



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109154614 B

(45) 授权公告日 2022.01.28

(21) 申请号 201780030645.1

(22) 申请日 2017.03.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109154614 A

(43) 申请公布日 2019.01.04

(30) 优先权数据
62/310360 2016.03.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.11.16

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/023207 2017.03.20

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/161371 EN 2017.09.21

(73) 专利权人 四方控股公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S.H.克富拉罕 A.鲍尔 G.秦
S.B.韦尔斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 初明明 万雪松

(51) Int.Cl.
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101952727 A, 2011.01.19
WO 2013056090 A1, 2013.04.18
WO 2005036171 A1, 2005.04.21

审查员 胡晓佳

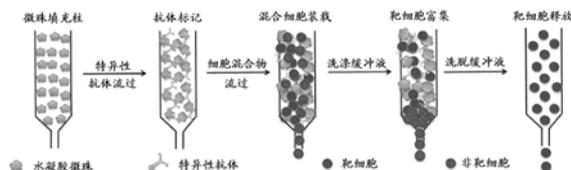
权利要求书3页 说明书17页 附图9页

(54) 发明名称

用于细胞分离的组合物、装置和方法

(57) 摘要

本发明的特征在于一种基质,以及利用所述基质的组合物、试剂盒、装置和方法,所述基质从一般群体产生分离的细胞群。所述分离群富含一个或多个目标群。基质可以被液化,并且允许回收未标记的、存活的和有功能的细胞。



1. 一种试剂盒,包括:

a) 基质,其附着于被配置为结合靶细胞表面的结合单元,其中所述基质的全部或一部分在交联剂的可用性降低时液化,其中所述基质包含水凝胶微珠,并且所述水凝胶包含藻酸—聚乙二醇共聚物,其中所述聚乙二醇是分支聚乙二醇,其中所述微珠具有1-200 μm 的直径,并且其中所述交联剂是阳离子;和

b) 过滤器,细胞可以通过所述过滤器而基质不能通过。

2. 权利要求1所述的试剂盒,其中所述基质是多孔的。

3. 权利要求1所述的试剂盒,其中所述过滤器容纳在容器中。

4. 权利要求1所述的试剂盒,其中所述阳离子是 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Al^{3+} 。

5. 权利要求4所述的试剂盒,其中所述阳离子是 Ca^{2+} 。

6. 权利要求1所述的试剂盒,其中所述直径为5-20 μm 。

7. 权利要求1所述的试剂盒,其中所述微珠的多分散指数为1至2。

8. 权利要求1所述的试剂盒,其中所述结合单元附着于微珠的表面。

9. 权利要求1所述的试剂盒,其中所述过滤器包含网或筛。

10. 权利要求1所述的试剂盒,其中所述结合单元包含抗体或其抗原结合片段、生物素或生物素结合蛋白。

11. 权利要求10所述的试剂盒,其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或其抗原结合片段、Fab、人源化抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、单价抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单链Fv分子、双特异性单链Fv分子、结构域抗体、双抗体、三链抗体、亲和抗体、SMIP、纳米抗体、Fv片段、Fab片段、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分子或串联scFv片段。

12. 权利要求1至11任一项所述的试剂盒,其中所述结合单元结合一种或多种选自T细胞受体、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD11b、CD11c、CD14、CD15、CD16、CD19、CD25、CD33、CD34、CD45RO、CD56、主要组织相容性复合物和嵌合抗原受体的细胞表面分子。

13. 一种组合物,其包含多个水凝胶微珠,每个微珠附着于被配置为结合靶细胞表面的结合单元,其中所述水凝胶微珠的直径为1-200 μm ,并且其中所有水凝胶微珠在交联剂的可用性降低时液化,其中所述水凝胶包含藻酸—聚乙二醇共聚物,其中所述聚乙二醇是分支聚乙二醇,并且其中所述交联剂是阳离子。

14. 权利要求13所述的组合物,其中所述微珠的多分散指数为1至2。

15. 权利要求13所述的组合物,其中所述结合单元附着于微珠的表面。

16. 权利要求15所述的组合物,其中所述结合单元包含抗体或其抗原结合片段、生物素或生物素结合蛋白。

17. 权利要求16所述的组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或其抗原结合片段、Fab、人源化抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、单价抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单链Fv分子、双特异性单链Fv分子、结构域抗体、双抗体、三链抗体、亲和抗体、SMIP、纳米抗体、Fv片段、Fab片段、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分子或串联scFv片段。

18. 权利要求13至17任一项所述的组合物,其中所述结合单元结合一种或多种选自T细

胞受体、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD11b、CD11c、CD14、CD15、CD16、CD19、CD25、CD33、CD34、CD45RO、CD56、主要组织相容性复合物和嵌合抗原受体的细胞表面分子。

19. 权利要求13所述的组合物,其中所述阳离子是 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Al^{3+} 。

20. 权利要求19所述的组合物,其中所述阳离子是 Ca^{2+} 。

21. 一种装置,其包括具有入口和出口的容器,所述容器含有包含水凝胶微珠的多孔基质并且被配置为允许细胞从入口向出口通过,同时将多孔基质留存在容器内,其中配置为结合靶细胞表面的结合单元附着到多孔基质,并且其中所述多孔基质的全部或一部分在交联剂的可用性降低时液化,其中所述水凝胶包含藻酸-聚乙二醇共聚物,其中所述聚乙二醇是分支聚乙二醇,其中所述微珠具有1-200 μm 的直径,并且其中所述交联剂是阳离子。

22. 权利要求21所述的装置,其中所述容器包括柱或槽。

23. 权利要求22所述的装置,其中所述容器包括允许细胞通过的过滤器。

24. 权利要求23所述的装置,其中所述过滤器包含网或筛。

25. 权利要求21所述的装置,其中所述多孔基质包含在填充床中。

26. 权利要求21所述的装置,其中所述可用性降低是由螯合剂的存在引起的。

27. 权利要求26所述的装置,其中所述螯合剂选自EDTA、EGTA、柠檬酸钠、BAPTA、冠醚、穴状配体、菲咯啉磺酸盐、二吡啶磺酸盐、二氧六环、DME、二甘醇二甲醚和三甘醇二甲醚。

28. 权利要求21所述的装置,其中所述阳离子是 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Al^{3+} 。

29. 权利要求28所述的装置,其中所述阳离子是 Ca^{2+} 。

30. 权利要求21所述的装置,其中所述直径为5-20 μm 。

31. 权利要求21所述的装置,其中所述微珠的多分散指数为1至2。

32. 权利要求21所述的装置,其中所述结合单元附着于微珠的表面。

33. 权利要求32所述的装置,其中所述结合单元包含抗体或其抗原结合片段、生物素或生物素结合蛋白。

34. 权利要求33所述的装置,其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或其抗原结合片段、Fab、人源化抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、单价抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单链Fv分子、双特异性单链Fv分子、结构域抗体、双抗体、三链抗体、亲和抗体、SMIP、纳米抗体、Fv片段、Fab片段、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分子或串联scFv片段。

35. 权利要求21所述的装置,其进一步包括一个或多个可操作地连接到出口的另外的容器,其中所述一个或多个另外的容器各自包括相同或不同的结合单元。

36. 权利要求35所述的装置,其进一步包括一个或多个三通阀。

37. 权利要求21至36任一项所述的装置,其中所述结合单元结合一种或多种选自T细胞受体、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD11b、CD11c、CD14、CD15、CD16、CD19、CD25、CD33、CD34、CD45RO、CD56、主要组织相容性复合物和嵌合抗原受体的细胞表面分子。

38. 一种分离靶细胞的方法,所述方法包括:

a) 提供包含靶细胞和非靶细胞的细胞悬液;

b) 使悬液与包含水凝胶微珠的多孔基质接触以使靶细胞与多孔基质结合,其中配置为

结合靶细胞表面的结合单元附着于多孔基质,并且其中所述多孔基质的全部或一部分在交联剂的可用性降低时液化,其中所述水凝胶包含藻酸-聚乙二醇共聚物,其中所述聚乙二醇是分支聚乙二醇,其中所述微珠具有1-200 μm 的直径,并且其中所述交联剂是阳离子;和

c) 从与多孔基质结合的靶细胞中除去未结合的细胞,从而分离靶细胞。

39. 权利要求38所述的方法,其中步骤(c)在容器中进行。

40. 权利要求39所述的方法,其中所述悬液和多孔基质在引入容器之前接触。

41. 权利要求39所述的方法,其中所述悬液和多孔基质在容器中接触。

42. 权利要求38所述的方法,进一步包括降低交联剂的可用性以使多孔基质液化。

43. 权利要求38所述的方法,其中步骤(c)从悬液中制备包含靶细胞的亚群。

44. 权利要求43所述的方法,其中至少80%的亚群是靶细胞。

45. 权利要求44所述的方法,其中至少95%的亚群是靶细胞。

46. 权利要求38所述的方法,其中悬液的50%或更少是靶细胞。

47. 权利要求46所述的方法,其中悬液的10%或更少是靶细胞。

48. 权利要求38所述的方法,所述靶细胞是干细胞、循环肿瘤细胞或白细胞。

49. 权利要求48所述的方法,其中所述干细胞是癌症干细胞。

50. 权利要求48所述的方法,其中所述靶细胞是T细胞、B细胞或NK细胞。

51. 权利要求50所述的方法,其中所述T细胞是T调节细胞。

52. 权利要求50所述的方法,其中所述T细胞是基因工程T细胞。

53. 权利要求52所述的方法,其中所述基因工程T细胞是嵌合抗原受体T细胞。

54. 权利要求48所述的方法,其中所述干细胞是未分化的干细胞。

55. 权利要求48所述的方法,其中所述干细胞是分化的干细胞。

56. 权利要求48所述的方法,其中所述干细胞选自间充质干细胞、造血干细胞、胚胎干细胞和诱导多能干细胞。

57. 权利要求38至56任一项所述的方法,其中所述靶细胞与第二结合单元结合,所述第二结合单元与多孔基质的结合单元结合。

用于细胞分离的组合物、装置和方法

发明领域

[0001] 本发明一般涉及细胞分离、细胞培养和生物处理领域。更具体地,本发明涉及为研究或临床应用而分离或富集特定细胞亚群的改进方案。

背景技术

[0002] 基于细胞的疗法有望在未来几十年改变医疗保健,为癌症、糖尿病和许多其它影响全球患者的疾病提供突破性的治疗。然而,为了实现这种潜力,需要以安全且经济可行的方式制备功能性细胞的方法。靶细胞群的富集以及随后从限定的细胞群中培养所需的细胞是许多复杂的生物学和生物医学工作流程中的重要的一步。因此,改进的细胞富集过程在基础生物学研究、组织工程、再生医学和诊断/治疗性健康监测领域中将有助于整体简化的实验方案。高级的基于细胞的疗法的产生需要根据表面抗原表达进行的细胞纯化,因为这些细胞不能仅通过物理参数(例如大小或密度)与相同来源(例如血液或组织)的其它细胞区分开来。这些细胞的纯化因而通常需要用表面标志物标记。

[0003] 目前的临床实验室和基础生物学研究应用在对感兴趣的靶细胞的分离和研究中面临重大挑战,包括:(1)难以从非靶细胞的复杂混合物中实现高纯度的基于多标志物的细胞分离;(2)具有极度异质性群体(如血细胞和骨髓)的复杂天然环境;(3)对分离少量期望细胞所需的血液特征和状况的不准确分析;(4)在诸如干细胞或祖细胞等情况中,低起始细胞浓度的低效大规模细胞富集;(5)有效分选两种或多种具有高细胞活力的细胞类型,以支持多种生物医学需求。

[0004] 目前,物理分离技术通常用于预纯化和浓缩,但其特异性低并且难以大规模处理。磁性分离昂贵、缓慢且费力。在需要阳性选择技术的情况下,磁性分离留下附着于纯化细胞的残留磁珠,并会阻碍增殖和降低活力。这些残留珠最终降低移植和植入应用中的细胞效能。

[0005] 需要有效的细胞分离技术,其在保持细胞功能的同时提供高细胞纯度和产量。

[0006] 发明简述

[0007] 我们开发了一种有效的亲和色谱细胞分选系统,其可以纯化多种细胞类型,纯度高、产量高、对纯化的细胞群的功能影响最小。本发明采用独特的生物相容性可溶解水凝胶用于亲和色谱系统,能够在没有残留亲和标签(例如免疫荧光或磁性标签)的情况下进行阳性选择。

[0008] 在一个方面中,本发明的特征在于一种试剂盒,其包含基质和过滤器,所述基质例如多孔基质,其附着于被配置为结合靶细胞表面的结合单元,其中所述基质的全部或部分在交联剂的可用性降低时液化;所述过滤器例如,容纳在容器中,细胞可以通过该过滤器而基质不能通过。在某些实施方案中,所述试剂盒还包含与基质交联的阳离子的螯合剂,例如EDTA、EGTA、柠檬酸钠、BAPTA、冠醚、穴状配体、菲咯啉磺酸盐、二吡啶磺酸盐、二氧六环、DME、二甘醇二甲醚或三甘醇二甲醚。基质可包含微珠,例如,直径为1-1000 μm ,如2-500 μm 、3-200 μm 、4-100 μm 或5-20 μm 。在某些实施方案中,所述微珠的多分散指数为1至2。所述结

合单元例如附着在微珠的表面。过滤器可包含网或筛,孔径为1-1000 μm ,例如1-30 μm 、10-40 μm 、20-30 μm 、5-50 μm 、20-80 μm 、1-100 μm 、200-500 μm 或500-1000 μm 。

[0009] 在某些实施方案中,基质包含可交联聚合物,例如水凝胶。在其它实施方案中,交联剂是离子,例如阳离子,例如 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Al^{3+} ,特别是 Ca^{2+} 。在进一步的实施方案中,所述水凝胶包括藻酸,例如以藻酸—聚乙二醇(PEG)共聚物的形式。例如所述水凝胶的中值粘度为约0.01至400厘泊(cP),例如约80cP。

[0010] 所述结合单元可包含抗体或其抗原结合片段、生物素或生物素结合蛋白。抗体或其抗原结合片段的例子包括单克隆抗体或其抗原结合片段、Fab、人源化抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、单价抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单链Fv分子、双特异性单链Fv((scFv')₂)分子、结构域抗体、双抗体、三链抗体、亲和抗体、结构域抗体、SMIP、纳米抗体、Fv片段、Fab片段、F(ab')₂分子或串联scFv(taFv)片段。在某些实施方案中,所述结合单元结合一种或多种选自T细胞受体(TCR)、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD11b、CD11c、CD14、CD15、CD16、CD19、CD25、CD33、CD34、CD45R0、CD56、主要组织相容性复合物(MHC)和嵌合抗原受体(CAR)的细胞表面分子。

[0011] 在另一方面中,本发明的特征在于一种组合物,其含多个水凝胶微珠,每个微珠附着于被配置为结合靶细胞表面的结合单元,其中所述水凝胶微珠的直径为约1-1000 μm 并且其中所有水凝胶微珠在交联剂的可用性降低时液化。所述水凝胶微珠可包括藻酸,例如以藻酸—聚乙二醇(PEG)共聚物的形式。例如所述水凝胶的中值粘度为约0.01至400厘泊(cP),例如约80cP。在某些实施方案中,微珠的多分散指数为1至2。所述结合单元例如附着在微珠的表面上。在某些实施方案中,交联剂是离子,例如阳离子,例如 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Al^{3+} ,特别是 Ca^{2+} 。所述结合单元可包含抗体或其抗原结合片段、生物素或生物素结合蛋白。抗体或其抗原结合片段的例子包括单克隆抗体或其抗原结合片段、Fab、人源化抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、单价抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单链Fv分子、双特异性单链Fv((scFv')₂)分子、结构域抗体、双抗体、三链抗体、亲和抗体、结构域抗体、SMIP、纳米抗体、Fv片段、Fab片段、F(ab')₂分子或串联scFv(taFv)片段。在某些实施方案中,所述结合单元结合一种或多种选自T细胞受体(TCR)、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD11b、CD11c、CD14、CD15、CD16、CD19、CD25、CD33、CD34、CD45R0、CD56、主要组织相容性复合物(MHC)和嵌合抗原受体(CAR)的细胞表面分子。可用性降低可能是由于存在螯合剂导致的,例如EDTA、EGTA、柠檬酸钠、BAPTA、冠醚、穴状配体、菲咯啉磺酸盐、二吡啶磺酸盐、二氧六环、DME、二甘醇二甲醚或三甘醇二甲醚。

[0012] 在进一步的方面中,本发明的特征在于一种装置,其包括具有入口和出口的容器(例如包括柱或槽),该容器包含多孔基质并且被配置为允许细胞从入口向出口通过,同时将多孔基质留存在容器内,其中配置为结合到靶细胞表面的结合单元附着到多孔基质上,并且其中全部或部分多孔基质在交联剂的可用性降低时液化。在某些实施方案中,所述容器包括过滤器(例如包括网或筛),其允许细胞通过。过滤器可包含网或筛,孔径为1-1000 μm ,例如1-30 μm 、10-40 μm 、20-30 μm 、5-50 μm 、20-80 μm 、1-100 μm 、200-500 μm 或500-1000 μm 。

[0013] 所述多孔基质可以包含在填充床中。在某些实施方案中,所述多孔基质包含可交联聚合物,例如水凝胶。在其它实施方案中,交联剂是离子,例如阳离子,例如 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Al^{3+} ,特别是 Ca^{2+} 。在进一步的实施方案中,所述水凝胶包括藻酸,例如

以藻酸—聚乙二醇 (PEG) 共聚物的形式。例如所述水凝胶的中值粘度为约0.01至400厘泊 (cP), 例如约80cP。所述多孔基质可包含微珠, 例如, 直径为1-1000 μm , 如2-500 μm 、3-200 μm 、4-100 μm 或5-20 μm 。在某些实施方案中, 所述微珠的多分散指数为1至2。所述结合单元例如附着在微珠的表面上。

[0014] 可用性降低可能是由于存在螯合剂导致的, 例如EDTA、EGTA、柠檬酸钠、BAPTA、冠醚、穴状配体、菲咯啉磺酸盐、二吡啶磺酸盐、二氧六环、DME、二甘醇二甲醚或三甘醇二甲醚。

[0015] 所述结合单元可包含抗体或其抗原结合片段、生物素或生物素结合蛋白。抗体或其抗原结合片段的例子包括单克隆抗体或其抗原结合片段、Fab、人源化抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、单价抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单链Fv分子、双特异性单链Fv ((scFv')₂) 分子、结构域抗体、双抗体、三链抗体、亲和抗体、结构域抗体、SMIP、纳米抗体、Fv片段、Fab片段、F(ab')₂分子或串联scFv (taFv) 片段。在某些实施方案中, 所述结合单元结合一种或多种选自T细胞受体 (TCR)、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD11b、CD11c、CD14、CD15、CD16、CD19、CD25、CD33、CD34、CD45R0、CD56、主要组织相容性复合物 (MHC) 和嵌合抗原受体 (CAR) 的细胞表面分子。

[0016] 所述装置还可包括一个或多个可操作地连接到出口的另外的容器, 其中一个或多个另外的容器各自包括具有相同或不同结合单元的多孔基质。另外的装置可以通过一个或多个三通阀连接。

[0017] 在一个相关方面中, 本发明的特征在于一种分离靶细胞的方法, 其通过以下进行: 提供包含靶细胞和非靶细胞的细胞悬液; 将悬液与基质接触以使靶细胞与基质结合, 其中配置为结合靶细胞表面的结合单元附着于基质, 并且其中基质的全部或一部分在交联剂的可用性降低时液化; 并且从与基质结合的靶细胞中除去未结合的细胞, 例如在容器中, 从而分离靶细胞。在某些实施方案中, 悬液和基质在引入容器之前接触。或者, 悬液和基质在容器中接触。所述方法可以进一步包括降低交联剂的可用性以液化基质, 例如将结合到基质上的细胞释放。

[0018] 在某些实施方案中, 所述方法从悬液中产生含有靶细胞的亚群。在一些实施方案中, 一个或多个靶细胞群占分离的细胞群的至少80% (例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。在一些实施方案中, 一个或多个靶细胞群占一般细胞群的50%或更少 (例如50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%或更少)。

[0019] 对于本发明的任一方面, 示例性的靶细胞是干细胞、循环肿瘤细胞、癌症干细胞或白细胞。例如, 靶细胞是T细胞、T调节细胞、B细胞、NK细胞或基因工程T细胞, 例如嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T细胞)。示例性的干细胞包括未分化或分化的干细胞。干细胞可选自间充质干细胞、造血干细胞、胚胎干细胞和诱导多能干细胞。在本发明任一方面的某些实施方案中, 所述靶细胞与第二结合单元结合, 所述第二结合单元与基质 (例如多孔基质或微珠) 的结合单元结合。

[0020] 本发明的特征在于一种装置, 包括柱, 其含有多孔基质和附着于多孔基质的结合单元。所述结合单元被配置为结合到靶细胞的表面。所述多孔基质的全部或一部分 (例如表

面层)在交联剂的可用性降低时液化。在一些实施方案中,所述柱进一步包括入口和出口,其中所述多孔基质配置为允许细胞从所述入口向所述出口通过。

[0021] 在一些实施方案中,所述多孔基质包括聚合物(例如可交联聚合物)。在一些实施方案中,所述聚合物包括水凝胶。在一些实施方案中,所述水凝胶包括藻酸或藻酸-聚乙二醇(PEG)共聚物。在一些实施方案中,当水凝胶为液体时,其中值粘度为约0.01至约400cP。在一些实施方案中,所述多孔基质由多个微珠组成。所述微珠可具有1-1000 μm (例如2-500 μm 、3-200 μm 、4-100 μm 或5-20 μm)的直径和/或1至2的多分散指数(例如通过凝胶渗透色谱法测量的)。

[0022] 在一些实施方案中,交联剂是离子(例如阳离子,例如 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Al^{3+})。在一些实施方案中,可用性降低是由于螯合剂存在引起的。在一些实施方案中,可用性降低是由于存在EDTA、EGTA、柠檬酸钠、BAPTA、冠醚、穴状配体、菲咯啉磺酸盐、二吡啶磺酸盐、二氧六环、DME、二甘醇二甲醚或三甘醇二甲醚引起的。

[0023] 在一些实施方案中,所述结合单元附着于多孔基质(例如微珠的表面)。在一些实施方案中,所述结合单元包括抗体或其抗原结合片段(例如,Fab、人源化抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、单价抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单链Fv分子、双特异性单链Fv((scFv')₂)分子、结构域抗体、双抗体、三链抗体、亲和抗体、结构域抗体、SMIP、纳米抗体、Fv片段、Fab片段、F(ab')₂分子或串联scFv(taFv)片段)。

[0024] 在一些实施方案中,所述装置配置为从一般细胞群产生分离的细胞群,其中分离的细胞群富含一个或多个靶细胞群。在一些实施方案中,所述一般细胞群含有干细胞、癌症干细胞或白细胞,其可以与一般群体分离。在一些实施方案中,所述一个或多个靶细胞群各自的特征在于一种或多种细胞表面分子(例如T细胞受体、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD11b、CD11c、CD14、CD15、CD16、CD19、CD25、CD33、CD34、CD44、CD45RO、CD56、CD69、主要组织相容性复合物(MHC)或嵌合抗原受体的一种或多种)的表达。

[0025] 在一些实施方案中,所述一个或多个靶细胞群占分离的细胞群的至少80%(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。

[0026] 在一些实施方案中,所述一个或多个靶细胞群占一般细胞群的50%或更少(例如50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%或更少)。

[0027] 在一些实施方案中,所述装置进一步包括一个或多个可操作地连接到出口的另外的柱,其中一个或多个另外的柱各自含有具有不同结合单元的基质。在一些实施方案中,所述装置还包括一个或多个三通阀,例如用于将分离的细胞群与剩余细胞(例如一般群的剩余细胞)分离。

[0028] 在另一方面中,本发明的特征在于一种使用本发明的装置产生富含靶细胞群的分离的细胞群的方法。

[0029] 在另一方面中,本发明的特征在于一种分离靶细胞群的方法,其通过以下进行:提供包括靶细胞群的细胞悬液;将悬液与多孔基质接触以产生结合细胞群(包括靶细胞)和未结合细胞群;将未结合细胞群从柱中分离;并且液化全部或部分多孔基质以释放结合细胞

群,从而分离靶细胞群。

[0030] 在一些实施方案中,所述靶细胞是T细胞、T调节细胞、B细胞、NK细胞、基因工程T细胞或干细胞。在一些实施方案中,所述基因工程T细胞是嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)。在一些实施方案中,所述干细胞是未分化的干细胞。在一些实施方案中,所述干细胞是分化的干细胞。在一些实施方案中,所述干细胞是间充质干细胞、造血干细胞、胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

[0031] 在本发明任一方面的某些实施方案中,所有基质在交联剂的可用性降低时液化。柱在本文中可以用来作任一目的的容器。

[0032] 附图简述

[0033] 图1.通过本发明的装置分离靶细胞的工作流程示意图。

[0034] 图2.说明响应释放缓冲液时聚合物基质的分子结构变化的图示。

[0035] 图3.显示用于富集双阳性或三阳性细胞的串联连接的三个微珠填充容器的示意图。

[0036] 图4A-4B.显示柱中(图4A)和柱外(图4B)分离方法的示意图。

[0037] 图5.不同类型和大小的藻酸盐微珠的代表性明场显微镜图像。

[0038] 图6A-6B.显示使用藻酸盐微珠从混合群样品中回收的CD34+ K_g1A细胞的分离效率及所得纯度和功效的直方图。6A:通过整个细胞分离捕获和释放的总CD34+ K_g1A细胞。6B:CD34+ K_g1A细胞分离的纯度和回收率。

[0039] 图7A-7C.显示使用藻酸盐微珠从PBMC样品中分离的CD4 + T细胞的分离效率、细胞纯度和活力的代表性流式细胞术数据。7A:PBMC样品中初始CD4 + T细胞群,如流式细胞术所示。7B:通过本发明获得的CD4 + T细胞的纯度、回收率和活力。7C:通过本发明获得的CD4 + T细胞的纯度、回收率和活力。

[0040] 图8A-8C.显示使用藻酸盐微珠从CD3 + T细胞淋巴细胞群中分离的CD4 + T细胞的分离效率、细胞纯度和活力的代表性流式细胞术数据。8A:CD3 + T细胞群中初始CD8 + 细胞,如流式细胞术所示。8B:回收的CD8+ T细胞纯度,如流式细胞术所示。8C:通过本发明获得的CD8 + T细胞的纯度、回收率和活力。

[0041] 发明详述

[0042] 本发明提供了组合物、试剂盒和装置,其包括通过对所需表面分子特异的结合单元(例如抗体或其片段)与靶细胞群结合的基质。本发明还提供了方法,包括使用该装置的方法。

[0043] 基质

[0044] 在本发明中可使用的基质包括聚合物(例如交联聚合物),其响应暴露于生物相容性试剂时可液化(例如溶解),所述生物相容性试剂降低交联剂对聚合物的可用性。可用作基质的一部分的交联聚合物包括水凝胶,例如藻酸盐水凝胶,其在阳离子(例如钙阳离子(Ca²⁺))的存在下是固体,并且在不存在这些阳离子的情况下是液体。可用作本发明的基质的一部分的其它交联聚合物,包括水凝胶,是本领域已知的。在一些实施方案中,所述基质是多孔基质。

[0045] 在一些实施方案中,所述基质包括藻酸盐水凝胶。基于藻酸盐的基质可包括另外的组分以增强各种性质,例如机械硬度或液化阈值。除非另有说明,否则提及藻酸或藻酸盐

也是指盐形式,例如藻酸钠。基于藻酸盐的基质可以由与聚环氧烷(例如PEG)缀合的藻酸形成,如WO 2012/106658中一般描述的。与仅通过藻酸盐的离子交联所实现的机械强度相比,藻酸与多官能PEG(例如四-臂PEG)的缀合赋予更大的机械强度。聚环氧烷,例如PEG和聚环氧丙烷,是本领域已知的。可以使用直链或支链聚环氧烷,例如4-臂或8-臂聚环氧烷,例如PEG。所述聚环氧烷,例如PEG,优选具有10kDa至20kDa的分子量。聚环氧烷(例如PEG)与藻酸的示例性比率为按重量1:2。因此,可以通过增加每个PEG分子上的官能团的数量来调节机械性质(例如硬度)。PEG可用作本发明的一部分,因为其具有优异的亲水性质,所述性质防止蛋白质吸附到本发明的复合物。血清蛋白质在复合物上的吸附可导致相邻细胞中的异常信号通路,例如由Fc受体接合引起的那些信号通路。PEG的亲水性质也对保持复合物内部的高扩散性起作用,使得离子螯合剂可快速接近复合物内部以便快速螯合保持刚性的阳离子。因此,在水凝胶内加入分支PEG分子确保了在暴露于适当刺激时水凝胶结构的快速溶解。或者,任何其它生物相容性的亲水聚合物(例如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇及其共聚物)可以用来替代(参见,例如美国专利号7,214,245)。

[0046] 水凝胶结构可以形成经配置以产生基质的任何形状,例如,用于放置在容器内。例如,根据本领域已知的和本文所述的方法,水凝胶可以形成珠(例如球形珠,例如纳米颗粒,或微珠)。示例性的珠粒直径在1和200 μm 之间。

[0047] 水凝胶颗粒(例如藻酸盐微珠)可以形成之间有空隙(即孔)的相邻颗粒的基质。颗粒的大小可以相似。或者,颗粒可以是多种尺寸的。通常,相对于颗粒尺寸而言,颗粒尺寸的一致性越大,相邻颗粒表面间的距离越大(即孔径越大)。这是由于较小颗粒倾向于填充较大颗粒之间的空隙,占据孔隙空间并可能阻止细胞通过。影响空间中(例如柱内)球形颗粒填充的参数包括例如,球体在其环境(例如缓冲液)中的相对密度,作用在一个球体与另一个球体之间的界面处的力(例如摩擦力或静电力)和球体的物理搅动。通常,球体之间的吸引力(例如物理或化学粘附、静电吸引)将减少填充并且每体积产生更少的球体,从而产生更大的孔隙。类似地,与其周围溶液具有相似密度(例如比周围溶液大1-10%)的球体通常填充不太紧密并产生更大的孔。球体一致性和孔径之间的正向一般关系可以被许多替代方法克服。例如,改变全部或部分水凝胶结构的形状(例如通过纳入非球形颗粒)可以引入更大的孔。另外或可替代地,可以通过使用长纤维、管或线的水凝胶结构的聚合物来引入不同的孔径和几何形状。合成这些结构,包括基于藻酸盐的结构的方法,是本领域已知的。

[0048] 最佳孔径可根据初始细胞群和/或靶细胞群而变化。例如,低频细胞群的富集可在具有较大孔和相反地,低的表面积与体积比的多孔基质内最适合发生。该配置为靶细胞结合到基质表面提供了足够的结合机会,同时允许大多数群体(即非靶群体)自由地流过孔。相反,可以使用高的相对基质密度来最大化结合区域,例如,在需要对大部分初始细胞群进行阳性选择的情况下。本发明的多孔基质具有例如从约5 μm 至约50 μm 的孔。

[0049] 另外,在基质中可以包括其它材料以提供结构和/或最佳孔尺寸或构造。例如,可溶解或不可溶解的网格或支架可用于将基质保持在适当位置(例如通过从水凝胶基质内支撑基质或通过向水凝胶结构(例如微珠)提供外部支撑)。合适的支架结构将具有足以允许细胞在基质(例如水凝胶)液化时通过的配置。例如,支架可以由配置为三维网格的纤维制成。或者,支架可具有不规则的形态(例如海绵状形态)。对于应用例如三维细胞培养(例如组织工程),合成这些支架的方法是本领域中已知的,和包括粒子沥滤法(例如盐浸)、乳液

冷冻干燥、电纺和3D打印。网格或支架的合适材料可以是生物相容性的,例如生物相容性聚合物。生物相容性聚合物在本领域中众所周知用于构建具有多种确定孔径的支架,并且包括例如可生物降解的脂肪族聚酯,例如聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)、聚(己内酯)、二醇/二酸脂肪族聚酯、聚酯-酰胺/聚酯-尿烷、聚(戊内酯)、聚(羟基丁酸酯)和聚(羟基戊酸酯)或一种或多种选自壳聚糖、几丁质、胶原、明胶和透明质酸的天然聚合物。磁珠也可用作水凝胶的不可溶解网格。

[0050] 基质可以是聚阳离子交联的藻酸盐-PEG共聚物水凝胶的多个水凝胶微珠的形式(图5)。这些微珠的直径可以为1-1000 μm (例如2-500 μm 、3-200 μm 、4-100 μm 或5-20 μm)。微珠的多分散指数(PDI)可以在1至2之间。微珠具有用结合单元或能够结合至结合单元的部分官能化的表面。

[0051] 本发明的基质可以是干燥形式,例如通过冷冻干燥,并在使用前或使用过程中再水化。

[0052] 装置

[0053] 本发明的装置包括容器和容器内的多孔基质。多孔基质可以是多种结构(例如颗粒,例如微珠,填充在容器内)、单块(即完整的)结构、在下层支架或芯之上的涂覆层或表面层,或其任何组合。或者,所述多孔基质可以包含在填充床中。本发明的多孔基质可通过例如加入适于液化多孔基质的生物相容性溶液来降解。被配置为选择性地结合基质孔内的靶细胞的表面分子的结合单元附着于多孔基质。所述结合单元可以是抗体或抗体的抗原结合片段。结合单元可与细胞表面分子形成亲和键以固定靶细胞来对抗容器中基质孔内的剪切力(例如从容器中洗涤未结合的细胞时)。图1显示了通过本发明的装置分离靶细胞的工作流程示意图。本发明的特征还在于包括多个相连(例如串联或并联)的容器的装置。

[0054] 用于容纳本发明的多孔基质的容器可以是不同类型的。适合的容器包括适当体积的柱或槽。容器的最适体积将取决于待分离的靶细胞的数量。对于小规模细胞处理,体积可以为约15mL或更小。其它体积,例如对于大规模处理,可以是100mL或更大。

[0055] 所述装置将包括留存多孔基质但允许细胞通过的部件。这种部件可以是过滤器,例如网或筛。过滤器中的开口可以是一致的,也可以不是一致的,基于靶细胞的大小以及多孔基质的性质来选择。例如,开口可以在1-1000 μm 之间,例如1-30 μm 、10-40 μm 、20-30 μm 、5-50 μm 、20-80 μm 、1-100 μm 、200-500 μm 或500-1000 μm 。例如1 μm 至100 μm 之间的开口可用于小规模或大规模地直接从复杂环境例如PBMC或全血中分离和纯化具有提高的回收率的单个或多个靶细胞。具有改进的通透性以避免堵塞的在200 μm 至500 μm 之间的较大的网孔尺寸,可用于物理破坏粗糙组织例如肌肉、脂肪、皮肤、肺或类似组织,以获得原代细胞,使它们理想用于干细胞、心肌细胞、神经和骨骼组织应用,同时能够更快地分离大量细胞材料并提高回收率。

[0056] 本发明的装置还可包括两个或更多个串联连接的容器。在这种配置中,第一容器的出口可操作地与后续容器的入口连接,允许细胞从第一柱通向一个或多个后续容器。每个容器可以具有相同的多孔基质或不同的多孔基质,以及相同的结合单元或不同的结合单元。可以用阀(例如双向阀)分隔容器(例如在第一容器的出口和第二容器的后续入口的交界处)。阀可以被配置为指示细胞从第一容器流入一个或多个后续容器的方向,或者,可选地,例如从一系列容器流出进入捕获贮存器。

[0057] 所述阀的机械结构可包括两个连续的T形三通阀。第一阀包含两个通道,其允许液体或细胞自由地流入第二阀或第三通道,例如包含过滤器。这种过滤器可以在加入螯合剂期间使用,通过留存靶细胞群同时允许螯合剂溶液流入第二阀并离开系统,防止随后容器与螯合剂接触。第二阀包含三个通道以允许溶液(例如洗涤溶液或螯合剂溶液)离开装置(例如用于废弃或回收)或流入后续容器(例如用于洗涤或洗脱多个串联柱)。所述阀可以手动控制或通过操控器(例如通过电动机或螺线管)控制。

[0058] 本发明的任一装置都可以根据本领域已知的方法按比例放大,以产生大量的功能细胞,例如用于临床应用,例如过继细胞转移。

[0059] 试剂盒

[0060] 本发明还提供了试剂盒,其包括如本文所述的基质和过滤器,例如网或筛。所述过滤器的尺寸允许细胞通过而不允许基质通过,例如,具有1-1000 μm 之间的开口,例如1-30 μm 、10-40 μm 、20-30 μm 、5-50 μm 、20-80 μm 、1-100 μm 、200-500 μm 或500-1000 μm ,如上所述。过滤器可以容纳在能够容纳基质和细胞群的容器中。或者,过滤器可以是添加到这种容器中的单独部件。

[0061] 所述基质可包含结合单元或被设计为由结合单元来官能化的。示例性的基质是聚阳离子交联的藻酸盐-PEG共聚物水凝胶的多个水凝胶微珠。这些微珠的直径可以为1-1000 μm (例如2-500 μm 、3-200 μm 、4-100 μm 或5-20 μm)。微珠的多分散指数(PDI)可以在1至2之间。

[0062] 结合单元

[0063] 本发明的特征在于用结合单元官能化(例如通过表面官能化)的固体基质。结合单元是对靶分子比非靶分子具有更高结合亲和力的任何分子。结合单元可以是任何小分子或大分子结构,该结构提供与靶细胞上的细胞表面分子(例如蛋白质、糖类或其组合)的所需的结合相互作用。

[0064] 结合单元包括抗体和其抗原结合片段及变体,这是本领域已知的。本发明的抗体变体包括单克隆抗体、Fab、人源化抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、单价抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单链Fv分子、双特异性单链Fv((scFv')₂)分子、结构域抗体、双抗体、三链抗体、亲和抗体、结构域抗体、SMIP、纳米抗体、Fv片段、Fab片段、F(ab')₂分子或串联scFv(taFv)片段。可以使用常规技术针对靶细胞表面分子生产抗体,包括多克隆和单克隆抗体,如Harlow and Lane, eds., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)所述。本发明的结合单元也可以是对特定表位具有高亲和力的核酸(例如适体)。

[0065] 结合单元还包括存在于另一细胞、病原体或细胞外基质分子上的粘附分子或其模拟物,其中所述粘附分子是靶细胞上细胞表面分子的天然结合配偶体。这种粘附分子通常是蛋白或糖蛋白,并且本发明的结合单元可以是保留了天然结合活性的这种粘附蛋白的片段。这些片段通常包含50个或更少的氨基酸、少于25个氨基酸或少于10个氨基酸。

[0066] 其它合适的结合单元可以是存在于细胞外基质中,特别是基质蛋白中的分子,例如纤连蛋白、胶原蛋白、层粘连蛋白、蛋白多糖、弹性蛋白、透明质酸、纤维蛋白原、玻连蛋白、骨桥蛋白及其片段(例如RGD结构域)。

[0067] 结合单元可结合与靶细胞结合的另一结合单元,例如抗体或其抗原结合片段。例如,结合单元可以是亲和素或链霉亲和素,并且其可以与用生物素(例如通过生物素化的抗

体)标记过的靶细胞结合。其它此类结合单元包括与靶细胞上已结合的抗体相结合的蛋白A、蛋白G和抗-物种抗体(例如山羊抗兔抗体)。

[0068] 本发明的结合单元可以是多聚体结合单元。多聚体结合单元是本领域已知的,并且可用于结合低亲和力配体。例如,主要组织相容性复合物(MHC)多聚体(例如二聚体、四聚体或Dextramer)被广泛用于在抗原特异性能力中结合T细胞受体(TCR),因为MHC分子对TCR的亲和力比抗体-抗原亲和力低几个数量级。通过将两个或更多个结合单元紧密靠近结合(例如通过亲和素多聚化或通过多臂PEG链),多聚体结合单元以高密度和高亲合力来结合靶标,导致较低的解离速率。将各种结合单元多聚化的其它方法在本领域中是已知的。

[0069] 应理解,结合单元可包含多种其它分子结构,包括凝集素、核酸和其它受体配体及其片段。一旦所需的靶分子已知,就有可能制备或合成其它分子,这些分子能够以必需的亲和力或亲合力结合靶标(参见例如上述抗体合成方法)。

[0070] 本发明的结合单元可以与基质缀合。这种缀合可以通过已知方法的共价反应或非共价反应进行。例如,对于结合亲和素或其变体(例如链霉亲和素或中性亲和素),生物素化的抗体和其它分子已被充分表征。可以根据本领域已知的方法用亲和素来官能化基质。具体地,亲和素-生物素(例如链霉亲和素-生物素)结合系统可用于将各种结合单元彼此连接或将其连接到基质上。马来酰亚胺活化的链霉亲和素可以通过藻酸盐微珠上存在的还原硫醇基团来连接。亲和素官能化的基质为用户提供提供了模块化的基础,以根据他或她期望的靶细胞群的表型定制该装置,例如通过紧接在使用前添加他或她选择的生物素化抗体。或者,基质可以与生物素缀合,随后亲和素化的结合单元可以与生物素连接。

[0071] 根据已知方法,水凝胶,例如藻酸盐水凝胶,可以与生物素、亲和素(例如链霉亲和素)缀合,或直接与结合单元(例如抗体或其抗原结合片段)缀合。由于与水凝胶表面缀合的限制,水凝胶可在缀合之前固化以使结合单元的效率最大化。

[0072] 藻酸还天然地具有多个羧基,其提供便于与聚环氧烷,例如聚乙二醇(PEG)和/或结合单元缀合的基团。聚环氧烷,例如PEG,和结合单元天然地具有或被修饰以具有适合于缀合羧基的基团。适合的基团包括胺基团,其通常存在于包含氨基酸的结合单元中或可以引入至结合单元和聚环氧烷,例如PEG。例如,可以使用胺封端的聚环氧烷,例如PEG。在其它情况下,可使用接头将聚环氧烷(例如PEG)或结合单元上的适当基团与藻酸上的羧基缀合。在水凝胶中,单个聚环氧烷,例如PEG,可以与一个或多个藻酸分子缀合。当聚环氧烷与多于一个藻酸结合时,组合物中此类交联的数量可能足以或可能不足以形成凝胶。结合单元可以直接与藻酸结合,或者可以与藻酸上结合的聚环氧烷(例如PEG)结合。

[0073] 另外或可替代地,可以通过常规技术,依靠激活任一或两种官能团来实现基质上和结合单元上的可用结合官能团之间的直接共价连接。结合单元和基质之间的共价连接可以使用双官能化合物实现,所述双官能化合物在一端具有能够结合结合单元的反应基团,在另一端具有能够结合基质的第二反应基团。或者,可以与结合单元一起合成连接区,然后将结合单元直接连接到多孔基质上。可用于共价连接的试剂包括例如碳二亚胺,例如水溶性碳二亚胺。用于将结合单元与多孔基质缀合的其它试剂和技术是本领域已知的,例如可以在Hermanson (Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 2010)中找到。许多其它缀合化学是本领域已知的。

[0074] 使用方法

[0075] 本发明的特征在于通过亲和色谱将一个或多个细胞群彼此分离或与一般群体分离。细胞选择主要基于特异性和非特异性结合之间捕获力的差异。特异性结合的细胞(即靶细胞)将被保留,同时非特异性或未结合的细胞将被除去,用于丢弃、使用或进一步分离。本文所用的“靶细胞”是指由本发明的结合单元靶向并意图结合多孔基质的细胞。靶细胞可以通过液化基质来回收。非靶细胞是不意图与结合单元结合的细胞。这种选择可以是阳性选择过程(即多孔基质上保留靶细胞)或阴性选择过程(即保留穿过多孔基质的非靶细胞)。本发明的特征在于阳性选择的方法,所述方法产生富集的靶细胞,在其表面上不具有残留亲和标签(例如磁珠)。如果例如需要的细胞表面分子特征未被充分表征或未知,或者如果不需要的细胞群普遍表达简化其靶向性的表面分子,则阴性选择过程可能是有利的。在一项实施例中,本发明提供了分离靶细胞群的方法,其通过以下进行:提供包括靶细胞群的细胞(例如一般细胞群)的悬液;使悬液与基质接触以产生结合细胞群(例如包括靶细胞)和未结合细胞群;并除去未结合的细胞群。本方法还可包括液化全部或部分基质以释放结合细胞群,从而分离靶细胞群。在结合步骤之前,细胞可以与未附着于任何基质的结合单元(例如抗体)接触,其中这种结合单元随后与如本文所述的基质结合。

[0076] 可以通过本发明靶向富集、分离、纯化或隔离的细胞包括可以被一种或多种表面分子(例如蛋白质、糖类或其组合)识别的任何细胞。靶细胞可以是哺乳动物细胞(例如小鼠、大鼠、非人灵长类动物或人类细胞)或非哺乳动物细胞。细胞可以作为来自一种或多种组织的混合群体进行分离,例如作为抽血、活组织检查或尸检的一部分。可以根据本领域已知的方法(例如通过裂解或粘附分离)除去组织内不想要的细胞,例如红细胞或基质细胞。细胞可以从储存中新鲜分离,例如从冷冻悬液中解冻。细胞可以是原代细胞或永生化细胞(即来自细胞系)。

[0077] 靶细胞的表面分子在本领域中是众所周知的。可以通过检测表面分子的常规测定,例如免疫测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫组织化学、免疫荧光或流式细胞术来检测的任何表面分子可以用作靶标。可靶向的特异性表面标志物包括CD3、CD4、CD8、CD11a、CD11b、CD11c、CD14、CD15、CD16、CD19、CD25、CD33、CD34、CD44、CD45RO、CD56、CD69和主要组织相容性复合物(MHC)(例如MHC-I、MHC-II、人白细胞抗原I类、人白细胞抗原II类或其任何基因或假基因产物)。

[0078] 具有使其能够进行亲和介导选择(例如,通过阳性选择、阴性选择或两者)的特征性表面分子表达的细胞类型包括例如CD3⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞,CD4⁺幼稚T细胞、CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(T调节细胞或Tregs)、CD4⁺记忆T细胞、CD8⁺ T细胞、CD19⁺ B细胞、CD56⁺ NK细胞、CD14⁺CD16⁻单核细胞、CD14⁺CD16⁺单核细胞、泛树突细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、CD34⁺造血祖细胞、间充质祖细胞以及皮肤和肠道干细胞。

[0079] 富集的细胞(例如由本发明的阳性选择过程制备的靶细胞或由本发明的阴性选择制备的非靶细胞)可以在分离或富集后保持其功能性和活力。富集的细胞的存活率可为80%-100%(例如至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。富集的细胞还可以保持增殖能力(例如在TCR接合或其它刺激时,例如保持对照细胞的至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的增殖能力)。

[0080] 靶细胞可通过任何合适的方法与基质接触。接触可以在或可以不在容器中发生,

在所述容器中结合的细胞与未结合的细胞分离。例如,细胞和基质可以在第一容器中接触以便结合。然后可以将该混合物转移到具有过滤器的第二容器中,该过滤器保留基质(和结合的细胞),同时允许未结合的细胞通过。在其它实施方案中,细胞和基质,例如多孔基质,在将要发生分离的容器中接触。例如,可以通过将细胞悬液(例如一般细胞群,例如本文所述的任何细胞,例如通过移液、泵送或注射细胞悬液,例如自动或手动)注入容器的入口来进行接触。

[0081] 在接触基质之前,可以在合适的缓冲液(例如含有血清的缓冲液)中制备一般细胞群。靶细胞将根据各种参数开始通过结合单元与基质结合,所述参数包括例如温度、结合单元和靶表面分子之间的结合亲和力、以及基质上结合单元的密度。该步骤可以在任何合适的温度(例如4°C、25°C或37°C)下持续从一秒到一天或更多天的时间(例如1秒、30秒、1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时、12小时、18小时、24小时或更长时间)。该结合反应的pH可以是约7.4或促进特异性结合反应的任何其它生理学上合适的pH。用于接触的容器可以在该反应过程中加盖或包覆以保持温度或防止蒸发或污染。

[0082] 其它试剂,例如蛋白(例如血清蛋白、例如白蛋白)可以包含在结合反应的步骤中,例如以限制非特异性结合。这些蛋白可以在加入细胞之前、加入细胞之后,或者在加入细胞的同时(例如作为细胞悬液缓冲液的组分)添加。这些血清蛋白可以是不同物种的细胞的血清蛋白。

[0083] 在全部或部分靶细胞与基质结合后,可以根据本领域已知的方法从靶细胞中除去(例如洗涤)未结合的细胞。具体地,可以使用合适的缓冲液(例如HEPES、Hanks缓冲盐水、HBSS、MOPS和MES(补充有钙))。任选地,可以在洗涤缓冲液中包含一种或多种另外的试剂(例如与本发明的任何溶液中存在的任何其它血清具有相同或更高浓度的血清蛋白)以加强对未结合细胞的去除。可以收集洗脱的未结合细胞以供使用或转移到另外的容器中,例如用于多参数富集,如上所述。

[0084] 本发明的方法可包括根据本领域已知的方法在容器内制备多孔基质。可以根据本文所述的方法合成基质,例如多孔基质,并以多种方式在容器内制备。可以将基质预填充到容器中,或者可以在紧接使用前制备。预填充的基质可以干燥(例如冻干)以长期储存。或者,预填充的基质可以保持水合(例如以避免使结合单元的敏感结合域变性)。预填充的基质可以保持在例如4°C下长期储存(例如一个或多个周,或者一个或多个个月,取决于结合单元的稳定性及缓冲液条件)。结合单元可在将基质装载到容器中之前或之后缀合到基质上。例如,基质可在允许紧接使用前与结合单元缀合的条件下储存。

[0085] 基质(例如交联的水凝胶)可以全部或部分地用低至中等浓度的生物相容性溶液液化。图2是说明在响应释放缓冲液时聚合物基质的分子结构变化的图示。通过藻酸与阳离子(例如Li⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Sr²⁺、Ba²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺或Al³⁺)的非共价交联,可以将水凝胶保持为固体。优选的阳离子是Ca²⁺。本发明的水凝胶的凝胶化可以通过与阳离子的螯合剂,例如EDTA、EGTA、柠檬酸钠、BAPTA、冠醚、穴状配体、菲咯啉磺酸盐、二吡啶磺酸盐、二氧六环、DME、二甘醇二甲醚或三甘醇二甲醚接触来保留。螯合剂可以是生物惰性分子,例如EDTA,众所周知其在与复合物溶解相关的浓度下不干扰细胞生长和增殖通路。EDTA是本发明所用的充分表征的钙螯合剂。EDTA可以生理学惰性缓冲液的形式,以2mM使用,优选其中还含有137mM NaCl、

2.7mM KCl、25mM HEPES和0.75mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

[0086] 以与基质的组成一致的方式液化基质可用于从容器中移除靶细胞。本发明包括通过将交联剂整合至藻酸盐基质去交联的必要程度，液化藻酸盐水凝胶基质（例如藻酸盐珠，例如微珠）的方法。可以在容器中加入包含合适浓度（例如0.01mM至1000mM，例如0.1mM、0.5mM、1.0mM、2.0mM、3.0mM、4.0mM、5.0mM、10mM、50mM、100mM、500mM或1000mM，取决于其它参数，例如孵育时间和温度）的螯合剂的缓冲液以液化全部或部分藻酸盐基质。在某些实施方案中，基质和结合的细胞在液化之前从容器中移除。

[0087] 有时需要分离以两种或多种分子的表达为特征的细胞群。本发明提供了分离这些细胞（例如双阳性或三阳性细胞）的方法。通过使混合细胞群与多组基质接触，可以实现双阳性细胞群的分离。例如，可以通过将混合细胞群通过一系列容器来实现该目标，每个容器包含独特的结合单元。应当理解，多参数富集也可以在单个容器中发生，其中在每次分离之后移除并更换基质。此外，相同类型的基质，例如其中结合单元是链霉亲和素，如果细胞与不同的结合单元，例如生物素化的抗体接触，与基质分开。

[0088] 图3是显示三个串联连接的含微珠的容器（例如柱）的示意图。这种配置可用于回收富集了多达三种表面分子的细胞群。三种表面分子中的每一种将被三个容器中的每一个内的不同结合单元靶向。在第一容器中，与第一微珠基质缔合的结合单元将结合表达第一表面分子的细胞群。未结合的细胞可以通过容器洗涤并通过出口从一系列容器中去除，该出口由容器出口处的三通阀控制，如上所述。然后可以根据上述方法切换阀以准备将靶细胞群导入第二容器中。然后将第一容器的细胞从微珠中释放出来并洗脱到含有微珠的第二容器中，所述微珠涂覆了第二目标表面分子的结合单元。与第二容器的微珠结合的细胞通常表达第一和第二目标表面标志物二者（即双阳性）。可以重复洗脱第三次，至第三个容器内，以回收三阳性细胞群。通过穿过另一个容器以回收多种细胞亚型，可以进一步富集该过程任何步骤中的未结合细胞。

[0089] 例如，可以通过使用抗CD4抗体作为第一基质上的结合单元来固定CD4⁺细胞，例如血液样品的CD4⁺细胞，并除去CD4⁻细胞，从而分离表达CD4和CD25的调节性T细胞（Tregs）。可以将水凝胶液化以释放CD4⁺细胞，并且可以将这些细胞转移（例如自动或手动）以与具有抗CD25抗体作为结合单元的另一基质接触。CD4⁺CD25⁻细胞不会与所述第二基质的结合单元结合，并可以洗涤以抛弃或用作例如幼稚CD4⁺细胞（即Th0细胞），留下CD4⁺CD25⁺细胞以便回收用作Tregs。

[0090] 上述方法可以类似地用于从单个样品中分离两种或更多种（例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种）细胞类型。具有可检测表面分子的任何排列的细胞群可以类似地富集或分离以供使用，因为通过本发明的阳性选择分离的细胞由于缺少残余亲和和标签而保留了活性和功能。

[0091] 通过在装置内（例如在同一柱内）使用两种或更多种结合单元可以在单个容器中靶向多种细胞类型。类似地，通过例如结合相同表面分子的多个表位，结合单元的微小变化可以改进靶细胞结合。例如，多克隆抗体适合用于本方法。

[0092] 上述方法可以类似地用于预选特定细胞群，用于进一步的细胞分选和分级方法，例如荧光激活细胞分选（FACS）或其它类似的流式细胞术方法。

[0093] 水凝胶的制备

[0094] 通常,藻酸盐颗粒的形成基于两种方法。复合物形成可以在形成藻酸盐纳米聚集体的水溶液中或在形成藻酸盐纳米颗粒的油滴的界面上发生。交联剂,例如氯化钙中的钙,可用于藻酸盐的络合。或者,可以使用油包藻酸盐的乳化来配制藻酸盐珠(例如纳米颗粒或微珠)。该技术可与形成藻酸盐纳米颗粒的藻酸盐乳液液滴的外部或内部凝胶化结合。这些方法中的大多数基于外部凝胶化方法,其中藻酸盐珠通常通过将藻酸钠溶液逐滴挤入氯化钙溶液中来制备。藻酸盐还可以与阳离子聚合物(例如壳聚糖)相互作用,并形成聚电解质复合物。因此,藻酸盐颗粒也可以通过将藻酸盐溶液滴加到含有阳离子聚合物的浴中来获得。通常,藻酸盐溶液通过针挤出以形成藻酸盐液滴,并且藻酸盐颗粒尺寸取决于初始挤出液滴的尺寸。小颗粒具有更高的机械强度和更大的比表面积。当与外部凝胶化结合时,空气雾化可用于形成藻酸盐颗粒,并产生直径为5-200 μm 的微珠。替代挤出/外部凝胶化的改良的乳化或内部凝胶化方法,是本领域已知的。例如,在无专门设备的条件下,乳化可以在环境温度下进行以制备藻酸盐珠粒。

[0095] 在某些实施方案中,使用喷雾装置(例如包括雾化器的装置)制备水凝胶。通常,聚合物溶液(例如,藻酸-PEG的水溶液)可以与压缩气体(例如氮气)同时注入雾化器中以雾化聚合物溶液,从而喷射液滴喷雾。这种喷雾可以被导入接收液体中,该接收液体被配置为将液滴硬化成珠。在聚合物溶液包含藻酸-PEG的情况下,接收溶液可包含阳离子(例如聚阳离子,例如 Ca^{2+}),并且在藻酸-PEG液滴与阳离子接收溶液接触后,液滴内的藻酸分子通过阳离子(例如聚阳离子,例如 Ca^{2+})交联并形成水凝胶珠。接收溶液可以包含其它组分作为其的一部分。例如,接收溶液可包括异丙醇,例如在阳离子交联期间和/或之后进一步硬化珠粒。另外或可替代地,根据需要,接收溶液可包含本领域已知的其它稳定剂和/或表面活性剂。

[0096] 通过调整本发明方法的各种参数可以实现所需的珠粒尺寸。通常,珠粒尺寸(和,例如所得到的水凝胶复合物尺寸)与雾化喷雾中形成的液滴的尺寸有关(例如,珠粒尺寸与雾化喷雾中形成的液滴的尺寸成比例(例如成正比)或比其略小)。在没有外部变量的情况下,液滴尺寸(以及所得到的珠粒或复合物尺寸)倾向于随着(i)增加通过雾化器的气体压力或气体流速,(ii)降低流过雾化器的液体的体积百分比,(iii)降低聚合物溶液的粘度,和(iv)增加喷雾角度而降低。

[0097] 在一些情况下,使用以30%至90%体积的液体体积百分比喷雾的雾化器,形成水凝胶珠粒。在这些体积分数下,所得水凝胶珠粒的尺寸将取决于上面讨论的其它因素,但平均直径范围可以为1-100 μm 。

[0098] 液体(例如共聚物溶液)与气体(例如氮气)的体积百分比是通过液体雾化器相对于气体的相对流速的函数。因此,通过雾化器增加气体相对于液体的流速将倾向于导致较小的液滴尺寸(和例如较小的珠粒尺寸)。可通过加压储存器控制气体流速。在许多情况下,气源是加压罐,并且通过压力控制和/或调节阀控制进入雾化器的气体流速。或者,可以通过其它方式,例如泵(例如压力控制泵)使气体流过雾化器。提供恒定流入雾化器的任何气体贮存器都适合用作本发明的一部分。

[0099] 类似地,液体(例如聚合物溶液)可以使用加压贮存器,例如注射泵(例如设定为恒定流速的注射泵)流过雾化器。或者,其它泵形式可用于驱动液体流动(例如聚合物溶液流动),例如蠕动泵。通过在延长的持续时间内进行大量液体处理,诸如蠕动泵的系统可以提供可扩展性的益处。然而,任何向雾化器提供恒定流量的液体贮存器都适合用作本发明的

一部分。

[0100] 可以配置雾化器以便可独立地控制液体流动和气体流动。这种雾化器包括外部混合雾化器,其中气体和液体流在不同的点离开雾化器喷嘴。外部混合雾化器使得平均雾化液滴尺寸(和例如所得平均珠粒尺寸)能够增加或减少,例如分别通过降低或增加气体流速,同时保持液体流速恒定。外部混合雾化器还可以更有效地雾化粘性液体。

[0101] 或者,可以使用内部混合雾化器。内部混合雾化器在喷嘴内将气体引入液体,并且在一些情况下能够产生较小的液滴。

[0102] 可以保持对液体(例如聚合物溶液)与气体(例如氮气)的体积百分比的进一步控制,例如通过使用球阀将液体贮存器(例如注射泵)连接到雾化器上,以在液体加压时允许液体流动,从而防止雾化过程开始和结束时体积百分比的变化。

[0103] 聚合物溶液可以是粘性的(例如粘度大于水,即大于1厘泊(cP))。粘度取决于聚合物(例如藻酸-PEG共聚物)的浓度。液体的粘度与雾化的液滴尺寸(和例如所得的珠粒尺寸)正相关。粘性溶液的雾化液滴尺寸与相应的雾化水滴之间的关系可按以下估算:

$$[0104] \quad D_f \cong D_w V_f^{0.2}$$

[0105] 其中 D_f =粘性液体的液滴尺寸, D_w =水的液滴尺寸,并且 V_f =粘性液体的粘度(cP)。

[0106] 应当理解,在非牛顿流体(例如非牛顿共聚物溶液,例如含有藻酸-PEG的非牛顿共聚物溶液)的情况下,粘度随剪切速率而变化。例如,含有藻酸和/或PEG的共聚物溶液可表现出剪切稀化行为,使得其粘度随剪切速率的增加而降低。在一些情况下,在用雾化器暴露于剪切力时,共聚物溶液的表观粘度降低大于50%。因此,在评估粘度对水凝胶颗粒尺寸的影响时,应考虑共聚物溶液在雾化器孔内的表观粘度。在给定剪切速率下(例如在雾化器内)影响非牛顿流体的表观粘度的因素是本领域已知的,并且可以通过已知方法计算和/或凭经验测试。

[0107] 雾化器的喷射角度是影响液滴尺寸的另一个参数。通常,喷射角度越宽,产生的液滴尺寸越小。

[0108] 在水凝胶珠合成后,可以使用标准方法(例如无菌过滤方法,例如使用140 μ m尼龙过滤器)过滤珠粒。然后可以通过例如标准离心/重悬方法,另外浓缩或纯化珠粒悬液。

[0109] 另外或可替代地,可以使用本领域目前已知的方法合成水凝胶珠粒。例如,水凝胶复合物可通过常规微乳方法配制成微珠。为各种应用而合成藻酸盐珠的方法是本领域已知的(参见,例如,Hatch等,*Langmuir* 27 (2011): 4257-4264和Sosnik, *ISRN Pharmaceutics* (2014):1-17)。

[0110] 可以使用标准缀合技术,包括马来酰亚胺/硫醇和EDC/NHS连接进行结合部分缀合(例如抗体缀合)。其它可用的缀合方法描述于Hermanson等,(2013) *Bioconjugate Techniques*: Academic Press。在一些情况下,在颗粒形成后立即发生结合部分缀合,例如如上所述。或者,在与结合部分缀合之前将颗粒储存(例如作为冷冻悬液或冻干粉末),并且在细胞处理之前(例如紧接在细胞处理之前,进行或不进行进一步纯化,例如过滤和/或离心/重悬)进行结合部分缀合。

实施例

[0111] 实施例1

[0112] 分离靶细胞的工作流程示意图如图1所示。用水凝胶(例如藻酸盐)微珠填充柱,所述微珠与靶细胞表面分子特异性的抗体缀合。在本实施例中,在与抗体缀合之前将微珠装载到柱中。或者,可以将抗体缀合的微珠直接装载到柱中。在柱中制备抗体缀合的微珠后,将混合细胞群(例如外周血单核细胞(PBMC)、脐带血、骨髓、混合淋巴细胞、肿瘤细胞)装载到柱中。将混合细胞群在柱中在4℃或37℃温育一段时间(例如5-30分钟),以使抗体与靶细胞上的同源细胞表面分子结合。在结合发生后,向柱中加入洗涤缓冲液以从柱中洗涤未结合的细胞,例如通过出口流出。进行一个或多个洗涤步骤以除去尽可能多的未结合细胞。接下来,加入液化缓冲液以溶解水凝胶微珠。液化缓冲液可以是任何生物相容性溶液,其配置为通过改变柱内的离子浓度来溶解水凝胶微珠。具体地,洗脱缓冲液可以是含有适当浓度的EDTA以螯合钙离子的缓冲盐水(例如PBS),从而使微珠的藻酸盐基质去交联。

[0113] 实施例2

[0114] 从复杂环境(例如PBMC和全血)中对单个或多个靶细胞进行的分离按照以下步骤顺序描述:1.用靶标特异性抗体标记细胞;2.将藻酸盐水凝胶微珠与抗体标记的细胞结合;3.将微珠复合物和细胞加入到装置形式如柱、过滤器或离心装置中,以进行细胞分离步骤,例如,样品装载、洗涤和洗脱。

[0115] 用靶细胞标记特异性抗体。

[0116] 例如1百万、5百万或10百万个PBMC的起始群体或其它细胞群可与特异性抗体一起孵育,用于在室温或4℃下选择靶细胞。

[0117] 藻酸盐水凝胶微珠与抗体-细胞结合。

[0118] 在去除未结合的抗体后,可将50或100μL链霉亲和素缀合的藻酸盐水凝胶微珠与抗体标记的细胞在1X细胞分离缓冲液中混合,然后在室温下摇动混合物1小时。细胞分离缓冲液是含有螯合剂的pH 7.4缓冲盐溶液。所述溶液含有25mM HEPES、137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM CaCl₂和0.5%w/v牛血清白蛋白。

[0119] 细胞分离过程

[0120] 细胞分离过程可以通过基于柱的装置完成,如下所示(图4A):

[0121] a) 加入1mL 1X细胞分离缓冲液以平衡具有孔径范围为10-100μm的网的柱;

[0122] b) 将链霉亲和素缀合的藻酸盐水凝胶微珠-抗体-细胞复合物装载到柱中并收集流过的未结合的细胞;

[0123] c) 使用1X细胞分离缓冲液洗涤柱并收集洗涤步骤中的所有样品;并且

[0124] d) 通过加入1X细胞释放缓冲液将颗粒溶解5分钟,并从该洗脱步骤收集所有结合的细胞用于进一步的应用。细胞释放缓冲液是含有螯合剂的pH 7.4的盐溶液。此溶液含有25mM HEPES、137mM NaCl、2.7mM KCl、2 mM EDTA和0.5%w/v牛血清白蛋白。

[0125] 细胞分离过程还可以通过基于过滤器的装置完成,如下所示(图4B):

[0126] a) 将网孔尺寸范围为10-100μm的过滤器连接到50 mL离心管,加入1 mL 1X 细胞分离缓冲液以平衡过滤器;

[0127] b) 将链霉亲和素缀合的藻酸盐水凝胶微珠-抗体-细胞复合物倒在过滤器上。未结合的细胞通过过滤器进入离心管,而结合了珠粒的靶细胞留存在过滤器上;

[0128] c) 加入1X细胞分离缓冲液充分洗涤过滤器,并将结合了珠粒的靶细胞留在过滤器上;

[0129] d) 倒置过滤器并将其连接到新的50 mL离心管,然后在过滤器上加入足够的1X细胞分离缓冲液以完全溶解珠粒。管中释放出的纯化的靶细胞现在可以进一步使用。

[0130] 对于用于分离实验的水凝胶颗粒,需要屏障以将非靶与靶细胞分离。在阳性选择配置中,非靶细胞被洗掉和/或掉落通过,并被抛弃。随后加入螯合剂和/或洗脱缓冲液来溶解颗粒,释放靶细胞,靶细胞又通过多孔屏障进行收集。使用重力驱动流动使细胞移动通过多孔屏障,然而也可以使用其他方法,例如离心、气压或射流。

[0131] 实施例3

[0132] 使用钙离子将藻酸钠与4-臂PEG胺化学交联以形成水凝胶微珠,随后用链霉亲和素进行官能化。通过改变以下成分的量 and 比例,可以得到多种水凝胶制剂。这些量和比例的变化影响所得水凝胶微珠的粘度、粘弹性和颗粒尺寸。使用两种基本颗粒生产方法生产多种尺寸的水凝胶微珠。第一种方法是使用喷雾装置(如本文所述),第二种方法是使用市售的Nisco VAR J30封装系统的空气动力学辅助喷射喷雾。表1提供了本发明的各种基质的组分。表2提供了用于形成本发明的各种基质的示例性参数。使用1L 70%异丙醇与100mM CaCl₂的硬化溶液,其中过程总结于表2中。

[0133] 表1. 各种水凝胶的实验组成

[0134]

	水凝胶1	水凝胶2	水凝胶3	水凝胶4
[藻酸钠]	450 mg	450 mg	900 mg	900 mg
[4-臂PEG]	225 mg	225 mg	450 mg	450 mg
[磺基-NHS]	22 mg	22 mg	44 mg	44 mg
[EDC]	8 mg	8 mg	16 mg	16 mg
[PEG4-SPDP]	100 mg	200 mg	100 mg	200 mg
[水]	30 (µg/ml)	30 (µg/ml)	30 (µg/ml)	30 (µg/ml)

[0135] 表2. 用于制备水凝胶微珠的过程参数

[0136]

	设备 (喷嘴)	颗粒尺寸 (µm)	所用的水 凝胶	气压	泵/ 流速 (mL/min)	喷雾距离	搅拌速 度
1	喷雾装置	10-150	1或2	10 psi	1	40 cm	200 rpm
2	喷雾装置	10-200	3或4	5 psi	1	40 cm	200 rpm
3	Nisco (150 µm)	100-150	3或4	500 mBar	1.5	17 cm	200 rpm
4	Nisco (150 µm)	150-200	3或4	250 mBar	1.5	17 cm	200 rpm
5	Nisco (150 µm)	15-50	1或2	500 mBar	0.5	22.5 cm	200 rpm
6	Nisco (150 µm)	50-100	1或2	500 mBar	1	22.5 cm	200 rpm

[0137] 在将链霉亲和素缀合至水凝胶微珠之前,首先通过加入PEG4-SPDP向未喷射的水凝胶或水凝胶微珠中添加硫醇基团。将100mg PEG4-SPDP加入30mL含有20mM CaCl₂ (pH7.4)的HEPES缓冲盐水中的水凝胶或水凝胶颗粒溶液中,并将混合物在室温下振荡2小时(或过夜)以制备硫醇-水凝胶或硫醇-水凝胶微珠。然后将114mg三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP-HCl)加入到20mL硫醇-水凝胶微珠溶液中2小时以形成还原硫醇基团。使用磺基琥珀酰亚胺

基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)进行链霉亲和素的马来酰亚胺活化。将9.6mg磺基-SMCC与200mg链霉亲和素在20mL 1X PBS缓冲液中混合,并将混合物在室温下振荡30分钟以产生马来酰亚胺活化的链霉亲和素。用含有20mM CaCl₂ (pH7.4)的HEPES缓冲盐水进行缓冲液交换后,将约250mg还原硫醇颗粒与200mg马来酰亚胺活化的链霉亲和素在含20mM CaCl₂ pH7.4的20mL HEPES缓冲盐水中混合,并将混合物在室温下摇动2小时(或过夜)以制备链霉亲和素缀合的水凝胶微珠。将最终的链霉亲和素缀合的水凝胶微珠在4℃下储存在含有20mM CaCl₂和0.09% (w/v) 叠氮化钠(pH 7.4)的HEPES缓冲盐水中。

[0138] 实施例4

[0139] 在本实施例中,捕获并释放目标细胞群。例如,CD34+ Kg1A细胞已被捕获并释放;CD4+ T细胞已直接从PBMC中捕获;CD4+和CD8+ T细胞已从CD3+ T细胞群中分离。表3中提供了本实施例的起始实验条件的概述。

[0140] 表3. 使用本发明的装置进行的细胞分离实验,包括靶细胞类型、起始细胞数和细胞结合标志物

[0141]

	起始细胞类型	靶细胞类型	起始细胞数量	分离靶
实施例A	Kg1A(骨髓急性髓性白血病)	Kg1A	至少1百万	CD34
实施例B	外周血单核细胞(PBMC)	CD3+ T细胞	至少1百万	CD3
实施例C	外周血单核细胞(PBMC)	CD4+ T细胞	至少1百万	CD4
实施例D	外周血单核细胞(PBMC)	CD8+ T细胞	至少1百万	CD8
实施例E	CD3+ T淋巴细胞	CD4+ T细胞	至少1百万	CD4
实施例F	CD3+ T淋巴细胞	CD8+ T细胞	至少1百万	CD8

[0142] 按照此前概述的分离程序,通过基于柱和基于细胞过滤器的装置,使用链霉亲和素缀合的水凝胶微珠,通过生物素化的抗人CD34抗体(581克隆)捕获和释放Kg1A细胞(骨髓急性髓性白血病),产生92%的高细胞摄取率和86%的高细胞回收率;这在图6A-6B的直方图中示出。这有效地证明了本发明的链霉亲和素缀合的水凝胶颗粒的高灵敏度和高结合效率。

[0143] 使用微珠上附着的生物素化的抗人CD4抗体(克隆RPA-T4)将藻酸盐水凝胶微珠和基于过滤器的装置用于分离和纯化CD4+ T细胞,导致从最初的PBMC样本中优异地捕获了所需的CD4+ T-细胞。本实验的结果在图7A-7C中示出,流式细胞术数据表明96.3%的高纯度细胞分离。发现这些细胞在分离后具有比原始PBMC样品中更高的细胞活力(99.2%)。随后的实验旨在使用生物素化的抗CD8抗体(克隆RPA-T8)分离和纯化CD8+ T-细胞,从CD3+ T淋巴细胞的均一群体开始,分离后得到98%的高纯度和97%的更高活力,该实验的结果在图8A-8C中示出。

[0144] 在所提供的实施例中,使用本发明的装置,以细胞活力和功能的完全保留,完成了高纯度细胞分离,如通过确立分离细胞的纯度和活力以及评估细胞分离的效率的流式细胞术分析证明的。以上获得的所有结果表明本发明的水凝胶微珠的高效率和高选择性,得到了在不同规模下细胞分离的创新且更有效的方法。

[0145] 其它实施方案在权利要求中。

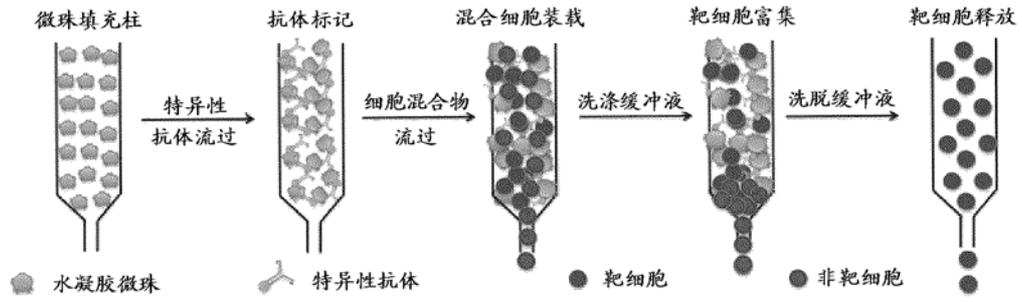


图 1

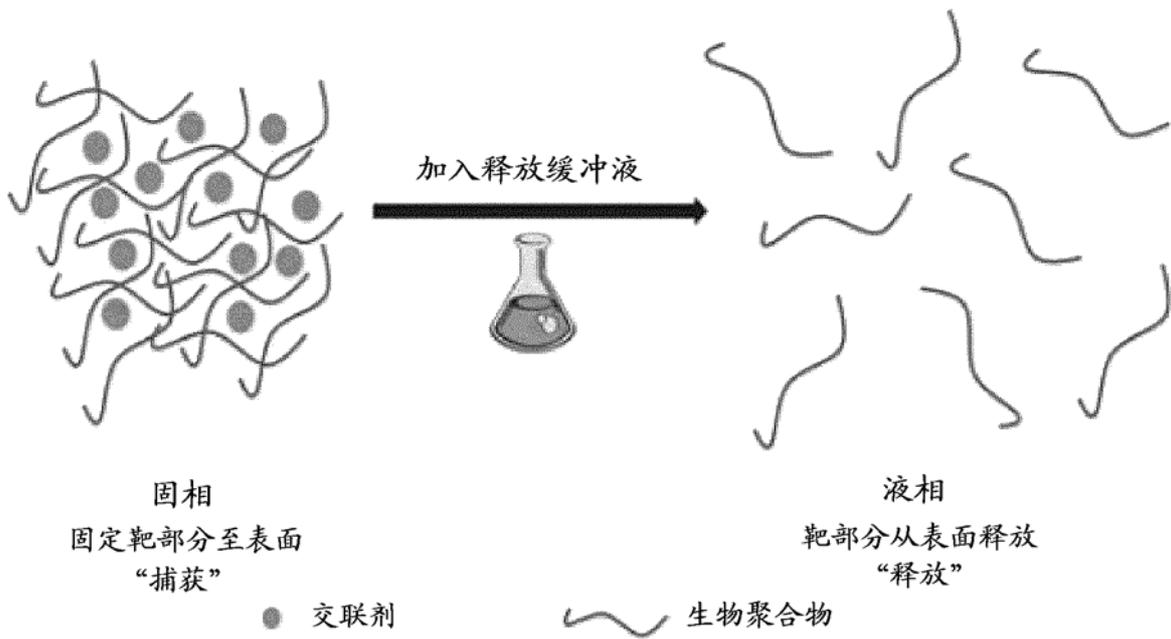


图 2

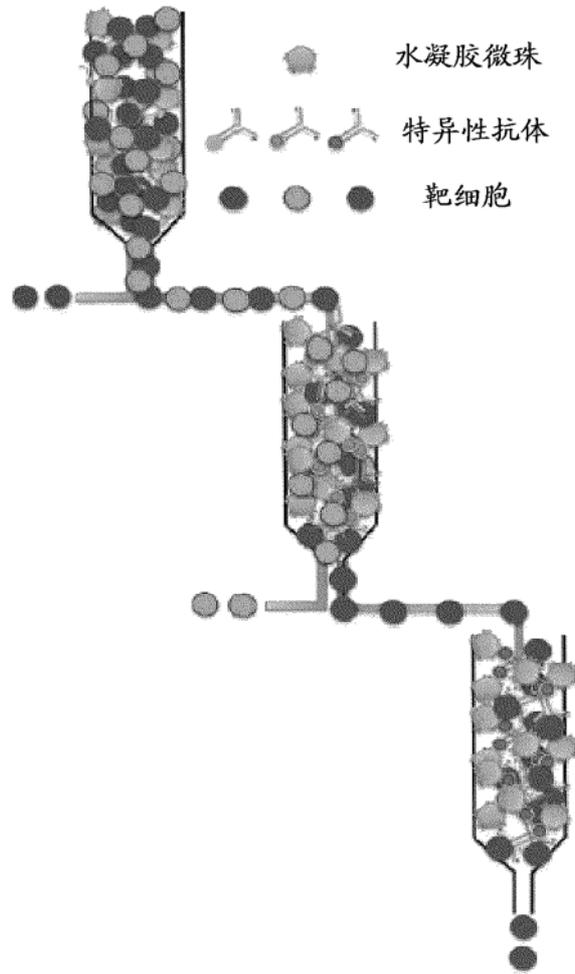


图 3

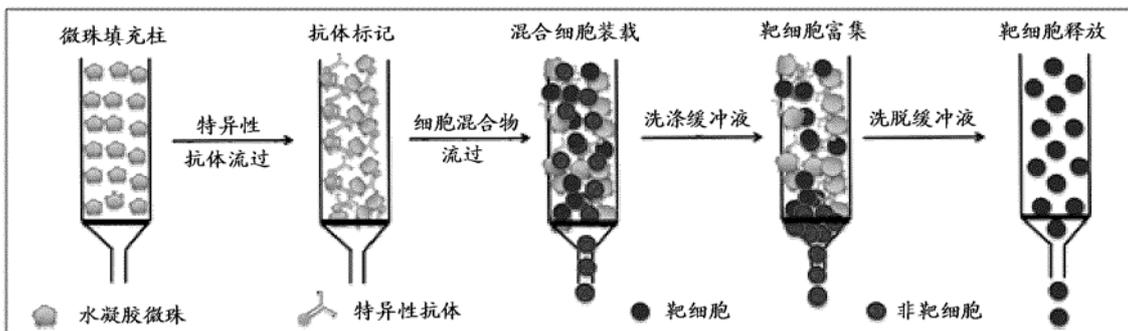


图 4A

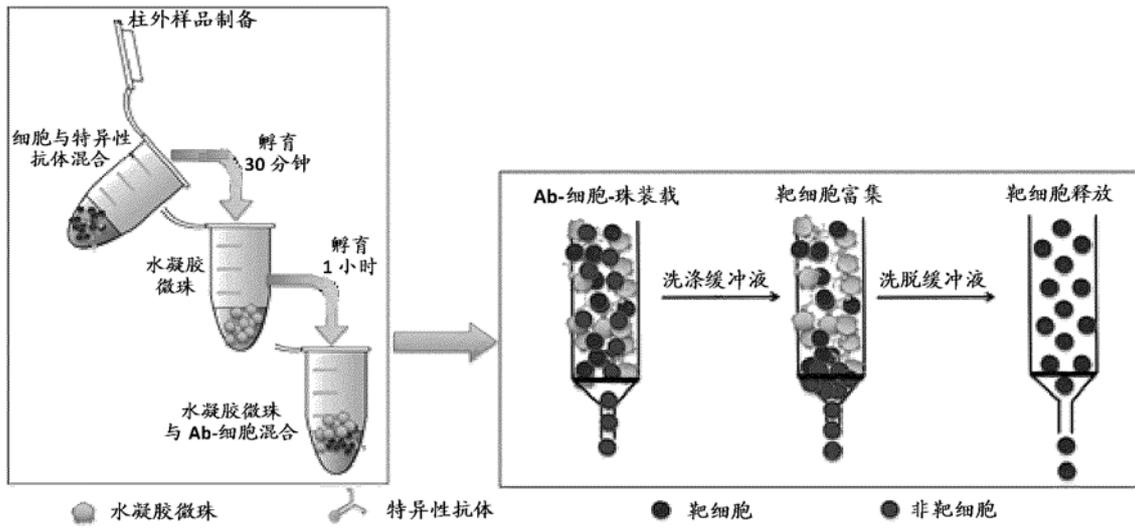


图 4B

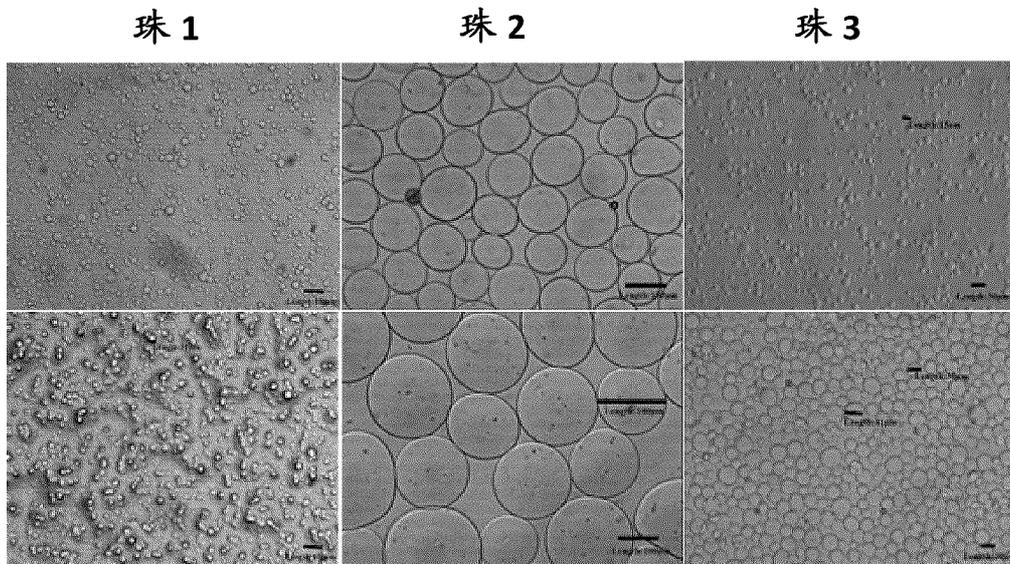


图 5

CD34+ Kg1A 细胞的分离

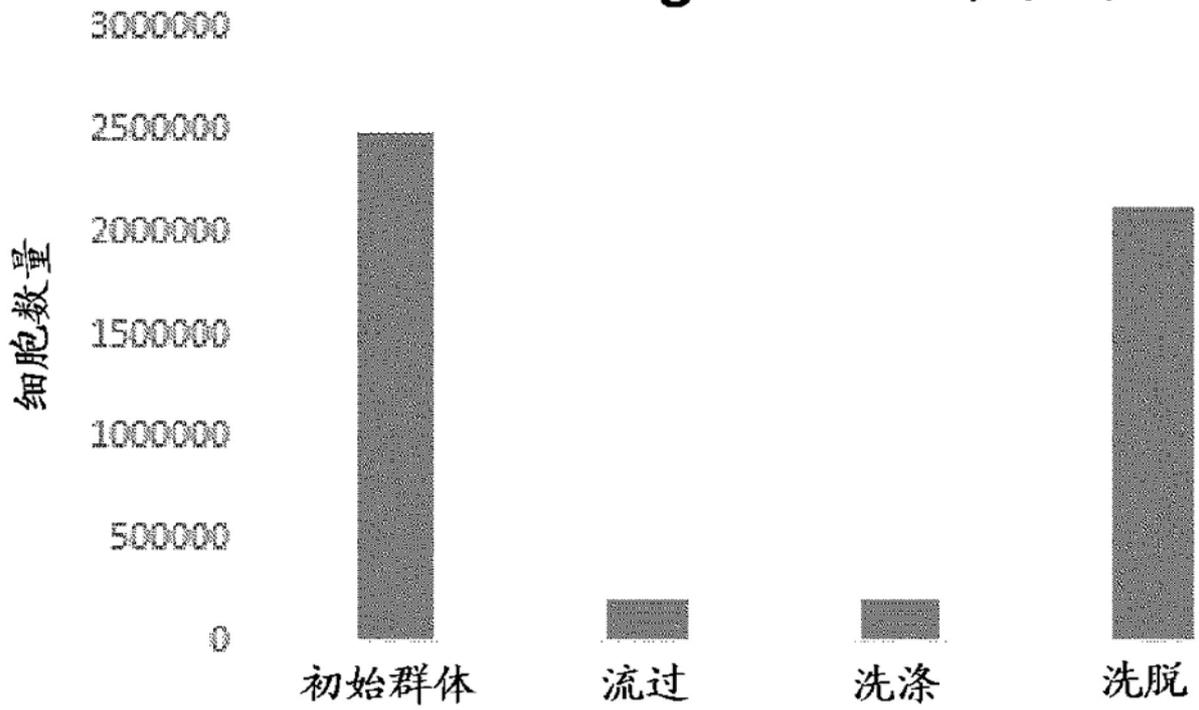


图 6A

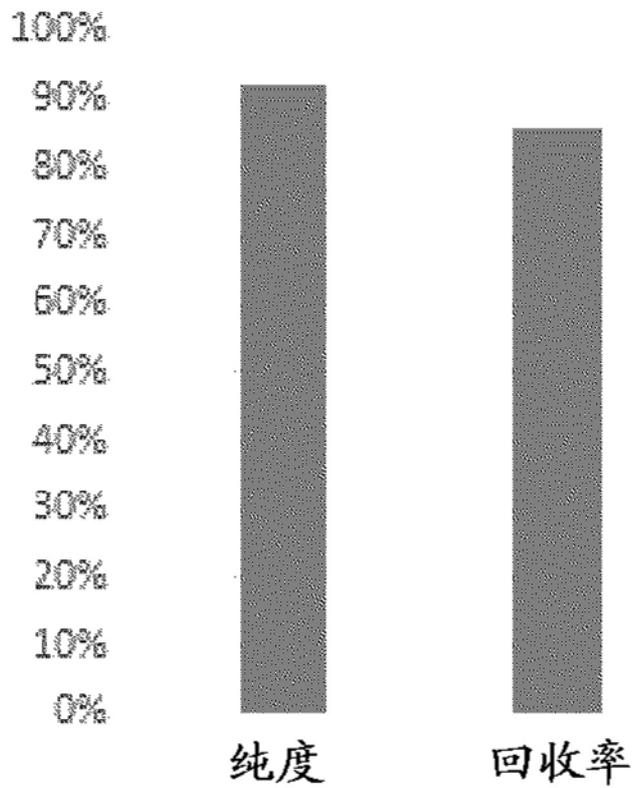


图 6B

初始 PBMC

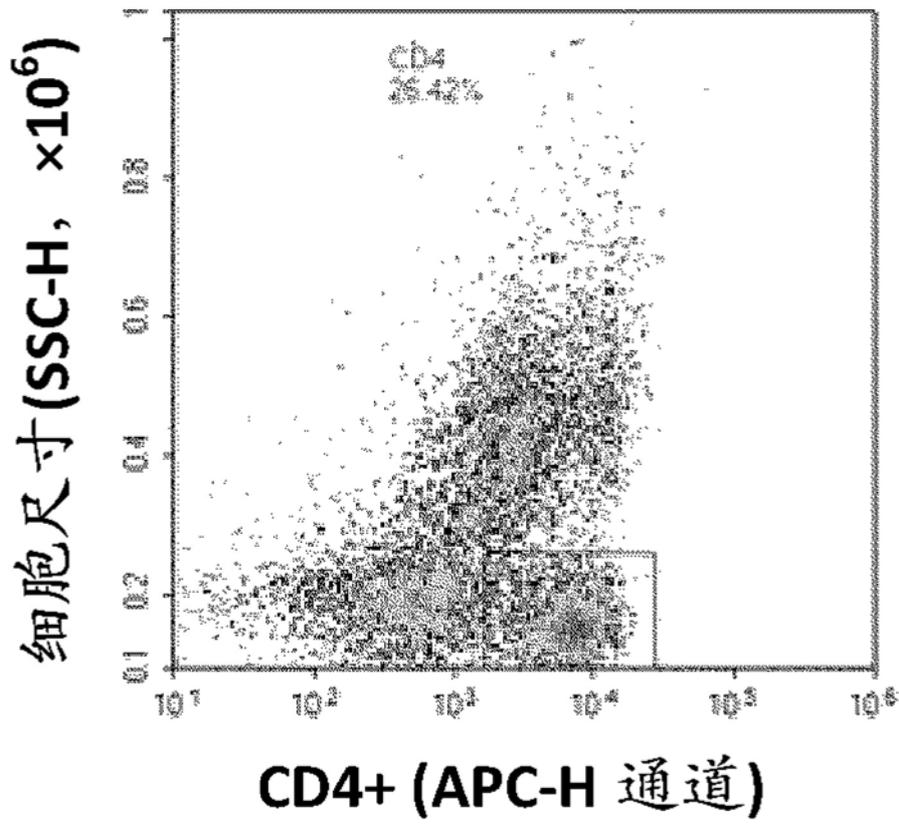


图 7A

纯化的 CD4+ T 细胞

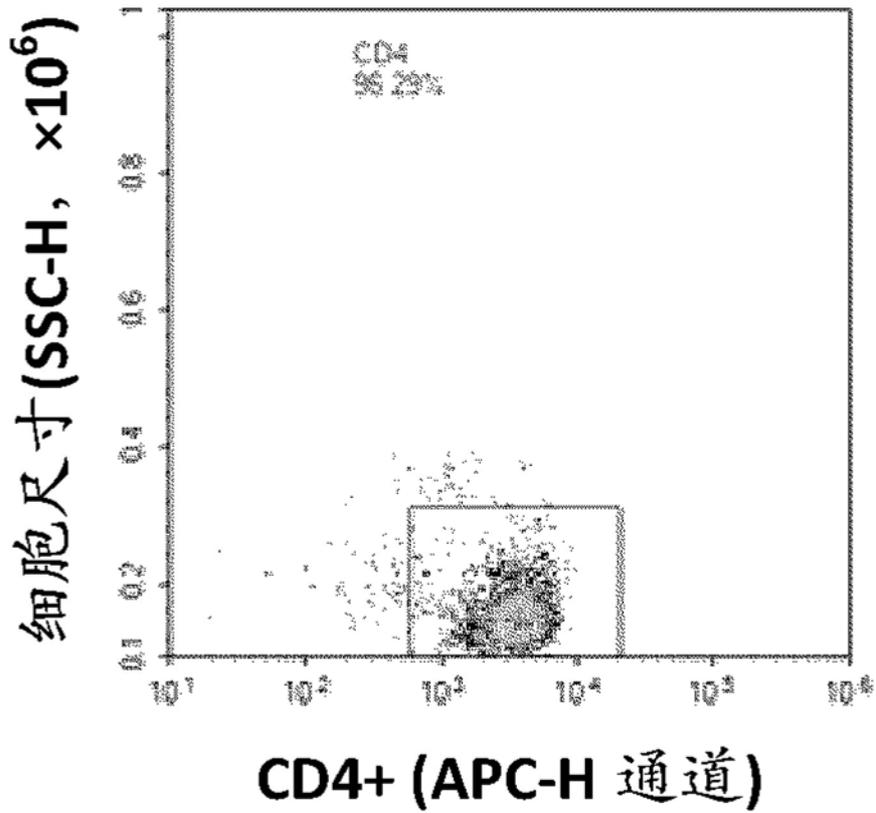


图 7B

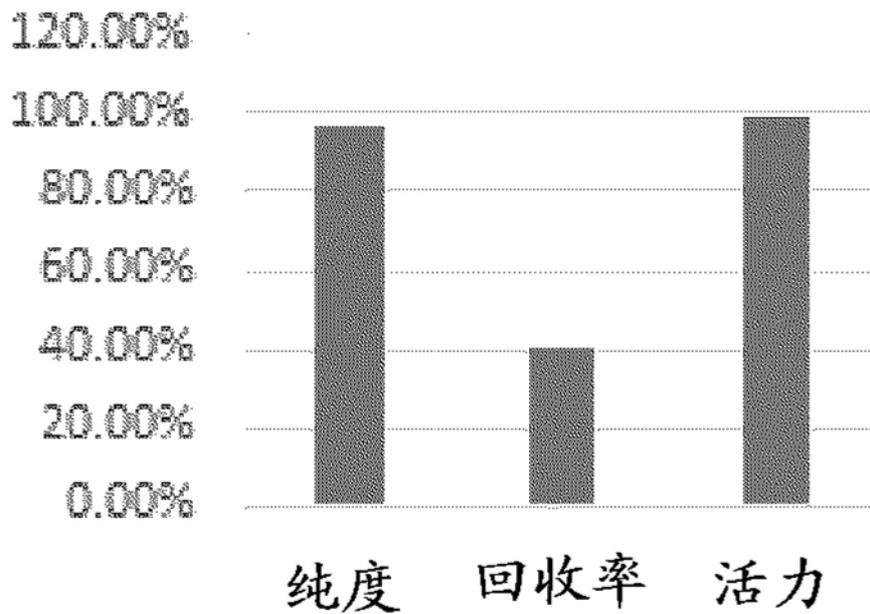


图 7C

初始 PBMC

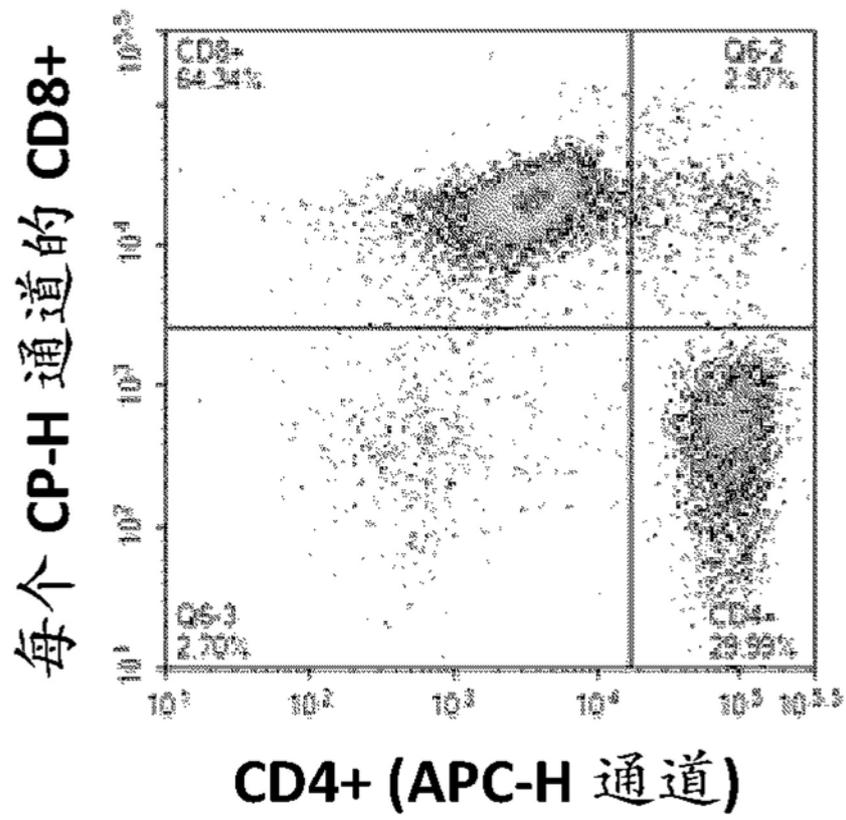


图 8A

纯化的 CD8+ T 细胞

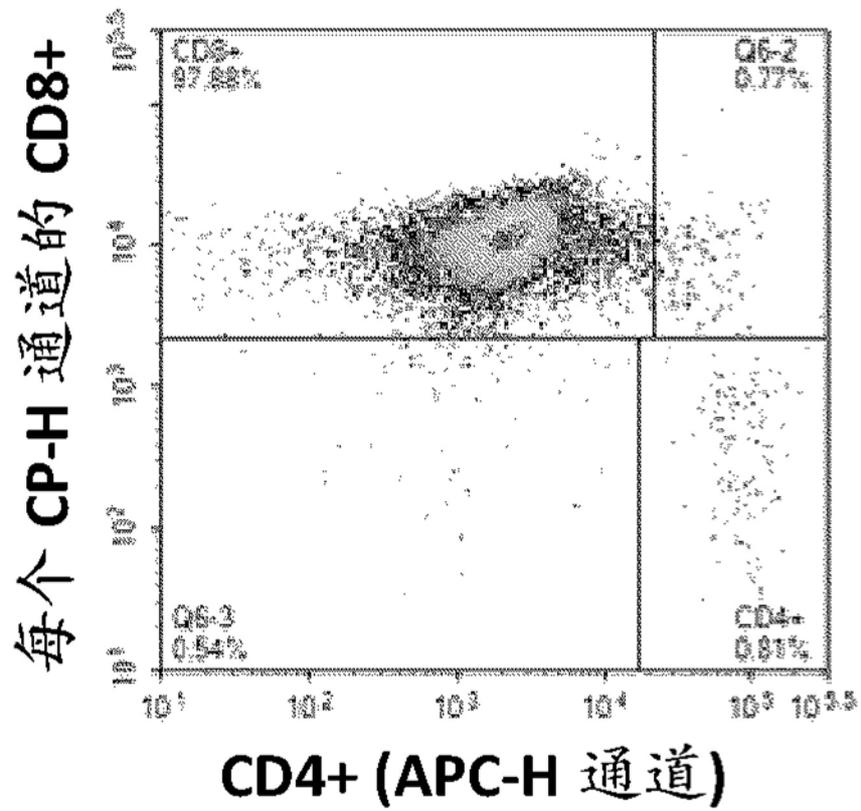


图 8B

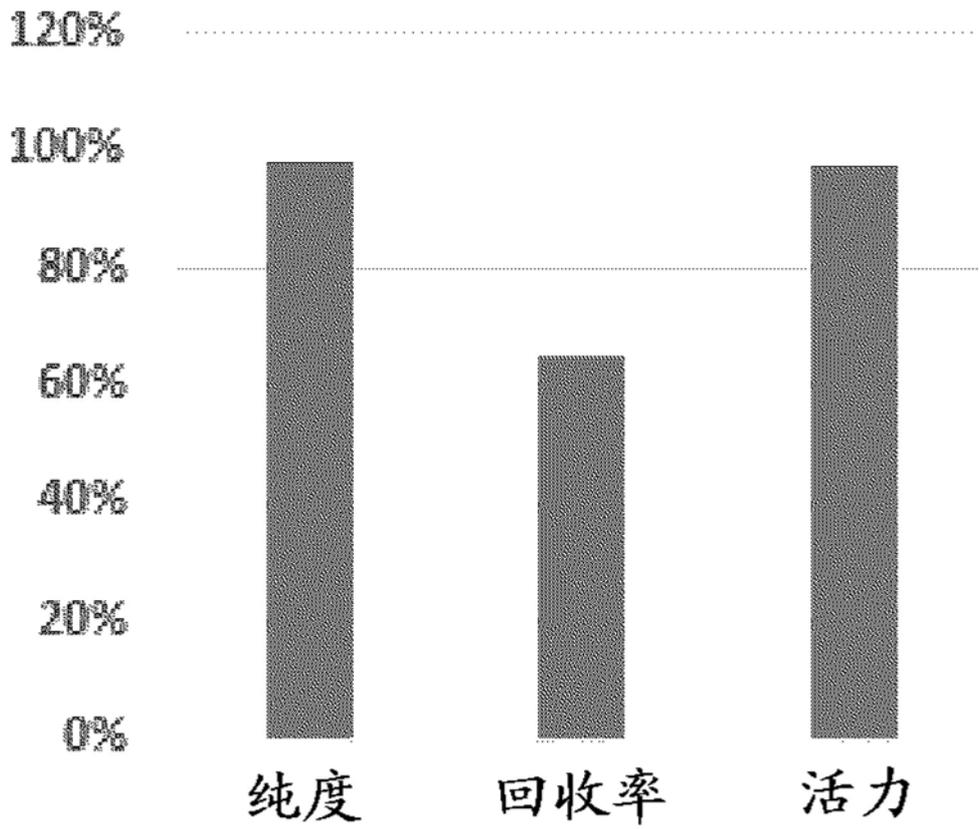


图 8C