

(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2004-538490

(P2004-538490A)

(43) 公表日 平成16年12月24日(2004.12.24)

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | F I                                | テーマコード (参考) |
|----------------------------|------------------------------------|-------------|
| <b>GO 1 N 33/53</b>        | GO 1 N 33/53 Z N A Y               | 4 B O 5 0   |
| <b>A 6 1 K 35/14</b>       | GO 1 N 33/53 D                     | 4 B O 6 3   |
| <b>A 6 1 K 35/23</b>       | A 6 1 K 35/14 C                    | 4 B O 6 5   |
| <b>A 6 1 K 35/28</b>       | A 6 1 K 35/23                      | 4 C O 8 7   |
| <b>A 6 1 K 35/30</b>       | A 6 1 K 35/28                      |             |
|                            | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 115 頁) 最終頁に続く |             |

|               |                              |          |   |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号     | 特願2003-521372 (P2003-521372) | (71) 出願人 | 504058570<br>ザ・ピーター・マッカラム・キャンサー・<br>インスティテュート<br>THE PETER MACCALLUM<br>CANCER INSTITUTE<br>オーストラリア国、ヴィクトリア 300<br>2、イースト・メルボルン、セント・アン<br>ドリュース・プレイス、スモルガン・ファ<br>ミリー・ビルディング |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年8月15日 (2002.8.15)       | (74) 代理人 | 100078662<br>弁理士 津国 肇   |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成16年2月16日 (2004.2.16)       | (74) 代理人 | 100075225<br>弁理士 篠田 文雄  |
| (86) 国際出願番号   | PCT/AU2002/001101            |          |   |
| (87) 国際公開番号   | W02003/016916                |          |   |
| (87) 国際公開日    | 平成15年2月27日 (2003.2.27)       |          |   |
| (31) 優先権主張番号  | PR 7036                      |          |   |
| (32) 優先日      | 平成13年8月15日 (2001.8.15)       |          |   |
| (33) 優先権主張国   | オーストラリア (AU)                 |          |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体性幹細胞の同定および単離ならびにその使用

## (57) 【要約】

本発明は、特に造血幹細胞、間葉幹細胞およびケラチノサイト幹細胞を含む体性幹細胞における、特異的な細胞タイプの集団の同定に関する。本発明は、更にまた該幹細胞を分離する方法および該幹細胞の使用も提供する。本発明の方法から派生して、幹細胞を同定する方法であって：幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；細胞上のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) またはそのフラグメントの存在を検出する工程；および ACE またはそのフラグメントを有する幹細胞を同定する工程、を含む方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

配列 L F Q E L Q P L Y L (配列番号 1) を有するペプチド配列またはその等価物の存在を検出する工程；および

前記配列またはその等価物を有する前記幹細胞を同定する工程、を含む方法。

## 【請求項 2】

幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

配列 E A D D F F T S (配列番号 2) を有するペプチド配列またはその等価物の存在を検出する工程；および

前記配列またはその等価物を有する幹細胞を同定する工程、を含む方法。

## 【請求項 3】

幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

細胞上のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) またはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

ACE またはそのフラグメントを有する幹細胞を同定する工程、を含む方法。

## 【請求項 4】

ACE が、配列番号 1 および / または配列番号 2 またはそれらの等価物によってコードされるポリペプチドの存在によって検出される、請求項 3 記載の方法。

## 【請求項 5】

前記幹細胞が体性幹細胞である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 6】

前記体性幹細胞が、造血幹細胞、間葉幹細胞、ケラチノサイト幹細胞、神経細胞、肝細胞および膵細胞を含む群から選択される、請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

前記幹細胞が造血幹細胞である、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 8】

前記幹細胞を含む細胞サンプルが、腸骨稜、脛骨、大腿骨、脊椎、骨膜、骨内膜またはその他の骨小腔を含む骨髄；血液；胚卵黄嚢；胎児の肝；脾臓；末梢血；皮膚；真皮；肝臓；脳；膵臓または腎臓を含む群から選択される幹細胞起源から得られる、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項の方法。

## 【請求項 9】

前記検出が、ACE または配列番号 1 または配列番号 2 によってコードされるポリペプチドに対する抗体、ACE または前記配列に対するアゴニストおよびアンタゴニスト、DNA、RNA、mRNA または ACE タンパク質のいずれかの存在によって ACE または前記配列の発現を検出できる核酸検出システム、および ACE または前記配列についての酵素的、蛍光的または比色定量アッセイを含む群から選択される手段の使用を含む、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 10】

ACE の検出が、ACE あるいは配列番号 1 または配列番号 2 によってコードされるポリペプチドに対する抗体を使用して実施される、請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 11】

前記抗体が抗体 BB 9 である、請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 12】

STRO-1、SH 2、SH 3 および SH 4 を含む群から選択される間葉幹細胞マーカーの使用を更に含む、請求項 11 記載の方法。

## 【請求項 13】

10

20

30

40

50

サイトケラチン 14、 - 6 インテグリン ( C D 4 9 F ) および C D 7 1 を含む群から選択されるケラチノサイト幹細胞マーカーの使用を更に含む、請求項 1 1 または請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

幹細胞豊富な細胞集団を得るための方法であって：

幹細胞を含む細胞集団を得る工程；

細胞上の A C E またはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

前記細胞上の A C E またはフラグメントの存在によって同定される細胞を選択する工程、を含む方法。

【請求項 1 5】

A C E が、配列番号 1 および / または配列番号 2 またはそれらの等価物によってコードされるポリペプチドの存在によって検出される、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

A C E の存在が、A C E またはそのフラグメントに対する抗体によって検出される、請求項 1 4 または請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 7】

抗体が、抗体 B B 9 である、請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 1 8】

幹細胞が、造血幹細胞である請求項 1 4 から 1 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 9】

集団から幹細胞を取り出すための方法であって：

幹細胞を含む細胞集団を得る工程；

細胞上の A C E またはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

前記細胞上の A C E の存在によって同定されるそれらの細胞を選択して取り除く工程、を含む方法。

【請求項 2 0】

A C E が、配列番号 1 および / または配列番号 2 によってコードされるポリペプチドまたはそれらの等価物の存在によって検出される、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

A C E の存在が、A C E またはそのフラグメントに対する抗体によって検出される、請求項 1 9 または請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

前記抗体が抗体 B B 9 である、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

幹細胞を単離する方法であって：

幹細胞を含む細胞集団を得る工程；

細胞上の A C E またはそのフラグメントの存在を検出する工程；

前記細胞上の A C E の存在によって同定されるそれらの細胞を選択する工程；

A C E の存在によって同定されたそれらの細胞を単離する工程と、を含む方法。

【請求項 2 4】

A C E が、配列番号 1 および / または配列番号 2 によってコードされるポリペプチドまたはそれらの等価物の存在によって検出される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

A C E の存在が、A C E またはそのフラグメントに対する抗体によって検出される、請求項 2 3 または 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

前記抗体が、抗体 B B 9 である、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記幹細胞が、造血幹細胞である、請求項 2 3 から 2 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 8】

10

20

30

40

50

請求項 14 から 18 のいずれか 1 項記載の方法によって調製される、幹細胞豊富化集団。

【請求項 29】

請求項 23 から 27 のいずれか 1 項記載の方法によって調製された幹細胞。

【請求項 30】

幹細胞含量を測定する方法であって、前記方法が：

幹細胞を含む細胞集団を得る工程；

A C E の指標を用いて細胞上の A C E またはそのフラグメントの存在を検出する工程；

細胞上に A C E 細胞またはそのフラグメントを有する選択する工程；および

選択前の前記細胞集団中の細胞の量に比較して選択した細胞を定量する工程、を含む方法

。

10

【請求項 31】

A C E またはそのフラグメントの指標が、A C E または配列番号 1 もしくは配列番号 2 によってコードされるポリペプチドに対する抗体である、請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

前記抗体が抗体 B B 9 である、請求項 30 または請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

請求項 28 記載の幹細胞豊富化集団を含む有効量の組成物を投与する工程を含む幹細胞関連症状を治療する方法。

【請求項 34】

前記幹細胞関連症状が、造血細胞、間葉細胞またはケラチノサイト関連症状を含む群から選択される、請求項 33 記載の方法。

20

【請求項 35】

造血幹細胞関連症状が、低レベルの造血幹細胞および再構築中の免疫不全宿主、サラセミア、鎌状細胞貧血、アデノシンデアミナーゼ欠損症、リコンビナーゼ欠損症、リコンビナーゼ調節遺伝子欠損症を含む群から選択される症状である、請求項 34 記載の方法。

【請求項 36】

前記間葉幹細胞関連症状が、(1) 急性傷害、異常な遺伝的発現または後天性疾患を通して損傷している間葉組織を再生させること；(2) 小アリコートの骨髄の除去、それらの間葉幹細胞の単離および損傷した組織部位へ MSC を送達するために適合する生体適合性担体と結合した MSC を用いての損傷した組織の治療によって、損傷した間葉組織を有する宿主を治療すること；(3) 様々な間葉組織を産生すること；(4) MSC 自己再生および分化拘束された間葉系統への分化に関係する増殖因子を検出および評価すること；(5) MSC 分化拘束および特定の間葉系統への分化を調節する阻害因子を検出および評価すること；および(6) 間葉細胞系統を発達させ、間葉組織の発達に関連する因子をアッセイすること、ならびに、欠落または損傷した骨格組織を再生すること、間葉幹細胞の活性化およびその後の分化後において自然な骨または粘性の架橋を作り出すように、補綴具または様々な三カルシウムもしくはヒドロキシアパタイトセラミックのビヒクルもしくは担体の多孔面上に単離した間葉幹細胞を付着させることを通して様々なプラスチック製または金属製補綴具の植え込みを強化すること、を含む群から選択される症状である、請求項 34 記載の方法。

30

40

【請求項 37】

幹細胞関連症状が、結合組織損傷の修復である、請求項 33 記載の方法。

【請求項 38】

幹細胞豊富化集団が、間葉幹細胞が豊富化している、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

ケラチノサイト幹細胞関連症状は熱傷である、請求項 34 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は特定細胞タイプ集団の同定に関し、特に造血幹細胞、間葉幹細胞およびケラチノ

50

サイト幹細胞を含む体性幹細胞における特定細胞タイプ集団の同定に関する。本発明は、また単離方法および該方法から派生する幹細胞の使用も提供する。

【背景技術】

【0002】

豊富化細胞集団を得るために特定の細胞タイプを同定することには極めて大きな利益がある。豊富化集団を入手できれば、特定細胞タイプをより明確に理解することができる、あるいは移植、遺伝子治療、白血病のような癌および乳癌を含む新生癌を含む疾患の治療、または組織および皮膚の修復術を含む様々な状況における使用にさえ提供でき得る。

【0003】

幹細胞ならびにそのような細胞の単離および同定は数多くの利点を提供する。これらの細胞は、制限なく分裂し、分裂して幹細胞または非可逆的に分化して新規のタイプの細胞を産生する細胞のどちらかを産生できる非最終分化細胞であると定義されている。単一タイプの細胞を発生させる幹細胞は単能性細胞と呼ばれる；多数の細胞タイプを発生させる幹細胞は多能性細胞と呼ばれる。

10

【0004】

幹細胞は、定義上はすべての自己再生組織中に存在する。これらの細胞は長寿命であると考えられており、細胞分裂に対して優れた能力を有し、最終的には定常状態組織のホメオスタシスを担うものである。幹細胞には以下のような数多くの特性がある：幹細胞は、超微細構造的および生化学的には余り分化されていない；幹細胞は大きな増殖能力を有し、長期間にわたる組織の維持および再生を担っている；幹細胞は、恐らくはその増殖能力を保存し、複製中に発生し得るDNAエラーを最小限に抑えるために、通常は「ゆっくりと分裂する」；幹細胞は創傷および一定の成長刺激に反応して増殖するように刺激することができる；幹細胞はしばしば(1)幹細胞から(2)TA細胞そして(3)最終的には分化細胞へのスキームにおいて一過性増幅細胞(「TA」)に相当する急速に増幅する細胞集団の極めて近傍に位置する；そして幹細胞は、通常はしっかり保護され高度に血管分布および神経分布した領域内で見いだされる。

20

【0005】

幹細胞の明確な同定は、体性幹細胞特異的な免疫学的または生化学的マーカーが知られていないので、これまで困難であった。幹細胞は通常「ゆっくりと分裂する」ので、同定方法が限定される。

30

【0006】

幹細胞は、遺伝子治療の重要な標的であり、挿入された遺伝子は幹細胞が移植された個体の健康を促進する。更に、幹細胞を単離できれば、幹細胞を骨髄または末梢血内の腫瘍細胞から精製し、骨髄抑制的または骨髄破壊的的化学療法後に患者に再注入する、リンパ腫および白血病、ならびに他の新生腫瘍状態の治療において役立つ。そこで、実質的に純粋な形で幹細胞を単離することに向けて世界的に努力が重ねられてきた。

【0007】

幹細胞は、多能性細胞の総数のほんのわずかなパーセンテージしか占めていない。多能性細胞は、様々な細胞表面マーカーの存在によって同定できる。そのようなマーカーは、特定の系統または前駆細胞に特異的であるか、または2つ以上の細胞タイプ上に存在することがある。現時点では、分化細胞に関連するどのくらいの数のマーカーが幹細胞上にも存在するのかが分かっていない。

40

【0008】

幹細胞である骨髄または末梢血中の細胞総数の比率が小さいこと、より分化した細胞と区別する幹細胞に関連するマーカーの不確定さ、および幹細胞を生物学的にアッセイする際の総合的な難しさのために、幹細胞の同定および精製はなかなか達成できなかった。

【0009】

体性幹細胞は、最終的には植物または動物の様々な部分に寄与する細胞を産性する。一般に、体細胞は造血幹細胞、間葉幹細胞またはケラチノサイト幹細胞に分裂できる。

【0010】

50

哺乳類造血細胞は、極めて広範囲の活動を担っている。それらはリンパ系、骨髄系および赤血球系を含む数種の系統に分裂する。B細胞およびT細胞を含むリンパ系統は、抗体を産生し、細胞免疫を調節し、血液中の病原微生物のような外来物質を検出する。単球、顆粒球、および巨核球を含む骨髄系統は、血液を異物について監視し、新生腫瘍細胞から保護し、異物を清掃し、血小板を産生する。赤血球系統には、酸素を運搬する赤血球が含まれる。

【0011】

造血幹細胞が相対的に少量であることは、一般に幹細胞および造血性分化に関する広範な研究を妨げてきた。造血幹細胞が豊富な細胞集団が入手し易くなれば、幹細胞挙動に影響を及ぼす生物学的修飾因子の同定が可能となり得る。例えば、これまでのところ(1)幹細胞が特定系統へ特定化する初期工程；(2)そのような特定化の防止；および(3)幹細胞増殖を制御する能力、に関連する成長因子については発見されていないと思われる。

10

【0012】

豊富化集団中で十分な数の幹細胞を入手できれば、例えば癌化学療法のような幹細胞を破壊する治療法を受けている患者において造血を再構築する際にも、極めて有用となり得る。

【0013】

間葉幹細胞(MSC)は、特に骨髄、血液、皮膚および骨膜中で見いだされる形成多能性細胞であり、サイトカインのような生理活性因子からの様々な影響によって、2つ以上の特定タイプの間葉または結合組織(すなわち、例えば脂肪、骨、間質、軟骨、弾性および線維性結合組織のような特殊な要素を支持する身体の組織)に分化できる。ヒト間葉幹細胞(hMSC)は、SH2、SH3およびSH4として知られる一定のモノクローナル抗体と反応する。

20

【0014】

ケラチノサイト幹細胞は、皮膚細胞および表皮の細胞を産生する。ケラチノサイト幹細胞は、潰瘍、急性創傷の治療および急性創傷に対する移植術において有用である。

【0015】

しかし、細胞表面マーカーによるこれらの特定細胞タイプの同定は、一般に最も優れた同定手段であることが証明されている。細胞表面抗原の更なる同定は、候補幹細胞の同定、単離および更なる特徴付けにおいて明らかに重要な価値がある。

30

【0016】

したがって、本発明の1つの目的は先行技術の問題の一部を克服または軽減することである。

【0017】

発明の開示

本発明の1つの態様では、幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

配列L F Q E L Q P L Y L (配列番号1)を有するペプチド配列またはその等価物の存在を検出する工程；および

該配列またはその等価物を有する幹細胞を同定する工程、を含む方法が提供される。

40

【0018】

本発明のまた別の態様では、幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

配列E A D D F F T S (配列番号2)を有するペプチド配列またはその等価物の存在を検出する工程；および

該配列またはその等価物を有する幹細胞を同定する工程、を含む方法が提供される。

【0019】

ここで配列番号1または配列番号2と記載するペプチド配列は、幹細胞上で特異的に発現することが見いだされている。該配列は、大きなタンパク質の一部または幹細胞によって発現した1配列であってよい。これらの配列は、幹細胞を同定または単離するために単

50

独で、または組み合わせて使用することができる。

【0020】

本出願人は、アンジオテンシン変換酵素（ACE）が幹細胞中で発現することを見いだした。ACEは、アンジオテンシン-Iからアンジオテンシン-IIへの変換において作用する。アンジオテンシン-IIは血圧を上昇させ、本態性高血圧の主因であると見なされている。ここに記載する配列はACEの一部であってよい。

【0021】

したがって、本発明のまた別の態様では、幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

細胞上のアンジオテンシン変換酵素（ACE）またはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

ACEまたはそのフラグメントを有する幹細胞を同定する工程、を含む方法が提供される。

【0022】

ACEを同定するあらゆる手段を使用できる。しかし、本発明の好ましい態様では、幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

該サンプルをアンジオテンシン変換酵素（ACE）に対する抗体と結合させる工程；

ACEまたはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

該幹細胞上の該抗体の存在を検出することによりACEを有する幹細胞を同定する工程、を含む方法が提供される。

【0023】

好ましくは、該抗体はACEに対して特異的ないずれかの抗体である。本発明に使用する抗体は、ACEまたはACEを表示するそのフラグメントに特異的に結合するための十分な特異性を保持している、天然または組み換え、合成または天然由来の、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであるあらゆる抗体またはそのフラグメントを含んでいる。好ましくは、該抗体はBB9ACE抗体である。

【0024】

本発明は更にまた、幹細胞が豊富な細胞集団を得るための方法であって：

幹細胞を含む細胞集団を得る工程；

細胞上のACEまたはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

該細胞上のACEの存在によって同定される細胞を選択する工程、を含む方法を含んでいる。

【0025】

本発明の好ましい態様では、造血幹細胞が豊富な細胞集団を得るための方法であって：

幹細胞を含む細胞集団を得る工程；

該細胞集団をACEに対する抗体と結合させる工程；および

該細胞上のACEの存在によって同定される細胞を選択する工程、を含む方法が提供される。

【0026】

同様に、また別の好ましい実施形態では、集団から幹細胞を除去する方法であって：

幹細胞を含む細胞集団を得る工程；

細胞上のACEまたはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

該細胞上のACEの存在によって同定されるそれらの細胞を選択して除く工程、を含む方法が提供される。

【0027】

本明細書に記載する方法は、細胞集団から幹細胞を単離するため、またはそのような集団中の幹細胞含量を測定するためにも使用できる。

【0028】

幹細胞が単離または同定されると、それらは幹細胞関連症状を治療または診断する方法に

において使用できる。

【0029】

好ましくは、単離される幹細胞は造血幹細胞、間葉幹細胞またはケラチノサイト幹細胞である。しかし、神経細胞、幹細胞および隣細胞もまた含むことができよう。最も好ましくは、該幹細胞は造血幹細胞である。

【0030】

幹細胞集団が単離されると、また別の単離方法を使用して該幹細胞を含む小集団を単離することができる。間葉またはケラチノサイト細胞のための特異的マーカーを使用すると、様々な細胞系統を同定および単離することができる。

【0031】

発明を実施するための最良の形態

本発明の1つの態様では、幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

配列 L F Q E L Q P L Y L (配列番号1) を有するペプチド配列またはその等価物の存在を検出する工程；および

該配列またはその等価物を有する幹細胞を同定する工程、を含む方法が提供される。

【0032】

本発明の別の態様では、幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

配列 E A D D F F T S (配列番号2) を有するペプチド配列またはその等価物の存在を検出する工程；および

該配列またはその等価物を有する幹細胞を同定する工程、を含む方法が提供される。

【0033】

配列番号1または配列番号2とここで記載するペプチド配列は、幹細胞上で特異的に発現することが見いだされている。該配列は、大きなタンパク質の一部または幹細胞によって発現した1配列であってよい。

【0034】

本明細書で使用する用語「等価物」とは、類似の方法であるが該配列の活性または機能を実質的には変化させない欠失、追加または置換を有し得る配列を意味する。このため、該配列の機能性を実質的に変化させずに少なくとも1つのアミノ酸が該ペプチド配列内に欠失していても、追加されても、または置換されてもよい。そこで、変異を有する該ペプチド配列は該幹細胞を同定するために依然として検出可能なはずである。

【0035】

本発明のまた別の態様では、幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

細胞上のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) またはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

ACE またはそのフラグメントを有する幹細胞を同定する工程、を含む方法が提供される。

【0036】

本出願人らは、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) が幹細胞中で発現することを見いだした。ACE はアンジオテンシン - I からアンジオテンシン - II への変換において作用する。アンジオテンシン - II は血圧を上昇させ、本態性高血圧の主因であると見なされている。

【0037】

ペプチジルジペプチダーゼ A (EC 3.4.15.1) およびキナーゼ II とも呼ばれる ACE は、メタロペプチダーゼ、より詳細にはアンジオテンシンや例えばブラジキニン等のキニン類のような生物学的に活性なポリペプチドを加水分解する亜鉛ペプチダーゼである。ブラジキニンは、少なくとも一部には血管拡張剤であるプロスタグランジンを誘発することによって作用し、ACE による加水分解で不活性化される血管拡張剤である。そこ

10

20

30

40

50

で、ACEは少なくとも一部には血管収縮薬であるアンジオテンシンIIを産生することによって、血管拡張薬であるブラジキニンを不活性化させることによって血圧を上昇させる。ブラジキニンは、更にまた疼痛および炎症反応の媒介を含む他の生物活性にも関係している。

【0038】

しかし、この酵素は以前は幹細胞にもそれらの同定にも関連付けられていなかった。

【0039】

ACEまたはそのフラグメントは、幹細胞上で検出されることがある。好ましくは、ACE分子が検出される。しかし、ACE分子のフラグメントもまたACEの性質を示すことがある。このようなフラグメントには、配列番号1または配列番号2またはそれらの等価物によってコードされる配列を有するペプチド配列が含まれることがある。

10

【0040】

本出願人は、配列番号1および配列番号2がACEアミノ酸配列内で見いだされ、引き続いてACE抗体によって同定されることを見いだした。

【0041】

本明細書の説明および請求項を通して、用語「含む(comprise)」および例えば「含んでいる(comprising)」および「含む(comprises)」のようなこの用語の変形は、他の添加物、構成要素、完全体または工程を排除することを意図していない。

【0042】

本発明の幹細胞およびここに記載した幹細胞には、無制限に分裂することができ、1つまたは数種の細胞タイプを産生することのできる、胚または成体中の本質的に未分化の細胞である、すべての幹細胞が含まれる。本発明の幹細胞には体性幹細胞が含まれるがそれらに限定しないことが好ましい。これらは造血幹細胞、間葉幹細胞、ケラチノサイト幹細胞、神経細胞、肝細胞および膵細胞を含む群から選択することができる。最も好ましくは、肝細胞はリンパ系統、骨髄系統または赤血球系統の幹細胞へ分化することのできる造血幹細胞である。しかし、本出願人は本方法が間葉幹細胞とケラチノサイト幹細胞とを区別するためにも有用であることを見いだした。

20

【0043】

幹細胞のサンプルは、胚起源または成体起源を含むあらゆる起源に由来してよい。好ましくは、幹細胞源は腸骨稜、脛骨、大腿骨、脊椎、骨膜、骨内膜またはその他の骨小腔を含む骨髄、血液、胚卵黄嚢、胎児肝、脾臓、末梢血液、皮膚、真皮、肝、脳、膵臓または腎臓からである。

30

【0044】

サンプルは、組織サンプルまたは細胞懸濁液または幹細胞を同定するためにACEに対するマーカーの相互作用を許容するインビトロで増殖させたいずれかの起源に由来する細胞であってよい。

【0045】

骨髄を単離するためには、胎児ウシ血清(FCS)またはその他の天然に存在する因子を一般には約5~25mMの低濃度にて、許容できる緩衝液とともに適宜補給した食塩液を含むがそれに限定されない適切な溶液を使用して骨をフラッシュ洗浄することができる。好適な緩衝液には、HEPES、リン酸緩衝液および乳酸緩衝液が含まれるが、それらに限定されない。または、骨髄は従来型技術によって骨から吸引することができる。

40

【0046】

ACEまたは特異的配列である配列番号1または配列番号2を検出する方法は、幹細胞を含むサンプルのタイプによるであろう。一般に、サンプルはマーカーと細胞との相互作用を促進するような方法でACEまたは配列に対するマーカーに暴露される、またはそれらと結合させられる。例えば、サンプルが血液サンプル中と同様に細胞懸濁液である場合は、マーカーは細胞懸濁液へ単純に添加すればよい。これは、マーカーがACEまたは該配列を物質的に同定することが意図される場合に適用できる。

【0047】

50

A C E または該配列に対するマーカーには、A C E または該配列を同定するあらゆる手段が含まれてよいが、好ましくは細胞表面上で A C E または該配列を同定するマーカーであり、A C E または該配列に対する抗体、A C E または該配列に対するアゴニストおよびアンタゴニスト、D N A、R N A、m R N A または A C E タンパク質いずれかの存在によって A C E または該配列の発現を検出できる核酸検出系、および A C E に対する酵素アッセイ、蛍光アッセイまたは比色定量アッセイを含むがそれらに限定されない。検出方法は、選択されるマーカーのタイプにより、当業者には明白であろう。

【0048】

該マーカーには、該マーカーの同定を強化するための標識を添加することができる。例えば、検出を強化するために当業者が熟知している蛍光、放射性または酵素マーカーを該マーカーへ結合させることができる。

10

【0049】

本発明の好ましい態様では、幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含む細胞サンプルを得る工程；

該サンプルをアンジオテンシン変換酵素（A C E）に対する抗体と結合させる工程；

A C E またはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

該幹細胞上の該抗体の存在を検出することにより A C E を有する幹細胞を同定する工程、を含む方法が提供される。

【0050】

好ましくは、該抗体は A C E に対して特異的ないずれかの抗体である。本発明において使用する抗体には、A C E または A C E を表示するそのフラグメントに特異的に結合するための十分な特異性を保持している、天然または組み換え、合成または天然由来の、モノクローナルまたはポリクローナルいずれかであるあらゆる抗体またはそのフラグメントが含まれる。本明細書で使用する用語「抗体」または「複数の抗体」には、抗体全体およびその機能的部分を含有する抗体フラグメントが含まれる。用語の「抗体」には、それに対して抗体全体が結合特異性を有するエピトープへの結合を可能とするために、軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域の十分な部分から構成されるあらゆる単一特異性または二重特異性化合物が含まれる。フラグメントは、少なくとも1つの重鎖または軽鎖免疫グロブリンペプチドの可変領域を含むことができ、F a b フラグメント F ( a b )<sub>2</sub> フラグメント、および F v フラグメントが含まれるが、それらに限定されない。

20

30

【0051】

組み換え抗体は、当該分野において既知のあらゆる組み換え手段によって製造することができる。このような組み換え抗体には、定常領域の大部分がヒト抗体定常領域によって置換されている細菌および非ヒト抗体中で生成するフラグメントが含まれるが、それらに限定されない。更に、このような「ヒト化」抗体は、組み換え抗体を発現させるために遺伝子操作された宿主脊椎動物によって入手できる。

【0052】

更に、単一特異性ドメインは、当該分野において既知のいずれかの方法によって別の適切な分子化合物へ付着させることができる。この付着は、例えば化学的であっても、または遺伝子操作によってでもよい。

40

【0053】

抗体は、酵素、磁性ビーズ、コロイド状磁性ビーズ、ハプテン、蛍光色素、金属化合物、放射性化合物または薬物を含むがそれらに限定されない他の適切な分子および化合物へ結合させることができる。抗体に結合させることのできる酵素には、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼおよびガラクトシダーゼが含まれるが、それらに限定されない。抗体に結合させることのできる蛍光色素には、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、フィコエリトリン、アロフィコシアニンおよびテキサスレッドが含まれるが、それらに限定されない。抗体に結合させることのできる追加の蛍光色素については、H a u g l a n d R . P . の「分子プローブ：蛍光プローブおよび研究用化学薬品のハンドブック（1992 - 1994）」（Molecular

50

Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, (1992-1994)」を参照されたい。抗体に結合させることのできる金属化合物には、フェリチン、コロイド状金、および特にコロイド状超磁性ビーズが含まれるが、それらに限定されない。抗体に結合させることのできるハプテンには、ピオチン、ジゴキシゲニン、オキサザロン、およびニトロフェノールが含まれるが、それらに限定されない。抗体に結合させることのできる、または抗体内に組み込むことのできる放射性化合物は当該分野において知られており、テクネチウム<sup>99m</sup>、<sup>125</sup>I、ならびに<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>Hおよび<sup>35</sup>Sを含むがそれらに限定されない。いずれかの放射性核種を含むアミノ酸を含むが、それらに限定されない。

【0054】

A C E 抗体は、抗体またはそれらの機能的部分を産生するために当該分野において既知の方法によって入手できる。使用した特定方法はここに提示した実施例の項に記載したが、抗体産生の当該分野において既知のあらゆる方法を使用できる。このような方法には、所望の特異性をもつ細胞表面抗体を用いてB細胞を分離する方法、軽鎖および重鎖の可変領域を発現するDNAをクローン化する方法、および適切な宿主細胞中で組み換え遺伝子を発現させる方法が含まれるが、それらに限定されない。抗体が不死化抗体産生ハイブリドーマ細胞から得られる、標準的なモノクローナル抗体生成法を使用できる。これらのハイブリドーマは、動物を幹細胞により免役し、好ましくは免役した宿主脾臓から単離した免疫動物からのBリンパ球を、好ましくはB細胞骨髄腫である適合性不死化細胞と融合させることによって産生させることができる。

【0055】

A C E 抗体はいずれの起源からも入手できる。A C E 抗体は市販で入手できる。効率的には、細胞上のA C E の存在を検出するあらゆる手段は本発明の範囲内に含まれる。

【0056】

本発明のまた別の好ましい態様では、幹細胞を同定する方法であって：

幹細胞を含むサンプルを得る工程；

該サンプルをアンジオテンシン変換酵素(A C E)に対して特異的な抗体B B 9と混合する工程；

B B 9またはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

該幹細胞上の抗体B B 9の存在を検出することにより幹細胞を同定する工程、を含むが方法が提供される。

【0057】

モノクローナル抗体(M A b)であるB B 9は、本出願人らによって、ヒト成人骨髄(B M)中の単核球の小さな小集団である間質細胞への結合およびそれに対応する末梢血(P B)中の白血球との反応性の欠如に基づいて同定された。B B 9は、高レベルのC D 3 4抗原およびT h y - 1発現、C D 3 8の低発現から発現欠如、ローダミン1 2 3の低残留およびK i 6 7を用いた標識の欠如によって証明される静止期状態を特徴とするB M C D 3 4<sup>+</sup>細胞の小さな小集団に結合した。C D 3 4<sup>+</sup>B B 9<sup>+</sup>細胞は、C D 3 4<sup>+</sup>B B 9<sup>-</sup>細胞とは対照的に、I L - 3、I L - 6、G - C S FおよびS C Fの組み合わせによって刺激された前C F U培養中で好ましくも造血を維持する能力を証明した。B B 9は更にまた、流動する末梢血(P B)からのC D 3 4<sup>+</sup>細胞へ結合することも証明した。

【0058】

B B 9は、初期抗体スクリーニング中には成人B Mおよび末梢血(P B)中の単核球への結合の欠如によって、引き続いてのフローサイトメトリー解析ではB M C D 3 4<sup>+</sup>細胞の小さな小集団への結合によって同定された。これらの細胞は、間質細胞を含まない液体培地中で長期間の造血を維持すること、そして表現型解析により初期造血前駆細胞(H P C)に特徴的なマーカーを発現することが証明されている。

【0059】

この抗体の単離については、実施例の中で詳細に記載した。

【0060】

B B 9は、好ましくは造血幹細胞を同定するために使用される。しかし本出願人らは、B

B 9 が間葉幹細胞およびケラチノサイト幹細胞を同定するために有用であることを見いだした。

【0061】

ここに概説した方法は、細胞集団から幹細胞を同定するために特に有用である。しかし、幹細胞全般の集団内で更に小集団を区別するためには追加のマーカーを使用できる。

【0062】

例えば、間葉幹細胞は更に S T R O - 1、S H 2、S H 3 および S H 4 を含むがそれらに限定されないマーカーによって同定できる。これらのマーカーは、間葉幹細胞を同定するために単独で、または組み合わせて使用できる。

【0063】

ケラチノサイト幹細胞は、サイトケラチン 1 4、 - 6 インテグリン ( C D 4 9 F ) および C D 7 1 を含むがそれらに限定されないマーカーによって同定できる。これらのマーカーは、ケラチノサイト幹細胞を同定するために単独で、または組み合わせて使用できる。

【0064】

追加のマーカーを使用する工程は、単独で、または A C E マーカーと組み合わせて適用できる。

【0065】

本発明のまた別の態様では、幹細胞が豊富な細胞集団を得るための方法であって：

幹細胞を含む細胞集団を得る工程；

細胞上の A C E またはそのフラグメントの存在を検出する工程；および

該細胞上の A C E の存在によって同定される細胞を選択する工程、を含む方法が提供される。

【0066】

そこで本発明には、集団の幹細胞を豊富化する方法が含まれる。これらの方法には、幹細胞の混合物と、好ましくは該抗体が A C E に結合することを許容する条件下で A C E を認識かつ結合する抗体とを混合する工程、および実質的に幹細胞が豊富である集団を得るために該抗体によって認識された細胞を分離する工程が含まれる。しかし、上記のような A C E の他の形態の同定方法も使用できる。これらの方法は、サンプル中で幹細胞の数についての診断アッセイとして使用できる。細胞および抗体は、該抗体が A C E およびその後定量される幹細胞へ特異的に結合するのを許容するために十分な条件下で混合され、定量化される。幹細胞は単離、または更に精製できる。

【0067】

上記のように、細胞集団は上記のようなサンプルを含むいずれかの幹細胞起源から入手できる。

【0068】

A C E の存在の検出は、細胞上の A C E を同定するいずれかの方法で実行できる。好ましくは、検出は A C E に対するマーカーの使用による。A C E に対するマーカーは、上記のマーカーのいずれかであってよい。しかし、A C E に対する抗体は、A C E に対するマーカーとして特に有用である。より好ましくは、該抗体は B B 9 である。

【0069】

上記のように、A C E または A C E のフラグメントを検出できる。好ましくは、A C E の全分子が検出される、または配列番号 1 または配列番号 2 に対応するフラグメントまたはその等価物を検出できる。

【0070】

最初に分化拘束された系統の細胞を除去することによって細胞を分離または豊富化するために様々な技術を使用できる。モノクローナル抗体は、細胞系統および/または分化工程を同定するために特に有用である。抗体は、粗分離のために固体支持体へ付着させることができる。使用される分離方法は、収集される分画の生存度の保持率を最大化しなければならない。「比較的粗雑な」分離を得るために、種々の有効性を有する様々な方法を使用できる。使用される特定方法は、分離の有効性、関連する細胞毒性、実施の容易さおよ

10

20

30

40

50

び速度、ならびに高性能の装置および/または専門技術の必要性による。

【0071】

分離または豊富化のための方法には、抗体コーティング磁性ビーズを使用した磁気分離、親和性クロマトグラフィー、相補体およびサイトトキシンを含むがそれらに限定されないモノクローナル抗体に結合した、またはモノクローナル抗体と一緒に使用される細胞毒性物質、および例えばプレートのような個体基質に付着した抗体を用いての“パンニング”、エルトリエーションまたはいずれか他の好都合な方法が含まれることができるがそれらに限定されない。

【0072】

分離または豊富化の方法の使用には、物理的特性（密度勾配遠心分離および向流遠心分離エルトリエーション）、細胞表面特性（レクチンおよび抗体親和性）、および生体染色特性（ミトコンドリア結合色素であるrho123およびDNA結合色素であるヘキスト33342）における差に基づく方法が含まれるがそれらに限定されない。

【0073】

正確な分離を提供する方法には、例えば複数のカラーチャンネル、低角度および鈍角散乱光検出チャンネル、インピーダンスチャンネル等のような様々な洗練度を有するFACSが含まれるがそれに限定されない。

【0074】

典型的には約 $1 \times 10^{8-9}$ 、好ましくは約 $5 \times 10^{8-9}$  cellsで開始する最初の分離では、ACE抗体は1つの蛍光色素を用いて標識できるが、他方様々な分化拘束された系統に対する抗体は少なくとも1つの相違する蛍光色素と結合させることができる。これらの系統の各々は別個の工程で分離できるが、望ましくはこれらの系統は、1つはACEおよび/または他の幹細胞マーカーに対してポジティブに選択されるように同時に分離される。これらの細胞は、死細胞（ヨウ化プロピジウム（PI）を含むがそれに限定されない）と関連する色素を使用することによって、死細胞に対して選択することができる。好ましくは、これらの細胞は2%のFCSを含む培地中で収集する。

【0075】

本発明にとって分離の特定順序は不可欠ではないと考えられるが、ここに指示した順序が好ましい。好ましくは、細胞は最初に粗分離によって分離され、その後ACE抗体を用いたポジティブ選択を用いて微細分離が行われる。

【0076】

本発明の好ましい態様では、造血幹細胞が豊富な細胞集団を得るための方法であって：  
幹細胞を含む細胞集団を得る工程；  
該細胞集団をACEに対する抗体と混合する工程；および  
該細胞上のACEの存在によって同定される細胞を選択する工程、を含む方法が提供される。

【0077】

好ましくは、該抗体はBB9である。しかし、ACEに対する他の抗体も同等に有効となり得る。細胞を単離するために抗体を使用するあらゆる分離法を利用することができ、これらの方法は当業者によく知られている。

【0078】

いずれかの細胞集団を更に豊富化させるためには、それらの細胞集団に対する特異的マーカーを使用できる。例えば、STRO-1、SH2、SH3およびSH4を含むがそれらに限定されない間葉細胞に対する特異的マーカーは、これらの細胞について、またはそれらに反して豊富化するために使用できる。

【0079】

同様に、サイトケラチン14、-6インテグリン（CD49F）およびCD71を含むがそれらに限定されないケラチノサイト幹細胞に対する抗体特異的マーカーはそれらの細胞について、またはそれらに反して豊富化するために使用できる。

【0080】

10

20

30

40

50

これらのマーカーは、更にまた間葉幹細胞またはケラチノサイト幹細胞を除去または選択して除くことによって造血幹細胞を豊富化するためにも使用できる。

【0081】

同様に、また別の好ましい実施形態では、集団から幹細胞を除去する方法であって：  
幹細胞を含む細胞集団を得る工程；  
細胞上のACEまたはそのフラグメントの存在を検出する工程；および  
該細胞上のACEの存在によって同定されるそれらの細胞を選択して除く工程、を含む方法が提供される。

【0082】

豊富化と同一方法で、実質的に幹細胞を含まない集団を提供するためにACEの使用は逆転させることができる。ACEを発現する細胞を選択するために上記で使用した方法は、幹細胞を選択して除き幹細胞が除去された集団を残すために使用できる。

【0083】

好ましくは、ACEはACEまたはそのフラグメントに対する抗体を使用することによって検出される。該フラグメントは、配列番号1または配列番号2またはそれらの等価物によってコードすることができる。好ましくは、該抗体はBB9である。

【0084】

上記に記載した方法には、更にまた他の幹細胞特異的マーカーに対するポジティブ選択による細胞の豊富化工程を含むことができる。適切なポジティブ幹細胞マーカーには、CD34<sup>+</sup>、Thy-1<sup>+</sup>、およびc-キット<sup>+</sup>が含まれるがそれらに限定されない。好ましくは、幹細胞はヒト由来であるが、いずれかの適切な動物に由来することができる。特定因子を用いての適切な選択ならびに幹細胞の自己再生およびそれらのマーカーについての幹細胞のスクリーニングを許容するバイオアッセイの開発によって、様々な目的のために、生育可能な幹細胞が豊富な組成物を製造することができる。

【0085】

本発明のまた別の態様では、幹細胞を単離する方法であって：  
幹細胞を含む細胞集団を得る工程；  
細胞上のACEまたはそのフラグメントの存在を検出する工程；および  
該細胞上のACEの存在によって同定されるそれらの細胞を選択する工程；および  
ACEの存在によって同定されたそれらの細胞を単離する工程、を含む方法が提供される。

【0086】

該幹細胞は、該幹細胞を単離する追加の工程を提供することにより、上記のような豊富化のために使用される方法のいずれかによって単離できる。有用な方法には、抗体コーティング磁性ビーズを使用した磁気分離、親和性クロマトグラフィー、相補体およびサイトトキシンを含むがそれらに限定されないモノクローナル抗体に結合した、またはモノクローナル抗体と一緒に使用される細胞毒性物質、および例えばプレートのような個体基質に付着した抗体を用いての「パンニング」、エルトリエーションまたはいずれか他の好都合な方法が含まれる。当業者は、これらの方法に習熟しており、ACEが選択されることを提供するいずれかの既知の方法を使用できる。

【0087】

別の好ましい態様では、幹細胞を単離する方法であって：  
幹細胞を含む細胞集団を得る工程；  
該細胞集団をACEに対する抗体と混合する工程；  
ACEに対する抗体によって同定されたそれらの細胞を選択する工程；および  
該抗体によって同定されたそれらの細胞を単離する工程、を含む方法が提供される。

【0088】

好ましくは、該抗体はBB9である。しかし、ACEに対して特異的である現在入手可能なあらゆる抗体を使用できる。

【0089】

好ましくは、単離された該幹細胞は造血幹細胞、間葉幹細胞またはケラチノサイト幹細胞である。しかし、神経細胞、幹細胞および隣細胞もまた含むことができよう。最も好ましくは、該幹細胞は造血幹細胞である。

【0090】

幹細胞集団が単離されると、また別の単離方法を使用して該幹細胞を含む小集団を単離することができる。上記の間葉またはケラチノサイト細胞のための特異的マーカーを使用すると、様々な細胞系統を同定および単離することができる。

【0091】

また別の態様では、ここに記載した方法によって単離された幹細胞が提供される。好ましくは、該幹細胞は造血幹細胞、間葉幹細胞および/またはケラチノサイト幹細胞である。最も好ましくは、該幹細胞は造血幹細胞である。

10

【0092】

本発明は、更にまた別の態様では幹細胞が豊富な組成物を提供する。好ましくは、該豊富化幹細胞は豊富な造血幹細胞、間葉幹細胞またはケラチノサイト幹細胞を含む。

【0093】

組成物が幹細胞豊富である場合は、これらは自家移植片に使用できる。更に、自家幹細胞を使用すれば移植片対宿主疾患を回避し得る。更に、これらの細胞は遺伝的欠陥を修正するため、または幹細胞または、個体または幹細胞全般のいずれかに関し、それらの子孫において天然に欠如している遺伝的能力を提供するために、適切な遺伝子導入によって修飾できる。更に、該幹細胞組成物を使用すると、それらの再生および分化に関連する因子を単離かつ定義することができる。

20

【0094】

本発明のまた別の態様では幹細胞含量を測定する方法であって：

幹細胞を含む細胞集団を得る工程；

A C E の指標を用いて細胞上の A C E またはそのフラグメントの存在を検出する工程；

A C E を有する細胞または細胞上のそのフラグメントを選択する工程；および

選択前の該細胞集団中の細胞の量に比較して選択した細胞を定量する工程、を含む前記方法が提供される。

【0095】

本発明のまた別の好ましい態様では、幹細胞含量を測定する方法であって：

30

幹細胞を含む細胞集団を得る工程；

該細胞集団を A C E に対する抗体と混合する工程；

A C E に対する抗体によって同定されたそれらの細胞を選択する工程；および

選択前の該細胞集団中の細胞の量に比較して A C E 抗体を使用して選択した細胞の量を定量する工程、を含む前記方法が提供される。

【0096】

選択した幹細胞の量を定量する工程は、白血病、癌または肉腫または一般感染症を含むがそれらに限定されない症状であり、特に造血幹細胞集団、より特別にはそれらの集団のリンパ系統における幹細胞の活性の上昇を惹起し得る症状を診断する手段を提供する。特に、その定量は抗体の産生、細胞免疫系の調節、血液中の外来物質の検出、宿主にとって異質である細胞の検出等を提供する、リンパ系統から分化する B 細胞および T 細胞の表示を提供することができる。単球、顆粒球、巨核球ならびにその他の細胞が含まれる骨髄系統は、血流中の異物の存在を監視し、新生細胞に対する保護を提供し、血流中の外来物質を清掃し、血小板を産生する等をする。赤血球系統は、酸素担体として機能する赤血球を提供する。

40

【0097】

本発明の更にまた別の態様では、集団中の幹細胞を検出するための組成物が提供されるが、前記組成物は A C E またはそのフラグメントの指標および担体を含む。

【0098】

A C E の指標は、幹細胞上の A C E を同定できるいずれかの検出手段を含むことができる

50

。好ましくは、該指標はACEまたはそのフラグメントに対する抗体である。好ましくは、該抗体は上記のとおりであり、BB9であってよい。

【0099】

該抗体は、ACEの全分子を検出できる、またはACE内に含有される特異的ペプチド配列を検出できる。好ましくは、該抗体は配列番号1または配列番号2またはそれらの等価物を検出し得る。

【0100】

該組成物は、更に間葉細胞とケラチノサイト細胞を識別するための追加のマーカールを含むことができる。間葉幹細胞のためには、追加のマーカールはSTR0、SH2、SH3またはSH4を含むがそれらに限定されない群から選択されるいずれかのマーカールを含むことができる。ケラチノサイト幹細胞のためには、マーカールはサイトケラチン14、-6インテグリン(CD49F)およびCD71を含むがそれらに限定されない群から選択できる。

10

【0101】

本発明は、細胞集団における幹細胞タイプの存在を同定することにより幹細胞に関連する症状を診断する方法を提供する。例えば、造血幹細胞のレベルの上昇または減少は血液中の異常を表示し得る。これは、白血病のような疾患において重要なことがあり、同様に、上昇は、感染症を意味するT細胞およびB細胞を含むリンパ系統へ分化する幹細胞の上昇であると言い換えることができる。その他の方法は、白血病または他の悪性腫瘍上のACE発現を測定することができる。

20

【0102】

本発明のまた別の態様では、幹細胞の豊富化集団を含む有効量の組成物を投与する工程を含む幹細胞関連症状を治療する方法が提供されるが、このとき前記幹細胞は該症状に関連しており、前記幹細胞の豊富化集団はここに記載した方法によって調製する。

【0103】

本明細書で使用する「幹細胞関連症状」とは、幹細胞との相互作用の結果として生じるあらゆる症状を意味する。

【0104】

ここに記載した方法によって単離された幹細胞を含む本発明の組成物は、多数の方法で利用できる。

30

【0105】

造血幹細胞については、これらの細胞は照射を受けた宿主および/または化学療法を受ける宿主のような免疫不全の宿主を十分に再構築するために；またはエリスロポエチン、GM-CSF、G-CSFもしくはM-CSFのようなコロニー刺激因子、IL-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8等のようなインターロイキン等を含むがそれらに限定されない多数の因子、または特定系統へと分化拘束される幹細胞に関連する間質細胞、もしくはそれらの増殖、成熟および分化とともに用いて、それらの成熟、増殖および1つもしくは2つ以上の選択される系統への分化を提供することによって特定系統のための細胞起源として使用できる

【0106】

造血幹細胞は更にまた、造血細胞の分化および成熟に関連する因子の単離および評価に使用することができる。そこで、本発明は条件培地のような培地の活性を決定するため、または細胞増殖活性、特定系統の分化拘束の関与等について液体を評価するための造血幹細胞の使用を含んでいる。

40

【0107】

造血幹細胞は、遺伝病の治療に使用することができる。そこで、本発明は遺伝的欠陥を修正するための自家または同種異系の幹細胞の遺伝的修飾による造血細胞に関連する遺伝病の治療を含んでいる。例えば、サラセミア、鎌状細胞貧血、アデノシンデアミナーゼ欠損症、リコンビナーゼ欠損症、リコンビナーゼ調節遺伝子欠損症等を含むがそれらに限定されない疾患は、相同的またはランダム組み換えのいずれかにより、造血幹細胞内への野

50

生型遺伝子の導入によって修復することができる。

【0108】

遺伝子療法のその他の応用は、化学療法中に選択的圧力に曝される正常幹細胞にとって利するように、薬剤耐性遺伝子を導入することである。適切な薬剤耐性遺伝子には、多剤耐性(MDR)タンパク質をコードする遺伝子が含まれるがそれに限定されない。

【0109】

造血細胞に関連する疾患以外の疾患もまた遺伝的修飾によって治療でき、該疾患はホルモン、酵素、インターフェロン、成長因子等を含むがそれらに限定されない特定分泌産物の欠如に関連する疾患である。適切な開始調節領域を使用することによって、不足するタンパク質の誘導産生を達成することができるので、たとえ通常はそのようなタンパク質を産生する細胞タイプとは相違する細胞タイプにおける産生であっても、該タンパク質の産生は自然産生と平行し得る。特定遺伝子産物または疾患、特に血液リンパ親和性疾患への罹病性を抑制するためにリボザイム、アンチセンスまたはその他のメッセージを挿入することも可能である。

10

【0110】

追加の態様では、本発明は治療および/または診断目的で本発明の方法によって同定および単離または豊富化されたヒト間葉幹細胞を利用する様々な方法に向けられる。例えば、ヒト間葉幹細胞は：(1)急性傷害、異常な遺伝的発現または後天性疾患を通して、損傷している間葉組織を再生させること；(2)小アリコートの骨髄の除去、それらの間葉幹細胞の単離および損傷した組織部位へMSCを送達するために適合する生体適合性担体と結合したMSCを用いて損傷した組織を治療することによって、損傷した間葉組織を有する宿主を治療すること；(3)様々な間葉組織を産生すること；(4)MSC自己再生および分化拘束された間葉系統への分化に関係する増殖因子を検出および評価すること；(5)MSC分化拘束および特定の間葉系統への分化を調節する阻害因子を検出および評価すること；および(6)間葉細胞系統を発達させ、間葉組織の発達に関連する因子をアッセイすること、において利用される。

20

【0111】

本発明は更にまた、欠落または損傷した骨格組織の再生のような結合組織障害を修正、または修飾するために、また、間葉幹細胞の活性化およびその後の分化後において自然な骨または粘性の架橋を作り出すように、補綴具または様々な三カルシウムもしくはヒドロキシアパタイトセラミックのビヒクルまたは担体の多孔面上に単離した間葉幹細胞を付着させることを通して、様々なプラスチック製または金属製補綴具の植え込みを強化するために間葉幹細胞を利用する方法に向けられる。

30

【0112】

更に、本発明は骨髄移植中に造血細胞貯蔵量の割合を強化するために間葉幹細胞の複合移植片を使用することに向けられる様々な方法に関する。本発明の追加の実施形態は、造血幹細胞の蓄積を産生するための触媒として、ヌードマウスの皮下部位内へのような宿主内に植え込まれる間葉幹細胞の複合移植片およびセラミックを使用するための様々な方法に関する。

【0113】

別の態様では、本発明は結合組織損傷を修復させるための方法に関する。本方法は、修復に必要な結合組織のタイプへ細胞を分化させるために適切な条件下で、間葉幹細胞または前駆細胞を含有する抽出物を結合組織損傷の領域へ適用する工程を含む。

40

【0114】

間葉幹細胞を含有する本発明による組成物は、特に結合組織欠損の修復、再構築および/または再生を促進するために有用である。本明細書で使用する結合組織には、骨、軟骨、靭帯、腱、間質および筋肉が含まれる。結合組織欠損には、外傷、疾患、年齢、先天的欠損症、外科的介入術等に起因して発生することのある正常結合組織と比較したあらゆる損傷または不規則性が含まれる。本明細書で使用する結合組織欠損は、更にまた美容上の強化だけが望ましい非損傷領域にも適用される。ここに開示した方法および物質は、特に整

50

形外科、歯科、口腔顎顔面、歯周およびその他の外科手技において使用するために適合する。

【0115】

好ましい実施形態では、間葉幹細胞は使用前に培養によって増殖することができるが、培養増殖を行わずにそのような間葉幹細胞を使用することも可能である。例えば、間葉幹細胞は骨髄から取り出し、そこから血球を分離した後に増殖させずに使用することができる。したがって、例えば間葉幹細胞を使用した結合組織を修復するための外科処置中に、患者から骨髄を入手し、血球を除去してACE抗体を使用する単離によってヒト間葉幹細胞を豊富化させ、処置中に患者へ再導入することができる。本質的に血球を含んでいない間葉幹細胞を含有する骨髄由来細胞を使用すると、その後、患者の結合組織を修復することができる。

10

【0116】

結合組織を修復するためにヒト間葉幹細胞を送達するためには、様々なビヒクルを使用できる。該組成物は、新規の骨または軟骨形成のための嵩および足場を提供するために損傷組織のためのパッチとして設計することができる。本発明によるここに記載した様々な組成物、方法および物質は、骨折直後の修復、癒着不能骨折の修復を刺激するため、脊椎固定を促進するために使用できる。同様に、軟骨およびその他の筋骨格組織の修復も達成できる。脊椎固定術の場合は、このような組成物、方法および物質は後方では椎弓板および横突起に沿った質量固定を促進するため、器具を用いてまたは用いずに使用できる、前方では椎体間固定を促進するため、固定ケージを充填するために使用できる。

20

【0117】

本発明において単離されたケラチノサイトもまた熱傷を治療する際に使用するための体外培養のために；インスリン、レプチンを含むがそれらに限定されない治療薬を全身性送達するための遺伝子治療のためのビヒクルとして使用でき、またそれらは治療用途のために他の組織へと再プログラミングできる幹細胞起源としても使用できる。

【0118】

文献、作用、物質、装置、製品等の考察は、本発明の内容を提供する目的でのみ本明細書に含まれている。これらのいずれかまたはすべてが本出願の各請求項の優先日前にオーストラリアに存在しており、先行技術の基礎の一部を形成し、または本発明に関連する分野における共通の一般知識であったとは示唆されても意味されてもいない。

30

【0119】

下記では、本発明に使用した方法の実施例についてより十分に説明する。しかしながら、以下の説明は例示だけを目的としており、決して上記に記載した本発明の一般性に対する制限であると見なすべきではないと理解されなければならない。

【実施例】

【0120】

実施例 1

BB9抗体の単離および特性付け

(a) 骨髄および末梢血からの細胞の単離

骨髄は、王立アデレード病院のヒトを対象とした治験審査委員会によって承認された手順書にしたがって、インフォームド・コンセントを得た後に健常人の胸骨および後腸骨稜から保存剤を含まないヘパリン中へ吸引した。骨髄単核球(BMMNC)は、フィコール(リンホプレップ、1.077g/dL; Nycomed Pharma AS、オスロ、ノルウェー)で400gで遠心分離し、20mmol/LのHEPES、pH7.35および5%の胎児ウシ血清(FCS; PA Biologicals、シドニー、ニュー・サウス・ウェールズ州、オーストラリア)を補給した4のHHF(ハンクス平衡塩類溶液)(HBSS; Gibco/BRL、グレンウェイパリー、ビクトリア州、オーストラリア)中での遠心分離により2度洗浄した後に単離した。

40

【0121】

流動する末梢血(PB)を採取し、前述したとおりに凍結保存した[17]。細胞は、使

50

用時まで液体窒素中に保存した。免疫標識およびセルソーティング（細胞選別）の実施日に、細胞のアンブルを37℃で急速解凍した。細胞が解凍したら、それらは直ちに10 mL解凍液（2%のBSA、10 mMのクエン酸および50 kunitz単位/mLのDNA分解酵素を補給したHBSS）を含有する丸底管（Falcon 2059; Becton Dickinson、リンカーンパーク、ニュージャージー州）中へ移した。細胞を室温で10分間放置し、その後で遠心してHHF中で2度洗浄した。非生存物質を除去するために、上記のとおりフィコールで遠心分離した後に単離した。本試験では2コホートの患者からの細胞を使用し、それらは7 mg/m<sup>2</sup>の用量での高用量シクロホスファミド（HDC）にG-CSF（アフエレーシスが完了するまで第2日から5 µg/kgを1日1回皮下注射）を加えたものおよびHDCにGM-CSF（同様にアフエレーシスが完了するまで第2日から5 µg/kg/日でsc）を加え流動させたものである[18]。

#### 【0122】

末梢血白血球（PBL）は、健常人ドナーPBから単離して保存料を含まないヘパリン中へ単離した。手短には、予備加温したペントスパン（Pentaspán、Boots Co., ウェリントン、ニュージーランド）をペントスパン6.6 mL対PB 10 mLの比率でPBへ添加した。これらを反転させて混合し、37℃で30分間インキュベートした。このインキュベーション中に、赤血球が沈殿したので、PBLを含有する上層を採取した。この層からの細胞を遠心分離し、HHF中で2度洗浄した。その後、上記に記載した方法に類似するフィコール法を使用してこれらの細胞を単核球および顆粒球に分離した。顆粒球および混入している赤血球はフィコールによりペレット化し、0.83%塩化アンモニウム中での低張性溶解により混入している赤血球を除去した後、この方法で調製した白血球は通常は>95%の好中性顆粒球を含んでいた。

#### 【0123】

##### (b) ヒト造血細胞系の培養

Jurkat、Hut 78、CEM VLB-100およびMolt-4（全T細胞系）、HL60（前骨髄球性白血病）、K562（赤白血病性）、Meg-01（巨核球）、Hi Meg（巨核球/白血病）、Nalm-6（B細胞系）、KG1（骨髄芽球性白血病細胞系）、KG1a（骨髄芽球性）、U937（骨髄系）、HEL-DR<sup>+</sup>（赤白血病性）、およびRC2A（AML）細胞はすべて、10%のFCS、ペニシリン（最終濃度100 i.u./mL）、硫酸ゲンタマイシン（最終濃度100 µg/mL）および2 mMのグルタミンを補給したRPMI-1640培地（Gibco/BRL、グレンウェバリー、ビクトリア州、オーストラリア）中で増殖させた。UT7（巨核球/赤白血病性）およびTF-1細胞は上記と同様にペニシリン、ゲンタマイシンおよびグルタミンを含む10%のFCSおよび2 ng/mLのGM-CSF（アムジェン、サウザンドオークス市、カリフォルニア州の好意による寄贈）を補給したRPMI-1640中で増殖させた。M07e細胞は、上記と同様にペニシリン、ゲンタマイシンおよびグルタミンおよび5 ng/mLのIL-3（アムジェン、サウザンドオークス、カリフォルニア州）を含む10%のFCSを補給したMEM（改良イーグル培地）中で増殖させた。

#### 【0124】

##### (c) ヒト非造血細胞系の培養

HFF2（線維芽細胞）およびMCF-7（乳腺細胞癌）は10%のFCS、ペニシリン、硫酸ゲンタマイシンおよびグルタミンを補給したDMEM（Gibco/BRL）中で増殖させた。MG63（骨肉腫細胞）は、上記と同様にペニシリン、ゲンタマイシンおよびグルタミンとともに10%のFCSを補給したMEM（Gibco/BRL）中で増殖させた。

#### 【0125】

##### (d) 骨髄間質細胞

免疫のために使用した骨髄間質細胞は前述したようにFACSによって精製したヒトSTRO-1<sup>+</sup> BMMNCから単離した[19]。これらの細胞は、20%のFCS、ペニ

シリン (100 i.u./mL)、硫酸ストレプトマイシン (100 µg/mL) およびグルタミン (2 mM) ならびに L-アスコルビン酸の長寿命誘導体、アスコルビン酸 2-ホスフェート (ASC-2P、Sigma、セントルイス、ミシガン州、米国) を補給した培地中で培養した。細胞は、週に 1 回培地を交換しながら、数週間に渡り 37、5% CO<sub>2</sub> の加湿インキュベーター内で培養した。

#### 【0126】

(e) モノクローナル抗体の生成

抗体 BB9 は、ヒトパピロウイルス (HPV) 16 E6/E7 オープンリーディングフレーム (HPV16E6/E7orf) を含有する両種指向性レトロウイルスを用いた STRO-1<sup>+</sup> 間質細胞の感染の結果として生じた HPV/MSC と指名された一連のヒト独立由来骨髄間質細胞を用いての BALB/c マウスの免疫後に発生させた [20-22]。手短には、BALB/c マウスはアジュバントとして 50 µg のムラミールジペプチド (Sigma) を含有する PBS 中の 2 ~ 10 × 10<sup>6</sup> cells の HPV/MSC 細胞を用いて腹腔内 (IP) 免疫した。マウスは、3 週間間隔で、IP 投与したのと同用量の細胞を用いて 2 回、および融合前 4 日間に、10<sup>6</sup> cells を静脈内投与し追加免疫した。免疫したマウスから単離した脾細胞は、標準的な方法 [23] によって NS-1 マウス骨髄細胞系と融合させ、HAT を含有する培地中で結果として生じたハイブリドーマを選択した [24]。

#### 【0127】

融合により発生したハイブリドーマは、最初は HPV/MSC 間質細胞と反応性の抗体の産生についてスクリーニングした。これは、96 ウェルプレート内で増殖した新鮮な固定されていない間質細胞についての間接的免疫蛍光アッセイによって実施した。この間質細胞系と反応性である抗体について、PBL と反応性の抗体を除去するためにネガティブスクリーニングを行った。これは、ハイブリドーマ上清およびフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 複合 F(ab)<sub>2</sub> ヒツジ抗マウス免疫グロブリン (Ig) (DDAF 試薬: Silenus、メルボルン、オーストラリア) を用いて PBL を連続的に染色することにより実施した。染色は、丸底 96 ウェルプレート (Nunc A/S、カムストラップ、デンマーク) 中で実施し、各インキュベーション工程後の洗浄は低温 HHF を添加した後に実施し、その後で遠心分離を行った。最終洗浄後、PBL は事前にポリ-L-リシン (1:10 で希釈; Sigma) でコート (室温で 30 分間) した平底 96 ウェルプレートに移し、細胞接着を促進するために再び遠心分離した。過剰な HHF を除去した後、100 µL の FACS 固定液 (PBS 中の 1% ホルマリン、2% グルコースおよび 0.02% アジ化ナトリウム) を添加することにより *in situ* で固定し、引き続き蛍光顕微鏡 (オリンパス BH2-RFCA、オリンパス光学、東京、日本) 下での検査により抗体反応性について視覚的にスコア付けした。PBL と非反応性である抗体についてはその後、下記に記載するようにフローサイトメトリー解析によって BMMNC への結合について試験した。抗体 BB9 は、最初はリンパ芽球細胞の小さな小集団との反応性に基づいて、引き続きのアッセイでは CD34<sup>+</sup> 細胞の小集団への結合によって選択した。その同定後、BB9 ハイブリドーマは限界希釈により 3 回クローニングし、市販キット (ベリンガーマンハイム、キャッスルヒル、ニュー・サウス・ウェールズ州、オーストラリア) を使用して抗体のアイソタイプを決定した。BB9 は IgG<sub>1</sub> アイソタイプであることが証明された。その後の試験はすべて、製造業者の推奨にしたがってタンパク質 A-セファロース (ファルマシア、ノースライド、ニュー・サウス・ウェールズ州、オーストラリア) を使用して使用済み組織培養上清から単離した精製 BB9 抗体を用いて実施した。標準条件下で BB9 をフルオレセインイソチオシアネート (FITC) またはビオチンのアミン反応性誘導体とを共役結合させる試みは、該抗体の結合活性の消失を生じさせた。結果として、BB9 の一次造血細胞および様々な造血系統に代表的な細胞系への結合パターンについてのすべての解析は間接的免疫蛍光染色によって実施した。

#### 【0128】

(f) フローサイトメトリー解析および蛍光活性化セルソーティング (FACS) のため

### の造血細胞の免疫標識

免疫標識の前に、一次造血細胞 (BMMNC、PBMNC、PBL) または造血細胞系は、Fc受容体をブロックするために氷上で30分間、4%正常ヒト血清 (Red Cross、アデレード、南オーストラリア; HHF-NHS) を補給したHHF中でインキュベートした。その後細胞は、単独抗体または同時にどちらもHHF中の最終濃度20 $\mu$ g/mLとなるよう希釈した抗CD34 MAb 43A1 (マウスIgG<sub>3</sub>; Tubingen University H-J. Buhning博士の好意による寄贈) [25] および抗体BB9 (マウスIgG<sub>1</sub>) の組み合わせを用いてのどちらかで標識した。追加のサンプルは、単独または適切な43A1とBB9抗体の様々な組み合わせのどちらかでアイソタイプが適合する非結合対照IgG<sub>3</sub> (Southern Biotechnology Associates)、バーミンガム、アラバマ州) またはIgG<sub>1</sub> (アデレード大学微生物学部のGraham Mayerhofer博士の好意で提供されたMAb 1B5、抗ジアルジア) 抗体を用いて平行染色した。すべての抗体のインキュベーションは氷上で45分間実施し、その後ですべての場合に4の過剰なHHF中で2回洗浄した。特異的に結合したモノクローナル抗体は、マウス-IgG<sub>1</sub> (フィコエリトリンに結合、PE) およびマウスIgG<sub>3</sub> (FITCに結合、どちらもCaltag; サンフランシスコ、カリフォルニア州) に対する最適に滴定したアイソタイプ特異的ヤギ抗体の組み合わせと共にインキュベーションを行った。更にHHF中で2回洗浄した後、細胞はFACS-FIX (フローサイトメトリー解析用) またはFACS用の低温HHFのどちらかに約10<sup>7</sup>/mLで懸濁させた。

### 【0129】

CD34<sup>+</sup>BM細胞の規定小集団上でBB9によって同定された抗原の発現を検討するために、3カラーフローサイトメトリー解析を実施した。これらの解析の大多数は、非分別BMMNCを使用して実施したが、一部は以前に説明したように[26]、561-ダイナビーズ (Dyna1、オスロ) によって予備的に豊富化したCD34<sup>+</sup>細胞を使用して実施した。BB9発現によって分別されたCD34<sup>+</sup>細胞による超生体蛍光色素ローダミン123 (Rh123) の残留を検討するために、BMMNCを用いて追加の試験を実施した。細胞は、最初に0.1 $\mu$ g/mLの最終濃度でRh123 (Molecular Probes Inc.、オレゴン州) を補給したHHF中において37で45分間インキュベートした。低温HHF中で2回洗浄した後、細胞は更に15分間37でインキュベートして結合していないRh123を流出させ、更に低温HHF-NHS中で洗浄した。免疫染色は、43A1をビオチン化ヤギ抗マウスIgG<sub>3</sub>特異的抗体およびストレプトアビジン-トリカラー (SAV-TC; どちらもCaltag) との連続的インキュベーションによって検出した以外は、上記のとおり43A1とBB9を使用して実施した。CD34/CD38/BB9およびCD34/CD90/BB9の共分布は、最初は細胞を43A1およびBB9と一緒にインキュベートし、その後上記のとおり抗マウスIgG<sub>3</sub>-FITCおよび抗マウスIgG<sub>1</sub>-トリカラー (TC) (どちらもCaltag) とインキュベートすることによって評価した。細胞は、抗マウスIgG<sub>1</sub> TC上の過剰な部位をブロックするために非結合マウスIgG<sub>1</sub>抗体3D3 [27] を含有する過剰な腹水と一緒にインキュベートし、その後Leu17-PEまたはPR13<sub>BIOTIN</sub> (IgG<sub>1</sub> 抗CD90; Systemix Inc.、パロアルト、カリフォルニア州のBeth Hill博士およびBen Chen博士の好意による寄贈) のどちらかを添加して更に45分間インキュベートした。結合したPR13<sub>BIOTIN</sub>はSAV-PE (Caltag) との最終インキュベーションによって局在化した。細胞のアリコートもまた、遮断工程の有効性を評価するために、IgG<sub>1</sub>-PEまたはIgG<sub>1</sub>-BIOTIN (Becton Dickinson) を用いて平行染色した。BMMNCの細胞周期解析は、最初は43A1とBB9を用いて細胞を標識化し、その後は上記のとおりビオチン化ヤギ抗マウスIgG<sub>3</sub>特異的抗体およびSAV-TCおよびPE-複合ヤギ抗マウスIgG<sub>1</sub>とのインキュベーションによって実施した。細胞は、過剰な無関係のマウスIgG<sub>1</sub>腹水を用いて30分間遮断し、HHF中で2回洗浄し、PBS中で2回洗浄し、氷温70%エタノールを用

いて10分間透過処理した。細胞はPBS中で2回洗浄し、更にPBS中の3%ヤギ血清を用いて30分間かけて遮断した。FITC複合Ki67 MA b ( Immunotec h、マルセイユ、フランス) またはIgG<sub>1</sub>-FITC対照を細胞懸濁液に1:10の最終希釈率で添加し、細胞は氷上で45分間インキュベートした。

#### 【0130】

フローサイトメトリ解析は、Profile IIまたはEPICS XL-MCLフローサイトメーター ( Coulter Corp.、ハイアリーア、フロリダ州) を使用して実施した。1サンプルあたり2万回のイベントをリストモード・データとして収集し、クーターELITEソフトウェアを使用して解析した。セルソーティングは、200~250mWで488nmの光線を発光するアルゴンレーザーを装備したFACSstar PLLUSセルソーター ( Becton Dickinson) を使用して実施した。細胞選別は、それらの光散乱特性に基づいて規定のリンパ球/芽細胞ウィンドウ内に入った細胞に限定した [ 4 ]。ソートゲートを選択するための閾値は、アイソタイプ対照抗体を用いて得た染色レベルに基づいた。細胞は、5% FCSを補給したIscoveの改良Dulbecco培地 ( IMDM; Gibco/BRL) を含有する試験管内へ収集した。選択した集団の純度は、選別した細胞のアリコートの分析により評価したが、通常は98%より高かった。

10

#### 【0131】

(g) BB9抗体を用いたBM間質細胞の染色

上記に由来する骨髄間質細胞はBB9 MA bを用いてin situで染色した。細胞は、染色前に37 で一晩、ガラス製8ウェルチャンバースライド ( Nunc) 中で増殖させた。細胞は、氷上で45分間、BB9またはIgG<sub>1</sub>アイソタイプ対照抗体1B5 ( どちらもHHF中で20μg/mLの最終濃度で) を用いて染色し、HHFを用いて2回洗浄した。特異的に結合した抗体は、暗所の氷上で30分間、HHF中で1:50の希釈率のFITC複合抗マウスIgG<sub>1</sub>モノクローナル抗体 ( Caltag) を使用して暴露した。2回の最終洗浄後、細胞はFACS fixを用いて固定し、蛍光顕微鏡 ( オリンパスBH2-RFCA) を用いて観察した。

20

#### 【0132】

(h) 磁気活性化セルソーティング ( MACS) を使用したBMMNCからのBB9<sup>+</sup>細胞の精製

BB9抗原と共発現する系統特異的抗原の発現を評価するために、BB9<sup>+</sup>BMMNCを磁気活性化セルソーティング ( MACS) によって単離した [ 28 ]。手短には、BMMNC ( 0.5~1x10<sup>8</sup> cells) を氷上で45分間かけて0.5mLのBB9抗体 ( 20μg/mLの最終濃度) 中に懸濁させた。その後、細胞はHHF中で2回洗浄し、1/50の希釈率のビオチン化ヤギ抗マウスIgG<sub>1</sub> ( Caltag) を含有する0.5mLのHHF中に4 で30分間再懸濁させた。これらの細胞はMACSバッファ ( 1%のBSA、5mmol/LのEDTAおよび0.01%のアジ化ナトリウムを補給した単一強度のCa<sup>2+</sup>およびMn<sup>2+</sup>を含まないリン酸緩衝食塩液 ( PBS) を含有する) 中で3回洗浄し、それに100μLのストレプトアビジンマイクロビーズ ( Miltenyi Biotec、ベルギッシュ・グラートバッファ、ドイツ) を添加した900μLのMACSバッファ中に再懸濁させた。4 で30分間インキュベートした後、SAV-PE複合体 ( 1/50; Caltag) を添加し更に15分間インキュベートした。細胞はMACSバッファ中で2回洗浄し、フローサイトメトリ解析のために小アリコートを除去した。残りの細胞は、製造業者の推奨にしたがって磁気ステンレススチール・ウールカラム ( カラム容量10<sup>8</sup> cells; Miltenyi Biotec) 上で分離した。BB9<sup>-</sup>細胞はカラム溶出液として収集したが、BB9<sup>+</sup>細胞は磁気基質に付着して残留した。BB9<sup>+</sup>細胞を得るために、カラムを磁石から取り出し、その後MACSバッファを用いて別の試験管内へフラッシュ洗浄した。小サンプルは、各フラクション中の細胞の回収率および純度を試験するためのサイトメトリ解析のためにBB9<sup>+</sup>およびBB9<sup>-</sup>細胞集団各々から採取した。

30

40

50

## 【0133】

MACSカラムから得たBB9<sup>+</sup>細胞は上記のとおり非結合マウスIgG<sub>1</sub>抗体を含有する過剰な腹水と一緒にインキュベートした。細胞はその後、次のとおりにFITC複合系統マーカー：IgG<sub>1</sub> FITC (Dako A/S、グロストラップ、デンマーク)、CD7 FITC (BDIS)、CDS FITC (BDIS)、CD10 FITC (Dako)、CD19 FITC (Immunotech)、CD33 FITC (Coulter)、CD14 FITC (Dako)、CD15 FITC (Immunotech)、CD34 FITC (BDIS)、CD61 FITC (BDIS)、グリコホリンA FITC (Dako)およびCD71 FITC (BDIS)の添加によって4で45分間かけて染色した。細胞はHHF中で2回洗浄し、FSCS fix中で固定し、フローサイトメトリ解析はEPICS XL-MCLフローサイトメーター (Coulter、ヒアルリー、フロリダ州)を使用して実施した。1サンプルあたり2万回のイベントをリストモード・データとして収集し、クールターELITEソフトウェアを使用して解析した。

10

## 【0134】

## (i) 造血前駆細胞クローン原性アッセイ

顆粒球マクロファージコロニー形成細胞 (CFU-GM)、赤血球前駆細胞 (BFU-E)、および多能性コロニー形成細胞 (CFU-Mix)は前述したとおりにアッセイした [29]。手短には、35mm径の培養皿中の0.9%のメチルセルロース、30%のFCS、1%のBSA (フラクシオンV; Sigma)、3mmol/LのL-グルタミン、および $5 \times 10^{-5}$  mmol/Lの2-メルカプトエタノールを補給したIMDM中で1mLの培養物を3組確立した。コロニーの増殖は、ヒト組み換えインターロイキン3 (IL-3)、IL-6、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G-CSF)、幹細胞因子 (SCF) (すべての因子はGenetics Institute、ボストン、マサチューセッツ州およびAmgen、サウザンドオークス、カリフォルニア州の好意によって提供された)および40単位のエリスロポエチン (Eprex; Janssen Cilag、オークランド、ニュージーランド州)各10ngの添加によって刺激した。CFU-GM、BFU-EおよびCFU-Mixは標準的基準にしたがって第14日に計数した。全培養は培養皿1枚あたり500細胞ずつをプレーティングすることにより3回ずつ確認した。

20

30

## 【0135】

## (j) 前CFUの培養

これは、CFU-GMの前駆細胞 (前CFU)の指標としてCFU-GMの新規生成を測定する、当研究所によって以前に報告された間質細胞フリーのサイトカイン依存性懸濁液培養系 [29]である。アッセイは、BMまたは流動PBのいずれかからのFACSによって単離された $10^3$  CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>およびCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>細胞を用いた24ウェルプレート中での3組の培養1mL中で行った。各1mLの培養はIMDM、30%のFCS、1%のBSA、3mmol/LのL-グルタミン、 $5 \times 10^{-5}$  mmol/Lの2-メルカプトエタノールを含んでおり、以下の組み換え成長因子が補給された：IL-3 (10ng/mL)、IL-6 (20ng/mL)、G-CSFおよびSCF (各々、100ng/mLで)。追加の因子は、同一最終濃度で第7日、更に第14、21、28、35および42日に添加し、培養は成長因子を含有する新鮮培地中に1:10で分割した。培養の14、21、28、35および42日後に存在しているCFU-GMを上記のとおり計数し、所定の時点での細胞およびCFU-GMの累積数は、全培養期間にわたる培養に対する累積希釈係数を考慮に入れることによって計算した。

40

## 【0136】

## (k) BB9抗原のプロテアーゼ感受性

BB9によって認識された抗原の性質を調査する目的で、BB9に結合することが見いだされたヒト造血細胞系は、抗体結合の消失を生じさせたものを同定するためにin vitroで様々なプロテアーゼを用いて処理した。酵素処理に先立ち、細胞はHBS (血清の不在

50

下で) 中で洗浄し、その後以下のプロテアーゼを含有する同一培地中において37 で1時間、 $10^6$  cells/mLでインキュベートした: 最終濃度20  $\mu$ g/mLのプロメライン、キモトリプシン、パパイン、ペプシン、プロナーゼ、サーモリシンおよびトリプシン、100 U/mLのキモパパイン、4 mg/mLのジスパーゼおよび1  $\mu$ g/mLのプロテイナーゼK。パパイン(Sigma)およびキモパパイン(Boots、プール、英国)を除くすべての酵素は、ベーリンガーマンハイム(マンハイム、ドイツ)から入手した。プロテアーゼ処理後、細胞はHHF中で2回洗浄し、上記のとおり免疫蛍光解析を使用してBB9抗原の発現についてアッセイした。UT7細胞のキモパパイン処理は、抗原遊離の特異的な性質を評価するために、抗CD71(Becton Dickinson)および9B3(抗MHCクラスI抗体)を含む様々な対照抗体を使用して繰り返した。 10

#### 【0137】

##### (1) 免疫沈降解析

UT7細胞はリン酸緩衝生理食塩液(PBS)中で2回洗浄し、同一バッファ中に1 mL当たり $2 \times 10^8$  cellsの割合で再懸濁させた。細胞は、触媒としてラクトペロキシダーゼ[30]を使用して室温で15分間、 $2$  mCi  $^{125}$ Iにより表面標識し、その後PBS中で4回洗浄した。UT7細胞は、プロテアーゼ阻害剤のPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオライド)、TPCK(L-(トシルアミド-2-フェニル)エチルクロロメチルケトン)、TLCK(1-クロロ-3-トシルアミド-7-アミノ-L-2-ヘプタノン)およびNPGb(p-ニトロフェニル-P'-グアニジノ-ベンゾエート-HCl)(すべてSigmaから購入)を含有する140 mMのNaCl、0.5 mMのMgCl<sub>2</sub>、0.5 mMのCaCl<sub>2</sub>、10 mMのTris、pH 7.4(CHAPSバッファ)中の1%のCHAPS洗剤(Sigma)を用いて1 mL当たり $2 \times 10^7$  cellsの最終濃度で、氷上で30分間かけて溶解させた。核および非溶解細胞物質は18,000 gで20分間の遠心分離によりペレット化し、溶解液はヒツジ抗マウスIgGダイナビーズ(Dynal)を用いて一晩予備洗浄した。1B5(アイソタイプ適合ネガティブコントロール)およびBB9を使用した各免疫沈降のために1.5 mLの溶解液を使用した。抗体は、1 mLのPBS/0.1% BSA中、50  $\mu$ L( $2 \times 10^7$ )のビーズとともに50  $\mu$ gの抗体を使用してM450ラット抗マウスIgG<sub>1</sub>ダイナビーズへ、一晩予備結合させた。ビーズは、細胞溶解液に添加する前にPBS/BSAを用いて2回、CHAPSバッファを用いて1回洗浄した。細胞溶解液およびビーズは4 で2~3時間回転させ、その後ダイナルMPC-6磁石を用いて除去し、CHAPSバッファを用いて3回洗浄し、ゲルサンプルバッファ(0.0625 MのTris pH 6.8、10%のグリセロール、20%のSDSおよび0.00125%のプロモフェノールブルー)中で5分間煮沸し、4~20%勾配SDS-PAGE上でランした。ゲルは8~10 mAで一晩ランし、メタノール:酢酸:水(5:1:4)中で30分間固定し、真空下で乾燥させ、ホスホイメージ解析(Molecular Dynamics Inc.、サニーベール、カリフォルニア州)または-70 でのオートラジオグラフィによって評価した。 20 30

#### 【0138】

1. モノクローナル抗体(MAb)BB9はCD34<sup>+</sup> BMMNCの小さな小集団に結合する 40

マウスモノクローナル抗体BB9は、ヒトBM由来間質細胞の免疫後に生成させ、免疫原との反応性およびPBMCへの有意な結合の欠如に基づいて初期ハイブリドーマスクリーニングにおいて同定した。蛍光顕微鏡による免疫標識幹細胞の検査により、BB9発現の繊細な点状パターンが明らかになったが、これは細胞表面に限定されているように見えた。フローサイトメトリー解析により、PBMCとの極めて低レベルの反応性が確認されたが、低い前方散乱光および低い垂直散乱光特性を特徴とする成人ヒトBM中の細胞の小さな小集団へのBB9の結合(平均 $9.9 \pm 2.2\%$ ;  $n = 10$ )が証明された(図1A)。引き続きのBB9および抗CD34抗体と成人骨髄由来単核球との2カラー免疫蛍光解析により、BB9がCD34<sup>+</sup>細胞の小集団へ結合することが明らかになった(平均 $22.4$ ; 範囲 $8.3 \sim 40.8\%$ ;  $n = 10$ )。重要なことに、BB9染色の強度は最高 50

CD34 抗原密度を示した細胞上で最大であった(図1B)。更に、CD34<sup>-</sup>細胞の小集団はBB9を発現したが、これらの細胞上でのBB9染色の強度は一貫してCD34<sup>+</sup>細胞により発現した強度より低かった。

【0139】

同様にBB9に結合した他の(CD34<sup>-</sup>)細胞の同一性を決定するために、磁気活性化セルソーティング(MACS)によってBB9<sup>+</sup>細胞をBMMNCから単離し、その後特定造血系統に対して特異的である1区画のMAbの各々を用いて染色した。表1に示したように、BB9によって同定されたBMMNCの約3分の1(39.8%±20.5%; n=3)は、それらのCD19の発現によって証明されたようにBリンパ球である。有意な比率のBB9<sup>+</sup>細胞もまたTリンパ球抗原CD7(18.8%±7.6%; n=3)、  
骨髄性マーカーCD33(10.6%±6.1%; n=3)を共発現し、更に細胞の11.7%は抗CD71抗体を用いて染色された。もっと低い比率(細胞の1~6%)はCD3、CD14、CD61およびグリコホリンAを共発現した。

10

【0140】

【表1】

**表1 BB9<sup>+</sup> BMMNC によって発現した系統抗原**

| 系統マーカー  | 平均値 ± SEM   |
|---------|-------------|
| CD7     | 18.8 ± 7.6  |
| CD3     | 5.7 ± 2.8   |
| CD19    | 39.8 ± 20.5 |
| CD33    | 10.6 ± 6.1  |
| CD14    | 1.3 ± 0.3   |
| CD34    | 9.8 ± 7.7   |
| CD61    | 2.0 ± 1.0   |
| グリコホリンA | 2.0 ± 0.2   |
| CD71    | 11.7 ± 7.1  |

20

30

【0141】

BB9<sup>+</sup>細胞は、上記のとおりMACSを使用してBMMNCから精製した。細胞は、BB9を検出するためには抗マウスIgG<sub>1</sub>-ビオチンおよびSAV-PEを使用して、他の系統抗原についてはFITCへ直接結合した抗体を用いて染色した。これらのマーカーとBB9との共発現は、クールターEliteソフトウェアを用いた解析を使用して可視化した。各サンプルについて20,000イベントを解析した。データは、各系統抗原を共発現するBB9<sup>+</sup>細胞の比率(%、3つの独立BMサンプルの平均値±SEM)を表している。

40

【0142】

BB9によって同定されたCD34<sup>+</sup>細胞の性質を調べる目的で、図2に示したソート領域にしたがってCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>およびCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>小集団を単離するために2カラーFACSを使用した。各小集団を標準半固体培養中でのクローン原性造血前駆細胞の含量についてアッセイした。8回の実験からのデータ(表2に要約した)は、骨髄前駆細胞(CFU-GM)がCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>およびCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>小集団のどちらにも存在することを証明している。これらの2つの小集団間、またはいずれかの小集団と未分画CD

50

34<sup>+</sup>細胞との間 (CD34<sup>+</sup>対CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> p = 0.44; CD34<sup>+</sup>対CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> p = 0.87) でCFU-GMの発現率における有意差 (p = 0.63) は明らかにならなかった。同様に、赤血球前駆細胞 (BFU-E) もまた両方の小集団中で検出されたが、全CD34<sup>+</sup>細胞 (p = 0.03、対t-検定) またはCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>フラクション (p = 0.01) のどちらと比較してもCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>フラクション内のBFU-Eの発現率が相対的に低かった。

【0143】

【表2】

**表2 CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> 及び CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> 細胞フラクション内のクローン原性**

10

**前駆細胞の発現率**

| 細胞起源       | 細胞タイプ                              | CFU-GM        | BFU-E         | CFU-Mix   |
|------------|------------------------------------|---------------|---------------|-----------|
| <b>骨髄</b>  |                                    |               |               |           |
| (n=8)      | CD34 <sup>+</sup>                  | 232.1 ± 67.6  | 81.5 ± 39.2   | 4.5 ± 3.2 |
|            | CD34 <sup>+</sup> BB9 <sup>+</sup> | 277.1 ± 114.1 | 38.7 ± 33.6   | 3.7 ± 5.1 |
|            | CD34 <sup>+</sup> BB9 <sup>-</sup> | 239.0 ± 137.7 | 88.1 ± 25.3   | 4.2 ± 2.8 |
| <b>流動血</b> |                                    |               |               |           |
| (n=6)      | CD34 <sup>+</sup>                  | 198.0 ± 119.1 | 185.7 ± 96.8  | 2.2 ± 0.9 |
|            | CD34 <sup>+</sup> BB9 <sup>+</sup> | 198.8 ± 142.1 | 89.5 ± 53.2   | 1.0 ± 1.1 |
|            | CD34 <sup>+</sup> BB9 <sup>-</sup> | 142.8 ± 69.1  | 245.8 ± 151.7 | 1.3 ± 2.4 |

20

【0144】

30

正常骨髄ドナー (n = 8) または流動末梢血サンプル (n = 6、HDC + G - CSFからの3例およびHDC + GM - CSFからの3例) からのCD34<sup>+</sup>細胞をBB9<sup>+</sup>およびBB9<sup>-</sup>サブフラクションに分離した。細胞は、IL-3、IL-6、G-CSF、GM-CSF、SCFおよびEpoを含有するメチルセルロース培養中において37 / 5% CO<sub>2</sub>で14日間プレーティングした。コロニーをin situで同定し、それらのタイプを次のように略記した: CFU-GM = 顆粒球および/またはマクロファージ; BFU-E = 赤血球系; CFU-Mix = 赤血球系および骨髄細胞および/または巨核球を含有する混合コロニー。数値データは、プレーティングした各表現型の1,000 cells当たりのコロニー平均数 (± 標準偏差) を表している。

【0145】

40

多能性前駆細胞 (CPU-Mix) もまたCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>およびCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>フラクションの両方で同定されたが、いずれの小集団においてもそれらの発現率に関して一貫した傾向は観察されなかった (表2)。CD34<sup>+</sup>集団内のBB9<sup>+</sup>およびBB9<sup>-</sup>小集団の発現率について修正すると、CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>小集団中のCFU-GM、BFU-EおよびCPU-Mixの回収率は各々33.8 ± 6.2%、13.8 ± 3.9%および24.5 ± 12.8%であった。

【0146】

2. 階層的に初期のHPC (造血前駆細胞) はBBSによって同定される抗原を発現する

階層的に初期のHSC (造血幹細胞) 上でのBB9の発現を調査するために、一連の3カ

50

ラ-免疫標識方法を実施した。図2のパネルBに示したように、BB9抗原の発現はCD38の発現と逆相関しており、最高レベルはCD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞上で、最低レベルはCD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>集団上でみられた。更に、図2のパネルCに示したように、BB9の結合はCD90 (Thy-1)の結合と有意な程度に共分布する；CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>はLTC-ICの大部分および致命的に照射された免疫不全マウスに移植する能力を含む細胞を含有することが以前に証明されている表現型を表している[7]。低Rh123残留を示すCD34<sup>+</sup>細胞(CD34<sup>+</sup>Rh123<sup>dull</sup>)は実質的に全部がBB9<sup>+</sup>であり、更に、CD34<sup>+</sup>Rh123<sup>bright</sup>細胞よりも顕著に高レベルのBB9抗原発現を示す(図2、パネルA)。BB9抗原を共発現しているCD34<sup>+</sup>細胞の細胞周期状態を調査するために、Ki67 MA bと組み合わせてBMMNCの3カラーフローサイトメトリー解析を実施した。Ki67は増殖中の細胞の細胞周期のG<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>およびM期にのみ存在するが、G<sub>0</sub>では存在しない核抗原を検出する[31]。図3Aに示したように、Ki67はCD34<sup>+</sup>細胞のほぼ55%に結合する。Ki67に結合できない残りのCD34<sup>+</sup>細胞(図3Aの領域R1)はG<sub>0</sub>細胞と定義される。リストモード・データファイルの解析により、CD34<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>細胞(R2内)およびCD34<sup>+</sup>Ki67<sup>-</sup>細胞(R1内)上でのBB9発現パターンの試験が可能になった。図3のパネルBは、非増殖性造血前駆細胞(CD34<sup>+</sup>Ki67<sup>-</sup>; 図3AのR1内)がBB9発現の最高レベルを示すことを示しており、79%がBB9<sup>+</sup>であると考えられる。これとは対照的に、増殖性細胞(Ki67<sup>+</sup>、図3AのR2内)はBB9の低レベルの発現を示している(図3C)。

10

#### 【0147】

20

これらをまとめると、このためこれらのデータはCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>細胞が以前には初期ヒトHPCに帰せられていた多数の表現型特性を示すことを証明している。階層的に初期のHPC(前CFU)上でのBB9抗原の発現を詳細に調査するために、CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>およびCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>BMMNC小集団を、前述したように間質細胞を含まないサイトカイン依存性懸濁液中で造血を開始かつ維持する能力についてアッセイした。ソーティングしたフラクションをIL-3、IL-6、G-CSFおよびSCF(36GS)の組み合わせ中で培養し[29]、CFU-GMおよび成熟骨髄細胞の産生について6週間にわたり1週間間隔でアッセイした。図4は、10回の実験からのデータの要約である。CFU-GMの産生(パネルA)は、第35日を除いて測定した全時点(p値の範囲0.0004~0.008)でCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>小集団からよりCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>からの方が有意に多かった。培養の停止時(第42日)に、10<sup>3</sup> CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>細胞から生成したCFU-GMの平均数は2.2 × 10<sup>5</sup> ± 1.2 × 10<sup>5</sup>であったが、同一数のCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>細胞は平均7,812個のコロニーしか産生しなかった。これを踏まえると、成熟骨髄細胞の対応する産生量は、全時点で第42日に平均2.5 × 10<sup>8</sup> cellsの生成をもたらしたBB9<sup>+</sup>小集団からより多かった(p値の範囲0.027~0.55)。このためこれらのデータは、これらの培養条件下で造血を開始かつ維持する能力を含む初期HPCはMA b BB9によって同定されたCD34<sup>+</sup>細胞の小集団に限定されることを示している。

30

#### 【0148】

3. BB9によって同定された抗原は流動末梢血中でCD34<sup>+</sup>細胞によって高レベルで発現する

40

CD34<sup>+</sup>細胞へのBB9の結合パターンを定常状態血液中および流動末梢血(MPB)中で解析した。これらの試験は、正常ドナー、または高用量シクロホスファミド(HDC)およびG-CSFまたはHDC+GM-CSFのどちらかの投与後に血液前駆細胞動員が誘発された患者から入手したサンプルを使用して実施した。定常状態血液の解析により、BB9がCD34<sup>+</sup>細胞の約5%(5.08% ± 0.58; n=4)に結合することが明らかになったが、これは定常状態BM CD34<sup>+</sup>細胞について以前に観察されたものより有意に低い比率であった(p=0.026)。これとは対照的に、流動末梢血中ではより高い比率のCD34<sup>+</sup>細胞がBB9に結合することが見いだされた(図5)。HDC+G-CSFにより引き出されたCD34<sup>+</sup>細胞の48.4% ± 4.3(n=3)および

50

HDC + GM - CSF の組み合わせによって流動した CD34<sup>+</sup>細胞の 54.7% ± 2.9 (n = 3) は、定常状態 BM から単離した CD34<sup>+</sup>集団で観察された比率 (表 3 を参照) の約 2 倍、そして定常状態血液中に存在する比率 (p = 0.0013) の 4 ~ 5 倍有意に高い BB9 抗原を示した。更に、流動 CD34<sup>+</sup>細胞の両集団上の BB9 抗原密度は定常状態末梢血中の CD34<sup>+</sup>細胞上での抗原密度より高かった。

【0149】

【表 3】

表 3 流動血、正常ヒト骨髄および定常状態末梢血上での BB9 の発現

| ドナーのタイプ(n)       | BB9 を発現する  | CD34 を発現する          | BB9 <sup>+</sup> を発現する |
|------------------|------------|---------------------|------------------------|
|                  | 単核球        | BB9 <sup>+</sup> 細胞 | CD34 <sup>+</sup> 細胞   |
| HDC + G-CSF (3)  | 19.9 ± 3.5 | 15.3 ± 6.2          | 48.4 ± 4.3             |
| HDC + GM-CSF (3) | 28.0 ± 7.6 | 34.4 ± 9.7          | 54.7 ± 2.9             |
| 正常 BM (10)       | 9.9 ± 2.2  | 17.0 ± 4.3          | 22.4 ± 3.3             |
| 正常 PB (4)        | 4.7 ± 0.6  | 3.3 ± 2.0           | 5.1 ± 0.6              |

10

20

【0150】

サンプルは、抗 CD34 Mab 43A1 (IgG<sub>3</sub>) および BB9 (IgG<sub>1</sub>) を用いて、またはアイソタイプ適合対照 Mab を用いて平行に標識し、その後マウス IgG<sub>3</sub> (FITC へ結合) およびマウス IgG<sub>1</sub> (PE へ結合) に対するアイソタイプ特異的抗体を用いた標識化により視認した。少なくとも 20,000 cells からのデータを獲得し、クーラー E LITE ソフトウェアを使用して解析した。データは、各ドナー起源から単離した細胞から指示した抗原を発現する細胞の比率 (%、平均値 ± SEM) を示している (高用量シクロホスファミド [HDC] + G - CSF または + GM - CSF の投与後の流動血; 正常成人骨髄; または定常状態成人末梢血)。

30

【0151】

6 例の流動血サンプル各々から FACS によって単離した CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> および CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> 小集団について実施したクローン原性アッセイは、BM 中で所見されたものに質的に類似する BB9<sup>+</sup> および BB9<sup>-</sup> フラクシオン内への CFU - GM および BFU - E の分配を示した (表 2)。CFU - GM は、CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> および CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> フラクシオン内の両方において類似の発現が所見された。しかし、BM サンプルと一致して、BFU - E は CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> 細胞フラクシオンと比較して CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> 細胞フラクシオン中では有意に欠乏していた (p = 0.033)。HDC + G - CSF サンプルについては、CFU - GM の 49.4% ± 12.8 (範囲 25.8 ~ 70.0%) および BFU - E の 21.3% ± 13.2 (範囲 0 ~ 45.4%) が CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> 小集団中で回収された。同様に、3 例の HDC + GM - CSF サンプルについて、CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> 小集団は平均して 65.9% ± 1.9 (範囲 62.2 ~ 68.0%) の CFU - GM および 36.6% ± 9.3 (範囲 19.5 ~ 51.3%) の BFU - E を含有していた。

40

【0152】

BM 細胞について示したように、MPB から単離した CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> および CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> 細胞の前 CFU アッセイは全測定時点で、BB9<sup>-</sup> 小集団と比較して BB9<sup>+</sup> からの CFU - GM (パネル A、図 6) および成熟骨髄細胞 (パネル B、図 6) の両方のより多い生成を示した。培養の停止時 (第 35 日) に、10<sup>3</sup> 個の CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> 細胞から生成した CFU - GM の平均数は 12,497 ± 7,764 であったが、同一数の CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> 細胞は平均 119 ± 82 個のコロニーしか産生しなかった。成熟骨髄細胞の対

50

応する産生は、全時点でCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>小集団においてより多く、CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>細胞からの $1.2 \times 10^6$ と比較して第35日に平均 $7.5 \times 10^6$  cellsの生成をもたらした(図6)。このためこれらのデータは、BM中と同様に流動PB中では、初期HPCがMab BB9によって同定されたCD34<sup>+</sup>細胞の小集団に限定されることを証明している。

#### 【0153】

4. BB9は分子量160 kDaのキモパイン感受性糖タンパク質を同定する。様々な造血系統およびその他の細胞系を代表する白血球細胞系へのBB9の結合についても調査した。図示したように(表3)、BB9はHL60、K562、Meg-01、UT7、MG63および皮膚線維芽細胞を含む数種の細胞系に高レベルで結合した。KG1、RC2AおよびMCF-7細胞系上およびB細胞系Na1m-6上でBB9抗原の低~中間の発現が観察されたが、KG1a、MO7eおよびT細胞系Jurkat、Hut78、GEM VLB-100およびMolt-4はすべてネガティブであった。BB9抗原の最高レベルの発現はGM-CSF依存性UT7細胞上で一貫して観察されたので、この抗原の性質を調査するためにその後の全試験ではこの細胞系を使用した。BB9がタンパク質エピトープを同定するかどうかを決定するために、フローサイトメトリーによって、その後のBB9の結合を防止するものを同定するために様々なプロテアーゼを用いてUT7細胞を処理した。プロメリン、キモトリプシン、パパイン、ペプシン、プロナーゼ、プロテイナーゼK、トリプシンおよびサーモリシンはすべて本アッセイで効果がなかったが、キモパインは本アッセイでポジティブコントロールとして使用したCD71について見られたように(データは示していない)、BB9による特異的標識を完全に阻害した。更に、UT7細胞からCD59およびCD90を効率的に除去しながらのPI-PLCによる処理(データは示していない)は、BB9の結合を変化させず、これはBB9エピトープがGPI結合糖タンパク質上で発現しないことを証明していた。最後に、BB9は還元条件下で160 kDaの見掛けの分子量を有する表面<sup>125</sup>I標識UT7細胞から糖タンパク質を免疫沈降させた(図7)。

#### 【0154】

成熟造血細胞上では広範囲の様々な細胞表面分子が同定されているが、ヒト造血組織中の造血幹細胞および造血前駆細胞に限定されている表面抗原を同定することははるかに困難であることが明らかになっている。これは、一部には免疫およびスクリーニングのために利用できるHPC(造血前駆細胞)の数が限定されることのような実際的な制約のためと、しかし同等に重要には、広範囲の様々な表面抗原が初期および成熟両方の造血細胞上で共発現することが明確に実証されていることの両方に起因し得る。様々な表面抗原が免疫するHPC集団上に存在すると、結果として免疫応答を支配し、そのためHPCに限定した抗原の同定をほとんど見込みがないものとさせる。これらの問題を回避することを試みて、我々は成熟造血細胞が共有する多数の抗原は欠如するがCD34[12、13]、CD90[14]、CD164[15]およびマウス中ではSca-1[16]などの造血幹細胞および造血前駆細胞上で発現する多数の細胞表面抗原を備えている免疫のための豊富な細胞起源である骨髓間質細胞を用いて、マウスを免疫することを選択した。このため我々は、骨髓間質細胞を用いた免疫はこれらの細胞および初期HPCによって共発現した追加の抗原に対する抗体を導き出すことができるという仮説を立て、この仮説を実現するためにモノクローナル抗体BB9を開発した。

#### 【0155】

我々は、BB9が約10%の骨髓単核球に結合し、その60%はTまたはBリンパ球限定抗原を示し、約20%はCD34を共発現することを証明した。表現型は様々ではあるが、全体としてのBB9<sup>+</sup>集団は、低~検出不能なレベルのCD71発現および細胞周期のG<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>およびM期中でのみ存在してG<sub>0</sub>期には存在しない核抗原を検出するKi67を用いた免疫染色の欠如によって証明されるように非増殖性である。重要なことに、BM CD34<sup>+</sup>集団内でBB9抗原を示すのはたった20%の細胞にすぎないが、この小集団内にはCD38の欠如[6]、Rh123の低残留[32]およびCD90の発現[

8]によって同定されるように候補造血幹細胞表現型を含む大多数の細胞が含まれる。これらのデータに一致して、機能的アッセイは更に、サイトカイン依存性の間質細胞を含まない培養中で造血を開始かつ維持する能力を含む初期HPCがCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>小集団へ限定されることを証明した。2種のレジメンによって流動化血液幹細胞のサンプルを用いて類似の観察を行ったが、これはBM中に見られた初期HPCに対するBB9の特異性が流動末梢血に及ぶことを示唆している。注目すべきことに、MPB中のCD34<sup>+</sup>細胞は定常状態PB中のBB9<sup>+</sup>より有意に高い比率で所見されたが、これは調査した2種のレジメンがCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>細胞を特異的に動員することを示唆した。類似のことは、同様にBM中よりも流動血中で有意に高い比率のCD34<sup>+</sup>細胞上で発現するCD90に関して以前に観察されている。

10

## 【0156】

BB9によって同定されたエピトープは、PI-PLCによってもキモパインを除く様々なプロテアーゼを用いた処理後にも遊離しなかった160kDa細胞表面糖タンパク質上に存在することが証明された。BB9抗原の計算分子量は、初期ヒトHPCによって発現することが以前に証明されている[34]170kDa糖タンパク質であるMDR-1の分子量と類似である。しかし、BB9の末梢血白血球(PBL)との反応性の欠如は、PBLの40~65%によって発現するMDR-1の分子量から区別する。更に、そのピンプラスチン耐性表現型と一致して、Tリンパ球系VLB-100[36]はMDR-1の高レベルの発現を示すが、BB9に検出可能なレベルでは結合しないことが証明された。このためこれらのデータはBB9がMDR-1を同定しないことを示唆している。BB9によって同定される抗原について初期ヒトHPC上に限定される、表面上類似の発現パターンを含むその他の細胞表面糖タンパク質には、CD90[8]、AC133[9, 11]、Flt3/flk-2(CD135)[37]、Tie-1[38]、KDR[39]、TEK[11]が含まれる。しかし、これらは分子量における差(Thy-1[7, 8]、AC133[40]、Tie-1[43]、TEK[41]、KDR[42])および初期造血細胞[37, 44]および造血細胞[38]の両方の上での発現パターンを含む数種の基準に基づくと、BB9抗原と一致するとは考えにくい。

20

## 【0157】

造血組織内、すなわち初期造血前駆細胞および骨髓間質細胞内のBB9抗原の限定された分布は興味深く、発現パターンは更にまたCD34[12, 13]、CD90[14]、CD164[15]およびSca-1[16]を含む数種の他の抗原によっても示された。これらの糖タンパク質中少なくとも3種には接着特性があることを前提とすると[45-48]、BB9が接着分子としても機能できるのではないかと推測することは魅力的である。初期の実験では、BB9が脾臓、胸腺および扁桃腺のような造血組織中の血管内皮細胞にも結合することを証明しており、提案された接着機能とは矛盾しない所見である。しかし、MAb BB9はin vitroでのCD34<sup>+</sup>細胞の骨髓間質細胞への接着を混乱させない(HR、PJS;未公表の観察所見)。造血系中でのBB9抗原が果たす役割の疑問に対する答えは、糖タンパク質の詳細な生化学的特性付けおよび最終的には抗原に対応するcDNAの単離の両方から利益を得られる。このような試験は現在進行中である。

30

## 【0158】

## 【表4】

40

表 4 造血細胞系およびその他の細胞系上での BB9 の発現

| 細胞系         | 反応性 | 細胞系の特性             |    |
|-------------|-----|--------------------|----|
| UT7         | ++  | 赤芽球性／巨核球性白血病       |    |
| TF-1        | +/- | 赤白血病               | 10 |
| K562        | ++  | 赤芽球性白血病, Ph+ (CML) |    |
| MEG-01      | ++  | 巨核芽球性白血病 Ph+ (CML) |    |
| MO7e        | -   | 巨核芽球性白血病           |    |
| HEL-DR      | ++  | 赤白血病               |    |
| Hi MEG      | +   | 巨核芽球性白血病           |    |
| KG-1        | +   | 骨髄芽球性白血病           | 20 |
| KG-1a       | -   | KG-1 の未熟亜系         |    |
| HL60        | ++  | 骨髄芽球性白血病           |    |
| U937        | +   | 組織球性白血病            |    |
| RC2A        | +   | AML (急性骨髄性白血病)     |    |
| Nalm-6      | +   | B 細胞               |    |
| Hut78       | -   | T 細胞               | 30 |
| Jurkat      | -   | T 細胞               |    |
| Molt-4      | -   | T 細胞               |    |
| CEM VLB-100 | -   | T 細胞               |    |
| 皮膚線維芽細胞     | +++ | 線維芽細胞              |    |
| MCF-7       | +   | 乳癌                 |    |
| MG63        | ++  | 骨癌                 | 40 |

## 【 0 1 5 9 】

BB9 発現を評価するために間接免疫蛍光法を使用した。細胞は 20  $\mu$ g / mL の BB9 MA b と 45 分間および PE 複合ヤギ抗マウス Ig G<sub>1</sub> 二次抗体とインキュベートした。試験した各細胞系についてクールター X L フローサイトメーター上で最低 10,000 イベントを獲得し、BB9 ポジティブ細胞の比率を次のとおりに定量した： - = 0 - 2 %、+ / - = 2 - 5 %、+ = 5 - 35 %、++ = 35 - 80 %、+++ = 80 - 100 %。

## 【 0 1 6 0 】

要約すると、我々は成人 BM および流動血内で骨髄間質細胞および初期ヒト HPC によっ 50

て共発現した細胞表面糖タンパク質に対する特性を含むモノクローナル抗体のBB9について記載した。臍帯血、胎児肝内および胚性造血中のBB9抗原の発現は現在調査中である。これに関連してBB9が幹細胞活性を含むCD34-細胞への結合を示す可能性は特に興味深い。

【0161】

実施例2

BB9抗体によって同定された単離細胞および細胞の移植。

単核球は、標準的方法によってFicoll-Hypaque(密度1.077g/mL)上での密度沈降によってヒト臍帯血のサンプルから単離した。免疫標識の前に、臍帯血単核球(CBMNC)はFcレセプターを遮断するために氷上で30分間、ヒト血清アルブミン(HAS; Baxter Healthcare)および100μg/mLの凝集正常ヒトガンマグロブリン(Sandoglobulin)を補給したPBS中でインキュベートした。その後、細胞は個別抗体または同時にどちらもPBS-HSA中の最終濃度20μg/mLへ希釈した抗CD34 MA b 43A1(マウスIgG<sub>3</sub>; Tübingen University H-J. Bühring博士の好意による寄贈)および抗体BB9(マウスIgG<sub>1</sub>)の組み合わせを用いてのどちらかで標識した。追加のサンプルは、単独または適切な43A1とBB9抗体の様々な組み合わせのどちらかでアイソタイプ適合非結合対照IgG<sub>3</sub>(Southern Biotechnology Associates、バーミンガム、アラバマ州)またはIgG<sub>1</sub>(アデレード大学微生物学部のGraham Mayerhofer博士の好意により提供されたMab 1B5、抗ジアルジア)抗体を用いて平行染色した。すべての抗体のインキュベーションは氷上で45分間実施し、その後ですべての場合に4の過剰なPBS-HSA中で2回洗浄した。特異的に結合したモノクローナル抗体は、適宜に滴定したマウス-IgG<sub>1</sub>(フィコエリトリンに結合、PE)およびマウスIgG<sub>3</sub>(FITCに結合、どちらもBiotechnology Associates; バーミンガム、アラバマ州、米国)に対するアイソタイプ特異的ヤギ抗体の組み合わせと共にインキュベーションを行った。PBS-HSA中で更に2回洗浄した後、細胞はFACSのために低温PBS-HSA中の約10<sup>7</sup>cells/mLで懸濁させた。

10

20

【0162】

細胞は、指示したゲートにしたがってCD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>/BB9<sup>+</sup>およびCD34<sup>+</sup>/BB9<sup>-</sup>フラクションに選別した。選別した細胞は、担体細胞としての10<sup>7</sup>照射CD34枯渴CBMNCと一緒に、マウス1匹当たり50~100,000cellsの線量で照射したNOD/SCIDマウス(400cGy)に移植した。移植については、移植6週間後に、アイソタイプIgG<sub>1</sub>-PE、CD11b-PE、CD19-PEまたはCD34-PE(全試薬はBecton Dickinsonから)いずれかとの組み合わせでヒト特異的抗CD45-FITCを用い、移植したNOD/SCIDマウスからの骨髄および末梢血のフローサイトメトリ解析(図8)によって評価した。結果は下記の表5に要約した。

30

【0163】

【表5】

40

表 5: 移植 6 週間後の移植結果

| 集団        | ヒト CD45+ 細胞の比率 (6 週間後) |
|-----------|------------------------|
| CD34+     | 15±6.5                 |
| CD34+BB9+ | 12±5                   |
| CD34+BB9- | 0.25±0.03              |

10

【 0 1 6 4 】

## SEQUENCE LISTING

<110> The Peter MacCallum Cancer Institute

Simmons, Paul J

<120> Identification and Isolation of Somatic Stem Cells and Uses Thereof

<130> 649197

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

10

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

20

<223>

<400> 1

Leu Phe Gln Glu Leu Gln Pro Leu Tyr Leu

1

5

10

<210> 2

<211> 8

30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(8)

<223>

<400> 2

40

Glu Ala Asp Asp Phe Phe Thr Ser

1

5

【 0 1 6 5 】

最後に、ここに説明した本発明の精神から逸脱することなく、様々な他の変形および/または変更を加えることができることが理解されよう。

【 0 1 6 6 】

【 表 6 】

50

## REFERENCES

1. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID, Thomas ED (1991) Engraftment after infusion of CD34<sup>+</sup> marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood*:1717
2. Civin CI, Trischmann T, Fackler M, Bernstein I, Brunning J, Campos L, Greaves M, Kamoun M, Katz D, Lansdorp P, Look A, Seed B, Sutherland D, Tindle R, Uchanska-Ziegler B (1989) Report on the CD34 cluster workshop, in Knapp W, Dorken B, Golk W, Rieber E, Stein H, Schmidt R, von dem Borne A (eds): *Leukocyte Typing IV*. Oxford, Oxford Press, 10
3. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996): *CD34: Structure, Biology and Clinical Utility*. *Blood* 87:1
4. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM (1989) Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 74:1563 20
5. Brandt J, Baird N, Lu L, Srour E, Hoffman R (1988) Characterization of a human hematopoietic progenitor cell capable of forming blast cell containing colonies in vitro. *J.Clin Invest* 82:1017
6. Huang S, Terstappen LWMM (1994) Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> hematopoietic stem cells. *Blood* 83:1515 30
7. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle A-M, Peault B (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *P.N.A.S. (U.S.A.)* 89:2804
8. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM (1993) Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 177:1331
9. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 15:5002 40
10. Buhring HJ, Seiffert M, Bock TA, Scheduling S, Thiel A, Scheffold A, Kanz L, Brugger W (1999) Expression of novel surface antigens on early hematopoietic cells. *Ann N Y Acad Sci* 872:25

11. de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BI, Testa NG (1998) CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 16:387
12. Simmons PJ, Torok-Storb B (1991) CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 78:2848 10
13. Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo G-R, Terstappen L (1995) The "common stem cell" hypothesis reevaluated: Human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 85:2422
14. Gronthos S, Simmons PJ (1996) The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J. Hematotherapy* 5:15
15. Zannettino ACW, Bühring H-J, Niutta S, Ashman LK, Känz L, Simmons PJ (1995) Identification and functional cloning of MGC-24, a mucin-like molecule expressed by haemopoietic progenitors and bone marrow stromal cells: A negative regulator of haemopoiesis. *Blood* 86:591a (abstract) 20
16. Satoh M, Mioh H, Shiotsu Y, Ogawa Y, Tamaoki T (1997) Mouse bone marrow stromal cell line MC3T3-G2/PA6 with hematopoietic-supporting activity expresses high levels of stem cell antigen Sca-1. *Exp. Hematol.* 25:972 30
17. To LB, Shepperd KM, Haylock DN, Dyson PG, Charles P, Thorp DL, Dale BM, Dart GW, Roberts MM, Sage RE, Juttner CA (1990) Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp. Hematol.* 18:442
18. Dyson PG, Jackson KA, McClure BJ, Rawling TP, To LB (1996) Increased levels of megakaryocyte progenitors in peripheral blood mobilised by chemotherapy and/or haemopoietic growth factor protocols. *Bone Marrow Transp.* 18:705 40
19. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994) The STRO-1<sup>+</sup> fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84:4164

20. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA (1991) The E7 gene of human papillomavirus type-16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* 65:473
21. Kaur P, Halbert CL (1995) Immortalization of human keratinocytes with human papilloma virus DNA. *Methods Cell Sci.* 17:117
22. Simmons PJ, Gronthos S, Ohta S, Graves SE (1995) Human bone marrow stromal cell precursors: identification and development potential. *Bone Marrow Transp.* 15 Supp 1:S3 10
23. Köhler E, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495
24. Goding JW (1980) Antibody production by hybridomas. *J. Imm. Meth.* 39:285
25. Buhning HJ, Burkhardt M, Ning Y, Müller CA (1995) Reactivity patterns and epitope mapping of CD34 panel mAbs, in Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer T, Tedder TF, Todd RF (eds): *Leukocyte Typing V.* Oxford, Oxford Press, p 847 20
26. Baird PN, Simmons PJ (1996) Expression of the Wilms' Tumour gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp. Hematol.* 25:312
27. O'Connor CG, Ashman LK (1982) Application of the nitrocellulose transfer technique and alkaline phosphatase conjugated anti-immunoglobulin for determination of the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. *J. Imm. Meth.* 54:267 30
28. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231
29. Haylock DN, To LB, Dowse TL, Juttner CA, Simmons PJ (1992) Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. *Blood* 80:1405 40
30. Marchalonis JJ (1969) An enzymatic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.* 113:299
31. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J. Immunol.* 133:1710

32. Spangrude GJ, Johnson GR (1990) Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *P.N.A.S. (U.S.A.)* 87:7433
33. Murray L, Chen B, Galy A, Chen S, Tushinski R, Uchida N, Negrin R, Tricot G, Jagannath S, Vesole D, Barlogie B, Hoffman R, Tsukamoto A (1995) Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood. *Blood* 85:368 10
34. Chaudhary PM, Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 66: 85
35. Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB (1992) Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80:2735
36. Beck WT, Mueller TJ, Tanzer LR (1979) Altered surface membrane glycoproteins in vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res.* 39:2070 20
37. Rappold I, Ziegler BL, Köhler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino ACW, Hill B, Neu S, Knapp W, Alitalo R, Alitalo K, Ullrich A, Kanz L, Bühring H-J (1997) Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing Flt3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 90:111 30
38. Kukk E, Wartiovaara U, Gunji Y, Kaukonen J, Bühring H-J, Rappold I, Matikainen M-T, Vihko P, Partanen J, Palotie A, Alitalo K, Alitalo R (1997) Analysis of Tie receptor tyrosine kinase in haemopoietic progenitor and leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 98:195
39. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C (1999) KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285:1553 40
40. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90:5013

41. Ziegler SF, Bird TA, Schneringer JA, Schooley KA, Baum PR (1993) Molecular cloning and characterization of a novel receptor protein tyrosine kinase from human placenta. *Oncogene* 8:663
42. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P (1992) Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1579 10
43. Batard P, Sansilvestri P, Scheinecker C, Knapp W, Debili N, Vainchenker W, Bühring H-J, Monier M-N, Kukk E, Partanen J, Matikainen M-T, Alitalo R, Hatzfeld J, Alitalo K (1996) The Tie receptor tyrosine kinase is expressed by human hematopoietic progenitor cells and by a subset of megakaryocytic cells. *Blood* 87:2212
44. Haylock DN, Horsfall MJ, Dowse TL, Ramshaw HS, Niutta S, Protopsaltis S, Peng L, Burrell C, Rappold I, Bühring H-J, Simmons PJ (1997) Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand. *Blood* 90:2260 20
45. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T (1995) The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *P.N.A.S. (U.S.A.)* 92:12240
46. He H, Naquet P, Caillol D, Pierres M (1991) Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial cells through a Ca<sup>2+</sup> independent mechanism. *J. Exp. Med.* 173:515 30
47. Zannettino AC, Bühring HJ, Niutta S, Watt SM, Benton MA, Simmons PJ (1998) The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. *Blood* 15:2613
48. Doyonnas R, Yi-Hsin Chan J, Butler LH, Rappold I, Lee-Prudhoe JE, Zannettino AC, Simmons PJ, Bühring HJ, Levesque JP, Watt SM (2000). CD164 monoclonal antibodies that block hemopoietic progenitor cell adhesion and proliferation interact with the first mucin domain of the CD164 receptor. *J Immunol.* 15:840 40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 6 7 】

【 図 1 】 図 1 は、正常ヒト骨髓上の CD 3 4 および B B 9 の発現を示した図である。パネ 50

ルAは、BMMNC上の垂直光散乱（側方散乱）についてのBB9の発現を描出している。長方形の領域は、BB9<sup>+</sup>であって低い側方散乱を示している細胞を取り囲んでいる。パネルBは、CD34およびBB9の発現を示す。CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>（右上の4分の1区）およびCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>（右下の4分の1区）を規定する長方形の領域は、クローン原性アッセイおよび前CFUアッセイに使用するためFACSによって細胞を単離するために使用された領域の典型であった。

【図2】図2は、BB9が初期造血前駆細胞へ優先的に結合することを示した図である。BM由来CD34<sup>+</sup>細胞上へのBB9の結合と比較した、RH123残留（パネルA）、CD38（パネルB）およびCD90（Thy-1：パネルC）発現の3カラーフローサイトメトリ解析。最高レベルのBB9抗原発現は、CD34<sup>+</sup>BMMNC上に存在してあり、これはCD90を共発現し、低から検出不能なCD38発現を示し、RH123<sup>dim</sup>である。各プロットは、リストモード・データとして収集された少なくとも10<sup>4</sup>のCD34<sup>+</sup>イベントから生成した。

10

【図3a】図3は、BB9がヒト成人BM内のCD34<sup>+</sup>集団中で静止（G<sub>0</sub>）細胞を同定することを示した図である。Ki67、CD34およびBB9発現の3カラーフローサイトメトリ解析を成人BMについて実施した。パネルAは、BMMNCのKi67およびCD34発現を示す。領域1（R1）は、低/ネガティブKi67発現を示すCD34<sup>+</sup>細胞を同定するが、R2は高Ki67を示すCD34<sup>+</sup>細胞を同定する。パネルBは、R1によって規定された細胞によるBB9の発現を示し（Ki67低：静止細胞）、パネルCはKi67ポジティブ（増殖）細胞のBB9発現を示す。

20

【図3b】図3は、BB9がヒト成人BM内のCD34<sup>+</sup>集団中で静止（G<sub>0</sub>）細胞を同定することを示した図である。Ki67、CD34およびBB9発現の3カラーフローサイトメトリ解析を成人BMについて実施した。パネルAは、BMMNCのKi67およびCD34発現を示す。領域1（R1）は、低/ネガティブKi67発現を示すCD34<sup>+</sup>細胞を同定するが、R2は高Ki67を示すCD34<sup>+</sup>細胞を同定する。パネルBは、R1によって規定された細胞によるBB9の発現を示し（Ki67低：静止細胞）、パネルCはKi67ポジティブ（増殖）細胞のBB9発現を示す。

【図4】図4は、前CFU培養中のCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>およびCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>BM細胞からのCFU-GMおよび有核細胞生成を示した図である。CFU-GM（パネルA）および有核細胞（パネルB）ならびに4種のHGF（IL-3、IL-6、SCFおよびG-SCF）を用いて刺激した前CFU培養中の1000個のCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>またはCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>BM細胞からの生成。第14日およびその後は1週間毎の間隔で、これらの培養物は10分割中の1つに分けられ、新鮮培地およびHGFが再供給された。相違するBM源を用いた10回の個別実験からの平均値および標準誤差を提示した。

30

【図5】図5は、定常状態および流動末梢血球上でのCD34およびBB9の発現を示した図である。定常状態造血に相当する健常人ドナーからの末梢血単核球（パネルAおよびB）、および高用量シクロホスファミン（HDC）+G-CSF（パネルC）またはHDC+GM-CSF（パネルD）を用いた患者からの流動末梢血単核球をCD34およびBB9に対する抗体を用いて免疫標識した。各パネルはCD34（水平軸）およびBB9（垂直軸）の発現を示しており、各4分の1区内の数は各4分の1区内の細胞の比率を表している。パネルB内に示したドットプロットは、定常状態血液からのCD34<sup>+</sup>細胞についてのCD34およびBB9発現を示す。これらのデータは、相違する細胞源からの少なくとも4サンプルを代表するデータである。

40

【図6】図6は、前CFU培養中の流動PB CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>およびCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>細胞からのCFU-GMおよび有核細胞生成を示した図である。パネルAおよびBは、各々4種のHGF（IL-3、IL-6、SCFおよびG-SCF）を用いて刺激した前CFU培養中の1000個のCD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>またはCD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup>BM細胞からのCFU-GMおよび有核細胞の生成を示している。第14日およびその後は1週間毎の間隔で、これらの培養物は10分割中の1つに分けられ、新鮮培地およびHGFが再供給された。各時点で、HDC+GM-CSFを用いて流動した3例およびHDC+G-CSFを用い

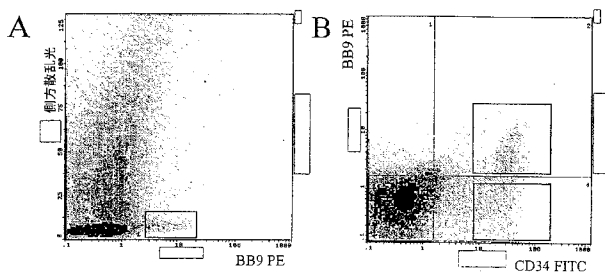
50

て流動した 3 例の、患者 6 例からの結合データについての平均値および標準誤差を提示した。

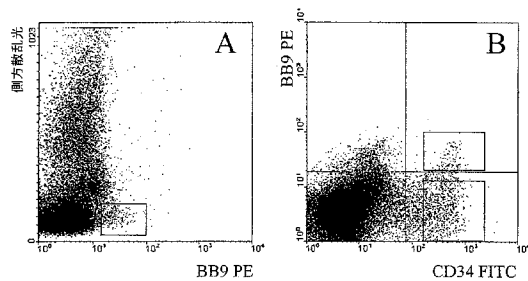
【図 7】図 7 は、BB9 が 160 kDa のタンパク質を同定しているのを示した図である。表面<sup>125</sup>I 標識 UT7 細胞の免疫沈降解析。レーン 1、ネガティブコントロール抗体。レーン 2、BB9；BB9 は 160 kDa のタンパク質を免疫沈降させた。分子量マーカーの位置は左側に示した。

【図 8】図 8 は、NOD / SCID マウスに移植された CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup>細胞を示した図である。

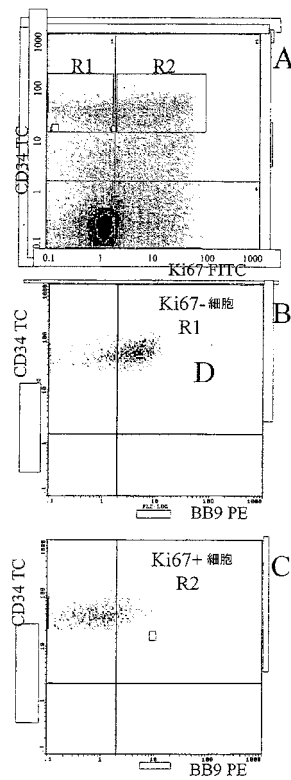
【図 1】



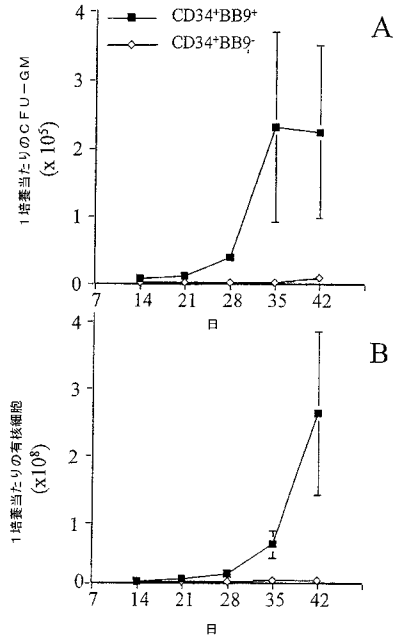
【図 2】



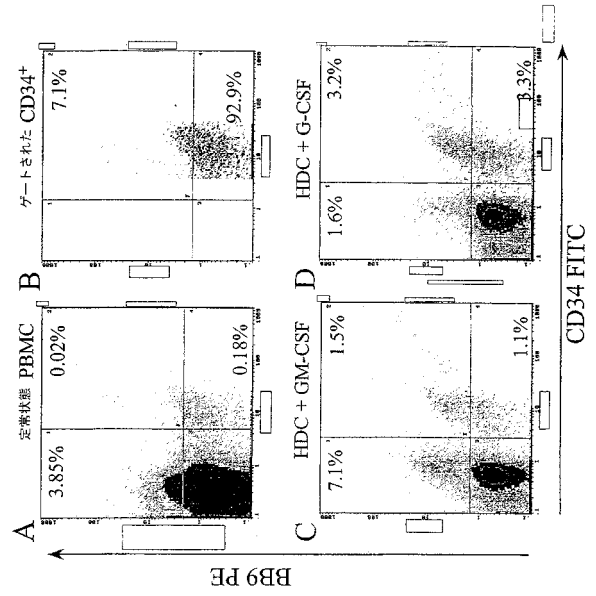
【図 3 b】



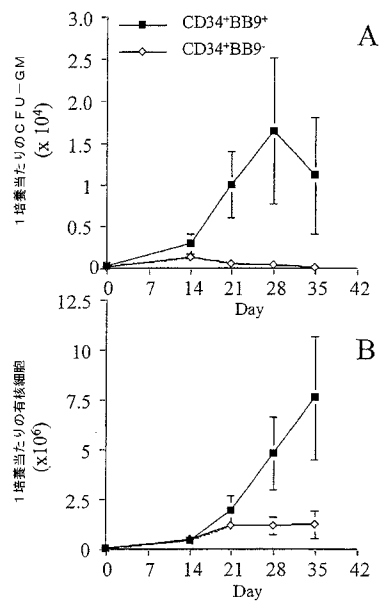
【 図 4 】



【 図 5 】

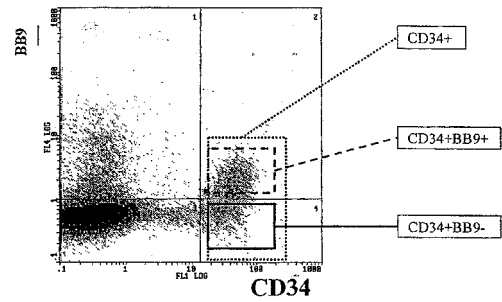


【 図 6 】



【 図 8 】

CD34+BB9+ 細胞が移植されたNOD/SCIDマウス



## 【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  
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/016916 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/577, 33/573
- (21) International Application Number: PCT/AU02/01101
- (22) International Filing Date: 15 August 2002 (15.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: PR 7036 15 August 2001 (15.08.2001) AU
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE PETER MACCALLUM CANCER INSTITUTE [AU/AU]; Smorgan Family Building, St Andrews Place, East Melbourne, Victoria 3002 (AU).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): SIMMONS, Paul, John [GB/AU]; 55 Davis Street, Kew, Victoria 3101 (AU).
- (74) Agent: PHILLIPS ORMONDE & FITZPATRICK; 367 Collins Street, Melbourne, Victoria 3000 (AU).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, 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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SI, SK, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search 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 03/016916 A1

(54) Title: IDENTIFICATION AND ISOLATION OF SOMATIC STEM CELLS AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to the identification of a specific population of cell types, in particular somatic stem cells including haematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells and keratinocyte stem cells. The invention also provides for methods of isolation and uses of the stem cells. Derived from the methods of the present invention, there is provided a method of identifying a stem cell comprising the steps of: obtaining a cell sample including stem cells; detecting the presence of angiotensin converting enzyme (ACE) or a fragment thereof on a cell; and identifying the stem cells having ACE or a fragment thereof.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

**IDENTIFICATION AND ISOLATION OF SOMATIC STEM CELLS AND USES  
THEREOF**

5 The present invention relates to the identification of a specific population of cell types, in particular somatic stem cells including haematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells and keratinocyte stem cells. The invention also provides for methods of isolation and uses of the stem cells derived from the methods.

10 **INTRODUCTION**

There exist a strong interest in identifying specific cell types in an effort to gain enriched populations of the cells. Having possession of an enriched population may allow for a better understanding of the specific cell types or even provide  
15 uses in various situations including transplantation, gene therapy, treatment of disease including cancers such as leukaemias, neoplastic cancers including breast cancers, or repair of tissues and skin.

20 Stem cells and the isolation and identification of such cells provides many advantages. These cells are defined as cells which are not terminally differentiated, which can divide without limit, and divide to yield cells that are either stem cells or which irreversibly differentiate to yield a new type of cell. Those stem cells which give rise to a single type of cell are called unipotent cells; those which give rise to many cell types are called pluripotent cells.

25 Stem cells are by definition present in all self-renewing tissues. These cells are believed to be long-lived, have a great potential for cell division and are ultimately responsible for the homeostasis of steady-state tissues. Stem cells possess many of the following properties: they are relatively undifferentiated, ultrastructurally and biochemically; they have a large proliferative potential and  
30 are responsible for the long term maintenance and regeneration of tissue; they are normally "slow-cycling", presumably to conserve their proliferative potential and to minimize DNA errors that could occur during replication; they can be stimulated to proliferate in response to wounding and to certain growth stimuli;

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

2

they are often located in close proximity to a population of rapidly proliferating cells corresponding to the transient amplifying cells ("TA") in the scheme of (1) stem cell to (2) TA cell to (3) terminally differentiated cell; and they are usually found in well protected, highly vascularized and innervated areas.

5

Positive identification of stem cells has been difficult because there are no known immunological or biochemical markers specific for somatic stem cells. Since they are normally "slow cycling", methods of identification are limited.

10 Stem cells are important targets for gene therapy, where the inserted genes promote the health of the individual into whom the stem cells are transplanted. In addition, the ability to isolate stem cells can serve in the treatment of lymphomas and leukaemias, as well as other neoplastic conditions where the stem cells are purified from tumor cells in the bone marrow or peripheral blood, 15 and reinfused into a patient after myelosuppressive or myeloablative chemotherapy. Thus, there have been world-wide efforts toward isolating stem cells in substantially pure form.

20 Stem cells constitute only a small percentage of the total number of pluripotent cells. Pluripotent cells are identifiable by the presence of a variety of cell surface "markers." Such markers can be either specific to a particular lineage or progenitor cell or be present on more than one cell type. Currently, it is not known how many of the markers associated with differentiated cells are also present on stem cells.

25

In view of the small proportion of the total number of cells in the bone marrow or peripheral blood which are stem cells, the uncertainty of the markers associated with the stem cell as distinct from more differentiated cells, and the general difficulty in assaying for stem cells biologically, the identification and purification 30 of stem cells has been elusive.

Somatic stem cells give rise to cells which ultimately contribute to various parts of the plant or animal. Generally the somatic cells can be divided into haematopoietic, mesenchymal or keratinocyte stem cells.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

3

Mammalian hematopoietic cells are responsible for an extraordinarily diverse range of activities. They are divided into several lineages, including lymphoid, myeloid and erythroid. The lymphoid lineage, comprising B cells and T cells, produces antibodies, regulates cellular immunity, and detects foreign agents such as disease-causing organisms in the blood. The myeloid lineage, which includes monocytes, granulocytes, and megakaryocytes, monitors the blood for foreign bodies, protects against neoplastic cells, scavenges foreign materials, and produces platelets. The erythroid lineage includes red blood cells, which carry oxygen.

The relative paucity of hematopoietic stem cells has prevented extensive research on stem cells and hematopoietic differentiation in general. The ready availability of a cell population enriched in hematopoietic stem cells would make possible the identification of biological modifiers affecting stem cell behavior. For example, there may be as yet undiscovered growth factors associated with (1) early steps of dedication of the stem cell to a particular lineage; (2) the prevention of such dedication; and (3) the ability to control stem cell proliferation.

The availability of sufficient numbers of stem cells in an enriched population would also be extremely useful, for example, in reconstituting hematopoiesis in patients undergoing treatments which destroy stem cells, such as cancer chemotherapy.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are the formative pluripotential cells found inter alia in bone marrow, blood, dermis and periosteum that are capable of differentiating into more than one specific type of mesenchymal or connective tissues (i.e. the tissues of the body that support the specialized elements; e.g. adipose, osseous, stroma, cartilaginous, elastic and fibrous connective tissues) depending upon various influences from bioactive factors, such as cytokines. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are reactive with certain monoclonal antibodies, known as SH2, SH3 and SH4.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

4

Keratinocyte stem cells give rise to skin cells and cells of the epidermis. They are particularly useful in the treatment of ulcers, acute wounds and grafting of acute wounds.

- 5 However, identification of these specific cell types by cell surface markers has generally proven to be the best means of identification. The identification of additional cell surface antigens would clearly be of major value in the identification, isolation and further characterization of candidate stem cells.
- 10 Accordingly, it is an object of the present invention to overcome or alleviate some of the problems of the prior art.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

- 15 In one aspect of the present invention there provided a method of identifying a stem cell comprising the steps of
- obtaining a cell sample including stem cells;
  - detecting the presence of a peptide sequence having the sequence LFGELQPLYL (SEQ ID NO:1) or an equivalent thereof; and
- 20 identifying the stem cells having the sequence or equivalent thereof.

- In another aspect of the present invention here provided a method of identifying a stem cell comprising the steps of
- obtaining a cell sample including stem cells;
- 25 detecting the presence of a peptide sequence having the sequence EADDFFTS (SEQ ID NO:2) or an equivalent thereof; and
- identifying the stem cells having the sequence or equivalent thereof.

- The peptide sequences described herein as SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2
- 30 have been found to be expressed specifically on stem cells. The sequence may be a portion of a larger protein or be a sequence expressed by the stem cells. These sequences may used alone or in combination to identify or isolate stem cells.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

5

Applicants have found that angiotension converting enzyme (ACE) is expressed in stem cells. ACE acts on converting angiotensin-I to angiotensin-II. Angiotensin-II increases blood pressure and is considered a main cause of essential hypertension. The sequences described may be a portion of ACE.

5

Accordingly, in another aspect of the present invention there is provided a method of identifying a stem cell comprising the steps of:

- obtaining a cell sample including stem cells;
- detecting the presence of angiotensin converting enzyme (ACE) or a
- 10 fragment thereof on a cell; and
- identifying the stem cells having ACE or a fragment thereof.

Any means of identifying the ACE may be used. However, in a preferred aspect of the present invention there is provided a method of identifying a stem cell

15 comprising the steps of:

- obtaining a cell sample including stem cells;
- combining the sample with an antibody for angiotensin converting enzyme (ACE);
- detecting the presence of ACE or a fragment thereof; and
- 20 identifying the stem cells having ACE by detecting the presence of the antibody on the stem cells.

Preferably, the antibody is any antibody specific for ACE. The antibody used in the present invention encompasses any antibody or fragment thereof, either

25 native or recombinant, synthetic or naturally-derived, monoclonal or polyclonal which retains sufficient specificity to bind specifically to the ACE or a fragment thereof which is indicative of ACE. Preferably, the antibody is BB9 ACE antibody.

- 30 The present invention also encompasses a method for obtaining a cell population enriched in stem cells comprising the steps of
- obtaining a cell population comprising stem cells;
  - detecting the presence of ACE or a fragment thereof on a cell; and

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

6

selecting for cells which are identified by the presence of ACE on the cell.

In a preferred aspect of the present invention there is provided a method of obtaining a cell population enriched in haematopoietic stem cells comprising the steps of:

5 obtaining cell populations comprising stem cells;  
combining the cell population with an antibody for ACE; and  
selecting for cells which are identified by the presence of ACE on the  
10 cell.

Similarly, in another preferred embodiment, there is provided a method of removing stem cells from a population comprising the steps of

obtaining a cell population comprising stem cells;  
15 detecting the presence of ACE or a fragment thereof on a cell; and  
selecting out those cells which are identified by the presence of ACE on the cell.

The methods described herein may also be used to isolate stem cells from cell populations or measure stem cell content in such populations.

Once a stem cell is isolated or identified, they may be used in methods of treating or diagnosing stem cell related conditions.

25 Preferably, the stem cell isolated is a haematopoietic stem cell, mesenchymal stem cell or a keratinocyte stem cell. However, other cells including neuronal, hepatic and pancreatic cells may also be included. Most preferably, the stem cell is a haematopoietic stem cell.

30 Once the stem cell population is isolated, further isolation techniques may be employed to isolate subpopulations with the stem cells. Specific markers for mesenchymal or keratinocyte cells may be used to identify and isolate the various cell lineages.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

7

**FIGURES**

- Figure 1 shows expression of CD34 and BB9 on normal human bone marrow.
- 5 Panel A displays expression of BB9 with respect to the perpendicular light scatter (side scatter) on BMMNC. The rectangular region surrounds cells that are BB9<sup>+</sup> and exhibit low side scatter. Panel B displays the expression of CD34 and BB9. The rectangular regions defining CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> (upper right quadrant) and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> cells (lower right quadrant) were typical of those used for
- 10 isolation of cells by FACS used for clonogenic and pre-CFU assays.
- Figure 2 shows that BB9 preferentially binds to primitive hematopoietic progenitors. Three colour flow cytometric analysis of Rh123 retention (panel A), CD38 (panel B) and CD90 (Thy-1; panel C) expression relative to the binding of
- 15 BB9 on BM derived CD34<sup>+</sup> cells. Highest levels of BB9 antigen expression are present on CD34<sup>+</sup> BMMNC, which co-express CD90, show low to undetectable CD38 expression and are Rh123<sup>dim</sup>. Each plot was generated from at least 10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup> events collected as list mode data.
- 20 Figure 3 shows that BB9 identifies quiescent (G<sub>0</sub>) cells in the CD34<sup>+</sup> population in adult human BM. Three colour flow cytometric analysis of Ki67, CD34 and BB9 expression was performed on adult BM. Panel A depicts Ki67 and CD34 expression of BMMNC. Region 1 (R1) identifies CD34<sup>+</sup> cells that exhibit low/negative Ki67 expression, whereas R2 identifies CD34<sup>+</sup> cells with high Ki67.
- 25 Panel B displays expression of BB9 by those cells defined by R1 (Ki67 low: quiescent cells) and Panel C displays BB9 expression of Ki67 positive (proliferating) cells.
- Figure 4 shows CFU-GM and nucleated cell generation from CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> BM cells in pre-CFU culture. Generation of CFU-GM (panel A) and nucleated cells (panel B) and from 1000 CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> or CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> BM cells in pre-CFU culture stimulated with 4 HGF (IL-3, IL-6, SCF and G-SCF). At day 14 and at weekly intervals thereafter, the cultures were subjected to 1 in 10

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

8

splits and refed with fresh medium and HGF. The mean and standard error from 10 separate experiments with different sources of BM are presented.

Figure 5 shows an expression of CD34 and BB9 on steady state and mobilized peripheral blood cells. Peripheral blood mononuclear cells from normal adult volunteer donors, representing steady state hematopoiesis (panels A and B), and patients mobilised with high dose cyclophosphamide (HDC) + G-CSF (panel C) or HDC + GM-CSF (panel D) were immunolabelled with antibodies to CD34 and BB9. Each panel displays the expression of CD34 (horizontal axis) and BB9 (vertical axis) and the numbers within each quadrant represents the proportion of cells within the respective quadrant. The dot plot shown within panel B displays CD34 and BB9 expression for CD34<sup>+</sup> cells from steady state blood. These data are representative of at least 4 samples of the different cell sources.

Figure 6 shows CFU-GM and nucleated cell generation from mobilized PB CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> cells in pre-CFU culture. Panels A and B show generation of CFU-GM and nucleated cells, respectively, from 1000 CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> or CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> MPB cells in pre-CFU culture stimulated with 4 HGF (IL-3, IL-6, SCF and G-SCF). At day 14 and at weekly intervals thereafter, the cultures were subjected to 1 in 10 splits and refed with fresh medium and HGF. At each time point, the mean and standard error for the combined data from 6 patients, 3 mobilised with HDC+GM-CSF and 3 with HDC+G-CSF are presented.

Figure 7 shows that BB9 identifies a Protein of 160 kDa. Immunoprecipitation analysis of surface <sup>125</sup>I labelled UT7 cells. Lane 1, negative control antibody. Lane 2, BB9; BB9 immunoprecipitated a protein of 160 kDa. The positions of molecular weight markers are shown at the left.

Figure 8 shows CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> cells engraft NOD/SCID Mice.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

9

**DESCRIPTION OF THE INVENTION**

In one aspect of the present invention there provided a method of identifying a stem cell comprising the steps of

- obtaining a cell sample including stem cells;
- detecting the presence of a peptide sequence having the sequence LFQELQPLYL (SEQ ID NO:1) or an equivalent thereof; and
- identifying the stem cells having the sequence or equivalent thereof.

10

In another aspect of the present invention here provided a method of identifying a stem cell comprising the steps of

- obtaining a cell sample including stem cells;
- detecting the presence of a peptide sequence having the sequence EADDFFTS (SEQ ID NO:2) or an equivalent thereof; and
- identifying the stem cells having the sequence or equivalent thereof.

15

The peptide sequences described herein as SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 have been found to be expressed specifically on stem cells. The sequence may be a portion of a larger protein or be a sequence expressed by the stem cells.

20

The term "equivalent" thereof as used herein means a sequence which functions in a similar way but may have deletions, additions or substitutions that do not substantially change the activity or function of the sequence. Therefore, at least one amino acid may be deleted, added or substituted into the peptide sequence without substantially changing the functionality of the sequence. Hence, the peptide sequence with changes should still be detectable for identification of the stem cells.

25

In another aspect of the present invention there is provided a method of identifying a stem cell comprising the steps of:

- obtaining a cell sample including stem cells;
- detecting the presence of angiotensin converting enzyme (ACE) or a fragment thereof on a cell; and

30

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

10

identifying the stem cells having ACE or a fragment thereof.

Applicants have found that angiotension converting enzyme (ACE) is expressed in stem cells. ACE acts on converting angiotensin-I to angiotensin-II.

5 Angiotensin-II increases blood pressure and is considered a main cause of essential hypertension.

ACE, also referred to as peptidyl dipeptidase A (EC 3.4.15.1) and kininase II is a metallopeptidase, more particularly a zinc peptidase which hydrolyses  
10 angiotensin I and other biologically active polypeptides, such as kinins, e.g., bradykinin. Bradykinin is a vasodilator, which acts at least in part by inducing release of vasodilator prostaglandins, and which is inactivated upon hydrolysis by ACE. Thus, ACE increases blood pressure at least in part by producing angiotensin II, a vasoconstrictor, and by inactivating bradykinin, a vasodilator.

15 Bradykinin is also involved in other biological activities including mediation of pain and inflammatory reactions.

However, the enzyme has not previously been connected to stem cells nor for their identification.

20

ACE or a fragment of ACE may be detected on the stem cell. Preferably the ACE molecule is detected. However, fragments of the ACE molecule may also be indicative of ACE. Such fragments may include peptide sequences having the sequence encoded by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or an equivalent  
25 thereof.

Applicants have found that the SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 are found within the ACE amino acid sequence and were subsequently found to be identified by ACE antibodies.

30

Throughout the description and claims of this specification, the word "comprise" and variations of the word, such as "comprising" and "comprises", is not intended to exclude other additives, components, integers or steps.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

11

The stem cells of the present invention and described herein include all stem cells which are essentially undifferentiated cells in an embryo or adult which can undergo unlimited division and can give rise to one or several cell types. It is preferred that the stem cells of the present invention include, but are not limited to, somatic stem cells. These may be selected from the group including haematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, keratinocyte stem cells neuronal, hepatic and pancreatic cells. Most preferably, they are haematopoietic stem cells which can differentiate to stem cells of a lymphoid, myeloid or erythroid lineage. However applicants find that the method is also useful for distinguishing mesenchymal and keratinocyte stem cells.

The sample of stem cells may originate from any source including an embryonic or adult source. Preferably, the stem cell source is from the bone marrow including iliac crests, tibiae, femurs, spine, periosteum, endosteum or other bone cavities, blood, embryonic yolk sac, fetal liver, spleen, peripheral, blood, skin, dermis, liver, brain, pancreas or kidney.

The sample may be a tissue sample or a cell suspension or cells derived from either source grown in vitro which allows for interaction of a marker for ACE to identify the stem cells.

For isolation of bone marrow, an appropriate solution can be used to flush the bone, including, but not limited to, salt solution, conveniently supplemented with fetal calf serum (FCS) or other naturally occurring factors, in conjunction with an acceptable buffer at low concentration, generally from about 5-25 mM. Convenient buffers include, but are not limited to, HEPES, phosphate buffers and lactate buffers. Otherwise bone marrow can be aspirated from the bone in accordance with conventional techniques.

The method of detecting ACE or the specific sequences SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 will be dependent upon the type of sample including the stem cells. Generally the sample is exposed or combined with a marker for ACE or the sequences in a manner which facilitates the marker interaction with the cells. For example, where the sample is a cell suspension as in a blood sample, the

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

12

marker may simply be added to the cell suspension. This is applicable where the marker is intended to physically identify ACE or the sequences.

The marker for ACE or the sequences may include any means which identifies  
5 ACE or the sequences, preferably it is a marker which identifies ACE or the sequences on a cell surface which includes but is not limited to antibodies to ACE or the sequences, agonists and antagonists against ACE or the sequences, nucleic acid detection systems which can detect expression of ACE or the sequences either by the presence of DNA, RNA, mRNA or ACE protein,  
10 and enzymatic, fluorescence or colourimetric assays for ACE. The method of detection will be apparent to the skilled addressee for the type of marker selected.

The marker may include the addition of labels to enhance the identification of  
15 the marker. For instance, fluorescence, radioactivity or enzymatic markers familiar to the skilled addressee may be linked to the marker to enhance detection.

In a preferred aspect of the present invention there is provided a method of  
20 identifying a stem cell comprising the steps of:

- obtaining a cell sample including stem cells;
- combining the sample with an antibody for angiotensin converting enzyme (ACE);
- detecting the presence of ACE or a fragment thereof; and
- 25 identifying the stem cells having ACE by detecting the presence of the antibody on the stem cells.

Preferably, the antibody is any antibody specific for ACE. The antibody used in  
the present invention encompasses any antibody or fragment thereof, either  
30 native or recombinant, synthetic or naturally-derived, monoclonal or polyclonal which retains sufficient specificity to bind specifically to the ACE or a fragment thereof which is indicative of ACE. As used herein, the terms "antibody" or "antibodies" include the entire antibody and antibody fragments containing functional portions thereof. The term "antibody" includes any monospecific or

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

13

bispecific compound comprised of a sufficient portion of the light chain variable region and/or the heavy chain variable region to effect binding to the epitope to which the whole antibody has binding specificity. The fragments can include the variable region of at least one heavy or light chain immunoglobulin polypeptide, and include, but are not limited to, Fab fragments, F(ab')<sub>2</sub> fragments, and Fv fragments.

The recombinant antibody can be produced by any recombinant means known in the art. Such recombinant antibodies include, but are not limited to, fragments produced in bacteria and non-human antibodies in which the majority of the constant regions have been replaced by human antibody constant regions. In addition, such "humanized" antibodies can be obtained by host vertebrates genetically engineered to express the recombinant antibody.

In addition, the monospecific domains can be attached by any method known in the art to another suitable molecule compound. The attachment can be, for instance, chemical or by genetic engineering.

The antibodies can be conjugated to other suitable molecules and compounds including, but not limited to, enzymes, magnetic beads, colloidal magnetic beads, haptens, fluorochromes, metal compounds, radioactive compounds or drugs. The enzymes that can be conjugated to the antibodies include, but are not limited to, alkaline phosphatase, peroxidase, urease and  $\beta$ -galactosidase. The fluorochromes that can be conjugated to the antibodies include, but are not limited to, fluorescein isothiocyanate, tetramethylrhodamine isothiocyanate, phycoerythrin, allophycocyanins and Texas Red. For additional fluorochromes that can be conjugated to antibodies see Haugland, R. P. Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1992-1994). The metal compounds that can be conjugated to the antibodies include, but are not limited to, ferritin, colloidal gold, and particularly, colloidal superparamagnetic beads. The haptens that can be conjugated to the antibodies include, but are not limited to, biotin, digoxigenin, oxazalone, and nitrophenol. The radioactive compounds that can be conjugated or incorporated into the antibodies are known to the art, and include but are not limited to technetium 99m, <sup>125</sup>I and

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

14

amino acids comprising any radionuclides, including, but not limited to  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  and  $^{35}\text{S}$ .

5 The ACE antibodies may be obtained by methods known in the art for production of antibodies or functional portions thereof. Specific methods used are described in the Examples presented herein although any method known in the art of antibody production can be used. Such methods include, but are not limited to, separating B cells with cell-surface antibodies of the desired specificity, cloning the DNA expressing the variable regions of the light and heavy chains and expressing the recombinant genes in a suitable host cell. Standard monoclonal antibody generation techniques can be used wherein the antibodies are obtained from immortalized antibody-producing hybridoma cells. These hybridomas can be produced by immunizing animals with stem cells, and fusing B lymphocytes from the immunized animals, preferably isolated from the immunized host spleen, with compatible immortalized cells, preferably a B cell myeloma.

15 ACE antibodies may be obtained from any source. They may be commercially available. Effectively, any means which detects the presence of ACE on the cells is with the scope of the present invention.

20 In a further preferred aspect of the present invention there is provided a method of identifying a stem cell comprising the steps of:

obtaining a sample including stem cells;  
25 combining the sample with antibody BB9 specific for angiotensin converting enzyme (ACE);  
detecting the presence of BB9 or a fragment thereof;  
identifying the stem cells by detecting the presence of the antibody BB9 on the stem cells.

30 A monoclonal antibody (MAb), BB9, was identified by the Applicants based on its binding to stromal cells, a minor subpopulation of mononuclear cells in adult human BM and corresponding lack of reactivity with leukocytes in PB. BB9 bound to a minor subpopulation of BM CD34<sup>+</sup> cells characterized by high level

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

15

CD34 antigen and Thy-1 expression, low-absent expression of CD38, low retention of Rhodamine 123 and quiescent cycle status as evidenced by lack of labeling with Ki67. CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> cells, in contrast to CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> cells, demonstrated a capacity to preferably sustain hematopoiesis in pre-CFU culture stimulated by the combination of IL-3, IL-6, G-CSF and SCF. BB9 also demonstrated binding to CD34<sup>+</sup> cells from mobilised PB.

BB9 was identified during initial antibody screening by its apparent lack of binding to mononuclear cells in adult BM and peripheral blood (PB) and, on subsequent flow cytometric analysis, by its binding to a minor subpopulation of BM CD34<sup>+</sup> cells. These cells have been shown to sustain long term hematopoiesis in stromal cell free liquid culture and by phenotypic analysis to express markers characteristic of primitive hematopoietic progenitor cells.

15 The isolation of this antibody is specifically described herein the examples.

BB9 is preferably used to identify haematopoietic stem cells. However, applicants have found that it is also useful for identifying mesenchymal stem cells and keratinocyte stem cells.

20

The method outlined herein is particularly useful for identifying stem cells from a population of cells. However, additional markers may be used to further distinguish subpopulations within the general stem cell population.

25 For instance, mesenchymal stem cells can be further identified by markers including, but not limited to, STRO-1, SH2, SH3 and SH4. These markers may be used singularly or in combination to identify mesenchymal stem cells.

30 Keratinocyte stem cells may be identified by markers including but not limited to, cytokeratin 14, alpha-6 integrin (CD49F) and CD71. These markers may be used separately or in combination to identify keratinocyte stem cells.

The step of using additional markers may be applied separately or in combination with an ACE marker.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

16

In another aspect of the present invention, there is provided a method for obtaining a cell population enriched in stem cells comprising the steps of  
obtaining a cell population comprising stem cells;  
5 detecting the presence of ACE or a fragment thereof on a cell; and  
selecting for cells which are identified by the presence of ACE on the cell.

The present invention thus encompasses methods of enriching a population for stem cells. The methods involve combining a mixture of stem cells preferably  
10 with an antibody that recognizes and binds to ACE under conditions which allow the antibody to bind to ACE and separating the cells recognized by the antibody to obtain a population substantially enriched in stem cells. However, other forms of identification of ACE may be used as described above. The methods  
15 can be used as a diagnostic assay for the number of stem cells in a sample. The cells and antibody are combined under conditions sufficient to allow specific binding of the antibody to ACE and the stem cells which are then quantitated. The stem cells can be isolated or further purified.

20 As discussed above the cell population may be obtained from any source of stem cells including those samples discussed above.

The detection for the presence of ACE may be conducted in any way to identify ACE on cells. Preferably the detection is by use of a marker for ACE. The  
25 marker for ACE may be any of the markers discussed above. However, antibodies to ACE are particularly useful as a marker for ACE. More preferably the antibody is BB9.

As discussed above, ACE or a fragment of ACE may be detected. Preferably  
30 the whole molecule ACE will be detected or a fragment corresponding to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or equivalents thereof can be detected.

Various techniques can be employed to separate or enrich the cells by initially removing cells of dedicated lineage. Monoclonal antibodies are particularly

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

17

useful for identifying cell lineages and/or stages of differentiation. The antibodies can be attached to a solid support to allow for crude separation. The separation techniques employed should maximize the retention of viability of the fraction to be collected. Various techniques of different efficacy can be employed to obtain "relatively crude" separations. The particular technique employed will depend upon efficiency of separation, associated cytotoxicity, ease and speed of performance, and necessity for sophisticated equipment and/or technical skill.

10 Procedures for separation or enrichment can include, but are not limited to, magnetic separation, using antibody-coated magnetic beads, affinity chromatography, cytotoxic agents joined to a monoclonal antibody or used in conjunction with a monoclonal antibody, including, but not limited to, complement and cytotoxins, and "panning" with antibody attached to a solid  
15 matrix, e.g., plate, elutriation or any other convenient technique.

The use of separation or enrichment techniques include, but are not limited to, those based on differences in physical (density gradient centrifugation and counter-flow centrifugal elutriation), cell surface (lectin and antibody affinity),  
20 and vital staining properties (mitochondria-binding dye rho123 and DNA-binding dye, Hoescht 33342).

Techniques providing accurate separation include, but are not limited to, FACS, which can have varying degrees of sophistication, e.g., a plurality of color channels, low angle and obtuse light scattering detecting channels, impedance channels, etc.

In a first separation, typically starting with about  $1 \times 10^{8-9}$ , preferably at about  $5 \times 10^{8-9}$  cells, ACE antibody can be labeled with one fluorochrome, while the  
30 antibodies for the various dedicated lineages, can be conjugated to at least one different fluorochrome. While each of the lineages can be separated in a separate step, desirably the lineages are separated at the same time as one is positively selecting for ACE and/or other stem cell markers. The cells can be selected against dead cells, by employing dyes associated with dead cells

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

18

(including but not limited to, propidium iodide (PI)). Preferably, the cells are collected in a medium comprising 2% FCS.

5 While it is believed that the particular order of separation is not critical to this invention, the order indicated is preferred. Preferably, cells are initially separated by a coarse separation, followed by a fine separation, with positive selection with ACE antibody.

10 In a preferred aspect of the present invention there is provided a method of obtaining a cell population enriched in haematopoietic stem cells comprising the steps of:

15 obtaining cell populations comprising stem cells;  
combining the cell population with an antibody for ACE; and  
selecting for cells which are identified by the presence of ACE on the cell.

20 Preferably the antibody is BB9. However, other antibodies to ACE would be equally effective. Any separation methods employing antibodies to isolate cells may be utilised and are familiar to the skilled addressee.

To further enrich for any cell population, specific markers for those cell populations may be used. For instance, specific markers for mesenchymal cells including but not limited to STRO-1, SH2, SH3 and SH4 may be used to enrich for or against these cells.

25 Similarly, specific markers for keratinocyte stem cells including but not limited to cytokeratin 14, alpha-6 integrin (CD49F) and CD71 may be used to enrich for or against those cells.

30 These markers may also be used to enrich for haematopoietic stem cells by removing or selecting out mesenchymal or keratinocyte stem cells.

Similarly, in another preferred embodiment, there is provided a method of removing stem cells from a population comprising the steps of

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

19

obtaining a cell population comprising stem cells;  
detecting the presence of ACE or a fragment thereof or a cell; and  
selecting out those cells which are identified by the presence of ACE on  
the cell.

5

In the same manner as the enrichment, the use of ACE may be reversed to provide a population substantially devoid of stem cells. The method used above to select for those cells expressing ACE can be used to select out the same cells leaving a population stripped of the stem cells.

10

Preferably, ACE is detected by using an antibody to ACE or a fragment thereof. The fragment may be encoded by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or an equivalent thereof. Preferably the antibody is BB9.

15 The methods described above can include further enrichment steps for cells by positive selection for other stem cell specific markers. Suitable positive stem cell markers include, but are not limited to, CD34<sup>+</sup>, Thy-1<sup>+</sup>, and c-kit<sup>+</sup>. Preferably the stem cells are human but can be derived from any suitable animal. By appropriate selection with particular factors and the development of bioassays  
20 which allow for self-regeneration of stem cells and screening of the stem cells as to their markers, a composition enriched for viable stem cells can be produced for a variety of purposes.

In yet another aspect of the present invention, there is provided a method of  
25 isolating a stem cell comprising

obtaining a cell population comprising stem cells;  
detecting the presence of ACE or a fragment thereof on a cell;  
selecting for those cells which are identified by the presence of ACE on  
the cell; and

30 isolating those cells identified by the presence of ACE.

The stem cells may be isolated by any of the methods used for enrichment as described above providing there is the added step of isolating the stem cell. Useful techniques include magnetic separation, using antibody-coated magnetic

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

20

beads, affinity chromatography, cytotoxic agents joined to a monoclonal antibody or used in conjunction with a monoclonal antibody, including, but not limited to, complement and cytotoxins, and "panning" with antibody attached to a solid matrix, e.g., plate, elutriation or any other convenient technique.

- 5 Persons skilled in the art would be familiar with these techniques and can employ any known techniques providing ACE is selected for.

In another preferred aspect there is provided a method of isolating a stem cell comprising

- 10 obtaining a cell population comprising stem cells;  
combining the cell population with an antibody for ACE;  
selecting for those cells which are identified by the antibody for ACE; and  
isolating those cells identified by the antibody.
- 15 Preferably the antibody is BB9. However, any antibody presently available which is specific for ACE may be used.

- Preferably, the stem cell isolated is a haematopoietic stem cell, mesenchymal stem cell or a keratinocyte stem cell. However, other cells including neuronal,  
20 hepatic and pancreatic cells may also be included. Most preferably, the stem cell is a haematopoietic stem cell.

- Once the stem cell population is isolated, further isolation techniques may be employed to isolate subpopulations with the stem cells. Specific markers  
25 described above for mesenchymal or keratinocyte cells may be used to identify and isolate the various cell lineages.

- In another aspect there is provided a stem cell isolated by the methods described herein. Preferably, the stem cell is a haematopoietic stem cell,  
30 mesenchymal stem cell and/or a keratinocyte stem cell. Most preferably, the stem cell is a haematopoietic stem cell.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

21

The present invention also provides in another aspect, a composition of enriched stem cells. Preferably the enriched stem cells comprise an enrichment of haematopoietic stem cells, mesenchymal stem cell or keratinocyte stem cells.

- 5 Where the compositions are enriched for stem cells, these may be used in autologous engraftment. Further, the use of autologous stem cells will avoid graft-versus-host disease. In addition, the cells can be modified by appropriate gene transfer, to correct genetic defects or provide genetic capabilities naturally lacking in the stem cells or their progeny, either as to the individual or as to the stem cells generally. In addition, the stem cell composition can be used to  
10 isolate and define factors associated with their regeneration and differentiation.

In yet another aspect of the present invention there is provided a method of measuring stem cell content, said method comprising:

- 15 obtaining a cell population comprising stem cells;  
detecting the presence of ACE or a fragment thereof on a cell with an indicator of ACE;  
selecting for those cells having ACE or a fragment thereof on the cell;  
and  
20 quantifying the selected cells relative to the quantity of cells in the cell population prior to selection.

In yet another preferred aspect of the present invention there is provided a method of measuring stem cell content said method comprising

- 25 obtaining a cell population comprising stem cells;  
combining the cell population with an antibody for ACE;  
selecting for those cells which are identified by the antibody for ACE; and  
quantifying the amount of selected cells relative to the quantity of cells in the cell population prior to selection with ACE antibody.

- 30 Quantifying the amount of selected stem cells provides for a means of diagnosis of a stem cell associated condition such as, but not limited to leukaemia, carcinomas, or sarcomas or general infections which can cause an increase in stem cell activity, particularly in the haematopoietic stem cell populations, more

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

22

specifically in the lymphoid lineages of those populations. In particular, the quantitation may provide an indication of the B and T cells which may differentiate from the lymphoid lineages to provide for the production of antibodies, regulation of the cellular immune system, detection of foreign agents  
5 in the blood, detection of cells foreign to the host, and the like. The myeloid lineage, which includes monocytes, granulocytes, megakaryocytes as well as other cells, monitors for the presence of foreign bodies in the blood stream, provides protection against neoplastic cells, scavenges foreign materials in the blood stream, produces platelets, and the like. The erythroid lineage provides  
10 the red blood cells, which act as oxygen carriers.

In yet another aspect of the present invention there is provided a composition for detecting stem cells in a population, said composition comprising an indicator of ACE or a fragment thereof and a carrier.  
15

The indicator of ACE may include any detection means which can identify ACE on a stem cell. Preferably the indicator is an antibody to ACE or a fragment thereof. Preferably the antibody is as described above and may be BB9.

20 The antibody may detect the full molecule of ACE or detect specific peptide sequences contained within ACE. Preferably the antibody will detect peptide sequence SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or an equivalent thereof.

The composition may also comprise additional markers to distinguish  
25 mesenchymal and keratinocyte cells. For mesenchymal stem cells the additional markers may include any marker selected from the group including, but not limited to STRO, SH2, SH3 or SH4. For keratinocyte stem cells the markers may be selected from the group including, but not limited to, cytokeratin 14, alpha-6 integrin (CD49F) and CD71.

30 The invention also provides for methods of diagnosing conditions associated with stem cells by identifying the presence of stem cell types in a cell population. For instance, increased or decreased levels of haematopoietic stem cells may indicate abnormalities in the blood. This may be important in

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

23

diseases such as leukaemia, similarly, increases may translate to increase in stem cells differentiating to lymphoid lineages including T and B cells indicating infection. Other methods may measure ACE expression on leukemia or other malignancies.

5

In another aspect of the present invention, there is provided a method of treating a stem cell associated condition comprising administering an effective amount of a composition comprising an enriched population of stem cells and wherein said stem cell is associated with the condition, said enriched population of stem cells being prepared by the methods described herein.

10

A "stem cell associated condition" as used herein means any condition which results from an interaction with stem cells.

15 The compositions of the present invention which comprise stem cells isolated by the described methods can find use in a number of ways.

For haematopoietic stem cells, these cells can be used to fully reconstitute an immunocompromised host such as an irradiated host and/or a host subject to chemotherapy; or as a source of cells for specific lineages, by providing for their maturation, proliferation and differentiation into one or more selected lineages by employing a variety of factors, including, but not limited to, erythropoietin, colony stimulating factors, e.g., GM-CSF, G-CSF, or M-CSF, interleukins, e.g., IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, etc., or the like, or stromal cells associated with the stem cells becoming committed to a particular lineage, or with their proliferation, maturation and differentiation.

20

25

The haematopoietic stem cells can also be used in the isolation and evaluation of factors associated with the differentiation and maturation of hematopoietic cells. Thus, the invention encompasses the use of haematopoietic stem cells in assays to determine the activity of media, such as conditioned media, or to evaluate fluids for cell growth activity, involvement with dedication of particular lineages, or the like.

30

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

24

- The haematopoietic stem cells can be used for the treatment of genetic diseases. Thus, the invention encompasses treatment of genetic diseases associated with hematopoietic cells by genetic modification of autologous or allogeneic stem cells to correct the genetic defect. For example, diseases including, but not limited to, beta.-thalassemia, sickle cell anemia, adenosine deaminase deficiency, recombinase deficiency, recombinase regulatory gene deficiency, etc. may be corrected by introduction of a wild-type gene into the haematopoietic stem cells, either by homologous or random recombination.
- 10 Other indications of gene therapy are introduction of drug resistance genes to enable normal stem cells to have an advantage and be subject to selective pressure during chemotherapy. Suitable drug resistance genes include, but are not limited to, the gene encoding the multi-drug resistance (MDR) protein.
- 15 Diseases other than those associated with hematopoietic cells can also be treated by genetic modification, where the disease is related to the lack of a particular secreted product including, but not limited to, hormones, enzymes, interferons, growth factors, or the like. By employing an appropriate regulatory initiation region, inducible production of the deficient protein can be achieved, so that production of the protein will parallel natural production, even though production will be in a different cell type from the cell type that normally produces such protein. It is also possible to insert a ribozyme, antisense or other message to inhibit particular gene products or susceptibility to diseases, particularly hematolymphotropic diseases.
- 20
- 25 In an additional aspect, the present invention is directed to various methods of utilizing human mesenchymal stem cells identified and isolated or enriched by the methods of the present invention for therapeutic and/or diagnostic purposes. For example, human mesenchymal stem cells find use in: (1) regenerating mesenchymal tissues which have been damaged through acute injury, abnormal genetic expression or acquired disease; (2) treating a host with damaged mesenchymal tissue by removal of small aliquots of bone marrow, isolation of their mesenchymal stem cells and treatment of damaged tissue with MSCs combined with a biocompatible carrier suitable for delivering MSCs to the
- 30

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

25

damaged tissues site(s); (3) producing various mesenchymal tissues; (4) detecting and evaluating growth factors relevant to MSC self-regeneration and differentiation into committed mesenchymal lineages; (5) detecting and evaluating inhibitory factors which modulate MSC commitment and differentiation into specific mesenchymal lineages; and (6) developing mesenchymal cell lineages and assaying for factors associated with mesenchymal tissue development.

The present invention is also directed to methods of utilizing the mesenchymal stem cells for correcting or modifying connective tissue disorders, such as the regeneration of missing or damaged skeletal tissue, enhancing the implantation of various plastic or metal prosthetic devices through the attachment of the isolated mesenchymal stem cells onto the porous surfaces of the prosthetic devices or various tri-calcium or hydroxyapatite ceramic vehicles or carriers, which, upon the activation and subsequent differentiation of the mesenchymal stem cells, produce natural osseous or viscous bridges.

In addition, the present invention relates to various methods directed to using composite grafts of mesenchymal stem cells to augment the rate of hemopoietic cell reserve during bone marrow transplantation. An additional embodiment of the invention concerns various methods for using composite grafts of mesenchymal stem cells and ceramics implanted into hosts, such as into subcutaneous sites in nude mice, as catalysts for the production of a reservoir of hemopoietic stem cells.

In another aspect, the present invention relates to a method for repairing connective tissue damage. The method comprises the steps of applying a mesenchymal stem or progenitor cell-containing extract to an area of connective tissue damage under conditions suitable for differentiating the cells into the type of connective tissue necessary for repair.

Compositions according to the present invention which contain mesenchymal stem cells are especially useful for facilitating repair, reconstruction and/or regeneration of a connective tissue defect. Connective tissue, as used herein,

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

26

includes bone, cartilage, ligament, tendon, stroma and muscle. Connective tissue defects include any damage or irregularity compared to normal connective tissue which may occur due to trauma, disease, age, birth defect, surgical intervention, etc. As used herein, connective tissue defects also refer to

5 non-damaged areas in which cosmetic augmentation is solely desired. The methods and materials disclosed herein are especially suitable for use in orthopedic, dental, oral maxillofacial, periodontal, and other surgical procedures.

10 Although in a preferred embodiment, the mesenchymal stem cells are culturally expanded prior to use, it is also possible to use such mesenchymal stem cells without culture expansion. For example, mesenchymal stem cells may be derived from bone marrow and used after separation of blood cells therefrom, without expansion. Thus, for example, during a surgical procedure for repairing

15 connective tissue using mesenchymal stem cells, bone marrow may be obtained from a patient, enriched in human mesenchymal stem cells, by removal of blood cells and isolation using ACE antibody and reintroduced to the patient during the procedure. The marrow-derived cells containing mesenchymal stem cells which are essentially free of blood cells may then be

20 used to repair the patient's connective tissue.

Various vehicles may be employed for delivery of human mesenchymal stem cells for repair of connective tissue. The compositions may be designed as a

25 patch for the damaged tissue to provide bulk and scaffolding for new bone or cartilage formation. The various compositions, methods, and materials described herein can, in accordance with the present invention, be used to stimulate repair of fresh fractures, non-union fractures and to promote spinal fusion. Likewise, repair of cartilage and other musculoskeletal tissues can be accomplished. In the case of spinal fusion, such compositions, methods, and

30 materials can be used posteriorly with or without instrumentation to promote mass fusion along the lamina and transverse processes and anteriorly, used to fill a fusion cage to promote interbody fusion.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

27

Keratinocytes isolated in the present invention may also be used for culture ex-vivo for use in treating burns; vehicles for gene therapy for systemic delivery of therapeutic agents such as but not limited to insulin, leptin or they may be used as a source of stem cells which may be reprogrammed into other tissues for therapeutic applications.

The discussion of documents, acts, materials, devices, articles and the like is included in this specification solely for the purpose of providing a context for the present invention. It is not suggested or represented that any or all of these matters formed part of the prior art base or were common general knowledge in the field relevant to the present invention as it existed in Australia before the priority date of each claim of this application.

Examples of the procedures used in the present invention will now be more fully described. It should be understood, however, that the following description is illustrative only and should not be taken in any way as a restriction on the generality of the invention described above.

#### EXAMPLES

##### 20 **Example 1: Isolation and Characterisation of BB9 Antibody**

###### (a) **Isolation of cells from bone marrow and peripheral blood**

Bone marrow was aspirated into preservative-free heparin from the sternum and posterior iliac crest of healthy volunteers after informed consent was obtained, according to procedures approved by the Human Ethics Committee of the Royal Adelaide Hospital. Bone marrow mononuclear cells (BMMNC) were isolated following centrifugation at 400g over Ficoll (Lymphoprep, 1.077 g/dL; Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) and washed twice by centrifugation at 4°C in HHF (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco/BRL, Glen Waverley, Victoria, Australia) supplemented with 20 mmol/L HEPES, pH 7.35, and 5% fetal calf serum (FCS; PA Biologicals, Sydney, NSW, Australia).

Mobilized peripheral blood (PB) was harvested and cryopreserved as previously described [17]. Cells were stored in liquid nitrogen until use. On the day of

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

28

immunolabeling and cell sorting, ampoules of cells were thawed quickly at 37°C. As soon as the cells had thawed they were transferred into a round-bottomed tube (Falcon 2059; Becton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey) containing 10 mL thaw solution (HBSS supplemented with 2% BSA, 10mM acid citrate and 50 kunitz units/mL DNase). Cells were allowed to sit at room temperature for 10 minutes and were then centrifuged and washed twice in HHF. In order to remove any nonviable material, cells were isolated following centrifugation over Ficolil as described above. Cells from 2 cohorts of patients were used in this study, those mobilized with high dose cyclophosphamide (HDC) at a dose of 10 7mg/m<sup>2</sup> plus G-CSF (5 µg/kg daily subcutaneously (sc) from day 2 until completion of apheresis) and with HDC plus GM-CSF (also 5 µg/kg/day sc from day 2 until completion of apheresis) [18].

Peripheral blood leukocytes (PBL) were isolated from normal donor PB drawn into preservative-free heparin. Briefly, pre-warmed Pentaspan (The Boots Co., Wellington, NZ) was added to PB at a ratio of 6.6 mL Pentaspan to 10 mL PB. These were mixed by inversion and incubated at 37°C for 30 minutes. During the incubation the red cells sedimented and the upper layer containing PBLs was harvested. Cells from this layer were centrifuged and washed twice in HHF. 20 These cells were then separated into mononuclear cells and granulocytes using a Ficolil technique similar to the one described above. The granulocytes and contaminating erythrocytes were pelleted through the Ficolil and, following removal of contaminating red cells by hypotonic lysis in 0.83% ammonium chloride, the leukocytes prepared in this manner routinely comprised >95% 25 neutrophil granulocytes.

**(b) Culture of human hematopoietic cell lines**

Jurkat, Hut 78, CEM VLB-100 and Molt-4 (all T cell lines), HL60 (promyelocytic leukaemia), K562 (erythroleukaemic), Meg-01 (megakaryocyte), Hi Meg 30 (megakaryocyte/leukaemia), Nalm-6 (B cell line), KG1 (myeloblastic leukaemic cell line), KG1a (myeloblastic), U937 (myeloid), HEL-DR<sup>+</sup> (erythroleukaemic), and RC2A (AML) cells were all grown in RPMI-1640 medium (Gibco/BRL, Glen Waverley, Victoria, Australia) supplemented with 10% FCS, penicillin (final concentration of 100 i.u./mL), gentamycin sulphate (100 µg/mL final) and 2 mM

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

29

glutamine. UT7 (megakaryocytic/erythroleukaemic) and TF-1 cells were grown in RPMI-1640 with 10% FCS with penicillin, gentamycin and glutamine as above and 2 ng/mL GM-CSF (generously donated by Amgen, Thousand Oaks, CA). M07e cells were grown in Alpha MEM (Alpha Modification of Eagles medium) supplemented with 10% FCS with penicillin, gentamycin and glutamine as above and 5 ng/mL IL-3 (Amgen, Thousand Oaks, CA).

**(c) Culture of non-hematopoietic human cell lines**

HFF2 (fibroblast cells) and MCF-7 (breast cell carcinoma) were grown in DMEM (Gibco/BRL) supplemented with 10% FCS, penicillin, gentamycin sulphate and glutamine. MG63 (osteosarcoma cells) were grown in Alpha MEM (Gibco/BRL) supplemented with 10% FCS with penicillin, gentamycin and glutamine as above.

**(d) Bone marrow stromal cells**

Bone marrow stromal cells used for immunization were isolated from human STRO-1<sup>+</sup> BMMNC purified by FACS as previously described [19]. These cells were cultured in Alpha medium supplemented with 20% FCS, penicillin (100 i.u./mL), streptomycin sulphate (100 µg/mL) and glutamine (2mM) and with a long lived derivative of L-ascorbate, ascorbic acid 2-phosphate (ASC-2P, Sigma, St Louis, MI, USA). Cells were cultured at 37°C 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator for several weeks with weekly medium changes.

**(e) Monoclonal antibody generation**

Antibody BB9 was developed following immunization of a BALB/c mouse with a series of independently derived human bone marrow stromal cells designated HPV/MSC resulting from infection of STRO-1<sup>+</sup> stromal cells with an amphotropic retrovirus containing human papilloma virus (HPV) 16 E6/E7 open reading frame (HPV16 E6/E7orf) [20-22]. Briefly, BALB/c mice were immunized intra-peritoneally (IP) with between 2 and 10 x 10<sup>6</sup> cells of the HPV/MSC cells in PBS containing 50µg muramyl dipeptide (Sigma) as adjuvant. Mice were boosted twice with the same dose of cells given IP at three weekly intervals and 4 days prior to fusion with 10<sup>6</sup> cells administered intravenously. Splenocytes

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

30

isolated from immunized mice were then fused with the NS-1 murine myeloma cell line according to standard methods [23] and the resulting hybridomas selected in medium containing HAT [24].

- 5 Hybridomas arising from the fusion were initially screened for production of antibodies reactive with HPV/MSK stromal cells. This was performed by means of an indirect immunofluorescence assay on fresh, unfixed stromal cells grown in 96 well plates. Antibodies reactive with this stromal cell line were then subjected to a negative screen in order to eliminate antibodies reactive with
- 10 PBL. This was performed by staining PBL sequentially with the hybridoma supernatants and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated-F(ab)<sub>2</sub> sheep anti-mouse immunoglobulin (Ig) (DDAF reagent: Silenus, Melbourne, Australia). Staining was performed in round-bottom 96-well plates (Nunc A/S, Kamstrup, Denmark) and washing after each incubation step was achieved by adding cold
- 15 HHF followed by centrifugation. After the final wash the PBL were transferred to flat bottom 96 well plates previously coated (30 minutes at room temperature) with poly-L-lysine (diluted 1 in 10; Sigma) and again centrifuged in order to promote cell attachment. After removal of the excess HHF the cells were fixed in-situ by the addition of 100µl of FACS fix (1% formalin, 2% glucose and 0.02%
- 20 sodium azide in PBS) and subsequently scored visually for antibody reactivity by examination under a fluorescence microscope (Olympus BH2-RFCA, Olympus Optical Co. Ltd. Tokyo, Japan). Antibodies that were non-reactive with PBL were then examined for their binding to BMMNC by means of flow cytometric analysis performed as described below. Antibody BB9 was selected
- 25 initially based upon its reactivity with a minor subpopulation of lymphoblastoid cells and in subsequent assays, according to its binding to a subpopulation of CD34<sup>+</sup> cells. Following its identification, the BB9 hybridoma was cloned three times by limiting dilution and the isotype of the antibody determined using a commercial kit (Boehringer Mannheim, Castle Hill, NSW, Australia). BB9 was
- 30 shown to be of the IgG<sub>1</sub> isotype. All subsequent studies were performed with purified BB9 antibody isolated from spent tissue culture supernatant using Protein A-Sepharose (Pharmacia, North Ryde, NSW, Australia) according to the manufacturers recommendations. Attempts to conjugate BB9 under standard conditions with amine reactive derivatives of Fluorescein Isothiocyanate (FITC)

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

31

or biotin resulted in loss of binding activity of the antibody. Consequently, all analysis of the pattern of binding of BB9 to primary hematopoietic cells and to cell lines representative of various hematopoietic lineages were performed by means of indirect immunofluorescence staining.

5

**(f) Immunolabeling of hematopoietic cells for flow cytometric analysis and Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)**

Prior to immunolabeling, primary hematopoietic cells (BMMNC, PBMNC, PBL) or hematopoietic cell lines were incubated in HHF supplemented with 4% normal human serum (Red Cross, Adelaide, South Australia; HHF-NHS) for 30 minutes on ice to block Fc receptors. Cells were then labeled either with the individual antibodies or simultaneously with a combination of the anti-CD34 MAb 43A1 (mouse IgG<sub>3</sub>; a generous gift from Dr. H-J. Bühring, Tübingen University) [25] and antibody BB9 (mouse IgG<sub>1</sub>) both diluted to a final concentration of 20µg/mL in HHF. Additional samples were stained in parallel with isotype-matched, non-binding control IgG<sub>3</sub> (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) or IgG<sub>1</sub> (MAb 1B5, anti-Giardia, generously provided by Dr Graham Mayerhofer, Department of Microbiology, University of Adelaide) antibodies either alone or in various pairwise combinations with the 43A1 and BB9 antibodies as appropriate. All antibody incubations were performed for 45 minutes on ice and were followed in all cases by two washes in an excess of HHF at 4°C. Specifically bound monoclonal antibody was then revealed by incubation with a combination of optimally titred isotype-specific goat antibodies directed against mouse-IgG<sub>1</sub> (conjugated to Phycoerythrin, PE) and mouse-IgG<sub>3</sub> (conjugated to FITC; both from Caltag; San Francisco, CA.). After a further two washes in HHF the cells were suspended at approximately 10<sup>7</sup> /mL in either FACS-FIX (for flow cytometric analysis) or cold HHF for FACS.

30 Three-colour flow cytometric analysis was performed to examine expression of the antigen identified by BB9 on defined subpopulations of CD34<sup>+</sup> BM cells. The majority of these analyses were performed using unfractionated BMMNC while some were performed with CD34<sup>+</sup> cells pre-enriched by 561-Dynabeads (Dyna,

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

32

Oslo) as described previously [26]. Additional studies were performed with BMMNC to examine the retention of the supravital fluorescent dye Rhodamine 123 (Rh123) by CD34<sup>+</sup> cells fractionated according to BB9 expression. Cells were first incubated for 45 minutes at 37°C in HHF supplemented with Rh123 (Molecular Probes Inc, Oregon) at a final concentration of 0.1 µg/mL. After two washes in cold HHF, the cells were incubated in HHF for a further 15 minutes at 37°C to allow efflux of unbound Rh123 and then washed in cold HHF-NHS. Immunostaining was then performed using 43A1 and BB9 as described above, with the exception that 43A1 was detected by means of sequential incubation with biotinylated goat anti-mouse IgG3-specific antibody and streptavidin-Tricolour (SAV-TC; both from Caltag). Co-distribution of CD34/CD38/BB9 and CD34/CD90/BB9 was assessed by firstly incubating cells with 43A1 and BB9 followed by anti-mouse IgG3-FITC and anti-mouse IgG1-Tricolour (TC) (both from Caltag) as above. Cells were then incubated with an excess of ascites containing a non-binding mouse IgG1 antibody, 3D3 [27] in order to block excess sites on the anti-mouse IgG1-TC after which was added either Leu17-PE (CD38, IgG1; Becton Dickinson, Mountain View, CA) or PR13<sub>BIOTIN</sub> (IgG1 anti-CD90; a generous gift from Drs. Beth Hill and Ben Chen, Systemix Inc., Palo Alto, CA) for a further 45 minutes. Bound PR13<sub>BIOTIN</sub> was localised by a final incubation with SAV-PE (Caltag). An aliquot of cells was also stained in parallel with IgG1-PE or IgG1-<sub>BIOTIN</sub> (Becton Dickinson) in order to assess the effectiveness of the blocking step. Cell cycle analysis of BMMNC was performed by initially labeling cells with 43A1 and BB9 then subsequent incubation with biotinylated goat anti-mouse IgG3-specific antibody and SAV-TC and PE-conjugated goat anti-mouse IgG1 as described above. Cells were then blocked with an excess of irrelevant mouse IgG1 ascites for 30 minutes, washed twice in HHF, twice in PBS and permeabilised with ice cold 70% ethanol for 10 minutes. Cells were washed twice in PBS and blocked for a further 30 minutes with 3% goat serum in PBS. FITC-conjugated Ki67 MAb (Immunotech, Marseille, France) or IgG1-FITC control was added to the cell suspension at a final dilution of 1 in 10 and cells were incubated on ice for 45 minutes.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

33

Flow cytometric analysis was performed using a Profile II or EPICS XL-MCL flow cytometer (Coulter Corp., Hialeah, FL). Twenty thousand events were collected per sample as list mode data and analysed using Coulter ELITE software. Cell sorting was performed using a FACStarPLUS cell sorter (Becton Dickinson) equipped with an argon laser emitting 488nm light at 200-250mW. Sorting was restricted to those cells which, based on their light scattering properties, fell within a defined lymphocyte/blast window [4]. Thresholds for the selection of sort gates was based on the levels of staining obtained with the isotype control antibodies. Cells were collected into tubes containing Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco/BRL) supplemented with 5% FCS. Purity of the selected populations was assessed by analysis of an aliquot of sorted cells and was routinely greater than 98%.

**(g) Staining of BM stromal cells with BB9 antibody**

15 Bone marrow stromal cells derived as described above were stained *in situ* with BB9 MAAb. Cells were grown in glass 8-well chamber slides (Nunc) overnight at 37°C prior to staining. The cells were stained with BB9 or IgG<sub>1</sub> isotype control antibody 1B5 (both at final concentrations of 20 µg/mL in HHF) on ice for 45 minutes and washed twice with HHF. Specifically bound antibody was revealed using FITC conjugated anti-mouse-IgG<sub>1</sub> monoclonal antibody (Caltag) at a dilution of 1 in 50 in HHF for 30 minutes on ice in the dark. After two final washes cells were fixed with FACS fix and observed using a fluorescence microscope (Olympus BH2-RFCA).

25 **(h) Purification of BB9<sup>+</sup> cells from BMMNC using Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS)**

In order to assess the expression of lineage-specific antigens co-expressed with BB9 antigen, BB9<sup>+</sup> BMMNC were isolated by means of magnetic-activated cell sorting (MACS) [28]. Briefly, BMMNC ( $0.5-1 \times 10^8$  cells) were suspended in 0.5 mL BB9 antibody (20 µg/mL final concentration) for 45 minutes on ice. The cells were then washed twice in HHF and resuspended in 0.5 mL HHF containing a 1/50 dilution of biotinylated goat anti-mouse IgG<sub>1</sub> (Caltag) for 30 minutes at 4°C. The cells were washed three times in MACS buffer (comprising single

strength  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mn}^{2+}$ -free phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 1% BSA, 5 mmol/L EDTA and 0.01% sodium azide) and resuspended in 900  $\mu\text{L}$  MACS buffer to which 100  $\mu\text{L}$  of streptavidin microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) was added. After incubating for 30 minutes at  $4^\circ\text{C}$ , SAV-PE conjugate (1/50; Caltag) was added for an additional 15 minutes. Cells were washed twice in MACS buffer and a small aliquot removed for flow cytometric analysis. The remaining cells were separated on a magnetic stainless steel wool column (column capacity  $10^8$  cells; Miltenyi Biotec) according to manufacturer's recommendations. The  $\text{BB9}^-$  cells were collected as column eluate, while the  $\text{BB9}^+$  cells remained attached to the magnetized matrix. To obtain the  $\text{BB9}^+$  cells, the column was removed from the magnet and then flushed with MACS buffer into another tube. Small samples were taken from each of the  $\text{BB9}^+$  and  $\text{BB9}^-$  cell populations for cytometric analysis to examine the recovery and purity of cells in each fraction.

The  $\text{BB9}^+$  cells obtained from the MACS column were then incubated with an excess of ascites containing a non-binding mouse IgG1 antibody as described above. Cells were then stained by the addition of the FITC conjugated lineage markers as follows: IgG1 FITC (Dako A/S, Glostrup, Denmark), CD7 FITC (BDIS), CD3 FITC (BDIS), CD10 FITC (Dako), CD19 FITC (Immunotech), CD33 FITC (Coulter), CD14 FITC (Dako), CD15 FITC (Immunotech), CD34 FITC (BDIS), CD61 FITC (BDIS), Glycophorin A FITC (Dako) and CD71 FITC (BDIS) for 45 minutes at  $4^\circ\text{C}$ . Cells were washed twice in HHF and fixed in FACS fix and flow cytometric analysis was performed using an EPICS XL-MCL flow cytometer (Coulter Corp., Hialeah, FL). Twenty thousand events were collected per sample as list mode data and analysed using Coulter ELITE software.

**(i) Hematopoietic progenitor cell clonogenic assays**

Granulocyte-macrophage colony-forming cells (CFU-GM), erythroid progenitors (BFU-E), and multipotent colony-forming cells (CFU-Mix) were assayed as previously described [29]. Briefly, triplicate 1 mL cultures were established in 35 mm dishes in IMDM supplemented with 0.9% methylcellulose, 30% FCS, 1% BSA (Fraction V; Sigma), 3 mmol/L L-glutamine, and  $5 \times 10^{-5}$  mmol/L 2-

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

35

mercaptoethanol. Colony growth was stimulated by the addition of 10 ng of each of the recombinant human interleukin-3 (IL-3), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF), stem cell factor (SCF) (all factors were generously provided by Genetics Institute, Boston, MA and Amgen, Thousand Oaks, CA) and 4U of erythropoietin (Eprex; Janssen Cilag, Auckland, New Zealand). CFU-GM, BFU-E and CFU-Mix were enumerated on day 14 according to standard criteria. All cultures were established in triplicate by plating 500 cells per dish.

10 **(j) Pre-CFU culture**

This is a stroma-free, cytokine-dependent suspension culture system previously reported by this laboratory [29], which measures the de novo generation of CFU-GM as an index of precursors (pre-CFU) of CFU-GM. Assays were established in triplicate 1 mL cultures in 24 well plates with  $10^3$  CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> cells isolated by FACS from either BM or mobilised PB. Each 1 mL culture comprised IMDM, 30% FCS, 1% BSA, 3 mmol/L L-glutamine,  $5 \times 10^{-5}$  mol/L 2-mercaptoethanol and was supplemented with the following recombinant growth factors: IL-3 (10 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL), G-CSF and SCF (each at 100 ng/mL). Additional factors were added to the same final concentration on day 7, and on days 14, 21, 28, 35 and 42 the cultures were split 1 in 10 into fresh medium containing growth factors. CFU-GM present after 14, 21, 28, 35 and 42 days of culture were enumerated as described above and the cumulative number of cells and CFU-GM at any given time point were calculated by taking into account the cumulative dilution factor for the culture over the entire culture period.

**(k) Protease sensitivity of the BB9 antigen**

To investigate the nature of the antigen recognized by BB9, human hematopoietic cell lines found to bind BB9 were treated *in vitro* with a variety of proteases in order to identify those that resulted in loss of antibody binding. Prior to enzyme treatment the cells were washed in HBSS (in the absence of serum) and then incubated at  $10^6$  cells/mL for 1 hour at 37°C in the same medium containing the following proteases: bromelain, chymotrypsin, papain, pepsin, pronase, thermolysin and trypsin at a final concentration of 20 µg/mL,

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

36

chymopapain at 100 U/mL, dispase at 4 mg/mL and proteinase K at 1 µg/mL. All enzymes were obtained from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany) with the exception of papain (Sigma) and chymopapain (Boots, Poole, UK). After protease treatment, cells were washed twice in HHF and assayed for expression of BB9 antigen using immunofluorescence analysis as described above. Chymopapain treatment of UT7 cells was repeated using a variety of control antibodies including anti-CD71 (Becton Dickinson) and 9B3 (anti-MHC Class I antibody) to assess the specific nature of the antigen release.

10 (I) **Immunoprecipitation analysis**

UT7 cells were washed twice in phosphate buffered saline (PBS) and resuspended at  $2 \times 10^8$  cells per mL in the same buffer. Cells were surface labeled with 2 mCi  $^{125}\text{I}$ , using lactoperoxidase as catalyst [30] for 15 minutes at room temperature and then washed four times in PBS. UT7 cells were lysed at a final concentration of  $2 \times 10^7$  cells per mL with 1% CHAPS detergent (Sigma) in 140 mM NaCl, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Tris, pH 7.4 (CHAPS buffer) containing the protease inhibitors PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride), TPCK (L-(tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethylketone), TLCK (1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-L-2-heptanone) and NPGB (p-Nitrophenyl-p'-guanidino-benzoate-HCl) (all purchased from Sigma) for 30 minutes on ice. Nuclei and non-solubilized cellular matter were pelleted by centrifugation at 18,000g for 20 minutes and lysate was precleared overnight with sheep anti-mouse Ig Dynabeads (Dyna). 1.5 mL of lysate was used for each immunoprecipitation using 1B5 (isotype-matched negative control) and BB9. Antibodies were prebound to M450 Rat anti-mouse IgG<sub>1</sub> Dynabeads overnight using 50µg antibody with 50 µL ( $2 \times 10^7$ ) beads in 1 mL PBS/0.1% BSA. Beads were washed x2 with PBS/BSA and x1 with CHAPS buffer before addition to the cell lysate. Cell lysate and beads were rotated for 2-3 hours at 4°C and then beads were removed using a Dynal MPC-6 magnet, washed x3 with CHAPS buffer, boiled for 5 minutes in gel sample buffer (0.0625 M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 20% SDS and 0.00125% bromophenol blue) and run on 4-20% gradient SDS-PAGE. Gels were run overnight at 8-10 mA, fixed for 30 minutes in methanol:acetic acid:water (5:1:4) dried under vacuum and assessed by

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

37

phosphorimage analysis (Molecular Dynamics Inc, Sunnyvale, CA) or autoradiography at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

1. **Monoclonal antibody (MAb) BB9 binds to a minor subpopulation of CD34<sup>+</sup> BMMNC**

The murine monoclonal antibody BB9 was generated following immunization with human BM derived stromal cells and was identified in the initial hybridoma screening based upon its reactivity with the immunogen and lack of significant binding to PBMC. Examination of immunolabelled stromal cells by fluorescent microscopy revealed a delicate punctate pattern of BB9 expression, which appeared to be restricted to the cell surface. Flow cytometric analysis confirmed the very low level reactivity with PBMC but demonstrated binding of BB9 to a minor subpopulation (average  $9.9 \pm 2.2\%$ ;  $n=10$ ) of cells in adult human BM characterized by low forward and low perpendicular light scatter properties (Fig. 1A). Subsequent two-colour immunofluorescence analysis of mononuclear cells from adult bone marrow with BB9 and anti-CD34 antibody revealed binding of BB9 to a subpopulation of CD34<sup>+</sup> cells (mean 22.4; range 8.3 - 40.8%,  $n=10$ ). Significantly, the intensity of BB9 staining was greatest on cells exhibiting the highest CD34 antigen density (Fig. 1B). In addition, although a small proportion of CD34<sup>+</sup> cells expressed BB9, the intensity of BB9 staining on these cells was consistently less than that expressed by CD34<sup>+</sup> cells.

To determine the identity of other (CD34<sup>-</sup>) cells, which also bound BB9, BB9<sup>+</sup> cells were isolated from BMMNC by means of magnetic activated cell sorting (MACS) and then stained with each of a panel of MAbs specific for particular hematopoietic lineages. As shown in Table 1, approximately one third ( $39.8\% \pm 20.5\%$ ;  $n=3$ ) of BMMNC identified by BB9 are B-lymphocytes as demonstrated by their expression of CD19. A significant proportion of BB9<sup>+</sup> cells also co-expressed the T-lymphoid antigen CD7 ( $18.8\% \pm 7.6\%$ ;  $n=3$ ), the myeloid marker CD33 ( $10.6 \pm 6.1\%$ ;  $n=3$ ) and a further 11.7% of cells also stained with anti-CD71 antibody. Lower proportions (between 1 - 6% of cells) co-expressed CD3, CD14, CD61, and glycoporphin A.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

38

**Table 1 shows Lineage Antigens Expressed by BB9<sup>+</sup> BMMNC.**

|    | Lineage Marker | mean $\pm$ SEM  |
|----|----------------|-----------------|
| 5  | CD7            | 18.8 $\pm$ 7.6  |
|    | CD3            | 5.7 $\pm$ 2.8   |
|    | CD19           | 39.8 $\pm$ 20.5 |
|    | CD33           | 10.6 $\pm$ 6.1  |
|    | CD14           | 1.3 $\pm$ 0.3   |
| 10 | CD34           | 9.8 $\pm$ 7.7   |
|    | CD61           | 2.0 $\pm$ 1.0   |
|    | Glycophorin A  | 2.0 $\pm$ 0.2   |
|    | CD71           | 11.7 $\pm$ 7.1  |

- 15 BB9<sup>+</sup> cells were purified from BMMNC using MACS as described. Cells were stained to detect BB9 using anti-mouse IgG1-biotin and SAV-PE, and other lineage antigens with antibodies directly conjugated to FITC. The co-expression of these markers with BB9 was visualised using analysis with Coulter Elite software. 20,000 events were analysed for each sample. Data represent the proportion of BB9<sup>+</sup> cells (% mean  $\pm$  SEM of three independent BM samples)
- 20 that co-express the respective lineage antigens.

To investigate the nature of the CD34<sup>+</sup> cells identified by BB9, two colour FACS was employed to isolate CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> subpopulations according to the sort regions shown in Figure 2. Each subpopulation was assayed for content of clonogenic hematopoietic progenitor cells in standard semi-solid cultures. Data from 8 experiments (summarized in Table 2) demonstrate that myeloid progenitors (CFU-GM) are present in both CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> subpopulations. No significant differences (p=0.63) in the incidence of CFU-GM was evident between these two subpopulations or between either subpopulation and unfractionated CD34<sup>+</sup> cells (CD34<sup>+</sup> versus CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> p=0.44; CD34<sup>+</sup> versus CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> p=0.87). Similarly, erythroid progenitors (BFU-E) were also detected in both subpopulations although there was a relative depletion in the

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

39

incidence BFU-E within the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> fraction as compared to either total CD34<sup>+</sup> cells ( $p = 0.03$ , paired t-test) or the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> fraction ( $p = 0.01$ ).

**Table 2 shows incidence of clonogenic progenitors within CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> cell fractions.**

| Cell Source     | Cell Type                          | CFU-GM        | BFU-E         | CFU-Mix   |
|-----------------|------------------------------------|---------------|---------------|-----------|
| Bone Marrow     |                                    |               |               |           |
| (n=8)           | CD34 <sup>+</sup>                  | 232.1 ± 67.6  | 81.5 ± 39.2   | 4.5 ± 3.2 |
| 10              | CD34 <sup>+</sup> BB9 <sup>+</sup> | 277.1 ± 114.1 | 38.7 ± 33.6   | 3.7 ± 5.1 |
|                 | CD34 <sup>+</sup> BB9 <sup>-</sup> | 239.0 ± 137.7 | 88.1 ± 25.3   | 4.2 ± 2.8 |
| Mobilized Blood |                                    |               |               |           |
| (n=6)           | CD34 <sup>+</sup>                  | 198.0 ± 119.1 | 185.7 ± 96.8  | 2.2 ± 0.9 |
|                 | CD34 <sup>+</sup> BB9 <sup>+</sup> | 198.8 ± 142.1 | 89.5 ± 53.2   | 1.0 ± 1.1 |
| 15              | CD34 <sup>+</sup> BB9 <sup>-</sup> | 142.8 ± 69.1  | 245.8 ± 151.7 | 1.3 ± 2.4 |

CD34<sup>+</sup> cells from normal bone marrow donors (n=8) or mobilised peripheral blood samples (n=6, 3 from HDC+G-CSF and 3 from HDC+GM-CSF) were separated into BB9<sup>+</sup> and BB9<sup>-</sup> subfractions. Cells were plated in methylcellulose cultures containing IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF, SCF and Epo for 14 days at 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Colonies were identified in situ and their types are abbreviated as follows: CFU-GM = granulocyte and/or macrophage; BFU-E = erythroid; CFU-Mix = mixed colonies containing erythroid and myeloid cells and/or megakaryocyte. The numerical data represents the mean (± Standard Deviation) of colonies per 1000 cells of each phenotype plated.

Multipotential progenitors (CFU-Mix) were also identified in both CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> fractions but no consistent trend was observed in their incidence in either subpopulation (Table 2). Correcting for the incidence of the BB9<sup>+</sup> and BB9<sup>-</sup> subpopulations within the CD34<sup>+</sup> population, the recovery of CFU-GM, BFU-E and CFU-Mix in the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> subpopulation was 33.8 ± 6.2 %, 13.8 ± 3.9 % and 24.5 ± 12.8%, respectively.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

40

## 2. Hierarchically primitive HPC express the antigen identified by BB9

In order to investigate the expression of BB9 on hierarchically primitive HSC a series of 3-colour immunolabeling procedures were performed. As shown in panel B of Figure 2, expression of the BB9 antigen is inversely correlated with that of CD38, the highest levels being found on CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells and the lowest on the CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> population. In addition, as shown in panel C of figure 2, binding of BB9 co-distributes to a significant extent with that of CD90 (Thy-1); CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> representing a phenotype previously shown to contain the majority of LTC-IC and cells with the capacity to engraft in lethally irradiated immunodeficient mice [7]. CD34<sup>+</sup> cells with low Rh123 retention (CD34<sup>+</sup>Rh123<sup>dull</sup>) are virtually all BB9<sup>+</sup> and, moreover, demonstrate markedly higher levels of BB9 antigen expression than those exhibited by CD34<sup>+</sup>Rh123<sup>bright</sup> cells (Fig. 2, panel A). To investigate the cell cycle status of CD34<sup>+</sup> cells co-expressing BB9 antigen, 3-colour flow cytometric analysis of BMMNC was performed in combination with Ki67 MAb. Ki67 detects a nuclear antigen present only in proliferating cells at G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> and M phases of the cell cycle but not in G<sub>0</sub> [31]. As shown in Figure 3A, Ki67 binds to approximately 55% of CD34<sup>+</sup> cells. The remainder of CD34<sup>+</sup> cells which fail to bind Ki67 (region R1 of figure 3A) are defined as G<sub>0</sub> cells. Analysis of listmode data files enabled examination of the pattern of BB9 expression on CD34<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> cells (within R2) and CD34<sup>+</sup>Ki67<sup>-</sup> cells (within R1). Panel B of figure 3 demonstrates that non-proliferating hematopoietic progenitor cells (CD34<sup>+</sup>Ki67<sup>-</sup>; within R1 of Fig. 3A) exhibit the highest level of BB9 expression, with 79% considered BB9<sup>+</sup>. In contrast, proliferating cells (Ki67<sup>+</sup>, within R2 of figure 3A) exhibit low-level expression of BB9 (figure 3C).

Collectively, therefore, these data demonstrate that CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> cells exhibit a number of phenotypic characteristics previously ascribed to primitive human HPC. To further investigate the expression of the BB9 antigen on hierarchically primitive HPC (pre-CFU), CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> BMMNC subpopulations were assayed for their capacity to initiate and sustain hematopoiesis in stroma-free, cytokine dependent suspension as described previously [29]. Sorted fractions were cultured in a combination of IL-3, IL-6, G-CSF and SCF (36GS)

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

41

[29] and assayed at weekly intervals over a period of 6 weeks for their production of CFU-GM and mature myeloid cells. Figure 4 is a summary of data from 10 experiments. The production of CFU-GM (panel A) was significantly greater from the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> than from the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> subpopulation at all time points measured (p values range from 0.0004 to 0.008) with the exception of day 35. At the cessation of cultures (day 42) the mean number of CFU-GM generated from 10<sup>3</sup> CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> cells was  $2.2 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$  while the same number of CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> cells produced only a mean of 7812 colonies. In accord with this, the corresponding production of maturing myeloid cells was greater from the BB9<sup>+</sup> subpopulation at all time points (p values from 0.027 to 0.55) leading to the generation of a mean of  $2.5 \times 10^8$  cells at day 42 (Fig. 4B) These data therefore demonstrate that primitive HPC with the capacity to initiate and sustain hematopoiesis under these culture conditions are restricted to a subpopulation of CD34<sup>+</sup> cells identified by MAb BB9.

15

### 3. The antigen identified by BB9 is expressed at high levels by CD34<sup>+</sup> cells in mobilized peripheral blood

The pattern of BB9 binding to CD34<sup>+</sup> cells was analyzed in steady state blood and mobilized peripheral blood (MPB). These studies were performed using samples obtained from normal donors or patients in which blood progenitor cell mobilization was induced following administration of either high dose cyclophosphamide (HDC) followed by G-CSF or with HDC plus GM-CSF. Analysis of steady state blood revealed that BB9 bound to approximately 5% of CD34<sup>+</sup> cells ( $5.08\% \pm 0.58$ ; n=4), a significantly lower proportion than previously observed for steady state BM CD34<sup>+</sup> cells (p = 0.026). In contrast, a consistently higher proportion of CD34<sup>+</sup> cells in mobilized peripheral blood were found to bind BB9 (Fig. 5). A mean of  $48.4\% \pm 4.3$  (n = 3) of CD34<sup>+</sup> cells elicited by HDC + G-CSF and  $54.7\% \pm 2.9$  (n = 3) of those mobilized by the combination of HDC + GM-CSF exhibited the BB9 antigen, approximately double the proportion observed in the CD34<sup>+</sup> population isolated from steady state BM (see Table 3) and significantly, 4-5 fold more than present in steady state blood (p=0.0013). Moreover, the BB9 antigen density on both populations

20  
25  
30

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

42

of mobilized CD34<sup>+</sup> cells was higher than that on CD34<sup>+</sup> cells in steady state peripheral blood.

**Table 3 shows expression of BB9 on mobilized blood, normal adult bone marrow and steady state peripheral blood.**

| Donor type (n)      | Mononuclear cells<br>expressing BB9 | BB9 <sup>+</sup> cells<br>expressing CD34 | CD34 <sup>+</sup> cells<br>expressing BB9 <sup>+</sup> |
|---------------------|-------------------------------------|---|--|
| HDC + G-CSF (3)     | 19.9 ± 3.5                          | 15.3 ± 6.2                                | 48.4 ± 4.3   |
| 10 HDC + GM-CSF (3) | 28.0 ± 7.6                          | 34.4 ± 9.7                                | 54.7 ± 2.9   |
| Normal BM (10)      | 9.9 ± 2.2                           | 17.0 ± 4.3                                | 22.4 ± 3.3   |
| Normal PB (4)       | 4.7 ± 0.6                           | 3.3 ± 2.0                                 | 5.1 ± 0.6  |

15 Samples were labeled with the anti-CD34 Mab 43A1 (IgG<sub>3</sub>) and BB9 (IgG<sub>1</sub>) or in parallel with isotype matched control Mab then visualized by subsequent labeling with isotype-specific antibodies against mouse-IgG<sub>3</sub> (conjugated to FITC) and mouse IgG<sub>1</sub> (conjugated to PE). The data from at least 20,000 cells were acquired then analyzed using Coulter ELITE software. The data represents the proportion (% , mean ± SEM) of cells expressing the indicated

20 antigen from cells isolated from the respective donor sources (mobilization following high dose cyclophosphamide [HDC] + G-CSF or +GM-CSF; normal adult bone marrow; or steady state adult peripheral blood).

25 Clonogenic assays performed on CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> subpopulations isolated by FACS from each of the six mobilized blood samples demonstrated a qualitatively similar partitioning of CFU-GM and BFU-E into the BB9<sup>+</sup> and BB9<sup>-</sup> fractions to that found in BM (Table 2). CFU-GM were found at a similar incidence within both the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> fractions. However, in accord with the BM samples, BFU-E were significantly depleted in the

30 CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> cell fraction as compared to the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> cell fraction (p = 0.033). For the HDC + G-CSF samples, 49.4% ± 12.8 (range 25.8 - 70.0%) of CFU-GM and 21.3% ± 13.2 (range 0 - 45.4%) of BFU-E were recovered in the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> subpopulation. Similarly, for the three HDC + GM-CSF samples,

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

43

the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> subpopulation contained a mean of 65.9% ± 1.9 (range 62.2 - 68.0%) of CFU-GM and 36.6% ± 9.3 (range 19.5 - 51.3%) of BFU-E.

As shown for the BM cells, pre-CFU assay of CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> cells isolated from MPB demonstrated greater generation of both CFU-GM (panel A, Fig. 6) and maturing myeloid cells (panel B, Fig. 6) from the BB9<sup>+</sup> than from the BB9<sup>-</sup> subpopulation at all time points measured. At the cessation of cultures (day 35) the mean number of CFU-GM generated from 10<sup>3</sup> CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> cells was 12,497 ± 7,764 while the same number of CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> cells produced only 119 ± 82 colonies. The corresponding production of maturing myeloid cells was greater from the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> subpopulation at all time points leading to the generation of a mean of 7.5 × 10<sup>6</sup> cells at day 35 compared to 1.2 × 10<sup>6</sup> from CD34<sup>+</sup>BB9<sup>-</sup> cells (Fig. 6). These data therefore demonstrate that in mobilised PB as in BM, the primitive HPC are restricted to a subpopulation of CD34<sup>+</sup> cells identified by MA b BB9.

#### 4. BB9 identifies a chymopapain-sensitive glycoprotein of molecular weight 160 kDa.

The binding of BB9 to leukaemic cell lines representing a variety of hematopoietic lineages and other cell lines was also investigated. As shown (Table 3), BB9 bound at high levels to several cell lines including HL60, K562, Meg-01, UT7, MG63 and dermal fibroblast cells. Low to intermediate expression of the BB9 antigen was observed on the KG1, RC2A and MCF-7 cell lines and on the B cell line Nalm-6 while KG1a, MO7e and the T cell lines Jurkat, Hut 78, CEM VLB-100 and Molt-4 were all negative. Since the highest level of expression of the BB9 antigen was consistently observed on the GM-CSF-dependent UT7 cells, this line was used in all subsequent studies to investigate the nature of the antigen. To determine whether BB9 identified a protein epitope, UT7 cells were treated with a range of proteases in order to identify those which prevented subsequent binding of BB9 as assessed by flow cytometry. Bromelain, chymotrypsin, papain, pepsin, pronase, proteinase K, trypsin and thermolysin were all without effect in this assay but chymopapain completely abrogated specific labelling with BB9 as was also seen for CD71 which was used as a positive control in this assay (data not shown). In addition,

5 treatment with PI-PLC while efficiently removing CD59 and CD90 from UT7 cells (data not shown) did not alter the binding of BB9 demonstrating that the BB9 epitope is not expressed on a GPI-linked glycoprotein. Finally, BB9 immunoprecipitated a glycoprotein from surface <sup>125</sup>I-labelled UT7 cells with an apparent molecular weight under reducing conditions of 160 kDa (Fig. 7).

10 Although a wide variety of cell surface molecules have been identified on mature haemopoietic cells it has proven much more difficult to identify surface antigens that are restricted to hematopoietic stem and progenitor cells in human hematopoietic tissues. This may in part be due both to practical constraints such as the limited numbers of HPC available for immunization and screening but equally importantly to the well documented co-expression on both primitive and mature hematopoietic cells of a wide variety of surface antigens whose presence on the immunizing HPC population may consequently dominate the immune response rendering the identification of antigens restricted to HPC much more unlikely. In an attempt to circumvent these problems we chose to immunize mice with bone marrow stromal cells, a plentiful source of cells for immunization lacking many of the antigens shared with mature hematopoietic cells but which exhibit many of the cell surface antigens expressed on hematopoietic stem and progenitor cells including CD34 [12,13] CD90 [14], CD164 [15] and, in the mouse, Sca-1 [16]. We therefore hypothesized that immunization with bone marrow stromal cells may elicit antibodies to additional antigens co-expressed by these cells and primitive HPC and in fulfillment of this hypothesis we developed monoclonal antibody BB9.

25 We have shown that BB9 binds to approximately 10% of bone marrow mononuclear cells, 60% of which exhibit T or B-lymphocyte restricted antigens while approximately 20% co-express CD34. Although phenotypically diverse, the BB9<sup>+</sup> population as a whole is non-proliferating as demonstrated by low to undetectable levels of CD71 expression and lack of immunostaining with Ki67 which detects a nuclear antigen present only during the G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> and M phases of cell cycle, not in G<sub>0</sub> [31]. Significantly, within the BM CD34<sup>+</sup> population only 20% of cells exhibit the BB9 antigen, but included within this subpopulation are the great majority of cells with candidate hematopoietic stem

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

45

cell phenotype as identified by their lack of CD38 [6], low retention of Rh123 [32] and expression of CD90 [8]. In accord with these data, functional assays further demonstrated that primitive HPC with the capacity to initiate and sustain hematopoiesis in cytokine dependent, stromal cell-free culture were restricted to the CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> subpopulation. Similar observations were made with samples of blood stem cells mobilized by two different regimens suggesting that the specificity of BB9 for primitive HPC seen in BM also extends to mobilized peripheral blood. Of note, a significantly higher proportion of CD34<sup>+</sup> cells in MPB were BB9<sup>+</sup> than found in steady state PB suggesting that the two regimens investigated specifically mobilize CD34<sup>+</sup>BB9<sup>+</sup> cells. Analogous observations have previously been made regarding CD90, which is similarly expressed on a significantly higher proportion of CD34<sup>+</sup> cells in mobilized blood than in the BM [33].

15 The epitope identified by BB9 was shown to reside on a 160 kDa cell surface glycoprotein that was not released by PI-PLC nor following treatment with a range of proteases, with the exception of chymopapain. The calculated molecular weight of the BB9 antigen is similar to that of MDR-1, a 170 kDa glycoprotein previously shown to be expressed by primitive human HPC [34].

20 However, the lack of reactivity of BB9 with peripheral blood leukocytes (PBL) distinguishes it from that of MDR-1, which is expressed by 40-65% of PBL [35]. Moreover, in accord with its vinblastine-resistant phenotype, the T-lymphoid line VLB-100 [36] exhibits high level of expression of MDR-1 but was shown not to bind BB9 at detectable levels. These data therefore suggest that BB9 does not

25 identify MDR-1. Other cell surface glycoproteins with ostensibly similar restricted patterns of expression on primitive human HPC to the antigen identified by BB9 include CD90 [8], AC133 [9,11], Flt3/flk-2 (CD135) [37], Tie-1 [38], KDR [39], TEK [11]. However, these are unlikely to correspond to the BB9 antigen based on several criteria including differences in molecular weight (Thy-1 [7,8], AC133 [40], Tie-1 [43], TEK [41], KDR [42]) and patterns of expression

30 both on primary hematopoietic cells [37,44] and on hematopoietic cell lines [38].

The restricted distribution of the BB9 antigen within hematopoietic tissues, i.e. primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells is intriguing,

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

46

a pattern of expression also exhibited by several other antigens including CD34 [12,13], CD90 [14], CD164 [15] and Sca-1 [16]. Given the adhesive properties of at least 3 of these glycoproteins [45-48] it is tempting to speculate that BB9 may also function as an adhesion molecule. Initial studies demonstrate that BB9 also binds to vascular endothelial cells in hematopoietic tissues such as spleen, thymus and tonsil, a finding not inconsistent with a proposed adhesive function. However, MAb BB9 does not perturb the adhesion of CD34<sup>+</sup> cells to bone marrow stromal cells *in vitro* (HR, PJS; unpublished observation). Answers to the question of the role of the BB9 antigen in the haemopoietic system will benefit both from further biochemical characterization of the glycoprotein and ultimately from the isolation of a cDNA corresponding to the antigen. Such studies are currently in progress.

**Table 4 shows expression of BB9 on hematopoietic and other cell lines.**

15

|    | Cell line   | Reactivity | Characteristics of cell line            |
|----|-------------|------------|---|
|    | UT7         | ++         | Erythroblastic/megakaryocytic leukaemia |
| 20 | TF-1        | +/-        | Erythroleukaemia                        |
|    | K562        | ++         | Erythroblastic leukaemia, Ph+ (CML)     |
|    | MEG-01      | ++         | Megakaryoblastic leukaemia Ph+ (CML)    |
|    | MO7e        | -          | Megakaryoblastic leukaemia              |
|    | HEL-DR      | ++         | Erythroleukaemia                        |
| 25 | Hi MEG      | +          | Megakaryoblastic leukaemia              |
|    | KG-1        | +          | Myeloblastic leukaemia                  |
|    | KG-1a       | -          | Immature subline of KG-1                |
|    | HL60        | ++         | Myeloblastic leukaemia                  |
| 30 | U937        | +          | Histiocytic leukaemia                   |
|    | RC2A        | +          | AML                                     |
|    | Nalm-6      | +          | B cell                                  |
| 35 | Hut78       | -          | T cell                                  |
|    | Jurkat      | -          | T cell                                  |
|    | Molt-4      | -          | T cell                                  |
|    | CEM VLB-100 | -          | T cell                                  |

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

47

|                    |     |                  |
|--------------------|-----|------------------|
| Dermal fibroblasts | +++ | Fibroblast       |
| MCF-7              | +   | Breast carcinoma |
| MG63               | ++  | Osteocarcinoma   |

5

Indirect immunofluorescence was used to assess BB9 expression. Cells were incubated with BB9 MAb at 20 µg/mL for 45 minutes and with PE conjugated goat anti-mouse IgG1 secondary antibody. At least 10,000 events were acquired on a Coulter XL flowcytometer for each cell line examined and the

10 proportion of BB9 positive cells quantitated as follows:

- = 0-2%, +/- = 2-5%, + = 5-35%, ++ = 35-80%, +++ = 80-100%.

In summary, we have described a monoclonal antibody, BB9, with specificity for a cell surface glycoprotein co-expressed by bone marrow stromal cells and primitive human HPC within adult BM and mobilized blood. The expression of the BB9 antigen within umbilical cord blood, fetal liver and during embryonic hematopoiesis is currently under investigation. In this respect the possibility that BB9 exhibits binding to CD34<sup>+</sup> cells with stem cell activity is of particular interest.

20

Example 2: Isolated cells identified by BB9 antibody and transplantation of the cells.

Mononuclear cells were isolated from samples of human umbilical cord blood by density sedimentation on Ficoll-Hypaque (density 1.077g/ml) according to standard procedures. Prior to immunolabeling, the cord blood mononuclear cells (CBMNC) were incubated in PBS supplemented with human serum albumin (HAS; Baxter Healthcare) and 100µg/mL aggregated normal human gamma globulin (Sandoglobulin) for 30 minutes on ice to block Fc receptors.

30 Cells were then labelled either with the individual antibodies or simultaneously with a combination of the anti-CD34 MAb 43A1 (mouse IgG3; a generous gift from Dr. H-J. Bühring, University of Tübingen) and antibody BB9 (mouse IgG1) both diluted to a final concentration of 20µg/mL in PBS-HSA. Additional samples were stained in parallel with isotype-matched, non-binding control IgG3

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

48

(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) or IgG<sub>1</sub> (MAb 1B5, anti-Giardia, generously provided by Dr Graham Mayerhofer, Department of Microbiology, University of Adelaide) antibodies either alone or in various pairwise combinations with the 43A1 and BB9 antibodies as appropriate. All antibody incubations were performed for 45 minutes on ice and were followed in all cases by two washes in an excess of PBS-HAS at 4°C. Specifically bound monoclonal antibody was then revealed by incubation with a combination of optimally titred isotype-specific goat antibodies directed against mouse-IgG<sub>1</sub> (conjugated to Phycoerythrin, PE) and mouse-IgG<sub>3</sub> (conjugated to FITC; both from Southern Biotechnology Associates, Birmingham AL, USA). After a further two washes in PBS-HAS the cells were suspended at approximately 10<sup>7</sup> cells/mL in cold PBS-HSA for FACS.

Cells were sorted into CD34+, CD34+/BB9+ and CD34+/BB9- fractions according to the gates indicated. The sorted cells were transplanted into irradiated NOD/SCID mice (400cGy) at a dose of 50 – 100,000 cells per mouse together with 10<sup>7</sup> irradiated CD34-depleted CBMNC as carrier cells. Engraftment was assessed at week 6 post transplant by flow cytometric analysis of bone marrow and peripheral blood (Figure 8) from the transplanted NOD/SCID mice with human specific anti-CD45-FITC in pairwise combination with either isotype IgG<sub>1</sub>-PE, CD11b-PE, CD19-PE or CD34-PE (all reagents from Becton-Dickinson). The results are summarised in Table 5 below.

**Table 5:** Engraftment Results at 6 Week Post-Transplantation

| Population | % Human CD45+ cells (Week 6) |
|------------|------------------------------|
| CD34+      | 15±6.5                       |
| CD34+BB9+  | 12±5                         |
| CD34+BB9-  | 0.25±0.03                    |

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

49

## SEQUENCE LISTING

5 <110> The Peter MacCallum Cancer Institute  
 Simmons, Paul J

<120> Identification and Isolation of Somatic Stem Cells and Uses  
 Thereof

10 <130> 649197

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

20 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(10)  
 <223>

25 <400> 1

Leu Phe Gln Glu Leu Gln Pro Leu Tyr Leu  
 1 5 10

30

<210> 2  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

35 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(8)  
 <223>

40 <400> 2

Glu Ala Asp Asp Phe Phe Thr Ser  
 1 5

45

Finally, it is to be understood that various other modifications and/or alterations  
 may be made without departing from the spirit of the present invention as  
 outlined herein.

50

## REFERENCES

1. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J,  
 Kalamasz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID, Thomas ED

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

50

- (1991) Engraftment after infusion of CD34<sup>+</sup> marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood*:1717
2. Civin CI, Trischmann T, Fackler M, Bernstein I, Brunning J, Campos L, Greaves M, Kamoun M, Katz D, Lansdorp P, Look A, Seed B, Sutherland D, Tindle R, Uchanska-Ziegler B (1989) Report on the CD34 cluster workshop, in Knapp W, Dorken B, Galk W, Rieber E, Stein H, Schmidt R, von dem Borne A (eds): *Leukocyte Typing IV*. Oxford, Oxford Press,
  - 5 3. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996): CD34: Structure, Biology and Clinical Utility. *Blood* 87:1
  - 10 4. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM (1989) Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 74:1563
  5. Brandt J, Baird N, Lu L, Srour E, Hoffman R (1988) Characterization of a human hematopoietic progenitor cell capable of forming blast cell containing colonies in vitro. *J.Clin Invest* 82:1017
  - 15 6. Huang S, Terstappen LWMM (1994) Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> hematopoietic stem cells. *Blood* 83:1515
  7. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle A-M, Peault B (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *P.N.A.S. (U.S.A.)* 89:2804
  - 20 8. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM (1993) Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 177:1331
  9. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 15:5002
  - 25 10. Buhning HJ, Seiffert M, Bock TA, Scheduling S, Thiel A, Scheffold A, Kanz L, Brugger W (1999) Expression of novel surface antigens on early hematopoietic cells. *Ann N Y Acad Sci* 872:25
  - 30 11. de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BI, Testa NG (1998) CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 16:387

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

51

12. Simmons PJ, Torok-Storb B (1991) CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 78:2848
13. Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo G-R, Terstappen L (1995) The "common stem cell" hypothesis reevaluated: Human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 85:2422
- 5 14. Gronthos S, Simmons PJ (1996) The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J. Hematotherapy* 5:15
15. Zannettino ACW, Bühring H-J, Niutta S, Ashman LK, Känz L, Simmons PJ (1995) Identification and functional cloning of MGC-24, a mucin-like molecule expressed by haemopoietic progenitors and bone marrow stromal cells: A negative regulator of haemopoiesis. *Blood* 86:591a (abstract)
16. Satoh M, Mioh H, Shiotsu Y, Ogawa Y, Tamaoki T (1997) Mouse bone marrow stromal cell line MC3T3-G2/PA6 with hematopoietic-supporting activity expresses high levels of stem cell antigen Sca-1. *Exp. Hematol.* 25:972
17. To LB, Shepperd KM, Haylock DN, Dyson PG, Charles P, Thorp DL, Dale BM, Dart GW, Roberts MM, Sage RE, Juttner CA (1990) Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp. Hematol.* 18:442
- 20 18. Dyson PG, Jackson KA, McClure BJ, Rawling TP, To LB (1996) Increased levels of megakaryocyte progenitors in peripheral blood mobilised by chemotherapy and/or haemopoietic growth factor protocols. *Bone Marrow Transp.* 18:705
- 25 19. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994) The STRO-1<sup>+</sup> fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84:4164
- 30 20. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA (1991) The E7 gene of human papillomavirus type-16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* 65:473
21. Kaur P, Halbert CL (1995) Immortalization of human keratinocytes with human papilloma virus DNA. *Methods Cell Sci.* 17:117

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

52

22. Simmons PJ, Gronthos S, Ohta S, Graves SE (1995) Human bone marrow stromal cell precursors: identification and development potential. *Bone Marrow Transp.* 15 Supp 1:S3
23. Köhler E, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495
- 5 24. Goding JW (1980) Antibody production by hybridomas. *J. Imm. Meth.* 39:285
25. Bühring HJ, Burkhardt M, Ning Y, Müller CA (1995) Reactivity patterns and epitope mapping of CD34 panel mAbs, in Schlossman SF, Bousmell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer T, Tedder TF, Todd RF (eds): *Leukocyte Typing V.* Oxford, Oxford Press, p 847
- 10 26. Baird PN, Simmons PJ (1996) Expression of the Wilms' Tumour gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp. Hematol.* 25:312
- 15 27. O'Connor CG, Ashman LK (1982) Application of the nitrocellulose transfer technique and alkaline phosphatase conjugated anti-immunoglobulin for determination of the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. *J. Imm. Meth.* 54:267
28. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231
- 20 29. Haylock DN, To LB, Dowse TL, Juttner CA, Simmons PJ (1992) Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. *Blood* 80:1405
30. Marchalonis JJ (1969) An enzymatic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.* 113:299
- 25 31. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J. Immunol.* 133:1710
32. Spangrude GJ, Johnson GR (1990) Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *P.N.A.S. (U.S.A.)* 87:7433
- 30 33. Murray L, Chen B, Galy A, Chen S, Tushinski R, Uchida N, Negrin R, Tricot G, Jagannath S, Vesole D, Barlogie B, Hoffman R, Tsukamoto A (1995) Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

53

- CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood. *Blood* 85:368
34. Chaudhary PM, Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 66: 85
- 5 35. Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB (1992) Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80:2735
36. Beck WT, Mueller TJ, Tanzer LR (1979) Altered surface membrane glycoproteins in vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res.* 39:2070
- 10 37. Rappold I, Ziegler BL, Köhler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino ACW, Hill B, Neu S, Knapp W, Alitalo K, Ullrich A, Kanz L, Bühring H-J (1997) Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing Flt3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 90:111
- 15 38. Kukk E, Wartiovaara U, Gunji Y, Kaukonen J, Bühring H-J, Rappold I, Matikainen M-T, Vihko P, Partanen J, Palotie A, Alitalo K, Alitalo R (1997) Analysis of Tie receptor tyrosine kinase in haemopoietic progenitor and leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 98:195
- 20 39. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C (1999) KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285:1553
- 25 40. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90:5013
41. Ziegler SF, Bird TA, Schneringer JA, Schooley KA, Baum PR (1993) Molecular cloning and characterization of a novel receptor protein tyrosine kinase from human placenta. *Oncogene* 8:663
- 30 42. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P (1992) Identification of the KDR

- tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1579
43. Batard P, Sansilvestri P, Scheinecker C, Knapp W, Debili N, Vainchenker W, Bühring H-J, Monier M-N, Kukk E, Partanen J, Matikainen M-T, Alitalo R, Hatzfeld J, Alitalo K (1996) The Tie receptor tyrosine kinase is expressed by human hematopoietic progenitor cells and by a subset of megakaryocytic cells. *Blood* 87:2212
- 5
44. Haylock DN, Horsfall MJ, Dowse TL, Ramshaw HS, Niutta S, Protopsaltis S, Peng L, Burrell C, Rappold I, Bühring H-J, Simmons PJ (1997) Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand. *Blood* 90:2260
- 10
45. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T (1995) The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *P.N.A.S. (U.S.A.)* 92:12240
- 15
46. He H, Naquet P, Caillol D, Pierres M (1991) Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial cells through a Ca<sup>2+</sup> independent mechanism. *J. Exp. Med.* 173:515
47. Zannettino AC, Bühring HJ, Niutta S, Watt SM, Benton MA, Simmons PJ (1998) The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. *Blood* 15:2613
- 20
48. Doyonnas R, Yi-Hsin Chan J, Butler LH, Rappold I, Lee-Prudhoe JE, Zannettino AC, Simmons PJ, Bühring HJ, Levesque JP, Watt SM (2000). CD164 monoclonal antibodies that block hemopoietic progenitor cell adhesion and proliferation interact with the first mucin domain of the CD164 receptor. *J Immunol.* 15:840
- 25

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

55

## CLAIMS

1. A method of identifying a stem cell comprising the steps of  
obtaining a cell sample including stem cells;  
5 detecting the presence of a peptide sequence having the sequence  
LFQELQPLYL (SEQ ID NO:1) or an equivalent thereof; and  
identifying the stem cells having the sequence or equivalent thereof.
2. A method of identifying a stem cell comprising the steps of  
10 obtaining a cell sample including stem cells;  
detecting the presence of a peptide sequence having the sequence  
EADDFFTS (SEQ ID NO:2) or an equivalent thereof; and  
identifying the stem cells having the sequence or equivalent thereof.
- 15 3. A method of identifying a stem cell comprising the steps of:  
obtaining a cell sample including stem cells;  
detecting the presence of angiotensin converting enzyme (ACE) or a  
fragment thereof on a cell; and  
20 identifying the stem cells having ACE or a fragment thereof.
4. A method according to claim 3 wherein ACE is detected by the presence  
of a polypeptide encoded by SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2 or an  
equivalent thereof.
- 25 5. A method according to any one of claims 1 to 4 wherein the stem cell is a  
somatic stem cell.
6. A method according to claim 5 wherein the somatic stem cell is selected  
from the group including haematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells,  
30 keratinocyte stem cells neuronal, hepatic and pancreatic cells.
7. A method according to claim 6 wherein the stem cell is a haematopoietic  
stem cell.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

56

8. A method according to any one of claims 1 to 7 wherein the cell sample including stem cells is obtained from a stem cell source selected from the group including the bone marrow including iliac crests, tibiae, femors, spine, periosteum, endosteum or other bone cavities; blood; embryonic yolk sac; fetal liver; spleen; peripheral; blood; skin; dermis; liver; brain; pancreas or kidney.
9. A method according to any one of claims 1 to 8 wherein the detection includes the use of a means selected from the group including antibodies to ACE or the polypeptide sequences encoded by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, agonists and antagonists against ACE or the sequences, nucleic acid detection systems which can detect expression of ACE or the sequences either by the presence of DNA, RNA, mRNA or ACE protein, and enzymatic, fluorescence or colourimetric assays for ACE or the sequences.
10. A method according to claim 9 wherein the detection of ACE is performed using an antibody to ACE or the polypeptide sequences encoded by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or equivalent thereof.
11. A method according to claim 10 wherein the antibody is antibody BB9.
12. A method according to claim 11 further including the use of mesenchymal stem cell marker selected from the group including STRO-1, SH2, SH3 and SH4.
13. A method according to claim 11 or 12 further including the use of keratinocyte stem cell marker selected from the group including cytokeratin 14, alpha-6 integrin (CD49F) and CD71.
14. A method for obtaining a cell population enriched in stem cells comprising the steps of  
obtaining a cell population comprising stem cells;  
detecting the presence of ACE or a fragment thereof on a cell; and  
selecting for cells that are identified by the presence of ACE or a fragment on the cell.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

57

15. A method according to claim 14 wherein ACE is detected by the presence of a polypeptide encoded by SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2 or an equivalent thereof.
- 5
16. A method according to claim 14 or 15 wherein the presence of ACE is detected by an antibody for ACE or a fragment thereof.
17. A method according to claim 16 wherein the antibody is BB9.
- 10
18. A method according to any one of claims 14 to 17 wherein the stem cells are haematopoietic stem cells.
19. A method of removing stem cells from a population comprising the steps
- 15 of
- obtaining a cell population comprising stem cells;  
detecting the presence of ACE or a fragment thereof or a cell; and  
selecting out those cells which are identified by the presence of ACE on the cell.
- 20
20. A method according to claim 19 wherein ACE is detected by the presence of a polypeptide encoded by SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2 or an equivalent thereof.
- 25
21. A method according to claim 19 or 20 wherein the presence of ACE is detected by an antibody for ACE or a fragment thereof.
22. A method according to claim 21 wherein the antibody is BB9.
- 30
23. A method of isolating a stem cell comprising
- obtaining a cell population comprising stem cells;  
detecting the presence of ACE or a fragment thereof on a cell;  
selecting for those cells which are identified by the presence of ACE on the cell; and

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

58

isolating those cells identified by the presence of ACE.

24. A method according to claim 23 wherein ACE is detected by the presence of a polypeptide encoded by SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2 or an equivalent thereof.

25. A method according to claim 23 or 24 wherein the presence of ACE is detected by an antibody for ACE or a fragment thereof.

26. A method according to claim 25 wherein the antibody is BB9.

27. A method according to any one of claims 23 to 26 wherein the stem cell is a haematopoietic stem cell.

28. An enriched stem cell population prepared by the methods according to any one of claims 14 to 18.

29. A stem cell prepared by the methods according to any one of claims 23 to 27.

20

30. A method of measuring stem cell content, said method comprising:  
obtaining a cell population comprising stem cells;  
detecting the presence of ACE or a fragment thereof on a cell with an indicator of ACE;

31. selecting for those cells having ACE or a fragment thereof on the cell;  
and

quantifying the selected cells relative to the quantity of cells in the cell population prior to selection.

31. A method according to claim 30 wherein the indicator of ACE or fragment thereof is an antibody to ACE or to a polypeptide encoded by SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2.

32. A method according to claim 30 or 31 wherein the antibody is BB9.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

59

33. A method for treating a stem cell associated condition comprising administering an effective amount of a composition comprising an enriched population of stem cells according to claim 28.

5

34. A method according to claim 33 wherein the stem cell associated condition is selected from the group including a haematopoietic, mesenchymal or keratinocyte associated condition.

10 35. A method according to claim 34 wherein the haematopoietic stem cell associated condition is a condition selected from the group including low levels of haematopoietic stem cells and reconstituting immunocompromised hosts, beta.-thalassemia, sickle cell anemia, adenosine deaminase deficiency, recombina

15

36. A method according to claim 34 wherein the mesenchymal stem cell associated condition is a condition selected from the group including (1) regenerating mesenchymal tissues which have been damaged through acute injury, abnormal genetic expression or acquired disease; (2) treating a host with damaged mesenchymal tissue by removal of small aliquots of bone marrow, isolation of their mesenchymal stem cells and treatment of damaged tissue with MSCs combined with a biocompatible carrier suitable for delivering MSCs to the damaged tissues site(s); (3) producing various mesenchymal tissues; (4) detecting and evaluating growth factors relevant to MSC self-regeneration and differentiation into committed mesenchymal lineages; (5) detecting and evaluating inhibitory factors which modulate MSC commitment and differentiation into specific mesenchymal lineages; and (6) developing mesenchymal cell lineages and assaying for factors associated with mesenchymal tissue development; regeneration of missing or damaged skeletal tissue, enhancing the implantation of various plastic or metal prosthetic devices through the attachment of the isolated mesenchymal stem cells onto the porous surfaces of the prosthetic devices or various tri-calcium or hydroxyapatite ceramic vehicles or carriers, which, upon the activation and subsequent

20

25

30

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

60

differentiation of the mesenchymal stem cells, produce natural osseous or viscous bridges.

37. A method according to claim 33 wherein the stem cell associated  
5 condition is a repair of connective tissue damage.

38. A method according to claim 37 wherein the enriched population of stem cells is enriched for mesenchymal stem cells.

10 39. A method according to claim 34 wherein the keratinocyte stem cell associated condition is a burn.

40. A method as hereinbefore described with reference to the examples.

WO 03/016916

PCT/AU02/01101

1/9

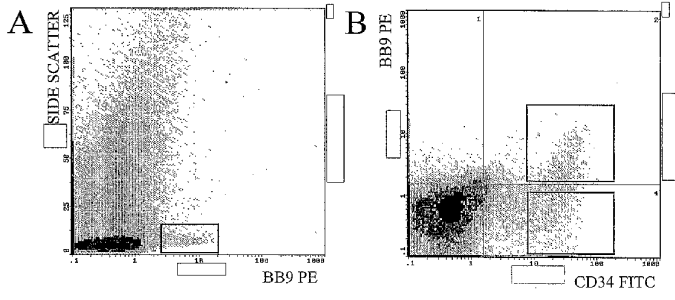


Figure 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

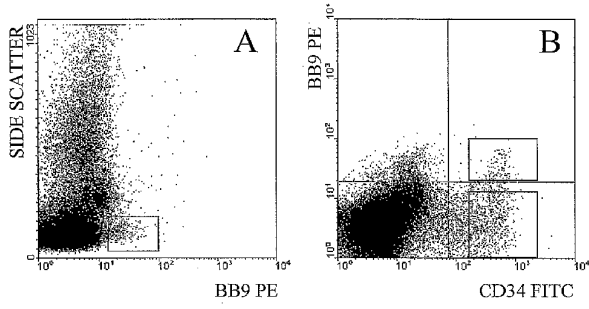


Figure 2

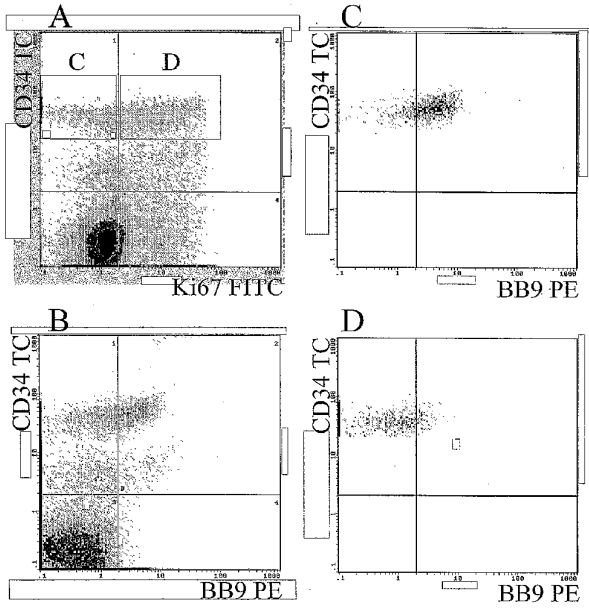


Figure 3(a)

4/9

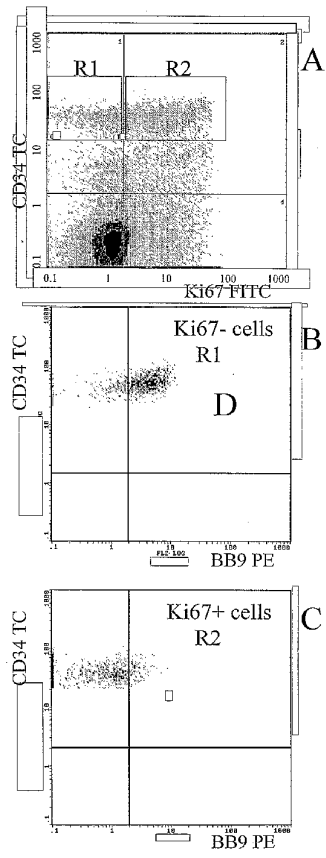


Figure 3(b)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

5/9

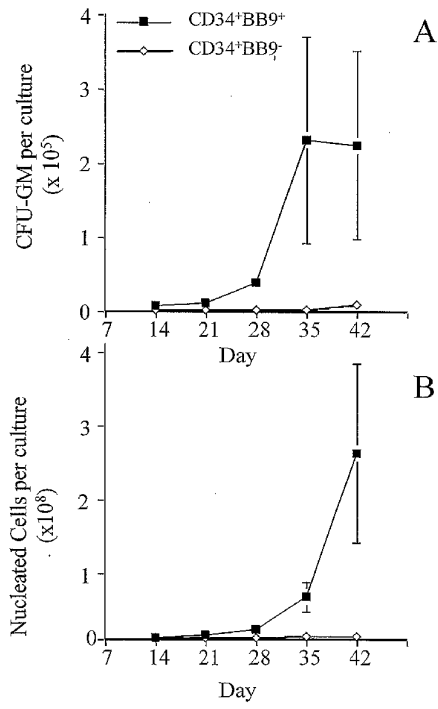


Figure 4

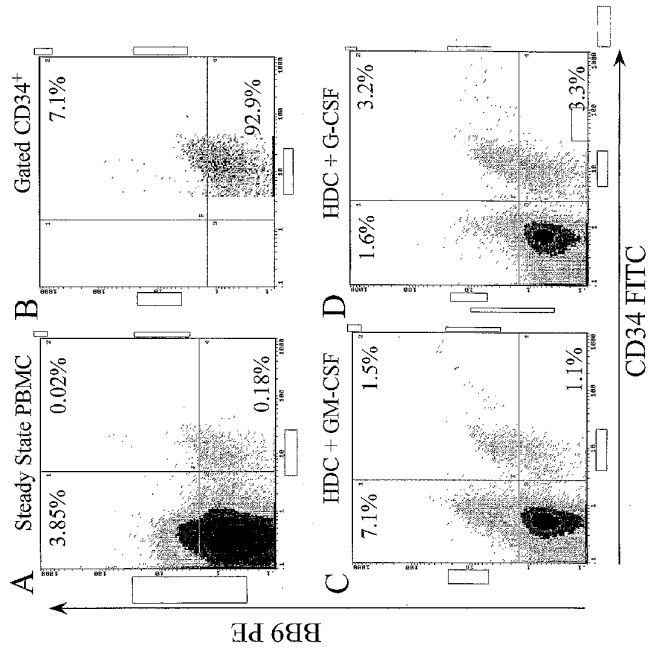


Figure 5

7/9

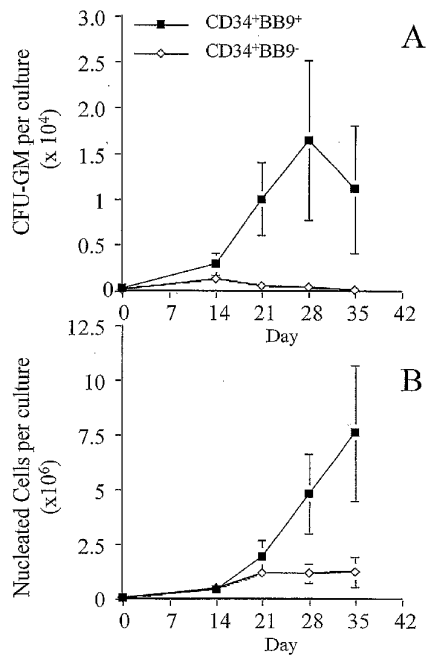


Figure 6

8/9

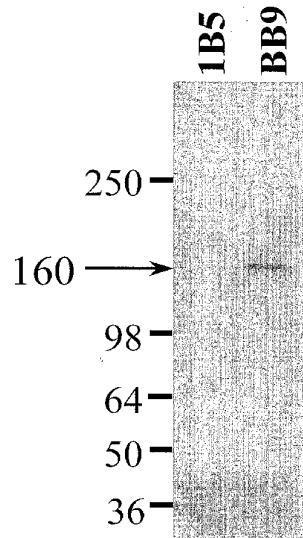


Figure 7

CD34+BB9+ cells engraft NOD/SCID Mice

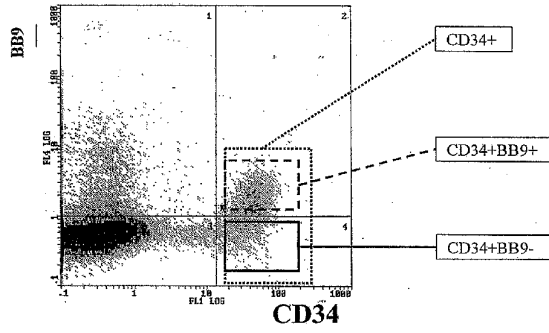


Figure 8

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International application No.<br>PCT/AU02/01101                            |
|--|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>   |   |  |
| Int. Cl. <sup>7</sup> : G01N 33/577, 33/573  |   |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |   |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  |   |  |
| 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 practicable, search terms used)<br>WPIDS, CA, MEDLINE, BIOSIS; KEYWORDS: BB9, PLURIPOTENT, STEM, PROGENITOR, ACE ANGIOTENSIN  |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| X  | RAMSHAW et al, "Monoclonal antibody BB9 raised against bone marrow stromal cells identifies a cell-surface glycoprotein expressed by primitive human hemopoietic progenitors" Experimental Hematology Vol 29 (2001) pp981-992 | 1-32   |
| Y  | Whole document<br>Page 982 column 1 line 8 - page 984 column 2 line 49  | 33-40  |
| Y  | US 6242579 B1 (LAWMAN et al) 5 June 2001<br>Abstract, column 3 lines 6-35, column 10 line 33 - column 13 line 16  | 33-40  |
| A  | MALLOW et al, "Production of Angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes" Horm Metab Res (2000) Vol 32 pp500-503<br>Whole document                          | 1-3  |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex   |   |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"I" 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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>17 September 2002   |   | Date of mailing of the international search report<br>25 SEP 2002          |
| Name and mailing address of the ISA/AU<br>AUSTRALIAN PATENT OFFICE<br>PO BOX 200, WODJEN ACT 2606, AUSTRALIA<br>E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au<br>Facsimile No. (02) 6285 3929   |   | Authorized officer<br><b>ROSS OSBORNE</b><br>Telephone No.: (02) 6283 2404 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/AU02/01101

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent Document Cited in Search Report: |         | Patent Family Member |          |    |         |    |         |
|---|---------|----------------------|----------|----|---------|----|---------|
| US                                      | 6242579 | AU                   | 71803/98 | US | 6043348 | WO | 9821334 |
| END OF ANNEX                            |         |                      |          |    |         |    |         |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | F I            | テーマコード(参考) |
|---------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 K 35/32             | A 6 1 K 35/30  |            |
| A 6 1 K 35/36             | A 6 1 K 35/32  |            |
| A 6 1 K 35/39             | A 6 1 K 35/36  |            |
| A 6 1 K 35/407            | A 6 1 K 35/39  |            |
| A 6 1 K 35/48             | A 6 1 K 35/407 |            |
| A 6 1 P 1/16              | A 6 1 K 35/48  |            |
| A 6 1 P 1/18              | A 6 1 P 1/16   |            |
| A 6 1 P 7/00              | A 6 1 P 1/18   |            |
| A 6 1 P 7/06              | A 6 1 P 7/00   |            |
| A 6 1 P 13/12             | A 6 1 P 7/06   |            |
| A 6 1 P 15/00             | A 6 1 P 13/12  |            |
| A 6 1 P 17/00             | A 6 1 P 15/00  |            |
| A 6 1 P 17/02             | A 6 1 P 17/00  |            |
| A 6 1 P 19/00             | A 6 1 P 17/02  |            |
| A 6 1 P 19/04             | A 6 1 P 19/00  |            |
| A 6 1 P 19/08             | A 6 1 P 19/04  |            |
| A 6 1 P 25/00             | A 6 1 P 19/08  |            |
| A 6 1 P 37/00             | A 6 1 P 25/00  |            |
| A 6 1 P 37/04             | A 6 1 P 37/00  |            |
| A 6 1 P 43/00             | A 6 1 P 37/04  |            |
| C 1 2 N 5/06              | A 6 1 P 43/00  | 1 1 1      |
| C 1 2 Q 1/02              | C 1 2 Q 1/02   |            |
| G 0 1 N 33/573            | G 0 1 N 33/573 | A          |
| // C 1 2 N 9/48           | C 1 2 N 5/00   | E          |
|                           | C 1 2 N 9/48   |            |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, 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, EC, 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, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 シモンズ, ポール・ジョン

オーストラリア国、ヴィクトリア 3 1 0 1、キュー、デービス・ストリート 5 5

Fターム(参考) 4B050 DD07 LL03

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ36 QQ79 QR48 QR51 QR77 QS33 QX01  
QX02

4B065 AA93X BB12 BB19 BB25 BB37 BC03 BC07 CA44

4C087 AA01 AA02 AA03 BB34 BB41 BB44 BB45 BB46 BB48 BB51  
BB52 BB57 BB63 BB64 CA04 DA02 DA03 DA27 DA32 NA14

ZA01 ZA51 ZA55 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96 ZB07 ZB09  
ZB21 ZB22

|             |   |         |            |
|-------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)     | 体细胞干细胞的鉴定和分离及其应用  |         |            |
| 公开(公告)号     | <a href="#">JP2004538490A</a>   | 公开(公告)日 | 2004-12-24 |
| 申请号         | JP2003521372  | 申请日     | 2002-08-15 |
| 申请(专利权)人(译) | 彼得·麦卡勒姆癌症研究所  |         |            |
| [标]发明人      | シモンズポールジョン  |         |            |
| 发明人         | シモンズ,ポール・ジョン  |         |            |
| IPC分类号      | G01N33/53 A61K35/14 A61K35/23 A61K35/28 A61K35/30 A61K35/32 A61K35/36 A61K35/39 A61K35/407 A61K35/48 A61P1/16 A61P1/18 A61P7/00 A61P7/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/04 A61P19/08 A61P25/00 A61P37/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K16/40 C12N5/06 C12N9/48 C12Q1/02 G01N33/50 G01N33/569 G01N33/573   |         |            |
| CPC分类号      | A61P1/16 A61P1/18 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/04 A61P19/08 A61P25/00 C07K16/40 G01N33/5014 G01N33/56966 G01N33/573 G01N2333/948  |         |            |
| FI分类号       | G01N33/53.ZNA.Y G01N33/53.D A61K35/14.C A61K35/23 A61K35/28 A61K35/30 A61K35/32 A61K35/36 A61K35/39 A61K35/407 A61K35/48 A61P1/16 A61P1/18 A61P7/00 A61P7/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/04 A61P19/08 A61P25/00 A61P37/00 A61P37/04 A61P43/00.111 C12Q1/02 G01N33/573.A C12N5/00.E C12N9/48  |         |            |
| F-TERM分类号   | 4B050/DD07 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/BB12 4B065/BB19 4B065/BB25 4B065/BB37 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/CA44 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB34 4C087/BB41 4C087/BB44 4C087/BB45 4C087/BB46 4C087/BB48 4C087/BB51 4C087/BB52 4C087/BB57 4C087/BB63 4C087/BB64 4C087/CA04 4C087/DA02 4C087/DA03 4C087/DA27 4C087/DA32 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA51 4C087/ZA55 4C087/ZA66 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB09 4C087/ZB21 4C087/ZB22 |         |            |
| 代理人(译)      | 津国 肇<br>筱田文雄  |         |            |
| 优先权         | 2001PR7036 2001-08-15 AU  |         |            |
| 其他公开文献      | JP4922548B2<br>JP2004538490A5   |         |            |
| 外部链接        | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及特定细胞类型群体的鉴定，特别是体细胞干细胞，包括造血干细胞，间充质干细胞和角质形成干细胞。本发明还提供了干细胞的分离方法和用途。源自本发明的方法，提供了一种鉴定干细胞的方法，该方法包括以下步骤：获得包括干细胞的细胞样品；以及检测细胞中血管紧张素转化酶（ACE）或其片段的的存在；鉴定具有ACE或其片段的干细胞。

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | F I                            | ターマコード (参) |
|----------------------------|--------------------------------|------------|
| <b>GO 1 N 33/53</b>        | GO 1 N 33/53 Z N A Y           | 4 B O 5 0  |
| <b>A 6 1 K 35/14</b>       | GO 1 N 33/53 D                 | 4 B O 6 3  |
| <b>A 6 1 K 35/23</b>       | A 6 1 K 35/14 C                | 4 B O 6 5  |
| <b>A 6 1 K 35/28</b>       | A 6 1 K 35/23                  | 4 C O 8 7  |
| <b>A 6 1 K 35/30</b>       | A 6 1 K 35/28                  |            |
|                            | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 115 頁) 最終 |            |

|              |                              |          |                  |
|--------------|------------------------------|----------|------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2003-521372 (P2003-521372) | (71) 出願人 | 504058570        |
| (86) (2) 出願日 | 平成14年8月15日 (2002. 8. 15)     |          | ザ・ピーター・マッカラム・キャン |
| (85) 翻訳文提出日  | 平成16年2月16日 (2004. 2. 16)     |          | インスティテュート        |
| (86) 国際出願番号  | PCT/AU2002/001101            |          | THE PETER MACCAL |
| (87) 国際公開番号  | W02003/016916                |          | CANCER INSTITUTE |
| (87) 国際公開日   | 平成15年2月27日 (2003. 2. 27)     |          | オーストラリア国、ヴィクトリア  |
| (31) 優先権主張番号 | PR 7036                      |          | 2、イースト・メルボルン、セント |
| (32) 優先日     | 平成13年8月15日 (2001. 8. 15)     |          | ドリュース・ブレイス、スモルガン |
| (33) 優先権主張国  | オーストラリア (AU)                 |          | ミリー・ビルディング       |
|              |                              | (74) 代理人 | 100078662        |
|              |                              |          | 弁理士 津田 肇         |
|              |                              | (74) 代理人 | 100075225        |
|              |                              |          | 弁理士 藤田 文雄        |