

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4005146号

(P4005146)

(45) 発行日 平成19年11月7日(2007. 11. 7)

(24) 登録日 平成19年8月31日(2007. 8. 31)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/548 (2006. 01)	GO 1 N 33/548	A
GO 1 N 15/14 (2006. 01)	GO 1 N 15/14	C
GO 1 N 33/483 (2006. 01)	GO 1 N 33/483	C
GO 1 N 33/533 (2006. 01)	GO 1 N 33/533	
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543	5 9 7
請求項の数 20 (全 75 頁)		

(21) 出願番号	特願平10-549499	(73) 特許権者	コールター インターナショナル コーポ レーション
(86) (22) 出願日	平成10年5月14日(1998. 5. 14)		アメリカ合衆国, フロリダ 33196,
(65) 公表番号	特表2002-504992(P2002-504992A)		マイアミ, メール コード 32-エーO
(43) 公表日	平成14年2月12日(2002. 2. 12)		2, サウス ウェスト 147 アベニュー
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/009774		11800
(87) 国際公開番号	W01998/052040	(74) 代理人	弁理士 石田 敬
(87) 国際公開日	平成10年11月19日(1998. 11. 19)		
審査請求日	平成17年4月19日(2005. 4. 19)	(74) 代理人	弁理士 鶴田 準一
(31) 優先権主張番号	08/857, 941		
(32) 優先日	平成9年5月16日(1997. 5. 16)	(74) 代理人	弁理士 福本 積
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	08/976, 031	(74) 代理人	弁理士 西山 雅也
(32) 優先日	平成9年11月21日(1997. 11. 21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 リガンドーアミノデキストラン-マーカーコンジュゲート及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

フローサイトメトリー分析において実質的に似ている結合パートナー密度を有する細胞の複数の集団を一回の測定で定量するための方法であって、該方法が、第1の細胞集団の表面上に存在する第1の結合パートナーに結合することができ、かつフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料に直接コンジュゲートしているリガンドで、第1の細胞集団を標識するステップと、第2の細胞集団の表面上に存在する第2の結合パートナーに結合することができ、かつ前記フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料にコンジュゲートしているアミノデキストランと架橋しているリガンドで、第2の細胞集団を標識するステップと、を含み、ここで前記フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料は、活性化に基づいて、各々の細胞について異なる検出可能な蛍光強度を作り出すことを特徴とする方法。

【請求項2】

細胞の複数の集団を一回の測定で定量するための方法であって、

(a) 選択された細胞集団の1～複数の対を供するステップであって、各々の対は第1の細胞集団と第2の細胞集団とを含み、各々の前記対の第1の集団は、各々の前記対の第2の集団上の第2の結合パートナーの密度に実質的に等しい第1の結合パートナー密度を有し、ここで前記第1の結合パートナーは各々の対の前記第1の細胞集団の表面上でのみ見出し出され、前記第2の結合パートナーは各々の対の前記第2の細胞集団の表面上でのみ見出し出され、ここで当該各々の対は、他の各々の対の第1の細胞集団の表面上で見出される

第1の結合パートナーとは異なった第1の結合パートナー、及び他の各々の対の第2の細胞集団の表面上で見出される第2の結合パートナーとは異なった第2の結合パートナーを有するステップと、

(b) フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料で直接、標識された第1のリガンドを、各々の第1の集団に供するステップであって、前記第1のリガンドは前記第1の結合パートナーに結合することができ、かつ前記第1のリガンドは他の各々の対の第1のリガントとは異なり、そして前記フィコビリプロテイン又はタンデム染料は他の各々の対の第1のリガンドとは異なるステップと、

(c) アミノデキストラン-フィコビリプロテインコンジュゲート又はアミノデキストラン-フィコビリプロテイン含有タンデム染料コンジュゲートで標識された第2のリガンドを、各々の第2の集団に供するステップであって、該第2のリガンドは前記第2の結合パートナーに結合することができ、かつ各々の前記第2の結合パートナーの中で異なり、そして細胞集団の対の中で、前記コンジュゲートのフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料は第1のリガンドのフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料と同一であり、リガンドの各々の対のフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料は異なる色であるステップと、

(d) 前記複数の選択された細胞集団を、前記第1及び第2の標識されたりガンドの各々の対と、結合パートナー-標識化リガンド複合体を形成するのを許容するのに十分な時間、インキュベートするステップと、

(e) 各々の前記複合体中のフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料を、レーザー励起線で励起させて蛍光を生じさせるステップと、

(f) フローサイトメトリーを用いる1回の測定において、各々の前記標識された第1のリガンドに結合した各々の第1の細胞集団の蛍光発光及び各々の前記標識された第2のリガンドに結合した各々の第2の集団の蛍光発光の強度を測定するステップであって、細胞集団の各々の対において、前記第1の標識されたりガンドは、前記第2の標識されたりガンドと、同じ色であるが区別できる強度の蛍光シグナルを供し、細胞集団は、標識強度及び色において検出可能なバリエーションにより区別されるステップと、を含む方法。

【請求項3】

前記フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料が、レーザー励起線488 Ar⁺下で発光することを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料が、レーザー励起線632.8nm He/Ne下で発光することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

前記細胞の集団が白血球であることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

前記リガンドが、抗体、機能的なフラグメント、オリゴヌクレオチド又はMHC-ペプチド-ストレプトアビジン複合体もしくはMHC-ペプチド-アビジン複合体であり、前記結合パートナーがレセプターであることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

前記リガンドがオリゴヌクレオチドであり、前記結合パートナーが核酸配列であることを特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記第1及び第2の標識されたりガンドの間の強度差が、正常なドナーにおいて前記第1及び第2の細胞集団についての天然の結合パートナー密度の範囲により観察される強度差より大きいことを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

前記アミノデキストランで架橋されたりガンド-フィコビリプロテインコンジュゲート又はリガンド-フィコビリプロテイン含有タンデム染料コンジュゲートが、アミノデキスト

10

20

30

40

50

ラン分子当り 2～20 のフィコビリプロテイン又はタンデム染料分子を含み、前記アミノデキストランが、 $1/142 \sim 1/5$ の、C 2～C 6 ジアミノアルカンで置換の程度を有することを特徴とする請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記アミノデキストランが、 $1/45 \sim 1/7$ の 1, 3-ジアミノプロパンでの置換の程度を有することを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記アミノデキストランが 5 X-アミノデキストランであることを特徴とする請求項 1～10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

前記アミノデキストランが 1 X-アミノデキストランであることを特徴とする請求項 1～10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

更なる細胞集団を、緑色蛍光タンパク質及び青色蛍光タンパク質からなる群から選択されるマーカーで標識することにより、該集団を区別することを更に含む請求項 1～12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

アミノデキストラン分子当り 2～20 のフィコビリプロテインを含むリガンドアミノデキストラン-タンデム染料コンジュゲートであって、該アミノデキストランが、 $1/142 \sim 1/5$ の、C 2～C 6 ジアミノアルカンでの置換の程度を有することを特徴とするコンジュゲート。

【請求項 15】

前記アミノデキストランが、 $1/45 \sim 1/7$ の範囲の、1, 3-ジアミノプロパンでの置換の程度を有することを特徴とする請求項 14 に記載のリガンドアミノデキストラン-タンデム染料コンジュゲート。

【請求項 16】

前記アミノデキストランが 5 X-アミノデキストランであることを特徴とする請求項 14 又は 15 に記載のリガンドアミノデキストラン-タンデム染料コンジュゲート。

【請求項 17】

前記アミノデキストランが、1 X-アミノデキストランであることを特徴とする請求項 14 又は 15 に記載のリガンドアミノデキストラン-タンデム染料コンジュゲート。

【請求項 18】

生物物質を検出する方法であって、

(a) リガンド-アミノデキストラン-フィコビリプロテイン含有タンデム染料コンジュゲートを、検出すべき生物材料を含むサンプルと混合して、該コンジュゲートのリガンドを該材料と結合させて複合体を形成するステップであって、ここで、該コンジュゲートがアミノデキストラン分子当り 2～20 のタンデム染料分子を含み、前記アミノデキストランが、 $1/142 \sim 1/5$ の、C 2～C 6 ジアミノアルカンでの置換の程度を有するステップと、

(b) 前記複合体の各々のタンデム染料分子を励起させて発光させるステップと、

(c) 前記複合体からの蛍光シグナルを検出するステップと、

を含む方法。

【請求項 19】

前記生物物質がヌクレオチド塩基であることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記生物材料物質が、1000 未満の細胞表面レセプターを含む抗原であり、前記リガンドが抗体であることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、蛍光標識又はマーカーを用いて細胞集団を分析するための方法に関する。

10

20

30

40

50

発明の背景

フローサイトメトリーによる細胞集団混合物の分析のための細胞の多重標識化は種々の方法で進行している。周知の有機蛍光団の蛍光発色の限られた数だけが、フローサイトメトリー測定が行われる可視-近UV-近IRスペクトル領域に入れることができる。その限定は放射バンドのバンド幅、これらの放射バンド間のスペクトルのオーバーラップ、及び励起波長の要求により指定される。3つのレーザーラインを要求する8までの色が種々の段階で導入されている：2~4色〔H.M. Shapiro in Practical Flow Cytometry, 3rd ed., Wiley-Liss, Inc. New York, NY, 1995, Chap. 7, p.291〕；5色〔A.J. Beavis and K.J. Pennline, Cytometry, 15: 371-376 (1994) ；M.C. O'Brien et al., Cytometry, 21: 76-83 (1995) ；M. Roederer et al, Cytometry, 21: 187-196 (1995) 〕；6色〔M. Roederer et al, Cytometry, 24: 191-197 (1996) 〕；イメージングのための7色〔T. Ried et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1388-1392 (1992) ；A. Gothot et al, Cytometry, 24: 214-225 (1996) 〕；及び8色〔M. Roederer et al, Tissue Antigens, 48: 485 (1996), abstract TC-6-02〕。6及び7色の場合は、周知の有機染料を蛍光標識として用いるフローサイトメトリー適用のための現在の上限であるようである。なぜなら、8色の例は、蛍光団の放射バンド間の激しいオーバーラップのため臨床的に重要なものと今までのところ考えることができないからである。

利用できる色の数の上限は達成したので、分析した細胞集団に固有の又は種々の手段により考察された蛍光強度の差に基づく別の方法が開示されている。細胞当りの広範囲の異なる固有の数のレセプターを含む標的化白血球集団の相互に排他的な対を、単色マーカーにより標識化し、フローサイトメトリーによって分析することができる（米国特許第5,538,855）。米国特許第4,499,052IKは、フハオレセイン及びロダミンの異なる所定の比率を含む蛍光ポリマーで特定の抗体を標識化することにより、細胞の複数の副次集団を区別する方法を記述する〔また、A.M. Saunders及びC.-H. Chang, Ann. N.Y. Acad. Sci., 468: 128 (1986) 〕。H.M. Shapiro (Practical Flow Cytometry, 1st ed., Alan R. Liss, Inc., pp. 127-128 (1985)) は、蛍光団A, B並びにA及びBの組合せで標識した3つの異なる抗体を用いる方法を記述する。米国特許第5,206,143号は、細胞のサンプルと混合された飽和及び副飽和の量のマーカーを記述する。細胞を標識するために用いる1又は2の蛍光団の蛍光強度の定量的な差が得られた。分析すべき各々のサブセットを、区別できる範囲の蛍光強度を示す異なる量の発色団で標識した。フルオレセイン-及びフィコエリトリン-標識化及び非標識化抗体の混合物を用いて種々の細胞サブセットの間の数オーダーの倍率の蛍光強度差が作られた〔P.K. Horanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 8361-8365 (1986) 〕。完全な血液中のヘルパー及びサプレッサー/細胞障害性T細胞、NK及びB細胞を同定するためのこの方法の使用が示された〔C.-M. Liuら、Am J. Clin. Pathol, 92: 721-728 (1989) 〕。更に、完全な血液中の8の白血球サブセットを3つの蛍光団のうちの1つと連結した6のモノクローナル抗体で分析した（P. Carayonら、J. Immunol. Methods, 138: 257-264 (1991) 〕。

種々の抗体-アミノデキストランコンジュゲートが米国特許第5,527,713号に記載されており、米国特許第5,658,741号は、コンジュゲート当り2又はそれ超の抗体を含む抗体-アミノデキストランコンジュゲートの調製を記述している。現在、タンパク質及び他の分子種の共有結合のためのジビニルスルホン成分を含むポリマー担体が欧州特許第0594772B1に記載されている。

ヒトゲノムプロジェクトは、核酸のための新しい検出及び配列決定法の開発を支持する推進力である。サンプルDNAとハイブリダイズし、又はそれに結合するいくつかの非放射性遺伝子プローブ、結合した蛍光染料を有するオリゴが開示されており〔L.M. Smithら、Nature, 321: 674-679 (1986) 及びL.M. Smithら、Nucleic Acids Res., 13: 2399-2412 (1985) 〕、用いられている。自動化DNAシーケンサーは、ヌクレオチドベース当りに1つ、非オーバーラップ放射バンドを有する4つの蛍光染料を用いる。蛍光染料-オリゴプライマーコンジュゲートの電気泳動移動度は全部で4つのコンジュゲートについて類似する必要がある。また、それらコンジュゲートの分子量はそれほど大きくなり得ないが、それら

10

20

30

40

50

は、電気泳動に用いるポリアクリルアミド又はアガロースゲルを通して移動しないであろう。分子はゲル孔を通して移動しないが、フォースト・レプテーションと呼ばれる過程によりゲル繊維のもつれを通して曲がりくねった経路に従う〔G.W. Slaterら、Macromolecules, 24: 6715-6720 (1991) ; P.-G. de Gennes, J. Chem. Phys., 55: 572 (1971) 〕。大きな分子はゲル孔内で“ヘルニア (hernias) ”、“袋小路 (cul-de-sac) ”、又は“串刺しらせん (impaled spirals) ”のような形態でゲル内にひっかかり得る。しかしながら、パルス電場を用いる電気泳動法〔米国特許第4,971,671〕は、約5,000,000塩基対までを含む別個のDNAフラグメントに上手く適用されている。

DNAを配列決定するための別の方法は、サザン・ハイブリダイゼーション技術からのものである〔E.M. Southern, J. Mol. Biol., 98: 503 (1975) 〕。ここでは、DNAは1又は複数の制限酵素で消化され、生じたフラグメントはアガロースゲルによる電気泳動によって大きさに従って分離される。そのDNAはその場で変性され、ゲルから固体支持体、通常、ニトロセルロースフィルター又はナイロン膜に移される。プロモーターとしての放射能標識の使用なしで、そのフィルターに結合したDNAは蛍光標識したDNA又はRNAにハイブリダイズされる〔E.M. Southern, Trends Genet., 12: 110-115 (1996) 〕。それは、プローブに相補的であるバンドの位置の検出を許容する。

遺伝子チッププローブはゲル又は電気泳動の使用に依存しない。この固体表面プローブは、Z. Strezoska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10089-10093 (1991) ; R. Drmanac et al., Science, 260: 1649-1652 (1993) ; A.B. Chetverin and F.R. Kramer, Biotechnology, 12: 1093-1099 (1994) ; T. Studt, R & D Magazine (February 1998) に記載されており、同時のDNA/RNA分析のためにチップ当たり400,000までのオリゴを許容するようデザインされている。

SER-遺伝子プローブ〔T. Vo-Dinhら、Anal. Chem. 66: 3379-3383 (1994) 及び米国特許第5,306,403〕は、ニトロセルロース膜上の核酸に結合するようにオリゴヌクレオチドにコンジュゲートした非蛍光染料を用いる。ハイブリダイゼーションの後、SER-Geneプローブ-DNA複合体は染料からのSERSスペクトルを検出するために表面増強アマン散乱 (SERS) 活性物質上に移される。

オリゴヌクレオチドプライマー当たり複数の染料分子を結合させることによる自動化DNA配列分析に用いるセンシティブティーの高いプローブについての必要性が、L.M. Smithら (Nature, 321: 674-679 (1986)) におけると同じくらい早期に認識されていた。しかしながら、ゲル電気泳動による分離のために低分子量に制限される染料-オリゴコンジュゲートのために可能な蛍光増強は限られた程度しかない。染料分子の対が2から6倍まで蛍光強度を増強するためにドナーアクセプター型エネルギー転移により関連づけられているオリゴ当たり2つの染料分子の使用は現在、J. Ju et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 4347-4351 (1995) ; J. Ju et al., Anal. Biochem., 231: 131-140 (1995) ; M.L. Metzker et al., Science, 271: 1420-1422 (1996) に記載されている。

抗原特異的T細胞の測定は、各々の異なる抗原について特有である多形性表面T細胞レセプターによる認識を必要とする。TCRのためのリガンドは主要組織適合性タンパク質 (MHC) 分子の溝内に折りたたまれる抗原性ペプチドである。これは、MHC/ペプチド複合体の多量体化により親和力が増加する場合にのみ細胞表面上で検出できる低アフィニティー相互作用である。これは、後にフィコエリトリンに結合する多価アビジン分子へのビオチニル化複合体の結合により達成することができる (MG McHeyszer-Williamsら、Current Opinion in Immunol., 278-284 (1996) 〕。いずれかの所定の応答の間のこれらの細胞の低い周波数は、シグナル対ノイズ比がまれな出来事を検出するために十分に大きいことを強制する。

より多数の細胞集団及び他の生物材料が蛍光マーカーにより区別できるようにするための方法が当該技術分野において必要とされ続けている。

発明の概要

本発明は、生物材料、特に少数で存在する及び／又は標的材料上に少数のレセプター又は他の結合パートナーを含むこれらの材料の検出を必要とする分野における多数の問題

10

20

30

40

50

を克服する。

一態様において、本発明は、細胞集団の異なる対の標識化に基づいて細胞の複数の集団を一回の測定で定量するための方法を供する。その対の各々の細胞集団は、その対の各々の細胞集団上で実質的に同様のレセプター密度で発現される相互に排他的な細胞レセプターを含む。1つの細胞集団は、第1の結合パートナー（例えばレセプター）に結合することができるリガンドであって、マーカー、例えば蛍光フィコビリプロテインに直接、コンジュゲートしているもので標識化される。第2の細胞集団は、第2の結合パートナー（例えばレセプター）に結合することができるリガンドであって、マーカー（例えば蛍光フィコビリプロテイン）にコンジュゲートしているアミノデキストランと架橋しているもので標識化される。レーザー活性化に基づいて、第1の結合パートナーに結合した直接、標識されたリガンドは、第2の結合パートナーに結合した標識化された架橋されたリガンドより異なる検出可能なマーカー強度を作り出す。このようなリガンドの対の使用は、同様の結合パートナー密度の細胞の2つの集団が単一色のマーカーの使用により区別されることを可能にする。

10

別の態様において、本発明は、細胞の異なる対の標識化に基づいて細胞の複数の集団を一回の測定で定量するための方法を供する。ここでその各々の対は、実質的に同様のレセプター密度で発現される相互に排他的な細胞レセプターを含む。細胞集団の対の中の細胞の各々の第1の集団について、異なる第1のリガンドは異なるフィコビリプロテインで直接、標識される。対の中の各々の第2の集団について、その対の第1のリガンドから異なる第2のリガンドは、アミノデキストランと架橋し、フィコビリプロテインで標識されることによりコンジュゲートを形成する。第1及び第2のリガンドの各々の対の中で、フィコビリプロテインは同じである；しかしながら、細胞集団の各々の別個の対は、その第1及び第2のリガンドを標識するために異なる色のフィコビリプロテイン（又は異なるレーザー励起線により励起されたフィコビリプロテインを用いる。第1及び第2の標識化リガンドの各々の対との、細胞集団の1又は複数の対を含む生物サンプルの、レセプター標識化リガンド複合体がそれらの間に形成されるのを許容するのに十分な時間のインキュベーションの後、そのサンプルはレーザー励起線にかけられてその標識が蛍光発光する。各々の標識された第1のリガンドに結合した各々の第1の細胞集団の蛍光発光及び各々の標識された第2のリガンドに結合した各々の第2の集団の蛍光発光の強度はフローサイトメトリーを用いて測定される。この方法により、細胞集団は、検出可能に異なる強度及び色のシグナルにより区別することができる。この方法は、任意に、用いるフィコビリプロテインと重複しない蛍光発光を作り出す標識（即ち550nm未満を放射する一般的なタンパク質様又は小分子である標識、例えばFITC）の使用により改良される。これにより、この方法は、単一レーザー、4色フローサイトメーターを用いて一回の定量測定で7本でのマーカーを用いることを許容する。

20

30

なお別の態様において、その方法は、2つの単色フィコビリプロテインを用いて4つの細胞集団間を区別するのに用いられる。更なる態様において、その方法は、3つの単色フィコビリプロテインを用いて6つの細胞集団の間を区別するのに用いられる。第4の色、例えばFITCは、その方法に用いるマーカーの総数を7にするために加えることができる。

なお更なる態様において、その方法は、異なる色及び強度特性を有する最大12の異なるシグナルを許容し、細胞表面レセプターの密度間の実質的な差に依存しないが、同定される細胞集団の各々の対のための相互に排他的な細胞表面レセプターの使用に依存する方法における12の異なる細胞集団の同定を可能にする、2つのレーザー励起線の使用に関する。

40

なお更なる態様において、本発明は、アミノデキストラン分子当たり2～20フィコビリプロテイン又はタンデム染料分子を含むリガンドーアミノデキストランー（フィコビリプロテイン又はタンデム染料）ーコンジュゲートを供する。ここで、前記デキストランは、1/142～1/5のC2～C6ジアミノアルカンでの所定の程度の置換を有する。また、このようなリガンドーアミノデキストラン（フィコビリプロテインータンデム染料）コンジュゲートを作り及び用いる方法は本発明の態様として含まれる。

本発明の他の態様及び利点は、その好ましい実施形態の以下の詳細な記載に更に記載され

50

る。

図面の簡単な記載

図1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 3C, 4A, 4B及び5A-5Fのヒストグラムは、細胞数のプロット（縦軸）対平均チャンネル蛍光強度（横軸）のプロットを示す。

図1A及び1Bは、各々のコンジュゲートを完全な血液と混合した時の、直接的コンジュゲートBB27-PEにより及びアミノデキストラン架橋化コンジュゲートBB27-5X-Amdex-PEにより印をつけたリンパ球の蛍光強度を比較する。

図2A及び2Bは、架橋されたコンジュゲートBB27-5X-Amdex-PEを完全な血液と混合する前に、遊離抗BB27抗体でブロックされていない又はブロックされた完全な血液におけるリンパ球のためのヒストグラムを示す。

図3A, 3B及び3Cは、各々のコンジュゲートを完全な血液と混合した時に、直接的コンジュゲートBY55-PEにより、及びアミノデキストラン架橋化コンジュゲートBY55-5Xの異なる画分により印をつけたリンパ球の蛍光強度を比較する。

図4A及び4Bは、架橋化コンジュゲートBY55-5X-Amdex-PEを完全な血液と混合する前に、遊離抗BY55でブロックされていない又はブロックされた完全な血液のリンパ球についてのヒストグラムを示す。

図5A-5Fは、各々のマーカーのセットを完全な血液と混合した時の、CD4-FITC, BB27-5X-Amdex-PE及びCD8-ECDと同時に染色したリンパ球と比較した。CD4-FITC, BB27-PE、及びCD8-ECDと同時に染色したリンパ球の蛍光強度を示すヒストグラムである。

図6Aは、アミノデキストラン分子の分子量（ダルトン）、又はCoulter N4MD Sub-Micron Particle Analyzerで測定したスルホスクシニミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-SMCC）活性化及び精製の前の、増強された蛍光発光強度を作り出す抗体-5X-Amdex-フィコビリプロテイン（即ちPE, PC5又はECD）コンジュゲートの調製において用いるのに適した5X-アミドデキストラン（5X-Amdex）サンプルのサイズ分布プロセッサ（SDP）示差重量分布に対するアミノデキストラン分子の相対的分子量（ダルトン）（質量%）（縦軸）のプロットを示すヒストグラムである。

図6Bは、図6Aに記載されるような、Amdex分子の分子量、又はCoulterアナライザーで測定した。スルホ-SMCC活性化及び精製後の、増強された蛍光発光強度を生成する抗体-5X-Amdex-PE, PC5、又はECDコンジュゲートの調製に用いるのに適した5X-AmdexサンプルのSDP示差重量分布に対するAmdex分子の相対的質量%（質量%）を示すヒストグラムである。

図7は、CD8αβ-5X-Amdex-PC5コンジュゲーション混合物の精製のための280nmにおいて動作するLKB 2138 Uvicord Sモニターを用いて測定したA₂₈₀対画分番号を示すクロマトグラムである。

図8Aは、細胞数（細胞の数）対平均チャンネル蛍光強度（MFI）をプロットし、抗体分子当たり0.86のPC5を含む直接的CD8αβ-PC5コンジュゲートのMFIを示すヒストグラムである。散乱したゲートを通ったCD8αβ+リンパ球の染色を、リガンドとして2.5μgのCD8αβ-PC5を含む10μLで染色した正常なドナーからの100μLの完全な血液の分析から示す。

図8Bは、細胞数対MFIをプロットし、直接的CD8αβ-PC5コンジュゲートの平均チャンネルPC5蛍光強度を増強するためにデキストラン分子当たり2超のPC5抗体を含む蛍光マーカーとしてのCD8αβ-5X-Amdex-PC5コンジュゲートの能力を示すヒストグラムである。散乱ゲートを適したCD8αβ+リンパ球の染色を、リガンドとして2.5μgのCD8αβ-5X-Amdex-PC5を含む10μLで染色した正常なドナーからの完全な血液100μLの分析から示す。そのヒストグラムは、架橋されたコンジュゲートは、CD8αβ+リンパ球に、3.5倍高い蛍光強度を有することを示す。

図9Aは、以下の実施例19の試験1の画分42についての、CD8αβ-PC5リガンド（ダイヤモンド）対CD8αβ-5X-Amdex-PC5リガンド（四角）についてのシグナル対ノイズ比（S/N）をプロットするグラフである。

10

20

30

40

50

図9Bは、以下の実施例19の試験1、画分42についてのCD8 α β - PC5リガンド（ダイヤモンド）対CD8 α β - 5X - Amdex - PC5リガンドについての陽性の平均チャンネル強度をプロットするグラフである。

図10Aは、直接的CD9-ECDリガンド及び実施例20の試験2からのCD4-5X - Amdex - ECDコンジュゲートの単一のプールされたサンプルについてのS / N、陽性平均蛍光及びMFI比の表である。

図10Bは、図10Aの結果のS / N比対マイクログラム / テストをプロットするグラフである。

図10Cは、図10Aの結果のMFI対マイクログラム / テストをプロットするグラフである。

図11Aは、CD4-ECDリガンドの0.03 μ g CD4抗体タイターについてのヒストグラムである。

10

図11Bは、CD4-5X - Amdex - ECDリガンドの0.03 μ g CD4抗体タイターについてのヒストグラムである。

図12Aは、Coulter XLフローサイトメーターでの488.0nm Ar⁺レーザー励起で行った同じ蛍光標識（CD4-5X - Amdex - PE）の一方向蛍光標識 - 抗体コンジュゲート（CD56 - PE）及び別の増強したアミドデキストラン - 架橋化蛍光標識 - 抗体コンジュゲートでの完全な血液中の白血球の相互に排他的な集団（CD56+及びCD4+）の可能な数値を示す2つの単色ヒストグラムの重ねあわせである。

図12Bは、直接のコンジュゲート、CD56 - PE及びCD4 - PEの対を用いることにより得られた図12Aと同様のヒストグラムのセットであり、CD56+及びCD4+分布の間のいくつかのオーバーラップを示す。

20

図13Aは、マーカーCD19 - PE及びCD4 - 5X - Amdex - PEの対についての図12のものと同様のヒストグラムである。

図13Bは、マーカーCD19 - PE及びCD4 - PEの2つの直接、コンジュゲートした対についての図13Aと同様のヒストグラムである。

図14Aは、マーカー、CD8 α β - PE及びCD4 - 5X - Amdex - PEの対についての図13Aのものと同様のヒストグラムである。

図14Bは、マーカーCD4 - PE及びCD8 α β - PEの2つの直接、コンジュゲートした対についての図14Aのものと同様のヒストグラムである。

図15Aは、マーカーCD56 - PC5及びCD8 α β - 5X - Amdex - PC5を用いる図14Aのものと同様のヒストグラムである。

30

図15Bは、陽性及び陰性数の位置の間の最適な分離対強度分布を示すためのCD8 α β - 5X - Amdex - PC5マーカーの異なるタイターで得られた図15Aと同様のヒストグラムである。

図15Cは、マーカーCD8 α β - PC5及びCD56 - PC5を用いる図15Aのものと同様のヒストグラムである。

図16Aは、マーカーCD19 - PC5及びCD8 α β - 5X - Amdex - PC5を用いる図15Aのものと同様のヒストグラムである。

図16Bは、陽性及び陰性数の位置の間の最適な分離対強度分布を示すためのCD8 α β - 5X - Amdex - PC5マーカーの異なるタイターで得られた図16Aのものと同様のヒストグラムである。

40

図16Cは、マーカーCD8 α β - PC5及びCD19 - PC5を用いる図15Cと同様のヒストグラムである。

図17Aは、マーカーCD4 - PC5及びCD8 α β - 5X - Amdex - PC5を用いる図15Aのものと同様のヒストグラムである。

図17Bは、陽性及び陰性数の位置の間の最適な分離対強度分布を示すためにCD8 α β - 5X - Amdex - PC5マーカーの異なるタイターで得られた図17Aのものと同様のヒストグラムである。

図17Cは、マーカーCD4 - PC5及びCD8 α β - PC5を用いる図16Cのものと同様のヒストグラムである。

図18Aは、Coulter XLフローサイトメーターでの488.0nm Ar⁺レーザー励起で行った正常

50

な血液ドナーの白血球の散乱ゲートを通したリンパ球集団においてCD56+（NK細胞）、CD4+（T4細胞）、CD19+（B細胞）、及びCD8 α β +（T8細胞）について分析するために同時に用いた2つの直接的蛍光色素-抗体コンジュゲートCD56-PE及びCD19-PC5、並びに2つのアミノデキストラン架橋化コンジュゲートからのFS対SSヒストグラムである。

図18Bは、図18Aの実験の二色PE（CD56/CD4-5X-Amdex）対PC5（CD19/CD8 α β -5X-Amdex）蛍光強度ヒストグラムである。

図19は、単色細胞数対PC5（CD19/CD8 α β -5X-Amdex）蛍光強度ヒストグラム及び単色数対PE（CD56/CD4-5X-Amdex）蛍光強度ヒストグラムとしてのPE対PCの2重パラメータ表示の投影図である。この図の上側のヒストグラム及び右側のヒストグラムを形成する2つの単色ヒストグラムは、各々、1つの直接的蛍光色素-抗体マーカー及び同じ色の増強された強度のアミドデキストラン架橋化マーカーを含む。これらは、第2又は第3の10進における最大の平均チャンネル蛍光と共に、通常のマーカーからの蛍光強度スケールの第4の10進における増強されたマーカーの優れた分離を示す。

10

図20A～20Dは、6のマーカー、4色、単一染色実験からの二重のパラメータのセットを示す。

図20Aは、Coulter XLフローサイトメーターでの488.0nm Ar⁺レーザー励起で行ったQ-P REPL、洗浄したサンプルについての二色、4マーカーCD56-PE/CD4-5X-Amdex-PE及びCD19-PC5/CD8 α β -5X-Amdex-PC5を示すヒストグラムである。

図20Bは、既に他のマーカーを含む完全な血液と混合した2つの更なる色マーカーCD3-ECD及びCD45RO-FITCの使用を示す同じ実験のヒストグラムである。

20

図20Cは、CD3-ECD対CD56-PE及びCD4-5X-Amdex-PEについての蛍光の検出を示す同じ実験のヒストグラムである。

図20Dは、CD3-ECD対CD19-PC5及びCD8 α β -5X-Amdex-PC5についての蛍光の検出を示す同じ実験のヒストグラムである。

図21Aは、CD4-PE及びCD4-1X Amdex（lot 2145-26）-PE標識化リンパ球についての蛍光事象の数対チャンネル蛍光強度のフローサイトメトリーヒストグラムである。

図21Bは、CD4-Amdex（Molecular Probe（M.P.））-PE標識化リンパ球についての蛍光事象の数対平均チャンネル蛍光強度のフローサイトメトリーヒストグラムである。

図21Cは、CD4-PE及びCD4-5X-Amdex-PE標識化リンパ球についての蛍光事象の数対平均チャンネル蛍光強度のフローサイトメトリーヒストグラムである。

30

図21Dは、CD4-PE及びCD4-1x-Amdex（lot 2326-11）-PE標識化リンパ球についての蛍光事象の数対平均チャンネル蛍光のフローサイトメトリーヒストグラムである。

図22Aは、A-15mカラムから収集したCD4-Amdex（M.P.）-ECDの画分についての陽性増幅比、シグナル対ノイズ比、及び陰性増幅を示す線のグラフである。

図22Bは、CD4-ECD対CD4-Amdex（M.P.）-ECDについてのフローサイトメトリーヒストグラムである。

図23は、CD8 α β -Amdex（M.P.）-PC5コンジュゲートの画分についての図22Aに記載される3つの比の平行依存性を示す。

発明の詳細な記載

本発明は、増強された蛍光強度を得るために役立つアミノデキストラン架橋化コンジュゲート及び3つのコンジュゲートを用いるための方法を供する。

40

要約すると、架橋されたコンジュゲートは、イミノチオラン活性化抗体及び蛍光マーカー（例えばPE）をスルホ-SMCC活性化アミノデキストランと適切なモル比で同時に反応させることにより、直接的に1リガンド-PEコンジュゲートより実質的に多くの蛍光マーカー（例えばフィコエリトリン（PE））で充填される。これにより、生物サンプル中の細胞サブセットの分析における飽和量のこれらの充填されたコンジュゲートの使用は、直接的なリガンド-PEコンジュゲートで印をつけた細胞からの蛍光強度より優る2～20倍、個々の印をつけた細胞からの蛍光シグナルの増幅を生ずる。蛍光の増幅は、最初に、それらのレセプターを直接の抗体-PEコンジュゲートで飽和させた時にかすかな蛍光強度を通常、示す印をつけた細胞について証明された。一例において、本発明は、適切な倍率の蛍光シグ

50

ナルが、抗体－アミノデキストラン－PEマーカで細胞のバックグラウンド蛍光上で後に観察することができるように、白血球上の抗原性レセプターの数が多い、架橋化抗体－PEコンジュゲートの使用に関する。細胞表面レセプターが多数、細胞当たり1000及びそれ超、存在する抗体も、アミノデキストラン架橋化抗体－PEコンジュゲートの調製にも用いることができ、それは、標的化細胞集団の蛍光強度を更に増幅するために用いることができる。更に、他のリガンドで抗体を置換し、他の結合パートナーで、細胞表面レセプターを置換して、以下に議論されるように、種々の生物材料の検出を可能にすることができる。本発明は、タンデム染料において2日目の蛍光マーカ（例えばPE）のを許容する方法も供する。これは、3色、色当たり2の強度のマーカのセットにPEとして同じレーザー線、488.0nm Ar⁺で励起することができる。直接及びアミノデキストラン架橋化抗体－蛍光染料コンジュゲート、蛍光マーカ（PE）タンデム染料分子の組合せで得ることができる蛍光色の数の増加を許容する。これらのタンデム染料はこれらの方法と同様に、本明細書で議論される。

本明細書を通しての便利さのため、引用は白血球（WBC）についてなされる。しかしながら、本発明の方法は、分析が要求される他の細胞集団に直ちに適用できると直ちに理解されよう。このような細胞集団は、例えばこれらに限らないが、組織由来細胞、腫瘍細胞、血液細胞、及び病原性生物からの細胞を含み得る。本発明の方法は、種々の他の生物材料、例えば個々のヌクレオチド塩基（例えば配列決定についてのもの）、アミノ酸、ウィルス等を検出するのに利用することができる。例えば表1を参照のこと。

一実施形態において、本発明は、フローサイトメトリーに用いるための“マーカ”のいくつかの型をくみ合わせるにより白血球集団の複数のサブセットを定量する改良された方法を供する。特に、実質的に同様の細胞表面レセプター密度を有するWBCの複数の集団を一回の測定で定量するための方法は、以下のステップを用いることにより、フローサイトメトリー分析において行うことができる。第2の細胞集団上に存在しない特定の細胞表面レセプターを特徴とする1つの細胞集団は、細胞表面レセプターに結合することができるリガンド（好ましくは抗体）とインキュベートされる。このリガンドは、便利には、蛍光フィコビリプロテインに直接、コンジュゲートされる。第1の細胞集団上のレセプターと異なり、第1の細胞集団上では見出しされない第2の細胞表面レセプターの存在を特徴とする第2の細胞集団は、この細胞表面レセプターに結合することができるが、第1の細胞表面レセプターに結合することができないリガンドとインキュベートされる。この第2のリガンドは、好ましくは、アミノデキストラン担体を通して同じ蛍光フィコビリプロテインに架橋された抗体である。レーザーでの励起に基づいて、フィコビリプロテインは、第1の細胞表面レセプターに結合するリガンドへの直接のコンジュゲーションと第2の細胞表面レセプターに結合するリガンドへの架橋されたコンジュゲーションとの間の差のため、各々の細胞集団について異なる検出可能な蛍光強度を作り出す。これにより、単一色フィコビリプロテインは、蛍光強度の差に基づいて2つの細胞集団間を区別することができる。

本発明の方法及び組成物の理解を容易にするために、この方法に用いる成分の以下の記載は以下の通り記載される。

A. リガンド

本明細書に定義する場合、リガンドは、表面上又は細胞（形成体）内もしくは溶液内にある1又は複数の特異的結合パートナーを検出し、それに反応する種々の剤をほう包含する。細胞内又は形成体内のリガンドは、特定の手法、例えば転座、浸透、エレクトロポレーション等により表面にアクセス可能に作られ、又は表面に運ばれる。本発明のリガンド及びそれらの結合パートナーの例を表1に列記する。

表 1

リガンド 抗 体	特異的結合パートナー 抗 原
天然のリガンド：サイトカイン又は ケモカイン	CKレセプター
ホルモン	ホルモンレセプター
成長因子	成長因子レセプター
第2試薬：ストレプトアビジン	ビオチニル化抗体－抗原
抗体	抗体－抗原
医薬：薬剤	薬剤レセプター
可溶性の天然のリガンド：カウンター レセプター	レセプター
CTLA－4	B 7 (CD80／86)
レクチン（アグルチニン）	相補的炭水化物又は細胞表面 グリコプロテインのオリゴサ ッカライド
MHC－ペプチド複合体	T細胞レセプター（TCR）
オリゴヌクレオチド	核酸内の相補配列 DNA or RNA

これらのリガンドを作製するために役立つ方法は当業者に周知である。全てのこのようなリガンドは、細胞の表面上の特定の細胞表面レセプターに結合する要求される能力を特徴とする。1つの好ましい実施形態において本発明のリガンドは、細胞表面レセプターの全て又は一部に優先的に結合する成分である。これにより、この本発明の実施形態に役立つリガンドは、WBC集団上の細胞表面レセプターに結合することができる抗体又はそのフラグメントであり得る。このような抗体又はフラグメントは、いずれかの天然源からのポリクローナル抗体、並びにクラスIgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEの天然又は組換えモノクローナル抗体、ハイブリッド誘導体、及び抗体のフラグメント、例えばFab、Fab'及びF（

10

20

30

40

50

ab')₂、ヒトに適合させた又はヒト抗体、抗体の相補性決定領域を含む組換え又は合成構成物等を含む。

本発明の例に用いるモノクローナル抗体は、一般に、慣用的なハイブリドーマ法により得られ、硫酸アンモニウム（45%）沈殿、遠心及びプロテインAを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより腹水から精製された。モノクローナル抗体を作る標準的な方法は、G. Kohler及びC. Milstein (*Nature*, 256: 495-497 (1975)) に記載される。もちろん、モノクローナル抗体を作る特定の方法及び型はこれらの技術に限られず、これらの抗体を作るためのいずれの技術も本発明の実施にあたりと想像される。細胞上及び細胞内のレセプターを標的にすることができるいずれのリガンドも用いることができる。なぜなら、抗体-デキストラン-フィコビリプロテインコンジュゲートを用いる蛍光強度の増幅は細胞上の特定のレセプター部位の密度によらないからである。リガンドの選択は、本発明において限定事項ではない。

B. マーカー：フィコビリプロテイン又はビリプロテイン、タンデム染料等

用語“マーカー”は、一般に、レーザーによる励起に基づいて特定の波長の検出可能なシグナルを放射することにより検出を可能にするタンパク質様分子、及び小さな化学分子をいう。フィコビリプロテイン、タンデム染料、特定の蛍光タンパク質、小化学分子、及び他の手段により検出できる特定の分子は、全てフローサイトメトリーの分析のためのマーカーとして考慮することができる。例えば、*Handbook of Fluorescent Probes and Resarch Chemicals*, 6th Ed., R.P. Haugland, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR (1996) に列記されるマーカーを参照のこと。本明細書を通して、用語“マーカー”は、特定のマーカー、で直接、標識されたりリガンドにより形成されたコンジュゲート、例えばCD56-PE又はアミノデキストランにより特定のマーカーに架橋されたりリガンドにより形成されたコンジュゲート、例えばCD56-5X-Amdex-PEをいうのにも用いることができる。その用語は、本願の文脈から明らかであろう。

“フィコビリプロテイン”は、紅藻、青-緑藻において見いだされる高分子のファミリーである。ビリプロテイン（用語“ビリプロテイン”は用語“フィコビリプロテイン”と等価である）は、少なくとも約30,000ダルトン、より通常は少なくとも約40,000ダルトンの分子量を有し、60,000ダルトン又はそれ超・程度で、通常、約300,000ダルトンを超えない大きさであり得る。ビリプロテインは、通常、2~3の異なるサブユニットから構成され、ここでそれらサブユニットは、約10,000~約60,000分子量の範囲であり得る。ビリプロテインは、通常、広範囲の種々の藻類及びシアノバクテリアからそれらの天然の型で得られるものが用いられる。

ビリプロテイン中のタンパク質の存在は、タンパク質様及び非タンパク質様分子へのコンジュゲーションのための広範囲の官能基を供する。存在する官能基は、アミノ、チオール及びカルボキシルを含む。特定の例において、ビリプロテインを別のタンパク質にコンジュゲートする場合、官能基、特にチオール基を導入することが要求され得る。各々のフィコビリプロテイン分子は多数の発色団を含む。典型的なリガンド、例えばフルオレセインで直接、標識された抗体分子は、それに会合する1~3の発色団を有するであろう。（例えば）フィコビリプロテインとのコンジュゲーションにより直接、標識された抗体分子は、各々がフルオレセインのものにおおよそ相当する吸光度及び量子収率を有する34程度の多さの会合する発色団を有し得る。

本発明に役立つフィコビリプロテインの例は、フィコシアニン、アロフィコシアニン（APC）、アロフィコシアニンB、フィコエリトリン（PE）及び好ましくはR-フィコエリトリンである。REは現在利用できる最も明るい蛍光染料のうちの1つである。抗体とコンジュゲートさせて、PEは、蛍光プレートアッセイにおいてインターロイキン-4を検出するのに用いられ、M.C. Custer及びM.T. Lotze, *J. Immunol. Methods*, 128, 109-117 (1990) において、適切なシグナルを作り出す唯一のテストされた蛍光色素であることが見い出されている。

タンデム染料はフィコビリプロテイン及び他の染料から形成することができる非天然分子である。例えば、米国特許第4,542,104号及び米国特許第5,272,257号を参照のこと。本発

10

20

30

40

50

明に役立つタンデム染料の例は、フィコエリトロシアニン又はPC5（PE-Cy5、フィコエリトリン-シアニン5.1；励起486～580nm、放射660～680nm）〔A.S. Waggonerら、Ann. N.Y. Acad. Sci., 677:185-193（1993）及び米国特許第5,171,846号〕及びECD（フィコエリトリン-テキサスレッド；励起、486～575nm、放射、610～635nm）〔米国特許第4,542,104号及び米国特許第5,272,257号〕である。他の周知のタンデム染料はPE-Cy7、APC-Cy5、及びAPC-Cy7である（M. Roedererら、Cytometry, 24:191-197（1996））。タンデム染料PC5及びECDは、その染料のイミノチオラン活性化に関連するいくつかの方法によりモノクローナル抗体に上手く、直接、コンジュゲートされているので、その手順は、本明細書に記載されるように、アミノデキストラン架橋化抗体-タンデム染料コンジュゲートの調製に移すことができると予想される。

10

リガンドに直接、コンジュゲートすることができ、本発明におけるフィコビリプロテイン又はタンデム染料と共にその方法に更なる数のマーカー（標識化リガンド）を加えるのに用いることができる更に別のマーカーには、550nm未満の波長を励起に基づいて放射する小分子がある。このような分子はフィコビリプロテインの放射とオーバーラップしない。このようなマーカーの一例は、フルオレセインインチオシアネート（FITC）である。他のものは、上述のHandbookに列記される。

更なる色を供するためにこの方法に用いることができる更に別のマーカーは、緑色蛍光タンパク質及び青色蛍光タンパク質として知られるタンパク質であり；紫外光による励起により発光するマーカーも役立つ。

ビリプロテイン及びタンデム染料は、種々のソース、例えばCoulter International Corporation, Miami, FL, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR及びProzyme, Inc., San Leandro, CAから市販される。先に議論される他のマーカー又は標識は、周知のソースから市販され得る。

20

C. リガンド-アミノデキストラン-（フィコビリプロテイン又はタンデム染料）コンジュゲート

本発明のコンジュゲートは、デキストラン分子当たり25までのフィコビリプロテイン又はタンデム染料分子を含む架橋化デキストラン、リガンド-（フィコビリプロテイン又はタンデム染料）コンジュゲートであり、好ましくは、水性媒体中で可溶性である（例えば1×PBS）。これらのコンジュゲートは、それらが2倍又はそれ超、直接的抗体-フィコビリプロテインを超える蛍光強度の増幅を作り出すことができる点で有利である。

30

適切なデキストランは比較的高い分子量を有し、水性媒体中で可溶性を保持する、即ち約2～5MDaである。好ましくは、これらのコンジュゲートのデキストラン構成物はアミノデキストランである。必要に応じて、架橋されたアミノデキストラン-（フィコビリプロテイン又はタンデム染料）コンジュゲートは、アミノデキストラン分子当たり2～20のフィコビリプロテイン又はタンデム染料分子を含み、ここで前記デキストランは、2MDaのデキストラン中に低い程度の置換（1/142～1/5）を有する。1つの典型的なアミノデキストランにおいて、置換の程度は、1, 3-ジアミノプロパンを用いて1/145～1/5（1×Amdexの置換の程度）である。別の典型的なアミノデキストランにおいて、置換の程度は1, 3-ジアミノプロパンを用いて1/40～1/7の範囲である。当業者は、必要な効果及び直ちに利用できる材料を考慮して、適切な置換を直ちに決定することができる。

40

アミノデキストランは、デキストランの過ヨウ素酸酸化、次の1, 3-プロパンジアミンとの反応により米国特許第5,466,609号及び米国特許第5,527,713号に記載される方法によって調製することができる。もちろん、アミノデキストランを作る特定の手法はこのような技術に限られず、このようなアミノデキストランを作るためのいずれの技術も当業者の知識内にある。例えば、当業者は、実施例に記載される1, 3-プロパンジアミンを、2～6の炭素原子を有するジアミノアルカンで直ちに置換することができる。好ましくは、アミノデキストランは5X-Amdex又は1X-Amdexであり、最も好ましくは5X-Amdexである。

そのコンジュゲートにおいて、デキストラン当りのビリプロテイン又はタンデム染料分子の数は、コンジュゲーションの間の活性化程の濃度、種の活性化の程度、デキストラン誘導体の大きさ及び形状、並びにビリプロテイン又はタンデム染料の大きさ及び形状による

50

であろう。デキストランにビリプロテイン又はタンデム染料をコンジュゲートするためにいくつかの連結基を用いることができる。フィコビリプロテインを炭素原子にコンジュゲートするための十分な文献がある。本発明においてフィコビリプロテインのかわりにタンデム染料を用いる場合に同じ方法を用いることができる。例えば、本明細書に引用により組み込まれる記載を参照のこと。市販の架橋剤の例は、Pierce Catalog and Handbook (Life Science and Analytical Research Produces, Pierce. Chemical Company, Rockford, IL, 1994/1995)を参照のこと。先の出版物に記載される周知の連結法を用いることができる。例えば、フィコビリプロテインは、より多くのチオール基を導入するために2-イミノチオランで活性化し、スルホ-SMCL-活性化アミノデキストランにコンジュゲートすることができる。

10

本発明に役立つタンパク質-アミノデキストランコンジュゲートは、2つの異なるタンパク質、一方はモノクローナル抗体、他方は蛍光タンパク質 (PE) をアミノデキストランに同時にコンジュゲートした (“Amdex” としても知られる) ことを除いて米国特許第5,527,713に記載されるように調製した。好ましくは、抗体及びフィコビリプロテインのアミノデキストランへのコンジュゲーションは、本明細書に記載されるような、PEの活性化、抗体の活性化、及びアミノデキストランの活性化により達成される。

より詳しくは、本発明に役立つ典型的な架橋化コンジュゲートは以下の通り調製した。

(1) 緩衝液を加えた蒸留水の溶液を、1×PBS中のスルホスクシニミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC) で活性化した。その混合物を室温で約1時間、ローラーで混合した。混合を終えた後、その反応混合物を直ちに、1×PBSで平衡化したG-50 Sephadexカラムの頂上に適用した。そのサンプルを1×PBSを用いて溶出し、約2mL画分に収集した。280nmに吸収がある第1のバンドの画分は、焦点可視光ビームでのTyndall散乱により確認して、高分子量活性化Amdexを含んでいた。これらの画分をプールしてスルホ-SMCC-活性化Amdexを供した。

20

(2) 1×PBS中2-イミノチオランの溶液を抗体濃縮物に加えることにより、リガンド、即ちモノクローナル抗体を活性化した。15mg/mLの抗体濃度及び15のイミノチオラン対抗体モル比を有する生じた溶液を環境温度で約1時間、混合した。次にその反応混合物を、1×PBSで平衡化したG-50 Sephadexカラムでのクロマトグラフィーにかけ、そのサンプルを1×PBSを用いて溶出した。第1のバンドのピークの画分を収集し、プールした。

(3) フィコビリプロテインを1×PBS中の2-イミノチオランの溶液の添加により活性化した。40mg/mLのフィコビリプロテイン濃度及び22.5のイミノチオラン対フィコビリプロテインモル活性化比を有する生じた溶液を約1時間、室温で混合した。次にその反応混合物を、1×PBSで平衡化したG-50 Sephadexカラムの頂上に適用し、サンプルを1×PBSで溶出した。

30

(4) イミノチオラン-モノクローナル抗体溶液を最初に、後にスルホ-SMCC-5X-Amdex溶液を加えたイミノチオラン-フィコビリプロテイン溶液と混合し、又はイミノチオランを最初に、スルホ-SMCC-5X-Amdex溶液に加え、イミノチオランモノクローナル抗体溶液を直後に加えた。次に全混合物を約16~24時間、一晩、ローラーで混合した。混合を終えた後、各々の混合物の全量を測定し、1×PBS中5mg/mLのL-システインのこの容量をコンジュゲーション混合物に加えた。次にL-システイン含有混合物を、いずれの未反応のスルホ-SMCC成分のブロッキングにも作用するように約15分、混合した。最後に、全混合物容量の0.120倍の量の1×PBS中、及び全混合物容量の0.020倍の容量の1Mホウサン緩衝液中のイオドアセトアミドをそのコンジュゲーション混合物に加えた。生じた混合物を約30分、いずれの未反応のスルフィドリル基もブロックした。

40

ブロッキングの後、その混合物を以下の通りサイズ排除クロマトグラフィーによりその構成物に精製した：コンジュゲーション混合物の全量を約1.0から1.5mLに減らした。次にそのサンプルを1×PBSで平衡化したBio-Gel A-5m又はA-15mアガロースカラム (2.5cm×48cm) の頂上に適用し、溶離液として1×PBSを用いてクロマトグラフィーを行った。約2~4mL容量の溶出液画分を収集した。その画分を280nmでモニターした。抗体-Amdex-PEコンジュゲートについて収集した最初のバンドの画分を、1cm経路長セルを用いて565及

50

び280nmで分光学的に分析した。そのコンジュゲート中7mg/mLでのPEの濃度を、565nmでの吸光度から得た。コンジュゲート中の活性抗体濃度をELISAアッセイにより決定し、 A_{280} 値をPEにより吸光度について補正した。

D. 本発明の方法

コンジュゲートは、広範囲の種々の方法に用いることができる。例えば、生物材料、例えば細胞、組織、オルガネラ、例えばプラスミド、核等の検出、診断、測定及び研究のための周知の方法を増強するために用いることができる。他の要求される生物材料には、例えば、個々の標識化することができる（例えば配列決定を許容する）、又はオリゴヌクレオチドの形態であるアミノ酸、ヌクレオチド塩基等がある。本発明のコンジュゲートは、個々の分子として存在し得る。又は上述のもののようなより複雑な生物の文脈において、抗原を検出するためにも適する。そのコンジュゲートは、ビリプロテイン又はタンデム染料が蛍光標識として機能するイムノアッセイ又は競合タンパク質結合アッセイに用いることができる。

本発明によれば、問題のコンジュゲートの要求される使用は、生物材料の蛍光染色である。これらのコンジュゲートは、増強されたシグナルを供する単一マーカーとして用いることができる。例えば、本発明のコンジュゲートは、個々のヌクレオチド塩基の標識化において役立ち、それにより自動シーケンサーにおける配列決定の間、これらの塩基の検出を増強することができる。別の例として、その増強されたシグナルは、本発明のコンジュゲートを、特に細胞（例えば、バックグラウンド蛍光に近い又はそれによりかくれた蛍光強度を通常、示すであろう10~1000の範囲の抗原性レセプター部位を有する細胞）上の富んでいない抗原部位を検出するために要求されるものにする。例えば、これらのコンジュゲートで染色した細胞は、次に、顕微鏡下で観察され、ここで蛍光剤の存在が特定の決定基部位の存在の診断となるか、又は細胞が蛍光活性化細胞ソーター（FACS）中で検出され得る。以下に記載されるように、抗体BB27、BY55及びIL-12は、このような適用のために特に役立つ。本発明のコンジュゲートは、低レベルで要求される標的生物材料上に存在する他の結合パートナーを検出するためにも同様に役立つ。

別の実施形態において、そのコンジュゲートは、ビリプロテイン及びタンデム染料の最大の蛍光発光が、少なくとも約15nm、好ましくは少なくとも約25nmだけ分離される場合に組み合わせて用いることができる。あるいは、ビリプロテイン又はタンデム染料コンジュゲートは、その最大発光が少なくとも約55nm、好ましくは約58nmだけ分離される場合に他のタンパク質又は非タンパク質蛍光剤と組み合わせて用いることができる。

蛍光剤の組合せを用いることにより、凝集物のサブセット、例えば特定の型の細胞、生物の株、ウィルスの株、異なるタンパク質又は抗原等の自然の複合化又は相互作用の検出を供することができる。特定の実施形態において、組合せは、例えばビリプロテインが約450~650nmの範囲の最大吸光度を有する場合、同じレーザー光源で活性化することができるビリプロテインを伴うフルオレセインを含む。

好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートは、フィコビリプロテインと直接的に共有結合でコンジュゲートした別のリガンド、即ちアミノデキストランで架橋されていない別のリガンドでのタンデムにおけるこのような染色法に用いられる。これらの架橋された抗体-Amdex-（フィコビリプロテイン又はタンデム染料）コンジュゲートのこの様式での使用は、白血球上の抗原性レセプターの数が高く、抗体-アミノデキストラン-（フィコビリプロテイン又はタンデム染料）マーカーで上述の細胞のバックグラウンド蛍光上で適切な倍率の蛍光シグナルを観察することができるリガンド又は抗体に限られない。細胞表面レセプターが多数、細胞当たり1000又はそれ超、存在する抗体は、アミノデキストラン-架橋化抗体-（フィコビリプロテイン又はタンデム染料）コンジュゲートの調製にも用いることができ、それは、標的にした細胞集団の蛍光強度を更に増幅するために本発明に従って用いることができる。

これにより、本発明によれば、細胞集団は次の1又は複数の対を用いることにより同定することができる：（a）第2の細胞副集団上で発現される第2の細胞表面抗原レセプターとほぼ同じか又はそれより少ない細胞当たりの数で第1の細胞副集団上で発現される細胞表面抗

10

20

30

40

50

原レセプターに結合する抗体で調製された慣用的な、直接的抗体-（フィコビリプロテイン又はタンデム染料）コンジュゲート；及び（b）血液細胞の相互に排他的な第2のサブセット上で発現される第2の細胞表面レセプターに結合する抗体で調製された第2のAmdex架橋化抗体-（フィコビリプロテイン又はタンデム染料）コンジュゲート。これら2つの型の標識されたりガンドの組合せは、同じ色の発光の2つの明確な及び重複しない蛍光強度で完全な血液との混合物中の2つの蛍光標識化細胞集団を作り出す。好ましくは、第1及び第2の標識されたりガンド間の強度差は、2つの直接的コンジュゲートを用い、別個の強度を正常なドナー内の第1及び第2の細胞集団についての天然のレセプター密度の範囲により観察する場合に観察される強度差より大きい。次に、このようなフィコビリプロテイン又はタンデム染料で標識された細胞は、顕微鏡下で観察することができ、ここで蛍光剤の存在は特定の決定基部位の存在の診断となるか、又はその細胞は、蛍光活性化細胞ソーター（FALS）において検出することができる。

10

直接及びアミノデキストラン架橋化抗体-蛍光染料コンジュゲートの組合せで得ることができる蛍光色の数を広げ、これによりこの方法により同定することができる白血球副集団の数を増加させるために、リガンド（a）及びリガンド（b）の更なる対を、好ましくはビリプロテインの最大蛍光発光が少くとも約15nm、好ましくは少くとも約25nmだけ、分離する場合に、更なるフィコビリプロテインを用いると同時に用いることができる。

直接コンジュゲートしたりガンド（a）及び架橋したコンジュゲート（b）に組み込んだ時にPEと同じレーザー線、488.0nm Ar⁺で励起することができるタンデム染料分子、例えばPC5又はECDの使用は、マーカーとしてフィコビリプロテインのみの使用からのマーカーの更に他の対を供し、それにより、3色の色当り2つの強度のマーカーを用いる方法を供する。

20

あるいは、ビリプロテイン以外の蛍光剤、例えばフルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ロダミン、ダンシル及びテキサスレッドは、その最大発光が少くとも約55nm、好ましくは約58nmだけ分離される場合に、本発明の方法において蛍光の更なる色を供するためにリガンドに直接、コンジュゲートされた単一密度の更なる色のマーカーとして用いることができる。

これにより、更なる色の単一密度のマーカーとしてのFITC（励起、468~505nm、発光504~541nm）標識化リガンド（例えばモノクローナル抗体）と一緒に、単一レーザー線と同時に励起することができる最大7つのマーカーを利用することができる。この7つのマーカーの組合せは、2又はそれ超のレーザー励起線、例えば488.0nm Ar⁺及び632.8nm He/Ne、並びに直接的抗体-APC（アロフィコシアニン、励起、650nm、発光、660nm）/アミノデキストラン架橋化抗体-APCコンジュゲート及びAPCのタンデム染料コンジュゲート、例えばAPC-Cy7 [M. Roedererら、*Cytometry*, 24: 191-197 (1996)] を含むマーカーからの蛍光発光の更なる色/強度の使用により更に広げることができる。また、他のタンパク質蛍光剤、例えば上述の緑色蛍光タンパク質及び青色蛍光タンパク質もこれらの材料に用いることができる [例えば、*Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6th Ed., R.P. Haugland, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, 1996]。

30

これにより、本発明の方法は、一回の測定での定量において細胞集団の複数のサブセットを検出するのに用いる場合、以下の通り要約することができる：

40

（A）要求される細胞集団の1~複数の対を供し、ここで、各々の対の第1の細胞集団は、各々の対の第2の集団上の第2の細胞表面レセプターの密度と実質的に等しいか又はそれより少い第1の細胞表面レセプター密度を有し、ここで前記第1のレセプターは各々の対の第1の細胞集団上でのみ見い出され、そして前記第2のレセプターは各々の対の第2の細胞集団上にのみ見い出され、ここで前記第1のレセプターは各々の第1の集団の中で異なり、前記第2のレセプターは各々の第2の集団の中で異なる。

（B）各々の第1の集団に、フィコビリプロテイン又はタンデム染料で直接、標識された第1のリガンドを供し、ここで該第1のリガンドは第1のレセプターに結合することができ、各々の第1の集団の中で異なり、そしてフィコビリプロテイン又はタンデム染料に各々の第1のリガンドの中で異なり、

50

(C) 各々の第2の集団に、アミノデキストリンー（フィコビリプロテイン又はタンデム染料）コンジュゲートで標識された第2のリガンドを供し、ここで該第2のリガンドは第2のレセプターに結合することができ、各々の第2のレセプターの中で異なり；ここで細胞集団の対の中で、コンジュゲートのフィコビリプロテイン又はタンデム染料は第1のリガンドのフィコビリプロテイン又はタンデム染料と同じであり、そしてリガンドの各々の対のフィコビリプロテイン又はタンデム染料は異なる色であり；

(D) 第1及び第2の標識化リガンドの各々の対と共に複数の細胞集団を含む生物サンプルを、レセプター標識化リガンド複合体がそれらの間に形成されるのに十分な時間、インキュベートし、

(E) 各々の複体内の各々のフィコビリプロテイン又はタンデム染料を、レーザー励起線で励起させて蛍光を引きおこし；そして

(F) フローサイトメトリーを用いて1回の測定で、各々の標識された第1のリガンドに結合した各々の第1の細胞集団の蛍光発光及び各々の標識された第2のリガンドに結合した各々の第2の集団の蛍光発光の強度を測定し；ここで細胞集団の各々の対の中で、第1の標識されたりガンドは、第2の標識されたりガンドのものと同じ色であるが定量的に区別できる強度の蛍光シグナルを供し、そして該細胞集団は標識強度及び色における検出可能なバリエーションにより区別される。

単色又は複数色のマーカー、例えばフィコビリプロテイン又はタンデム染料を伴う本発明の方法の使用の例を以下に供する。複数色／強度免疫蛍光のフローサイトメトリーへの導入は、いくつかの顕著な利点を有する。極めて少いサンプルしか利用できない。即ち細胞数が少い場合、多くのサンプルを要求しないことが特に重要である。少い色／強度になるほどコストはより大きなパネルより少くなり得る。その方法は、完全な血液サンプルの調製においてより少い溶解及び消光試薬を用いる。サンプル処理のためにより少い時間しか必要とされず；分注し、取り扱うためにより少い管しかなく、異型対照は必要とされない。

米国特許第5,538,855号に開示される先行技術の方法と対照的に、例えば、これらの方法に用いられる直接的抗体－染料コンジュゲートに優る架橋化抗体－染料コンジュゲートの増強された蛍光強度は、同じ色のマーカーのための固有のレセプター密度がオーバーラップしない蛍光マーカー強度を生ずる細胞サブセットに、細胞サブセットの分析を制限しない。むしろ、類似した固有のレセプター密度を有する細胞の2つの異なる相互に排他的な集団（の複数の対）は、本発明に従って、蛍光マーカーと同じ色であるが異なる強度と同時に分析することができる。同じ色の複数強度マーカーの蛍光強度の重複を避けるために、その強度差は正常な血液ドナー中の2つの標的化血液細胞についての天然のレセプター密度の範囲により観察されるものより大きくなければならない。

以下の例は本発明の種々の態様を詳述する。これらの例は本発明の範囲を限定せず、それは、添付の請求の範囲において具体化される。

実施例1：精製された抗体の調製

A. BB27モノクローナル抗体

5th International Workshop on White Cell Differentiation antigens (Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens, eds. Schlossman, S.F., Boumsell, L.,

Gilks, W., Harlan, J.M., Silverstein, R., Tedder, T.F., and Todd, R.F., (1995), Oxford University Press, Oxford, UK) においてCD101として集められたBB27モノクローナル抗体を、Balb/cマウスのCD4+CD8+胸腺クローンB12での免疫化によって得た。免疫化したマウスからの脾臓を最後の注入後5日に、NS1細胞系と融合させた。間接的免疫蛍光及びフローサイトメトリーによる最初のスクリーニングは、弱い免疫化細胞と反応する全てのハイブリドーマ培養上清を保持し、PBMLを残した。選択された抗体を含む培養物を、希釈を限定することにより、2倍にクローン化した〔Gouttefangeasら、Int. Immunol. 6 (3) : 423 (1994) を参照のこと〕。そのクローン化したハイブリドーマを、腹水生産のためにプリスタンを与えたBalb/cマウスにi.p.注入した。硫酸アンモニウム（45%）沈殿、遠心及びプロテインA-Sepharoseを用いてのアフィニティークロマトグラフィ

10

20

30

40

50

ーにより腹水から抗体を精製した。

単球、休止中又は活性化された顆粒球、及び特定の胃の細胞系上でBB27抗原を発現させた。それは、末梢血液T細胞(29%)及び特定のT細胞系でも発現させた。BB27により規定されるTーリンパ球サブセットは、CD4+細胞の約3分の1及びCD8+細胞の2分の1を含むことが更に見い出された。更に、BB27はCD45RA‘非経験’及びCD45RO‘記憶’T細胞サブセットの両方で発現させた。

B. IL-12R β .44モノクローナル抗体

IL-12R β .44モノクローナル抗体はIL-12R β .44に特異的であり、ヒトIL12レセプター β 鎖を認識する。ヒトIL12レセプター β 鎖(IL-12R β)を移入したマウス細胞系300-19でBALB/cマウスを免疫化することによりそれを得て、次にNS1ミエローマ細胞との脾臓細胞の融合を行った。ハイブリドーマ上清を、陽性細胞系として免疫化移入体及び陰性対照として非移入の親系300-19を用いて間接的免疫蛍光及びフローサイトメトリーによりスクリーニングした〔Gollobら、J. Immunol. 157: 1886 (1996)を参照のこと〕。IL-12R β .44ハイブリドーマをi.p.注入したマウスにおいて腹水を作った。硫酸アンモニウム沈殿(45%)、遠心及びプロテインA-Sepharoseを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより腹水から抗体を精製した。抗体はIgG1である。

活性化し、休止中でないT細胞及びNK細胞で、並びにT細胞クローンでIL12R β 鎖を発現させる〔Desaiら、J. Immunol. 148: 3125 (1992)を参照のこと〕。

C. BY55モノクローナル抗体

BY55モノクローナル抗体を、ヒトNK細胞系YT2C2でBALB/cマウスを免疫化することにより得て、次にNS1ミエローマ細胞と融合させた〔Maizaら、J. Exp. Med. 178: 1121 (1993)〕。ハイブリドーマ上清を免疫化細胞で陽性スクリーニングし、T細胞クローンJF1及びEBV形質転換B細胞系で陰性スクリーニングした。選択された抗体を含む培養物を希釈を限定することにより2回、クローン化した。そのクローン化されたハイブリドーマを、腹水生産のためにプリスタンを与えたBalb/cマウスにi.p.注入した。硫酸アンモニウム沈殿(40%, 2回)及びSephacry, S300カラムでのサイズ排除クロマトグラフィーにより腹水から抗体を精製した。BY55抗体はIgM抗体である。

BY55抗原は、ナチュラルキラー(NK)細胞、 γ/δ T細胞及び α/β T細胞の副集団上で発現される〔Maizaら、J. Exp. Med. 178: 1121 (1993)を参照のこと〕。それらは、各々NK細胞及びNK細胞又は細胞障害性リンパ球として機能的に定義される臍帯血及び骨髓細胞内でも見い出される〔BensussanらProc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 9136, 1994〕。BY55抗体は、the 5th International Workshop on White Cell Differentiation Antigens, [Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens, eds. Schlossman, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J.M., Silverstein, R., Tedder, T.F., and Todd, R.F., (1995), Oxford University Press, Oxford, UK]において評価されている。

実施例2: 抗体-PEコンジュゲートの調製

IgG又はIgMモノクローナル抗体のPEへのコンジュゲーションを、次の通り、PEの2-イミノチオラン(IT)活性化及び抗体のスルホスクシニミジル4-〔N-マレイミドメチル〕シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホSMCC)活性化により行った。

A. スルホSMCCでのモノクローナル抗体の活性化

36mg/mLの濃度の20mgのモノクローナル抗体のために、0.555mLのモノクローナル抗体濃縮物が要求された。蒸留水中のスルホSMCCの20mg/mL溶液を調製し、スルホ- SMCC: モノクローナル抗体=15:1の活性化比で用いた。これにより、全量1,000mLを作るために、0.100mLの1Mリン酸緩衝液、1M塩化ナトリウム、pH7.4を0.304mLの1×PBS緩衝液と混合し、それに、室温で攪拌しながら0.555mLのモノクローナル抗体溶液を加え、次に0.041mLのスルホSMCC溶液をゆっくりと加えた。15mLチューブ内のその反応混合物を室温で60分、ローラーで混合し、次に、1×Bis-Tris緩衝液(0.1M Bis-Tris, 0.1M塩化ナトリウム、pH5.55、氷酢酸でpHを調節)で平衡化した30mL G-50 Sephadexカラムの頂上に直ちに適用した。その活性化されたモノクローナル抗体を1×Bis-Tris緩衝液でカラムから溶出し

10

20

30

40

50

、280nmで第1の吸収ピークの画分を収集した。mg/mLでのスルホSMCC-モノクローナル抗体濃度を A_{280} 値により決定した。その活性化されたモノクローナル抗体溶液をBiS-Tris緩衝液で希釈し又は濃縮した。

B. 2-イミノチオランでのPEの活性化

Prozyme, Inc. (San Leandro, CA) からの50mMリン酸ナトリウムpH7.0中60%硫酸アンモニウム懸濁液として得られたPE, R-フィコエリトリン (紅藻) を、50mMリン酸、2mM EDTA, pH7.0緩衝液で平衡化したG-50 Sephadexカラムに適用し、後者の緩衝液で溶出し、そして次に、濃縮した。50mMリン酸、2mM EDTA, pH7.0緩衝液中74.38mg/mLの濃度のPE 34mgのために、0.457mLのPE濃縮液が必要であった。2-イミノチオランヒドロクロライド

(IT) の6mg/mL溶液を調製し、IT: PE=15.7: 1の活性化比で用いた。これにより、全量0.850mLを作るために、0.085mLの1Mリン酸緩衝液を0.257mLの1×PEカラム緩衝液 (0.1Mリン酸、0.1M塩化ナトリウム、0.1%ナトリウムアジド、0.1mM EDTA) と混合し、それに室温で攪拌しながらPE溶液0.457mLを加え、次に0.051mLのIT溶液をゆっくり加えた。15mL管中の反応混合物を60分、ローラーで混合し、次にBiS-Tris緩衝液で平衡化した25mL G-50 Sephadexカラムに直ちに充填した。その活性化PEを1×BiS-Tris緩衝液でカラムから溶出し、そのカラムから落ちた第1のピークを収集した。活性化PEのmg/mLでの濃度を $A_{565}/8.167$ として決定した。その活性化PEを1×BiS-Tris緩衝液で3mg/mLに希釈し又は濃縮した。

C. イミノチオラン-PEとのスルホ- SMCC-モノクローナル抗体のコンジュゲーション

コンジュゲーションのために、等量 (9.0mL) の2mg/mLの活性化モノクローナル抗体及び3mg/mLのPEを、活性化モノクローナル抗体を攪拌中の活性化PEに加え、そして次に、0.360mLの1Mリン酸緩衝液を加えることにより混合した。その反応混合物を、1時間、室温でローラーで混合した。混合時間の終わりに、DW中の25mg/mLのL-システイン0.918mLを更にその反応混合物に加え、それを更に15分、ローラーで混合した。

D. モノクローナル抗体-PEコンジュゲートの精製

1×PEカラム緩衝液で平衡化したBio-Gel A 1.5mカラム (モノクローナル抗体の1mg当たり10mL又は200mL) を調製した。そのサンプルをBio-Gel A 1.5mカラムに充填し、1×PEカラム緩衝液で溶出した。 A_{280}/A_{565} 比を各々の画分について計算した。遊離PE溶離液剤2画分までの0.43からの比率の全ての画分をプールした。例えば、そのプールしたBB27-PE画分をAmicon YM30膜を用いることによりカラム容量の1%未満の1.73mLの容量に濃縮し、その濃縮物を、1×PBS, 0.1%ナトリウムアジド、0.1mM EDTA緩衝液でフィルターに通し、そのBB27-PEコンジュゲートを4°Cで15分、1800×gで遠心した。このプールしたサンプルの50倍希釈物は $A_{565}=0.6820$ 又は $(/8.167 \times 50) = 4.18\text{mg/mL}$ のPE及びBB27-PEコンジュゲート中の7.22mgの全PE、及び $A_{280}=0.1883$ 又は $[0.6820 : 5.60 (\text{PE's } A_{565}/A_{280})] \times 50 = 3.33\text{mg/mL}$ BB27及びBB27-PEコンジュゲート中の5.75mgの全BB27を供した。PE/BB27のモル比は、それゆえ、 $(7.22\text{mg PE}/240,000) / (5.75\text{mg BB27}/160,000) = 0.837$ である。式 $[A_{280}/A_{565} (\text{コンジュゲート}) - A_{280}/A_{565} (\text{染料}) \times 8.77]$ に基づく補正したF/P比は0.855である。

各々0.614及び0.577のF/P比及び0.967及び0.862の補正したF/P比を有するIL-12R-PE及びBY55-PEコンジュゲートを調製するために同様の方法を用いた。

実施例3: 抗体-アミノデキストラン-PEコンジュゲートの調製

アミノデキストラン、1×-Amdex又は5X-Amdexのいずれかで抗-CD3抗体のコンジュゲートを調製するための手順は1996年6月18日に発行された米国特許第5,527,713号に用いたものと同様であった。しかしながら、本研究において、2つの異なるタンパク質、一方はモノクローナル抗体及び他方は蛍光タンパク質とアミノデキストランに同時にコンジュゲートさせた。全てのタンパク質、BB27及びPE: 3: 1及び約1: 1の5X-Amdex重量比、並びに抗体: 1: 2の5X-Amdex重量比での試験を行った。

A. スルホ- SMCCでのアミノデキストランの活性化

0.033mLの20×PBS緩衝液を加えて1×PBS溶液を作った蒸留水中の5×Amdexの10mg/mL溶液0.667mLを1×PBS中10mg/mLスルホ- SMCC溶液0.120mLで活性化した。その混合物を室温で

10

20

30

40

50

約1時間、ローラーで混合した。その混合を終えた後、その反応混合物を直ちに、1×PBSで平衡化した25mL G-50 Sephadexカラムの頂上に適用した。そのサンプルを、1×PBSを用いて溶出し約2mL画分に収集した。280nmの第1の吸収バンドの画分は、焦点可視光ビーム (Model 650, Cambridge Tastruments, Inc. Buffalo, NY) でのTyndall散乱により確認して高分子量の活性化5X-Amdexを含んでいた。これらの画分をプールして約3.5mLの全スルホ-SMCC-活性化5X-Amdex, 1.75mLを供し、それを2つの試験の各々に用いた。

B. 抗体の活性化

先の通り調製したBB27モノクローナル抗体を、1×PBS中の2mg/mLのイミノチオランの溶液0.065mL及び0.324mLの1×PBSを0.278mLのBB27濃縮物 (36.00mg/mL) に加えることにより活性化した。15mg/mLの抗体濃度及び15のイミノチオランモル活性化比を有する生じた溶液を約1時間、環境温度で混合した。次にその反応混合物を、1×PBSで平衡化した20mL G-50 Sephadexカラムでクロマトグラフィーを行い、そのサンプルを1×PBSで溶出した。その第1のバンドピーク画分は、全部で8.797mgのIT-BB27抗体誘導体を含む3.519mg/mL抗体溶液約2.5mLを供した。

10

C. PEの活性化

ProzymeからのPE. R-フィコエリトリン (紅藻) を、50mMリン酸、2mM EDTA, pH7.0で平衡化したG-50 Sephadexカラムでの溶出による緩衝液交換により60%硫酸アンモニウムを除去し、濃縮し、そして次に、1×PBS中のイミノチオランの2mg/mL溶液及び0.089mLの1×PEを0.189mLのPE濃縮物 (79.27mg/mL) に加えることにより活性化した。40mg/mLのPE濃度及び22.5のイミノチオランモル活性化比を有する生じた溶液を室温で約1時間、混合した。次にその反応混合物を1×PBSで平衡化した20mL G-50 Sephadexカラムの頂上に適用し、サンプルを1×PBSで溶出した。第1のバンドピーク画分は、5.033gの A_{565}/A_{280} 比の約3.8mLの2.523mg/mL PEを供し、それは全部で9.587mgのIT-PEを含んでいた。

20

D. IT-BB27及びIT-PEのスルホ-SMCC-5X-Amdexへのコンジュゲーション

(1) 試験1-全量10mgのタンパク質: 3.333mg 5X-Amdex

0.406mLの3.519mg/mL IT-BB27溶液 (約1.429mg抗体) を、最初に、3.397mLの2.523mg/mL IT-PE溶液 (8.571mg PE) と混合し、それに、1.750mLのスルホ-SMCC-5X-Amdex溶液 (約3.333mg 5X-Amdex) を加え、その全体の混合物を16~24時間、ローラーで混合した。

(2) 試験2-全量3mgのタンパク質: 3.333mg 5X-Amdex

30

同様の方法で、0.430mLの3.519mg/mL IT-BB27溶液 (約1.5138mg抗体) を最初に、0.600mLのIT-PE溶液 (約1.5138mg PE) と混合し、それに1.750mLのスルホ-SMCC-5X-Amdex溶液 (約3.333mg 5X-Amdex) を加え、その全混合物を16~24時間、一晚ローラーで混合した。

混合を終えた後、各々の混合物の全量を測定し、この容量の0.120倍の1×PBS中5mg/mL L-システインを各々のコンジュゲーション混合物に加えた。次にL-システイン含有混合物を更に15分、混合し、いずれの未反応のスルホ-SMCC成分もブロッキングした。最後に、全混合物容量の0.120倍の1×PBS中20mg/mLのイオドアセトアミド及び全混合物容量の0.020倍の1Mホウ酸緩衝液pH9.8を各々の混合物に加えた。生じた混合物を約30分、混合していずれの未反応のスルフヒドリル基もブロックした。

40

E. BB27-5X-Amdex-PEコンジュゲートの精製

試験1のコンジュゲーション混合物の全量を、冷却Beckman J-6B遠心機を用いて2000rpmで約20分、そのサンプルを含むAmicon Centri-Prep 30管を遠心することにより約1.5mLに減らした。試験2のコンジュゲーション混合物を、約2.9mLで濃縮なしで用いた。そのサンプルを、1×PBSで平衡化したBio-Gel A-5mアガロースカラム (2.5cm×48cm) の頂上に入れ、溶離液として1×PBSを用いてクロマトグラフィーを行った。約4mL容量の溶出液画分を、ドロップ収集モードで作動するPharmacia LKB FRAC-100コレクターを用いて収集した。その画分を、280nmで動作するLKB 2138 Uvicord Sモニターを用いてモニターした。試験1において、カラムから溶出した最初のせまく強いバンドはBB27-アミノデキストラン-PEコンジュゲートを含んでいた。試験1の最初のピークの強度の3分の1未満の

50

低い強度の肩部分は過剰なPEを含んでいた。中～低強度の十分に分離した第3のバンドは低分子量の過剰なブロッキング試薬であった。試験2は、せまく強い第1のバンドを示さず、過剰なPEを含む第2のバンド上に最初の広い肩部分のみを示した。

BB27-5X-Amdex-PEコンジュゲートについて収集した画分を、1cm経路長セルを用いて565及び280nmで分光学的に分析した。コンジュゲート中のmg/mLでのPEの濃度を、式： $A_{565}/8.167$ を用いることにより565nmでの吸光度から得た。コンジュゲート中の活性をBB27抗体の濃度を、IgG1抗体についてのELISAアッセイにより決定した。試験1における第1のせまいピーク下の画分21～25についてのデータを表2に列記する。試験2において、ほとんどのPEを含む7つの画分をプールし、濃縮して表2に示すデータを供した。

表 2

画分	A_{565}	A_{280}	A_{565} / A_{280}	PE, mg/mL	BB27, $\mu g/mL$
21	1.096	0.276	3.96	0.134	1.32
22	2.437	0.581	4.19	0.298	3.75
23	2.081	0.472	4.41	0.255	3.64
24	1.315	0.282	4.66	0.161	1.90
25	0.907	0.188	4.82	0.111	1.70
試験 2	1.745	0.492	3.55	0.214	43.8

実施例4：BB27-1X-Amdex-PEコンジュゲートの調製

活性化、コンジュゲーション、ブロッキング、及びクロマトグラフィー手順は試験1のBB27-5X-Amdex-PEコンジュゲートについて上述されるのと同じであった。コンジュゲーションの間のIT-PE (8.571mg)、IT-BB27 (1.429mg)、及びスルホ-SMCC-1X-Amdex (3.333mg)の濃度は各々0.973、0.162及び0.386mg/mLであった。この時、最初のせまいピークの6つの画分を、1cm経路長セルを用いて565及び280nmで分析した。IT-PE (A_{565} / A_{280}) 比は5.356であった。6つの画分についての吸光度及び濃度データを表3に示す。

表 3

画分	A_{565}	A_{280}	A_{565} / A_{280}	PE, mg/mL
19	0.329	0.080	4.14	0.040
20	1.072	0.241	4.45	0.131
21	1.423	0.313	4.55	0.174
22	1.258	0.267	4.70	0.154
23	1.023	0.209	4.89	0.125
24	0.863	0.172	5.01	0.106

実施例5：PEコンジュゲート精製及び保存のために1×PBSのかわりにカラム緩衝液を用いるBB27-5X-Amdex-PEコンジュゲートの調製

その手順は、試験1のBB27-5X-Amdex-PEコンジュゲートについて上述されるものと同じであるが、最後のコンジュゲートの精製は、1×PBS、0.1mM EDTA、1mMイオドアセトア

ミド、pH7.2からなるカラム緩衝液で平衡化したBio-Gel A-5mアガロースカラムで行い、溶離液として同じカラムでクロマトグラフィーを行った。試験3において、試験1と同じ量でIT-PE (8.571mg), IT-BB27 (1.429mg) を、スルホ-SMCC-5X-Amdex (3.333mg) と、コンジュゲーションの間、各々2.23, 0.373及び0.869mg/mLの濃度で混合した。試験4において、試験1と同量のIT-PE, IT-BB27であるが、2倍量のスルホ-SMCC-5X-Amdex (6.666mg) をコンジュゲーションの間、各々1.65, 0.275及び1.28mg/mLの濃度で用いた。IT-PE (A_{565}/A_{280}) 比は5.790であった。試験3及び4における第1のせまいピーク下で収集した画分についてのデータを表4に列記する。

表 4

画分	A_{565}	A_{280}	A_{565}/A_{280}	PE, mg/mL	BB27, $\mu\text{g/mL}$
試験3					
19	0.728	0.377	1.93	0.089	1.47
20	1.382	0.511	2.70	0.169	3.83
21	1.006	0.421	2.39	0.123	3.15
22	0.684	0.350	1.95	0.084	1.86
試験4					
20	1.043	0.441	2.37	0.128	2.11
21	0.986	0.425	2.32	0.121	2.76
22	0.765	0.374	2.04	0.094	1.50

実施例6: ELISAによるIgG1及びIgM抗体についての分析

Enzyme-Immunoassay (E.T. Maggio, CRC Press, Boca Raton, FL, 1985, pp 181-196) に記載される方法に従って、マイクロタイタープレート (Corning改良型平底ELISAプレート) を100 μL のアフィニティー精製したヤギ抗マウスIgG1又はIgM (Southern Biotechnology Associates, Inc.) でコートし、0.2M炭酸緩衝液pH9.6中0.6 $\mu\text{g/mL}$ に、4°Cで一晩、希釈した。0.05% Tween 20を含む1×PBS, pH7.2で洗った後、そのプレートを1% BSAを含むPBSで飽和させ、室温で90分、インキュベートした。抗体-5X-Amdex-PEコンジュゲートサンプルの希釈物を1% BSA/PBS中に作り、各々100 μL をそのプレートに加え、次にそれを室温で1時間、インキュベートした。各々7.8及び250ng/mLから15.6及び500ng/mLの間のIgG1及びIgM抗体標準の希釈物を較正曲線のために用いた。そのプレートを洗った後、PBSで希釈した100 μL のセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 接合ヤギ抗マウスIg (Cappel) を加え、室温で1時間、インキュベートした。そのプレートを洗い、反応物を、0.2Mクエン酸ナトリウム緩衝液pH4.0中0.2mg/mLのABTS, 2, 2'-アジノービス (3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸 (Sigma) 200 μL 、及び0.02%過酸化水素を加えることにより明らかにした。室温での1時間のインキュベーションの後、そのプレートを、参照波長として490nmを用いて405nmでV MAXマイクロプレートリーダーで読んだ。吸光度対濃度の片対数プロットを用いてIgG1及びIgM抗体標準線形回帰曲線を調製した。サンプル中の抗体濃度を、その標準曲線の直線域における吸光度値を用いることにより計算した。

実施例7: 抗体、アミノデキストラン-PEコンジュゲートの分子量の評価

ゲルろ過標準 (Bio-Rad) 又は分子量マーカー (Sigma) 及びブルーデキストラン (T-2 M) の混合物を、抗体-アミノデキストラン-PEコンジュゲートを精製するのに用いたのと同じA-5mカラムに適用し、そのカラムから1×PBSで溶出し、 A_{280} によりモニターし

10

20

30

40

50

、120滴／画分又は約4mL／画分の同じ液滴カウントで収集した。得られた曲線は、標準の分子量の対数を溶出容量（ V_e ）のカラム中空容量（ V_o ）に対する各々の比に対してプロットし、補間法により、抗体－アミノデキストラン－PEコンジュゲートを評価するのに用いた。中空容量を、溶出プロファイルにおける抗体凝集物の位置から決定した。結果を、画分20～25で収集した標準及びコンジュゲートについて表5に示す。PE（MW 240,000ダルトン）が350,000ダルトンのMWでコンジュゲート及び5X－Amdex中唯一のタンパク質であると仮定してPE／アミノデキストランモル比での上限も一緒に示す。更に、主要バンドの肩部分として収集し、565nmにおいて特定のPE吸光度を示す35～40の間の画分を過剰なPE又はそれから1：1のPE：アミノデキストランコンジュゲートに割り当てた分子量480,000～195,000ダルトンの種を含むように分子量対 V_e/V_o の5'対数プロットから評価する。

10

表 5

	V_e/V_o	MW, ダルトン	
ブルーデキストラン	1.04	～2,000,000	
チログロブリン	1.69	670,000	
IgG	2.15	158,000	
オブアルブミン	2.41	44,000	20
ミオグロビン	2.61	17,000	
ビタミンB-12	3.00	1,350	
画 分			PE／アミノデキストラン
20	1.026	2,000,000	6.9
21	1.077	1,850,000	6.3
22	1.128	1,750,000	5.8
23	1.179	1,650,000	5.4
24	1.231	1,500,000	4.8
25	1.282	1,400,000	4.4
30	1.54	920,000	
35	1.79	480,000	
40	2.05	195,000	40

実施例8：抗IL-12R β .44-5X－アミノデキストラン－PEコンジュゲートの調製

手順は、実施例3の試験3のBB27-5X－Amdex-PEコンジュゲートの調製について概説されるのと同じであった。但し、抗IL-12R抗体、及びIgG1クラスのものもITで活性化し、BB27抗体のかわりにコンジュゲーションに用いた。試験4において、IT-PE（8.571mg）、IT-IL-12R β .44（1.429mg）を、スルホ-SMCC-5X－Amdex（3.333mg）と、コンジュゲーションの間、各々1.67、0.279及び0.651mg/mlの濃度で混合した。試験5において、試験4と同じ反応物を用いた。但し、スルホ-SMCCでの5X－Amdexの2倍の活性化、即ち、3.333mgの5X－Amdexのために1×PBS中10mg/mlのスルホ-SMCC溶液0.120mLで行った。試験6でのコンジュゲーションの間の反応物の濃度は各々1.07、0.178及び0.415mg/mLであっ

50

た。IT-PE (A_{565}/A_{280}) 比は5.866であった。試験5及び6での第1のせまいピーク下で収集された画分についてのデータを表6に列記する。

表 6

画分	<u>A₅₆₅</u>	<u>A₂₈₀</u>	<u>A₅₆₅ / A₂₈₀</u>	<u>PE, mg/mL</u>	<u>IL-12R β, 44,</u> <u>μ g/mL</u>	
試験 5						
20	1.015	0.428	2.37	0.124	1.55	10
21	2.178	0.677	3.22	0.267	4.55	
22	1.630	0.549	2.97	0.200	4.15	
23	0.992	0.410	2.42	0.121	1.98	
24	0.721	0.351	2.06	0.088	1.79	
試験 6						
21	0.803	0.355	2.26	0.098	1.90	20
22	0.813	0.356	2.29	0.100	2.25	
23	0.687	0.323	2.13	0.084	1.54	

実施例9：抗BY55抗体-5X-アミノデキストラン-PEコンジュゲート

手順は実施例3の試験3においてBB27-5X-Amdex-PEコンジュゲートについて概説されるのと同じであった。但し、IgMクラスのBY55抗体をITで活性化し、BB27抗体のかわりにコンジュゲーションにおいて用いた。試験7において、同じ量の反応物、IT-PE (8.571mg)、IT-BY55 (1.429mg) を、スルホ-SMCC-5X-Amdex (3.333mg) と、コンジュゲーションの間に、各々2.14, 0.357及び0.833mg/mLの濃度で混合した。試験8において、反応物IT-PE (8.571mg), IT-BY55 (2.858mg) を、スルホ-SMCC-5X-Amdex (3.333mg) と、各々1.91, 0.637、及び0.743mg/mLの濃度で、コンジュゲーションの間に、混合するように、通常量の2倍の抗体を用いた。IT-PE (A_{565}/A_{280}) 比は5,800であった。試験7及び8における最初のせまいピーク下で収集した画分についてのデータを表7に列記する。

表 7

画分	A_{565}	A_{280}	A_{565} / A_{280}	PE, mg/mL	BY55, $\mu\text{g/mL}$
試験 7					
20	1.338	0.549	2.44	0.164	3.43
21	2.506	0.817	3.07	0.307	7.50
22	1.596	0.541	2.95	0.195	4.78
23	0.874	0.363	2.41	0.107	3.10
試験 8					
19	1.352	0.753	1.79	0.165	11.6
20	3.096	1.246	2.49	0.379	31.7
21	2.111	0.880	2.40	0.258	17.8
22	1.024	0.556	1.84	0.125	6.40

10

20

実施例10：BB27-PE及びBB27-アミノデキストラン-PEコンジュゲートでの完全な血液のフローサイトメトリー分析

BB27-PE及びBB27-アミノデキストラン-PEコンジュゲートの画分を、(10 μ l 容量の) 管当り2 μ g又は1 μ gのいずれかで始めて滴定した。希釈物を100 μ lの完全な血液に加えて、室温で1時間、インキュベートした。血液をCOULTER^{▲ R ▼} Q-Prep (Coulter Corporation, Miami, FL) 上で溶解し、PBSで1回、洗ってフローサイトメーター (COULTER XL) に流した。リンパ球集団を通した時、典型的なヒストグラムはそれらの細胞上の低いBB27レセプター密度 (4細胞当り1000未満) により、標識化T細胞のための識別線に近い低いPE平均チャンネル蛍光強度を示す。

30

抗体分子当り0.85PE分子を含む直接的BB27-PEコンジュゲートと比較した、デキストラン分子当り2超のPE分子を含むマーカーとしてのBB27-5X-Amdex-PEコンジュゲートの利用性を図1A及びBにヒストグラムで示す。図1A及び1Bは、BB27抗体での散乱したゲートを通ったリンパ球の染色を示す。正常なドナーからの完全な血液100 μ lは、(A) BB27-PE又は(B) BB27-5X-Amdex-PEとして0.25 μ gのBB27を含む10 μ lが染色された。図1A及び1Bは、架橋されたコンジュゲートがBB27+リンパ球上で10倍高い蛍光強度を有することを示す。ここで、標識されたT細胞の平均チャンネル蛍光強度は、試験1の種々の画分、蛍光マーカーとしてのBB27-5X-Amdex-PEコンジュゲートを用いることにより、8倍まで増強させることができた。BB27-5X-Amdex-PEマーカーを用いる前の精製された非標識化BB27抗体 (750 μ g/ml) での、完全な血液中の標的としたリンパ球上のBB27レセプター部位をブロックする効果を図2A及び2Bの細胞数対PE蛍光強度ヒストグラムで示す。図2A及び2Bは、BB27抗体での散乱したリンパ球の染色を示す。正常なドナーからの完全な血液100 μ Lを、過剰な (750 μ g/ml) 非標識化BB27でブロッキングした後、BB27-5X-Amdex-PE又は (図2B) BB27-5X-Amdex-PEの形態で0.25 μ gのBB27抗体を含む (図2A) 10 μ Lで染色した。図2A及び2Bは、コンジュゲートが、BB27抗原に特異的であることを示す。対照、BB27-PE、及びサンプル、BB27-5X-Amdex-PEの完全な血液での滴定を2つの血液ドナーで行った。同じ装置設定で得られた対照に対する平均チャンネルPE蛍光強度及びサンプル強度を表8及び9に列記する。

40

表 8

<u>ドナー 1</u>	<u>平均チャンネルPE蛍光強度</u>				
<u>BB27, μg</u>	<u>対照</u>	<u>画分 22</u>	<u>画分 23</u>	<u>画分 24</u>	<u>画分 25</u>
2	14.2	73.6	53.0	54.5	39.3
1	12.8	71.6	53.1	48.5	39.6
0.5	11.7	77.2	60.8	42.2	41.1
0.25	10.4	78.6	56.8	48.1	43.4
0.125	10.2	74.7	65.4	45.5	50.2
0.0625	8.46	57.1	-	50.2	57.3
0.031	9.06	43.6	50.4	50.4	57.0
<u>MFI 比, 画分 / 対照</u>					
2	1.0	5.2	3.7	3.8	2.8
1	1.0	5.6	4.1	3.8	3.1
0.5	1.0	6.6	5.2	3.6	3.5
0.25	1.0	7.6	5.5	4.6	4.2
0.125	1.0	7.3	6.4	4.5	4.9
0.0625	1.0	6.7	-	5.9	6.8
0.031	1.0	4.8	5.6	5.6	6.3

10

20

30

表 9

ドナー 2	平均チャンネルPE蛍光強度					
BB27, μ g	対照	画分 22	画分 23	画分 24	画分 25	
2	12.6	68.3	57.2	51.4	42.1	
1	12.1	53.5	46.4	51.4	36.1	
0.5	10.9	44.0	42.1	44.6	29.1	10
0.25	8.25	40.1	38.2	36.4	27.2	
0.125	7.47	43.5	31.6	30.0	25.5	
0.0625	7.96	37.8	28.4	27.7	19.5	
0.031	6.90	28.5	31.4	23.6	20.6	
	MFI 比, 画分／対照					
2	1.0	5.4	4.5	4.1	3.3	20
1	1.0	4.4	3.8	4.2	3.0	
0.5	1.0	4.0	3.9	4.1	2.7	
0.25	1.0	4.9	4.6	4.4	3.3	
0.125	1.0	5.8	4.2	4.0	3.4	
0.0625	1.0	4.7	3.6	3.5	2.4	
0.031	1.0	4.1	4.6	3.4	3.0	30

表8及び9に示す通り、抗体－アミノデキストラン－フィコエリトリンコンジュゲートは、2～8倍、標識化T細胞の蛍光強度を増強した。

第1のドナーからのデータは、PE強度を絶対強度スケールにおくため、COULTER Flow-Cal 575ビーズ、即ちPE標準ビーズを用いることにより、蛍光等量単位（FEU）を評価するのに用いた。4つのサンプル画分についてのレセプター部位の飽和を示す蛍光強度定常領域における0.25 μ g BB27タイター及び対照についての最大蛍光強度を示す2 μ g BB27タイターを用いた。データは表10に集め、それを標準化FEU及びデキストランの分子当りのPE分子を示し、それは、直接的BB27－PEコンジュゲート中の抗体当りのPEを示し、PE蛍光が、BB27抗体及びPEがデキストランにより架橋されているコンジュゲート中のPE分子間のいずれの相互作用によっても消光されないことを想定する。

表 10

サンプル	FEU 単位	FEU , 標準化	PE/デキストラン又は抗体
画分22	117,093	5.641	4.8
画分23	90,500	4.360	3.7
画分24	71,526	3.446	2.9
画分25	64,355	3.100	2.7
対照	20,756	1.000	0.855

10

標準化したFEUカラム中の増強は低い結合を意味し、デキストランで架橋されたBB27-P Eコンジュゲートは直接的BB27-PEコンジュゲートの様に単一レセプターを占有することを仮定することに注意のこと。表10における画分22～25についてのPE/デキストラン比の間の差及び表5における同じ画分についての上限の結合比は、見積もられた1又は2のBB27抗体/デキストラン比を供する。1又は2のBB27/デキストラン飽和におけるPE/デキストラン比、及び表2からのPE濃度に基づいて、計算したBB27抗体濃度はELISAにより測定したBB27濃度より10倍まで高く、それは表2に示した。

同様のフローサイトメトリーデータを対照、BB27-PE、及びBB27-1X-Amdex-PEの6画分について得て、それを表11及び12に要約する。

20

表 11

ドナー 1	平均チャンネルPE蛍光強度						
BB27, μ g	対照	画分19	画分20	画分21	画分22	画分23	画分24
1	12.7	25.1	28.5	29.4	27.2	22.7	21.8
0.5	11.2	29.7	24.8	24.8	20.5	26.2	20.6
0.25	10.2	23.7	11.0	13.9	19.1	21.2	16.4
0.125	7.7	21.4	6.3	-	17.3	-	13.7
0.0625	6.6	15.9	4.9	11.6	12.9	20.2	11.6
0.031	6.2	11.4	5.3	8.9	10.3	13.4	11.4
MFI 比, 画分/対照							
1	1.0	2.0	2.2	2.3	2.1	1.8	1.7
0.5	1.0	2.6	2.2	2.2	1.8	2.3	1.8
0.25	1.0	2.3	1.1	1.4	1.9	2.1	1.6
0.125	1.0	2.8	0.8	-	2.2	-	1.8
0.0625	1.0	2.4	0.7	1.8	2.0	3.1	1.8
0.031	1.0	1.8	0.9	1.4	1.7	2.2	1.8

30

40

表 12

<u>ドナー 2</u>	<u>平均チャンネルPE蛍光強度</u>						
<u>BB27, μ g</u>	<u>対照</u>	<u>画分19</u>	<u>画分20</u>	<u>画分21</u>	<u>画分22</u>	<u>画分23</u>	<u>画分24</u>
1	10.6	24.5	27.8	25.9	21.3	18.7	19.8
0.5	8.1	21.6	21.2	18.9	17.6	20.3	18.8
0.25	9.1	19.4	19.7	17.2	18.1	19.4	14.9
0.125	7.9	19.8	16.6	14.5	13.4	15.8	14.8
0.0625	6.8	12.3	11.8	13.7	12.1	12.4	12.6
0.031	5.7	9.6	9.4	11.0	10.8	13.5	9.8
	<u>MFI 比, 画分/対照</u>						
1	1.0	2.3	2.6	2.4	2.0	1.8	1.9
0.5	1.0	2.7	2.6	2.3	2.2	2.5	2.3
0.25	1.0	2.1	2.2	1.9	2.0	2.1	1.6
0.125	1.0	2.5	2.1	1.8	1.7	2.0	1.9
0.0625	1.0	1.8	1.7	2.0	1.8	1.8	1.9
0.031	1.0	1.7	1.6	1.9	1.9	2.4	1.7

6つのサンプル中の0.5 μ g のBB27タイター及び対照についての1 μ g タイターを、COULTER Flow-Cal 575ビーズを用いてFEUを評価するのに用いた。データを表13に示す。

表 13

<u>サンプル</u>	<u>FEU 単位</u>		<u>FEU, 標準化</u>		<u>PE/デキストラン又は抗体</u>		
	<u>ドナー 1</u>	<u>ドナー 2</u>	<u>ドナー 1</u>	<u>ドナー 2</u>	<u>ドナー 1</u>	<u>ドナー 2</u>	
対照	19,726	17,342	1.0	1.0	0.85	0.85	40
画分19	43,930	31,856	2.2	1.8	1.9	1.5	
画分20	36,626	31,259	1.9	1.8	1.6	1.5	
画分21	31,558	25,297	1.6	1.5	1.4	1.3	
画分22	30,216	25,893	1.5	1.5	1.3	1.3	
画分23	38,713	29,918	2.0	1.7	1.7	1.5	
画分24	30,663	27,682	1.5	1.6	1.3	1.4	

BB27-5X-Amdex-PE (5.6倍まで) での増強と比べてBB27-1X-Amdex-PE (対照の2.2倍まで) での完全な血液中で、標的にしたT細胞で得られた低いPE蛍光増強及び低い見掛けPE対デキストランモル比に注意のこと。1X-Amdex (1,000,000ダルトン) は5X-Amde

10

20

30

40

50

x (350,000ダルトン) より高い平均分子量を有するが、1X-Amdexは、そのPE及びBB27抗体とのコンジュゲート内でT細胞上でBB27抗体のための2又はそれ超のレセプター部位を架橋することができるより長い糖ポリマーも有する。そのPE及びBB27抗体コンジュゲート内の5X-Amdexは、2又はそれ超のレセプター部位を架橋するために必要な鎖の長さを有し得ない。

試験3及び4のBB27-5X-Amdex-PEコンジュゲートは、平均チャンネルPE蛍光強度について、より高いMFI比、画分/対照を示した。完全な血液と混合し、溶解し、そして消光したコンジュゲート0.15~0.009 μ gについて、2つの血液ドナーについて、MFI比は試験3のコンジュゲートで2.9~10.9、試験4のコンジュゲートで3.2~15.7の範囲であった。試験4で用いた2倍量のスルホ-SMCC-5X-Amdexについて、このコンジュゲートで得られたMFI比は約1.5倍高く、デキストランコンジュゲート当りより多くのPEを示した。2倍の調製物に用いたアミノデキストランのより多くの量は、より多くのPEを獲得することができるより高分子量のアミノデキストランをより大量に供するであろう。

実施例11: IL-12R β .44-PE及びIL-12R β .44-アミノデキストラン-PEコンジュゲートでのトランスフェクタント細胞のフローサイトメトリー分析

極めて低い蛍光強度、直接的IL-12R β .44-PEコンジュゲートによる完全な血液中で標的にされた細胞からの細胞の自己蛍光バックグラウンドとの重複のため、フローサイトメトリーにより、直接的対アミノデキストラン架橋したIL-12R β .44-PEコンジュゲートで標識した細胞の蛍光強度を比較するためにトランスフェクタント細胞系を用いた。対照、IL-12R β .44-PE、及びサンプル1×IL-12R β .44-5X-Amdex-PE及び2×IL-12R β .44-5X-Amdex-PEのタイターを、管当たり0.3 μ gで始めて、200 μ lの反応容量中総数 10^6 細胞/管について、トランスフェクトしていない親細胞(PB110)とに混合したIL-12Rレセプタートランスフェクタント細胞(PB112)で行った。細胞を室温で1時間、インキュベートし、PBSで1回、洗い、フローサイトメトリー(COULTER XL)によって分析した。同じ装置設定で得られた対照に対する平均チャンネルPE蛍光強度及びサンプル強度を表14及び15に列記する。

10

20

表 14

<u>1 × コンジュゲート</u>	<u>平均チャンネルPE蛍光強度</u>				
<u>IL-12R β.44, μg</u>	<u>対照</u>	<u>画分20</u>	<u>画分21</u>	<u>画分22</u>	<u>画分23</u>
0.3	162.5	455.	411.3	528.	854.3
0.15	161.7	365.8	318.2	293.7	820.4
0.075	121.4	225.4	194.8	212.5	457.4
0.0375	97.3	185.7	94.1	143.9	398.9
0.019	67.7	102.9	79.2	99.3	195.2
0.009	41.5	82.5	53.6	46.3	101.2
	<u>MFI 比, 画分/対照</u>				
0.3	1.0	2.8	2.5	3.2	5.3
0.15	1.0	2.3	2.0	1.8	5.1
0.075	1.0	1.9	1.6	1.8	3.8
0.0375	1.0	1.9	1.0	1.5	4.1
0.019	1.0	1.5	1.2	1.5	2.9
0.009	1.0	2.0	1.3	1.1	2.4

表 15

<u>2 × コンジュゲート</u>	<u>平均チャンネルPE蛍光強度</u>			
<u>IL-12R β.44, μg</u>	<u>対照</u>	<u>画分21</u>	<u>画分22</u>	<u>画分23</u>
0.3	162.5	144.	131.8	146.9
0.15	161.7	121.6	111.2	122.1
0.075	121.4	65.5	58.6	61.9
0.0375	97.3	39.1	37.9	51.2
0.019	67.7	21.9	19.	25.3
0.009	41.5	11.4	8.85	12.1

1×IL-12R β.44-5X-Amdex-PEコンジュゲートの画分は、フローサイトメトリーによりトランスフェクトされた細胞でテストした時に、直接的IL-12R β.44-PEコンジュゲートに優る5.3倍までの増幅されたPE蛍光強度を示した。しかしながら、IL-12R β.44-5X-Amdex-PEコンジュゲートを調製することにおける2×-活性化スルホ-SMCC-5X-Amdexの使用は、対照として用いた直接的IL-12R β.44-PEコンジュゲート（F/P比=0.967）に優るマーカー蛍光強度における利点は示さなかった。2×コンジュゲート中の5X-Amdexの活性化のより大きな低度は、同じコンジュゲート内にかなり少いPEを明白に

10

20

30

40

50

生じた。

実施例12：BY55-PE及びBY55-アミノデキストラン-PEコンジュゲートでの完全な血液のフローサイトメトリー分析

BY55抗体コンジュゲートを、IgG抗体についての約160,000ダルトンと比較して、かなり高い分子量約900,000ダルトンのIgMクラス抗体での蛍光増幅の方法の適用性を示すために調製した。対照BY55-PE及びサンプル1×BY55-5X-Amdex-PE及び2×BY55-5X-Amdex-PEのタイターを、(10 μ l中)管当たり0.9 μ gで始めて、100 μ lの完全な血液で、1つの血液ドナーで行った。細胞を室温で1時間、インキュベートし、COULTER Q-Prepで溶解し、PBSで1回、洗い、フローサイトメーター(COULTER XL)にかけた。同じ装置設定で得られた対照に対する平均チャンネルPE蛍光強度を表16及び17に列記する。

10

表16

<u>1×コンジュゲート</u>	<u>平均チャンネルPE蛍光強度</u>				
<u>BY55, μg</u>	<u>対照</u>	<u>画分20</u>	<u>画分21</u>	<u>画分22</u>	<u>画分23</u>
0.9	2.42	44.9	29.1	22.9	10.8
0.45	2.58	37.1	29.5	18.6	9.45
0.225	2.55	29.1	23.7	12.	9.32
0.1125	1.95	28.8	24.1	10.5	7.33
0.0563	2.08	23.	21.5	11.8	9.03
	<u>MFI 比, 画分/対照</u>				
0.9	1.0	18.6	12.0	9.5	4.5
0.45	1.0	14.4	11.4	7.2	3.7
0.225	1.0	11.4	9.3	4.7	3.7
0.1125	1.0	14.8	12.4	5.4	3.8
0.0563	1.0	11.1	10.3	5.7	4.3

20

30

表 17

<u>2 × コンジュゲート</u>	<u>平均チャンネルPE蛍光強度</u>				
<u>BY55, μg</u>	<u>対照</u>	<u>画分19</u>	<u>画分20</u>	<u>画分21</u>	<u>画分22</u>
0.9	2.42	21.9	29.4	15.0	9.95
0.45	2.58	25.2	20.7	13.9	7.33
0.225	2.55	27.2	14.4	12.7	7.51
0.1125	1.95	15.0	13.6	9.3	6.33
0.0563	2.08	13.6	10.5	9.5	2.42
	<u>MFI 比, 画分／対照</u>				
0.9	1.0	9.0	12.1	6.2	4.1
0.45	1.0	9.8	8.0	5.4	2.8
0.225	1.0	10.7	5.6	5.0	2.9
0.1125	1.0	7.7	7.0	4.8	3.2
0.0563	1.0	6.5	5.0	4.6	1.2

10

20

1×BY55コンジュゲート、画分20及び21、並びに2×BY55コンジュゲート、画分19及び20からのデータを、絶対スケール上にPE強度をおくためにCOULTER Flow-Cal 57ビーズを用いることによりFEUを評価するのにも用いた。結果を表18に示す。

表 18

FEU 単位					
BY55, μ g	対 照	1 ×, 画分20	1 ×, 画分21	2 ×, 画分19	2 ×, 画分20
0.9	22,601	405,546	263,114	198,208	265,818
0.45	24,044	335,231	266,720	287,956	187,390
0.225	23,773	263,113	214,434	245,986	130,597
0.1125	18,364	260,409	218,040	136,006	123,386
0.0563	19,536	208,124	194,602	123,386	95,440
FEU, 標識化					
0.9	1.00	17.9	11.6	8.8	11.8
0.45	1.00	13.9	11.1	9.5	7.8
0.255	1.00	11.1	9.0	10.3	5.5
0.1125	1.00	14.2	11.9	7.4	6.7
0.0563	1.00	10.7	10.0	6.3	4.9
PE/デキストラン又は抗体					
0.9	0.862	15.4	10.0	7.6	10.2
0.45	0.862	12.0	9.6	8.2	6.7
0.255	0.862	9.6	7.8	8.9	4.7
0.1125	0.862	12.2	10.2	6.4	5.8
0.0563	0.862	9.2	8.6	5.4	4.2

直接的BY55-PEコンジュゲートについての0.862の補正したF/P又はPE/抗体比を用いて、各々の値に0.862をかけることにより、標準化したFEU値からPE/デキストラン比を得た。BY55-5X-Amdex-PEコンジュゲートから得たMFI比は試験3及び4においてBB27-5X-Amdex-PEコンジュゲートについて得た値と同様であり、これによりIgM及びIgGの両方のクラスの抗体-5X-Amdex-PEコンジュゲートがコンジュゲート当り同様の数のPE分子を含み得ることを示す。同様に、1又は2のBY55/デキストラン表18からの飽和におけるPE/デキストラン比及び表7からのPE濃度に基づいて、計算したBY55濃度はELISAにより決定したBY55濃度より10倍まで高く、これを表7に示す。抗体及びPEのアミノデキストラン架橋化コンジュゲート内のBB27及びBY55の両方についての低いELISAの値は、おそらく、本アッセイに用いたヤギ抗マウス抗体へのコンジュゲーションにおける種々の抗体エピトープの相対的なアクセスしにくさを反応する。このアッセイの標準曲線は遊離抗体を用いて作ったので、そのコンジュゲーション抗体濃度は実際より低いようである。

直接的BY55-PEコンジュゲートと比較した、5X-Amdex-架橋化BY55-PEコンジュゲート、1×画分20及び2×画分19での完全な血液中の標的とするBY55+細胞のかなり高い分解能は、図3A及び3Bにおける別の血液ドナーについて明白である。ここには、FS対SSヒスト

10

20

30

40

50

グラムにおいてリンパ球を通した細胞数対PE蛍光強度が各々のマーカーについて示されている。図3A及び3Bは、BY55抗体での散乱して通ったリンパ球の染色を示す。正常なドナーからの完全な血液100 μ Lを、(図3A) BY55-PE、(図3B) BY55-5X-Amdex-PE, 1 $\times$ /画分20又は(c) BY55-5X-Amdex-PE, 2 $\times$ /画分19としてBY55 0.25 μ gを含む10 μ Lで染色した。図3A, 3B及び3Cは、架橋されたコンジュゲートがBY55+リンパ球より30倍高い蛍光強度を有する。BY55-PE直接的コンジュゲート、1 $\times$ 画分20、及び2 $\times$ 画分19の各々についての0.625, 6.60、及び3.36の平均チャンネルPE蛍光強度で中心にある大きな自己蛍光シグナル、並びに3.67, 75.4及び90.0でのBY55+細胞シグナルは、2 $\times$ 画分19サンプルについて最も分解されるここでは、PE/デキストラン比によれば、コンジュゲートは、1 $\times$ 画分20サンプルと比べてコンジュゲート当り1つの更なるIgM及び約4つの少いPEを含む。コンジュゲート中のIgMがより多くなるに比例して、より優れた抗体の提示のため、バックグラウンド蛍光はより少くなり得、これにより標的にした細胞についてのコンジュゲートの特異性は大きくなり、同時に、他の細胞へのコンジュゲートの非特異的結合は少なくなる。結合の特異性を図4A及び4Bに示す。ここでは、第3のドナーからのリンパ球は、750 μ g / mlの非標識化BY55抗体による先のブロッキングあり及びなしで染色される。図4A及び4Bは、BY55抗体での散乱して通ったリンパ球の染色を示す。正常なドナーからの完全な血液100 μ Lを、過剰(750 μ g / ml)の非標識化BY55でブロッキングした後、BY55-5X-Amdex-PE, 2 $\times$ /画分19又は(図4B) BY55-5X-Amdex-PE, 2 $\times$ /画分19の形態のBY55抗体0.25 μ gを含む(図4A) 10 μ Lで染色した。図4A及び4Bは、コンジュゲートがBY55抗原に特異的であることを示す。

実施例13：多色染色における抗体-デキストラン-フィコエリトリンコンジュゲートの使用

増加量の抗体-デキストラン-フィコエリトリンコンジュゲートが、他の細胞表面抗原への特定の抗体の結合を立体的に妨害するであろうか否かを決定するため、BB27-5X-Amdex-PE(画分23)を、CD4-FITC及びCD28-ECDと同時にインキュベートした。CD4, CD28及びBB27抗原は、CD4+CD28+BB27-細胞から機能的に区別されるCD4+T細胞上で発現される[Gouttefangeasら、Int. Immunol. 6(3) 423, (1994)]、抗体を、全量110 μ l中テスト当たり各々0.25 μ gの濃度で、1時間、100 μ lの完全な血液とインキュベートした。血液をCOULTER Q-Prep上で溶解し、PBSで1回、洗い、そしてフローサイトメーター(COULTER XL)にかけた。リンパ球集団上にゲートを通した時、単一パラメータヒストグラム(図5A-5F)は、BB27-PEで染色することと比べてBB27-5X-Amdex-PEで染色することにより作られた増強されたシグナルを示す。図5A-5Fは、3つのマーカーを用いる多色分析を示す。図5A-5Fは、多色マーカーを用いた時でさえ増強されたシグナルが得られることを示す。BB27-5X-Amdex-PE又はBB27-PEの存在下での3つの抗体についての平均蛍光強度ピーク位置の類似性により証明されるように、無関係な抗体CD4及びCD28の結合に差はなかった。このことは、BB27-PEと比べたBB27-5X-Amdex-PEの量の増加は他の抗体の細胞表面抗原への結合に影響を与えないことを示し、これにより、本発明の潜在的な使用は多色フローサイトメトリ分析に広げられる。

実施例14：抗CD8 α β 抗体-PC5コンジュゲートの調製

直接的モノクローナル抗体-蛍光剤(PE, PC5, ECD)コンジュゲートは、イミノチオラン活性化PE(又はPC5; ECD)のスルホ-SMCC活性化抗体とのコンジュゲーション反応又はイミノチオラン活性化PE(又はPC5, ECD)のDTT(ジチオトレイトール)還元化抗体とのコンジュゲーション反応の確立された手順により調製されるように、Coulter Corporation又はImmunotechからほとんどの抗体について市販されている。これらのコンジュゲート中のモノクローナル抗体：蛍光剤のモル比は約1:1である。IgGモノクローナル抗体のPC5とのコンジュゲーションは、PC5のスルホスクシニミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)活性化及びジチオトレイトール(DTT)でのヒンジ領域におけるジスルフィド結合の還元による抗体の活性化により行った。

A. モノクローナル抗体(MCA)の活性化

14.04mg/mLの濃度のMCA 50mgのために、3.549mLのMCA濃縮物が必要とされた。1 $\times$ PBS中D

10

20

30

40

50

TTの15.4mg/mL溶液を調製し、DTT:MCA=300:1の活性化比で用いた。これにより、5mg/mLのMCAを含む10mLの全量を作るために、5.451mLの1×BBS緩衝液(20mMホウ酸、150mM塩化ナトリウム、pH8.8)を反応容器に入れ、それに、25°Cで攪拌しながら、MCA溶液3.549mLを加え、次に1,000mLのDDT溶液をゆっくりと加えた。その容器中の反応混合物を20分、25°Cでインキュベートし、その後、2.5mMのMES₂-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸)消光緩衝液(50mM MES, 5.0M過塩素酸ナトリウム、4mM EDTA(エチレンジアミンテトラ酢酸)、pH5を加え、その反応混合物を更に2分、インキュベートした。次に、直ちに、その活性化MCAサンプルを、MESカラム緩衝液(50mM MES, 100mM過塩素酸ナトリウム、4mM EDTA, pH6.0)で平衡化した200mL G-50 Sephadexカラムの頂上に適用した。その活性化MCAをMES緩衝液でカラムから溶出し、280nmにおける最初の吸収ピークの画分を収集した。mg/mLでの活性化MCA濃度を、 A_{280} 値により決定した。1.394mg/mLでの活性化MCA溶液34mL(47.4mg)を得た。

10

B. PC5のスルホ-SMCCでの活性化

PC5, PE(R-フィコエリトリン(紅藻))-5'シアニタンデムコンジュゲートを米国特許第4,542,104号及び米国特許第5,272,257号に記載される通り調製した。1×BBS緩衝液中14.69mg/mLの濃度のPC5 55mgのため、3.744mLのPC5濃縮物が必要とされる。1×BBS緩衝液中スルホ-SMCCの4.5mg/mL溶液を調製し、スルホ-SMCC:PC5=40:1の活性化比で用いた。これにより、全量11mLの5mg/mLのPC5を作るために、5.936mLの1×BBS緩衝液を反応容器に入れ、それに25°Cで攪拌しながら、PC5溶液3.744mLを加え、次にゆっくりと0.44mLのNEM(N-エチルマレイミド、1×BBS緩衝液中31.25mg/mL)溶液を加えた。その容器中の反応混合物を30分、インキュベートした。次に、0.88mLのスルホ-SMCC溶液(4.5mg/mL)をその混合物に加え、それを更に60分、インキュベートした。最後のインキュベーション時間の終りに、1×BBS緩衝液中1Mの塩化アンモニウム1.1mLをその混合物に加え、更に2分、インキュベートした。次に直ちに、活性化PC5を、MOPS(3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸)カラム緩衝液(50mM MOPS, 100mM過塩素酸ナトリウム、4mM EDTA, pH7.0)で平衡化した200mL G-50 Sephadexカラムに充填した。その活性化PC5を、MOPS緩衝液でカラムから溶出し、そのカラムから落ちた最初の色のピークを収集した。活性化PC5の1.962mg/mLの濃度を $A_{565.5}/8.167$ として決定した。その活性化PC5をMOPS緩衝液で1.5mg/mLに希釈して全量32.7mLを供した。

20

C. MCAのPC5とのコンジュゲーション

30

コンジュゲーションのために、等量(32.7mL)の1.4mg/mLの活性化MCA及び1.5mg/mLの活性化PC5を、活性化MCAを攪拌中の活性化PC5に加えることにより混合した。その反応混合物を25°Cで2時間、インキュベートした。その混合時間の終りに、1×BBS緩衝液中31.25mg/mLのNEM 2.642mLを更にその反応混合物に加え、それを更に5分、ローラーで混合した。

D. MCA-PC5コンジュゲートの精製

1×BBS, 2mM EDTA, pH7.2緩衝液で平衡化したSuperdex 200 prepグレードカラム(MCA 1mg当り3.4mLのカラム又は318mL)を調製した。そのMCA-PC5反応混合物をSuperdex pgカラム容量、4.33mLの2%未満に濃縮した。そのサンプルをSuperdex 200 pgカラムに充填し、119mL/hrで1×PBS, 2mM EDTA, pH7.2緩衝液で溶出した。 $A_{280}/A_{565.5}$ 比を各々の画分について計算した。遊離PC5溶出液前2画分までの0.43からの比の全ての画分をプールした。例えば、そのプールしたCD8 α β -PC5画分25mLは、Amicon YM30膜を用い、その濃縮物を1×PBS, 0.1%ナトリウムアジド、0.1mM EDTA緩衝液でフィルターに流し、そしてCD8 α β -PC5コンジュゲートを4°Cで15分、1800×gで遠心することにより、カラム容量の1%未満、3.45mLの容量に濃縮した。このプールしたサンプルの100倍希釈物は、CD8 α β -PC5コンジュゲートにおいて $A_{565.5}=0.4809$ 又は $(18.167) \times 100=5.888$ mg/mLのPC5及び20.31mgの全PC5、並びにCD8 α β -PC5コンジュゲートにおいて $A_{280}=0.1513$ 又は $[0.4809/5.476(PC5のA_{565.5}/A_{280})] \times 100=6.349$ mg/mLのCD8 α β 及び21.90mgの全CD8 α β を供した。それゆえ、PC5/CD8 α β のモル比は、 $(20.31mgのPC5/240,000)/(21.90mgのCD8\alpha\beta/160,000)=0.618$ である。式:MCA:PC5= $[A_{280}/A_{565.5}$ (コンジュゲ

40

50

ート) - $A_{280} / A_{565.5}$ (染料))] $\times 8.77$ に基づく補正した F / P 比は 0.864 である。0.96 の F / P 比を有する CD4-ECD コンジュゲートを調製するために同様の方法を用いた。あるいは、直接的 MCA-染料 コンジュゲートは、上述のように、抗体のスルホ-SMCC 活性化、染料 (例えば PE 又は PC5) の 2-イミノチオラン活性化、次のコンジュゲーション及び精製によって調製することができた。

実施例 15: 抗体-アミノデキストラン-フィコビリプロテインコンジュゲートの調製における好ましいアミノデキストランの特性

コンジュゲートの調製のための手順は、1X-Amdex 又は 5X-Amdex のいずれかのアミノデキストランとの抗 CD3 抗体のコンジュゲートを調製するために米国特許第 5,527,713 号に記載されるのと同様であった。しかしながら、この例において、2つの異なるタンパク質、一方はモノクローナル抗体、他方は蛍光タンパク質を、蛍光染料、PE について上述されるように、アミノデキストランに同時にコンジュゲートした。コンジュゲートの調製に用いられるアミノデキストランのための要求は、本明細書においてより正確に定義することができる。5X-Amdex の合成は、米国特許第 5,466,609 号; 5,527,713 号; 5,552,086 号; 5,639,620 号; 及び 5,658,741 号に記載されている。好ましい 5X-Amdex は、可能な限り高く、2M の平均 MW のデキストラン (好ましくはロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostic mesenteroides*) 株 B-512) とほぼ等しい平均分子量を有し、それを全ての実験において出発材料として用いた。2M より低い平均 MW は、酸化デキストラン、デキストランアルデヒドの 1, 3-ジアミノプロパンでのアミノ化の間のデキストランのアミノ分解の競合反応により、全ての調製において産物 5X-Amdex のために得た。Coulter N4MD Sub-Micron Particle Analyzer で、適当に希釈したサンプルについて測定したデキストランの過ヨウ素酸酸化の後、平均 MW の減少は観察されなかった。抗体-5X-Amdex-染料コンジュゲートについての最も良い結果は、5X-Amdex の平均 MW が 350,000 ダルトンに等しいかそれ超である場合に得られた。酸化グルコース残基当り 2 のジアミノプロパン分子によるデキストランの置換の約 $1/7 \sim 1/9$ の程度として分析され、約 350,000 ダルトン未満の平均 MW を示す材料は、蛍光増幅を行うことができるコンジュゲートを作らなかった。好ましい 5X-Amdex で、アミノデキストランのスルホ-SMCC での活性化、G-50 Sephadex カラムでのクロマトグラフィーによる分離、及び A_{280} モニターにより検出される第 1 のせまいピーク下での材料の選択は、1~2M ダルトンの範囲内の更に高い平均 MW のスルホ-SMCC-活性化 5X-Amdex を作り出す。Coulter N4MD Sub-Micron Particle Analyzer で測定したスルホ-SMCC 活性化及び精製の前及び後の増強された蛍光発光強度を作り出す抗体-5X-Amdex-PE, PC5、又は ECD コンジュゲートの調製に用いるのに適した 5X-Amdex アミノデキストランサンプルの相対分子量平均 MW 分布を図 6A 及び 6B に示す。

実施例 16: 全タンパク質、CD8 α β 及び PC5 との、3:1 の 5X-Amdex 重量比及び 1:2.3 の抗体:5X-Amdex 重量比への試験 1 コンジュゲーション

A. アミノデキストランのスルホ-SMCC での活性化

0.023mL の 20 $\times$ PBS 緩衝液を加えて 1 $\times$ PBS を作った DW 中の 5X-Amdex の 22.867mg/mL 溶液 0.437mL を 1 $\times$ PBS 中の 10mg/mL スルホ-SMCC 溶液 0.180mL で活性化した。その混合物を室温で約 1 時間、ローラーで混合した。混合を終えた後、その反応混合物を、1 $\times$ PBS で平衡化した 60mL G-50 Sephadex カラムの頂上に直ちに適用した。そのサンプルを 1 $\times$ PBS を用いて溶出し、約 2mL 画分に収集した。焦点可視光ビーム (Model 650, Cambridge Instruments, Inc., Buffalo, NY) で Tyhdall 散乱により確認して、280nm での最初の吸収バンドの画分は、高分子量の活性化 5X-Amdex を含んでいた。これらの画分をプールして約 3.7mL の全スルホ-SMCC-活性化 5X-Amdex を供した。

B. 抗体の活性化

CD8 α β モノクローナル抗体を、1 $\times$ PBS 中 2mg/mL の イミノチオランの溶液 0.065mL 及び 1 $\times$ PBS を 0.162mL の CD8 β 濃縮物 (61.67mg/mL) に加えることにより活性化した。15mg/mL の抗体濃度及び 15 倍大きい イミノチオランモル濃度を有する生じた溶液を約 1 時間、環境温度で混合した。次にその反応混合物を 1 $\times$ PBS で平衡化した 60mL Sephadex カラムでクロマトグラフィーを行い、サンプルを 1 $\times$ PBS を用いて溶出した。その第 1 のバンドのピーク画

分は、全部で11.24mgのIT-CD8 α β 抗体誘導体を含む3.407mg/mLの抗体溶液約3.3mLを作り出した。

C. PC5の活性化

米国特許第4,542,104号及び米国特許第5,272,257号に記載されるように調製したPC5濃縮物を、1×PBS中2mg/mLのイミノチオランの溶液0.232mL及び1×PBS 0.126mLを0.542mLのPC5濃縮物(66.48mg/mL)に加えることにより活性化した。40mg/mLのPC5濃度及び22.5倍大きいイミノチオラン濃度を有する生じた溶液を室温で約1時間、混合した。次にその反応混合物を1×PBSで平衡化した60mL G-50 Sephadexカラムの頂上に適用し、そのサンプルを1×PBSで溶出した。その最初のバンドピーク画分は6.0821の A_{565}/A_{280} 比の6.683mg/mLのPC5約4.3mLを供し、それは、全部で28.738mgのIT-PC5を含んでいた。

10

D. IT-CD8 α β 及びIT-PC5のスルホ-SMCC-5X-Amdexへのコンジュゲーション

3:1全タンパク質:5X-Amdex重量比:1.257mLの3.407mg/mLのIT-CD8 α β 溶液(約4.287mg抗体)を6.683mg/mLのIT-PC5溶液(約25.713mgPC5)と最初に混合し、それに3.7mLのスルホ-SMCC-5X-Amdex溶液(約10mgの5X-Amdex)を加え、その全混合物を16~24時間一晩、ローラーで混合した。混合を終えた後、その混合物の全量を測定し、この容量の0.120倍の1×PBS中5mg/mLのL-システインを各々のコンジュゲーション混合物に加えた。次にL-システイン含有混合物をいずれの未反応のスルホ-SMCC成分もブロッキングするために、更に15分、混合した。最後に、全混合物容量の0.120倍の量の1×PBS中の20mg/mLイオドアセトアミド及び全混合物容量の0.020倍の量の1Mホウ酸緩衝液pH9.8をその混合物に加えた。生じた混合物は、いずれの未反応のスルヒドリル基もブロッキングす

20

E. CD8 α β -5X-Amdex-PC5コンジュゲートの精製

全量のコンジュゲーション混合物を、冷却Beckman J-6Bセントリフュージを用いて2200rpmで約30分、サンプルを含むAmicon Centri-Prep 30管を遠心することにより約1.5mLに減らした。そのサンプルを1×PBSで平衡化したBio-Gel A-15mアガロースカラム(2.5cm×48cm)の頂上に入れ、溶離液として1×PBSを用いてクロマトグラフィーを行った。約1.8mL容量の溶出画物を、液滴収集モードで作動するPharmacia LKB FRAC-100コレクターを用いて収集した。その画分を、280nmで動作するLKB2138 Uvicord Sモニターを用いてモニターした。 A_{280} 対画分番号記録を示すクロマトグラムを図7に示す。カラムから溶出された最初のせまく強いバンドはCD8 α β -アミノデキストラン-PC5コンジュゲートを含

30

んでいた。その第1のピークの強度の3分の1未満である第2の低い強度の広いバンド及び第3のバンドは、約1:1のPC5:アミノデキストランコンジュゲート及び過剰なPC5を含んでいた。中~低強度の十分に分離した第4のバンドは低分子量の過剰なブロッキング試薬のせいであった。CD8 α β -5X-Amdex-PC5コンジュゲートについて収集した画分を、1mm経路長セルを用いて565.5及び286nmにおいて分光学的に分析した。そのコンジュゲート中のmg/mLでのPC5の濃度は、式: $A_{565.5}/8.167$ を用いることにより、565.5nmの吸光度から得た。抗体濃度はその補正した A_{280} 値から決定した。コンジュゲート中の活性なCD8 α β 抗体濃度は、IgG1抗体についてはELISAアッセイにより決定したが、アッセイ結果は、コンジュゲートの非抗体部分からの干渉を示すようであった。これにより、PC5の寄与について補正した

40

A_{280} 値を用いて抗体濃度を得た。試験1における最初のせまいピーク下の画分36~46についてのデータを表19に列記する。

表 19

画分	$A_{565.5}$	A_{280}	$A_{565.5}/A_{280}$	PC 5, mg/mL	CD 8 $\alpha \beta$, mg/mL	CD 8 $\alpha \beta$, $\mu g/mL$, ELISA
36	0.0891	0.0344	2.59	0.109	0.193	<0.016
37	0.2661	0.0959	2.77	0.326	0.507	<0.016
38	0.7280	0.2450	2.97	0.891	1.212	0.029
39	1.1681	0.3744	3.12	1.430	1.758	0.042
40	1.1810	0.3646	3.24	1.446	1.639	0.043
41	0.8906	0.2648	3.36	1.090	1.134	0.040
42	0.5169	0.1452	3.56	0.633	0.573	0.025
43	0.2720	0.0715	3.81	0.333	0.252	0.019
44	0.1637	0.0397	4.13	0.200	0.118	<0.016
45	0.1160	0.0260	4.46	0.142	0.063	<0.016
46	0.0915	0.0191	4.79	0.112	0.035	<0.016

F. 抗体-アミノデキストラン-PEコンジュゲートの分子量の評価

ブルーデキストラン (Sigma, T-2M) を、抗体-アミノデキストラン-PEコンジュゲートを精製するのに用いたBio-Gel A-15mカラムに適用し、そのカラムから1×PBSで溶出し、 A_{280} によりモニターし、そして60滴/画分の同じ液滴数で収集した。抗体-アミノデキストラン-染料コンジュゲートの溶出プロフィールにおける最初のせまいピーク（おおよそ画分40）はブルーデキストランの溶出プロフィールにおける最初のせまいピークと同じ画分にあった。それゆえ、我々は、コンジュゲートが2,000,000ダルトン又はそれ超の分子量を有すると見積もった。A-15mアガロースカラムでの中空容量は、分子量、1500万/4=375万、又はそれ超のデキストラン又はデキストラン誘導体を含むと評価した。先の研究に用いたA-5mアガロースカラムのかわりにA-15mアガロースカラムに適用した抗体-アミノデキストラン-PE、PC5、又はECDコンジュゲートについて得られたクロマトグラムは、第1のバンドから第1の主要なバンドへの肩部分のかなり優れた分離を供し、コンジュゲートのより優れた精製を供した。

実施例17：抗CD4抗体-5X-Aminodextran-ECDコンジュゲートの調製

手順は、実施例16におけるCD8 $\alpha \beta$ -5X-Amdex-PC5コンジュゲートの調製について概説されるのと同じであった。但し、IgG1クラスの抗CD4抗体もITで活性化し、CD8 $\alpha \beta$ 抗体のかわりにコンジュゲーションに用い、タンデムPE-Texas red又はECD蛍光染料をPC5のかわりに用いた。試験2において、IT-ECD (7.657mg)、IT-CD4 (1.272mg) をSMCC-5X-Amdex (5mg) と、各々1.11、0.184、及び0.725mg/mLの濃度で、コンジュゲーションの間に混合した。IT-ECD ($A_{565.5}/A_{280}$) 比は5.296であった。そのコンジュゲーション混合物を約1.5mLに濃縮し、A-15mカラムの頂上に適用した。試験2の最初のせまいピーク下の画分当たり約3.6mLで収集した画分についてのデータを表20に列記する。

表 20

画分	A _{565.5}	A ₂₈₀	A _{565.5} / A ₂₈₀	ECD, mg/mL	CD 4, μ g/mL, ELISA
18	0.0218	0.0071	3.06	0.027	
19	0.0714	0.0201	3.56	0.087	
20	0.0472	0.0122	3.87	0.058	
プール				0.567	1.46

10

実施例18：抗CD56（又はCD4）抗体－5X－アミノデキストラン－PEコンジュゲート

再び、手順は実施例16でCD8 α β －5X－Amdex－PC5コンジュゲートについて概説されるのと同じであった。但し、IgGクラスの抗CD56（NKH－1）又は－CD4抗体及びPEをITで活性化し、CD8 α β 抗体及びPC5のかわりにコンジュゲーションに用いた。試験3において、反応物、2.822mLの8.50mg/mL IT－PE（23.987mg）を最初に、5.4mLのスルホ－SMCC－5X－Amdex（3.333mg）溶液と混合し、それに2.10mLの1.922mg/mLのIT－CD56（4.036mg）を加えた。IT－PE（A₅₆₅ / A₂₈₀）比は5.800であった。コンジュゲーション混合物を約1.5mLに濃縮し、A－15mカラムの頂上に適用した。試験3の最初のせまいピーク下の画分当り1.8mLで集めた画分についてのデータを表21に列記する。

20

表 21

画分	A _{565.5}	A ₂₈₀	A _{565.5} / A ₂₈₀	PE, mg/mL	CD56, mg/mL	CD56, μ g/mL, ELISA
36	0.1302	0.0421	3.10	0.159	0.190	1.37
37	0.3752	0.1115	3.37	0.459	0.450	4.38
38	0.6978	0.1964	3.55	0.854	0.729	11.4
39	0.7182	0.1928	3.72	0.879	0.657	12.4
40	0.4911	0.1256	3.90	0.601	0.387	8.33
41	0.3003	0.0732	4.10	0.368	0.200	4.58
42	0.1998	0.0462	4.33	0.245	0.108	3.59
43	0.1508	0.0336	4.49	0.185	0.069	2.77
44	0.1251	0.0271	4.62	0.153	0.049	2.35
45	0.1117	0.0236	4.72	0.137	0.039	4.16

30

40

試験4において、3.117mLの8.25mg/mL IT－PE（25.715mg）を最初に、3.3mLのスルホ－SMCC－5X－Amdex（10mg）溶液と混合し、次にそれに1.434mLの2.991mg/mLのIT－CD4（4.287mg）を加えた。そのコンジュゲーション混合物を約1.5mLに濃縮し、A－15mカラムの頂上に適用した。試験4における最初のせまいピーク下の画分当り1.8mLで収集した画分に

50

ついでデータのデータを表22に列記する。

表 22

画分	A _{565.5}	A ₂₈₀	A _{565.5} / A ₂₈₀	PE, mg/mL	CD 4, mg/mL	CD 4, μg/mL, ELISA
36	0.0797	0.0234	3.41	0.098	0.093	1.11
37	0.2044	0.0596	3.43	0.250	0.234	2.85
38	0.3205	0.0900	3.56	0.392	0.332	5.85
39	0.3387	0.0920	3.68	0.415	0.321	8.74
40	0.2714	0.0702	3.86	0.332	0.222	4.83
41	0.1948	0.0475	4.10	0.239	0.130	3.67
42	0.1436	0.0337	4.26	0.176	0.083	2.48
43	0.1115	0.0254	4.39	0.137	0.057	2.01

以下の実施例19～22は、フローサイトメトリーにおいて細胞マーカーとしての直接的及びアミノデキストラン架橋化蛍光剤－抗体コンジュゲートの比較を示す。

実施例19：CD8αβ－PC5及びCD8αβ－5X－Amdex－PC5コンジュゲートでの完全な血液のフローサイトメトリー分析

5.71mg/mLの抗体濃度でのCD8αβ－PC5及び試験1からのCD8αβ－5X－Amdex－PC5コンジュゲートの画分を滴定し、管当たりコンジュゲート中3μgの抗体で始めた。その滴定についての抗体の量を、コンジュゲートについての補正したA₂₈₀値から決定した。希釈物を100μLの完全な血液に加え、室温で60分、インキュベートした。その血液との混合物を溶解し、Coulter Q－PREPで消光し、（1mLの1×PBSを加え、500gで5分、遠心し、その上清を捨て、そして1mLの1×PBS中に細胞を再度懸濁することにより）1×PBSで1回、洗い、フローサイトメトリー（Coulter Epics XL-MCL）にかけた。

抗体分子当たり0.86のPC5を含む直接的CD8αβ－PC5コンジュゲートで得られた平均チャンネルPC5蛍光強度を増強するためのデキストラン分子当たり2超のPC5分子を含む蛍光マーカーとしてのCD8αβ－5X－Amdex－PC5コンジュゲートの能力を、図8A～8Bのヒストグラム、RHS対LHSで示す。図8A及び8Bの2つのヒストグラムは、散乱してゲートを通ったリンパ球の染色を示す。正常なドナーからの完全な血液100μLを、LHS、CD8αβ－PC5又はRHS、CD8αβ－5X－Amdex－PC5として2.5μgのCD8αβを含む10μLで染色した。そのヒストグラムは、架橋されたコンジュゲートが、CD8αβ＋リンパ球に3.5倍高い蛍光強度を有することを示す。

別の実験において、標識したT細胞の平均チャンネル蛍光強度は、試験1の種々の画分、蛍光マーカーとしてCD8αβ－5X－Amdex－PC5コンジュゲートを検査することにより8倍まで増強することができるが見い出された。同じ装置設定での対照、CD8αβ－PC5、及びサンプル、CD8αβ－5X－Amdex－PC5のタイターで試験を行った。その結果、同じタイターでの平均チャンネルPC5蛍光強度及びMFI比－サンプル画分対対照を別の正常なドナーについて表23に示す。

表 23

平均チャンネルPC 5 蛍光強度									
画 分									
CD 8 $\alpha \beta$, μg	対照	36	37	38	39	40	41	42	43
3	53	265	325	379	419	376	377	381	
2.5	53	282	303	352	334	335	357	368	
2	55	236	266	302	293	311	319	320	
1.5	51	194	226	252	240	213	265	292	336
1	50	174	196	178	183	166	197	216	262
0.5	51	93	130	134	132	155	112	117	177
MFI 比, 画分/対照									
3	1.0	5.0	6.1	7.1	7.9	7.1	7.1	7.1	
2.5	1.0	5.3	5.7	6.6	6.3	6.3	6.7	6.9	
2	1.0	4.3	4.8	5.5	5.3	5.7	5.8	5.8	
1.5	1.0	3.8	4.4	4.9	4.7	4.2	5.2	5.7	6.6
1	1.0	3.5	3.9	3.6	3.7	3.3	4.0	4.3	5.3
0.5	1.0	1.8	2.5	2.6	2.6	3.0	2.2	2.3	3.5

対照、直接的CD8 $\alpha\beta$ -PC5コンジュゲートのF/P比について補正したMFI比、0.860は、表23に列記される値より約16~17%高かった。対照対サンプルについてのシグナル対ノイズ及びMFI比を、試験1、画分42について図9A~9Bのグラフに要約する。

実施例20：CD4-ECD及びCD4-5X-Amdex-ECDコンジュゲートでの完全な血液のフローサイトメトリー分析

CD4-ECD及び試験2からのCD4-5X-Amdex-ECDコンジュゲートの1つのプールしたサンプルを、先の例と同様に、管当り（CD4-5X-Amdex-ECDについてELISA分析及びCD4-ECDについて A_{280} 値に基づいて）0.5 μg で始めて滴定した。その結果を、直接及び架橋化抗体-ECDコンジュゲートでのCD4+リンパ球についてのシグナル対ノイズ比及び平均チャンネルECD蛍光強度について図10に示す。9.7で最大になるMFI比を平均チャンネル位置から計算した。CD4-ECDコンジュゲートについて0.96のF/P比を用いて、対応する最大MFI比は10.1である。各々のコンジュゲート、LHSでのCD4-ECD及びRHSでのCD4-5X-Amdex-ECDの0.03 μg CD4抗体タイターについての代表的ヒストグラムを図11A~11Bに示す。

実施例21：CD56-PE及びCD56-5X-Amdex-PEコンジュゲートでの完全な血液のフローサイトメトリー分析

CD56（NKH-1）抗体コンジュゲートを、複数マーカー、増強及び非増強PE、フローサイトメトリー分析を証明するのに用いるために調製した。これにより、CD56-5X-Amdex-PEコンジュゲートについての蛍光増幅の確立が最初に必要とされた。0.125mg/mLの抗体濃

度の対照、CD56-PE、及び管当り8 μ gの抗体で始めた試験3からのCD56-5X-Amdex-PEを、1つの血液ドナーからの100 μ Lの完全な血液と、室温で30分、混合した。そのコンジュゲート中のCD56抗体の濃度はA₂₈₀値に基づいた。そのサンプルをQ-PREPにかけ、溶解し、消光し、次に1 $\times$ PBSで洗った。同じ装置設定でCoulter EPICS XL-MCLフローサイトメーターで得た対照に対する平均チャンネルPE蛍光強度を表23に列記する。それは、対照より14倍高い最大増強を示す。

表24

平均チャンネルPE蛍光強度						
画 分						
CD56, μ g	対照	37	39	40	41	42
8	8			112		
7			100			
6				104		
5		82			88	
4				87	75	
3		65	75	79		63
2		50	51	69	65	55
1		25		43		38
0.5						29
MFI 比, 画分／対照						
8	1.0			14.0		
7			12.4			
6				13.0		
5		10.3			11.0	
4				10.8	9.3	
3		8.1	9.4	9.9		7.8
2		6.2	6.3	8.6	8.1	6.9
1		3.1		5.3		4.8
0.5						3.6

実施例22：CD4-PE及びCD4-5X-Amdex-PEコンジュゲートでの完全な血液のフローサイトメトリー分析

10

20

30

40

50

リンパ球についての強度のしっかりとした分布で増強された蛍光標準を得るためにCD4抗体コンジュゲートを調製した。0.0625mg/mL抗体の濃度の対照CD4-PE、及び管当たりコンジュゲート中3 μ g抗体で始める試験4からのサンプル、CD4-5X-Amdex-PEを、室温で30分、1つの正常な血液ドナーからの100 μ Lの完全な血液と混合した。コンジュゲート中のCD4抗体の濃度は補正したA₂₈₀値に基づいた。その混合期間の後、全てのサンプルをQ-PREPにかけて赤血球を溶解し、消光した。そのサンプルを、500gで5分遠心し、その上清を捨て、そしてその細胞を1mLの1 $\times$ PBSに再度懸濁することにより1mLの1 $\times$ PBSで更に洗った。同じ装置設定でCoulter EPICS XL-MCLフローサイトメーターで得た対照に対する平均チャンネルPE蛍光強度を表25に示し、それは、13の最大MFI比を供する。

表25

平均チャンネルPE蛍光強度									
画 分									
CD 4, μ g	対照	36	37	38	39	40	41	42	43
3	44	443	499	513	478	471	393	357	298
2.5	42	420	489	507	467	482	392	371	323
2	42	393	451	463	425	448	396	362	319
1.5	42	352	379	384	412	425	376	355	321
1	41	281	296	293	343	331	319	327	316
0.5	40	78	220		234	269	265	265	273
MFI 比, 画分/対照									
3	1.0	11.0	12.4	12.7	11.9	11.7	9.7	8.8	7.4
2.5	1.0	10.4	12.1	12.6	11.6	12.0	9.7	9.2	8.0
2	1.0	9.7	11.2	11.5	10.5	11.1	9.8	9.0	7.9
1.5	1.0	8.7	9.4	9.5	10.2	10.5	9.3	8.8	8.0
1	1.0	7.0	7.3	7.3	8.5	8.2	7.9	8.1	7.8
0.5	1.0	1.9	5.5		5.8	6.7	6.6	6.6	6.8

実施例23：フローサイトメトリー分析における二重強度の同じ色のマーカーの使用

A. 同じ色の蛍光マーカーの対の重ね合わせた1つのヒストグラム—直接対増強標識

1つの直接的蛍光標識—抗体コンジュゲート及び別の同じ蛍光標識の増強されたアミノデキストラン架橋化蛍光標識—抗体コンジュゲートで、完全な血液中の白血球の相互に排他的な集団を計数する能力を、Coulter EPICS XL-MCLフローサイトメーターでの488.0nm Ar⁺レーザー励起で行った以下の例で示す。マーカーの第1の対は、重ね合わせた図12Aに示す単色ヒストグラムを得るために用いたCD56-PE及びCD4-5X-Amdex-PEである。蛍光強度スケールの10の4乗にある増幅されたせまく分布したCD4+集団は強度スケールの10の2及び3乗に広がる固有の弱く広いCD56+集団から十分に分離される。また、CD4+細胞からのバックグラウンド蛍光はCD56+細胞からのシグナルと干渉しないことに注意のこと。

直接的コンジュゲート、CD56-PE及びCD4-PEの対を用いることにより得られたヒストグラムの同様のセットを図12Bに示す。それは、CD56+及びCD4+分布の間のいくつかの重複を示す。

同様の重ね合わせたヒストグラムを、マーカーの対、CD19-PE及びCD4-5X-Amdex-PE、CD8 α β -PE及びCD4-5X-Amdex-PEについて図13A~14Bに、並びにCD56-PC5及びCD8 α β -5X-Amdex-PC5、CD19-PC5及びCD8 α β -5X-Amdex-PC5、CD4-PC5及びCD8 α β -5X-Amdex-PC5について図15A~17Cに示す。図15B、16B及び17Bは、標識された細胞数対蛍光強度分布のピーク間の最適な分離を示すためにCD8 α β -5X-Amdex-PC5マーカーの異なるタイターで得られたヒストグラムを示す。

CD4-PE、CD19-PE、又はCD8 α β -PEマーカーの、CD56-5X-Amdex-PEマーカーとの更なる組合せは、細胞のCD56陽性及び陰性集団についての固有の広い強度分布、及び細胞当りのCD4+又はCD8 α β +レセプターと比較した細胞当りのCD56レセプターの一般的に低い数のため、好ましい分離を供しなかった。これにより、より高い強度マーカーを増強したCD56マーカーと共に用いる場合、CD56とCD4又はCD8 α β 強度分布との間の重なりは更に大きくなる。

B. フローサイトメトリー分析における単色レーザー励起線を伴う4つのマーカー、二重色の使用

2つの直接的蛍光剤-抗体コンジュゲート、CD56-PE及びCD19-PC5、並びに2つのアミノデキストラン架橋化コンジュゲート、CD4-5X-Amdex-PE及びCD8 α β -5X-Amdex-PC5を用いて、Coulter EPICS XL-MCLフローサイトメーターでの488.0nm Ar⁺レーザー励起で行った正常な血液ドナーの白血球の散乱してゲートを通ったリンパ球集団におけるCD56+ (NK細胞)、CD4+ (T4細胞)、CD19+ (B細胞)、及びCD8 α β + (T8細胞)について分析した。FS対SS及び二色PE (CD56/CD4-5X-Amdex) 対PC5 (CD19/CD8 α β -5X-Amdex) 蛍光強度ヒストグラムを図18A及び図18Bに示す。また、細胞数対PC5 (CD19/CD8 α β -5X-Amdex) 蛍光強度ヒストグラムを図19の投影図に示す。各々、1つの直接的蛍光剤-抗体マーカー及び増強した強度のアミノデキストラン架橋した同じ色のマーカーを含む、2つの単色投影ヒストグラム (本図の上及び右側) は、10の2又は3乗における最大平均チャンネル蛍光強度での通常のマーカーからの、10の4乗の蛍光強度スケールにおける増強されたマーカーの優れた分離を示す。図18Bのヒストグラムで示されるように、陽性CD56、CD4、CD19、及びCD8 α β 細胞集団は二色ヒストグラム上に示されるイベントの90%を説明する。

C. フローサイトメトリー分析における単一レーザー励起線を伴う6つのマーカーの4色の使用

2つの更なる色のマーカー、CD3-ECD及びCD45RO-FITCを、二色の4つのマーカー、CD56-PE/CD4-5X-Amdex-PE及びCD19-PC5/CD8 α β -5X-Amdex-PC5を既に含む完全な血液と混合した。Q-PREPにかけ、洗ったサンプルを、Coulter EPICS XL-MCLフローサイトメーターでの488.0nm Ar⁺レーザー励起にかけ；次に、25の異なる標的とされた白血球集団の分解能を示す図20A~20Dのヒストグラムのセットを得た。更に、7つのマーカーの4色の分析を、6つのマーカー実験において、CD3-ECDのかわりにマーカーの対、CD16-ECD及びCD3-5X-Amdex-ECDを加えることにより、単色レーザー励起線で得ることができた。

実施例24：更なるアミノデキストランの調製

A. 1X~5X置換化アミノデキストランの調製

これは、本質的に上述され、現在発行されている特許、米国特許第5,639,620号及び米国特許第5,707,877号に記載される通り行った。

T4-1X-PE及びT8 β -1X-PC5コンジュゲートの調製のための試験に用いた1X-Amdexの4つの組は、表26に列記される元素分析を示し、それらからデキストランの反応したグルコース単位当たり2つのプロパンジアミン基での置換の程度についての値が計算された。

10

20

30

40

表 26

Lot No.	% C	% H	% N	% O by diff.	置換の程度
-2213-18	40.49	6.58	0.69	52.24	1/44.8
-2145-26	42.53	6.52	1.01	49.94	1/31.9
-2249-50	43.58	6.50	0.82	49.10	1/40.5
-2326-75	43.05	6.68	1.17	49.54	1/27.8

lot-2326-75 1X-Amdexの分子量は、Viscotek (Houston, TX) 三重検出（屈折示数、粘度、光散乱）システムにより決定して、約1MDaであった。Viscotek三重検出システムは、モデルT-60示差粘度計／光散乱二重検出器及び670.0nmダイオードレーザーソースを伴うモデルLR40示差レーザー屈折計からなる。その方法及び分析の原理は、M.A. Haneyら（Today's Chemist at Work, 3 (11) : 39-43 (1994) 及びI. Hallら、Adv. Chitin Sci., 1 : 361-371 (1996)）に詳細に記載されている。より詳細については実施例34を参照のこと。

デキストラン名目上2,000,000MWのアミノ、Cat. No. D-7145はMolecular Probes, Inc., Eugeneから購入した。lot 6551-3についての分析データ：130アミン／モル。Viscotek三重検出システムによるアミノデキストランのこの組の分子量の測定は約3MDaを供した。それゆえ、 $3,000,000 \text{ g/mol} \div 162.1 \text{ g/mol}$ グルコースモノマー＝18,507グルコース単位／デキストラン分子又は $130 / 18,507 = 0.00702$ 、即ち約1／142の程度の反応グルコース単位当りの1つのアミン基での置換がある。Amdexの1つの組を、T4-Amdex-PE, T8 β -Amdex-PC5、及びT4-AmdexのECDコンジュゲートを調製するために3つのコンジュゲートに用いた。

B. 架橋化5X-Aminodextronの調製

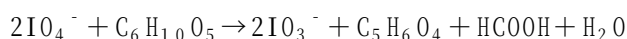
T-2Mデキストラン、500 g, 3.08mol (Sigma, St. Louis, MO) を、5000mLの蒸留水を含む1ガロンWaring blendor Nodel CB6適用ステンレススチールボールに移した。その混合物を、デキストランの白色固体が溶けるまで、典型的には約5分、最大速度の1／2で混合した。2000mLの蒸留水中1.25molのm-過ヨウ素酸 (NaIO₄, Sigma) の267.5 g の溶液を、5ガロン円柱状タンク内で激しく頭上で攪拌しながら、5～15分にわたってデキストラン溶液に加えた。過ヨウ素酸の添加を終えた後、その反応混合物を更に約4時間、室温で攪拌した。約5000～6000mLの蒸留水を更に反応混合物に4時間にわたって加え、溶液の粘度を減らした。4時間後12Lの反応容量は、 $7.40 \text{ nmho} \cdot \text{cm}^{-1}$ の最初の比導電率及び2.65の最初のpHを有した。次にその反応混合物を、管材アダプターキット、KA12-3Pを備えた中空繊維カートリッジ、A/G Technology Corp. モデルUFP-5-E-35, 5,000分子量カットオフ又はモデルUFP-30-E-35, 30,000分子量カットオフを用いて脱塩した。洗浄を約100リッターの蒸留水を用いて行い、約 $6 \sim 20 \mu \text{ mho} \cdot \text{cm}^{-1}$ の比導電率及び6.5～7.0のpHを有する洗った酸化デキストラン溶液6000～9000mLを得た。

デキストランアルデヒド溶液は、環境温度においてゼラチン化する傾向があるので、最初に、1, 3-ジアミノプロパン、DAP (Aldrich) を加える前にデキストランアルデヒドが完全に溶解することを確実にした。次に、DAPの最初の部分、70mLの純粋な液体を、約5分にわたって、脱塩した酸化デキストラン溶液に加えた。生じた溶液は直ちにゲルを形成し始め、それは、黄色の溶液として再溶解する前更に5～10分、続いた。次にその反応混合物を氷浴上において8～10℃の反応温度を維持し、激しく攪拌し、その後、30mL DAPの第2の部分5分にわたって加えた。更に10分、攪拌した後、DAPの第3及び最後の70mL部分をその反応混合物に加えた。全DAPの添加及び反応時間は45分であった。次に、1mM水酸化カリ

ウム水溶液700mL中の70g, 5.00molのホウ化水素ナトリウムを、その反応混合物に、8～10°Cで、約10～15分にわたって、頭上で攪拌しながら加えた。ホウ化水素ナトリウム添加を終えた後、その反応混合物を、黄色のシックベースの色が消えるまで更に2時間、攪拌した。次にその反応混合物を、中空繊維カートリッジを用いて脱塩した。全量7500mLの1回の試験で、最初の比導電率は30.3mmho-cm⁻¹であり、最初のpHは11.79であった。約80Lの蒸留水を用いて、10～20mmho-cm⁻¹の比導電率及び7.0～8.0のpHを有する架橋化5X-アミノデキストラン溶液約1600mLを作った。そのアミノデキストラン溶液を1.6μmガラスフィルターを通してろ過し、モデルTDS-00030-A, Dura-Dryマイクロプロセッサ制御凍結乾燥器 (FTS System, Inc.) において最少、72時間、凍結乾燥して、75～90g (15～18%収率) の薄片状の白～青白っぽい黄色の結晶を作った。

10

ロイコノストク・メセシテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) NRRL B-512により生産されたデキストラン中のグルコース単位の過ヨウ素酸酸化は、無水グルコース残基の95%、反応したグルコース単位のモル当り1モルのギ酸を遊離するとして、A. Jeanes and C.A. Wilham, *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 2655-2657 (1950) 及びthe Structure of Nrrl B-512 Dextran. Methylation Studies, J.W. Van Cleve, W.C. Schaefer, and C.E. Rist, *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 4435-4438 (1956) に示されている。これにより、2段階過ヨウ素酸酸化反応についての全体の酸化還元式は



であり、これは、完全な反応のために、1molグルコース単位又は2molアルデヒド単位当り2molの過ヨウ素酸を必要とする。しかしながら、2.5molのグルコース単位当り1molの過ヨウ素酸又は5molのグルコース単位当り2molの過ヨウ素酸が、置換の理論的程度が1/5である。即ちデキストラン中5単位のうち1のグルコース単位が2のアルデヒド基で置換されるように用いた。これにより、DAPでのデキストランの置換の最大の程度も、1/5であり、即ちデキストラン中5のグルコース単位中1が2のDAP基で置換され、DAPによるアルデヒド基の架橋がないことを仮定する。

20

代表的な5X-Amdexの組の特徴の比較を表27に要約する。

表 27

Lot No.	デキストラン スケール	DAP 反応	5 X- Amdex 収量	%N	置換の 程度*	Ab, PE コンジュゲートの の収率
2326-11	500 g	3 部	75 g	3.79	1/8.3	極めて優秀
2326-69	300	3 部	95	3.91	1/7.7	部分的
2776-75	300	1 部	62	4.50	1/7.1	なし
2847-15	300	1 部, 4 X	74	3.10	1/9.5	なし
11/6/97	100	3 部, pH 8.5 with aq. HCl	52	4.44 ; 2.81%Cl	1/6.1	なし
11/6/97, ion exch. & acet. fract.				3.82 ; <0.5%Cl	1/8.3	部分的
1/5/98	500	3 部	87	4.15	1/6.9	優秀
2/2/98	500	2 部, ~1/3 DAP	45	3.48	1/8.2	少量 1 X- Amdex 様

* いずれの架橋についても補正なし

全ての組を、5,000Da分子量カットオフ中空繊維カートリッジでメンブランろ過した。但し、2/2/98の組については、30,000Da分子量カットオフカートリッジを用いた。いくつかの5X-Amdexの組は、更なる記述を必要とする。特に、DAP及びホウ化水素ナトリウムを加えた後の11/6/97組の反応混合物を塩酸水溶液でpH8.5に調節した。次にそれを脱塩し、濃縮し、そして上述の方法で凍結乾燥した。5X-Amdex, 11/6/97についての元素分析は、C=39.72%, H=7.77%, N=4.44%, Cl=2.81%, O(差による)=45.26%であった。実際の分析に基づく経験式は $C_{10.4}H_{24.3}O_{8.9}NCl_{0.25}$ であった。そのクロラ

イド分析は、4つの全アミン(第1級及び第2級)基のうちの1つが塩化物対イオンを有することを示した。一級アミン基のみが凍結乾燥前に反応混合物が脱塩された中性pH近くでプロトン化されるであろうと仮定すると、これは、アミノデキストラン中のジアミノプロパン基の50%がデキストラン鎖間の橋かけ又は架橋基であることを意味する。これらの橋かけDAP基は2つの2級アミノ基のみを含む。これにより、アミノデキストランの唯一の置換化グルコース残基についての理想化した反復単位は以下の配列を含む:

(a) 1の架橋DAP; 2の非架橋DAP; 2の架橋DAP; 2の非架橋DAP, 1の架橋DAP;

(b) 2の架橋DAP; 2の架橋DAP; 4の非架橋DAP; 又は(a)もしくは(b)配列のいずれかの特定の置換。

凍結乾燥したアミノデキストランヒドロクロライドの一部を蒸留水に溶かし、その上清の

比導電率が最小になるまで、混合床 (H^+ , OH^- 形態)、Bio-Rad AG 501-X8樹脂でバッチ様に脱イオン化した。その樹脂を、その懸濁液のレーヨン布でのろ過により除去し、そのろ液中のアミノデキストラン (約50mg/mL) を、アセトン10~43%カット) により分画した。その固体沈殿物をアセトンで洗い、シリカゲル下で真空デシケーター中で乾燥させた。この脱イオン化した分画した材料の元素分析は、C = 45.55%, H = 7.03%, N = 3.82%, ClC 0.5%, O (差による) = 43.60%を供し、これらは、塩化物イオンが先の方法において除去されていることを示す。

コンジュゲートの最も優れた収率を供する2326-11, 5X-Amdexの組についての元素分析は、C = 44.45%, H = 7.20%, N = 3.79%, O (差による) = 44.56%であった。その試験式は $C_{13.7}H_{26.4}O_{10.3}N$ であり、それは、1.5のジアミノプロパン置換化糖環 ($C_{9.5}H_{21}O_2N_3$) の単位当たり5単位のグルコース又は1/6のデキストラン中の置換の程度に基づく式 $C_{13}H_{24}O_9N \cdot H_2O$ と同様であった。優れたコンジュゲートの収率を供する1/5/98 5X-Amdex組についての分析は、C = 41.38%, H = 7.81%, N = 4.15%, O = 45.64%, I = 97ppm, B = 590ppmであった。その経験式は、 $C_{11.6}H_{26.1}O_{9.6}N$ であり、それは、1.5ジアミノプロパン置換化糖環の1単位当たり4単位のグルコースに基づく式 $C_{11.2}H_{20.3}O_{7.3}N \cdot 2H_2O$ と同様であった。これにより、デキストラン中のジアミン置換の程度は1/5であり、それは、置換の理論的程度について計算した値と十分に一致した。Viscotek 三重検出システムによる lot 2326-11及び lot 1/5/98 5X-Amdexの分子量の測定は、各々400,000及び70,000Daであった。

架橋化5X-Amdexの組を調製するための全反応容量、デキストラン濃度、及び反応時間を表28に要約する。

表28

Lot No.	容量	濃度 mg/ml	DAP	NaBH ₄	
			Rxn. 時間	Rxn. 時間	90° LS
2326-11	7000mL	71.4	45分	2 時間	1.2×10^5
2326-69	6000	50.0	60	2.5	8.3×10^4
11/6/97	1700	58.8	45	2	2.5×10^4
1/5/98	9100	54.9	45	2	7.0×10^4
2/2/98	8000	62.5	40	2	6.0×10^4

水溶性 T-2M デキストランから最も高い分子量の架橋化アミノデキストランを調製するための最適な条件は、環境温度でゼラチン化がおこる前に、酸化し脱塩化したデキストランアルデヒド溶液をその最も低い容量に濃縮し、そして次にDAPを3部に分けて、最初に加えた後に厚いゲルを形成するように加え、15分、そのゲルを洗って溶かし、そして更にDAPの他の2部を加えることにより500g デキストランスケールで得た。

90°の光散乱 (LS) 強度を、5つのみがいたスライドを伴う、1cm長クォーツセル内で10mg/mLで先の5X-Amdex組の全てについてCoulter N4MD Analyzerで測定した。これも表4に列記する。更に、10mg/mLでの出発デキストラン、T-2Mについての90°LSは $7.4 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ の範囲であり；そして10mg/mLの1X-Amdex組は $2.9 \sim 3.7 \times 10^4$ の範囲であった。蛍光増幅において最も有効であったコンジュゲートを調製することにおける最も優れた結果は、全般的に、最も高い光散乱強度を示し、最も高い酸化デキストランの濃度で調製された材料で得られた。

実施例25：抗CD8αβ抗体-PC5コンジュゲートの調製

直接的モノクローナル抗体 (MCA) - 蛍光剤 (PE, PC5, ECD) コンジュゲートは、イミノチオラン活性化PE (又はPC5; ECD) のスルホ-SMCC活性化抗体と、又はスルホ-SMCC活性

化PE（又はPC5；ECD）のDTT（ジチオトレイトール）還元化抗体とのコンジュゲーション反応の確立された手順により調製されるように、Coulter Corporation又はImmuntechからほとんどの抗体について市販されている。これらのコンジュゲート中のMCA、蛍光剤のモル比は約1：1である。IgGモノクローナル抗体のPC5へのコンジュゲーションは、PC5のスルホスクシニミジル4-〔N-マレイミドメチル〕シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-SMCC）活性化及びジチオトレイトール（DTT）でのヒンジ領域中のジスルフィド結合の還元による抗体の活性化により達成された。

A. モノクローナル抗体の活性化

14.04mg/mLの濃度のMCA 50mgのために、3.549mLのMCA濃縮物が要求された。1×PBS中のDTTの15.4mg/mL溶液を調製し、DTT：MCA=300：1の活性化比で用いた。これにより、5mg/mLのMCAを含む10mLの全容量を作るために、5.451mLの1×BBS緩衝液（20mMホウ酸、150mM塩化ナトリウム、pH8.8）を反応容器に入れ、それに、25°Cで攪拌しながら3.549mLのMCA溶液を加え、次に1000mLのDTT溶液をゆっくりと加えた。その容器内の反応混合物を25°Cで20分、インキュベートし、その後、2.5mLのMES（2-〔N-モルホリノ〕エタンスルホン酸）消光緩衝液（50mM MES, 5.0M過塩素酸ナトリウム、4mM EDTA（エチレンジアミンテトラ酢酸）、pH5.8）を加え、その反応混合物を更に2分、インキュベートした。次に、直ちに、活性化MCAサンプルを、MESカラム緩衝液（50mM MES, 100mM過塩素酸、4mM EDTA, pH6.0）で平衡化した200mL G-50 Sephadexカラムの頂上に適用した。活性化MCAをMES緩衝液でカラムから溶出し、280nmにおける最初の吸収ピークの画分を収集した。mg/mLにおける活性化MCA濃度を A_{280} 値により決定した。1.394mg/mL（47.4mg）の活性化MCA溶液34mLを得た。

10

20

B. PC5の2-イミノチオランでの活性化

PC5, PE（R-フィコエリトリン（紅藻））-5'シアニタンデムコンジュゲートを、1992年12月15日に発行された米国特許第5,171,846号に記載されるように調製した。1×BBS緩衝液中14.69mg/mLの濃度のPC5の55mgのために、3.744mLのPC5濃度が要求された。1×BBS緩衝液中スルホ-SMCCの4.5mg/mL溶液を調製し、スルホ-SMCC：PC5=40：1の活性化比で用いた。これにより、全量11mLで5mg/mLのPC5を作るために、5.936mLの1×BBS緩衝液を反応容器に入れ、それに25°Cで攪拌しながら3.744mLのPC5溶液を加え、次に0.44mLのNEM（N-エチルマレイミド、1×BBS緩衝液中31.25mg/mL）溶液をゆっくりと加えた。その容器内の反応混合物を30分、インキュベートした。次に0.88mLのスルホ-SMCC溶液（4.5mg/mL）をその混合物に加え、それを、更に60分、インキュベートした。最後のインキュベーション時間の終りに、1×BBS緩衝液中1Mの塩化アンモニウム1.1mLをその混合物に加え、更に2分、インキュベートした。次に直ちに、活性化PC5を、MOPS（3-〔N-モルホリノ〕プロパンスルホン酸）カラム緩衝液（50mM MOPS, 100mM過塩素酸ナトリウム、4mM EDTA, pH7.0）で平衡化した200mL G-50 Sephadexカラムに充填した。その活性化PC5をそのカラムからMOPS緩衝液で溶出し、そのカラムからの最初の色のピークを収集した。活性化PC5の1.962mg/mLの濃度を $A_{565.5}/8.167$ として決定した。活性化PC5をMOPS緩衝液で1.5mg/mLに希釈して全量32.7mLを供した。

30

C. PC5とのMCAのコンジュゲーション

コンジュゲーションのために、等量（32.7mL）の1.4mg/mLの活性化MCA及び1.5mg/mLの活性化PC5を、攪拌中の活性化PC5に活性化MCAを加えることにより混合した。その反応混合物を25°Cで2時間、インキュベートした。その混合時間、終りに、1×BBS緩衝液中31.25mg/mLのNEM 2.642mLを更にその反応混合物に加え、それを更に5分、ローラーで混合した。

40

D. MCA-PC5コンジュゲートの精製

1×PBS, 2mM EDTA, pH7.2緩衝液で平衡化したSuperdex 2000 prepグレードカラム（MCA 1mg当りカラムの3.4mL又は318mL）を調製した。MCA-PC5反応混合物をSuperdex 200カラム容量、4.33mLの2%未満に濃縮した。そのサンプルをSuperdex 200 pgカラムに充填し、119mL/hrで1×PBS, 2mM EDTA, pH7.2緩衝液で溶出した。 $A_{280}/A_{565.5}$ 比を各々の画分について計算した。遊離PC5が溶出する前2画分までの0.43からの比の全ての画分をプールし

50

た。例えば、そのプールしたCD8 α β -PC5画分、25mLを、Amicon YM30膜を用いて、その濃縮物を1 $\times$ PBS, 0.1%ナトリウムアジド、0.1mM EDTA緩衝液でろ過し、そしてそのCD8 β -PC5コンジュゲートを4 $^{\circ}$ Cで15分、1800 $\times$ gで遠心することにより、カラム容量の1%未満の3.45mLの容量に濃縮した。このプールしたサンプルの100倍希釈物は、 $A_{565.5} = 0.4809$ 又は $(0.4809 / 8.167) \times 100 = 5.888\text{mg/mL}$ のPC5及び20.31mgのCD8 α β -PC5コンジュゲート中の全PC5、並びに $A_{280} = 0.1513$ 又は $[0.4809 / 5.476 (\text{PC5's } A_{565.5} / A_{280})] \times 100 = 6.349\text{mg/mL}$ のCD8 α β 及び21.90mgのCD8 β -PC5コンジュゲート中の全CD8 α β を供した。それゆえ、PC5/CD8 β のモル比は、 $(20.31\text{mgのPC5} / 240,000) // (21.09\text{mgのCD8}\alpha\beta / 160,000) = 0.618$ である。式： $\text{MCA:PC5} = [A_{280} / A_{565.5} (\text{コンジュゲート}) - A_{280} / A_{565.5} (\text{染料})] \times 8.77$ に基づく補正したF/P比は0.864である。

10

同様の方法を、0.96のF/P比を有するCD4-ECDコンジュゲートを調製するために用いた。

実施例26：抗体-アミノデキストラン-フィコビリプロテインコンジュゲートの調製

更なるコンジュゲートを、以下の事項を除いて、実施例27～32に記載される実験に用いるために本質的に先の3つに記載されるように調製した。

1X-Amdex組のために、4:1:1=染料:Ab:Amdexの先の5X-Amdex試験又は25.713:4.287:10=染料:Ab:Amdexの重量比として10mg Amdexスケールで用いた。

Amdex-Molecular Probesのために、Amdexに対して50%未満の染料及びAbを、モル比が2:0.5:1=染料:Ab:Amdexとなり、重量比が10mg Amdexスケールで12.856:2.143:10=染料:Ab:Amdexとなるように用いた。

20

架橋された5X-Amdexのために、先に列記された、1X-Amdex試験に用いたのと同じ染料:Ab:Amdexモル比を適合させた。

実施例27：抗-CD8 α β 抗体-アミノデキストラン-PC5コンジュゲート

コンジュゲーションを、モル比が2:0.5:1=PC5:CD8 α β 抗体となり重量比が10mg Amdexスケールで12.856:2.143:10となるように、アミノデキストラン（名目上2,000,000Da, 130アミン/分子又は約1/100程度の反応グルコース単位当りの1つのアミン基での置換、Cat. No. D-D7145, Molecular Probes, Inc.からのlot 6551-3）に対して50%少い染料及び抗体

A. スルホ-SMCCでのアミノデキストランの活性化

0.018mLの20 $\times$ PBS緩衝液を加えて1 $\times$ PBS溶液を作った蒸留水中のAmdexの29.412mg/mL溶液0.340mLを1 $\times$ PBS中10mg/mLのスルホ-SMCC溶液0.180mLで活性化し、それに0.462mLの1 $\times$ PBS溶液を加えて10mg/mLの全Amdex濃縮物を作った。その混合物を室温で約1時間、ローラーで混合した。混合を終えた後、その反応混合物を直ちに、1 $\times$ PBSで平衡化した60mL G-50 Sephadexカラムの頂上に適用した。そのサンプルを1 $\times$ PBSを用いて溶出し、約2mLの画分に集めた。280nmにおける最初の吸収バンドは、焦点可視光ビーム（Model 650, Cambridge Instruments, Inc., Buffalo, NY）でのTyhdall散乱により確認して、高分子量の活性化Amdexを含んでいた。これらの画分をプールして約5.8mLの全スルホ-SMCC活性化Amdexを供した。

30

B. 抗体の活性化

CD8 α β モノクローナル抗体を、1 $\times$ PBS中2mg/mLのイミノチオランの溶液0.033mL及び0.219mLの1 $\times$ PBSを0.081mLのCD8 β 濃縮物（61.67mg/mL）に加えることにより活性化した。15mg/mLの抗体濃度及び15倍大きいイミノチオランモル濃度を有する生じた溶液を約1時間、環境温度で混合した。次にその反応混合物を1 $\times$ PBSで平衡化した60mL G-50 Sephadexカラムでのクロマトグラフィーにかけ、そのサンプルを、1 $\times$ PBSを用いて溶出した。最初のバンドピーク画分は、全部で4.67mgのIT-CD8 α β 抗体誘導体を含む1.113mg/mL抗体溶液約4.2mLを作り出した。

40

C. PC5の活性化

PC5を、1 $\times$ PBS中イミノチオランの2mg/mL溶液0.097mL及び0.098mLの1 $\times$ PBSを0.179mLのPC5濃縮物（83.625mg/mL）に加えることにより活性化した。40mg/mLのPC5濃度及び22.5倍大きいイミノチオランモル濃度を有する生じた溶液を室温で約1時間、混合した。次に

50

その反応混合物を、1×PBSで平衡化した60mL G-50 Sephadexカラムの頂上に適用し、そのサンプルを1×PBSで溶出した。最初バンドピーク画分は、6.2394の A_{565}/A_{280} 比で約3.9mLの3.35mg/mL PC5を供し、それは、全部で13.065mgのIT-PC5を含んでいた。

D. IT-CD8 α β 及びIT-PC5のスルホ-SMCC-Amdexへのコンジュゲーション

15mgの全タンパク質：10mgのAmdex

1.926mLの1.113mg/mLのIT-CD8 α β 溶液（約2.143mg抗体）を最初に3.839mLの3.35mg/mLのIT-PC5溶液（約12.856mgのIT-PC5）と混合し、それに、5.8mLのスルホ-SMCC-Amdex溶液（約10mg Amdex）を加え、その全体の混合物を16~24時間、ローラーで混合した。

混合を終えた後、その全量の混合物を測定し、この容量の0.120倍の1×PBS中5mg/mLのL-システインを各々のコンジュゲーション混合物に加えた。次にそのL-システイン含有混合物を更に15分混合していずれの未反応のスルホ-SMCC成分もブロックするように混合した。最後に、全混合物量の0.120倍の量の1×PBS中20mg/mLのイオドアセトアミド及び全混合物容量の0.020倍の量の1Mホウ酸緩衝液、pH9.8を各々の混合物に加えた。生じた混合物を、いずれの未反応のスルヒドリル基をブロックするように約30分、混合した。

E. CD8 α β -Amdex-PC5コンジュゲートの精製

全量のコンジュゲーション混合物を、冷却Beckman J-6B遠心機を用いて2000rpmで約20分、サンプルを含むAmicon Centri-Prep 30管を遠心することにより約2.5mLに減らした。

そのサンプルを1×PBSで平衡化したBio-Gel A-15mアガロースカラム（2.5cm×48cm）の頂上に入れ、溶離液として1×PBSを用いてクロマトグラフィーにかけた。約3.6mL容量の溶出液画物を、滴下収集モードで動作するPharmacia LKB FRAC-100コレクターを用いて収集した。その画分を、280nmで動作するLKB2138 Uvicord Sモニターを用いてモニターした。 A_{280} 対画分番号の記録を示すクロマトグラムを図22A及び22Bに示す。カラムから溶出した最初のせまく強いバンドはCD8 α β -アミノデキストラン-PC5コンジュゲートを含んでいた。その最初のピークの強度の3分の1未満の低い強度の肩部分は約1:1のPC5：アミノデキストランコンジュゲート及び過剰なPC5を含んでいた。中~低強度の十分に分離した第3のバンドは低分子量の過剰なブロッキング試薬のせいであった。

CD8 α β -Amdex-PC5コンジュゲートについて収集した画分を、1mm長セルを用いて565.5及び280nmで分光学的に分析した。コンジュゲート中のmg/mLでのPC5の濃度は、式： $A_{565.5}/8.167$ を用いることにより、565.5nmにおける吸光度から得た。最初のせまいピーク下の画分19~24についてのデータを表29に列記する。

表29. CD8 β -Amdex -PC5 コンジュゲーション

画分	PC5, mg/mL	容量/画分	PC5, mg
19	.148	3.6 mL	0.533
20	.371		1.336
21	.301		1.084
22	.172		0.619
23	.107		0.385
24	.079		0.284
			4.241mg(コンジュゲート中の全量)

12.73mg I.T.-PC5をコンジュゲーションに用いたので、

収率 = $4.241\text{mg} \div 12.73\text{mg} \times 100 = 33.32\%$

実施例28：抗CD4抗体－アミノデキストラン－ECDコンジュゲートの調製

これらのコンジュゲートは、IgG1クラスの抗CD4抗体をITで活性化し、CD8 α β 抗体のかわりにコンジュゲーションに用い、そしてタンデムPE－Texasレッド又はECD蛍光染料をPC5のかわりに用いた他は、実施例27に記載される通り調製する。試験2において、IT－ECD（12.856mg）、IT－CD4（2.143mg）を、スルホ－SMCC－Amdex（10mg）と、1.10, 0.184及び0.857mg/mLの濃度でコンジュゲーションの間に各々混合した。IT－ECD（ $A_{565.5} / A_{280}$ ）比は5.424であった。コンジュゲーション混合物を約1.5mLに濃縮し、A－15mカラムの頂上に適用した。試験2において最初のせまいピーク下の画分当り約3.6mLで収集された画分についてのデータを表30に列記する。

表30. CD4－Amdex－ECD コンジュゲート

画 分	ECD , mg/mL	容量／画分	ECD , mg
20	.194	3.6mL	0.698
21	.505		1.818
22	.382		1.375
23	.203		0.731
24	.131		0.472
25	.099		0.356
26	.085		<u>0.306</u>

5.756mg(コンジュゲート

中の全量)

12.858mg I.T.-ECDをコンジュゲートに用いたので、収率 = $5.756\text{mg} \div 12.858\text{mg} \times 100 = 44.77\%$

実施例29：抗CD4抗体－アミノデキストラン－PEコンジュゲート

その方法は、IgGクラスの抗CD4抗体及びPEをITで活性化し、CD8 α β 抗体及びPC5のかわりにコンジュゲーションに用いた他は実施例27に記載されるのと同じであった。試験3において、反応物、3.890mLの330mg/mLのIT－PE（12.856mg）を最初に4.75mLのスルホ－SMCC－Amdex（10mg）溶液と混合し、次にそれに、3.058mLの0.701mg/mLのIT－CD4（2.143mg）を加えた。IT－PE（ A_{565} / A_{280} ）比は5.800であった。そのコンジュゲーション混合物を約1.0mLに濃縮し、A－15mカラムの頂上に適用した。試験3における最初のせまいピーク下の画分当り3.6mLで収集した画分についてのデータを表31に列記する。

表31. CD 4 - Amdex - PEコンジュゲート

画分	PE, mg/mL	容量／画分	PE, mg
18	.035	3.6mL	0.126
19	.282		1.015
20	.417		1.501
21	.292		1.051
22	.163		0.587
23	.106		0.382
24	.082		<u>0.295</u>
			4.957mg(コン ジュゲート中 全量)

12.856mg I.T.-PEをコンジュゲーションに用いたので、収率＝4.957mg÷12.856mg×100＝38.56%

実施例30：抗体－5X－Amdex，X連結化PE及びPC5コンジュゲートの調製

1X－Amdex試験と同様、低収量のT4－5X－Amdex，XL－PEコンジュゲートを得た。5X－Amdex，XLの1／5／98の組とのCD8αβ－5X－PC5コンジュゲートは、Bio-Gel A－15mカラムからの強い最初のバンドを供したが、青－紫コンジュゲートのバルクがカラムの頂上でゲル内で凝集し、溶出できなかったので収率は低かった。この試験における最初のせまいピーク下の画分当り約3.6mLで収集したデータを表32に列記する。

表32. CD 8 α β - 5 X - Amdex - PC 5 コンジュゲート

画分	PC 5, mg/mL	容量／画分	PC 5, mg
20	.164	3.6mL	0.590
21	.365		1.314
22	.303		1.091
23	.212		0.763
24	.161		0.580
25	.137		<u>0.493</u>
			4.831mg(コン ジュゲート中 全量)

25.724mg I.T.-PC5をコンジュゲーションに用いたので、収率＝4.831mg÷25.724mg×100＝18.78%

実施例31：オリゴヌクレオチド-Amdex-蛍光染料コンジュゲートの調製

A. 直接的遺伝子増幅試薬

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロライド (EDAC) との反応により5'末端ホスフェートを通してDNA(オリゴ)の水溶性カルボジイミドを調製し; イミダゾール緩衝液中で反応させて5'-ホスホルイミダゾリドを生成し; そして次にアミノデキストランと反応させてホスホルアミデート結合を供し、そしてG-50 Sephadexでコンジュゲートを精製する。次に、スルホ-SMCCを含むコンジュゲート中のアミノデキストランの残りのアミノ基を活性化させ; 2-イミノチオランで染料(PE, PC5、又はECD)を活性化し; 2つの活性化成分をコンジュゲートし、そしてA-15mコンジュゲートを精製する。先の合成法の記述について、例えば、Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press, San Diego, CA, 1996, Chap. 17, pp. 639-671; and Pierce Catalog and Handbook, Life Science and Analytical Research Products, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1994/1995を参照のこと。

B. 間接的遺伝子増幅試薬

(a) 5'末端ホスフェートを通して水溶性カルボジイミドを最初に形成し、イミダゾール緩衝液と反応させて5'-ホスホルイミダゾリドを供し、そして次にエチレンジアミンと反応させてホスホルアミデート結合を形成することによりアミノ5'-オリゴを調製し; オリゴ誘導体をG-25 Sephadexで精製し; (b) 1×PBS, pH7.2~7.3中の、ビオチニル化剤、例えばビオチンの水溶性N-ヒドロキシスルホスクニミドエステルをアミノ5'-オリゴと反応させることにより5'-末端ホスフェート基を通してビオチニル化DNA又はオリゴを調製し; 産物をG-25 Sephadexで精製し; (c) 抗体をタンパク質ストレプトアビジン又はアビジンで置換することを除いて抗体-Amdex-PEコンジュゲートの調製と同様の方法により(ストレプトアビジン又はアビジン)-Amdex-PE(PE又はECD)コンジュゲートを調製し; そして次に(b)及び(c)を組み合わせて、精製された複合体DNA A(オリゴ)-アビジン-Amdex-PEを用いてDNA又はRNAのサンプルを分析する。

実施例32：MHC/ペプチド-Avidin-Amdex-蛍光染料コンジュゲートの調製

そのストラテジーは、実施例31Bに記載される間接的遺伝子増幅試薬の調製と同様である。(a) Tracking of Antigen-specific Helper T Cell Response, M.G. McHeyszer-Williams, J.D. Altman, and M.M. Davis, Current Opinion in Immunol. 278-284 (1996)に記載されるようにビオチニル化MHC/ペプチド複合体を調製し; (b) 抗体をタンパク質ストレプトアビジン又はアビジンで置換することを除いて抗体-Amdex-PEコンジュゲートと同様の方法により(ストレプトアビジン又はアビジン)-Amdex-PE(PC5又はECD)コンジュゲートを調製し; そして次に(a)及び(b)を組み合わせて、精製したコンジュゲートMHC/ペプチド-(ストレプトアビジン又はアビジン)-Amdex-PEを用いて、TCRへの結合を分析する。

実施例33：コンジュゲートで染色した細胞についてのフローサイトメトリーの結果

直接又はアミノデキストランで架橋した蛍光抗体コンジュゲートの、100 µLの完全な血液との混合物を室温で10分、インキュベートし、次に溶解してCoulter Q-PREPで消光し、(2mLの1×PBSを加え、500 gで5分、遠心し、その上清を捨て、そして細胞を1mLの1×PBSに再度懸濁することにより)1×PBSで1回洗い、そしてフローサイトメーター(Coulter Epics XL-MCL)で分析した。コンジュゲートのタイターは、通常、サンプルのA₂₈₀値により決定して0.5 µgの抗体であった。

A. CD4-1X-Amdex-PEの組

表 33

	Mnl-X			S/N	S/N Ampl. Ratio	Neg. Ampl. Ratio	Pos. Amplif. Ratio
	Neg	Mnl	Pos Mnl				
2213-18 1 X	画分21	0.15	59	396	1.0	0.8	0.8
	22	0.14	90	639	1.7	0.8	1.3
	23	0.15	101	670	1.8	0.8	1.4
	24	0.15	123	802	2.1	0.8	1.7
	25	0.17	106	630	1.6	0.9	1.5
	26	0.19	289	1512	3.9	1.0	4.1
	27	0.21	275	1286	3.4	1.2	3.9
	28	0.20	264	1304	3.4	1.1	3.7
	29	0.24	258	1098	2.9	1.3	3.6
	30	0.23	248	1073	2.8	1.2	3.5
2145-26 1 X	21	0.20	232	1143	3.0	1.1	3.3
	22	0.22	265	1231	3.2	1.2	3.7
	23	0.22	272	1238	3.2	1.2	3.8
	24	0.23	283	1216	3.2	1.3	4.0
	25	0.21	261	1221	3.2	1.2	3.7
	26	0.27	250	932	2.4	1.4	3.5
	27	0.29	238	818	2.1	1.6	3.3
	28	0.33	223	676	1.8	1.8	3.1
	29	0.29	211	736	1.9	1.5	3.0
	30	0.28	195	691	1.8	1.5	2.7
2249-50 1 X	20	0.20	143	732	1.9	1.0	2.0
	21	0.22	196	897	2.3	1.2	2.8
	22	0.21	204	969	2.5	1.1	2.9
	23	0.24	198	840	2.2	1.3	2.8
	24	0.25	190	777	2.0	1.3	2.7
	25	0.26	181	704	1.8	1.4	2.5
	26	0.27	175	646	1.7	1.5	2.5
2326-75 1 X	22	0.18	138	773	2.0	1.0	1.9
	23	0.21	229	1113	2.9	1.1	3.2
	24	0.19	252	1318	3.4	1.0	3.5
	25	0.19	238	1248	3.3	1.0	3.3
	26	0.20	211	1055	2.8	1.1	3.0
	27	0.19	190	978	2.6	1.0	2.7
	28	0.23	203	865	2.3	1.3	2.8
	29	0.22	176	797	2.1	1.2	2.5
	30	0.25	169	688	1.8	1.3	2.4
CD 4 - 5 X - PE		0.21	177	837	2.2	1.1	2.5
CD 4 - PE		0.19	71	383	1.0	1.0	1.0

CD4, PEとの1X Amdexコンジュゲートの4の組について列記される陽性増幅比は、コンジュゲーション混合物のBio-Gel A-15mクロマトグラフィーに現れる低い収率の最初のバンド又は肩部分の中央部分の画分中4.1, 4.0, 2.9及び3.5の最大値を示す。最も高い増

10

20

30

40

50

幅は、弱い最初のバンドよりむしろ第2のバンドの肩部分上の画分における組2213-18及び2145-26コンジュゲートで得られた。しかしながら、最も大きい増幅と最初のバンドとの間の1:1対応はlot 2249-50及び2326-75コンジュゲートで観察された。

B. CD8 α β -1X-Amdex-PC5の組

表 34

		Mnl-X						%	
		Neg Mnl	Pos Mnl	S/N	S/N Ampl. Ratio	Neg. Ampl. Ratio	Pos. Amplif. Ratio	Neg	Pos
2213-18 1 X	画分21	0.19	33	176	0.6	1.0	0.6	71	29
	22	0.25	75	307	1.1	1.3	1.4	70	30
	23	0.29	88	305	1.1	1.5	1.6	70	29
	24	0.28	86	307	1.1	1.5	1.6	70	30
	25	0.28	80	283	1.0	1.5	1.4	70	30
	26	0.29	86	296	1.0	1.5	1.6	71	29
	27	0.28	82	288	1.0	1.5	1.5	69	31
	28	0.30	86	290	1.0	1.5	1.5	71	29
	29	0.29	84	289	1.0	1.5	1.5	71	29
	30	0.30	81	272	0.9	1.6	1.5	71	29
2145-26 1 X	20	0.16	22	135	0.5	0.8	0.4	72	28
	21	0.19	39	200	0.7	1.0	0.7	71	29
	22	0.22	52	235	0.8	1.1	0.9	71	29
	23	0.21	57	270	0.9	1.1	1.0	71	29
	24	0.22	57	262	0.9	1.1	1.0	71	29
	25	0.25	45	181	0.6	1.3	0.8	72	28
	26	0.23	64	277	1.0	1.2	1.2	70	30
	27	0.24	66	271	0.9	1.3	1.2	71	29
	28	0.25	43	173	0.6	1.3	0.8	71	29
	29	0.26	68	258	0.9	1.4	1.2	70	30
2249-50 1 X	22	0.31	92	297	1.0	1.6	1.7	70	30
	23	0.33	118	359	1.2	1.7	2.1	69	31
	24	0.33	123	368	1.3	1.7	2.2	70	30
	25	0.34	124	364	1.3	1.8	2.2	69	31
	26	0.36	113	310	1.1	1.9	2.0	71	29
	27	0.36	102	282	1.0	1.9	1.8	71	29
2326-75 1 X	21	0.27	175	652	2.2	1.4	3.2	70	30
	22	0.36	193	539	1.9	1.9	3.5	70	30
	23	0.41	193	472	1.6	2.1	3.5	71	29
	24	0.36	170	470	1.6	1.9	3.1	71	29
	25	0.33	153	462	1.6	1.7	2.8	71	30
	26	0.35	138	398	1.4	1.8	2.5	70	30
	27	0.32	134	423	1.5	1.7	2.4	71	29
CD8 α β -5X-PC5		0.44	664					73	27
CD8 α β -PC5		0.19	55	290	1.0	1.0	1.0	73	28

CD8 α β , PC5との組2213-18及び2145-26 1X-Amdexコンジュゲートは、直接的CD8 α

β -PC5対照とほぼ同じか又はそれより少しだけ良い平均チャンネル蛍光強度の最初のバンド画分を供した。組2249-50及び2326-75の1X-Amdexとのコンジュゲートは、各々2.2及び3.5でピークがある増幅を示し、最初のクロマトグラフィーバンドのピークにおける画分に対応した。

C. 分子プローブAmdex, CD4-Amdex-PEコンジュゲート

表 35

		Mnl-X		S/N	S/N Ampl. Ratio	Neg. Ampl. Ratio	Pos. Amplif. Ratio	%	
		Neg Mnl	Pos Mnl					Neg	Pos
0.3X-mp-2m	fxn 18	0.47	501	1072	3.6	1.9	6.9	46	54
	fxn 19	0.51	624	1226	4.1	2.1	8.5	45	55
	fxn 21	0.44	508	1168	3.9	1.8	7.0	45	55
	fxn 22	0.37	426	1157	3.9	1.5	5.8	55	45
	fxn 23	0.42	351	837	2.8	1.7	4.8	45	55
	fxn 24	0.43	319	738	2.5	1.8	4.4	51	49
2145-26 1X	0.5 μ g	0.24	202	843	2.8	1.0	2.8	55	45
CD4-5 xPE.	1 μ g	0.54	311	576	1.9	2.2	4.3	47	53
	0.1 μ g	0.17	5	32	0.1	0.7	0.1	46	54
CD4-PE	1 μ g BP	0.24	73	300	1.0	1.0	1.0	46	54

D. CD4-Amdex-ECDコンジュゲート

表 36

		Mnl-X		S/N	S/N Ampl. Ratio	Neg. Ampl. Ratio	Pos. Amplif. Ratio	%	
		Neg Mnl	Pos Mnl					Neg	Pos
0.3X-mp-2m	fxn 19	0.21	129	624	2	1.0	2.2	63	37
	fxn 20	0.23	240	1032	4	1.1	4.1	63	37
	fxn 21	0.24	243	1016	4	1.1	4.2	62	38
	fxn 22	0.24	228	936	3	1.1	3.9	63	37
	fxn 23	0.24	200	823	3	1.1	3.4	63	37
	fxn 24	0.26	191	733	3	1.2	3.3	64	36
	fxn 25	0.26	189	722	3	1.2	3.2	62	38
	fxn 26	0.22	150	690	3	1.0	2.6	63	37
	fxn 27	0.22	146	674	2	1.0	2.5	63	37
	fxn 28	0.21	133	624	2	1.0	2.3	63	37
CD4-ECD	0.5 μ g BP	0.22	58	242	1	1.0	1.0	62	38

E. CD8 α β -Amdex-PC5コンジュゲート

表 37

	CD 8 α β - PC 5	Mnl-X						%	
		Neg Mnl	Pos Mnl	S/N	S/N Ampl. Ratio	Neg. Ampl. Ratio	Pos. Amplif. Ratio	Neg	Pos
0.3 X-mp- 2 m	fxn 18	0.18	52	280	0.9	1.2	1.1	82	18
	fxn 19	0.20	102	519	1.7	1.3	2.2	82	18
	fxn 20	0.19	97	498	1.6	1.3	2.1	81	19
	fxn 21	0.20	95	480	1.6	1.3	2.0	82	18
	fxn 22	0.21	92	436	1.4	1.4	2.0	82	18
	fxn 23	0.26	82	313	1.0	1.7	1.8	82	19
	fxn 23	0.26	82	313	1.0	1.7	1.8	82	19
1 X 2326-75	1x fxn 21	0.23	131	572	1.9	1.5	2.8	81	19
CD8 α β - 5 X -PC 5	5x fxn 43	off scale							
CD8 α β -PC 5	0.5 μ g BP	0.15	47	307	1.0	1.0	1.0	83	17

Molecular Probes, IncからのAmdexとのCD4, PE ; CD4, ECD ; 及びCD8 α β , PC5コンジュゲートにおいて、各々画分19~20, 20~21、及び19~20において8.5, 4.2及び2.2の最大増幅がおこった。これらの画分は、コンジュゲート混合物のクロマトグラフィーにおいて観察された最初の強いバンドの低い画分側又は高い分子量側に一致した。CD4-Amdex-PEコンジュゲートは、いずれのアミノデキストランの組とのCD4, PEコンジュゲートについて得られるより最も高い増幅を供した。また、このECDコンジュゲートは、最初のバンドの中での優れた収率及びいずれのECDコンジュゲートの中でも最も高い増幅を示す最初のものである。

F. CD4-5X-Amdex-PEコンジュゲート

表 38

	Mnl-X						%	
	Neg Mnl	Pos Mnl	S/N	S/N Ampl. Ratio	Neg. Ampl. Ratio	Pos. Amplif. Ratio	Neg	Pos
fxn 21	0.42	271	651	1.7	2.2	3.7	66	34
fxn 22	0.39	301	769	2.0	2.0	4.1	68	32
fxn 23	0.42	334	794	2.1	2.2	4.6	64	35
fxn 24	0.47	332	715	1.9	2.4	4.6	65	35
fxn 25	0.60	343	569	1.5	3.1	4.7	63	37
fxn 26	0.33	290	870	2.3	1.7	4.0	64	36
CD 4 -5X-PE	0.35	211	596	1.6	1.8	2.9	65	35
1X-2326-75	0.20	281	1391	3.7	1.0	3.9	71	29
1X-2249-50	0.23	201	870	2.3	1.2	2.8	65	35
CD 4 -PE	0.19	73	376	1.0	1.0	1.0	64	36

5X-Amdexの1/5/98組とのコンジュゲートは、最初のパンド、第2のブロード上の肩部分、過剰IPEの強いパンド、画分45近くの中央部分に相当する画分25~24で4.4~4.0の最大増幅を示した。

反応したグルコース単位当たり1つのアミノ基での約1/100の置換の程度は、優れた収率でAb-Amdex-PE (PC5, ECD) コンジュゲートを得るために十分であることを示した。CD4-Amdex-PEコンジュゲートについて、Molecular Probesアミノデキストランは、完全な血液中でCD4+細胞を標識化することにおいて直接的CD4-PEコンジュゲートで得られるより優れた最も高い蛍光強度の増幅を供した。蛍光イベントの数対平均チャンネル蛍光強度のフローサイトメトリーヒストグラムを、同じ血液ドナーの種々のCD4-PE対CD4-Amdex-PE標識化リンパ球について図21A~21Dに示す。直接的コンジュゲートと各々のAmdex架橋化コンジュゲートとの間の優れた分離を得た。また、CD4陰性集団からの干渉は観察されなかった。CD4-ECD対CD4-Amdex-ECDについての同様のヒストグラムを、A-15mカラムから収集したCD4-Amdex-ECDの画分についての正の増幅比、シグナル対ノイズ比、及び負の増幅比のグラフと一緒に図22A~22Bに示す。CD8αβ-Amdex-PC5コンジュゲートの画分についての同じ3つの比の平行グラフ依存性を図23に示す。

実施例34：三重ディテクターシステムの結果

サンプルを、バッチモードでのいずれのカラムパッキングもなく、0.01" i.d. ステンレススチール管材の50' コイルからなるカラムを通して、0.2M硝酸ナトリウム水溶液中0.7~1.0mg/mLの濃でViscotek三重検出システムで行った。3つの一次ディテクターの応答を以下に示す；光散乱、 $M \times (dn/dc)^2 \times C$ ；粘度、 $IV \times C$ ；リフラクトメーター、 $dn/dc \times C$ 。各々のディテクターは異なるが、相補的な可変性に寄与する。右角光散乱は、粘度検出と組み合わせた時に分子量を供する。90°LSを、粘度計により供される分子サイズ情報と一緒に、デバイの等式を用いて、角度非対称について補正される。粘度測定は分子密度を供し、それはコンホメーション及び枝分れに関連し、リフラクトメーターはサンプルの濃度を測定し、ポリマーサンプルの反射指数増加量の直接的検出を供する。旋回の半径、 R_g の三乗に関連する溶液中のポリマー分子の流体力学的容量は、固有粘度 (IV 又は η) 及びアボガドロ数で割った重量平均分子量 (M_w) に直接、比例する。三重ディテクターシステムによる重複バッチ分析から決定したデキストラン及びアミノデキストランサン

プルについての分子データを表39に要約する。

表 39

サンプル	濃度 mg/mL	dn/dc mL/g	M _w , Da	IV, dL/g	R _g , nm
5X-Amdex, 2326-11	0.860	0.155	414,000 (395,000/432,000)	0.262 (0.269/0.254)	5.6 (15.5/15.6)
1X-Amdex, 2326-75	0.940	0.155	1,044,000 (1,141,000/947,000)	0.449 (0.449/0.434)	25.2 (26.2/24.3)
Dextran T-2M	0.800	0.147	2,102,000 (2,215,000/1,989,000)	0.609 (0.631/0.586)	35.5 (36.5/34.5)
5X-Amdex, 1/5/98	0.800	0.190	70,000 (70,200/69,700)	0.167 (0.164/0.170)	7.38 (7.33/7.42)
Amdex, Mol. Pr.	0.770	0.155	2,999,000 (3,002,000/2,995,000)	0.674 (0.682/0.666)	41.3 (41.5/41.1)

三重ディテクターシステムにより決定された R_g 値の正確さは 0.5nm を請け負う。

架橋化アミノデキストランの 5X-Amdex, 1/5/98 サンプルを除く全てのデータについての回帰分析は 0.993 の相関係数、3.339 の Y-切片、及び 0.493 の傾きを供した。その傾きは、Mark-Houwink-Sakurada の式： $[\eta] = KM^a$ における指数に相当し、先のサンプルの 4 つにおいて、その値は、M. Kurata 及び Y. Tsunashima “Viscosity-Molecular Weight Relationships and Unperturbed Dimensions of Linear Chain Molecules”, Chapter VII, pp.1-555, in Polymer Handbook, J. Brandrup and E. H. Immergut, eds., Wiley-Interscience, New York, NY (1989) において編集して、25°C で水中 20,000~100,000Da のデキストランの直線状の画分について得られた $a = 0.50$ のものと極めて似ている。この指数の値、 $a = 0.50$ は、‘シータ’温度又は溶媒条件下で直線状フレキシブルポリマーについて確立されているが、25°C での水中での 800,000Da のデキストランの枝分れした画分は $a = 0.20$ を供した。それゆえ、我々は、硝酸ナトリウム水溶液中でコンパクトな球状構造に配列したフレキシブルな直鎖としてふるまわないアミノデキストランサンプルのみが、架橋された 5X-Amdex, 1/5/98 サンプルであると結論づける。4 つのデキストランサンプルについての等式における K の値は、先の参照の直鎖デキストランについて列記される $97.8 \times 10^{-3} \text{ mL/g}$ の値と比較して、 $46 \times 10^{-3} \text{ mL/g}$ であった。

約 2,000Da より大きい分子量のデキストランの先の研究は、全て、球状の構造を示した：1) “Electron-Microscopic Study of Dextran and Poly (vinyl alcohol) Solution, Che

10

20

30

40

50

m, Abstr. 82: 64427v (1975) において凍結固定により調製され、電子顕微鏡により検出されたデキストランはデキストラン球状体を示し；2) 水溶液中のデキストランはH. Van Oene and L.H. Cragg, "Shear Dependence in Solutions of Fractionated Dextran: A Variable-Shear Capillary Viscometer for use with Aqueous Solutions", J. Polym. Sci., 57: 175-185 (1962) においてコンパクトな“毛のある”ヘリックスコイルと認められ；3) 光散乱装置のセル内でデキストランを形成する重合反応の直接の観察及び次のデキストラン溶液についてのZimmプロットの作製は、F.A. Bovey, "Enzymatic Polymerization. I. Molecular Weight and Branching During the Formation of Dextran", J. Polym. Sci., 35: 167-182 (1959) において $64 \sim 105 \times 10^6$ Daの分子量のための旋回の75~85nm半径の均一な球を示した。

ランダムにコイルした直鎖ポリマー分子についての旋回の半径は、 $R_g^2 = 1/6 n l^2$ (ここで、 n はポリマー鎖中の統計的セグメントの数であり、 l は各々の統計的セグメントの長さである) としてランダム歩行統計法から得られた。また、ランダムコイル中の平均二乗の端から端の距離は、“Principles of Colloid and Surface Chemistry”, 2nd ed., P. C. Hiemenz, Marcel Dekker, Inc., New York, NY pp.102-107 (1986) に示される $R^2 = n l^2$ により与えられる。これにより、光散乱及び粘度から得られた正確な R_g 及び量平均分子量値、並びに端から端の距離の平均2乗根、 R 、セグメント当りの平均分子量、 M_i 、統計的セグメントの数、及び各々のポリマー内の統計的なセグメント長を計算するための元素分析（経験式及び置換の程度）を用いることが可能になる。次に、これらの後者の値は、上述のF.A. Boveyにより、約8Å長として報告される1.6連結化グルコースの一単位の長さと比較することができる。その計算したデータを表40に示す。

表40

サンプル	M_i , Da	n	R , nm	I , Å
5 X - Amdex, 2326-11	183.7	2,254	38.2	8.0
1 X - Amdex, 2326-75	164.0	6,366	61.7	7.7
Dextran, T - 2 M	162.1	12,967	87.0	7.6
5 X - Amdex, 1/5/98	154.8	452	18.1	8.5
Amdex, Mol. Pr.	162.9	18,410	101.2	7.5

架橋した5X - Amdex, 1/5/98についての M_i 値は、他のアミノデキストランサンプルと同様に、即ち4つの窒素原子での経験式を得て、2つのジアミノプロパン単位での各々の反応したグルコース残基の置換の程度から得られた単位の数にわたってその分子量を平均化することにより、計算することができなかった。むしろ、鎖当り8つの窒素原子（4つの架橋、4つの非架橋）での経験式の量を置換の程度から得られた単位の数（1/5）の3倍である15単位にわたって平均化した。結果として、8.5Åの統計的セグメント長は、その値が全て8Åの報告された値に極めて近い直鎖ポリマー分子についての7.5~8.0Åの範囲の別の値と同様である。デキストラン中の1.6-グリコシル単位の残基間のメチレン基は、グルコース残基がエーテル結合によってのみ連結している硝酸セルロース内の1, 4-グリコシル単位の鎖の剛性と対称的にデキストラン鎖上で更なるフレキシビリティを与えるようである。P. Dotyら (J. Amer. Chem. Soc., 75: 754 (1953) 及びA.M. Holtzerら、58: 624 (1954) に報告されるアセトン中の硝酸セルロースについての光散乱の結果及びZimmプロットは、 $M_w = 400,000$ Da及び35Åの統計的セグメント長又は約7の1, 4-グリコシル単位を供した。この硝酸セルロースにおいて、各々のモノマー単位は、297Daの分子量及び5.15Åの長さを有する。400,000Daの一本鎖中の単位の数1350であろう。それゆえ、

この鎖は、もし完全に引きのばせば、6950 Å の長さとなろう。光散乱からの端から端への距離の平均二乗根は1500 Å であった。より長い統計的セグメント長及び高い R 値は、硝酸セルロースが異常にかたくかつ伸びた構造を有することを確認する。ランダムにコイルしたポリマー、例えばデキストラン及びアミノデキストランは、極めてより密にコイルし、コンパクトな構造を有する。

実施例35：抗体－アミノデキストラン－フィコビリプロテインコンジュゲート及びフィコビリプロテイン対アミノデキストランモル比の分子量の評価

ブルーデキストラン (Sigma, T-2M) を、抗体－アミノデキストラン－PEコンジュゲートを精製するのに用いた A-15m カラムに適用し、1×PBS でカラムから溶出し、 A_{280} でモニターし、120滴／画分の同じ液滴数で収集した。抗体－アミノデキストラン－染料コンジュゲートの溶出プロファイルにおける最初のせまいピーク (1X Amdex, Amdex (M.P.)、及び 5X-Amdex, 2326-11 についておおよそ画分 20) は、ブルーデキストランの溶出プロファイルにおける最初のせまいピークと同じ画分内でおこった。それゆえ、そのコンジュゲートは、少なくとも 2MDa の分子量を有すると見積もられる。より正確な分子量は、632.8nm He/Ne レーザー励起での、1×PBS 緩衝液、pH 7.2 中 5mg/mL 又はそれ未満の濃度の PE, PC5 及び ECD 並びにそれらの CD4 (及び CD8 α β) 抗体－アミノデキストラン－染料コンジュゲートの溶液について、Coulter サブミクロン粒子アナライザー、Model N4MD での動光学的散乱 (QELS、検定弾性光散乱又は PCS、光子相関分光法とも呼ばれる) 測定から得た。これらの測定の結果を及びアミノデキストランとの PE 及びその CD4 抗体コンジュゲートについて表 40 に示す。ナノ秒のオーダーでの蛍光放射イベントは 3~10 マイクロ秒のサンプル時間で測定した並進ブラウン運動に作用しないようである。CD4-Amdex (M.P.) との全ての 3 つの PE, PC5、及び ECD コンジュゲートについての分析は、最大放射バンドが各々 583, 660, 615nm の広く異なる波長に位置する場合でさえ、146nm の同じ平均直径を供した。表 40 に列記される対応するコンジュゲートの分子量 (M) を、半径 $R/2$ の球の表面領域と三重ディテクター (光散乱、粘度、及び反射示数) の結果からのデキストラン及びアミノデキストランの分子量との間に確立され、より大きな分子について T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Principles [W.H. Freeman, New York, 1983] p. 242] において表面領域と分子量との間の直接の比例関係とも呼ばれる同じ関係： $4\pi (R/2)^2 = 1.1M$ を仮定することにより計算した。

表 41 は、PE 及びそのコンジュゲートの平均直径並びに PE-アミノデキストランのモル比を供する。モル比、PE/Amdex は 3 つの異なる方法で得た：

(1) アミノデキストランのかたい球の周りの密接にパッキングしたアレイ内に配列することができる PE のかたい球 (平均直径、34.3nm) (表 5 からの R 値により供される径) の数を計算し、即ちアミノデキストランの球の表面領域 $4(R/2)^2$ を $d^2(PE) \times 3/2$ で割り、そして次に PE のモル分数をかけることにより；

(2) コンジュゲートの分子量から 1 つのデキストラン分子の分子量を引き、次に IgG 抗体 (160,000Da) 及び PE (270,000Da) のモル重量の平均で割り、そして最後に、PE のモル分数をかけることにより；

(3) 完全な血液中の標的とする CD4+リンパ球上のレセプター部位の飽和においてフローサイトメトリーにより測定した。直接的 CD4-PE コンジュゲートの平均チャンネル蛍光強度に対する直接的 CD4-アミノデキストラン-PE コンジュゲートの平均チャンネル蛍光強度の比をとることによる。コンジュゲートのサンプル中の PE のモル分数は、 A_{565} からの PE 及び 280nm での PE 吸光度について補正した A_{280} からの CD4 抗体の濃度、並びに各々のモル重量についての分光測定データから計算した。PE について供される第 2 のモル重量値 (a) は、R. McColland and D. Guard-Friar, Phycobiliproteins, CRL Press Inc., Boca Raton, FL (1983) に記載される通りである。

表 41

種	平均直径 nm	モル重量 Da	モル分数 PE/ (PE+Ab)	PE/Amdex (パッキングによる)	PE/Amdex (MW)	PE/Amdex (フローサイトメ トリ)
PE	34.3	336,000 270,000 [a]				
CD 4 - 1 X - Amdex - PE	90.2	2,324,000	0.553	6.5	3.3	2.4
CD 4 - Amdex (M. P.)	146	6,088,000	0.488	15.4	7.0	8.2
CD 4 - 5 X - Amdex(-2326- 11)	116	3,843,000	0.401	4.8	6.4	4.2
CD 4 - 5 X - Amdex(1/5/98)	57.4	940,000	0.560	3.4	2.3	4.4

パッキングによる及びモル重量によるPE/Amdex比の評価は、1X-Amdex及びAmdex (M.P.) コンジュゲートについて互いから最も大きく異なる。モル重量計算からの値はかなり近く、これは、これらの比較的高分子重量及び低アミノ置換のアミノデキストランの周囲のタイトにパッケージングした染料及び抗体構造が存在しないことを示唆する。むしろ、大きなPE/Amdex比及びこれによる高い蛍光増幅を有することにおける限定因子は、アミノデキストランの大きさではなく、タンパク質がコンジュゲートすることができる機能的なアミン基での置換の程度である。

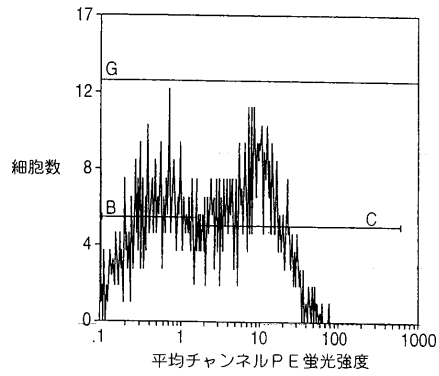
パッキング又は分子量データから計算したPE/Amdex比間の一致度は5X-Amdexコンジュゲートについて、特に組2326-11アミノデキストランコンジュゲートについて極めて近い。ここで、パッキングの考慮は、大きな染料対Amdex比を得る能力を支配する。更に、増幅率は架橋された5X-Amdexについて単一の5X-Amdex分子あたりのパッキング限界を超えており、このことは、1超の5X-Amdex分子がコンジュゲートの一部であることを示唆する。これは、---5X-Amdex---Ab, PE---5X-Amdex---のネットワークが更なるPE分子を形成し、これを含むことを許容する。

本明細書に言及される全ての出版物は本願が属する当業者に示すものである。各々の出版物はそれが言及される位置における引用により、本明細書に個々に組み込まれる。1997年11月21日に出版された親出願08/976,031及び1997年5月16日に出版され特許された出願08/857,941のテキストも引用により本明細書に組み込まれる。

本発明は特に好ましい実施形態を引用して記載されているが、本発明の多数の改良及びバリエーションは上述の明細書に含まれると認められるであろうし、当業者に明らかであろうと予想される。本発明の組成物及び方法へのこのような改良及び変換は、添付の請求の範囲の範囲内に含まれると信じられる。

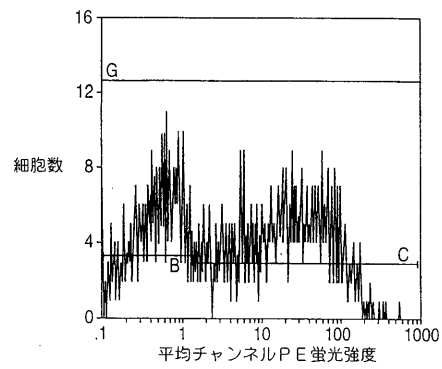
【図 1 A】

FIG. 1A



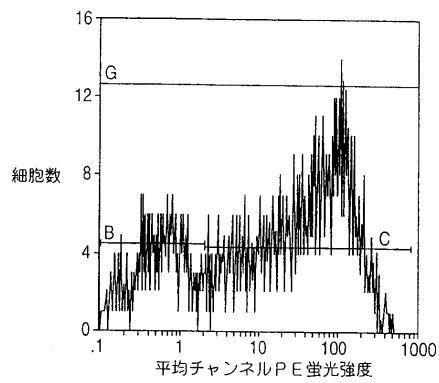
【図 2 A】

FIG. 2A



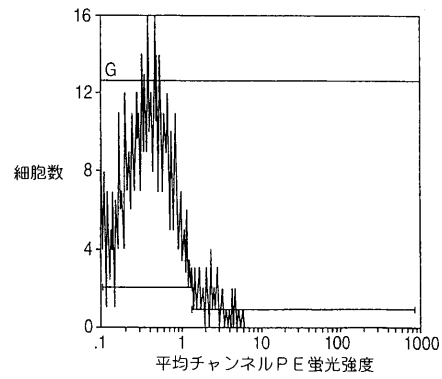
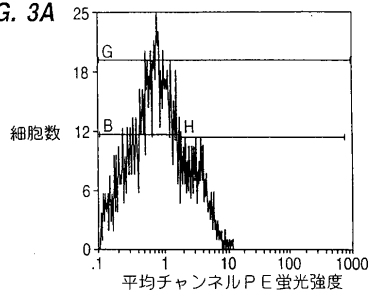
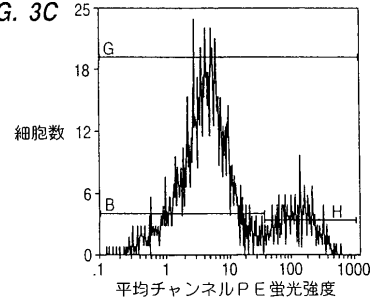
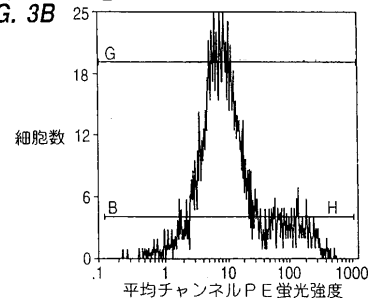
【図 1 B】

FIG. 1B



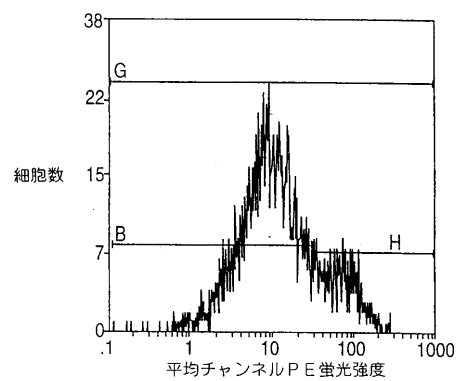
【図 2 B】

FIG. 2B

【図 3 A】
FIG. 3A【図 3 C】
FIG. 3C【図 3 B】
FIG. 3B

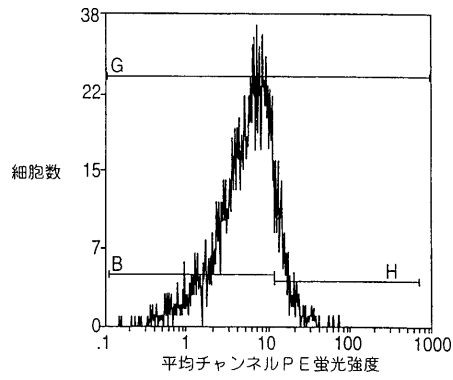
【図 4 A】

FIG. 4A



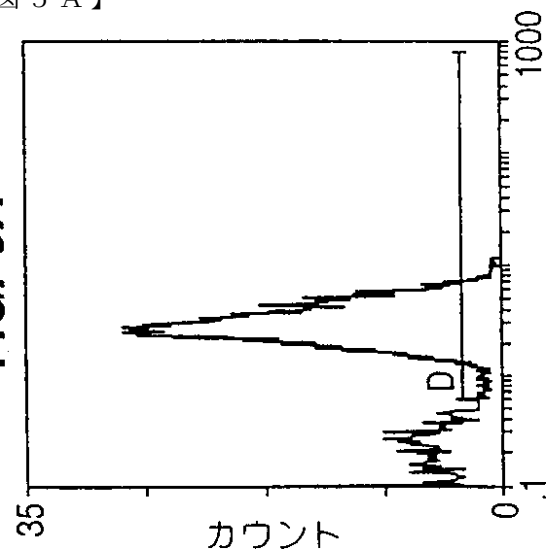
【図 4 B】

FIG. 4B



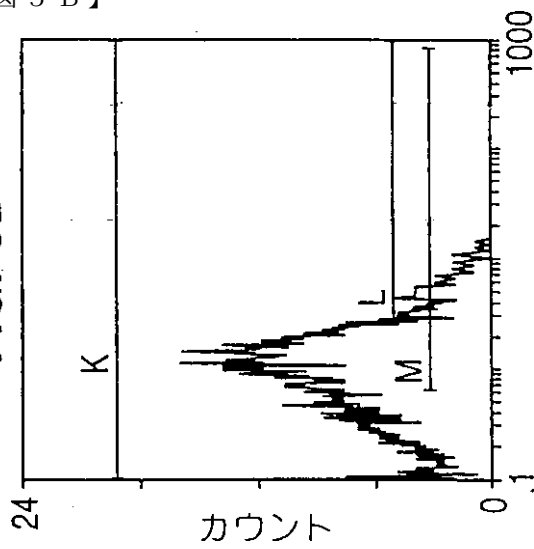
【図 5 A】

FIG. 5A



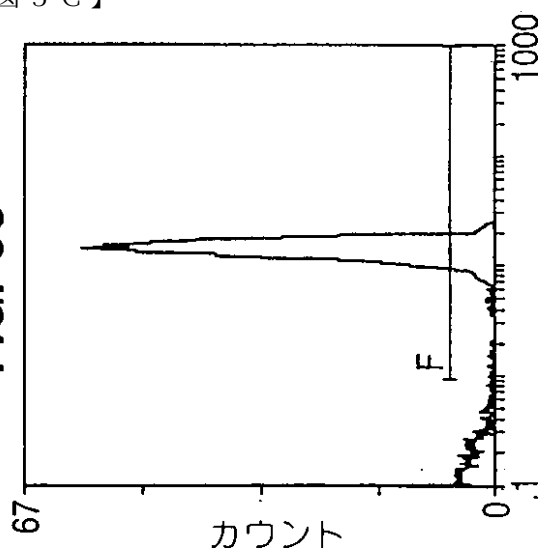
【図 5 B】

FIG. 5B

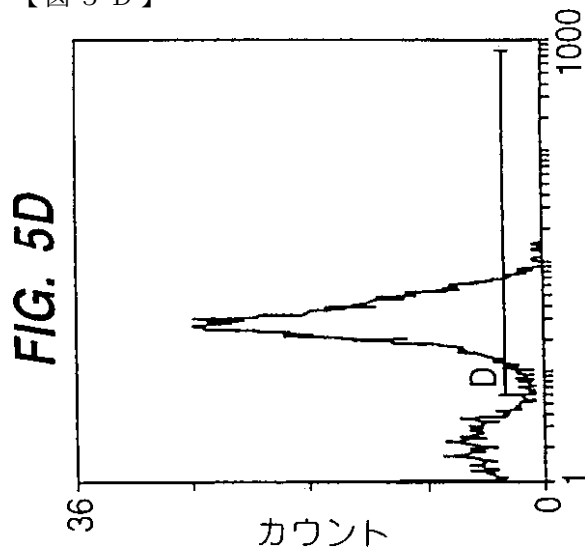


【図 5 C】

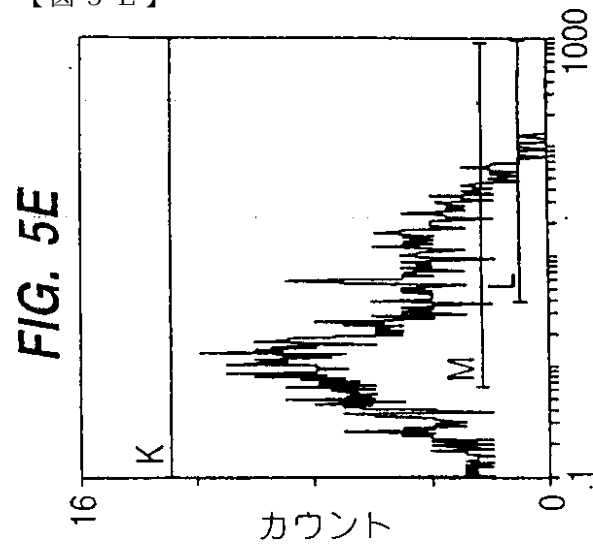
FIG. 5C



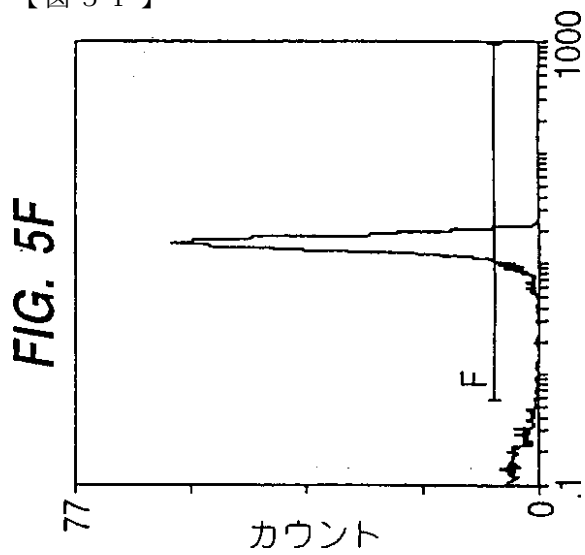
【図 5 D】



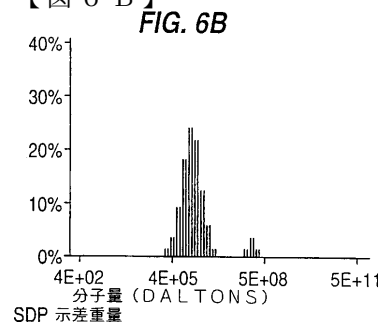
【図 5 E】



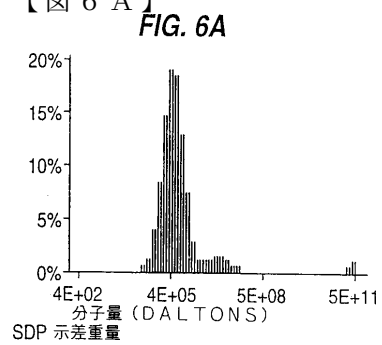
【図 5 F】



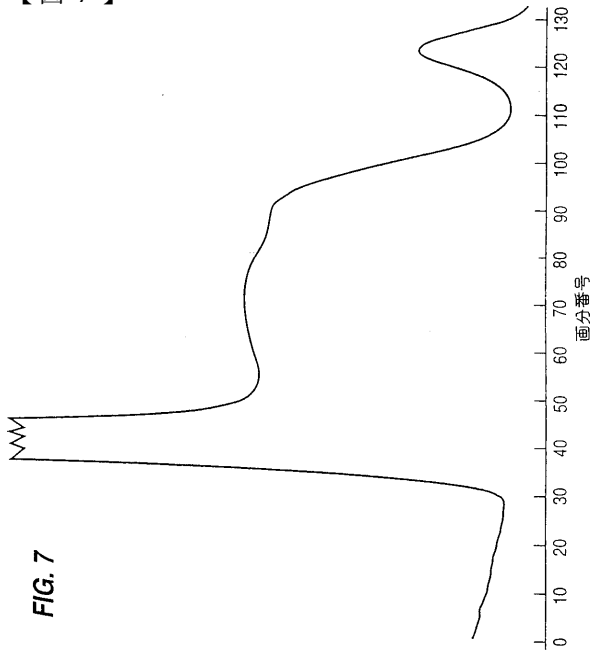
【図 6 B】



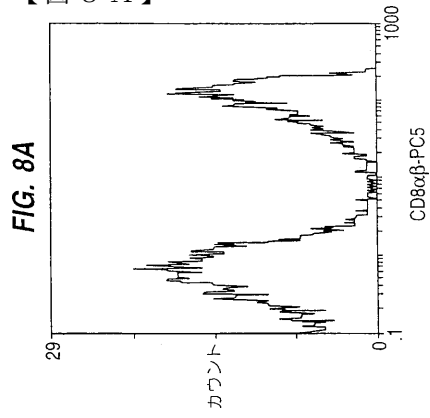
【図 6 A】



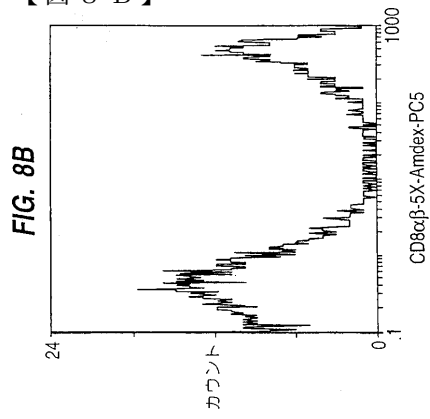
【図 7】



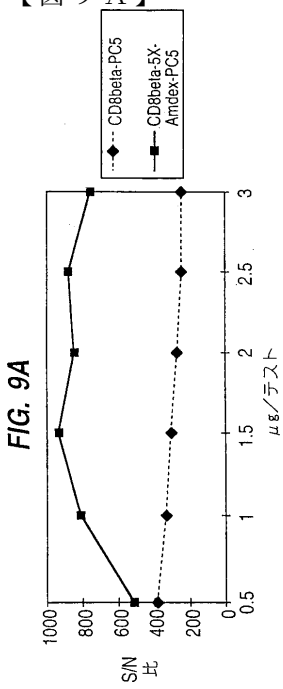
【図 8 A】



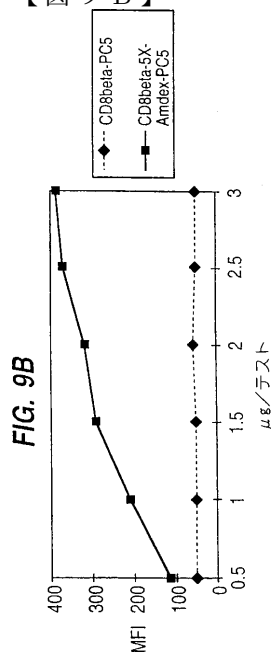
【図 8 B】



【図 9 A】



【図 9 B】



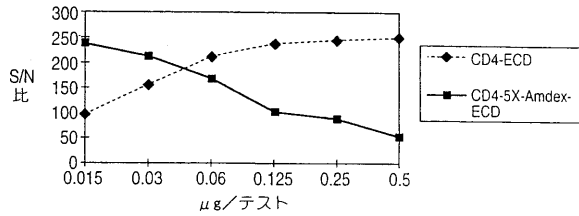
【図 10 A】

FIG. 10A

$\mu\text{g}/\text{テスト}$	S/N		MFI-POS		MFI 比
	CD4-ECD	CD4-5X-Amdex-ECD	CD4-ECD	CD4-5X-Amdex-ECD	
0.015	99	239	18	267	5.3
0.03	158	213	29	349	7.0
0.06	211	169	41	359	7.2
0.125	237	102	47	359	7.2
0.25	245	90	50	398	8.0
0.5	248	52	53	485	9.7

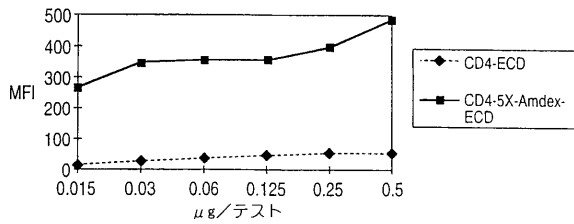
【図 10 B】

FIG. 10B



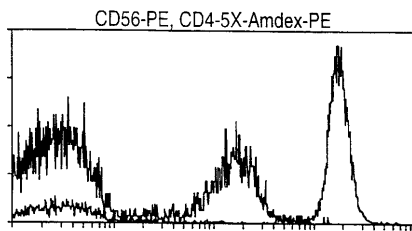
【図 10 C】

FIG. 10C



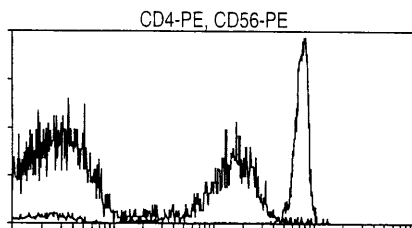
【図 12 A】

FIG. 12A



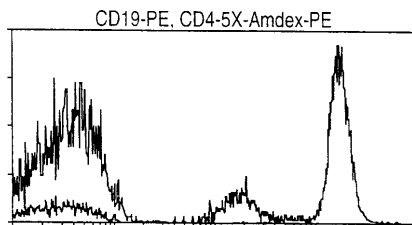
【図 12 B】

FIG. 12B



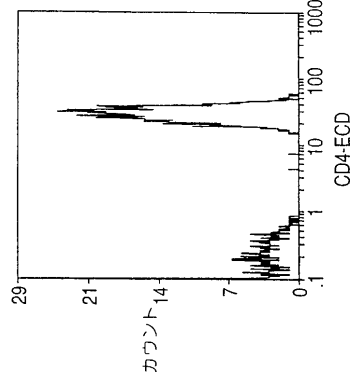
【図 13 A】

FIG. 13A



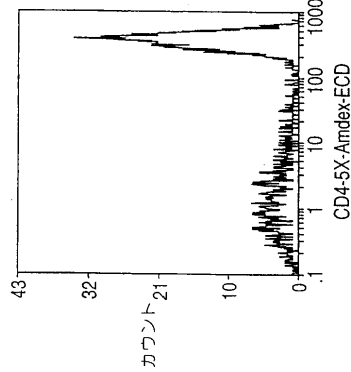
【図 11 A】

FIG. 11A



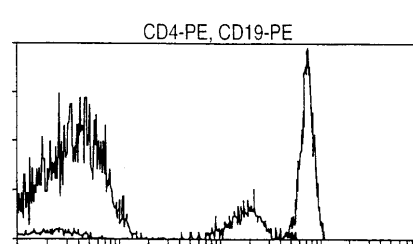
【図 11 B】

FIG. 11B



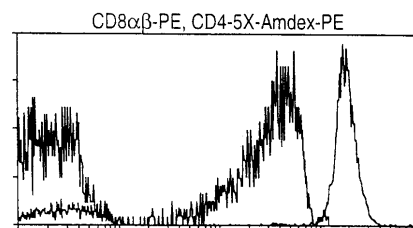
【図 13 B】

FIG. 13B



【図 14 A】

FIG. 14A



【図 14 B】

FIG. 14B

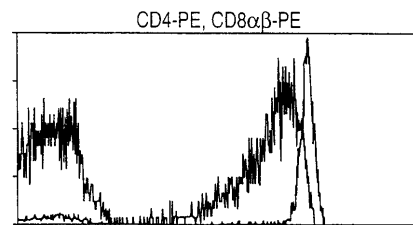
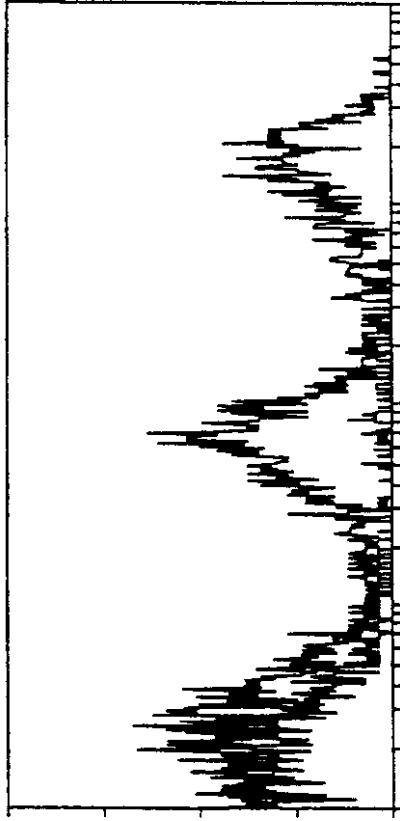
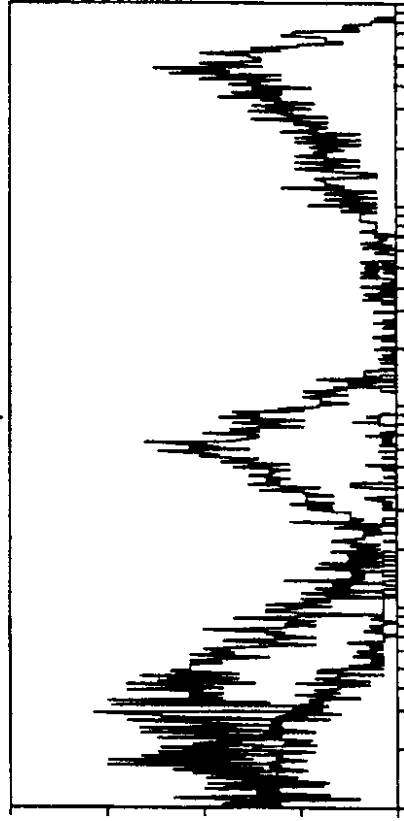


FIG. 15A

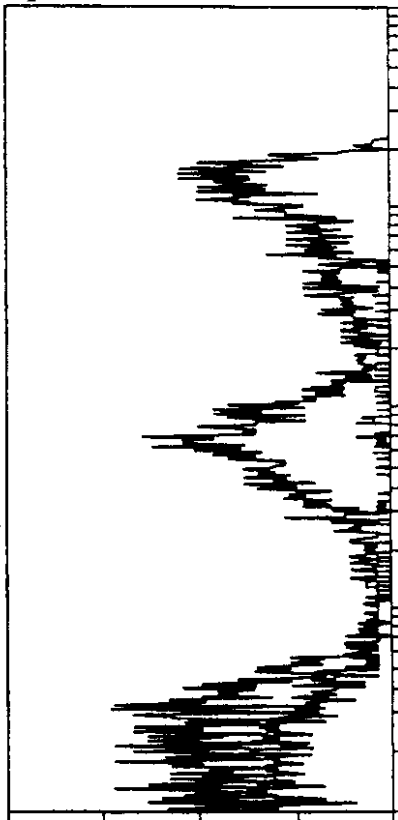
【図 15 A】

CD56-PC5, CD8 α β -5X-Amdex-PC5**FIG. 15B**

【図 15 B】

CD56-PC5, CD8 α β -5X-Amdex-PC5**FIG. 15C**

【図 15 C】

CD8 α β -PC5, CD56-PC5**FIG. 16A**

【図 16 A】

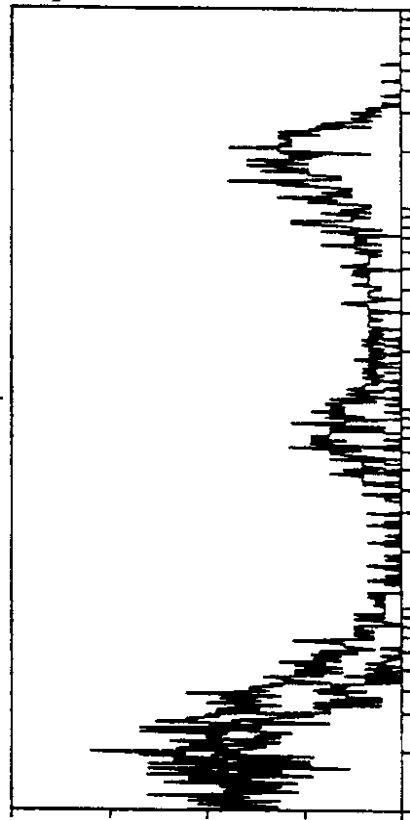
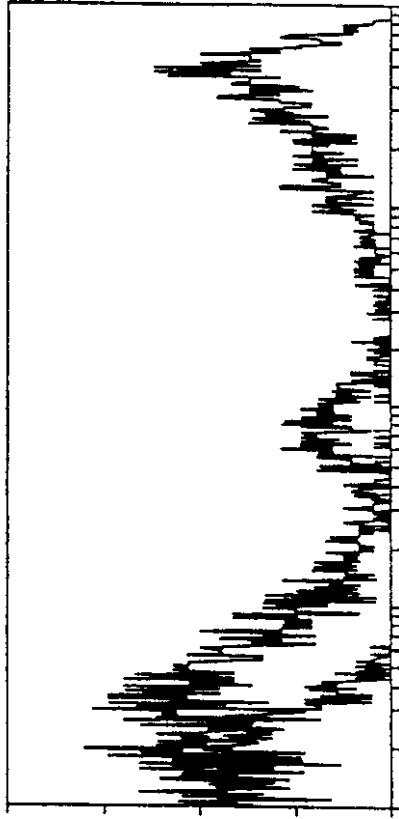
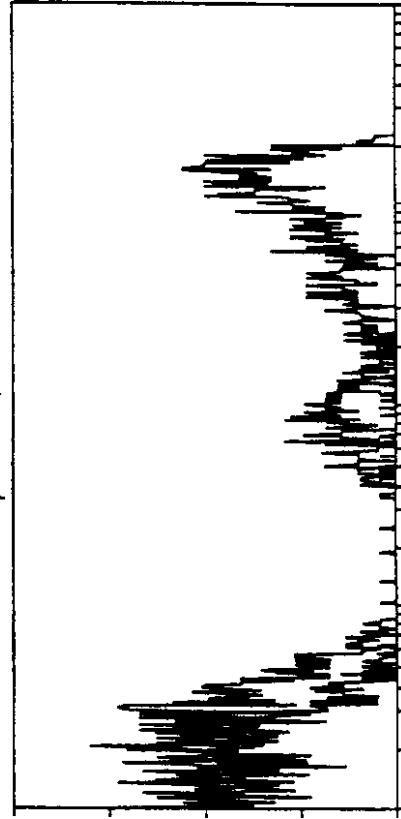
CD19-PC5, CD8 α β -5X-Amdex-PC5

FIG. 16BCD19-PC5, CD8 α β -5X-Amdex-PC5

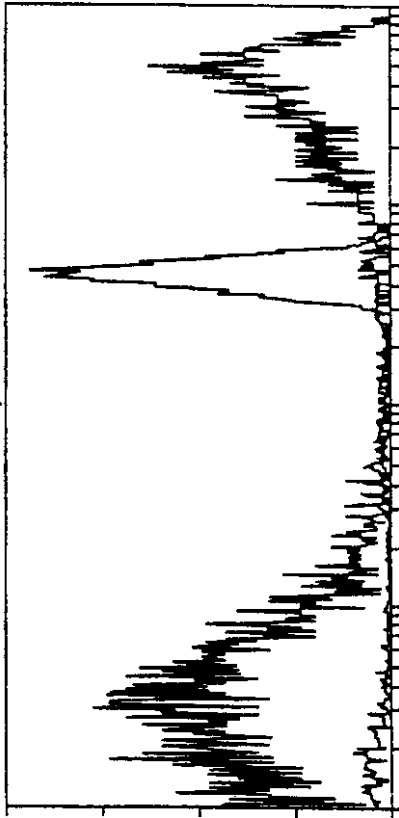
【図 16 B】

**FIG. 16C**CD8 α β -PC5, CD19-PC5

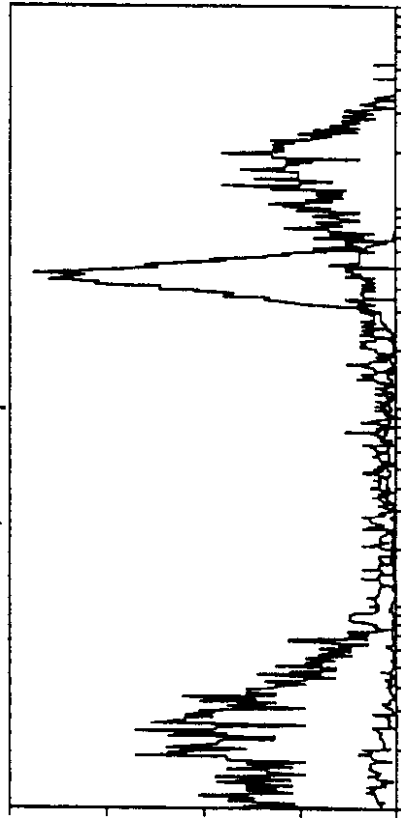
【図 16 C】

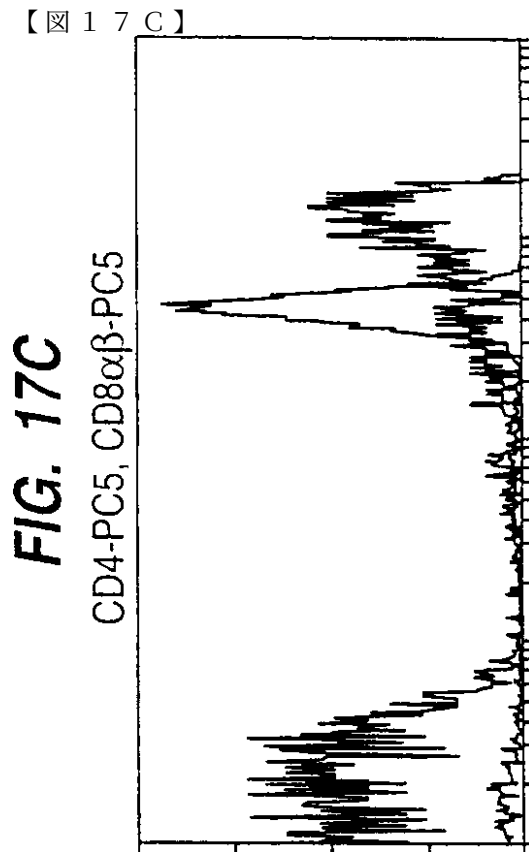
**FIG. 17A**CD4-PC5, CD8 α β -5X-Amdex-PC5

【図 17 A】

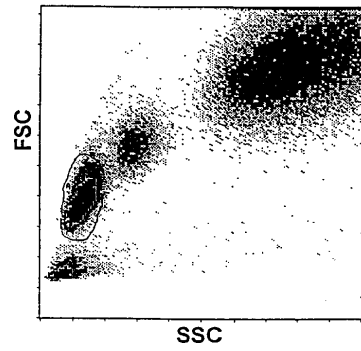
**FIG. 17B**CD4-PC5, CD8 α β -5X-Amdex-PC5

【図 17 B】

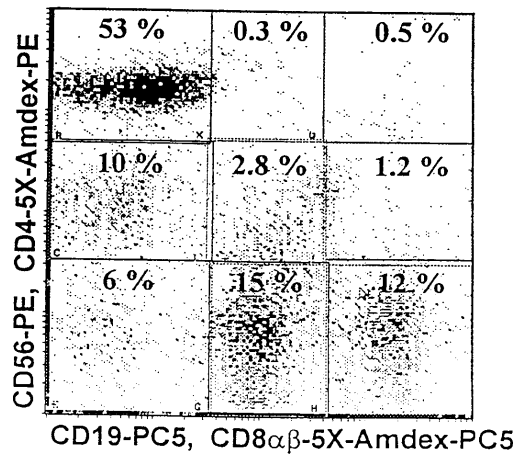




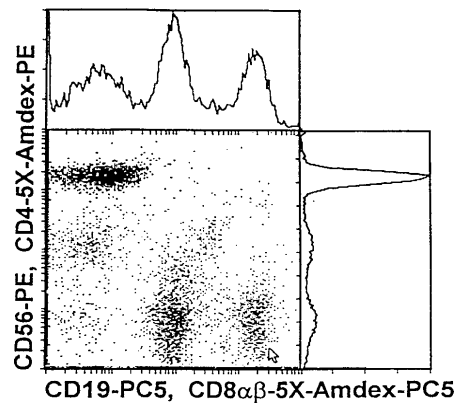
【図 18 A】
FIG. 18A



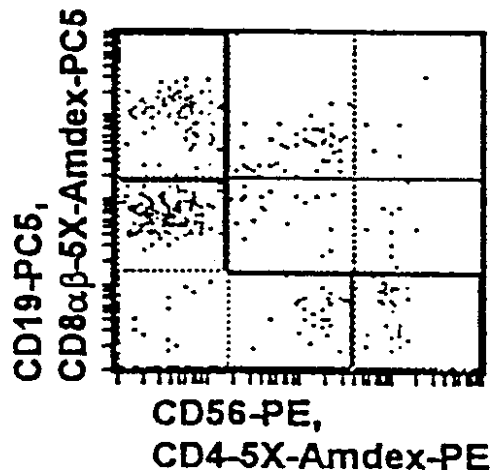
【図 18 B】
FIG. 18B



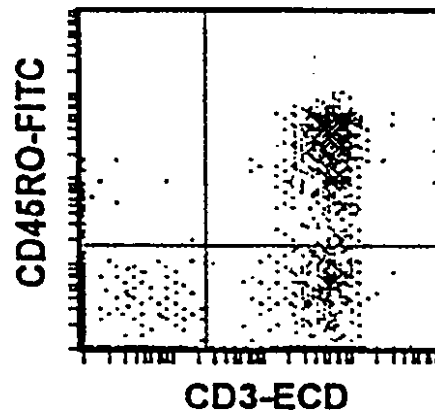
【図 19】
FIG. 19



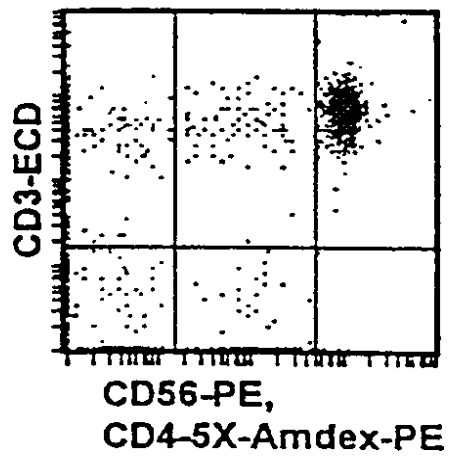
【図 20 A】

FIG. 20A

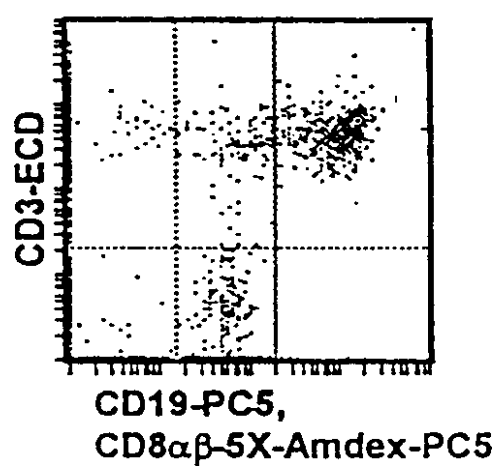
【図 20 B】

FIG. 20B

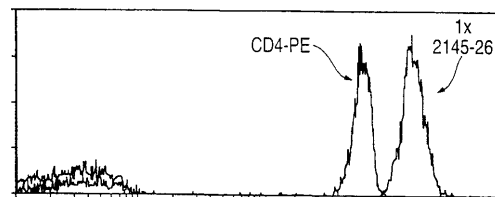
【図 20 C】

FIG. 20C

【図 20 D】

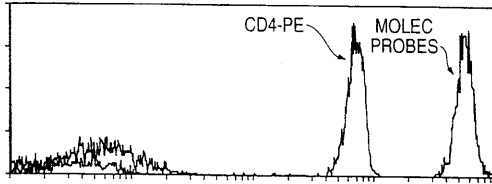
FIG. 20D

【図 21 A】

FIG. 21A

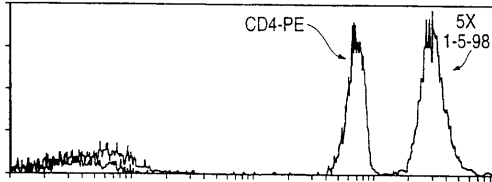
【図 2 1 B】

FIG. 21B



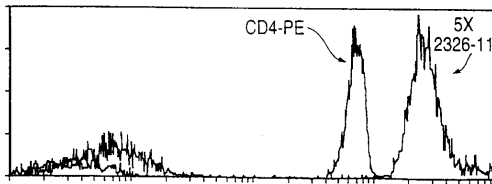
【図 2 1 C】

FIG. 21C



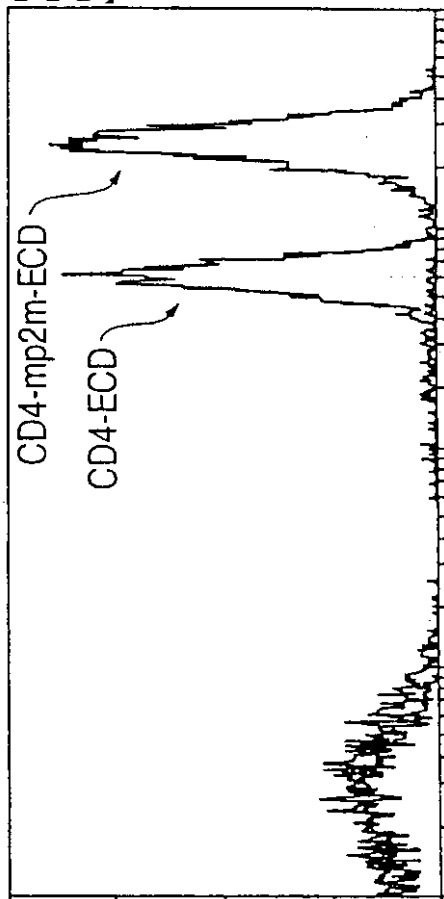
【図 2 1 D】

FIG. 21D



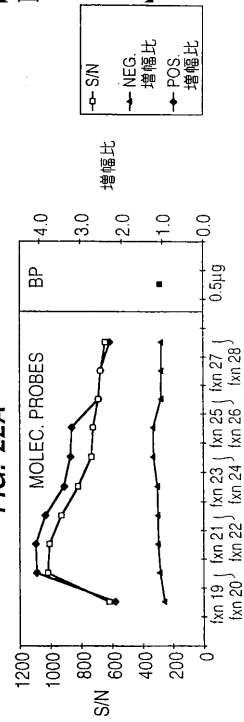
【図 2 2 B】

FIG. 22B



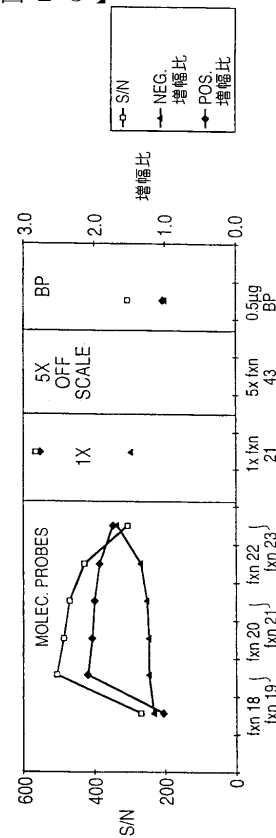
【図 2 2 A】

FIG. 22A



【図 2 3】

FIG. 23



フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 シーマン, オラビ

アメリカ合衆国, フロリダ 33331, デビイ, コブルストーン コート 15920

(72)発明者 バーシュテイン, アレキサンダー

アメリカ合衆国, フロリダ 33016, ハイアリー, ウエスト 26 コート 6192

(72)発明者 ミルバガナル, ラビンドラ

アメリカ合衆国, フロリダ 33024, ハリウッド, ノース ウエスト サーティフィフス ス
トリート 9810

(72)発明者 レイナー, ロバート

アメリカ合衆国, フロリダ 33026, クーパー シティ, トレントン アベニュー 4073

(72)発明者 ロス, パトリシア

アメリカ合衆国, フロリダ 33026, ペンブローク ピンズ, ノース ウエスト 12 スト
リート 11979

(72)発明者 スミス, セシリア

アメリカ合衆国, フロリダ 33196, マイアミ, サウス ウエスト 147 プレイス 11
022

(72)発明者 ウィルキンソン, ジュリー

アメリカ合衆国, フロリダ 33326, ウェストン, ホワイトヘッド サークル 49

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 国際公開第97/008552 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/548

G01N 33/483

G01N 33/543

G01N 33/533

G01N 15/14

PubMed