



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106662584 B

(45)授权公告日 2020.05.05

(21)申请号 201580035819.4

(22)申请日 2015.04.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106662584 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(30)优先权数据
14166718.8 2014.04.30 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.12.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/059510 2015.04.30

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/166049 EN 2015.11.05

(73)专利权人 IBA股份有限公司
地址 德国哥廷根

(72)发明人 U·D·卡尔

(74)专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382
代理人 张伟 丁磊

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/566(2006.01)

(56)对比文件
CN 101622340 A,2010.01.06,
WO 2012/044999 A2,2012.04.05,
WO 2013/124474 A2,2013.08.29,
WO 2013/011011 A2,2013.01.24,
WO 2012/044999 A2,2012.04.05,
审查员 段晓露

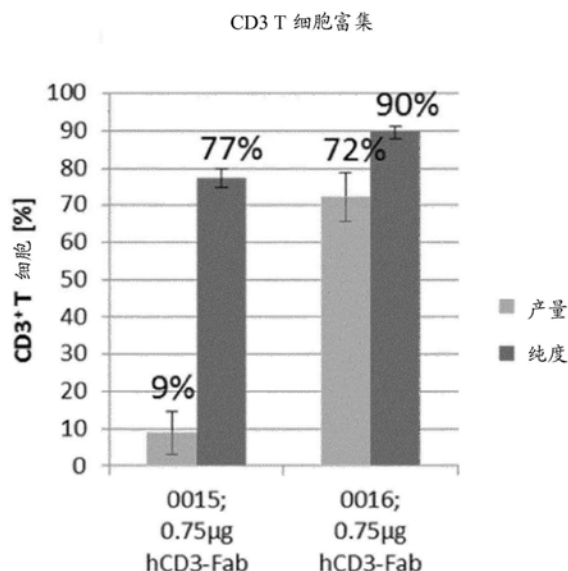
权利要求书6页 说明书36页
序列表7页 附图27页

(54)发明名称

分离靶细胞的方法

(57)摘要

本发明提供采用固相分离靶细胞的新方法,所述固相包含配体L,其中配体L能够特异性结合配体结合配偶体LB,所述配体结合配偶体LB存在于用于分离靶细胞的受体分子结合试剂或多聚化试剂中。本发明还提供用于从样品中分离靶细胞的相应新装置和设备。



1. 一种分离靶细胞的方法, 其中所述靶细胞在所述靶细胞表面上具有受体分子, 所述方法包括:

- 使

i) 受体分子结合试剂,

所述受体分子结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合位点B能够特异性结合在所述靶细胞表面上的受体分子, 且

其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合在多聚化试剂上的结合位点Z,

ii) 多聚化试剂,

其中所述多聚化试剂包含两个或更多个能够可逆地结合包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,

其中所述多聚化试剂进一步包含配体结合配偶体LB, 所述配体结合配偶体LB能够特异性结合配体L,

其中所述多聚化试剂是可溶性的,

和

iii) 样品, 所述样品包含所述靶细胞,

接触,

由此允许所述受体分子结合试剂、所述多聚化试剂和所述靶细胞形成多价结合复合物, 所述多价结合复合物包含结合到与所述多聚化试剂结合的两个或更多个受体分子结合试剂的靶细胞,

- 使所述靶细胞、受体分子结合试剂和多聚化试剂的多价结合复合物与固相接触, 所述固相包含所述配体L, 其中所述固相适用于色谱法并且其中所述固相是非磁性材料或非可磁化材料,

由此通过所述配体L与所述配体结合配偶体LB之间的结合允许所述靶细胞在所述固相上的可逆固定, 其中经至少包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C与所述多聚化试剂的结合位点Z之间的结合的破坏, 所述靶细胞在所述固相上的固定是可逆的。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述受体分子结合试剂与所述多聚化试剂互相接触以形成包含两个或更多个结合到所述多聚化试剂的受体分子结合试剂的复合物, 然后使该复合物与所述靶细胞接触。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述受体分子结合试剂与所述受体分子之间的结合的解离常数 (K_d) 是低亲和性的。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述受体分子结合试剂与所述受体分子之间的结合的解离常数 (K_d) 在约 10^{-2} 至约 10^{-10} M的范围内。

5. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述受体分子结合试剂与所述受体分子之间的结合的解离常数 (K_d) 在约 10^{-3} M至约 10^{-10} M的范围内。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述固相选自珠子或塑料板。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其中在竞争条件下, 包含在所述受体分子结合试剂中的配偶体C与所述多聚化试剂的结合位点Z之间形成的可逆键是可替换的。

8. 根据权利要求7所述的方法, 包括使所述固相与竞争试剂接触, 所述竞争试剂能够破坏所述结合配偶体C与所述结合位点Z之间形成的可逆键, 由此破坏所述靶细胞/多价结合复合物并允许从所述固相中释放所述靶细胞。

9. 根据权利要求1所述的方法, 其中包含在所述多聚化试剂中的配体结合配偶体LB与包含在所述固相上的配体L之间形成的键是可替换的。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中在竞争条件下, 所述配体结合配偶体LB与所述配体L之间形成的键是可替换的。

11. 根据权利要求10所述的方法, 包括使所述固相与竞争试剂接触, 所述竞争试剂能够替换所述配体结合配偶体LB与所述配体L之间形成的键, 由此从所述固相中释放所述靶细胞。

12. 根据权利要求7所述的方法, 其中采用相同的竞争试剂来破坏所述结合配偶体C与所述结合位点Z之间形成的可逆键和破坏所述配体结合配偶体LB与所述配体L之间形成的键。

13. 根据权利要求8所述的方法, 进一步包括收集从所述固相中释放的所述靶细胞。

14. 根据权利要求1所述的方法, 其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C与所述多聚化试剂的结合位点Z之间的可逆键具有约 10^{-5} 至约 10^{-13} M的 K_d 。

15. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述结合配偶体C与所述结合位点Z形成选自如下的结合对:

- 链霉亲和素或链霉亲和素类似物和结合链霉亲和素的配体,
- 在二价阳离子存在下结合的结合对,
- 低聚组氨酸肽和包含至少两个螯合基团K的结合部分A, 其中每个螯合基团K能够结合过渡金属离子, 由此使结合部分A能够结合所述低聚组氨酸肽,
- 抗原和针对所述抗原的抗体, 其中所述结合配偶体C包含所述抗原且所述多聚化试剂包含针对所述抗原的所述抗体。

16. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述结合配偶体C与所述结合位点Z形成选自如下的结合对:

(a) 所述结合配偶体C包含生物素, 和所述多聚化试剂包含可逆地结合生物素的链霉亲和素类似物或抗生物素蛋白类似物,

(b) 所述结合配偶体C包含可逆地结合链霉亲和素或抗生物素蛋白的生物素类似物, 和所述多聚化试剂包含可逆地结合所述生物素类似物的链霉亲和素、或抗生物素蛋白、或链霉亲和素类似物、或抗生物素蛋白类似物, 或

(c) 所述结合配偶体C包含链霉亲和素结合肽或抗生物素蛋白结合肽, 和所述多聚化试剂包含可逆地结合所述链霉亲和素或抗生物素蛋白结合肽的链霉亲和素、或抗生物素蛋白、或链霉亲和素类似物、或抗生物素蛋白类似物。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述多聚化试剂包含在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 19)的链霉亲和素突变蛋白, 或在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 20)的链霉亲和素突变蛋白, 且其中所述结合配偶体C包含链霉亲和素结合肽, 所述链霉亲和素结合肽由以下序列组成:

-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa- (SEQ ID NO: 1), 其中Xaa是任何氨基酸, 且Yaa和Zaa都是Gly, 或Yaa是Glu和Zaa是Lys或Arg。

18. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述多聚化试剂包含在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 19)的链霉亲和素突变蛋白, 或在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 20)的链霉亲和素突变蛋白, 且其中所述结合配偶体C包含链霉亲和素结合肽, 所述链霉亲和素结合肽由以下序列组成:

顺序设置的至少两个链霉亲和素结合肽, 其中每个肽结合链霉亲和素, 其中两个肽之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸, 和其中所述至少两个肽中的每个都包含氨基酸序列-His-Pro-Baa-, 其中Baa选自谷氨酰胺、天冬酰胺和甲硫氨酸。

19. 根据权利要求15所述的方法, 其中对于在二价阳离子存在下结合的结合对, 所述结合配偶体C包含钙调蛋白结合肽, 和所述多聚化试剂包含钙调蛋白, 或其中所述结合配偶体C包含FLAG肽, 和所述多聚化试剂包含结合FLAG肽的抗体, 或其中所述结合配偶体C包含低聚组氨酸标签, 和所述多聚化试剂包含螯合过渡金属。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述二价阳离子选自Ca²⁺、Ni²⁺或Co²⁺。

21. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述结合配偶体C与所述多聚化试剂的所述结合位点Z之间的结合被金属离子螯合破坏。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述金属离子螯合通过加入EDTA或EGTA完成。

23. 根据权利要求15所述的方法, 其中包含在所述结合配偶体C中的抗原是表位标签。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述表位标签选自Myc-标签(序列:EQKLISEEDL, SEQ ID NO: 14)、HA-标签(序列:YPYDVPDYA, SEQ ID NO: 15)、VSV-G-标签(序列:YTDIEMNRLGK, SEQ ID NO: 16)、HSV-标签(序列:QPELAPEDPED, SEQ ID NO: 17)和V5-标签(序列:GKPIPNPLLGLDST, SEQ ID NO: 18)。

25. 根据权利要求15所述的方法, 其中包含在所述结合配偶体C中的抗原是蛋白。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述蛋白选自谷胱甘肽-S-转移酶、麦芽糖结合蛋白(MBP)、几丁质结合蛋白(CBP)和硫氧还蛋白。

27. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述配体L与所述配体结合配偶体LB的键的解离常数K_d小于所述可逆结合配偶体C与所述结合位点Z的键的解离常数K_d。

28. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述配体L与所述配体结合配偶体LB形成选自如下的结合对:

- 作为配体结合配偶体LB的链霉亲和素或链霉亲和素类似物, 和作为配体L的结合链霉亲和素的分子,

- 在二价阳离子存在下结合的结合对,

- 作为配体L的低聚组氨酸肽, 和作为配体结合配偶体LB的包含至少两个螯合基团K的结合部分A, 其中每个螯合基团K能够结合过渡金属离子, 由此使所述结合部分A能够结合所述低聚组氨酸肽,

- 抗原和针对所述抗原的抗体, 其中所述配体L包含所述抗原, 和所述配体结合配偶体LB包含针对所述抗原的所述抗体,

- 作为配体结合配偶体LB的选自谷胱甘肽-S-转移酶、麦芽糖结合蛋白(MBP)、几丁质

结合结构域和纤维素结合结构域的蛋白质,和分别作为配体L的谷胱甘肽、麦芽糖、几丁质或纤维素,

- 作为配体结合配偶体LB的抗体Fc结构域,和作为配体L的免疫球蛋白结合蛋白。

29. 根据权利要求9所述的方法,其中所述配体L与所述配体结合配偶体LB形成选自如下的结合对:

(a) 所述配体L包含生物素和所述配体结合配偶体LB包含可逆地结合生物素的链霉亲和素类似物或抗生物素蛋白类似物,

(b) 所述配体L包含可逆地结合链霉亲和素或抗生物素蛋白的生物素类似物,和所述配体结合配偶体LB包含可逆地结合所述生物素类似物的链霉亲和素、或抗生物素蛋白、或链霉亲和素类似物、或抗生物素蛋白类似物,或

(c) 所述配体L包含链霉亲和素结合肽或抗生物素蛋白结合肽,和所述配体结合配偶体LB包含可逆地结合所述链霉亲和素或抗生物素蛋白结合肽的链霉亲和素、或抗生物素蛋白、或链霉亲和素类似物、或抗生物素蛋白类似物。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述配体结合配偶体LB包含在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 19)的链霉亲和素类似物,或在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO: 20)的链霉亲和素类似物。

31. 根据权利要求28所述的方法,其中对于在二价阳离子存在下结合的结合对,

所述配体L包含钙调蛋白结合肽,和所述配体结合配偶体LB包含钙调蛋白,或

其中所述配体L包含低聚组氨酸肽,和所述配体结合配偶体LB包含含有至少两个螯合基团K的结合部分A,其中每个螯合基团K能够结合过渡金属离子,由此使所述结合部分A能够结合所述低聚组氨酸肽。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述结合配偶体LB与所述配体L之间的结合被金属离子螯合替换。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述金属离子螯合通过加入EDTA或EGTA完成。

34. 根据权利要求28所述的方法,其中包含在包含抗原的所述配体L中的所述抗原是表位标签。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述表位标签选自Myc-标签(序列:EQKLISEEDL, SEQ ID NO: 14)、HA-标签(序列:YPYDVPDYA, SEQ ID NO: 15)、VSV-G-标签(序列:YTDIEMNRLGK, SEQ ID NO: 16)、HSV-标签(序列:QPELAPEDPED, SEQ ID NO: 17)、V5-标签(序列:GKPIPNPLLGLDST, SEQ ID NO: 18)和序列ASMTGGQMG (SEQ ID NO: 21)。

36. 根据权利要求12所述的方法,其中

- 所述竞争试剂是生物素或生物素衍生物,

- 所述结合配偶体C是结合链霉亲和素的配体,和所述多聚化试剂是链霉亲和素或链霉亲和素类似物,和

- 所述配体L是生物素或生物素类似物,和所述配体结合配偶体LB是链霉亲和素或链霉亲和素类似物。

37. 根据权利要求1所述的方法,其中所述结合位点Z和所述多聚化试剂的配体结合配偶体LB是相同的。

38. 根据权利要求1所述的方法, 其中特异性地结合所述受体分子的所述受体分子结合试剂选自抗体、二价抗体片段、单价抗体片段、具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子和MHC分子。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其中所述二价抗体片段是 (Fab)₂' -片段或二价单链Fv片段。

40. 根据权利要求38所述的方法, 其中所述单价抗体片段选自Fab片段、Fv片段和单链Fv片段(scFv)。

41. 根据权利要求38所述的方法, 其中所述具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子选自适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、glubody、基于锚蛋白支架的蛋白、基于晶体支架的蛋白、adnectin和avimer。

42. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述样品包含靶细胞和其他细胞的混合物, 其中所述其他细胞在其细胞表面上缺乏所述受体分子, 且其中所述方法包括将所述靶细胞与所述其他细胞相分离。

43. 一种将靶细胞固定在固相上的方法, 其中所述靶细胞在所述靶细胞表面上具有受体分子, 所述方法包括:

- 使

i) 受体分子结合试剂,

所述受体分子结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合位点B能够特异性结合在所述靶细胞表面上的受体分子, 且

其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合在多聚化试剂上的结合位点Z,

ii) 多聚化试剂,

其中所述多聚化试剂包含两个或更多个能够可逆地结合包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,

其中所述多聚化试剂进一步包含配体结合配偶体LB, 所述配体结合配偶体LB能够特异性结合配体L,

其中所述多聚化试剂是可溶性的,

和

iii) 样品, 所述样品包含所述靶细胞,

接触,

由此允许所述受体分子结合试剂、所述多聚化试剂和所述靶细胞形成多价结合复合物, 所述多价结合复合物包含结合到与所述多聚化试剂结合的两个或更多个受体分子结合试剂的靶细胞,

- 使所述靶细胞、受体分子结合试剂和多聚化试剂的多价结合复合物与固相接触, 所述固相包含所述配体L, 其中所述固相适用于色谱法并且其中所述固相是非磁性材料或非可磁化材料,

由此通过所述配体L与所述配体结合配偶体LB之间的结合允许所述靶细胞在所述固相上的可逆固定, 其中至少包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C与所述多聚化

试剂的结合位点Z之间的结合的破坏,所述靶细胞在所述固相上的固定是可逆的。

44.根据权利要求43所述的方法,其中所述受体分子结合试剂与所述多聚化试剂互相接触以形成包含两个或更多个结合到所述多聚化试剂的受体分子结合试剂的复合物,然后使该复合物与所述靶细胞接触。

45.根据权利要求43或44所述的方法,其中所述受体分子结合试剂与所述受体分子之间的结合的解离常数(K_d)是低亲和性的。

46.根据权利要求43所述的方法,其中所述受体分子结合试剂与所述受体分子之间的结合的解离常数(K_d)在约 10^{-2} 至约 10^{-10} M的范围内。

47.包含配体L的固相在如权利要求1至46中任一项所述的分离靶细胞或用于固定靶细胞的方法中的用途,其中所述配体L能够特异性结合配体结合配偶体LB,其中所述固相适用于色谱法并且其中所述固相是非磁性材料或非可磁化材料。

分离靶细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种分离靶生物实体 (bioentity) 如细胞或其它生物材料如细胞器或病毒的方法。可以采用所述方法来定义色谱法, 包括柱色谱法。本发明还涉及用于从样品中分离靶细胞的新装置以及相应的设备。本发明还涉及其上具有配体的固定相在靶细胞的分离中的用途。

背景技术

[0002] 所需细胞类型的纯的和功能性细胞群的分离是各种治疗、诊断和生物技术应用的前提。

[0003] 色谱法是一种用于分离低分子量和高分子量分子包括蛋白质的得到充分确认的技术。这种技术也被应用于细胞分离, 特别是以亲和色谱法的形式使用对所需细胞类型特异的固定化配体, 如免疫配体。例如, 不同的T细胞亚群如下分离: 用单克隆免疫球蛋白标记和负载到具有聚丙烯酰胺珠子的柱子上, 兔抗-小鼠IgG共价结合到珠子上 (Braun, R., 等, Journal of Immunological Methods (1982) 54, 251-258)。进一步例如, 使用共价缀合到双花扁豆凝集素的Sepharose 6MB的凝集素-亲和柱色谱法已被用于从健康白细胞中分离白血病细胞 (Ohba, H., 等, Cancer Letters (2002) 184, 207-214)。

[0004] 由于细胞尺寸通常大于蛋白质, 与蛋白质相比, 它们很难进入常规色谱吸附剂的珠子的孔中。由于扩散限制, 使用大孔的吸附剂不能明显克服这种分离现象。另一方面, 只有蛋白质可进入的孔内的表面积通常很大程度上超过蛋白质和细胞都可进入的表面积。因此, 使用用于固定蛋白质性或其他受体结合配体的常规色谱吸附剂来产生用于细胞的亲和基质通常需要使用大量过剩浪费的受体结合配体, 这是由于它们中的大部分都被固定在细胞不能进入的孔或腔中。特异受体结合试剂通常是昂贵的且很难在所需规模产生, 由此需要认真考虑这方面。冷冻凝胶剂形式的整体吸附剂的使用因此被提出作为一种细胞亲和色谱法的替代技术 (参见例如Dainiak, M.B., 等, Adv. Biochem. Engin./Biotechnol. (2007), 106, 101-127)。然而, 整体吸附剂缺乏, 以致所需的吸附剂可能无法在市场上以整体柱的形式获得。此外, 在亲和色谱法的情况下, 通常仍需要移除用于从这些细胞中洗脱所需细胞的竞争化合物。整体吸附剂在细胞生存力方面的潜在优势可能因此被移除用于从亲和色谱柱中洗脱细胞的化合物所需的另外的程序逆转。

[0005] 目前使用的最重要的细胞分离方法是磁体-辅助细胞分选 (MACS) 和荧光-辅助细胞分选 (FACSTM)。通过流式细胞术的细胞分选个别地分析细胞, 在流式细胞术中通常荧光团耦合到抗体, 用于标记细胞。细胞在极高压下使用细胞分选器高速分离。FACSTM技术能够在一步骤中通过应用具有不同荧光团的一组抗体分离由一组对应标记物定义的细胞。因此, 此方法是可靠的, 但是时间和成本强度大且费劲。特别是对于非常大且多样的细胞群的筛选, 如含有 1×10^{10} 个细胞的血浆分离置换法产物, 流式细胞分析仪的极长分选时间对于一个适当的选择过程是不可接受的。FACSTM的另一个缺点在于, 复杂且易于干扰的流式细胞分析仪很难适应分离治疗性细胞产品必需的GMP环境。此外, 在细胞选择程序中应用的压力

可能会损害细胞效应子功能。

[0006] 磁体-辅助的细胞分离是一种广泛使用的用于研究和治疗应用的系统。尽管与FACS™技术相比,所分离细胞的产量和纯度是中等的,但选择程序是稳健的,不需要复杂的自动化。磁体-辅助分离的主要缺点是所分离细胞上剩下的包括磁珠的染色试剂,其可能会损害所分离细胞群的效应子功能。此外,非连续阳性选择过程可能归因于所分离细胞上的这些剩余磁性试剂。连续阳性选择程序是选择由一组标记物定义的细胞群强制性的。

[0007] 虽然仍然利用磁性或荧光标记,分离细胞的一个显著进步是“Streptamer®技术”,其是例如国际专利申请W0 02/054065、美国专利7,776,562和美国专利8,299,782中所描述的,其中对位于细胞表面上的受体分子表现出低亲和性结合的受体分子结合试剂用于可逆细胞染色和分离。与目前使用的单一阳性选择结合磁性阴性选择(目的是除了一个目标,移除所有细胞群)相比,使用在每次选择后移除低亲和性受体结合试剂的Streptamer®技术的连续阳性选择生成极高纯度和产量的细胞群。

[0008] 此外,国际专利申请W0 2013/124474描述了通过柱色谱法的靶细胞的色谱分离。在该方法中,通过如链霉亲和素结合肽的亲亲和标签,结合位于靶细胞表面上的受体分子的受体分子结合试剂(如Fab片段)被可逆地固定在固定色谱相上。对于这种固定,所述固定相包含与亲和和标签形成可逆键的亲亲和试剂,例如,与作为受体分子结合试剂的一部分的链霉亲和素结合肽可逆结合的链霉亲和素突变蛋白。然后使含有靶细胞的样品与固定相接触,并通过结合到受体分子结合试剂将其可逆地固定于固定相上。然后通过加入竞争试剂从固定相中分离/洗脱靶细胞,所述竞争试剂也结合到亲和试剂的结合位点,由此从固定相中替换受体分子结合试剂并因此也从固定相中释放靶细胞。在美国专利6,022,951的实施例11中描述了使用单克隆完整抗体代替(单价)抗体片段作为受体分子结合试剂的类似色谱纯化。

[0009] 然而,国际专利申请W0 2013/124474的方法可能具有若干限制。若将Fab片段固定在色谱柱(固定色谱相)上,然后将具有靶细胞的样品施加至该色谱柱,则复合物形成的on-速率(Kon),即Fab片段与受体分子的结合的on-速率(Kon),会由于用于将样品装载至柱子上的流速而变为固定靶细胞的限制。在这种情况下,并非所有靶细胞都能结合到色谱柱上。这将导致纯化的靶细胞的低产量。另外,Fab片段在色谱柱上的固定的分布可能不均匀。当将Fab片段装载到柱子上时,Fab片段可主要结合在柱的顶部,导致在该柱的顶部上的密度过高,在柱的下部中的密度过低。这将导致复合物形成不足,并因此也影响分离的细胞的产量。此外,需要相对大量的Fab片段以便确保整个色谱树脂均匀地覆盖了Fab片段。为了避免Fab片段和靶细胞的受体分子之间的复合物形成的on-速率的速率限制问题,在国际专利申请W0 2013/124474的方法中可以首先将Fab片段与含有靶细胞的样品一起温育,并将该温育混合物施加到色谱柱上。在这种情况下,Fab片段对受体分子的亲和力将是限制性的;这种亲和力可能不够高以在细胞表面上提供充足的Fab片段分子来确保靶细胞与固定相/色谱的有效结合。此外,由于流动,靶细胞上的选择的受体分子可能没有机会形成亲合结合到色谱树脂上所必需的簇(可能不会达到Fab片段与受体分子的结合的平衡)。此外,对于每种类型的Fab片段和在靶细胞表面上的选择的受体分子,在固定相上的固定程度可能不同。因此,纯化效率将根据所考虑的靶细胞群而变化。

[0010] 尽管Streptamer®-技术或国际专利申请WO 2013/124474中描述的方法通常工作良好,但是由于上文所讨论的缺点,仍然需要一种方法,其例如允许对于所考虑的靶细胞的所有类型的纯化方案标准化,即也不考虑由给定受体分子和其受体分子结合试剂组成的结合对所固有的结合特性的性质。

发明内容

[0011] 本公开可以被认为一般涉及用于细胞分离的固相技术或色谱技术。本文提供了用于分离在其表面上具有已知受体分子的所需生物实体如靶细胞的方法。本文公开的方法可包括将这样的细胞与其表面上没有这种受体的其他细胞分离。通常,相应的方法提供了一种能够分离复杂细胞群,例如调节性T细胞或中央记忆性T细胞,从而用于研究、诊断和特别是治疗目的的快速、有效和温和的分离程序。当要分离生物细胞或生物细胞群时,本文公开的方法允许获得富集的、分离的和/或纯化的靶细胞或靶细胞群,其基本上不含用于富集、分离和/或纯化目的的试剂。

[0012] 第一方面,本发明提供一种分离靶细胞的方法,其中所述靶细胞在所述靶细胞表面上具有受体分子,所述方法包括:

[0013] -使

[0014] i) 受体分子结合试剂,所述受体分子结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

[0015] 其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合位点B能够特异性结合在所述靶细胞表面上的受体分子,且

[0016] 其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合到在多聚化试剂上的结合位点Z,

[0017] ii) (可溶性)多聚化试剂,

[0018] 其中所述多聚化试剂包含两个或更多个能够可逆地结合到包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,

[0019] 其中所述多聚化试剂进一步包含配体结合配偶体LB,所述配体结合配偶体LB能够特异性结合配体L,

[0020] 和

[0021] iii) 样品,所述样品包含所述靶细胞,

[0022] 接触,

[0023] 由此允许所述受体分子结合试剂、所述多聚化试剂和所述靶细胞形成多价结合复合物,所述多价结合复合物包含结合到与所述多聚化试剂结合的两个或更多个受体分子结合试剂的靶细胞,

[0024] -使所述靶细胞、受体分子结合试剂和多聚化试剂的多价结合复合物与固(solid)相接触,所述固相包含配体L,

[0025] 由此通过所述配体L与所述配体结合配偶体LB之间的结合允许所述靶细胞在所述固相上的可逆固定,其中经至少包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C与所述多聚化试剂的结合位点Z之间的结合的破坏,所述靶细胞在所述固相上的固定是可逆的。

[0026] 第二方面,本发明提供一种分离靶细胞的替代方法,其中所述靶细胞在所述靶细胞表面上具有受体分子,所述方法包括:

[0027] -使

[0028] i) 受体分子结合试剂,

[0029] 所述受体分子结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

[0030] 其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合位点B能够特异性结合在所述靶细胞表面上的受体分子,

[0031] 其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合在多聚化试剂上的结合位点Z,且

[0032] 其中所述受体分子结合试剂进一步包含配体结合配偶体LB,所述配体结合配偶体LB能够特异性结合配体L,

[0033] ii) (可溶性) 多聚化试剂,

[0034] 其中所述多聚化试剂包含两个或更多个能够可逆地结合包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,

[0035] 和

[0036] iii) 样品,所述样品包含所述靶细胞,

[0037] 接触,

[0038] 由此允许所述受体分子结合试剂、所述多聚化试剂和所述靶细胞形成多价结合复合物,所述多价结合复合物包含结合到与所述多聚化试剂结合的两个或更多个受体分子结合试剂的靶细胞,

[0039] -使所述靶细胞、受体分子结合试剂和多聚化试剂的多价结合复合物与固相接触,所述固相包含配体L,

[0040] 由此通过所述配体L与所述配体结合配偶体LB之间的结合允许所述靶细胞在所述固相上的可逆固定,其中经

[0041] a) 包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C与所述多聚化试剂的结合位点Z之间的结合,和/或

[0042] b) 所述固相的配体L与包含在所述受体分子结合试剂中的配体结合配偶体LB之间的结合,

[0043] 的破坏,所述靶细胞在所述固相上的固定是可逆的。

[0044] 如上所述,在第一或第二方面的方法的一些实施方案中,所述受体分子结合试剂、所述可溶性多聚化试剂和所述含有靶细胞的样品在同一时间一起温育。在其它实施方案中,所述受体分子结合试剂与所述多聚化试剂互相接触以形成包含两个或更多个结合到多聚化试剂的受体分子结合试剂的复合物,然后使该复合物与所述靶细胞接触(一起温育)。

[0045] 在第一或第二方面的方法中,所述受体分子结合试剂与所述受体分子之间的结合的解离常数(K_d)可是低亲和性的,其含义是所述受体分子结合试剂与所述受体分子之间的结合的解离常数(K_d)可在约 10^{-2} 至约 10^{-7} M的范围内。在本发明的其它实施方案中,所述受体分子结合试剂与所述受体分子之间的结合可是高亲和性的,其含义是所述受体分子结合试剂与所述受体分子之间的结合的解离常数(K_d)可在约 10^{-7} 至约 10^{-10} M的范围内。

[0046] 在一些实施方案中,第一或第二方面的方法可进一步包括使固定相与竞争试剂接触。这种竞争试剂能够破坏所述结合配偶体C与所述结合位点Z之间的结合。通过使所述固定相与这种竞争试剂接触,靶细胞从所述固定相中洗脱。

[0047] 第三方面,本发明提供一种将靶细胞固定在固相上的方法,其中所述靶细胞在所述靶细胞表面上具有受体分子。所述方法包括:

[0048] -使

[0049] (i) 受体分子结合试剂,所述受体分子结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

[0050] 其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合位点B能够特异性结合在所述靶细胞表面上的受体分子,且

[0051] 其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合在多聚化试剂上的结合位点Z,

[0052] ii) (可溶性) 多聚化试剂,

[0053] 其中所述多聚化试剂包含两个或更多个能够可逆地结合包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,

[0054] 其中所述多聚化试剂进一步包含配体结合配偶体LB,所述配体结合配偶体LB能够特异性结合配体L,

[0055] 和

[0056] iii) 样品,所述样品包含所述靶细胞,

[0057] 接触,

[0058] 由此允许所述受体分子结合试剂、所述多聚化试剂和所述靶细胞形成多价结合复合物,所述多价结合复合物包含结合到与所述多聚化试剂结合的两个或更多个受体分子结合试剂的靶细胞,

[0059] -使所述靶细胞、受体分子结合试剂和多聚化试剂的多价结合复合物与固相接触,所述固相包含配体L,

[0060] 由此通过所述配体L与所述配体结合配偶体LB的结合允许所述靶细胞在所述固相上的可逆固定,其中经至少包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C与所述多聚化试剂的结合位点Z之间的结合的破坏,所述靶细胞在所述固相上的固定是可逆的。

[0061] 第四方面,本发明提供一种将靶细胞固定在固相上的替代方法,其中所述靶细胞在所述靶细胞表面上具有受体分子。所述方法包括:

[0062] -使

[0063] i) 受体分子结合试剂,所述受体分子结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

[0064] 其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合位点B能够特异性结合在所述靶细胞表面上的受体分子,

[0065] 其中包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合在多聚化试剂上的结合位点Z,且

[0066] 其中所述受体分子结合试剂进一步包含配体结合配偶体LB,所述配体结合配偶体LB能够特异性结合配体L,

[0067] ii) (可溶性) 多聚化试剂,

[0068] 其中所述多聚化试剂包含两个或更多个能够可逆地结合包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,和

[0069] iii) 样品,所述样品包含所述靶细胞,

[0070] 接触,

[0071] 由此允许所述受体分子结合试剂、所述多聚化试剂和所述靶细胞形成多价结合复合物,所述多价结合复合物包含结合到与所述多聚化试剂结合的两个或更多个受体分子结合试剂的靶细胞,

[0072] -使所述靶细胞、受体分子结合试剂和多聚化试剂的多价结合复合物与固相接触,所述固相包含配体L,

[0073] 由此通过所述配体L与所述配体结合配偶体LB的结合允许所述靶细胞在所述固相上的可逆固定,其中经

[0074] a) 包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C与所述多聚化试剂的结合位点Z之间的结合,和/或

[0075] b) 所述固相的配体L与包含在所述受体分子结合试剂中的配体结合配偶体LB之间的结合,

[0076] 的破坏,所述靶细胞在所述固相上的固定是可逆的。

[0077] 第五方面,本发明提供一种用于从样品中分离靶细胞的装置。所述装置包括:

[0078] -包含配体L的固相,其中所述配体L能够特异性地结合配体结合配偶体LB,所述配体结合配偶体LB存在于用于分离靶细胞的受体分子结合试剂或(可溶性)多聚化试剂中,所述配体L由此允许所述靶细胞在所述固相上的可逆固定,

[0079] -以下中的至少一个

[0080] a) 第一固定相,其中所述第一固定相适用于细胞分离,所述第一固定相是凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中所述基质包含亲和试剂,所述亲和试剂具有特异性结合包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,由此允许所述受体分子结合试剂在所述第一固定相上的固定和所述受体分子结合试剂从包含所述靶细胞的洗脱液中的移除,

[0081] 或

[0082] b) 第二固定相,其中所述第二固定相包含配体L,其中所述配体L能够特异性结合存在于用于分离靶细胞的受体分子结合试剂或多聚化试剂中的配体结合配偶体LB,所述配体L由此允许所述受体分子结合试剂或所述多聚化试剂在所述第二固定相上的固定和所述受体分子结合试剂或所述多聚化试剂从包含所述靶细胞的洗脱液中的移除。

[0083] 第六方面,本发明提供一种用于从样品中分离靶细胞的设备。这种设备包括根据第五方面的用于从样品中分离靶细胞的装置。

[0084] 第七方面,本发明提供包含配体L的固相的用途,其中所述配体L能够特异性结合配体结合配偶体LB,用于靶细胞的可逆固定或分离。所述配体可以是生物素或生物素衍生物。合适的生物素衍生物的实例包括、但不限于脱硫生物素、亚氨基生物素、2-(4'-羟基偶氮苯)苯甲酸(HABA)或链霉亲和素结合肽。本第七方面包括包含配体L的固相在根据本发明的第一或第二方面用于分离靶细胞的方法或根据第三或第四方面用于固定靶细胞的方法中的用途,其中所述配体L能够特异性结合配体结合配偶体LB。

[0085] 附图简述

[0086] 附图示出了本文所示的细胞分离的实施方案。不受理论约束,附图包括关于潜在的分离机制的结论。给出的结论仅为说明之用,仅仅服务于允许可实现的分离如何在分子水平上设想的可视化。

[0087] 图1描述一个分离靶细胞(3)的方法的实施方案,靶细胞(3)在靶细胞表面上具有受体分子(4)。靶细胞可以由存在至少一个特定特异性受体分子(4)定义。提供一种受体分子结合试剂(1)。所述受体分子结合试剂(1)具有结合位点(B),其可特异性结合受体分子(4)。受体分子结合试剂(1)可以是如Fab片段的(单价)抗体片段,其含义是所述结合位点(B)可以是抗原结合位点。如本文所定义的,受体分子结合试剂(的结合位点B)与受体分子之间的结合的解离常数(K_d)可以是低亲和性的。受体分子结合试剂(1)还包含结合配偶体(C),其能够可逆地结合多聚化试剂(2)的结合位点(Z)。所述结合配偶体(C)可以是,例如亲和和标签或肽,如链霉亲和素结合肽。更详细地,所述结合配偶体(C)可以是,例如链霉亲和素-结合肽,如例如美国专利5,506,121中描述的肽Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:3,也称为“**Strep-标签®II**”),或国际专利申请W0 02/077018或美国专利7,981,632中描述的具有顺序设置的两个或更多个单个结合模块的链霉亲和素结合肽。这种顺序设置的说明性实例是序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:13,也以其商标名“**Twin-Strep-标签®**”已知)。所述结合配偶体(C)可融合或缀合至受体分子结合试剂。若所述受体分子结合试剂(1)是Fab片段,所述结合配偶体C可融合至该抗体片段的重链或轻链的C-末端。

[0088] 可溶性多聚化试剂(2)含有多个能够可逆地结合结合配偶体(C)的结合位点Z。通过结合配偶体(C),受体结合试剂(1)结合多聚化试剂(2)上的结合位点(Z)。当多聚化试剂(2)与多个受体结合试剂(1)互相结合时,它们相对于受体分子结合试剂的结合位点(B)形成多价结合复合物。例如,如在国际专利申请W0 02/054065或美国专利7,776,562中所描述的,与单独的(单价)受体分子结合试剂的结合相比,这种多价结合复合物因此提供亲合效果,由此允许使用如此低亲和力的、不能以单一形式稳定结合靶细胞但能从受体分子上快速解离的单价受体分子结合试剂。稍后(参见下文),包含在这种多价复合物中的多聚化的受体分子结合试剂(1)可结合到靶细胞(3)。当将链霉亲和素结合肽用作结合配偶体(C)时,多聚化试剂(2)可以是链霉亲和素肽(=结合配偶体C1)通过在图1中示意性示出的其(生物素)结合位点Z可逆地结合的任何链霉亲和素突变蛋白。这种多聚化试剂可以是在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO:19)的链霉亲和素突变蛋白(类似物),或在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO:20)的链霉亲和素突变蛋白(类似物)。这种突变蛋白描述在例如美国专利6,103,493中,并且以商标**Strep-Tactin®**以突变蛋白“m1”和突变蛋白“m2”的形式从IBA GmbH,哥廷根,德国商购获得。

[0089] 多聚化试剂(2)还包含能够特异性结合配体(L)的配体结合配偶体(LB)。在图1所示的实例中,所述配体结合配偶体(LB)可以是例如六-组氨酸标签或谷胱甘肽-S-转移酶。在这种情况下,链霉亲和素突变蛋白(单体)可以重组产生为具有六-组氨酸标签或谷胱甘肽-S-转移酶作为融合配偶体的融合蛋白。

[0090] 在图1的方法中,之后,使包含靶细胞(3)的样品与多价结合复合物接触,从而靶细胞(3)结合到该多价结合复合物。提供色谱基质(5)作为固相(固定相)。所述色谱基质(5)含有配体结合配偶体(LB)所结合的配体(L),由此将作为靶细胞/多价结合复合物一部分的靶

细胞固定在固定相(5)上。在图1的实例中,配体L可以是例如螯合基团,所述螯合基团其上复合有过渡金属并且能够结合如六-组氨酸标签的低聚组氨酸肽。固相或固定相(5)可以是如TALON®树脂(Westburg, Leusden, The Netherlands)的固定金属亲和色谱(IMAC)树脂。可选地,若将谷胱甘肽-S-转移酶用作配体结合配偶体LB,则配体L可以是谷胱甘肽。在这种情况下,固相(5)可以是与谷胱甘肽偶联的琼脂糖凝胶(sepharose)基质。

[0091] 配体结合配偶体(LB)结合到配体L的结果是:靶细胞(3)被固定在固相上,且样品正在消耗靶细胞(3)。因此,靶细胞(3)与样品中的其它组分分离。如果需要,之后可以用合适的洗涤缓冲液(图1未示出)洗涤固相。然后,使竞争试剂(6)与固定相(5)接触。所述竞争试剂(6)可特异性结合配体(L)并破坏配体(L)与配体结合配偶体(LB)之间的结合。此外,破坏受体分子结合试剂的结合配偶体(C)与多聚化试剂(2)的结合位点(Z)之间的结合。这可以例如通过结合多聚化试剂的结合位点(Z)的竞争试剂(12)实现,由此从多聚化试剂(2)的结合位点(Z)替换受体分子结合试剂(2)的结合配偶体C。由于在该实例中采用了低亲和性的受体分子结合试剂(1),因此受体分子结合试剂(1)从受体分子(4)(图1未示出)中解离。结果,靶细胞(3)从不含有用于分离的任何试剂的固定相(5)中释放。在配体L是其上复合有过渡金属的螯合基团且配体结合配偶体LB是低聚组氨酸标签的实例中,配体L与配体结合配偶体LB之间的结合可被如EDTA或EGTA的金属螯合剂破坏。这一实例表明,竞争试剂本身无需是竞争剂,而可以是能够破坏配体结合配偶体LB与配体L之间或结合配偶体C与多聚化试剂的结合位点Z之间形成的键的任何化合物。在图1的这一实例中,其中多聚化试剂(2)是链霉亲和素突变蛋白,结合配偶体C是链霉亲和素结合肽,相应的竞争试剂(12)可以是与链霉亲和素的生物素结合位点结合的任何化合物,例如,游离链霉亲和素结合肽或生物素或生物素衍生物,如亚氨基生物素或脱硫生物素。同样,竞争试剂还可以是pH变化,因为链霉亲和素结合肽与链霉亲和素的结合可以被如pH 4的低pH破坏。此外,此处还注意到,对于如图1所示的固定在固体支持物上的靶细胞(3)的洗脱/分离,无需破坏配体结合配偶体LB与配体L之间的键。相反,为了使靶细胞从固体支持物中释放,破坏受体分子结合试剂(1)的结合配偶体C与多聚化试剂的结合位点Z的结合即可。在此处上下文中注意到,由此配体结合配偶体LB与配体L之间形成的键甚至不必是可逆的,其也可以是不可逆的并且仅为与靶细胞(3)通过受体分子结合试剂(1)的结合配偶体C与多聚化试剂的结合位点Z之间形成的可逆键结合的多聚化试剂(2)的固定服务。然而,如果在配体结合配偶体LB与配体L之间形成的键也是可逆的,则这可能是有利的,因为这允许固相的再生。在此处上下文中,还注意到配体结合配偶体LB还可包含在受体分子结合试剂(1)中,而不是包含在多聚化试剂(2)中。在图1的这一说明性实例中,其中多聚化试剂是链霉亲和素突变蛋白,配体L是螯合基团,所述螯合基团其上复合有过渡金属并且能够结合低聚组氨酸肽,受体分子结合试剂可以是抗体片段,如Fab片段,在其两条多肽链之一(例如,重链)的C-末端携带作为结合配偶体C的链霉亲和素结合肽(参见上文)和在另一多肽链(例如,轻链)的C-末端携带作为配体结合LB的六组氨酸标签。为了确保六组氨酸标签是空间可接近的,Fab片段的轻链可以在恒定结构域的C-末端与六组氨酸标签之间具有人工连接子作为“扩链剂”。在此上下文中还注意到,可以通过加入含有生物素和EDTA作为竞争试剂的缓冲液,同时方便地实现两种键,即多聚化试剂(2)与受体分子结合试剂(1)的结合配偶体C之间的键和固相的配体L与多聚化试剂的配体结合配偶体LB之间的键的破坏。生物素将从多聚化试剂中替换结合配偶体C(链霉亲和

素结合肽),作为金属螯合剂的EDTA将与介导六组氨酸标签与配体L结合的金属离子复合,由此释放六组氨酸标签并因此从固相中释放受体分子结合试剂。

[0092] 图2描述一种分离靶细胞(3)的方法的另一实施方案,所述靶细胞(3)在靶细胞表面上具有受体分子(4)。提供一种受体分子结合试剂(1),所述受体分子结合试剂(1)具有能够特异性结合受体分子(4)的结合位点(B)。受体分子结合试剂(1)还包含结合配偶体(C),其能够可逆地结合可溶性多聚化试剂(2)的结合位点(Z)。多聚化试剂(2)具有多个特异性结合包含在受体结合试剂(1)中的结合配偶体(C)的结合位点Z。形成能够结合靶细胞(3)的多价结合复合物。多聚化试剂(2)的结合位点(Z)还定义配体结合配偶体(LB),其能够结合包含在固相中的配体(L)。因此,在图2的实例中,配体结合配偶体LB与结合位点Z相同。使具有靶细胞(3)的样品与多价结合复合物接触,从而靶细胞(3)结合至该结合复合物。提供一种固相(5),如用于色谱法的固定相或珠子,其含有能够结合结合位点(Z)的配体(L),所述结合位点(Z)还定义配体结合配偶体(LB)。结果,多聚化试剂(2)上的游离结合位点(Z)结合到配体(L),由此将作为靶细胞/多价结合复合物的一部分的靶细胞固定在固定相(5)上。由此样品正在消耗靶细胞(3)且靶细胞(3)与样品中的其它组分相分离。

[0093] 在图2所示的本发明的方法的实例中,受体分子结合试剂(1)可以再次是显示其结合位点(B)与受体分子(4)的低亲和力结合的抗体片段,如Fab片段。受体分子结合试剂的结合配偶体C可以是链霉亲和素结合肽。例如,结合配偶体C可以由Junttila等,Proteomics 5(2005),1199-1203或美国专利7,981,632描述的序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:3,“Strep-tag®”)、序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:11,也称为“di-tag3”)或序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:12,也称为“the di-tag2”)的链霉亲和素结合肽。这种结合细胞表面受体如CD3、CD4、CD8 (T细胞标记物)、CD8、CD62L、CD45RA (记忆T细胞的标记物)、CD4、CD25、CD45RA (调节性T细胞的标记物)、CD56 (天然杀伤细胞的标记物)、CD19 (B细胞标记物)和CD34 (干细胞标记物)的重组Fab片段,例如可作为“Streptamer®”试剂从IBA GmbH (哥廷根,德国)商购获得,并因此可用作受体结合分子,用于采用本发明的方法分离相应细胞。此处提及的所有链霉亲和素结合肽都结合相同的结合位点,即链霉亲和素的生物素结合位点。若采用一个或多个这种链霉亲和素结合肽作为结合配偶体C,则多聚化试剂(2)是链霉亲和素突变蛋白,如在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO:19)的链霉亲和素突变蛋白“m1”,或在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (SEQ ID NO:20)的链霉亲和素突变蛋白(类似物)“m2”。通常,使用可溶性多聚化试剂(2)。在链霉亲和素突变蛋白的情况下,该可溶性多聚化试剂可以是,例如,链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的任何突变蛋白(类似物)的低聚体或聚合物。这种多聚化试剂,例如可从IBAGmbH,哥廷根,德国作为“Strep-Tactin PE for Fab Streptamers” (产品编号6-5001-010或6-5011-010)商购获得。所述低聚体可包含链霉亲和素、抗生物素蛋白或其突变蛋白的三个或更多个四聚体。所述低聚体或聚合物可通过多糖交联。在第一步中,可基本上按照Noguchi,A.,Takahashi,T.,Yamaguchi,T.,Kitamura,K.,Takakura,Y.,Hashida,M.& Sezaki,H. (1992) Preparation and properties of the immunoconjugate composed of

anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin C dextran conjugate. Bioconjugate Chemistry 3, 132-137”中描述的通过将羧基残基引入多糖如葡萄糖, 制备这种链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的突变蛋白的低聚体或聚合物。在第二步中, 采用常规碳二亚胺化学, 通过内部赖氨酸残基的伯氨基和/或游离N-末端至葡聚糖骨架中的羧基使链霉亲和素或抗生物素蛋白或其突变蛋白偶联。可选地, 还可通过双功能连接子如戊二醛经由交联或通过文献中描述的其它方法获得合适的链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的任何突变蛋白的交联低聚体或聚合物。还可以通过“点击化学”, 如通过叠氮化物与末端炔基之间的1,3-偶极环加成来获得链霉亲和素的低聚体或聚合物。基于这一目的, 可以通过市售试剂, 如叠氮化物琥珀酰亚胺酯(从Life Technologies获得, 产品编号A10280)和炔琥珀酰亚胺酯(从Life Technologies获得, 产品编号A10279), 分别将叠氮化物和炔基引入链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白。然后, 将携带叠氮基的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白与通常携带炔基的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的化学计量摩尔量反应以产生低聚体(即具有3个或更多个单独的链霉亲和素四聚体)或聚合多聚化试剂。

[0094] 在图2的实例中, 固相的配体L可以是例如共价连接到所述固相的生物素。固相的生物素结合多聚化试剂(2)的游离结合位点(Z), 由此将作为靶细胞/多价结合复合物一部分的靶细胞固定在固定相(5)上。这种固相可以是, 例如, 可从Affiland S.A. (Ans-Liege, Belgium)获得的(d)-生物素琼脂糖凝胶™、可从IBAGmbH, 哥廷根, 德国获得的生物素-琼脂糖, 或使用本文在实验部分中描述的实验方案获得的具有共价结合的生物素的Superflow®琼脂糖。在这一实例中, 固相的配体L可选地可以是生物素衍生物, 如脱硫生物素、亚氨基生物素、2-(4'-羟基偶氮苯)苯甲酸(HABA)或链霉亲和素结合肽。

[0095] 之后使固定相(5)与竞争试剂(7)接触。竞争试剂(7)本身可以能够(作为整体)结合到多聚化试剂(2)的结合位点(Z)。可选地, 竞争试剂(7)可具有结合受体分子结合试剂(1)的结合位点(C)的结合位点(8)。通过竞争试剂(7)与多聚化试剂(2)的竞争结合, 该竞争试剂, 例如通过替换, 破坏受体分子结合试剂(1)的结合位点C与多聚化试剂(2)的结合位点(Z)之间的结合。如上所述, 固相的配体L还结合多聚化试剂(2)的结合位点(Z)。因此, 竞争试剂还从多聚化试剂(2)中替换结合的配体L。通过这样做, 多聚化试剂(2)从固相(5)中释放。由于靶细胞(3)与多聚化的受体分子结合试剂(1)结合, 因此靶细胞(3)也从固相(固定相)(5)中释放, 并且真正例如从固定相(5)为色谱基质的柱子中洗脱。在图2的这一实例中, 竞争试剂(7)可以是生物素, 其“作为整体”结合多聚化试剂(2)的结合位点(Z)。因此, 游离的生物素将在多聚化试剂(2)中(竞争地)替换共价偶联至固相(5)并充当配体L的生物素, 以及充当受体分子结合试剂且携带链霉亲和素结合肽的Fab片段。因此, 若固相(5)是色谱材料, 在使固定的靶细胞(3)与游离生物素接触之后, 所得到的洗脱液包含分离的靶细胞(3)、游离受体分子结合试剂(1)、(可溶性)链霉亲和素多聚化试剂(2)以及游离生物素。因此, 分离混合物包含与国际专利申请W0 2013/124474中描述的“选择滤筒(selection cartridge)”的洗脱液相同的试剂。这就意味着, 若固相(5)是用于色谱法的固定相(5), 则本发明的方法可以替代国际专利申请W0 2013/124474的“选择滤筒”上所实施的分离靶细胞的方法。因此, 本发明的方法, 当在柱色谱法中实施时, 可以替代国际专利申请W0 2013/124474的“选择滤筒”。此外, 可以通过国际专利申请W02013/124474中描述的

“去除滤筒 (removal cartridge)”来移除这种色谱柱的洗脱液的试剂。在此处上下文中,注意到如生物素-琼脂糖凝胶TM的固相可以无菌形式获得。因此,采用含有滤筒的无菌生物素-琼脂糖凝胶TM,可在GMP条件下,用于细胞分离的自动、封闭系统中简单地实施本发明的方法。因此,本发明提供一种简单且优雅的手段来获得目标靶细胞,例如用于基于细胞的疗法的T细胞或B细胞。在此上下文中,还注意到本发明提供另外的优点,即可将相同的(标准化的)多聚化试剂用于任何所需细胞类型的分离。由于多聚化试剂可以与相同的固相(例如生物素-琼脂糖凝胶TM)一起使用,因此可以总是使用相同的多聚化试剂,如低聚链霉亲和素突变蛋白,其提供a) 足够的游离结合位点Z用于固相上的固定,和b) 相同的限定(过量)数目的游离结合位点Z,用于受体分子结合试剂的多价复合物的形成。因此,本发明允许确保:无论何种用于分离特定细胞类型的特异性受体分子结合试剂,都能提供足够数量的结合位点Z用于多价结合复合物的形成。此外,本发明的方法的进一步优点是,在将细胞固定在固相上之前,将靶细胞与多聚化试剂和受体分子结合试剂一起温育。这种用于形成含有结合细胞的多价复合物的温育可以a) 在限定的小体积中进行,由此增加形成的复合物的浓度,和b) 在限定的时间内进行,同样与待分离的细胞类型无关。因此,本发明提供了标准化靶细胞分离的可能性,而与靶细胞的性质无关。

[0096] 图3显示一个分开/分离靶细胞的方法的实施方案,其中受体分子结合试剂(1)由两种或更多种试剂或亚单位形成。衔接子试剂(9)与受体分子结合预试剂(100)互相接触。该受体分子结合预试剂(100)具有针对包含在衔接子试剂(9)中的结合部分(10)的结合位点(11)。通过结合位点(11)和结合部分(10),衔接子试剂(9)与受体结合预试剂(100)互相结合。由此形成的受体结合试剂(1)具有可已经包含在受体结合预试剂(100)中的结合位点(B)。受体结合试剂(1)还包括可以特异性且可逆地结合多聚化试剂(2)的结合位点(Z)的结合配偶体(C)。所述结合配偶体(C)可已经包含在衔接子试剂(9)中。然后如图1所示实施该方法。可加入含有多个结合位点(Z)的多聚化试剂(2),其能够结合结合配偶体(C)。该多聚化试剂(2)还包含能够特异性结合配体(L)的配体结合配偶体(LB)。通过结合配偶体(C),受体分子结合试剂(1)结合多聚化试剂(2)上的结合位点(Z)。形成能够结合靶细胞(3)的多价结合复合物。若使含有靶细胞(3)的样品与多价结合复合物接触,则靶细胞(3)结合多价结合复合物。提供一种固定相(5),其含有配体结合配偶体(LB)结合的配体(L)。结果,靶细胞/多价结合复合物被固定在所述固定相(5)上。加入一种特异性结合配体(L)的竞争试剂(6)。由此破坏配体(L)与配体结合配偶体(LB)之间的结合且靶细胞/多价结合复合物从固定相(5)中释放。

[0097] 图4进一步说明了分开/分离靶细胞的方法的实施方案,其中受体分子结合试剂是例如在图2的实例中提到的携带链霉亲和素结合肽的Fab片段(111)。Fab分子结合靶细胞表面上的受体分子,例如,如存在于T细胞上的CD3或CD8的细胞表面受体。多聚化试剂是多聚的链霉亲和素突变蛋白(12),如在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷(SEQ ID NO:19)的链霉亲和素突变蛋白“m1”的低聚体,或在野生型链霉亲和素的序列位置44至47处包含氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷(SEQ ID NO:20)的链霉亲和素突变蛋白“m2”的低聚体。可以通过化学偶联多个链霉亲和素突变蛋白的分子来形成这种低聚体。这种多聚链霉亲和素突变蛋白(12)包含多个针对Fab-片段(111)的链霉亲和素结合肽的结合位点Z。所述多聚链霉亲和素突变蛋白(12)还包含6x His-标签,其

能结合金属亲和基质,如Ni琼脂糖凝胶™、NTA-琼脂糖、His60Ni、HisPur树脂或TALON树脂,仅提及少数市售固相。若使携带链霉亲和素结合肽的Fab片段(111)、多聚链霉亲和素突变蛋白(12)与其靶细胞表面上具有受体分子的靶细胞接触,则形成靶细胞/多价结合复合物。若该靶细胞/多价结合复合物与包含固定金属离子的固定相接触,则该复合物、并由此所述靶细胞被固定在固定相上。之后,可通过加入例如生物素和EDTA或咪唑来洗脱靶细胞。

[0098] 图5描述了允许能够结合低聚组氨酸标签的多聚化试剂的装配的合适部分。示于图5A至图5D的部分来自Schmidt, J.等, J. Biol. Chem. [2011] 286, 48, 41723-41735)。这些化合物包含生物素和多个能够结合低聚组氨酸标签的次氨基三乙酸(NTA)部分。通过使任意这些试剂与链霉亲和素反应来获得多聚化剂。由于链霉亲和素是同源四聚体,因此其提供四个结合位点用于生物素,而生物素不可逆地结合于链霉亲和素,这些生物素化的化合物的反应产生携带多个(4至16个)螯合基团K的试剂,其中每个螯合基团K能够结合过渡金属离子,如 Ni^{2+} 或 Co^{2+} ,由此使得多聚化试剂能够结合低聚组氨酸肽。因此,当图5中所述部分的螯合基团与这种过渡金属复合时,多聚化试剂可与携带低聚组氨酸标签的受体分子结合试剂形成多价复合物。如Schmidt等(2011,上文)所述,受体分子结合试剂可以是例如可溶性主要组织相容性复合物(MHC)肽,在其N-末端具有融合的低聚组氨酸标签。作为纯粹说明性的实例,这种MHC肽可以是如Schmidt等(2011,上文)所述的包含His-6标签、His-12标签或2_His-6标签的HLA-A 0201-肽。这种受体分子结合试剂也称为“Histamer”,并且可以与本文描述的采用多聚次氨基三乙酸(NTA)部分作为结合位点Z的多聚化试剂一起从TC Metrix SA, Epalinges, Switzerland商购获得。

[0099] 图6显示了用于从外周血富集CD4⁺细胞的实验结果。将多聚Strep-Tactin®用作多聚化试剂,将携带链霉亲和素-结合肽的抗CD4Fab片段用作受体分子结合试剂。将来自人血液的CD4⁺白细胞用作示例性靶细胞。固定相含有生物素作为配体L。通过使用荧光-激活细胞分选(FACS)的流式细胞术分析来表征细胞。图6A描述了总细胞(无门控)的图(Accuri C6流式细胞分析仪)。细胞针对CD3-PE和CD4-APC染色。图6B描述了总细胞(门P1)的图。细胞针对CD3-PE和CD4-APC染色。图6C描述了总细胞(门P1)的图。细胞未染色。图6D描述了级分(fraction)D+W的细胞(门P1)的图。细胞针对CD3-PE和CD4-APC染色。图6E描述了级分E(门P1)的图。细胞针对CD3-PE和CD4-APC染色。图6F描述了级分R的细胞(门P1)的图。细胞针对CD3-PE和CD4-APC染色。

[0100] 图7显示了总结图6中描述的FACS分析的结果的表。对总细胞的分析揭示了在门控的淋巴细胞群内的39.56%CD4⁺细胞浓度。在流出物(flow through)和洗涤级分中的细胞消耗至4.01%CD4⁺细胞浓度。通过生物素洗脱显示95.04%的CD4⁺细胞的纯度。在移液管处理柱树脂后,物理洗脱的细胞仍显示出88.26%的纯度。

[0101] 图8显示了在工作实施例中的细胞纯化柱的说明性装配。切割市售的旋转柱以除去下端(图8A)。然后将柱的上部插入含有膜的市售离心管的合适盖子中(图8B)。将具有上柱部分的盖子放置在附属管上(图8C)。

[0102] 图9显示了通过如国际专利申请W0 2013/124474(实施例10.1)中描述的采用移液器头作为柱的色谱纯化,或使用其中细胞与CD8结合Fab片段和生物素化固相预温育(实施例10.2)的本发明方法的实施方案,从外周血单核细胞(PBMC)的制备物中分离CD8⁺细胞的比较实验的结果。图9A显示了如国际专利申请W0 2013/124474中描述的,采用荧光-激活细

胞分选 (FACS) 的选择 (分离) 靶细胞前的初始PBMC制备物、洗涤 (wash through) 级分以及分离的洗脱级分 (CD8+细胞阳性级分) 的流式细胞术分析的Accuri C6图, 而图9B显示了采用本发明方法的实施方案, 选择 (分离) 靶细胞前的初始PBMC制备物、洗涤级分以及分离的洗脱级分 (CD8+细胞阳性级分) 的FACS分析的Accuri C6图。图9C显示了柱状图, 其中比较了两种方法分离的CD8+细胞的产量和纯度。在图9C中, 数字0015表示根据国际专利申请W0 2013/124474的方法的结果, 而数字0016表示本发明方法的该实施方案的结果。图9C中以%给出的产量和纯度的数值是三次独立实验的平均值。

[0103] 图10显示了通过如国际专利申请W0 2013/124474中描述的采用移液器头作为柱的色谱纯化, 或使用其中细胞与CD3结合Fab片段和生物素化固相预温育的本发明方法的实施方案, 从外周血单核细胞 (PBMC) 的制备物中分离CD3+细胞的比较实验的结果。图10A显示了如国际专利申请W0 2013/124474中描述的, 采用荧光激活细胞分选 (FACS) 的选择 (分离) 靶细胞前的初始PBMC制备物、洗涤级分以及分离的洗脱级分 (CD3+细胞阳性级分) 的流式细胞术分析的Accuri C6图, 而图10B显示了采用本发明方法的实施方案, 选择 (分离) 靶细胞前的初始PBMC制备物、洗涤级分以及分离的洗脱级分 (CD8+细胞阳性级分) 的FACS分析的Accuri C6图。图10C显示了柱状图, 其中比较了两种方法分离的CD3+细胞的产量和纯度。在图10C中, 数字0015表示根据国际专利申请W0 2013/124474的方法的结果, 而数字0016表示本发明方法的该实施方案的结果。图10C中以%给出的产量和纯度的数值是三次独立实验的平均值。

具体实施方式

[0104] 本文提供通常通过流体色谱法 (其可以以间歇模式或以连续模式进行) 分离或分开细胞和其它生物实体 (例如, 由表面上的共同特异性受体分子限定的细胞器、病毒、脂质体或朊病毒) 的方法。以下所用术语“靶细胞”通常是指所有这样的生物实体 (细胞、细胞器、病毒、脂质体或朊病毒)。

[0105] 尽管在以下的公开中参照本发明的第一方面的方法一般地解释了本发明, 但是显然, 以下公开可以与本文所定义的本发明的第二、第三和第四方面的方法同样地实施。

[0106] 本发明基于这样惊奇的发现: 可溶性多聚化试剂与具有配体L的固定相的组合的应用提供了优于例如国际专利申请W02013/124474中所述的已知方法的若干优点, 所述配体L与作为受体分子结合试剂或可溶性多聚化试剂的一部分的配体结合配体LB结合。

[0107] 第一, 本发明允许先温育受体结合试剂、多聚化试剂和靶细胞样品, 然后使这一反应混合物与固定相接触。这样做可以确保达到受体分子结合试剂与受体分子的结合, 和因此与靶细胞的结合的平衡。由于这种温育包括通过将单价受体分子结合试剂结合至多聚化试剂的多个结合位点Z, 使单价受体分子结合试剂多聚化, 这确保了当将受体分子结合试剂与靶细胞一起温育时确实可以达到亲合效果。此外, 由于可使用限定的多聚化试剂, 且与受体分子结合试剂和/或所选择的靶细胞的种类无关, 因此, 可使纯化方案标准化而无需考虑所使用的受体分子结合试剂和靶细胞。

[0108] 第二, 认为可溶性多聚化试剂改善了受体分子结合试剂至 (多聚化的) 受体分子结合试剂的可及性 (accessibility), 这是由于多聚化试剂是可溶性的, 其能够例如, 比固定在固体表面 (如色谱基质) 上的立体地和流动限制的多聚化试剂更好地达到裂隙 (crevice)

或与靶细胞表面上的复合受体分子相互作用。

[0109] 第三个优点是,与其中理想地应采用具有低孔径的色谱基质以便防止受体分子结合试剂进入孔并由此无法用于分离靶细胞的国际专利申请W02013/124474的方法相比,可将任何固相用于本发明的方法,因为未结合的受体分子结合试剂不与固相接触。

[0110] 第四,由于使用总是相同限定的多聚化试剂的可能性,可以采用限定的和较小量的受体分子结合试剂来分离细胞。

[0111] 第五,由于靶细胞(作为形成的多聚结合复合物的一部分)的固定是经由受体分子结合试剂或多聚化试剂的配体结合配偶体LB介导的,则这种固定与所采用的受体分子结合试剂和靶细胞的类型无关。事实上,相同的反应(LB与配体L的结合)可以用于任何给定细胞类型的固定。因此,这也允许分离/纯化方案的标准化。

[0112] 最后,如本文所述,可溶性多聚化试剂的使用允许通过色谱法将全部所使用的试剂(受体分子结合试剂、多聚化试剂和竞争试剂)移除。这允许将包含配体L的固相的装置与如本文所述的第一固定相或第二固定相中的至少一个一起使用。这种装置又允许本文所描述的分离方法简单自动化,并因此开发例如在GMP条件下的用于分离靶细胞的自动且封闭的设备(此处应注意,本文所述的所有试剂以及包含配体L的固相和第一固定相或第二固定相都可在GMP条件下制备)。

[0113] 除非另有说明,本文(包括说明书和权利要求书)中使用的下列术语具有以下给出的定义。

[0114] 本文所用术语“竞争试剂”是指能够降低、干扰或消除一对结合剂或部分(如包含在受体结合试剂中的结合位点B与靶细胞表面上的受体分子,包含在受体结合试剂中的结合配偶体C与包含在多聚化试剂中的结合位点Z,或配体L与配体结合配偶体LB)之间复合物的形成的任何试剂或条件。术语“竞争”是指任何对结合的干扰,而不考虑这种干扰的性质。在一些实施方案中,这种干扰也可以是对某一结合位点的非竞争性结合。当可逆键由复合的金属离子如 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 或 Zn^{2+} 介导时,这种竞争机制的一个实例是通过如EDTA或EGTA的螯合剂的金属螯合。这一机制适应用于在 Ca^{2+} 存在下结合的结合对(如钙调蛋白和钙调蛋白结合肽),或用于在固定金属-螯合亲和色谱(IMAC)中采用的结合对。在一些实施方案中,竞争试剂可具有一个能够特异性结合包含在结合配偶体中的一个上的结合位点的结合位点,所述结合配偶体如结合位点B、结合位点Z、结合配偶体C或配体结合配偶体LB。还可能是,整个竞争试剂能够特异性结合包含在这些结合配偶体中的一个上的结合位点。在一些实施方案中,通过pH或缓冲液的盐强度的改变来提供竞争,且之后竞争试剂使pH或盐强度增加或降低。pH的改变可以例如,用于替换/破坏链霉亲和素与链霉亲和素结合肽的结合,或用于替换/破坏蛋白质A或蛋白质G与抗体Fc结构域之间的结合。

[0115] 术语“分离的”表示靶细胞已经从其正常的生理环境如天然来源中移除。一种分离的细胞可例如包含在一个不同的培养基(如原始提供的水性溶液)中,或放置在不同的生理环境中。通常,分离的细胞构成存在于其环境(如适用的溶液/悬浮液)中的总细胞的比例高于其被取出的环境中的总细胞比例。在一些实施方案中,除本文所述的方法之外,所需靶细胞的分离可包括一般细胞富集技术,如离心、过滤或细胞色谱。如B细胞或T细胞的淋巴细胞可以从例如外周血、从血液、脑脊液或其富集级分中获得。B细胞或T细胞可以从外周血单核细胞(PBMC),如人PBMC中获得。可以采用,例如基于细胞密度和/或细胞尺寸的已知标准技

术来富集这种PBMC。作为说明性实例,可以例如采用蔗糖、葡聚糖、Ficoll®或Percoll®通过密度梯度离心来富集或分离PBMC。

[0116] “分离的”通常指获得的样品(如洗脱液或级分)含有作为基本上占优势细胞(细胞群)类型的靶细胞,例如,该靶细胞代表存在于样品中的大于约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约85%或大于约90%的细胞。在一些实施方案中,分离的靶细胞限定存在于样品中的大于约95%或大于约97%的细胞。在一些实施方案中,分离的靶细胞限定存在于样品中的大于约99%的细胞。“分离的”还包括在经过如本文所述的分离/纯化方法之后,含有靶细胞的样品中没有反应物,例如本文定义的受体结合试剂、多聚化试剂或竞争试剂。

[0117] 本文使用的“分离”意味着,与用于靶细胞分离的样品的含量(浓度)相比,靶细胞在实施本文所述方法获得的样品中富集。与上述一致,这意味着靶细胞可以在样品中富集,例如,从样品中细胞总量的约0.1%的含量富集至样品(如从采用本文公开方法中获得的洗脱液或级分)中约10%或更多、或20%或更多。在一些实施方案中,靶细胞可以从样品中细胞总量的约0.1%的含量富集至从本文描述的方法中获得的样品中30%或更多、如40%或更多。术语“分离”还包括检测样品中靶细胞的存在或不存在。因此,靶细胞分离可用于分析或制备目的(例如,用于检测靶细胞群的存在,也用于量化存在于样品中的细胞,或用于大规模分离细胞以用于基于细胞的疗法)。分析目的可包括诊断应用以及基础研究应用,其中例如本文所述的分离方法用于筛选目的,例如一个特定受体分子例如G-蛋白耦合受体(GPCR)或任何其他生理相关受体(如胰岛素受体)是否在选定的宿主细胞中重组表达(同样见下文)。

[0118] 在分离、纯化或富集靶细胞的上下文中的“固定相”是与流动相接触的色谱系统的一部分。应用于色谱系统的样品的各个组分可以显示在流动相和固定相之间的单独分配。在色谱期间,固定相保持在特定空间内,并且在许多实施方案中具有至少基本固定的位置。术语“色谱基质”和“固定相”在本文中可互换使用。在本发明中,固定相可以以间歇模式或流通模式(flow-through mode)使用。

[0119] 本文所用术语“靶细胞”涵盖所有生物实体/囊泡,其中膜(也可以是脂质双层)将内部与外部环境(环境)分离,并且在生物实体/囊泡的表面上包含一种或多种类型的特异性受体分子。因此,靶细胞/生物实体/囊泡或靶细胞群被在其表面上存在至少一个常见特异性受体分子定义。

[0120] 靶细胞或靶细胞群从样品中分离,所述样品例如可包含各种不同的细胞或细胞群。含有至少一个特定受体分子的几乎任何靶细胞均可以与包含在样品中的其他组分相分离。为了使本文描述的方法达到如下所述的亲合效果,受体分子通常以两个或更多个拷贝存在于靶细胞表面上。

[0121] 在一些实施方案中,靶细胞可以是原核细胞,如细菌细胞。在一些实施方案中细胞可以是古菌。在一些实施方案中细胞可以是病毒或细胞器,如线粒体、叶绿体、微粒体、溶酶体、高尔基体或细胞核。在一些实施方案中,细胞可以是真核细胞,如植物细胞、真菌细胞、酵母细胞、原生动物或动物细胞。在一些实施方案中靶细胞包括细胞核。在一些实施方案中,靶细胞是哺乳动物细胞,包括但不限于从人、小鼠、兔、豚鼠、松鼠、仓鼠、猫、狗、狐猴、山羊、猪、马、恒河猴、猕猴或黑猩猩中获得的细胞。哺乳动物细胞的例子包括但不限于血液细

胞或组织细胞,如肝细胞或干细胞,如源于合适来源的CD34-阳性外周干细胞或者胚胎干细胞关键蛋白(Nanog)或Oct-4表达干细胞。血液细胞可以如是白细胞或红细胞。白细胞可以是例如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、巨噬细胞或树突细胞。个别淋巴细胞可以是,例如T细胞—包括CMV-特异CD8⁺T-淋巴细胞、细胞毒性T-细胞、记忆T-细胞(记忆T细胞的示例性例子是CD62L⁺CD8⁺特异性中央记忆T-细胞)或调节性T-细胞(Treg的示例性例子是CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺Treg细胞)、T-辅助细胞(例如CD4⁺T-辅助细胞)、B细胞或天然杀伤细胞,提到的只是一些示例性例子。

[0122] 靶细胞通常是细胞,包括细胞群或如上提到的任何其他生物实体群,其膜(在一些实施方案中也可以是脂质双层)将内部与外部环境(环境)分离。靶细胞的进一步特点是其表面上具有特定特异性受体分子。可以通过本文所述的方法在任何使用的纯化试剂(如受体结合试剂;竞争试剂;和/或多聚化试剂)的顺序移除下纯化这种靶细胞。除了如果靶是细胞或细胞器则生理状态并不改变的优势之外,相应方法或用途提供了调节优势,即在使用这些纯化的生物实体作为药物时,纯化试剂没有施用给受试者(如患者)。

[0123] 例如,靶细胞可以是组织如器官或其部分的细胞。各个器官的实例包括但不限于肾上腺组织、骨骼、血液、膀胱、脑、软骨、结肠、眼、心、肾、肝、肺、肌肉、神经、卵巢、胰腺、前列腺、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸、胸腺、肿瘤、血管或子宫组织、或结缔组织。在一些实施方案中,细胞是干细胞、淋巴细胞或癌细胞。

[0124] 将要从分离出靶细胞的样品可以是任何来源。其例如但不限于可源自人、动物、植物、细菌、真菌或原生动物。因此,任何以下样品选自但不限于土壤样品、空气样品、环境样品、细胞培养样品、骨髓样品、食物样品、血液样品、血清样品、血浆样品、尿样品、粪便样品、精液样品、淋巴液样品、脑脊液样品、洗鼻咽样品、痰液样品、口腔拭子样品、咽喉拭子样品、鼻拭子样品、支气管肺泡灌洗样品、支气管分泌物样品、牛奶样品、羊水样品、活检样品、癌症样品、肿瘤样品、组织样品、细胞样品、细胞培养样品、细胞溶解产物样品、病毒培养样品、指甲样品、头发样品、皮肤样品、法医样品、感染样品、院内感染样品、空间样品或其任何组合。当需要时,相应的样品可以已被预处理到任何程度。作为一个说明性实例,在用于本文所述的方法之前,组织样品可能被消化、均质或离心。在另一个说明性实例中,体液如血液的样品可以通过血液细胞标准分离获得。如果本文描述的分离方法用于基础研究,样品可以是体外细胞培养实验的细胞。样品通常会准备成液体的形式,如溶液或分散体。

[0125] 位于靶细胞表面,包括位于生物实体的可及表面上的受体分子可以是在根据本发明的方法中的分离过程期间存在于细胞表面上的任何分子。受体分子是一种受体分子结合试剂所针对的分子。在一些实施方案中,受体是肽或蛋白,如膜受体蛋白。在一些实施方案中,受体是脂质或多糖。作为蛋白质的受体分子可以是外周膜蛋白或膜本体蛋白质。在一些实施方案中,它可以具有一个或多个跨膜的结构域。作为一些说明性实例,膜蛋白可以是CD分子(分化簇),如CD3、CD4、CD8、CD247(T细胞标记物)、CD8、CD62L、CD45RA(记忆T细胞标记物)、CD4、CD25、CD45RA(调节T细胞标记物)、CD56(天然杀伤细胞标记物)、CD19(B细胞标记物)和CD34、Oct-4、胚胎干细胞关键蛋白(Nanog)(干细胞标记物),仅列举几个说明性示例。因此,靶细胞可以是例如血细胞的群或亚群;如诸如T细胞、T-辅助细胞(例如CD4⁺T-辅助细胞)、B细胞或天然杀伤细胞的淋巴细胞;单核细胞;或干细胞,如CD34-阳性外周干细胞或者胚胎干细胞关键蛋白(Nanog)或Oct-4表达干细胞。在其表面具有CD8的大多数T细胞是细胞

毒性T细胞。因此,靶细胞可以是CD8⁺细胞毒性T-细胞。受体还可以是肿瘤细胞的标记物。膜蛋白还可以是G-蛋白偶联受体,如嗅觉受体、视紫红质受体、视紫红质信息素受体、肽激素受体、味觉受体、GABA受体、阿片类受体、5-羟色胺受体、Ca²⁺受体、视黑素、神经递质受体、受体激酶如丝氨酸/苏氨酸激酶、酪氨酸激酶、孔/通道如氯通道、钾通道,或细胞粘附受体如金属蛋白酶、整合素或钙粘蛋白。

[0126] 本文所述的方法可以作为流体色谱法,通常为液相色谱法的一部分来实施。任何材料都可以作为本发明上下文中的色谱基质采用,只要材料适用于色谱分离所选择的生物实体如靶细胞即可。一个合适的色谱材料至少本质上是无害的,即当用于填充的色谱柱中在预期条件下进行细胞分离(cell isolation)和/或细胞分开(cell separation)时不损害细胞生存力(或生物实体的生存力或稳定性)。本文所述的方法中所使用的色谱基质保留于预定位置,通常为在预定位点,而待分离的样品及其内包含的组分的位置是变化的。作为说明性实例,若使用填充床色谱柱,则通常将固定相限制在柱底部与流动适配器之间。当色谱作为膨胀床吸附实施时,树脂在使用中变成流化的,并且所采用的珠子以浓度梯度的形式排列,单个珠子占有这样一个位置:其沉降速度与向上的液体流速匹配。因此,色谱基质是符合本领域技术人员常规理解的“固定相”,该固定相是色谱系统中的流动相流动通过的部分,且其中包含在液相中的组分在相之间扩散。

[0127] 若使用珠子,则柱色谱中的珠子的尺寸通常是相当均匀的,而在膨胀床中的珠子的尺寸是可变的,通常为约50至约400μm的范围。在这方面,注意加入到液体样品中、与样品混合、然后从样品中移除(如通过弃除上清(液体),同时将珠子暂时放在适当位置(例如,通过外部磁场或通过离心))的颗粒如可自由活动的磁珠在一个实施方案中并不是本文使用的固定相。然而,本发明的方法还可以在间歇模式中实施。在这样一种方法中,可以将这些(磁)珠加入到含有靶细胞的样品中以在这些珠子上固定靶细胞(经由在靶细胞、受体结合试剂和亲和/多聚化试剂之间形成复合物),然后将珠子与样品例如通过暂时将珠子放在适当位置相分离,同时丢弃上清液。这样一种间歇方法也是根据本发明的方法。

[0128] 通常,各个色谱基质具有固相或半固相的形式,而包含待分离(isolated/separated)的靶细胞的样品是流体相(fluid phase)。用于实现分离的流动相同样是流体相(fluid phase)。色谱法基质可以是颗粒物质(具有任何合适的尺寸和形状)或整体色谱材料,包括纸基材或膜。因此,色谱法可以是例如柱色谱法。在一些实施方案中,色谱法也可以是平面色谱法。在一些实施方案中,“色谱柱”可以是膨胀床色谱。如果将颗粒基质材料用于柱色谱法,则颗粒基质材料可以例如具有约5μm至约200μm、或从约5μm至400μm、或从约5μm至约600μm的平均粒径。如下详述,色谱基质可以例如是或包含聚合物树脂或金属氧化物或类金属氧化物。如果使用平面色谱,基质材料可以是任何适合平面色谱的材料,如传统的基于纤维素的或基于有机聚合物的膜(例如,纸膜、硝化纤维素膜或聚偏二氟乙烯(PVDF)膜)或二氧化硅涂覆的玻璃板。在一个实施方案中,色谱基质/固定相是一种非磁性材料或非可磁化材料。

[0129] 用于现有技术且也适用于本文所述方法的非磁性材料或非可磁化色谱固定相,包括衍生化的二氧化硅或交联凝胶。交联凝胶(通常生产成珠子形式)可以基于天然聚合物,即在天然形成的聚合物类上。例如,色谱固定相基于其的天然聚合物是多糖。相应的多糖通常是交联的。多糖基质的实例是琼脂糖凝胶(例如,SuperflowTM琼脂糖或Sepharose®材

料,如商购可获得的不同珠子和孔尺寸的Superflow™Sephacryl®)或交联葡聚糖凝胶。另一个说明性实例是葡聚糖共价结合的颗粒交联琼脂糖基质,这是商购可获得的(以各种珠子大小和不同孔尺寸)如Sephadex®或Superdex®,都可以从GE Healthcare获得。这种色谱材料的另一个说明性实例是Sephacryl®,其也可以不同的珠子和孔尺寸从GE Healthcare获得。

[0130] 交联凝胶也可以基于合成聚合物,即基于天然不存在的聚合物类。通常用于细胞分离的色谱固定相基于其的合成聚合物基于具有极性单体单元且因此本身具有极性的聚合物。这样的极性聚合物是亲水的。亲水(“爱水的”)分子,也称为疏脂的(“厌脂肪的”),包含可以与水分子形成偶极-偶极相互作用的部分。疏水(“厌水的”)分子,也称为亲脂的,具有与水分离的倾向。

[0131] 合适的合成聚合物的说明性实例是聚丙烯酰胺、苯乙烯-二乙烯基苯凝胶以及丙烯酸酯和二醇或丙烯酸酯和二醇的共聚物。一个说明性实例是聚甲基丙烯酸酯凝胶,可以以Fractogel®商购获得。另一个实例是乙二醇和甲基丙烯酸酯的共聚物,可以以Toyopearl®商购获得。在一些实施方案中,色谱固定相可以也包括天然和合成的聚合物组分,如复合基质或复合物或多糖和琼脂糖的共聚物,如聚丙烯酰胺/琼脂糖复合物,或多糖和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的复合物。葡聚糖和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的共聚物的一个说明性实例是上述Sephacryl®系列材料。衍生化二氧化硅可以包括耦合到合成或天然聚合物的二氧化硅颗粒。这种实施方案的实例包括、但不限于多糖接枝二氧化硅、聚乙烯吡咯烷酮接枝二氧化硅、聚氧化乙烯接枝二氧化硅、聚(2-羟基乙基天冬酰胺)二氧化硅和聚(N-异丙基丙烯酰胺)接枝二氧化硅。

[0132] 如用于本文所述方法中的色谱基质的固相还可以包括可被磁吸引的颗粒。此外,这种可被磁吸引的颗粒可包含能够结合多聚化试剂的配体结合配偶体LB的配体L。可被磁吸引的颗粒可以含有抗磁性、铁磁性、顺磁性或超顺磁材料。超顺磁材料响应磁场,这个磁场具有不产生永久磁化的感应磁场。基于氧化铁的铁磁性颗粒是,例如可从DynaL Biotech商购购得的Dynabeads®,从Miltenyi Biotec商购购得的磁性MicroBeads,从CPG Inc.商购购得的磁性多孔玻璃珠,以及从各自其他来源的,如Roche Applied Science、BIOCLON、BioSource International Inc.、micromod、AMBION、Merck、Bangs Laboratories、Polysciences或Novagen Inc.,这里只列出一些。例如,Hutten,A.等人(J.Biotech.(2004),112,47-63)已经描述了基于超顺磁Co和FeCo的铁磁性纳米颗粒,以及铁磁Co纳米晶体。在一些实施方案中,本文公开方法中所用色谱基质没有任何可被磁吸引的材料。

[0133] 在分离靶细胞的方法中,可采用色谱基质作为亲和色谱基质。亲和色谱基质本身可包括永久结合(通常是共价结合)的部分,其能够特异性结合选定的靶。例如,常规亲和色谱基质可以包括结合特定给定靶的抗体。可选地,用于固定金属-螯合亲和色谱(IMAC)的色谱基质用例如三齿亚氨基二乙酸的螯合配体剂或低聚组氨酸标签修饰,所述三齿亚氨基二乙酸能够在金属离子和蛋白质的某些裸露侧链之间形成配位键。因此,在本领域,亲和色谱基质通常设计成使得其本身能够特异性结合待分离的靶。在本文公开方法的一些实施方案中,固定相用作国际专利申请W0 2013/124474中描述的“选择滤筒”的替代物。

[0134] 多聚化试剂包含两个或更多个针对包含在受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z。在之后形成的非共价结合复合物中，两个或更多个受体结合试剂结合到多聚化试剂。结合的受体结合试剂彼此紧密排布，使得如果具有(至少两个拷贝的)受体分子的靶细胞存在于样品中，并与具有一个或多个能够结合特定受体分子的结合位点B的受体结合试剂接触，可以发生亲合效应。在一些实施方案中，受体结合试剂包括多个如两个或更多个针对靶细胞上受体的结合位点B。

[0135] 因此，在本文所述的多个受体结合试剂结合至多聚化试剂的方法中，如美国专利7,776,562或国际专利申请W002/054065中描述的亲合(多聚化)效应可以发生，从而允许靶细胞/多价结合复合物的形成。这种靶细胞/多价结合复合物可被可逆地固定在固定相上，由此使靶细胞固定在固定相上。由于可以通过加入竞争试剂来破坏多聚化试剂的结合位点Z与受体分子结合试剂的结合配偶体C之间的键，随后可以在温和条件下洗脱靶细胞，在这种条件下受体分子结合试剂完全从靶细胞中解离，由此避免受体分子结合试剂影响靶细胞的功能状态。因此，这种经由此亲和色谱法分离靶细胞不仅具有允许靶细胞群(或本文描述的任何其他生物实体)的分离/纯化，且不改变由常见特异性受体分子定义的靶细胞群的功能状态的优点。而且，这种方法还有额外的好处，它完全废除使用磁珠纯化细胞的需要，由此简化了对细胞的任何进一步处理并进一步打开了本文还描述的分离靶细胞的自动化的途径。

[0136] 在一些实施方案中，色谱基质，如第一或第二(如果使用)固定相包含在色谱柱中，例如填充在色谱柱中。在一些实施方案中，使用第一和第二固定相。所述第一固定相对应于上文描述的固定相，其包含例如配体L。第二固定相可用于从使用的试剂，例如受体结合试剂、竞争试剂和/或多聚化试剂中消耗第一固定相的洗脱液。由此，这种第二固定相可以是如国际专利申请W0 2013/124474中描述的“移除滤筒”。在一些实施方案中，第二固定相包括通常与其共价连接的亲和试剂。亲和试剂能够结合包含在受体结合试剂中的结合配偶体C。亲和试剂还可能结合竞争试剂。这样的色谱基质可以是亲和色谱基质。其也可以是凝胶过滤基质，亲和试剂耦合于其上。通过固定的亲和试剂，色谱基质可以消耗受体分子结合试剂的流动相。接触色谱基质的样品，例如负载到与其填充的柱子上，同样可以耗尽其中的受体结合试剂。作为一个说明性实例，若采用链霉亲和素结合肽作为结合配偶体C，且采用生物素作为竞争试剂，则亲和试剂可以是与色谱基质(如sephararose™)偶联的链霉亲和素(参见国际专利申请W0 2013/124474以获得这种“移除滤筒”的详细描述)。此外，若将链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的可溶性低聚体用作可溶性多聚化试剂，可以通过其上固定或共价耦合了生物素的另一(第三)固定相将这种多聚化试剂从洗脱液中移除(参见从Affiland S.A. (Ans-Liege, Belgium)商购获得的生物素-琼脂糖凝胶，或在本文实验部分制备的具有共价结合的生物素的Superflow®琼脂糖)。基于可溶性链霉亲和素的多聚化试剂将通过与其生物素基团结合而固定在固相上。因此，本发明提供了在移除本发明方法中使用的所有试剂的情况下自动分离靶细胞的可能性。

[0137] 应用含有靶细胞的样品之后，可以随后用流动相(如水性介质，如缓冲液)洗涤本文所用的色谱基质，以便移除没有固定在色谱基质上的任何物质。这种洗涤可以在本文所述的方法或用途的上下文中使用的任何固定相上进行。相应的色谱基质可以用作第一固定相或用作第二固定相。

[0138] 然后,例如通过条件改变可以诱导上文描述的非共价多价复合物的解离,该复合物的形成使靶细胞固定在亲和色谱基质上。这种条件改变例如可以是pH或水性流动相离子强度的改变。在一些实施方案中,采用竞争试剂以便诱导受体分子结合试剂与多聚化试剂之间的可逆非共价复合物的解离。通过占有或阻塞多聚化试剂对于包含在受体结合试剂中的结合配偶体的结合位点,竞争试剂能够结合多聚化试剂。通过使用与多聚化试剂具有特别高亲和力的竞争试剂,或通过使用相对于受体分子结合试剂的浓度过量的竞争试剂(在这种情况下,相比于受体结合试剂的结合配偶体C,竞争试剂也可能对多聚化试剂的结合位点Z具有较低亲和力),受体结合试剂和多聚化试剂之间的非共价键合可以被破坏。允许靶细胞从色谱基质中洗脱,如从色谱基质填充于其中的柱子洗脱。收集洗脱液,由此收集靶细胞。

[0139] 用作色谱中流动相的流体相可以是适用于保存靶细胞的生物活性的任何流体。通常,流体是液体。在一些实施方案中,相应的液体是或包括水,例如以水性溶液的形式。其他组分可以包含在相应的水性溶液中,例如溶解或悬浮于其中。作为说明性实例,水性溶液可以包含一种或多种缓冲化合物。多种缓冲化合物用于本领域,且可以用来实施本文描述的各种方法。缓冲液的实例包括、但不限于磷酸盐溶液如磷酸盐缓冲盐水(PBS)、碳酸盐、琥珀酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、甲酸盐、硼酸盐、N-(2-乙酰胺基)-2-氨基-乙磺酸酯(也称为ACES)、N-(2-羟乙基)-哌嗪-N'-2-乙磺酸(也称为HEPES)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪-丙磺酸(也称为HEPPS)、哌嗪-1,4-二(2-乙磺酸) (也称为PIPES)、(2-[三(羟甲基)-甲氨基]-1-乙磺酸(也称为TES)、2-环己胺-乙磺酸(也称为CHES)和N-(2-乙酰胺基)-亚氨基二乙酸盐(也称为ADA)。可用于这些盐的任何抗衡离子;铵、钠和钾可以作为说明性实例。缓冲剂的更多例子包括但不限于,三-乙醇胺、二乙醇胺、两性离子缓冲剂如甜菜碱、乙胺、三乙胺、甘氨酸、双甘氨酸、组氨酸、三(羟甲基)-氨基甲烷(也称为TRIS)、二-(2-羟乙基)-亚氨基-三(羟甲基)-甲烷(也称为BIS-TRIS)和N-[三(羟甲基)-甲基]-甘氨酸(也称为TRICINE),这里只举几个例子。缓冲液可以进一步包括稳定待分离的靶细胞的组分,例如蛋白质如(血清)白蛋白、生长因子、微量元素等。选择合适的流动相在本领域普通技术人员知识范围内,且可以经验性进行。

[0140] 与国际专利申请W02013/011011一致,受体分子结合试剂与靶细胞上的受体分子之间的结合强度对靶细胞与多聚化试剂经由受体结合试剂的结合可逆性可能不是必不可少的。相反,不考虑结合强度,意味着不论经由结合位点B的受体结合试剂与受体分子之间的结合的解离常数(K_d)具有低亲和性,例如, K_d 的范围是约 10^{-3} 至约 10^{-7} M,或具有高亲和性,例如, K_d 的范围是约 10^{-7} 至约 1×10^{-10} M,靶细胞均可以可逆地结合,只要经由结合位点B的受体结合试剂与靶细胞表面上的受体分子之间的结合的解离发生得足够快。在这方面,经由结合位点B的受体结合试剂与受体分子之间的结合的解离速率常数(k_{off})可以具有约 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更高的值。这个解离速率常数是表征受体结合试剂的结合位点B与靶细胞表面上的受体分子之间形成的复合物的解离反应的常数。受体结合试剂的结合位点B与靶细胞表面上的受体分子之间的结合反应的结合速率常数(k_{on})可以具有任何值。为了确保受体分子与受体结合试剂之间的充分可逆结合,将结合平衡的 k_{off} 值选择为具有下述值是有益的:约 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更大,约 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更大,如约 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3.5 \times$

10^{-4}sec^{-1} 或更大、约 $4\times 10^{-4}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $5\times 10^{-4}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $7.5\times 10^{-4}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1.5\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2.5\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $4\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 、约 $5\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $7.5\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1\times 10^{-2}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $5\times 10^{-2}\text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1\times 10^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或更大或者约 $5\times 10^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或更大。本文使用的关于 k_{off} 速率、 k_{on} 速率或 K_{D} (参见下述)的术语“约”的含义是包含 $\pm 20.0\%$ 的误差范围,包括 $\pm 15.0\%$ 、 $\pm 10.0\%$ 、 $\pm 8.0\%$ 、 $\pm 9.0\%$ 、 $\pm 7.0\%$ 、 $\pm 6.0\%$ 、 $\pm 5.0\%$ 、 $\pm 4.5\%$ 、 $\pm 4.0\%$ 、 $\pm 3.5\%$ 、 $\pm 3.0\%$ 、 $\pm 2.8\%$ 、 $\pm 2.6\%$ 、 $\pm 2.4\%$ 、 $\pm 2.2\%$ 、 $\pm 2.0\%$ 、 $\pm 1.8\%$ 、 $\pm 1.6\%$ 、 $\pm 1.4\%$ 、 $\pm 1.2\%$ 、 $\pm 1.0\%$ 、 $\pm 0.9\%$ 、 $\pm 0.8\%$ 、 $\pm 0.7\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.4\%$ 、 $\pm 0.3\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 或 $\pm 0.01\%$ 。应注意,本文使用的动力学和热力学常数的值指大气压力条件,即1.013巴和室内温度,即 25°C 。

[0141] 在一些实施方案中,受体分子结合试剂具有能够特异性结合到受体分子的单一(单价)结合位点B。这种单价受体分子结合试剂的实例是可溶性MHC I肽(其与细胞特异性抗原呈递肽复合,这种MHC分子在例如国际专利申请W0 02/054065中或在Schmidt, J.等, J. Biol. Chem. [2011] 286, 48, 41723-41735中描述,并且可从例如IBA GmbH或TC Metrix S.A. 商购获得)、单价抗体片段(如例如, Fab片段、Fv片段或单链Fv片段(scFv))或单价人工结合分子(蛋白质性的或其他),如基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白(也称为“Anticalin®”)。可选地,受体分子结合试剂还可以具有两个或更多个结合位点B。这种受体分子结合试剂的实例是完整(二价)抗体分子或保留两个结合位点的抗体片段,如 F(ab')_2 片段。受体分子结合试剂可以是多价分子,如五聚体IgE分子。

[0142] 在一些实施方案中,是在分子水平上,而不是经由至少结合位点B的受体分子结合试剂与靶细胞上的受体分子的结合的 k_{off} 速率($3\times 10^{-5}\text{sec}^{-1}$ 或更大),允许将本文所述可逆试剂与本文所述靶细胞的分离组合。而是并例如如美国专利7,776,562或国际专利申请W002/054065所描述,受体分子与受体分子结合试剂的结合位点B之间的低亲和力与经由固定化多聚化试剂介导的亲合效应一起允许靶细胞的可逆分离。在这些实施方案中,可以在多聚化试剂的两个或更多个结合位点Z和至少两个受体结合试剂的结合配偶体C之间形成复合物,从而允许靶细胞的可逆固定化和随后的从固相中洗脱靶细胞(经由加入竞争试剂,将其破坏形成于结合配偶体C与结合位点Z之间的结合(复合),进而导致受体结合试剂从靶细胞中解离)。这种低结合亲和力可以由解离常数(K_{D})表征,所述 K_{D} 在约 10^{-2}M 或 10^{-3}M 至约 10^{-7}M ,或约 10^{-3}M 至约 10^{-6}M ,或约 10^{-4}M 至约 10^{-7}M 的范围内。

[0143] 如上所示,受体分子结合试剂除了具有能够结合受体分子的结合位点B之外,还具有结合配偶体C。这个结合配偶体C能够可逆地结合多聚化试剂的结合位点Z,其中多聚化试剂具有一个或多个用于结合配偶体C的结合位点。包含在受体结合试剂中的结合配偶体C与多聚化试剂的结合位点Z之间形成的非共价的键可以具有任何所需的强度和亲和力,只要其在实施本发明方法的条件下是可破坏的或可逆的即可。包含在受体分子结合试剂中的结合配偶体C与多聚化试剂的结合位点Z之间的结合的解离常数(K_{D})可以具有在约 10^{-2}M 至约 10^{-13}M 范围内的值。因此,这种可逆的键可以例如具有从约 10^{-2}M 至约 10^{-13}M 、或从约 10^{-3}M 至约 10^{-12}M 或从约 10^{-4}M 至约 10^{-11}M 、或从约 10^{-5}M 至约 10^{-10}M 的 K_{D} 值。这种键的 K_{D} 以及在受体分子结合试剂的结合位点B与受体分子之间形成的键的 K_{D} 、 k_{off} 和 k_{on} 速率可以由任何合适的手段测定,例如,通过荧光滴定法、平衡透析或表面等离子体共振。受体分子结合试剂可包括至

少一个、包括两个、三个或更多个第二结合配偶体C,且多聚化试剂可包括至少两个、如三、四、五、六、七、八个或更多个用于包含在受体分子结合试剂中的结合配偶体的结合位点。如美国专利7,776,562或国际专利申请W0 2002/054065所述,可以选择结合配偶体C和具有一个或多个对应的结合位点Z的多聚化试剂的任意组合,只要结合配偶体C和多聚化试剂的结合位点Z能够在(多价)复合物中可逆地结合或多聚化以产生亲合效应即可。

[0144] 包含在受体分子结合中的结合配偶体C可以是寡肽、多肽、蛋白质、核酸、脂质、糖、低聚糖或多聚糖。这种结合配偶体相比于其他物质对多聚化试剂的结合位点具有更高的亲和力。相应结合配偶体的实例包括、但不限于免疫球蛋白分子、其片段和具有抗体样功能的蛋白质性结合分子。

[0145] 在一些实施方案中,包含在受体结合试剂中的结合配偶体C包含生物素,多聚化试剂包含与生物素可逆结合的链霉亲和素类似物或抗生物素蛋白类似物。在一些实施方案中,包含在受体结合试剂中的结合配偶体C包含与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物,多聚化试剂包含与相应生物素类似物可逆结合的链霉亲和素、抗生物素蛋白、链霉亲和素类似物或抗生物素蛋白类似物。在一些实施方案中,包含在受体结合试剂中的结合配偶体C包含链霉亲和素或抗生物素蛋白结合肽,多聚化试剂包含与相应链霉亲和素或抗生物素蛋白结合肽可逆结合的链霉亲和素、抗生物素蛋白、链霉亲和素类似物或抗生物素蛋白类似物。

[0146] 在一些实施方案中,包含在受体结合试剂中的结合配偶体C可以包含链霉亲和素-结合肽,所述链霉亲和素-结合肽包含以下序列之一或由以下序列之一组成:

[0147] a) -Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa- (SEQ ID NO:1), 其中Xaa是任何氨基酸,和Yaa及Zaa都是Gly,或Yaa是Glu和Zaa是Lys或Arg,

[0148] b) -Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly- (SEQ ID NO:2),

[0149] c) -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys- (SEQ ID NO:3),

[0150] d) 顺序设置的至少两个链霉亲和素结合肽,其中每个肽结合链霉亲和素,其中两个肽之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,和其中所述至少两个肽中的每个都包含氨基酸序列-His-Pro-Baa-,其中Baa选自谷氨酰胺、天冬酰胺和甲硫氨酸,

[0151] e) 如d)中所述的顺序设置,其中所述至少两个肽中的一个包含序列-His-Pro-Gln-,

[0152] f) 如d)中所述的顺序设置,其中所述肽中的一个包含氨基酸序列-His-Pro-Gln-Phe- (SEQ ID NO:4),

[0153] g) 如d)中所述的顺序设置,其中至少一个肽至少包含氨基酸序列-0aa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa- (SEQ ID NO:5), 其中0aa是Trp、Lys或Arg,Xaa是任何氨基酸,和其中Yaa和Zaa都是Gly,或Yaa是Glu和Zaa是Lys或Arg,

[0154] h) 如d)中所述的顺序设置,其中至少一个肽至少包含氨基酸序列-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa- (SEQ ID NO:6), 其中Xaa是任何氨基酸,和其中Yaa和Zaa都是Gly,或Yaa是Glu和Zaa是Lys或Arg,

[0155] i) 如d)中所述的顺序设置,其中至少一个肽至少包含氨基酸序列-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys- (SEQ ID NO:7),

[0156] j) 氨基酸序列-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys- (Xaa)_n-Trp-Ser-His-Pro-

Gln-Phe-Glu-Lys- (SEQ ID NO:8), 其中Xaa是任何氨基酸, 和n是从0至12的整数,

[0157] k) 选自以下的氨基酸序列: Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:9)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:10)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:11)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:12) 或 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:13)。

[0158] 在这些例子中, 多聚化试剂可以包含链霉亲和素突变蛋白 (类似物) Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 或链霉亲和素突变蛋白 (类似物) Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, 这两个都描述在例如美国专利6,103,493中, 且可以以商标 **Strep-Tactin®** 商购获得。这种多聚链霉亲和素突变蛋白也可以称为多聚化的 Strep-Tactin。

[0159] 在一些实施方案中, 受体分子结合试剂的结合配偶体C包含本领域技术人员已知的部分作为亲和标签。在这样的实施方案中, 多聚化试剂包含相应的结合配偶体, 例如已知结合到亲和标签的抗体或抗体片段。作为已知亲和标签的一些说明性实例, 包含在受体分子结合试剂中的结合配偶体C可以包含低聚组氨酸、麦芽糖-结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、几丁质结合蛋白 (CBP) 或硫氧还蛋白、钙调蛋白结合肽 (CBP)、FLAG'-肽、HA-标签 (序列: Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala, SEQ ID NO:15)、VSV-G-标签 (序列: Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys, SEQ ID NO:16)、HSV-标签或单纯疱疹病毒糖蛋白D的HSV表位 (序列: Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp, SEQ ID NO:17)、T7表位 (Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly, SEQ ID NO:21)、麦芽糖结合蛋白 (MBP)、序列Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu的转录因子c-myc的“myc”表位 (SEQ ID NO:14)、V5-标签 (序列: Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr, SEQ ID NO:18)、或谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)。在这样的实施方案中, 多聚化试剂 (在这种情况下为抗体或抗体片段) 的一个或多个结合位点与抗原之间形成的复合物可以通过加入游离抗原而被竞争性地破坏, 所述游离抗原即游离肽 (表位标签) 或游离蛋白质 (如MBP或CBP)。亲和标签也可以是寡核苷酸标签。这样的寡核苷酸标签可以例如用于与具有互补序列的寡核苷酸杂交, 所述寡核苷酸连接到或包含在多聚化试剂中。

[0160] 合适的结合对的其它实例包括将免疫球蛋白结构域如抗体Fc结构域用作受体分子结合试剂中的结合配偶体C, 和将蛋白质A、蛋白质G或蛋白质L用作多聚化试剂。蛋白质A、蛋白质G和蛋白质L都能够可逆地结合抗体Fc结构域。这种结合可被缓冲液条件的改变例如通过增加缓冲液的盐强度或通过降低pH (例如, 从约7.0的中性pH降至约3.0至约2.5的pH) 而破坏。

[0161] 在一些实施方案中, 包含在受体结合试剂中的结合配偶体C与多聚化试剂的一个或多个结合位点Z之间的结合在二价、三价或四价阳离子存在下产生。在这方面, 在一些实施方案中, 亲和/多聚化试剂包括二价、三价或四价阳离子, 通常通过合适的螯合剂保持, 例如复合。在这样的实施方案中, 包含在受体结合试剂中的结合配偶体可以包括包含 (例如复合) 二价、三价或四价阳离子的部分。相应的金属螯合剂的实例包括、但不限于乙二胺、乙二胺四乙酸 (EDTA)、乙二醇四乙酸 (EGTA)、二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)、N,N-二(羧甲基)甘氨酸 (也称为次氨基三乙酸, NTA)、1,2-二(邻氨基苯氧基)-乙烷-N,N,N',N'-三乙酸 (BAPTA)、2,

3-二巯基-1-丙醇(二巯基丙醇)、卟啉和血红素。作为一个实例,EDTA与大多数二价、三价和四价金属离子形成复合物,所述离子如钙(Ca^{2+})、锰(Mn^{2+})、铜(Cu^{2+})、铁(Fe^{2+})、钴(Co^{3+})和锆(Zr^{4+}),而BAPTA对于 Ca^{2+} 是特异性的。作为说明性实例,本领域使用的标准方法是在低聚组氨酸标签与铜(Cu^{2+})、镍(Ni^{2+})、钴(Co^{2+})或锌(Zn^{2+})离子之间形成复合物,其通过螯合剂次氨基三乙酸(NTA)的方式呈现。

[0162] 在一些实施方案中,包含在受体分子结合试剂中的结合配偶体C包含钙调蛋白结合肽,多聚化试剂包含如在美国专利5,985,658中所描述的多聚体钙调蛋白。在一些实施方案中,包含在受体分子结合试剂中的结合配偶体C包含FLAG肽,多聚化试剂包含与FLAG肽结合的抗体,如与美国专利4,851,341所描述的单克隆抗体4E11结合的FLAG肽。在一些实施方案中,与FLAG肽结合的抗体可以是商购可获得的单克隆抗体M1。在一个实施方案中,包含在受体分子结合试剂中的结合配偶体C包含低聚组氨酸标签,多聚化试剂包含结合过渡金属离子并由此还能结合低聚组氨酸标签的螯合基团K。所有这些结合复合物的破坏都可以通过金属离子螯合如钙螯合,例如通过加入EDTA或EGTA(上述)完成。钙调蛋白,抗体如4E11或螯合金属离子或游离螯合剂可以通过常规方法多聚化,如通过与链霉亲和素或抗生物素蛋白或其多聚体的生物素化和络合,或在第一步中通过引入羧基残基到如葡聚糖的多糖,基本上如Noguchi,A等人Bioconjugate Chemistry(1992)3,132-137中所述,且在第二步中,使用常规碳二亚胺化学经由伯胺基团连接钙调蛋白或抗体或螯合金属离子或游离螯合剂到多糖如葡聚糖骨架中的羧基。在这样的实施方案中,包含在受体结合试剂中的结合配偶体C与多聚化试剂的一个或多个结合位点Z之间的结合可以被金属离子螯合破坏。例如,金属螯合可以通过加入EGTA或EDTA完成。

[0163] 在一些实施方案中,可溶性多聚化试剂是链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的任何类似物的低聚体或聚合物。结合位点Z是抗生物素蛋白或链霉亲和素的天然的生物素结合。相应的低聚体或聚合物可以从对应的单体链霉亲和素或抗生物素蛋白或其类似物获得。例如,这种多聚化试剂可以以“Strep-Tactin® PE for Fab Streptamers”(产品编号6-5001-010或6-5011-010,偶联到荧光标记-该标记不干扰本发明的方法,因此无需移除)从IBA GmbH,哥廷根,德国商购获得。此外,用于形成低聚体或聚合物的各种技术是本领域已知的。相应的低聚体或聚合物可以例如通过多糖交联。在一个实施方案中,在第一步中,链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的类似物的低聚体或聚合物,通过将羧基残基引入到多糖如葡聚糖中来制备,基本上如Noguchi,A等人Bioconjugate Chemistry(1992)3,132-137中所述。然后在第二步中,使用常规碳二亚胺化学,链霉亲和素或抗生物素蛋白或其类似物可以经由内部赖氨酸残基的伯胺基团和/或游离N-端连接到葡聚糖骨架中的羧基。链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的任何类似物的交联低聚体或聚合物也可以通过经由用作连接子的双功能分子(如戊二醛)交联或通过本领域描述的其他方法获得。亚氨基硫醇/SMCC、NHS活化羧基葡聚糖或树枝状分子的应用是本领域建立的交联技术的进一步实例。

[0164] 作为说明性实例,在第一步中,链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的类似物的低聚体或聚合物,可以通过将羧基残基引入到多糖如葡聚糖中来制备,基本上如Noguchi,A等人(Bioconjugate Chemistry[1992]3,132-137)中所述。然后在第二步中,使用常规碳二亚胺化学,链霉亲和素或抗生物素蛋白或其类似物可以经由内部

赖氨酸残基的伯胺基团和/或游离N-末端连接到葡聚糖骨架中的羧基。在一个实施方案中,以每摩尔葡聚糖约60摩尔链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的摩尔比实施偶联反应。

[0165] 在一个实施方案中,用于本文所述的靶细胞分离的链霉亲和素突变蛋白是在美国专利6,103,493中和在DE 196 41 876.3中描述的那些链霉亲和素突变蛋白。基于野生型链霉亲和素的氨基酸序列,这些链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置44至53的区域内具有至少1个突变。在一些实施方案中,采用最小链霉亲和素突变蛋白。最小链霉亲和素突变蛋白N-末端开始于野生型链霉亲和素的氨基酸10至16区域,并C-末端结束于野生型链霉亲和素的氨基酸133至142区域。这种链霉亲和素突变蛋白的实例在位置44处具有疏水性脂肪族氨基酸而不是Glu,在位置45处具有任何氨基酸,在位置46处具有疏水性脂肪族氨基酸或/和在位置47处具有碱性氨基酸而不是Val。所述链霉亲和素突变蛋白可以是突变蛋白Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或链霉亲和素突变蛋白(类似物)Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷,两者都描述在例如美国专利6,103,493中,且都以商标**Strep-Tactin®**商购获得。

[0166] 野生型链霉亲和素(wt-链霉亲和素)是指Argarana等人,Nucleic Acids Res.14 (1986) 1871-1882公开的氨基酸序列。链霉亲和素突变蛋白是与野生型链霉亲和素的序列以一个或多个氨基酸置换、缺失或添加相区分的多肽,并且所述多肽保留野生型链霉亲和素的结合特性。链霉亲和素-样多肽和链霉亲和素突变蛋白是在免疫学上与野生型链霉亲和素基本上相同的多肽,并且尤其能够以与野生型链霉亲和素相同或不同的亲和力结合生物素、生物素衍生物或生物素类似物。链霉亲和素-样多肽或链霉亲和素突变蛋白可以含有不是野生型链霉亲和素的部分的氨基酸,或者它们可以仅包含野生型链霉亲和素的一部分。链霉亲和素-样多肽也是不同于野生型链霉亲和素的多肽,因为宿主没有将宿主产生的多肽转换为野生型链霉亲和素的结构所需的酶。术语“链霉亲和素”还包括链霉亲和素四聚体和链霉亲和素二聚体,尤其是链霉亲和素同源四聚体、链霉亲和素同源二聚体、链霉亲和素异源四聚体和链霉亲和素异源二聚体。每个亚基通常都具有用于生物素或生物素类似物的结合位点或用于链霉亲和素-结合肽的结合位点。链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的实例在例如WO 86/02077、DE 19641876A1、US 6,022,951、WO 98/40396或WO 96/24606中提到。

[0167] 如上所述,用于本发明的固相包括能够(特异性)结合包含在多聚化试剂中的配体结合配偶体LB的配体L。配体L与配体结合配偶体LB之间形成的键提供了靶细胞(作为多价结合复合物的一部分)在固相上的(可逆)固定。因此,LB与L之间形成的键本身无需一定是可逆的,也可以是不可逆的。在这种情况下,L与LB之间可形成共价键。可选地,L可以是生物素和LB可以是抗生物素蛋白或链霉亲和素的生物素结合位点。尽管基于非共价相互作用,这种结合具有约 1×10^{-15} M的解离常数(K_d),并且被认为是不可逆的。

[0168] 然而,L与LB之间的结合是可逆的也是可能的。在这种情况下,配体L与配体结合配偶体LB的键的解离常数 K_d 可以比结合配偶体C与结合位点Z的可逆键的解离常数 K_d 小。换言之,L和LB之间的结合比结合配偶体C与结合位点Z的结合更强。在此处上下文中,注意到可以选择本文涉及的两个结合对(第一结合对:受体分子结合试剂的结合配偶体C与多聚化试剂的结合位点Z;第二结合对:固相的配体L与包含在多聚化试剂中的配体结合配偶体LB),使得所述结合对既可以被相同也可以被不同的竞争试剂破坏(替换)。

[0169] 作为两个不同的竞争试剂的实例,受体分子结合试剂的结合配偶体C可以是链霉

亲和素结合肽,和多聚化试剂的结合位点Z可以是链霉亲和素突变蛋白的生物素结合位点。可以通过加入生物素或其类似物来破坏这种结合。固相的配体L可以是能够与六组氨酸标签结合的螯合基团,和包含在多聚化试剂中的配体结合配偶体LB可以是六组氨酸标签。可以通过加入如EDTA的螯合剂或如咪唑的竞争剂来破坏这种结合。

[0170] 然而,将相同的竞争试剂用于破坏结合配偶体C与结合位点Z之间形成的可逆键,和用于破坏配体结合配偶体LB与配体L之间形成的键是有利的。作为这种实施方案的实例,受体分子结合试剂的结合配偶体C可以是链霉亲和素结合肽,和多聚化试剂的结合位点Z可以是链霉亲和素突变蛋白的生物素结合位点。固相的配体L也可以是生物素,和包含在多聚化试剂的配体结合配偶体LB也是链霉亲和素突变蛋白的生物素结合位点。在这两种情况下,都可以通过加入生物素或其类似物来破坏所述结合。因此,在这样的实施方案中,多聚化试剂的结合位点Z和配体结合配偶体LB可以是相同的。在这样的实施方案中注意到,多聚化试剂,其在使受体分子结合试剂多聚化(通过形成多价复合物,该多价复合物中两个或更多个受体分子结合试剂结合至多聚化试剂)后仍具有游离的结合位点Z(其随后与配体结合配偶体LB相同)用于随后的配体L的结合。相应的条件可以由本领域技术人员凭经验确定,例如,通过改变多聚化试剂与受体分子结合试剂的摩尔比,和测定这些多价结合复合物随后与携带配体L的固相的结合速率。

[0171] 根据上文,相同结合对可以用作结合配偶体C和结合位点Z也可用作配体L和配体结合配偶体LB。在说明性实例中,配体L和配体结合配偶体LB形成的结合对选自:

[0172] -作为配体结合配偶体LB的链霉亲和素或链霉亲和素类似物,和结合链霉亲和素的配体L(分子),

[0173] -在二价阳离子存在下结合的结合对,

[0174] -作为配体L的低聚组氨酸肽,和作为配体结合配偶体LB的包含至少两个螯合基团K的结合部分A,其中每个螯合基团能够结合过渡金属离子,由此使结合部分A能够结合所述低聚组氨酸肽,

[0175] -抗原和针对所述抗原的抗体,其中所述配体L包含所述抗原,和所述配体结合配偶体LB包含针对所述抗原的所述抗体,

[0176] -作为配体结合配偶体LB的选自谷胱甘肽-S-转移酶、麦芽糖结合蛋白(MBP)、几丁质结合结构域和纤维素结合结构域的蛋白质,和分别作为配体L的谷胱甘肽、麦芽糖、几丁质或纤维素,

[0177] -作为配体结合配偶体LB的抗体Fc结构域,和作为配体L的如蛋白A、蛋白G或蛋白L的免疫球蛋白结合蛋白。

[0178] 本文公开的方法可以在任何温度下实施,在所述温度下至少基本上不损害靶细胞的生存力。当本文中提及至少基本上不是有害的、不是不利的或者至少基本上不影响生存力的条件时,是指在这种条件下可以回收的具有全部生存力的靶细胞的百分比是至少70%,包含至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%。在一些实施方案中,根据本发明的方法在约20℃或以下,例如约14℃或以下、约9℃或以下或者约6℃或以下的温度下实施。如果水性基质用来包含靶细胞的话,根据待分离的靶细胞,合适的温度范围可以是例如约2℃至约45℃,包含约2℃至约40℃、约3℃至约35℃,或约4℃至约30℃。在一些实施方案中,根据本发明的方法在恒温

值下实施,或者在选择温度值 \pm 约5℃、 \pm 约4℃、 \pm 约3℃、 \pm 约2℃、 \pm 约1℃或 \pm 约0.5℃下实施。温度可以例如选择为具有约5℃、约10℃、约15℃、约20℃或约25℃的值。在一些实施方案中,在根据本发明的方法过程中改变温度,即增加、减少或通过其组合改变。例如温度可以在以上定义的范围内改变,如在约2℃至约40℃范围内或约3℃至约35℃范围内。本领域技术人员能够凭借经验确定合适的温度,综合考虑细胞的性质和分离条件。例如,温度不敏感细胞如癌细胞可在室温或甚至升高的温度如37℃下进行分离。

[0179] 在本发明的方法中,特异性结合受体分子的受体分子结合试剂的一个或多个结合位点B可以例如是抗体、其片段和具有抗体样功能的蛋白质性结合分子。(重组)抗体片段的实例是Fab片段、Fv片段、单链Fv片段(scFv)、二价抗体片段如(Fab)₂'-片段、双体、三体(Iliades, P., 等, FEBS Lett (1997) 409, 437-441)、十体(Stone, E., 等, Journal of Immunological Methods (2007) 318, 88-94)和其他结构域抗体(Holt, L.J., 等, Trends Biotechnol. (2003), 21, 11, 484-490)。在一些实施方案中,受体分子结合试剂的一个或多个结合位点可以是二价蛋白质性人工结合分子如二聚体脂质运载蛋白突变蛋白,其也被称为“duocalin”。在一些实施方案中,受体结合试剂可以具有单一第二结合位点,即它可以是单价的。单价受体结合试剂的实例包括、但不限于单价抗体片段、具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子或MHC分子。单价抗体片段的实例包括、但不限于Fab片段、Fv片段、和单链Fv片段(scFv),包括二价单链Fv片段。

[0180] 如上所述,具有抗体样功能的蛋白质性结合分子的实例是基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白(参见例如,WO 03/029462, Beste等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96, 1898-1903)。脂质运载蛋白,例如胆汁三烯结合蛋白、人嗜中性粒细胞明胶酶-相关脂质运载蛋白、人载脂蛋白D或人泪脂质运载蛋白,拥有可以被修饰的天然配体-结合位点,使得它们结合给定的靶。具有抗体样结合性质的蛋白质性结合分子的其他实例可以用作特异性结合受体分子的受体结合试剂,所述实例包括、但不限于所谓的glubody(参见如国际专利申请WO 96/23879),基于锚蛋白支架(Mosavi, L.K., 等人, Protein Science (2004) 13, 6, 1435-1448)或晶体支架(如国际专利申请WO 01/04144)的蛋白,Skerra, J. Mol. Recognit. (2000) 13, 167-187中所描述的蛋白质,AdNectin、tetranectin和avimer。avimer包括通过人受体结构域家族的外显子改组进化的多价avimer蛋白质,其含有作为多个结构域串在若干细胞表面受体中出现的所谓的A-结构域(Silverman, J., 等, Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-1561)。源自人纤连蛋白的结构域的adnectin包含三个可以针对与靶的免疫球蛋白样结合进行工程化的环(Gill, D.S. & Damle, N.K., Current Opinion in Biotechnology (2006) 17, 653-658)。源于相应人同源三聚体蛋白质的tetranectin,同样在可以针对所需结合进行改造的C-型凝集素结构域中包含环区(出处同上)。

[0181] 合适的蛋白质性结合分子的其他实例是EGF-样结构域、Kringle-结构域、纤连蛋白I型结构域、纤连蛋白II型结构域、纤连蛋白III型结构域、PAN结构域、Gla结构域、SRCR结构域、Kunitz/Bovine胰腺胰蛋白酶抑制剂结构域、淀粉酶抑制剂(tendamistat)、Kazal-型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域、Trefoil (P-型) 结构域、血管性血友病因子C型结构域、过敏毒素样结构域、CUB结构域、甲状腺球蛋白I型重复、LDL-受体A类结构域、Sushi结构域、连接(Link)结构域、血小板反应蛋白I型结构域、免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白样结构域(例如,结构域抗体或骆驼重链抗体)、C-型凝集素结构域、MAM结构域、血管性血友病因子A型结

构域、生长调节素B结构域、WAP-型四二硫化物核心结构域、F5/8C型结构域、血液结合素结构域、SH2结构域、SH3结构域、层粘连蛋白-型EGF-样结构域、C2结构域、“Kappabody”(参见Ill.等,Protein Eng(1997) 10,949-57)、所谓的“小体(minibody)”(Martin等,EMBO J(1994) 13,5303-5309)、双体(参见Holliger等,PNAS USA(1993) 90,6444-6448)、所谓的“Janusis”(参见Traunecker等,EMBO J(1991) 10,3655-3659或Traunecker等,Int J Cancer(1992) 增刊7,51-52)、纳米抗体、微体、affilin、affibody、knottin、泛素、锌指蛋白、自体荧光蛋白或富含亮氨酸的重复蛋白。具有抗体样功能的核酸分子的实例是适体。适体折叠成限定的三维基序并且显示对于给定靶结构的高亲和性。

[0182] 本文公开的方法也可以使用部件试剂盒实施,例如,所述试剂盒设计为进行如上详述的方法。所述试剂盒可以包括如上定义的受体分子结合试剂。所述试剂盒例如可以包括填充如在溶液中的受体结合试剂的容器。所述试剂盒可进一步包括如上定义的多聚化试剂。例如,所述试剂盒可以包括填充如在溶液中的多聚化试剂的容器。所述试剂盒还可以包括如上定义的色谱基质,其可以(预)装填到柱子如滤筒中。在一些实施方案中,与这种色谱基质和/或容器相关的,提供以如何使用该试剂盒来实现根据本发明的方法的说明书形式的通知。

[0183] 本文所述方法还可包括多个固定相如若干彼此独立使用的色谱柱的应用。所述方法还包括多个彼此独立使用的受体分子结合试剂和多聚化试剂的应用。在一些实施方案中,使用第一组匹配的受体分子结合试剂、多聚化试剂和固定相,和第二组及任何其它组匹配的受体结合试剂、多聚化试剂和固定相。这样的组合可用于多次实施根据本发明的方法。在一个实施方案中,靶细胞在其表面上具有多个不同的受体分子。对于每个受体,可以独立实施根据本发明的方法。当在本发明方法的第二次运行中将靶细胞固定在固定相时,来自第一次运行的任何剩余试剂,即不同的受体结合试剂和多聚化试剂,通常不结合固定相,并由此将它们从靶细胞移除。然而,本文所述方法的任何重复还可以包括作为“移除滤筒”的固定相(除了提供合适的配体用于形成相应的多价结合复合物来固定靶细胞外)在移除前一次运行所剩余的任何试剂中的用途。因此,为靶细胞上第一受体分子设计的第一次运行可涉及采用第一受体分子结合试剂和第一多聚化试剂。为第二受体分子设计的第二次运行可涉及采用第二受体分子结合试剂和第二多聚化试剂。

[0184] 本发明进一步提供一种用于自样品中分离靶细胞的装置,所述装置包括

[0185] -包含配体L的固相,其中所述配体L能够特异性地结合配体结合配偶体LB,所述配体结合配偶体LB存在于用于分离靶细胞的受体分子结合试剂或多聚化试剂中,所述配体L由此允许所述靶细胞在所述固相上的可逆固定,

[0186] -以下中的至少一个

[0187] a) 第一固定相,其中所述第一固定相适用于细胞分离,所述第一固定相是凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中所述基质包含亲和试剂,所述亲和试剂具有特异性结合包含在所述受体分子结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,由此允许所述受体分子结合试剂在所述第一固定相上的固定和所述受体分子结合试剂从包含所述靶细胞的洗脱液中的移除,

[0188] 或

[0189] b) 第二固定相,其中所述第二固定相包含配体L,其中所述配体L能够特异性结合

存在于用于分离靶细胞的受体分子结合试剂或多聚化试剂中的配体结合配偶体LB,所述配体L由此允许所述受体分子结合试剂或所述多聚化试剂在所述第二固定相上的固定和所述受体分子结合试剂或所述多聚化试剂从包含所述靶细胞的洗脱液中的移除。

[0190] 在这种装置中,所述固相和所述第一或第二固定相中的至少一个可以是流体连接的。在一个实施方案中,装置的所述第一固定相和/或所述第二固定相包含在色谱柱中或是平面固定相。

[0191] 在另一个实施方案中,所述固相包含在用于分离靶细胞的间歇反应器中。所述间歇反应器可以是包含其上固定有配体L的固相的容器。可选地,所述间歇反应器包含其上固定有配体L的珠子。在不同的实施方案中,所述固相是适于色谱法的固定相。

[0192] 若间歇反应器包含珠子,则本发明的装置可进一步包括将所述珠子保持在所述间歇反应器中的保持装置。若所述珠子是磁珠,则所述保持装置可以是磁体。

[0193] 在所述装置的一个实施方案中,所述固相流体连接到所述第一固定相,且所述第一固定相流体连接到所述第二固定相。可选地,装置中固定相的顺序可以颠倒使得所述固相流体连接到所述第二固定相,且所述第二固定相流体连接到所述第一固定相。

[0194] 在所述装置的一个实施方案中,包含在固相和/或第二固定相中的配体L是生物素或生物素衍生物。这种生物素衍生物的实例包括、但不限于脱硫生物素、亚氨基生物素、2-(4'-羟基偶氮苯)苯甲酸(HABA)或链霉亲和素结合肽。

[0195] 在本发明装置的另一个实施方案中,包含在第一固定相中的亲和试剂可以是链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白。

[0196] 本发明还涉及一种用于从样品中分离靶细胞的设备,其中所述设备包括本文公开的用于分离靶细胞的装置。

[0197] 根据上述内容,本发明还涉及包含配体L的固相的用途,其中所述配体L能够特异性结合配体结合配偶体LB,用于可逆地固定或分离靶细胞。在示例性用途中,所述配体可以是生物素或如脱硫生物素、亚氨基生物素、2-(4'-羟基偶氮苯)苯甲酸(HABA)或链霉亲和素结合肽的生物素衍生物。本文特别考虑包含配体L的固相在如本文所定义的分选靶细胞或用于固定靶细胞的方法中的用途,其中配体L能够特异性结合配体结合配偶体LB。

[0198] 由于本领域普通技术人员能够很容易理解本发明的公开内容,根据本发明可以同样采用目前存在的或以后将被开发的物质、手段、用途、方法或步骤的其他组合,所述组合执行与本文描述的相应的示例性实施方案基本上相同的功能或获得基本上相同的结果。

[0199] 实验例

[0200] 实施例1:“细胞纯化柱”的构建

[0201] 从Bio-Spin®柱(BioRad;产品编号732-6008)的上端约45mm处切下该柱的下部出口(图8A)。将剩余的上端柱体夹入“离心和试管”(Becton-Dickinson;产品号352235;参见图8B)的过滤管盖子中。该盖子含有能够保持Superflow™树脂的35μm尼龙网。将具有柱的盖子放回12x75mm、5mL的聚苯乙烯圆底试管上(图8A)。所述柱子准备用Superflow树脂填充。

[0202] 实施例2:生物素-Superflow(0,38mg/mL生物胞素)的制备

[0203] 根据本领域已知的标准程序将生物胞素(Sigma-Aldrich,产品编号B4261)偶联至Superflow®6(Sterogene,产品编号806)。简言之,在1MNaCO₃中洗涤并重悬浮Superflow树脂。采用Acetonitril(10ml/ml);Bromcyan(0.2g/ml)实施活化。用pH 9.5的1M NaCO₃和

1M HCl洗涤所述树脂。在0.1M硼酸;0.5M NaSO₄中使生物胞素偶联至Superflow树脂(0.38mg/mL)以得到生物素-Superflow。用pH 8.0的50mM Tris洗涤得到的生物素-Superflow。

[0204] 在本发明的分离方法中,所述**Superflow®**树脂作为固相,生物素作为配体L,以经由作为配体L的生物素和作为配体结合配偶体LB的链霉亲和素突变蛋白“**Strep-Tactin®**”之间的结合,允许靶细胞/多价结合复合物在固定相上的可逆固定。

[0205] 实施例3:使用Ficoll梯度离心从血液中分离淋巴细胞

[0206] 在该实施例中,根据制造商的方案采用Amersham-Biosciences **Ficoll-Paque®** Plus (6x500ml#17-1440-03)。简言之,使用注射器无菌地取出所需体积的Ficoll (3ml用于4ml稀释的抗凝血液样品)。将Ficoll-Paque Plus (3ml)加入离心管中。小心地将稀释的血液样品(4ml)铺在**Ficoll-Paque®** Plus上。在室温(20℃)下,以400xg离心20分钟。使用干净的巴斯德吸管取出上层,使淋巴细胞层在界面处未被扰动。采用干净的巴斯德吸管将淋巴细胞层转移到干净的离心管中。向试管中的淋巴细胞中加入3倍体积或以上的平衡盐溶液。通过轻轻地将淋巴细胞吸入和取出巴斯德吸管来使它们悬浮。在10-100×g和18-20℃下离心10分钟,随后移除上清液。

[0207] 实施例4:包含可溶性多聚Strep-Tactin、携带链霉亲和素结合标签的抗CD4Fab片段、和T细胞的多价结合复合物的制备

[0208] 根据本领域所用的标准方案制备人血沉棕黄层(buffy coat)细胞。将100μl多聚化的可溶性Strep-Tactin(浓度1.7mg/ml,可作为“**Strep-tactin®** PE forFab streptamer”获得,产品编号6-5001-010,IBA GmbH哥廷根,德国-此处注意到链霉亲和素突变蛋白的藻红蛋白(PE)荧光标记未在这些实验中使用,因为在本发明的方法中其不产生干扰而保持在试剂中)与900μl缓冲液IS(在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的0.5%BSA(w/v),其中PBS=8.06mM Na₂HPO₄ 1.47mM KH₂PO₄、137mM NaCl)混合,以获得170μg/ml的1:10稀释液。6μg稀释的多聚化Strep-Tactin(35.3μl)与4μg在其重链携带链霉亲和素结合肽(SAWSHPQFEK(GGGG)₂GGSAWSHPQFEK,SEQ ID NO:13,也称为**Twin-Strep-tag®**)的CD4结合Fab-片段(250μg/ml的16μl,例如可作为CD4Fab Streptamer分离试剂盒产品编号6-8000-206的一部分获得,IBA GmbH,哥廷根,德国)和74μl缓冲液IS混合至终体积为125μl,并在4℃下,在15ml管中温育45分钟。在该温育过程中,所述Fab片段将通过其链霉亲和素结合肽与多聚化Strep-tactin(用作多聚化试剂)结合。

[0209] 以100μl的体积加入1×10⁷个细胞的量并在冰上与抗CD4Fab-片段/Strep-Tactin温育20分钟。将细胞重悬浮(用于洗涤)在10ml缓冲液IS中,以400×g离心,移除上清液并将细胞重悬浮在3ml缓冲液IS中。通过这样操作,形成了靶T细胞结合的多价结合复合物。

[0210] 实施例5:CD4+T细胞的色谱分离

[0211] 根据实施例1的描述组装“细胞纯化柱”。用1ml床体积的生物素-Superflow(0.38mg/ml生物胞素)(参见实施例2)填充柱子。按照实施例3的描述从血沉棕黄层(buffy coat)分离外周血单核细胞(PBMC)。

[0212] 将100μl多聚化Strep-Tactin(1.7mg/ml)与900μl的缓冲液IS混合来得到170μg/

ml的1:10稀释液。将6 μ g稀释的多聚化Strep-Tactin (35.3 μ l) 与用于实施例4的4 μ g抗CD4Fab片段 (250 μ g/ml的16 μ l) 和74 μ l的缓冲液IS混合至终体积为125 μ l,并在4 $^{\circ}$ C下,在15ml管中温育45分钟。根据实施例4,以100 μ l的体积加入 1×10^7 个细胞并与抗CD4Fab片段/Strep-Tactin在4 $^{\circ}$ C下温育20分钟。将细胞重悬浮在10ml缓冲液IS中,以400 \times g离心,移除上清液并将细胞重悬浮在3ml缓冲液IS中。用1ml冷冻的缓冲液IS平衡该柱两次。

[0213] 将实施例4中获得的细胞悬浮液 (1×10^7 个细胞) 以每份1ml的3份施加到柱上,以便通过Strep-Tactin的游离结合位点与固相的生物素的结合将靶细胞固定在柱上。3ml的总体积在约15分钟内通过柱子。收集流出物。用1ml缓冲液IS洗涤柱子5次。总共5ml在约25分钟内通过柱子。收集并合并流出物以及洗涤体积 (级分D+W)。通过5次加入具有1mM生物素的1ml缓冲液IS来洗脱细胞,并收集 (级分E)。总共5ml在约20分钟内通过柱子。为了移除那些由于在柱树脂内的非特异性结合或某种类型的堆积而不能被洗脱的细胞,在下部出口处盖上柱子,将树脂用1ml缓冲液IS重悬浮,并用1ml移液器头通过上下吹吸来大力混合。然后取下盖子并收集流出物 (flow out)。将这一程序重复一次并与第一次级分合并以得到级分R。通过在缓冲液IS中离心 (400 \times g) 洗涤所有收集的细胞悬浮液,并用门控抗体染色。在50 μ l具有2 μ l门控抗体 (在这种情况下为CD3-PE和CD4-APC) 的缓冲液IS中进行染色。将细胞在4 $^{\circ}$ C下在黑暗中温育20分钟,并通过在200 μ l缓冲液IS中离心 (400 \times g) 来洗涤用于FACS分析。在Accuri C6流式细胞术中进行FACS分析。图6A至6F描绘了在FACS分析中测量的级分的Accuri C6图。

[0214] 结果

[0215] 图7提供了结果的概述。

[0216] • 总细胞的FACS分析表明在门控淋巴细胞中39.56%CD4 $^{+}$ 细胞的浓度。

[0217] • 流出物和洗涤级分中的细胞被消耗至4.01%CD4 $^{+}$ 细胞的浓度。

[0218] • 通过生物素洗脱表明CD4 $^{+}$ 细胞的纯度为95.04%。

[0219] • 在移液管处理柱树脂后,物理洗脱的细胞仍显示出88.26%的纯度。

[0220] 实施例6:采用包含GST-标记的Strep-Tactin和Fab-片段的多价结合复合物分离T细胞

[0221] 根据公认的程序制备人血沉棕黄层 (buffy coat) 细胞。根据标准程序来产生Strep-Tactin和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 的融合蛋白。采用GST Spin Trap柱 (GE Healthcare Biosciences,Uppsala,Sweden),根据制造商的说明对所述融合蛋白进行亲和纯化。采用“控制蛋白交联试剂盒” (Thermo Fisher Scientific Inc,Waltham,MA,U.S.A.,产品23456),根据制造商的说明使所述GST-标记的Strep-Tactin多聚化。125 μ l多聚化GST-标记的Strep-Tactin (2.0mg/ml) 与875 μ l pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水混合以得到250 μ g/ml的1:8的稀释液。将6 μ g稀释的多聚化GST-Strep-Tactin (35.3 μ l) 与4 μ g携带链霉亲和素结合肽的Fab片段温育,并随后加入到实施例4中描述的细胞中,其中采用pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水重悬浮所述细胞。

[0222] 根据实施例1组装“细胞纯化柱”。用1ml床体积的谷胱甘肽琼脂糖凝胶 (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow,GE Healthcare Biosciences,Uppsala,瑞典) 填充柱子。用1ml pH 7.3的冷磷酸盐缓冲盐水平衡该柱两次。将细胞悬浮液以小部分施加至该柱上。收集流出物并用1ml pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水洗涤该柱5次。收集洗涤级分。通过

加入1ml具有10mM谷胱甘肽和1mM生物素的pH 8.0的50mM Tris/HCl将细胞洗脱。收集洗脱液。进一步用1ml含有10mM谷胱甘肽的pH 8.0的50mM Tris/HCl洗涤该柱5次。未洗脱的细胞可以按照实施例5所述移除。

[0223] 实施例7:采用包含生物素-NTA、Fab-His的多价结合复合物分离T细胞

[0224] 根据公认的程序制备人血沉棕黄层 (buffy coat) 细胞。根据标准程序来产生6×His标记的CD4结合Fab片段。采用Ni-NTA spin柱 (Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.), 根据制造商的说明对融合蛋白进行亲和纯化。按照Schmidt等 (上文, 2011) 所述合成生物素与多个次氨基三乙酸 (NTA) 部分的缀合物。将所述生物素/NTA缀合物以约0.1μg/ml的浓度溶解在含有1mg/ml NiCl₂的pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水中, 并在保留链霉亲和素的游离生物素位点 (可作为配体结合配偶体LB) 的情况下, 将所述生物素/NTA缀合物与链霉亲和素接触以形成多聚化NTA部分。将88μl多聚化生物素/Ni-NTA链霉亲和素缀合物与4μg 6×His标记的CD4-Fab (16μl, 250μg/ml) 和21μl缓冲液IS混合至终体积为125μl, 并在4℃下, 在15ml管中温育1小时。如实施例4所述, 以100μl的体积加入1×10⁷个细胞并在冰上与多聚化的CD4-Fab/生物素/Ni-NTA温育20分钟, 采用pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水来重悬浮所述细胞。

[0225] 根据实施例1组装“细胞纯化柱”。用1ml床体积的实施例2中制备的生物素-Superflow (0.38mg/ml生物胞素) 填充柱子。用1ml pH 7.3的冷磷酸盐缓冲盐水平衡该柱两次。将细胞悬浮液以小部分施加至该柱上。收集流出物并用1ml pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水洗涤该柱5次。收集洗涤级分。通过5次加入1ml含有1mM EDTA的pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水将细胞洗脱。虽然EDTA的加入使携带六组氨酸标签 (受体分子结合试剂) 的CD4Fab片段从多聚化试剂中释放, 由此也使细胞从固相中释放, 但多聚化试剂将 (经由链霉亲和素与作为固相的配体L的生物素的结合) 保留固定在固相上。收集洗脱液。进一步用1ml pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水洗涤该柱5次。未洗脱的细胞可以按照实施例5所述移除。

[0226] 实施例8:采用包含FLAG-Strep-Tactin、Fab-Strep的多价结合复合物分离T细胞

[0227] 根据公认的程序制备人血沉棕黄层 (buffy coat) 细胞。按照实施例4和5使用携带链霉亲和素结合肽的CD4结合Fab片段。根据标准程序来产生具有FLAG-标签 (DYKDDDDK) 的Strep-Tactin。采用 **ANTI-FLAG®M2** 磁珠 (Sigma-Aldrich), 根据制造商的说明对融合蛋白进行亲和纯化。采用“控制蛋白交联试剂盒” (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, U.S.A., 产品23456), 根据制造商的说明使所述FLAG-标记的Strep-Tactin多聚化。按照实施例4和6中所述将多聚化FLAG-标记的Strep-Tactin、Fab-Strep和细胞组合。

[0228] 根据实施例1组装“细胞纯化柱”。用1ml床体积的 **ANTI-FLAG®M1** 琼脂糖亲和凝胶 (Sigma-Aldrich) 填充柱子。用1ml pH 7.3的冷磷酸盐缓冲盐水平衡该柱两次。将细胞悬浮液以小部分施加至该柱上。收集流出物并用1ml pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水洗涤该柱5次。收集洗涤级分。通过5次加入1ml也含有1mM生物素的FLAG肽溶液 (Sigma, 产品号F3290) 将细胞洗脱。收集洗脱液。进一步用1ml FLAG肽/生物素溶液洗涤该柱2次。未洗脱的细胞可以按照实施例5所述移除。

[0229] 实施例9:采用包含多聚化钙调蛋白和携带钙调蛋白结合肽的Fab-片段的多价结合复合物分离T细胞

[0230] 根据标准程序来产生CD4结合Fab片段和钙调蛋白结合肽 (CBP) 的融合蛋白。采用钙调蛋白亲和树脂 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.), 根据制造商的说明

采用间歇结合方法对该Fab片段-CBP融合蛋白进行亲和纯化。多聚化试剂是低聚Strep-Tactin,向其中加入生物素化的钙调蛋白以得到化学计量的多聚化钙调蛋白,其保留了可以作为配体结合配偶体LB的生物素结合位点。将抗CD4Fab片段-CBP融合蛋白与低聚Strep-Tactin在4℃下,于缓冲液IS中温育1小时,所述低聚Strep-Tactin具有已经固定于其上的生物素化的钙调蛋白。

[0231] 根据实施例1组装“细胞纯化柱”。用1ml床体积的实施例2中制备的生物素-Superflow(0,38mg/ml生物胞素)填充柱子。用1ml pH 7.3的冷磷酸盐缓冲盐水平衡该柱两次。将细胞悬浮液以小部分施加至该柱上。收集流出物并用1ml pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水洗涤该柱5次。收集洗涤级分。通过5次加入1ml含有1mM EDTA的pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水将细胞洗脱。与实施例7类似,在本实施例中EDTA使携带钙调蛋白结合肽(受体分子结合试剂)的CD4Fab片段从多聚化试剂中释放,由此也使细胞从固相中释放,但多聚化试剂将(经由链霉菌亲和素与作为固相的配体L的生物素的结合)保留固定在固相上。收集洗脱液。进一步用1ml含有1mM EDTA的pH 7.3的磷酸盐缓冲盐水洗涤该柱5次。未洗脱的细胞可以按照实施例5所述移除。

[0232] 实施例10:采用未标记的细胞和Fab片段功能化的树脂(现有技术)相对于采用Fab片段预温育的细胞和本发明的生物素树脂,基于移液器头单步骤纯化源自PBMC的人CD8+细胞

[0233] 对于这一实验,采用源自全血单位的血沉棕黄层,使用标准Ficoll-Hypaque密度离心在室温下制备外周血单核细胞(参见实施例3)。

[0234] 实施例10.1:采用Fab功能化树脂,根据本领域方法分离未标记的细胞(对比例)

[0235] 基本如国际专利申请W0 2013/124474中所述,采用移液器头作为柱子,通过色谱纯化从PBMC制备物中分离CD8+细胞。

[0236] 简言之,用1.5μg抗-CD8 Fab-片段装载填充100μl **Strep-Tactin®**-琼脂糖(产品编号:6-0425-000,IBA GmbH,哥廷根)的移液器头,所述抗-CD8 Fab-片段在重链的C-末端携带顺序设置的两个Strep-tagII链霉菌亲和素结合分子(下划线),即SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK((SEQ ID NO:13),该序列也以其商标名“**Twin-Strep-tag®**”而已知), (随后命名为抗-CD8 Fab-TST和对应商购可获得的产品具有产品编号:6-8003,IBA GmbH,哥廷根)。为此,在细胞分离之前,将在300μl缓冲液IS中的1.5μg抗-CD8 Fab-TST以200μl/min的速度施加至含有**Strep-Tactin®**-琼脂糖的移液器头。对于靶细胞分离,将1×10⁷个重悬浮在1ml缓冲液IS中的新鲜制备的PBMC以300μl/min的速度通过样品的两个上下循环施加至存在于移液器头中的**Strep-Tactin®**-琼脂糖基质上。随后,通过用1ml缓冲液IS,以2ml/min的速度洗涤三次(上下吹打缓冲液)来将未结合的(CD8-阴性)细胞从移液器头中移除。最终,通过用1ml 100μM D-生物素溶液以600μl/min的流速漂洗,从亲和基质上卸除结合的细胞,随后通过用2 x ml缓冲液IS以2ml/min的流速冲洗,从移液器头中洗脱CD8+靶细胞,。独立地(在单独的容器中)合并洗脱的CD8-阳性级分和之前移除的CD8-阴性级分,并通过流式细胞术分析以确定产量和纯度。为此,将细胞重悬浮在100μl缓冲液IS中并在4℃下用抗-人CD8-PE(OKT8)(来自BioLegend,产品编号300908)和抗-人CD3-APC(OKT3)(来自BioLegend,产品编号317318)抗体于黑暗中染色20分钟。之后,在缓冲液IS中洗涤并重悬浮细胞。加入

碘化丙啶 (PI) 以区分死细胞和活细胞。用流式细胞分析仪 (Accuri C6, BD) 获得数据并用 C Flow Plus 分析软件 (BD) 分析。

[0237] 实施例10.2: 根据本发明的方法, 采用生物素化树脂分离用 Fab 片段预温育的细胞

[0238] 在 4℃ 下, 黑暗中, 用 1.5 μg 抗-CD8 Fab-TST (其作为含有针对多聚化试剂的结合配偶体 C 的受体分子结合试剂) 温育 1 μg 多聚化可溶性 Strep-Tactin (产品编号: 6-0911-000, IBA GmbH, 哥廷根, 其用作多聚化试剂) 45 分钟。将新鲜制备的 PBMC (30 μl 缓冲液 IS 中 1×10^7 个细胞) 转移至 Fab 片段/多聚化 Strep-Tactin 制备物中。在 4℃ 下, 黑暗中, 将含有 PBMC 和加载 Fab 片段的多聚化 Strep-Tactin 的反应混合物温育 20 分钟, 并用 1 ml 缓冲液 IS 洗涤一次。

[0239] 移液器头中填充 100 μl 作为包含配体 L 的固相的生物素-琼脂糖 (产品编号: 6-0446-000, IBA GmbH, 哥廷根)。将用抗-CD8 Fab-TST/多聚化 Strep-Tactin 预温育的细胞以 300 μl/min 的速度通过采用样品的两个上下循环施加至存在于移液器头中的 **Strep-Tactin®**-琼脂糖基质上。随后, 通过用 1 ml 缓冲液 IS, 以 2 ml/min 的速度洗涤三次 (上下吹打缓冲液) 来将未结合的 (CD8-阴性) 细胞从移液器头中移除。最终, 通过用 1 ml 100 μM D-生物素溶液以 600 μl/min 的流速漂洗, 从亲和基质上卸除结合的细胞, 随后通过用 2 x ml 缓冲液 IS 以 2 ml/min 的流速冲洗, 从移液器头中洗脱 CD8+ 靶细胞。独立地 (在单独的容器中) 合并洗脱的 CD8-阳性级分和之前移除的 CD8-阴性级分, 并通过流式细胞术分析以确定产量和纯度。为此, 将细胞重悬浮在 100 μl 缓冲液 IS 中并在 4℃ 下用抗-人 CD8-PE (OKT8) (来自 BioLegend, 产品编号 300908) 和抗-人 CD3-APC (OKT3) (来自 BioLegend, 产品编号 317318) 抗体于黑暗中染色 20 分钟。之后, 在缓冲液 IS 中洗涤并重悬浮细胞。加入碘化丙啶 (PI) 以区分死细胞和活细胞。用流式细胞分析仪 (Accuri C6, BD) 获得数据并用 C Flow Plus 分析软件 (BD) 分析。

[0240] 实施例10.1和10.2的结果比较

[0241] 从使用国际专利申请 WO 2013/124474 中描述的方法 (图 9A) 和本发明的方法 (图 9B) 的代表性分离实验的 Accuri C6 图可以看出, 两种方法都能够分离 CD8+ 靶细胞。图 9C 中描述的两中方法的结果的比较 (图 9C 中, 数字 0015 表示国际专利申请 WO 2013/124474 的方法的结果, 而数字 0016 表示本发明的方法的结果; 以 % 表示的数字是指三个独立实验的平均值) 表明, 在将等量的抗-CD8 Fab-TST 用作受体分子结合试剂时, 使用本发明的方法以 89% 的产量和 70% 的纯度获得 CD8+ 细胞, 而国际专利申请 WO 2013/124474 的方法以 63% 的纯度提供产量为 72% 的 CD8+ 细胞。这表明本发明的方法提高了待分离的靶细胞的产量和纯度。

[0242] 实施例11: 使用降低量的 Fab-片段的, 采用未标记的细胞和 Fab 片段功能化的树脂相对于 Fab 片段预温育的细胞和生物素树脂, 基于移液器单步骤纯化源自 PBMC 的人 CD3+ 细胞

[0243] 同样在本实施例中, 将本发明的分离靶细胞的方法的性能与使用如国际专利申请 WO 2013/124474 中描述的移液器头的色谱纯化进行比较。

[0244] 在这一实验中, 通过实施例 10 中所述移液器头的使用, 采用未标记的细胞和如国际专利申请 WO 2013/124474 所述用 Fab 片段功能化的 Strep-tactin 树脂将 CD3+ 细胞从 PBMC 制备物中分离。作为比较, 采用根据本发明的方法用 Fab 片段预-温育的细胞和生物素树脂来分离 CD3+ 细胞。所采用的抗-CD3 Fab-片段 (产品编号: 6-8001, IBA GmbH, 哥廷根) 在其重

链C-末端携带**Twin-Strep-tag®** (SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK; (SEQ ID NO:13))。与实施例10相比,将Fab片段的量从1.5μg降低至0.75μg,而树脂体积、多聚化可溶性Strep-Tactin的量和细胞数量分别保持不变。采用抗-人CD3-APC (OKT3) (来自BioLegend,产品编号317318) 和抗-人CD4-PE (OKT4) (来自BioLegend,产品编号317410) 抗体,通过流式细胞术分析获得的CD3-阳性级分和CD3-阴性级分。

[0245] 从使用国际专利申请WO 2013/124474中描述的方法(图10A)和本发明的方法(图10B)的代表性分离实验的Accuri C6图可以看出,在这些条件下,两种方法都再次能够分离CD8+靶细胞。图10C中描述的两种方法的结果的比较(图10C中,数字0015表示国际专利申请WO 2013/124474的方法的结果,而数字0016表示本发明的方法的结果;以%表示的数字是指三个独立实验的平均值)表明,在将等量的0.75抗-CD8 Fab-TST用作受体分子结合试剂时,使用本发明的方法以72%的产量和90%的纯度获得CD8+细胞,而国际专利申请WO 2013/124474的方法以77%的纯度提供产量仅为9%的CD8+细胞。因此,当将受体分子结合试剂的量降低50% (与实施例10中所用的量相比) 时,采用本发明的方法的靶细胞产量和纯度均保持恒定,而国际专利申请WO 2013/124474的方法的产量显著下降。

[0246] 总结实施例5、10和11的结果,本发明的方法能够从PBMC制备物中分离CD4+、CD8+和CD3+细胞。实施例10和11的比较表明,与国际专利申请WO 2013/124474中描述的方法相比,受体分子结合试剂(如携带链霉亲和素结合肽作为结合配偶体C的Fab片段)的量可以降低而不引起产量和纯度的显著损失,由此节省成本和资源。这一比较还表明,本发明的方法比国际专利申请WO 2013/124474中描述的方法更稳健。

[0247] 实施例12:采用本发明的生物素化树脂、Strep-Tactin和Fab-片段分离B细胞

[0248] 在4℃下,黑暗中,用以产品编号6-8013-100从IBA GmbH商购获得的1.5μg抗-CD19 Fab片段温育1μg多聚化可溶性Strep-Tactin (产品编号:6-0911-000, IBA GmbH, 哥廷根, 用作多聚化试剂) 45分钟,所述Fab片段(“抗-CD19 Fab-TST”)在重链C-末端携带**Twin-Strep-tag®**,由此作为包含针对多聚化试剂的结合配偶体C的受体分子结合试剂。将新鲜制备的PBMC (30μl缓冲液IS中 1×10^7 个细胞)转移至Fab片段/多聚化Strep-Tactin制备物中。在4℃下,黑暗中,将含有PBMC和加载Fab片段的多聚化Strep-Tactin的反应混合物温育20分钟,并用1ml缓冲液IS洗涤一次。

[0249] 移液器头中填充100μl作为包含配体L的固相的生物素-琼脂糖(产品编号:6-0446-000, IBA GmbH, 哥廷根)。将用抗-CD19 Fab-TST/多聚化Strep-Tactin预温育的细胞以300μl/min的速度通过采用样品的两个上下循环施加至存在于移液器头中的**Strep-Tactin®**-琼脂糖基质上。随后,通过用1ml缓冲液IS,以2ml/min的速度洗涤三次(上下吹打缓冲液)来将未结合的(CD19-阴性)细胞从移液器头中移除。最终,通过用1ml 100μM D-生物素溶液以600μl/min的流速漂洗,从亲和基质上卸除结合的细胞,随后通过用2x1ml缓冲液IS以2ml/min的流速冲洗,从移液器头中洗脱CD19+靶细胞。独立地(在单独的容器中)合并洗脱的CD19-阳性级分和之前移除的CD19-阴性级分,并通过流式细胞术分析以确定产量和纯度。为此,将细胞重悬浮在100μl缓冲液IS中并在4℃下用抗-人CD19-APC抗体(来自eBioscience, clon: SJ25C1, 产品编号:17-0198-42)于黑暗中染色20分钟。之后,在缓冲液IS中洗涤并重悬浮细胞。加入碘化丙啶(PI)以区分死细胞和活细胞。用流式细胞分析仪

(Accuri C6, BD) 获得数据并用 C Flow Plus 分析软件 (BD) 分析。

[0250] 本说明书中之前发表的文件的列表或讨论不一定看做是承认该文件是现有技术的一部分或公知常识。

[0251] 在缺乏未在本文具体公开的任何一个或多个元素、一个或多个限制的情况下, 可以适当地实施本文示例性描述的本发明。因此, 例如, 术语“包括”、“包含”、“含有”等应该在广义上理解且没有限制。此外, 本文使用的术语和表述被用作描述性术语且没有限制, 在使用这些术语和表述时, 没有排除显示和描述的特征或其部分的等同物的意思, 而是应认识到各种修改均可在发明要求保护的范围内。因此, 应理解的是, 尽管本发明已经通过示例性实施方案和可选特征进行了具体公开, 但是本领域技术人员可以寻求对本文公开的其中体现的发明做出修改和变化, 这样的修改和变化被认为在本发明的范围内。。

[0252] 本文已经全面且一般地描述了本发明。落入一般公开内容内的每个较窄种类和亚属分组也形成本发明的部分。这包括本发明的一般描述, 其具有从属中移除任何主题的条件或否定限制, 无论离体材料是否在本文专门叙述。

[0253] 其他实施方案在以下权利要求范围内。此外, 在本发明的特征或方面以马库什组的方式描述时, 本领域技术人员将认识到本发明也由此以马库什组的任何个体成员或成员亚组的形式描述。

[0001] 序列表

[0002] <110> IBA股份有限公司

[0003] <120> 分离靶细胞的方法

[0004] <130> LC16310019P

[0005] <150> EP14166718.8

[0006] <151> 2014-04-30

[0007] <160> 21

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 8

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工

[0013] <220>

[0014] <223> 链霉亲和素-结合肽

[0015] <220>

[0016] <221> MISC_FEATURE

[0017] <222> (2) .. (2)

[0018] <223> Xaa是任何氨基酸

[0019] <220>

[0020] <221> MISC_FEATURE

[0021] <222> (7) .. (7)

[0022] <223> Xaa是Gly或Glu

[0023] <220>

[0024] <221> MISC_FEATURE

[0025] <222> (8) .. (8)

[0026] <223> Xaa是Gly、Lys或Arg

[0027] <400> 1

[0028] Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

[0029] 1 5

[0030] <210> 2

[0031] <211> 8

[0032] <212> PRT

[0033] <213> 人工

[0034] <220>

[0035] <223> 链霉亲和素-结合肽

[0036] <400> 2

[0037] Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

[0038] 1 5

[0039] <210> 3
[0040] <211> 8
[0041] <212> PRT
[0042] <213> 人工
[0043] <220>
[0044] <223> 链霉亲和素-结合肽
[0045] <400> 3
[0046] Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
[0047] 1 5
[0048] <210> 4
[0049] <211> 4
[0050] <212> PRT
[0051] <213> 人工
[0052] <220>
[0053] <223> 合成肽
[0054] <400> 4
[0055] His Pro Gln Phe
[0056] 1
[0057] <210> 5
[0058] <211> 8
[0059] <212> PRT
[0060] <213> 人工
[0061] <220>
[0062] <223> 链霉亲和素-结合肽
[0063] <220>
[0064] <221> MISC_FEATURE
[0065] <222> (1) .. (1)
[0066] <223> Xaa是Trp、Lys或Arg
[0067] <220>
[0068] <221> MISC_FEATURE
[0069] <222> (2) .. (2)
[0070] <223> Xaa是任何氨基酸
[0071] <220>
[0072] <221> MISC_FEATURE
[0073] <222> (7) .. (7)
[0074] <223> Xaa是Gly或Glu
[0075] <220>
[0076] <221> MISC_FEATURE
[0077] <222> (8) .. (8)

[0078] <223> Xaa是Gly、Lys或Arg
[0079] <400> 5
[0080] Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
[0081] 1 5
[0082] <210> 6
[0083] <211> 8
[0084] <212> PRT
[0085] <213> 人工
[0086] <220>
[0087] <223> 链霉亲和素-结合肽
[0088] <220>
[0089] <221> MISC_FEATURE
[0090] <222> (2) .. (2)
[0091] <223> Xaa是任何氨基酸
[0092] <220>
[0093] <221> MISC_FEATURE
[0094] <222> (7) .. (7)
[0095] <223> Xaa是Gly或Glu
[0096] <220>
[0097] <221> MISC_FEATURE
[0098] <222> (8) .. (8)
[0099] <223> Xaa是Gly、Lys或Arg
[0100] <400> 6
[0101] Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
[0102] 1 5
[0103] <210> 7
[0104] <211> 8
[0105] <212> PRT
[0106] <213> 人工
[0107] <220>
[0108] <223> 链霉亲和素-结合肽
[0109] <400> 7
[0110] Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
[0111] 1 5
[0112] <210> 8
[0113] <211> 28
[0114] <212> PRT
[0115] <213> 人工
[0116] <220>

[0117]	<223>	链霉亲和素结合肽
[0118]	<220>	
[0119]	<221>	MISC_FEATURE
[0120]	<222>	(9) .. (20)
[0121]	<223>	Xaa是任何氨基酸并且其中多达12个可以缺失
[0122]	<400>	8
[0123]		Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
[0124]		1 5 10 15
[0125]		Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
[0126]		20 25
[0127]	<210>	9
[0128]	<211>	8
[0129]	<212>	PRT
[0130]	<213>	人工
[0131]	<220>	
[0132]	<223>	链霉亲和素-结合肽
[0133]	<400>	9
[0134]		Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
[0135]		1 5
[0136]	<210>	10
[0137]	<211>	8
[0138]	<212>	PRT
[0139]	<213>	人工
[0140]	<220>	
[0141]	<223>	链霉亲和素-结合肽
[0142]	<400>	10
[0143]		Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
[0144]		1 5
[0145]	<210>	11
[0146]	<211>	28
[0147]	<212>	PRT
[0148]	<213>	人工
[0149]	<220>	
[0150]	<223>	链霉亲和素-结合肽
[0151]	<400>	11
[0152]		Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
[0153]		1 5 10 15
[0154]		Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
[0155]		20 25

[0195]	1	5	
[0196]	<210>	16	
[0197]	<211>	11	
[0198]	<212>	PRT	
[0199]	<213>	人工	
[0200]	<220>		
[0201]	<223>	VSV-G-标签	
[0202]	<400>	16	
[0203]	Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys		
[0204]	1	5	10
[0205]	<210>	17	
[0206]	<211>	11	
[0207]	<212>	PRT	
[0208]	<213>	人工	
[0209]	<220>		
[0210]	<223>	HSV-标签	
[0211]	<400>	17	
[0212]	Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp		
[0213]	1	5	10
[0214]	<210>	18	
[0215]	<211>	14	
[0216]	<212>	PRT	
[0217]	<213>	人工	
[0218]	<220>		
[0219]	<223>	V5-标签	
[0220]	<400>	18	
[0221]	Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr		
[0222]	1	5	10
[0223]	<210>	19	
[0224]	<211>	4	
[0225]	<212>	PRT	
[0226]	<213>	人工	
[0227]	<220>		
[0228]	<223>	链霉亲和素类似物序列位置44至47	
[0229]	<400>	19	
[0230]	Val Thr Ala Arg		
[0231]	1		
[0232]	<210>	20	
[0233]	<211>	4	

[0234]	<212>	PRT
[0235]	<213>	人工
[0236]	<220>	
[0237]	<223>	链霉亲和素类似物序列位置44至47
[0238]	<400>	20
[0239]	Ile Gly Ala Arg	
[0240]	1	
[0241]	<210>	21
[0242]	<211>	10
[0243]	<212>	PRT
[0244]	<213>	人工
[0245]	<220>	
[0246]	<223>	T7 表位
[0247]	<400>	21
[0248]	Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly	
[0249]	1	5 10

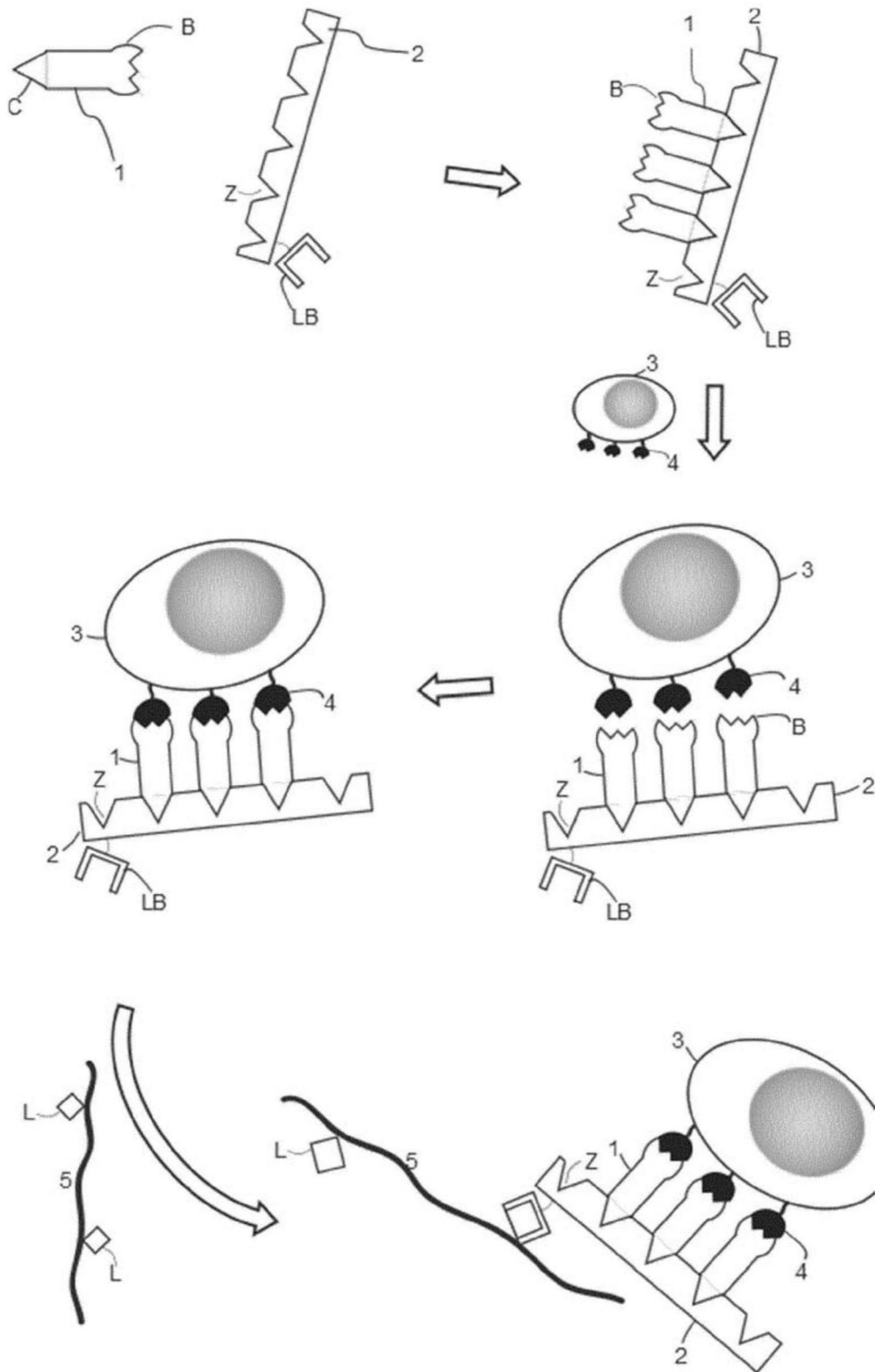


图1 (续下页)

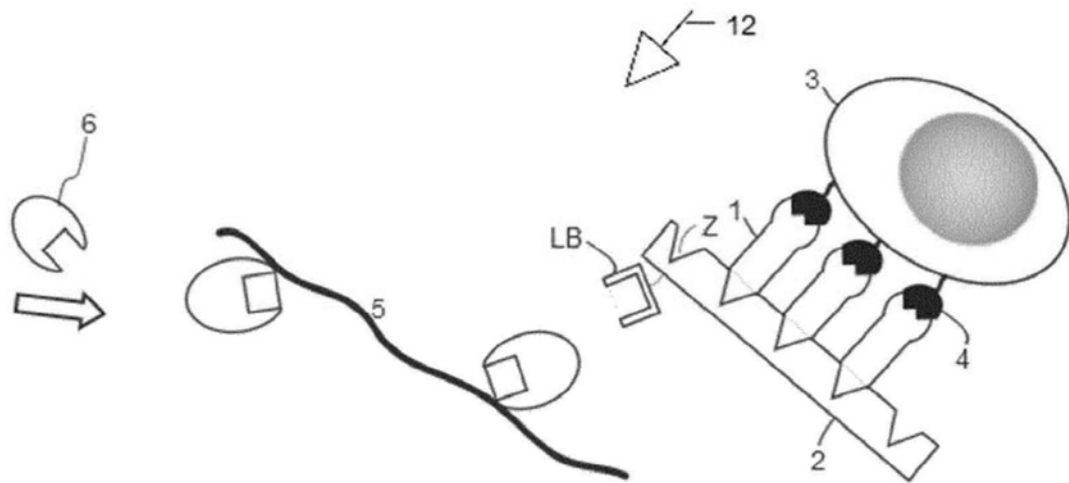


图1 (续前页)

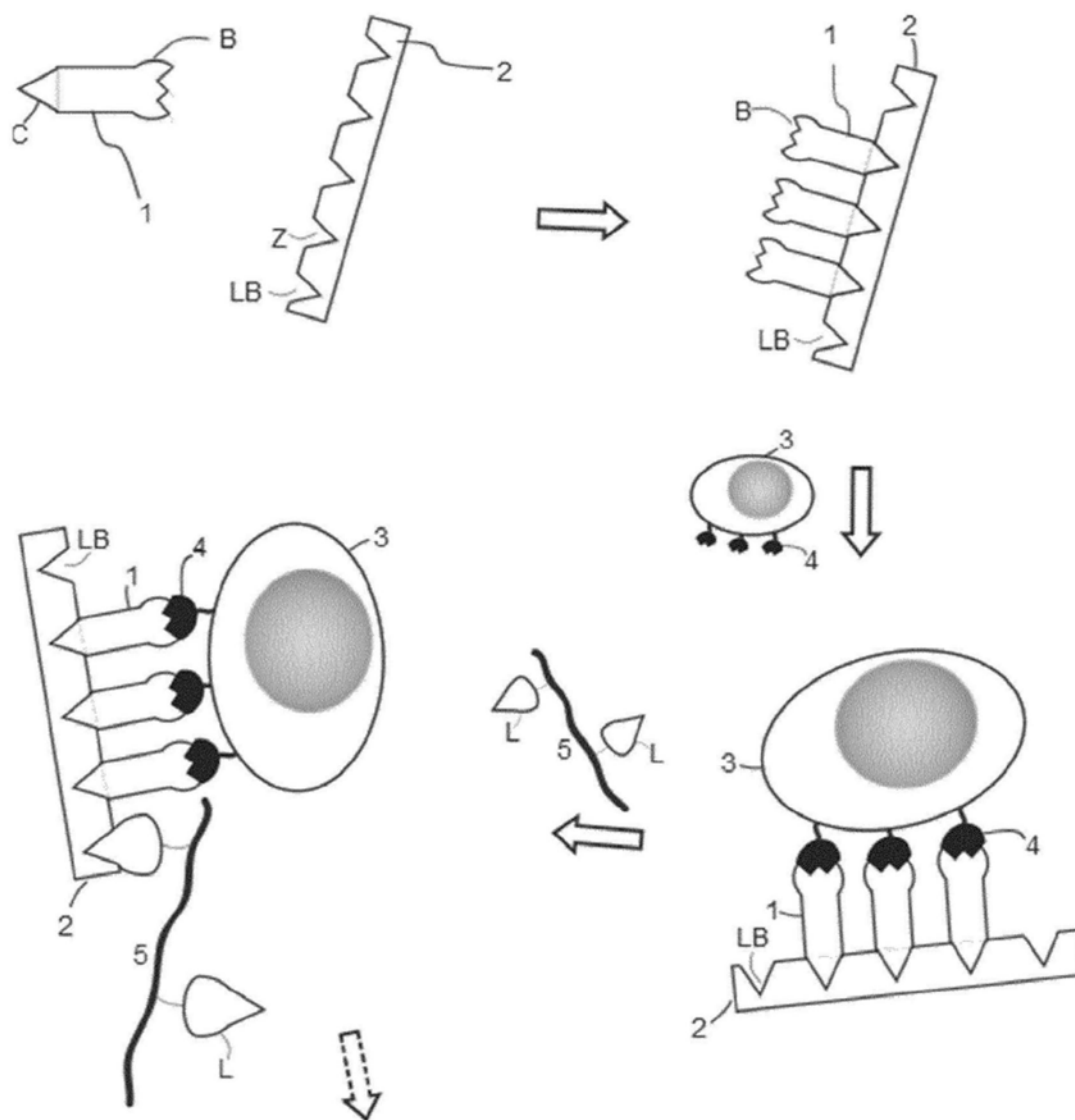


图2(续下页)

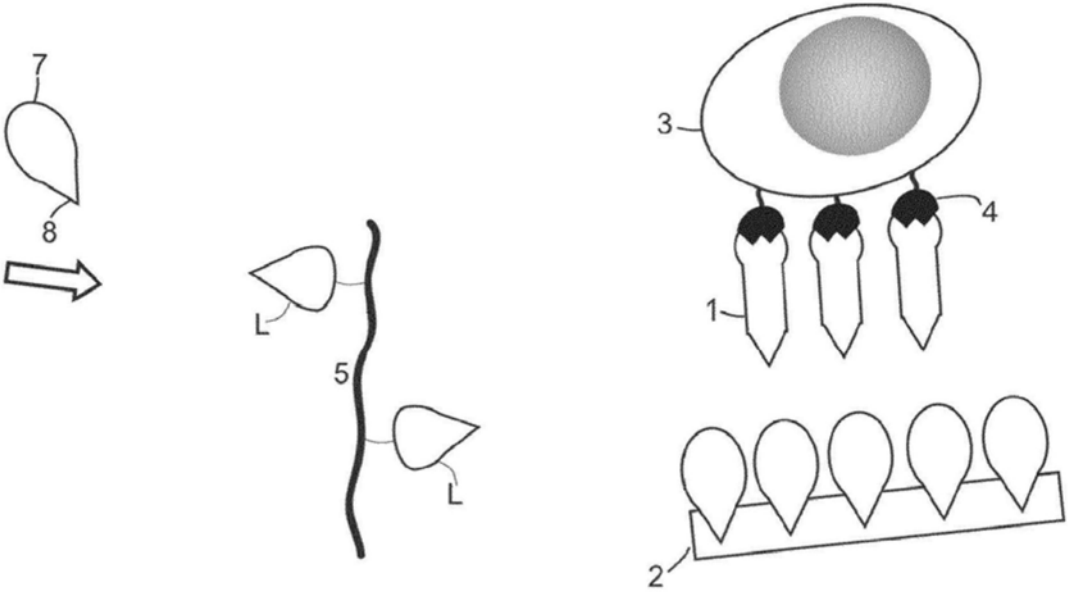


图2 (续前页)

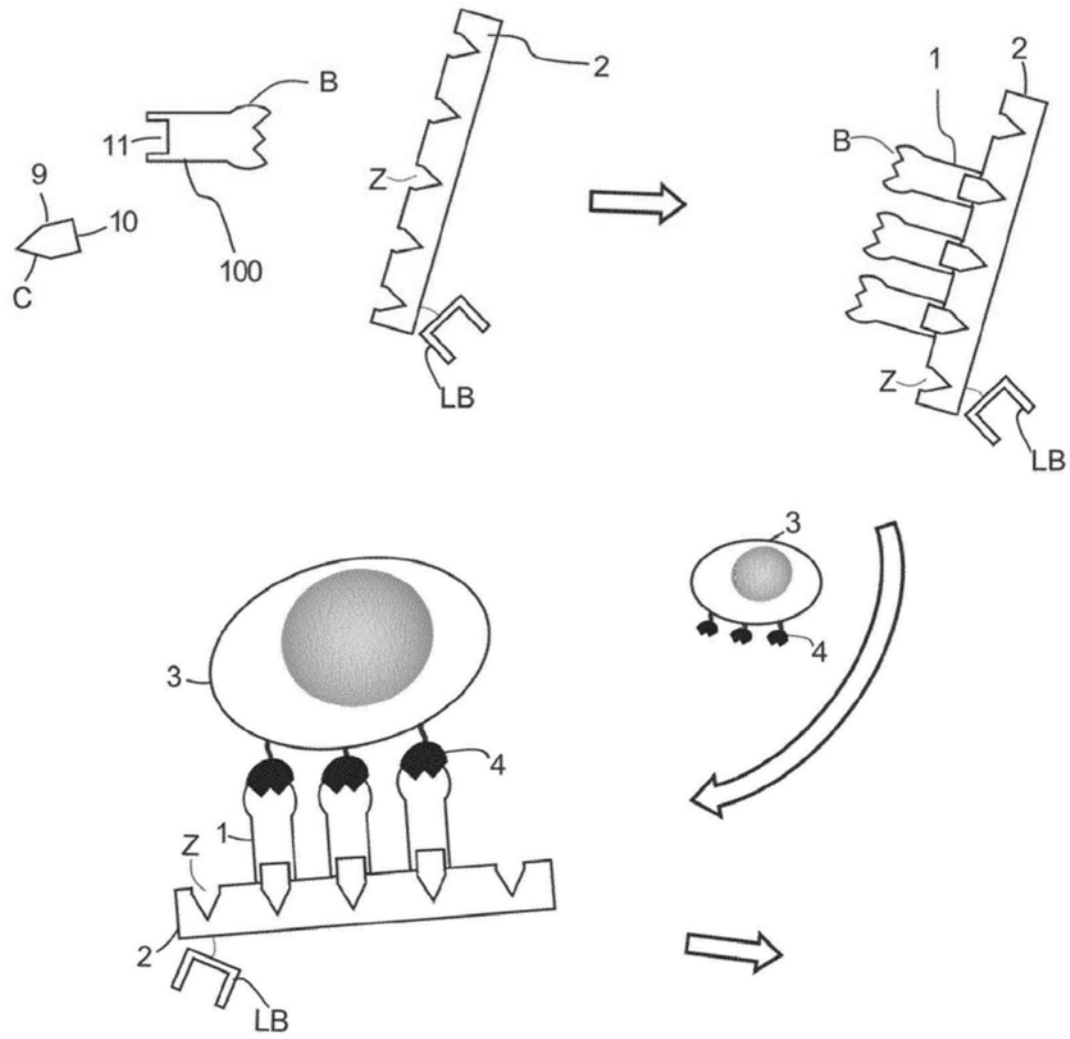


图3(续下页)

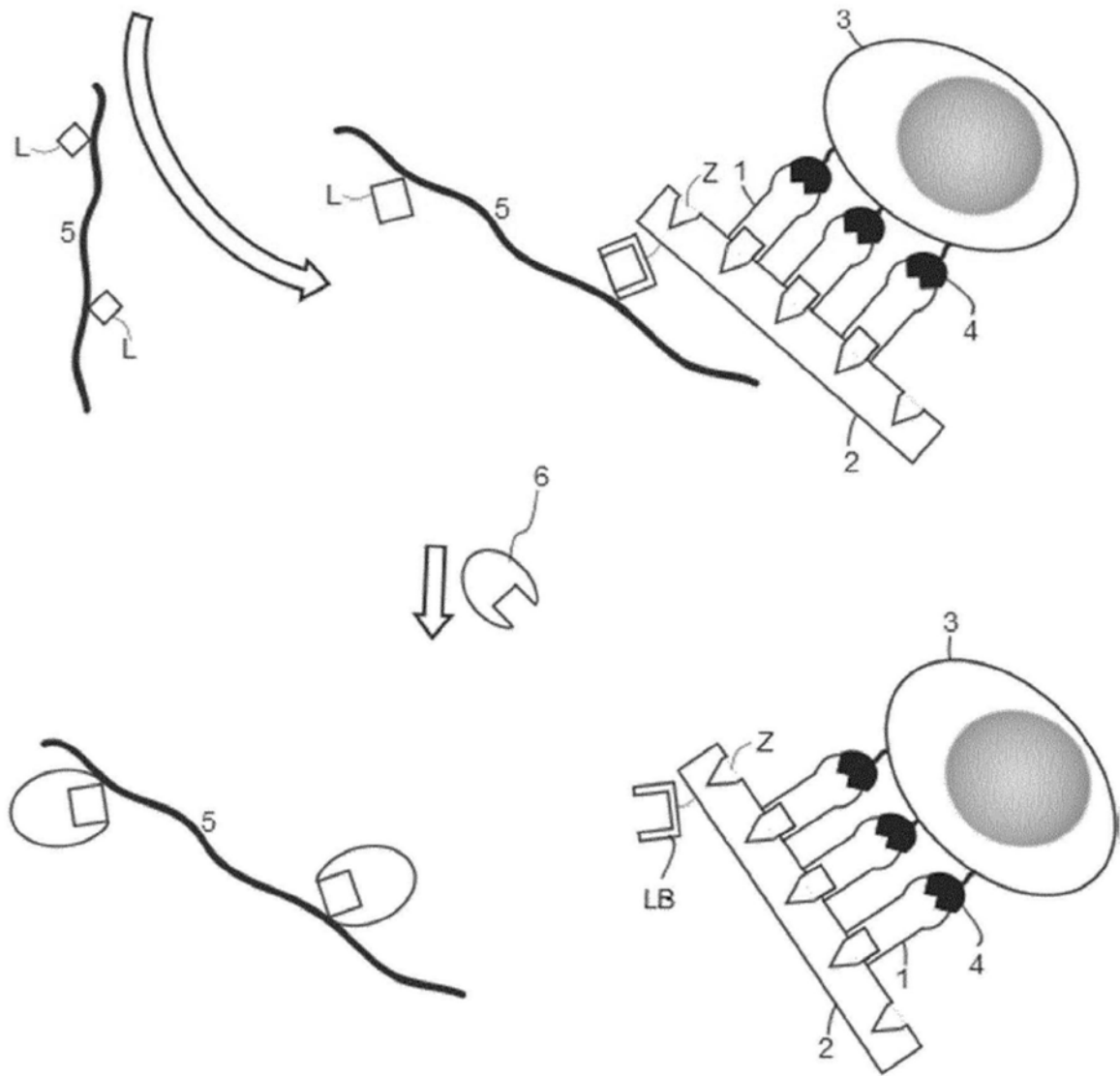


图3 (续前页)

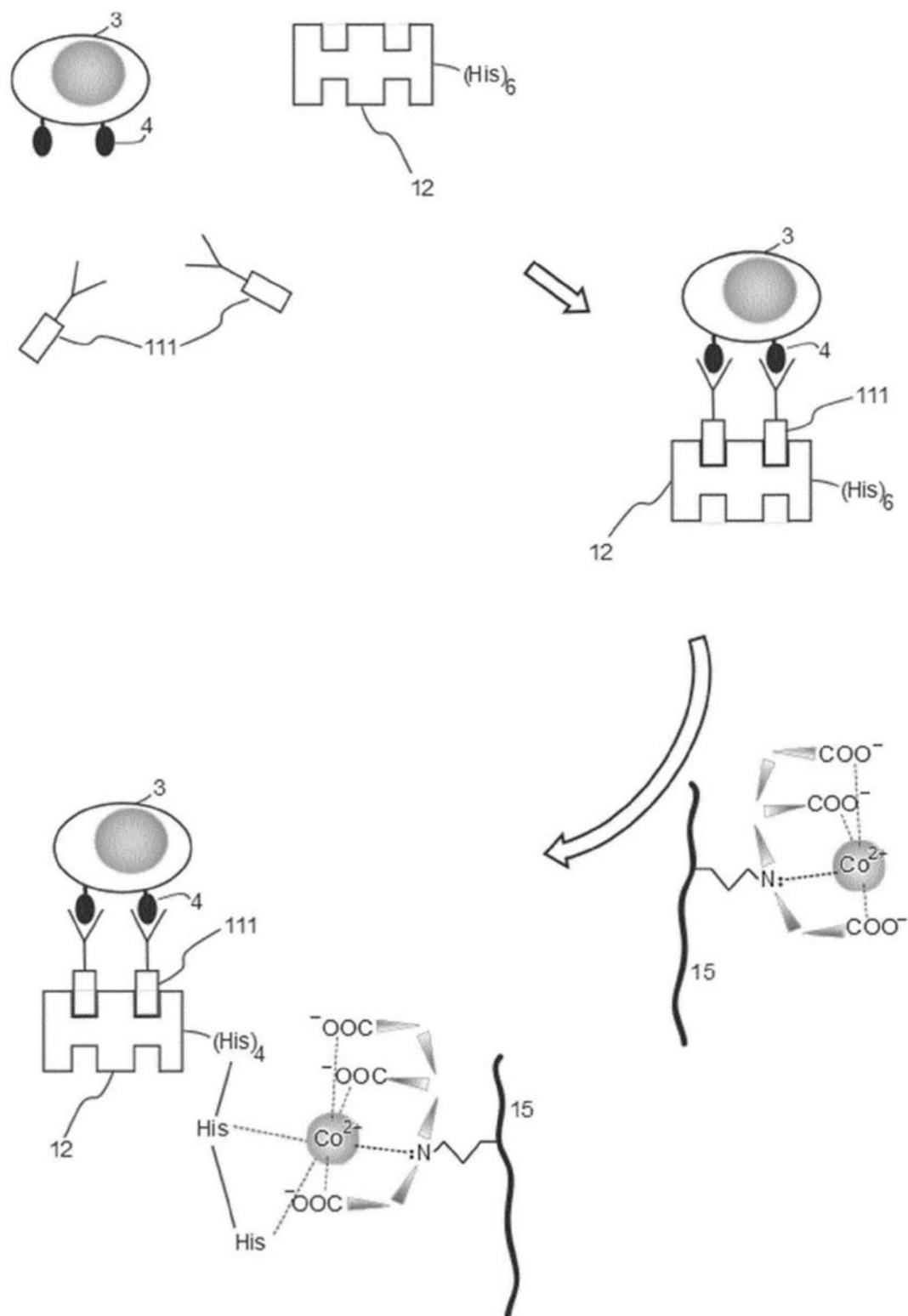


图4

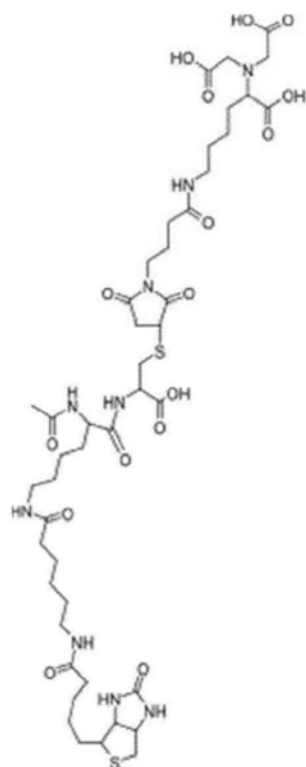


图5A

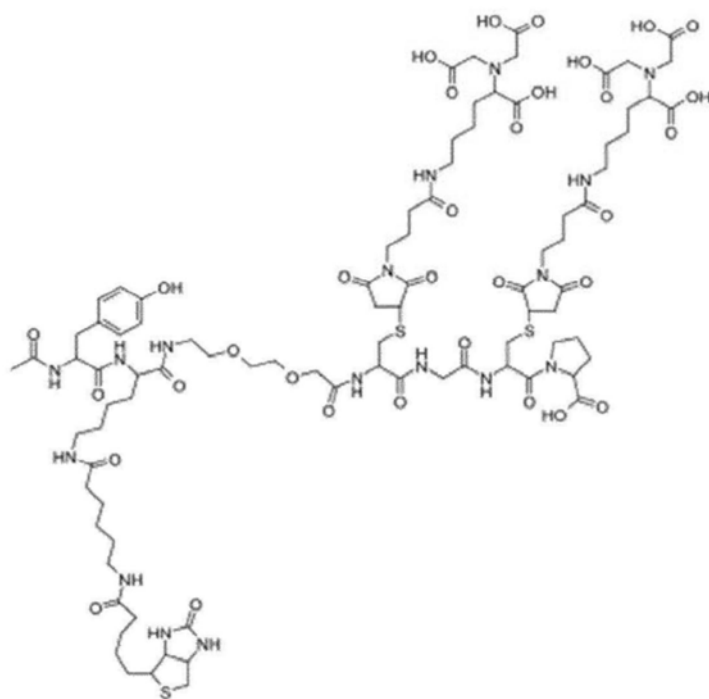


图5B

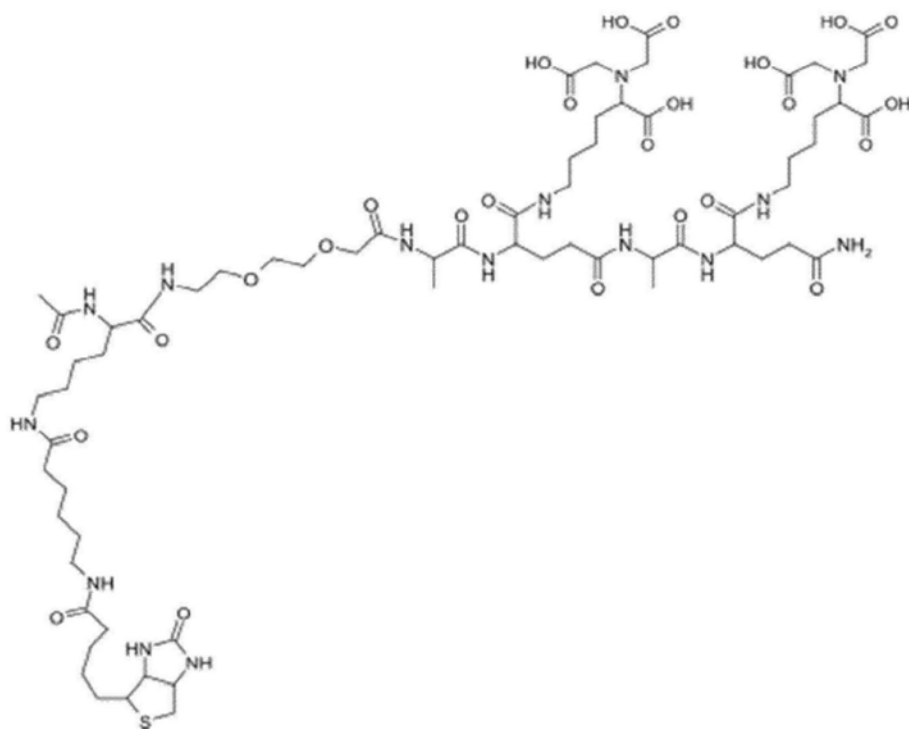


图5C

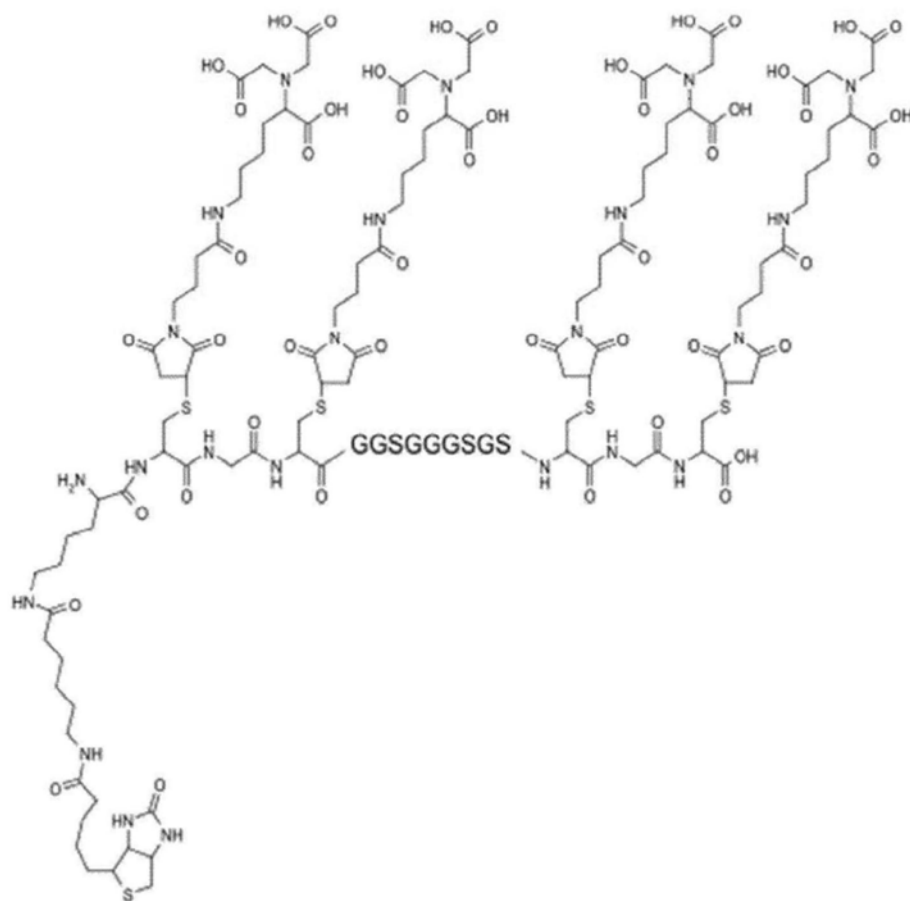


图5D

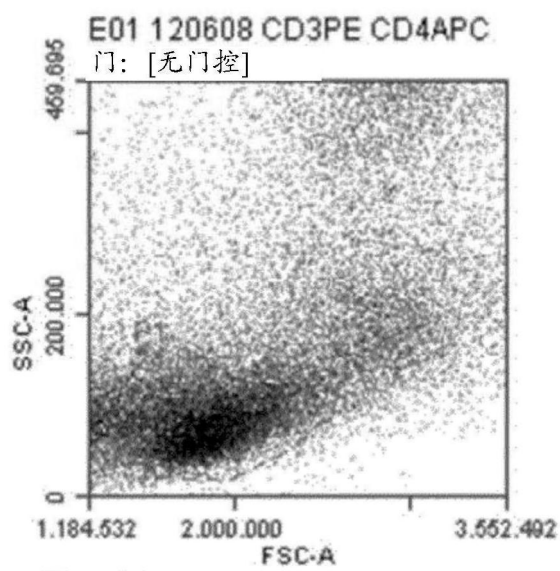


图6A

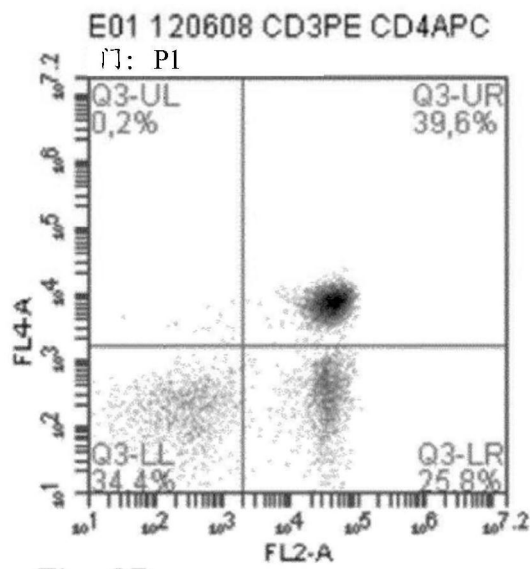


图6B

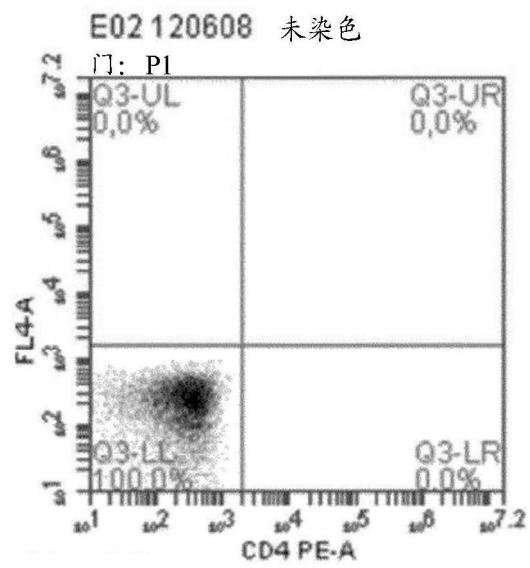


图6C

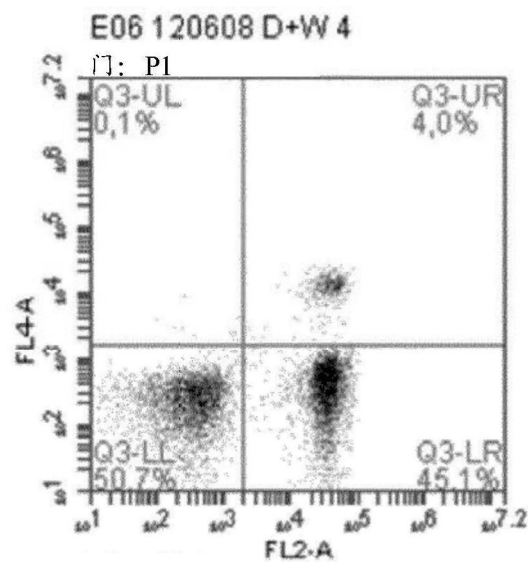


图6D

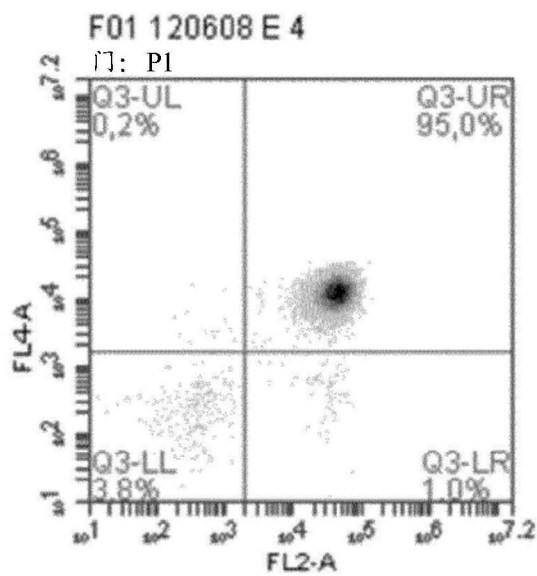


图6E

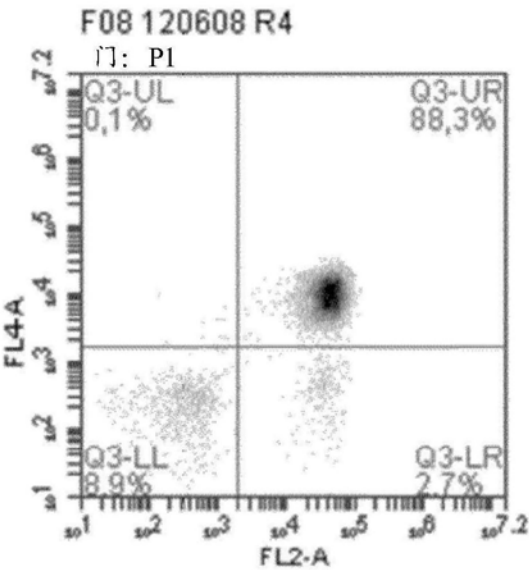


图6F

图 7	图 1 (FSC-A/SSC-A)			图 3 (FL2-A/FL4-A)	
	全部		P1	Q3UR	
	计数	体积 μl	计数	计数	此图 的%
E01 CD3PE CD4APC	41.674	2	10.000	3.956	39.56%
E02 未染色	39.053	2	10.000	0	0.00%
E06 D+W4	51.109	3	10.000	401	4.01%
F01 E 4	14.720	4	10.000	9.504	95.04%
F08 R4	15.622	19	10.000	8.826	88.26%

图7

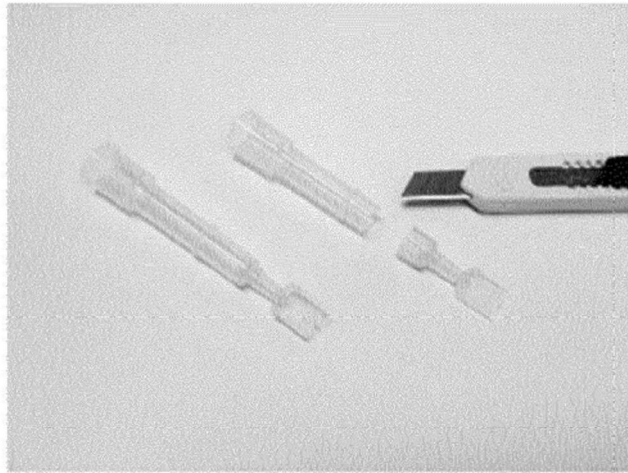


图8A

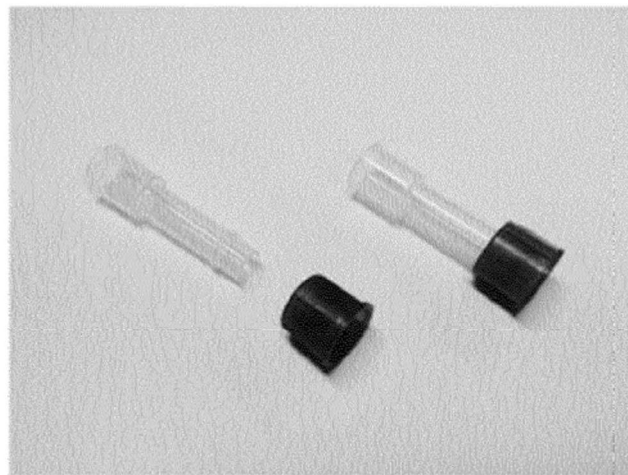


图8B

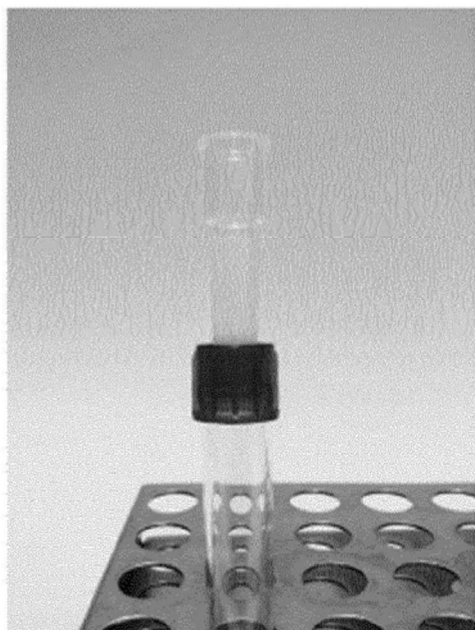


图8C

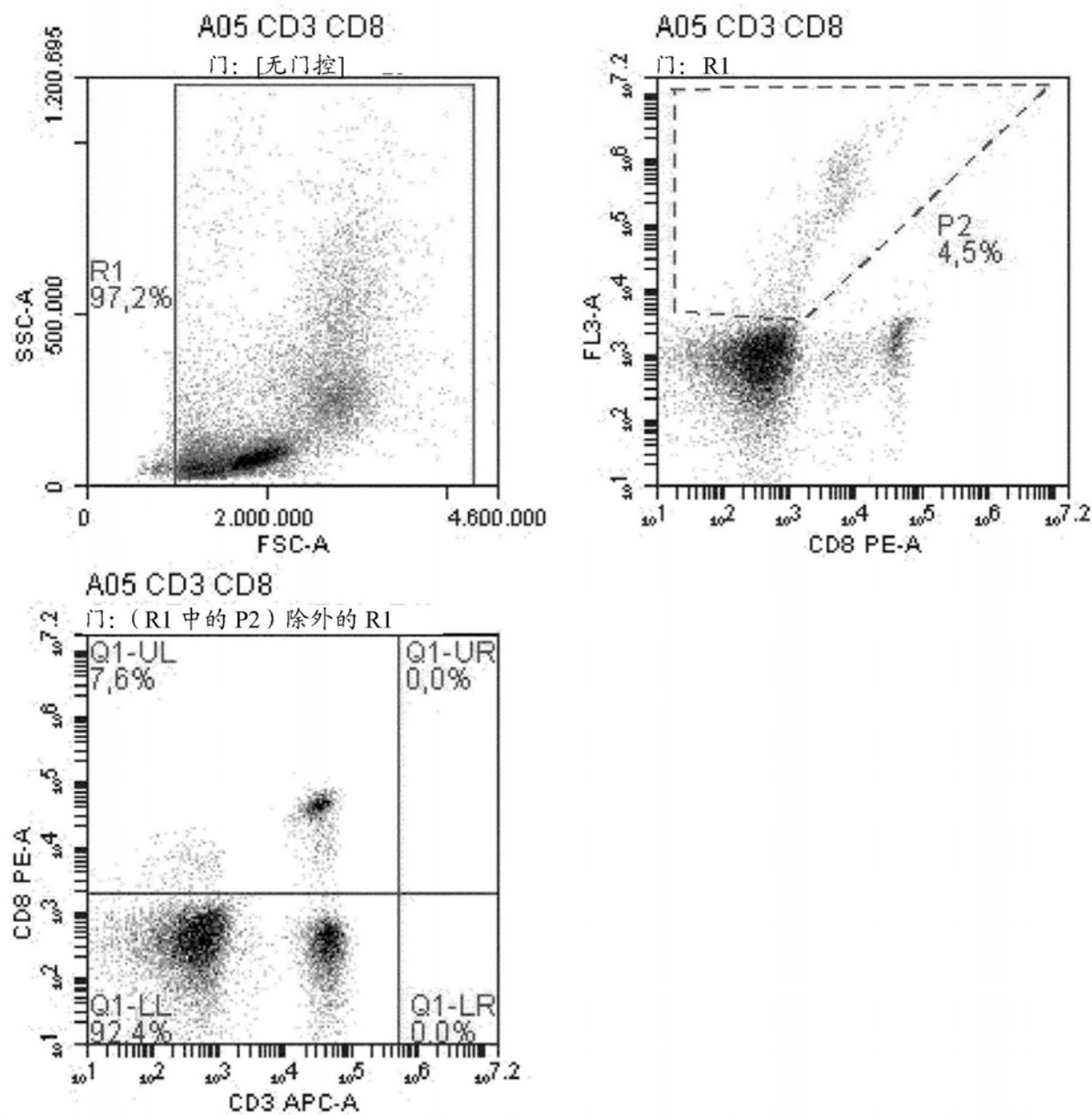


图9A选择前

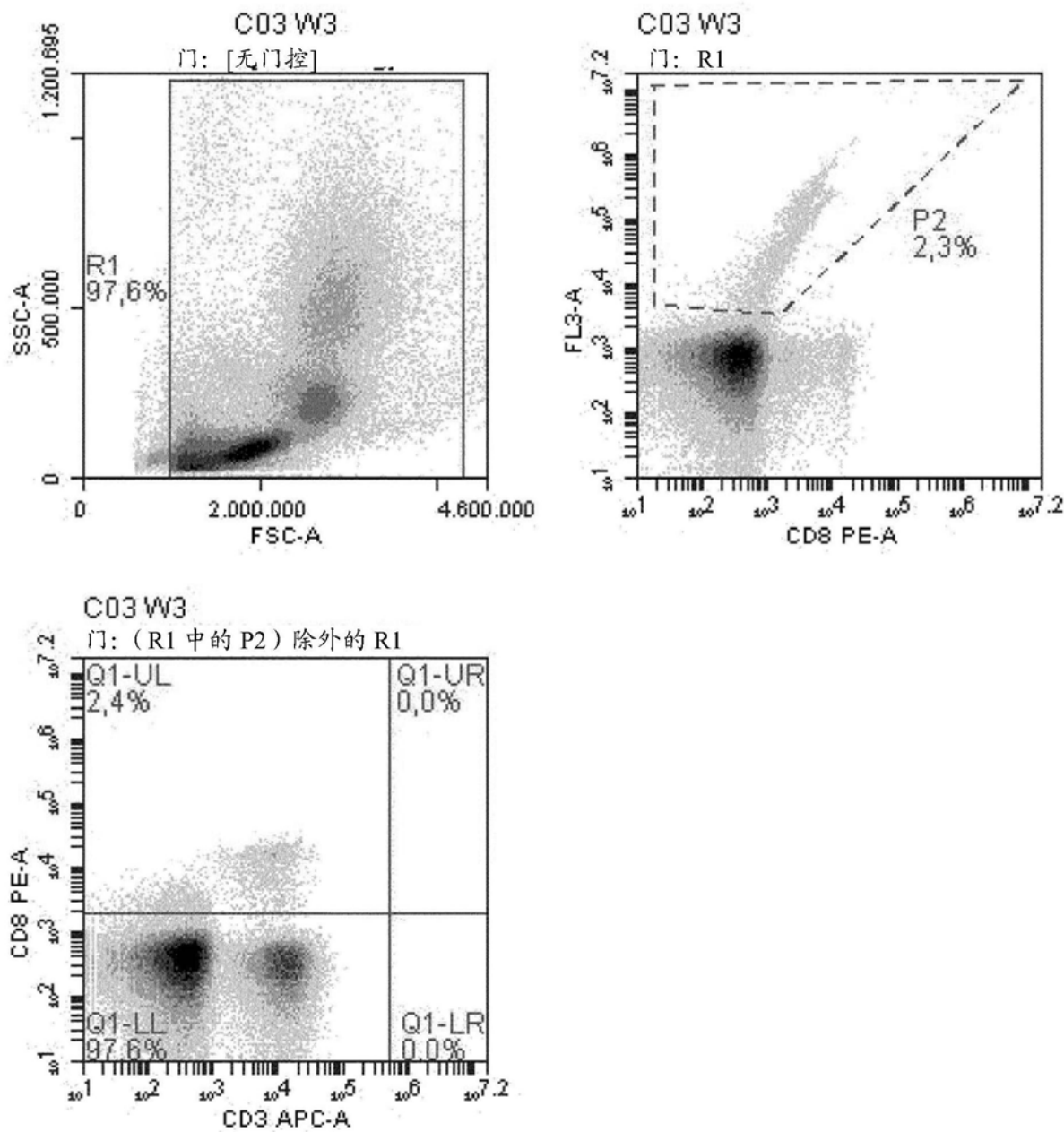


图9A (续) 洗脱级分

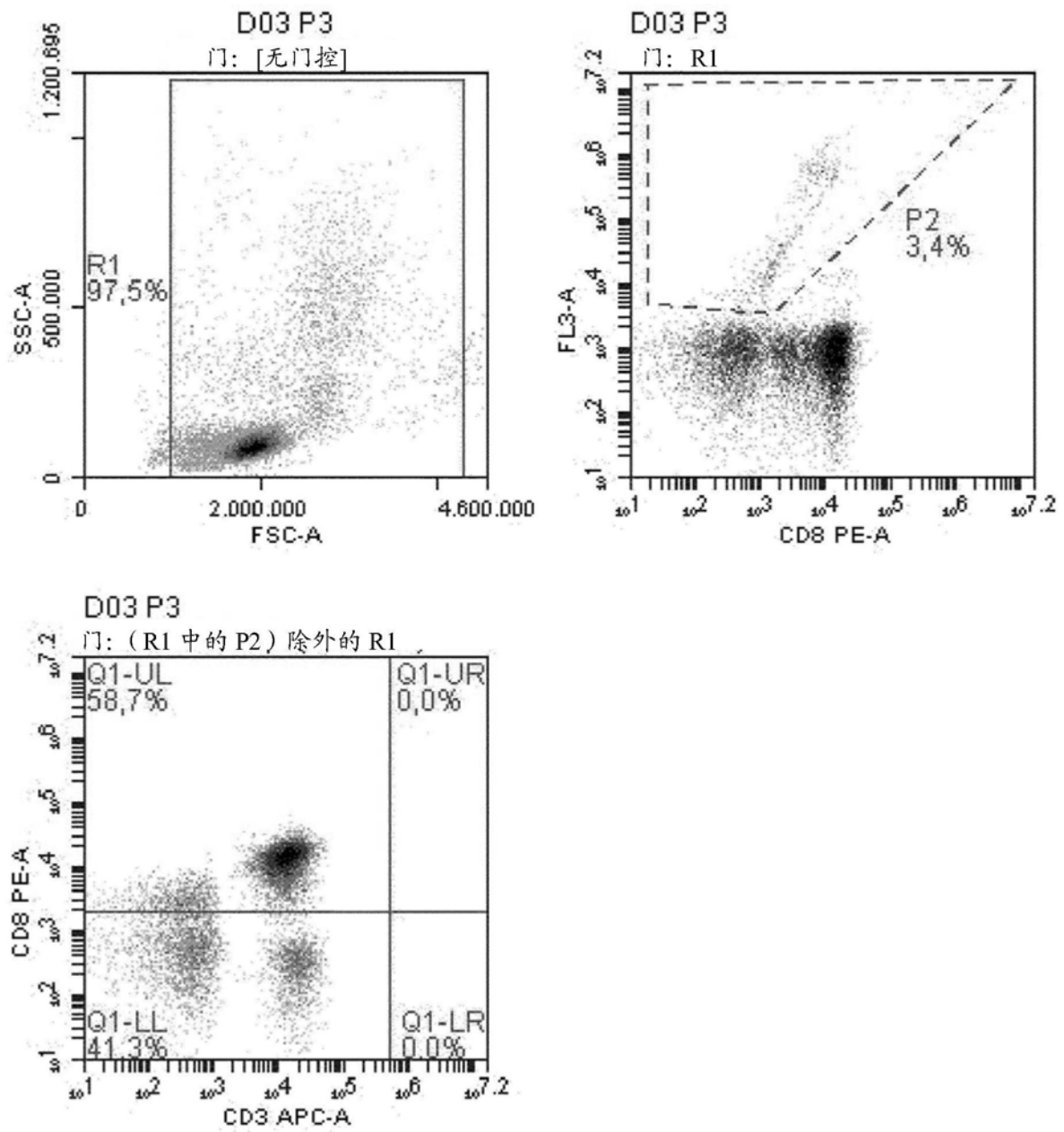


图9A (续) 阳性级分

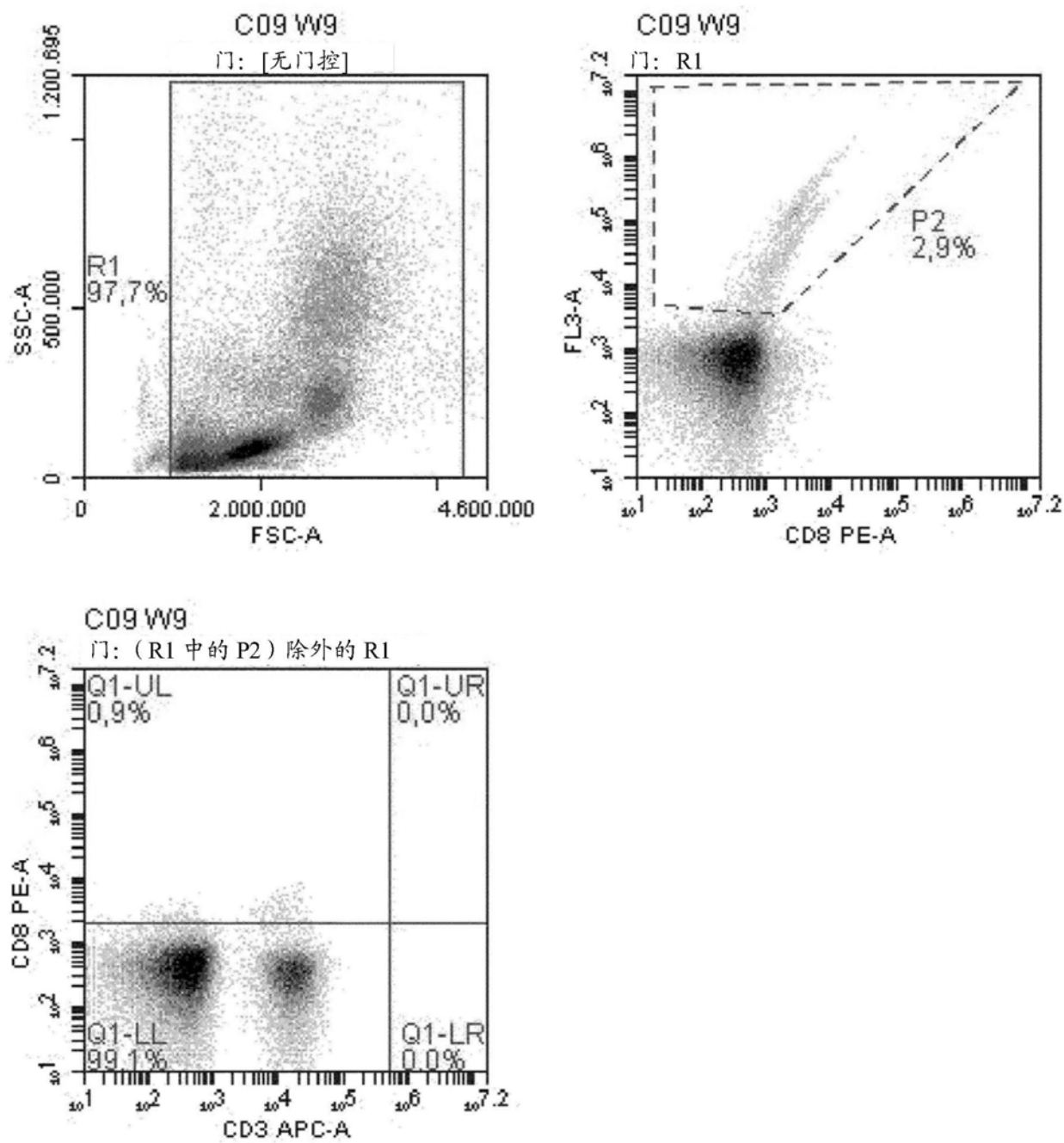


图9B洗脱级分

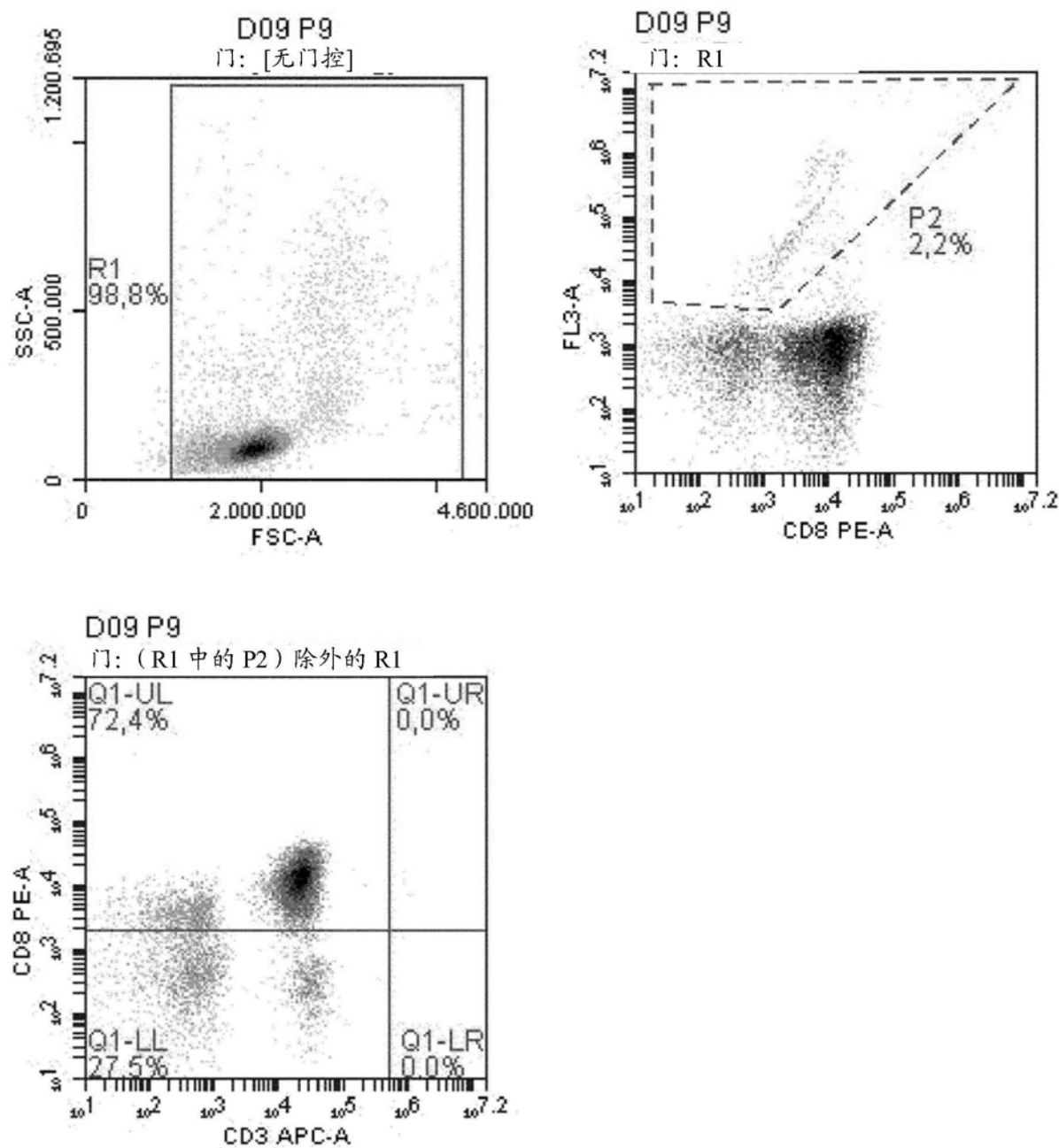


图9B(续) 阳性级分

CD8 T 细胞富集

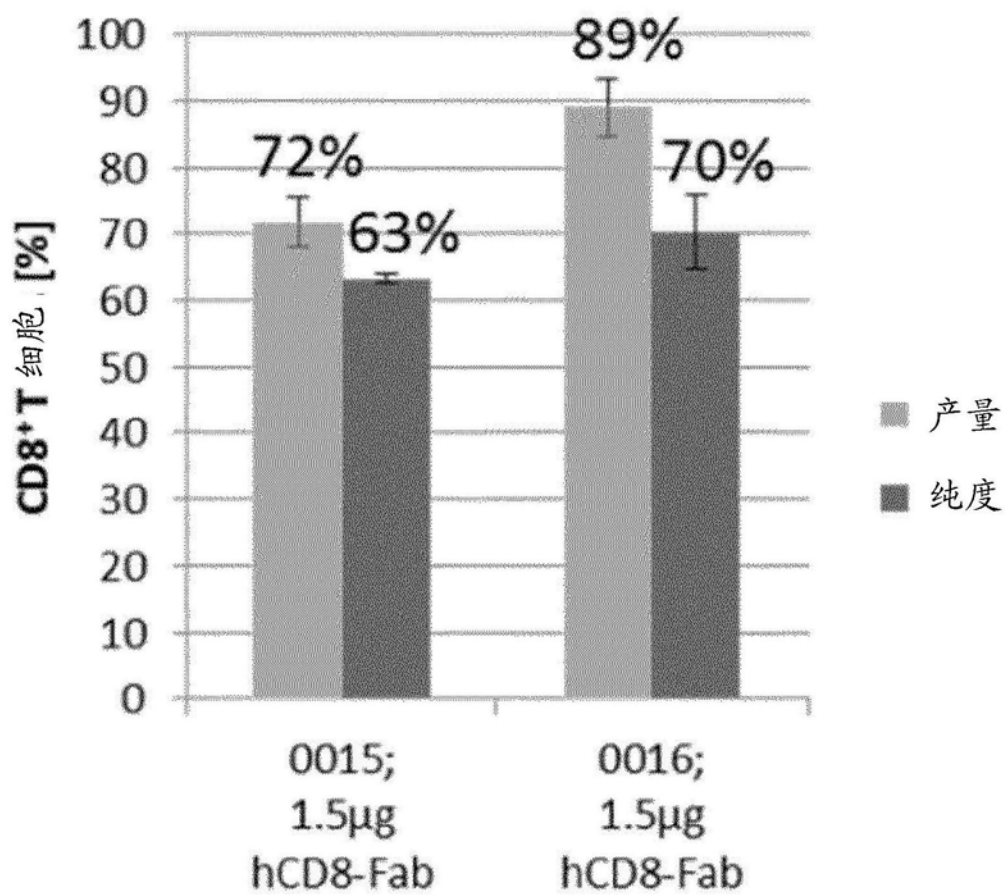


图9C

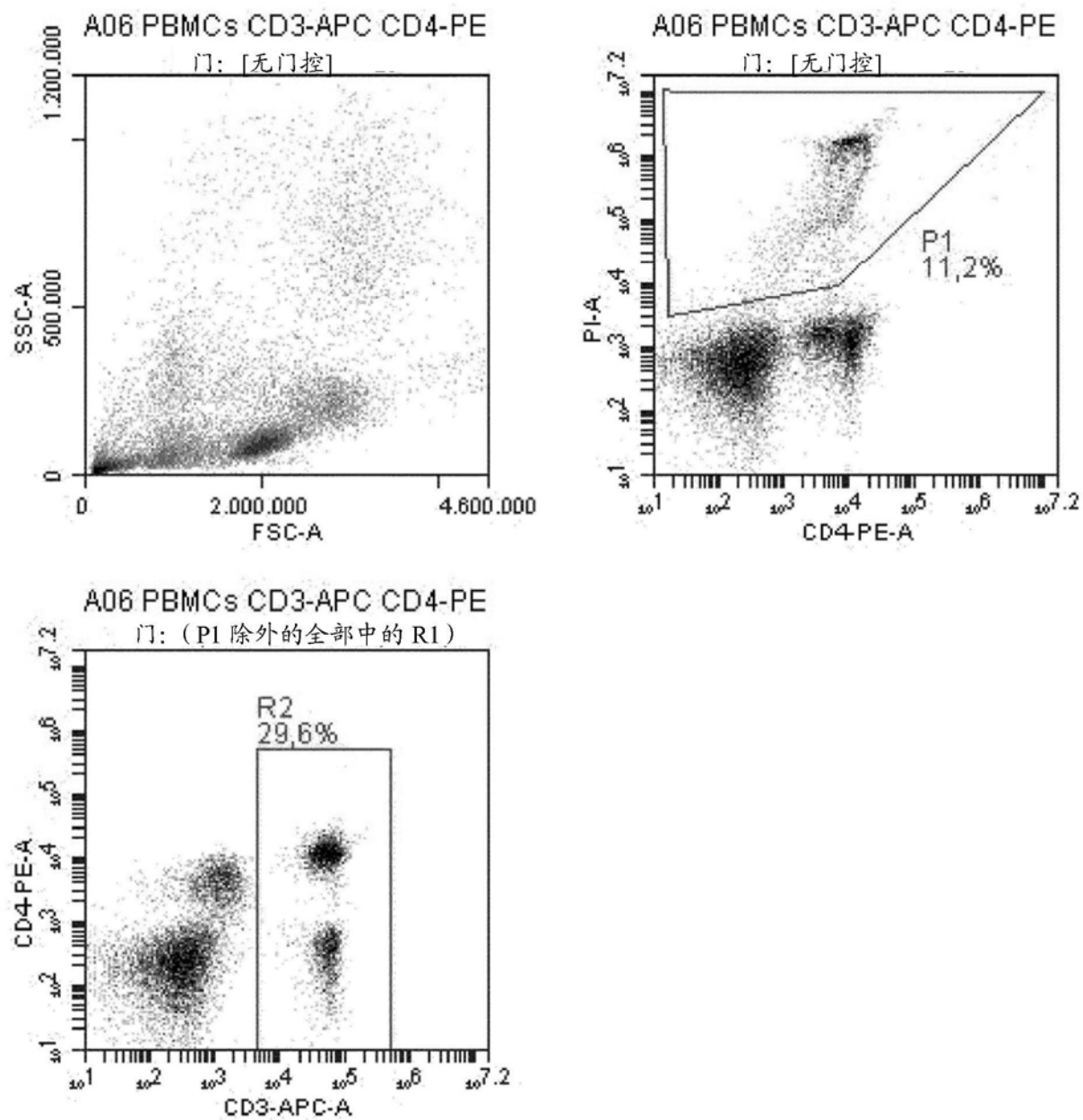


图10A选择前

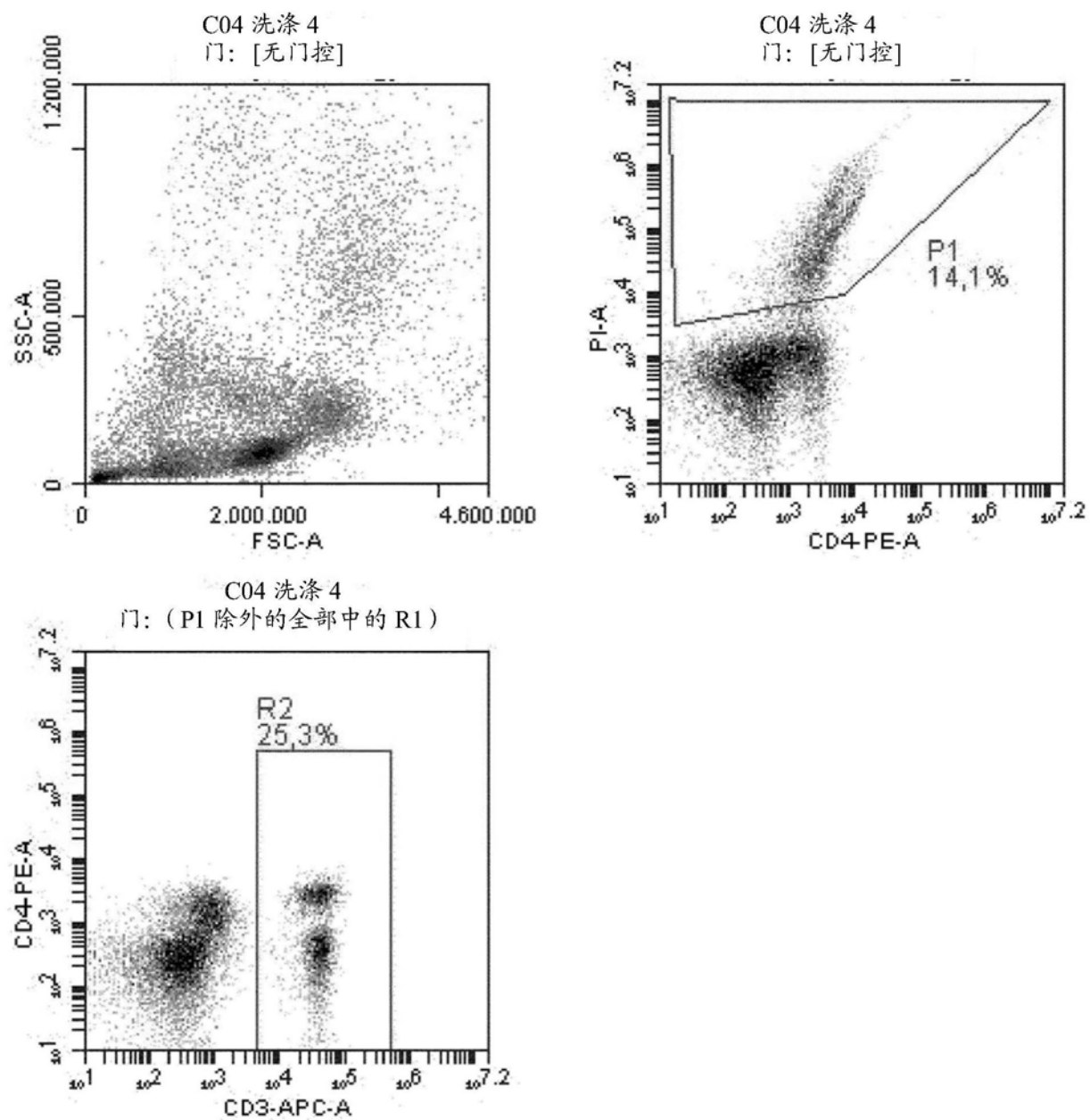


图10A(续)洗脱(wash through)级分

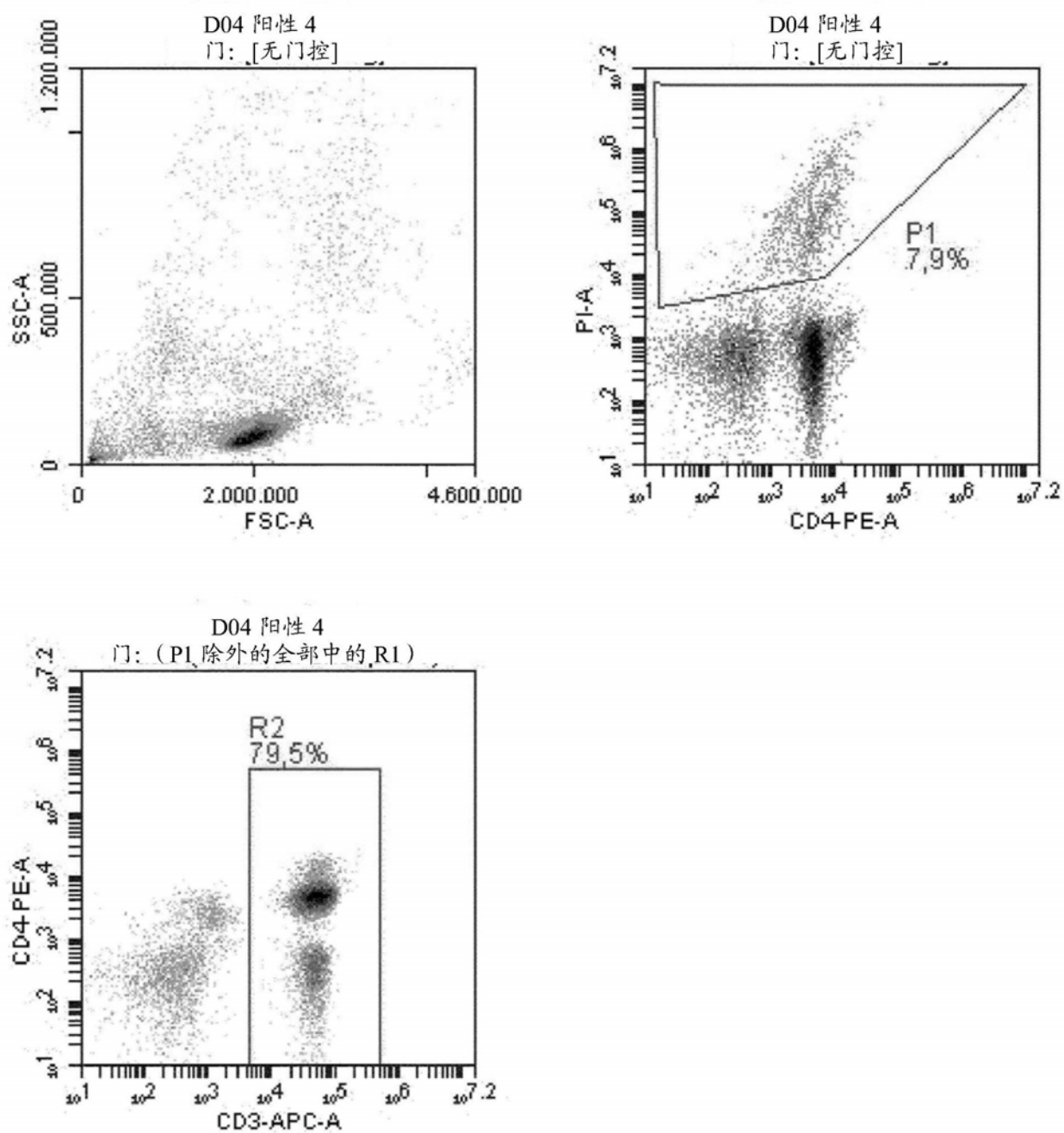


图10A (续) 阳性级分

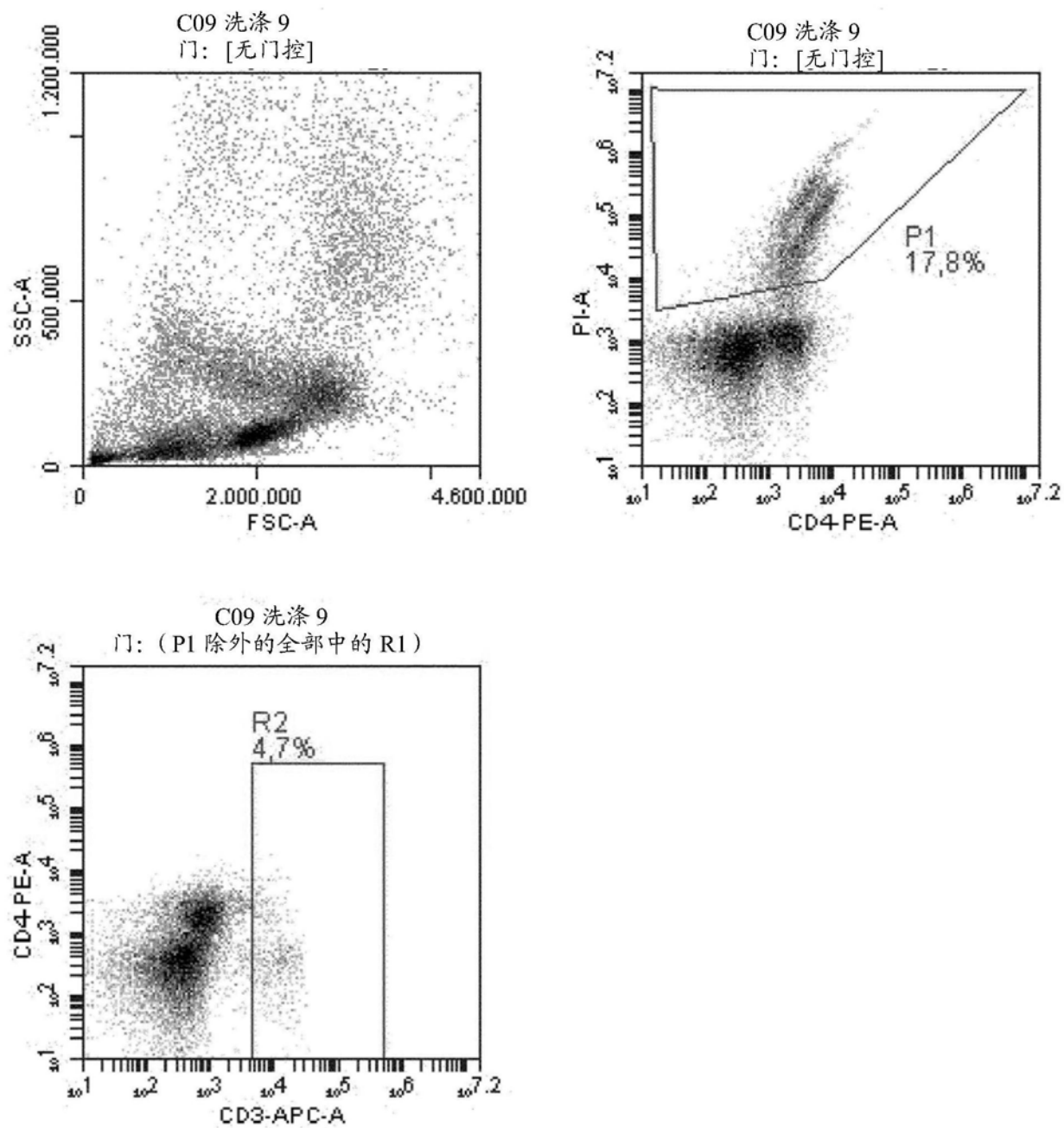


图10B洗脱级分

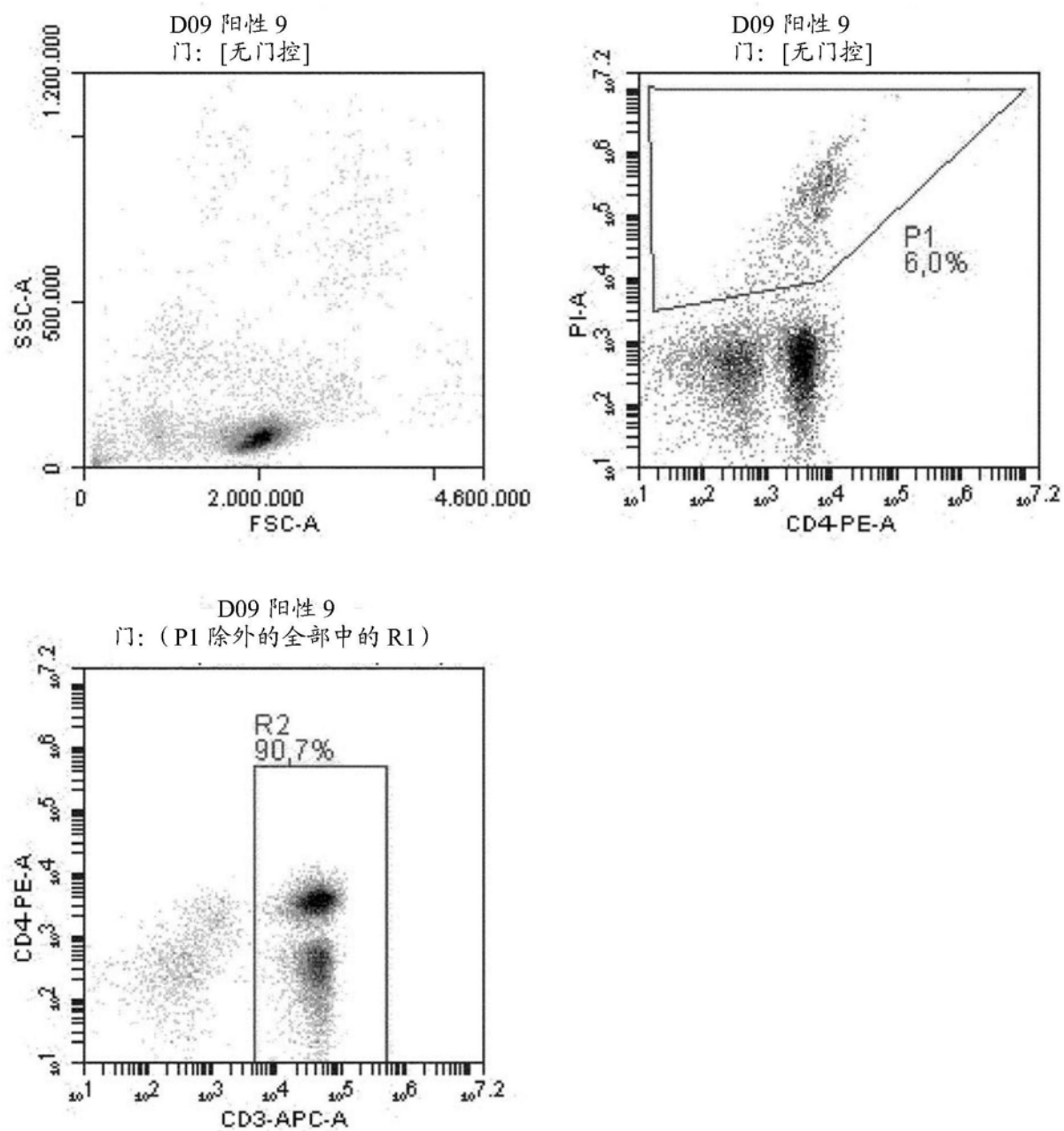


图10B (续) 阳性级分

CD3 T 细胞富集

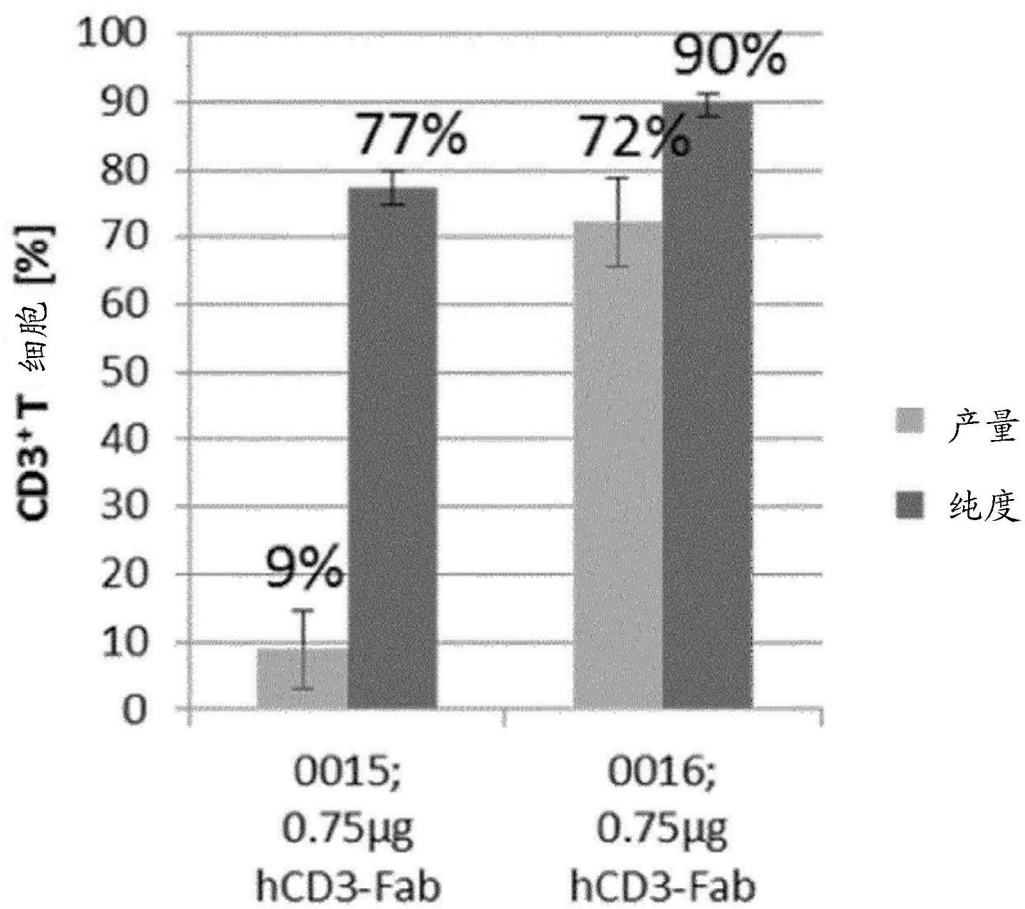


图10C