



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105087788 B

(45)授权公告日 2018.11.23

(21)申请号 201510481064.2

(22)申请日 2015.08.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105087788 A

(43)申请公布日 2015.11.25

(73)专利权人 上海白泽医疗器械有限公司
地址 201814 上海市嘉定区安亭镇园国路
1585号7幢3楼
专利权人 上海细胞治疗工程技术研究中心
集团有限公司

(72)发明人 钱其军 陆元修 杨华 宋启平
李林芳 师传胤

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100
代理人 韦东

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

C12Q 1/02(2006.01)

(56)对比文件

CN 104450617 A,2015.03.25,

CN 101892196 ,2010.11.24,

CN 104498595 A,2015.04.08,

invitrogen.CELlection™ Pan Mouse IgG
Kit.《www.lifetechnologies.com》.2013,全文.

Invitrogen.CELlection™ Epithelial
Enrich.《www.lifetechnologies.com》.2012,第
2页左栏、右栏第1段.

Invitrogen.CELlection™ Epithelial
Enrich.《www.lifetechnologies.com》.2012,第
2页左栏、右栏第1段.

审查员 魏应亮

权利要求书2页 说明书8页

序列表2页 附图6页

(54)发明名称

一种分选人细胞的免疫磁珠、其制备及切除
方法

(57)摘要

本发明提供一种分选人细胞的免疫磁珠制
备及切除方法。具体而言,本发明涉及一种磁珠-
核酸-抗体复合物或含该磁珠-核酸-抗体复合物的
试剂盒,所述复合物包含磁珠、共价偶联于磁
珠上的核酸、以及与核酸共价偶联的抗体,其中,
所述核酸包含至少一个酶切位点,且所述抗体能
与待筛选细胞表面上的抗原特异性结合。本发明
还包括所述磁珠-核酸-抗体复合物的用途及制
备方法,以及使用所述磁珠-核酸-抗体复合物进
行细胞分选的方法。

1. 一种磁珠-核酸-抗体复合物或含该磁珠-核酸-抗体复合物的试剂盒,所述复合物包含磁珠、共价偶联于磁珠上的核酸、以及与核酸共价偶联的抗体,其中,

所述核酸包含NotI和SalI的酶切位点;和

所述抗体能与外周血单个核细胞表面上的抗原特异性结合,且所述抗体选自:特异性识别CD3、CD14或CD45抗原的抗体。

2. 如权利要求1所述的磁珠-核酸-抗体复合物或含该磁珠-核酸-抗体复合物的试剂盒,其特征在于,所述磁珠-核酸-抗体复合物具有以下任意一个或多个或全部特征:

(1) 所述磁珠表面带有反应性基团;

(2) 所述磁珠的材料为 Fe_3O_4 或 Fe_2O_3 ,粒径为10nm到10 μ m;

(3) 所述核酸经由偶联剂与磁珠共价偶联;和

(4) 所述抗体通过偶联剂与核酸共价偶联。

3. 如权利要求2所述的磁珠-核酸-抗体复合物或含该磁珠-核酸-抗体复合物的试剂盒,其特征在于,所述反应性基团为氨基或羧基。

4. 如权利要求2所述的磁珠-核酸-抗体复合物或含该磁珠-核酸-抗体复合物的试剂盒,其特征在于,所述偶联剂为戊二醛。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的磁珠-核酸-抗体复合物或含该磁珠-核酸-抗体复合物的试剂盒,其特征在于,所述外周血单个核细胞为淋巴细胞。

6. 如权利要求4所述的磁珠-核酸-抗体复合物或含该磁珠-核酸-抗体复合物的试剂盒,其特征在于,

(i) 所述磁珠通过戊二醛将其表面的氨基与核酸5'端的氨基共价结合形成磁珠-核酸复合物;和/或

(ii) 所述核酸3'端的氨基通过戊二醛与抗体上的氨基共价结合。

7. 如权利要求1-4和6中任一项所述的磁珠-核酸-抗体复合物或含该磁珠-核酸-抗体复合物的试剂盒,其特征在于,所述磁珠-核酸-抗体复合物具有以下任意一个、任意两个或全部特征:

(I) 所述核酸包含gcggccgc和/或gtcgac;

(II) 所述核酸长50~150个碱基;和

(III) 所述核酸3'端和5'端的一个或数个碱基选自胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤。

8. 如权利要求1-4中任一项所述的磁珠-核酸-抗体复合物或含该磁珠-核酸-抗体复合物的试剂盒,其特征在于,

所述磁珠的材料为 Fe_3O_4 或 Fe_2O_3 ,粒径为100nm到2 μ m;

所述磁珠表面含有氨基官能团;

所述磁珠通过戊二醛将其表面的氨基与核酸5'端的氨基共价结合形成磁珠-核酸复合物;

所述核酸3'端的氨基通过戊二醛与抗体上的氨基共价结合;和

所述核酸含有gcggccgc和/或gtcgac,或者其序列如SEQ ID NO:1所示。

9. 一种制备权利要求1-8中任一项所述的磁珠-核酸-抗体复合物的方法,其特征在于,所述方法包括:

(1) 将表面带有反应性基团的磁珠与偶联剂孵育;

(2) 将核酸与偶联剂孵育；

(3) 将步骤(1)所得的偶联了偶联剂的磁珠和步骤(2)所得的偶联了偶联剂的核酸混合，孵育，获得共价偶联了核酸的磁珠；

(4) 将抗体与步骤(3)所得的共价偶联了核酸的磁珠孵育，从而制备得到所述磁珠-核酸-抗体复合物。

10. 如权利要求9所述的方法，其特征在于，所述方法包括以下任意一个或多个或全部特征：

(i) 步骤(1)、(2)和(3)的孵育在室温下进行，时间为1~3小时；

(ii) 步骤(4)的孵育在室温下进行，时间为5~20小时；

(iii) 用PBS缓冲液重悬步骤(3)获得的共价偶联了核酸的磁珠，磁分离；和

(iv) 步骤(4)中，将抗体与步骤(3)所得的共价偶联了核酸的磁珠孵育后，磁分离，然后用PBS缓冲液重悬磁珠团块，磁分离。

11. 一种分选外周血单个核细胞的方法，所述方法包括：

(1) 将权利要求1-8中任一项所述磁珠-核酸-抗体复合物或采用权利要求9或10所述的方法制备得到的磁珠-核酸-抗体复合物与含有外周血单个核细胞的细胞混合物接触，孵育；

(2) 对孵育完成的细胞进行磁分离，获得结合了细胞的磁珠；

(3) 对所述结合了细胞的磁珠进行酶切；

(4) 对步骤(3)酶切后的混合物进行磁分离，获取上清液；

(5) 从上清液中分离出目标细胞。

12. 权利要求1-8中任一项所述的磁珠-核酸-抗体复合物在细胞分选或制备用于分选外周血单个核细胞的试剂盒中的用途。

一种分选人细胞的免疫磁珠、其制备及切除方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学生物学实验技术领域,涉及一种分选人细胞的免疫磁珠、其制备及切除方法。

背景技术

[0002] 肿瘤是严重危害人类健康的疾病之一,手术、放疗、化疗等传统治疗方法已经难以杀灭体内残存的肿瘤细胞。21世纪,随着肿瘤治疗的科技进步,已发展进入生物治疗的技术系统。其中,生物治疗是目前最为成熟、应用最为广泛的肿瘤生物治疗方法。生物治疗就是从患者的外周血中采集单个核细胞(PBMC),然后送到GMP工作室内进行培养、扩增、诱导、行肿瘤抗原刺激,从而获得能识别癌细胞的DC细胞和具有高杀瘤活性的CIK细胞,然后如同打点滴一样分次回输到患者体内,有效抑制肿瘤细胞生长、消除转移病灶,达到预防和控制肿瘤复发和转移的目的,实现延长患者生存期、提高患者生活质量的多重目标。

[0003] 目前患者PBMC细胞提取多采用机器采集细胞之后进行Ficoll密度梯度离心法分离,从而得到高密度的PBMC细胞。但是由于该方法耗时较长,不利于后续细胞培养,并且收集到的PBMC细胞纯度80%,回收率80%左右,一定程度上造成了细胞的浪费。

发明内容

[0004] 针对上述现有技术的不足,本发明提供了一种新的通过制备带有抗体的免疫磁珠来进行分选人细胞的方法,分选过后可以通过酶切的方式将磁珠去除,从而提高目的细胞的纯度,也不影响后续细胞的培养,可以在临床及实验室方面大量推广。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供了一种磁珠-核酸-抗体复合物,通过抗体特异性地识别细胞来达到分选的目的,再通过磁分离的方式将磁珠连同细胞一并分离处理,最后再通过高保真酶将磁珠-核酸-抗体复合物中的核酸切断,从而达到磁珠与细胞的分离。

[0006] 本发明的磁珠-核酸-抗体复合物包含磁珠、共价偶联于磁珠上的核酸、以及与核酸共价偶联的抗体,其中,所述核酸包含至少一个酶切位点,且所述抗体能与待筛选细胞表面上的抗原特异性结合。

[0007] 在一个具体实施方式中,所述磁珠表面带有反应性基团,例如氨基或羧基。

[0008] 在一个具体实施方式中,所述磁珠的材料为 Fe_3O_4 或 Fe_2O_3 ,粒径为10nm到10 μm 。

[0009] 在一个具体实施例中,所述磁珠的材料为 Fe_3O_4 或 Fe_2O_3 ,粒径为100nm到2 μm 。

[0010] 在一个具体实施方式中,所述核酸经由偶联剂与磁珠共价偶联。

[0011] 在一个具体实施方式中,所述抗体通过偶联剂与核酸共价偶联。

[0012] 在一个具体实施方式中,所述偶联剂为戊二醛。

[0013] 在一个具体实施方式中,所述核酸为单链或双链DNA,所述酶切位点可被限制性内切酶或核酸酶酶切断裂。

[0014] 在一个具体实施方式中,所述抗体识别选自以下的细胞的表面抗原:外周血细胞、造血细胞、神经干细胞和肿瘤细胞。

- [0015] 在一个具体实施方式中,所述磁珠通过戊二醛将其表面的氨基与核酸5'端的氨基共价结合形成磁珠-核酸复合物。
- [0016] 在一个具体实施方式中,所述核酸3'端的氨基通过戊二醛与抗体上的氨基共价结合。
- [0017] 在一个具体实施方式中,所述细胞为人细胞,选自红细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、外周血单核细胞或淋巴细胞。
- [0018] 在一个具体实施方式中,所述酶切位点选自NotI和SalI的酶切位点。
- [0019] 在一个具体实施方式中,所述核酸包含gcggccgc和/或gtcgac。
- [0020] 在一个具体实施方式中,所述核酸如SEQ ID NO:1所示。
- [0021] 在一个具体实施方式中,所述核酸长50~150个碱基。
- [0022] 在一个具体实施方式中,所述抗体特异性识别细胞表面的CD3、CD14或CD45抗原。
- [0023] 在一个具体实施方式中,所述细胞为外周血单个核细胞(PBMC)。
- [0024] 在一个具体实施方式中,细胞为中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞或淋巴细胞。
- [0025] 在一个具体实施方式中,所述核酸3'端和5'端的一个或数个碱基选自胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤。
- [0026] 在一个具体实施方式中,所述磁珠-核酸-抗体复合物具有以下特征:
- [0027] (1) 所述磁珠的材料为 Fe_3O_4 或 Fe_2O_3 ,粒径为100nm到2 μ m;
- [0028] (2) 所述磁珠表面含有氨基官能团;
- [0029] (3) 所述磁珠通过戊二醛将其表面的氨基与核酸5'端的氨基共价结合形成磁珠-核酸复合物;
- [0030] (4) 所述核酸3'端的氨基通过戊二醛与抗体上的氨基共价结合;
- [0031] (5) 所述核酸含有gcggccgc和/或gtcgac,或者其序列如SEQ ID NO:1所示;和
- [0032] (6) 所述抗体为特异性识别外周血单个核细胞中的淋巴细胞表面抗原的抗体。
- [0033] 本发明提供一种制备磁珠-核酸-抗体复合物的方法,所述方法包括:
- [0034] (1) 将表面带有反应性基团的磁珠与偶联剂孵育;
- [0035] (2) 将核酸与偶联剂孵育;
- [0036] (3) 将步骤(1)所得的偶联了偶联剂的磁珠和步骤(2)所得的偶联了偶联剂的核酸混合,孵育,获得共价偶联了核酸的磁珠;
- [0037] (4) 将抗体与步骤(3)所得的共价偶联了核酸的磁珠孵育,从而制备得到所述磁珠-核酸-抗体复合物。
- [0038] 在一个具体实施方式中,步骤(1)、(2)和(3)的孵育在室温下进行,时间为1~3小时。
- [0039] 在一个具体实施方式中,步骤(4)的孵育在室温下进行,时间为10~20小时。
- [0040] 在一个具体实施方式中,用PBS缓冲液重悬步骤(3)获得的共价偶联了核酸的磁珠,磁分离。
- [0041] 在一个具体实施方式中,步骤(4)中,将抗体与步骤(3)所得的共价偶联了核酸的磁珠孵育后,磁分离,然后用PBS缓冲液重悬磁珠团块,磁分离。
- [0042] 本发明还提供一种分选细胞的方法,所述方法包括:

- [0043] (1) 将本发明的磁珠-核酸-抗体复合物与含有目标细胞的细胞混合物接触, 孵育;
- [0044] (2) 对孵育完成的细胞进行磁分离, 获得结合了细胞的磁珠;
- [0045] (3) 对所述结合了细胞的磁珠进行酶切;
- [0046] (4) 对步骤(3) 酶切后的混合物进行磁分离, 获取上清液; 和
- [0047] (5) 从上清液中分离出目标细胞。
- [0048] 在一个具体实施方式中, 所述分选细胞的方法包括:
- [0049] (a) 将本发明的磁珠-核酸-抗体复合物与含有目标细胞的细胞混合物接触, 孵育;
- [0050] (b) 对孵育完成的细胞进行磁分离, 获得结合了细胞的磁珠;
- [0051] (c) 用酶切缓冲液重悬细胞;
- [0052] (d) 加入酶, 进行酶切;
- [0053] (e) 对步骤(d) 酶切后的混合物进行磁分离, 获取上清液; 和
- [0054] (f) 从上清液中分离出目标细胞。
- [0055] 本发明还提供一种试剂盒, 所述试剂盒含有本发明所述的磁珠-核酸-抗体复合物。
- [0056] 在一个具体实施方式中, 试剂盒中还含有能切割所述核酸的酶以及相应的酶切缓冲液。
- [0057] 本发明还提供本发明所述的磁珠-核酸-抗体复合物在细胞分选以及制备用于分选细胞的试剂盒中的用途。
- [0058] 本发明的磁珠-核酸-抗体复合物与同类产品相比, 其优势在于:
- [0059] ①所选用的限制性内切酶为高保真酶, 可以在温和环境中快速酶切, 5-10分钟即可完成酶切;
- [0060] ②酶切反应不影响细胞活性, 有利于后续细胞培养;
- [0061] ③在酶切反应过程中, 磁珠的切除效率很高; 和
- [0062] ④在后续培养细胞过程中, 用于分选的磁珠不会进入人体, 在临床上安全可靠。

附图说明

- [0063] 图1显示实施例2中外周血单个核细胞的流式细胞仪检测CD3-PECy7阳性的比例(34.1%)。
- [0064] 图2显示实施例2中分选完成之后阴性细胞中流式细胞仪检测CD3-PECy7阳性的比例(2.5%)。
- [0065] 图3显示实施例2中分选完成后带有磁珠的细胞流式细胞仪检测CD3-PECy7阳性的结果(80.7%), 比例只有80%的原因在于流式细胞仪受磁珠的影响, 一部分的磁珠会被系统记为阴性从而降低了细胞的纯度。
- [0066] 图4显示实施例2中分选完成后带有磁珠的细胞在显微镜下的照片。
- [0067] 图5显示实施例3中切除完磁珠后细胞进行流式细胞仪检测CD3-PECy7阳性的结果(95.8%)。
- [0068] 图6显示实施例3中切除完磁珠后细胞在显微镜下的照片。
- [0069] 图7显示细胞初始状态, CD14阳性细胞比例占39.2%。
- [0070] 图8显示分选过后细胞中CD14阳性细胞所含比例仅为0.3%。

- [0071] 图9显示最终经过切除磁珠后收集到的CD14阳性细胞所占比例91.3%。
- [0072] 图10显示细胞初始状态,CD45阳性细胞比例占49.5%。
- [0073] 图11显示分选过后细胞中CD45阳性细胞所含比例仅为3.4%。
- [0074] 图12显示最终经过切除磁珠后收集到的CD45阳性细胞所占比例95%。

具体实施方式

[0075] 本发明通过抗体特异性地识别细胞来达到分选的目的,再通过磁分离的方式将磁珠连同细胞一并分离处理,最后再通过高保真酶将磁珠-核酸-抗体复合物中的核酸切断,从而达到磁珠与细胞的分离。

[0076] 适用于本发明磁珠-核酸-抗体复合物来分选的细胞可以是本领域已知的各种细胞,尤其是哺乳动物的细胞。更具体而言,细胞是包括外周血细胞、造血细胞、神经干细胞和肿瘤细胞。外周血细胞包括红细胞和白细胞。白细胞包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、外周血单个核细胞。外周血单个核细胞包括单核细胞或淋巴细胞。本发明尤其优选分选外周血单个核细胞中的淋巴细胞。

[0077] 如前所述,通过抗体与细胞表面抗原的特异性结合来实现细胞分选。因此,可根据待筛选细胞的表面抗原来选择本发明磁珠-核酸-抗体复合物中的抗体。常见的细胞表面抗原包括但不限于CD3、CD4、CD8、CD14和CD56等。因此,本发明包括抗这些表面抗原的特异性抗体。也可使用抗体的抗原结合片段来制备本发明的磁珠-核酸-抗体复合物。因此,本文所述的“抗体”包括全长抗体及其抗原结合片段。抗体优选是单克隆抗体。

[0078] 本发明通过使用一段核酸序列将抗体与磁珠偶联,该段核酸序列至少含有一个酶切位点,优选含有2个酶切位点。

[0079] 通常,核酸序列长50~150个碱基,例如长70~120个碱基或者长70~100个碱基不等。可根据抗体、磁珠大小、成本等方面确定核酸序列的长度。并可根据所使用的酶所识别的特异性序列来设计核酸序列,这都是根据现有的技术就能确定。

[0080] 对除酶切位点以外的其它碱基序列并无特殊限制,这些碱基序列主要起到桥梁的作用。当含有2个或2个以上酶切位点时,所述酶切位点之间的距离也可根据现有的技术加以确定。

[0081] 适用于本发明的酶可以是在37℃达到最高酶活的限制性内切酶,包括但不限于EcoRI、HindIII、BamHI、NotI和SalI。如需使用两种及两种以上的酶时,只要所选用的酶在同一个缓冲体系下可以同时酶切即可。本发明也可使用核酸酶,例如DNase I。

[0082] 在本发明的一个具体实施例中,酶是NotI和/或SalI。因此,酶切位点为这两种酶中的任一种或两种的酶切位点。作为一个例子,NotI的酶切位点的碱基序列为gcggccgc; SalI的酶切位点的碱基序列为gtcgac。

[0083] 作为一个例子,本发明使用如下所示的核酸序列来将抗体与磁珠偶联:

[0084]

CGGCATCGCGGCTTCATCAAGGTGAGGCgcggccgcAGTATGgtcgacACCAGATCCTGATCGAGATCTGCGCC (SEQ ID NO:1),

[0085] 其中,小写的gcggccgc为NotI的酶切位点;小写的gtcgac为SalI的酶切位点。

[0086] 在优选的实施例中,在使用戊二醛作为偶联剂将核酸与磁珠偶联时,优选使用3'

端和5'端的一个或数个(例如10个以内,或6个以内)碱基为含有氨基的碱基的核酸,例如胞嘧啶(C)、腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)。

[0087] 在存在两个或多个酶切位点时,所述酶切位点可以是一种酶的酶切位点。即,例如,所有酶切位点都是NotI的酶切位点,或都是SalI的酶切位点。

[0088] 可采用本领域常规的化学合成方法合成用于本发明磁珠-核酸-抗体复合物中的核酸,包括引物PCR或者全基因合成等方法。

[0089] 通常,通过偶联剂将核酸共价连接到磁珠上。磁珠亦称为免疫磁珠,由载体微球和免疫配基结合而成。载体微球的核心部分为金属小颗粒(Fe_3O_4 , Fe_2O_3)。核心外包裹一层高分子材料,如聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯亚胺等。最外层是功能基层,如羟基、氨基、醛基、羧基等。可采用本领域常规的方法自行制备带有反应性基团的磁珠。磁珠的粒径通常在10nm到10um的范围之内,例如,可采用化学制备方法或物理制备方法制备磁珠。化学制备方法包括化学共沉淀法和沉淀氧化法等,物理制备方法包括高能球磨法、物理气相沉积法、真空冷冻干燥法等。也可使用市场上销售的磁珠。例如,法国Ademtech公司销售有羧基纳米磁性颗粒和氨基纳米磁性颗粒,粒径在200nm和300nm。

[0090] 可根据磁珠上带有的反应性基团选用合适的偶联剂。例如,作为一个例子,本发明使用带有氨基的磁珠,并使用戊二醛作为偶联剂,将核酸共价偶联到磁珠上。若使用带有羧基的磁珠,可使用EDC/NHS作为偶联剂。

[0091] 偶联时,可分别将偶联剂与磁珠和核酸孵育,然后再将孵育后的磁珠-偶联剂与核酸-偶联剂混合,孵育。对混合时偶联剂、磁珠和核酸的用量并无特殊限制,可根据常规技术手段予以确定。孵育的时间也可根据实际情况确定,通常在0.5~3小时,例如1~3小时。通常在室温下进行孵育。

[0092] 偶联后,磁珠通过戊二醛将其表面的氨基与核酸5'端的氨基共价结合形成磁珠-核酸复合物:

[0093] $\text{磁珠-NH}_2 + \text{HOC-(CH}_2)_3\text{-COH} \rightarrow \text{磁珠-NH-(CH}_2)_4\text{-COH}$

[0094] $\text{磁珠-NH-(CH}_2)_4\text{-COH} + \text{核酸} \rightarrow \text{磁珠-NH-(CH}_2)_4\text{-CH}_2\text{-NH-核酸}$

[0095] 应理解,磁珠上可能不只含有一个反应性官能团。因此,每粒磁珠可与多个戊二醛分子发生反应。

[0096] 获得磁珠-核酸复合物之后,可将目标抗体与磁珠-核酸复合物混合,同时加入偶联剂,进行孵育。通常在室温下进行孵育,孵育时间可根据磁珠、抗体的量等条件确定,通常在10~20小时的范围内。偶联剂将核酸3'端的氨基与抗体上的氨基共价结合,从而将抗体偶联到磁珠-核酸复合物上,形成磁珠-核酸-抗体复合物。优选的偶联剂是戊二醛。

[0097] 在制备磁珠-核酸复合物和磁珠-核酸-抗体复合物过程中,可通过常规的方法分离所制备得到的复合物,通常是磁分离。磁分离之后,可用缓冲液(例如PBS缓冲液)清洗、分散分离得到的磁性团块一次或数次。

[0098] 应理解,每个磁珠上偶联的抗体或其抗原结合片段的分子数量并不限于1个,可以是数个或多个。

[0099] 由此获得的本发明磁珠-核酸-抗体复合物可用来分选细胞。因此,本发明还提供一种分选细胞的方法,所述方法包括:

[0100] (1) 将本发明的磁珠-核酸-抗体复合物与含有目标细胞的细胞混合物接触,孵育;

[0101] (2)对孵育完成的细胞进行磁分离,获得结合了细胞的磁珠;

[0102] (3)对所述结合了细胞的磁珠进行酶切;

[0103] (4)对步骤(3)酶切后的混合物进行磁分离,获取上清液;和

[0104] (5)从上清液中分离出目标细胞。

[0105] 用于本发明磁珠-核酸-抗体复合物进行分选的细胞除前文所述的人外周血细胞外,还包括人类其它各种细胞,包括红细胞、造血细胞、神经干细胞、以及多种肿瘤细胞。出于分选不同细胞的目的,可根据待分选细胞的表面抗原选择适用于本发明磁珠-核酸-抗体复合物中的抗体或其抗原结合片段。

[0106] 对细胞与磁珠-核酸-抗体复合物的孵育时间并无特殊限制,可根据待分选的细胞及其量等加以确定。通常,孵育时间在0.5~2小时之间。

[0107] 酶切的条件可根据所使用的酶而确定,这都可根据已知技术加以确定。

[0108] 应理解的是,本发明的分选方法是体外或离体方法,该分选方法本身为非治疗或诊断目的。

[0109] 本发明中,术语“含有”或“包括”表示各种成分可一起应用于本发明的混合物或组合物中。因此,术语“主要由...组成”和“由...组成”包含在术语“含有”或“包括”中。

[0110] 本发明的其他方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

[0111] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照国家标准测定。若没有相应的国家标准,则按照通用的国际标准、常规条件、或按照制造厂商所建议的条件进行。除非另外说明,否则所有的份数为重量份,所有的百分比为重量百分比。

[0112] 除非另有定义或说明,本文中所使用的所有专业与科学用语与本领域技术熟练人员所熟悉的意义相同。此外任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。

[0113] 此外,应理解,本发明也包括文中所述的各优选范围相互组合而获得的各技术方案。

[0114] 实施例1:磁珠-核酸-抗体复合物的制备

[0115] (1)将表面带有氨基基团的磁珠(0.5mg)取至1.5ml EP管中,磁分离,弃上清。

[0116] (2)PBS缓冲液1ml重悬磁珠团块,再磁分离,弃上清。

[0117] (3)重复步骤2两到三次。

[0118] (4)加入偶联剂戊二醛600-800u1,放置于混合旋转仪室温孵育1.5h。

[0119] (5)将核酸片段(SEQ ID NO:1)(磁珠:核酸为1mg:50ug)取至1.5ml离心管中,加入戊二醛600-800u1,放置于混合旋转仪室温孵育1.5h。

[0120] (6)将孵育好的磁珠从旋转仪上取下,磁分离,去除上清。

[0121] (7)加入步骤4中孵育完成后的核酸片段,重悬磁珠团块,放置于混合旋转仪室温孵育1.5h。

[0122] (8)PBS(pH7.2-7.3,组成成分为氯化钠0.8%,氯化钾0.02%,磷酸氢二钠0.144%,磷酸二氢钾0.024%,均为质量体积比,下同)1ml缓冲液重悬磁珠团块,再磁分离,去除上清。

[0123] (9)重复步骤8两到三次。

[0124] (10)加入待偶联的抗体(鼠抗人CD3,白泽A0031) 800u1,重悬磁珠,放置于混合旋转仪室温孵育16h。

[0125] (11)将偶联好的磁珠从旋转仪上取下,磁分离,弃上清。

[0126] (12)PBS 1ml重悬磁珠团块,磁分离,弃上清。

[0127] (13)重复步骤12两到三次。

[0128] (14)加入少量PBS缓冲液,重悬磁珠团块,4℃冰箱保存。

[0129] 实施例2:磁珠-核酸-抗体复合物细胞分选方法

[0130] (1)取人外周血单个核细胞(PBMC) 1ml,1500rpm离心5min。图1显示外周血单个核细胞的流式细胞仪检测CD3-PECy7阳性的比例(初始细胞数 1×10^8 ,CD3阳性细胞比例34.1%,即含 3.41×10^7 个CD3阳性细胞)。

[0131] (2)弃上清,加入PBS重悬细胞,1500rpm离心5min。

[0132] (3)重复步骤2两次。

[0133] (4)用少量PBS将细胞重悬,加入实施例1制备好的磁珠,混合均匀,放置在混合旋转仪室温孵育1h。

[0134] (5)孵育完成的细胞进行磁分离,吸出上清,即为阴性细胞。图2显示分选完成之后阴性细胞中流式细胞仪检测CD3-PECy7阳性的比例(2.5%),即分选出的CD3阳性细胞数为 3.16×10^7 ,分选效率为92.7%。

[0135] (7)PBS重悬细胞,磁分离,弃上清。

[0136] (8)重复步骤7两到三次。

[0137] (9)加入少量PBS重悬细胞,即为分选过后的阳性细胞。图3显示分选完成后带有磁珠的细胞流式细胞仪检测CD3-PECy7阳性的结果(80.7%)。图4显示分选完成后带有磁珠的细胞在显微镜下的照片。

[0138] 实施例3:磁珠切除方法

[0139] (1)将实施例2收集到的阳性细胞低速离心。

[0140] (2)弃上清,加入双酶切缓冲液90u1重悬细胞。

[0141] (3)加入酶,37℃水浴10min。

[0142] (4)磁分离,吸出上清至新离心管中。

[0143] (5)离心,弃上清,少量PBS重悬,即为分选过后不带磁珠的阳性细胞。

[0144] 下表1显示采用不同的酶切方式进行磁珠切除实验,测算得到的切除时间、切除效率和细胞活性。

[0145] 表1

[0146]

酶	时间 ¹ min	回收细胞数	活细胞数 ²	死细胞数	细胞活性 ³
NotI	25	3.1×10^7	1.46×10^7	1.64×10^7	47.09%
SaII	18	3.1×10^7	1.61×10^7	1.49×10^7	51.93%
NotI+SaII	12	3.1×10^7	2.46×10^7	0.64×10^7	79.35%
核酸酶(Dnase I)	9	3.1×10^7	2.88×10^7	0.22×10^7	92.90%

[0147] 1:完全将磁珠切除所花时间,本实验即为回收 3.1×10^7 个细胞为准。

[0148] 2:活细胞与死细胞计数通过台盼蓝染色,然后显微镜下计数所得。

[0149] 3:细胞活性计算方式为细胞活性=活细胞数/(活细胞数+死细胞数)。

[0150] 从表1可以看出,在不同的酶切方式下,细胞活性与酶切时间相关,越短的酶切时间,细胞活性越高,因为酶切环境中,酶切缓冲液与细胞培养液不同,细胞存在于缓冲液中时间越长越不容易存活。通过单酶切、双酶切及使用核酸酶3种不同方式进行实验,可以发现双酶切的效率远高于单酶切,而核酸酶无酶切位点要求,所以切除速度最快,细胞活性最高。

[0151] 图5显示使用NotI和SalI切除完磁珠后细胞进行流式细胞仪检测CD3-PECy7阳性的结果(95.8%)。图6显示使用NotI和SalI切除完磁珠后细胞在显微镜下的照片。

[0152] 实施例4:选用CD14单克隆抗体进行细胞分选及切除

[0153] 实验步骤同实施例1-3,除流式抗体为CD14-PE。结果如图7-9所示。图7为细胞初始状态,CD14阳性细胞比例占39.2%。图8为分选过后细胞中CD14阳性细胞所含比例仅为0.3%。图9为最终经过使用NotI和SalI切除磁珠后收集到的CD14阳性细胞所占比例91.3%。

[0154] 实施例5:选用CD45单克隆抗体进行细胞分选及切除

[0155] 实验步骤同实施例1-3,除流式抗体为CD45-FITC。结果如图10-12所示。图10为细胞初始状态,CD45阳性细胞比例占49.5%。图11为分选过后细胞中CD45阳性细胞所含比例仅为3.4%。图12为最终经过使用NotI和SalI切除磁珠后收集到的CD45阳性细胞所占比例95%。

[0001]

序列表

<110> 上海白泽医疗器械有限公司

<120> 一种分选人细胞的免疫磁珠、其制备及切除方法

<130> 154801

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 77

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头序列

<400> 1

gcggcatcgg cggttcate aaggtgagge gggccgcag tatggtcgac accagatcct 60
gatcgagatc tgcggcc 77

<210> 2

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 酶切位点

<400> 2

gcggccgc

8

<210> 3

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 酶切位点

<400> 3

gtcgac

6

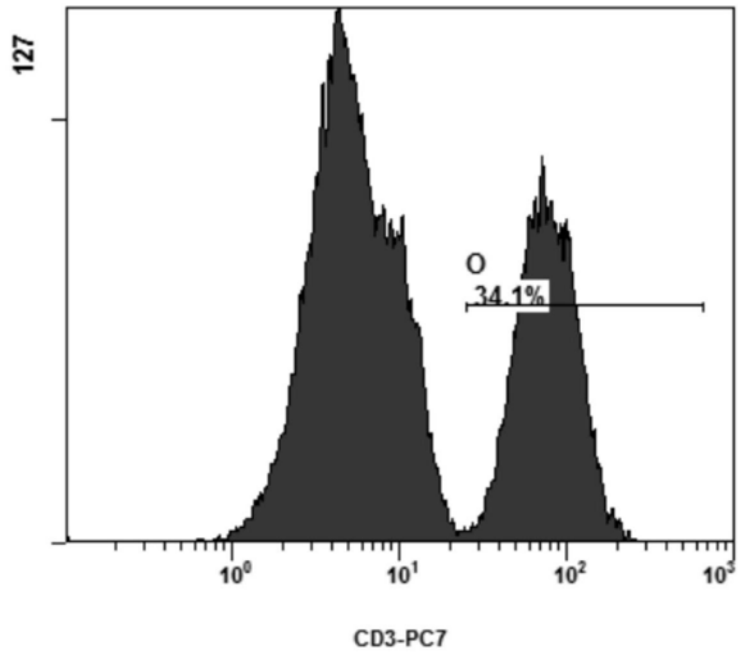


图1

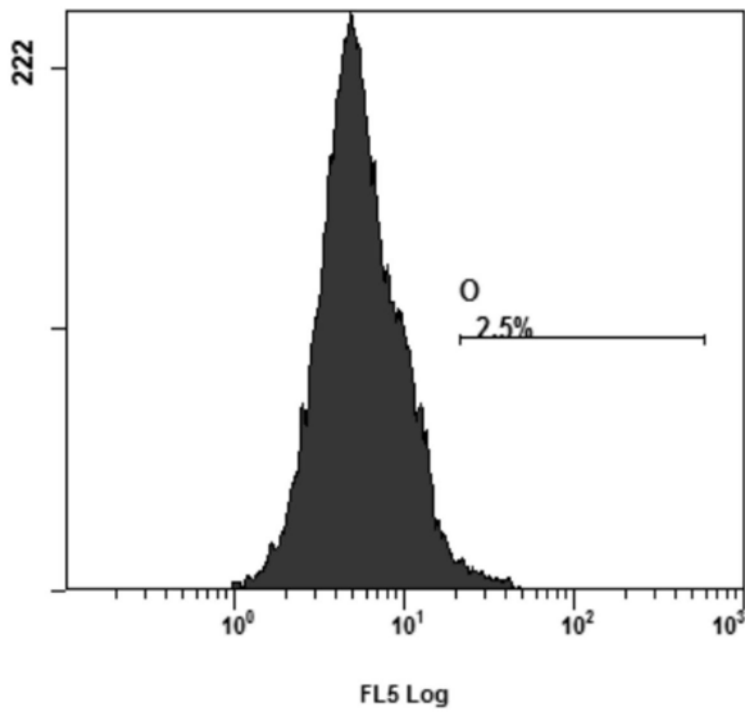


图2

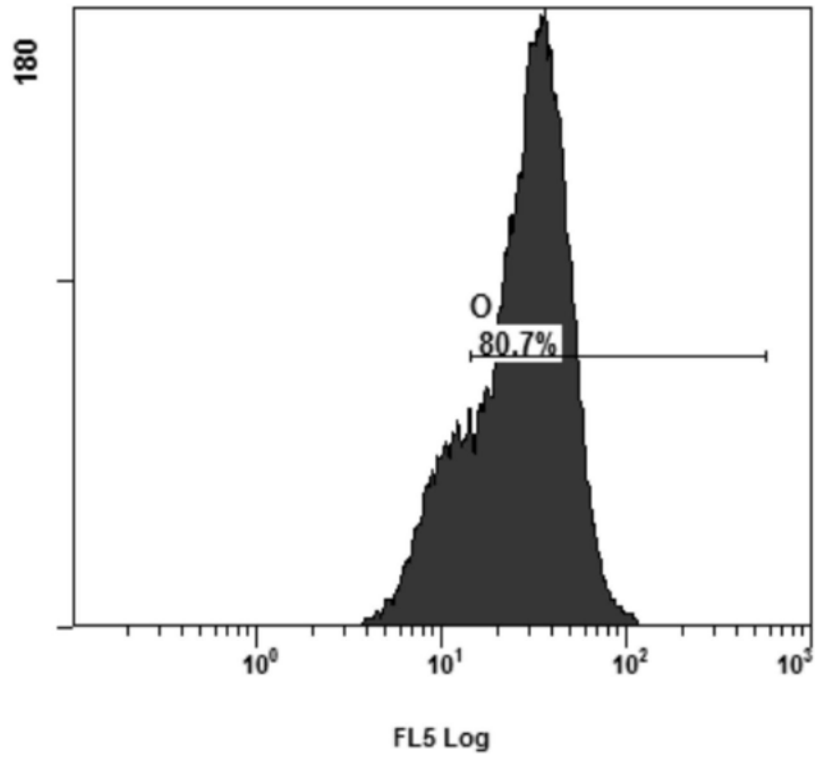


图3

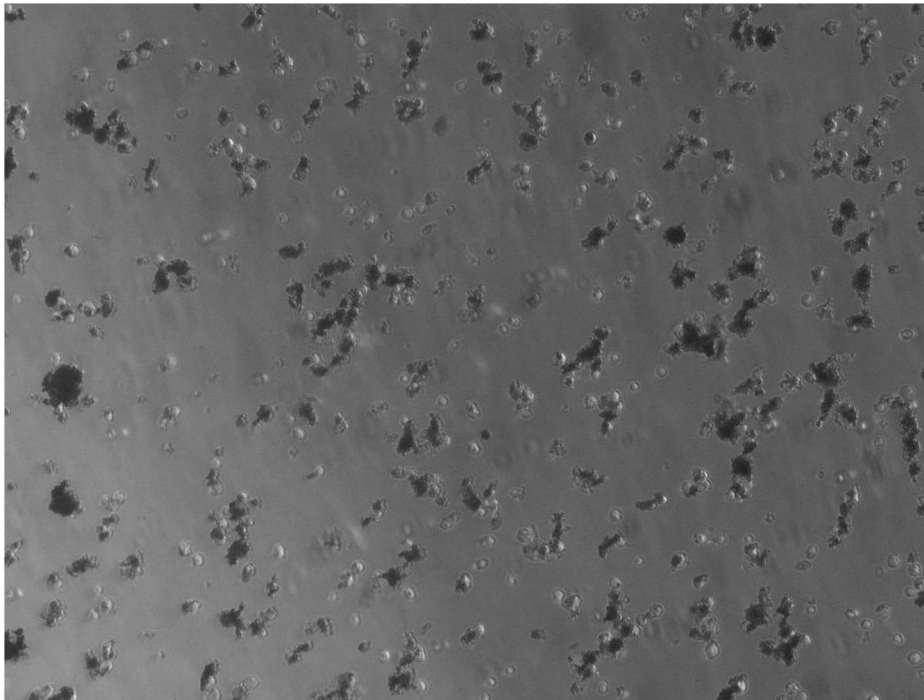


图4

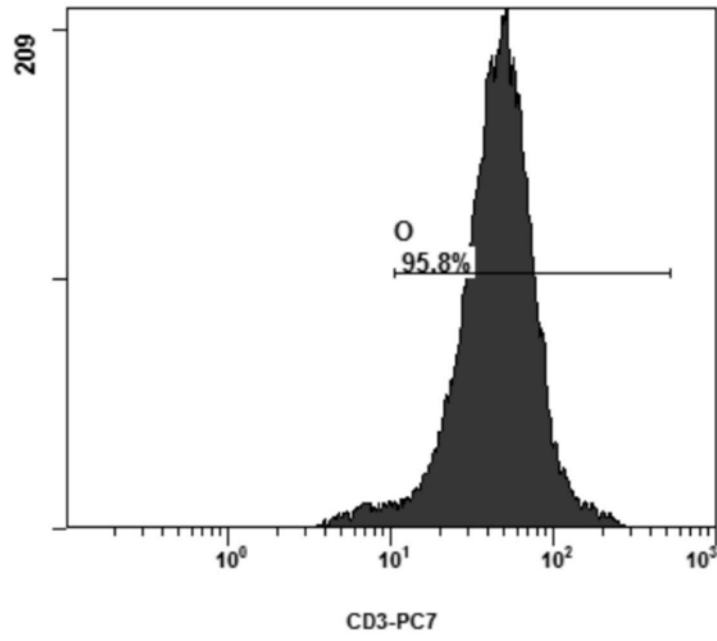


图5

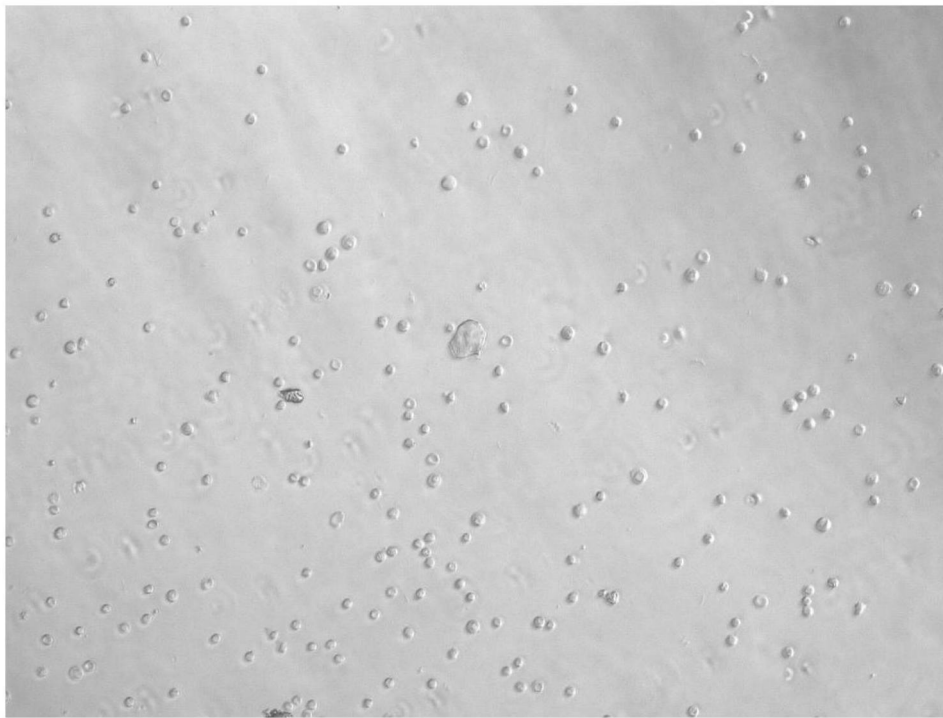


图6

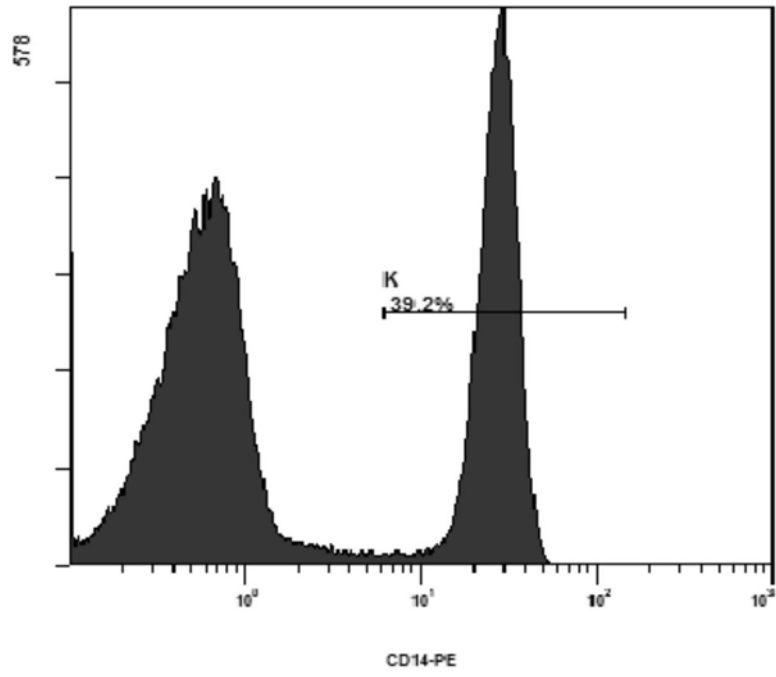


图7

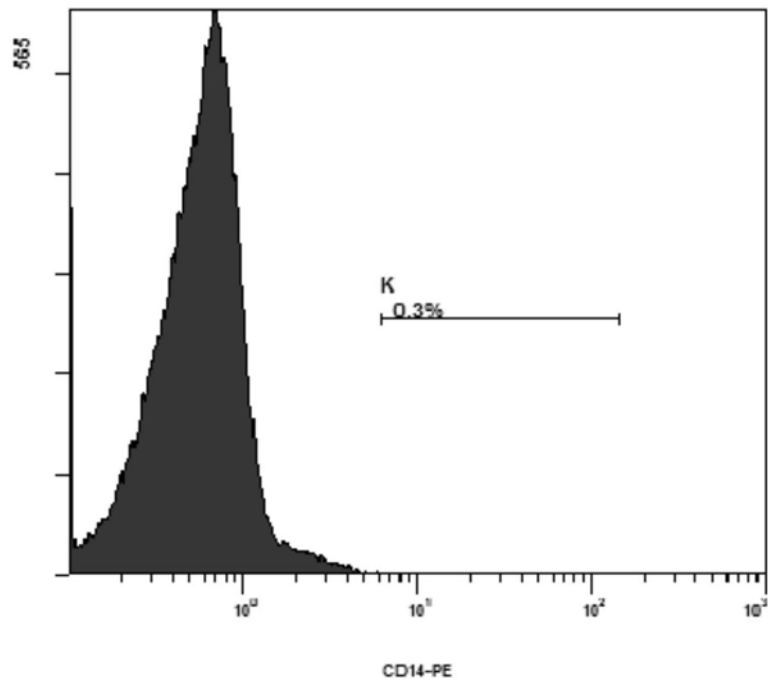


图8

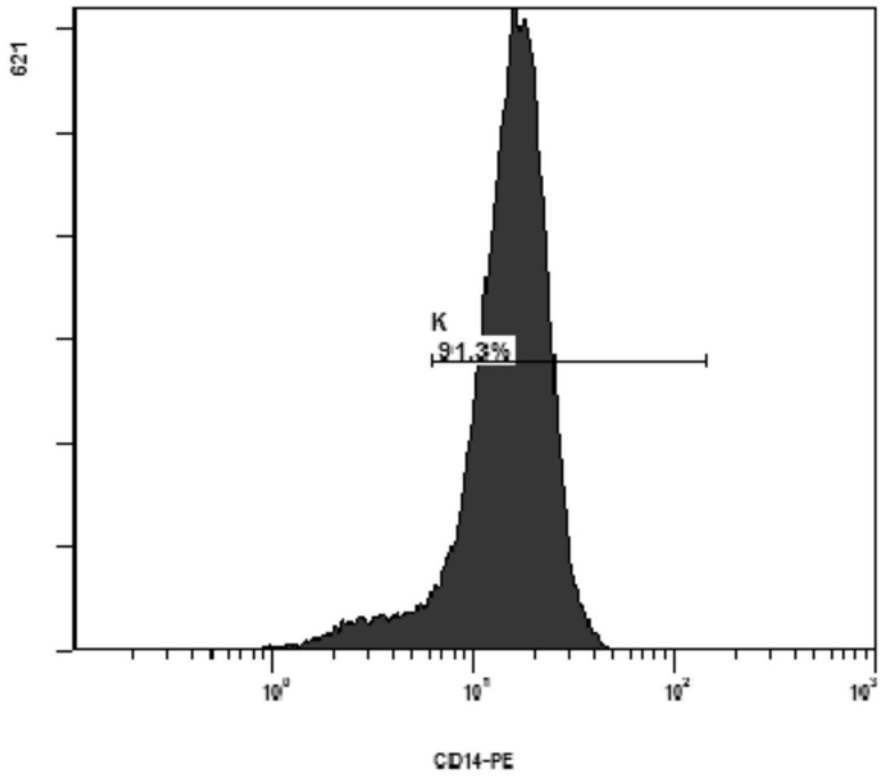


图9

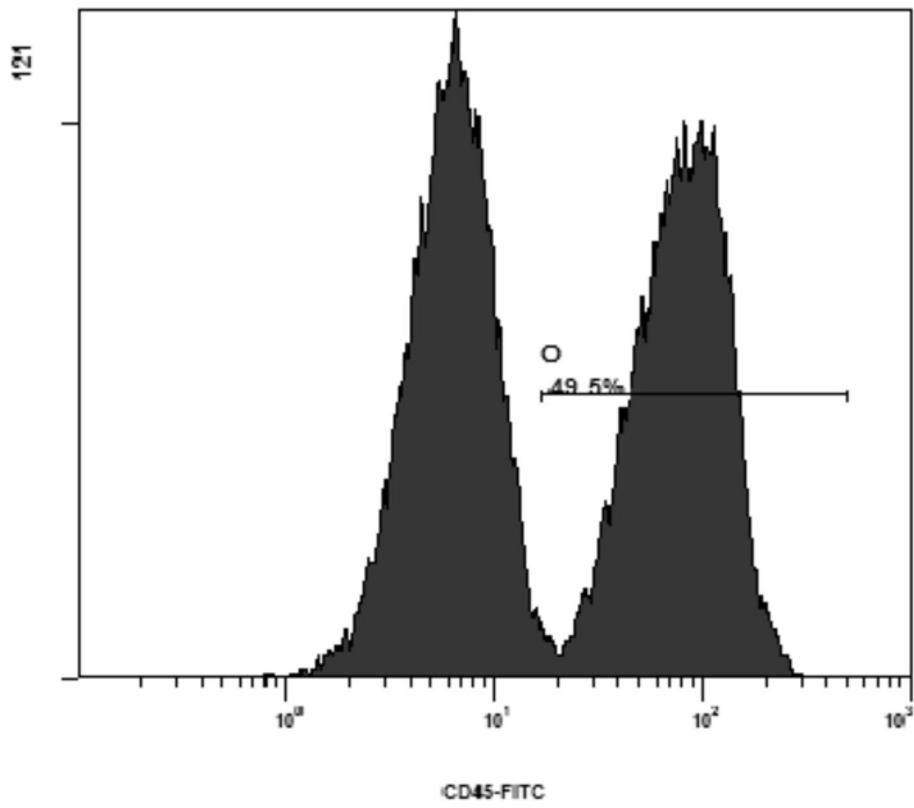


图10

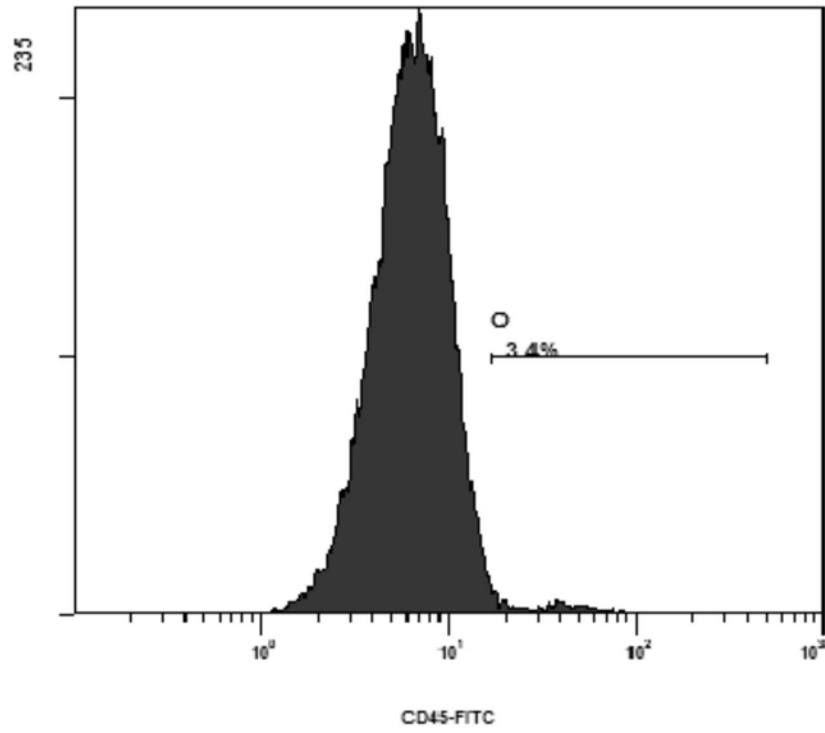


图11

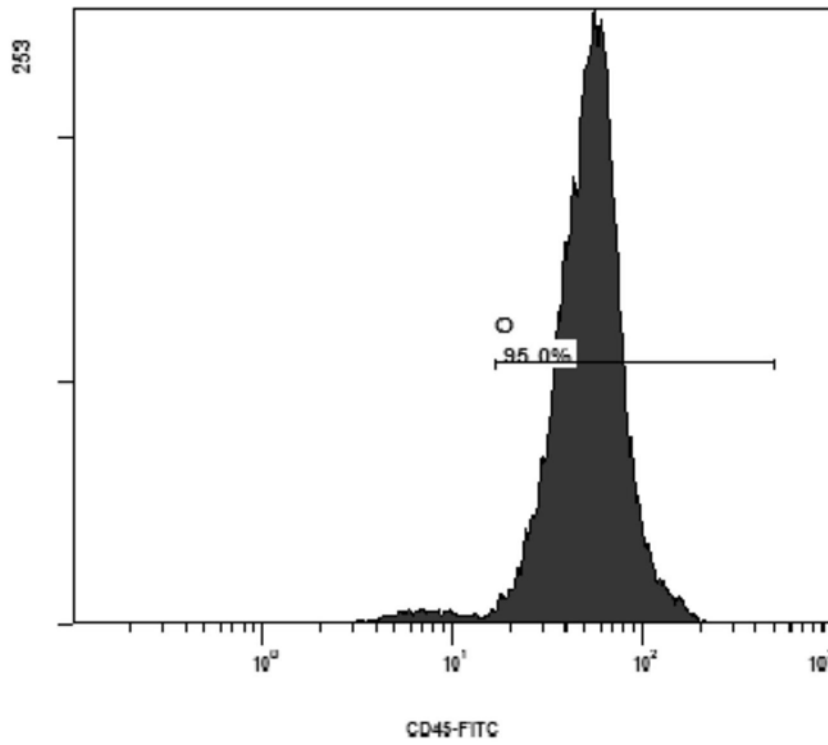


图12

专利名称(译)	一种分选人细胞的免疫磁珠、其制备及切除方法		
公开(公告)号	CN105087788B	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201510481064.2	申请日	2015-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	上海白泽医疗器械有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海白泽医疗器械有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海白泽医疗器械有限公司 上海细胞治疗工程技术研究中心集团有限公司		
[标]发明人	钱其军 陆元修 杨华 宋启平 李林芳 师传胤		
发明人	钱其军 陆元修 杨华 宋启平 李林芳 师传胤		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02		
CPC分类号	C12Q1/6804 C12Q2521/301		
代理人(译)	韦东		
审查员(译)	魏应亮		
其他公开文献	CN105087788A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种分选人细胞的免疫磁珠制备及切除方法。具体而言，本发明涉及一种磁珠-核酸-抗体复合物或含该磁珠-核酸-抗体复合物的试剂盒，所述复合物包含磁珠、共价偶联于磁珠上的核酸、以及与核酸共价偶联的抗体，其中，所述核酸包含至少一个酶切位点，且所述抗体能与待筛选细胞表面上的抗原特异性结合。本发明还包括所述磁珠-核酸-抗体复合物的用途及制备方法，以及使用所述磁珠-核酸-抗体复合物进行细胞分选的方法。

酶	时间 ¹ /min	回收细胞数	活细胞数 ²	死细胞数	细胞活性 ³
NotI	25	3.1×10^7	1.46×10^7	1.64×10^7	47.09%
SaII	18	3.1×10^7	1.61×10^7	1.49×10^7	51.93%
NotI+SaII	12	3.1×10^7	2.46×10^7	0.64×10^7	79.35%
核酸酶 (Dnase I)	9	3.1×10^7	2.88×10^7	0.22×10^7	92.90%