

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03825336.4

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 100350040C

[22] 申请日 2003.9.26 [21] 申请号 03825336.4

[30] 优先权

[32] 2002.9.27 [33] US [31] 60/414,692

[86] 国际申请 PCT/US2003/030265 2003.9.26

[87] 国际公布 WO2004/029208 英 2004.4.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.23

[73] 专利权人 生物 E 股份有限公司

地址 美国明尼苏达州

[72] 发明人 D·P·科林斯 J·H·哈普科

C·A·布切特

[56] 参考文献

US6117985A 2000.9.12

审查员 于保华

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 4 页 说明书 22 页 附图 4 页

[54] 发明名称

细胞分离组合物和方法

[57] 摘要

本发明提供了用于细胞分离的组合物和方法。这些试剂和技术通过表面识别特别地凝集细胞，并可以用来以高产量回收罕见的细胞类型。

1. 一种组合物，包含：
  - a) 葡聚糖；
  - b) 抗血型糖蛋白 A 抗体；
  - c) 抗 CD15 抗体；
  - d) 抗 CD9 抗体；
  - e) 抗 CD94 抗体；和
  - f) 抗 CD161 抗体。
2. 如权利要求 1 所述的组合物，所述组合物还包含抗 CD72 抗体。
3. 如权利要求 1 所述的组合物，所述组合物还包含抗 CD4 抗体、抗 CD16 抗体和抗 CD19 抗体。
4. 如权利要求 1 所述的组合物，所述组合物还包含抗 CD8 抗体、抗 CD16 抗体和抗 CD19 抗体。
5. 如权利要求 1 所述的组合物，所述组合物还包含抗 CD2 抗体。
6. 如权利要求 1 所述的组合物，还包含肝素。
7. 如权利要求 1 所述的组合物，还包含二价阳离子。
8. 如权利要求 7 所述的组合物，其特征在于所述二价阳离子是  $\text{Ca}^{+2}$ 。
9. 如权利要求 7 所述的组合物，其特征在于所述二价阳离子是  $\text{Mg}^{+2}$ 。
10. 如权利要求 1 所述的组合物，还包含磷酸缓冲盐水。
11. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于所述组合物的 pH 在 6.8 到 7.8 之间。
12. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于所述组合物的 pH 在 7.2 到 7.4 之间。
13. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于所述抗血型糖蛋白 A 抗体是单克隆。
14. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于所述抗血型糖蛋白 A 抗体是 IgM 抗体，或 IgG 抗体。
15. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于所述抗血型糖蛋白 A 抗体是抗人血型糖蛋白 A 抗体。

16. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗血型糖蛋白 A 抗体的浓度是大约 0.1mg/L 到大约 15mg/L。

17. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD15 抗体是单克隆抗体。

18. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD15 抗体是 IgM 抗体或 IgG 抗体。

19. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD15 抗体是抗人 CD15 抗体。

20. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD15 抗体的浓度是大约 0.1mg/L 到大约 15mg/L。

21. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD9 抗体是单克隆抗体。

22. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD9 抗体是 IgM 抗体或 IgG 抗体。

23. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD9 抗体是抗人 CD9 抗体。

24. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD9 抗体的浓度是大约 0.1mg/L 到大约 15mg/L。

25. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD94 抗体的浓度是 0.01mg/L 到 10mg/L。

26. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD161 抗体的浓度是 0.01mg/L 到 10mg/L。

27. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD94 抗体是 IgM 或 IgG 抗体。

28. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD161 抗体是 IgM 或 IgG 抗体。

29. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD94 抗体是抗人 CD94 抗体。

30. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD161 抗体是抗人 CD161 抗体。

31. 一种组合物, 包含:

- a) 葡聚糖;
- b) 抗血型糖蛋白 A 抗体;
- c) 抗 CD15 抗体;

- d) 抗 CD9 抗体;
- e) 抗 CD4 抗体或抗 CD8 抗体;
- f) 抗 CD16 抗体;
- g) 抗 CD19 抗体;
- h) 抗 CD94 抗体;
- i) 抗 CD161 抗体;
- j) 肝素; 和
- k) 二价阳离子。

32. 如权利要求 31 所述的组合物, 其特征在于所述组合物包含抗 CD4 抗体。

33. 如权利要求 31 所述的组合物, 其特征在于所述组合物包含抗 CD8 抗体。

34. 如权利要求 31 所述的组合物, 其特征在于至少一种所述抗体是生物素化的。

35. 如权利要求 34 所述的组合物, 其特征在于所述抗 CD16 抗体、所述抗 CD19 抗体、所述抗 CD94 抗体和所述抗 CD161 抗体是生物素化的。

36. 一种试剂盒, 包含血液收集容器和权利要求 31 的细胞分离组合物。

37. 如权利要求 36 所述的试剂盒, 其特征在于所述血液收集容器是血袋。

38. 如权利要求 36 所述的试剂盒, 其特征在于所述血液收集容器是真空管。

39. 一种分离细胞的方法, 所述方法包含:

a) 将含血细胞样品与组合物接触, 所述组合物包含:

- i) 葡聚糖;
- ii) 抗血型糖蛋白 A 抗体;
- iii) 抗 CD15 抗体;
- iv) 抗 CD9 抗体;
- v) 抗 CD94 抗体; 和
- vi) 抗 CD161 抗体。

b) 使得所述样品分离成凝集物和上清液相; 和

c) 回收所述细胞。

40. 如权利要求 39 所述的方法, 其特征在于所述组合物还包含抗 CD4 抗体、抗 CD16 抗体和抗 CD19 抗体。

41. 如权利要求 39 所述的方法, 其特征在于所述组合物还包含抗 CD8 抗体、抗 CD16 抗体和抗 CD19 抗体。

- 
42. 如权利要求 39 所述的方法, 其特征在于所述样品来源于人类。
  43. 如权利要求 42 所述的方法, 其特征在于所述样品是外周血样品。
  44. 如权利要求 42 所述的方法, 其特征在于所述样品是脐带样品。
  45. 如权利要求 42 所述的方法, 其特征在于所述样品是骨髓样品。
  46. 如权利要求 42 所述的方法, 其特征在于所述细胞是转移性肿瘤细胞。
  47. 如权利要求 42 所述的方法, 其特征在于所述细胞是从所述上清液相中回收的。
  48. 如权利要求 47 所述的方法, 其特征在于所述细胞是干细胞。
  49. 如权利要求 39 所述的方法, 其特征在于所述抗 CD94 抗体和所述抗 CD161 抗体是生物素化的。
  50. 如权利要求 49 所述的方法, 其特征在于所述细胞的回收包括将所述上清液相与包含亲和素包被微粒的组合物接触, 分离所述上清液相和所述组合物, 和从所述上清液相中回收细胞。

## 细胞分离组合物和方法

### 技术领域

本发明涉及用于分离细胞的组合物和方法。

### 背景

许多常规的血细胞分离过程包括通过密度-梯度沉降来初步大批分离红细胞组分和粒细胞组分。密度-梯度分离依赖于不同细胞类型的密度中的小差异造成在可变密度的液体介质中不同水平上分离细胞。细胞类型之间的密度差异可以是小的，单个细胞类型在大小和密度上可以是不等同的。因此，特定的细胞类型可分布在整个密度-梯度介质中，而不是在密度介质中的离散区域精确地分离。这种现象导致所需细胞的回收差和/或被不需要的细胞类型污染。在罕见的血细胞类型如造血祖细胞的富集过程中，通常密度-梯度沉降的产量差。例如，据报道用常规密度-梯度方法从脐带血中分离祖细胞(如，CD34+造血干细胞)导致需要的干细胞明显丧失。见如，Wagner, I.E., Am J Ped Hematol Oncol 15:169(1993)。作为另一个例子，据报道用常规密度-梯度方法分离淋巴细胞造成特定淋巴细胞亚群的丧失。见如，Collins, D.P., J Immunol Methods 243:125(2000)。

增加供体组织中罕见细胞类型的回收可以显著改善移植和免疫治疗(如，骨髓移植、基于干细胞的基因治疗，和免疫细胞治疗)的成功，这种成功与用于治疗的细胞的实际数量显然相关。

### 概要

本发明提供了用于分离细胞的组合物和方法。例如，本文公开的组合物和方法可用于有效地制备用于组织培养、免疫表型鉴定、其他诊断检测的细胞，进一步纯化，和治疗性施用。

本发明的方法包括将含有血细胞的样品(如，外周血样品、脐带样品，和骨髓样品)与细胞分离组合物接触。不受特定的机理的束缚，本发明的组合物可以通过与细胞表面抗原相互作用和/或通过刺激细胞-细胞粘附(如，通过增加细胞表面粘

附因子的表达)选择性地凝集细胞。凝集的细胞部分与未凝集的细胞分离,后者保留在溶液中。可以从凝集物或上清液相的一个或两个中回收细胞。

本文公开的组合物和方法可用于分离和富集各种细胞类型,包括,例如,T淋巴细胞、T辅助细胞、T抑制细胞、B细胞、造血干细胞、母体循环中的循环胎儿细胞,和循环转移肿瘤细胞。本文公开的组合物和方法可用于异基因移植和自体移植范围。在自体移植范围,例如本文公开的组合物和方法可用于,从患者的血液或骨髓中移除不需要的细胞如转移性肿瘤细胞。需要的细胞(如,造血干细胞)随后可返回给患者,其中没有或基本没有威胁生命的肿瘤细胞。本文公开的组合物和方法可应用在任何哺乳动物的细胞,包括人类、非人类的灵长类动物、啮齿动物、猪、牛和马。

细胞分离组合物可包含葡聚糖、抗血型糖蛋白A抗体,以及抗细胞表面抗原如CD9, CD15, CD2, CD3, CD4, CD8, CD72, CD16, CD41a, HLA I类, 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, 或表面Ig,的一种或几种抗体,和它们的组合。

例如,一种组合物可包含葡聚糖、抗血型糖蛋白A抗体、抗CD15抗体、抗CD9抗体、抗CD94抗体、和抗CD161抗体。在一些实施方案中,该组合物可进一步包括抗CD72抗体或抗CD2抗体。在其他实施方案中,该组合物可进一步包括抗CD4抗体、抗CD16抗体、和抗CD19抗体、或抗CD8抗体、抗CD16抗体,和抗CD19抗体。

细胞分离组合物可包含抗其他类型细胞的表面抗原(如,肿瘤细胞的细胞表面蛋白)的抗体。

抗细胞表面抗原的抗体可以包括在细胞分离组合物中,可以是溶解和底物结合形式中的一种或两种。抗体可结合于底物如乳胶微粒、酸蚀玻璃颗粒、聚集的多肽、多糖、亲和素颗粒、或生物素化琼脂糖凝胶颗粒。细胞分离组合物中的抗体可以是单克隆和可以是IgM或IgG抗体。在一些实施方案中,细胞分离组合物包含抗人抗体。细胞分离组合物中可溶性抗体的浓度可以在约0.01 mg/L到约15 mg/L。底物结合抗体可以大约0.1到大约 $50.0 \times 10^9$  微粒/L的浓度包含在细胞分离组合物中。

细胞分离组合物也可包含肝素、二价阳离子(如, $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ),和磷酸缓冲盐水。在一些实施方案中,组合物的pH在6.8到7.8之间(如,在7.2到7.4之间)。

本发明还提供包含细胞分离组合物组分和包装材料的试剂盒。试剂盒可包括血液收集容器如血袋和真空管。

除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中的普通技术人员通常理解的意思相同。虽然与本文描述类似和等同的方法和材料可用于实施本发明，但合适的方法和材料在下文中描述。本文中提及的所有出版物、专利申请、专利、和其他参考文献纳入本文作为参考。在冲突的情况下，以本说明书，包括定义为准。此外，本文的材料、方法和实施例仅为说明并不是限制。

本发明的其他特征和优点可从以下详细的描述和从权利要求中显而易见。

### 附图的说明

图 1 是从血液样品中回收 CD4 T 细胞的百分比的图。

图 2 是从血液样品中回收 CD4 T 细胞的纯度百分比的图。

图 3 是从血液样品中回收 CD8 T 细胞的百分比的图。

图 4 是从血液样品中回收 CD8 T 细胞的纯度百分比的图。

### 详细描述

本发明涉及用于分离细胞的组合物和方法。本发明的组合物可用于从含血细胞的样品中选择性地凝集细胞。不受特定的机理的束缚，本发明的组合物可以通过与细胞表面抗原相互作用和/或通过刺激细胞表面粘附因子如 LFA-1(淋巴细胞功能相关抗原-1, CD11a/CD18)和 ICAM-1(细胞间粘附分子-1, CD54)的表达来凝集细胞。凝集的细胞与未凝集的细胞分离，后者保留在溶液中。可以从上清液或从凝集物中回收细胞。

### 细胞分离组合物

本发明的细胞分离组合物可包含葡聚糖和抗细胞表面抗原(即，有特异性结合亲和力)的一种或多种抗体。

葡聚糖是多糖，由葡萄糖单元主要以 $\alpha(1$  到 6)形式连接组成。葡聚糖可使红细胞堆积(即，形成叠积)并因此有助于红细胞从溶液中移去。通常，在细胞分离组合物中的葡聚糖的浓度是 10 到 20g/L(例如，20 g/L)。抗细胞表面抗原的抗体通过同型凝集(即，相同细胞类型的细胞的凝集)和/或异型凝集(即，不同细胞类型的细胞的凝集)有助于血细胞从溶液中移去。

细胞分离组合物可包含抗血细胞表面抗原包括, 例如, 血型糖蛋白 A, CD15, CD9, CD2, CD3, CD4, CD8, CD72, CD16, CD41a, HLA I 类, 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 的抗体, 和它们的组合。因此, 细胞分离组合物可配制成选择性地凝集特定类型的血细胞。

在一些实施方案中, 细胞分离组合物包括抗血型糖蛋白 A 的抗体。通常, 在细胞分离组合物中的抗血型糖蛋白 A 抗体的浓度范围从 0.1 到 15mg/L(例如 0.1 到 10 mg/L, 1 到 5 mg/L, 或 1 mg/L)。抗血型糖蛋白 A 抗体通过至少两个机理有助于红细胞从溶液中移去。由于血型糖蛋白 A 是红细胞上的主要表面糖蛋白, 抗血型糖蛋白 A 抗体可导致红细胞的同型凝集。此外, 抗血型糖蛋白 A 抗体可也可稳定葡聚糖介导的叠积形成。示范性单克隆抗血型糖蛋白 A 抗体包括, 但不限于 107FMN (鼠 IgG1 同种型), YTH (大鼠 IgG2b 同种型), 和 E4 (鼠 IgM 同种型)。如见 M. Vanderlaan 等., Molecular Immunology 20:1353(1983); Telen M. J. 和 Bolk, T.A., Transfusion 27:309(1987); 和 Outram S.等., Leukocyte Research 12:651(1988)。

在一些实施方案中, 细胞分离组合物包括抗 CD15 的抗体。在细胞分离组合物中的抗 CD15 抗体的浓度范围从 0.1 到 15mg/L(例如, 0.1 到 10, 1 到 5, 或 1 mg/L)。抗 CD15 抗体可通过与粒细胞表面上存在的 CD15 分子交联导致粒细胞的同型凝集。抗 CD15 抗体还可通过刺激与单核细胞、NK 细胞和 B 细胞上的粘合分子相互作用的粒细胞表面上的粘附分子(如, L-选择蛋白和 beta-2 整联蛋白)表达来引起粒细胞与单核细胞、NK 细胞和 B 细胞的同型和异型凝集。这些细胞类型的异型凝集有利于这些细胞连同红细胞组分一起从溶液中移去。示范性单克隆抗 CD15 抗体包括, 但不限于 AHN1.1 (鼠 IgM 同种型), FMC-10 (鼠 IgM 同种型), BU-28(鼠 IgM 同种型), MEM-157 (鼠 IgM 同种型), MEM-158 (鼠 IgM 同种型), MEM-167 (鼠 IgM 同种型)。如见, Leukocyte typing IV (1989); Leukocyte typing II (1984); Leukocyte typing IV (1995); Solter D. 等., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5565(1978); Kannagi, R. 等, J. Biol. Chem. 257:14865 (1982); Magnani, J. L. 等, Archives of Biochemistry and Biophysics 233:501(1984); Eggens, I. 等., J. Biol Chem. 264:9476(1989)。

在一些实施方案中, 细胞分离组合物包括抗 CD9 的抗体(例如, 浓度范围在 0.1

到 15 , 0.1 到 10 , 1 到 5, 或 1 mg/L)。抗 CD9 抗体可通过血小板粘着于粒细胞和单核细胞的表面引起粒细胞和单核细胞的异型凝集。CD9 抗体可促进血小板 1-选择蛋白的表达, 血小板 1-选择蛋白有利于血小板结合于白细胞表面。因此, 抗 CD9 抗体可以促进多细胞-细胞连结并从而有利于凝集和从溶液中移去。示范性单克隆抗 CD9 抗体包括, 但不限于 MEM-61 (鼠 IgG1 同种型), MEM-62 (鼠 IgG1 同种型), MEM-192 (鼠 IgM 同种型), FMC-8 (鼠 IgG2a 同种型), SN4 (鼠 IgG1 同种型), BU-16 (鼠 IgG2a 同种型)。如见, Leukocyte typing VI (1995); Leukocyte typing II (1984); Von dem Bourne A.E.G. Kr 和 Moderman P. N. (1989) 载于: 《细胞分型 II》 (Leukocyte typing IV) W. Knapp, 等编著), 989-92 页. Oxford University Press, Oxford; Jennings, L.K., 等载于: 《细胞分型 V》 (Leukocyte typing V) S.F. Schlossmann 等编著, 1249-51 页, Oxford University Press, Oxford (1995); Lanza, F. 等, J. Biol. Chem. 266:10638 (1991); Wright 等, Immunology Today 15:588 (1994); Rubinstein, E. 等., Seminars in Thrombosis and Hemostasis 21:10 (1995)。

在一些实施方案中, 细胞分离组合物可包含抗 CD41 的抗体, 该抗体可选择性地凝集血小板。在一些实施方案中, 细胞分离组合物包含抗 CD3 的抗体, 该抗体可选择性地凝集 T 细胞。在一些实施方案中, 细胞分离组合物包含抗 CD2 的抗体, 该抗体可选择性地凝集 T 细胞和 Nk 细胞。在一些实施方案中, 细胞分离组合物包含抗 CD72 的抗体, 该抗体可选择性地凝集 B 细胞。在一些实施方案中, 细胞分离组合物包含抗 CD16 的抗体, 该抗体可选择性地凝集 NK 细胞和嗜中性粒细胞。这些抗体的浓度范围可在 0.01 到 15 mg/L。

在其他实施方案中, 细胞分离组合物包括抗 CD94 和 CD161 的抗体, 这些抗体可选择性地凝集 NK 细胞的亚群。克隆 HP-3D9 是合适的抗 CD94 抗体的例子。克隆 B199.2 是合适的抗 CD161 抗体的例子。单克隆抗 CD94 和抗 CD161 抗体特别有用。通常, 这些抗体的浓度范围从 0.01 mg/L 到 10mg/L (例如, 0.1 到 5 , 0.1 到 2.5 , 0.1 到 1.5 mg/L)。例如, 抗 CD94 抗体的浓度可以是 0.125 到 0.25 mg/L。抗 CD161 抗体的浓度可以是 0.25 到 1 mg/L。

如上所述可配制细胞分离组合物来选择性地凝集特定的血细胞。作为一个实施例, 包含葡聚糖和抗血型糖蛋白 A, CD15, 和 CD9 的抗体的细胞分离组合物可有利于红细胞、粒细胞、NK 细胞、B 细胞, 和血小板的凝集。T 细胞、NK 细胞和罕见的前体细胞随后可从溶液中回收。如果(组合物)制剂也包含抗 CD3 抗体, T 细

胞也被凝集，NK 细胞和罕见的前体可从溶液中回收。在其他实施方案中，细胞分离组合物包括葡聚糖和抗血型糖蛋白 A，CD15，CD9，CD94，和 CD161 的抗体，使得红细胞、粒细胞、NK 细胞、B 细胞，和血小板凝集，T 细胞和罕见的前体细胞可从溶液中回收。为了获得纯化的 CD4 T 细胞群，组合物中可包含抗 CD8 抗体，抗 CD16 抗体，和抗 CD9 抗体。为了获得纯化的 CD8 T 细胞群，组合物中可包含抗 CD4 抗体，抗 CD16 抗体，和抗 CD9 抗体。合适的抗 CD4 抗体的非限制性例子包括克隆 QS4120，RPA-T4，S3.5，M-T441，RFT-4，和 13B8.2。合适的抗 CD8 抗体的非限制性例子包括克隆 HIT8a，UCHT4，和 RPA-T8。克隆 3G8 是合适的抗 CD16 抗体的例子。合适的抗 CD19 抗体的非限制性例子包括克隆 HIB19 和 BU12。

细胞分离组合物可包含抗其他类型细胞表面抗原(如，肿瘤细胞的细胞表面蛋白)的抗体。本领域技术人员可使用常规方法制备抗血液和其他人类及其他哺乳动物的细胞表面抗原的抗体，包括，例如，非人类的灵长类动物、啮齿动物(如小鼠、大鼠、仓鼠、兔和豚鼠)、猪、牛和马。

通常，组合物中使用的抗体是单克隆抗体，它们针对抗原内包含的特定抗原表位的同源群抗体。合适的单克隆抗体可以是商品化产品，或可以使用标准的杂交瘤技术制备。特别是，单克隆抗体可以通过使用培养的连续细胞系来生产抗体分子的技术来获得，包括 Kohler, G. 等, Nature, 1975, 256:495 中所描述的技术，人 B-cell 杂交瘤技术(Kosbor 等, Immunology Today 4:72(1983); Cole et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 80:2026(1983)), 和 EBV-杂交瘤技术(Cole 等, 《单克隆抗体和癌症治疗》(“Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy”), Alan R. Liss, Inc., 77-96 页(1983))。

抗体可以是任何免疫球蛋白类包括 IgG，IgM，IgE，IgA，IgD，和它们的任何亚类。IgG 和 IgM 同种型抗体在本发明的细胞分离组合物中特别有用。五聚 IgM 抗体比 IgG 抗体包含更多的抗原结合部位，在一些情况下(如，抗血型糖蛋白 A 和抗 CD15)，它对细胞分离试剂特别有用。在其他情况下，(如，抗 CD9 抗体)，IgG 同种型抗体对刺激同型和/或异型的凝集特别有用。

抗细胞表面抗原的抗体可以液相(即，可溶的)提供或可与固体相结合(即，底物结合)提供。通常提供在细胞分离组合物中的液体相抗体的浓度在大约 0.01 和大约 15mg/L 之间(例如，在 0.25 到 10，0.25 到 1，0.5 到 2，1 到 2，4 到 8，5 到 10 mg/L 之间)。通常提供在细胞分离组合物中的底物结合抗体的浓度在大约 0.1 和大约  $50.0 \times 10^9$  微粒/L 之间(如，在 0.25 到  $10.0 \times 10^9$ ，1 到  $20.0 \times 10^9$ ，

2 到  $10.0 \times 10^9$ ,  $0.5$  到  $2 \times 10^9$ ,  $2$  到  $5 \times 10^9$ ,  $5$  到  $10 \times 10^9$ , 和  $10$  到  $30 \times 10^9$  微粒/L 之间), 其中微粒指有抗体结合的固体相微粒。

抗不同细胞表面抗原的抗体可以与固体相共价结合以促进细胞表面分子的交联和细胞表面粘附分子的活化。使用底物结合抗体可有利于细胞分离(如, 借助于微粒促使凝集细胞的质量, 或借助于用于纯化的特性)。

在一些实施方案中, 与底物结合抗体有关的固体相是微粒。在一些实施方案中, 抗体结合到乳胶微粒如顺磁性珠(如, 通过生物素-亲和素连接, 共价结合到聚苯乙烯珠的 COO 基团上, 或共价结合到改良珠上的  $\text{NH}_2$  基团)。在一些实施方案中, 抗体结合到酸蚀玻璃颗粒(如, 通过生物素-亲和素连接)。在一些实施方案中, 抗体与聚集多肽如聚集牛血清白蛋白结合(如, 通过生物素-亲和素连接, 或共价连接到多肽 COO 基团或  $\text{NH}_2$  基团)。在一些实施方案中, 抗体共价结合到多糖如高分子量(如,  $>1,000,000$  Mr)硫酸葡聚糖。在一些实施方案中, 生物素化抗体与亲和素颗粒连接, 产生具有每亲和素分子四个抗体分子的四聚聚合物。在一些实施方案中, 抗体通过生物素-亲和素-生物素化抗体连接与生物素化琼脂凝胶颗粒(One Cell Systems, Cambridge, MA, U.S.A.)结合。通常这种微粒是大约 300-500 微米大小, 并可以在超声处理水浴或在快速混合水浴中形成。

细胞-底物微粒(即, 微粒包含细胞和底物结合抗体)作为凝集物可从溶液中沉降。当微粒是顺磁性珠时, 细胞-底物微粒也可通过, 例如, 应用磁场, 从溶液中移去。

细胞分离组合物也可包含二价阳离子(如,  $\text{Ca}^{+2}$  和  $\text{Mg}^{+2}$ )。二价阳离子可以通过, 例如, 平衡盐溶液(如, Hanks 平衡盐溶液)提供。 $\text{Ca}^{+2}$  离子对选择蛋白 - 介导的和整联蛋白 - 介导的细胞-细胞粘附是重要的。

本发明的细胞分离组合物也可包含抗凝剂如肝素。肝素可防止凝结和与高钙环境中凝结有关的非特异性细胞损失。肝素也促进血小板聚集。聚集的血小板可粘附到粒细胞和单核细胞, 并因此比单独的血小板更能增强异型凝集。肝素可作为一种肝素盐(如, 肝素钠、肝素锂, 或肝素钾)提供。

### 细胞分离方法

可使用本文公开的组合物, 例如, 有效制备组织培养、免疫表型鉴定、诊断测试、进一步纯化, 和治疗性施用所用的细胞。不受特定的机理的束缚, 本发明的组合物可以通过与细胞表面抗原相互作用和/或通过刺激细胞-细胞粘附(如, 通过

增强细胞表面粘附因子的表达)来选择性地凝集细胞。凝集的细胞与未凝集的细胞分离,后者保留在溶液中。

在凝集后,未凝集的细胞可从溶液相(即,上清液)中回收。在使用一个或多个生物素化抗体的实施方案中,上清液可与包含亲和素或链霉亲和素包被的微粒(如,磁性珠)的组合物接触以进一步排除不需要的细胞的上清液。在上清液与组合物混合后,珠可以从上清液中分离(如,通过使用磁性),细胞可以从上清液中移去。

细胞也可以从凝集物中回收。凝集的细胞可以通过,例如,将细胞转移到包含二价阳离子螯合剂如 EDTA 或 EGTA 的缓冲液中来解离。从凝集物中回收的细胞可以通过使用抗细胞表面抗原的抗体进一步分离。可以通过将凝集物加热到正好高于熔点的温度,从凝胶微粒-抗体-细胞凝集物中回收细胞。

本文公开的组合物可用于从包含样品的各种血细胞中分离细胞,包括外周血(如,通过静脉穿刺获得),脐带血(如,妊娠后获得),和骨髓(如,抽吸获得)。含血细胞的样品与细胞分离组合物接触值特定类型的细胞凝集。例如,红细胞和分化的骨髓血成分可使用包含针对这些细胞的表面抗原的抗体的细胞分离组合物来选择性地凝集。本文公开的组合物和方法可用来分离和富集各种细胞类型,包括,例如,T淋巴细胞、T辅助细胞、T抑制细胞、B细胞、造血干细胞、母体循环中的循环胎儿细胞,和循环转移性肿瘤细胞。本文公开的组合物可用来凝集任何哺乳动物的细胞,包括人类、非人类的灵长类动物、啮齿动物、猪、牛和马。

本文公开的组合物和方法可用于异基因移植和自体移植范围。在自体移植范围,例如本文公开的组合物和方法可用于,从患者的血液或骨髓中移除不需要的细胞如转移性癌细胞。需要的细胞(如,造血干细胞)随后可返回给患者,没有或基本没有威胁生命的肿瘤细胞。

包含抗肿瘤细胞表面蛋白抗体的细胞分离组合物可用来从患者的血液或骨髓中排除肿瘤细胞。例如:这种组合物也可用于诊断程序以获得和检测凝集物中的肿瘤细胞,肿瘤细胞集中在凝集物中,因此比在循环血液或骨髓中更容易检测。包含抗上皮生长因子受体的抗体的细胞分离组合物可用来凝集源自上皮肿瘤的肿瘤细胞(如,头和颈部肿瘤)。包含抗雌激素受体的抗体的细胞分离组合物可用来凝集源自乳房和卵巢肿瘤的肿瘤细胞。包含抗表面免疫球蛋白的抗体的细胞分离组合物可用来凝集与慢性淋巴细胞白血病、浆细胞瘤、和多发性骨髓瘤有关的肿瘤细胞。乳房癌细胞在细胞表面上表达 CD15,并可以使用包含抗 CD15 抗体的细

胞分离组合物从骨髓中排除。其他制剂可基于细胞类型和细胞表面蛋白来制备以从患者的血液或骨髓中获得或排除源自其他癌的肿瘤细胞(如红白血病、内皮癌、或胃肠癌)。

### 细胞分离试剂盒

细胞分离组合物可结合包装材料并作为一种试剂盒销售。细胞分离组合物的成分可以单独包装或与其他成分联合包装。在一些实施方案中,包装材料包括血液收集容器(如,血袋,真空管)。试剂盒中包含的包装材料通常包含描述如何使用细胞分离组合物来凝集特定类型细胞的说明书或标签。生产这种试剂盒的成分和方法是熟知的。

本发明以下列实施例进一步描述,这些实施例并不限制权利要求中所描述的本发明的范围。

### 实施例

#### 实施例 1: 分离血细胞

本实施例描述使用以下描述的细胞分离试剂分离细胞的一般方法。等体积的细胞分离试剂(即, 25ml)与等体积的乙烯二胺四乙酸(EDTA)抗凝肝素化外周血样品(即, 25ml)在 50ml 圆锥管中混合。含计数大于  $20 \times 10^6$  细胞/ml 白细胞的样品以一份血与两份细胞分离试剂混合。在室温管在摇动平台上轻轻混合 20 到 45 分钟。管在支架上竖放 30 到 50 分钟使得凝集细胞与保留在溶液中的未凝集细胞部分分离。不扰动凝集物,使用移液管从上清液中回收未凝集细胞。回收的细胞在 25 ml PBS 中洗涤并以 500 x 离心 7 分钟。细胞沉淀再悬浮于 4ml PBS。

在一种或多种抗体是生物素化的实施方案中,亲和素包被的磁珠被加入上清液(1 mL 珠/mL 起始样品)。珠和上清液在摇动平台上混合 20 分钟。通过将包含混合物的管置于 PrepaMag™ 5 分钟来除去与不需要细胞结合的珠。珠和结合不需要细胞的珠移到管的侧面。使用吸量管将每个管中心和底部的液体移出,操作要小心不扰动管侧面上的珠和细胞。

也可以使用包含 EDTA 和乙二醇-二(2-氨基乙基乙醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)的低渗裂解溶液从凝集物中回收细胞。凝集细胞用 25ml Vitalyse™ (BioErgonomics, St. Paul, MN)处理并涡动。10 分钟后,细胞或是暴露于应用的磁场来回收与结合顺磁性珠的抗体连接的细胞,或是以 500 x 离心 7 分钟并移

去上清液。在两种情况下，细胞浮于 4ml PBS。

红细胞、白细胞、淋巴细胞、单核细胞、粒细胞、T 细胞、B 细胞和 NK 细胞的回收通过流式细胞仪和免疫分型来确定。在流式细胞仪之前，使用 Coulter Onyx 血液学分析仪确定白细胞回收(即，白血细胞计数)，样品用 PBS 调节到细胞计数  $1 \times 10^7$  细胞/ml。100  $\mu$ l 等分的体积调节样品在室温或是以 FITC 标记的抗 CD3 抗体(与 T 细胞反应)、PE 标记的抗 CD19 抗体(与 B 细胞反应)，或是 PE 标记的抗 CD16 抗体(与 NK 细胞反应)在黑暗中染色 15 到 30 分钟。每个样品中加入 2 ml PBS，随后样品被涡动并离心以形成细胞沉淀。弃去上清液，细胞沉淀被涡动并重悬浮于 0.5 ml PBS。通过使用 Coulter XL 流式细胞仪的流式细胞术分析染色和未染色的细胞。红细胞、根据诊断的前光和侧光散射特性来确定白细胞、淋巴细胞、单核细胞、粒细胞和血小板。根据标记抗体的光散射和染色来确定 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞。

## 实施例 2：红细胞凝集

使用表 1 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。

表 1

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)          | 20 g/L   |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水(10 X)       | 100 ml/L |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)          | 1 mL/L   |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)     | 50 mL/L  |
| 抗人血型糖蛋白 a(鼠 IgM 单克隆抗体克隆 E4) | 1.0 mg/L |

分离的结果示于表 2。红细胞从上清液中被排除 99.7%。淋巴细胞(T 细胞，B 细胞，和 NK 细胞)相对于单核细胞和粒细胞在上清液中富集。

表 2

|          | 分离前                | 分离后                 |
|----------|--------------------|---------------------|
| 红细胞 每 mL | $4.41 \times 10^9$ | $0.015 \times 10^9$ |
| 白细胞 每 mL | $5.9 \times 10^6$  | $5.3 \times 10^6$   |
| 淋巴细胞(%)  | 28.7               | 41.9                |
| 单核细胞(%)  | 8.69               | 4.78                |
| 粒细胞(%)   | 62.5               | 52.6                |

|               |      |      |
|---------------|------|------|
| T 细胞 (CD3+)   | 19.7 | 31.8 |
| B 细胞 (CD19+)  | 4.46 | 5.42 |
| NK 细胞 (CD16+) | 3.15 | 5.9  |

### 实施例 3：红细胞和 CD2<sup>+</sup>细胞凝集

使用表 3 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。

表 3

|                                                                                 |                         |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 葡聚糖 (平均分子量 413,000)                                                             | 20 g/L                  |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水 (10 X)                                                          | 100 mL/L                |
| 肝素钠 (10,000 单位/mL)                                                              | 1mL/L                   |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)                                                         | 50 mL/L                 |
| 抗人血型糖蛋白 a (鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)                                                  | 1.0 mg/L                |
| 抗人 CD2 顺磁性凝集微粒 (亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD2, 克隆 d 118.10.1 的饱和剂量标记) | $14.2 \times 10^9$ 微粒/L |

分离的结果示于表 4。在上清液中, 红细胞被排除 99.7%, T 细胞被排除 95.1%, 和 NK 细胞被排除 69.1%。B 细胞相对于其他细胞在上清液中富集。

表 4

|               | 分离前                | 分离后                 |
|---------------|--------------------|---------------------|
| 红细胞 每 mL      | $4.41 \times 10^9$ | $0.014 \times 10^9$ |
| 白细胞 每 mL      | $5.9 \times 10^6$  | $2.63 \times 10^6$  |
| 淋巴细胞 (%)      | 28.7               | 16.0                |
| 单核细胞 (%)      | 8.69               | 6.04                |
| 粒细胞 (%)       | 62.5               | 75.6                |
| T 细胞 (CD3+)   | 19.7               | 3.3                 |
| B 细胞 (CD19+)  | 4.46               | 9.63                |
| NK 细胞 (CD16+) | 3.15               | 4.32                |

#### 实施例 4：红细胞和 CD72+细胞凝集

使用表 5 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。

表 5

|                                                                              |                         |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)                                                           | 20 g/L                  |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水(10 X)                                                        | 100 ml/L                |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)                                                           | 1 mL/L                  |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)                                                      | 50 mL/L                 |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)                                                | 1.0 mg/L                |
| 抗人 CD72 顺磁性凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒, 用生物素标记的小鼠抗人 CD72, 克隆 BU40 的饱和剂量标记) | $2.63 \times 10^6$ 微粒/L |

分离的结果示于 6。在上清液中, 红细胞被排除 99.5%, B 细胞被排除 81.6%。

表 6

|               | 分离前                | 分离后                 |
|---------------|--------------------|---------------------|
| 红细胞 每 mL      | $4.41 \times 10^9$ | $0.021 \times 10^9$ |
| 白细胞 每 mL      | $5.9 \times 10^6$  | $3.2 \times 10^6$   |
| 淋巴细胞 (%)      | 28.7               | 47.0                |
| 单核细胞 (%)      | 8.69               | 4.78                |
| 粒细胞 (%)       | 62.5               | 47.7                |
| T 细胞 (CD3+)   | 19.7               | 41.3                |
| B 细胞 (CD19+)  | 4.46               | 2.75                |
| NK 细胞 (CD16+) | 3.15               | 4.77                |

#### 实施例 5：红细胞, CD15+和 CD9+细胞凝集

使用表 7 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。

表 7

|                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)               | 20 g/L                          |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水(10 X)            | 100 ml/L                        |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)               | 1 mL/L                          |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)          | 50 mL/L                         |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)    | 0.1-15 mg/L<br>(大约 1.0 mg/L 较佳) |
| 抗 CD 15(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 MEM-158) | 0.1-15 mg/L<br>(大约 1.0 mg/L 较佳) |
| 抗 CD 9(鼠 IgG 单克隆抗体, 克隆 MEM-61)   | 0.1-15 mg/L<br>(大约 1.0 mg/L 较佳) |

分离的结果示于表 8。在上清液中, 红细胞被排除 99.9%, 单核细胞和粒细胞被排除 99.8%, B 细胞被排除 74%, NK 细胞被排除 64.9%。此外, 在分离前在上清液中  $226 \times 10^6/\text{ml}$  在上清液中存在的血小板被排除到  $1.4 \times 10^6/\text{ml}$ , 99.4%排除。

表 8

|              | 分离前                | 分离后                 |
|--------------|--------------------|---------------------|
| 红细胞 每 mL     | $4.41 \times 10^9$ | $0.006 \times 10^9$ |
| 白细胞 每 mL     | $5.9 \times 10^6$  | $1.53 \times 10^6$  |
| 淋巴细胞(%)      | 28.7               | 99.0                |
| 单核细胞(%)      | 8.69               | 0.12                |
| 粒细胞(%)       | 62.5               | .083                |
| T 细胞(CD3+)   | 19.7               | 83.2                |
| B 细胞(CD19+)  | 4.46               | 8.10                |
| NK 细胞(CD16+) | 3.15               | 8.43                |

实施例 6: 红细胞, CD15+细胞、CD9+细胞、和 CD2+细胞凝集

使用表 9 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。

表 9

|                                                                                |                         |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)                                                             | 20 g/L                  |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水(10 X)                                                          | 100 ml/L                |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)                                                             | 1 mL/L                  |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)                                                        | 50 mL/L                 |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)                                                  | 1 mg/L                  |
| 抗 CD 15(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 MEM-158)                                               | 1 mg/L                  |
| 抗 CD 9(鼠 IgG 单克隆抗体, 克隆 MEM-61)                                                 | 1 mg/L                  |
| 抗人 CD2 顺磁性凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD2, 克隆 d 118.10.1 的饱和剂量标记) | $14.2 \times 10^9$ 微粒/L |

分离的结果示于表 10。在上清液中, 红细胞被排除 99.9%, 单核细胞和粒细胞被排除 99.9%, B 细胞被排除 16.8%, NK 细胞被排除 29%, T 细胞被排除 91.5%。此外, 血小板在分离前以  $226 \times 10^6/\text{ml}$  在上清液中存在的血小板, 被排除到  $0.3 \times 10^6/\text{ml}$ , 排除 99.9%排除。

表 10

|               | 分离前                | 分离后                 |
|---------------|--------------------|---------------------|
| 红细胞 每 mL      | $4.41 \times 10^9$ | $0.005 \times 10^9$ |
| 白细胞 每 mL      | $5.9 \times 10^6$  | $1.26 \times 10^6$  |
| 淋巴细胞 (%)      | 28.7               | 99.8                |
| 单核细胞 (%)      | 8.69               | 0.06                |
| 粒细胞 (%)       | 62.5               | 0.09                |
| T 细胞 (CD3+)   | 19.7               | 6.78                |
| B 细胞 (CD19+)  | 4.46               | 69.5                |
| NK 细胞 (CD16+) | 3.15               | 20.7                |

实施例 7: 红细胞, CD15+细胞、CD9+细胞、和 CD72+细胞凝集  
使用表 11 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。

表 11

|                                                                            |                         |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)                                                         | 20 g/L                  |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水(10 X)                                                      | 100 ml/L                |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)                                                         | 1 mL/L                  |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)                                                    | 50 mL/L                 |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)                                              | 1 mg/L                  |
| 抗 CD 15(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 MEM-158)                                           | 1 mg/L                  |
| 抗 CD 9(鼠 IgG 单克隆抗体, 克隆 MEM-61)                                             | 1 mg/L                  |
| 抗人 CD72 顺磁性凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD72, 克隆 BU40 的饱和剂量标记) | $2.63 \times 10^9$ 微粒/L |

分离的结果示于表 12。在上清液中, 红细胞被排除 99.9%, 单核细胞被排除到难以检测出, 粒细胞被排除 99.97%, B 细胞被排除 97.2%, NK 细胞被排除 54.9%。此外, 在分离前以  $226 \times 10^6/\text{ml}$  在上清液中存在的血小板, 被排除到  $0.1 \times 10^6/\text{ml}$ , 99.96%排除。

表 12

|               | 分离前                | 分离后                 |
|---------------|--------------------|---------------------|
| 红细胞 每 mL      | $4.41 \times 10^9$ | $0.006 \times 10^9$ |
| 白细胞 每 mL      | $5.9 \times 10^6$  | $2.3 \times 10^6$   |
| 淋巴细胞 (%)      | 28.7               | 99.9                |
| 单核细胞 (%)      | 8.69               | 0                   |
| 粒细胞 (%)       | 62.5               | 0.1                 |
| T 细胞 (CD3+)   | 19.7               | 92.4                |
| B 细胞 (CD19+)  | 4.46               | 0.59                |
| NK 细胞 (CD16+) | 3.15               | 7.02                |

实施例 8: 红细胞, CD15+细胞、CD9+细胞、CD19+细胞、和 CD16+细胞凝集

使用表 13 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。T 细胞和 CD3+细胞从上清液中回收。B 细胞和粒细胞从凝集物中回收。

表 13

|                                                                            |                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)                                                         | 20 g/L                                                             |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水(10 X)                                                      | 100 ml/L                                                           |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)                                                    | 50 mL/L                                                            |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)                                                         | 1 mL/L                                                             |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)                                              | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                        |
| 抗人 CD 15(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 MEM-158)                                          | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                        |
| 抗人 CD 9(鼠 IgG 单克隆抗体, 克隆 MEM-61)                                            | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                        |
| 抗 CD19 顺磁性凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD19, 克隆 HIB40 的饱和剂量标记) | 0.1-30.0 × 10 <sup>9</sup> 微粒/L(大约 19.8 × 10 <sup>9</sup> 微粒/L 较佳) |
| 抗 CD16 顺磁性凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD16, 克隆 3G8 的饱和剂量标记)   | 5.5 × 10 <sup>11</sup> 微粒/L                                        |

实施例 9: 红细胞, CD15+细胞、CD9+细胞、CD19+细胞、CD16+细胞、和 CD4+细胞凝集

使用表 14 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。CD8+细胞从上清液中回收。

表 14

|                                                                                              |                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)                                                                           | 20 g/L                                                     |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水(10 X)                                                                        | 100 ml/L                                                   |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)                                                                           | 1 mL/L                                                     |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)                                                                      | 50 mL/L                                                    |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)                                                                | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                |
| 抗人 CD 15(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 MEM-158)                                                            | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                |
| 抗人 CD 9(鼠 IgG 单克隆抗体, 克隆 MEM-61)                                                              | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                |
| 抗 CD19 顺磁性凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD19, 克隆 HIB40 的饱和剂量标记)                   | $0.1-30.0 \times 10^9$ 微粒/L(大约 $19.8 \times 10^9$ 微粒/L 较佳) |
| 抗 CD16 顺磁性凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD16, 克隆 3G8 的饱和剂量标记)                     | $5.5 \times 10^{11}$ 微粒/L                                  |
| 抗 CD4 顺磁性凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD4, 克隆 RFT4- $\gamma$ 或克隆 QS4120 的饱和剂量标记) | $1.2 \times 10^{10}$ 微粒/L                                  |

实施例 10: 红细胞, CD15+细胞、CD9+细胞、CD19+细胞、CD16+细胞、和 CD8+细胞凝集。

使用表 15 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。CD4+细胞从上清液中回收。

表 15

|                                                                          |                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)                                                       | 20 g/L                                                     |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水(10 X)                                                    | 100 ml/L                                                   |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)                                                       | 1 mL/L                                                     |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)                                                  | 50 mL/L                                                    |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)                                            | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                |
| 抗从 CD 15(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 MEM-158)                                        | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                |
| 抗人 CD 9(鼠 IgG 单克隆抗体, 克隆 MEM-61)                                          | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                |
| 抗 CD19 凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD19, (克隆 HIB19)的饱和剂量标记) | $0.1-30.0 \times 10^9$ 微粒/L(大约 $19.8 \times 10^9$ 微粒/L 较佳) |
| 抗 CD16 凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD16, (克隆 3G8)的饱和剂量标记)   | $5.5 \times 10^{11}$ 微粒/L                                  |
| 抗 CD8 凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD8, (克隆 HIT8a)的饱和剂量标记)   | $7.92 \times 10^{10}$ 微粒/L                                 |

实施例 11: 红细胞, CD15+细胞、CD9+细胞、CD19+细胞和 CD2+细胞凝集。

使用表 16 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。CD34+细胞从上清液中回收, 纯度>50%, 产量 >80%。

表 16

|                                                                           |                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)                                                        | 20 g/L                                                             |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水(10 X)                                                     | 100 ml/L                                                           |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)                                                        | 1 mL/L                                                             |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)                                                   | 50 mL/L                                                            |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)                                             | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                        |
| 抗人 CD 15(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 MEM-158)                                         | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                        |
| 抗人 CD 9(鼠 IgG 单克隆抗体, 克隆 MEM-61)                                           | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                        |
| 抗 CD19 凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD19, 克隆 HIB19 的饱和剂量标记)   | 0.1-30.0 × 10 <sup>9</sup> 微粒/L(大约 19.8 × 10 <sup>9</sup> 微粒/L 较佳) |
| 抗 CD2 凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD2, 克隆 d118.10.1 的饱和剂量标记) | 0.1-30.0 × 10 <sup>9</sup> 微粒/L(大约 3.0 × 10 <sup>10</sup> 微粒/L 较佳) |

实施例 12: 红细胞, CD15+细胞、CD9+细胞、CD2+细胞和 CD16+细胞凝集。

使用表 17 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。B 细胞从上清液中回收。

表 17

|                                                                           |                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)                                                        | 20 g/L                                                             |
| Dulbecco 磷酸缓冲盐水(10 X)                                                     | 100 ml/L                                                           |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)                                                        | 1 mL/L                                                             |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)                                                   | 50 mL/L                                                            |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)                                             | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                        |
| 抗人 CD 15(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 MEM-158)                                         | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                        |
| 抗人 CD 9(鼠 IgG 单克隆抗体, 克隆 MEM-61)                                           | 0.1-15 mg/L(大约 1.0 mg/L 较佳)                                        |
| 抗 CD2 凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD2, 克隆 d118.10.1 的饱和剂量标记) | 0.1-30.0 × 10 <sup>9</sup> 微粒/L(大约 3.0 × 10 <sup>10</sup> 微粒/L 较佳) |
| 抗 CD16 凝集微粒(亲和素包被的 4.3 微米直径顺磁性聚苯乙烯微粒用生物素标记的小鼠抗人 CD16, 克隆 3G8 的饱和剂量标记)     | 5.5 × 10 <sup>11</sup> 微粒/L                                        |

实施例 13: 红细胞, 成熟骨髓细胞、NK 细胞和 B 细胞凝集。

使用表 18 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。盐酸(4N)或氢氧化钠(4N)用来调节 pH 到 7.2 和 7.4 之间。抗 CD8, CD16, CD19, CD94, 和 CD161 抗体被生物素化。富集 CD4 T 细胞的细胞悬浮液从上清液中获得。从每个全血样品(图 1 提供 5 个供体的代表性数据)中回收大约 75 到 94%的 CD4 细胞。与之相比, 在使用密度-梯度分离的其他商品化产品中细胞回收是 50%或更少。CD4 细胞的平均纯度是 96.1%(见图 2, 12 个供体的代表性数据), 而使用密度-梯度分离的其他商品化产品纯化的 CD4 细胞的平均纯度是 86.7%。

表 18

|                                   |             |
|-----------------------------------|-------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)                | 2%          |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)                | 1 U/L       |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)           | 达最终体积       |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)     | 1 : 40 稀释   |
| 抗人 CD 15(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 MEM-158) | 1 mg/L      |
| 抗人 CD 9(鼠 IgG 单克隆抗体, 克隆 MEM-61)   | 1 mg/L      |
| 抗人 CD 8(克隆 HIT8a)                 | 1 mg/L      |
| 抗人 CD 16(克隆 3G8)                  | 1 mg/L      |
| 抗人 CD 19(克隆 HIB19)                | 1 mg/L      |
| 抗人 CD 94(克隆 HP3D9)                | 0.125 mg/mL |
| 抗人 CD 161(克隆 B199.2)              | 0.25 mg/mL  |

实施例 14: 红细胞, 成熟骨髓细胞、NK 细胞和 B 细胞凝集。

使用表 19 描述的试剂按照实施例 1 所述方法分离细胞。盐酸(4N)或氢氧化钠(4N)用来调节 pH 到 7.2 和 7.4 之间。抗 CD4, CD16, CD19, CD94, 和 CD161 抗体被生物素化。富集 CD8 T 细胞的细胞悬浮液从上清液中获得。从每个全血样本(图 3 提供 5 个供体的代表性数据)中回收大约 53 到 81%的 CD8 细胞。与之相比, 在使用密度-梯度分离的其他商品化产品中细胞回收是少于 52%, 细胞回收通常少于 35%。CD8 细胞的平均纯度是 93.9%(见图 4, 12 个供体的代表性数据), 而使用其他商品化产品纯化的 CD8 细胞的平均纯度是 84.2%。

表 19

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| 葡聚糖(平均分子量 413,000)                | 2%         |
| 肝素钠 (10,000 单位/ML)                | 1 U/L      |
| Hank 平衡盐溶液 (pH 7.2-7.4)           | 达最终体积      |
| 抗人血型糖蛋白 A(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 E4)     | 1 : 40 稀释  |
| 抗人 CD 15(鼠 IgM 单克隆抗体, 克隆 MEM-158) | 1 mg/L     |
| 抗人 CD 9(鼠 IgG 单克隆抗体, 克隆 MEM-61)   | 1 mg/L     |
| 抗人 CD 4(克隆 QS4120)                | 1 mg/L     |
| 抗人 CD 16(克隆 3G8)                  | 1 mg/L     |
| 抗人 CD 19(克隆 HIB19)                | 1 mg/L     |
| 抗人 CD 94(克隆 HP-3D9)               | 0.25 mg/mL |
| 抗人 CD 161(克隆 B199.2)              | 1 mg/mL    |

## 其他实施方案

尽管结合前文的详细描述和实施例对本发明作了描述, 以上的描述和实施例是用来阐明而并非限制本发明的范围, 本发明的范围由所附的权利要求的范围限定。本发明的其他方面、优点和改进是在权利要求的范围内。

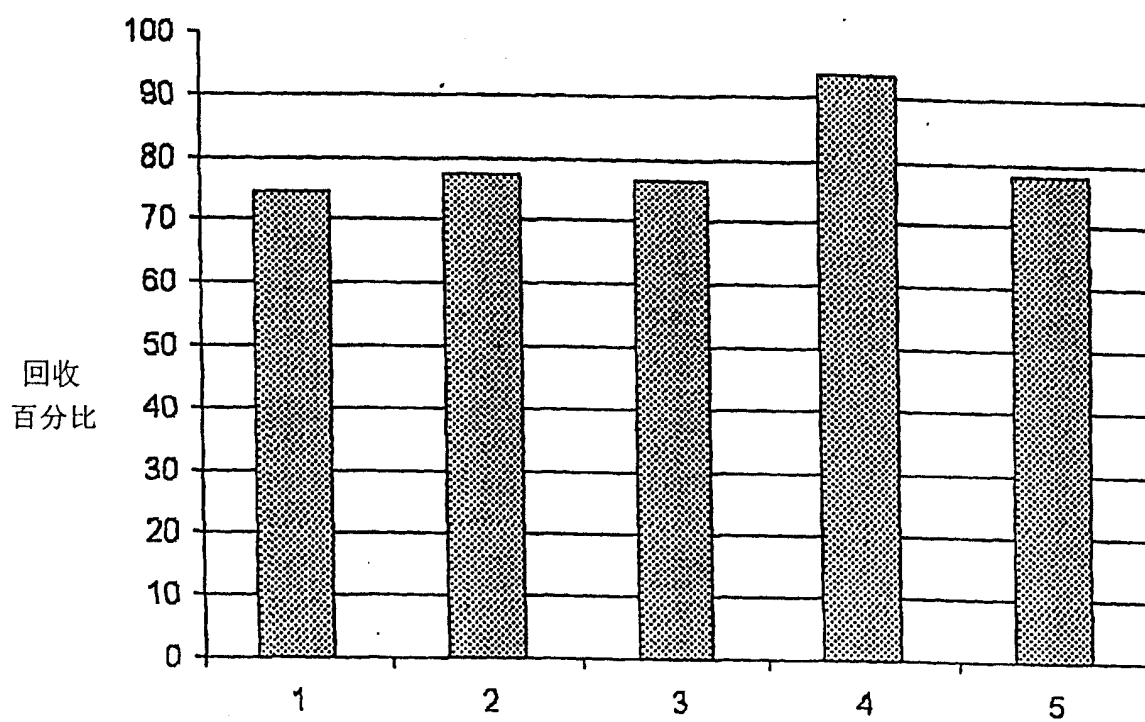


图 1

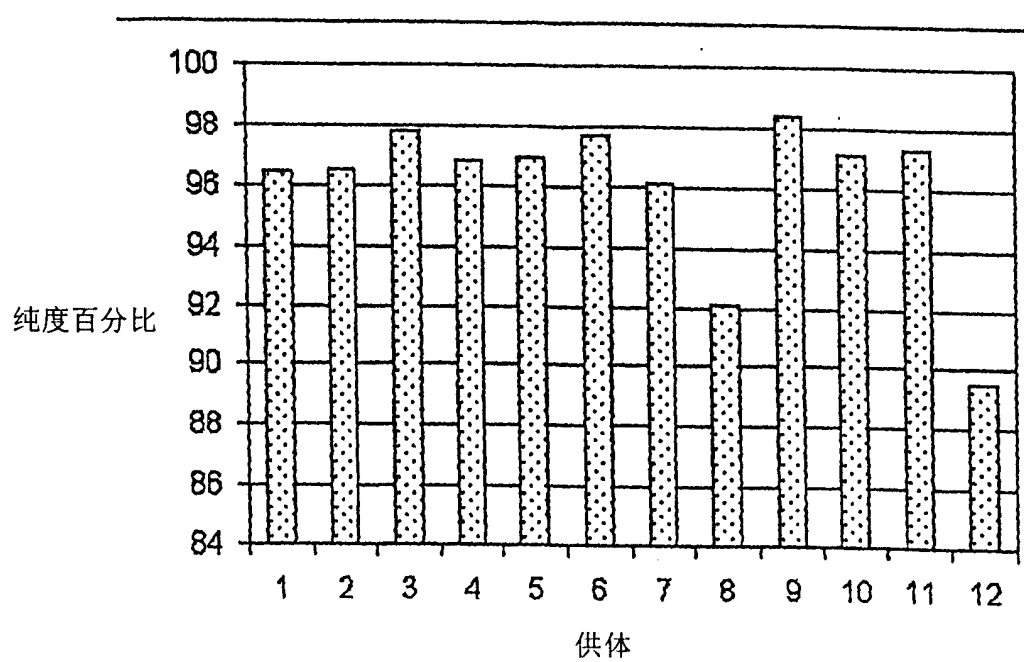


图 2

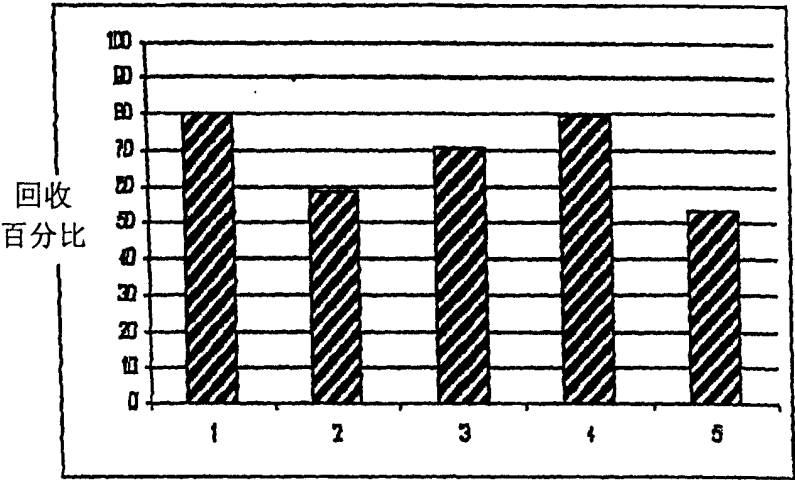


图 3

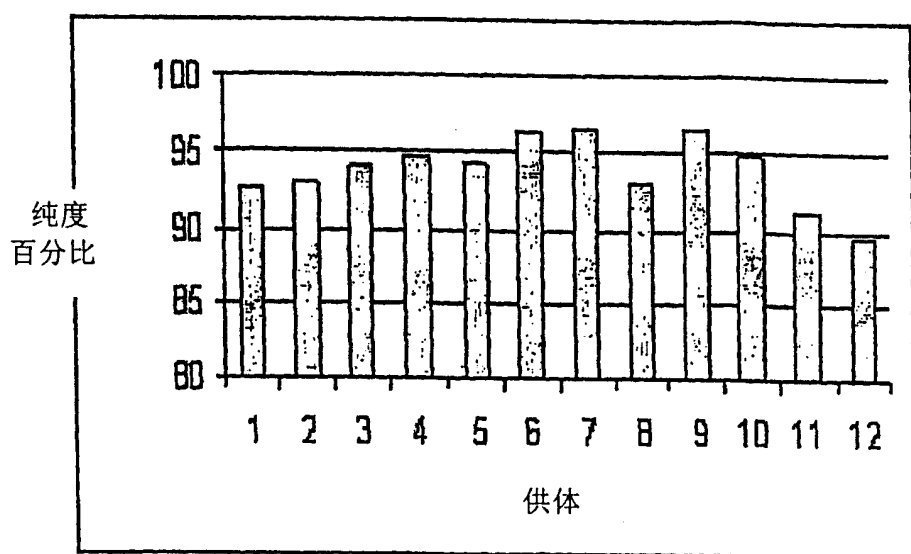


图 4