic acid probes into the microdrops, or diffusion of secreted products. Furthermore, microdrops can readily be analyzed using flow cytometry and sub-populations can be detected. The number of occupied cells in each microdrop preparation depends on the number of cells used for encapsulation and is approximated by Poisson statistics for single cell encapsulation (19). To obtain microdrops having a high probability of initially containing 0 or 1 cells, an experimental protocol has been developed in which 1-1.5 million cells are encapsulated in 20 million microdrops, resulting in approximately 5-10% single cell occupation... The emulsion is transiently cooled, causing the drops to gel. Once gelled, the microdrops are physically distinct and robust and can be removed from the oil into an aqueous medium by low speed centrifugal separation. Since the microdrop agarose matrix is a permeable semi-solid support, immunochemical procedures can be performed on encapsulated cells.

**[05]** SUMMARY OF THE CLAIMED INVENTION

**[06]** The invention provides methods of analyzing a secreted protein. Such method entail encapsulating a cell in a microdrop wherein the microdrop comprises matrix component molecules, first biotin molecules linked to the matrix component molecules, capture molecules with affinity for a molecule secreted by the cell linked to second biotin molecules, and streptavidin linking the first and second biotin molecules, the first biotin molecules and the matrix component molecules being in a molar ratio of less than 0.85, preferably 0.01 to 0.2, and optionally 0.02-0.2 moles biotin per mole matrix component molecules. The molecule is secreted from the cell and binds to the capture molecules is thereby retained within the microdrop. The secreted molecule is then detected. In some methods the

WO 02/097122

PCT/US02/16783

concentration of the first biotin molecules in the microdrop is less than or equal to 42 micromolar.

[07] In some methods, the encapsulating step encapsulates a plurality of cells in the microdrop. In some methods, the encapsulating step encapsulates a single cell in the microdrop. In some methods, the secreted molecule is a protein, hormone, or carbohydrate. In some methods, the streptavidin and capture molecules are encapsulated into the microdrops at the same time as the cell. In some methods, the streptavidin and captured molecules are incorporated into the microdrop after the encapsulating step. In some methods, the microdrop further comprises second capture molecules with affinity for a second secreted molecule, the second capture molecules being linked to additional copies of the second biotin molecules. In some methods, the cell secretes the second molecule. In some methods, the detecting step is performed by contacting the microdrop with a detection reagent having affinity for the secreted molecule, and detecting binding of the detection reagent to the secreted molecule. In some methods, the detection reagent is labeled. In some methods, a signal of the labeled detection reagent bound to the secreted molecule is proportional to the number of copies of the secreted molecule within the microdrop. In some methods, the detecting step is performed by contacting the microdrop with a first detection reagent having specific affinity for the secreted molecule and a second detection reagent having specific affinity for the second secreted molecule, wherein the first and second detection reagents are differentially labeled. In some methods, the cell secretes a third secreted molecule, and the microdrop further comprises third capture molecules with affinity for the third secreted molecule, the third capture molecules being linked to additional copies of the second biotin molecules, and the method further comprises contacting the microdrop with first, second, third and fourth detection reagents having specific affinity for the secreted molecule, the second secreted molecule, the third secreted molecule and a cell surface marker respectively, and the detecting step detects the secreted protein, the second secreted protein, the third secreted protein and the cell surface marker. In some methods, the detection step is performed by contacting the microdrop with a first detection reagent having affinity for the secreted molecule and a second detection reagent having affinity for a cell surface marker, and the first and second detection reagents are differentially labeled. In some methods, the detection reagent and the capture molecules bind to different epitopes on the secreted molecule. In some methods, the matrix component is agarose. In some methods, the secreted protein is an antibody. In some methods, the secreted protein is an antibody of IgG isotype and the capture molecules are antibodies specific for the IgG isotype. In some methods, the secreted

WO 02/097122

PCT/US02/16783

protein is a cytokine. Some methods further comprise inducing the cell to secrete the secreted molecule. In some methods, the inducing is performed after the encapsulating step. In some methods, the inducing is performed before the encapsulating step.

[08] In some methods, the cell comprises a vector comprising a nucleic acid segment encoding the secreted protein, the segment being operably linked to one or more regulatory DNA segments that effect expression of the secreted protein. In some methods, the secreted protein is naturally secreted by the cell. Some methods further comprise a step of propagating the cell to form a cell line after the detecting step. In some methods, the cell was obtained from a patient. In some methods, the cell is a cytotoxic T-cell. Some methods further comprise introducing a population of cells resulting from propagating the cell into the patient. In some methods, the cell is a stem cell. In some methods, the patient is suffering from an autoimmune disease and the cell is a Th2 cell. In some methods, the cell is an islet cell secreting insulin and the patient is in a prodromal period prior to onset of clinical symptoms. Some methods further comprise treating the cell with IL-10 during the propagating step. Some methods further comprise separating the cells from other cells using a cell sorter based on a fluorescent signal resulting from binding of a fluorescently labeled detection reagent to the secreted molecule. In some methods, the cell secretes first and second proteins, and the matrix comprises first and second capture molecules with affinity for the first and second proteins respectively, and the analyzing step comprises contacting the cell with first and second detection reagents that bind to the first and second secreted proteins, and detecting the first and second proteins from signal of the first and second detecting reagents bound to the first and second secreted proteins.

[09] The invention provides methods of analyzing a population of cells. Such methods entail encapsulating a population of cells in microdrops. The cells are contacted with a first detection reagent for a first marker, and a second detection reagent for a second marker, wherein the first marker is a secreted protein and the second marker is a cell surface protein or a second secreted protein. Cells having both the first and second markers are detected. In some methods, at least some microdrops encapsulate single cells. Some methods further comprise separating the microdrops encapsulating the cells from unoccupied microdrops on a Percoll, polysucrose, sodium diatrizoate, or iodixanol gradient. Some method further comprise forming an array of microdrops encapsulating the cells attached to a solid support, and wherein the detecting is performed using a scanning fluorescent, colorimetric, chemiluminescent detector. Some methods further comprise contacting the microdrops



WO 02/097122

PCT/US02/16783

encapsulating cells with an agent, and wherein the detecting indicates whether the agent affects the level of the secreted protein.

[10] In some methods, the encapsulated cells are population of cells from a patient and the agent is a different population of cells from the patient. In some methods, the sub-population of cells is isolated by binding of fluorescently labelled antibody to a cell surface marker, and detection of the fluorescent signal. In some methods, the population of cells are obtained from a patient and the presence of the cells having both the first and second markers indicates an immune status of the patient. In some methods, the cells are antigen-specific T-cells. In some methods, the first and second markers are selected from the group consisting of IL-4, IL-10, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ . In some methods, the first and second particular proteins are selected from the group consisting of IL-10 and IL-12. In some methods, the identified cells are Th1 cells. In some methods, the identified cells are Th2 cells. In some methods, the second marker is a cell surface marker of T-cell differentiation. In some methods, one of the markers is CD4 or CD8.

[11] The invention further provides methods of analyzing a population of cells. Such methods entail encapsulating a population of cells expressing proteins in microdrops, and wherein the microdrops comprise matrix component molecules, first biotin molecules linked to matrix component molecules, at least first capture molecules having affinity for an epitope in at least one type of secreted protein; the first capture molecules being linked to second biotin molecules, and streptavidin, linking the first and second biotin molecules; whereby proteins are secreted from the cells and proteins having affinity for the first capture molecules are captured within the microdrops; and analyzing the secreted proteins within the microdrops. In some methods, at least some of the microdrops encapsulate a single cell. In some methods, the cells secrete the same protein at different levels, and the analyzing step compares the levels. In some methods, the cells secrete different proteins, and the analyzing step detecting a cell secreting a particular protein. In some methods, the population of cells was obtained from the patient, and the analyzing identifies a subpopulation of cytotoxic T-cells and the method further comprises reintroducing the population of cells without the subpopulation of cells into the patient. In some methods, the patient is suffering from or susceptible to an autoimmune disease, graft versus host disease or host versus graft disease. Some methods further comprise treating the population of cells without the subpopulation of cells with IL-10 before the reintroducing step.

[12] The invention further provides a population of microdrops encapsulating cells, and the microdrops comprise matrix component molecules, first biotin molecules linked to the

WO 02/097122

PCT/US02/16783

matrix component molecules, capture molecules with affinity for a protein secreted by the cell linked to second biotin molecules, and streptavidin linking the first and second biotin molecules, the first biotin molecules and the matrix molecules being in a molar ratio of less than 0.85, preferably less than 0.01-0.2, and optionally less than 0.02-0.2 moles biotin per mole matrix component molecules. In some populations at least some microdrops encapsulate a single cell.

[13] The invention further provides in a method of analyzing a protein secreted by a cell in which the cell is encapsulated with a microdrop comprising biotinylated agarose the improvement wherein the molar ratio of biotin to agarose is less than 0.85, preferably 0.01 to 0.2, and optionally 0.02 to 0.2 moles biotin per mole agarose.

[14] The invention further provides methods of analyzing a secreted protein. Such methods entail encapsulating a cell in a microdrop wherein the microdrop comprises matrix component molecules,  $\text{Ni}^{2+}$ NTA linked to the matrix component molecules, capture molecules with affinity for a molecule secreted by the cell linked to a hexahistidine tag, wherein the molecule is secreted from the cell and binds to the capture molecules thereby being retained within the microdrop; and contacting the cell with a detection reagent that binds to the secreted molecule wherein the detection reagent.

[15] The method further provides methods of analyzing a secreted protein. Such method entail encapsulating a cell in a microdrop wherein the microdrop comprises matrix component molecules linked to biotin, streptavidin linked to  $\text{Ni}^{2+}$  and capture molecules with affinity for a molecule secreted by the cell linked to a hexahistidine tag, wherein the molecule is secreted from the cell and binds to the capture molecules thereby being retained within the microdrop; and contacting the cell with a detection reagent that binds to the secreted molecule wherein the detection reagent.

[16] The invention further provides methods of preparing an antibody of IgG isotype. Such methods entail culturing a population of cells secreting antibodies of IgM isotype under conditions whereby one or more of the cells can undergo isotype switching to IgG isotype; encapsulating the population of cells in microdrops including a capture reagent specific for antibodies of IgG isotype, whereby microdrops containing a cell secreting an antibody of IgG isotype capture the secreted antibody of IgG isotype within the cells; and detecting one or more microdrops containing a cell secreting an antibody of IgG isotype.

[17] In some methods, the cells are cultured in the presence of an agent that stimulates isotype switching. In some methods, the capture reagent is an antibody to the IgG isotype. In some methods, the detecting comprises contacting the microdrops with a detection reagent

WO 02/097122

PCT/US02/16783

that binds to the captured antibody at a different site than the capture reagent. In some methods, the detection reagent is an anti-idiotypic antibody. In some methods, the anti-idiotypic antibody is fluorescently labelled. Some methods further comprise isolating the microdrop that has captured the cell secreting the IgG antibody. In some methods, the population of cells are encapsulated in microdrops such that at least some microdrops encapsulate a plurality of cells; and the method isolates a microdrop that has captured a plurality of cells, one or more of which secretes IgG antibody. Some methods further comprise isolating the plurality of cells. Some methods further comprise encapsulating the plurality of cells in microdrops under conditions whereby at least some microdrops encapsulate a single one of the plurality of cells, wherein the microdrops include a capture reagent specific for antibodies of IgG isotype, whereby microdrops containing a cell secreting an antibody of IgG isotype capture the secreted antibody within the microdrops; and detecting one or more microdrops containing a cell secreting an antibody of IgG isotype.

[18] The invention further provides methods for screening a population of cells for a subpopulation having a desired property. Such methods entail (a) encapsulating the population of cells in microdrops at a first ratio of average number of cells per occupied microdrop; (b) screening the encapsulated cells to identify a first subpopulation of microdrops encapsulating cells having the desired property; (c) isolating the cells from the microdrops resulting from the screening step; (d) encapsulating the cells from the screening step at a second ratio of average number of cells per occupied microdrop, the second ratio being smaller than the first ratio; (e) screening the encapsulated cells to identify a second subpopulation of microdrops encapsulating cells having the desired property.

[19] Some methods further comprise repeating steps (c)-(e) at a further ratio of average number of cells per occupied microdrops to isolate a further subpopulation of microdrops.

[20] Some methods further comprise isolating a microdrop encapsulating a single cell from the second subpopulation. In some methods, the subpopulation of cells having the desired property is less than 0.01% of the population of cells before the method is performed.

[21] The invention further provides a kit for making microdrops. Such a kit comprises matrix component molecules linked to biotin, in a molar ratio of less than 0.85, preferably 0.01 to 0.2 and optionally 0.02 to 0.2 moles biotin per mole matrix component molecules. In some kits, the matrix molecules are agarose. Some kits further comprise instructions for using the kit to make microdrops. Some kits further comprise streptavidin and a capture molecule linked to second biotin molecules.

[22] BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

WO 02/097122

PCT/US02/16783

[23] **Figure 1. Capture web for retaining secreted protein in microdrops.**

[24] **Figure 2. mrIFN $\gamma$  titration curve generated using unoccupied GMDs.**

Unoccupied GMDs were prepared from CelBioGel-<sup>TM</sup>-2. After treating with streptavidin and biotinylated anti-IFN $\gamma$  Ab, GMDs were incubated with decreasing concentrations of mrIFN $\gamma$ . After labeling with PE-conjugated anti-IFN $\gamma$  Ab, the cytokine bound to the agarose matrix was detected by fluorescence.

[25] **Figure 3. GMD cytokine secretion assay using CHO cells transfected with hrIL-**

4. The GMD secretion assay was performed using a 1 hr secretion incubation. Flow cytometry histograms 1,2 and 3 represent the unstained, negative (or "no capture"), and positive controls, respectively. GMDs occupied by single cells were gated (histogram 4, gate A). Viable (PI negative) cells were chosen for data acquisition (histogram 4, gate B) and analyzed for FITC fluorescence (histogram 5). Positive events were identified under marker C (histogram 6).

[26] **Figure 4. Flow cytometric analysis of IL-4 secretion by activated antigen-specific**

**T cells.** The black lit histogram shows "no capture" (negative control Marker M1 was set to identify events with positive (higher than in the negative control) FITC fluorescence. The blue line histogram represents positive control (mrIL-4 at 10 ng/ml). 3.2% of positive events we detected after a 3.5 hr incubation (the red lit histogram) while 20.87% (the green line histogram) were detected after an 18 hr incubation. Proportion increase of mean FITC fluorescence indicates increase cytokine secretion by detected cells.

[27] **Figure 5. Simultaneous detection of viable CD3 positive IFN $\gamma$  secreting cells.**

After stimulating *in vitro* with antigen in the presence of mitomycin C treated autologous feeder cells and mrIL-2, we performed the GMD IFN $\gamma$  secretion assay with  $1 \times 10^6$  encapsulated cells. Cells were incubated with FcBlock<sup>TM</sup> and PE-labeled mouse anti-CD3 Ab (10  $\mu$ g/ml) prior to flow cytometric analysis. Unoccupied GMDs were discriminated from occupied GMDs using FSC and SSC (**panel A**). Only GMDs occupied by viable (PI negative) cells were included in data acquisition (**RI gate, panel A**). Dot plots of the negative control and the IFN $\gamma$  secretion sample (both stained with anti-IFN $\gamma$ /FITC (FL-1) anti-CD3/PE (FL-2) Abs) are shown in **panel B** and **panel C**, respectively.

[28] **Figure 6. Simultaneous detection of mrIFN $\gamma$  and mrIL-4 using unoccupied**

**GMDs and flow cytometry.** Unoccupied GMDs were made with CelBioGel mrIFN $\gamma$  (100 ng/ml), mrIL-4 (25 ng/ml) or a mixture of both cytokines were detected using two-color flow cytometry. Dot plots show results: FL-1 (FITC) vs FL-2 (PE) of negative control (**panel A**),

WO 02/097122

PCT/US02/16783

samples incubated with mouse anti-IFN $\gamma$ /PE (**panel B**), with mouse anti-IL-4/FITC (**panel C**), and with a mixture of both Abs (**panel D**).

[29] **Figure 7. Simultaneous detection of CD3, CD4 and CD69 cell surface expression and IFN $\gamma$  secretion by encapsulated freshly isolated human PBMCs using four color flow cytometry.** Human PBMCs unstimulated or stimulated *in vitro* for 24 hr with PHA (5  $\mu$ g/ml) were encapsulated in CelBioGel-R<sup>-1</sup>. Lymphocyte subsets were identified by immunophenotype and IFN $\gamma$  secretion using four color flow cytometry. Representative histograms from unstimulated cells used as negative controls for all tested parameters are shown in 1-4 A. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells were identified among both unstimulated and stimulated lymphocytes (3-A and 3-B). In addition, a 79.6% sub-population of stimulated lymphocytes expressing CD69 (2-B, under marker E) and a 9.6% sub-population secreting IFN $\gamma$  (4-B, under marker I) were identified after subtracting background from unstimulated controls (1.3%, 2-A, under marker E and 1.3%, 4-A, under marker I).

[30] **Figure 8. mIgG1 detection using unoccupied GMDs (CBG-3), biotin- and HRP-labelled goat anti-mouse IgG1 and TSA**

[31] DEFINITIONS

[32] Specific binding or affinity between an antibody or other binding agent and an antigen means a binding affinity of at least  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . Preferred binding agents bind with affinities of at least about  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , and preferably  $10^8 \text{ M}^{-1}$  to  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , or  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ . The term epitope means an antigenic determinant capable of specific binding to an antibody. Epitopes usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. Conformational and nonconformational epitopes are distinguished in that the binding to the former but not the latter is lost in the presence of denaturing solvents.

[33] A capture molecule is an antibody or other molecule that has specific affinity for a polypeptide secreted by a cell.

[34] The terms adhesion molecule and bridging molecule are used to describe components of the linkage between capture molecules and a matrix. The adhesion molecules are linked to the capture molecule and matrix molecule, and the bridging molecule specifically binds to both adhesion molecules forming a bridge between them and thereby linking the capture molecule to the matrix.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

[35] Cell surface markers include CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11(a), (b), (c), CD18, CD44, CD45R, CD59, MHC I, II and III, carcinoembryonic antigen, growth factor receptor (*e.g.*, FGFR, PDGFR, EFG, NGFR, and VEGF) G-protein receptors, such as substance K receptor, the angiotensin receptor, the  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors, the serotonin receptors, and PAF receptor. *See, e.g.*, Gilman, *Ann. Rev. Biochem.* 56:625-649 (1987), ion channels (*e.g.*, calcium, sodium, potassium channels), muscarinic receptors, acetylcholine receptors, GABA receptors, glutamate receptors, and dopamine receptors (*see* Harpold, 5,401,629 and US 5,436,128), and adhesion molecules (*see* Springer, *Nature* 346:425-433 (1990). Osborn, *Cell* 62:3 (1990); Hynes, *Cell* 69:11 (1992)).

[36] CD markers are widely used in the determination of cell lineage and sublineage. For example, T cells are identified by the expression of CD3. A mature T cell may belong to the T4 subset, in which case, it will express CD4. Similarly, there are markers for other cell populations and sub-populations. Within the lineages, it is helpful to distinguish cells at different stages of differentiation and activation. Differentiation status is particularly useful in the diagnostic analysis of the lymphoid and myeloid malignancies, and in research on the hemopoietic system. Examples include markers for naive or antigen-experienced cells (especially the CD45 isoforms) and molecules such as CALLA (CD9) found on B-lineage precursors, including B lineage acute lymphoblastic leukemia. Activation status is especially interesting in studies of cell function. Activation markers include growth factor receptors such as CD25 (a component of the receptor for IL-2), and molecules whose cellular function is not fully understood, such as CD69 and CD98.

[37] Secreted proteins of interest include cytokines and chemokines, such as interleukins IL-1 through IL-18 for example, tumor necrosis factors  $\alpha$  &  $\beta$ , interferons  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , transforming growth factor alpha and beta (TGF- and TGF- $\beta$ ), colony stimulating factor (CSF), tumor necrosis factor and granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF). *See* Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research (Aggarwal *et al.* eds., Blackwell Scientific, Boston, MA 1991), hormones, enzymes, antibodies and intercellular messengers. Virtually any protein can be engineered to be secreted by fusion to an appropriate signal sequence.

[38] Three types of CelBioGel used in the examples termed CelBioGel-1, -2, and -3 have molar ratios of biotin to agarose of 1:1, 0.2 to 1, and 0.04 to 1 respectively within the experimental error with which such ratios can be calculated ( $\pm$ 10%). The total biotin concentration in the matrix should not exceed 42  $\mu$ M.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

[39] Reference to "screening" includes "selection" unless otherwise apparent from the context.

[40] DETAILED DESCRIPTION

[41] I. General

[42] The present invention provides improved methods of analyzing secreted molecules from cells encapsulated in microdrops. These methods are premised in part on the result that the sensitivity of detection of secreted molecules depends on the extent of biotinylation of matrix molecules, and that improved sensitivity is obtained using molar ratios of biotin to agarose of less than 0.85, and/or a final biotin concentrations of less than 42  $\mu$ M, 42  $\mu$ M being equivalent to the biotin content as contained in CelBioGel-2 (as defined below) For example, use of a ratio of about 0.01 to 0.2 and optionally 0.02 to 0.2 mol biotin per mol agarose results in an improved sensitivity of detection approaching 10 to 100-fold (see Example 2) compared with a 1:1 ratio.

[43] Although an understanding of mechanism is not required for practice of the invention, it is believed that the improvement results in part from greater uniformity in distribution of capture molecules linked to the biotin throughout the volume of microdrops and availability of a greater number of free capture sites subsequent to the formation of the streptavidin bridge. We believe that there are more free capture sites in agarose with a low biotin ratio because the streptavidin, which has four available binding sites for biotin, is less saturated with biotin molecules present in the matrix. Therefore, in the matrix with a low biotin ratio, more binding sites are available for the biotinylated capture antibodies. [How does reducing the number of biotin molecules increase the number of capture sites]

[44] The invention also provides methods of analyzing secreted proteins from encapsulated cells. The improved gel matrix ratios described above are advantageous although not essential for such methods. The new methods involve detecting a secreted protein and at least one other marker, either a second secreted protein or a cell surface marker, from the same cell. The capacity to detect multiple markers on the same cell can provide an indication of the differentiation state of the cell. This information is particularly useful in characterizing populations of cells. For example, the presence of cells having certain combinations of markers within a lymphocyte population can be indicative of an immune status in a patient. The assay can be used to generate antigen-specific clones from patients to study autoimmune disease in vitro, monitor immune status, and generate T cell lines that can be used for immunotherapy. The methods are advantageous in detecting low levels of secreted protein

WO 02/097122

PCT/US02/16783

(e.g., 1 fg), and in isolating rare secreting cells (e.g., present as less than 0.1% or 0.0001% of a population) in functional and viable form

[45] II. The Capture Web

[46] Cells to be analyzed are encapsulated within a capture web (as shown in Figure 1) within a gel microdrop (microdrop). The capture web includes multiple copies of a matrix molecule that forms a gel and multiple copies of a capture molecule for a secreted protein immobilized in the gel. In some methods, the capture molecule is immobilized via a bridge. For example, the bridge can be formed by first and second adhesive molecules linked to the matrix molecule and the capture molecule respectively, and a bridging molecule that links to the first and second adhesive molecules to each other. The bridge effectively anchors the capture molecule to the matrix. In some methods, the first and second adhesive molecules are both biotin, and the bridging molecule is streptavidin or avidin. In these methods, biotin molecules attached to matrix molecules are referred to as first biotin molecules, and biotin molecules attached to the capture molecule are referred to as second biotin molecules.

[47] The matrix molecule exists in liquid form when heated and solidifies as a gel when cooled. Agarose is an example of such a matrix molecule. Agarose is a mixture of polysaccharide chains having alternating alpha (1-3) and beta (1-4) linkages. Various grades of agarose are available with low melting temperature agarose (Type IX) being preferred. Alginate, carrageenan, or polyacrylamide can also be used as alternatives to agarose.

[48] Other combinations of proteins and small molecules can be used as alternatives to streptavidin (or avidin) and biotin respectively. For example, glutathione S-transferase can be used with glutathione, and maltose binding protein with maltose. Combinations of synthetic proteins and small molecules from combinatorial libraries having mutual affinity for each other can also be used.

[49] In a further variation, a capture molecule is linked to a matrix molecule via a bridge formed from NTA (nitrilotriacetic acid)-Ni<sup>2+</sup> and a hexahistidine tag linked to the capture molecule. The NTA-Ni<sup>2+</sup> is chemically attached to the matrix molecule. Ni-NTA-agarose matrices are available commercially from Qiagen. Ni<sup>2+</sup> forms strong noncovalent bonds with hexahistidine. The hexahistidine tag can also be attached to the capture molecule by chemical linkage but is more typically synthesized with a protein capture molecule as a fusion protein. In a still further variation, a capture molecule is attached to a matrix molecule via a bridge formed from biotin linked to the matrix molecule, streptavidin (or avidin) linked to Ni<sup>2+</sup> and a hexahistidine tag linked to the capture molecule. The streptavidin binds to the



WO 02/097122

PCT/US02/16783

biotin and the  $\text{Ni}^{2+}$  binds to the hexahistidine tag. Again, such methods have the advantage that the hexahistidine tag can be linked to the capture molecule as a fusion protein.

[50] As noted, when biotin is used as part of the bridge between capture molecule and matrix, the ratio of matrix molecules to biotin affects the sensitivity of subsequent detection. The molar ratio of biotin molecules to matrix molecules is preferably in the range of 0.01 to 0.2 moles biotin per mole matrix molecule and optionally 0.02 to 0.2 moles biotin per mole matrix molecule (within the extent of experimental error with which the ratio can be measured, typically about  $\pm 10\%$ ). The latter ratio is equivalent to a ratio of approximately 0.16 to 1.6 micromoles biotin per gram of agarose. The ratio can be determined by NMR or using a commercially available kit from Pierce. Preparations of biotinylated agarose in various ratios between agarose and biotin are commercially available. The ratio can be decreased by mixing biotinylated agarose with ordinary agarose before drop formation. Alternatively, the ratio of biotin to agarose can be adjusted at the time that the biotin is attached to the agarose. In general, for the other bridging formats discussed above, in which a matrix molecule is linked to an adhesive molecule, and one or more additional molecules, the molar ratios of matrix molecule to adhesive molecule attached to the matrix molecule are the same as the ratios given for an agarose and biotin.

[51] Components of the bridge for capturing secreted molecules, including capture molecules can, in general, be mixed with matrix molecules and incorporated into microdrops at the same time as cells, or can be supplied exogenously after microdrops have formed.

[52] Microdrops formed from agarose or other matrix molecules provide a defined microenvironment around a biological entity. The gel does not impede diffusion and allows analysis of large numbers of individual microdrops using flow cytometry, as well as recovery of microdrops of interest using fluorescence activated cell sorting (FACS<sup>TM</sup>) or automated image scanning and micromanipulation. For single cell encapsulation, the number of cells occupying each microdrop is approximated by Poisson statistics, similar to limiting dilution cloning or Petri dish inoculation. To obtain a preparation with a high probability that each microdrop contains 0 or 1 initial cells, about 5-10% of the microdrops should be occupied. If higher throughput is desired, an increased number of cells should be used for the encapsulation process, resulting in multiple cell occupancy in an initial screen. Cells from a sub-population of microdrops resulting from the screen are then reencapsulated at a lower average number of cells per microdrop and the screening is repeated (see discussion of isolating IgG antibodies for an example of this approach). (Microdrops are prepared by dispersing cells in liquefied biotinylated agarose (or other matrix molecules) into an excess

WO 02/097122

PCT/US02/16783

of a hydrophobic fluid to form an emulsion. The emulsion is transiently cooled, causing gelling. Once formed, microdrops are physically distinct and robust and can be removed from the oil into an aqueous medium by low speed centrifugation. Alternatively, microdrops can be formed by passing a mixture of liquefied gel and entities through a pulsating nozzle, such as the printhead of an inkjet printer. Instrumentation for microdrop formation, the CellSys 100™ Microdrop Maker, is a specially designed emulsifier coupled to a high precision motor available from One Cell Systems, Inc. By varying the rotation speed, type and amount of surfactant, and emulsion viscosity, microdrops ranging from 2-200  $\mu\text{m}$ , for example, can be prepared. The Microdrop Maker currently available from One Cell Systems is efficient for making large numbers of microdrops (*e.g.*,  $10^7$ ), requiring approximately one million biological entities to meet the single occupancy requirement. Sometimes, the microencapsulation procedure, can be miniaturized for encapsulating smaller ample preparations. Vortexing can also be used. Such is useful for some clinical applications in which only small numbers of biological entities are present.

[53] Any type of cells can be encapsulated in the microdrops. For example, the cells can be primary cell cultures or cell lines. The cells can be obtained from patient samples, from natural sources (*e.g.*, sea water or soil) or from genetic engineering experiments (*e.g.*, transformed with vectors expressing recombinant proteins). Vectors provide control sequences such as promoters and enhancers and signal sequences to control expression and secretion of recombinant proteins. Optionally, the promoter used is inducible, such as a metallothionein promoter or an arabinose promoter. Cells populations produced by genetic engineering include cells transformed with nucleic acids encoding unrelated proteins, and cells transformed with nucleic acids representing different variants of the same protein. The variants can be natural (*e.g.*, allelic or species) or induced. The variants can be generated by DNA shuffling technology as described by US 5,830,721, US 5,811,238, US 5,605,793. The cells can be hybridomas secreting antibodies, natural B cells secreting antibodies or cells transformed with antibody encoding genes so that the transformed cells secrete antibodies. The cells can be from humans, mammals, such as horse, sheep, mice, cows, goats, and pigs, plants, bacteria, or fungi. Cell types include primary cells, lymphocytes, monocytes, macrophages, dendritic cells, chondrocytes, pancreatic cells, beta cells, and stem cells. Many types of cells including particular populations of lymphocytes can be obtained from AllCells, LLC (Foster City, CA).

[54] The capture web can be assembled prior to cell encapsulation by adding streptavidin and capture reagent in melted agarose simultaneously with cells. Alternatively, cell

WO 02/097122

PCT/US02/16783

encapsulation can also be performed as the first step of the procedure with capture web components being added later. Once microdrops are formed, the rest of the capture web is assembled. For example, if biotin is being used as part of the bridge linking capture molecule to the matrix, one of the additional components of the capture web is a biotinylated capture molecule with affinity for a protein to be detected. The biotin molecules linked to the capture molecule are referred to as second biotin molecules to distinguish them from the biotin molecules linked to the matrix molecules. The other additional component of the capture web is streptavidin or avidin. This component, which can be added together with capture antibody and cells prior to encapsulation, forms a bridge between the first biotin molecules linked to the matrix and the second biotin molecules linked to the capture molecule. The additional components can be introduced into microdrops by diffusion. That is, these components are introduced into media containing the microdrops and the components diffuse into the microdrops. Typically, the streptavidin or avidin is introduced first followed by the biotinylated capture molecules. Unbound capture molecules can be washed off. As previously discussed, a low ratio of biotin to agarose is advantageous to allow capture molecules to diffuse evenly throughout the microdrops. The same principles apply using other types of bridges between the matrix molecule and capture molecule. For example, using NTA-Ni<sup>2+</sup> to attach hexahistidine-capture molecule, microdrops are formed using a matrix molecule modified to bear NTA-Ni<sup>2+</sup> and capture molecule linked to its hexahistidine tag is diffused into the complete microdrops.

**[55]** III. Capture Molecules and Detection Reagents

**[56]** Various methods of the invention employ both capture molecules and detection reagents. Both capture molecules and detection reagents are designed to have affinity for a protein or other molecule to be detected. (Unless otherwise apparent, procedures applicable to detection of secreted proteins are also applicable to other secreted molecules, such as carbohydrates, and hormones). Capture molecules are distinguished from detection reagents in that capture molecules are part of the capture web in microdrops, and serve to anchor secreted proteins within microdrops. By contrast, detection reagents are typically introduced after proteins have been secreted and anchored to the capture molecule in the capture web. The detection reagent diffuses into the microdrops and binds to a secreted protein linked to the capture web, thereby allowing detection of the secreted protein.

**[57]** The nature of capture molecules and detection reagents depends on the secreted protein to be analyzed. If for example the secreted protein is a cytokine, then the capture molecule and the detection reagent can both be antibodies that bind to the cytokine.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

Preferably, the capture molecule and detection reagent are antibodies that bind to different epitopes on the cytokine so that both capture molecule and detection reagent can bind simultaneously. If for example, the secreted protein is an antibody, then the capture molecule can be an anti-idiotypic antibody or an antigen to the antibody. In general, capture molecules and detection reagents can be any molecules that have specific affinity for a secreted protein to be detected. The capture molecules and detection reagents can be natural ligands, synthetic molecules or antibodies for example. Antibodies to large numbers of secreted molecules and cell surface markers are commercially available from BD/Pharmingen, Beckman Coulter, Biosource, and R & D Systems. Often antibodies are commercially available in fluorescently labelled form or labelled with biotin.

[58] In some methods, more than one secreted protein is of interest and multiple capture molecules and detection reagents are used. For example, if two secreted proteins are to be detected, two different capture molecules for the respective secreted proteins, both linked to second biotin molecules, can be introduced into gel microdrops. The two secreted proteins bind to their respective capture molecules in the microdrops. The secreted proteins are then detected using two detection reagents specific for the two secreted proteins. These principals can be extended for simultaneous detection of n secreted proteins using n capture molecules and n detection reagents.

[59] In some methods, a secreted protein is to be detected in combination with a cell surface marker. Examples of such markers include lymphocytic markers, CD4, CD8, as well as growth factor receptors and ion channels. In such methods, a capture molecule and detection reagent is needed for the secreted protein as indicated above. However, the cell surface marker on the cell surface does not require linkage to the capture web. Thus, a capture molecule is not needed for retention of a cell surface marker. The cell surface marker is detected using a detection reagent specific for the cell surface marker.

[60] Typically, detection reagents are labelled or are amenable to labeling indirectly via a secondary detection reagent that binds to the detection reagent. Such labeling can be fluorescence, isotopic, magnetic, and paramagnetic among others. Examples of fluorescent labels include PI, FITC, PE, PC5 (PE-Cy5), ECD (PE-Texas Red), and Cy-Chrome (R-PE) which can be detected using 630, 525 nm, 575 nm, 675 nm, 610 nm, and 650 nm band pass filters. In some methods, the detection reagent is labelled with an enzyme, and the microdrops contain a substrate for the enzyme that is processed to a fluorogenic product. In some methods, the signal from a detection reagent is amplified using a secondary label. For example, a primary detection reagent labelled with fluorescein can be incubated 15-30 min

WO 02/097122

PCT/US02/16783

with rabbit anti-fluorescein IgG (Accurate Chemical & Scientific). After washing with PBS buffer, microdrops are incubated for 15-30 min with FITC or phycoerythrin -labelled goat anti-rabbit antibody (Sigma, St. Louis, MO). If more than one detection reagent is used, then the different detection reagents are differentially labelled (*e.g.*, using different fluorophores). Molecules used for capture are typically not labelled (other than with the biotin molecules that serve to link them to the capture web).

[61] In some methods, cells are induced to stimulate secretion of proteins. For example, recombinant proteins can be engineered to be expressed from an inducible promoter. Supplying an inducing agent initiates or increases secretion of proteins. Induction can be performed before or after cells are encapsulated into microdrops.

[62] IV. Methods of Assay

[63] Assays are performed by encapsulating populations of cells into biotinylated microdrops. A capture web to retain one or more secreted proteins is then formed within the microdrops. The microdrops are then cultured in media for a period to permit protein secretion to occur. This period is typically from 30 min to 48 hr. In some methods, the period is less than 24, 12, 6 or 1 hr. In general, longer periods of incubation result in more secreted protein and a stronger signal. However, after a certain period of time, all capture molecules of the capture web are saturated with secreted protein and further secreted protein simply leaks from the microdrops and does not lead to a stronger signal. In some methods, the period of incubation is sufficiently long that secreted protein from encapsulated cells with the highest rates of secretion occupies all or most of the capture molecules in the microdrops, and protein secreted from encapsulated cells with lower secretion levels occupy proportionally fewer of the capture molecules in the microdrops. In these circumstances, the strength of signal from various cells in a population is approximately proportional to the secretion levels of the cells. With some cells that have low secretion levels, such as MNCs, crosstalk, or leakage of unbound protein into neighboring cells is never seen. For transfected cells that have high secretion rates, the time for secretion can be adjusted to control crosstalk. Because secretion rates are relatively constant for a particular cell line, once the secretion rate is determined, the optimal time for the secretion assay to avoid crosstalk can be determined.

[64] In a variation of the above method, microdrops containing cells are treated with a drug or agent that is a candidate drug before and/or during the incubation period in comparison with a control population of untreated microdrops containing cells. If comparison between treated and control cells indicates a different level of secretion of a protein of interest, then it can be concluded that the drug or candidate drug affects the level of

WO 02/097122

PCT/US02/16783

secretion of this protein. information can be useful in establishing activity of a candidate agent or in determining mechanism of a drug already known to be effective.

[65] In another variation of the above method, cells are stimulated or suppressed with other cells or growth factors or cytokines, prior to transplantation in patients. For example, treatment with IL-10 can be used to suppress undesired inflammatory responses (see WO 97/42324).

[66] After incubation to allow secretion, one or more detection reagents is added, one for each secreted protein or cell surface marker to be detected. The detection reagent binds to a protein to which it has specific affinity that has been captured by the web. After binding of detection reagent(s) and generation of signal, the signal can be detected by a variety of approaches. In one simple approach, microdrops are deposited on a glass or plastic surface, such as a microscope slide, or Petri dish. The microdrops adhere to the support and can be arranged in an array format to facilitate analysis. The microdrops can then be individually examined under a microscope for one of more different labels. Detection can be via fluorescence, chemiluminescence, or color of secreted molecules. Digital imaging systems have made it possible to examine cell activity with increasingly higher resolution. Automated microscope based systems driven by value added software are now common research tools. These systems share a number of common features including: the ability to acquire and store fluorescent images, image enhancement, calibration and thresholding (discrimination) options, and system automation and device control. Microscopic images are digitized into a matrix of small regions called picture elements of pixels. The measurement of the brightness at each pixel is stored and then processed to generate an enhanced image. Image analysis systems are distinctive in the type of processing used for image enhancement and the level of resolution available. For example, a simple scanning imaging system from MetaCyte, as are other laser-based instruments such as laser scanning confocal microscope and laser scanning cytometer (Oncosis and CompuCyte). For the he Oncosis instrument, their proprietary Photosis™ laser-activated dye can be used for applications requiring the destruction of cell secreting a specific protein (*e.g.*, where the secreted protein is a cancer specific protein). Cells of interest can be recovered using micromanipulation.

[67] In other methods, microdrops are analyzed using a flow cytometer. Such an instrument counts the number of labelled microdrops and the number of microdrops lacking a label. If two differentially labelled detection reagents are used, the flow cytometer can count microdrops bearing first label only, microdrops bearing second label only, microdrops bearing both labels, and microdrops bearing neither label. In methods employing larger

WO 02/097122

PCT/US02/16783

numbers of labels, still further categories of microdrops can be distinguished. The type of label present indicates the type and level of protein protein(s) secreted. Color compensation can be adjusted for spectral overlap using a color compensation kit such as Cyto-Comp™ Reagent Kit and Cyto-Trol™ Control Cells (Beckman Coulter). Cyto-Comp™ consists of 4 sets of two-color reagents to adjust color compensation for multicolor analysis.

[68] Optionally, if cells are fluorescently labelled, flow cytometry analysis can be followed by sorting to make different populations of encapsulated cells available for further analysis, such as microscopy, cell line generation or DNA isolation. FACS separates individual cells having defined properties, such as presence of one or more particular secreted proteins, or degree of secretion level of one or more particular secreted proteins. Such cells can then be further propagated for further analysis (*e.g.*, to analyze DNA preparations from the cells) or to generate a cell line. In some methods, cells having desired properties are introduced into patients for therapeutic purposes.

[69] Optionally, Percoll (silica particles (15-30 nm diameter) coated with non-dialysable polyvinylpyrrolidone (PVP)), polysucrose (Ficoll) with sodium diatrizoate, or iodixanol (iodinated derivative of benzoic acid) gradient centrifugation can be used to eliminate the majority of unoccupied microdrops from the preparation permitting recovery of mostly (>95%) cell-occupied microdrops. Microdrops are prepared by dispersing cells in molten matrix molecules, such as agarose, then forming an emulsion in an excess of a hydrophobic fluid. This method is particularly useful for analyzing rare secreting cells, cells secreting at low levels, and rare cell sub-populations.

[70] Some methods use gating strategies to focus the detection apparatus on a sub-population of microdrops containing a desired population of cells. For example, forward or side scatter can be used to distinguish occupied from unoccupied microdrops. The occupied microdrops can then be further gated to detect a sub-population of cells having a particular surface marker bound by a fluorescently labeled detection reagent. The gated sub-population of cells can then be analyzed for presence of particular secreted proteins differentially labeled from the surface marker.

[71] Some methods use indirect detection of detection reagent for signal amplification. For example, if the detection reagent is an antibody, it can be detected using a labelled antibody against the Ig isotype of interest. In other methods, an amplification cascade is employed. For example, Tyramide Signal Amplification™ (TSA) technology is described by US 5,731,158 and US 5,583,001 and kits are available from Perkin Elmer. When this approach is used for detection, the primary detection reagent that binds to captured secreted

WO 02/097122

PCT/US02/16783

molecules is a molecule, usually, an antibody labeled with horseradish peroxidase (HRP). The HRP is used to catalyze the deposition and binding of a labelled tyramide in microdrops that bind the HRP-labelled detection reagent. In turn, the label on the tyramide serves as binding sites for a secondary detection reagent that is typically labelled fluorescently, and has affinity for the label on the tyramide.

[72] V. Applications

[73] 1. Secretion Levels

[74] The above methods are useful in analyzing mixed populations of cells secreting the same protein to identify one or more individual cells that secrete the protein at a defined level. In some methods, one is interested in identifying and recovering cells that secrete the protein in excess of a defined level. In some methods, one is interested in identifying one or more cells that have maximum secretion rates among a population. These methods are useful for analyzing biological entities for secretion of growth factors, cytokines, antibodies, hormones or other secretory molecules. The methods are also useful for analyzing transformed cells secreting a protein encoded by a construct introduced into the cells by genetic engineering. The methods are also useful for analyzing levels of secretion of proteins from hybridomas or other established cell lines. Isolated cells secreting a protein of interest or a high level of a protein of interest can be used to propagate a cell line for production of the protein of interest. The methods are also useful for isolating populations of antigen-specific T and B cells or to identify cells secreting a protein of interest.

[75] 2. Cells Secreting Different Proteins

[76] The methods are also useful for analyzing mixed population of cells in which the cells in the population secrete different proteins. In such methods, the goal is to isolate one or more cells secreting a particular protein or proteins of interest. This is accomplished using capture molecules and detection reagents specific for the protein or proteins of interest. Again, the initial populations of cells to be analyzed can be primary cells or transformed cells into which constructs encoding different proteins have been introduced. Cells isolated by such methods can be subject to further analysis. For example, the recombinant construct occupying such cells can be sequenced to characterize the DNA coding sequence encoding the protein of interest.

[77] 3. Simultaneous Analysis of Multiple Markers

[78] In some methods, multiple markers are detected on the same cell in a population. For example, one can detect the presence of two (or more) secreted proteins from the same cell, or one can detect the presence of one or more secreted proteins and one or more cell surface



WO 02/097122

PCT/US02/16783

markers from the same cell. By such methods, one can develop a histogram of different cell types present in a population. The ability to characterize individual cells in this fashion provides useful information for analyzing differentiation patterns of cells and in clinical diagnostics. For example, certain diseases of the immune system are characterized by secretion of certain molecules from lymphocytes and/or expression of certain cell markers on the lymphocytes. Identification of cells secreting particular combinations of molecules and/or possessing certain cell markers serves to identify the immune disorder affecting the patient.

**[79] 4. Diagnostic, Research and Therapeutic Methods**

**[80]** In some methods, cell populations are obtained from patients for diagnosis or monitoring the effectiveness of immunotherapy. Such cell populations are often lymphocytes but can be obtained from tissues or body fluids, such as whole blood, semen, saliva, tears, urine, fecal material, sweat, buccal smears, skin hair, lymph nodes, tumors, and bone marrow samples. In some methods, cells are obtained from a patient for therapeutic purposes. In such methods, the goal is to identify a sub-population of cells having a desired property (*e.g.*, secreting antibodies against a pathogen, secretion of a growth factor, cytokines or hormone, participation in a desired immune response). The desired cell type can be isolated, modified, stimulated, and or amplified and then reintroduced into a patient *e.g.*, for immunotherapy.

**[81]** Some examples in which isolation of particular populations of cells from a patient is suitable with a view toward *in vitro* growth and/or other manipulation are as follows:

Autoantigen-specific Th2 cells can be isolated from patients with cell-mediated autoimmune disorders (multiple sclerosis, diabetes, rheumatoid arthritis). Characteristic cytokine and cell surface markers for these cells are indicated below. The cells are propagated *ex vivo* and re-injected to augment remission or to prolong remission in the patient from whom they were obtained. Autologous antigen-specific cytotoxic T cells (CTL) can be isolated from patients undergoing infection or suffering from cancer by expression of the CD8 cell surface marker. The CTL's are specific for one or more antigens on the infecting microorganism or cancer. The CTL's are amplified *ex vivo* to generate vaccines (*e.g.*, anti-cancer, anti-intracellular bacterial infections (tuberculosis) or parasitic diseases (malaria, leishmania)). In another application, cells from pancreatic islets of a patient are screened to identify those secreting insulin. These cells are amplified *in vitro* and re-introduced into the patient as a means of preventing or delaying Type 1 diabetes. The method can be performed during the prodromal period before clinical onset of disease in which some islet cells remain in the patient and are available for isolation and amplification. Alternatively, cells can be obtained from a healthy

WO 02/097122

PCT/US02/16783

donor and transplanted to a diabetes patient with compatible HLA antigens and/or an immunosuppressive regime. In another method, cells from a patient with a genetic or other deficiency are screened to identify a subset of cells that have secretory defects for important bioactive molecules. These cells can be recognized from lack of signal when microdrops encapsulating the cells are contacted with a detection reagent specific for the bioactive molecule. A gene promoting secretion of the biomolecules under appropriate transcriptional control is inserted into the cells, the cells are amplified and re-injected into a patient. In another method, autologous multipotent stem cells are isolated from a patient, induced to differentiate in vitro to a desired lineage (e.g., heart, skin, nerve cells) and re-introduced to the patient to treat different disorders (e.g., myocardial infarction, skin burns, damaged nerves). Multipotent stem cells can be recognized by CD34 marker and/or lack of CD38, CD33, CD45RA and CD71.

**[82]** 5. Cytokine Assays

**[83]** Cytokines play an important role in both the pathogenesis and treatment of disease. A number of these proteins have been approved for clinical use including: interferon- $\alpha$ , interferon- $\beta$ , granulocyte-colony stimulating factor, and interleukin-2, and assessment of the functional status of T cells is essential for predicting patient response to therapy. Activation by mitogens or antigens, necessary for successful response to an immune system challenge, results in a cascade of cytokine secretion, receptor up-regulation, cellular proliferation and development of effector functions (7-12). Different cytokines are released from cells present in the immune system in response to signals from a variety of stimuli, including other cytokines. Mature T cells respond to antigen stimulation by producing unique combinations of these regulatory molecules and the functional consequence of these responses is dependent on cytokine secretion pattern (13-16). Cytokine secretion is widely used in both basic and clinical research as a crucial marker for cell differentiation and functional activity. The pattern of cytokine secretion combined with cell surface markers provides important information about the type, strength, and flexibility of a patient's immune response.

**[84]** The present methods are particularly useful for detecting patterns of cytokine secretion, optionally in combination with cell surface markers, of individual cells. Applications include monitoring patient immune status before and after transplantation, determining antigen-specific response of T lymphocytes after vaccination, assessing effectiveness of treatments for cancers, autoimmune disorders, bacterial, and viral infections, such as AIDS (1-6), and determining immunotoxicity of drugs (7,8), and recovering single,

WO 02/097122

PCT/US02/16783

viable T cells based on secretory profile combined with surface expression. Advantages of the present methods include: (1) high sensitivity (secreted cytokine levels of 1-10 ng/ml culture or 1.25-12.5 fg per microdrop are within the bounds of routine detection; (2) quantitative detection, (3) single cell analysis, (4) simultaneous detection of cytokines and cell surface markers; and (5) recovery of viable cells.

[85] (a) Distinguishing Th1 and Th2 cells

[86] An exemplary diagnostic assay is the identification and recovery of Th1 and Th2 cell types. To identify and isolate Th1 or Th2 cells from heterogeneous populations, stimulated cells are encapsulated and cell surface antigen expression and cytokine secretion are simultaneously detected. Activated Th1 cells are identified as double-positive cells expressing CD3, CD4 (specific for helper cells) and CD69 (specific for activated cells) and secreting IFN $\gamma$ , but not IL-4 (CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-4<sup>-</sup> cells). Cells expressing a similar phenotype (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), but secreting IL-4, but not IFN $\gamma$  (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>-</sup>IL-4<sup>+</sup> cells) are identified as Th2 cells. Multicolor flow cytometric analysis is performed using a combination of fluorochrome-labelled antibodies:: anti-CD4/Cy-Chrome (or CD4/ECF), anti-CD69/PC5, anti-IFN $\gamma$ /FITC, and anti-IL-4/PE. Th1 and Th2 cells are optionally sorted by FACS and propagated. The ability to identify and isolate Th1 and Th2 sub-populations from mitogen or antigen stimulated peripheral blood mononuclear cells as quickly as possible is a useful for clinicians. These studies are used to : 1.) assess the immune status of patients, 2.) expand T cell clones to identify cells in autoimmune disease against *in vitro* targets, or 3.) create cytotoxic T cell clones that can be programmed to kill tumor cells *in vitro*, expanded, and used therapeutically in a donor. Using optimized stimulation conditions, both Th1 and Th2 cells can be stimulated so that the secretion of both IL-4 and IFN $\gamma$  can be simultaneously detected within 48 hours on the same population of mononuclear cells.

[87] (b) Analysis of cytokine secretion and cell surface expression profiles of both human monocytes and CD34+ cells after activation with different stimuli

[88] Monocytes and dendritic cells are major sources of a variety of cytokines, including TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and IFN $\gamma$  (65,67,68). After stimulation with a range of antigens, these cells participate in both innate and adaptive responses. In blood, different subsets of circulating MNC (such as monocytes and B cells) can function as antigen presenting cells, communicating directly with T cells through specific and regulatory receptor ligand interactions and soluble cytokine interactions. Cytokines produced by this cell

WO 02/097122

PCT/US02/16783

population play a key regulatory role in a number of clinical conditions. For example, increased production of the pro-inflammatory cytokines  $\text{TNF}\alpha$  and IL-1 by monocytes has been implicated in septic shock (67,69,70). High local and systemic concentrations of cytokines released by monocytes have the potential to cause cascade effects on other cell types, including T cells, leading to pathological cytokine imbalances, which are characteristic of this condition (67,68,71). Measurement of cytokines produced by human monocytes in response to lipopolysaccharide (LPS) and other bacterial products is an *in vitro* model used to analyze events that occur in sepsis (72).

[89] The present methods can be used to determine the response of single, viable monocytes to stimulus by identifying secreted cytokines and cell surface antigen expression. Examples of monocyte profiles of interest include: a) CD3/PC5, CD4/ECD, CD69/PE expression and  $\text{TNF}\alpha$ /FITC secretion, and b) CD3/PC5, CD4/ECD, CD69/PE expression and IL-1 $\beta$ /FITC secretion.

[90] (c) Analysis of *in vitro* Differentiation of CD34<sup>+</sup> Human Cells Grown in Stromal-Free Liquid Suspension Culture

[91] Primitive cells of the hematopoietic system are characterized by their ability to generate large numbers of all known mature blood cell types. In peripheral blood, the majority of CD34<sup>+</sup> cells do not express CD38, CD33, CD45RA, and CD71 and, therefore, demonstrate CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD33<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD71<sup>-</sup> phenotype. These cells differentiate in stages marked by the acquisition or loss of specific phenotypic characteristics and cytokine secretion (59,73,74). After differentiation, most CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup> cells are of granulopoietic lineage, whereas CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD71<sup>+</sup> cells are of erythroid lineage. CD33 antigen is a characteristic marker for monocytes and myeloid progenitors, while CD38 is predominately expressed on T and B cells. The microdrop secretion assay can be used to monitor *in vitro* differentiation and proliferation of CD34<sup>+</sup> cells on an individual cell basis. Monitoring differentiation in this fashion allows culture conditions to be devised that direct differentiation along a desired path and/or which result in differentiation at a desired rate. Monitoring is also useful for defining culture conditions for *ex vivo* growth of human hematopoietic cells removed from a patient for subsequent reintroduction into the patient.

[92] (d) Multiparameter analysis

[93] It is possible to attach several capture antibodies to the gel matrix and with cell surface markers for lymphocyte sub-populations and monocyte/macrophage/dendritic cell markers, a single mononuclear sample can be analyzed and sorted based on T lymphocyte

WO 02/097122

PCT/US02/16783

sub-population (T helper or T cytotoxic), Th1 or Th2, natural killer, B cell, monocyte/macrophage, or dendritic cells. Using two capture antibodies for secretion and two cell-surface markers, using lymphocyte or monocyte gating, a single laser can be used to isolate lymphokine secreting lymphocyte or monocyte sub-population. With multiple tandem lasers a multi-parameter analysis can be obtained on the single mononuclear peripheral blood sample; multiple sort capabilities permits the isolation of each of the different lymphocyte and monocyte sub-populations.

**[94] 6. Isolation of Rare IgG Switch Variants**

**[95]** Antibody products are available for a variety of diseases, including cancer, heart and autoimmune diseases, and transplant rejection. Unfortunately, many of the hybridomas produced for both research and clinical use are of the IgM subclass, which are generally considered the least useful due to their pentameric structure and their lack of affinity for protein A and protein G. These make purification and modification of IgM antibodies difficult, and enzymatic digestion for Fab fragment production almost impossible.

**[96]** Hybridomas spontaneously class-switch from producing IgMs to IgGs at a highly variable frequency depending on the cell line, but in general, switching frequencies of  $1:10^6$  are not uncommon (1,7) Many protocols have been devised to bias isotype production towards more favorable isotypes such as IgG1 or better still the IgG2 variants, but these procedures are lengthy and very labor-intensive involving multiple screening cycles. Some of these protocols include the use of different adjuvants or co-injection of stimulating factors or lymphokines, altering the dose of the antigen or boosting repeatedly (hyperimmunization) (1,4-6), yet prior methods remain unreliable due to the low frequency of switching relative to the number of cells that can reasonably be screened.

**[97]** Use of microdrops, preferably conforming to the composition requirements described above provide a means for screening sufficiently large numbers of cells to isolate rare IgG isotype switch variants. Mixed populations of cells secreting antibodies of IgM isotype are propagated either in growth medium alone or in the presence of different B cell mutagens/stimulators (purified recombinant antigen, lipopolysaccharides (LPS), retinoic acid) and/or cytokines (mIL-4, mIFN $\gamma$ ) for a period sufficient for isotype switching to occur in some cells (*e.g.*, about seven days). Sometimes, to increase the rate of isotype switching, murine thymocyte feeder layers are also used.

**[98]** The cell population is then encapsulated in microdrops. The microdrops can contain the same type of matrix shown in Figure 1, preferably but not necessarily conforming to the

WO 02/097122

PCT/US02/16783

preferred molar ratios of biotin to matrix molecules described above, and the capture molecule is an IgG isotype specific antibody. Typically, the capture molecule is an antibody. The capture molecule may be specific for all IgG subtypes or can be specific to a particular subtype, such as IgG1, IgG2, IgG2a, IgG3 and IgG4. In microdrops occupied by at least one cell secreting IgG isotype specific antibodies for capture reagent, the secreted antibodies are bound to the microdrops. In microdrops occupied by cell(s) secreting IgM isotype specific antibodies, secreted antibodies are not captured in the microdrops. After incubating the microdrops for sufficient time to allow antibody secretion *e.g.*, 1-12 hr, a detection reagent is diffused into the microdrops. Typically, the detection reagent binds to the captured secreted antibody at a site different than the capture molecule. Typically, the detection reagent is an antibody against the captured secreted antibody of the IgG isotype of interest. . Usually, the detection reagent is labelled, *e.g.*, fluorescently, allowing detection of microdrops occupied by cells secreting IgG antibody. These microdrops can be sorted from other microdrops by FACS or other methods described above. Cells can then be recovered from the isolated microdrops. This selection method permits detection and isolation of sub-populations of cells secreting IgG as small as 0.0001%. In a variation of the above method, cells secreting antibodies are encapsulated under conditions such that most occupied microdrops are occupied by a plurality of cells. The analysis proceeds as before. If any one of the multiple cells encapsulated in each microdrop secretes an IgG antibody, then this microdrop is scored as positive. Cells recovered from such microdrops are then subjected to at least one further cycle of encapsulation and screening. Subsequent cycle(s) of encapsulation are performed with a lower mean ratio of cells per microdrop until, in a final round of screening, most occupied microdrops encapsulate a single cell. Such an iterative procedure allows larger populations of cells to be screened.

[99] In a further variation, aliquots of cells can be dispensed into microtiter wells with up to about 1000 cells per well. Supernatant from the wells is then tested for antibodies of IgG isotype using a dipstick assay. Only cells from wells showing a positive signal by the dipstick assay are encapsulated and screened using the microdrop method.

#### [100] 7. Comparison of Microdrop Detection with Other Methods

[101] A wide array of commercially available assay methods for identifying T cells of interest by both surface expression and secretory profiles are described below. Each approach has benefits for specific applications and several are easy to use, informative, and relatively inexpensive. The proposed microdrop format relies on use of microencapsulation technology, flow cytometry, and available antibody reagents. In contrast to other methods,

WO 02/097122

PCT/US02/16783

the microdrop secretion assay makes it possible to detect small sub-populations of single cells secreting cytokines of interest, and to assay surface expression and secretory profile simultaneously. The technique is compatible with most ELISA type and flow cytometry assay procedures and also permits recovery of a population of functionally active cells for use in research and studies relating to immunotherapy.

[102] *Supernatant Assays for Detecting and Quantitating Cytokines* Although several methods have been developed to quantify soluble cytokines in biological fluids and tissue culture supernatant, each technique has at least one significant limitation. Since these approaches are not single cell-based, they do not provide information on which cell subset secretes a cytokine of interest.

[103] *Bioassays* Bioassays, which rely on growth of specialized cell lines in the presence of cytokines, are the least sensitive approach. Although relatively simple and well characterized, these formats are not reproducible and their low specificity frequently prevents cytokine differentiation between some cytokines (such as IL- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ). Moreover, these assays are only semi-quantitative, and, in some cases, cytokine levels are underestimated due to the presence of inhibitors in biological samples (35).

[104] *ELISA* Due to its inherent high specificity and sensitivity, the ELISA format is increasingly used to detect and quantitate soluble cytokines and chemokines, however, its use is limited to measuring a single cytokine per assay. Using enzyme-mediated signal amplification, the sandwich ELISA can measure physiologically relevant (*i.e.*, >5-10 pg/ml) concentrations of specific cytokines or chemokines (36). The sensitivity of this approach has increased significantly with development of new approaches, such as the dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay (DELFIA) using europium-labelled antibody (Ab) (37) and the cell culture-capture ELISA (2,38).

[105] *FlowMetrix™ System* The FlowMetrix™ System (Luminex, Austin, TX) uses beads as the solid support for conventional immunoabsorbent assays with a green-fluorescent reporter dye followed by flow cytometric analysis. As the individual bead sets can be separated by flow cytometry, many assays can be performed simultaneously, permitting quantitation of multiple analytes in small (100-200  $\mu$ l) volumes of cell culture supernatants or biological fluids (39). Because the FlowMetrix™ technology only measures the average secretion of the entire cell population, it is not useful for screening diverse cell populations with the aim of selecting and recovering a sub-population of viable cells. While the sensitivity of the FlowMetrix System is comparable to ELISA (picograms) for detecting

WO 02/097122

PCT/US02/16783

single analytes, sensitivity drops to the nanogram level when performing multiplex analysis (39).

**[106] *In situ Hybridization with Specific Cytokine Nucleic Acid Probes and Cytokine mRNA Expression Assays (RT-PCR)*** *In situ* hybridization or RT-PCR are useful techniques for identifying cells expressing cytokine genes, although expression obviously does not indicate translation/secretion of the biologically active protein (40). Message Amplification Phenotyping (MAPPING) was also recently developed to assay and quantitate expression of specific cytokine messages in cells (41). MAPPING analysis utilizes a micro-procedure for isolating RNA from cells followed by reverse transcription of total cellular RNA to cDNA and enzymatic amplification of cytokine-specific DNA fragments by PCR. This technique permits simultaneous determination of the collective pattern of mRNAs present in cells without the complexity and time required for individual cytokine assays, such as *in situ* hybridization. Simultaneous detection of a limited number of cytokines can also be performed using northern analysis or the ribonuclease protection assay (42). However, as with RT-PCR and *in situ* hybridization, these assays are not quantitative, are performed with killed cells, and do not directly measure secretion of native cytokine.

**[107] *Single Cell Cytokine Assays*** Due to the importance of understanding the functional heterogeneity of lymphoid cells, interest in single cell assays has increased. Current methods include ELISPOT, limiting dilution analysis, reverse hemolytic plaque assays, immunohistochemistry, and single cell PCR (41,43). Although these methods permit analysis of cytokine secretion by individual cells, they are time consuming and labor intensive and are, therefore, not suitable for high throughput screening of large cell populations and recovery of single, viable, cells of interest after analysis is not possible.

**[108] *Intracellular Cytokine Staining*** Recently, multiparameter flow cytometric analysis of individual cytokine producing cells within mixed cell populations has become useful for intracellular staining with specific anti-cytokine monoclonal Abs (3,6-8,11,44-48). High quality reagents and kits, as well as optimized protocols for simultaneous detection of cell surface and intracellular antigens (such as Becton Dickinson/PharMingen and R&D Systems) are commercially available. Prior to staining, cells are usually activated *in vitro* with various stimuli. The flow cytometric method is based on direct detection of intracellular cytokines and cell surface markers using fluorochrome-conjugated antibodies. Methods for cell preparation include: fixation, permeabilization and disruption of cytokine secretion by treatment with drugs, such as monensin or brefeldin, in order to retain cytokines intracellularly. The ability to analyze key intracellular functional markers by multiparameter



WO 02/097122

PCT/US02/16783

flow cytometry offers unique advantages for clinical studies. However, since assay procedures render cells non viable cells, measurement of functional secretion and recovery and propagation of cells of interest for research or therapeutic applications using FACS is not possible.

[109] *Affinity Matrix Technology* Two new approaches for identifying and isolating cells based on specific protein secretion were recently developed. Both use an artificial affinity matrix specific for the secreted product attached to the surface of viable cells. The first approach relies on biotinylation of cell surface proteins followed by incubation with streptavidin and biotinylated capture Ab. To prevent leakage of the secreted product, an incubation step is performed in pre-warmed, low permeability media containing gelatin. Fluorochrome-labelled antibody staining is used for flow cytometric detection of positive cells (49,50). The second more direct approach, developed at Miltenyi Biotec (Auburn, CA), uses Ab-Ab conjugates directed against the common lymphocyte surface marker CD45 (49-54). After secretion, cells are labelled with fluorochrome-conjugated anti-cytokine antibody and then detected after incubating with magnetic microbeads coated with anti-fluorochrome antibody (anti-FTC or anti-PE Abs). Positive cells can be analyzed by flow cytometry before incubating with magnetic microbeads or enriched using a MACS column (52-54). Simultaneous staining for a cell surface marker (other than CD45, which is blocked by the Ab-Ab conjugate) is also possible.

[110] Compared with other methods, the cellular affinity matrix technology permits analysis and sorting of large numbers of individual cells based on secreted products. Although successful isolation of viable cells has been reported, effects of the affinity matrix constructed on the cell surface on function and viability is a concern. Moreover, the amount of product secreted by individual cells, as well as the number of cell surface markers that can be simultaneously detected, are limited. In addition, it is difficult to estimate the secretion level. Using this assay format, the amount of secreted product bound to the affinity matrix will depend on the number of receptors expressed on the cell surface before labeling. A low concentration of binding sites within the affinity matrix will result in rapid saturation, making discrimination of low vs. high secretors nearly impossible.

[111] A comparison of current cytokine detection methods is shown in Table 1.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

[112]

Table 1. Comparison of assay characteristics for detecting cytokines

Characteristics	Biossays	ELISA	Bead-based system	RNA detection	ELISPOT	Intra-cellular cytokine staining	Affinity matrix technology	GMD assay format
Specificity	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Detection Level	Low	5-10 pg/ml	0 pg/ml or 0-40 ng/ml	High	Moderate	Not determined	Not determined	-10 ng/ml or 25-12.5 Ig/GMD
Quantitative	Semi-quantitative	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes
Single Cell Analysis	No	No	No	possible	Yes	Yes	Yes	Yes
Simultaneous cytokine and Cell Surface Marker Detection	No	NO	No	No	No	Yes	Yes, but only 1 secreted cytokine	Yes
Viable Cell Detection	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes

[113] 8. Kits

[114] The invention further describes kits for making microdrops. The kits contain matrix molecules (typically agarose) linked to biotin in a molar ratio of less than 0.85, preferably 0.01 to 0.2 moles biotin per mole matrix component molecules. The kit can also contain streptavidin, a capture molecule linked to second biotin molecules, and or a detection molecule. Kits also typically contain labeling providing directions for use of the kit. Kits are also provided for detecting IgG switch variants as described above. Such kits include biotinylated matrix molecules, preferably but not necessarily at the molar ratio described above, together with capture and detection molecules, and optionally labelling indicating instructions for use. The term labeling refers to any written or recorded material that is attached to, or otherwise accompanies a kit at any time during its manufacture, transport, sale or use. For example, the term labeling encompasses advertising leaflets and brochures, packaging materials, instructions, audio or video cassettes, computer discs, as well as writing imprinted directly on kits.

## [115] EXAMPLES

## [116] I. Materials and Methods

## [117] Cells and Culture Conditions

[118] 1) *Transfected Cell Line* We generated a stably transfected CHO cell line secreting hrIL-4 (CHO hrIL-4) using the liposome mediated procedure (Lipofectin® Reagent, Life Technologies) as follows: a plasmid containing the hrIL-4 gene was constructed by amplifying the gene sequence by PCR and inserting the sequence into the pIRESneo vector

WO 02/097122

PCT/US02/16783

(Clontech). The pIRES vector contains an attenuated internal ribosome entry site (IRES) of the encephalomyocarditis virus (ECMV) which permits translation of two open reading frames from one messenger RNA. The transfection procedure and cloning were performed as recommended by the manufacturer. The CHO IL-4 cell line was maintained in MEM Alpha medium containing 5% dialyzed FBS and 1% penicillin/streptomycin by splitting trypsinized cells 1:10 twice a week.

[119] 2) *Antigen-specific T Cell Line* To generate an antigen-specific murine T cell line, Balb/c female mice were immunized with a synthetic peptide M1081 (a kind gift of N. Rosenthal, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, sequence: CGMYCAYTIPGMGGNSLM, MW 1869). We coupled this peptide, which is a portion of EITF2A, a protein involved in cardiac development, to KLH, used as a carrier, and animals were injected intraperitoneally every 4 weeks for one year. To make a single cell suspension from aseptically removed spleen and mesenteric lymph nodes, organs were desegregated on a 70  $\mu$ m cell strainer in a petri dish using a syringe plunger. Then the single cell suspension was resuspended in DMEM (GibcoBRL, Grand Island, NY) containing 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, Utah), HEPES, antibiotics (penicillin and streptomycin, GibcoBRL), and  $5 \times 10^{-5}$ M of 2-mercaptoethanol (2-ME, Sigma, St. Louis, MO). To lyse erythrocytes, the cell suspension was treated with lysis buffer (Sigma) and washed 2 times with Hanks balanced salt solution (HBSS, Gibco) containing 5% FBS. Cell viability and count were performed in a hemocytometer chamber using a Trypan Blue (TB, Sigma) exclusion assay. Aliquots of splenocytes were frozen ( $-70^{\circ}$  C) for use as autologous feeder cells. According to the conventional procedure described by Londei, M., *et al.*, 1991 (55), an antigen specific T cell line was generated using mLN cells and maintained in culture by re-stimulating with alternative weekly cycles of specific Ag in the presence of mitomycin C treated autologous feeder cells and mIL-2.

[120] 3) *Mouse Splenocytes* Spleens were aseptically removed from naïve Balb/c female mice and a single cell suspension was prepared, as described above. The cell concentration was adjusted to  $1.5 \times 10^6$ /ml in complete medium and 2 ml ( $3 \times 10^6$  cells) was then added to each of three wells of the 24-well plate. The remaining cells were aliquoted and frozen. To stimulate cells, we added either ConA (5  $\mu$ g/ml) or PHA (5  $\mu$ l/ml) to experimental wells and mixed by pipetting. Cells in complete medium alone were used as a negative control. The plate was incubated at  $37^{\circ}$  C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 hr prior to performing the microdrop cytokine secretion assay.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

[121] 4) Fresh human PBMCs were isolated from a healthy donor using the Histopaque 1077-1 (Sigma) technique. Isolated cells ( $3 \times 10^6$ /ml) were cultured in RPMI-1640+10% FBS (dialyzed) in the presence or absence of PHA (5  $\mu$ g/ml) for 24 hr at 37° C in 5% CO<sub>2</sub>.

[122] **Immunoreagents** For use as capture and reporter antibodies in the microdrop secretion assay format, biotinylated and fluorochrome-labelled (FITC or PE) monoclonal antibodies against mouse cytokines and purified recombinant cytokines (mrIFN $\gamma$ , mrIL-2, mrIL-4, mrIL-6), PE-labelled anti-mouse CD3, and antibody directed against Fc $\gamma$ II/III receptor (Fc Block™) were obtained from PharMingen, Inc. (San Diego, CA). The hrIL-4 antibody pair was also obtained from PharMingen. Mitomycin C, ConA, and PHA were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Anti-human CD3/PE-Cy5 and CD4/ECD Abs were obtained from Immunotech (Beckman Coulter, Miami, FL). Anti-human CD69/FITC, anti-human IFN $\gamma$ /PE, biotinylated anti-human IFN $\gamma$ , and purified rhIFN $\gamma$  were obtained from BD/PharMingen (San Diego, CA).

[123] **Gel Microdrop Formation** Two biotinylated agarose encapsulation matrices, CelBioGel™-1 or CelBioGel™-2, which contain different amounts of biotin and CelMix™ 200 emulsion matrix (One Cell Systems, Inc., Cambridge, MA) were used to prepare microdrops. To prepare a batch of  $20 \times 10^6$  microdrops, one 400  $\mu$ l aliquot of agarose was heated in a microwave for 75 seconds, and 25  $\mu$ l of 10% pluronic acid (Sigma) was added as a surfactant. To make unoccupied microdrops for use in generating titration curves, 100  $\mu$ l of complete medium was added to the agarose/surfactant mixture. After vortexing and equilibrating at 37° C for 3 min, the mixture was added dropwise to 15 ml of CelMix™ 200 emulsion matrix pre-warmed to 37° C in a glass scintillation vial. The vial was attached to the CellSys™ 100 Microdrop Maker (One Cell Systems, Inc.) and the mixture was emulsified as follows: 2,100 rpm for 1 min at room temperature (RT), 2,100 rpm for 1 min in an ice bath, at 1,100 rpm for 10 min in an ice bath. The oil was removed by centrifuging at 650 g for 10 min and then washed twice with 10 ml of HBSS by centrifuging at 450 g for 5 min.

[124] **Single Cell Encapsulation** After counting in a hemocytometer chamber and determining viability using a Trypan Blue exclusion assay, cells from actively growing cultures were resuspended in complete medium at a concentration of  $1 \times 10^7$ /ml. To make conditioned medium, cell culture supernatants were centrifuged (800 g for 5 min) to remove cell debris. Then,  $1 \times 10^6$  cells in 100  $\mu$ l of complete medium were added to the agarose/surfactant mixture and microdrops were formed as described above. To increase the number of occupied microdrops, in some experiments two aliquots of CelBioGel™-2, each

WO 02/097122

PCT/US02/16783

containing  $1 \times 10^6$  cells, were resuspended in 15 ml of CelMix™ prior to the encapsulation procedure described above.

**[125] Multiple Cell Encapsulation** Prior to encapsulation, cells are grown in two 75 cm<sup>2</sup> flasks or in two 12-well plates (2 ml/well) for 5 days. Pooled cells (total number is higher than  $2 \times 10^6$ ) are counted and resuspended in 200 or 300 µl of growth medium. Two aliquots of 500 µl melted CelBioGel are vortexed with 25 µl of 10% Pluronic F-68 solution (Sigma-Aldrich), equilibrated at 37°C for 3 min and then each is mixed with 100-150 µl of cell suspension. These mixtures are added to 15ml prewarmed CelMix™, covered and shaken vigorously 10 times to form an emulsion. Then the vial is attached to a CellSys100™ Microdrop Maker (One Cell Systems, Inc). To generate large diameter microdrops, 1800 rpm and 1000 rpm speeds are used for emulsification. The generated microdrops are washed two times in DPBS to remove oil, filtered through a 70 µm cell strainer and counted in a hemocytometer chamber.

**[126] Immobilization of Capture Antibody in Agarose Matrix** microdrops were then washed with HBSS+2% FBS and a bridge was constructed by incubating the suspension with streptavidin (10 µg/ml) in 8 ml of DMEM+5% FBS for 15 min at RT. After washing with HBSS+2% FBS, microdrops were resuspended in 4 ml of DMEM+5% FBS and the same volume of capture reagent (biotinylated anti-cytokine antibody at 10 µg/ml) was added to make a 5 µg/ml final concentration. The sample was then incubated for 15 min at RT. The microdrop suspension was washed again with HBSS+2% FBS to remove unbound capture antibody.

**[127] Cytokine Secretion Incubation and Fluorescent Labeling** Encapsulated cells were then resuspended in 30 ml of pre-warmed (37° C) complete medium and incubated at 37° C in 5% CO<sub>2</sub> for either 3.5 hr or 18 hr to permit cytokine secretion. After the secretion incubation, the microdrop suspension was washed with HBSS+2% FBS and then resuspended in 4 ml of DMEM+5% FBS. The same volume of DMEM+5% FBS containing fluorochrome-conjugated anti-cytokine antibody (10 µg/ml) was added to the microdrop suspension. In order to discriminate dead cells, propidium iodide (PI, Molecular Probes, Eugene, OR) at a final concentration of 2 µg/ml was added. After incubating for 20 min at RT, the sample was washed and transferred to special tubes for flow cytometric analysis.

**[128] Cell Surface Staining** After labeling the secreted cytokine with reporter Ab, CD3 cell surface receptors were stained with PE labelled anti-CD3 monoclonal Ab. To reduce non-specific immunofluorescent staining mediated by Fc receptors, encapsulated cells were

WO 02/097122

PCT/US02/16783

resuspended in 1 ml of HBSS+2%FBS and incubated with 1 µg Fc Block™ for 15 min at 4° C. The sample was then washed and stained with anti-CD3 monoclonal antibody labelled with PE by incubating in 1 ml of HBSS + 2% FBS containing 5 µg of anti-CD3/PE antibody for 30 min at 4° C. After washing with HBSS + 2% FBS, the sample was analyzed by flow cytometry.

**[129] Assay Controls** In addition to the secretion sample stained with fluorescent Ab, four separate assay controls were prepared: a) *Unstained control* (to detect cell autofluorescence): an aliquot of microdrops was saved directly after cell encapsulation. b) *No capture control* (to detect background fluorescence due to non-specific binding of immunoreagents to the agarose matrix or the cell surface): an aliquot of microdrops was processed as normal, except the capture Ab-binding step was omitted. c) *Positive control* (to ensure that reagents worked properly): an aliquot of microdrops was removed after loading with capture antibody prior to the secretion incubation, incubated with purified cytokine, and d) *Isotype controls* to determine if non-specific binding of fluorescently-labelled detection antibodies occurs: an aliquot of microdrops was removed after the secretion incubation step and incubated with a similarly labelled related isotype control antibody labelled as the detection antibody.).

**[130] Microdrop Supernatant Assay** As an alternative to conventional ELISA, we also developed a cell based microdrop supernatant secretion assay (analogous to the Flowmetrix™ (Luminex, Austin, TX) system) to assess the detection levels derived from the cytokine titration curves. An aliquot of microdrop suspension from the secretion assay protocol was processed as the positive control (described above) except it was incubated with culture supernatant (directly or after diluting with fresh medium at a ratio of 1:10 or 1:100) instead of with purified cytokine. Extrapolating from the titration curve generated with cell free microdrops, the relative cytokine concentration in the supernatant was determined according to the mean fluorescence intensity and supernatant dilution factor. This assay format was used to measure cytokine concentration in cell culture supernatants collected the same day the secretion assay was performed.

**[131] Impact of Microdrop Size on Assay Reproducibility** Microdrops are generated using an emulsion process which results in a Gaussian size distribution; the majority (~76%) of microspheres fall within one standard deviation on either side of the mean. Among occupied microdrops, the size distribution is smaller, since smaller microdrops tend to be unoccupied. For the cytokine secretion assay, reproducibility is less dependent on the size variation of the

WO 02/097122

PCT/US02/16783

microspheres than on the number of capture sites per microdrop and the amount of cytokine secreted by individual cells during the secretion time.

[132] **Potential for Assay Crosstalk** "Crosstalk" (leakage of the secreted product from microdrops occupied by secretors) could result in false-positive microdrops and can be assessed using the supernatant assay. This is a concern for conditions during which cells (such as hybridomas or transfected cells) secrete protein in excess of capture antibody bound to the matrix. Crosstalk can be virtually eliminated by choosing the appropriate secretion time. For example, when performing the microdrop secretion assay to isolate high protein secreting CHO and hybridoma cells for bioprocessing applications, as soon as signal exceeds background, frequently in 15-30 minutes and prior to saturation of the antibody binding sites, then cells can be sorted. For conditions present for assaying sub-populations of cytokine secreting cells, since cytokine levels are ordinarily low, and below the capture capacity of an average microdrop, "crosstalk" remains a theoretical concern. Quantitative analysis of secretion and inter-experiment comparisons can also be performed to ensure that the number of capture sites is in excess of the amount of secreted cytokine.

[133] **Microscopy** Encapsulated cells were visualized using a Nikon ECLIPSE E600 epifluorescence microscope equipped with a phase contrast objective. Cell viability after Trypan Blue staining was evaluated microscopically. Prior to flow cytometric analysis, a 480/30 nm excitation and a 535/40 nm barrier filter set was used to examine microdrops stained with FITC. Red fluorescence from PI-treated cells as well as PE staining was detected by examining samples using 546/10 nm excitation and a 590 nm barrier filter. Samples were observed using either 400x or 1000x magnification. Fluorescence microscopy was used to determine the viability of encapsulated cells and to identify positively stained microdrops containing secretors. Low background fluorescence in no capture control and strong fluorescence in positive controls indicated that the assay was performed properly.

[134] **Density Gradient Separation**

[135] Separation of the unoccupied from occupied microdrops is achieved by centrifugation of microdrops through a stepwise density gradient, for example 5, 6, 7 and 8% Percoll (Sigma #P1644) in DPBS. A gradient consisting of 1.5ml of each of the four concentrations is aseptically prepared in a 10cc syringe (B-D) with a luer lock tip and a nylon stopcock. A 2ml microdrop suspension is layered on the top of the gradient and a piece of Parafilm is placed over the top. The syringe assembly is placed in a 50 ml centrifuge tube (Corning) and the assembly is centrifuged at 400Xg for 20 minutes at 18-22° C. The layer of 6% Percoll

WO 02/097122

PCT/US02/16783

contains the unoccupied microdrops and is discarded. Collection of the bottom 3 ml, 7-8% Percoll, results in recovery of primarily (~90%) cell-occupied microdrops. Percoll is removed by washing the microdrops in two volumes of buffer, twice and centrifuging at 400Xg.

[136] *Flow Cytometry* Microdrop samples were analyzed using a FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) or an EPICS Elite™ (Beckman Coulter, Miami, FL), both available at One Cell Systems. Fluorochrome-labelled (FITC or PE) detection reagents and PI-labelled dead cells were excited by the 488 nm spectral line of an argon laser. Green (FITC) and red (PE or PI) fluorescence were collected using 525 nm, 575 nm, and 630 nm long pass band filters, respectively. For statistical analysis, EPICS Elite 4.02 software (Beckman Coulter) was used. To measure the fluorescence intensity of unoccupied microdrops (titration curves), 20,000 events were acquired for each sample. Occupied microdrops have increased light scatter characteristics compared with unoccupied microdrops and were distinguished in a plot of forward and right angle light scatter. Using light scatter, occupied microdrops were easily resolved from unoccupied microdrops, which were eliminated from the data acquisition by increasing the forward scatter threshold or discriminator until unoccupied microdrops disappeared from the screen. Microdrops occupied by two or more cells were distinguished from microdrops occupied by single cells by increased FS. Only microdrops occupied by single viable (PI negative) cells were gated for data acquisition and analysis. To identify this sub-population, dual parameter dot plots (PI vs. FS) were used. This microdrop sub-population was then analyzed for green (FITC) or red (PE) fluorescence in both control and secretion samples. Fluorescence higher than the negative control represented cytokine secreting cells. For compensation settings, samples stained with only FITC or PE-labelled detection reagents or PI were run and the spectral overlap in each sample was electronically subtracted. Samples were run at a rate of approximately 600 events per second and at least 10,000 gated events were collected.

[137] *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* We sorted cytokine secreting cells using an EPICS Elite™ equipped with a 100 µm nozzle. Fluorescence of the sub-population of microdrops occupied by single PI negative (viable) cells was analyzed. Microdrops generating positive fluorescence were gated and sorted at a rate of 600-800 events per second. Positive events were collected in a 15 ml tube filled with growth medium containing 25% of conditioned medium.



WO 02/097122

PCT/US02/16783

[138] **Recovery and Propagation of Viable Cells After Sorting** Positive microdrops collected during the sorting procedure were placed in growth medium containing 25% of conditioned medium and 1U/ml (for transfected CHO cells) or 3U/ml of agarase (New England Biolabs, Beverly, MA) and then incubated at 37° C in 5% CO<sub>2</sub> for 7-10 days. To recover antigen-specific lymphocytes after an 18 hr incubation in the presence of agarase (3 U/ml) and mIL-2 (10 ng/ml), specific Ag (10 µg/ml), mIL-2 (10 ng/ml) and mitomycin C treated autologous feeder cells, diluted in a 1:1 ratio with sorted cells, were added and the flask was returned to the incubator. Cell viability and growth were evaluated every other day using microscopy after Trypan Blue staining and counting in a hemocytometer chamber.

[139] **Attachment of Microdrops to a Plastic or Glass Surface**

[140] Attachment of microdrops to a sterile, uncoated polystyrene surface (B-D Falcon Petri dish, #351008 or 1006) is achieved by preparing microdrops from agarose to which biotin is covalently attached (e.g. CelBioGel™-1). The microdrops are prepared according to the protocol that results in the majority of cell-containing microdrops occupied by single-cells. The occupied microdrops obtained from the Percoll gradient are washed twice in protein-free tissue culture buffer, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) or Hank's balanced salt solution (HBSS). Microdrops are added to a Petri dish containing buffer and allowed to remain undisturbed on a level surface at room temperature. Attachment is complete within 15 minutes and is believed to be the result of bonding of the agarose surface to functional groups of the polystyrene, probably via hydrogen bonding, and is blocked only if protein is present in the buffer during the attachment step. The blocking of sites on the Petri dish to which there are no microdrops attached is achieved by adding serum, such as 5% fetal bovine serum. Blocking is complete within 5 minutes and insures that the solid phase network is constructed only in the microdrop and not on the plate surface. The protein, media and incubation conditions of all subsequent steps do not interfere with or reverse attachment.

[141] **Cells and Culture Conditions for Antibody Secretion** Hybridoma cell line CRL-8018 secreting mIgM<sub>k</sub> specific for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and TIB-114 secreting mIgG3 specific for sheep red blood cells (both from ATCC) were used in experiments. CRL-8018 hybridoma cells were grown in Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 20% FBS (Gibco Lab.). DMEM supplemented with 10% FBS (Gibco BRL Products) was used for the TIB-114 hybridoma cell line. Both hybridoma media also contained 2mM L-Glutamine (Life Technologies) and Pen/Strep (Penicillin 1U/ml/Streptomycin 1µg/ml, Life Technologies). Cultures were maintained in at 37° C,

WO 02/097122

PCT/US02/16783

5%CO<sub>2</sub> in a humidified incubator at densities between 1x10<sup>5</sup> to 1x10<sup>6</sup> cells/ml by addition or replacement of fresh medium twice a week.

**[142] *Microdrop Isotype-Specific Detection and Isolation Assay*** Artificial mixtures of mouse IgM secreting hybridoma CRL-8018 and mouse IgG3 secreting hybridoma TIB-114 were used in experiments. First, CRL-8018 cells were grown for 7 days in TIB-114 growth medium (DMEM+10% FBS) and mIgM secretion level was determined by testing supernates using IsoStrip™ (Roche DiagnosticsCorp.). CRL-8018 cells were then spiked with TIB-114 cells at 0.1%, 0.01%, or 0.001% and microdrop-based enrichment was performed after encapsulating 2x10<sup>6</sup>, 25x10<sup>6</sup> or 50x10<sup>6</sup> cells. All microdrops containing at least one IgG secreting cell were sorted, as described below, pooled, and cultured for 5 days at 37° C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM+10% FBS supplemented with 5U/ml of agarase

**[143] *Induction of Class-Switching*** Using CRL-8018 cell line, we investigated and evaluated methods of increasing the number class-switching events *in-vitro*. Cells were plated in 75 cm<sup>2</sup> flasks or in 12-well plates at 1x10<sup>4</sup>/ml and incubated for 7 days in complete growth medium supplemented with:

**[144]** recombinant HBsAg (1 µg/ml) plus rhIL-4 (10 ng/ml);

**[145]** recombinant HBsAg (1 µg/ml) plus rmIFNγ (10 ng/ml);

**[146]** LPS (1 µg/ml) plus rhIL-4 (10 ng/ml);

**[147]** LPS (1 µg/ml) plus rmIFNγ (10 ng/ml);

**[148]** retinoic acid at 25 nM, 50 nM, or 100 nM.

**[149]** After incubating for 7 days, culture supernates were tested for the presence of IgM and/or IgG production using IsoStrip™ according to the manufacturer's instruction.

**[150] *Determination of in-vitro Induced Switching Rate Using Sequential Sublining*** CRL-8018 cells were resuspended in growth medium supplemented with mitogen(s)/growth factors as described above and plated out in ten 96-well plates at a density of 1,000 cells/well. Cells were cultured at 37° C, 5%CO<sub>2</sub> in a humid incubator for 5 days. Cell culture supernates were collected and an isotype-specific ELISA performed. Briefly, 96-well flexible assay plates, previously coated with 10µg/plate of purified goat anti-mouse IgG (Jackson Immunochemicals) in 20mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich), 50 µl/well, were incubated overnight at 4°C and then washed 3 times in Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium and magnesium/0.2% Tween 20 (DPBS-/Tween) (Sigma-Aldrich). Non-specific protein binding sites were blocked using PBS+1%BSA, 200 µl/well for 2 hr at room temperature (RT).

WO 02/097122

PCT/US02/16783

[151] 100 µl of each of the culture supernates were harvested and incubated in the anti-IgG coated plates for 2 hr at RT. The assay plates were washed three times in DPBS-/Tween, and 50 µl of HRP conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson Immunochemicals) diluted 1:100 in PBS/Tween were applied to each well and incubated at RT for 1 hr. Plates were washed again and developed using 100 µl of TMB substrate solution (Sigma-Aldrich). The reaction was halted with 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) and plates were read at 405nm on an ELx800 ELISA plate reader (Bio-TEK Instruments, Inc.). Five rounds of the above procedure were performed to determine the switching rate.

[152] *Determination of Spontaneous and in-vitro Stimulated Switching Rate Using the Microdrop Isotype Capture and Isolation Assay* Due to the low rate of isotype switching, analysis of large cell populations is necessary. - We, therefore, used a modified microdrop encapsulation protocol to isolate spontaneous or *in-vitro* induced rare IgG isotype switch variants among IgM secreting hybridoma cells. . If the IgG concentration in supernatants was < 0.1 µg/ml, we initially encapsulated multiple cells, followed by single cell encapsulation. In all cases, if, after *in-vitro* induction, the concentration of secreted IgG in supernatants was > 0.1 µg/ml, one round of single cell encapsulation was sufficient for discriminating and sorting a small sub-population of positive cells.

[153] Two aliquots of 500 µl melted CelBioGel-3™ were vortexed with 25 µl of 10% Pluronic F-68 solution (Sigma-Aldrich), equilibrated at 37° C for 3 min and then each was mixed with at least 2x10<sup>6</sup> hybridoma cells in 100-200µl of growth medium. These mixtures were added to 15 ml prewarmed CelMix™, covered and shaken vigorously 10 times to form an emulsion. Then the vial was attached to CellSys100™ Microdrop Maker (One Cell Systems, Inc) and the emulsion was mixed at 1800 rpm for 1 min at RT, then 1800 rpm for 1 min at 0°C, and subsequently 1000 rpm for 6 min at 0° C. Microdrops were washed three times in DPBS to remove oil and then incubated in 7 ml DPBS containing streptavidin (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 10 µg/ml for 10 min at RT.

[154] After incubating with streptavidin, microdrops were washed three times by resuspending in 15 ml DPBS- followed by centrifugation at 1500 rpm for 5 min and then incubated with 10 µg/ml of biotinylated goat anti-mouse IgG for 10 min. Microdrops were again washed three times in DPBS- (as above) and resuspended in 20 ml of prewarmed growth medium and incubated at 37° C for 2 hr for antibody secretion by the encapsulated cells. After incubation, microdrops were pelleted by centrifugation at 1500 rpm for 5 min, resuspended in cold DPBS- and labelled with 10 µg/ml of FITC-conjugated goat anti-mouse

WO 02/097122

PCT/US02/16783

IgG-specific antibody (Jackson Immunochemicals). microdrops were washed twice in HBSS, resuspended in 2 ml of growth medium and sorted using a Coulter EPICS Elite; gating was set to sort only highlypositive microdrops, based on controls .

[155] To determine spontaneous and *in-vitro* induced switching rate using the microdrop isotype capture and isolation assay, CRL-8018 hybridoma cells were plated out in two 75 cm<sup>2</sup> flasks or two 12-well plates (2 ml/well) at a density of 1x10<sup>4</sup> cells/ml in complete growth medium alone or in the presence of stimulators as described above. Cells were cultured at 37° C, 5%CO<sub>2</sub> in a humid incubator for 5 days. Cell culture supernates were harvested and IgM and/or IgG production was tested using IsoStip™ or an ELISA-based mouse Isotyping kit (Zymed, Inc.). All cells from 75 cm<sup>2</sup> flasks and from wells positive for IgG production were pooled, resuspended in 100-200 µl of growth medium and encapsulated in microdrops. The first round of isotype capture and isolation enrichment with multiple occupied microdrops was then performed, as described above. After sorted cells were propagated in culture for 5 days, the second round of the assay was performed using microdrops occupied by single cells. After isolation by FACS, IgG secretors were plated out in 96-well plates, 1 cell/well. The number of recovered clones was estimated using supernatant ELISA after incubating plates at 37° C in 5%CO<sub>2</sub> for 14 days.

[156] **Generation of Controls for the Microdrop Isotype Capture and Isolation Assay**  
Unstained control was used to measure autofluorescence of encapsulated cells. For each experiment, the negative (no capture or NOC) control was generated by omitting incubation of one aliquot of microdrop suspension with capture (biotinylated) anti-IgG. As a positive control, one aliquot of microdrop suspension was incubated with purified mouse IgG (Sigma) at a final concentration of 1 µg/ml followed by staining with detection Ab.

[157] **Fluorescence Activated Cell Sorting** Cell sorting was performed using an EPICS Elite™ Coulter Corp. with a 100 µm flow nozzle . FITC-labelled detection reagents were excited by the 488 nm spectral line of an argon laser. Green (FITC) fluorescence was collected using a 525nm, long pass band filter. For statistical analysis, EPICS Elite 4.02 software was used. First, occupied microdrops were distinguished from unoccupied microdrops by increasing forward and right angle light scatter. The light scatter properties of occupied microdrops were easily resolved from unoccupied microdrops, which were eliminated from the data acquisition by increasing the forward scatter threshold or discriminator until they no longer appear on the screen. To enrich for IgG switched variants during the first step of the procedure, all occupied microdrops were acquired and those which

WO 02/097122

PCT/US02/16783

had at least one positive cell were sorted and pooled for culturing. For the second step of enrichment, single occupied microdrops were discriminated from multiple occupied microdrops using their different forward scatter characteristics, gated and only single occupied microdrops containing positive IgG switched cells were gated for sorting. Samples were run at a rate of approximately 600 events per second with 50,000 or more gated events collected. Dead cells have increased side scatter and low forward scatter, and, therefore, this sub-population can be gated out. Singly occupied microdrops were gated and analyzed for green fluorescence both in control and secretion samples. FITC fluorescence higher than the negative control represented antibody-secreting cells. The sub-population of the brightest occupied microdrops was gated and sorted at a rate of at least  $10^6$  microdrops per hour. Up to approximately 50,000 events were collected.

**[158] *Cell Recovery and Propagation After Microdrop Encapsulation and Sorting***

Microdrops sorted after the first step of enrichment were pooled in 1 ml of growth medium for incubating in one well of a 12-well plate. After the second round of the enrichment process, the concentration of sorted single occupied microdrops was adjusted to 10 cells/ml by resuspending in growth medium and cells were deposited in 96-well plate(s) (one cell per 100  $\mu$ l per well). To release cells from microdrops, 5U/ml of agarase (New England Biolabs, Inc.) was added to the medium. This routine procedure did not affect cell viability. After incubating overnight at 37° C and 5% CO<sub>2</sub>, 1 ml or 100  $\mu$ l of fresh medium were added to each well and incubation was continued until visible cell growth was detected. ELISAs were performed with supernatants on all proliferating hybridoma clones and those producing the highest amounts of antibody were selected and propagated in 15-ml culture flasks.

**[159] Results**

**[160] 1. *Determination of Ratio of Biotin to Agarose***

**[161]** The ratio of biotin to agarose can be determined by NMR by combining a known weight of biotinylated agarose with a known mass of a standard that gives a recognizable NMR pattern. NMR service is commercially available (*e.g.*, NMR Analysis and Consulting, Decatur, IL). Potassium hydrogen phthalate (KHP) is suitable as a standard. The frequencies of the NMR spectrum are expressed on a ppm scale. The intensities of signals are proportional to the number of H atoms emitting signals. The KHP signal can be integrated over a range of 7.7 to 7.9 ppm. Biotin generates many NMR signals. A signal at 2.40 ppm that comes from two hydrogens next to the carboxyl group is suitable for analysis.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

The percentage mass of biotin present in the biotinylated agarose can be determined from the following formula

[162]  $A_{\text{biotin}}/A_{\text{KHP}} \times 4/2 \times 244.3/204.2 \times \text{wt}_{\text{KHP}}/\text{wt}_{\text{sample}} \times 100$ .

[163] A stands for the areas of NMR peaks, 4 is the number of H's giving rise to the KHP peak, 2 is the number of H's in the biotin peak, 244.3 is the molecular weight of biotin and 204 the molecular weight of KSP. The percentages by weight can be converted to molar percentages by dividing the relative masses by the respective molecular weights of 244.3 for biotin and 120,000 for agarose. For example, CelBioGel-1 showed a mass ratio of 1 g agarose to 0.00225 g biotin, corresponding to a molar ratio of 0.92 mmoles biotin to 0.83 mmoles agarose or 1.1 moles biotin per mole agarose.

[164] Alternatively, the ratio of biotin to agarose can be determined using an ImmunoPureHABA kit (Pierce). The kit detects biotin by displacing avidin from a complex formed with HABA (2-[4'-hydroxyazobenzene] benzoic acid). Displacement causes a decrease in absorbance of HABA-avidin solution measured at 500 nm, which is proportional to the concentration of biotin.

[165] The kit was used to determine absorbance on CelBioGel-1. Absorbance of HABA-avidin solution (0.9 ml) was 0.924. Absorbance of HABA-avidin after adding 0.1 ml of CelBioGel (10mg/ml) was 0.532. The amount of biotin in the CelBioGel was calculated using the formula (described by Pierce)

[166] 1.)  $D A_{500} = (0.9 \times 0.924) - 0.532 = 0.299$

[167] 2.)  $\text{mmoles of biotinylated agarose/ml} = 10/120000 = 8.33 \times 10^{-5}$

[168] 3.)  $\mu\text{moles of biotin/ml reaction mixture} = DA_{500}/\text{absorption coefficient} = 0.299/34 = 8.8 \times 10^{-3}$

[169] 4.)  $\text{moles of biotin/mole of biotinylated agarose} = 8.8 \times 10^{-3} \times (10 \times 1) : 8.33 \times 10^{-5} \times 1000 (\mu\text{moles/mole}) = 1.056$

[170] This is within a 5% margin of error of the value determined by NMR.

[171] 2. Comparison of Biotinylated Matrixes

[172] This example compares three types of biotinylated agarose termed CelBioGel™-1, -2, and -3 having molar ratios of a biotin to agarose of 1:1, 0.2:1, and 0.04:1 within a +/-10% experimental error margin. To determine assay sensitivity and to assess optimal concentrations of biotinylated capture and fluorochrome-labelled reporter antibody, cell free microdrops were incubated in serial dilutions of mrIL-4, mrIL-6, mrIFN $\gamma$ , and hrIL-4 using either CelBioGel-1 or CelBioGel-2 for 15 min on a rotator at RT with 10 $\mu$ g/ml of streptavidin

WO 02/097122

PCT/US02/16783

(Sigma) in 4 ml of DMEM with 2% FBS and the secretion assay was performed as described above, except no cells were added. Excess streptavidin was removed by washing with HBSS plus 2% FBS (used for all washes). The unoccupied microdrop preparation was then incubated with biotinylated capture antibody (5 g/ml) in 4 ml of medium for 15 min on a rotator at RT, followed by washing to remove unbound reagent. Aliquots of this preparation (8x10<sup>5</sup> microdrops) were incubated with varying dilutions of purified cytokine (100 ng/ml to 1 ng/ml) and incubated at 37°C for 30 minutes on a rotator. Unoccupied microdrops incubated in HBSS plus 2% FBS served as the negative control. Following the washing procedure, all samples were incubated with fluorochrome-conjugated reporter antibody (5 g/ml) for 15 min on a rotator at RT, washed, and transferred into different tubes for single color flow cytometric analysis. Mean fluorescence intensity is proportional to the cytokine concentration captured in single microdrops.

[173] By plotting cytokine concentration vs. the corresponding average mean fluorescence of microdrops (after subtracting the background fluorescence value in the negative control), we generated titration curves for the average amount of cytokine detectable per microdrop. From the titration curve, we determined the lowest concentration of cytokine that resulted in fluorescence signal (above the negative control). One representative titration curve for detecting mrIFN $\gamma$  labelled with PE-conjugated antibody is shown in Figure 2. Average mean fluorescence used to generate titration curves for mrIFN $\gamma$  are summarized in Table 2. The level of mean fluorescence measured in unoccupied microdrops made from CelBioGel-1 and CelBioGel-2 correlated with cytokine concentration and the response was linear over the range of concentrations tested (1 ng/ml to 100 ng/ml). CelBioGel-2 demonstrated higher sensitivity. Using both agarose matrices, the end-point of the assay, which was the lowest concentration of cytokine detectable over background (negative control), varied from >100 to 10 ng/ml or >125 fg/microdrop when CelBioGel-1 was used and 12.5 fg/microdrop when CelBioGel-2 was used.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

**[174] Table 2. Cytokine detection levels in solution using unoccupied microdrops labelled with capture and reporter antibody determined by flow cytometry**

Cytokine	Fluorochrome label of detection Ab	Encapsulation matrix	Mean fluorescence corresponding to cytokine concentration						Detection level	
			100 (ng/ml)	50 (ng/ml)	10 (ng/ml)	5 (ng/ml)	1 (ng/ml)	0 (ng/ml)	ng/ml	fg/microdrop
mrIFN $\gamma$	FITC	CelBioGel <sup>TM</sup> -1	0.473	0.267	0.229	0.17	0.12	0.1	>100	>125
mrIFN $\gamma$	FITC	CelBioGel <sup>TM</sup> -2	43.36	20.36	2.53	1.7	1.21	1.62	10	12.5

**[175]** We estimate that, on average, one 40  $\mu$ m microdrop generated using CelBioGel-2 ( $\sim 3 \times 10^{-8}$  ml volume) contains  $6 \times 10^8$  molecules of biotin. After loading microdrops with streptavidin ( $3 \times 10^7$  molecules/microdrop), all the biotinylated capture antibody in a 20  $\mu$ g aliquot ( $\sim 1 \times 10^7$  molecules/microdrop) are bound to the agarose matrix. In our experiments, even during a long incubation (18 hr), individual single cells secreted only small amounts of cytokines (on average from 1.8 to 35 fg/cell/microdrop). The molecular weight of the cytokines we tested are: mrIFN $\gamma$  ~17 kDa, mrIL-4 ~14 kDa, and mrIL-6 ~21.7 kDa. Calculations using Avogadro's number show that 1 fg of IL-6 contains  $\sim 3 \times 10^4$  molecules. Assuming a 1:1 ratio of analyte to detector, saturation of all binding sites in an individual microdrop (molecules of biotinylated antibody immobilized in the agarose matrix) would on average require at least 333.3 femtograms of secreted cytokine, which is in excess of the secretion levels detected in our experiments with primary cells (on average 1.8 – 35 fg/cell/microdrop after incubating for 18 hr). The reported level of cytokine secreted by individual cells (0.2 – 8 fg/cell of GM-CSF per 1 hr or 144 fg per 18 hr) (7) are ordinarily low and, therefore, we do not expect saturation of capture sites using our assay conditions. Assuming similar conditions for performing the secretion assay, the fluorescence intensity of occupied microdrops should reflect the amount of cytokine secreted by single cells during the secretion incubation time and the relative level of cytokine secretion can be estimated using the titration curve, approximating quantitation.

**[176]** The effect of CelBioGel, CelBioGel-2 and CelBioGel-3 on the detection limit of the microdrop secretion assay was also evaluated using transfected CHO cells secreting high levels of mIgG1 ( $>20$   $\mu$ g/ml). Flow cytometry results are presented in Table 3. Although similar percentages of secretors were detected for CelBioGel-2 and CelBioGel-3 (approximately 99.5%), mean FITC fluorescence intensity (MFI) was significantly higher for CelBioGel-3 (144.91 vs 38.67), indicating a higher assay detection limit using CelBioGel-3.



WO 02/097122

PCT/US02/16783

CelBioGel-3 (144.91 vs 38.67), indicating a higher assay detection limit using CelBioGel-3. Of the three types of CelBioGel, CelBioGel-1 was the least sensitive. Only 81.24% of secretors were detected. In addition, MFI was low (10.63).

[178] Table 3: Flow cytometry results of the microdrop Secretion Assay performed using transfected CHO cells secreting mIgG1 and different types of CelBioGel™ (CelBioGel-1™, CelBioGel-2™ and CelBioGel-3™).

Samples	CelBioGel1		CelBioGel-2		CelBioGel-3	
	% positive	MFI	% positive	MFI	% positive	MFI
Negative Control	-----	1.29	-----	1.61	-----	2.83
Positive control	-----	79.35	-----	291.1	-----	450.8
Secretion 15 min	81.25%	10.63	99.5%	38.67	99.6%	144.91

[179] Similar experiments were performed using transfected NSO cells with low secretory activity (<1µg/ml). Flow cytometry results are presented in Table 4. The detection limit was higher using CelBioGel-3. Compared to CelBioGel-2, the percentage of secretors detected and Mean Fluorescence Intensity was approximately 3 times higher using CelBioGel-3.

[180] Table 4. Flow cytometric results of the microdrop Secretion Assay performed using transfected NSO cells and different types of CelBioGel (CelBioGel-2 and CelBioGel-3).

WO 02/097122

PCT/US02/16783

<u>SAMPLES</u>	<u>CelBioGel-2</u>		<u>CelBioGel-3</u>	
	% positive	MFI	% positive	MFI
Negative control	----	0.918	----	1.04
Positive control	----	24.7	----	63.3
<u>Secretion 1 hr</u>	7.8%	1.3	23%	3.26

[181] 3. *Detection of hrIL-4 Secreting Transfected CHO Cells* To optimize the secretion assay, we initially used a transfected CHO cell line known to reproducibly secrete about 200 ng per ml of hrIL-4. After culturing cells for 3 days until they reached 75% confluency, we performed the microdrop cytokine secretion assay using  $1 \times 10^6$  cells and CelBioGel-1. After a 2 hr incubation, microscopy revealed that the majority of occupied microdrops were saturated and bright FITC fluorescence was visible in unoccupied microdrops indicating assay "crosstalk" (diffusion of secreted cytokine in excess of the saturated binding sites). We, therefore, used a 1 hr incubation for the assay and histograms of one representative experiment (of five) are shown in **Figure 3**. Compared to the unstained sample (**panel 1**), incubation with FITC-labelled detection antibody resulted in low background fluorescence (0.34) in the negative ("no capture") control (**panel 2**) from non-specific binding. Microdrops in the positive control (25 ng/ml of hrIL-4, **marker C, panel 3**) exhibited significantly higher fluorescence (11.6). After incubating the sample for 1 hr, the subpopulation of microdrops occupied by single cells was gated using FS vs SSC dot plot (**gate A, dot plot 4**) and included for further data acquisition. Next, we discriminated viable (PI negative) cells (**gate B, dot plot 5**) using FITC fluorescence. Both the percentage and the mean fluorescence of positive events were determined by subtracting the corresponding values from the negative control. 26% of the encapsulated cell population secreted varying amounts of hrIL-4 as shown under **marker C, panel 5**. Cell viability assessed by Trypan Blue staining before experimentation and by PI staining during flow cytometry was high (98%) and was unaffected either by encapsulation or by secretion assay procedures. Results

WO 02/097122

PCT/US02/16783

showed that if the cytokine level is high, as expected using transfected cells, positive microdrops can easily be detected after a short (1 hr) secretion incubation.

[182] **4. Detection of Cytokine Secretors in an Activated Murine Antigen-specific T Cell Line** Next, we detected three different cytokines produced by an antigen-specific cell line. After growing cells in bulk culture for 48 hr, we tested supernatant using the microdrop assay format (microdrop supernatant control) and determined the relative amounts of cytokines secreted by the cells as: ~30 ng/ml of IFN $\gamma$ , ~5 ng/ml of IL-4, and ~15 ng/ml of IL-6. Cell viability, assessed by Trypan Blue staining, ranged from 72% to 80%. Reduced cell viability was probably the result of activation-induced apoptosis and the presence of dead (or dying) mitomycin C treated feeder cells in the sample. Using the microdrop secretion assay and flow cytometry, we determined the percentage of cells secreting each individual cytokine and the mean fluorescence intensity corresponding to the average amount of cytokine secreted per cell after incubating for both 3.5 and 18 hr.

[183] Sub-populations of cells secreting each cytokine (1.26% IFN $\gamma$ , 3.32% IL-4, and 1.38% IL-6) were detected after a short (3.5 hr) incubation. By extrapolating values of mean fluorescence from the cytokine titration curves, we estimated the average relative level of cytokine secreted by individual cells as: ~12.5 fg for IFN $\gamma$ , ~1.8 fg for IL-4, and ~2.0 fg for IL-6, respectively. After increasing the incubation time to 18 hr, the frequency of cytokine secreting cells increased as follows: IFN $\gamma$  (from 1.26% to 18.5%), IL-4 (from 3.32% to 20.87%) and IL-6 (from 1.38% to 15.55%). The mean fluorescence and, thus, the average relative amount of secreted cytokine also increased significantly (IFN $\gamma$ : from ~12.5 fg to 35 fg, and IL-4: from ~1.8 fg to 3.6 fg, respectively). Although, after lengthening the incubation time, the frequency of IL-6 secreting cells increased from 1.38% to 15.55%, the increases in the relative levels of cytokine secretion were not significant (~2.0 fg/microdrop vs ~2.4 fg/microdrop). 90% of the FITC-positive occupied microdrops were PI-negative, indicating high cell viability throughout the assay procedures. Histograms from one representative experiment to detect IL-4 after incubating for both 3.5 and 18 hr are shown in Figure 4 and the estimated frequency of IFN $\gamma$ , IL-4, and IL-6 sub-populations are presented in Table 5.

[184] **Table 5. Flow cytometric analysis of cytokine secretion by activated antigen-specific T cells using the microdrop secretion assay format.**

WO 02/097122

PCT/US02/16783

Cytokine detected	Frequencies of cytokine secreting cells (% positive events)	
	3.5 hr secretion incubation	18 hr secretion incubation
mrIFN $\gamma$	1.26%	18.5%
mrIL-4	3.32%	20.87%
mrIL-6	1.38%	15.55%

[185] **5. Detection of IFN $\gamma$  and IL-6 Secreting Cells Among Activated Mouse Naïve Splenocytes** Due to the anticipated low frequency of activated cells in primary culture and their inherent low level of cytokine secretion, we stimulated naïve mouse splenocytes *in vitro* with either ConA or PHA for 24 hr prior to performing the microdrop secretion assay. Results using both mitogens were essentially the same. Analysis of microdrop supernatant controls showed that after 24 hr in culture, on average, splenocytes secreted ~20 ng/ml of IFN $\gamma$  and ~10 ng/ml of IL-6. Cell viability, determined by the Trypan Blue exclusion assay before and after encapsulation, was high (>98%). After incubating with capture antibody and incubating encapsulated cells for 3.5 and 18 hr, samples were stained with either FITC-labelled anti-mouse IFN $\gamma$  or PE-labelled anti-mouse IL-6 Abs (both at final concentrations of 5  $\mu$ g/ml).

[186] Although sub-populations of cytokine secreting cells were not detectable by flow cytometry after incubating for 3.5 hr, both IFN $\gamma$  and IL-6 secreting cells were discriminated after increasing the incubation to 18 hr. As expected, compared to the antigen-specific cell line and transfected cells, the frequency of positive cells and the average mean fluorescence of positive microdrops were lower for both cytokines. In this heterogeneous population of stimulated naïve splenocytes, we detected a 4.72% sub-population of cells secreting IFN $\gamma$  and a 4.43% sub-population secreting IL-6. By extrapolating corresponding mean fluorescence values from the titration curve, the estimated average amounts of cytokines secreted by individual cells were ~11.5 fg/microdrop for IFN $\gamma$  and ~2 fg/microdrop for IL-6, respectively. Flow cytometric analysis of PI staining showed that cell viability was high throughout the experiment (>98%).

[187] **6. Simultaneous Detection of Secreted Cytokine and Cell Surface Marker** We next performed experiments to simultaneously detect secreted IFN $\gamma$  and CD3 surface expression in mouse antigen-specific T cells. Cells were re-stimulated with M1081 peptide in the presence of mitomycin C treated autologous feeder cells and mrIL-2 and maintained in culture for 2

WO 02/097122

PCT/US02/16783

days, as described in Materials and Methods. Cell viability before experimentation was ~74%. To perform the microdrop secretion assay, we incubated cells for 18 hr after encapsulation. Using two-color flow cytometry, we discriminated a sub-population of CD3<sup>+</sup> cells secreting IFN $\gamma$  (**Figure 5**) by gating on microdrops occupied by single viable (PI negative) cells (**R1 gate, panel A**) and measuring FITC (FL-1) and PE (FL-2) fluorescence. **[188]** Two sub-populations were detected in the "no capture" (negative) control (**panel B**): CD3<sup>+</sup> cells (45.9% in the upper left quadrant) and CD3<sup>-</sup> cells (53.88% in the lower left quadrant); both had low levels of background FITC fluorescence (1.49 and 2.56, respectively). However, in the secretion sample (**panel C**), a 14.8% sub-population of CD3<sup>+</sup> activated antigen-specific cells was detected (double-positive events in the upper right quadrant). 29.4% of CD3<sup>+</sup> cells did not secrete IFN $\gamma$  (single-positive events in the upper left quadrant). IFN $\gamma$  secreting cells were also detected among the CD3<sup>-</sup> sub-population (5.4% in the lower right quadrant). Most of these events were probably B lymphocytes, NK cells, or macrophage and dendritic cells derived from mitomycin C treated autologous feeder cells. Double-negative events (49.7% CD3<sup>-</sup> cells), which did not secrete IFN $\gamma$ , were located in the lower left quadrant.

**[189] 7. Recovery and Propagation of Cytokine Secreting Cells** We recovered both transfected CHO cells secreting hrIL-4 and activated mouse antigen-specific cells secreting IFN $\gamma$  by FACS. After sorting a sub-population (5%) of highly fluorescent microdrops occupied by single viable CHO cells secreting hrIL-4, cells were released from microdrops by agarase treatment (1U/ml), and incubated for 48 hr in a 24-well plate. Cells released from microdrops adhered to the bottom of the well and grew as a monolayer. Cells were then transferred to a 25 cm<sup>2</sup> culture flask, incubated until confluency, and re-screened after 2 weeks using the microdrop secretion assay. Next, we sorted a sub-population (18.5%) of activated mouse antigen-specific cells secreting IFN $\gamma$ . 50,438 positive events (microdrops occupied by single viable cytokine secreting cells) were collected. After sorting, encapsulated cells were pooled and incubated in medium containing mrIL-2 (10 ng/ml) and agarase (3U/ml) for 18 hr, when the majority of the cells were released from microdrops. After adding complete medium (5 ml) mixed with conditioned medium (in a 3:1 ratio) and supplemented with the antigen (M1081 peptide) at 10  $\mu$ g/ml, mitomycin C treated autologous feeder cells (1:1) and mrIL-2 (10  $\mu$ g/ml), the flask was returned to the incubator for an additional 6 days prior to re-stimulation. Viability and proliferation, assessed every other day

WO 02/097122

PCT/US02/16783

via Trypan Blue staining and counting in a hemocytometer chamber, indicated the presence of an increasing population of viable antigen-specific cells.

**[190] 8. Simultaneous Detection of *mrIFN $\gamma$*  and *mrIL-4* in Unoccupied Microdrops using Two-Color Flow Cytometry.**

**[191]** After labeling with a mixture of biotinylated anti-IFN $\gamma$  and anti-IL-4 Abs (both at final concentration of 5  $\mu$ g/ml), microdrops were incubated with a mixture of purified cytokines: mrIFN $\gamma$  (100 ng/ml) and mrIL-4 (25 ng/ml). In the negative ("no capture") control (**Figure 6, panel A**), background fluorescence was very low for both FL-1 (FITC) and FL-2 (PE) fluorescence; the majority of microdrops (99%) were double negative and located in the lower left quadrant. When mrIFN $\gamma$  (**panel B**) or mrIL-4 (**panel C**) were detected individually (incubated with only anti-IFN $\gamma$ /PE or with only anti-IL-4/FITC, both at 5  $\mu$ g/ml), positive microdrops exhibiting high FL-2 (541.48) or FL-1 (155.06) fluorescence were located in the upper left or lower right quadrants, respectively. When detecting both cytokines simultaneously (incubating with a mixture of fluorochrome-labelled Abs, both at 5  $\mu$ g/ml), 84% of microdrops were double positive (**panel D**, the upper right quadrant of the dot plot) with mean fluorescence of 189.5 (FL-1) and 636 (FL-2). The levels of secreted cytokine detected simultaneously were similar to the levels measured individually, suggesting that the microdrop immunoassay can be used to detect more than one cytokine secreted by individual encapsulated cells without compromising assay sensitivity.

**[192] 9. Detection of Multiple Cell Surface Markers and a Secreted Cytokine Simultaneously using Four Color Flow Cytometry**

**[193]** Using encapsulated human PBMCs (unstimulated and stimulated with PHA), we successfully detected CD3, CD4, and CD69 cell surface expression and IFN $\gamma$  secretion after a 4 hr incubation. Four color analysis was performed using an EPICS Elite (Coulter Corp.). Fluorochrome-labelled samples were excited by the 488 nm spectral line of an argon laser. To identify lymphocyte sub-populations by immunophenotype and IFN $\gamma$  secretion, we first identified lymphocytes using forward vs. side scatter. CD3 and CD4 fluorescence were then detected on cells within the gated lymphocyte population. CD69 expression was used to identify activated cells (FITC) and anti-IFN $\gamma$  antibody was used to identify cytokine secreting cells (PE). Histograms from this experiment demonstrate that using the microdrop assay format and four color flow cytometry, surface markers and secreted cytokine can be detected simultaneously within defined lymphocyte sub-population after *in vitro* stimulation of human PBMCs with PHA (**Figure 7**).

WO 02/097122

PCT/US02/16783

[194] The sub-population of microdrops occupied by lymphocytes was identified using a dual parameter dot plot (SSC vs. FS, histograms 1-A and 1-B in Figure 7). An increase in forward scatter can be seen with mitogen-stimulated lymphocytes as expected. Although sub-populations of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells were identifiable in both unstimulated (32.8%, Figure 7, histogram 3-A, quadrant C2) and stimulated PBMCs samples (37.8%, Figure 7, histogram 3-B, quadrant C2), as expected, CD69 expression was only detectable in the population of stimulated lymphocytes. After subtracting the background level of the unstimulated control (Figure 7, histogram 2-A, 1.3% marker E), we identified a 79.6% sub-population of lymphocytes expressing CD69 with mean FITC fluorescence of 102.3 (Figure 7, histogram 2-B, marker E).

[195] In addition, we identified a 9.6% sub-population of stimulated lymphocytes secreting IFN $\gamma$  (10.9% - 1.3% = 9.6%-Figure 7, histograms 4-A and 4-B, marker I).

[196] Neither the encapsulation procedure nor the microdrop Secretion Assay affected cell viability as determined by a Trypan Blue exclusion assay

[197] **10. Detecting Secreted Products Released by Individual Cells using Enzyme-Linked Immunoassay Format, TSA Signal Amplification Reagent, and Flow Cytometry**

[198] HRP-labelled detection antibody and TSA amplify the signal at least 10 fold allowing detection of pg/ml levels. This sensitivity is particularly useful for detecting cytokine-secreting cells because the majority of these regulatory factors are secreted transiently in small quantities. To demonstrate the feasibility of the proposed approach we detected different amounts of purified mouse IgG1 in the supernatant using unoccupied microdrops (CelBioGel-3). Microdrops were incubated with streptavidin (50  $\mu$ g/ml) for 15 min at RT and washed 3 times with HBSS. Then, incubating with biotinylated goat a-mouse IgG1 (H+L) at a concentration of 10  $\mu$ g/ml was performed for 15 min at RT. After washing with HBSS 3 times, microdrops were incubated with different concentrations of purified mouse IgG1 (1.0  $\mu$ g/ml, 0.01  $\mu$ g/ml, and 0.001  $\mu$ g/ml) for 20 min at RT and then washed again in HBSS 3 times. Detection antibody (HRP-labelled goat a-mouse IgG1, Fc fragment specific) was added to all samples at final dilution of 1:200. After incubating for 20 min at RT and washing 3 times with HBSS, FITC-labelled TSA reagent was added at a final dilution of 1:200. After a 10 min incubation at RT, microdrops were washed 3 times in HBSS and all samples were analyzed by flow cytometry along with three controls: 1) unstained microdrops, 2) TSA reagent only, and 3) negative (no capture Ab) control. Results of this experiment demonstrate feasibility of using the proposed microdrop assay for extracellular

WO 02/097122

PCT/US02/16783

detection of secreted products are shown in Figure 8. Low background fluorescence was seen in all three controls (1.27, 2.87, and 4.6, respectively). While mIgG1 at 1 µg/ml and 0.01 mg/ml generated MFI of 224.78 and 93.14, respectively, mIgG1 at concentration of 0.001 µg/ml (1 ng/ml) was still clearly detectable (MFI 31.98).

**[199] 11. Detection of In-vitro Induced IgG Isotype Switching Rate Among CRL-8018 Hybridoma Cells Using Sequenel Sublining** Experiments were performed with CRL-8018 hybridoma cell line as described in Materials and Methods. We determined that for the CRL-8018 cell line, the most effective *in-vitro* conditions were: a) retinoic acid (at 100 nM), which induced a switch to mIgG1 and mIgG2b, or b) purified antigen (HBsAg at 1 µg/ml) combined with mIL-4 (at 10 ng/ml), which induced a switch to mIgG1. Sequential sublining was performed as described in Materials and Methods.  $1 \times 10^6$  cells were resuspended in 200 ml of growth medium supplemented with 100 nM of retinoic acid ( $5 \times 10^3$ /ml) and plated out in ten 96-well plates at a density of 1,000 cells/well (0.2 ml/well). After 5 days of incubation at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, mIgG isotype specific ELISA was performed with cell culture supernates. Cells from two positive wells were plated out in 96-well plates at a density of 100 cells/well (25 plates). Five rounds of the above procedure were performed: 1,000 cells/well, 100 cells/well, 10 cells/well, and 1 cell/well. Results of one representative experiment are shown in Table 6. After plating out cells at a density of 1,000 cells/well in ten 96-well plates, supernatant ELISA revealed that 6 wells (0.6%) were low positive for mIgG. This indicates that the rate of isotype switching was ~0.0006%. About two months, 110 plates and 10,560 supernates for mIgG isotype specific ELISA were required for the assay.



WO 02/097122

PCT/US02/16783

[200]  
[200] Table 6. Detection of mIgG switch variants in CRL-8018 hybridoma cell line by sequential subcloning after *in-vitro* induction with retinoic acid (100 nM)

Plating density	1,000 cells/well	100 cells/well	10 cells/well	1 cell/well
mIgG positive wells	6	298	564	2188
% positive <sup>a</sup>	0.6%	12.4%	23.5%	91.2%

<sup>a</sup>Percent of 960 wells plated at 1,000 cells/well and 2400 wells at lower densities.

[201] Results of Microdrop Isotype Capture and Isolation Assay for Detecting Small Sub-populations in Artificial Cell Mixtures The sequential (two-step) microdrop isotype capture and isolation assay was used in experiments with IgM secreting CRL-8018 hybridoma cell line spiked with IgG3 secreting TIB-114 hybridoma cells. After plating CRL-8018 cells at  $1 \times 10^4$ /ml in six 75 cm<sup>2</sup> flasks (25 ml of DMEM+10% FBS/flask) for 7 days, cells were harvested and mixed with TIB-114 cells at 0.1% (experiment 1), 0.01% (experiment 2), and 0.001% (experiment 3). CelBioGel-3 was used to encapsulate cell mixtures:  $2 \times 10^6$  cells in experiment 1 (single cell encapsulation),  $25 \times 10^6$  cells in experiment 2, and  $50 \times 10^6$  cells in experiment 3 (both multiple cell encapsulations). One round of the microdrop isotype capture and isolation was performed in experiment 1 and the two-step assay format was used in experiments 2 and 3, as described in Materials and Methods. Isolated cells were propagated in culture and supernates were analyzed using IsoStrip™ dipsticks, as described above. In experiments 2 and 3, both mIgM and mIgG3 were detected in supernates of cells recovered after the first round of sorting. However, mIgG3 and only traces of mIgM were detected after a sequential second round of sorting. Single cell encapsulation of  $1 \times 10^6$  IgM secreting cells spiked with 0.1% of IgG3 secreting hybridoma in experiment 1 resulted in isolation of only mIgG3 secreting cells by FACS. Results of experiments are summarized in Table 7.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

[202] Table 7. Results of the microdrop isotype capture and isolation assay for detecting small sub-populations of mIgG3 secreting hybridoma cells mixed with mIgM secreting hybridoma cell line.

Proportion of mIgG3 secreting cells among mIgM secreting hybridoma	Total number of encapsulated cells	Mean number of cells per GMD	The first round of FACS		Sequential second round of FACS of single occupied GMDs	
			% positive events detected		% positive events detected	
Experiment 1 (0.1%)	1x10 <sup>6</sup>	1.0	0.1%	112.45	—	—
Experiment 2 (0.01%)	25x10 <sup>6</sup>	3.2	0.47%	146.24	25.7%	151.8
Experiment 3 (0.001%)	50x10 <sup>6</sup>	7.5	0.03%	132.4	13.4%	137.52

[203] **Determination of Spontaneous and in-vitro Induced Switching Rate Using the Microdrop Isotype Capture and Isolation Assay** The Microdrop-based assay format was used to isolate in-vitro induced and spontaneous isotype switch variants from populations of IgM secreting CRL-8018 hybridoma cell line. Representative results of one experiment from five performed with each experimental condition are shown in Table 8. In the first round of experiments, we determined the rate of spontaneous isotype switching. 75x10<sup>6</sup> hybridoma cells were encapsulated using two aliquots of CelBioGel-3 and one 15-ml aliquot of CelMix™ as described in Materials and Methods. Approximately 60% of microdrops were occupied, with a mean of 9 cells per occupied The mIgG isotype capture assay was then performed and microdrops occupied by positive cells (0.02%) were isolated using FACS. Based on the number of cell encapsulated, the estimated rate of isotype switching was calculated to be 0.0013%. Microdrops were sorted into 1 well of a 12-well plate and incubated overnight in 1 ml of growth medium containing 5 U/ml agarase. After overnight incubation, the majority of actively dividing cells had outgrown microdrops. 1 ml of fresh medium was added to the well and cells were incubated for an additional 5 days. The second round of the microdrop isotype detection and isolation assay was performed by encapsulating 1x10<sup>6</sup> cells using single cell encapsulation conditions. 24.6% of occupied microdrops contained mIgG secreting cells. The sub-population of microdrops with the highest fluorescence (3.5%) were isolated by FACS.sub-population After overnight incubation in the

WO 02/097122

PCT/US02/16783

presence of 5U/ml of agarase, sorted cells were resuspended in complete medium and cloned by plating out in ten 96-well plates at a density of 1 cell/well. In two weeks, of 960 wells tested, 785 (81.7%) were scored positive by supernatant mIgG isotype ELISA.

[204] To demonstrate detection of in vitro induced isotype switching, CRL-8018 hybridoma cells were grown for 5 days in complete medium containing 100 nM of retinoic acid. The presence of isotype switched cells was determined using IsoStrip™, which has a 0.1 µg/ml detection limit. For wells containing less than 0.1 µg/ml mIgG, multiple cell encapsulation was performed. For wells containing greater than 0.1 µg/ml mIgG, conventional single cell encapsulation was performed. Multiple cell encapsulation using  $25 \times 10^6$  cells resulted in ~55% microdrops occupancy, with a mean cell number of 2.5 cells/microdrop. 0.09% positive events were detected, and isolated cells subjected to a second round of encapsulation. 36.4% positive events were detected, and the sub-population exhibiting the highest mean fluorescence (2.9%) was isolated. For single cell encapsulation,  $2 \times 10^6$  cells from mIgG-positive wells were used. CelMix

[205] **Table 8. Flow cytometric results of the microdrop isotype capture and isolation assays for detecting and sorting small sub-populations of mIgG-switched mIgM secreting CRL-8018 hybridoma cells.**

	Total number of encapsulated cells	Mean number of cells per GMD	Detection of mIgG secreting cells using FACS				
			The first round of FACS (all positive GMDs were sorted)		Sequential second round of FACS of single occupied GMDs		
			% positive events detected	FITC MFI	% positive events detected	FITC MFI	Sorted GMDs MFI (% pos)
Spontaneous isotype switch	$75 \times 10^6$	9.0	0.02%	8.25	24.6%	12.7	83.4 (3.5%)
<i>In-vitro</i> induced isotype switch (retinoic acid at 100 nM)	$25 \times 10^6$ mIgG >0.1 µg/ml	2.5	0.09%	17.93	36.4%	11.3	75.2 (2.9%)
	$2 \times 10^6$ mIgG <0.1 µg/ml	1	0.15%	320.65	—	—	—

[206] **Determination of Antigen Specificity of Isotype-switched Cells Isolated Using the microdrop-based Assay** To demonstrate antigen specificity of isotype switched cells isolated using the microdrop-based assay format, we used supernate ELISA-based mouse MonoAb ID kit (Zymed Laboratories). After coating 96-well plates with HBsAg (10 µg/ml),

WO 02/097122

PCT/US02/16783

the procedure was performed according to the manufacturer's recommendations to determine isotype subclasses of antigen specific antibody: mIgG1 ( $\gamma_1$  chain specific), mIgG2a ( $\gamma_{2a}$  chain specific), mIgG2b ( $\gamma_{2b}$  chain specific), mIgG3 ( $\gamma_3$  chain specific), mIgA ( $\alpha$  chain specific), mIgM ( $\mu$  chain specific), mouse kappa light chain specific, and mouse lambda light chain specific. We tested supernates of CRL-8018 hybridoma cells grown in complete medium and switched cells isolated after *in-vitro* induction with retinoic acid (100 nM), mIgM ( $\kappa$  chain specific) and mIgG1, and both specific for human hepatitis B surface antigen (HBsAg) were detected, respectively. This demonstrates that isotype switched variants had the same antigen specificity as the original hybridoma cell line.

**[207] Bibliography**

- [208] 1. Opal, Chest, 117(4):1162-1172. 2000.
- [209] 2. Bakhtiet, Clin Diag Lab Immunol, 6(3):415-419. 1999.
- [210] 3. Lin, . Betaseron. In: Characterization of Biotechnology Pharmaceutical Products. Brown, et al. (eds), Dev Biol Stand. Basel, Karger, 96:97-104. 1998.
- [211] 4. Baiter, Science, 286:205-206. 1995.
- [212] 5. Clerici J Clin Invest, 91:759-765. 1993.
- [213] 6. Klein AIDS, 11:1111-1118. 1997.
- [214] 7. Collins Cytometry, 33:249-255. 1998.
- [215] 8. Van den Berg, Transpl Int, 11(suppl 1):S318-S321. 1998.
- [216] 9. Smith, Immunol Rev, 51:337-357. 1980.
- [217] 10. Abbas, Nature, 383:787-793. 1996.
- [218] 11. Maino, Clinical Immunol Newsletter, 16(6):95-98. 1996.
- [219] 12. Paul, Cell, 76:241-251. 1994.
- [220] 13. Mosmann J Immunol, 136:2348-2357. 1986.
- [221] 14. Mosmann, Immunol Today, 17:138-146. 1996.
- [222] 15. Powrie, Immunol Today, 14:270-274. 1993.
- [223] 16. Sher, A. and Coffman, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. Ann Rev Immunol, 10:385-394. 1992.
- [224] 17. Weaver, J.C. Gel microdroplets for microbial measurement and screening: basic principles. Biotech. and Bioengr. Symp. 17:185-195, 1986.
- [225] 18. Weaver, J.C., Williams, G.B., Klibanov, A. and Demain, A.L. Gel microdrops: rapid detection and enumeration of individual microorganisms by their metabolic activity. Bio/Technology, 6:1084-1089. 1988.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

- [226] 19. Weaver, J.C., Bliss, J.G., Harrison, G.L., et al. In *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, Academic Press: San Diego, 2(3): 234-247. 1991.
- [227] 20. Powell, K.T. and Weaver, J.C. Gel microdroplets and flow cytometry: rapid determination of antibody secretion by individual cells within a cell population. *Bio/Technology*, 8:333-337. 1990.
- [228] 21. Weaver, *Nature Medicine*, 3(5):583-584. 1997.
- [229] 22. Gray *J. Immunol Methods*, 182:155-163. 1995.
- [230] 23. Akselband, 34<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Microbiology, Worcester, Massachusetts, October 1999, 26-28.
- [231] 24. Goguen, *Nature*, 363:189-90. 1993.
- [232] 25. Nguyen, *Cytometry*, 21:111-119, 1995.
- [233] 26. Ryan, *J. Clin. Microbiol.*, 33:1720-26, 1995.
- [234] 27. Weaver, In *Flow cytometry applications in animal cell culture*, Eds. Al-Rubeai and Emery, Marcel Dekker, New York, NY, 39-62, 1995.
- [235] 28. Kenny, *Bio/Technology*, 13:787-790, 1995.
- [236] 29. Gift, *Nat. Biotech.*, 14:884-887, 1996.
- [237] 30. Trnovsky *Am. J. Hum. Genetics*, 59, 4, A135, 1996.
- [238] 31. Ferrante Susceptibility testing and screening using a gel microdrop (GMD) based assay. Society for Industrial Microbiology, Northeast Branch, March 1997.
- [239] 32. Weaver In *ASM Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> edition, Eds. Demain AL and Davis JE, Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, pp. 114-118, 1999.
- [240] 33. Gift, *Cytometry* 39:243-249, 2000.
- [241] 34. Hammill *Cytotechnology*, 34:27-37. 2000.
- [242] 35. Wadhwa In: *Cytokines. A Practical Approach*. pp.309-330. F. R. Balkwill (ed), IRL PRESS at Oxford University Press. Oxford, NY. 1991.
- [243] 36. Crowther, *Methods Mol Biol*, 42:1-223. 1995.
- [244] 37. Ogata, A *J Immunol Methods*, 148:15-21. 1992.
- [245] 38. Shankar, ELISA. *J Immunol*, 18(4):371-388. 1997.
- [246] 39. Carson, *J Immunol Methods*, 227:41-52. 1999.
- [247] 40. Naylor, In: *Cytokines. A Practical Approach*. pp.31-50. F.R.Balkwill (ed), IRL PRESS at Oxford University Press. Oxford, NY. 1991.
- [248] 41. Brenner, In: *Cytokines. A Practical Approach*. pp.51-59. F.R.Balkwill (ed), IRL PRESS at Oxford University Press. Oxford, NY. 1991.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

- [249] 42. Naylor, In: Balkwill R.F. (ed). Cytokines. A Practical Approach. Oxford Univ. Press, Oxford, p.35. 1995.
- [250] 43. Carter, Curr Opin Immunol, 9:177-182. 1997.
- [251] 44. Maino, Cytometry, 34:207-215. 1998.
- [252] 45. Sun J Immunol Methods, 212:89-98. 1998.
- [253] 46. Openshaw J Exp Med, 182:1357-1367. 1995.
- [254] 47. Jung, J Immunol Methods, 159:197-207. 1993.
- [255] 48. Prussin, J Immunol Methods, 188:117-128. 1995.
- [256] 49. Manz, Immunology, 92:1921-1925. 1995.
- [257] 50. Holmes, J Immunol Methods, 230:141-147. 1999.
- [258] 51. Brosterhus, Eur J Immunol, 29:4053-4059. 1999.
- [259] 52. Scheffold, Eur Cytokine Netw, 9 (suppl 3): 5-11. 1998.
- [260] 53. Akdis, Immunol Methods, 182:251-261. 1995.
- [261] 54. Akdi, Eur J Immunol, 27:2351-2357. 1997.
- [262] 55. Londei, In: Cytokines. A Practical Approach. pp.151-169. F.R.Balkwill (ed), IRL PRESS at Oxford University Press, Oxford, NY. 1991.
- [263] 56. Brosterhus Eur J Immunol, 29(12):4053-4059. 1999.
- [264] 57. Waldrop, J Immunol, 161(10):5284-5295. 1998.
- [265] 58. Zandstra Proc Natl Acad Sci USA, 94:4698-4703. 1997.
- [266] 59. Petzer, J Exp Med, 183:2551-2558. 1996.
- [267] 60. Perfetto Cytometry, 30:1-9. 1997.
- [268] 61. Waldrop J Clin Invest, 99:1739-1741. 1997.
- [269] 62. Maino Cytometry, 20:127-133. 1995.
- [270] 63. Sedar, J Exp Med, 176:1091-1098. 1992.
- [271] 64. Hsieh, Proc Natl Acad Sci USA, 89:6065-6069. 1992.
- [272] 65. Hsieh Proc Natl Acad Sci USA, 90:10188-10192. 1993.
- [273] 67. Dinarello, J Exp Med, 163:1433-1450. 1986.
- [274] 68. Dinarello, C.A. Biology of interleukin 1. FASEB J 2:108-115. 1988.
- [275] 69. Okusawa J Clin Invest, 81:1162-1172. 1998.
- [276] 70. Hesse, Surg Gynecol Obstet, 166:147-153. 1988.
- [277] 71. Moser, J Clin Invest, 83:444-455. 1989.
- [278] 72. Allison, In Aggarwal. B., Puri, K.K. (eds). Human cytokines: their role in disease and therapy. Blackwell Science, pp. 689-713. 1995.
- [279] 73. Eaves, Blood, 80:67a. 1992.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

- [280] 74. Ogawa, Blood, 81:2844-2853. 1993.
- [281] 75. Mercken J Immunol Methods, 138:173-180. 1991.
- [282] 76. Boot, J Immunol Methods, 106:195-202. 1988.
- [283] 77. Muller, J Immunol, 131(2):877-881. 1983.
- [284] 78. Kenney, J Immunol Methods. Jul 26;121(2):157-66. 1989
- [285] 79. Borrebaeck, Trends Biotechnol 1986, 4, 147.
- [286] 80. Stavnezer, J. Science, 228:984-985. 2000.
- [287] 81. Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual. (eds. Harlow E., Lane D.) Cold Spring Harbor Laboratory, pp242 1988.
- [288] 82. Spira, Clin Exp Immunol. 105(3):436-42. 1996
- [289] 83. Spira, Methods of Hybridoma Formation (eds. Bartal A.H., Hirshaut Y) Humana Press, pp 385-391. 1987.
- [290] 84. Pluschke, Eur J Immunol. 17(3):413-6. 1987
- [291] 86. Weave, Nature Medicine. 3(5):583-585, 1997.
- [292] 87. Powell Bio/Technology, 8:333-337, 1990.
- [293] 88. Kenny,. Bio/Technology, 13:787-790, 1995.
- [294] 89. Weaver, In Methods: a companion to methods in enzymology, Academic Press, San Diego, 2(3):234-247, 1991.
- [295] 90. Weaver, In Flow cytometry applications in animal cell culture, Eds. Al-Rubeai and Emery, Marcel Dekker, New York, NY, 39-62, 1995.
- [296] 91. Gray J. Imm. Meth., 182:155-163, 1995.
- [297] 92. Hammill, Cytotechnology, 34:27-37. 2000.
- [298] 93. Lin, M. and Chen, Y. B cell differentiation. II. Isotype potential of a single B cell. Cell Immunol, 150:343-352. 1993.
- [299] All publications and patent applications cited above are incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be so incorporated by reference. Although the present invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity and understanding, it will be apparent that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claims. Unless otherwise apparent from the context is apparent that the elements, steps, features and embodiments of the invention described in this application can be used in all combinations with each other.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

WHAT IS CLAIMED IS

1. A method of analyzing a secreted protein, comprising:  
encapsulating a cell in a microdrop wherein the microdrop comprises matrix component molecules, first biotin molecules linked to the matrix component molecules, capture molecules with affinity for a molecule secreted by the cell linked to second biotin molecules, and streptavidin linking the first and second biotin molecules, the first biotin molecules and the matrix component molecules being in a molar ratio of less than 0.85 moles biotin per mole matrix component molecules, wherein the molecule is secreted from the cell and binds to the capture molecules thereby being retained within the microdrop; and detecting the secreted molecule.
2. The method of claim 1, wherein the molar ratio is 0.01 to 0.2.
3. The method of claim 1, wherein the molar ratio is 0.02 to 0.2.
4. The method of claim 1, wherein the concentration of the first biotin molecules in the microdrop is less than or equal to 42 micromolar.
5. The method of claim 1, wherein the encapsulating step encapsulates a plurality of cells in the microdrop.
6. The method of claim 1, wherein the encapsulating step encapsulates a single cell in the microdrop.
7. The method of claim 1, wherein the secreted molecule is a protein, hormone, or carbohydrate.
8. The method of claim 1, wherein the secreted molecule is a protein.
9. The method of claim 1, wherein the streptavidin and capture molecules are encapsulated into the microdrops at the same time as the cell.
10. The method of claim 1 wherein the streptavidin and captured molecules are incorporated into the microdrop after the encapsulating step.



WO 02/097122

PCT/US02/16783

11. The method of claim 1, wherein the microdrop further comprises second capture molecules with affinity for a second secreted molecule, the second capture molecules being linked to additional copies of the second biotin molecules.

12. The method of claim 11, wherein the cell secretes the second molecule.

13. The method of claim 1, wherein the detecting step is performed by contacting the microdrop with a detection reagent having specific affinity for the secreted molecule, and detecting binding of the detection reagent to the secreted molecule.

14. The method of claim 13, wherein the cell is a T-cell or a B-cell and the detection reagent is an antigen that specifically binds to the T-cell or B-cell.

15. The method of claim 13, wherein the detection reagent is labelled.

16. The method of claim 15, wherein a signal of the labelled detection reagent bound to the secreted molecule is proportional to the number of copies of the secreted molecule within the microdrop.

17. The method of claim 13, wherein the detection reagent is fluorescently labelled.

18. The method of claim 13, wherein the detection reagent is labelled with an enzyme that generates a product that is detected with a secondary detection reagent.

19. The method of claim 13, wherein the detecting step is performed by contacting the microdrop with a first detection reagent having specific affinity for the secreted molecule and a second detection reagent having specific affinity for the second secreted molecule, wherein the first and second detection reagents are differentially labelled.

20. The method of claim 12, wherein the cell secretes a third secreted molecule, and the microdrop further comprises third capture molecules with affinity for the third secreted molecule, the third capture molecules being linked to additional copies of the second

WO 02/097122

PCT/US02/16783

biotin molecules, and the method further comprises contacting the microdrop with first, second, third and fourth detection reagents having specific affinity for the secreted molecule, the second secreted molecule, the third secreted molecule and a cell surface marker respectively, and the detecting step detects the secreted protein, the second secreted protein, the third secreted protein and the cell surface marker.

21. The method of claim 13, wherein the detection step is performed by contacting the microdrop with a first detection reagent having affinity for the secreted molecule and a second detection reagent having affinity for a cell surface marker, and the first and second detection reagents are differentially labelled.

22. The method of claim 21, wherein the detection reagent and the capture molecules specifically bind to different epitopes on the secreted molecule.

23. The method of claim 13, wherein more than one secreted protein and/or surface marker are detected simultaneously.

24. The method of claim 1, wherein the detecting step is performed by flow cytometry.

25. The method of claim 1, wherein the detecting step is performed by microscopy.

26. The method of claim 1, wherein the matrix component is agarose.

27. The method of claim 3, wherein the secreted protein is an antibody.

28. The method of claim 3, wherein the secreted protein is an antibody of IgG isotype and the capture molecules are antibodies specific for the IgG isotype.

29. The method of claim 3, wherein the secreted protein is a cytokine.

30. The method of claim 1, further comprising inducing the cell to secrete the secreted molecule.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

31. The method of claim 30, wherein the inducing is performed after the encapsulating step.
32. The method of claims 30, wherein the inducing is performed before the encapsulating step.
33. The method of claim 8, wherein the cell comprises a vector comprising a nucleic acid segment encoding the secreted protein, the segment being operably linked to one or more regulatory DNA segments that effect expression of the secreted protein.
34. The method of claim 30, wherein the secreted protein is naturally secreted by the cell
35. The method of claim 1, wherein the analyzing step is performed using flow cytometry.
36. The method of claim 1, wherein the analyzing step is performed using microscopy.
37. The method of claim 1, further comprising propagating the cell to form a cell line after the detecting step.
38. The method of claim 37, wherein the cell was obtained from a patient
39. The method of claim 38, wherein the cell is a cytotoxic T-cell.
40. The method of claim 37, further comprising introducing a population of cells resulting from propagating the cell into the patient.
41. The method of claim 37, wherein the cell is a stem cell.
42. The method of claim 37, wherein the patient is suffering from an autoimmune disease and the cell is a Th2 cell.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

43. The method of claim 37, wherein the cell is an islet cell secreting insulin and the patient is in a prodromal period prior to onset of clinical symptoms.

44. The method of claim 43, wherein the method further comprises treating the cell with IL-10 during the propagating step.

45. The method of claim 1, further comprising separating the cell from other cells using a cell sorter based on a fluorescent signal resulting from specific binding of fluorescently labelled detection reagents to secreted molecules and/or surface markers.

46. The method of claim 8, wherein the cell secretes first and second proteins, and the matrix comprises first and second capture molecules with affinity for the first and second proteins respectively, and the analyzing step comprises contacting the cell with first and second detection reagents that specifically bind to the first and second secreted proteins, and detecting the first and second proteins from signal of the first and second detecting reagents bound to the first and second secreted proteins.

47. A method of analyzing a population of cells, comprising  
encapsulating a population of cells in microdrops;  
contacting the cells with a first detection reagent for a first marker, and a  
second detection reagent for a second marker, wherein the first marker is a secreted protein  
and the second marker is a cell surface protein or a second secreted protein;  
detecting cells having both the first and second markers.

48. The method of claim 47, wherein at least some microdrops encapsulate single cells.

49. The method of claim 47, further comprising separating the microdrops encapsulating the cells from unoccupied microdrops on a Percoll, polysucrose, sodium diatrizoate, or iodixanol gradient.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

50. The method of claim 47, further comprising forming an array of microdrops encapsulating the cells attached to a solid support, and wherein the detecting is performed using a scanning fluorescent, colorimetric, or chemiluminescent detector.

51. The method of claim 50, further comprising retrieving a microdrop microdrop of interest from the solid support by physical retrieval.

52. The method of claim 51, wherein the physical retrieval is performed by micromanipulation.

53. The method of claim 47, further comprising contacting the microdrops encapsulating cells with an agent, and wherein the detecting indicates whether the agent affects the level of the secreted protein.

54. The method of claim 47, further comprising contacting the cell with an agent to stimulate secretion before the encapsulating step.

55. The method of claim 47, wherein the encapsulated cells are population of cells from a patient and the agent is a different population of cells from the patient.

56. The method of claim 47, wherein the sub-population of cells is isolated by binding of fluorescently labelled antibody to a cell surface marker, and detection of the fluorescent signal.

57. The method of claim 47, wherein the population of cells are obtained from a patient and the presence of the cells having both the first and second markers indicates an immune status of the patient.

58. The method of claim 47, further comprising propagating the cells having the first and second markers, and administering the propagated cells to a patient.

59. The method of claim 47, wherein the cells are antigen-specific T-cells.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

60. The method of claim 47, wherein the first and second markers are selected from the group consisting of IL-4, IL-10, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ .
61. The method of claim 47, wherein the first and second particular proteins are selected from the group consisting of IL-10 and IL-12.
62. The method of claim 47, wherein the identified cells are Th1 cells.
63. The method of claim 47, wherein the identified cells are Th2 cells.
64. The method of claim 47, wherein second marker is a cell surface marker of T-cell differentiation.
65. The method of claim 47, wherein one of the markers is CD4
66. The method of claim 47, wherein one of the markers is CD8.
67. A method of analyzing a population of cells, comprising:  
encapsulating a population of cells expressing proteins in microdrops, and wherein the microdrops comprise matrix component molecules, first biotin molecules linked to matrix component molecules, at least first capture molecules having affinity for an epitope in at least one type of secreted protein; the first capture molecules being linked to second biotin molecules, and streptavidin, linking the first and second biotin molecules; whereby proteins are secreted from the cells and proteins having affinity for the first capture molecules are captured within the microdrops;  
analyzing the secreted proteins within the microdrops.
68. The method of claim 67, wherein the analyzing step is performed by flow cytometry or scanning microscopy.
69. The method of claim 67, wherein at least some of the microdrops encapsulate a single cell.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

70. The method of claim 67, wherein the cells secrete the same protein at different levels, and the analyzing step compares the levels.

71. The method of claim 67, wherein the cells secrete different proteins, and the analyzing step detecting a cell secreting a particular protein.

72. The method of claim 67, wherein the population of cells was obtained from the patient, and the analyzing identifies a sub-population of cytotoxic T-cells and the method further comprises reintroducing the population of cells without the sub-population of cells into the patient.

73. The method of claim 67, wherein the patient is suffering from or susceptible to an autoimmune disease, graft versus host disease or host versus graft disease.

74. The method of claim 67, further comprising treating the population of cells without the sub-population of cells with IL-10 before the reintroducing step.

75. A population of microdrops encapsulating cells, and the microdrops comprise matrix component molecules, first biotin molecules linked to the matrix component molecules, capture molecules with affinity for a protein secreted by the cell linked to second biotin molecules, and streptavidin linking the first and second biotin molecules, the first biotin molecules and the matrix molecules being in a molar ratio of less than 0.85 moles biotin per mole matrix component molecules.

76. The population of claim 75, wherein the molar ratio is 0.02 to 0.2.

77. The population of claim 75, wherein the molar ratio is 0.01-0.2.

78. The population of claim 75, wherein the concentration of biotin does not exceed  $42 \text{ M}$

79. The population of claim 75, in which at least some microdrops encapsulate a single cell.

WO 02/097122

PCT/US02/16783

80. The population of claim 75, wherein the molar ratio of matrix component molecules and first biotin molecules is from 0.05 to 0.2 moles biotin per mole agarose.

81. In a method of analyzing a protein secreted by a cell in which the cell is encapsulated with a microdrop comprising biotinylated agarose the improvement wherein the molar ratio of biotin to agarose is less than 0.85 moles biotin per mole agarose.

82. the method of claim 81, wherein the molar ratio is 0.01 to 0.2.

83. A method of analyzing a secreted protein, comprising:  
encapsulating a cell in a microdrop wherein the microdrop comprises matrix component molecules,  $\text{Ni}^{2+}$ NTA linked to the matrix component molecules, capture molecules with affinity for a molecule secreted by the cell linked to a hexahistidine tag, wherein the molecule is secreted from the cell and binds to the capture molecules thereby being retained within the microdrop;  
contacting the cell with a detection reagent that specifically binds to the secreted molecule wherein the detection reagent.

84. A method of analyzing a secreted protein, comprising:  
encapsulating a cell in a microdrop wherein the microdrop comprises matrix component molecules linked to biotin, streptavidin linked to  $\text{Ni}^{2+}$  and capture molecules with affinity for a molecule secreted by the cell linked to a hexahistidine tag, wherein the molecule is secreted from the cell and binds to the capture molecules thereby being retained within the microdrop;  
contacting the cell with a detection reagent that binds to the secreted molecule wherein the detection reagent.

85. A method of preparing an antibody of IgG isotype, comprising;  
culturing a population of cells secreting antibodies of IgM isotype under conditions whereby one or more of the cells can undergo isotype switching to IgG isotype;  
encapsulating the population of cells in microdrops including a capture reagent specific for antibodies of IgG isotype, whereby microdrops containing a cell secreting an antibody of IgG isotype capture the secreted antibody of IgG isotype within the cells;



WO 02/097122

PCT/US02/16783

detecting one or more microdrops containing a cell secreting an antibody of IgG isotype.

86. The method of claim 85, wherein the cells are cultured in the presence of an agent that stimulates isotype switching.

87. The method of claim 85, wherein the capture reagent is an antibody to the IgG isotype.

88. The method of claim 85, wherein the detecting comprises contacting the microdrops with a detection reagent that specifically binds to the captured antibody at a different site than the capture reagent.

89. The method of claim 85, wherein the detection reagent is an anti-idiotypic antibody.

90. The method of claim 85, wherein the anti-idiotypic antibody is fluorescently labelled.

91. The method of claim 85, further comprising isolating the microdrop that has captured the cell secreting the IgG antibody;

92. The method of claim 85, wherein the population of cells are encapsulated in microdrops such that at least some microdrops encapsulate a plurality of cells; and the method isolates a microdrop that has captured a plurality of cells, one or more of which secretes IgG antibody.

93. The method of claim 85, further comprising isolating the plurality of cells.

94. The method of claim 93, further comprising encapsulating the plurality of cells in microdrops under conditions whereby at least some microdrops encapsulate a single one of the plurality of cells, wherein the microdrops include a capture reagent specific for antibodies of IgG isotype, whereby microdrops containing a cell secreting an antibody of IgG isotype capture the secreted antibody within the microdrops;

WO 02/097122

PCT/US02/16783

detecting one or more microdrops containing a cell secreting an antibody of IgG isotype.

95. The method of claim 85, wherein the capture molecules are antigen molecules that specifically bind to the secreted antibody of IgG isotype.

96. A method of screening a population of cells for a sub-population having a desired property, comprising

- (a) encapsulating the population of cells in microdrops at a first ratio of average number of cells per occupied by microdrop;
- (b) screening the encapsulated cells to identify a first sub-population of microdrops encapsulating cells having the desired property;
- (c) isolating the cells from the microdrops resulting from the screening step;
- (d) encapsulating the cells from the screening step at a second ratio of average number of cells per occupied microdrop, the second ratio being smaller than the first ratio;
- (e) screening the encapsulated cells to identify a second sub-population of microdrops encapsulating cells having the desired property.

97. The method of claim 96, further comprising repeating steps (c)-(e) at a further ratio of average number of cells per occupied microdrops to isolate a further sub-population of microdrops.

98. The method of claim 96, further comprising isolating a microdrop encapsulating a single cell from the second sub-population.

99. The method of claim 96, wherein the sub-population of cells having the desired property is less than 0.01% of the population of cells before the method is performed.

100. A kit for making microdrops, comprising of  
matrix component molecules linked to biotin, in a molar ratio of biotin to matrix molecules of less than 0.85 moles biotin per mole matrix component molecules

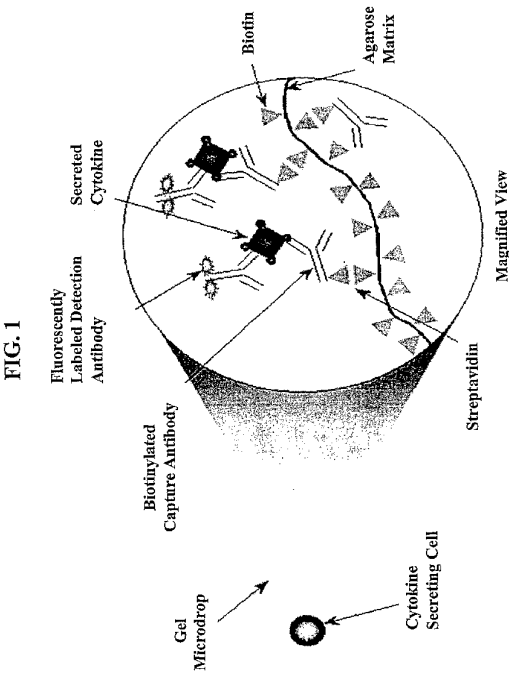
WO 02/097122

PCT/US02/16783

101. The kit of claim 100, wherein the molar ratio is 0.01 to 0.2 moles biotin to moles matrix component molecules.
102. The kit of claim 100, wherein the concentration of first biotin molecules in the microdrop is less than or equal to 42 micromolar.
103. The kit of claim 100, wherein the matrix molecules are agarose.
104. The kit of claim 100, further comprising instructions for using the kit to make microdrops.
105. The kit of claim 100, further comprising streptavidin and capture molecules linked to second biotin molecules, and reporter molecules for both secreted proteins and cell surface markers, and assay control reagents
106. A kit for detecting an antibody of IgG isotype, comprising  
biotinylated matrix molecules  
a capture molecule that specifically binds to the isotypic region of an IgG antibody;  
a detection molecule that specifically binds to the IgG antibody at a different site than the capture molecule.

WO 02/097122

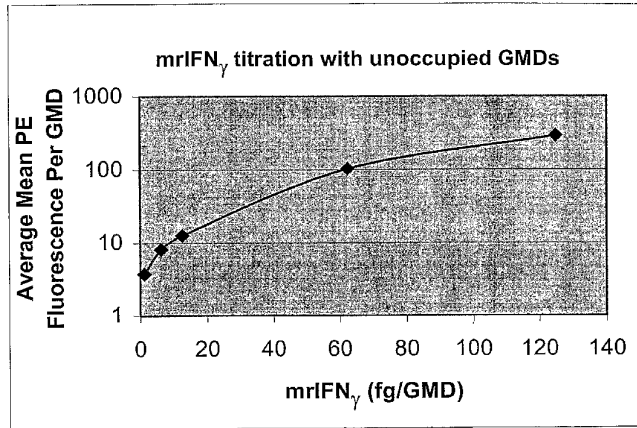
PCT/US02/16783

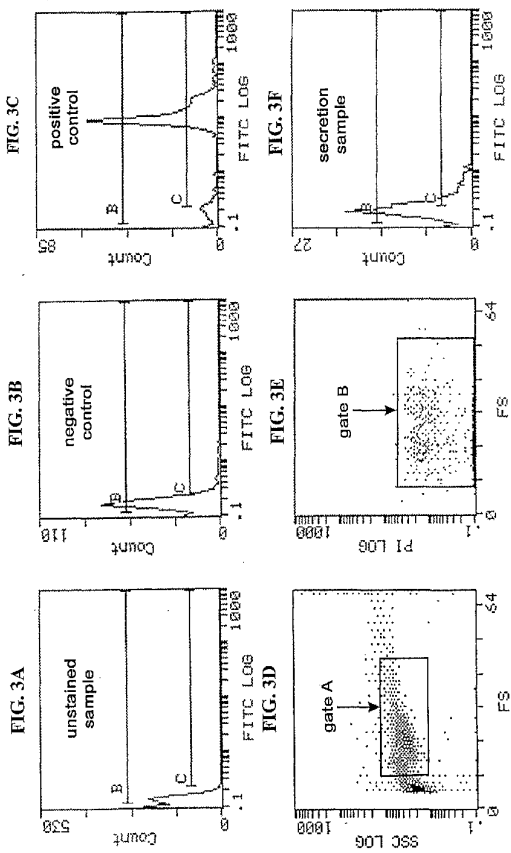


WO 02/097122

PCT/US02/16783

FIG. 2

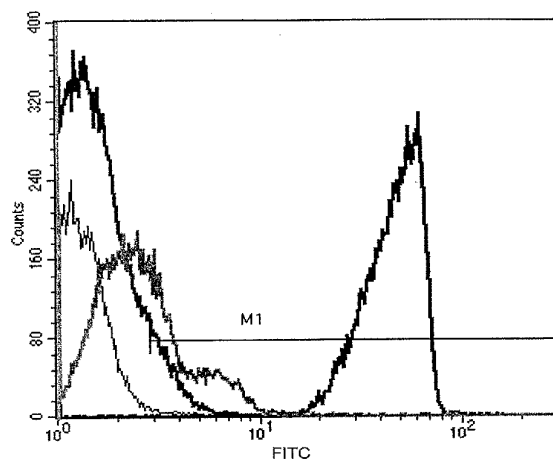




WO 02/097122

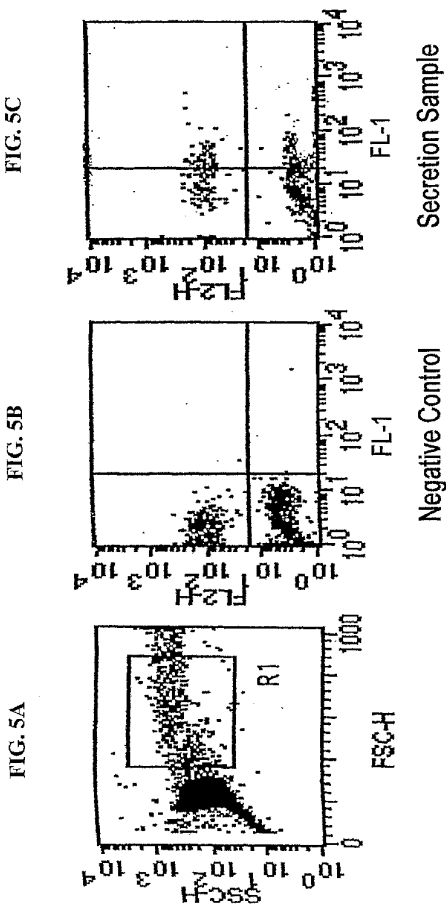
PCT/US02/16783

FIG. 4



WO 02/097122

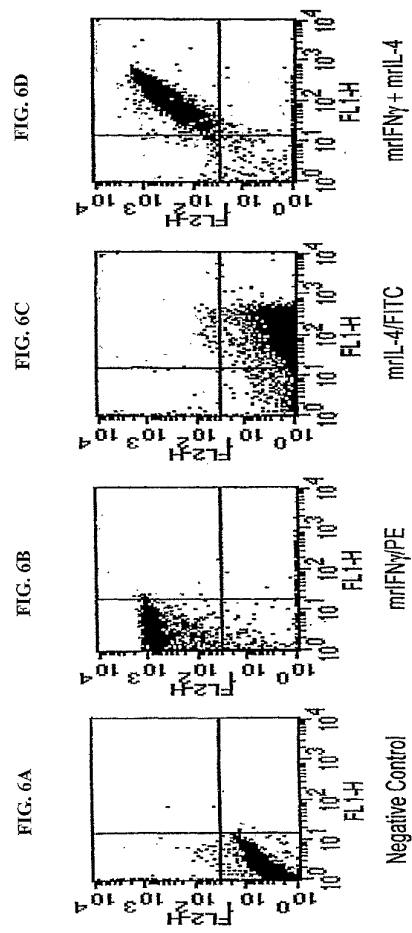
PCT/US02/16783





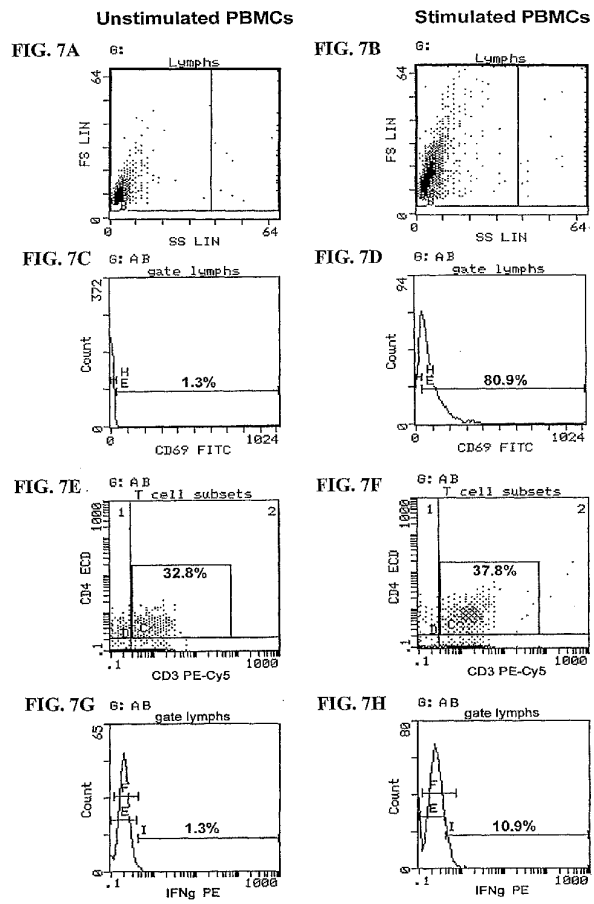
WO 02/097122

PCT/US02/16783



WO 02/097122

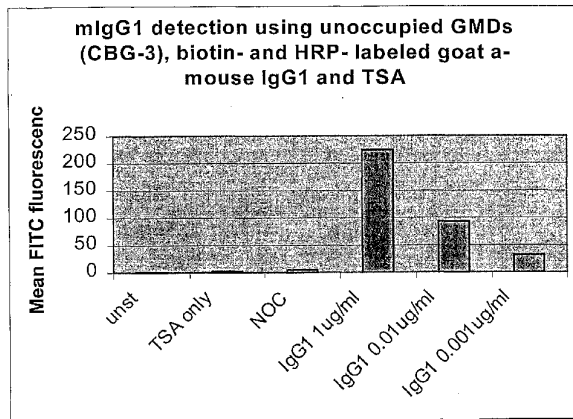
PCT/US02/16783



WO 02/097122

PCT/US02/16783

FIG. 8



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/16783
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C12Q 1/02, 1/24 US CL : 436/535 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/63, 501, 526, 528, 530, 532, 535, 543, 829; 435/7.1, 7.2, 29, 30, 32, 34, 39, 177, 182, 243, 442 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4,959,301 A (WEAVER et al.) 25 September 1990 (25.09.1990), see entire document	1-84, 96-105
Y	US 5,225,332 A (WEAVER et al.) 06 July 1993 (06.07.1993), see entire document, especially columns 30-42.	1-84, 96-105
Y	US 5,888,728 A (OLSON et al.) 30 March 1999 (30.03.1999), see entire document, especially columns 4-5.	1-106
Y	DATABASE MEDLINE, ACC. NO. 93055465. HADAS ET AL., rapid and sensitive heterogeneous immunoelectrochemical assay using disposable electrodes. Journal of Immunocassay. 1992. Vol. 13, No. 2, pages 251-252, abstract.	1-106
Y	DATABASE MEDLINE, ACC. NO. 95310745. GRAY ET AL., Secretion capture and report web: use of affinity derivatized agarose microdroplets for the selection of hybridoma cells. Journal of Immunological Methods. June 1995. Vol. 182, No. 2, pages 155-163, abstract.	85-95, 106
Y	US 4,801,529 A (PERLMAN) 31 January 1989 (31.01.1989), see entire document.	1-74, 83-84, 96-99
A	US 6,309,883 B1 (MINSHULL et al.) 30 October 2001 (30.10.2001), see entire document.	1-106
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 July 2002 (15.07.2002)		19 SEP 2002
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20031 Facsimile No. (703)305-3330		Authorized officer Valerie Bell-Harris for Guilene R. Gabel Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

International application No.  
PCT/US02/16783

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,174,673 B1 (SHORT et al.) 16 January 2001 (16.01.2001), see entire document.	1-106

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジェスパークセン ダイアナ  
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 マルヴァーン スイート 20 グレイト バレー パーク  
ウェイ 1 ニューロニクス インコーポレイテッド

(72)発明者 アクセルバンド エフゲーニャ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブライトン アpartment 2 レイク ショア ロー  
ド 181

(72)発明者 マクグラス パトリシア  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ インマン ストリート 39

(72)発明者 トルノフスキ ヤン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ソーガス ウォールデン アベニュー 57

(72)発明者 モーン フィリップ ティー . ジュニア  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 フォックスバロ グラニット ストリート 114

Fターム(参考) 4B063 QA05 QA19 QQ08 QQ79 QQ91 QR48 QR56 QR83 QS24 QS32  
QS39 QX01  
4B064 AG27 CA10 CA50 CG21 DA01 DA13

专利名称(译)	通过包封细胞分泌蛋白质		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004528574A</a>	公开(公告)日	2004-09-16
申请号	JP2003500287	申请日	2002-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	一个单元系统公司		
申请(专利权)人(译)	一个单元系统公司		
[标]发明人	ジェスパークセンダイアナ アクセルバンドエフゲーニャ マクグラスパトリシア トルノフスキヤン モーンフィリップティージュニア		
发明人	ジェスパークセン ダイアナ アクセルバンド エフゲーニャ マクグラス パトリシア トルノフスキ ヤン モーン フィリップ ティー. ジュニア		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/00 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/567 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5432 C07K16/00 C07K2317/52 G01N33/5436 G01N33/56966 G01N33/56972 Y10S436/823		
FI分类号	G01N33/53.D C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/566		
F-TERM分类号	4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR83 4B063/QS24 4B063/QS32 4B063/QS39 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA50 4B064/CC21 4B064/DA01 4B064/DA13		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/293822 2001-05-26 US		
其他公开文献	JP2004528574A5 JP4194934B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

# 摘要(译)

本发明提供了从包封在微滴中的细胞中分析分泌蛋白的方法。与先前的制剂相比，微滴用生物素化的基质分子配制，生物素与基质分子的比例降低。降低的比例有利于提高检测分辨率并允许同时检测多种分泌蛋白和/或多种细胞表面标志物。本发明进一步提供了分离已从IgM同种型转换的IgG同种型抗体的方法。

