



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112639434 A

(43) 申请公布日 2021.04.09

(21) 申请号 201980056700.3

(22) 申请日 2019.08.30

(30) 优先权数据

62/725,750 2018.08.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.02.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/048976 2019.08.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/047363 EN 2020.03.05

(71) 申请人 热动力医疗公司

地址 美国加利福尼亚州兰乔科尔多瓦市

(72) 发明人 威廉·布萨 菲利普·H·科埃罗

乔纳森·埃利斯 达力普·塞提

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 马丛

(51) Int.Cl.

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

从血液中分离靶细胞的方法

(57) 摘要

本文公开了从血液中分离靶细胞的方法,包括在开口容器中将体积小于或等于10mL的未稀释血液样品和结合剂混合,每种结合剂包含(A)主要结合剂,主要结合剂含能结合未稀释血液样品中靶细胞上的至少一个细胞表位的试剂,(B)结合于主要结合剂的第一接头,以在未稀释血液样品中产生附接结合剂的靶细胞;将未稀释的血液样品中附接结合剂的靶细胞与多种悬浮剂接触,悬浮剂包括能附接第一接头的第二接头,以产生未稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物;将未稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物稀释至少20%,以产生稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物;向稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物施加矢量力,如离心力,以产生分层的稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物;将分层的稀释的附接悬试剂的靶细胞混合物中的附接悬试剂的靶细胞去除;以及将靶细胞从附接悬试剂的靶细胞混合物中分离。

1. 一种从血液中分离靶细胞的方法,包括:
 - (a) 将以下在开口容器中混合
 - (i) 体积小于或等于10mL的未稀释血液样本,及
 - (ii) 结合剂,其中每种结合剂包含(A)主要结合剂,所述主要结合剂包含能够结合未稀释血液样品中靶细胞上的至少一个细胞表位的试剂,(B)结合于主要结合剂的第一接头,其中所述混合发生在适于促进主要结合剂与靶细胞结合的时间和条件下,以在未稀释的血液样品中产生附接结合剂的靶细胞;
 - (b) 将未稀释的血液样品中附接结合剂的靶细胞与多种悬浮剂接触,其中每种悬浮剂包含结合到悬浮剂上的第二接头,其中第二接头能够与第一接头连接,其中所述接触发生的时间和条件适于促进第二接头与第一接头连接,以产生未稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物;
 - (c) 将未稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物稀释至少20%,以产生稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物;
 - (d) 向稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物施加矢量力,例如离心力,以产生分层的稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物;
 - (e) 将分层的稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物中的附接悬浮剂的靶细胞去除;
 - (f) 将靶细胞从附接悬浮剂的靶细胞中分离。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述悬浮剂包括充气气泡。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述充气气泡包括被脂质或磷脂壳包封的全氟化碳气体核。
4. 根据权利要求2~3中任一项所述的方法,其中所述充气气泡的平均体积大于 $6\mu\text{m}^3$ 且小于 $10\mu\text{m}^3$ 。
5. 根据权利要求2~4中任一项所述的方法,其中所述充气气泡的平均直径在 $1.5\mu\text{m}$ 至约 $3\mu\text{m}$ 之间。
6. 根据权利要求2~5中任一项所述的方法,其中充气气泡以至少 $4\times 10^8/\text{mL}$ 的浓度存在于接触步骤中。
7. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其中所述第二接头包括链霉亲和素,并且所述第一接头包括生物素。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中链霉亲和素以大于20000分子/ μm^2 的浓度存在于悬浮剂上。
9. 根据权利要求7所述的方法,其中链霉亲和素以大于25000分子/ μm^2 的浓度存在于悬浮剂上。
10. 根据权利要求7所述的方法,其中链霉亲和素以大于26000分子/ μm^2 的浓度存在于悬浮剂上。
11. 根据权利要求1~10中任一项所述的方法,其中所述结合剂包括附接于所述第一接头的抗体。
12. 根据权利要求1~11中任一项所述的方法,其中所述未稀释的血液样品的体积小于或等于5mL。
13. 根据权利要求1~11中任一项所述的方法,其中所述未稀释的血液样品的体积小于

或等于3mL。

14. 根据权利要求1~13中任一项所述的方法, 其中所述未稀释的血液样品的体积为1mL至3mL。

15. 根据权利要求1~14中任一项所述的方法, 其中所述稀释步骤包括将未稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物稀释20%至500%, 以产生稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物。

16. 根据权利要求1~15中任一项所述的方法, 其中所述去除步骤包括使用移液管或注射器从分层的稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物中去除附接悬浮剂的靶细胞。

17. 根据权利要求1~16中任一项所述的方法, 其中所述分离步骤包括通过超声处理或施加正压以使微泡脱气, 将靶细胞从附接悬浮剂的靶细胞中分离。

18. 根据权利要求1~17中任一项所述的方法, 其中所述靶细胞包括表面免疫表型的细胞, 包括CD45⁺、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD25⁺、CD14⁺、CD16⁺、CD19⁺、CD56⁺、CD34⁺、CD117⁺、CD235a、CD349⁻、T细胞受体 (TCR) α 、 γ 、 β 和 δ 中的一种或多种。

19. 根据权利要求1~18中任一项所述的方法, 其中靶细胞包括CD3⁺细胞。

20. 根据权利要求1~19中任一项所述的方法, 其中分离的靶细胞具有至少85%的纯度。

21. 根据权利要求1~19中任一项所述的方法, 其中分离的靶细胞具有至少90%的纯度。

22. 根据权利要求1~21中任一项所述的方法, 其中分离的靶细胞具有至少80%的活力。

23. 根据权利要求1~21中任一项所述的方法, 其中分离的靶细胞具有至少90%的活力。

24. 根据权利要求1~23中任一项所述的方法, 其中血液样品中至少50%的靶细胞被分离。

25. 根据权利要求1~23中任一项所述的方法, 其中血液样品中至少70%的靶细胞被分离。

26. 根据权利要求1~25中任一项所述的方法, 其中靶细胞不是血小板或红细胞。

从血液中分离靶细胞的方法

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求2018年8月31日提交的序列号为62/725750的美国临时专利申请的优先权,并通过引用将其全部内容合并与此。

背景技术

[0003] 免疫学、干细胞生物学、组织工程学、传染病生物学、生理学、生物物理学、分子遗传学和病理学等领域的基础研究通常涉及应用从志愿献血者新鲜血液中分离出的细胞。通常这些是小体积的制剂(一般少于一百万个细胞),由新鲜抽取的小静脉样本(大约10mL或更少的血液)制成。研究人员将越来越多地寻求基于所需细胞类型的表面免疫表型(如外周血单个核细胞,而不是混合细胞型制剂,即所谓的“PBMC制剂”(PBMC preps))分离单一分子特异性细胞类型。

[0004] 基础研究人员需要以最小的成本及投资快速地从小样本量中制备这种靶细胞分离物,这通常使得目前使用的最复杂的细胞分离方法不适于这一需要。现有方法存在多种缺陷,包括成本昂贵、生产量非常低、生产的靶细胞回收率和纯度不足以满足研究者的需求,和/或不能从全血中分离靶细胞,需要在分离靶细胞之前进行耗时的红细胞去除和PBMC制剂的初始步骤。因此,需要一种研究规模的血细胞分离的方法,该方法成本低、资金强度大、生产量快速、靶细胞回收率和纯度高,适于在未进行预先PBMC制备和/或红细胞去除的情况下的小于毫升级的全血样品。

发明内容

[0005] 一方面,公开了从血液中分离靶细胞的方法,包括:

[0006] (a) 将以下在开口容器中混合

[0007] (i) 体积小于或等于10mL的未稀释血液样本,及

[0008] (ii) 结合剂,其中每种结合剂包含(A)主要结合剂(primary binding agent),所述主要结合剂包含能够结合未稀释血液样品中靶细胞上的至少一个细胞表位的试剂,(B)结合于主要结合剂的第一接头,

[0009] 其中所述混合发生在适于促进主要结合剂与靶细胞结合的时间和条件下,以在未稀释的血液样品中产生附接结合剂的靶细胞;

[0010] (b) 将未稀释的血液样品中附接结合剂的靶细胞与多种悬浮剂接触,其中每种悬浮剂包含结合到悬浮剂上的第二接头,其中第二接头能够与第一接头连接,其中所述接触发生的时间和条件适于促进第二接头与第一接头连接,以产生未稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物;

[0011] (c) 将未稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物稀释至少20%,以产生稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物;

[0012] (d) 向稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物施加矢量力,例如离心力,以产生分层的稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物;

[0013] (e) 将分层的稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物中的附接悬浮剂的靶细胞去除；和

[0014] (f) 将靶细胞从附接悬浮剂的靶细胞中分离。

[0015] 在一个实施方案中，悬浮剂包括充气气泡 (gas-filled bubbles)。在另一个实施方案中，充气气泡包括被脂质或磷脂壳包封的全氟化碳气体核。在另一个实施方案中，充气气泡的平均体积大于 $6\mu\text{m}^3$ 且小于 $10\mu\text{m}^3$ 。在一个实施方案中，充气气泡的平均直径在 $1.5\mu\text{m}$ 至约 $3\mu\text{m}$ 之间。在另一个实施方案中，充气气泡以至少 $4 \times 10^8/\text{mL}$ 的浓度存在于接触步骤中。在一个实施方案中，第二接头包括链霉亲和素 (SA)，第一接头包括生物素。在多种进一步的实施方案中，链霉亲和素以大于 20000 分子/ μm^2 、 25000 分子/ μm^2 或 26000 分子/ μm^2 的浓度存在于悬浮剂上。在一个实施方案中，结合剂包括附接于第一接头的抗体。在各种实施方案中，未稀释的血液样品的体积小于或等于 5mL 、小于或等于 3mL 、或 1mL 至 3mL 。

[0016] 在一个实施方案中，稀释步骤包括将未稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物稀释 20% 至 500% ，以产生稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物。在另一个实施方案中，去除步骤包括使用移液管或注射器从分层的稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物中去除附接悬浮剂的靶细胞。在另一个实施方案中，分离步骤包括通过超声处理或施加正压以使微泡脱气，将靶细胞从附接悬浮剂的靶细胞中分离。

[0017] 在一个实施方案中，靶细胞包括表面表型的细胞，包括 CD45^+ 、 CD3^+ 、 CD4^+ 、 CD8^+ 、 CD25^+ 、 CD14^+ 、 CD16^+ 、 CD19^+ 、 CD56^+ 、 CD34^+ 、 CD117^+ 、 CD235a 、 CD349^- 、T 细胞受体 (TCR) α 、 γ 、 β 和 δ 细胞中的一种或多种。在另一个实施方案中，靶细胞包括 CD3^+ 。在其他实施方案中，分离的靶细胞具有至少 85% 或至少 90% 的纯度。在进一步的实施方案中，分离的靶细胞具有至少 80% 或至少 90% 的活力。在更进一步的实施方案中，血液样品中至少 50% 或至少 70% 的靶细胞被分离。在另一个实施方案中，靶细胞不是血小板或红细胞。

附图说明

[0018] 图1示出了微泡试剂 (悬浮剂) 的链霉亲和素浓度 (分子/ μm^2) 与靶细胞 CD3^+ 回收百分比 (%) 的相关性的示例性图表。

[0019] 图2示出了微泡试剂 (悬浮剂) 体积与靶细胞 CD3^+ 的回收百分比 (%) 的相关性的示例性图表。

具体实施方式

[0020] 除非上下文另有明确规定，本文所用单数形式“一”、“一个”和“所述”包括复数指代物。除非另有明确说明，否则本文所用的“和”可与“或”互换使用。

[0021] 本文所用术语“大约”是指所述参数的 $\pm 5\%$ 。

[0022] 除非上下文另有明确规定，本公开中任何方面的实施方案均可以组合使用。

[0023] 除非上下文另有明确要求，否则在整个说明书和权利要求书中，“包括”、“包含”等词语应理解为包容性的，而不是排他性的或穷举性的；也就是说，其意义为“包括但不限于”。使用单数或复数的词也分别包括复数和单数。此外，在本申请中使用“在此”、“以上”、“以下”和类似含义的词语时，应指本申请整体，而不是指本申请的任何特定部分。

[0024] 本公开的实施方案的描述并非旨在穷举或将本公开限制于所公开的特定形式。尽

管本文出于说明目的描述了本公开的具体实施方案和示例,但是相关领域的技术人员应认识到,在本公开的范围内可以进行各种等效修改。

[0025] 一方面,提供了从血液中分离靶细胞的方法,包括:

[0026] (a) 将以下在开口容器中混合

[0027] (i) 体积小于或等于10mL的未稀释血液样本,及

[0028] (ii) 结合剂,其中每种结合剂包含 (A) 主要结合剂,所述主要结合剂包含能够结合未稀释血液样品中靶细胞上的至少一个细胞表位的试剂, (B) 结合于主要结合剂的第一接头,其中所述混合发生在适于促进主要结合剂与靶细胞结合的时间和条件下,以在未稀释血液样品中产生附接结合剂的靶细胞;

[0029] (b) 将未稀释的血液样品中附接结合剂的靶细胞与多种悬试剂接触,其中每种悬试剂包含结合于悬试剂上的第二接头,其中第二接头能够与第一接头连接,其中所述接触发生的时间和条件适于促进第二接头与第一接头连接,以产生未稀释的附接悬试剂的靶细胞混合物;

[0030] (c) 将未稀释的附接悬试剂的靶细胞混合物稀释至少20%,以产生稀释的附接悬试剂的靶细胞混合物;

[0031] (d) 向稀释的附接悬试剂的靶细胞混合物施加矢量力,例如离心力,以产生分层的稀释的附接悬试剂的靶细胞混合物;

[0032] (e) 将分层的稀释的附接悬试剂的靶细胞混合物中的附接悬试剂的靶细胞去除;和

[0033] (f) 将靶细胞从附接悬试剂的靶细胞混合物中分离。

[0034] 本发明的方法在使用相对简单的试剂和小体积分离具有非常高纯度及活力的特定血细胞亚群方面具有显著的改进,因此特别适用于小规模实验室及研究用途。

[0035] 所述方法在一个开口容器中进行,因此不需要昂贵而复杂的血细胞分离装置。如本文所用,“开口”容器是一种非密封的容器,通常在层流罩中无菌使用。“开口”容器通常用于处理少量血液,如1mL、2mL、5mL、10mL、15mL或50mL塑料管。

[0036] 所要分离靶细胞的血液是未稀释的体积小于或等于10mL的血液样品(即全血或外周血)。可以靶向未稀释血液样品中的任何此类靶细胞,包括但不限于包含CD45⁺、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD25⁺、CD14⁺、CD16⁺、CD19⁺、CD56⁺、CD34⁺、CD117⁺、CD235a、CD349⁻、T细胞受体(TCR) α 、 γ 、 β 和 δ 中的一种或多种的表面免疫表型的细胞。在一个具体实施方案中,红细胞和血小板不是靶向的(即靶细胞不是血小板或红细胞)。在一个具体实施方案中,靶细胞包括CD3⁺细胞。

[0037] 如以下实施例中所述,发明人已经证明本文公开的方法可用于分离纯度和活力大于80%(平均94%)并且在大多数情况下大于90%(平均95%)的靶细胞,平均靶细胞回收率至少为70%,平均回收率为85%。

[0038] 在各种实施方案中,所要分离特定细胞子集的未稀释血液样品为约0.1mL至10mL、约0.1mL至约7.5mL、约0.1mL至约5mL、约0.1mL至约3mL、约0.5mL至10mL、约0.5mL至约7.5mL、约0.5mL至约5mL、约0.5mL至约3mL,约1mL至10mL、约1mL至约7.5mL、约1mL至约5mL、约1mL至约3mL、0.1mL、0.25mL、0.5mL、0.75mL、1mL、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL、4mL、4.5mL、5mL、5.5mL、6mL、6.5mL、7mL、7.5mL、8mL、8.5mL、9mL、9.5mL或10mL。血液可以从任何

感兴趣的生物体中获得,包括但不限于人类、啮齿动物(即小鼠、大鼠、仓鼠等)、兔子、猪、山羊、猴子、绵羊、马、牛等。在一个具体的实施方案中,血液来源于人类。

[0039] 本文所用“结合剂”是能够以足够高的亲和力和特异性结合血液中靶细胞上的至少一个细胞表位的结构,例如分子。合适的结合剂可以包括但不限于抗体、寡核苷酸、适配子、分子印迹聚合物、碳水化合物、蛋白质、肽、酶、小分子、脂质、脂肪酸、金属原子、金属离子和合成聚合物。在一个具体的实施方案中,结合剂包含一种或多种选择性结合血液中靶细胞上的细胞表位的抗体。一种或多种抗体的选择将取决于血样中感兴趣的靶细胞。

[0040] 本文所用“第一接头”和“第二接头”包括一对化学部分,一个共价或非共价地附接于结合剂(第一接头),另一个共价或非共价地附接于悬浮剂(第二接头),它们在适当的条件下能够在合适的介质中以足够高的亲和力自发地相互连接(共价或非共价),以通过接头实现结合剂与悬浮剂的间接连接,从而形成未稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物。在一个实施方案中,第一接头包含生物素;在该实施方案中,结合分子包含共价结合到抗体上的生物素。在该实施方案中,第二接头通常包含链霉亲和素。在其他具体的实施方案中,第一接头为第一寡核苷酸,第二接头为第二寡核苷酸,在其长度的至少一部分上与第一寡核苷酸互补(例如完全互补),并且能够通过碱基配对与第一寡核苷酸结合。

[0041] 在某些实施方案中,加入到未稀释的血液中的结合剂的量足以使结合剂在靶细胞上的结合位点基本饱和,同时在混合物中仅留下一定量的未结合的结合剂,该量不足以基本上干扰悬浮剂与第一接头的连接。在进一步的实施方案中,添加到未稀释血液中的结合剂的量通过预先计算未稀释血液中的靶细胞数量来确定,所述预先计算可使用但不限于本领域技术人员已知的任何合适的手段,例如血液分析仪、流式细胞仪、显微镜观察、沉积作用、酶动力学检测、酶联免疫吸附试验等。在某些实施例中,添加到未稀释血液中的一种或多种结合剂的量通过针对未稀释血液的等分试样测试两种或多种结合剂的浓度范围来确定。在进一步的实施方案中,所用的一种或多种结合剂的量最大为靶细胞上存在的结合剂结合位点数量的40倍。

[0042] 本文所用“悬浮剂”是一种具有与单独的靶细胞浓度和/或血液浓度显著不同的原料。合适的悬浮剂可以包括但不限于,具有蛋白质或脂质壳的气体包封的气泡、中空聚合物、玻璃珠(中空或实心)、注有气体的微孔珠、不混溶液体的液滴、金纳米颗粒和银纳米颗粒。在一个具体实施方案中,悬浮剂包括充气气泡,例如被蛋白质、脂质、磷脂或碳水化合物壳包封的气泡。在一个实施方案中,充气气泡包括被磷脂或脂质壳包封的全氟化碳气体核。

[0043] 浮力试剂可以具有任何合适的直径;在一个非限制性实施例中,充气气泡具有至少 $1.5\mu\text{m}$ 的平均直径。发明人已经证明,悬浮剂、结合剂和接头的具体实施方案对于包括但不限于细胞回收率、纯度、生存力和活性的参数提供了显著的改善。

[0044] 在一个具体的实施方案中,充气气泡(例如被磷脂或脂质壳包封的全氟化碳气体核)具有大于 $6\mu\text{m}^3$ 且小于 $10\mu\text{m}^3$ 的平均体积。在各种实施方案中,充气气泡(例如被磷脂或脂质壳包封的全氟化碳气体核)具有约 $6.2\mu\text{m}^3$ 至约 $9.9\mu\text{m}^3$ 、约 $6.5\mu\text{m}^3$ 至约 $9.5\mu\text{m}^3$ 、约 $7\mu\text{m}^3$ 至约 $9\mu\text{m}^3$ 或约 $7\mu\text{m}^3$ 至约 $8.5\mu\text{m}^3$ 的平均体积。

[0045] 在另一个具体的实施方案中,充气气泡(例如被磷脂或脂质壳包封的全氟化碳气体核)具有大于 $1.5\mu\text{m}$ 的平均直径。在各种进一步的实施方案中,充气气泡(例如被磷脂或脂

质壳包封的全氟化碳气体核)具有大于1.5 μm 至约3 μm 的平均直径。在其他实施方案中,充气气泡(例如被磷脂或类脂壳包封的全氟化碳气体核)具有约1.6 μm 至约2.9 μm 、约1.7 μm 至约2.8 μm 或约1.8 μm 至约2.7 μm 的平均直径。

[0046] 在一个具体的实施方案中,充气气泡(例如被磷脂或脂质壳包封的全氟化碳气体核)以至少 $4 \times 10^8/\text{mL}$ 的浓度存在于接触步骤中。在各种实施方案中,充气气泡(例如被磷脂或脂质壳包封的全氟化碳气体核)以 $4 \times 10^8/\text{mL}$ 至约 $12 \times 10^8/\text{mL}$ 、 $4 \times 10^8/\text{mL}$ 至约 $11 \times 10^8/\text{mL}$ 或 $4 \times 10^8/\text{mL}$ 至约 $8.5 \times 10^8/\text{mL}$ 的浓度存在于接触步骤中。在另一个具体的实施方案中,第二接头(如链霉亲和素(SA))或与第一接头成对的寡核苷酸的第二个成员,以至少20000分子/ μm^2 的浓度存在于悬浮剂(如被磷脂或脂质壳包封的全氟化碳气体核)上。在另一个实施方案中,链霉亲和素或其第二接头以至少20000分子/ μm^2 、21000分子/ μm^2 、22000分子/ μm^2 、23000分子/ μm^2 、24000分子/ μm^2 、25000分子/ μm^2 、26000分子/ μm^2 、27000分子/ μm^2 、28000分子/ μm^2 、29000分子/ μm^2 或30000分子/ μm^2 的浓度存在于悬浮剂(例如被磷脂或脂质壳包封的全氟化碳气体核)上;在各种进一步的实施方案中,链霉亲和素或其第二接头以约20000分子/ μm^2 、21000分子/ μm^2 、22000分子/ μm^2 、23000分子/ μm^2 、24000分子/ μm^2 、25000分子/ μm^2 、26000分子/ μm^2 、27000分子/ μm^2 、28000分子/ μm^2 、29000分子/ μm^2 或30000分子/ μm^2 至约40000分子/ μm^2 之间的浓度存在于悬浮剂(例如被磷脂或脂质壳包封的全氟化碳气体核)上。

[0047] 混合步骤和接触步骤在促进所述结合事件的条件下进行一定时间。可以使用任何适宜的条件来促进这种混合与接触,并且,基于本文的教导,确定合适的条件如温度、培养时间、搅拌或其他混合力的使用、所应用的介质、为结合的洗涤步骤等是在本领域技术人员的能力范围内。这里详细描述了非限制性的实施方案。

[0048] 在步骤(b)之后,将未稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物稀释至少20%,以产生稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物,从而促进血液中结合细胞与未结合细胞的分离。在各种实施方案中,稀释度在20%至约500%之间;在各种其它实施方案中,在20%至约450%、400%、350%、300%、250%、200%、200%、150%或100%之间,以产生稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物。

[0049] 然后向稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物施加矢量力,以产生分层的稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物。“矢量力”是具有方向和大小的力,包括但不限于重力、向心力和离心力。在一个具体实施方案中,矢量力包括通过离心产生的离心力。

[0050] 随后使用任何合适的步骤,包括但不限于使用移液管或注射器将附接悬浮剂的靶细胞从分层的稀释的附接悬浮剂的靶细胞混合物中去除。

[0051] 随后使用任何合适的方法将靶细胞从附接悬浮剂的靶细胞中分离,以将悬浮剂从靶细胞中分离出来。这种方法包括但不限于超声或施加正压以使微泡脱气或塌陷。

[0052] 实施例

[0053] 实施例1:鉴定可改善CD3+细胞回收率的微泡试剂的理化特性

[0054] 获得微泡试剂的理化特性,并研究了其与血细胞混合物中CD3+细胞回收率的相关性。简而言之,获得了具有少量粒细胞和红细胞的单核细胞的细胞混合物。将细胞混合物与0.875 μg 的CD3-生物素抗体(克隆号UCHT1,可从多个供应商处获得)共同孵育,之后与链霉亲和素包封的悬浮微泡试剂共孵育。孵育后,混合物在室温下以 $400 \times g$ 离心5分钟。用移液管从试管中取出附接悬浮剂的靶细胞。使用10mL注射器对此部分进行脱气,以施加轻微的

正压,使悬浮剂不可逆地塌陷。表1示出了试剂的理化特性和获得的CD3+细胞回收率。为了研究微泡试剂的理化特性与性能之间的相关性,进行了CD3+细胞回收率(%)的回归分析。观察到微泡试剂上的链霉亲和素浓度与CD3+细胞回收率之间呈正相关(图1)。观察到微泡试剂的平均体积(浮力指标)和CD3+细胞回收率之间也呈正相关(图2)。

[0055] 表1:微泡(悬浮)试剂的理化特性以及靶细胞CD3+回收百分比(%)

微泡体积 (μm^3)	微泡直径 (μm)	微泡浓度 ($10^8/\text{mL}$)	链霉亲和素浓 度 (分子/ μm^2)	CD3+细胞 回收率 (%)
8.4	2.1	4.0	36000	94.2%
6.0	1.8	11.0	19000	73.2%
7.5	1.9	8.2	25000	84.4%
7.1	1.8	7.8	30000	90.5%
7.3	2.2	6.9	26500	96.1%
7.2	2.4	5.6	26200	90.3%
7.1	2.7	4.6	8400	72.5%

[0057] 实施例2:靶细胞CD3+从未稀释的全血中的分离

[0058] 本发明所用到的全部的人类外周血均为购得。将少量(1mL、3mL或5mL)未稀释的全血与CD3-生物素抗体在室温下共同孵育30分钟。抗体孵育后,将链霉亲和素包封的微泡试剂加入试管中并在室温下孵育20分钟。微泡孵育后,加入缓冲液稀释并增加体积。将试管以 $400\times g$ 离心7.5分钟。用移液管从试管中取出附接悬浮剂的靶细胞。用10mL注射器对组分进行脱气,使悬浮剂不可逆地塌陷。表2示出了在不同体积(1mL、3mL和5mL)下获得的CD3+细胞的回收率。表3示出了离心前不添加缓冲液的细胞回收率。离心前添加缓冲液可显著提高CD3+细胞的回收率。抗体孵育前添加缓冲液并稀释血液,对CD3+细胞的回收产生负面影响。

[0059] 表2:小规模(1mL、3mL和5mL)全外周血中回收靶细胞CD3+的回收百分比(%)

规模	PB 稀释	离心前每 mL 血液添加的 缓冲液量	CD3+回收 率	CD3+活力	CD3+纯度
1 mL	无	0.5	84%	89%	98%
1 mL	无	0.5	86%	91%	98%
1 mL	无	0.5	86%	93%	98%
1 mL	无	0.5	109%	92%	98%

[0061]

1 mL	无	0.5	96%	92%	97%
1 mL	无	0.5	95%	93%	98%
1 mL	无	0.5	78%	97%	93%
1 mL	无	0.5	78%	98%	92%
1 mL	无	0.5	77%	98%	91%
3 mL	无	0.5	79%	98%	91%
3 mL	无	0.5	69%	92%	91%
3 mL	无	0.5	77%	99%	92%
1 mL	无	0.5	91%	97%	96%
1 mL	无	0.5	91%	96%	94%
1 mL	无	0.5	108%	96%	95%
1 mL	无	0.5	100%	95%	94%
1 mL	无	0.5	92%	95%	90%
1 mL	无	0.5	78%	97%	90%
1 mL	无	0.5	91%	97%	96%
1 mL	无	0.5	92%	98%	95%
1 mL	无	0.5	96%	97%	95%
1 mL	无	0.5	91%	97%	94%
1 mL	无	0.5	86%	96%	93%
1 mL	无	0.5	89%	97%	95%
5 mL	无	0.5	80%	97%	98%
5 mL	无	0.5	71%	96%	98%
5 mL	无	0.5	73%	97%	98%
5 mL	无	0.5	64%	81%	98%
5 mL	无	0.5	70%	81%	98%
5 mL	无	0.5	78%	89%	97%
		平均	85%	94%	95%
		标准差 (SD)	11%	4%	3%

[0062] 表3:在以3mL规模孵育抗体之前,以不同的稀释度从全外周血中回收靶细胞CD3⁺的回收百分比(%)

[0063]

规模	PB 稀释	离心前每 mL 血液添 加的缓冲液 量	CD3+回收 率	CD3+活力	CD3+纯度
3 mL	无	0	66%	97%	92%
3 mL	1 至 1	0	74%	98%	95%
3 mL	1 至 2	0	75%	98%	95%
3 mL	1 至 4	0	66%	98%	92%
3 mL	1 至 8	0	55%	98%	85%

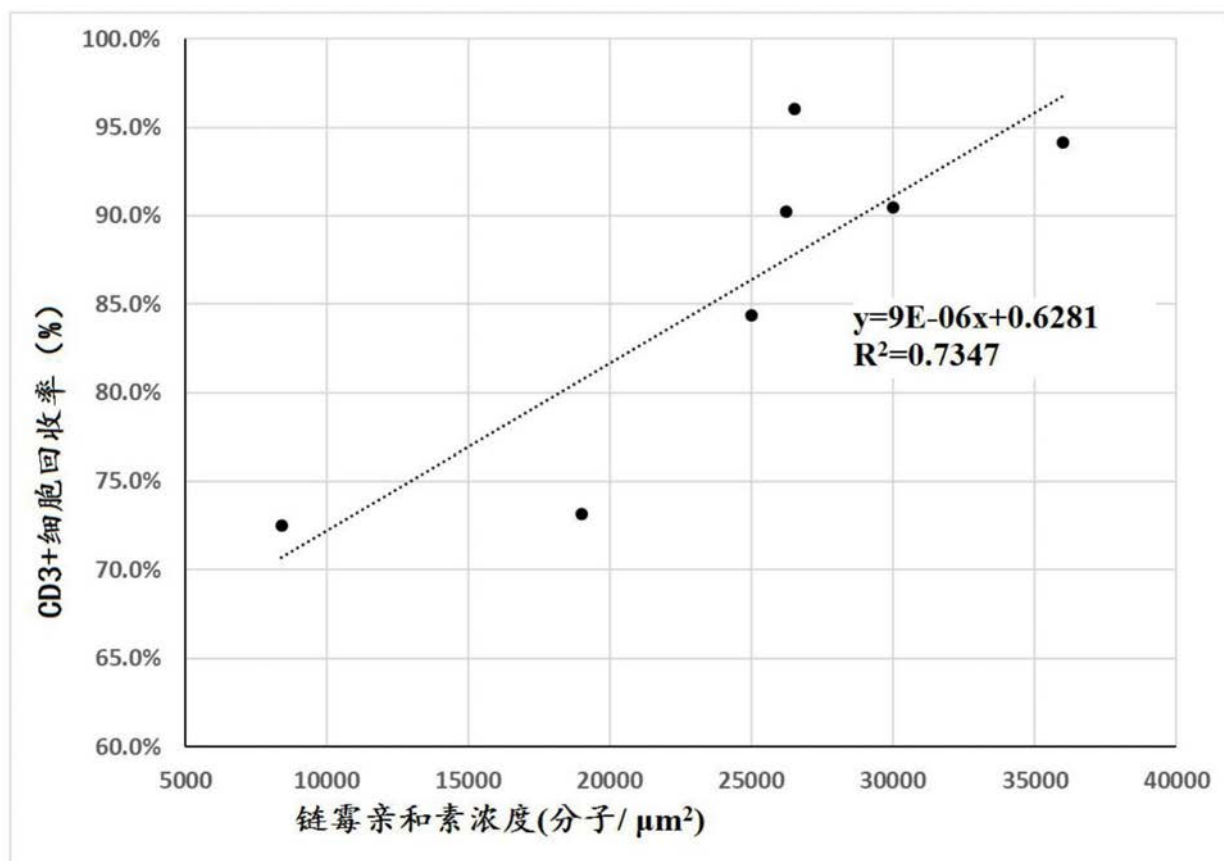


图1

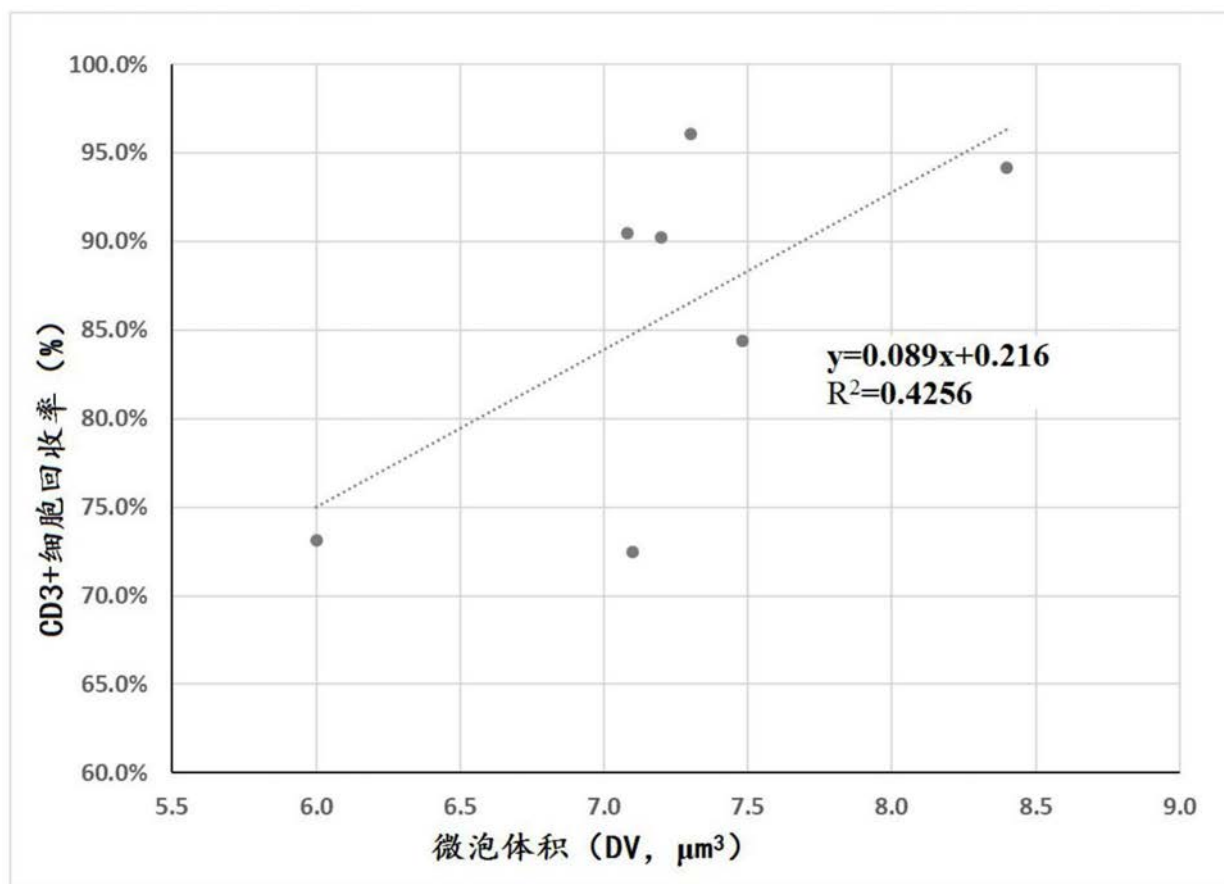


图2