

(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2016-506494

(P2016-506494A)

(43) 公表日 平成28年3月3日(2016.3.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 K	4 B O 6 3
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 9 7	
G O 1 N 15/14 (2006.01)	G O 1 N 15/14 C	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2015-544496 (P2015-544496)	(71) 出願人	513064405 ロフィアス バイオサイエンス ゲゼル ルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング ドイツ連邦共和国 93053 レーゲン スブルク ヨゼフ・エンゲルト・シュトラ ーセ 13 ビオパルク ドリット
(86) (22) 出願日	平成25年12月2日 (2013.12.2)	(74) 代理人	100092093 弁理士 辻居 幸一
(85) 翻訳文提出日	平成27年5月27日 (2015.5.27)	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 禎男
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/075253	(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(87) 国際公開番号	W02014/083201	(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治
(87) 国際公開日	平成26年6月5日 (2014.6.5)		
(31) 優先権主張番号	12195029.9		
(32) 優先日	平成24年11月30日 (2012.11.30)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アロ反応性T細胞のフローサイトメトリー検出を利用した、ドナーとレシピエントとの間の適合性の決定法

(57) 【要約】

アロ反応性T細胞のフローサイトメトリー検出を利用した、ドナーとレシピエントとの間の適合性を決定する方法であって、以下の工程：a) 分析すべきドナー/レシピエントペアから得られた一方の血液サンプルに標識を添加する工程であって、以下では前記サンプルを標識サンプルと呼び、この標識は、レシピエントに由来するサンプルと区別するために適しており、分析すべきドナー/レシピエントペアから得られた他方の血液サンプルを、以下では非標識サンプルと呼ぶ工程、b) 両方のサンプルを、第1の培地で少なくとも1回希釈し、サンプルの細胞成分を液相から分離する工程、c) 細胞成分、特に同一体積の、標識サンプルの血液サンプル残渣、非標識サンプルの血液サンプル残渣を第2の培地にそれぞれ別々に再取込みする工程、d) 非標識サンプルからの一部と標識サンプルの一部とを、特におよそ1:1の比率で混合して、混合物を得る工程、e) 請求項1の工程d)に記載される、標識サンプルと非標識サンプルとからなる混合物中で、抗CD28抗体、または抗CD28抗体と抗CD49d抗体の添加により抗原提示細胞(A

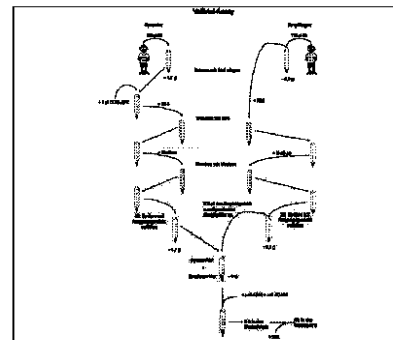


Fig. 1

Verfahren zur Bestimmung der Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger
 Spender Blut + Empfänger Blut
 500 µl vs 500 µl whole blood
 700 µl vs 700 µl whole blood
 Falcon 18 Blut wägen Weight Falcone containing blood
 Waschen mit FACS Washing using FACS
 Waschen mit Medium Washing using medium
 Mit Medium auf Ausgangsgewichte auffüllen Fill with med um to initial weight
 500 µl von Empfängerblut zum Spenderblut überpipettieren Transfer 500 µl from the recipient
 blood to the donor blood by pipette
 Spenderblut + Empfängerblut Donor blood + recipient blood
 2 h in den Brutschrank 2 h in the incubator
 4 h in den Brutschrank 4 h in the incubator

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アロ反応性 T 細胞のフローサイトメトリー検出を利用した、ドナーとレシピエントとの間の適合性を決定する方法であって、以下の工程：

a) 分析すべきドナー / レシピエントペアから得られた一方の血液サンプルに標識を添加する工程であって、以下では前記サンプルを標識サンプルと呼び、前記標識はレシピエントに由来するサンプルを弁別するために適した標識であり、分析すべきドナー / レシピエントペアから得られた他方の血液サンプルを、以下では非標識サンプルと呼ぶ工程、
b) 両方のサンプルを、第 1 の培地で少なくとも 1 回希釈し、サンプルの細胞成分を液相から分離する工程、

c) 細胞成分、特に同一体積の、標識サンプルの血液サンプル残渣、非標識サンプルの血液サンプル残渣を第 2 の培地にそれぞれ別々に、再取込みする工程、

d) 非標識サンプルからの一部と標識サンプルの一部とを、特におよそ 1 : 1 の比率で混合して維持して、混合物を得る工程、

e) 請求項 1 の工程 d) に記載される、標識サンプルと非標識サンプルとの混合物において、抗 CD 28 抗体、または抗 CD 28 抗体と抗 CD 49 d 抗体の添加により抗原提示細胞 (APC) を刺激する工程、続いて、

f) 35 ~ 39 °C、好ましくは 37 °C の温度にて、1.5 時間 ~ 2.5 時間、好ましくは 2 時間の期間、保護ガス雰囲気、CO₂ 雰囲気下でもよく、混合物の 1 回目のインキュベーションを行う工程、

g) 分泌阻害剤を添加する工程、

h) 請求項 1 の工程 d) に由来するサンプルを混合する工程、

i) 続いて、35 ~ 39 °C、好ましくは 37 °C の温度にて、少なくとも 2.5 時間の期間、保護ガス雰囲気、CO₂ 雰囲気下で、2 回目のインキュベーションを行う工程、

j) 場合によっては赤血球を溶解する工程、

k) 例えば、標識された抗 CD 4 抗体および / または抗 CD 8 抗体による、CD 4 リンパ球または CD 8 リンパ球の標識、およびフローサイトメトリー検出を利用して、リンパ球をフローサイトメトリーにより検知する工程、

l) 細胞内サイトカインで活性化されたリンパ球および活性化マーカーを発現するリンパ球をフローサイトメトリーにより検知する工程、

m) フローサイトメトリー検知において以下の結果：

- a. 標識陽性 / CD 4 陽性 / CD 69 陽性 / INF - γ 陽性、
- b. 標識陰性 / CD 4 陽性 / CD 69 陽性 / INF - γ 陽性、
- c. 標識陽性 / CD 8 陽性 / CD 69 陽性 / INF - γ 陽性、
- d. 標識陰性 / CD 8 陽性 / CD 69 陽性 / INF - γ 陽性

が現れる場合、標識サンプルが得られた個体と非標識サンプルが得られた個体との間に存在するアロ反応性の存在が同定されたとする工程を含む方法。

【請求項 2】

標識が、標識された CD 45 抗体、CFD - SE、または CFSE である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

請求項 1 の工程 b) で挙げた第 1 の培地が請求項 1 の工程 c) で挙げた第 2 の培地と独立であり、第 1 の培地および第 2 の培地が、リン酸緩衝生理食塩水、RPMI からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

サンプルの細胞成分の液相からの分離が遠心分離を利用して行われる、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

分泌阻害剤が、ブレフェルジン A (BFA) またはモネシンである、請求項 1 から 4 の

10

20

30

40

50

いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

フローサイトメトリー検知に先立って添加される細胞膜透過処理剤 (Zellmembranpermeator) がサポニンである、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

サイトカインが γ -IFN である、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

活性化マーカーが CD69 である、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 の a の場合に、ドナー/レシピエントペアに由来する非標識パートナーに対するドナー/レシピエントペアの標識パートナーのアロ反応性 CD4 T 細胞が示される、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 10】

請求項 1 の b の場合に、ドナー/レシピエントペアの標識パートナーに対するドナー/レシピエントペアの非標識パートナーのアロ反応性 CD4 T 細胞が示される、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 の c の場合に、ドナー/レシピエントペアの非標識パートナーに対する、ドナー/レシピエントペアの標識パートナーのアロ反応性 CD8 T 細胞が示される、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 12】

請求項 1 の d の場合に、ドナー/レシピエントペアの標識パートナーに対する、ドナー/レシピエントペアの非標識パートナーのアロ反応性 CD8 T 細胞を示される、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

ドナー血液サンプルおよびレシピエント血液サンプルが全血に由来する、請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明の目的は、アロ反応性 T 細胞のフローサイトメトリー検出を利用した、ドナーとレシピエントとの間の適合性の決定法である。

【背景技術】

【0002】

組織または臓器の提供に対する細胞性免疫反応は、急性および慢性双方の移植片拒絶反応においても重要な役割を演じる。レシピエントにおいて提供への拒絶反応が起こるかどうかのリスクを判断することがきわめて重要である。

Urban Sester et al. は、Transplantation, Vol. 78 (4), 607-614, (2004) の中で、臨床実地で使用することを目的とした、アロ反応性 T 細胞の同定法を記載している。その際の欠点は、末梢血単核球を利用して行う比較的手間のかかる手法である。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

それゆえ、特に全血からの迅速かつ確かな適合性リスク評価を可能にするより簡単なテストを使用できることが望まれる。

【課題を解決するための手段】

【0004】

それは、本発明によると、アロ反応性 T 細胞のフローサイトメトリー検出を利用した、ドナーとレシピエントとの間の適合性の決定法により可能になる。本発明による方法は、

50

以下の工程：

a) 分析すべきドナー／レシピエントペアから得られた一方の血液サンプルに標識を添加する工程であって、以下では前記サンプルを標識サンプルと呼び、前記標識はレシピエントに由来するサンプルを弁別するために適した標識であり、分析すべきドナー／レシピエントペアから得られた他方の血液サンプルを、以下では非標識サンプルと呼ぶ工程、

b) 両方のサンプルを、第1の培地で少なくとも1回希釈し、サンプルの細胞成分を液相から分離する工程、

c) 細胞成分、特に同一体積の、標識サンプルの血液サンプル残渣、非標識サンプルの血液サンプル残渣を第2の培地にそれぞれ別々に、再取込みする工程、

d) 非標識サンプルからの一部と標識サンプルの一部とを、特におよそ1：1の比率で混合して維持して、混合物を得る工程、

e) 請求項1の工程d)に記載される、標識サンプルと非標識サンプルとの混合物において、抗CD28抗体、または抗CD28抗体と抗CD49d抗体の添加により抗原提示細胞(APC)を刺激する工程、続いて、

f) 35～39℃、好ましくは37℃の温度にて、1.5時間～2.5時間、好ましくは2時間の期間、保護ガス雰囲気、CO₂雰囲気下でもよく、混合物の1回目のインキュベーションを行う工程、

g) 分泌阻害剤を添加する工程、

h) 請求項1の工程d)に由来するサンプルを混合する工程、

i) 続いて、35～39℃、好ましくは37℃の温度にて、少なくとも2.5時間の期間、保護ガス雰囲気、CO₂雰囲気下で、2回目のインキュベーションを行う工程、

j) 場合によっては赤血球を溶解する工程、

k) 例えば、標識された抗CD4抗体および／または抗CD8抗体による、CD4リンパ球またはCD8リンパ球の標識、およびフローサイトメトリー検知を利用して、リンパ球をフローサイトメトリーにより検知する工程、

l) 細胞内サイトカインで活性化されたリンパ球および活性化マーカーを発現するリンパ球をフローサイトメトリーにより検知する工程、

m) フローサイトメトリー検知において以下の結果：

a. 標識陽性／CD4陽性／CD69陽性／INF-γ陽性、

b. 標識陰性／CD4陽性／CD69陽性／INF-γ陽性、

c. 標識陽性／CD8陽性／CD69陽性／INF-γ陽性、

d. 標識陰性／CD8陽性／CD69陽性／INF-γ陽性

が現れる場合、標識サンプルが得られた個体と非標識サンプルが得られた個体との間に存在するアロ反応性が同定INFされたとする工程

を含む。

【0005】

本発明による方法の一実施形態では、サンプルまたは両方とものサンプルが全血に由来してもよい。

本発明による方法のさらなる一実施形態では、標識は、標識されたCD45抗体、CFDA-SE、またはCFSEである。

特に、本発明による方法の工程b)で使用される第1の培地が、請求項1の工程c)で挙げた第2の培地と独立であってもよい。第1の培地と第2の培地は、任意の細胞培養培地であってよく、特に、リン酸緩衝生理食塩水、RPMIからなる群から選択されるような培地であってもよい。

【0006】

本発明による方法では、サンプルの細胞成分の、液相からの分離が、遠心分離を利用して行われてもよい。

典型的には、分泌阻害剤はブレフェルジンA(BFA)またはモネシンである。

本発明による方法のさらに別の一実施形態では、フローサイトメトリー検知に先立って添加される細胞膜透過処理剤(Zellmembranpermeator)はサボニン

10

20

30

40

50

、T w e e n（登録商標）である。

典型的には、本発明による方法でのサイトカインは γ -I F Nである。

活性化マーカーとしては、C D 6 9を使用することができる。

【0007】

工程m) ケースaの結果が存在する場合、ドナー/レシピエントペアに由来する非標識パートナーに対する、ドナー/レシピエントペアの標識パートナーのアロ反応性C D 4 T細胞が示される。

工程m) ケースbの結果が存在する場合、ドナー/レシピエントペアの標識パートナーに対する、ドナー/レシピエントペアの非標識パートナーのアロ反応性C D 4 T細胞が示される。

工程m) ケースcの結果が存在する場合、ドナー/レシピエントペアの非標識パートナーに対する、ドナー/レシピエントペアの標識パートナーのアロ反応性C D 8 T細胞が示される。

工程m) ケースbの結果が存在する場合、ドナー/レシピエントペアの標識パートナーに対する、ドナー/レシピエントペアの非標識パートナーのアロ反応性C D 8 T細胞が示される。

これらの場合、それぞれ、拒絶反応リスクの高まりが存在する。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】全血アッセイにおける前染色および刺激の概略図である。ドナーの全血（V B）500 μ lおよびレシピエントの全血700 μ lを基にファルコンチューブの初期重量を測定する。続いて、ドナー血液にC D 4 5 - A P C抗体5 μ lを添加し、暗所（室温）で30分間インキュベートする。次の工程では、レシピエント血液サンプルもドナー血液サンプルも、P B S 15mlで洗浄する（353gで10分間遠心分離）。上清を取り除いた後、培地（R P M I；1% G l n；1% P / S；0.5% H S A）15mlで洗浄する。遠心分離（353g；10分間）後、上清を取り除き、ファルコンチューブに培地を加えて初期重量にする。次いで、レシピエント血液（未染色血液サンプル）500 μ lをドナー血液にピペットで移す（およそ1ml）。刺激するために、抗C D 2 8および抗C D 4 9 dからなる混合物をピペット添加し、インキュベーター中で2時間インキュベートする。続いて、サンプルにB F Aを加え、インキュベーター中で4時間インキュベートする（曲線矢印は添加）。

【図2】それぞれ、各Ab（抗体）A）S i g m aのC D 4 5 - F I T C（青色）、B）B DのC D 4 5 - A P C（褐色）、およびC）B DのC D 4 5 - F I T C（緑色）による、C D 4 5染色細胞集団（円形シンボル）およびC D 4 5未染色細胞集団（四角形シンボル）の平均蛍光強度（M F I）を、製造元濃度および対応する希釈（各濃度の1/2、1/4および1/8）に基づいてプロットした図である。染色細胞集団のM F Iは、濃度の上昇と共に高まり、未染色細胞集団のM F Iはゼロレベルのままである（A）、またはわずかに増加する（BおよびC）。図D）には、C D 4 5陽性細胞集団のM F Iの、C D 4 5陰性細胞集団のM F Iに対する比率をプロットしている。S i g m aの抗C D 4 5 - F I T C（青色）が、最高のM F I比を示す。B Dの抗C D 4 5 - A P C（褐色）は、B DのC D 4 5 - F I T C（緑色）と同様に、なおもより良好なM F I比を示す。赤色円形は、さらなる実験経過において選択された濃度を示す。

【図3】F A C S測定の評価第1部を示す図である。評価戦略は、全血サンプルおよびP B M C（末梢血単核球）サンプルにおいて、本質的には同一アルゴリズムに従って適用される。まず、2つの非占有チャンネル（V - 4 5 0およびV - 5 0 0）を相互に表示することにより（右上方のドットプロット）、ゲートP 5中に表示されている非特異的イベントを除去する。その下方のドットプロットには、C D 8がC D 4に対してプロットされている。その場合、ゲートP 3中に位置する細胞を除去する。ゲートP 1中に位置する細胞が、「バックゲート」される、つまり、左側のドットプロット表示（F S C対S S C）中では、ゲートP 1（中央のドットプロット、右側）中で視認可能な細胞のみが表示されて

10

20

30

40

50

いる。リンパ球への第2の「バックゲート」が、ゲートP2（密度プロット、左下側）により行われ、その場合、CD45陽性細胞とCD45陰性細胞との間で一集団へとゲートされた（青色ゲート）。これらの細胞は、その密度プロット（左上側、青色で表示）中での局在により、リンパ球ではないため、ゲーティングの際にはこれらの細胞を評価に含まないように努めた。両方のバックゲーティング戦略が適用された密度プロット（左上側）では、前方散乱（FSC）が側方散乱（SSC）に対して表示される。それにより、リンパ球集団（枠）にゲートすることができる。リンパ球はまた、密度プロット表示（右下側）を利用して、さらにCD45陽性細胞（枠、上側）とCD45陰性細胞（枠、下側）とに細分される。

【図4】FACS測定の評価第2部を示す図である。次の工程では、第1部からのCD45陽性リンパ球とCD45陰性リンパ球とを、CD4陽性細胞（左側の2つの正方形）とCD8陽性細胞（右側の2つの正方形）とにさらに細分し、それらをIFN γ に対してプロットする（上方の4つの密度プロット）。その下方の4つのドットプロット中では、上方の密度プロットのうちの陽性T細胞のみ、つまり黄色枠内に存在する細胞のみを表示する。その際、左側の両方のドットプロットが、再びCD4陽性T細胞を表し、右側の両方のドットプロットがCD8陽性T細胞を表す。これらの細胞を、次に、さらにそれらの、活性化マーカーCD69およびサイトカインIFN γ の発現を手がかりに、4つの分集団に細分すると、それぞれ右上側の象限（枠）内に、アロ反応性と定義されるT細胞が位置することになる。CD45 + CD4 + : ドナーのCD4 T細胞。右上側の象限中のイベントは、レシピエントの細胞に対して反応する、ドナーのアロ反応性CD4 T細胞に対応する。CD45 - CD4 + : レシピエントのCD4 T細胞。右上側の象限中のイベントは、ドナーの細胞に対して反応する、レシピエントのアロ反応性CD4 T細胞に対応する。CD45 + CD8 + : ドナーのCD8 T細胞。右上側の象限中のイベントは、レシピエントの細胞に対して反応する、ドナーのアロ反応性CD8 T細胞に対応する。CD45 - CD8 + : レシピエントのCD8 T細胞。右上側の象限中のイベントは、ドナーの細胞に対して反応する、レシピエントのアロ反応性CD8 T細胞に対応する。

【図5】それぞれ、4つの異なる、並行して作製された調製物（それぞれ2つのアロ反応性サンプルおよび対応する自己対照）に由来する未染色CD4 T細胞のIFN γ / CD69ドットプロットを表す図である。アロ反応性サンプルを右段に表示し、対応する自己対照を左段に表示している。その際、被験者AのCD4 T細胞の0.015%が、被験者Bに対してアロ反応性を示す（自己対照を差し引いた）。対照的に、被験者BのCD4 T細胞の0.362%が、被験者Aに対してアロ反応性を示す（自己対照を差し引いた）。

【図6】それぞれ、4つの異なる、並行して作製された調製物（それぞれ2つのアロ反応性サンプルおよび対応する自己対照）に由来する未染色CD8 T細胞のIFN γ / CD69ドットプロットを表す図である。アロ反応性サンプルを右段に表示し、対応する自己対照を左段に表示している。その際、被験者CのCD8 T細胞の0.277%が、被験者Dに対してアロ反応性を示す（自己対照を差し引いた）。対照的に、被験者DのCD8 T細胞の0.018%が、被験者Cに対してアロ反応性を示す（自己対照を差し引いた）。

【図7】サイトメガロウイルス（CMV）血清反応陰性被験者aおよびCMV血清反応陽性被験者bのCD4 T細胞を示す図である。このドットプロットは、（左から右に向かって）被験者aおよびbに由来する、図（A）では対照抗原による刺激後の、そして図（B）ではCMV - Agでの刺激後の、部分的にCD45染色された（*）またはCD45未染色のCD4 T細胞の自己刺激およびアロ測定によるIFN γ 発現を示す。（A）非特異的な刺激後にはIFN γ の発現は起こらない。（B）CMV - Agによる刺激後には、CMV血清反応陽性被験者bにおいてのみIFN γ 発現が検出される。非特異的な細胞破片（灰色のゲート）は、評価において考慮されなかった。細胞頻度は、個々の象限内において%表示されている。予備実験に基づく、異なる血液型の血液サンプルの組み合わせも、アロ反応性の損失または歪曲されたT細胞頻度をもたらさないようであるが、なぜならABO式血液型の同一血液型の組み合わせにおいても異なる血液型の被験者においてもアロ反応性T細胞を検出できたからである。このことは、全血アッセイにおいては同種凝

10

20

30

40

50

集素が重要でないこと、または洗浄工程により除去されることも示唆する。

【図 8】47名の被験者に由来する590のペア組み合わせを示す図であり、ただし、CD4T細胞(A)およびCD8T細胞(B)について、被験者は「レシピエント」として未染色の状態、かつ、同一被験者は以前はそれと同じペアの組み合わせにおいて前染色された「ドナー」として存在する。両方の図において、一被験者の未染色としての出現と他方の前染色された出現との間で有意な相関関係を認めることができる(CD4:スピアマン検定、 $r = 0.2576$ 、 $p < 0.0001$; CD8:スピアマン検定; $r = 0.4541$ 、 $p < 0.0001$)。

【図 9】47名の被験者に由来する590の独立したペア組み合わせについて、アロ反応性CD4T細胞(A)およびアロ反応性CD8T細胞(B)の存在を全血アッセイで検査した図である。その際、算出された検出限界(NG、破線)は、アロ反応性CD4T細胞では0.0081%であり、アロ反応性CD8T細胞では0.0145%である。(C)アロ測定に関して、検出限界を上回る、または検出限界を下回る、様々なペア組み合わせの比率(フィッシャーの正確検定、 $p = 0.4149$)。データは、中央値 $\pm$ IRとして示されている。

【発明を実施するための形態】

【0009】

全血中でのアロ反応性T細胞の検出には、それぞれ2名の被験者(「レシピエントとドナー」)からヘパリン化全血が必要とされる。単離PBMCを使用する場合と同様に、ドナー血液とレシピエント血液とを合わせた後でフローサイトメーターにおいて両個体の細胞を区別できるように、ドナー血液サンプルをCD45抗体で前染色した。

レシピエントおよびドナーからの細胞の前処理は、それぞれ、15mlのファルコンチューブ中で行った。PBMCを使用する場合と同様に、レシピエントサンプルは未染色のままであって、抗CD45を用いて前染色されたドナーサンプルに添加された(図1)。前処理の洗浄処置の際にピペット操作損失が起きたため、レシピエントサンプルでは全血700 μ lを使用し、そのうちの500 μ lをドナーの全血500 μ lに添加した。

【0010】

全血を含むファルコンチューブを初めに計量し、それぞれの初期重量(レシピエントサンプルは6.9gでドナーサンプルは6.7g)を書き留めた。ドナーサンプルを染色するために、各チューブに直接、CD45抗体5 μ lをピペット添加し、混合し、暗所で30分間インキュベートした。続いて、レシピエントサンプルもドナーサンプルもそれぞれ14mlのPBSで洗浄した(遠心分離:353g;10分間)。上清を除去し、サンプルに培地(RPMI+0.5% HSA+1% P/S)14mlを加えて洗浄した(遠心分離:353g;10分間)。

測定の際にアロ反応性を妨害する可能性がある同種凝集素(血液型抗体)を除去するために個々の洗浄工程は不可欠だった。上清を慎重に除去した後、15mlのファルコンチューブをもう一度計量し、培地を加えてその初期重量にした。その後にはじめて、一調製物のレシピエントサンプル500 μ lを同一調製物の対応するドナーサンプルへと移し入れた。一調製物中の細胞懸濁液または全血の総量は、その結果1mlである(図1)。それぞれの刺激用調製物に、共刺激性抗体(1 μ g/mlの抗CD28および1 μ g/mlの抗CD49d)の混合物を添加した。刺激用調製物を混合してからインキュベーター(37 $^{\circ}$ C、6% CO₂、ファルコンチューブの蓋はゆるく締めた)中で2時間インキュベートした。

【0011】

次いで10 μ g/mlのプレフェルジンAを添加し、混合し、インキュベーター(37 $^{\circ}$ C、6% CO₂、ファルコンチューブの蓋はゆるく締めた)中でさらに4時間インキュベートした。続いて、全血調製物の固定を行った。

方法の特徴づけおよび確立に貢献した、選択された複数実験では、アロ反応に加えて、対照(Ko)抗原、CMV抗原(それぞれ32 μ g/ml)による刺激、またはStaphylococcus aureusのエンテロトキシンB(SEB、2.5 μ g/ml

10

20

30

40

50

）による刺激を行った。これらは、共刺激性抗体の添加後に加えられ、その後、上述したように、インキュベーター中での2時間のインキュベーション、それに続くBFAの添加、インキュベーター中でのさらなる4時間のインキュベーションを行った。CMVでの刺激においては、以前にCMVと接触したことがある結果、特異的T細胞免疫応答を生じさせていた場合、その被験者は、対応する免疫応答を示す。対照抗原による刺激は陰性対照として利用され、SEBによる刺激は陽性対照として利用された。SEBは、わずかな濃度ですでに強力な刺激をもたらすスーパー抗原である。その際、T細胞は、その抗原特異性にはかわりなく刺激される。陽性対照により、刺激条件が正しいかどうか、または被験者のT細胞が基本的に刺激可能であったかが点検された。

【0012】

全血調製物を固定するために、まず、細胞間接着を緩める2mMのEDTAを添加し、チューブをそれぞれ10秒間、撹拌ミキサ上で混合した。RT、暗所で15分間インキュベーションした後、赤血球を溶解し白血球を固定するために、全血1mlごとに溶解溶液9mlを添加し、さらなる10分間のインキュベーション（暗所、RTで）とそれに続く遠心分離（353gで10分間）後に、上清を吸引し、細胞をFACSバッファー2mlに再懸濁した。第2の遠心分離工程（353gで10分間）に続き上清を除去した。次いで、ペレットを400μl/サンプルのFACSバッファーに取り込んだ。続いて、細胞を直接に染色するか、または一晚、4の冷蔵庫中で保管した。

【0013】

フローサイトメトリー用に染色（FACS染色）するために、分析すべき細胞懸濁液それぞれ200μlをFACSチューブに移し、サポニンバッファー2mlに10分間インキュベートした。インキュベーションは、RT、暗所で行ったが、なぜならサンプルはすでに、光に当たると退色するであろう蛍光色素結合表面抗体で前染色されていたためである。サポニンにより細胞が透過処理されたため、続いて添加するAbが細胞内に到達することができた。インキュベーション後に、チューブを353gで10分間遠心分離し、続いて上清を除去した。サンプルごとにAb混合物50μlをピペット添加し（表1を参照）、混合し、30～45分間インキュベートした。続いて、結合していない遊離の蛍光色素結合Abを除去するために、細胞をFACSバッファー3mlで洗浄した。サンプルを353gで7分間遠心分離した後、上清を吸引し、最終的には細胞を400μlの1%PFAに取り込み、混合し、フローサイトメーターで分析した。

【0014】

表1：様々な染色用の抗体混合物の組成

染色1			染色2		
抗体	コンジュゲート	量(μl)	抗体	コンジュゲート	量(μl)
CD8	APC	0.5	CD8	PerCP	4
CD4	PE-Cy7	0.5	CD4	PE-Cy7	0.5
CD69	PerCP	2	CD69	PE	2
IFN γ	PE	0.3	IFN γ	FITC	0.5
SAP 5%		1	SAP 5%		1
FACSバッファー		47.7	FACSバッファー		42
合計		50	合計		50

【0015】

フローサイトメトリー（FACS、fluorescence activated cell sorting）は、適切な抗体で前もって標識された細胞の特異的な光散乱特性および蛍光特性を測定するためのレーザー支援方法である。

毛細管を介して、正圧により細胞懸濁液が測定用キュベットに導入される。流体力学的収束により、細胞を取り囲む支持液により細胞が強く加速され、個々の細胞が分析点において順次、レーザー光線を通過し、そこではそれら個々の単一細胞が検知され、分析され

、分類される。細胞が、レーザー光と相互作用すると、ある細胞集団に典型的な光回折または光散乱が起こり、それが光検出器によって検知される。その際、いわゆる前方散乱光 (FSC = forward scatter) は細胞のサイズに関する情報を提供し、光の回折によって引き起こされる。側方散乱光 (SSC = side scatter) は細胞の顆粒度に関する情報を仲介し、光の屈折によって引き起こされる。そのように算定された各細胞のサイズ特性および顆粒度特性は、二次元ダイアグラムで描写可能であり、細胞分集団の同定に利用される。

【0016】

さらに蛍光色素が結合された抗体により、集団または分集団の個々の単一細胞を、より詳細に同定し特徴づけることが可能である。これは細胞型特異的な表面分子 (例えば、CD3、CD4またはCD8のような膜受容体) を染色することにより、または細胞膜の透過処理後に細胞内局在抗原を検出することによっても可能である。蛍光色素はレーザーによって励起され、光学系で測定可能な、より長波長の光子の形状で光を放出する。様々な蛍光色素は励起波長が同じであるにもかかわらず、特徴的な異なる放出波長を有するため、1つのレーザーを用いて、様々な結合された複数のAbを識別し、それにより同時に異なる細胞特性を調査することが可能である。

中でも、波長領域488nmのアルゴンレーザー (青色) で励起され520nmの最大蛍光を発する蛍光色素FITC (フルオレセインイソチオシアネート) を使用した。同様に、576nmの最大放射を有するフィコエリスリン (PE) を使用した。PerCP (ペリジニクロロフィルタンパク質複合体) は、678nmで可視化され、PE-Cy7 (フィコエリスリンシアニン7) は785nmで可視化される。それに対して、アロフィコシアニン (APC) は、ヘリウムネオンレーザー (赤色) によって635nmの波長で励起される。この色素の放射の最大値は660nmにある。

【0017】

測定および分析、ならびにコンピュータ支援データ処理のためには、フローサイトメーター (FACS Canto TI) およびソフトウェアプログラムFACS Diva Software Version 6.1.3を使用した。個々の細胞の分類は、前方散乱光 (FSC) および側方散乱光 (SSC) 中での散乱光信号による「ドットプロット」表示および「密度プロット」表示を利用して行った。その際、全血中でも、PBMCにおいても、サンプルごとにCD4 T細胞およびCD8 T細胞がフローサイトメトリーにより検知され、定められたゲーティング戦略を利用して評価された。十分な細胞数を確保するために、できる限り、測定ごとに100,000個のCD8 T細胞を検知するよう努めた。

【0018】

その結果として、まず全細胞をその顆粒度 (SSC) およびそのサイズ (FSC) に基づいて図解し、リンパ球領域を特定した (「ゲートした」)。1つの点は、「ドットプロット」表示中では個々の細胞に対応し、「密度プロット」表示中の密度勾配は、ある特定の特性の細胞の頻度に対応する。続いて、リンパ球を、CD45前染色 (「ドナー」またはCD45+) 細胞および未染色 (「レシピエント」またはCD45-) 細胞に区分した (図3)。それらの細胞をそれぞれ、さらにCD8陽性T細胞およびCD4陽性T細胞に細分した (図4)。機能特性をさらに把握するために、4つの細胞集団 (CD4+CD45+; CD4+CD45-; CD8+CD45+; CD8+CD45-) を、さらに、活性化マーカーCD69およびサイトカインIFN γ の発現を手がかりにそれぞれ4つの分集団に細分した。象限へのこの細分により、それぞれの蛍光信号の、個々の象限中での百分率での割合を算出することができた。アロ反応性T細胞は、CD69とIFN γ との共発現によって定義され、従って右上方の象限内に現れた (図5および図6)。

【0019】

本研究の統計分析は、GraphPad Prismプログラムを利用して行った。2つの群の連続変数を互いに比較する場合には、ノンパラメトリックなマン・ホイットニー (Mann-Whitney) 検定を使用した。2つを超える群の対応する分析には、ク

10

20

30

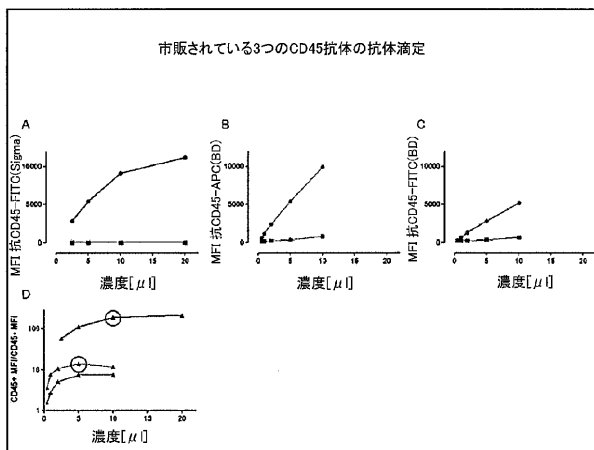
40

50

ラスカル・ウォリス (Kruskal - Wallis) 検定を使用し、有意性が認められた場合、ダン (Dunn) の多重比較検定を利用して個々の集団を互いに比較した。2つ以上のカテゴリカル変数の依存性は、フィッシャーの正確検定またはカイ二乗検定を利用して算定した。相関関係分析には、スピアマン検定を使用した。0.05を下回るすべてのp値は有意と見なされる。

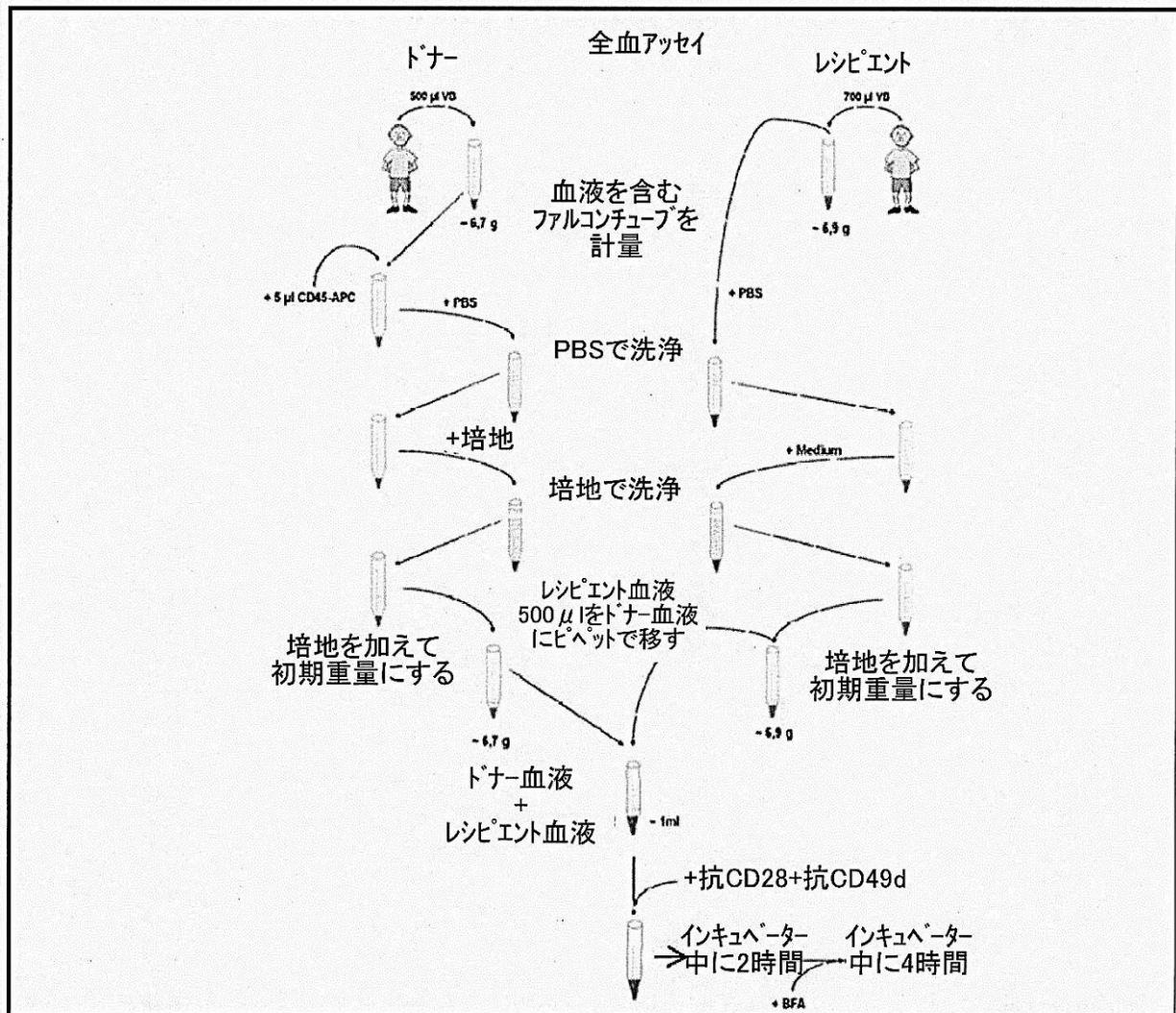
【図2】

Fig. 2



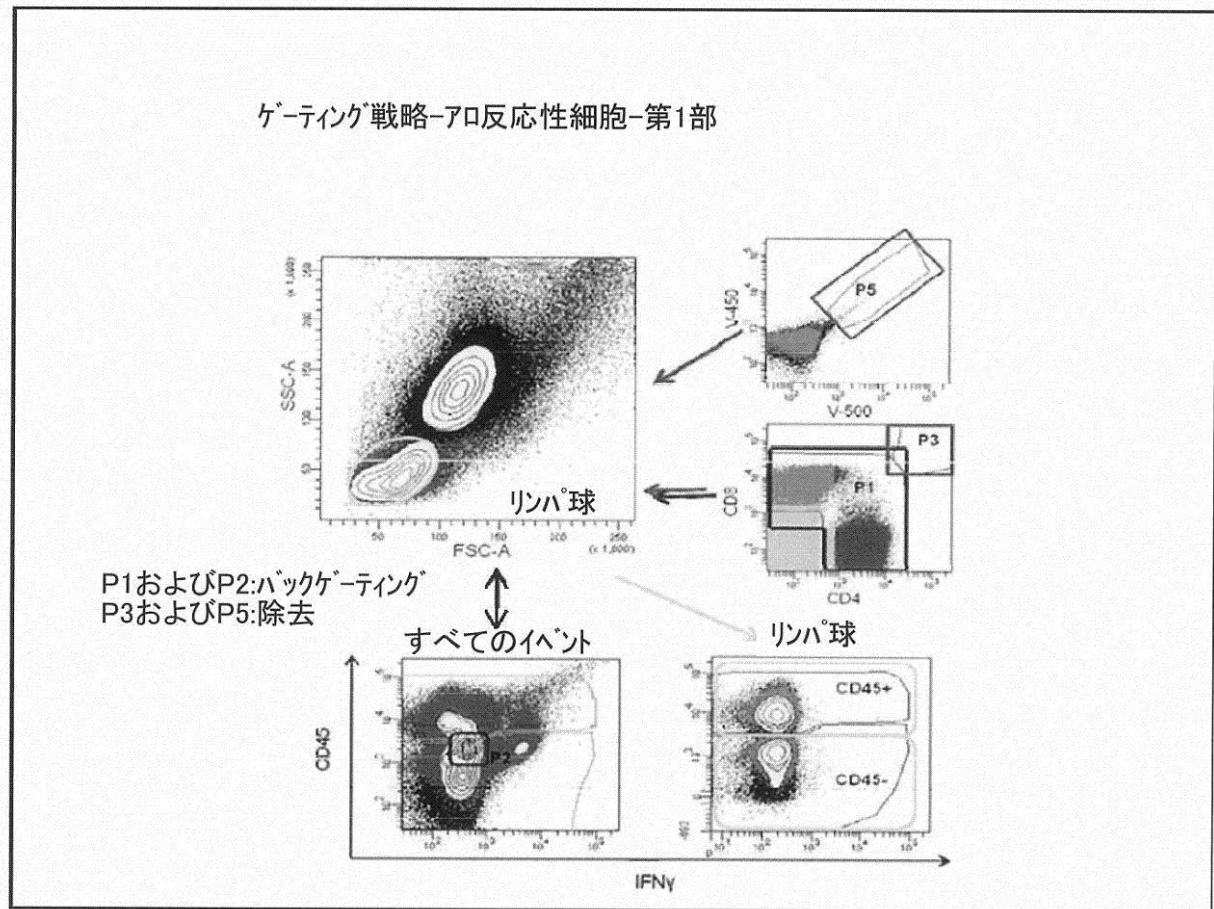
【図 1】

Fig. 1



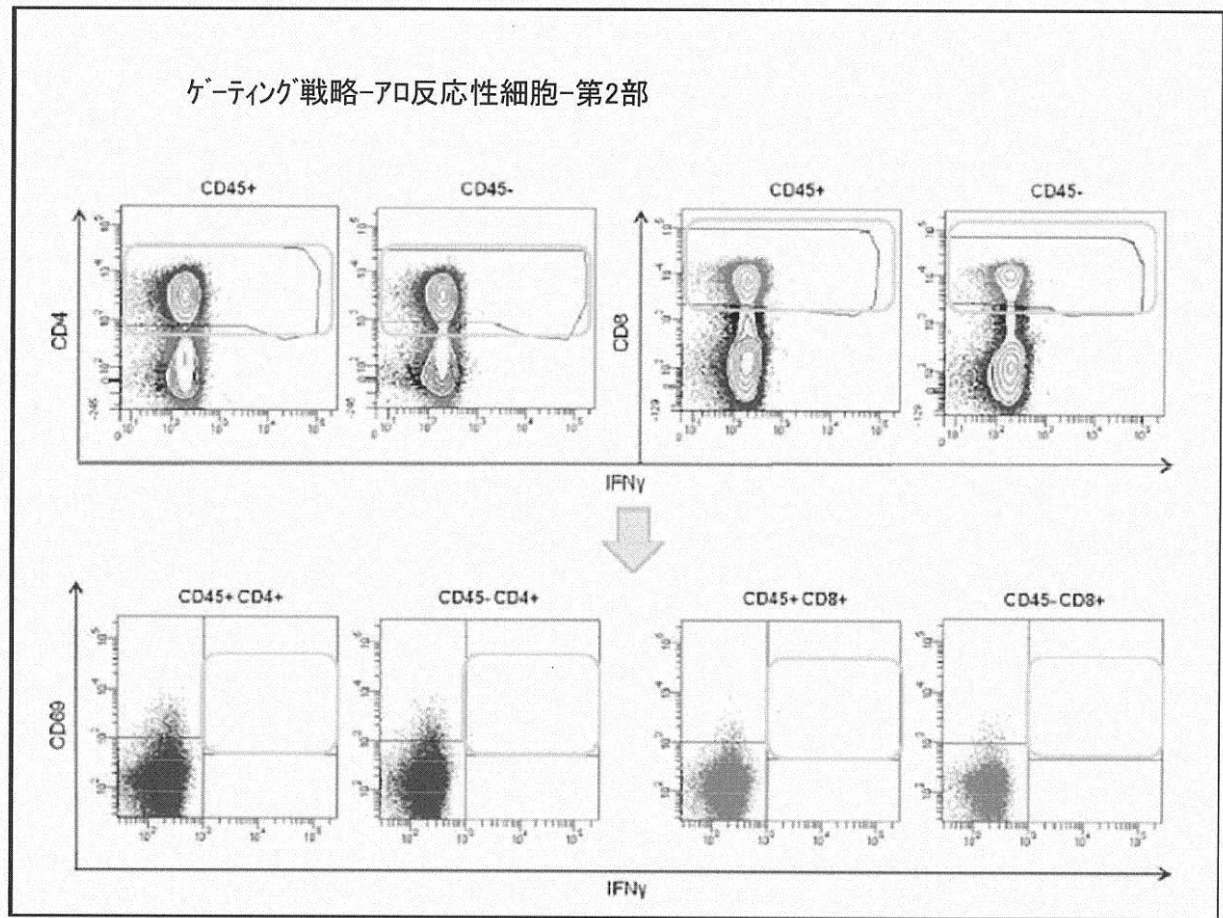
【図 3】

Fig. 3



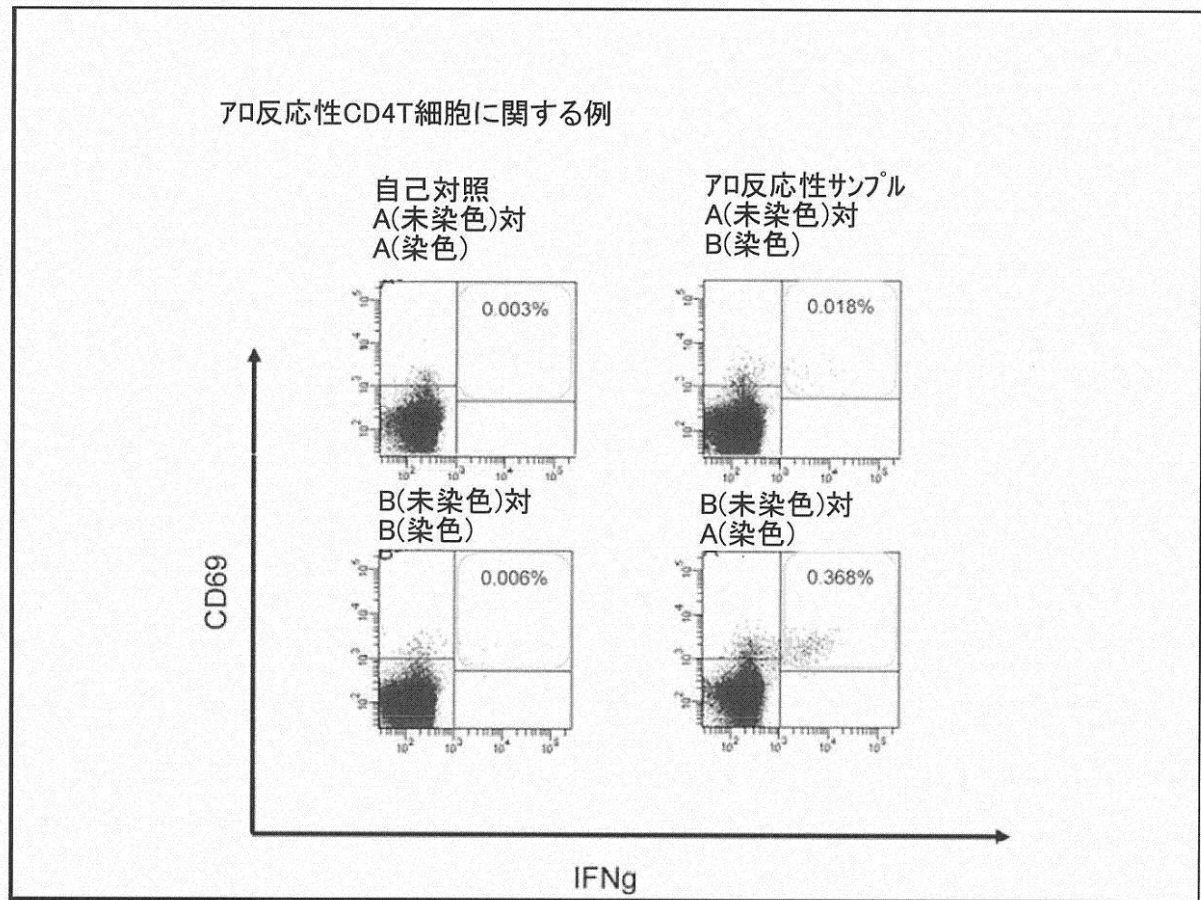
【図 4】

Fig. 4



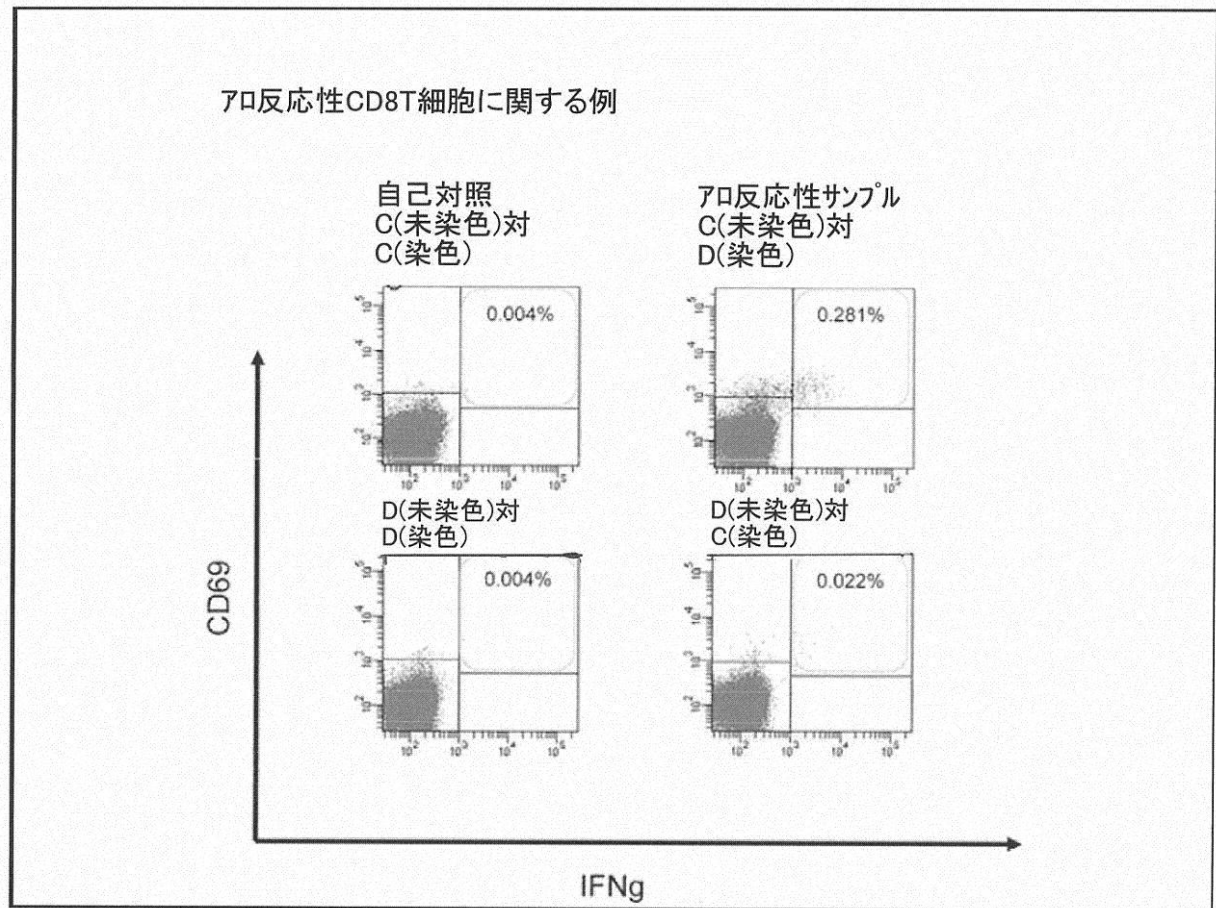
【 図 5 】

Fig. 5



【図 6】

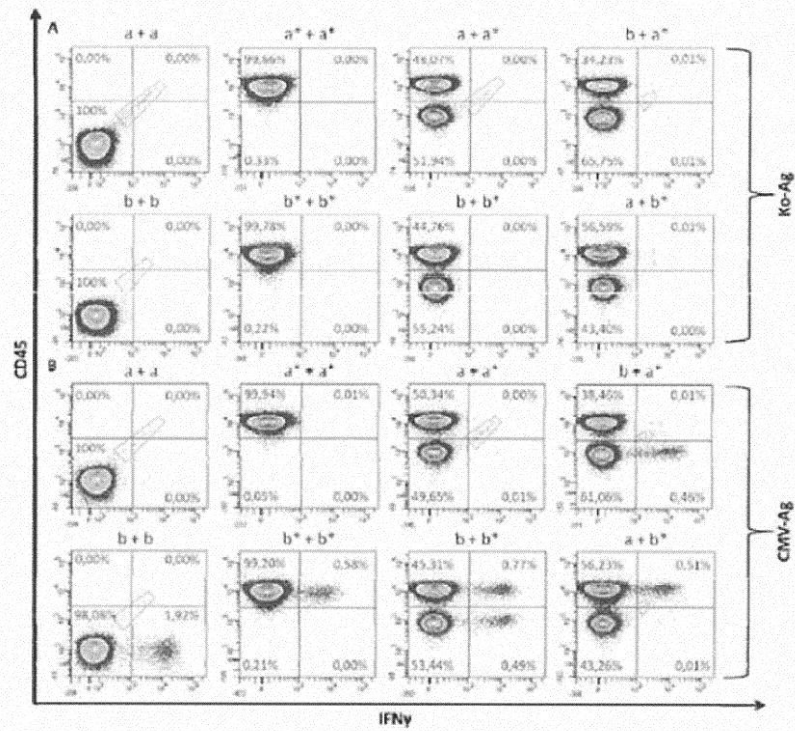
Fig. 6



【 図 7 】

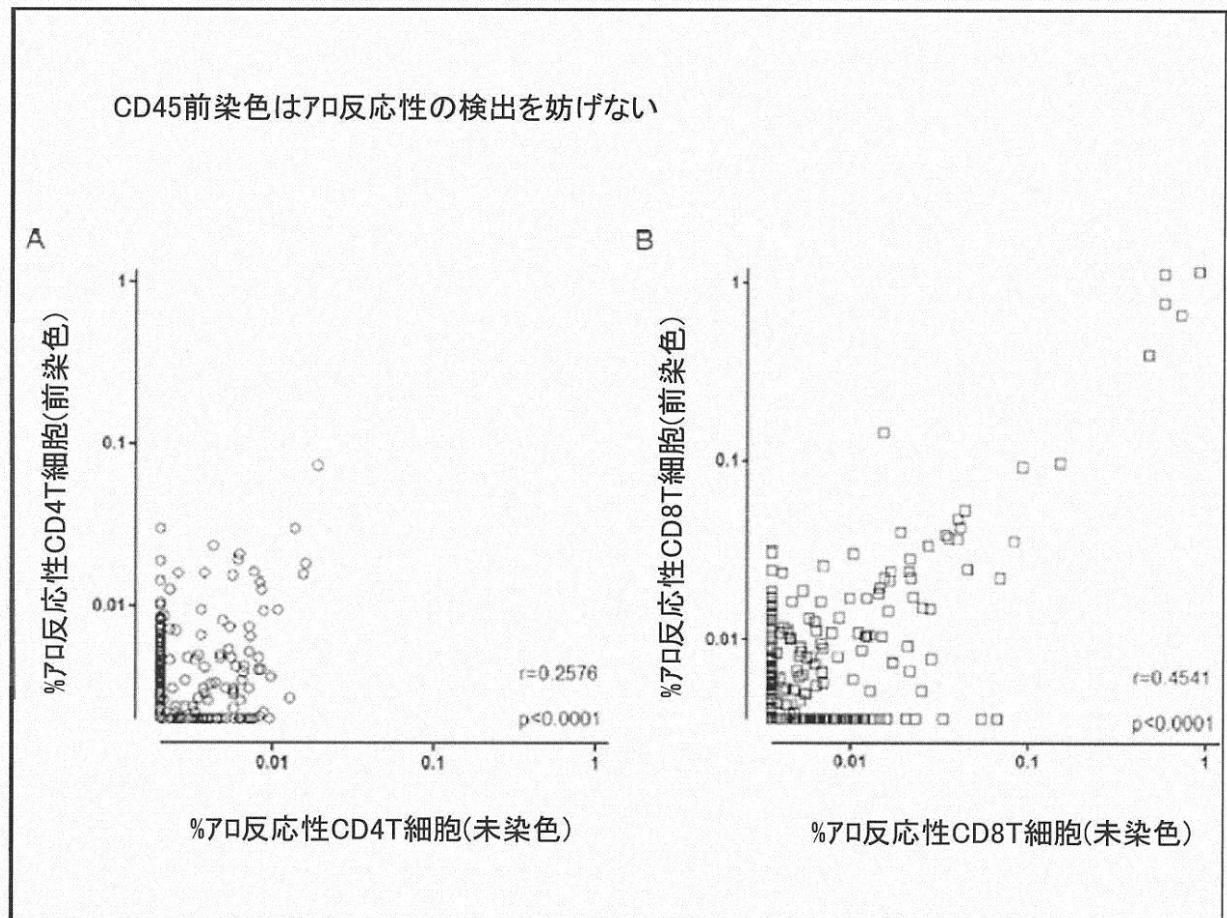
Fig. 7

非特異的ハイスタンダー-活性化の排除



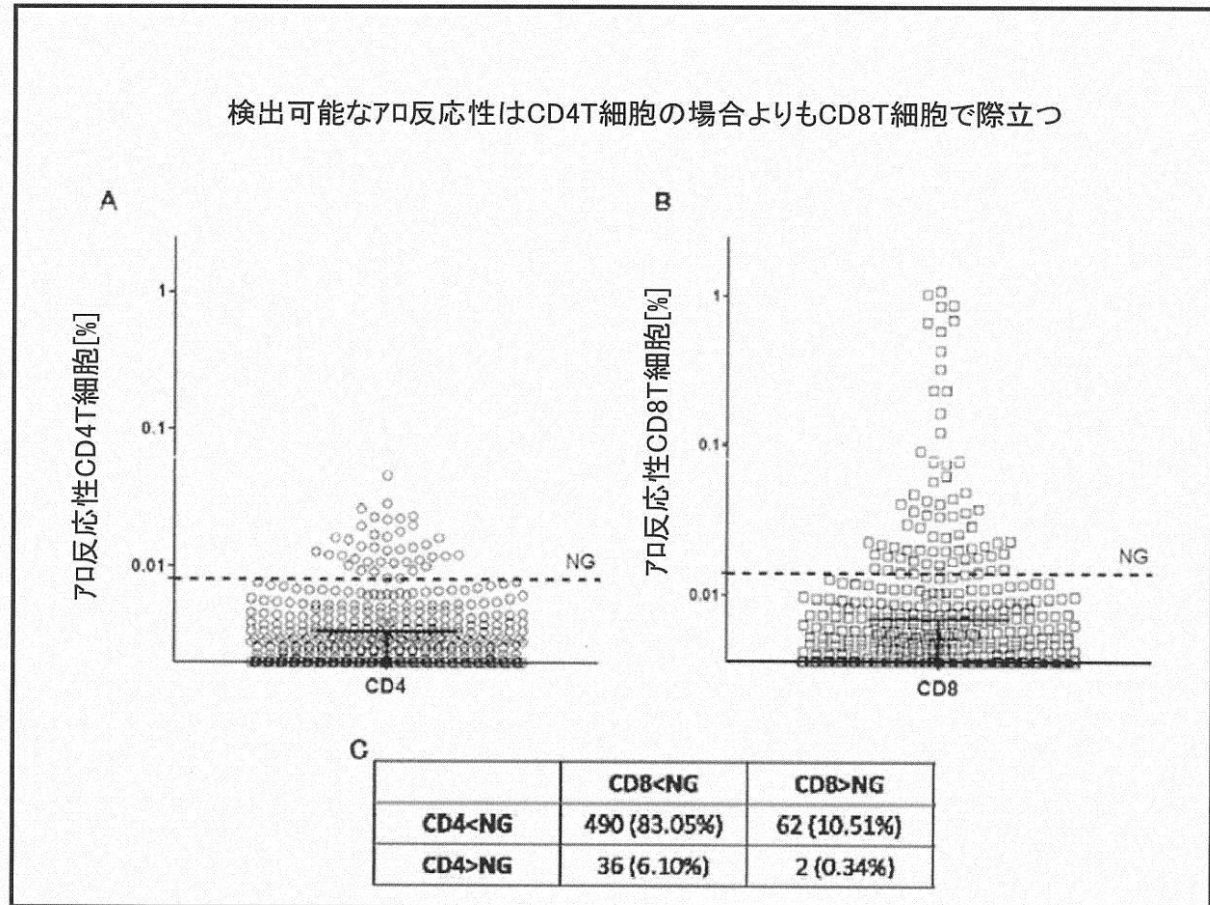
【 図 8 】

Fig. 8



【図 9】

Fig. 9



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/075253

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/50 G01N33/569 G01N33/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

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)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	URBAN SESTER ET AL: "Rapid Identification of Preformed Alloreactive T Cells for Use in a Clinical Setting", TRANSPLANTATION, vol. 78, no. 4, 27 August 2004 (2004-08-27), pages 607-614, XP055058763, ISSN: 0041-1337, DOI: 10.1097/01.TP.0000131949.59284.4D cited in the application abstract page 607 - page 608; figure 1 ----- -/--	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 2014

Date of mailing of the international search report

03/03/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lunter, Pim

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/075253

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	UDEME D. EKONG ET AL: "Lymphocyte activation markers may predict the presence of donor specific alloreactivity in pediatric living related liver transplant recipients", HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 72, no. 5, 26 February 2011 (2011-02-26), pages 392-397, XP055058764, ISSN: 0198-8859, DOI: 10.1016/j.humimm.2011.02.003 abstract pages 392,396 -----	1-12
Y	MARTINS SERGIO L R ET AL: "Development of a novel flow cytometric assay to assess the phenotype and function of alloreactive human T cells", BLOOD; 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), pages 403b-404b, XP008125456, ISSN: 0006-4971 abstract -----	1-12
Y	KORIN Y D ET AL: "A Novel Flow Assay for the Detection of Cytokine Secreting Alloreactive T Cells: Application to Immune Monitoring", HUMAN IMMUNOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 66, no. 11, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 1110-1124, XP027857134, ISSN: 0198-8859 [retrieved on 2005-11-01] abstract page 1115 page 1119 -----	13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/075253

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. G01N33/50 G01N33/569 G01N33/68
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	URBAN SESTER ET AL: "Rapid Identification of Preformed Alloreactive T Cells for Use in a Clinical Setting", TRANSPLANTATION, Bd. 78, Nr. 4, 27. August 2004 (2004-08-27), Seiten 607-614, XP055058763, ISSN: 0041-1337, DOI: 10.1097/01.TP.0000131949.59284.4D in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 607 - Seite 608; Abbildung 1 ----- -/--	1-13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen
 ☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Februar 2014

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

03/03/2014

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Lunter, Pim

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/075253

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	UDEME D. EKONG ET AL: "Lymphocyte activation markers may predict the presence of donor specific alloreactivity in pediatric living related liver transplant recipients", HUMAN IMMUNOLOGY, Bd. 72, Nr. 5, 26. Februar 2011 (2011-02-26), Seiten 392-397, XP055058764, ISSN: 0198-8859, DOI: 10.1016/j.humimm.2011.02.003 Zusammenfassung Seiten 392,396 -----	1-12
Y	MARTINS SERGIO L R ET AL: "Development of a novel flow cytometric assay to assess the phenotype and function of alloreactive human T cells", BLOOD; 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, Bd. 102, Nr. 11, 16. November 2003 (2003-11-16), Seiten 403b-404b, XP008125456, ISSN: 0006-4971 Zusammenfassung -----	1-12
Y	KORIN Y D ET AL: "A Novel Flow Assay for the Detection of Cytokine Secreting Alloreactive T Cells: Application to Immune Monitoring", HUMAN IMMUNOLOGY, NEW YORK, NY, US, Bd. 66, Nr. 11, 1. November 2005 (2005-11-01), Seiten 1110-1124, XP027857134, ISSN: 0198-8859 [gefunden am 2005-11-01] Zusammenfassung Seite 1115 Seite 1119 -----	13

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 パールマン フェルディナント ヘルマン

ドイツ連邦共和国 3 0 1 7 5 ハノーファー フェルディナントシュトラッセ 7

(72)発明者 フリーザー ダニエル

ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 0 ハイデルベルク ハントシュースハイマー ラントシュトラッセ
9 / 1

(72)発明者 ゼスター マルティナ

ドイツ連邦共和国 6 6 4 2 4 ホンブルク リンデンシュトラッセ 1 1

(72)発明者 ゼスター ウルバン

ドイツ連邦共和国 6 6 4 2 4 ホンブルク リンデンシュトラッセ 1 1

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ79 QR48 QR51 QR66 QR69

QR77 QS03 QS10 QS12 QS28 QS33 QS36 QS39 QX01

【要約の続き】

P C)を刺激する工程、続いて、f) 35 ~ 39、好ましくは37の温度にて、1.5時間 ~ 2.5時間、好ましくは2時間の期間、保護ガス雰囲気、CO₂雰囲気下でもよく、混合物の1回目のインキュベーションを行う工程、g) 分泌阻害剤を添加する工程、h) 請求項1の工程d)に由来するサンプルを混合する工程、i) 続いて、35 ~ 39、好ましくは37の温度にて、少なくとも2.5時間の期間、保護ガス雰囲気、CO₂雰囲気下でもよく、2回目のインキュベーションを行う工程、j) 場合によっては赤血球を溶解する工程、k) 例えば、標識された抗CD4抗体および/または抗CD8抗体による、CD4リンパ球またはCD8リンパ球の標識、およびフローサイトメトリー検知を利用して、リンパ球をフローサイトメトリーにより検知する工程、l) 細胞内サイトカインで活性化されたリンパ球および活性化マーカーを発現するリンパ球をフローサイトメトリーにより検知する工程、m) フローサイトメトリー検知において以下の結果：a. 標識陽性/CD4陽性/CD69陽性/INF-γ陽性、b. 標識陰性/CD4陽性/CD69陽性/INF-γ陽性、c. 標識陽性/CD8陽性/CD69陽性/INF-γ陽性、d. 標識陰性/CD8陽性/CD69陽性/INF-γ陽性が現れる場合、標識サンプルが得られた個体と非標識サンプルが得られた個体との間にアロ反応性が存在すると同定する工程を含む方法。

专利名称(译)	使用流式细胞术检测同种异体反应性T细胞确定供体和受体之间的相容性		
公开(公告)号	JP2016506494A	公开(公告)日	2016-03-03
申请号	JP2015544496	申请日	2013-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	洛菲厄斯生物科学有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Rofiasu生物科学GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	パールマンフェルディナントヘルマン フリーザーダニーロ ゼスターマルティナ ゼスターウルバン		
发明人	パールマン フェルディナント ヘルマン フリーザー ダニーロ ゼスター マルティナ ゼスター ウルバン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N15/14 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/5091 G01N33/56972 G01N2333/70514 G01N2333/70517 G01N2800/245 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/543.597 G01N15/14.C C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	山崎 一夫		
优先权	2012195029 2012-11-30 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(21) 出願番号 特願2015-544496 (P2015-544496) (86) (22) 出願日 平成25年12月2日 (2013. 12. 2) (85) 翻訳文提出日 平成27年5月27日 (2015. 5. 27) (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/075253 (87) 国際公開番号 WO2014/083201 (87) 国際公開日 平成26年6月5日 (2014. 6. 5) (31) 優先権主張番号 12195029. 9 (32) 優先日 平成24年11月30日 (2012. 11. 30) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 513064405 ロフィアス バイオサイエンス ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング ドイツ連邦共和国 93053 レーゲンスブルク ヨゼフ-エンゲルト-シュトラッセ 13 ビオバルク ドリット (74) 代理人 100082083 弁理士 辻居 幸一 (74) 代理人 100082005 弁理士 熊倉 慎男 (74) 代理人 100084663 弁理士 稲田 篤 (74) 代理人 100093300 弁理士 浅井 賢治
-------	---	---

最終頁に続く

一种利用同种反应性T细胞的流式细胞术检测确定供体和受体之间相容性的方法，其包括以下步骤：a) 从待分析的供体/受体对中获得。将标记物添加到其中一个血液样本中的步骤，该样本在下文中被称为标记样本，该标记物适合于与衍生自接受者，待分析的供体/接受者的样本区分开。从该对血液中获得的另一份血液样品在下文中称为未标记样品，b) 两个样品均用第一培养基稀释至少一次，并且样品的细胞成分与液相分离，c) 重新摄取细胞成分，特别是相同体积的标记样品的血样残留物和未标记样品的血样残留物，分别吸收到第二种培养基中，d) 未标记的支持物 将拉出物的一部分和标记的样品的一部分混合，特别是按大约1：1的比例混合，以获得混合物，e) 标记的样品和未标记的，如权利要求1的步骤d) 所述。通过在样品组成的混合物中添加抗CD28抗体或抗CD28抗体和抗CD49d抗体来刺激抗原呈递细胞 (APC)，然后进行f) 35-39℃，优选37℃的温度。在保护性气体气氛中，CO2气氛可以使用1.5到2.5个小时，最好是2个小时，这是第一次孵育混合物的步骤，g) 添加分泌抑制剂的步骤，h) 将权利要求1的步骤d) 的样品，i) 的样品随后在保护性气体气氛CO2下在35-39℃，优选37℃的温度下混合至少2.5小时的步骤。第二个孵化步骤，可能在大气中，j) 通过流式细胞术检测淋巴细胞，例如，利用标记的抗CD4和/或抗CD8抗体标记CD4或CD8淋巴细胞，并进行流式细胞术检测。L) 通过流式细胞术检测被细胞内细胞因子激活的淋巴细胞和表达

激活标记的淋巴细胞的步骤，m) 流式细胞术检测的以下结果：a。标记阳性/ CD4 阳性/ CD69阳性/INF- γ 阳性，b。标记为阴性/ CD4阳性/ CD69阳性/INF- γ 阳性，c。标记为阳性/ CD8阳性/ CD69阳性/INF- γ 阳性，d。标记为阴性/ CD8阳性/ 当出现CD69阳性/INF- γ 阳性时，该方法包括鉴定在获得标记样品的个体与未标记样品的个体之间存在同种反应性的步骤的方法。