

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/555

G01N 33/569

C07K 16/28



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00809750. X

[45] 授权公告日 2005 年 9 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1218182C

[22] 申请日 2000.5.26 [21] 申请号 00809750. X

[30] 优先权

[32] 1999. 5.28 [33] US [31] 60/136,770

[32] 2000. 3.31 [33] US [31] 60/193,371

[32] 2000. 5.11 [33] US [31] 60/203,477

[86] 国际申请 PCT/CA2000/000616 2000. 5. 26

[87] 国际公布 WO2000/073794 英 2000. 12. 7

[85] 进入国家阶段日期 2001. 12. 28

[71] 专利权人 干细胞技术公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚

[72] 发明人 T·E·托马斯 C·皮特斯

P·兰斯卓普

审查员 石剑平

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

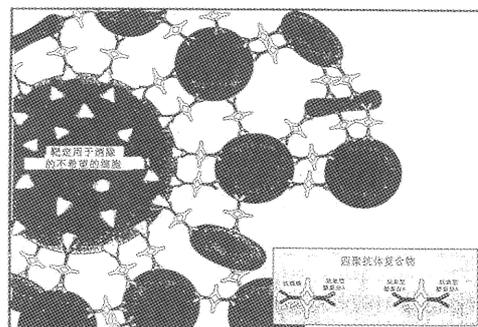
代理人 樊卫民

权利要求书 4 页 说明书 38 页 附图 1 页

[54] 发明名称 利用免疫玫瑰花结分离细胞的方法

[57] 摘要

本发明涉及利用免疫玫瑰花结分离细胞的方法。该方法包括使含有具核细胞和红细胞的样品接触一种可使具核细胞与红细胞形成免疫玫瑰花结的抗体组合物。该抗体组合物优选地含有双功能抗体或四聚抗体复合物。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种负选择方法，用于从含有希望的细胞、红细胞和不希望的细胞之样品中富集并回收希望的细胞，其包括：

(1) 在允许不希望的细胞与红细胞可形成免疫玫瑰花结的条件下，使样品接触一种抗体组合物，后者含有：(a)至少一种抗体，其可与不希望的细胞上的抗原结合，该抗体与(b)至少一种可与红细胞结合的抗体直接或间接地连接；和

(2)从样品中分离免疫玫瑰花结，获得富含希望的细胞的样品。

2. 根据权利要求1的方法，其中在步骤(2)中通过密度分离法分离免疫玫瑰花结。

3. 根据权利要求1的方法，其中在步骤(2)中通过沉淀法分离免疫玫瑰花结。

4. 根据权利要求1的方法，用于单核细胞的富集和回收，其中抗体(a)包含能与抗原(1)CD2和/或CD3和/或CD5；(2)CD19和/或CD20和/或CD21和/或CD22和/或CD24；和(3)CD66b和/或CD16结合的抗体。

5. 根据权利要求4的方法，其中抗体(a)还包含CD56和/或CD8。

6. 根据权利要求1的方法，用于B细胞的富集和回收，其中抗体(a)包含能与抗原(1)CD2和/或CD3和/或CD4和CD8两者；(2)CD16和/或CD66b和/或CD11b和/或CD15；和(3)CD36和/或CD14结合的抗体。

7. 根据权利要求6的方法，其中抗体(a)还包含CD56。

8. 根据权利要求1的方法，用于T细胞的富集和回收，其中抗体(a)包含能与抗原(1)CD16和/或CD66b和/或CD11b和/或CD15；(2)CD19和/或CD20和/或CD21和/或CD22和/或CD24和/或Ig；和(3)CD36和/或CD14结合的抗体。

9. 根据权利要求8的方法，其中抗体(a)还包含CD56。

10. 根据权利要求1的方法，用于CD4⁺T细胞的富集和回收，

其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD8; (2) CD16 和/或 CD66b 和/或 CD11b 和/或 CD15; (3) CD19 和/或 CD20 和/或 CD21 和/或 CD22 和/或 CD24 和/或 Ig; 和 (4) CD36 和/或 CD14 结合的抗体。

11. 根据权利要求 10 的方法, 其中抗体 (a) 还包含 CD56。

12. 根据权利要求 1 的方法, 用于 CD8⁺ T 细胞的富集和回收, 其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD4; (2) CD16 和/或 CD66b 和/或 CD11b 和/或 CD15; (3) CD19 和/或 CD20 和/或 CD21 和/或 CD22 和/或 CD24 和/或 Ig; 和 (4) CD36 和/或 CD14 结合的抗体。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其中抗体 (a) 还包含 CD56。

14. 根据权利要求 1 的方法, 用于 NK 细胞的富集和回收, 其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD3; (2) CD66b 和/或 CD15; (3) CD19 和/或 CD20 和/或 CD21 和/或 CD22 和/或 CD24; 和 (4) CD36 和/或 CD14 结合的抗体。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中抗体 (a) 还包含 CD4。

16. 根据权利要求 1 的方法, 用于嗜碱性粒细胞的富集和回收, 其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD3; (2) CD2; (3) CD14; (4) CD15; (5) CD16; (6) CD19; (7) CD24; (8) CD34; (9) CD36; (10) CD56 和 (11) CD45RA 结合的抗体。

17. 根据权利要求 1 的方法, 用于树突细胞的富集和回收, 其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD3; (2) CD14; (3) CD16; (4) CD19; (5) CD34; (6) CD56 和 (7) CD66b 结合的抗体。

18. 根据权利要求 1 的方法, 用于造血先祖细胞的富集和回收, 其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD2 和/或 CD3; (2) CD16 和/或 CD66b; (3) CD19 和/或 CD24; 和 (4) CD14 结合的抗体。

19. 根据权利要求 18 的方法, 其中抗体 (a) 还包含 CD56。

20. 根据权利要求 1 的方法, 用于类红细胞先祖细胞的富集和回收, 其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD2 和/或 CD3; (2) CD16 和/或 CD66b; (3) CD19 和/或 CD24; 和 (4) CD14; (5) CD45RA; (6) CD33 和 (7) CD10 结合的抗体。

21. 根据权利要求 20 的方法，其中抗体 (a) 还包含 CD56。

22. 根据权利要求 1 的方法，用于髓先祖细胞的富集和回收，其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD2 和/或 CD3；(2) CD16 和/或 CD66b；(3) CD19 和/或 CD24；和 (4) CD14；(5) CD71；和 (6) CD10 结合的抗体。

23. 根据权利要求 22 的方法，其中抗体 (a) 还包含 CD56。

24. 根据权利要求 1 的方法，用于巨核细胞先祖细胞的富集和回收，其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD2 和/或 CD3；(2) CD16 和/或 CD66b；(3) CD19 和/或 CD24；和 (4) CD14；(5) CD45RA；(6) CD10 结合的抗体。

25. 根据权利要求 24 的方法，其中抗体 (a) 还包含 CD56。

26. 根据权利要求 1 的方法，用于非造血肿瘤细胞的富集和回收，其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD45 和 (2) CD66b 结合的抗体。

27. 根据权利要求 26 的方法，其中抗体 (a) 还包含 CD2、CD16、CD19、CD36 和 CD38。

28. 根据权利要求 1 的方法，用于上皮肿瘤细胞的富集和回收，其中抗体 (a) 包含能与抗原 (1) CD45 和 (2) CD66b 结合的抗体。

29. 根据权利要求 28 的方法，其中抗体 (a) 还包含 CD2、CD16、CD19、CD36 和 CD38。

30. 根据权利要求 1 的方法，用于从包含粒细胞的样品中富集和回收单核细胞，其中抗体 (a) 包含能与抗原 CD66b 或 CD66abce 结合的抗体。

31. 根据权利要求 30 的方法，其中样品是贮存的全血或脐带血。

32. 根据权利要求 31 的方法，其中样品中粒细胞的密度低于新鲜全血的粒细胞密度。

33. 根据权利要求 1 的方法，其中抗体组合物含有四聚抗体复合物，其中含有 (a) 一种可与不希望的细胞上的抗原结合的抗体；和 (b) 一种可与红细胞结合的抗体；和 (c) 可与 (a) 和 (b) 所述抗体的 Fc 片段结合的两种抗体，其中 (a) 和 (b) 中的抗体来自相同动物种，(c) 中的抗体与

(a)和(b)中的抗体来自不同动物种。

34. 一种从含有具核细胞和红细胞的样品中分离具核细胞的方法，包括：

(1) 在允许具核细胞与红细胞形成免疫玫瑰花结的条件下，使样品接触一种抗体组合物，后者含有：(a)至少一种抗体，其可与待分离的具核细胞上的抗原结合，该抗体与(b)至少一种可与红细胞结合的抗体直接或间接地连接；和

(2)将免疫玫瑰花结与剩余样品分离。

35. 根据权利要求 34 的方法，其中抗体组合物含有一种双功能抗体，其中可与具核细胞结合的抗体与可与红细胞结合的抗体直接连接。

36. 根据权利要求 34 的方法，其中抗体组合物含有四聚抗体复合物，其中含有(a)一种可与具核细胞上的抗原结合的抗体；和(b)一种可与红细胞结合的抗体；和(c)可与(a)和(b)所述抗体的 Fc 片段结合的两 种抗体，其中(a)和(b)中的抗体来自相同动物种，(c)中的抗体与(a)和(b)中的抗体来自不同动物种。

37. 根据权利要求 34 的方法，其中具核细胞选自：T 细胞、B 细胞、NK 细胞、树突细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、树突细胞、浆细胞、肥大细胞、造血先祖细胞、造血干细胞、先祖细胞和肿瘤细胞。

38. 根据权利要求 34 的方法，其中可与红细胞结合的抗体是抗血型糖蛋白 A。

39. 根据权利要求 34 的方法，其还包括(3)裂解免疫玫瑰花结中的红细胞，以分离细胞。

40. 根据权利要求 1 的方法，其还包括在步骤(1)中加入引起红细胞凝集的化合物。

41. 根据权利要求 40 的方法，其中所述化合物是羟乙基淀粉。

42. 根据权利要求 3 的方法，其还包括在步骤(2)中加入沉淀试剂。

43. 根据权利要求 42 的方法，其中所述沉淀试剂是羟乙基淀粉、明胶或甲基纤维素。

利用免疫玫瑰花结分离细胞的方法

发明领域

本发明涉及利用免疫玫瑰花结(immunorosettes)分离细胞的方法。本发明包括在本发明的方法中使用的新型抗体组合物。

发明背景

在许多用途中,希望富集(或者,排除)生物样品中的某些细胞群体。血液学、免疫学和肿瘤学领域依赖于外周血样品和来自有关组织(如骨髓、脾脏、胸腺和胎肝)的细胞悬液。从这些异源样品中分离特定细胞型对于这些领域的研究、对某些恶性和免疫/造血疾病的诊断和治疗是关键。

纯化的免疫细胞(如T细胞和抗原递呈细胞)群体是研究免疫功能所必需的,并在免疫治疗中使用。对细胞、分子和生物化学过程的研究需要分析分离的某些细胞型。大量技术已经用于分离T细胞亚组、B细胞、嗜碱性粒细胞、NK细胞和树突细胞。

造血干细胞的分离也已经是备受关注的领域。纯干细胞群体将促进对血细胞生成的研究,来自外周血和/或骨髓的造血细胞的移植越来越多地与高剂量化学治疗和/或放射治疗结合用于治疗多种疾病,包括恶性、非恶性和遗传疾病。这些移植物中的极少量细胞能长期造血重建,因此有一种强烈需求来发展造血干细胞的纯化技术。此外,严重的并发症和实际上移植方法的成功很大程度上依赖于用于去除移植物中对移植受体造成危险的细胞的方法的效果。这些细胞包括引起异体移植中移植物抗宿主疾病(GVHD)的T淋巴细胞,和可引起恶性生长复发的自体移植物中的肿瘤细胞。通过除去不必要的细胞,从而减少需输入的细胞保藏剂的体积,缩减移植物也是重要的。

在某些情况中,从生物样品如骨髓移植物中除去或排除肿瘤细胞

是希望的。支气管、乳房导管和胃肠道及泌尿生殖道的上皮癌代表了今天所能见到的主要的实体瘤类型。微转移肿瘤细胞迁移被认为是上皮癌患者的一个重要的预后因素 (Braun 等人, 2000; Vaughan 等人, 1990)。检测这些转移细胞的能力受组织或液体取样的效率和肿瘤检测方法灵敏度的限制。一种富集血样中循环上皮肿瘤细胞的技术会提高检测转移疾病的能力, 并将促进对这些稀少细胞的研究和确定使疾病扩散的生物学变化。

造血细胞和免疫细胞已经根据物理性质 (如密度) 和对可杀伤循环细胞的某些药理试剂的敏感性分离。抗细胞表面抗原的单克隆抗体的出现已经大大扩展了区别和分离不同细胞型的能力。用单克隆抗体从血液和相关细胞悬液中分离细胞群体有两种基本方法。它们的不同之处在于是用抗体区别、标记希望的还是不希望的细胞。

在正选择技术中, 希望的细胞用抗体标记, 并从剩余的未标记/不必要的细胞中移出。在负选择中, 标记并移出不需要的细胞。抗体/补体处理和免疫毒素的使用是负选择技术, 但是 FACS 分选和大多数分批免疫吸附技术能适用于正选择和负选择两者。在免疫吸附技术中, 细胞用单克隆抗体选择, 优先结合到能从剩余细胞中去除的表面上, 例如珠柱、烧瓶、磁性颗粒。免疫吸附技术在临床上和研究中受到欢迎, 因为它们保持了用单克隆抗体导向细胞的高特异性, 但是不同于 FACS 分选, 它们能被放大, 以直接处理临床收获物中的大量细胞, 它们避免了使用细胞毒性试剂 (如免疫毒素) 和补体的危险。然而, 它们需要利用“装置”或细胞分离表面, 如珠柱、淘洗瓶或磁铁。

分离造血干细胞、免疫细胞和循环上皮肿瘤细胞的现有技术全都包括一个初始步骤, 来除去红细胞, 然后是对一种装置或人工颗粒的抗体介导的粘附。(Firat 等人, 1988; de Wynter 等人, 1975; Shpall 等人, 1994; Thomas 等人, 1994; Miltenyi Biotec Inc., Gladbach, 德国)。在正选择的情况中, 还有另外一个步骤: 从该装置或颗粒中去除细胞。所有这些多个步骤都需要时间并且导致细胞损失。Slaper-Cortenbach 等人(1990)描述了一种利用形成免疫玫瑰花结净化

骨髓的普通急性白血病(cALL)细胞的方法。该方法需要首先从骨髓样品中去除红细胞，并用可结合 cALL 细胞的抗体标记。标记的红细胞然后被加回 cALL 细胞已形成免疫玫瑰花结的样品中。当随后还有一个补体介导的 cALL 细胞裂解步骤时，该排除方法效果最好。

密度分离通常用于将外周血单核细胞与粒细胞和红细胞分离。Ficoll(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, 瑞典)是用于此用途的最常用的密度溶液。在 Ficoll 密度分离中，全血在 Ficoll 上分层，然后离心。红细胞和粒细胞位于细胞沉淀中，而单核细胞保持在 Ficoll 血浆界面。该技术的成功依赖于单核细胞和粒细胞密度的不同。如果全血贮存超过 24 小时，粒细胞密度改变，将与红细胞一起沉淀。在一次密度分离中不能从细胞密度改变的贮存的血液或样品中获得纯单核细胞悬液。

由上可见，在本领域中需要提供新型方法，用来从生物样品中分离希望的细胞或去除不希望的细胞。

发明概述

本发明已经发展了一种方法，通过使细胞与样品中已经存在的红细胞形成免疫玫瑰花结分离细胞。与现有技术方法相比，本发明的方法是一种更加简单但同样有效的免疫亲和技术。没有“装置”或不需要细胞悬液中通常不存在的人工分离表面(例如，磁性颗粒、亲和柱)。不需要首先从样品中去除红细胞，然后在用抗体标记后重新导入它们。特定细胞型与样品中存在的自体红细胞交联，随后通过沉淀或离心去除玫瑰花结。

因此，在一个实施方案中，本发明提供一种从含有具核细胞和红细胞的样品中分离具核细胞的方法，其包括：

(1) 在具核细胞与红细胞可形成免疫玫瑰花结的条件下，使样品接触一种抗体组合物，后者含有：(a)至少一种抗体，其可与将要分离的具核细胞上的抗原结合，该抗体与(b)至少一种可与红细胞结合的抗体直接或间接地连接；和

(2)从样品中去除免疫玫瑰花结。

该方法能在正选择和负选择方案中使用。该方法适用于含有红细胞的任何样品，包括全血、骨髓、胎肝、脐带血、棕黄层悬液、胸膜和腹膜渗出液和胸腺细胞及脾细胞样品。

附图简述

现在参照附图描述本发明，其中：

图1是使用四聚抗体复合物在不希望的具核细胞周围形成的红细胞玫瑰花结的示意图。

发明详述

I. 发明方法

如上所述，本发明涉及一种通过细胞与红细胞形成免疫玫瑰花结分离细胞的方法。

最广义的来讲，本发明提供一种从含有具核细胞和红细胞的样品中分离具核细胞的方法，其包括：

(1) 在具核细胞与红细胞可形成免疫玫瑰花结的条件下，使样品接触一种抗体组合物，后者含有：(a)至少一种抗体，其可与将要分离的具核细胞上的抗原结合，该抗体与(b)至少一种可与红细胞结合的抗体直接或间接地连接；和

(2)从样品中去除免疫玫瑰花结。

该方法能在正选择和负选择方案中使用。在正选择中，希望的细胞形成玫瑰花结。在这种实施方案中，该方法进一步包括裂解免疫玫瑰花结中的红细胞和分离希望的细胞的步骤。因此在正选择方法中，抗体组合物将含有(a)至少一种抗体，其对人们希望获得或从样品中分离的具核细胞特异。

优选地，本发明的方法在负选择方案中使用。在负选择中，希望的细胞不形成免疫玫瑰花结，而是在去除免疫玫瑰花结后保留在样品中。在负选择方法中，抗体组合物将含有(a)至少一种抗体，其对人们

希望从样品中去除的细胞特异。因此，本发明提供一种负选择方法，用于在含有希望的细胞、红细胞和不希望的细胞的样品中富集并回收希望的细胞，该方法包括：

(1) 在不希望的细胞与红细胞可形成免疫玫瑰花结的条件下，使样品接触一种抗体组合物，后者含有：(a)至少一种抗体，其可与不希望的细胞上的抗原结合，该抗体与(b)至少一种可与红细胞结合的抗体直接或间接地连接；和

(2)从剩余样品中分离免疫玫瑰花结，以获得富含希望的细胞的样品。

利用多种技术，能将在步骤(1)中红细胞和不需要的细胞之间形成的免疫玫瑰花结与希望的细胞分离。在一个实施方案中，含有免疫玫瑰花结的样品在浮力密度溶液(如 Ficoll-Hypaque)上分层并离心。免疫玫瑰花结沉淀，而希望的细胞保留在浮力密度溶液与样品之间的界面上。然后从界面上移出希望的细胞供进一步使用。在另外一个实施方案中，在步骤(1)中获得的含有免疫玫瑰花结的样品与一种沉淀试剂(如羟乙基淀粉/明胶或甲基纤维素)混合，并使玫瑰花结沉淀。需要的细胞保留在悬液中，移出用于进一步用途。在另一个实施方案中，在步骤(1)中获得的含有免疫玫瑰花结的样品在借助或不借助离心或反向流动淘析的情况下沉淀。希望的细胞保留在悬液中，移出用于进一步的用途。

下面更详细地描述本发明使用的抗体组合物。

本发明的方法可在含有红细胞的生物样品(包括血液(特别是脐带血和全血)、骨髓、胎肝、棕黄层悬液、胸膜和腹膜渗出液和胸腺细胞和脾细胞悬液)的处理中使用。令人惊讶的是，发明者发现该方法能用来直接从全血或全骨髓中除去细胞，而不需要预先处理。这使本发明的方法具有优于现有方法的一个重要优点。特别是，红细胞中不须被去除、标记和加回样品中。

本发明的方法能用来制备富含任何细胞型的样品，这些细胞型包括但不限于：T细胞、B细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、嗜碱

性粒细胞、肥大细胞、先祖细胞、干细胞和肿瘤细胞。

在一个实施方案中，本发明的方法能用来由骨髓样品制备造血先祖和干细胞制品。例如，本发明的方法可在负选择方案中用来从样品中排除或净化 B 和 T 淋巴细胞、单核细胞、NK 细胞、粒细胞和/或肿瘤细胞，以制备造血先祖和干细胞制品，以在本领域技术人员明白的移植以及其他治疗方法中使用。例如，在异体移植中能从供体中收集骨髓或血液，并用此处描述的方法富集先祖和干细胞。利用负选择，制品中的人造血先祖和干细胞不被抗体覆盖，或修饰，使其十分适用于移植和本领域技术人员明白的其他治疗用途。

在另一个实施方案中，本发明的方法能用来从血液中分离并回收成熟树突细胞和它们的前体。树突细胞有许多有用的用途，包括作为能在体外和体内都激活 T 细胞的抗原递呈细胞。一个例子是，树突细胞能在体外装载（脉冲）一种肿瘤抗原，并且体内注射，诱导抗肿瘤 T 细胞反应。

在另一个实施方案中，本发明的方法也可用来由样品（如血液和骨髓）制备细胞悬液，其富含所选的分化细胞型，如 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞、树突细胞、嗜碱性粒细胞和浆细胞。这使得能研究细胞与细胞的特异相互作用，包括生长因子产生和对生长因子的反应。这也允许对特异细胞型进行分子和生物化学分析。富含 NK 细胞、树突细胞和 T 细胞的细胞制品也能在针对某些恶性疾病的免疫治疗中使用。

在另一个实施方案中，本发明的方法能用来从样品中分离肿瘤细胞，例如非造血转移肿瘤细胞。该方法在检测来自患者的血液、骨髓、腹膜和胸膜渗出液的非造血肿瘤细胞中 useful，以帮助转移疾病的诊断和检测，监视转移疾病的发展，监视治疗的效果。

II. 抗体组合物

本发明包括在本发明的方法中使用的抗体组合物。该抗体组合物将包含：(a)至少一种抗体，它能与具核细胞上的一种抗原结合，该抗

体与(b)至少一种能与红细胞上的抗原结合的抗体直接或间接地连接。

术语“至少一种抗体”意指抗体组合物至少包含一种类型的抗体(与至少一个抗体分子不同)。一种类型的抗体是指一种可与特定抗原结合的抗体。例如,可与抗原 CD2 结合的抗体被认为是一种类型的抗体。优选地,本发明的抗体组合物含有(a)一种以上的可与具核细胞结合的抗体类型。

两种抗体(a)和(b)可通过制备的双功能或双特异性抗体直接连接。两种抗体(a)和(b)也可通过例如制备的四聚抗体复合物间接连接。所有这些都以下描述。

一方面,对具核细胞特异的抗体直接与红细胞特异的抗体连接。在一个实施方案中,本发明的抗体组合物含有双功能抗体,其包含至少一种对具核细胞特异的抗体,其与(b)至少一种红细胞特异性抗体直接连接。双功能抗体可通过将一种抗体与另一种抗体化学偶联制备,例如,使用 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫)丙酸酯(SPDP)。

在另一个实施方案中,抗体组合物含有双特异性抗体。双特异性抗体含有红细胞特异的抗体的可变区,和对于将要分离的具核细胞表面上的至少一种抗原特异的可变区。双特异性抗体可通过形成杂种杂交瘤制备。杂种杂交瘤可以用本领域周知的方法制备;例如 Staerz 和 Bevan (1986, PNAS(USA) 83:1453)和 Staerz 和 Bevan (1986, Immunology Today, 7:241)中所公开的。双特异性抗体也可通过使用如 Staerz 等人(1985, Nature, 314:628)和 Perez 等人(1985, Nature 316:354)所述的方法通过化学方法构建,或通过重组免疫球蛋白基因构建体的表达构建。

另一方面,本发明的抗体组合物含有:(a)至少一种对具核细胞型特异的抗体,其与(b)至少一种红细胞特异的抗体间接连接。“间接连接”意指抗体(a)和抗体(b)不是彼此直接共价连接,而是通过连接部分(如免疫复合物)连接。在一个优选实施方案中,通过制备四聚抗体复合物将具核细胞型的抗体与红细胞特异的抗体间接连接。可以通过将能与红细胞结合的第一种单克隆抗体与能与将要分离的具核细胞结

合的第二种单克隆抗体混合制备四聚抗体复合物。第一种和第二种单克隆抗体来自第一种动物种。第一种和第二种抗体与大约等摩尔量的第二种动物种的单克隆抗体反应，后者抗第一种动物种的抗体的 Fc-片段。第一种和第二种抗体也可与大约等摩尔数量的第二种动物种的单克隆抗体的 F(ab')₂ 片段反应，后者抗第一种动物种的抗体的 Fc-片段。(参见授予 Lansdorp 的美国专利号 4,868,109,关于四聚抗体复合物及其制备方法的描述在此引用作为参考)。

优选地，红细胞特异的抗体是抗-血型糖蛋白 A。本发明的抗体组合物中含有的抗-血型糖蛋白 A 用来结合红细胞。血型糖蛋白 A 特异的单克隆抗体的例子有 10F7MN(美国专利号 4,752,582,细胞系: ATCC 保藏号 HB-8162)和 D2.10(Immunotech, 马赛, 法国)。

优选地，具核细胞特异的抗体是一种抗体组合。抗体组合可以对许多细胞型特异，使得可以从样品中去除许多细胞型。当使用抗体组合时，每种抗体将与一种红细胞特异的抗体连接(直接或间接地)。

在一个优选的实施方案中，抗体组合物是一种四聚复合物，其含有(a) 可结合红细胞的抗-血型糖蛋白 A 抗体，(b)一种可与人们希望形成免疫玫瑰花结的具核细胞型结合的抗体，和(c)可与(a)和(b)两者的 Fc 部分(任选的 F(ab')₂ 抗体片段)结合的抗体。(a):(b):(c)的摩尔比可能约为 1:3:4。当要分离几种类型的细胞时，可用几种抗-具核细胞抗体(b)制备复合物。然后将复合物一起混合，形成一种抗体组合物，供本发明的方法使用。图 1 是通过四聚抗体复合物形成的玫瑰花结的示意图。

在本发明内容中，抗体被理解为包括单克隆抗体和多克隆抗体、抗体片段(例如，Fab 和 F(ab')₂)、嵌合抗体、双功能或双特异性抗体和四聚抗体复合物。如果以适当的亲和力(结合常数)结合，例如大于或等于 10^7 M^{-1} ，则认为抗体对具核细胞或红细胞表面上的选择抗原具有反应性。

单克隆抗体优选地在本发明的抗体组合物中使用。对于具核细胞表面上的选择抗原特异的单克隆抗体可以利用常规技术容易地产生。

例如，单克隆抗体可以通过 Kohler 和 Milstein 1975 发展的杂交瘤技术产生(Nature 256,495-497; 参见美国专利号 RE 32,011、4,902,614、4,543,439 和 4,411,993, 在此引用作为参考; 参见《单克隆抗体, 杂种瘤: 生物学分析的一个新方面》, Plenum Press, Kennett, McKearn, Bechtol (编) 1980, 和《抗体: 实验室手册》, Harlow 和 Lane(编), 冷泉港实验室出版社, 1988)。也可利用其他技术构建单克隆抗体(例如, 参见 William D. Huse 等人, 1989, “在 λ 噬菌体中产生免疫球蛋白组成成分大组合文库”, Science 246:1275-1281, L. Sastry 等人, 1989, “为了产生单克隆催化抗体, 免疫学组成成分在大肠杆菌中的克隆: 重链可变区特异 cDNA 文库的构建”, Proc Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-5732; Kozbor 等人, 1983 Immunol. Today 4,72, 关于人 B 细胞杂交瘤技术; Cole 等人, 1985,《癌症治疗中的单克隆抗体》, Allen R. Bliss, Inc., 77-96 页, 关于生产人单克隆抗体的 EBV-杂交瘤技术; 参见 Michelle Alting-Mees 等人, 1990, “单克隆抗体表达文库: 杂交瘤的一种快速替代” Strategies in Molecular Biology 3:1-9)。为了生产对抗原有特异反应性的抗体, 能免疫化学筛选杂交瘤细胞, 并可分离单克隆抗体。

抗体可以用常规技术切成片段, 并用与以上对于完整抗体相同的方法依用途筛选这些片段。例如, $F(ab')_2$ 片段能通过用胃蛋白酶处理抗体产生。可处理产生的 $F(ab')_2$ 片段, 还原二硫桥, 产生 Fab' 片段。

本发明也涉及嵌合抗体衍生物, 即结合了非人动物可变区和人恒定区的抗体分子。嵌合抗体分子可包括, 例如, 来自小鼠、大鼠或其他种的抗体的抗原结合域, 及人恒定区。已经描述了多种制备嵌合抗体的方法, 它们能用来制备含有可识别分化细胞或肿瘤细胞表面上的选择抗原的免疫球蛋白可变区的嵌合抗体。参见, 例如, Morrison 等人, 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81,6851; Takeda 等人, 1985, Nature 314:452; Cabilly 等人, 美国专利号 4,816,567; Boss 等人, 美国专利号 4,816,397; Tanaguchi 等人, 欧洲专利公开文本 EP171496; 欧洲专利公开文本 0173494, 英国专利 2177096B。

双功能抗体可通过化学偶联、体细胞杂交或遗传工程技术制备。

化学偶联是基于含有 ϵ -氨基或绞链区硫醇基的同型和异型双功能试剂的使用。同型双功能试剂如 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)(DNTB)在两个 Fab 之间产生二硫键, O-次苯基二马来酰亚胺(O-PDM)在两个 Fab 之间产生硫醚键(Brenner 等人, 1985, Glennie 等人, 1987)。异型双功能试剂如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫)丙酸酯(SPDP)结合抗体的暴露氨基和 Fab 片段, 而无论类型或同种型如何(Van Dijk 等人, 1989)。

体细胞杂交包括两种建立的杂种瘤的融合, 产生四合瘤(quadroma)(Milstein 和 Cuello, 1983), 或一种建立的杂交瘤与来自用第二种抗原免疫的小鼠的淋巴细胞的融合, 产生三合瘤(trioma)(Nolan 和 Kennedy, 1990)。使每种杂交瘤细胞系对特异抗药性标记有抗性(De Lau 等人, 1989), 或用不同荧光染料标记每种杂交瘤并分选出异源荧光细胞(Karawajew 等人, 1987), 选择杂种杂交瘤。

遗传工程包括基于重组 DNA 的技术的使用, 以将编码抗体特异片段的 DNA 序列连接于质粒中, 并表达重组蛋白。双特异性抗体也能使用接头通过结合两种单链 Fv(scFv) 片段制备为单一共价结构(Winter 和 Milstein, 1991); 作为共表达来自转录因子 fos 和 jun 的序列的亮氨酸拉链(Kostelny 等人, 1992); 共表达 p53 作用域的螺旋-转角-螺旋(Rheinnecker 等人, 1996), 或 diabodies(Holliger 等人, 1993)。

表 1 提供针对具核细胞上特定人抗原的抗体的例子, 它们可在本发明的方法中使用。本发明的方法也可用于其他物种。针对具核细胞的一种或多种抗体的选择将取决于样品的性质、将要富集或排除的细胞的选择, 和该方法是正选择还是负选择方法。在所有情况中, 当在本发明的方法中使用, 针对将要形成免疫玫瑰花结的具核细胞的抗体将与红细胞特异的抗体直接或间接连接。

本发明的方法和抗体组合物优选地在负选择方案中, 用来制备一种富含特定细胞型的细胞制品。这通过使用缺乏针对希望分离的特定细胞型的抗体的抗体组合物实现。因此, 本发明提供一种抗体组合物,

用于在含有希望的细胞、红细胞和不希望的细胞的样品中富集和回收希望的细胞，该抗体组合物含有(a)至少一种可与不希望的细胞上的抗原结合的抗体，其与(b)至少一种可结合红细胞的抗体连接。表2列出了可在本发明的负选择方案中用于人体细胞的抗体组合物的具体实施方案。该表提供了能在上述方法中用作抗体(a)富集特定细胞型的抗特定抗原抗体的列表和混合配方(鸡尾酒)。在大多数情况中，提供了必需抗体的几种选择，以及几种任选的抗体。例如，为了富集T细胞，抗体(a)可以是抗下列成分的抗体的鸡尾酒：(1)CD16和/或CD66b和/或CD11b和/或CD15；(2)CD19和/或CD20和/或CD21和/或CD22和/或CD24和/或Ig；和(3)CD36和/或CD14。鸡尾酒可任选地含有抗CD33和/或CD56和/或IgE和/或CD41的抗体。除了表2列出的抗体组合外，本领域技术人员应当理解，也可用其他抗体组合富集特定细胞型，如美国专利号5,877,299所述，在此引用作为参考。由于本发明涉及制备富集细胞制品的免疫玫瑰花结的制备，本领域技术人员应当理解，也可使用其他抗体和抗体组合。

本发明的方法和抗体组合物可在正选择方案中，用来制备一种细胞制品，其中希望的细胞形成免疫玫瑰花结。下面列出了在正选择方案中有用的抗体组合的一些例子。

为了用正选择方法分离非造血肿瘤细胞，抗体组合物包含对肿瘤细胞表达的非造血抗原特异的抗体，如抗乳癌和肺癌和成神经细胞瘤细胞表面上表达的抗原的抗体。上皮肿瘤细胞上表达的非造血抗原的抗体可从商业来源获得(如表3所示)，或可用本领域周知的技术制备。

为了用正选择方法分离B细胞，抗体组合物含有抗CD24和/或CD19和/或CD20和/或CD22的抗体。

为了用正选择方法分离T细胞，抗体组合物含有抗CD3和/或CD2和/或CD5和/或CD4和CD8两者的抗体。

为了用正选择方法分离NK细胞，抗体组合物含有抗CD56的抗体。

为了用正选择方法分离粒细胞，抗体组合物含有抗CD16和/或

CD66e 和/或 CD66b 的抗体。

为了用正选择方法分离单核细胞，抗体组合物含有抗 CD14 的抗体。

下列非限制性实施例说明本发明：

实施例

实施例 1

四聚体的制备

为了制备在本发明的方法中使用的四聚抗体复合物，可使用下列方案：(a)使 1mg 细胞特异性抗体形成玫瑰花结(例如抗-CD2、CD3、CD4、CD8、CD14、CD16、CD19 等)；(b)加入 3 mg 抗-血型糖蛋白 A 抗体 (抗红细胞)，混合均匀；(c)然后加入 4.0 mg P9 抗体或 2.72 mg P9 F(ab')₂ 抗体片段。37℃ 温育过夜。P9 抗体与步骤(a)和(b)中加入的抗体的 Fc 部分结合，形成四聚抗体复合物。关于四聚物制备的更多信息，参见授予 Lansdorp 的美国专利号 4,868,109，在此引用作为参考。含有抗表达的抗原或具核细胞的不同抗体的四聚抗体复合物分开制备，然后混合。

抗体组合物根据人们希望排除哪些细胞通过结合不同的四聚抗体复合物制备。不同的四聚抗体复合物的浓度不同：抗具核细胞上表达的抗原的抗体一般在四聚复合物中为 10-30 μg/mL。该组合物然后向细胞中 1/10 稀释，使细胞悬液中每种抗具核细胞抗体的终浓度为 1.0-3.0 μg/mL。

实施例 2

使用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成方法

下面叙述了使用 Ficoll Hypaque 从全外周血中使细胞形成免疫玫瑰花结的负选择方法。

- 1.每 mL 全外周血加入 100μL 抗体组合物。
- 2.在室温下温育 20 分钟。

3.用等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)+2%胎牛血清(FCS)稀释样品,并轻轻混合。

4.将被稀释的样品在 Ficoll Hypaque 上分层,或使 Ficoll 在被稀释的样品之下分层。

5.在关闭刹车的情况下,在室温下以 $1200\times g$ 离心 20 分钟。

6.从 Ficoll:血浆界面移出富集的细胞。

7.用 $5-10\times$ 体积的 PBS+2% FBS 洗涤富集的细胞。

注意:为了富集单核细胞和其他粘附细胞,向全血样品和所有洗涤/稀释溶液中加入 1 mM EDTA。

实施例 3

利用羟乙基淀粉沉淀的免疫玫瑰花结形成方法

下面叙述了利用羟乙基淀粉从全外周血中使细胞形成免疫玫瑰花结的负选择方法。羟乙基淀粉是许多可通过凝集提高红细胞沉淀速率的化合物之一。

1. 每 5 mL 血液和混合物加入 1 mL 6% 羟乙基淀粉盐水溶液。

2. 向全血中加入实施例 1 中描述的抗体组合物,使得每种抗-具核细胞抗体的终浓度为 1.0-2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3. 在室温下温育 10 分钟。

4. 在室温下以 $50\times g$ 离心 5 分钟。

5. 取出上清液。该级分中含有富集的细胞。

6. 用 $2-5\times$ 体积的 PBS+2% 胎牛血清(FBS)洗涤富集的细胞级分。

实施例 4

利用羟乙基淀粉/碘克沙醇(Iodixanol)混合物的免疫玫瑰花结形成方法

下面叙述了一种从全外周血中使细胞形成免疫玫瑰花结的负选择方法。

1. 每 5 mL 血液和混合物中加入 1 mL 6% 羟乙基淀粉盐水溶液。

2. 加入 0.6 mL 的 60% w/v 碘克沙醇和混合物。碘克沙醇是许多可略微增加水溶液密度的化合物之一。

3. 向全血中加入实施例 1 中描述的抗体组合物,使每种抗-具核细胞抗体的终浓度为 1.0-2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4. 在室温下温育 10 分钟。

5. 在室温下以 $50\times\text{g}$ 离心 5 分钟。

6. 移出上清液。该级分中含有富集的细胞。

7. 用 2-5 \times 体积的 PBS+2% FBS 洗涤富集的细胞级分。

实施例 5

免疫玫瑰花结形成方法——正选择

下面叙述了一种从全外周血中使细胞形成免疫玫瑰花结的正选择方法。

1. 留出 1 mL 血液。

2. 将 10 mL 血液在 Ficoll-Paque 上分层,并在室温和关闭刹车的情况下,以 $1200\times\text{g}$ 离心 20 分钟。

3. 回收 Ficoll:血浆界面上的 MNC 层,用 PBS+2% FBS 洗涤。

4. 计数细胞,并以 $1\times 10^8/\text{mL}$ 重悬浮。

5. 测量样品体积,称为体积 A。

6. 加入 0.2 mL 来自步骤 1 的保留血液。

7. 用 PBS+2% FBS 使总体积达到体积 A 的两倍。

8. 以 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的终浓度加入对特定抗原特异的四聚抗体复合物,其合成在实施例 1 中描述。

9. 在室温下温育 20 分钟。

10. 用 PBS+2% FBS 稀释两倍,并在以 1.085 g/mL 的密度和 280 mOsm 摩尔渗透压浓度制备的 Percoll 上分层。

11. 如步骤 2 以 $1200\times\text{g}$ 离心 20 分钟。

12. 弃去上清液,重悬浮包含富集细胞的沉淀。

13. 用氯化铵溶液裂解红细胞,并用 PBS+2% FBS 洗涤。

实施例 6

T 细胞的富集——利用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从全外周血中富集 T 细胞。制备了含有抗 CD16、CD19、CD36 和 CD56 抗体的四聚抗体复合物的 T 细胞富集鸡尾酒。结果（显示在表 4 中）证明本发明的方法可产生 95% 的 T 细胞纯度，回收率接近 50%。

实施例 7

CD8⁺ T 细胞的富集——使用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从全外周血中富集 CD8⁺T 细胞。测试了两种四聚抗体复合物鸡尾酒。一种鸡尾酒含有抗 CD4、CD16、CD19、CD36 和 CD56 的抗体，另一种含有抗 CD4、CD16、CD19、CD36、CD56 和 IgE 的抗体。结果（显示在表 5 中）证明，向鸡尾酒中加入抗 IgE 可提高 CD8⁺ T 细胞的纯度，而不影响回收率。

实施例 8

CD4⁺ T 细胞的富集——使用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从全外周血中富集 CD4⁺T 细胞。制备了四聚抗体复合物的两种 CD4⁺ T 细胞富集鸡尾酒。一种鸡尾酒含有抗 CD8、CD16、CD19、CD36 和 CD56 的抗体。另一种鸡尾酒含有抗 CD8、CD16、CD19、CD36、CD56 和 IgE 的抗体。结果（显示在表 6 中）证明，本发明的方法导致 93% 的 CD4⁺ T 细胞纯度和 46% 的回收率，向富集鸡尾酒中加入抗-IgE 可提高 CD4⁺ T 细胞的纯度。

实施例 9

B 细胞的富集——使用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从全外周血中富集 B 细胞。制备了四聚抗体复合物的两种 B 细胞富集鸡尾酒。一种鸡尾酒含有抗 CD2、CD3、CD16、CD36 和 CD56 的抗体。另一种鸡尾酒含有抗 CD2、CD3、CD16、CD36、CD56 和 IgE 的抗体。结果（显示在表 7 中）证明，本发明的方法导致 88% 的 B 细胞纯度和 43% 的回收率，向富集鸡尾酒中加入抗-IgE 可提高 B 细胞的纯度。

实施例 10

NK 细胞的富集——使用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从全外周血中富集 NK 细胞。制备了四聚抗体复合物的两种 NK 细胞富集鸡尾酒。一种鸡尾酒含有抗 CD3、CD4、CD19、CD66b 和 CD36 的抗体。另一种鸡尾酒含有抗 CD3、CD4、CD19、CD66b 和 CD36 和 IgE 的抗体。结果（显示在表 8 中）证明，本发明的方法导致 74% 的 NK 细胞纯度和 44% 的回收率，向鸡尾酒中加入抗-IgE 可提高纯度但降低回收率。

实施例 11

先祖细胞的富集

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从全脐带血中富集先祖细胞。使用两种不同的四聚抗体复合物的鸡尾酒：

(a)含有抗 CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56 和 CD66b 的四聚抗体复合物的先祖细胞富集鸡尾酒；

(b)含有抗 CD2、CD14、CD19 和 CD66b 的四聚抗体复合物的减量鸡尾酒。

结果（显示在表 9 中）证明，对于广泛先祖富集鸡尾酒，本发明的方法导致 29% 的 CD34⁺细胞纯度和 53% 的回收率，而对于四种抗体减量鸡尾酒只导致 5% 的纯度和 45% 的回收率。

实施例 12

单核细胞的富集——使用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从全外周血中富集单核细胞。制备了几种四聚抗体的单核细胞富集鸡尾酒（见表 10）。表 10 所示的结果证明，本发明的方法导致 76% 的 CD14⁺ 细胞纯度和 65% 的 CD14⁺ 细胞回收率，抗-CD8 或抗-IgE 的加入可提高单核细胞的纯度，但同时加入 CD8 和抗-IgE 两种没有加成作用。

实施例 13

非造血肿瘤细胞的富集

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从全外周血中富集乳癌细胞。以 1/10³、1/10⁴ 和 1/10⁵ 的频率将来自 CAMA 乳癌细胞系的细胞加入全外周血样品中。制备四聚抗体复合物的三种肿瘤细胞富集鸡尾酒。鸡尾酒的抗体组成在表 11 中列出。结果（显示在表 12 中）证明，本发明的方法导致超过 2 Log 的肿瘤细胞富集，和 20-50% 的肿瘤细胞回收率。更广泛的鸡尾酒引起更程度的肿瘤细胞富集。

实施例 14

T 细胞富集——用抗-CD36 取代抗-CD14 的作用

该实施例证明，当富集鸡尾酒由于用抗-CD36 取代抗-CD14 而改变时，利用实施例 2 中描述的方法从全外周血中富集 T 细胞提高。表 13 中的结果显示，抗体取代使 CD3⁺ 细胞的 % 纯度提高 24%。

实施例 15

利用羟乙基淀粉沉淀对特异细胞群体的富集

该实施例说明利用实施例 3 中描述的方法从全外周血中富集不同细胞群体。

制备含有抗 CD16、CD19、CD36 和 CD56 抗体的四聚抗体复合物的 T 细胞富集鸡尾酒。本发明的方法导致 95% 以上的 T 细胞纯度和 60% 回收率。

制备含有抗 CD2、CD3、CD16、CD36 和 CD56 抗体的四聚抗体复合物的 B 细胞富集鸡尾酒。本发明的方法导致 75% 的 B 细胞纯度和 39% 的回收率。

制备含有抗 CD3、CD4、CD19、CD36 和 CD66b 抗体的四聚抗体复合物的 NK 细胞富集鸡尾酒。本发明的方法导致 65% 的 NK 细胞纯度和 27% 的回收率。

实施例 16

利用羧乙基淀粉/碘克沙醇混合物对特异性细胞群体的富集

该实施例说明利用实施例 4 中描述的方法从全外周血中富集不同细胞群体。结果（表 14 中列出）总结如下。

制备含有抗 CD16、CD19、CD36 和 CD56 抗体的四聚抗体复合物的 T 细胞富集鸡尾酒。本发明的方法导致 95% 的 T 细胞纯度和 61% 的回收率。

制备含有抗 CD8、CD16、CD 19、CD36 和 CD56 抗体的四聚抗体复合物的 CD4⁺ T 细胞富集鸡尾酒。本发明的方法导致 89% 的 CD4⁺ 细胞纯度和 64% 的回收率。

制备含有抗 CD4、CD16、CD19、CD36 和 CD56 抗体的四聚抗体复合物的 CD8⁺ T 细胞富集鸡尾酒。本发明的方法导致 80% 的 CD8⁺ T 细胞纯度和 43% 的回收率。

制备含有抗 CD2、CD3、CD16、CD36 和 CD56 抗体的四聚抗体复合物的 B 细胞富集鸡尾酒。本发明的方法导致 84% 的 B 细胞纯度和 58% 的回收率。

制备含有抗 CD3、CD4、CD19、CD36 和 CD66b 抗体的四聚抗体复合物的 NK 细胞富集鸡尾酒。本发明的方法导致 80% 的 NK 细胞纯度和 50% 的回收率。

实施例 17

使用不同分层基质的免疫玫瑰花结形成

该实施例证明，用不同基质代替步骤 4 中的 Ficoll-Hypaque 能改进实施例 2 的方法。Ficoll 的密度是 1.077 g/mL，而摩尔渗透压浓度约为 300 mOsm。Percoll 和碘克沙醇溶液制备为 1.085 g/mL 密度和 280 mOsm 的摩尔渗透压浓度。制备含有抗 CD2、CD3、CD16、CD36 和 CD56 抗体复合物的 A B 细胞富集鸡尾酒。

两种不同样品的 B 细胞富集结果（显示在表 15 中）证明，以较高密度使用不同的分层基质能提高 B 细胞的回收率而不降低 B 细胞纯度。

实施例 18

利用免疫玫瑰花结形成的 T 细胞净化

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从全外周血中去除 T 细胞。制备抗 CD3 的四聚抗体复合物的 T 细胞净化鸡尾酒。本发明的方法导致 2.3 log 的 CD3⁺ 细胞排除。

实施例 19

利用免疫玫瑰花结形成的 B 细胞净化

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从全外周血中去除 B 细胞。制备抗 CD19 的四聚抗体复合物的 B 细胞净化 (purging) 鸡尾酒。本发明的方法导致 3.0 log 的 CD19⁺ 细胞排除。

实施例 20

利用免疫玫瑰花结形成的乳癌细胞净化

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从接种有 1-5% CAMA 乳癌细胞的全外周血中去除乳癌细胞。制备含有抗乳癌抗体 5E11 和 BRST 1 的四聚抗体复合物的净化鸡尾酒。表 16 所示的结果证明，本发明的方法导致 1.0-1.4 log 的乳癌细胞排除。

实施例 21

从预先贮存的全外周血中去除粒细胞

全外周血样品中粒细胞的密度在贮存>24 个小时后降低。通常用来从新鲜全血中去除红细胞和粒细胞的密度分离方法不能有效地从贮存的血样中去除粒细胞。贮存的粒细胞的沉淀率可能提高，使得能通过形成免疫玫瑰花结在标准 Ficoll 密度分离(1.077 g/mL)中有效去除。

该实施例说明利用实施例 2 中描述的方法从贮存(48 小时)的全外周血中去除粒细胞。制备含有抗 CD66b 的四聚抗体复合物的粒细胞排除鸡尾酒。表 17 显示的结果证明，本发明的方法导致 1.8-2.6 log 的粒细胞排除。

实施例 22

利用免疫玫瑰花结形成对特异性细胞群体的正选择

该实施例说明利用实施例 5 描述的正选择方法从全外周血中富集 CD8⁺细胞。制备抗 CD8 的四聚抗体复合物。本发明的方法导致 CD8⁺的富集，单核细胞级分的百分比从开始时的 25%升至沉淀中的 32%。

虽然参照目前认为是优选的实施例描述了本发明，但应当理解，本发明不限于所公开的实施例。相反，本发明旨在覆盖在附加权利要求书的精神和范围内包括的多种修改和相当的安排。

所有公开文本、专利和专利申请在此完整引用作为参考，每个公开文本、专利和专利申请特别、分别地引用作为参考。

表 1
在细胞分离中使用的抗体

抗原	抗体	来源
CCR5	BLR-7	R&D, Minneapolis, MN
CD2	6F10.3	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
	MT910	Dako, Carpinteria, CA
CD3	UCHT1	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
	SK7	Becton Dickinson Immunocytometry, Mountain View, Calif.
CD4	13B8.2	Becton Dickinson Immunocytometry, Mountain View, Calif.
CD5	UCHT2	Serotec, Raleigh, NC

CD8	B911 OKT3	Becton Dickinson Immunocytometry, Mountain View, Calif. BioDesigns
CD10	ALB1	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
CD11b	ICRF44	Pharmingen, San Diego, CA
CD14	MEM 15 MEM 18	Exbio, Praha, 捷克共和国
CD15	DU-HL60-3	Sigma, St. Louis, MO
CD16	MEM 154 3G8 NKP15	Exbio, Praha, 捷克共和国 IMMUNOTECH, 马赛, 法国 Becton Dickinson Immunocytometry, Mountain View, Calif.
CD19	J4.119 4G7 HD37	IMMUNOTECH, 马赛, 法国 Becton Dickinson Immunocytometry, Mountain View, Calif. Dako, Carpinteria, CA
CD20	MEM97 L27	Exbio, Praha, 捷克共和国 Becton Dickinson Immunocytometry, Mountain View, Calif.
CD21	B-Ly4	Pharmingen, San Diego, CA
CD22	HIB22	Pharmingen, San Diego, CA
CD24	32D12 ALB9	Steinar Funderud 博士, 癌症研究院, 免疫学系, Oslo, 挪威 IMMUNOTECH, 马赛, 法国
CD25	3G10	Caltag, Burlingame, CA
CD27	1A4CD27	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
CD29	Lial.2	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
CD33	D3HL60.251	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
CD34	581	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
CD36	FA6.152 IVC7	IMMUNOTECH, 马赛, 法国 CLB, 荷兰中心实验室, 红十字输血中心
CD38	T16	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
CD41	PI1.64 SZ22	Kaplan, 第五届国际人类白细胞分化抗原会议 IMMUNOTECH, 马赛, 法国
CD42a	Beb1	Becton Dickinson Immunocytometry, Mountain View, Calif.
CD45	J33 MEM28	IMMUNOTECH, 马赛, 法国 Exbio, Praha, 捷克共和国
CD45RA	8D2.2 L48	Craig 等人, 1994, StemCell Technologies, Vancouver, 加拿大 Becton Dickinson Immunocytometry, Mountain View, Calif.
CD45RO	UCHL1	Dako, Carpinteria, CA
CD56	T199 MY31	IMMUNOTECH, 马赛, 法国 Becton Dickinson Immunocytometry, Mountain View, Calif.

CD66c	CLB/gran10	CLB, 荷兰中心实验室, 红十字输血中心
CD66b	B13.9 80H3	CLB, 荷兰中心实验室, 红十字输血中心 IMMUNOTECH, 马赛, 法国
CD69	L78	BD Biosciences, San Jose, CA
CD71	My29	Zymed Laboratories, San Francisco, CA
CD124	S456C9	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
HLADR	IMMU357.12	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
IgA1	NiF2	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
IgE	G7-18	Pharmingen, San Diego, CA
IgG	8A4	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
TCR $\alpha\beta$	WT31	BD Biosciences, San Jose, CA
TCR $\gamma\delta$	Immu510	IMMUNOTECH, 马赛, 法国

表 2

免疫玫瑰花结

用于人细胞负选择的抗体鸡尾酒

T 细胞富集

抗-

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

静息 T 细胞富集

抗-

HLA-DR 和/或 CD25、CD69

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

$\gamma\delta$ T 细胞富集

抗-

 $\alpha\beta$ TCR

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

 $\alpha\beta$ T 细胞富集

抗-

 $\gamma\delta$ TCR

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

CD4+ T 细胞富集

抗-

CD8

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

幼稚 CD4+ T 细胞富集

抗-

CD8

CD45RO 和/或 CD29

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

记忆 CD4+ T 细胞富集

抗-

CD8

CD45RA

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

静息 CD4+ T 细胞富集

抗-

CD8

HLA-DR 和/或 CD25、CD69

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

CD4+ $\alpha\beta$ T 细胞富集

抗-

$\gamma\delta$ TCR

CD8

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15
CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig
CD36 和/或 CD14
和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

TH1 CD4+ T 细胞富集

抗-

CD8

CD124

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15
CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig
CD36 和/或 CD14
和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

TH2 CD4+ T 细胞富集

抗-

CD8

CCR5

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15
CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig
CD36 和/或 CD14
和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

CD8+ T 细胞富集

抗-

CD4

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15
CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig
CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

幼稚 CD8+ T 细胞富集

抗-

CD4

CD45RO 和/或 CD29

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

记忆 CD8+ T 细胞富集

抗-

CD4

CD45RA

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

静息 CD8+ T 细胞富集

抗-

CD4

HLA-DR 和/或 CD25、CD69、CD27

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

CD8+ $\alpha\beta$ T 细胞富集

抗-

 $\gamma\delta$ TCR

CD4

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、IgE、CD41

B 细胞富集

抗-

CD2 和/或 CD3、CD4 和 CD8 两者

CD16 和/或 CD66b、CD11b、CD15

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD56、CD41

NK 细胞富集

抗-

CD3

CD66b 和/或 CD15

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24

CD36 和/或 CD14

和任选的抗-CD33、CD4、IgE、CD41

单核细胞富集

抗-

CD2 和/或 CD3、CD5

CD19 和/或 CD20、CD21、CD22、CD24

**CD66b 和/或 CD16
和任选的抗-CD8、CD56**

树突细胞富集

抗-

CD3

CD14

CD16

CD19

CD34

CD56

CD66b

嗜碱性粒细胞富集

抗-

CD2

CD3

CD14

CD15

CD16

CD19

CD24

CD34

CD36

CD56

CD45RA

先祖细胞富集

抗-

CD2 和/或 CD3

CD16 和/或 CD66b

CD19 和/或 CD24

CD14

和任选的抗-CD56、CD10、CD45RA、CD38、CD36、CD33、CD71

红系先祖细胞富集

抗-

CD2 和/或 CD3

CD16 和/或 CD66b

CD19 和/或 CD24

CD14

CD45RA

CD33

CD10

和任选的抗-CD56

髓祖细胞富集

抗-

CD2 和/或 CD3

CD16 和/或 CD66b

CD19 和/或 CD24

CD14

CD71

CD10

和任选的抗-CD56

巨核细胞先祖富集

抗-

CD2 和/或 CD3
 CD16 和/或 CD66b
 CD19 和/或 CD24
 CD14
 CD45RA
 CD10
 和任选的抗-CD56

上皮肿瘤细胞富集

抗-

CD45
 CD66b
 和任选的 CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD36、CD38、CD56、
 CD66e

表 3

可识别在上皮肿瘤细胞上表达的非造血抗原的抗体

特异性	抗体	抗原	供应商/发展者
上皮细胞标记物	BerEp4	ESA, (上皮特异性抗原) (也称作 HEA)	DAKO
	HEA125	ESA	Serotec, Cymbus, Pierce, RDI, Biodesign
	VU-1D9	ESA	Cymbus
	GP1.4	EMA, (上皮膜抗原)(也称作 PEM / Episialin, 一种唾液粘蛋白)	IMMUNOTECH, 马赛, 法国
	VU-4H5	EMA	Neomarkers
	MC.5	EMA	Biogenex, 也来自 Biodesign
	B24.1	EMA	Biomedica
	E29	EMA	DAKO
	H11	EGFR	DAKO

	RAR9941	上皮糖蛋白	Baxter, 德国
	RAR9948	上皮糖蛋白	Baxter, 德国
癌(乳癌、宫颈癌、卵巢癌、肺癌、子宫内膜癌)	CU-18	BCA 225 (乳癌相关抗原)	ID Labs
癌	I15D8	癌相关抗原	Biogenex, Biodesign
腺癌	B72.3	TAG-72 (肿瘤相关糖蛋白)	ID Labs, Biogenex, Signet
腺癌、乳腺及肺癌	B6.2	未知, 乳癌标记物	Biogenex
乳癌	5E11	未知, 乳癌	STI
	6E7	未知, 乳癌	STI
	H23A	未知, 乳癌	STI
	CA27.29	MAM-6, 粘蛋白	Cedarlane
	SM-3	奶粘蛋白核心抗原	Cymbus, Biodesign, Imperial Cancer Research Fund
	DF3	CA 15-3 (乳癌标记物)	ID Labs
	552	CA 15-3	Biodesign
	695	CA 15-3	Biodesign
	RAR9938	c-erbB2	Baxter, 德国
	C13B5	c-erbB2	IMMUNOTECH, 马赛, 法国, 也来自 Biogenex
肺	MOC-1	小细胞肺癌	ICN Biomed, 也来自 Biodesign
	MOC-21	小细胞肺癌	ICN Biomed, 也来自 Biodesign
	MOC-31	小细胞肺癌	ICN Biomed, 也来自 Biodesign
	MOC-32	小细胞肺癌	ICN Biomed, 也来自 Biodesign
	MOC-52	小细胞肺癌	ICN Biomed, 也来自 Biodesign
	TFS-4	小细胞肺癌	Biodesign
黑素瘤	NKI/C3	黑素瘤相关抗原	ICN Biomed, 也来自 Biodesign
	NKI/M6	黑素瘤相关抗原	Biodesign
	PAL-MI	黑素瘤相关抗原	ICN Biomed, 也来自 Biodesign

	HMB45	黑素瘤细胞	Biodesign
卵巢肿瘤	185	CA-125 (卵巢肿瘤标记物)	ICN Biomed, 也来自 Biodesign
	OV-632	卵巢癌标记物	ICN Biomed, 也来自 Biodesign
胃肠癌	CA 19-9	GI 肿瘤标记物	ICN Biomed, 也来自 Biodesign
	CA242	GI 癌	BioDesign
肾细胞癌	RC38	肾细胞癌	Biodesign
尤因肉瘤	O13		Signet
尤因肉瘤	CC49	在人腺癌上	Signet
成神经细胞瘤	UJ13A	未知	Hurko 和 Walsh (1983) Neurology 33:734
	UJ181.4	未知	"
	UJ223.8	未知	"
	UJ127.11	未知	"
	5.1.H11	未知	"
	390,459	未知	R.C. Seeger, L. A. Children's Hospital, Calif.
	BA-1.2	未知	"
	HSAN 1.2	未知	Reynolds 和 Smith (1982) Hybridomas in Cancer p235

表 4

T 细胞富集——利用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

纯度	平均值	95
	SD	4
	n	19
回收率	平均值	46
	SD	12
	n	19

SD=平均值的标准差

纯度=% CD3⁺细胞回收率= CD3⁺细胞的回收率

表 5

CD8⁺ T 细胞富集——利用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

鸡尾酒	n	%纯度±1SD	%回收率±1SD
CD4、CD16、CD19、CD36、CD56	19	76±8	44±19
CD4、CD16、CD19、CD36、CD56、TgE	5	81±4	45±37*

SD=平均值的标准差

纯度=% CD8⁺细胞回收率= CD8⁺细胞的%回收率

* n=4

表 6

CD4⁺ T 细胞富集——利用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

鸡尾酒	n	%纯度±1SD	%回收率±1SD
CD8、CD16、CD19、CD36、CD56	19	89±4	57±22
CD8、CD16、CD19、CD36、CD56、TgE	7	93±3	46±10*

SD=平均值的标准差

纯度=% CD4⁺细胞回收率= CD4⁺细胞的%回收率

* n=5

表 7

B 细胞富集——利用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

鸡尾酒	N	%纯度±1SD	%回收率±1SD
CD2、CD3、CD16、 CD36、CD56	22	72±15	61±27
CD2、CD3、CD16、 CD36、CD56、TgE	5	88±7	43±18

SD=平均值的标准差

纯度=% CD19⁺细胞

回收率= CD19⁺细胞的%回收率

表 8

NK 细胞富集——利用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

鸡尾酒	n	%纯度±1SD	%回收率±1SD
CD3、CD4、CD19、CD66b、CD36	15	74±10	44±19
CD3、CD4、CD19、CD66b、CD36、TgE	6	88±4	27±20

SD=平均值的标准差

纯度=% CD56⁺细胞

回收率= CD56⁺细胞的%回收率

表 9

CD34⁺细胞从全脐带血的富集——利用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

鸡尾酒	n	%纯度±1SD	%回收率±1SD
先祖细胞富集	15	29±9	53±29
减量的	8	5±1	45±20

纯度=% CD34⁺细胞

回收率= CD34⁺细胞的%回收率

SD=平均值的标准差

表 10

单核细胞富集——利用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

鸡尾酒	n	%纯度±1SD	%回收率±1SD
CD2、CD3、CD19、CD56、CD66b	8	71±7	63±28
CD2、CD3、CD19、CD56、CD66b、CD8	5	76±1.5	65±28
CD2、CD3、CD19、CD56、CD66b、IgE	6	77±4	58±24
CD2、CD3、CD19、CD56、CD66b、IgE、CD8	4	76±3	64±26
CD2、CD3、CD19、CD56、CD66b、CD16	1	76	64
CD2、CD3、CD19、CD56、CD66b、CD20	1	73	41

纯度= CD14⁺细胞的%纯度

回收率= CD14⁺细胞的%回收率

表 11
肿瘤富集鸡尾酒的抗体组成

鸡尾酒	鸡尾酒中的抗体
单独的 CD45	CD45
CD45 和 CD66b	CD45、CD66b
广泛鸡尾酒	CD45、CD2、CD16、CD19、CD36、CD38、CD66b

表 12
CAMA 乳腺癌细胞从全血中的富集

初始频率 (CAMA)	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁵	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁵	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁵
	CAMA 细胞的%纯度			CAMA 细胞的 Log 富集			CAMA 细胞的%回收率		
富集的									
单独的 CD45	4±2 (n=4)	5±2 (n=7)	0.5±0.4 (n=3)	1.4±0.3 (n=4)	2.2±0.3 (n=7)	2.3±0.4 (n=3)	10±3 (n=4)	26±7 (n=5)	55±36 (n=2)
CD45 和 CD66b	27±4 (n=6)	3.2±0.6 (n=6)	0.5±0.1 (n=5)	2.4±0.1 (n=6)	2.5±0.1 (n=6)	2.7±0.1 (n=5)	15±2 (n=6)	12±1 (n=5)	22±4 (n=5)
广泛的鸡 尾酒	65±8 (n=9)	26±8 (n=9)	3±1 (n=6)	2.8±0.1 (n=9)	3.2±0.2 (n=9)	3.2±0.3 (n=6)	38±8 (n=7)	49±14 (n=5)	33±7 (n=5)

表 13
T 细胞富集——利用 Ficoll 的免疫玫瑰花结形成

	n	含 CD14 的鸡尾酒 ±1SD	含 CD36 的鸡尾酒 ±1SD
纯度	3	80±10	94±5
回收率	3	56±12	42±10

SD=平均值的标准差

纯度=CD3⁺细胞的%纯度

回收率=CD3⁺细胞的%回收率

表 14

利用羟乙基淀粉/碘克沙醇混合物的免疫玫瑰花结形成

富集的细胞 型	纯度			回收率		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
T 细胞	95%	3%	3	61%	9%	3
CD4 ⁺ 细胞	89%	5%	2	64%	5%	2
CD8 ⁺ 细胞	80%	8%	2	43%	1%	2
B 细胞	84%	8%	5	58%	26%	5
NK 细胞	80%	15%	4	50%	23%	4

SD=平均值的标准差

纯度=希望的细胞型的%纯度

(T 细胞=CD3⁺细胞、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞, B 细胞=CD19⁺细胞, NK 细胞=CD56⁺细胞)

回收率=希望的细胞之%回收率

表 15

利用不同分层基质的免疫玫瑰花结形成

B 细胞富集

基质	Ficoll	Percoll	碘克沙醇
样品 1 (一式三份)			
纯度 ±SE	82 ±2.9	81 ±1.4	86 ±2.7
回收率 ±SE	78 ±6.0	110 ±3	104 ±10
样品 2 (一式三份)			
纯度 ±SE	71 ±1.2	77 ±1.5	81 ±2.4
回收率 ±SE	49 ±8	78 ±3	64 ±1

SE=平均值的标准误

纯度=CD19⁺细胞的%纯度回收率=CD19⁺细胞的%回收率

表 16

利用免疫玫瑰花结形成对乳腺癌细胞的净化

	样品 1	样品 2
CAMA 细胞的 Log 排除	1.4, 1.4	1.1, 1.0

表 17
从贮存的全外周血中去除粒细胞

	免疫玫瑰花结形成	单独的 Ficoll
轻密度级分中的%粒细胞	1.1, 1.4, 0.7, 0.4	20.9, 18.0

免疫玫瑰花结形成=实施例 2 中概述的方法，使用含有抗-CD66b 的排除鸡尾酒

单独的 Ficoll=不使用免疫玫瑰花结的标准 Ficoll 密度分离

本说明书中引用参考文献的全部引文

1. Braun 等人, N. Engl. J. Med. 342:525:533.
2. Brenner, M.B., Trowbridge, I.S., Strominger, J.L., 1985, Cell 40:183-190.
3. De Lau, W.B., Van Loon, A.E, Heije, K., Valerio, D., Bast, B.J, 1989, J. Immunol. Methods, 117:1-8.
4. deWynter, E.A.等人, 1975, Stem Cells, Vol. 13:524-532.
5. Firat 等人, 1988, Bone Marrow Transplantation, Vol. 21:933-938.
6. Glennie, M.J., McBride, H.M., Worth, A.T., Stevenson, G.T., 1987, J. Immunol., 139:2367-2375.
7. Holliger, P., Prospero, T., Winter, G., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448.
8. Horrocks, C, M. Fairhurst 和 T. Thomas, 1998. Blood. Vol. 92, p. 25A.
9. Karawajew, L., Micheel, B., Behrsing, O., Gaestel, M., 1987, J. Immunol. Methods 96:265-270.
10. Kostelny, S.A., Cole, M.S., Tso, J.Y.,1992, J. Immunol. 148:1547-1553.
11. Kohler 和 Milstein, 1975, Nature 256, 495-497.
12. Milstein, C., Cuello, A.C., 1983, Nature, 305:537-540.
13. Nolan, O., Kennedy, O.R., 1990, Biochem. Biophys. Acta,

-
- 1040:1-11.
14. Perez 等人, 1985, *Nature* 316:354.
 15. Rheinacker 等人, 1996, *J. Immunol.* 157:2989-2997.
 16. Shpall, E.J.等人, 1994, *J. of Clinical Oncology* 12:28-36.
 17. Slaper-Cortenbach, Ineke C.M., 等人, 1990, *Exp. Hematol.* 18:49-54.
 18. Staerz 和 Bevan, 1986, *PNAS (USA)* 83: 1453.
 19. Staerz 和 Bevan, 1986, *Immunology Today*, 7:241.
 20. Staerz 等人, 1985, *Nature*, 314:628.
 21. Thomas, T.E., 1994, *Cancer Research, Therapy and Control* 4(2): 119-128.
 22. Van Dijk, J. et al, 1989, *Int. J. Cancer* 44:738-743.
 23. Vaughan 等人, 1990, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 9:9.
 24. Winter, G., Milstein, C., 1991, *Nature*, 349:293-299.

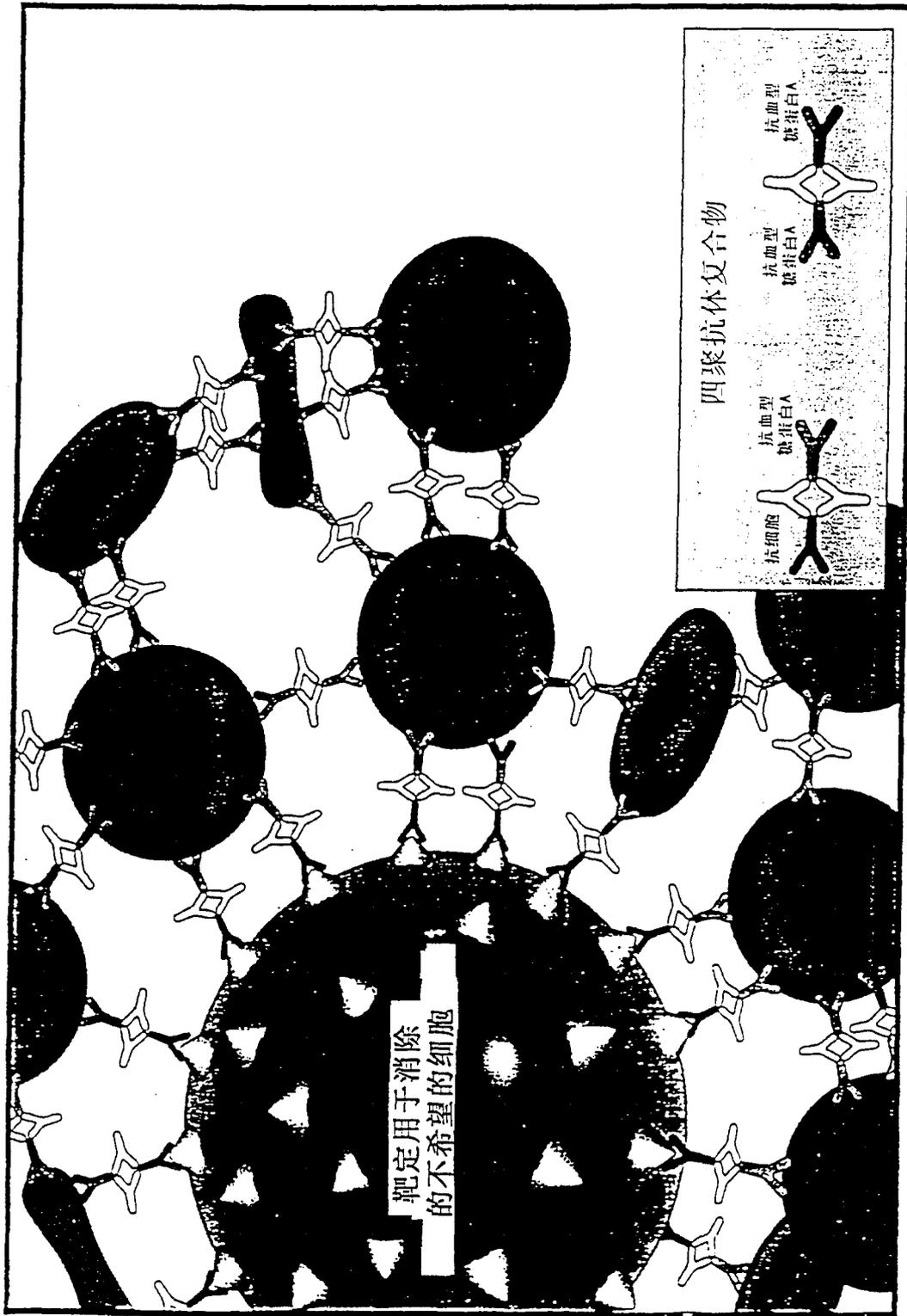


图1

专利名称(译)	利用免疫玫瑰花结分离细胞的方法		
公开(公告)号	CN1218182C	公开(公告)日	2005-09-07
申请号	CN00809750.X	申请日	2000-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	干细胞技术公司		
申请(专利权)人(译)	干细胞技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	干细胞技术公司		
[标]发明人	TE托马斯 C皮特斯 P兰斯卓普		
发明人	T·E·托马斯 C·皮特斯 P·兰斯卓普		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C12N1/00 C12N5/00 C12N5/06 C12N5/08 G01N33/50 G01N33/80 G01N33/555 G01N33/569		
CPC分类号	C07K16/2803 C07K2317/31 C07K16/28 A61K2039/505 G01N33/5094 G01N33/80		
优先权	60/136770 1999-05-28 US 60/203477 2000-05-11 US 60/193371 2000-03-31 US		
其他公开文献	CN1367876A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及利用免疫玫瑰花结分离细胞的方法。该方法包括使含有具核细胞和红细胞样品接触一种可使具核细胞与红细胞形成免疫玫瑰花结的抗体组合物。该抗体组合物优选地含有双功能抗体或四聚抗体复合物。

