

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4344696号
(P4344696)

(45) 発行日 平成21年10月14日(2009.10.14)

(24) 登録日 平成21年7月17日(2009.7.17)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 Z
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14 Z

請求項の数 33 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2004-539912 (P2004-539912)	(73) 特許権者	505110262
(86) (22) 出願日	平成15年9月26日 (2003.9.26)		バイオイー, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2006-500932 (P2006-500932A)		アメリカ合衆国 ミネソタ 55127,
(43) 公表日	平成18年1月12日 (2006.1.12)		セント ポール, センタービル ロード
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/030265		4280
(87) 国際公開番号	W02004/029208	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成16年4月8日 (2004.4.8)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成18年9月7日 (2006.9.7)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/414,692		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成14年9月27日 (2002.9.27)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	コリンズ, ダニエル ピー.
			アメリカ合衆国 ミネソタ 55014,
			リノ レイクス, ペリカン プレイス
			6656

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞分離組成物および細胞分離法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

組成物であって、a) デキストラン；b) 抗グリコホリンA抗体；c) 抗CD15抗体；d) 抗CD9抗体；e) 抗CD94抗体；およびf) 抗CD161抗体を含有する、組成物。

【請求項2】

抗CD72抗体をさらに含有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

抗CD4抗体、抗CD16抗体、および抗CD19抗体をさらに含有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

抗CD8抗体、抗CD16抗体、および抗CD19抗体をさらに含有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

抗CD2抗体をさらに含有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

ヘパリンをさらに含有する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

二価のカチオンをさらに含有する、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記二価のカチオンが Ca^{2+} または Mg^{2+} である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

リン酸緩衝化生理食塩水をさらに含有する、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記組成物の pH が、6.8 と 7.8 との間である、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記組成物の pH が、7.2 と 7.4 との間である、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記抗体が、IgM 抗体または IgG 抗体である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記抗体が、抗体ヒト抗体である、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記抗グリコホリン A 抗体、前記抗 CD15 抗体、または前記抗 C 抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記抗グリコホリン A 抗体、前記抗 CD15 抗体、または前記抗 CD9 抗体の濃度が、約 0.1 mg/L から約 15 mg/L である、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記抗 CD94 抗体または前記抗 CD161 抗体の濃度が、約 0.01 mg/L から約 10 mg/L である、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 17】

請求項 1 に記載の組成物であって、
g) 抗 CD4 抗体または抗 CD8 抗体；
h) 抗 CD16 抗体；
i) 抗 CD19 抗体；
j) ヘパリン；および
k) 二価のカチオン
をさらに含有する、組成物。

【請求項 18】

抗 CD4 抗体を含む、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

抗 CD8 抗体を含む、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記抗体のうちの少なくとも 1 つが、ビオチン化されている、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記抗 CD16 抗体、前記抗 CD19 抗体、前記抗 CD94 抗体、および前記抗 CD161 抗体が、ビオチン化されている、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

血液収集容器、および請求項 17～21 のいずれか 1 項に記載の組成物を備える、キット。

10

20

30

40

50

【請求項 2 3】

前記血液収集容器が、血液バッグまたは真空採血管である、請求項 2 2 に記載のキット。

【請求項 2 4】

細胞を分離するための方法であって、該方法は、以下の a) ～ c) :

a) i) デキストラン;

i i) 抗グリコホリン A 抗体;

i i i) 抗 C D 1 5 抗体;

i v) 抗 C D 9 抗体;

v) 抗 C D 9 4 抗体; および

v i) 抗 C D 1 6 1 抗体

を含有する組成物と、血液細胞含有サンプルを接触させる工程、

b) 該サンプルを、凝集相および上清相へと分画する工程、および、

c) 該細胞を回収する工程

を包含する、方法。

【請求項 2 5】

前記組成物が、抗 C D 4 抗体、抗 C D 1 6 抗体、および抗 C D 1 9 抗体をさらに含有する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

抗 C D 8 抗体、抗 C D 1 6 抗体、および抗 C D 1 9 抗体をさらに含有する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記サンプルが、ヒト由来である、請求項 2 4 ～ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記サンプルが、末梢血サンプル、臍帯血サンプル、または骨髓サンプルである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記細胞が、転移性腫瘍細胞である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記細胞が、前記上清相から回収される、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記細胞が、幹細胞である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

記抗 C D 9 4 抗体および前記 C D 1 6 1 抗体がビオチン化された、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の方法であって、ここで、前記細胞を回収する工程は、
アビジンコートされた粒子を含有する組成物と前記上清相を接触させる工程、
前記上清相と前記組成物を分離する工程、および
前記上清相から細胞を回収する工程
を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、細胞を分離するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

多くの従来の血液細胞単離手順は、密度勾配沈降による赤血球成分および顆粒球成分の、予備的な大規模分離を含む。密度勾配分離は、様々な細胞型の僅かな差異に依存し、その差異によって、それらの細胞型が、変動する密度の流体媒体中にて、異なるレベルで分離することを引き起こされる。それらの細胞型間の密度における差異は、僅かなもので

10

20

30

40

50

あり得、そして、個々の細胞型は、サイズおよび密度において異質なものであり得る。結果として、特定の細胞型が、その密度媒体中の別個の領域で正確に分離するというよりも、それらの細胞型が、密度勾配媒体全体に分布し得る。この現象は、所望の細胞型の回収が乏しいこと、および／または、所望しない細胞型の夾雑という結果を生じ得る。造血性前駆細胞のような希少な血液細胞型を濃縮する手順において、一般的に、密度勾配沈降は、低い収率になる。例えば、臍帯血から前駆細胞（例えば、CD34+造血性幹細胞）を単離する従来の密度勾配方法を用いると、所望の幹細胞の重大な損失を生じ得ることが報告されている。例えば、Wagner, J. E., Am J Ped Hematol Oncol 15:169 (1993)を参照のこと。別の例として、リンパ球を単離する従来の密度勾配方法を用いると、特定のリンパ球のサブセットの選択的な損失を生じることが報告されている。例えば、Collins, D. P., J Immunol Methods 243:125 (2000)を参照のこと。

10

【0003】

ドナー組織から希少な細胞型の回収を増加させることは、移植と免疫療法（例えば、骨髄移植、幹細胞ベースの遺伝子治療、および免疫細胞療法）の成功を劇的に向上し得、明らかに、それらの成功は、治療に用いられている細胞の実際の数に関係している。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

（要旨）

20

本発明は、細胞を分離するための組成物および方法を提供する。これらの開示された組成物および方法は、例えば、組織培養、免疫表現型の特性評価、他の診断テスト、さらなる精製、および療法的投与にのために細胞を効率的に調製し得る。

【0005】

本発明の方法は、細胞分離組成物と、血液細胞含有サンプル（例えば、末梢血サンプル、臍帯サンプル、および骨髄サンプル）を接触させる工程を包含する。特定の機構によって拘束されることなく、本発明の組成物は、細胞表面抗原との相互作用を介して、および／または、細胞-細胞接着を（例えば、細胞表面接着因子の発現を増加させることを介して）刺激することによって、細胞を選択的に凝集させ得る。凝集した細胞は、溶液中に残存している凝集されていない細胞から分画される。細胞は、凝集相もしくは上清相のいずれかから、またはそれらの両方から、回収され得る。

30

【0006】

開示された組成物および方法は、多様な細胞型（例えば、Tリンパ球、Tヘルパー細胞、Tサプレッサー細胞、B細胞、造血性幹細胞、母体循環中の循環胎児細胞、および循環転移性腫瘍細胞を含む）の単離、および濃縮に使用し得る。上記の開示された組成物および方法は、同種移植および自己移植との関連で使用され得る。自己移植との関連で、それらの開示された組成物および方法は、患者の血液または骨髄から転移性癌細胞のような所望しない細胞を除去するために使用され得る。所望の細胞（例えば、造血性幹細胞）は、生命を脅かす腫瘍細胞を含まずに、またはそれらの腫瘍細胞を実質的に含まずに、患者へと戻され得る。上記の開示された組成物および方法は、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類、ブタ、ウシ、およびウマを含む、全ての哺乳類の細胞に適用され得る。

40

【0007】

細胞分離組成物は、デキストラン、抗グリコホリンA抗体、ならびに細胞表面抗原（例えば、CD9、CD15、CD2、CD3、CD4、CD8、CD72、CD16、CD41a、HLAクラスI、HLA-DR、CD29、CD11a、CD11b、CD11c、CD19、CD20、CD23、CD39、CD40、CD43、CD44、CDw49d、CD53、CD54、CD62L、CD63、CD66、CD67、CD81、CD82、CD94、CD99、CD100、CD161、Leu-13、TPA-1または表面Ig）に対する1以上の抗体、およびそれらの組み合わせを含み得る。

【0008】

50

例えば、組成物は、デキストラン、抗グリコホリンA抗体、抗CD15抗体、抗CD9抗体、抗CD94抗体、および抗CD161抗体を含有し得る。いくつかの実施形態において、このような組成物は、抗CD72抗体または抗CD2抗体をさらに含有し得る。他の実施形態において、このような組成物は、抗CD4抗体、抗CD16抗体、および抗CD19抗体、または、抗CD8抗体、抗CD16抗体、および抗CD19抗体をさらに含有し得る。

【0009】

細胞分離組成物は、他の型の細胞（例えば、腫瘍細胞の細胞表面タンパク質）の表面抗原に対する抗体を含み得る。

【0010】

細胞表面抗原に対する抗体が、可溶性形態もしくは基質結合形態のいずれかでまたはそれらの両方の形態で、細胞分離組成物に含まれ得る。抗体は、基質（例えば、ラテックス微粒子、酸でエッチング加工されたガラス粒子、凝集ポリペプチド、多糖類、アビジン粒子、またはビオチン化されたアガロースゲル粒子）に結合し得る。細胞分離組成物中の抗体は、モノクローナル抗体であり得、そして、これらの抗体は、IgM抗体またはIgG抗体であり得る。いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、抗ヒト抗体を含有する。細胞分離組成物中の可溶性抗体の濃度は、約0.01mg/L～約15mg/Lであり得る。基質結合型抗体は、約0.1粒子/Lと約50.0×10⁹粒子/Lとの間である濃度で、細胞分離組成物に含まれ得る。

【0011】

細胞分離組成物は、ヘパリン、二価カチオン（例えば、Ca²⁺、Mg²⁺）、およびリン酸緩衝化生理食塩水も含有し得る。いくつかの実施形態において、組成物は、6.8と7.8との間（例えば、7.2と7.4との間）でpHを有する。

【0012】

本発明は、細胞分離組成物および梱包材料との構成要素を備える、キットも提供し得る。キットは、血液バッグまたは真空採血管のような血液収集容器を含み得る。

【0013】

別段規定されない限り、本明細書中で用いられる全ての専門用語および科学的用語は、本発明が属する分野における当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中で記載されたものと同様または同等な方法および材料が、本発明を実施することに用いられ得るが、適切な方法および材料が、以下に記載されている。本明細書中にて言及した全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それら全体が、参考として援用される。矛盾が生じた場合、定義を含む本明細書が、優先する。さらに、上記の材料、方法、および実施例は、単に例証であり、限定を意図するものではない。

【0014】

本発明の、他の特徴および利点は、以下の詳細な記載および特許請求の範囲から明らかである。

【0015】

（詳細な説明）

本発明は、細胞を分離するための組成物および方法の特徴づける。本発明の組成物は、血液細胞含有サンプルから細胞を選択的に凝集することに使用され得る。特定の機構によって拘束されることなく、本発明の組成物は、細胞表面抗原との相互作用を介して、および／または、細胞表面接着因子（例えば、LFA-1（リンパ球機能関連抗原1、CD11a/CD18）およびICAM-1（細胞間接着分子1、CD54））の発現を刺激することによって、凝集し得る。凝集した細胞は、溶液中に残存している凝集されていない細胞から分画される。細胞は、上清相または凝集相から回収され得る。

【0016】

（細胞分離組成物）

本発明に記載の細胞分離組成物は、デキストランおよび細胞表面抗原に対する（すなわち、細胞表面抗原に対して特異的な結合アフィニティーがある）、1以上の抗体を含有し

10

20

30

40

50

得る。

【0017】

デキストランは、 α (1 $\rightarrow$ 6) モードで優位的に結合したグルコース単位からなる多糖類である。デキストランは、赤血球のスタッキングを引き起こし得（すなわち、赤血球連鎖形成）、そしてそれによって、溶液からの赤血球系細胞の除去を促進する。代表的には、細胞分離組成物中のデキストランの濃度は、10 g/L $\sim$ 20 g/L（例えば、20 g/L）である。細胞表面抗原に対する抗体は、ホモ型の凝集（すなわち、同細胞型の細胞の凝集）を介して、および／または、ヘテロ型の凝集（すなわち、異細胞型の細胞の凝集）を介して、溶液からの血液細胞の除去を促進され得る。

【0018】

細胞分離組成物は、血液細胞表面抗原に対する抗体を含み得、それらの抗原としては、例えば、グリコホリンA、CD15、CD9、CD2、CD3、CD4、CD8、CD72、CD16、CD41a、HLAクラスI、HLA-DR、CD29、CD11a、CD11b、CD11c、CD19、CD20、CD23、CD39、CD40、CD43、CD44、CDw49d、CD53、CD54、CD62L、CD63、CD66、CD67、CD81、CD82、CD94、CD99、CD100、CD161、Leu-13、TPA-1、表面Ig、およびそれらの組み合わせが挙げられる。このようにして、細胞分離組成物は、特定の型の血液細胞を選択的に凝集するように処方され得る。

【0019】

いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、グリコホリンAに対する抗体を含む。代表的には、細胞分離組成物中の抗グリコホリンA抗体の濃度は、0.1 mg/L $\sim$ 15 mg/Lの範囲である（例えば、0.1 mg/L $\sim$ 10 mg/L、1 mg/L $\sim$ 5 mg/L、または1 mg/L）。抗グリコホリンA抗体は、少なくとも二つの機構によって、溶液から赤血球を除去することを促進し得る。抗グリコホリンA抗体は、赤血球のホモ型の凝集を引き起こし得る。なぜなら、グリコホリンAは、赤血球において主要な表面糖タンパク質であるからである。さらに、抗グリコホリンA抗体は、デキストラン媒介赤血球連鎖形成を安定化し得る。例示的なモノクローナル抗グリコホリンA抗体としては、107 FMN（マウスIgG1アイソタイプ）、YTH89.1（ラットIgG2bアイソタイプ）、およびE4（マウスIgMアイソタイプ）が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、M. Vanderlaanら, Molecular Immunology 20:1353 (1983); Telen M. J. and Bolk, T. A., Transfusion 27:309 (1987); および Outram S. ら, Leukocyte Research 12:651 (1988) を参照のこと。

【0020】

いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD15に対する抗体を含む。細胞分離組成物中の抗CD15抗体の濃度は、0.1 mg/L $\sim$ 15 mg/Lの範囲であり得る（例えば、0.1 mg/L $\sim$ 10 mg/L、1 mg/L $\sim$ 5 mg/L、または1 mg/L）。抗CD15抗体は、顆粒球の表面に存在するCD15分子を架橋することによって、顆粒球のホモ型の凝集を引き起こし得る。抗CD15抗体は、単球、NK細胞およびB細胞上の接着分子と相互作用する、顆粒球の表面上の接着分子（例えば、L-セレクトインおよび β -2インテグリン）の発現を促進することによって、単球、NK細胞およびB細胞との顆粒球のホモ型の凝集およびヘテロ型の凝集も引き起こし得る。これら細胞型のヘテロ型の凝集は、赤血球成分とともに、溶液からのこれらの細胞の除去を促進し得る。例示的なモノクローナル抗CD15抗体としては、AHN1.1（マウスIgMアイソタイプ）、FMC-10（マウスIgMアイソタイプ）、BU-28（マウスIgMアイソタイプ）、MEM-157（マウスIgMアイソタイプ）、MEM-158（マウスIgMアイソタイプ）、MEM-167（マウスIgMアイソタイプ）が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Leukocyte typing IV (1989); Leukocyte typing II (1984); Leukocyte typing VI (1995); Solter D. ら, Proc. Natl. Acad. Sci.

10

20

30

40

50

USA 75:5565 (1978); Kannagi, R. ら, J. Biol. Chem. 257:14865 (1982); Magnai, J. L. ら, Archives of Biochemistry and Biophysics 233:501 (1984); Eggens, I. ら, J. Biol. Chem. 264:9476 (1989) を参照のこと。

【0021】

いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD9に対する抗体を含む（例えば、 $0.1\text{mg/L} \sim 15\text{mg/L}$ 、 $0.1\text{mg/L} \sim 10\text{mg/L}$ 、 $1\text{mg/L} \sim 5\text{mg/L}$ 、または 1mg/L の範囲の濃度で）。抗CD9抗体は、血小板のホモ型の凝集を引き起こし得る。抗CD9抗体は、顆粒球および単球の表面へ接着している血小板を介して、顆粒球および単球のヘテロ型の凝集も引き起こし得る。CD9抗体は、白血球細胞表面への血小板の結合を促進する、血小板1-セレクチンの発現を促進し得る。このようにして、抗CD9抗体は、多様な細胞-細胞結合を促進し得、それによって、凝集および溶液からの除去を促進する。例示的なモノクローナル抗CD9抗体としては、MEM-61（マウスIgG1アイソタイプ）、MEM-62（マウスIgG1アイソタイプ）、MEM-192（マウスIgMアイソタイプ）、FMC-8（マウスIgG2aアイソタイプ）、SN4（マウスIgG1アイソタイプ）、BU-16（マウスIgG2aアイソタイプ）が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Leukocyte typing VI (1995); Leukocyte typing II (1984); Von dem Bourne A. E. G. Kr. and Moderman P. N. (1989) In Leukocyte typing IV (ed. W. Knapp, ら), pp. 989-92. Oxford University Press, Oxford; Jennings, L. K. ら, In Leukocyte typing V, ed. S. F. Schlossmann ら., pp. 1249-51. Oxford University Press, Oxford (1995); Lanza, F. ら, J. Biol. Chem. 266:10638 (1991); Wright ら. Immunology Today 15:588 (1994); Rubinstein, E. ら, Seminars in Thrombosis and Hemostasis 21:10 (1995).

いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD41に対する抗体を含み、それは血小板を選択的に凝集させ得る。いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD3に対する抗体を含み、それはT細胞を選択的に凝集させ得る。いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD2に対する抗体を含み、それはT細胞およびNK細胞を選択的に凝集させ得る。いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD72に対する抗体を含み、それはB細胞を選択的に凝集させ得る。いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD16に対する抗体を含み、それはNK細胞および好中球を選択的に凝集させ得る。これら抗体のそれぞれの濃度は、 $0.01\text{mg/L} \sim 15\text{mg/L}$ の範囲であり得る。

【0022】

他の実施形態において、細胞分離組成物は、CD94およびCD161に対する抗体を含み、それらは、NK細胞のサブセットを選択的に凝集し得る。クローンHP-3D9は、適切な抗CD94抗体の一例である。クローンB199.2は、適切な抗CD161抗体の一例である。モノクローナル抗CD94抗体およびモノクローナル抗CD161抗体は、特に有益である。代表的には、これらの抗体のそれぞれの濃度は、 $0.01\text{mg/L} \sim 10\text{mg/L}$ の範囲である（例えば、 $0.1\text{mg/L} \sim 5\text{mg/L}$ 、 $0.1\text{mg/L} \sim 2.5\text{mg/L}$ 、 $0.1\text{mg/L} \sim 1.5\text{mg/L}$ ）。例えば、抗CD94抗体の濃度は、 $0.125\text{mg/L} \sim 0.25\text{mg/L}$ であり得る。抗CD161抗体の濃度は、 $0.25\text{mg/L} \sim 1\text{mg/L}$ であり得る。

【0023】

上述のように、細胞分離組成物は、特定の血液細胞を選択的に凝集するように処方され

得る。一例として、デキストランならびにグリコホリンA、CD15、およびCD9に対する抗体を含有する細胞分離組成物は、赤血球、顆粒球、NK細胞、B細胞、および血小板の凝集を促進し得る。次いで、T細胞、NK細胞、および希少な前駆体は、溶液より回収され得る。その処方物が、CD3に対する抗体も含むと、T細胞もまた、凝集し、そして、NK細胞および希少な前駆体が、溶液より回収され得る。他の実施形態において、細胞分離組成物は、デキストランおよびグリコホリンA、CD15、CD9、CD94、およびCD161に対する抗体を含み、その結果、赤血球、顆粒球、NK細胞、B細胞、および血小板は凝集され、そして、T細胞および希少な前駆体が溶液より回収され得る。CD4 T細胞の精製された群を得るために、抗CD8抗体、抗CD16抗体、および抗CD19抗体が、組成物中に含まれ得る。CD8 T細胞の精製された群を得るために、抗CD4抗体、抗CD16抗体、および抗CD19抗体が組成物中に含まれ得る。適切な抗CD4抗体の非限定的な実施例としては、クローンQS4120、クローンPRA-T4、クローンS3.5、クローンM-T441、クローンRFT-4、およびクローン13B8.2が挙げられる。適当な抗CD8抗体の非限定的な実施例としては、クローンHIT8a、クローンUCHT4、およびクローンRPA-T8が挙げられる。クローン3G8は、適切な抗CD16抗体の一例である。適切な抗CD19抗体の非限定的な実施例としては、クローンHIB19、およびクローンBU12が挙げられる。

10

【0024】

細胞分離組成物は、他の型の細胞の表面抗原（例えば、腫瘍細胞の細胞表面タンパク質）に対する抗体を含み得る。当該者は、慣用法を用いて、血液の細胞および他の表面抗原に対する抗体を調製し得る。その他の細胞は、ヒトならびに他の哺乳類（例えば、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、およびモルモット）、ブタ、ウシ、およびウマを含む）に由来する。

20

【0025】

代表的には、上記の組成物に用いられる抗体は、モノクローナル抗体であり、これは、ある抗原に含まれる特定エピトープに対する抗体の一群である。適切なモノクローナル抗体は、市販されているか、または標準ハイブリドーマ技術を用いて調製され得る。特に、モノクローナル抗体は、培養物中の連続継代細胞系による抗体分子の産生を提供する技術によって、得ることができる。上記の技術としては、Kohler, G. ら, Nature, 1975, 256:495によって記載された技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kosbor ら, Immunology Today 4:72 (1983) ; Cole ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026 (1983)）、およびEBV-ハイブリドーマ技術（Cole ら, 「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」, Alan R. Liss, Inc., pp 77-96 (1983)）が挙げられる。

30

【0026】

抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD、およびそれらのサブクラスを含む、任意の免疫グロブリンクラスであり得る。IgGアイソタイプおよびIgMアイソタイプの抗体は、本発明の細胞分離組成物において、特に有益である。五量体IgM抗体は、IgG抗体より多くの抗原結合部位を含み、そして、いくつかの場合では（例えば、抗グリコホリンAおよび抗CD15）、細胞分離試薬にとって特に有用である。他の場合において（例えば、抗CD9抗体）、そのIgGアイソタイプの抗体は、ホモ型の凝集および/またはヘテロ型の凝集を刺激するために、特に有益である。

40

【0027】

細胞表面抗原に対する抗体は、液相（すなわち、可溶性）で提供され得、または、固相に結合して（すなわち、基質結合型）提供され得る。代表的には、液相抗体は、約0.01mg/Lと約15mg/Lとの間（例えば、0.25mg/Lと10mg/Lとの間、0.25mg/Lと1mg/Lとの間、0.5mg/Lと2mg/Lとの間、1mg/Lと2mg/Lとの間、4mg/Lと8mg/Lとの間、5mg/Lと10mg/Lとの間）である濃度で、細胞表面組成物中に提供され得る。代表的には、基質結合型抗体は、約

50

0.1 粒子/L と約 5.0×10^9 粒子/L との間（例えば、0.25 と 1.0×10^9 粒子/L との間、1 粒子/L と 2.0×10^9 粒子/L との間、2 粒子/L と 1.0×10^9 粒子/L との間、0.5 粒子/L と 2×10^9 粒子/L との間、2 粒子/L と 5×10^9 粒子/L との間、5 粒子/L と 10×10^9 粒子/L との間、および 10 粒子/L と 30×10^9 粒子/L との間）である濃度で、細胞分離組成物中に提供される。ここでの粒子とは、そこに抗体が結合している個相粒子をいう。

【0028】

異なる細胞表面抗原に対する抗体は、細胞表面分子の架橋および細胞表面接着分子の活性化を促進するために、固相へ共有結合的に結合され得る。基質結合型抗体の利用は、（例えば、凝集細胞に起因する粒子の量によって、または精製に便利な特性によって）細胞分離を促進し得る。

【0029】

いくつかの実施形態において、基質結合型抗体が結合している固相は、粒状である。いくつかの実施形態において、抗体は、常磁性ビーズのようなラテックス微粒子に、（例えば、ビオチン-アビジン結合を介して、ポリスチレンビーズの COO 基への共有結合を介して、または変性ビーズ上の NH_2 基への共有結合を介して）結合される。いくつかの実施形態において、抗体は、酸性エッチングされたガラス粒子に、（例えば、ビオチン-アビジン結合を介して）結合される。いくつかの実施形態において、抗体は、凝集ウシ血清アルブミンのような凝集ポリペプチドに、（例えば、ビオチン-アビジン結合を介して、ポリペプチド COO 基またはポリペプチド NH_2 基への共有結合を介して）結合される。いくつかの実施形態において、抗体は、高分子量（例えば、 $> 1,000,000 \text{ M}_r$ ）デキストランスルフェートのような多糖へ共有結合される。いくつかの実施形態において、ビオチン化抗体は、アビジン粒子に結合し、一つのアビジン分子について四つの抗体を保持する四量体の複合体をつくる。いくつかの実施形態において、抗体は、ビオチン-アビジン-ビオチン化抗体結合を介して、ビオチン化アガロースゲル粒子（One Cell Systems, Cambridge, MA, U.S.A）に結合する。このような粒子は、代表的には、大きさで約 $300 \sim 500$ ミクロンであり、超音波水浴の中で、または高速混合水浴の中で生成され得る。

【0030】

細胞-基質粒子（すなわち、細胞および基質結合型抗体を含む粒子）は、凝集体として溶液から沈殿し得る。細胞-基質粒子は、例えば、粒子が常磁性ビーズのときのような印加された磁場によって、溶液より除去もされ得る。

【0031】

細胞分離組成物はまた、二価のカチオン（例えば、 Ca^{+2} および Mg^{+2} ）も含有し得る。二価カチオンは、例えば、平衡塩類溶液（例えば、ハンス液）によって、提供され得る。 Ca^{+2} イオンは、セレクチン媒介性細胞-細胞接着およびインテグリン媒介性細胞-細胞接着に対して、重要であり得る。

【0032】

本発明の細胞分離組成物はまた、ヘパリンのような抗凝血剤を含み得る。ヘパリンは、凝固および高濃度カルシウム環境での凝固に関連する、非特異的な細胞損失を防ぎ得る。ヘパリンは、血小板クランピング（clumping）も促進する。クランピングした血小板は、顆粒球および単球へ付着し得、それによって、単独の血小板より、ヘテロ型の凝集を高め得る。ヘパリンは、ヘパリン塩（例えば、ヘパリンナトリウム、ヘパリンリチウム、またはヘパリンカリウム）として供給され得る。

【0033】

（細胞分離方法）

この開示された方法は、例えば、組織培地、免疫表現性特性評価、診断テスト、さらなる精製、および治療的投与のために細胞を効率的に調製するために使用され得る。特別な機構によって拘束されることなく、本発明の組成物は、細胞表面抗原との相互作用を介して、および/または、細胞-細胞接着を刺激することによって（例えば、細胞表面因子の

発現の増大を介して)、凝集し得る。凝集していない細胞から離れた凝集細胞画分は、溶液中に残る。

【0034】

凝集の後、凝集していない細胞は液相（すなわち、上清相）より回収され得る。1以上ビオチン化された抗体が使用される実施形態において、上記の上清相は、所望しない細胞の上清相をさらに減らすために、アビジンまたはストレプトアビジンに覆われた粒子（例えば、磁性ビーズ）を含む組成物と接触され得る。その上清相と組成物とを混合した後、それらのビーズは、その上清相より分離され得、そして細胞が、上清相から除去され得る。

【0035】

細胞はまた、凝集体から回収され得る。凝集細胞は、例えば、EDTAまたはEGTAのような二価カチオンキレート剤を含む緩衝液へ細胞を移すことによって、解離され得る。その凝集体より回収された細胞は、細胞表面抗原に対する抗体を使用することによって、さらに分離され得る。細胞は、融点のちょうど上の温度へ凝集体を温めることによって、ゲル微粒子-抗体-細胞凝集体より回収され得る。

【0036】

上記の開示された方法は、末梢血（例えば、静脈穿刺によって得られる）、臍帯血（例えば、妊婦後に得られる）、および骨髓（例えば、吸引液より）を含んでいるサンプルを含む、多様な血液細胞より、細胞を分離することに用いられ得る。血液細胞含有サンプルは、特定型の細胞の凝集を引き起こすために、細胞分離組成物と接触し得る。例えば、赤血球および分化骨髓血液成分は、これらの細胞の表面抗原に対する抗体を含む細胞分離組成物を用いて、選択的に凝集され得る。それらの開示された組成物および方法は、多様な細胞型（これは、例えば、Tリンパ球、Tヘルパー細胞、Tサプレッサー細胞、B細胞、造血性幹細胞、母体循環中の循環胎児細胞、および循環転移性腫瘍細胞を含む）について単離し、そして富ませるのに使用され得る。それらの開示された組成物は、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類、ブタ、ウシ、およびウマを含む、全ての哺乳類の細胞を凝集するために用いられ得る。

【0037】

それらの開示された組成物および方法は、同種移植および自己移植との関連で用いられ得る。自己移植との関連で、上記の開示された組成物および方法は、所望しない細胞（例えば、患者の血液または骨髓から転移性癌細胞）を除去するために用いられ得る。

【0038】

腫瘍細胞の細胞表面タンパク質に対する抗体を含有する細胞分離組成物は、患者の血液または骨髓から腫瘍細胞を一掃するために用いられ得る。このような組成物は、例えば、凝集体の中の腫瘍細胞を得たり検出したりするための、診断的手順のためにも用いられ得る。ここでは、それらは濃縮され、それゆえ、循環血中でより、または骨髓中でより、より簡単に検出され得る。上皮増殖因子についてのレセプターに対する抗体を含む細胞分離組成物は、上皮腫瘍（例えば、頭頸部の腫瘍）に由来する腫瘍細胞を凝集することに用いられ得る。エストロゲンレセプターに対する抗体を含有する細胞分離組成物は、胸部の腫瘍および卵巣の腫瘍に由来する腫瘍細胞を凝集するのに用いられ得る。表面免疫グロブリンに対する抗体を含有する細胞分離組成物は、慢性リンパ性白血病、形質細胞腫、および多様な骨髓腫に関連する腫瘍細胞を凝集することに用いられ得る。乳癌細胞は、それらの細胞表面上にCD15を発現し、そして、CD15に対する抗体を含む細胞分離組成物を用いると、骨髓より排出され得る。他の処方物が、患者の血液もしくは骨髓から、他の癌（例えば、赤血球病、内皮癌、または胃腸癌）より誘導された転移性腫瘍細胞を得るため、またはそれらを一掃するために、細胞型および細胞表面タンパク質に基づいて作製され得る。

【0039】

（細胞分離キット）

細胞分離組成物は、梱包材料と組み合わせられ、キットとして販売され得る。細胞分離

10

20

30

40

50

組成物の成分は、別個に、または互いに組み合わせて、梱包され得る。いくつかの実施形態において、梱包材料は、血液収集容器を含む（例えば、血液バッグ、真空採血管）。代表的には、キットで備えられる梱包材料は、説明書、またはどのように細胞分離組成物が特定型の細胞を凝集することに用いられ得るかを記載したラベルを備える。このようなキットを製造するための成分および方法は、周知である。

【0040】

本発明は、以下の実施例においてさらに記載され、これらは、特許請求の範囲で記載された本発明の範囲を限定しない。

【実施例】

【0041】

10

（実施例1：血液細胞を分離すること）

この実施例は、以下で記載する細胞分離試薬を用いて、細胞を分離する一般的な方法を記載している。等量（すなわち、25ml）の細胞分離試薬を、50ml コニカル採血管中で、等量（すなわち、25ml）のエチレンジアミン四酢酸（EDTA）抗凝固ヘパリン処理末梢血サンプルと組み合わせられた。20×10⁶細胞/ml より多い白血細胞数を含んでいるサンプルでは、血液と細胞分離試薬を1：2で組み合わせた。採血管を、ロッカープラットホーム上で、20分間～45分間、室温で穏やかに混合した。採血管を、凝集していない細胞から、凝集細胞を分割させるために、ラックの中で30分間～50分間、直立に静置した。凝集していない細胞は、溶液中に残った。凝集体をかき乱すことなく、ピペットを使用して、上清から凝集していない細胞を回収した。回収した細胞を、25ml PBSで洗浄し、そして、7分間に亘って500×gで遠心分離した。細胞ペレットを、4mlのPBS中に再懸濁した。

20

【0042】

1以上の抗体をビオチン化する実施例では、アビジンで被覆した磁性ビーズを、上清に加えた（出発サンプルの1mlにつき1mlのビーズ）。ビーズおよび上清を、プラットホームロッカー上で20分間に亘って混合した。ビーズおよび所望しない細胞に結合したビーズを、その混合物を含んでいる採血管をPrepaMagTM中で5分間に亘って置くことによって、取り除いた。ビーズおよび所望しない細胞に結合したビーズを、採血管の側面にひきつけた。その採血管の側面上にあるビーズおよび細胞をかき乱さないようにして、ピペットを用いて、各採血管の中心および底からその流体を取り出した。

30

【0043】

細胞も、EDTAおよびエチレングリコールビス（2-アミノエチルエーテル）-N,N,N',N'-四酢酸（EGTA）を含んでいる、低浸透圧溶解液を用いて、凝集体から回収した。凝集細胞を、25ml VitalyseTM（BioErgonomics, St. Paul, MN）で処理し、そしてボルテックスした。10分後、細胞を、印加した磁場に対して曝露し、常磁性ビーズに結合した抗体に結合する細胞を回収するか、または、7分間に亘って500×gで遠心分離して、そして上清が除去された。いずれの場合でも、細胞を、4mlのPBSに再懸濁した。

【0044】

赤血球、白血球、リンパ球、単球、顆粒球、T細胞、B細胞、およびNK細胞の回収を、フローサイトメトリーおよび免疫表現法によって決定した。フローサイトメトリーの前に、白血球回収（すなわち、白血細胞数）を、Coulter Onyx Hematology Analyzerを用いて決定し、そしてサンプルを、細胞数1×10⁷細胞/mlに調整した。100μlアリコートの体積調整サンプルを、FITC標識化抗CD3抗体（T細胞に対して反応性）、PE標識化抗CD19抗体（B細胞に対して反応性）、またはPE標識化抗CD16抗体（NK細胞に反応性）のいずれかで、15分～30分間に亘り、暗所にて室温で染色した。2mlのPBSを、サンプルの各々に加え、次いで、そのサンプルをボルテックスし、遠心分離して、細胞をペレット化した。上清は廃棄し、そして、細胞ペレットをボルテックスして、0.5mlのPBSに再懸濁した。染色細胞および未染色細胞を、Coulter XL フローサイトメーターを用いたフローサ

40

50

イトメトリーによって分析した。赤血球、白血球、リンパ球、単球、顆粒球、および血小板を、特徴的な前方および側方の光散乱特性に基づいて同定した。B細胞、T細胞、およびNK細胞を、光散乱および標識化抗体による染色に基づいて同定した。

【0045】

(実施例2：赤血球凝集)

表1に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために用いた。

【0046】

【表1】

表1

デキストラン (平均分子量413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 mL/L
ヘパリンナトリウム (10,000 units/ML)	1 mL/L
ハンクス 液 (pH 7.2-7.4)	50 mL/L
抗ヒトグリコホリンA(マウス 1 g Mモノクローナル抗体、クローンE4)	1.0 mg/L

10

【0047】

分離の結果は表2に示す。赤血球は、その上清から99.7%まで低減した。リンパ球(T細胞、B細胞、およびNK細胞)を、単球および顆粒球と比べて、上清中にて濃縮した。

20

【0048】

【表2】

表2

	分離前	分離後
赤血球 / mL	4.41×10^9	0.015×10^9
白血球 / mL	5.9×10^6	5.3×10^6
リンパ球 (%)	28.7	41.9
単球 (%)	8.69	4.78
顆粒球 (%)	62.5	52.6
T細胞 (CD3+)	19.7	31.8
B細胞 (CD19+)	4.46	5.42
NK細胞 (CD16+)	3.15	5.9

30

【0049】

(実施例3：赤血球およびCD2+細胞の凝集)

表3に記載した試薬を、実施例1に記載した方法によって細胞を分離するために使用した。

【0050】

40

【表 3】

表 3

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 mL/L
ヘパリンナトリウム (10,000 units/mL)	1 mL/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50 mL/L
抗ヒトグリコホリンAマウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンE4)	1.0 mg/L
抗ヒトCD2常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD2、 クローンd118、10、1で標識された、アビジンコート化 4、3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	14.02 x 10 ⁹ 粒子/L

10

【0051】

分離の結果を表4に示す。上清中では、赤血球を99.7%まで低減し、T細胞を95.1%まで低減し、そしてNK細胞を69.1%まで低減した。B細胞を、他の細胞と比べて上清中で濃縮した。

【0052】

【表 4】

表 4

	分離前	分離後
赤血球 / mL	4.41 x 10 ⁹	0.014 x 10 ⁹
白血球 / mL	5.9 x 10 ⁶	2.63 x 10 ⁶
リンパ球 (%)	28.7	16.0
単球 (%)	8.69	6.04
顆粒球 (%)	62.5	75.6
T細胞 (CD3+)	19.7	3.3
B細胞 (CD19+)	4.46	9.63
NK細胞 (CD16+)	3.15	4.32

20

【0053】

(実施例4：赤血球およびCD72⁺細胞の凝集)

30

表5に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために使用した。

【0054】

【表 5】

表 5

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 mL/L
ヘパリンナトリウム (10,000 units/mL)	1 mL/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50 mL/L
抗ヒトグリコホリンA (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンE4)	1.0 mg/L
抗ヒトCD72常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒト CD72、クローンBU40で標識された、アビジンコート化 4、3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	2.63 x 10 ⁶ 粒子/mL

40

【0055】

分離の結果は表6に示す。上清中では、赤血球は99.5%奪われ、そしてB細胞は81.6%奪われた。

【0056】

【表 6】

表 6		
	分離前	分離後
赤血球 / mL	4.41×10^9	0.021×10^9
白血球 / mL	5.9×10^6	3.2×10^6
リンパ球 (%)	28.7	47.0
単球 (%)	8.69	4.78
顆粒球 (%)	62.5	47.7
T細胞 (CD3+)	19.7	41.3
B細胞 (CD19+)	4.46	2.75
NK細胞 (CD16+)	3.15	4.77

10

【0057】

(実施例5：赤血球、CD15+細胞、およびCD9+細胞の凝集)

表7に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために用いた。

【0058】

【表 7】

表 7	
デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 mL/L
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /ml)	1 mL/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50 mL/L
抗ヒトグリコホリンA (マウス IgMモノクローナル抗体、クローンE4)	0.1 - 15 mg/L (好ましくは約 1.0 mg/L)
抗CD15 (マウス IgMモノクローナル抗体、クローンMEM-158)	0.1 - 15 mg/L (好ましくは約 1.0 mg/L)
抗CD9 (マウス IgGモノクローナル抗体、クローンMEM-61)	0.1 - 15 mg/L (好ましくは約 1.0 mg/L)

20

【0059】

分離の結果は表8に示す。上清中では、赤血球を99.9%まで低減し、単球および顆粒球を99.8%まで低減し、B細胞は74%まで低減し、そしてNK細胞を64.9%まで低減し。さらに、分離の前に上清中 $2.26 \times 10^6 / \text{ml}$ で存在する血小板を、99.4%の涸渇のために $1.4 \times 10^6 / \text{ml}$ まで低減した。

30

【0060】

【表 8】

表 8		
	分離前	分離後
赤血球 / mL	4.41×10^9	0.006×10^9
白血球 / mL	5.9×10^6	1.53×10^6
リンパ球 (%)	28.7	99.0
単球 (%)	8.69	0.12
顆粒球 (%)	62.5	.083
T細胞 (CD3+)	19.7	83.2
B細胞 (CD19+)	4.46	8.10
NK細胞 (CD16+)	3.15	8.43

40

【0061】

(実施例6：赤血球、CD15+細胞、CD9+細胞、およびCD2+細胞の凝集)

表9に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために使用した。

50

【0062】

【表9】

表 9

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 mL/L
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /mL)	1 mL/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50 mL/L
抗ヒトグリコホリンA (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンE4)	1 mg/L
抗CD15 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-158)	1 mg/L
抗CD9(マウス(murine)IgGモノクローナル抗体、クローンMEM-61)	1 mg/L
抗ヒトCD2常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD2、 クローンd118、10、1で標識された、アビジンコート化 4、3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	14.02 x 10 ⁹ 粒子/L

10

【0063】

分離の結果は表10に示す。上清中では赤血球を99.9%まで低減し、単球および顆粒球を99.9%まで低減し、B細胞を16.8%まで低減し、NK細胞を29%まで低減し、そしてT細胞を91.5%まで低減した。さらに、分離の前に上清中226×10⁶/mLで存在する血小板を、99.9%の潤渴のために0.34×10⁶/mLまで低減した。

20

【0064】

【表10】

表 10

	分離前	分離後
赤血球 / mL	4.41 x 10 ⁹	0.005 x 10 ⁹
白血球 / mL	5.9 x 10 ⁶	1.26 x 10 ⁶
リンパ球 (%)	28.7	99.8
単球 (%)	8.69	0.06
顆粒球 (%)	62.5	0.09
T細胞 (CD3+)	19.7	6.78
B細胞 (CD19+)	4.46	69.5
NK細胞 (CD16+)	3.15	20.7

30

【0065】

(実施例7：赤血球、CD15+細胞、CD19+細胞、およびCD72+細胞の凝集)

表11に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために使用した。

40

【0066】

【表 1 1】

表 11

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化食塩水 (10X)	100 mL/L
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /mL)	1 mL/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50 mL/L
抗ヒトグリコホリンA (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンE4)	1 mg/L
抗CD15 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-158)	1 mg/L
抗CD9(マウス(murine)IgGモノクローナル抗体、クローンMEM-61)	1 mg/L
抗ヒトCD72常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD72、 クローンBU40で標識された、アビジンコート化4.3ミクロン 直径常磁性ポリスチレン粒子)	2.63×10^9 粒子/L

10

【0067】

分離の結果を、表12に示す。上清中では、赤血球を99.9%まで低減し、単球を検出不能になるまで低減し、顆粒球を99.97%まで低減し、B細胞を97.2%まで低減し、NK細胞を54.9%まで低減した。さらに、分離の前に上清中 2.26×10^6 / mlで存在する血小板を、99.96%の潤渇のために 0.1×10^6 / mlまで低減した。

20

【0068】

【表 1 2】

表 12

	分離前	分離後
赤血球 / mL	4.41×10^9	0.006×10^9
白血球 / mL	5.9×10^6	2.3×10^6
リンパ球 (%)	28.7	99.9
単球 (%)	8.69	0
顆粒球 (%)	62.5	0.1
T細胞 (CD3+)	19.7	92.4
B細胞 (CD19+)	4.46	0.59
NK細胞 (CD16+)	3.15	7.02

30

【0069】

(実施例8：赤血球、CD15+細胞、CD9+細胞、CD19+細胞、およびCD16+細胞の凝集)

表13に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために使用する。T細胞およびCD3+細胞を、上清から回収する。B細胞および顆粒球を凝集体から回収する。

【0070】

40

【表 13】

表 13

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 mL/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50mL/L
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /ml)	1 mL/L
抗ヒトグリコホリンA (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンE4)	0.1-15 mg/L (preferably about 1.0 mg/L)
抗ヒトCD15 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-158)	0.1-15 mg/L (preferably about 1.0 mg/L)
抗ヒトCD9 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-61)	0.1-15 mg/L (preferably about 1.0 mg/L)
抗CD19 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD19、 クローンH1B19 で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	0.1-30.0 x 10 ⁹ 粒子/L (preferably about 19.8 x 10 ⁹ 粒子/L)
抗CD16 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD16、 クローン3G8 で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	5.5 x 10 ¹¹ 粒子/L

10

【0071】

20

(実施例9：赤血球、CD15+細胞、CD9+細胞、CD19+細胞、CD16+細胞、およびCD4+細胞の凝集)

表14に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために使用した。CD8+細胞を、上清から回収した。

【0072】

【表 14】

表 14

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 mL/L
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /mL)	1 mL/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50mL/L
抗ヒトグリコホリンA (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンE4)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗ヒトCD15 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-158)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗ヒトCD9 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-61)	0.1-15 mg/L (好ましくは about 1.0 mg/L)
抗CD19 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD19、 クローンH1B19 で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	0.1-30.0 x 10 ⁹ 粒子/L (好ましくは 約 19.8 x 10 ⁹ 粒子/L)
抗CD16 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD16、 クローン3G8 で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	5.5 x 10 ¹¹ 粒子/L
抗CD4 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD4、 クローンRFT-4γ またはクローンQS4120 で標識された、 アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	1.2 x 10 ¹⁰ 粒子/L

30

40

【0073】

(実施例10：赤血球、CD15+細胞、CD9+細胞、CD19+細胞、CD16+

50

細胞、およびCD8+細胞の凝集)

表15に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために使用した。CD4+細胞を、上清から回収した。

【0074】

【表15】

表 15

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 mL/L
ヘパリンナトリウム (10,000 units/mL)	1 mL/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50mL/L
抗ヒトグリコホリンA (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンE4)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗ヒトCD15 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-158)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗ヒトCD9 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-61)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗CD19 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD19 (クローンH1B19) で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	0.1-30.0 x 10 ⁹ 粒子/L (好ましくは 約 19.8 x 10 ⁹ 粒子/L)
抗CD16 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD16 (クローン3G8) で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	5.5 x 10 ¹¹ 粒子/L
抗CD8常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD8 (クローンHIT8a) で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	7.92 x 10 ⁹ 粒子/L

【0075】

(実施例11: 赤血球、CD15+細胞、CD9+細胞、CD19+細胞、およびCD2+細胞の凝集)

表16に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために使用した。CD34+細胞を、50%を超える純度かつ80%を超える収率で、上清から回収した。

【0076】

10

20

30

【表 16】

表 16

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 mL/L
ヘパリンナトリウム (10,000 単位/mL)	1 mL/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50mL/L
抗ヒトグリコホリンA (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンE4)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗ヒトCD15 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-158)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗ヒトCD9 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-61)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗CD19 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD19、 クローンH1B19で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	0.1-30.0 x 10 ⁹ 粒子/L (好ましくは 約 19.8 x 10 ⁹ 粒子/L)
抗CD2 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD2、 クローンd118.10.1で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	0.1-30.0 x 10 ⁹ 粒子/L (好ましくは 約 3.0 x 10 ¹⁰ 粒子/L)

10

【0077】

20

(実施例12：赤血球、CD15+細胞、CD9+細胞、CD2+細胞、およびCD16+細胞の凝集)

表17に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために使用した。B細胞を、上清から回収された。

【0078】

【表 17】

表 17

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/L
ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 mL/L
ヘパリンナトリウム(10,000 単位/mL)	1 mL/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50mL/L
抗ヒトグリコホリンA (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンE4)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗ヒトCD15 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-158)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗ヒトCD9 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-61)	0.1-15 mg/L (好ましくは 約 1.0 mg/L)
抗CD2 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD2、 クローンd118.10.1で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	0.1-30.0 x 10 ⁹ 粒子/L (好ましくは 約 3.0 x 10 ¹⁰ 粒子/L)
抗CD16 常磁性凝集粒子 (飽和用量のビオチン標識化マウス (mouse) 抗ヒトCD16、 クローン3G8で標識された、アビジンコート化 4.3ミクロン直径常磁性ポリスチレン粒子)	5.5 x 10 ¹¹ 粒子/L

30

40

【0079】

(実施例13：赤血球、成熟骨髓性細胞、NK細胞、およびB細胞の凝集)

表18に記載した試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために使用した。塩酸(4N)または水酸化ナトリウム(4N)を、7.2と7.4との間であるpHに調整するために使用した。抗CD8抗体、抗CD16、抗CD19抗体、抗CD94抗体、および抗CD161抗体を、ビオチン化した。CD4 T細胞について濃縮され

50

た細胞懸濁液を、上清から得た。CD4細胞のおよそ75%~94%を、それぞれの白血球サンプルから回収した（図1は、5人のドナーの代表的データを提供する）。比較のため、密度勾配分離を用いた市販の他の製品では、細胞の回収は50%またはそれ以下であった。平均して、CD4細胞の純度は、96.1%であるが（図2、12人のドナーの代表データを参照のこと）、他方、密度勾配分離を用いた市販の他の製品を用いて精製したCD4細胞については、平均純度は86.7%であった。

【0080】

【表18】

表 18

デキストラン (平均分子量 413,000)	2%
ヘパリンナトリウム(10,000 単位 /mL)	1 U/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	最終体積へ
抗ヒトグリコホリンA (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンE4)	1:40 希釈
抗ヒトCD15 (マウス (murine) IgM モノクローナル抗体、クローンMEM-158)	1 mg/L
抗ヒトCD9 (マウス IgMモノクローナル抗体、クローンMEM-61)	1 mg/L
抗ヒトCD8 (クローンHIT8a)	1 mg/L
抗ヒトCD16 (クローン3G8)	1 mg/L
抗ヒトCD19 (クローンHIB19)	1 mg/L
抗ヒトCD94 (クローンHP-3D9)	0.125 mg/mL
抗ヒトCD161 (クローンB199.2)	0.25 mg/mL

【0081】

（実施例14：赤血球、成熟骨髄性細胞、NK細胞、およびB細胞の凝集）

表19に記載された試薬を、実施例1に記載された方法によって細胞を分離するために使用した。塩酸（4N）または水酸化ナトリウム（4N）を、7.2と7.4との間にpHを調整するために使用した。抗CD4抗体、抗CD16、抗CD19抗体、抗CD94抗体、および抗CD161抗体を、ビオチン化した。CD8 T細胞を濃縮した細胞懸濁液を、上清から得た。CD8細胞のおよそ53%から81%が、それぞれの白血球サンプルから回収された（図3は、5人のドナーの代表データを提供する）。比較として、密度勾配分離を必要とする市販の他の製品では、細胞の回収は、52%以下であり、さらに代表的には、細胞回収は、35%未満であった。平均して、CD8細胞の純度は、93.9%であるが（図4を参照のこと、12人のドナーの代表データ）、他方、市販の製品により精製したCD8細胞については、平均純度は84.2%であった。

【0082】

【表 19】

表 19

デキストラン (平均分子量 413,000)	2%
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /mL)	1 U/L
ハンクスの平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	最終体積へ
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgMモノクローナル抗体、クローン E 4)	1:40 希釈
抗ヒト CD 15 (マウス IgMモノクローナル抗体、クローン MEM-158)	1 mg/L
抗ヒト CD 9 (マウス IgMモノクローナル抗体、クローン MEM-61)	1 mg/L
抗ヒト CD 4 (クローン QS 4120)	1 mg/L
抗ヒト CD 16 (クローン 3G8)	1 mg/L
抗ヒト CD 19 (クローン HIB19)	1 mg/L
抗ヒト CD 94 (クローン HP-3D9)	0.25 mg/mL
抗ヒト CD 161 (クローン B199.2)	1 mg/mL

10

【0083】

(他の実施例)

前述の詳細な記載および実施例について、本発明が記載されてきたが、前述の記載および実施例は、本発明の範囲を説明することを意図し、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって規定される。他の局面、利点、および改変は、その特許請求の範囲のうちにある。

20

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図 1】図 1 は、血液サンプルからの CD 4 T 細胞のパーセント回収のグラフである。

【図 2】図 2 は、血液サンプルから回収された CD 4 T 細胞のパーセント純度のグラフである。

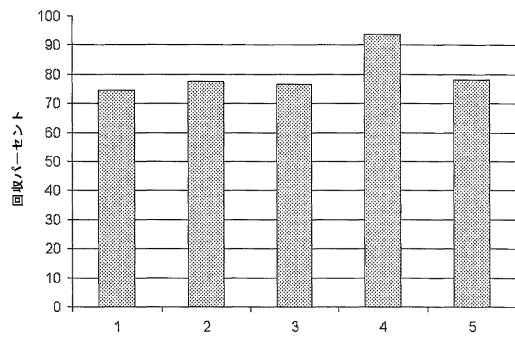
【図 3】図 3 は、血液サンプルからの CD 8 T 細胞のパーセント回収のグラフである。

【図 4】図 4 は、血液サンプルから回収された CD 8 T 細胞のパーセント純度のグラフである。

30

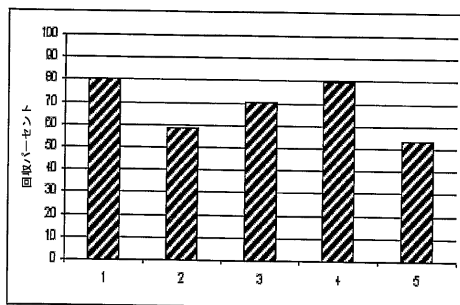
【図 1】

FIG 1



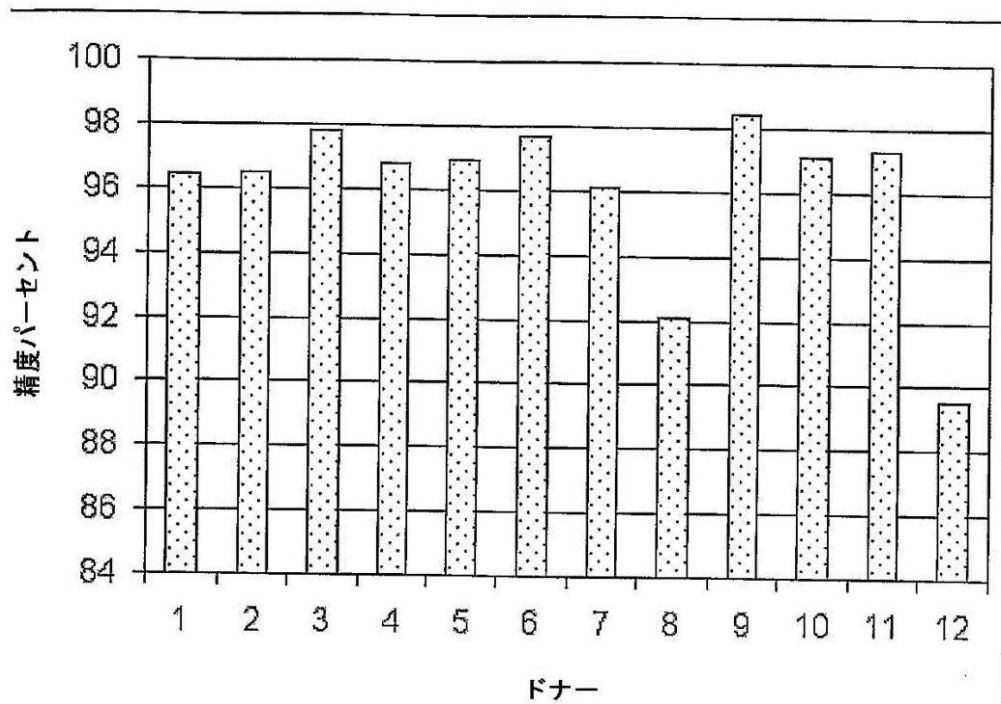
【図 3】

FIG 3



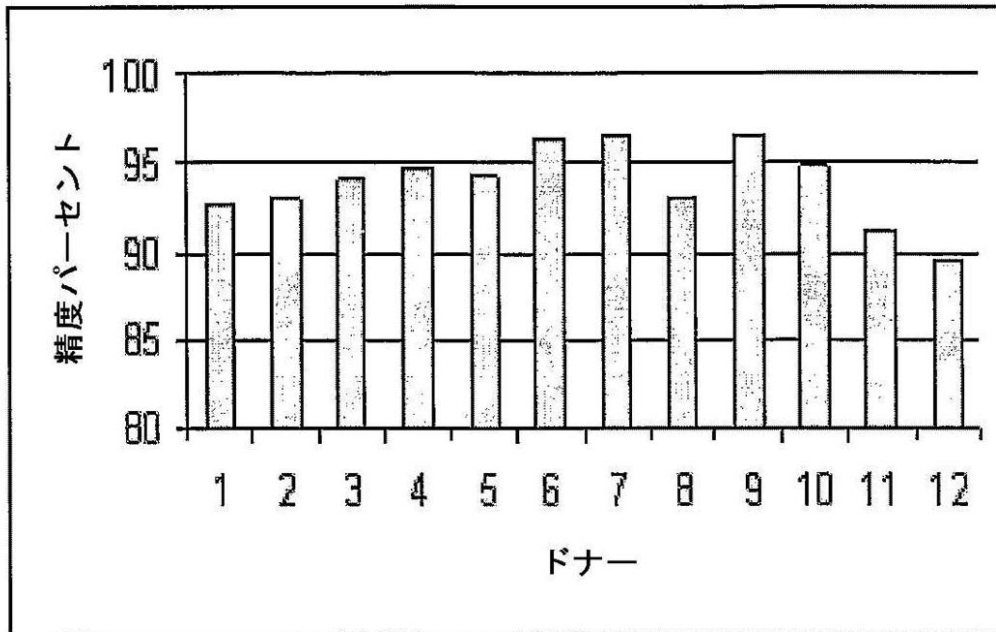
【図 2】

FIG 2



【図 4】

FIG 4



フロントページの続き

- (72)発明者 ハブケ, ジョエル エイチ.
アメリカ合衆国 ミネソタ 55430, ブルックリン センター, 55ティーエイチ アベ
ニュー ノース - 2401
- (72)発明者 バッカート, キャロル エー.
アメリカ合衆国 ミネソタ 55303, ラムジー, 173アールディー アベニュー エヌ
. ダブリュー. 8110

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 特開平10-160731 (JP, A)
米国特許第6153113 (US, A)
特表2004-526452 (JP, A)
Journal of Immunological Methods, 1992年, Vol. 152, pp. 245-251

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 5/00
A61K 35/12
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
CiNii