

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-154532

(P2016-154532A)

(43) 公開日 平成28年9月1日(2016.9.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	Z 2 G 0 4 5
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48	B 4 B 0 2 9
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	K 4 B 0 6 5
G O 1 N 33/553 (2006.01)	G O 1 N 33/553	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L 外国語出願 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-252850 (P2015-252850)
 (22) 出願日 平成27年12月25日 (2015.12.25)
 (31) 優先権主張番号 14200362.3
 (32) 優先日 平成26年12月27日 (2014.12.27)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 312000044
 ミルテニー バイオテック ゲゼルシャフ
 ト ミット ベシュレンクテル ハフツン
 グ
 Milt enyi Biotec Gmb
 H
 ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラー
 トバッハ フリードリヒ-エーバート-シ
 ュトラーセ 68
 Friedrich-Ebert-Str
 asse 68, D-51429 Ber
 gisch Gladbach, Germ
 any

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マルチソート細胞分離法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】全血のような生物学的試料から、不所望な細胞を分離し、特定の標的細胞を分離するための迅速かつ簡単な方法の提供。

【解決手段】 a) 試料を、細胞凝集剤及び第一の抗原認識部に結合された特定の数値範囲を有する鉄含量を有する第一の磁性粒子並びに第二の抗原認識部に結合された特定の数値範囲を有する鉄含量を有する第二の磁性粒子に接触させて、混合物 a) を得る、 b) 第一の磁場勾配を混合物 a) に付与することにより、第一の磁性粒子に結合された第一の抗原認識部に結合された細胞を除去して、混合物 b) を得て、前記細胞凝集剤に結合された混合物 a) の細胞を含む凝集体を得る、 c) 第二の磁場勾配を混合物 b) に付与することにより第二の磁性粒子に結合された第二の抗原認識部に結合された細胞を静止させ、 d) 第二の磁場勾配から、静止した細胞を標的細胞として回収する、標的細胞の分離方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞試料から標的細胞を富化するための方法であって：

- a) 前記試料を、細胞凝集剤、および第一の抗原認識部に結合された $0.1 \text{ pg} \sim 5000 \text{ pg}$ の鉄含量を有する第一の磁性粒子；および第二の抗原認識部に結合された $0.05 \text{ fg} \sim 100 \text{ fg}$ の鉄含量を有する第二の磁性粒子と接触させることで、混合物 a) を得ること、
- b) 第一の磁場勾配を前記混合物 a) に付与することにより、前記第一の磁性粒子に結合された第一の抗原認識部に結合された細胞を除去して、混合物 b) を得て、前記細胞凝集剤に結合された混合物 a) の細胞を含む凝集体を得ること、
- c) 第二の磁場勾配を前記混合物 b) に付与することにより、第二の磁性粒子に結合された第二の抗原認識部に結合された細胞を静止させること、
- d) 静止した細胞を第二の磁場勾配から標的細胞として回収すること、
- を特徴とする前記方法。

10

【請求項 2】

細胞凝集剤に結合された混合物 a) の細胞を含む凝集体を、混合物 b) から分離することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第二の磁場勾配は、第一の磁場勾配よりも高いことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

第一の磁場勾配と第二の磁場勾配は、混合物 b) および混合物 c) を強磁性分離手段において第一の磁場と第二の磁場に供することによって付与されることを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

第一の磁性粒子は、15%未満の直径の c_v 値を有することを特徴とする、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

細胞凝集試薬は、フィブリノゲンおよび免疫グロブリンのようなタンパク質、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルピロリドン (PVP)、メチルセルロース、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 7】

第一の磁性粒子は、複数の異なる第一の抗原認識部に結合されていることを特徴とする、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

第二の磁性粒子は、複数の異なる第二の抗原認識部に結合されていることを特徴とする、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

第一の抗原認識部および / または第二の抗原認識部は、CD3、CD4、CD8、CD14、CD15、CD19、CD34、CD36、CD61、CD123、CD193、CD235a、抗 IgE および抗 TCRab の群から選択される抗原に対する抗体であることを特徴とする、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 10】

細胞の試料は、全血、パフィコート、または末梢血の試料である、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

第一の磁性粒子は、 $1 \mu\text{m} \sim 5 \mu\text{m}$ の平均直径を有することを特徴とする、請求項 1 から 10 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

50

第二の磁性粒子は、10 nm ~ 250 nmの平均直径を有することを特徴とする、請求項1から11までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

細胞凝集剤は、赤血球を凝集させることを特徴とする、請求項1から12までのいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的細胞を試料から非標的細胞のディプリーションによって分離する方法であって、凝集させ、第一の磁気的な細胞ソーティングを行い、その後第二の磁気的な細胞ソーティングステップによって標的細胞を富化することによって行う前記分離方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

細胞分離法は、科学研究所および臨床研究所において調査、診断または臨床的な用途のために一般に普及している。これらの方法のほとんどは、少量の細胞に限られているにすぎない。膨大な数の非標的細胞から細胞を分離するためには、磁気的な細胞ソーティングまたは密度勾配遠心法は確立された技術である。

【0003】

特に興味深い分離手順は、全血からの細胞の分離、例えば全血からのT細胞の分離である。このために、赤血球を、標的細胞の単離または精製の前に取り除く必要がある。赤血球の排除は、例えば密度勾配遠心法、末梢血単核細胞(PBMC)試料調製、赤血球溶解、または例えば多機能抗体、多糖類、ポリビニルピロリドンもしくはポリオキシエチレンによる凝集と引き続いての遠心分離による凝集によって行うことができる。標的細胞を単離する前に赤血球を取り除くことは、特許文献1(欧州特許出願公開第2597153(A1)号明細書)に開示されている。

20

【0004】

赤血球または更なる不所望な細胞の排除の後に、標的細胞の単離のために後続のプロセスステップを使用する必要がある。そのような方法は当該技術分野で長いこと知られており、例えば細胞表面抗原に対する親和性を有するモノクローナル抗体を用いるものであり、例えば特許文献2(米国特許第5840502号明細書)、特許文献3(米国特許第5648223号明細書)、特許文献4(米国特許第5646004号明細書)、特許文献5(米国特許第5474687号明細書)、または特許文献6(米国特許第7316932号明細書)に開示されている。

30

【0005】

多機能抗体またはポリマーの凝集剤としての使用は、例えば特許文献7(国際公開第00/73794号パンフレット)または特許文献8(米国特許第7160723号明細書)に記載されている。開示された技術は、有核細胞および赤血球を含む試料と凝集剤とを接触させることと、凝集された赤血球細胞を遠心分離によって除去することと、更に前記有核細胞を所望の細胞を認識する抗体を使用して、例えば磁気的な細胞ソーティングによって精製することを含む。これらの方法は、時間のかかる面倒な遠心分離ステップを含む幾つかのプロセスステップの欠点を有する。

40

【0006】

特許文献9(国際公開第2013/076070号パンフレット)は、複数の非標的細胞を、凝集および磁気的な細胞ソーティングによってディプリーションすることで、ディプリーションカクテルにより影響が及ぼされない細胞の懸濁液を得ることを教示している。該方法で得られた細胞は「手つかず(untouched)」である一方で、ただ負の選択が行われているにすぎないため、純度はかなり低い。特許文献9(国際公開第2013/076070号パンフレット)によっては標的細胞の特異的で純粋なサブポピュレーションを得ることはできない。磁気的な細胞ソーティングを利用する類似の方法は、特許

50

文献 10 (国際公開第 01/17687 (A1)号パンフレット) および特許文献 11 (国際公開第 96/31776 (A1)号パンフレット) に開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献 1】欧州特許出願公開第 2597153 (A1)号明細書

【特許文献 2】米国特許第 5840502号明細書

【特許文献 3】米国特許第 5648223号明細書

【特許文献 4】米国特許第 5646004号明細書

【特許文献 5】米国特許第 5474687号明細書

10

【特許文献 6】米国特許第 7316932号明細書

【特許文献 7】国際公開第 00/73794号パンフレット

【特許文献 8】米国特許第 7160723号明細書

【特許文献 9】国際公開第 2013/076070号パンフレット

【特許文献 10】国際公開第 01/17687 (A1)号パンフレット

【特許文献 11】国際公開第 96/31776 (A1)号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従って、本発明の課題は、全血のような生物学的試料から、不所望な細胞を除去し、特定の標的細胞を分離するための迅速かつ簡単な方法を提供することであった。

20

【0009】

驚くべきことに、試料を 1ステップでインキュベートし、引き続き磁気的に分離するステップを行うことによって、異なる直径を有する磁性粒子を利用することにより中間の後処理を行うことなく標的細胞を富化することができることが判明した。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の主題は、細胞試料から標的細胞を富化するための方法であって、少なくとも以下のステップ：

a) 前記試料を、細胞凝集剤、および第一の抗原認識部に結合された $0.1 \text{ pg} \sim 5000 \text{ pg}$ の鉄含量を有する第一の磁性粒子；および第二の抗原認識部に結合された $0.05 \text{ fg} \sim 100 \text{ fg}$ の鉄含量を有する第二の磁性粒子と接触させることで、混合物 a) を得るステップ、

30

b) 第一の磁場勾配を前記混合物 a) に付与することにより、前記第一の磁性粒子に結合された第一の抗原認識部に結合された細胞を除去して、混合物 b) を得て、前記細胞凝集剤に結合された混合物 a) の細胞を含む凝集体を得るステップ、

c) 第二の磁場勾配を前記混合物 b) に付与することにより、第二の磁性粒子に結合された第二の抗原認識部に結合された細胞を静止させるステップ、

d) 静止した細胞を第二の磁場勾配から標的細胞として回収するステップ、

40

を特徴とする前記方法である。

【0011】

本発明の一つの別形において、細胞凝集剤に結合された混合物 a) の細胞を含む凝集体と、第一の磁性粒子に結合された第一の抗原認識部に結合された細胞とは、第一の磁場勾配に起因して、混合物 b) から分離される。

【0012】

言い換えると、混合物 b) は、細胞凝集剤および/または第一の抗原認識部/第一の磁性粒子に結合されなかった細胞の懸濁液からなる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】図 1 は、本発明の方法を概略的に示している。

50

【図 2】図 2 は、本発明の方法による制御性 T 細胞の富化を示している。

【図 3】図 3 は、本発明の方法による造血幹細胞 (HSC) の富化を示している。

【図 4】図 4 は、本発明によるものではない制御性 T 細胞の富化を示している。

【図 5】図 5 は、本発明によるものではない CD 8 陽性 NK 細胞の富化の結果を示している。

【図 6】図 6 は、本発明の方法による CD 8 陽性 NK 細胞の富化の結果を示している。

【0014】

詳細な説明

混合物 b) は、細胞凝集剤に結合された混合物 a) の細胞を含む凝集体から、例えば濾過、沈降、および / または遠心分離によって分離されうる。

10

【0015】

沈降は、1 x g での重力沈降を意味し、それは、加工されるべき試料を含む容器が何もされない状態、すなわち揺動または遠心分離がされない状態におかれることで起こり、凝集された細胞は前記容器の底に沈降される。遠心分離は、例えば 1 x g ~ 20 x g で行われる。もう一つの実施形態においては、混合物 a) は、適切なメッシュサイズを有するフィルタシステムに導通される。好ましくは、前記凝集体は、第一の抗原認識部 / 第一の磁性粒子に結合された細胞が除去されると同時に、第一の磁場勾配中で沈降物として沈降され、上清が混合物 b) として得られる。

【0016】

用語「抗原認識部」は、細胞内または細胞外で発現された抗原に対する、任意の種類の抗体またはフラグメント化抗体を指す。前記用語は、完全にインタクトな抗体またはフラグメント化抗体誘導体、例えば Fab、Fab、F(a' b)2、sdAb、scFv、ジ scFv に関連し、それらは、前記の種類の子を含む共有結合および非共有結合の接合体を含めて組み換え法によって合成されている。

20

【0017】

図 1 は、以下のプロセスステップを有する本発明の方法を概略的に示している：

(a) 異種起源の細胞試料を、i) 赤血球凝集剤、ii) 第一のタイプの抗原認識部に結合された第一のタイプの磁性粒子 (小粒子)、および iii) 第二のタイプの抗原認識部に結合された第二のタイプの磁性粒子 (大粒子) と一緒にインキュベートすることを示している。

30

(b) 混合物 a) を第一の磁場勾配にさらすことで、第一のタイプの磁性粒子に結合された第一の抗原認識部に結合された細胞が除去される。同時に、細胞凝集剤に結合された細胞は、不要な細胞の沈降物を形成する。上清を回収することで、混合物 b) が得られる。

(c) 混合物 b) を、MACS セパレーター中に MACS (登録商標) カラムを設置することによって第二の磁場勾配にさらすことで、第二のタイプの磁性粒子に結合された第二のタイプの抗原認識部に結合された標的細胞を静止させる。

(d) 前記第二の磁場勾配から、静止した標的細胞を回収する。

【0018】

本発明は、磁気源、例えば永久磁石または電磁石によって発生された磁場勾配を利用する。本発明の範囲内では、Miltényi Biotech GmbH (ドイツ) により市販されている MACS x press セパレーター、MACS iMAG セパレーター、または QuadroMACS (商品名) セパレーターのような、いかなるタイプおよび形態の磁石も使用できる。

40

【0019】

用語「磁性粒子」は、強磁性、超常磁性、または常磁性の固相、例えばコロイド粒子、微小球、ナノ粒子、またはビーズを指す。それらの粒子は、懸濁液、または凍結乾燥状態で使用することができる。

【0020】

磁性粒子の磁化は、前記粒子内にある、マグネタイトまたはマグヘタイトのような鉄酸化物の形で化学的に存在する鉄の含量に左右される。鉄含量における 1000 倍以上の差

50

は、低い磁場勾配によって、高い鉄含量を有する第一の磁性粒子を、高い磁場勾配によってしか影響を受けない低い鉄含量を有する第二の磁性粒子から分離することを可能にする。

【0021】

第一の磁性粒子は、粒子当たり、有利には0.5pg~500pgの、より有利には1pg~50pgの鉄を含有する。第一の磁性粒子としては、MACSiBead粒子を使用できる。前記粒子は、例えばMACSiMAGセパレーター(Miltenyi Biotec)のように通常の磁石によって保留できる。例として、MACSiBead粒子は、直径3.5μmを有し、3%(w/w)から10%(w/w)の間の鉄を乾燥質量で含有する。

10

【0022】

第二の磁性粒子は、粒子当たり、有利には0.1fg~50fgの、より有利には0.1fg~10fgの鉄を含有する。第二の磁性粒子としては、MicroBead粒子を使用できる。前記粒子は、例えばMiltenyi Biotecから入手できるLSカラムと組み合わせたQuadroMACS(商品名)セパレーターのように通常の磁石によって磁気的分離カラムと組み合わせて保留させることができる。使用される前記MicroBead粒子は、50nm~100nmの粒径を有してよく、該粒子は30%(w/w)から60%(w/w)の間の鉄を乾燥質量で含有する。

【0023】

本発明において使用される第一の磁性粒子と第二の磁性粒子は、前記鉄含量に加えて、または前記鉄含量に代えて、直径によって特徴付けることができる。第一の磁性粒子は、1μm~5μmの、好ましくは2.5μm~3.5μmの平均直径を示す。本発明の好ましい一実施形態においては、第一の磁性粒子の寸法は、できる限り単分散性であるべきであり、例えば15%未満の、好ましくは10%未満の直径のcv値を有する。第二の磁性粒子は、10nm~250nmの、好ましくは30nm~150nmの平均直径を有してよく、例えば60%未満の、好ましくは30%未満の直径のcv値を有する。

20

【0024】

用語「細胞試料」は、種々の表現型またはサブポピュレーションを種々の量で有する細胞の懸濁液または混合物、例えば全血、末梢血、白血球搬出、パフィコート、臍帯血、および骨髄中によくある細胞の懸濁液または混合物を指す。そのような細胞試料は、例えば赤血球、血小板、および白血球、例えばT細胞、制御性T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、および/または造血幹細胞を含む。

30

【0025】

用語「細胞凝集剤」は、例えば細胞試料内にある赤血球の細胞凝集を惹起する、当該技術分野で公知の任意の化合物を指す。例えば、赤血球は、全血からある特定の試薬によって凝集されて沈殿物を形成し、こうして上清を除去可能にする。例えば、全血と細胞凝集剤の接触により、赤血球のおよび幾らかの血小板(platelet)、すなわち血小板(thrombocyte)の凝集物の形成が惹起され、こうしてこれらの不所望な細胞ポピュレーションの沈降がもたらされる。沈降プロセスは、更に第一の磁性粒子によって増強される。

40

【0026】

本発明で使用される細胞凝集剤は、好ましくは、フィブリノゲンおよび免疫グロブリンのようなタンパク質、またはデキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルピロリドン(PVP)、メチルセルロース、もしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)のようなヒドロキシル基含有ポリマーである。

【0027】

本発明による方法においては、第二の磁場勾配は、第一の磁場勾配よりも高くてもよいが、さもなくば磁力が高められねばならない。これは、より高い第二の磁場を付与するか、または第一の磁性粒子よりも高い磁性材料の含量を有する第二の磁性粒子を使用するか、のいずれかによって達成できる。

【0028】

50

第一の磁性勾配を付与することによって、第一の磁性粒子に結合された本質的に全ての細胞（すなわち 85% ~ 99%）は磁石に保持され、一方で、相対的にかなり少ない第二の磁性粒子に結合された本質的に全ての細胞（すなわち 85% ~ 99%）は、混合物 b）中に留まる。

【0029】

第一の磁場勾配と第二の磁場勾配は、好ましくは、混合物 b）および混合物 c）を強磁性分離手段において第一の磁場と第二の磁場に供することによって付与される。そのような強磁性分離手段は、磁氣的細胞分離の技術分野で公知であり、例えば粒子、メッシュ、不織布繊維のような磁性材料を詰めた管である。第二の磁場勾配を、第一の磁場勾配よりも高くなるように、同じ磁場において異なる強磁性分離手段を使用することによって調整することができる。

10

【0030】

第一の磁性粒子および第二の磁性粒子は、非標的細胞と標的細胞のそれぞれにある少なくとも 1 つの抗原に結合する、少なくとも 1 種の抗原認識部に結合される。前記抗原認識部は、単一特異的、および / または多重特異的であってよい。好ましくは、第一の磁性粒子および / または第二の磁性粒子は、複数の異なる第一の抗原認識部に結合される。本発明において使用される磁性粒子は、1 種以上の、例えば 2、3、4、6、8、10 または 12 種の異なる抗原認識部に結合させることができる。

【0031】

本発明の一実施形態においては、前記細胞凝集剤は、HPMC - 15 であり、また、この粒子の特異性は、それぞれの抗原認識部によって定義付けられる。第一の抗原認識部および / または第二の抗原認識部は、例えば CD 1 c、CD 2、CD 3、CD 4、CD 7、CD 8、CD 11 b、CD 14、CD 15、CD 16、CD 19、CD 23、CD 25、CD 27、CD 34、CD 36、CD 38、CD 43、CD 45、CD 45 RO、CD 45 RA、CD 56、CD 61、CD 123、CD 127、CD 133、CD 193、CD 235 a、CD 335、CD 304 を含むある特定の細胞表面マーカーに対する抗体、抗 Fc __、抗 T 細胞受容体 /、抗 T 細胞受容体 /、抗 ビオチン、抗 Ig E、抗 HLA - DR およびそれらの組み合わせから選択されうる。

20

【0032】

標的細胞の富化のための第二の磁性粒子としては、抗体が接合された粒子、例えば抗 CD 8 抗体、抗 CD 25 抗体または抗 CD 34 抗体を有する粒子が使用される。従って、ステップ d）において、これらの抗体に対する抗原を提示する細胞が標的細胞として回収されうる。

30

【0033】

細胞凝集剤に結合された細胞と、第一の磁性粒子に結合された第一の抗原認識部に結合された細胞を除去した後に、第一の粒子を実質的に含まず、かつ望まれない殆どの細胞がディプリーションされた混合物または細胞懸濁液 b）が得られる。

【0034】

ステップ c）において、第二の磁場勾配は、こうして得られた混合物 b）に付与される。第一の磁場勾配とは異なり、第二の磁場勾配は、相対的にかなり少ない第二の磁性粒子に結合された細胞を保持し、それにより標的細胞と不所望の細胞とが分離される。

40

【0035】

本発明の方法のステップ d）は、好ましくは、例えば強磁性分離手段を磁場勾配から外して、バッファー溶液によって該強磁性分離手段から細胞を溶出させることによって、静止させられた細胞を除去することによって行われる。

【0036】

本発明の更なる課題は、末梢血、臍帯血、および / または骨髓のような細胞試料から治療的に、診断的に、または科学的に有益な細胞を単離、富化、および / または回収するための組成物を提供することである。

【0037】

50

本発明による組成物は、細胞凝集剤と、第一の抗原認識部に結合された $1\ \mu\text{m} \sim 5\ \mu\text{m}$ の平均直径を有する第一の磁性粒子と、第二の抗原認識部に結合された $10\ \text{nm} \sim 250\ \text{nm}$ の平均直径を有する第二の磁性粒子とを含む。

【0038】

挙げられる細胞分離成分は、キットとして提供するのに適している。それぞれのキットは、本明細書に記載される方法によって、所望の細胞を細胞含有試料から分離することを行うのに必要な成分を含んでいる。

【0039】

該キットの必須成分は、本明細書に挙げられるような、細胞凝集試薬と、第一の磁性粒子および第二の磁性粒子である。該粒子は、キットにおいて、例えば液体中、バッファ中で、または凍結乾燥された形で利用可能であってよく、制御性T細胞、CD8陽性NK細胞、および/または造血幹細胞の単離のために使用することができる。

10

【0040】

磁性粒子(乾燥材料)の鉄含量の測定は、その鉄酸化物を、酸、例えばリン酸で分解し、そして溶解された鉄イオンを分析手段、例えば呈色する錯体の測光測定、例えば鉄試験用のMerck社製のSpectroquant試験キットを用いた測光測定によって定量化することによって行われる。ビーズ懸濁液の粒子計数は、粒子計数器またはノイバウエル計算板で顕微鏡により決定できる。同じビーズ懸濁液中の物質濃度は、定義された容量のビーズ懸濁液のビーズ材料を水中に移すことによって、洗浄し、前記水を乾燥により除去し、そして固体残分を秤量することによって測定することができる。粒子の鉄含量を計算することで、乾燥ビーズ材料の既知の物質濃度および前記乾燥されたビーズ材料の既知の鉄含量を用いてビーズ懸濁液の粒子計数を知ることができる。例えば、MACSiBeadは、 $44.5\ \text{mg}/\text{ml}$ のビーズの乾燥質量を有し、 $1\ \text{mg}$ 当たり 1.36×10^9 個の粒子を有し、乾燥ビーズ材料中に 4.61% (w/w)の鉄含量を有し、該材料は1粒子当たり $1.51\ \text{pg}$ の鉄を含有する。

20

【0041】

粒子計数は直接的に得ずに、球形と想定した単独の粒子の質量を計算し、DLS測定によって得られた流体力学的径および $2.5\ \text{mg}/\text{mL}$ の粒子密度を用いて推定される(Aaron B. Kantor, Ian Gibbons, Stefan Miltenyi, および Juergen Schmitz により、「細胞分離法および応用(Cell Separation Methods and Applications)」, Diether Recktenwald, Andreas Radbruch, Marcel Dekker 編集, ニューヨーク, 1998, 第153頁~第171頁において)。例えば、 $100\ \text{nm}$ の寸法、 $10\ \text{mg}/\text{mL}$ の乾燥質量、および乾燥ビーズ材料中に 40% (w/w)の鉄含量を有するMicroBeadは、1粒子当たり $0.53\ \text{fg}$ の鉄を含有する。

30

【実施例】

【0042】

異なるプロセスパラメータで磁性ビーズを製造することで、異なる寸法の粒子が得られた。粒径は、Beckman社製のCoulter Delsa NanoおよびCoulter Counter Z2機器によって特徴付けられた。実施例においては、第一の磁性粒子を「大磁性粒子」と呼び、それは $3.5\ \mu\text{m}$ の直径および $1.51\ \text{pg}$ の鉄含量を有し、かつ第二の磁性粒子を「小磁性粒子」と呼び、それは $0.3\ \mu\text{m}$ の直径および $14.3\ \text{fg}$ の鉄含量を有する(特に規定がない限り)。大磁性粒子は、Miltenyi Biotec GmbHから、例えば「anti-Biotin MACSiBead」として市販されている。小磁性粒子は、Miltenyi Biotec GmbHから、例えば「CD25 MicroBead」として市販されている。

40

【0043】

例1: 制御性T細胞の単離

大磁性粒子は、CD8、CD14、CD15、CD19、CD123、CD127を認

50

識する抗体に接合させた。小磁性粒子は、CD25を認識する抗体に接合させた。抗体ビーズ接合体をヒト全血で滴定して、最適な濃度を決定した。

【0044】

前記磁性ビーズ抗体接合体を、15mLのHPMC(0.75%のHPMC15ストック溶液)を含めて予め決められた量で混ぜてカクテルとした。そのカクテルを、30mLのヒト全血に加え、かき混ぜて、MACSmix(商品名)チューブローター(Miltenyi Biotec GmbH)中で10分にわたりインキュベートし、そしてMACSpress(登録商標)セパレーター(Miltenyi Biotec GmbH)中で15分にわたり置いた。上清を直接的にMACS技術で、LSカラムおよびQuadroMACS(商品名)セパレーター(Miltenyi Biotec GmbH)を使用することによって更に処理した。不要な細胞は該カラムを通過する。磁氣的に標識された細胞は、該カラム中にプランジャーをしっかりと押し込むことによって流出されることになる。単離された制御性T細胞は、MACSquantアナライザーフローサイトメーター(Miltenyi Biotec)において蛍光色素が接合された抗体の組み合わせを使用して分析されることになる。

10

【0045】

図2は、例1に従い、制御性T細胞は、45分以内で非常に素早く富化することができ、本発明の標識を組み合わせる方策を用いて約91%の純度を有することを示している。

【0046】

例2：造血幹細胞(HSC)の単離

大磁性粒子は、CD61を認識する抗体に接合させ、小磁性粒子は、CD34を認識する抗体に接合させた。抗体ビーズ接合体をヒト全血で滴定して、最適な濃度を決定した。

20

【0047】

前記磁性ビーズ抗体接合体を、4mLのHPMC(0.75%のHPMC15ストック溶液)を含めて予め決められた量で混ぜてカクテルとした。そのカクテルを、8mLのヒト全血に加え、かき混ぜて、MACSmix(商品名)チューブローター(Miltenyi Biotec GmbH)中で10分にわたりインキュベートし、そしてMACSpress(登録商標)セパレーター(Miltenyi Biotec GmbH)中で15分にわたり置いた。上清を直接的にMACS技術で、LSカラムおよびQuadroMACS(商品名)セパレーター(Miltenyi Biotec GmbH)を使用し、引き続き第二のMSカラムを使用することによって更に処理した。不要な細胞は該カラムを通過する。磁氣的に標識された細胞は、該カラム中にプランジャーをしっかりと押し込むことによって流出される。単離されたHSCは、MACSquantアナライザーフローサイトメーター(Miltenyi Biotec)において蛍光色素が接合された抗体の組み合わせを使用して分析されることになる。

30

【0048】

図3は、例2に従い、HSCは、50分以内で全血から直接的に非常に素早く富化することができ、本発明の標識を組み合わせる方策を用いて約67%の純度を有することを示している。

【0049】

比較例1：赤血球凝集試薬を用いない制御性T細胞の単離

大磁性粒子は、CD8、CD14、CD15、CD19を認識する抗体に接合させており、小磁性粒子は、CD25を認識する抗体に接合させた。抗体ビーズ接合体をヒト全血で滴定して、最適な濃度を決定した。

40

【0050】

前記磁性ビーズ抗体接合体を、4mLのHPMC(0.75%のHPMC15ストック溶液)を用いずに予め決められた量で混ぜて最終容量4.5mLでカクテルとした。そのカクテルを、8mLのヒト全血に加え、かき混ぜて、MACSmix(商品名)チューブローター(Miltenyi Biotec GmbH)中で10分にわたりインキュベートし、そしてMACSpress(登録商標)セパレーター(Miltenyi

50

Biotec GmbH) 中で15分にわたり置いた。上清を、LSカラムおよびQuadroMACS (商品名)セパレーター(Miltenyi Biotec GmbH)を使用することによって、MACS技術で直接、更に処理した。不要な細胞は該カラムを通過する。磁氣的に標識された細胞は、該カラム中にプランジャーをしっかりと押し込むことによって流出される。単離された制御性T細胞は、MACSquantアナライザーフローサイトメーター(Miltenyi Biotec)において蛍光色素が接合された抗体の組み合わせを使用して分析されることになる。

【0051】

図4は、比較例1(HPMC15を用いない)に従い、制御性T細胞が42%の純度および 6.9×10^4 の回収量で得られることを示している。

【0052】

比較例1を、HPMC15を用いて繰り返すと、制御性T細胞は、90%の純度および 2.1×10^5 の回収量で得ることができた。

【0053】

例3： 逐次的な磁氣的標識によるCD8陽性NK細胞の単離

3 μ mおよび300nmを有する大磁性粒子を別々に、CD3、CD4、CD14、CD15、CD19、CD36、CD61、CD123、CD193、IgE、およびTCR α を認識する抗体に接合させた。小磁性粒子は、CD8を認識する抗体に接合させた。抗体ビーズ接合体をヒト全血で滴定して、最適な濃度を決定した。

【0054】

大磁性ビーズ抗体接合体を、予め決められた量で混ぜてカクテルとした。前記カクテルを、8mLのヒト全血と一緒に4mLの0.75%HPMC15ストック溶液と組み合わせてインキュベートした。該混合物をかき混ぜて、MACSmix (商品名)チューブローター(Miltenyi Biotec GmbH)中で10分にわたりインキュベートし、そしてMACSxpress (登録商標)セパレーター(Miltenyi Biotec GmbH)中で15分にわたり置いた。その後、上清を凝集物から、新しいチューブへとピペティングすることによって除去する。

【0055】

小磁性粒子を単離されたNK細胞に加え、かき混ぜて、10分にわたりインキュベートした。それらの細胞を、MSカラムおよびOctoMACS (商品名)セパレーター(Miltenyi Biotec GmbH)を使用することによって処理した。不要な細胞は該カラムを通過する。磁氣的に標識された細胞は、該カラム中にプランジャーをしっかりと押し込むことによって流出される。単離されたCD8陽性NK細胞は、MACSquantアナライザーフローサイトメーター(Miltenyi Biotec)において蛍光色素が接合された抗体の組み合わせを使用して分析されることになる。

【0056】

比較例3

例3を、3 μ m直径を有する「大磁性粒子」に代えて300nm直径を有する磁性粒子を使用したことを除き同様に繰り返した。

【0057】

例3においては、CD8陽性NK細胞を約93%の高純度で得ることができた。比較例3によって示されるように、3 μ m直径を有する大磁性粒子に代えて300nmの粒子を有する磁性粒子を使用することによって、純度は73%にまで低減された。

【0058】

図5は、例3および比較例3による、全血から直接的に何らかの非磁氣的な予備富化を行わずに単離されたCD8陽性NK細胞を示している。直径300nmを有する磁性粒子を使用することによって、陽性のフラクションは、第一の磁氣的富化の間に引き留められなかった非NK細胞に標識された磁性粒子に起因して、27%の不要な細胞を示す(図5の左側)。図5の右側に示されるように、本発明により標識された直径3 μ mを有する大磁性粒子を使用することによって、非NK細胞は、第一の磁氣的ステップの間にほぼ完全

10

20

30

40

50

に残留できた。

【0059】

従って、本発明の方法を用いると、3 μmの直径を有する大磁性粒子を使用することによって第二の単離ステップの後に、相対的にかなり高い純度のCD8陽性NK細胞に至ることができる。

【0060】

例4： 同時の磁氣的標識によるCD8陽性NK細胞の単離

3 μmを有する大磁性粒子を別々に、CD3、CD4、CD14、CD15、CD19、CD36、CD61、CD123、CD193、IgE、およびTCRαβを認識する抗体に接合させた。小磁性粒子は、CD8を認識する抗体に接合させた。抗体ビーズ接合体をヒト全血で滴定して、最適な濃度を決定した。

10

【0061】

大磁性ビーズ抗体接合体および小磁性ビーズ抗体接合体を、予め決められた量で混ぜてカクテルとした。前記カクテルを、4 mLのヒト全血と一緒に2 mLの0.75%HPMC15ストック溶液と組み合わせてインキュベートした。該混合物をかき混ぜて、MACSmix（商品名）チューブローテーター（Miltenyi Biotec GmbH）中で10分にわたりインキュベートし、そしてMACSpress（登録商標）セパレーター（Miltenyi Biotec GmbH）中で15分にわたり置いた。その後、上清を直接的にMACS技術で、LSカラムおよびQuadroMACS（商品名）セパレーター（Miltenyi Biotec GmbH）を使用することによって更に処理した。不要な細胞は該カラムを通過する。磁氣的に標識された細胞は、該カラム中にプランジャーをしっかりと押し込むことによって流出される。

20

【0062】

比較例4

例4を、3 μm直径を有する「大磁性粒子」に代えて300 nm直径を有する磁性粒子を使用したことを除き同様に繰り返した。

【0063】

例4においては、CD8陽性NK細胞を、大磁性粒子を使用することによって約80%の高純度で得ることができた。比較例4によって示されるように、3 μm直径を有する大磁性粒子に代えて300 nmの粒子を有する磁性粒子を使用することによって、純度は6.7%にまで低減された。

30

【0064】

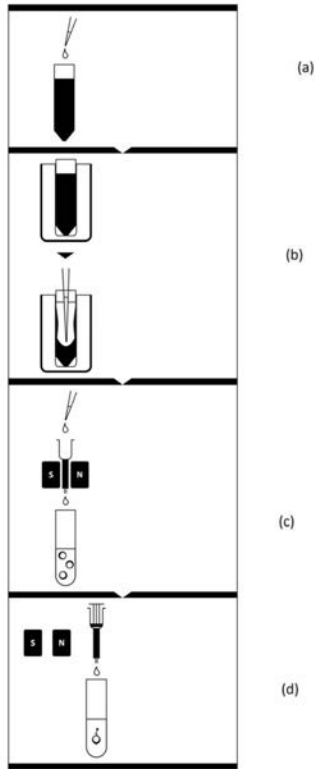
図6は、例4および比較例4による、全血から直接的に何らかの予備富化を行わずに単離されたCD8陽性NK細胞を示している。「大磁性粒子」に代えて直径300 nmを有する磁性粒子を使用することによって、陽性のフラクションは、第一の磁氣的富化の間に引き留められなかった非NK細胞に標識された磁性粒子に起因して、93%の不要な細胞を示す（図6の左側）。図6の右側に示されるように、非NK細胞に標識された直径3 μmを有する大磁性粒子は、第一の磁氣的ステップの間にほぼ完全に残留できた。

【0065】

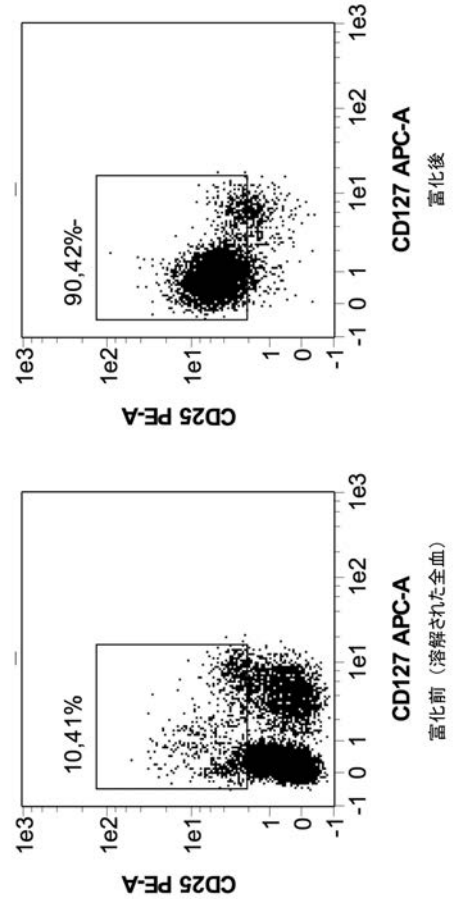
従って、本発明の方法を用いると、3 μmの直径を有する大磁性粒子を使用することによって第二の単離ステップの後に、相対的に明らかに高い純度のCD8陽性NK細胞に至りうる。

40

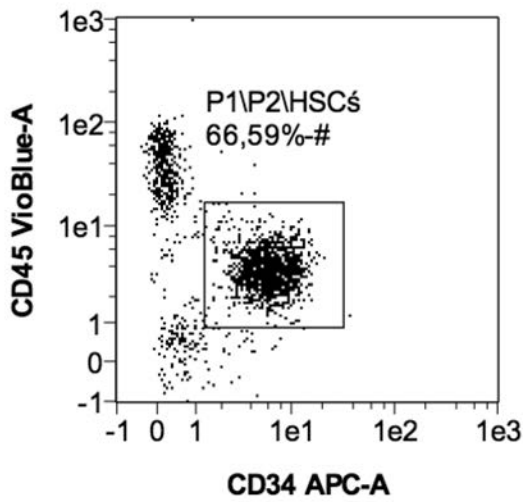
【 図 1 】



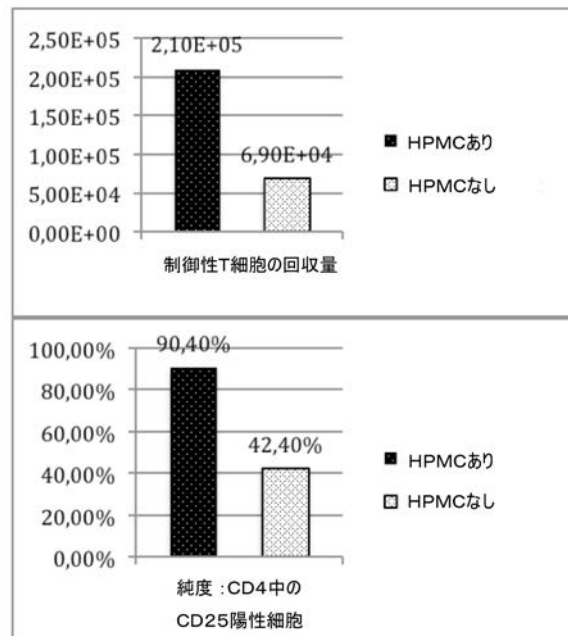
【 図 2 】



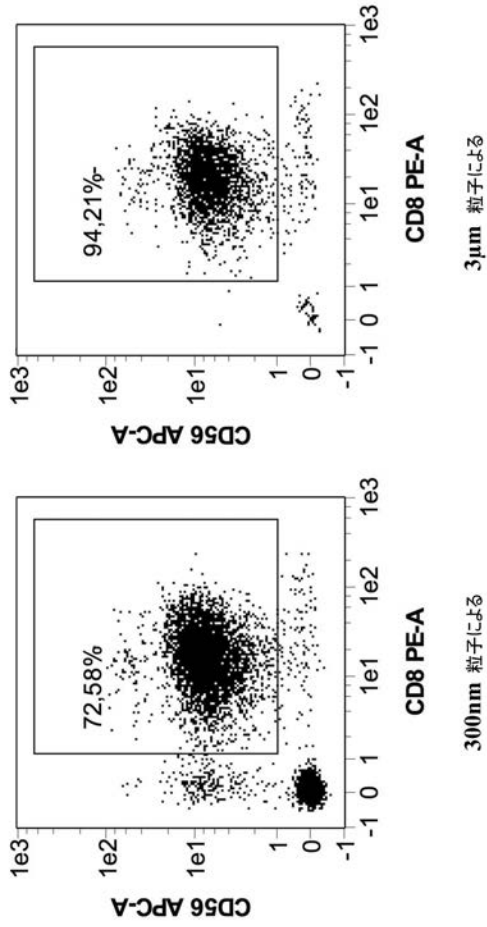
【 図 3 】



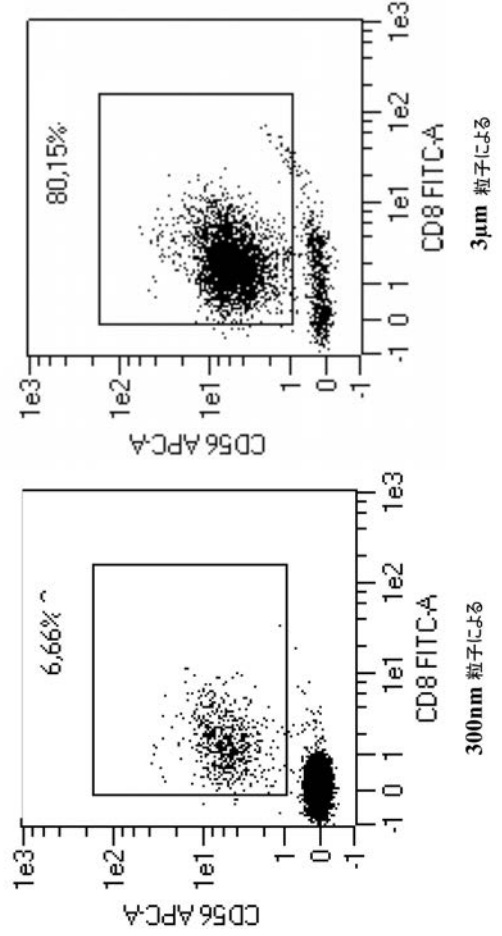
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	16/42 (2006.01)	C 0 7 K	16/42
C 1 2 N	5/078 (2010.01)	C 1 2 N	5/078
(74)代理人	100114890 弁理士 アインゼル・フェリックス=ラインハルト		
(74)代理人	100099483 弁理士 久野 琢也		
(72)発明者	フィリップ シュタインブリュック ドイツ連邦共和国 ゴーリンゲン	オスカー - リース - シュトラーセ	1 5
(72)発明者	クリスティアン ドーゼ ドイツ連邦共和国 キュアテン	メアヒェンヴェーク	2 ベー
(72)発明者	フォルカー フッパート ドイツ連邦共和国 キュアテン	イム ハイドナー フェルト	9
(72)発明者	ブアгент カウリング ドイツ連邦共和国	ベアギッシュ グラートバッハ ヴィンガーツハイデ	6 6
F ターム(参考)	2G045 AA02 AA24 AA25 BB12 CA02 CA11 CA18 CA19 CA20 CA21 CA24 CA25 CB01 DA36 FA37 FB03 4B029 AA09 AA21 AA27 BB11 CC01 FA05 FA15 GA08 HA10 4B065 AA90X AB04 BD14 BD15 BD18 CA43 CA44 CA46 CA60 4H045 AA11 BA10 EA50 EA60		

【 外国語明細書 】

MULTISORT CELL SEPARATION METHOD

BACKGROUND

[0001] The present invention is directed to a process for separation of target cells from a
5 sample by depletion of non-target cells by aggregation and first magnetic cell sorting
followed by enrichment of the target cells by a second magnetic cell sorting step.

[0002] Cell separation methods are wide spread in scientific and clinical laboratories for
research, diagnostics, or clinical applications. Most of these methods are limited to small
amounts of cells only. For separation of cells from a vast number on non-target cells,
10 magnetic cell sorting or gradient density centrifugation are established technologies.

[0003] A particular challenging separation procedure is the separation of cells from
whole blood, for example T cells from whole blood. To this end, erythrocytes have to be
discharged before isolating or purifying the target cells. Elimination of erythrocytes can be
performed for example by gradient density centrifugation; peripheral blood mononuclear cells
15 (PBMC) sample preparation, erythrocyte lysis, or aggregation by, for example,
multifunctional antibodies, polysaccharides, polyvinylpyrrolidone, or polyoxyethylene and
subsequent centrifugation. Discharging of erythrocytes prior to isolation of target cells is for
example disclosed in EP2597153A1.

[0004] After the elimination of erythrocytes or further undesired cells, subsequent
20 process steps for isolation the target cells need to be employed. Such methods are long known
in the art and use, for example, monoclonal antibodies with affinity to cell surface antigens,
for example as disclosed in US5840502, US5648223, US5646004, US5474687, or
US7316932.

[0005] The use of multifunctional antibodies or polymers as aggregation agents is
25 described, for example, in WO00/73794 or US7160723. The technique disclosed comprises
contacting a sample containing nucleated cells and red blood cells with an aggregation agent,
removal of the aggregated red blood cells by centrifugation and further purification of the
nucleated cells using antibodies recognizing the desired cells, for example, by magnetic cell
sorting. These methods have the disadvantage of several process steps including a time-
30 consuming and laborious centrifugation step.

[0006] WO 2013/076070 teaches to deplete a plurality of non-target cells by
aggregation and magnetic cell sorting to obtain a suspension of cells, which are not affected
by the depletion cocktail. While the cells obtained with the process are “untouched”, the
purity is rather low, because only a negative selection process is performed. It is not possible

to obtain a specific, pure subpopulation of target cells with the process of WO 2013/076070. A similar process utilizing magnetic cells sorting is disclosed in WO01/17687A1 and WO96/31776A1.

SUMMARY

5 [0007] It was therefore the object of the present invention to provide a fast and simple method for removing undesired cells and separating specific target cells from biological samples like whole blood.

[0008] Surprisingly, it was found that it is possible to enrich target cells by incubating a sample in one step and subsequent magnetic separation steps without intermediate work-up by
10 utilizing magnetic particles having different diameters.

OBJECT OF THE INVENTION

[0009] Object of the invention is a method for enriching target cells from a sample of cells characterized by at least the steps:

- 15 a) contacting the sample with a cell aggregation agent and first magnetic particles having an iron content of 0.1 pg to 5000 pg, coupled to a first antigen recognizing moiety; and second magnetic particles having an iron content of 0.05 fg to 100 fg and coupled to a second antigen recognizing moiety to obtain mixture a)
- 20 b) applying a first magnetic field gradient to the mixture a) thereby removing the cells bound to the first antigen recognizing moiety coupled to the first magnetic particles, to obtain a mixture b) and obtaining an agglomerate comprising the cells of mixture a) bound to the cell aggregation agent
- c) applying a second magnetic field gradient to the mixture b) thereby
25 immobilizing the cells bound to the second antigen recognizing moiety coupled to the second magnetic particles
- d) recovering the immobilized cells from the second magnetic field gradient as target cells.

[0010] In a variant of the invention, the agglomerate comprising the cells of the mixture a) bound to the cell aggregation agent and - due to the first magnetic field gradient - cells
30 bound to the first antigen recognizing moiety coupled to the first magnetic particles are separated from mixture b).

[0011] In other words, mixture b) consists of a suspension of cells not bound to the cell aggregation agent and/or the first antigen recognizing moiety/ first magnetic particles.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0012] Fig. 1 shows schematically the method of the invention

[0013] Fig. 2 shows enrichment of regulatory T-cells with the method of the invention

[0014] Fig. 3 shows enrichment of hematopoietic stem cells (HSCs) with the method of the invention

5 [0015] Fig. 4 shows enrichment of regulatory T-cells not according to the invention

[0016] Fig. 5 shows the results of enriching CD8 positive NK cells not according to the invention

[0017] Fig. 6 shows the results of enriching CD8 positive NK cells according to the method of the invention

10

DETAILED DESCRIPTION

[0018] Mixture b) may be separated from the agglomerate comprising the cells of mixture a) bound to the cell aggregation agent for example by filtration, sedimentation, and/or centrifugation.

15 [0019] Sedimentation means gravity sedimentation at 1x g, which occurs if the container containing the sample to be processed is in an idle state, i.e., no rocking or centrifugation, allowing the aggregated cells to sediment to the bottom of the container. Centrifugation is, for example, performed at 1 to 20 x g. In another embodiment, mixture a) is guided over a filter system having an appropriate mesh size. Preferable, the agglomerate is allowed to settle as sediment in the first magnetic field gradient simultaneously with the
20 removal of the cells bound to the first antigen-recognizing moiety/the first magnetic particles and the supernatant is obtained as mixture b).

[0020] The term “antigen recognizing moiety” refers to any kind of antibody or fragmented antibody, directed against antigens expressed intracellular or extra cellular. The term relates to fully intact antibodies or fragmented antibody derivatives, e.g., Fab, Fab,
25 F(a'b)2, sdAb, scFv, di-scFv that have been synthesized by recombinant procedures including covalent and non-covalent conjugates containing these kind of molecules.

[0021] Fig. 1 shows schematically the method of the invention with the process steps:

30 (a) Incubation of the heterogeneous cell sample with i) a red blood cell aggregation agent; ii) a first type of magnetic particle (small particles), coupled to a first type of antigen-recognizing moiety; and iii) a second type of magnetic particle (large particles), coupled to a second type of antigen-recognizing moiety is shown.

(b) Exposure of mixture a to a first magnetic field gradient removes the cells bound to the first antigen-recognizing moiety coupled to the first type of magnetic particles.

Simultaneously, the cells bound to the cell aggregation agent form sediment of unwanted cells. The supernatant is collected to obtain mixture b).

(c) Exposure of mixture b) by placing a MACS® Column in a MACS Separator to a second magnetic field gradient immobilizes the target cells bound to the second type of antigen-recognizing moiety coupled to the second type of magnetic particles.

(d) Recovery of the immobilized target cells from the second magnetic field gradient

[0022] The present invention utilizes a magnetic field gradient generated by a magnetic source, e.g., by a permanent magnet or electromagnet. Any type and form of magnet can be used within the present invention, like the MACSxpress Separator, MACSiMAG Separator, or the QuadroMACS™ Separator commercially available by Miltenyi Biotec GmbH, Germany.

[0023] The term “magnetic particles” refers to ferromagnetic, super paramagnetic, or paramagnetic solid phases such as colloidal particles, microspheres, nanoparticles, or beads. The particles may be used in suspension or in a lyophilized state.

[0024] The magnetization of a magnetic particle is dependent on the content of iron within said particles, which is chemically present in form of iron oxides like magnetite, or maghemite. A difference in iron content by a factor of 1000 or greater allows for the separation of the first magnetic particles having high iron content by low magnetic field gradients from the second magnetic particles having low iron content which are only affected by high magnetic field gradients.

[0025] The first magnetic particles contain preferentially 0.5 pg to 500 pg, more preferentially 1 pg to 50 pg iron per particle. As first magnetic particles, MACSiBead particles may be used, which can be retained, for example, by standard magnets, like the MACSiMAG Separator (Miltenyi Biotec). As example, MACSiBeads particles, which have a diameter of a 3.5 µm contain between 3% and 10% w/w iron in dry weight.

[0026] The second magnetic particles contain preferable 0.1 fg to 50 fg, more preferentially 0.1 fg to 10 fg of iron per particle. As second magnetic particles, MicroBead particles may be used, which can be retained, for example, by standard magnets in combination with magnetic separations columns, like the QuadroMACS™ Separator in combination with LS columns obtainable from Miltenyi Biotec. The MicroBead particles of use may have a diameter of 50 to 100 nm particle containing between 30 to 60% w/w iron in dry weight.

[0027] The first and second magnetic particles used in the present invention may in addition or in alternative to the iron content be characterized by diameter. The first magnetic

particles show a mean diameter of 1 – 5 μm , preferable 2.5 – 3.5 μm . In a preferred embodiment of the invention, the size of the first magnetic particles should be as monodisperse as possible, for example, with a cv of diameter of less than 15%, preferable less than 10%. The second magnetic particles may have a mean diameter of 10 – 250 nm, preferable 30 – 150 nm with a cv of diameter, for example, of less than 60%, preferable less than 30%.

[0028] The term “cell sample” refers to suspensions or mixtures of cells having different phenotypes or subpopulation in different amounts, for example, cells, which are common in whole blood, peripheral blood, leukapheresis, buffy coat, umbilical cord blood, and bone marrow. Such cell samples include, for example, erythrocytes, platelets, and leukocytes, like T-cells, regulatory T-cells, B-cells, NK cells, dendritic cells, monocytes, granulocytes, and/or hematopoietic stem cells.

[0029] The term “cell aggregation agent” refers to any compound known in the art, which triggers cell aggregation for example of erythrocytes within the cell sample. For example, erythrocytes can be aggregated from whole blood and by certain reagents to form sediment in order to be able to remove the supernatant. For example, contacting whole blood with the cell aggregation agent triggers aggregate formation of erythrocytes and of some platelets, i.e., thrombocytes, resulting in the sedimentation of these undesired cell populations. The sedimentation process is further enhanced by the first magnetic particles.

[0030] The cell aggregation agents used in the present invention are preferable proteins like fibrinogen and immunoglobulin or hydroxyl-group containing polymers like dextran, hydroxyethyl starch, polyvinyl pyrrolidone (PVP), methylcellulose or hydroxypropylmethylcellulose (HPMC).

[0031] In the method according to the invention, the second magnetic field gradient may be higher than the first magnetic field gradient or the magnetic force must be increased. This can be achieved by either applying a higher second magnetic field or the use of the second magnetic particles having a higher content of magnetic material than the first magnetic particles.

[0032] By applying the first magnetic gradient, essentially all cells (i.e. 85 - 99%) bound to the first magnetic particles are retained on the magnet, whereas essential all cells (i.e. 85 - 99%) bound to the much smaller second magnetic particles remain in mixture b).

[0033] The first and second magnetic field gradient is preferable applied by subjecting mixture b) and mixture c) on ferromagnetic separation means into the first and second magnetic field. Such ferromagnetic separation means are known in the art of magnetic cell

separation and are, for example, tubes filled with magnetic materials, like particles, mesh, non-woven fibres. It is possible to adjust the second magnetic field gradient as higher than the first magnetic field gradient by using different ferromagnetic separation means in the same magnetic field.

5 [0034] First and second magnetic particles are coupled to at least one antigen-recognizing moiety, which binds to at least one antigen on non-target cells and the target cells, respectively. The antigen-recognizing moieties may be mono- and/or multi-specific. Preferable, the first and/or the second magnetic particles are coupled to a plurality of different first antigen recognizing moieties. It is possible to couple the magnetic particles used in the present invention to one or more, like 2, 3, 4, 6, 8, 10, or 12 different antigen-recognizing
10 moieties.

[0035] In one embodiment of the present invention, the cell aggregation agent is HPMC-15 and the specificity of the particles is defined by the respective antigen-recognizing moieties. The first and/or the second antigen-recognizing moiety might be selected from
15 antibodies directed against certain cell surface markers including, e.g., CD1c, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD23, CD25, CD27, CD34, CD36, CD38, CD43, CD45, CD45RO, CD45RA, CD56, CD61, CD123, CD127, CD133, CD193, CD235a, CD335, CD304, anti Fc_epsilon, anti T cell receptor alpha/beta, anti T cell receptor gamma/delta, anti-Biotin, anti IgE, anti HLA-DR, and combinations thereof.

20 [0036] As second magnetic particle for enrichment of the target cells, antibody conjugated particles, for example, with anti-CD8; anti-CD25 or anti-CD34 antibodies are used. Accordingly, in step d), cells presenting antigens for these antibodies can be recovered as target cells.

[0037] After removing the cells bound to the cell aggregation agent and the cells bound
25 to the first antigen recognizing moiety coupled to the first magnetic particles a mixture or cell suspension b) is obtained, which is substantially free of first particles and depleted of most cells which are not desired.

[0038] In step c), a second magnetic gradient is applied to the thus obtained mixture b). In contrast to the first magnetic gradient, the second magnetic gradient retains the cells bound
30 to the much smaller second magnetic particles and thereby separates the target cells from the non-desired cells.

[0039] Step d) of the process of the invention is preferable carried out by removing the immobilised cells, for example, by removing the ferromagnetic separation means from the

magnetic gradient and eluting the cells from the ferromagnetic separation means with buffer solution.

[0040] It is a further object of the invention to provide compositions for isolating, enriching, and/or recovering therapeutically, diagnostically, or scientifically valuable cells
5 from a cell sample, like peripheral blood, umbilical cord blood, and/or bone marrow.

[0041] The composition according to the invention comprises a cell aggregation agent; first magnetic particles having a mean diameter of 1 – 5 μm , coupled to a first antigen recognizing moiety; and second magnetic particles having a mean diameter of 10 – 250 nm and coupled to a second antigen recognizing moiety.

10 [0042] The cell separation components mentioned are suited to be provided as a kit. Each kit contains the components necessary to perform the separation of desired cells from a cell-containing sample with the method described herein.

[0043] Essential components of the kit are the cell aggregation reagents and the first and second magnetic particles as mentioned herein. The particles may be available in the kit
15 in, e.g., liquids, buffers, or in a lyophilized form and may be used for the isolation of regulatory T-cells, CD8 positive NK cells, and/or hematopoietic stem cells.

[0044] The determination of the iron content of the magnetic particles (dried material) is performed by degrading the iron oxide with acid, e.g., phosphoric acid, and quantifying the dissolved iron ions by analytical means, such as photometrical determination of colored
20 complexes, for instance, with the Merck Spectroquant Test Kit for iron testing. Particle counts of bead suspensions can be determined by particle counters or microscopically with a Neubauer chamber. The mass concentration in the same bead suspension can be determined by transferring the bead material of a defined volume of bead suspension into water by washing, removing said water by drying and weighing the solid residue. The iron content of a
25 particle can be calculated knowing the particle count of a bead suspension with a known mass concentration of dry bead material and the known iron content of said dried bead material. For example, MACSiBeads with 44.5 mg per ml dry weight of beads, 1.36×10^9 particles per mg and an iron content of 4.61% w/w in the dry bead material containing 1.51 pg of iron per particle.

30 [0045] The particle count is not obtained directly, but estimated by calculating the weight of a single particle assuming a spherical shape and using the hydrodynamic diameter obtained by DLS measurements and the particle density of 2.5 mg/mL, according to Aaron B. Kantor, Ian Gibbons, Stefan Miltenyi, and Jürgen Schmitz in "Cell Separation Methods and Applications", Ed. Diether Recktenwald, Andreas Radbruch, Marcel Dekker, New York, 1998,

p. 153 - 171.). For example, MicroBeads having a size of 100 nm, a dry weight of 10 mg per mL, and an iron content of 40% w/w in the dry bead material contain 0.53 fg of iron per particle.

EXAMPLES

5 [0046] Magnetic beads were manufactured with different process parameters resulting in different size of the particles. Particle size was characterized by Beckman Coulter Delsa Nano and Coulter Counter Z2 instruments. In the examples, first magnetic particles are referred to as “Large Magnetic particles”, having a diameter of 3,5 μ m and an iron content of 1.51 pg and second magnetic particles are referred to as “Small Magnetic particles” having a
10 diameter of 0,3 μ m and an iron content of 14,3 fg (if not stated otherwise). Large Magnetic particles are commercially available from Miltenyi Biotec GmbH as, for example, “anti-Biotin MACSiBeads“. Small Magnetic particles are commercially available from Miltenyi Biotec GmbH as, for example, “CD25 MicroBeads”.

[0047] Example 1: isolation of regulatory T-cells

15 [0048] Large magnetic particles were conjugated to antibodies recognizing CD8, CD14, CD15, CD19, CD123, CD127. Small magnetic particles were conjugated to antibodies recognizing CD25. Antibody bead conjugates have been titrated on human whole blood and the optimal concentration has been determined.

[0049] The magnetic bead antibody conjugates have combined including 15mL HPMC
20 0,75% HPMC15 stock solution to a cocktail at the previously determined amounts. The cocktail has been given to 30 mL of human whole blood, mixed, incubated for 10 minutes in a MACSmix™ Tube rotator (Miltenyi Biotec GmbH) and placed in a MACSxpress® Separator (Miltenyi Biotec GmbH) for 15 minutes. Supernatant has been direct further processed with MACS-Technology by using a LS-Column and QuadroMACS™ Separator
25 (Miltenyi Biotec GmbH). Unwanted cells pass through the column. The magnetically labeled cells would be flush out by firmly pushing the plunger into the column. The isolated regulatory T-cells would be analyzed on a MACSquant Analyzer flow cytometer (Miltenyi Biotec) using a combination of fluorochrome-conjugated antibodies.

[0050] Fig. 2 shows that according to example 1, regulatory T-cells can be enriched
30 very fast, within 45min, with a purity of about 91% by using the combined labelling strategy of the invention.

[0051] Example 2: isolation of hematopoietic stem cells (HSCs)

[0052] Large Magnetic particles were conjugated to antibodies recognizing CD61 and small magnetic particles were conjugated to antibodies recognizing CD34. Antibody bead

conjugates have been titrated on human whole blood and the optimal concentration has been determined.

[0053] The magnetic bead antibody conjugates have combined including 4mL HPMC 0,75% HPMC15 stock solution to a cocktail at the previously determined amounts. The cocktail has been given to 8 mL of human whole blood, mixed, incubated for 10 minutes in a MACSmix™ Tube rotator (Miltenyi Biotec GmbH) and placed in a MACSxpress® Separator (Miltenyi Biotec GmbH) for 15 minutes. Supernatant has been direct further processed with MACS-Technology by using a LS-column and QuadroMACS™ Separator (Miltenyi Biotec GmbH) followed by a second MS-column. Unwanted cells pass through the column. The magnetically labeled cells would be flush out by firmly pushing the plunger into the column. The isolated HSCs would be analyzed on a MACSquant Analyzer flow cytometer (Miltenyi Biotec) using a combination of fluorochrome-conjugated antibodies.

[0054] Fig. 3 shows that according to example 2, HSCs could be enriched very fast direct from whole blood, within 50 min, with a purity of about 67% by using a combined labelling strategy of the invention.

[0055] Comparative Example 1: Isolation of Regulatory T-cells without Erythrocyte aggregation reagent

[0056] Large magnetic particles have been conjugated to antibodies recognizing CD8, CD14, CD15, CD19 and small magnetic particles were conjugated to antibodies recognizing CD25. Antibody bead conjugates have been titrated on human whole blood and the optimal concentration has been determined.

[0057] The magnetic bead antibody conjugates have combined with an without 4mL HPMC 0,75% HPMC15 stock solution to a cocktail at the previously determined amounts with a final volume of 4.5mL. The cocktail has been given to 8 mL of human whole blood, mixed, incubated for 10 minutes in a MACSmix™ Tube rotator (Miltenyi Biotec GmbH) and placed in a MACSxpress® Separator (Miltenyi Biotec GmbH) for 15 minutes. Supernatant has been direct further processed with MACS-Technology by using a LS-Column and QuadroMACS™ Separator (Miltenyi Biotec GmbH). Unwanted cells pass through the column. The magnetically labeled cells would be flush out by firmly pushing the plunger into the column. The isolated regulatory T-cells would be analyzed on a MACSquant Analyzer flow cytometer (Miltenyi Biotec) using a combination of fluorochrome-conjugated antibodies.

[0058] Fig. 4 shows that according to comparative example 1 (Without HPMC15), regulatory T-cells are obtained with purity and recovery of 42% and 6.9E+04 respectively.

[0059] Repeating comparative example 1 with HPMC15, regulatory T-cells could be achieved with a purity of 90% and recovery of 2.1E+05.

[0060] Example 3: Isolation of CD8 positive NK cells with successive magnetic labelling

5 [0061] Large magnetic particles, with 3 μm and 300 nm have been separated conjugated to antibodies recognizing CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD61, CD123, CD193, IgE, and TCRab. Small magnetic particles were conjugated to antibodies recognizing CD8. Antibody bead conjugates have been titrated on human whole blood and the optimal concentration has been determined.

10 [0062] Large magnetic bead antibody conjugates have been combined to a cocktail at the previously determined amounts. The cocktail was incubated with 8 mL of human whole blood in combination with 4 mL 0.75% HPMC 15 stock solution. The mixture was mixed and incubated for 10 minutes in a MACSmix™ Tube Rotator (Miltenyi Biotec GmbH) and placed in a MACSxpress® Separator (Miltenyi Biotec GmbH) for 15 minutes. Afterwards the
15 supernatant is removed from the aggregates by pipetting into a new tube.

[0063] The small magnetic particles have been given to the isolated NK cells, mixed, incubated for 10 minutes. The cells were processed with MACS-Technology by using a MS-Column and OctoMACS™ Separator (Miltenyi Biotec GmbH). Unwanted cells pass through the column. The magnetically labelled cells would be flush out by firmly pushing the plunger
20 into the column. The isolated CD8 positive NK cells would be analysed on a MACSquant Analyser flow cytometer (Miltenyi Biotec) using a combination of fluorochrome-conjugated antibodies.

[0064] Comparative Example 3

[0065] Example 3 was repeated identical with the exception that instead of “Large
25 magnetic particles” with 3 μm diameter, magnetic particles with 300 nm diameter were used.

[0066] In example 3, CD8 positive NK cells could be achieved with a high purity of about 93%. As shown by Comparative Example 3, by using magnetic particles with 300 nm particles instead of large magnetic particles with 3 μm diameter, the purity was reduced to 73%.

30 [0067] Fig. 5 shows isolated CD8 positive NK cells direct from whole blood without any non-magnetic pre-enrichment according to Example 3 and Comparative Example 3. By using magnetic particles with a diameter of 300nm the positive fraction shows 27% unwanted cells due to the magnetic particles labeled to non NK-cells which could not detain during the first magnetic enrichment (Fig. 5, left side). As shown in Fig. 5, right side, by using large

magnetic particles with a diameter of 3µm labeled according to the invention, non NK-cells could remain nearly complete during the first magnetic step.

[0068] Therefore, with the method of the invention, a significant higher purity of CD8 positive NK cells after the second isolation step by using large magnetic particles with 3µm diameter can be reached.

[0069] Example 4: Isolation of CD8 positive NK cells with simultaneous magnetic labelling

[0070] Large magnetic particles, with 3 µm have been separated conjugated to antibodies recognizing CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD61, CD123, CD193, IgE, and TCRab. Small magnetic particles were conjugated to antibodies recognizing CD8. Antibody bead conjugates have been titrated on human whole blood and the optimal concentration has been determined.

[0071] Large and small magnetic bead antibody conjugates have been combined to a cocktail at the previously determined amounts. The cocktail was incubated with 4 mL of human whole blood in combination with 2 mL 0.75% HPMC 15 stock solution. The mixture was mixed and incubated for 10 minutes in a MACSmix™ Tube Rotator (Miltenyi Biotec GmbH) and placed in a MACSxpress® Separator (Miltenyi Biotec GmbH) for 15 minutes. Afterwards the supernatant has been direct further processed with MACS-Technology by using a LS-Column and QuadroMACS™ Separator (Miltenyi Biotec GmbH). Unwanted cells pass through the column. The magnetically labelled cells would be flush out by firmly pushing the plunger into the column.

[0072] Comparative Example 4

[0073] Example 4 was repeated identical with the exception that instead of “Large magnetic particles” with 3 µm diameter, magnetic particles with 300 nm diameter were used

[0074] In example 4, CD8 positive NK cells could be achieved with a purity of about 80% by using large magnetic particles. As shown by Comparative Example 4, by using magnetic particles with 300 nm particles instead of large magnetic particles with 3µm diameter, the purity was reduced to 6,7%

[0075] Fig. 6 shows isolated CD8 positive NK cells direct from whole blood without any pre-enrichment according to Example 4 and Comparative Example 4. By using magnetic particles with a diameter of 300 nm instead of “large magnetic particles”, the positive fraction shows 93% unwanted cells due to the magnetic particles labeled to non NK-cells which could not detain during the first magnetic enrichment (Fig. 6, left side). As shown in Fig. 6, right

side, large magnetic particles with a diameter of 3 μ m labeled to non NK-cells could remain nearly complete during the first magnetic step.

[0076] Therefore, with the method of the invention,, an obvious higher purity of CD8 positive NK cells after the second isolation step by using large magnetic particles with 3 μ m diameter can be reached.

Claims

- 1) A method for enriching target cells from a sample of cells characterized by:
 - 5 a) contacting the sample with a cell aggregation agent and first magnetic particles having an iron content of 0.1 pg to 5000 pg, coupled to a first antigen recognizing moiety; and second magnetic particles having an iron content of 0.05 fg to 100 fg and coupled to a second antigen recognizing moiety to obtain mixture a)
 - 10 b) applying a first magnetic field gradient to the mixture a) thereby removing the cells bound to the first antigen recognizing moiety coupled to the first magnetic particles, to obtain a mixture b) and obtaining an agglomerate comprising the cells of mixture a) bound to the cell aggregation agent
 - c) applying a second magnetic field gradient to the mixture b) thereby immobilizing the cells bound to the second antigen recognizing moiety coupled to the second magnetic particles
 - 15 d) recovering the immobilized cells from the second magnetic field gradient as target cells.

- 2) Method according to claim 1 characterized in that the agglomerate comprising the cells of the mixture a) bound to the cell aggregation agent are separated from mixture b).
- 20 3) Method according to claims 1 or 2, characterized in that the second magnetic field gradient is higher than the first magnetic field gradient.

- 4) Method according to any of claims 1 to 3, characterized in that the first and second magnetic field gradient is applied by subjecting mixture b) and mixture c) on ferromagnetic separation means into first and second magnetic field.
- 25 5) Method according to any of claims 1 to 4, characterized in that the first magnetic particles have a cv of diameter of less than 15%.

- 30 6) Method according to any of claims 1 to 5 characterized in that the cell aggregation reagent is selected from the group consisting of proteins like fibrinogen and immunoglobulins, dextran, hydroxyethyl starch, polyvinyl pyrrolidone (PVP), methylcellulose or hydroxypropylmethylcellulose (HPMC).

- 7) Method according to any of claims 1 to 6 characterized in that the first magnetic particles are coupled to a plurality of different first antigen recognizing moieties.
- 5 8) Method according to any of claims 1 to 7 characterized in that the second magnetic particles are coupled to a plurality of different second antigen recognizing moieties.
- 9) Method according to any of claims 1 to 8 characterized in that the first and/or second antigen recognizing moieties are antibodies against antigens selected from the group
10 CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD34, CD36, CD61, CD123, CD193, CD235a, anti-IgE and anti-TCRab
- 10) Method according to any of claims 1 to 9 wherein the sample of cells is a sample of whole blood, Buffy-Coat or peripheral blood.
- 15 11) Method according to any of claims 1 to 10 characterized in that the first magnetic particles have a mean diameter of 1 – 5 μm
- 12) Method according to any of claims 1 to 11 characterized in that the second magnetic
20 particles have a mean diameter of 10 – 250 nm.
- 13) Method according to any of claims 1 to 12 characterized in that the cell aggregation agent aggregate erythrocytes.

Abstract

The invention is directed to a method for enriching target cells from a sample of cells characterized by:

- 5 a) contacting the sample with a cell aggregation agent and first magnetic particles having an iron content of 0.1 pg to 5000 pg, coupled to a first antigen recognizing moiety; and second magnetic particles having an iron content of 0.05 fg to 100 fg and coupled to a second antigen recognizing moiety to obtain mixture a)
- 10 b) applying a first magnetic field gradient to the mixture a) thereby removing the cells bound to the first antigen recognizing moiety coupled to the first magnetic particles, to obtain a mixture b) and obtaining an agglomerate comprising the cells of mixture a) bound to the cell aggregation agent
- c) applying a second magnetic field gradient to the mixture b) thereby immobilizing the cells bound to the second antigen recognizing moiety coupled to the second magnetic particles
- 15 d) recovering the immobilized cells from the second magnetic field gradient as target cells.

Drawings

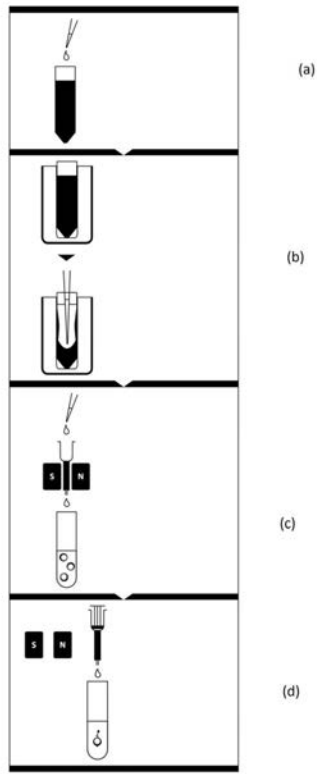


Fig. 1

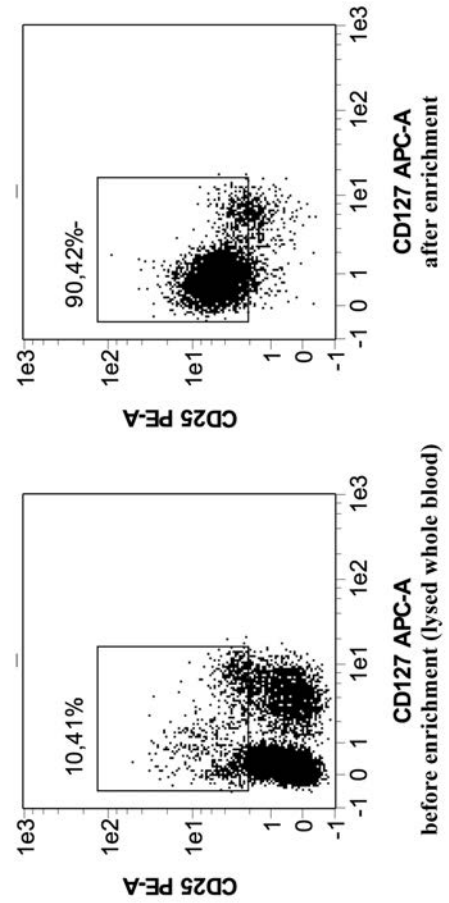


FIG.2

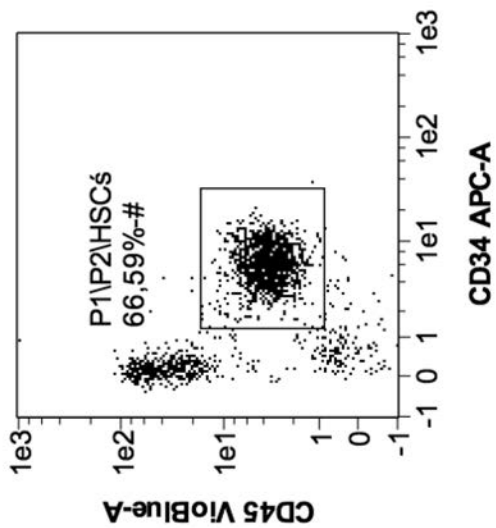


Fig. 3

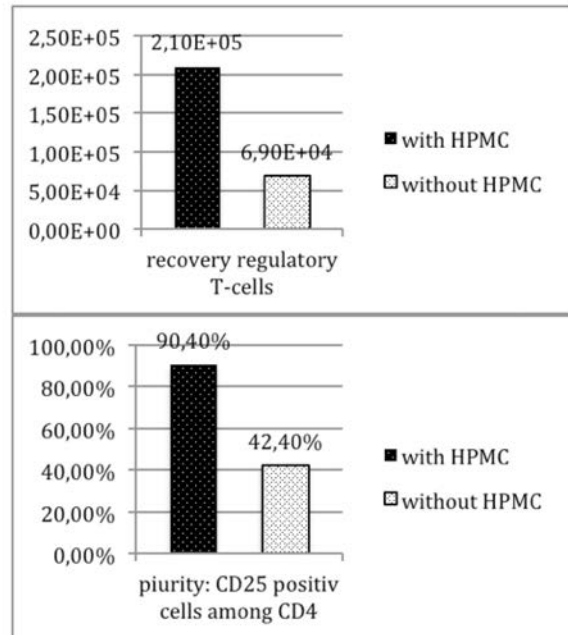


Fig. 4

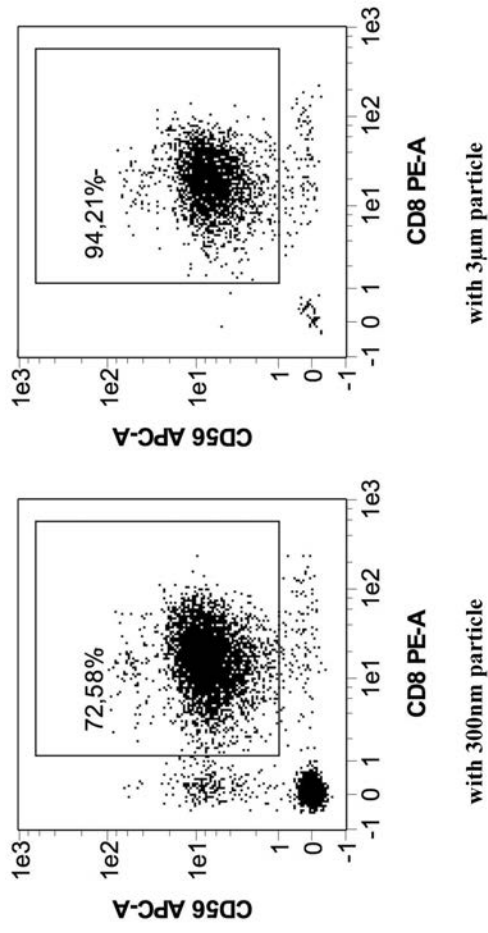


Fig. 5

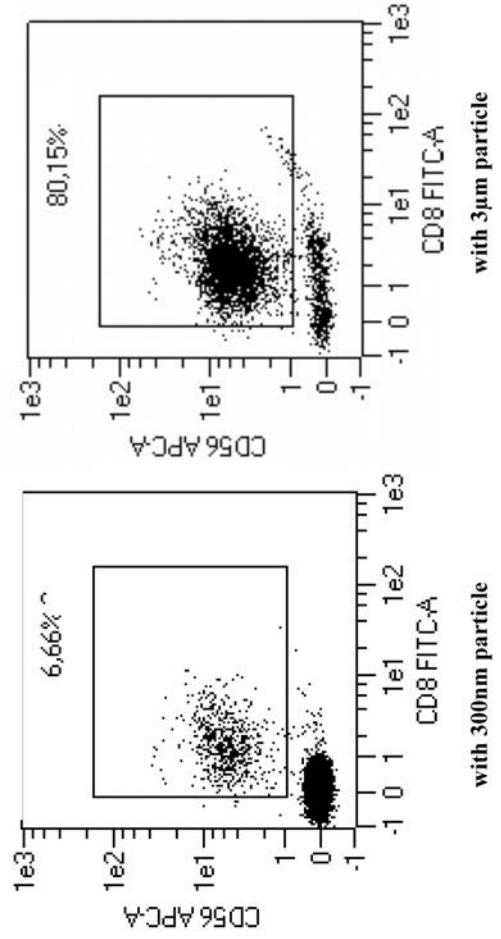


Fig. 6

专利名称(译)	多重细胞分离方法		
公开(公告)号	JP2016154532A	公开(公告)日	2016-09-01
申请号	JP2015252850	申请日	2015-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	美天旒GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsongu 美天旒生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	美天旒生物技术GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	フィリップシュタインブリュック クリスティアンドーゼ フォルカーフツパート ブアグントカウリング		
发明人	フィリップシュタインブリュック クリスティアン ドーゼ フォルカー フツパート ブアグント カウリング		
IPC分类号	C12M1/00 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/553 C12N5/071 C07K16/28 C07K16/42 C12N5/078		
CPC分类号	C12N5/00 C12N5/0637 C12N5/0646 C12N5/0647 C12N13/00 B03C1/01 B03C1/288 B03C2201/26 C12N5/0087 G01N33/54333 G01N1/40 G01N2001/4038		
FI分类号	C12M1/00.Z G01N33/48.B G01N33/53.K G01N33/553 C12N5/071 C07K16/28 C07K16/42 C12N5/078 C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/BB12 2G045/CA02 2G045/CA11 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CA20 2G045/CA21 2G045/CA24 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB03 4B029/AA09 4B029/AA21 4B029/AA27 4B029/BB11 4B029/CC01 4B029/FA05 4B029/FA15 4B029/GA08 4B029/HA10 4B065/AA90X 4B065/AB04 4B065/BD14 4B065/BD15 4B065/BD18 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4B065/CA60 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/EA50 4H045/EA60		
优先权	2014200362 2014-12-27 EP		
其他公开文献	JP6661368B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决方案：分离靶细胞的方法包括以下步骤：a) 使样品与细胞聚集体接触，所述细胞聚集体包含至少一种细胞，其中第一磁性颗粒具有耦合到第一抗原识别部分的特定数值范围的铁含量，并且具有耦合到第二抗原识别部分的具有特定数值范围的铁含量的第二磁性颗粒，以获得混合物a)；b) 向混合物施加第一磁场梯度a)，从而除去与偶联到第一磁性颗粒的第一抗原识别部分结合的细胞以获得混合物b)，并获得包含混合物a)的细胞的结块，所述混合物a)与细胞聚集体代理；c) 将第二磁场梯度施加到混合物b)，从而固定结合到偶联到第二磁性颗粒的第二抗原识别部分的细胞；d) 从第二磁场梯度中回收固定的细胞作为靶细胞画画：

图 3】

