

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 501629

(P2003 - 501629A)

(43)公表日 平成15年1月14日(2003.1.14)

(51)Int.Cl⁷

識別記号

F I

テマコード^{*} (参考)

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

K

4 B 0 6 5

C 1 2 N 1/00

C 1 2 N 1/00

T

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 69数)

(21)出願番号 特願2001 - 500864(P2001 - 500864)

(86)(22)出願日 平成12年5月26日(2000.5.26)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月28日(2001.11.28)

(86)国際出願番号 PCT/CA00/00616

(87)国際公開番号 W000/073794

(87)国際公開日 平成12年12月7日(2000.12.7)

(31)優先権主張番号 60/136,770

(32)優先日 平成11年5月28日(1999.5.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/193,371

(32)優先日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ステムセル テクノロジース インコーポ
レーテッド

カナダ ヴィ5ゼット 4ジェー7 プリティ
ッシュ コロンビア,ヴァンクーバー,ウエ
スト ブロードウェイ 808 - 777

(72)発明者 トーマス, テリー, イー.

カナダ ヴィ6ジェイ 4エス3 プリティッ
シュ コロンビア,ヴァンクーバー,ウエス
ト ファースト アヴェニュー 1510,アパ
ートメント 404

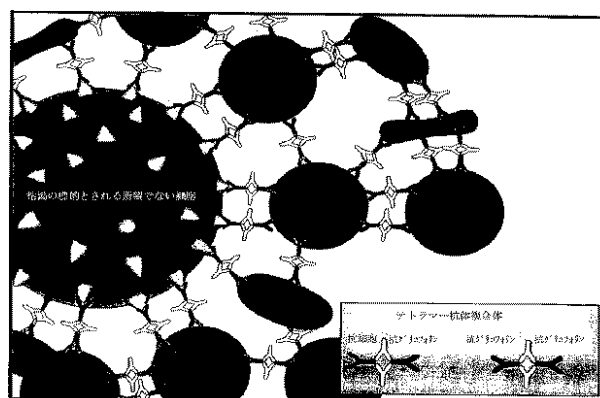
(74)代理人 弁理士 岡部 正夫 (外 1 0 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫口ゼットを用いる細胞分離法

(57)【要約】

本発明は、免疫口ゼットを用いて細胞を分離する方法に関する。この方法は、有核細胞および赤血球を含有する試料を、有核細胞と赤血球との免疫口ゼット形成を可能にする抗体組成物と接触させることを含む。この抗体組成物は、好ましくは、2価抗体またはテトラマー抗体複合体を含有する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 所望の細胞、赤血球、および所望でない細胞を含有する試料において所望の細胞を濃縮し回収するネガティブ選択方法であって、

(1) 所望でない細胞と赤血球とが免疫ロゼットを形成可能な条件下で、(a) 少なくとも1種の、所望でない細胞上の抗原に結合する抗体と、それが直接または間接的に結合している(b) 少なくとも1種の、赤血球に結合する抗体、とを含む抗体組成物に試料を接触させる段階、および

(2) 試料から免疫ロゼットを分離して所望の細胞が濃縮された試料を得る段階を含む方法。

【請求項2】 段階(2)において免疫ロゼットが密度分離によって分離される請求項1に記載の方法。

【請求項3】 段階(2)において免疫ロゼットが沈降によって分離される請求項1に記載の方法。

【請求項4】 抗体(a)が、抗原(1)CD2および/またはCD3および/またはCD5、(2)CD19および/またはCD20および/またはCD21および/またはCD22および/またはCD24、ならびに(3)CD66bおよび/またはCD16に結合することのできる抗体を含む、単核細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項5】 抗体(a)が、さらにCD56および/またはCD8を含む請求項4に記載の方法。

【請求項6】 抗体(a)が、抗原(1)CD2および/またはCD3および/または、CD4およびCD8の両方、(2)CD16および/またはCD66bおよび/またはCD11bおよび/またはCD15、ならびに(3)CD36および/またはCD14に結合することのできる抗体を含む、B細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項7】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項6に記載の方法。

【請求項8】 抗体(a)が、抗原(1)CD16および/またはCD66bおよび/またはCD11bおよび/またはCD15、(2)CD19および/

またはCD20および/またはCD21および/またはCD22および/またはCD24および/またはIg、ならびに(3)CD36および/またはCD14に結合することのできる抗体を含む、T細胞を濃縮および回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項9】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項8に記載の方法。

【請求項10】 抗体(a)が、抗原(1)CD8、(2)CD16および/またはCD66bおよび/またはCD11bおよび/またはCD15、(3)CD19および/またはCD20および/またはCD21および/またはCD22および/またはCD24および/またはIg、ならびに(4)CD36および/またはCD14に結合することのできる抗体を含む、CD4⁺T細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項11】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項10に記載の方法。

【請求項12】 抗体(a)が、抗原(1)CD4、(2)CD16および/またはCD66bおよび/またはCD11bおよび/またはCD15、(3)CD19および/またはCD20および/またはCD21および/またはCD22および/またはCD24および/またはIg、ならびに(4)CD36および/またはCD14に結合することのできる抗体を含む、CD8⁺T細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項13】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項12に記載の方法。

【請求項14】 抗体(a)が、抗原(1)CD3、(2)CD66bおよび/またはCD15、(3)CD19および/またはCD20および/またはCD21および/またはCD22および/またはCD24、ならびに(4)CD36および/またはCD14に結合することのできる抗体を含む、NK細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項15】 抗体(a)が、さらにCD4を含む請求項14に記載の方法。

【請求項16】 抗体(a)が、抗原(1)CD3、(2)CD2、(3)CD14、(4)CD15、(5)CD16、(6)CD19、(7)CD24、(8)CD34、(9)CD36、(10)CD56、および(11)CD45RAに結合することのできる抗体を含む、好塩基性細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項17】 抗体(a)が、抗原(1)CD3、(2)CD14、(3)CD16、(4)CD19、(5)CD34、(6)CD56、および(7)CD66bに結合することのできる抗体を含む、樹状細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項18】 抗体(a)が、抗原(1)CD2および/またはCD3、(2)CD16および/またはCD66b、(3)CD19および/またはCD24、ならびに(4)CD14に結合することのできる抗体を含む、造血前駆細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項19】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項18に記載の方法。

【請求項20】 抗体(a)が、抗原(1)CD2および/またはCD3、(2)CD16および/またはCD66b、(3)CD19および/またはCD24、(4)CD14、(5)CD45RA、(6)CD33、ならびに(7)CD10に結合することのできる抗体を含む、赤血球前駆細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項21】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項20に記載の方法。

【請求項22】 抗体(a)が、抗原(1)CD2および/またはCD3、(2)CD16および/またはCD66b、(3)CD19および/またはCD24、ならびに(4)CD14、(5)CD71、ならびに(6)CD10に結合することのできる抗体を含む、骨髓前駆細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項23】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項22に記載の方法。

【請求項24】 抗体(a)が、抗原(1)CD2および/またはCD3、(2)CD16および/またはCD66b、(3)CD19および/またはCD24、ならびに(4)CD14、(5)CD45RA、ならびに(6)CD10に結合することのできる抗体を含む、巨核球前駆細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項25】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項24に記載の方法。

【請求項26】 抗体(a)が、抗原(1)CD45、および(2)CD66bに結合することのできる抗体を含む、非造血腫瘍細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項27】 抗体(a)が、さらにCD2、CD16、CD19、CD36、およびCD38を含む請求項26に記載の方法。

【請求項28】 抗体(a)が、抗原(1)CD45、および(2)CD66bに結合することのできる抗体を含む、上皮腫瘍細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項29】 抗体(a)が、さらにCD2、CD16、CD19、CD36およびCD38を含む請求項28に記載の方法。

【請求項30】 抗体(a)が、抗原CD66b、またはCD66abceに結合することのできる抗体を含む、顆粒細胞を含有する試料から単核細胞を濃縮し回収するための請求項1に記載の方法。

【請求項31】 試料が保存された全血または臍帯血である請求項30に記載の方法。

【請求項32】 試料中の顆粒細胞の密度が、新鮮血液からの顆粒細胞の密度よりも低い請求項31に記載の方法。

【請求項33】 抗体組成物が、(a)所望でない細胞上の抗原に結合する抗体、(b)赤血球に結合する抗体、ならびに(c)(a)および(b)で定義された抗体のFc部分に結合する2種の抗体を含み、(a)および(b)の抗体が同一の動物種の抗体であり、(c)の抗体が(a)および(b)の抗体と異なる動物種の抗体であるテトラマー抗体複合体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項34】 (a) 少なくとも1種の、所望でない細胞上の抗原に結合する抗体と、それが直接または間接的に結合している (b) 少なくとも1種の、赤血球に結合する抗体とを含む、所望の細胞、赤血球、および所望でない細胞を含有する試料において所望の細胞を濃縮し回収するための抗体組成物。

【請求項35】 抗体 (a) が、抗原 (1) CD2 および / または CD3 および / または CD5、(2) CD19 および / または CD20 および / または CD21 および / または CD22 および / または CD24、ならびに (3) CD66b および / または CD16 に結合することのできる抗体を含む、単核細胞を濃縮し回収するための請求項34に記載の組成物。

【請求項36】 抗体 (a) が、さらに CD56 および / または CD8 を含む請求項35に記載の組成物。

【請求項37】 抗体 (a) が、抗原 (1) CD2 および / または CD3 および / または、CD4 および CD8 の両方、(2) CD16 および / または CD66b および / または CD11b および / または CD15、ならびに (3) CD36 および / または CD14 に結合することのできる抗体を含む、B細胞を濃縮し回収するための請求項34に記載の組成物。

【請求項38】 抗体 (a) が、さらに CD56 を含む請求項37に記載の組成物。

【請求項39】 抗体 (a) が、抗原 (1) CD16 および / または CD66b および / または CD11b および / または CD15、(2) CD19 および / または CD20 および / または CD21 および / または CD22 および / または CD24 および / または Ig、ならびに (3) CD36 および / または CD14 に結合することのできる抗体を含む、T細胞を濃縮し回収するための請求項34に記載の組成物。

【請求項40】 抗体 (a) が、さらに CD56 を含む請求項39に記載の組成物。

【請求項41】 抗体 (a) が、抗原 (1) CD8、(2) CD16 および / または CD66b および / または CD11b および / または CD15、(3) CD19 および / または CD20 および / または CD21 および / または CD2

2 および / または C D 2 4 および / または I g、ならびに (4) C D 3 6 および / または C D 1 4 に結合することのできる抗体を含む、C D 4⁺ T 細胞を濃縮し回収するための請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 2】 抗体 (a) が、さらに C D 5 6 を含む請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 3】 抗体 (a) が、抗原 (1) C D 4、(2) C D 1 6 および / または C D 6 6 b および / または C D 1 1 b および / または C D 1 5、(3) C D 1 9 および / または C D 2 0 および / または C D 2 1 および / または C D 2 2 および / または C D 2 4 および / または I g、ならびに (4) C D 3 6 および / または C D 1 4 に結合することのできる抗体を含む、C D 8⁺ T 細胞を濃縮し回収するための請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 4】 抗体 (a) が、さらに C D 5 6 を含む請求項 4 3 に記載の組成物。

【請求項 4 5】 抗体 (a) が、抗原 (1) C D 3、(2) C D 6 6 b および / または C D 1 5、(3) C D 1 9 および / または C D 2 0 および / または C D 2 1 および / または C D 2 2 および / または C D 2 4、ならびに (4) C D 3 6 および / または C D 1 4 に結合することのできる抗体を含む、NK 細胞を濃縮し回収するための請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】 抗体 (a) が、さらに C D 4 を含む請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 7】 抗体 (a) が、抗原 (1) C D 3、(2) C D 2、(3) C D 1 4、(4) C D 1 5、(5) C D 1 6、(6) C D 1 9、(7) C D 2 4、(8) C D 3 4、(9) C D 3 6、(1 0) C D 5 6、および (1 1) C D 4 5 R A に結合することのできる抗体を含む、好塩基性細胞を濃縮し回収するための請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 8】 抗体 (a) が、抗原 (1) C D 3、(2) C D 1 4、(3) C D 1 6、(4) C D 1 9、(5) C D 3 4、(6) C D 5 6、および (7) C D 6 6 b に結合することのできる抗体を含む、樹状細胞を濃縮し回収するための請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項49】 抗体(a)が、抗原(1)CD2および/またはCD3、(2)CD16および/またはCD66b、(3)CD19および/またはCD24、ならびに(4)CD14に結合することのできる抗体を含む、造血前駆細胞を濃縮し回収するための請求項34に記載の組成物。

【請求項50】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項49に記載の組成物。

【請求項51】 抗体(a)が、抗原(1)CD2および/またはCD3、(2)CD16および/またはCD66b、(3)CD19および/またはCD24、(4)CD14、(5)CD45RA、(6)CD33、ならびに(7)CD10に結合することのできる抗体を含む、赤血球前駆細胞を濃縮し回収するための請求項34に記載の組成物。

【請求項52】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項51に記載の組成物。

【請求項53】 抗体(a)が、抗原(1)CD2および/またはCD3、(2)CD16および/またはCD66b、(3)CD19および/またはCD24、ならびに(4)CD14、(5)CD71、ならびに(6)CD10に結合することのできる抗体を含む、骨髓前駆細胞を濃縮し回収するための請求項34に記載の組成物。

【請求項54】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項53に記載の組成物。

【請求項55】 抗体(a)が、抗原(1)CD2および/またはCD3、(2)CD16および/またはCD66b、(3)CD19および/またはCD24、ならびに(4)CD14、(5)CD45RA、ならびに(6)CD10に結合することのできる抗体を含む、巨核球前駆細胞を濃縮し回収するための請求項34に記載の組成物。

【請求項56】 抗体(a)が、さらにCD56を含む請求項55に記載の組成物。

【請求項57】 抗体(a)が、抗原(1)CD45、および(2)CD66bに結合することのできる抗体を含む、非造血腫瘍細胞を濃縮し回収するため

の請求項34に記載の組成物。

【請求項58】 抗体(a)が、さらにCD2、CD16、CD19、CD36、およびCD38を含む請求項57に記載の組成物。

【請求項59】 抗体(a)が、抗原(1)CD45、および(2)CD66bに結合することのできる抗体を含む、上皮腫瘍細胞を濃縮し回収するための請求項34に記載の組成物。

【請求項60】 抗体(a)が、さらにCD2、CD16、CD19、CD36、およびCD38を含む請求項59に記載の組成物。

【請求項61】 抗体(a)が、抗原CD66b、またはCD66abceに結合することのできる抗体を含む、顆粒細胞を含有する試料から単核細胞を濃縮し回収するための請求項34に記載の組成物。

【請求項62】 有核細胞と赤血球を含む試料から有核細胞を分離する方法であって、

(1)(a)少なくとも1種の、分離されるべき有核細胞上の抗原に結合する抗体と、その抗体が直接または間接的に結合している(b)少なくとも1種の、赤血球に結合する抗体、とを含む抗体組成物に、有核細胞と赤血球とが免疫口ゼットを形成可能な条件下で試料を接触させる段階、および

(2)試料の残部と免疫口ゼットを分離する段階を含む方法。

【請求項63】 抗体組成物が二価抗体を含み、有核細胞に結合する抗体が、赤血球に結合する抗体に直接結合している請求項62に記載の方法。

【請求項64】 (a)有核細胞上の抗原に結合する抗体、(b)赤血球に結合する抗体、ならびに(c)(a)および(b)で定義された抗体のFc部分に結合する2種の抗体を含み、(a)および(b)の抗体が同一の動物種の抗体であり、(c)の抗体が(a)および(b)の抗体と異なる動物種の抗体であるテトラマー抗体複合体を、抗体組成物が含む請求項62に記載の方法。

【請求項65】 有核細胞が、T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、単核細胞、好塩基性細胞、樹状細胞、プラズマ細胞、マスト細胞、造血前駆細胞、造血幹細胞、前駆細胞、および腫瘍細胞からなるグループから選択される請求項62に記載の方法。

【請求項66】 赤血球に結合する抗体が、抗グリコフォリンA抗体である請求項62に記載の方法。

【請求項67】 さらに(3)免疫ロゼット中の赤血球を溶解して細胞を単離する段階を含む請求項62に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、免疫口ゼットを用いて細胞を分離する方法に関する。本発明は、本発明の方法に用いるための新規な抗体組成物を含む。

【0002】**(発明の背景)**

多くの応用例において、生物試料中のある種の細胞集団を濃縮、あるいは枯渇することが望ましい。血液学、免疫学、および腫瘍学の分野は、骨髓、脾臓、胸腺、および胎児肝臓など、関連する組織からの末梢血、および細胞懸濁液の試料に依存している。これらの不均質な試料から特定の細胞型を分離することが、これらの分野での研究や、ある種の悪性疾患や免疫/造血障害の診断と治療にとって不可欠である。

【0003】

T細胞、および抗原提示細胞などの免疫細胞が精製された集団は、免疫機能の研究のために必要であり、免疫療法に用いられている。細胞、分子、および生化学的プロセスの研究では、単離された特定の細胞型を分析する必要がある。T細胞サブセット、B細胞、好塩基性細胞、NK細胞、および樹状細胞を単離するために、数多くの手法が用いられてきた。

【0004】

造血幹細胞の単離もまた、非常に関心の高い分野である。幹細胞の純粋な集団は、造血の研究を容易にすることになり、末梢血および/または骨髓由来の造血細胞の移植は、悪性、非悪性および遺伝的疾患を含む多様な疾患の治療のために、高用量化学療法および/または放射線療法と組み合わせて用いられることが多くなった。そのような移植物中には、長期の造血再構築が可能な細胞は非常に少なく、したがって造血幹細胞を精製するための手法を開発することが強く鼓舞される。さらに、移植受容者にリスクをもたらす移植組織中の細胞を除去するために用いられる手法の有効性が、重大な合併症、さらに言えば移植手法の成功を左右する。そのような細胞には、同種異系移植片における移植片対宿主病(GVH

D)の原因であるTリンパ球、悪性増殖の再発を引き起こす可能性のある自己移植における腫瘍細胞が含まれる。不必要な細胞を除去して移植物の量を減らすことにより、注入される低温保存剤の量を低減することも重要である。

【0005】

場合によっては、たとえば骨髓移植組織のような生物試料から腫瘍細胞を除去する、または枯渇させることが望ましい。気管支、乳管、胃腸管および尿生殖管の上皮癌は、今日見られる固形腫瘍の主要な型である。微小転移性腫瘍細胞の移動は、上皮癌患者の予後経過を示す重要な因子であると考えられている(Braun等、2000年、Vaughan等、1990年)。そのような転移性細胞を検出する能力は、組織、または液体試料採取の有効性、および腫瘍検出法の感度によって制限される。血液試料中の循環上皮腫瘍細胞を濃縮する手法は、転移性疾患を検出する能力を高め、そのような希少な細胞の研究や、疾病の拡散を可能にする生物的变化を確定することが容易となろう。

【0006】

造血細胞、および免疫細胞は、密度などの物理特性に基づいて、および周期細胞を殺傷するある種の薬剤への感受性に基づいて分離されてきた。細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体の登場は、異なる細胞型の識別、および分離の可能性を大いに広げた。モノクローナル抗体を用いて血液、および関連する細胞懸濁液から細胞集団を分離するには、2つの基本的なアプローチがある。それらの違いは、抗体で識別/標識される細胞が所望の細胞であるか、または所望でない細胞であるかという点である。

【0007】

ポジティブ選択法では、所望の細胞を抗体で標識し、残りの標識されていない/所望でない細胞から回収する。ネガティブ選択では、所望でない細胞を標識し、除去する。抗体/補体処理や免疫毒素の使用は、ネガティブ選択法であるが、FACS選別やほとんどのバッチ式免疫吸着法は、ポジティブ選択とネガティブ選択の両方に使用することができる。免疫吸着法では、細胞はモノクローナル抗体で選択され、残りの細胞から回収することのできるもの、たとえばビーズカラム、フラスコ、磁性粒子などの表面に優先的に結合させる。免疫吸着法は、モノ

クローナル抗体を用い標的細胞に対する高い特異性を維持するが、FAC選別とは違って臨床採取で多量の細胞を直接に処理するためにスケールアップすることができ、かつ免疫毒素などの細胞毒性試薬は補体を用いる危険を回避できるので、臨床でも研究でも人気があった。しかしながら、免疫吸着法は、デバイスすなわち細胞を分離するための表面、たとえばビーズカラム、パンニングフラスコ、または磁石などの使用を必要とする。

【0008】

造血幹細胞、免疫細胞、および循環上皮腫瘍細胞を単離するための現在の手法はすべて、まず赤血球を除去し、次にデバイスまたは人工粒子に抗体を介して付着させる段階を含む(Firat等、1988年; de Wynter等、1975年; Shpall等、1994年; Thomas等、1994年; Milt enyi Biotec Inc.、Gladbach、Germany)。ポジティブ選択の場合、装置または粒子から細胞を回収するさらなる段階がある。これらの複数の工程はすべて時間がかかり、細胞損失を招く。Slaper-C ortenbach等(1990年)は、免疫ロゼット形成を用いて、通常急性白血病(cALL)細胞の骨髄を駆逐する方法を述べている。この方法は、最初に骨髄試料から赤血球を除去してcALL細胞に結合する抗体で標識する必要がある。次に標識赤血球を試料に戻して添加するとcALL細胞は免疫ロゼットを形成する。この枯渇方法は、続いてcALL細胞を補体を介して溶解させるとき、もっとも有効に機能する。

【0009】

密度分離は、顆粒細胞、および赤血球から末梢血単核細胞を単離するために通例用いられる。フィコール(Ficoll)(Amersham Pharmacia Biotech AB、Uppsala、Sweden)は、この用途に用いられるもっとも一般的な密度溶液である。フィコール密度分離では、全血をフィコールに重層し、次に遠心分離する。赤血球と顆粒細胞は細胞ペレットとして沈降し、単核細胞はフィコールと血漿の界面に残留する。この手法が成功するかどうかは、単核細胞と顆粒細胞の間の密度の差異にかかっている。全血が24時間より長く保存された場合顆粒細胞の密度が変化し、赤血球と共にペレット

とならない。保存血液または細胞密度が変化した試料からは、1回の密度分離で純粋な単核細胞の懸濁液を得ることはできない。

【0010】

これまでに述べたように、生物試料から所望の細胞を分離する、または所望でない細胞を除去する新規な方法を提供することが当分野において求められている。

(発明の概要)

【0011】

本発明者等は、細胞を試料中に存在している赤血球と免疫ロゼット形成させることによって、その細胞を分離する方法を開発した。本発明の方法は、従来技術の方法に比べてはるかに簡単であるにもかかわらず、同等に有効な免疫アフィニティ手法である。「デバイス」、すなわち細胞懸濁液に通常存在しない人工分離表面（たとえば、磁性粒子、アフィニティカラム）を必要としない。最初に試料から赤血球を回収して抗体で標識した後にそれらを再び添加する必要もない。特定の細胞型を、試料内に存在する自己赤血球と交差結合させ、できたロゼットをその後、沈降、または遠心分離によって除去する。

【0012】

したがって、実施形態の1つでは、本発明は、

(1) 有核細胞と赤血球が免疫ロゼットを形成できる条件下で、(a) 少なくとも1種の、分離しようとする有核細胞上の抗原に結合する抗体と、それが直接または間接的に結合している(b) 少なくとも1種の、赤血球に結合する抗体、とを含む抗体組成物に試料を接触させる段階、および

(2) 試料から免疫ロゼットを除去する段階を含む、有核細胞と赤血球を含む試料から有核細胞を分離する方法を提供する。

【0013】

この方法は、ポジティブ選択とネガティブ選択プロトコルの両方に用いることができる。この方法は、全血、骨髓、胎児肝臓、臍帯血、軟膜懸濁液、胸膜および腹膜滲出液、ならびに胸腺細胞および脾細胞の試料を含む、赤血球を含有する任意の試料に用いることができる。

ここで本発明を図面に関して説明する。

【0014】

発明の詳細な説明

I. 本発明の方法

前述のとおり、本発明は、細胞を赤血球と共に免疫ロゼット形成させることによって、その細胞を分離する方法に関する。

【0015】

もっとも広い態様では、本発明は、

(1) 有核細胞と赤血球が免疫ロゼットを形成できる条件下で、(a) 少なくとも1種の、分離しようとする有核細胞上の抗原に結合する抗体と、それが直接または間接的に結合している(b) 少なくとも1種の、赤血球に結合する抗体、とを含む抗体組成物に試料を接触させる段階、および

(2) 試料から免疫ロゼットを除去する段階を含む、有核細胞と赤血球を含む試料から有核細胞を分離する方法を提供する。

【0016】

この方法は、ポジティブおよびネガティブ選択プロトコルの両方に用いることができる。ポジティブ選択においては、所望の細胞がロゼットを形成する。そのような実施形態ではこの方法はさらに、免疫ロゼットの赤血球を溶解し、所望の細胞を分離する段階を含むことになる。したがって、ポジティブ選択法において、抗体組成物は、(a) 試料から得るまたは分離することを所望する有核細胞に特異的な少なくとも1種の抗体を含有する。

【0017】

好ましくは本発明の方法は、ネガティブ選択プロトコルに用いられる。ネガティブ選択においては、所望の細胞は免疫ロゼット形成せず、免疫ロゼット除去後も試料中に残存する。ネガティブ選択法において抗体組成物は、(a) 試料から除去することを所望する細胞に特異的な少なくとも1種の抗体を含有することになる。したがって、本発明は、

(1) 所望でない細胞と赤血球が免疫ロゼットを形成できる条件下で、(a) 少なくとも1種の、所望でない細胞上の抗原に結合する抗体と、それが直接また

は間接的に結合している (b) 少なくとも1種の、赤血球に結合する抗体、とを含む抗体組成物に試料を接触させる段階、および

(2) 試料から免疫ロゼットを除去する段階を含む、所望の細胞、赤血球、および所望でない細胞を含む試料において所望の細胞を濃縮し回収するためのネガティブ選択法を提供する。

【0018】

段階(1)で形成された赤血球と所望でない細胞との間の免疫ロゼットは、様々な手法を用いて所望の細胞から分離することができる。1つのやり方は、免疫ロゼットを含有する試料を、浮遊密度溶液 (i c o l l - H y p a q u e など) に重層し、遠心分離する。免疫ロゼットはペレットとなり、所望の細胞は、浮遊密度溶液と試料との間の界面に留まる。次に所望の細胞をその後の使用のために界面から回収する。別のやりかたでは、段階(1)で得られた免疫ロゼットを含有する試料を、沈殿試薬 (ヒドロキシエチルデンプン、ゼラチン、メチルセルロースなど) と混合して、ロゼットを沈降させる。懸濁状態の所望の細胞はその後の使用のために回収する。他の実施形態において、段階(1)で得られた免疫ロゼットを含有する試料を、遠心分離や向流溶離 (C o u n t e r F l o w E l u t r i a t i o n) を利用してまたは利用せずに沈降させる。所望の細胞は懸濁液中に留まり、後で使用するために回収される。

【0019】

本発明に用いる抗体組成物は、以下にさらに詳しく記載する。

本発明の方法は、血液 (特に臍帯血、および全血)、骨髓、胎児肝臓、軟膜懸濁液、胸膜および腹膜滲出液、ならびに胸腺細胞および脾細胞の懸濁液を含む、赤血球を含有する生物試料の処理に用いることができる。驚いたことに、本発明者等は、この方法で前処理なしに全血または全骨髓から細胞を直接除去できることを見出した。これは、従来技術の方法と比べて、本発明の方法の著しい利点である。特に、赤血球を除去し、標識し、試料に戻して添加する必要がない。

【0020】

本発明の方法は、これに限定されるものではないが、T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、単核細胞、好塩基性細胞、マスト細胞、前駆細胞、幹細胞、およ

び腫瘍細胞を含む任意の細胞型の濃縮された試料を調製するために用いることができる。

【0021】

一実施形態において、本発明の方法は、骨髓試料から造血前駆細胞および幹細胞標品を調製するために用いることができる。たとえば、本発明の方法は、試料からBリンパ球、Tリンパ球、単核細胞、NK細胞、顆粒細胞、および/または腫瘍細胞を枯渇させまたは除いて、移植や当分野の技術者ならすぐわかる他の治療法に用いる造血前駆細胞および幹細胞標品を調製するためのネガティブ選択プロトコルに用いることができる。たとえば、同種異系移植組織の場合、ドナーから骨髓または血液を採取し、本明細書に記載の方法によって前駆細胞および幹細胞を濃縮することができる。ネガティブ選択を用いることにより、標品中のヒト造血前駆細胞および幹細胞は抗体で被覆または変性されておらず、移植などの当分野の技術者に容易に認められる他の治療法に極めて適している。

【0022】

他の実施形態において、本発明の方法は、血液から成熟樹状細胞およびそれらの前駆体を単離回収するために用いることができる。樹状細胞は、*in vitro*および*in vivo*の両方でT細胞を活性化することのできる抗原提示細胞を含み、いろいろ有用な適用ができる。一例として、抗腫瘍T細胞反応を誘発するために、*in vitro*で樹状細胞に腫瘍抗原を負荷（パルス）し、*in vivo*に注入することができる。

【0023】

他の実施形態において、本発明の方法はさらに、血液や骨髓などの試料から、T細胞、B細胞、NK細胞、単核細胞、樹状細胞、好塩基性細胞、プラズマ細胞など選択された分化細胞型が濃縮された細胞標品を調製するのに用いることができる。これは、成長因子産生とその成長因子に対する反応などの特定の細胞間相互作用を研究を可能にする。さらに、特定の細胞型に関する分子的、生化学的分析を可能にする。NK細胞、樹状細胞、およびT細胞が濃縮された細胞標品は、ある種の悪性疾患に対する免疫療法に用いることもできる。

【0024】

他の実施形態において、本発明の方法は、非造血転移性腫瘍細胞などの腫瘍細胞を試料から分離するために用いることができる。この方法は、転移性疾患の診断および検出、転移性疾患の進行の監視、または治療の効能の監視を助けるために、患者の血液、骨髄、ならびに腹膜および胸膜滲出液から、非造血腫瘍細胞を検出する際に有用である。

【0025】

II. 抗体組成物

本発明は、本発明の方法に用いるための抗体組成物を含む。この抗体組成物は (a) 有核細胞上の抗原に結合する抗体少なくとも1種と、それが直接または間接的に結合している (b) 少なくとも1種の、赤血球上の抗原に結合する抗体、とを含むことになる。

【0026】

「少なくとも1種の抗体」という用語は、その抗体組成物が、少なくとも1種類の抗体 (少なくとも1つの抗体分子とは異なる) を含むことを意味する。1種類の抗体とは、特定の抗原に結合する抗体を意味する。たとえば、抗原CD2に結合する抗体は、1種類の抗体とみなされる。好ましくは、本発明の抗体組成物は、(a) 有核細胞に結合する複数種の抗体を含有する。

【0027】

2種の抗体 (a) および (b) は、二価抗体または二重特異性抗体を調製することによって、直接結合してもよい。2種の抗体 (a) および (b) は、たとえばテトラマー抗体複合体を調製することによって、間接的に結合してもよい。これらはすべて以下に記載する。

【0028】

一態様では、有核細胞に特異的な抗体は、赤血球に特異的な抗体と直接結合している。一実施形態において、本発明の抗体組成物は、有核細胞に特異的な少なくとも1種の抗体、その抗体が直接結合している (b) 赤血球に特異的な少なくとも1種の抗体、とを含む二価抗体を含有する。二価抗体は、たとえばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP) を用いることによって、1つの抗体を他の抗体に化学的に結合することによって調製で

きる。

【0029】

他の実施形態において、抗体組成物は二重特異性抗体を含有する。二重特異性抗体は、赤血球に特異的な抗体の可変領域と、分離する有核細胞の表面上の少なくとも1種の抗原に特異的な可変領域とを含む。この二重特異性抗体は、ハイブリッドハイブリドーマを形成することによって調製することができる。このハイブリッドハイブリドーマは、Staerz、およびBevan(1986年、PNAS(USA)83:1453)、ならびにStaerz、およびBevan(1986年、Immunology Today 7:241)に開示されているものなど、当分野で知られている手法によって調製することができる。二重特異性抗体はまた、Staerz等(1985年、Nature 314:628)、およびPerez等(1985年、Nature 316:354)に記載されているような手法を用いて化学的手段によって、または組換え免疫グロブリン遺伝子構築体を発現させることによって構築することができる。

【0030】

他の態様において、本発明の抗体組成物は、(a)有核細胞型に特異的な少なくとも1種の抗体、その抗体が間接的に結合している(b)赤血球に特異的な少なくとも1種の抗体、とを含む。「間接的に結合」とは、抗体(a)および抗体(b)が互いに直接には共有結合してはいないが、免疫複合体などの結合部分によって連結していることを意味する。好ましい実施形態では、テトラマー抗体複合体を形成することで有核細胞型に対する抗体は赤血球に特異的な抗体に間接的に結合する。テトラマー抗体複合体は、赤血球に結合することのできる第1のモノクローナル抗体と、分離する有核細胞に結合することのできる第2のモノクローナル抗体を混合することによって調製することができる。この第1および第2のモノクローナル抗体は第1の動物種由来である。第1の動物種の抗体のFc部分に対する第2の動物種のモノクローナル抗体のほぼ等モル量を、第1および第2の抗体と反応させる。第1および第2の抗体は、第1の動物種の抗体のFc部分に対する第2の動物種のモノクローナル抗体のF(ab')₂部分と反応させることもできる(テトラマー抗体複合体、およびその調製方法の説明として参照

により本明細書の一部とするLansdorpの米国特許第4868109号を参照のこと)。

【0031】

好ましくは、赤血球に特異的な抗体は、抗グリコフォリンA抗体である。本発明の抗体組成物に含まれる抗グリコフォリンA抗体は、赤血球を結合するために用いられる。グリコフォリンAに特異的なモノクローナル抗体の例は、10F7MN(米国特許第4752582号、細胞系統:ATCC受託番号HB-8162)、およびD2.10(Immunotech、Marseille、France)である。

【0032】

好ましくは、有核細胞に特異的な抗体は、抗体の組み合わせである。この抗体の組み合わせは、多くの細胞型を試料から除去することができるように、いくつかの細胞型に特異的であってよい。抗体の組み合わせを用いるとき、各抗体は赤血球に特異的な抗体に(直接、または間接的に)結合される。

【0033】

好ましい実施形態において、抗体組成物は、(a)赤血球に結合する抗グリコフォリンA抗体、(b)免疫ロゼット形成を望む有核細胞型と結合する抗体、ならびに(c)(a)および(b)両方のFc部分と結合する抗体、任意選択でF(ab')₂抗体断片でもよい、からなるテトラマー複合体である。(a):(b):(c)のモル比は、およそ1:3:4である。数種の細胞型を分離するとき、複合体は数種の抗有核細胞抗体(b)を用いて作製される。次にこの複合体を混合し、本発明の方法で用いるための抗体組成物を形成することができる。図1は、テトラマー抗体複合体によって形成されたロゼットの概略図である。

【0034】

本発明のコンテキストにおいて、抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体断片(たとえばFabやF(ab')₂)、キメラ抗体、2価または二重特異性抗体、およびテトラマー抗体複合体を含むものと理解される。抗体は、それらが適切な親和性(結合定数)、たとえば10⁷M⁻¹以上、で結合する場合、有核細胞または赤血球の表面上の選択された抗原に対して反応性である

と理解される。

【0035】

モノクローナル抗体は、好ましくは本発明の抗体組成物に用いられる。有核細胞の表面上の選択された抗原に特異的なモノクローナル抗体は、通常の手法を用いて容易に生成することができる。たとえば、モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein、1975年によって最初に開発されたハイブリドーマ手法によって生成することができる(Nature 256、495~497; 参照により本明細書の一部とする米国特許RE32011、第4902614号、第4543439号、および第4411993号も参照のこと; Monoclonal Antibodies、Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses、Plenum Press、Kennett、McKearn、およびBechtol(編)、1980年、ならびにAntibodies: A Laboratory Manual、HarlowおよびLane(編)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988年も参照のこと)。モノクローナル抗体を構築するために、他の手法も用いることができる(たとえば、William D. Huse等、1989年、「Generation of a Large Combinational Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda」、Science 246:1275~1281、L. Sastry等; 1989年、「Cloning of the Immunological Repertoire in Escherichia coli for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728~5732; Kozbor等、1983年、Immunol. Today 4、72、ヒトB細胞ハイブリドーマ手法に関して; Cole等、1985年、Monoclonal Antibodies in Canc

er Therapy、Allen R. Bliss, Inc.、77~96頁、ヒトモノクローナル抗体を生成するためのEBVハイブリドーマ手法に関して、を参照のこと；さらに、Michelle Alting-Mees等、1990年、「Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas」、Strategies in Molecular Biology 3: 1~9も参照のこと）。ハイブリドーマ細胞は、抗原に特異的に反応する抗体産生について免疫化学的にスクリーニングすることができ、モノクローナル抗体を単離することができる。

【0036】

抗体は通常の手法を用いて断片にし、全抗体に関して上述したものと同一方法で使う断片を選別することができる。たとえば、抗体をペプシンで処理することによって、 $F(ab')_2$ 断片をつくることができる。結果として生じる $F(ab')_2$ 断片は、処理してジスルフィド架橋を還元することにより、 Fab' 断片とすることができる。

【0037】

本発明はさらに、キメラ抗体誘導体、すなわち非ヒト動物可変領域とヒト不変領域とを合わせた抗体分子を企図する。キメラ抗体分子は、たとえばマウス、ラット、または他の種の抗体に由来する抗原結合ドメインとヒト不変領域とを含むことができる。これまでにキメラ抗体を作製するための様々なアプローチが述べられており、それを用いて、分化細胞、または腫瘍細胞表面上の選択された抗原を認識する免疫グロブリン可変領域を持つキメラ抗体を作製することができる。たとえば、Morrison等、1985年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81、6851；Takeda等、1985年、Nature 314: 452；Cabilly他、米国特許第4816567号；Boss他、米国特許第4816397号；Tanaguchi他、欧州特許公開EP171496；欧州特許公開第0173494号、英国特許GB2177096Bを参照のこと。

【0038】

2価抗体は、化学的複合、体細胞ハイブリダイゼーション、または遺伝子工学手法によって調製することができる。

【0039】

化学的連結は、 ϵ -アミノ基またはヒンジ部のチオール基と、ホモおよびヘテロ2官能性試薬の使用に基づく。5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DN TB)などのホモ2官能性試薬は、2つのFabの間にジスルフィド結合を生成し、0-フェニレンジマレイミド(O-PDM)は、2つのFabの間にチオエーテル結合を生成する(Brenner等、1985年、Glennie等、1987年)。N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)などのヘテロ2官能性試薬は、クラスやアイソタイプに関わらず、抗体の露出アミノ基とFab部分を連結する(Van Dijk等、1989年)。

【0040】

体細胞ハイブリダイゼーションには、クアドローマを生成する、2つの確立したハイブリドーマの融合(MilsteinおよびCuello、1983年)、またはトリオーマを生成する、第2の抗原で免疫化されたマウス由来のリンパ球と1種の確立したハイブリドーマの融合(NolanおよびKennedy、1990年)が含まれる。ハイブリッドハイブリドーマは、特定の薬剤耐性マーカーに耐性の各ハイブリドーマ細胞系統を作ることによって(De Lau等、1989年)、または各ハイブリドーマを異なる蛍光色素で標識し、ヘテロ蛍光細胞を選別することによって(Karaway等、1987年)選択される。

【0041】

遺伝子工学には、プラスミドに特定の抗体断片をコードするDNA配列とプラスミドを連結し、組換えタンパク質を発現させる組換えDNAに基づく技術を使用することが含まれる。二重特異性抗体はまた、リンカーを用いて2つの1本鎖Fv(scFv)断片をつなぐことによって単一共有結合構造とする(WinterおよびMilstein、1991年)、転写因子fosおよびjun由来のロイシンジッパー共発現配列とする(Kostelny等、1992年)、p53の相互作用領域を共発現するヘリックス-ターン-ヘリックスとする(Rh

einnecker等、1996年)、またはダイアボディとする(Holliger等、1993年)ことにより作製することもできる。

【0042】

表1は、本発明の方法に用いることのできる、有核細胞上の特定のヒト抗原に対する抗体の例を示す。本発明の方法は、他の種に関しても用いることができる。有核細胞に対する1種または複数の抗体の選択は、試料の性質、濃縮または枯渇する細胞の選択、方法がポジティブかネガティブ選択プロトコルであるかによって決まることになる。すべての場合において、免疫ロゼットが形成される有核細胞に対する抗体(または複数の抗体)は、本発明の方法に用いられるとき、赤血球に特異的な抗体に直接または間接に結合することになる。

【0043】

本発明の方法および抗体組成物は、好ましくは、特定の細胞型に関して濃縮された細胞標品を調製するためにネガティブ選択プロトコルにおいて用いられる。これは、単離したい特定の細胞型に対する抗体を欠く抗体組成物を用いることによって達成される。したがって、本発明は、(a)所望でない細胞上の抗原に結合する少なくとも1種の抗体、その抗体が結合している(b)赤血球に結合する少なくとも1種の抗体、とを含む、所望の細胞、赤血球および所望でない細胞を含有する試料中において、所望の細胞を濃縮し回収するための抗体組成物を提供する。ヒトの細胞に関して本発明のネガティブ選択プロトコルにおいて用いることのできる抗体組成物の特定の実施形態を、表2に記載する。この表は、特定の細胞型を濃縮する上述の方法において抗体(a)として用いることのできる、特定の抗原に対する抗体のリストまたはカクテルを提供する。ほとんどの場合において、必須の抗体に関するいくつかの選択、ならびにいくつかの任意選択の抗体を提供する。たとえば、T細胞を濃縮する場合、抗体(a)は、(1)CD16および/またはCD66bおよび/またはCD11bおよび/またはCD15、(2)CD19および/またはCD20および/またはCD21および/またはCD22および/またはCD24および/またはIg、ならびに(3)CD36および/またはCD14に対する抗体のカクテルであることができる。このカクテルは任意選択で、CD33および/またはCD56および/またはIgEおよ

び／またはCD41に対する抗体を含むことができる。表2に挙げた抗体の組み合わせに加えて、参照により本明細書の一部とする米国特許第5877299号に記載されているような特定の細胞型を濃縮するために他の抗体組み合わせを用いてよいことを、当分野の技術者は理解するであろう。本発明は細胞濃縮標品を調製するための免疫ロゼットの形成に関するもので、当分野の技術者は、他の抗体や抗体組み合わせを用いてもよいことが理解できよう。

【0044】

本発明の方法および抗体組成物は、細胞標品を調製するために、所望の細胞が免疫ロゼット形成されるポジティブ選択プロトコルに用いることができる。ポジティブ選択プロトコルに有用な抗体組み合わせのいくつかの例を以下に記載する。

【0045】

ポジティブ選択プロトコルで非造血性腫瘍細胞を分離するための抗体組成物は、腫瘍細胞に発現した非造血性抗原に特異的な抗体、たとえば乳癌や肺癌腫、ならびに神経芽腫細胞の表面上に発現した抗原に対する抗体などを含む。上皮腫瘍細胞に発現した非造血抗原に対する抗体は、（たとえば、表3に示したように）市販品製造元から入手でき、あるいは当分野で知られている手法を用いて調製することもできる。

【0046】

ポジティブ選択プロトコルでB細胞を分離するには抗体組成物は、CD24および／またはCD19および／またはCD20および／またはCD22に対する抗体を含有する。

【0047】

ポジティブ選択プロトコルでT細胞を分離するには、抗体組成物はCD3および／またはCD2および／またはCD5および／または、CD4およびCD8の両方に対する抗体を含有する。

【0048】

ポジティブ選択プロトコルでNK細胞を分離するには、抗体組成物はCD56に対する抗体を含有する。

【0049】

ポジティブ選択プロトコルで顆粒細胞を分離するには、抗体組成物はCD16および/またはCD66eおよび/またはCD66bに対する抗体を含有する。

【0050】

ポジティブ選択プロトコルで単核細胞を分離するには、抗体組成物はCD14に対する抗体を含有する。

以下の非限定的な実施例は本発明を例示するものである。

【0051】

【実施例】

実施例1

テトラマーの調製

本発明の方法に使用するテトラマー抗体複合体を調製するために、以下のプロトコルを用いることができる。(a)ロゼット形成する細胞に特異的な抗体(たとえば、抗CD2、CD3、CD4、CD8、CD14、CD16、CD19など)1mgを取る。(b)3mgの抗グリコフォリンA抗体(対赤血球)を添加し、十分に混合する。(c)次に4.0mgのP9抗体、または2.72mgのP9F(ab')₂抗体断片を添加する。37℃で一晩インキュベートする。P9抗体は、段階(a)および(b)で添加した抗体のFc部分に結合し、テトラマー抗体複合体を生じる。テトラマーの調製に関するさらなる情報は、参照により本明細書の一部とするLansdorpの米国特許第4868109号を参照されたい。有核細胞に発現した抗原に対する異なる抗体を包含するテトラマー抗体複合体は別々に調製し、その後混合する。

この抗体組成物は、枯渇を望む細胞に応じて、種々のテトラマー抗体複合体を合わせることによって作製する。種々のテトラマー抗体複合体の濃度は多様であり、典型的に、有核細胞に発現した抗原に対する抗体は、テトラマー複合体中10~30μg/mlである。次にこの組成物を細胞中1/10に希釈し、それにより細胞懸濁液中の各抗有核細胞抗体の最終濃度は1.0~3.0μg/mlとなる。

【0052】

実施例 2

フィコールを用いる免疫ロゼット法

フィコールハイパークを用いて、全末梢血から細胞を免疫ロゼット形成させるためのネガティブ選択プロトコルを以下に述べる。

1. 全末梢血 1 ml 当たり 100 μ l の抗体組成物を添加する。
2. 室温で 20 分インキュベートする。
3. 等量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) + 2 % 子ウシ胎児血清 (FCS) で試料を希釈し、緩やかに混合する。
4. フィコールハイパークの上部に希釈試料を加層するか、または希釈試料の下部にフィコールを加層する。
5. ブレーキなし、室温、1200 $\times$ g で 20 分間、遠心分離する。
6. フィコール、プラスマ界面から濃縮細胞を除去する。
7. 濃縮細胞を 5 ~ 10 倍量の PBS + 2 % FBS で洗浄する。

注：単核細胞や他の付着細胞を濃縮する場合、1 mM の EDTA を全血試料、およびすべての洗浄 / 希釈溶液に添加する。

【0053】

実施例 3

ヘタスターチ (hetastarch) 沈降を用いる免疫ロゼット法

ヘタスターチを用いて、全末梢血から細胞を免疫ロゼット形成させるためのネガティブ選択プロトコルを以下に述べる。ヘタスターチは、凝集作用によって赤血球沈降速度を高める化合物の 1 つである。

1. 血液 5 ml 当たり 1 ml の食塩水中 6 % ヘタスターチを添加し、混合する。
2. 各抗有核細胞抗体の最終濃度が 1.0 ~ 2.0 μ g / ml となるように、実施例 1 に記載した抗体組成物を全血に添加する。
3. 室温で 10 分インキュベートする。
4. 室温、50 $\times$ g で 5 分間、遠心分離する。
5. 上澄みを除去する。この分画は濃縮細胞を含有する。
6. 濃縮細胞分画を 2 ~ 5 倍量の PBS + 2 % ウシ胎児血清 (FBS) で洗浄

する。

【0054】

実施例4

ヘタスターチ/イオジキサノール混合物を用いる免疫ロゼット法

全末梢血から細胞を免疫ロゼット形成させるためのネガティブ選択プロトコルを以下に述べる。

1. 血液5ml当たり1mlの食塩水中6%ヘタスターチを添加し、混合する。
2. 0.6mlの60%w/vイオジキサノールを添加し混合する。イオジキサノールは、水溶液密度を相当に高める化合物の1つである。
3. 各抗有核細胞抗体の最終濃度が1.0~2.0μg/mlとなるように、実施例1に記載した抗体組成物を全血に添加する。
3. 室温で10分インキュベートする。
4. 室温、50×gで5分間、遠心分離する。
5. 上澄みを回収する。この分画は濃縮細胞を含有する。
6. 濃縮細胞分画を2~5倍量のPBS+2%FBSで洗浄する。

【0055】

実施例5

免疫ロゼット法 ポジティブ選択

全末梢血から細胞を免疫ロゼット形成させるためのポジティブ選択プロトコルを以下に述べる。

1. 1mlの血液を取りわけておく。
2. 10mlの血液をフィコールパーク(Ficoll-Paque)に重層し、ブレーキなし、室温、1200×gで、20分間、遠心分離する。
3. フィコール-血漿界面のMNC層をとり、PBS+2%FBSで洗浄する。
4. 細胞をカウントし、 $1 \times 10^8 / \text{ml}$ になるよう再懸濁する。
5. 試料の量を測定し、量Aとする。
6. 段階1で取っておいた血液0.2mlを添加する。

7. PBS + 2% FBSで、全量を量Aの2倍にする。
8. 実施例1に合成を記載した、所与の抗原に特異的なテトラマー抗体複合体を、最終濃度1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加する。
9. 室温で20分インキュベートする。
10. PBS + 2% FBSで2倍に希釈し、密度1.085 g/ml 、オスモル濃度280 mOsm に調製したパーコール (Percoll) に重層する。
11. 段階2のとおり、1200 $\times g$ で20分間、遠心分離する。
12. 上澄みを捨て、濃縮細胞を含有するペレットを再懸濁する。
13. 赤血球を塩化アンモニウム溶液で溶解し、PBS + 2% FBSで洗浄する。

【0056】

実施例6

T細胞の濃縮 フィコールを用いる免疫ロゼット形成

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、全末梢血からのT細胞の濃縮を例示する。CD16、CD19、CD36、およびCD56に対する抗体を含有するテトラマー抗体複合体のT細胞濃縮カクテルを調製した。表4に示した結果は、本発明の方法が50%に近い回収率で、T細胞の純度95%をもたらすことを示す。

【0057】

実施例7

CD8⁺T細胞の濃縮 フィコールを用いる免疫ロゼット形成

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、全末梢血からのCD8⁺T細胞の濃縮を例示する。テトラマー抗体複合体の2種のカクテルを試験した。1つのカクテルは、CD4、CD16、CD19、CD36、およびCD56に対する抗体を含有し、もう一方は、CD4、CD16、CD19、CD36、CD56、およびIgEに対する抗体を含有した。表5に示した結果は、カクテルに抗IgEを添加することで、回収率に影響を及ぼさず、CD8⁺T細胞の純度が向上することを示す。

【0058】

実施例 8

CD4⁺T細胞の濃縮 フィコールを用いる免疫ロゼット形成

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、全末梢血からのCD4⁺T細胞の濃縮を例示する。テトラマー抗体複合体の2種のCD4⁺T細胞濃縮カクテルを調製した。1つのカクテルは、CD8、CD16、CD19、CD36、およびCD56に対する抗体を含有した。もう一方のカクテルは、CD8、CD16、CD19、CD36、CD56、およびIgEに対する抗体を含有した。表6に示した結果は、本発明の方法が回収率46%で、CD4⁺T細胞の純度93%をもたらし、かつ濃縮カクテルに抗IgEを添加することで、CD4⁺T細胞の純度が向上することを示す。

【0059】

実施例 9

B細胞の濃縮 フィコールを用いる免疫ロゼット形成

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、全末梢血からのB細胞の濃縮を例示する。テトラマー抗体複合体の2種のB細胞濃縮カクテルを調製した。1つのカクテルは、CD2、CD3、CD16、CD36、およびCD56に対する抗体を含有した。もう一方のカクテルは、CD2、CD3、CD16、CD36、CD56、およびIgEに対する抗体を含有した。表7に示した結果は、本発明の方法が回収率43%で、B細胞の純度88%をもたらし、かつカクテルに抗IgEを添加することで、B細胞の純度が向上することを示す。

【0060】

実施例 10

NK細胞の濃縮 - フィコールを用いる免疫ロゼット形成

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、全末梢血からのNK細胞の濃縮を例示する。テトラマー抗体複合体の2種のNK細胞濃縮カクテルを調製した。1つのカクテルは、CD3、CD4、CD19、CD66b、およびCD36に対する抗体を含有した。もう一方のカクテルは、CD3、CD4、CD19、CD66b、CD36、およびIgEに対する抗体を含有した。表8に示した結果は、本発明の方法が回収率44%で、NK細胞の純度74%をもたらし、かつ

カクテルに抗IgEを添加することで、純度は向上するが、回収率が低下することを示す。

【0061】

実施例11

前駆細胞の濃縮

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、全臍帯血からの前駆細胞の濃縮を例示する。テトラマー抗体複合体の2種の異なるカクテル、

(a) CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、およびCD66bに対するテトラマー抗体複合体を含有する前駆細胞濃縮カクテル、

(b) CD2、CD14、CD19、およびCD66bに対するテトラマー抗体複合体を含有する減量(debulking)カクテルを用いた。

表9に示した結果は、本発明の方法が、広範な前駆細胞濃縮カクテルの場合、回収率53%で、CD34⁺細胞の純度29%のをもたらし、4抗体減量カクテルの場合、純度はわずか5%、回収率45%となることを示す。

【0062】

実施例12

単核細胞の濃縮 フィコールを用いる免疫ロゼット形成

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、全末梢血からの単核細胞の濃縮を例示する。テトラマー抗体の単核細胞濃縮カクテルをいくつか調製した(表10を参照)。表10に示した結果は、本発明の方法がCD14⁺の回収率65%で、CD14⁺細胞の純度76%をもたらし、抗CD8または抗IgEの添加は単核細胞の純度を向上させたが、抗CD8とIgE両方の添加は付加的な効果を有さなかったことを示す。

【0063】

実施例13

非造血腫瘍細胞の濃縮

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、全末梢血からの乳癌細胞の濃縮を例示する。CAMA乳癌細胞系統由来の細胞を、頻度1/10³、1/10

⁴、および $1/10^5$ で全末梢血の試料に接種した。テトラマー抗体複合体の3種の腫瘍細胞濃縮カクテルを調製した。このカクテルの抗体組成を表11に記載する。表12に示した結果は、本発明の方法が、腫瘍細胞の回収率20～50%で、 2×10^6 を超える腫瘍細胞の濃縮をもたらすことを示す。より広範なカクテルは、より高度の腫瘍細胞の濃縮をもたらす。

【0064】

実施例14

T細胞の濃縮 - 抗CD36による抗CD14代替の効果

本実施例は、抗CD14を抗CD36に変えて濃縮カクテルを変更したとき、実施例2に記載した方法を用いる全末梢血からのT細胞の濃縮が向上することを例示する。表13の結果は、抗体を置き換えた場合、 $CD3^+$ の純度%が24%増加することを示している。

【0065】

実施例15

ヘタスターチ沈降を用いる特定細胞集団の濃縮

本実施例は、実施例3に記載した方法を用いる、全末梢血からの多様な細胞集団の濃縮を例示する。

CD16、CD19、CD36、およびCD56に対する抗体を含有するテトラマー抗体複合体のT細胞濃縮カクテルを調製した。本発明の方法は、回収率60%で、95%を超えるT細胞の純度をもたらす。

CD2、CD3、CD16、CD36、およびCD56に対する抗体を含有するテトラマー抗体複合体のB細胞濃縮カクテルを調製した。本発明の方法は、回収率39%で、B細胞の純度75%をもたらす。

CD3、CD4、CD19、CD36、およびCD66bに対する抗体を含有するテトラマー抗体複合体のNK細胞濃縮カクテルを調製した。本発明の方法は、回収率27%で、NK細胞の純度65%をもたらす。

【0066】

実施例16

ヘタスターチ/イオジキサノール混合物を用いる特定細胞集団の濃縮

本実施例は、実施例4に記載した方法を用いる、全末梢血からの多様な細胞集団の濃縮を例示する。表14に記載した結果を以下に要約する。

CD16、CD19、CD36、およびCD56に対する抗体を含有するテトラマー抗体複合体のT細胞濃縮カクテルを調製した。本発明の方法は、回収率61%で、T細胞の純度95%をもたらす。

CD8、CD16、CD19、CD36、およびCD56に対する抗体を含有するテトラマー抗体複合体のCD4⁺T細胞濃縮カクテルを調製した。本発明の方法は、回収率64%で、CD4⁺T細胞の純度89%をもたらす。

CD4、CD16、CD19、CD36、およびCD56に対する抗体を含有するテトラマー抗体複合体のCD8⁺T細胞濃縮カクテルを調製した。本発明の方法は、回収率43%で、CD8⁺T細胞の純度80%をもたらす。

CD2、CD3、CD16、CD36、およびCD56に対する抗体を含有するテトラマー抗体複合体のB細胞濃縮カクテルを調製した。本発明の方法は、回収率58%で、B細胞の純度84%をもたらす。

CD3、CD4、CD19、CD36、およびCD66bに対する抗体を含有するテトラマー抗体複合体のNK細胞濃縮カクテルを調製した。本発明の方法は、回収率50%で、NK細胞の純度80%をもたらす。

【0067】

実施例17

異なる成層媒質を用いる免疫口ゼット形成

本実施例は、段階4のフィコールハイペークを異なる媒質に替えることによって、実施例2の方法を変更できることを例示する。フィコールの密度は1.077 g/ml、オスモル濃度は約300 mOsmであった。パーコールとイオジキサノールの溶液を、密度1.085 g/ml、オスモル濃度は280 mOsmで調製した。CD2、CD3、CD16、CD36、およびCD56に対する抗体複合体を含有するB細胞濃縮カクテルを調製した。

表15に示した2つの別の試料に関するB細胞濃縮の結果は、より高い密度の別の成層媒質を使用することによって、B細胞の純度を低下させることなく、B細胞の回収率を増大できることを示す。

【0068】

実施例18

免疫口ゼットを用いるT細胞の駆逐

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、全末梢血からのT細胞の除去を例示する。CD3に対するテトラマー抗体複合体のT細胞駆逐カクテルを調製した。本発明の方法は、 $2.31 \log$ でCD3⁺細胞の枯渇をもたらした。

【0069】

実施例19

免疫口ゼットを用いるB細胞の駆逐

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、全末梢血からのB細胞の除去を例示する。CD19に対するテトラマー抗体複合体のB細胞駆逐カクテルを調製した。本発明の方法は、 $3.01 \log$ でCD19⁺細胞の枯渇をもたらした。

【0070】

実施例20

免疫口ゼット形成を用いる乳癌細胞の駆逐

本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、1～5% C A M A乳癌細胞を接種した全末梢血からの乳癌細胞の除去を例示する。抗乳癌抗体5E11、およびB R S T 1を含有するテトラマー抗体複合体の駆逐カクテルを調製した。表16に示した結果は、本発明の方法が $1.0 \sim 1.41 \log$ で乳癌細胞の枯渇をもたらすことを示す。

【0071】

実施例21

あらかじめ保存された全末梢血からの顆粒細胞の除去

全末梢血試料中の顆粒細胞の密度は、24時間を超える保存によって減少する。新鮮全血から赤血球と顆粒細胞を除去するために通例用いられる密度分離方法は、保存された血液試料からは有効に顆粒細胞を除去しない。保存顆粒細胞の沈降速度を、免疫口ゼット形成によって、標準フィコール密度分離(1.077 g/ml)で有効に除去できるように増大することができる。本実施例は、実施例2に記載した方法を用いる、保存(48時間)全末梢血からの顆粒細胞の除去を

例示する。CD66bに対するテトラマー抗体複合体を含有する顆粒細胞枯渇カクテルを調製した。表17に示した結果は、本発明の方法が1.8~2.610gの顆粒細胞の枯渇をもたらすことを示す。

【0072】

実施例22

免疫口ゼット形成を用いる特定細胞集団のポジティブ選択

本実施例は、実施例5に記載したポジティブ選択方法を用いる、全末梢血からのCD8⁺の濃縮を例示する。CD8に対するテトラマー抗体複合体を調製した。本発明の方法はCD8⁺の濃縮をもたらし、単核細胞分画%は最初の25%からペレット中の32%となる。

【0073】

現在好ましいとみなされる実施例に関して本発明を述べたが、本発明は開示された実施例に限定されないものであると理解される。それとは反対に、本発明は添付される請求の範囲の精神および範囲内に包含される多様な修正、および同等の翻案を含むことを意図する。

【0074】

すべての出版物、特許、および特許出願は、それぞれ個々の出版物、特許、または特許出願が、完全な形で参照により組み込まれると明確かつ個別に指示された場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

表 1

細胞分離に用いる抗体

抗原	抗体	供給元
CCR5	BLR-7	R&D、ミネソタ州、ミネアポリス
CD2	6F10.3 MT910	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ Dako、カリフォルニア州、カービンテリア
CD3	UCHT1 SK7	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ Becton Dickinson Immunocytometry、カリフォルニア州、マウンテンビュー
CD4	13B8.2	Becton Dickinson Immunocytometry、カリフォルニア州、マウンテンビュー
CD5	UCHT2	Serotec、ノースカロライナ州、ローリー
CD8	B911 OKT3	Becton Dickinson Immunocytometry、カリフォルニア州、マウンテンビュー Bio Designs
CD10	ALB1	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
CD11b	ICRF44	Pharmingen、カリフォルニア州、サンディエゴ
CD14	MEM 15 MEM 18	Exbio、チェコ共和国、ブラハ
CD15	DU-HL60-3	Sigma、ミズーリ州、セントルイス
CD16	MEM 154 3G8 NKP15	Exbio、チェコ共和国、ブラハ IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ Becton Dickinson Immunocytometry、カリフォルニア州、マウンテンビュー
CD19	J4.119 4G7 HD37	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ Becton Dickinson Immunocytometry、カリフォルニア州、マウンテンビュー Dako、カリフォルニア州、カービンテリア
CD20	MEM97 L27	Exbio、チェコ共和国、ブラハ Becton Dickinson Immunocytometry、カリフォルニア州、マウンテンビュー
CD21	B-Ly4	Pharmingen、カリフォルニア州、サンディエゴ
CD22	HIB22	Pharmingen、カリフォルニア州、サンディエゴ

表1(つづき)

抗原	抗体	供給元
CD24	32D12	Dr. Steinar Funderud, Institute for Cancer Research, Dept. of Immunology、ノルウェー、オスロ
	ALB9	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
CD25	3G10	Caltag、カリフォルニア州、バーリングヘム
CD27	1A4CD27	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
CD29	Lia1.2	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
CD33	D3HL60.251	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
CD34	581	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
CD36	FA6.152	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
	IVC7	CLB, Central Laboratory of the Netherlands, Red Cross Blood Transfusion Service
CD38	T16	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
CD41	PI1.64	Kaplan, 5th International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens
	SZ22	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
CD42a	Beb1	Becton Dickinson Immunocytometry、カリフォルニア州、マウンテンビュー
CD45	J33	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
	MEM28	Exbio、チェコ共和国、プラハ
CD45RA	8D2.2	Craig等、1994年、StemCell Technologies、カナダ、バンクーバー
	L48	Becton Dickinson Immunocytometry、カリフォルニア州、マウンテンビュー
CD45RO	UCHL1	Dako、カリフォルニア州、カーピンテリア
CD56	T199	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
	MY31	Becton Dickinson Immunocytometry、カリフォルニア州、マウンテンビュー
CD66c	CLB/gran10	CLB, Central Laboratory of the Netherlands, Red Cross Blood Transfusion Service
CD66b	B13.9	CLB, Central Laboratory of the Netherlands, Red Cross Blood Transfusion Service
	80H3	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
CD69	L78	BD Biosciences、カリフォルニア州、サンノゼ

表1(つづき)

抗原	抗体	供給元
CD71	My29	Zymed Laboratories、カリフォルニア州、サンフランシスコ
CD124	S456C9	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
HLADR	IMMU357.12	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
IgA1	NiF2	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
IgE	G7-18	Pharmingen、カリフォルニア州、サンディエゴ
IgG	8A4	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ
TCR $\alpha\beta$	WT31	BD Biosciences、カリフォルニア州、サンノゼ
TCR $\gamma\delta$	Immu510	IMMUNOTECH、フランス、マルセイユ

表 2

ヒト細胞をネガティブ選択するための免疫ロゼット形成抗体カクテル

T細胞濃縮

抗－

CD16および／またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および／またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および／またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

休止T細胞濃縮

抗－

HLA-DRおよび／またはCD25、CD69

CD16および／またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および／またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および／またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

$\gamma\delta$ T細胞濃縮

抗－

$\alpha\beta$ TCR

CD16および／またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および／またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および／またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

表 2 (続き) **$\alpha\beta$ T細胞濃縮**

抗-

 $\gamma\delta$ TCR

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

CD4+T細胞濃縮

抗-

CD8

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

ナイーブCD4+T細胞濃縮

抗-

CD8

CD45ROおよび/またはCD29

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

表 2 (続き)**記憶CD4+T細胞濃縮**

抗-

CD8

CD45RA

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

休止CD4+T細胞濃縮

抗-

CD8

HLA-DRおよび/またはCD25、CD69

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

CD4+ $\alpha\beta$ T細胞濃縮

抗-

 $\gamma\delta$ TCR

CD8

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

表 2 (続き)**TH1CD4+T細胞濃縮**

抗-

CD8

CD124

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

TH2CD4+T細胞濃縮

抗-

CD8

CCR5

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

CD8+T細胞濃縮

抗-

CD4

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

表 2 (続き)**ナイーブCD8+T細胞濃縮**

抗-

CD4

CD45ROおよび/またはCD29

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

記憶CD8+T細胞濃縮

抗-

CD4

CD45RA

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

休止CD8+T細胞濃縮

抗-

CD4

HLA-DRおよび/またはCD25、CD69、CD27

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

表 2 (続き)

CD8+ $\alpha\beta$ T細胞濃縮

抗-

 $\gamma\delta$ TCR

CD4

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24、Ig

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、IgE、CD41

B細胞濃縮

抗-

CD2および/またはCD3、CD4およびCD8の両方

CD16および/またはCD66b、CD11b、CD15

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD56、CD41

NK細胞濃縮

抗-

CD3

CD66bおよび/またはCD15

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24

CD36および/またはCD14

および任意選択で、抗CD33、CD4、IgE、CD41

表 2 (続き)

単核細胞濃縮

抗-

CD2および/またはCD3、CD5

CD19および/またはCD20、CD21、CD22、CD24

CD66bおよび/またはCD16

および任意選択で、抗CD8、CD56

樹状細胞濃縮

抗-

CD3

CD14

CD16

CD19

CD34

CD56

CD66b

好塩基性細胞濃縮

抗-

CD2

CD3

CD14

CD15

CD16

CD19

CD24

CD34

CD36

CD56

CD45RA

表 2 (続き)**前駆細胞濃縮**

抗-

CD2および/またはCD3

CD16および/またはCD66b

CD19および/またはCD24

CD14

および任意選択で、抗CD56、CD10、CD45RA、CD38、CD36、CD33、CD71

赤血球前駆細胞濃縮

抗-

CD2および/またはCD3

CD16および/またはCD66b

CD19および/またはCD24

CD14

CD45RA

CD33

CD10

および任意選択で、抗CD56

骨髄前駆細胞濃縮

抗-

CD2および/またはCD3

CD16および/またはCD66b

CD19および/またはCD24

CD14

CD71

CD10

および任意選択で、抗CD56

表 2 (続き)

巨核球前駆細胞濃縮

抗-

CD2および/またはCD3

CD16および/またはCD66b

CD19および/またはCD24

CD14

CD45RA

CD10

および任意選択で、抗CD56

上皮腫瘍細胞濃縮

抗-

CD45

CD66b

および任意選択で、CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD36、CD38、CD56、
CD66e

表 3

上皮腫瘍細胞に発現した非造血抗原を認識する抗体

特異性	抗体	抗原	供給元／開発者
上皮細胞マーカー	BerEp4	ESA（上皮特異抗原） （別名、HEA）	DAKO
	HEA125	ESA	Serotec, Cymbus, Pierce, RDI, Biodesign
	VU-1D9	ESA	Cymbus
	GP1.4	EMA（上皮膜抗原） （別名、PEM／エピシアリン （Episialin）、シアロムチ ン）	IMMUNOTECH、 フランス、 マルセイユ
	VU-4H5	EMA	Neomarkers
	MC.5	EMA	Biogenex、Biodesign
	B24.1	EMA	Biomeda
	E29	EMA	DAKO
	H11	EGFR	DAKO
	RAR9941	上皮糖タンパク	Baxter、ドイツ
	RAR9948	上皮糖タンパク	Baxter、ドイツ
癌（乳、子宮頸 部、卵巣、肺、 子宮内膜）	CU-18	BCA225（乳癌関連抗原）	ID Labs
癌	115D8	癌関連抗原	Biogenex、Biodesign
腺癌	B72.3	TAG-72 （腫瘍関連糖タンパク）	ID Labs、 Biogenex、Signet
腺癌、乳癌、 および肺癌	B6.2	未知、乳癌マーカー	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、ムチン	Cedarlane
	SM-3	ミルクムチンコア抗原	Cymbus, Biodesign, Imperial Cancer Research Fund

表3(つづき)

特異性	抗体	抗原	供給元／開発者
	DF3	CA15-3 (乳腫瘍マーカ)	ID Labs
	552	CA 15-3	Biodesign
	695	CA 15-3	Biodesign
	RAR9938	e-erb B2	Baxter、ドイツ
	C13B5	e-erb B2	IMMUNOTECH、 フランス、マルセイユ、Biogenex
肺	MOC-1	肺小細胞癌	ICN Biomed、 Biodesign
	MOC-21	肺小細胞癌	ICN Biomed、 Biodesign
	MOC-31	肺小細胞癌	ICN Biomed、 Biodesign
	MOC-32	肺小細胞癌	ICN Biomed、 Biodesign
	MOC-52	肺小細胞癌	ICN Biomed、 Biodesign
	TFS-4	肺小細胞癌	Biodesign
黒色腫	NKI/C3	黒色腫関連抗原	ICN Biomed、 Biodesign
	NKI/M6	黒色腫関連抗原	Biodesign
	PAL-MI	黒色腫関連抗原	ICN Biomed、 Biodesign
	HMB45	黒色腫細胞	Biodesign
卵巣腫瘍	185	CA-125 (卵巣腫瘍マーカ)	ICN Biomed、 Biodesign
	OV-632	卵巣癌マーカ	ICN Biomed、 Biodesign
胃腸癌	CA 19-9	胃腸腫瘍マーカ	ICN Biomed、 Biodesign
	CA 242	胃腸癌	BioDesign
腎細胞癌	RC38	腎細胞癌	Biodesign
ユーイング肉腫	O13		Signet
ユーイング肉腫	CC49	ヒト腺癌上	Signet

表3(つづき)

特異性	抗体	抗原	供給元／開発者
神経芽腫	UJ13A	未知	HurkoおよびWalsh (1983年)、 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、 カリフォルニア州
	BA-1.2	未知	//
	HSAN 1.2	未知	Reynoldsおよび Smith (1982年)、 Hybridomas in Cancer、235頁

表4

T細胞濃縮－フィコールを用いる免疫ロゼット形成

純 度	平 均	95
	SD	4
	n	19
回 収 率	平 均	46
	SD	12
	n	19

SD＝平均値からの標準偏差

純度＝CD3⁺細胞%

回収率＝CD3⁺細胞の回収率

表5

CD8⁺ T細胞濃縮ーフィコールを用いる免疫ロゼット形成

カクテル	n	純度%±1SD	回収率%±1SD
CD4, CD16, CD19, CD36, CD56	19	76±8	44±19
CD4, CD16, CD19, CD36, CD56, IgE	5	81±4	45±37*

SD＝平均値からの標準偏差

純度＝CD8⁺細胞%

回収率＝CD8⁺細胞の回収率%

* n = 4

表6

CD4⁺ T細胞濃縮－フィコールを用いる免疫ロゼット形成

カクテル	n	純度%±1SD	回収率%±1SD
CD8, CD16, CD19, CD36, CD56	19	89±4	57±22
CD8, CD16, CD19, CD36, CD56, IgE	7	93±3	46±10*

SD = 平均値からの標準偏差

純度 = CD4⁺ 細胞%

回収率 = CD4⁺ 細胞の回収率%

* n = 5

表7

B細胞濃縮－フィコールを用いる免疫ロゼット形成

カクテル	n	純度%±1SD	回収率%±1SD
CD2, CD3, CD16, CD36, CD56	22	72±15	61±27
CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, IgE	5	88±7	43±18

SD＝平均値からの標準偏差

純度＝CD19⁺細胞%

回収率＝CD19⁺細胞の回収率%

表 8

NK細胞濃縮－フィコールを用いる免疫ロゼット形成

カクテル	n	純度%±1SD	回収率%±1SD
CD3, CD4, CD19, CD66b, CD36	15	74±10	44±19
CD3, CD4, CD19, CD66b, CD36, IgE	6	88±4	27±20

SD＝平均値からの標準偏差

純度＝CD56⁺細胞%

回収率＝CD56⁺細胞の回収率%

表9

全臍帯血からのCD34⁺細胞の濃縮－フィコールを用いる
免疫ロゼット形成

カクテル	n	純度%±1SD	回収率%±1SD
前駆細胞濃縮	15	29 ± 9	53 ± 29
減量	8	5 ± 1	45 ± 20

純度＝CD34⁺細胞%

回収率＝CD34⁺細胞の回収率%

SD＝平均値からの標準偏差

表10

単核細胞-フィコールを用いる免疫ロゼット形成

カクテル	n	純度%±1SD	回収率%±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

純度 = CD14⁺ 細胞の純度%

回収率 = CD14⁺ 細胞の回収率%

表11

腫瘍濃縮カクテルの抗体組成

カクテル	カクテル中の抗体
CD45のみ	CD45
CD45および CD66b	CD45, CD66b
広範カクテル	CD45, CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD66b

表12

全血からのCAMA乳癌細胞の濃縮

出発頻度 (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細胞の純度%			CAMA細胞の濃縮log			CAMA細胞の 回収率%		
濃縮									
CD45のみ	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 および 66b	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)
広範カクテル	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細胞濃縮－フィコールを用いる免疫ロゼット形成

	n	CD14を含むカクテル ± 1 S D	CD36を含むカクテル ± 1 S D
純 度	3	80±10	94±5
回収率	3	56±12	42±10

S D = 平均値からの標準偏差

純度 = C D 3⁺ 細胞の純度%

回収率 = C D 3⁺ 細胞の回収率%

表 1 4

ヘタスターチ／イオジキサノール混合物を用いる免疫ロゼット形成

濃縮細胞型	純 度			回収率		
	平均	SD	n	平均	SD	n
T細胞	95%	3%	3	61%	9%	3
CD4 ⁺ 細胞	89%	5%	2	64%	5%	2
CD8 ⁺ 細胞	80%	8%	2	43%	1%	2
B細胞	84%	8%	5	58%	26%	5
NK細胞	80%	15%	4	50%	23%	4

SD＝平均値からの標準偏差

純度＝所望の細胞型の純度％（T細胞＝CD3⁺細胞、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、
B細胞＝CD19⁺細胞、NK細胞＝CD56⁺細胞）

回収率＝所望の細胞の回収率％

表 1 5

異なる成層媒質を用いる免疫ロゼット形成、B細胞濃縮

媒 質	フィコール	パーコール	イソギサノール
試料 1 (三連)			
純度 ± 1 S E	82 $\pm$ 2.9	81 $\pm$ 1.4	86 $\pm$ 2.7
回収率 ± 1 S E	78 $\pm$ 6.0	110 $\pm$ 3	104 $\pm$ 10
試料 2 (三連)			
純度 ± 1 S E	71 $\pm$ 1.2	77 $\pm$ 1.5	81 $\pm$ 2.4
回収率 ± 1 S E	49 $\pm$ 8	78 $\pm$ 3	64 $\pm$ 1

S E = 平均の標準誤差

純度 = CD 19⁺ 細胞の純度%回収率 = CD 19⁺ 細胞の回収率%

表 1 6

免疫ロゼット形成を用いる乳癌細胞の駆逐

	試料 1	試料 2
CAMA細胞の枯渇 (log)	1.4, 1.4	1.1, 1.0

表 1 7

保存全末梢血からの顆粒細胞の除去

	免疫ロゼット形成	フィコールのみ
軽密度分画中の 顆粒細胞%	1.1, 1.4, 0.7, 0.4	20.9, 18.0

免疫ロゼット形成＝抗CD66bを含有する枯渇カクテルを用いる、

実施例2に略述した方法

フィコールのみ＝免疫ロゼット形成を伴わない標準のフィコール密度分離

本明細書で参照した参考文献のリスト

1. Braun等、N.Engl.J.Med.、342:525:533
2. M.B.Brenner、I.S.Trowbridge、J.L.Strominger、1985年、Cell 40:183～190
3. W.B.De Lau、A.E.Van Loon、K.Heije、D.Valerio、B.J.Bast、1989年、J.Immunol.Methods、117:1～8
4. E.A.deWynter等、1975年、Stem Cells、Vol.13:524～532
5. Firat等、1988年、Bone Marrow Transplantation、Vol.21:933～938
6. M.J.Glennie、H.M.McBride、A.T.Worth、G.T.Stevenson、1987年、J.Immunol.139:2367～2375
7. P.Holliger、T.Prospero、G.Winter、1993年、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、90:6444～6448
8. C.Horrocks、M.Fairhurst、およびT.Thomas、1998年、Blood.Vol.92、25A頁
9. L.Karawajew、B.Micheel、O.Behrsing、M.Gaestel、1987年、J.Immunol.Methods 96:265～270
10. S.A.Kostelny、M.S.Cole、J.Y.Tso、1992年、J.Immunol.148:1547～1553
11. Kohler、およびMilstein、1975年、Nature 256、495～497
12. C.Milstein、A.C.Cuello、1983年、Nature、305:537～540
13. O.Nolan、O.R.Kennedy、1990年、Biochem.Biophys.Acta、1040:1～11

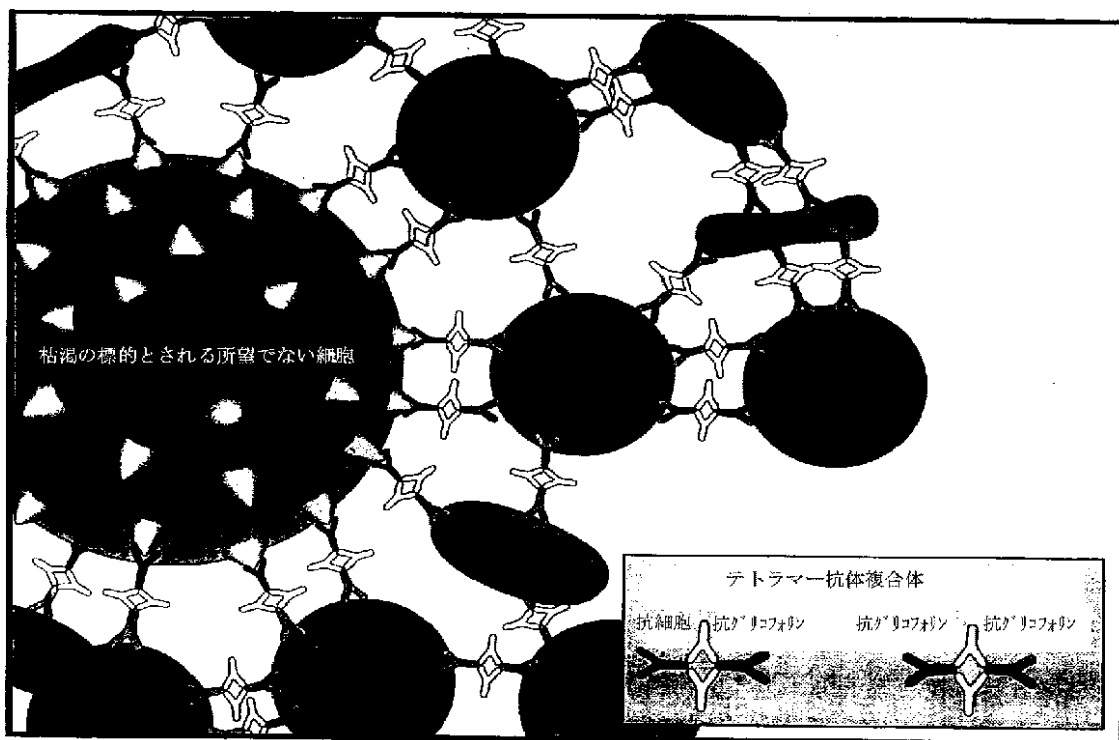
14. Perez等、1985年、Nature 316:354
15. Rheinnecker等、1996年、J.Immunol.157:2989～2997
16. E.J.Shpall等、1994年、J.of Clinical Oncology 12:28～36
17. Slaper-Cortenbach、C.M.Ineke等、1990年、Exp.Hematol.18:49～54
18. Staerz、およびBevan、1986年、PNAS(USA)83:1453
19. Staerz、およびBevan、1986年、Immunology Today、7:241
20. Staerz等、1985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

【図面の簡単な説明】

【図1】

テトラマー抗体複合体を用いて所望でない有核細胞の周囲に形成した赤血球のロゼットの概略図である。

【図1】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 00/00616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/555 G01N33/569 C07K16/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1990 SLAPER-CORTENBACH I C M ET AL: "EFFECTIVE PURGING OF BONE MARROW BY A COMBINATION OF IMMUNOROSETTE DEPLETION AND COMPLEMENT LYSIS" Database accession no. PREV199089050090 XP002162646 abstract	1-67
Y	& EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (NEW YORK), vol. 18, no. 1, 1990, pages 49-54, ISSN: 0301-472X --- -/--	1-33, 35-67
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 March 2001		12/04/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Goetz, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 00/00616

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 868 109 A (LANDS DORP PETER M) 19 September 1989 (1989-09-19)	34
Y	column 4, line 51-65 column 7, line 31-63 figure 2	1-33, 35-67
Y	US 5 470 570 A (REIST CRAIG ET AL) 28 November 1995 (1995-11-28) column 1, line 64 -column 2, line 7 column 3, line 1-29	1-33, 35-67
Y	US 5 086 002 A (HILLYARD CARMEL J ET AL) 4 February 1992 (1992-02-04) column 5, line 4-47 column 7, line 46-62 column 9, line 1-13 column 10, line 23-37 column 11, line 1-62 claims 1,2,10; figures 1A-1C	1-33, 35-67
Y	DE 197 10 496 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17 September 1998 (1998-09-17) page 2, line 65 -page 3, line 1 table 1	4-30, 35-61
P,X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; August 1999 (1999-08) SLAPER-CORTENBACH I C M ET AL: "The depletion of T cells from haematopoietic stem cell transplants." Database accession no. PREV199900472730 XP002162647 abstract & RHEUMATOLOGY (OXFORD), vol. 38, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 751-754, ISSN: 1462-0324	1-67
A	BERTOLINI FRANCESCO ET AL: "Allogeneic hematopoietic stem cells from sources other than bone marrow: Biological and technical aspects." HAEMATOLOGICA, vol. 82, no. 2, 1997, pages 220-238, XP002162644 ISSN: 0390-6078 the whole document	1-67

I

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Patent Application No.
PCT/CA 00/00616

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	Stemcell Technologies Website: Technical Bulletin for Density Gradient Separation with RosetteSep-TM DM-L http://www.stemcell.com/stemcell/pdfs/pfd_bulletins/rsdml_tb.pdf XP002162645 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern. Patent Application No.

PCT/CA 00/00616

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4868109 A	19-09-1989	NL 8501219 A EP 0205198 A	17-11-1986 17-12-1986
US 5470570 A	28-11-1995	US 5487890 A AU 8869291 A WO 9205801 A	30-01-1996 28-04-1992 16-04-1992
US 5086002 A	04-02-1992	US 5413913 A AP 81 A AT 116740 T CA 1308652 A DE 3852683 D DE 3852683 T DK 519388 A EP 0308242 A ES 2070129 T IE 61639 B IL 87768 A JP 1153960 A JP 2553159 B KR 9210224 B NO 175024 B NZ 226202 A CA 8953 A US 4894347 A ZA 8806937 A	09-05-1995 28-04-1990 15-01-1995 13-10-1992 16-02-1995 11-05-1995 18-03-1989 22-03-1989 01-06-1995 16-11-1994 29-12-1994 16-06-1989 13-11-1996 21-11-1992 09-05-1994 29-01-1992 30-11-1990 16-01-1990 28-06-1989
DE 19710496 A	17-09-1998	AU 7035198 A WO 9840745 A EP 0972199 A	29-09-1998 17-09-1998 19-01-2000

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/203,477

(32)優先日 平成12年5月11日(2000.5.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ピーターズ, ケリー

カナダ ヴィ5 ヴィ 1イー6 ブリティ
ッシュ コロンビア, ヴァンクーバー, イ
ースト エイティーンズ アヴェニュー
228, スート 103

(72)発明者 ランスドープ, ピーター

カナダ ヴィ6 アール 2エックス4 ブ
リティッシュ コロンビア, ヴァンクーバ
ー, ウェスト フォーティーンズ アヴェ
ニュー 4068

Fターム(参考) 4B065 AA90X BA25 BD39

专利名称(译)	使用免疫玫瑰花结的细胞分离方法		
公开(公告)号	JP2003501629A	公开(公告)日	2003-01-14
申请号	JP2001500864	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)	干通科技有限公司		
[标]发明人	トーマステリーイー ピーターズケリー ランスドープピーター		
发明人	トーマス,テリー,イー. ピーターズ,ケリー ランスドープ,ピーター		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C12N1/00 C12N5/00 C12N5/06 C12N5/08 G01N33/50 G01N33/80		
CPC分类号	G01N33/80 A61K2039/505 C07K16/28 C07K16/2803 C07K2317/31 G01N33/5094		
FI分类号	G01N33/53.K C12N1/00.T		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/BA25 4B065/BD39		
优先权	60/136770 1999-05-28 US 60/193371 2000-03-31 US 60/203477 2000-05-11 US		
其他公开文献	JP4526749B2 JP2003501629A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用免疫玫瑰花ette分离细胞的方法。该方法包括使包含有核细胞和红细胞的样品与抗体组合物接触，该抗体组合物允许免疫印迹形成有核细胞和红细胞。抗体组合物优选包含二价抗体或四聚体抗体复合物。

