

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成29年9月14日(2017.9.14)

【公表番号】特表2016-515823(P2016-515823A)

【公表日】平成28年6月2日(2016.6.2)

【年通号数】公開・登録公報2016-034

【出願番号】特願2016-504429(P2016-504429)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/04	(2006.01)
C 0 7 K	16/18	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 N	5/078	(2010.01)
C 1 2 N	5/0781	(2010.01)
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
G 0 1 N	37/00	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/04	Z N A
C 0 7 K	16/18	
C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 N	5/078	
C 1 2 N	5/0781	
C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	5/10	
G 0 1 N	37/00	1 0 1
C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	15/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月28日(2017.3.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞外効果を有するエフェクター細胞を含む細胞集団を同定する方法であって、マイクロリアクターに、1または複数のエフェクター細胞を含む細胞集団を保持する工程であって、前記マイクロリアクターの中味は、1または複数の読み出し粒子を含む読み出し粒子集団をさらに含む、工程と、

前記マイクロリアクター内で、前記細胞集団と、前記1または複数の読み出し粒子とをインキュベートする工程と、

前記細胞集団を前記細胞外効果の存在についてアッセイする工程であって、前記読み出し粒子集団またはその亜集団は、前記細胞外効果の直接的または間接的な読み出しを提供する、工程と、

前記アッセイする工程の結果に基づいて、前記細胞集団内の前記1または複数のエフェ

クター細胞が前記細胞外効果を発揮するかどうかを決定する工程と、を含む方法。

【請求項 2】

該読み出し粒子は、下記(a)及び(b)からなる群の少なくとも1つを含む、請求項1に記載の方法

(a) タンパク質、ペプチド、脂質、膜抽出物又はそれらの混合物によって官能化されたビーズ、及び

(b) 細胞。

【請求項 3】

該細胞外効果は、結合、アンタゴニスト活性、アポトーシスの調節、細胞増殖の調節、前記み出し粒子の形態学的外観の変化、前記読み出し粒子内のタンパク質の局在の変化、前記読み出し粒子によるタンパク質の発現、アクセサリー粒子の生物学的活性の中和、前記エフェクター細胞によって誘発される読み出し細胞の細胞溶解、前記エフェクター細胞によって誘発される前記読み出し細胞の細胞アポトーシス、読み出し細胞壊死、抗体の内在化、前記アクセサリー粒子の内在化、前記エフェクター細胞による酵素中和、可溶性シグナル伝達分子の中和またはそれらの組み合わせからなる群より選ばれる、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記1または複数のエフェクター細胞は、抗体分泌細胞(ASC)を含む請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞集団は、約2から約500個の細胞を含む請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記読み出し粒子集団または前記亜集団は、前記マイクロリアクターの表面に固定化されている請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞集団および前記読み出し粒子集団を複数のアクセサリー粒子と共にインキュベートする工程をさらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記複数のアクセサリー粒子は、下記からなる群より選ばれる少なくとも1種である、請求項6に記載の方法

a) 細胞、ビーズ、タンパク質、ペプチド、成長因子、サイトカイン、神経伝達物質、脂質、リン脂質、アミノ酸、モノアミン、糖タンパク質、炭水化物、ホルモン、ウイルス粒子、抗体、抗体フラグメント、蛍光基質、フルオロフォア、二次抗体、またはそれらの組み合わせ；

b) スフィンゴシン-1-リン酸、リゾホスファチジン酸またはそれらの組合せ；

c) 蛍光基質または開裂されたとき蛍光になる非蛍光基質；

d) 線維芽細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、キラーT細胞、抗原提示細胞、樹状細胞、組換え細胞またはそれらの組み合わせ；

e) 複数のウイルス粒子；及び

f) 複数の補体経路誘導因子。

【請求項 9】

前記細胞外効果は、前記1または複数のエフェクター細胞またはそのサブセットによって分泌される分子と、前記読み出し粒子集団または前記亜集団との間の結合相互作用である請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞外効果は、前記1または複数のエフェクター細胞またはそのサブセットによって分泌される分子と、前記複数のアクセサリー粒子の1または複数のアクセサリー粒子との間の結合相互作用である請求項7に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞集団を含む前記マイクロリアクターをその周囲の環境から実質的に離隔する工

程をさらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記細胞集団内の前記1または複数のエフェクター細胞が、前記読み出し粒子集団または前記亜集団で前記細胞外効果を示す場合、前記方法は、前記細胞集団またはその一部を回収して、回収された細胞集団を得る工程を含む請求項1に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記回収する工程は、マイクロキャピラリーの開放端を、前記読み出し粒子集団または亜集団に対して細胞外効果を示す1又は複数の細胞を含む前記細胞集団を含むマイクロリアクター内に置く工程、及び

前記マイクロリアクターの内容物又はその一部を吸引して吸引回収された細胞集団を得る工程と、を含む請求項1 2に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記回収された細胞集団に由来する複数の細胞亜集団を、デバイス中の別個のマイクロリアクター内に保持する工程であって、前記別個のマイクロリアクターは1又は複数の読み出し粒子を含む読み出し粒子集団を含む工程と、

個々の前記細胞亜集団と、前記読み出し粒子集団とを前記マイクロリアクター内でインキュベートする工程と、

個々の前記細胞亜集団を第2の細胞外効果についてアッセイする工程であって、前記読み出し粒子集団又はその亜集団は前記二次細胞外効果の読み出しを提供し及び前記第2の細胞外効果は前記回収された細胞集団で測定された前記細胞外効果と同じか又は異なる細胞外効果である工程と、

前記アッセイする工程の結果に基づいて、前記第2の細胞外効果を示す1又は複数の細胞を含む前記複数の中から細胞亜集団を同定する工程と、

をさらに含む請求項1 3に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記保持する工程は、

前記吸引回収された細胞集団をマイクロキャピラリーによりデバイス中へ導入する工程であって、前記マイクロキャピラリーは前記デバイスの選択された範囲に導入される、工程と、

圧力を加えて前記吸引回収された細胞集団を前記デバイスの別個のマイクロリアクター内へと流す工程と、及び

前記デバイスから前記マイクロキャピラリーを引き出す工程と、を含む請求項1 4記載の方法。

【請求項 1 6】

複数の容器に、前記回収された細胞集団に由来する複数の細胞亜集団であって、各細胞亜集団は個々の容器中に存在する複数の細胞亜集団を、分配する工程と、

前記個々の細胞亜集団を溶解して溶解した細胞亜集団を提供する工程と、

前記溶解した細胞集団のそれぞれの内の1または複数の核酸を増幅する工程と、をさらに含む請求項1 2に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記細胞亜集団内の前記1または複数の細胞が前記読み出し粒子の集団またはその亜集団に対して前記第2の細胞外効果を示す場合、前記細胞亜集団またはその一部を回収して前記回収された細胞亜集団を得る工程をさらに含む請求項1 4に記載の方法。

【請求項 1 8】

下記工程の少なくとも1つをさらに含む、請求項1 7記載の方法

(a) 前記デバイスの前記別個のマイクロリアクター中に、前記回収された細胞亜集団に由来する前記複数の細胞亜集団を保持する工程であって、前記別個のマイクロリアクターの各々は、前記1または複数の読み出し粒子を含む前記読み出し粒子集団を含む、工程と、

前記マイクロリアクター内で前記個々の細胞亜集団と、前記読み出し粒子集団とをイン

キュベートする工程と、

前記個々の細胞亜集団を第3の細胞外効果の存在についてアッセイする工程であって、
前記読み出し粒子集団または前記亜集団は、前記第3の細胞外効果の読み出しを提供する
工程と、

前記アッセイする工程の結果に基づいて、前記第3の細胞外効果を示す前記1または複数の細胞を含む前記複数の中から細胞亜集団を同定する工程、及び

(b) 複数の容器に、前記回収された細胞亜集団に由来する複数の細胞亜集団であって
各細胞亜集団は個々の容器中に存在する、細胞亜集団を保持する工程と、

前記細胞亜集団を溶解して溶解した細胞亜集団を提供する工程と、

前記溶解した細胞集団内の1または複数の核酸を増幅する工程。

【請求項19】

前記細胞亜集団内の前記1または複数の細胞が前記読み出し粒子集団またはその亜集団
に対して前記第3の細胞外効果を示す場合、前記細胞亜集団またはその一部を回収して前
記回収された細胞亜集団を得ることをさらに含む請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記回収された細胞亜集団に由来する複数の細胞亜集団であって、各細胞亜集団は個々
の容器中に存在する複数の細胞亜集団を複数の容器に保持する工程と、

前記細胞亜集団を溶解して溶解した細胞亜集団を提供する工程と、

前記溶解した細胞集団内の1または複数の核酸を増幅する工程と、をさらに含む請求項
19記載の方法。

【請求項21】

前記回収する工程は、前記第3の細胞外効果を示す前記1または複数の細胞を含む前記
細胞亜集団を含む前記マイクロリアクターにマイクロキャピラリーを挿入する工程と、

前記チャンバの内容物またはその一部を吸引して吸引回収された細胞亜集団を得る工程
と、を含む請求項19に記載の方法。

【請求項22】

前記個々の細胞集団は、約1から約20個の細胞の平均細胞数を有する、請求項17記
載の方法。

【請求項23】

前記複数のアクセサリー粒子とともに、前記個々の細胞亜集団と、前記読み出し粒子集
団とをインキュベートする工程をさらに包む、請求項17記載の方法。

【請求項24】

細胞外効果を示す1または複数のエフェクター細胞を含む細胞の出発集団から前記細胞
外効果を発揮する前記エフェクター細胞を濃縮する方法であって、

前記細胞の出発集団を複数のマイクロリアクターに保持して複数の細胞亜集団を得る工
程であって、前記マイクロリアクターあたりの前記エフェクター細胞の平均数はY以下で
あり、前記集団中の細胞の総数はXよりも大きく、前記集団における前記エフェクター細
胞の予想される割合は1/Xである、工程と、

前記細胞外効果を示す前記1または複数のエフェクター細胞を含む1または複数のマイ
クロリアクターを同定するために、前記マイクロリアクター内で前記細胞亜集団をアッセ
イして、工程と、

前記細胞外効果を発揮する前記1または複数のエフェクター細胞を含む前記1または複
数のチャンバを同定する工程と、

前記同定された1または複数のチャンバから、前記細胞亜集団またはその一部を回収し
て前記エフェクター細胞のために、濃縮された細胞の濃縮集団を提供する工程であって、
前記エフェクター細胞のために前記濃縮された細胞の前記濃縮集団は、1/Yの前記エフ
エクター細胞の割合を有する工程と、を含む方法。

【請求項25】

前記1/Xは、0.05未満である、請求項24記載の方法。

【請求項26】

前記細胞外効果は、目的の抗原に結合する抗体の発現である、請求項2_4記載の方法。

【請求項 2_7】

前記細胞外効果は、結合相互作用であり、及び

a) 前記読み出し細胞の細胞外タンパク質で測定され；又は

b) 前記読み出し細胞の細胞内タンパク質で測定される、請求項1_4記載の方法。