



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104254780 B

(45)授权公告日 2017.04.12

(21)申请号 201380010911.6

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2013.02.25

G01N 33/53(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104254780 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2014.12.31

US 6022951 A,2000.02.08,

US 2004082012 A1,2004.04.29,

(30)优先权数据

US 6022951 A,2000.02.08,

US 5985658 A,1999.11.16,

61/602,150 2012.02.23 US

WO 2011107489 A1,2011.09.09,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.08.25

CN 101622340 A,2010.01.06,

CN 101622340 A,2010.01.06,

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/053650 2013.02.25

Thomas GM Schmidt, Arne Skerra.The
strp-tag system for one-step purification
and high-affinity detection or capturing
of proteins..《Nature Protocol》.2007,第2卷
(第6期), (续)

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/124474 EN 2013.08.29

(73)专利权人 朱诺治疗有限公司
地址 德国哥廷根市

审查员 毕秀华

(72)发明人 H·施塔德勒

(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 曹津燕 张伟

(51)Int.Cl.
G01N 33/569(2006.01)

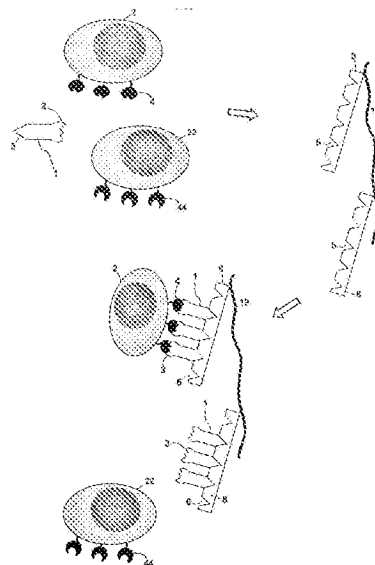
权利要求书3页 说明书28页
序列表7页 附图11页

(54)发明名称

细胞和其它复杂生物材料的色谱分离

(57)摘要

本发明涉及靶细胞或另一复杂生物材料的
色谱分离,特别是通过柱色谱法如亲和色谱法或
凝胶渗透色谱法。本发明采用结合到位于靶细胞
表面上的受体分子的受体结合试剂。通常,本发
明为生物材料的无痕分离提供新方法,所述生物
材料如细胞、细胞器、病毒等。本发明还涉及一种
用于分离细胞和其他复杂生物材料的设备。



CN 104254780 B

[接上页]

(56)对比文件

Ashok Kumar等.Affinity binding of cells to cryogel adsorbents with immobilized specific ligands:effect of ligand coupling and matrix architecture..《J Mol Recognit》.2005,第18卷

Ye Xu等.Aptamer-based microfluidic device for enrichment, sorting, and detection of multiple cancer cells..《Anal Chem》.2009,第81卷

Ye Xu等.Aptamer-based microfluidic device for enrichment, sorting, and detection of multiple cancer cells..《Anal Chem》.2009,第81卷

Stefan Miltenyi等.High gradient magnetic cell separation with MACS..《Cytometry》.1990,第11卷

Anita Schmitt等.Adoptive transfer and

selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8+ T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation..《Transfusion》.2011,第51卷

Kelong Wang等.Open-tubular capillary cell affinity chromatography: single and tandem blood cell separation..《Anal Chem》.2008,第80卷

Rosaely Casalegno-Garduño等.Multimer technologies for detection and adoptive transfer of antigen-specific T cells..《Cancer Immunol Immunother》.2009,第59卷

Maria B.Dainiak等.Methods in cell separations..《Adv Biochem Engin/Biotechnol》.2007,第106卷

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:

-提供样品,所述样品包含所述靶细胞和受体结合试剂,

所述受体结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

其中,包含在所述受体结合试剂中的结合位点B能够特异性结合到所述受体分子,且

-使所述样品在合适的固定相上进行色谱,所述固定相为凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中所述凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质包含亲和试剂,其中所述亲和试剂包含特异性结合到包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,由此分离所述靶细胞,并且

其中所述样品进一步包含竞争试剂,其中所述竞争试剂结合到亲和试剂的结合位点Z,所述结合位点Z特异性结合到包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C,由此使所述竞争试剂固定到所述固定相上。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述色谱是柱色谱或平面色谱。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中使所述样品进行色谱包括允许包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C与与其特异性结合的所述固定相的亲和试剂的结合位点Z形成复合物,由此使所述受体结合试剂固定到所述固定相上。

4. 根据权利要求1或3所述的方法,其中包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C能够特异性结合到所述亲和试剂的结合位点Z,其中所述亲和试剂包含两个或更多个能够特异性结合到包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述亲和色谱基质和/或所述凝胶过滤基质具有共价固定于其上的所述亲和试剂。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品是或包含液体。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品包含体液。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述体液是血液或血液组分。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中使所述样品进行色谱包括允许所述样品通过色谱柱的固定相和用流体流动相洗涤所述固定相,其中所述流体流动相至少基本上缺乏所述受体结合试剂。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中使所述样品进行色谱包括从所述色谱基质洗脱所述靶细胞。

11. 根据权利要求10所述的方法,其进一步包括收集所述靶细胞。

12. 一种从样品中色谱分离靶细胞的方法,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:

-提供样品,所述样品包含所述靶细胞,

-提供受体结合试剂,所述受体结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

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

-其中,包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合到亲和试剂的结合位点Z,且

-使所述样品在第一固定相上进行色谱,所述第一固定相具有固定于其上的所述亲和

试剂,

-其中所述亲和试剂包含结合位点Z,其中所述结合位点Z与包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C形成可逆的键,且其中所述受体结合试剂的结合位点B结合到所述靶细胞表面上的受体分子,由此使所述靶细胞可逆地固定在所述固定相上,

-提供竞争试剂,所述竞争试剂包含结合位点,从而特异性结合到所述亲和试剂的结合位点Z;

-将所述竞争试剂负载到第一固定相上,

由此允许破坏在所述受体结合试剂、所述受体分子和所述亲和试剂之间形成的非共价可逆复合物;

-从所述第一固定相的洗脱液回收洗脱样品,其中所述洗脱样品包含所述靶细胞;

-使所述洗脱样品在第二固定相上进行色谱,所述第二固定相为凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中所述凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质包含亲和试剂,所述亲和试剂具有特异性结合到包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,且

-使所述洗脱样品通过所述第二固定相,其中使所述洗脱样品通过所述第二固定相包括允许所述竞争试剂与所述亲和试剂的结合位点Z形成复合物,由此使所述竞争试剂固定到所述第二色谱柱的固定相上。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中为所述第二固定相的所述亲和色谱基质和/或所述凝胶过滤基质具有固定于其上的所述亲和试剂。

14. 根据权利要求12至13中任一项所述的方法,其中所述第一固定相和所述第二固定相中的每一个包含在柱中或是平面固定相。

15. 根据权利要求12至13中任一项所述的方法,其中所述受体结合试剂的结合位点B和所述受体分子之间的键具有在约 10^{-2} M至约 10^{-10} M范围内的离解常数(K_D)。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中经由所述结合位点B的所述受体结合试剂和所述受体分子之间的结合的离解常数(K_D) 在约 10^{-3} 至约 10^{-7} M的 K_D 范围内,或其中经由所述结合位点B的所述受体结合试剂和所述受体分子之间的结合的离解速率常数(k_{off}) 具有约 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更大的值。

17. 根据权利要求1或12所述的方法,其中所述受体结合试剂的结合配偶体C和所述亲和试剂的结合位点Z之间的可逆的键具有在约 10^{-2} M至约 10^{-13} M范围内的离解常数(K_D)。

18. 根据权利要求1或12所述的方法,其中所述固定相是非磁性材料或非可磁化材料。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述固定相包含纤维素膜、塑料膜、多糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、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、聚(N-异丙基丙烯酰胺)接枝二氧化硅、苯乙烯-二乙烯基苯凝胶、丙烯酸酯或丙烯酰胺和二醇的共聚物、多糖和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的共聚物中的一个或其任何两个或更多个的组合,或者由纤维素膜、塑料膜、多糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、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、聚(N-异丙基丙烯酰胺)接枝二氧化硅、苯乙烯-二乙烯基苯凝胶、丙烯酸酯或丙烯酰胺和二醇的共聚物、多糖和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的共聚物中的一个或其任何两个或更多个的组合组成。

20. 根据权利要求1或12所述的方法,其中所述亲和色谱基质和/或所述凝胶过滤基质

包含整体基质、微粒基质或平面基质,或者由整体基质、微粒基质或平面基质组成。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述微粒基质具有约5 μm 至约200 μm 或约5 μm 至600 μm 、或约5 μm 至1500 μm 的平均粒径。

22. 根据权利要求1或12所述的方法,其中所述亲和色谱基质和/或所述凝胶过滤基质具有0至约500nm的平均孔径。

23. 根据权利要求12所述的方法,其中所述受体结合试剂选自免疫球蛋白、免疫球蛋白的功能片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、适体和MHC分子。

24. 根据权利要求1或12所述的方法,其中包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C包含生物素、链霉亲和素结合肽和抗生物素蛋白结合肽中的一个,且其中所述亲和试剂包含链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白和抗生物素蛋白突变蛋白或其混合物。

25. 根据权利要求1或12所述的方法,其中所述靶细胞是哺乳动物细胞。

26. 根据权利要求1或12所述的方法,其中所述靶细胞是具有细胞核的细胞。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述靶细胞是白细胞或干细胞。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述白细胞是淋巴细胞。

29. 用于色谱的第一固定相和第二固定相的装置,其中所述第一固定相适用于细胞分离,其中所述固定相是非磁性材料或非可磁化材料,并且所述第一固定相由亲和色谱基质限定,其中所述亲和色谱基质具有固定于其上的亲和试剂,

其中所述亲和试剂具有至少一个能够可逆地结合到包含在受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,

其中所述第二固定相适用于细胞分离,所述第二固定相为凝胶过滤基质和亲和色谱基质,其中所述亲和色谱基质、或凝胶过滤和亲和色谱基质包含亲和试剂,所述亲和试剂具有特异性结合到包含在所述受体结合试剂中的所述结合配偶体C的结合位点Z。

30. 根据权利要求29所述的装置,其中固定于所述第一固定相的亲和色谱基质上的至少所述亲和试剂包含两个或更多个能够可逆地结合到包含在受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z。

31. 根据权利要求29或30所述的装置,其中所述第一固定相和所述第二固定相各自被包含在色谱柱中或是平面固定相。

32. 根据权利要求29或31所述的装置,其包含多个第一固定相和第二固定相。

33. 一种用于纯化靶细胞的设备,所述设备包括至少一个如权利要求29至32中任一项所限定的用于色谱的第一固定相和第二固定相的装置。

34. 根据权利要求33所述的设备,其进一步包括多个串联流体连接的第一固定相和第二固定相的装置。

35. 根据权利要求34所述的设备,其包括样品入口,所述样品入口流体连接到用于色谱的第一固定相和第二固定相的第一装置的第一固定相。

36. 根据权利要求35所述的设备,其包括用于纯化的靶细胞的样品出口,所述样品出口流体连接到至少一个用于色谱的第一固定相和第二固定相的装置的最后一个的第二固定相。

37. 根据权利要求33至36中任一项所述的设备,其包括竞争试剂容器,所述竞争试剂容器流体连接到用于色谱的第一固定相和第二固定相的装置的第一固定相中的至少一个。

细胞和其它复杂生物材料的色谱分离

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2012年2月23日向美国专利商标局提交的美国临时专利申请61/602,150“细胞和其他复杂生物材料的色谱分离”的优先权权益,所述申请的全部内容并入本文用于全部目的。

发明领域

[0003] 本发明涉及靶细胞或不同(复杂的)生物材料的色谱分离,特别是通过柱色谱法如亲和色谱法或凝胶渗透色谱法。本发明采用结合到位于靶细胞表面上的受体分子的受体结合试剂。本文公开的方法也可以被描述为(无痕)细胞亲和色谱技术(CATCH)。总之,本发明为生物材料的无痕分离提供了新方法,所述生物材料如细胞、细胞器、病毒等。本发明还涉及一种用于分离细胞和其他复杂生物材料的设备(apparatus)。

[0004] 发明背景

[0005] 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。

[0006] Bonnafous等人, *J. Immunol. Methods*. 1983 Mar 11; 58 (1-2): 93-107描述了具有通过可切割的汞-硫键固定的配体细胞亲和色谱,这意味着经由共价键固定配体。在这种方法中, Bonnafous等人将有机汞mersalyl缀合到携带伯胺基团的trisacryl珠子。根据 Bonnafous等人, 硫醇化配体可以通过可切割Hg-S键共价固定在这个基质上。 Bonnafous等人报道了细胞分离的两个模型研究: (i) 伴刀豆球蛋白A用N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)-丙酸酯硫醇化且固定到mersalyl-trisacryl; 结合到伴刀豆球蛋白A-mersalyl-trisacryl的小鼠胸腺细胞通过短硫醇处理从支持物上洗脱, 其保存细胞生存力; (ii) 抗二硝基苯基抗体用S-乙酰基-巯基琥珀酸酐修饰, 且固定到mersalyl-trisacryl上; 之前用三硝基苯磺酸标记的绵羊红细胞结合到这种支持物且通过硫醇处理回收而没有溶血。

[0007] 关于这点请注意, 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特异于所需细胞类型如免疫配体的固定化配体。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., 等人, *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-亲和柱层析法已被用于从健康白细胞中分离白血病细胞 (Ohba, H., 等人, *Cancer Letters* (2002) 184, 207-214)。

[0008] 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孔。由于扩散限制, 使用大孔的吸着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, 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认为是一种细胞亲和色谱法的替代技术(参见例如Dainiak, M.B., 等人, *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。

[0009] 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 (FACS™)。通过流式细胞术的细胞分选个别地分析细胞, 流式细胞术中通常荧光团耦合到抗体, 用于标记细胞。细胞在极高速高压下使用细胞分选器分离。FACS™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。FACS™的另一个缺点是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, 在细胞选择过程中应用的压力可能会损害细胞效应子功能。

[0010] 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, 但选择过程是健壮的, 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结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。同时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WO 02/054065和美国专利7,776,562中所描述的, 其中对位于细胞表面上的受体表现出低亲和结合的受体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(目的是除了一个感兴趣的, 移除所有细胞群)相比, 在每次选择后移除低亲和受体结合试剂的使用Streptamer®技术的连续阳性选择生成极高纯度和产量的细胞群。

[0011] 本发明的一个目标是提供一种方法和一种设备, 其克服了已知细胞分离技术的缺点, 例如所描述的FACS™和MACS技术。例如, 本发明旨在提供一个快速、高效和温和的细胞选择程序, 尤其是使得连续阳性细胞选择能够分离复杂细胞群, 如用于研究、诊断、特别是治疗目的的调控T细胞或中央记忆T细胞。理想情况下, 这个新方法和设备也应适用于分离细胞外的其他复杂生物材料。

[0012] 这个目的被独立权利要求的主题解决, 此外是如独立权利要求中所述的方法、用途和装置(arrangement)。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供用于分离其在表面上具有已知受体分子的所需细胞、包括从其他在其表面缺乏这个受体的细胞中分离这种细胞的方法、套件、设置、试剂的组合和使用色谱固定相的用途。

[0015] 根据第一方面, 本发明提供了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,该方法包括:

[0016] -提供样品,所述样本包含所述靶细胞,

[0017] -提供受体结合试剂,所述受体结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

[0018] 其中,包含在所述受体结合试剂中的结合位点B能够特异性结合到所述靶细胞表面上的受体分子,其中,经由所述结合位点B的受体结合试剂和受体分子之间的结合离解常数(K_D)具有低亲和性,或其中经由所述结合位点B的受体结合试剂和受体分子之间的结合离解速率常数(k_{off})具有约 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更大的值,其中包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合到亲和试剂的结合位点Z,和

[0019] -使所述样品在合适的固定相上进行色谱,所述固定相具有固定于其上的所述亲和试剂,

[0020] 其中所述亲和试剂包含结合位点Z,其中所述结合位点Z与包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C形成可逆的键,且其中所述受体结合试剂的结合位点B结合到所述靶细胞表面上的受体分子,由此使所述靶细胞可逆地固定在所述固定相上。

[0021] 根据第二方面,本发明提供了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:

[0022] -提供样品,所述样品包含所述靶细胞和受体结合试剂,所述受体结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,其中,包含在所述受体结合试剂中的结合位点B能够特异性结合到所述受体分子,且

[0023] -使所述样品在合适的固定相上进行色谱,所述固定相为凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中所述凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质包含亲和试剂,其中所述亲和试剂包含特异性结合到包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z,由此分离所述靶细胞。。

[0024] 根据第三方面,本发明提供了一种从样品中色谱分离靶细胞的方法,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:

[0025] -提供样品,所述样品包含所述靶细胞,

[0026] -提供受体结合试剂,所述受体结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

[0027] -其中,包含在所述受体结合试剂中的结合位点B能够特异性结合到所述靶细胞表面上的受体分子,

[0028] -其中,包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体能够可逆地结合到亲和试剂的结合位点Z,且

[0029] -使所述样品在合适的固定相上进行色谱,所述固定相具有固定于其上的亲和试剂。

[0030] -其中所述亲和试剂包含结合位点Z,其中所述含结合位点Z与包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C形成可逆的键,且其中所述受体结合试剂的结合位点B结合到所述靶细胞表面上的受体分子,由此使所述靶细胞可逆地固定在所述固定相上,

[0031] -提供竞争试剂,所述竞争试剂包含结合位点,从而特异性结合到所述亲和试剂的结合位点Z;

[0032] -将所述竞争试剂负载到第一固定相上,

[0033] 由此允许破坏在(多个)所述受体结合试剂、所述受体分子和所述亲和试剂之间形

成的非共价可逆复合物；

[0034] -从所述第一固定相的洗脱液回收洗脱样品，其中所述洗脱样品包含所述靶细胞；

[0035] -使所述洗脱样品在第二合适的固定相上进行色谱，所述第二固定相为凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质，其中所述凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质包含亲和试剂，所述亲和试剂具有特异性结合到包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z，且

[0036] -使所述洗脱样品通过所述第二色谱柱。

[0037] 根据第四方面，本发明提供了受体结合试剂和/或亲和试剂用于使用固定相经由色谱分离靶细胞的用途，其中所述靶细胞在所述靶细胞表面上具有受体分子，其中所述受体结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C，所述受体结合试剂的结合位点能够特异性结合到所述靶细胞的受体分子，其中经由所述结合位点B的受体结合试剂和受体分子之间的结合的离解常数(KD)具有低亲和性，或其中经由所述结合位点B的受体结合试剂和受体分子之间的结合的离解速率常数(koff)具有约 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更大的值，且其中包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合到所述亲和试剂的结合位点Z。

[0038] 根据第五方面，本发明提供链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白(类似物)、抗生物素蛋白和抗生物素蛋白类似物中的一个用于经由色谱分离靶细胞的用途，其中所述色谱是凝胶过滤色谱。

[0039] 根据第六方面，本发明提供纤维素膜、塑料膜、多糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、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、聚(N-异丙基丙烯酰胺)接枝二氧化硅、苯乙烯-二乙烯基苯凝胶、丙烯酸酯或丙烯酰胺和二醇的共聚物、多糖和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的共聚物中的一个和其任何两个或更多的组合的色谱基质的用于分离细胞的用途，所述细胞包含细胞核。

[0040] 根据第七方面，本发明提供用于色谱的第一固定相和第二固定相的装置，

[0041] 其中所述第一固定相适用于细胞分离，所述第一固定相由亲和色谱基质限定，其中所述亲和色谱基质具有固定于其上的亲和试剂，其中所述亲和试剂具有至少一个能够可逆地结合到包含在受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z，

[0042] 其中所述第二固定相适用于从其他组分中分离靶细胞，所述第二固定相为凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质，其中所述亲和色谱基质、或凝胶过滤和亲和色谱基质包含亲和试剂，所述亲和试剂具有特异性结合到包含在所述受体结合试剂中的所述结合配偶体C的结合位点Z。在一些实施方案中，包含在所述第一固定相和第二固定相中/固定于所述第一固定相和第二固定相上的亲和试剂是相同的。在一些实施方案中，包含在所述第一固定相和第二固定相中/固定于所述第一固定相和第二固定相中的亲和试剂是链霉亲和素、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。

[0043] 根据第八方面，本发明提供一种用于分离靶细胞的套件，其中所述靶细胞在所述靶细胞表面上具有受体分子，所述套件包含：

[0044] (a) 受体结合试剂，所述受体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结合试剂中的结合位点B能够特异性结合到所述靶细胞表面的受体分子，且其中包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合到多聚化试剂上的结合位点Z；
和

[0045] (b) 适用于细胞分离的固定相,所述固定相由凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质限定,其中所述亲和色谱基质、或所述凝胶过滤和亲和色谱基质包含亲和试剂,所述亲和试剂具有能够可逆地结合到包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z。

[0046] 根据第九方面,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:

[0047] -提供样品,所述样品包含所述靶细胞,

[0048] -提供受体结合试剂,所述受体结合试剂包含单价结合位点B和结合配偶体C,其中所述受体结合试剂选自单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、适体和MHC分子,

[0049] 其中包含在所述受体结合试剂中的单价结合位点B能够特异性结合到所述靶细胞表面上的受体分子,其中包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合到亲和试剂的结合位点Z,和

[0050] 使所述样品在合适的固定相上进行色谱,所述固定相具有固定于其上的所述亲和试剂,其中所述亲和试剂包含结合位点Z,其中所述结合位点Z与包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C形成可逆的键,且其中所述受体结合试剂的结合位点B结合到所述靶细胞表面上的受体分子,由此使所述靶细胞可逆地固定在所述固定相上。

[0051] 根据第十方面,本发明提供一种用于纯化靶细胞的设备,所述设备包括用于色谱的第一固定相和第二固定相的至少一个装置。这个装置的第一固定相适用于细胞分离,其中所述第一固定相是亲和色谱基质,其中所述亲和色谱基质有固定于其上的亲和试剂,其中所述亲和试剂具有至少一个能够可逆地结合到包含在受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z。所述第二固定相适用于细胞分离,其中所述第二固定相是凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质。亲和色谱基质或凝胶过滤和亲和色谱基质包含亲和试剂,所述亲和试剂具有特异性结合到包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C的结合位点Z。

[0052] 根据第十一方面,本发明提供一种就靶细胞表面上的所需受体分子的重组表达筛选所述靶细胞的方法,其中所述所需受体分子要在所述靶细胞表面上表达,所述方法包括:

[0053] -提供样品,所述样品包含疑似重组表达所述所需靶受体的靶细胞,

[0054] -提供受体结合试剂,所述受体结合试剂包含结合位点B和结合配偶体C,

[0055] 其中包含在所述受体结合试剂中的结合位点B能够特异性结合到所述靶细胞表面上的所需受体分子,

[0056] 其中包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C能够可逆地结合到亲和试剂的结合位点Z,和

[0057] -使所述样品在合适的固定相上进行色谱,所述固定相具有固定于其上的所述亲和试剂,

[0058] 其中所述亲和试剂包含结合位点Z,其中所述结合位点Z与包含在所述受体结合试剂中的结合配偶体C形成可逆的键,且其中所述受体结合试剂的结合位点B结合到所述靶细胞表面上的受体分子,由此使所述靶细胞可逆地固定在所述固定相上。

[0059] 附图简述

[0060] 参照详述并当结合非限制实施例和附图考虑时,本发明将被更好的理解。这些图说明本发明方法的实施方案。不受理论约束,附图包含关于潜在的分选机制的结论。给出的

结论仅为说明之用,仅仅服务于允许可视化令人惊讶的可实现分离如何在分子水平上设想。

[0061] 图1描述一个分离靶细胞(2)的方法的实施方案,靶细胞(2)在靶细胞表面上具有受体分子(4)(即靶细胞由存在至少一个常见特异性受体分子(4)所定义)。包含靶细胞的样品也可包含其他细胞(22),其缺乏受体分子(4),而是在其表面上具有不同的受体分子(44)。例如,例如在包含靶细胞的样品中提供受体结合试剂(1)。受体结合试剂(1)具有结合位点B(3),其特异性结合到受体分子(4)。受体结合试剂(1)还包含结合配偶体C(5),其可特异性且可逆地结合道亲和试剂(8)的结合位点Z(6)。在一些实施方案中,受体结合试剂可具有单价结合位点B,且可以是单价抗体片段(例如,Fab片段、单链Fv片段或Fv片段)或具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、适体或MHC分子。在这种背景下,注意本发明所用亲和试剂也可以具有两个或更多个可以由结合配偶体C结合的结合位点Z,由此提供受体结合试剂的多聚化。因此,本文使用的该亲和试剂也可以是多聚化试剂。例如,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、抗生物素蛋白突变蛋白或其混合物。此外,耦合到不同亲和试剂的不同色谱基质可以在柱中分层,从而形成用于分离的多组分系统。使包含受体结合试剂(1)和靶细胞(2)的样品与色谱基质(19)接触,亲和试剂(8)固定在色谱基质(19)上。亲和试剂(8)具有多个结合位点Z(6),其特异性结合到结合配偶体C(5),结合配偶体C(5)被包含在受体结合试剂(1)中。受体结合试剂(1)经由结合配偶体C结合到亲和试剂(8)上的结合位点Z(6),由此经由复合物固定靶细胞(2),所述复合物由亲和试剂一个或多个的结合位点Z和色谱基质(19)上的受体结合试剂的结合位点Z形成。由此样品中靶细胞(2)减少,因此靶细胞(2)被从包括受体结合试剂(1)的样品的其他组分中分离。在这种背景下,注意受体结合试剂(1)可以包含在包含要被分离的靶细胞的样品中,或在加入包含靶细胞的样品中之前,将受体结合试剂(1)加入到色谱基质(19)中以结合到固定于其上的多聚化试剂(8)(此方面还参见实验部分)。当滤筒(cartridge)填充这样的亲和色谱基质(19)并用于靶细胞的分离时,通过亲和色谱法的方式,这样的滤筒本文也称为“选择筒”。在这方面注意,这种色谱法可以作为柱层析法或平面色谱法实施。

[0062] 图2描述一个分离在靶细胞表面上具有受体分子(4)的靶细胞(2)的方法的另一个实施方案。图2所示的方法可以独立实施或与图1所描述的方法结合实施(后一种情况下,图1所示方法实施之后,实施图2的方法)。图2方法中使用的样品包含靶细胞(2)、受体结合试剂(1)和竞争试剂(7)。受体结合试剂(1)具有结合位点B(3),其能够特异性结合到受体分子(4)。受体结合试剂(1)还包括结合配偶体C(5),其能够特异性结合到亲和试剂(8)上的结合位点Z(6)(亲和试剂(8)可以与图1所示亲和/多聚化试剂(8)相同)。亲和试剂(8)具有多个结合位点Z(6),它能够特异性结合到包含在受体结合试剂(1)中的结合配偶体C(5)。竞争试剂(7)也具有能够结合到亲和试剂(8)上的结合位点(6)的结合位点(9)。也可以是全部竞争试剂(7)形成结合位点(9)的情况。例如对于全部竞争试剂形成结合位点(9)的情况,竞争试剂(7)可以是具有链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的亲力的生物素或生物素衍生物,而受体结合试剂(1)中的结合配偶体C(5)可以是融合到受体结合试剂(1)的链霉亲和素结合肽。竞争试剂(7)和受体结合试剂(1)均结合到多个包含在亲和试剂(8)中的结合位点Z(6)的结合位点(6)。因此,竞争试剂(7)和受体结合试剂(1)被固定在色谱基质(19)上。结果,包含样品细胞的样品中竞争试剂(7)和受体结合试剂(1)减少。由于竞争试剂(7)和受体

结合试剂(1)均结合到包含在色谱基质(19)中的亲和试剂,靶细胞(2)没有结合到色谱基质,并将例如通过其中色谱基质用作固定相的柱子。当滤筒填充这种色谱基质(19)并用于消耗/去除包含靶细胞(群)的样品的反应物时,这种滤筒也称为“去除滤筒”。在这方面注意,这种色谱法可以作为柱层析法或平面色谱法实施。

[0063] 图3显示一个分离/隔离含有核(2)的靶细胞的方法的实施方案的实施方案。提供包含靶细胞(2)的样品,和例如可选地,受体结合试剂(1)和竞争试剂(7)。将样品负载到层析柱上,所述层析柱包含凝胶过滤介质(19),所述凝胶过滤介质(19)选自使用选自下述的色谱基质的基质:多糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、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、聚(N-异丙基丙烯酰胺)接枝二氧化硅、苯乙烯-二乙烯基苯凝胶、丙烯酸酯或丙烯酰胺和二醇的共聚物、多糖和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的共聚物的一个和其任何两个或更多的组合。由于样品允许通过凝胶过滤基质(19),受体结合试剂(1)和竞争试剂(7)在柱子上保持更长时间。例如,这些试剂可以进入凝胶过滤基质的孔,而靶细胞较早从色谱柱(2)洗脱,并可被收集进一步使用。

[0064] 图4描述一个分离靶细胞(2)的方法的另一个实施方案,所述靶细胞由靶细胞表面上存在至少一个常见特异性受体分子(4)所定义。在这种方法中,使用第一色谱柱(选择滤筒)和第二色谱柱(去除滤筒)。提供的样品尤其包含具有受体分子(4)的靶细胞(2)和在其表面上具有不同受体分子(44)的其他细胞(22)。样品还包括受体结合试剂(1),其具有特异性结合到受体分子(4)的结合位点B(3)。受体结合试剂(1)还包括结合配偶体C(5),其特异性结合到亲和试剂(8)的结合位点Z(6)。将样品负载到第一色谱柱上,所述第一色谱柱具有合适的亲和色谱基质(29)形式的固定相,其中亲和色谱基质(29)具有固定于其上的亲和试剂(8)。在多个受体结合试剂(1)、亲和(多聚化)试剂(8)和靶细胞(2)(而非其他细胞(22))之间形成非共价可逆复合物。其他细胞将自发或洗涤色谱柱之后通过第一色谱柱(可选的洗涤步骤未示于图4)。竞争试剂(7)然后负载到色谱柱上。竞争试剂(7)具有结合位点(9)(或构成结合位点),其能够结合到亲和试剂(8)的结合位点Z(6)。多个竞争试剂(7)存在且其部分与亲和试剂(8)形成复合物,并由此固定在色谱基质(29)上。由于这种竞争性结合,结合配偶体C(5)(其包含在受体结合试剂(1)中)与结合位点Z的结合被破坏。通过这样做,受体结合试剂从色谱基质(29)释放,因此受体结合试剂(1)、亲和试剂(8)和靶细胞(2)之间形成的非共价可逆复合物也离解。收集来自第一色谱柱的洗脱液的洗脱样品,其包含靶细胞(2)、竞争试剂(7)和受体结合试剂(1)。洗脱样品被负载到第二色谱柱,其具有合适的固定相,这个固定相既是亲和色谱基质(19),同时也可以作为凝胶渗透基质。亲和色谱基质(19)具有固定于其上的亲和试剂(8)。例如,亲和试剂(8)可以是链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白突变蛋白或其混合物。受体结合试剂(1)和竞争试剂(7)结合到亲和试剂(8)上的结合位点Z(6),由此被固定在色谱基质(19)上。因此,包含所分离靶细胞的洗脱样品中受体结合试剂(1)和竞争试剂(7)减少。不含任何反应物的靶细胞现在处于用于一步使用的状态,例如,用于诊断应用(例如,进一步FACS™分选)或用于基于任何细胞的治疗应用。

[0065] 图5显示从外周血单核细胞(PBMC)中富集CD8+细胞的一个实验的结果。这个实验在两个柱子上进行的,这两个柱子都包含Sephadex-50树脂耦合Strep-tactin®作为亲和试

剂和使用CD8结合Fab片段作为单价受体结合试剂,携带链霉亲和素结合肽作为结合配偶体C。图B-D图显示一个根据本发明的方法的分离的结果,而图E-G显示阴性对照的结果。

[0066] 图6a和图6b都是本发明用于分离细胞的设备的实施方案的示意图,所述设备使用选择滤筒和去除滤筒的至少一个顺序装置。图6a的设备10包括蠕动泵102和各种控制用于色谱分离靶细胞的液体相(样品缓冲液、洗涤缓冲液、洗脱液)的流动的阀门(例如,磁性阀)。蠕动泵和阀门由微处理器(未显示)控制。设备10的各个储器和滤筒经由管400彼此流体连接。设备10包括缓冲液储器114,其经由样品入口如管400流体连接至包含样品(例如血液或其它身体细胞)的样品储器116,所述样品包括将被纯化的靶细胞。包含在合适的缓冲液中的细胞样品接下来被应用到第一选择滤筒104,其包含合适的固定相,如图3所示具有固定于其上的亲和试剂的亲和色谱基质形式。在选择滤筒中,携带第一类特异性常见受体分子的靶细胞通过特异性结合到第一类受体分子的受体结合试剂的方式固定。不携带第一类受体分子的细胞流动通过柱子且经由废物储器112被丢弃。存储在洗脱缓冲液储器110中的洗脱液(如这里所示的竞争试剂)接下来被应用到柱子中,从而导致破坏亲和试剂和受体结合试剂之间形成的可逆的键,因此也洗脱靶细胞。然后将包含靶细胞的洗脱液应用于去除滤筒106,其如图3所示包含亲和试剂存在于其上的第二固定相。在亲和试剂捕获/固定受体结合试剂和竞争试剂的同时,纯化的靶细胞通过这个柱子,并被导向选择滤筒204和去除滤筒206的第二装置。靶细胞在这第二装置中经由如上所述其表面上第二类常见特异性受体分子纯化,其表面不携带第二类受体分子的细胞流动经过选择滤筒且经由废料储器212被丢弃。图6a中流体连接到选择滤筒和去除滤筒的第二顺序装置的选择滤筒204的洗脱缓冲液储器110被描述为连接到选择滤筒104的另外的储器。然而,在使用相同的竞争试剂的情况下,装置10可以仅包括一个洗脱缓冲液储器,其流体连接到多个“滤筒装置”的每个的选择滤筒。最后,去除滤筒206流体连接到样品出口214以收集所分离靶细胞。图6b的设备具有类似的设计,其有三个顺序连接的“滤筒装置”,每个由选择滤筒和去除滤筒组成。图6b的设备还包括温度控制元件以保持恒温,例如4℃、15℃或25℃。

[0067] 图7a至7c显示从外周血单核细胞(PBMC) CD8+细胞中富集人CD8+细胞的另一个实验的结果,图7a显示PBMC的起始样品,图7b显示CD8+细胞阴性洗涤级分,图7c显示CD8+阳性洗脱液级分。

[0068] 图8a至8c显示从全血中富集人CD8+细胞的一个实验的结果,图8a显示起始全血样品,图8b显示CD8+细胞阴性洗涤级分,图8c显示CD8+阳性洗脱液级分。

[0069] 图9a至9c显示从脾细胞中富集鼠CD4+细胞的一个实验的结果,图9a显示起始脾细胞样品,图9b显示CD4+细胞阴性洗涤级分,图9c显示CD4+阳性洗脱液级分。

[0070] 图10a至10c显示从外周血单核细胞(PBMC)中富集人CD4+细胞的一个实验的结果,图10a显示PBMC的起始样品,图10b显示CD4+细胞阴性洗涤级分,图10c显示CD4+阳性洗脱液级分。

[0071] 图11a至11c显示从全血中富集人CD4+细胞的一个实验的结果,图11a显示起始全血样品,图11b显示CD4+细胞阴性洗涤级分,图11c显示CD4+阳性洗脱液级分。

[0072] 发明详述

[0073] 本发明提供执行细胞和其他生物实体如细胞器、病毒、脂质体等的液体色谱分离的方法和设备(下文提及靶细胞时还包括提及所有其他生物实体)。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。在其表面上具有至少一个常见受体分子的几乎任何所述靶细胞均可以从包含在样品中的其他组分中分离。为了使本文描述的亲和色谱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。本文使用的术语“(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。这意味着靶细胞/生物实体/囊泡或靶细胞群被在表面上存在至少一个常见表面特异性受体分子定义。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,靶细胞在实施本发明方法获得的样品中富集。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%的含量富集至从本发明方法收集的样品中约10%或更多、或20%或更多、30%或更多、40%或更多。“分离”也意味着获得的样品包含靶细胞作为基本上唯一类型的细胞(细胞群),例如,靶细胞代表样品中存在的细胞的超过75%、或超过80%、或超过85%、或超过90%、或超过95%或超过97%或超过99%。“分离的”还包括已经历本发明的分离/纯化方法之后,含有靶细胞的样品没有反应物(例如,本文所定义的受体结合试剂或竞争试剂)。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)。分析目的包括例如诊断应用以及基础研究应用,其中例如本发明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重组表达(同样见下文)。

[0074] 在一些实施方案中,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,包括啮齿类动物物种的细胞,或两栖动物细胞,如滑体亚纲包含如青蛙、蟾蜍、火蜥蜴或蝾螈的细胞。哺乳动物细胞的例子包含但不限于血液细胞、精子细胞或组织细胞,如肝细胞或干细胞,如源于合适来源的CD34-阳性外周血干细胞或胚胎干细胞关键蛋白(Nanog)或Oct-4表达干细胞。血液细胞可以如白细胞或红细胞。白细胞可以如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性细胞、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⁺T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-辅助细胞如CD4⁺T-辅助细胞、B细胞或自然杀伤细胞,提到的只是一些示例性例子。

[0075] 靶细胞群或如上提到的任何其他生物实体群,其膜(也可以是脂质双层)将内部与外部环境(环境)分离并且进一步特点是表面上包含常件特异性受体分子,可以通过本发明的方法在任何使用的纯化试剂(受体结合试剂、竞争试剂、亲和/多聚化试剂)的顺序去除下进行纯化,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,这一事实提供了调节优势,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患者。在这种情况下,相比于纯化试剂与药剂(为细胞或脂质体)一起施用的情况,监管当局如FDA(美国)或EMA(欧洲)对所述纯化试剂的生产过程要求较少的昂贵的约束。因此,关于本发明的方法

还存在一个明显的技术优势,对于实体纯化,其生理状态可以不像对例如脂质体一样操纵,如果这种脂质体必须纯化且用作药物的话。

[0076] 哺乳动物的实例包括但不限于大鼠、小鼠、兔、天竺鼠、松鼠、仓鼠、刺猬、猫、鸭嘴兽、美洲鼠兔、犰狳、狗、狐猴、山羊、猪、负鼠、马、大象、蝙蝠、土拨鼠、猩猩(*orang-utan*)、猕猴(*rhesus monkey*)、绒毛猴(*woolly monkey*)、猕猴(*macaque*)、黑猩猩、绢毛猴(*saguinus oedipus*)、绒猴和人。例如,细胞可以使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。

[0077] 靶细胞将由其分离的样品可以是任何来源。其例如但不限于源自人、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、降雨样本、原子尘样本、污水样本、地下水样本、磨损样品、考古样品、食物样品、血液样品(包括全血)、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、咽喉拭子样品本、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,相应的样品将被预处理到任何程度。作为一个示例性实例,在用于根据本发明的方法之前,组织样品可能被消化、均质或离心。在另一个示例性实例中,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。

[0078] 通常,根据本发明的色谱方法是流体色谱法,通常是液相色谱法。色谱法可以以流动经过模式进行,其中应用包含要被分离的细胞的流体样品,例如,通过重力流或泵在包含色谱基质的柱子的一端,且其中流体样品存在柱子另一端的柱子上(这一点也参见实施例1-7)。此外,色谱法可以以“上下”模式进行,其中应用包含要被分离的细胞的流体样品,例如,通过在包含色谱基质的柱子的一端上的装有移液器头的移液器,且其中流体样品在柱子的另一端进入和离开色谱基质/移液器头(这一点参见实施例8至10)。或者,色谱法还可以以批处理模式应用,其中色谱材料(固定相)与包含细胞的样品一起孵育,例如,通过摇晃、旋转或重复接触和去除流体样品,如通过移液器。任何材料都可以作为本发明中的色谱基质,只要材料适用于色谱分离细胞。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细胞隔离(*cell isolation*)和/或细胞分离(*cell separation*)时不损害细胞生存力(或生物实体的生存力或稳定性)。本发明所使用的色谱基质保留于预定位置,通常为在预定位点,而要分离的样品及其内包含的组分的位置是变化的。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的一部分,流动相流动(或通过流经或以批处理模式)通过固定相且包含在液相中的组分在相之间的分布(溶解或分散)发生。因此,术语“色谱基质”和“固定相”本文可互换使用。在这方面,注意加入到液体样品中、与样品混合、然后从样品中去除(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并不是本文使用的固定相。因此,下述方法不是本发明的方法:在所述方法中,将这些(磁)珠

加入到含有靶细胞的样品中可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体),然后将珠子与样品,例如通过暂时将珠子放在适当位置,同时丢弃上清液。

[0079] 通常,各个色谱基质具有固相或半固相的形式,而包含要被分离(isolated/separated)的靶细胞的样品是液相。用于实现色谱分离的流动相同样是液相。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(参见实施例部分)。因此,色谱法既可以是柱层析法也可以是平面色谱法。除了标准色谱柱,允许双向流动的柱子如购自PhyNexus, Inc. San Jose, CA, U.S.A.的PhyTip®柱子或离心管可以用于基于柱子/基于流经模式的本文描述的细胞色谱分离。因此,允许双向流动的移液器头或柱子也被本文使用的术语“色谱柱”涵盖。如果使用颗粒基质材料,颗粒基质材料可以例如具有约5 μm 至约200 μm 、或从约5 μm 至400 μm 、或从约5 μm 至约600 μm 的平均粒径。如下详述,色谱基质可以是或包含如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。

[0080] 也适用于本发明的现有技术所使用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,Superflow™琼脂糖或Sephacryl®材料,如市场上可购买的不同珠子和孔尺寸的Superflow™Sephacryl®)或交联葡聚糖凝胶。另一个示例性实例是葡聚糖共价结合的微粒交联琼脂糖基质,这是市场上可以买到的(以各种珠子大小和不同孔尺寸)如Sephadex®或Superdex®,都可以从GEHealthcare获得。这种色谱材料的另一个示例性实例是Sephacryl®,其也以不同的珠子和孔尺寸从GEHealthcare获得。

[0081] 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。

[0082] 合适的合成聚合物的示例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酰胺和二醇的共聚物。一个示例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一个示例性实例是上述Sephacryl®系列材料。衍生化二氧化硅可以包括耦合到天然或合成聚合

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。

[0083] 在一些实施方案中,本发明中采用的色谱基质是凝胶过滤(也称为尺寸排阻)基质,例如当用于本文描述的去滤筒时。凝胶过滤可以具有这样的性质,这个性质设计为至少基本上不经历与要被分离的细胞的相互作用。因此,凝胶过滤基质允许主要基于其尺寸分离本文定义的细胞或其它生物实体。相应的色谱基质通常是如上所述的颗粒多孔材料。色谱基质可以具有某个排阻限值,通常这根据分子量定义,高于该分子量则分子完全排除进入孔中。定义尺寸排阻限值的相应分子量可以选择为对应于要被分离的靶细胞(或生物实体)的分子量的分子量以下。在这样的实施方案中,靶细胞被阻止进入尺寸排阻色谱基质的孔中。同样,是亲和色谱基质的固定相可以具有小于选定靶细胞尺寸的尺寸的孔。在示例性实施方案中,亲和色谱基质和/或凝胶过滤基质的平均孔尺寸为0至约500nm。

[0084] 存在于样品中的其他组分如受体结合分子或竞争试剂可以具有低于孔的排阻限值的尺寸,且其能够进入尺寸排阻色谱基质的孔中。在这些能够部分或全部进入孔体积的组分中,不易进入孔体积的较大分子通常会首先洗脱,而最小的分子最后洗脱。在一些实施方案中,尺寸排阻色谱基质的排阻限值选择为靶细胞的最大宽度以下。因此,可进入孔体积的组分通常比靶细胞在尺寸排阻色谱基质中保留更久/保留在尺寸排阻色谱基质上。因此,可以在与样品的其他物质/组分不同的色谱柱洗脱液中收集靶细胞。因此如受体结合试剂或可应用时的竞争试剂的组分在比靶细胞稍后的时间点从凝胶渗透基质中洗脱。如果凝胶渗透基质包含具有结合位点的亲和试剂(通常共价结合于其上),例如能够结合样品中的试剂如受体结合试剂和/或竞争试剂的结合位点Z,这种分离效果将进一步增强。受体结合试剂和/或竞争试剂将被亲和试剂的结合位点Z结合,由此固定在凝胶渗透基质上。这种方法通常在如本发明中所用的去滤筒中进行,且在一些实施方案中,根据本发明所述的方法、组合和套件包括和/或采用这样的凝胶过滤基质。在相应方法中,细胞被相应基于尺寸分离。

[0085] 本发明中所用的色谱基质还可以包括可被磁吸引的物质,如一个或多个可被磁吸引的颗粒或铁磁流体。相应的可被磁吸引的颗粒可以包含多聚化试剂或具有能够结合靶细胞的结合位点的亲和试剂。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。基于氧化铁磁性颗粒如可从Dyna1 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.等人已经描述了基于超顺磁Co和FeCo的磁性纳米颗粒,以及铁磁Co纳米晶体(J.Biotech.(2004),112,47-63)。然而,在一些实施方案中,本发明中所用色谱基质没有任何可被磁吸引的材料。

[0086] 在分离靶细胞的方法的一些实施方案中,采用色谱基质作为亲和色谱基质。亲和色谱基质本身包括永久结合(通常是共价结合)的部分,其能够特异结合选定的靶。例如,常规亲和色谱基质可以包括结合特定给定靶的抗体。或者,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试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分析物或要被分离的靶细胞。在其中使用色谱基质的本发明中,例如在如下详述的“选择滤筒”中,亲和和色谱基质本身不是设计成能够特异性结合要被分离的靶细胞。而是在这种实施方案中,本发明中使用的亲和色谱基质(固定相)包含亲和试剂,所述亲和试剂具有至少一个或多个能够特异性结合到也用于本发明的受体结合试剂的结合位点Z。当受体结合试剂与亲和/多聚化试剂接触时,经由受体结合试剂的结合配偶体C和亲和/多聚化试剂的一个或多个结合位点Z形成可逆复合体。因此,这个复合体的形成依赖于配体及其各自的结合配偶体之间的非共价相互作用,因而从根本上不同于如上Bonnafous等人所述的使用可切割的共价键。通常亲和试剂包含一个能够与结合配偶体C形成可逆的键的结合位点Z就是足够的,只要亲和试剂以足够高的表面密度存在/提供于亲和色谱基质上,从而当受体结合试剂和亲和试剂之间经由结合位点和结合配偶体C形成复合物时将导致亲合效应。然而,还可行的是亲和试剂包含两个或更多个结合位点Z用于结合配偶体C。在然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固定在亲和色谱基质上彼此紧密排布,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,发生亲合效应。因此,在这些实施方案中,类似于美国专利7,776,562、美国专利8,298,782或国际专利申请W002/054065中之一描述的亲合(多聚化)效应可以发生,以允许靶细胞在亲和色谱基质上的可逆多聚化。由于通过加入竞争试剂能够破坏亲和试剂(也可以充当多聚化试剂)的结合位点Z和受体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,在这种条件下受体结合试剂完全从靶细胞中离解,由此避免受体结合试剂影响靶细胞的功能状态。这种经由此亲和色谱法分离靶细胞因此并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/纯化的优点,其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。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进一步处理并打开了本文还描述的分离靶细胞的自动化的途径。

[0087] 在根据本发明的方法的其他实施方案中,使用的色谱基质具有固定于其上的亲和试剂。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(见下文)。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。在一些实施方案中,色谱基质包含在色谱柱中,例如装填在其中。通过固定的亲和试剂,色谱基质可以消耗受体结合试剂的流动相。接触色谱基质的样品,例如负载到与其装填的柱子上,同样可以耗尽其中的受体结合试剂。在根据本发明的一个方法中,受体结合试剂包含在与相应固定相即色谱基质接触的样品中。

[0088] 应用含有靶细胞的样品之后,随后用流动相洗涤色谱基质(无论是用于亲和色谱法还是用于凝胶渗透),所述固定相例如水性介质,如缓冲液,以变去除没有固定在色谱基质上的任何物质。然后,可以诱导上文描述的非共价复合物的离解,例如通过改变条件,该复合物的形成使靶细胞固定在亲和色谱基质上。这种条件的改变例如可以是水性流动相离子强度的改变或温度的改变。在一些实施方案中,采用竞争试剂以便诱导受体、受体结合试剂和亲和试剂之间的可逆非共价复合物的离解。通过占有或阻塞亲和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,竞争试剂能够结合亲和试剂。通过使用与亲和试剂具有特别高亲和力的竞争试剂,或通过相对于靶细胞和受体结合试剂中的至少一个使用过量竞争试剂(在这种情况下,相比于受体结合试剂的结合配偶体C,竞争试剂也可能对亲和试剂的结合位点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可以被破坏。允许靶细胞从色谱基质中洗脱,如从色谱基质装填于其中的柱子洗脱。收集洗脱液,由此收集靶细胞。

[0089] 在一些实施方案中,使用的源样品,其包含或疑似包含靶细胞,且将受体结合试剂加入到源样品中,以便允许形成上述包含靶细胞和在亲和色谱基质上的亲和试剂的非共价复合物。作为示例性实例,血液样品(例如全血样品)或淋巴样品可以定义这样的源样品(参见实施例部分)。可以选择具有所需靶细胞的结合位点的受体结合试剂,其分别存在于血液或淋巴中。受体结合试剂,任选的某个缓冲液,可以加入到血液样品或淋巴样品中。所用缓冲液与用于平衡色谱基质和用于后续洗涤的洗脱液至少基本上相同。随后,样品可以负载到色谱柱上。该色谱柱可以具有固定于其基质上的亲和试剂,所述亲和试剂可以结合受体结合试剂。另外,在靶细胞的样品应用于亲和色谱基质之前,受体结合试剂可以已经固定在亲和色谱基质上。在样本如血液或淋巴样品任选地与受体结合试剂已经被完全负载到色谱柱上之后,可以用流动相洗涤色谱基质。可以包含在用于洗涤色谱基质的缓冲液中的竞争试剂可以随后被负载到色谱柱上。随后,可以用流动相洗涤色谱基质。使用标准的检测技术,如光学检测设备,可以监测靶细胞的洗脱。然后可以收集靶细胞。因此,这样的洗脱液可以包含受体结合试剂和/或竞争试剂。

[0090] 为了能够进一步纯化靶细胞的洗脱液,色谱基质(例如尺寸排阻色谱基质)可以包含亲和试剂,其如固定在色谱基质上的分子,具有能够特异性结合到包含在受体结合试剂中的结合配偶体B和/或结合到竞争试剂的结合位点Z。

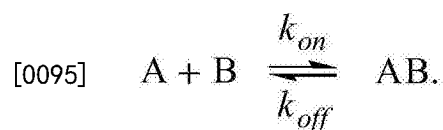
[0091] 因此,与上述一致,本文使用的尺寸排阻色谱基质可以具有固定于其上的亲和试剂。因为各自色谱基质也能够根据尺寸和/或形状分离物质,其也可以称为混合模式色谱基质。因此,在其中固定在这样的尺寸排阻色谱基质上的亲和试剂不匹配受体结合试剂的实施方案中(原因是受体结合试剂具有结合位点,其不能与选择的受体结合试剂形成复合物),仍然可以采用混合模式色谱基质作为尺寸排阻色谱基质。在其中固定的亲和试剂有结合位点且结合位点不具有与选择的受体结合试剂形成复合物的能力的实施方案中,亲和试剂可以用于使靶细胞可逆地固定在色谱基质上。

[0092] 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。作为示例性实例,水性溶液可以包含一个或多个缓冲化合物。多种缓冲化合物用于本领域,且可以用来执行本文描述的各种方法。缓冲剂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、巴比妥酸盐、草酸盐、乳酸盐、邻苯二甲酸盐、马来酸盐、甲次砷酸盐、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、钠和钾可以作为示例性实例。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。缓冲剂可以进一步包括稳定要被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的知识范围内，且可以经验性进行。

[0093] 与共同待审的国际专利申请PCT/EP2012/063969(公开为W02013/011011,其全部内容通过引用并入用于所有目的)一致,受体结合试剂和靶细胞上的受体分子之间的结合强度对靶细胞与亲和试剂经由受体结合试剂的可逆结合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的受体结合试剂和受体分子之间的结合的离解常数(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染色,只要经由结合位点B的受体结合试剂和受体分子之间的结合的离解发生得足够快。在这方面,经由结合位点B的受体结合试剂和受体分子之间的离解速率常数(k_{off})可以具有约 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更高的值(这个离解速率常数是表征受体结合试剂的结合位点B和靶细胞表面上的受体分子之间形成的复合物的离解反应的常数)。受体结合试剂的结合位点B和靶细胞表面上的受体分子之间的离解反应的离解速率常数(k_{on})可以具有任何值。为了确保受体分子和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 $3.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 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”意思是包含 $\pm 20.0\%$ 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 $\pm 0.01\%$ 。本文注意,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 。

[0094] 如果受体结合试剂用“A”表示,靶细胞表面上的受体用“B”表示,受体结合试剂和受体之间的复合物用“AB”表示,受体结合试剂和受体之间的双分子相互作用可以由双态过程描述,记为



[0096] 该过程的相应的离解 K_d 常数定义为

$$[0097] \quad K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]}$$

[0098] 在这些方程中, [A]、[B] 和 [AB] 是在给定温度和给定压力下, 受体、受体结合试剂(配体) 和相应复合物的平衡摩尔浓度。离解 K_d 常数也可以表示为on-rate (k_{on}) 常数与off-rate (k_{off}) 常数之比, on-rate (k_{on}) 常数表示复合物的结合/形成的速度, 也称为结合速率常数, off-rate (k_{off}) 常数表示复合物的分离的速度, 也称为离解速率常数, 其中

$$[0099] \quad K_d = k_{off}/k_{on}$$

[0100] 就这一点而言注意, 离解常数 K_d 定义一个已经达到平衡的状态。然而, 在色谱分离的条件下, 平衡不可能形成。在本发明中, 这或许可以解释为什么在一些实施方案中是off-rate (k_{off}) 常数而不是离解常数 K_d 可以决定可逆结合可能等于或大于——以数量术语(sec^{-1}) 为至少高达—— $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 。

[0101] 在一些实施方案中, 受体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。在一些实施方案中, 受体结合试剂具有能够结合到受体分子的至少两个(即多个结合位点B, 包括三个、四个或者五个相同的结合位点B)。在这些实施方案的任一个中, 受体分子经由(每个) 结合位点B的结合可以具有约 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更大的 k_{off} 值。因此, 受体结合试剂可以是单价的(例如单价抗体片段或单价人工合成结合分子(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®**”), 或是二价分子, 如抗体或其中两个结合位点均保留的片段, 如 $F(ab')_2$ 片段。在一些实施方案中, 受体分子可以是多价分子如五聚体IgE分子, 条件是 k_{off} 速率为 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更大。

[0102] 在本发明的一些实施方案中, 它是在分子水平上(而不是经由至少结合位点B的受体结合试剂和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)) 经由本文描述的可逆细胞亲和色谱技术提供(无痕) 分离生物材料。而是并如美国专利7776562或国际专利申请W002/054065所描述, 受体分子和受体结合试剂的结合位点B之间的低亲和力与经由固定化亲和试剂介导的亲合效应一起允许靶细胞的可逆和无痕分离。在这些实施方案中, 可以在亲和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亲和色谱基质中洗脱靶细胞(经由加入竞争试剂, 其将破坏形成于结合配偶体C和结合位点Z之间的结合(复合), 进而导致受体结合试剂从靶细胞离解)。如上所述, 此低结合亲和力可以由受体结合试剂经由结合位点B和靶细胞表面上的受体分子的结合的离解常数(K_D) 表征, 所述 K_D 在约 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 至约 $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 范围内。

[0103] 在一些实施方案中, 根据本发明的方法可以用于消耗之前用于细胞分离的试剂样品。例如, 受体结合试剂和竞争试剂可出现在如上所述亲和色谱法的选择滤筒的洗脱液中。使用根据本发明的方法, 这种试剂可以至少基本上(包括完全) 从样品去除, 例如从细胞群。作为示例性实例, 如上定义的受体结合试剂可以从样品中消耗至如FACS或Western印迹的检测限值以下的水平。可以使用竞争试剂以便从亲和纯化基质如亲和色谱珠子中洗脱靶细胞。这种竞争试剂具有能够特异性结合到亲和试剂的结合位点Z的结合位点。在这样的实施方案中, 本发明各自的方法可以服务于消耗受体结合试剂和竞争试剂, 包括去除这些试剂。

[0104] 在一些实施方案中, 分离靶细胞的方法可以包括两个纯化步骤, 其中只有第二步,

即在“去除滤筒”中去除受体结合试剂和/或竞争试剂,根据本发明进行。第一步可以是美国专利7,776,562、美国专利8,298,782或国际专利申请W0 02/054065中描述的分离靶细胞的方法。对于此样品,然后可以进行根据本发明的“去除方法”,以消耗靶细胞样品中再其他细胞和受体结合试剂与竞争试剂。同样,根据美国专利7,776,562、美国专利8,298,782或国际专利申请W0 02/054065在第一步中获得的样品也可以进行如上所述的凝胶渗透色谱,其中使用没有亲和试剂固定于其上的没有修饰的的色谱基质。也可行的是,第一个分离步骤是任何其他用于分离细胞的已知现有技术,例如,美国专利6,022,951的实施例11中描述的方法,然后进行在本发明的去除滤筒中实施的纯化方法。

[0105] 位于靶细胞表面(或生物实体的可及表面)上的受体分子可以是任何分子,只要其在根据本发明的方法中在色谱分离方法过程中保持共价或非共价键合到细胞表面即可。受体分子是受体结合试剂可以指向的分子。在一些实施方案中,受体是肽或蛋白质,如膜受体蛋白。在一些实施方案中,受体是脂质、多糖或核酸。作为蛋白的受体可以是外周膜蛋白或膜内在蛋白。在某些实施方案中。它可以具有一个或多个跨膜的结构域。作为一些示例性实例,具有跨膜结构域的膜蛋白可以是G-蛋白耦合受体,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、神经递质受体如配体门控的、电压门控的或机械门控的受体,包括乙酰胆碱、烟碱、肾上腺素、去甲肾上腺素、儿茶酚胺、L-DOPA-、多巴胺和5-羟色胺(生物胺、脑内啡/脑啡肽)神经肽受体、受体激酶如丝氨酸/苏氨酸激酶、酪氨酸激酶、孔/通道蛋白如氯通道、钾通道、钠通道、OMP蛋白、ABC转运体(ATP-结合盒-转运体)如氨基酸转运体、Na-葡萄糖转运体、Na⁺/碘化物转运体,离子转运体如集光复合物、细胞色素c氧化酶、ATP酶Na/K、H/K、Ca、细胞粘附受体如金属蛋白酶、整合素或catherin。

[0106] 在一些实施方案中,受体分子可以是定义所需的细胞群或亚群的抗原,例如血液细胞群或亚群,如淋巴细胞(如T细胞、T-辅助细胞如CD4⁺T-辅助细胞、B细胞和自然杀伤细胞)、单核细胞或干细胞,如CD34-阳性外周干细胞或Nanog或Oct-4表达干细胞。T-细胞的实例包括细胞如CMV-特异性CD8⁺T-淋巴细胞、细胞毒性T-细胞、记忆T-细胞和调节T-细胞(Treg)。Treg的示例性实例是CD4⁺CD25⁺CD45RA⁻Treg细胞,记忆T-细胞的示例性实例是CD62L⁺CD8⁺特异性中心记忆T-细胞。受体也可以是肿瘤细胞的标记物。

[0107] 如上所示,受体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能够结合到亲和试剂的结合位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。形成于包含在受体结合试剂中的结合配偶体C和亲和试剂的结合位点Z之间的非共价的键可以具有任何所需的强度和亲和力,只要其在进行本发明方法的条件下是可破坏的或可逆的即可。包含在受体结合试剂中的结合配偶体C和亲和试剂的结合位点Z之间的结合的离解常数(K_D)可以具有约10⁻²M至约10⁻¹³M范围内的值。因此,这种可逆的键可以例如具有约10⁻²M至约10⁻¹³M、或从约10⁻³M至约10⁻¹²M或约10⁻⁴M至约10⁻¹¹M、或约10⁻⁵M至约10⁻¹⁰M的K_D值。这种键的K以及形成于受体结合试剂的结合位点B和受体分子之间的键的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,且亲和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、美国专利8,298,

782或国际专利申请WO 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的亲试剂的任一组合,只要结合配偶体C和亲试剂的结合位点Z能够在(多价)复合物中可逆地结合或多聚化从而产生亲合效应即可。

[0108] 包含在受体结合试剂中的结合配偶体可以是例如基于碳氢化合物的(包括聚合物),且包括氮-、磷-、硫-、碳-、卤素-或拟卤素基团。它可以是醇、有机酸、无机酸、胺、膦、硫醇、二硫化物、烷烃、氨基酸、肽、寡肽、多肽、蛋白质、核酸、脂质、糖、低聚糖、或多聚糖。作为其它实例,它也可以是阳离子、阴离子、聚阳离子、聚阴离子、聚阳离子、电解质、聚电解质、碳纳米管或碳纳米泡沫。通常,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冠醚、免疫球蛋白、其片段和具有抗体样功能的蛋白质性结合分子。

[0109] 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,亲和试剂包含一个链霉亲和素类似物或与生物素可逆结合的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包含一个与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物,亲和试剂包含链霉亲和素、抗生物素蛋白、链霉亲和素类似物或与相应生物素类似物可逆结合的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,亲和试剂包含链霉亲和素、抗生物素蛋白、链霉亲和素类似物或与相应链霉亲和素或抗生物素蛋白结合肽可逆结合的抗生物素蛋白类似物。

[0110] 在一些实施方案中,包含在受体结合试剂中的结合配偶体可以包含链霉亲和素-结合肽Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys,亲和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,这两个例如被描述在美国专利6,103,493中,且可以以商标 **Strep-Tactin®** 商购获得。链霉亲和素结合肽可以例如是单一的肽如美国专利5,506,121中所描述的“**Strep-tag®**”,或是链霉亲和素结合肽,如国际专利公开WO 02/077018或美国专利7,981,632所描述,其具有两个或更多个单独的结合模块的顺序排布。

[0111] 在一些实施方案中,受体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,亲和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示例性实例,包含在受体结合试剂中的结合配偶体可以包含二硝基酚或异羟基洋地黄毒苷、寡组氨酸、多组氨酸、免疫球蛋白结构域、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)、VSV-G-标签(序列:Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys)、HSV-标签(序列:Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp)、T7表位(Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、单纯疱疹病毒糖蛋白D的序列Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp的HSV表位、序列Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu的转录因子c-myc的“myc”表位、V5-标签(序列:Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr)、或谷胱甘肽-S-转移酶(GST)。在这样的实施方案中,形成于亲和试剂(在这种情况下为抗体或抗体片段)的一个或多个结合位点和抗原之间的

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)或游离抗原蛋白质(如MBP或CBP)。亲和标签也可以是寡核苷酸标签。例如,这样的寡核苷酸标记可以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亲和试剂中。

[0112] 合适的结合配偶体的其他实例包括但不限于凝集素、蛋白质A、蛋白质G、金属、金属离子、次氨基三乙酸衍生物(NTA)、RGD-基序、右旋糖苷、聚乙烯亚胺(PEI)、氧化还原聚合物、糖蛋白、适体、染料、直链淀粉、麦芽糖、纤维素、几丁质、谷胱甘肽、钙调蛋白、明胶、多粘菌素、肝素、NAD、NADP、赖氨酸、精氨酸、苯甲脒、多聚U或寡-dT。凝集素如伴刀豆球蛋白A已知结合到多糖和糖基化蛋白。染料的示例性实例是三嗪染料如活性蓝F3G-A(CB)或红色HE-3B,其特异性结合NADH-依赖酶。Green A结合到辅酶A蛋白、人血清白蛋白和脱氢酶。染料7-氨基放线菌素D和4',6-联脒-2-苯基吡啶结合到DNA。金属阳离子如Ni、Cd、Zn、Co或Cu通常用于结合亲和标签如包含的寡组氨酸序列,包括六组氨酸或His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys标签(MAT标签)和N-甲基丙烯酰-(L)-半胱氨酸甲酯。

[0113] 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和亲和试剂的一个或多个结合位点之间的结合以存在二价、三价或四价阳离子产生。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'-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与大多数单价、二价、三价和四价金属离子形成复合物,如银(Ag^+)、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。作为示例性实例,本领域使用的标准方法是在挂组氨酸标签和铜(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。

[0114] 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包含钙调蛋白结合肽,亲和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,包含在受体结合试剂中的结合配偶体C包含FLAG肽,亲和试剂包含与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。在一个实施方案中,包含在受体结合试剂中的结合配偶体C包含寡组氨酸标签,亲和试剂包含结合寡组氨酸标签的抗体或过渡金属离子。所有这些结合复合物的破坏可以通过金属离子螯合如钙螯合完成,例如通过加入EDTA或EGTA(上述)。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体化,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和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。

[0115] 在一些实施方案中,亲和试剂是链霉亲和素或抗生物素蛋白或链霉亲和素或抗生

物素蛋白的任何类似物的低聚物或聚合物。结合位点Z是链霉亲和素或抗生物素蛋白的天然抗生物素结合。相应的低聚物或聚合物可以被多糖交联。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链霉亲和素或抗生物素蛋白的类似物的低聚物或聚合物,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。然而,链霉亲和素或抗生物素蛋白或链霉亲和素或抗生物素蛋白的任何类似物的交联低聚物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。

[0116] 在本发明的方法中,特异性结合到受体分子的受体分子结合试剂的一个或多个结合位点可以例如是抗体、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., 等人, FEBS Lett (1997) 409, 437-441)、十体(Stone, E., 等人, Journal of Immunological Methods (2007) 318, 88-94)和其他结构域抗体(Holt, L. J., 等人, 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含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含但不限于Fab片段、Fv片段、和单链Fv片段(scFv),包括二阶单链Fv片段。

[0117] 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等人, 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到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W001/04144)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形式在若干细胞表面受体中出现的所谓的A-结构域(Silverman, J., 等人, Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-1561)。adnectin源自人纤连蛋白的结构域包含三个可以针对与靶的免疫球蛋白样结合进行改造的环(Gill, D. S. & Damle, N. K., Current Opinion in Biotechnology (2006) 17, 653-658)。tetranectin源于相应人同源三聚体蛋白质,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)。peptoid可以作为蛋白质配体,是不同于肽的寡(N-烷基)甘氨酸,与肽的区别在于侧链连接到酰胺氮而非 α 碳原子。peptoid通常抗蛋白酶和其他修饰酶,且比肽具有高得多的细胞渗透性(参见例如Kwon, Y.-U., 和Kodadek, T., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 1508-1509)。

[0118] 适当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1

型结构域、纤连蛋白11型结构域、纤连蛋白111型结构域、PAN结构域、G1a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1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1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111.E等人,Protein Eng (1997) 10,949-57)、所谓的“小体(minibody)”(Martin等人,EMBO J (1994) 13,5303-5309)、双体(参见Holliger等人,PNAS USA (1993) 90,6444-6448)、所谓的“Janusis”(参见Traunecker等人,EMBO J (1991) 10,3655-3659或Traunecker等人,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序列蛋白。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。

[0119] 本文使用的术语“核酸分子”是指任何可能结构的核酸,如单链、双链或其组合。核酸包括例如DNA分子、RNA分子、使用核苷酸类似物或使用核酸化学产生的DNA或RNA类似物、锁核酸分子(LNA)、PNA分子(如上)和tecto-RNA分子(例如Liu, B., 等人, J. Am. Chem. Soc. (2004) 126, 4076-4077)。PNA分子是具有伪肽骨架的合成核酸类似物,其中例如DNA或RNA中存在的磷酸二酯骨架被短脂肪族部分重复单元替换,所述短脂肪族部分重复单元具有氨基端和羧基端,从而在低聚物或聚合物中形成酰胺键。LNA分子具有修饰的在C4'和O2'之间具有亚甲基桥的RNA骨架,所述亚甲基桥锁定N型结构的呋喃糖环,从而提供具有更高的双重稳定性和核酸酶抗性的相应分子。不像PNA分子,LNA分子具有带电骨架。DNA或RNA可以是基因组的或合成起源,且可以是单链或双链的。这种核酸可以是如mRNA、cRNA、合成RNA、基因组DNA、cDNA合成DNA、DNA和RNA的共聚物、寡核苷酸等。相应的核酸可以还包含非天然核苷酸类似物和/或被连接到亲和标签或标记。

[0120] 根据本发明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°C或以下,例如约14°C或以下、约9°C或以下或约6°C或以下的温度下实施。根据要被分离的靶细胞,合适的温度范围可以是例如约2°C至约45°C,包含约°C至约40°C、约3°C至约35°C,或约4°C至约30°C,如果水性基质用来包含靶细胞的话。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±约5°C、±约4°C、±约3°C、±约2°C、±约1°C或±约0.5°C下实施。温度可以例如选择为具有约5°C、约10°C、约15°C、约20°C或约25°C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,即被增加、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,如造约2°C至约40°C范围内或约3°C至约35°C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,分离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°C下进行。

[0121] 所述方法也可以使用部件套件实施,所述套件例如设计为进行如上详述的方法。所述套件包可以包括如上定义的受体结合试剂。所述套件例如可以包括填充如在溶液中的受体结合试剂的容器。所述套件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,提供以如何使用该套件来实现根据本发明的方法的说明书形式的通知。

[0122] 本发明还提供了链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白(类似物)、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白突变蛋白(类似物)或其混合物用于经由色谱分离靶细胞的用途,其中所述色谱是凝胶过滤色谱。为此,实施方案中,链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白突变蛋白或这些中任意的混合物如链霉亲和素和链霉亲和素突变蛋白的混合物,作为亲和试剂固定在本文描述的“去除滤筒”的固定相上。本文使用的术语“链霉亲和素”包括野生型链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白和链霉亲和素-样多肽。同样,本文使用的术语“抗生物素蛋白”包括野生型抗生物素蛋白以及抗生物素蛋白的突变蛋白,如亲和素、精氨酸修饰的去糖基抗生物素蛋白(其表现出更中性的pI并且可以作为天然抗生物素蛋白的替代物获得)。去糖基的中性形式的抗生物素蛋白包括那些可商购获得的形式,如可通过Sigma-Aldrich获得的“Extravidin”,或可从Thermo Scientific或Invitrogen获得的“NeutrAvidin”。

[0123] 在野生型链霉亲和素(wt-streptavidin)中,涉及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与野生型链霉亲和素序列具有一个或多个氨基酸置换、缺失或添加的多肽,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,或者它们可以只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生物素或生物素类似物的结合位点或链霉亲和素-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 19641876 A1、US 6,022,951、WO 98/40396或WO 96/24606中提到。

[0124] 在优选的实施方案中,用于经由色谱(其中所述色谱是凝胶过滤色谱)分离靶细胞的链霉亲和素突变蛋白是在美国专利6,103,493和DE 196 41876.3中描述的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点44至53的区域内具有至少一个突变。优选最小的链霉亲和素的突变蛋白,其N-端起始于野生型链霉亲和素的氨基酸10至16的区域,并且C-端结束于野生型链霉亲和素的氨基酸133至142的区域。这种优选的链霉亲和素突变蛋白的实例在位点44具有疏水脂肪族氨基酸(而非Glu)、在位点45具有任何氨基酸、在位点46具有疏水脂肪族氨基酸或/和在位点47具有碱性氨基酸(而非Val)。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,这两个被描述在美国专利6,103,493中,例如其可以以商标 **Strep-Tactin®** 商购获得。

[0125] 本发明还提供了用于纯化靶细胞的设备,其中所述设备包括如上所述用于色谱的第一固定相和第二固定相的至少一个装置,所述第一固定相和第二固定相意味着用于细胞选择的色谱柱(选择滤筒)和用于去除分离或染色靶细胞的试剂的第二色谱柱(去除滤筒)。进行这样的两步骤分离程序产生可以直接进行下一个所需的应用或选择循环的靶细胞。相比于FACS和MACS选择,在本发明色谱选择方法中,在两个选择循环之间不需要如洗涤和离心的进一步程序,并且细胞在功能上并不被如受体结合试剂或磁珠的结合的分离试剂损害。因此,本发明首次提供一个可靠的、构造简单的但仍有效纯化靶细胞的设备。

[0126] 与上述一致,本发明要求保护的设备可以包括多个串联流体连接的第一固定相和第二固定相(色谱柱)的装置。所述设备可以包括样品入口,所述样品入口流体连接到用于色谱的第一固定相和第二固定相的第一装置的第一固定相。所述设备还包括用于纯化的靶细胞的样品出口,所述样品出口流体连接到用于色谱的第一固定相和第二固定相的至少一个装置的最后一个的第二固定相。所述设备还包括竞争试剂容器,所述容器流体连接到用于色谱的第一固定相和第二固定相的装置的第一固定相中的至少一个。

[0127] 由于本领域普通技术人员能够很容易领会本发明的公开内容,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。

具体实施方案

[0128] 在当前实施例中,重组生产的针对细胞表面标记物的Fab片段用作受体结合试剂。Fab片段在大肠杆菌或其他宿主中重组表达,并且包含链霉亲和素结合肽作为结合配偶体C。四聚体的链霉亲和素或四聚体的链霉亲和素突变蛋白提供了一个或多个结合位点Z。将Fab片段结合到链霉亲和素,所述链霉亲和素本身共价连接到珠子上。这些珠子用于细胞悬浮液的亲和柱层析,所述细胞悬浮液具有含细胞外蛋白(受体分子)的细胞亚群,这些蛋白能够由Fab片段结合。未结合的细胞在此“选择滤筒”被冲走,而结合的细胞随后用含有生物素的缓冲液洗脱,所述缓冲液破坏Fab片段(作为受体结合试剂)的链霉亲和素结合肽和链霉亲和素突变蛋白之间的结合。因此,具有细胞结合于其上的Fab片段从柱子上释放,并且由于失去亲合效应,Fab片段从靶细胞离解。现在可以使用另一个具有共价结合的链霉亲和素的凝胶(色谱)基质,通过第二柱层析,从剩余Fab片段和生物素中纯化悬浮液,由此在空隙体积中洗脱细胞,而Fab片段和生物素定量结合在色谱基质中。细胞现在可以进行进一步的纯化循环,所述循环以相同的方式使用不同的Fab片段或任何其他受体结合试剂。具有Fab片段的柱子(选择滤筒)和随后的Fab和生物素去除柱子(去除滤筒)可以以连续方式通过简单线性一个接一个地设置柱子而连接。通过这样做,本发明可以提供如图6所示自动化细胞纯化系统,所述系统没有磁珠或任何手动干预,并且允许快速、简易和低成本的靶细胞纯化。

[0129] 例如,这个程序允许T-细胞连续纯化,该纯化起始于CD4⁺纯化,随后是从CD8⁺级分的CD25⁺纯化,从而得到如下所示的调节T-细胞的高度富集的级分。使用不同Fab片段的进一步纯化循环当然是可能的。

[0130] 从人血液中分离CD8⁺T-细胞(典型的单步纯化)材料与方法

[0131] 人血液用于使用标准程序分离PCMB。

[0132] 实施例1:经由柱色谱单步纯化CD8+细胞

[0133] Sephadex G50 (Sigma) 用作固定相,使用CNBr方法与 **Strep-tactin®** (重组链霉亲和素变体, IBA GmbH, 德国) 共价耦合。Sephadex G50的50%悬浮液包含共价耦合的70微克 **Strep-tactin®**/ml的珠子悬浮液。**Strep-tactin®**作为亲和试剂,在加入受体结合试剂和含有靶细胞的样品之前,亲和试剂被固定在亲和基质中。可商购获得的(产品编号:6-8003,来自 IBA GmbH, 哥廷根, 德国) CD8+结合的Fab片段用作(单价)受体结合试剂,所述片段的重链在羧基端融合有顺序设置的两个链霉亲和素结合模块(SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK),链霉亲和素结合肽作为结合配偶体C。

[0134] 用10微克CD8+结合Fab片段在4°C下孵育含有 **Strep-tactin®**的Sephadex G50的2ml悬浮液20分钟,以允许Fab片段结合CD8+靶细胞。然后将悬浮液填充到底部有90微米熔块的塑料微型柱(Mobitec, 哥廷根, 德国)中。因此,此柱子作为本文定义的选择滤筒。用含0.5%牛血清白蛋白的PBS(磷酸盐缓冲盐水)(PBSA缓冲液)平衡柱子,得到1ml的床体积。将1ml PBSA中来自PCMB的5百万个细胞负载到柱子中,以便使样品透入亲和色谱基质。然后用12ml PBSA洗涤柱子。收集洗涤缓冲液,然后3000g离心6分钟,以沉淀从柱子中洗涤的细胞(沉淀物1)。此后,6ml含有0.1毫摩尔生物素(Sigma)(作为竞争试剂)的PBSA被加入到柱子中,以便洗脱经由受体结合和多聚化试剂可逆固定在柱子上的CD8+细胞。收集包含生物素的级分,然后同上离心以沉淀细胞(沉淀物2)。

[0135] 在1ml PBSA中重悬来自两个级分的沉淀物,以用于分析。

[0136] 沉淀物1包含约390万个细胞,沉淀物2包含70万个细胞。

[0137] FACS分析(数据未显示)显示,CD8+细胞中,相对于沉淀物1,起始材料大量消耗CD8+细胞(约70%),沉淀物2显示纯度为68%的CD8+细胞。因此,可以经由可逆固定/亲和色谱法分离CD8+靶细胞。

[0138] 通过以下实验证实了从PBMC中富集CD8+细胞的整个结果,结果如图5所示。在包含如上所解释的耦合 **Strep-Tactin®**的Sephadex-50树脂的两个柱子上实施了富集。第一个柱子(选择滤筒)(图B-D)负载了从如上所述IBA GmbH商购获得的CD8结合Fab片段。第二个柱子(图E-G)用作这个选择滤筒的阴性对照(不得与去除滤筒混淆,所述去除滤筒是设置在选择滤筒后的“第二个柱子”),并且未负载这个CD8结合Fab片段。因此,第一个柱子应该显示细胞的CD8-Fab-特异性富集,而第二个柱子(阴性对照)则不应该这样。为了测定富集情况,在开始选择程序之前,测定PBMC中的CD8+T-细胞的细胞群(图5,图A,CD8+T-细胞18.4%,右上象限)。使PBMC级分设置到第一个柱子上之后,测定流经的非阻滞细胞(图B,CD8+T-细胞6.3%)。12.1%(18.4%-6.3%)或66%的CD8+T-细胞结合到柱子上。然后,可以通过加入生物素缓冲液(破坏Strep-标签/**Strep-tactin®**相互作用)和随后的洗涤步骤(图C+D,CD8+T-细胞47%和62.2%)特异性洗脱这些细胞。相比之下,在第二个柱子中没有发现CD8+T-细胞的富集(图D-E-F-G),原因是流经级分中(图E,CD8+T-细胞,17.0%)和洗脱馏分中(图F和G)的CD8+T-细胞群没有明显不同于选择程序之前(图A)。所应用细胞的约1%差别是柱子上未特异性结合的细胞的原因,显示所应用PBMC的95%通过该柱子。

[0139] 实施例2:从C8+细胞中去除生物素和Fab

[0140] 如上所述分离CD8⁺细胞,不同的是,生物素洗脱(6ml缓冲液)之后的细胞直接通过 Superflow™ Sepharose® 珠子(6ml床体积)的柱子,所述珠子具有共价结合于其上的 Strep-Tactin® (1BA GmbH,哥廷根,德国),具有300nM生物素/ml的结合能力。而 Superflow™ Sepharose® 珠子作为凝胶渗透基质用于分离/富集靶细胞,固定在珠子上的 Strep-Tactin® 对配有链霉亲和素结合肽的CD8⁺Fab和生物素都有亲和力。因此, Strep-Tactin® 作为生物素和CD8⁺Fab片段的亲和/去除试剂。收集填充Superflow珠子的第二个柱子(作为去除滤筒)的洗脱液(6ml)。

[0141] 用Western印迹试验,使用生物素分析和Fab片段分析,在包含靶细胞的洗脱液中未检出生物素和Fab片段(结果未显示)。使用FITC标记的生物素(Sigma)和荧光标记的CD8⁺Fab(1BA GmbH)实施一个类似的实验。当用敏感荧光计测量时,证实最终洗脱液中不含Fab片段或生物素这一事实。因此,发现生物素和Fab被完全去除,Superflow™/Strep-Tactin® 色谱之后的洗脱液包含95%至100%的CD8⁺细胞,细胞没有明显损失。

[0142] 实施例3:“线性流动”色谱的连续纯化

[0143] 由于实验2所描述的最后级分不含生物素和Fab(通过阻断 Strep-Tactin® 上的Fab结合位点,两者都会干扰后续纯化过程),纯化的CD8⁺细胞可以进入另一个纯化循环,该循环使用例如CD25⁺Fab片段(或存在于被分离的CD8⁺靶细胞的表面上的任何其他受体分子)。可以使用如图6a或图6b中所描述的设备实施这样的T-细胞的连续纯化。

[0144] 实施例4:通过色谱在平面基质上纯化细胞(Strep-Tactin®涂覆的硝化纤维素膜)

[0145] 在这个实验中,用于纯化实施例1和2中的细胞的(“三维”)柱色谱基质(涂覆有 Strep-Tactin® 的珠子)被 Strep-Tactin® 涂覆的平面基质代替。

[0146] 实验程序:

[0147] 1) Strep-Tactin® 非共价结合到硝化纤维素膜和纯化CD8⁺T细胞。

[0148] 关于 Strep-Tactin® 在膜上的非共价结合,将一块硝化纤维素膜(24cm²,Whatman, UK)放在皮氏培养皿中并用10ml PBS中的4mg Strep-Tactin® (1BA GmbH)孵育10分钟,然后用20ml PBS洗5次。然后加入5微克CD8⁺Fab片段(产品编号:6-8003-005,1BA GmbH,哥廷根,同上)到5ml PBS中,4℃孵育5分钟。然后加入FACS缓冲液(0.5%BSA(w/v),在PBS中,pH7.4)中的5百万个细胞(PBMC)并在4℃孵育10分钟。然后在10ml FACS缓冲液中洗涤膜五次,收集洗涤级分用于FACS分析。然后将膜在10ml包含1mmol生物素的FACS缓冲液中孵育5分钟。收集所得级分用于FACS分析。

[0149] FACS分析表明,含有生物素的级分为关于CD8⁺T细胞99.1%纯的。与原始材料相比,CD8⁺细胞的产量为约1.5%。因此,这个实验表明,使用平面色谱法以“批状”方式可以有效地分离靶细胞。

[0150] 实施例5:通过有Superflow™琼脂糖的柱层析法单步纯化人类CD8⁺细胞

[0151] 将3ml Superflow Strep-Tactin® (300nM生物素结合,1BA GmbH,哥廷根,德国)被

负载到微型柱 (Mobitec, 哥廷根, 德国) 上。用缓冲液 (PBS加上0.5%的牛血清白蛋白, “FACS缓冲液”) 平衡柱子, 然后负载来自人血液的PBMC (1000万个细胞, 在0.2ml FACS缓冲液中), 所述PBMC之前已经用12微克抗CD8的Fab (产品编号:6-8003, 1BA GmbH, 哥廷根) 孵育 (如上所述, Fab-片段的重链在羧基端融合有顺序设置的两个链霉亲和素结合模块SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK)。此柱子用作本文定义的选择滤筒。用12ml FACS缓冲液通过重力流洗涤柱子, 然后用12ml包含1mM生物素的FACS缓冲液进行洗脱。

[0152] FACS缓冲液的洗涤级分 (12ml) 仅包含1.77%的CD8+细胞, 相比之下起始级分 (A) 包含7.98%的CD8+细胞, 因此77.8%的CD8+细胞在柱子上被阻滞。用包含生物素的缓冲液级分 (B, 12ml) 洗脱导致大约65%的结合的CD8+细胞, 纯度为98.5%。这个实验也表明, 可以经由本文描述的可逆固定/亲和色谱法使用商购可得色谱基质分离CD8+靶细胞。

[0153] 实施例6: 经由柱色谱法单步纯化人CD8+细胞

[0154] 通过使用柱子从密度梯度 (Ficoll) 纯化的PBMC中纯化人CD8+细胞, 所述柱子由500 μ l **Strep-Tactin®**-琼脂糖 (从Agarose Beads Technologies, Madrid, Spain获得的交联琼脂糖, 其排阻尺寸相比于Superflow™琼脂糖减小) 珠子树脂制得, 所述珠子树脂用10 μ g抗-CD8Fab-片段 (产品编号:6-8003, 1BA GmbH, 哥廷根) 官能化。为此, 在细胞纯化之前, 通过以300 μ l/min的速度泵送1000 μ l包含Fab的洗涤缓冲液 (PBS加上0.5%牛血清白蛋白) 经过柱子, 在重链C端携带顺序设置的两个链霉亲和素结合模块SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK的Fab片段被负载 (固定) 到 **Strep-Tactin®**-琼脂糖基质上。为了纯化靶细胞, 用蠕动泵以300 μ l/min的流量, 自动负载 1×10^8 现配的PBMC (在2ml洗涤缓冲液中) 到柱子上。随后, 以2ml/min的速度, 通过用总共7ml的洗涤缓冲液重复洗涤循环 (4x), 从柱子中去除未结合的 (CD8-阴性) 细胞。最后, 通过加入5ml 100 μ m D-生物素溶液 (V=600 μ l/min) 并且用5ml洗涤缓冲液以2ml/min洗脱, 从亲和基质中去除结合的细胞, 从而从柱子中洗脱CD8+靶细胞。通过流式细胞术分析获得的CD8-阳性和-阴性级分。纯化CD8+靶细胞, 产量为80%, 纯度为88%。相应的起始-、阴性-和阳性-级分的点状图以及代表选择的相应纯度和产量如图7所示。

[0155] 实施例7: 经由柱色谱法单步从全血中纯化人CD8+细胞

[0156] 通过使用柱子从全血中纯化人CD8+细胞, 所述柱子由1200 μ l **Strep-Tactin®**-琼脂糖 (从Agarose Beads Technologies, Madrid, Spain获得的交联琼脂糖, 其排阻尺寸相比于Superflow™琼脂糖减小) 珠子树脂制得, 所述珠子树脂用30 μ g抗-CD8Fab-片段 (产品编号:6-8003, 1BA GmbH, 哥廷根) 官能化。为此, 在细胞纯化之前, 通过以300 μ l/min的速度泵送1500 μ l包含Fab片段的洗涤缓冲液 (PBS加上0.5%牛血清白蛋白) 经过柱子, 在重链C端携带顺序设置的两个链霉亲和素结合模块SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK的Fab片段被固定到**Strep-Tactin®**-琼脂糖基质上。为了纯化靶细胞, 用蠕动泵以300 μ l/min的流量, 自动负载10ml现抽全血 (用洗涤缓冲液1:1稀释) 到柱子上。随后, 以2ml/min的速度, 通过用总共13ml的洗涤缓冲液重复洗涤循环 (4x), 从柱子中去除未结合的 (CD8-阴性) 细胞。最后, 通过加入10ml 100 μ m D-生物素溶液 (V=600 μ l/min) 并且用10ml洗涤缓冲液以2ml/min洗脱, 从亲和基质中去除结合的细胞, 从而从柱子中洗脱CD8+靶细胞。通过流式细胞术分析获得的CD8-阳性和-阴性级分。纯化CD8+靶细胞, 产量为80%, 纯度为88%。相应的起始-、阴性-和

阳性-级分的点状图以及代表选择的相应纯度和产量如图8所示。

[0157] **实施例8:基于移液器的从脾细胞中单步纯化鼠CD4+细胞**

[0158] 通过使用移液器从脾细胞中分离CD4+细胞,所述移液器负载80 μ l **Strep-Tactin®**-琼脂糖珠子树脂(从Agarose Beads Technologies, Madrid, Spain获得的交联琼脂糖,其排阻尺寸相比于Superflow™琼脂糖减小),所述珠子树脂用2 μ g抗-CD4Fab-片段(产品编号:6-8003, lBA GmbH, 哥廷根)官能化。移液器头填充Phynexus Inc., USA的琼脂糖材料。所用的Fab片段包含CD4结合抗体GK1.5的野生型可变结构域(Dialynas DP等人, Immunol Rev. 1983; 74: 29-56, GenBank Entry kappa light chain: M84148.1 GenBank Entry heavy chain: M84149.1), 在重链C端携带顺序设置的两个链霉亲和素结合模块SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK。在细胞纯化之前,通过使用手持电动移液器将400 μ l包含Fab片段的洗涤缓冲液(PBS加上0.5%牛血清白蛋白)以300 μ l/min的速度吸移到琼脂糖色谱基质上,实现Fab片段负载/固定到**Streptactin®**-琼脂糖基质上。为了纯化靶细胞,使用移液管以300 μ l/min的速度,通过样品的3x重复上下循环,将1x10⁷鼠脾细胞(0.5ml洗涤缓冲液)应用到存在于移液器头的色谱基质中。这个具有包含细胞的缓冲液的上下运动“批状”色谱程序相当于使用用于使细胞固定在色谱基质上的基于流动-的方法。随后,通过用1ml洗涤缓冲液以2ml/min的速度三次重复洗涤(通过上下吸移洗涤缓冲液)从移液器头去除未结合的(CD4-阴性)细胞。最后,通过加入1ml 100 μ M D-生物素溶液(V=600 μ l/min)并且用2ml (2x1ml)洗涤缓冲液以2ml/min的流量洗脱,从亲和基质中去除结合的细胞,从而从移液器头中洗脱CD4+靶细胞。通过流式细胞术分析获得的CD4-阳性和-阴性级分。纯化CD4+靶细胞,产量为95%,纯度为85%。相应的起始-、阴性-和阳性-级分的点状图以及代表选择的相应纯度和产量如图9所示。

[0159] **实施例9:经由柱色谱法单步纯化人CD4+细胞**

[0160] 通过使用移液器头从密度梯度(Ficoll)纯化的PBMC中纯化人CD4+细胞,所述移液器头负载80 μ l **Strep-Tactin®**-琼脂糖(从Agarose Beads Technologies, Madrid, Spain获得的交联琼脂糖,其排阻尺寸相比于Superflow™琼脂糖减小)珠子树脂制得,所述珠子树脂用2 μ g抗-CD4Fab-片段官能化。使用的CD4Fab片段是美国专利7,482,000和Bes, C., 等人. J Biol Chem 278, 14265-14273 (2003) 所描述的13B8.2Fab的突变体。称为“m13B8.2”的突变体Fab片段携带CD4结合鼠抗体13B8.2的可变结构域和恒定结构域,所述恒定结构域由用于重链的 γ 1型恒定人CH1结构域和 κ 型恒定人轻链结构域组成,如美国专利7,482,000中所描述的。相比于m13B8.2中的13B8.2Fab片段的可变结构域,轻链位点91的His残基(在SEQ ID NO:2中为位点93)突变成Ala,并且重链位点53的Arg残基(在SEQ ID NO:1中为位点55)突变成Ala。此外,Fab片段m13B8.2在重链C端携带顺序设置的两个链霉亲和素结合模块SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK。在细胞纯化之前,通过使用手持电动移液器将200 μ l包含Fab片段的洗涤缓冲液以300 μ l/min的速度吸移,将Fab片段固定到**Strep-Tactin®**-琼脂糖基质上。为了选择靶细胞,使用移液管以300 μ l/min的速度,通过样品的3x重复上下循环,将1x10⁷现配的PBMC(在0.5ml洗涤缓冲液中)(PBS加上0.5%牛血清白蛋白)自动应用到存在于移液器头的色谱基质中。随后,通过用1ml洗涤缓冲液以2ml/min的速度三次重复洗涤(通过上下吸移洗涤缓冲液),从移液器头去除未结合的(CD8-阴性)细胞。最后,通过加入

1ml100 μ M D-生物素溶液 ($V=600\mu\text{l}/\text{min}$) 并且用2ml (2x1ml) 洗涤缓冲液以2ml/min的流量洗脱,从亲和基质中去除结合的细胞,从而从移液器头中洗脱CD4+靶细胞。通过流式细胞术分析获得的CD4-阳性和-阴性级分。纯化CD4+靶细胞,产量为90%,纯度为99%。相应的起始-、阴性-和阳性-级分的点状图以及代表选择的相应纯度和产量如图10所示。

[0161] 实施例10:基于移液器的从全血中单步纯化人CD4+细胞

[0162] 通过使用移液器头从全血中分离CD4+细胞,所述移液器负载80 μl Strep-Tactin[®]-琼脂糖(从Agarose Beads Technologies, Madrid, Spain获得的交联琼脂糖,其排阻尺寸相比于Superflow[™]琼脂糖减小)珠子树脂制得,所述珠子树脂用0.5 μg 抗-CD4Fab-片段官能化。实施例9中所用的CD4结合Fab片段m13B8.2也用于实施例10。在细胞分离之前,通过使用手持电动移液器将200 μl 包含Fab的洗涤缓冲液以300 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度吸移,将Fab片段固定在Strep-Tactin[®]-琼脂糖基质上。为了分离靶细胞,使用移液管以300 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度,通过3x重复上下循环,将2ml现抽全血(用洗涤缓冲液1:1稀释)(PBS加上0.5%牛血清白蛋白)自动应用到存在于移液器头的色谱基质中。随后,通过1ml的洗涤缓冲液以2ml/min的速度5次重复洗涤(通过上下吸移),从移液器头去除未结合的(CD4-阴性)细胞。最后,通过加入1ml100 μM D-生物素溶液 ($V=600\mu\text{l}/\text{min}$) 并且用2ml (2x1ml) 洗涤缓冲液以2ml/min洗脱,从亲和介质中移除结合的细胞,从而从移液器头中洗脱CD4+靶细胞。通过流式细胞术分析获得的CD4-阳性和-阴性级分。纯化CD4+靶细胞,产量为88%,纯度为70%。相应的起始-、阴性-和阳性-级分的点状图以及代表选择的相应纯度和产量如图11所示。

[0163] 在本文中,注意对于如在实施例4至11中获得的靶细胞的进一步纯化或进一步用途,作为洗脱液的生物素和作为相应的受体结合试剂的Fab片段可以通过实施例2中描述的“去除滤筒”从靶细胞样品中去除。

[0164] 本说明书中之前发表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。

[0165] 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。

[0166] 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。

[0167] 其他实施方案在以下权利要求范围内。此外,在本发明的功能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。

序列表

<110> 阶段细胞疗法有限公司
 <120> 细胞和其它复杂生物材料的色谱分离
 <130> LC14310012P
 <150> US 61/602,150
 <151> 2012-02-23
 <160> 13
 <170> PatentIn 版本 3.5
 <210> 1
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> 人
 <220>
 <223> Fab 片段 m13B8.2 的重链
 [0001]
 <400> 1
 Ala Met Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30
 Thr Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Val Pro
 50 55 60
 Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80

Phe Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Lys Asn Asp Pro Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

[0002]

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser
210 215 220

Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
245 250

<210> 2
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人
 <220>
 <223> Fab 片段 m13B8.2 的轻链

<400> 2

Ala Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Gly Glu Thr Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Glu Met Ile Tyr
 20 25 30

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu
 35 40 45

[0003] Leu Val His Asp Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Thr Leu
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala His Tyr Gly Asn
 85 90 95

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Ile
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser
 210 215

[0004] <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 链霉亲和素-结合肽

<400> 3

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> HA-标签

<400> 4

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VSV-G. 标签

<400> 5

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

[0005] <213> 人工的

<220>

<223> HSV-标签

<400> 6

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> T7 表位

<400> 7

Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> myc-表位

<400> 8

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工的

[0006]

<220>

<223> V5-标签

<400> 9

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> MAT-标签

<400> 10

His Asn His Arg His Lys His Gly Gly Gly Cys

1 5 10

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 链霉亲和素突变蛋白

<400> 11

Val Thr Ala Arg
 1

<210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 链霉亲和素突变蛋白类似物

[0007]

<400> 12

Ile Gly Ala Arg
 1

<210> 13
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 链霉亲和素结合模块

<400> 13

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

[0008]

20 25 30

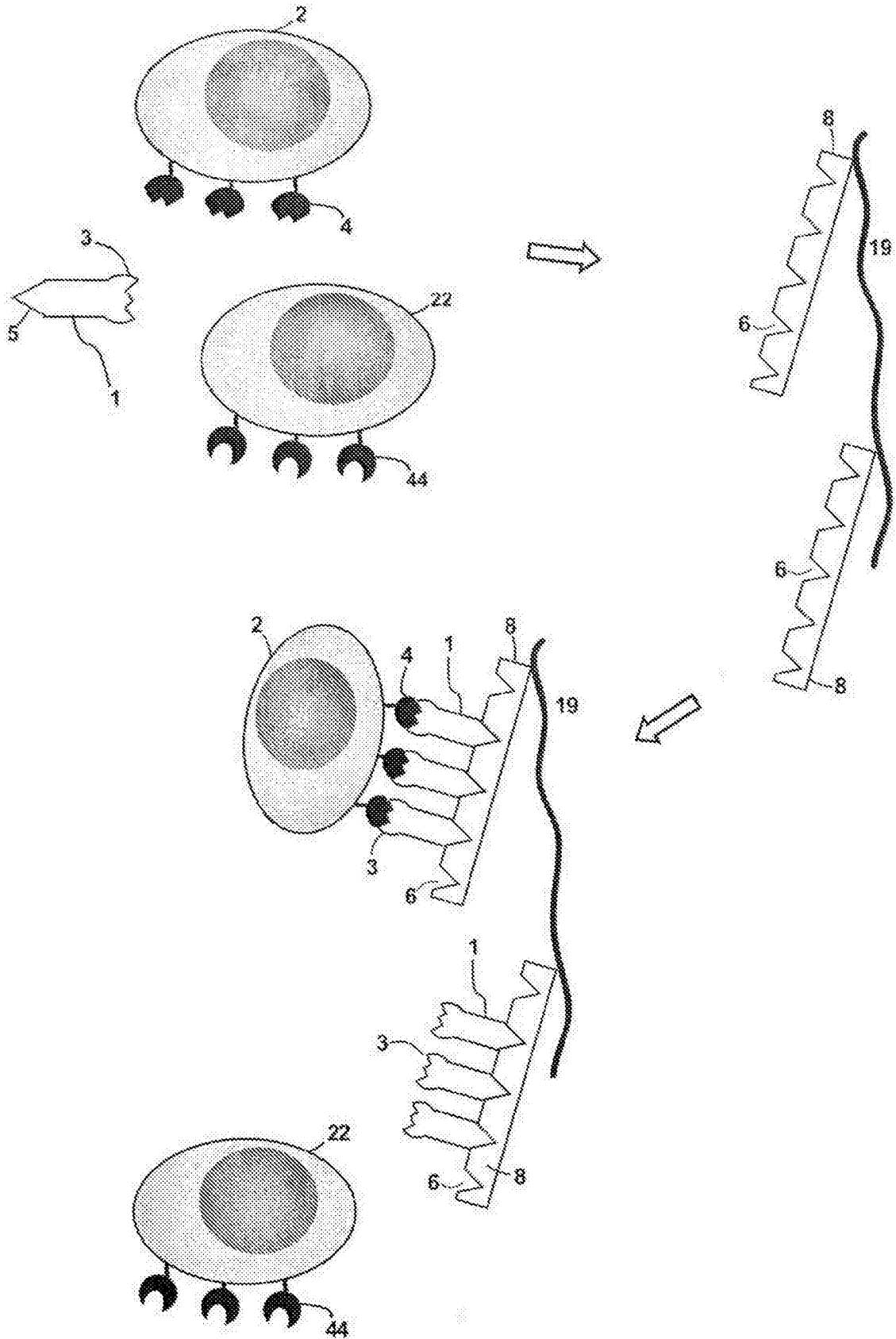


图1

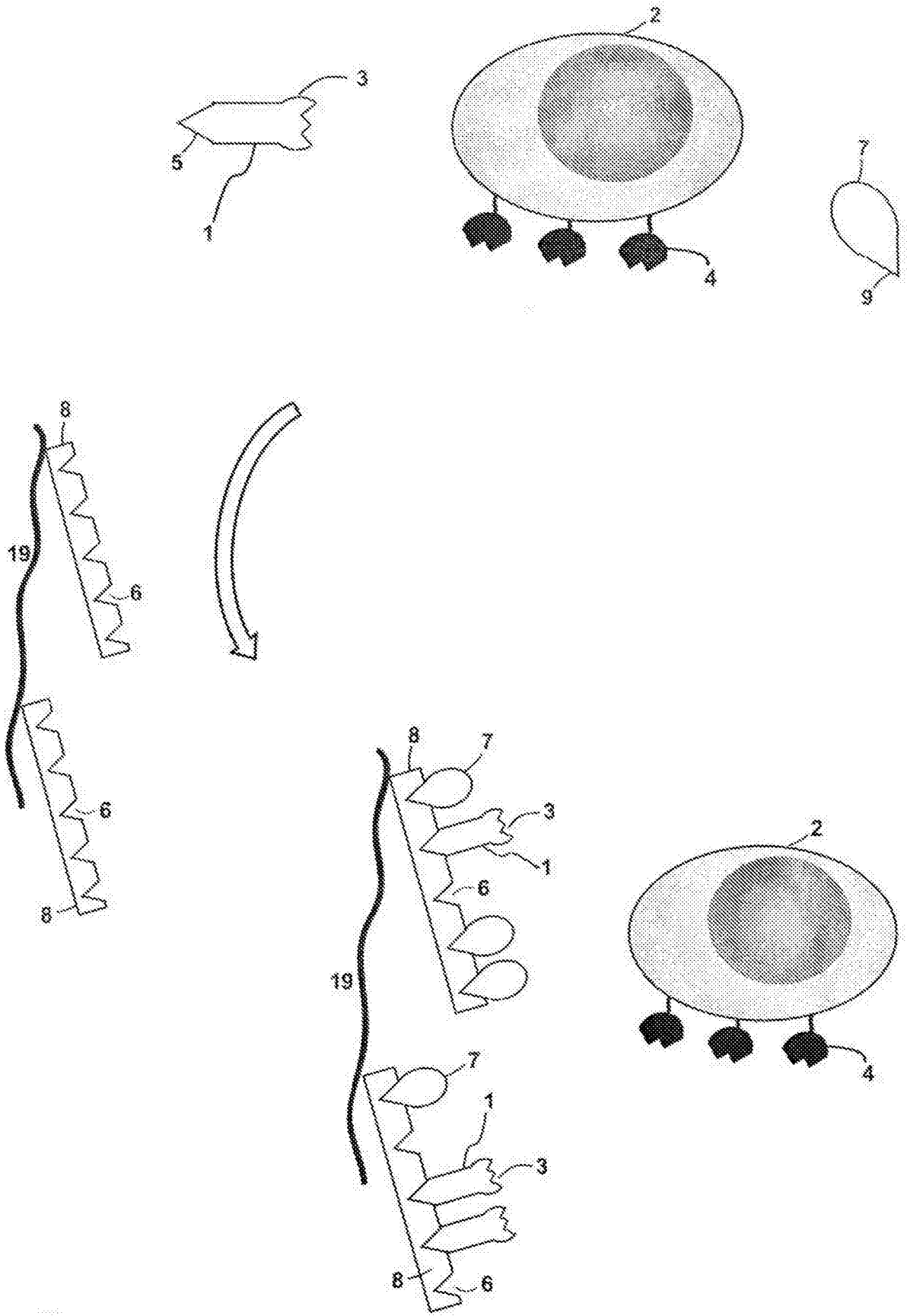


图2

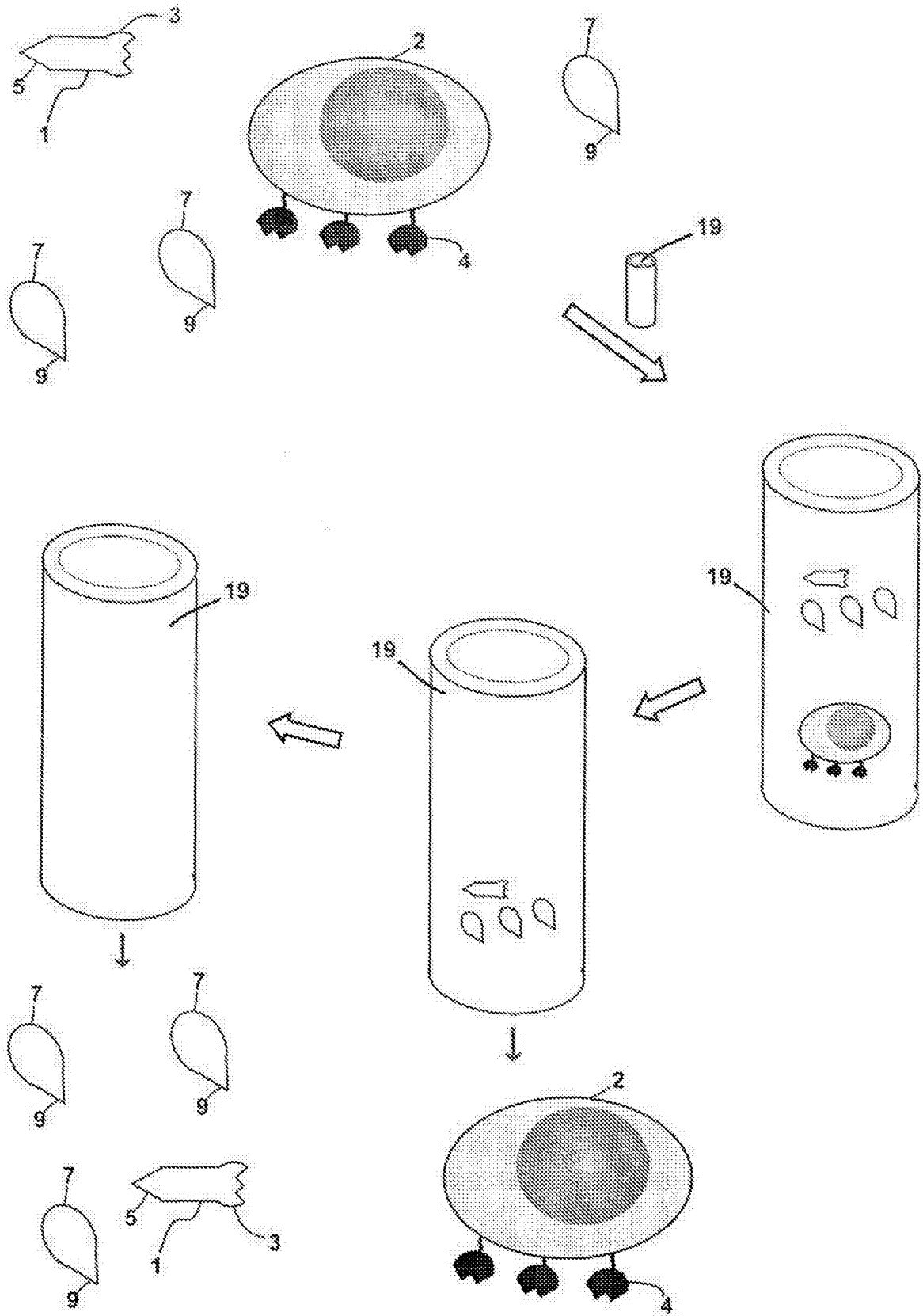


图3

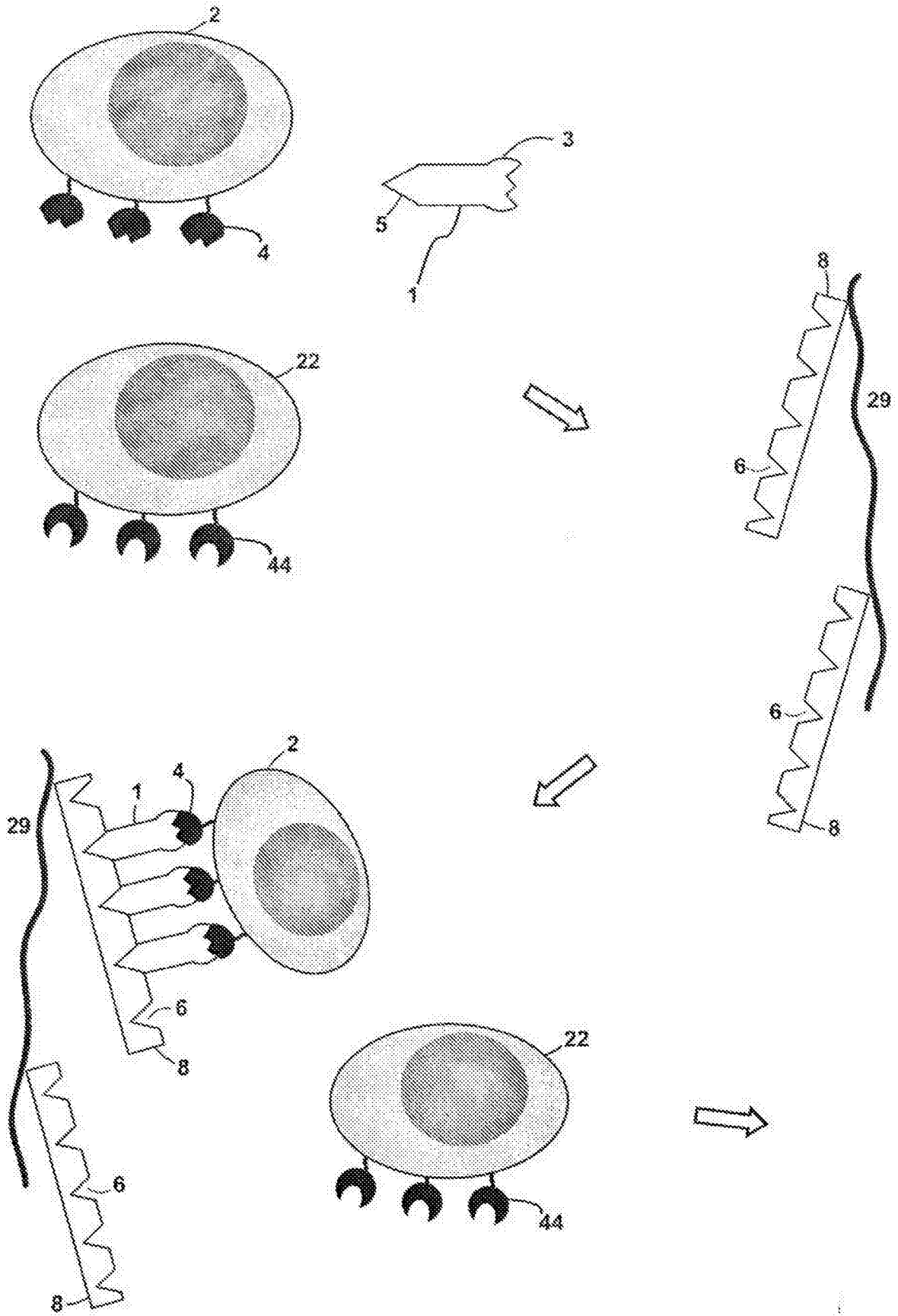


图4(下页续)

续前页

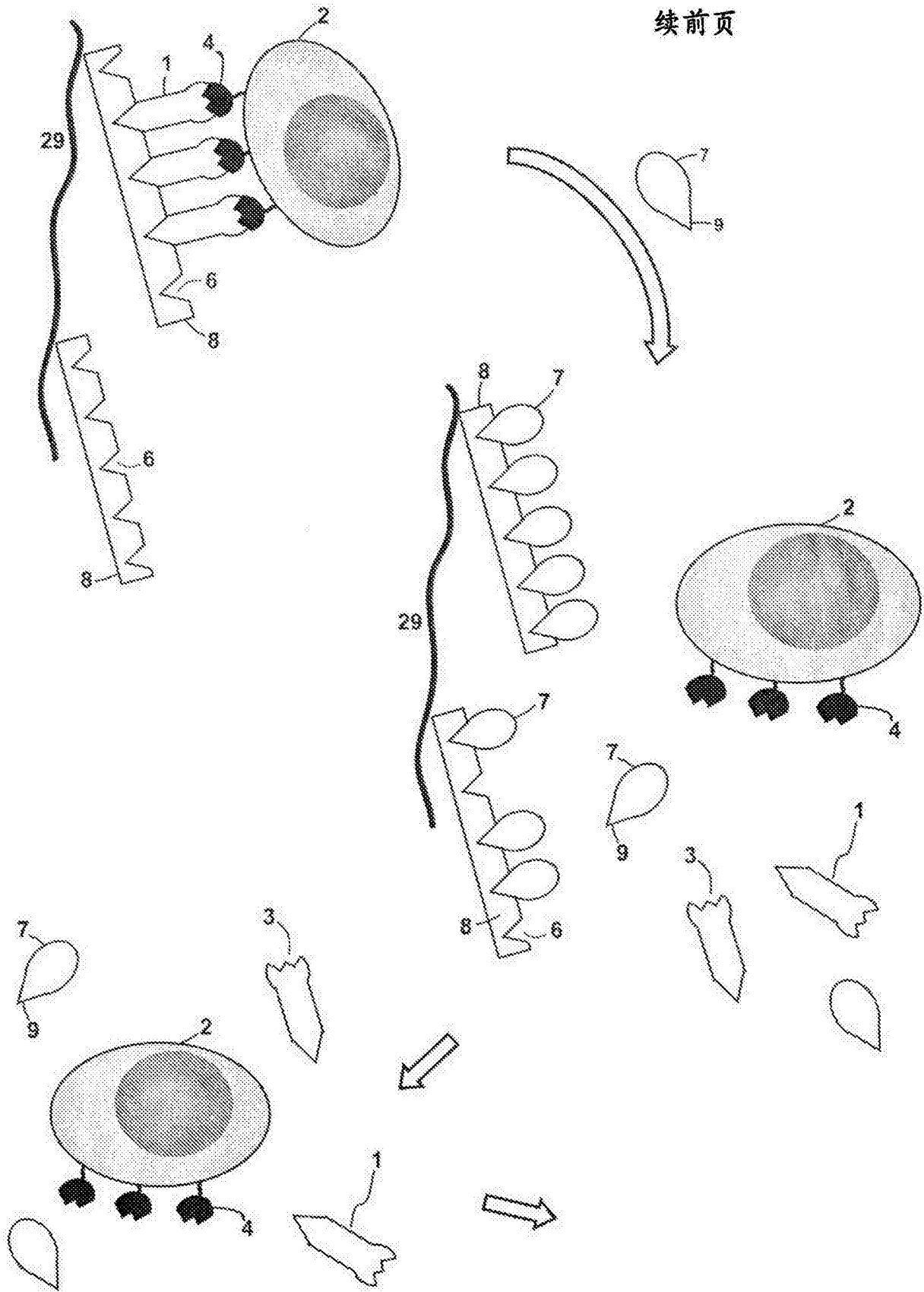
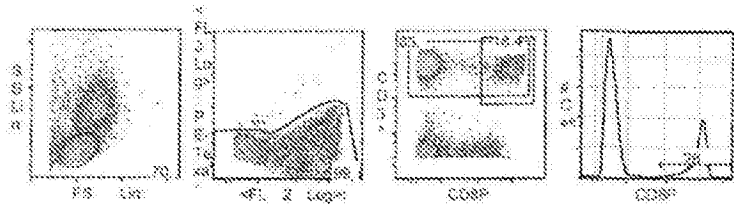
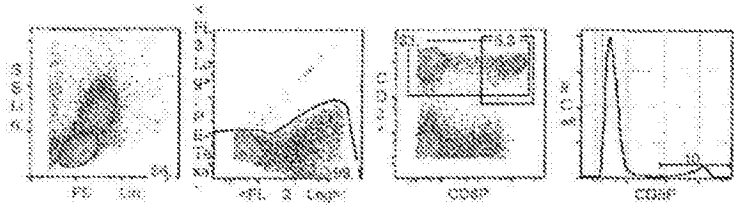


图4(下页续)

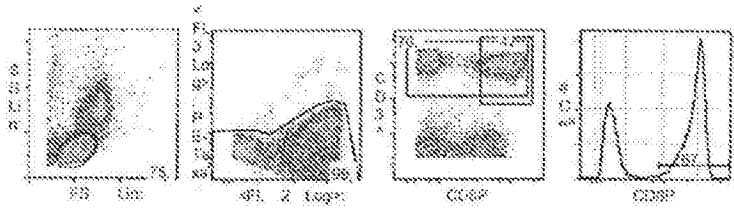
A. 选择之前



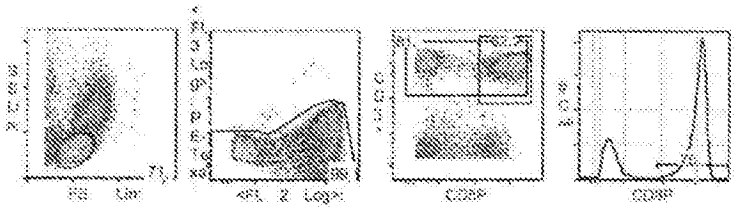
B. 洗涤级分



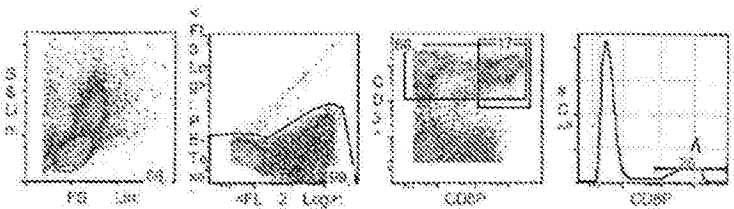
C. 1.立即用 D-生物素的洗脱级分



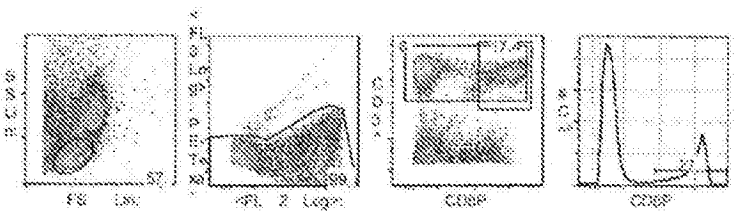
D. 2. D-生物素和随后洗涤之后的洗脱级分



E. 1. 洗涤级分



F. 1.立即用 D-生物素的洗涤级分



G. 2. D-生物素和随后洗涤之后的洗脱级分

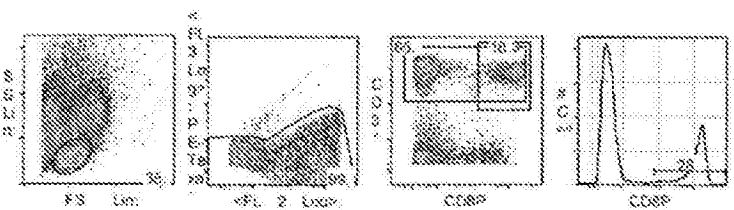


图5

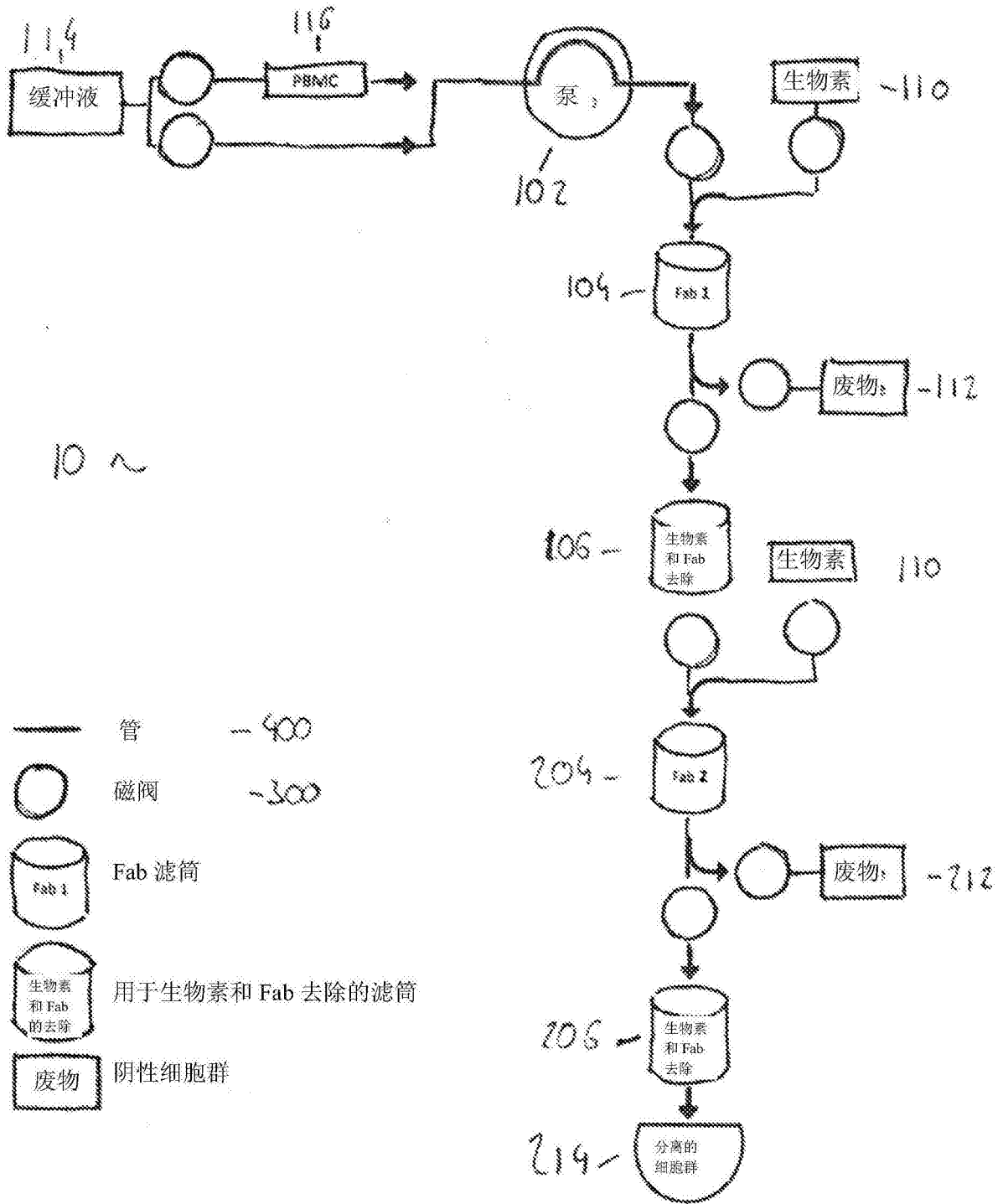


图6a

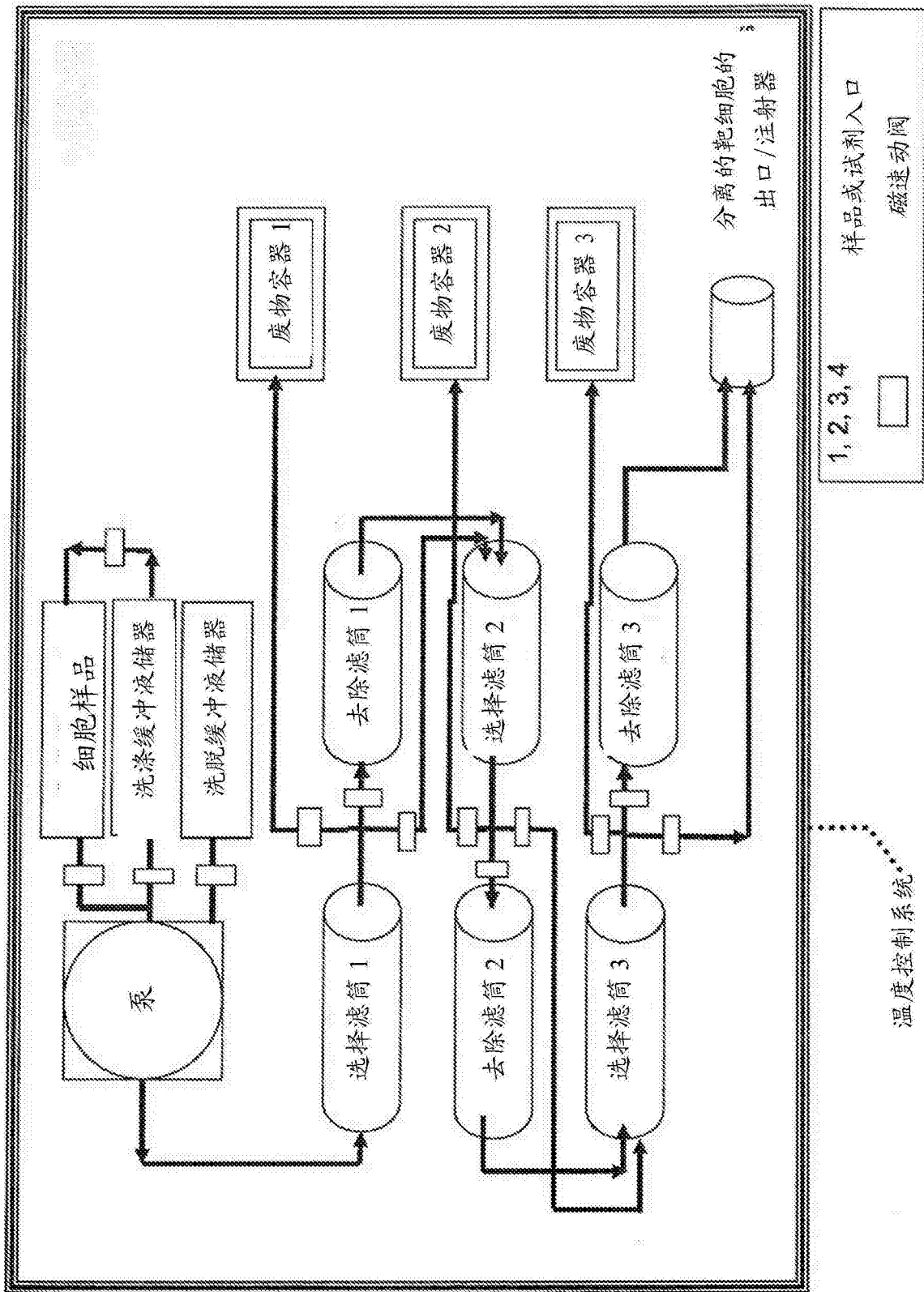


图6b

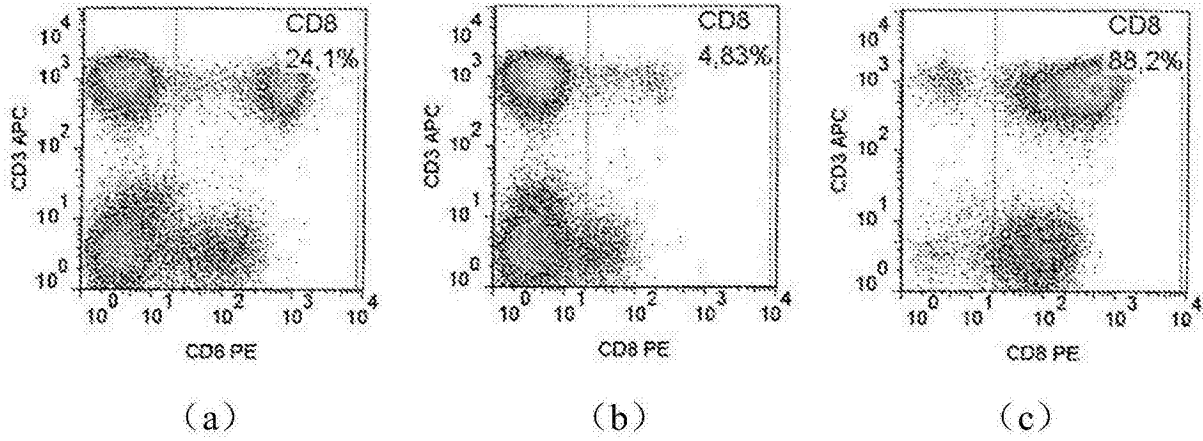


图7

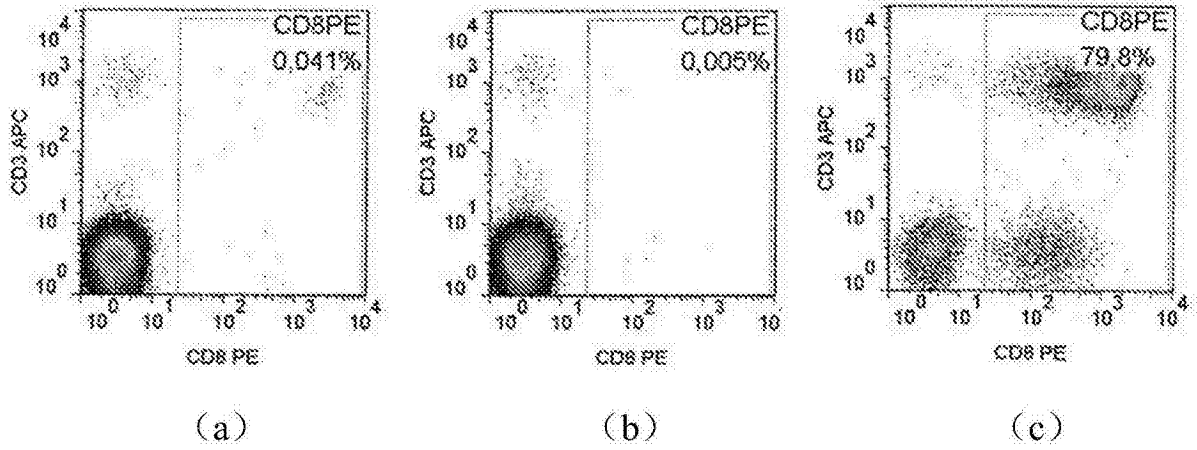


图8

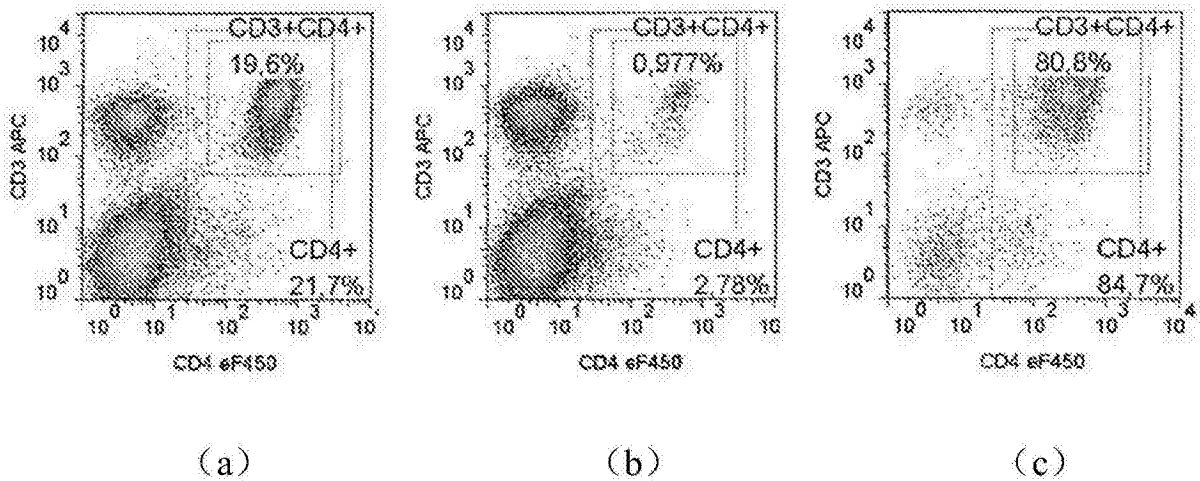


图9

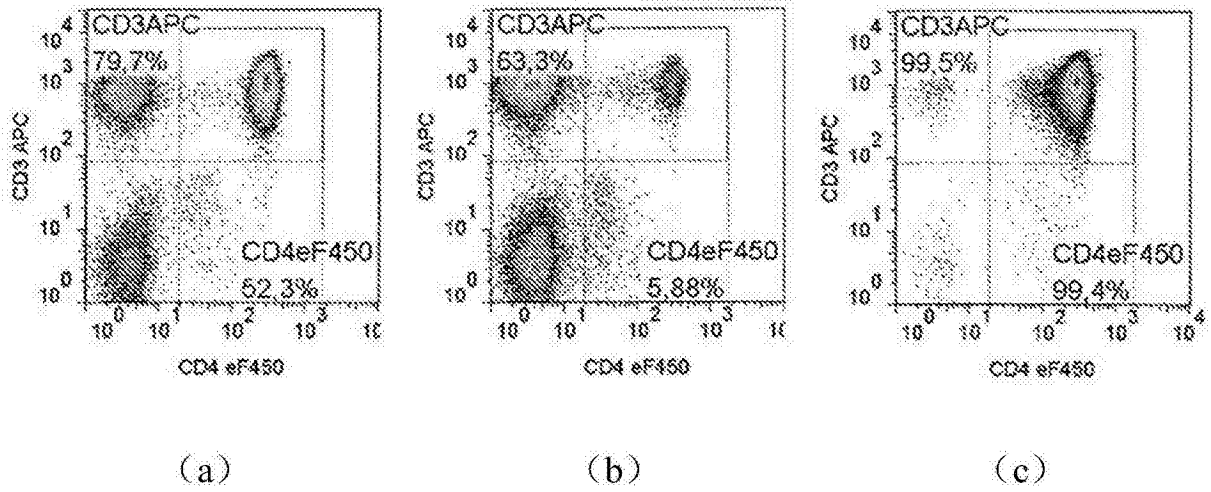


图10

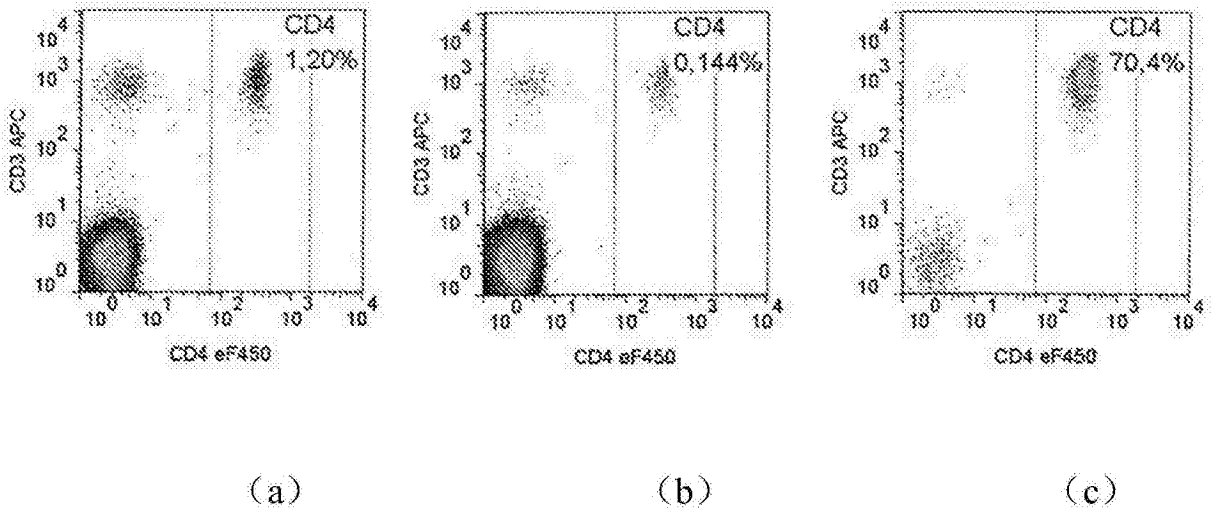


图11

专利名称(译)	细胞和其它复杂生物材料的色谱分离		
公开(公告)号	CN104254780B	公开(公告)日	2017-04-12
申请号	CN201380010911.6	申请日	2013-02-25
[标]发明人	H·施塔德勒		
发明人	H·施塔德勒		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N1/405 G01N33/54306 G01N33/56966 G01N33/56972 G01N2333/7051 G01N2333/70517		
代理人(译)	张伟		
优先权	61/602150 2012-02-23 US		
其他公开文献	CN104254780A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及靶细胞或另一复杂生物材料的色谱分离，特别是通过柱色谱法如亲和色谱法或凝胶渗透色谱法。本发明采用结合到位于靶细胞表面上的受体分子的受体结合试剂。通常，本发明为生物材料的无痕分离提供新方法，所述生物材料如细胞、细胞器、病毒等。本发明还涉及一种用于分离细胞和其他复杂生物材料的设备。

