

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501110

(P2004-501110A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28	C07K 16/28 ZNA	4B063
A61K 35/12	A61K 35/12	4B065
A61P 35/00	A61P 35/00	4C087
A61P 37/04	A61P 37/04	4H045
C07K 7/06	C07K 7/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 171 頁) 最終頁に続く		

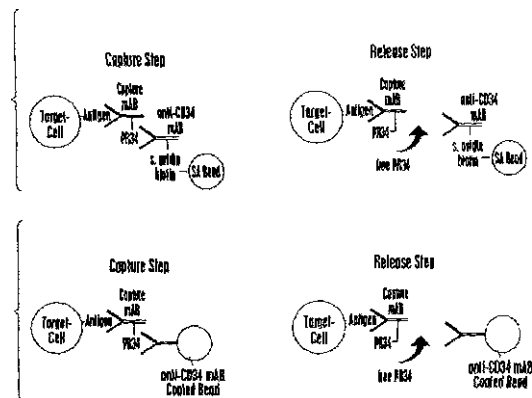
(21) 出願番号	特願2001-586964 (P2001-586964)	(71) 出願人	500375062
(86) (22) 出願日	平成13年5月23日 (2001.5.23)		ネクセル セラピューティックス インコーポレイティド
(85) 翻訳文提出日	平成14年11月25日 (2002.11.25)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 92618, アーバイン, パーカー 9
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/016840	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02001/090153		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成13年11月29日 (2001.11.29)	(74) 代理人	100108774
(31) 優先権主張番号	09/578, 784		弁理士 橋本 一憲
(32) 優先日	平成12年5月23日 (2000.5.23)	(72) 発明者	シュエファー アンドリュウ ティー.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラミラダ クリークサイド プレイス 16366
(31) 優先権主張番号	09/659, 469		
(32) 優先日	平成12年9月11日 (2000.9.11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞選択用試薬および使用方法

(57) 【要約】

本発明は、遊離型のペプチドをこのペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させることができる、ペプチドを含むペプチド-リガンド接合体を提供する。本発明はまた、細胞を選択する方法を提供する。本方法は、細胞集団をペプチド-リガンド接合体に接触させ、該接合体がペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させることができるペプチドに接合した集団中の細胞に特異的な第1のリガンドを含み、これにより細胞-接合体複合体を形成し、該ペプチド-リガンド接合体に第2のリガンドを接触させ、細胞-接合体複合体を単離することを含む。本方法は、さらに、遊離型のペプチドを加えて複合体から細胞を放出させる工程を含むことができる。本発明はまた、2つまたはそれ以上の特異的に単離された細胞を含む細胞の亜集団および細胞亜集団を単離する方法を提供する。本発明は、さらに、ペプチド-リガンド接合体を使用した病態の診断法を提供する。本発明は、さらに、ペプチドおよび抗体に特異的な抗体を離脱させることができるペプチドを含む細胞を単離するためのキットを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 のリガンドに接合したペプチドを含み、遊離型の前記ペプチドが該ペプチドに特異的な第 2 のリガンドを離脱させることができる、ペプチドーリガンド接合体。

【請求項 2】

第 1 のリガンドが細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する、請求項 1 記載のペプチドーリガンド接合体。

【請求項 3】

標的分子が細胞表面受容体である、請求項 2 記載のペプチドーリガンド接合体。

【請求項 4】

第 1 のリガンドが抗体である、請求項 1 記載のペプチドーリガンド接合体。

【請求項 5】

抗体が抗 CD 8 抗体または抗 CD 2 抗体である、請求項 4 記載のペプチドーリガンド接合体。

【請求項 6】

第 2 のリガンドが抗体である、請求項 1 記載のペプチドーリガンド接合体。

【請求項 7】

第 2 のリガンドが CD 3 4 に特異的に結合する、請求項 1 記載のペプチドーリガンド接合体。

【請求項 8】

第 2 のリガンドがモノクローナル抗体 9 C 5 である、請求項 7 記載のペプチドーリガンド接合体。

【請求項 9】

ペプチドが Q Q G W F P (配列番号 1) ; Q Q G W F P K D (配列番号 2) ; および Q Q G W F P K D C (配列番号 3) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 記載のペプチド接合体。

【請求項 10】

ペプチドがアシル化されている、請求項 9 記載のペプチドーリガンド接合体。

【請求項 11】

(a) 細胞集団をペプチドーリガンド接合体に接触させ、接合体がペプチドに特異的な第 2 のリガンドを離脱させることができるペプチドに接合した前記集団中の細胞に特異的な第 1 のリガンドを含み、それにより細胞ー接合体複合体を形成する工程と、
(b) ペプチドーリガンド接合体に第 2 のリガンドを接触させる工程と、
(c) 細胞ー接合体複合体を単離する工程とを含む、細胞を選択する方法。

【請求項 12】

(d) 細胞ー接合体複合体を遊離型のペプチドに接触させ、それにより該細胞ー接合体複合体から細胞を放出させる工程をさらに含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

第 1 のリガンドが細胞表面上の標的分子に特異的に結合する、請求項 11 記載の方法。

【請求項 14】

標的分子が細胞表面受容体である、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

第 1 のリガンドが抗体である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 16】

抗体が抗 CD 8 抗体または抗 CD 2 抗体である、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

第 2 のリガンドが抗体である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 18】

ペプチドが Q Q G W F P (配列番号 1) ; Q Q G W F P K D (配列番号 2) ; および Q Q G W F P K D C (配列番号 3) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1

10

20

30

40

50

1 記載の方法。

【請求項 19】

遊離型のペプチドがアミノ酸配列 Q Q G W F P（配列番号 1）または Q Q G W F P K D（配列番号 2）を含む、請求項 12 記載の方法。

【請求項 20】

ペプチドがアシル化されている、請求項 12 記載の方法。

【請求項 21】

第 2 のリガンドが C D 3 4 特異的抗体である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 22】

抗体が 9 C 5 である、請求項 21 記載の方法。

10

【請求項 23】

細胞が幹細胞である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 24】

幹細胞が血液産生幹細胞である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

血液産生幹細胞が造血幹細胞である、請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

幹細胞が間葉幹細胞、ニューロン幹細胞、または筋肉幹細胞である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 27】

20

細胞が樹状細胞である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 28】

細胞が T 細胞である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 29】

細胞が造血細胞である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 30】

細胞が C D 3 4 + 細胞である、請求項 28 記載の方法。

【請求項 31】

細胞が腫瘍細胞である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 32】

30

腫瘍細胞が、乳房、前立腺、結腸、肺、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、白血病、卵巣、膵臓、副腎、腎細胞癌、子宮頸部、肝臓、胃、および神経芽腫からなる群より選択される細胞である、請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

（a）細胞集団をペプチドーリガンド接合体に接触させ、接合体がペプチドに特異的な第 2 のリガンドを離脱させることができるペプチドに接合した前記集団中の細胞に特異的な第 1 のリガンドを含み、それにより細胞ー接合体複合体を形成する工程と、

（b）ペプチドーリガンド接合体に第 2 のリガンドを接触させる工程と、

（c）細胞ー接合体複合体を単離する工程とを含む、細胞集団からの細胞を濃縮する方法。

40

【請求項 34】

（d）細胞ー接合体複合体をペプチドに接触させ、それにより、細胞ー接合体複合体から細胞を放出させる工程をさらに含む、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

第 1 のリガンドが細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する、請求項 33 記載の方法。

【請求項 36】

標的分子が細胞表面受容体である、請求項 35 記載の方法。

【請求項 37】

第 1 のリガンドが抗体である、請求項 33 記載の方法。

【請求項 38】

50

抗体が抗 C D 8 抗体または抗 C D 2 抗体である、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 3 9】

第 2 のリガンドが抗体である、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 0】

ペプチドが Q Q G W F P (配列番号 1) ; Q Q G W F P K D (配列番号 2) ; および Q Q G W F P K D C (配列番号 3) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 1】

遊離型のペプチドがアミノ酸配列 Q Q G W F P (配列番号 1) または Q Q G W F P K D (配列番号 2) を含む、請求項 3 4 記載の方法。

10

【請求項 4 2】

ペプチドがアシル化されている、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 3】

第 2 のリガンドが C D 3 4 特異的抗体である、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 4】

抗体が 9 C 5 である、請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 5】

細胞が幹細胞である、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 6】

幹細胞が血液産生幹細胞である、請求項 4 5 記載の方法。

20

【請求項 4 7】

血液産生幹細胞が造血幹細胞である、請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

幹細胞が間葉幹細胞、ニューロン幹細胞、または筋肉幹細胞である、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 9】

細胞が樹状細胞である、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 5 0】

細胞が T 細胞、ナイーブ T 細胞、記憶 T 細胞、またはナチュラルキラー細胞である、請求項 3 3 記載の方法。

30

【請求項 5 1】

細胞が造血細胞である、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 5 2】

細胞が C D 3 4 + 細胞である、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 3】

細胞が腫瘍細胞である、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 5 4】

腫瘍細胞が、乳房、前立腺、結腸、肺、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、白血病、卵巣、膵臓、副腎、腎細胞癌、子宮頸部、肝臓、胃、および神経芽腫からなる群より選択される細胞である、請求項 5 3 記載の方法。

40

【請求項 5 5】

(a) 細胞集団を含む試料をペプチドーリガンド接合体に接触させ、接合体がペプチドに特異的な第 2 のリガンドを離脱させることができるペプチドに接合した前記集団中の細胞に特異的な第 1 のリガンドを含み、それにより細胞ー接合体複合体を形成する工程と、
(b) ペプチドーリガンド接合体に第 2 のリガンドを接触させる工程と、
(c) 細胞ー接合体複合体を単離する工程と、
(d) 複合体中の細胞を同定する工程とを含み、該細胞が病態に関連する、病態を診断する方法。

【請求項 5 6】

(e) 細胞ー接合体複合体をペプチドに接触させ、それにより細胞ー接合体複合体から細

50

胞を放出させる工程をさらに含む、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 5 7】

病態が癌である、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 5 8】

癌が、乳癌、前立腺癌、結腸、肺、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、白血病、卵巣、膵臓、副腎、腎細胞癌、子宮頸部、肝臓、胃、および神経芽腫からなる群より選択される、請求項 5 7 記載の方法。

【請求項 5 9】

第 1 のリガンドが細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 6 0】

第 1 のリガンドが抗体である、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 6 1】

第 2 のリガンドが抗体である、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 6 2】

ペプチドが Q Q G F P (配列番号 1) ; Q Q G W F P K D (配列番号 2) ; および Q Q G W F P K D C (配列番号 3) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 6 3】

遊離型のペプチドがアミノ酸配列 Q Q G W F P (配列番号 1) または Q Q G W F P K D (配列番号 2) を含む、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 6 4】

抗体が 9 C 5 である、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 6 5】

ペプチドおよび抗体に特異的な抗体を離脱させることができるペプチドを含む、細胞単離用キット。

【請求項 6 6】

ペプチドが標的分子に指向するリガンドに接合される、請求項 6 5 記載のキット。

【請求項 6 7】

ペプチドが Q Q G W F P (配列番号 1) ; Q Q G W F P K D (配列番号 2) ; および Q Q G W F P K D C (配列番号 3) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 6 5 記載のキット。

【請求項 6 8】

ペプチドがアミノ酸配列 Q Q G W F P K D C (配列番号 1) を含む、請求項 6 5 記載のキット。

【請求項 6 9】

ペプチドがアシル化される、請求項 6 7 記載のキット。

【請求項 7 0】

抗体が C D 3 4 に特異的に結合する、請求項 6 5 記載のキット。

【請求項 7 1】

抗体が 9 C 5 である、請求項 7 0 記載のキット。

【請求項 7 2】

細胞表面受容体に結合するリガンドに接合したペプチドを含むペプチド-リガンド接合体をさらに含む、請求項 6 5 記載のキット。

【請求項 7 3】

(a) 細胞集団をペプチド特異的リガンドに接触させ、細胞集団がペプチドに融合した細胞表面融合ポリペプチドを発現する細胞を含み、遊離型のペプチドが融合ポリペプチドに結合したペプチド特異的リガンドを離脱させることができ、それにより細胞-ペプチドリガンド複合体を形成する工程と、

(b) 細胞-ペプチドリガンド複合体を単離する工程とを含む、細胞を選択する方法。

【請求項 7 4】

10

20

30

40

50

(c) 細胞－ペプチドリガンド複合体を遊離型のペプチドに接触させ、それにより該細胞－ペプチドリガンド複合体から細胞を放出させる工程をさらに含む、請求項 7 3 記載の方法。

【請求項 7 5】

ACKQF (配列番号: 34); ASKQF (配列番号: 35); ACKRPP (配列番号: 36); ACKQFN (配列番号: 37); ACKQFDFC (配列番号: 38); ACKQFNNDV (配列番号: 39); ACKQFACKQF (配列番号: 40); ACKQFDFCNDH (配列番号: 41); ACKRPPVSLTCH (配列番号: 42); ACKQLHSVSGCR (配列番号: 43); ACKQFNNDVTCN (配列番号: 44); ACKQFDFCNDHWSK (配列番号: 45); ACKQFNNDVTCNKRH (配列番号: 46); ACKQFDFCNDHWSKSQH (配列番号: 47); ACKQFNNDVTCNAEGDD (配列番号: 48); KCHPNMSLKECH (配列番号: 49); RCRRPATTPACR (配列番号: 50); および RCRRPATTPACRACKQF (配列番号: 51)。

10

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 7 6】

(a) 細胞集団に、ペプチド－リガンド接合体を接触させ、接合体が集団中の第 1 の細胞に特異的な第 1 のリガンドを含み、第 1 のリガンドがペプチド特異的なリガンドを離脱させることができるペプチドに接合されており、それにより第 1 の細胞－接合体複合体を形成し、

20

細胞集団に、該集団中の第 2 の細胞に特異的な第 2 のリガンドと接触させ、それにより第 2 の細胞－第 2 のリガンド複合体が形成される工程と、

(b) ペプチド－リガンド接合体にペプチド特異的なリガンドを接触させる工程と、

(c) 第 1 の細胞－接合体複合体および第 2 の細胞－第 2 のリガンド複合体を単離する工程とを含む、細胞亜集団を選択する方法。

【請求項 7 7】

第 2 のリガンドがペプチド特異的なリガンドである、請求項 7 6 記載の方法。

30

【請求項 7 8】

(d) 第 1 の細胞－接合体複合体および第 2 の細胞－第 2 のリガンド複合体に遊離型のペプチドを接触させ、それにより該第 1 の細胞－接合体複合体から第 1 の細胞を放出させ、該第 2 の細胞－第 2 のリガンド接合体から第 2 の細胞を放出させる工程をさらに含む、請求項 7 7 記載の方法。

【請求項 7 9】

第 2 のリガンドがペプチドに接合されている、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 8 0】

(d) 第 1 の細胞－接合体複合体および第 2 の細胞－第 2 のリガンド複合体に遊離型のペプチドを接触させ、それにより該第 1 の細胞－接合体複合体から第 1 の細胞を放出させ、該第 2 の細胞－第 2 のリガンド接合体から第 2 の細胞を放出させる工程をさらに含む、請求項 7 9 記載の方法。

40

【請求項 8 1】

第 2 のリガンドが第 2 のペプチド特異的なリガンドを離脱させることができる第 2 のペプチドに接合している、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 8 2】

(d) 第 1 の細胞－接合体複合体に遊離型のペプチドを接触させ、第 2 の細胞－第 2 のリガンド複合体に遊離型の第 2 のペプチドを接触させ、それにより該第 1 の細胞－接合体複合体から第 1 の細胞を放出させ、該第 2 の細胞－第 2 のリガンド接合体から第 2 の細胞を放出させる工程をさらに含む、請求項 8 1 記載の方法。

50

【請求項 8 3】

第 1 のリガンドが第 1 の細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 8 4】

標的分子が細胞表面受容体である、請求項 8 3 記載の方法。

【請求項 8 5】

第 2 のリガンドが第 2 の細胞の表面上の標的分子に特異的に結合する、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 8 6】

標的分子が細胞表面受容体である、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 8 7】

第 1 および第 2 のリガンドが抗体である、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 8 8】

抗体が抗 C D 8 抗体または抗 C D 2 抗体である、請求項 8 7 記載の方法。

【請求項 8 9】

ペプチド特異的リガンドが抗体である、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 9 0】

ペプチドが Q Q G W F P (配列番号 1) ; Q Q G W F P K D (配列番号 2) ; および Q Q G W F P K D C (配列番号 3) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 9 1】

遊離型のペプチドがアミノ酸配列 Q Q G W F P (配列番号 1) または Q Q G W F P K D (配列番号 2) を含む、請求項 8 0 記載の方法。

【請求項 9 2】

ペプチドがアシル化される、請求項 9 1 記載の方法。

【請求項 9 3】

ペプチド特異的リガンドが C D 3 4 特異的抗体である、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 9 4】

抗体が 9 C 5 である、請求項 9 3 記載の方法。

【請求項 9 5】

第 1 および第 2 の細胞が幹細胞である、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 9 6】

幹細胞が血液産生幹細胞である、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 9 7】

血液産生幹細胞が造血幹細胞である、請求項 9 6 記載の方法。

【請求項 9 8】

幹細胞が間葉幹細胞、ニューロン幹細胞、または筋肉幹細胞である、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 9 9】

第 1 および第 2 の細胞が樹状細胞である、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 1 0 0】

細胞が T 細胞である、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 1 0 1】

細胞が造血細胞である、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 1 0 2】

細胞が C D 3 4 + 細胞である、請求項 1 0 0 記載の方法。

【請求項 1 0 3】

細胞が腫瘍細胞である、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 1 0 4】

腫瘍細胞が、乳房、前立腺、結腸、肺、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、白血病、卵巣、膵臓

10

20

30

40

50

、副腎、腎細胞癌、子宮頸部、肝臓、胃、および神経芽腫からなる群より選択される細胞である、請求項 103 記載の方法。

【請求項 105】

(a) 細胞集団にペプチド-リガンド接合体を接触させ、接合体がペプチド特異的リガンドを離脱させることができるペプチドに接合した集団中の第 1 の細胞に特異的な第 1 のリガンドを含み、ペプチド特異的リガンドが該集団中の第 2 の細胞に結合し、それにより細胞-接合体複合体を形成する工程と、

(b) ペプチド-リガンド接合体にペプチド特異的リガンドを接触させる工程と、

(c) 細胞集団に第 2 の細胞に特異的な第 2 のリガンドを接触させ、第 2 のリガンドがペプチドによって離脱されず、該ペプチド特異的リガンドと別の部位に結合する工程と、

(d) 細胞-接合体複合体を単離する工程とを含む、細胞を選択する方法。

10

【請求項 106】

(d) 細胞-接合体複合体に遊離型のペプチドを接触させ、それにより該細胞-接合体複合体から第 1 の細胞を放出させる工程をさらに含む、請求項 105 記載の方法。

【請求項 107】

C D 3 4 細胞および少なくとも 1 つの他の特異的に単離された細胞型を含む、実質的に純粋な細胞亜集団。

【請求項 108】

他の特異的に単離された細胞型が、間葉細胞、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞、および増強細胞からなる群より選択される、請求項 107 記載の実質的に純粋な細胞亜集団。

20

【請求項 109】

請求項 107 記載の実質的に純粋な細胞亜集団を投与することを含む、個体の病態を治療する方法。

【請求項 110】

病態が移植である、請求項 109 記載の方法。

【請求項 111】

病態が癌または免疫抑制である、請求項 109 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

30

発明の背景

本発明は、一般に、細胞を陽性選択する方法、より詳細には、集団から細胞を陽性選択する方法に関する。

【0002】

希少な細胞型の高純度の単離には、細胞生物学の研究に不可欠であり、分子医学における適用に重要である。細胞関連疾患の診断には、たとえ細胞が希少であっても各細胞の検出、単離、および分析するための方法を必要とする。

【0003】

細胞に基づく治療は、血液および骨髄などの不均一な細胞集団からの 1 つまたはそれ以上の特異的細胞表現型の選択をも含み得る。例えば、特異的細胞型の単離は、治療遺伝子を細胞に導入し、その結果患者に導入して治療遺伝子または治療タンパク質を送達させる遺伝子治療への適用に有用である。単離幹細胞は、免疫無防備状態の患者への移植のための治療としても使用されている。幹細胞移植は、特に、治療中に損傷した免疫系組織を補償するための高用量化学療法を受けている癌患者に有用である。

40

【0004】

細胞選択技術は、一般に、大きく 2 つのカテゴリー（陰性細胞選択および陽性細胞選択）に分類される。陰性細胞選択は、集団からの選択した細胞表現型の除去を含む。陽性細胞選択は、より大きい不均一集団からの特異的細胞表現型の選択または単離を含む。

【0005】

特定の細胞型に特異的な抗体の使用が陽性細胞選択に適用されている。細胞特異的抗体を

50

使用して細胞集団から特定の細胞を有効に単離することができる一方で、さらなる使用のための結合細胞の放出は、特に細胞の生存度の維持において問題となり得る。ビーズに結合させた抗体に結合した細胞を放出する手法には、例えば、pHおよび温度の変更、還元剤および／またはキレート剤の使用、およびプロテアーゼの使用が含まれる。しかし、これらの各手法は、細胞生存度の維持または治療に適用するためのその有用性の維持に関して不利である。例えば、細胞表面に結合する抗体は、細胞の生理学の変化を誘導し得る（ベラルディー（B e r a r d i . ）ら、S c i e n c e、267、104-108（1995））。

【0006】

細胞の陽性選択に有用な1つの方法は、特定の細胞および離脱ペプチドに特異的な抗体を使用する（1999年10月19日刊行の米国特許第5,968,753号）。この方法は、抗体に特異的に結合している細胞をペプチドで離脱して遊離の結合抗体である細胞を放出させることができるという点で有利である。しかし、このような方法は、所与の細胞に特異的な各抗体を予め結合した抗体-細胞複合体を離脱させるように機能するペプチドをスクリーニングすることが必要である。したがって、この方法は、各細胞型に特異的な抗体の同定および抗体に結合した細胞を離脱させることができるペプチドのスクリーニングを必要とする。 10

【0007】

したがって、細胞を陽性選択する一方で細胞の生存度および治療に有用である方法、さらに、種々の細胞型の陽性選択に普遍的に適用することができる方法の必要性がある。本発明は、この必要性を満たし、さらにそれに関連する利点も提供する。 20

【0008】

発明の概要

本発明によれば、遊離型のペプチドがペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させることができる、ペプチドを含むペプチド-リガンド接合体が得られる。ペプチド-リガンド接合体を、特定の細胞の陽性選択を行うために種々の細胞型に有利に適用することができる。ペプチド-リガンド接合体は、ペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させる能力に基づいて、種々の異なる細胞型に特異性を有する種々のリガンドに接合することができるペプチドを使用し、このようにして予め結合させたりリガンド-細胞複合体を離脱させるように機能することができるペプチドについて各々が細胞特異的なリガンドをスクリーニングする必要性をなくす。ペプチドが接合するリガンドは、標的分子（例えば、細胞表面受容体などの細胞表面上で発現する標的分子）に特異的に結合する抗体などの分子であり得る。 30

【0009】

本発明はまた、細胞を選択する方法を提供する。この方法は、細胞集団をペプチド-リガンド接合体に接触させ、該接合体がペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させることができるペプチドに接合した該集団中の細胞に特異的な第1のリガンドを含み、それにより細胞-接合体複合体を形成する工程と；該ペプチド-リガンド接合体に該第2のリガンドを接触させる工程と；該細胞-接合体複合体を単離する工程とを含む。本発明の方法は、該細胞-接合体複合体を遊離型の該ペプチドに接触させ、それにより該細胞-接合体複合体から該細胞を放出させる工程をさらに含むことができる。本発明は、さらに、ペプチド-リガンド接合体を使用して集団由来の細胞を濃縮する方法を提供する。 40

【0010】

本発明は、さらに、細胞亜集団を選択する方法を提供する。この方法は、細胞集団に、ペプチド-リガンド接合体を接触させ、該接合体が該集団中の第1の細胞に特異的な第1のリガンドを含み、該第1のリガンドがペプチド特異的なリガンドを離脱させることができるペプチドに接合されており、それにより第1の細胞-接合体複合体が形成され；該集団中の第2の細胞に特異的な第2のリガンドと接触させ、それにより第2の細胞-第2のリガンド複合体を形成する工程と；ペプチド-リガンド接合体に該ペプチド特異的なリガンドを接触させる工程と；該第1の細胞-接合体複合体および該第2の細胞-第2のリガンド複 50

合体を単離する工程とを含む。本発明はまた、細胞亜集団の組成物を提供する。

【0011】

本発明は、さらに、病態を診断する方法を提供する。この方法は、細胞集団を含む試料をペプチドーリガンド接合体に接触させ、該接合体がペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させることができるペプチドに接合した該集団中の細胞に特異的な第1のリガンドを含み、それにより細胞ー接合体複合体を形成する工程と；該ペプチドーリガンド接合体に該第2のリガンドを接触させる工程と；該細胞ー接合体複合体を単離する工程と；該複合体中の該細胞を同定し、該細胞が病態に関連する工程とを含む。

【0012】

本発明は、さらに、細胞を単離するためのキットを提供する。このキットは、ペプチドおよび抗体に特異的な抗体を離脱させることができるペプチドを含む。本発明のキットを使用して、細胞に結合する任意の所望のリガンドにペプチド特異的な抗体を離脱させることができるペプチドを結合させることができる。

【0013】

発明の詳細な説明

本発明によれば、遊離型のペプチドがペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させることができる、第1のリガンドに接合したペプチドを含むペプチドーリガンド接合体が提供される。

【0014】

本明細書中で使用されるように、「ペプチドーリガンド接合体」という用語は、リガンドに共有架橋結合した少なくとも1つのペプチドを含む分子を意味する。ペプチドーリガンド接合体は、リガンドのその結合パートナーへの結合が検出可能であるように元のリガンドのリガンド結合活性を全部または一部保持している。ペプチドーリガンド接合体を、本明細書中で開示される種々の化学的架橋剤を使用してペプチドとリガンドとを結合することによって作製することができる。

【0015】

本発明のペプチドーリガンド接合体は、リガンドに共有結合した複数コピーのペプチド（例えば、2コピーまたはそれ以上、3コピーまたはそれ以上、4コピーまたはそれ以上、5コピーまたはそれ以上、6コピーまたはそれ以上、7コピーまたはそれ以上、8コピーまたはそれ以上、9コピーまたはそれ以上、10コピーまたはそれ以上、11コピーまたはそれ以上、12コピーまたはそれ以上、13コピーまたはそれ以上、14コピーまたはそれ以上、15コピーまたはそれ以上、16コピーまたはそれ以上、17コピーまたはそれ以上、18コピーまたはそれ以上、19コピーまたはそれ以上、または20コピーまたはそれ以上のペプチド）を含むことができる。本発明のペプチドーリガンド接合体はまた、25コピーまたはそれ以上、30コピーまたはそれ以上、35コピーまたはそれ以上、40コピーまたはそれ以上、45コピーまたはそれ以上、50コピーまたはそれ以上、75コピーまたはそれ以上、さらに100コピーまたはそれ以上のペプチドを含むことができる。リガンドがその結合パートナーの特異的結合活性を保持する限り、任意のコピー数のペプチドをリガンドに接合することができることが理解される。当業者は、リガンドへの種々の量のペプチドの結合および集団から細胞を単離する方法のために至適化したペプチドの数または範囲の決定によって本発明のペプチドーリガンド接合体を容易に至適化することができる。本明細書中で使用されるように、「ペプチドーリガンド接合体」という用語は、ペプチドがペプチド結合を介してリガンドに直線状に結合して1つの直鎖ポリペプチドを形成する融合ポリペプチドを特異的に排除する。

【0016】

本明細書中で使用されるように、「ペプチド」または「ポリペプチド」という用語は、2つまたはそれ以上のアミノ酸のペプチドまたはポリペプチドを意味する。「ポリペプチド類似体」という用語には、1つまたはそれ以上の残基が機能的に類似の残基と保存的に置換され、親ペプチドからリガンドを離脱させる能力を示す、特に本明細書中記載の配列に実質的に同一のアミノ酸配列を含む任意のポリペプチドが含まれる。コードされたアミノ

酸の保存的置換には、例えば、以下の群内に属するアミノ酸が含まれる：（１）非極性アミノ酸（G l y、A l a、V a l、L e u、およびI l e）；（２）極性中性アミノ酸（C y s、M e t、S e r、T h r、A s n、およびG l n）；（３）極性酸性アミノ酸（A s pおよびG l u）；（４）極性塩基性アミノ酸（L y s、A r g、およびH i s）；および（５）芳香族アミノ酸（P h e、T r p、T y r、およびH i s）。ペプチドがペプチドに特異的なリガンドを離脱させる部分的またはすべての能力を保持している限り、他のわずかな改変は本発明のペプチドの範囲内に含まれる。

【0017】

本発明のペプチドのアミノ酸長は、約２個またはそれ以上、約３個またはそれ以上、約４個またはそれ以上、約５個またはそれ以上、約６個またはそれ以上、約７個またはそれ以上、約８個またはそれ以上、約９個またはそれ以上、または約１０個またはそれ以上のアミノ酸の範囲であり得る。ある種の態様では、アミノ酸長は、例えば、約１１個またはそれ以上、約１２個またはそれ以上、約１３個またはそれ以上、約１４個またはそれ以上、約１５個またはそれ以上、約１６個またはそれ以上、約１７個またはそれ以上、約１８個またはそれ以上、約１９個またはそれ以上、約２０個またはそれ以上、約２１個またはそれ以上、約２２個またはそれ以上、約２３個またはそれ以上、約２４個またはそれ以上、約２５個またはそれ以上、約２６個またはそれ以上、約２７個またはそれ以上、約２８個またはそれ以上、約２９個またはそれ以上、約３０個またはそれ以上のアミノ酸を含む。本発明のペプチドはまた、例えば、約３２個またはそれ以上、約３５個またはそれ以上、約３８個またはそれ以上、約４０個またはそれ以上、約４５個またはそれ以上、約５０個またはそれ以上、約５５個またはそれ以上、約６０個またはそれ以上、約６５個またはそれ以上、約７０個またはそれ以上、約７５個またはそれ以上、約８０個またはそれ以上、約９０個またはそれ以上、または、約１００個またはそれ以上のアミノ酸のアミノ酸長を含む。

【0018】

ペプチドまたはポリペプチドの改変には、このようなペプチドがペプチドに特異的なリガンドを離脱させる能力を示す場合、その誘導体、類似体、および機能的模倣体も含み得る。例えば、誘導体には、アルキル化、アシル化、カルバミル化、ヨウ素化などのペプチドの化学修飾、またはペプチドを誘導化する任意の改変を含み得る。このような誘導化分子には、例えば、遊離アミノ基が誘導体化されて塩酸アミン、p-トルエンシルホニル基、カルボベンズオキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基、またはホルミル基を形成する分子が含まれる。遊離カルボキシ基を誘導体化して、塩、メチル、およびエチルエステルもしくはエステルの他の型またはヒドラジドを形成することができる。遊離水酸基を誘導体化して、O-アシルまたはO-アルキル誘導体を形成することができる。ヒスチジンのイミダゾール窒素を誘導体化してN-im-ベンジルヒスチジンを形成することができる。１つまたはそれ以上の天然に存在する２０個の標準的なアミノ酸のアミノ酸誘導体（例えば、４-ヒドロキシプロリン、５-ヒドロキシリジン、３-メチルヒスチジン、ホモセリン、オルニチン、またはカルボキシグルタミン酸）を含むペプチドもまた誘導体または類似体に含まれ、ペプチド結合によって結合されていないアミノ酸も含めることができる。このようなペプチド誘導体を、ペプチド合成の際に組み込むことができるか、ペプチドを周知の化学修飾法によって改変することができる（例えば、グレイザー（G l a z e r）ら、「タンパク質の化学修飾：方法および分析手順の選択（C h e m i c a l

M o d i f i c a t i o n o f P r o t e i n s . S e l e c t e d M e t h o d s a n d A n a l y t i c a l P r o c e d u r e）」、Elsevier Biomedical Press、New York（１９７５）を参照のこと）。

【0019】

合成直鎖ペプチドの類似体を、構造を環状形態への化学的に変換することによって作製することができる。直鎖ペプチドの環状化は、標的タンパク質への結合能力の増減によって生物活性を調整することができる（ペルトン・ジェイ・ティー（P e l t o n ,

10

20

30

40

50

J. T.) ら、Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.、82: 236-239)。直鎖ペプチドは非常に柔軟性があり、溶液中で多数の異なる高次構造をとる傾向がある。環状化は、使用可能な高次構造の数を制約するように作用するので、ペプチドのより活性または不活性な構造を好む。合成ペプチドの免疫原性は、実験で認められた溶液中の高次構造の優先度に相関していた (ダイソン・エイチ (Dyson, H.) ら、1988、Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry、17: 305-324)。免疫原性の相違は、環状ペプチドの特異的抗体の結合親和性の相違を示し得る。

【0020】

遊離のN末端とC末端との間のペプチド結合の形成 (ホモデティック (homodetic) シクロペプチド) またはアミノ酸骨格および／またはN末端またはC末端付近に位置する側鎖基の間の新規の共有結合の形成 (ヘテロデティック (heterodetic) シクロペプチド) によって直鎖ペプチドの環状化を行う (ボダンスズキー・エム (Bodanszky, M.)、「ペプチド合成の原理 (Principles of Peptide Synthesis)」、Springer-Verlag (1984))。後者の環状化は、別の化学ストラテジーを使用して、共有結合 (例えば、ジスルフィド、ラクトン、エーテル、またはチオエーテル) を形成させる。一般に、5つを超える残基の直鎖ペプチドを比較的容易に環状化することができる。中心の4つの残基中のβ-ターン構造を形成するためのペプチドの性質は、ホモデティックシクロペプチドまたはヘテロデティックシクロペプチドの形成を容易にする。N末端またはC末端のプロリンまたはグリシン残基の存在はまた、特に6残基長よりも短い直鎖ペプチドからのシクロペプチドの形成を容易にする。

【0021】

本発明のペプチドの改変体には、その機能的模倣体が含まれる。模倣体は、ペプチドに特異的なリガンドを離脱させるペプチド機能を模倣する化学的部分を含む化学物質を含む。例えば、ペプチドが機能的活性を有する2つの荷電化学的部分を含む場合、模倣体には空間的方向の2つの荷電化学的構造が配置され、荷電化学機能が三次元空間で維持されるような構造に制限されている。したがって、本発明のペプチドのペプチドに特異的なリガンドを離脱させる機能を提供する官能基に配向している模倣体は、本発明のペプチドの意味の範囲内に含まれる。ペプチドがペプチドに特異的なリガンドを離脱させる能力を保持している限り、これらの改変は「ペプチド」または「ポリペプチド」という用語の範囲内に含まれる。

【0022】

本明細書中で使用されるように、「リガンド」という用語は、分子に選択的に結合することができる分子を意味する。この用語は、選択的に、リガンドとその結合パートナーとの間の結合相互作用が定量アッセイ法による非特異的相互作用に対して検出可能であることを意味する。リガンドは、本質的に、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質、または任意の有機由来化合物などの任意の型の分子であり得る。さらに、誘導体、類似体、および模倣化合物もまた、この用語の定義の範囲内に含まれることが意図される。1つの態様では、本発明のリガンドは、抗体であり得る。

【0023】

本明細書中で使用されるように、「離脱させることができる」という語句は、ペプチドを参照して使用する場合、ペプチドのリガンドとその結合パートナーとのあらかじめ形成された複合体を破壊する能力を意味する。あらかじめ形成された複合体の分解により、複合体からリガンドを離脱できる。あらかじめ形成された複合体の例は、ペプチド-リガンド接合体とペプチドに特異的な第2のリガンドとの複合体である。このような場合、ペプチドに特異的なリガンドを離脱させることができるペプチドは、第2のリガンドと予め結合したペプチド-リガンド接合体を離脱させることができ、それにより、ペプチド-リガンド接合体を第2のリガンドから放出することができる。リガンドを離脱させることができ

10

20

30

40

50

るペプチドに特異的なリガンドは、例えば、抗体であり得る。

【0024】

本明細書中で使用されるように、「遊離型のペプチド」という用語は、リガンドに接合されていないペプチドを意味する。遊離型のペプチドは、リガンドに接合したペプチドと同一であり得る。または、遊離型のペプチドがペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させる能力を有する限り、遊離型のペプチドをリガンドに接合したペプチドの改変体であり得る。本発明の方法では、遊離型のペプチドは、ペプチド-リガンド接合体とペプチドに特異的な第2のリガンドとあらかじめ形成された複合体を離脱させることができる。

【0025】

当業者は、ペプチド-リガンド接合体とペプチドに特異的な第2のリガンドとあらかじめ形成された複合体の離脱に十分な遊離型のペプチドの量を容易に決定することができる。遊離ペプチドは、本発明の方法での使用に十分な量のあらかじめ形成された複合体を離脱させ、遊離ペプチドは全てのあらかじめ形成された複合体を離脱させる必要はないことが理解される。複合体を離脱するために使用される遊離ペプチドの量を、あらかじめ形成された複合体の離脱を至適化するペプチドの量を決定するための複合体に対するペプチドの比の変化によって至適化することができる。例えば、細胞がペプチド-リガンド接合体に結合し、その結果ペプチドに特異的な第2のリガンドに結合し、その結果ビーズなどの固体支持体に結合するあらかじめ形成された複合体を、ビーズに結合した複合体と種々の量の遊離ペプチドとのインキュベーションおよびあらかじめ形成された複合体離脱を至適にする遊離ペプチドの量の決定によって遊離ペプチドの至適量について試験することができる。したがって、ペプチドとビーズの比率の変化を使用して、離脱のための遊離ペプチドの至適使用量を決定することができる。

【0026】

リガンドを離脱させることができるペプチドに特異的なリガンドは、ペプチド特異的なリガンドともいい、一般に、ペプチドに対して約 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \sim 1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する。ペプチド特異的なリガンドを使用して、細胞が遊離型のペプチドによって放出される方法で標的細胞を捕獲することができる。あらかじめ形成された複合体離脱ペプチドにおける有効性は、複合体中のリガンドに対するペプチドの親和性の関数である。一般に、このようなリガンドを離脱させることができるペプチドのオン速度 (k_{on}) は速く、予め結合した複合体が解離した場合ペプチドはより有効に結合する。本発明で特に有用なペプチドは、リガンドに対する親和性が高く、一般に比較的小さい。

【0027】

ペプチドに特異的なリガンドを離脱させることができるペプチドの例には、本明細書中に開示されている以下：

QQGWFP (配列番号: 1); QQGWFPKD (配列番号:

2); および QQGWFPKDC (配列番号: 3),

が含まれる。本発明で有用なリガンドを離脱させることができる任意のペプチドを、アミノ末端でアセチル化され、カルボキシル末端でアミド化されるように改変することができる。

【0028】

さらなるペプチドの例には、例えば、ATCC HB 11646によって産生された9069抗体を離脱させるペプチドが含まれる(例えば、米国特許第5,968,753号を参照のこと)。このようなペプチドには、QQGFFP (配列番号4)、TQGTFS (配列番号5)、NQGYFP (配列番号6)が含まれる。他には、QG₁X₁F (配列番号52)およびX₂QG₁X₁FX₃ (配列番号53) (式中、X₁ = W、Y、S、F、またはT; X₂ = Q、N、T、またはS; およびX₃ = P、W、またはS)が含まれる。

【0029】

9069抗体を離脱させるさらなるペプチドには、以下が含まれる：

10

20

30

40

Q G X F (配列番号: 54); J₁ Q G X F J₂
 (配列番号: 55); X Q G X F X (配列番号: 56); J₁ X Q G X F X
 J₂ (配列番号: 57); J₁ Q Q G W F P J₂ (配列番号: 7); J₁ T Q
 G S F W J₂ (配列番号: 8); J₁ Q Q G W F P K D J₂ (配列番号:
 9); J₁ Q Q G W F P D K J₂ (配列番号: 10); J₁ A D G A X
 Q G X F X G A K D J₂ (配列番号: 11); J₁ A D G A Q Q G W F
 P G A K D J₂ (配列番号: 12); J₁ A D G A T Q G S F W G A K
 D J₂ (配列番号: 13); J₁ N S S V Q S J₂ (配列番号: 14); J₁ A
 D G A L I S Q V S G A K D J₂ (配列番号: 15); J₁ L I S Q V
 S J₂ (配列番号: 16); J₁ N S S V X X J₂ (配列番号: 17); J₁ N
 S S V G L J₂ (配列番号: 18); J₁ T G Q A S T J₂ (配列番号:
 19); J₁ A D G A P F W G Q Q G A K D J₂ (配列番号: 20);
 J₁ A D G A T Q G T F S G A K D J₂ (配列番号: 21); J₁ P E L
 P T Q G T F S N V S K E J₂ (配列番号: 22); J₁ A D G A T Q
 G I C L G A K D J₂ (配列番号: 23); J₁ E V K L T Q G I C L
 E Q N K T J₂ (配列番号: 24) and J₁ A D G A N Q G Y F P G A
 K D J₂ (配列番号: 25),

10

20

式中、J₁ および J₂ は、0～6個のアミノ酸残基からなる群より選択され、Xは任意のアミノ酸である。J₁ および J₂ は、水溶液中のペプチドの溶解性を助けるために親水性、極性、または電荷アミノ酸残基を含む。親水性、極性、または電荷アミノ酸の例は、G、S、T、C、Y、N、Q、D、E、H、K、およびRである。

【0030】

A T C C H B - 1 1 8 8 5 と命名された A T C C に寄託されているハイブリドーマによって産生された 9 0 7 9 と呼ばれる抗 C D 3 4 抗体によって結合した細胞を放出することができるペプチドの例には、以下が含まれる。

PGSPLGKD (配列番号:

30

26); YSRLGFKD (配列番号: 27); QYTQPKD (配列番号: 28);

NLQGEFKD (配列番号: 29); RSFYIRD (配列番号: 30); IQEFGVKD

(配列番号: 31); SFRVGKYD (配列番号: 32); KDVYSLWPKD

(配列番号: 33)。

【0031】

細胞への抗 C D 2 抗体 B - E 2 の結合を競合するペプチドの例には、以下が含まれる。

ACKQF (配列番号: 34);
 ASKQF (配列番号: 35); ACKRPP (配列番号: 36);
 ACKQFN (配列番号: 37); ACKQFDFC (配列番号: 38); ACKQFNNDV
 (配列番号: 39); ACKQFACKQF (配列番号: 40); ACKQFDFCNDH
 (配列番号: 41); ACKRPPVSLTCH (配列番号: 42); ACKQLHSVSGCR
 (配列番号: 43); ACKQFNNDVTCN (配列番号: 44);
 ACKQFDFCNDHWSK (配列番号: 45); ACKQFNNDVTCNKRH (配列番号:
 46); ACKQFDFCNDHWSKSKH (配列番号: 47);
 ACKQFNNDVTCNAEGDD (配列番号: 48); KCHPNMSLKECH (配列番号:
 49); RCRRPATTPACR (配列番号: 50);
 RCRRPATTPACRACKQF (配列番号: 51)

10

(実施例 V I を参照のこと)

【0032】

本発明はまた、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。

ACKQF (配列番号: 34); ASKQF (配列番号: 35);
 ACKRPP (配列番号: 36); ACKQFN (配列番号: 37); ACKQFDFC
 (配列番号: 38); ACKQFNNDV (配列番号: 39); ACKQFACKQF
 (配列番号: 40); ACKQFDFCNDH (配列番号: 41); ACKRPPVSLTCH
 (配列番号: 42); ACKQLHSVSGCR (配列番号: 43); ACKQFNNDVTCN
 (配列番号: 44); ACKQFDFCNDHWSK (配列番号: 45); ACKQFNNDVTCNKRH
 (配列番号: 46); ACKQFDFCNDHWSKSKH (配列番号: 47);
 ACKQFNNDVTCNAEGDD (配列番号: 48); KCHPNMSLKECH (配列番号:
 49); RCRRPATTPACR (配列番号: 50); および
 RCRRPATTPACRACKQF (配列番号: 51)。

20

30

【0033】

あらかじめ形成された複合体からリガンドを離脱させることができるペプチドを同定する方法は、例えば、1999年10月19日刊行の米国特許第5,968,753号およびPCT国際公開公報第95/34817号で開示されているように当業者に周知である。ペプチドに特異的なリガンドを離脱させることができるペプチドを同定するために、抗体に結合するペプチドを最初に決定することができる。例えば、競合結合アッセイ法を行って、ペプチドが抗体の抗原への結合を防止することができるかを決定することができる(実施例 V I を参照のこと)。抗原結合を競合するペプチドをさらに試験して、抗体と抗原とあらかじめ形成された複合体、単離抗原または細胞に結合した抗原のいずれかを離脱させることができるペプチドを同定することができる。あらかじめ形成された複合体を離脱させるこれらのペプチドをさらに試験して、最適な離脱活性を有する任意のペプチド(ビーズからの細胞の離脱に適切なペプチド)を同定することができる。したがって、任意の所望の適用(細胞とあらかじめ形成された複合体の離脱またはビーズなどの固体支持体に結合した細胞の離脱を含む)のために至適な離脱活性を有するペプチドを同定することができる。

40

【0034】

あらかじめ形成された複合体からリガンドを離脱させることができるペプチドを、必要に応じて、ペプチドのリガンドへの接合を促進するように改変することができる。例えば、本明細書中に開示されているように、Cys残基を加えてペプチドQQGWFPKD(配列番号2)の架橋を促進する。Cys残基を介してペプチドを結合する方法は当業者に公

50

知であり、例えば、EMCSまたはMBSの使用が含まれる（実施例Iを参照のこと；Pierce、Rockford IL）。ペプチドがペプチド特異的リガンドへの結合能力を保持する限り、ペプチドをいずれかの周知の方法によって改変してリガンドへの接合を容易にすることができることが理解される。

【0035】

ペプチドをペプチドのリガンドへの接合を容易にするように改変することができるにもかかわらず、ペプチドを使用してペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させる場合、遊離型のペプチドに同一の改変を行う必要はない。さらに、遊離型のペプチドがペプチドーリガンド接合体に結合した第2のリガンドを離脱させることができる限り、遊離型のペプチドはリガンドに結合したペプチドと同一のアミノ酸配列を有する必要はない。さらに、遊離型のペプチドがペプチドーリガンド接合体に結合した第2のリガンドを離脱させることができる限り、遊離型のペプチドはまた接合ペプチドの改変体（ペプチド模倣体または任意のポリペプチド改変体を含む）であり得る。

10

【0036】

ペプチドへの接合に有用なリガンドは、一般に、細胞表面受容体などの細胞表面上の標的分子に結合する。このようなリガンド（標的特異的リガンドともいう）はペプチドへの接合に有用であり、例えば、細胞表面分子または受容体に結合する細胞表面分子またはリガンドに特異的な抗体であり得る。リガンドは、天然に存在するリガンドであっても天然に存在するリガンドの改変体であってもよい。リガンドはまた、細胞表面上の標的分子に対する結合活性についてスクリーニングされた化学物質であり得る。本明細書中に開示されるように、細胞表面分子に対するリガンドを同定する方法は当業者に周知である。

20

【0037】

リガンドの例として、本発明は、標的に特異的に結合して標的特異的リガンドとして機能するか、リガンドを離脱させることができるペプチドに特異的であり且つペプチド特異的リガンドとして機能する抗体を提供する。本明細書中で使用されるように、「抗体」という用語は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体ならびにこのような抗体の抗原結合断片を含むように最も広義で使用される。ポリクローナル抗体を使用する場合、ポリクローナル血清を抗原を使用して親和性精製して、バックグラウンドが減少し、抗原特異的抗体の濃度が高い単一特異的抗体が得られる。

30

【0038】

本発明の抗体またはこのような抗体の抗原結合断片は、標的分子またはその断片の特異的結合活性が少なくとも約 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であると特徴付けられる。したがって、標的分子についての特異的結合活性を保持する本発明の抗体の Fab、F(ab')₂、Fd および Fv 断片は、抗体の定義内に含まれる。当業者は、標的分子への抗体の特異的結合活性を標的分子への抗体の結合活性と標的分子ではない対照分子との比較により容易に決定することができる。ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を調製する方法は、当業者に周知である（例えば、ハーローおよびレーン（Harlow and Lane）、「抗体：実験マニュアル（Antibodies：A Laboratory Manual）」、Cold Spring Harbor Laboratory Press（1988）を参照のこと）。

40

【0039】

さらに、本明細書中で使用される、「抗体」という用語には、天然に存在する抗体、天然に存在しない抗体（例えば、一本鎖抗体、キメラ抗体、二官能性抗体、およびヒト化抗体が含まれる）、およびその抗原結合断片が含まれる。このような天然に存在しない抗体を、固相ペプチド合成を使用して構築することができるか、組換えによって産生することができるか、例えば、ヒューズ（Huse）ら、Science 246：1275-1281（1989）記載のように、可変重鎖および可変軽鎖からなるコンビナトリアルライブラリーのスクリーニングによって得ることができる。これらおよび他の例えばキメラ抗体、ヒト化抗体、CDR移植抗体、一本鎖抗体、および二官能

50

性抗体を作製するこれらの方法および他の方法は、当業者に周知である（ウィンターおよびハリス（Winter and Harris）、Immunol. Today 14：243－246（1993）；ワード（Ward）ら、Nature 341：544－546（1989）；ハーローおよびレーン（Harlow and Lane）、前記、1988）；ヒルヤード（Hilyard）ら、「タンパク質工学：実践アプローチ（Protein Engineering：A practical approach）」（IRL Press 1992）；ボラベック（Borrabeck）、「抗体工学（Antibody Engineering）」、第2版、（Oxford University Press 1995））。 10

【0040】

天然供給源から組換えまたは化学合成で作製することができる単離標的分子、その断片、またはペプチドなどの免疫原を使用して抗体を生成することができる。非免疫原または免疫原性の弱い標的分子もしくはその一部を、担体分子（ウシ血清アルブミン（BSA）またはスカシ貝ヘモシアニン（KLH）など）へのハプテンの結合によって作製することができる。種々の他の担体分子および担体分子へハプテンを結合する方法は、当技術分野で周知である（例えば、ハーローおよびレーン（Harlow and Lane）、前記、1988を参照のこと）。免疫原性断片を、融合タンパク質としてのポリペプチド（例えば、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、ポリHisなど）である標的分子の一部を発現することによっても作製することができる。ペプチド融合体を発現する方法は、当業者に周知である（アウスベル（Ausubel）ら、「現代の分子生物学プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）」、増補47、John Wiley & Sons、New York（1999））。 20

【0041】

標的特異的リガンドおよびペプチド特異的リガンドが共に抗体である場合、2つの抗体は、2つの異なる種由来であり得る。2つの異なる種の使用は、ペプチド相互作用によって複合体を特異的に単離するために二次抗体を使用する場合に特に有用である（以下を参照のこと）。例えば、標的特異的抗体はヒト抗体であり、ペプチド特異的抗体はマウス抗体であり得る。抗体を作製するのに有用な種の例には、ヒト、マウス、ウサギ、ラット、ヒツジ、およびヤギなどの哺乳動物種ならびにニワトリなどの非哺乳動物種が含まれる。標的特異的抗体およびペプチド特異的抗体が異なる種由来である限り、標的特異的抗体およびペプチド特異的抗体は任意の種であり得る。 30

【0042】

抗体の例には、細胞表面抗原に特異的な抗体が含まれうる。例えば、CD2、CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD20、CD25、CD34、CD56、およびCD69などの細胞表面マーカーに特異的な抗体は、本発明のリガンドとして使用することができる抗体の例である。細胞表面マーカーは、特定の細胞型または細胞群に特異的であり得る。例えば、CD2は全てのT細胞のpan T細胞マーカーであり、CD8はT細胞サブセットのマーカーである。したがって、これらの細胞表面マーカーに特異的な抗体リガンドを使用して、それぞれCD8陽性であるT細胞またはT細胞のサブセットを単離することができる。 40

【0043】

本発明のリガンドとして有用な他の抗体の例には、腫瘍細胞マーカー（HER2/neu、CD138、p53、前立腺特異的抗原、黒色腫関連抗原（MAGE）1、MAGE2、MAGE3、MAGE4、MAGE6、またはMAGE12、gp100、癌胚抗原（CEA）、Pan-O-5マーカーなどが含まれる）および白血病またはリンパ腫などの腫瘍型のマーカー（CD19、CD20、CD22、CD25、およびCD30が含まれる）が含まれる。Pan-O-5抗体は、上皮腫瘍に結合することができる。 50

【0044】

本発明のリガンドとして有用な他の抗体の例には、幹細胞に特異的な抗体が含まれる。このような幹細胞には、例えば、造血幹細胞などの血液産生幹細胞、間葉幹細胞、ニューロン幹細胞、または筋肉幹細胞が含まれる。本質的に、全ての表面分子の任意の型も、本発明で有用なリガンドの標的として使用することができる。このような細胞表面分子には、細胞表面受容体（例えば、成長因子受容体またはサイトカイン受容体）が含まれる。

【0045】

ペプチドに特異的なリガンドを離脱することができる本発明のペプチドを、所望の標的に特異的な任意のリガンドにも接合することができる。本発明のペプチドを、所望の標的（特定の細胞型など）に特異的な任意の標的特異的リガンドに接合することができる（図1）。例えば、標的特異的リガンドは、特定の細胞型上の細胞表面受容体に特異的な公知のリガンドであり得る。標的特異的リガンドを、当業者に周知の方法によって作製することもできる。例えば、細胞表面上の標的に特異的な抗体リガンドを、所望の細胞型または細胞型特異的標的分子での免疫化および所望の細胞型に特異的に結合する抗体のスクリーニングによる本明細書中に開示される抗体産生法を使用して作製することができる。当業者は、特定の細胞型への特異的結合を、例えば所望の細胞へのリガンドの結合と細胞型特異的標的分子を発現しない対照細胞への結合と比較することによって決定することができる。

10

【0046】

抗体を使用することに加えて、細胞表面上で発現する標的分子に特異的なリガンドは、細胞表面上の受容体に結合する天然に存在するリガンドであり得る。このような天然に存在するリガンドおよび受容体の例には、成長因子およびサイトカインならびにこれらの同族体受容体が含まれる。公知のリガンド-受容体結合パートナーに加えて、オーファン受容体に結合する天然に存在するリガンドを、当業者に周知の方法によって決定することができる。例えば、発現ライブラリーをオーファン受容体でスクリーニングして、受容体に結合する天然に存在するリガンドを決定することができる。さらに、天然に存在するリガンドを、酵母2ハイブリッドアッセイ法などのスクリーニングアッセイ法を使用して同定することができる（例えば、米国特許第5,283,173号、同第5,468,614号、および同第5,667,973号；アウスベル（Ausubel）ら、前記、1999；ルバン（Luban）ら、Curr.

20

30

Opin. Biotechnol. 6:59-64 (1995)を参照のこと）。このような天然に存在するリガンドを、ペプチドに特異的なリガンドを離脱することができるペプチドに接合することができる。

【0047】

細胞表面で抗体を発現する抗体発現T細胞の場合、標的特異的リガンドはT細胞中で発現される抗体に特異的な抗原であり得る。したがって、本発明の方法を使用して、抗原に特異的な抗体を発現するT細胞またはT細胞集団を単離または濃縮することができる。

【0048】

天然に存在するリガンドに加えて、標的分子に特異的な天然に存在しないリガンドを、本発明のペプチドに接合することもできる。天然に存在しないリガンドは、例えば、ポリペプチドについて上記のような天然に存在するリガンドの誘導体であり得る。さらに、天然に存在しないリガンドは、標的分子に対する結合活性についてスクリーニングされた化合物であり得る。標的分子のリガンドとして機能することができる化合物（単一または複合体の有機分子、金属含有化合物、炭水化物、ペプチド、タンパク質、ペプチド模倣体、糖タンパク質、リボタンパク質、核酸、抗体などの化学的または生物学的分子が含まれる）についてのスクリーニングに使用するための多数の化合物を生成する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、ヒューズ（Huse）、米国特許第5,264,563号；フランシス（Francis）ら、Curr.

40

Opin. Chem. Biol. 2:422-428 (1998)；チエツェ（Tietze）ら、Curr. Biol. 2:363-371

50

(1998) ; ソフィア (s o f i a) 、 M o l . D i v e r s . 3 : 7 5 - 9 4 (1998) ; エイクラー (E i c h l e r) ら、 M e d . R e s . R e v . 1 5 : 4 8 1 - 4 9 6 (1995) などに記載されている。多数の天然および合成化合物を含むライブラリーも市販の供給源から得ることができる。分子のコンビナトリアルライブラリーを、周知のコンビナトリアル化学法を使用して調製することができる (ゴードン (G o r d o n) ら、 J . M e d . C h e m . 3 7 : 1 2 3 3 - 1 2 5 1) (1994) ; ゴードン (G o r d o n) ら、 J . M e d . C h e m . 3 7 : 1 3 8 5 - 1 4 0 1 (1994) ; ゴードン (G o r d o n) ら、 A c c . C h e m . R e s . 2 9 : 1 4 4 - 1 5 4 (1996) ; ウィルソンおよびクザルニック (W i l s o n a n d C z a r n i k) 編、 「コンビナトリアル化学：合成と応用 (C o m b i n a t o r i a l C h e m i s t r y : S y n t h e s i s a n d A p p l i c a t i o n)」、John Wiley & Sons、New York (1997)。

10

20

30

40

50

【0049】

ペプチドがペプチドに特異的なリガンドを離脱することができる任意のペプチド-リガンド結合対を、細胞を単離するための本発明の方法と組み合わせて使用することができる。ペプチドを任意の標的特異的なリガンドに接合させて、ペプチド-リガンド接合体によって標的細胞を単離することができる。次いで、細胞を遊離型のペプチドとあらかじめ形成された複合体から離脱させることができる。

【0050】

1つの態様では、リガンドを離脱させることができるペプチドに特異的なリガンドは、CD34に特異的に結合する。CD34に特異的に結合するこのようなリガンドの1つは、モノクローナル抗体9C5である。抗体9069としても知られている抗CD34抗体9C5は、1994年6月7日アメリカンタイプカルチャーコレクション、10801ユニバーシティ・ブルヴァード、Manassas VA 90110に寄託され、HB11646と命名された。9C5リガンドを離脱させることができるペプチドの例は、QQGWFP (配列番号1) ; QQGWFPKD (配列番号2) ; およびQQGWFPKDC (配列番号3) である (実施例I~IIIを参照のこと)。

【0051】

ペプチド-リガンド接合体を、例えば、標的分子に特異的なリガンドへの少なくとも1コピーのペプチドの化学的架橋によって作製することができる。適切な架橋剤には、例えば、ヘテロ二官能性架橋剤であるN-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミドエステル(EMCS) (実施例Iを参照のこと) が含まれる。他の適切な架橋剤には、例えば、グルタルアルデヒド ; m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS) ; カルボジイミド ; ビス-ジアゾベンジジン(BDB) ; アジドベンゾイルヒドラジド(ABH) ; N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド(ANB-NOS) ; N-(4-(p-アジドサリチルアジド)ブチル)-3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド(APDP) ; p-アジドフェニルグリオキサルモノヒドレート(APG) ; 4-(p-アジドサリチルアミド)ブチルアミン(ASBA) ; 1-(p-アジドサリチルアミド)-4-(ヨードアセトアミド)ブタン(ASIB) ; ビス-(β-(4-アジドサリチルアミド)エチル)ジスルフィド(BASED) ; ビスマレイミドヘキサン(BMH) ; ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS³) ; ビス(2-スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル)スルホン(BSOCS) ; ビス(2-スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル)スルホン(スルホ-BSOCS) ; 1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(DFDNB) ; ジメチルアジピミデート・2HCl(DMA) ; ジメチルピメルイミデート・2HCl(DMP) ; ジメチルスベルイミデート・2HCl(DMS) ; 1,4-ジ- (3

' - (2' - ピリジルジチオ) - プロピオンアミド)) ブタン (DPDPB) ; ジスクシンイミジルグルタレート (DSG) ; ジチオビス (スクシンイミジルプロピネート) (DSP) ; ジスクシンイミジルスベレート (DSS) ; ジスクシニミジルタータレート (DST) ; ジメチル 3, 3' - ジチオビスプロピオンイミデート・2HCl (DTBP) ; 3, 3' - ジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオネート) (DTSSP) ; 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミドヒドロクロリド (EDC) ; エチレングリコールビス - (スクシンイミジルスクシネート) (EGS) ; エチレングリコールビス - (スルホスクシンイミジルスクシネート) (スルホ - EGS) ; N - γ - マレイミドブチリルオキシ - スクシンイミドエステル (GMBSS) ; N - γ - マレイミドブチリルオキシ - スルホスクシンイミドエステル (スルホ - GMBSS) ; N - ヒドロキシスクシンイミジル - 4 - アジドベンゾエート (HSAB) ; - ヒドロキシスルホスクシンイミジル - 4 - アジドベンゾエート (スルホ - HSAB) ; m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ - MBS) ; 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサ - 1 - カルボキシルヒドラジド・HCl (M₂C₂H) ; 4 - (4 - N - マレイミドフェニル) - 酪酸ヒドラジド・HCl (MPBH) ; N - ヒドロキシスクシンイミジル - 4 - アジドサリチル酸 (NHS - ASA) ; N - ヒドロキシスルホスクシンイミジル - 4 - アジドサリチル酸 (スルホ - NHS - ASA) ; スルホスクシンイミジル (4 - アジドサリチルアミド) ヘキサノエート (スルホ - NHS - LC - ASA) ; 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオニルヒドラジド (PDPH) ; p - ニトロフェニル - 2 - ジアゾ - 3, 3, 3 - トリフルオロプロピオネート (PNP - DTP) ; 2 - ジアゾ - 3, 3, 3 - トリフルオロプロピオニルクロリド (DTP) ; N - スクシンイミジル (4 - アジドフェニル) 1, 3' - ジチオプロピオネート (SADP) ; スルホスクシンイミジル (4 - アジドフェニルジチオ) プロピオネート (スルホ - SADP) ; スルホスクシンイミジル 2 - (7 - アジド - 4 - メチルクマリ - 3 - アセトアミド) エチル - 1, 3' - ジチオプロピオネート (SAED) ; スルホスクシンイミジル 2 - (m - アジド - o - ニトロベンズアミド) - エチル - 1, 3' - ジチオプロピオネート (SAND) ; N - スクシンイミジル - 6 - (4' - アジド - 2' - ニトロフェニルアミノ) ヘキサノエート (SANPAH) ; スルホスクシンイミジル - 6 - (4' - アジド - 2' - ニトロフェニルアミノ) ヘキサノエート (スルホ - SANPAH) ; スルホスクシンイミジル - 2 - (p - アジドサリチルアミド) エチル - 1, 3' - ジチオプロピオネート (SASD) ; - ヒドロキシスクシンイミジル - 2, 3 - ジブromoプロピオネート (SDBP) ; N - スクシンイミジル (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾエート (SIAB) ; スルホスクシンイミジル (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾエート (スルホ - SIAB) ; スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサ - 1 - カルボキシレート (SMCC) ; スルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサ - 1 - カルボキシレート (スルホ - SMCC) ; スクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレート (SMPB) ; スルホスクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレート (スルホ - SMPB) ; スクシンイミジルオキシカルボニル - メチル - α - (2 - ピリジルジチオ) トルエン (SMPT) ; スルホスクシンイミジル 6 - (α - メチル - α - (2 - ピリジルジチオ) トルアミド) ヘキサノエート (スルホ - SMPT) ; 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) ; スクシンイミジル 6 - (3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオンアミド) ヘキサノエート (LC - SPDP) ; スルホスクシンイミジル 6 - (3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオンアミド) ヘキサノエート (スルホ - LC - SPDP) ; スルホスクシンイミジル 7 - アジド - 4 - メチルクマリ - 3 - アセテート (スルホ - SAMCA) ; スルホスクシンイミジル 4 (p - アジドフェニル) ブチレート (スルホ - SAPB) ; N - (α - マレイミドアセトキシ) スクシンイミドエステル (AMAS) ; 1, 8 - ビス - マレイミドトリエチレングリコール (BM (PEO)₃) ; 1, 11 - ビス - マレイミドテトラエチレングリコール (BM (PEO)₄) ; 1, 4 - ビス - マレイミドブタン (BMD) ; 1, 4 - ビス - マレイミジル - 2, 3 - ジヒドロキシブタン (BMDB) ; N - (β - マレイミド

10

20

30

40

50

プロピオン酸) ヒドラジド・トリフルオロ酢酸 (BMPH) ; N-(β -マレイミドプロピルオキシ) -スクシンイミドエステル (BMP S) ; N- ϵ -マレイミドカプロン酸 (EMCA) ; N-(ϵ -マレイミドカプロン酸) ヒドラジド (EMCH) ; N- κ -マレイミドウンデカン酸 (KMUA) ; N-(κ -マレイミドウンデカン酸) -ヒドラジド (KMUH) ; スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル) -シクロヘキサン-1-カルボキシ (6-アミドカプロエート) (LC-SMCC) ; スクシンイミジル-6-(β -マレイミド-プロピオンアミド) ヘキサノエート (SMPH) ; N-(ϵ -マレイミドカプロイルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (Sulfo-EMCS) ; N-(κ -マレイミドウンデカノイルオキシ) -スルホスクシンイミドエステル (Sulfo-KMUS) ; N-スクシンイミジル-(4-ビニルスルホニル) ベンゾエート (SVSB) (ハーローおよびレーン (Harlow and Lane)、「抗体：実験マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988) ; Pierce Chemical Co. ; Rockford ILを参照のこと) が含まれる。

【0052】

本発明のペプチド-リガンド接合体およびペプチドに特異的なリガンドは、陽性細胞選択技術に特に有用である。ペプチドに特異的なリガンドを離脱させることができるペプチドを、細胞表面標的分子に特異的に結合する任意のリガンドに結合させることができ、これを使用して細胞表面標的分子を発現する細胞を単離することができる。ペプチド-リガンド接合体の例には、抗CD8抗体に接合したPR34⁺ (商標) ペプチド (QQGWFPKDC ; 配列番号3) および抗CD2抗体に接合したPR34⁺ (商標) ペプチドが含まれる (実施例IおよびIVを参照のこと)。

【0053】

本発明はまた、細胞を選択する方法を提供する。本方法は、細胞集団をペプチド-リガンド接合体に接触させ、該接合体がペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させることができる該ペプチドに接合した該集団中の細胞に特異的な第1のリガンドを含み、それにより細胞-接合体複合体を形成する工程と、該ペプチド-リガンド接合体に該第2のリガンドを接触させる工程と、該細胞-接合体複合体を単離する工程とを含む。本発明の方法は、さらに、細胞-接合体複合体に遊離型のペプチドを接触させ、それにより該細胞-接合体複合体から該第1の細胞を放出させる工程をさらに含むことができる。

【0054】

本発明の方法は、種々の細胞型を含む細胞集団からの細胞の単離に有用である。本発明の方法は、リガンドを集団中の標的細胞に特異的に結合させることにより、集団から標的細胞を選択することができる、ペプチド-リガンド接合体を使用する。

【0055】

本発明の方法は、幹細胞の単離に特に有用である。単離した幹細胞を、種々の治療法 (例えば、治療薬の発現法または移植) で使用することができる。治療遺伝子産物を発現することができる遺伝因子を幹細胞に形質導入して、遺伝子治療のために患者に導入することができる。幹細胞は、幹細胞移植が必要な患者 (例えば、高用量の化学療法薬で治療した癌患者) への移植に特に有用である。特に移植のための骨髄細胞および幹細胞の処理法は、当業者に周知である (例えば、アレマン (Areman) ら、「骨髄細胞および幹細胞処理：最新技術マニュアル (Bone Marrow and Stem Cell Processing: A Manual of Current Technology)」, F. A. Davis Company, Philadelphia (1992) を参照のこと) 。幹細胞は、例えば、CD34⁺細胞であり得る。

【0056】

本発明の方法を使用して、種々の組織型の幹細胞を単離することができる。本発明の方法を使用して、例えば、血液産生幹細胞、間葉幹細胞、ニューロン幹細胞、または筋肉幹細胞

胞を単離することができる。本明細書中で使用されるように、「血液産生細胞」とは、血液細胞由来の細胞を意味する。血液細胞は、一般に、骨髓由来である。血液細胞には、例えば、赤血球、単核球、白血球、樹状細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナイーブT細胞および記憶T細胞、抗原特異的T細胞などが含まれる。血液産生細胞は血液産生細胞由来であるにもかかわらず、血液細胞は血液中に存在する必要があることが理解される。したがって、血液を介して輸送されるが、血液から種々の組織に移動する細胞は、血液産生細胞の意味の範囲内に含まれる。血液産生細胞には、血液系を介して存在または移動する細胞、骨髓由来の細胞、リンパ系由来の細胞、または臍帯血由来の細胞が含まれる。このような細胞には、免疫系の多数の細胞が含まれる。血液産生幹細胞には、造血幹細胞が含まれる。

10

【0057】

種々の幹細胞は、その各系に特異的な種々の細胞に分化することができる。したがって、ニューロン幹細胞は、神経系の種々の細胞に分化することができ、間葉幹細胞は間葉起源の種々の細胞または組織（骨格筋、血管、および尿生殖系、および結合組織を含む）に発生することができる。造血幹細胞などの血液産生幹細胞は、白血球およびその種々の分化形態（B細胞およびT細胞を含む）のような種々の細胞型に分化することができる。

【0058】

本発明の方法はまた、T細胞およびT細胞サブセット、B細胞およびB細胞サブセット、樹状細胞、NK細胞、ナイーブT細胞または記憶T細胞、間葉幹細胞、ニューロン幹細胞、抗原特異的T細胞、単球などの細胞を単離するのに有用である。T細胞サブセットには、T細胞発現特異的マーカー（CD2、CD4、CD8、CD3、CD16、CD56、CD34、CD25、およびCD69など）が含まれる。B細胞サブセットには、CD19およびCD20などのB細胞発現マーカーが含まれる。

20

【0059】

本発明の方法を使用して、腫瘍細胞（例えば、乳房、前立腺、結腸、肺、卵巣、膵臓、副腎を含む種々の組織の腫瘍由来の腫瘍細胞、ならびに白血病、骨髓腫、黒色腫、リンパ腫、腎細胞癌、副腎細胞癌、膵臓細胞癌、または他の腫瘍細胞型などの癌由来の腫瘍細胞）を単離することもできる。腫瘍細胞の単離は、下記の診断法に特に有用である。本発明の方法を使用して、抗イディオタイプ（例えば、イディオタイプが細胞表面上で発現する骨髓腫またはB細胞リンパ腫細胞）を単離することができる。この場合、ペプチド特異的リガンドによって認識されるペプチドに接合した抗イディオタイプ抗体を使用して、標的細胞を捕獲することができる。その後、ペプチド特異的抗体が結合する遊離型のペプチドの添加によって細胞の放出を達成することができる。

30

【0060】

腫瘍細胞の単離を、腫瘍ワクチンのような治療法のための抗原供給源として使用することもできる。例えば、本発明の方法によって単離された腫瘍細胞を、エキソビボで樹状細胞に曝露して樹状細胞を抗原感作することができる。次いで、感作した樹状細胞を個体に投与して、樹状細胞中で発現する腫瘍抗原に対するT細胞応答を刺激することができる。または、単離した腫瘍細胞を照射するか他の方法で成長を不可能にし、個体に再導入し、腫瘍細胞中で発現する腫瘍細胞抗原に対する免疫応答を刺激することができる。必要に応じて、単離腫瘍細胞をインビトロで培養して、樹状細胞に曝露するか照射することができる。

40

【0061】

本明細書中で使用されるように、「特異的に結合する」または「～に特異的な」という用語は、結合相互作用に関して使用する場合、非特異的相互作用と測定可能なほど異なる結合を意味する。特異的結合を、例えば、一般に結合活性を示さない類似の構造の分子である対照分子への結合と比較した標的分子への結合の決定によって測定することができる。この場合、この分子が対照分子よりも標的分子に対する親和性が測定可能な高いかどうかを示される。同様に、標的細胞への特異的結合を、一般に標的細胞に特異的な標的分子を発現しない細胞である対照細胞への結合の比較によって決定することができる。

50

【0062】

本明細書中で使用されるように、「選択的結合」は、分子間、例えば、1つの分子または密接に関連する分子に結合する抗体などのリガンドで特異的且つ差別的な結合相互作用を意味する。例えば、抗体は、抗原性エピトープが分子に固有である場合、抗原に特異的且つ選択的であり得る抗原に特異性を示す。したがって、選択的結合性を有する分子は、1つの細胞または密接に関連する細胞に対して固有のエピトープに特異性を示す抗体で例示されるように、分子間で区別することができる。または、抗体は、多数の分子に共通のエピトープに対する特異性を持ち得る。このような抗体は特異的結合を有するが、1つの分子または密接に関連する分子に選択性を示さない。

【0063】

結合特異性を、例えば、標的に結合することが公知の対照分子との競合によって決定することができる。例えば、標的へのリガンドの特異的結合を、同一のリガンドとの結合の競合によって実証することができる。この場合、特異的結合により分子の結合が同一のリガンドによって競合的に阻害されるかどうかを示される。

【0064】

本明細書中で使用されるように、「特異的結合」という用語には、低親和異性および高親和性特異的結合の両方が含まれる。特異的結合を、例えば、少なくとも約 10^{-4} M の K_d を有する低親和性相互作用によって示すことができる。特異的結合を、高親和性結合分子（例えば、少なくとも約 10^{-7} M、少なくとも約 10^{-8} M、少なくとも約 10^{-9} M、少なくとも約 10^{-10} M または少なくとも約 10^{-11} M、または 10^{-12} M またはそれ以上の K_d を持つ結合分子）によって示すこともできる。低親和異性および高親和性結合分子はいずれも本発明の方法において有用である。

【0065】

選択的結合は、標的分子への比較的特異的な特定のリガンドの結合を意味する。一般に、選択的結合は、部分的に、対照分子または細胞と比較して標的分子または標的細胞が少なくとも2倍（2×）高い特異的結合の検出によって特徴付けられる。したがって、標的分子または細胞への選択的結合を示す分子は、少なくとも1つの他の分子または細胞と比較して検出可能に異なる結合活性を有する。

【0066】

集団からの細胞の単離に本発明の方法を使用する場合、一般に、固体支持体上の細胞の単離に有利である。本明細書中で使用されるように、「固体支持体」という用語は、集団からの細胞の単離に有用な分子の固定を可能にするのに十分に安定な固体媒体を意味する。固体支持体には、例えば、ニトロセルロースなどの膜、ナイロン、ポリビニリデンジフルオリド、プラスチック、ガラス、ポリアクリルアミド、アガロース、またはポリスチレンが含まれる。固体支持体を、集団からの細胞の単離に有用な分子の固定を支持する限り本質的に任意のサイズまたは形状で作製することもできる。例えば、固体支持体は、天然または合成の膜フィルターまたはガラススライドなどの平面であり得る。または、固体支持体は、種々の球形（例えば、ガラス、ポリアクリルアミド、またはアガロース製のビーズを含む）であり得る。固体支持体はまた、粒子または鉄溶液であり得る。同様に、固体支持体として多孔質媒体を使用することができ、これは本明細書中で使用する用語の定義の範囲内である。さらに、任意の固体支持体を、例えば、結合分子またはリンカーの結合に直接的または間接的に使用することができる化学官能基を含むように改変することができる。

【0067】

固体支持体は、標的細胞の単離に有用な性質をさらに示すことができる。例えば、固体支持体は、集団からの細胞の単離に有用な磁気ミクロスフェアであり得る（ハードウィック（Hardwick）ら、J. Hematotherapy、1：379-386（1992）；エーゲランド（Egeland）ら、Scand. J. Immunol.、27：439-444（1988）；Dynal、Lake Success NYを参照のこと）。

10

20

30

40

50

【0068】

集団からの細胞の単離のために、ペプチド-リガンド接合体中のペプチドに特異的なリガンドを、固体支持体に結合することができる。ペプチド特異的なリガンドを固体支持体に共有結合するか、非共有相互作用を介して固体支持体に結合することができる。例えば、ペプチド特異的なリガンドを、ビーズに直接結合することができる（図1および実施例Vを参照のこと）。固体支持体へのリガンドの直接結合のために、本明細書中に開示されているような架橋剤を使用して、固体支持体にリガンドを共有結合させることができる。非共有相互作用を介した支持体へのリガンドの結合のために、リガンドを固体支持体に直接結合させるか、非共有相互作用によって（例えば、ビーズへのリガンドの直接結合）結合させることができる（図1および実施例Vを参照のこと）。ビーズまたは他の固体支持体への直接結合を、ビーズの生化学的および／または生物物理学的性質（親水性、疎水性、イオンの特徴など）によって媒介する。または、リガンドを、媒体間の相互作用（例えば、抗体リガンドの場合、二次抗体）を介して支持体に結合させることができる。二次抗体または試薬などのリガンドに対して結合活性を示す分子を、例えば、一般に固体支持体への共有結合を介して固体支持体に結合させることができる。次いで、リガンドを、固体支持体に共有結合したリガンド特異的な分子との非共有相互作用を介して固体支持体に結合させる。

10

【0069】

リガンドが抗体である場合、固体支持体に結合したリガンド特異的な分子は、抗体に特異的な二次抗体であり得る。例えば、抗体がマウスモノクローナル抗体である場合、固体支持体に結合した二次抗体は、抗マウス重鎖および／または軽鎖抗体または抗イソ型抗体であり得る。二次抗体を選択する場合、抗体は、好ましくはペプチド特異的なリガンドには特異的であり、標的特異的なリガンドには特異的ではない。したがって、リガンドとして抗体を使用する場合、ペプチド特異的な抗体は、標的特異的な抗体と異なる種由来であり得る。異なる種の使用により、ペプチド特異的な抗体に特異的であるが標的特異的な抗体に結合しない二次抗体を都合よく使用が可能である。二次抗体として有用な種の例には、ヒト、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、およびヤギなどの哺乳動物種ならびにニワトリなどが含まれる。異なる種の抗体リガンドの使用により、ペプチド特異的な抗体に特異的な二次抗体が使用可能である。したがって、ペプチドおよびペプチド特異的なリガンドの相互作用を介して結合する細胞のみをビーズによって単離して、遊離ペプチドとの複合体の離脱が可能である。

20

30

【0070】

さらに、リガンドを、固体支持体に結合することができる分子によって認識される部分を組み込むように改変することができる。例えば、本明細書中に開示されるように、リガンドをビオチンに接合することができる（実施例I～IIIを参照のこと）。次いで、ビオチン化リガンドを、固体支持体に結合させたアビジンまたはストレプトアビジンに結合させることができる（図1を参照のこと）。ビオチンおよびアビジンの使用は、これが高親和性相互作用であるので細胞の免疫選択に特に有用である（例えば、1993年7月6日刊行の米国特許第5,225,353号および1993年6月1日刊行の同第5,215,927号を参照のこと）。本明細書中に開示のように、CD34+およびCD2+標的細胞に特異的なペプチド-リガンド接合体を使用したCD34+細胞およびCD2+細胞の単離は、ストレプトアビジンビーズで単離した場合、非常に有効であった（実施例II IおよびIVを参照のこと）。

40

【0071】

ビオチンに加えて、適切な結合パートナーを有する任意の分子を使用してリガンドに結合することができる。適切な架橋剤（本明細書中に開示のもの）を使用して共有結合させることができる。または、リガンドが組換えで発現する場合、固体支持体に結合させた分子に特異性を示す適切なタグを、リガンドとの融合ポリペプチドとして発現させることができる。融合ポリペプチドの発現は、当業者に周知である（アウスベル（Ausubel）ら、前記、1999を参照のこと）。

50

【0072】

集団から細胞を単離する場合、細胞の結合効率は、ビーズもしくは他の固体支持体への細胞の比率または固体支持体の表面積に依存して変化し得る。したがって、当業者は、細胞－ビーズ比の変更、並びに最適な細胞結合および単離効率が得られるビーズ比の決定によって最も効率よく細胞を単離するための細胞－ビーズまたは他の固体支持体の最適な比を同定することができる。

【0073】

標的細胞の単離のための結合複合体を形成する場合、形成された結合複合体により標的細胞が単離可能である限り、標的細胞、ペプチド－リガンド接合体、ペプチド特異的リガンド、およびビーズなどの固体支持体をいずれの順番において組み合わせることができる。10
いずれの成分も予めインキュベーションを行って複合体を形成した後全ての成分を組み合わせることができる。例えば、本明細書中に開示されるように、標的細胞、ペプチド－リガンド接合体、ペプチド特異的リガンド、および捕獲ビーズの連続的インキュベーションにより、ペプチド特異的リガンドを捕獲ビーズとあらかじめ形成された複合体中に存在する場合よりも有効に細胞が結合する（実施例 I I を参照のこと）。当業者は、特定のペプチド－リガンド接合体およびペプチド特異的リガンドを使用して特定の細胞の最適な単離条件を決定するための成分の最適なインキュベーション条件、インキュベーション時間およびビーズ対細胞比を容易に決定することができる。細胞の結合条件の最適化に加えて、種々の量の上記遊離ペプチドを使用した遊離ペプチドによる細胞の離脱のために細胞－ビーズ比を最適化することができる。20

【0074】

さらに、本発明は、細胞集団からの細胞を濃縮する方法を提供する。本方法は、細胞集団をペプチド－リガンド接合体に接触させ、該接合体がペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させることができるペプチドに接合した該集団中の細胞に特異的な第1のリガンドを含み、それにより細胞－接合体複合体を形成する工程と；該ペプチド－リガンド接合体に該第2のリガンドを接触させる工程と；該細胞－接合体複合体を単離する工程とを含む。本発明の方法は、該細胞－接合体複合体を該ペプチドに接触させ、それにより該細胞－接合体複合体から該細胞を放出させる工程をさらに含むことができる。さらに、以下により詳細に記載するように、本発明は、細胞亜集団を濃縮する方法を提供する。本明細書中で使用されるように、「細胞集団由来の細胞または亜集団の濃縮」は、標的細胞が元の細胞集団よりも他の集団と比較して濃度が高いことを意味する。当業者は、本明細書中に開示される周知の免疫学的方法または組織化学的方法を使用して濃縮細胞または細胞集団の相対純度を容易に決定することができる。30

【0075】

さらに、病態を診断する方法が提供される。この方法には、細胞集団を含む試料をペプチド－リガンド接合体に接触させ、該接合体がペプチドに特異的な第2のリガンドを離脱させることができるペプチドに接合した該集団中の細胞に特異的な第1のリガンドを含み、それにより細胞－接合体複合体が形成する工程と；該ペプチド－リガンド接合体に該第2のリガンドを接触させる工程と；該細胞－接合体複合体を単離する工程と；該複合体中の該病態に関連する細胞を同定する工程とを含む。本発明の方法は、該細胞－接合体複合体を該ペプチドに接触させ、それにより該細胞－接合体複合体から該細胞を放出させる工程をさらに含むことができる。40

【0076】

本発明の病態を診断する方法は、病態に関連する限定数の細胞が存在する病態の診断に特に有用である。細胞集団を含む試料を、リガンドが病態に関連する標的細胞に特異的なペプチド－リガンド接合体と接触させる。試料は、例えば、血液試料または生検であり得る。組織生検の場合、初代培養物を得るための周知のタンパク質分解消化法を使用して細胞を分散させることができる（例えば、ジャフィー（Jaffee）ら、Cancer J. Sci. Am.、4：194－203（1998）を参照のこと）。組織生検の場合、分散細胞集団中の特定の細胞の存在を決定する。腫瘍生検などの腫瘍試料由来の細胞50

胞の分散は、本明細書中に開示されるように腫瘍ワクチン法に有用であり得る。

【0077】

癌などの疾患の初期検出法における1つの制限は、初期段階では癌細胞数が限られているので検出が困難であるという点である。本発明の方法を有利に使用して初期段階の癌における限られた癌細胞数を濃縮し、それにより細胞をより容易に検出可能である。例えば、本発明の方法を、初期段階の乳癌または前立腺癌のような初期段階の癌を検出するためのスクリーニング法として使用することができる。本発明の方法を、血液試料中の濃度が低く標準的な方法を使用した検出には不十分な濃度である転移性癌細胞を検出するために試料に適用することもできる。本発明の方法により、検出法への適用前に細胞を濃縮可能である。したがって、本発明の方法は、診断用の腫瘍細胞の濃縮、例えば、血液または骨髓由来の腫瘍細胞の濃縮に有用である。

10

【0078】

細胞集団由来の細胞から単離または濃縮した特定の細胞型を同定する方法は、当業者に周知であり、例えば、免疫学的手順、組織化学的方法、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用した組織特異的遺伝子発現の解析を含む。特定の細胞型の検出に有用な免疫学的手順には、検出可能な抗体を使用する免疫アッセイ法が含まれる。このような免疫アッセイ法には、例えば、当技術分野で周知の免疫組織化学、免疫蛍光、ELISA法、ラジオイムノアッセイ法、蛍光表示細胞分取（FACS）分析、免疫沈降、免疫プロット分析、パンドックス（Pandex）マイクロ蛍光測定アッセイ法、凝集アッセイ法、フローサイトメトリー、および血清診断アッセイ法が含まれる（ハーローおよびレーン（Harlow and Lane）、前記、1998；ハーローおよびレーン「抗体の使用：実験マニュアル（Using Antibodies: A Laboratory Manual）」、Cold Spring Harbor Press（1999））。組織化学的または免疫組織化学的方法による細胞の同定法は、当業者に周知である（例えば、サムナー（Sumner）、「基礎組織化学（Basic Histochemistry）」、Wiley-Interscience、New York（1988）；グ（Gu）編、「分析形態学：理論、応用、およびプロトコル（Analytical Morphology: Theory, Applications, and Protocols）」、Birkhauser Boston、Cambridge MA（1997）を参照のこと）。

20

30

【0079】

さらに、PCRによる細胞の同定法は、当技術分野で周知である（例えば、ディーフェンバッハおよびドベクスラー（Dieffenbach and Dveksler）、「PCRプライマー：実験マニュアル（PCR Primer: A Laboratory Manual）」、Cold Spring Harbor Press（1995）；アウスベル（Ausubel）ら、前記、1999を参照のこと）。逆転写酵素PCR（RT-PCR）および対応するPCR産物の検出において、1つの細胞または少数の細胞中で細胞特異的メッセンジャーRNA発現を検出することができる。細胞特異的mRNA発現を検出するためにハイブリッド形成し増幅反応を開始させるようにPCRプライマーを選択することができる。細胞特異的mRNAの検出に特に有用なプライマーは、2つの異なるエクソンによってコードされる領域中で開始するプライマーである。このようなプライマーを、適切なサイズのPCR産物の有効な産生によってmRNAが検出されるように選択することができる。それに対して、2つの異なるエクソンによってコードされる領域中でハイブリッド形成するプライマーはイントロン配列の介在によりゲノムDNAから検出可能な産物を生成せず、あまりに遠く離れているためいかなる検出可能なPCR産物も生成されないプライマーを置く。2つの異なるエクソンから開始するように選択したこのようなプライマーは、細胞特異的mRNA発現の検出に有用である。

40

50

【0080】

いくつかの適用では、結合したペプチド-リガンド接合体から細胞が放出されることが望ましい。例えば、細胞表面抗原に結合した抗体は、細胞生理学の変化を誘導することができる（ベラルディー（B e r a r d i）ら、前記、1995）。したがって、細胞の生理学的状態が潜在的に重要な本発明の方法によって単離された細胞を用いた適用（例えば、治療への適用）では、単離細胞からペプチド-リガンド接合体を離脱させることが望ましい。さらに、ある細胞診断技術（例えば、組織化学法および免疫組織化学法）において固体支持体に結合したペプチドから細胞を放出させることが望ましい。

【0081】

細胞からのペプチド-リガンド接合体の1つの解離法は、それ自体を公知の分子によって置換することができる細胞特異的リガンドを使用することである。例えば、接合体中の標的特異的リガンドを、公知のペプチドに置換することができるか、当業者はこのようなペプチドを本明細書中に開示のリガンドを離脱させることができるかを容易に決定することができる（米国特許第5,968,753号を参照のこと）。このような場合、ペプチド-リガンド接合体中の標的特異的リガンドおよびペプチド特異的リガンドの両方を、対応するペプチドによって離脱させることができる。

10

【0082】

細胞からペプチド-リガンド接合体を離脱させるためのペプチドの使用に加えて、他の分子をペプチドと併せて使用して、ペプチドによる離脱を増強することができる。当業者は、種々の化合物の存在下で本明細書中に開示の方法によるペプチド離脱活性のスクリーニングによってペプチドの離脱活性を容易にする他の試薬または成分を容易に決定することができる。例えば、緩衝液のpH、塩濃度、または温度を変化させてペプチドでの離脱を増強することができる。他の薬剤を加えることができ、例えば、ジチオトレイトールなどの還元剤および／またはエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）またはエチレンジアミンテトラ酢酸（EGTA）などのキレート剤を加えてペプチドでの離脱を増強することができる。

20

【0083】

細胞からペプチド-リガンド接合体を離脱させるように機能することができる分子を、当業者は容易に決定することができる。例えば、リガンドに特異的であり且つ細胞からペプチド-リガンド接合体を離脱させることができるペプチドを、周知の方法を使用してスクリーニングおよび同定することができる（米国特許第5,968,753号を参照のこと）。さらに、細胞からペプチド-リガンド接合体を離脱させる化合物を、周知のスクリーニング法を使用して同定し、標的分子について非天然リガンドを同定するために上記の離脱活性を示す化合物を同定することができる。

30

【0084】

化合物をスクリーニングして、例えば、標的分子からの標的特異的リガンドの離脱を検出することができる。このようなスクリーニング法では、標的分子を細胞表面上で発現させるか組換えにより発現させることができる。当業者は、リガンドと標的分子とあらかじめ形成された複合体からのリガンドの離脱の検出法を知っているか、またはこれを容易に決定することができる。スクリーニング法について、リガンドは放射性標識、蛍光色素、強磁気物質、発光タグ、またはビオチンなどの検出可能な結合剤で検出可能に標識することができる。標識リガンドにより、リガンドに離脱活性を示す化合物をより容易に同定可能である。

40

【0085】

さらに、タンパク質分解消化、例えば、キモパイン、ペプシン、パパイン、キモトリプシンなどを使用して固体支持体に結合している複合体から細胞を離脱させることができる。プロテアーゼを使用した親和性基質からの細胞の放出方法は、当業者に周知である（1992年1月14日刊行の米国特許第5,081,030号）。

【0086】

本発明は、さらに、細胞亜集団を選択する方法を提供する。本方法は、細胞集団にペプチ

50

ドーリガンド接合体を接触させ、第1のリガンドがペプチド特異的リガンドを離脱させることができるペプチドに接合している場合、該接合体が該集団中の第1の細胞に特異的な第1のリガンドを含み、それにより細胞－接合体複合体を形成し、該集団中第2の細胞に特異的な第2のリガンドに該細胞集団を同時または連続的に接触させ、それにより細胞－第2のリガンド複合体を形成する工程と；該ペプチドドーリガンド接合体に該ペプチド特異的リガンドを接触させる工程と；該第1の細胞－接合体複合体および第2の細胞－第2のリガンド複合体を単離する工程とを含む。

【0087】

したがって、本発明の方法を有利に使用して、細胞集団または2つまたはそれ以上の異なる細胞型の亜集団から1つの細胞型を単離することができる。本方法は、異なる細胞に特異的な2つまたはそれ以上の標的特異的リガンドの1つまたは任意の組み合わせを使用する。例えば、本明細書中に開示される方法を使用して固体支持体への標的特異的リガンドの結合によって細胞を単離することができる。さらに、例えば、下記のペプチドを使用して、固体支持体から細胞を放出させることができる。

【0088】

1つの態様では、細胞亜集団を単離する場合、細胞亜集団を、標的特異的リガンドを離脱させることができる同一のペプチドを使用して都合よく放出させることができる（図6を参照のこと）。例えば、ペプチド特異的リガンド（例えば、9069抗体など）はまた、細胞上の標的分子（例えば、CD34抗原など）に特異的である場合、ペプチド特異的リガンドを同時に使用して、対応するペプチドドーリガンド接合体（図6B、細胞型2）に結合する細胞およびペプチド特異的リガンドが結合する標的細胞（図6B、細胞型4）（本明細書中では標的分子（例えば、CD34細胞））を単離することができる。したがって、細胞亜集団を単離する本発明の方法は、ペプチド特異的リガンドおよび標的特異的リガンドである第2のリガンドを使用することができる（図6B）。このようなペプチド特異的リガンドの例は、CD34細胞に特異的であり且つPR34（商標）ペプチドによって離脱される本明細書中に開示の9069抗体である。したがって、リガンドがPR34（商標）ペプチドに接合する場合、9069抗体などの抗体を使用してCD34細胞を単離して、第2の細胞に特異的なリガンドを使用して第2の細胞を同時に単離することができる。

【0089】

例えば、CD34細胞を含む細胞集団（骨髄など）を使用して、骨髄集団中にCD34細胞およびいくつかの他の細胞を含む細胞亜集団（例えば、間葉幹細胞）を単離することができる（図7を参照のこと）。このような骨髄の亜集団は、移植への適用に特に有用であり得る。血液細胞集団を使用して、例えばCD34細胞または別の血液細胞型と共にT細胞、B細胞、またはNK細胞集団を含む亜集団を単離することもできる。例えば、抗白血病活性を示すT細胞、B細胞、またはNK細胞または任意の数の特異的細胞型を、CD34細胞と共に単離することができる。このようなT細胞またはB細胞亜集団は、免疫応答、例えば、抗白血病免疫応答の刺激への適用に特に有用であり得る一方で、CD34細胞は造血系の再構築を担う。

【0090】

標的特異的リガンドが各細胞型に使用可能である限り、本発明の方法を使用して、集団から任意の数の特異的細胞型を単離することができる。このような細胞型の亜集団は、集団由来の、例えば、2個またはそれ以上、3個またはそれ以上、4個またはそれ以上、5個またはそれ以上、6個またはそれ以上、7個またはそれ以上、8個またはそれ以上、9個またはそれ以上、10個またはそれ以上、12個またはそれ以上、15個またはそれ以上、20個またはそれ以上の細胞型であり得る。

【0091】

1つを超える細胞型の亜集団を単離する場合、任意の数の標的特異的リガンドを、ペプチド特異的リガンドを放出させることができる同一のペプチドに接合することができる（図6A、リガンド6および8に接合したペプチドが同一である場合）。同一のペプチドへの

異なる細胞型に特異的な2つまたはそれ以上のリガンドの接合または標的特異的リガンドでもあるペプチド特異的リガンドの使用により、単離した亜集団中の種々の細胞型を同一のペプチドを使用して都合よく放出させることができる。または、複数の標的特異的リガンドをペプチド特異的リガンドを離脱させることができる2つまたはそれ以上の異なるペプチドに接合することができ、これを使用して異なるペプチドを使用して放出させることができる複数の細胞型を単離することができる（図6A、2つの異なるペプチドがリガンド6および8に接合する場合））。

【0092】

集団から複数の細胞型を単離するための複数の標的特異的リガンドの使用に加えて、同一の細胞に対して2つまたはそれ以上の標的特異的リガンドを使用することができる。1つの細胞型を単離するための1つより多い標的特異的リガンドの使用は、例えば、特定の細胞型の単離効率の増大に有用であり得る。

10

【0093】

さらに、必要に応じて、細胞の集団または亜集団を、複数の標的特異的リガンドを使用して連続的に接触させることができる。例えば、細胞の亜集団を、集団中のいくつかの異なる細胞を認識するリガンドを使用して単離することができる。このような標的特異的リガンドを使用した初期単離工程を使用して、特定の細胞を含む亜集団を濃縮させることができる。このような亜集団を放出させて、引き続いて亜集団中の特定の細胞に特異性を示す異なる標的特異的リガンドと接触させることができる。このような連続単離工程は、1つの細胞型に特異的な標的特異的リガンドを使用不可能である場合に特に有用であり得る。連続的方法を使用して、特定の細胞型が同一のリガンドにも結合する他の細胞から分離されるように亜集団を単離し、その後標的特異的リガンドに結合し、いくつかの細胞型に特異性を示す標的特異的リガンドを使用して1つの細胞型を単離することができる。

20

【0094】

細胞亜集団の単離法には、第1の細胞-接合体複合体および第2の細胞-接合体複合体に遊離型の離脱ペプチドを接触させ、それにより第1の細胞-接合体複合体から第1の細胞および第2の細胞-接合体複合体から第2の細胞が放出される工程をさらに含むことができる。したがって、本発明の方法を使用して、集団から細胞亜集団を選択および放出させることができる。

【0095】

本発明の方法を使用して、細胞亜集団を単離することができる。細胞の同時単離または連続的インキュベーションに加えて、細胞を本明細書中に開示される方法によってそれぞれ単離およびプールして細胞亜集団を得ることもできる。

30

【0096】

本発明はまた、所望の細胞と同時精製することができる細胞の陰性選択を行うための第2のリガンドの使用法を提供する（図6C）。本方法は、細胞集団にペプチド-リガンド接合体を接触させ、該接合体がペプチド特異的リガンドを離脱させることができるペプチドに接合されている該集団中の第1の細胞に特異的な第1のリガンドを含み、該ペプチド特異的リガンドが集団中の第2の細胞に結合しており、それにより細胞-接合体複合体が形成され；ペプチドリガンド接合体をペプチド特異的リガンドに接触させる工程と；第2の細胞に特異的な第2のリガンドに細胞集団を接触させ、第2のリガンドがペプチドによって離脱されずにペプチド特異的リガンドと異なる部位に結合する工程と；該細胞-接合体複合体を単離する工程とを含む。本方法は、細胞-接合体複合体に遊離型のペプチドを接触させ、それにより、細胞-接合体複合体から第1の細胞を放出させる工程をさらに含むことができる。

40

【0097】

所望の細胞と同時精製することができる細胞について陰性選択を行うための第2のリガンドの使用法は、細胞選択法の特異性の増強に有用であり得る（図6Cを参照のこと）。例えば、CD34特異的抗体9069は、上記のCD34+細胞型に対するCD34の標的特異的リガンドとしても機能することができるペプチド特異的リガンドである。細胞集団

50

がC D 3 4細胞を含む場合、例えば、P R 3 4（商標）ペプチドに接合した標的特異的リガンドに結合する標的細胞（例えば、図6 C中の細胞型2）と共に骨髓のC D 3 4細胞（例えば、図6 C中の細胞型4）が同時単離される。細胞の単離亜集団からC D 3 4細胞型を排除することが望ましい場合、C D 3 4に結合するが非離脱抗体である別の抗体（すなわち、P R 3 4（商標）ペプチドまたは反応に使用される任意の他のペプチド）を含むことができる（例えば、図6 Cのリガンド16）。非離脱リガンドが固体支持体に結合する場合、細胞型2を放出することができる一方で、細胞型4が細胞型4の非離脱標的特異的リガンド（すなわち、リガンド16）への結合を介して捕獲されたままである（図6 C）。

【0098】

10

細胞を非離脱リガンドに同時に接触させるかペプチドでの離脱後に連続的に接触させることができる。非離脱抗体は、離脱ペプチドへの結合に関して非競合的である。離脱ペプチドとのインキュベーションの前に非離脱リガンドを接触させる場合、非離脱リガンドは標的特異的リガンドでもあるペプチド特異的リガンドに関して非競合的である。例えば、9069抗体の場合、非離脱リガンドはC D 3 4標的細胞に非競合的に結合する。陰性選択を行う細胞が細胞亜集団から十分に除去されている限り、非離脱リガンドは、標的特異的リガンドでもあるペプチド特異的リガンドと同一の分子または同一の標的細胞上の異なる分子に結合することができる。

【0099】

一般に、細胞の陰性選択を行うために使用した第2のリガンドを、陰性選択を行う細胞への結合に十分な量で使用し、この量はリガンドの相対的親和性に依存する。したがって、相対親和性に基づいて、相対量を補償することができる。例えば、親和性が10倍異なる場合、約等量の結合活性が存在するように約10倍異なるように相対量を調整することができる（すなわち、低親和性リガンドが高親和性リガンドの1/10の濃度である）。一般に、細胞の陰性選択に使用した第2のリガンドを、少なくとも等量の結合活性で使用し、特に、陰性選択を行った細胞が有効に保持されるように過剰に使用する。細胞の陰性選択に使用した第2のリガンドは、少なくとも約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、または約10倍過剰の結合活性で存在し、必要に応じて、約50倍、約100倍、約1000倍、約10,000倍、またはさらに約20,000倍過剰の結合活性またはそれ以上で存在し得る。

20

30

【0100】

少なくとも2つの標的特異的リガンドを使用した細胞亜集団を単離する場合、一般に、細胞を固体支持体（例えば、本明細書中で開示される磁気ビーズなどのビーズまたは粒子）上で単離する。必要に応じて、標的特異的リガンドを同一のビーズに結合させることができる。または、異なる標的特異的リガンドを結合させて、連続的または同時にインキュベートすることができるビーズを分離することができる。

【0101】

本発明は、さらに、C D 3 4細胞および少なくとも1つの他の特異的単離細胞型を含む実質的に純粋な細胞亜集団を提供する。上記のように、C D 3 4抗原を発現するC D 3 4細胞を、本発明の方法または他の方法によって単離するか、必要に応じて第2の細胞型との同時に単離することができる。本明細書中で使用されるように、「実質的に純粋」は、細胞または細胞集団に関して使用する場合、元の細胞集団と比較した特異的単離細胞の濃縮を意味する。第2の細胞型は、間葉細胞、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、もしくは増強細胞、または標的特異的リガンドが本明細書中で開示の方法によって細胞型の単離に使用可能である任意の型の細胞であり得る。「増強細胞」は、H L A抗原耐性を誘導し、例えば移植片対宿主疾患または移植片拒絶に有用であり得る耐性誘導細胞である（例えば、シュシェルト（Schuchert）ら、Nature

40

Med. 6:904-909（2000）を参照のこと）。C D 3 4細胞を含む亜集団に加えて、標的特異的リガンドが亜集団中で単離される細胞標的に使用可能である限り、種々の病態の治療のための有用な細胞の組み合わせとして任意の細胞組み合わせを単離す

50

ることができることが理解される（以下を参照のこと）。

【0102】

実質的に純粋な亜集団を、本明細書中に開示の方法を使用した細胞の特異的単離によって特定の細胞型を濃縮することができる。実質的に純粋な細胞集団は、一般に、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の実質的に純粋な亜集団を含み、本質的に100%の実質的に純粋な集団であり得る。亜集団中の特異的に単離された細胞型は等量である必要はないが、それぞれの特異的に単離された細胞型が最初の細胞集団と比較して濃縮される限り任意の比であり得ることが理解される。例えば、上記のように、本発明の方法を使用して、CD34細胞および間葉細胞を単離することができ、実質的に純粋なCD34細胞および間葉細胞の亜集団は、10%から本質的に100%の実質的に純粋な亜集団であり得る。

10

【0103】

実質的に純粋な亜集団中の細胞の組み合わせは、種々の治療への適用に有用であり得る。例えば、CD34細胞と間葉細胞との組み合わせは、幹細胞でのこれを必要とする患者の移植の増大または造血系細胞を有する患者を得るために有用であり得る。間葉幹細胞により、間質細胞、コラーゲン、または骨細胞などが得られ、CD34細胞により、造血細胞機能を得ることができる。CD34細胞とナチュラルキラー（NK）細胞との組み合わせは、例えば、抗腫瘍活性または抗ウイルス活性が亢進したこの組み合わせを必要とする患者を得るために有用であり得る。CD34細胞とT細胞またはT細胞サブセットの組み合わせは、例えば、抗腫瘍活性、抗ウイルス活性、免疫機能の亢進、または移植設定での応答の亢進に有用であり得る。

20

【0104】

したがって、本発明は、本発明の方法によって単離した実質的に純粋な細胞亜集団を使用した個体の病態に対する応答を亢進する方法を提供する。実質的に純粋な細胞亜集団を使用した本発明の方法は、免疫無防備個体の治療に特に有用である。このような個体には、造血系または間葉細胞系の先天性欠損症個体、癌患者（白血病などの免疫系を抑制する癌または癌治療に起因する免疫抑制）、または免疫が抑制されるか免疫抑制治療が必要な自己免疫疾患の個体が含まれる。本明細書中で使用されるように、免疫抑制患者は、物理的

30

【0105】

したがって、本発明は、本発明の方法によって単離した実質的に純粋な細胞亜集団を使用して、例えば、器官移植または幹細胞移植であり得る移植を受けたか受ける予定の個体を治療することができる。本発明の実質的に純粋な細胞亜集団を使用して、免疫抑制個体を治療することもできる。したがって、本発明は、個体の治療法または病態を治療するための治療に対する個体の応答を亢進させる方法を提供する。本明細書中で使用される、「治療応答の亢進」は、病態に関連する兆候または症状の任意の測定可能な改善を意味する。当業者は、個体が病態に関連する兆候または症状の測定可能な改善を示し、個体で直接測定可能な兆候または症状を媒介することができるか、寿命の長期化またはより良好な生活の質を反映するかどうかを容易に決定することができる。

40

【0106】

したがって、本発明の方法は、免疫無防備個体に関連する種々の病態の治療に有用である。例えば、CD34細胞および間葉細胞は、器官移植を受けたか受ける予定の個体の耐性を誘導することができる。CD34細胞および間葉細胞を使用して、同種異系移植の安全性を増大させる（骨髄または幹細胞移植に起因する移植片対宿主疾患の緩和）こともできる。CD34細胞と間葉細胞との組み合わせは、同種異系移植の耐性の誘導および自家細胞移植におけるより迅速且つ有効な移植に有用である。CD34と間葉細胞との組み合わ

50

せは耐性を誘導および供与器官または組織の受け入れの増大に有用なだけでなく、これらの細胞の組み合わせにより、器官拒絶または移植片対宿主疾患の緩和のための免疫抑制治療の必要性を減少させることができる。

【0107】

本発明の方法または任意の他の方法によって単離した実質的に純粋な細胞亜集団を使用して、所望の特徴を有する細胞（例えば、機能的細胞および支持細胞の単離物）を得ることもできる。本発明の方法により単離できる機能的細胞により、特定の細胞機能が得られる一方で支持細胞により機能的細胞を刺激する。機能的細胞および支持細胞の1つのこのような組み合わせは、IL-2を産生するCD4細胞およびIL-2によって活性化されるナチュラルキラー（NK）細胞である。したがって、本発明は、それぞれ支持細胞および機能的細胞として機能することができ、NK細胞免疫応答の刺激に使用することができるCD4細胞とNK細胞との組み合わせを提供する。

10

【0108】

支持細胞と機能的細胞との組み合わせの別の例は、間葉細胞と組み合わせたCD34細胞である。間葉細胞は、CD34細胞の成長を刺激するサイトカインを生成する。したがって、間葉細胞およびCD34細胞を含む実質的に純粋な細胞亜集団において、間葉細胞は、造血系の細胞を得る際に機能することができる、CD34細胞の支持細胞として機能することができる。同様に、間質細胞はまた、CD34細胞の成長刺激のための支持細胞として機能することができる。本発明の方法を使用し、本明細書中に開示される細胞選択法を使用して支持細胞と機能的細胞との任意の有用な組み合わせを単離することができることが理解される。

20

【0109】

実質的に純粋な細胞亜集団はまた、細胞治療への適用に有用であり得る。例えば、一般に、レトロウイルスベクターを使用して、インビボ細胞治療法のために遺伝子を形質導入する。しかし、レトロウイルスは、細胞への有効な感染のために細胞を複製する必要がある。したがって、レトロウイルスベクターを使用する必要がある治療法は、増殖細胞を使用する。支持細胞が機能的細胞の成長を刺激することができる場合、増殖細胞を得るための1つの方法は、機能的細胞と支持細胞との組み合わせを含む本発明の方法によって単離された実質的に純粋な細胞亜集団を使用することである。例えば、間葉細胞とCD34細胞との組み合わせをこのような治療で使用して、間葉細胞がCD34細胞を増殖させるための成長刺激として機能するサイトカインを得ることができる。したがって、このような亜集団での増殖CD34細胞に治療遺伝子を導入し、インビボ治療法で形質導入細胞を使用することができる。したがって、本発明は、インビボ治療に適用するために細胞の形質導入効率を増大させる方法を提供する。

30

【0110】

本発明の別の態様によれば、ペプチドに特異的な抗体を離脱することができる少なくとも1つの本発明のペプチドおよび適切なパッケージング材料中の抗体を含む、好ましくはキット形態の診断系が得られる。例えば、キットは、QQGWFP（配列番号1）；QQGWFPKD（配列番号2）；およびQQGWFPKDC（配列番号3）、またはその組み合わせ、および9C5抗体を含むことができる。本発明の診断系は、試料中の細胞型の有無についてのアッセイ法に有用である。

40

【0111】

適切な診断系には、少なくとも1つのアッセイ法に十分な量で個別にパッケージングされた化学試薬として少なくとも1つの本発明のペプチドまたは抗体が含まれる。本発明のキットは、さらに、ペプチドを任意の所望のリガンドに結合可能な本明細書中に開示の架橋剤を含むことができる。本発明のキットはまた、接合体中のリガンドが細胞表面標的分子に特異的であり、標的分子を発現する特定の細胞を単離可能なペプチド-リガンド接合体を含むことができる。本発明のキットは、細胞を単離するためのビーズなどの個体支持体をさらに含むことができ、例えば、キットは磁気ビーズを含むことができる。

【0112】

50

本発明のキットの内容物は、滅菌された、汚染物を含まない環境を得るためにパッケージング材料中に含まれる。さらに、パッケージング材料は、キット内の材料をどのように使用すれば封入されたペプチドとの予め結合したペプチドーリガンド複合体を離脱することができるか、または適切ならば特定の細胞を単離することができるのかを示した説明書を含む。使用説明書には、通常試薬濃度を記載した具体的な表現または少なくとも1つのアッセイ法パラメーター（試薬および混合すべき試料の相対量、試薬／試料混合物の品質保持期限、温度、緩衝液条件など）が含まれる。

【0113】

本発明は、さらに、細胞を選択する方法を提供する。本方法は、細胞集団をペプチド特異的リガンドに接触させ、該細胞集団がペプチドに融合した細胞表面融合ポリペプチドを発現する細胞を含み、遊離型のペプチドが該融合ポリペプチドに結合した該ペプチド特異的リガンドを離脱させることができ、それにより細胞ーペプチドリガンド複合体を形成する工程と、該細胞ーペプチドリガンド複合体を単離する工程とを含む。本方法は、該細胞ーペプチドリガンド複合体を遊離型の該ペプチドに接触させ、それにより該細胞ーペプチドリガンド複合体から該細胞を放出させる工程をさらに含むことができる。

10

【0114】

標的細胞に結合させるためのペプチドーリガンド接合体の使用に加えて、本発明はまた、リガンドを離脱させることができるペプチドを有利に使用し、該リガンドが細胞表面上で発現する分子との融合体として発現するペプチドと複合体を形成する、細胞の単離法を提供する。この場合、ペプチドは細胞表面ポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現するので、リガンドが標的細胞に特異的なペプチドーリガンド接合体の結合が迂回される。本明細書中で使用されるように、「融合ポリペプチド」は、共に天然に発現されない少なくとも2つの異種分子が1つの翻訳産物として発現するものである。細胞表面ポリペプチドに融合したペプチドの場合、少なくとも1コピーのペプチドが、細胞表面ポリペプチド内で融合体として発現される。必要に応じて、複数コピーのポリペプチドを融合ポリペプチドの一部として発現することができる。ペプチドが細胞表面上で発現し、細胞に投与したペプチド特異的リガンドに接触可能であるように、ペプチドを細胞表面ポリペプチドに融合する。

20

【0115】

周知の方法を使用して、ペプチドを細胞表面ポリペプチドとの融合体として発現することができる（アウスベル（Ausubel）ら、前記、1999）。組換えペプチドー細胞表面ポリペプチド融合体を発現する細胞の単離法は、遺伝子操作した細胞の単離または濃縮に有用であり、この方法を使用して、遺伝子治療などの治療の適用に有用な細胞を単離または濃縮することができる。

30

【0116】

上記のように、ビーズなどの固体支持体での細胞の捕獲によって細胞を単離することができる。または、FACSによって細胞を単離することができる。細胞を単離するためのFACSの使用は、ペプチドー表面ポリペプチド融合体を発現する細胞を単離する場合に特に有用である。

【0117】

本発明の種々の態様の活性に実質的に影響を与えない改変もまた本明細書で提供され、本発明の定義内であることが理解される。したがって、以下の実施例は、本発明の例示を意図し、本発明の限定を意図しない。

40

【0118】

実施例 I

CD8抗体とのPR34+（商標）ペプチド接合体の合成およびSUP-T1細胞への結合

本実施例は、PR34+（商標）ペプチドの合成、CD8抗体への接合、およびT細胞へのペプチドー抗体接合体の結合を記載する。

【0119】

50

ペプチド A c - Q Q G W F P K D (P R 3 4 + (商 標) ; 配 列 番 号 2) を、本 質 的 に 以 前 記 載 の ペ プ チ ド に 特 異 的 な リ ガ ン ド を 離 脱 さ せ る こ と が で き る ペ プ チ ド と し て 同 定 し た (米 国 特 許 第 5 , 9 6 8 , 7 5 3 号) 。

【0120】

P R 3 4 + (商 標) ペ プ チ ド を、C 末 端 C y s 残 基 を 使 用 し て 合 成 し、M T - 4 1 5 (ヒ ト C D 8 に 対 す る 抗 体) に 共 有 結 合 し て、C D 8 - P R 3 4 + 接 合 体 を 得 た。ペ プ チ ド を、ヘ テ ロ 二 官 能 性 リ ン カ ー N - (ε - マ レ イ ミ ド カ プ ロ イ ル オ キ シ) ス ク シ ン イ ミ ド エ ス テ ル (E M C S) を 使 用 し て C D 8 抗 体 に 接 合 さ せ た。製 造 者 が 推 奨 す る 標 準 的 プ ロ ト コ ー ル を 使 用 し た (P i e r c e C h e m i c a l C o . ; R o c k f o r d I L) 。

10

【0121】

抗 ヒ ト C D 3 4 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 で あ る 9 C 5 抗 体 を、ビ オ チ ン ヒ ド ラ ジ ン (P i e r c e) を 使 用 し て ビ オ チ ン 化 し た。最 初 に 冷 蔵 よ り も む し ろ 室 温 で メ タ 過 ヨ ウ 素 酸 酸 化 を 行 う こ と 以 外 は、製 造 者 (P i e r c e) が 推 奨 す る 標 準 的 プ ロ ト コ ー ル の 後 に ビ オ チ ン 化 反 応 を 行 っ た。

【0122】

フ ロー サ イ ト メ ト リ ー 実 験 の た め に、S U P - T 1 細 胞 を 使 用 し た。S U P - T 1 は、典 型 的 な T 細 胞 表 面 マ ー カ ー を 発 現 す る こ と が 公 知 の T リ ン パ 球 由 来 の 腫 瘍 細 胞 系 統 で あ る。フ ロー サ イ ト メ ト リ ー 用 に S U P - T 1 細 胞 を 調 製 し、C D 8 抗 体 - P R 3 4 + ペ プ チ ド (C D 8 - P R 3 4 +) 接 合 体、ビ オ チ ン 化 9 C 5、お よ び フ ィ コ エ リ ト リ ン 標 識 (P E 標 識) ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン で 連 続 的 に 感 作 し た。S U P - T 1 細 胞 を ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン - P E、連 続 的 に C D 8 - P R 3 4 + 接 合 体、ビ オ チ ン 化 9 C 5 の い ず れ か と イ ン キ ュ ベ ー ト し、そ の 後 ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン - P E ; ま た は 連 続 的 に C D 8 - P R 3 4 + 接 合 体、ビ オ チ ン 化 9 C 5、ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン - P E、次 い で P R 3 4 + (商 標) を 含 ま な い ペ プ チ ド と 1 5 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。次 い で、S U P - T 1 細 胞 を、フ ロー サ イ ト メ ト リ ー に よ っ て 分 析 し た。ダ ル ベ ッ コ リ ン 酸 緩 衝 生 理 食 塩 水 (G i b c o B R L)、0 . 0 5 % ア ジ 化 物、1 . 0 % ヒ ト 血 清 ア ル ブ ミ ン (P A H) の 混 合 液 中 で 全 て の イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン を 行 っ た。全 て の イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン を 室 温 で 1 5 分 間 行 い、そ の 後 そ れ ぞ れ を 1 . 0 m l

20

P A H で 洗 浄 し た。フ ロー サ イ ト メ ト リ ー の た め に、染 色 細 胞 を 0 . 2 5 m l の P A H 中 に 再 懸 濁 し た。S U P - T 1 細 胞 (1×10^6) を、1 μ g の C D 8 - 9 0 6 9 N ま た は C D 3 4 - ビ オ チ ン の い ず れ か で 染 色 し た。5 . 0 m g / m l の ペ プ チ ド を 使 用 し た。

30

【0123】

図 2 は、フ ロー サ イ ト メ ト リ ー 分 析 の 結 果 を 示 す。ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン - P E と の S U P - T 1 細 胞 の イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン を 示 し、「イ ソ 型」を 示 す。イ ソ 型 と 比 較 し て 認 め ら れ た 平 均 チ ャ ネ ル 蛍 光 の シ フ ト は、抗 体 - ペ プ チ ド 接 合 体 が、標 的 細 胞 へ の 良 好 な 親 和 性 を 示 す 結 合 で あ る こ と を 示 し た (「抗 体 + S A - P E」で 示 さ れ る)。遊 離 の P R 3 4 + (商 標) ペ プ チ ド (Q Q G W F P K D ; 配 列 番 号 2) を 加 え て、ピー ク の 左 側 へ の シ フ ト で 示 さ れ る よ う に、蛍 光 シ グ ナ ル が 消 滅 し た (「抗 体 + ペ プ チ ド + S A - P E」)。

【0124】

こ れ ら の 結 果 は、C D 8 - P R 3 4 + 接 合 体 が、T 細 胞 結 合 活 性 を 保 持 す る こ と を 示 す。こ れ ら の 結 果 は ま た、C D 8 - P R 3 4 + 接 合 体 が ビ オ チ ン 化 9 C 5 に 結 合 す る こ と が で き、C D 8 - P R 3 4 + 接 合 体 と ビ オ チ ン 化 9 C 5 と の 複 合 体 が 免 疫 原 性 親 和 性 を 保 持 し て T 細 胞 を 結 合 可 能 に す る こ と を 示 す。こ れ ら の 結 果 は、遊 離 の P R 3 4 + (商 標) ペ プ チ ド が C D 8 - P R 3 4 + 接 合 体 か ら ビ オ チ ン 化 9 C 5 を 放 出 し、そ れ に よ り T 細 胞 を 放 出 す る こ と が で き る こ と を さ ら に 示 す。

40

【0125】

実施例 I I

ペ プ チ ド - 抗 体 接 合 体 お よ び ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン ビ ーズ を 使 用 し た S U P - T 1 細 胞 の 陽 性 細 胞 選 択

50

本実施例は、CD8-PR34+接合体、ビオチン化9C5、およびストレプトアビジンビーズを使用したSUP-T1細胞の陽性選択を示す。

【0126】

陽性選択のために、SUP-T1細胞を種々の条件下でインキュベートし、ストレプトアビジンビーズを使用してロゼット形成させた。感作のために、 1×10^6 個のSUP-T1細胞のアイソレックス (Isolex) (商標) 緩衝液 (リン酸緩衝生理食塩水、15 mMクエン酸、1%ヒトアルブミン) を1 μ gのCD8-9069Nで感作し、1 mlのアイソレックス (商標) 緩衝液で洗浄し、1 μ gのCD34-ビオチンで感作し、1 mlのアイソレックス (商標) 緩衝液で洗浄した。両インキュベーションを、体積500 μ l、室温で15分間行った。ロゼット形成のために、15 μ lのストレプトアビジン (SA) 被覆ビーズ (Dynal) を各チューブに加えた。チューブを、穏やかに攪拌しながら室温で30分間インキュベートした。溶出のために、ロゼット形成した細胞を、磁石を使用してビーズを保持しながらアイソレックス (商標) 緩衝液で洗浄した。次いで、ビーズを500 μ lの体積で5 mg/mlのPR34+ (商標) ペプチドと15分間インキュベートした。混合物を磁石に2分間曝露し、上清をピペットで捨てた。ビーズをアイソレックス (商標) 緩衝液で洗浄し、この洗浄物を先の上清と合わせた。全放出細胞を計数した。

【0127】

対照反応では (チューブ1)、SUP-T1細胞をストレプトアビジンビーズと直接インキュベートした。陽性選択のために、SUP-T1細胞を2つの条件下でインキュベートした。第1の条件下では (チューブ2)、SUP-T1細胞をCD8-PR34+接合体、ビオチン化9C5、およびその後ストレプトアビジンビーズと連続的にインキュベートした。第2の条件下では (チューブ3)、SUP-T1細胞をCD8-PR34+接合体とインキュベートし、ストレプトアビジンビーズをビオチン化9C5と別にインキュベートした。両方を洗浄し、その後30分間共にインキュベートした。

【0128】

ストレプトアビジンビーズでのロゼット形成反応後、残存する遊離の細胞を除去し、3つ全ての反応物を放出薬剤としてPR34+ (商標) ペプチドと30分間インキュベートした。遊離細胞を、回収し、定量した。

【0129】

表1に示すように、ストレプトアビジンビーズのみとインキュベートしたSUP-T1細胞 (チューブ1) は、1%のSUP-T1細胞のみを捕獲した。それに対して、CD8-PR34+接合体、続いてビオチン化9C5、およびストレプトアビジンビーズと連続的にインキュベートしたSUP-T1細胞 (チューブ2) 約80%が捕獲された。CD8-PR34+接合体および次いでストレプトアビジンと予め結合したビオチン化9C5とインキュベートした場合 (チューブ3)、SUP-T1細胞の約44%が捕獲された。

【00】

【表1】 SUP-T1細胞の陽性選択

チューブ	SUP-T1 捕獲%	SUP-T1 収量%
1	1	6.16
2	80	43
3	44	31

【0130】

遊離のPR34+ペプチドとのインキュベーションにより、ストレプトアビジンビーズによって捕獲された結合SUP-T1細胞が放出された。SUP-T1細胞の収量は、CD8-PR34+接合体、その後のビオチン化9C5およびストレプトアビジンビーズとの連続的インキュベーションで細胞の約43%が捕獲された。放出細胞の収量は、CD8-P

R 3 4 + 接合体、その後のストレプトアビジンビーズに予め結合した 9 C 5 で処理した細胞の約 3 1 % であった。

【0 1 3 1】

これらの結果は、C D 8 - P R 3 4 + 接合体を使用して、C D 8 抗体受容体を発現する S U P - T 1 細胞を高い比率で捕獲することができることを示す。これらの結果は、遊離の P R 3 4 + (商標) ペプチドを使用して、C D 8 - P R 3 4 + 接合体によって捕獲された S U P - T 1 細胞を離脱させることができることをさらに示す。

【0 1 3 2】

実施例 I I I

単核細胞調製物からの C D 8 + 細胞の陽性選択

10

本実施例は、単核細胞集団から C D 8 を発現する細胞の陽性選択を記載する。

【0 1 3 3】

C D 8 - P R 3 4 + 接合体の集団から C D 8 + 細胞を単離する能力を試験するために、C D 8 + 細胞を含む単核細胞 (M N C) を調製した。単核細胞をヒト供与者から採取した。単核細胞を、製造者のプロトコールに従って C S - 3 0 0 0 (商標) (B a x t e r) を使用して G - C S F 可動ヒト供与者から採取した。M N C の出発集団は、1 9 . 4 2 % C D 3 + / 8 + 細胞であった。各ロゼット形成反応のために、 2×10^6 個の C D 8 + 細胞を含む M N C の量を使用した。ビオチン化 C D 8 抗体 (M T - 4 1 5) を、本質的に実施例 I 記載のようにビオチン化した。

【0 1 3 4】

20

M N C を、3 つの条件下でインキュベートした。条件 1 では、M N C をストレプトアビジンビーズのみとインキュベートした。条件 2 では、M N C をビオチン化 C D 8 抗体とインキュベートし、その後ストレプトアビジンビーズとインキュベートした。条件 3 では、M N C を C D 8 - P R 3 4 + 接合体とインキュベートし、その後ビオチン化 9 C 5 およびストレプトアビジンビーズとインキュベートした。ストレプトアビジンビーズとのインキュベーション後、遊離の細胞を除去し、ストレプトアビジンビーズに結合した細胞を遊離の P R 3 4 + (商標) ペプチドとインキュベートした。放出細胞を計数し、C D 8 + 細胞数をフローサイトメトリーを使用して評価した。C D 8 + 細胞を、C D 3 と C D 4 との組み合わせを使用して定量した。C D 3 は、p a n

T 細胞マーカーであり、C D 3 + 集団を、互いに排他的な C D 4 + および C D 8 陽性集団にさらに分けることができる。したがって、C D 8 + 細胞はまた、C D 3 + / 4 - である主要な細胞と定義することができる。インキュベーション条件は、実施例 I I 記載のものと本質的に同一であった。

30

【0 1 3 5】

表 2 に示すように、C D 8 + 細胞の約 1 9 % が、ストレプトアビジンビーズのみで捕獲された (条件 1) 。それに対して、9 0 % を超える C D 8 + 細胞がビオチン化 C D 8 抗体で捕獲され (条件 2) 、これは、抗 C D 8 抗体での C D 8 + 細胞の有効な結合を示す。同様に、8 3 % を超える C D 8 + 細胞が C D 8 - P R 3 4 + 接合体で捕獲され (条件 3) 、これは、接合 C D 8 抗体が単核細胞集団中の C D 8 細胞を有効な結合が可能な抗原結合活性を保持していることを示していた。

40

【0 0】

【表 2】単核細胞調製物からの C D 8 細胞の選択

条件	捕獲%	収量%	純度%
1	19.3	NA	NA
2	90.6	2.45	12.1
3	83.6	16.0	61.1

【0 1 3 6】

50

CD8-PR34+接合体で捕獲したCD8+細胞と遊離PR34+（商標）放出ペプチドとのインキュベーションにより、収量16%で純度61%のCD8+細胞が得られた。CD3+/4-細胞濃度（すなわち、CD8+細胞）は、放出細胞では出発細胞集団よりも3.5倍高かった。しかし、遊離PR34+（商標）放出ペプチドを用いて脱離したCD8+細胞の収量は3%未満であった。条件2での低収量のCD8+細胞は、機械的放出が細胞放出に有意に寄与しないことを示す。

【0137】

これらの結果は、CD8-PR34+接合体を使用して単核細胞集団から対応する受容体（特に、CD8+細胞）を有する細胞を単離することができ、これを使用して単核細胞集団中に存在するCD8+細胞を高い比率で単離することができることを示す。これらの結果はまた、捕獲細胞を、遊離のPR34+（商標）ペプチドで放出させて、純度の高いCD8+細胞を得ることができることを示す。 10

【0138】

実施例 I V

CD2+T細胞の陽性選択

本実施例は、ペプチド-リガンド接合体を使用したCD2+T細胞の陽性選択を記載する。

【0139】

本質的に実施例 I 記載のように、PR34+ペプチド-接合体の異なる細胞型を単離する能力を試験するために、PR34+（商標）ペプチドをCD2抗体（B-E2；IgG2bイソ型；Diaclone；Besancon；France）に結合させた。CD2抗体に接合したPR34+（商標）ペプチド（9069Nとも呼ばれる）を、CD2-9069Nと呼んだ。9069抗体としても知られるビオチン化9C5抗体を、b-9069と呼んだ。 20

【0140】

可動または非可動MNC調製物のいずれか（実施例 I I Iを参照のこと）を使用し、類似の結果が得られた。細胞を1μgまたは5μgのCD2-9069N接合体と室温で15分間インキュベートした（表3を参照のこと）。次いで、細胞を1μgまたは10μgのビオチン化9C5抗体（b-9069）およびストレプトアビジンビーズとインキュベートした。その後、結合した細胞を、緩衝液または2.5mgの遊離PR34+（商標）ペプチド（9069N）のいずれかとインキュベートした。インキュベーション条件は、本質的に実施例 I I に記載されたものであった。次いで、放出細胞を定量し、純度を決定した。純度および細胞数を、抗CD3抗体およびトゥルーカウント（True Count）フローサイトメトリー定量法（Becton Dickinson；San Jose CA）を使用して評価した。 30

【0141】

表3に示すように、CD2-9069N接合体とのインキュベーションにより、高い割合（少なくとも75%）のCD2+細胞が捕獲された。5μgの接合体とインキュベートした場合、1μgよりもわずかに捕獲効率が高いように思われた。これらの結果は、CD2-9069N接合体を使用して、高い割合のCD2+T細胞を単離することができることを示す。遊離ペプチドとのインキュベーションにより、高い割合（50~87%）で捕獲CD2+細胞が放出された。それに対して、緩衝液とのインキュベーションにより、少ない割合の捕獲細胞しか放出されなかった。これらの結果は、遊離のペプチドが、CD2-9069ペプチド接合体で捕獲された細胞を特異的に放出することができることを示す。遊離ペプチドによって放出された細胞の純度は高く、70~89%の範囲であった。 40

【00】

【表3】CD2-9069Nを使用したCD2+T細胞の陽性選択

実験条件	捕獲T細胞% (15 分 /RT)	放出試薬 (30 分 /RT)	放出T細胞%	純度% (CD3+)
CD2-9069N (1 µg) b-9069 (1 µg)	75	9069N (2.5 mg)	71	89
		緩衝液	15	81
CD2-9069N (5 µg) b-9069 (1 µg)	87, 93	9069N (2.5 mg)	61, 56	88, 81
		緩衝液	20, 8.2	76, 66
CD2-9069N (1 µg) b-9069 (10 µg)	77, 89	9069N (2.5 mg)	87, 65	87, 74
		緩衝液	9.0, 5.0	69, 61
CD2-9069N (5 µg) b-9069 (10 µg)	95	9069N (2.5 mg)	50	70
		緩衝液	5.5	61

10

20

30

【0142】

これらの結果は、CD2-PR34+ペプチド接合体を使用してCD2+細胞を単離することができ、遊離PR34+（商標）ペプチドを使用して純度の高い細胞を高い割合で放出させることができることを示す。これらの結果は、ペプチドを細胞特異的リガンドに結合させる場合、ペプチドに特異的なリガンドを離脱させることができるペプチド（ペプチド／リガンド対PR34+／9C5）を使用して、種々の細胞型を単離することができることも示す。

40

【0143】

実施例V

ビーズへの直接結合によるCD2+ T細胞の陽性選択

本実施例は、ビーズへのペプチド特異的抗体の直接結合によるCD2 T細胞の陽性選択を記載する。

【0144】

50

本質的に実施例 I V 記載のように、C D 2 抗体 B - E 2 を P R 3 4 (商標) ペプチドに接合した。M N C を C D 2 - P R 3 4 接合体を使用して本質的に実施例 I V 記載のようにインキュベートした。次いで、細胞を M - 4 5 0

ダイナビーズ (Dyna1) 上に被覆した C D 3 4 抗体 9 0 6 9 とインキュベートした。C D 3 4 抗体被覆ビーズを、ビーズ表面への種々の量の抗 C D 3 4 抗体を吸収することによって調製した。ビーズを 0 μ g、1 μ g、5 μ g、20 μ g、または 50 μ g の抗体 / 10^8 ビーズで予め結合させた。対照として、細胞のアリコートにストレプトアビジン被覆ダイナビーズとインキュベートした。

【0145】

表 4 に示すように、C D 2 細胞はダイナビーズ上に直接被覆した C D 3 4 抗体によって有効に捕獲された。示される割合は、C D 2 のように C D 2 細胞を定量するために使用した p a n

T 細胞マーカーである全 C D 3 陽性細胞である。捕獲した細胞の割合は、試験した各量の抗体に類似していた。捕獲細胞の割合は、約 60 ~ 70 % であり、ストレプトアビジンビーズで認められた 80 % 捕獲よりも幾らか低いくだけであった。ストレプトアビジン被覆ダイナビーズ対照では、ビオチン化 9 0 6 9 抗体 (9 C 5) を使用した。

【00】

【表 4】 C D 2 - P R 3 4 接合体を使用した T 細胞選択およびダイナビーズへの抗体の直接結合による捕獲

実験条件 *	放出薬剤 ***	捕獲 %	収量 %	純度 %
50 μ g	PR34+™ (2.5 mg)	64.5	57.5	91.4
	緩衝液	64.5	26.0	89.1
20 μ g	PR34+™ (2.5 mg)	61.7	47.4	91.8
	緩衝液	61.7	0.2	82.1
5 μ g	PR34+™ (2.5 mg)	72.0	68.9	91.3
	緩衝液	72.0	23.5	88.3
1 μ g	PR34+™ (2.5 mg)	73.0	55.9	92.4
	緩衝液	73.0	7.6	71.7
0 μ g	PR34+™ (2.5 mg)	2.88	ND (low)	ND
SA**	PR34+™ (2.5 mg)	80.4	81.5	94.5

(脚注) % は全 C D 3 陽性細胞に対するものである。

* ダイナル (Dyna1) M - 4 5 0 ダイナビーズを、ビーズ表面への種々の量の抗 C D 3 4 抗体の吸収によって調製した。数値は、 μ g 抗体 / 10^8 ビーズである。

** ストレプトアビジン被覆ダイナビーズ対照

*** C D 3 4 抗体からの C D 2 - P R 3 4 接合体の離脱に、P R 3 4 (商標) C D 3 4

放出剤を使用した。

【0146】

ビーズと遊離PR34（商標）ペプチドとのインキュベーションにより、約50%またはそれ以上の収量のCD2細胞が得られた。遊離ペプチドによって放出された細胞の純度は、90%を超え、これはストレプトアビジンビーズから捕獲および放出された細胞の純度に匹敵した（表4を参照のこと）。

【0147】

これらの結果は、ペプチド-リガンド接合体によって結合した細胞を、ビーズへのペプチド特異的抗体の直接結合によって有効に捕獲することができることを示す。捕獲細胞を、ビーズから高純度で有効に放出することもできる。

10

【0148】

実施例VI

種々のペプチドを使用したCD2抗体で捕獲した細胞の放出

本実施例は、種々のペプチドによる抗CD2抗体に結合した細胞の離脱を記載する。

【0149】

CD2モノクローナル抗体B-E2に親和性を示すペプチドを、ファージディスプレイライオパニングによって単離した。抗CD2抗体B-E2へのT細胞の結合についての競合物として種々のペプチドを試験した。1mMの各ペプチドを使用して競合アッセイ法を行った。ペプチドは、競合物CD2抗原と比較して 2×10^7 倍モル過剰であり、抗CD2抗体と比較して 6×10^6 倍モル過剰であった。FACS競合アッセイ法を使用して競合

20

【0150】

競合アッセイ法のために、0.5mlの1mMの種々のペプチド溶液を、 1×10^6 末梢血単核細胞(MNC)に添加し、その後100μlの0.02μg/mlのCD2抗体(B-E2)を加え、室温で15分間インキュベートした。細胞を溶解試薬(155mM塩化アンモニウム、10mM重炭酸カリウム、および0.1mM

EDTA)で1回洗浄し、2mlのPAH(DPBS、1%ヒト血清アルブミン、0.02%Na₃N₃)で2回洗浄した。1μlのヤギF(ab')₂断片である抗マウスIgG(重鎖+軽鎖)-フィコエリトリン接合体(GAM-PE;

Immunotech; Miami FL)を各試料に加え、室温で10分間インキュベートした。細胞を2mlのPAH中で2回洗浄した。最終細胞ペレットを0.25mlの0.5%パラホルムアルデヒド中に再懸濁した。試料を、フローサイトメトリーによって分析した。

30

【0151】

競合アッセイ法の結果を図3に示す。種々のペプチドは競合結合活性を示した。「*」で示したペプチドで処理した細胞はアポトーシスが認められた。

【0152】

いくつかのペプチドを、放出活性についてさらに試験した。簡単に述べれば、100μlの0.02μg/mlのCD2抗体との 1×10^6 個のMNCの室温で15分間のインキュベーションによってFACS放出アッセイ法を行った。細胞を2mlの溶解試薬で1回洗浄し、2mlのPAH溶液で2回洗浄した。0.5mlの1mMまたは5mMペプチド保存液を細胞ペレットに加え、室温で30分間インキュベートした。細胞を、2mlのPAHで2回洗浄した。1μlのGAM-PEを各試料に添加し、室温で10分間インキュベートした。細胞を2mlのPAH中で2回洗浄した。最終細胞ペレットを0.25mlの0.5%パラホルムアミド中に再懸濁した。試料を、フローサイトメトリーで分析した。

40

【0153】

放出アッセイ法では、1mMまたは5mMペプチド(図4で5mMをインキュベートする以外は、1mMのペプチド)のいずれかであった。ある場合、1mMジチオトレイトール(DTT)の存在下で、放出アッセイ法を行った。2つの異なる供与細胞のバッチを使用

50

してアッセイ法を行った（図4に、供与細胞の第2のバッチを「*」で示した）。放出アッセイ法の結果を、図4に示す。環状ペプチドRCRRPATTPACRは、最も高い放出活性を示すように思われた。

【0154】

これらの結果は、種々のペプチドがCD2抗体を離脱するように機能することができることを示す。

【0155】

実施例VII

Pan-O-5モノクローナル抗体を使用したカンマ（Camma）細胞の陽性選択

本実施例は、乳房細胞系統を選択することができるPan-O-5モノクローナル抗体を使用したカンマ細胞（乳房細胞系統）の陽性選択を記載する。 10

【0156】

抗体被覆ビーズを調製するために、ダイナビーズ（Dyna1）を、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（D-PBS）で洗浄した。洗浄したビーズを50μgの抗CD34モノクローナル抗体／10⁸ビーズで4℃で24時間被覆した。ビーズをアイソレックス緩衝液で2回洗浄し、1%アルブミンのアイソレックス緩衝液と4℃で24時間インキュベートした。

【0157】

Pan-O-5-PR34接合体を合成するために、Pan-O-5モノクローナル抗体を、N-（ε-マレイミドカプロイルオキシ）スクシンイミドエステルと室温で30分間インキュベートして抗体-リンカー複合体を作製した。抗体-リンカー複合体を、アミコン（Amicon）スピнкаラム（30KD； 20

Millipore Corp.；Bedford MA）使用してD-PBSで2回洗浄した。Pan-O-5-抗体-リンカー複合体を、PR34（商標）ペプチドと室温で30分間インキュベートした。Pan-O-5-リンカー-PR34抗体複合体をアミコンスピнкаラム使用してD-PBSで2回洗浄した。接合体の濃度を、280nmの吸光度によって測定した。

【0158】

細胞（18×10⁶）を、Pan-O-5-リンカー-PR34抗体（5μg/ml）と15分間インキュベートした。細胞抗体複合体をアイソレックス緩衝液で2回洗浄し、抗CD34被覆ダイナビーズ（5ビーズ／細胞）と室温で30分間インキュベートした。ダイナビーズを磁石で単離し、非結合細胞を除去した。ビーズ-細胞画分をPR34（商標）ペプチド（5mg/ml）と室温で30分間インキュベートした。磁石を使用して、放出細胞を非放出細胞から分離した。結果を、図5に示す（N=1）。 30

【0159】

図5に示すように、Pan-O-5-リンカー-PR34抗体は、90%を超えるカンマ細胞を有効に捕獲した。PR34（商標）ペプチドを使用して、75%を超える細胞が放出された。カンマ細胞の収量は、70%を超えていた。

【0160】

これらの結果は、細胞の陽性選択のためのペプチド-リガンド接合体の方法を、乳癌細胞を選択することができるPan-O-5抗体を含む種々の細胞型に特異的な種々の抗体と使用することができることを示す。 40

【0161】

本出願を通して、種々の刊行物が参照されている。これらの刊行物の開示の全体が、本発明が属する当技術分野の状態をより詳細に記載するために、本出願の本明細書に参照として組み入れられる。

【0162】

本発明を上記の実施例を参照して記載したが、本発明の精神を逸脱することなく種々の変更を行うことができると理解すべきである。したがって、本発明は、特許請求の範囲のみによって限定される。 50

【図面の簡単な説明】

【図 1】 ペプチドに接合した標的特異的抗体およびペプチドに特異的な抗体を使用して標的細胞の捕獲および放出の略図を示す。上のパネルは、ストレプトアビジンビーズを使用したペプチド-抗体複合体の捕獲を示し、下のパネルはビーズへのペプチド特異的抗体の直接結合による捕獲を示す。

【図 2】 抗体-ペプチド接合体（抗体 + S A - P E）および抗体-ペプチド接合体および遊離のペプチド（抗体 + ペプチド + S A - P E）の存在下での S U P - T 1 細胞のみ（イソ型）のフローサイトメトリーを示す。

【図 3】 抗 C D 2 抗体についての種々のペプチドの競争 % を示す。

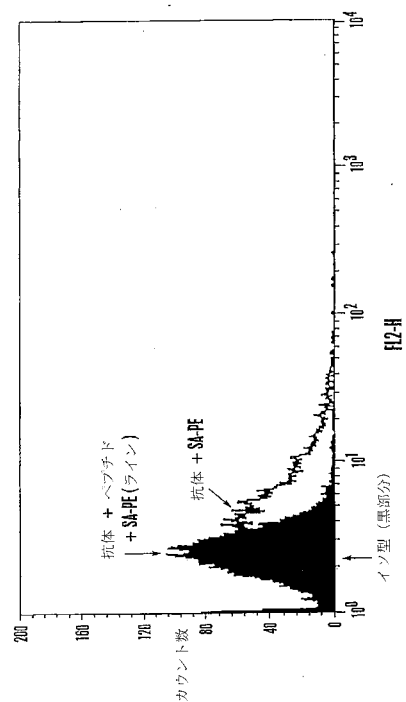
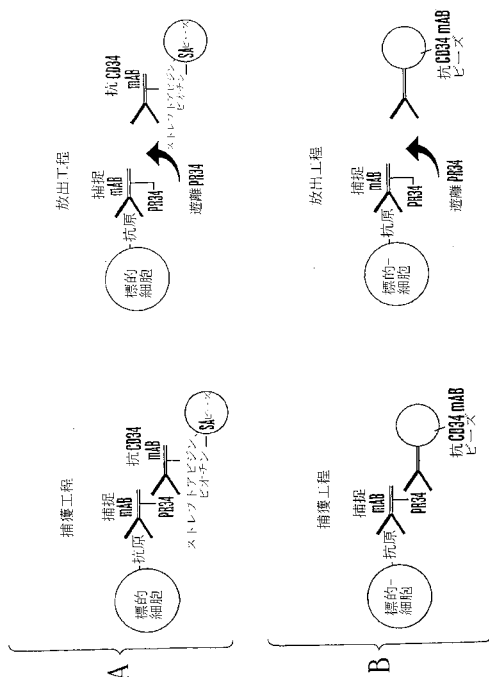
【図 4】 種々のペプチドを使用して抗 C D 2 抗体に結合した T 細胞の放出 % を示す。星印 10
は異なる供与細胞を使用した第 2 のアッセイ法からのデータを示す。

【図 5】 P n a - O - 5 モノクローナル抗体を使用したカンマ細胞の陽性選択および遊離ペプチドでの放出を示す。

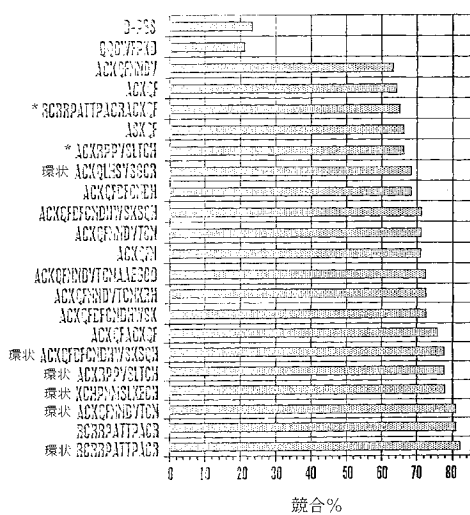
【図 6】 細胞垂集団の単離の概略図を示す。図 6 A は、2 つの標的特異的抗体リガンド（それぞれ、抗体 6 および 8）を使用した 2 つの細胞型 2 および 4 の単離を示す。両標的特異的リガンド 6 および 8 をペプチド 1 0 に接合して、ペプチド特異的抗体リガンド 1 4 によって認識されるペプチド-リガンド接合体 1 2 を形成する。2 つの標的特異的リガンド 6 および 8 に結合したペプチド 1 0 は、対応するペプチド 1 0 の遊離型を離脱させることができる同一のペプチドまたは異なるペプチドであり得る。遊離ペプチド 1 0 の添加により、ペプチド特異的リガンド 1 4 から細胞型 2 および 4 が放出される。図 6 B は、2 つの 20
細胞型 2 および 4 の単離を示す。細胞型 2 の標的特異的リガンド 6 を使用して、細胞型 2 を単離する。標的特異的リガンド 6 をペプチド 1 0 に接合して、ペプチド-リガンド接合体 1 2 を形成する。ペプチド特異的リガンド 1 4 はペプチド-リガンド接合体 1 2 に結合する。ペプチド特異的リガンド 1 4 はまた、細胞型 4 の標的特異的リガンドである。遊離ペプチド 1 0 の添加により、ペプチド特異的リガンド 1 4 から細胞型 2 および 4 が放出される。図 6 C は、細胞型 2 のみが放出されるような第 2 の細胞型 4 の陰性選択による、例えば図 6 B で単離した 2 つの細胞型 2 および 4 からの 1 つの細胞型 2 の単離を示す図である。細胞型 2 を、ペプチド 1 0 に接合した標的特異的リガンド 6 に結合させて、ペプチド-リガンド接合体 1 2 を形成する。図 6 B に類似の細胞型 4 を、細胞型 4 の標的特異的リガンドでもあるペプチド特異的リガンド 1 4 に結合する。細胞型 4 はペプチド 1 0 で離脱 30
されない第 2 の標的特異的リガンド 1 6 とともに結合する。遊離ペプチド 1 0 を添加することで、細胞型 2 が放出されるが、細胞型 4 は標的特異的リガンド 1 6 に捕獲されたままである。

【図 7】 本質的に図 6 B で示した方法による 2 つの細胞型の単離を示す。ペプチドにより離脱される C D 3 4 抗体は、C D 3 4 細胞に直接結合する。C D 3 4 抗体はまた、ペプチドに接合する間葉細胞（M S C）特異的リガンドに結合する。C D 3 4 細胞および間葉細胞の両方を、他の細胞から単離する。その後、C D 3 4 細胞および間葉細胞は共に遊離型のペプチドにより固体支持体から放出される。

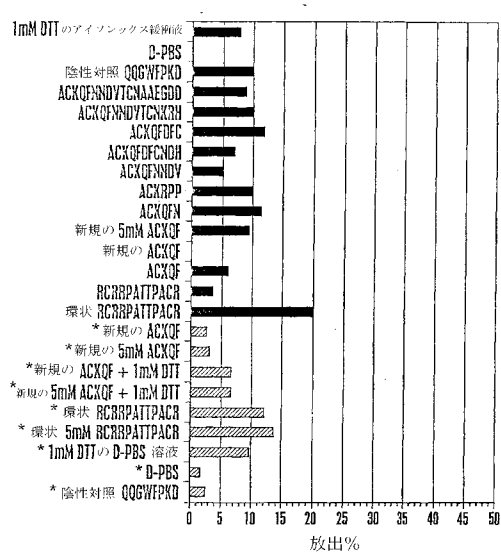
【图 2】



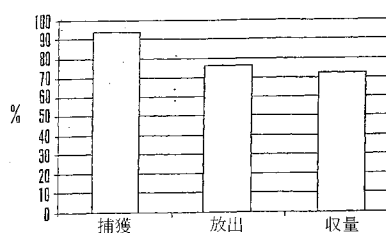
【図 3】



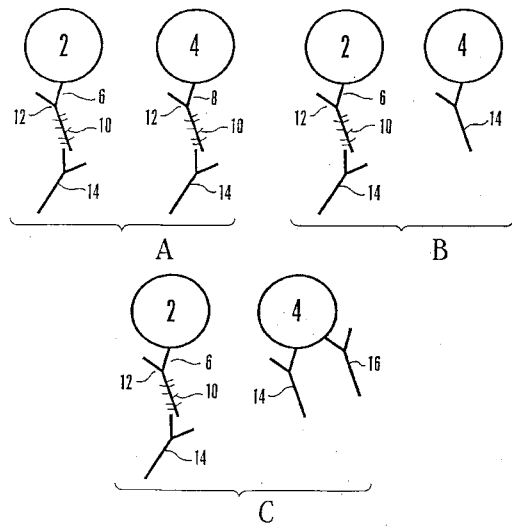
【図 4】



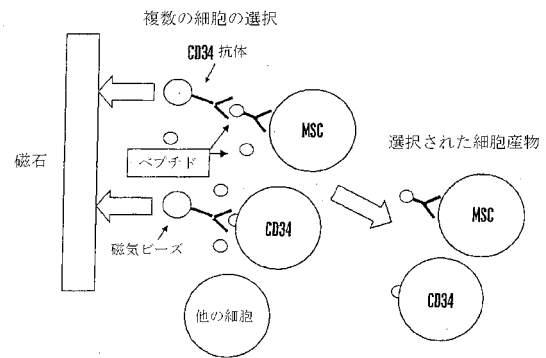
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/90153 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/00

(21) International Application Number: PCT/US01/16840

(22) International Filing Date: 23 May 2001 (23.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/578,784 23 May 2000 (23.05.2000) US
09/659,469 11 September 2000 (11.09.2000) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 09/659,469 (CIP)
Filed on 11 September 2000 (11.09.2000)
US 09/578,784 (CIP)
Filed on 23 May 2000 (23.05.2000)

(71) Applicant (for all designated States except US): NEXELL THERAPEUTICS, INC. [US/US]; 9 Parker, Irvine, CA 92618 (US).

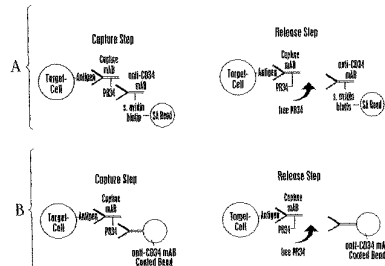
(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): SCHAEFFER, Andrew, T. [US/US]; 16366 Creekside Place, La Mirada, CA 90638 (US); TSENG-LAW, Janet [US/US]; 47 Rockrose, Aliso Viejo, CA 92656 (US); THORNTON, Jeffrey, R. [US/US]; Apartment 4307, 22751 El Prado, Rancho Santa Margarita, CA 92688 (US); VAN EPPS, Dennis, E. [US/US]; 8 Birkdale Way, Coto de Caza, CA 92679 (US).

(74) Agents: RAMOS, Robert, T. et al.; Campbell & Flores, LLP, 7th floor, 4370 La Jolla Village Drive, San Diego, CA 92122 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, 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, MZ, 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.

[Continued on next page]

(54) Title: REAGENTS FOR CELL SELECTION AND METHODS OF USE



(57) Abstract: The present invention provides peptide-ligand conjugates containing a peptide, where a free form of the peptide is capable of displacing a second ligand specific for the peptide. The invention also provides a method of selecting a cell. The method includes the steps of contacting a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein the conjugate comprises a first ligand specific for a cell in the population conjugated to a peptide capable of displacing a second ligand specific for the peptide, thereby forming a cell-conjugate complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the second ligand; and isolating the cell-conjugate complex. The method can further include the step of adding a free form of the peptide to release the cell from the complex. The invention also provides a subpopulation of cells containing two or more specifically isolated cells and methods of isolating cell subpopulations. The invention additionally provides a method of diagnosing a condition using peptide-ligand conjugates. The invention further provides a kit for isolating a cell containing a peptide capable of displacing an antibody specific for the peptide and the antibody.



WO 01/90153 A2

WO 01/90153 A2



(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

1

REAGENTS FOR CELL SELECTION AND METHODS OF USE

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention relates generally to cell selection methods and more specifically to methods of positively selecting cells from a population.

Isolation of rare cell types to high purity is essential for the study of cell biology and has important applications in molecular medicine. The diagnosis of cell-related diseases requires methods for detection, isolation and analysis of individual cells, even if the cells are rare.

Cell-based therapies can also involve the selection of one or more specific cell phenotypes from a heterogeneous cell population such as blood or bone marrow. For example, isolation of specific cell types is useful in gene therapy applications, in which a therapeutic gene is introduced into a cell, which in turn is introduced into a patient to deliver a therapeutic gene or protein. Isolated stem cells are also used therapeutically for transplantation into an immunocompromised patient. Stem cell transplantation is particularly useful in cancer patients who have undergone high-dose chemotherapy to compensate for tissues of the immune system that are damaged during therapy.

Cellular selection techniques generally fall into two broad categories, negative cell selection and positive cell selection. Negative cell selection involves the removal of selected cell phenotypes from a population. Positive cell selection involves the

WO 01/90153

PCT/US01/16840

2

selection or isolation of a specific cell phenotype from a larger heterogeneous population.

The use of antibodies specific for a particular cell type have been applied to positive cell selection.

5 While the use of a cell-specific antibody can be used to efficiently isolate a particular cell from a population of cells, the release of the bound cells for further use can be problematic, in particular in maintaining cell viability. Techniques for releasing cells bound to an
10 antibody attached to a bead can include, for example, changing the pH and temperature, use of reducing agents and/or chelating agents, and the use of proteases. However, each of these techniques has disadvantages in terms of maintaining cell viability or maintaining their
15 usefulness for therapeutic applications. For example, antibody binding to the cell surface can induce changes in the cell's physiology (Berardi et al., Science 267:104-108 (1995)).

One method useful for positively selecting
20 cells uses an antibody specific for a particular cell and a displacing peptide (U.S. Patent No. 5,968,753, issued October 19, 1999). The method is advantageous in that cells specifically bound to the antibody can be displaced with the peptide, resulting in release of a cell that is
25 free of bound antibody. However, such a method requires that each antibody specific for a given cell be screened for a peptide that will function to displace a pre-bound antibody-cell complex. Therefore, the method requires the identification of an antibody specific for a each
30 cell type and screening for a peptide that can displace a cell bound to the antibody.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

3

Thus, there exists a need for methods to positively select cells while maintaining cell viability and usefulness in therapeutic applications and, further, methods that can be applied universally to positively select a variety of cell types. The present invention satisfies this need and provides related advantages as well.

SUMMARY OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, there are provided peptide-ligand conjugates containing a peptide, wherein a free form of the peptide is capable of displacing a second ligand specific for the peptide. The peptide-ligand conjugate can be advantageously applied to a variety of cell types to positively select a particular cell. The peptide-ligand conjugate utilizes a peptide that, based on its ability to displace a second ligand specific for the peptide, can be conjugated to a variety of ligands having specificity for a variety of different cell types, thus eliminating the need to screen each cell-specific ligand for a peptide that can function to displace a pre-bound ligand-cell complex. The ligand to which a peptide is conjugated can be a molecule such as an antibody that specifically binds a target molecule, for example, a target molecule expressed on the surface of a cell such as a cell surface receptor.

The invention also provides a method of selecting a cell. The method includes the steps of contacting a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein the conjugate comprises a first ligand specific for a cell in the population conjugated to a peptide capable of displacing a second ligand specific for the peptide, thereby forming a cell-conjugate

WO 01/90153

PCT/US01/16840

4

complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the second ligand; and isolating the cell-conjugate complex. The methods of the invention can further include the step of contacting the cell-conjugate complex with a free form of the peptide, thereby releasing the cell from the cell-conjugate complex. The invention further provides a method of enriching for a cell from a population using a peptide-ligand conjugate.

The invention further provides a method of selecting a cell subpopulation. The method includes the steps of contacting a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein the conjugate comprises a first ligand specific for a first cell in the population, where the first ligand is conjugated to a peptide capable of displacing a peptide-specific ligand, thereby forming a first cell-conjugate complex; and with a second ligand specific for a second cell in the population, thereby forming a second cell-second ligand complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the peptide-specific ligand; and isolating the first cell-conjugate complex and the second cell-second ligand complex. The invention also provides compositions of subpopulations of cells.

The invention additionally provides a method of diagnosing a condition. The method includes the steps of contacting a sample comprising a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein the conjugate comprises a first ligand specific for a cell in the population conjugated to a peptide capable of displacing a second ligand specific for the peptide, thereby forming a cell-conjugate complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the second ligand; isolating the

WO 01/90153

PCT/US01/16840

5

cell-conjugate complex; and identifying the cell in the complex, wherein the cell is associated with a condition.

The invention further provides a kit for isolating a cell. The kit contains a peptide capable of displacing an antibody specific for the peptide and the antibody. The kits of the invention can be used to couple a peptide capable of displacing an antibody specific for the peptide to any desired ligand that binds to a cell.

10

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows a schematic diagram of the capture and release of a target cell using a target-specific antibody conjugated to a peptide and an antibody specific for the peptide. The top panel shows capture of the peptide-antibody complex using streptavidin beads, and the bottom panel shows capture by direct binding of the peptide-specific antibody to the beads.

Figure 2 shows flow cytometry of SUP-T1 cells alone (Isotype), in the presence of an antibody-peptide conjugate (Antibodies + SA-PE), and in the presence of the antibody-peptide conjugate and free peptide (Antibodies + Peptide + SA-PE).

Figure 3 shows the percent competition of various peptides for an anti-CD2 antibody.

Figure 4 shows the percent release of T cells bound to anti-CD2 antibody using various peptides. The asterisk indicates data from a second assay with different donor cells.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

6

Figure 5 shows positive selection of Camma cells using Pan-O-5 monoclonal antibody and release with free peptide.

Figure 6 shows a schematic diagram of the isolation of a subpopulation of cells. Figure 6A shows the isolation of two cell types 2 and 4 with two target-specific antibody ligands (antibodies 6 and 8, respectively). Both target-specific ligands 6 and 8 are conjugated to a peptide 10 to form a peptide-ligand conjugate 12 that is recognized by a peptide-specific antibody ligand 14. The peptide 10 coupled to the two target-specific ligands 6 and 8 can be the same peptide or different peptides, which are capable of being displaced by a free form of the corresponding peptide 10. Addition of free peptide(s) 10 will release cell types 2 and 4 from the peptide-specific ligand(s) 14.

Figure 6B shows the isolation of two cell types 2 and 4. Cell type 2 is isolated using a target-specific ligand 6 for cell type 2. Target-specific ligand 6 is conjugated to peptide 10 to form a peptide-ligand conjugate 12. The peptide-specific ligand 14 binds to the peptide-ligand conjugate 12. The peptide-specific ligand 14 is also a target-specific ligand for cell type 4. Addition of free peptide 10 will release cell types 2 and 4 from the peptide-specific ligand 14.

Figure 6C shows the isolation of a single cell type 2 from, for example, the two cell types 2 and 4 isolated in Figure 6B, by the negative selection of a second cell type 4 so that only cell type 2 is released. Cell type 2 is bound to a target-specific ligand 6 that

WO 01/90153

PCT/US01/16840

7

is conjugated to peptide 10 to form a peptide-ligand conjugate 12. Cell type 4, similar to Figure 6B, is bound to a peptide-specific ligand 14 that is also a target-specific ligand for cell type 4. Cell type 4 is also bound by a second target-specific ligand 16 that is not displaced with peptide 10. Addition of free peptide 10 will release cell type 2, but cell type 4 remains captured by target-specific ligand 16.

Figure 7 shows the isolation of two cell types essentially by the method shown in Figure 6B. A CD34 antibody, which can be displaced by peptide, binds directly to a CD34 cell. The CD34 antibody also binds to a mesenchymal cell (MSC)-specific ligand that is conjugated to the peptide. Both CD34 cells and mesenchymal cells are isolated away from other cells. Both CD34 and mesenchymal cells are then released from the solid support with a free form of the peptide.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, there are provided a peptide-ligand conjugates comprising a peptide conjugated to a first ligand, wherein a free form of the peptide is capable of displacing a second ligand specific for the peptide.

As used herein, the term "peptide-ligand conjugate" refers to a molecule containing at least one peptide covalently cross-linked to a ligand. A peptide-ligand conjugate retains full or partial ligand binding activity of the original ligand such that specific binding of the ligand to its binding partner is detectable. The peptide-ligand conjugate can be

WO 01/90153

PCT/US01/16840

8

generated by coupling the peptide and ligand using a variety of chemical cross-linking agents as disclosed herein.

A peptide-ligand conjugate of the invention can contain multiple copies of the peptide covalently coupled to the ligand, for example, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 11 or more, 12 or more, 13 or more, 14 or more, 15 or more, 16 or more, 17 or more, 18 or more, 19 or more, or 20 or more copies of the peptide. A peptide-ligand conjugate of the invention can also contain 25 or more, 30 or more, 35 or more, 40 or more, 45 or more, 50 or more, 75 or more, or even 100 or more copies of the peptide. It is understood that any number of copies of the peptide can be conjugated to the ligand so long as the ligand retains specific binding activity for its binding partner. One skilled in the art can readily optimize a peptide-ligand conjugate of the invention by coupling various amounts of peptide to the ligand and determining a number or range of peptides optimized for methods of isolating a cell from a population. As used herein, the term "peptide-ligand conjugate" specifically excludes a fusion polypeptide in which the peptide is linearly linked to the ligand via a peptide bond to form a single, linear polypeptide.

As used herein, the term "peptide" or "polypeptide" refers to a peptide or polypeptide of two or more amino acids. The term "polypeptide analog" includes any polypeptide having an amino acid sequence substantially the same as a sequence specifically described herein in which one or more residues have been conservatively substituted with a functionally similar residue and which displays the ability to displace a

WO 01/90153

PCT/US01/16840

9

ligand from a parent peptide. Conservative substitutions of encoded amino acids include, for example, amino acids that belong within the following groups: (1) non-polar amino acids (Gly, Ala, Val, Leu, and Ile); (2) polar
5 neutral amino acids (Cys, Met, Ser, Thr, Asn, and Gln); (3) polar acidic amino acids (Asp and Glu); (4) polar basic amino acids (Lys, Arg and His); and (5) aromatic amino acids (Phe, Trp, Tyr, and His). Other minor modifications are included within a peptide of the
10 invention so long as the peptide retains some or all of its capability of displacing a ligand specific for the peptide.

The amino acid length of a peptide of the present invention can range from about 2 or more, about 3
15 or more, about 4 or more, about 5 or more, about 6 or more, about 7 or more, about 8 or more, about 9 or more, or about 10 or more amino acids. In certain embodiments, the amino acid lengths include, for example, about 11 or more, about 12 or more, about 13 or more, about 14 or
20 more, about 15 or more, about 16 or more, about 17 or more, about 18 or more, about 19 or more, about 20 or more, about 21 or more, about 22 or more, about 23 or more, about 24 or more, about 25 or more, about 26 or more, about 27 or more, about 28 or more, about 29 or
25 more, or about 30 or more amino acids. A peptide of the invention also includes amino acid lengths of, for example, about 32 or more, about 35 or more, about 38 or more, about 40 or more, about 45 or more, about 50 or more, about 55 or more, about 60 or more, about 65 or
30 more, about 70 or more, about 75 or more, about 80 or more, about 90 or more, or about 100 or more amino acids.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

10

A modification of a peptide or polypeptide can also include derivatives, analogues and functional mimetics thereof, provided that such a peptide displays the capability of displacing a ligand specific for the peptide. For example, derivatives can include chemical modifications of the peptide such as alkylation, acylation, carbamylation, iodination, or any modification that derivatizes the peptide. Such derivatized molecules include, for example, those molecules in which free amino groups have been derivatized to form amine hydrochlorides, p-toluene sulfonyl groups, carbobenzoxy groups, t-butyloxycarbonyl groups, chloroacetyl groups or formyl groups. Free carboxyl groups can be derivatized to form salts, methyl and ethyl esters or other types of esters or hydrazides. Free hydroxyl groups can be derivatized to form O-acyl or O-alkyl derivatives. The imidazole nitrogen of histidine can be derivatized to form N-im-benzylhistidine. Also included as derivatives or analogues are those peptides which contain one or more naturally occurring amino acid derivatives of the twenty standard amino acids, for example, 4-hydroxyproline, 5-hydroxylysine, 3-methylhistidine, homoserine, ornithine or carboxyglutamate, and can include amino acids that are not linked by peptide bonds. Such peptide derivatives can be incorporated during synthesis of a peptide, or a peptide can be modified by well known chemical modification methods (see, for example, Glazer et al., Chemical Modification of Proteins. Selected Methods and Analytical Procedures, Elsevier Biomedical Press, New York (1975)).

Analogues of synthetic linear peptides can be made by chemically converting the structures to cyclic forms. Cyclization of linear peptides can modulate bioactivity by increasing or decreasing the potency of

WO 01/90153

PCT/US01/16840

11

binding to the target protein (Pelton, J.T., et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 82:236-239). Linear
peptides are very flexible and tend to adopt many
different conformations in solution. Cyclization acts to
5 constrain the number of available conformations, and
thus, favor the more active or inactive structures of the
peptide. The immunogenicity of synthetic peptides has
been correlated with the experimentally observed
conformational preferences in solution (Dyson, H., et
10 al., 1988, Annual Review of Biophysics and Biophysical
Chemistry, 17:305-324). Differences in immunogenicity
can be indicative of differences in binding affinity of
specific antibodies for cyclic peptides.

Cyclization of linear peptides is accomplished
15 either by forming a peptide bond between the free
N-terminal and C-terminal ends (homodetic cyclopeptides)
or by forming a new covalent bond between amino acid
backbone and/or side chain groups located near the N- or
C-terminal ends (heterodetic cyclopeptides) (Bodanszky,
20 M., Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag
(1984)). The latter cyclizations use alternate chemical
strategies to form covalent bonds, for example,
disulfides, lactones, ethers, or thioethers. Generally,
linear peptides of more than five residues can be
25 cyclized relatively easily. The propensity of the
peptide to form a beta-turn conformation in the central
four residues facilitates the formation of both homo- and
heterodetic cyclopeptides. The presence of proline or
glycine residues at the N- or C-terminal ends also
30 facilitates the formation of cyclopeptides, especially
from linear peptides shorter than six residues in length.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

12

A modification of a peptide of the invention includes functional mimetics thereof. Mimetics encompass chemicals containing chemical moieties that mimic the function of the peptide in displacing a ligand specific for the peptide. For example, if a peptide contains two charged chemical moieties having functional activity, a mimetic places two charged chemical moieties in a spatial orientation and constrained structure so that the charged chemical function is maintained in three-dimensional space. Thus, a mimetic, which orients functional groups that provide a function of an invention peptide to displace a ligand specific for the peptide, are included within the meaning of a peptide of the invention. All of these modifications are included within the term "peptide" or "polypeptide" so long as the peptide retains its function in displacing a ligand specific for the peptide.

As used herein, the term "ligand" refers to a molecule that can selectively bind to a molecule. The term selectively means that the binding interaction between the ligand and its binding partner is detectable over non-specific interactions by a quantifiable assay. A ligand can be essentially any type of molecule such as polypeptide, nucleic acid, carbohydrate, lipid, or any organic derived compound. Moreover, derivatives, analogues and mimetic compounds are also intended to be included within the definition of this term. In one embodiment, a ligand of the invention can be an antibody.

As used herein, the phrase "capable of displacing" when used in reference to a peptide refers to the ability of the peptide to disrupt a preformed complex of a ligand with its binding partner. The disruption of the preformed complex allows displacement of the ligand

WO 01/90153

PCT/US01/16840

13

from the complex. An exemplary preformed complex is a complex between a peptide-ligand conjugate and a second ligand specific for the peptide. In such a case, a peptide capable of displacing a ligand specific for the peptide can displace a peptide-ligand conjugate prebound with a second ligand, thereby releasing the peptide-ligand conjugate from the second ligand. A ligand specific for a peptide capable of displacing the ligand can be, for example, an antibody.

10 As used herein, a "free form of a peptide" refers to a peptide that is not conjugated to a ligand. The free form of a peptide can be identical to a peptide that is conjugated to a ligand. Alternatively, the free form of the peptide can be a modification of the peptide conjugated to a ligand so long as the free form of the peptide has the ability to displace a second ligand specific for the peptide. In methods of the invention, the free form of the peptide is capable of displacing a preformed complex between a peptide-ligand conjugate and
20 a second ligand specific for the peptide.

One skilled in the art can readily determine the amount of a free form of a peptide sufficient to displace a pre-formed complex between a peptide-ligand conjugate and a second ligand specific for the peptide.
25 The free peptide displaces an amount of pre-formed complexes sufficient for use in methods of the invention, and it is understood that the free peptide need not displace all pre-formed complexes. The amount of free peptide used to displace a complex can be optimized by
30 varying the ratio of peptide to complex to determine an amount of peptide that is optimized to displace a pre-formed complex. For example, a pre-formed complex in which a cell is bound to a peptide-ligand conjugate which

WO 01/90153

PCT/US01/16840

14

in turn is bound to a second ligand specific for the peptide which in turn is bound to a solid support such as a bead can be tested for an optimized amount of free peptide by incubating the complex bound to the beads with various amounts of free peptide and determining an amount of free peptide that is optimized for displacement of the pre-formed complex. Thus, varying the peptide to bead ratio can be used to determine an optimized amount of free peptide to use for displacement.

10 A ligand specific for a peptide capable of displacing the ligand, also referred to as a peptide-specific ligand, will generally have an affinity of about $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ to about $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ for the peptide. The peptide-specific ligand can be used to capture a target cell in a manner that allows the cell to be released by a free form of the peptide. The effectiveness of a peptide in displacing a pre-formed complex is a function of the affinity of the peptide for a ligand in the complex. Generally, such a peptide capable of displacing a ligand will have a high on rate (k_{on}), which allows the peptide to bind more efficiently when a pre-bound complex dissociates. Peptides particularly useful in the invention have high affinity for a ligand and are generally relatively small.

25 Exemplary peptides capable of displacing a ligand specific for the peptide includes, for example, the peptides QQGWFP (SEQ ID NO:1); QQGWFPKD (SEQ ID NO:2); and QQGWFPKDC (SEQ ID NO:3), as disclosed herein. Any of the peptides capable of displacing a ligand useful in the invention can be modified to be acetylated at the amino terminus or amidated on the carboxyl terminus.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

15

Additional exemplary peptides include, for example, peptides that displace the 9069 antibody produced by ATCC HB 11646 (see, for example, U.S. Patent No. 5,968,753). Such peptides include Q Q G F F P (SEQ ID NO:4); T Q G T F S (SEQ ID NO:5); N Q G Y F P (SEQ ID NO:6). Others include Q G X₁ F (SEQ ID NO:52) and X₂ Q G X₁ F X₂ (SEQ ID NO:53), wherein X₁= W, Y, S, F or T; X₂= Q, N, T, or S; and X₃= P, W, or S.

Additional peptides that displace the 9069 antibody include Q G X F (SEQ ID NO:54); J₁ Q G X F J₂ (SEQ ID NO:55); X Q G X F X (SEQ ID NO:56); J₁ X Q G X F X J₂ (SEQ ID NO:57); J₁ Q Q G W F P J₂ (SEQ ID NO:7); J₁ T Q G S F W J₂ (SEQ ID NO:8); J₁ Q Q G W F P K D J₂ (SEQ ID NO:9); J₁ Q Q G W F P D K J₂ (SEQ ID NO:10); J₁ A D G A X Q G X F X G A K D J₂ (SEQ ID NO:11); J₁ A D G A Q Q G W F P G A K D J₂ (SEQ ID NO:12); J₁ A D G A T Q G S F W G A K D J₂ (SEQ ID NO:13); J₁ N S S V Q S J₂ (SEQ ID NO:14); J₁ A D G A L I S Q V S G A K D J₂ (SEQ ID NO:15); J₁ L I S Q V S J₂ (SEQ ID NO:16); J₁ N S S V X X J₂ (SEQ ID NO:17); J₁ N S S V G L J₂ (SEQ ID NO:18); J₁ T G Q A S T J₂ (SEQ ID NO:19); J₁ A D G A P F W G Q Q G A K D J₂ (SEQ ID NO:20); J₁ A D G A T Q G T F S G A K D J₂ (SEQ ID NO:21); J₁ P E L P T Q G T F S N V S K E J₂ (SEQ ID NO:22); J₁ A D G A T Q G I C L G A K D J₂ (SEQ ID NO:23); J₁ E V K L T Q G I C L E Q N K T J₂ (SEQ ID NO:24) and J₁ A D G A N Q G Y F P G A K D J₂ (SEQ ID NO:25), wherein J₁ and J₂ are selected from the group consisting of 0 - 6 amino acid residues and X is any amino acid. J₁ and J₂ contain hydrophilic, polar, or charged amino acid residues to aid the solubility of the peptide in aqueous solution. Examples of hydrophilic, polar, or charged amino acids are: G, S, T, C, Y, N, Q, D, E, H, K and R.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

16

Exemplary peptides capable of releasing cells bound by the anti-CD34 antibody designated 9079, which is produced by the hybridoma deposited with the ATCC, designated ATCC HB-11885, include PGSPFLGKD (SEQ ID NO:26); YSRLGFKD (SEQ ID NO:27); QYTQPKD (SEQ ID NO:28); NLQGEFKD (SEQ ID NO:29); RSFYIRD (SEQ ID NO:30); IQEFGVKD (SEQ ID NO:31); SFRVGYKD (SEQ ID NO:32); KDVYSLWPKD (SEQ ID NO:33).

Exemplary peptides which compete for binding of the anti-CD2 antibody B-E2 to cells include ACKQF (SEQ ID NO:34); ASKQF (SEQ ID NO:35); ACKRPP (SEQ ID NO:36); ACKQFN (SEQ ID NO:37); ACKQFDFC (SEQ ID NO:38); ACKQFNNDV (SEQ ID NO:39); ACKQFACKQF (SEQ ID NO:40); ACKQFDFCNDH (SEQ ID NO:41); ACKRPPVSLTCH (SEQ ID NO:42); ACKQLHSVSGCR (SEQ ID NO:43); ACKQFNNDVTCN (SEQ ID NO:44); ACKQFDFCNDHWSK (SEQ ID NO:45); ACKQFNNDVTCNKRH (SEQ ID NO:46); ACKQFDFCNDHWSKSH (SEQ ID NO:47); ACKQFNNDVTCNAEGDD (SEQ ID NO:48); KCHPNMSLKECH (SEQ ID NO:49); RCRRPATTPACR (SEQ ID NO:50); and RCRRPATTPACRACKQF (SEQ ID NO:51) (see Example VI).

The invention also provides a peptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of ACKQF (SEQ ID NO:34); ASKQF (SEQ ID NO:35); ACKRPP (SEQ ID NO:36); ACKQFN (SEQ ID NO:37); ACKQFDFC (SEQ ID NO:38); ACKQFNNDV (SEQ ID NO:39); ACKQFACKQF (SEQ ID NO:40); ACKQFDFCNDH (SEQ ID NO:41); ACKRPPVSLTCH (SEQ ID NO:42); ACKQLHSVSGCR (SEQ ID NO:43); ACKQFNNDVTCN (SEQ ID NO:44); ACKQFDFCNDHWSK (SEQ ID NO:45); ACKQFNNDVTCNKRH (SEQ ID NO:46); ACKQFDFCNDHWSKSH (SEQ ID NO:47); ACKQFNNDVTCNAEGDD (SEQ ID NO:48); KCHPNMSLKECH (SEQ ID NO:49); RCRRPATTPACR (SEQ ID NO:50); and RCRRPATTPACRACKQF (SEQ ID NO:51).

WO 01/90153

PCT/US01/16840

17

Methods for identifying a peptide capable of displacing a ligand from a pre-formed complex are well known to those skilled in the art as taught, for example, in U.S. Patent No. 5,968,753, issued October 19, 1999, and PCT publication WO 95/34817. To identify a peptide capable of displacing a ligand specific for the peptide, peptides that bind to an antibody can be initially determined. For example, a competitive binding assay can be performed to determine which peptides can prevent binding of an antibody to an antigen (see Example VI). Those peptides which are competitive for antigen binding can be further tested to determine those which can displace a performed complex between the antibody and antigen, either an isolated antigen or an antigen attached to a cell. Those peptides which displace a pre-formed complex can be further tested to identify any peptides having optimized displacing activity, for example, peptides that are optimized for displacing a cell from a bead. Thus, peptides can be identified having optimized displacing activity for any desired application, including displacement of a performed antibody complex with a cell or displacement of cell bound to a solid support such as a bead.

The peptides capable of displacing a ligand from a pre-formed complex can be modified, if desired, to facilitate conjugation of the peptide to a ligand. For example, as disclosed herein, a Cys residue was added to facilitate cross-linking of the peptide QQGWFPKD (SEQ ID NO:2). Methods of coupling a peptide via a Cys residue are well known to those skilled in the art including, for example, using EMCS or MBS (see Example I; Pierce, Rockford IL). It is understood that peptides can be modified by any of the well known methods to facilitate

WO 01/90153

PCT/US01/16840

18

conjugation to a ligand so long as the peptide retains its ability to bind to a peptide-specific ligand.

Although the peptides can be modified to facilitate conjugation of a peptide to a ligand, the same modification need not be included in the free form of the peptide when the peptide is used to displace a second ligand specific for the peptide. Furthermore, the free form of the peptide need not have an identical amino acid sequence as the peptide conjugated to the ligand so long as the free form of the peptide is capable of displacing a second ligand bound to the peptide-ligand conjugate. Moreover, the free form of the peptide can also be a modification of the conjugated peptide, including a peptidomimetic or any polypeptide modification, as disclosed herein, so long as the free form of the peptide is capable of displacing a second ligand bound to the peptide-ligand conjugate.

Ligands useful for conjugating to a peptide generally bind to a target molecule on a cell surface such as a cell surface receptor. Such a ligand, also referred to as a target-specific ligand, is useful for conjugating to a peptide and can be, for example, an antibody specific for a cell surface molecule or a ligand that binds to a cell surface molecule or receptor. A ligand can be a naturally occurring ligand or can be a modification of a naturally occurring ligand. A ligand can also be a chemical that is screened for binding activity to a target molecule on a cell surface. Methods for identifying a ligand to a cell surface molecule are well known to those skilled in the art, as disclosed herein.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

19

As exemplary ligands, the invention provides antibodies that specifically bind to a target and function as a target-specific ligand or that are specific for a peptide capable of displacing the ligand and function as a peptide-specific ligand. As used herein, the term "antibody" is used in its broadest sense to include polyclonal and monoclonal antibodies, as well as antigen binding fragments of such antibodies. When using polyclonal antibodies, the polyclonal sera can be affinity purified using the antigen to generate mono-specific antibodies having reduced background binding and a higher concentration of antigen-specific antibodies.

An antibody of the invention, or antigen binding fragment of such an antibody, is characterized by having specific binding activity for a target molecule or a fragment thereof of at least about $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Thus, Fab, F(ab')_2 , Fd and Fv fragments of an invention antibody, which retain specific binding activity for a target molecule, are included within the definition of an antibody. Specific binding activity of an antibody to a target molecule can be readily determined by one skilled in the art, for example, by comparing the binding activity of an antibody to a target molecule versus a control molecule that is not the target molecule. Methods of preparing polyclonal or monoclonal antibodies are well known to those skilled in the art (see, for example, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)).

In addition, the term "antibody" as used herein includes naturally occurring antibodies as well as non-naturally occurring antibodies, including, for example, single chain antibodies, chimeric, bifunctional and humanized antibodies, as well as antigen-binding

WO 01/90153

PCT/US01/16840

20

fragments thereof. Such non-naturally occurring antibodies can be constructed using solid phase peptide synthesis, can be produced recombinantly or can be obtained, for example, by screening combinatorial libraries consisting of variable heavy chains and variable light chains as described by Huse et al. (Science 246:1275-1281 (1989)). These and other methods of making, for example, chimeric, humanized, CDR-grafted, single chain, and bifunctional antibodies are well known to those skilled in the art (Winter and Harris, Immunol. Today 14:243-246 (1993); Ward et al., Nature 341:544-546 (1989) ; Harlow and Lane, *supra*, 1988); Hilyard et al., Protein Engineering: A practical approach (IRL Press 1992); Borrabeck, Antibody Engineering, 2d ed. (Oxford University Press 1995)).

Antibodies can be raised using an immunogen such as an isolated target molecule, a fragment thereof, or a peptide, which can be prepared from natural sources produced recombinantly or chemically synthesized. A non-immunogenic or weakly immunogenic target molecule or portion thereof can be made immunogenic by coupling the hapten to a carrier molecule such as bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH). Various other carrier molecules and methods for coupling a hapten to a carrier molecule are well known in the art (see, for example, Harlow and Lane, *supra*, 1988). An immunogenic fragment can also be generated by expressing a portion of a target molecule that is a polypeptide as a fusion protein, for example, to glutathione S transferase (GST), polyHis or the like. Methods for expressing peptide fusions are well known to those skilled in the art (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999)).

WO 01/90153

PCT/US01/16840

21

When the target-specific ligand and the peptide-specific ligand are both antibodies, the two antibodies can be from two different species. The use of two different species is particularly useful when using a secondary antibody to specifically isolate a complex via the peptide interaction (see below). For example, the target-specific antibody can be a human antibody and the peptide-specific antibody can be a mouse antibody. Exemplary species useful for generating antibodies include mammalian species such as human, mouse, rabbit, rat, sheep and goat as well as non-mammalian species such as chicken. A target-specific antibody and peptide-specific antibody can be any species so long as the target-specific and peptide-specific antibodies are from different species.

Exemplary antibodies can include antibodies specific for cell surface antigens. For example, antibodies specific for cell surface markers such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD25, CD34, CD56, and CD69 are exemplary antibodies that can be used as ligands in the invention. The cell surface markers can be specific for a particular cell type or a group of cells. For example, CD2 is a pan T cell marker for all T cells whereas CD8 is a marker for a subset of T cells. Accordingly, antibody ligands specific for these cell surface markers can be used to isolate T cells or a subset of T cells that are CD8 positive, respectively.

Other exemplary antibodies useful as ligands in the invention include antibodies specific for tumor cell markers, including HER2/neu, CD138, p53, prostate specific antigens, melanoma associated antigens (MAGE) 1, 2, 3, 4, 6, or 12, gp100, carcinoembryonic antigen (CEA), the Pan-O-5 marker and the like, and markers for tumor

WO 01/90153

PCT/US01/16840

22

types such as leukemia or lymphoma, including CD19, CD20, CD22, CD25 and CD30. The Pan-O-5 antibody can bind to epithelial tumors.

Other exemplary antibodies useful as ligands in the invention include antibodies specific for stem cells. Such stem cells include, for example, a blood-generated stem cell such as a hematopoietic stem cell, a mesenchymal stem cell, a neuronal stem cell, or a muscle stem cell. Essentially, any type of all surface molecule can be used as a target for a ligand useful in the invention. Such cell surface molecules include cell surface receptors, for example, growth factor or cytokine receptors.

The peptides of the invention, which are capable of displacing a ligand specific for the peptide, can be conjugated to any ligand specific for a desired target. The peptides of the invention can be conjugated to any target-specific ligand that is specific for a desired target such as a particular cell type (Figure 1). For example, a target-specific ligand can be a known ligand specific for a cell surface receptor on a particular cell type. A target-specific ligand can also be generated by methods well known to those skilled in the art. For example, an antibody ligand specific for a target on the surface of a cell can be generated using the antibody production methods disclosed herein by immunizing with a desired cell type or a cell type-specific target molecule and screening for antibodies that specifically bind to the desired cell type. Specific binding to a particular cell type can be determined by one skilled in the art, for example, by comparing binding of the ligand to a desired cell with

WO 01/90153

PCT/US01/16840

23

binding to a control cell that does not express the cell-type specific target molecule.

In addition to using antibodies, a ligand specific for a target molecule expressed on the surface of a cell can be a naturally occurring ligand that binds to a receptor on the cell surface. Examples of such naturally occurring ligands and receptors include growth factors and cytokines and their cognate receptors. In addition to known ligand-receptor binding partners, naturally occurring ligands that bind to orphan receptors can be determined by methods well known to those skilled in the art. For example, an expression library can be screened with an orphan receptor to identify a naturally occurring ligand that binds to the receptor. Additionally, a naturally occurring ligand can be identified using screening assays such as yeast two-hybrid assays (see, for example, U.S. Patent Nos. 5,283,173, 5,468,614 and 5,667,973; Ausubel et al., *supra*, 1999; Luban et al., Curr. Opin. Biotechnol. 6:59-64 (1995)). Such naturally occurring ligands can be conjugated to a peptide capable of displacing a ligand specific for the peptide.

In the case of an antibody-expressing T cell, which expresses an antibody on the cell surface, a target-specific ligand can be an antigen specific for the antibody expressed in a T cell. The methods of the invention can thus be used to isolate or enrich for a T cell or population of T cells expressing antibodies specific for an antigen.

In addition to naturally occurring ligands, non-naturally occurring ligands specific for a target molecule can also be conjugated to a peptide of the

WO 01/90153

PCT/US01/16840

24

invention. A non-naturally occurring ligand can be, for example, a derivative of a naturally occurring ligand, as described above for polypeptides. In addition, a non-naturally occurring ligand can be a compound that is screened for binding activity to a target molecule. Methods for producing pluralities of compounds to use in screening for compounds that can function as a ligand for a target molecule, including chemical or biological molecules such as simple or complex organic molecules, metal-containing compounds, carbohydrates, peptides, proteins, peptidomimetics, glycoproteins, lipoproteins, nucleic acids, antibodies, and the like, are well known in the art and are described, for example, in Huse, U.S. Patent No. 5,264,563; Francis et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 2:422-428 (1998); Tietze et al., Curr. Biol., 2:363-371 (1998); Sofia, Mol. Divers. 3:75-94 (1998); Eichler et al., Med. Res. Rev. 15:481-496 (1995); and the like. Libraries containing large numbers of natural and synthetic compounds also can be obtained from commercial sources. Combinatorial libraries of molecules can be prepared using well known combinatorial chemistry methods (Gordon et al., J. Med. Chem. 37: 1233-1251 (1994); Gordon et al., J. Med. Chem. 37: 1385-1401 (1994); Gordon et al., Acc. Chem. Res. 29:144-154 (1996); Wilson and Czarnik, eds., Combinatorial Chemistry: Synthesis and Application, John Wiley & Sons, New York (1997)).

Any peptide-ligand binding pair in which the peptide is capable of displacing the ligand specific for the peptide can be used in combination in methods of the invention for isolating a cell. The peptide can be conjugated to any target-specific ligand to allow isolation of a target cell by the peptide-ligand conjugate. The cell can then be displaced from the pre-formed complex with a free form of the peptide.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

25

In one embodiment, a ligand specific for a peptide capable of displacing the ligand specifically binds CD34. One such ligand that specifically binds CD34 is monoclonal antibody 9C5. The anti-CD34 antibody 9C5, also known as antibody 9069, was deposited in the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas VA 90110, on June 7, 1994, and designated HB 11646. An example of a peptide capable of displacing the 9C5 ligand is the peptide QQGWFPP (SEQ ID NO:1), QQGWFPPKD (SEQ ID NO:2); and QQGWFPPKDC (SEQ ID NO:3) (see Examples I to III).

A peptide-ligand conjugate can be generated, for example, by chemically cross-linking at least one copy of a peptide to a ligand specific for a target molecule. Suitable cross-linking agents include, for example, the heterobifunctional cross-linking agent N-(ε-maleimidocaproyloxy)succinimide ester (EMCS) (see Example I). Other suitable cross-linking agents include, for example, glutaraldehyde; m-maleimido benzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS); carbodimide; bis-diazo benzidine (BDB); azidobenzoyl hydrazide (ABH); N-5-azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide (ANB-NOS); N-(4-(p-azidosalicylajido)butyl)-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide (APDP); p-azidophenyl glyoxal monohydrate (APG); 4-(p-azidosalicylamido)butylamine (ASBA); 1-(p-azidosalicylamido)-4-(iodoacetamido)butane (ASIB); bis-(β-(4-azidosalicylamido)ethyl)disulfide (BASED); bismaleimido hexane (BMH); bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS³); bis(2-succinimidooxycarbonyloxy)ethyl sulfone (BSOCOES); bis(2-sulfosuccinimidooxycarbonyloxy)ethyl sulfone (sulfo-BSOCOES); 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene (DFDNB); dimethyl adipimidate·2 HCl (DMA); dimethyl pimelimidate·2 HCl (DMP); dimethyl suberimidate·2 HCl (DMS); 1,4-di-(3'-

WO 01/90153

PCT/US01/16840

26

(2'-pyridyldithio)-propionamido))butane (DPDPB);
disuccinimidyl glutarate (DSG);
dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP); disuccinimidyl
suberate (DSS); disuccinimidyl tartarate (DST); dimethyl
5 3,3'-dithiobispropionimide-2 HCl (DTBP); 3,3'-
dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate) (DTSSP); 1-ethyl-
3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride
(EDC); ethylene glycolbis-(succinimidylsuccinate) (EGS);
ethylene glycolbis-(sulfosuccinimidylsuccinate) (sulfo-
10 EGS); N-γ-maleimidobutyryloxy-succinimide ester (GMBS);
N-γ-maleimidobutyryloxy-sulfosuccinimide ester (sulfo-
GMBS); N-hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoate (HSAB);
-hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate (sulfo-HSAB);
m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester
15 (sulfo-MBS); 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-
carboxylhydrazide-HCl (M_2C_2H); 4-(4-N-maleimidophenyl)-
butyric acid hydrazide-HCl (MPBH); N-hydroxysuccinimidyl-
4-azidosalicylic acid (NHS-ASA); N-
hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidosalicylic acid (sulf-NHS-
20 ASA); sulfosuccinimidyl(4-azidosalicylamido)hexanoate
(sulfo-NHS-LC-ASA); 3-(2-pyridyldithio)propionyl
hydrazide (PDPH); p-nitrophenyl-2-diazo-3,3,3-
trifluoropropionate (PNP-DTP); 2-diazo-3,3,3-
trifluoropropionylchloride (DTP); N-succinimidyl(4-
25 azidophenyl)1,3'-dithiopropionate (SADP);
sulfosuccinimidyl(4-azidophenyldithio)propionate (sulfo-
SADP); sulfosuccinimidyl 2-(7-azido-4-methylcoumarin-3-
acetamide)ethyl-1,3'-dithiopropionate (SAED);
sulfosuccinimidyl 2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-ethyl-
30 1,3'-dithiopropionate (SAND); N-succinimidyl-6-(4'-azido-
2'-nitrophenylamino)hexanoate (SANPAH);
sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-
nitrophenylamino)hexanoate (sulfo-SANPAH);
sulfosuccinimidyl-2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-
35 dithiopropionate (SASD); -hydroxysuccinimidyl-2,3-

WO 01/90153

PCT/US01/16840

27

dibromopropionate (SDBP); N-succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate (SIAB); sulfosuccinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate (sulfo-SIAB); succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC);

5 sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC); succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrate (SMPB); sulfosuccinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrate (sulfo-SMPB); 4-succinimidylloxycarbonyl-methyl- α -(2-pyridyldithio)toluene

10 (SMPT); sulfosuccinimidyl 6-(α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluamido)hexanoate (sulfo-SMPT); N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP); succinimidyl 6-(3-(2-pyridyldithio)propionamido)hexanoate (LC-SPDP); sulfosuccinimidyl 6-(3-(2-pyridyldithio)propionamido)hexanoate (sulfo-LC-SPDP);

15 sulfosuccinimidyl 7-azido-4-methylcoumarin-3-acetate (sulfo-SAMCA); sulfosuccinimidyl 4-(p-azidophenyl)butyrate (sulfo-SAPB); N-(α -maleimidoacetoxy)succinimide ester (AMAS); 1,8-bis-maleimidotriethyleneglycol (BM(PEO)₃); 1,11-bis-maleimidotetraethyleneglycol (BM(PEO)₄); 1,4-bis-maleimidobutane (BMD); 1,4-bis-maleimidyl-2,3-dihydroxybutane (BMDB); N-(β -maleimidopropionic acid)hydrazide-trifluoroacetic acid (BMPH); N-(β -maleimidopropoxy)-succinimide ester (BMPS); N-(ϵ -maleimidocaproic acid (EMCA); N-(ϵ -maleimidocaproic acid)hydrazide (EMCH); N-(κ -maleimidoundecanoic acid (KMUA); N-(κ -maleimidoundecanoic acid)-hydrazide (KMUH);

25 succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxy(6-amidocaproate) (LC-SMCC); succinimidyl-6-(β -maleimido-propionamido)hexanoate (SMPH); N-(ϵ -maleimidocaproyloxy)sulfosuccinimide ester (Sulfo-EMCS); N-(κ -maleimidoundecanoyloxy)-sulfosuccinimide ester (Sulfo-KMUS); N-succinimidyl-(4-vinylsulfonyl)benzoate

30

WO 01/90153

PCT/US01/16840

28

(SVSB) (see Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Pierce Chemical Co.; Rockford IL).

5 The peptide-ligand conjugates of the invention
and ligands specific for the peptide are particularly
useful in positive cell selection techniques. A peptide
capable of displacing a ligand specific for the peptide
can be coupled to any ligand that specifically binds to a
cell surface target molecule and used to isolate a cell
10 that expresses the cell surface target molecule.
Exemplary peptide-ligand conjugates include the PR34[™]
peptide (QQGWFPKDC; SEQ ID NO:3) conjugated to an anti-
CD8 antibody and the PR34[™] peptide coupled to an anti-
CD2 antibody (see Examples I and IV).

15 The invention also provides a method of
selecting a cell. The method includes the steps of
contacting a cell population with a peptide-ligand
conjugate, wherein the conjugate comprises a first ligand
specific for a cell in the population conjugated to a
20 peptide capable of displacing a second ligand specific
for the peptide, thereby forming a cell-conjugate
complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the
second ligand; and isolating the cell-conjugate complex.
A method of the invention can further comprise the step
25 of contacting the cell-conjugate complex with a free form
of the peptide, thereby releasing the cell from the
cell-conjugate complex.

 The methods of the invention are useful for
isolating a cell from a population of cells containing
30 various cell types. The methods of the invention use a
peptide-ligand conjugate in which the ligand can
specifically bind to a target cell in a population,

WO 01/90153

PCT/US01/16840

29

thereby allowing selection of the target cell from the population.

The methods of the invention are particularly useful for isolating a stem cell. Isolated stem cells
5 can be used in various therapeutic methods, for example, in methods of expressing a therapeutic agent or in transplantation. Stem cells can be transduced with genetic elements capable of expressing a therapeutic gene product and introduced into a patient for gene therapy
10 methods. A stem cell is particularly useful for transplantation into a patient in need of stem cell transplantation, for example, a cancer patient treated with high dose chemotherapy. Methods for processing bone marrow and stem cells, particularly for transplantation,
15 are well known to those skilled in the art (see, for example, Areman et al., Bone Marrow and Stem Cell Processing: A Manual of Current Techniques F.A. Davis Company, Philadelphia (1992). A stem cell can be, for example, a CD34+ cell.

20 The methods of the invention can be used to isolate stem cells of various tissue types. The methods of the invention can be used, for example, to isolate a blood-generated stem cell, a mesenchymal stem cell, a neuronal stem cell, or a muscle stem cell. As used
25 herein, a "blood-generated cell" refers to a cell derived from a blood cell. A blood cell is generally derived from bone marrow. Blood cells include, for example, red blood cells, mononuclear cells, leukocytes, dendritic cells, macrophages, natural killer (NK) cells, naive or
30 memory T cells, antigen-specific T cells and the like. Although a blood-generated cell is derived from a blood cell, it is understood that the blood cell need not reside in blood. Thus, cells that are transported via

WO 01/90153

PCT/US01/16840

30

blood, but migrate out of blood into various tissues are included within the meaning of a blood-generated cell. A blood-generated cell includes cells that exist or migrate via the blood system, cells derived from bone marrow, 5 cells from the lymphatic system, or cells from cord blood. Such cells include many cells of the immune system. A blood-generated stem cell can include a hematopoietic stem cell.

The various stem cells can differentiate into 10 various cells specific for their respective systems. Thus, neuronal stem cells can differentiate into various cells of the nervous system and mesenchymal stem cells can develop into various cells or tissue of mesenchymal origin, including musculo-skeletal, vascular and 15 urogenital systems and connective tissue. Blood-generated stem cells such as hematopoietic stem cells can differentiate into various blood cell types such as leukocytes and their various differentiated forms, including B-cells and T-cells.

20 The methods of the invention are also useful for isolating cells such as T cells and T cell subsets, B cells and B cell subsets, dendritic cells, NK cells, naive or memory T cells, mesenchymal stem cells, neuronal stem cells, antigen-specific T cells, monocytes and the 25 like. T cell subsets include T cells expressing specific markers such as CD2, CD4, CD8, CD3, CD16, CD56, CD34, CD25, and CD69. B cell subsets include B cells expressing markers such as CD19 and CD20.

The methods of the invention can also be used 30 to isolate a tumor cell, for example, a tumor cell from tumors of various tissues including breast, prostate, colon, lung, ovary, pancreas, adrenal, and from cancers

WO 01/90153

PCT/US01/16840

31

such as leukemia, myeloma, melanoma, lymphoma, renal cell carcinoma, adrenal cell carcinoma, pancreatic carcinoma or other tumor cell type. The isolation of tumor cells can be particularly useful in diagnostic methods, as described below. The methods of the invention can also be used to isolate anti-idiotypic, for example, myeloma or B cell lymphoma cells where the idiotype is expressed on the cell surface. In this case, anti-idiotypic antibody conjugated to peptide recognized by a peptide-specific ligand can be used to capture a target cell. Subsequent release of the cell can be achieved by the addition of the free form of the peptide to which the peptide-specific antibody binds.

The isolation of tumor cells can also be used as a source of antigen for therapeutic methods such as a tumor vaccine. For example, a tumor cell isolated by methods of the invention can be exposed to dendritic cells *ex vivo* to antigen-prime the dendritic cells. The primed dendritic cells can then be administered to an individual to stimulate a T cell response against the tumor antigens expressed in the dendritic cells. Alternatively, the isolated tumor cells can be irradiated or rendered unable to grow by other methods and reintroduced into the individual to stimulate an immune response to tumor cell antigens expressed in the tumor cell. If desired, the isolated tumor cells can be cultured *in vitro* prior to exposure to dendritic cells or radiation.

As used herein, the term "specific binding" or "specific for," when used in reference to a binding interaction, means binding that is measurably different from a non-specific interaction. Specific binding can be measured, for example, by determining binding to a target

WO 01/90153

PCT/US01/16840

32

molecule compared to binding to a control molecule, which generally is a molecule of similar structure that does not have binding activity. In this case, specific binding is indicated if the molecule has measurably
5 higher affinity for the target molecule than the control molecule. Similarly, specific binding to a target cell can be determined by comparing binding to a control cell, which generally is a cell that does not express a target molecule specific to the target cell.

10 As used herein, selective binding refers to a binding interaction that is both specific and discriminating between molecules, for example, a ligand such as an antibody that binds to a single molecule or closely related molecules. For example, an antibody can
15 exhibit specificity for an antigen that can be both specific and selective for the antigen if the antigenic epitope is unique to a molecule. Thus, a molecule having selective binding can differentiate between molecules, as exemplified by an antibody having specificity for an
20 epitope unique to one molecule or closely related molecules. Alternatively, an antibody can have specificity for an epitope that is common to many molecules. Such an antibody has specific binding but is not selective for one molecule or closely related
25 molecules.

Specificity of binding can be determined, for example, by competition with a control molecule that is known to bind to a target. For example, specific binding of a ligand to a target can be demonstrated by competing
30 for binding with the same ligand. In this case, specific binding is indicated if the binding of a molecule is competitively inhibited by the same ligand.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

33

The term "specific binding," as used herein, includes both low and high affinity specific binding. Specific binding can be exhibited, for example, by a low affinity interaction having a K_d of at least about 10^{-4} M. 5 Specific binding also can be exhibited by a high affinity binding molecule, for example, a binding molecule having a K_d of at least about of 10^{-7} M, at least about 10^{-8} M, at least about 10^{-9} M, at least about 10^{-10} M, or can have a K_d of at least about 10^{-11} M or 10^{-12} M or greater. Both 10 low and high affinity binding molecules are useful in methods of the invention.

Selective binding refers to binding of a particular ligand relatively specifically to a target molecule. In general, selective binding is 15 characterized, in part, by detecting at least a two-fold (2x) greater specific binding of the ligand to the target molecule or target cell as compared to a control molecule or cell. Accordingly, a molecule exhibiting selective binding to a target molecule or cell has detectably 20 distinct binding activity compared to at least one other molecule or cell.

When using methods of the invention to isolate a cell from a population, it is generally advantageous to isolate the cells on a solid support. As used herein, 25 the term "solid support" refers to a solid medium which is sufficiently stable so as to allow immobilization of a molecule useful for isolating a cell from a population. Solid supports can include, for example, membranes such as nitrocellulose, nylon, polyvinylidene difluoride, 30 plastic, glass, polyacrylamide, agarose or polystyrene. Solid supports can also be made in essentially any size or shape so long as it supports the immobilization of a molecule useful for isolating a cell from a population.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

34

For example, the solid support can be a flat planar surface such as a natural or synthetic membrane filter or a glass slide. Alternatively, the solid support can be of various spherical shapes, including, for example, beads made of glass, polyacrylamide or agarose. The solid support can also be a particle or ferrous solutions. Porous mediums can similarly be used as solid supports and such mediums are included within the definition of the term as used herein. Additionally, any of the solid supports can be modified, for example, to include functional chemical groups that can be used directly or indirectly for attachment of binding molecules or linkers.

The solid support can additionally exhibit properties useful in isolating a target cell. For example, the solid support can be magnetic microspheres, which are useful in isolating cells from a population (see Hardwick et al., J. Hematotherapy 1:379-386 (1992); Egeland et al., Scand. J. Immunol. 27:439-444 (1988); Dynal, Lake Success NY).

For isolation of a cell from a population, the ligand specific for the peptide in a peptide-ligand conjugate can be attached to a solid support. The peptide-specific ligand can be covalently coupled to the solid support or attached to the support via non-covalent interactions. For example, the peptide-specific ligand can be directly bound to beads (see Figure 1 and Example V). For direct coupling of the ligand to the solid support, cross-linking agents, as disclosed herein, can be used to covalently couple the ligand to the solid support. For attachment of the ligand to a support via non-covalent interactions, the ligand can be directly attached to the support and bound by non-covalent

WO 01/90153

PCT/US01/16840

35

interactions, for example, by directly binding the ligand to beads (see Figure 1 and Example V). The direct binding of a ligand to beads or other solid support is mediated by biochemical and/or biophysical properties of the beads, such as hydrophilicity, hydrophobicity, ionic character, and the like. Alternatively, the ligand can be attached to the support via an intermediary interaction, for example, a secondary antibody in the case of an antibody ligand. A molecule having binding activity for the ligand such as a secondary antibody or reagent can be attached to the solid support, generally via covalent coupling to the solid support. The ligand is then attached to the solid support via non-covalent interactions with the ligand-specific molecule covalently attached to the solid support.

In the case where the ligand is an antibody, the ligand-specific molecule attached to the solid support can be a secondary antibody specific for the antibody. For example, if the antibody is a mouse monoclonal antibody, the secondary antibody attached to the solid support can be an anti-mouse heavy and/or light chain antibody or an anti-isotype antibody. When selecting a secondary antibody, the antibody is preferably specific for the peptide-specific ligand and not the target-specific ligand. Accordingly, when using antibodies as ligands, the peptide-specific antibody can be from a different species than the target-specific antibody. Using different species allows the convenient use of a secondary antibody that is specific for the peptide-specific antibody but does not bind the target-specific antibody. Exemplary species useful as secondary antibodies include mammalian species such as human, rabbit, mouse, rat, sheep and goat, as well as chicken and the like. The use of different species of antibody

WO 01/90153

PCT/US01/16840

36

ligand allows the use of a secondary antibody specific for the peptide-specific antibody. Thus, only the cells which are bound via the peptide and peptide specific ligand interaction will be isolated by the beads, allowing displacement of the complex with free peptide.

In addition, the ligand can be modified to incorporate a moiety that is recognized by a molecule that can be bound to the solid support. For example, as disclosed herein, the ligand can be conjugated to biotin (see Examples I to III). The biotinylated ligand can then be bound to avidin or streptavidin attached to a solid support (see Figure 1). The use of biotin and avidin is particularly useful for immunoselection of cells since this is a high affinity interaction (see, for example, U.S. Patent Nos. 5,225,353, issued July 6, 1993, and 5,215,927, issued June 1, 1993). As disclosed herein, isolation of CD34+ and CD2+ cells using a peptide-ligand conjugate specific for CD34+ and CD2+ target cells, respectively, was highly efficient when isolated with streptavidin beads (see Examples III and IV).

In addition to biotin, any molecule that has an appropriate binding partner can be used to couple to a ligand. Covalent coupling can be performed using an appropriate cross-linking agent, such as those disclosed herein. Alternatively, if the ligand is expressed recombinantly, an appropriate tag having specificity for a molecule attached to the solid support can be expressed as a fusion polypeptide with the ligand. Expression of fusion polypeptides are well known to those skilled in the art (see Ausubel et al., *supra*, 1999).

WO 01/90153

PCT/US01/16840

37

When isolating a cell from a population, the efficiency of cell binding can vary depending on the ratio of cells to beads or other solid support or surface area of the solid support. Therefore, one skilled in the art can determine an optimized ratio of cells to beads or other solid support to isolate cells with the highest efficiency by varying the ratio of cells to beads and determining one that provides an optimized efficiency of cell binding and isolation.

When forming a binding complex for isolation of a target cell, the target cells, peptide-ligand conjugate, peptide-specific ligand and solid support such as beads can be combined in any order so long as the binding complex formed allows isolation of the target cell. Any of the components can be pre-incubated to form a complex prior to the combination of all components. For example, as disclosed herein, sequential incubation with target cells, peptide-ligand conjugate, peptide-specific ligand and capture beads resulted in more efficient binding of cells than when the peptide-specific ligand was in a pre-formed complex with the capture beads (see Example II). One skilled in the art can readily determine an optimized condition for incubation of components, time of incubation and ratio of beads to cells to determine optimized conditions for isolation of a particular cell using a particular peptide-ligand conjugate and peptide-specific ligand. In addition to optimizing conditions for binding of cells, the cell to bead ratio can also be optimized for displacement of cells by free peptide using various amounts of free peptide, as described above.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

38

The invention additionally provides a method of enriching for a cell from a cell population. The method includes the steps of contacting a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein the conjugate comprises
5 a first ligand specific for a cell in the population conjugated to a peptide capable of displacing a second ligand specific for the peptide, thereby forming a cell-conjugate complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the second ligand; and isolating the
10 cell-conjugate complex. The method of the invention can further comprise the step of contacting the cell-conjugate complex with the peptide, thereby releasing the cell from the cell-conjugate complex. Furthermore, as described in more detail below, the
15 invention provides methods of enriching for a subpopulation of cells. As used herein, enriching for a cell or subpopulation from a cell population means that the target cell(s) is at a higher concentration relative to other cells than in the original cell population. One
20 skilled in the art can readily determine the relative purity of an enriched cell or cell population using well known immunological or histochemistry methods, as disclosed herein.

Additionally provided is a method of diagnosing
25 a condition. The method includes the steps of contacting a sample comprising a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein the conjugate comprises a first ligand specific for a cell in the population conjugated to a peptide capable of displacing a second
30 ligand specific for the peptide, thereby forming a cell-conjugate complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the second ligand; isolating the cell-conjugate complex; and identifying the cell in the complex, wherein the cell is associated with a condition.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

39

The method of the invention can further comprise the step of contacting the cell-conjugate complex with the peptide, thereby releasing the cell from the cell-conjugate complex.

5 The methods of the invention for diagnosing a condition are particularly useful for diagnosing a condition in which there are a limited number of cells associated with the condition. A sample containing a population of cells is contacted with a peptide-ligand
10 conjugate in which the ligand is specific for a target cell associated with a condition. The sample can be, for example, a blood sample or biopsy. In the case of a tissue biopsy, the cells can be dispersed using well known methods of proteolytic digestion for obtaining
15 primary cultures (see, for example, Jaffee et al., Cancer J. Sci. Am., 4:194-203 (1998)). In the case of a tissue biopsy, the presence of a particular cell in the dispersed cell population is determined. Dispersal of cells from a tumor sample such as a tumor biopsy can be
20 useful for tumor vaccine methods, as disclosed herein.

One limitation of early detection methods for diseases such as cancer is that, at early stages, there are a limited number of cancer cells, which therefore can be difficult to detect. The methods of the invention can
25 be advantageously used to concentrate the limited number of cancer cells in early stage cancer, thereby allowing the cells to be more readily detected. For example, the methods of the invention can be used as a screening method to detect early stages of cancer such as early
30 stages of breast cancer or prostate cancer. The methods of the invention can also be applied to a sample to detect metastatic cancer cells, which can be at low concentrations in a blood sample and therefore at

WO 01/90153

PCT/US01/16840

40

insufficient concentrations to allow detection using standard methods. The methods of the invention allow concentration of cells prior to the application of detection methods. Thus, the methods of the invention
5 are useful for enriching for tumor cells for diagnostic applications, for example, enriching for tumor cells from blood or bone marrow.

Methods of identifying a particular cell type isolated or enriched from a cell population are well
10 known to those skilled in the art, including, for example, immunological procedures, histochemical methods, or analysis of tissue-specific gene expression using polymerase chain reaction (PCR). Immunological procedures useful for detection of a particular cell type
15 include immunoassays that employ a detectable antibody. Such immunoassays include, for example, immunohistochemistry, immunofluorescence, ELISA assays, radioimmunoassay, fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis, immunoprecipitation, immunoblot
20 analysis, Pandex microfluorimetric assay, agglutination assays, flow cytometry and serum diagnostic assays, which are well known in the art (Harlow and Lane, *supra*, 1988; Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999)). Methods for
25 identifying a cell by histochemical or immunohistochemical methods are well known to those skilled in the art (see, for example, Sumner, Basic Histochemistry Wiley-Interscience, New York (1988); Gu, ed., Analytical Morphology: Theory, Applications, and
30 Protocols Birkhauser Boston, Cambridge MA (1997)).

Additionally, methods for identifying a cell by PCR are well known in the art (see, for example, Dieffenbach and Dveksler, PCR Primer: A Laboratory

WO 01/90153

PCT/US01/16840

41

Manual, Cold Spring Harbor Press (1995); Ausubel et al., *supra*, 1999). The detection of cell-specific messenger RNA expression can be performed in a single cell or a small number of cells using reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and detection of corresponding PCR products. PCR primers can be selected to hybridize and prime an amplification reaction to detect expression of a cell-specific mRNA. Particularly useful primers for detection of a cell specific mRNA are primers that prime in regions encoded by two different exons. Such primers can be selected to allow detection of mRNA by efficient production of a PCR product of the appropriate size. In contrast, the primers which hybridize in regions encoded by two different exons would not generate a detectable product from genomic DNA due to the intervening intron sequence, which would place the primers too far apart to generate any detectable PCR product. Such primers selected to prime from two different exons are useful to detect cell-specific mRNA expression.

In some applications, it can be desirable to release a cell from the bound peptide-ligand conjugate. For example, antibody binding to cell surface antigens can induce alterations in cell physiology (Berardi et al., *supra*, 1995). Therefore, in applications using cells isolated by the methods of the invention in which the physiological state of the cell is potentially important, for example, in therapeutic applications, it can be desirable to displace the peptide-ligand conjugate from the isolated cells. Additionally, it can be desirable to release a cell from the peptide bound to a solid support in certain cell diagnostic techniques, for example, histochemistry and immunohistochemistry methods.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

42

One method of displacing the peptide-ligand conjugate from a cell is to use a cell-specific ligand that itself can be displaced by a known molecule. For example, the target-specific ligand in the conjugate can be displaced by a peptide that is known, or such a peptide can be readily determined by one skilled in the art, to be capable of displacing the ligand, as disclosed herein (see U.S. Patent No. 5,968,753). In such a case, both the target-specific ligand in the peptide-ligand conjugate and the peptide-specific ligand can be displaced by a corresponding peptide.

In addition to the use of a peptide to displace the peptide-ligand conjugate from a cell, other molecules can be used in conjunction with the peptide to enhance displacement by the peptide. One skilled in the art can readily determine other reagents or components that facilitate the displacement activity of a peptide by screening for peptide displacement activity by the methods disclosed herein in the presence of various compounds. For example, the pH of the buffer, the salt concentration, or the temperature can be varied to enhance displacement with a peptide. Other agents can be added, for example, reducing agents such as dithiothreitol and/or chelating agents such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) or ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) can be added to enhance displacement with a peptide.

Molecules that can function to displace the peptide-ligand conjugate from the cell can be readily determined by one skilled in the art. For example, peptides that are specific for the ligand and capable of displacing a peptide-ligand conjugate from a cell can be

WO 01/90153

PCT/US01/16840

43

screened and identified using well known methods (see U.S. Patent No. 5,968,753). In addition, compounds for displacing a peptide-ligand conjugate from a cell can be identified using well known screening methods to identify
5 a compound having displacement activity, as described above for identifying non-natural ligands for a target molecule.

The compounds can be screened, for example, to detect displacement of a target-specific ligand from the
10 target molecule. In such screening methods, the target molecule can be expressed on the surface of the cell or expressed recombinantly. One skilled in the art will know or can readily determine methods to detect the displacement of the ligand from a pre-formed complex
15 between the ligand and the target molecule. For screening methods, the ligand can be detectably labeled, for example, with a radiolabel, a fluorochrome, a ferromagnetic substance, a luminescent tag or a detectable binding agent such as biotin. A labeled
20 ligand allows a compound having displacing activity for the ligand to be more readily determined.

In addition, a cell can be displaced from a complex attached to a solid support using proteolytic digestion, for example, with chymopapain, pepsin, papain,
25 chymotrypsin and the like. Methods for releasing cells from an affinity matrix using proteases are well known to those skilled in the art (U.S. Patent No. 5,081,030, issued January 14, 1992).

The invention further provides a method of
30 selecting a cell subpopulation. The method includes the steps of contacting a cell population both with a peptide-ligand conjugate, wherein the conjugate comprises

WO 01/90153

PCT/US01/16840

44

a first ligand specific for a first cell in the population, where the first ligand is conjugated to a peptide capable of displacing a peptide-specific ligand, thereby forming a first cell-conjugate complex; and
5 further contacting the cell population simultaneously or sequentially with a second ligand specific for a second cell in the population, thereby forming a second cell-second ligand complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the peptide-specific ligand; and isolating
10 the first cell-conjugate complex and the second cell-second ligand complex.

Thus, the methods of the invention can be advantageously used to isolate a single cell type from a population of cells or a subpopulation of two or more
15 different cell types. The methods utilize one or any combination of two or more target-specific ligands specific for different cells. The cells can be isolated, for example, by binding the target-specific ligands to a solid support using the methods disclosed herein.
20 Furthermore, the cells can be released from the solid support, for example, using a peptide, as described below.

In one embodiment, when isolating a subpopulation of cells, the subpopulation of cells can be
25 conveniently released using the same peptide capable of displacing the target-specific ligand (see Figure 6). For example, if the peptide-specific ligand (e.g., the 9069 antibody and the like) is also specific for a target molecule on a cell (e.g., CD34 antigen and the like), the
30 peptide-specific ligand can be simultaneously used to isolate a cell bound to a corresponding peptide-ligand conjugate (Figure 6B, cell type 2) and the target cell to which the peptide-specific ligand binds (Figure 6B, cell

WO 01/90153

PCT/US01/16840

45

type 4), herein the target molecule (e.g., CD34 cells). Thus, the invention methods for isolating a subpopulation of cells can use a second ligand that is a peptide-specific ligand and a target-specific ligand (Figure 6B). An example of such a peptide-specific ligand is the 9069 antibody disclosed herein, which is specific for CD34 cells and is displaced by the PR34™ peptide. Therefore, an antibody such as the 9069 antibody can be used to isolate a CD34 cell and simultaneously isolate a second cell using a ligand specific for the second cell, where the ligand is conjugated to the PR34™ peptide.

For example, a population of cells containing CD34 cells, such as bone marrow, can be used to isolate a subpopulation of cells containing CD34 cells and some other cell in the bone marrow population, for example, a mesenchymal stem cell (see Figure 7). Such a subpopulation of bone marrow cells can be particularly useful for transplantation applications. A blood cell population can also be used to isolate a subpopulation containing a T cell, B cell, or NK cell population along with, for example, a CD34 cell or another blood cell type. For example, a T cell, B cell or NK cell exhibiting anti-leukemic activity, or any number of specific cell types, can be isolated along with CD34 cells. Such T cell or B cell subpopulations can be particularly useful in applications for stimulating an immune response, for example, an anti-leukemic immune response, whereas the CD34 cell is responsible for reconstituting the hematopoietic system.

The methods of the invention can be used to isolate any of a number of specific cell types from a population so long as a target-specific ligand is

WO 01/90153

PCT/US01/16840

46

available for the respective cell types. Such a subpopulation of cell types can be, for example, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 12 or more, 15 or more, 20 or more cell types from a population.

When isolating a subpopulation of more than one cell type, any number of target-specific ligands can be conjugated to the same peptide capable of releasing a peptide-specific ligand (Figure 6A, when peptide conjugated to ligands 6 and 8 is the same). By conjugating two or more ligands specific for different cell types to the same peptide or by using a peptide-specific ligand that is also a target-specific ligand, the various cell types in the isolated subpopulation can be conveniently released with the same peptide. Alternatively, multiple target-specific ligands can be conjugated to two or more different peptides capable of displacing a peptide-specific ligand and used to isolate multiple cell types that can be released with the different peptides (Figure 6A, when two different peptides are conjugated to ligands 6 and 8).

In addition to using multiple target-specific ligands to isolate multiple cell types from a population, two or more target-specific ligands to the same cell can be used. The use of more than one target-specific ligand to isolate a single type of cell can be useful, for example, for increasing the efficiency of isolating a particular cell type.

Furthermore, if desired, a population or subpopulation of cells can be contacted sequentially using multiple target-specific ligands. For example, a subpopulation of cells can be isolated with a ligand that

WO 01/90153

PCT/US01/16840

47

recognizes several different cells in a population. An initial isolation step using such a target-specific ligand can be used to enrich for a subpopulation containing a particular cell. Such a subpopulation can
5 be released and sequentially contacted with a different target-specific ligand having specificity for a particular cell in the subpopulation. Such a sequential isolation step can be particularly useful when a target-specific ligand that is specific for a single cell type
10 is unavailable. The sequential method can be used to isolate a subpopulation so that a particular cell type is segregated from other cells that also bind the same ligand followed by binding to a target-specific ligand, allowing the use of a target-specific ligand having
15 specificity for several types of cells to isolate a single cell type.

The method of isolating a subpopulation of cells can further include the step of contacting the first cell-conjugate complex and the second cell-second
20 ligand complex with a free form of a displacing peptide, thereby releasing the first cell from the first cell-conjugate complex and the second cell from the second cell-second ligand conjugate. Thus, the methods of the invention can be used to select and release a
25 subpopulation of cells from a population.

The methods of the invention can be used to isolate a subpopulation of cells. In addition to isolating cells simultaneously or with sequential incubation, cells can also be individually isolated by
30 the methods disclosed herein and pooled to obtain a subpopulation of cells.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

48

The invention also provides a method of using a second ligand to negatively select for a cell that can co-purify with a desired cell (Figure 6C). The method includes the steps of contacting a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein the conjugate comprises a first ligand specific for a first cell in the population conjugated to a peptide capable of displacing a peptide-specific ligand, wherein the peptide-specific ligand binds to a second cell in the population, thereby forming a cell-conjugate complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the peptide-specific ligand; contacting the cell population with a second ligand specific for the second cell, wherein the second ligand is not displaced by the peptide and binds to a distinct site from the peptide-specific ligand; and isolating the cell-conjugate complex. The method can further comprise the step of contacting the cell-conjugate complex with a free form of the peptide, thereby releasing the first cell from the cell-conjugate complex.

The methods of using a second ligand to negatively select for a cell that can co-purify with a desired cell can be useful to enhance the specificity of the cell selection process (see Figure 6C). For example, the CD34-specific antibody 9069 is a peptide-specific ligand that can also function as a target-specific ligand for CD34 on the CD34+ cell type, as described above. In the case where the cell population contains CD34 cells, for example, bone marrow, the CD34 cells (for example, cell type 4 in Figure 6C) will be co-isolated with target cells bound to a target-specific ligand conjugated to the PR34™ peptide (for example, cell type 2 in Figure 6C). If it is desired to exclude the CD34 cell type from an isolated subpopulation of cells, another antibody that

WO 01/90153

PCT/US01/16840

49

also binds to CD34 cells but is a non-displaceable antibody, that is, which is not displaced by the PR34™ peptide or any other peptide to be used in the reaction, can be included (for example, ligand 16 in Figure 6C).

5 If the non-displaceable ligand is bound to a solid support, cell type 2 can be released whereas cell type 4 remains captured via binding to the non-displaceable target-specific ligand for cell type 4, that is, by ligand 16 (Figure 6C).

10 The cells can be simultaneously contacted with the non-displaceable ligand or sequentially contacted after displacing with the peptide. The non-displaceable antibody is non-competitive with respect to binding to the displacing peptide. If the non-displaceable ligand
15 is contacted prior to incubation with a displacing peptide, the non-displaceable ligand is non-competitive with respect to the peptide-specific ligand that is also a target-specific ligand. For example, in the case of the 9069 antibody, the non-displaceable ligand binds
20 non-competitively to a CD34 target cell. The non-displaceable ligand can bind to the same molecule as the peptide-specific ligand that is also a target-specific ligand or to a different molecule on the same target cell, so long as the cell to be negatively
25 selected is sufficiently removed from the cell subpopulation.

In general, the second ligand used to negatively select a cell is used in an amount that is sufficient to bind the cells to be negatively selected,
30 depending on the relative affinities of the ligands. The relative amounts can be compensated accordingly based on the relative affinities. For example, if the affinities differ by a factor of 10, the relative amounts can be

WO 01/90153

PCT/US01/16840

50

adjusted to differ by about 10, that is the lower affinity ligand is at 10 times the concentration as the higher affinity ligand, so that approximately an equivalent amount of binding activity is present. In general, the second ligand used to negatively select a cell is used in at least an equivalent amount of binding activity, and will particularly be used in excess so that negatively selected cells are efficiently retained. The second ligand used to negatively select a cell will generally be present in at least about 2-fold, about 3-fold, about 4-fold, about 5-fold, about 6-fold, about 7-fold, about 8-fold, about 9-fold or about 10-fold excess binding activity, and can be present in at least about 50-fold, about 100-fold, about 1000-fold, about 10,000-fold or even about 20,000-fold excess binding activity or greater, if desired.

When isolating a subpopulation of cells using at least two target-specific ligands, the cells are generally isolated on a solid support, for example, beads such as magnetic beads or particles, as disclosed herein. If desired, the target specific-ligands can be bound to the same bead. Alternatively, distinct target-specific ligands can be bound to separate beads, which can be incubated sequentially or simultaneously.

The invention additionally provides a substantially pure cell subpopulation comprising CD34 cells and at least one other specifically isolated cell type. As described above, a CD34 cell, which expresses the CD34 antigen, can be isolated by the methods of the invention or other methods and, if desired, co-isolated with a second cell type. As used herein, "substantially pure," when used in reference to a cell or cell subpopulation, refers to an enrichment of a specifically

WO 01/90153

PCT/US01/16840

51

isolated cell relative to an original cell population.
The second cell type can be a mesenchymal cell, T cell, B
cell, natural killer cell, or facilitating cell, or any
type of cell for which a target specific ligand is
5 available for isolating the cell type by the methods
disclosed herein. A "facilitating cell" is a tolerance
inducing cell (see, for example, Schuchert et al. Nature
Med. 6:904-909 (2000)) that induces tolerance towards HLA
antigen and can be useful, for example, in graft-versus-
10 host disease or transplant rejection. It is understood
that, in addition to subpopulations containing CD34
cells, any combination of cells can be isolated in a cell
subpopulation as a useful combination of cells for
treating a variety of conditions so long as a
15 target-specific ligand is available for the cell targets
to be isolated in the subpopulation (see below).

The substantially pure subpopulation can be
enriched for particular cell types by specifically
isolating the cells using the methods disclosed herein.
20 A substantially pure subpopulation of cells will
generally comprise at least about 10%, at least about
20%, at least about 30%, at least about 40%, at least
about 50%, at least about 60%, at least about 70%, at
least about 80%, at least about 90%, at least about 95%,
25 at least about 98%, or at least about 99% of the
substantially pure subpopulation, and can be essentially
100% of the substantially pure population. It is
understood that the specifically isolated cell types in
the subpopulation need not be in equal amounts but can be
30 in any ratio so long as each of the specifically isolated
cell types is enriched relative to the initial cell
population. For example, the methods of the invention
can be used to isolate CD34 cells and mesenchymal cells,
as described above, and a substantially pure

WO 01/90153

PCT/US01/16840

52

subpopulation of CD34 cells and mesenchymal cells can be from 10% up to essentially 100% of the substantially pure subpopulation.

The combination of cells in a substantially pure subpopulation can be useful for a variety of therapeutic applications. For example, the combination of CD34 cells and mesenchymal cells can be useful for augmenting engraftment of a patient in need thereof with stem cells or providing the patient with cells of the hematopoietic system. Mesenchymal stem cells can provide stromal, collagen or bone cells and the like, and the CD34 cells can provide hematopoietic cell function. The combination of CD34 cells and natural killer (NK) cells can be useful, for example, for providing a patient in need thereof with enhanced anti-tumor activity or anti-viral activity. The combination of CD34 cells and T cells or a T cell subset can be useful, for example, for providing enhanced anti-tumor activity, anti-viral activity, immune function, or enhanced response in a transplantation setting.

The invention thus provides methods for enhancing a response to a condition in an individual using substantially pure cell subpopulations isolated by methods of the invention. Methods of the invention using a substantially pure subpopulation of cells are particularly useful for treating an immuno-compromised individual. Such an individual includes an individual having a congenital defect of the blood forming system or mesenchymal cell system, an individual having cancer, either a cancer that suppresses the immune system such as leukemia or immunosuppression resulting from cancer treatment, or an individual having an autoimmune disease that results in immunosuppression or requires

WO 01/90153

PCT/US01/16840

53

immunosuppressive therapy. As used herein, an individual having immunosuppression has a reduced immune response that can result from a physical stimulus (e.g., X-irradiation), chemical stimulus (e.g., immunosuppressive drugs), or biological stimulus (e.g., anti-lymphocyte serum or congenital defects of the immune system).

A substantially pure subpopulation of cells can be used, for example, to treat an individual who has undergone or will undergo transplantation, which can be organ transplantation or stem cell transplantation. The invention substantially pure subpopulations of cells can also be used to treat an individual having immunosuppression. The invention thus provides methods to treat an individual or enhance the individual's response to therapy for treating a condition. As used herein, "enhancing a response to a therapy" refers to any measurable improvement in a sign or symptom associated with a condition. One skilled in the art can readily determine whether an individual exhibits measurable improvement in a sign or symptom associated with a condition, which can be immediate signs or symptoms that are directly measurable in the individual or is reflected in longer life span or a better quality of life.

The methods of the invention are therefore useful for treating a variety of conditions associated with an immunocompromised individual. For example, CD34 cells and mesenchymal cells can induce tolerance in an individual who has undergone or will undergo organ transplantation. CD34 cells and mesenchymal cells can also be used to enhance safety of allogeneic transplant, that is, reduce graft versus host disease resulting from bone marrow or stem cell transplantation. The

WO 01/90153

PCT/US01/16840

54

combination of CD34 and mesenchymal cells is useful for inducing tolerance for allogeneic transplantation and more rapid engraftment or efficient engraftment in autologous cell transplantation. The combination of CD34 and mesenchymal cells is useful not only to induce tolerance and increase acceptance of a donor organ or tissue, the combination of cells can also reduce the need for immunosuppressive therapy for reducing organ rejection or graft versus host disease.

10 The substantially pure subpopulations of cells isolated by methods of the invention or any other methods can also be used to provide cells having desired characteristics, for example, the isolation of a functional cell and a feeder cell. A functional cell
15 provides a particular cellular function while a feeder cell provides a stimulus for the functional cell. One such combination of functional and feeder cells that can be isolated by methods of the invention is a CD4 cell, which produces IL-2, and a natural killer (NK) cell,
20 which is activated by IL-2. Thus, the invention provides a combination of CD4 and NK cells, which can function as a feeder cell and a functional cell, respectively, and be used to stimulate an NK cell immune response.

 Another exemplary feeder cell and functional
25 cell combination is CD34 cells combined with mesenchymal cells. Mesenchymal cells produce cytokines that stimulate growth of CD34 cells. Thus, in a substantially pure cell subpopulation containing mesenchymal and CD34 cells, mesenchymal cells can function as a feeder cell
30 for CD34 cells, which can function in providing cells of the hematopoietic system. Similarly, stromal cells can also function as a feeder cell for stimulating growth of CD34 cells. It is understood that the methods of the

WO 01/90153

PCT/US01/16840

55

invention can be used to isolate any useful combination of feeder and functional cells using the methods of selecting cells disclosed herein.

A substantially pure subpopulation of cells can also be useful in cell therapy applications. For example, retroviral vectors are commonly used to transduce genes for *in vivo* cell therapy methods. However, retroviral vectors require that the cells be replicating in order to efficiently infect the cells. Therapeutic methods requiring the use of retroviral vectors therefore use proliferating cells. One method to obtain proliferating cells is to use a substantially pure subpopulation of cells isolated by methods of the invention containing a functional cell and feeder cell combination, where the feeder cell can stimulate growth of the functional cell. For example, a combination of mesenchymal cells and CD34 cells can be used in such a therapeutic application, with the mesenchymal cells providing cytokines that function as a growth stimulus to proliferate CD34 cells. The proliferating CD34 cells in such a subpopulation can thus be transduced with a therapeutic gene and the transduced cells used in *in vivo* therapeutic methods. Thus, the invention provides methods of increasing the transduction efficiency of cells for *in vivo* therapeutic applications.

In accordance with another embodiment of the present invention, there are provided diagnostic systems, preferably in kit form, comprising at least one invention peptide capable of displacing an antibody specific for the peptide and the antibody in a suitable packaging material. For example, the kit can contain the peptide QQGWFPP (SEQ ID NO:1); QQGWFPPKD (SEQ ID NO:2); QQGWFPPKDC (SEQ ID NO:3), or a combination thereof, and the 9C5

WO 01/90153

PCT/US01/16840

56

antibody. Invention diagnostic systems are useful for assaying for the presence or absence of a cell type in a sample.

A suitable diagnostic system includes at least one invention peptide or antibody as a separately packaged chemical reagent(s) in an amount sufficient for at least one assay. A kit of the invention can additionally contain a cross-linking agent, as disclosed herein, that allows the peptide to be conjugated to any desired ligand. A kit of the invention can also contain a peptide-ligand conjugate in which the ligand in the conjugate is specific for a cell surface target molecule and which allows the isolation of a particular cell expressing that target molecule. An invention kit can further contain a solid support such as beads to isolate cells, for example, the kit can include magnetic beads.

The contents of the kit of the invention are contained in packaging material, preferably to provide a sterile, contaminant-free environment. In addition, the packaging material contains instructions indicating how the materials within the kit can be employed to displace a prebound peptide-ligand complex with the enclosed peptide or to isolate a particular cell, if appropriate. The instructions for use typically include a tangible expression describing the reagent concentration or at least one assay method parameter, such as the relative amounts of reagent and sample to be admixed, maintenance time periods for reagent/sample admixtures, temperature, buffer conditions, and the like.

The invention additionally provides a method of selecting a cell. The method includes the steps of contacting a cell population with a peptide-specific

WO 01/90153

PCT/US01/16840

57

ligand, wherein the cell population comprises a cell
expressing a cell surface fusion polypeptide fused to a
peptide, wherein the free form of the peptide is capable
of displacing the peptide-specific ligand bound to the
5 fusion polypeptide, thereby forming a cell-peptide ligand
complex; and isolating the cell-peptide ligand complex.
The method can further include the step of contacting the
cell-peptide ligand complex with a free form of the
peptide, thereby releasing the cell from the cell-peptide
10 ligand complex.

In addition to using a peptide-ligand conjugate
to bind to a target cell, the invention also provides
methods of isolating cells that advantageously use
peptides capable of displacing a ligand, where the ligand
15 forms a complex with the peptide expressed as a fusion
with a molecule expressed on the surface of a cell. In
this case, the peptide is expressed as a fusion
polypeptide with a cell surface polypeptide, thus
bypassing the binding of a peptide-ligand conjugate where
the ligand is specific for a target cell. As used
20 herein, a "fusion polypeptide" is one in which at least
two heterologous molecules that are not naturally
expressed together are expressed as a single translation
product. In the case of a peptide fused to a cell
25 surface polypeptide, at least one copy of the peptide is
expressed as a fusion with the cell surface polypeptide.
If desired, multiple copies of the peptide can be
expressed as part of the fusion polypeptide. The peptide
is fused to the cell surface polypeptide such that the
30 peptide is expressed on the surface of the cell and
accessible to a peptide-specific ligand administered to
the cell.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

58

The peptide can be expressed as a fusion with a cell surface polypeptide using well known methods (Ausubel et al., *supra*, 1999). Methods of isolating cells expressing recombinant peptide-cell surface polypeptide fusions are useful for isolating or enriching for genetically engineered cells and can be used to isolate or enrich for cells useful in therapeutic applications such as gene therapy.

Cells can be isolated by capturing the cells with a solid support such as beads, as described above. Alternatively, cells can be isolated by FACS. The use of FACS to isolate cells is particularly useful when isolating a cell expressing a peptide-surface polypeptide fusion.

It is understood that modifications which do not substantially affect the activity of the various embodiments of this invention are also provided within the definition of the invention provided herein. Accordingly, the following examples are intended to illustrate but not limit the present invention.

EXAMPLE I

Synthesis of PR34[™] Peptide Conjugate with CD8 Antibody and Binding to SUP-T1 Cells

This example describes the synthesis of PR34[™] peptide, conjugation to a CD8 antibody, and binding of the peptide-antibody conjugate to T cells.

The peptide Ac-QQGWFPKD (PR34[™]; SEQ ID NO:2) was identified as a peptide capable of displacing a ligand specific for the peptide essentially as described previously (U.S. Patent No. 5,968,753).

WO 01/90153

PCT/US01/16840

59

The PR34™ peptide was synthesized with a C-terminal Cys residue and covalently coupled to MT-415, an antibody directed against human CD8 to generate the CD8-PR34+ conjugate. The peptide was conjugated to the CD8 antibody using the heterobifunctional linker N-(ε-maleimidocaproyloxy) succinimide ester (EMCS). The standard protocol recommended by the manufacturer was used (Pierce Chemical Co.; Rockford IL).

The 9C5 antibody, which is an anti-human CD34 monoclonal antibody, was biotinylated using Biotin Hydrazide (Pierce). The biotinylation reaction was performed following the standard protocol recommended by the manufacturer (Pierce) except that the initial meta-periodate oxidation was performed at room temperature rather than refrigerated.

For flow cytometry experiments, SUP-T1 cells were used. SUP-T1 is a T-lymphoma-derived tumor cell line known to express typical T cell surface markers. The SUP-T1 cells were prepared for flow cytometry and sequentially sensitized with the CD8 antibody-PR34+ peptide (CD8-PR34+) conjugate, biotinylated 9C5, and phycoerythrin-labeled (PE-labeled) streptavidin. The SUP-T1 cells were incubated with either streptavidin-PE; sequentially with the CD8-PR34+ conjugate, biotinylated 9C5, followed by streptavidin-PE; or sequentially with CD8-PR34+ conjugate, biotinylated 9C5, streptavidin-PE, followed by a 15 min incubation with free PR34™ peptide. The SUP-T1 cells were then analyzed by flow cytometry. All incubations were performed in a mixture of Dulbecco's phosphate buffered saline (GibcoBRL), 0.05% azide, 1.0% human serum albumin (PAH). All incubations were for 15 min at room temperature and each was followed by a wash with 1.0 ml PAH. The stained cells were resuspended in

WO 01/90153

PCT/US01/16840

60

0.25 ml PAH for flow cytometry. SUP-T1 cells (1×10^6) were stained with 1 μ g of either the CD8-9069N or the CD34-biotin. The peptide was used at 5.0 mg/ml.

Figure 2 shows the results of the flow cytometry analysis. Incubation of the SUP-T1 cells with streptavidin-PE is shown and indicated by "isotype." The observed shift in the mean channel fluorescence relative to isotype indicated that the antibody-peptide conjugate was binding with good affinity to the target cells (indicated by "Antibodies + SA-PE"). The addition of free PR34[™] peptide (QQGWFFKD; SEQ ID NO:2) eliminated the fluorescent signal, as indicated by the left shift of the peak ("Antibodies + Peptide + SA-PE").

These results demonstrate that the CD8-PR34+ conjugate retains T cell binding activity. These results also demonstrate that the CD8-PR34+ conjugate can bind to biotinylated 9C5 and that the CD8-PR34+ conjugate and biotinylated 9C5 complex retains antigenic affinity, allowing T cells to be bound. These results further demonstrate that the free PR34[™] peptide can release the biotinylated 9C5 from the CD8-PR34+ conjugate, thereby allowing release of the T cells.

EXAMPLE II

Positive Cell Selection of SUP-T1 Cells Using a Peptide-Antibody Conjugate and Streptavidin Beads

This example shows the positive selection of SUP-T1 cells using the CD8-PR34+ conjugate, biotinylated 9C5 and streptavidin beads.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

61

For positive selection, SUP-T1 cells were incubated under various conditions and rosetted using streptavidin beads. For sensitization, 1×10^6 SUP-T1 cells in Isolex[™] Buffer (phosphate buffered saline, 15 mM citrate, 1% human albumin) were sensitized with 1 μ g CD8-9069N, washed with 1 ml Isolex[™] buffer, sensitized with 1 μ g CD34-biotin, and washed with 1 ml Isolex[™] buffer. Both incubations were in a volume of 500 μ l for 15 min at room temperature. For rosetting, 15 μ l of Streptavidin (SA) coated beads (Dynal) were added to each tube. The tubes were incubated for 30 min at room temperature with mild agitation. For elution, the rosetted cells were washed with Isolex[™] buffer using a magnet to trap the beads. The beads were then incubated for 15 min with 5 mg/ml PR34[™] peptide in a 500 μ l volume. The mixture was exposed to the magnet for 2 min, and the supernatant was pipetted off. The beads were washed with Isolex[™] buffer, and this wash was combined with the earlier supernatant. The total released cells were counted.

In the control reaction (tube 1), SUP-T1 cells were incubated directly with streptavidin beads. For positive selection, SUP-T1 cells were incubated under two conditions. In the first condition (tube 2), SUP-T1 cells were incubated sequentially with the CD8-PR34[™] conjugate, followed by biotinylated 9C5 and then streptavidin beads. In the second condition (tube 3), SUP-T1 cells were incubated with the CD8-PR34[™] conjugate, and the streptavidin beads were incubated separately with biotinylated 9C5. Both were washed and then incubated together for 30 min.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

62

Following the rosetting reaction with streptavidin beads, the remaining free cells were removed, and all three reactions were incubated with PR34[™] peptide as a release agent for 30 min. The free cells were then collected and quantitated.

As shown in Table 1, SUP-T1 cells incubated with streptavidin beads alone (tube 1) captured only 1% of the SUP-T1 cells. In contrast, about 80% of SUP-T1 cells incubated sequentially with the CD8-PR34+ conjugate followed by biotinylated 9C5 and streptavidin beads (tube 2) were captured. About 44% of SUP-T1 cells were captured when incubated with the CD8-PR34+ conjugate followed by biotinylated 9C5 pre-bound to streptavidin beads (tube 3).

Table 1. Positive Selection of SUP-T1 Cells.

Tube	% SUP-T1 Capture	% SUP-T1 Yield
1	1	6.16
2	80	43
3	44	31

Incubation with free P34+ peptide released the bound SUP-T1 cells captured by the streptavidin beads. The yield of SUP-T1 cells was about 43% for cells captured with sequential incubation with CD8-PR34+ conjugate followed by biotinylated 9C5 and streptavidin beads. The yield of released cells was about 31% for cells treated with CD8-PR34+ conjugate followed by 9C5 pre-bound to streptavidin beads.

These results demonstrate that the CD8-PR34+ conjugate can be used to capture a high percentage of SUP-T1 cells, which express a CD8 antibody receptor.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

63

These results further demonstrate that the free PR34[™] peptide can be used to displace SUP-T1 cells captured by the CD8-PR34⁺ conjugate.

EXAMPLE III**5 Positive Selection of CD8⁺ Cells from a Mononuclear Cell Preparation**

This example describes the positive selection of cells expressing CD8 from a population of mononuclear cells.

10 To test the ability of the CD8-PR34⁺ conjugate to isolate CD8⁺ cells from a population, mononuclear cells (MNCs), which contain CD8⁺ cells, were prepared. Mononuclear cells were collected from human donors. Mononuclear cells were collected from a G-CSF mobilized
15 human donor using a CS-3000[™] (Baxter) following the protocol of the manufacturer. The starting population of MNCs was 19.42% CD3⁺/8⁺. For each rosetting reaction, a quantity of MNCs containing 2x10⁶ CD8⁺ cells was used. Biotinylated CD8 antibody (MT-415) was biotinylated
20 essentially as described in Example I.

The MNCs were incubated under three conditions. In condition 1, MNCs were incubated with streptavidin beads alone. In condition 2, MNCs were incubated with biotinylated CD8 antibody, followed by streptavidin
25 beads. In condition 3, MNCs were incubated with CD8-PR34⁺ conjugate, followed by biotinylated 9C5 and streptavidin beads. After incubation with streptavidin beads, the free cells were removed, and the cells attached to streptavidin beads were incubated with free
30 PR34[™] peptide. The released cells were counted, and the number of CD8⁺ cells was evaluated using flow cytometry.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

64

The CD8+ cells were quantitated using a combination of CD3 and CD4. CD3 is a pan T cell marker, and CD3+ populations can be further subdivided into mutually exclusive CD4+ and CD8 positive populations. Therefore, CD8+ cells can also be defined as the majority of cells that are CD3+/4-. The incubation conditions were essentially the same as those described in Example II.

As shown in Table 2, about 19% of the CD8+ cells were captured with streptavidin beads alone (condition 1). In contrast, greater than 90% of the CD8+ cells were captured with the biotinylated CD8 antibody (condition 2), demonstrating the efficient binding of CD8+ cells with the anti-CD8 antibody. Similarly, greater than 83% of CD8+ cells were captured with the CD8-PR34+ conjugate (condition 3), demonstrating that the conjugated CD8 antibody retained antigen binding activity that allowed efficient binding of CD8 cells in the mononuclear cell preparation.

Table 2. Selection of CD8 Cells from a Mononuclear Cell Preparation.

Condition	% Capture	% Yield	% Purity
1	19.3	NA	NA
2	90.6	2.45	12.1
3	83.6	16.0	61.1

Incubation of the CD8+ cells captured with the CD8-PR34+ conjugate with free PR34+™ release peptide resulted in a 16% yield of CD8+ cells with 61% purity. The concentration of CD3+/4- cells (i.e., CD8+ cells) was 3.5 fold higher in the released cells than in the starting cell population. However, there was less than 3% yield of CD8+ cells displaced with the free PR34+™

WO 01/90153

PCT/US01/16840

65

release peptide. The low yield of CD8+ cells in condition 2 indicates that mechanical release did not significantly contribute to the release of cells.

These results demonstrate that the CD8-PR34+ conjugate can be used to isolate cells bearing the corresponding receptor, specifically CD8+ cells, from a population of mononuclear cells and can be used to isolate a high percentage of the CD8+ cells present in the mononuclear cell population. These results also demonstrate that the captured cells can be released with free PR34+™ peptide, resulting in high purity of CD8+ cells.

EXAMPLE IV

Positive Selection of CD2+ T Cells

This example describes the positive selection of CD2+ T cells using a peptide-ligand conjugate.

To test the ability of a PR34+ peptide-conjugate to isolate a different cell type, the PR34+™ peptide was coupled to a CD2 antibody (B-E2; IgG2b isotype; Diaclone; Besançon, France) essentially as described in Example I. The PR34+™ peptide, also designated 9069N, conjugated to the CD2 antibody was designated CD2-9069N. The biotinylated 9C5 antibody, also known as the 9069 antibody, was designated b-9069.

Either mobilized or non-mobilized MNC preparations (see Example III) were used, with similar results. Cells were incubated with 1 µg or 5 µg of CD2-9069N conjugate for 15 min at room temperature (see Table 3). The cells were then incubated with 1 µg or 10 µg of biotinylated 9C5 antibody (b-9069) and streptavidin

WO 01/90153

PCT/US01/16840

66

beads. Bound cells were subsequently incubated with either buffer or 2.5 mg of free PR34[™] peptide (9069N). Incubation conditions were essentially as described in Example II. The released cells were then quantitated and
5 the purity determined. Purity and cell counts were assessed using an anti-CD3 antibody and the True Count flow cytometry quantitation method (Becton Dickinson; San Jose CA).

As shown in Table 3, incubation with the
10 CD2-9069N conjugate captured a high percentage (at least 75%) of CD2+ cells. There appeared to be slightly higher efficiency of capture when incubated with 5 µg of conjugate than 1 µg. These results show that the CD2-9069N conjugate can be used to isolate a high percentage
15 of CD2+ T cells. Incubation with free peptide resulted in release of a high percentage of the captured CD2+ cells, ranging from 50 to 87%. In contrast, incubation with buffer resulted in only a small percentage of the captured cells being released. These results show that
20 the free peptide can specifically release cells captured with a CD2-9069N peptide conjugate. The purity of the cells released by the free peptide was high, ranging from 70 to 89% purity.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

67

Table 3. Positive Selection of CD2⁺T cells using CD2-9069N.

Experimental Conditions	% T-cells captured (15 min./RT)	Release Reagents (30 min./RT)	% T-cells released	% Purity (CD3 ⁺)
CD2-9069N (1 µg)	75	9069N (2.5 mg)	71	89
b-9069 (1 µg)		buffer	15	81
CD2-9069N (5 µg)	87, 93	9069N (2.5 mg)	61, 56	88, 81
b-9069 (1 µg)		buffer	20, 8.2	76, 66
CD2-9069N (1 µg)	77, 89	9069N (2.5 mg)	87, 65	87, 74
b-9069 (10 µg)		buffer	9.0, 5.0	69, 61
CD2-9069N (5 µg)	95	9069N (2.5 mg)	50	70
b-9069 (10 µg)		buffer	5.5	61

5

10

WO 01/90153

PCT/US01/16840

68

These results demonstrate that the CD2-PR34+ peptide conjugate can be used to isolate CD2+ cells, and the free PR34+™ peptide can be used to release a high percentage of cells having a high degree of purity. These results also show that the a peptide capable of displacing a ligand specific for the peptide, the peptide/ligand pair PR34+/9C5, can be used to isolate a variety of cells types when the peptide is coupled to a cell-specific ligand.

10

EXAMPLE V**Positive Selection of CD2+ T Cells by Direct Binding to Beads**

This example describes positive selection of CD2 T cells by direct binding of a peptide-specific antibody to beads.

The CD2 antibody B-E2 was conjugated to PR34+™ peptide essentially as described in Example IV. MNCs were incubated essentially as described in Example IV using CD2-PR34 conjugate. The cells were then incubated with the CD34 antibody 9069 coated on M-450 Dynabeads (Dyna). The CD34 antibody coated beads were prepared by absorbing various amounts of anti-CD34 antibody on the bead surface. The beads were prebound with 0, 1, 5, 20, or 50 µg of antibody per 10⁸ beads. As a control, an aliquot of cells was incubated with streptavidin coated Dynabeads.

As shown in Table 4, CD2 cells were efficiently captured by the CD34 antibody directly coated on Dynabeads. The percentage shown is the total of CD3 positive cells, which is a pan T cell marker, as is CD2, used to quantitate the CD2 cells. The percentage of cells captured was similar for each

WO 01/90153

PCT/US01/16840

69

amount of antibody tested. The percentage of cells captured was about 60 to 70%, only somewhat lower than the 80% capture observed with streptavidin beads. In the streptavidin coated Dynabead control, biotinylated 5 9069 antibody (9C5) was used.

Table 4. T Cell Selection Using CD2-PR34 Conjugate and Capture by Direct Binding of Antibody to Dynabeads.

	Experi- mental Condition*	Release Agent***	%Capture	%Yield	%Purity
10	50 µg	PR34+™ (2.5 mg)	64.5	57.5	91.4
		buffer	64.5	26.0	89.1
	20 µg	PR34+™ (2.5 mg)	61.7	47.4	91.8
		buffer	61.7	0.2	82.1
	5 µg	PR34+™ (2.5 mg)	72.0	68.9	91.3
		buffer	72.0	23.5	88.3
15	1 µg	PR34+™ (2.5 mg)	73.0	55.9	92.4
		buffer	73.0	7.6	71.7
	0 µg	PR34+™ (2.5 mg)	2.88	ND (low)	ND
	SA**	PR34+™ (2.5 mg)	80.4	81.5	94.5

% is of the total CD3 positive cells.

*Dynal M-450 Dynabeads were prepared by absorbing varying amounts of anti-CD34 antibody on the bead surface. The number refers to µg antibody per 10⁸ beads.

**Streptavidin coated Dynabead control.

***PR34+™ CD34 release agent used to displace the CD2-PR34 conjugate from the CD34 antibody.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

70

Incubation of the beads with free PR34[™] peptide resulted in about 50% or greater yield of CD2 cells. The purity of the cells released by free peptide was greater than 90%, which was comparable to the purity of cells captured and released from streptavidin beads (see Table 4).

These results demonstrate that cells bound by a peptide-ligand conjugate can be efficiently captured by directly binding a peptide-specific antibody to beads. The captured cells can also be efficiently released from the beads with a high purity.

EXAMPLE VI

Release of Cells Captured with CD2 Antibody Using Various Peptides

This example describes the displacement of cells bound to anti-CD2 antibody by various peptides.

Peptides having affinity for the CD2 monoclonal antibody B-E2 were isolated by phage display biopanning. Various peptides were tested as competitors for binding of T cells to the anti-CD2 antibody B-E2. A competition assay was performed using 1 mM of each peptide. The peptides were at 2×10^7 fold molar excess relative to the competitor CD2 antigen and at 6×10^6 fold molar excess relative to anti-CD2 antibody. Competition was measured using a FACS competition assay (see Figure 3).

For the competition assay, 0.5 ml of a 1 mM solution of various peptides was added to 1×10^6 peripheral blood mononuclear cells (MNC) followed by the addition of 100 μ l of 0.02 μ g/ml of CD2 antibody (B-E2) and incubated for 15 min at room temperature.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

71

Cells were washed once in lysing reagent (155 mM ammonium chloride, 10 mM potassium bicarbonate, and 0.1 mM EDTA) and twice in 2 ml of PAH (DPBS, 1% human serum albumin, 0.02% NaN₃). 1 µl of goat F(ab')₂ fragment anti-mouse IgG (heavy + light)-phycoerythrin conjugated (GAM-PE; Immunotech; Miami FL) was added to each sample and incubated for 10 min at room temperature. Cells were washed twice in 2 ml of PAH. The final cell pellet was resuspended in 0.25 ml of 0.5% paraformaldehyde. The samples were analyzed by flow cytometry.

The results of the competition assay are shown in Figure 3. A variety of peptides exhibited competitive binding activity. Cells treated with the peptides indicated by "*" appeared apoptotic.

Several of the peptides were further tested for release activity. Briefly, the FACS release assay was performed by incubating 1x10⁶ MNC with 100 µl of 0.02 µg/ml of CD2 antibody for 15 min at room temperature. Cells were washed once with 2 ml of lysing reagent and twice with 2 ml of PAH solution. 0.5 ml of a 1 mM or 5 mM peptide stock was added to the cell pellet and incubated at room temperature for 30 min. Cells were washed twice in 2 ml of PAH. 1 µl of GAM-PE was added to each sample and incubated for 10 min at room temperature. Cells were washed twice in 2 ml of PAH. The final cell pellet was resuspended in 0.25 ml of 0.5% paraformaldehyde. The samples were analyzed by flow cytometry.

In the release assay, either 1mM or 5 mM peptide (1 mM peptide except where indicated to be 5 mM in Figure 4). In some cases, the release assay was performed in the presence of 1 mM dithiothreitol (DTT).

WO 01/90153

PCT/US01/16840

72

The assay was performed with two different batches of donor cells (second batch of donor cells designated with "*" in Figure 4). The results of the release assay are shown in Figure 4. The cyclic peptide
5 RCRFPATTPACR appeared to have the highest release activity.

These results demonstrate that a variety of peptides can function to displace a CD2 antibody.

EXAMPLE VII

10 **Positive Selection of Camma Cells Using Pan-O-5
Monoclonal Antibody**

This example describes positive selection Camma cells, a breast cell line, using Pan-O-5
monoclonal antibody, which can select a breast cell
15 line.

To prepare antibody-coated beads, Dynabeads (Dyna) were washed with Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS). Washed beads were coated with 50 µg anti-CD34 monoclonal antibody per 10⁸ beads for 24 hours
20 at 4°C. The beads were washed twice with Isolex buffer and incubated with 1% albumin in the Isolex buffer for 24 hours at 4°C.

To synthesize the Pan-O-5-PR34 conjugate, the Pan-O-5 monoclonal antibody was incubated with
25 N-(ε-maleimidocaproyloxy)succinimide ester for 30 min at room temperature to generate an antibody-linker complex. The antibody-linker complex was washed twice with D-PBS using an Amicon spin column (30KD; Millipore Corp.; Bedford MA). The Pan-O-5-antibody-linker
30 complex was incubated with PR34™ peptide for 30 min at room temperature. The Pan-O-5-linker-PR34 antibody

WO 01/90153

PCT/US01/16840

73

complex was washed twice with D-PBS using an Amicon spin column. The concentration of the conjugate was determined by absorbance at 280 nm.

Cells (18×10^6) were incubated with Pan-O-5-linker-PR34 antibody (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 15 min. The cell-antibody complex was washed twice with Isolex buffer and incubated with anti-CD34-coated Dynabeads (5 beads per cell) for 30 min at room temperature. The Dynabeads were isolated with a magnet, and unbound cells were removed. The bead-cell fraction was incubated with PR34TM peptide (5 mg/ml) for 30 min at room temperature. Released cells were separated from unreleased cells using a magnet. The results are shown in Figure 5 (N=1).

As shown in Figure 5, the Pan-O-5-linker-PR34 antibody efficiently captured greater than 90% of the Camma cells. Greater than 75% of cells were released using PR34TM peptide. The yield of Camma cells was greater than 70%.

These results demonstrate that the peptide-ligand conjugate method for positively selecting cells can be used with a variety of antibodies specific for various target cells, including the Pan-O-5 antibody, which can select breast cancer cells.

Throughout this application various publications have been referenced. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference in this application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

74

Although the invention has been described
with reference to the examples provided above, it
should be understood that various modifications can be
made without departing from the spirit of the
5 invention. Accordingly, the invention is limited only
by the claims.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

75

What is claimed is:

1. A peptide-ligand conjugate comprising a peptide conjugated to a first ligand, wherein a free form of said peptide is capable of displacing a second
5 ligand specific for said peptide.
2. The peptide-ligand conjugate of claim 1, wherein said first ligand specifically binds a target molecule on a cell surface.
3. The peptide-ligand conjugate of claim 2,
10 wherein said target molecule is a cell surface receptor.
4. The peptide-ligand conjugate of claim 1, wherein said first ligand is an antibody.
5. The peptide-ligand conjugate of claim 4,
15 wherein said antibody is an anti-CD8 antibody or an anti-CD2 antibody.
6. The peptide-ligand conjugate of claim 1, wherein said second ligand is an antibody.
7. The peptide-ligand conjugate of claim 1,
20 wherein said second ligand specifically binds CD34.
8. The peptide-ligand conjugate of claim 7, wherein said second ligand is monoclonal antibody 9C5.
9. The peptide conjugate of claim 1, wherein said peptide comprises an amino acid sequence
25 selected from the group consisting of QQGWFP (SEQ ID NO:1); QQGWFPKD (SEQ ID NO:2); and QQGWFPKDC (SEQ ID NO:3).

WO 01/90153

PCT/US01/16840

76

10. The peptide-ligand conjugate of claim 9,
wherein said peptide is acylated.

11. A method of selecting a cell, comprising
the steps of:

5 (a) contacting a cell population with a
peptide-ligand conjugate, wherein said conjugate
comprises a first ligand specific for a cell in said
population conjugated to a peptide capable of
displacing a second ligand specific for said peptide,
10 thereby forming a cell-conjugate complex;

(b) contacting said peptide-ligand conjugate
with said second ligand; and

(c) isolating said cell-conjugate complex.

12. The method of claim 11, further
15 comprising the step of:

(d) contacting said cell-conjugate complex
with a free form of said peptide, thereby releasing
said cell from said cell-conjugate complex.

13. The method of claim 11, wherein said
20 first ligand specifically binds a target molecule on
the surface of said cell.

14. The method of claim 13, wherein said
target molecule is a cell surface receptor.

15. The method of claim 11, wherein said
25 first ligand is an antibody.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

77

16. The method of claim 15, wherein said antibody is an anti-CD8 antibody or an anti-CD2 antibody.

17. The method of claim 11, wherein said
5 second ligand is an antibody.

18. The method of claim 11, wherein said peptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of QQGWFP (SEQ ID NO:1); QQGWFPKD (SEQ ID NO:2); and QQGWFPKDC (SEQ ID NO:3).

10 19. The method of claim 12, wherein said free form of said peptide comprises the amino acid sequence QQGWFP (SEQ ID NO:1) or QQGWFPKD (SEQ ID NO:2)

20. The method of claim 12, wherein said peptide is acylated.

15 21. The method of claim 11, wherein said second ligand is a CD34-specific antibody.

22. The method of claim 21, wherein said antibody is 9C5.

20 23. The method of claim 11, wherein said cell is a stem cell.

24. The method of claim 23, wherein said stem cell is a blood-generated stem cell.

25. The method of claim 24, wherein said blood-generated stem cell is a hematopoietic stem cell.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

78

26. The method of claim 23, wherein said stem cell is a mesenchymal stem cell, a neuronal stem cell or a muscle stem cell.

27. The method of claim 11, wherein said
5 cell is a dendritic cell.

28. The method of claim 11, wherein said cell is a T-cell.

29. The method of claim 11, wherein said cell is a hematopoietic cell.

10 30. The method of claim 28, wherein said cell is a CD34+ cell.

31. The method of claim 11, wherein said cell is a tumor cell.

15 32. The method of claim 31, wherein said tumor cell is a cell selected from the group consisting of breast, prostate, colon, lung, lymphoma, myeloma, melanoma, leukemia, ovarian, pancreatic, adrenal, renal cell carcinoma, cervical, hepatic, stomach, and neuroblastoma.

20 33. A method of enriching for a cell from a cell population, comprising the steps of:

(a) contacting a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein said conjugate comprises a first ligand specific for a cell in said
25 population conjugated to a peptide capable of displacing a second ligand specific for said peptide, thereby forming a cell-conjugate complex;

WO 01/90153

PCT/US01/16840

79

(b) contacting said peptide-ligand conjugate with said second ligand; and

(c) isolating said cell-conjugate complex.

34. The method of claim 33, further comprising the step of:

(d) contacting said cell-conjugate complex with said peptide, thereby releasing said cell from said cell-conjugate complex.

35. The method of claim 33, wherein said first ligand specifically binds a target molecule on the surface of said cell.

36. The method of claim 35, wherein said target molecule is a cell surface receptor.

37. The method of claim 33, wherein said first ligand is an antibody.

38. The method of claim 37, wherein said antibody is an anti-CD8 antibody or an anti-CD2 antibody.

39. The method of claim 33, wherein said second ligand is an antibody.

40. The method of claim 33, wherein said peptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of QQGWFP (SEQ ID NO:1); QQGWFPKD (SEQ ID NO:2); QQGWFPKDC (SEQ ID NO:3).

WO 01/90153

PCT/US01/16840

80

41. The method of claim 34, wherein said free form of said peptide comprises the amino acid sequence QQGWFP (SEQ ID NO:1) or QQGWFPKD (SEQ ID NO:2).

5 42. The method of claim 33, wherein said peptide is acylated.

43. The method of claim 33, wherein said second ligand is a CD34-specific antibody.

10 44. The method of claim 43, wherein said antibody is 9C5.

45. The method of claim 33, wherein said cell is a stem cell.

46. The method of claim 45, wherein said stem cell is a blood-generated stem cell.

15 47. The method of claim 46, wherein said blood-generated stem cell is a hematopoietic stem cell.

48. The method of claim 45, wherein said stem cell is a mesenchymal stem cell, a neuronal stem cell, or muscle stem cell.

20 49. The method of claim 33, wherein said cell is a dendritic cell.

50. The method of claim 33, wherein said cell is a T-cell, a naive T cell, a memory T cell, or a natural killer cell.

25 51. The method of claim 33, wherein said cell is a hematopoietic cell.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

81

52. The method of claim 50, wherein said cell is a CD34+ cell.

53. The method of claim 33, wherein said cell is a tumor cell.

5 54. The method of claim 53, wherein said tumor cell is a cell selected from the group consisting of breast, prostate, colon, lung, lymphoma, myeloma, melanoma, leukemia, ovarian, pancreatic, adrenal, renal cell carcinoma, cervical, hepatic, stomach, and
10 neuroblastoma.

55. A method of diagnosing a condition, comprising the steps of:

(a) contacting a sample comprising a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein
15 said conjugate comprises a first ligand specific for a cell in said population conjugated to a peptide capable of displacing a second ligand specific for said peptide, thereby forming a cell-conjugate complex;

(b) contacting said peptide-ligand conjugate
20 with said second ligand;

(c) isolating said cell-conjugate complex;
and

(d) identifying said cell in said complex, wherein said cell is associated with a condition.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

82

56. The method of claim 55, further comprising the step of:

(e) contacting said cell-conjugate complex with said peptide, thereby releasing said cell from said cell-conjugate complex.

57. The method of claim 55, wherein said condition is cancer.

58. The method of claim 57, wherein said cancer is selected from the group consisting of breast cancer, prostate cancer, colon, lung, lymphoma, myeloma, melanoma, leukemia, ovarian, pancreatic, adrenal, renal cell carcinoma, cervical, hepatic, stomach, and neuroblastoma.

59. The method of claim 55, wherein said first ligand specifically binds a target molecule on the surface of said cell.

60. The method of claim 55, wherein said first ligand is an antibody.

61. The method of claim 55, wherein said second ligand is an antibody.

62. The method of claim 55, wherein said peptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of QQGFP (SEQ ID NO:1); QQGWFPKD (SEQ ID NO:2); and QQGWFPKDC (SEQ ID NO:3).

63. The method of claim 56, wherein said free form of said peptide comprises the amino acid sequence QQGWFP (SEQ ID NO:1) or QQGWFPKD (SEQ ID NO:2).

WO 01/90153

PCT/US01/16840

83

64. The method of claim 55, wherein said antibody is 9C5.

65. A kit for isolating a cell, comprising a peptide capable of displacing an antibody specific for
5 said peptide and said antibody.

66. The kit of claim 65, wherein said peptide is conjugated to a ligand directed to a target molecule.

67. The kit of claim 65, wherein said
10 peptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of QQGWFP (SEQ ID NO:1); QQGWFPKD (SEQ ID NO:2); and QQGWFPKDC (SEQ ID NO:3).

68. The kit of claim 65, wherein said peptide comprises the amino acid sequence QQGWFPKDC
15 (SEQ ID NO:1).

69. The kit of claim 67, wherein said peptide is acylated.

70. The kit of claim 65, wherein said antibody specifically binds CD34.

20 71. The kit of claim 70, wherein said antibody is 9C5.

72. The kit of claim 65, further comprising a peptide-ligand conjugate comprising said peptide conjugated to a ligand that binds a cell surface
25 receptor.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

84

73. A method of selecting a cell, comprising the steps of:

(a) contacting a cell population with a peptide-specific ligand, wherein said cell population comprises a cell expressing a cell surface fusion polypeptide fused to a peptide, wherein the free form of said peptide is capable of displacing said peptide-specific ligand bound to said fusion polypeptide, thereby forming a cell-peptide ligand complex; and

10 (b) isolating said cell-peptide ligand complex.

74. The method of claim 73, further comprising the step of:

(c) contacting said cell-peptide ligand complex with a free form of said peptide, thereby releasing said cell from said cell-peptide ligand complex.

75. A peptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of ACKQF (SEQ ID NO:34); ASKQF (SEQ ID NO:35); ACKRPP (SEQ ID NO:36); ACKQFN (SEQ ID NO:37); ACKQFDFC (SEQ ID NO:38); ACKQFNNDV (SEQ ID NO:39); ACKQFACKQF (SEQ ID NO:40); ACKQFDFCNDH (SEQ ID NO:41); ACKRPPVSLTCH (SEQ ID NO:42); ACKQLHSVSGCR (SEQ ID NO:43); ACKQFNNDVTCN (SEQ ID NO:44); ACKQFDFCNDHWSK (SEQ ID NO:45); ACKQFNNDVTCNKRH (SEQ ID NO:46); ACKQFDFCNDHWSKSQH (SEQ ID NO:47); ACKQFNNDVTCNAEGDD (SEQ ID NO:48); KCHPNMSLKECH (SEQ ID NO:49); RCRRPATTPACR (SEQ ID NO:50); and RCRRPATTPACRACKQF (SEQ ID NO:51).

WO 01/90153

PCT/US01/16840

85

76. A method of selecting a cell subpopulation, comprising the steps of:

(a) contacting a cell population with:

5 a peptide-ligand conjugate, wherein said conjugate comprises a first ligand specific for a first cell in said population, said first ligand conjugated to a peptide capable of displacing a peptide-specific ligand, thereby forming a first cell-conjugate complex; and

10 with a second ligand specific for a second cell in said population, thereby forming a second cell-second ligand complex;

(b) contacting said peptide-ligand conjugate with said peptide-specific ligand; and

15 (c) isolating said first cell-conjugate complex and said second cell-second ligand complex.

77. The method of claim 76, wherein said second ligand is said peptide-specific ligand.

20 78. The method of claim 77, further comprising the step of:

(d) contacting said first cell-conjugate complex and said second cell-second ligand complex with a free form of said peptide, thereby releasing said first cell from said first cell-conjugate complex and
25 said second cell from said second cell-second ligand conjugate.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

86

79. The method of claim 76, wherein said second ligand is conjugated to said peptide.

80. The method of claim 79, further comprising the step of:

5 (d) contacting said first cell-conjugate complex and said second cell-second ligand complex with a free form of said peptide, thereby releasing said first cell from said first cell-conjugate complex and said second cell from said second cell-second ligand
10 conjugate.

81. The method of claim 76, wherein said second ligand is conjugated to a second peptide capable of displacing a second peptide-specific ligand.

82. The method of claim 81, further
15 comprising the step of:

(d) contacting said first cell-conjugate complex with a free form of said peptide and said second cell-second ligand complex with a free form of said second peptide, thereby releasing said first cell
20 from said first cell-conjugate complex and said second cell from said second cell-second ligand conjugate.

83. The method of claim 76, wherein said first ligand specifically binds a target molecule on the surface of said first cell.

25 84. The method of claim 83, wherein said target molecule is a cell surface receptor.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

87

85. The method of claim 76, wherein said second ligand specifically binds a target molecule on the surface of said second cell.

86. The method of claim 85, wherein said target molecule is a cell surface receptor.

87. The method of claim 76, wherein said first and second ligands are antibodies.

88. The method of claim 87, wherein said antibody is an anti-CD8 antibody or an anti-CD2 antibody.

89. The method of claim 76, wherein said peptide-specific ligand is an antibody.

90. The method of claim 76, wherein said peptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of QQGWFP (SEQ ID NO:1); QQGWFPKD (SEQ ID NO:2); and QQGWFPKDC (SEQ ID NO:3).

91. The method of claim 80, wherein said free form of said peptide comprises the amino acid sequence QQGWFP (SEQ ID NO:1) or QQGWFPKD (SEQ ID NO:2)

92. The method of claim 91, wherein said peptide is acylated.

93. The method of claim 76, wherein said peptide-specific ligand is a CD34-specific antibody.

94. The method of claim 93, wherein said antibody is 9C5.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

88

95. The method of claim 76, wherein said first or second cell is a stem cell.

96. The method of claim 95, wherein said stem cell is a blood-generated stem cell.

5 97. The method of claim 96, wherein said blood-generated stem cell is a hematopoietic stem cell.

98. The method of claim 95, wherein said stem cell is a mesenchymal stem cell, a neuronal stem cell or a muscle stem cell.

10 99. The method of claim 76, wherein said first or second cell is a dendritic cell.

100. The method of claim 76, wherein said cell is a T-cell.

15 101. The method of claim 76, wherein said cell is a hematopoietic cell.

102. The method of claim 100, wherein said cell is a CD34+ cell.

103. The method of claim 76, wherein said cell is a tumor cell.

20 104. The method of claim 103, wherein said tumor cell is a cell selected from the group consisting of breast, prostate, colon, lung, lymphoma, myeloma, melanoma, leukemia, ovarian, pancreatic, adrenal, renal cell carcinoma, cervical, hepatic, stomach, and
25 neuroblastoma.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

89

105. A method of selecting a cell,
comprising the steps of:

- (a) contacting a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein said conjugate
5 comprises a first ligand specific for a first cell in said population conjugated to a peptide capable of displacing a peptide-specific ligand, wherein said peptide-specific ligand binds to a second cell in said population, thereby forming a cell-conjugate complex;
- 10 (b) contacting said peptide-ligand conjugate with said peptide-specific ligand;
- (c) contacting said cell population with a second ligand specific for said second cell, wherein said second ligand is not displaced by said peptide and
15 binds to a distinct site from said peptide-specific ligand; and
- (d) isolating said cell-conjugate complex.

106. The method of claim 105, further comprising the step of:

- 20 (d) contacting said cell-conjugate complex with a free form of said peptide, thereby releasing said first cell from said cell-conjugate complex.

107. A substantially pure cell subpopulation comprising CD34 cells and at least one other
25 specifically isolated cell type.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

90

108. The substantially pure cell subpopulation of claim 107, wherein said other specifically isolated cell type is selected from the group consisting of a mesenchymal cell, T cell, B cell,
5 natural killer cell, and facilitating cell.

109. A method of treating a condition in an individual, comprising administering the substantially pure cell subpopulation of claim 107.

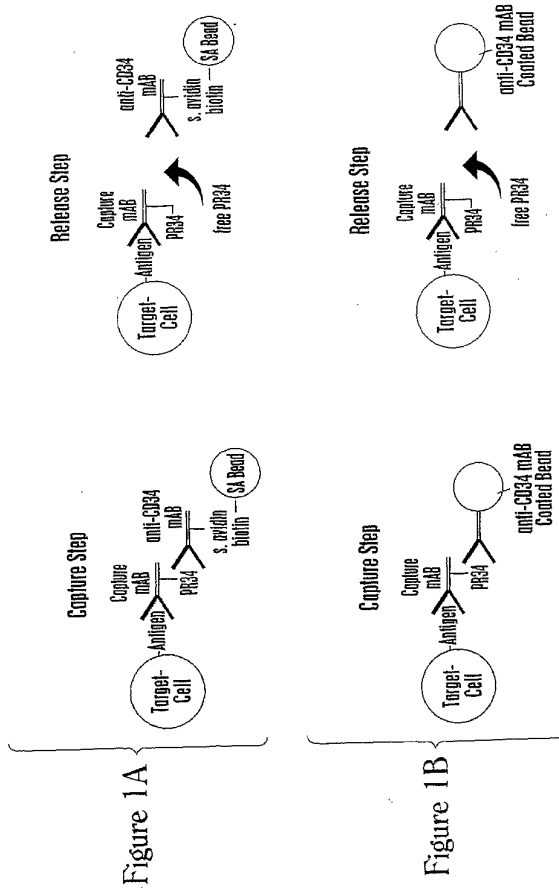
110. The method of claim 109, wherein said
10 condition is transplantation.

111. The method of claim 109, wherein said condition is cancer or immunosuppression.

WO 01/90153

PCT/US01/16840

1/6



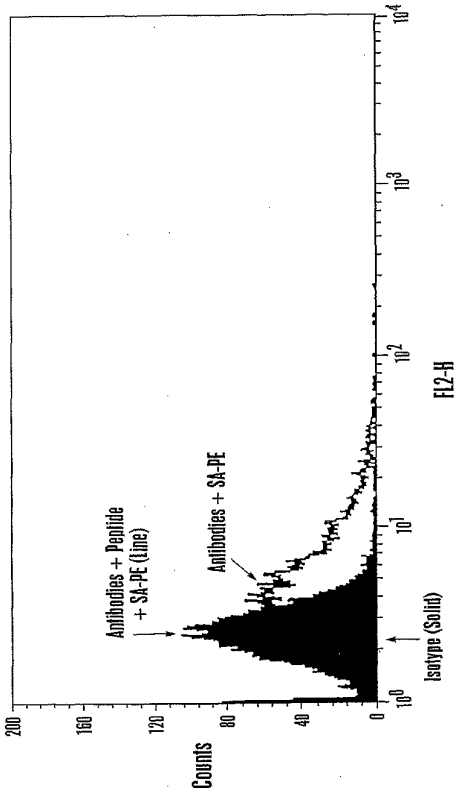


Figure 2

WO 01/90153

PCT/US01/16840

3/6

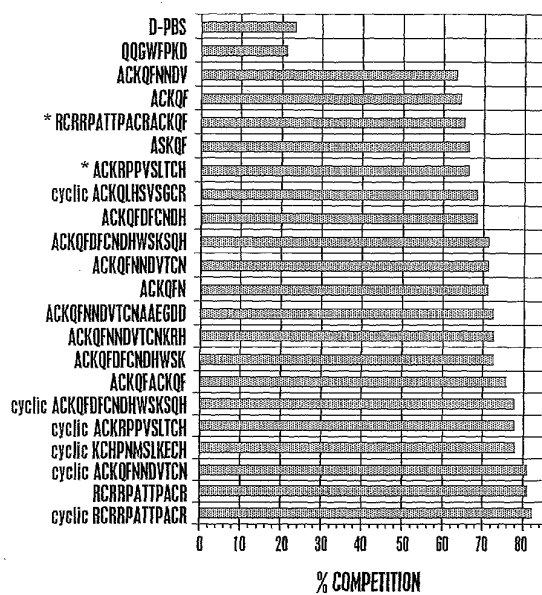


Figure 3

WO 01/90153

PCT/US01/16840

4/6

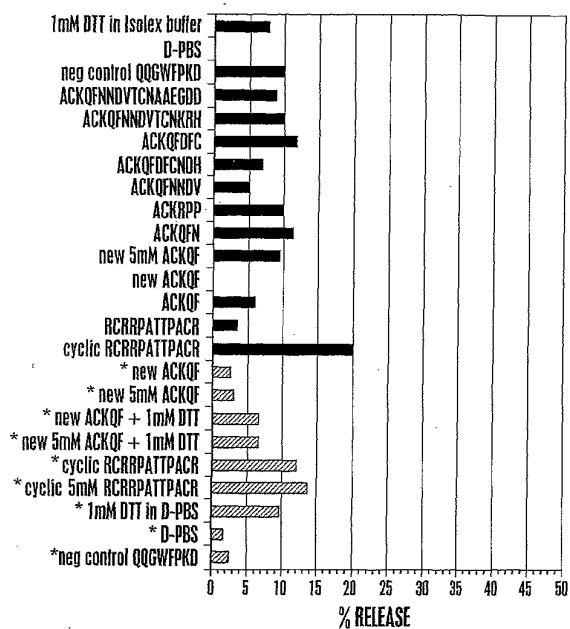


Figure 4

WO 01/90153

PCT/US01/16840

5/6

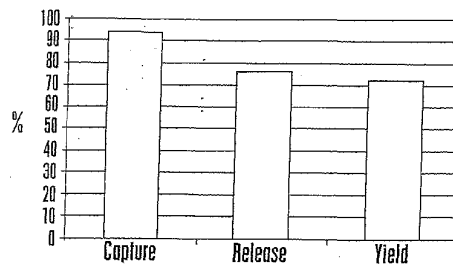


Figure 5

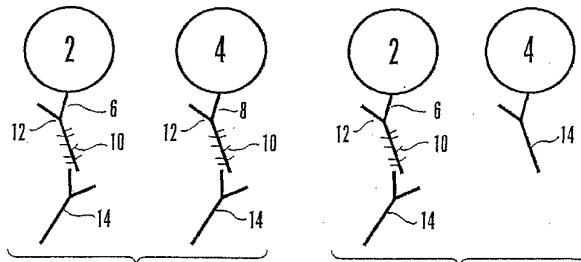


Figure 6A

Figure 6B

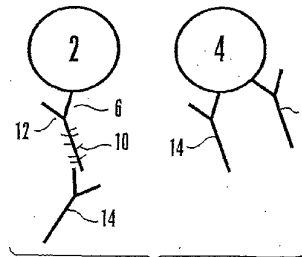


Figure 6C

WO 01/90153

PCT/US01/16840

6/6

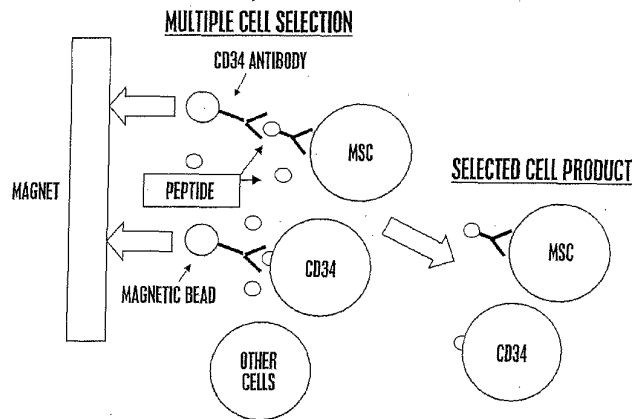


Figure 7

WO 01/90153

PCT/US01/16840

SEQUENCE LISTING

<110> Nexell Therapeutics Inc.

<120> Reagents For Cell Selection and Methods
of Use

<130> FP-NT4664

<150> US 09/578,784

<151> 2000-05-23

<150> US 09/659,469

<151> 2000-09-11

<160> 57

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 1

Gln Gln Gly Trp Phe Pro

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 2

Gln Gln Gly Trp Phe Pro Lys Asp

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

WO 01/90153

PCT/US01/16840

<400> 3
Gln Gln Gly Trp Phe Pro Lys Asp Cys
1 5

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 4
Gln Gln Gly Phe Phe Pro
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 5
Thr Gln Gly Thr Phe Ser
1 5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 6
Asn Gln Gly Tyr Phe Pro
1 5

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(18)
<223> Xaa =any hydrophilic, polar or charged amino acid

WO 01/90153

PCT/US01/16840

that may or may not be present

<400> 7
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Gln Gly Trp Phe Pro Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(18)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
 that may or may not be present

<400> 8
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Gln Gly Ser Phe Trp Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa

<210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(20)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar, or charged amino acid
 that may or may not be present

<400> 9
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Gln Gly Trp Phe Pro Lys Asp Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

WO 01/90153 PCT/US01/16840

<223> synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(20)

<223> Xaa=any hydrophilic, polar, or charged amino acid
that may or may not be present

<400> 10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Gln Gly Trp Phe Pro Asp Lys Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Xaa
20

<210> 11

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(6)

<223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
that may or may not be present

<221> VARIANT

<222> 11,14,16

<223> Xaa=any amino acid

<221> VARIANT

<222> (21)...(26)

<223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
that may or may not be present

<400> 11

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Gly Ala Xaa Gln Gly Xaa Phe Xaa
1 5 10 15
Gly Ala Lys Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

<210> 12

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(26)

<223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
that may or may not be present

WO 01/90153

PCT/US01/16840

<400> 12
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Gly Ala Gln Gln Gly Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Ala Lys Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

<210> 13
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(26)
<223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
that may or may not be present

<400> 13
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Gly Ala Thr Gln Gly Ser Phe Trp
1 5 10 15
Gly Ala Lys Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(18)
<223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
that may or may not be present

<400> 14
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Ser Ser Val Gln Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa

<210> 15
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

WO 01/90153

PCT/US01/16840

<221> VARIANT
 <222> (1)...(26)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
 that may or may not be present

<400> 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Gly Ala Leu Ile Ser Gln Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Lys Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25

<210> 16
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(18)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
 that may or may not be present

<400> 16
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ile Ser Gln Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa

<210> 17
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(6)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
 that may or may not be present

<221> VARIANT
 <222> 11,12
 <223> Xaa=any amino acid

<221> VARIANT
 <222> (13)...(18)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
 that may or may not be present

WO 01/90153 PCT/US01/16840

<400> 17
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Ser Ser Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa

<210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(18)
<223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
that may or may not be present

<400> 18
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Ser Ser Val Gly Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa

<210> 19
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> (1)...(18)
<223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
that may or may not be present

<400> 19
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Gly Gln Ala Ser Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa

<210> 20
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

WO 01/90153 PCT/US01/16840

<221> VARIANT
 <222> (1)...(26)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
 that may or may not be present

<400> 20
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Gly Ala Pro Phe Trp Gly Gln Gln
 1 5 10 15
 Gly Ala Lys Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25

<210> 21
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(26)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
 that may or may not be present

<400> 21
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Gly Ala Thr Gln Gly Thr Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Lys Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25

<210> 22
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(27)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
 that may or may not be present

<400> 22
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser
 1 5 10 15
 Asn Val Ser Lys Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25

<210> 23
 <211> 26
 <212> PRT

WO 01/90153 PCT/US01/16840

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(26)

<223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
that may or may not be present

<400> 23

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Asp	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	Ile	Cys	Leu
1			5				10					15		
Gly	Ala	Lys	Asp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		20					25							

<210> 24

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(27)

<223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
that may or may not be present

<400> 24

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	Gln	Gly	Ile	Cys	Leu
1				5				10					15		
Glu	Gln	Asn	Lys	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		20						25							

<210> 25

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<221> VARIANT

<222> (1)...(26)

<223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
that may or may not be present

<400> 25

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Asp	Gly	Ala	Asn	Gln	Gly	Tyr	Phe	Pro
1				5				10					15		
Gly	Ala	Lys	Asp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		20						25							

WO 01/90153

PCT/US01/16840

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 26
Pro Gly Ser Pro Leu Gly Lys Asp
1 5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 27
Tyr Ser Arg Leu Gly Phe Lys Asp
1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 28
Gln Tyr Thr Gln Pro Lys Asp
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 29
Asn Leu Gln Gly Glu Phe Lys Asp
1 5

<210> 30

WO 01/90153

PCT/US01/16840

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 30
Arg Ser Phe Tyr Tyr Arg Asp
1 5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 31
Ile Gln Glu Phe Gly Val Lys Asp
1 5

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 32
Ser Phe Arg Val Gly Tyr Lys Asp
1 5

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 33
Lys Asp Val Tyr Ser Leu Trp Pro Lys Asp
1 5 10

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 01/90153

PCT/US01/16840

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 34
Ala Cys Lys Gln Phe
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 35
Ala Ser Lys Gln Phe
1 5

<210> 36
<211> 6
<212> PRT

<220>

<400> 36
Ala Cys Lys Arg Pro Pro
1 5

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 37
Ala Cys Lys Gln Phe Asn
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<223> synthetic peptide

WO 01/90153

PCT/US01/16840

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 34
Ala Cys Lys Gln Phe
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 35
Ala Ser Lys Gln Phe
1 5

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 36
Ala Cys Lys Arg Pro Pro
1 5

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 37
Ala Cys Lys Gln Phe Asn
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

WO 01/90153

PCT/US01/16840

<400> 38

Ala Cys Lys Gln Phe Asp Phe Cys
1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 39

Ala Cys Lys Gln Phe Asn Asn Asp Val
1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 40

Ala Cys Lys Gln Phe Ala Cys Lys Gln Phe
1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 41

Ala Cys Lys Gln Phe Asp Phe Cys Asn Asp His
1 5 10

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 42

Ala Cys Lys Arg Pro Pro Val Ser Leu Thr Cys His

WO 01/90153 PCT/US01/16840

1 5 10

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 43
Ala Cys Lys Gln Leu His Ser Val Ser Gly Cys Arg
1 5 10

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 44
Ala Cys Lys Gln Phe Asn Asn Asp Val Thr Cys Asn
1 5 10

<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 45
Ala Cys Lys Gln Phe Asp Phe Cys Asn Asp His Trp Ser Lys
1 5 10

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 46
Ala Cys Lys Gln Phe Asn Asn Asp Val Thr Cys Asn Lys Arg His
1 5 10 15

WO 01/90153

PCT/US01/16840

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 47
Ala Cys Lys Gln Phe Asp Phe Cys Asn Asp His Trp Ser Lys Ser Gln
1 5 10 15
His

<210> 48
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 48
Ala Cys Lys Gln Phe Asn Asn Asp Val Thr Cys Asn Ala Ala Glu Gly
1 5 10 15
Asp Asp

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 49
Lys Cys His Pro Asn Met Ser Leu Lys Glu Cys His
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 50
Arg Cys Arg Arg Pro Ala Thr Thr Pro Ala Cys Arg
1 5 10

WO 01/90153

PCT/US01/16840

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<400> 51
Arg Cys Arg Arg Pro Ala Thr Thr Pro Ala Cys Arg Ala Cys Lys Gln
1 5 10 15
Phe

<210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa=Trp, Tyr, Ser, Phe or Thr

<400> 52
Gln Gly Xaa Phe
1

<210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide

<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa=Gln, Asn, Thr, or Ser

<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa=Trp, Tyr, Ser, Phe or Thr

<221> VARIANT
<222> 6
<223> Xaa=Pro, Trp or Ser

<400> 53
Xaa Gln Gly Xaa Phe Xaa

WO 01/90153

PCT/US01/16840

1

5

<210> 54
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> 3
 <223> Xaa=any amino acid

<400> 54
 Gln Gly Xaa Phe
 1

<210> 55
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(6)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
 that may or may not be present

<221> VARIANT
 <222> 9
 <223> Xaa=any amino acid

<221> VARIANT
 <222> (11)...(16)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar or charged amino acid
 that may or may not be present

<400> 55
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Gly Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

<210> 56
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

WO 01/90153 PCT/US01/16840 --

<221> VARIANT
 <222> 1, 4, 6
 <223> Xaa=any amino acid

<400> 56
 Xaa Gln Gly Xaa Phe Xaa
 1 5

<210> 57
 <211> 18
 <212> PPT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide

<221> VARIANT
 <222> (1)...(6)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar, or charged amino acid
 that may or may not be present

<221> VARIANT
 <222> 7, 10, 12
 <223> Xaa=any amino acid

<221> VARIANT
 <222> (13)...(18)
 <223> Xaa=any hydrophilic, polar, or charged amino acid
 that may or may not be present

<400> 57
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Gly Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

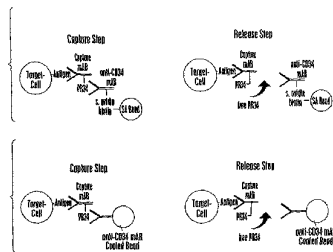
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/90153 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/00 (71) Applicant (for all designated States except US): NEXELL THERAPEUTICS, INC. [US/US]; 9 Parker, Irvine, CA 92618 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/16840 (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): SCHAEFFER, Andrew, T. [US/US]; 16366 Creekside Place, La Mirada, CA 90638 (US). TSENG-LAW, Janet [US/US]; 47 Rockrose, Aliso Viejo, CA 92656 (US). THORNTON, Jeffrey, R. [US/US]; Apartment 4307, 22751 El Prado, Rancho Santa Margarita, CA 92688 (US). VAN EPPS, Dennis, E. [US/US]; 8 Birkdale Way, Coto de Caza, CA 92679 (US).
- (22) International Filing Date: 23 May 2001 (23.05.2001) (74) Agents: RAMOS, Robert, T. et al.; Campbell & Flores, LLP, 7th floor, 4370 La Jolla Village Drive, San Diego, CA 92122 (US).
- (25) Filing Language: English (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, EE, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, IL, IN, JP, KE, KG, KH, KR, KZ, LA, LV, LY, MA, MG, MK, MN, MU, MV, MW, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PK, PL, PT, RU, SA, SD, SG, SI, SK, SL, SM, SN, SR, ST, SV, SW, SY, TD, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VE, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/578,784 23 May 2000 (23.05.2000) US (57) Abstract: The present invention provides peptide-ligand conjugates containing a peptide, where a free form of the peptide is capable of displacing a second ligand specific for the peptide. The invention also provides a method of selecting a cell. The method includes the steps of contacting a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein the conjugate comprises a first ligand specific for a cell in the population conjugated to a peptide capable of displacing a second ligand specific for the peptide, thereby forming a cell-conjugate complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the second ligand; and isolating the cell-conjugate complex. The method can further include the step of adding a free form of the peptide to release the cell from the complex. The invention also provides a subpopulation of cells containing two or more specifically isolated cells and methods of isolating cell subpopulations. The invention additionally provides a method of diagnosing a condition using peptide-ligand conjugates. The invention further provides a kit for isolating a cell containing a peptide capable of displacing an antibody specific for the peptide and the antibody.
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 09/659,469 (CIP)
Filed on 11 September 2000 (11.09.2000)
US 09/578,784 (CIP)
Filed on 23 May 2000 (23.05.2000)

[Continued on next page]

(54) Title: REAGENTS FOR CELL SELECTION AND METHODS OF USE



WO 01/90153 A2

WO 01/90153 A2



EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), 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, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(48) Date of publication of this corrected version:

28 March 2002

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(15) Information about Correction:

see PCT Gazette No. 13/2002 of 28 March 2002, Section II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/090153 A3(51) International Patent Classification: C07K 7/06,
7/08, 1/04, G01N 33/569, 33/574, 33/543, A61P 37/06,
C12N 5/06(74) Agents: RAMOS, Robert, T. et al.; Campbell & Flores,
LLP, 7th floor, 4370 La Jolla Village Drive, San Diego, CA
92122 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/16840

(22) International Filing Date: 23 May 2001 (23.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/578,784 23 May 2000 (23.05.2000) US
09/659,469 11 September 2000 (11.09.2000) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier applications:
US 09/659,469 (CIP)
Filed on 11 September 2000 (11.09.2000)
US 09/578,784 (CIP)
Filed on 23 May 2000 (23.05.2000)(71) Applicant (for all designated States except US): NEXELL
THERAPEUTICS, INC. [US/US]; 9 Parker, Irvine, CA
92618 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SCHAEFFER, An-
drew, T. [US/US]; 16366 Crookside Place, La Mirada, CA
90638 (US); TSENG-LAW, Janet [US/US]; 47 Rockrose,
Aliso Viejo, CA 92656 (US); THORNTON, Jeffrey,
R. [US/US]; Apartment 4307, 22751 El Prado, Rancho
Santa Margarita, CA 92688 (US); VAN EPPS, Dennis, E.
[US/US]; 8 Birkdale Way, Coto de Caza, CA 92679 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (util-
ity model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (util-
ity model), DI, DK (utility model), DM, DZ, EC, IE
(utility model), ES, IT, IT (utility model), IT, GB, GR, 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, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK (utility model), SK, SI, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI,
CG, CL, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
20 March 2003

(15) Information about Correction:

Previous Correction:

see PCT Gazette No. 13/2002 of 28 March 2002, Section II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/090153 A3

(54) Title: REAGENTS FOR CELL SELECTION AND METHODS OF USE

(57) Abstract: The present invention provides peptide-ligand conjugates containing a peptide, where a free form of the peptide is capable of displacing a second ligand specific for the peptide. The invention also provides a method of selecting a cell. The method includes the steps of contacting a cell population with a peptide-ligand conjugate, wherein the conjugate comprises a first ligand specific for a cell in the population conjugated to a peptide capable of displacing a second ligand specific for the peptide, thereby forming a cell-conjugate complex; contacting the peptide-ligand conjugate with the second ligand; and isolating the cell-conjugate complex. The method can further include the step of adding a free form of the peptide to release the cell from the complex. The invention also provides a subpopulation of cells containing two or more specifically isolated cells and methods of isolating cell subpopulations. The invention additionally provides a method of diagnosing a condition using peptide-ligand conjugates. The invention further provides a kit for isolating a cell containing a peptide capable of displacing an antibody specific for the peptide and the antibody.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/16840
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K7/06 C07K7/08 C07K1/04 G01N33/569 G01N33/574 G01N33/543 A61P37/06 C12N5/06		
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 C07K G01N C12N		
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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 02016 A (KESSLER STEVEN) 3 February 1994 (1994-02-03)	1-6, 11-17, 21-39, 45-54, 65-74, 76, 79-89, 95-104, 107-111
A	page 15, line 27 - line 30	77
Y	claim 12	105, 106
	table 4	
	example 8	
	page 37, line 23 - page 38, line 11	
A	WO 95 07466 A (BAXTER INT) 16 March 1995 (1995-03-16)	1-54, 65-74
X	claim 6	107-111
-/-		
☒ 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 claims 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 8 July 2002		Date of mailing of the international search report 18. 07. 2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3940, Tx. 31 951 apo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1996)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/16840
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 01368 A (HOLMES MICHAEL JOHN ;DYNAL AS (NO)) 7 February 1991 (1991-02-07)	1-54, 65-74
X	page 2, line 3 - line 16 page 2, line 33 - line 36 page 4, line 18 -page 7, line 19	107-111
X	WO 95 34817 A (BAXTER INT) 21 December 1995 (1995-12-21) cited in the application the whole document & US 5 968 753 A 19 October 1999 (1999-10-19) cited in the application	65-71, 90-94, 107-111
X	TSENG-LAW JANET ET AL: "Identification of a peptide directed against the anti-CD34 antibody, 9C5, by phage display and its use in hematopoietic stem cell selection." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (CHARLOTTESVILLE), vol. 27, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 936-945, XP002192619 ISSN: 0301-472X cited in the application the whole document	65-71, 90-94
Y		105,106
X		107-111
X	WO 99 61588 A (OSIRIS THERAPEUTICS INC) 2 December 1999 (1999-12-02) claims 1-12	107-111
P,A	SCHUCHERT M J ET AL: "CHARACTERIZATION OF A NEWLY DISCOVERED T-CELL RECEPTOR BETA-CHAIN HETERODIMER EXPRESSED ON A CD8+ BONE MARROW SUBPOPULATION THAT PROMOTES ALLOGENEIC STEM CELL ENGRAFTMENT" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 6, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 904-909, XP002936229 ISSN: 1078-8956 cited in the application page 908, paragraph 3	107-111

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/16840**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT,
no additional fees are to be refunded.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
Claims relating to inventions 1 and 21-24.
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-54, 65-74

Peptide-ligand conjugate, method and kit using displaceable antibody-peptide conjugate

Invention 2: Claims 55-64

Method of diagnosing a condition

Invention 3-20: Claim 75

A peptide of claim 75 (SEQ ID NOs:34-51)

Invention 21: Claims 76-104

Method of selecting a cell involving two cell subpopulations

Invention 22: Claims 105,106

Method of selecting a cell involving displaceable and non-displaceable ligands

Invention 23: Claims 107, 108

A substantially pure cell subpopulation

Invention 24: Claims 109-111

Method of treating a condition

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 109-111 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition (but see objections because of lack of unity).

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No PCT/US 01/16840	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9402016	A	03-02-1994	AU 678179 B2	22-05-1997	
			AU 4993793 A	14-02-1994	
			CA 2141428 A1	03-02-1994	
			EP 0652703 A1	17-05-1995	
			WO 9402016 A1	03-02-1994	
WO 9507466	A	16-03-1995	AU 7832094 A	27-03-1995	
			CA 2168205 A1	16-03-1995	
			EP 0717848 A1	26-06-1996	
			JP 9502351 T	11-03-1997	
			WO 9507466 A2	16-03-1995	
WO 9101368	A	07-02-1991	AU 6035090 A	22-02-1991	
			WO 9101368 A1	07-02-1991	
WO 9534817	A	21-12-1995	AT 169409 T	15-08-1998	
			AU 697627 B2	15-10-1998	
			AU 2826195 A	05-01-1996	
			CA 2192455 A1	21-12-1995	
			DE 69503903 D1	10-09-1998	
			DE 69503903 T2	25-03-1999	
			DK 765478 T3	03-05-1999	
			EP 0765478 A1	02-04-1997	
			ES 2121400 T3	16-11-1998	
			JP 2849630 B2	20-01-1999	
			JP 9508534 T	02-09-1997	
			WO 9534817 A1	21-12-1995	
			US 5968753 A	19-10-1999	
			US 6017719 A	25-01-2000	
WO 9961588	A	02-12-1999	AU 4094099 A	13-12-1999	
			CA 2328425 A1	02-12-1999	
			EP 1078042 A1	28-02-2001	
			WO 9961588 A1	02-12-1999	
			US 6225119 B1	01-05-2001	
			US 2001005591 A1	28-06-2001	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 7/08	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/06	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	E

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,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,MZ,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 ツェンゲーロウ ジャネット
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 アリソ バイジョ ロックローズ 47

(72)発明者 ソーントン ジェフリー アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ランチョ サンタ マルガリータ エル プラド 2275
1 アpartment 4307

(72)発明者 バン エップソ デニス イー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 コト デ カザ パークデイル 8

Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ08 QQ96 QR48
4B065 AA90 BA30 CA44
4C087 AA01 AA03 BB43 NA14 ZB09 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA30 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA41 CA40
DA76 EA22 EA28

专利名称(译)	细胞选择试剂和使用方法		
公开(公告)号	JP2004501110A	公开(公告)日	2004-01-15
申请号	JP2001586964	申请日	2001-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	Nekuseru治疗团雷开球德		
申请(专利权)人(译)	Nekuseru治疗团雷开球德		
[标]发明人	シェーファーアンドリュウティー ツェングロウジャネット ソーントンジェフリーアール バンエップソデニスイー		
发明人	シェーファー アンドリュウ ティー. ツェング-ロウ ジャネット ソーントン ジェフリー アール. バン エップソ デニス イー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/12 A61K47/48 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/28 C07K16/30 C07K19/00 C12N5/06 C12N5/08 C12Q1/02		
CPC分类号	A61K47/6849 A61K47/6855 A61K47/6898 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 B82Y5/00 C07K16/2806 C07K16/2815 C07K16/2896 C07K16/3015 C07K2317/34		
FI分类号	C07K16/28.ZNA A61K35/12 A61P35/00 A61P37/04 C07K7/06 C07K7/08 C07K19/00 C12Q1/02 G01N33/53.Y C12N5/00.E		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B065/AA90 4B065/BA30 4B065/CA44 4C087/AA01 4C087/AA03 4C087/BB43 4C087/NA14 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA28		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	09/578784 2000-05-23 US 09/659469 2000-09-11 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供含有肽的肽 - 配体缀合物，其中游离形式的肽能够置换对肽特异的第二配体。本发明还提供了一种选择细胞的方法。该方法包括使细胞群与肽 - 配体缀合物接触的步骤，其中缀合物包含对与缀合能够置换对肽特异的第二配体的肽缀合的群体中的细胞特异的第一配体，从而形成细胞。 - 共轭复合物;使肽 - 配体缀合物与第二配体接触;并分离细胞结合复合物。该方法可以进一步包括添加游离形式的肽以从复合物中释放细胞的步骤。本发明还提供了含有两种或更多种特异性分离细胞的细胞亚群和分离细胞亚群的方法。本发明另外提供了使用肽 - 配体缀合物诊断病症的方法。本发明进一步提供了用于分离含有能够置换对肽和抗体特异的抗体的肽的细胞的试剂盒。

チューブ	SUP-T1 捕獲%	SUP-T1 収量%
1	1	6.16
2	80	43
3	44	31