

(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2019-532255

(P2019-532255A)

(43) 公表日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A Y	2 G O 4 3
GO 1 N 33/541 (2006.01)	GO 1 N 33/541	2 G O 4 5
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 5 4
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	4 B O 2 9
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/533	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-569087 (P2018-569087)
 (86) (22) 出願日 平成29年6月27日 (2017. 6. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年2月15日 (2019. 2. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/065755
 (87) 国際公開番号 W02018/001985
 (87) 国際公開日 平成30年1月4日 (2018. 1. 4)
 (31) 優先権主張番号 16176537.5
 (32) 優先日 平成28年6月28日 (2016. 6. 28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 513306280
 テクニッシェ ユニヴェルズィテート ミ
 ユンヘン
 ドイツ連邦共和国 ミュンヘン アルシス
 シュトラーセ 2 1
 (71) 出願人 514214106
 ジュノ セラピューティクス ゲーエムベ
 ーハー
 ドイツ連邦共和国 8 1 6 7 5 ミュンヘ
 ン グリルパーザーシュトラーセ 1 0
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 受容体ーリガンド k o f f 速度を分析するための可逆的細胞標識および不可逆的細胞標識の組み合わせ

(57) 【要約】

本発明は、可逆的細胞標識および不可逆的細胞標識の組み合わせを用いて標的細胞上の受容体分子Rの解離速度定数(k_{off})を決定する方法に関する。本発明はさらに、そのような受容体分子Rを含む細胞であって、受容体分子Rにそのような細胞標識の組み合わせを結合させている、該細胞に関する。本発明はさらに、本発明の方法を実施するのに有用なキットおよび機器に関する。本発明はさらに、高アビディティT細胞の単離方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的細胞に付着した第1の検出可能な標識および該標的細胞に付着した第2の検出可能な標識を検出する段階を含む、標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の解離速度定数(k_{off})を決定する方法であって、
該細胞が、

(i) 該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および

(ii) 該第1の受容体結合試薬の該第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬
と接触されており、

該第1の受容体結合試薬(i)および該第1の多量体化試薬(ii)が、該標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、該第1の多価結合複合体が、1つの該第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの該第1の受容体結合試薬を含み、かつ

該第1の検出可能な標識が該第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができ、かつ

該第2の検出可能な標識が該受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着しており、
該第1の検出可能な標識および該第2の検出可能な標識が互いに異なる、該方法。

【請求項2】

前記細胞が、

(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬、および

(iv) 該第2の受容体結合試薬の該第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬
とさらに接触されており、

該第2の受容体結合試薬(iii)および該第2の多量体化試薬(iv)が、該標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、該第2の多価結合複合体が、1つの該第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ

第2の検出可能な標識が該第2の多価結合複合体に結合している、
請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記細胞が、

(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2

とさらに接触されており、

該多量体受容体結合試薬M2が該受容体分子Rを介して標的細胞に本質的に不可逆的に結合し、

第2の検出可能な標識が該多量体受容体結合試薬M2に結合している、

請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記細胞が、

(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、該受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2

とさらに接触されており、

第2の検出可能な標識が該不可逆的受容体結合試薬I2に結合している、

10

20

30

40

50

請求項1記載の方法。

【請求項5】

受容体分子RがT細胞受容体(TCR)である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

第1の受容体結合部位B1がMHC分子である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

a. 第1の結合パートナーC1がストレプトアビジン結合ペプチドまたはアビジン結合ペプチドを含み、かつ第1の多量体化試薬がストレプトアビジンもしくはアビジン、または該ストレプトアビジン結合ペプチドもしくはアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジン類似体もしくはアビジン類似体を含む、あるいは

b. 第1の結合パートナーC1が、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体を含み、かつ第1の多量体化試薬がストレプトアビジンもしくはアビジン、または該ビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジン類似体もしくはアビジン類似体を含む、

前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

第1の結合パートナーC1がストレプトアビジン結合ペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 01)を含み、かつ多量体化試薬がストレプトアビジン類似体Va1⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 02)またはストレプトアビジン類似体Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 03)を含む、請求項7記載の方法。

【請求項9】

第1の結合パートナーC1と第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1との間の結合が二価カチオンの存在下で起こる、請求項1~6のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

a. 第1の結合パートナーC1がカルモジュリン結合ペプチドを含み、かつ第1の多量体化試薬がカルモジュリンを含む、または

b. 第1の結合パートナーC1がオリゴヒスチジンタグを含み、かつ第1の多量体化試薬が、金属キレート剤に結合した金属イオンを含む、

請求項9記載の方法。

【請求項11】

第1の結合パートナーC1が抗原を含み、かつ第1の多量体化試薬が該抗原に対する抗体を含む、請求項1~6のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

抗原がエピトープタグである、請求項11記載の方法。

【請求項13】

エピトープタグがFLAGタグ(配列: DYKDDDDK、SEQ ID NO: 04)、Mycタグ(配列: EQKLISE EDL、SEQ ID NO: 05)、HAタグ(配列: YPYDVPDYA、SEQ ID NO: 06)、VSV-Gタグ(配列: YTD IEMNRLGK、SEQ ID NO: 07)、HSVタグ(配列: QPELAPEDPED、SEQ ID NO: 08)、およびV5タグ(配列: GKPIPNPLLGLDST、SEQ ID NO: 09)からなる群より選択される、請求項18記載の方法。

【請求項14】

抗原がタンパク質を含む、請求項11記載の方法。

【請求項15】

タンパク質が、マルトース結合タンパク質(MBP)、キチン結合タンパク質(CBP)およびチオレドキシンの群より選択される、請求項14記載の方法。

【請求項16】

第1の結合パートナーC1がグルタチオンS-トランスフェラーゼを含み、かつ第1の多量体化試薬がグルタチオンを含む、または第1の結合パートナーC1がグルタチオンを含み、かつ第1の多量体化試薬がグルタチオンS-トランスフェラーゼを含む、請求項1~6のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

第1の結合パートナーC1が免疫グロブリンFc部分を含み、かつ第1の多量体化試薬がプロテインA、プロテインG、プロテインa/g、およびプロテインLからなる群より選択されるタンパク質を含む、または第1の結合パートナーC1がプロテインA、プロテインG、プロテインa/g、およびプロテインLからなる群より選択されるタンパク質を含み、かつ第1の多量体化試薬が免疫グロブリンFc部分を含む、請求項1~6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

第2の受容体結合部位B2がMHC分子である、請求項2、3および5~17のいずれか一項記載の方法。

【請求項 19】

第1の受容体結合部位B1および第2の受容体結合部位B2が同じである、請求項2、3および5~18のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 20】

第2の受容体結合部位B2または不可逆的受容体結合試薬I2が、抗体、二価抗体断片、一価抗体断片、および抗体様結合を有するタンパク質性結合分子からなる群より選択される、請求項2~17のいずれか一項記載の方法。

【請求項 21】

二価抗体断片が(Fab)₂断片または二価一本鎖Fv断片である、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

一価抗体断片が、Fab断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片(scFv)からなる群より選択される、請求項20記載の方法。

20

【請求項 23】

抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子が、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づく突然変異タンパク質、グルボディ(glubody)、アンキリン骨格に基づくタンパク質、結晶性骨格に基づくタンパク質、アドネクチン(adnectin)、およびアビマー(avimer)の群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項 24】

第2の結合パートナーC2がビオチンまたはビオチン類似体を含み、かつ第2の多量体化試薬が、ビオチンまたは該ビオチン類似体に本質的に不可逆的に結合するストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む、請求項2および5~23のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 25】

標的細胞が哺乳動物細胞である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 26】

哺乳動物細胞がリンパ球または幹細胞である、請求項24記載の方法。

【請求項 27】

リンパ球がT細胞、Tヘルパー細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞である、請求項25記載の方法。

【請求項 28】

T細胞がCMV特異的CD8+ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞および制御性T細胞の群より選択される、請求項26記載の方法。

40

【請求項 29】

第1の検出可能な標識が蛍光色素である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 30】

第2の検出可能な標識が蛍光色素である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 31】

第1の検出可能な標識の各々が第1の蛍光色素であり、かつ第2の検出可能な標識が第2の蛍光色素であり、該第1の蛍光色素の発光シグナルが、好ましくは該第2の蛍光色素の発光シグナルと区別することができる、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 32】

(a) 受容体分子Rを含む標的細胞を、(i)第1の受容体結合試薬および(ii)第1の多量体化

50

試薬と接触させる段階、ならびに

(b) 該標的細胞を、(iii)第2の受容体結合試薬および(iv)第2の多量体化試薬と接触させる段階、または

該標的細胞を、(iii')多量体受容体結合試薬と接触させる段階、または
該標的細胞を、(iii'')不可逆的受容体結合試薬と接触させる段階

を含む、請求項2~31のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

(a)が(b)の前に実施される、請求項32記載の方法。

【請求項34】

(a)の後かつ(b)の前に洗浄段階をさらに含む、請求項33記載の方法。

10

【請求項35】

(c)(i)第1の受容体結合試薬と(ii)第1の多量体化試薬との間の結合を破壊する段階をさらに含む、請求項32~34のいずれか一項記載の方法。

【請求項36】

(i)第1の受容体結合試薬と(ii)第1の多量体化試薬との間の結合が、(i)および(ii)を競合試薬CRと接触させることにより破壊され、該競合試薬CRが、該第1の多量体化試薬上の第1の結合部位Z1への結合について第1の結合パートナーC1と競合することができる、請求項35記載の方法。

【請求項37】

第1の結合パートナーC1がストレプトアビジン結合ペプチドであり、かつ競合試薬CRがビオチンまたはビオチン類似体である、請求項36記載の方法。

20

【請求項38】

第1の多量体化試薬がストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体を含む、請求項36または37記載の方法。

【請求項39】

(i)第1の受容体結合試薬と(ii)第1の多量体化試薬との間の結合が、金属イオンキレート化により破壊される、請求項35記載の方法。

【請求項40】

金属キレート化がEDTAまたはEGTAの添加により達成される、請求項39記載の方法。

【請求項41】

(i)第1の受容体結合試薬と(ii)第1の多量体化試薬との間の結合が、pH変化により破壊される、請求項35記載の方法。

30

【請求項42】

(d) 標的細胞に付着した第1の検出可能な標識を検出し、かつ該標的細胞に付着した第2の検出可能な標識を検出する段階

をさらに含む、請求項32~41のいずれか一項記載の方法。

【請求項43】

第1の検出可能な標識が第1の蛍光色素であり、かつ第2の検出可能な標識が第2の蛍光色素であり、該第1の蛍光色素の発光シグナルが、好ましくは該第2の蛍光色素の発光シグナルと区別することができる、請求項42記載の方法。

40

【請求項44】

第1の検出可能な標識および第2の検出可能な標識の検出がフローサイトメトリーによる、請求項43記載の方法。

【請求項45】

第2の検出可能なシグナルの検出が、標的細胞上の受容体分子Rの存在を示す、請求項44記載の方法。

【請求項46】

第2の検出可能なシグナルが検出される細胞上での第1の検出可能な標識の検出が、該第1の検出可能な標識の検出時の受容体分子Rからの第1の受容体結合部位B1の非解離を示す、請求項45記載の方法。

50

【請求項 4 7】

第2の検出可能なシグナルが検出される細胞上での第1の検出可能な標識の非検出が、該第1の検出可能な標識の検出時の受容体分子Rからの第1の受容体結合部位B1の解離を示す、請求項45記載の方法。

【請求項 4 8】

第2の検出可能なシグナルが検出される細胞上での第1の検出可能な標識の検出事象の減少が、受容体分子Rからの第1の受容体結合部位B1の解離の動態を示す、請求項45～47のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 9】

結合部位Z1とパートナーC1との間の可逆的結合の解離速度定数(k_{off})が、 $0.5 \times 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 以上の範囲内である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。 10

【請求項 5 0】

結合部位Z2とパートナーC2との間の結合の解離速度定数(k_{off})が、 $1 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 以下の範囲内である、請求項2および5～48のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 1】

多量体受容体結合試薬M2と標的細胞との間の本質的に不可逆的な結合の解離速度定数(k_{off})が、 $1 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 以下の範囲内である、請求項3および5～48のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 2】

不可逆的受容体結合試薬I2と受容体分子Rとの間の本質的に不可逆的な結合の解離速度定数(k_{off})が、 $1 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 以下の範囲内である、請求項4～48のいずれか一項記載の方法。 20

【請求項 5 3】

標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の解離速度定数(k_{off})が、 10^0秒^{-1} ～ 10^{-4}秒^{-1} の範囲内であると推測される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 4】

前記細胞を第1の受容体結合試薬と接触させる段階が15 以下の温度で行われる、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 5】

接触させる段階が4 以下の温度で行われる、請求項54記載の方法。 30

【請求項 5 6】

少なくとも3つの受容体分子Rを含む細胞であって、該細胞が、

(i) 該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および

(ii) 該第1の受容体結合試薬の該第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬

を、少なくとも2つの受容体分子Rに結合させており、

該第1の受容体結合試薬(i)および該第1の多量体化試薬(ii)が、標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、該第1の多価結合複合体が、1つの該第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの該第1の受容体結合試薬を含み、かつ 40

第1の検出可能な標識が該第1の受容体結合試薬に結合しており、かつ

第2の検出可能な標識が少なくとも1つの受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着している、該細胞。

【請求項 5 7】

前記細胞が、

(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結 50

合試薬、および

(iv) 該第2の受容体結合試薬の該第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬を、少なくとも2つの受容体分子Rにさらに結合させており、該第2の受容体結合試薬(iii)および該第2の多量体化試薬(iv)が、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、該第2の多価結合複合体が、1つの該第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ第2の検出可能な標識が該第2の多価結合複合体に結合している、請求項56記載の細胞。

【請求項58】

前記細胞が、

(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2

を、少なくとも2つの受容体分子Rにさらに結合させており、

該多量体受容体結合試薬M2が該少なくとも2つの受容体分子Rを介して該細胞に本質的に不可逆的に結合し、

第2の検出可能な標識が該多量体受容体結合試薬M2に結合している、

請求項56記載の細胞。

【請求項59】

前記細胞が、

(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、該受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2

を、該受容体分子Rにさらに結合させており、

第2の検出可能な標識が該不可逆的受容体結合試薬I2に結合している、

請求項56記載の細胞。

【請求項60】

標的細胞が哺乳動物細胞である、請求項56～59のいずれか一項記載の細胞。

【請求項61】

哺乳動物細胞がリンパ球または幹細胞である、請求項60記載の細胞。

【請求項62】

リンパ球がT細胞、Tヘルパー細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞である、請求項61記載の細胞。

【請求項63】

T細胞がCMV特異的CD8+ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞および制御性T細胞の群より選択される、請求項62記載の細胞。

【請求項64】

受容体分子RがT細胞受容体(TCR)である、請求項56～63のいずれか一項記載の細胞。

【請求項65】

標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の解離速度定数(k_{off})を決定するための試薬キットであって、該キットが、

(i) 該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および

(ii) 該第1の受容体結合試薬の該第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬、

ここで、

該第1の受容体結合試薬(i)および該第1の多量体化試薬(ii)が、該標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、該第1の多価結合複合体が、1つの該第1の多量体化試薬

10

20

30

40

50

に結合した少なくとも2つの該第1の受容体結合試薬を含み、

第1の検出可能な標識が該第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができる；ならびに

(iii) 該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬；および

(iv) 該第2の受容体結合試薬の該第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬、

ここで、

該第2の受容体結合試薬(iii)および該第2の多量体化試薬(iv)が、該標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、該第2の多価結合複合体が、1つの該第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、

第2の検出可能な標識が該第2の多価結合複合体に結合している；

または

(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2、

ここで、

該多量体受容体結合試薬M2が該受容体分子Rを介して該標的細胞に本質的に不可逆的に結合し、

第2の検出可能な標識が該多量体受容体結合試薬M2に結合している；

または

(iii'') 該受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、該受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2、

ここで、

第2の検出可能な標識が該不可逆的受容体結合試薬I2に結合している；

を含み、

該第1の検出可能な標識が該第2の検出可能な標識ではない、該キット。

【請求項66】

第1の多量体化試薬上の第1の結合部位Z1への結合について第1の結合パートナーC1と競合することができる競合試薬CRをさらに含む、請求項65記載のキット。

【請求項67】

好ましくはEDTAまたはEGTAである金属キレート試薬をさらに含む、請求項65記載のキット。

【請求項68】

受容体分子Rを含む標的細胞と、

(i) 該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬と、

(ii) 該第1の受容体結合試薬の該第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬と

を含有する第1の容器であって、

該第1の受容体結合試薬(i)および該第1の多量体化試薬(ii)が、該標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成することができる、該第1の多価結合複合体が、1つの該第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの該第1の受容体結合試薬を含み、かつ

第1の検出可能な標識が該第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができる、かつ

第2の検出可能な標識が該受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着しており、

10

20

30

40

50

該第1の検出可能な標識が該第2の検出可能な標識ではない、
該第1の容器；ならびに

- a. 該第1の多量体化試薬上の該第1の結合部位Z1への結合について第1の結合パートナーC1と競合することができる競合試薬CR、または
- b. 好ましくはEDTAもしくはEGTAである金属キレート試薬を含む流体を含有する第2の容器

を含む機器であって、

該第1の容器および第2の容器が、流体を該第2の容器から該第1の容器へ移動させることができるように接続されている、該機器。

【請求項69】

10

第1の容器が、

(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬と、

(iv) 該第2の受容体結合試薬の該第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬とをさらに含有し、

該第2の受容体結合試薬(iii)および該第2の多量体化試薬(iv)が、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成することができ、該第2の多価結合複合体が、1つの該第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ第2の検出可能な標識が該第2の多価結合複合体に結合している、請求項68記載の機器。

20

【請求項70】

第1の容器が、

(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2

をさらに含有し、

該多量体受容体結合試薬M2が該受容体分子Rを介して標的細胞に本質的に不可逆的に結合し、

30

第2の検出可能な標識が該多量体受容体結合試薬M2に結合している、請求項68記載の機器。

【請求項71】

第1の容器が、

(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、該受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2をさらに含有し、

第2の検出可能な標識が該不可逆的受容体結合試薬I2に結合している、

請求項68記載の機器。

40

【請求項72】

フローサイトメトリー用の機器に含まれる、請求項68~71のいずれか一項記載の機器。

【請求項73】

第1の容器がフローサイトメトリー用の機器のサンプル入口と接続されている、請求項68~72のいずれか一項記載の機器。

【請求項74】

第1の容器および第2の容器が、カニューレまたは管を介して接続されている、請求項68~73のいずれか一項記載の機器。

【請求項75】

第1の容器と第2の容器との間の接続部内に配置された弁を含む、請求項68~74のいずれ

50

か一項記載の機器。

【請求項 7 6】

弁が三方弁である、請求項75記載の機器。

【請求項 7 7】

(a) 請求項1～56のいずれか一項記載の方法を用いて、対象から得られたサンプル中のT細胞の解離速度定数(k_{off})を決定する段階、

(b) 該対象から得られたサンプルから該T細胞を単離する段階を含む、高アビディティT細胞を単離する方法。

【請求項 7 8】

決定された解離速度定数が、所与の閾値以下である値を有する、請求項77記載の方法。

10

【請求項 7 9】

閾値が約 10^{-1} 秒 $^{-1}$ ～約 10^{-3} 秒 $^{-3}$ の範囲内である、請求項77記載の方法。

【請求項 8 0】

サンプルが末梢血サンプルまたはPBMCサンプルである、請求項77～79のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 1】

対象が哺乳動物、好ましくはヒトである、請求項77～80のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

発明の分野

本発明は、可逆的細胞標識および不可逆的細胞標識の組み合わせを用いて標的細胞上の受容体分子Rの解離速度定数(k_{off})を決定する方法に関する。本発明はさらに、そのような受容体分子Rを含む細胞であって、受容体分子Rにそのような細胞標識の組み合わせを結合させている、該細胞に関する。本発明はさらに、本発明の方法を実施するのに有用なキットおよび機器に関する。本発明はさらに、高アビディティT細胞の単離方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

ウイルス感染およびいくつかの細菌感染の制御における細胞性適応免疫の重要性は、枯渇実験または養子移入実験によって、ならびに遺伝的マウスモデルにおいて説得力をもって実証されている。それによって、抗原特異的CD8+ T細胞は、細胞内病原体に対する防御に関して主要な役割を果たすと見られている。また、ある種のがんにおいて、機能的CD8+ T細胞の存在は、腫瘍退縮の誘導と関連している可能性がある。それゆえ、さまざまな免疫療法的アプローチは、患者における機能的CD8+ T細胞応答の再構成を目的とする。抗原特異的T細胞が依然として存在しているが微小環境によって沈黙している場合、「チェックポイント阻害剤」の適用は既存のT細胞の有効性を再活性化するのに役立つ。しかし、内因性抗原特異的T細胞が欠如しているか、または既存の細胞が弱い抗原認識のT細胞受容体(TCR)を保有している場合、より強力なT細胞の養子T細胞移入は防御的抗原特異的CD8+ T細胞応答を回復する有望なアプローチとなりうる。過去数十年にわたる研究は、広

30

40

に興味深い。

【0003】

T細胞の機能性を記述するための重要なパラメータは、「T細胞アビディティ」といわれ、これは機能レベルで、例えば抗原特異的刺激後のサイトカイン産生として一般に評価される。高い機能的アビディティを有するT細胞は、ウイルス感染の除去または腫瘍退縮の誘導が優れていることが示されうる。T細胞アビディティの大部分はTCR内にもともと備わっており、構造的アビディティとして評価することができ、これは、TCRのその同族リガ

50

ンドであるペプチド主要組織適合遺伝子複合体(pMHC)に対する結合強度である。

【0004】

Nauerth et al., 2013, Science Translational Medicine, 5(192):192ra87(非特許文献1)は、構造的TCRアビディティの重要な要素を定量化するために、いわゆる「TCR-リガンド k_{off} 速度アッセイ」について報告した。このアッセイは、可逆的多量体、いわゆるストレプタマー(Streptamer)に基づいている。組み換えにより発現されたpMHCは、pMHCのC末端に融合している短いStrepタグ(Streptag)配列を通じてストレプトアクチン(Streptactin)骨格上で多量体化することができる。これらの多量体複合体は、生きているT細胞の表面に発現しているTCRに安定的に結合することができる。しかしながら、ビオチンの添加によって、多量体複合体は破壊され、T細胞表面に単量体のTCR-pMHC複合体を残す。この単量体結合は安定しておらず、pMHCはTCR-pMHCの結合強度に応じた速度でTCRから解離する。pMHCが蛍光標識されている場合、その解離を蛍光色素の減衰によってモニターすることができる。構造的アビディティを評価する他の方法とは対照的に、TCR-リガンド k_{off} 速度アッセイは、生きているT細胞の表面に発現したTCRに結合した真の単量体pMHCの解離の測定を可能にする。蛍光顕微鏡の助けを借りた k_{off} 速度アッセイを用いて、本発明者らはTCR-pMHC結合半減期時間($t_{1/2}$)と、対応するT細胞の機能性との間の明確な相関関係を実証することができた。 $t_{1/2}$ が遅いT細胞は、インビトロでより高い機能的アビディティを示すだけでなく、インビボでの感染に対してより高い防御能力も示した。

10

【0005】

リアルタイム顕微鏡法による蛍光減衰のモニタリングは、単一細胞レベルでTCRリガンド k_{off} 速度を正確に分析する可能性を提供する。残念なことに、アッセイの設定はかなり労働集約的であり、特別な器具の使用を必要とする。Hebeisen et al. 2015, Cancer Res, 75(10):1983-91(非特許文献2)には、被分析T細胞の事前選別またはクローニングと k_{off} 速度測定を組み合わせることが提案されていた。しかしながら、これは時間のかかる手順であるだけでなく、インビトロでの増殖プロトコルが複雑なT細胞集団の組成を変化させることが多いので、得られる結果を偏らせる危険性もある。

20

【0006】

したがって、本発明の目的は、これらの欠点を少なくとも部分的に克服する手段および方法を提供することである。

【先行技術文献】

30

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Nauerth et al., 2013, Science Translational Medicine, 5(192):192ra87

【非特許文献2】Hebeisen et al. 2015, Cancer Res, 75(10):1983-91

【発明の概要】

【0008】

本発明は、標的細胞に付着した第1の検出可能な標識および標的細胞に付着した第2の検出可能な標識を検出する段階を含む、標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の解離速度定数(k_{off})を決定する方法であって、ここで該細胞は、(i) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および(ii) 第1の受容体結合試薬の第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬と接触されており、第1の受容体結合試薬(i)および第1の多量体化試薬(ii)は、標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、第1の多価結合複合体は、1つの第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第1の受容体結合試薬を含み、かつ第1の検出可能な標識は第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができ、かつ第2の検出可能な標識は受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着しており、第1の検出可能な標識および第2の検出可能な標識は互いに異なる、該方法に関する。

40

50

【0009】

本発明は、前記細胞が、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナー-C2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬、および(iv) 第2の受容体結合試薬の第2の結合パートナー-C2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬とさらに接触されていてもよく、ここで第2の受容体結合試薬(iii)および第2の多量体化試薬(iv)は、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、第2の多価結合複合体は、1つの第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ第2の検出可能な標識は第2の多価結合複合体に結合していることをさらに包含する。

10

【0010】

本発明はまた、前記細胞が、(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2とさらに接触されていてもよく、ここで多量体受容体結合試薬M2は受容体分子Rを介して標的細胞に本質的に不可逆的に結合し、第2の検出可能な標識は多量体受容体結合試薬M2に結合していることを包含する。

【0011】

本発明はまた、前記細胞が、(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2とさらに接触されていてもよく、ここで第2の検出可能な標識は不可逆的受容体結合試薬I2に結合していることを包含する。

20

【0012】

本発明はさらに、少なくとも3つの受容体分子Rを含む細胞であって、ここで該細胞は、(i) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナー-C1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および(ii) 第1の受容体結合試薬の第1の結合パートナー-C1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬を、少なくとも2つの受容体分子Rに結合させており、第1の受容体結合試薬(i)および第1の多量体化試薬(ii)は、標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、第1の多価結合複合体は、1つの第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第1の受容体結合試薬を含み、かつ第1の検出可能な標識は第1の受容体結合試薬に結合しており、かつ第2の検出可能な標識は少なくとも1つの受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着している、該細胞を包含する。

30

【0013】

本発明はさらに、前記細胞が、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナー-C2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬、および(iv) 第2の受容体結合試薬の第2の結合パートナー-C2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬を、少なくとも2つの受容体分子Rにさらに結合させていてもよく、ここで第2の受容体結合試薬(iii)および第2の多量体化試薬(iv)は、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、第2の多価結合複合体は、1つの第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ第2の検出可能な標識は第2の多価結合複合体に結合していることを包含する。

40

【0014】

本発明はまた、前記細胞が、(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2を、少なくとも2つの受容体分子Rにさらに結合させていてもよく、ここで多量体受容体結合試薬M2は少なくとも2つの受容体分子Rを介して細胞に本質的に不可逆的に結合し、第2の検出可能な標識は多量体受容体結合試薬M2に結合し

50

ていることを包含する。

【0015】

本発明はまた、前記細胞が、(iii') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2を、受容体分子Rにさらに結合させていてもよく、ここで第2の検出可能な標識は不可逆的受容体結合試薬I2に結合していることを包含する。

【0016】

本発明はさらに、標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の解離速度定数(k_{off})を決定するための試薬キットであって、キットは、(i) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および(ii) 第1の受容体結合試薬の第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬を含み、ここで、第1の受容体結合試薬(i)および第1の多量体化試薬(ii)は、標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、第1の多価結合複合体は、1つの第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第1の受容体結合試薬を含み、第1の検出可能な標識は第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができる、該キットを包含する。

【0017】

キットはさらに、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬；および(iv) 第2の受容体結合試薬の第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬、ここで、第2の受容体結合試薬(iii)および第2の多量体化試薬(iv)は、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、第2の多価結合複合体は、1つの第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、第2の検出可能な標識は第2の多価結合複合体に結合している；または(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬は、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2、ここで、多量体受容体結合試薬M2は受容体分子Rを介して標的細胞に本質的に不可逆的に結合し、第2の検出可能な標識は多量体受容体結合試薬M2に結合している；または(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2、ここで、第2の検出可能な標識は不可逆的受容体結合試薬I2に結合している；を含み、ここで第1の検出可能な標識は第2の検出可能な標識ではない。

【0018】

本発明はさらに、受容体分子Rを含む標的細胞と、(i) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬と、(ii) 第1の受容体結合試薬の第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬とを含有する、第1の容器であって、第1の受容体結合試薬(i)および第1の多量体化試薬(ii)は、標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成することができる、第1の多価結合複合体は、1つの第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第1の受容体結合試薬を含み、かつ第1の検出可能な標識は第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができる、かつ第2の検出可能な標識は受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着しており、第1の検出可能な標識は第2の検出可能な標識ではない、該第1の容器；ならびに(a) 第1の多量体化試薬上の第1の結合部位Z1への結合について第1の結合パートナーC1と競合することができる競合試薬CR、または(b) 好ましくはEDTAもしくはEGTAである金属キレート試薬、を含む流体を含有する第2の容器；を含む、機器であって、第1の容器およ

び第2の容器は、流体を第2の容器から第1の容器へ移動させることができるように接続されている、該機器を包含する。

【0019】

機器の第1の容器は、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬と、(iv) 第2の受容体結合試薬の第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬とをさらに含有してもよく、ここで第2の受容体結合試薬(iii)および第2の多量体化試薬(iv)は、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成することができ、第2の多価結合複合体は、1つの第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ第2の検出可能な標識は第2の多価結合複合体に結合している。

10

【0020】

機器の第1の容器は、(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬は、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2をさらに含有してもよく、ここで多量体受容体結合試薬M2は受容体分子Rを介して標的細胞に本質的に不可逆的に結合し、第2の検出可能な標識は多量体受容体結合試薬M2に結合している。

【0021】

機器の第1の容器は、(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2をさらに含有してもよく、ここで第2の検出可能な標識は不可逆的受容体結合試薬I2に結合している。

20

【0022】

本発明はさらに、(a) 本明細書において記述される本発明の方法を用いて、対象から得られたサンプル中のT細胞の解離速度定数(k_{off})を決定する段階、および(b) 該対象から得られたサンプルから該T細胞を単離する段階を含む、高アビディティT細胞を単離する方法を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

30

【図1A】少なくとも2つの第1の結合部位Z1(26)および任意で第3の検出可能な標識(93)を含む、第1の多量体化試薬(25)；少なくとも2つの第2の結合部位Z2(36)および第2の検出可能な標識を含む、第2の多量体化試薬(35)；第1の受容体結合部位B1(71)、第1の検出可能な標識(91)、および第1の結合パートナーC1(81)を含む、第1の受容体結合試薬(20)；第2の受容体結合部位B2(72)および第2の結合パートナーC2(82)を含む、第2の受容体結合試薬(30)；少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2(72)および第2の検出可能な標識(92)を含む、多量体受容体結合試薬M2(40)；不可逆的受容体結合部位B3(73)および第2の検出可能な標識(92)を含む、不可逆的受容体結合試薬I2(50)；ならびに少なくとも1つの受容体分子R(11)を含む標的細胞(10)の略図を示す。

【図1B】第1の多量体化試薬(25)および第2の多量体化試薬(35)を用いた解離速度定数(k_{off})決定の原理を例示する。標的細胞(10)は、第1の受容体結合試薬(20)の第1の受容体結合部位B1(71)を、少なくとも2つの受容体分子R(11)に結合させている。第1の受容体結合試薬(20)は、第1の受容体結合部位B1(71)、第1の検出可能な標識(91)および第1の結合パートナーC1(81)を含む。第1の受容体結合試薬(20)に含まれる第1の結合パートナーC1(81)および第1の多量体化試薬(25)に含まれる第1の結合部位Z1(26)を介して、少なくとも2つの第1の受容体結合試薬(20)が第1の多量体化試薬(25)に可逆的に結合される。第1の多量体化試薬(25)は、任意で第3の検出可能な標識(93)を含んでもよい。さらに、標的細胞(10)は、第2の受容体結合試薬(30)の第2の受容体結合部位B2(72)を、少なくとも2つの受容体分子R(11)に結合させている。第2の受容体結合試薬(30)に含まれる第2の結合パートナーC1(82)および第2の多量体化試薬(35)に含まれる第2の結合部位Z2(36)を介して、少なくと

40

50

も2つの第2の受容体結合試薬(30)が第2の多量体化試薬(35)に安定的に結合される。第2の多量体化試薬(35)は、第2の検出可能な標識(92)を含む。あるいは、第2の検出可能な標識は、第2の多量体化試薬に含まれることに加えてまたは含まれることの代わりに、第2の受容体結合剤(30)に含まれることができる(図中に示されず)。複合体を競合試薬CR(60)と接触させると、競合試薬CR(60)は、第1の多量体化試薬(25)に含まれる第1の結合部位Z1(26)について、第1の受容体結合試薬(20)に含まれる第1の結合パートナーC1(81)と競合する。第1の多量体化試薬(25)に含まれる第1の結合部位Z1(26)への競合試薬CR(60)の結合により、第1の受容体結合試薬(20)と第1の多量体化試薬(25)との間の結合は破壊され、第1の多量体化試薬(25)、最終的には第1の受容体結合試薬(20)が標的細胞(10)から切り離される。

10

【図1C】第1の多量体化試薬(25)および多量体受容体結合試薬M2(40)を用いた解離速度定数(k_{off})決定の原理を示す。標的細胞(10)は、第1の受容体結合試薬(20)の第1の受容体結合部位B1(71)を、少なくとも2つの受容体分子R(11)に結合させている。第1の受容体結合試薬(20)は、第1の受容体結合部位B1(71)、第1の検出可能な標識(91)および第1の結合パートナーC1(81)を含む。第1の受容体結合試薬(20)に含まれる第1の結合パートナーC1(81)および第1の多量体化試薬(25)に含まれる第1の結合部位Z1(26)を介して、少なくとも2つの第1の受容体結合試薬(20)が第1の多量体化試薬(25)に可逆的に結合される。第1の多量体化試薬(25)は、任意で第3の検出可能な標識(93)を含んでもよい。さらに、標的細胞(10)は、多量体受容体結合試薬M2(40)の第2の受容体結合部位B2(72)を、少なくとも2つの受容体分子R(11)に結合させている。多量体受容体結合試薬M2(40)は、第2の検出可能な標識(92)を含む。複合体を競合試薬CR(60)と接触させると、競合試薬CR(60)は、第1の多量体化試薬(25)に含まれる第1の結合部位Z1(26)について、第1の受容体結合試薬(20)に含まれる第1の結合パートナーC1(81)と競合する。第1の多量体化試薬(25)に含まれる第1の結合部位Z1(26)への競合試薬CR(60)の結合により、第1の受容体結合試薬(20)と第1の多量体化試薬(25)との間の結合は破壊され、第1の多量体化試薬(25)、最終的には第1の受容体結合試薬(20)が標的細胞(10)から切り離される。

20

【図1D】第1の多量体化試薬(25)および不可逆的受容体結合試薬I2(50)を用いた解離速度定数(k_{off})決定の原理を示す。標的細胞(10)は、第1の受容体結合試薬(20)の第1の受容体結合部位B1(71)を、少なくとも2つの受容体分子R(11)に結合させている。第1の受容体結合試薬(20)は、第1の受容体結合部位B1(71)、第1の検出可能な標識(91)および第1の結合パートナーC1(81)を含む。第1の受容体結合試薬(20)に含まれる第1の結合パートナーC1(81)および第1の多量体化試薬(25)に含まれる第1の結合部位Z1(26)を介して、少なくとも2つの第1の受容体結合試薬(20)が第1の多量体化試薬(25)に可逆的に結合される。第1の多量体化試薬(25)は、任意で第3の検出可能な標識(93)を含んでもよい。さらに、標的細胞(10)は、不可逆的受容体結合試薬I2(50)を、受容体分子R(11)に結合させている。不可逆的受容体結合試薬I2(50)は、第2の検出可能な標識(92)を含む。複合体を競合試薬CR(60)と接触させると、競合試薬CR(60)は、第1の多量体化試薬(25)に含まれる第1の結合部位Z1(26)について、第1の受容体結合試薬(20)に含まれる第1の結合パートナーC1(81)と競合する。第1の多量体化試薬(25)に含まれる第1の結合部位Z1(26)への競合試薬CR(60)の結合により、第1の受容体結合試薬(20)と第1の多量体化試薬(25)との間の結合は破壊され、第1の多量体化試薬(25)、最終的には第1の受容体結合試薬(20)が標的細胞(10)から切り離される。

30

40

【図2A】フローサイトメトリーに基づく k_{off} 速度アッセイの設定および分析。フローサイトメーターの例示的な設定の略図である。

【図2B】フローサイトメトリーに基づく k_{off} 速度アッセイの設定および分析。 k_{off} 速度アッセイ用のFACS管を有するサンプル温度制御装置の例示的描写である。

【図2C】フローサイトメトリーに基づく k_{off} 速度アッセイの設定および分析。T細胞クローンを用いたフローに基づく k_{off} 速度アッセイの例示的なゲーティング戦略を示す：2C TCRを発現するT細胞クローンを可逆的多量体(ストレプトアクチンAPCおよびSIYRYGL(SEQ ID NO: 10)-H2Kb-Alexa488を含む)および生/死の識別用のヨウ化プロピジウム(PI)で染

50

色した。染色された細胞をCyan Lxにて分析し、30秒後に2 mMのD-ビオチンを添加し、10分間解離を観察した。サンプルを生きたリンパ球にてゲーティングし、これらの細胞からのストレプトアクチン-APCおよびMHC-Alexa488の解離を観察した。

【図2D】フローサイトメトリーに基づく k_{off} 速度アッセイの設定および分析。解離反応速度を視覚化するためのデータの整理を示す：生きているリンパ球のAPCおよびAlexa488蛍光強度を、FlowJoにおいて、計算された分析時間にわたりプロットした。計算時間を200ゲートに分割し、1ゲートに含まれる全細胞の平均蛍光強度(MFI)を算出した。APC(左軸)およびAlexa488(右軸)のMFI値をGraph Pad Prismにて分析時間にわたってプロットした(上のグラフ)。分析用のデータ点を選択し、指数関数的減衰に当てはめた(下のグラフ)。

【図2E】フローサイトメトリーに基づく k_{off} 速度アッセイの設定および分析。全細胞の解離反応速度の直接分析である：生きている全リンパ球の蛍光値がGraph Pad Prismに直接エクスポートされている。分析用のデータ点を選択し、指数関数的減衰に当てはめる。

【図3A】CMV特異的T細胞クローンをを用いたフローサイトメトリーに基づく k_{off} 速度アッセイ。図3A~図3Cは、ヒトCMV特異的T細胞クローンの k_{off} 速度アッセイを示す：T細胞クローンを特異的可逆的多量体(ストレプトアクチンAPCおよびMHC-Alexa488を含む)および生/死の識別用のヨウ化プロピジウム(PI)で染色した。 k_{off} 速度アッセイはCyan Lxにて実施した。生きている細胞のAlexa 488およびAPC染色の蛍光値を分析時間にわたってプロットし、分析用のデータ点を記述のように選択し、指数関数的減衰に当てはめる。

【図3B】CMV特異的T細胞クローンをを用いたフローサイトメトリーに基づく k_{off} 速度アッセイ。図3A~図3Cは、ヒトCMV特異的T細胞クローンの k_{off} 速度アッセイを示す：T細胞クローンを特異的可逆的多量体(ストレプトアクチンAPCおよびMHC-Alexa488を含む)および生/死の識別用のヨウ化プロピジウム(PI)で染色した。 k_{off} 速度アッセイはCyan Lxにて実施した。生きている細胞のAlexa 488およびAPC染色の蛍光値を分析時間にわたってプロットし、分析用のデータ点を記述のように選択し、指数関数的減衰に当てはめる。

【図3C】CMV特異的T細胞クローンをを用いたフローサイトメトリーに基づく k_{off} 速度アッセイ。図3A~図3Cは、ヒトCMV特異的T細胞クローンの k_{off} 速度アッセイを示す：T細胞クローンを特異的可逆的多量体(ストレプトアクチンAPCおよびMHC-Alexa488を含む)および生/死の識別用のヨウ化プロピジウム(PI)で染色した。 k_{off} 速度アッセイはCyan Lxにて実施した。生きている細胞のAlexa 488およびAPC染色の蛍光値を分析時間にわたってプロットし、分析用のデータ点を記述のように選択し、指数関数的減衰に当てはめる。

【図3D】CMV特異的T細胞クローンをを用いたフローサイトメトリーに基づく k_{off} 速度アッセイ。顕微鏡にておよびフローサイトメーターにて評価したTCR-pMHC結合半減期時間の比較を示す。

【図4A】可逆的多量体および不可逆的多量体による二重染色の原理。可逆的多量体および不可逆的多量体によるCD8+ T細胞の染色(左上)ならびにD-ビオチン添加後の可逆的多量体の解離(右下)の略図である。

【図4B】可逆的多量体および不可逆的多量体による二重染色の原理。ヒトCMV特異的T細胞クローンに由来するT細胞が、特異的可逆的多量体(ストレプトアクチンAPCおよびHLA-B8 IE188-96-Alexa488を含む)および生/死の識別用のヨウ化プロピジウム(PI)で、ならびに特異的不可逆的多量体(ストレプトアビジンBV421および非標識B8 IE188-96分子を含む)で染色されたことを示す。D-ビオチン添加前のヒトCMV特異的T細胞クローンの二重染色(ストレプトアクチンAPCおよびストレプトアビジンBV421、生きているCD8+リンパ球にてゲーティングした)のドットプロット(左)。30秒後のD-ビオチン添加に伴う分析時間にわたる不可逆的多量体(ストレプトアビジンBV421)の骨格の染色強度ならびに可逆的多量体の骨格(ストレプトアクチンAPC)およびpMHC分子(Alexa488)の染色強度。

【図5A】二重染色後の可逆的多量体染色強度および k_{off} 速度。不可逆的多量体染色のインキュベーション時間および濃度の滴定を描く：CMV陽性(B7 pp65)ドナー由来のPBMCを、特異的可逆的多量体(ストレプトアクチンAPCおよびHLA-B7 pp65-Alexa488を含む)、CD8 PE-Cyに対する抗体、および生/死の識別用のヨウ化プロピジウム(PI)とともにインキュベートした。洗浄後、ドットプロットの上を示したインキュベーション時間および多量体の

10

20

30

40

50

希釈で、サンプルを特定の不可逆的多量体とともにインキュベートした(材料および方法も参照されたい)。ドットプロットは、生きているCD8+リンパ球のCD8 Pe-Cy7およびストレプトアビジンBV421染色を示す。

【図5B】二重染色後の可逆的多量体染色強度および k_{off} 速度。図5Bおよび図5Cは、図5Aに描かれたゲートの不可逆的多量体(ストレプトアビジンBV421)および可逆的多量体(MHC Alexa 488およびストレプトアクチンAPC)の染色のヒストグラムを示す。

【図5C】二重染色後の可逆的多量体染色強度および k_{off} 速度。図5Bおよび図5Cは、図5Aに描かれたゲートの不可逆的多量体(ストレプトアビジンBV421)および可逆的多量体(MHC Alexa 488およびストレプトアクチンAPC)の染色のヒストグラムを示す。

【図5D】二重染色後の可逆的多量体染色強度および k_{off} 速度。A)に記述されたサンプルに含有されるB7pp65特異的T細胞のTCR-pMHC k_{off} 速度を示す。

【図5E】二重染色後の可逆的多量体染色強度および k_{off} 速度。図5Eおよび図5Fは、可逆的多量体のみでまたはBV421とコンジュゲートされたもしくはPEとコンジュゲートされた不可逆的多量体との組み合わせで染色された2つのCMV特異的T細胞クローン(HLA B8 IE188-96に特異的)の結果を示す。全てのサンプルを生/死の識別のためにヨウ化プロビジウム(PI)で染色した。 K_{off} 速度を生きているリンパ球から測定した。

【図5F】二重染色後の可逆的多量体染色強度および k_{off} 速度。図5Eおよび図5Fは、可逆的多量体のみでまたはBV421とコンジュゲートされたもしくはPEとコンジュゲートされた不可逆的多量体との組み合わせで染色された2つのCMV特異的T細胞クローン(HLA B8 IE188-96に特異的)の結果を示す。全てのサンプルを生/死の識別のためにヨウ化プロビジウム(PI)で染色した。 K_{off} 速度を生きているリンパ球から測定した。

【図6A】B7 pp65特異的T細胞集団の二重染色および選別。CMV陽性ドナー由来のPBMC(HLA B7 pp65に特異的)を、特異的可逆的多量体(ストレプトアクチンAPCおよびMHC-Alexa488を含む)、CD8に対する抗体、および生/死の識別用のヨウ化プロビジウム(PI)で染色した。細胞を2つのサンプルに分けた。一方のサンプルを用いて、生きているCD8+ ストレプトアクチンAPC+ リンパ球に対するFACS選別をMoFlo (Beckman Coulter)にて実施した。もう一方のサンプルは、不可逆的多量体(ストレプトアビジンPEを含む)でさらに染色した。生きているリンパ球のストレプトアビジンPEおよびCD8 eF450染色(左写真)ならびに二重染色サンプルのストレプトアビジン+ 細胞のMHC Alexa488およびストレプトアクチン染色(右写真)のドットプロットを示す。

【図6B】B7 pp65特異的T細胞集団の二重染色および選別。CMV陽性ドナー由来のPBMC(HLA B7 pp65に特異的)を、特異的可逆的多量体(ストレプトアクチンAPCおよびMHC-Alexa488を含む)、CD8に対する抗体、および生/死の識別用のヨウ化プロビジウム(PI)で染色した。細胞を2つのサンプルに分けた。一方のサンプルを用いて、生きているCD8+ ストレプトアクチンAPC+ リンパ球に対するFACS選別をMoFlo (Beckman Coulter)にて実施した。もう一方のサンプルは、不可逆的多量体(ストレプトアビジンPEを含む)でさらに染色した。図6Bは、可逆的多量体染色B7pp65特異的T細胞を用いた k_{off} 速度アッセイを示す一方で、図6Cは、二重染色B7pp65特異的T細胞を用いた k_{off} 速度アッセイを示す。分析した細胞のAlexa 488およびAPC染色の蛍光値を分析時間にわたってプロットし、分析用のデータ点を記述のように選択し、指数関数的減衰に当てはめる。

【図6C】B7 pp65特異的T細胞集団の二重染色および選別。CMV陽性ドナー由来のPBMC(HLA B7 pp65に特異的)を、特異的可逆的多量体(ストレプトアクチンAPCおよびMHC-Alexa488を含む)、CD8に対する抗体、および生/死の識別用のヨウ化プロビジウム(PI)で染色した。細胞を2つのサンプルに分けた。一方のサンプルを用いて、生きているCD8+ ストレプトアクチンAPC+ リンパ球に対するFACS選別をMoFlo (Beckman Coulter)にて実施した。もう一方のサンプルは、不可逆的多量体(ストレプトアビジンPEを含む)でさらに染色した。図6Bは、可逆的多量体染色B7pp65特異的T細胞を用いた k_{off} 速度アッセイを示す一方で、図6Cは、二重染色B7pp65特異的T細胞を用いた k_{off} 速度アッセイを示す。分析した細胞のAlexa 488およびAPC染色の蛍光値を分析時間にわたってプロットし、分析用のデータ点を記述のように選択し、指数関数的減衰に当てはめる。

10

20

30

40

50

【図 6 D】B7 pp65特異的T細胞集団の二重染色および選別。CMV陽性ドナー由来のPBMC(HLA A B7 pp65に特異的)を、特異的可逆的多量体(ストレプトアクチンAPCおよびMHC-Alexa488を含む)、CD8に対する抗体、および生/死の識別用のヨウ化プロビジウム(PI)で染色した。細胞を2つのサンプルに分けた。一方のサンプルを用いて、生きているCD8+ ストレプトアクチンAPC+ リンパ球に対するFACS選別をMoFlo (Beckman Coulter)にて実施した。もう一方のサンプルは、不可逆的多量体(ストレプトアビジンPEを含む)でさらに染色した。選別したサンプルおよび二重染色サンプルのTCR-pMHC結合半減期時間の比較を示す。

【図 7 - 1】オリゴクローンHLA * 07 02/CMVpp65特異的CD8 T細胞集団のエクスピボ k_{off} 速度測定。健常ドナーの新鮮血液からフィコール(Ficoll)勾配遠心分離によってPBMCを単離した。単一の生きているCD19- CD8+ 不可逆的pMHC-PE+ T細胞に対するBooleanゲーティング。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。

10

【図 7 - 2】オリゴクローンHLA * 07 02/CMVpp65特異的CD8 T細胞集団のエクスピボ k_{off} 速度測定。健常ドナーの新鮮血液からフィコール(Ficoll)勾配遠心分離によってPBMCを単離した。単一の生きているCD19- CD8+ 不可逆的pMHC-PE+ T細胞に対するBooleanゲーティング。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。

【図 8 - 1】オリゴクローンHLA * 02 01/CMVpp65特異的CD8 T細胞集団(ドナーHZ961)のエクスピボ k_{off} 速度測定。健常ドナーの新鮮血液からフィコール勾配遠心分離によって単離された凍結保存PBMCの k_{off} 速度測定。単一の生きているCD19- CD8+ 不可逆的pMHC-PE+ T細胞に対するBooleanゲーティング。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。

20

【図 8 - 2】オリゴクローンHLA * 02 01/CMVpp65特異的CD8 T細胞集団(ドナーHZ961)のエクスピボ k_{off} 速度測定。健常ドナーの新鮮血液からフィコール勾配遠心分離によって単離された凍結保存PBMCの k_{off} 速度測定。単一の生きているCD19- CD8+ 不可逆的pMHC-PE+ T細胞に対するBooleanゲーティング。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。

【図 9 - 1】オリゴクローンHLA * 02 01/CMVpp65特異的CD8 T細胞集団(ドナーHZ510)のエクスピボ k_{off} 速度測定。健常ドナーの新鮮血液からフィコール勾配遠心分離によって単離された凍結保存PBMCの k_{off} 速度測定。単一の生きているCD19- CD8+ 不可逆的pMHC-PE+ T細胞に対するBooleanゲーティング。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。

30

【図 9 - 2】オリゴクローンHLA * 02 01/CMVpp65特異的CD8 T細胞集団(ドナーHZ510)のエクスピボ k_{off} 速度測定。健常ドナーの新鮮血液からフィコール勾配遠心分離によって単離された凍結保存PBMCの k_{off} 速度測定。単一の生きているCD19- CD8+ 不可逆的pMHC-PE+ T細胞に対するBooleanゲーティング。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。

40

【図 10 - 1】CD8+ J76腫瘍細胞に対する k_{off} 速度測定を用いた単離TCRの機能的特徴付け。単一クローンPCRを用いて2つのHLA * 02 01/CMVpp65特異的TCRを単離した。その構造的アビディティを分析するため、内因性TCRを欠くCD8+ J76腫瘍細胞にTCRを形質導入した。単一の生きているCD8+ 不可逆的pMHC-PE+ T細胞に対するBooleanゲーティング。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。

【図 10 - 2】CD8+ J76腫瘍細胞に対する k_{off} 速度測定を用いた単離TCRの機能的特徴付け。単一クローンPCRを用いて2つのHLA * 02 01/CMVpp65特異的TCRを単離した。その構造的アビディティを分析するため、内因性TCRを欠くCD8+ J76腫瘍細胞にTCRを形質導入した

50

。単一の生きているCD8+ 不可逆的pMHC-PE+ T細胞に対するBooleanゲーティング。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。

【図11-1】高アビディティおよび低アビディティTCR pMHC相互作用についてのネズミモデル系における k_{off} 速度測定。行a.; SIIQFEKL:H2kb (SEQ ID NO:14)、行b.: SIYNFEKL:H2kb (SEQ ID NO: 15); 行c.: SIINFEKL:H2kb (SEQ ID NO: 15)。

【図11-2】高アビディティおよび低アビディティTCR pMHC相互作用についてのネズミモデル系における k_{off} 速度測定。行a.; SIIQFEKL:H2kb (SEQ ID NO:14)、行b.: SIYNFEKL:H2kb (SEQ ID NO: 15); 行c.: SIINFEKL:H2kb (SEQ ID NO: 15)。

【発明を実施するための形態】

10

【0024】

詳細な説明

いくつかの用途、例えば、T細胞クローンまたは形質導入T細胞のような同種の集団の測定の場合、単一細胞の分離は必要ではなく、一般的に利用可能な器具の使用により k_{off} 速度値の迅速なスクリーニングを可能にする方法が望ましいであろう。それゆえ、本出願の発明者らは、可逆的多量体に基づく k_{off} 速度アッセイの原理を、従来のフローサイトメトリーによって誘導される用途に移行することを目的とした。本発明者らは、驚くべきことに、 k_{off} 速度の動態が実際にフローサイトメトリーによって高感度で得られることを実証した; それにより、この手順は、顕微鏡によって誘導されるアッセイと同等の値を有する信頼性の高い解離測定値をもたらす。本発明者らは、さらに驚くべきことに、この手順がエキスピボで直接的に抗原特異的T細胞集団の分析に移行されうることを実証した。インビボ抗原特異的T細胞集団は非常に小さいことが多く、付加的な(非特異的)細胞の存在が、 k_{off} 速度測定に必要であるような染色動態の追跡を制限するため、これらの結果を以前には予想することができなかった。Hebeisen et al. 2015, Cancer Res, 75(10):1983-91には、被分析T細胞の事前選別またはクローニングと k_{off} 速度測定を組み合わせることが提案されていた。しかしながら、本発明者らは、これが時間のかかる手順であるだけでなく、インビトロでの増殖プロトコルが複雑なT細胞集団の組成を変化させることが多いので、得られる結果を偏らせる危険性もあることを認識した。それゆえ、本発明者らは、可逆的および不可逆的特異的MHC多量体を用いた抗原特異的T細胞の二重染色による、細胞選別およびインビトロでの細胞増殖を伴わない k_{off} 速度値の直接評価を想定した。不可逆的多量体で染色することにより、可逆的多量体の解離を観察しながら抗原特異的標的集団を安定的に同定することが可能になる。重要なことに、本出願の発明者らは、pMHCの解離速度が、不可逆的多量体によるさらなる染色によって影響されないことを実証することができた。ゆえに、フローサイトメトリーにより誘導されるTCRリガンドの k_{off} 速度測定と組み合わせた多量体二重染色を、非常に小さな抗原特異的T細胞集団でさえも直接エキスピボで分析するために用いることができる。

20

30

【0025】

それゆえ、本発明は、標的細胞に付着した第1の検出可能な標識および標的細胞に付着した第2の検出可能な標識を検出する段階を含む、標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の解離速度定数(k_{off})を決定する方法を包含する。第1の検出可能な標識は細胞に可逆的に結合しうるが、第2の検出可能な標識は細胞に本質的に不可逆的に結合しうる。この目的のため、細胞を、(i) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および第1の多量体化試薬であって、第1の受容体結合試薬の第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む、該第1の多量体化試薬と接触させた。第1の多量体化試薬は好ましくは、少なくとも3個、好ましくは少なくとも3個、好ましくは4~20個、好ましくは4~8個、好ましくは4個の第1の結合部位Z1を含む。第1の受容体結合試薬(i)および第1の多量体化試薬(ii)は、標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、第1の多価結合複合体は、1つの第1の多

40

50

量体化試薬に結合した少なくとも2つの第1の受容体結合試薬を含む。第1の多価複合体は好ましくは、1つの第1の多量体化試薬に結合した少なくとも3個、好ましくは少なくとも4個、好ましくは4~20個、好ましくは4~8個、好ましくは4個の第1の受容体結合試薬を含む。第1の検出可能な標識は第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができるかと理解されたい。第2の検出可能な標識は受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着しているとさらに理解されたい。第1の検出可能な標識および第2の検出可能な標識は互いに異なり、それらは同じ化合物ではないことを意味するとも理解されたい。第1の多量体化試薬は、第3の検出可能な標識を任意でさらに含んでもよい。第1、第2、および第3の検出可能な標識の各々は、好ましくは互いに異なり、好ましくは互いに区別されうると理解されたい。

10

【0026】

これに関連して、受容体結合試薬Bとその受容体R、例えば細胞表面受容体分子との間の複合体(C)の形成は、
 $C \rightleftharpoons B + R$

と表記される2状態プロセスによって記述できることに留意されたい。対応する解離 K_d 定数は

$$K_d = \frac{[B] + [R]}{[C]}$$

と定義され、式中[B]、[R]、および[C]は、所与の温度および圧力での受容体、受容体結合試薬(リガンド)およびそれぞれの複合体の平衡モル濃度である。解離 K_d 定数はまた、複合体の会合/形成の速度についてのオン速度の定数(k_{on}) (会合速度定数とも呼ばれる)および複合体の解離についてのオフ速度の定数(k_{off}) (解離速度定数とも呼ばれる)の比として

20

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

で表すこともできる。本出願において、熱力学的および速度論的定数 K_d 、 k_{on} および k_{off} の値は、温度4 および大気圧1.013 barでのその決定をいう。

【0027】

本明細書において用いられる「可逆的」は、一価結合複合体の文脈において用いられる場合、2つの結合パートナー間の結合、例えば受容体分子Rとその結合パートナーBとの間の結合の k_{off} 速度に関して表現されうる。可逆的結合の k_{off} 速度は、約 0.5×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 1×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 2×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 3×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 4×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 5×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 1×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 1.5×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 2×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 3×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 4×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 、約 5×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 1×10^{-2} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、または約 5×10^{-1} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上でありうる。そのような可逆的結合複合体のそれぞれの K_D 値は、約 1×10^{-10} M以上、約 1×10^{-9} M以上、約 1×10^{-8} M以上、約 1×10^{-7} M以上、約 1×10^{-6} M以上、約 1×10^{-5} M以上、約 1×10^{-4} M以上、約 1×10^{-3} M以上の範囲内でありうる。それと対照的に、
 「不可逆的」または「本質的に不可逆的」は、同義的にかつ交換可能に用いられ、また k_{off} 速度に関して表現されうる。例えば受容体分子Rとその結合パートナーBとの間の(本質的に)不可逆な結合の k_{off} 速度は、約 1×10^{-5} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-6} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-7} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-8} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-9} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-10} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下でありうる。そのような不可逆的結合複合体のそれぞれの K_D 値は、約 2×10^{-10} M以下、約 1×10^{-11} M以下、または約 1×10^{-12} M以下、約 1×10^{-13} M以下、または約 1×10^{-14} M以下の範囲内でありうる。それは 2×10^{-10} M~約 10^{-15} Mの範囲内でありうる。 k_{off} 速度、 k_{on} 速度または K_d に関して本明細書において用いられる場合の「約」という用語は、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 、 $\pm 0.3\%$ 、 $\pm 0.4\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 ± 0.7 ± 0.9 、% ± 1.0 、%、 $\pm 1.2\%$ 、 $\pm 1.4\%$ 、 $\pm 1.6\%$ 、 $\pm 1.8\%$ 、

30

40

50

± 2.0%、± 2.2%、± 2.4%、± 2.6%、± 2.8%、± 3.0%、± 3.5%、± 4.0%、± 4.5%、± 5.0%、± 6.0%、± 7.0%±、8.0%、± 9.0%±、10.0%、± 15.0%、または± 20.0%の許容誤差を含むことが意図される。しかしながら、受容体分子Rは典型的には標的細胞の表面上に2つまたはそれ以上のコピーで存在しうるので、細胞に結合する試薬が2つまたはそれ以上の結合部位Bを含む場合、アビディティ効果を考慮しなければならない可能性がある。そのような場合には、単一の受容体Rと単一の結合部位Bとの間の結合は可逆的でありうるが、複数のRを含む細胞と複数の結合部位Bを含む試薬との結合は本質的に不可逆的でありうる。そのような多価結合の場合、見掛けの k_{off} 値を定義することができ、ここで見掛けの k_{off} 値は、結合が一価であると仮定した場合に、見掛け上測定されうる k_{off} 値である。論じられるように、アビディティ効果のために、2つ以上の受容体Rを含む細胞と、2つ以上の結合部位Bを含む試薬、例えば多量体試薬の結合は、本質的に不可逆的であることができ、例えば見掛け上の k_{off} 値は不可逆的結合について定義された範囲内であることができる。しかしながら、各々が結合部位Bを含む複数の結合試薬を可逆的に多量体化することは可能である。この目的のため、少なくとも2つの結合部位Zを含む多量体化試薬が用いられうる。結合試薬は、結合部位Bに加えて、多量体化試薬上の結合部位Zに結合しうる結合パートナーCを含む。ここで、CとZとの間の結合は可逆的であり、それは好ましくは、例えば結合部位ZについてCと競合し、CをC:Z複合体から移動させうる試薬を加えることにより、破壊されうる。ゆえに、各々が結合部位Bを含む2つまたはそれ以上の結合試薬が結合した、可逆的多量体は、多量体の形態である限り本質的に不可逆的な結合を通常は示すような高いアビディティおよび見掛けの k_{off} 値で、2つまたはそれ以上の受容体Rを含む細胞に結合しうる。多量体化自体を本明細書において記述されるように逆行させることができ、結合部位Bと受容体Rとの一価の結合が可逆的である場合、細胞への結合は依然として可逆的でありうる。可逆的多量体によるそのような可逆的結合は、例えば米国特許第7,776,562号、国際特許出願WO 02/054065、または国際特許出願WO 2013/011011に記述されている。

10

20

30

40

50

【0028】

本明細書において用いられる場合、「検出可能な標識」とは、フローサイトメトリーにおいて染色された細胞の検出のために用いられうる検出可能な実体をいう。好ましくは、標識は染色または単離される細胞の特徴に悪影響を及ぼさない。標識の例は、ほんの数例を挙げると、フィコエリスリン、アロフィコシアニン(APC)、ブリリアントバイオレット(Brilliant Violet) 421、Alexa Fluor 488、クマリンまたはローダミンのような蛍光標識である。標識は、受容体結合試薬および/または多量体化試薬に結合されうる。適用可能な場合、第1の検出可能な標識は好ましくは受容体結合試薬に結合され、一方で任意の第3の検出可能な標識は好ましくは多量体化試薬に結合される。標識は直接標識、すなわち上記で特定されたような多価結合複合体の成員のうちの1つに結合した標識でありうる。そのような場合、標識は、例えば、受容体結合試薬または多量体化試薬のいずれかに共有結合(コンジュゲート)されうる。あるいは、標識は、間接標識、すなわち上記で特定されたような多価結合複合体の成員のうちの1つに順に結合することができるさらなる試薬に結合される標識でありうる。そのような標識は、多価結合複合体が形成される前、その間またはその後付加されうる。そのような間接標識の例は、Lata et al., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 10205-10215またはHuang et al., Bioconjugate Chem. 2006, 17, 1592-1600により記述されているようなビス-、トリス-、またはテトラキス-NTA含有蛍光色素である。標識は、オリゴヒスチジンタグに(金属キレート化を介して)非共有結合的に結合することができる。したがって、この例では、受容体結合試薬および/または多量体化試薬は、オリゴヒスチジンタグを保有してもよく(例えば、CH1もしくはCLドメインのC末端に融合されたヘキサ-ヒスチジンタグのようなオリゴヒスチジンタグを有する、受容体結合試薬としてのFab断片、またはサブユニットのうちの1つのN末端またはC末端に融合されたオリゴヒスチジンタグを有する、多量体化試薬としての市販のStrep-Tactin(登録商標)突然変異タンパク質(IBA GmbH, Goettingen, Germany)のようなストレプトアビジン突然変異タンパク質を用いることができ)、それによりLata et al(前記)またはHuang et al(前

記)により記述されているそのようなNTAに基づく蛍光色素化合物を非共有結合させることができる。そのような非共有結合標識は、多価結合複合体が形成される前に必ずしもその標的(受容体結合試薬および/または多量体化試薬)に結合する必要はないが、多価結合複合体が形成される時にまたは多価結合複合体が形成された後にサンプルに加えることもできる。そのような非共有結合標識は、多価結合複合体が標的細胞に結合した後に加えることもできる。上記の蛍光色素を含むNTA:オリゴヒスチジンタグ結合対の代わりに、例えば、ジゴキシゲニンと抗ジゴキシゲニン抗体または蛍光もしくは他の標識を保有する抗体断片のような他の任意の特異的結合対も間接標識に用いることができる。そのような場合、受容体結合試薬および/または多量体化試薬は、ジゴキシゲニンにコンジュゲート/カップリングされ、選択された標識を保有する抗ジゴキシゲニン抗体または抗体断片は多量体化試薬または受容体結合試薬に(ジゴキシゲニンを介して)結合する。本発明は、第1の検出可能な標識または第2の検出可能な標識が両方とも蛍光色素でありうることを包含する。任意の第3の検出可能な標識もまた、蛍光色素でありうる。第1の検出可能な標識は第1の蛍光色素であり、第2の検出可能な標識は第2の蛍光色素であることが好ましく、ここで第1の蛍光色素の発光シグナルは、好ましくは第2の蛍光色素の発光シグナルと区別することができる。任意の第3の検出可能な標識もまた、好ましくは第1および第2の蛍光色素の両方とは区別されうる蛍光色素でありうる。説明に役立つ実例として、第1の検出可能な標識はAlexa Fluor 488 (Alexa488)であり、一方で第2の検出可能な標識はBrilliant Violet 421 (BV421)でありうる。任意の第3の検出可能な標識はアロフィコシアニン(APC)でありうる。

10

20

【0029】

論じられるように、標的細胞はそれに付着した第2の検出可能な標識を有し、ここで第2の検出可能な標識は受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着している。そのような第2の標識を1つまたは複数の受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着させるための複数の可能性があることを理解されたい。したがって、本発明は、1つの可能性として、第2の検出可能な標識が不可逆的多量体を介して細胞に付着していることを想定している。この目的のため、細胞を、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬、および(iv) 第2の受容体結合試薬の第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬と、さらに接触させてもよい。第2の多量体化試薬は好ましくは、少なくとも3個、好ましくは少なくとも3個、好ましくは4~20個、好ましくは4~8個、好ましくは4個の第2の結合部位Z2を含む。第2の結合パートナーC2と第2の結合部位Z2との間の安定的結合は、本明細書において定義されるように本質的に不可逆的な結合でありうる。ゆえに、第2の結合パートナーC2と第2の結合部位Z2との間の結合についての解離速度定数(k_{off})は、例えば、本質的に不可逆的な結合について本明細書において定義された範囲内であることができる。ここで、第2の受容体結合試薬(iii)および第2の多量体化試薬(iv)は、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、第2の多価結合複合体は、1つの第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、第2の検出可能な標識は第2の多価結合複合体に結合している。あるいは、第2の結合パートナーC2と第2の結合部位Z2との間の結合は可逆的結合であってもよく、第2の結合パートナーC2と第2の結合部位Z2はC1およびZ1に関して定義される化合物の任意の対であってもよく、ただし、C2とZ2との間の結合は、C1とZ1との間の結合が破壊されうるのと同じ方法では破壊することができない。説明に役立つ実例として、C1はストレプトアビジン結合親和性ペプチドでありえ、Z1はストレプトアクチンのようなストレプトアビジン突然変異タンパク質でありえ、一方でC2はオリゴヒスチジンタグでありえ、Z2は二価カチオンを含む化合物である。ピオチンがこれらの複合体に付加される場合、C1とZ1との間の結合は破壊され、一方でC2とZ2との間の結合は損なわれないままである。ゆえに、C2とZ2の結合は一般に(例えば、複合体をEDTAのような金属キレート剤と接触させることによって)破壊することができるが、それでもなお、C1とZ1との間の結

30

40

50

合が破壊されうるのと同じ手段または方法によって、C2とZ2との間の結合が破壊されない限り、本発明の方法において不可逆的多量体として機能することができる。したがって、Z2とC2との間の結合は、不可逆的であることが好ましく、またはZ1とC1との間の結合を破壊しうる手段によって破壊可能でないことが好ましい。第2の多価複合体は、好ましくは、1つの第2の多量体化試薬に結合した少なくとも3個、好ましくは少なくとも4個、好ましくは4~20個、好ましくは4~8個、好ましくは4個の第2の受容体結合試薬を含む。ゆえに、Z2とC2との間の結合は損なわれないうままであるが、Z1とC1との間の結合を選択的に破壊することが可能であることが好ましい。ゆえに、第1の検出可能な標識の細胞への付着を選択的に逆行させることが可能でありえ、その一方で第2の検出可能な標識は細胞に付着したままであろう。B1およびB2は同じでも異なってもよいことをさらに理解されたい。B1およびB2は同じであることが好ましい。

10

【0030】

標的細胞に第2の検出可能な標識を本質的に不可逆的に付着させるための別の可能性は、複数のB2結合部位を含む結合試薬を用いることでありうる。ゆえに、本発明の方法は、細胞をさらに、(iii') 多量体受容体結合試薬M2と接触させることを含んでもよく、ここで多量体第2受容体結合試薬は、少なくとも2個の第2の受容体結合部位B2、好ましくは少なくとも3個、好ましくは少なくとも4個、好ましくは4~20個、好ましくは4~8個、好ましくは4個の受容体結合部位B2を含み、第2の受容体結合部位B2は受容体分子Rに特異的に結合し、多量体受容体結合試薬M2は受容体分子Rを介して標的細胞に本質的に不可逆的に結合し、かつ第2の検出可能な標識は多量体受容体結合試薬M2に結合していることが包含される。ここで多量体受容体結合試薬M2と標的細胞との間の結合についての見掛けの解離速度定数(k_{off})は、例えば、約 1×10^{-5} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-6} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-7} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-8} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-9} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-10} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下であることができる。ここでもまた、B1とB2は同じでも異なってもよく、好ましくは同じであってもよいと理解されたい。

20

【0031】

標的細胞に第2の検出可能な標識を本質的に不可逆的に付着させることはまた、受容体Rに不可逆的に結合する薬剤を用いることによっても達成されうる。したがって、本発明は、本発明の方法が細胞をさらに、(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2と接触させることを含んでもよく、ここで第2の検出可能な標識は不可逆的受容体結合試薬I2に結合していることを包含する。Rへの結合のために、I2は、Rに本質的に不可逆的に結合し、かつ好ましくはB1とは異なる、不可逆的結合部位B3を含みうると理解されたい。ここで不可逆的結合部位B3と受容体分子Rとの間の結合についての解離速度定数(k_{off})は、例えば、約 1×10^{-5} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-6} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-7} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-8} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-9} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下、約 1×10^{-10} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以下であることができる。

30

【0032】

本発明の方法において、 k_{off} 速度測定に用いることができる少なくとも1つの共通の受容体分子を有する実質的に任意の標的細胞を用いることができる。アビディティ効果を達成するために、受容体分子は典型的には標的細胞の表面上に2コピー以上で存在する。典型的な態様において、標的細胞は真核細胞または原核細胞、好ましくは哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞はリンパ球または幹細胞でありうる。ゆえに、標的細胞は、T細胞、Tヘルパー細胞、B細胞、またはナチュラルキラー細胞、例えばCMV特異的CMV特異的CD8+ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞および制御性T細胞でありうる。同様に、標的細胞集団を規定する少なくとも1つの共通の(特異的)受容体は、所与の結合部位B1への結合の k_{off} 速度を決定できる任意の受容体でありうる。例えば、受容体は、免疫細胞の集団もしくは亜集団、例えばT細胞の集団もしくは亜集団、Tヘルパー細胞、例えば、CD4+ Tヘルパー細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞を規定する受容体でありうる。T細胞の例とし

40

50

ては、CMV特異的CD8+ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞および制御性T細胞(Treg)のような細胞が挙げられる。受容体分子Rは、標的細胞上に存在する任意の受容体でありうる。しかしながら、受容体は、例えばT細胞受容体またはB細胞受容体のような、抗原特異的受容体であることが好ましい。受容体は好ましくはT細胞受容体でありえ、一方標的細胞は好ましくはCD8+ T細胞でありうる。これに関連して、本明細書において用いられる「標的細胞」という用語は、膜(これは脂質二重層であることもできる)が内部を外部環境から分離し、かつ生物学的実体の表面上に特定の受容体分子を含む全ての生物学的実体/小胞を包含することに留意されたい。そのような実体の例としては、細胞、ウイルス、リポソーム、細胞小器官、例えばミトコンドリア、葉緑体、細胞核またはリソソームが挙げられるが、これらに限定されることはない。

10

【0033】

本発明の方法において、受容体分子Rに特異的に結合する受容体結合試薬の第1の受容体結合部位B1は、例えばMHC分子であることができる。第1の受容体結合部位B1としてのMHC分子の使用は、エクスピボで直接、T細胞の抗原特異的亜集団のT細胞受容体の k_{off} 速度の特徴付けを可能にする。「MHC分子」という用語は、ペプチドとコンジュゲートしているMHC分子を含むことに留意されたい。第1の受容体結合部位B1はまた、抗体、または(Fab)₂'断片、二価一本鎖Fv断片のような二価抗体断片でありうる。それはまた、「デュオカリン(duocalin)」としても知られる二量体リポカリン突然変異タンパク質のような二価タンパク質性人工結合性分子でありうる。他の態様において、受容体結合試薬は単一の結合部位B1を有してもよく、すなわち、一価であってもよい。一価受容体結合試薬の例としては、一価抗体断片または抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、例えばリポカリン突然変異タンパク質が挙げられるが、これらに限定されることはない。

20

【0034】

本明細書において論じられるように、第1の結合パートナーC1と第1の結合部位Z1との間の結合は可逆的であるべきであり、すなわち結合は主張される方法を実施するのに適した条件の下で破壊されうるべきである。第1の結合パートナーC1と第1の結合部位Z1との間の結合についての解離速度定数(k_{off})は、例えば、可逆的結合について本明細書において定義される通りであり、例えば約 5×10^{-4} 秒⁻¹の範囲内であることができる。この結合の k_{off} もまた、任意の適当な手段によって、例えば、蛍光滴定、平衡透析または表面プラズモン共鳴によって決定することができる。細胞からの多量体化試薬の染色の解離/除去は、解離した受容体結合試薬の除去、したがって、先に染色された細胞からの検出可能な標識を含む多価結合複合体全体の除去をもたらす。

30

【0035】

本発明によれば、受容体結合試薬は、それが少なくとも1つの第1の結合パートナーC1を含み、第1の多量体化試薬が第1の結合パートナーC1に対して少なくとも2つの第1の結合部位Z1、少なくとも3つまたは少なくとも4つの第1の結合部位Z1を含むように選択されうる。あるいは、2つの異なる(種類の)受容体結合試薬を用いることが可能である。

【0036】

本発明によれば、パートナーは以下の群から選択することができる：(a) 第1の結合パートナーC1がストレプトアビジン結合ペプチドまたはアビジン結合ペプチドを含み、かつ第1の多量体化試薬がストレプトアビジンもしくはアビジン、または該ストレプトアビジン結合ペプチドもしくはアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジン類似体もしくはアビジン類似体を含む；あるいは(b) 第1の結合パートナーC1が、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体を含み、かつ第1の多量体化試薬がストレプトアビジンもしくはアビジン、または該ビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジン類似体もしくはアビジン類似体を含む。第1の結合パートナーC1はストレプトアビジン結合ペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 01)を含むことができ、多量体化試薬は、野生型ストレプトアビジン配列の位置番号44~47にアミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 02)を有するストレプトアビジン類似体、または野生型ストレプトアビジン配列の位置番号44~47にアミノ酸配列Ile⁴⁴-Gly⁴

40

50

⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 03)を有するストレプトアビジン類似体を含む。これらの突然変異タンパク質は両方とも、例えば、米国特許第6,103,493号に記述されており、IBA GmbH, Goettingen, GermanyからStrep-Tactin(登録商標)という商標で市販されている。例えば、ストレプトアビジン結合ペプチドは、例えば、米国特許第5,506,121号に記述されている「Strep-tag(登録商標)」のような単一ペプチド、または国際特許公開WO 02/077018に記述されている2つ以上の個々の結合モジュールの連続配置を有するストレプトアビジン結合ペプチドでありうる。2つ以上の個々の結合モジュールの連続配置を有するストレプトアビジン結合ペプチドの例としては、国際特許出願WO02/077018もしくは米国特許第7,981,632号に記述されているdi-tag3配列

(WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWHPQFEK; SEQ ID NO: 11)

、di-tag2配列

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(SEQ ID NO: 12)

または配列

WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

(SEQ ID NO: 13、Twin-Strep-tag(登録商標)としても公知)が挙げられる。

【0037】

本発明はまた、第1の結合パートナーC1と多量体化試薬の少なくとも2つの第1の結合部位Z1との間の結合が二価カチオンの存在下で起こりうることも包含する。説明に役立つ実例として、例えば、米国特許第5,985,658号に記述されているように、第1の結合パートナーC1はカルモジュリン結合ペプチドを含み、多量体化試薬は多量体カルモジュリンを含む。あるいは、第1の結合パートナーC1はFLAGペプチドを含んでもよく、第1の多量体化試薬は、FLAGペプチドに結合する抗体、例えば米国特許第4,851,341号に記述されているようにモノクローナル抗体4E11に結合するFLAGペプチドに結合する抗体を含んでもよい。さらに別の説明に役立つ実例として、第1の結合パートナーC1はオリゴヒスチジンタグを含み、第1の多量体化試薬は、オリゴヒスチジンタグに結合する抗体または遷移金属イオンを含む。これら全ての結合複合体の破壊は、金属イオンのキレート化、例えばカルシウムのキレート化により、例えばEDTAまたはEGTAの添加により達成されうる。カルモジュリン、4E11のような抗体、またはキレート化金属イオンもしくは遊離キレート剤は、従来の方法により、例えばビオチン化およびストレプトアビジンもしくはアビジンまたはそれらの多量体との複合体化により、あるいは第1段階における、Noguchi, A., Takahashi, T., Yamaguchi, T., Kitamura, K., Takakura, Y., Hashida, M. & Sezaki, H. (1992). 「Preparation and properties of the immunoconjugate composed of anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin C dextran conjugate. Bioconjugate Chemistry 3, 132-137」に本質的に記述されているような多糖類、例えばデキストランへのカルボキシル残基の導入、かつ第2段階における、慣用のカルボジイミド化学を用いた多糖類骨格、例えばデキストラン骨格中のカルボキシル基への第1級アミノ基によるカルモジュリンまたは抗体またはキレート化金属イオンもしくは遊離キレート剤のカップリングにより、多量体化されうる。

【0038】

本発明の方法では、多量体化試薬がストレプトアビジンもしくはアビジンのオリゴマーもしくはポリマー、またはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意の類似体のオリゴマーもしくはポリマーであることも可能である。オリゴマーまたはポリマーは、多糖類によって架橋されうる。ストレプトアビジンのオリゴマーもしくはポリマー、またはアビジンのオリゴマーもしくはポリマー、またはストレプトアビジンの類似体もしくはアビジンの類似体のオリゴマーもしくはポリマーは、第1段階において、「Noguchi, A., Takahashi, T., Yamaguchi, T., Kitamura, K., Takakura, Y., Hashida, M. & Sezaki, H. (1992). Preparation and properties of the immunoconjugate composed of anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin C dextran conjugate. Bioconjugate Che

10

20

30

40

50

mistry 3,132-137」に本質的に記述されているように、多糖類、例えばデキストランへのカルボキシル残基の導入によって調製されうる。次いで、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはそれらの類似体は、第2段階において、慣用のカルボジイミド化学を用いてデキストラン骨格中のカルボキシル基へ内部リジン残基および/または遊離N末端の第1級アミノ基を介してカップリングされうる。しかしながら、ストレプトアビジンもしくはアビジンの架橋オリゴマーもしくはポリマー、またはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意の類似体の架橋オリゴマーもしくはポリマーもまた、グルタルジアルデヒドのような二官能性リンカーを介して架橋することにより、または文献に記述されている他の方法により得られうる。

【0039】

本発明はさらに、第1の結合パートナーC1が抗原を含み、多量体化試薬が該抗原に対する抗体または抗体断片を含みうることを包含する。抗原は、例えば、エピトープタグでありうる。適当なエピトープタグの例としては、FLAGタグ(配列: DYKDDDDK、SEQ ID NO: 04)、Mycタグ(配列: EQKLISEEDL、SEQ ID NO: 05)、HAタグ(配列: YPYDVPDYA、SEQ ID NO: 06)、VSV-Gタグ(配列: YTDIEMNRLGK、SEQ ID NO: 07)、HSVタグ(配列: QPELAPEDPED、SEQ ID NO: 08)、およびV5タグ(配列: GKP I P N P L L G L D S T、SEQ ID NO: 09)が挙げられるが、これらに限定されることはない。抗原はタンパク質であってもよく、例えば、第1の結合パートナーC1は、抗原としてマルトース結合タンパク質(MBP)、キチン結合タンパク質(CBP)またはチオレドキシンを含みうる。これらの場合、多量体化試薬(抗体)の少なくとも2つの第1の結合部位Z1と抗原との間で形成された複合体は、遊離抗原、すなわちMycタグもしくはHAタグ(エピトープタグ)のような遊離ペプチドまたは遊離タンパク質(MBPもしくはCBPのような)を加えることによって破壊することができる。これに関連して、FLAGタグが第1の結合パートナーC1として用いられ、第1の多量体化試薬がFLAGタグに結合する抗体または抗体断片を含む場合には、この可逆的結合を遊離FLAGペプチドの添加によって破壊することも可能であることに留意されたい。

【0040】

本発明はまた、第1の結合パートナーC1がグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)を含み、第1の多量体化試薬が第1の結合部位Z1としてグルタチオンを含みうるか、または第1の結合パートナーC1がグルタチオンを含み、第1の多量体化試薬が第1の結合部位Z1としてグルタチオンS-トランスフェラーゼを含みうることを包含する。ここで、GSTとグルタチオンとの間の結合は、過剰のグルタチオンの添加によって解離することができる。遊離グルタチオンは、GSTに結合しているC1またはZ1に含まれるグルタチオンを競合的に移動させて、第1の受容体結合剤を第1の多量体化試薬から解離させることができる。

【0041】

本発明はまた、第1の結合パートナーC1が免疫グロブリンFc部分を含み、第1の多量体化試薬がプロテインA、プロテインG、プロテインa/g、およびプロテインLからなる群より選択されるタンパク質を含みうるか、または第1の結合部位Z1としての第1の結合パートナーC1がプロテインA、プロテインG、プロテインa/g、およびプロテインLからなる群より選択されるタンパク質を含み、第1の多量体化試薬が第1の結合部位Z1として免疫グロブリンFc部分を含むことを包含する。免疫グロブリンFc部分とプロテインA、プロテインG、プロテインa/g、またはプロテインLとの間の結合は、例えば、酸性pHを適用することによって破壊されうる。

【0042】

本発明はさらに、第2の受容体結合試薬に含まれるかまたは多量体受容体結合試薬M2に含まれる第2の受容体結合部位B2が一般に、第1の受容体結合試薬B1に関して本明細書において定義される化合物でありうることを企図する。B2はMHC分子であることが好ましい。第2の受容体結合部位B2は、好ましくは第1の受容体結合部位B1と同じでありうることもさらに包含される。第2の受容体結合部位B2はまた、抗体、二価抗体断片、一価抗体断片、および抗体様結合を有するタンパク質性結合分子でありうる。

【0043】

二価抗体断片の例としては、(Fab)₂'断片または二価一本鎖Fv断片が挙げられるが、これらに限定されることはない。一価抗体断片の例としては、Fab断片、Fv断片、単ドメイン抗体、および一本鎖Fv断片(scFv)が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0044】

受容体分子に特異的に結合する受容体結合試薬として用いることができる、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子の例としては、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づく突然変異タンパク質、グルボディ(glubody)、アンキリン骨格に基づくタンパク質、結晶性骨格に基づくタンパク質、アドネクチン(adnectin)、アビマー(avimer)、EGF様ドメイン、クリングルドメイン、フィブロネクチンI型ドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン、PANドメイン、Glaドメイン、S RCRドメイン、Kunitz/ウシ膵臓トリプシンインヒビタードメイン、テングミスタット、カザール型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル(P型)ドメイン、フォンウィルブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、サイログロブリンI型リピート、LDL受容体クラスAドメイン、Sushiドメイン、リンク(Link)ドメイン、トロンボスポンジンI型ドメイン、免疫グロブリンドメインまたは免疫グロブリン様ドメイン(例えば、ドメイン抗体またはラクダ重鎖抗体)、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、フォンウィルブランド因子A型ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、F5/8 C型ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、「カッパボディ」(Kappabodies)(Ill. et al. 「Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions」 Protein Eng 10:949-57 (1997))、「ミニボディ」(Minibodies)(Martin et al. 「The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6」 EMBO J 13:5303-9 (1994))、「ジャヌシン」(Janusins)(Traunecker et al. 「Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells」 EMBO J 10:3655-3659 (1991)およびTraunecker et al. 「Janusin: new molecular design for bispecific reagents」 Int J Cancer Suppl 7:51-52 (1992))、ナノボディ、アドネクチン、テトラネクチン、マイクロボディ、アフィリン、アフィボディまたはアンキリン、クリスタリン、ノッティン、ユビキチン、ジンクフィンガータンパク質、自己蛍光タンパク質、アンキリンまたはアンキリンリピートタンパク質またはロイシンリッチリピートタンパク質、アビマー(Silverman, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, Nat Biotech, Dec;23(12): 1556-61, Nat Biotech.の電子出版 2005 Nov 20版); ならびにヒト受容体ドメインのファミリーのエキソンシャッフリングにより進化された多価アビマータンパク質(同様にSilverman J, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP, Nat Biotech, Dec;23(12):1556-61, Nat. Biotechnologyの電子出版 2005 Nov 20版に記述される)が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0045】

本発明はさらに、不可逆的受容体結合試薬I2に含まれる不可逆的受容体結合部位B3が、抗体、二価抗体断片、一価抗体断片、および抗体様結合を有するタンパク質性結合分子でありうることを包含する。不可逆的受容体結合部位B3は、好ましくは第1の受容体結合部位B1と同じ化合物ではないことを理解されたい。

【0046】

本発明はさらに、第2の結合パートナーC2がビオチンまたはビオチン類似体を含み、第2の多量体化試薬が、ビオチンまたは該ビオチン類似体に本質的に不可逆的に結合する第2の結合部位Z2としてストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含みうることを包含する。説明に役立つ実例として、第2の結合パートナーC2はビオチンであり、第2の結合部位Z2はストレプトアビジンでありうる。同時に、第1の結合パートナーB1は、SEQ ID NO

: 01に記載されるようなストレプトアビジン結合ペプチドを含みうるが、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1は、ストレプトアビジン野生型配列の位置番号44~47にアミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 02)を有するストレプトアビジン類似体またはこれらの配列位置番号44~47にアミノ酸配列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 03)を有するストレプトアビジン類似体を含みうる。ここで、多量体複合体を過剰の遊離ビオチンと接触させると、C1に含まれるストレプトアビジン結合ペプチドは第1の結合部位Z1から移動され、一方でC2に含まれるビオチンは第2の結合部位Z2に結合したままである。したがって、第2の多量体化試薬が標的細胞に付着したまま、第1の多量体化試薬が標的細胞から解離するので、それにより受容体と第1の受容体結合部位B1の k_{off} 速度の測定が可能になる。

10

【0047】

あるいは、第2の結合パートナーC2および第2の結合部位Z2は、C1およびZ1に関して定義される化合物の任意の対であってもよく、ただし、C2とZ2との間の結合は、C1とZ1との間の結合が破壊されうるのと同じ方法では破壊することができない。説明に役立つ実例として、C1はstrep-tagでありえ、Z1はストレプトアクチンでありえ、一方でC2はオリゴヒスチジンタグでありえ、Z2は二価カチオンを含む化合物である。ビオチンがこれらの複合体に付加される場合、C1とZ1との間の結合は破壊され、一方でC2とZ2との間の結合は損なわれないままであろう。ゆえに、C2とZ2の結合は一般に(例えば、複合体をEDTAのような金属キレート剤と接触させることによって)破壊することができるが、それでもなお、C1とZ1との間の結合が破壊されうるのと同じ手段または方法によって、C2とZ2との間の結合が破壊されない限り、本発明の方法において不可逆的多量体として機能することができる。

20

【0048】

本発明の方法は、受容体分子Rを含む標的細胞を、第1の受容体結合試薬および第1の多量体化試薬と接触させる段階を含みうる。これら3つの成分を互いに接触させる段階は、任意の順序で行うことができる。説明に役立つ実例として、第1の受容体結合剤を第1の多量体化試薬と最初に接触させて第1の受容体結合剤と第1の多量体化試薬の複合体の形成を可能にし、次いで2つの化合物を標的細胞と接触させることができる。別の説明に役立つ実例として、細胞を最初に、第1の受容体結合試薬と接触させることができ、一方、第1の多量体化試薬をその後、細胞および第1の受容体結合試薬と接触させる。さらなる説明に役立つ実例として、3つの成分全てを同時に互いに接触させることができる。

30

【0049】

本発明の方法は、標的細胞を第2の受容体結合剤および第2の多量体化試薬と接触させる段階をさらに含みうる。この場合もやはり、これら3つの成分を接触させる段階は任意の順序で行うことができ、標的細胞を第1の受容体結合試薬および第1の多量体化試薬と接触させるために与えられた説明に役立つ実例が準用される。あるいは、本発明の方法は、標的細胞を本明細書において記述される多量体受容体結合剤と接触させる段階、または標的細胞を本明細書において記述される不可逆的受容体結合試薬と接触させる段階をさらに含みうる。標的細胞を第1の受容体結合試薬および第1の多量体化試薬と接触させる段階は好ましくは、細胞を第2の受容体結合剤および第2の多量体化試薬または多量体受容体結合試薬または不可逆的受容体結合試薬と接触させる前に実施されうる。任意で、洗浄段階をこれら2つの段階の間に行ってもよい。

40

【0050】

本発明の方法はさらに、第1の受容体結合試薬と第1の多量体化試薬との間の結合を破壊する段階を含みうる。細胞が第1の受容体結合試薬および第1の多量体化試薬、ならびに第2の受容体結合剤および第2の多量体化試薬または多量体受容体結合試薬または不可逆的受容体結合試薬と接触された後にこの段階が実施されうると理解されたい。第1の受容体結合試薬と第1の多量体化試薬との間の結合の破壊は、当業者に知られているかまたは本明細書に記述されている任意の適当な方法によって行うことができる。例えば、結合は、結合した複合体を競合試薬CRと接触させることによって破壊することができる。ここで、競合試薬CRは、第1の多量体化試薬上の第1の結合部位Z1への結合について第1の結合パート

50

ナーC1と競合することが可能でありうる。適当な競合試薬は本明細書において記述されており、どのような種類の第1の結合パートナーC1が第1の受容体結合試薬に含まれるかおよびどのような種類の第1の結合部位Z1が第1の多量体化試薬に含まれるかに依存する。説明に役立つ実例として、第1の結合パートナーC1がストレプトアビジン結合ペプチドであり、第1の多量体化試薬がStrep-tactin(登録商標)のようなストレプトアビジン突然変異タンパク質でありうる場合、競合試薬CRはビオチンまたはビオチン類似体でありうる。

【0051】

第1の受容体結合試薬と第1の多量体化試薬との間の結合はまた、金属イオンのキレート化により、例えば複合体をEDTAまたはEGTAのような金属キレート剤と接触させることにより行われうる。結合試薬と第1の多量体化試薬を破壊するこの種のもはまた、金属イオンキレート化により行われ、例えば、第1の結合パートナーC1がオリゴヒスチジンタグであり、第1の結合部位Z1が二価カチオンを含む場合に行われうる。第1の受容体結合試薬と第1の多量体化試薬との間の結合を破壊する別の方法は、pH変化によるものである。この方法は、例えば、第1の結合部位Z1が免疫グロブリンFc領域を含み、第1の結合部位Z1がプロテインAを含む場合に行われうる。

10

【0052】

好ましい態様において、標的細胞はT細胞、好ましくはCD8+ T細胞であり；受容体RはT細胞受容体であり；第1の受容体結合部位B1および第2の受容体結合部位B2は同じであり、両方ともMHC分子であり；第1の結合パートナーC1はストレプトアビジン結合ペプチドを含み、第1の多量体化試薬はストレプトアクチンを含み；第2の結合パートナーはビオチンを含み、第2の多量体化試薬はストレプトアビジンを含み、第1の検出可能な標識(例えばAlexa 488)は第1の受容体結合試薬に結合しており、第2の検出可能な(例えばBV421)標識は好ましくは第2の多量体化試薬に結合しており；第3の検出可能な標識(例えばAPC)は、好ましくは第1の多量体化試薬に付着している。第1、第2、および任意の第3の検出可能な標識は互いに区別されうると理解されたい。ここで、ビオチンは、C1とストレプトアクチンのZ1との間の可逆的結合を破壊するための競合試薬CRとして用いることができる。

20

【0053】

本発明の方法は、標的細胞に付着した第1の検出可能な標識を検出し、かつ標的細胞に付着した第2の検出可能な標識を検出する段階をさらに含む。ここで、両方の検出可能な標識を検出する段階は、好ましくは、第1の受容体結合試薬と第1の多量体化試薬との間の結合を破壊する段階の後に行われうる。第1の多量体化試薬が第3の検出可能な標識を含む場合、本発明の方法はさらに、第3の検出可能な標識を検出する段階を含む。さらに、本発明の方法は、(a)さらなる検出可能な標識を検出する段階を含む。説明に役立つ実例として、標的細胞は、例えばeF450のようなさらなる検出可能な標識を有するCD8抗体でさらに染色されうる。標的細胞はまた、生細胞と死細胞との識別を可能にする色素で染色されうる。そのような色素の説明に役立つ実例はヨウ化プロビジウムであり、これはインターカレート剤でありかつ蛍光分子であり、これは膜不透過性であって、一般に生細胞から排除され、かくして死細胞を同定するために用いることができる。

30

【0054】

検出可能な標識の検出はフローサイトメトリーに基づく分析によって行われうる。本発明により企図される。フローサイトメトリーに基づく分析は、典型的には、細胞を同定かつ分類するための光学的検出と組み合わせられ、高い感度および特異性と組み合わせられた速さを可能にする。これにより、光学的または電子的検出装置を通して流れる単一細胞の物理的および化学的特性の同時マルチパラメトリック分析が可能とされる。これらの特定の物理的および化学的特性は、各細胞の特定の光散乱特性および/または蛍光特性を含む。

40

【0055】

本発明は、受容体分子Rに直接的または間接的に結合する2つの検出可能な標識の使用を包含する。第1の検出可能な標識は細胞に可逆的に結合するが、標的細胞/受容体分子Rへの第2の検出可能な標識の結合は本質的に不可逆的である。したがって、第2の検出可能な

50

標識のシグナルの検出は、標的細胞上の受容体分子Rの存在を示しうる。第2の検出可能な標識の存在は標的細胞上の受容体分子Rの存在を示しうるが、該細胞上の第1の検出可能な標識の存在または非存在は受容体分子からの第1の受容体結合部位B1の非解離または解離を示しうる。ここで、第1の検出可能な標識の存在は、第1の受容体結合部位の非解離を示し、一方、その非存在は第1の受容体結合部位の解離を示す。第2の検出可能なシグナルが検出される細胞上の第1の検出可能な標識の検出事象の減少は、受容体分子Rからの第1の受容体結合部位B1の解離の動態を示しうると理解されたい。そのような解離は指数関数的減衰の動態に従いうる。第2の検出可能な標識が存在する細胞上の第1の検出可能な標識についての検出事象の数を分析する際に、受容体分子Rおよび第1の受容体結合部位B1の結合の解離速度定数(k_{off})は、当業者によく知られている標準的な方法(例えば曲線の当てはめ)によって得られうる。

10

【0056】

本発明の方法は一般に、標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の結合の任意の k_{off} 値の決定を可能にしうる。しかしながら、この方法は、好ましくは、標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の結合に適用され、ここで k_{off} 値は約 10^0 秒⁻¹~約 10^{-4} 秒⁻¹の範囲内、好ましくは 10^{-1} 秒⁻¹~約 10^{-3} 秒⁻¹の範囲内であると推測される。

【0057】

本発明の方法は任意の適当な温度で行うことができる。典型的には、標的細胞を含む混合物と第1の受容体結合試薬、第1の多量体化試薬、第2の受容体結合試薬、第2の多量体化試薬、多量体受容体結合試薬M2または不可逆的受容体結合試薬I2のいずれかとの接触、およびその後の、第1の受容体結合試薬と第1の多量体化試薬との間の結合の破壊、および同様に第1の検出可能な標識、第2の検出可能な標識または第3の検出可能な標識のいずれか1つの検出は、標的細胞の、例えばT細胞が染色または単離される場合T細胞の、表現型の変化をもたらす可能性がある活性化および/またはシグナル伝達事象が実質的に起こらない、そのような温度で行われうる。したがって、本発明の方法または本発明の方法の個々の段階それぞれは、好ましくは、15℃以下の温度で行われうるか、または4℃以下の温度で行われうる。

20

【0058】

本発明はさらに、標的細胞がサンプル中に含まれうることを包含する。サンプルは、標的細胞および複数の他の細胞を含みうる。サンプルは細胞集団(例えばCD8+ T細胞)を含み、標的細胞はその亜集団(例えばある種の抗原に特異的なCD8+ T細胞)でありうる。

30

【0059】

サンプルは、任意の適当な供給源、典型的には体組織の全サンプルまたは血液のような体液由来でありうる。したがって、サンプルは末梢血サンプルでありうる。後者の場合、サンプルは、例えば、血液細胞のフィコール勾配のような標準的な単離方法によって得ることができる末梢血単核球(PBMC)の集団でありうる。しかしながら、サンプル中に含まれる細胞集団は精製された形態であってもよく、米国特許第7,776,562号、米国特許第8,298,782号、国際特許出願WO02/054065または国際特許出願WO2013/011011に記述された特許のように可逆的細胞染色/単離技術を用いて単離されうる。あるいは、細胞の集団はまた、米国特許第6,352,694 B1号または欧州特許第EP 0 700 430 B1号に記述されるように、負の磁気免疫接着を介した細胞選別によっても得ることができる。本明細書に記述される単離方法が基礎研究において用いられる場合、サンプルはインビトロ細胞培養実験の細胞でありうる。サンプルは、典型的には、溶液または分散液のような、流体の形態で調製されているであろう。

40

【0060】

サンプルは対象から得られうる。本明細書において用いられる「対象」は、ヒトまたはヒト以外の動物、一般には哺乳動物をいう。対象は、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、サル、類人猿または、好ましくは、ヒトのような哺乳動物種でありうる。対象は典型的には生きている生物であるが、サンプルは死後に採取されてもよい。

50

【0061】

本発明はまた、少なくとも3つの受容体分子Rを含む細胞であって、(i) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および第1の多量体化試薬であって、第1の受容体結合試薬の第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む、該第1の多量体化試薬を、少なくとも2つの受容体分子Rに結合させている、該細胞を包含する。第1の受容体結合試薬(i)および第1の多量体化試薬(ii)は、細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、第1の多価結合複合体は、1つの第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第1の受容体結合試薬を含む。第1の検出可能な標識は第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができる

と理解されたい。したがって、細胞には第1の検出可能な標識が付着している。さらに、細胞には第2の検出可能な標識が付着している。第1の検出可能な標識は細胞に可逆的に結合されうるが、第2の検出可能な標識は細胞に本質的に不可逆的に付着されうる。第1の検出可能な標識および第2の検出可能な標識は互いに異なり、それらは同じ化合物ではないことを意味するとも理解されたい。第1の多量体化試薬は、第3の検出可能な標識を任意でさらに含んでもよい。第1、第2、および第3の検出可能な標識の各々は、好ましくは互いに異なり、好ましくは互いに区別されうると理解されたい。そのような細胞は、受容体分子Rと第1の受容体結合部位Bの解離速度定数(k_{off})を決定するために特に有用であり、それを本発明の方法によって実施することができる。

10

20

【0062】

論じられるように、細胞は細胞自身に付着した第2の検出可能な標識を有し、ここで第2の検出可能な標識は受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着している。そのような第2の標識を1つまたは複数の受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着させるための複数の可能性があることを理解されたい。したがって、本発明は、1つの可能性として、第2の検出可能な標識が本発明による不可逆的多量体を介して細胞に付着していることを包含する。ゆえに、細胞は、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬、および(iv) 第2の受容体結合試薬の第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬を、少なくとも2つの受容体分子Rにさらに結合させていてもよく、ここで第2の受容体結合試薬(iii)および第2の多量体化試薬(iv)は、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、第2の多価結合複合体は、1つの第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ第2の検出可能な標識は第2の多価結合複合体に結合している。

30

【0063】

あるいは、細胞は、本発明による多量体受容体結合試薬M2を細胞自身に付着させていてもよい。ゆえに、細胞は、(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2を、少なくとも2つの受容体分子Rにさらに結合させていてもよく、ここで多量体受容体結合試薬M2は少なくとも2つの受容体分子Rを介して細胞に本質的に不可逆的に結合し、第2の検出可能な標識は多量体受容体結合試薬M2に結合している。

40

【0064】

別の代替として、細胞は、本発明による不可逆的受容体結合試薬I2を細胞自身に付着させていてもよい。ゆえに、細胞は、(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2を、受容体分子Rにさらに結合させていてもよく、ここで第2の検出可能な標識は不可逆的受容体結合試薬I2に結合している。

【0065】

50

細胞は本発明による任意の標的細胞でありうると理解されたい。同様に、受容体分子Rは、本発明による任意の受容体分子Rでありうる。

【0066】

本発明はさらに、本発明の方法を行うのに適したキットを包含する。したがって、キットは、(i) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および(ii) 第1の受容体結合試薬の第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬を含んでもよく、ここで第1の受容体結合試薬(i)および第1の多量体化試薬(ii)は、標的細胞に結合することができる第1の多価結合複合体を形成することができ、第1の多価結合複合体は、1つの第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第1の受容体結合試薬を含んでもよく、第1の検出可能な標識は第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができる。

10

【0067】

キットは、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬、および(iv) 第2の受容体結合試薬の第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬をさらに含んでもよく、ここで第2の受容体結合試薬(iii)および第2の多量体化試薬(iv)は、標的細胞に結合することができる第2の多価結合複合体を形成することができ、第2の多価結合複合体は、1つの第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、第2の検出可能な標識は第2の多価結合複合体に結合しているかまたは結合することができる。

20

【0068】

あるいは、キットは、(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2をさらに含んでもよく、ここで多量体受容体結合試薬M2は受容体分子Rを介して標的細胞に本質的に不可逆的に結合することができ、第2の検出可能な標識は多量体受容体結合試薬M2に結合している。

30

【0069】

あるいは、キットは、(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合することができる、該不可逆的受容体結合試薬I2をさらに含んでもよく、ここで第2の検出可能な標識は不可逆的受容体結合試薬I2に結合している。

【0070】

キットは、第1の多量体化試薬上の第1の結合部位Z1への結合について第1の結合パートナーC1と競合することができる競合試薬CRをさらに含んでもよい。キットは、好ましくはEDTAまたはEGTAである、金属キレート剤をさらに含んでもよい。

【0071】

本発明は機器をさらに包含する。そのような機器は、受容体分子Rを含む標的細胞と、(i) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬と、第1の多量体化試薬であって、第1の受容体結合試薬の第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む、該第1の多量体化試薬とを含有する第1の容器を含み、ここで第1の受容体結合試薬(i)および第1の多量体化試薬(ii)は、標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成することができ、第1の多価結合複合体は、1つの第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第1の受容体結合試薬を含み、かつ第1の検出可能な標識は第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができ

40

50

、かつ第2の検出可能な標識は受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着しており、第1の検出可能な標識は第2の検出可能な標識ではない。

【0072】

機器は、第1の多量体化試薬上の第1の結合部位Z1への結合について第1の結合パートナーC1と競合することができる競合試薬CR；または好ましくはEDTAもしくはEGTAである金属キレート試薬；を含む流体を含有する第2の容器をさらに含む。第1の容器および第2の容器は、流体を第2の容器から第1の容器へ移動させることができるように接続されている。

【0073】

機器の第1の容器は、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬と、(iv) 第2の受容体結合試薬の第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬とをさらに含有してもよく、ここで第2の受容体結合試薬(iii)および第2の多量体化試薬(iv)は、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成することができ、第2の多価結合複合体は、1つの第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ第2の検出可能な標識は第2の多価結合複合体に結合している。

10

【0074】

あるいは、機器の第1の容器は、(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2をさらに含んでもよく、ここで多量体受容体結合試薬M2は受容体分子Rを介して標的細胞に本質的に不可逆的に結合することができ、第2の検出可能な標識は多量体受容体結合試薬M2に結合している。

20

【0075】

あるいは、機器の第1の容器は、(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、該受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合することができる、該不可逆的受容体結合試薬I2をさらに含んでもよく、ここで第2の検出可能な標識は不可逆的受容体結合試薬I2に結合している。

【0076】

装置は、第1の容器の温度を制御するための装置をさらに含む。装置は、第1の容器を少なくとも部分的に囲む隔離層を含む。機器は、第1の容器内の温度を決定することができる温度計をさらに含む。装置は、冷却要素をさらに含む。そのような冷却要素は空気冷却器でありうる。冷却要素は、第1の容器の温度または第1の容器の内部の温度の電子制御を可能にしうる。

30

【0077】

第1の容器は、例えばサンプル管でありうる。典型的なサンプル管は、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリスチロールもしくはポリプロピレンのようなプラスチック、ガラス、または鋼のような金属からなりうる。管は円筒形および円形、平らまたは円錐形の基部を有しうる。第1の容器の容量は、典型的には、マイクロリットルからリットルの範囲内、典型的には約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25 mLを含め、その間の任意の数を含めて、約0.01 mL ~ 約1000 mL、好ましくは約0.05 mL ~ 約500 mL、約0.1 mL ~ 約200 mL、約0.5 mL ~ 約100 mL、約1 mL ~ 約50 mL、約1 mL ~ 約25 mLの容量を有しうる。

40

【0078】

第2の容器は注射器でありうる。任意の注射器を本発明の機器内に含めることができる。それは、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリスチロールもしくはポリプロピレンのようなプラスチック、ガラス、または鋼のような金属、あるいはそれらの混合物を含む、注射器に典型的な任意の材料で作ることができる。注射器は、手動操作に適していてもよく、または電子制御操作に適していてもよい。

50

【0079】

本発明の機器は、フローサイトメトリー用の機器に含まれうる。機器の第1の容器は、フローサイトメトリー用の機器のサンプル入口と接続されうる。

【0080】

第1の容器および第2の容器は、カニューレまたは管を介して接続されうる。カニューレは、典型的には注射針であり、例えば銅または(ステンレス)鋼のような金属で作られうる。管は、管に典型的に用いられる任意の材料のものでありうる。それは、例えば、ほんの数例を挙げると、シリコン、ゴム、ポリテトラフルオロエチレン(polytetrafluoroethylene) (PTFE)、ポリ塩化ビニル(PVC)、銅、または(ステンレス)鋼からなりうる。カニューレまたは管は、約0.5 mm、約0.6 mm、約0.7 mm、約0.8 mm、約0.9 mm、約1 mm、約1.2 mm、約1.5 mm、約2 mm、約3 mm、約4 mm、または約5 mmを含めて、約0.1 ~ 約20 mm、典型的には約0.2 ~ 約10 mm、約0.5 ~ 約5 mmの内径を有しうる。

10

【0081】

第1の容器および第2の容器の間の接続部内に弁が配置されうる。そのような弁は、好ましくは三方弁でありうる。三方弁は第3の容器に接続されてもよい。第3の容器は、第1の容器に含有される化合物に含まれる第1の結合部位Z1と第1の結合パートナーC1との間の結合を破壊することができる試薬を含有しうる。第2の容器/注射器は、三方弁を用いることによって、第2の容器/注射器を第1の容器から取り外すことなくまたは接続を断つことなくロードおよびアンロードされうる。

20

【0082】

本発明はまた、高アビディティT細胞を単離する方法を包含する。この方法は、対象から得られたサンプル中のT細胞の解離速度定数(k_{off})が本発明の方法によって決定される第1の段階を含みうる。これにより、高アビディティT細胞が同定されうる。「高アビディティT細胞」は、所与の抗原への結合時のT細胞受容体の k_{off} 値によって定義されうる。 k_{off} 値が所与の閾値以下である場合、T細胞は「高アビディティ」のものでありうる。閾値は、高アビディティT細胞を単離する目的に依りうる。典型的には、閾値は約 10^{-1} 秒 $^{-1}$ ~ 約 10^{-3} 秒 $^{-1}$ の範囲内であり、好ましくは、閾値は約 5×10^{-2} 秒 $^{-1}$ ~ 約 2×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 、好ましくは約 2×10^{-2} 秒 $^{-1}$ ~ 約 5×10^{-3} 秒 $^{-1}$ の範囲内、好ましくは約 1×10^{-2} 秒 $^{-1}$ でありうる。

【0083】

本方法は次に、同じ対象から得られたサンプルからT細胞またはT細胞の集団を単離するさらなる段階を含みうる。T細胞(集団)の単離は、当技術分野において公知の任意の方法により、例えば米国特許第7,776,562号、米国特許第8,298,782号、国際特許出願WO02/054065または国際特許出願WO2013/011011に記述された特許のように可逆的細胞染色/単離技術を用いることにより実施することができる。第2の段階においてT細胞(集団)が単離されるサンプルは、第1の段階と同じサンプルであってもよいし、または同じ対象から得られた別のサンプルであってもよい。

30

【0084】

本発明は以下の項目によってさらに特徴付けられる。

【0085】

項目1. 標的細胞に付着した第1の検出可能な標識および該標的細胞に付着した第2の検出可能な標識を検出する段階を含む、標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の解離速度定数(k_{off})を決定する方法であって、該細胞が、(i) 該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および(ii) 該第1の受容体結合試薬の該第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬と接触されており、該第1の受容体結合試薬(i)および該第1の多量体化試薬(ii)が、該標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、該第1の多価結合複合体が、1つの該第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの該第1の受容体結合試薬を含み、かつ該第1の検出可能な標識が該第1の受容体結合試薬に結合してい

40

50

るかまたは結合することができ、かつ該第2の検出可能な標識が該受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着しており、該第1の検出可能な標識および該第2の検出可能な標識が互いに異なる、該方法。

【0086】

項目2. 前記細胞が、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬、および(iv) 該第2の受容体結合試薬の該第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬とさらに接触されており、該第2の受容体結合試薬(iii)および該第2の多量体化試薬(iv)が、該標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、該第2の多価結合複合体が、1つの該第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ第2の検出可能な標識が該第2の多価結合複合体に結合している、項目1の方法。

10

【0087】

項目3. 前記細胞が、(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2とさらに接触されており、該多量体受容体結合試薬M2が該受容体分子Rを介して標的細胞に本質的に不可逆的に結合し、第2の検出可能な標識が該多量体受容体結合試薬M2に結合している、項目1の方法。

20

【0088】

項目4. 前記細胞が、(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、該受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2とさらに接触されており、第2の検出可能な標識が該不可逆的受容体結合試薬I2に結合している、項目1の方法。

【0089】

項目5. 受容体分子RがT細胞受容体(TCR)である、前記項目のいずれかの方法。

【0090】

項目6. 第1の受容体結合部位B1がMHC分子である、前記項目のいずれかの方法。

【0091】

項目7. (a) 第1の結合パートナーC1がストレプトアビジン結合ペプチドまたはアビジン結合ペプチドを含み、かつ第1の多量体化試薬がストレプトアビジンもしくはアビジン、または該ストレプトアビジン結合ペプチドもしくはアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジン類似体もしくはアビジン類似体を含む、あるいは(b) 第1の結合パートナーC1が、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体を含み、かつ第1の多量体化試薬がストレプトアビジンもしくはアビジン、または該ビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジン類似体もしくはアビジン類似体を含む、前記項目のいずれかの方法。

30

【0092】

項目8. 第1の結合パートナーC1がストレプトアビジン結合ペプチドTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 01)を含み、かつ多量体化試薬がストレプトアビジン類似体Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 02)またはストレプトアビジン類似体Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 03)を含む、項目7の方法。

40

【0093】

項目9. 第1の結合パートナーC1と第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1との間の結合が二価カチオンの存在下で起こる、項目1~6のいずれかの方法。

【0094】

項目10. a. 第1の結合パートナーC1がカルモジュリン結合ペプチドを含み、かつ第1の多量体化試薬がカルモジュリンを含む、またはb. 第1の結合パートナーC1がオリゴヒスチンタグを含み、かつ第1の多量体化試薬が、金属キレート剤に結合した金属イオンを含む、項目9の方法。

50

【 0 0 9 5 】

項目11. 第1の結合パートナーC1が抗原を含み、かつ第1の多量体化試薬が該抗原に対する抗体を含む、項目1~6のいずれかの方法。

【 0 0 9 6 】

項目12. 抗原がエピトープタグである、項目11の方法。

【 0 0 9 7 】

項目13. エピトープタグが
FLAGタグ (配列: DYKDDDDK, SEQ ID NO: 04), Mycタグ
(配列: EQKLISEEDL, SEQ ID NO: 05), HAタグ (配列: YPYDVPDYA, SEQ ID
NO: 06), VSV-Gタグ (配列: YTDIEMNRLGK, SEQ ID NO: 07), HSVタグ (配列:
QPELAPEDPED, SEQ ID NO: 08), および V5タグ (配列: GKPIPNPLLGLDST, SEQ ID
NO: 09)

10

からなる群より選択される、項目18の方法。

【 0 0 9 8 】

項目14. 抗原がタンパク質を含む、項目11の方法。

【 0 0 9 9 】

項目15. タンパク質が、マルトース結合タンパク質(MBP)、キチン結合タンパク質(CBP)
)およびチオレドキシンの群より選択される、項目14の方法。

20

【 0 1 0 0 】

項目16. 第1の結合パートナーC1がグルタチオンS-トランスフェラーゼを含み、かつ第1の多量体化試薬がグルタチオンを含む、または第1の結合パートナーC1がグルタチオンを含み、かつ第1の多量体化試薬がグルタチオンS-トランスフェラーゼを含む、項目1~6のいずれかの方法。

【 0 1 0 1 】

項目17. 第1の結合パートナーC1が免疫グロブリンFc部分を含み、かつ第1の多量体化試薬がプロテインA、プロテインG、プロテインa/g、およびプロテインLからなる群より選択されるタンパク質を含む、または第1の結合パートナーC1がプロテインA、プロテインG、プロテインa/g、およびプロテインLからなる群より選択されるタンパク質を含み、かつ第1の多量体化試薬が免疫グロブリンFc部分を含む、項目1~6のいずれかの方法。

30

【 0 1 0 2 】

項目18. 第2の受容体結合部位B2がMHC分子である、項目2、3および5~17のいずれかの方法。

【 0 1 0 3 】

項目19. 第1の受容体結合部位B1および第2の受容体結合部位B2が同じである、項目2、3および5~18のいずれかの方法。

【 0 1 0 4 】

項目20. 第2の受容体結合部位B2または不可逆的受容体結合試薬I2が、抗体、二価抗体断片、一価抗体断片、および抗体様結合を有するタンパク質性結合分子からなる群より選択される、項目2~17のいずれかの方法。

40

【 0 1 0 5 】

項目21. 二価抗体断片が(Fab)₂'断片または二価一本鎖Fv断片である、項目20の方法。

【 0 1 0 6 】

項目22. 一価抗体断片が、Fab断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片(scFv)からなる群より選択される、項目20の方法。

【 0 1 0 7 】

項目23. 抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子が、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づく突然変異タンパク質、グルボディ(glubody)、アンキリン骨格に基づくタンパク質、結晶性骨格に基づくタンパク質、アドネクチン(adnectin)

50

、およびアビマー(avimer)の群より選択される、項目20の方法。

【0108】

項目24. 第2の結合パートナーC2がビオチンまたはビオチン類似体を含み、かつ第2の多量体化試薬が、ビオチンまたは該ビオチン類似体に本質的に不可逆的に結合するストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む、項目2および5~23のいずれかの方法。

【0109】

項目25. 標的細胞が哺乳動物細胞である、前記項目のいずれかの方法。

【0110】

項目26. 哺乳動物細胞がリンパ球または幹細胞である、項目24の方法。

【0111】

項目27. リンパ球がT細胞、Tヘルパー細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞である、項目25の方法。

【0112】

項目28. T細胞がCMV特異的CD8+ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞および制御性T細胞の群より選択される、項目26の方法。

【0113】

項目29. 第1の検出可能な標識が蛍光色素である、前記項目のいずれかの方法。

【0114】

項目30. 第2の検出可能な標識が蛍光色素である、前記項目のいずれかの方法。

【0115】

項目31. 第1の検出可能な標識の各々が第1の蛍光色素であり、かつ第2の検出可能な標識が第2の蛍光色素であり、該第1の蛍光色素の発光シグナルが、好ましくは該第2の蛍光色素の発光シグナルと区別することができる、前記項目のいずれかの方法。

【0116】

項目32. (a) 受容体分子Rを含む標的細胞を、(i)第1の受容体結合試薬および(ii)第1の多量体化試薬と接触させる段階、ならびに(b) 該標的細胞を、(iii)第2の受容体結合試薬および(iv)第2の多量体化試薬と接触させる段階、または該標的細胞を、(iii')多量体受容体結合試薬と接触させる段階、または該標的細胞を、(iii'')不可逆的受容体結合試薬と接触させる段階を含む、項目2~31のいずれかの方法。

【0117】

項目33. (a)が(b)の前に実施される、項目32の方法。

【0118】

項目34. (a)の後かつ(b)の前に洗浄段階をさらに含む、項目33の方法。

【0119】

項目35. (c) (i)第1の受容体結合試薬と(ii)第1の多量体化試薬との間の結合を破壊する段階をさらに含む、項目32~34のいずれかの方法。

【0120】

項目36. (i)第1の受容体結合試薬と(ii)第1の多量体化試薬との間の結合が、(i)および(ii)を競合試薬CRと接触させることにより破壊され、該競合試薬CRが、該第1の多量体化試薬上の第1の結合部位Z1への結合について第1の結合パートナーC1と競合することができる、項目35の方法。

【0121】

項目37. 第1の結合パートナーC1がストレプトアビジン結合ペプチドであり、かつ競合試薬CRがビオチンまたはビオチン類似体である、項目36の方法。

【0122】

項目38. 第1の多量体化試薬がストレプトアビジンまたはストレプトアビジン類似体を含む、項目36または37の方法。

【0123】

項目39. (i)第1の受容体結合試薬と(ii)第1の多量体化試薬との間の結合が、金属イオンキレート化により破壊される、項目35の方法。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 4 】

項目40. 金属キレート化がEDTAまたはEGTAの添加により達成される、項目39の方法。

【 0 1 2 5 】

項目41. (i)第1の受容体結合試薬と(ii)第1の多量体化試薬との間の結合が、pH変化により破壊される、項目35の方法。

【 0 1 2 6 】

項目42. (d) 標的細胞に付着した第1の検出可能な標識を検出し、かつ該標的細胞に付着した第2の検出可能な標識を検出する段階をさらに含む、項目32～41のいずれかの方法。

【 0 1 2 7 】

項目43. 第1の検出可能な標識が第1の蛍光色素であり、かつ第2の検出可能な標識が第2の蛍光色素であり、該第1の蛍光色素の発光シグナルが、好ましくは該第2の蛍光色素の発光シグナルと区別することができる、項目42の方法。

【 0 1 2 8 】

項目44. 第1の検出可能な標識および第2の検出可能な標識の検出がフローサイトメトリによる、項目43の方法。

【 0 1 2 9 】

項目45. 第2の検出可能なシグナルの検出が、標的細胞上の受容体分子Rの存在を示す、項目44の方法。

【 0 1 3 0 】

項目46. 第2の検出可能なシグナルが検出される細胞上での第1の検出可能な標識の検出が、該第1の検出可能な標識の検出時の受容体分子Rからの第1の受容体結合部位B1の非解離を示す、項目45の方法。

【 0 1 3 1 】

項目47. 第2の検出可能なシグナルが検出される細胞上での第1の検出可能な標識の非検出が、該第1の検出可能な標識の検出時の受容体分子Rからの第1の受容体結合部位B1の解離を示す、項目45の方法。

【 0 1 3 2 】

項目48. 第2の検出可能なシグナルが検出される細胞上での第1の検出可能な標識の検出事象の減少が、受容体分子Rからの第1の受容体結合部位B1の解離の動態を示す、項目45～47のいずれかの方法。

【 0 1 3 3 】

項目49. 結合部位Z1とパートナーC1との間の可逆的結合の解離速度定数(k_{off})が、 $0.5 \times 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 以上の範囲内である、前記項目のいずれかの方法。

【 0 1 3 4 】

項目50. 結合部位Z2とパートナーC2との間の結合の解離速度定数(k_{off})が、 $1 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 以下の範囲内である、項目2および5～48のいずれかの方法。

【 0 1 3 5 】

項目51. 多量体受容体結合試薬M2と標的細胞との間の本質的に不可逆的な結合の解離速度定数(k_{off})が、 $1 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 以下の範囲内である、項目3および5～48のいずれかの方法。

【 0 1 3 6 】

項目52. 不可逆的受容体結合試薬I2と受容体分子Rとの間の本質的に不可逆的な結合の解離速度定数(k_{off})が、 $1 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 以下の範囲内である、項目4～48のいずれかの方法。

【 0 1 3 7 】

項目53. 標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の解離速度定数(k_{off})が、 $10^0 \text{秒}^{-1} \sim 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ の範囲内であると推測される、前記項目のいずれかの方法。

【 0 1 3 8 】

項目54. 前記細胞を第1の受容体結合試薬と接触させる段階が15 以下の温度で行われる、前記項目のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 9 】

項目55. 接触させる段階が4 以下の温度で行われる、項目54の方法。

【 0 1 4 0 】

項目56. 少なくとも3つの受容体分子Rを含む細胞であって、該細胞が、(i) 該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および(ii) 該第1の受容体結合試薬の該第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬を、少なくとも2つの受容体分子Rに結合させており、該第1の受容体結合試薬(i)および該第1の多量体化試薬(ii)が、標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、該第1の多価結合複合体が、1つの該第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの該第1の受容体結合試薬を含み、かつ第1の検出可能な標識が該第1の受容体結合試薬に結合しており、かつ第2の検出可能な標識が少なくとも1つの受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着している、該細胞。

10

【 0 1 4 1 】

項目57. 前記細胞が、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬、および(iv) 該第2の受容体結合試薬の該第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬を、少なくとも2つの受容体分子Rにさらに結合させており、該第2の受容体結合試薬(iii)および該第2の多量体化試薬(iv)が、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、該第2の多価結合複合体が、1つの該第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ第2の検出可能な標識が該第2の多価結合複合体に結合している、項目56の細胞。

20

【 0 1 4 2 】

項目58. 前記細胞が、(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2を、少なくとも2つの受容体分子Rにさらに結合させており、該多量体受容体結合試薬M2が該少なくとも2つの受容体分子Rを介して該細胞に本質的に不可逆的に結合し、第2の検出可能な標識が該多量体受容体結合試薬M2に結合している、項目56の細胞。

30

【 0 1 4 3 】

項目59. 前記細胞が、(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、該受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2を、該受容体分子Rにさらに結合させており、第2の検出可能な標識が該不可逆的受容体結合試薬I2に結合している、項目56の細胞。

【 0 1 4 4 】

項目60. 標的細胞が哺乳動物細胞である、項目56～59のいずれかの細胞。

【 0 1 4 5 】

項目61. 哺乳動物細胞がリンパ球または幹細胞である、項目60の細胞。

40

【 0 1 4 6 】

項目62. リンパ球がT細胞、Tヘルパー細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞である、項目61の細胞。

【 0 1 4 7 】

項目63. T細胞がCMV特異的CD8+ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞および制御性T細胞の群より選択される、項目62の細胞。

【 0 1 4 8 】

項目64. 受容体分子RがT細胞受容体(TCR)である、項目56～63のいずれかの細胞。

【 0 1 4 9 】

50

項目65. 標的細胞上の受容体分子Rと第1の受容体結合部位B1の解離速度定数(k_{off})を決定するための試薬キットであって、該キットが、(i) 該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬、および(ii) 該第1の受容体結合試薬の該第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬、ここで、該第1の受容体結合試薬(i)および該第1の多量体化試薬(ii)が、該標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成し、該第1の多価結合複合体が、1つの該第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの該第1の受容体結合試薬を含み、第1の検出可能な標識が該第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができる; ならびに(iii) 該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナーC2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬; および(iv) 該第2の受容体結合試薬の該第2の結合パートナーC2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬、ここで、該第2の受容体結合試薬(iii)および該第2の多量体化試薬(iv)が、該標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成し、該第2の多価結合複合体が、1つの該第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、第2の検出可能な標識が該第2の多価結合複合体に結合している; または(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2、ここで、該多量体受容体結合試薬M2が該受容体分子Rを介して該標的細胞に本質的に不可逆的に結合し、第2の検出可能な標識が該多量体受容体結合試薬M2に結合している; または(iii'') 該受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、該受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2、ここで、第2の検出可能な標識が該不可逆的受容体結合試薬I2に結合している; を含み、該第1の検出可能な標識が該第2の検出可能な標識ではない、該キット。

10

20

【0150】

項目66. 第1の多量体化試薬上の第1の結合部位Z1への結合について第1の結合パートナーC1と競合することができる競合試薬CRをさらに含む、項目65のキット。

30

【0151】

項目67. 好ましくはEDTAまたはEGTAである金属キレート試薬をさらに含む、項目65のキット。

【0152】

項目68. 受容体分子Rを含む標的細胞と、(i) 該受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第1の受容体結合部位B1を含む第1の受容体結合試薬であって、第1の多量体化試薬の第1の結合部位Z1に可逆的に結合することができる少なくとも1つの第1の結合パートナーC1をさらに含む、該第1の受容体結合試薬と、(ii) 該第1の受容体結合試薬の該第1の結合パートナーC1の可逆的結合のための少なくとも2つの第1の結合部位Z1を含む第1の多量体化試薬とを含有する第1の容器であって、該第1の受容体結合試薬(i)および該第1の多量体化試薬(ii)が、該標的細胞に結合する第1の多価結合複合体を形成することができる、該第1の多価結合複合体が、1つの該第1の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの該第1の受容体結合試薬を含み、かつ第1の検出可能な標識が該第1の受容体結合試薬に結合しているかまたは結合することができる、かつ第2の検出可能な標識が該受容体分子Rに本質的に不可逆的に付着しており、該第1の検出可能な標識が該第2の検出可能な標識ではない、該第1の容器; ならびに(a) 該第1の多量体化試薬上の該第1の結合部位Z1への結合について第1の結合パートナーC1と競合することができる競合試薬CR、または(b) 好ましくはEDTAもしくはEGTAである金属キレート試薬、を含む流体を含有する第2の容器を含む機器であって、該第1の容器および第2の容器が、流体を該第2の容器から該第1の容器へ移動させることができるように接続されている、該機器。

40

50

【 0 1 5 3 】

項目69. 第1の容器が、(iii) 受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも1つの第2の受容体結合部位B2を含む第2の受容体結合試薬であって、第2の多量体化試薬の第2の結合部位Z2に安定的に結合することができる少なくとも1つの第2の結合パートナー-C2をさらに含む、該第2の受容体結合試薬と、(iv) 該第2の受容体結合試薬の該第2の結合パートナー-C2の安定的結合のための少なくとも2つの第2の結合部位Z2を含む第2の多量体化試薬とをさらに含有し、該第2の受容体結合試薬(iii)および該第2の多量体化試薬(iv)が、標的細胞に結合する第2の多価結合複合体を形成することができ、該第2の多価結合複合体が、1つの該第2の多量体化試薬に結合した少なくとも2つの第2の受容体結合試薬を含み、かつ第2の検出可能な標識が該第2の多価結合複合体に結合している、項目68の機器。

10

【 0 1 5 4 】

項目70. 第1の容器が、(iii') 多量体受容体結合試薬M2であって、多量体第2受容体結合試薬が、受容体分子Rに特異的に結合する少なくとも2つの第2の受容体結合部位B2を含む、該多量体受容体結合試薬M2をさらに含有し、該多量体受容体結合試薬M2が該受容体分子Rを介して標的細胞に本質的に不可逆的に結合し、第2の検出可能な標識が該多量体受容体結合試薬M2に結合している、項目68の機器。

【 0 1 5 5 】

項目71. 第1の容器が、(iii'') 受容体分子Rに特異的に結合する不可逆的受容体結合試薬I2であって、該受容体分子Rに本質的に不可逆的に結合する、該不可逆的受容体結合試薬I2をさらに含有し、第2の検出可能な標識が該不可逆的受容体結合試薬I2に結合している、項目68の機器。

20

【 0 1 5 6 】

項目72. フローサイトメトリー用の機器に含まれる、項目68～71のいずれかの機器。

【 0 1 5 7 】

項目73. 第1の容器がフローサイトメトリー用の機器のサンプル入口と接続されている、項目68～72のいずれかの機器。

【 0 1 5 8 】

項目74. 第1の容器および第2の容器が、カニューレまたは管を介して接続されている、項目68～73のいずれかの機器。

【 0 1 5 9 】

項目75. 第1の容器と第2の容器との間の接続部内に配置された弁を含む、項目68～74のいずれかの機器。

30

【 0 1 6 0 】

項目76. 弁が三方弁である、項目75の機器。

【 0 1 6 1 】

項目77. (a) 項目1～56のいずれかの方法を用いて、対象から得られたサンプル中のT細胞の解離速度定数(k_{off})を決定する段階、(b) 該対象から得られたサンプルから該T細胞を単離する段階を含む、高アビディティT細胞を単離する方法。

【 0 1 6 2 】

項目78. 決定された解離速度定数が、所与の閾値以下である値を有する、項目77の方法。

40

【 0 1 6 3 】

項目79. 閾値が約 10^{-1} 秒 $^{-1}$ ～約 10^{-3} 秒 $^{-3}$ の範囲内である、項目77の方法。

【 0 1 6 4 】

項目80. サンプルが末梢血サンプルまたはPBMCサンプルである、項目77～79のいずれかの方法。

【 0 1 6 5 】

項目81. 対象が哺乳動物、好ましくはヒトである、項目77～80のいずれかの方法。

【 0 1 6 6 】

本明細書において用いられる場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(

50

the)」は、文脈が明らかにそうでないことを示していない限り、複数の参照を含むことに留意されなければならない。したがって、例えば、「1つの試薬(a reagent)」への言及は、1つまたは複数のそのような異なる試薬を含み、「その方法(the method)」への言及は、本明細書において記述される方法を修正または置換できる当業者に公知の等価な段階および方法への言及を含む。

【0167】

そうでないことが示されない限り、要素の系列の前に置かれる「少なくとも」という用語は、この系列のあらゆる要素に言及していると理解されるべきである。当業者は、慣用的以上の実験を用いずとも、本明細書において記述される本発明の具体的態様の多くの等価物を認識するまたは確認することができるであろう。そのような等価物は、本発明によって包含されることが意図される。

10

【0168】

「および(ならびに)/または(もしくは)」という用語は、本明細書のいずれの場所で用いられる場合でも、「および(ならびに)」、「または(もしくは)」および「この用語によって接続される要素の全てまたは任意の他の組み合わせ」の意味を含む。

【0169】

本明細書において用いられる「約」または「およそ」という用語は、示された値または範囲の20%以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内を意味する。しかし、これには名数(concrete number)も含まれ、例えば約20は20を含む。

【0170】

本明細書および添付の特許請求の範囲の全体を通して、文脈がそうでないことを必要としない限り、「含む(comprise)」という単語、ならびに「含む(comprises)」および「含む(comprising)」のような変化形は、言及されている整数値もしくは段階または整数値もしくは段階の群を含むが、任意のその他の整数値もしくは段階または整数値もしくは段階の群を排除しないことを暗に示すものと理解されよう。本明細書において用いられる場合、「含む(comprising)」という用語は、「含有する(containing)」もしくは「含む(including)」という用語と、または本明細書において用いられる場合に時には「有する(having)」という用語と置き換えることができる。

20

【0171】

本明細書において用いられる場合、「からなる」は、特許請求の範囲の要素の中で指定されていない任意の要素、段階または成分を排除する。本明細書において用いられる場合、「から本質的になる」は、特許請求の範囲の基本かつ新規の特徴に実質的に影響しない材料または段階を排除しない。

30

【0172】

本明細書の各例において、「含む」、「から本質的になる」および「からなる」という用語はいずれも、他の2つの用語のいずれかと置き換えられうる。

【0173】

本発明は、本明細書において記述した特定の方法論、プロトコル、材料、試薬、および物質などに限定されず、したがって変化しうることが理解されるべきである。本明細書において用いられる専門用語は、特定の態様を説明することのみを目的としており、特許請求の範囲によってのみ定義される本発明の範囲を限定するものと意図されない。

40

【0174】

本明細書の本文全体を通して引用されている全ての刊行物および特許(全ての特許、特許出願、科学刊行物、製造元の仕様書、説明書などを含む)は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本明細書のいかなる事項も、本発明が先行発明のためにそのような開示に先行する権利がないことの承認と解釈されるべきではない。参照により組み入れられる材料が本明細書と矛盾または相反する程度まで、本明細書は任意のそのような材料に優先する。

【実施例】

【0175】

50

細胞

ヒトCMV特異的T細胞クローンおよびネズミT細胞株を、Nauerth M, Weissbrich B, Knal I R, Franz T, Doessinger G, Bet J, Paszkiewicz PJ, Pfeifer L, Bunse M, Uckert W and others. TCR-ligand k_{off} rate correlates with the protective capacity of antigen-specific CD8+ T cells for adoptive transfer. *Sci Transl Med* 2013;5:192ra87-192ra87に記述されているように作製した。末梢血を健常成人ドナー(男性)から得た。書面によるインフォームドコンセントをドナーから入手し、血液サンプルの使用は、ヘルシンキ宣言にしたがい地域の施設内倫理委員会(Ethikkommission der Medizinischen Fakultät et der Technischen Universität München)による国内法にしたがって承認された。全血をPBS (pH 7.4)で1:1希釈し、フィコール層上2000 rpmで20分間の密度勾配遠心分離によってPBMCを得た。

10

【0176】

多量体および抗体染色

Nauerth et al 2013に記述されているようにTwin-Strep-Tagを保有する可逆的多量体の作製のためのpMHC分子を再折畳みし、多量体化した。この報告のなかで k_{off} 速度アッセイに用いられた全てのpMHC分子は、Alexa488マレイミドフルオロフォア(Thermo Fisher)および多量体化ストレプトアクチンAPC (IBA)にコンジュゲートされていた。Busch DH, Philip IM, Vijh S, Pamer EG. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 1998;8:353-62に記述されているプロトコルにしたがって不可逆的多量体の作製のためのビオチン化pMHC分子を再折畳みした。多量体化の場合、1 μ gのビオチン化pMHC分子を総容量50 μ l中1.25 μ gのストレプトアビジンB V421またはストレプトアビジンPE (Biolegend)とともに45分間インキュベートした。 k_{off} 速度アッセイの場合、 5×10^6 個までの細胞を可逆的多量体とともに45分間インキュベートした。必要なら、CD8抗体(CD8 eF450、eBioscienceまたはCD8 PeCy7、Beckman Coulter)を25分後に添加し、さらに20分間インキュベートした。生/死識別のため、0.2 μ gのヨウ化プロピジウム溶液を添加し、5分間インキュベートした。細胞をその後、洗浄し、 k_{off} 速度アッセイに直接使用するか、または(別段の指示がない限り)10分間不可逆的多量体でさらに染色した。不可逆的多量体の滴定の場合、細胞を50 μ lの不可逆的多量体(1:1)で、25 μ lのFACS緩衝液で希釈された25 μ lのもの(1:2)でまたは37,5 μ lのFACS緩衝液で希釈された12,5 μ lの不可逆的多量体(1:4)のいずれかで染色した。

20

30

【0177】

FACS分析および選別

CyanLx 9色フローサイトメーター(Beckman Coulter)を用いてサンプルを分析した。 k_{off} 速度アッセイの場合、分析したサンプルの計算パラメータを保存して、解離反応速度の分析を可能にした。細胞選別をMoFlo (Beckman Coulter)にて実施した。FACSデータをFlowJo v9.5.2ソフトウェア(Tree Star, Inc.)で分析した。

【0178】

フローサイトメリーに基づく k_{off} 速度アッセイ

k_{off} 速度アッセイの実施の場合、細胞を $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/mlに希釈し、FACS緩衝液900 μ lを含有する予冷 k_{off} 速度FACS管に細胞100 μ lを添加した。 k_{off} 速度FACS管をフローサイトメーターの冷却装置(quitools)と一緒に取り付け、分析を開始した。30秒後、進行中の分析の間に細胞に三方弁で2 mMのD-ビオチン1 mlを添加した。細胞を計15分間分析した。 k_{off} 速度の分析の場合、特定のT細胞の蛍光データをFlowJoから表計算プログラム(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)へエクスポートした。本文に記述されているように k_{off} 速度の分析のためのデータ点を選択し、そのデータ点に単相の指数関数的減衰曲線を当てはめた。

40

【0179】

微視的 k_{off} 速度アッセイ

Nauerth et al. 2013に詳細に記述されているように実施した。

【0180】

50

実施例1: フローサイトメトリーに基づくTCRリガンド k_{off} 速度アッセイの設定および分析
TRC-リガンド k_{off} 速度アッセイの原理をフローサイトメトリーに移すためには、データ分析のための基本的な要素を、顕微鏡法に基づくオリジナルのアプリケーションと同様に取得する必要がある: 最初に、最初のpMHC/ストレプトアクチン多量体染色を決定する必要がある; その後、D-ビオチンをサンプルに添加する必要があり、引き続いて、ストレプトアクチン骨格およびpMHCの解離を、最小レベルのリガンド結合に達するまで追跡する必要がある。本発明者らは、いくつかのT細胞受容体の場合、 k_{off} 速度動態が非常に速くなりうることを顕微鏡法に基づくアッセイから既に承知していたので、オンライン測定を中断することなくd-ビオチンをプローブに添加できるフローサイトメトリーのための実験設定をデザインした。この目的のために、本発明者らは、D-ビオチン溶液を含有する注射針に三方弁を介して接続された鋭い注射針で標準的なポリエチレンFACS管を貫通させた(図2A)。この設定により、いずれかの時点でサンプルホルダからプローブを取り出す必要なく、初期染色値(通常30秒)を取得し、その後D-ビオチン注入、続いて解離相の取得(通常15分)を行うことが可能になる。

10

【0181】

異なるサンプル間で比較できる再現性のある結果を得るために、 k_{off} 速度アッセイは規定の温度で実施されることが好ましい。TCR-リガンド相互作用の場合、アッセイは低温で(好ましくは4 °Cで)実施された。この目的のために、本発明者らは、D-ビオチン注入システム用の小さな開口部を残しながら、サンプル管をしっかりと囲むペルチェ制御冷却装置をデザインした(図2B)。

20

【0182】

この実験設定で、本発明者らは次に、2C TCRを発現するT細胞株を用いて完全な k_{off} 速度配列を取得した。本発明者らは、骨格としてAPCコンジュゲート・ストレプトアクチンおよびAlexa488標識pMHC (H2Kb- SIYRYYGL (SEQ ID NO: 10))に基づく可逆的MHC多量体で細胞を染色した。さらなるPI染色を実施して死細胞を同定した。解離のデータ分析は、関心対象の集団(この場合は生きているリンパ球)に対するゲーティングとその後の分析時間にわたるストレプトアクチン-APC蛍光およびMHC-Alexa488蛍光の表示によって実施された(図2C)。根底にある解離動態を視覚化するために、本発明者らは最初に、分析時間にわたって200ゲートを引き(drew)、各ゲートについてMHCAlexa488およびストレプトアクチン-APCのMFIを計算した。このデータ整理によってMHCAlexa488およびストレプトアクチン-APCの蛍光値を1つのグラフにプロットすること、それゆえ、両解離動態の直接的な比較が可能となる(図2D)。分析の開始時に、両方の蛍光色素の初期染色強度は可視的であり、一定のみである。D-ビオチンの添加により、分離したストレプトアクチン骨格の解離によって引き起こされる、APC蛍光の急速な減衰が検出可能である。興味深いことに、Alexa488の蛍光も、最初は速い減衰を示し、同時にストレプトアクチン-APCの解離を示す。ストレプトアクチン-APCの完全な解離後、Alexa488の2番目のより遅い減衰が検出可能になる。MHC-Alexa488減衰のこれら2つの動態は、多量体化MHC分子の異なる結合状態によって説明することができる。ストレプトアクチン骨格上で多量体化されたMHC分子の一部のみが表面発現TCRに結合する可能性が高い。いくつかのMHC分子は、ストレプトアクチンに結合しているだけなので、D-ビオチン添加後に骨格と同時に解離し、非常に速い動態を示す。以下のAlexa488減衰のより遅い動態は、T細胞表面からの単量体のTCR結合MHC分子の解離に起因し、TCRリガンドの k_{off} 速度の計算の基礎となる。TCR結合分子と未結合MHC-Alexa488分子の動態の重なりが干渉しているため、これらの知見は、非細胞結合成分の完全な解離後にのみ k_{off} 速度を正しく計算できることを示す。それゆえ、本発明者らはストレプトアクチン-APCの完全解離の時点をもMHC-Alexa488解離の k_{off} 速度計算の出発点として用いることにした。

30

40

【0183】

k_{off} 速度の最終計算のため、本発明者らは分析された各細胞の蛍光と時間の値を表計算ソフトウェアに直接エクスポートし、分析時間にわたるストレプトアクチン-APCとMHC-Alexa488蛍光のドットプロットを作成した(図2E)。次に、本発明者らは、D-ビオチン添加後

50

のストレプトアクチン-APCのデータ点およびストレプトアクチン骨格の完全解離後のMHC-Alexa488のデータ点を選択した。指数関数的減衰が全細胞のドットプロットに直接当てはまるので、限られた数のゲートでMFIを計算しても情報の削減は行われず、これは限られた数の細胞しか分析できない場合に特に重要である。

【0184】

要約すると、フローサイトメーターのアプリケーションにTCRリガンド k_{off} 速度アッセイを移すことにより、温度制御条件下でのT細胞の迅速な分析および k_{off} 速度の正確な計算が可能とされる。

【0185】

実施例2: フローサイトメトリーに基づくTCRリガンド k_{off} 速度アッセイと顕微鏡法により誘導されるTCRリガンド k_{off} 速度アッセイは同等の値をもたらす

顕微鏡法により誘導されるTCRリガンド k_{off} 速度アッセイを用いて、Nauert et al. 2013は、 k_{off} 速度と分析したT細胞の機能性との間の明確な相関関係を実証した。それにより、実験の設定を標準化することができ、再現性が高く真に定量的な k_{off} 速度値の決定を確実にすることができる。新規のフローサイトメトリーに基づく設定から得られた結果が同等な値をもたらすかどうかを試験するために、本発明者らは両方の方法と並行してCMV特異的T細胞クローンの k_{off} 速度を分析した。異なる特異性およびアビディティの3つのクローンを分析し(図3A~C)、全ての場合において、得られた k_{off} 速度は極めて同等であった(図3D)。これらのデータは、前述の顕微鏡法により誘導されるアプローチと比較して、同様の堅固性、再現性および精度を新規のフローサイトメトリーに基づく設定で達成できる

【0186】

実施例3: 可逆的および不可逆的MHC多量体による二重染色の原理

上記のフローサイトメトリーに基づく k_{off} 速度アッセイの実験設定により、分析は高度に精製された抗原特異的T細胞集団、T細胞クローンまたはTCR形質導入T細胞でのみ実施することができる。これらの場合、生きている細胞に対するゲーティングは、リガンド解離動態の取得を通して関心対象の細胞集団を同定するのに十分であるべきである。しかしながら、事前の選別またはクローニングなしに直接エクスピボで抗原特異的T細胞集団を分析するにはまた、 k_{off} 速度アッセイ中の標的集団の安定的な同定が必要である。それゆえ、本発明者らは、これがさらなる抗原特異的な不可逆的染色によって達成されるかどうかを試験した(図4A)。従来のMHC多量体は、C末端でビオチン化され、ストレプトアビジンに対して非常に高い親和性でこれらのドメインと結合する組み換えpMHCからなる。これらの結合は、D-ビオチンの添加によりかなりの量で破壊されることがなく、従来の多量体はそれゆえ、抗原特異的T細胞の疑似の不可逆的染色をもたらす。図4Bは、ストレプトアビジンBV421を含有する不可逆的多量体およびストレプトアクチンAPC骨格に結合したAlexa488コンジュゲートMHCを有する可逆的多量体による抗原特異的T細胞の二重染色の原理を示す。同じ特異性についてのMHC多量体二重染色が一般的に可能であることが他者らによって以前に記述されており、このアプローチは今や、抗原特異的T細胞同定の感度を高めるために頻繁に用いられる(Hadrup et al., 2009, Nat Methods, 6:520-6)。しかしながら、2つの異なるタイプの多量体試薬による二重染色はこれまで試験されていない。それゆえ、本発明者らは、可逆的および不可逆的な特異的多量体を用いてCMV由来HLA-B8拘束性エピトープIE188-96に特異的なT細胞クローンを染色した。図4B(左上のドットプロット)に示されるように、両方の多量体は、直接的に相関する二重染色パターンによって示されるように、標識細胞の細胞表面上に類似の染色特性を有して蓄積する。他のエピトープ特異性およびHLA拘束性を有する他のT細胞クローンでも非常によく似た結果が得られ(データは示さず)、このアプローチの一般的な実現可能性を示している。D-ビオチンの添加後、BV421染色は分析時間にわたって安定なままであるが、MHC-Alexa488およびストレプトアクチンAPC染色は減衰する(図4B、下パネル)。これらのデータは、従来の可逆的なMHC多量体との組み合わせ染色が、TCRリガンド k_{off} 速度アッセイ中に関心対象の細胞集団を常に追跡するのに適したツールとなることを示している。

10

20

30

40

50

【0187】

実施例4: 二重染色は可逆的多量体染色強度および k_{off} 速度に影響を及ぼさない

本発明者らは、 k_{off} 速度アッセイに対する不可逆的および可逆的多量体による二重染色の適合性をより詳細にさらに分析するために、同じ特異性の不可逆的試薬による追加の染色が可逆的多量体染色およびその後の k_{off} 速度を妨げるかどうかを試験した。それゆえ、本発明者らは、確立されたプロトコルにしたがって最初に特定の可逆的多量体を用いB7pp65特異的T細胞集団でCMV+ ドナー由来PBMCを染色して、最適なMHC-Alexa488染色強度を達成した。未結合の試薬を洗い流した後に、本発明者らは追加の染色段階において不可逆的多量体を加えた。本発明者らは、同様の初期の不可逆的多量体染色手順で濃度とインキュベーション時間の両方を滴定した。図5Aおよび図5Bに示されるように、不可逆的多量体の濃度の増加は、不可逆的多量体の染色強度にわずかしが影響を及ぼさなかった(図5B)。さらに重要なことには、異なる濃度の不可逆的多量体染色にわたって、その後に決定された k_{off} 速度は全ての条件下で同一であった(図5C、D)。インキュベーション時間を増やしても、可逆的MHC多量体染色またはその後の k_{off} 速度測定に検出可能な影響はなかった(図5D)。これらのデータは、可逆的および不可逆的MHC多量体試薬を用いた二重染色アプローチが堅固であることを実証し、染色条件(インキュベーション時間、多量体濃度)のわずかな変化がその後の k_{off} 速度結果に影響しないことを意味している。MHC多量体二重染色が何らかの形で k_{off} 速度動態に影響を及ぼしうるかどうかを評価するために、本発明者らは、可逆的多量体のみで染色したまたは不可逆的多量体でさらに染色したT細胞の k_{off} 速度測定を比較した。これらの実験は、TCRアビディティに依る潜在的な差異を制御するために、よく特徴付けられた高アビディティおよび低アビディティCMV特異的T細胞クローンで実施された。図5Eおよび図5Fに示されるように、両方のT細胞クローンは、一重または二重染色後に極めて同等の k_{off} 速度を示した。これは、二重染色アプローチが結果として得られる k_{off} 速度値に影響を及ぼさなかったこと、およびこの観察結果が、非常に異なるアビディティを有するT細胞に当てはまることを明確に実証している。

10

20

【0188】

実施例5: 二重染色は、エクスピボで直接、CD8+ T細胞集団の k_{off} 速度測定を可能にする

従来不可逆的多量体による追加の染色は、 k_{off} 速度アッセイ中にエピトープ特異的T細胞を安定的に染色するのに適したツールであるので、本発明者らは次に、PBMC由来の抗原特異的T細胞集団の直接分析がこの設定で可能かどうか調べた。この目的のために、本発明者らは、全リンパ球0.31%の容易に検出可能なB7pp65特異的T細胞集団を有するCMV陽性ドナー由来の血液を採取した(図6A)。本発明者らは密度遠心分離によってPBMCを精製し、細胞を可逆的多量体およびCD8抗体で、続いて不可逆的多量体で染色した。対照として、細胞の一部を可逆的多量体およびCD8抗体でのみ染色し、ストレプトアクチンAPC+ CD8+ T細胞のFACS選別後に k_{off} 速度を分析した。エクスピボで直接、B7pp65特異的T細胞集団の k_{off} 速度を測定するためのゲーティング戦略を図6Aに示す。シングルレットおよび生きているリンパ球のゲーティング後、ゲートをCD8+ 不可逆的多量体+ T細胞に設定した。このゲートを分析に用いて、ストレプトアクチンAPCおよびMHC Alexa488の蛍光を経時的に表示し、 k_{off} 速度を計算した。各測定細胞の蛍光値の直接的なエクスポートは、情報の損失を防ぐためにこの小集団を分析することによって選択された。この戦略は、経時的なMHC488蛍光の緩徐な減衰を有していた集団内の少なくとも1つの高アビディティT細胞クローンの存在を実証した(図6B、C)。事前選別された細胞と比べて直接分析された細胞の k_{off} 速度は類似しており、直接分析の信頼性を実証していた(図6D)。まとめると、これらのデータは、不可逆的および可逆的多量体を用いた二重染色が、エクスピボで直接、エピトープ特異的T細胞集団の k_{off} 速度測定を可能にし、事前選別されたT細胞と極めて同等な結果を提供することを示す。

30

40

【0189】

実施例6: オリゴクローンヒトCMV特異的CD8+ T細胞のエクスピボ k_{off} 速度測定

異なるドナー由来のオリゴクローンヒトCMV特異的CD8+ T細胞のさらなるエクスピボ k_{off} 速度測定を、実施例1に記述されているように実施した。ここで、サンプルに含まれる細

50

胞の一部のみがCMV特異的であった。図7は、オリゴクローンHLA * 07 02/CMVpp65特異的CD8 T細胞集団のエクスピボ k_{off} 速度測定を示す。健常ドナーの新鮮な血液からフィコール勾配遠心分離によってPBMCを単離した。単一の生きているCD19⁻ CD8⁺不可逆的pMHC-PE⁺ T細胞に対するBooleanゲーティングを実施した。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。図8は、オリゴクローンHLA * 02 01/CMVpp65特異的CD8 T細胞集団(ドナーHZ961)のエクスピボ k_{off} 速度測定を示す。健常ドナーの新鮮血液からフィコール勾配遠心分離によって単離された凍結保存PBMCに対して k_{off} 速度測定を行った。単一の生きているCD19⁻ CD8⁺不可逆的pMHC-PE⁺ T細胞に対するBooleanゲーティングを実施した。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。図9: オリゴクローンHLA * 02 01/CMVpp65特異的CD8 T細胞集団(ドナーHZ510)のエクスピボ k_{off} 速度測定。健常ドナーの新鮮血液からフィコール勾配遠心分離によって単離された凍結保存PBMCに対して k_{off} 速度測定を行った。単一の生きているCD19⁻ CD8⁺不可逆的pMHC-PE⁺ T細胞に対するBooleanゲーティングを行った。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した。これらの実験は、標的特異的CD8⁺ T細胞の k_{off} 速度決定が血液またはPBMCサンプルに対して直接行われうること、および信頼できる結果が異なるドナー由来の細胞で達成されることを実証する。

10

20

30

40

50

【0190】

実施例7: CD8⁺ J76腫瘍細胞に対する k_{off} 速度測定を用いた単離TCRの機能的特徴付け

単一クローンPCRを用いて2つのHLA * 02 01/CMVpp65特異的TCRを単離した。その構造的アビディティを分析するため、内因性TCRを欠くCD8⁺ J76腫瘍細胞にTCRを形質導入した。 k_{off} 速度測定を実施例1に記述されているように行った。単一の生きているCD8⁺不可逆的pMHC-PE⁺ T細胞に対するBooleanゲーティングを実施した。経時的なストレプトアクチンAPCおよび可逆的pMHC-Alexa488のデータをGraphPad PRISMにエクスポートし、指数関数的減衰曲線に当てはめて k_{off} 速度を決定した(図10)。ごく一部のJ76腫瘍細胞のみがそれぞれのTCRを組み換え発現したが、2つのTCRの k_{off} 値は確実に決定された。この実験はこの場合もやはり、複雑な集団内のごく一部の細胞にのみ存在する受容体の k_{off} 速度が、本明細書において記述される方法を用いて決定されうることを示す。

【0191】

実施例8: 高アビディティおよび低アビディティTCR pMHC相互作用についてのネズミモデル系における k_{off} 速度測定

図11は、実施例1に記述されたように行われたネズミT細胞の k_{off} 速度決定を示す。この目的のために、実施例1に記述された方法にしたがって可逆的および不可逆的ネズミMHC多量体を作製した。以下のエピトープ: SIIQFEKL:H2kb (SEQ ID NO:14)、SIYNFEKL:H2kb (SEQ ID NO: 15)、およびSIINFEKL:H2kb (SEQ ID NO: 15)を用いてH2-KB多量体を作製した。これらの結果は、本明細書において記述された方法が異なる種の細胞に対して行われうることを示している。

【0192】

本明細書において例示的に記述された本発明は、本明細書において具体的に開示されていない、任意の要素、限定の非存在下において適当に実践されうる。さらに、本明細書において利用される用語および表現は、限定の用語としてではなく、説明の用語として使用されており、そのような用語および表現の使用には、示されたおよび記述された特徴またはその一部の任意の等価物を排除する意図はなく、さまざまな改変が主張される本発明の範囲内で可能であるものと認識される。したがって、本発明は例示的な態様および任意選択の特徴によって具体的に開示されているが、本明細書において開示されそこで具体化された本発明の改変および変形が当業者によって用いられてもよいこと、ならびにそのような改変および変形は本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

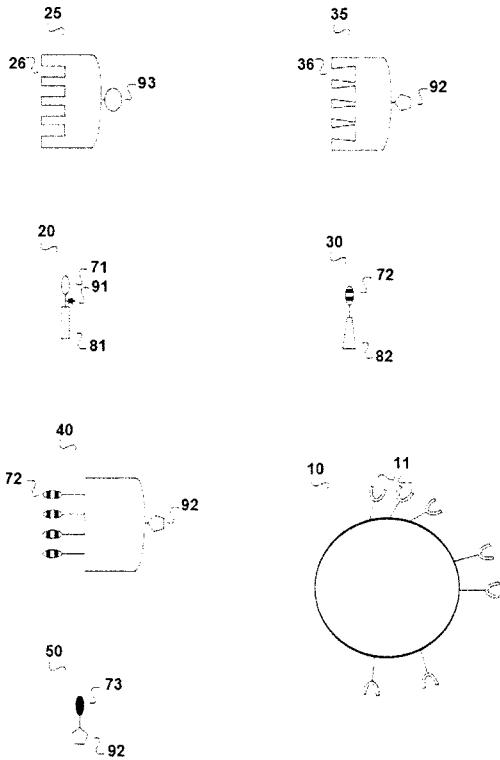
【0193】

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

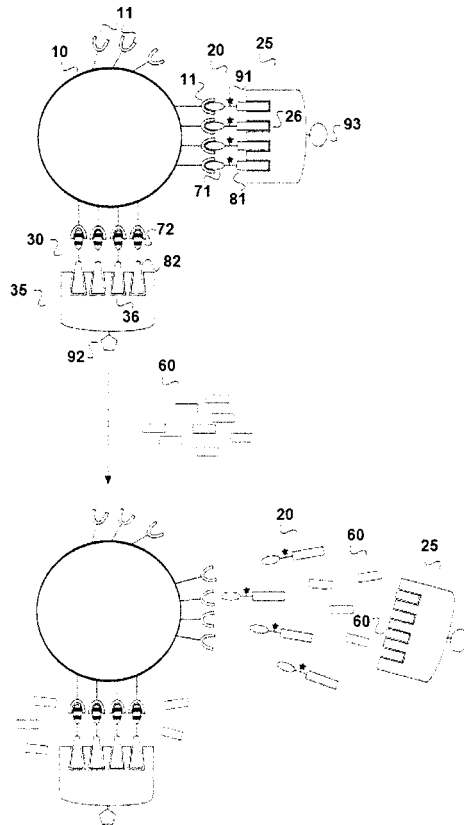
【0194】

他の態様は添付の特許請求の範囲の範囲内である。さらに、本発明の特徴または局面がマーカッシュ群によって記述されている場合、当業者であれば、本発明はそのマーカッシュ群の個々の成員または成員の垂群によっても記述されることを認識するであろう。

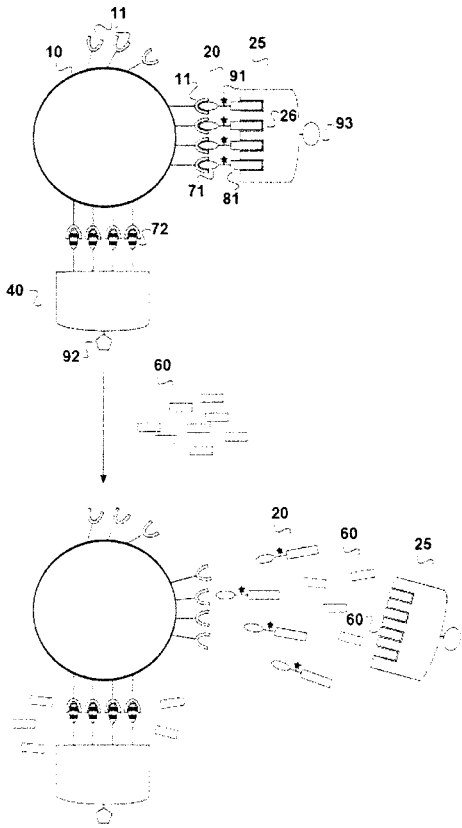
【図1A】



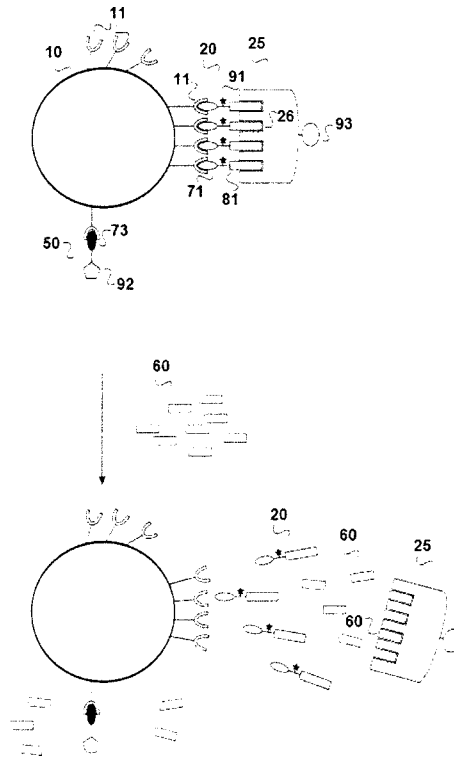
【図1B】



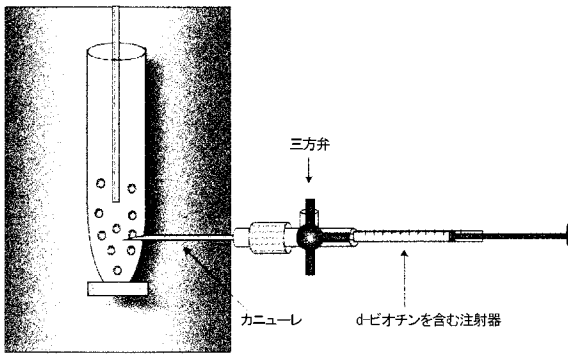
【図 1 C】



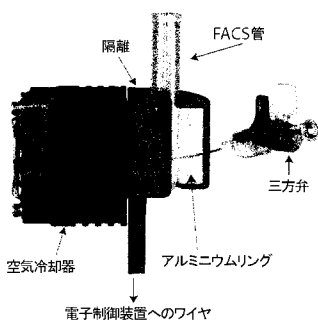
【図 1 D】



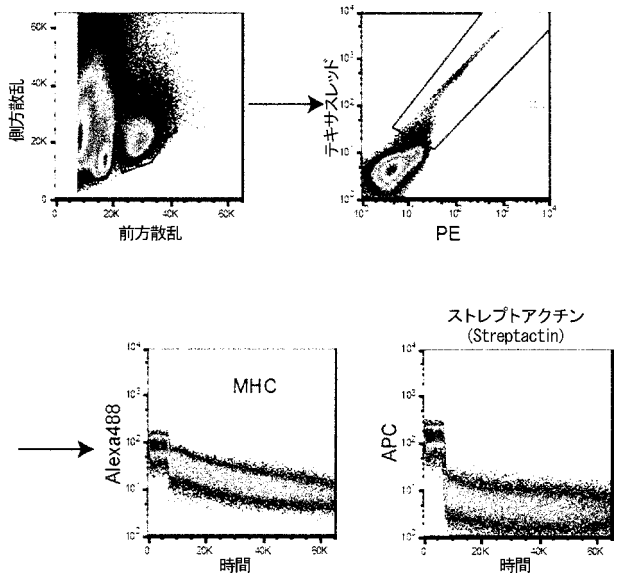
【図 2 A】

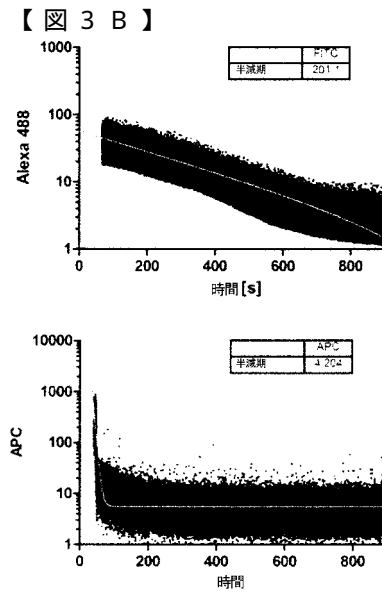
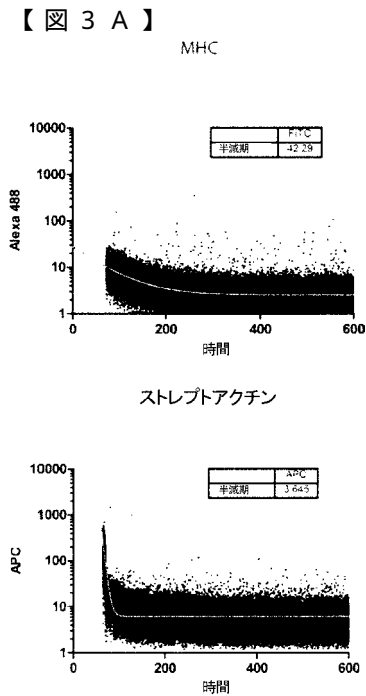
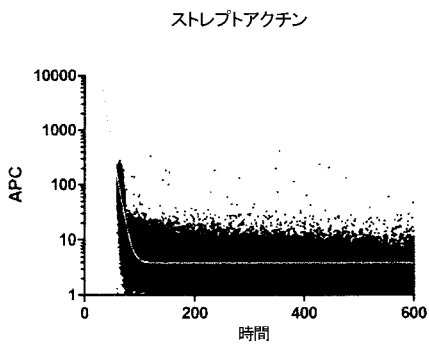
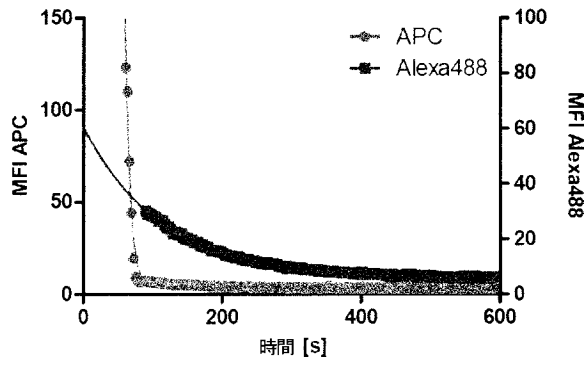
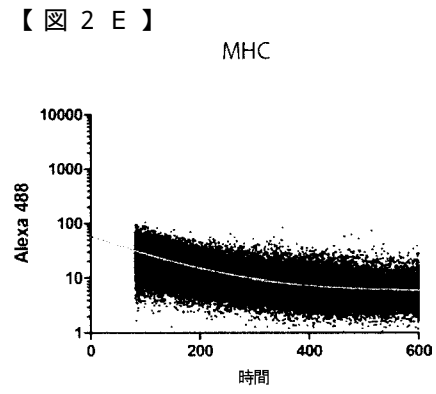
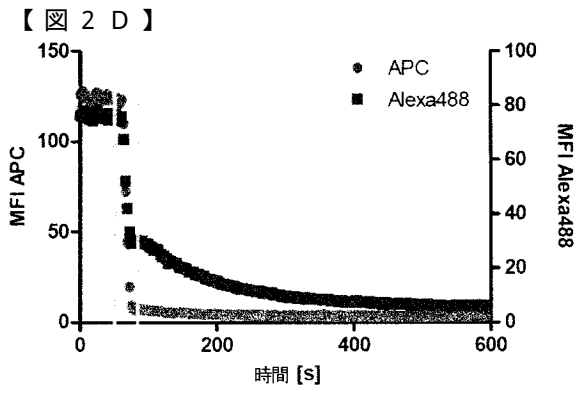


【図 2 B】



【図 2 C】

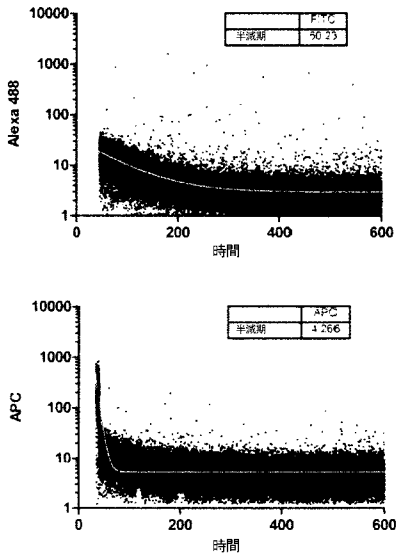




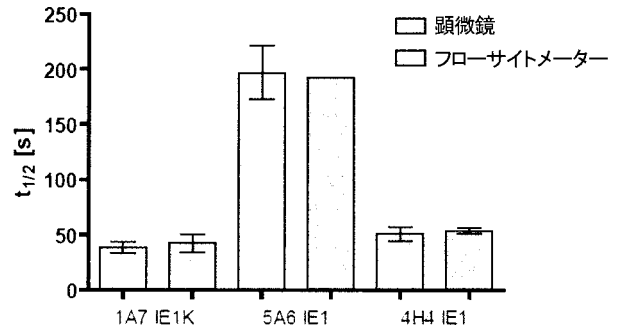
クローン5A6
B8 IE1₈₈₋₉₆

クローン1A7
B8 IE1K₁₉₉₋₂₀₇

【図 3 C】

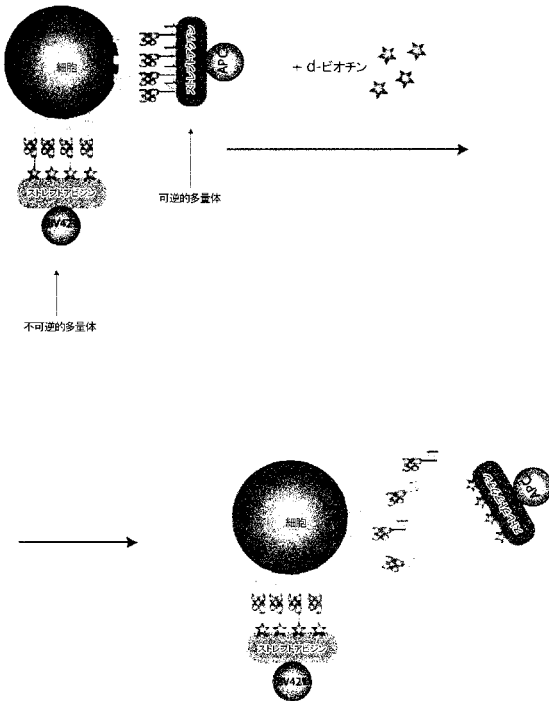


【図 3 D】

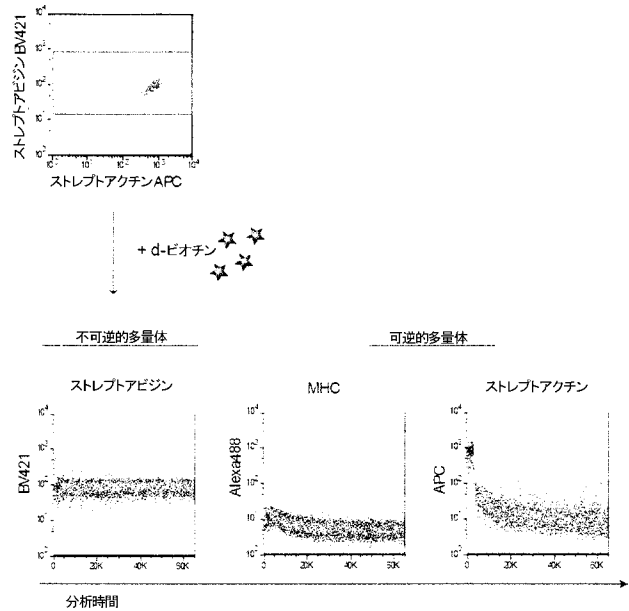


クローン4H4
B8 IE1₈₈₋₉₆

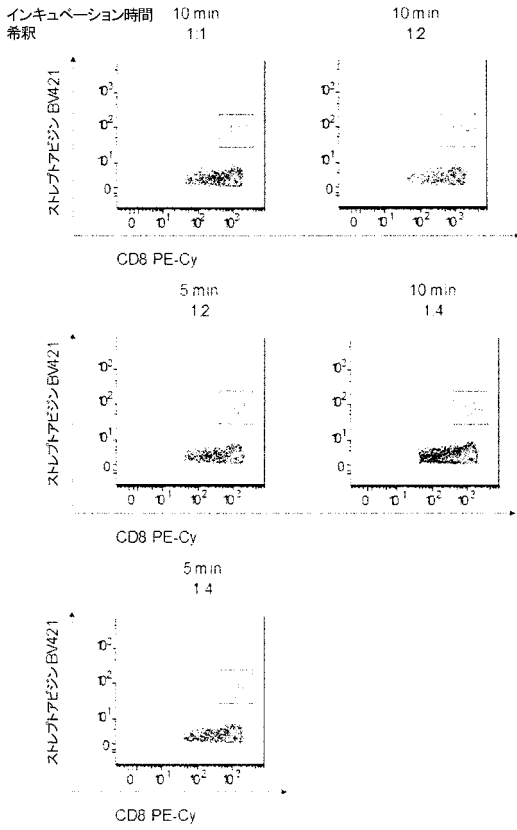
【図 4 A】



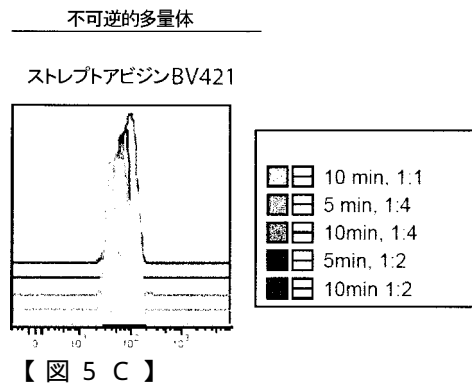
【図 4 B】



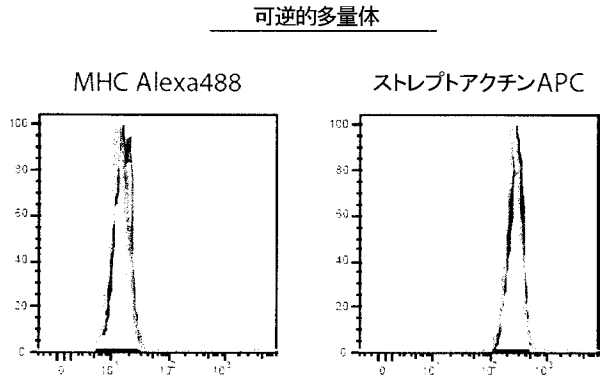
【 図 5 A 】



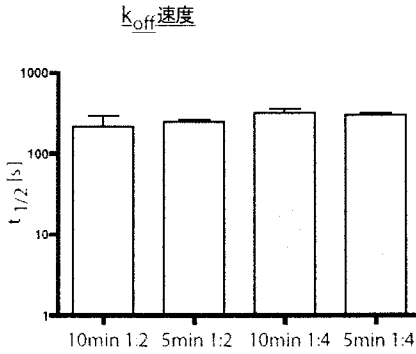
【 図 5 B 】



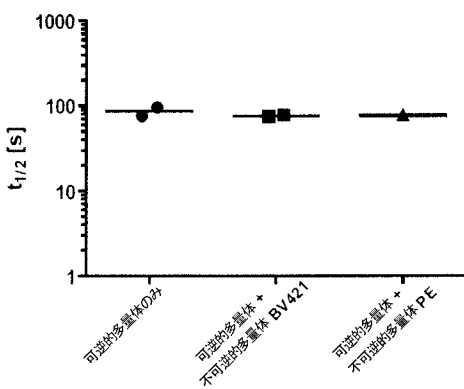
【 図 5 C 】



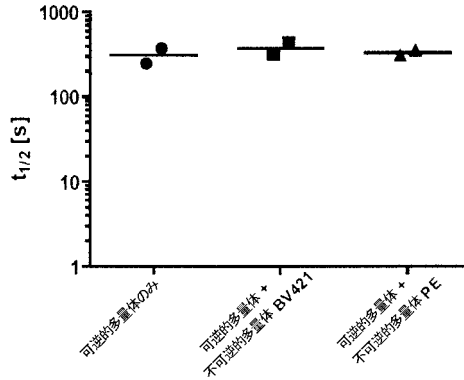
【 図 5 D 】



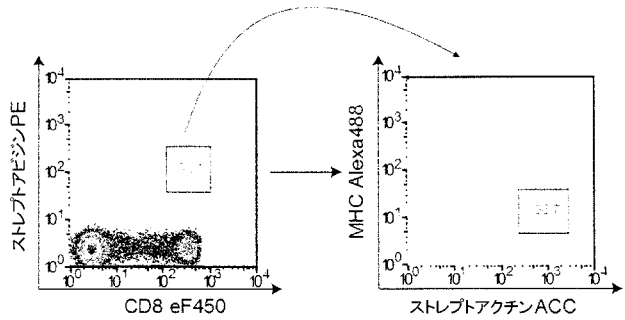
【 図 5 E 】



【 図 5 F 】

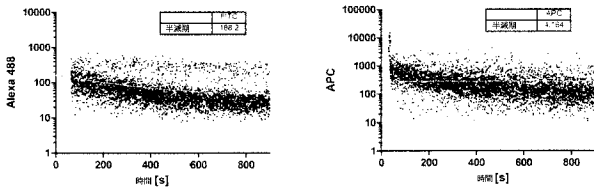


【 図 6 A 】



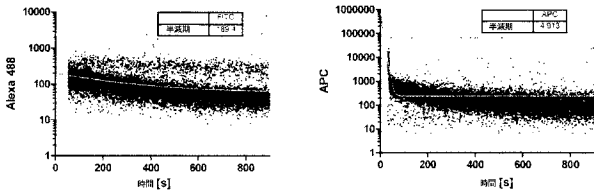
【 図 6 B 】

選別した細胞(可逆的多量体のみ)

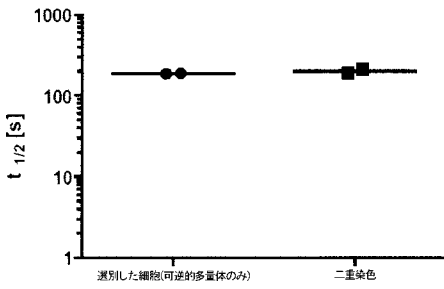


【 図 6 C 】

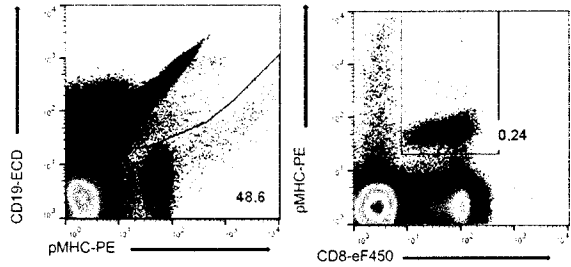
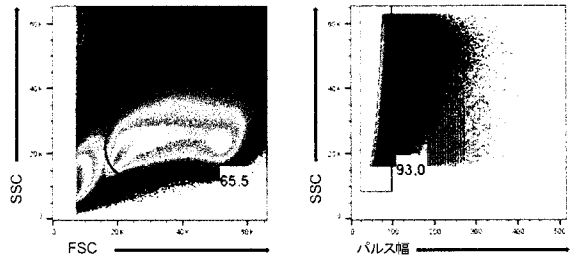
可逆的多量体および不可逆的多量体による二重染色



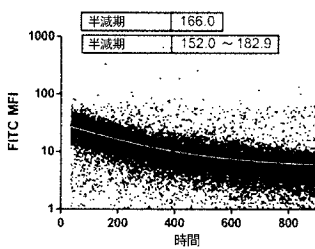
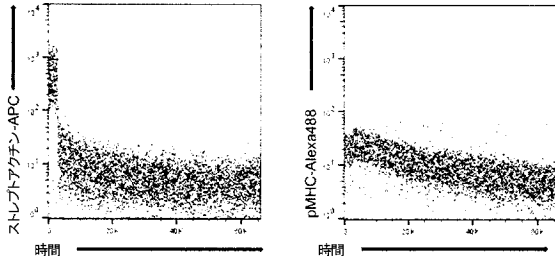
【 図 6 D 】



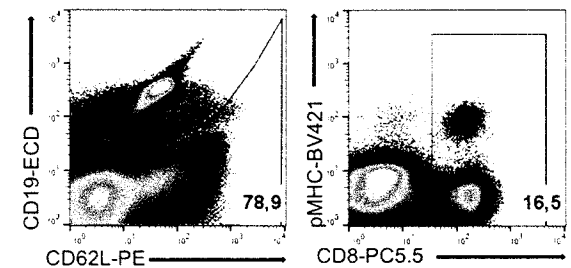
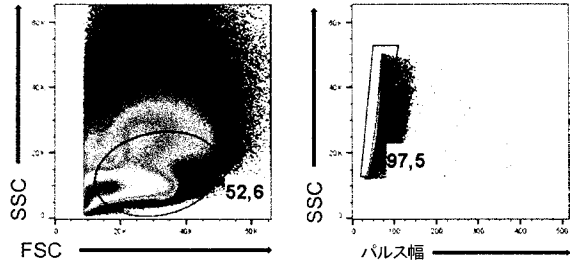
【 図 7 - 1 】



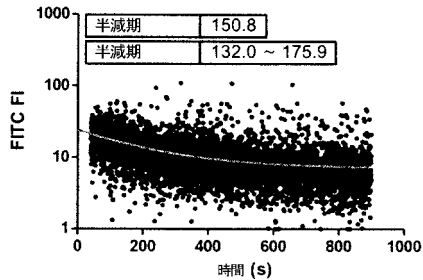
【 図 7 - 2 】



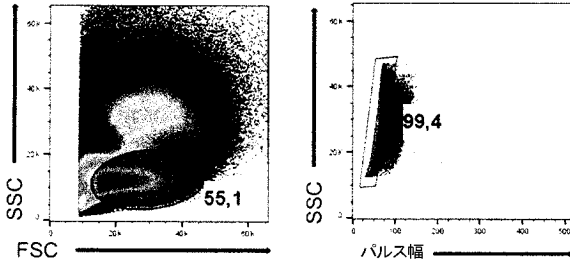
【 図 8 - 1 】



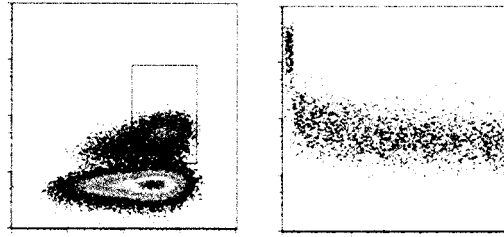
【 図 8 - 2 】



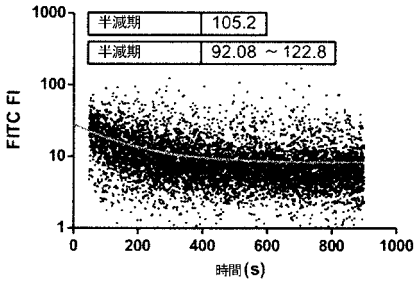
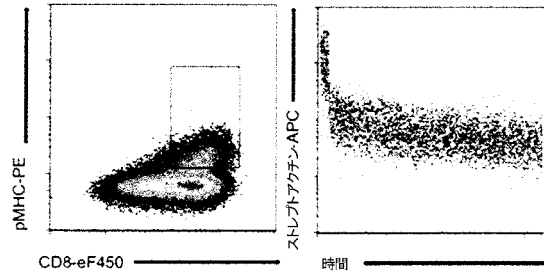
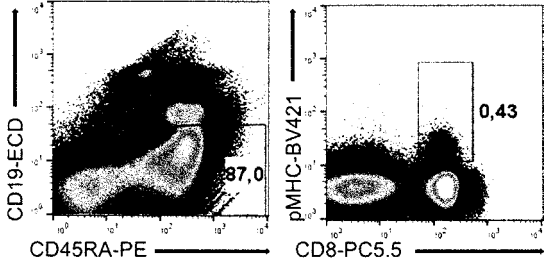
【図 9 - 1】



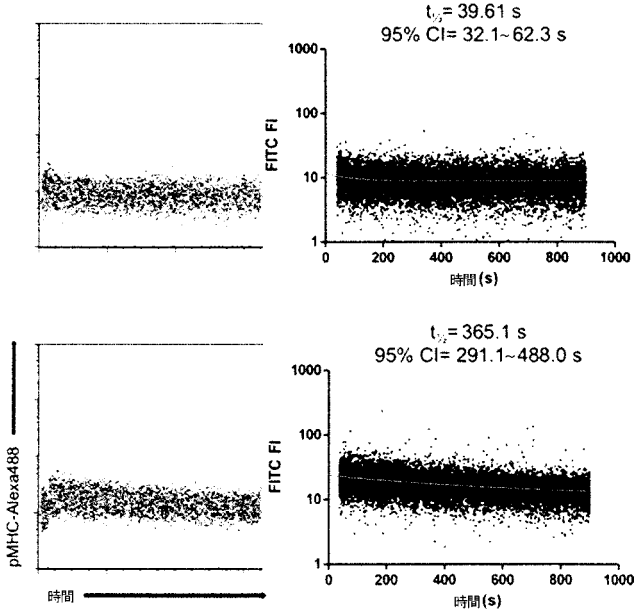
【図 10 - 1】



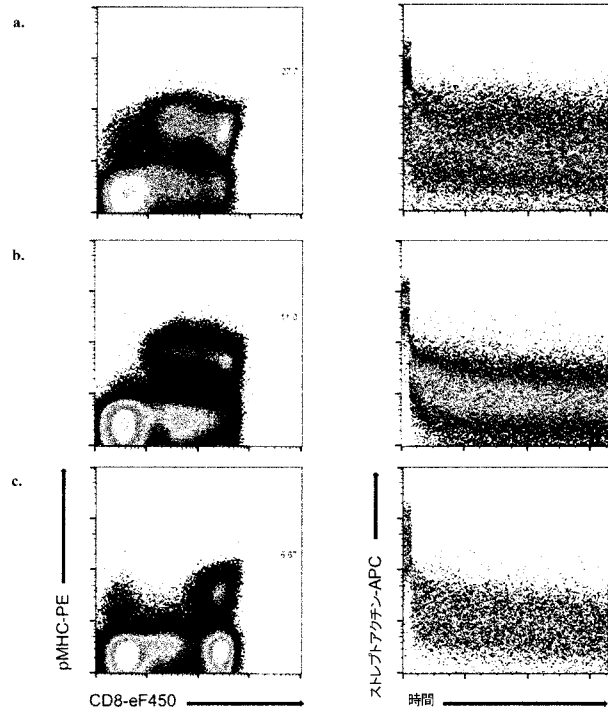
【図 9 - 2】



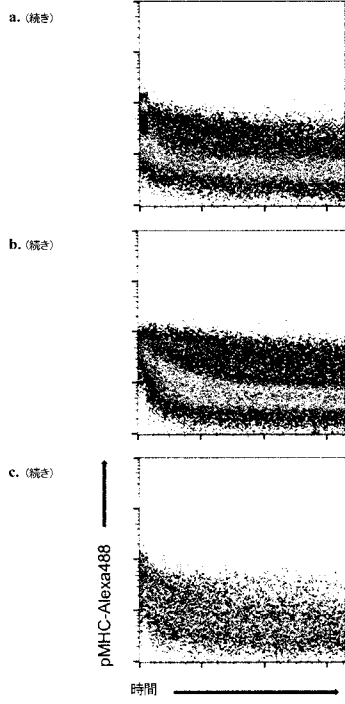
【図 10 - 2】



【図 11 - 1】



【 図 1 1 - 2 】



【 配列表 】

2019532255000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/065755

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12Q1/04	C07K14/36	G01N33/50 G01N33/543 G01N33/566
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) C12Q C07K 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, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. HEBEISEN ET AL: "Identification of Rare High-Avidity, Tumor-Reactive CD8+ T Cells by Monomeric TCR-Ligand Off-Rates Measurements on Living Cells", CANCER RESEARCH, vol. 75, no. 10, 15 May 2015 (2015-05-15), pages 1983-1991, XP055310347, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3516 cited in the application page 1984 - page 1989; figures ----- -/--	1-81
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" 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 "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 25 September 2017		Date of mailing of the international search report 06/10/2017
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 Gonçalves Mauger, M

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/065755

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>NAUERTH MAGDALENA ET AL: "TCR-ligand koff rate correlates with the protective capacity of antigen-specific CD8+ T cells for adoptive transfer", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, AAAS - AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 5, no. 192, 3 July 2013 (2013-07-03), pages 70-79, XP008177407, ISSN: 1946-6242, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3005958 page 71 - page 75; figures -----</p>	1-81
X	<p>M. NAUERTH ET AL: "Supplementary Materials for TCR-Ligand koff Rate Correlates with the Protective Capacity of Antigen-Specific CD8+ T Cells for Adoptive Transfer", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 5, no. 192, 3 July 2013 (2013-07-03), pages 192ra87-192ra87, XP055310480, Washington, DC ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.3005958 see supplementary methods; figures -----</p>	1-81
X	<p>PLEUN HOMBRINK ET AL: "Mixed functional characteristics correlating with TCR-ligand koff -rate of MHC-tetramer reactive T cells within the naive T-cell repertoire", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 43, no. 11, 25 November 2013 (2013-11-25), pages 3038-3050, XP055211633, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.201343397 page 3048 - page 3049 -----</p>	1-81
X	<p>BIANCA WEISSBRICH ET AL: "Adoptive immunotherapy", ONCOIMMUNOLOGY, vol. 2, no. 10, 1 October 2013 (2013-10-01), page e26199, XP055211662, DOI: 10.4161/onci.26199 pages e26199-1 - pages e26199-2; figure 1 ----- -/--</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/065755

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Magdalena Nauerth: "Development of a novel TCR avidity assay for human CD8+ T cells", 6 May 2012 (2012-05-06), XP055308572, Retrieved from the Internet: URL: http://mediatum.ub.tum.de/doc/1097838/1097838.pdf page 42 - page 87 -----	1-81
X	US 2011/070605 A1 (BUSCH DIRK H [DE] ET AL) 24 March 2011 (2011-03-24) paragraph [0021] - paragraph [0038]; claims; figures -----	1-81
X	WO 2013/011011 A2 (IBA GMBH [DE]; SCHMIDT THOMAS [DE]; STEMBERGER CHRISTIAN [DE]; BUSCH D) 24 January 2013 (2013-01-24) cited in the application abstract; claims; examples -----	1-81
X	KNABEL MICHAEL ET AL: "Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 8, no. 6, 1 June 2002 (2002-06-01), pages 631-637, XP002460640, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM0602-631 page 633 - page 635; figures 3,4 -----	1-81
X	TIM SCHROEDER: "Nach Zellen angeIn", FASZINATION FORSCHUNG : DAS WISSENSCHAFTSMAGAZIN, MÜNCHEN TUM, DE 30 June 2010 (2010-06-30), pages 28-37, XP002687294, ISSN: 1865-3022 Retrieved from the Internet: URL: http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=%22fab-strep%22%20stemberger&source=web&cd=7&ved=0CD4QFjAG&url=http%3A%2F%2Fportal.mytum.de%2Fpressestelle%2Ffaszination-forschung%2F2010nr6%2F05_Zellen.pdf%2Fdownload&ei=APu1UPW3DMWwOQwa4oDgDA&usg=AFQjCNGwSHKQR7Pkf1ZIEou_V9PZ6Nz-Ng&cad=rja [retrieved on 2012-11-16] page 37 ----- -/--	1-81

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/065755

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRISTIAN STEMBERGER ET AL: "Novel Serial Positive Enrichment Technology Enables Clinical Multiparameter Cell Sorting", PLOS ONE, vol. 7, no. 4, 24 April 2012 (2012-04-24), page e35798, XP055043969, DOI: 10.1371/journal.pone.0035798 page e35798 -----	1-81

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/065755

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011070605 A1	24-03-2011	CA 2467434 A1	11-07-2002
		EP 1227321 A1	31-07-2002
		EP 1346217 A2	24-09-2003
		JP 4416400 B2	17-02-2010
		JP 2004525354 A	19-08-2004
		US 2004082012 A1	29-04-2004
		US 2011070605 A1	24-03-2011
		WO 02054065 A2	11-07-2002
		-----	-----
WO 2013011011 A2	24-01-2013	CN 103797028 A	14-05-2014
		EP 2734538 A2	28-05-2014
		JP 2014529361 A	06-11-2014
		US 2014295458 A1	02-10-2014
		US 2015301046 A1	22-10-2015
		WO 2013011011 A2	24-01-2013
-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 33/49	K 4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	G 0 1 N 21/64	F
C 1 2 M 1/26 (2006.01)	G 0 1 N 21/78	C
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/0783	
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 M 1/26	
	C 0 7 K 7/06	
	C 1 2 N 15/115	Z

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. A l e x a F l u o r

(74) 代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74) 代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ナウエース マグダレナ

ドイツ連邦共和国 8 1 5 4 1 ミュンヘン レガーシュトラッセ 2 4

(72) 発明者 ブッシュ デイルク

ドイツ連邦共和国 8 3 7 2 7 シュリールゼー ガルテンシュトラッセ 3

(72) 発明者 ジェルメロス ロタール

ドイツ連邦共和国 3 7 0 7 7 ゲッティンゲン アム メンツェルベルク 1 6 エイ

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 FA02 HA01

2G045 AA24 CA17 CA30 DA36 FA37 FB12

2G054 AA08 EB03 GA04 GB02
4B029 AA09 BB11 CC01 HA05 HA09
4B065 AA94X AC20 BA21 BD50 CA44
4H045 AA30 BA13 BA15 BA41 BA70 CA11 EA50 FA74

专利名称(译)	结合可逆和不可逆细胞标记分析受体-配体的koff率		
公开(公告)号	JP2019532255A	公开(公告)日	2019-11-07
申请号	JP2018569087	申请日	2017-06-27
发明人	ナウエース マグダレナ ブッシュ デイルク ジェルメロス ロタール		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/541 G01N33/533 G01N33/49 G01N21/64 G01N21/78 C12N5/0783 C12M1/26 C07K7/06 C12N15/115		
CPC分类号	C07K14/70539 C07K2319/22 C12Q1/04 G01N33/502 G01N33/543 G01N33/566 C12N5/0636 G01N33/557 G01N2458/00		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Y G01N33/541 G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/533 G01N33/49.K G01N21/64.F G01N21/78.C C12N5/0783 C12M1/26 C07K7/06 C12N15/115.Z		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/EA01 2G043/FA02 2G043/HA01 2G045/AA24 2G045/CA17 2G045/CA30 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB12 2G054/AA08 2G054/EB03 2G054/GA04 2G054/GB02 4B029/AA09 4B029/BB11 4B029/CC01 4B029/HA05 4B029/HA09 4B065/AA94X 4B065/AC20 4B065/BA21 4B065/BD50 4B065/CA44 4H045/AA30 4H045/BA13 4H045/BA15 4H045/BA41 4H045/BA70 4H045/CA11 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
優先権	2016176537 2016-06-28 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用可逆和不可逆细胞标记的组合确定靶细胞上受体分子R的解离速率常数 (k关) 的方法。本发明进一步涉及包含这样的受体分子R的细胞, 其中这样的细胞标记组合与受体分子R结合。本发明进一步涉及用于执行本发明方法的试剂盒和设备。本发明进一步涉及分离高亲和力T细胞的方法。

(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2019-532255 (P2019-532255A) (43) 公表日 令和1年11月7日 (2019.11.7)
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 ZNAY	2G043
GO1N 33/541 (2006.01)	GO1N 33/541	2G045
GO1N 33/533 (2006.01)	GO1N 33/53 D	2G054
GO1N 33/49 (2006.01)	GO1N 33/53 U	4B029
GO1N 21/64 (2006.01)	GO1N 33/533	4B065
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2018-569087 (P2018-569087)	(71) 出願人 513306280	
(82) 出願日 平成29年6月27日 (2017.6.27)	テクニッシュェ ウニヴェルズイテート ミ	
(83) 権利文書提出日 平成31年2月15日 (2019.2.15)	ュンヘン	
(84) 国際出願番号 PCT/JP2017/065755	ドイツ連邦共和国 ミュンヘン アルシス	
(87) 国際公開番号 W02018/001985	シュトゥラーセ 21	
(81) 国際公開日 平成30年1月4日 (2018.1.4)	(71) 出願人 514214106	
(31) 優先権主張番号 16176537.5	ジュノ セラピューティクス ゲーエムベ	
(32) 優先日 平成28年6月28日 (2016.6.28)	ーハー	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)	ドイツ連邦共和国 81675 ミュンヘン	
	グルルバーザーシュトゥラーセ 10	
	(74) 代理人 100102978	
	弁理士 清水 初志	
	(74) 代理人 100102118	
	弁理士 番名 雅夫	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 受容体-リガンドkoff速度を分析するための可逆的細胞標識および不可逆的細胞標識の組み合わせ